

表3. ノロウイルス感染集団発生月別報告数、2007年9月～2009年2月

Genogroup	2007年												2008年					2008/09	
	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	9月～2月
I	-	-	3	11	13	20	32	11	3	1	-	1	-	-	4	1	2	3	10
II	1	16	100	194	144	85	43	38	17	3	1	-	3	3	22	80	65	12	185
I + II	-	1	-	4	6	4	5	3	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2
unknown	-	1	17	15	5	6	2	2	-	3	-	-	-	-	1	12	3	-	16
合計	1	18	120	224	168	115	82	54	21	8	1	1	3	3	27	93	71	16	213
(GI/4 再掲)	-	(4)	(43)	(70)	(66)	(30)	(10)	(7)	(3)	-	-	-	-	-	(7)	(33)	(26)	(1)	(67)

推定感染経路

人一人伝播の疑い	-	6	74	116	92	69	49	28	12	3	-	-	1	2	16	46	37	6	108
食品媒介の疑い	-	4	18	60	43	22	17	10	2	1	-	-	-	-	7	18	22	7	54
不明	1	8	28	48	33	24	16	16	7	4	1	1	2	1	4	29	12	3	51
合計	1	18	120	224	168	115	82	54	21	8	1	1	3	3	27	93	71	16	213

(病原微生物検出情報：2009年3月5日現在報告数)

ノロウイルスが検出された 213 事例の推定感染経路は、保育所、幼稚園、小学校、福祉施設、老人施設、病院、飲食店などでの人→人感染が疑われているものが 108 事例 (51%)、食品媒介が疑われているものが 54 事例 (25%、2006/07 シーズンは 1,244 事例中 239 事例 19%、2007/08 シーズンは 813 事例中 177 事例 22%)、その他感染経路

が特定できず不明のものが 51 事例 (24%) であり、診断名別にみると、「感染性胃腸炎」131 事例 (62%)、「食中毒」46 事例 (22%)、「有症苦情 (食中毒疑いを含む)」36 事例 (17%) で、人→人伝播が疑われる感染性胃腸炎の施設内集団発生が前 2 シーズンより減少傾向にあった (表 4)。

表 4. ノロウイルス感染集団発生の推定伝播経路と診断名、2008 年 9 月～2009 年 2 月

診断名	推定伝播経路			合計
	人→人伝播の疑い	食品媒介の疑い	不明	
感染性胃腸炎	96	5	30	131
食中毒	1	43	2	46
有症苦情	11	6	19	36
その他・不明	-	-	-	-
合計	108	54	51	213

(病原微生物検出情報: 2009 年 3 月 5 日現在報告数)

#### D. 考察

感染症発生動向調査で収集される患者データは患者を診断した医師の届出に記載された情報を保健所がデータベースに登録しているものであり、患者届出後に積極的疫学調査等により明らかとなった情報は含まれていない。A 型肝炎および E 型肝炎患者データでは原因食品の記載が乏しく、また推定原因食品が記載されていた症例においても国産か輸入であるかは全く不明であった。原因食品を追求するためには地方自治体、保健所が実施した患者の喫食調査の情報を国産・輸入の区別までを含めてシステムに追加入力するよう協力を求める必要があると考える。

2006/07 シーズンは例年より早くからノ

ロウイルスの流行がみられ、施設内集団発生より数は少ないものの食中毒あるいは食中毒疑いの有症苦情の事例も例年より多かったが、2007/08 シーズンは例年並みの事例数に戻り、2008/09 シーズンはさらに減少傾向であった。集団発生事例から検出されたノロウイルスの遺伝子型では 2006/07～2008/09 シーズンとも GII/4 が大部分を占めていた。関係者および広く一般に対して迅速に情報を公開するため、「ノロウイルス感染集団発生<速報>」を国立感染症研究所感染症情報センター病原微生物検出情報 (IASR) ホームページ上に掲載し (<http://idsc.nih.go.jp/iasr/noro.html>)、毎週更新した。

#### E. 結論

A型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルスに汚染された輸入食品を追求するためには、感染症発生動向調査システムに喫食調査の情報を追加する必要がある。ノロウイルスに汚染された輸入食品を追及するためには、集団発生病原体票のノロウイルス遺伝子型の情報に国内で流行している株であるかどうかを判別できるように、ウイルスのシーケンス結果に基づく解析結果を追加する必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

「輸入生鮮魚介類および動物生肉のウイルス汚染のサーベイランスに関する研究」  
輸入食品のウイルス汚染状況に関する研究

研究分担者 大塚有加（愛媛県立衛生環境研究所）

研究協力者 山下育孝（愛媛県立衛生環境研究所）

豊嶋千俊（元 愛媛県立衛生環境研究所、現 愛媛県食肉衛生検査センター）

都築秀明、長谷川敏博（愛知県衛生研究所 食品監視・検査センター）

### 研究要旨

輸入食品のウイルス学的安全性評価の一環として、2008年5月から2009年2月までの間に輸入された生鮮魚介類におけるノロウイルス(NV)、A型肝炎ウイルス(HAV)の汚染状況を調査した。韓国、中国及びロシアから輸入されたアカガイ40件について、リアルタイムPCR及びRT-PCRによりNVとHAVの検出を試みた結果、韓国産アカガイ32件中6件、中国産アカガイ7件中1件からNVが検出された。なお、HAVの生鮮魚介類汚染は認められなかった。

