

E-3 で採取されたカキ（ロット e）から遺伝子群/型不明の NoV が 2 株検出された。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、類似性が高い株はカキ由来の HAR13.1(KC954431) と HAR13.6(KC954433)（いずれも 91%の一致）であり、ロット e の 2 株については由来動物の推定が困難であった。カキのノロウイルス汚染のリスク評価のため、このような既知のヒト型 NoV に分類されない NoV 株がヒトに感染するかどうか、また発症に関わるかどうかについて、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く、生食用カキについても、すべてのロットから NoV が検出された。NoV の流行期には、生食用カキについても加熱調理を行うなどの対策が必要である。

- ・カキからの検出率が高かった GII. 17、GII. 4、GII. 3 が同じ時期のヒト胃腸炎患者からも多く検出されていたが、患者由来のデータと比較して、GII. 17 はカキでより検出率が高い傾向をみせた。
- ・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が検出された。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

区分	ロット	養殖地 (県-海域)	加工年月日	※ 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			
生 食 用	a	A-12	2015年2月9日	1	-	GII.6, GII.17, GII.21	-	-	-	-
				2	-	GII.13, GII.17	-	-	-	-
				3	GI.5	GII.17, GII.21	-	-	-	-
				4	-	GII.4.2012	-	-	-	-
				5	-	GII.3, GII.17	-	GI.2	-	-
				6	-	GII.3, GII.17	-	-	-	-
	b	B-2	記載なし (消費期限 2015年2月16日)	1	GI.2	GII.4.2012, GII.17	-	-	-	-
				2	-	GII.17	-	-	-	-
				3	-	GII.17	-	-	-	-
				4	-	GII.17	-	-	-	-
				5	GI.2	GII.4.2012, GII.17	-	-	-	-
				6	GI.2	GII.4.2012, GII.17	-	GI.2	-	-
	c	C-1	2015年2月10日	1	-	-	-	-	-	-
				2	-	GII.17	-	-	-	-
				3	-	GII.3	-	-	-	-
				4	-	-	-	-	-	-
				5	-	-	-	-	-	-
				6	-	-	-	-	-	-
	d	E-1	2015年2月9日	1	-	-	-	-	-	-
				2	-	-	-	-	-	-
				3	-	GII.3	-	-	-	-
				4	-	-	-	-	-	-
				5	-	-	-	-	-	-
				6	-	-	-	-	-	-
e	E-3	2015年2月12日	1	-	-	群/型不明	-	-	-	
			2	-	GII.13	-	-	-	-	
			3	-	GII.4.2012	-	-	-	-	
			4	-	-	群/型不明	-	-	-	
			5	-	GII.3, GII.17	-	-	-	-	
			6	-	-	-	-	-	-	
加 熱 用	f	A-11	2015年2月9日	1	-	GII.4.2012, GII.17	-	-	-	-
				2	-	GII.17	-	-	-	-
				3	-	GII.17	-	-	-	-
				4	GI.1, GI.4	GII.3, GII.4.2012, GII.13, GII.17	-	GI.2	-	-
				5	-	GII.4.2012, GII.17	-	-	-	-
				6	-	GII.6, GII.13, GII.17	-	GI.2	-	-
	g	B-1	2015年2月9日	1	GI.2	GII.4.2012, GII.17	-	GI.2	-	-
				2	GI.2	GII.3, GII.4.2006b, GII.4.2012, GII.17	-	GI.2	-	-
				3	-	GII.3, GII.4.2012, GII.13, GII.17	-	-	-	-
				4	GI.2	GII.4.2012, GII.17	-	GI.2	-	-
				5	GI.2	GII.17	-	-	-	-
				6	GI.2	GII.3, GII.4.2012, GII.17	-	GI.2	-	-

※: 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

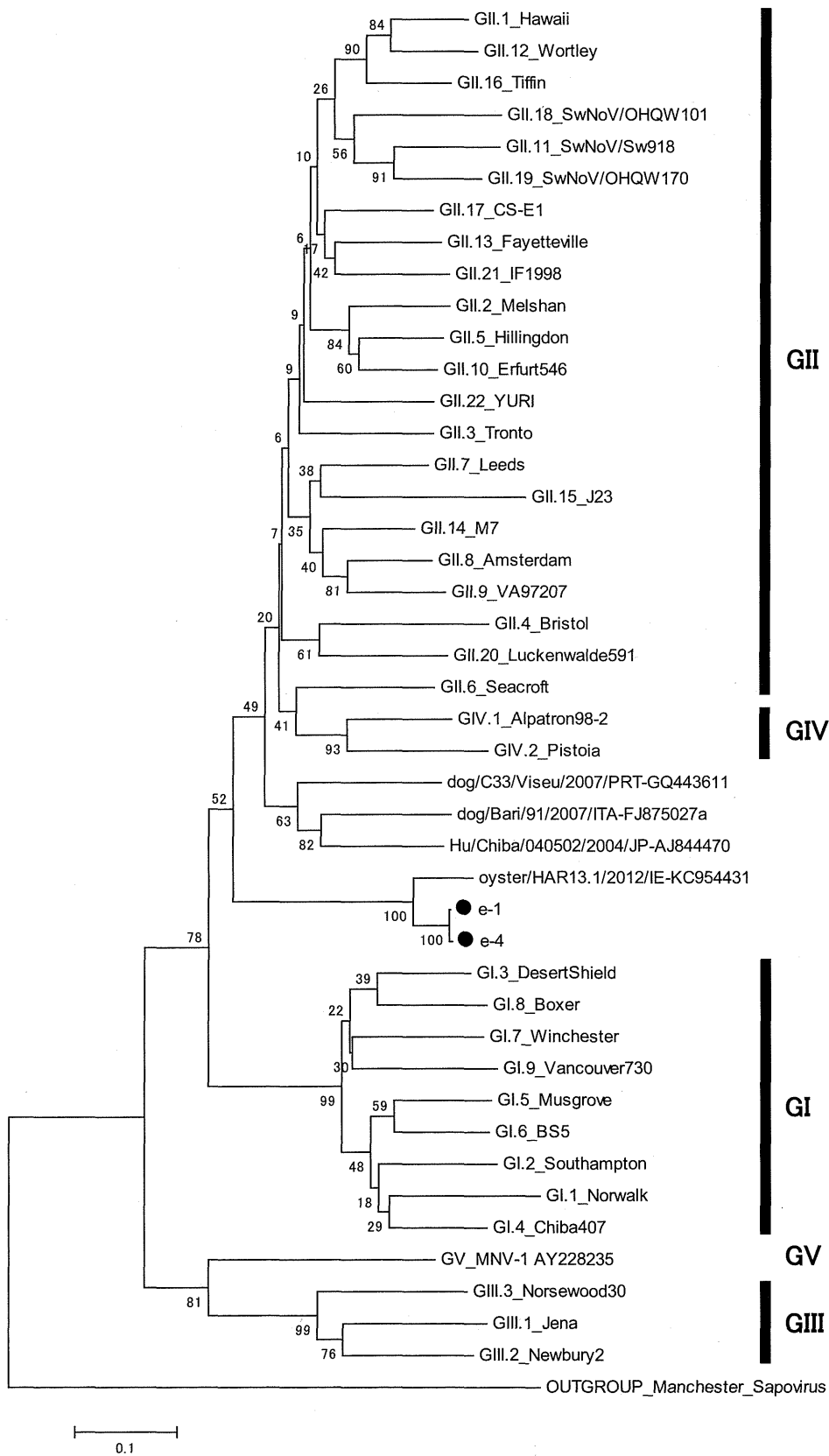


図1 NoV 系統樹 (既存の群/型に該当しない株について)

市販カキのノロウイルス等汚染実態調査

研究協力者	筒井 理華	青森県環境保健センター
研究協力者	武差 愛美	青森県環境保健センター
研究協力者	坂 恭平	青森県環境保健センター
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

市販カキの汚染実態を明らかにするために、2015年1月に購入した市販カキ 8ロット 16検体について、ノロウイルス (NoV) やサポウイルス (SaV) 等の検索を行った。生食用および加熱用カキ 4検体から NoV GII .3、GII .4/2006b、GII .4/2012、SaV GI /1 が検出された。NoV GII は 8ロット 15検体から検出され、コピー数は 1.32 ~71.44 コピー/g (中腸腺) であった。シーケンス解析の結果、生食用 2ロットから NoV GII .3、GII .4/2006b が各 1検体、加熱用 1ロットから NoV GII.4/2012、SaVGI/1 が各 1検体から検出された。

ヒトの健康被害の原因となるウイルスが検出されていることから、今後もカキの汚染実態を明らかにするために継続的な調査が必要である。

A. 研究目的

カキは、ウイルス等を蓄積する中腸腺を喫食することにより、食中毒や感染性胃腸炎を引き起こすことが知られている。食中毒の原因としては、ノロウイルス (NoV) やサポウイルス (SaV)、A 型肝炎ウイルス (HAV) 等が報告されている。そこで、国内産の市販カキの汚染実態を明らかにすることを目的とし、市販カキの NoV、SaV、HAV の検索を行った。

B. 研究方法

1. 材料

2015年1月に青森県内で購入した国産

の市販カキ 8ロット 16パックを用いた。購入したカキは、生食用が 2県 3海域 5ロット、加熱用が 1県 2海域 3ロットであった。カキの中腸腺 2.0~3.8g を 1検体とし、1ロットにつき 2検体を調査対象とした。

2. 検出方法

平成 26 年度報告書に記載の方法を使用した。「食品のウイルス標準試験法検討委員会」による「一般的な食品検体からのウイルスの回収・濃縮法」に基づき実施した。10%乳剤をアミラーゼ処理後、ガンマグロブリン製剤を添加し、黄色ブドウ球菌加工試薬による濃縮を行った。濃

縮沈渣に QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) および TRIzol®-LS (invitrogen) を添加し、懸濁後、RNA 抽出した。DNase 処理から逆転写反応は「ノロウイルスの検出法 (食安監発第 1105001 号)」に準じた方法で実施した。NoV は、通知法 (平成 19 年 5 月 14 日食安監発第 0514004 号厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知) に基づき、Real-time PCR 法によりウイルス遺伝子の定量を行った。Real-time PCR 法により NoV が検出された場合、RT-PCR 法によるウイルス遺伝子検出を行い、DNA ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定し、系統樹解析を行った。SaV は Kitajima らの方法 (Kitajima , Appl Environ Microbiol , 76 , 2010)、HAV は野田ら (平成 23 年度分担報告書改良法) の方法に基づき RT-PCR 法によるウイルス遺伝子検出を行った。SaV、HAV 陽性株は、NoV と同様に DNA 遺伝子解析を行った。

(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

1. 市販カキからの各種ウイルスの検出

NoV GII は市販カキ 8 ロット 16 検体中 8 ロット 15 検体から検出され、そのコピー数は 1.32 ~ 71.44 コピー/ g (中腸腺) であった。遺伝子定量値を用途別にみると、生食用カキは 1.32 ~ 39.14 コピー/ g (中腸腺)、加熱用カキは 6.71 ~ 71.44 コピー/ g (中腸腺) で、加熱用カキが高い傾向にあった。SaV は 16 検体中 1 検体(加熱用)から検出さ

れた。NoV GI および HAV は検出されなかった (表)。

2. 検出ウイルスの遺伝子解析

シーケンス解析の結果、NoV では 3 検体、SaV では 1 検体の遺伝子解析が可能であった。生食用 2 ロットから NoV GII .3、GII .4/2006b が各 1 検体、加熱用 1 ロットから NoV GII.4/2012、SaV GI/1 が各 1 検体から検出された (図)。海域 A 1 ロットから NoV GII.3、海域 B 2 ロットから NoV GII .4/2006b、が 1 検体、NoV GII.4/2012、SaV GI/1 が各 1 検体から検出された。また、海域 B の生食用 1 ロットから NoV GII .4/2006b、加熱用 1 ロットから NoV GII.4/2012、SaVGI/1 が各 1 検体から検出された。

D. 考察

海域 A および海域 B の生食用カキから NoV が検出されていることから養殖海域による NoV 汚染の有無については、差がないことが示唆された。同一海域の生食用および加熱用では、加熱用 1 ロットでウイルス量が多かったものの、加熱用より生食用でウイルス量が多い検体があり、生食用および加熱用にかかわらずウイルスが検出された。また、同一ロットから NoV と SaV の複数のウイルスが検出された加熱用では検出されたウイルス量も多く、より汚染されていたことが示唆された。生食用と加熱用にかかわらず、複数の海域から NoV 等のヒトの健康被害の原因となるウイルスが検出されていることから、今後もカキの汚染実態を明らかにするために継続的な調査が必要である。

E. 結論

生食用および加熱用カキ 16 検体から NoV GII .3、GII .4/2006b、GII .4/2012、SaV GI /1 が検出された。NoV GI および HAV は検出されなかった。

養殖海域による NoV 汚染の有無については、差がないことが示唆された。

生食用および加熱用にかかわらず NoV 等が検出された。

加熱用は NoV の遺伝子量が多く、NoV および SaV の複数のウイルスが検出された検体もあり、より汚染されていた。

今後も複数の海域で養殖された生食用と

加熱用のカキの汚染実態調査が必要である。

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 市販カキからのウイルス検出状況

ロット	生カキ：生 加熱用かき：加 養殖地（県 海域）	検体 No	NoV				SaV	HAV
			Real-Time PCR		遺伝子解析			
			GI	GII	GI	GII		
A	生 A11	1	—	4.76	—	—	—	
		2	—	1.32	—	GII.3	—	
B	生 B4	3	—	11.75	—	—	—	
		4	—	12.77	—	—	—	
C	生 B4	5	—	20.00	—	—	—	
		6	—	26.71	—	GII.4/2006b	—	
D	生 B4	7	—	1.66	—	—	—	
		8	—	22.33	—	—	—	
E	生 B9	9	—	9.52	—	—	—	
		10	—	39.14	—	—	—	
F	加 B6	11	—	71.44	—	GII.4/2012	—	
		12	—	50.14	—	—	GI/1	
G	加 B9	13	—	11.02	—	—	—	
		14	—	—	—	—	—	
H	加 B9	15	—	10.78	—	—	—	
		16	—	6.71	—	—	—	

※NoV GII:コピー/g (中腸線)

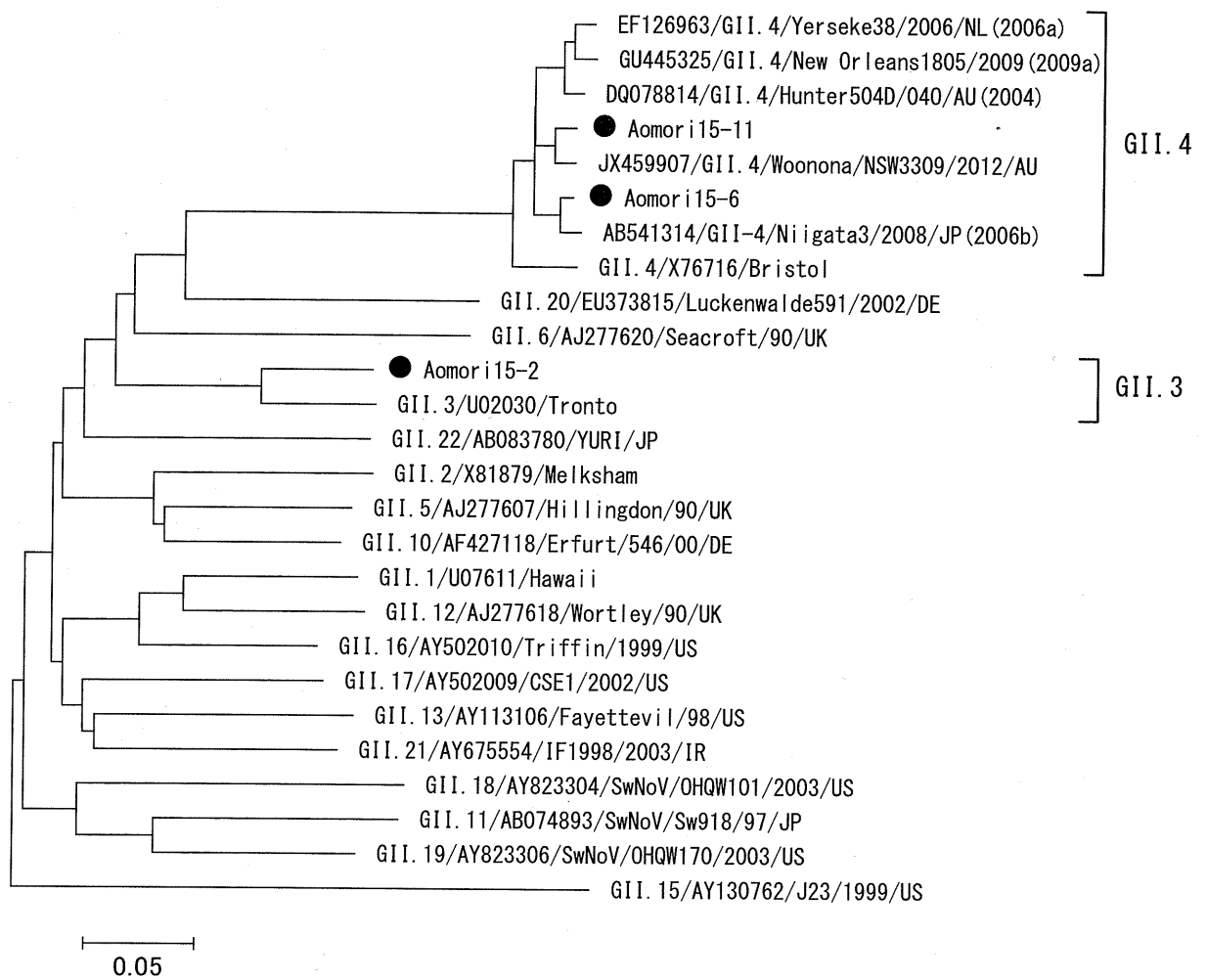


図 NJ法によるNoV系統樹(279bp)

市販カキからのノロウイルス等の検出状況

研究協力者	佐藤 直人	岩手県環境保健研究センター
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	高橋 雅輝	岩手県環境保健研究センター
研究協力者	小野 泰司	岩手県環境保健研究センター

研究要旨

カキのウイルス汚染状況の把握を目的として、2015 年 2 月に購入した国産の市販カキ 6 ロット 24 検体を対象に、食品媒介性ウイルスの検索を行った。その結果、ノロウイルスは 3 ロット 8 検体、サポウイルスは 1 ロット 1 検体から検出され、A 型肝炎ウイルスと E 型肝炎ウイルスは全て陰性であった。ノロウイルスの検出率は、検体別では生食用で 9.1% (1/11)、加熱用で 53.8% (7/13) で、加熱用が生食用より高い傾向がみられた。遺伝子型別ではノロウイルス GII.17 が 66.7% (8/12) と最も多かった。

A. 研究目的

カキ等の二枚貝は、ノロウイルスによる汚染が多い食品であることが知られている。その中でもカキは、生あるいは加熱不十分による喫食により食中毒の原因となることが多い。さらにノロウイルス以外の食品媒介性ウイルスによる汚染も知られており、その状況を把握しておくことは、対策を検討する上で重要である。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、市販されている生食用および加熱用カキを対象に、食品媒介性ウイルスの検索を行った。

B. 研究方法

1. 材料

2015 年 2 月に購入した国産の市販カキ 6 ロット 24 検体（生食用が 3 ロット 11 検体、加熱用が 3 ロット 13 検体）を対象とした。中腸腺 1.5 ～2.0 g を 1 検体とし、各ロットに含まれるすべてのカキを検査に用いた。

2. 検索ウイルスおよび検査方法

検索ウイルスは、ノロウイルス、サポウイルス、A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスとした。

検査方法は、カキの前処理は当研究班の示す「二枚貝（カキ）からのウイルスの濃縮法方法」に準じて実施した。得られた濃縮材料は、当研究班の示す「濃縮材料からのウイルス RNA の抽出・DNase 処理・逆転写反応」に準じて逆転写反応

まで実施した。遺伝子検出は Nested PCR 法により、ノロウイルスは平成 19 年 5 月 14 日付け食安監発第 0514004 号厚生労働省通知、サポウイルスは Kitajima ら (Appl Environ Microbiol, 76:2010) の報告、A 型肝炎ウイルスは野田ら (厚生労働科学研究「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」平成 23 年度総括・研究分担報告書) の報告、E 型肝炎ウイルスは国立感染症研究所の示す「E 型肝炎検査マニュアル」に準じて、それぞれ実施した。

Nested PCR 反応で得られた増幅産物は、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。

(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

1. 検索ウイルスの検出状況

市販カキ 6 ロット 24 検体についてウイルス検索を実施した結果、ノロウイルスは 3 ロット 8 検体から検出された (表)。サポウイルスは 1 ロット 1 検体から検出された。A 型肝炎ウイルスと E 型肝炎ウイルスは全て陰性だった。

2. ノロウイルスの検出

ノロウイルスは、ロット別で生食用 3 ロット中 1 ロット (33.3%)、加熱用 3 ロット中 2 ロット (66.7%)、検体別では生食用 11 検体中 1 検体 (9.1%)、加熱用 7 検体中 13 検体 (53.8%) から検出された (表)。

3. ノロウイルスおよびサポウイルスの遺

伝子型

ノロウイルス陽性となった 8 検体についてダイレクトシーケンスを実施した結果、12 株のノロウイルスが遺伝子型別された。GII.17 が 8 株 (66.7%) と大半を占め、GI.2 が 4 株 (33.3%) であった。サポウイルス 1 株の遺伝子型は GI.2 であった (表)

D. 考察

市販カキ 6 ロット 24 検体中 3 ロット 8 検体からノロウイルスが検出された。ノロウイルスが高率に検出された要因として、今回調査したカキが感染性胃腸炎の流行期に採取されたものであることによると推察される。今後、異なる時期のカキを調査することで、より正確な汚染状況が明らかになると考えられる。

ノロウイルス以外の食品媒介性ウイルスについては、サポウイルスが 1 検体から検出されたが、A 型肝炎ウイルスと E 型肝炎ウイルスは検出されなかった。このことから、カキの汚染率は低いと推察された。しかし、検体採取時期の問題や検体数が少ないこともあり、今後も調査を継続する必要がある。

ノロウイルスの検出率は、検体別で生食用よりも加熱用で高い傾向がみられた。このことから、この時期の加熱用カキを喫食する場合は、十分に加熱する必要があると消費者に注意喚起することが重要である。また、生食用カキからもノロウイルスが検出されていることから、この時期に採取されたカキの生食は控えることが望ましいと考える。

ノロウイルスの遺伝子型は、GII.17 が最も多く検出された。このことは同海域

周辺において同株が広く流行したことによるものと推察される。一方、ノロウイルス GI.4 およびサポウイルス GI.2 も検出されたことから、これらの小流行あるいは不顕性感染の存在が示唆された。

E. 結論

2015年2月に採取した市販カキを対象に食品媒介性ウイルスの検索を行い、以下の結果を得た。

1. 市販カキ 6 ロット中 3 ロットからノロウイルスが検出された。
2. ノロウイルスの検出率は、検体別で生食用よりも加熱用でやや高い傾向がみられた。

3. GII.17 が検出されたノロウイルス遺伝子型のうち約 67%を占めた。

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 市販カキからの食品媒介性ウイルス検出結果

区分	ロット数 (No)	海域	サンプル数 (No)	NoV GI	NoV GII	SaV	HAV	HEV
総計	6	5	24	4	8	1	0	0
生食計	3	3	11	0	1	0	0	0
加熱計	3	3	13	4	7	1	0	0
生食	1	4	1-1	-	-	-	-	-
生食	1	4	1-2	-	-	-	-	-
生食	1	4	1-3	-	-	-	-	-
生食	1	4	1-4	-	-	-	-	-
生食	3	新規	3-1	-	-	-	-	-
生食	3	新規	3-2	-	-	-	-	-
生食	3	新規	3-3	-	-	-	-	-
生食	5	30	5-1	-	-	-	-	-
生食	5	30	5-2	-	GII.17	-	-	-
生食	5	30	5-3	-	-	-	-	-
生食	5	30	5-4	-	-	-	-	-
加熱	2	1	2-1	GI.2	GII.17	-	-	-
加熱	2	1	2-2	-	-	-	-	-
加熱	2	1	2-3	GI.2	GII.17	-	-	-
加熱	2	1	2-4	-	-	-	-	-
加熱	2	1	2-5	-	GII.17	-	-	-
加熱	4	4	4-1	GI.2	GII.17	-	-	-
加熱	4	4	4-2	-	GII.17	-	-	-
加熱	4	4	4-3	-	GII.17	-	-	-
加熱	4	4	4-4	GI.2	GII.17	GI.2	-	-
加熱	6	9	6-1	-	-	-	-	-
加熱	6	9	6-2	-	-	-	-	-
加熱	6	9	6-3	-	-	-	-	-
加熱	6	9	6-4	-	-	-	-	-

平成 27 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

秋田県における市販生カキからのノロウイルス・サポウイルスの検出 および 2014/2015 シーズンのノロウイルス・サポウイルスの検出状況

研究協力者 秋野 和華子 秋田県健康環境センター・保健衛生部

研究分担者 斎藤 博之 秋田県健康環境センター・保健衛生部

研究要旨

2015 年 1 月に購入した市販生カキについてノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) の検出を行った。3 海域全てから NoV GII、NoV GI、SaV が検出された。NoV の遺伝子型としては、全ての海域から NoV GII.17、NoV GI.2 が確認された。SaV の遺伝子型としては、近年、秋田県で検出がなかった SaV GV.1 が検出された。

2014/2015 シーズンは秋田県において二枚貝による食中毒事例が多発した。ウイルスによる食中毒事例 9 事例は全て NoV の感染によるもので、そのうち 6 事例はカキ等二枚貝が原因と推定された事例であった。6 事例中 4 事例は GII と GI の混合感染であった。この 4 事例からは遺伝子型も複数認められ、4 事例全てから GII.17 が検出された。感染症発生動向調査および集団感染事例において検出された NoV の遺伝子型は、GII.4 Sydney 2012 亜型が最も多く、GII.17 の検出は散発的であった。今回の結果から、秋田県における市販生カキの NoV、SaV の汚染実態が明らかとなり、食中毒の発生に影響を及ぼしていた可能性が示唆された。

A. 研究目的

ノロウイルス等胃腸炎ウイルスが検出される食中毒事例では、二枚貝が原因食品と推定されるケースがある。特に、冬場に旬を迎えるカキの生食および加熱不十分なままでの喫食は、食中毒を引き起こす要因となっていることも多い。そこで、冬季における市販生カキのウイルス汚染状況を把握するため、生食用カキについてノロウイルス (NoV)、サポウイルス

(SaV) の検出を行った。

また、2014/2015 シーズンは秋田県において二枚貝による食中毒が多発した。そこで本稿では、食中毒事例を含め、本県の NoV、SaV の検出状況についても併せて報告する。

B. 研究方法

1. 材料および対象

1) 市販生カキ

2015年1月30、31日に秋田市内で購入した国産の生カキを用いた。生食用2県3海域(ロット)を各2パックずつ用意し、カキの中腸腺2~3個分を1検体として、1パックにつき3検体(合計:18検体)の検査を行った。

2) 食中毒事例および集団感染事例

2014/2015シーズンにウイルスが検出された食中毒事例9事例(照会事例2事例含む)とNoV、SaVが検出された集団感染事例23事例(照会事例1事例含む)を集計対象とした(中核市である秋田市分の事例は除く)。

3) 感染症発生动向調査

病原体定点医療機関において2014/2015シーズンに小児科から採取された糞便検体194検体のうちNoV、SaVが検出された34検体を集計対象とした。

2. 方法

1) 市販生カキからのウイルス検出

厚生労働省通知法(平成19年5月14日付け食安監発第0514004号)「貝の中腸腺を用いた方法(超遠心法)」に準じ濃縮を行い、QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)により核酸を抽出した。DNase処理は、RNA抽出時にオンカラムDNaseI処理を実施した。その後、NoVはKojimaらの方法(J. Virol. Methods, 100, 107-114, 2002.)により、SaVはKitajimaらの方(Appl. Environ. Microbiol., 76, 2461-2467, 2010.)によりRT-PCRを行い、陽性検体の一部についてはCapsid N/S領域遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定した。

2) 食中毒事例におけるカキからのウイルス検出

食品衛生検査指針2015(微生物編)「貝の中腸腺乳剤を直接用いる方法」を参考に濃縮を行った。カキから中腸腺を摘出し、すり鉢ですり潰した後、PBS(-)を1ml程度加えた。15,000rpm 15分間の遠心後、上清を分取し、125mg/mlに調整した液化 α -アミラーゼを上清1ml当たり20 μ l加え、さらにDNaseI 20 μ lを添加した。その後、37°Cで30分間消化を行い、得られた検体液を核酸抽出材料とした。以降は、市販生カキからのウイルス検出同様に抽出し、検査を行った。

3) 糞便検体からのウイルス検出

糞便乳剤からQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)により核酸を抽出した。その後、NoVはKageyamaらの方法(J. Clin. Microbiol., 41, 1548-1557, 2003.)により、SaVはOkaらの方法(J. Med. Virol., 78, 1347-1353, 2006.)によりリアルタイムRT-PCRを行い、陽性検体についてはCapsid N/S領域遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定した。

(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

1. 市販生カキからのウイルス検出状況

市販生カキからのウイルス検出状況を表1に示す。18検体全ての検体からNoV GIIが検出された。NoV GI、SaVは全ての海域から検出された。検出されたNoV GII

の遺伝子型は、GII. 3、GII. 17、GII. 21であった。また、検出された NoV GI の遺伝子型は、GI. 2、GI. 5 であり、SaV の遺伝子型は、GI. 1、GI. 2、GI. 3、GV. 1 であった。NoV GII. 17、NoV GI. 2 は全ての海域から認められた。

2. 食中毒事例からの検出状況

食中毒事例の詳細について表 2 に示す。9 事例全てが NoV の感染であり、9 事例中 6 事例はカキ等二枚貝が原因と推定された事例であった。そのうち 4 事例は NoV GII と GI の混合感染であった。この 4 事例については遺伝子型が複数検出されており、4 事例全てから NoV GII. 17 が認められた。また、近年、秋田県においては検出がなかった NoV GII. 21 が確認された。

3. 感染症発生動向調査における NoV、SaV の遺伝子型別検出状況

感染症発生動向調査において検出された NoV、SaV の遺伝子型について表 3、表 4 に示す。検出された NoV は全て GII であった。GII. 4 Sydney 2012 亜型が 16 例 (69.6%) と最も多く、その検出時期は流行期である 1 月、2 月に多くなっていた。また、同時期には 3 例 (13.0%) から GII. 4 2006b 亜型も検出された。GII. 17 は散発的に 3 例 (13.0%) から認められた。GII. 3 は 1 例 (4.3%) の検出であった。SaV は 10~12 月に多く検出されており、検出遺伝子型は GI. 1 が 4 例 (36.4%)、GII. 1 が 4 例 (36.4%)、GV. 1 が 3 例 (27.3%) であった。

4. 集団感染事例における NoV、SaV の遺伝子型別検出状況

集団感染事例において検出された NoV、

SaV の遺伝子型について表 5、表 6 に示す。GII. 4 Sydney 2012 亜型が 10 例 (47.6%) と最も多かった。次いで、GII. 3 が 5 例 (23.8%) で認められ、いずれも 5 月以降の検出であった。GII. 17 は感染症発生動向調査の検出状況と同様に、散発的に 4 例 (19.0%) から検出された。GI. 2 と GI. 7 はそれぞれ 1 例 (4.8%) から検出された。SaV は感染症発生動向調査の検出状況と同様に 10~12 月に検出が多くなっており、検出遺伝子型は GV. 1 が 3 例 (75.0%)、GI. 1 が 1 例 (25.0%) であった。

D. 考察

市販生カキは、3 海域全てから NoV、SaV が検出されており、冬場の生カキにおけるウイルス汚染の実態が明らかになった。平成 26 年度報告書において検出の報告があった NoV GII. 17 は、全ての海域で確認されており、産地での流行が考えられた。また、2014/2015 シーズンにおいて秋田県では 10~12 月に SaV が多く検出されていたが、その中には、近年、本県では確認されていなかった遺伝子型である SaV GV. 1 が含まれており、この型は、市販生カキ 1 海域からも検出されていた。海域周辺でも本県同様の流行があったものと考えられる。今回購入した生カキには、NoV に不活化効果を示すとされるオゾンナノバブル洗浄処理を施したカキが含まれていた。そのロットからもウイルス遺伝子が検出されたことから、今後はウイルスの感染性についての確認も必要と思われる。

2014/2015 シーズンに発生した食中毒事例 9 事例中 6 事例はカキ等二枚貝が原

因と推定された事例であり、いずれも生食および加熱不十分で食されていた。二枚貝や冬季のカキを喫する際には、十分な加熱処理を行うことが感染予防につながると考えられる。NoV GII. 17 は、原因が二枚貝の事例および県外からの照会事例において検出されていた。原因と推定される二枚貝は秋田県が産地となっていないこと、また、感染症発生動向調査および集団感染事例においては NoV GII. 17 の検出が散発的であったことから、県内で主流の遺伝子型とは考えにくい。しかしながら、市販生カキの調査では 3 海域全てから NoV GII. 17 が検出されており、また、食中毒事例で搬入された生カキ 2 事例からも確認されていることから、昨シーズン県内で流通した生カキの喫食により、NoV GII. 17 の感染（不顕性感染を含む）が引き起こされていた可能性も考えられた。生カキが原因と推定された食中毒 1 事例から検出された NoV GII. 21 は、近年、本県において検出されていなかった型であるが、市販生カキからも確認されているため、今後の動向に注意を払う必要があると考える。

E. 結論

市販生カキからの NoV、SaV の検出は、秋田県内で流通していたカキの汚染状況を反映しているものと思われ、2014/2015 シーズンに本県で多発していたカキによる食中毒事例との関連性を示す重要な結果となった。特に、今シーズン流行が懸念されている NoV GII. 17 は、市販カキから高率に検出されていたことから、流行株の予測や予防対策を考える上でも、市

販生カキにおけるウイルスの汚染実態調査は継続していく必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、柴田ちひろ、佐藤由衣子、安部真理子、飯塚禮子、木内雄：死亡例を含む A 型肝炎の家族内感染事例，病原微生物検出情報，36(5)，p15 (2015)

2. 学会発表

1) 斎藤博之、秋野和華子、田中智之、野田衛：食品のウイルス検査法における捕捉抗体の供給源に関する研究、第 25 回秋田応用生命科学研究会講演会、2015、秋田

2) 斎藤博之、秋野和華子、野田衛：食品のサポウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際の RNA 検出系の最適化、第 36 回日本食品微生物学会学術総会、2015、川崎

3) 秋野和華子、斎藤博之、野田衛：食品のウイルス検査における偽陽性防止対策に関する検討、第 36 回日本食品微生物学会学術総会、2015、川崎

4) Hiroyuki Saito, Wakako Akino, Mamoru Noda: Optimization of RT-PCR to detect Sapovirus RNA recovered by PANtrap method. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015、福岡

5) 斎藤博之、秋野和華子、田中智之、野田衛：食品検体の病原ウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際の捕捉抗体供給源に関する検討、第 110 回

日本食品衛生学会学術講演会、2015、京都

6) 斎藤博之、秋野和華子、野田衛：LNA (Locked Nucleic Acid) 修飾プライマーを用いたサポウイルス RNA 検出系の最適化、秋田応用生命科学研究会第 26 回講演会、

2015、秋田

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

海域	No.	ノロウイルス		サポウイルス
		G II型	G I型	
A-30	①-1	検出	(-)	(-)
	①-2	検出	(-)	GI.1
	①-3	GII.17	GI.5	(-)
	②-1	GII.3	GI.2	(-)
	②-2	検出	(-)	(-)
	②-3	検出	(-)	(-)
B-9	③-1	GII.17	GI.2	(-)
	③-2	検出	(-)	GI.2
	③-3	検出	(-)	(-)
	④-1	GII.17	(-)	(-)
	④-2	検出	(-)	(-)
	④-3	検出	(-)	(-)
B-4	⑤-1	検出	(-)	(-)
	⑤-2	GII.21	GI.2	(-)
	⑤-3	検出	(-)	(-)
	⑥-1	検出	検出	GI.3
	⑥-2	GII.17	GI.2	(-)
	⑥-3	検出	検出	GV.1

表2 秋田県における食中毒事例の詳細 (2014/2015 シーズン)

依頼年月日	推定原因食品	原因施設	検出ノロウイルス遺伝子型		備考
			G II型	G I型	
2015年1月16日	カキ料理	飲食店	GII Mix		照会事例：千葉県
2015年1月23日	不明 (施設の給食)	老人施設	GII.4 Sydney 2012		
2015年1月27日	不明 (会食料理)	飲食店	GII.4 Sydney 2012		
2015年1月27日	カキボン酢	旅館	GII.4 Sydney 2012 GII.17	GI.4	
2015年1月28日	酢ガキ	旅館	GII.4 Sydney 2012 GII.17 (調理従事者) GII.13 (カキ中腸腺)	GI.3	
2015年2月11日	酢ガキ	飲食店	GII.21 GII.17 (カキ中腸腺)	GI.4 GI.4 (カキ中腸腺)	
2015年2月13日	蒸しガキ	旅館	GII.6		
2015年4月7日	不明 (旅館の食事)	旅館	GII.17		照会事例：福島県
2015年4月29日	アサリ料理	飲食店	GII.17 GII.17 (アサリ中腸腺)	GI.3 GI.6 GI.3 (アサリ中腸腺)	

表3 感染症発生動向調査において検出されたNoVの遺伝子型(2014/2015シーズン)

	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	計
GII.3											1		1
GII.4 Sydney 2012					9	3		2	1	1			16
GII.4 2006b					2	1							3
GII.17				1			1	1					3
計	0	0	0	1	11	4	1	3	1	1	1	0	23

(株数)

表4 感染症発生動向調査において検出されたSaVの遺伝子型(2014/2015シーズン)

	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	計
GI.1		1	1	1								1	4
GII.1		1	2	1									4
GV.1			1	2									3
計	0	2	4	4	0	0	0	0	0	0	0	1	11

(株数)

表5 集団感染事例において検出されたNoVの遺伝子型(2014/2015シーズン)

	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	計
GII.3									2	2	1		5
GII.4 Sydney 2012			1	2*1	1	3		2*2	1				10
GII.17				1*1		2				1			4
GI.2					1								1
GI.7								1*2					1
計	0	0	1	3	2	5	0	3	3	3	1	0	21

(株数)

*1: 12月の2事例中1事例よりGII.4 Sydney 2012とGII.17の2種類の遺伝子型を検出

*2: 4月の2事例中1事例よりGII.4 Sydney 2012とGI.7の2種類の遺伝子型を検出

表6 集団感染事例において検出されたSaVの遺伝子型(2014/2015シーズン)

	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	計
GI.1										1			1
GV.1		1		2									3
計	0	1	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	4

(株数)

カキからのノロウイルス抽出法の検討

研究協力者	植木 洋	宮城県保健環境センター微生物部
研究協力者	菅原 直子	宮城県保健環境センター微生物部
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

カキからのノロウイルス (NoV) 遺伝子検出検査のウイルス抽出に用いている細胞破碎法の破碎条件を検討し最適化を行った。さらに、細胞破碎法と proteinaseK (PK) 及び α -amylase (AM) の 2 種の酵素処理をそれぞれ組み合わせ合わせた抽出方法を用い、カキから NoV 遺伝子を定量的に検出し比較検討した。抽出液として滅菌蒸留水 (以下 DDW) を使用した場合の最適破碎条件は、従来実施していた条件よりも緩和な 3,500rpm・15 秒が最も検出率が高かった。酵素処理を導入した場合は、AM 液を使用しカキ中腸腺を 4500rpm, 15 秒で細胞破碎後、37°C1 時間の加温する方法が、未処理、PK 処理と比較して検出率および遺伝子定量値ともに高く、最も高感度であった。

A. 研究目的

カキは NoV による食中毒の主要な原因食品の一つである。カキの安全性確保には出荷時の NoV 検査が重要で、迅速、簡便な検査法の確立が求められている。

今回我々はカキからのウイルス濃縮・抽出について超遠心法と同等以上の効果が確認され、かつ短時間で多検体の処理が可能な細胞破碎法 (以下破碎法) の破碎条件の最適化を図るとともに、近年報告されている酵素処理の有用性について検討した。

B. 研究方法

1. 材料

平成 24 年 3 月及び平成 25 年 2 月に宮城県内の同一海域で採取した畜養カキの各個体より無菌的に中腸腺を切り出し使用した。

2. 方法 1 破碎条件の検討

取り出した中腸腺を直径 3mm のステンレスビーズを入れた 5mL 容量の破碎用チューブにとり DDW (ニッポンジーン) 2mL を加え、細胞破碎機 (Micro Smash SM-100 TOMY) で破碎した。中腸腺の破碎条件は A(従来法):4,500rpm・60 秒, B:4,500rpm・30 秒, C:4,500rpm・15 秒, D:3,500rpm・15 秒の 4 条件とした。破碎後、遠心上清から、厚労省通知法 (食安監発第