

平成 28 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
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告書

秋田県における二枚貝からのノロウイルス・サポウイルスの検出と
感染性胃腸炎患者からのノロウイルス・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

2016 年に秋田県で流通した生食用カキおよび殻付き生アサリについて、ノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) の検出を行った。1 月に購入した生カキは、NoV GII が 3 海域から、NoV GI が 2 海域から検出され、遺伝子型は GII. 3、GII. 17、GI. 2、GI. 4 が確認された。パック充填の浮遊液については、1 海域から NoV GII. 17 が検出された。2 月に購入した生カキからは、NoV の GII. 4 Sydney 2012 亜型、GII. 17、GI. 2、GI. 4 が検出された。3 月に購入したアサリからは、NoV の GII. 6 と GI. 7 が検出された。1 月～3 月に購入した生カキおよびアサリの SaV は、不検出であった。10 月、11 月、12 月に購入した生カキについては、12 月購入分から NoV の GII. 2 と GII. 3 が検出された。同時期に購入したアサリについては、NoV の GII. 2 が 11 月購入分以降に確認され、NoV の GI. 7 が 12 月購入分より検出された。

2016 年の秋田県における食中毒事例 3 事例はすべてが NoV GII の感染であり、検出された遺伝子型は GII. 4 Sydney 2012 亜型と GII. 17 であった。集団感染事例において検出された NoV の遺伝子型は、GII. 2 が最も多く、その検出時期は 10 月～12 月であった。感染症発生動向調査においては、NoV GII. 4 Sydney 2012 亜型の検出が最も多かった。次いで多く確認された NoV GII. 2 の検出時期は、11 月～12 月であった。SaV は、GI. 1 と GII. 3 が散発的に検出された。

今回の結果から、秋田県で流通している二枚貝の NoV、SaV の汚染実態が明らかとなり、検出された遺伝子型は市中の流行状況に反映されているものと考えられた。

A. 研究目的

カキ等二枚貝の生食および加熱不十分な状態での喫食は、ノロウイルス等によ

るウイルス性胃腸炎を引き起こす原因と考えられている。今回、二枚貝の汚染状況を把握するため、秋田県内で流通して

いる生食用カキおよび殻付き生アサリ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、秋田県において2016年に感染性胃腸炎患者から検出されたNoV、SaVの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

① 2016年1月購入分

2016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3県4海域（ロット）を各2パックずつ用意し、カキの中腸腺2～4個分を1検体として、1パックにつき2～3検体（合計：22検体）の検出を行った。また、パックに充填されている浮遊液についてもロットごとにNoVのみ検出を行った。

② 2016年2月購入分

2016年2月22日に秋田市内で購入した国産の生カキを用いた。生食用1県1海域（ロット）を1パック用意し、カキの中腸腺1個分を1検体として、6検体の検出を行った。

③ 2016年10月、11月、12月購入分

2016年10月15日、11月25日、12月17日に秋田市内で購入した国産の生カキを用いた。10月、11月は生食用1県1海域（ロット）を1パック、12月は生食用2県2海域（ロット）を各1パックずつ用意し、カキの中腸腺2～4個分を1検体として、1パックにつき2～3検体（合計：11検体）についてNoVのみ検出を行った。なお、10月、11月、12月の1パックについては同じ業者で加工された同一海域の

カキを選択し、経時変化も確認した。

2) 市販殻付き生アサリ

①2016年3月購入分

2016年3月7日に秋田市内で購入した国産の殻付き生アサリを用いた。1県1海域（ロット）を1パック用意し、パックに入っていたアサリの中腸腺（40個分）を合わせ1検体としてNoVのみ検出を行った。また、アサリは検査実施まで冷凍にて保存していたが、解凍の際に得られた液（解凍液）についてもNoVの検出を行った。

