

市販カキにおけるノロウイルスの定量的汚染調査

野田 衛 西尾 治* 秋山 美穂* 国井 悦子
藤井 彰人 池田 義文 平崎 和孝 荻野 武雄

2002年12月から2003年2月に採取した市販カキのノロウイルス(NV)汚染状況を遺伝子1群NV(G1)および遺伝子2群NV(G2)特異的定量PCR法で調べた。供試41ロット123検体のうち、21ロット(51.2%)、34検体(27.6%)から100コピー/個以上のNV遺伝子が検出され、そのうち7ロット(17.1%)、8検体(6.5%)は1000コピー/個以上のNV遺伝子が検出された。生食用カキは加熱調理用カキと比較し、NV汚染率、NV汚染量とも少ない傾向を示したが、明瞭な違いは認められなかった。カキにおけるG1およびG2検出の有無およびそれぞれの定量値に関連性が認められた。NV汚染率およびNV汚染量に経時変化が観察された。同一ロットに含まれるカキのNV汚染レベルは約半数のロットで 10^2 オーダー以上の差が認められた。胃腸炎集団発生に関連したカキのNV汚染量は市販カキのNV汚染レベルの範囲内であった。

キーワード： ノロウイルス，市販カキ，定量PCR法

はじめに

近年ノロウイルス(NV, ノーウォーク様ウイルス)による食品媒介性胃腸炎集団発生が多発し、社会問題となっている¹⁾⁻⁵⁾。その原因食品として最も重要とされているカキは、現在養殖海域の細菌学的基準に基づき、生食用と加熱調理用に区分され販売されているが、両者のウイルス学的安全性については比較検討されていない。一方、近年従来の定性的なPCR法に代わり定量的に検出できるいわゆるreal-time PCR法が一般化され、カキからのNV検出にも応用されつつある⁴⁾⁻⁶⁾。今回我々は、カキによる健康被害発生防止のためのリスク・アナリシスの一助とするため、市場に流通する生食用および加熱調理用カキについてNV汚染状況を定量的に調査し、両者を比較した。さらに、同一ロットに含まれる各カキのNV汚染量の個体差の把握および胃腸炎集団発生に関連するカキとの汚染量の比較を行ったので合わせて報告する。

方 法

1 材料

2002年12月から2003年2月に2食料品店(3製造業者)で購入した生食用カキ24ロット(包装パック)72検体、加熱調理用カキ17ロット51検体、計41ロット123検体(1ロットにつき3個)お

よび胃腸炎集団発生4事例に関連したカキ6検体について検査を行った。

2 カキ中腸腺からのウイルスの濃縮

カキからのウイルスの濃縮は杉枝ら⁷⁾の方法および厚生労働省通知に従い実施した。すなわち、カキから中腸腺部分を切出し、PBS(-)で10%乳剤にした後、10,000rpm, 30分粗遠心を行い、その上清を40%ショ糖液に重層し27,000rpm, 180分超遠心分離した。沈渣を遺伝子解析用蒸留水100 μ lに再浮遊したものを濃縮材料とした。

3 濃縮材料からのウイルスRNA抽出とcDNA合成

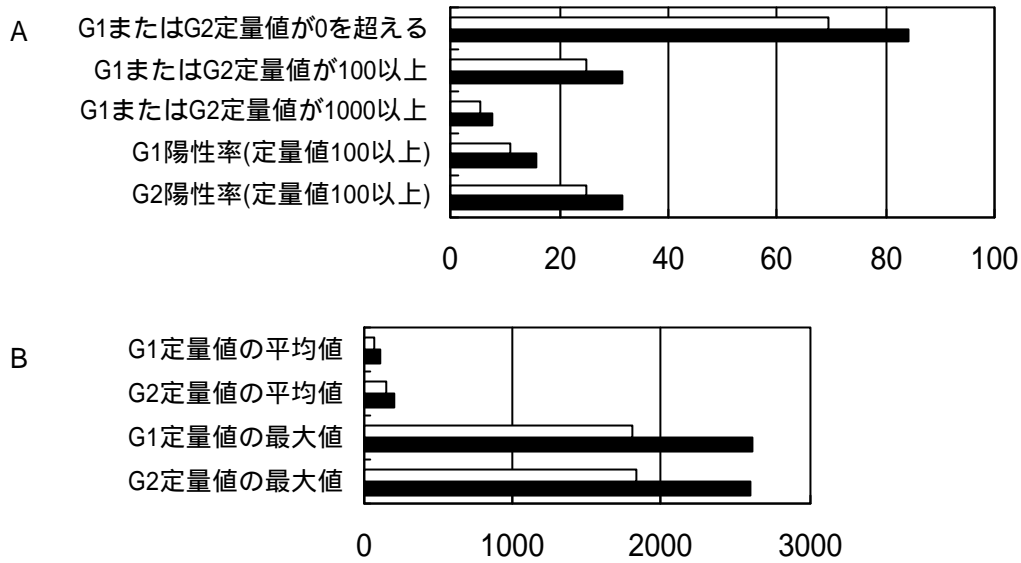
濃縮材料からのウイルスRNA抽出は、全量を抽出材料としQIAamp Viral RNA Mini Kit(Quiagen)を用い、説明書に従い実施した⁵⁾。抽出RNAは30 μ lの溶出液に回収した。回収RNA全量をDNase処理した後、ランダムヘキサマー(Amersham Pharmacia)およびSuperscript(GibcoBRL)を用いcDNAを合成した。

