

図2 リアルタイム PCR のステップサイクルの比較 上段2ステップサイクルによる増幅曲線 10^7 コピーから 10^4 コピーまでの希釈列を用いたが、いずれも 30 サイクル以降に増幅曲線が立ち上がり、コピー数の分解能が低い。下段 10^5 から 10^2 コピーまでよく分解しリアルタイム PCR の系として利用可能である。下段赤線がネガティブコントロールの検出線。

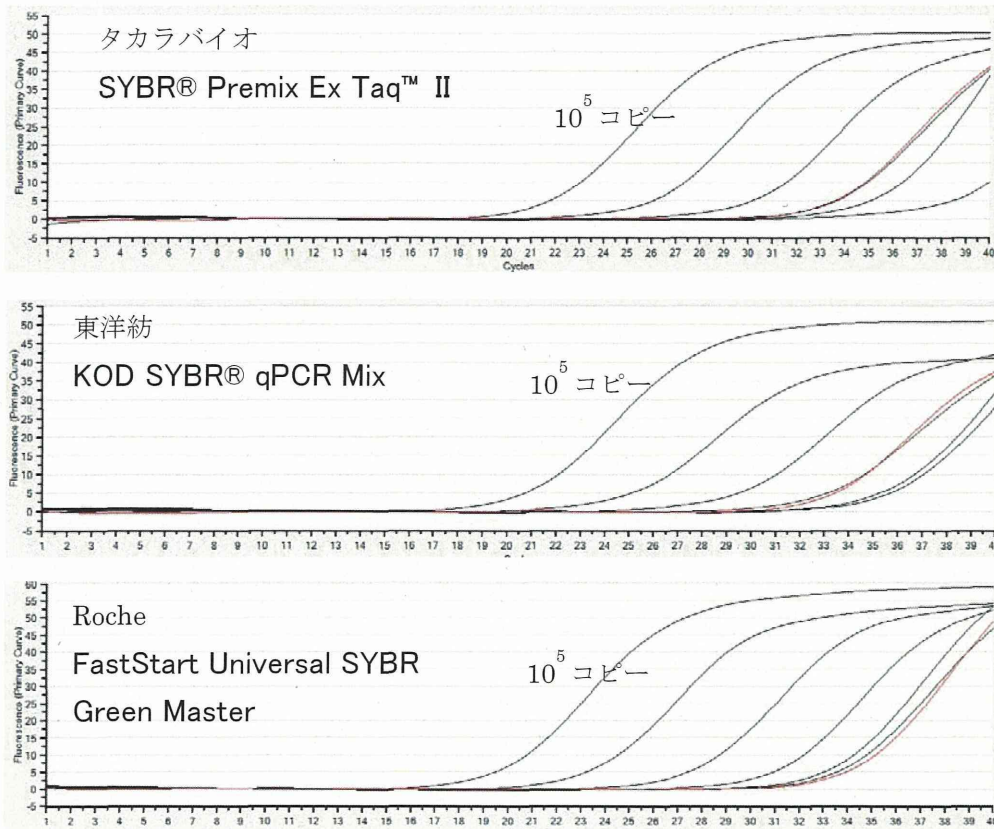


図3 タカラバイオ，東洋紡，Roche 社のリアルタイム PCR 試薬の比較
 3社の試薬で検出感度等に大きな差は見られず，同等の性能であることが示唆された。
 赤線がネガティブコントロールの検出線。

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究」

研究分担報告(研究協力報告総括)

市販カキの食品媒介性ウイルスの汚染調査および 検査法における課題の把握

研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
	佐藤 直人	岩手県環境保健研究センター
	重本 直樹	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	斎藤 博之	秋田県健康環境センター
	秋野 和華子	秋田県健康環境センター
	吉富 秀亮	福岡県保健環境研究所
	田村 務	新潟県保健環境科学研究所
	筒井 理華	青森県環境保健センター
	山本 美和子	広島市衛生研究所
	吉岡 健太	熊本県保健環境科学研究所
	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所

研究要旨

カキの食品媒介性ウイルスの汚染状況および検査法の問題点の把握等を目的として、全国 10 自治体において 2014 年 2 月に採取された国産の市販生カキを対象に、食品媒介ウイルスの検出を試みた。ノロウイルスは 73%(47/64)、サポウイルスは 14%(7/49)のロットから検出され、A 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルスは陰性(それぞれ 47, 36 ロット検査)であった。加熱調理用カキは生食用カキと比較してノロウイルスの検出率、定量値とも高い値を示した。産地別のノロウイルス検出率は 50%~100%であった。ノロウイルス遺伝子群ごとの検体別検出率およびリアルタイム PCR 法による平均定量値は GI が 23%, 350 コピー数/g, GII が 46%, 5,939 コピー数/g で、GII が高い検出率、定量値を示した。検出ノロウイルスの遺伝子型は GI が 9 種類、GII が 8 種類に分類され、GII/4(63 株)、GII/6(31)、GI/4(23)、GII/14(16)が多かった。サポウイルスは GI.2 と GII.3 が検出された。リアルタイム PCR 法の定量値と nested PCR 法の結果を比較すると、陽性基準である 10 コピー/g 以上を示した検体は、nested PCR 法陽性検体のうち、GI は 14.8%(4/27)、GII は 56.1%(32/57)に過ぎず、リアルタイム PCR 法では偽陰性となる場合が多かった。以上の結果から、ノロウイルス流行期における市販カキのノロウイルス汚染リスクは極めて高いことおよび現在の陽性基準に基づくリアルタイム PCR 法では偽陰性となる場合が少なくないことが示された。

