

平成 29 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

秋田県内で市販されている二枚貝からのノロウイルスの検出および  
2016/2017 シーズンのノロ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

秋田県内で流通している二枚貝について、ノロウイルス (NoV) の検出を行った。年間を通して市販されている生アサリからは、2016 年 11 月～2017 年 1 月および 2017 年 4 月購入分から GII.2 が検出され、定量値 (単位: コピー数/g 中腸腺) はいずれも  $10^2$  以上  $10^3$  未満であった。2017 年 10 月には GII.4 Sydney 2012 が検出されたが、定量値は得られなかった。2016 年 12 月、2017 年 1 月、4 月には GI.7 が検出され、定量値は  $10^1$  以上  $10^2$  未満であった。砂抜き液は不検出であった。パック入り生カキからは、2016 年 12 月～2017 年 3 月に GII が検出され、遺伝子型は GII.2、GII.3、GII.17 が確認された。定量値はいずれも  $10^2$  以上  $10^4$  未満であった。GI は 2017 年 1 月、2 月、4 月に検出され、遺伝子型は GI.2、GI.4 であった。いずれも低い定量値であった。パック充填の浮遊液は、2017 年 3 月の 1 検体から GII.17 が検出され、定量値 (単位: コピー数/mL) は 9.39 であった。2017 年 5 月に購入した県外産岩ガキからは、GII.4 Sydney 2012 が検出されたが、定量値は得られなかった。2017 年 6 月に購入した県内産岩ガキからは GII.17 が検出された。定量値は低く  $6.28 \times 10$  であった。

2016/2017 シーズンの秋田県における食中毒事例は、カキが推定原因食品であった 1 事例のみで NoV GII.2 が検出された。集団感染事例および感染症発生動向調査において検出された NoV の遺伝子型は、GII.2 が最も多く、検出のピークは 12 月であった。次いで検出が多かった GII.4 Sydney 2012 は 4 月以降に増加が認められた。

今回の結果から、秋田県で流通している二枚貝の NoV 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と相関するものと考えられた。

- A. 研究目的
- |                                      |
|--------------------------------------|
| 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 |
|--------------------------------------|
- カキ等二枚貝の生食および加熱不十分

考えられている。これまで冬季における二枚貝のウイルス汚染について検査を実施してきたが、今回は年間を通して秋田県内で市販されている二枚貝のノロウイルス (NoV) について検査を行い、その汚染状況を確認した。

また、秋田県において 2016/2017 シーズンに感染性胃腸炎患者から検出された NoV 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) 市販殻付き生アサリ

秋田市内で販売している国産 (2 都道府県 2 海域) の殻付き生アサリを用いた。同一産地のアサリを同一店舗から継続して購入し、ウイルス検出状況の推移を観察した。1 海域は年間を通して販売されており 2016 年 10 月～2017 年 11 月まで、他方の 1 海域は販売されていた 2017 年 4 月～7 月の検査を行った。両海域ともに、1 パックに入っているアサリの中腸腺をすべて合わせて 1 検体とした。また、2017 年 2 月以降のアサリについては、砂抜き (3%の食塩水で 6 時間程度) をした液の検査も実施した。

#### 2) 市販殻付き生ハマグリ

秋田市内で 2017 年 3 月と 10 月に販売していた中国産の殻付き生ハマグリについて検査を行った。アサリ同様、1 パックに入っているハマグリの中腸腺をすべて合わせて 1 検体とした。3 月のハマグリについては、砂抜きをした液の検査も実施した。

#### 3) パック入り市販生カキ

2016 年 10 月～2017 年 4 月に秋田市内

で購入した国産の生カキを用いた。2016 年 10 月～2017 年 3 月までは生食用 2 都道府県 6 海域 (ロット) を用意し、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: 28 検体) の検査を行った。4 月の生カキは中腸腺 1 個を 1 検体とし、5 検体の検査を行った。また、2017 年 1 月以降は、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検査を行った。

#### 4) 市販岩ガキ

##### ① 県外産殻付き岩ガキ

2017 年 5 月に秋田市内で購入した県外産 1 県 1 海域の岩ガキについて、中腸腺 1 個を 1 検体とし、2 検体の検査を行った。

##### ② 秋田県産殻付き岩ガキ

2017 年 6 月に秋田市内で購入した秋田県産 2 海域の岩ガキについて、中腸腺 1 個を 1 検体とし、1 海域につき 5 検体 (合計: 10 検体) の検査を行った。

