

例との比較を行った(図2)。感染症事例では、すべての発生施設でGII/4が優勢であり、小中学校・高校(69.2%)及び保育所・幼稚園(81.8%)では若干割合が低めではあるが、その他の発生施設では、社会福祉施設(96%)、高齢者施設(98.8%)、宿泊施設・病院・その他(100%)と、非常に高い割合でGII/4が検出された。食中毒事例においてもGII/4の占める割合は94.4%と非常に高く、感染症事例の傾向と一致した。GII/4以外の遺伝子型としては、GII/13、GII/8、GII/10など、過去に検出頻度の低いタイプの出現がみられた。

4. GII/4のサブタイプ分類

食中毒事例から検出されたGII/4 NV 17株について、ポリメラーゼ領域(P1/P3領域)及びキャプシド領域(N末端~G2-SKR領域)の塩基配列を基に系統樹解析を行った(図3)。過去3シーズンのGII/4流行タイプは、cluster A(2002年 variant)、B、C(2004年 variant)に分類される3タイプであり、2006/07シーズンの食中毒17事例から検出されたGII/4 NVは、15株がcluster D、2株がcluster C'に分類された。

感染症事例から検出されたGII/4 NVのサブタイプ分類を発生施設別に示し(図4)、食中毒事例との比較を行った。前シーズンまでの流行タイプは、cluster Bタイプが社会福祉施設、高齢者施設及び家庭における感染症4事例から検出されたのみであった。いずれの発生施設においても大多数がcluster Dタイプ、一部cluster C'タイプが検出され、食中毒事例と同様の傾向を見せた。

D. 考察

2006/07シーズンに発生したNVの集団胃腸炎事例では、発生月当たりの食中毒及び感染症事例数の割合はおおむね一定であり、食中毒事例と感染症事例の発生数には相関が認められた。また、集団発生の原因となったNVの遺伝子型及びサブタイプも、食中毒と感染症事例で一致した。調理従事者関連の食中毒事例の発生機序としては、NV感染者数が増加すると調理従事者のNV感染のリスクが高くなり、その時期の感染症流行株が調理施設に持ち込まれ、食中毒が発生する、という流れがあると考えられるが、今回の結果はそれを裏付けるものであった。

今シーズンの食中毒事例では、調理従事者について検査を行った15事例のうち14事例で、複数の調理従事者からNVが検出された。検出されたNV遺伝子の塩基配列は、事例内で100%一致したことから、それぞれの調理従事者は別ルートで感染したのではなく、調理施設内でNV感染の拡大が起こったものと考えられた。NVによる食中毒の予防のためには調理現場環境のウイルス汚染リスクを低くする必要はあるが、NVに感染した調理従事者の人数が多いほど、環境汚染のリスクは高くなる。今シーズンは、100名以上の患者を出した大規模食中毒事例が4事例あり、そのうち2事例では、それぞれ6、7名の調理スタッフがNVに感染していたことが確認された。調理従事者間でのNV感染の拡大には、食品媒介とヒト-ヒト感染の双方の経路が考えられ、今後、調理施設におけるNV感染拡大のリスクファクターについて解析を行い、予防対策を講じ

る必要があると考える。

2006/07 シーズンの流行遺伝子型は食中毒及び感染症事例ともに GII/4 であり、毎年 GII/4 が 85～100% を占める病院や高齢者施設だけでなく、例年様々な遺伝子型が検出される保育所・幼稚園や小学校においても、これまでにないほど GII/4 の検出頻度が高かった。また、2006/07 シーズンの GII/4 流行型は、過去 3 シーズンに検出されていた GII/4 とは別のクラスターに分類されるものであった。GII/4 NV は、2003/04 シーズン以降、毎年主な流行遺伝子型となっており、新しい variant が 2 年に 1 度は出現している。variant の出現と事例数増加の因果関係は不明であり、今後も疫学データの蓄積が必要である。

E. 結論

1. 2006/07 シーズンに発生した食中毒 18 事例はすべて、調理従事者による食品汚染が原因と考えられるものであった。調理従事者を対象としたウイルス検査により、ほとんどの食中毒事例において複数の調理従事者のノロウイルス感染が確認され、調

理場環境のノロウイルス汚染のリスクが高かった可能性が示された。

2. 2006/07 シーズンは食中毒と感染症事例ともに GII/4 型の検出頻度が非常に高く、流行した GII/4 株は、前シーズンまでの流行タイプとは異なるサブタイプに分類された。今後 GII/4 型ノロウイルスの動向には注目していきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

吉澄志磨、石田勢津子、奥井登代、岡野素彦：ヒトーヒト感染によるノロウイルスの胃腸炎集団発生例における分子疫学的検討、第 54 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋市、2006 年 11 月 19-21 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 食中毒事例の検査結果

事例 No.	初発年月日	発症者 /喫食者	原因施設	摂食場所	原因食品	RT-PCR結果(陽性数/検査数)			遺伝子型	
						患者	調理従事者	食品	患者	調理従事者
1	2006.10.18	21/109	旅館	旅館	不明	0/1	2/11	nt	(GII/4) [*]	GII/4
2	2006.11.11	37/246	病院給食施設	病院	不明	6/7	2/21	nt	GII/4	GII/4
3	2006.11.12	44/不明	飲食店	飲食店	不明	2/2	nt	nt	GII/4	-
4	2006.11.18	6/6	飲食店	飲食店	不明	nt	2/3	nt	-	GII/4
5	2006.11.21	24/94	飲食店	事務所等	不明(弁当)	7/7	3/6	nt	GII/4	GII/4
6	2006.12.01	12/15	飲食店	飲食店	不明	6/6	2/14	nt	GII/4	GII/4
7	2006.12.02	110/不明	旅館	旅館	不明	7/8	nt	nt	GII/4	-
8	2006.12.04	19/35	旅館	旅館	不明	8/11	1/4	0/8	GI/8	GI/8
9	2006.12.05	298/963	旅館	旅館	不明	17/18	7/18	nt	GII/4	GII/4
10	2006.12.05	33/不明	飲食店	会合場所	不明(仕出し)	5/5	2/6	nt	GII/4	GII/4
11	2006.12.10	19/38	旅館	旅館	不明	2/2	3/3	nt	GII/4	GII/4
12	2006.12.16	23/36	飲食店	飲食店	不明	7/7	2/7	nt	GII/4	GII/4
13	2007.01.17	9/43	飲食店	事務所	不明(弁当)	4/4	2/2	nt	GII/4	GII/4
14	2007.01.18	132/277	飲食店	事務所	不明(弁当)	20/20	6/6	nt	GII/4	GII/4
15	2007.01.19	88/259	飲食店	飲食店	不明	15/18	4/15	nt	GII/4	GII/4
16	2007.01.19	295/1203	飲食店	飲食店	不明	21/25	2/19	nt	GII/4	GII/4
17	2007.01.26	58/109	飲食店	家庭等	不明(出前)	2/2	nt	nt	GII/4	-
18	2007.02.01	42/77	飲食店	会合場所等	不明(仕出し)	8/8	4/7	nt	GII/4	GII/4