平成18年度から20年度までの3年間の結果では、韓国、中国及びロシアから輸入された二枚貝（アカガイ、ハマグリ、カキ）計120件中12件（10.0%）からNVが検出された。内訳は、韓国産アカガイ75件中7件（9.3%）、中国産アカガイ33件中4件（12.1%）、ロシア産アカガイ5件中1件（20.0%）であった。さらに、中国産アカガイ1件からHAVが検出された。

これらの結果から、輸入二枚貝のウイルス汚染の実態が明らかとなり、輸入生鮮魚介類のウイルス汚染モニタリングの重要性が示唆された。

### A. 研究目的

近年、魚介類等生鮮食品を介する急性胃腸炎やA型肝炎の食中毒事例が多数報告されている。我が国は大量の魚介類等生鮮食品を輸入しているため、健康危機管理対策として輸入食品の安全性を確保することは重要な課題である。しかし、これら食品中のNVやHAV等の検査は輸出国ではほとん

ど行われておらず、また、国内においても報告は少ない。

そこで本研究では、輸入生鮮魚介類のNV及びHAVの汚染状況について国別、材料別にサーベイランスを行い、これら輸入食品のウイルス汚染状況の実態を把握し、食中毒の発生防止に寄与することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 平成 20 年度

検査材料：2008 年 5 月から 2009 年 2 月の間に、愛知県内の市場に搬入された輸入二枚貝（アカガイ）40 件を買上げて用いた。検査材料は 1 件につき 3 個を用い、検査を行った。

方法：二枚貝から切り出した中腸腺約 1g を PBS で 10% 乳剤とし、10,000 回転で 20 分間冷却遠心した。遠心上清を HCFC141b で処理し、得られた水相を 30% ショ糖クッションに重層し、38,000rpm で 2 時間超遠心後、沈渣を 140  $\mu$ l の蒸留水に浮遊させたものを抽出材料とした。RNA 抽出には QIAmp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いた。抽出した RNA は、DNase I (TaKaRa) で処理後、Random Hexamer (Amersham) を用いて Super Script II (Invitrogen) で逆転写し cDNA を作製した。この cDNA を用いて、リアルタイム PCR 及び Nested RT-PCR により NV 及び HAV の検査を行った。NV のリアルタイム PCR は、COGF/R primer と RING-TP probe を用いた影山らの方法で行い、ABI PRISM 7000 で測定した。RT-PCR は、1st PCR に genogroup I (G I) 用として COG1F/G1SKR primer を、genogroup II (G II) 用として COG2F/G2SKR primer を用い、Nested PCR には SKF/R を用いた。HAV のリアルタイム PCR は、HAV449/HAV557 primer を用いた TaqMan probe 法で行った。また、RT-PCR は、primer HAV2799/3273 (1st PCR) 及び HAV2907/3162 (Nested PCR) を用いた。なお、NV 及び HAV のリアルタイム PCR 用既知濃度スタンダードは国立感染症研究

所西尾治博士から分与を受けた。増幅された PCR 産物については大阪市立環境科学研究所（入谷氏）に依頼し、ダイレクトシーケンス法で遺伝子塩基配列を決定し、片山らの方法でカプシド領域の系統樹解析により遺伝子型別を行った。

### 2. 平成 18 年度～20 年度

検査材料：2006 年 5 月から 2009 年 2 月の間に、愛知県内の市場に搬入された輸入二枚貝（アカガイ、ハマグリ、カキ）120 件を買上げて用いた。

方法：平成 20 年度と同様である。なお、平成 18 年度は、検出された PCR 産物のシーケンスを国立感染症研究所（西尾博士、木村博士）に依頼し実施した。得られた遺伝子塩基配列のうち NV についてはカプシド領域部分、HAV については VP1/2A 領域部分について、系統樹解析を行った。

## C. 研究結果

### 1. 平成 20 年度

2008 年 5 月から 2009 年 2 月の間に採取した輸入二枚貝（アカガイ）40 件中 7 件（17.5%）から NV が検出され、HAV はすべて陰性であった（表 1）。月別では、8、10、12、1 月に各 1 件、2 月に 3 件 NV が検出された（表 2）。産地国別では、韓国産が 32 件中 6 件、中国産は 7 件中 1 件が陽性であり、ロシア産 1 件は陰性であった（表 3、4）。

### 2. 平成 18 年度～20 年度

輸入二枚貝 120 検体について、NV 及び HAV の検査を実施した結果、アカガイ 113 件中 12 件から NV が検出され、また、1 件からは HAV が検出された。ハマグリ及びカ

