

## ノート

# 生食用カキに含まれる ノロウイルスとカキ養殖海域の海況

中野陽子<sup>\*</sup>, 山中葉子<sup>\*\*</sup>, 永井佑樹, 岩出義人

## *Norovirus* Detection from Oyster(*Crassostrea gigas*) and Sea Condition of Oyster-Farm

Yohko NAKANO<sup>\*</sup>, Yohko YAMANAKA<sup>\*\*</sup>, Yuhki NAGAI, and Yoshito IWADE

2007 年 6 月から 2008 年 3 月まで毎月 1 回, 鳥羽市浦村町と志摩市の矢町の 2 箇所の計 3 箇所の養殖海域で養殖されたカキに含まれるノロウイルス(以下 NV)を検索した。7 月, 12 月, 1 月, 2 月にウイルスが検出された。合計 186 検体の中腸腺を検査したところ検出数は 19 検体(検出率 10.2%)であった。感染性胃腸炎の流行は 12 月上旬から始まり, その 1 週間後から *Norovirus* (NV) が検出されはじめた。夏季でもカキ中腸腺から NV が検出されたが, 同じ場所に同一ロットを養殖し続けると翌月には検出されなくなった。塩分濃度は水深が深くなるほど変動の幅が小さかった。浦村と的矢では塩分濃度の変化に差があった。浦村は変化が小さく, 的矢は変化が大きく, 深度により異なる傾向を示した。海水温の傾向は両海域とも夏季は深いほど低く, 冬場は深い方が若干高かった。海水温が 15 を下回り感染性胃腸炎の流行期になるとカキ中腸腺から NV が検出されるものが現れるので, 海水温をモニターすることは対策を開始する目安となると考えられた。今回の調査で降雨による塩分濃度の変化の差から, 両海域は同じ対策ではなく, それぞれ海域特有のリスク回避策を模索する必要性が示唆された。

キーワード: ノロウイルス, 海水温, 塩分濃度, 汚染リスク回避

### はじめに

三重県では 1997 年から独自にカキ養殖と Small Round Structured Virus (SRSV) についての研究を行い, その結果をもとに 2003 年度から「みえのかき安心情報」として情報提供を行ってきた。ここ数年 NV 感染症への関心が高まるにつれ, 二枚貝の NV 汚染リスクをいかに防ぐかという取り組みが望まれ, さまざまな対策・研究が行われているところである。カキ等の二枚貝は基本的にウイルス等の微細な粒子を蓄積しやすく, その蓄積や排泄には二枚貝本体の要素が大きく, また個体差が存在すると考えられている。本研究では, 「複数海域の, 複数深度に垂下し養殖したカキ」についてその養殖海域の海況と NV

検出に関連があるのか, あればその傾向はどうかに注目し調査を実施した。その結果若干の知見を得たので報告する。

### 対象と方法

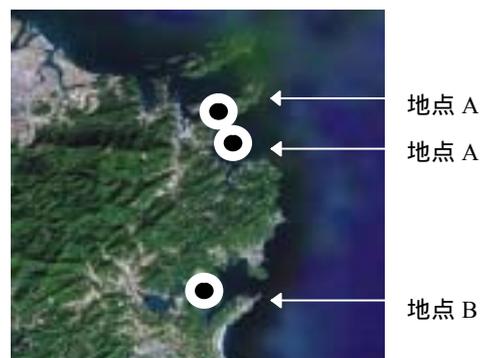


図 1. 養殖海域の位置

<sup>\*</sup> 津保健福祉事務所, <sup>\*\*</sup> あすなる学園

## 1. カキ採取海域

本研究で使用したカキは、三重県鳥羽市浦村町（地点 A）、志摩市的矢町（地点 B）の 2 箇所の計 3 箇所の養殖海域のものである（図 1）。各海域の養殖業者に複数深度にカキを吊り分け養殖を行うことを依頼し、調査を実施した。

