

表 4 検出された遺伝子型の種類と検出率

2013年

	遺伝子型	検出検体数 (1ロットあたり6検体検査)								検出ロット数 (8 ロット中)	
		生食用						加熱用			総計 (48検体中)
		1	2	3	4	5	6	7	8		
NoV	GI.3	3								3 (6%)	1
	GI.4	2								2 (4%)	1
	GI.7							1		1 (2%)	1
	GII.2	1								1 (2%)	1
	GII.4_2012	5		1	2			5	2	15 (31%)	5
	GII.4_2006b							1		1 (2%)	1
	GII.6	4							2	6 (13%)	2
	GII.17	1						1		2 (4%)	2
SaV	GIV.1	1								1 (2%)	1
	GI.2	4								4 (8%)	1
	GI.6							1		1 (2%)	1

2014年

	遺伝子型	検出検体数 (1ロットあたり6検体検査)								検出ロット数 (8 ロット中)	
		生食用							加熱用		総計 (48検体中)
		1	2	3	4	5	6	7	8		
NoV	GI.4			2					4	6 (13%)	2
	GI.7					1				1 (2%)	1
	GII.2	2								2 (4%)	1
	GII.3			1					1	2 (4%)	2
	GII.4_2012	3	1	2	2				5	13 (27%)	5
	GII.6	2	2	2				1		7 (15%)	4
	GII.13	1			1					2 (4%)	2
	GII.14								1	1 (2%)	1
SaV	GII.17							1		1 (2%)	1
	GI.3						1			1 (2%)	1

2015年

	遺伝子型	検出検体数 (1ロットあたり6検体検査)							検出ロット数 (7 ロット中)	
		生食用					加熱用			総計 (42検体中)
		1	2	3	4	5	6	7		
NoV	GI.1						1		1 (2%)	1
	GI.2		3					5	8 (19%)	2
	GI.4						1		1 (2%)	1
	GI.5	1							1 (2%)	1
	GII.3	2		1	1	1	1	3	9 (21%)	6
	GII.4_2012	1	3			1	3	5	13 (31%)	5
	GII.4_2006b							1	1 (2%)	1
	GII.6	1					1		2 (5%)	2
	GII.13	1				1	2	1	5 (12%)	4
	GII.17	5	6	1		1	6	6	25 (60%)	6
SaV	GII.21	2							2 (5%)	1
	GI.2	1	1				2	4	8 (19%)	4

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」

総合研究協力報告(平成 25～27 年度)

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
研究協力者	三上 稔之	青森県環境保健センター
研究協力者	東海林 彰	青森県環境保健センター
研究協力者	古川 紗耶香	青森県環境保健センター
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

市販カキの汚染実態を明らかにするために、2013年2月、2014年2月、2015年1月に購入した市販カキ18ロット46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。市販カキの遺伝子解析の結果、生食用および加熱用カキ15検体からNoV GI.1、GI.3、GI.7、NoV GII.3、GII.4、GII.4/2006b、GII.4/2012、GII.12、GII.13、GII.14、GII.17、SaV GI/1、GI/2が検出され、複数のNoV遺伝子の保有が明らかになった。生食用であっても養殖地にかかわらず、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線を喫食することにより、食中毒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、NoVや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

2013年2月、2014年2月、2015年1月に青森県内で購入した国産の市販カキ18ロット46パックを用いた。購入したカキは、生食用が3県7海域12ロット31パック、加熱用が2県4海域6ロット15パックであった。カキの中腸腺1.5～3.8gを1検体(1パック)とし、1ロットにつ

き 2~3 検体を調査対象とした。

2. 検出方法

カキの濃縮から RNA 抽出は、平成 25 年度~平成 27 年度で異なる方法を使用した。DNase 処理から遺伝子解析については、3 年間同様の方法を使用した。

カキの濃縮について、平成 25 年度は「食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究」による「二枚貝（カキ）からのウイルスの濃縮法」に基づき実施した。10%乳剤をアミラーゼ処理後、PEG 濃縮し RNA 抽出した。平成 26 年度および平成 27 年度は、「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 AVLBuffer (QIAamp® Viral RNA Mini Kit 添付) 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. 検出結果