キからはNV及びHAVともに検出されなかった(表5)。月別では、NVが2006年5、6、9月に各1件、2007年2月に2件、2008年8、10、12、2009年1月に各1件、2009年2月に3件検出された(表6)。NVは年間を通して散発的に検出されているが、2月の輸入貝のNV汚染が高率に認められた。産地国別、種類別にみると、韓国産アカガイ75件中7件、中国産アカガイ33件中4件、ロシア産アカガイ5件中1件がNV陽性であり、韓国産ハマグリ、カキ及び中国産ハマグリはNV陰性であった(表7、8)。以上のように、NVは3年間の合計で120件中12件陽性(陽性率10.0%)であり、HAVは、2006年5月の中国産アカガイ1件のみ陽性であった。

輸入二枚貝から検出されたNV及びHAVの遺伝子型を各表中に示した。NVは、GIが6検体から、GIIが5検体から検出され、1検体(2007年2月買上げ、中国産アカガイ)からはGIとGII両方が検出された。なお、1検体から複数のNV株が検出されたものが4件あった。二枚貝から検出されたGI株は、片山らの分類に該当する近縁株はなく、型別できなかつた。そこで、DDBJ-BLAST検索を実施した結果、korea/C23/00/JP(AY356543)類似株が4株、korea/C25/01/JP(AY356545)及びkanagawa/C36/04/JP(AY641760)類似株がそれぞれ3株検出された。GIIは、GII/2が1株、GII/12及びGII/13がそれぞれ2株検出された。なお、型別できなかつた1株は、DDBJ-BLAST検索の結果、Yuri(AB83780)に類似していた。また、複数の遺伝子型が混合している可能性があり解析不能のものが2株あった。HAV陽性株に

ついては、シーケンスの結果1Aに属した。

#### D. 考 察

わが国で消費される二枚貝の大部分は輸入品であると言われ、しかも、輸出国においてウイルス学的安全性の確認検査はほとんど行われていない。このことから、わが国においてそれらウイルスの汚染状況についてサーベイランスを行い、国内における患者発生との関連を監視する必要性が高まっている。

3年間にわたる調査で、輸入二枚貝の10%にNV汚染が認められ、また、HAVも120件中1件ではあるが検出された。輸入二枚貝から検出されたNVは、特にGIについて、国内で流行している株とは非常に相同性が低く、今後、それらの流行状況を注意深く監視する必要があると考えられた。また、輸入食品を介して、海外からNVの新しい株が国内に持ち込まれる危険性が示唆された。

わが国のA型肝炎のほとんどは、国内でカキやその他海産物等を介した食中毒の様式の糞口感染であるとされている。国内でのHAVの常在流行はみられておらず、輸入貝類によるHAVの持込みが一要因を占めていると推測される。今回、HAV陽性貝は同時にNVも陽性であったことから、貝類のNV汚染モニタリングは、胃腸炎食中毒の予防と同時にA型肝炎の予防にも有効に機能するものと考えられた。

輸入食品中のNV、HAV等のウイルス量は微量である場合が多く、NVについては、今回の調査で陽性となった検体でも、テストチューブ当たりの実測値が1例を除き10

コピー未満であり、Nested RT-PCR でのみ陽性であった。これら微量のウイルスを検出する検査感度の向上は、引き続き今後の課題である。食品からのウイルスの精製、濃縮及びウイルス RNA 抽出法等はさらに検討していく必要があると考えられる。

#### E. まとめ

輸入貝類のウイルス汚染状況を把握するため、リアルタイム PCR 及び Nested RT-PCR による NV 及び HAV 遺伝子の検出を行った。

2006 年 5 月から 2009 年 2 月の間に 120 件の輸入貝を検査した結果、NV が 12 件、HAV が 1 件検出された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 近藤玲子、市川高子、大塚有加、大瀬戸光明、

井上博雄：調理従事者からノロウイルスが検出された食中毒事例—愛媛県、病原微生物検出情報、28：285-286、2007

2) 大塚有加、市川高子、豊嶋千俊、近藤玲子、大瀬戸光明、井上博雄：2006/2007 シーズンにおける散発性及び集団発生の感染性胃腸炎患者からのウイルス検出状況、愛媛県立衛生環境研究所年報、9：16-20、2006

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産の出願・登録状況

なし

表1 検体種類別輸入食品検査状況（平成20年度）

区分	検体名	総検体数	NV陽性数/NV 検体数	NV陽性率(%)	NV遺伝子型	HAV陽性数 /HAV検査数
魚介類	アカガイ	40	7/40	17.5	G I /不明 <sup>※1</sup> (2) G I /不明 <sup>※2</sup> (1) G I /不明 <sup>※3</sup> (2) G II /2 (1) G II /12 (2) G II /13 (1) G II /不明 <sup>※4</sup> (1)	0/40
	計	40	7/40	17.5		0/40