②2016年10月、11月、12月購入分

2016年10月16日、11月25日、12月17日に秋田市内で購入した国産の殻付き生アサリを用いた。各月、1県1海域（ロット）を1パック用意し、パックに入っていたアサリの中腸腺（10月：26個分、11月：29個分、12月：24個分）を合わせて各月1検体ずつとし、NoVのみ検出を行った。なお、アサリはすべて同じ店舗にて、同一産地のものを購入し、経時変化も確認した。

3) 食中毒事例および集団感染事例

2016年1月～12月にウイルスが検出された食中毒事例3事例とNoV、SaVが検出された集団感染事例31事例を集計対象とした（中核市である秋田市分の事例は除く）。

4) 感染症発生動向調査

病原体定点医療機関において2016年1月～12月に小児科から採取された糞便検体310検体のうちNoV、SaVが検出された52検体を集計対象とした。

2. 方法

1) 市販生カキおよび殻付き生アサリ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。抽出時にはニッポンジーンの「DNaseI（RT Grade）」を用い、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 らの方法（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。GII.4 Sydney 2012 亜型については、日本遺伝子研究所の「ノロウイルス GII.4 Sydney 2012 変異株検出用プライマーセット」を使用し、判定した。

2) 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. 市販生カキおよび殻付き生アサリからのウイルス検出状況

1) 1 月購入分の市販生カキ（表 1）

3 海域から NoV GII が検出された。検出された NoV GII の遺伝子型は、GII.3 と GII.17 であった。また、NoV GI は 2 海域から検出されたが、そのうち 1 海域から検出された NoV GI については型別不能であった。確認された NoV GI の遺伝子型は GI.2 と GI.4 であった。SaV はすべての海域において不検出であった。浮遊液については、中腸腺からの検出率が高かった 1 海域から NoV GII が検出され、遺伝子型は GII.17 であった。

2) 2 月購入分の市販生カキ（表 2）

すべての検体から NoV GII が検出された。検出された NoV GII の遺伝子型は、GII.4 Sydney 2012 亜型と GII.17 であった。NoV GI は 5 検体から検出され、検出された NoV GI の遺伝子型は GI.2 と GI.4 であった。

3) 3 月購入分の殻付き生アサリ（表 3）

NoV の GII.6 と GI.7 が検出され、SaV は検出されなかった。解凍液の NoV は不検出であった。

4) 10 月、11 月、12 月購入分の市販生カキおよび殻付き生アサリ（表 4）

経時変化の確認を実施した 10 月、11 月、12 月の生カキ（同一 1 海域）については、12 月購入分から NoV GII.2 が検出された。また、12 月のみ購入の生カキ 1 海域からは、NoV GII.3 が検出された。NoV GI は不検出であった。経時変化の確認を実施した 10 月、11 月、12 月の殻付き生アサリについては、11 月、12 月購入分か

ら NoV GII.2 が検出され、また、12 月購入分からは NoV GI.7 も検出された。

2. 食中毒事例におけるウイルスの検出状況

食中毒事例の詳細について表 5 に示す。3 事例すべてが NoV GII の感染であり、遺伝子型は GII.4 Sydney 2012 亜型と GII.17 が確認された。3 事例中 1 事例は、GII.4 Sydney 2012 亜型と GII.17 が同時に検出された。

3. 集団感染事例における NoV 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 の遺伝子型について表 6 に示す。10 月以降、GII.2 の検出が増加し、19 例 (61.3%) と最も多かった。次いで、GII.17 が 7 例 (22.6%) で 1 月～5 月の検出であった。GII.4 Sydney 2012 亜型は 3 例 (9.7%) 確認され、GII.6 と GI.3 はそれぞれ 1 例 (3.2%) から検出された。2016 年の集団感染事例において SaV は検出されなかった。

4. 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 7、表 8 に示す。NoV は GII.4 Sydney 2012 亜型が 22 例 (46.8%) と最も多く、その検出時期は流行期である 1 月がピークとなっており、その後は散発的に確認された。また、GII.17 の 6 例 (12.8%) は、集団感染事例の検出状況と同様に 1 月～5 月の検出であり、GII.2 の 13 例 (27.7%) は 11 月以降に確認された。GII.3 は 4 例 (8.5%)、GI.2 は 2 例 (4.3%) で、いずれも散発的に検出された。SaV は検出数が