#### 5) 食中毒事例および集団感染事例

2016/2017 シーズンに NoV が検出された食中毒事例 1 事例と集団感染事例 33 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)。

#### 6) 感染症発生動向調査

病原体定点医療機関において 2016/2017 シーズンに小児科から採取された糞便検体 253 検体のうち NoV が検出された 45 検体を集計対象とした。

## 2. 方法

### 1) 二枚貝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、Kojima らの方法 (J. Virol. Methods, 100, 107-114, 2002.) により NoV の 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、ダイレクトシークエンスにて塩基配列を決定した。

## 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、Kageyama らの方法 (J. Clin. Microbiol., 41, 1548-1557, 2003.) により NoV のリアルタイム 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、ダイレクトシークエ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. 二枚貝からの NoV 検出状況

#### 1) 市販殻付き生アサリ (表 1、表 2)

年間を通して市販されていた産地 K の生アサリからは、2016 年 11 月～2017 年 1 月および 4 月に GII. 2 が検出され、定量値 (単位: コピー数/g 中腸腺) はいずれも  $10^2$  以上  $10^3$  未満であった。2017 年 10 月には GII. 4 Sydney 2012 が検出されたが、極微量のため定量値は得られなかった。2016 年 12 月、2017 年 1 月、4 月には GI. 7 が検出され、定量値は  $10^1$  以上  $10^2$  未満であった。砂抜き液は、生アサリか

ら NoV が検出された 2 検体を含む 5 検体について検査を実施したが、いずれも不検出であった。2017 年 4 月～7 月に購入した産地 H の殻付き生アサリについては、すべての検体において不検出であった。

#### 2) 市販殻付き生ハマグリ (表 3)

2017 年 3 月と 10 月に購入した中国産生ハマグリにおいては、いずれも不検出であった。3 月には砂抜き液についても検査を行ったが不検出であった。

#### 3) パック入り市販生カキ (表 4、表 5)

検出された GII の遺伝子型は、海域 B の生カキから 2016 年 12 月～2017 年 3 月まで GII. 2 のみが検出され、定量値はいずれも  $10^2$  以上  $10^3$  未満であった。海域 A の生カキからは、2016 年 12 月に GII. 3 が検出され、2017 年 1 月、3 月には GII. 17、2 月には GII. 2、GII. 17 が検出された。定量値は  $10^2$  以上  $10^4$  未満であった。GI の遺伝子型は、2017 年 1 月に海域 A、B から GI. 2 が検出され、2017 年 2 月には海域 A から GI. 4 が検出された。また、中腸腺 1 個を 1 検体として検査を実施した海域 B における 4 月の生カキ 1 検体からは、GI. 2 が検出された。定量値は  $1.97 \sim 8.41 \times 10$  で、いずれも低い定量値であった。浮遊液は、3 月に購入した海域 A から GII. 17 が検出され、定量値 (単位: コピー数/mL) は 9.39 であった。

#### 4) 岩ガキ

##### ① 県外産殻付き岩ガキ (表 6)

2017 年 5 月に購入した県外産 (I 産) 岩ガキからは GII. 4 Sydney 2012 が検出されたが、定量値は得られなかった。

##### ② 秋田県産殻付き岩ガキ (表 7)

2017 年 6 月に購入した秋田県産殻付き

岩ガキからは GII. 17 が検出された。定量値は低く  $6.28 \times 10$  であった。

#### 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 8 に示す。2016/2017 シーズンは NoV が検出された 1 事例のみの発生で、カキが原因食品と推定された事例であった。検出遺伝子型は GII. 2 であった。

#### 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 9 に示す。2016 年 10 月以降、GII. 2 の検出が増加し、25 例 (71.4%) と最も多かった。次いで、GII. 4 Sydney 2012 が 7 例 (20.0%) で 2017 年 4 月以降に増加が見られた。GII. 6、GII. 17 と GI. 4 はそれぞれ 1 例 (2.9%) から検出された。GII. 6 が検出された 1 例および GI. 4 が検出された 1 例からは GII. 2 も同時に検出された。

#### 4. 感染症発生動向調査における NoV 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 の遺伝子型について表 10 に示す。GII. 2 が 26 例 (56.5%) と最も多く、その検出は 2016 年 11 月以降に増加しており、集団感染事例の検出状況と同様に 12 月がピークとなった。17 例 (37.0%) の検出があった GII. 4 Sydney 2012 は 2017 年 4 月以降に多く確認された。GII. 3、GI. 2 および GI. 7 はそれぞれ 1 例 (2.2%) が検出された。GI. 7 が検出された 1 例からは GII. 4 Sydney 2012 も同時に検出された。