( )内は株数

※1: C23(AY356543)類似

※2: C25(AY356545)類似

※3: C36(AY641760)類似

※4: 型別困難

表2 月別輸入食品検査状況（平成20年度）

区分	検体採取 年月	総検体数	NV陽性数 /NV検体数	NV陽性率(%)	NV遺伝子型	HAV陽性数 /HAV検査数
魚介類	2008年5月	4	0/4			0/4
	2008年6月	4	0/4			0/4
	2008年7月	4	0/4			0/4
	2008年8月	4	1/4	25.0	G I /不明 <sup>※3</sup>	0/4
	2008年9月	4	0/4			0/4
	2008年10月	4	1/4	25.0	G I /不明 <sup>※2</sup>	0/4
	2008年11月	4	0/4			0/4
	2008年12月	4	1/4	25.0	G I /不明 <sup>※1</sup>	0/4
	2009年1月	4	1/4	25.0	G I /不明 <sup>※3, ※1</sup>	0/4
	2009年2月	4	3/4	75.0	・G II /2, G II /13, G II /不明 <sup>※4</sup> ・G II /12 ・G II /12	0/4
	計	40	7/40	17.5		0/40

※1: C23(AY356543)類似

※2: C25(AY356545)類似

※3: C36(AY641760)類似

※4: 型別困難



表3 産地国別輸入食品検査状況（平成20年度）

区分	産地国	総検体数	NV陽性数/NV 検体数	NV陽性率(%)	NV遺伝子型	HAV陽性数 /HAV検査数
魚介類	韓国	32	6/32	18.8	G I /不明 <sup>※1</sup> (2) G I /不明 <sup>※2</sup> (1) G I /不明 <sup>※3</sup> (2) G II /2 (1) G II /12 (1) G II /13 (1) G II /不明 <sup>※4</sup> (1)	0/32
	中国	7	1/7	14.3	G II /12 (1)	0/7
	ロシア	1	0/1			0/1
	計	40	7/40	17.5		0/40

( )内は株数

※1: C23(AY356543)類似

※2: C25(AY356545)類似

※3: C36(AY641760)類似

※4: 型別困難

表4 産地国別・種類別輸入食品検査状況（平成20年度）

区分	産地国	種類	総検体数	NV陽性数 /NV検体数	NV陽性率 (%)	NV遺伝子型	HAV陽性数 /HAV検査数
魚介類	韓国	アカガイ	32	6/32	18.8	G I /不明 <sup>※1</sup> (2) G I /不明 <sup>※2</sup> (1) G I /不明 <sup>※3</sup> (2) G II /2 (1) G II /12 (1) G II /13 (1) G II /不明 <sup>※4</sup> (1)	0/32
	中国	アカガイ	7	1/7	14.3	G II /12 (1)	0/7
	ロシア	アカガイ	1	0/1			0/1
	計		40	7/40	17.5		0/40

( )内は株数

※1: C23(AY356543)類似

※2: C25(AY356545)類似

※3: C36(AY641760)類似

※4: 型別困難

表5 検体種別輸入食品検査状況（平成18-20年度）

区分	検体名	総検体数	NV陽性数 /NV検体数	NV陽性率 (%)	NV遺伝子型	HAV陽性数 /HAV検査数	HAV 遺伝子型
魚介類	アカガイ	113	12/113	10.6	G I /不明 <sup>※1</sup> (4) G I /不明 <sup>※2</sup> (3) G I /不明 <sup>※3</sup> (3) G II /2 (1) G II /12 (2) G II /13 (2) G II /不明 <sup>※5</sup> (1) G II /不明 <sup>※4</sup> (2)	1/113	1A (1)
	ハマグリ	6	0/6			0/6	
	カキ	1	0/1			0/1	
	計	120	12/120	10.0		1/120	