少なく、検出遺伝子型は GII.3 が 4 例 (80.0%)、GI.1 が 1 例 (20.0%) で散発的に認められた。

D. 考察

二枚貝による食中毒事例が多発していた 2014/2015 シーズン (平成 27 年度報告書参照) に比べ、2016 年は秋田県内において食中毒事例が大幅に減少した。しかしながら、1 月、2 月購入の市販生カキからは、2014/2015 シーズンに引き続き NoV GII.17 が多く検出され、また、カキの流通が増加する 1 月以降に感染症発生動向調査および食中毒・集団感染事例においても NoV GII.17 の検出数が多くなっている。昨年の調査と同様に、県内で流通した生カキの喫食により、NoV GII.17 の感染および不顕性感染が引き起こされ、感染の契機となっていた可能性も考えられた。今回、カキの浮遊液から NoV が検出されたことは、調理時における汚染拡大の原因となり得る危険性を示唆しており、注意喚起を促すひとつのデータとして重要な結果であると考えられる。市販殻付き生アサリからの NoV の検出は、アサリの加熱不足による喫食が、家庭内等での感染を引き起こし、そこから伝播する可能性も懸念されると思われた。アサリは本来、加熱することが前提の食材であるが、調理の方法によっては加熱不十分な状態で提供される可能性も考えられるため、注意が必要である。秋田県内で生カキが店頭に並び始めた 10 月以降のカキおよびアサリからは、NoV GII.2 と GII.3 が検出された。特に GII.2 は、2016/2017 シーズンに検出数が多くなっているとの

報告があり（病原微生物検出情報 Vol. 38 No. 1）、本県の感染症発生動向調査および集団感染事例においても10月以降に多く検出されている。購入した生カキおよび殻付き生アサリは秋田県が産地となっていないことから、海域周辺でも本県同様の時期に流行が始まったものと考えられる。また、2016年に秋田県内でNoV GII.2が検出された集団感染19事例は、すべて保育園および幼稚園での発生であった。免疫が未熟である低年齢層への感染拡大が懸念され、今後の動向に注視する必要があると考える。

E. 結論

市販生カキおよびアサリからのNoV、SaVの検出は、秋田県内におけるウイルスの侵淫状況に反映されているものと考えられ、検出される遺伝子型も市中の流行と相関するものと思われた。また、今回、検査を試みた生カキの浮遊液やアサリからのNoVの検出は、食品の取り扱いを考える上でも重要な結果であり、今後もデータを蓄積しながら、感染予防に向けての啓発や注意喚起に役立てていく必要性があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hiroko Sato, Chihiro Shibata, Wakako Akino, Hiroyuki Saito, Shihoko Saito, Naota Monma, Akira Toukairin, Mamoru Takahashi, Hiromi Fujita, Teruki Kadosaka, Nobuhiro Takada, Hiroki Kawabata and Shuji Ando: Survey of *Leptotrombidium akamushi* in Omono river

basin in Akita Prefecture, Japan in 2011 ~2014. *Med. Entomol. Zool.*, 67 (3), 167-175 (2016)

2. 学会発表

1) 斎藤博之、秋野和華子、野田衛：ノロウイルス遺伝子型別の効率化に関する検討、第37回日本食品微生物学会学術総会、2016、東京

2) 秋野和華子、斎藤博之、野田衛：市販生カキからのノロウイルス・サポウイルスの検出と秋田県内における流行状況の推移、第37回日本食品微生物学会学術総会、2016、東京

3) Hiroyuki Saito, Yuko Shimizu, Hiroko Sato, Wakako Akino, Satoshi Hayakawa and Hiroshi Usijima : Immunological response in a patient of norovirus GII.P17-GII.17 infection. 第64回日本ウイルス学会学術集会、2016、札幌

4) 斎藤博之、秋野和華子、野田衛：疫学的視点から見たノロウイルス GII.P17-GII.17 型の病原性に関する一考察、第112回日本食品衛生学会学術講演会、2016、函館

5) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、清水優子、早川智、牛島廣治：ノロウイルス GII.17 感染に伴う免疫応答と病原性に関する一考察、秋田応用生命科学研究会第28回講演会、2016、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（1月購入）

海域	No.	ノロウイルス		サポウイルス	浮遊液
		G II型	G I型		
A-21	①-1	GII.17	(-)	(-)	ノロウイルス GII.17
	①-2	GII.17	(-)	(-)	
	①-3	GII.17	GI.2	(-)	
	②-1	GII.17	検出	(-)	
	②-2	GII.17	(-)	(-)	
	②-3	GII.17	GI.4	(-)	
C-1	③-1	(-)	(-)	(-)	(-)
	③-2	(-)	GI.NA	(-)	
	④-1	(-)	(-)	(-)	
	④-2	(-)	(-)	(-)	
B-9	⑤-1	(-)	(-)	(-)	(-)
	⑤-2	GII.17	(-)	(-)	
	⑤-3	GII.17	(-)	(-)	
	⑥-1	(-)	(-)	(-)	
	⑥-2	(-)	(-)	(-)	
	⑥-3	(-)	(-)	(-)	
B-5	⑦-1	GII.17	(-)	(-)	(-)
	⑦-2	(-)	(-)	(-)	
	⑦-3	(-)	(-)	(-)	
	⑧-1	GII.3	(-)	(-)	
	⑧-2	GII.17	(-)	(-)	
	⑧-3	(-)	(-)	(-)	

表 2 市販生カキからのウイルス検出状況（2月購入）

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

* GII.4 : GII.4 Sydney 2012

表3 市販殻付き生アサリからのウイルス検出状況（3月購入）

海域	個数	ノロウイルス		サポウイルス	解凍液
		G II型	G I型		
K県	40	GII. 6	GI. 7	(-)	(-)

表4 市販生カキおよび殻付き生アサリからのウイルス検出状況（10月～12月購入）

購入月	検体名 海域	加工日	個数	ノロウイルス	
				G II型	G I型
10月	生カキ B-9	2016年10月14日	3	(-)	(-)
			3	(-)	(-)
	アサリ K県	2016年10月16日	26	(-)	(-)
11月	生カキ B-9	2016年11月24日	3	(-)	(-)
			3	(-)	(-)
			2	(-)	(-)
	アサリ K県	2016年11月25日	29	GII. 2	(-)
12月	生カキ B-9	2016年12月16日	3	(-)	(-)
			3	(-)	(-)
			2	GII. 2	(-)
	生カキ A-30	2016年12月16日	4	GII. 3	(-)
			4	GII. 3	(-)
			3	(-)	(-)
	アサリ K県	2016年12月17日	24	GII. 2	GI. 7

表5 秋田県における食中毒事例の詳細（2016年）

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
2016年1月8日	不明（提供した料理）	飲食店	GII. 4 Sydney 2012 GII. 17
2016年1月26日	不明（弁当）	仕出屋	GII. 4 Sydney 2012
2016年2月9日	不明（弁当）	飲食店	GII. 17

表6 集団感染事例において検出された NoV の遺伝子型 (2016 年)

	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	計
GII. 2										1	6	12	19
GII. 4 Sydney 2012		1		2									3
GII. 6						1							1
GII. 17	2		2	2	1								7
GI. 3					1								1
計	2	1	2	4	2	1	0	0	0	1	6	12	31

(株数)

表7 感染症発生動向調査において検出された NoV の遺伝子型 (2016 年)

	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	計
GII. 2											3	10	13
GII. 3	1	1					1				1		4
GII. 4 Sydney 2012	9	4	1	3	1	1			1			2	22
GII. 17	2	1	2		1								6
GI. 2							1		1				2
計	12	6	3	3	2	1	2	0	2	0	4	12	47

(株数)

表8 感染症発生動向調査において検出された SaV の遺伝子型 (2016 年)

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

(株数)