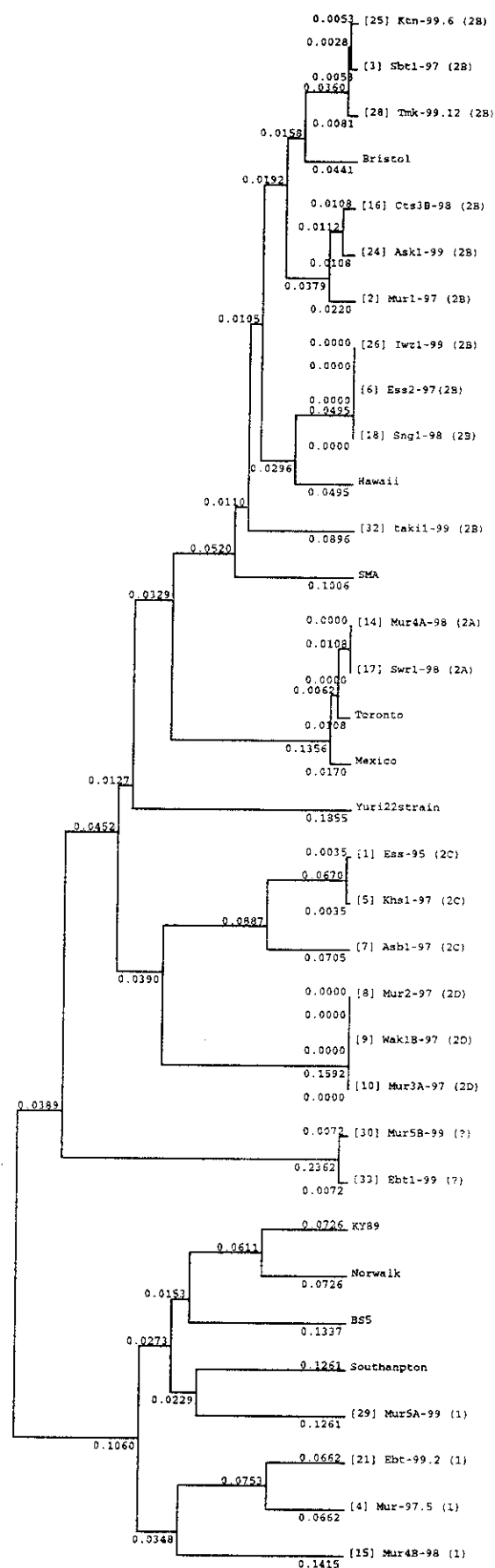


Primer検定結果 (Genogroup別)

Genogroup	No.	発生年月	MR3/4	82/81	P1/3	P1/2	Y1/2	EM
I	(4)	97. 5	-	+	-	-	+	-
	(15)	98. 2	+	+	-	+	-	-
	(21~23)	99. 2	-	+	-	-	-	+
	(29)	99.12	-	-	+	-	-	+
	(35)	00. 1	-	+	+	+	+	+
II A	(14)	98. 2	+	+	+	+	+	+
	(17)	98. 5	+	+	+	+	+	+
II B	(6)	97.12	+	+	+	+	-	+
	(18)	98.10	+	+	+	+	+	+
	(26)	99. 6	-	+	+	+	+	+
	(16)	98. 3	-	-	+	+	+	-
	(24)	99. 2	+	+	+	+	+	NT
	(2)	97. 2	+	+	+	+	-	NT
	(3)	97. 3	+	-	+	+	+	NT
	(25)	99.	-	+	+	+	+	+
	(27)	99.12	-	-	-	+	-	(+)
	(28)	"	+	+	+	+	+	+
	(32)	99.12	-	+	+	+	+	+
II C	(1)	95.	-	-	+	+	-	+
	(5)	97.11	+	-	+	+	+	+
	(7)	97.12	+	+	+	+	-	NT
II D	(8)	97.12	+	+	+	+	+	NT
	(9)	97.12	+	+	+	+	+	+
	(10)	97.12	+	+	+	+	+	+
	(11)	"	-	+	+	+	+	+
	(12)	"	-	+	-	-	-	+
?	(30)	99.12	-	+	+	-	-	+
	(33)	99.12	-	+	+	-	-	+



ポリメラーゼ領域 (280bp)

Primer検定結果

発生年月	地区	場所	(牡蠣)	検体No.	Genogroup	MR3/4	82/81	P1/3	P1/2	Y1/2	EM
(1) 95.	江差	小学校	(-)	32	II C	-	-	+	+	-	+
(2) 97.2	室蘭	旅館	(-)	19	II B	+	+	+	+	-	NT
(3) 97.3	士別	調理弁当	(-)	3	II B	+	-	+	+	+	NT
(4) 97.5	室蘭	小学校	(-)	2	I	-	+	-	-	+	-
(5) 97.11	千歳	幼稚園	(-)	44	II C	+	-	+	+	+	+
(6) 97.12	江差	保育所	(-)	2	II B	+	+	+	+	-	+
(7) 97.12	旭川	ホテル	(-)	1	II C	+	+	+	+	-	NT
(8) 97.12	室蘭	飲食店	(+)	9	II D	+	+	+	+	+	NT
(9) 97.12	稚内	飲食店	(+)	6	II D	+	+	+	+	+	+
(10) 97.12	室蘭	飲食店	(+)	11	II D	+	+	+	+	+	+
(11)				6	II D	-	+	+	+	+	+
(12)				13	II D	-	+	-	-	-	+
(13)				10	-	-	-	-	-	-	+
(14) 98.2	室蘭 (登別)	病院	(+)	3	II A	+	+	+	+	+	NT
(15)				21	I	+	+	-	+	-	-
(16) 98.3	千歳	家庭	(+)	2	II B	-	-	+	+	+	-
(17) 98.5	砂原	幼稚園	(-)	6	II A	+	+	+	+	+	-
(18) 98.10	砂川	保育所	(-)	120	II B	+	+	+	+	+	+
(19) 98.12	帯広	大会後食事	(-)	4	-	-	-	-	-	-	+
(20)				5	-	-	-	-	-	-	+
(21) 99.2	江別	保育所	(-)	1	I	-	+	-	-	-	+
(22)				8	I	-	+	-	-	-	+
(23)				17	I	-	+	-	-	-	+
(24) 99.2	旭川	飲食店	(-)	105	II B	+	+	+	+	+	NT
(25) 99.6	倶知安	養護老人ホーム	(-)	72	II B	-	+	+	+	+	+
(26) 99.6	岩見沢	小学校1クラス	(-)	3	II B	-	+	+	+	+	+
(27) 99.12	札幌	法事	(+)	苫1	II B	-	-	-	+	-	(+)
(28)				苫2	II B	+	+	+	+	+	+
(29) 99.12	室蘭 (伊達)	飲食店	(+)	29	I	-	-	+	-	-	+
(30)				26	?	-	+	+	-	-	+
(31)				40	-	-	-	-	-	-	+
(32) 99.12	滝川	部活合宿	(-)	39	II B	-	+	+	+	+	+
(33) 99.12	江別 (厚田)	福祉施設	(+)	6	?	-	+	+	-	-	+
(34)				2	-	-	-	-	-	-	+
(35) 00.1	岩見沢	飲食店	(+)	3	I	-	+	+	+	+	+
(36)				4	-	-	-	-	-	-	+

