

平成 19 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)

「食品中のウイルスの制御に関する研究」

協力研究報告書

パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収

研究協力者 齋藤博之 (秋田県健康環境センター・保健衛生部)

分担研究者 田中智之 (堺市衛生研究所)

研究要旨:

食品検体からノロウイルス (NV) を検出するための実践的な手法としてパンソルビン・トラップ法 (パントラ法) を新規に開発し、将来的な実用化の可能性を探るための検討を行った。本研究では最近の流行で主流を占めている Genogroup II, Genotype 4 (GII/4) に的を絞り、糞便で汚染させた食品からの NV 検出を試みた。本法を用いることで、50ml の食品乳剤から簡便に 50 μ l の RNA 抽出液を得ることができた。NV の回収率はポテトサラダで 78.0%、焼ソバで 15.2%、牛乳で 10.2%であった。実用化のためには改善すべき点が多々あるものの、これまでほとんど手が付けられてこなかった「カキ以外の一般的な食品」からの NV 検出法としての方向性を見出すことができた。

A. 研究目的

ウイルス性食中毒の大部分を占めるのがノロウイルス (NV) であることがわかっているにもかかわらず、原因として疑われる食品からウイルスを検出できた例はカキを除けば極めて稀少である。検出出来た稀少な例においても、表面が平滑でウイルスの洗滌回収が容易な固形食品検体に限られているのが実情である。また、ウイルスを含む洗滌液を PCR で用いる量まで減量濃縮するには多大な労力と時間とコストを要し、多検体を取り扱うのは事実上不可能である。こうした困難な状況を打開するために、固形、液状、練り物、油物などの一般的な食品から

NV を検出する手法の開発に着手した。その際、単に検出することを目的とするのではなく、できるだけ簡便で安価となるように工夫し、真に”使える”手法となることを目指した。

B. 研究方法

1. 研究材料

汚染実験に用いる食品として、市販されているポテトサラダ、焼ソバ、及び牛乳を用いた。また、検出対象となる NV として、2006 年 12 月に秋田市で発生した食中毒事例で搬入された糞便 (GII/4, Accession No. : AB293424) を用いた。

2. 試薬類

1) 抗GII/4血清

感染研でVLPから作成したもの(ロットNo.: 抗104ウサギ971222、ホモ抗体価: 100万倍)を用いた。

2) 洗滌液

0.1%のTween20を含むPBSを用いた。

3) パンソルピン

黄色ブドウ球菌を熱処理してホルマリン固定したものの懸濁液で、和光純薬から購入した。

4) フェノール系RNA抽出キット

TRIzol-LS (invitrogen)を使用した。

5) RNA共沈剤

エタ沈メイト(ニッポンジーン)を使用

3. パンソルピン・トラップ法の手順

基本的な操作の流れを図1に示した。糞便を蒸留水(DW)で乳剤としたその遠心上清で各種食品を汚染させ、同時に一部をオリジナルとして残した。汚染させた食品を洗滌液に懸濁させた後、3,000rpm 20分(普通の遠心機で可)で固形物を除去した(このとき、上清が濁っていても問題は無い)。食品の遠心上清に抗血清を加えてNVと抗体の複合体を形成させ、そこにパンソルピンを加えることで、黄色ブドウ球菌表面に存在するプロテインAに吸着したNV複合体を回収した。NVを吸着した菌体を少量のDWで再懸濁したものをTRIzol-LSでフェノール抽出し、水層にエタ沈メイトを添加してイソプロピルアルコール沈澱によりRNAを回収した。回収したRNAはDW 50 μ lに溶解してリアルタイムPCRによって

NVのコピー数を測定した。

食品のうち牛乳については、50mlに糞便遠心上清を加え以後の操作を行った。抗血清添加量の検討のため、PBS 50mlに糞便遠心上清を加え、その後添加する抗血清の量を1~50 μ lの範囲で変化させて検討した。

4. コピー数の測定

cDNAの合成は、最終的に得られたRNA抽出液(50 μ l)から8.5 μ lを取り、Random 9merによる逆転写により行った(反応容量20 μ l)。cDNA溶液を5 μ l取り、Kageyamaら(J Clin Microbiol. 2003;41;1548~1557.のリアルタイムPCR法でNVのコピー数を測定した。使用した機器はロシュ製「LightCycler 350S」で反応容量は20 μ lである。

C. 研究結果

1. 抗血清添加量の検討

図2及び表1に示したとおり、50mlの食品乳剤に対して、抗血清2~50 μ lを添加しても回収率に顕著な差は見られなかったが、1 μ lを境に半減した。抗血清を加えなかった場合にはNVは検出できなかった。

2. 食品からの回収実験

固形食品については基本的に表面を洗滌したPBSを検査することになるため、ここでは処理がより困難と思われるポテトサラダ(練り物)、焼きソバ(油物)、及び牛乳(液状)についてNVで汚染させてからの回収を試みた。結果は図3~5(増幅曲線)、及び表2(実測値)に示したとおり、ポテ

トサラダでは 78.0%、焼きそばでは 15.2%、牛乳では 10.2%の回収率であった。それぞれ、抗血清を加えないブランクを設定したが、いずれも非特異吸着の範囲と考えられる数値であった。

D. 考察

1. これまでの問題点の整理

これまで、カキ以外の一般的な食品検体からの NV 検出が困難であった理由には次のようなものが考えられた。

1) 検体数の問題

1 食当たりの品目は 10~20 種類存在し、1日3食3日分となると、簡単に100検体くらいになる。さらに、検便と違って一部を代表検体として検査して、他を省略するといった”間引き”は原則としてできない。一定範囲の食品をプールして検査するにしても、次で示す”検体量”の問題に直面する。

2) 検体量の問題

食品検体を PBS 等で洗滌、懸濁して乳剤とした場合、その量は少なく見積もっても 50ml 程度になる。一方、PCR で用いる検体 (RNA 抽出液) は 50 μ l 程度であり、1,000 倍に相当する減量濃縮が必要である。

3) 検体の質の問題

表面が平滑な固形食品では、PBS 等で洗滌することで、比較的濁質の少ない形で NV を回収できる可能性がある。しかし、練り物や油物等を PBS に懸濁した場合は、どれほど遠心しても上清は濁ったままであり、フィルターでろ過しても目詰まりを起こしてうまく

