

流入する河川水からは8月にRT-PCR法でNV遺伝子が検出された。平成15年度は河川水の影響を重視し、検出率の低い海水を調査対象外として河川を1河川追加し(外湾流入河川)定量PCR法により調査を実施した。しかし期間中3河川からNV遺伝子は検出されなかった。

かき筏の水平垂直分布調査

平成14年度および15年度の2月に同一海域の同じ筏でかきのNV汚染を調査した。筏は一本のロープで約50mの長さで東西に張られている。東端をa、aから25m離れた中央部をb、aから50m離れた西端をcとし、各々の地点から鉛直に0.5m(表層)、7m(中層)、15m(下層)の水深で採取した養殖かきをポイントごとに3個体採取し個別にNVの検出を行った。平成14年度は同一検体についてRT-PCR法および定量PCR法を実施したが、いずれの検体からもNVは検出されなかった。平成15年度は定量PCR法のみで調査を実施し、東端(a)表層から採取したかきからGⅡ型NV遺伝子が実測値で0.13 copy 検出された。今回調査対象とした養殖筏は陸地から約2kmの沖合の外湾にあることなどで河川の影響が少なく、NVの汚染程度が低いと考えられ水平垂直分布を明確に把握することができなかった。なお、同時に実施した海水検査でもNV遺伝子は検出されなかった。

かきおよび河川水から検出されたNVの遺伝子解析

平成14年度に実施

平成14年8月26日に採水した内湾流入河川Aから検出されたNVおよび同年10月21日に外湾で採取した養殖かき3個体中

2個体から検出されたNV遺伝子について系統解析を行った。

PCR産物をクローニング後シーケンスし262ntについて塩基配列を決定し解析した結果、河川水から1株、外湾で採取したかきそれぞれ1個体から3株(合計6株)のNVが検出された。NJ法で分子系統樹を作成した結果を別紙図-2に示す。検出された7株はすべてMX近縁株で、株間のホモロジーは95.5%以上認められ同じ遺伝子型であることが明らかになった。このことにより養殖かきのNV汚染は、流入河川の影響があることが示唆された。さらに、内湾流入河川は外湾で養殖されているかきに少なからず影響を及ぼしていることが推測された。河川Aが流れている地域では、前年にMX近縁株を優勢株とした胃腸炎の流行が確認されておりその影響が継続していたと推測される。しかし、平成15年度に行った発生動向調査のこの地区の胃腸炎患者から検出されたNVの遺伝子型はGⅡのLordsdale近縁株が多く地域性はあるものの優先株の変遷が認められた。

かき、河川水、海水を対象としたNVの定量

NVの汚染状況を定量的に把握するために、養殖かき、養殖海域海水、同海域流入河川水を用いてNVの定量試験を実施した。

かき

表-2に過去3カ年のかきを対象として行った定量PCRによるNVの汚染状況を示す。なお、平成13年度行った検査では流通品1検体を含んでいる。

3年間を通して実測値で10 copy以上を示した検体は、平成13年度の1検体のみで

あった。また、1 copy 以上 10 copy 未満のかきは全体の 7.6%で、1 copy 以上検出され たかきは全体の 8.4%と低い結果であった。

表-2かきのNV汚染状況

年度 実測値	平成13	平成14	平成15
0~<1	3	46	60
1≤~<10copy	8	1	0
≥10copy	1	0	0

数字は検体数

表-3 に平成 13 年度に実施した 5 海域で 養殖したかきを対象行った海域別かきの NV 状況を示す。なお、流通品は養殖海域 M が 2 件、ON が 1 件、I が 1 件、SD が 2 件でそれ以外は養殖かきであった。海域 S、I、M については実測値が 1≤~<10 copy

の検体が 80% (8/10) と多かったが SD と ON については検体数がそれぞれ 1 検体であるが 0~<1 copy および ≥10 copy であった。このことにより、NV 汚染の地域差 (養殖海域) が示唆された。

表-3 養殖海域別かきのNV汚染状況

養殖海域 実測値	S	I	M	SD	ON
0~<1(copy)	1	1			1
1≤~<10	3	2	3		
≥10				1	

河川水

平成 14 年度は外湾および内湾流入河川 (それぞれ 1 河川)、平成 15 年度は外湾に影響を及ぼしていると考えられる河川を 1 河川追加し、外湾流入 2 河川と内湾流入 1 河川について NV の検出を行った。その結果、平成 14 年から平成 15 年度の調査期間中すべての検体で 0 copy であった。しかし平成 14 年の 8 月に採水した内湾流入河川からは RT-PCR 法で MX 近縁株が検出された。また、平成 15 年度の 12 月から 1 月の期間に行った厚生科学追加研究において、

ほぼ同時期に採水した内湾流入河川水から NV が検出された例があった。原因については不明であるが、潮の干満の影響も考えられた。

海水

平成 14 年度に外湾海水 7 検体、内湾海水 8 検体について定量 PCR および RT-PCR を実施した。その結果どちらの方法においても NV は検出されなかった。この結果が検体量 (今回は 10L) に原因しているか否については不明であるが、検体量を検討す

る際には、かき 1 個体 1 時間当たりの給餌のためのろ水量も考慮する必要があると考えられる。

D. まとめ

養殖かきへの NV の汚染経路は、胃腸炎患者～下水処理場～河川水～かきと考えられている。今回の研究では、検出時期は異なるが河川水およびかきから検出された NV の遺伝子型は一致しており推測されていた汚染経路を遺伝子学的に裏付けることができた。

平成 13 年度から平成 15 年度までの期間に養殖かきを対象として行った NV の定量では、陽性例（実測値で 10copy 以上）は 0.8% (1/119) であった。この数字は西田ら（病原微生物検出情報 Vol.24 No.12）が全国の市販かきを対象に行った調査で報告している 11% (23/209) と比較すると著しく低い。この原因については、養殖海域の NV 汚染程度の差などが考えられる。宮城県漁連が漁協単位で行っている養殖かき自主検査でも検出率の年度差はもちろんのこと、年間を通しての検出率が、養殖海域によって大きく異なっていることが確認されている。この傾向は、今回行った養殖海域別かきの NV 汚染結果からも示唆された。このことは、市販かきや養殖かきを対象に NV の汚染状況を把握するためには、広域的な調査の必要性を示していると考えられる。また、河川水を対象に検査を実施する場合は潮の干満、海水の場合は検体量を考慮する必要があると考えられた。かきによる食中毒を防ぐことは、食品衛生上はもちろん

のこと水産業を守り育む観点からも非常に重要である。抜本的な対策としてかき養殖海域流入河川に放流している下水処理場での NV 除去があげられるが、短期間に整備することは難しい。かきからのウイルス浄化についても検討されているが画期的方法はまだ報告されていない。このような状況の中で、出荷時のスクリーニングの充実は現実的対応が可能であり即効性があると考えられる。しかし、現在行われている検査方法は、コストが高い上に、処理能力が低いなどの問題点がある。今後、検査時間の短縮や多検体の検査が可能なる方法の確立が早急に望まれる。