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

分担研究者 斎藤博之 秋田県衛生科学研究所微生物部主任

研究要旨 小型球形ウイルス(NLV)による食中毒や集団発生に早期に対応するために RT-PCR 用のプライマーを新規に設計し、従来から用いられてきたプライマーとの検出効率を比較した。新規開発プライマー対(P1/P2、P1/P3、Y1/Y2)は糞便検体に適用した場合はいずれも1回の PCR で NLV を検出できるだけの感度が得られた。従来のプライマー(81/82、Yuri22)も加えて5通りの PCR を比較したところ、流行時期や地域によって有効なプライマーが異なり、複数の反応を同時に行う必要があるものと考えられた。また、流行経路を解明する基礎的データ収集の一環として下水(処理前、及び、処理後)からの NLV 検出を試みた。12 月に入った時点で下水中に NLV が検出され、1 月・2 月の下水サンプルからも検出された。また、下水処理場を経た後も NLV は全く影響を受けることなく検出された。従って NLV による環境汚染の予防対策としては下水処理システムの改善が大きな意義を持つことになろう。

A. 研究目的

冬季に多発する小型球形ウイルス(NLV)による下痢症の検査は最近では RT-PCR 法が用いられることが多い。現在のところ我国で用いられているプライマーは 35/36 系(35/36、81/82)と Yuri 系(MR3/4、Yuri52F/R、Yuri22F/R)が主流を占めているものの、いずれも「特定の株」の配列に基づいたプライマーであり、より広い範囲の株に対応できるようなプライマーの設計が望まれた。こうした目的のために、平成 10 年度の本研究班の解析評価会議で多くの株の塩基配列を組み合わせた「特定の株によらない」プライマーとして P1/P2、P1/P3、Y1/Y2 が提案された。今年度の事業としてそれらの新規開発プライマーと従来のプライマーとの検出効率の比較を行った。

また、比較に使用する検体として糞便のほかには下水も加え、環境中の NLV の実態調査も合わせて行った。

B. 研究方法

1) 検体種別: 糞便検体として、病原体サーベイランス定点病院のある3地域から感染性胃腸炎と診断された患者の糞便を集めた。期間は平成 11 年 3 月から平成 12 年 3 月までで、地域別では秋田(市)70 検体、由利 8 検体、大館 26 検体である。さらに食中毒や施設内集団発生例の糞便検体として 12 事例 394 検体を加えた。

下水検体として平成 11 年 9 月から平成 12 年 2 月まで 2 週間おきに下水処理場において流入水(処理前)

と放流水(処理後)を採水した。

2) 検体処理法: 糞便検体からはグラスミルク法(平成 10 年度本研究班報告書参照)によりRNAを抽出した。下水は1リットルを6000rpmで粗遠心して固形物を除いた後、10%ポリエチレングリコールと1M食塩を加えて4℃に一晩放置し、再び6000rpmで遠心してウイルス粒子を回収した。回収したペレットからはISOGEN-LSによってRNAを抽出した。

3) PCR: 抽出したRNAはエキストラバンドを減らすためにDNase I処理をしてからランダムプライマーによる逆転写反応を行った(平成 10 年度本研究班報告書参照)。合成されたcDNAを5つに分割し、それぞれYuri系、35/36系、Y1/Y2、P1/P2、P1/P3のプライマー系によるPCRを行った。Yuri系と35/36系は最初にMultiplex primer setによる1次PCRを行ってからYuri22F/R、及び81/82によるnested PCRを行った(条件等は平成 10 年度本研究班報告書参照)。Y1/Y2、P1/P2、P1/P3の各反応系は1次PCRのみで判定した。PCRの条件は、「94℃ 1分、45℃ 2分、60℃ 4分」を5サイクル行い、その後で「94℃ 30秒、50℃ 30秒、72℃ 30秒」を30サイクル行った。また、ランダムプライマーによる逆転写反応と比較するためP3を用いてcDNAを合成し、それをP1/P2で増幅する反応系も合わせて行った。

4) サザンブロット: PCRで観察されたバンドを同定するために、ゲルからナイロン膜に転写し、当該事例と無関係の患者から増幅したPCR断片全長をプローブとしたサザンブロットを行った。

5) SSCP: 下水中のNLVに対してSSCP解析を行った。方法は平成9年度本研究班報告書に記載したとおりである。

C. 研究結果

表1(秋田市)、表2(由利)、表3(大館)にそれぞれの地域におけるプライマー別検出成績を示した(陰性検体も含めて表示)。マス目を塗りつぶしてある部分が検出を示している。3地域のいずれも秋以降の検体に対してYuri系や35/36系の成績が低くなったが、Y1/Y2やP1/P2、P1/P3による検出効率には時期によるバラツキが少なかった。表4には集団発生事例別にプライマーごとの検出成績を示した。分類の「食中毒1類」はカキが原因であったもの、「食中毒2類」はカキと無関係のもの、「施設内」は老人施設などで人から人へ感染したと考えられるものを表す。また、かつこ内の数字は「絶対的検出数」(そのプライマーでのみ検出できた数)を示している。これによると、複数のプライマーにより同時に検出される場合が多いが、事例6～9のようにYuri系や35/36系が無効で、新規開発プライマーで初めて同定できたケースもあった。これらの事例はいずれも時期的に検査定点での成績と同じ傾向を示している。

下水については表 5 に検出結果を示した、12 月から 2 月にかけて NLV が検出され、その時期は感染症サーベイランスにおける感染性胃腸炎の流行時期と一致した(図 1 「秋田市」及び「秋田中央」参照)。また、処理後の放流水であっても NLV は検出された。下水から検出された NLV のSSCPパターン(図 2)からは、雑多なNLVが含まれていることがわかった。

D. 考察

本研究で行ったプライマーの比較検討により、新規に開発されたプライマーは検査定点、集団発生のいずれにおいても安定した検出効率を得られることがわかった。ただし、個々の事例においては 1つのプライマーのみを使用するのは現段階では無理があるためやはり複数種類のプライマー系を同時に使用する必要があると考えられる。そのための手間を簡略化するためには逆転写反応をランダムプライマーで共通化するのは効果があると思われる。本研究では P3 で逆転写した後に P1/P2 で増幅するプライマー系も検討したが、結果は表 1～5 の P1/P3(ランダムプライマーで逆転写して P1/P3 で増幅)とほとんど同じであった。これは増幅反応時には P2 から合成された DNA 鎖を P3 から合成された DNA 鎖が追いかける形となり、Taq DNA polymerase のエクソヌクラーゼ活性によって先行鎖が分解されるため、結果として P2 の寄与は低下してしまうものと考えられる。従って反応系に 3 種を混合させるよりも、P1 と P2 あるいは P1 と P3

のように 2 種類を用いた方が感度的にも有利であり判定もしやすくなる。ランダムプライマーによる逆転写反応に関しては条件を整えれば感度的には問題が無くなる(終濃度 $2.5 \mu\text{M}$ 、 $25\sim 30^\circ\text{C}$ 10 分、その後 37°C 30 分)。終濃度は単一プライマーによる逆転写反応よりも高く、また最初は低温で反応させる(ランダムプライマーの T_m が 30°C であるため)ことが重要である。

下水にからの検出成績をみると全てのプライマーで検出されていることがわかる。これは下水中には多くの種類の NLV が混在していることを示しており SSCP のパターンからもそれは証明される(単一の遺伝子は 2 本の SSCP バンドになる)。感染症サーベイランスにおける感染性胃腸炎患者の増加には当然ロタウイルスやアデノウイルスによるものも含まれると考えられるが、近似的に NLV によるものと仮定すればその NLV は散发例(検査定点での成績、表 1～3)に相当する。散发例の NLV は遺伝子的に多種類のウイルスが同時に流行していることが SSCP の結果からわかっているため、多くの家庭の便所から排泄された NLV のプールである下水にもやはり多種類の NLV が含まれる結果となる。また、下水中の NLV の SSCP パターンを比較すると、同じ多種類であっても採水時期によってパターンが変化してくるのがわかる(図 2)。これは同じ地域(下水処理場管轄区)であっても、流行する NLV は極めて短期間に(本研究では 2 週間)その種類が変わることを意味する。また、放流水にも NLV が含まれていることは、下水

