

市販生カキにおけるウイルス汚染調査 (2010-2011 ~ 2015-2016 シーズン)

入谷展弘¹⁾、改田 厚¹⁾、山元誠司^{1),2)}、上林大起^{1),2)}、阿部仁一郎¹⁾、
久保英幸¹⁾、野田 衛³⁾、西尾孝之¹⁾、小笠原準¹⁾

Detection of Viruses in Japanese Raw Oysters, from 2010-2011 to 2015-2016

Nobuhiro IRITANI¹⁾, Atsushi KAIDA¹⁾, Seiji P. YAMAMOTO^{1),2)}, Daiki KANBAYASHI^{1),2)},
Niichiro ABE¹⁾, Hideyuki KUBO¹⁾, Mamoru NODA³⁾, Takayuki NISHIO¹⁾, Jun OGASAWARA¹⁾

Abstract

During 6 seasons from 2010-2011 through 2015-2016, we collected 61 samples of Japanese raw oysters (55 for raw consumption and 6 for consumption after cooking) to investigate norovirus (NoV), sapovirus (SaV), hepatitis A virus (HAV) and hepatitis E virus (HEV) using real-time reverse transcription (RT)-PCR and RT-PCR. NoVs were detected in 16 samples for raw consumption (29.1%) and 4 samples for consumption after cooking (66.7%). The NoV strains from oysters were characterized into at least 7 genotypes (1 in genogroup I and 6 in genogroup II). SaVs were detected in 3 of 27 samples for raw consumption (11.1%) and characterized into 3 genotypes. HAVs and HEVs were not detected. This study showed that raw oysters had been contaminated with NoVs and SaVs, indicating that raw oysters constitute an important vehicle of NoV and SaV infections.

Key words: Norovirus, Sapovirus, Hepatitis A virus, Hepatitis E virus, Japanese raw oyster

I 緒言

食中毒の原因物質の中でウイルスの占める割合は高く、そのほとんどがノロウイルス(NoV)である[1]。NoV食中毒は冬季に多発し、原因食品の一つとしてカキなどの二枚貝が多く報告されている。二枚貝は養殖海域に流れ込んだ NoV を餌のプランクトンとともに取り込んで消化器管に蓄積して汚染されると考えられている[2-4]。NoV 以外の腸管系ウイルスも同様に二枚貝に蓄積されるため、他の腸管系ウイルスもカキ喫食による食中毒の原因となりうる。

NoV 以外のウイルスでは、サポウイルス(SaV)が二枚貝[5, 6]や二枚貝の喫食が関連した食中毒事例[7-9]から検出されている。また、A 型肝炎ウイルス(HAV)も二枚貝関連のウイルス性食中毒において注意が必要なウイルスである[10]。E 型肝炎ウイルス(HEV)はイノシシなどの生肉を介して感染することが知られているが、二枚

貝からの検出[11, 12]や感染[13]も報告されている。

我々は、これまで国産市販生カキの NoV および HAV 検査を行い、ウイルスによる汚染を監視してきた[10, 14]。今回、これまで調査してきた 2 種類のウイルスに加えて、二枚貝の喫食で感染の可能性がある SaV と HEV を加えた 4 種類のウイルスについて市販生カキのウイルス汚染実態を調査した。

II 材料と方法

1) 市販生カキ

2010-2011 から 2015-2016 の 6 シーズン(1 シーズン: 4 月～翌年 3 月)の 11 月～2 月に大阪市内で販売されていた国産生食用パック詰むき身カキ 55 ロット(表 1)および加熱調理用むき身カキ 6 ロット(2013 年 2 月 1 ロット、2014 年 2 月 1 ロット、2015 年 2 月 4 ロット)を検査材料とした。検査はカキ 1 ロットについて、カキ 3 個をまとめて検査した。

1) 大阪市立環境科学研究所

〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34

Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

2) 大阪府立公衆衛生研究所

〒537-0025 大阪市東成区中道1丁目 3-69

Osaka Prefectural Institute of Public Health, 3-69, Nakamichi 1-chome, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan

3) 国立医薬品食品衛生研究所

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

2) カキの処理およびウイルス RNA の抽出

カキの前処理には、野田ら[15]のアミラーゼ処理・ポリエチレングリコール(PEG)沈殿法を用いた。即ち、むき身カキから中腸腺を摘出後、PBS(-)で約 10%の乳剤にし、25mg の α -アミラーゼ(和光純薬)を加えて、37°Cで 60 分間攪拌した。アミラーゼ処理後、10,000rpm で 20 分間 4°C遠心した上清に PEG 溶液(最終濃度 12% PEG6000、1M NaCl)を加え、4°Cで 2 時間～一夜静置した。さらに、10,000rpm で 20～30 分間 4°Cで遠心した沈渣を diethyl pyrocarbonate (DEPC) 処理水または 0.5% zwittergent 加 PBS(-)で再浮遊し、RNA 抽出用試料とした。ウイルス RNA の抽出は High Pure Viral RNA kit (Roche)を用いて抽出した。

3) DNase 処理および cDNA の作製

抽出した RNA の DNase 処理については、2012-2013 シーズンまでの検体は RNA 抽出後に Turbo DNA-free kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて行った。2013-2014 シーズン以降の検体は DNase I recombinant, RNase free (Roche)を用いて RNA 抽出カラム上で RNA 抽出キット添付説明書に従って行った。cDNA は High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて作製した。

4) ウイルスの検出

NoV および HAV はすべての検体について、SaV および HEV は 2013-2014 シーズン以降の検体(27 ロット)について検査した。NoV の検出は Kageyama ら[16]のリアルタイム RT-PCR 法に従い、Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)を用いて、既報[10]のとおり実施した。SaV は Kitajima らの

方法[17]、HAV は野田らの方法[18]、HEV は国立感染症研究所病原体検出マニュアル(平成 17 年 4 月)に従って検査した。

5) ウイルスの遺伝子型別

NoV が陽性となった場合は、既報[19]に従って Capsid N/S 領域の遺伝子を増幅し、塩基配列を決定した。NoV の遺伝子型および GII.4 亜型は、Norovirus Genotyping Tool ver. 1.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool/>)を用いて分類し、遺伝子型番号は新しい表記法による番号を用いた[20]。

他のウイルスが陽性となった場合は、その遺伝子増幅産物をダイレクトシーケンスして塩基配列を決定した。SaV の遺伝子型別は Oka らの方法[21]に従った。

6) NoV 事例

2010-2011 から 2015-2016 の 6 シーズンに当研究所に検査依頼され、NoV が検出された 502 事例を対象とした。

III 結果

NoV は生食用カキ 55 ロット中 16 ロット(29.1%)(表1)、加熱調理用カキ 6 ロット中 4 ロット(66.7%)から検出された。生食用カキにおける NoV 陽性率は 10.0～77.8%と各シーズンで変動しており、2010-2011 シーズンが最も高かった(77.8%)。月別では、2010 年 12 月分が最も高く(77.8%)、次いで 2015 年 1 月(40.0%)であった。NoV 陽性カキ 1 個あたりのウイルス汚染量は、生食用では 1 ロット(OY14-8)を除いたすべてがリアルタイム PCR 判定基準の実測値 10 コピーを下回っており、低い汚染量であった(表2)。一方、加熱調理用で実測値 10 コピー未

