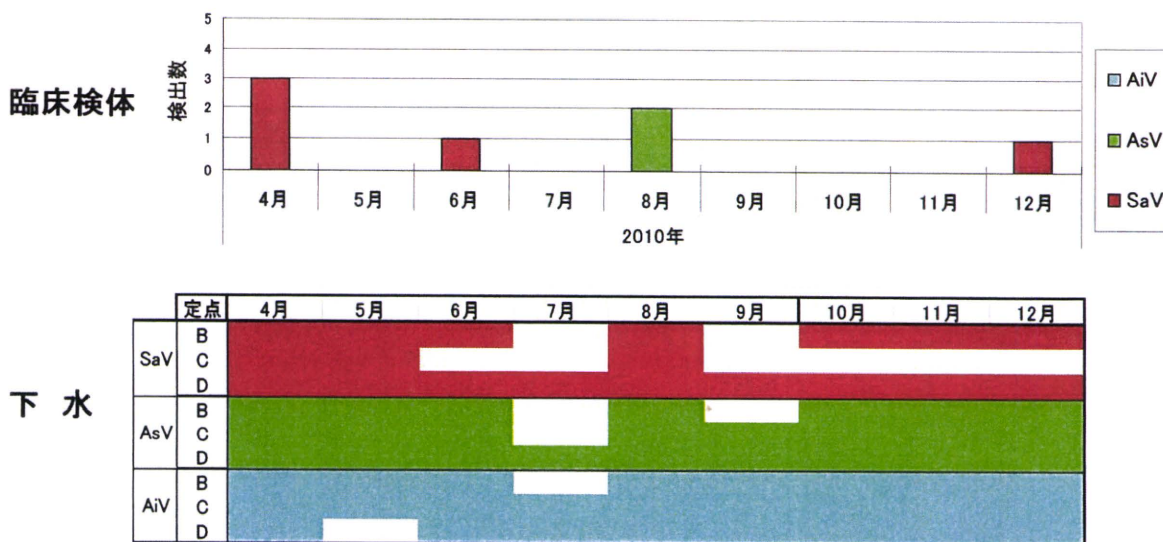


図6 検出NVの系統樹解析結果

図7. SaV AsV AiV検出状況(2011年4月～12月)



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

**汚水処理施設における下痢症ウイルスの動態について**

研究協力者 高橋 知子 岩手県環境保健研究センター  
研究分担者 田中 智之 堺市衛生研究所

**研究要旨**

感染性胃腸炎の原因ウイルスを把握するために、汚水処理施設における流入水および放流水中の下痢症ウイルスの有無について検査を行った。その結果、多様なウイルスが検出され、汚水処理施設の処理対象地域にノロウイルス以外の下痢症ウイルスによる胃腸炎患者の存在も示唆された。このことから、流入水の下痢症ウイルス調査は、処理対象地域の感染性胃腸炎の原因ウイルスを推定するのに有効であると考えた。また、流入水から連続して同じウイルス遺伝子が検出される場合は、その下痢症ウイルスが流行していることを示唆するものであると考えた。流入水に比較して、放流水ではウイルス遺伝子が検出される件数(種類)が少ないことから、汚水処理施設で大部分が除去されていると考えられた。しかし、ウイルスが放流水に残存するケースもあり、放流水がカキ等の二枚貝の汚染源のひとつとなる可能性もあると考えた。一方、感染症発生動向調査における感染性胃腸炎の定点あたりの患者数増加と、ウイルス遺伝子の検出件数(種類)との関連性は明らかではなかった。

**A. 研究目的**

定点医療機関から報告されている感染性胃腸炎の原因ウイルスは、ノロウイルスが大部分を占めると考えられる。感染症発生動向調査における感染性胃腸炎の定点あたりの患者数と、汚水処理施設における流入水中の下痢症ウイルス遺伝子検出状況の関連性について検討するために、汚水処理施設の流入水から下痢症ウイルス遺伝子の有無についての検査、また、放流水でのノロウイルス遺伝子検出状況から、ノロウイルスを含めた下痢症ウイルスの下流の