処理の行程においてNLVは除去されないとみなすことができる。

E. 結論

新規設計のプライマーはいずれも安定した検出効率が得られるが、現時点では1つの検体に対して複数種類のPCRを行い総合判定するのが望ましい。手間の軽減策の1つとしてランダムプライマーの使用が考えられる。また、新規開発プライマーは混合塩基を含むのでSSCP法には不向きである。この点に関してYuri系や35/36系は解析用プライマーとして再評価されるべきである。

現在の下水処理システムではNLVを除去できないため、カキの安全性を高めるにはその改良が具体的な目標となるであろう。なお、本研究で行った下水の検査はNLV検出に限らず、病原体サーベイランスの方法の1つとして有効である。一定のエリアのマクロな情報として下水検査も加えれば、患者からの検出成績のバラツキを補完することができると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiroyuki Saito, Shioko Saito, Kazuko Kamada, Seizaburo Harata, Hiroyasu Sato, Morihiro Morita and Yoshimichi Miyajima. Application of RT-PCR designed from the sequence of the local SRSV Strain to the screening in viral gastroenteritis outbreaks. Microbiology and

Immunology 42, No.6, 439-446 (1998)

2. 学会発表

- 1) 斎藤博之、原田誠三郎、佐藤宏康. 最近の流行事例におけるSRSVの特徴と効果的なRT-PCR法の検討. 第45回日本ウイルス学会学術集会. 1997

- 2) 斎藤博之、原田誠三郎、佐藤宏康. SRSVに起因する食中毒における疫学指標としてのSSCP解析の検討. 第46回日本ウイルス学会学術集会. 1998

3. その他の発表

- 1) 斎藤博之、八柳潤、佐藤宏康、宮島嘉道、鈴木紀行、森田盛大. 老人保健施設内で集団発生したSRSV感染症に関する調査報告. Infectious Agents Surveillance Report (病原微生物検出情報)、Vol.18、No.6、5-6 (1997)
- 2) 斎藤博之、斎藤志保子、原田誠三郎、佐藤宏康、宮島嘉道. 最近のSRSV流行事例における効果的なRT-PCR法の検討. Infectious Agents Surveillance Report (病原微生物検出情報)、Vol.19、No.1、pp5 (1998)
- 3) 斎藤博之、原田誠三郎、佐藤宏康、宮島嘉道、鏡屋公雄、高橋勝美、添野武彦. 老人保健施設内で集団発生した小型球形ウイルス感染症に関する調査報告(第2報). Infectious Agents Surveillance Report (病原微生物検出情報)、Vol.20、No.11、5-6 (1999)

表1 検査定点におけるプライマー別NLV検出状況(秋田市)

月	検体番号	年月日	Yuri22	81/82	Y1/Y2	P1/P2	P1/P3	地域
3	38643	1999/3/27						秋田
	38647	1999/3/30						秋田
4	38654	1999/4/1						秋田
	38675	1999/4/5						秋田
	38678	1999/4/6						秋田
	38688	1999/4/7						秋田
	39696	1999/4/8						秋田
	38697	1999/4/8						秋田
	38746	1999/4/16						秋田
	38874	1999/4/22						秋田
5	38912	1999/5/10						秋田
	38966	1999/5/15						秋田
	38973	1999/5/17						秋田
	38984	1999/5/19						秋田
	38996	1999/5/25						秋田
6	39023	1999/6/3						秋田
	39046	1999/6/3						秋田
9	39479	1999/9/6						秋田
	39550	1999/9/16						秋田
	39552	1999/9/20						秋田
	39561	1999/9/20						秋田
	39569	1999/9/22						秋田
	39580	1999/9/24						秋田
	39592	1999/9/28						秋田
10	39603	1999/10/3						秋田
	39650	1999/10/6						秋田
	39659	1999/10/12						秋田
	39683	1999/10/18						秋田
11	39731	1999/11/2						秋田
	39742	1999/11/4						秋田
	39734	1999/11/5						秋田
	39738	1999/11/5						秋田
	39748	1999/11/10						秋田
	39749	1999/11/10						秋田
	39752	1999/11/11						秋田
	39758	1999/11/12						秋田
	39760	1999/11/12						秋田
	39761	1999/11/14						秋田
	39835	1999/11/19						秋田
	39845	1999/11/25						秋田
	39848	1999/11/25						秋田
	39858	1999/11/25						秋田
	39864	1999/11/26						秋田
	39866	1999/11/29						秋田
	39868	1999/11/29						秋田
	39878	1999/11/30						秋田

表1(続き) 検査定点におけるプライマー別NLV検出状況(秋田市)

月	検体番号	年月日	Yuri22	81/82	Y1/Y2	P1/P2	P1/P3	地域
12	39919	1999/12/3						秋田
	39922	1999/12/3						秋田
	39931	1999/12/6						秋田
	39932	1999/12/6						秋田
	39933	1999/12/6						秋田
	39934	1999/12/6						秋田
	39961	1999/12/9						秋田
	39963	1999/12/13						秋田
	39978	1999/12/13						秋田
	39980	1999/12/15						秋田
	39981	1999/12/15						秋田
	39983	1999/12/15						秋田
	39969	1999/12/16						秋田
	39970	1999/12/16						秋田
	39972	1999/12/16						秋田
	39977	1999/12/16						秋田
	39984	1999/12/16						秋田
	39987	1999/12/20						秋田
	39988	1999/12/21						秋田
	39993	1999/12/25						秋田
1	00320023	2000/1/17						秋田
	00320121	2000/1/20						秋田
2	00320495	2000/2/8						秋田
3	00320564	2000/3/8						秋田

表2 検査定点におけるプライマー別NLV検出状況(由利地方)

月	検体番号	年月日	Yuri22	81/82	Y1/Y2	P1/P2	P1/P3	地域
5	38980	1999/5/19						由利
	39000	1999/5/25						由利
	39003	1999/5/27						由利
6	39015	1999/6/1						由利
	39099	1999/6/10						由利
11	39850	1999/11/29						由利
12	39853	1999/12/1						由利
	00320006	1999/12/27						由利

表3 検査定点におけるプライマー別NLV検出状況(大館地方)

月	検体番号	年月日	Yuri22	81/82	Y1/Y2	P1/P2	P1/P3	地域
4	38842	1999/4/19						大館
	38845	1999/4/19						大館
	38848	1999/4/19						大館
	38851	1999/4/19						大館
	38852	1999/4/19						大館
5	38949	1999/5/2						大館
	39053	1999/5/21						大館
6	39070	1999/6/7						大館
	39091	1999/6/7						大館
10	39619	1999/10/4						大館
	39621	1999/10/4						大館
11	39813	1999/11/15						大館
	39814	1999/11/15						大館
	39888	1999/11/15						大館
	39889	1999/11/23						大館
	39891	1999/11/23						大館
12	39909	1999/12/6						大館
	39912	1999/12/6						大館
	39915	1999/12/6						大館
	39916	1999/12/6						大館
	39917	1999/12/6						大館
1	00320056	2000/1/16						大館
	00320069	2000/1/17						大館
2	00320533	2000/2/15						大館
	00320541	2000/2/22						大館
	00320542	2000/2/24						大館