## 2. 調査期間・頻度・収集データ

2007 年 6 月から 2008 年 3 月まで月 1 回の採取を行い、6 月から 9 月までは前々年から養殖されている「2 年もの殻つきカキ」で 3 海域、3 深度から別々に採取した。10 月以降は前年夏から養殖されている「当年ものむき身カキ」で 2 海域、2 深度から採取した。一定点につき 3 個の中腸腺を検査に供し、合計 168 個を使用した。各海域、各深度において塩分濃度および海水温を測定し、近接の降水量観測データを収集した

## 3. NV検査方法

NV の検出は食安監発第 1105001 号 9) に基づき実施し、カキ中腸腺 10% 乳剤のポリエチレングリコールを用いた濃縮には野田らの  $\alpha$ -アミラーゼを添加する方法を用いた<sup>11)</sup>。RNA の抽出は Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いた<sup>9)</sup>。逆転写酵素は Super Script II(Invitrogen)を使用し、PCR 酵素は Ex Taq(TaKaRa)を使用し、Nested-PCR を実施した。PCR 産物は景山ら<sup>9)</sup>の方法で遺伝子型別を行った

## 結 果

### 1. A海域について

#### 1) 地点

#### a. NV 検出状況

7 月と 1 月、2 月に NV が検出された。検出数は 8 検体で、検出率は 5.8%であった（表 1）。カキ中腸腺から検出された NV の遺伝子型は G2/4 類似株が 6 検体、G2/2 類似株が 2 検体であった。感染性胃腸炎の流行期になるとカキ中腸腺

表 1. 採水地点及び深度ごとの NV RT-PCR 陽性数 (n=168, 3 個/定点)

| 地点    | 深度 (m) | Jun 12 | Jul 10 | Aug 14 | Sep 11 | Oct 9 | Nov 12 | Dec 10 | Jan 15 | Feb 10 | Mar 11 |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| A     | 1.5    | 0      | 3      | 0      | 0      | 0     | 0      | 0      | 1      | 2      | 0      |
|       | 3.5    | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     | 0      | 0      | 0      | 2      | 0      |
|       | 7      | 0      | 0      | 0      | 0      | -     | -      | -      | -      | -      | -      |
| A     | 1.5    | 0      | 1      | 0      | 0      | -     | -      | -      | -      | -      | -      |
|       | 3.5    | 0      | 1      | 0      | 0      | -     | -      | -      | -      | -      | -      |
|       | 5      | 0      | 0      | 0      | 0      | -     | -      | -      | -      | -      | -      |
| B     | 1.5    | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     | 0      | 2      | 2      | 2      | 0      |
|       | 3      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     | 0      | 0      | 0      | 2      | 0      |
| Total |        | 0      | 5      | 0      | 0      | 0     | 0      | 2      | 3      | 8      | 0      |

- : Not Tested

表 2. 採取地点及び深度ごとの検出 NV の遺伝子型

| 地点 | 深度 (m) | Jul 10               | Dec 10       | Jan 15       | Feb 10       |
|----|--------|----------------------|--------------|--------------|--------------|
| A  | 1.5    | G2/4<br>G2/4<br>G2/4 | -            | G2/4         | G2/4<br>G2/2 |
|    | 3.5    | -                    | -            | -            | G2/4<br>G2/2 |
| A  | 1.5    | G2/13                | -            | -            | -            |
|    | 3.5    | G2/4                 | -            | -            | -            |
| B  | 1.5    | -                    | G2/4<br>G1/4 | G2/4<br>G1/4 | G2/4<br>G2/2 |
|    | 3.5    | -                    | -            | -            | G2/2<br>G2/6 |
| 計  |        | 5                    | 2            | 3            | 8            |