4 NV検出定量PCR

NV検出定量PCRは、Kageyamaら⁸⁾の方法によるreal-time PCRでNV遺伝子1群(G1)およびNV遺伝子2群(G2)に属するウイルスをそれぞれ特異的に増幅し、検出・定量した。ウイルスRNA定量値(コピー数)は全てカキ中腸腺1個当たりのコピー数に換算して示した。

5 RT-PCR およびカプシド領域の塩基配列決定

*：国立感染症研究所



は生食用カキ， は加熱調理用カキ。A: ノロウイルス定量値分布の比較。単位は%。B: ノロウイルス定量値の平均値および最大値の比較。単位はカキ中腸腺1個当りのコピー数。

図1 生食用カキと加熱調理用カキとのノロウイルス汚染状況の比較

逆転写二段階遺伝子増幅法 (RT-PCR) は ORF2 を増幅する G1 および G2 特異的プライマー(G1: COG1F/G1SKR G1SKF/R, G2: COG2F/G2SK R G2SKF/R)を用い, 既報に準じた PCR 反応条件で実施した⁹⁾。塩基配列は PCR 産物からダイデオキシ法により直接決定し, UPGMA 法で進化系統樹を作成した。

6 供試カキ残品喫食による胃腸炎発症調査

全ての供試ロットのカキ残品を通常の調理法でカキフライに調理後喫食し, 発症の有無を調査した。

結 果

1 市販カキの NV 汚染状況

市販カキ 41 ロットのうち, G1 および G2 に対し 3 個とも 0 を示したのは 4 ロット (9.8%) で, 他の 37 ロット (90.2%) は 3 個のカキのいずれかが G1 あるいは G2 に対し 6.6 以上の値を示した。カキ個体別にみると, G1 および G2 ともに 0 を示した個体は 123 検体中 30 検体 (24.4%) で, 他の 93 検体 (75.6%) は G1 あるいは G2 に対し 0.085 以上の値を示した。そのうち 100 以上を示したのは 21 ロット (51.2%), 34 (27.6%) 検体, 1000 以上は 7 ロット (17.1%), 8 検体 (6.5%) であった。全てのロットのカキ残品をカキフライに調理し 1 家族 3 名で喫食したが, 下痢, 嘔吐, 発熱等の症状を呈することはなかった。

2 生食用カキと加熱調理用カキとの NV 汚染状況の比較

G1 および G2 定量値がともに 0 を示したのは生食用カキが 22 検体 (30.6%), 加熱調理用カキが 8 検体 (15.7%) であった。一方, G1 または G2 定量値のいずれかが 0 を越えたのは生食用カキが 50 検体 (69.4%), 加熱調理用カキが 43 検体 (84.3%) で, そのうち 100 以上を示したのは生食用カキが 18 検体 (25.0%), 加熱調理用カキが 16 検体 (31.4%), 1000 以上は生食用カキが 4 検体 (5.6%), 加熱調理用カキが 4 検体 (7.8%) であった (図 1)。また, それぞれから検出した G1 あるいは G2 定量値の平均値および最大値はすべて加熱調理用カキが高い値を示した。

