

らの抗体の有用性を野外材料を用いたイムノクロマト法により検討したが、検出率は低かった。

今後、G 特異性の抗体を用い、カクテルする方法も考えられる。さらに新規抗体を作製し、SV の ELISA 法あるいはイムノクロマト法などによる検出系を構築し、流行疫学、早期発見および早期予防に役立てたい。

F：研究業績

学会発表

北元憲利、岡智一郎、片山和彦、Hansman GS、三好龍也、田中智之：サポウイルスに対する単

クローン抗体の解析 第 58 回日本ウイルス学会、2010 年 11 月 7 日～9 日、徳島

G：知的財産の出願、登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

表1 単クローン抗体（腹水 MAb）の各 VLPs に対する反応性

MAb		Antigen (VLPs)						
		GI		GII			GIV/1 (Syd3)	GV/1
		GI/1 (Mc114)	GI/5 (Akita)	GII/2 (Mc10)	GII/3 (C12)	GII/3 (Syd53)		
GI/1 (Mc114)	8318	++	-	NT	NT	-	-	-
	5011	++	-	-	-	-	-	-
	1325	++	-	-	-	-	-	-
	4357	++	-	-	-	-	-	-
	4732	±	-	NT	NT	-	±	++
GI/5 (Akita)	8127	++	++	+	+	+	+	++
	81270	++	++	NT	NT	+	+	++
	616	++	++	-	-	-	-	-
	630	++	++	-	-	-	-	-
GII/3 (Syd53)	8083	-	-	+	++	++	-	-
	1803	-	-	+	++	++	-	-
	1015	-	-	-	++	++	-	-
	930	-	-	NT	NT	+	-	-
GIV/1 (Syd3)	819	-	-	-	-	-	++	-
	806	-	-	-	-	-	++	-
GV/1 (NK24)	1011	++	±	±	±	±	±	++
	1052	-	-	-	-	-	-	++
	1496	-	-	-	-	-	-	++
	155	-	-	-	-	-	-	++
	6609	-	-	NT	NT	-	-	++
	4652	-	-	NT	NT	-	-	++
	563	-	-	NT	NT	-	-	++
	8315	-	-	-	-	-	-	+

表2 サポウイルス (SV) に対する主な単クローン抗体 (MAbs) の交差性

MAb	Antigen(VLPs)						
	GI		GII			GIV	GV
	Mc114	Akita	Mc10	C12	Syd53	Syd3	NK24
1325	++	-	-	-	-	-	-
616	++	++	-	-	-	-	-
1015	-	-	-	++	++	-	-
819	-	-	-	-	-	++	-
1496	-	-	-	-	-	-	++
8127	++	++	+	+	+	+	++

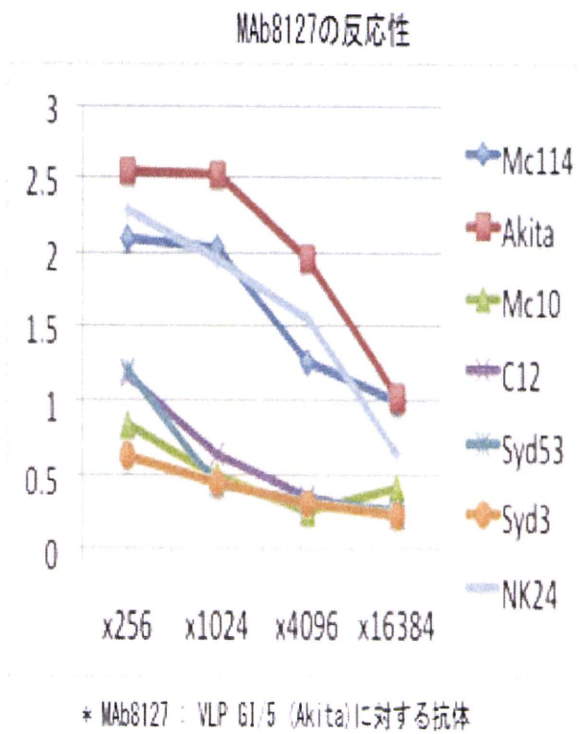


図1 抗体 8127 の反応性 (ELISA 法)

縦軸は OD 値、横軸は抗体の希釈倍数を示す

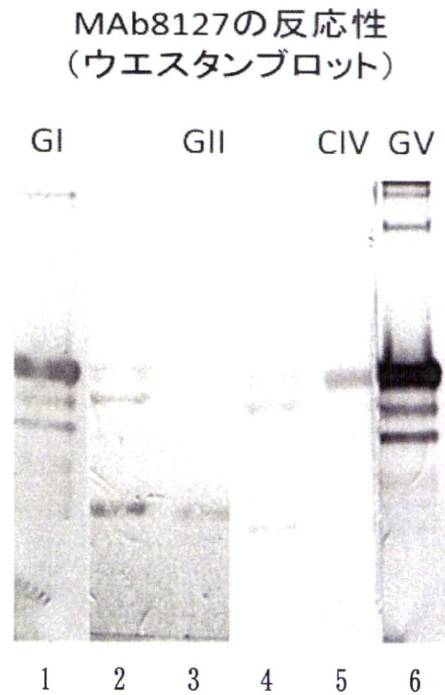


図2 抗体 8127 の反応性 (ウエスタンブロット法)

1 : Mc114、2 : Mc10、3 : C12、
4 : Syd53、5 : Syd3、6 : NK24

MAb8127 の各Genogroupに対する特異性
(競争ELISAによる)

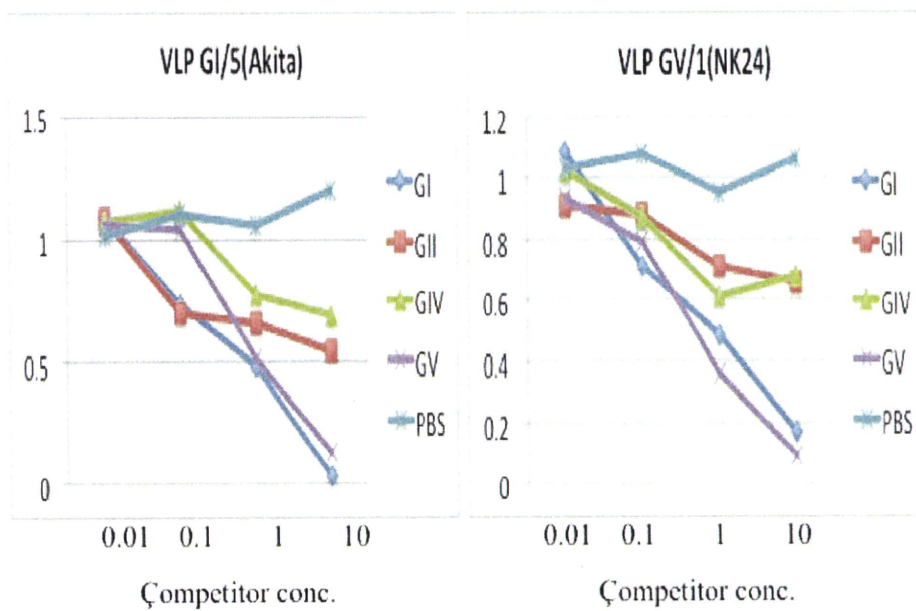


図3 抗体8127の各Genogroupに対する特異性
(競争ELISA法による)