2013 年から 2015 年に購入した市販カキの NoV の結果は、18 ロット 46 検体中 NoV GI が 4 ロット 11 検体から検出され、9.50 ~316.83 コピー/g（中腸腺）、NoV GII が 12 ロット 27 検体から検出され、1.32 ~882.03 コピー/g（中腸腺）であった。生食用から NoV GI が 3 ロット 8 検体から検出され、9.50 ~98.77 コピー/g（中腸腺）、NoV GII が 8 ロット 19 検体から検出され、1.32 ~882.03 コピー/g（中腸腺）、加熱用から NoV GI が 1 ロット 3 検体から検出され、32.42~316.83 コピー/g（中腸腺）、NoV GII が 4 ロット 8 検体から検出され、6.71 ~597.63 コピー/g（中腸腺）であった。SaV は 46 検体中生食用と加熱用各 1 検体から検出された。HAV は検出されなかった（表）。

2. 解析結果

シーケンス解析の結果、NoV GI は 4 ロット 6 検体、7 ロット 13 検体、SaV では 2 ロット 2 検体の遺伝子解析が可能であった。生食用 5 ロットから NoV GII .17 が 3 検体、GI .3、GI .7 が各 2 検体、GI .1、GII .3、GII .4、GII .4/2006b、GII.4/2012、GII .12、GII .14、SaV GI/2 が各 1 検体、加熱用 2 ロットから NoV GII.13 が 3 検体、GI .3、

GII.4/2012、SaV GI/1 が各 1 検体から検出された（表、図 1、図 2）。

養殖地 A の生食用 3 ロットから NoV GII.17 が 3 検体、GI.3 が 2 検体、GI.1、GII.3、GII.4、GII.12 が各 1 検体、養殖地 B の生食用 2 ロットから NoV GII .4/2006b、GII.4/2012、GII.14 が各 1 検体、加熱用 2 ロットから NoV GII.13 が 3 検体、GI .3、GII.4/2012、SaV GI/1 が各 1 検体から検出された。

D. 考察

養殖地 A および養殖地 B の生食用カキから NoV が検出されていることから養殖地による NoV 汚染の有無については、差がないことが示唆された。養殖地 B2 の生食用と加熱用では、加熱用でウイルス量が多く、養殖地 B9 では、生食用でウイルス量が多く検出されている検体があり、生食用および加熱用にかかわらず NoV に汚染されていることが示唆された。同一ロットから複数の遺伝子が検出され、カキ喫食による集団事例患者から、NoV GI と NoV GII が同時に検出される事例が発生する可能性が推測された。また、定量検出からカキに含まれるウイルス量に個体差があることが確認された。

生食用と加熱用にかかわらず市販カキから複数の NoV が検出され、カキを喫食することにより NoV 感染リスクが非常に高いことが示唆された。

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

市販カキから 3 遺伝子型の NoV GI、8

遺伝子型の NoV GI、2 遺伝子型の SaV の遺伝子型が検出された。養殖地による NoV 汚染の有無の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 に汚染されていることが示唆された。同一ロットから複数の遺伝子が検出されたことから、カキの喫食による集団事例患者から NoV GI と NoV GII が同時に検出される事例が発生する可能性があるとして推測された。

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 市販カキからのウイルス検出状況

	ロット	生カキ：生 加熱用カキ：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		
2013年2月	①	生 A10	1	—	43.81	—	—	—	—
			2	15.03	313.34	—	GII.17	—	—
			3	29.45	191.99	GI.3	GII.12	—	—
	②	生 A11	4	98.77	470.78	GI.3	GII.17	—	—
			5	93.16	882.03	GI.1	GII.4	GI/2	—
			6	21.56	98.83	—	GII.17	—	—
	③	生 B2	7	9.50	57.02	GI.7	GII.4/2012	—	—
			8	30.2	42.01	GI.7	—	—	—
			9	33.67	45.05	—	GII.14	—	—
	④	加 B2	10	32.42	93.38	—	GII.13	—	—
			11	316.83	594.63	—	GII.13	—	—
			12	65.23	299.47	GI.3	GII.13	—	—
	⑤	加 D99	13	—	—	—	—	—	—
			14	—	—	—	—	—	—
			15	—	—	—	—	—	—
2014年2月	⑥	生 A10	16	—	—	—	—	—	—
			17	—	—	—	—	—	—
			18	—	—	—	—	—	—
	⑦	生 B5	19	—	—	—	—	—	—
			20	—	—	—	—	—	—
			21	—	—	—	—	—	—
	⑧	生 B5	22	—	—	—	—	—	—
			23	—	—	—	—	—	—
			24	—	—	—	—	—	—
	⑨	生 D99	25	—	—	—	—	—	—
			26	—	—	—	—	—	—
			27	—	—	—	—	—	—
	⑩	加 B2	28	—	—	—	—	—	—
			29	—	—	—	—	—	—
			30	—	—	—	—	—	—