( )内は株数

※1: C23(A Y356543)類似

※2: C25(A Y356545)類似

※3: C36(A Y641760)類似

※4: 型別困難

※5: Yuri類似

表6 月別輸入食品検査状況（平成18-20年度）

区分	検体採取年月	総検体数	NV陽性数 /NV検体数	NV陽性率 (%)	NV遺伝子型	HAV陽性数 /HAV検査数	HAV 遺伝子型
魚介類	2006年5月	4	1/4	25.0	G II / 不明 <sup>※4</sup>	1/4	1A
	2006年6月	4	1/4	25.0	G II / 13	0/4	
	2006年7月	4	0/4			0/4	
	2006年8月	4	0/4			0/4	
	2006年9月	4	1/4	25.0	G I / 不明 <sup>※3</sup>	0/4	
	2006年10月	4	0/4			0/4	
	2006年11月	4	0/4			0/4	
	2006年12月	4	0/4			0/4	
	2007年1月	4	0/4			0/4	
	2007年2月	4	2/4	50.0	・G I / 不明 <sup>※1, ※2</sup> , G II / 不明 <sup>※5</sup> ・G I / 不明 <sup>※1, ※2</sup>	0/4	
	2007年5月	4	0/4			0/4	
	2007年6月	4	0/4			0/4	
	2007年7月	4	0/4			0/4	
	2007年8月	4	0/4			0/4	
	2007年9月	4	0/4			0/4	
	2007年10月	4	0/4			0/4	
	2007年11月	4	0/4			0/4	
	2007年12月	4	0/4			0/4	
	2008年1月	4	0/4			0/4	
	2008年2月	4	0/4			0/4	
	2008年5月	4	0/4			0/4	
	2008年6月	4	0/4			0/4	
	2008年7月	4	0/4			0/4	
	2008年8月	4	1/4	25.0	G I / 不明 <sup>※3</sup>	0/4	
	2008年9月	4	0/4			0/4	
	2008年10月	4	1/4	25.0	G I / 不明 <sup>※2</sup>	0/4	
	2008年11月	4	0/4			0/4	
	2008年12月	4	1/4	25.0	G I / 不明 <sup>※1</sup>	0/4	
	2009年1月	4	1/4	25.0	G I / 不明 <sup>※3, ※1</sup>	0/4	
	2009年2月	4	3/4	75.0	・G II / 2, G II / 13, G II / 不明 <sup>※4</sup> ・G II / 12 ・G II / 12	0/4	
計		120	12/120	10.0		1/120	

※1: C23(A Y356543)類似

※2: C25(A Y356545)類似

※3: C36(A Y641760)類似

※4: 型別困難

※5: Yui類似

表7 産地国別輸入食品検査状況 (平成18-20年度)

区分	産地国	総検体数	NV陽性数 /NV検体数	NV陽性率 (%)	NV遺伝子型	HAV陽性数 /HAV検査数	HAV 遺伝子型
魚介類	韓国	77	7/77	9.1	G I / 不明 <sup>※1</sup> (2) G I / 不明 <sup>※2</sup> (1) G I / 不明 <sup>※3</sup> (3) G II / 2 (1) G II / 12 (1) G II / 13 (1) G II / 不明 <sup>※4</sup> (1)	0/77	
	中国	38	4/38	10.5	G I / 不明 <sup>※1</sup> (2) G I / 不明 <sup>※2</sup> (2) G II / 12 (1) G II / 不明 <sup>※5</sup> (1) G II / 不明 <sup>※4</sup> (1)	1/38	1A (1)
	ロシア	5	1/5	20.0	G II / 13 (1)	0/5	
	計	120	12/120	10.0		1/120	

( )内は株数

※1: C23(AY356543)類似

※2: C25(AY356545)類似

※3: C36(AY641760)類似

※4: 型別困難

※5: Yuri類似

表8 産地国別・種類別輸入食品検査状況 (平成18-20年度)

区分	産地国	種類	総検体数	NV陽性数 /NV検体数	NV陽性率 (%)	NV遺伝子型	HAV陽性数 /HAV検査数	HAV 遺伝子型
魚介類	韓国	アカガイ	75	7/75	9.3	G I / 不明 <sup>※1</sup> (2) G I / 不明 <sup>※2</sup> (1) G I / 不明 <sup>※3</sup> (3) G II / 2 (1) G II / 12 (1) G II / 13 (1) G II / 不明 <sup>※4</sup> (1)	0/75	
		ハマグリ	1	0/1			0/1	
		カキ	1	0/1			0/1	
	中国	アカガイ	33	4/33	12.1	G I / 不明 <sup>※1</sup> (2) G I / 不明 <sup>※2</sup> (2) G II / 12 (1) G II / 不明 <sup>※5</sup> (1) G II / 不明 <sup>※4</sup> (1)	1/33	1A (1)
		ハマグリ	5	0/5			0/5	
	ロシア	アカガイ	5	1/5	20.0	G II / 13 (1)	0/5	
	計		120	12/120	10.0		1/120	

( )内は株数

※1: C23(AY356543)類似

※2: C25(AY356545)類似

※3: C36(AY641760)類似

※4: 型別困難

※5: Yuri類似

厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業  
分担研究報告書

輸入生鮮魚介類および動物生肉のウイルス汚染のサーベイランスに関する研究  
研究分担項目 輸入食品のウイルス汚染状況に関する研究

研究協力者 田中俊光 千葉市保健所  
菊地正悟 愛知医科大学  
秋山美穂 国立感染症研究所  
研究代表者 西尾 治 国立感染症研究所

#### 研究要旨

おもに中国、韓国から輸入された二枚貝、エビなどの生鮮魚介類について、ノロウイルス (NV)、A 型肝炎ウイルス (HAV) の汚染状況を調べた。検査を実施した 88 件のうち、28 件 (32%) から NV が検出された。中国産アカガイ 25 件中 11 件 (44%)、中国産ハマグリ 27 件中 7 件 (26%)、韓国産アカガイ 14 件中 3 件 (21%)、韓国産タイラギ (平貝) 14 件中 3 件 (21%)、韓国産バカガイ (アオヤギ) 1 件中 1 件 (100%)、ロシア産アカガイ 3 件中 1 件 (33%)、北朝鮮産ハマグリ 2 件中 1 件 (50%)、マレーシア産ウシエビ 1 件中 1 件 (100%) から NV が検出された。なお、HAV はすべて陰性であった。