表4 集団事例におけるプライマー別NLV検出状況

番号	年月	分類	検査件数	陽性件数	Yuri22	81/82	Y1/Y2	P1/P2	P1/P3	地域
1	1999/4	食中毒1類	8	3	0	1(1)	2(2)	1(0)	0	雄勝
2	1999/5	施設内	146	38	35(3)	32(0)	28(3)	25(0)	24(0)	秋田
3	1999/6	食中毒1類	60	3	0	3(3)	0	0	0	秋田
4	1999/7	食中毒1類	12	3	1(0)	2(0)	3(1)	2(0)	2(0)	秋田
5	1999/11	施設内	36	24	24(0)	24(0)	20(0)	20(0)	20(0)	秋田
6	1999/12	施設内	24	13	0	0	13(5)	8(0)	8(0)	秋田
7	1999/12	施設内	12	9	0	0	9(0)	9(0)	9(0)	秋田
8	1999/12	施設内	29	16	0	0	14(0)	15(1)	15(1)	秋田
9	2000/1	施設内	12	10	0	0	10(2)	7(0)	8(0)	大館
10	2000/3	食中毒2類	9	7	6(0)	6(0)	7(1)	6(0)	5(0)	由利
11	2000/3	施設内	31	21	2(0)	1(0)	15(0)	21(0)	21(0)	雄勝
12	2000/3	食中毒1類	15	7	6(0)	4(0)	4(0)	5(0)	4(0)	仙北

表5 下水におけるプライマー別NLV検出状況

年月日	種別	Yuri22	81/82	Y1/Y2	P1/P2	P1/P3
1999/9/10	流入水					
	放流水					
1999/9/29	流入水					
	放流水					
1999/10/13	流入水					
	放流水					
1999/10/27	流入水					
	放流水					
1999/11/12	流入水					
	放流水					
1999/11/24	流入水					
	放流水					
1999/12/8	流入水					
	放流水					
1999/12/20	流入水					
	放流水					
2000/1/5	流入水					
	放流水					
2000/1/19	流入水					
	放流水					
2000/2/2	流入水					
	放流水					
2000/2/15	流入水					
	放流水					

図1 感染性胃腸炎発生動向

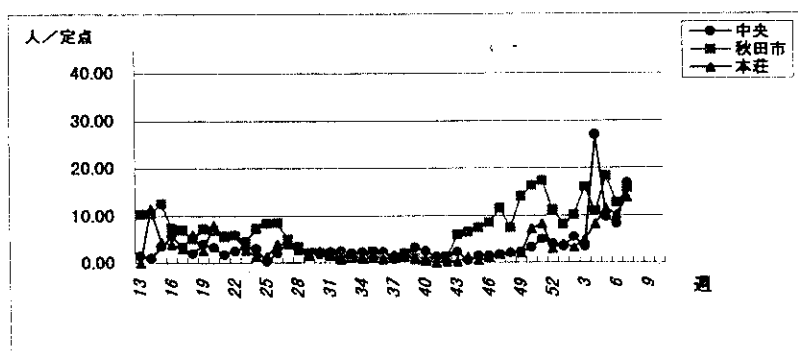
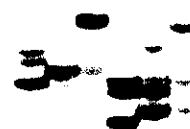


図2 SSCPによる下水中のNLVの遺伝子解析



ウイルス性食中毒遺伝子の検査標準法確立と全国行政対応整備に関する研究

研究者 秋山和夫 宮城県保健環境センター総括研究員

要旨：かきの SRSV 検出状況を月別に調査した結果、検出率は 1 月にピークとなることが判明した。また、かき及び海水・河川水の細菌学的な調査とかきの SRSV 検出状況を比較検討したが、両者間に必ずしも関連は認められなかった。

A. 研究目的

かきにおける SRSV の経時的な動向を調査することで検出時期を明確に把握し、汚染要因解明の資料を得ること。さらに、かき・養殖海域・河川水の細菌学的検査や海水温度の調査を行い、季節的な変動と細菌汚染が SRSV 検出状況へ与える影響を知る目的で行った。

B. 研究方法

＜材料＞ 1996 ～ 99 年度までの 4 年間にわたり、かき出荷前の 8 月から出荷が終了する 3 月まで毎月かきを採取した。4 年間の各月の検査件数は 8 月：6 件、9 月：13 件、10 月：15 件、11 月：36 件、12 月：35 件、1 月：37 件、2 月：13 件、3 月：8 件の合計 163 件であった。

調査には養殖海域より水揚げされた直後にむき身としたかきを用いた。SRSV 検出は 163 件の全てについて行い、E.coli 最確数 (E.coli MPN) は 157 件、一般細菌数は 125 件について測定した。また海水はかきの水揚げと同一地点より採水した 113 件、河川水は養殖海域に流出する河口付近より採水した 47 件について調査した。

＜RNA 抽出＞ RNA 抽出は、中腸線 8 g に PBS40ml を加えストマッカーで処理し遠心後、上清を 6M グアニジンチオシアネートとガラスパウダーで処理して行った。

＜プライマー＞ NV 系 (1st に p36 / p35', 2nd に NV82・SM82 / NV81)、Yuri 系 (1st に MR3 / MR4, 2nd に Yuri22F / 22R) の 2 系統を使用した。

＜PCR 反応条件＞ NV 系は食品衛生法に従い、Yuri 系は 94℃ 1min、45℃ 2min、60℃

4min を 5 サイクル反応後、94℃ 1min、45℃ 1min20sec、72℃ 1min を 30 サイクル行った。サザンハイブリダイゼーションは食品衛生法に従い行った。

＜かきの E.coli MPN と一般細菌数＞

食品衛生法の食品、添加物等の規格基準「生食用かきの成分規格」に従い行った。なお、規格基準は E.coli MPN は 230 以下 / 100g・一般細菌数は 50,000 個以下 / 1g である。

＜海水の大腸菌群最確数 (大腸菌群 MPN)＞

食品衛生法の食品、添加物等の規格基準「生食用かきの加工基準」に従い行った。なお、基準は 70 以下 / 100ml である。

＜糞便性大腸菌群数 / 100ml＞

水質汚濁防止法の水浴場水質判定基準の測定方法に従い行った。

C. 研究結果

1. かきからの SRSV 検出状況

月別の検出率は 8 月：16.7%・9 月：7.7%・10 月：0%・11 月：19.4%・12 月：22.9%・1 月：48.6%・2 月：38.5%・3 月：0%と 8 月から検出され 11 月より検出率が増加し 1 月にピークとなった。

2. かきの SRSV 検出状況と E.coli MPN 及び一般細菌数 (図 1・2)

E.coli MPN230 以内は 132 件でそのうち 30 件 (22.7%) から SRSV が検出された。これに対して規格違反の 231 以上では 26 件中 5 件 (19.2%) から SRSV が検出され、前者との差は認められなかった。特に、SRSV 検出率が高くなる 12・1 月には、1 例を除き規格範囲内で、E.coli MPN の検出限界である 1.8

未満では 34 件中 8 件 (23.5%) と検出率が高くなる傾向があった。

一方、一般細菌数は 1996 年～98 年までの 3 年間に検査した 125 件について検討すると、122 件 (97.6%) は 50,000 個以下の規格基準範囲であり、この中で SRSV が検出されたのは 50 ～ 7500 個の間にある 21 件であった。規格違反は 3 件のみで SRSV は検出されなかった。