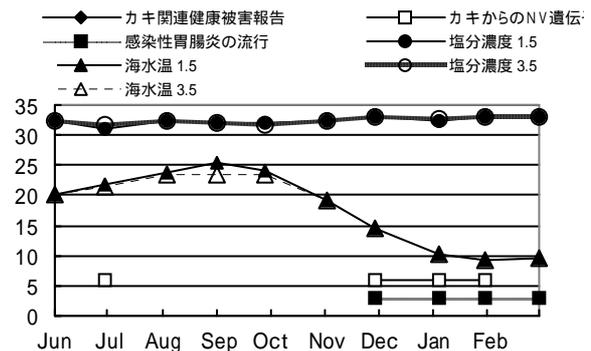


図 2. A海域の海況

腺から NV が検出された（表 1 及び 2、図 2）。

#### b. 海況について

採取時の海水温は 9 月にピークとなり 25℃まで上昇した。その後 12 月には 15℃以下になった。水温は夏季には深いほど低く、冬場は深い方が若干高かった。温度の変動時もこの傾向を保ったままであった（表 3、図 3）。A 海域の水深 1.5m の採取時の塩分濃度は 31% から 33% 程度で、近郊の降雨による塩分濃度の変動は A 海

表 3. 採水地点及び深度ごとの海水温 (°C)

| 地点 | 深度 (m) | Jun 12 | Jul 10 | Aug 14 | Sep 11 | Oct 9 | Nov 12 | Dec 10 | Jan 15 | Feb 10 | Mar 11 |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| A  | 1.5    | 20.1   | 21.9   | 23.7   | 23.7   | 23.6  | 19.0   | 14.5   | 10.3   | 9.4    | 9.5    |
|    | 3.5    | 20.0   | 21.3   | 23.5   | 23.5   | 23.6  | 19.0   | 14.5   | 10.3   | 9.3    | 9.5    |
|    | 7      | 20.1   | 20.2   | 23.3   | 23.3   | -     | -      | -      | -      | -      | -      |
| A  | 1.5    | 20.1   | 22.1   | 23.9   | 23.9   | -     | -      | -      | -      | -      | -      |
|    | 3.5    | 20.1   | 21.3   | 23.6   | 23.6   | -     | -      | -      | -      | -      | -      |
|    | 5      | 20.2   | 20.5   | 23.5   | 23.5   | -     | -      | -      | -      | -      | -      |
| B  | 1.5    | 22.5   | 24.0   | 28.4   | 25.3   | 23.2  | 18.0   | 13.1   | 10.8   | 8.4    | 10.1   |
|    | 3.5    | -      | 23.4   | 27.5   | 28.6   | 23.7  | 19.2   | 13.5   | 10.5   | 9.3    | 10.4   |

- : No Data

表 4. 採水地点及び深度ごとの塩分濃度 (‰)

| 地点 | 深度 (m) | Jun 12 | Jul 10 | Aug 14 | Sep 11 | Oct 9 | Nov 12 | Dec 10 | Jan 15 | Feb 10 | Mar 11 |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| A  | 1.5    | 32.3   | 31.1   | 32.2   | 31.9   | 31.8  | 32.4   | 32.9   | 32.6   | 33.0   | 32.6   |
|    | 3.5    | 32.4   | 31.8   | 32.3   | 32.0   | 31.8  | 32.4   | 32.9   | 32.6   | 33.0   | 32.6   |
|    | 7      | 32.7   | 32.8   | 32.4   | 32.2   | -     | -      | -      | -      | -      | -      |
| A  | 1.5    | 31.9   | 31.0   | 32.3   | 31.8   | -     | -      | -      | -      | -      | -      |
|    | 3.5    | 32.4   | 31.9   | 32.4   | 32.0   | -     | -      | -      | -      | -      | -      |
|    | 5      | 32.1   | 32.5   | 32.4   | 32.3   | -     | -      | -      | -      | -      | -      |
| B  | 1.5    | 22.1   | 11.7   | 23.5   | 18.1   | 22.2  | 31.3   | 32.9   | 33.3   | 33.0   | 33.5   |
|    | 3.5    | -      | 24.2   | 32.2   | 31.9   | 23.4  | 32.5   | 33.2   | 33.3   | 33.6   | 33.7   |

