

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

川崎市における二枚貝のノロウイルス検出状況

研究協力者	清水 智美	川崎市健康安全研究所
研究協力者	清水 英明	川崎市健康安全研究所
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

川崎市内の河川に生息する二枚貝及び市内で流通する二枚貝についてノロウイルス (NoV) 検査を行い、ヒトでの流行遺伝子型との関連性について調査した。平成 29 年 8 月及び 10 月に採取した河川のシジミから NoV GII. 2、GII. 4 及び GII. 17 が検出され、近年のヒトでの主流遺伝子型と一致することが確認された。一方 GI 群については、ここ数シーズンではヒトからほとんど検出されていないが、河川のシジミからは一定数の検出がみられた。平成 29 年 8 月、10 月及び 12 月に市内で購入した市販のシジミの NoV 保有率は 5.6%と比較的低かったものの、生食又は加熱不十分な状態で喫食することによって NoV に感染するリスクがあることが確認された。また、平成 29 年 10 月及び 12 月に市内で購入した市販の生食用生カキの 25.0%から遺伝子型別不能の GI が検出された。遺伝子型が割り当てられていないことから、報告数が稀な株であり、ヒトには感染しない又はヒトに対して病原性を持たないことが推測されるが、今後ヒトへの感染例が報告される可能性があるため、詳細に解析する必要があると考えられる。本研究は長期にわたり調査する必要があるため、今後も定期的に二枚貝を採取し、NoV の検査を継続して行い、データを蓄積することが重要であると考えられる。

A. 研究目的

ウイルス性食中毒は、ウイルスに汚染された食品を喫食することによって引き起こされる。ウイルスに汚染された河川水や海水をろ過し、中腸腺中にウイルスが蓄積・濃縮した二枚貝を、生食又は加熱不十分な状態で喫食することによる食中毒事例が、絶えず報告されている。

本研究は、二枚貝のノロウイルス (NoV) 保有率や保有遺伝子型の把握を目的とし、川崎市内の河川に生息する二枚貝及び市内で流通する二枚貝について NoV 検査を行った。また、ヒトでの流行遺伝子型と比較を行い、関連性について調査した。

B. 研究方法

1. 材料

(1) 市内の河川に生息するシジミ

平成 29 年 8 月及び 10 月に市内河川の干潟にて採取したシジミを材料とし、各月 12 検体ずつ NoV の検査を行った。

(2) 市内流通のシジミ

平成 29 年 8 月、10 月及び 12 月に 1 パックずつ購入したシジミを材料とし、1 パックにつき 12 検体の検査を行った。なお、10 月及び 12 月のシジミの産地は同一県であった。

(3) 市内流通の生食用及び加熱用生カキ

平成 29 年 10 月及び 12 月に 1 パックずつ購入した生食用及び加熱用生カキを材料とし、1 パックにつき 6 検体の検査を行った。なお、生食用の産地及び加熱用の産地はそれぞれ同一県であった。

(4) 市内における NoV 検出状況

平成 25 年 9 月から平成 30 年 1 月までの期間に当所において NoV 陽性となった食中毒及び感染症集団発生事例を対象とした (202 事例)。

2. 二枚貝からの NoV 検出

(1) 二枚貝からのウイルス濃縮

二枚貝 1 個体を 1 検体とした。食品のウイルス標準試験法検討委員会「二枚貝(カキ)からのウイルスの濃縮法(ポリエチレングリコールによる濃縮法)」を参考に、二枚貝の中腸腺を取り出し、9 倍量の α -アミラーゼ(和光純薬)/PBS 液 (2.8 mg/mL) を加えて 10%乳剤を作製した。15 分ごとに攪拌しながら 37°C の恒温器中で 1 時間静置したのち、10,000 rpm、20 分間冷却遠心した。その後は、厚生労働省通

知法「貝の中腸腺を用いる方法(ポリエチレングリコールによる濃縮方法)」に準じ、遠心上清にポリエチレングリコール 6,000 を 8%、NaCl を 2.1 g/100 mL になるように加えて軽く攪拌し、4°C の冷蔵庫に一晩静置し、10,000 rpm、20 分間冷却遠心した沈渣を 300 μ L の DDW で再浮遊させ濃縮した。

