

国内産・韓国産カキのノロウイルス汚染状況と県内の食中毒事例

山口県環境保健研究センター

西田 知子・堀切 裕治・中尾 利器・松村 健道・片山 淳

Detection of Norovirus in Japanese and Korean Oysters and in Specimen from Patients of Food-borne Gastroenteritis

Tomoko NISHIDA, Yuji HORIKIRI, Toshiki NAKAO, Kendo MATSUMURA, Atsushi KATAYAMA
Yamaguchi Prefectural Research Institute of Public Health

はじめに

平成13年に本邦で発生した微生物による食中毒事例のうち、ウイルスを原因とするものは発生件数では270件(16%)、患者数では7,371人(32%)を占めた¹⁾。ウイルス性食中毒の病因物質は、ノロウイルス(NV)が99%を占めており、NVによる食中毒は生カキの喫食に起因するものが最多となっている¹⁾。今回、市販生食用カキのNV汚染状況を明らかにするため生食用カキのNV汚染状況を調査し、併せて本県で発生した二枚貝の喫食が原因と推定される食中毒事例について検討した。

材料と方法

1 調査材料

2001年11月～2002年4月にかけて市販されていた国内産および韓国産カキ111検体と同期間に県内で発生した二枚貝の喫食が原因と推定された食中毒事例のNV遺伝子陽性患者・従業者便23検体。

2 調査方法

カキから抽出したNVのカプシド領域遺伝子を増幅し、リアルタイムPCRにより定量した。さらに塩基配列を決定し分子系統樹を作成、食中毒事例の患者・従業者由来株の塩基配列と併せて分子疫学調査を実施した。

(1) カキのNV遺伝子の定量と解析

ア カキの中腸腺を国内産は5個、韓国産は2個を一検体とした。滅菌PBS(-)で乳剤を作製し、粗遠心の後、超遠心処理を行った。沈査を滅菌超純水

に再浮遊後、RNAを抽出し、DNase処理を行い、逆転写酵素によってcDNAを作成した。

イ 作製したcDNAを用い、影山らによるリアルタイムPCR(2)によってNVのcDNAコピー数を遺伝子型別に定量した。

本法におけるリアルタイムPCR検査で陽性と判定されるのは10コピー以上で、これに希釈率をかけ、カキ1個当たり150コピー以上を陽性とした。ウ PCRを行い、ダイターミネーター法でカプシド領域の塩基配列を決定した²⁾。

(2) 食中毒患者・従業者便由来NV遺伝子解析

滅菌PBS(-)で乳剤を作製し、遠心上清からRNAを抽出した。DNase処理を行い、逆転写反応の後、PCRを行い、陽性バンドを確認したものについてダイターミネーター法でカプシド領域の塩基配列を決定した。

(3) 検査に用いたプライマー及びプローブ(図1)

カキのリアルタイムPCRにはプライマーとしてCOG1F/COG1R, COG2F/COG2R, プローブとしてRING1-TP(a)/(b), RING2-TPを、遺伝子解析のための1st PCRにはCOG1F/G1-SKR, COG2F/G2-SKR, 2nd PCRにはG1-SKF/G1-SKR, G2-SKF/G2-SKRプライマーセットを用いた。