E. 研究発表

1. 論文発表

植木洋、秋山和夫、渡辺徹、大村達夫：遺伝子相同性にもとづく Norovirus (NV) のカキへの汚染経路の解明、環境工学研究論文集、40：607-616、2003

西尾治、西香南子、福田伸治、西田知子、篠原美千代、三上稔之、沖村容子、新川奈緒美、杉枝正明、古屋由美子、大瀬戸光明、鈴木宏：ウイルス性食中毒の病因、臨床とウイルス、31：163-170、2003

2. 学会発表

西香南子、福田伸治、篠原美千代、大瀬戸光明、植木洋、西尾治：カキ及び養殖海域の NV 汚染調査とカキ筏における水平垂直分布調査、第 51 回日本ウイルス学会、2003 年 10 月 27-29 日、京都

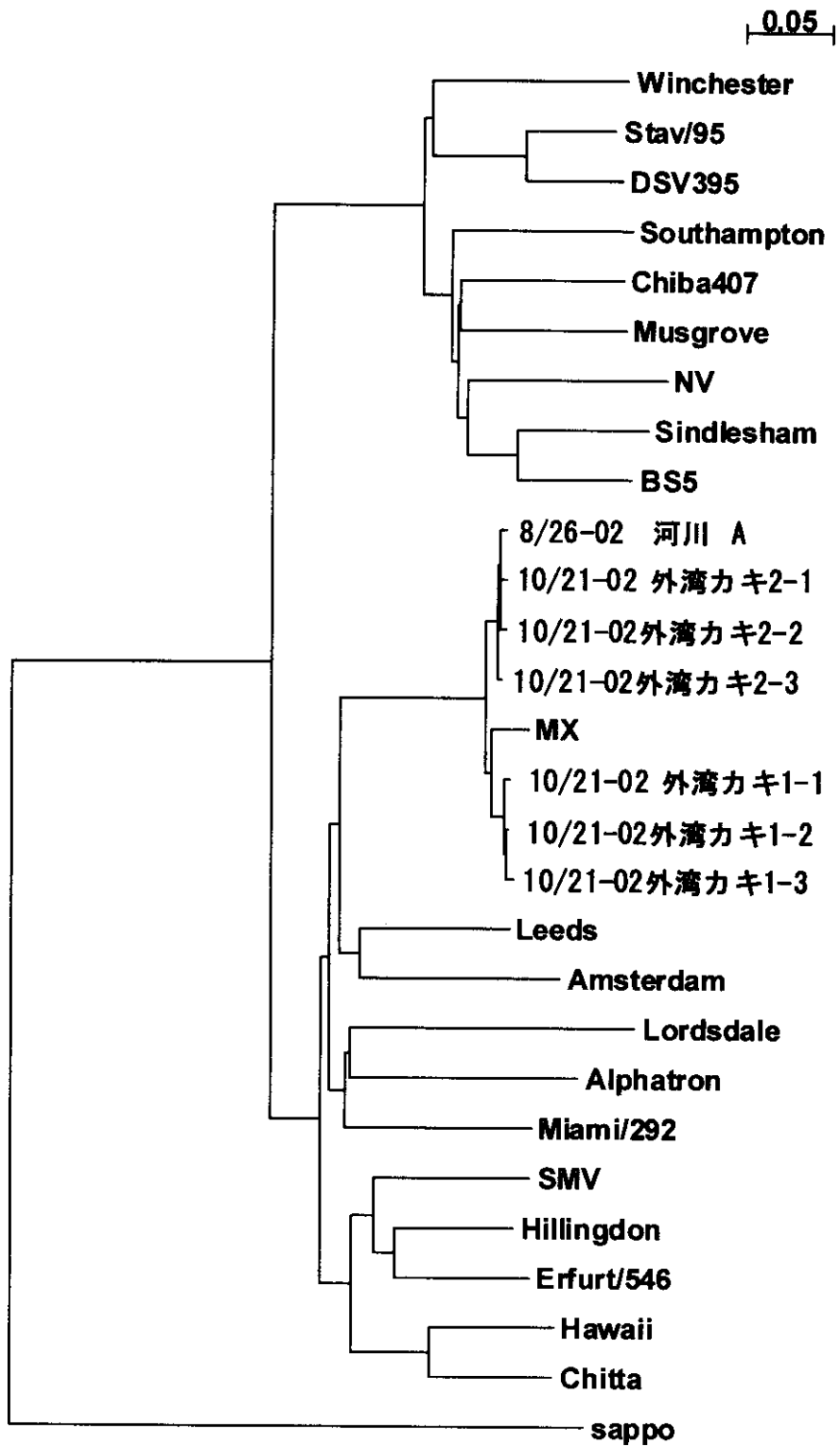


図-2 カキ、河川水から検出された NV の分子系統樹

based on capsid region (262nt)

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
分担研究報告書

食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究
分担研究項目 カキ養殖海域におけるノロウイルスの定量的把握と検出株の
遺伝子学的解析並びに集団発生事例から検出したノロウイルス
の遺伝子学的解析

研究協力者 広島県保健環境センター 微生物第二部 福田伸治
主任研究者 国立感染症研究所 感染症情報センター第六室 西尾 治

研究要旨

カキ養殖海域におけるノロウイルス (NV) の定量的把握と検出株の遺伝子学的解析を行うとともに、集団発生事例の発生状況の解析および検出株の遺伝子学的解析を行った。

2001/02 および 2003/04 年シーズン（11 月から 2 月）に、延べ 8 地点（1 地点は加熱調理用カキ出荷海域）の海水およびカキ各 60 検体、汽水 12 検体について、カキ養殖海域における NV の分布の定量的把握を行った。海水およびカキとも加熱調理用カキ出荷海域において、海水で最高 8×10^2 コピー/l、カキ 19×10^2 コピー/個を示したが、生食用カキ出荷海域においては、海水で 3.0×10^1 /l を 1 回、カキで 1.3×10^2 コピー/個から 4.8×10^2 コピー/個を 4 回計測したのみで、その他は実測値 (4μ l) は 10 コピー以下か陰性であり、沿岸部に近いほど河川水による汚染の影響を強く受ける傾向にあった。また、実測値は小さいものの 1 月および 2 月に多く検出される傾向にあった。カキ養殖筏の部位別水深別では、部位によらず上（海面下 0.5m）および中（海面下 4.5m）での検出率が高い傾向にあり、中層付近まで河川水による汚染の影響を受けていることが示唆された。

海水およびカキから検出された NV は、2003/04 年に遺伝子型 I の C-4（Southampton 類似株）が高率に検出されたこともあり、遺伝子型 I の検出率が高かった。一方、集団発生事例から検出した NV の型は多様であり、環境からの検出株と集団発生事例からの検出株は必ずしも一致しない傾向にあった。

A. 研究目的

カキ等による NV の胃腸炎集団発生が問題となっており、カキ養殖海域における NV の定量的把握と検出株の遺伝子学的解析を行いカキの汚染状況を把握し、さらに筏の部位別で NV 検出状況を調査し、カキのウイルス学的安全性について検討した。

B. 研究方法

2001 年 11 月から 2004 年 2 月の期間において、調査地点を生食用出荷海域が延べ 7 地点、加熱調理用出荷海域が 1 地点、汽水が 1 地点とし、カキは 1 地点あたり 2 個、海水は 20 リットル、汽水 5 リットルを採取し調査した。