- : No Data

域では少なかった．変動した場合は表層ほど塩分濃度が下がり，下層の塩分濃度より濃くなることはなかった．7月にNV遺伝子が検出されたので7月1日から31日までの塩分濃度の変化を調査したところ，採取前後で塩分濃度の変化はほとんどなかった(図3)．NVが検出されたカキの採取時の海水温は21.9，10.8，9.8であった．塩分濃度は31.1‰，32.6‰，33.0‰であった(表3及び4，図2及び3)．

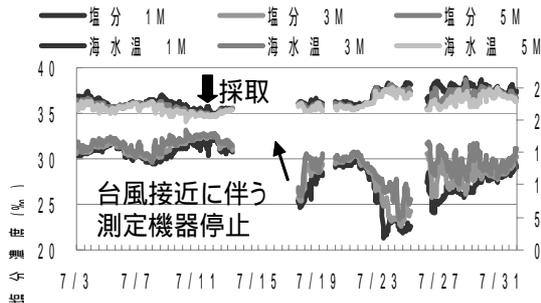


図3．A海域の塩分濃度の変化

## 2) 地点

### a.NV 検出状況

この地点では6月から9月までの4ヵ月間のみの調査となった．NV遺伝子は7月に検出された．検出数は2検体，検出率は0.7%であった(表1)．カキ中腸腺から検出されたNVの遺伝子型はG2/4類似株が1検体，G2/13類似株が1検体であった(表2)．

### b.海況について

NVが検出されたカキの採取時の海水温は22.1，21.3であった(表3)．塩分濃度は31.0‰，31.9‰であった(表4)．

## 2．B海域について

### 1) B地点

#### a. NV 検出状況

12月，1月，2月にNVが検出された．検出数は8検体で検出率は4.8%であった(表1)．カキ中腸腺から検出されたNVの遺伝子型はG2/4類似株が4検体，G2/2類似株が2検体，G2/6類似株が1検体，G1/4類似株が2検体であった(表2及び5)．

#### b.海況について

水深1.5mの採取時の水温は8月にピークとなり28℃まで上昇した．その後12月にはA地点同様15℃以下になった．塩分濃度は11‰から

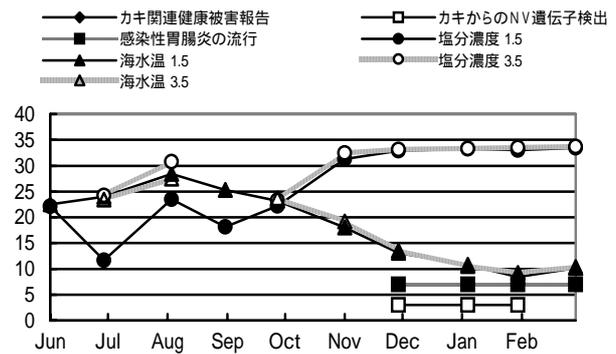


図4．B海域の海況

33‰程度まで大きく変化した．NVが検出されたカキの採取時の海水温は13.1，10.8，8.4，9.3であった(表3)．塩分濃度は32.9‰，33.3‰，33.0‰，33.6‰であった(表4，図4)．台風が襲来し，大量の降雨があったので，3日

表5．台風通過後のB地点における連続採取時の海況とNV検出結果

| 深度<br>(m) | 採水日    | 海水温<br>(℃) | 塩分濃度<br>(‰) | nested-PCR |      |
|-----------|--------|------------|-------------|------------|------|
|           |        |            |             | G1         | G2   |
| 1.5       | 16-Jul | 24.0       | 11.7        | -          | G2/4 |
|           | 17-Jul | 23.4       | 12.0        | -          | -    |
|           | 18-Jul | 24.0       | 16.6        | -          | -    |
| 3.5       | 16-Jul | 23.4       | 24.2        | -          | -    |
|           | 17-Jul | 23.2       | 20.6        | -          | -    |
|           | 18-Jul | 23.5       | 20.7        | -          | -    |