河川、海域およびカキ等の二枚貝への汚染の可能性について検討することを目的とした。

**B. 研究方法**

1. 材料

A 漁業集落排水施設(対象人口:1,200人、処理方法:接触ばっ気法) B 下水処理施設(対象人口:12,000人、処理方法:硝化促進型活性汚泥法)について、平成21年10月~平成22年3月と平成22年8月~平成23年1月に、毎月1~2回、

流入水および放流水を採取した。

## 2. ウイルス濃縮方法

流入水及び放流水は静置後の上清を用い PEG沈澱法後の濃縮液を30%ショ糖液に重層後超遠心(36000rpm150分)を行い、得られた沈澱を蒸留水で再浮遊し、ウイルス濃縮検体とした。

## 3. ウイルス検出方法

RNA および DNA 抽出は QIAamp MinElute Virus Kits (QIAGEN) を用いて行なった。RNA ウイルスについては、抽出後 DNase 処理を行い、PrimeScript RTreagent Kit (TAKARA) を用いて cDNA を作製した。各ウイルスの検出は、Amplitaq Gold 360 Master Mix を用いて、表1のプライマーで PCR 法を行った。対象ウイルスは、ノロウイルス G I および G II、アデノウイルス、A 群および C 群ロタウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス、エンテロウイルス、ボカウイルスに加え A 型肝炎ウイルスとした。増幅産物についてはダイレクトシーケンスにより塩基配列解析を行い、遺伝子型の決定を行った。

### (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. 結果

2009/10 シーズン (2011 年 1 月末まで) においては、A および B 両施設の流入水からノロウイルス遺伝子が高率に検出されたほか、サポウイルス、エンテロウイルス、アデノウイルス、アイチ

ウイルス、A 群ロタウイルスの下痢症ウイルス遺伝子が検出された。C 群ロタウイルス、アストロおよび A 型肝炎ウイルス遺伝子は検出されなかった。B 下水処理施設でのみ、2009 年 51 週にボカウイルスが検出された(表 2 および 4)。2010/11 シーズンの流入水では、両施設からノロウイルス G I および G II、サポウイルス、エンテロウイルス、アデノウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス、A 群ロタウイルス遺伝子が検出された。B 下水処理場でのみ C 群ロタウイルス遺伝子が 2010 年 49 週~2011 年 1 週に 3 回連続して検出された(表 3 および 5)。この他にも、両シーズン、両施設において、連続して同じウイルス遺伝子が検出される場合があった。一方、放流水からも、同様に多様な下痢症ウイルス遺伝子が検出されたが、2009/10 および 2010/11 シーズンともに、流入水と比較して、各下痢症ウイルスの検出件数は少なかった。放流水から検出されたウイルスは、B 下水処理場の方が検出件数および種類が多かった。A 漁業集落排水施設ではノロウイルス G II、アデノウイルス、アイチウイルス、アストロウイルスで、B 下水処理場では、ノロウイルス G I および G II、サポウイルス、アイチウイルス、アストロウイルス、A 群および C 群ロタウイルスが検出された。流入水で検出されたウイルス遺伝子が、放流水でも検出されたり、流入水で検出されたウイルスが、放流水では検出されない場合もあった。感染性胃腸炎患者の実数の増加と流入水でのウイルス遺伝子検出件数との関連性は明らかではない

が、流入水からノロウイルス遺伝子が検出されると、患者数が増加する傾向にあった。(図 1～8)

#### D. 考察

汚水処理施設の流入水からの下痢症ウイルス遺伝子の検出状況から、汚水処理施設の処理対象地域にノロウイルス以外の下痢症ウイルスによる胃腸炎患者が存在することが示唆された。このことから、処理対象地域の感染性胃腸炎の原因ウイルスを推定することが可能と考えた。また、流入水において、連続して同じウイルス遺伝子が検出される場合もあり、当該ウイルスの流行を示唆するものと考えた。流入水と放流水のウイルス遺伝子検出件数の状況から、汚水処理施設における処理工程中に、流入した下痢症ウイルスの大部分が除去されていると推察された。これは、過去の調査において、ノロウイルスの大部分が処理工程中に除去されていた成績と同様と考えられた。また、放流水では、年末から検出件数が増加する傾向にあり、流入するウイルス量の増加によるものと推察された。一方で、流入水、放流水ともに検出されたウイルス遺伝子や、流入水でのみ検出されたウイルス遺伝子について、流入するウイルス量のちがいの他、各ウイルスの特性なども示唆されると考えた。流入水、放流水ともに、下痢症ウイルス遺伝子の検出頻度は、B下水処理場の方が多かったが、対象処理人口の影響が考えられた。放流水中の下痢症ウイルスは、河川、海域ひいては二枚貝等の汚染につながると考えられた。流入水