	ロット	生カキ：生 加熱用カキ：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		
2015年1月	⑪	生 A11	31	—	4.76	—	—	—	—
			32	—	1.32	—	GII.3	—	—
	⑫	生 B4	33	—	11.75	—	—	—	—
			34	—	12.77	—	—	—	—
	⑬	生 B4	35	—	20.00	—	—	—	—
			36	—	26.71	—	GII.4/2006b	—	—
	⑭	生 B4	37	—	1.66	—	—	—	—
			38	—	22.33	—	—	—	—
	⑮	生 B9	39	—	9.52	—	—	—	—
			40	—	39.14	—	—	—	—
	⑯	加 B6	41	—	71.44	—	GII.4/2012	—	—
			42	—	50.14	—	—	GI/1	—
	⑰	加 B9	43	—	11.02	—	—	—	—
			44	—	—	—	—	—	—
	⑱	加 B9	45	—	10.78	—	—	—	—
			46	—	6.71	—	—	—	—

※陰性：—

※Real-time PCR：コピー/g（中腸線）

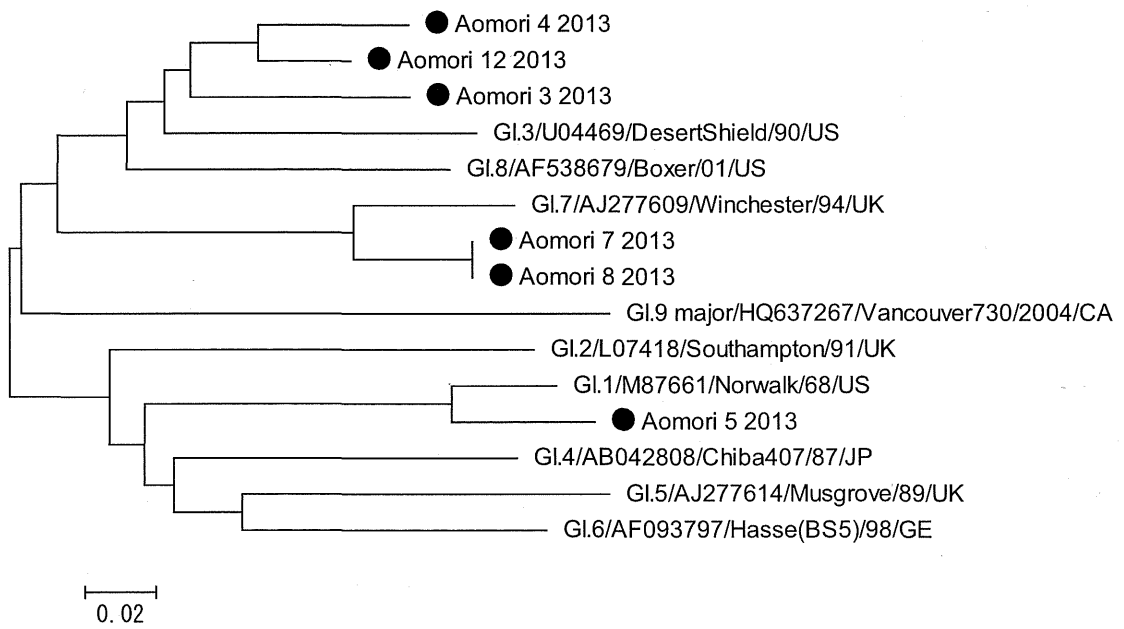


図1 NJ法によるNoV GI分子系統樹 (253bp)