—: No Data

間連続して採取を行い，同様にNV遺伝子検索を行ったところ，台風通過後1日目の中腸腺からのみ検出された．採取時の海水温は24.0℃，塩分濃度は11.7‰であった．台風通過後の最低塩分濃度は約11‰まで下がっていた(表5，図5)．表層の塩分濃度が最も変動が大きく，下層が最も変動が小さかった．表層の塩分濃度が深部より濃くなることはなかった(図5)．この海域は「閉鎖的な内湾で3本の河川が流入する場所なので塩分濃度の変化が大きい」という漁業者情報に一致した結果であった．

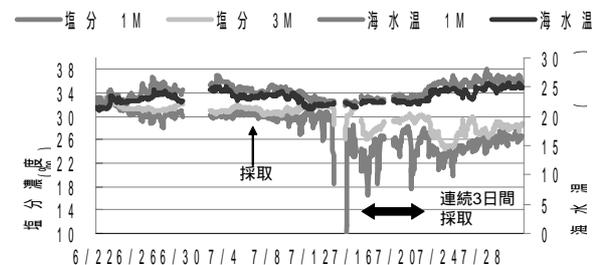


図5．B海域の海水温と塩分濃度の変化

## 3．降水量データについて

採取海域直近の気象庁観測所の降水量が

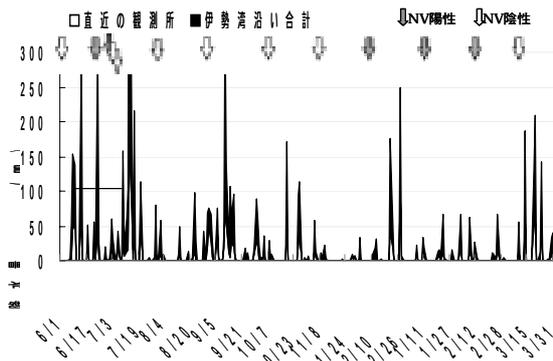


図 6 . 伊勢湾沿いの観測所降水量データ (気象統計より)

50mm を超えたのは 7 月の台風通過時( 150mm ), 梅雨時に 2 度, 9 月の台風通過時, 年末, 3 月であった . 感染性胃腸炎が流行し始めてから 50mm を超えた降水が観測されたのは 3 度であった( 図 6 ).

## 考 察

7 月と 12 月, 1 月, 2 月にノロウイルス遺伝子が検出された . 検出数は 17 検体 , 検出率は 10.1 % と過去数年と比較しても検出率に差はなかった . 検出ウイルスの遺伝子型は G2/4 類似株が 10 検体 , G2/2 類似株が 4 検体 , G2/6 類似株が 1 検体 , G2/13 類似株が 1 検体 , G1/4 類似株が 1 検体であった . ウイルスが検出されたカキの採取時の海水温は 7 月に約 22 , 12 月から 2 月は 13

から 8.5 , 塩分濃度は 7 月, 12 月から 2 月ともに約 32 ‰であった . 感染性胃腸炎の流行は 12 月上旬から始まり, その 1 週間後からウイルスが検出されはじめた . A 海域は塩分濃度の変化があまり顕著でなく, 大きくゆるやかに変動していた ( 図 7 ). 緩やかな変化の中でも表層よりも中間層, 下層の方が変動の幅が小さかった . 一方, B 海域は閉鎖湾で梅雨時などは非常に大きく塩分濃度が変化していた . この海域では表層の方が中間層よりも変動の幅が大きく, 両海域に共通した変動の特徴は見られなかった . ウイルス汚染のリスクを回避するために生産者は工夫を重ねているが, 今回の調査で A 海域と B 海域で同じ対策ではなく, それぞれ海域特有のリスク回避策を模索する必要性が示唆された . 前年度 11 月以降は降雨が少なく, 塩分濃度の変化は少なかった . ただ, 感染性胃腸炎の流行と海水温の低下, 50mm 以上の大量降雨後にノロウイルスによる健康被害が起こりやすいという,

これまでの三重県のカキ取扱基準は特に B 海域の 12 月 ~ 2 月の NV の検出時の状況には良く当てはまり, ノロウイルス汚染対策に有用であることが示唆された .