表1 市販生食用カキからの NoV 検出状況

	シーズン						合計
	2010-2011	2011-2012	2012-2013	2013-2014	2014-2015	2015-2016	
11 月	nt ¹⁾	nt	nt	nt	nt	1/3 ²⁾ (33.3%)	1/3 (33.3%)
12 月	7/9 (77.8%)	3/9 (33.3%)	2/9 (22.2%)	1/9 (11.1%)	0/5 (0.0%)	nt	13/41 (31.7%)
1 月	nt	nt	nt	nt	2/5 (40.0%)	0/3 (0.0%)	2/8 (25.0%)
2 月	nt	nt	0/1 (0.0%)	0/1 (0.0%)	0/1 (0.0%)	nt	0/3 (0.0%)
合計	7/9 (77.8%)	3/9 (33.3%)	2/10 (20.0%)	1/10 (10.0%)	2/11 (18.2%)	1/6 (16.7%)	16/55 (29.1%)

1) not tested

2) NoV 陽性ロット数/検査ロット数

表2 市販生カキから検出された NoV の遺伝子型およびウイルス量

シーズン	検体番号	種類	採取月/年	採取海域番号	遺伝子型 (GII.4 亜型)	ウイルス量 ¹⁾
2010-2011	OY10-2	生食	12/2010	C2	GII.4mix ²⁾	33
	OY10-3	生食	12/2010	I	GII ³⁾	17
	OY10-4	生食	12/2010	A20	GII.4 (DenHaag_2006b)	2
	OY10-5	生食	12/2010	D2	GII.2	6
	OY10-6	生食	12/2010	C2	GII ³⁾	14
	OY10-8	生食	12/2010	B9	GII.6	3
	OY10-9	生食	12/2010	D1	GII.2	20
2011-2012	OY11-2	生食	12/2011	C99	GII ³⁾	195
	OY11-3	生食	12/2011	D2	GII ³⁾	325
	OY11-6	生食	12/2011	A20	GII ³⁾	192
2012-2013	OY12-1	生食	12/2012	D99-1	GII.13	1
	OY12-9	生食	12/2012	D99-1	GII.4 (Sydney_2012)	1
	N13-2	加熱調理	2/2013	A10	GII.4 (Sydney_2012)	87
2013-2014	OY13-2 ⁴⁾	生食	12/2013	A11	GII.6	235
	N14-2	加熱調理	2/2014	A10	GI.4 GII.17mix ²⁾	GI: 193 GII: 4,563
2014-2015	OY14-8	生食	1/2015	D99-1	GII.3	1,226
	OY14-9	生食	1/2015	C1	GII.3	518
	N15-3	加熱調理	2/2015	A10	GII.13mix ²⁾	1,809
	N15-5	加熱調理	2/2015	A10	GII.3	1,177
2015-2016	OY15-2	生食	11/2015	D99-2	GII.3	79

1) カキ 1 個あたりの NoV 遺伝子コピー数で、実測値 10 コピー/tube 以上は太字で示した。

2) 各遺伝子型に分類できたが、複数の塩基配列が混在していた。

3) 遺伝子型別領域が増幅されなかったため、型別できなかった。

4) SaV GII.1 が検出された。

満となったのは 4 ロット中 1 ロット(N13-2)のみであった。

20 ロットから検出された 21 株の NoV のうち、16 株は 7 種類 (GI: 1 種類、GII: 6 種類) の遺伝子型に分類され、同一ロットのカキには 1～2 種類の遺伝子型が存在していた(表2)。また、OY10-2、N14-2、N15-3 から検出された 3 株には、同じ遺伝子型で複数の NoV 遺伝子が混在しており、ダイレクトシーケンスで 1 種類の遺伝子に確定できなかった。最も多く認められた遺伝子型は、4 ロットから検出された GII.4 および GII.3 であった。また、GII.2 および GII.4 DenHaag_2006b は 2010-2011 シーズン、GII.4 Sydney_2012 は 2012-2013 シーズン、GI.4 および GII.17 は 2013-2014 シーズン、GII.3 は 2014-2015 および 2015-2016 シーズンに検出され、シーズンによって検出される遺伝子型に特徴が認められた。

6 シーズンの期間に大阪市で NoV が検出された 502 事例の中で、カキの喫食が関連していたのは 28 事例

(5.6%)であった(表3)。そのうち 23 事例(82.1%)は 1 月から 3 月の期間に発生していた。特に、2015 年 1 月には 7 事例と頻発し、うち 6 事例から非常に珍しい遺伝子型である GII.17 が検出された。