から検出された下痢症ウイルスの件数と当該地域における感染性胃腸炎患者実数の関連性については、流入水中にノロウイルスが検出され始めると、患者数は増加する傾向にあり、感染性胃腸炎の主たる原因ウイルスがノロウイルスであることが示唆された。しかし、検出件数と患者数について、明らかな関連性は不明であり、各地域の定点医療機関の位置が、汚水処理施設の位置と明確に一致しないことや、今回調査した施設の対象人口の違いが要因として考えられた。

#### E. 結論

住民の排泄物等が集まる汚水処理施設における流入水の下痢症ウイルスの調査は、地域に発生しているもしくは流行している感染性胃腸炎の原因ウイルスを推定することができると思える。今回の調査でのウイルス遺伝子検出は定性であり、今後は、定量的な調査および考察が必要である。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 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 使用したプライマー

Noro:	1st COG1F/G1SKR,COG2F/G2SKR
	2nd G1SKF/G1SKR,G2SKF/G2SKR
Sapo:	1st SV-F13,SV-F14/SV-R13,SV-R14 nest SV-F22/SV-R2
Entero:	EVP4/OL68-1
Adeno:	AdnU-S'2/AdnU-A2
Astro:	1st Mon244/82b
	2nd AST-S1,AST-S2,AST-S3,AST-S4,AST-S5,AST-6,ASTS7,AST-S8/END
Aichi:	C94b(+)/264k(-)
RotaA:	1st Beg9/End9
	nest aAT8,aBT1,aCT2,aDT4,aET3,aFT9/RVG9
RotaC:	1st G8S/G8A nest NG8S1/NG8A2
HAV:	1st HAV+2799/HAV-3273 nest HAV+2907/HAV-3162
Boca:	188F/ 542R

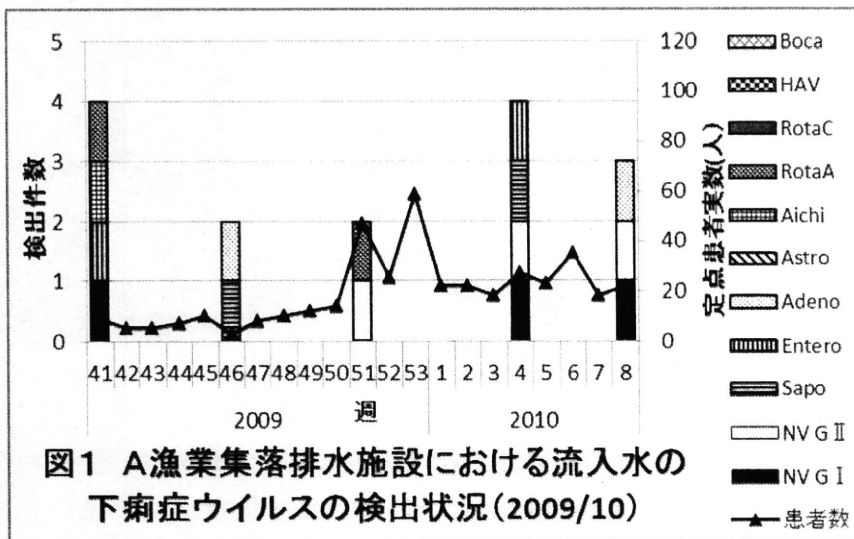


図1 A漁業集落排水施設における流入水の下痢症ウイルスの検出状況(2009/10)

