

RT-PCR 法による二枚貝からのノーウォーク様ウイルスの検出

和佐野 ちなみ¹・宮代 守²・樋脇 弘²・馬場 純一³
本河 鉄也⁴・西原 美子⁴

Detection of Norwalk-like viruses in Bivalve Molluscan Shellfishes by RT-PCR

Chinami WASANO , Mamoru MIYASHIRO , Hiroshi HIWAKI
Junichi BABA , Tetsuya HONKAWA and Yoshiko NISHIHARA

Summary

During 4 fiscal years from 1998 to 2001, a total of 143 shellfish samples collected from fish market and retail stores were examined for the contamination of Norwalk-like viruses (NLVs). Samples were analyzed by using a nested reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

NLVs were isolated from 36 of 143 samples (25.2%) : 25 of 98 stripped oysters (25.5%), 5 of 21 oysters (23.8%), 2 of 15 short-necked clams (13.3%), 4 of 7 hard clams (57.1%), and 0 of 2 bloody clams (0%). All of the positive samples were obtained during the winter period (November to March).

Microplate hybridization using polymerase-specific probes provided from the National Institute of Public Health was performed to verify the RT-PCR products. It revealed that most of the products belonged to genogroup .

Key Words :ノーウォーク様ウイルス Norwalk-like viruses ,小型球形ウイルス SRSV
ノーウォークウイルス *Norwalk virus* ,二枚貝 bivalve molluscan shellfish ,カキ oyster

はじめに

Norwalk-like viruses (NLVs)は、冬季に多発する嘔吐下痢症や乳幼児・小児に集団発生する急性胃腸炎の原因ウイルスである。

NLVs の感染源はもともとヒトの糞便であるが、糞口感染や嘔吐物による飛沫感染といったヒトからヒトへの二次感染事例、あるいは汚染された食品や飲料水を摂取することによる食中毒事例など様々な感染経路が報告されている¹⁻⁵⁾。

NLVs 食中毒の典型は生カキの喫食によるものであるが、カキなどの二枚貝を調理した食品も NLVs 食中毒の推定原因食品または喫食食品として数多く報告されている¹⁻⁴⁾。

NLVs は細胞培養系がないため、従前は電子顕微鏡で検出していたが、現在は reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR 法)による検出が主流となり、食品中の微量ウイルスの検出が可能となった。しかし、食中毒が発生した場合、残物や同一ロットの食品が保存されていない事例が多く、喫食食品からの NLVs 検出事例は少ない。

このため、NLVs 食中毒の代表的な媒介食品である二枚貝の汚染実態を把握し、何らかの衛生対策を講じることが必要と考える。

そこで、市内に流通する二枚貝(カキ、アサリ、ハマグリ、アカガイ)について NLVs の汚染実態を調査したのでその結果を報告する。

材料および方法

1. 検査材料

平成 10 年度から 13 年度にかけて、鮮魚市場または魚介類販売業から、計 143 検体の二枚貝を買い上げ、または収去を行った(表 1)。

- 1.福岡市保健環境研究所 微生物部門
(現所属:保健福祉局生活衛生部食肉衛生検査所)
- 2.福岡市保健環境研究所 微生物部門
- 3.福岡市保健環境研究所 微生物部門
(現所属:衛生化学部門)
- 4.福岡市食品衛生検査所

2. 前処理

1 検体あたり、カキでは5個、他の貝では20～30個の中腸腺を採取し(検体量としては5g程度)、国立公衆衛生院の示した方法⁶⁾に従い、SV Total RNA Isolation System キット(Promega)を用いてRNAを抽出した。

3. RT-PCR法によるNLVs遺伝子の検出

国立公衆衛生院⁶⁾の示した方法に準じ、RNA polymerase をコードする遺伝子領域を増幅するプライマーを用いて nested RT-PCR 法により NLVs 遺伝子を検出した。

プライマーの組み合わせは、1st PCR (35', 36)→Nested PCR (NV81, NV82, SM82), および 1st PCR (Yuri52F, Yuri52R, MR3, MR4)→Nested PCR (Yuri22F, Yuri22R)とした⁷⁾。

4. マイクロプレートハイブリダイゼーションによるNLVs遺伝子の確認

国立公衆衛生院の示した方法⁶⁾に従い、実施した。

プローブは、国立公衆衛生院より配布された G1, G2 (平成10年度～平成12年度)および G1P-A,B, G2P-A,B,C (平成13年度)を使用した。

結 果

NLVs 遺伝子は、表1に示すように143検体中36検体(25.2%)から検出され、いずれのNLVs遺伝子もマイクロプレートハイブリダイゼーションでプローブ型別された(表2)。

36株中29株はGenogroup に属すプローブ型であり、G2型が17株、G2P-A・B型が2株、G2P-B型が5株、G2P-B・C型が2株、およびG2P-C型が3株であった。