3. 海水の大腸菌群 MPN (図 3)

113 件中 109 件 (96.5%) が基準内であり、同時に同一地点で採取したかきからの SRSV 検出は全てこの範囲に含まれていた。しかも、1.8 未満の養殖海域から採取されたかきの SRSV 検出率は、42 件中 13 件 (31%) であり、必ずしも海水の汚染と結びつく結果は得られなかった。

4. 河川水の糞便性大腸菌群数 (図 4)

1997 と 99 年の 2 年間実施したが、11 月以降に糞便性大腸菌群数は上昇する傾向が認められ、最高で 75,000 個まで達した例もあった。これは、この時期に河川水の糞便性大腸菌群による汚染が増大するのではなく、河川の流量が減少するため濃縮される可能性が高いと考えられる。また同時に河口の最も近い養殖海域から採取したかきの SRSV 検出数と糞便性大腸菌群数には関連は認められなかった。

5. かきを採取した海域の海水温度 (図 5)

SRSV が検出された 40 件の採取時における海水温度は、8・9 月の 20℃以上でも検出されたが 15℃以下になると検出数は上昇し、10℃以下でさらに検出数は増加する傾向があった。

D. 考察

今回、経時的にかきの SRSV 検出状況を把握すると共にかき及び環境水中の細菌汚染状況を調査し、その関連について比較検討した。

かきの月別 SRSV 検出状況は海水温が 20℃以上の 8・9 月でも検出されたが、頻度は低率で 10 月には全く検出されなかった。そ

の後、海水温が 15℃以下となる 11 月から検出率が上昇し、10℃以下の 1 月にピークとなった。これらより、海水温が 15℃以下になると SRSV 検出状況に大きな影響を及ぼすと考えられた。このことは宮城県内でのかきの SRSV 検出が県北の養殖海域から始まることが多いことから推察された。

次に、かきの SRSV 検出状況の季節的変動要因として、冬季に発生する感染性胃腸炎患者の動向が考えられる。宮城県感染症発生動向調査によれば、1999 年の第 3 週より感染性胃腸炎患者は増加し、第 5 週まで続いたが流行は短期間で終息した。その後、同年の第 49 週に再び患者報告数の増加が著明となり 2000 年の 8 週現在でもほぼ同じ患者数で推移しており、流行期間が長期にわたっている。これらの期間の SRSV 検出状況は、前者の流行時期では 1 月に検出率がピークとなり、患者が減少した約 1 ヶ月後には急激に減少した。しかし、後者の流行期では 1 月に続き 2 月でも高い検出状況であった。このことから、感染性胃腸炎の発生時期や規模が、かきの SRSV 検出頻度に重要な影響を与える可能性があると考えられた。

次に、かきの E.coli や一般細菌数、海水の大腸菌群及び河川水の糞便性大腸菌群と SRSV 検出との関連については、E.coli MPN や海水の大腸菌群 MPN が検出限界以下でも SRSV が検出されることや季節的に大きな変動が見られないことなどから、細菌学的な因子を指標として SRSV の検出状況を把握することは困難であると考えられた。