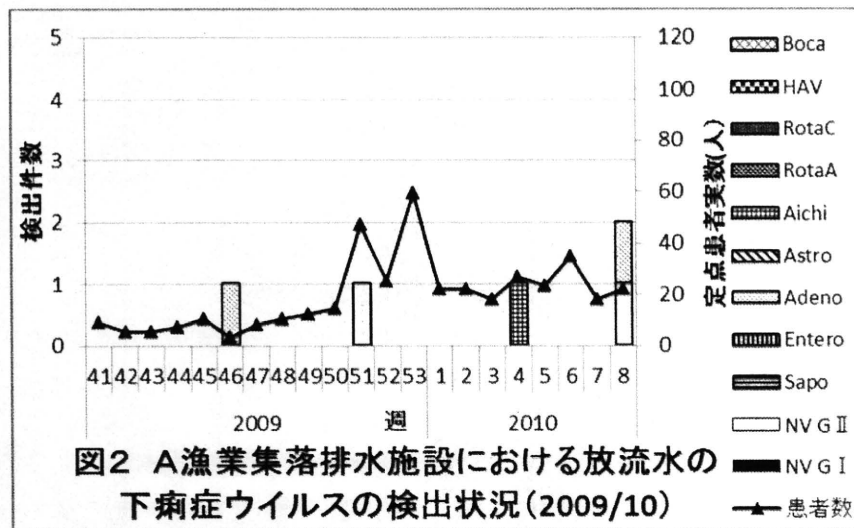


図2 A漁業集落排水施設における放流水の下痢症ウイルスの検出状況(2009/10)

表2 A漁業集落排水施設における下痢症ウイルス検出状況(2009/10)

年	流入水					放流水				
	2009			2010		2009			2010	
	41	46	51	4	8	41	46	51	4	8
NV G I	G I 型不明			G I / 4	G I 型不明					
NV G II			G II / 4	G II / 4	G II 型不明			G II / 4		G II / 4
Sapo		Sapo		Sapo						
Entero	Echo18			CoxA16						
Adeno		Adeno31			Adeno31		Adeno31			Adeno31
Astro										
Aichi	Aichi									Aichi
RotaA	RotaA		RotaA							
RotaC										
HAV										
Boca										

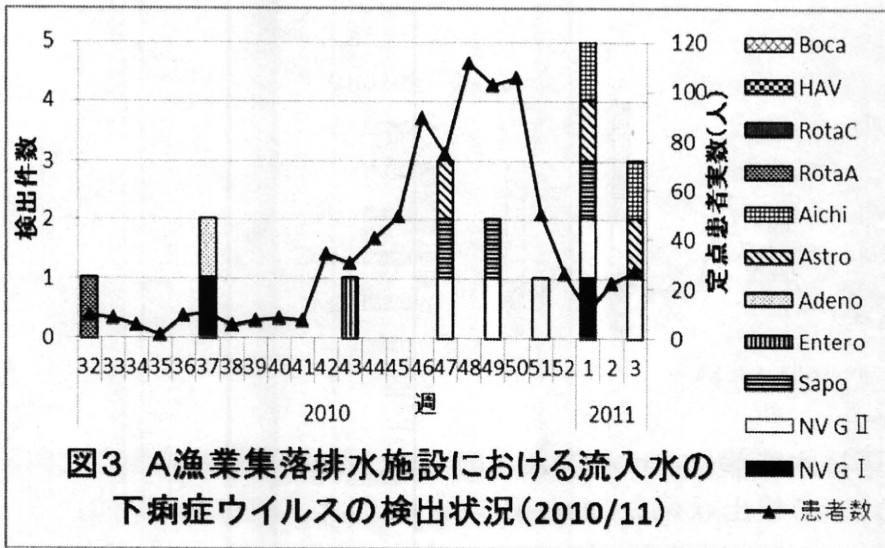


図3 A漁業集落排水施設における流入水の  
下痢症ウイルスの検出状況(2010/11)

