

表 4. 調理従事者のノロウイルス陰性確認試験成績

調理者	遺伝子型	Ct 値 (日数)					
		初回検査	検査 2 回目	検査 3 回目	検査 4 回目	検査 5 回目	検査 6 回目
1-1	GII/4	22.1(9)	35.1(16)	25.5(27)	陰性(30)		
2-1	GII/4	29.4(5)	陰性(11)				
2-2	GII/4	24.8(5)	陰性(11)				
2-3	GII/4	17.8(5)	31.9(11)	24.0(18)	陰性(26)		
2-4	GII/4	22.8(5)	32.4(11)	38.1(18)	33.4(26)	35.1(33)	陰性(47)
2-5	GII/4	21.5(7)	37.0(11)	34.0(18)	36.7(26)	陰性(33)	
3-1	GII/4	25.2(5)	32.3(8)	39.6(14)			
3-2	GII/4	27.5(5)	30.3(10)	38.8(14)			
4-1	GII/2	32.7(4)	28.1(10)	34.5(13)	陰性(17)		
4-2	GII/13	22.4(5)	35.1(10)	35.6(13)	陰性(17)		
4-3	GII/2	31.0(5)	38.3(10)	38.9(13)	陰性(17)		
4-4	GII/2	25.9(5)	35.0(10)	39.6(12)	38.2(17)	陰性(21)	
4-5	GII/13	22.7(5)	陰性(12)				
4-6	GII/13	24.6(7)	陰性(21)				
5-1	GII/4	34.4(8)	陰性(17)				
6-1	GII/4	36.7(8)	陰性(17)				

掃除機内ダストからのノロウイルスおよびサポウイルス汚染実態調査

研究協力者: 吉田徹也 (長野県環境保全研究所)

研究分担者: 田中智之 (堺市衛生研究所)

研究分担者: 粕尾しず子、畔上由佳、内山友里恵、笠原ひとみ、上田ひろみ、長瀬 博、藤田 暁
(長野県環境保全研究所)

研究協力者: 野田 衛 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨:

昨年度開発した掃除機内ダスト(ダスト)からのノロウイルス(NoV)回収法を用い、ウイルス性胃腸炎流行時期におけるダスト中の NoV 汚染実態調査を real time RT-PCR 法を用い実施した。サポウイルス(SaV)についても、併せて調査を実施した。その結果、一般家庭のダスト 51 検体中それぞれ 1 検体(2.0%)が NoV あるいは SaV 陽性であった。また、陽性検体のウイルス RNA 量は、NoV が $10^{5.7}$ コピー/g、SaV が $10^{6.6}$ コピー/g であり、重要な感染源になることが示唆された。ダストが NoV あるいは SaV 陽性であった家庭については、さらにダストを継続して採取し、ウイルス量の推移を調査した。その結果、NoV 陽性家庭の場合は 30 日後、SaV 陽性家庭では 105 日後まで陽性となった。また、検出ウイルスの遺伝子解析を行ったところ、同一由来株が継続して検出されていた。以上の結果から、一旦室内環境が NoV 等に汚染されると、かなりの長期間ダストからウイルスが検出されることが明らかになり、適切な消毒等の措置が必要と思われた。

A. 研究目的

昨年度の本研究において我々は、掃除機内ダスト(ダスト)からのノロウイルス(NoV)回収法の確立を目的として検討を行い、簡便で回収率の比較的高い方法を報告した。

そこで、今年度はこの方法を用い、一般家庭等のダストにおける NoV 等の汚染実態を把握することを目的とし調査を行った。また、ダストが NoV 等陽性となった場合には、継続して調査を行い、汚染の推移を明らかにすることも目的とした。

B. 研究方法

1. 調査対象ウイルス

実態調査の対象としたウイルスは、ダストからの回収法を検討した NoV およびその他としてサポウイルス(SaV)とした。SaV は NoV と同じカリシウイルス科に属し、同様の挙動を示すと考えられたため、併せて調査を実施した。

2. 材料

(1) 掃除機内ダスト

一般家庭のダスト 51 検体および事業

所等のダスト 11 検体を汚染実態調査用として用いた。ダスト採取時期は、2008 年 12 月～2009 年 3 月および 2009 年 11 月～2010 年 2 月のウイルス性胃腸炎の流行時期とした。

また、ダストが NoV あるいは SaV 陽性であった場合には、当該家庭のダスト試料を継続して採取した。

(2) 拭取り試料

SaV 陽性家庭については、汚染源を明らかにするため、トイレ床、便座、水洗タンク出水レバーおよびトイレドアノブを滅菌綿棒で拭取り、試料とした。

(3) 糞便試料

NoV 様症状を呈した患者 1 名から得た。なお、糞便検体はインフォームドコンセントを得て採取した。

3. RNA 抽出のための前処理方法

(1) 掃除機内ダスト

ダスト約 1 g をフィルター付き滅菌ポリバッグに正確に計り取り、ダストの 3 倍量の SDS Tris-Glycine Buffer (SDS-TG) を加え、時々よく攪拌しながら、室温で 1～6 時間放置した。振出し液を回収し、室温で 10,000rpm、10 分間遠心分離後、上清を RNA 抽出用試料とした。

(2) 拭取り試料

拭取りを行った綿棒は、滅菌ポリチューブに入れ、1 ml の SDS-TG を加えた後、30 秒間ボルテックスした。1 時間以上室温で放置した後、3,000rpm で 3 分間遠心分離した。遠心上清を 1.5 ml チューブに分取し、さらに室温で 10,000rpm、10 分間遠心分離し、その上清を RNA 抽出試料とした。

(3) 糞便試料

PBS(-) で 10%程度の乳剤を作成し、4℃で 10,000rpm、20 分間遠心分離し、その上清を RNA 抽出試料として用いた。

4. NoV および SaV 定量方法

RNA 抽出、DNase 処理、逆転写反応、NoV および SaV の定量は、それぞれ Kageyama ら (J Clin Microbiol, 41, 1548～1557 (2003)) および Oka ら (J Med Virol, 78, 1347～1353 (2006)) のリアルタイム RT-PCR 法で実施した。

5. NoV および SaV 遺伝子解析方法

NoV 遺伝子解析は、Kojima ら (J Virol Methods, 100, 107～114 (2002)) の報告した G2-SKF/G2-SKR プライマーによりカプシド領域の一部を増幅し、その PCR 産物をダイレクトシーケンス法により 287-nt の塩基配列の決定を行った。その後、Katayama ら (Virol, 299, 225～239 (2002)) の参照株を用い、遺伝子型別および分子系統樹の作成を試みた。