## D. 考察

秋田市内で 2016 年 10 月～2017 年 5 月に購入した生カキから検出された GII. 2 と GII. 4 の遺伝子型は、本県における感染症発生動向調査および食中毒・集団感染事例からも同じ時期に確認されていた。これらのカキは県外産であり、カキの海域周辺でも本県同様の流行があったものと考えられた。一方、全国的に検出数が減少している GII. 17 (IASR\_HP: 月別ノロウイルス GII 遺伝子型検出報告状況) は、2017 年 1 月～3 月のパック入り生カキおよび 2017 年 6 月に購入した本県産の岩ガキから検出されている。これらの結果から、GII. 17 はカキとの関連性が強く、不顕性感染等により環境中で維持され続けている可能性が考えられた。定量値においては、胃腸炎に関連したカキの NoV 汚染量が  $10^3$  コピー数/g 程度であったとする報告がある (食品衛生学雑誌 2017 Vol. 58 No. 1)。2016 年 12 月～2017 年 3 月に検出された GII の定量値はすべて  $10^2$  以上であったこと、また、カキ 1 個当たりの中腸腺が 1～3g 程度であることから、それらの供試生カキは 1～数個の喫食で感染が成立するものと考えられた。秋田県産の岩ガキから検出された NoV の定量値は低く、自主検査では陰性と判断されるコピー数であり感染性は低いと考えられる。しかしながら、NoV の保有は感染の可能性を示唆する結果でもあり、今後とも注意が必要であると思われた。浮遊液は、今回も昨年と同一の海域から NoV が検出された。この結果は調理時汚染の可能性を示唆しており、引き続き啓発等に役立てていきたいと考えている。

一年を通して検査を実施した殻付き生アサリから検出された NoV の遺伝子型も生カキ同様に本県の流行状況とほぼ一致していた。アサリにおいても産地周辺で同様の流行があったものと考えられる。今回検査に使用したアサリの中腸腺は 1 個当たり 0.1~0.2g 程度であり、得られた定量値から単純に換算すると、アサリ 1 個の喫食では感染の可能性は低いと考えられる。しかし、料理によってはアサリ数十個が使用され、また、殻の開口を目安に調理を終了した場合には、加熱不十分な状態で食卓に提供されることも危惧される。生カキを契機とする NoV の感染は、近年の報道等によりその危険性が周知されつつある中、カキ以外の二枚貝における感染の可能性については認識が不足しているように思われる。今回の結果は注意喚起を促すデータとして重要であると考えられた。

## E. 結論

市販生カキおよび生アサリから検出された NoV の遺伝子型は、市中の流行と相関するものと考えられた。今回、秋田県産の岩ガキにおいて NoV が検出されたことから、今後は秋田県内の下水についても検査を実施し、岩ガキへの影響等を詳細に調査して行きたいと考えている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Hiroko Sato, Chihiro Shibata, Yoko Fujiya, Wakako Akino and Saito H: Epidemiology of scrub typhus in Akita Prefecture, 2007-2016. *Infectious*

*Agents Surveillance Report*, **38** (6), 5-6 (2017)

2) Hiroyuki Saito, Wakako Akino, Hiroko Sato, Yoko Fujiya, Chihiro Shibata, Ryoetsu Sato and Hiroyuki Shimizu: Isolation of enterovirus D68 using suckling mice. *Infectious Agents Surveillance Report*, **38** (10), 11-12 (2017)

### 2. 学会発表

1) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、清水優子、早川智、牛島廣治、野田衛: 生カキが原因でノロウイルスに感染した症例におけるノロウイルス排泄状況と抗体価の推移、第 29 回秋田応用生命科学研究会講演会、2017、秋田

2) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、清水優子、早川智、牛島廣治、野田衛: パンソルビン・トラップ法の捕捉抗体供給源としてのガンマグロブリンの再評価、第 38 回日本食品微生物学会学術総会、2017、徳島

3) 秋野和華子、斎藤博之、野田衛: 市販生カキにおけるノロウイルス汚染の定量的調査、第 38 回日本食品微生物学会学術総会、2017、徳島

4) Hiroyuki Saito, Yuko Shimizu, Hiroko Sato, Wakako Akino, Satoshi Hayakawa and Hiroshi Usijima : Immunological response in a patient of noroviruses infection associated with raw oyster. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017、大阪