カキは中腸腺を摘出し、PBS で乳剤にした後、粗遠心を行い、その上清をポリ

エチレングリコール濃縮法で濃縮した。海水および汽水は陰電荷フィルター法で処理した。濃縮材料からのウイルス RNA 抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit(Quiagen)を用い、抽出 RNA は DNase 処理した後、ランダムヘキサマーを用いて cDNA を合成した。RT-PCR 法およびリアルタイム PCR で NV 検出を行った。RT-PCR 法のプライマーは、1st PCR では、genogroup1 (G1) が COG1F/G1SKR, genogroup2 (G2) が COG2F/G2SKR および ALPF/G2ALSKR を用い、Nested PCR では、G1 が G1SKF/G1SKR, G2 が G2SKF/G2SKR および G2SKF/G2ALSKR を用いた。RT-PCR 法で陽性となった PCR 産物は遺伝子配列を決定し、NJ 法で系統樹作成を行った。リアルタイム PCR 法は、G1 がプライマー：COG1F/COG1R, プローブ：RING1-TP(a), RING1-TP(b), G2 がプライマー：COG2F, ALPF/COG2R, プローブ：RING2AL-TP を用い行った。

C. 研究成績

(1) 加熱調理用海域と生食用海域における分布の比較

表 1 に示すように、広島湾内の 5 地点について調査した。NV は検査定点 1 の加熱調理用出荷海域において高率に検出された。検出された NV 遺伝子量は、海水で最高 8×10^2 コピー/1, カキで 19×10^2 コピー/個であった。生食用出荷海域においては、1 月に 4.8×10^2 /個の最高値を示したのみであった(検査定点 2)。また、1 月および 2 月に検出率が高いことが認められた。

(2) 生食用海域における分布

表 2 に 2002/03 年シーズンの結果を、表 3 に 2003/04 年シーズンの結果を示す。2002/03 年シーズンは実測値/4 μ l が 10 以上を示すものはなかったが、2003/04

年シーズンは海水で 1 回、汽水で 1 回、カキで 3 回実測値/4 μ l が 10 以上を示した。NV 遺伝子量は海水で 3.0×10^1 /1, 汽水で 2.4×10^1 /1, カキで 1.3×10^2 /個から 2.9×10^2 /個であった。また、年により差はあるが、2 月の検出率が高い傾向にあった。

Real time PCR と RT-nested PCR の結果は必ずしも一致していなかったが、RT-nested PCR の結果を見ると、2002/03 年シーズンは遺伝子型 I が 1 回、遺伝子型 II が 1 回検出された。また、2003/04 年シーズンは遺伝子型 I が 7 回、遺伝子型 II が 1 回検出され、遺伝子型 I が多く検出された。

(3) 2001/02 年から 2003/04 年の 3 シーズンに検出した遺伝子の系統解析

検出された NV は、遺伝子型 I では C-30 (NV 類似株) が 2 株、C-4 (Southampton 類似株) が 6 株と C-4 が高率に検出された。また、遺伝子型 II では C-13 (Chitta 類似株) が 1 株、C-16 (Hillingdon 類似株) が 1 株検出された(図 1)。

(4) 筏部位別 NV 検出状況

図 2 に示す筏の四隅と真中の 5 箇所の上(海面下 0.5m)、中(4.5m)、下(9m)のカキについて実施した。2002/03 年シーズンに実施した結果(加熱調理用海域)を表 4 に、2003/04 年シーズンに実施した結果(生食用海域)を表 5 に示した。Real Time PCR と RT-nested PCR の結果は必ずしも一致していないが、2002/03 年は、Real time PCR では上のカキで 5 ヶ所、中で 3 ヶ所、下で 0 ヶ所、RT-nested PCR では上のカキで 3 ヶ所、中 3 ヶ所、下で 1 ヶ所から検出され、遺伝子型 II の検出率が高かった。一方、2003/04 年は Real Time PCR では上のカキで 4 ヶ所、中のカキで 3 ヶ所、下のカキで 2 ヶ所、

RT-nested PCR では上のカキで 4 ヶ所、中で 0 ヶ所、下で 3 ヶ所であり、遺伝子型 I のみの検出であった。検出したカキの NV 遺伝子量 (実測値/4 μ l) はすべて 10 コピー未満であったが、筏の部位によらず上および中での検出率が高い傾向が認められた。

D. 考察およびまとめ

2001/02 年から 2003/04 年の 3 シーズンにおけるカキおよび海水からの NV の検出は年によらず、1 月あるいは 2 月にピークとなり、乳幼児感染性胃腸炎発生のピークからは 1 から 2 月遅れる傾向にあったが、NV 食中毒発生のピークと一致していることが認められた。これは、この時期に全国のカキを原因とする食中毒が多くなる傾向を反映している結果と考えられる。また、2001/02 年シーズンの結果に示されるように、NV の検出率が高くなるに従い、NV 遺伝子量も 1 月および 2 月に多くなる傾向が認められた。当然のことながら、遺伝子量は沿岸部に近い加熱調理用出荷海域においてより多く、沿岸部ほど河川水による汚染の影響が強いことが示唆された。

また、筏の部位別検出状況では下 (海面下 9m) のカキと比較し、上 (0.5m) および中 (4.5m) のカキでの検出率が高く、水深による差が認められた。これは、河川水と共に流入した NV は筏の中 (海面下 4.5m) 付近までのカキの汚染に影響を及ぼしていることが示唆された。

3 シーズンにカキおよび海水から検出された NV は、遺伝子型 I の検出が多かったが、これは、2003/04 年シーズンに遺伝子型 I の C-4 (Southampton 類似株) が高率に検出されたことを反映している結果であるが、検出される型が変化し、最近では遺伝子型 I の検出率が検出される傾向に変化していることが示唆される。

E. 研究発表

1. 論文発表

福田伸治、高尾信一、河崎智彦、山本一夫、住井賢一、正岡亮太、片平尚貴、島津幸枝、宮崎佳都夫:感染経路が解明された Norwalk virus 食中毒事例、広島県保健環境センター研究報告、10:15-18、2002

福田伸治、高尾信一、桑山勝、島津幸枝、宮崎佳都夫:小児科領域の検体から検出した Sapovirus の遺伝子学的解析、広島県保健環境センター研究報告、11:27-29、2003

福田伸治、高尾信一、桑山勝、島津幸枝、宮崎佳都夫:ウイルス性食中毒の発生の特徴、日本食品微生物学会雑誌、20(4):203-209、2003

福田伸治、宮崎佳都夫:乳幼児感染性胃腸炎患者における Norwalk virus, Sapporo virus および Human astrovirus の検出状況と流行型、感染症学雑誌、77:965-970、2003

福田伸治:アストロウイルス、総合臨床、51:2971-2975、2002

西尾治、西香南子、福田伸治、西田知子、篠原美千代、三上稔之、沖村容子、新川奈緒美、杉枝正明、古屋由美子、大瀬戸光明、鈴木宏:ウイルス性食中毒の病因、臨床とウイルス、31:163-170、2003