SaV は生食用カキ 27 ロット中 3 ロット(11.1%)から検出され、それぞれ 2013 年 12 月、2015 年 1 月および 2 月のカキであった。2013 年 12 月分から検出された SaV は GII.1 に分類され、NoV も検出された(OY13-2、表2)。2015 年 1 月および 2 月に検出された SaV は、それぞれ GI.1 と GI.3 に分類された。加熱調理用カキから SaV は検出されなかった。HAV および HEV は今回供試されたすべてのカキ検体から検出されなかった。

IV 考察

2006-2007 から 2009-2010 シーズンにおける我々の調査[14]では、12 月および 1 月の生食用カキの NoV 陽

表3 6シーズンの大阪市におけるカキ喫食を伴う NoV 事例

シーズン	NoV 陽性 事例数		カキ関連事例数および発生年月
2010-2011	84	3 (3.6%)	2011年3月 3事例
2011-2012	61	6 (9.8%)	2011年7月 1事例、11月 1事例 2012年1月 2事例、2月 1事例、3月 1事例
2012-2013	117	4 (3.4%)	2013年1月 2事例、2月 1事例、3月 1事例
2013-2014	72	2 (2.8%)	2014年2月 1事例、3月 1事例
2014-2015	105	10 (9.5%)	2014年11月 1事例 2015年1月 7事例、2月 1事例、3月 1事例
2015-2016	63	3 (4.8%)	2015年7月 1事例、11月 1事例 2016年1月 1事例
合計	502	28 (5.6%)	

性率は 19.1% (17/89 ロット) であり、カキ関連 NoV 食中毒は 1 シーズンに 2~6 事例発生していた。今回は、生食用カキの NoV 陽性率が 29.1% と過去の調査結果と比較して高かった。しかし、2014-2015 シーズンを除く 5 シーズンに発生したカキ関連 NoV 食中毒は 1 シーズンで 2~6 事例と前回と同じであった。2010 年 12 月市販生食用カキの NoV 陽性率 (77.8%) は最も高かったが、同じ月にカキ関連 NoV 食中毒は認められず、2010-2011 シーズンにおいても 3 事例と他のシーズンと比べて多くなかった。2015 年 1 月のカキを除いたすべての生食用カキがリアルタイム PCR で実測値 10 コピー未満であり、汚染ウイルス量が少なかったことが一つの要因ではないかと考えられた。一方で、2015 年 1 月にはカキ関連 NoV 食中毒が 7 事例と頻発しており、2014-2015 シーズンでは合計 10 事例発生した。これは同時期のカキの高い NoV 陽性率 (40.0%) と汚染ウイルス量の多さが関連していたことが示唆された。流通している生カキの NoV 汚染状況とカキ関連 NoV 食中毒発生の関連性を示唆する同様の報告 [10, 22] はあり、生カキの NoV 陽性率や汚染ウイルス量がカキ関連 NoV 食中毒発生の危険度を表す指標の一つになる可能性がある。しかし、我々の調査した生カキの流通時期や産地は限定的であるため、より広い範囲でのデータをもとに解析し、判断する必要がある。

大阪市では 2015 年 1 月から 3 月に NoV GII.17 による集団胃腸炎が多発し、この期間に発生したカキ関連 NoV 食中毒のほとんどから NoV GII.17 が検出された [19]。さらに、この時期における NoV GII.17 の流行は全

国的であり、カキの喫食との関連性が示唆されている [23]。今回我々が検査した 2015 年 1 月および 2 月の生食用カキから NoV GII.17 は検出されなかったが、野田ら [24] は、同時期に販売されていたカキの半数近くから NoV GII.17 を検出しており、NoV GII.17 がカキ関連食中毒の多発に関連した可能性を指摘している。また、NoV GII.17 が流行前の 2014 年 2 月のカキ (N14-2、表 2) から検出されたことからカキ中のウイルス汚染の監視が、NoV の流行予測につながる可能性がある。