(2) NoV の検査

QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、Recombinant DNase I (TaKaRa) を用いて DNase 処理を行い、PrimeScript® II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) を用いた逆転写反応によって cDNA を合成した。Capsid N/S 領域について semi nested PCR (1st: COG1F/G1SKR, COG2F/G2SKR, semi nested: G1SKF/G1SKR, G2SKF/G2SKR) を行い、陽性となった検体はダイレクトシーケンスによって塩基配列を解読し、Norovirus Genotyping Tool (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) を用いて遺伝子型を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施については、当所倫理審査委員会にて承認済みである(承認番号: 29-4)。

C. 研究結果

1. 河川のシジミの NoV 保有状況

24 検体中 6 検体から NoV が検出された(保有率 25.0%)。8 月に採取したシジミのうち 1 検体からは GI.3 と GII.17 が混合で検出され、2 検体からは GII.4 が検出

された。10月採取のシジミからは、GI. 3、GII. 2 及び GII. 4 が 1 検体ずつ検出された（表 1）。

2. 市販のシジミの NoV 保有状況

36 検体中 2 検体から NoV が検出された（保有率 5.6%）。2 検体ともに 12 月購入のシジミであり、遺伝子型は GII. 17 であった。8 月及び 10 月購入のシジミからは NoV が検出されなかった（表 2）。

3. 市販の生食用生カキの NoV 保有状況

12 検体中 4 検体から NoV が検出された（保有率 33.3%）。10 月購入の 2 検体及び 12 月購入の 1 検体から、塩基配列がほぼ一致する GI が検出されたが、既知の遺伝子型に分類されなかった。また、12 月購入の 1 検体から GII. 17 が検出された（表 3）。

4. 市販の加熱用生カキの NoV 保有状況

加熱用生カキから NoV は検出されなかった（保有率 0.0%）（表 4）。

5. 市内における NoV 検出状況

2013/14 シーズンの主流遺伝子型は GII. 4(51.0%) 及び GII. 6(27.5%)、2014/15 及び 2015/16 シーズンでは GII. 4(34.3%, 24.4%) 及び GII. 17(23.9%, 34.1%) が主流であった。2016/17 においては GII. 2 が 60.7% を占め、2017/18 シーズンは 1 月までの時点で GII. 2(60.0%) が優勢であった（図 1）。

D. 考察

河川のシジミから NoV GII. 2、GII. 4 及び GII. 17 が検出され、近年のヒトでの主流遺伝子型と一致することが確認された。一方 GI 群については、24 検体中 2 検体（8.3%）で検出がみられた。検出された遺

伝子型は 2 検体ともに GI. 3 であった。NoV GI は当市においてここ数年シーズンではヒトからほとんど検出されていない。2015 年夏期にヒトから複数の GI. 3 が検出されたが、今回シジミから検出された GI. 3 とは塩基配列が明らかに異なっていた（未公開データ）。そのため、当所では把握していない NoV GI. 3 患者の発生又は不顕性感染の可能性等が推測される。

市販のシジミの NoV 保有率は 5.6% と比較的良かったものの、生食又は加熱不十分な状態で喫食することによって NoV に感染するリスクがあることが確認された。シジミは加熱して喫食することがほとんどであるが、十分な加熱を施さない調理方法もあるため、注意が必要である。

市販の生食用生カキの 25.0% から遺伝子型別不能の GI が検出された。遺伝子型が割り当てられていないことから、報告数が稀な株であり、ヒトには感染しない又はヒトに対して病原性を持たないことが推測される。しかしながら今後ヒトへの感染例が報告される可能性があるため、詳細に解析する必要があると考えられる。

本研究は長期にわたり調査する必要があるため、今後も定期的に二枚貝を採取し、NoV の検査を継続して行い、データを蓄積することが重要であると考えられる。

E. 結論

- ・河川のシジミから、近年のヒトでの主流遺伝子型である GII. 2、GII. 4 及び GII. 17 が検出された。
- ・GI はヒトからの検出が少ないが、河川のシジミからは一定数の検出がみられた。