E. 結語

1. 海水温が 15℃以下になると SRSV の検出率は高くなる可能性が示唆された。

2. かきからの SRSV 検出頻度は感染性胃腸炎患者の発生時期や規模に影響を受けるものと考えられた。

3. かきの細菌数や環境水の細菌数と SRSV 検出頻度との関連は認められなかった。

図1 カキのE.coli MPN

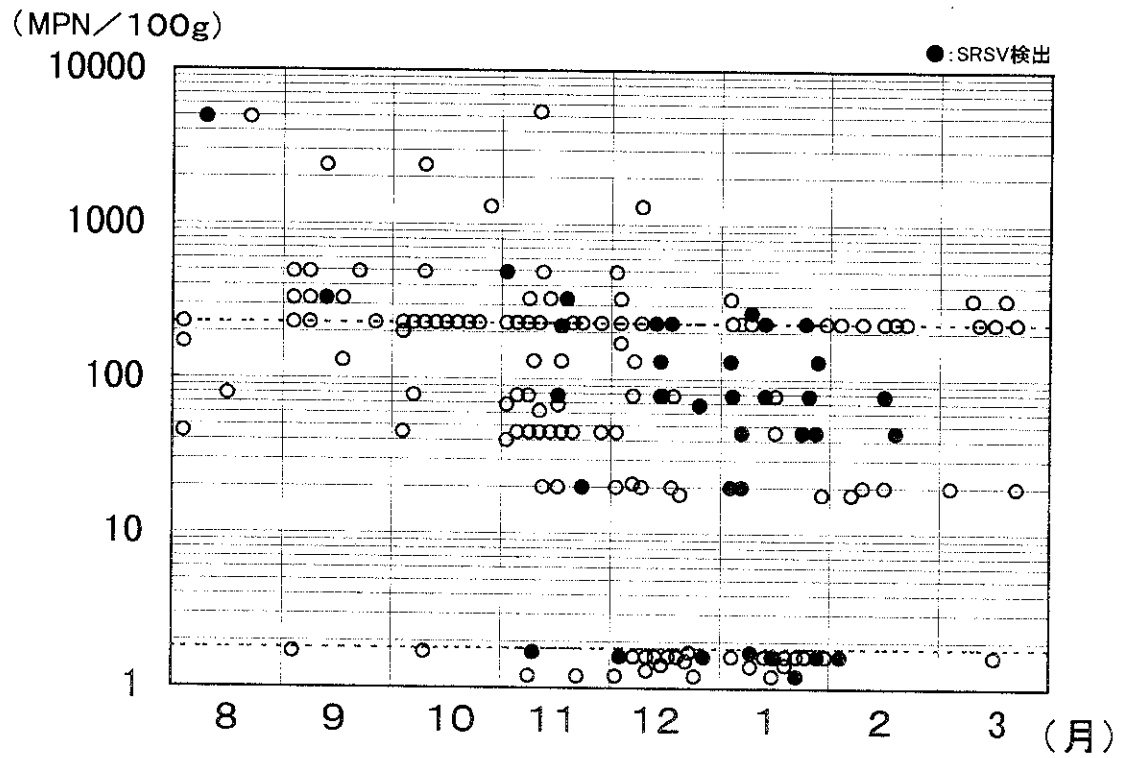


図2 カキの一般細菌数

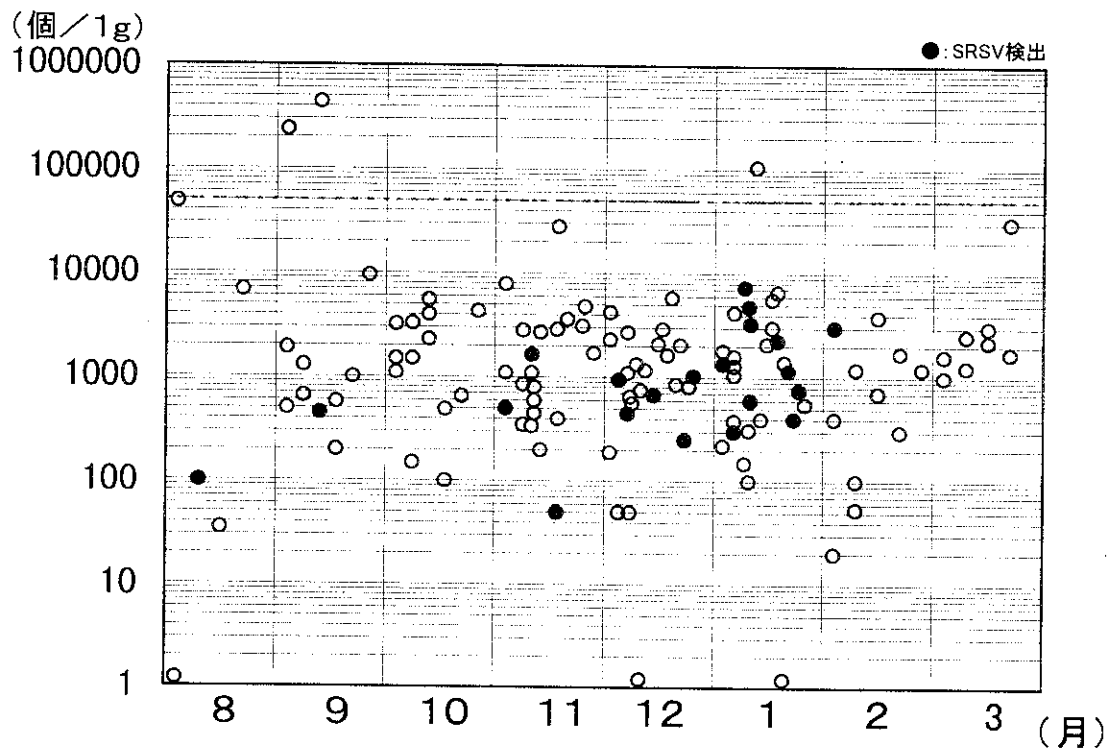


図3 海水の大腸菌群MPN

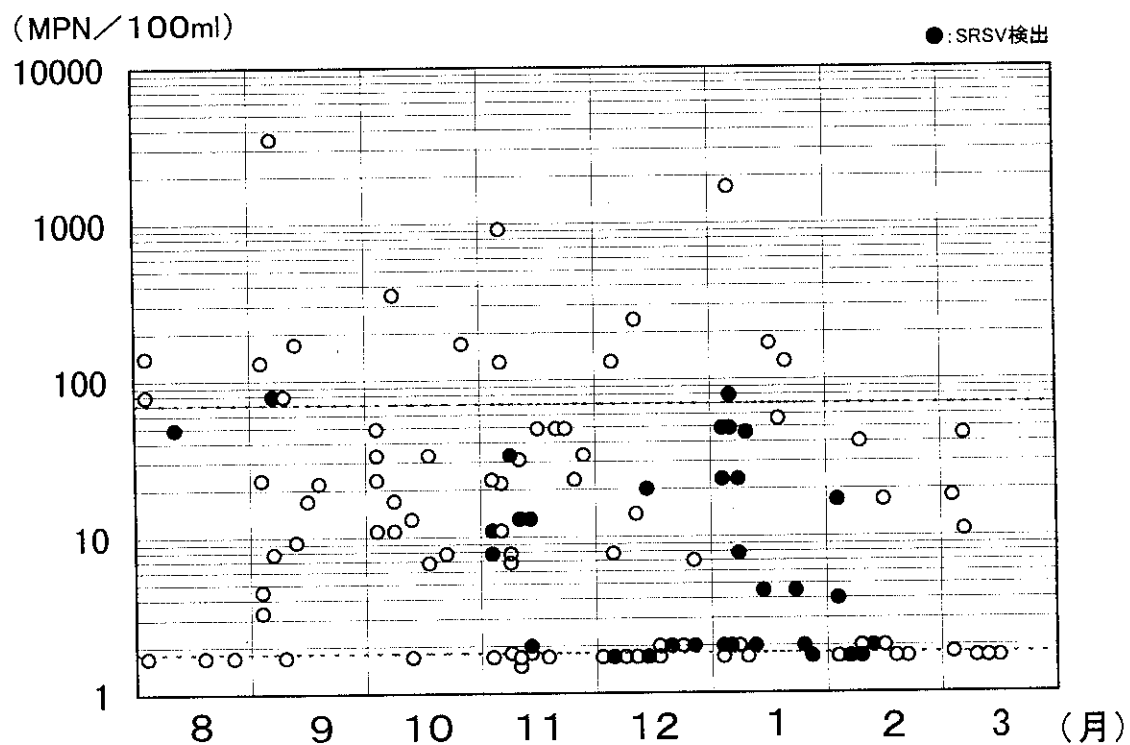


図4 河川水の糞便性大腸菌群

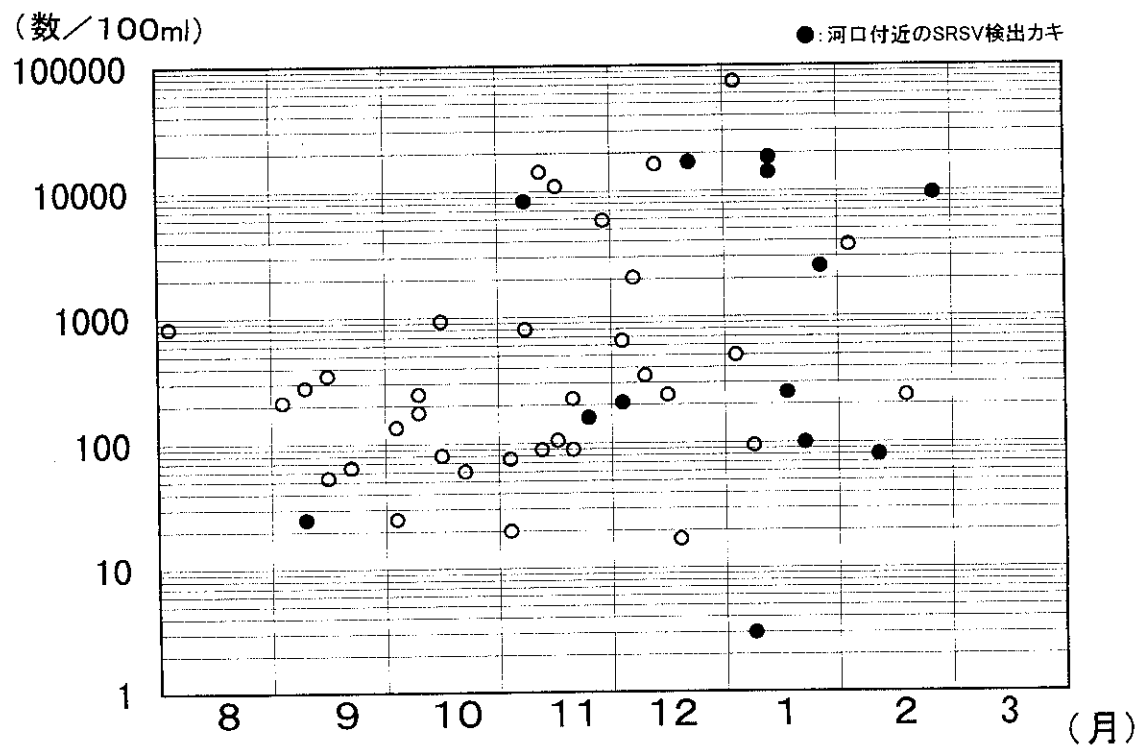
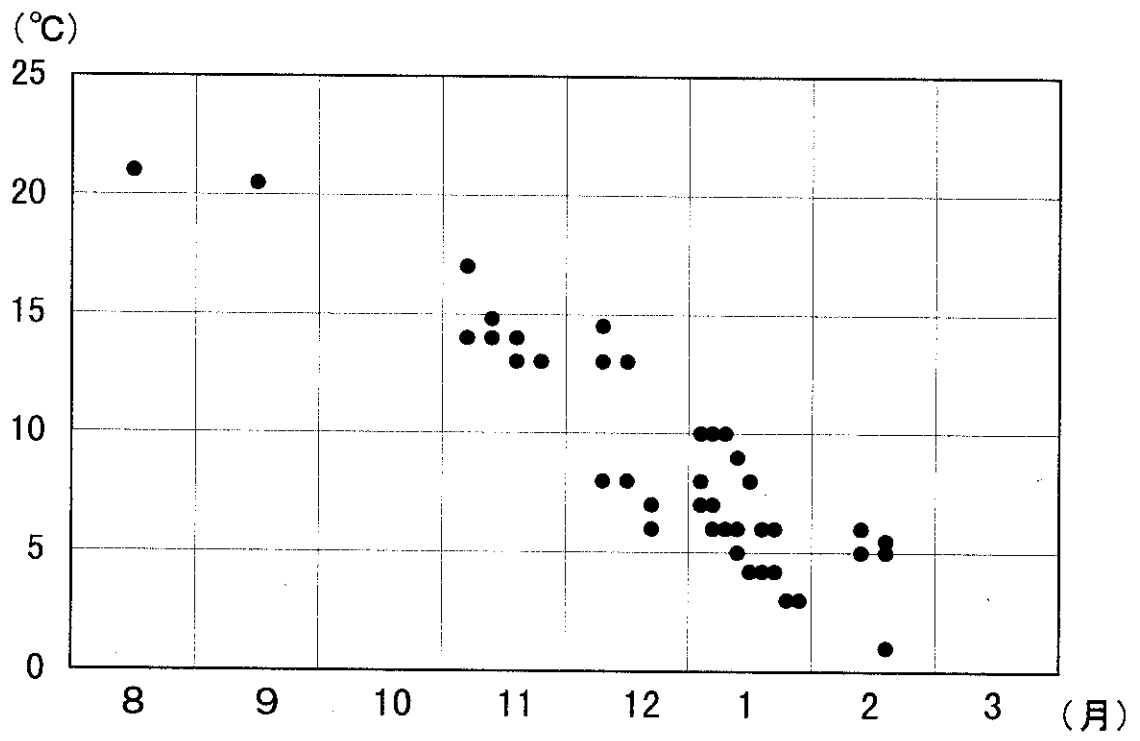