NoV 以外には SaV が生食用カキから検出された。SaV は二枚貝などカキ関連食中毒患者からも検出されていることから、原因ウイルスとして考慮しなければならない。NoV が陰性または陽性率が低い場合は、追加で SaV 検査を実施することも検討する必要がある。今回、HAV および HEV は検出されなかったが、HAV は国内感染例でカキなどの魚介類を原因食品とする割合が高く [25]、食中毒事例 [26-29] などの報告がある。過去の調査において 2000-2001 および 2002-2003 の 2 シーズンに販売されていた 1 ロットずつに微量ながら HAV による汚染が認められたこともあり [10]、市販生カキ中の汚染監視は重要である。HAV 抗体保有率は年々低下しており [30]、罹患年齢が高くなるほど重症化の割合が高くなるため、HAV 感染例や重症化例の増加が危惧される。HEV については、カキにおける汚染実態が明らかにされておらず、今後の継続した調査が必要である。

V まとめ

- ・国産市販カキには NoV および SaV による汚染が認められ、カキ関連食中毒の感染源として注意する必要がある。
- ・今回の調査から国産市販カキには HAV および HEV による汚染が認められなかったが、HAV はカキ関連食中毒の原因ウイルスとして重要と考えられ、継続した監視が必要である。

謝辞 本研究に御協力いただいた健康局健康推進部生活衛生課および食品衛生監視員の方々に深謝いたします。

(本研究の一部は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「食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究」(平成 25~27 年度)において実施した。)

参考文献

- 1) 厚生労働省. 食中毒統計資料, http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html (WEB サイトの内容は 2016 年 7 月 1 日に確認した。)
- 2) 全国ウイルス性食中毒研究班: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 年度報告書(2000)
- 3) 西尾治, 秋山美穂, 愛木智香子, 杉枝正明, 福田伸治, 西田知子, 他. ノロウイルスによる食中毒について. *食品衛生学雑誌* 2005; **46**: 235-245.
- 4) 佐野大輔, 植木洋, 渡部徹. 水中病原ウイルスによる水環境汚染の実態. *モダンメディア* 2006; **52**: 115-124.
- 5) Hansman G, Oka T, Li TC, Nishio O, Noda M, Takeda N. Detection of human enteric viruses in Japanese clams. *J Food Prot* 2008; **71**: 1689-1695.
- 6) Ueki Y, Shoji M, Okimura Y, Miyota Y, Masago Y, Oka T, et al. Detection of sapovirus in oysters. *Microbiol Immunol* 2010; **54**: 483-486.
- 7) Nakagawa-Okamoto R, Arita-Nishida T, Toda S, Kato H, Iwata H, Akiyama M, et al. Detection of multiple sapovirus genotypes and genogroups in oyster-associated outbreaks. *Jpn J Infect Dis* 2009; **62**: 63-66.
- 8) Iizuka S, Oka T, Tabara K, Omura T, Katayama K, Takeda N, et al. Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish. *J Med Virol* 2010; **82**:1247-1254.
- 9) Iritani N, Kaida A, Abe N, Kubo H, Sekiguchi J, Yamamoto SP, et al. Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks between 2001 and 2012 in Osaka City, Japan. *J Med Virol* 2014; **86**: 2019-2025.
- 10) 入谷展弘, 勢戸祥介, 春木孝祐, 西尾治, 久保英幸, 改田厚, 他. 市販カキからのノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルスの検出. *生活衛生* 2005; **49**: 279-287.
- 11) Li TC, Miyamura T, Takeda N. Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 2007; **76**: 170-172.
- 12) Crossan C, Baker PJ, Craft J, Takeuchi Y, Dalton HR, Scobie L. Hepatitis E virus genotype 3 in shellfish, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 2012; **18**: 2085-2087.
- 13) Koizumi Y, Isoda N, Sato Y, Iwaki T, Ono K, Ido K, et al. Infection of a Japanese patient by genotype 4 hepatitis E virus while traveling in Vietnam. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 3883-3885.
- 14) 入谷展弘, 改田厚, 久保英幸, 阿部仁一郎, 西尾治, 後藤薫, 他. 市販食用カキにおけるノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルス汚染調査(2006-2007~2009-2010 シーズン). *大阪市立環科研報告* 2010; **72**: 7-12.
- 15) 野田衛, 西尾治, 山本美和子, 伊藤文明, 池田義文, 松本勝, 他. 混合カキ検体からのノロウイルス濃縮操作におけるアミラーゼ処理の有用性. *広島市衛生研究所年報* 2006; **25**: 35-43.
- 16) Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 1548-1557.
- 17) Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Katayama H, Takeda N, Katayama K, et al. Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan. *Appl Environ Microbiol* 2010; **76**: 2461-2467.
- 18) 野田衛. 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進事業, 食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究 平成 23 年度総括・研究分担報告書(2012).
- 19) 入谷展弘, 山元誠司, 改田厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 上林大起, 他. 2014-2015 シーズンに大阪市で認められたノロウイルス流行. *大阪市立環科研報告* 2015; **77**: 13-16.
- 20) 片山和彦, 木村博一. ノーウォークウイルス(ノロウイルス)の遺伝子型(2015 年改訂版). 病原微生物検出情報 2015/9/8 掲載 (<http://www.nih.gov/niid/ja/id/778-disease-based/na/norovirus/idsc/iasr-news/5913-pr4274.html>)
- 21) Oka T, Mori K, Iritani N, Harada S, Ueki Y, Iizuka S, et al. Human sapovirus classification based on