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、野田衛: ノロウイルス GII.17 に対するパンソルビン・トラップ法の有効性に関する検討、第 113 回日本

食品衛生学会学術講演会、2017、東京

**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 市販殻付き生アサリからの NoV 検出状況 (産地 K)

シーズン	購入月	加工日	個数	ノロウイルス				砂抜き液
				G II		G I		
				遺伝子型	コピー数/g中腸腺	遺伝子型	コピー数/g中腸腺	
2016/17	10月	2016年10月16日	26	(-)	NT	(-)	NT	NT
	11月	2016年11月25日	29	GII. 2	627. 45	(-)	NT	NT
	12月	2016年12月17日	24	GII. 2	464. 31	GI. 7	38. 90	NT
	1月	2017年1月19日	20	GII. 2	981. 96	GI. 7	26. 10	NT
	2月	2017年2月13日	28	(-)	NT	(-)	NT	(-)
		2017年2月13日	29	(-)	NT	(-)	NT	(-)
	3月	2017年3月13日	31	(-)	NT	(-)	NT	(-)
	4月	2017年4月18日	21	GII. 2	445. 49	GI. 7	32. 94	(-)
	5月	2017年5月15日	25	(-)	NT	(-)	NT	NT
	6月	2017年6月14日	21	(-)	NT	(-)	NT	NT
	7月	2017年7月18日	25	(-)	NT	(-)	NT	NT
8月	2017年8月21日	29	(-)	NT	(-)	NT	NT	
2017/18	9月	2017年9月13日	24	(-)	NT	(-)	NT	NT
	10月	2017年10月18日	34	GII. 4*	0. 00	(-)	NT	(-)
	11月	2017年11月20日	27	(-)	NT	(-)	NT	NT

(-) : 不検出

\* GII. 4 : GII. 4 Sydney 2012

表 2 市販殻付き生アサリからの NoV 検出状況 (産地 H)

シーズン	購入月	加工日	個数	ノロウイルス				砂抜き液
				G II		G I		
				遺伝子型	コピー数/g中腸腺	遺伝子型	コピー数/g中腸腺	
2016/17	4月	2017年4月16日	13	(-)	NT	(-)	NT	NT
	5月	2017年5月15日	9	(-)	NT	(-)	NT	NT
	6月	2017年6月14日	11	(-)	NT	(-)	NT	NT
	7月	2017年7月17日	9	(-)	NT	(-)	NT	NT

表 3 市販殻付き生ハマグリからの NoV 検出状況 (中国産)

シーズン	購入月	加工日	個数	ノロウイルス				砂抜き液
				G II		G I		
				遺伝子型	コピー数/g中腸腺	遺伝子型	コピー数/g中腸腺	
2016/17	3月	2017年3月13日	9	(-)	NT	(-)	NT	(-)
2017/18	10月	2017年10月18日	6	(-)	NT	(-)	NT	NT

表4 パック入り市販生カキからのNoV検出状況(2016年10月~2017年3月)

シーズン	購入月	検体名 海域	加工日	個数	ノロウイルス				浮遊液 コピー数/mL
					G II		G I		
					遺伝子型	コピー数/g中腸腺	遺伝子型	コピー数/g中腸腺	
2016/17	10月	生カキ B-9	2016年10月14日	3	(-)	NT	(-)	(-)	NT
				3	(-)	NT	(-)	(-)	
	11月	生カキ B-9	2016年11月24日	3	(-)	NT	(-)	(-)	NT
				3	(-)	NT	(-)	(-)	
				2	(-)	NT	(-)	(-)	
	12月	生カキ B-9	2016年12月16日	3	(-)	NT	(-)	(-)	NT
				3	(-)	NT	(-)	(-)	
				2	GII. 2	426. 67	(-)	(-)	
		生カキ A-30	2016年12月16日	4	GII. 3	445. 49	(-)	(-)	NT
				4	GII. 3	173. 49	(-)	(-)	
	3			(-)	NT	(-)	(-)		
	1月	生カキ B-9	2017年1月26日	3	(-)	NT	(-)	(-)	(-)
				3	GII. 2	110. 27	(-)	(-)	
		生カキ B-9	未記入 消費期限：2017年1月31日	3	GII. 2	683. 92	GI. 2	0. 00	(-)
				2	GII. 2	887. 84	(-)	(-)	
		生カキ A-30	2017年1月27日	3	GII. 17	1446. 27	(-)	(-)	(-)
				3	GII. 17	1245. 59	GI. 2	12. 64	
	3			GII. 17	1712. 94	(-)	(-)		
	2月	生カキ B-9	未記入 消費期限：2017年3月2日	4	GII. 2	135. 22	(-)	(-)	(-)
				3	GII. 2	392. 16	(-)	(-)	
		生カキ A-30	2017年2月24日	3	GII. 17	1041. 57	GI. 4	1. 97	(-)
				3	GII. 2	674. 51	GI. 4	2. 32	
	2	GII. 17	743. 53	(-)	(-)				
	3月	生カキ B-6	未記入 消費期限：2017年3月20日	4	GII. 2	150. 90	(-)	(-)	(-)
4				GII. 2	283. 29	(-)	(-)		
生カキ A-21		2017年3月17日	3	GII. 17	577. 25	(-)	(-)	GII. 17 9. 39	
			2	(-)	NT	(-)	(-)		
			2	(-)	NT	(-)	(-)		