いかない。また、現在の一応のスタンダードとされている PEG 沈澱法を用いると、NV とは無関係の大量の沈澱が生じて手に負えないことも多い。特に牛乳に PEG を添加した場合には、ヨーグルト状に凝固してその後の操作が困難になる。

4) 労力・時間・コストの問題

PEG 沈澱法では、原則としてオーバーナイトの処理が必要とされており、さらに 10,000rpm 程度の遠心によって沈澱を回収しなければならない。しかし、50ml の容量を 10,000rpm で遠心するには高速冷却遠心機のような大型機器を必要とし、遠心チューブも専用品を用いることになっている場合が多い。こうした専用遠心チューブはディスプレイ使用を前提としていないため高価であり、さらに洗浄後再利用するには PCR を行う上で不安が残る。また、一般に”抽出キット”として市販されている試薬は 1ml 程度の検体量を想定して作られているため、50ml の食品乳剤に適用させるのは困難である。1 検体に 4~5 万円をかけられるのならば、あるいは可能かもしれないが、1 事例当たり多数の検体が搬入される状況下では到底容認できる金額ではない。

2. パンソルビン・トラップ法の開発

ハンソルビン・トラップ法 (パントラ法) は、食品乳剤中に NV に特異的な抗体を添加することにより、抗原抗体複合体を形成させ、それを黄色ブドウ球菌表面のプロテイン A に吸着させ、菌体と共に NV 複合体を沈澱させるこ

とで回収する原理である。最大の特長は、食品乳剤が濁ったままでよいという点にある。図1において食品を懸濁した後で3,000rpm 20分の遠心を行っているが、このとき用いる遠心機は一般の検査室にある普通のものであり、チューブもプラスチックのディスポ製品である。この遠心条件で沈澱する固形物だけを除去しておけば、上清は濁っていても不都合はない。その後パンソルピンを添加した後に再び3,000rpm 20分の遠心が行われるが、この条件で沈澱する食品由来の固形成分はすでに最初の遠心の際に除去されているため、NVを吸着した黄色ブドウ球菌だけが沈澱される。この段階で上清は濁ったままである。しかし、NVは菌体と一緒に沈澱の方に移行しているため、上清は破棄することが出来る。菌体の沈澱を少量のDWで再懸濁してからRNA抽出を行えば、50mlの食品乳剤から50 μ lのPCRサイズのRNA溶液まで、効率良く減量濃縮できる。所要時間は10検体程度ならば約4時間程度（待ち時間、作業時間合計）であり、PEG沈澱法と比べて圧倒的に簡便である。リアルタイムPCRにより回収率を測定したところ、ポテトサラダで78.0%、焼きそばで15.2%、牛乳で10.2%とバラつきが見られたが、食品の物理的性状によって最初の洗滌効率が異なるためある程度の差が出るのはやむを得ない部分もある。回収率10%でリアルタイムPCRの検出感度を反応チューブ当たり10コピー/ μ lと仮定し、最終的に得られたRNA溶液

の10分の1をPCRに用いた場合、理論上は食品1g当たり100コピーのNVが存在すれば検出できることになる。Nested PCRを用いるならばもっと希薄な汚染でも検出できる可能性がある。また、操作が簡便であるため多検体を検査することが可能で、結果として事例ごとの検出効率は向上することが期待できる。

3. 今後の検討課題

前述のとおり、パントラ法はこれまでのPEG沈澱法と比べて圧倒的な簡便性を備えているため、食品からのNV検出法のスタンダードとして有望と考えられる。しかし、開発初期段階であるため、以下の改善すべき点も多くある。

- 1) 同じ食品でも回収率が相当にバラつくため安定させること。
- 2) 開発当初の実験であるため数値評価の関係上、反応チューブ当たり $1.817 \times 10^5 \sim 7.236 \times 10^5$ コピー/ μ l（食品1g当たり $9.085 \times 10^5 \sim 3.618 \times 10^6$ コピーに相当）といった、現実の食中毒では考えにくい程度の高濃度汚染検体を使用したため（表2）、汚染度を下げた場合の検討が必要である。この点については汚染度が下がると回収率が悪くなる傾向がある。前項の問題も含めて考えると、回収率には食品の洗滌液の組成、沈澱させた黄色ブドウ球菌からのRNA抽出、さらには逆転写反応やリアルタイムPCRの条件まで多くの要因が関係しているため今後時間をかけて解決してゆく必要がある。

3) 他の血清型への適用拡大

開発初期の時点では、検討事項を簡略化するために、流行の主流である GII/4 型を実験材料として用いたが、今後は他の血清型へ適用拡大する必要がある。現在のところ感染研で準備している NV に対する抗血清は、GI については 1, 2, 3, 4, 8, 11 型の 6 種で、GII については 1-8, 10, 12, 14, 15, 17 型の 13 種である。理論上はこれらの 19 種類の抗血清をあらかじめ混合しておき、各々 100 倍になるように食品乳剤に加えれば目的は達成できると考えられる。しかし、添加する血清の量が増えるとパンソルピンのキャパシティを超える可能性もあるため、この点は改めてプロトコールを見直す必要がある。カタログデータではパンソルピン 1 μ l 当たり 2.46 μ g の Human IgG を結合する能力があるため、計算上は 300 μ l の添加で 738 μ g の Human IgG を結合させることができる。本法で用いている Rabbit IgG については Human IgG とほぼ同程度の親和性があるとされているが、実際に確認する作業が必要である。

4) 実践での証明

適切な食品検体が搬入される事例があるかどうかは不透明であるが、機会があれば実践で試みるのも実用性を証明するのに必要な作業と考えられる。ただし、発展途上の手法を用いるに当たっては行政当局とのすり合わせが重要であり、いたずらに混乱を招く事態は避けなければならない。また、本法が一応の完成をみた時点で、複数

のラボでの評価試験を行うことを計画している。

E. 結論

カキ以外の一般的な食品からの NV 検出法として、黄色ブドウ球菌を利用したパントラ法の開発に着手した。開発初期段階の検討では食品の物理的形状を選ばずにどのような検体であっても共通の処理工程で簡便に NV を減量濃縮することができ、実際の検査の局面で十分に効果を発揮できる可能性は高いと考えられた。しかし、一方では実用に供するために乗り越えなければならない問題点も多々見つかったが、今後の工夫次第で解決できる範囲のものであり、完成に向けて本研究を継続してゆく意義は大きいものと評価できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