Fukuda S, Takao S, Shimazu Y, Miyazaki K : An application of microplate hybridization assay for the confirmation and probe typing of "Norwalk-like viruses". Microbiol Immunol. 46(7):495-498, 2002

Fukuda S, Takao S, Shimazu Y, Miyazaki K : Prevalence of Norwalk viruses in Southern and Northern parts of Hiroshima Prefecture, Japan in 2000/2001 season. Jpn J Infect Dis. 54:153-154, 2001

Nishida T, Kimura H, Saitoh M, Shinohara M, Kato M, Fukuda S, Munemura T, Mikami T, Kawamoto A, Akiyama M, Kato Y, Nishi K, Kozawa K, Nishio O: Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. Appl Environl Microbiol. 69(10):5782-5786, 2003

2. 学会発表

新川奈緒美、吉澄志磨、福田伸治、西香南子、杉枝正明、古屋由美子、三上稔之、西田知子、牛島廣治、秋山美穂、岡部信彦、西尾治：全国各地で発生したノロウイルス (NV) による食中毒事例について、第 51 回日本ウイルス学会、2003 年 10 月 27-29 日、京都

西香南子、福田伸治、篠原美千代、大瀬戸光明、植木洋、西尾治：カキ及び養殖海域の NV 汚染調査とカキ筏における水平垂直分布調査、第 51 回日本ウイルス学会、2003 年 10 月 27-29 日、京都

表1 海水・カキにおけるノロウイルス量 (2001/02)

検査定 点	採取年月日	塩分濃度(%)	水温(°C)	海水NV量(/l)		カキNV量(/個)	
				G1	G2	G1	G2
1	01/11/05	2.61	20.3	○	○	○	○
2	01/11/05	2.92	21.4				
3	01/11/13	2.93	20.0				
4	01/11/13	2.93	19.6				
5	01/11/12	2.98	20.4				
.....							
1	01/12/03	2.59	16.5	313	258	○	○
2	01/12/03	2.81	17.3	○			
3	01/12/10	2.85	15.7				
4	01/12/10	2.82	14.9				
5	01/12/10	2.95	16.3			○	
.....							
1	02/01/15	2.65	12.1	○	829	○	717
2	02/01/15	2.83	12.1			○	483
3	02/01/07	2.85	12.1		○		○
4	02/01/04	2.81	11.5	○			
5	02/01/22	2.89	11.6				
.....							
1	02/02/04	2.71	11.1	95	○	1318	1946
2	02/02/04	2.82	10.8		○		○
3	02/02/05	2.85	10.7				○
4	02/02/05	2.86	10.1				
5	02/02/05	2.93	11.2		○		

定量PCRにおいて10コピー以上を示したものについて、希釈率を乗じ数量化した。10コピー未満のものは○と示した。海水は1リットル当り、カキは1個当りのコピー数を示す。検査定點1は加熱調理用出荷海域、検査定點2-5は生食用出荷海域。G1:遺伝子型I, G2:遺伝子型II。

表2 海水・カキにおけるNV量(2002/03)

検査定点 (検体No.)	採取年月日	塩分布度(%)	水温(℃)	海水NV量(/l)				カキNV量(/個)			
				Real time		RT-PCR		Real time		RT-PCR	
				G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
1-1	02/11/19	2.93	17.2	-	-	-	-	-	-	-	-
1-2											
2-1	02/11/19	2.93	17.1	-	-	-	-	-	-	-	-
2-2											
3-1	02/11/19	2.94	17.3	-	-	-	-	-	-	-	-
3-2											
4-1	02/11/19	2.94	17.1	-	○	-	-	-	-	-	-
4-2											
5-1	02/11/19	2.94	16.2	-	-	-	-	-	-	-	●
5-2								○	-	-	-
6	02/11/16		18.0	-	-	-	-				

1-1	02/12/09	2.98	14.6	-	-	-	-	-	○	-	-
1-2									○	-	-
2-1	02/12/09	2.97	14.9	-	-	-	-	-	-	-	-
2-2											
3-1	02/12/09	2.98	13.9	-	○	-	-	-	-	-	-
3-2									○	-	-
4-1	02/12/09	2.97	14.7	-	-	-	-	-	-	-	-
4-2											
5-1	02/12/09	2.96	13.8	-	-	-	-	-	-	-	-
5-2									○	-	-
6	02/12/07		15.8	-	-	-	-				

1-1	03/01/20	2.71	10.3	-	-	-	-	-	-	-	-
1-2											
2-1	03/01/20	2.85	10.8	-	-	-	-	-	-	-	-
2-2											
3-1	03/01/20	2.82	11.1	-	-	-	-	-	-	-	-
3-2											
4-1	03/01/20	2.83	10.9	-	-	-	-	-	-	-	-
4-2											
5-1	03/01/20	2.84	10.3	-	-	-	-	-	-	-	-
5-2											
6	03/01/18		12.1	-	-	-	-				

1-1	03/02/04	2.93	9.1	-	-	-	-	-	-	-	-
1-2								○	○	-	-
2-1	03/02/04	2.95	8.5	-	-	-	-	-	-	-	-
2-2											
3-1	03/02/04	2.91	9.2	-	-	-	-	-	○	-	-
3-2								○	○	●	-
4-1	03/02/04	2.95	9.1	-	-	-	-	-	-	-	-
4-2											
5-1	03/02/04	2.96	9.0	-	-	-	-	-	-	-	-
5-2											
6	03/02/02		10.3	-	-	-	-				

○ : 実測値10未満/4μl, ● : RT-nested PCR陽性, 6 : 汽水

表3 海水・カキにおけるNV量(2003/04)

検査定点 (検体No.)	採取年月日	塩分布度(%)	水温(°C)	海水NV量(/l)				カキNV量(/個)			
				Real time		RT-PCR		Real time		RT-PCR	
				G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
1-1	03/11/18	3.11	19.4	-	-	-	-	-	-	-	-
1-2								○	130	-	●
2-1	03/11/18	3.09	19.6	29.6	-	●	-	-	-	-	-
2-2								○	○	●	-
3-1	03/11/18	3.10	19.7	-	-	-	-	-	-	-	-
3-2								-	○	-	-
4-1	03/11/18	3.14	19.9	-	-	-	-	-	-	-	-
4-2								-	-	-	-
5-1	03/11/18	3.11	19.6	-	-	-	-	○	-	-	-
5-2								-	-	-	-
6	03/11/16		18.6	-	-	-	-	-	-	-	-

1-1	03/12/15	2.19	14.8	-	-	-	-	-	-	-	-
1-2								-	-	-	-
2-1	03/12/15	2.11	14.9	-	-	-	-	-	-	-	-
2-2								-	-	-	-
3-1	03/12/15	1.96	14.6	○	-	-	-	-	-	-	-
3-2								-	-	-	-
4-1	03/12/15	2.21	15.1	-	-	-	-	-	-	-	-
4-2								-	-	-	-
5-1	03/12/15	2.07	14.4	-	-	-	-	-	-	●	-
5-2								-	-	-	-
6	03/12/14		16.4	-	-	-	-	-	-	-	-