#### A. 研究目的

NV による健康被害は、例年、冬期にピークを迎えるものの、近年では一年を通じて散発する傾向にある。また、NV による食中毒の原因食品としては、カキによるものが多く見られているが、最近ではカキに関連しない事例が多くなってきている。

このような状況の中で、季節に関係なく国内に大量に流通する輸入食品のうち、生鮮魚介類、特にアジアから輸入される二枚貝のウイルス汚染状況を調査し、安全性を評価するための基礎データの蓄積を目的とした。

#### B. 研究材料と方法

検査材料は、千葉市中央卸売市場に 2006 年 5 月～2008 年 2 月の間に搬入された、中国産ハマグリ 27 件、アカガイ 25 件、カキ (フライ) 1 件、韓国産アカガイ 14 件、タイラギ 14 件、バカガイ 1 件、ロシア産アカガイ 3 件、北朝鮮産ハマグリ 2 件、マレーシア産ウシエビ 1 件の計 88 件を用いた。

検査材料は 1 件につき 3 個 (1 個は中腸腺 1g 以上) を用い、各々検査を行った。

貝の中腸腺を摘出した後、PBS で 10% になるようにホモジナイズし、10,000rpm

で 20 分遠心後の上清を超遠心法 (35,000rpm で 3 時間) で濃縮して 200  $\mu$ l とした。この全量から High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いて RNA を抽出し、DNase I (TAKARA) 処理後、Random Hexamer (Amersham) を用いて Super Script II (Invitrogen) で逆転写して cDNA を合成した。検査はこの cDNA をもとに NV、HAV についてリアルタイム PCR および Nested PCR を行った。NV のリアルタイム PCR のプライマーは G I では COG1F/COG1R、G II では COG2F/ALPF/COG2R を使い、プローブは Taq MAN プローブ (ABI) で、G I は RING1-TP(A) と RING1-TP(b)、G II は RING2AL-TP を用いた。Nested PCR は、カプシド領域のプライマーを用いて行った。HAV のリアルタイム PCR のプライマーは、HAV+499 と HAV-557 を使い、プローブは Taq MAN プローブ (ABI) で、HAV+482-P-FAM を用いた。Nested PCR は、HAV+2799/3273、および HAV+2907/3162 プライマーを用いて実施した。

なお、リアルタイム PCR では実測値が 10 コピー以上のものを陽性とし、また、Nested PCR では増幅された PCR 産物がダイレクトシーケンスで塩基配列が決定され、既存の NV もしくは HAV との相同性が認められたものを陽性とした。最終的な判定として、検査材料 1 件 3 個中、1 個でもリアルタイム PCR もしくは Nested PCR で陽性になったものについて、その検体を陽性と計上した。なお、塩基配列が決定できたものについては、標準株を用いて

系統樹解析を行った。

### C. 研究結果

輸入生鮮魚介類 88 件のうち 28 件 (32%) が NV 陽性であった。リアルタイム PCR では、G I のみ陽性が 2 件、G II のみ陽性が 15 件で、G I と G II が共に陽性の検査材料は無かった。Nested PCR では、G I のみ陽性が 5 件、G II のみ陽性が 8 件で、G I と G II が共に陽性のものが 5 件であった。また、リアルタイム PCR もしくは Nested PCR のいずれかで G I のみ陽性が 4 件、G II のみ陽性が 17 件で、G I と G II が共に陽性のものが 7 件であった。また、検査材料 1 件 3 個中、リアルタイム PCR もしくは Nested PCR のいずれかで陽性であったのは、3 個中 1 個陽性が 17 件、3 個中 2 個陽性が 6 件、3 個中 3 個すべて陽性が 5 件であった。なお、HAV はすべて陰性であった。

種類別の NV 汚染状況は、バカガイ 1 件中 1 件 (100%)、ウシエビ 1 件中 1 件 (100%)、アカガイ 42 件中 15 件 (36%)、ハマグリ 29 件中 8 件 (28%)、タイラギ 14 件中 3 件 (21%) が NV 陽性であった (表 1)。ダイレクトシーケンスで塩基配列が決定されたものは 31 株あったが、半分以上の 17 株がアカガイから得られたものであった。また、ハマグリ、タイラギから検出されるものは、G II のみであるのに対し、アカガイから得られた 17 株のうち 12 株が G I であり、G I が検出される比率が高かった。さらに AY356543 類似株が 2 株、AY356545 類似株が 2 株、AY356546