nt : not tested

※: 他県における検査でNV陽性となった患者7名分のデータ

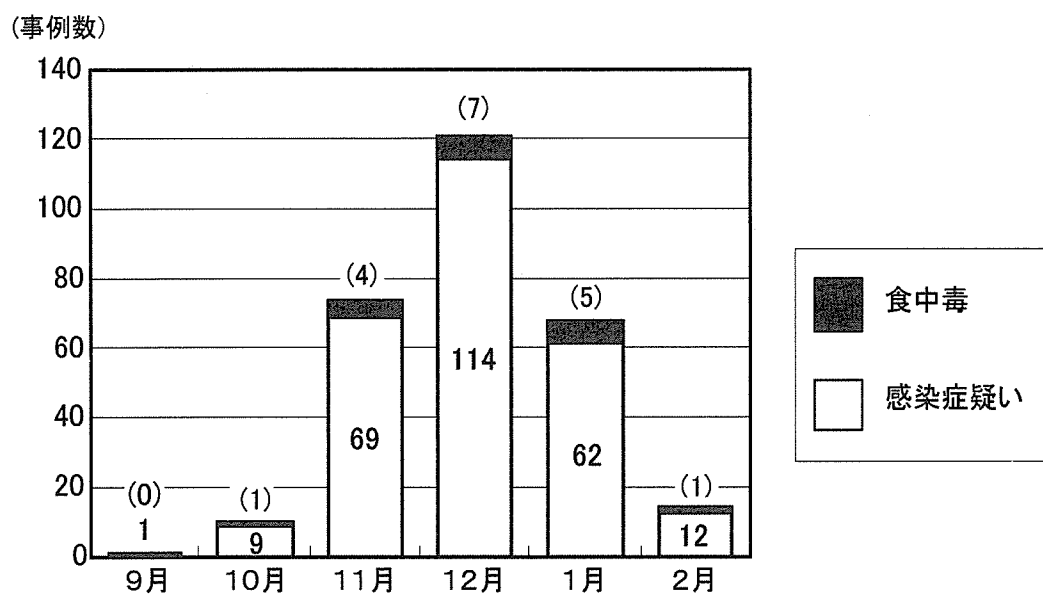
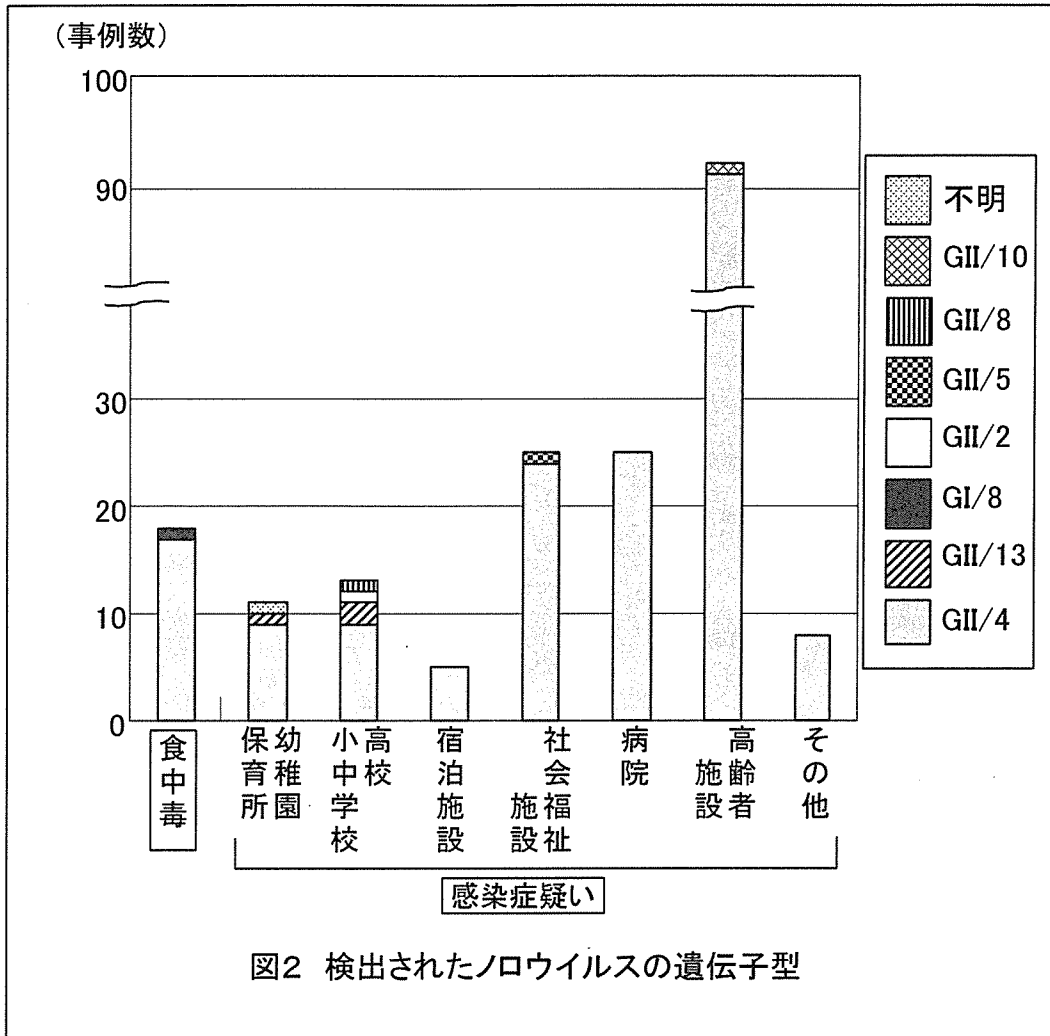