- 市販のシジミの NoV 保有率は 5.6%と比較的低かったものの、生食又は加熱不十分な状態で喫食することによって NoV に感染するリスクがあることが確認された。
- 生食用生カキから遺伝子型別不能の GI が検出された。
- 今後も定期的に二枚貝を採取し、データを蓄積する必要がある。

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 河川のシジミにおける NoV 保有状況

採取月	検体数	陽性数	陽性率	遺伝子型
8月	12	3	25.0%	GI.3 と GII.17 (混合) GII.4 GII.4
10月	12	3	25.0%	GI.3 GII.2 GII.4
total	24	6	25.0%	

表2 市販のシジミにおける NoV 保有状況

採取月	検体数	陽性数	陽性率	遺伝子型
8月	12	0	0.0%	
10月	12	0	0.0%	
12月	12	2	16.7%	GII.17 GII.17
total	36	2	5.6%	

表3 市販の生食用生カキにおける NoV 保有状況

採取月	検体数	陽性数	陽性率	遺伝子型
10月	6	2	33.3%	GI 型不明 GI 型不明
12月	6	2	33.3%	GI 型不明 GII.17
total	12	4	33.3%	

表 4 市販の加熱用生カキにおける NoV 保有状況

採取月	検体数	陽性数	陽性率	遺伝子型
10月	6	0	0.0%	
12月	6	0	0.0%	
total	12	0	0.0%	

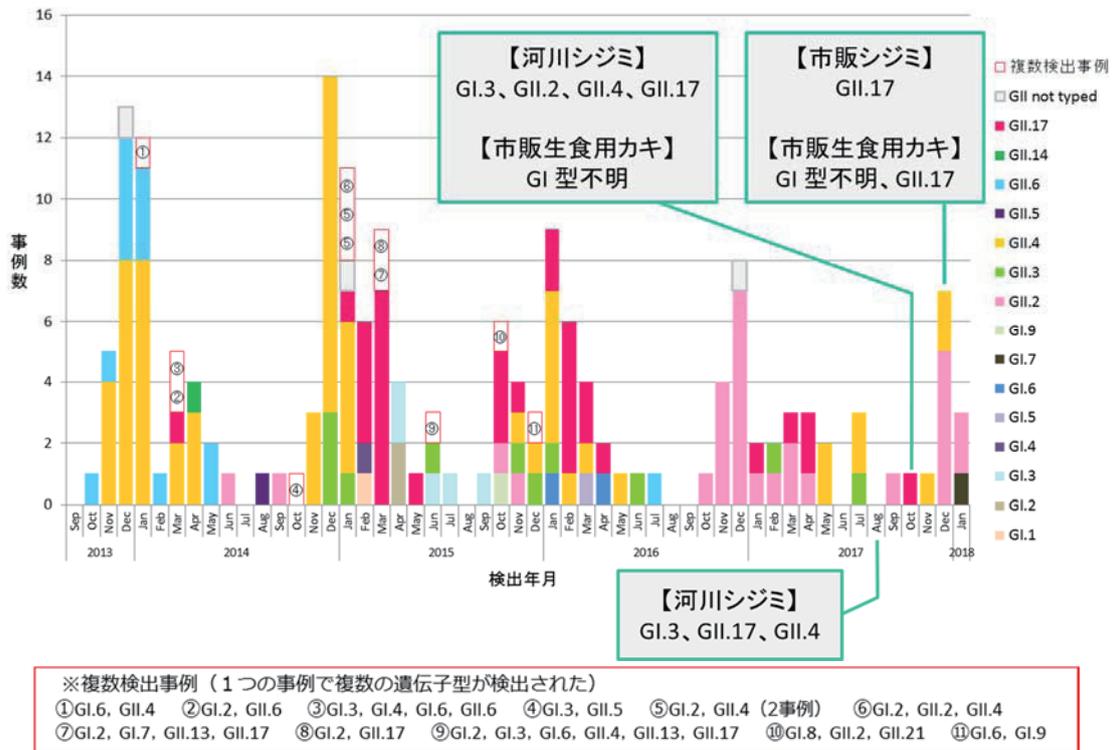


図 1 市内における NoV 検出状況 (2013. 9～2018. 1)