● : 2013年検出株

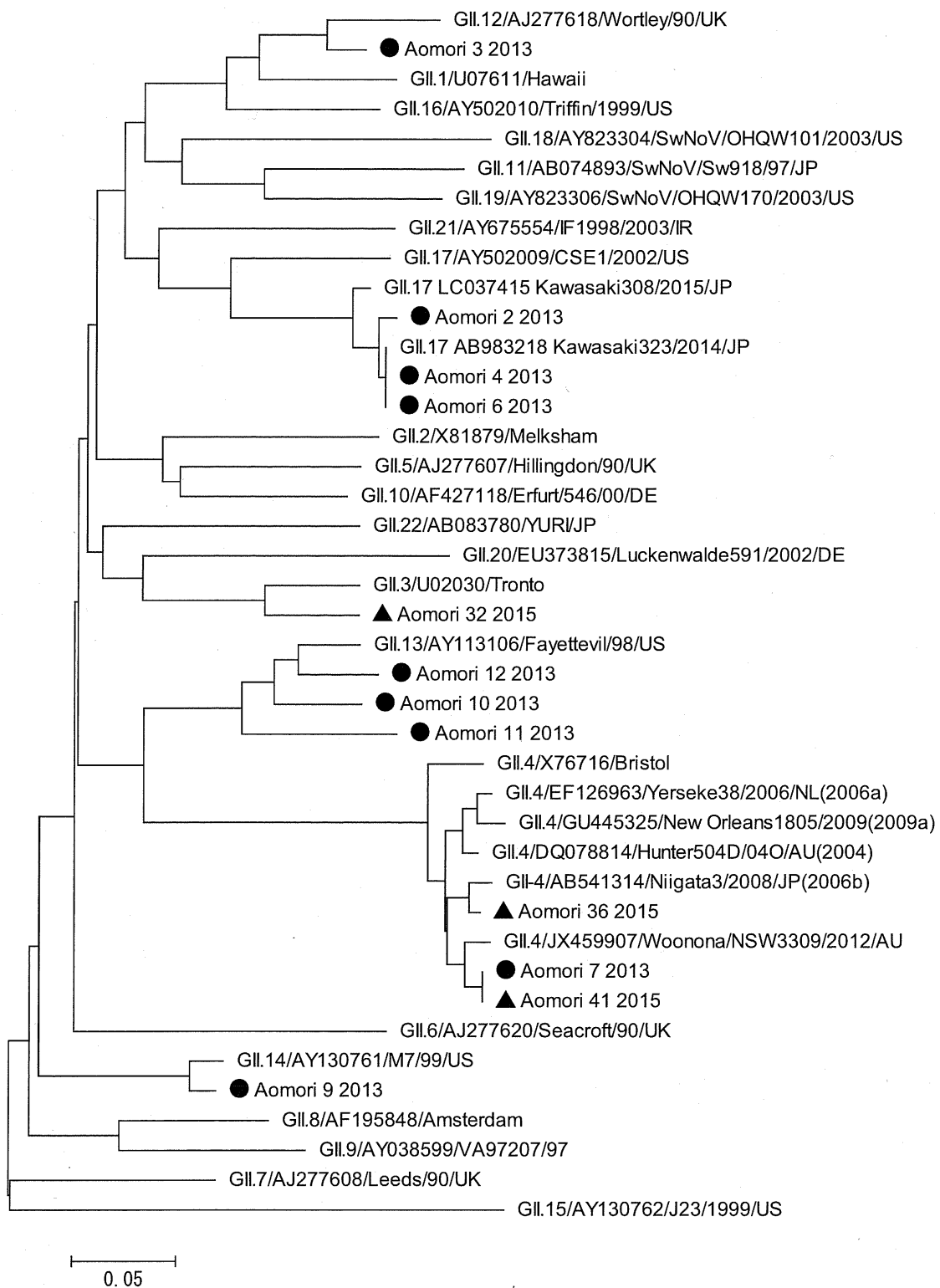


図2 NJ法によるNoV GII分子系統樹 (264bp)

● : 2013年検出株、▲ : 2015年検出株

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」

総合研究協力報告(平成 25～27 年度)

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、2014 年 2 月および 2015 年 2 月に購入した国産の市販カキ 13 ロット 72 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、ロット別で生食用 7 ロット中 4 ロット (57.1%)、加熱用 6 ロット中 4 ロット (66.7%)、検体別では生食用 37 検体中 5 検体 (13.5%)、加熱用 35 検体中 16 検体 (45.7%) から検出された。サポウイルスは加熱用 1 ロット (16.7%) 1 検体 (2.9%) からのみ検出され、A 型および E 型肝炎ウイルスは検出されなかった。ノロウイルスの遺伝子型は、GII.17 および GII.4_2012 変異株が多く検出された。

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、その汚染実態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

岩手県において、2014 年 2 月および 2015 年 2 月に購入した市販カキ (生食用 5 海域 7 ロット、加熱用 5 海域 6 ロット) を対象とした。