平成 22 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）
「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」
研究協力報告書

愛媛県で検出されたノロウイルスの遺伝子解析

協力研究者	山下育孝	（愛媛県立衛生環境研究所）
協力研究者	青木紀子	（愛媛県立衛生環境研究所）
協力研究者	青木里美	（愛媛県立衛生環境研究所）
分担研究者	本村和嗣	（国立感染症研究所）
分担研究者	田中智之	（堺市衛生研究所）

研究要旨

2010 年 1 月から 12 月の間に、急性胃腸炎の散発例及び集団発生例から検出されたノロウイルス (NoV) について分子疫学的解析を行い、愛媛県における NoV の流行状況を明らかにすると共に集団発生との関連性について検討した。調査期間中に散発例から NoV が 122 例 (検出ウイルスの約 56.5%) 検出され、その内 GII が 96.7% (118 例) を占めていた。GII の遺伝子型は 5 種類で、GII.4、GII.3、GII.2 の 3 タイプで全体の 95% を占めていたが、期間により遺伝子型の検出頻度に違いがみられた。1 月～6 月は、GII.4 (56.1%) が最も多く、10 月～12 月は、GII.3 (54.9%) が最も多かった。一方、集団発生例では GII.4 が 3 事例、GII.2 と GII.3 が各 1 事例、混合感染事例として GII.4 と 2、GII.4 と 3、GII.2 と GI.7 及び GII.2 と 4 と 12 と GI.2 と 7 の混合例が各 1 事例から検出された。GII.4 が関与した事例が 6 事例で最も多かった。カキの関与が認められない集団発生例から検出された NoV 株と塩基配列が一致する株が、ほぼ同時期に地域内で流行していることから、地域社会での NoV の流行が食中毒や胃腸炎集団発生と密接な関係を持っていることが示唆された。

1 月～6 月に最も多く検出された GII.4 は、約 55% が 2006b であったが、約 45% は、2008a 及び新たな変異株である NewOrleans2009 タイプであった。GII.4 に次いで多く検出された GII.3 は、すべてポリメラーゼ領域が SaitamaUI/97/JP と高い相同性を示す組換えウイルスであった。また、GII.2 は、組換えウイルスと組換えのないウイルスの 2 種類が検出された。

A. 研究目的

近年、ウイルスによる食中毒や施設内での胃腸炎集団発生の報告が増加傾向にある。胃腸炎の起因ウイルスには、ノロ

ウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV)、ロタウイルス、アストロウイルス、腸管アデノウイルス等が知られているが、集団発生事例の原因ウイルスの大半が NoV に

よるものであり、衛生行政上 NoV が最も重要視されている。しかし、2007 年以降は、SaV を原因とする集団発生事例も報告されるようになってきた。

最近、カキ等の二枚貝を原因とする食中毒事例は、減少する傾向がみられている。一方、非カキ関連の食中毒や、施設内におけるヒト-ヒト感染による事例が増加している。いずれも調理従事者を介した食品の 2 次汚染あるいはヒトを介した 2 次感染によって生じた集団発生であると推定される。

これらの集団発生の予防及び食品の安全を確保するためには、地域における食中毒起因ウイルスの流行状況の把握と感染経路の解明が重要と考えられることから、散发性胃腸炎及び食中毒等集団発生事例から検出された NoV について分子疫学的解析を行った。

B. 研究方法

1. 材料

2010 年 1 月から 12 月の間に、感染症発生動向調査病原体検査のために採取された散发性胃腸炎患者糞便 409 検体及び集団発生 15 事例から得られた 144 検体（患者糞便 88 検体、従事者糞便 25 検体、食品 12 検体、拭き取り 19 検体）を用いた。糞便は検査実施まで -20℃ で冷凍保存した。

感染性胃腸炎患者数は、感染症発生動向調査における定点当たり週別患者報告数を使用した。

2. 方法

糞便からのウイルス検索は、電子顕微鏡法 (EM)、リアルタイム PCR 法または RT-PCR 法で行った。EM は常法により粗精製した糞便材料を、2% PTA 染色後 4 万倍

で観察し、胃腸炎起因ウイルスの検索を行った。ロタウイルス、アデノウイルスは主に EM で検出されたものについて、ELISA 法やイムノクロマト法によって型別した。NoV 遺伝子の検出は、影山らの COGF/R 系プライマーと RINGTaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法で行った。SV 遺伝子の検出は、岡田らの方法に準じ、カプシド領域を増幅する SaV 系プライマーを用いた nested-PCR 法で行った。一部の検体については、岡らのリアルタイム PCR 法を併用して実施した。

NoV の遺伝子解析は、カプシド領域の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定し、片山らが提唱する方法で遺伝子型別を行った。遺伝子型番号は影山らの方法に従った。さらに GII.4 型別株等一部の遺伝子型については、ポリメラーゼ領域の系統樹解析を実施した。

拭き取り調査は、綿棒式キット（栄研器材）または WHIRL-PAK (NASCO) を用いて採取し搬入された検体について実施した。拭き取り検体は超遠心 (38000rpm 2hr) 沈査を、食品は 10% 乳剤として 3000rpm、20 分遠心後の上清の超遠心沈査をそれぞれ RNA 抽出し使用した。

(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. 感染性胃腸炎患者の発生状況

愛媛県における 2010 年の患者報告数の推移を図 1 に示した。2009/2010 シーズンは、例年より患者報告数のピークが 1~2 ヶ月遅れ、1 月下旬 (第 4 週) に見られたが、報告数は例年並みであった。一

方、2010/2011 シーズンは、11 月上旬から患者報告数が増加し始め、12 月中旬(第 50 週)にピークを迎えた。

2. 散発性胃腸炎患者からのウイルス検出状況

散発性胃腸炎患者 417 名からのウイルス検出状況を表 1 に示した。NoV が 122 例(56.5%)で最も多く、次いで A 群ロタウイルスが 35 例、SaV が 27 例、アデノウイルスが 25 例、アストロウイルスが 2 例であった。検出された NoV122 例の Genogroup 別内訳は、GII が圧倒的に多く 118 例(96.7%)で、GI は 4 例(3.3%)と非常に少なかった。

3. 集団発生事例から検出された NoV の遺伝子型

2010 年に発生した NoV による集団発生事例の概要を表 2 に示した。食中毒事例は 3 事例で、その内 1 事例がカキの喫食が原因であった。この事例 7 では、患者から GI、GII 両方が検出され、遺伝子型は、GI が 2 種類、GII が 3 種類含まれていた。カキ等二枚貝が関連しない食中毒は 2 事例有り、事例 1 は会席料理が原因であり、市の検査で従事者から NoV が検出された。当所に搬入された患者糞便からは GII.4 が検出されている。事例 9 は、飲食店の仕出弁当が原因で、患者、調理従事者糞便から GII.4 が検出された。この他に、食中毒とは確定されなかった事例が 4 事例あり、そのうち 3 事例(事例 2、4 はカキ関連)は、2 種類の遺伝子型の NoV が検出されていた。また、ヒト-ヒト感染が疑われる施設内での集団発生が 2 事例あり、事例 5 からは GII.4 が、事例 8 からは GII.3 が検出された。