SaV 遺伝子解析は、Okada ら (Arch Virol, 151, 2503～2509 (2006)) の報告した F22/R2 プライマーによりカプシド領域の一部を増幅し、その PCR 産物をダイレクトシーケンス法により 399-nt の塩基配列の決定を行った。その後、Hansman ら (Emerg Infect Dis, 13, 1519～1525 (2007)) の参照株を用い、遺伝子型別および分子系統樹の作成を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. ダストの汚染実態調査結果

一般家庭のダスト 51 検体中それぞれ 1 検体 (2.0%) が NoV あるいは SaV 陽性であった (表 1)。事業所等のダスト 11 検体はいずれも陰性であった (表 1)。陽性検体のウイルス RNA 量は、NoV が $10^{5.7}$ コピー/g、SaV が $10^{6.6}$ コピー/g であった。

2. ダスト陽性家庭における汚染実態調査結果

ダストが NoV あるいは SaV 陽性であった家庭については、さらにダストを継続して採取し、ウイルス量の推移等を調査した。

その結果、NoV 陽性家庭においては、初回採取時のウイルス量が $10^{5.7}$ コピー/g であったが、30 日後には $10^{4.3}$ コピー/g に減少し、60 日後には定量下限未満となった (表 2)。

SaV 陽性家庭においては、初回採取時のウイルス量が集塵器内ダスト (図 1-a) で $10^{6.6}$ コピー/g であった。その後、34 および 45 日後に $10^{5.2}$ コピー/g に減少し、77 日後には定量下限未満となった。一方、集塵器奥ダスト (図 1-b) では、68 日後で $10^{6.2}$ コピー/g、92 日後においても $10^{4.4}$ コピー/g であった。そのため、105 日後にサンプリングをした後、フィルターの清掃と消毒用アルコールの噴霧を行い、その 2 日後に再度サンプリングしたところ、SaV は定量下限未満となった (表 3)。

3. SaV 陽性家庭における室内環境汚染調査結果

SaV 陽性家庭におけるトイレ床、便座、水洗タンクレバーおよびトイレ内側ドアノブの拭取り試料 4 検体は、いずれも SaV 陰性であった (表 4)。

4. ダスト由来 NoV および SaV 株の遺伝

子解析結果

ダスト由来 NoV 2 株 (Dust_7、Dust_22) および SaV 4 株 (Dust_26、Dust_46、Dust_56、Dust_58) について遺伝子解析を実施した。

その結果、NoV 2 株のカプシド領域の一部 288-nt は 100% 相同であり、遺伝子型 GII/6 に属した (図 2)。

また、SaV 4 株のカプシド領域の一部 399-nt も 100% 相同であり、遺伝子型は GI に属した (図 3)。

5. NoV 患者が発生した家庭におけるダスト汚染調査結果

NoV 患者が発生した家庭における、患者発生前後のダストを採取し、NoV による汚染について調査を行った。

その結果、患者便中には NoV (GI/14) が $10^{9.98}$ コピー/g 認められたものの、患者発生後のダストは NoV 陰性であった (表 5)。聞き取り調査の結果、当該家庭は 5 名家族で、そのうちの中学生 1 名が、嘔吐、腹痛といった症状を呈していた。

D. 考察

今回、ウイルス性胃腸炎の流行時期におけるダストの汚染実態調査を実施したところ、一般家庭のダストは 51 検体中 1 検体 (2.0%) が、NoV あるいは SaV 陽性であった。また、陽性検体中のウイルス量は、NoV 陽性ダストが $10^{5.7}$ コピー/g、SaV 陽性ダストが $10^{6.6}$ コピー/g で、感染源に十分なりうる事が推察された。我々は、結婚式披露宴会場における NoV による集団胃腸炎事例を経験し、その際に当該会場専用の掃除機ダストが NoV 陽性であったこと、およびその NoV 量が $10^{4.2}$

～ $10^{5.2}$ コピー/g であったことを報告した（ビルと環境, 121, 33～36 (2009)）。今回のダスト中のウイルス量は、前述の集団胃腸炎事例に比べても多いことから、感染源となる可能性が示唆された。

NoV 陽性家庭について聴取り調査を実施したところ、この家庭では最初の試料採取の2週間前に家族のうち2名が嘔吐、下痢といった症状を呈していたことが判明した。このことから、この時点でこの2名は、NoV に感染していたことが推定された。継続調査の結果、最初の試料採取から30日後のダストも、ウイルス量は $10^{4.3}$ コピー/g と減少したものの、NoV 陽性となった（表2）。また、遺伝子解析の結果、0日目および30日目に検出された2株（Dust_7 および Dust_22）のNoVは、カプシド領域の一部の塩基配列が100%相同であったことから、同一由来株であることが示唆された。これらのことから、当該家庭の室内環境は、同一由来株に継続して汚染されていたことが推察された。

一方、SaV 陽性家庭についても聴取り調査を実施したものの、はっきりとした感染症患者の発生を確認することはできなかった。当該家庭においても継続調査を実施したところ、集塵器内ダスト（図1-a）では45日目まで、集塵器奥ダスト（図1-b）に至っては105日目までの長期間、SaV がダスト中に認められた（表3）。遺伝子解析の結果、0日目、45日目、68日目および105日目に検出された4株（それぞれ Dust_26、Dust_46、Dust_56 および Dust_58）のSaVは、カプシド領域の一部の塩基配列が100%相同であったことから、同一由来株であることが示唆され

た。これらのことから、この家庭においても、同一由来株により長期間継続して室内環境が汚染されていたことが推察された。

当該家庭で使用されていた掃除機は、紙パック式ではなく、いわゆるサイクロン式の掃除機であった。集塵器の奥には非常に目の細かいフィルターがあることから、ウイルス粒子が微小な埃とともに捕集され、非常に長期間認められたものと考えられた。SaV の汚染源を明らかにするため、77日目にトイレ内環境の拭取り調査を実施したが、SaV は認められなかった。このことから、SaV は77日目において室内環境からは排除されており、掃除機の集塵器奥のフィルター面のみに潜んでいた可能性が考えられた。そこで、105日目にダスト採取後の掃除機フィルターの清掃および消毒用アルコール（70% Ethanol (w/w)）の噴霧を実施し、その効果を調査した。消毒用アルコール噴霧2日後の107日目にダストを採取し、SaV の定量を試みたところ、定量下限未満になった。NoV 等カリシウイルス科のウイルスは、消毒用アルコールに比較的抵抗性といわれている。しかし、 $10^2 \sim 10^3$ オーダー程度であれば、ネコカリシウイルスは不活化させることが可能であり（Duizer et al., Appl Environ Microbiol 70, 4538～4543 (2004), Gehrke et al., J Hosp Infect, 56, 49～55 (2004)）、次亜塩素酸溶液を使用できない電化製品等に対しては、消毒用アルコールもある程度有効だと思われる。

ダストがNoV あるいはSaV 陽性となった家庭が認められた一方、NoV 感染症患者

が発生したにもかかわらずダストが汚染されなかった家庭も今回の調査で明らかになった。ダストが NoV に汚染された家庭では、ダスト採取 2 週間前に家族 2 名が NoV 様症状を呈したものの、聞取り調査では部屋や廊下で嘔吐はしておらず、床などを汚染していない事例であった。また、SaV 陽性であった家庭についても、嘔吐等の事実は明らかにされなかった。ダストが汚染されなかった事例についても、発症者（中学生）はトイレで 1 回嘔吐したのみで、部屋等は汚染していなかった。これら 3 事例はいずれも嘔吐で室内を汚染はしなかったものの、小学生以下の低年齢の子供の存在していた 2 事例は、ダストが NoV あるいは SaV 陽性であった。このことから、発病者や家族の中に低年齢の小学生以下の者がいると、年少者特有の何らかの行動（手洗いが不十分）などによって、環境を汚染してしまうのではないかと考えられた。さらに、前述の結婚式披露宴会場における NoV による集団胃腸炎事例も、会場内で嘔吐した者は認められなかった事例であった。これらのことから、嘔吐物直接ではなく、それ以外の経路で NoV 等によって如何にして環境が汚染されるのかを解明できれば、感染予防対策を講ずる上で、非常に有用な知見を得られるものと考えられる。

（謝辞）

最後に本調査研究にご理解をいただき、掃除機内のダストを提供していただいた方々に、深謝いたします。

E. 結論

汚染実態調査の結果、一般家庭の掃除機内ダストにおける、NoV あるいは SaV

による汚染率はそれぞれ 2 % 程度で、その汚染ウイルス量は、 10^6 コピー/g を超えるものも存在することが明らかになった。

遺伝子解析によって同一由来ウイルスが 30 日以上 of 長期間、ダストから継続して検出されたことから、ダストは重要な感染源になりうるということが強く示唆された。

塩素剤を用いることができない掃除機等の電化製品の消毒には、消毒用アルコールもある程度有効と思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tetsuya Yoshida, Shizuko Kasuo, Yuka Azegami, Yurie Uchiyama, Kazuyo Satsumabayashi, Takashi Shiraishi, Kazuhiko Katayama, Takaji Wakita, Naokazu Takeda, and Tomoichiro Oka: Characterization of sapoviruses detected in gastroenteritis outbreaks and identification of asymptomatic adults with high viral load. J. Clin. Virol., 45: 67-71, 2009.
- 2) 吉田徹也, 粕尾しず子, 畔上由佳, 内山友里恵, 薩摩林一代, 白石崇, 中沢春幸, 園田春美, 藤田暁: 結婚式披露宴会場で発生したノロウイルスによる集団感染性胃腸炎事例. ビルと環境, 125: 33-36, 2009.
- 3) 吉田徹也, 粕尾しず子, 畔上由佳, 内山友里恵, 笠原ひとみ, 上田ひろみ, 長瀬博, 藤田暁, 山川晋, 園田

春美, 中村安満: 加熱調理不足の
カキが原因の一つとして疑われたノ
ロウイルス等による食中毒事例—長野
県. 病原微生物検出情報, 131:
18-19, 2010.

2. 学会発表

吉田徹也, 粕尾しず子, 畔上由佳,
内山友里恵, 笠原ひとみ, 上田ひろみ,
長瀬博, 藤田暁: 長野県におけるア
ストロウイルス血清型8型の検出. 日本
ウイルス学会第 57 回学術集会,
2009. 10, 東京都.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

表1 ダスト中の NoV あるいは SaV 汚染実態

調査対象	供試 検体数	陽性 検体数(%)	ウイルス別陽性数(%)	
			NoV	SaV
一般家庭ダスト	51	2 (3.9)	1 (2.0)	1 (2.0)
事業所等ダスト	11	0	0	0
合 計	62	2 (3.2)	1 (1.6)	1 (1.6)

調査期間:2008 年 12 月～2009 年 3 月、2009 年 11 月～2010 年 3 月

表2 NoV 陽性家庭のダストにおける
ウイルス量の推移

経過日数	0	30	60
検査結果	+	+	—
	(5.7)*	(4.3)*	

*:log₁₀(copies/g of dust)

表3 SaV 陽性家庭のダストにおけるウイルス量の推移

経過日数	0	34	45	68	77	92	105	107
集塵器内 ダスト	+	+	+	NT	—	—	NT	NT
	(6.6)*	(5.2)*	(5.2)*					
集塵器奥 ダスト	NT	NT	NT	+	NT	+	+	—
				(6.2)*		(4.4)*	(5.4)*	

*:log₁₀(copies/g of dust)、 NT:試験未実施

表4 SaV 陽性家庭 77 日目における汚染源調査結果

検体の種類		SaV 検査結果
集塵器内ダスト		—
拭 取 り 試 料	トイレ床	—
	便座	—
	水洗タンクレバー	—
	トイレ内側ドアノブ	—

表5 NoV 患者が発生したにもかかわらず、ダスト汚染されなかった事例

年月日	Feb.20,'09	Feb.21,'09	Feb.22,'09	Mar.3,'09
経過日数	0	1	2	11
エピソード	発病	発病前 ダスト採取	患者便採取	発病後 ダスト採取
検査結果		ダスト: -	便: +(GI/14) (9.98)*	ダスト: -
備考	嘔吐(1回)、腹痛、 倦怠感 (下痢、発熱なし)		正常便排泄 (発病後、最初 の排便)	発病後、2回 掃除実施

*: \log_{10} (copies/g of stool)