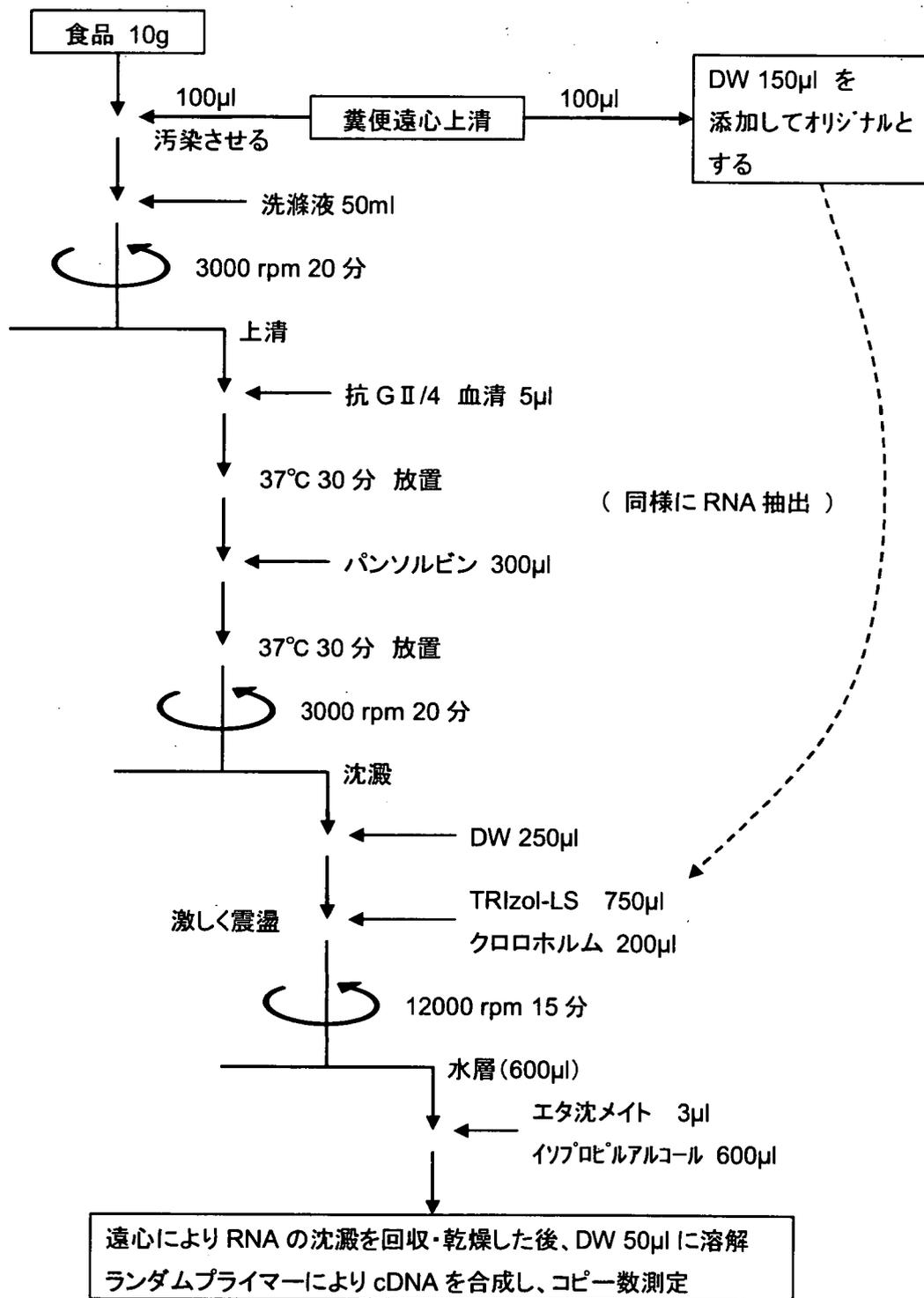


図1 パンソルビン・トラップ法の操作手順

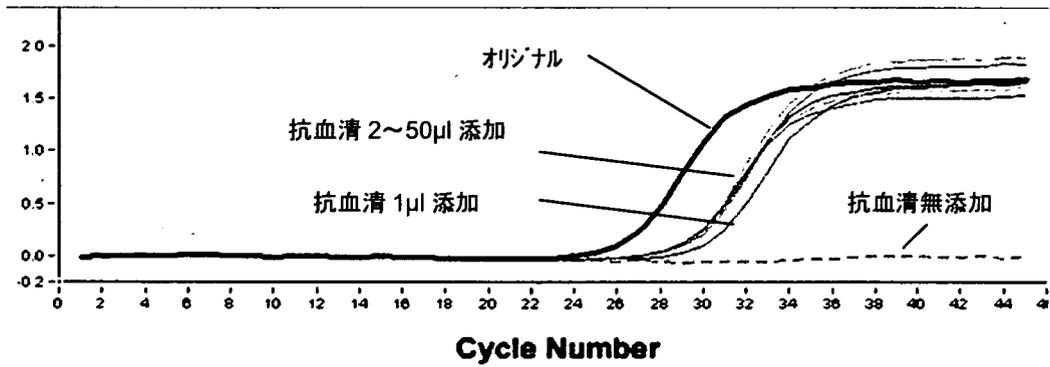


図 2 抗血清添加量と回収率の関係 (増幅曲線)

表 1 抗血清添加量と回収率の関係 (実測値)

添加量 (μ l)	コピー数/ μ l*	回収率 (%)
0	N.D.	-
1	6.369E+02	8.78
2	1.377E+03	18.99
5	1.290E+03	17.79
10	1.461E+03	20.15
20	1.506E+03	20.77
50	1.426E+03	19.67