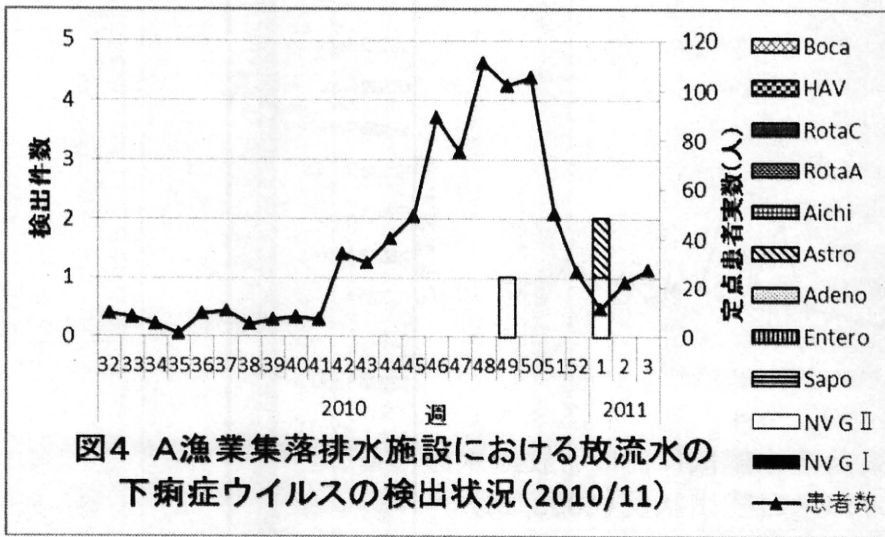


図4 A漁業集落排水施設における放流水の  
下痢症ウイルスの検出状況(2010/11)

表3 A漁業集落排水施設における下痢症ウイルス検出状況(2010/11)

年	流入水								放流水							
	2010				2011				2010				2011			
	32	37	43	47	49	51	1	3	32	37	43	47	49	51	1	3
NV G I		G I 型不明					G I /11									
NV G II				G II /2	G I /2	G I 型不明	G II /4	G II /4					G II /2		G II /2	
Sapo				Sapo G I /2	Sapo G I /2		Sapo									
Entero			Entero 88													
Adeno		Adeno 31														
Astro				Astro 1			Astro 1	Astro 1								Astro 1
Aichi							Aichi	Aichi								
RotaA	RotaA 3															
RotaC																
HAV																
Boca																

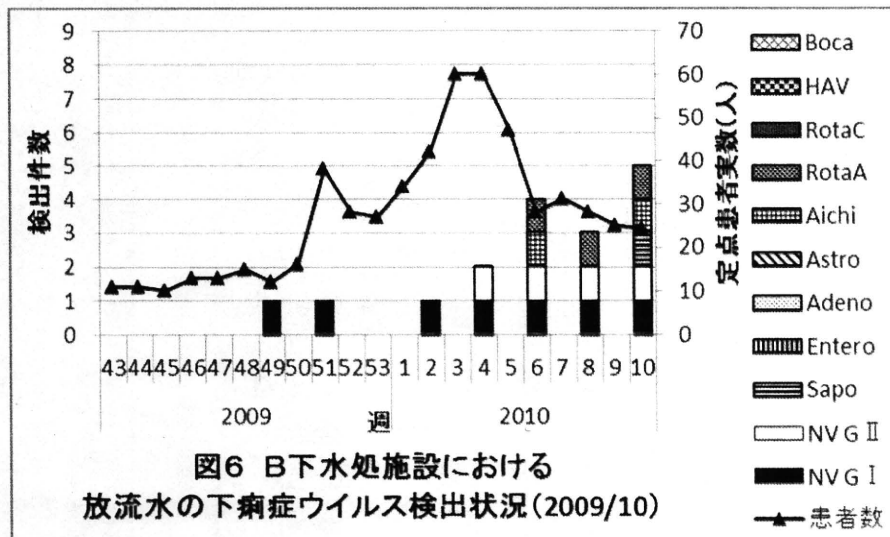
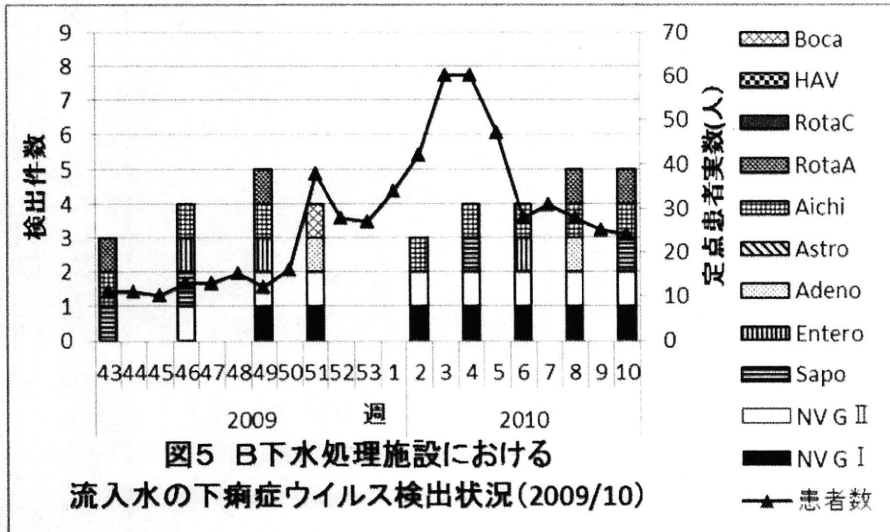