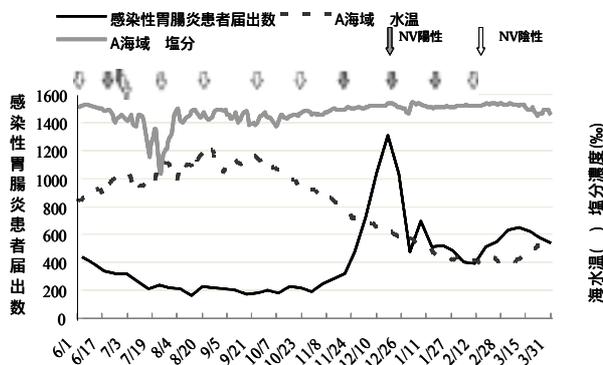


図 7 . A 海域 の水温, 塩分濃度, 三重県内の感染性胃腸炎患者数と NV 検出

## 文 献

- 1) 有田知子, 木村博一, 野田 衛, 西尾 治, ( 2008 ) パンに含まれるノロウイルス回収法の検討 , 感染症学雑誌 82 , 473-475 , 23-28 .
- 2) 病原微生物検出情報 ( 2007 ) 28 , 279-280 .
- 3) 三重県農水商工部, みえのうみホームページ , <http://www.sea.pref.mie.jp/mirainet/index.htm> .
- 4) 気象庁, 気象統計情報 , <http://www.jma.go.jp/jma/menu/report.html> .
- 5) 伊勢保健福祉事務所, みえのカキ安心情報 , <http://www.pref.mie.jp/NHOKEN/HP/kaki/1-index/index.htm> .
- 6) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Takeda, N., and Katayama, K. ( 2003 ) Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription -PCR , J . Clin . Microbiol . , 41 , 1548-1557 .
- 7) 鳥羽磯部漁業協同組合 ( 2006 ) カキの養殖・加工ガイドライン .
- 8) Kojima, S., T. Kageyama, S. Fukushi, F. B. Hoshino, M. Shinohara, K. Uchida, K. Natori, N. Takeda, and K. Katayama, ( 2002 ) Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. J. Virol. Methods 100, 107-114.
- 9) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全

課長通知 ( 2003 ) ノロウイルスの検出法について .

- 10) 野田 衛,西尾 治,伊藤文明,池田義文 ( 2006 ) カキ混合検体からのノロウイルス濃縮捜査におけるアミラーゼ処理の有用性 , 第 54 回日本ウイルス学会総会 .
- 11) Nishida, T., H. Kimura, M. Saitoh, M. Shinohara, M. Kato, S. Fukuda, T. Munemura, T. Mikami, A. Kawamoto, M. Akiyama, Y. Kato, K. Nishi, K. Kozawa, and O. Nishio. ( 2003 ) Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 5782-5786.
- 12) Nishida, T., O. Nishio, M. Kato, T. Chuma, H. Kato, H. Iwata, and H. Kimura., ( 2007 ) Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan, *Microbiol. Immunol.*, 51, 177-184.
- 13) Phan, T. G., P. Khamrin, M. Akiyama, F. Yagyu, S. Okitsu, N. Maneekarn, O. Nishio, and H. Ushijima. ( 2007 ) Detection and genetic characterization of norovirus in oysters from China and Japan. *Clin. Lab.*, 53, 405-412.
- Vinje, J., H. Deijl, R. van der Heide, D. Lewis, K.-O. Hedlund, L. Svensson, and M. P. G. Koopmans, ( 2000 ) Molecular detection and epidemiology of Sapporo-like viruses, *J. Clin. Microbiol.*, 38, 530-536.