オリジナル 7.252E+03

*図 1 の最終抽出物 (イソプロパノール沈澱を DW 50 μ l に溶解) のコピー数

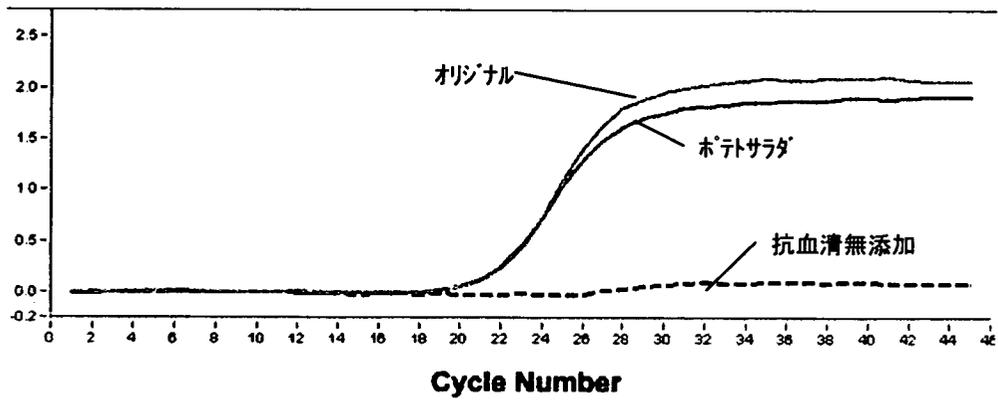


図3 ポテトサラダからのNV回収実験（増幅曲線）

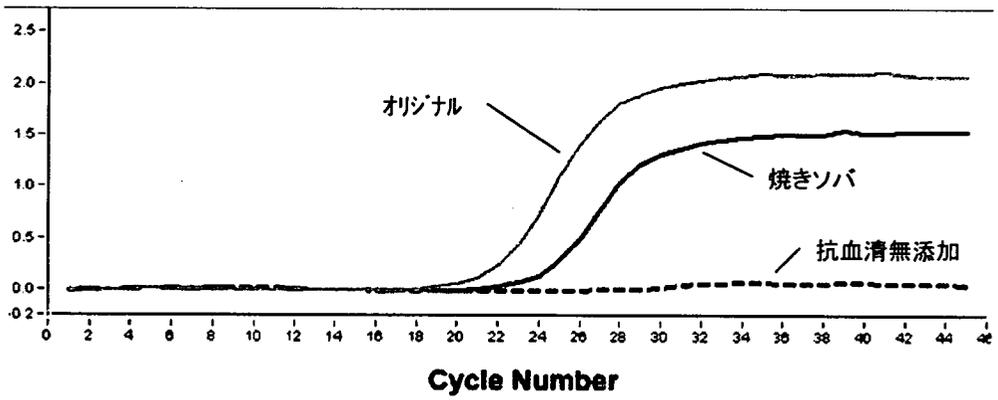


図4 焼きソバからのNV回収実験（増幅曲線）

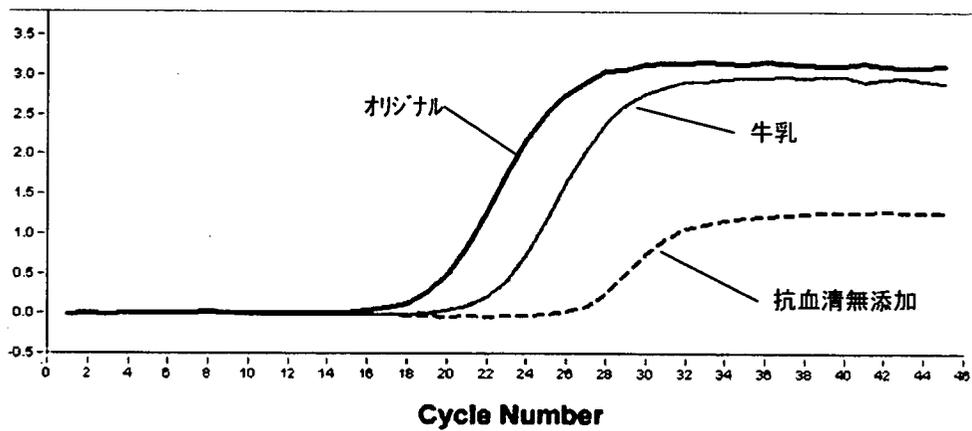


図5 牛乳からのNV回収実験（増幅曲線）

表2 食品からの回収率の比較 (実測値)

食品	コピー/μl*	回収率 (%)
ポテトサラダ (ブランク**)	1.418E+05 (3.633E+02)	78.04 (0.20)
焼きソバ (ブランク**)	2.757E+04 (1.519E+02)	15.17 (0.84)
牛乳 (ブランク**)	7.351E+04 (2.197E+03)	10.16 (0.30)
オリジナル	1.817E+05 (ポテトサラダ、焼きソバ) 7.236E+05 (牛乳)	

*図1の最終抽出物 (イソプロピルアルコール沈澱を DW 50 μl に溶解) のコピー数

**抗血清無添加

平成 19 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)

「食品中のウイルスの制御に関する研究」

協力研究報告書

アミラーゼを用いたカキからのノロウイルス濃縮法の検討について

協力研究者 植木 洋 (宮城県保健環境センター 微生物部)
分担研究者 田中智之 (堺市衛生研究所長)
協力研究者 庄司美加 (宮城県保健環境センター 微生物部)

研究要旨:

カキからの Norovirus (NV) 遺伝子抽出法である破碎法に、前処理としてアミラーゼ (AM) 処理を加え、ウイルスの抽出効果について検討した。その結果、抽出された NV 遺伝子数は、AM 処理群が非処理群と比較して高かった。さらに、Mann-Whitney の U 検定を用いた統計的解析でも、2 群間に有意差が認められた。AM 処理によるカキからの NV 遺伝子抽出法は、効率的で今後も NV 保有カキの疫学調査などに活用できる方法と考える。

A. 研究目的

カキの中腸腺からの NV を濃縮・抽出する方法として、これまで破碎法が用いられている。α-アミラーゼ (AM) で前処理をすることにより、NV 遺伝子の検出率が向上するとの報告が見られている。今回 AM 処理による NV 遺伝子抽出と従来の破碎法のみの場合による NV 定量 PCR 法で比較検討した。