- complete capsid nucleotide sequences. *Arch Virol* 2012; **157**: 349-352.
- 22) 西尾治, 中川(岡本)玲子. ノロウイルス感染症と海産物の安全性. *臨床とウイルス* 2008; **36**: 305-314.
- 23) 入谷展弘, 山元誠司, 改田厚, 上林大起, 久保英幸, 野田衛. 2014-2015 シーズンに流行したノロウイルス GII.17 について. *食品衛生研究* 2015; **65**: 7-15.
- 24) 野田衛. 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進事業, 食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究 平成 27 年度総括・研究分担報告書 (2016).
- 25) 清原知子, 石井孝司. A 型肝炎 基礎. *臨床とウイルス* 2009; **37**: 283-290.
- 26) 猿渡正子, 青木聡, 野田伸司, 所光男, 木方正, 安江智雄, 他. A 型肝炎患者(寿司店主)が感染源と思われる A 型肝炎ウイルスによる食中毒—岐阜県. *病原微生物検出情報(IASR)* 2001; **23**: 147-149.
- 27) 古田敏彦, 竹内寛行, 東谷市郎, 西尾治. 大アサリの喫食を原因とするノーウォーク様ウイルスと A 型肝炎ウイルスによる食中毒事例—浜松市. *病原微生物検出情報(IASR)* 2001; **23**: 119-120.
- 28) 貞升健志, 新開敬行, 中村敦子, 山崎清, 村田以和夫, 諸角聖, 他. A 型肝炎ウイルス(HAV)による食中毒 2 事例について—東京都. *病原微生物検出情報(IASR)* 2002; **23**: 273.
- 29) 新潟市保健所, 新潟市衛生試験所, 新潟県福祉保健部, 新潟県保健環境科学研究所. A 型肝炎ウイルスによる食中毒事例—新潟市・新潟県. *病原微生物検出情報(IASR)* 2006; **27**: 178.
- 30) Kiyohara T, Sato T, Totsuka A, Miyamura T, Ito T, and Yoneyama T. Shifting seroepidemiology of Hepatitis A in Japan, 1973-2003. *Microbiol Immunol* 2007; **51**: 185-191.