図1 2006/07シーズンのノロウイルスによる集団胃腸炎事例の発生状況



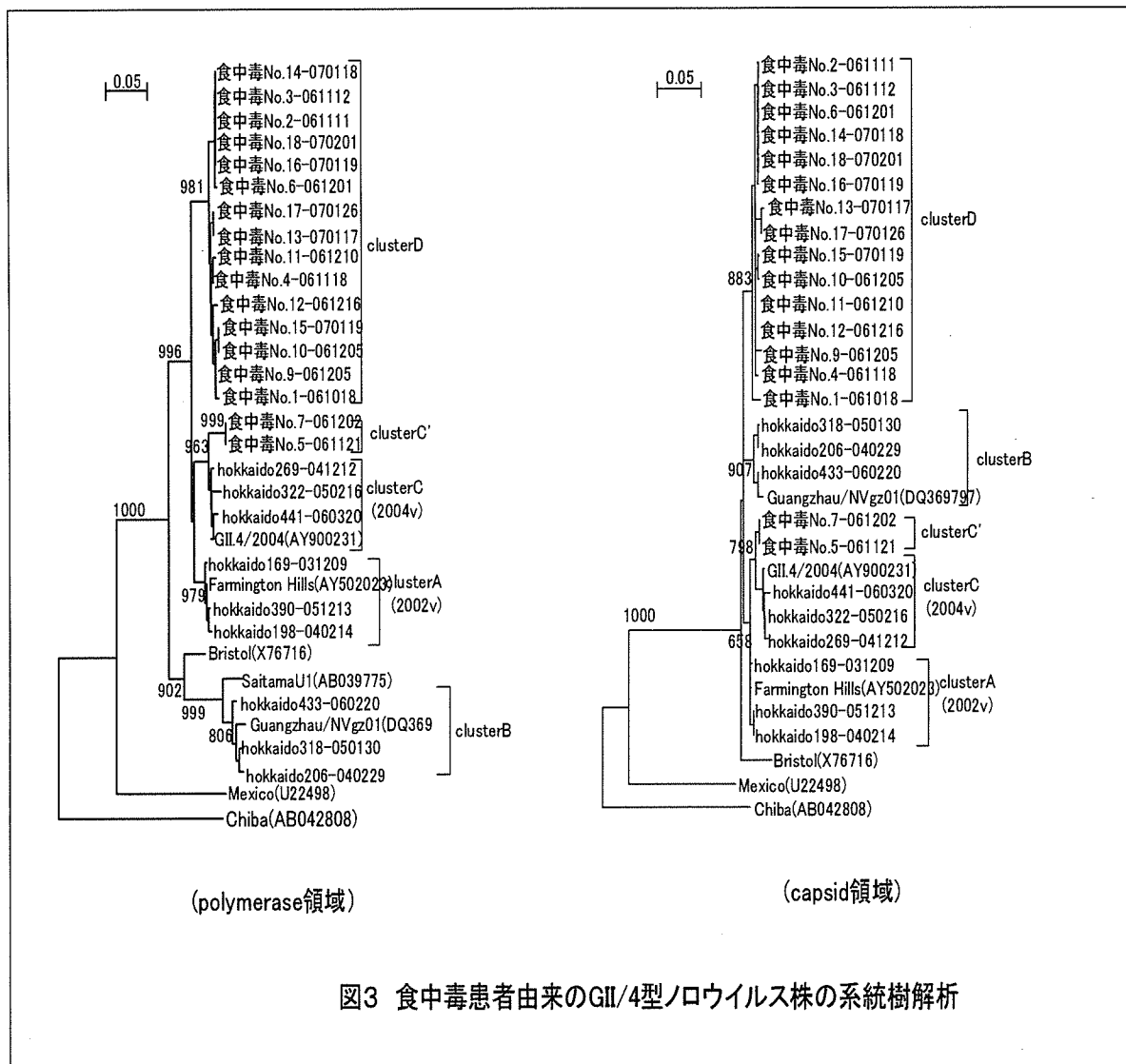
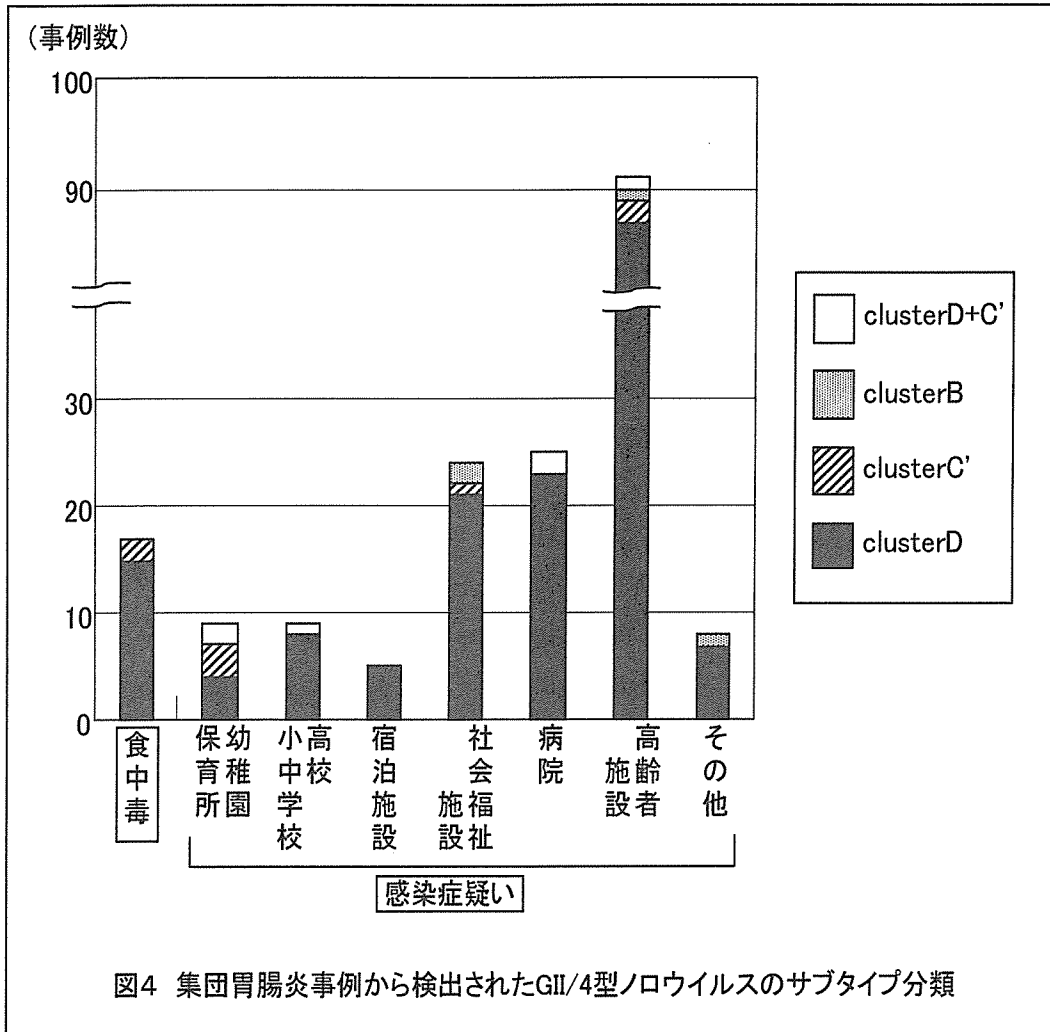


図3 食中毒患者由来のGII/4型ノロウイルス株の系統樹解析



平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金 (食品の安心・安全確保推進研究事業)

「ウイルス性食中毒の予防に関する研究」班

協力研究報告書

—青森県における集団発生からのノロウイルス検出と遺伝子型 (2005. 9~2006. 5) —

研究協力者 三上稔之 (青森県環境保健センター)