B. 研究方法

B-1 対象検体

2007 年 10 月下旬より、下水処理施設が処理水を放流している S 川にカキを垂下し、2007 年 11 月、12 月にそれぞれ 1 回、2008 年 1 月に 2 回計 4 回サンプリングした。合計 77 個体採取し、対象検体とした。

B-2 NoV の濃縮・遺伝子定量

カキは採取後、直ちに 1 個体ずつ中腸腺を摘出し AM 処理群 (N=38) と非処理群 (N=39) に分けた。AM 処理群 (N=38) は中腸腺 1 個に対し、α-アミラーゼを 2.5mg/ml の割合で加え、37℃ 2 時間静置し、細胞破碎装置 Micro Smash™ (TOMY) を用いて破碎した後、NV の RNA 抽出を行った。非処理群は実験対照とし、AM 処理は実施しなかった。カキの NV 遺伝子は、公定法に準じて定量した。

B-3 AM 処理効果の判定

AM 処理群と非処理群から得られた個々の定量値をカキ中腸腺 1g の NV 遺伝子数に換算後、処理群・非処理群の平均値を比較した。さらに遺伝子群別にもアミラーゼ処理につ

いて比較した。有効性の確認は、Mann-Whitney の U 検定を用いて 2 群間の差を見た。

C. 研究結果と考察

C-1 平均値の比較

AM 処理の有無による中腸腺 1g 当たりの NV 遺伝子数の平均値を図 1 に示した。AM 処理群の平均値は 5,432 copies/g、非処理群では 3,707 copies/g であり、AM 処理群が 1.46 倍高かった。また、遺伝子群別での平均値を図 2 に示した。G I 群での AM 処理群の平均値は 4,519 copies/g、非処理群では 3,195 copies/g、G II 群での AM 処理群の平均値は 913 copies/g、非処理群では 512 copies/g であった。いずれの群においても AM 処理群の方で高いコピー数が得られた。

C-2 統計学的解析 (Mann-Whitney の U 検定)

AM 処理の有効性を評価するために、Mann-Whitney の U 検定 (式 1) を用いて独立 2 群間の差を比較した結果、NV 遺伝子 Genogroup I (GI) および Genogroup II (GII) を含めた群 (GI + GII) では AM 処理群、非処理群の間に有意差が認められた ($p < 0.05$)。すなわち AM 処理はカキからの NV 抽出法として有効であることが確認できた。一方、遺伝子群別では、GI では差が認められなかったが、GII では有意差 ($p < 0.01$) が確認された。

$$U_i = R_i - \frac{N_i(N_i + 1)}{2} \quad \dots \text{式 1}$$

(U_i : U 統計量, R_i : 平均順位が小さい方の和, N_i : 平均順位が小さい方の標本数)

これらのことから、AM 処理は NV 遺伝子の検出に有効であることが示唆された。今後、反応温度や pH、反応時間の最適化について検討する必要があると考える。

D. 結論

今回、カキからの NV 濃縮・抽出法として、AM 処理について検討を行った。その結果、中腸腺 1g 当たりの NV 遺伝子数の平均値は AM 処理群が高かった。また、AM 処理群と非処理群に統計学的有意差が確認された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

なし

図1 AM処理の有無によるNV遺伝子数の比較(平均値+SE)

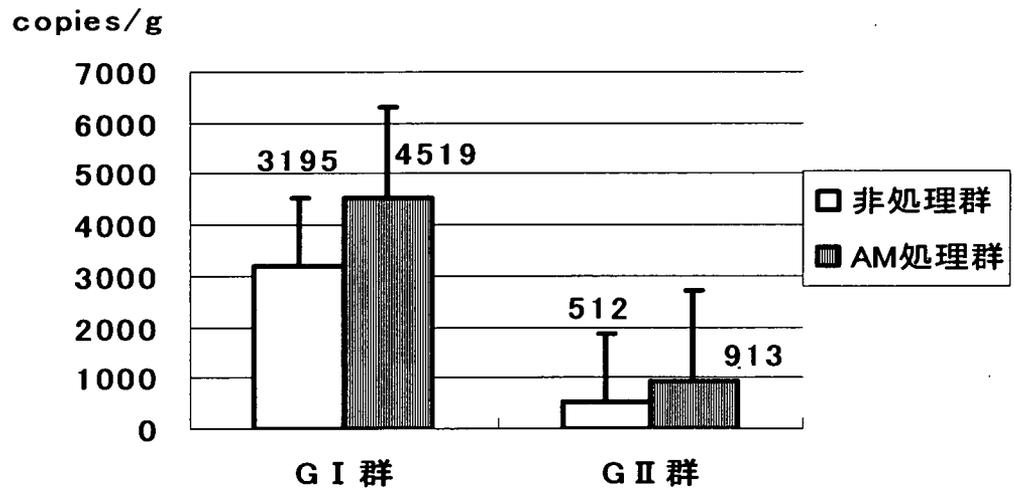
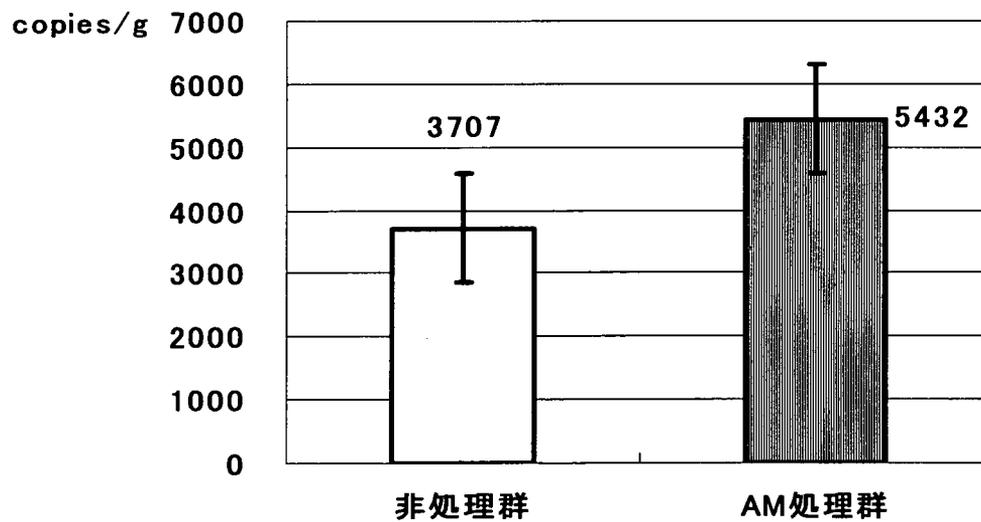


