

ヒトノロウイルス汚染カキ試料作製手順

宮城県水産技術総合センター

国立医薬品食品衛生研究所

国立感染症研究所

国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所

作製日：2023 年 3 月 19 日

はじめに

ノロウイルスは、ヒトに感染し重度の腹痛、嘔吐、下痢を引き起こす食中毒原因ウイルスである。ノロウイルスを原因とする食中毒の患者数は、国内で発生した食中毒患者総数のうち最多であり、そのうちの1割以上がカキ中のノロウイルスを原因とした食中毒であると推察されている。また、カキはノロウイルスに汚染されていると消費者に広く知られていることにより、消費への影響が懸念されている。

カキなどの二枚貝は、海水中のノロウイルスを取り込んでおり、このことから一定の割合でノロウイルスに汚染されている。カキ生産者は、出荷前のカキを清浄海水等で畜養して、組織内に蓄積された大腸菌などの病原性微生物を排出させており、近年ではこの浄化処理によるノロウイルスの浄化も試みられている。しかし、浄化処理に関する温度や畜養条件は生産者がこれまでの経験から設定しており、生産者ごとに異なっている。さらに、浄化処理が実際にノロウイルスの低減につながっているか検証した試験はほとんど行われておらず、科学的に信頼できるデータの蓄積が必要になっている。

本手順書の内容は、令和2年度から4年度まで実施された農林水産省事業課題、安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業短期課題解決型研究「カキ中のノロウイルス低減対策に関する研究」の実施成果から、ヒトノロウイルス汚染カキ試料作製について手順をまとめたものである。本手順書の内容が、公設試験研究機関等における食中毒リスクの少ない安全なカキ生産技術の開発や、適切なカキの衛生対策の実施に活用されることが期待される。

構成

- 1 基本的な注意事項
- 2 使用する代表的な資材
- 3 ヒトノロウイルス汚染カキ試料作製
- 4 試料作製終了後の滅菌処置
- 5 汚染条件の検討
- 6 ノロウイルスの検出法
- 7 参考情報
- 8 チェックリスト

【別添資料】 ノロウイルスの感染性推定遺伝子検査法 操作手順

1 基本的な注意事項

- (1) 実験時は手袋、マスク、実験衣を着用し、作業者の安全を確保するよう適切な安全対策に留意する。
- (2) ウイルス液は微量のため、飛沫等が発生しないように取り扱いに注意する。
- (3) 作業台等にウイルス液が付着した場合は、速やかに次亜塩素酸ナトリウム液を噴霧してペーパー等でふき取る。

2 使用する代表的な資材（実験1回分）

(1) 試料の作製

- ア FRP 製水槽 丸型（容量 3.3m³） 1 台
- イ ポリカーボネイト円形水槽（容量 200L） 1 台
- ウ 軟質ビニールチューブ 口径 4×6 mm
- エ エアーストーン 50φ ホース口 4 mm 2 個
（必要な場合：エアレーションポンプ(参考最大風量 7 L/min)
- オ サーモヒーター&サーモスタット 1000 W セット 1 セット
- カ 園芸支柱（籠吊り下げ用）直径 11 mm×120 cm 2 本
- キ 養殖籠 直径 上枠 39cm 下枠 45cm 2 個
- ク 発泡スチロール（水槽の蓋用） 縦 1 m×横 1 m 1 枚
- ケ 蓋つきバケツ 1 個（15L）

(2) 実験機材の滅菌処理用の資材

- ア 次亜塩素酸ナトリウム溶液 濃度 12%
- イ チオ硫酸ナトリウム溶液 濃度 30%
- ウ オートクレーブバッグ
- エ オートクレーブ
- オ コンテナ（足踏消毒用）縦 359mm×横 259mm×高さ 140mm
- カ 霧吹き

3 ヒトノロウイルス汚染カキ試料作製

令和2-4年度包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業短期課題解決型研究「カキ中のノロウイルス低減対策に関する研究」において、カキがノロウイルスを取り込む条件を検討した。その結果、以下に示す条件が汚染カキ作製に好ましいと考えられた。