類似株が1株、AY641760類似株が3株など、国内の食中毒事例や食品検査から検出されない株が検出された(表4)。また、大部分の検査材料からは1~2種類の遺伝子型の株(1種類:12件、2種類:4件)しか検出されなかったが、バカガイ1件から4種類の遺伝子型(GI/4、GII/4、GII/6、GII/16)が検出された。GII/4は、塩基配列の決定したすべての種類(アカガイ、ハマグリ、タイラギ、バカガイ)から検出された。

月別の検出状況では、月平均で全体の平均の陽性率32%を超えた月は10月~翌1月(10月:42%、11月:36%、12月70%、1月:43%)で、逆に8~9月は共に13%と低かった。年度別でみると2006年度は年度を通して夏期でもNVが検出されていた(6月~9月:14件中4件が陽性、29%)のに対して、2007年度は5月~9月の間はほとんど検出されない(5月~9月:22件中2件が陽性、9%)など、夏期における陽性率の差がみられた(表2)。

産地別のNV汚染状況は、中国産の53件中18件(34%)、韓国産の29件中7件(24%)、ロシア産の3件中1件(33%)、北朝鮮産の2件中1件(50%)、マレーシア産の1件中1件(100%)がNV陽性であった(表3)。塩基配列が決定した31株のうち、最も多く検出されたのはGII/4であったが、GII/4の中でも、2006年10月から2007年1月までの間に中国産のアカガイ、ハマグリから検出されたGII/4の塩基配列や、2007年11~12月の韓国産のアカガイ、タイラギから検出されたGII/4の

塩基配列はそれぞれ完全に一致するなど、魚介類の種類に関わらず時期的、地域的な共通性が見られた(表5,6)。

#### D. 考察

2006年6月~2008年2月の間に千葉市中央卸売市場に搬入された輸入生鮮魚介類88件のNVおよびHAVの汚染状況を調査した。その結果、種類別ではアカガイの36%がNV陽性で、ハマグリ(28%)、タイラギ(21%)に比べ高い汚染率を示したが、アカガイ42件の中でも、中国産が25件中11件陽性(44%)と、韓国産(14件中3件陽性:21%)、ロシア産(3件中1件陽性:33%)に比べ高かった。北朝鮮産ハマグリ(2件中1件陽性:50%)、韓国産バカガイ(1件中1件陽性:100%)、マレーシア産ウシエビ(1件中1件:100%)を別として、産地別の中の種類別においても、中国産アカガイのNV汚染率は高く、生食する上で、中腸腺の処理や、処理後の十分な洗浄等、取り扱いには特に注意が必要であるものと考えられた。アカガイから検出される遺伝子型の中には本邦での検出報告の無いAY356543や、AY356545、AY356546、AY641760類似株が多く、これらが本邦で広まらない理由が、病原性によるものなのか、それともアカガイが適切に処理されているからなのかは現在のところ明確では無い。輸入生鮮魚介類を取り扱う際は、中腸腺を傷付けないように気を付けるとともに、身を割いたりする場合は中腸腺を完全に取り除くなどの注意が必要である。また、内容液や滲出液等についても

十分な注意をして取り扱い、内容液等で汚染された調理器具などは流水で良く洗い流してから洗浄し、次亜塩素酸での消毒が必要である。

分子疫学的には塩基配列の決定した 31 株のうち、GII/4 が 10 株と最も多く、また、魚介類の種類に関わらず検出されるなど、GII/4 が本邦を含むアジア地域に広く侵淫していることが示唆された。さらに 2006 年 10 月から 2007 年 1 月までの間に中国産のアカガイ、ハマグリから検出された GII/4 の塩基配列や、2007 年 11~12 月の韓国産のアカガイ、タイラギから検出された GII/4 の塩基配列はそれぞれ完全に一致するなど、地域に継続して汚染が広まっている実態も示唆された。GII/4 以外の遺伝子型の検出状況は、GI では GI/4 が 3 株、GI/5 が 1 株、GI/10 が 2 株の他、AY356543 類似株が 2 株、AY356545 類似株が 2 株、AY356546 類似株が 1 株、AY641760 類似株が 3 株、GII では GII/1 が 1 株、GII/2 が 1 株、GII/3 が 2 株、GII/5 が 1 株、GII/6 が 1 株、GII/16 が 1 株と、多様な遺伝子型が検出された。輸入生鮮魚介類が本邦での検出報告の無い遺伝子型を含む多様な NV で汚染されている実態は、我が国に絶えず新しい遺伝子型の NV が侵入してきていることを示し、食品衛生上、また、公衆衛生上、輸入生鮮魚介類の取扱いは他の食品よりも特に注意を払って扱うことが必要と考えられた。

## E. 結論

2006 年 6 月~2008 年 2 月の間に千葉市

中央卸売市場に搬入された輸入生鮮魚介類 88 件中 28 件(32%)から NV が検出され、高率に NV に汚染されていること明らかになった。輸入生鮮魚介類は NV による食中毒の原因食品となり得るだけでなく、周囲に NV の汚染を広める可能性を含んでおり、輸入生鮮魚介類を取り扱う際は、保存場所を他の食品と別にする事や、調理を他の食品の処理が終わってから最後に行うことや、調理後の器具や手指を良く洗浄、消毒するなど、細心の注意を払う必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Goto T, Kimura H, Numazaki K, Akiyama M, Kato M, Noda M, Nozaki Y, Tanaka-Taya K, Taniguchi K, Yamagata T, Oogane T, Momoi YM, Okabe N. A case of meningoencephalitis associated with G1P [8] rotavirus infection in a Japanese infant. *Scand J Infect Dis* 39 (11):1067-1070, 2007.