図2 AM処理の有無によるNV遺伝子数の比較: 遺伝子群別(平均値+SE)



平成 19 年度厚生科学研究費（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

下水流入水からのノロウイルス検出と隣接海域のイワガキ汚染の状況

研究協力者 滝澤剛則 （富山県衛生研究所）
分担研究者 田中智之 （堺市衛生研究所）
研究協力者 中村一哉、小原真弓、長谷川澄代、岩井雅恵、
堀元栄詞、倉田 毅 （富山県衛生研究所）

研究要旨：

富山県西部地域の下水処理場の流入水を材料にノロウイルス (NV) の存在状況を調査した。流入下水からは、一年を通じて Genogroup (GI)、Genogroup II (GII) NV が検出された。ヒトでの発症例が増加する冬期間では、主に GII/4 遺伝子型が検出されるものの、春から夏にかけては、様々な遺伝子型が検出される傾向にあった。GI では、2000 年に初出した WUG1 型組換え株が比較的高い頻度で検出されており、このタイプの株が現在も環境中で維持されていることが示された。GI、GII 共に新しい遺伝子型や組換え型の株が検出されており、NV が変化を続けていることが示唆された。下水処理水が流れ込む海域で採取されたイワガキからはウイルスは検出されず、この海域の NV による汚染の程度は低いものと考えられた。2007-2008 シーズンの NV 集団感染・発生事例の原因株について解析を行った結果、下水からの検出状況とは異なり、保育園で発生した GII/13 を原因とする 1 事例を除き、すべてを GII/4 が占めていた。GII/13 が原因となった事例では、不顕性感染の職員から保育園の園児に広まった経緯が推定されており、GII/13 が大人では不顕性感染を起こしやすい株である可能性が想起された。以上の結果を踏まえて、流入下水や臨床例を対象にした調査を引き続き行っていくとともに、不顕性感染の実態を把握するために、健常者検便サンプルを対象にした調査研究が必要と考える。

A. 研究目的

生活廃水が流入する下水中には、ヒトやペットから排泄されたウイルスが多く含まれており、生活環境中に循環しているウイルスを調査する材料として至適である。NV は感染者の糞便中に排泄されるウイルスとして代表的なものであり、下水流入水中にも環境での分布状況を反映しながら存

在していると思われる。また、近年 NV の不顕性感染が着目されているが、生活廃水中には顕性・不顕性に関わらず感染者から排泄されたウイルスが存在していると考えられ、より網羅的な調査を行う対象として期待できる。今回、下水処理場への流入下水を材料に、検出される NV について遺伝学的解析を行い、環境中の NV の変遷を時系列

に追った。また、下水処理水が流れ込む海域のイワガキ汚染状況、県内で発生した NV 集団感染事例についても検討し、流入下水中の NV の存在様式との比較考察を行った。

B. 研究方法

1. 下水採取と濃縮処理

2007 年 1 月から 12 月の月毎に採取した富山県西部地域の下水処理場への流入下水を調査対象とした。採取した下水のうち 1 リットルを 3,000rpm で 30 分遠心し、夾雑物を取り除いた上清に最終濃度 0.05M になるように塩化マグネシウムを添加し、0.5 規定の塩酸を用いて pH3.5 に調整した。前処理後検体を陰電荷膜にろ過吸着させ、この陰電荷膜を 3% beef extract 液 10ml に浸漬し、超音波処理により吸着分子を溶出した。溶出液を再度遠心後、回収される上清を 100 倍濃縮下水検体とした。上記の方法とは別に PEG 沈殿法による濃縮操作により 250 倍濃縮下水検体も調整した。濃縮下水検体から QIAamp Viral RNA Kit を用いて RNA を抽出し、以下の実験に供した。

2. RT-PCR と増幅産物クローニングおよび塩基配列解析

抽出した RNA について、DNase 処理を行った後、Superscript III 逆転写酵素とランダムヘキサマーを用いて cDNA 合成を行った。ノロウイルスの検出は厚生労働省通知に記載されているプライマー、G1SKF/R または G2SKF/R を用いた PCR 法で行い、増幅産物については塩基配列解析により特異性の確認および遺伝子型の決定を行った。また、ポリメラーゼ遺伝子の高度に保存された領域上でプライマー、1421f および 1364f (La Rosa *et al.*,

JV. 2007: 73; 4152-4161) を作製し、GI については、1421f または 1364f と G1SKR を組み合わせた semi-nested PCR 法で、GII については、1421f と NV2oR、1364f と G2SKR それぞれのプライマーペアを用いた nested-PCR 法によって、ポリメラーゼ遺伝子の 3' 側からカプシド遺伝子の 5' 側にかけての増幅を試みた。増幅された PCR 産物は pGEM-T ベクターにクローニング後、塩基配列を決定した。決定された塩基配列を用いて、ポリメラーゼ遺伝子 3' 側領域とカプシド遺伝子 5' 側領域それぞれについて系統樹解析を行い、得られた系統樹のパターンから組換え型株の存在についての検討も行った。

3. イワガキからのノロウイルス検出

2007 年 3 月から 8 月にかけて採取された富山湾西部に生息するイワガキを材料とした。中腸腺摘出・乳剤作製から RT-PCR 法による NV 遺伝子検出に至る一連の実験は、厚生労働省通知に従って行った。

4. 集団感染事例

2007 年 4 月から 2008 年 1 月にかけて県内で発生した集団発生例の原因株について塩基配列解析を行い、遺伝子型を決定した。患者糞便の処理、RT-PCR 法によるノロウイルス遺伝子の増幅は厚生労働省通知に従って行った。

C. 研究結果

調査期間中、6 月と 12 月を除いた各月の下水中から GI NV が検出された。使用したプライマーによって検出感度や検出されやすい遺伝子型に相違が認められ、従来のプライマーを用いた PCR 法では GI/4 が検出されやすい傾向にあった (表 1)。系統樹解析に