3. 散発例及び集団発生例から検出された遺伝子型と月別検出状況

散発例から検出された NoV の遺伝子型は GII が 5 種類、GI が 2 種類(GI.4、GI.8)認められた。GII では、GII.4 が最も多く検出され、次いで GII.3、GII.2、GII.13、GII.12 であった。

検出数の大部分を占めた GII の月別の遺伝子型別検出状況を図 2 に示した。

GII.4 は、1 月～5 月及び 12 月に、GII.2 は 2 月～3 月及び 11 月～12 月に検出された。GII.3 は、1 月～6 月及び 10 月に少数例検出されていたが 11 月～12 月に検出数が急増した。1 月～6 月(2009/2010 シーズン)の検出数は、GII.4 が 32 株(56.1%)で最も多く、次いで GII.3 が 11 株(19.3%)、GII.2 が 9 株(15.8%)であった。10 月～12 月(2010/2011 シーズン)では、GII.3 が 28 株(54.9%)で最も多く、GII.2 が 18 株(35.3%)、GII.4 が 5 株(9.8%)検出された。

一方、集団発生は、1 月～2 月に GII.4 が 2 事例、GII.4 と 3 の混合例が 1 事例、GII.4 と 2 の混合例が 1 事例、GII.2 が 1 事例、GII.2 と 7 の混合例が 1 事例、GII.2、4、12 と GI.2、7 の混合例が 1 事例見られた。また、11 月に GII.3 及び GII.4 が関与している事例が各 1 事例あった。

4. NoV 遺伝子の系統樹解析

散発例及び集団発生例から検出された GII の系統樹解析の結果を図 3 に示した。カキ関連事例を除き、集団発生から複数検出された株は、事例毎に遺伝子塩基配列が 100%一致していた。さらに、遺伝子解析を行った大部分の事例で、集団発生株と同一の株が散発例からも、ほぼ同時期に検出されていた。

5. GII.4 の系統樹解析

GII.4 は、2002 年以降、NoV の主流型であり、複数の亜型が報告されている。

そこで、今回は、VP1 NS 領域(図 4)に加え、VP1 全長(図 5)及びポリメラーゼ領域(図 6)について解析し、詳細に検討を行った。NS 領域の解析の結果、散発例では、2009/2010 シーズンは、愛媛県において 2006 年から 2009 年の主流型であった 2006b タイプが 55%、2006b とは異なるクラスターに属する株が 45%検出された。2010/2011 シーズンは、すべて 2006b タイプであった。VP1 全長及びポリメラーゼ領域の系統樹解析の結果 2006b とは異なるクラスターに属する株は、Apeldoorn317/2007/NL 株や OC08086/08/JP 株に近縁な 2008a 及び新たな変異株である NewOrleans/1805/2009/ USA 株や NSW001P/2008/AU 株に近縁な NewOrleans2009 タイプであった。2008a 及び NewOrleans2009 タイプの株は、愛媛県において過去に検出事例はなく 2009/2010 シーズンに初めて確認された。

6. GII.3、GII.2 の系統樹解析

2010 年に検出された GII.3 及び GII.2 の NS 領域の系統樹解析の結果を図 7 に示した。GII.2 と GII.3 は、2009/2010 シーズンと 2010/2011 シーズンの両方で検出されているがシーズンにより検出株の NS 領域の塩基配列に若干の違いが認められた(図 7)。ポリメラーゼ領域の系統樹解析の結果を図 8 に示した。NS 領域で GII/3 と型別された株は、ポリメラーゼ領域の塩基配列をみると、すべて SaitamaU1/97/JP と高い相同性を示す組換え株であった。また、GII.2 は、ポリメラーゼ領域が 2 つのクラスターに分かれ、一つは組換え株で、もう一つは Melksham/89/UK と同一のクラスターに分類される組換えが起っていない株であった。

D. 考察

散発性胃腸炎の原因ウイルスの約 57%は NoV であった。その内約 97%は GII であり、人の NoV 感染症における GII の関与が非常に高いことが示された。

2010 年に散発例及び集団発生例から検出された NoV の遺伝子型は、GII が 5 種類、GI が 2 種類で短期間に多様な遺伝子型の株が地域内で流行していたことが示された。また、1 つの遺伝子型が 2~3 ヶ月あるいは、それ以上地域で流行し、時として複数の遺伝子型の NoV が同時期に流行していることが示された。

散発例と集団発生事例から検出された NoV の遺伝子型の分布及びそれらの塩基配列が極めて良く一致していたことから、地域で散発的に見られているウイルスとカキ等二枚貝が関与していない集団発生の原因ウイルスとの間には強い関連性が示唆された。このことは、地域の流行ウイルスが、調理従事者等を介して調理中の食品を 2 次汚染し、食中毒の原因となり、また、学校、病院及び老人福祉施設等に持ち込まれて、施設内においてヒト-ヒト感染で集団発生を引き起こしていることを強く示唆するものである。食中毒等集団発生の予防には、調理従事者への更なる衛生指導の徹底と入所者、職員等への日常の手洗いの指導が重要である。

過去 2 シーズンにおいて検出された GII.4 はすべて 2006b であったが、2009/2010 シーズンは、2006b とは異なる株が 45%検出された。これらの変異株は、これまで愛媛で検出されたことのない 2008a タイプと NewOrleans2009 タイプであった。2008a は、2008/2009 シーズンに、北海道、新潟、愛知、大阪等大阪以北で

散発的に検出されていた。このことから、これらのウイルスが、愛媛をはじめ、全国に広がったものと推察された。また、NewOrleans2009 タイプの新しい変異株は、昨シーズン国内では検出されていないことから、2008/2009 シーズン以降に国内に持ちこまれたものと推察された。

GII.4 の新たな変異株の出現や GII.3 及び GII.2 の組換えウイルスが多数検出されていることから、今後もノロウイルスの詳細な解析と発生動向の把握が必要と考えられた。

E. 結論

1. 2010年1月から12月の間に、散発性胃腸炎からEM、RT-PCR法及びリアルタイムPCR法でNoVが122例(56.6%)、ロタウイルスが40例(18.5%)、SaVが27例(12.5%)、アデノウイルスが25例(11.6%)、アストロウイルスが2例(0.9%)検出された。
2. 検出されたNoVのGenogroupは、GIIが118例(96.7%)、GIが4例(3.3%)であった。遺伝子型は、GIIが5種類、GIが2種類で、GII.4、GII.3、GII.2が検出数の大部分を占めていた。食中毒等集団発生からは、GIIが4種類、GIが2種類で、散発例と同様GII.4、GII.3、GII.2が多く検出された。
3. 集団発生例から検出された株と塩基配列が一致した株が、同じ地域の散発例から検出され、地域で流行しているNoVが集団発生の原因と関連していることが示唆された。
4. 2009/2010シーズンは、過去2シーズンGII.4の主流となっていた2006bタイプの検出数が減少し、新しい変異株である2008aタイプとNewOrleans2009タイプが愛媛県で初