生食用カキおよび加熱調理用カキとも 12 月前半からすでに NV が検出された (図 2)。NV 定量値の平均値および最大値並びに定量値 100 以上を陽性とした場合の陽性率をみると, 加熱調理用カキは 12 月後半, 生食用カキは 1 月前半が汚染量のピークとなり, 両者に明瞭な時期的な違いが認められた。ピーク時以降減少傾向を示し, 2 月前半まで検出された。1 月後半採取の加熱調理用カキ 9 検体はすべて 1 以上の値を示した。

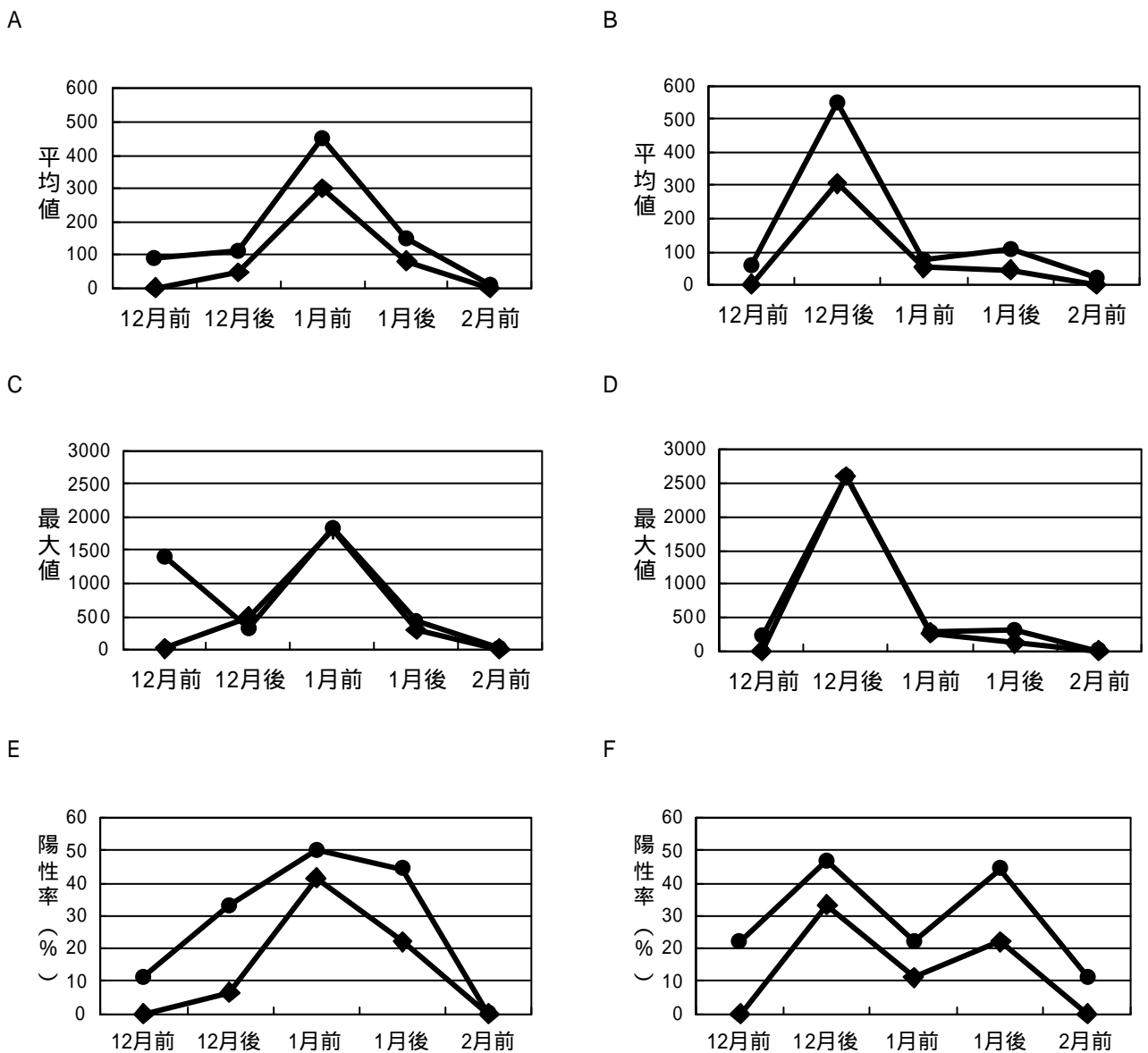
3 同一ロット中の各カキの NV 定量値分布

同一ロット中の各カキの定量値を 0 (定量値 1 未満), 10^0 ($1 < 10$), 10^1 ($10 < 100$), 10^2 ($100 < 1000$), 10^3 ($1000 \sim$) の 5 レベルに区分し, その分布を調べ