より組換え株の存在について検討を行った結果、GI/2 ポリメラーゼ遺伝子と GI/6 カプシド遺伝子からなる WUG 1 型組換え株 (Katayama *et al.*, *Virology*. 2002 :299; 225-239) が高い頻度で検出された (図 1、表 1)。また、2 月と 3 月には、従来報告されている遺伝子型のいずれともクラスターを形成しない未分類型 (SW0702-2、SW0702-11、SW0703-10) が検出された (図 1)。

GII NV は、調査を実施した期間中、毎月検出された。ヒトでの発症例が増加する冬期間においては、GII/4 が支配的に検出された。それ以外の時期には、GII/4 以外の遺伝子型も検出される傾向にあった。5 月から 7 月にかけて GII/3 や GII/6 が検出されており、3 月と 9 月には GII/13 が検出された (表 1)。特に 9 月に検出された GII/13 (SW0709-11) はポリメラーゼ遺伝子塩基配列に基づく系統樹では GII/7 とクラスターを形成しており、新しいタイプの組換え株であると考えられた。

下水処理場所在地に隣接した海域のイワガキのノロウイルス保有状況を検査した結果、ウイルスは未検出であるか、10 コピー/個未満であり、汚染進行は観察されなかった (表 2)。

2007 年 4 月から 2008 年 1 月にかけて、県内で発生した集団感染事例の原因株について遺伝子型を検討した結果、2007 年 12 月に保育園で発生した 1 例が GII/13 を原因とする以外は、すべて GII/4 (2006b 初期型) であった (表 3)。この GII/13 が組換え型であるか検討したところ、下水中から 9 月に検出された株に似た GII/7 由来ポリメラーゼ遺伝子を持つ組換え型であった。

D. 考察

生活廃水中には様々な遺伝子型の NV が存在し、発症例で報告される検出状況とは異なる態様を示していた。GI では 2000 年に初出した WUG1 型組換え株が高い頻度で検出されており、このタイプの組換え型ウイルスが現在も環境中に維持されているものと考えられた。また、既知遺伝子型の参照株いずれともクラスターを形成しない未分類の株も検出されており、GI NV が変化を続けている可能性が示された。GII NV では、検出される遺伝子型の季節との関連性が注目された。冬期間に GII/4 が支配的に検出されるのは、GII/4 による感染性胃腸炎が流行することに伴う、生活排水中への GII/4 ウイルス排泄量の増加が背景にあると考えられる。冬以外の時期には、GII/4 の流行が終息し生活廃水中へのウイルス排泄量が減少した結果、比較的低い割合で環境中に維持されていた遺伝子型も検出されるものと推察された。GII NV の組換え株の探索によりポリメラーゼ遺伝子が GII/7、カプシド遺伝子が GII/13 からなる新規の組換え型が検出された。GII では組換え株の存在が多く報告されており、NV が組換えを起こす意義について、さらなる疫学的、分子生物学的な解析が求められる。

流入下水中には多くの NV が存在することが明らかとなり、下水処理によるこれら NV の浄化効率を検討することが今後の課題である。今回、下水処理水が流れ込む海域に生息するイワガキを対象に NV の汚染状況を調査し、下水処理水中の NV による環境水汚染を間接的に評価することを試みた。今回の調査では、対象となったイ

ワガキにNV汚染は確認されなかった。イワガキは水通しの良い岩場に生息しており、このことがイワガキへのウイルス蓄積量に影響を与えている可能性も想定される。しかし、現時点でのこの海域のNVによる汚染の程度は低いものと考えられ、下水処理により、流入下水に含まれるNVは相応に浄化されているものと推察された。

下水中に検出されるNVの多様性に比べ、集団発生事例の原因になったウイルスはGII/4に偏る傾向が観察された。他の遺伝子型はヒトでの発症例から報告される頻度は相当に低く、これらが環境中でどのように維持されているのか解明が望まれる。今季の集団発生事例にはGII/13を原因とした1例が存在した。この事例は、保育園で園児たちが集団で下痢を発症したことで探知されたものであるが、一連の調査により、全く症状を呈しない不顕性感染者の職員が感染源となった可能性が考えられた。このことはGII/13が成人では不顕性感染を起こしやすい可能性を示すものであるが、現時点では症例が少なく断定はできない。今回の症例以外にも不顕性感染でNVを保持しているケースは相当数あると予想される。健常者便を対象にしたNV調査を実施することで、不顕性感染の実態を把握することができるものと期待される。さらに、より広範囲な宿主の調査を実施することで、流入下水から特徴的に検出される遺伝子型の由来に関して有用な知見が得られるものと思われる。

E. 結論

- 1) 富山県西部地域の流入下水からは、一年を通じてGI、GII NVが検出された。

- 2) 冬期では、GII/4が支配的に検出されるものの、春から夏にかけては、様々な遺伝子型が検出された。

- 3) GIでは、WUG1型組換え株が比較的高い頻度で検出され、WUG1型が環境中で維持されていることが示された。

- 4) GI、GII共に新しい遺伝子型や組換え型の株が検出され、高度に進化を続けていることが示唆された。

- 5) イワガキからはウイルスは検出されず、この海域のNVによる汚染の程度は低いものと考えられた。

- 6) NV集団感染・発生事例の原因株について解析を行った結果、下水からの検出状況とは異なり、GII/13の1事例を除き、GII/4が占めていた。

- 7) GII/13の事例では、不顕性感染者から広まった経緯が推定されており、GII/13は不顕性感染を起こしやすい株である可能性が想起された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 長谷川澄代、小原真弓、岩井雅恵、堀元栄詞、滝澤剛則、倉田 毅：ウイルス性胃腸炎の集団発生事例について(2006年度)。富山県衛生研究所年報30, 91-97, 2007.

- 2) 小原真弓、長谷川澄代、岩井雅恵、堀元栄詞、滝澤剛則、倉田 毅：2006年度に検出されたノロウイルス

ス GenogroupII の遺伝子解析. 富山県衛生研究所年報, 30, 98-104, 2007.

- 3) 小原真弓 長谷川澄代 中村一哉 岩井雅恵 堀元栄詞 倉田毅 滝澤剛則、齊藤尚仁、大江浩: 長期ノロウイルス排泄中に認められた遺伝子変化. 病原微生物検出情報 28, 288-289, 2007.