図5 SRSVが検出された海域の海水温



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

分担研究者 斎藤博之 (秋田県衛生科学研究所)

協力研究者 三上稔之 筒井理華 佐藤 孝 (青森県環境保健センター)

研究要旨

ヒトカリシウイルス汚染実態調査は八甲田山系の河川で住宅街を通過し、むつ湾に流入する河川の一つであるA川を対象に1999年8月から2000年1月まで18回の採水を行い、ヒトカリシウイルス遺伝子検出をNested PCR法により行った。結果は全て陰性であった。しかし、大腸菌及び大腸菌群陽性のことから、水の濃縮法、ウイルス遺伝子検出法、調査範囲等の検討が示唆された。

研究目的

ヒトカリシウイルスによる食中毒はウイルス汚染食品等を喫食することにより発症する。しかし、その感染源は未だ不明であることから、環境中における本ウイルスの生態調査を行い、侵淫状況を把握し食品等の汚染防止及び予防を計る。

研究材料と方法

1. 採水場所は河口から約70メートル上流で1999年8月27日から2000年1月17日(8月2回、9月2回、10月4回、11月5回、12月4回、1月1回)までの18回採取した。
2. 前処理は採水1.000mlを3.000rpm 20分間遠心、その上清を回収しPEG 10% NaClを0.5M濃度に添加し、一夜4℃で攪拌し、3.000rpm、20分間遠心後、滅菌蒸留水5mlに浮遊。さらに20%PEG、1M NaCl溶液を等量加え、一夜静置。12.000rpm 15分間遠心、上清を捨て、沈殿物を滅菌蒸留水(500μl)に浮遊し、RNA抽出材料とした。
3. RNA抽出には材料250μlを用いてISOGEN-LS(ニッポンジーン)によった。
4. プライマーは1stにNV系36/35'、2ndにNV81/82、SM82を用いた。

5. RT-PCRにはRNA PCR KIT(TAKARA)を用いた。

PCR増幅条件は1st、2nd共に熱変性94℃ 1分、アニーリング43℃ 1分20秒、合成72℃ 1分で35サイクル行い、最終合成72℃ 10分とした。

6. 細菌検査では一般生菌数(標準定量法)、大腸菌及び大腸菌群(コリラート:アスカ純薬)の定性を実施した。

研究結果

ヒトカリシウイルス遺伝子はA川の18回採水からは検出されなかった。濁度が若干あり一般生菌数では最も多いのが水温17℃のときの16,600cfu/mlで最小は水温11℃で150cfu/mlであった。また、大腸菌及び大腸菌群では全て陽性であった。

考察

ヒトカリシウイルス遺伝子が検出されなかったことや、一般生菌数などから住宅街を通過した割には生活排水等の汚染は比較的少ないように推察されたが、動物由来の汚染の指標の一つとされている大腸菌及び大腸菌群が陽性のことから、ヒトカリシウイルス遺伝子検出においては今回の調査を基に採水場所や水の濃縮法、ウイルス遺伝子検出法の検討、さらには、調査範囲を拡大し、海水域の汚染も考慮した調査が必要であると思われる。

表. 検査成績

採水年月日	99.8.27.	8.30.	9.6.	9.22.	10.4.	10.12.	10.18.	10.25.	11.1.	11.8.	11.15.	11.22.	11.29.	12.6.	12.13.	12.22.	12.27.	00.1.17.
一般生菌数/ml	220	580	8400	600	16600	3900	6400	1770	15100	8550	4200	150	240	650	1640	2270	/	/
大腸菌と群	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	/
SRSV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
水温(℃)	/	/	/	17	17	16.5	12	12	13	12	12	11	6	7.5	5	6	5	7

平成11年度厚生科学特別研究事業分担研究報告

課題（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）

分担研究者・杉枝正明 主任研究者・川本尋義

研究要旨：静岡県内で集団発生したウイルス性食中毒6事例について患者および調理従事者糞便を対象に、プライマーセット（35系、Yuri系、Y系）の3種類によるNLVs遺伝子の検出を試みた。その結果、全ての事例をYuri系プライマーで高率に検出することができた。また、NLVs食中毒事例で原因施設と特定された場合、調理従事者糞便も同時に検索するが各事例からNLVs遺伝子が検出された。

食中毒事例における患者、非発症者および調理従事者の糞便を経時的に採取し、SRSV遺伝子の検出を調査したところ、患者は発症後3週間、非発症者で2週間、調理従事者で3週間まで排泄が確認された。

環境水中（下水処理場）からのNLVs遺伝子の検出を、未処理下水（流入口）、処理下水（放流水）を調査したところ、毎月、未処理下水、処理下水からNLVs遺伝子が検出された。

A. 研究目的

NLVs遺伝子は多様性であることが知られておりウイルス性食中毒事例を解明するためにはプライマーの選択がその感染源、感染経路を究明し、事例を解決する上で重要な問題となっている。

そこで、今回、県内で集団発生した6事例を3種類のプライマーセットの組み合わせによるNLVs遺伝子の検出感度の違いについて試みると共に原因施設と断定された調理従事者の糞便の検索、糞便中のNLVs遺伝子の排泄状況について調査した。