残りの7株については、3株がGenogroup に属すG1型、4株がG1・G2型であった。

月別の検出状況を表3に示したが、NLVsは11月から3月にかけて検出され、特に1～2月の冬季に集中していた。

Table 1 Detection of NLVs genes from bivalve molluscan Shellfishes by RT-PCR

Fiscal Year					
(April to March)	1998	1999	2000	2001	Total
No. of samples	24	26	39	54	143
No. of positive	4	6	14	12	36
Detection rate(%)	16.7	23.1	35.9	22.2	25.2

Table 2 Probe type of 36 NLVs genes obtained by RT-PCR

Probe ^{a)} type	Fiscal Year				
	1998	1999	2000	2001	Total
G1	3			NT ^{b)}	3
G1・G2	1		3	NT	4
G2		6	11	NT	17
G2P-A・B	NT	NT	NT	2	2
G2P-B	NT	NT	NT	5	5
G2P-B・C	NT	NT	NT	2	2
G2P-C	NT	NT	NT	3	3
Total	4	6	14	12	36

^{a)}G1 and G1P-A,B :

: Probes for verification of genogroup

G2 and G2P-A,B,C :

: Probes for verification of genogroup

^{b)}NT : Not tested

Table 3 Monthly detection of NLVs genes from bivalve molluscan shellfishes by RT-PCR

Month	No. of samples	No. of positive	Detection rate (%)
Jul.	5	0	0
Aug.	5	0	0
Sep.	4	0	0
Oct.	8	0	0
Nov.	37	2	5.4
Dec.	19	0	0
Jan.	33	18	54.5
Feb.	28	14	50
Mar.	4	2	50
Total	143	36	25.2

表4に、検体の種類別NLVs検出結果を示した。

生カキ(むき身)では98検体中25検体(25.5%)からNLVsが検出され、生食用でも84検体中20検体(23.8%)がNLVs陽性であった。

殻付きカキでは 21 検体中 5 検体 (23.8%) から NLVs が検出され、生食用では 11 検体中 3 検体 (27.3%) が NLVs 陽性であった。

カキ以外の二枚貝では、アサリで 15 検体中 2 検体 (13.3%) が NLVs 陽性、ハマグリで 7 検体中 4 検体 (57.1%) が NLVs 陽性であった。

Table 4 NLVs contamination by each bivalve molluscan shellfishes

Samples	No.of samples	No.of positive	Detection rate (%)
Stripped oysters	98	25	25.5
ready to eat	(84)	(20)	(23.8)
for cooking	(10)	(5)	(50.0)
unknown	(4)	(0)	(0)
Oysters	21	5	23.8
ready to eat	(11)	(3)	(27.3)
for cooking	(5)	(2)	(40.0)
unknown	(5)	(0)	(0)
Short-necked clams	15	2	13.3
Hard clams	7	4	57.1
Bloody clams	2	0	0
Total	143	36	25.2

考 察

NLVs は、その遺伝子解析から Genogroup および Genogroup の遺伝子型群に大別され、Genogroup は国内で検出される NLVs の主流を占めている^{8,9)}。

平成 10 年度から 13 年度にかけて市販の二枚貝 143 検体を検査し、36 検体から NLVs 遺伝子を検出した。マイクロプレートハイブリダイゼーションの結果、大半の 29 株は Genogroup に属すプローブ型であることがわかった。

36 株の NLVs は 11 月～3 月に限って検出され、冬季に NLVs 性胃腸炎の集団発生ピークが見られる報告^{3,4)}と一致した。

NLVs 性胃腸炎の集団発生の約 7 割は食中毒事例であり、その半数は生カキの喫食を原因としている^{3,4)}。これまでの報告によれば NLVs は、市販カキ (生食用か加熱用かは不明) から 17.4%¹⁰⁾、生食用カキから 27.4%¹¹⁾、40%¹²⁾、自生カキから 25%¹³⁾程度検出され、さらにカキ以外では、アサリ、アカガイ、マテガイなどからも検出されている¹⁰⁾。

今回の調査では、二枚貝全体としては 25.2% が NLVs 陽

性であったが、生食用カキの場合、生カキ (むき身) で 23.8%、殻付きカキで 27.3%の陽性率であった。

冬季にカキから NLVs が検出されるのは、水温が低くなるためカキの生理活性が低下し、カキ体内に取り込まれたウイルスの浄化が十分行われないためと推察されている^{14,15)}。

NLVs の汚染源はもともヒトの糞便であり、NLVs はヒト社会から下水道、河川、海といった環境水系を経てカキの生息環境に運ばれ、カキの体内に蓄積されるといったウイルス生態系ができているため、冬季におけるカキの NLVs 汚染は避けようがない。

しかも、NLVs 感染が成立するウイルス量はわずか数個から 100 個程度と推定されており⁴⁾、ヒトへの感染は容易に成立する。このため、生食用カキの加工業者においては NLVs フリーとなるような浄化方法の開発が望まれる。