分担研究者 田中智之 (堺市衛生研究所)

研究協力者 石川和子 熊谷邦彦 (青森県環境保健センター)

研究要旨: ノロウイルス (NV) は、2005 年 9 月から 2006 年 5 月までの集団発生 18 事例の発症者及び調理従事者便 307 検体中 165 検体から検出され、Genogroup 別では、GII 単独が 13 事例で、GI と GII 重複例が 5 事例であった。集団発生地域は、県内全域で確認された。GII の遺伝子型の検出比率は、GII/4 Bristol 類似株が、45% を占め、次いで 3 型 Saitama 株 (25%)、2 型 Malksham 株 (10%) の順で、4 型が広く浸透し、分布していることが推測され、集団発生の原因 NV の主流であることが示唆された。また、GII/4 Bristol 類似株が単独で検出された 6 事例のポリメラーゼ領域の遺伝子解析では、5 事例において Bristol 株が変異した GII/12 SaitamaU1/97/JP 類似株で、1 事例が GII/4 ポリメラーゼ領域変異株である 2002 型 (Farmington Hills/2002/USA) 株近縁であった。県内において主流と思われる GII/4 型変異類似株は、高齢者や低年齢層の集団施設において特異的な感染と示唆できるのか、NV の感染力や増殖・複製機構の研究を進める必要がある。

A. 研究目的

2005 年 9 月から 2006 年 5 月までの集団発生 18 事例及び感染性胃腸炎散発 6 例の糞便、吐物、食品、ふきとりについて、ノロウイルス (*Norovirus*:NV) カプシド領域の遺伝子増幅により Genogroup I、II (GI、GII) の検索を行った。検出遺伝子は、ダイレクトシーケンス解析により遺伝子型別を行うとともに、主流となった遺伝子型については、ポリメラーゼ領域の解析も行った。NV の変異を含めた集団発生における特異性等について分子疫学的検討を行い、食中毒や感染症の予防に資す

るための基礎資料とする。

B. 研究材料と方法

1. 材料

2005 年 9 月から 2006 年 5 月までの集団発生 18 事例及び散発 6 例から採取された糞便 307 検体、吐物 10 検体、食品 54 検体、ふきとり 70 検体を用いた。

2. 方法

糞便は滅菌蒸留水で 10% 乳剤とし、10,000 rpm、20 分間冷却遠心後、上清を用いた。

食品は 10% 乳剤、ふき取りは使用した

スポンジのしぼり水、カキは中腸腺を10%乳剤にし、10,000 rpm、20分間冷却遠心した。上清に等量の20%ポリエチレングリコールおよび1MNaClを加え、4℃に一晩静置後、10,000 rpm、20分間冷却遠心濃縮し、沈渣に滅菌蒸留水300μlを加え、試料として用いた。

RNA抽出は、各々の試料140μlをQIAmp Viral RNA Miniキット遠心法(QIAGEN社製)により行い、抽出RNAは、DNase I (Takara) 37℃30分間、75℃加熱5分間の処理を行った。

RT-PCRは型どおりに行った。NV-RNAは、cDNA合成にrandom hexamer (Amersham社製)およびSuper Script II RT (Invitrogen社製)を用いた。増幅は、カプシド領域には、COG1F/G1SKR、COG2F/G2SKRまたは、G1SKF/G1SKRとG2SKF/G2SRR、ポリメラーゼ領域にはNV81/82のプライマーを用いた。

NV遺伝子の塩基配列は、PCR産物をQIAquick PCR Purification Kitで精製し、BigDye Terminator Kit (ABI PRISM)を用いて、オートシーケンサーABI PRISM310 (Applied Biosystems)で決定した。

NV遺伝子配列の比較は、カプシド領域のG1は264塩基、G2は246塩基について、ポリメラーゼ領域では231塩基をClustal Wで行った。遺伝子型番号は片山、(IDWR6(11):14-19, 2004)に従った。

C. 研究結果

NVは、集団発生18事例の発症者及び調理従事者便307検体中165検体から検出され、Genogroup別では、GII単独が13事例で、GIとGII重複例が5事例であっ

た。また、感染性胃腸炎散発例6検体は、すべてGIIであった。

発生年月と事例数は、2005年9、10、11月が各々1例、12月3例、2006年1月3例、2月2例、3月1例、4月2例、5月4例であった(図1)。また、発生地域及び施設は、弘前市、八戸市の福祉養護施設(3)、十和田市、八戸市、浪岡町の高齢者施設(4)、弘前市の小学校(1)、弘前市、板柳町の低年齢層施設(3)、京都、東京への修学旅行(1)、弘前市のホテル(1)、大鰐町の国民宿舎(1)、八戸市の居酒屋(1)、八戸市の下宿先(1)、八戸市、青森市の家庭内(2)であった(表1)。

事例1を除く、17事例と散発6例についてカプシド遺伝子解析による遺伝子型は、事例2~8及び散発6例では、いずれもGII/4 Bristol 類似株であった。事例9では、GII/2 Malksham 類似株、事例13はGII/5 Hillingdon 類似株、事例16、18はGII/3 Saitama 類似株であった。1事例内で2種類のNVが確認された事例17では、5月連休中の発症者からGII/3 Saitama 類似株、12日発症者からは、GII/2 Melksham 類似株、5月11日の吐物、12日の検食2検体と調理済みまな板はGII/3 Saitama 類似株であった(表2)。

GI・GIIが重複検出された5事例の遺伝子解析は、事例10では、GI/14 Saitama 類似株(5)、GII/4 Bristol 類似株(4)であった。検食からは、検出されなかった。事例11では、GIが1型 Norwalk 類似株(1)と8型 WUG I 類似株(4)で、GIIが3型 Saitama 類似株(2)と4型 Bristol 類似株(1)であった。また、検食では、同じロットのカキからGII/3 Saitama 類似

株が検出された。事例 12 では、GI/1 Norwalk 類似株 (2) と GI/8 WUG I 類似株 (2) であった。GII では GI/6 Saitama 類似株 (1) と GI/15 Saitama 類似株 (1) であった。検食では、同じロットのカキからは検出されなかった。事例 14 では、GI/8 WUG I 類似株 (1) で、GI/3 Saitama 類似株 (3) であった。

事例 15 では、GI/8 WUG I 類似株 (2) と GI/7 Winchester 類似株 (1) で、GI/5 Hillingdon 類似株 (1) であった。(表 3)。

解析を行った 17 集団事例における 6 種類の GI の検出比率は、GI/4 Bristol 類似株が 45%、GI/3 Saitama 類似株が 25%、GI/2 Malksham 類似株 GI/5 Hillingdon 類似株が 10%、GI/6 Saitama 類似株、GI/15 Saitama 類似株が 5% であった (図 2)。