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 13 ロット 72 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 8 ロット (61.5%) 20 検体 (27.8%) から検出された。サポウイルスは 1 ロット (7.7%) 1 検体 (1.4%) 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 (表 1、2)。

2. ノロウイルスおよびサポウイルスの検出

ノロウイルスは、ロット別で生食用 7 ロット中 4 ロット (57.1%)、加熱用 6 ロット中 4 ロット (66.7%)、検体別では生食用 37 検体中 5 検体 (13.5%)、加熱用

35 検体中 16 検体 (45.7%) から検出された (表 3、4)。

3. 検出ウイルスの遺伝子型

ノロウイルス陽性となった 20 検体 24 株についてダイレクトシーケンスを実施した結果、21 株のノロウイルスが遺伝子型別された。検出数の多い順に GII.17 が 8 株 (38.1%)、GII.4_2012 変異株が 7 株 (33.3%)、GI.2 が 4 株 (19.0%) であった (表 5)。

サポウイルスは 1 株が遺伝子型別され、遺伝子型は GI.2 であった (表 5)。

D. 考察

市販カキ 13 ロット 72 検体中 8 ロット 20 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、ロット別では大きな差はないが、検体別すなわちカキ個体別では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ことを消費者に注

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 およびGII. 4_2012 変異株が多く検出された。このことは同海域周辺においてこれらの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. 2、GI. 4、GII. 14 およびサボウイルス 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

2014年2月および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 13 ロット中 72 検体中 8 ロ

ット 20 検体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高い傾向がみられた。

3. ノロウイルスの遺伝子型は、GII. 17 およびGII. 4_2012 変異株が多く検出された。

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 1 市販カキの食品媒介性ウイルス検査結果(ロット別)

ウイルス名	2014 年		2015 年		計	
	陽性数/ロット数	検出率	陽性数/ロット数	検出率	陽性数/ロット数	検出率
ノロウイルス	5/7	71.4%	3/6	50.0%	8/13	61.5%
サポウイルス	0/7	0.0%	1/6	16.7%	1/13	7.7%
A 型肝炎ウイルス	0/7	0.0%	0/6	0.0%	0/13	0.0%
E 型肝炎ウイルス	0/7	0.0%	0/6	0.0%	0/13	0.0%

表 2 市販カキの食品媒介性ウイルス検査結果(検体別)

ウイルス名	2014 年		2015 年		計	
	陽性数/検体数	検出率	陽性数/検体数	検出率	陽性数/検体数	検出率
ノロウイルス	12/48	25.0%	7/24	33.3%	20/72	27.8%
サポウイルス	0/48	0.0%	1/24	4.2%	1/72	1.4%
A 型肝炎ウイルス	0/48	0.0%	0/24	0.0%	0/72	0.0%
E 型肝炎ウイルス	0/48	0.0%	0/24	0.0%	0/72	0.0%

表 3 検出ウイルスの生食用・加熱用別検査結果(ロット別)

ウイルス名	区分	2014 年		2015 年		計	
		陽性数/ロット数	検出率	陽性数/ロット数	検出率	陽性数/ロット数	検出率
ノロウイルス	生食用	3/4	75.0%	1/3	33.3%	4/7	57.1%
	加熱用	2/3	66.7%	2/3	66.7%	4/6	66.7%
サポウイルス	生食用	0/4	0.0%	0/3	0.0%	0/7	0.0%
	加熱用	0/3	0.0%	1/3	33.3%	1/6	16.7%

表 4 検出ウイルスの生食用・加熱用別検査結果(検体別)

ウイルス名	区分	2014 年		2015 年		計	
		陽性数/検体数	検出率	陽性数/検体数	検出率	陽性数/検体数	検出率
ノロウイルス	生食用	4/26	15.4%	1/11	9.1%	5/37	13.5%
	加熱用	9/22	40.9%	7/13	53.8%	16/35	45.7%
サポウイルス	生食用	0/26	0.0%	0/11	0.0%	0/37	0.0%
	加熱用	0/22	0.0%	1/13	7.7%	1/35	2.9%

表 5 検出ウイルスの遺伝子型および年別検出数

ウイルス名	遺伝子群	遺伝子型	検出数	
			2014 年	2015 年
ノロウイルス	GI	GI.2		4
		GI.4	1	
		型別不能	3	
	GII	GII.4_2012 変異株	7	
		GII.14	1	
		GII.17		8
サポウイルス	GI	GI.2		1

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」

総合研究協力報告(平成 25～27 年度)