た。G1 あるいは G2 定量値が 3 個とも同じレベルであったのは延 82 ロット中 19 ロット (23.2%) , 1 個のレベルが異なるのは 39 ロット (47.6%) , 3 個ともレベルが異なるのは 24 ロット (29.3%) であった (表 1)。最大値と最小値との差が 10^1 オーダー以内であったのは 42 ロット (51.2%) , 10^2 オーダー以上は 40 ロット (48.8%) で , そのうち 16 ロット (19.5%) は 10^3 オーダーの差が認められた。1000 以上の NV に汚染したカキが含まれていた 9 ロットのうち , 5 ロットは NV 定量値 0 のカキも含まれていた。

4 同一カキ中の G1 定量値と G2 定量値の相関性
 同一カキ個体における G1 定量値と G2 定量値は , G1 陰性 (0 コピー/個) G2 陰性 , G1 陽性 (0 コピー/個以外) G2 陰性 , G1 陰性 G2 陽性 , G1 陽性 G2 陽性の 4 群に大別され , G1 と G2 が陽性の検体では G1 定量値が高くなると G2 定量値も高くなる傾向を示した (図 3)。相関係数は全体 (N=123) で $r=0.78$, G1 と G2 が陽性の検体 (N=67) で $r=0.77$ であった。

5 胃腸炎集団発生関連カキの NV 検査結果
 胃腸炎集団発生 4 事例に関連したカキ 6 検体のうち 6 検体すべてから G2 が , 3 検体から G1 が検



A, C, E は生食用カキ , B, D, F は加熱調理用カキ。● は G1 , ◆ は G2。A, B は各月ごとの NV 定量値の平均値 , C, D は各月ごとの NV 定量値の最大値 , E, F は定量値 100 コピー/個以上を陽性とした場合の陽性率を示す。定量値の単位はすべてカキ中腸腺 1 個当りのコピー数。

図 2 市販カキの月別ノロウイルス汚染状況

表1 同一ロットに含まれる各カキのNV 定量値分布

同一ロットのカキの NV定量値	延ロット数 (%)	延ロット数	NV定量値(カキ中腸腺1個当たりのコピー数)が 各区分内の値を示したカキ個体数						
			0	0<~<1	1~<10	10~<100	100~ <1000	1000~	
3個とも同じレベル	19 (23.2)	13 6	3				3		
1個が異なるレベル	39 (47.6)	1 5 1 4 7 4 1 2 1 1 1 5 4 1 1	2 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1	1 2 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1		2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1		2 2 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	2 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
3個とも異なるレベル	24 (29.3)	3 3 1 3 4 1 3 2 2 2	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1		1 1 1 1 1 1 1 1 1 1		1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1

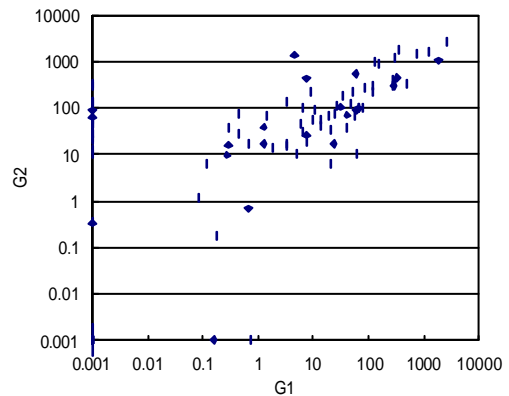
ロット数はG1及びG2各41ロットの合計(延82ロット)の集計。

出された。その定量値はG2が209.6~1777.9,G1が1.2~19.5であった。この値は、市販カキと比較し、G1は平均値より低く、G2はほぼ平均値程度のものから、高いものでも生食用カキの最大値よりは低く、すべて市販カキの汚染レベルの範囲内にあった(図4)。一方、これらの事例のうち、事例1の患者からはG2が検出されたが、事例2と事例4の患者からはG1が検出された。RT-PCRでは事例2の原因食と推定されたカキからG1(Southampton類似株)が検出されたが、定量PCRでのG1定量値は極めて低い値(1.2コピー/個)であった。

考 察

市販カキ41ロット123検体についてNV汚染状況を調査した結果、汚染がほぼないと考えられるもの(定量値0)は4ロット(9.8%)、30検体(24.4%)、逆に汚染がほぼ確実と考えられるもの

(定量値100以上)は21ロット(51.2%)、34検体(27.6%)、高濃度のNV汚染が考えられるもの(定量値1000以上)は7ロット(17.1%)、8検体(6.5%)であり、市販カキの多くがNVに汚染して



全体(N=123)の相関係数は r=0.78。

G1とG2が陽性の検体(N=67)の相関係数は r=0.77。

図3 カキにおけるG1定量値とG2定量値の相関

いることが明らかになった。これまでのカキのNV汚染調査結果^{4)-6),10)-12)}と比較すると、今回の結果は高いNV汚染率を示したが、この原因はプライマーを含めた検査法による検出感度の違い、検査対象に加熱調理用カキが含まれていることなどが考えられる。

生食用カキと加熱調理用カキのNV汚染状況を比較した結果、汚染率、汚染量などいずれの比較項目においても生食用カキのNV汚染が少ない傾向を示したものの、明らかに汚染程度が少ないと結論できる違いは認められなかった。このことは、生食用カキは非加熱での喫食を許可していることから、NV感染による健康被害発生の危険度はむしろ生食用カキが高いことを示唆している。両者の汚染時期のピークに差が認められたのは、養殖海域での汚染時期の違い(データ示さず)によると考えられた。

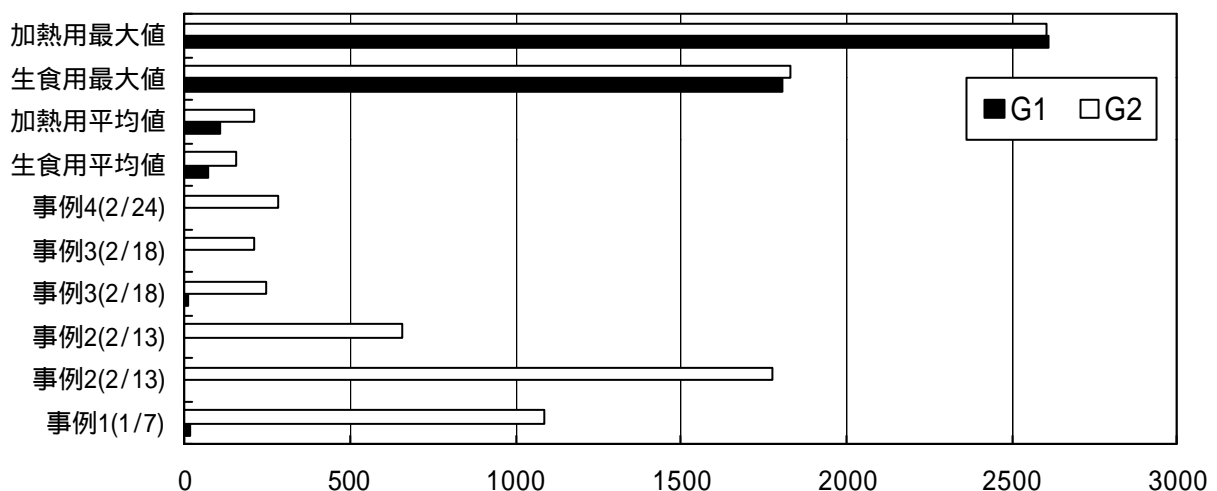
同一ロットのカキ3個におけるNV定量値分布を調べた結果、それぞれのカキのNV定量値に 10^1 オーダー以上の差が75%に、 10^2 オーダー以上の差が約半数に認められ、さらに1000以上のNV汚染カキが含まれていた9ロットのうち、5ロットはNV定量値0のカキも含まれており、同一ロット内のカキのNV量に個体差があることが明らかになった。このことは、市販カキのNV汚染調査あるいは集団胃腸炎発生時の食品検査において複数のカキ個体について検査を行う必要があることを示すとともに、胃腸炎集団発生において、カキを喫食しているにもかかわらず発症しない例が

あることの宿主以外の要因の一つと考えられる。

胃腸炎集団発生関連カキ6検体のうち6検体すべてからG2が、3検体からG1が検出されたが、その汚染量は市販カキの汚染レベルの範囲内にあり、特に高い値ではなかった。一方、今回検査した市販カキの残品にもほぼ同程度のNV汚染があると考えられるが、すべてのロットの残品をカキフライに調理し1家族3名で喫食した結果、下痢、嘔吐、発熱等の症状を呈することはなかった。以上のことは、NVに汚染している場合でも適切に加熱調理して喫食すればNV感染の多くは防止できること、逆に市販カキの多くは未加熱あるいは加熱不足で喫食した場合、胃腸炎を発症する危険性があることを示唆している。

胃腸炎集団発生に関連したカキ1検体からRT-PCRでG1(Southampton類似株)が検出されたが、定量PCRによるG1定量値は1.2コピー/個と極めて低値を示した。同時期に別のカキから本例と同じ塩基配列を示す株が検出されており(未発表データ)、そのG1定量値も0.9コピー/個と極めて低値であった。これらの結果は、それらのNV株は今回定量PCRで使用したプライマーで検出困難な株の可能性があること、さらにそのような株の場合定量値が実際の汚染量と乖離する可能性があることを示唆しており、詳細な検討が必要である。

定量PCRでPCR反応系当たり10コピー以下の低定量値の場合、結果の再現性に問題があることが指摘されている⁵⁾。しかし、月別NV検出状況



単位はカキ中腸腺1個の当りのコピー数。

図4 胃腸炎集団発生関連カキのノロウイルス定量値

をみると(図2),NV 汚染が低い時期で低値を示す検体が多く, NV 汚染が高まるとその割合が低下する傾向が認められ, 低定量値は少ないウイルス量を反映しているものと思われた。このことから, 定量 PCR で低値を示した場合, 個別の検査結果については, 慎重に取り扱う必要があるものの, 疫学的にはその定量値は意義を持つと考えられ, さらなるデータの蓄積が必要である。

本研究の一部は平成 14 年度厚生科学研究費生活総合研究事業「食品の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究」として行われた。

文 献

- 1) 食品媒介性ウイルス性胃腸炎集団発生実態調査研究班:最近5年間の食品媒介ウイルス性胃腸炎手段発生全国実態調査総合報告書(1995)
- 2) 全国ウイルス性食中毒研究班:厚生科学特別研究事業平成10年度研究報告書 ウイルス性食中毒原因の遺伝子検査標準法確立と全国行政対応整備に関する研究,平成10年度厚生科学研究報告書(1999)
- 3) 全国ウイルス性食中毒研究班:厚生科学特別研究事業平成11年度研究報告書 ウイルス性食中毒原因の遺伝子検査標準法確立と全国行政対応整備に関する研究,平成11年度厚生科学研究報告書(2000)
- 4) 西尾 治:厚生科学研究費補助金生活安全総合研究事業 食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究 平成13年度総括・分担研究報告書(2002)
- 5) 西尾 治:厚生科学研究費補助金生活安全総合研究事業 食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究 平成14年度総括・分担研究報告書(2003)
- 6) Nishida T et al: Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters, *Appl Environ Microbiol*, 69, 5782 ~ 5786(2003)
- 7) 杉枝正明 他:市販生食用カキ中腸腺における SRSV 遺伝子の検出,静岡県環境衛生科学研究所報告,39,1~6(1997)
- 8) Kageyama T et al: Broadly reactive and highly sensitive assay for norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR, *J Clin Microbiol*, 41, 1548 ~ 1557(2003)
- 9) 野田 衛 他:平成12年度の胃腸炎集団発生事例のウイルス学的検査結果,広島市衛生研究所年報,13,43~48(2001)
- 10) 上野美和 他:RT-PCR法による生食用カキからの小型球形ウイルス遺伝子の検出,和歌山市衛生研究所報,11,73~77(1999)
- 11) 北橋智子 他:千葉市沿岸の自生カキからの HAV, SRSV, アストロウイルス遺伝子の検出,感染症学雑誌,73,559~563(1999)
- 12) Guyader FL et al: Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish, *Appl Environ Microbiol*, 66, 3241 ~ 3248(2000)