表5 パック入り市販生カキからのNoV検出状況(2017年4月)

シーズン	購入月	検体名 海域	加工日	個数	ノロウイルス				浮遊液
					G II		G I		
					遺伝子型	コピー数/g中腸腺	遺伝子型	コピー数/g中腸腺	
2016/17	4月	生カキ B-9	未記入 消費期限：2017年4月18日	1	(-)	NT	(-)	(-)	(-)
				1	(-)	NT	(-)	(-)	
				1	(-)	NT	GI. 2	84. 08	
				1	(-)	NT	(-)	(-)	
				1	(-)	NT	(-)	(-)	

表6 県外産市販殻付き岩ガキからのNoV検出状況(2017年5月)

シーズン	購入月	産地 検体名	加工日	個数	ノロウイルス			
					G II		G I	
					遺伝子型	コピー数/g中腸腺	遺伝子型	コピー数/g中腸腺
2016/17	5月	I産 岩ガキ	2017年5月14日	1	GII.4*	0.00	(-)	NT
				1	(-)	NT	(-)	NT

\* GII.4 : GII.4 Sydney 2012

表7 秋田県産市販殻付き岩ガキからのNoV検出状況(2017年6月)

シーズン	購入月	海域 検体名	加工日	個数	ノロウイルス			
					G II		G I	
					遺伝子型	コピー数/g中腸腺	遺伝子型	コピー数/g中腸腺
2016/17	6月	秋田県O産 岩ガキ	2017年6月8日	1	(-)	NT	(-)	NT
				1	(-)	NT	(-)	NT
				1	(-)	NT	(-)	NT
			2017年6月10日	1	(-)	NT	(-)	NT
				1	(-)	NT	(-)	NT
				1	(-)	NT	(-)	NT
		秋田県T産 岩ガキ	2017年6月9日	1	GII.17	62.75	(-)	NT
				1	(-)	NT	(-)	NT
				1	(-)	NT	(-)	NT
			2017年6月10日	1	(-)	NT	(-)	NT
1	(-)	NT		(-)	NT			

表8 秋田県における食中毒事例の詳細(2016/2017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
2017年1月15日	カキ酢(推定)	旅館	GII.2	照会事例:宮城県

表9 集団感染事例において検出されたNoVの遺伝子型(2016/2017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.2		1	6*1	12		4	1*2				1		25
GII.4 Sydney 2012								3	2	1	1		7
GII.6			1*1										1
GII.17										1			1
GI.4							1*2						1
計	0	1	7	12	0	4	2	3	2	2	2	0	35

(株数)

\*1: 11月の6事例中1事例よりGII.2とGII.6の2種類の遺伝子型を検出

\*2: 3月の1事例よりGII.2とGI.4の2種類の遺伝子型を検出

表 10 感染症発生動向調査において検出された NoV の遺伝子型 (2016/2017 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.2			3	10	6	1	3	2	1				26
GII.3			1										1
GII.4 Sydney 2012	1			2				2	4*	6	1	1	17
GI.2	1												1
GI.7									1*				1
計	2	0	4	12	6	1	3	4	6	6	1	1	46

(株数)

\* : 5月の5検体中1検体より GII.4 Sydney 2012 と GI.7 の2種類の遺伝子型を検出