養殖カキおよび下水からのノロウイルス検出

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

2013 年 10 月～2014 年 2 月 (13/14 シーズン) 及び 2014 年 10 月～2015 年 2 月 (14/15 シーズン) の 2 期間に、岩手県内 A 湾産の養殖カキ 120 件および同湾に隣接する下水処理施設で採取した流入水・放流水計 40 件を対象に、ノロウイルス (NoV) 遺伝子の検出を試みた。その結果、13/14 シーズンは、放流水では 12 月に NoV が 2 件、カキでは 1～2 月に NoV が 6 件検出された。14/15 シーズンは、カキでは 1 月以降 NoV が 4 件検出されたが、放流水では 2 月に NoV 1 件のみの検出に留まった。放流水の NoV 遺伝子数は、流入水よりも総じて低い傾向にあった。放流水とカキの NoV 遺伝子型は複数検体で一致していた。養殖カキの垂下 10 m 層では 2 シーズンの合計 120 件中 1 件のみ NoV が検出されたが、2 m 層では同 8 件が検出され、浅い層が深い層より検出率が高い傾向を認めた。

A. 研究目的

カキのノロウイルス (NoV) 汚染の低減は、これを原因とする食中毒の発生を防止する上で重要であり、NoV の特性から、下水処理場の放流水はカキを汚染する原因の一つと推察される。今回、カキによる食中毒を防止する目的で、対象海域で養殖したカキの NoV 汚染状況と、同海域への下水処理場放流水に含まれる NoV 遺伝子数を経時的に調査し、同放流水とカキにおける NoV の量的関係を比較検討した。併せて NoV の処理実態を把

握するため、下水処理場の流入水についても同様に調査検討した。

B. 研究方法

1. 材料

2013 年 10 月～2014 年 2 月 (13/14 シーズン) 及び 2014 年 10 月～2015 年 2 月 (14/15 シーズン) の 2 期間に、対象海域へ放流された下水処理場 (対象人口: 8000 人、処理方法: 長時間エアレーション法) の放流水とその流入水 (以下「放流水等」) 並びに同海域の 1 地点で水深 2 m 層と 10

m層に垂下して実験的に養殖したカキを調査対象とした。カキは各層から3個ずつ毎月2回計120件を、放流水等は1.0Lを毎月2回計40件それぞれ採取し試験に供した。

2. 試料前処理方法

1) 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」に準じて実施した。

2) 放流水等は、12,000rpmで20分間遠心後、上清をpH3.5に調整、陰電荷フィルターでろ過した後フィルターを細切し、3%Beef extractに誘出させたものを濃縮検体とした。

3. ウイルス検出方法

カキおよび放流水等から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。ノロウイルス遺伝子の検出は、平成19年5月14日付け食安監発第0514004号厚生労働省通知に示すプライマーセットを用いNested PCRを行った。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. 放流水等およびカキからのウイルスの検出

13/14シーズンは、放流水では12月にGI、GIIともに2件ずつ検出され、1mLあ

たりのコピー数はおよそ150~200コピーであった(図1)。

流入水ではNoV GIが3件、GIIが6件検出され、1mLあたりのコピー数は130~およそ12000コピーと全体的に流入水の方が放流水よりも高い傾向がみられた(図1)。

カキでは、GIはすべて陰性、GIIで1~2月に2m層から5件、10m層から1件、計6件検出された。検出されたコピー数は、いずれも実測値で10コピー未満であった(図1)。

14/15シーズンは、流入水では10月に1件と12月以降5件からGI、GIIがそれぞれ検出されたが、放流水では2月にGIIが1件のみ検出された。1mLあたりのコピー数は流入水ではおよそ100から15000コピー、放流水では200コピーと、13/14シーズンと同様、全体的に流入水よりも低い傾向がみられた(図2)。

カキでは、GIは13/14シーズンと同様すべて陰性、GIIは1~2月に2m層から3件検出されたが、10m層はすべて陰性であった。検出されたコピー数は、実測値で41~170コピーであった(図2)。

2. 放流水およびカキから検出されたNoV遺伝子型

放流水とカキから検出されたNoV遺伝子型を比較した結果、13/14シーズンでは、GII.4_2012変異株が、14/15シーズンではGII.17が一致するなど、放流水とカキのNoV遺伝子型が複数の検体で一致していた(表)。