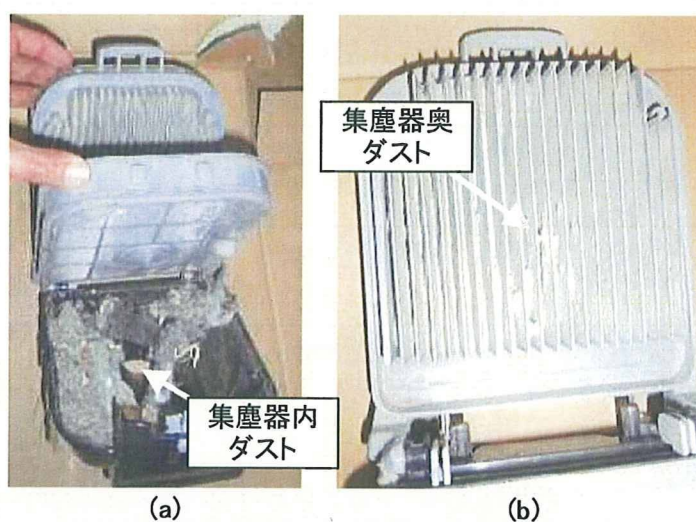


図1 SaV 陽性家庭の掃除機ダスト採取部位

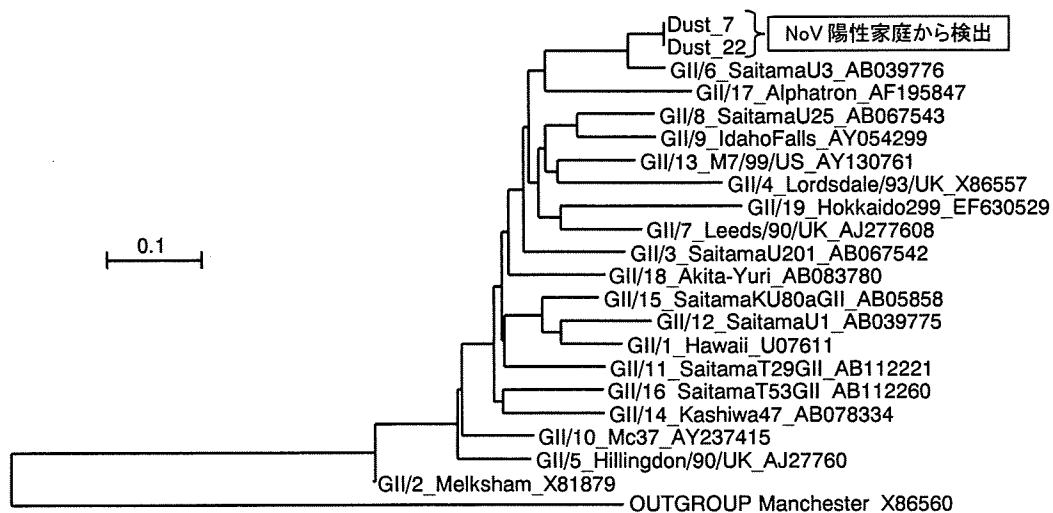


図2 ダスト由来 NoV 株の系統樹解析結果

G2-SKF/G2-SKR プライマーセットで増幅した capsid 領域の一部、287-nt で解析した。

試料 Dust_7 および Dust_22 はそれぞれ、表2経過日数 0日目および 30 日目に検出された NoV 株である。

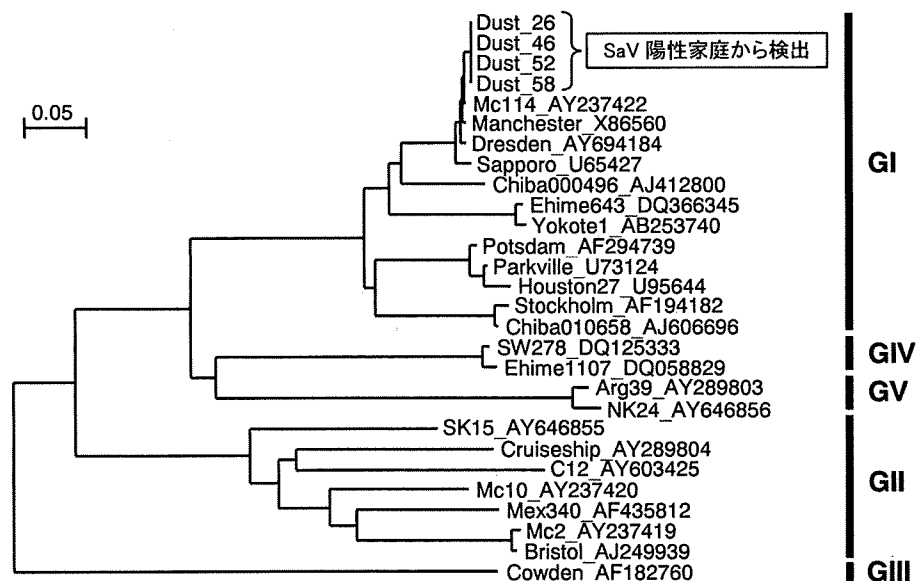


図3 ダスト由来 SaV 株の系統樹解析結果

F22/R2 プライマーセットで増幅した capsid 領域の一部、399-nt で解析した。

試料 Dust_26、Dust_46、Dust_52 および Dust_58 はそれぞれ、表3経過日数0 日目、45 日目、68 日目および 105 日目に検出された SaV 株である。

平成 21 年度の富山県におけるノロウイルス・サポウウイルスの検出状況

研究協力者：滝澤 剛則 (富山県衛生研究所)

研究分担者：田中 智之 (堺市衛生研究所)

研究協力者：中村 一哉、小原 真弓、岩井 雅恵、堀元 栄詞、倉田 毅
(富山県衛生研究所)

研究要旨：

集団感染事例からは GII/4 が 4 事例と最も多く検出されたが、GII/3、GII/6、GII/11、及び C 群ロタウイルスによる事例も認められた。調理従事者等健常者延べ 222 人の検便を行ったところ、GII/3 が 1 件検出された。富山県西部地域の下水流入水からは、比較的多種の遺伝子型のノロウイルスが検出された。サポウウイルスは、集団感染事例、健常者からは検出されなかったが、下水流入水からは GI/1 と GII/1 が検出された。平成 19 年度に下水流入水から検出されたノロウイルスの遺伝子解析を行ったところ、異なる遺伝子型のポリメラーゼとカプシド遺伝子を持つ組換え型が複数検出された。

A. 研究目的

富山県におけるノロウイルス (NoV)、及びサポウウイルス (SaV) の浸淫状況を調査するために、継続してウイルス性胃腸炎等の集団発生事例便検体、健常者便検体、および下水流入水から NoV 及び SaV の検出と解析を行った。また、NoV 遺伝子変異の多様性の原因を検索するために、下水流入水から検出された NoV 遺伝子のポリメラーゼ領域及びカプシド領域を比較解析した。

B. 研究方法

1. 材料

1) 集団感染事例

平成 21 年度に県内で発生した集団発生

事例の便検体を検索した。検便は管轄の厚生センター、保健所が行った。

2) 健常者便

平成 21 年 6 月、8 月、11 月、2009 年 2 月に、県内 5 施設の調理従事者あるいは介護従事者を対象に検便を行い、延べ 222 検体検査した。

3) 下水流入水

県西部に位置する下水処理場において、平成 21 年 4 月から 12 月の毎月 1 回下水流入水 1 リットルを採取し、NoV 及び SaV の検出を行った。本年度は地域による違いの有無を検討するために、同じ流域で下流と上流の 2 地点から採取した。

また、平成 19 年に下水流入水から検出された NoV のポリメラーゼとカプシド遺伝子の解析を行った。

2. 便乳剤の調整

便は、厚生労働省通知に準じて乳剤を調整した。

3. 下水流入水の濃縮

下水流入水を 3,000rpm で 30 分遠心して得られた上清に最終濃度 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。この液を陰電荷膜にろ過吸着させた後、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。

4. RT-PCR とクローニングおよび塩基配列解析

便乳剤、濃縮下水検体から QIAamp Viral RNA mini Kit を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA について、DNase 処理を行った後、SuperscriptIII 逆転写酵素とランダムヘキサマーを用いて cDNA を合成した。NoV は厚生労働省通知に従い、G1SKF/R または G2SKF/R プライマーを用いた PCR 法で、SaV は SV-F11 と SV-R1 プライマー (Okada et al., Arch. Virol., 147: 1445-1451, 2002) を用いた PCR により検出した。増幅産物の塩基配列を解析し遺伝子型の決定を行った。一方、ポリメラーゼ遺伝子の保存された領域に、プライマー 1421f および 1364f (La Rosa G, et al., Appl. Environ. Microbiol., 73, 4152-4161, 2007) を作製した。GI 群は、1421f または 1364f と G1SKR とを組み合わせた semi-nested PCR 法により、また、GII 群は、1421f と NV2oR、または 1364f と G2SKR とを組み合わせた nested-PCR 法

により、ポリメラーゼ遺伝子の 3' 側からカプシド遺伝子の 5' 側にわたる領域を増幅した。増幅した PCR 産物の塩基配列を決定し、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った。得られた系統樹のパターンから組換え型の存在について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 集団感染事例 (表 1)

平成 21 年 4 月～12 月までに富山県で発生した感染性胃腸炎集団発生事例は 10 事例と例年に比して少なかった。NoV (遺伝子群/遺伝子型) は、GII/4 が 4 事例と最も多かったが、GII/3、GII/6、GII/11、及び C 群ロタウイルスによる事例も認められた。

2. 健常者 (表 2)

平成 21 年 8 月の 1 検体から、10 コピー以上の NoV が検出された。遺伝子型は GII/3 であった。また、8 月と 11 月の計 3 検体からは、10 コピー以下ながら NoV が検出されたが、遺伝子型は解析できなかった。SaV は検出されなかった。

3. 下水流入水 (表 3)

下流からは、GI/4, 8, 11、GII/3, 4 が、また上流からは GII/3, 4, 12 が検出され、下流のほうが多種の遺伝子型が検出されたが、NoVGII/3, 4 は共通に検出された。SaVGI/1 は下流のみから、また、NoVGII/12 は上流のみから検出された。

4. 下水流入水からの検出された NoV の遺伝子解析 (表 4、図 1、2)

平成 19 年に下水から検出された NoV 遺

伝子のポリメラーゼ領域及びカプシド領域を解析した。調査期間中、6月と10月を除いた各月の下水からGI群が検出された。使用したプライマーによって検出される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。GII群は、調査期間中毎月検出された。ヒトでの発症例が増加する冬季においては、GII/4が主に検出された。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り、5月から7月にかけてGII/3,4,6が、また、3月と9月にはGII/13が検出された(表4)。

系統樹解析の結果では、GI群で多く検出されたGI/4は、ポリメラーゼ遺伝子及びカプシド遺伝子が、いずれもGI/4型内でクラスターを形成しており、組換え体ではないと推定された(図1)。一方、GI/2型ポリメラーゼ遺伝子と、GI/6型カプシド遺伝子からなるWUG1型組換え株が4回検出された。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(表4、図1)。

GIIの中でもっとも多く検出されたGII/4は、ポリメラーゼ遺伝子、及びカプシド遺伝子ともにGII/4内でクラスターを形成したのに対して、9月に検出されたGII/13(SW0709-11)は、ポリメラーゼ遺伝子に基づく系統樹ではGII/7内で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(図2)。これは、平成19年12月の集団発生1事例からも検出されていた。

D. 考察

下水流入水中からは、集団感染事例で検出される遺伝子型を含む様々な遺伝子型のGI、GII群のNoVが検出された。それらは、集団感染事例の発生の無い9、10月にも検出された。SaVも、集団感染事例からは検出されなかったが、下水流入水から検出された。したがって、下水流入水には、多くは不顕性に感染しながら地域に維持されているNoVやSaVが含まれていると考えられる。

昨年度の調査では、下水流入水から検出されるNoVの遺伝子型の種類には、地域による違いが認められた。その理由のひとつとして、一方の下水流入水に環境水が混入している可能性が考えられたため、今回は同じ流域の上流と下流で検討した。その結果、共通に、あるいは一方にのみ検出された遺伝子型が認められたが、今後さらにデータを増やして、それらの違いの原因を検証していく必要がある。

本研究において、下水流入水からすでに報告されているNoVG1組換え型に加えて、既知の参照株と一致しないGIや、新たなGII組み換え型が検出された。一方、平成18年度の調査においては、2ヶ月間糞便中にウイルス遺伝子が検出され、その経過中にカプシド領域の塩基が、AからGに変化した例を報告した。これらのことから、地域(住民)においてNoV遺伝子に少しずつ変異が生じており、下水流入水を調査することにより、そのような変化が捕捉可能であることを示唆している。

一方、SaVは、集団発生事例、健康者からは検出されなかったが、下水流入水から検出されている。NoV同様SaV遺伝子にも徐々に変異が生じていることが予想され、今後病原性を変化させたSaVが顕性化する可能性も十分考えられる。下水流

入水中の SaV の由来、及び遺伝子変異の有無を解析することは、今後の重要な課題である。

E. 結論

胃腸炎集団感染事例からは NoVGII/4 が主に検出されたが、それ以外の遺伝子型も検出された。延べ 222 名の健常者検便からは、NoVGII/3 が 1 件検出された。下水流入水からは、新たな変異を含む多種の遺伝子型の NoVGI、GII が検出された。SaV は、集団感染事例、健常者からは検出されなかったが、下水流入水から検出された。下水流入水から検出される NoV の遺伝子型には流域差が認められた。下水流入水は、主に不顕性感染により地域に浸淫している NoV や SaV を反映しているものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Iwai M, Hasegawa S, Obara M, Nakamura K, Horimoto E, Takizawa T, Kurata T, Sogen S, Shiraki K.: Continuous existence of noroviruses and sapoviruses in raw sewage reveals infection among inhabitants in Toyama, Japan (2006-2008). Appl. Environ. Microbiol., 75, 1264-1270, 2009.