一方、加熱用カキの場合、生カキ (むき身) が 50.0%、殻付きカキが 40.0%の陽性率であった。さらにカキ以外にも、アサリやハマグリから NLVs が検出され、陽性率はそれぞれ 13.3%、57.1%であった。

NLVs については細胞による培養系がないため、加熱による食品中のウイルス不活化データは、ポリオウイルスや A 型肝炎ウイルスなどを用いたものしかない^{1,2)}。そのため、現在のところ、食品に含まれる NLVs の加熱処理は国の HACCP マニュアル¹⁶⁾に基づき、食品の中心温度を最低でも 75 以上に保持する必要があると考えられている。しかし、飲食店や家庭において、カキフライやカキ鍋などを調理する場合、中心温度 75 以上に加熱することは、通常少ないように思われる。

NLVs 食中毒事例の半数は生カキ以外の食品を介したもので、サラダ・マリネ・寿司・サンドウィッチなどの非加熱食品のほかに、鉄板焼き・ウナギ蒲焼きなどの加熱食品までが原因食品として推定されている^{1,2,4)}。これらの食品については、その汚染経路として、調理以前・調理中・調理後の二次汚染、あるいは調理者による糞便汚染などが推定される。このため、少なくとも営業施設においては、二枚貝の加熱調理は中心温度 75 以上を厳守し、二枚貝を取り扱った後や用便後の手洗い励行、ならびに調理器具類の用途別使い分けと洗浄・消毒を行い、食品への二次汚染防止を徹底することが重要である。

要 約

平成 10 年度から 13 年度にかけて、RT-PCR 法を用いて市販二枚貝の NLVs 検査を実施した。NLVs 遺伝子は、二枚貝全体では 143 検体中 36 検体から検出され、25.2%の陽性率であった。

生食用カキの場合、生カキ (むき身) が 23.8%、殻付きカキ

で 27.3%の陽性率であった。加熱用のカキでは、生カキ(むき身)が 50.0%、殻付きカキが 40.0%の陽性率であった。さらにカキ以外にも、アサリやハマグリから NLVs 遺伝子が検出された。

36 株の NLVs 遺伝子は、マイクロプレートハイブリダイゼーションにより、大半の 29 株が Genogroup に属すプロープ型であることがわかった。

文 献

- 1) 関根大正ほか：食品と小型ウイルス感染症，日本食品微生物学会雑誌，14(3)，135～143，1997
- 2) 関根大正：食品とウイルス性胃腸炎 - 小型球形ウイルスを中心に -，食品衛生学雑誌，vol.40，No.2，123～130，1999
- 3) 食品媒介ウイルス性胃腸炎集団発生全国実態調査研究班：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，平成 7 年 12 月 8 日
- 4) 勢戸祥介，ウイルスによる食水系感染症講座 小型球形ウイルス，防菌防黴，vol.27，No.4，255～260，1999
- 5) 和佐野ちなみほか：平成 12 年度のノーウォーク様ウイルス感染事例について，福岡市保健環境研究所所報 26，172～174，2001
- 6) 平成 10 年および平成 11 年度小型球形ウイルス(ヒトカリシウイルス)技術研修テキスト，国立公衆衛生院
- 7) Hiroyuki Saito et al：Application of RT-PCR Designed from the Sequence of the Local SRSV Strain to the Screening in Viral Gastroenteritis Outbreaks，Microbiol.Immunol，42(6)，439～446，1998
- 8) 山崎謙治ほか：1989 年から 1998 年に日本国内で検出された Norwalk-like viruses(NLVs)の遺伝的特徴および統一プライマーの検討，感染症学雑誌，第 74 巻，第 5 号，470～475，2000
- 9) 武田直和ほか：小型球形ウイルス(平成 9 年度食品保健特殊技術講習会)，食品衛生研究，vol.48，No.7，65～75，1998
- 10) 藤田満ほか：貝類におけるウイルス分布調査，食品衛生研究，vol.49，No.4，123～130，1999
- 11) 杉枝正明ほか：市販生食用カキからの SRSV 遺伝子の検出状況(1995～1996 年)とその遺伝子解析，第 18 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集，1997
- 12) 橋本修ほか：カキに濃縮される小型球形ウイルスの検出とその遺伝子解析，第 19 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集，1998
- 13) 北橋智子ほか：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
- 14) 中正純ほか：かきの養殖海域における SRSV 汚染調査とウイルス浄化試験について，食品衛生研究，vol.50，No.8，97～103，2000
- 15) 岡田恵美ほか：かき採捕海域での SRSV の汚染調査および浄化試験について，食品衛生研究，vol.51，No.11，39～43，2001
- 16) 衛食第 85 号(平成 9 年 3 月 24 日)厚生省生活衛生局長通知，大量調理施設衛生管理マニュアル