一方、GI では、GI/8 WUG I 類似株が 50%、GI/1 Norwalk 類似株が 25.0%、GI/14 Saitama 類似株が 12.5%、GI/7 Winchester 類似株が 12.5% であった (図 3)。表 4 に示したようにポリメラーゼ領域の遺伝子解析は、カプシド領域で単独に GI/4 Bristol 類似株が検出された事例 2、3、4、5、7、8 の 6 事例について実施し、事例 2、4、5、7、8 が GI/12 SaitamaU1/97/JP 類似株で、事例 3 が GI/4 Bristol 株のポリメラーゼ変異株である 2002 型 (Farmington Hills/2002/USA) に最も近縁であった。

D. 考察

県内における発生地域は、全域にわたり、発生施設においては、福祉養護施設 (3) と高齢者施設 (4) が 18 事例中 7 事例で

約 40% を占め、次いで、幼稚園、保育園等の、低年齢層においても発生した。これらは高齢及び低年齢層への NV 感染の特異性によるのか、あるいは、施設内の衛生面や基礎疾患を保有している高齢者における免疫機能の低下なのか、いろいろな要因が考えられる。

施設内における感染の広がり、未だ不明が多く、今後、詳細な疫学調査とウイルス学的検証が必要である。

集団発生における NV の Genogroup は、GI がほとんどで、遺伝子型検出比率では、GI/4 Bristol 類似株が、主流で GI の中で 45% を占め、次いで 3 型 Saitama 株 (25%)、2 型 Malksham 株 (10%) の順で、GI/4 が広く浸透し分布していることが示唆された。また、GI は、5 事例の集団発生において、いずれも GI と重複で検出され、二枚貝の中腸腺で複数の NV を保有する食品が原因と推測されるが、喫食残品がないなど、検体確保等の問題を検討する必要があると思われる。検出された GI の遺伝子型の割合は、8 型 WUG I 類似株が 50% で半分を占め、1 型 Norwalk (25%)、14 型 Saitama (12.5%)、7 型 Winchester (12.5%) の順で、GI では 8 型が今後流行の主流の可能性が示唆される。

ポリメラーゼ領域の遺伝子では、解析した 5 事例において Bristol 株が変異した GI/12 SaitamaU1/97/JP 類似株で、1 事例が GI/4 Bristol 株のポリメラーゼ領域変異株である 2002 型 (Farmington Hills/2002/USA) 株近縁で、県内において主流と思われる NV は、GI/4 Bristol 株の変異株で、この変異が高齢者や低年齢層において、より感染及び増殖をしや

すいように変異しているのか、NVの感染力や増殖・複製機構について研究を進める必要がある。

E. 結論

1. 2005年9月から2006年5月までの集団

発生18事例及び散発6例から検出されたノロウイルスは、GII/4 Bristol、GII/3 Saitama、GII/2 Malksham、GII/5 Hillingdon、GII/6 Saitama、GII/15 Saitamaの6種類でGI/8 WUGI、GI/1 Norwalk、GI/14 Saitama、GI/7 Winchesterの4種類であった。

2. 集団発生の原因ウイルスは、主にGII/4

型 Bristol 類似株で、ポリメラーゼ領域遺伝子解析から Bristol 株が変異した GII/12 SaitamaU1/97/JP 類似株であ

り、1事例では、GII/4 Bristol 株のポリメラーゼ領域変異株である 2002 型近縁株によることが確認された。

3. GI・GII重複検出事例は、二枚貝の中腸

腺など複数の NV を保有する食品が関与することが推測された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

なし

2) 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

表 1 2005/2006 ノロウイルス集団発生事例（青森県）

事例番号	発生日	発生場所	発病者数／ 喫食者数	ふん便			吐物	食品	ふきとり	検査結果	シーケンス
				陽性数／ 検査数	陽性数／ 検査数	陽性数／ 検査数					
1	2005. 9. 26	家庭内	6 / 8	7 / 7	7 / 7		0 / 4		NV(GII) 7		
2	10. 21	福祉養護施設 特別養護老人 ホーム	30 / 55	16 / 23	0 / 0	5 / 5	0 / 7		NV(GII) 16	5	
3	11. 12	特別養護老人 ホーム	36 / 110	27 / 29	1 / 1	9 / 9	1 / 9	2 / 2	NV(GII) 29	8	
4	12. 4	幼稚園	44 / 74	17 / 28	1 / 1	3 / 3	0 / 5	0 / 13	NV(GII) 18	9	
5	12. 14	特別養護老人 ホーム		9 / 11	0 / 0	6 / 6			NV(GII) 9	6	
6	12. 16	福祉養護施設 特別養護老人 ホーム		4 / 8	1 / 1	20 / 20			NV(GII) 5	4	
7	2006. 1. 12	グループホーム		4 / 6	6 / 6				NV(GII) 4	3	
8	1. 1	グループホーム	5 / 5	5 / 5	2 / 2	3 / 3			NV(GII) 7	4	
9	1. 31	福祉養護施設	10 / 44	8 / 8	1 / 1	6 / 6			NV(GII) 9	5	
10	2. 1	国民宿舎	12 / 21	9 / 11	0 / 0	4 / 4	0 / 14		NV(GI) 1 (GII) 3 NV(GI・GII) 5	G15・G14	
11	2. 13	ホテル	9 / 33	9 / 9	12 / 12	0 / 27	2 / 10	0 / 19	NV(GI) 6 (GII) 6 カキ2	G15・G14	
12	3. 24	居酒屋	31 / 71	9 / 13	0 / 0	5 / 5	0 / 1	0 / 15	NV(GI) 3 NV(GI II) 5 NV(GI・GII) 1	G14・G12	
13	4. 25	修学旅行	20 / 235	6 / 14					NV(GII) 6		
14	4. 26	下宿	11 / 18	7 / 12	0 / 0	1 / 1		0 / 6	NV(GI) 3 NV(GII) 4	G11・G13	
15	5. 6	家庭内	3 / 4	3 / 3			0 / 0		NV(GI) 2 NV(GI・GII) 1	G13・G11	
16	5. 1	小学校	61 / 401	6 / 6			0 / 0		NV(GII) 6	6	
17	5. 12	保育園	67 / 125	9 / 13	0 / 0	3 / 3	2 / 4	2 / 4	NV(GII) 9、検査2、 まな板1、吐物2	M7、S5	
18	5. 25	保育園	11 / 81	4 / 6			0 / 0	1 / 1	NV(GII) 4	4	
			159	215	6	92	10	54	70		