1-1	04/01/19	3.11	11.3	-	-	-	-	○	-	-	-
1-2								-	-	-	-
2-1	04/01/19	3.11	11.1	-	-	-	-	-	-	-	-
2-2								-	-	-	-
3-1	04/01/19	3.14	11.4	○	-	-	-	-	-	-	-
3-2								-	-	-	-
4-1	04/01/19	3.14	11.5	-	-	-	-	-	-	-	-
4-2								-	-	-	-
5-1	04/01/19	3.11	10.9	-	-	-	-	291.9	-	●	-
5-2								-	-	-	-
6	04/01/18		10.9	23.6	-	-	-	-	-	-	-

1-1	04/02/03	3.02	9.3	-	○	●	-	-	-	-	-
1-2								-	-	-	-
2-1	04/02/03	3.10	8.7	○	-	●	-	-	-	-	-
2-2								-	-	-	-
3-1	04/02/03	3.08	8.6	○	-	-	-	○	-	-	-
3-2								148.2	○	-	-
4-1	04/02/03	3.09	9.5	-	-	-	-	○	○	-	-
4-2								○	○	-	-
5-1	04/02/03	3.14	8.9	-	-	-	-	○	-	-	-
5-2								-	-	●	-
6	04/02/01		8.6	-	-	-	-	-	-	-	-

○ : 実測値10未満/4μl, ● : RT-nested PCR陽性, 6 : 汽水

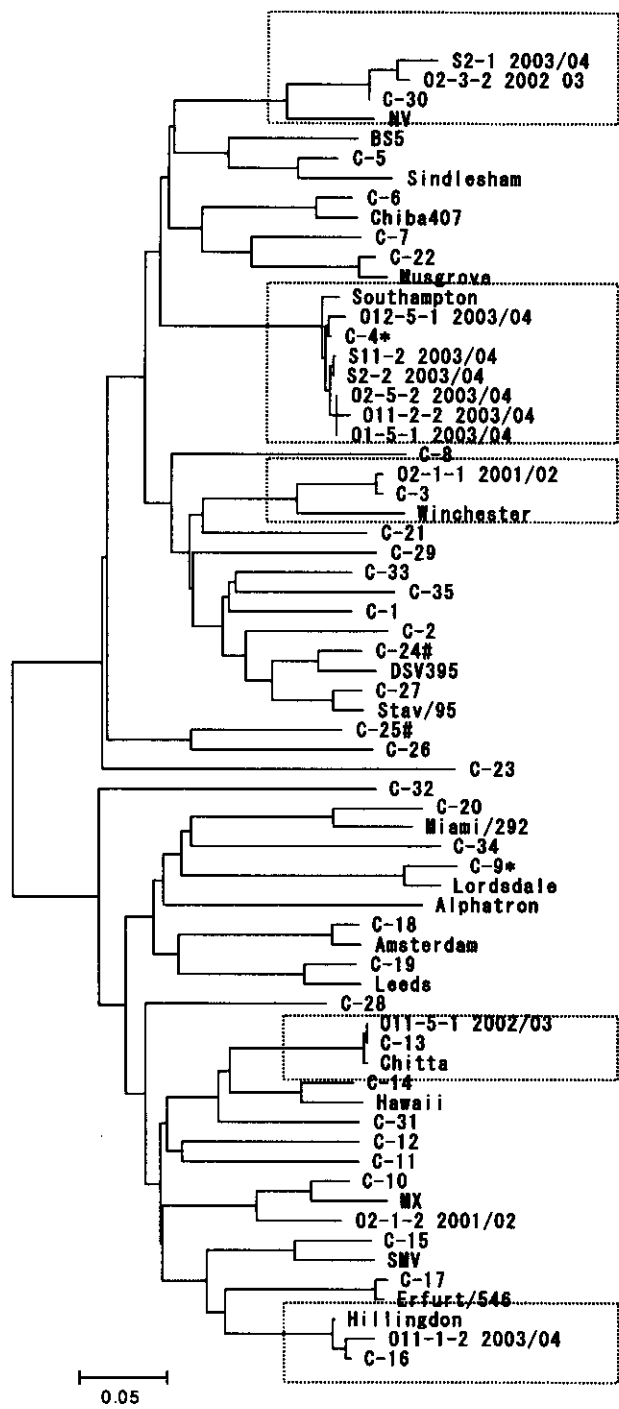


図1 カキおよび海水から検出したNVの系統樹

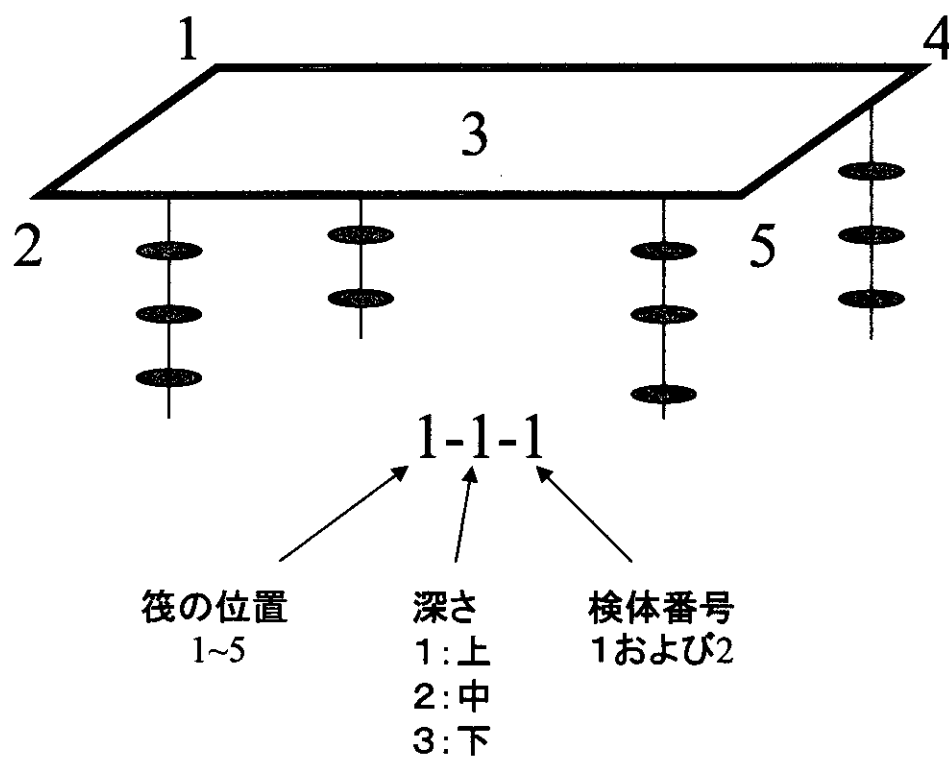


図2 筏からのカキの採取部位

表4 筏部位別NV量(2002/03)