	基本条件
エアー	あり
水温	10-20℃*
pH	8.1 (調整なし)
餌	無
塩分濃度	30 (調整なし)
時間	48 時間

*本手順書においては、20℃設定を提案する。

- (1) FRP 水槽内や水槽の周囲に、次亜塩素酸ナトリウム水溶液(有効塩素濃度 1,000ppm)を入れた踏込消毒水槽や霧吹きを準備する。



踏込消毒水槽



霧吹

- (2) FRP 製水槽内に 200L ポリカーボネイト円形水槽を設置する。



水槽設置図

- (3) 設置した 200L 水槽に砂ろ過海水を 175L 貯め、エアーストーン 2 個で微通気を施し、サーモヒーターで 20℃に調温する。

- (4) 養殖籠 2 つに殻付きカキを 35 個ずつ (計 70 個) 入れ、(1) で準備した水槽にそ

それぞれの籠が上下段になるように園芸支柱に吊るして収容し、1 日以上(1-3 日間)馴致する。なお、上下の籠は重なる部分が少なくなるように配置する。



養殖籠収容図



水槽収容図（平面）



水槽収容図（側面）

（５） 馴致後、水槽にウイルスを添加し、発泡スチロールで蓋をする。添加するウイルス量は、作製したい汚染カキ濃度に応じて **5 汚染条件の検討** の表を参考に決定する。

* 添加時はウイルス飛散防止のため通気を止める。



蓋設置図

（６） ウイルスを添加した 24 時間後に、再度ウイルスを添加する。

* 添加時はウイルス飛散防止のため通気を止める。

（７） （６）でウイルスを添加した 24 時間後に、ヒーターを切り、通気を止めてから蓋を外し、カキを水槽から取り出し、蓋つきバケツに入れる。



平面図

（８） 以降のサンプル処理は別添【ノロウイルスの感染性推定遺伝子検査法操作手順】を参考に行う。

4 試料作製終了後の滅菌処置（汚染した不要なカキの処理を含む）

（１） 水槽にカキを入れた状態で、次亜塩素酸ナトリウムを終濃度が有効塩素濃度

1,000ppm になるように添加し、蓋をして 15 分間通気して止める。

- (2) 水槽の周囲、水槽の縁、水槽の蓋等を霧吹きに入れた有効塩濃度 1,000ppm の次亜塩素酸ナトリウム溶液を噴霧して滅菌する。
- (3) 1 時間以上静置した後、水槽にチオ硫酸ナトリウム溶液（おおよそ塩素添加量の 2 分 1 量）を添加し、通気して塩素を中和する。
- (4) 塩素の中和完了後、カキを水槽から取り出し、オートクレーブバッグに入れる。
* カキの突起により袋が破れるため、3 重にすると良い。
- (5) 袋詰めしたものをオートクレーブして滅菌を完了する。
- (6) オートクレーブ滅菌後は各種規制に従い、各施設の責任において処理する。

5 汚染条件の検討

令和 2 年度から 4 年度にかけて、ノロウイルス GII.4、GII.17、GI.7 の 3 つの型を用いてウイルス汚染カキを作製した。上記に記載した方法で、1 回の実験を 2 ～ 4 回反復した。

ウイルスの水槽中の終濃度と中腸腺中のウイルス取込量 (log copies/g、実験毎の平均値)、陽性率 (%)、実験毎の陽性率) を表 1 ～ 6 に示した。検出は「定量下限値以下」、ND は「不検出」、横線は「実験未実施」の意味である。

- * カキによるウイルスの蓄積効率については、カキの産地やウイルスの遺伝子型及びロットにより影響され、季節変動の影響も考えられうる。特に、夏季における産卵直後のミズガキはウイルスを取り込まないことが明らかになっている。また、今回は試験的に個体別に検出しているが、検査時には 3 ～ 10 個程の検体（中腸腺）を合わせて 1 検体として分析する。
- * 本実験方法で安定的にノロウイルス汚染カキを作成するには、ノロウイルス GII.4 では終濃度 7.2log copies/L 以上、ノロウイルス GII.17 では終濃度 4.8log copies/L 以上、ノロウイルス GI.7 では終濃度 6.8log copies/L 以上のウイルスを接種する必要があった。

表1 ノロウイルス GII.4 中腸腺中の平均ウイルス陽性率 (%)

終濃度 (log copies/L)	実験月						
	1月	2月	3月		4月	6月	9月
	下旬	上旬	上旬	下旬	下旬	下旬	上旬
2.8	-	ND	-	-	-	-	-
4.8	ND	ND	-	-	16.7	-	-
5.8	25.0~50.0	-	-	-	-	25.0	6.7
6.8	-	-	-	55.0~85.0	-	75.0	-
7.2	-	-	94.4~100.0	88.9	-	-	-