表2 集団事例から検出されたNVG II 遺伝子型

事例番号	発生年月日	発生場所	検出数	シーケンスによる型別
1	2005. 9. 26	家庭内	0	
2	10. 21	福祉養護施設	5	G II /4/Bristol/93/UK
3	11. 12	特別養護老人ホーム	8	G II /4/Bristol/93/UK
4	12. 4	幼稚園	9	G II /4/Bristol/93/UK
5	12. 14	特別養護老人ホーム	6	G II /4/Bristol/93/UK
6	12. 16	福祉養護施設	4	G II /4/Bristol/93/UK
7	2006.1. 12	特別養護老人ホーム	3	G II /4/Bristol/93/UK
8	1. 1	グループホーム	4	G II /4/Bristol/93/UK
9	1. 31	福祉養護施設	5	G II /2/Melksham/89/UK
13	4. 25	修学旅行	6	G II /5/Hillingdon/90/UK
16	5. 1	小学校	6	G II /3/SaitamaU201/98/JP
17	5. 12	保育園	7	G II /2/Melksham/89/UK
			5	G II /3/SaitamaU201/98/JP
18	5. 25	保育園	4	G II /3/SaitamaU201/98/JP
散発	11・12・1月	弘前・むつ	6	G II /4/Bristol/93/UK

表3 集団事例から検出されたG I・G II 遺伝子型

事例番号	発生年月日	発生場所	検出数		シーケンスによる型別
			G I	G II	
10	2006 2. 1	国民宿舎	G I	1	G I /14/SaitamaT25G I /01/JP (1株)
			G I・G II	4	G I /14/SaitamaT25G I /01/JP (4株) G II /4/Bristol/93/UK (4株)
11	2. 13	ホテル	G I	5	G I /1/Norwalk/68/US (1株) G I /8/WUG I /00/JP (4株)
			G II	4	G II /3/SaitamaU201/98/JP (3株) G II /4/Bristol/93/UK (1株)
12	3. 24	居酒屋	G I	4	G I /1/Norwalk/68/US (2株) G I /8/WUG I /00/JP (2株)
			G II	2	G II /6/SaitamaU3/97/JP (1株) G II /15/SaitamaKU80aG II /99/UK (1株)
14	4. 26	下宿	G I	1	G I /8/WUG I /00/JP (1株)
			G II	3	G II /3/SaitamaU201/98/JP (3株)
15	5. 6	家庭内	G I	2	G I /8/WUG I /00/JP (2株)
			G I・G II	1	G I /7/Winchester/94/UK (1株) G II /5/Hillingdon/90/UK (1株)

表 4 カプシドとポリメラーゼ解析による遺伝子型

事例番号	発生場所・地域		カプシド解析 遺伝子型	ポリメラー ゼ 解析遺伝
2	福祉養護 施設	弘前	G II / 4	G II / 12
3	特別養護 老人ホーム	上十三	G II / 4	* 2002型
4	幼稚園	戸(三戸)	G II / 4	G II / 12
5	特別養護 老人ホーム	八戸	G II / 4	G II / 12
7	特別養護 老人ホーム	むつ	G II / 4	G II / 12
8	グループ ホーム	森(浪岡)	G II / 4	G II / 12

* : G II / 4 変異株

事例数

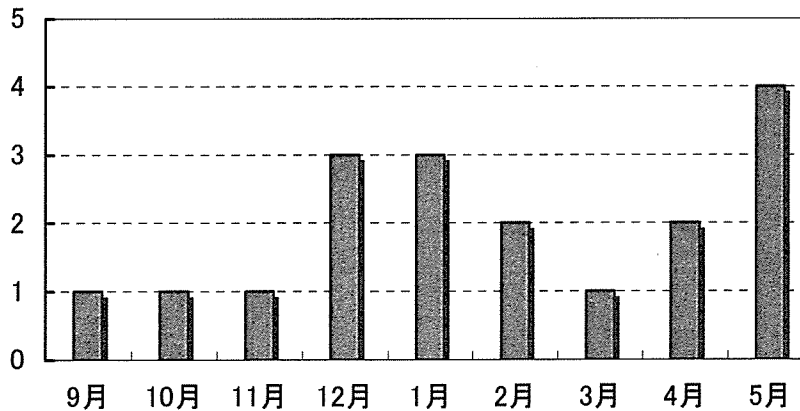
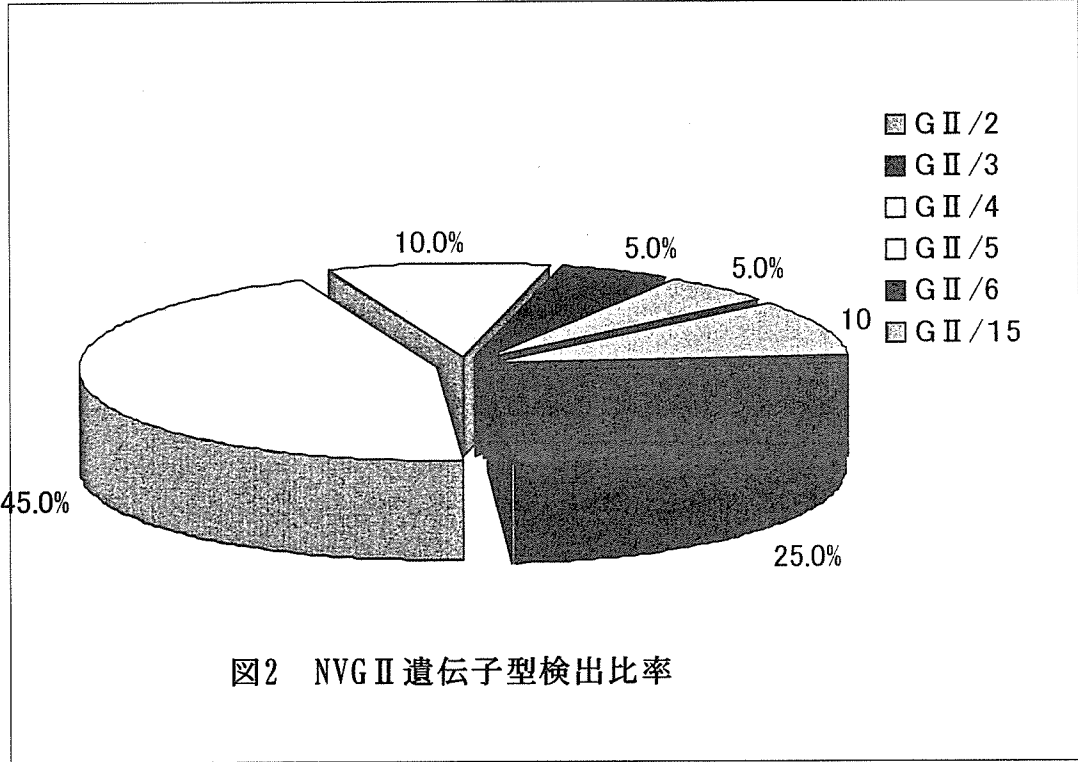
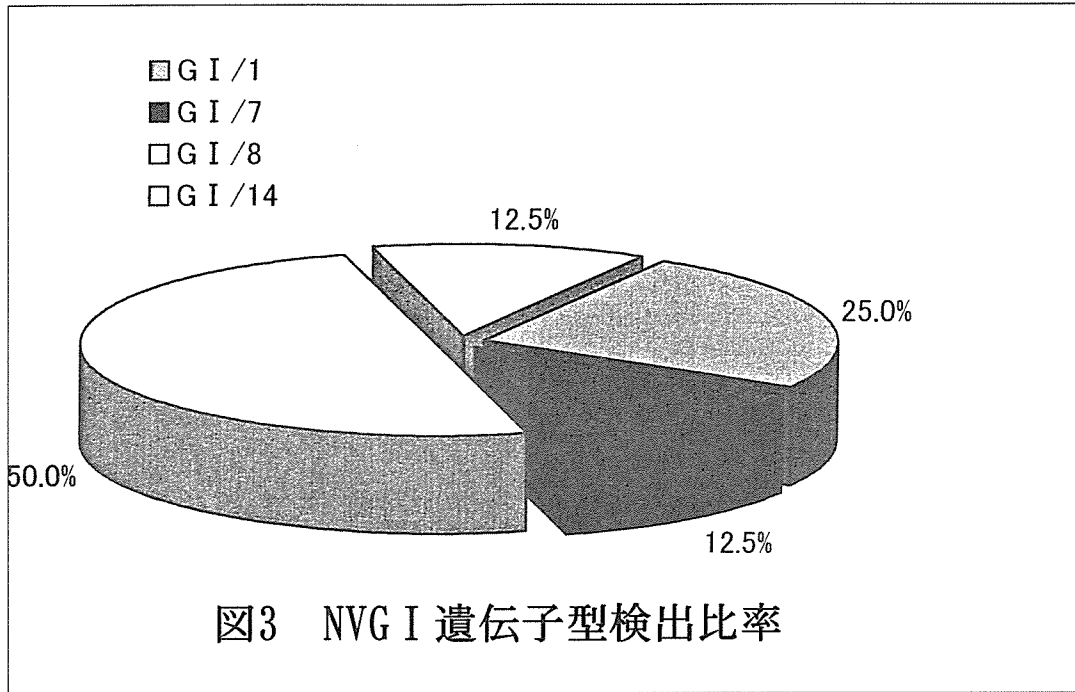