検査地点 (検体No.)	場所	NV量(/個)		RT-PCR	
		Real time G1	G2	G1	G2
1-1-1	上	○	○	-	-
1-1-2	上	-	-	-	-
1-2-1	中	-	○	-	●
1-2-2	中	-	-	-	-
1-3-1	下	-	-	-	-
1-3-2	下	-	-	-	-
2-1-1	上	-	○	-	-
2-1-2	上	-	○	-	●
2-2-1	中	-	-	-	-
2-2-2	中	-	-	-	-
2-3-1	下	-	-	-	-
2-3-2	下	-	-	-	-
3-1-1	上	○	○	-	●
3-1-2	上	-	-	-	-
3-2-1	中	-	-	-	-
3-2-2	中	-	-	-	-
3-3-1	下	-	-	-	-
3-3-2	下	-	-	●	-
3-1-1	上	-	○	-	-
4-1-2	上	-	-	-	-
4-2-1	中	○	○	●	●
4-2-2	中	-	-	-	-
4-3-1	下	-	-	-	-
4-3-2	下	-	-	-	-
5-1-1	上	○	○	●	-
5-1-2	上	-	-	-	-
5-2-1	中	○	○	-	●
5-2-2	中	-	-	-	-
5-3-1	下	-	-	-	-
5-3-2	下	-	-	-	-

G1: 遺伝子型I, G2: 遺伝子型II
 RT-PCR: RT-nested PCR
 ○: 実測値/4μl 10未満, ●: RT-nested PCR陽

表5 筏部位別NV量(2003/04)

検査地点 (検体No.)	場所	NV量(/個)		RT-PCR	
		Real time G1	G2	G1	G2
1-1-1	上	-	-	-	-
1-1-2	上	○	-	●	-
1-2-1	中	-	-	-	-
1-2-2	中	○	-	-	-
1-3-1	下	-	-	●	-
1-3-2	下	-	-	-	-
2-1-1	上	-	○	-	-
2-1-2	上	-	-	●	-
2-2-1	中	○	-	-	-
2-2-2	中	-	-	-	-
2-3-1	下	-	-	●	-
2-3-2	下	-	-	-	-
3-1-1	上	-	-	-	-
3-1-2	上	○	-	●	-
3-2-1	中	○	○	-	-
3-2-2	中	-	-	-	-
3-3-1	下	-	-	-	-
3-3-2	下	-	-	-	-
4-1-1	上	-	-	-	-
4-1-2	上	-	-	-	-
4-2-1	中	-	-	-	-
4-2-2	中	-	-	-	-
4-3-1	下	-	-	-	-
4-3-2	下	-	○	-	-
5-1-1	上	-	-	-	-
5-1-2	上	○	-	●	-
5-2-1	中	-	-	-	-
5-2-2	中	-	-	-	-
5-3-1	下	○	-	●	-
5-3-2	下	-	○	●	-

G1: 遺伝子型I, G2: 遺伝子型II
 RT-PCR: RT-nested PCR
 ○: 実測値/4μl 10未満, ●: RT-nested PCR陽性

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
分担研究報告書

食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究
分担研究項目 海水とカキにおけるノロウイルス汚染状況に関する研究

協力研究者 北海道立衛生研究所 吉澄 志磨
主任研究者 国立感染症研究所 西尾 治

研究要旨

北海道の一閉鎖系海域に A、B、C の 3 定点を設け、継続的に海水とカキのノロウイルス (NV) 汚染状況を調査した。

カキ養殖海域への下水流入と海水及びカキの NV 汚染の関連性を確認するため、下水処理場の流入水と放流水についても調査を行った。流入水からは、8 月から翌年 3 月までのほぼ全期間に渡って NV 遺伝子が検出され、検出された遺伝子型は全道における集団胃腸炎事例の結果とほぼ一致した。3 つの処理場の NV 除去率には大きな差が見られた。カキおよび海水から NV が検出されたのは定点 B の海水のみであったが、昨年度より検出ウイルス量が低く、これは海面が結氷しなかったため、海水の拡散が例年より進み、NV 濃度の上昇が抑えられた可能性が考えられた。

H14 年度から H15 年度にかけて、カキ及び海水から NV が検出されたのはすべて、NV 除去率が最も低い処理場 b からの流入水の影響を受ける定点であり、閉鎖海域では流入下水についての対策が有効であると考えられた。しかし、検出されていない新しい遺伝子型の NV が 4 種類検出され、海水やカキから検出される NV が必ずしも下水由来ではない可能性も示唆された。

A. 研究目的

近年、カキのノロウイルス (NV) 汚染とそれに関わる環境要因についての調査が進められつつあるが、北海道における冬季のカキ養殖環境は、氷点下の海水温や養殖海域の結氷など、日本においても特殊な状況にある。そこで、北海道の一閉鎖系海域に定点を設け、継続的に海水とカキの NV 汚染状況を調査することにより、寒冷地におけるカキ汚染の実態について把握することを目的とした。

B. 研究材料および方法

1. 研究材料

北海道オホーツク海側のカキ養殖海域に A、B、C の 3 定点を置き、平成 14 年度は海水 (A-2、B-2、C-3；平成 14 年 11 月～平成 15 年 3 月) 及びカキ (A-1, 2, 3、B-1, 2, 3、C-2, 3, 4, 5；平成 14 年 10 月～平成 15 年 3 月) を、平成 15 年度は下水の流入水及び放流水 (処理場 a、b、c；平成 15 年 8 月～平成 16 年 3 月)、海水 (A-2、B-2、C-1, 3, 5；平成 15 年 11 月～平成 16 年 3 月) 及びカキ (A-1, 2, 3、B-1, 2, 3、C-1, 2, 3, 4, 5；平成 15

年11月～平成16年3月)を毎月1回採取した。この調査海域では通常12～1月に海面が完全結氷するため、結氷前に、定点Bはカキの採捕を終了し、定点C-1～4のカキロープはすべて漁港内(C-5)に移動している。定点Aのみカキロープを移動せず、完全結氷以降、氷上を渡ってカキの採捕を続ける。平成14年度は12月下旬に海面が結氷したため、1月以降のカキの採取は定点A-1, 2, 3と定点C-5のみ行った。平成15年度は定点BおよびCに調査用のカキを設置し、全期間カキを採取できるようにした。しかし、平成15年度は海面が完全結氷せず、海面が部分的に凍っていた1～2月(船が出せなかった期間)は、ほとんどの定点において海水及びカキの採取ができなかった。

2. 研究方法

カキは中腸腺1g(中腸腺2～3個分)を1検体とし、PBS(-)にて15%乳剤を作製した。10,000rpm、20分間遠心後、HCFC141-bで処理し、9,000rpm、20分間遠心した。上清をPEG沈(4℃、一晚)し、DEPC処理水に再浮遊した後、10,000rpm、20分間遠心した上清をRNA抽出に用いた。海水は20Lを、下水の流入水は50mℓ、放流水は200mℓに塩化マグネシウムを最終濃度50mMになるように加えたものを1検体とした。それぞれについて陰電荷フィルター法で処理し、さらに限外濾過により濃縮したものをRNA抽出に用いた。RNA抽出、RT-PCR及びリアルタイムPCRは、指定された方法により行った。

C. 研究成績

各定点の下水、海水及びカキにおけるリアルタイムPCRの結果を表1～3に、RT-PCRの結果を表4～6に示した。リアルタイムPCRの結果については、下水及び海

水は1L当たり、カキは中腸腺1g当たりのコピー数を示した。RT-PCRで検出されたものについては検出された株の遺伝子型を示し、検出されなかったものについては「-」とした。

平成14年度は、RT-PCRにより、定点Bの1、2、3月の海水からそれぞれC-6(G1)及びC-20(G2)、C-6(G1)、C-6(G1)及びC-10(G2)のクラスターに分類されるNVが検出されたが、定点A及びCのカキ、海水はすべて陰性であった。また、リアルタイムPCRで実測値10コピー以上の値を示したのは、定点Bの2、3月の海水のみであった。

平成15年度は、カキ、海水に加えて下水処理場の流入水と放流水についても調査を行った。下水処理場の流入水からは、RT-PCRにより、8月から翌年3月までのほぼ全期間に渡ってNV遺伝子が検出された。また、処理場cにおいては、検出されるクラスターの種類が1～2月にかけて増加した。G1では全期間を通してC-6のNVが検出され、特に処理場cでは8ヶ月間毎月検出された。1月以降はC-27も高率に検出された。G2では全期間を通してC-10及びC-20が優勢で、1月以降はC-9が高率に検出された。流入水中のウイルスコピー数は、処理場aでは11月から、処理場b及びcでは10月から、実測値10コピー以上の値を示した。処理場a,bの流入水ではG1よりもG2のコピー数が高かったが、処理場cの流入水はほぼ全期間を通してG1もG2も同程度かつ3処理場中最も高いコピー数を示した。一方、下水処理場の放流水においては、RT-PCRにより、処理場aは8月(G1:C-8)及び12月(G2:C-20)、処理場cは12月(G1:C-27)及び2月(G1:C-6)の2ヶ月のみNV遺伝子が検出されたが、処理場bではG

1 が 8～10 月及び 12 月 (C-6, 2, 27)、G2 が 11～2 月 (C-19, 20, 10, 9) と、8 月から 2 月にかけて毎月検出された。ウイルスコピー数で実測値 10 コピー以上の値を示したのは、処理場 a が 12～3 月、処理場 b が 10～2 月で、処理場 c は全ての月で実測値 10 コピー以下であった。平成 15 年度のカキ及び海水については、リアルタイム PCR により実測値 10 コピー以上の値を示すものはなかったが、RT-PCR により、定点 C の 11 月のカキ (G1:C-2)、定点 B の 2 月の海水 (G1:C-27)、定点 C の 2 月 (G1:クラスター不明, G2:C-37) 及び 3 月 (G1:クラスター不明, G2:C-38) の海水から NV 遺伝子が検出された。

D. 考察

(1) 平成 14 年度、カキ及び海水

平成 14 年度は、12 月まではカキ海水ともにすべての定点で NV は検出されなかったが、1 月以降、RT-PCR 及びリアルタイム PCR により、定点 B の海水から NV 遺伝子が検出された。しかし、定点 B では結氷前 (12 月下旬) にカキの養殖を終了したため、1 月以降の海水汚染がカキの汚染につながるかどうかについては確認することができなかった。養殖海域の NV 汚染は、下水中のヒト糞便及び吐物が海域に流入することにより起こると考えられているが、今回定点とした A, B, C 地点のうち、定点 A, C へは下水処理場 a, c からの放流水が直接流入しており、B 地点へは河川を通して下水処理場 b の放流水が流れ込む。ただし、定点 A 及び C への流入に関わる下水処理場はどちらも漁村の約 100 世帯をまかなっているにすぎず、一方定点 B への流入に関わる下水処理場は約 730 世帯の処理を行っている。平成 14 年度の海水調査において、RT-PCR 及びリ

アルタイム PCR (実測値 10 コピー以上) で NV が検出されたのは定点 B の海水のみであったが、定点 B 海域への下水流入に関与する世帯数が多いことが、その要因の一つとして考えられた。また、NV 検出が海面の結氷以降に認められたことから、結氷による影響も考えられた。

(2) 平成 15 年度、下水

カキ養殖海域への下水流入と海水及びカキの NV 汚染の関連性を確認するため、平成 15 年度は、下水処理場の流入水と放流水についても調査を行った。表 4～6 に示したように、流入水からは、8 月から翌年 3 月までのほぼ全期間に渡って NV 遺伝子が検出された。G1 では C-6 と 12 月以降は C-27 が、G2 では C-10、C-20 と 1 月以降は C-9 の NV が高率に検出され、定点海域周辺ではこれらの遺伝子型の NV が流行していたと考えられた。平成 15 年度の全道における集団胃腸炎事例でも、G1 は C-6 の NV が、G2 は主に C-20、C-16、11 月以降は圧倒的に C-9 の NV が検出され、定点の流入下水の結果とほぼ一致した。流入水中のウイルスコピー数は冬季に上昇し、12～3 月は 1L 当たり $6 \times 10^4 \sim 10^7$ という高いコピー数を維持した。処理場 a, b の流入水では、G1 よりも G2 のコピー数が有意に高かった。日本では、NV による胃腸炎散発事例、集団発生事例はともに冬季に急増し、その 9 割以上から G2 に属する NV が検出されている。処理場 a, b の流入水の調査結果は、日本における冬季の胃腸炎患者発生状況と一致した結果となった。一方、処理場 c の流入水は、全期間を通して G1 も G2 もほぼ同程度のコピー数で検出された。また、処理場 c の処理世帯数は約 100 世帯に過ぎないにもかかわらず、G1 の C-6 クラスターに分類される NV が 8 月以降 8 ヶ月間毎月検出され

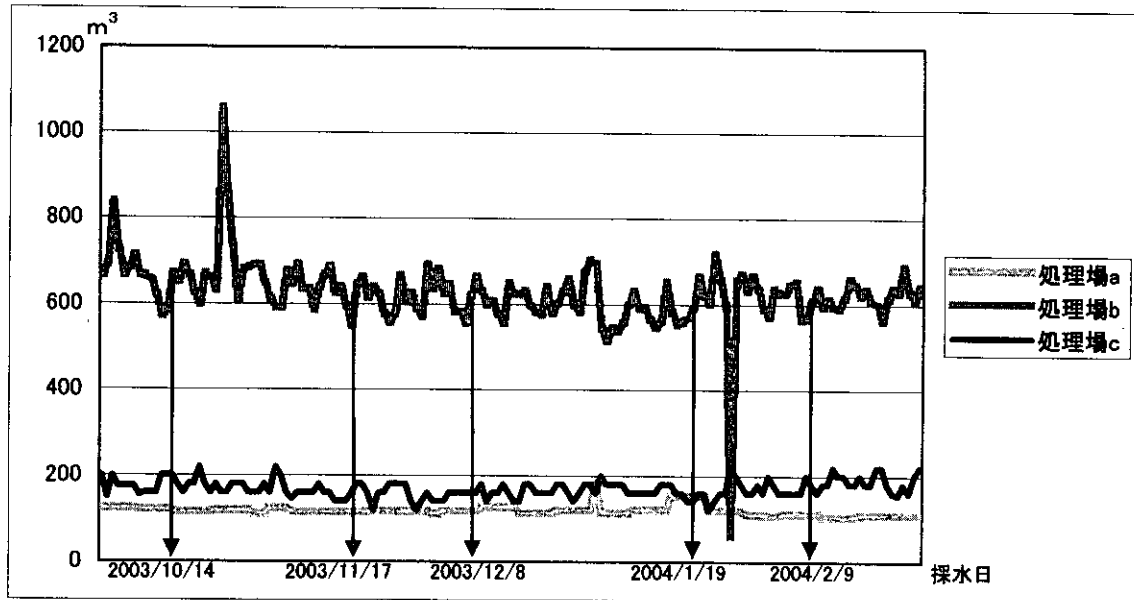


図 1. 下水処理場における 1 日当たりの処理量 (流入量)