表2 ノロウイルス GII.4 中腸腺中の平均ウイルス取込量 (log copies/g)

終濃度 (log copies/L)	実験月						
	1月	2月	3月		4月	6月	9月
	下旬	上旬	上旬	下旬	下旬	下旬	上旬
2.8	-	ND	-	-	-	-	-
4.8	ND	ND	-	-	検出	-	-
5.8	検出~4.8	-	-	-	-	3.8	検出
6.8	-	-	-	4.8~5.6	-	4.7	-
7.2	-	-	4.8~5.3	5.0	-	-	-

表3 ノロウイルス GII.17 中腸腺中の平均ウイルス陽性率 (%)

終濃度 (log copies/L)	実験月			
	11月		12月	
	上旬	下旬	上旬	下旬
3.8	-	-	62.5	12.5
4.8	75.0	62.5	87.5	-
5.8	100.0	-	100.0	-

表4 ノロウイルス GII.17 中腸腺中の平均ウイルス取込量 (log copies/g)

終濃度 (log copies/L)	実験月			
	11月		12月	
	上旬	下旬	上旬	下旬
3.8	-	-	5.5	検出
4.8	4.5~5.0	5.7	5.5	-
5.8	5.8~5.9	-	5.8	-

表5 ノロウイルス G I.7 中腸腺中の平均ウイルス陽性率 (%)

終濃度 (log copies/L)	実験月		
	1 月	2月	12月
	上旬	下旬	下旬
3.8	12.5	-	-
4.8	-	11.1~16.7	100
6.8	77.8	-	83.3~100.0

表6 ノロウイルス G I.7 中腸腺中の平均ウイルス取込量 (log copies/g)

終濃度 (log copies/L)	実験月		
	1 月	2月	12月
	上旬	下旬	下旬
3.8	検出	-	-
4.8	-	検出	6.3~6.4
6.8	4.7	-	4.3~4.7

【参考】

25 L の海水に 13-25 個のカキを並べても汚染カキを作製することができる。このような小規模試験を実施した結果について、参考として掲載する。汚染カキの作製方法は、上記のとおりである。

表 7 ノロウイルス GI.7 中腸腺中の平均ウイルス陽性率(%)

終濃度	試験月								
log copies/L	1月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
3.5	-	-	-	-	-	-	11	-	-
4.5	16.7	-	-	67	0	11	78	89-100	-
5.5	-	100	100	-	0	29	89-100	-	100

表 8 ノロウイルス GI.7 中腸腺中の平均ウイルス取込量(log copies/g)

終濃度	試験月								
log copies/L	1月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
3.5	-	-	-	-	-	-	5.4	-	-
4.5	4.5	-	-	5.3	ND	ND-4.5	5.3	6.1	-
5.5	-	5.6	6.7	-	ND	ND-6.3	5.7-6.8	-	7.1-7.8

表 9 ノロウイルス GII.17 中腸腺中の平均ウイルス陽性率(%)

終濃度	試験月								
log copies/L	1月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
3.4	-	-	-	-	-	-	11	-	-
4.1	-	-	-	-	-	-	-	89-100	-
4.4	-	-	-	67	-	22	89	100	-
5.1	83-100	-	-	-	-	-	-	-	88-100
5.4	-	78	87	-	100	33-44	56-67	-	-

表 10 ノロウイルス GII.17 中腸腺中の平均ウイルス取込量(log copies/g)

終濃度	試験月								
log copies/L	1月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
3.4	-	-	-	-	-	-	4.8	-	-
4.1	-	-	-	-	-	-	-	6.0-7.0	-
4.4	-	-	-	6.1	-	5.3	6.5	5.9	-
5.1	5.4-5.6	-	-	-	-	-	-	-	6.1-6.3
5.4	-	6	6.7	-	5.8	5.6	6.2	-	-