2) Nakamura K, Iwai M, Zhang J, Obara M, Horimoto E, Hasegawa S, Kurata T, and Takizawa T. Detection of a novel recombinant norovirus from sewage water in Toyama prefecture, Japan. Jpn. J. Infect. Dis., 62, 394-398, 2009.

3) Nakamura K, Saga Y, Iwai M, Obara M, Horimoto E, Hasegawa S, Kurata T, Okumura H, Nagoshi M and Takizawa T. Frequent Detection of Noroviruses and Sapoviruses in Swine Population and High Genetic Diversity of Porcine Sapovirus in Japan, during fiscal year 2008. J. Clinic. Microbiol., in press.

2. 学会発表

1) 中村一哉、堀元栄詞、岩井雅恵、小原真弓、長谷川澄代、倉田毅、滝澤剛則：サポウイルスの遺伝的多様性獲得への豚の関与。第 57 回日本ウイルス学会、東京都、2009 年。

2) 中村一哉：豚カリシウイルスの分子疫学：豚サポウイルスで観察される高度な遺伝的多様性。第 21 回ウイルス性下痢症研究会、東京都、2009 年。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 富山県における感染性胃腸炎集団発生事例からの検出状況
(平成21年4月～12月)

事例番号	発生日	発生場所	患者数 (/喫食者数)	検出ウイルス	遺伝子型	推定伝播経路	
1	2009年3月30日	宿泊施設(県外)	50	ノロウイルス	GII/6	食品	
2	2009年4月18日	飲食店	14/68	ノロウイルス	GI/11	食品	* 富山市検査
3	2009年4月19日	宿泊施設(県外)	39/149	ノロウイルス	GII/4	食品	* 富山市検査
4	2009年4月13日	不明	5	ノロウイルス	GII/4	不明	* 飲食店への有症苦情
5	2009年5月4日	不明	4	ノロウイルス	GII/4	不明	* 飲食店への有症苦情
6	2009年5月8日	中学校	27	ロタウイルス	C群	ヒト→ヒト	
7	2009年5月29日	飲食店	26/31	ノロウイルス	GII/4	食品	* 富山市検査
8	2009年11月10日	幼稚園	60	ノロウイルス	GII/3	ヒト→ヒト	
9	2009年11月11日	保育園	32	ノロウイルス	GII/3	ヒト→ヒト	
10	2009年12月21日	飲食店	46	ノロウイルス	GII	食品	

表2 調理従事者及び介護従事者便からのノロウイルス、サポウイルス検出状況
(平成20～21年度)

検査年月 判定結果	2008年				2009年				延べ 総数
	6月	8月	11月	2月	6月	8月	11月	2月	
NoV陽性数	0	0	0	0	0	1	0	0	1
NoV検出数(<10コピー)	0	0	0	1	0	2	1	0	4
SaV陽性数	0	0	0	0	0	0	0	0	0
検査数	30	30	53	53	55	57	58	52	388

表3 下水流入水からのノロウイルス、サポウイルスの検出状況
(平成21年1月～12月)

西部地区(下流域)

ウイルス		2009年											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
ノロ	GI/4												
	GI/8												
	GI/11												
	GII/3												
	GII/4												
サポ	GI/1												
	GII/1												

砺波地区(上流域)

ウイルス		2009年											
		4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月			
ノロ	GII/3												
	GII/4												
	GII/12												
サポ	GII/1												

■ : 検出あり

表 4 系統樹解析に用いた NoV の下水流入から検出された月（平成 19 年）と遺伝子型

	2007年 1月	2月	3月	4月	5月	6月
GI	WUG1型	4型	WUG1型	ND	WUG1型	ND
		未分類型	未分類型	(4型)		
GII	4型	4型	13型	4型	6型	4型
	6型		(4型)		(3型)	(3型)
	7月	8月	9月	10月	11月	12月
GI	ND	WUG1型	ND	ND	ND	ND
	(4型)	(4型)	(4型)		(4型)	(4型)
GII	4型	4型	13型(組換え)	4型	4型	4型
	(3型)					

():従来のプライマーにより検出,

ND:未検出

図 1 下水流入水から検出された NoV GI の系統樹解析

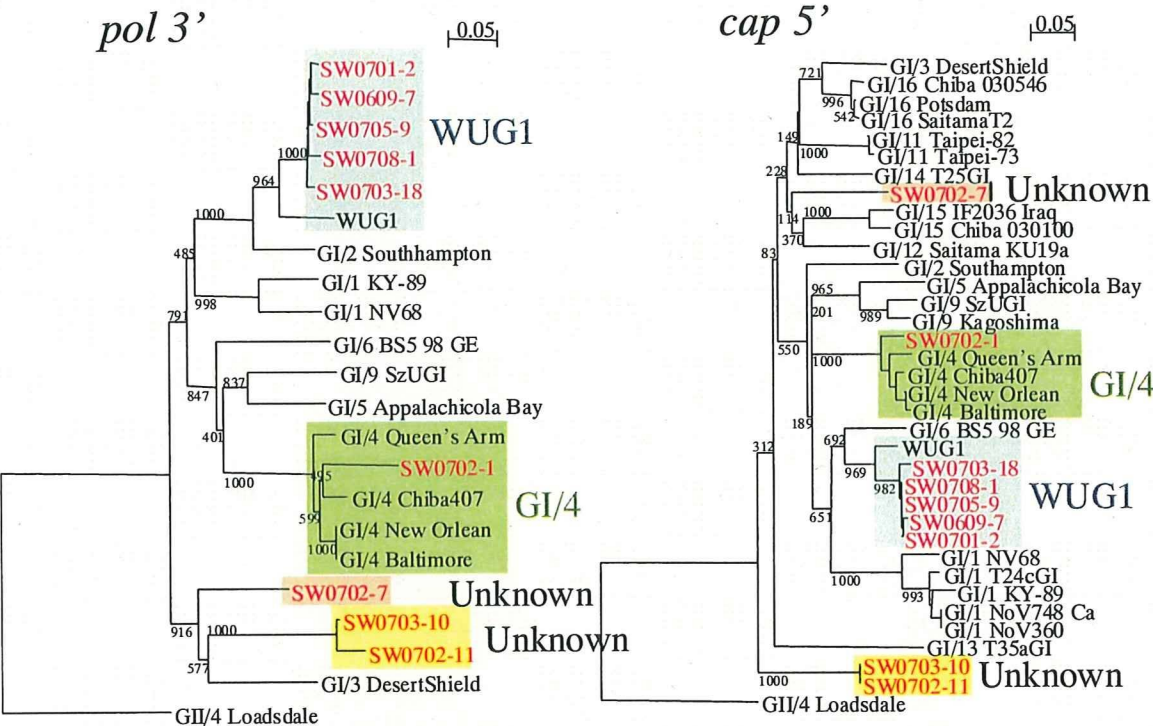
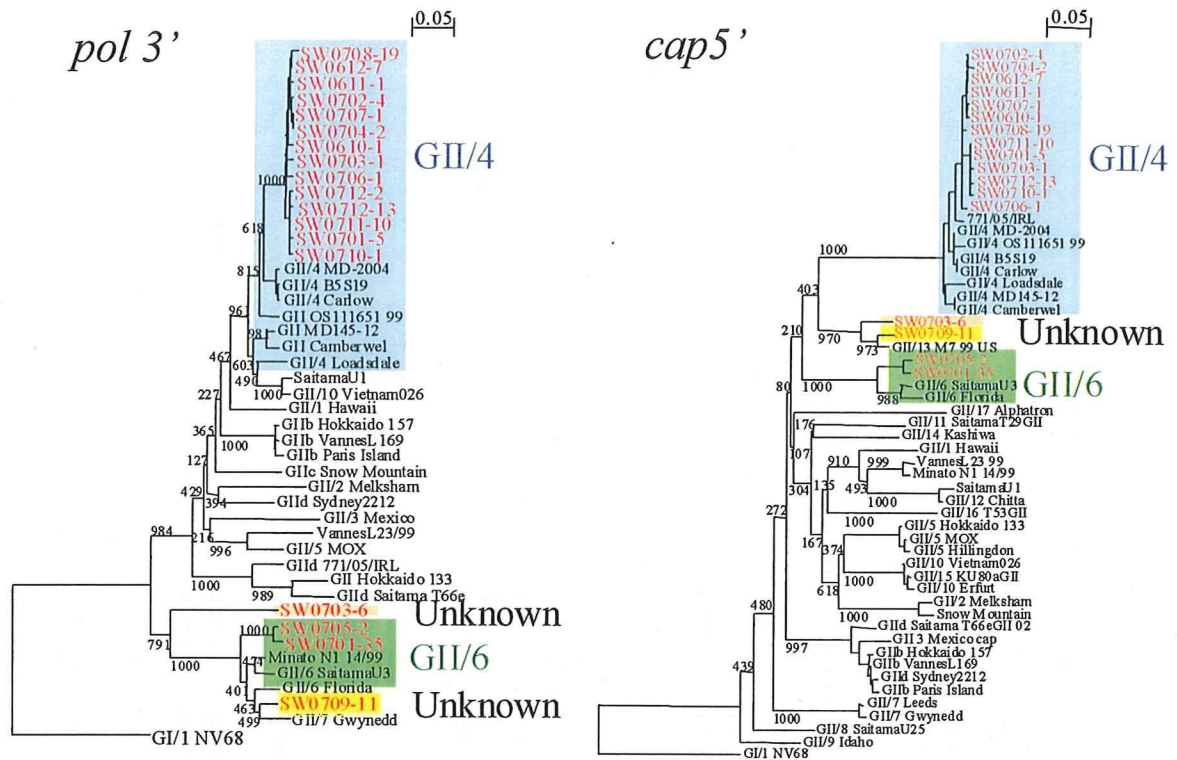


図2 下水流入水から検出された NoV GII の系統樹解析



平成 21 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」

研究協力報告書

パンソルビン・トラップ法による食品検査法の構築(検討2)

研究協力者: 東方 美保 (福井県衛生環境研究センター)

研究分担者: 田中 智之 (堺市衛生研究所)

研究協力者: 斎藤 博之 (秋田県健康環境センター・保健衛生部)

研究協力者: 北元 憲利 (兵庫県立大学 環境人間学部)

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濃縮法として、斎藤らが平成 19 年度から開発に着手したパンソルビン・トラップ法について、抗原-抗体-パンソルビン複合体を形成させる処理の簡略化、および多種類の遺伝子型の NV への適用拡大を検討した。複合体形成処理については、反応時間の短縮(60 分→15 分)も含めた作業の単純化が可能であることを確認した。遺伝子型の適用範囲拡大の検証にあたっては、16 種類の遺伝子型(GI/1, 2, 3, 4, 8, 11、GII/1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12)の NV について、対応する単味血清、遺伝子群別のプール血清、NV プール血清を用いた場合に検出可能であることを確認した。

A. 研究目的

ノロウイルス(NV)を原因物質とする食中毒検査において、推定原因食品からのウイルス検出が切望されている。斎藤らが平成 19 年度から開発に着手したパンソルビン・トラップ法は、さまざまな形状をとる食品からの効率的な NV 濃縮が期待でき、実用化の可能性も高い。今年度は、抗原-抗体-パンソルビン複合体を形成させる処理の簡略化の検討、さらに、これまでは GII/4 の NV のみに限っていた汚染ウイルスを、他の遺伝子型の NV に適用拡大した場合の試用を行った。

B. 研究方法

1. 材料

1) 汚染実験に用いる食品

市販されている総菜(焼きそば、ポテトサラダ、ナポリタン)を用いた。

2) 汚染実験に用いる検出対象 NV

福井県内で発症した胃腸炎患者より採取し、NV 陽性と確認された糞便検体(GI/1, 2, 3, 4, 8, 11、GII/1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12、の 16 遺伝子型の NV 遺伝子が検出された 20 検体)を用いた。なお遺伝子型は、Capsid 領域(G1-SKF / G1-SKR または G2-SKF / G2-SKR による増幅産物についてダイレクトシーケンス法で決定した遺伝子配列)の系統解析に基づいて型別した。

3) 抗 NV 血清

国立感染症研究所で VLP から作製した

ウサギ免疫血清 19 種 (抗 GI/1, 2, 3, 4, 8, 11、抗 GII/1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 17) をもとに、単味血清のままか、もしくは等量混合することにより GI プール血清 (抗 GI/1, 2, 3, 4, 8, 11 の 6 種プール)、GII プール血清 (抗 GII/1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 17 の 13 種プール)、NV プール血清 (全 19 種プール) として使用した。