ており、このクラスターに属する NV 株がこの地区でどのように維持されていたのか、興味深いところである。処理場 c は、流入水中の NV 濃度は 3 処理場のなかで一番高いにもかかわらず、放流水中のウイルスコピー数は非常に低く、12～2 月の 3 ヶ月間のみ NV が検出されたが、いずれも実測値 10 コピー以下であった。この処理場 c における NV 除去率は $10^3 \sim 10^4$ と、3 処理場中最も高かった。一方、処理場 b の放流水は、RT-PCR では 8 月から 2 月まで、リアルタイム PCR では 10 月から 2 月まで実測値 10 コピー以上の値で NV が検出され、下水の流入から放流までの NV 除去率が $10 \sim 10^3$ と、3 処理場中最も低かった。また、処理場 b の放流水の特徴として、夏から秋にかけて G1 が、秋から冬にかけて G2 が検出されたことが挙げられる。処理場 b の流入水でも同様の傾向が見られた。冬にかけて G2 量が増加したことについてはヒトでの

(3) 平成 15 年度、カキ及び海水

平成 15 年度は湖面が結氷しなかったため、ほとんどの定点で 1～2 月の海水とカ

NV 感染状況と一致するが、夏季に G1 の NV による胃腸炎患者が多いという報告はなく、G1 に属する NV の感染様式については不明な点が多いと考えられた。3 つの処理場における NV 除去率には大きな差があったが、3 処理場とも汚水の処理は活性汚泥法を用いている。1 日当たりの下水処理量は、処理場 b が最も多く約 600 m³、続いて処理場 c が約 160 m³、処理場 a が約 110 m³ であった (図 1)。処理場 b は合流式であるため、下水の流入量は雨水の影響を受けるが、検体採取日の流入量は平均的な値であり、越流はなかったと考えられた。処理場 a 及び処理場 c の 1 日当たりの処理量は毎日ほぼ一定であり、汚水処理の効果も毎日一定であると考えられた。処理条件は 3 処理場でほぼ同等であるにもかかわらず、処理場 c における下水処理過程で NV が高率に除去されている理由について、さらに検討する必要があると考えられた。

キノの採取ができず、下水中の NV 濃度がピークとなった時期の海水とカキの調査結果を得ることができなかった。定点 B の海

水からは2～3月にかけて NV が検出されたが、ウイルス量は5.72及び1.55copies/L (全て実測値 10 コピー以下) と、平成 14 年度の同時期より 4～17 倍低かった。今回調査を行ったカキ養殖海域は通常冬季に海面が完全結氷するが、結氷により海流や河川水の拡散が緩慢になり、流入した NV が溜まりやすくなるのではないかと考えられる。平成 15 年度は海面が結氷しなかったことから、定点 B の海水の拡散が例年より進み、NV 濃度の上昇が抑えられた可能性が考えられた。また、定点 B の 2 月の海水からは、下水中の 1 月以降の優勢株である C-27 の NV が検出され、下水の流入と海水汚染の関連が認められた。定点 C-1 へは、定点 B に流入する河川水が海流によって流れ込むため、定点 B 同様処理場 b からの流入下水の影響を受けると考えられる。定点 C-1 の 11 月のカキから C-2 の NV が検出されたが、この遺伝子型の NV は他に処理場 b の 10 月の下水 (流入水及び放流水) からのみ検出されており、下水中のウイルス量も 10 月としては非常に高い値であったことから、処理場 b の下水の流入により、定点 C-1 のカキが NV に汚染されたと考えられた。11 月のサロマ湖の水温は 6℃前後であり、この時期までは、カキの活性は低下しても海水の吸い込みはある程度行っていると考えられる。しかし 12 月以降は水温が 0℃以下になり、その水温でのカキの海水の吸い込み量や消化機能がどの程度なのかは不明である。低水温時期の海水の汚染が直接カキの汚染につながるかどうか、今後の検討が必要である。H14 年度から H15 年度にかけて、カキ及び海水から NV が検出されたのはすべて、NV 除去率が最も低い処理場 b からの流入水の影響を受ける定点であり、閉鎖海域では流入下水につい

ての対策が有効であると考えられた。しかし、定点 C-1 の 2～3 月の海水からは、下水からも集団胃腸炎事例からも検出されていない、新しい遺伝子型の NV が 4 種類 (G1 : 2 種類、G2 : 2 種類) 検出され、海水やカキから検出される NV が必ずしも下水由来ではない可能性も示唆された。本養殖海域周辺は酪農地帯であるため、G1 のプライマーで検出された 2 種類の NV についてはウシ由来のカリシウイルスである可能性があり、現在検索中である。

E. 研究発表

1. 論文発表

Nishida T, Kimura H, Saitoh M, Shinohara M, Kato M, Fukuda S, Munemura T, Mikami T, Kawamoto A, Akiyama M, Kato Y, Nishi K, Kozawa K, Nishio O: Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. *Appl Environl Microbiol.* 69(10):5782-5786, 2003

西田知子、野田衛、三上稔之、篠原美千代、春木孝祐、大瀬戸光明、加藤由美子、秋山美穂、西尾治：市販生食用カキのノロウイルス汚染状況、病原微生物検出情報、24 : 317、2003

西尾治、西香南子、福田伸治、西田知子、篠原美千代、三上稔之、沖村容子、新川奈緒美、杉枝正明、古屋由美子、大瀬戸光明、鈴木宏：ウイルス性食中毒の病因、臨床とウイルス、31 : 163-170、2003

西尾治：ノロウイルスによる食中毒の発生とその防止について、*Kewpie News*, 357 号、2003

2. 学会発表

新川奈緒美、吉澄志磨、福田伸治、西香南子、杉枝正明、古屋由美子、三上稔之、西田知子、牛島廣治、秋山美穂、岡部信彦、西尾治：全国各地で発生したノロウイルス（NV）による食中毒事例について、第51回日本ウイルス学会、2003年10月27-29日、京都

西田知子、野田衛、三上稔之、篠原美千代、春木孝祐、大瀬戸光明、秋山美穂、西尾治：市販生食用カキのノロウイルスおよびA型肝炎ウイルス汚染状況、第51回日本ウイルス学会、2003年10月27-29日、京都

西香南子、福田伸治、篠原美千代、大瀬戸光明、植木洋、西尾治：カキ及び養殖海域のNV汚染調査とカキ筏における水平垂直分布調査、第51回日本ウイルス学会、2003年10月27-29日、京都