めて確認された。

5. 2010年に検出されたGII.3は、ポリメラーゼ領域がすべて、SaitamaU1/97/JPと高い相同性を示す組換え株であった。
6. GII.2は、カプシド領域とポリメラーゼ領域の間で組換えが見られた組換え株と組換えのない株の2種類が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yasutaka Yamashita, Yuka Ootsuka, Meiko Kondo, Mitsuaki Oseto, Mitsunori Doi, Takeshi Miyamoto, Tetsuroo Ueda, Hirokazu Kondo, Tomoyuki Tanaka, Takaji Wakita, Kazuhiko Katayama, Naokazu Takeda, and Tomoichiro Oka. Molecular Characterization of Sapovirus Detected in a Gastroenteritis Outbreak at a Wedding Hall. J.Med.Virol. 2010, 82:720-726

2. 口頭発表

- 1) 青木紀子、青木里美、山下育孝、土井光徳、野田 衛：愛媛県において2009/2010シーズンに検出されたノロウイルスGII/4の分子疫学的解析。第58回日本ウイルス学会学術集会。徳島、2010年11月
- 2) 山下育孝、青木紀子、青木里美、土井光徳、野田 衛：愛媛県で検出されたノロウイルスGII/6の分子疫学的解析。第58回日本ウイルス学会学術集会。徳島、2010年11月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許習得：なし

2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

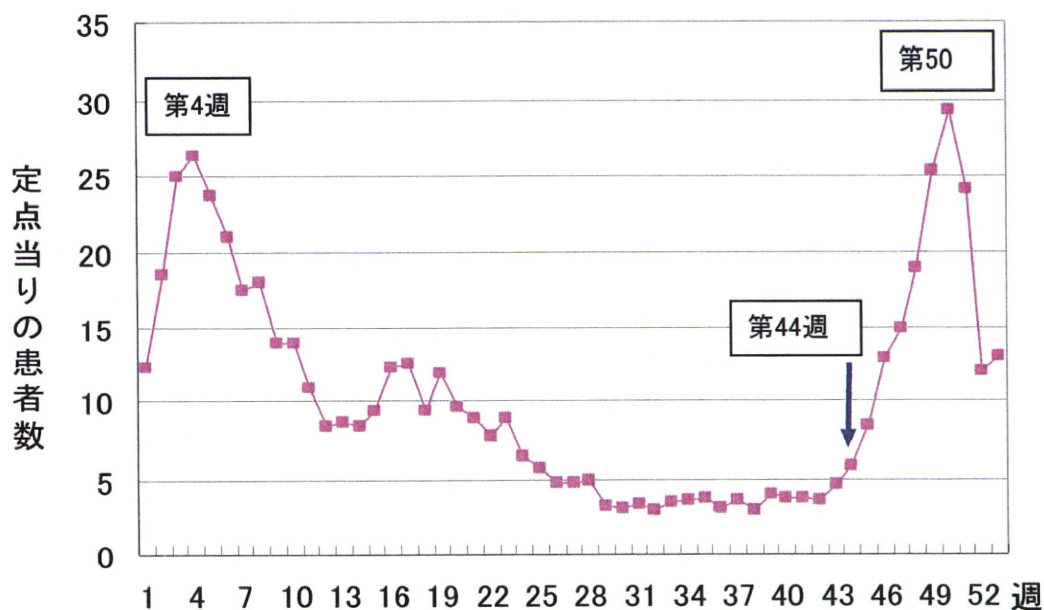


図1 NVGIIの月別遺伝子型別検出状況

表1 散発性胃腸炎患者からのウイルス検出状況

		(2010.1~12)		
		ウイルス	検出数	検出率(%)
検査数	417例	ノロウイルス	122	56.5
		<ul style="list-style-type: none"> 〔 GI 〔 GII 	4	118
陽性検体数	191例(45.8%)	ロタウイルス	40	18.5
		<ul style="list-style-type: none"> 〔 A群 〔 NT 	35	5
重複感染例 (2検体は、3種類検出)	23検体	サポウイルス	27	12.5
		アデノウイルス	25	11.6
		アストロウイルス	2	0.9
		検出数	216	100

表2 NVが検出された集団発生事例

事例 No.	発生日	原因施設	感染経路 (原因食品)	喫食者数	患者数	ノロウイルス陽性数/検査数				遺伝子型 (例数)
						患者便吐物	従事者便	食品	ふき取り	
1	1.18	飲食店	会席料理	60	31	6/6				GII/4(6)
2	1.23	飲食店	会席料理*	不明	7	2/3				GII/2(1) GII/4(1)
3	1.28	飲食店	会席料理*	6	5	3/3				GII/2(3)
4	2.14	飲食店	カキのコース料理*	10	6	3/3				GI/7(1) GII/2(1)
5	2.15	宿泊施設	合宿 *	37	13	6/10	0/3			GII/4(6)
6	2.15	結婚式場	宴会料理*	不明	不明	4/5				GII/3(2) GII/4(1)
7	2.19	飲食店	酢かき	10	8	7/9	0/3	0/1**	0/7	GI/2(2),GI/7(1) GII/2(1),GII/4(1) GII/12(1)
8	11.10	事業所 独身寮	感染症*	約80	30	8/8	1/7	0/11		GII/3(5)
9	11.30	飲食店	仕出弁当	31	14	4/4	2/10		0/12	GII/4(6)