2. 学会発表

- 1) 岩井雅恵、小原真弓、長谷川澄代、堀元栄詞、滝澤剛則、倉田毅: 下水流入水中のノロウイルス. 第48回日本臨床ウイルス学会(富山) 2007年6月2日.

- 2) 長谷川澄代、小原真弓、岩井雅恵、

堀元栄詞、滝澤剛則、倉田毅: 平成18年度に富山県で発生したウイルス性胃腸炎の集団発生について. 第48回日本臨床ウイルス学会(富山) 2007年6月2日.

- 3) 小原真弓、長谷川澄代、岩井雅恵、堀元栄詞、滝澤剛則、倉田毅: ノロウイルスの長期排泄でウイルス遺伝子に変化がみられた一例. 第48回日本臨床ウイルス学会(富山) 2007年6月2日.

G. 知的財産の出願・登録状況 なし

表1 流入下水から検出されたノロウイルスの遺伝子型 (2007年)

	1月	2月	3月	4月	5月	6月
GI	WUG1型 (4型)	4型 未分類型	WUG1型 未分類型	ND (4型) (14型)	WUG1型	ND
GII	4型 6型	4型	13型 (4型)	4型	6型	4型 (3型)
	7月	8月	9月	10月	11月	12月
GI	ND (4型)	WUG1型 (4型)	ND (4型)	ND	ND (4型)	ND (4型)
GII	4型 (3型)	4型 (3型)	13(組換え)型	4型	4型	4型

(): 従来のプライマーを用いて検出された遺伝子型, ND: 未検出

表2 イワガキからのノロウイルス検出状況 (2007年3月-8月)

	3月	4月	5月1回目	5月2回目	6月1回目	6月2回目	7月	8月
GI	<10 ¹	ND	ND	ND	<10 ¹	<10 ¹	ND	ND
GII	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹	ND	<10 ¹	<10 ¹	ND	<10 ¹

表3 富山県内で発生した集団感染事例の原因ウイルスの遺伝子型

発生時期	発生場所	伝播経路	検出遺伝子型
------	------	------	--------

2007年4~5月	公民館	ヒト-ヒト	GII/4 2006b 初期型
2007年 12月	老人保健施設	ヒト-ヒト	GII/4 2006b 初期型
	保育園	ヒト-ヒト	GII/4 2006b 初期型
	保育園	ヒト-ヒト	GII/13 組換え型
	結婚式場	食品	GII/4 2006b 初期型
	病院	ヒト-ヒト	GII/4 2006b 初期型
	宿泊施設	食品	GII/4 2006b 初期型
	食品提供施設(弁当)	食品	GII/4 2006b 初期型
	宿泊施設	食品	GII/4 2006b 初期型
	宿泊施設	食品	GII/4 2006b 初期型
	2008年 1月	飲食店(弁当)	食品
飲食店(弁当)		食品	GII/4 2006b 初期型
宿泊施設(弁当)		食品	GII/4 2006b 初期型
宿泊施設		食品	GII/4 2006b 初期型
老人保健施設		ヒト-ヒト	GII/4 2006b 初期型
老人保健施設		ヒト-ヒト	GII/4 2006b 初期型

図1 下水から検出されたGI群ノロウイルスの系統樹解析

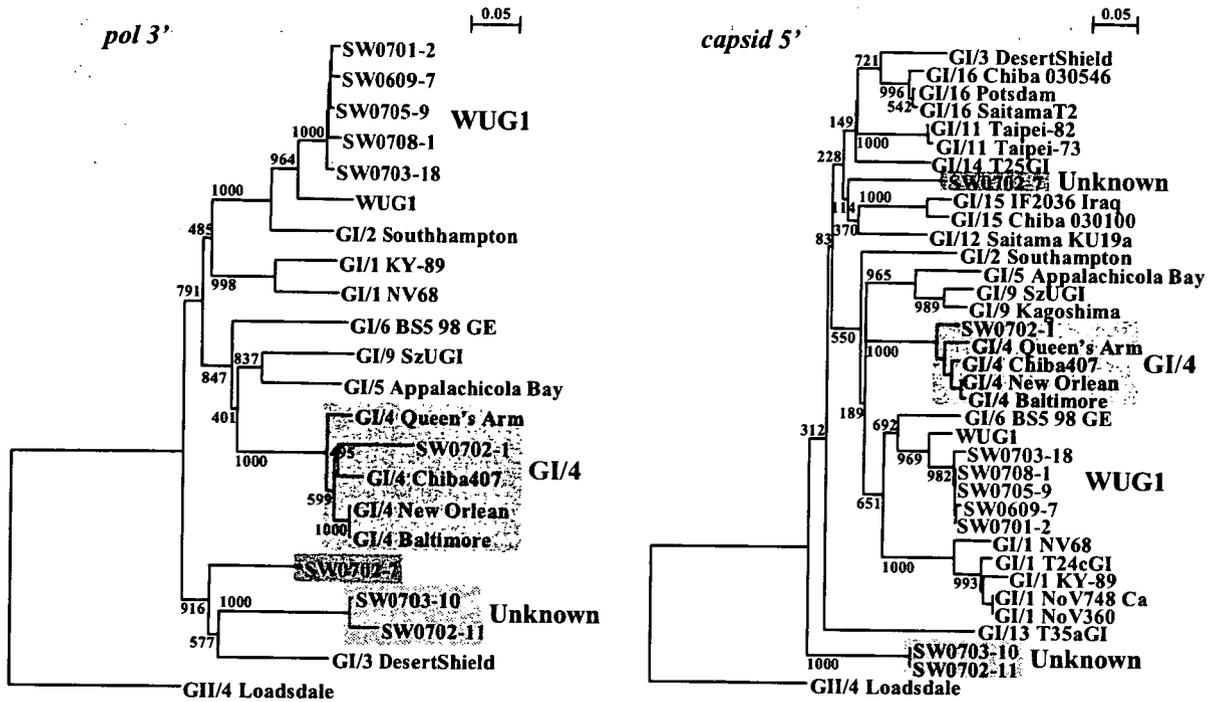


図2 下水から検出されたGII群ノロウイルスの系統樹解析