3. 養殖カキからのNoV検出

養殖カキの垂下10m層では2シーズンの合計120件中1件のみNoVが検出さ

れたが、2 m層では同 8 件が検出され、浅い層が深い層より検出率が高い傾向を認めた（図 1、図 2）。

D. 考察

今回の調査において下水処理場放流水とカキから同じ遺伝子型の NoV が検出されたことから、カキの汚染源の一つとして当該下水処理場からの放流水が関与していた可能性が考えられた。しかし、2 年間の限られた調査であり、更に詳細な汚染実態を把握するため、周辺河川等、他の様々な要因も含め網羅的に精査する必要がある。

放流水および流入水からの NoV 検出状況では、放流水の NoV 遺伝子数が、流入水よりも総じて低い傾向にあった。このことから、下水処理工程においてウイルスがある程度良好に除去されていることが推察された。

養殖カキの調査を実施したところ、深い層が浅い層より検出率が低い傾向を認めた。このことは、養殖カキの NoV 汚染低減手段の一つとして期待された。しかし検体数が少ないことから、今後も調査を継続し、カキへの NoV の蓄積状況を明

らかにしていく必要があると考える。

E. 結論

1. 下水処理場放流水とカキの NoV 汚染の関係が示唆された。
2. 下水処理工程において NoV がある程度良好に除去されていることが推察された。
3. 養殖カキの調査から、深い層が浅い層より検出率が低い傾向を認めた。

なお、本事業は農林水産省「消費・安全対策交付金」事業により、カキの垂下及び採材等を岩手県水産技術センターが実施し、詳細な遺伝子解析についてのみ本研究費で当センターが実施した。

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

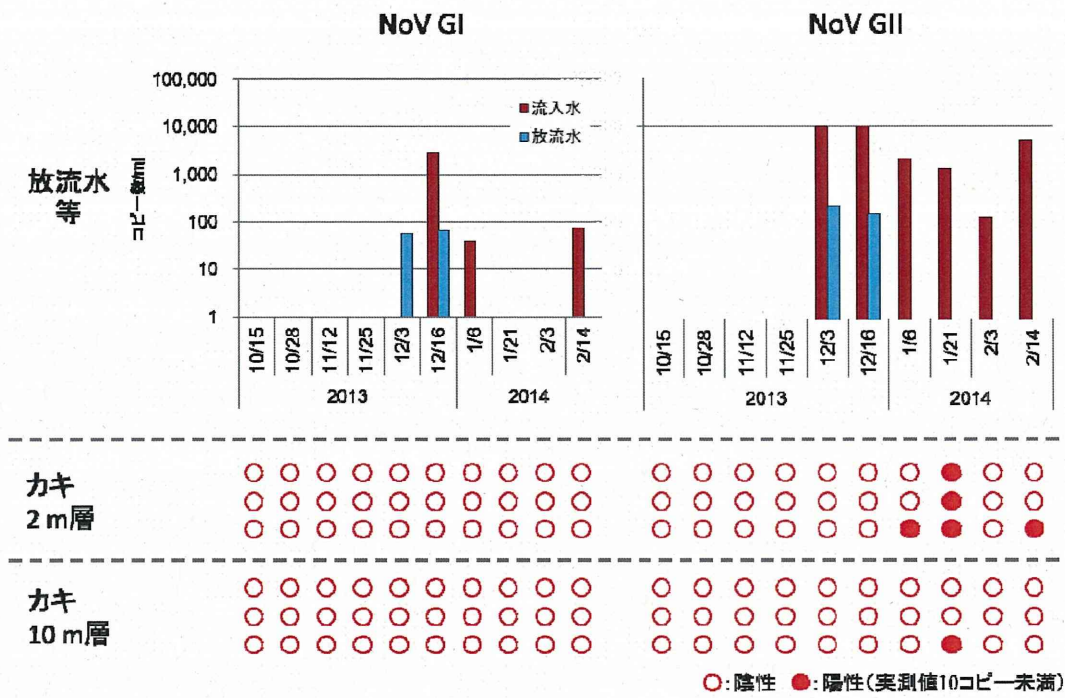


図1 放流水等・カキからのNoV検出結果(13/14シーズン)

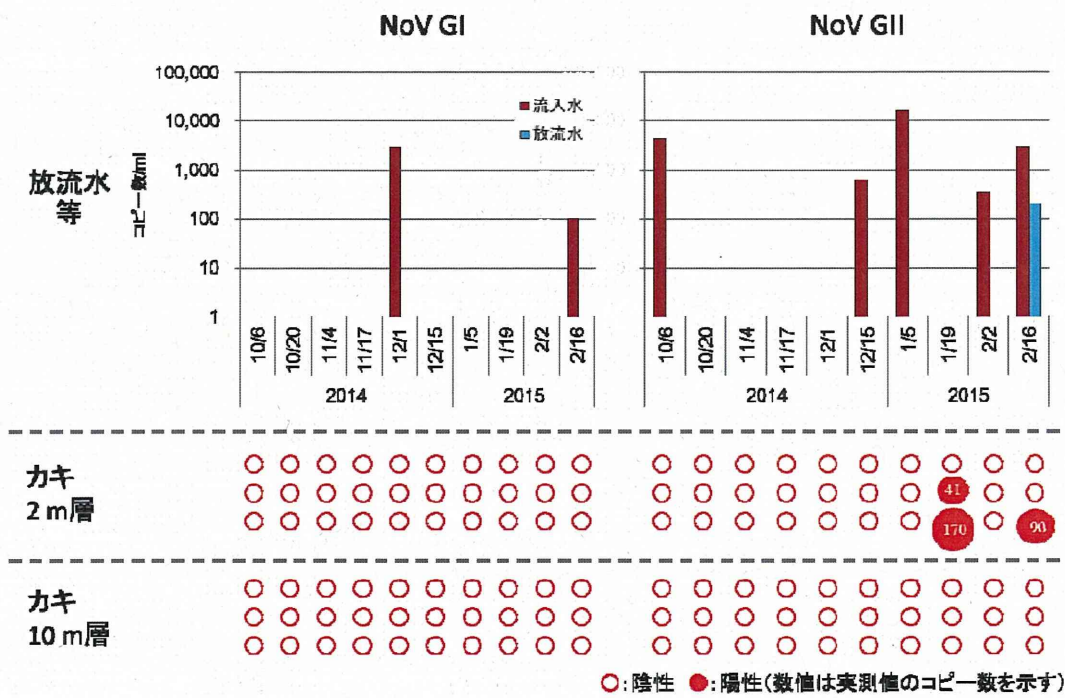


図2 放流水等・カキからのNoV検出結果(14/15シーズン)

表 放流水・カキ由来の NoV 遺伝子型

採取年月日	放流水	カキ(水深2 M)	カキ(水深10 M)
2013. 12. 3	GI.6 GII.4_2012	-	-
12. 16	GI.3 GII.4_2012	-	-
2014. 1. 6	-	GII(型別不能)	-
1. 21	-	GII.4_2012	GII.4_2012
2. 14	-	GII.14	-
2015. 1. 19	-	GII.6	-
2. 16	GII.17	GII.17	-

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」

総合研究協力報告(平成25~27年度)

Nested real-time PCR を用いた市販カキからのノロウイルス検出と カキの前処理の高感度化の検討

研究協力者	植木 洋	宮城県保健環境センター
	木村 俊介	宮城県保健環境センター
	田中 智之	堺市衛生研究所
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

平成23年11月から平成27年3月までに買い上げた市販カキ298ロット894個体を対象として通知法の定量PCR法によるノロウイルス(以下NoV)の検査を実施した結果、10コピー未満で増幅曲線が確認されたのは256個体(28.6%)であった。この256個体のうち、Nested real-time PCR法により73個体(28.5%)からNoV遺伝子が検出された。

また、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砕法の破砕条件やproteinaseK及び α -amylase(AM)の2種の酵素処理の有用性を検討した。その結果AM液を使用しカキ中腸腺を4500rpm、15秒で細胞破砕後、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

カキを対象としたNoVの定量PCR法による検査(食安監発第1105001号、以下通知法)においては、実測値が陽性基準(2well中2well共に10コピー以上)を満たさなくとも増幅曲線が確認されるケースがある。そこで、通知法における陽性基準の科学的妥当性を評価するために、検証を行った。

また、迅速なカキからのウイルス濃縮・抽出である細胞破砕法(以下破砕法)の高感度化を目的に破砕条件や酵素処理

の有用性を検証した。

B. 研究方法

1. 材料

平成23年11月から平成27年3月までに県内で買い上げた市販カキ(298ロット894個体)

2. 方法

材料について、通知法に基づいたReal-timePCR法でNoV遺伝子検出検査を実施した。そのうち、実測値が陽性基準(2well中2well共に10コピー以上)を満たして