食中毒患者・従業者便のNV遺伝子解析にはG1-SKF/G1-SKR, G2-SKF/G2-SKRプライマーセットを用いた³⁾。

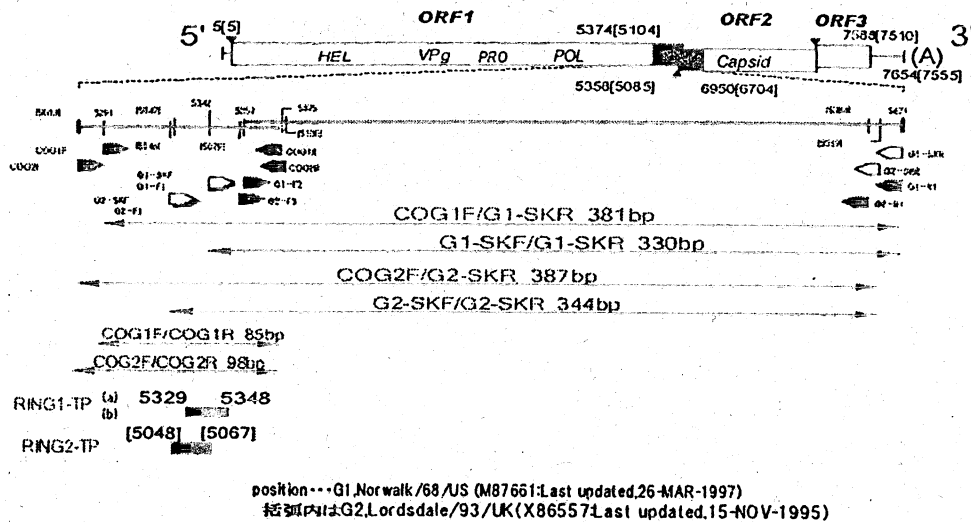


図1 リアルタイムPCRと遺伝子解析のためのプライマー、プローブ

結果

1 国内産カキのリアルタイムPCR検査結果

1月から3月にかけて陽性のものがみられた(表1)。

表1 国内産カキのNV汚染状況('01.11月~'02.4月)

月	検体数	NV陽性検体数	陽性率(%)
11	16	0	
12	12	0	
1	17	2	12
2	11	2	18
3	8	1	13
4	3	0	
計	67	5	7