Nishida T, Nishio O, Kato M, Chuma T, Kato H, Iwata H, Kimura H. Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiol Immunol*, 51:177-184, 2007.

Saitoh M, Kimura H, Kozawa K, Nishio O, Shoji A. Detection and phylogenetic analysis of norovirus in corbicula fluminea in a freshwater river in Japan. *Microbiol Immunol*, 51:815-822, 2007.

西尾治, 中川(岡本)玲子. ノロウイルス



感染症と海産物の安全性. 臨床とウイルス,  
36:305-314, 2008.

宗村徹也, 藤本嗣人, 近平雅嗣, 木村博一,  
西尾治, 吉田弘, 岡部信彦, 辻勉. エンテ  
ロウイルス遺伝子診断法における市販  
RNA 抽出キット選択の影響. 感染症学雑  
誌, 82(1):55-57, 2008.

西尾治: ノロウイルスによる食中毒の原因

食材. アニムス,14:36-40,2009.

## 2. 学会発表

なし

## G. 知的財産権の出願・登録

なし

表1 種類別輸入食品検査状況

区分	検体名	検体数	NV 陽性数	陽性率	ノロウイルス										HAV		
					G1リアルタイムPCR		G2リアルタイムPCR		リアルタイムPCR		G1とGII陽性例		RT-PCR		遺伝子型	リアルタイムPCR	RT-PCR
					PCR		PCR		G1+GII		G1	GII	G1+GII				
					1<~<10	10≤	1<~<10	10≤	G1&GII: 1<~<10	G1orGII: 1<~<10				G1&GII: 10≤			
魚介類	アカガイ	42	15/42	36	0	1	7	6	0	0	0	5	1	4	G1/4(3),G1/6(3),G1/10(2),G1/2(1),G1/3(1),G1/4(3),AY356543(2),AY356545(2),AY356546(1),AY641760(3)	0	0
	ハマグリ	29	8/29	28	0	0	6	5	1	0	0	0	6	0	G1/1(1),G1/2(1),G1/3(1),G1/4(5),G1/6(1)	0	0
	タイラギ	14	3/14	21	0	0	2	3	0	0	0	0	1	0	G1/4(1)	0	0
	ハカガイ	1	1/1	100	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	G1/4(2),G1/4(1),G1/6(1),G1/16(1)	0	0
ウシエビ	1	1/1	100	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		0	0	
カキ(フライ)	1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	
計		88	28/88	32	0	1	15	15	1	1	0	5	8	5	G1/4(3),G1/6(1),G1/10(2),G1/1(1),G1/2(1),G1/3(2),G1/4(1),G1/5(1),G1/6(1),G1/16(1),AY356543(2),AY356545(2),AY356546(1),AY641760(3)	0	0



表3 産地別輸入食品検査状況

区分	検体名	検体数	NV 陽性数	陽性率	ノロウイルス										HAV				
					G1リアルタイムPCR		G2リアルタイムPCR		リアルタイムPCR G1とGII陽性例		RT-PCR			遺伝子型		リアルタイムPCR	RT-PCR		
					PCR		PCR		G1+GII		G1	GII	G1+GII	G1/GII		G1/GII/GI+GII	G1/GII/GI+GII		
					1<~<10	10≤	1<~<10	10≤	G1&GII: 1<~<10	G1orGII: 1<~<10	G1&GII: 10≤	0	1	2					
魚介類	中国	53	18/53	34	1<~<10	0	1	0	0	0	4	6	3	G1/GII/GI+GII	0	0			
					10≤	11	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	G1/GII/GI+GII	0	0
					合計	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
魚介類	韓国	29	7/29	24	1<~<10	0	0	1	0	0	0	1	2	G1/GII/GI+GII	0	0			
					10≤	4	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
					合計	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
魚介類	ロシア	3	1/3	33	1<~<10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
					10≤	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					合計	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
魚介類	北朝鮮	2	1/2	50	1<~<10	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0			
					10≤	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					合計	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
魚介類	マレーシア	1	1/1	100	1<~<10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
					10≤	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					合計	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
魚介類	計	88	28/88	32	1<~<10	0	1	1	0	0	5	8	5	G1/GII/GI+GII	0	0			
					10≤	15	15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					合計	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0