* 推定

**食材の袋

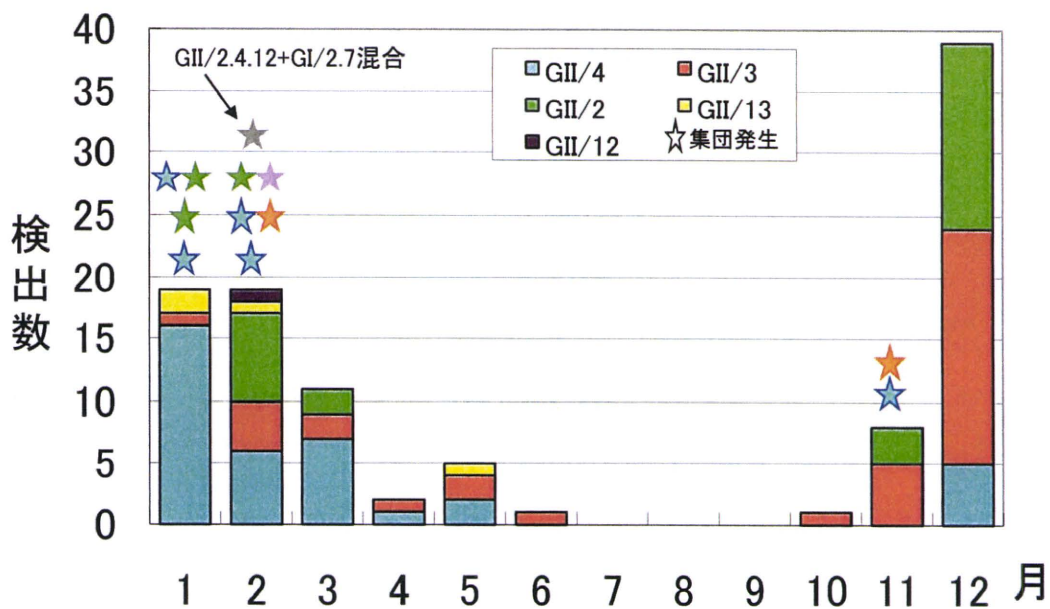


図2 NVGIIの月別遺伝子型別検出状況

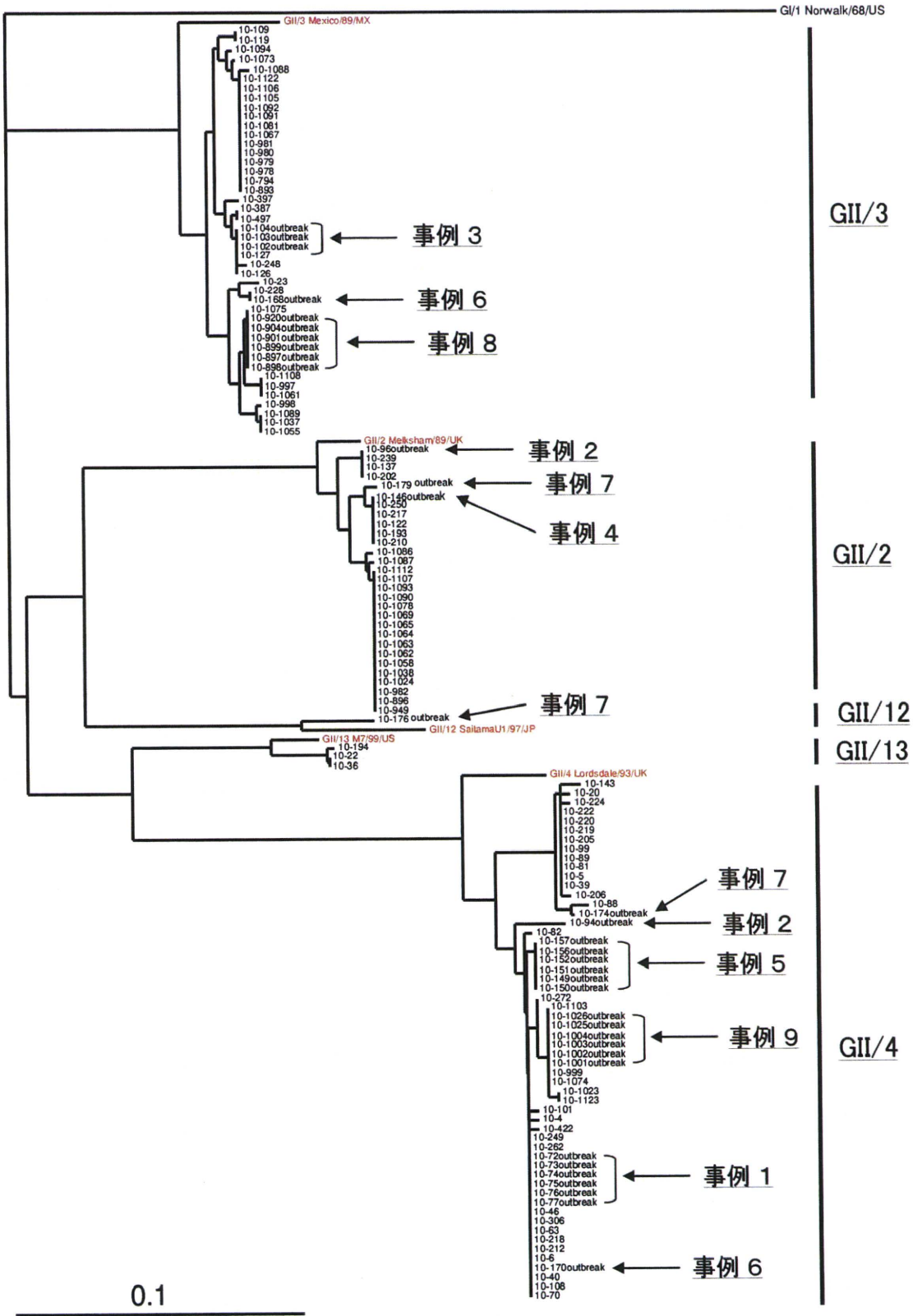


図3 NoV GII の系統樹[VP1 NS 領域]

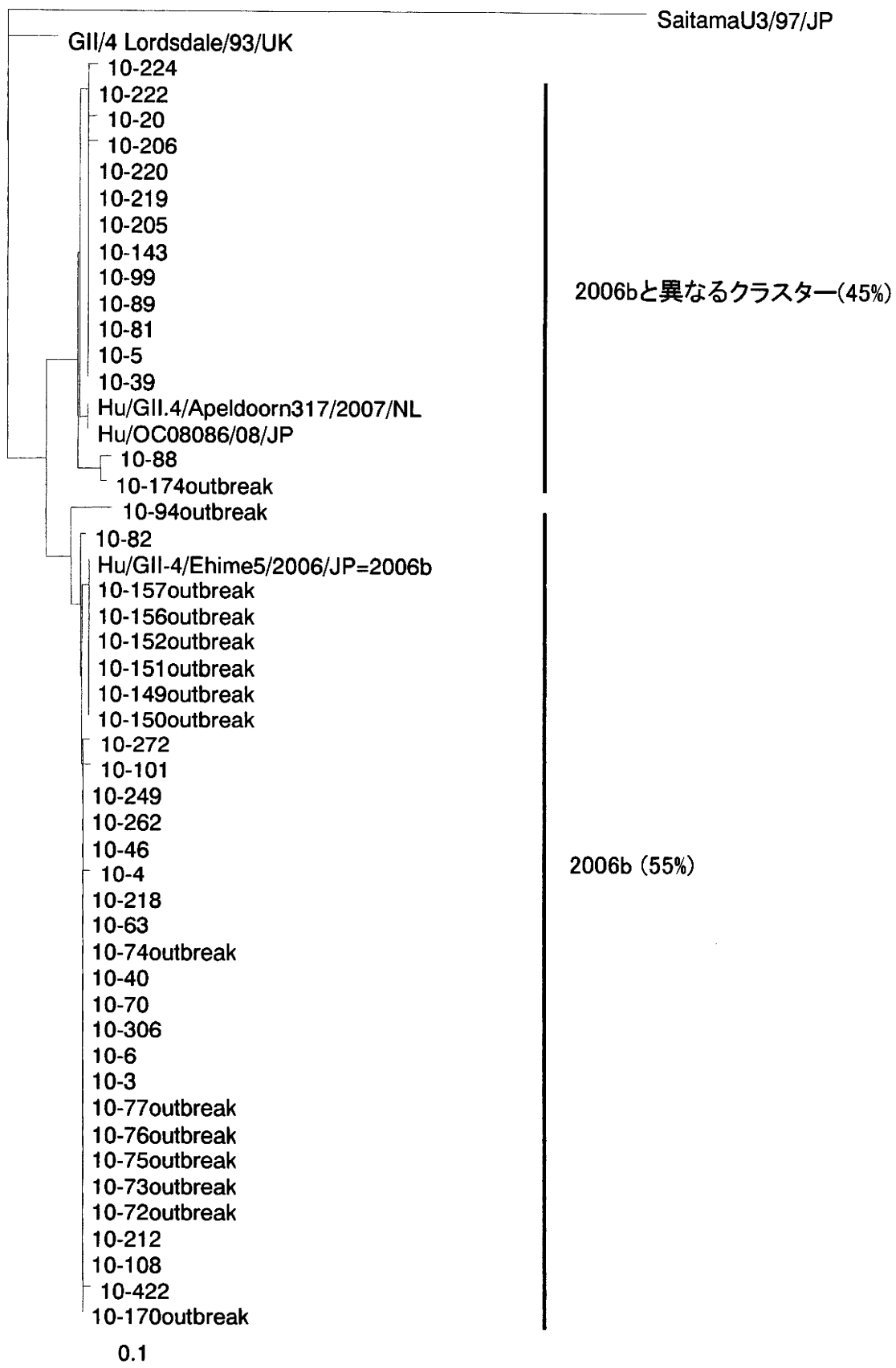


図 4 GII/4 の系統樹[VP1 N/S 領域](2009/2010)

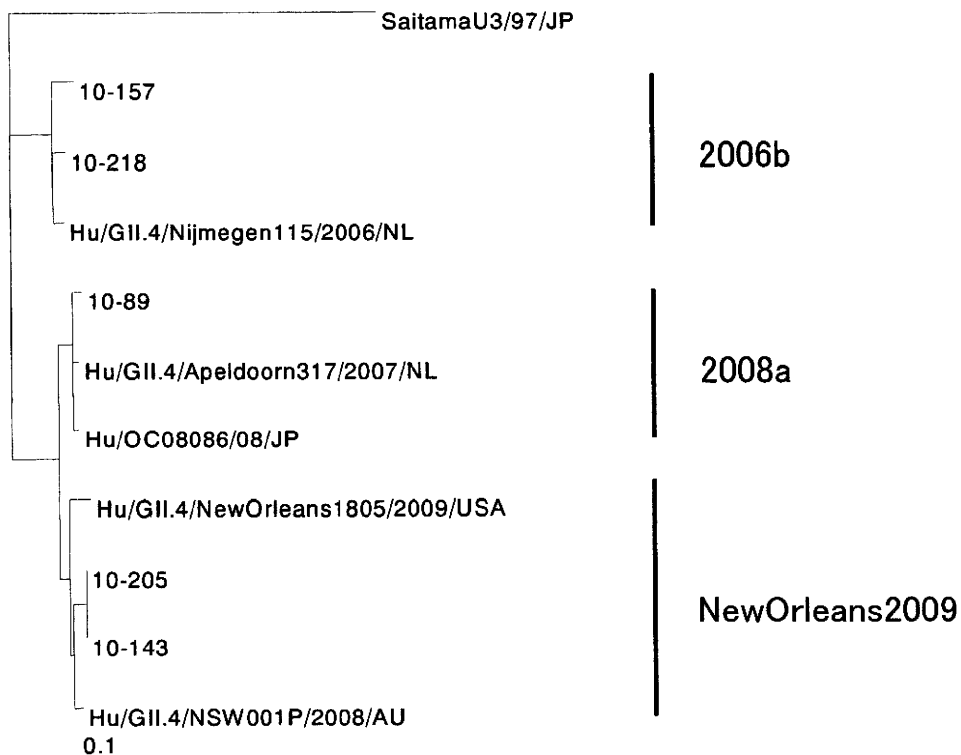


図 5 GII/4 の系統樹[VP1 全長](2009/2010)

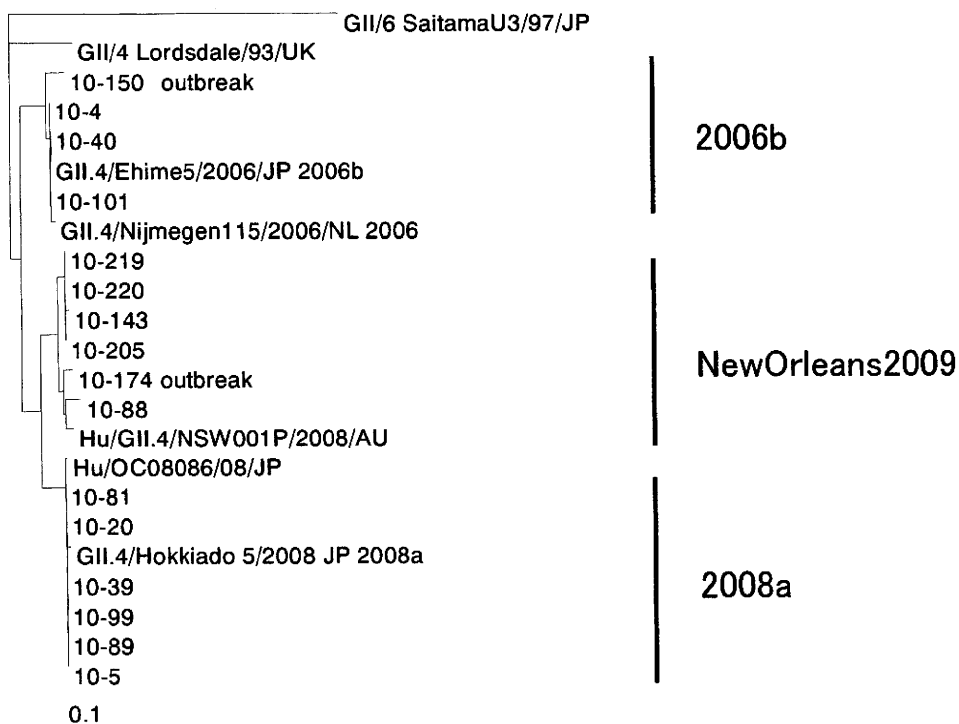


図 6 GII/4 の系統樹[ポリメラーゼ領域](2009/2010)