2 韓国産カキのリアルタイムPCR検査結果

NV遺伝子検出率は低かった(表2)。

表2 韓国産カキのNV月別汚染状況

月	検体数	NV陽性検体数	陽性率(%)
11	43	2	5
12	1	0	
計	44	2	5

3 食中毒患者・従業者便からのNV遺伝子検出と原因食品の追求

この期間に発生した食中毒6事例のうち、5事例で非加熱二枚貝の喫食があり、検査した患者・従業者30名中23名がNV遺伝子陽性であった。

非加熱二枚貝の喫食があった食中毒5事例のうち、検査が残っていた2事例16検体について検査を行ったが、

NV遺伝子は検出されなかった。

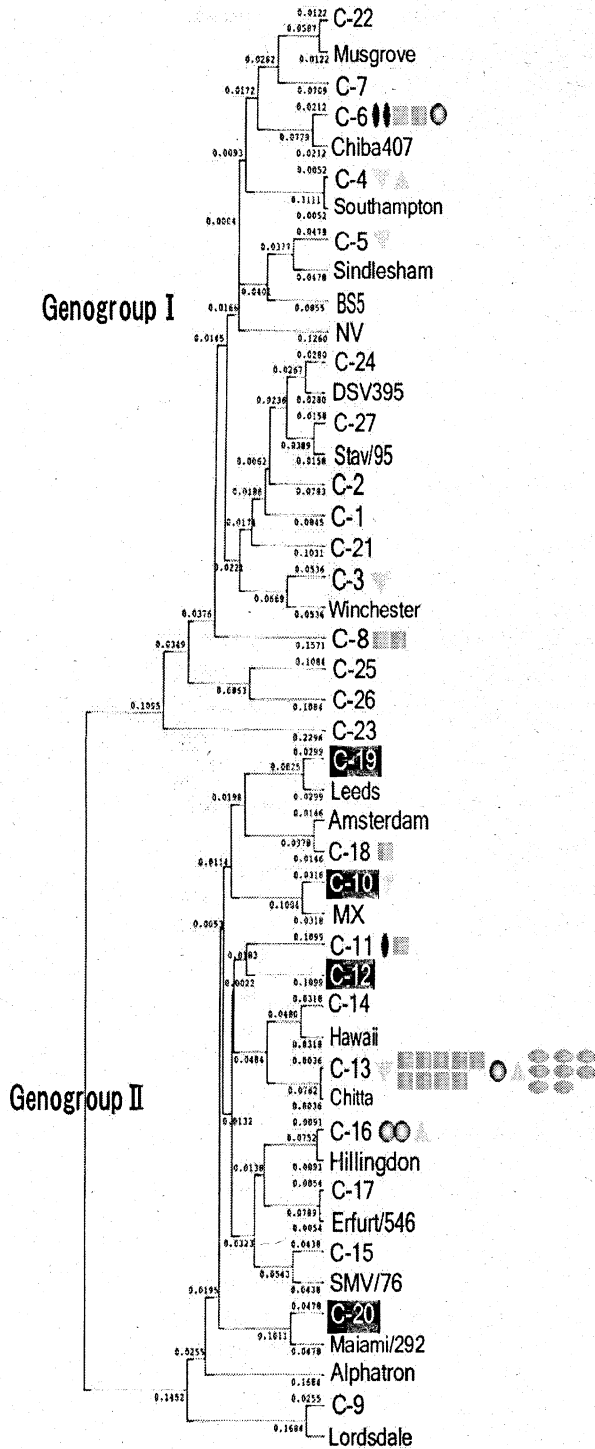
4 NV遺伝子の塩基配列決定と分子系統樹(UPGMA法)の作成

市販カキ及び食中毒患者・従業者由来NV遺伝子の塩基配列を決定し、90%以上の相同性を持つものを1グループにしてC-1からC-27に分類し、UPGMA法で系統樹を作成した。

二枚貝喫食が原因として疑われた食中毒患者・従業者由来株の遺伝子型は多様で、一人から複数の遺伝子型のNVが検出された例もあった(表3, 図2)。

表3 食中毒事例の患者・従業者由来NV遺伝子型

事 例	シーケンス
H13.12.15 防府 飲食店 (ミル貝喫食有り)	C-3,C-13 C-4 C-5,C-10
H14.1.22 下関 家庭 (カキ喫食有り)	C-6 C-6 C-11
H14.1.20 下関 飲食店 (カキ喫食有り)	C-13 C-6,C-13 C-11 C-18 C-8,C-13 C-8,C-13 C-13 C-13 C-13 C-6,C-13
H14.1.26 広島 飲食店 (カキ喫食有り)	C-4,C-13 C-16
H14.2.24 下関 家庭 (カキ喫食有り)	C-16 C-16 C-10 C-6
H14.4.19 長門 小学校	C-13 C-13 C-13 C-13 C-13(二次感染) C-13(二次感染) C-13(二次感染) C-13(二次感染)



●●●市販カキ由来NV遺伝子
図2 NV分子系統樹 (カプシド領域)

考察およびまとめ

- 1 調査した国内産7% (5/67), 韓国産5% (2/44) のカキからNV遺伝子が検出された。
- 2 1月~3月に生食用カキからNV遺伝子が検出されたことから, この時期のNVによる食中毒に注意する必要があると考えられた。
- 3 韓国産カキからのNV遺伝子検出率が低かった理由は, 検体の大部分が11月に採取されたものであったためと推察された。
- 4 二枚貝が原因食品と推定される食中毒事例の患者・従業者便由来NV遺伝子型は多様であった。
- 5 市販カキ由来のNV遺伝子型は, 県内の食中毒患者・従業者便由来のものとは異なる結果であった。これは, 調査した市販カキの採取海域と, 原因と推定された二枚貝の採取海域とが異なっていたためと推察された。今後, より広域におよぶ市販カキの調査が必要と考えられた。

本研究は平成13年度厚生科学研究生活安全総合研究の一環として行った。

謝辞

NV遺伝子の定量と塩基配列の決定を行ってくださった国立感染症研究所, 西尾治博士に深謝します。

文献

- 1) <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokutyu>
- 2) Kageyama, T., et al. 2003. J. Clin. Microbiol. 41: 1548 - 1557
- 3) Kojima, S., et al. 2002. J. Virol. Methods 100: 107 - 114.