6 ノロウイルスの検出法

カキ中のヒトノロウイルスの検査法には、感染性推定遺伝子検査法、厚生労働省の通知法、改良法、ISO 法等がある。本試験は感染性推定遺伝子検査法(別添)により行った。この試験を始める前に、本研究課題で用いる定量法による回収率を求めた。具体的には、未汚染カキの中腸腺を取り出してネコカリシウイルスを接種し感染性推定遺伝子検査法と同一の RNA 抽出、dT プライマーを用いた逆転写、リアルタイム PCR に供した。接種したネコカリシウイルス液からも、同様の条件で RNA を抽出し、逆転写反応とリアルタイム PCR に供した。リアルタイム PCR のプライマーは野田らの報告書に記載のものを使用した¹⁾。カキ中腸腺からの定量値と接種したウイルス検体の定量値の差から、本課題で用いる定量法の回収率を計算した。回収率はおよそ 20%であった。そのため、本報告データはカキ中腸腺中のノロウイルス量を定量する際に、回収率から数字を補正した。

本手順書に掲載されている試験結果は、ネコカリシウイルスを工程管理ウイルスとして用いて実施された。感染性遺伝子推定検査法(別添資料)の工程管理ウイルスとしてはネコカリシウイルスが使用されており、他の検査法において工程管理ウイルスとして使用されているマウスノロウイルス(MNV)や Mengo ウイルスを、同検査法の工程管理に適用できるかについての検証は実施されていない。

- 1) 食品のウイルス汚染のリスク評価のための遺伝子検査法の開発と応用に関する研究
研究成果報告書

[https://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=cho99920131203
&fileId=1203](https://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=cho99920131203&fileId=1203)

7 参考情報

包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業短期課題解決型研究「カキ中のノロウイルス低減対策に関する研究」最終年度報告書

ノロウイルスの検出法について：食安監発第 0514004 号（食安監発第 1105001 号）

<https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/031105-1.html>

別添 ノロウイルスの検出法：厚生労働省

<https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/dl/031105-1a.pdf>

食品のウイルス汚染のリスク評価のための遺伝子検査法の開発と応用に関する研究

<http://www.fsc.go.jp/fsciis/technicalResearch/show/cho99920131203>

ISO 15216 に準拠した検査法（ISO 法）に関する検討結果について

https://www.maff.go.jp/j/shokusan/hq/i-4/attach/pdf/yusyutu_shinsei_asia-375.pdf

ISO 15216-1 に基づくノロウイルス検査法の導入に向けた取組について

https://www.maff.go.jp/j/study/nov_oysters_survey_committee/attach/pdf/5th_time-3.pdf

カキのノロウイルスの国内及び国際的検査法(ISO 15216)に係る性能比較

日本食品微生物学会雑誌 Jpn. J. Food Microbiol., 39(2), 83–86, 2022

病原体検出マニュアル ノロウイルス（第 1 版）：国立感染症研究所

<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Norovirus20190611.pdf>

8 チェックリスト

区分	No.	項 目	チェック	備 考
水槽準備	1	FRP円形水槽に200L円形水槽を設置する。		
	2	200L円形水槽にろ過海水を175L貯める。		
	3	水槽にエアーストーンを2個設置し微通気する。		
	4	水温をサーモヒーターで20℃に調温する。		
	5	養殖籠2つに殻付きカキを35個ずつ（計70個）収容する。		
	6	カキ収容籠を園芸支柱に吊るし、上下段で水槽に設置する。		
	7	設置したカキを1～3日間馴致する。		
ウイルス添加	8	ウイルス添加前に通気を止める。		
	9	ウイルスを水槽に添加し、発砲で蓋をする。		
	10	通気を開始する。		
	11	ウイルスを添加した24時間後に通気を止める。		
	12	再度ウイルスを水槽に添加し、発砲で蓋をする。		
	13	通気を開始する。		
サンプリング	14	再度ウイルスを添加した24時間後に通気を止める。		
	15	サーモヒーターの電源を切る。		
	16	蓋を外して、カキを水槽から静かに取り出す。		
	17	取り出したカキは蓋つきバケツに収容する。		
滅菌処置	18	水槽に次亜塩素酸ナトリウム溶液を終濃度が1000ppmになるように添加する。		
	19	蓋をして通気を15分間行う。		
	20	通気開始15分後、通気を止め1時間以上静置する。		
	21	水槽の周囲、水槽の縁、水槽の蓋等に次亜塩素酸ナトリウムを散布する。		
	22	静置後、チオ硫酸ナトリウム溶液を添加し、通気して塩素を中和する。		
	23	塩素の中和が完了後、水槽の水を捨てる。		
	24	水槽からカキを取り出し、オートクレーブパックに袋詰めする。		
	25	袋詰めしたものをオートクレーブして滅菌を完了する。		
	26	オートクレーブ滅菌後は各種規制に従い、各施設の責任において処理する。		