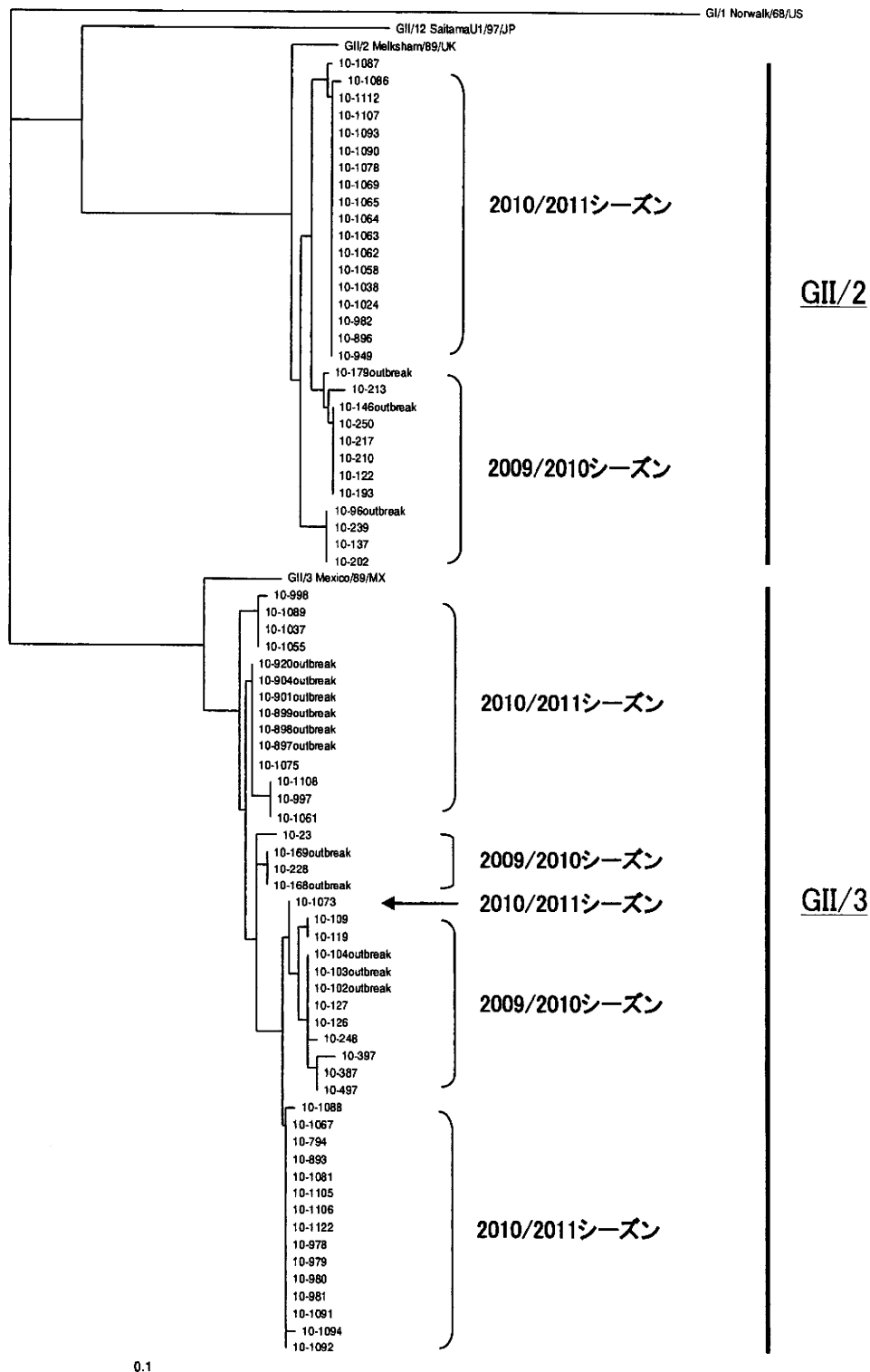


図7 GII/2、GII/3 の系統樹[VP1 NS 領域]

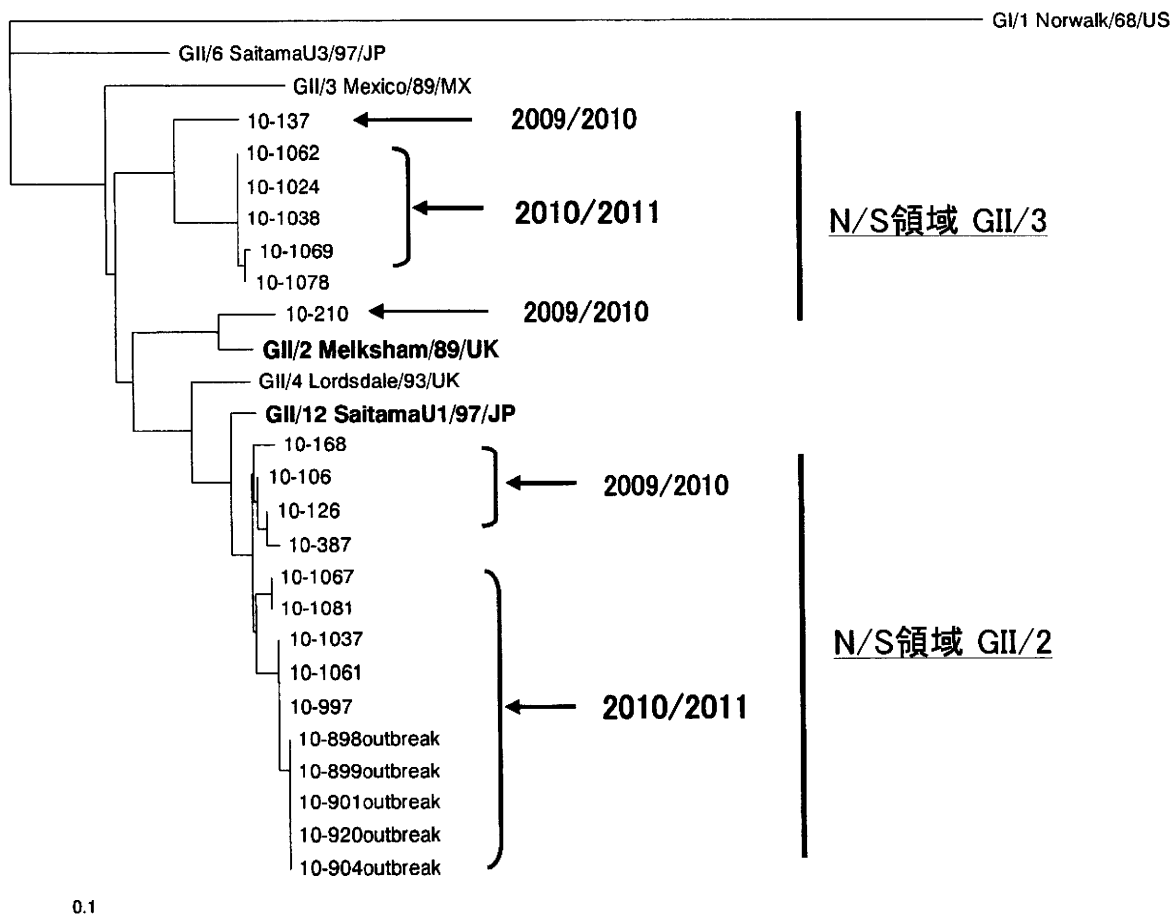


図8 GII/2、GII/3 の系統樹[ポリメラーゼ領域]

平成 22 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)

「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」

研究協力報告書

カキ及び下水における A 型肝炎 (HAV) ・ ノロウイルス (NV) 等の汚染実態調査

研究協力者	三上 稔之	青森県環境保健センター
研究協力者	筒井 理華	青森県環境保健センター
研究協力者	吉田 綾子	青森県環境保健センター
研究協力者	井上 治	青森県環境保健センター
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所

研究要旨

2010 年 11 月～12 月に下水処理施設から採水した合流水 7 検体及び分流水 7 検体について、検査を実施した結果、合流水についてノロウイルス(NV)G1 遺伝子では 7 検体全てから、3.8～34.9 コピー/5 μ l のコピー数が検出された。NVG2 遺伝子では 7 検体全てから、20.0～1308.7 コピー/5 μ l のコピー数が検出された。サポウイルス(SV)遺伝子は、7 検体中 4 検体から検出された。A 型肝炎ウイルス(HAV)及びアストロウイルス(AstV)遺伝子は検出されなかった。分流水は、NVG1 では 7 検体すべてから、2.5～2334.3 コピー/5 μ l のコピー数が検出された。NVG2 では 7 検体全てから、57.0～6676.1 コピー/5 μ l のコピー数が検出された。7 検体中 6 検体から SV が検出された。HAV 及び AstV 遺伝子は検出されなかった。合流水及び分流水から検出された NVG1 (7 株)、G2 (8 株) の Capsid 領域の遺伝子解析結果では、合流水及び分流水から、G1 では G1/1/M87661Norwalk/68/US、G1/2/L07418Southampton/91/UK、G1/4/AB042808Chiba407/1987/JP 、 G1/6/AF093797BS5/98/CE 、 G1/7/AJ277609Winchester/94/UK の 5 種類のウイルスが確認された。G2 では G2/4/Bristol/93/UK、G2/12/SaitamaU1/97/JP の 2 種類のウイルスが確認された。