図1 2005年～2006年月別NV集団発生事例数





平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
「ウイルス性食中毒の予防に関する研究」
協力研究報告書

カキ養殖海域周辺の汚水処理施設におけるノロウイルスの消長

研究協力者 高橋 朱実 (岩手県環境保健研究センター保健科学部)
分担研究者 田中 智之 (堺市衛生研究所)
研究協力者 高橋 雅輝、蛇口 哲夫 (岩手県環境保健研究センター保健科学部)

研究要旨: 岩手県のカキ養殖が行われている A 湾に放流水が達する 3 箇所の汚水処理施設 (公共下水道終末処理施設、漁業集落排水施設、し尿処理施設) のノロウイルス (以下 NV) 除去効果を調査すると共に、その処理水が放流先の海域に与える影響を検討した。

6 回の調査で、3 施設の処理前の流入水、あるいはし尿からは、殆どの検体から NV 遺伝子が検出され、感染性胃腸炎の流行が確認されない夏季 (9 月) にも NV を含む汚水が流入されていた。処理後の放流水では、公共下水道処理施設で冬季の 2 回 (06 年 1 月、2 月)、漁業集落排水で冬季の 1 回 (06 年 2 月)、nested-PCR 法で NV が検出されたが、それらの濃度は、0.5~12 コピー/ml に過ぎなかった。これらを除くと放流水の NV 濃度はすべて定量限界未満であり、いずれの処理施設においても、流入してきた NV は、ほぼ除去されている状況だった。また、し尿処理施設では、6 回の調査全てで、NV が処理前のし尿に検出され、その濃度は $2.0 \times 10^2 \sim 1.1 \times 10^5$ コピー/ml だったが、処理工程を見ると、反応槽でほぼ除去され、その後の工程には全く検出されず、十分に除去されている状況だった。

また 3 箇所の汚水処理施設の放流水中に、NV は殆ど検出されない濃度になっていたにも関わらず、07 年 1 月に採取したカキからは高率に NV が検出された。カキを汚染させる要因について、浄化槽、生活排水も含め、NV による胃腸炎の流行状況等との関連を、広く調べていく必要性が確認された。

A 研究目的

ノロウイルス (以下 NV) の感染者から糞便中に排出された大量のウイルスは、下水処理で十分に処理できない場合に河川に放流され、海域に達し、最終的にカキ等の二枚貝に蓄積されると考えられ、下水処理施設の排水は、養殖カキの汚染源になる可能性がある。

我が国における下水道普及率は平成 17 年

度末で 69.3% ではあるが、大都市と中小市町村で大きな格差があり、特に人口 5 万人未満の市町村における普及率は 39.3% で浄化槽等を含めた汚水処理人口普及率でも 62.9% に過ぎない状況にある。また、岩手県の下水道普及率は 46.2% であり、特にカキ養殖をしている沿岸市町村の下水道普及率は 34.6% で、汚水処理人口普及率は 45.8% と 50% に満たない状況で、糞便処理

は下水道や浄化槽の他、汲み取りによるし尿処理施設で行われている。それらの汚水処理場でのNV除去効果は、処理施設や、処理方法によっても異なることが予想されるが、その実態はわかっていない。

このような背景の下、カキの養殖を行っている閉鎖湾に放流先の河川が流れ込み、海水や養殖カキの汚染源となる可能性のある、公共下水道終末処理場、漁業集落排水処理施設・し尿処理施設におけるNVの消長と、その海域で養殖されたマガキと海水のNV検出状況について調査し、下水処理水が放流先の海域に与える影響を検討した。

B 研究材料と方法

1. 調査材料

カキを養殖している岩手県内A閉鎖湾周辺の公共下水道処理施設、漁業集落排水処理施設、し尿処理施設における処理前の流入水等と処理後放流水を検液とし、05年11月から07年1月にかけて2ヶ月に1回（05年11/24、06年1/15、2/22、9/12、12/12、07年1/16）計6回の検体採取を行った。また、し尿処理施設においては処理工程（図1）における処理前のし尿、一次処理水（嫌気好気反応槽後の脱離液、遠心分離の分離液）、二次処理水（凝集沈殿処理水及び砂ろ過処理水）、高度処理水（活性炭処理水）を検査材料とした。

また、A湾内で養殖しているマガキ（10～15個採取し、カキ1個分の中腸腺を1検体とした）と、カキ棚周辺定点2箇所の海水（各10ℓ）、を下水検体と同時期に採取し、検査材料とした。

2. ウイルス濃縮方法

し尿処理施設の処理前のし尿及び一次処理水は、遠心分離を3,000rpmで30分を2回実施し、上清を試料とした。その他の汚水検体はpH調整後塩化アルミニウム又はポリ塩化アルミニウムを加えて混和し、フィル