なお、本研究の詳細については、各研究協力報告に取りまとめられている。

A. 研究目的

ノロウイルスの汚染リスクのある食品は二枚貝であり、とりわけカキは生食用として販売されていることから、食中毒の原因となる場合が多い。

現在、カキのノロウイルスの検査は厚生労働省から示されている通知法で実施される場合が多いと推定される。しかし、通知法では、検査感度が十分ではないことから、検査法の改良等が行われている。これまで、カキのウイルス汚染率に関して多くの報告があるが、改良された試験法での汚染実態調査はあまり実施されていない。また、現在、リアルタイム PCR 法における陽性基準は実測値 10 コピー数/g とされているが、汚染量が少ない場合、陰性と判定される可能性がある。

一方、カキにはヒトで流行したウイルスが蓄積されることから、カキから検出されたウイルスの遺伝子型を調べることで、下水と同様にヒトで流行した遺伝子型を把握することができると考えられる。

そこで、改良された試験法を用いてのカキの食品媒介ウイルスの汚染状況の把握、検査法における問題点の把握、検出ウイルスの遺伝子型を特定し、ヒトの流行との関連性を明らかにすることなどを目的として、2014年2月に全国10自治体で市販カキを採取し、代表的な食品媒介ウイルスであるノロウイルス、サポウイルス、A型肝炎ウイルスおよびE型肝炎ウイルスの検出を試みるとともに遺伝子型別を実施した。

なお、検査機関ごとの調査結果については、各研究協力報告を参考にさせていただきたい。

B. 研究方法

1. 材料

2014年2月に全国10自治体で購入した国産の市販生カキ64ロット217検体を検査材料とした(表1)。供試カキは6(便宜的に、養殖海域を都道府県別にまとめ、A~Fと表記)の産地のものであった。原則として1ロット(パック)につき、中腸腺1.5~2.0gを1検体として、3検体を検査に用いた。

2. 検査対象ウイルスおよび検査方法

ノロウイルスを中心として、サポウイルス、A型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス等について検査した。

検査方法は、カキの前処理については、「食品のウイルス標準試験法検討委員会」のホームページに記載されている「二枚貝(カキ)からのウイルスの濃縮法」(http://www.nihs.go.jp/fhm/csvdf/kentest/csvdf001_wg_100820.pdf)を基本とした方法(一部改変)で実施した。

濃縮材料からのRNA抽出、DNase処理および逆転写反応も同ホームページに掲載されている、「濃縮材料からのウイルスRNAの抽出・DNase処理・逆転写反応」(http://www.nihs.go.jp/fhm/csvdf/kentest/csvdf002_wg_100820.pdf)を基本とした方法(一部改変)で実施した。各検査対象ウイルスの遺伝子検出は、リアルタイムPCR法またはnested PCR法で行った。

Nested PCR法でウイルスが検出された場合、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定後、系統樹を作成し、遺伝子型を決定した。ノロウイルスの遺伝子型は国内で一般的に行われているカプシド

N/S 領域の部分配列に基づく片山らの分類法に従った。サポウウイルスの遺伝子型別は岡らの分類法に従った。一部の株については、クローニング後各クローンの塩基配列を決定した。

(検査法の詳細については、各研究協力者の研究協力報告を参照)

(倫理面への配慮)

本研究では特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 市販カキ等からのウイルスの検出状況

(1) 各食品媒介ウイルスの検出状況

Nested PCR 法により市販カキ 64 ロット 217 検体のうちノロウイルスは 47 ロット (73.4%)、113 検体 (52.1%) から検出された (表 2)。

サポウウイルスは nested PCR 法またはリアルタイム PCR 法により 49 ロット中 7 ロット (14.3%)、166 検体中 8 検体 (4.8%) から検出された (表 3, 4)。

A 型肝炎ウイルスは 47 ロット 164 検体、E 型肝炎ウイルスは 36 ロット 131 検体について検査したが、いずれも陰性であった (表 3, 4)。

(2) 産地別のウイルス検出率の比較

産地別のノロウイルス検出率をロット別にみると、GI は加熱調理用カキが 50%~67%、生食用カキが 17%~46%、GII は加熱調理用カキが 67%~100%、生食用カキが 43%~73% に分布した (表 3)。

検体別では (表 4)、GI は加熱調理用カキが 17%~42%、生食用カキが 6%~24%、

GII は加熱調理用カキが 36%~100%、生食用カキが 22%~60% に分布し、産地により検出率に違いが認められた。

サポウウイルスの多くは産地 A のカキから検出された。

(3) 生食用カキと加熱調理用カキのウイルス検出率および定量値の比較

生食用カキと加熱調理用カキのノロウイルス検出率をロット別にみると、加熱調理用カキ 85.7% (18/21)、生食用 67.4% (29/43)、検体別にみると加熱調理用カキ 68% (51/75)、生食用カキ 43.7% (62/142) であった (表 2)。

サポウウイルスの検出率はロット別では加熱調理用カキ 18.8% (3/16)、生食用カキ 12.1% (4/33)、検体別では加熱調理用カキ 6.8% (4/59)、生食用カキ 3.7% (4/107) であった (表 3, 4)。

ノロウイルスのリアルタイム PCR 法で定量値が得られた (実測値 10 未満のデータを含む) ものについて、定量値の算術平均値を比較すると、GI では加熱調理用カキ 472 コピー数/g、生食用カキ 188 コピー数/g、GII では加熱調理用カキ 5,939 コピー数/g、生食用カキ 789 コピー数/g で、いずれも加熱調理用カキが 3~8 倍程度高い定量値を示した (表 5)。最大の定量値は加熱調理用カキで GI が 2,640 コピー数/g、GII が 41,136 コピー数/g、生食用カキでは GI が 355 コピー数/g、GII が 3,032 コピー数/g であった。GI と GII の比較では、GII が約 10 倍程度高い定量値を示した。