SV 10 株のうち 2 株についての解析では、G I /Manchester、G I /Sapporo の 2 種類のウイルスが確認された。

2010 年 11 月～12 月に購入した市販生カキ 12 検体及びパック水 6 検体から NV、HAV、SV 及び AstV 遺伝子は検出されなかった。

A. 研究目的

A型肝炎ウイルス (HAV) は、糞便中に排泄され、汚染食品や汚染飲料水を介して経口感染する。上下水道が整備されている先進国では患者が少ないが、日本では年間200例前後の劇症肝炎症例も含めた患者報告なされており、保健衛生上重要なウイルスである。また、嘔吐や下痢等を主症状とするウイルス性胃腸炎や食中毒の主な原因であるノロウイルス (NV) は、HAV同様に糞便中に含まれて排泄され、下水や河川水に流れ込むと考えられる。このことから、ヒトから排泄されたウイルスの汚染実態について、下水を経時的に採取し、モニタリングすることにより、地域のHAV・NV等汚染実態の把握ができる。

一方、市販生カキは、中腸腺に様々なウイルスを蓄積することが知られており、食中毒や感染症の原因になる可能性が高く、本研究では、下水処理施設の合流水、分流水、生カキ及びパック内浮遊水中HAV、NV、SV、アストロウイルス (AstV) の汚染実態を明らかにし、リスク評価の基礎資料とするところを目的とした。

B. 研究方法

1. 材料

(1) 下水流入水

下水処理施設の流入水は、2010年11月～12月に採水した合流水7検体及び分流水7検体について、調査を実施した(表1)。

(2) 市販生食用カキ

市販生食用カキは、2010年11月～12月に購入した6パック(中腸腺12検体及

びパック内浮遊水6検体)について調査を実施した。検体番号は、1パックの生食用カキを等分にし、枝番を付した(1-1～6-2)。パック水は、生食用カキと同じ番号とした(1～6)(表2)。

2. 方法

(1) 検体処理

合流水及び分流水各2ℓを3,000rpm、20分間冷却遠心後、上清にポリエチレングリコール6000を8%、0.5M NaCl溶液を添加(以下、PEG濃縮という)し、常温で2時間攪拌し、再度3,000rpm、20分間冷却遠心した。No1～3については、沈渣に(-)PBS2mℓを添加し、3,000rpm、20分間遠心した。遠心上清を30%ショ糖2.5mℓに重層し、40,000rpm、2時間超遠心後、沈渣に蒸留水300μℓを加え、溶解して濃縮検体とした。No4～7については、沈渣に(-)PBS1.5mℓを添加し、3,000rpm、20分間遠心し、上清を濃縮検体として使用した。

市販生カキは、1パックを2等分し、中腸腺を4～5個プールしたものを1検体として、7倍量の滅菌蒸留水を添加し、ホモジナイズ後、10,000rpm、20分間冷却遠心した。遠心上清に等量の20%ポリエチレングリコール・1M NaCl溶液を加え、4℃で4時間静置後、3,000rpm、20分間冷却遠心し、沈渣に滅菌蒸留水400μℓを添加し使用した。

パック水は、ポリエチレングリコール6000を10%、NaClを2.1g/100mlになるように加え、ポリエチレングリコール及びNaClが完全に溶解した後、4℃で4時間～一晩静置し、3,000rpm、20分間冷却遠心した。沈渣に滅菌蒸留水2mℓを添加

し、3,000 rpm、20 分間冷却遠心し、上清を 30% ショ糖溶液に重層し、40,000 rpm、2 時間超遠心した。沈渣に滅菌蒸留水 400 μ l を添加し使用した。

(2) RNA 抽出と増幅

RNA 抽出は、QIAamp Vial RNA Mini Kit (QIAGEN) を使用し、DNase 処理を行い、RT 反応により cDNA 合成を行った。

合流水及び分流水について、NV の増幅には景山らの方法に準じてリアルタイム PCR 法を実施した。また、COGF/R プライマー及び RING1-TP Taq Man プローブを用い、ABI PRISM 7000 及び 7500 (Applied Biosystems) を使用した。NV Capsid 領域の増幅は 1stPCR には COG1F/G1SKR と COG2F/G2SKR プライマー、2ndPCR には G1SKF/G1SKR と G2SKF/G2SKR プライマーを用いた。HAV の増幅は 1stPCR には HAV2799/3273 (498bp) プライマー、2ndPCR には HAV2907/3162 (280bp) プライマーを用いた。増幅条件は、94°C 1 分、アニーリング 50°C 1 分、伸長反応 72°C 2 分を 1 cycle として、40 cycle 行い、最終増幅を 72°C 15 分とし、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いて行った。SV と AstV の増幅は 1stPCR には PreCAP1/82b (719bp) 及び SLV5317/SLV5749 のマルチプレックスを用いた。2ndPCR にはそれぞれ単一のプライマーを用いた。増幅条件は、94°C 30 秒、アニーリング 55°C 30 秒、伸長反応 72°C 1 分を 1 cycle として、35 cycle 行い、最終増幅を 72°C 15 分として行った。

市販生カキ及びパック水について、NV の増幅には NV Capsid 領域の PCR 法を実施した。HAV、SV 及び AstV は、合流水・

分流水と同様に実施した。

(3) 遺伝子解析

NV 及び SV の塩基配列は、QIAquick PCR Purification Kit で精製した PCR 産物を用い、オートシーケンサー ABI PRISM310 (Applied Biosystems) で決定した。解析は、Clustal W により行った。

(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) 下水流入水

合流水及び分流水の処理は、PEG 濃縮後の超遠心による精製、濃縮操作の必要性について、リアルタイム PCR により検討した。その結果、超遠心を実施した濃縮検体より、超遠心を実施しない方がウイルス遺伝子数が多かったことを確認したことにより、No4 以降の検体については、超遠心を実施しないこととした。

合流水について、NVG1 遺伝子では 7 検体全てから検出された最小コピー数が 3.8 コピーから最大コピー数が 34.9 コピー/5 μ l の範囲で検出された。濃縮工程を考慮し、濃縮前処理の元の採水量 2l に換算すると、およそ $7.2 \times 10^2 \sim 3.6 \times 10^3$ であった。NVG2 遺伝子では 7 検体全てから検出され、最小コピー数が 20.0 コピー、最大では 1308.7 コピー/5 μ l、2 l に換算するとウイルス量はおよそ $7.9 \times 10^2 \sim 7.5 \times 10^5$ であった (表 3、図 1、2)。SV 遺伝子は、7 検体中 4 検体から検出された。HAV 及び AstV 遺伝子は検出されなかった (表 4)。