4) 抗 NV モノクローナル抗体

堺市衛生研究所で樹立したハイブリドーマから得られたマウス腹水 4 種類 (Mab#22 : broad, Mab#23 : broad, Mab#3912 : GI specific, Mab#14 : GII specific) をもとに、単独のままか、もしくは等量混合することによりカクテル抗体 (broad な Mab#22, Mab#23 のカクテル) として使用した。

2. 方法

1) NV 陽性糞便による食品の汚染

NV 陽性糞便を DW で乳剤とし、その遠心上清もしくは希釈液を、食品 10g あたり 70 μ L 分 (1/10 スケールでの検討時には食品 1g あたり 7 μ L 分) 加えて汚染させた。

2) 汚染食品からのウイルス濃縮

汚染させた食品 10g を、フィルター付ストマッカー袋 (フィルトレイトバッグ HG-P [栄研化学]) に入れ、食品洗滌液 (Tris-HCl (pH8.4) - 0.5M NaCl - 0.1% Tween20) を 50mL 加え、超音波洗浄機により 15 分間処理を行った。フィルターろ過した回収液に、枯草菌由来 α -Amylase 粉末 [和光純薬] を 0.125g 加え、よく振り混ぜたのち、3,000rpm 30 分間遠心した。分取した遠心上清液に、抗 NV 血清を 5 μ L、PANSORBIN Cells [和

光純薬] を 300 μ L 加え、37°C で一定時間インキュベートし、3,000rpm で 20 分遠心した沈澱を、300 μ L の再懸濁液 (0.1M Na-Citrate (pH4.2)) で懸濁して RNA 抽出用サンプルとした。1/10 スケールでの検討時には、試薬類の量を全て 1/10 とし、再懸濁液には QIAamp Viral RNA Mini Kit [QIAGEN] の構成成分である AVL Buffer (carrier RNA 添加) を 300 μ L 用いた。

3) RNA 抽出

RNA 抽出用サンプルに、TRIzol-LS [invitrogen] を 900 μ L 加え、よく振り混ぜたのち室温で 5 分間静置した。さらにクロロホルムを 240 μ L 加え、よく振り混ぜて室温で 10 分間静置後、12,000rpm 15 分遠心した。分取した水層 700 μ L にエタノールを 560 μ L 加え、混合後、QIAamp カラム (QIAamp Viral RNA Mini Kit の構成成分) に 630 μ L ずつ、2 回に分けてアプライした。以降は、QIAamp Viral RNA Mini Kit の説明書にそって操作を行い、RNA 抽出液 60 μ L を得た。

また、比較対象として糞便のみ (食品なし) からの測定も行ったが、この場合は汚染用 NV 液 70 μ L に DW を 70 μ L 加えたもの (1/10 スケールでの検討時には、汚染用 NV 液 7 μ L に DW を 133 μ L 加えたもの) から QIAamp Viral RNA Mini Kit で RNA を抽出した。

4) DNase および α -Amylase 処理、逆転写反応

8.0 μ L 分の RNA を用い、DNase I [ニッポンジーン] および α -Amylase Ultrapure [ニッポンジーン] を各 0.8 μ L、RNase inhibitor [ニッポンジーン] を 0.25 μ L、5 \times First Strand buffer

(SuperScriptIII [invitrogen]に添付)を $4.0\mu\text{L}$ 加えた後、蒸留水で反応量を $140\mu\text{L}$ とし、 37°C 10 分、 75°C 5 分のインキュベーションを行った。その後、特異的プライマー (COG2F および COG2R または COG1F および COG1R を最終濃度各 $0.5\mu\text{M}$ で使用)、dNTP、RTmate[ニッポンジーン]、および SuperScriptIII [invitrogen]を追加し、 50°C 60 分、 98°C 5 分の反応で、 $20\mu\text{L}$ の cDNA を合成した。

5) コピー数の測定

Kageyama らのリアルタイム PCR 法[J Clin Microbiol, 41, 1548~1557 (2003)] に準じて NV のコピー数を測定した。アプライドバイオシステム製「ABI PRIZM 7900HT」を使用し、cDNA を $2\mu\text{L}/\text{well}$ (反応容量 $20\mu\text{L}$) 用いて duplicate で反応を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 複合体形成処理簡略化の検討

これまでの標準プロトコールでは、ウイルス-抗体-パンソルビン複合体を形成させるために、抗体を加えて 30 分、パンソルビンを加えてさらに 30 分の反応を行ってきた。この操作を簡略化可能かどうか検討するために、表 1 のとおり 9 種類の操作パターンを設定し、GII/4 型の NV で汚染した食品について単味血清を用い、回収できたコピー数を測定した。

焼きそばとポテトサラダについて、ア〜カの条件で比較した場合には、差はほとんど見られなかった(図 1, 2)。そこで、

さらに簡略化したカ〜ケとア(標準)の条件で定量値を比較したところ、ク(同時添加 5 分)、ケ(同時添加 0 分)で、有意な減少傾向がみとめられた(ポテトサラダとナポリタンでの検討;図 3)。この傾向は、反応スケールが 1/10 の場合や、汚染濃度を 1/10 にした場合にも共通していた(ナポリタンでの検討;図 4)。

したがって、反応時間にやや余裕を持たせ、同時添加 15 分の反応で、回収効率低下につながることなく簡略化が可能と判断し、以降の検討は変更後のプロトコールにより行った。

2. 多種類の遺伝子型 NV への適用拡大

ポテトサラダ 1g に対し、食品洗滌液 5mL、抗血清または抗体 $0.5\mu\text{L}$ 、パンソルビン $30\mu\text{L}$ を用いる 1/10 スケールの実験系で、16 種類の遺伝子型の NV について回収を試みた。

表 2 では、単味血清(対応する 1 種のみ)の場合、遺伝子群別プール血清(GI プール血清または GII プール血清)の場合、NV プール血清の場合について、各遺伝子型の NV がどの程度回収可能であるかを検討した。

GI/1, 3, 4, 8, 11、GII/1, 2, 4, 5, 7, 10 の 11 遺伝子型の NV については、単味血清、遺伝子群別プール血清、NV プール血清のすべての場合で回収が可能であった。増幅曲線の例として、GI/11 の場合を図 5 に、GII/5 の場合を図 6 に示す。

回収効率は、理論的に推定されたとおり、単味血清使用時に最も高い傾向を示した。しかし、二枚貝を喫食して発症した患者由来で複数の遺伝子型の NV による混合感染の可能性がある糞便検体の場合などに