2. 検出ウイルスの遺伝子型

170 株のノロウイルスが遺伝子型別され、GI (43 株) が 9 種類、GII (127 株) が 8

種類に分類された(表 6)。GII/4 が 63 株と最も多く、全検出遺伝子型の 37%を占めた。GII/4 のうち Sydney 2012 変異株が 57 株(GII/4 の 90.5%)と大半を占めた。GII/4 Sydney 2012 変異株は産地 E 以外の産地のカキから検出された。ノロウイルス検出率が高かった産地 A のカキから、産地 E で検出された GII.18 (ブタ型ノロウイルス)を除くすべての遺伝子型のノロウイルスが検出された。また、群別・型別不明のノロウイルスが産地 E のカキから検出された。

サポウイルスは 5 株が遺伝子型別され、4 株が GI.2, 1 株が GII.3 であった。

3. リアルタイム PCR 法と nested PCR 法の比較

リアルタイム PCR 法による定量値と nested PCR 法の結果を比較した結果、nested PCR 法陽性検体のうち、リアルタイム PCR 法で 10 以上の定量値を示し、陽性と判定されたものは、GI で 27 検体中 4 検体 (14.8%)、GII で 57 検体中 32 検体 (56.1%)に過ぎなかった(表 7)。また、nested PCR 法陽性で、リアルタイム PCR 法で定量値が得られた(実測値: >0)ものは、GI が 21 検体(77.8%)、GII で 53 検体(93.0%)であった。一方、nested PCR 法陰性で、リアルタイム PCR 法陽性(定量値 10 以上)と判定されたものは GII で 3 例認められた。

D. 考察

1. カキのノロウイルス汚染状況

昨年に引き続きノロウイルスの流行期における市販カキのノロウイルス汚染状況を調べた。その結果、市販カキの多く

がノロウイルスに汚染されていることが明らかになった。昨年度実施した 2013 年 2 月に採取された市販カキの調査結果と比較すると、汚染率、汚染量とも概ね同様の傾向を示した。今後もデータの蓄積を図る必要がある。

2. 産地別のノロウイルス検出率の比較

昨年の調査においてはノロウイルス検出率が産地ごとに大きく異なり、特に産地 A のカキの検出率が高い傾向にあった。今年度の産地別のノロウイルス検出率も昨年とほぼ同様の傾向を示した。

3. 生食用カキと加熱調理用カキのノロウイルス検出率、定量値の比較

生食用カキと加熱調理用カキのノロウイルス検出率および定量値を比較すると、検出率、定量値とも加熱調理用カキが高い値を示した(表 3, 4, 5)。加熱調理用カキについては、加熱調理を徹底する必要があるとともに、生食用カキにも汚染のリスクがあることから、生食でのリスクがあることを正確にリスクコミュニケーションするとともに、流行期には生食を控えるなどの指導が必要である。一方、産地を考慮すると、加熱調理用カキが生食用カキよりノロウイルス検出率が高いとは必ずしも限らなかった。

これらの傾向も昨年とほぼ同様であった。

4. 検出ノロウイルスの遺伝子型

今回、市販カキから GI が 9 種類、GII が 7 種類 (GII.18 (ブタ型)を除く)の遺伝子型のノロウイルスが検出された(表 6)。病原微生物検出情報によると(2015 年 3 月 8 日現在)、2013 年 11 月～2014 年 2 月に GI は GI/2, GI/3, GI/4,

GI/6, GI/7, GI/12, GI/14 の 7 遺伝子型, GII は GII/2, GII/3, GII/4, GII/6, GII/7, GII/13, GII/14, GII/17 の 8 遺伝子型が感染性胃腸炎患者から検出されているが, これらのうち, GI は 7 種類すべてが, GII は GII/7, GII/17 を除く 6 種類が今回の調査で市販カキから検出されている。さらに, 多くの市販カキから GII/4 および GII/6 が検出されているが, 2013 年 11 月～2014 年 2 月に感染性胃腸炎患者から検出され, 遺伝子型別されたノロウイルスのうち GII/4 は 63%, GII/6 は 15% を占めている。以上のように, 市販カキから検出されるノロウイルス遺伝子型は, ヒトにおけるノロウイルスの流行状況をよく反映しているものと思われた。一方, 市販カキから比較的多く検出された GI/4 は同期間に感染性胃腸炎患者からの検出例のわずか 1% に過ぎない。GI/4 は下水の調査でも比較的多く検出されており, 不顕性感染を起こしやすい遺伝子型であるかも知れない。

5. リアルタイム PCR 法と nested PCR 法の比較

リアルタイム PCR 法と nested PCR 法の結果を比較した結果, nested PCR 法陽性検体のうち, リアルタイム PCR 法で実測値 10 以上を示し陽性と判定されたものは GI で 15%, GII では 56% に過ぎなかった (表 7)。このことから, 現在の陽性判定基準に基づくリアルタイム PCR による検査では, 偽陰性となる場合が多く, カキの安全性を確保することが困難であることが示された。

一方, リアルタイム PCR 法で実測値が得られたものを陽性とした場合では,

nested PCR 法陽性検体の GI で 78%, GII で 93% が陽性となり, 両法の一致率は高くなったが, nested PCR 法陰性でリアルタイム PCR 陽性となるものが GI で 14 例, GII で 6 例認められた。この原因として, コピー数が少ないことによる結果の解離に加え, リアルタイム PCR 法の偽陽性の可能性も否定できない。

これらの結果についても, 昨年の結果と概ね同様であった。

6. その他の食品媒介ウイルスの汚染状況

サポウイルスはロット別では 14%, 検体別では 5% から検出され, 昨年との検出率と比較すると低い傾向にあった。検出されたサポウイルスの遺伝子型は GI.2 と GII.3 であった。ヒトでの流行との関連について詳細に検討する必要がある。

一方, A 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルスは検査数が少ないものの, 全て陰性であった。このことから, 市販カキにおける両ウイルスの汚染リスクは高いものと考えられる。しかし, A 型肝炎ウイルスは三好らの報告 (IASR IASR Vol. 36 p. 6-7: 2015 年 1 月号) の報告にあるように, 下水から検出されていることから, 二枚貝に蓄積される危険性は存在するものと思われる。また, イノシシ等の野生動物や豚にも感染することから, それらの排泄物が河川を汚染し, 二枚貝に蓄積される危険性は否定できないものと考えられる。事実, 本調査において市販カキからブタ由来と推定されるブタ型ノロウイルスが検出されている。これらのことから A 型肝炎ウイルスや E 型肝炎ウイルスについても検査を継続し, 汚染

実態をより正確に把握する必要がある。

E. 結論

カキの食品媒介性ウイルスの汚染状況および検査法の問題点の把握等を目的として、10自治体において2014年2月に採取された国産の市販生カキ等を対象にウイルス検出を試み、以下の結果を得た。

1. ノロウイルスは73%(47/64)、サポウイルスは14%(7/49)のロットから検出され、A型肝炎ウイルスおよびE型肝炎ウイルスは陰性(それぞれ47,36ロット検査)であった。
2. 加熱調理用カキは生食用カキと比較してノロウイルスの検出率、定量値とも高い値を示した。
3. ノロウイルス検出率は産地より異なっていた。
4. ノロウイルスの遺伝子群別では、GIIが高い検出率、定量値を示した。
5. 検出ウイルスの遺伝子型はノロウイ

ルスGIが9種類、GIIが8種類に分類され、GII/4 Sydney 2012 変異株、GII/6が多くを占めた。サポウイルスはGI.2, GII.3に型別された。

6. リアルタイムPCR法とnested PCR法の結果を比較すると、nested PCR法で陽性、リアルタイムPCR法で陰性となる場合がみられ、特にGIで顕著であった。

F. 研究発表

1. 論文発表
(各研究協力報告に記載)
2. 学会発表
(各研究協力報告に記載)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表1 検査機関別・産地別検査検体数

検査機関	産地(都道府県)別検査検体数						計
	A	B	C	D	E	F	
①	12	6					18
②	1			1			2
③	3	3		6		6	18
④	24						24
⑤	18						18
⑥	9		6				15
⑦	3	9		3			15
⑧	6	12	6	6	18		48
⑩	7			4			11
⑪		48					48
計	83	78	12	20	18	6	217

表2 市販カキのノロウイルス検査結果

区分		GI 結果	GII 結果		ノロウイルス結果		
			-	+	-	+	検出率
ロット別	加熱用*1	-	3	5	3	18	85.7%
		+	0	13			
	生食用	-	14	14	14	29	67.4%
		+	3	12			
	全体	-	17	19	17	47	73.4%
		+	3	25			
検体別	加熱用	-	24	27	24	51	68.0%
		+	2	22			
	生食用	-	80	37	80	62	43.7%
		+	11	14			
	全体	-	104	64	104	113	52.1%
		+	13	36			

結果は nested PCR 法の判定に基づく。

*1:加熱用は調理用カキを、生食用は生食用カキを示す(以下の表も同様)。

表3 市販カキの産地別ウイルス検査結果(ロット別)

ウイルス	区分	結果	産地(都道府県別)						計
			A	B	C	D	E	F	
NoV GI	加熱用	-	5	2				1	8
		+	8	4				1	13
		検出率	61.5%	66.7%				50.0%	61.9%
	生食用	-	9	6	3	5	5		28
		+	6	5	1	2	1		15
		検出率	40.0%	45.5%	25.0%	28.6%	16.7%		34.9%
	全体	-	14	8	3	5	5	1	36
		+	14	9	1	2	1	1	28
		検出率	50.0%	52.9%	25.0%	28.6%	16.7%	50.0%	43.8%
NoV GII	加熱用	-	1	2					3
		+	12	4				2	18
		検出率	92.3%	66.7%				100.0%	85.7%
	生食用	-	4	4	2	4	3		17
		+	11	7	2	3	3		26
		検出率	73.3%	63.6%	50.0%	42.9%	50.0%		60.5%
	全体	-	5	6	2	4	3		20
		+	23	11	2	3	3	2	44
		検出率	82.1%	64.7%	50.0%	42.9%	50.0%	100.0%	68.8%
NoV 検査ロット数			28	17	4	7	6	2	64
SaV	加熱用	-	5	6				2	13
		+	3						3
		検出率	37.5%	0.0%				0.0%	18.8%
	生食用	-	6	8	4	6	5		29
		+	1	2			1		4
		検出率	14.3%	20.0%	0.0%	0.0%	16.7%		12.1%
	全体	-	11	14	4	6	5	2	42
		+	4	2	0	0	1	0	7
		検出率	26.7%	12.5%	0.0%	0.0%	16.7%	0.0%	14.3%
検査ロット数			15	16	4	6	6	2	49
HAV	加熱用	-	8	6				2	16
	生食用	-	6	9	4	6	6		31
	検査ロット数			14	15	4	6	6	2
HEV	加熱用	-	5	5				2	12
	生食用	-	2	7	4	5	6		24
	検査ロット数			7	12	4	5	6	2

結果は nested PCR 法の判定に基づく。

表中の NoV, SaV, HAV および HEV はそれぞれ、ノロウイルス、サポウイルス、A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスを示す(以下の表も同様)。

表4 市販生カキの産地別ウイルス検出状況(検体別)

ウイルス	区分	結果	産地(都道府県別)						計
			A	B	C	D	E	F	
NoV GI	加熱用	-	22	24				5	51
		+	16	7				1	24
		検出率	42.1%	22.6%				16.7%	32.0%
	生食用	-	34	39	10	17	17		117
		+	11	8	2	3	1		25
		検出率	24.4%	17.0%	16.7%	15.0%	5.6%		17.6%
	全体	-	56	63	10	17	17	5	168
		+	27	15	2	3	1	1	49
		検出率	32.5%	19.2%	16.7%	15.0%	5.6%	16.7%	22.6%
NoV GII	加熱用	-	6	20					26
		+	32	11				6	49
		検出率	84.2%	35.5%				100.0%	65.3%
	生食用	-	18	36	8	15	14		91
		+	27	11	4	5	4		51
		検出率	60.0%	23.4%	33.3%	25.0%	22.2%		35.9%
	全体	-	24	56	8	15	14	0	117
		+	59	22	4	5	4	6	100
		検出率	71.1%	28.2%	33.3%	25.0%	22.2%	100.0%	46.1%
NoV 検査検体数			83	78	12	20	18	6	217
SaV	加熱用	-	18	31				6	55
		+	4						4
		検出率	18.2%	0.0%				0.0%	6.8%
	生食用	-	18	40	12	16	17		103
		+	1	2			1		4
		検出率	5.3%	4.8%	0.0%	0.0%	5.6%		3.7%
	全体	-	36	71	12	16	17	6	158
		+	5	2	0	0	1	0	8
		検出率	12.2%	2.7%	0.0%	0.0%	5.6%	0.0%	4.8%
検査検体数			41	73	12	16	18	6	166
HAV	加熱用	-	22	31				6	59
	生食用	-	18	41	12	16	18		105
	検査検体数		40	72	12	16	18	6	164
HEV	加熱用	-	13	28				6	47
	生食用	-	6	35	12	13	18		84
	検査検体数		19	63	12	13	18	6	131

結果は nested PCR 法の判定に基づく。

表5 生食用カキと加熱調理用カキにおけるノロウイルス定量値の比較

項目	ノロウイルス GI			ノロウイルス GII		
	生食用	加熱用	全体	生食用	加熱用	全体
平均値	187.9	471.6	350.0	788.8	5939.2	3844.1
最小値	6.3	7.2	6.3	5.0	3.0	3.0
最大値	355.2	2640.0	2640.0	3032.0	41136.0	41136.0
陽性検体数	15	20	35	24	35	59

リアルタイム PCR で実測値が得られた(>0)検体の集計。
 数値はカキ中腸腺 1g 当たりのコピー数。

表6 検出ウイルスの遺伝子型

ウイルス	遺伝子群	遺伝子型	産地(都道府県別)						計
			A	B	C	D	E	F	
NoV	GI	GI/2				2			2
		GI/3	1						1
		GI/4	11	9	2	1			23
		GI/5	1						1
		GI/6	2						2
		GI/7	2				1		3
		GI/12	3						3
		GI/13	1						1
		GI/14	6					1	7
		計	27	9	2	3	1	1	43
	GII	GII/2	2						2
		GII/3	4	1	1				6
		GII/4_2012	29	15	2	5		6	57
		GII/4	6						6
		GII/6	18	3	2	1	1	6	31
		GII/13	5	2					7
		GII/14	13	2		1			16
		GII.17	1	1					2
		GII.18(ブタ型)					3		3
		計	78	24	5	7	1	12	127
GIとGIIの計		105	33	7	10	2	13	170	
群別・型別不明						4		4	
SaV	GI	GI.2	2	2				4	
	GII	GII.3					1	1	
	計		2	2	0	0	1	0	5

表7 リアルタイムPCR法の定量値と nested PCR法の結果の比較

項目		定性判定	NoV GI 定量結果 (実測値)			NoV GII 定量結果 (実測値)		
			-	<10*1	≥10	-	<10	≥10
全体		-	62	14	0	40	3	3
		+	6	17	4	4	21	32
区分別	加熱用	-	25	5		9		
		+	2	11	4	3	9	26
	生食用	-	37	9		31	3	3
		+	4	6		1	12	6
検査 機関別	②	-	1			1		
		+		1				1
	③	-	11	3		1		3
		+	3	1		2	5	7
	④	-	2	11			2	
		+		8	3		8	14
	⑤	-	14			10		
		+	1	3		2		6
	⑥	-	13			7		
		+		2			8	
	⑦	-	15			15		
		+						
	⑩	-	6			6	1	
		+	2	2	1			4

定性判定は nested PCR 法の結果に基づく。

*1：実測値が 10 未満の定量値が得られた(増幅曲線が得られた)もの。

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究

平成 26 年度 研究協力報告書

吉澄 志磨	入谷 展弘
筒井 理華	三好 龍也
佐藤 直人	重本 直樹
植木 洋	山本 美和子
田村 務	山下 育孝
森 功次	吉富 秀亮
宗村 佳子	原田 誠也
小林 慎一	

平成 26 (2014) 年 3 月

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究」

研究協力報告

市販カキからの腸管系ウイルスの検出

研究協力者	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

カキのウイルス汚染実態の把握を目的として、2014 年 2 月上旬に加工された国産の市販生カキ;8 海域(ロット)を対象に、1 ロットあたり 6 検体について 4 種類の腸管系ウイルスの検索を行った。生食用カキでは、検査を行った 7 ロットのうち 6 ロットからヒト型ノロウイルス(NoV)が検出されたが、各ロットの陽性率は 1/6~6/6 と大幅な差が見られた。加熱用カキ 1 ロットの NoV 陽性率は 5/6 と高かった。最も多くの検体から検出された NoV 遺伝子型は GII/4 Sydney2012 であり、次いで GII/6 であった。一方、サポウイルスは生食用 1 ロット 1 検体から検出されたのみであり、A 型肝炎ウイルス及び E 型肝炎ウイルスは検出されなかった。生食用として販売されているカキについても、NoV は海域にかかわらず検出されており、ヒトの健康被害の原因として注意が必要である。

A. 研究目的

カキを生または加熱不十分な状態で喫食することにより、急性胃腸炎などの健康被害が引き起こされることがある。これは、カキの生育海域にヒトの腸管系ウイルスが流れ込んだ場合、カキが餌のプランクトンとともにウイルスも取り込み、それが中腸腺に蓄積されるためである。健康被害としては、ノロウイルス(NoV)などによる急性胃腸炎のほか、A 型肝炎ウイルス(HAV)、E 型肝炎ウイルス(HEV)による急性肝炎があげられる。そこで今回、カキのウイルス汚染状況の把握を目的として、2014 年 2 月に加工された国産の生カ

キを対象に、NoV、サポウイルス(SaV)、HAV、HEV の 4 種類の腸管系ウイルスの検索を行った。

B. 研究方法

1. 材料

2014 年 2 月 8, 9, 11 日に札幌市内で購入した国産の市販むき身生カキを調査対象とした。購入品は、生食用が 5 県 7 海域(ロット)、加熱用が 1 県 1 ロットである。加工年月日は 2014 年 2 月 5 日から 10 日までであった。これら 8 ロットの生カキをそれぞれ 2 パックずつ用意し、カキの中腸腺 1.5~2.0g を 1 検体と

して、1 パックにつき 3 検体（つまり、1 ロットあたり 6 検体）を調査に用いた。

2. 検索ウイルス

NoV、SaV、HAV、HEV について検索を行った。

3. 方法

平成 25 年度報告書に記載の方法を用いた。すなわち、10%中腸腺乳剤を α -アミラーゼ（和光純薬）で処理した後ポリエチレングリコール沈殿法により得られた濃縮沈査に、0.5% Zwittergent 加 PBS(-)を加えて再浮遊させた溶液を RNA 抽出材料とした。RNA 抽出には High Pure Viral RNA Kit (Roche) を使用し、カラム上で DNase I (Roche) 処理を行った。cDNA は、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) によりランダムプライマーを用いて合成した。これを鋳型とし、Nested PCR 法により各ウイルスの遺伝子の増幅を試みた。

増幅産物については、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。塩基の混合がみられた検体についてのみ、TOPO TA Cloning Kit (Life Technologies) を用いてクローニングを行い、それぞれ 16 クローンの塩基配列を決定した。遺伝子型は、NoV はキャプシド N/S 領域の塩基配列を用いた Kageyama らの方法 (J. Clin. Microbiol, 42 : 2004)、SaV は Oka らの方法 (Arch. Virol, 157 : 2012) に従って分類した。NoV の GII/4 型のみ亜型分類も行った。

(倫理面への配慮)

本研究では特定の研究対象者は存在せ

ず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

市販生カキからのウイルスの検出状況を表 1 に示した。

生食用カキでは、7 ロット (a~g) すべてからウイルス遺伝子が検出された。SaV がロット f の 1 検体から検出され、この他はすべて NoV の検出であった。HAV と HEV は検出されなかった。NoV が検出された 6 ロットの NoV 検出率は、a : 6/6、b : 3/6、c : 5/6、d : 2/6、e : 3/6、g : 4/6 であった。このうち、ロット e の 3 検体からはブタ型 NoV が、ロット c の 1 検体とロット g の 4 検体からは群/型不明の NoV (図 1, ▲c-3 及び●g-3~6) が検出された。そこで、既知のヒト型ノロウイルスのみの検出率とすると、a : 6/6、b : 3/6、c : 5/6、d : 2/6、e : 1/6、g : 1/6 となった。検出されたヒト型 NoV の遺伝子型は、a が 4 種類 (GII/2, GII/4, GII/6, GII/14)、b が 2 種類 (GII/4, GII/6)、c が 4 種類 (GI/4, GII/3, GII/4, GII/6)、d が 2 種類 (GII/4, GII/14)、e が 1 種類 (GI/7)、g が 1 種類 (GII/6) であった。また、ロット f の 1 検体から検出された SaV の遺伝子型は、GII/3 であった。

今回検査を行った加熱用カキは 1 ロット (h) のみであり、6 検体中 5 検体から NoV が検出された。SaV、HAV、HEV は検出されなかった。検出 NoV の遺伝子型は、GI/4, GII/3, GII/4, GII/13 と GII の型該当なし (図 1, ◆h-3 : GII.17/Kawasaki323 株とキャプシド N/S 領域で 100% の一致) の 5 種類であった。

今回検出された GII/4 の亜型は、すべ

て sydney2012 であった。

D. 考察

1. 検出ウイルスの種類

ウイルス陽性検体は、SaV 単独検出の 1 検体を除き、すべて NoV の検出であり、カキ喫食による健康被害としては NoV の関与の可能性が圧倒的に高いと考えられた。

2. 生食用カキからのヒト型 NoV の検出

今回の調査に用いた生食用カキの養殖地は 5 県 7 海域であり、このうち 5 県 6 海域のカキからヒト型 NoV が検出された。

検出率は、最も低いものは 1/6 (2 海域) であったのに対し、最も高いものは 6/6 (1 海域) であり、同じ時期に採捕されたカキでも、採取海域によりウイルス陽性率が大幅に異なることが示された。また、検出率の高いロットほど、ロットあたりの検出遺伝子型の種類が多い傾向にあった。

このように NoV 汚染の程度にばらつきはあるものの、生食用として販売されているカキについても海域にかかわらず NoV が検出されていることから、ヒトの健康被害の原因として対策が必要であると考えられた。

3. 生食用と加熱用の比較

今回の調査では、養殖県が同じ「生食用/加熱用カキのセット」は 1 セット；生食用 b と加熱用 h のみであった。いずれも NoV のみが検出された。NoV 陽性率は、生食用 b は 3/6、加熱用 h は 5/6 であり、加熱用の方が高かった。また、1 検体から検出された NoV 遺伝子型の数は、生食用 b では 3 検体とも 1 種類であったのに対し、

加熱用 h では 5 検体中 4 検体において複数 (2~4 種類) の NoV 遺伝子型が確認された。さらに、ロットあたりの検出遺伝子型の数も、生食用 b は 2 種類、加熱用 h は 5 種類と、加熱用 h の方が多かった。以上のことから、加熱用 h の NoV 汚染の程度は、生食用 b に比べて大幅に高かったことが示された。

4. NoV の流行株とカキへの蓄積

今回のカキ調査では、7 ロットの 23 検体からヒト型 NoV が検出された。最も多く検出された NoV 遺伝子は GII/4_Sydney2012 (5 ロット、13 検体) であり、次いで GII/6 (4 ロット、7 検体) であった。

ヒトでの NoV 流行状況を確認するため、国立感染症研究所のウェブサイトに掲載されている病原微生物検出情報の月別胃腸炎ウイルス検出状況 (<https://nesid3g.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data63j.pdf>) を利用した。今回のカキの採捕時期は 2014 年 2 月上旬頃と推測されることから、2014 年 1~2 月にヒトから検出された NoV 遺伝子型を確認したところ、遺伝子型が判明しているもののうち最も報告数が多かった遺伝子型は GII/4、次いで GII/6 であった。その占める割合は、GII/4 が 1 月:73%、2 月:54%、GII/6 が 1 月:15%、2 月:31% であった。このことから、この時期のヒトでの流行遺伝子型が GII/4 と GII/6 であったことが示唆された。

以上のように、ヒトで流行していたと考えられる NoV 遺伝子型とカキから高率に検出された遺伝子型が一致し、ヒトでのウイルス流行状況とカキのウイルス蓄

積に関連性があることが示された。

5. ヒト型以外の NoV の検出について

今回、ロット e の 3 検体からブタ型 NoV が、ロット c の 1 検体とロット g の 4 検体から遺伝子群/型不明の NoV が検出された。遺伝子群/型不明の株について、キャプシド N/S 領域の塩基配列の類似性検索を行ったところ、ロット c の 1 株(C-3)はヒト由来の Kanagawa/C36 (AY641760) と最も類似性が高く、一致率は 96%であった。一方、ロット g の 4 株のうち 2 株 (g-5、g-6) と最も類似性が高かった株も Kanagawa/C36 であったが、一致率は低く、それぞれ 81%、84%であった。また、g-3 及び g-4 と類似性が高い株はカキ由来の HAR13.1 (KC954431) と HAR13.6 (KC954433) の 2 株のみで、いずれも 90%の一致であった。以上のことから、ロット c の 1 株はヒト由来の可能性も考えられたが、ロット g の 4 株については由来動物の推定は困難であった。

今回の調査において、養殖県 E の 2 ロット (e, g) ではヒト型以外の NoV の検出率が非常に高かった (e : 3/6、g : 4/6) が、ヒト型 NoV 陽性となったのはいずれも 1 検体のみであった。そのため、ヒト型以外の NoV がヒトへの健康被害に関与するか否かが、この海域のカキのリスク評価に大きな影響を及ぼすと考えられた。既存のヒト型 NoV に分類されない株やブタやウシなどの動物由来の NoV が、ヒトに

感染するかどうか、発症に関わるかどうかについて、今後さらなる情報の集積が必要である。

E. 結論

- ・検索ウイルスのうち NoV の陽性率が圧倒的に高かった。生食用カキについても、ほとんどのロットから NoV が検出された。
- ・同じ時期に採捕されたカキでも、採取海域によりウイルス陽性率が大幅に異なっていた。
- ・カキ採捕と同時期のヒトでの流行遺伝子型と考えられる GII/4 と GII/6 が、カキからも高率に検出された。
- ・一部海域のカキから既存の NoV 遺伝子型には分類されない株とブタ型 NoV が検出されており、これらがヒトの健康被害に関与するかどうかについて、検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表1 市販生カキからのウイルス検出状況

ロット	養殖地 (県-海域)	加工年月日	※1 検体 No.	PCR検査結果 (陽性: 遺伝子群/型を記載、陰性:-)					
				NoV			SaV	HAV	HEV
				I	II	その他			
a	A-15	2014年2月10日	1	-	GI/4_2012	-	-	-	-
			2	-	GI/4_2012 GI/2 GI/14	-	-	-	-
			3	-	GI/6	-	-	-	-
			4	-	GI/6	-	-	-	-
			5	-	GI/2	-	-	-	-
			6	-	GI/4_2012	-	-	-	-
b	B-3	2014年2月7日	1	-	GI/6	-	-	-	-
			2	-	-	-	-	-	-
			3	-	-	-	-	-	-
			4	-	-	-	-	-	-
			5	-	GI/4_2012	-	-	-	-
			6	-	GI/6	-	-	-	-
c	C-1	2014年2月7日	1	-	GI/4_2012	-	-	-	-
			2	-	GI/3 GI/6	-	-	-	-
			3	-	GI/4_2012 GI/6	群/型不明	-	-	-
			4	GI/4	-	-	-	-	-
			5	GI/4	-	-	-	-	-
			6	-	-	-	-	-	-
d	D-1	2014年2月6日	1	-	-	-	-	-	-
			2	-	-	-	-	-	-
			3	-	-	-	-	-	-
			4	-	GI/4_2012 GI/14	-	-	-	-
			5	-	-	-	-	-	-
			6	-	GI/4_2012	-	-	-	-
e	E-1	2014年2月5日	1	-	ブタ型 ※2	-	-	-	-
			2	-	-	-	-	-	-
			3	-	-	-	-	-	-
			4	-	ブタ型 ※2	-	-	-	-
			5	-	-	-	-	-	-
			6	GI/7	ブタ型 ※2	-	-	-	-
f	E-2	2014年2月6日	1	-	-	-	GI/3	-	-
			2	-	-	-	-	-	-
			3	-	-	-	-	-	-
			4	-	-	-	-	-	-
			5	-	-	-	-	-	-
			6	-	-	-	-	-	-
g	E-3	2014年2月9日	1	-	-	-	-	-	-
			2	-	-	-	-	-	-
			3	-	-	群/型不明	-	-	-
			4	-	-	群/型不明	-	-	-
			5	-	-	群/型不明	-	-	-
			6	-	GI/6	群/型不明	-	-	-
h	B-1	2014年2月5日	1	-	-	-	-	-	-
			2	GI/4	GI/4_2012	-	-	-	-
			3	GI/4	GI/4_2012 GI/13 GI_NT ※3	-	-	-	-
			4	-	GI/4_2012	-	-	-	-
			5	GI/4	GI/3 GI/4_2012	-	-	-	-
			6	GI/4	GI/4_2012	-	-	-	-

※1: 1ロットにつき2パックずつ使用しており、No.1~3、No.4~6 がそれぞれ同一パックの検体である

※2: NoV 遺伝子型分類ツール (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) を用いた分類では、GI.18

※3: 型該当なし。NoV 遺伝子型分類ツールで GI.17 と分類される kawasaki232 株(AB983218) と、キャプシド N/S 領域で 100% の一致

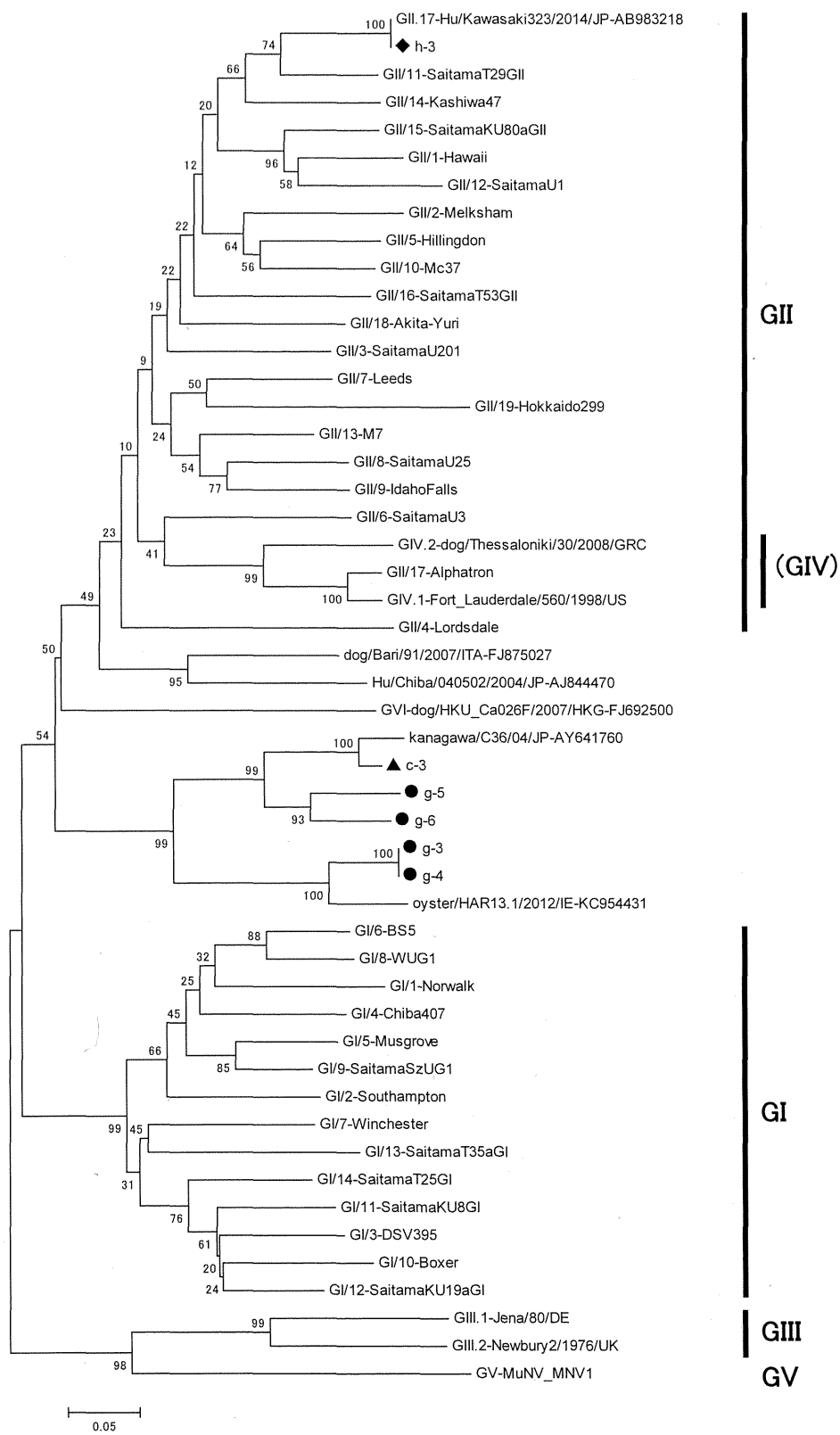


図1 NoV 系統樹 (既存の群/型に該当しない株について)