ターで捕集後グリシン緩衝液（pH 11.5）で溶出し、遠心分離を3,000rpm、30分を2回実施し、上清を試料とした。得られた上清は30%ショ糖液に重層し超遠心（36000rpm、150分）を行い、得られた沈殿を300 μ ℓの蒸留水で再浮遊し、ウイルス濃縮検体とした。マガキについては中腸腺を摘出しPBSで10%懸濁後、遠心分離を3,500rpm、30分を2回実施し、上清にPEG液及びアミラーゼを加えて室温で一晩振とうした後、3,500rpm、30分冷却遠心を行い、得られた沈殿物を400 μ ℓの蒸留水で再浮遊してウイルス濃縮検体とした。

3. NVの検出方法

各濃縮検体のRNAの抽出はQIAamp Viral RNA Miniキット（QIAGEN）を用いた。DNase処理後、random primer（9mer）を用いてSuper Script II RT（Invitrogen）で逆転写し、cDNAを合成した。

全ての検体についてNVのnested-PCRを行った。1st PCRにはCOG1F/G1-SKR、COG2F/G2-SKRを、nested-PCRにはそれぞれG1-SKF/G1-SKR、G2-SKF/G2-SKRを用いた。増幅産物が確認された検体は、1st PCR産物をUniversal PCR Master Mix（ABI）を用いたrealtime-PCR法で確認した。NVが検出された検体は、同様のrealtime-PCR法を用いて、濃縮検体のNVコピー数を測定した。

C 研究結果

1) 3施設のNV検出状況

下水道、漁業集落排水処理施設、し尿処理施設におけるNV検出状況を示した（表1）。処理前の流入水等では3施設とも検査を行ったほとんどの期間でNVが検出され、検出されなかったのは06年9月の下水道流入水のみであった。し尿処理施設の放流水ではいずれもNVは検出されなかった。放流水で検出されたのは、下水道施設では06年の1

月及び2月で、漁業集落排水処理施設では06年2月のみであった。

2) し尿処理施設の処理工程のNV検出状況

し尿処理施設の処理工程(図1)毎におけるNV検出状況を表2に示した。

一次処理水(嫌気好気反応槽後の脱離液、遠心分離の分離液)の段階ではほぼNVは検出されず、凝集沈殿処理後の二次処理水以降ではNVが検出されることはなかった。

3) マガキのNV検出結果

05年11月～06年9月には、マガキからNVは検出されなかったが、06年12月に10個中1個(G1)、07年1月に10個中8個(G1:6個、G2:6個)からNVが検出された(表3)。

4) 海水の結果

2定点で採水した海水からは、6回の調査期間のいずれの検体からもNVは検出されなかった(表4)。

5) リアルタイムPCR法による定量

公共下水道のNV濃度を図2に示した。流入水では、GIが定量可能だったのは、6回の調査のうち1回のみで、06年1月に採水した検体で、4.1コピー/ml検出され、GIIは、6回の調査のうち、4回(05年11月、06年1月、06年12月、07年1月)の検体で、81～330コピー/mlが検出された。しかし、処理後の放流水でNVの定量が可能だったのは、6回の調査のうち、1回(06年2月)のみで、GIIが0.9コピー/mlと微量が検出されたのみで、他は定量限界以下であった。

漁業集落排水処理施設のNV濃度を図3に示した。流入水では、GIで定量可能だったのは、6回の調査のうち1回(06年9月採水)で、27コピー/mlが検出され、GIIは6回のうち5回で13～1200コピー/mlが検出された。処理後の放流水でNVが定量可能だったのは、6回の調査のうち1回(06年2月採水)のみで、GI 0.5コピー/ml、GII 1.2コピー/mlが検出され、いずれもごく微量であった。

し尿処理施設のNV濃度を図4に示した。

処理前のし尿ではGIは 2.0×10^2 から 9.9×10^3 コピー/ml、GIIは 1.6×10^3 から 1.1×10^5 コピー/mlが検出され、下水道、漁業集落排水処理施設の水洗による流入水と比較して分濃度が高めに測定された。しかし、放流水からNVは全く検出されなかった。

D 考察

処理前の流入水、ふん尿等では、3施設ともにほとんどの採取時期検体からNVが検出された。しかし、処理後の放流水においては、公共下水道で06年1月および2月に、また漁業集落排水処理施設では06年1月にNested-PCR法では検出されたが、リアルタイムPCR法では06年2月に漁業集落排水処理施設でGIIが12コピー/mlされたにすぎず、その他の放流水では、全て定量限界未満で、いずれの処理施設においても、流入してきたNVは、ほぼ除去されている状況にあった。

特にし尿処理施設においては、反応槽でほぼ除去されており、更にその後の凝集沈殿処理等の高度処理を行っていることから十分に除去されているものと考えられる。

また、3箇所の処理施設では、年間を通して、NV(主として遺伝子群II)が流入水あるいはし尿として流入していたが、特にし尿処理施設の処理前糞尿では、ヒト胃腸炎の糞便からは比較的検出される割合の低い遺伝子群Iについても、同等量が検出される場合もあった。また、非流行時期である9月にも流入水あるいは処理前糞尿からNVが検出されていたことから、NVによる胃腸炎と確認されないNV感染者がいる可能性が示唆された。

カキにおいては、06年2月に10個中1個からGIが検出され、07年1月に10個中8個(GI:6個、GII:6個)からNVが検出された。同時期の汚水処理施設3箇所の放流水からは、NVはほぼ検出されていない状況ではあったが、06年1月に採取したカキから高率に

NVが検出されたことにより、カキを汚染する要因を広く検討する必要性が示唆された。

糞尿は下水道、漁業集落排水処理施設・浄化槽等の汚水処理施設のほか汲み取りによるし尿処理施設において処理されることから、カキの汚染を検討するにあたっては総合的に関連を検討していく必要があると思量される。

下水道、汚水処理施設、し尿処理施設は、法体系、規制基準等も異なり、またそれぞれの施設における処理方式、運転管理も多種多彩である。下水処理場の放流水におけるNVの検出状況、除去効果を調査するにあたっては施設の機能が十分に発揮されるよう運転管理されているかも含めて様々な処理条件、要因を検討することが重要であり、併せて下水処理場の放流水が放流先水域に与える影響を定量的に検討する必要がある。

E. 結論

1. カキ養殖海域A湾の汚染源となる可能性の有る3箇所の汚水処理施設のいずれにおいても、流入してきたNVは、ほ

ぼ除去されている状況にあった。特にし尿処理施設においては、処理前には $10^2 \sim 10^5$ copy/ml あったNVも、その処理工程で、ほぼ完全に除去されていた。

2. 3箇所の汚水処理施設の放流水中のNVは、殆ど検出されない濃度になっていたにも関わらず、07年1月に採取したカキからは高率にNVが検出されたことから、カキを汚染させる要因について、浄化槽、生活排水も含め、NVによる胃腸炎の流行状況等との関連を、広く調べていく必要性が確認された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし