

## ノロウイルス検出率に及ぼすカキ検査個数の影響

野田 衛 西尾 治<sup>\*1</sup> 秋山 美穂<sup>\*1</sup> 国井 悦子  
山本美和子 藤井 彰人 池田 義文 平崎 和孝<sup>\*2</sup>  
松本 勝 荻野 武雄

カキのノロウイルス(NV)検査におけるカキの適正な検査個数の把握を目的に、市販カキ 10 パックのほぼすべてのカキ個体について、定量 PCR 法により遺伝子 1 群(G1)および 2 群(G2)別の NV 遺伝子のコピー数を測定した。その結果、3 個を検査した場合は、7~11 個を検査した場合と比較して NV 検出率が低く、3 個の検査ではそのパック全体の NV 汚染の安全性を確保できない場合があることが示された。

キーワード： ノロウイルス，定量 PCR 法，カキ，検査法，検査個数

### はじめに

ノロウイルス(NV)による食中毒および食中毒様胃腸炎集団発生はカキを原因食品とする事例が大半を占めることから<sup>1)-6)</sup>、本ウイルスによる食中毒を予防するためには、カキの対策が極めて重要であり、そのためには、カキからの迅速・簡便・確実な NV 検出・定量法の確立が前提となる。カキからの NV 検出には現在逆転写二段階遺伝子増幅法(定性 PCR 法)による定性遺伝子検査およびリアルタイム遺伝子増幅法(定量 PCR 法)による定量的遺伝子検査が行われている<sup>5)-7)</sup>が、定性 PCR 法と定量 PCR 法との検査結果の乖離、前処理法の違いによる定量値のバラツキ、定量 PCR 法における陽性(陰性)限界値の問題など幾つかの問題点が指摘されている<sup>5),6),8)</sup>。それらに加え、最近、同じ筏の養殖カキあるいは同一パックの市販カキにおいて、カキ個体ごとの NV 検出の有無や定量値の違いが指摘されている<sup>5),6),8)</sup> ことから、カキの検査個数は、検査結果に大きな影響を与えられ考えられる。そこで今回我々は、検査に供する適正なカキの個数の把握を目的に、検査個数の検査結果(NV 汚染率)に与える影響を調べた。

### 方 法

#### 1 供試カキ

2004 年 1 月および 2 月に 2 食料店で購入したパック詰め市販カキ 10 パック(加熱調理用 2 パック、生食用 8 パック)を材料とし、各パックにつき 7

個から 11 個のカキを個別に検査した。

#### 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<sup>9)</sup>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%シヨ糖液に重層し 27,000rpm、180 分超遠心分離した。沈渣を遺伝子解析用蒸留水 100  $\mu$ 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<sup>5),6)</sup>。抽出 RNA は 30  $\mu$ 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<sup>10)</sup>の方法による定量 PCR 法で 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 検査結果の取り扱い

検査に先立ち、同じパックに含まれるカキ個体にはランダムに 1 から順に番号を付し、各パックの個体番号が No.1 ~ No.3 のカキの検査結果をもって、3 個を検査した場合の結果とみなした。

\*1：国立感染症研究所

\*2：現 経済局中央卸売市場食肉市場

表1 市販パック詰めカキのカキ個体別の NV(G1)遺伝子定量結果

No	種類	加工日	カキ個体番号										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	加熱調理用	04/1/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	加熱調理用	04/1/13	0	0	0	8.1	0	4.4	53.1	0			
3	生食用	04/1/13	0	0	0.6	1.3	0	0	50.0	245.0	52.5		
4	生食用	04/1/13	15.6	0	1.9	6.9	0	0	0	18.8			
5	生食用	04/2/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6	生食用	04/2/10	0	0	0	0	0	0	0	0			
7	生食用	04/2/8	0	0	0	0	0	0	0	0			
8	生食用	04/2/9	0	0	0	0	0	0	0	0			
9	生食用	04/2/10	0	0	0	0	0	0	0	0			
10	生食用	04/2/10	0	1.9	0	1.9	0	0	5	6.9	0	49.4	

単位：中腸腺 1 個あたりのコピー数

カキ個体別の NV 遺伝子定量結果を表 1(G1 定量値)および表 2(G2 定量値)に示した。各パックにつき 3 個を検査したと仮定した場合(No.1~No.3 の結果), 0 を超える定量値を示したのは G1 で 3 パック, G2 で 2 パック, G1 または G2 の定量値が 0 を超える値を示したのは 3 パックであり, その定量値は 0.6 から 15.6 であった。カキ中腸腺 1 個あたり 125 コピー以上 (反応系あたりのコピー数が 10 以上)を陽性とした場合の NV 陽性率は 0% であった(表 3)。

一方,各パックにつき 7~11 個を検査した場合, 0 を超える定量値を示したのは G1 で 4 パック, G2 で 5 パック, G1 または G2 の定量値が 0 を超える値を示したのは 6 パックであり, その定量値は 0.6 から 268.8 であった。NV 陽性率は G1 で 10%, G2 で 30%, G1 または G2 の陽性率は 30% であった(表 3)。

125 コピー/個以上の定量値を示したカキ個体は, G1 で 1 検体, G2 で 3 検体であり, いずれも各パックにつき 1 個体のみであった。G1 と G2 がともに 125 コピー/個以上の値を示したカキ個体は 1 検体のみであった。

考 察

以上の結果から,同一パックにつき 3 個を検査した場合, 7~11 個を検査した場合と比較して, NV 検出率は低く, その結果から同一パック全体の安全性を確保できない可能性があることが示された。現在,厚生労働省の検査指針には「貝 1 ロットに付き 3 検体から 10 検体(中腸腺としての合計 12g から 24g 程度を目途とする。)の検査を行う。」と記載されている。3 個の検査と 10 個の検査ではコスト的また労力的に大きく異なり, 実際には, 3 個程度の個体についての検査が一般的で

表2 市販パック詰めカキのカキ個体別の NV(G2)遺伝子定量結果

No	種類	加工日	カキ個体番号										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	加熱調理用	04/1/13	0	0	0	268.8	0	0	0	0	0	0	0
2	加熱調理用	04/1/13	0	0	0	133.1	8.8	21.9	30.6	1.3			
3	生食用	04/1/13	0	4.4	5.7	0	0	0	0	220.0	0		
4	生食用	04/1/13	12.5	0	0	0	0	0	0	0			
5	生食用	04/2/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6	生食用	04/2/10	0	0	0	0	0	0	0	0			
7	生食用	04/2/8	0	0	0	3.1	0	0	0				
8	生食用	04/2/9	0	0	0	0	0	0	0	0			
9	生食用	04/2/10	0	0	0	0	0	0	0	0			
10	生食用	04/2/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

単位：中腸腺 1 個あたりのコピー数

表3 同一パックにつき3個を検査した場合と7~11個検査した場合とのNV遺伝子検出率の比較

定量値	G1 検出率		G2 検出率		G1 または G2 検出率	
	3 個検査	7-11 個検査	3 個検査	7-11 個検査	3 個検査	7-11 個検査
0*を超える	30%	40%	20%	50%	30%	60%
10 以上	10%	40%	10%	40%	10%	50%
125 以上	0%	10%	0%	30%	0%	30%

\* : 中腸腺 1 個あたりのコピー数

あると推測される。同一パックにつき多くの個体を検査すれば検出が増えることはある意味で当然であり、もちろんその方が望ましい。しかし、1ロットにつき10個の検査は、コスト的、労力的に大きな負担であり、現実的にはその実施はかなり困難であるといわざるを得ない。従って、何個のカキ個体について検査すべきかということに関しては、その検査の目的、検査室の人的・経済的な違いなど様々な要因によって左右されるため、一律的に論ずることは困難であると考えられる。しかし、一般的に次の点を基本的な概念として認識しておく必要がある。

第一に、市販カキの検査の主な目的は、同一加工場において同一日に加工されたカキ全体(母集団)の汚染の有無を無作為に抽出した検体(標本)の結果から推定し把握することにある。一般的にある母集団の状況を把握するためには、母集団の状態を統計学的に反映できる標本数について検討する必要があるが、3個では当然のこと、10個の検査でも統計学的に耐え得る検体数には程遠い。すなわち、3個あるいは10個のカキの検査結果は、同一加工場の同一加工日のカキ全体の状態を必ずしも反映しているものとはいえない。

第二に、少なくとも1個の結果が陽性となった場合はその母集団がNVに汚染している事実は示せる(汚染率は不明だが)が、10個検査し全てが陰性であったとしても、母集団全てがNVに汚染していないことを示しているわけではない。すなわち、現在の検査法では、陽性の結果から母集団のNV汚染の危険性を示すことができるが、陰性の結果をもって安全性を確保することには必ずしもならない。

第三に、検査に供するカキ個体数を増やせば増やすほど、母集団の安全性や危険性の信頼度は上昇する。すなわち、検査回数と安全性の確保は比例するものであり、言い換えれば、検査の充実は安全性の確保を高めることに結びつく。

以上のことを踏まえた上で、カキの検査を行う

場合は、検査する事業所などが独自で判断し、検査個数を決定することが重要であると考えられる。しかし、特に、業者の自主検査などにおいては安全性確保が商品の付加価値として消費者に認識されなければならない。そのためには、カキのNV汚染に伴う健康被害発生の危険性を消費者が認識すること、カキの安全性の確保、すなわち、NV検査の有無およびその結果などについての情報を消費者に提供すること、検査法やその結果はできるだけ具体的に記述すること、以上の点が整った上で、安全性確保と商品の価格のどちらを優先するかは消費者の選択にゆだねることができるようにすること、などの体制が整うことが重要となると考えられる。さらに、カキ生産加工業者には、陽性の場合には「生食用」から「加熱調理用」に切り替えるなどの指導を行うことはいうまでもなく、「陰性の結果は必ずしも安全性を確保しているわけではない」ことを十分に理解してもらうことが重要である。

今回の結果は1月および2月に一地域で採取したパック詰め市販カキについての結果であり、NV汚染が少ない時期や多い時期あるいは少ない地域や多い地域など、時間的・地理的要因による検討は行われていない。今後同様のデータの積み重ねが必要と考えられる。

一方、カキを個別に検査するのは、多くのカキ個体を混合して検査を行った場合、PCR反応を阻害する物質の混入が増えることなどから検査結果の信頼性が下がることが最大の理由とされている。このことが解消され10個程度のカキを混合したものを検体とした検査が可能となれば、個別に検査する必要性はなく、上述の問題の多くは解決できると考えられる。現在のカキのNV遺伝子検出法はカキ個体からの中腸線の抽出、中腸腺の乳剤化、粗遠心分離、超遠心分離、RNAの抽出、混入DNAの分解、逆転写反応、PCR反応と複雑な検査法であり、多検体処理は非常に難しい。検査結果を行政あるいはカキ商品の安全性確保に結び

つけるためには、迅速・簡便・確実な検査法の開発が急務の課題である。

本研究の一部は平成 15 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集団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) 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15年度総括・分担研究報告書 平成13~15年度総合研究報告書(2004)
- 7) Nishida T et al: Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters, Appl Environ Microbiol, 69, 5782~5786(2003)
- 8) 野田 衛 他:市販カキにおけるノロウイルスの定量的汚染調査,広島市衛生研究所年報,22,61~66(2003)
- 9) 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)
- 10) 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)