また、生活環境水におけるNLVs遺伝子の実態を把握するため、ヒト生活排水が集約される下水処理場における流入下水、放流水について調査した。

B. 研究方法

3種類のプライマーセットによるNLVs検索は集団食中毒6事例の患者糞便74検体、調理従事者糞便は同一事例の25検体を用いた。

食中毒事例における患者、非発症者および調理従事者糞便中の排泄状況については経時的に19検体を採取し調査対象とした。

下水処理場の流入下水、放流水は、1999年8月から2000年2月の期間に計26検体を調査対象とした。

糞便の各試料は、電顕試料作製方法の前処理に準じて検体を濃縮後、RNA抽出方法はJiangらが報告したCTAB法を用いた。

RT-PCR法によるNLVs遺伝子の検出にはRNAポリメラーゼ領域を増幅するプ

ライマーを用いた。

下水処理場（分流式）の流入下水、放流水は毎月2回、各20Lを採取しセルロース・吸着凝集法で試料を濃縮し、以後、糞便同様に試料を処理した。

C, D 結果および考察

3種類のプライマーセットを用いて最も検出率が高かったのは、Yuri系プライマーのNested PCRで74検体中37検体（50%）であった。これまで35系、Yuri系プライマーを併用し、多くが35系プライマーで検出されてきたが、今回Yuri系プライマーの検出が良かった理由についての詳細は把握できていない。

また、Y系プライマーを使用して一部の事例は確認することができたが、全事例を確認することはできなかったが、1st PCR確認することができる利点などを考えるとPCRの条件等の諸条件を改善することで解決するものと思われる（表1）。

集団発生事例の原因施設として特定された場合、原因および推定食品からの検出はかなり困難である場合が多い。特に貝類を摂食していない場合、検査材料の搬入は多岐である。

表2に示したように事例中の原因施設の調理従事者糞便からNLVs遺伝子が検出された。患者と同様、摂食していることもかんがえられるが、健康者糞便を対象とした検出率（1%）¹⁾より、高率に検出されていることから調理従事者に対する衛生指導などの必要性が重要である。

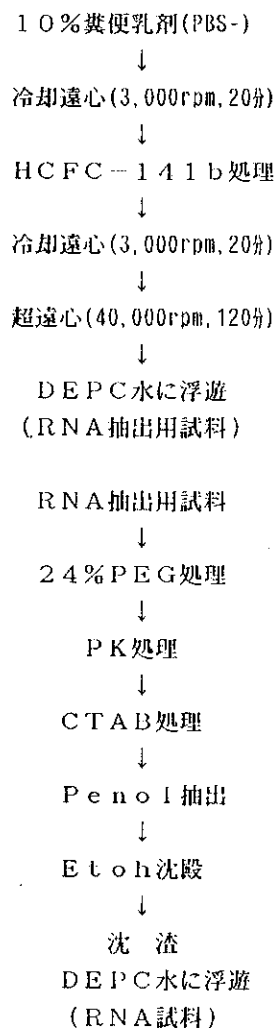
糞便中のNLVs遺伝子の排泄について患者、非発者および調理従事者の糞便を経時的に調査したところ、患者および調理従事者の一部で3週間後にも排泄が確認され、日数経過と共にNLVs量は減少していくが人から人、人から食品など感染源となる可能性が考えられる（表3）

ヒト生活環境水が集約される下水処理場におけるNLVs遺伝子を把握するため、未処理水、放流水について調査したところ、調査期間の8月から翌年2月まで毎月、未処理水、放流水から検出され人の生活環境下でNLVs遺伝子が季節に関係なく存在していることが示唆され、河川、汽水域および海洋を汚染しているものと思われる

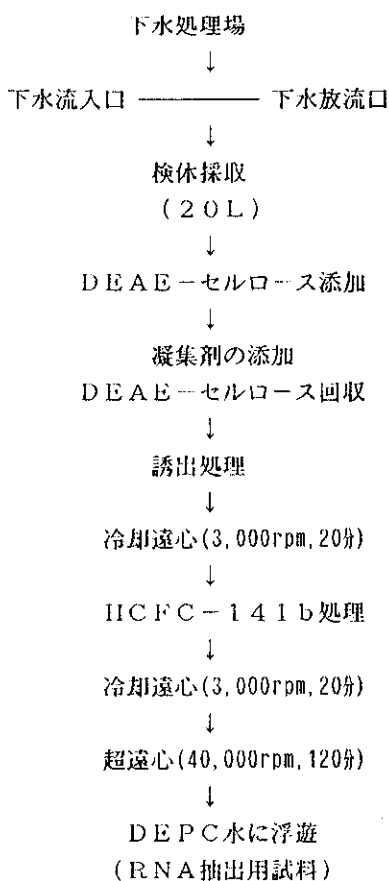
E. 論文

- 1) 学校給食施設調理従事者からのSRSV遺伝子の検出, 日本食品微生物学雑誌, 16(3), 193-196(1999)

糞便中からのNLVs遺伝子の検出

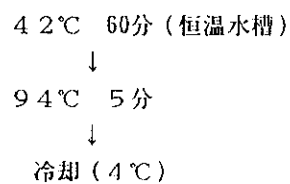


下水処理場からのNLVs遺伝子の検出

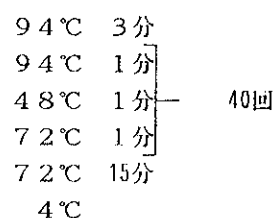


cDNAの合成		1st PCR		Nested PCR	
DEPC	11.3 μ l	DEPC	61.0 μ l	DEPC	37.3 μ l
10 $\times$ RT buffer	3.0 μ l	10 $\times$ PCR buffer	7.0 μ l	10 $\times$ PCR buffer	5.0 μ l
2.5mM dNTPs	8.0 μ l	10 μ M Primer	1.5 μ l	2.5mM dNTPs	4.0 μ l
10 μ M Primer	1.5 μ l	5U/ μ l Taq Pol	0.5 μ l	50 μ M Primer	0.5 μ l
40U/ μ l Rnase Inh.	1.0 μ l			50 μ M Primer	0.5 μ l
33U/ μ l AMV RT	0.2 μ l			5U/ μ l Taq Pol	0.2 μ l
RNA Sample	5.0 μ l			1st PCR産物	1.0 μ l

RT反応



PCR反応(1st, Nested)



NLVs 遺伝子検出用プライマーとその塩基配列

名 称	プライマー	塩基配列 (5' → 3')	設定位置	増幅領域
35系 (1st)	35	cttgllggtttgaggccat	4936←4956	470bp
	36	ataaaagttggcatgaaca	4487→4505	
35系 (Nest)	NV81	acaatctcatcatcaccala	4865←4884	330bp
	NV82	tcatlltgatgcagatta	4555→4572	
	SM82	ccactatgatgcagatta	4555→4572	
Yuri系 (1st)	MR3	ccgtcagaglgggatgaa		470bp
	MR4	agtgggtttgaggccgta		
Yuri系 (Nest)	Yuri22F	attgaatgaggatggacccat		370bp
	Yuri22R	catcatccccglagaaagat		
GI	SR33	lgtcacgatctcatcatcacc	4856←4876	123bp
	SR48	gtgaacagcataaatcacctgg	4754→4774	
	SR50	gtgaacaglataaaccactgg	4754→4774	
	SR52	gtgaacagrataaaccattgg	4754→4774	
GII	SR33	tgtcacgatctcatcatcacc	4856←4876	123bp
	SR46	tggaaattccatgcccactgg	4754→4774	
Y系	Y1	tgggactcaacaca(AG)CAGAG		233bp
	Y2	lcaga(ac)ag(gl)GCACA(cg)agagtl		