表4 B下水処理場における下痢症ウイルス検出状況(2009/10)

年	流入水									放流水								
	2009				2010					2009				2010				
	43	46	49	51	2	4	6	8	10	43	46	49	51	2	4	6	8	10
NV G I			GI/4	GI/4	GI/4	GI/4	GI/4	GI/4	GI/4			GI/4	GI/4	GI/4	GI/4	GI/4	GI/4	GI/4
NV G II		GI/2	GI/4	GI/2	GI/13	GI/2	GI/4,6	GI/2	GI/4					GI/2	GI/4	GI/4	GI/13	
Sapo	Sapo	Sapo				Sapo			Sapo									Sapo
Entero		Echo9	Echo9				Rhino											
Adeno				Adeno3				Adeno41										
Astro																		
Aichi	Aichi	Aichi	Aichi		Aichi	Aichi	Aichi	Aichi	Aichi							Aichi		Aichi
RotaA	RotaA		RotaA					RotaA	RotaA						RotaA	RotaA	RotaA	
RotaC																		
HAV																		
Boca				Boca														



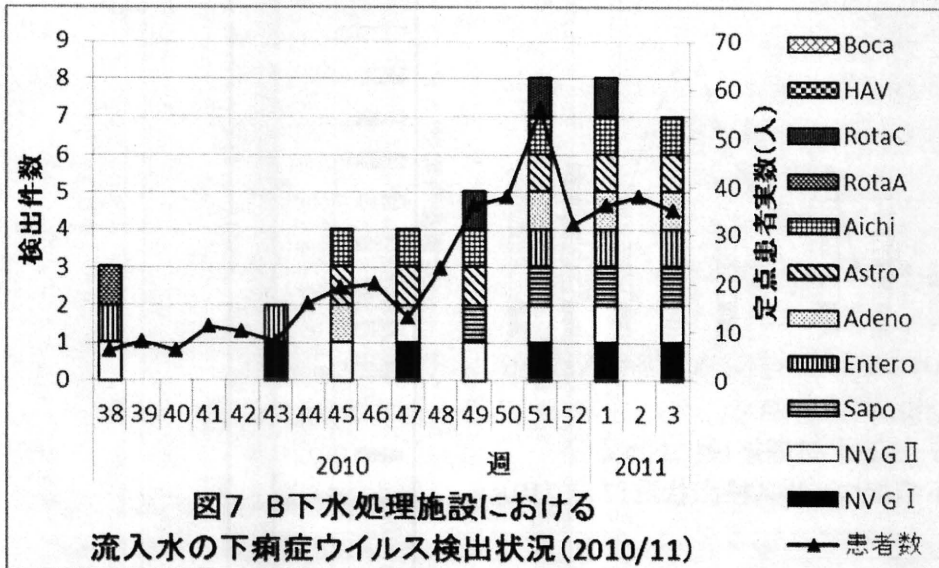


図7 B下水処理施設における  
流入水の下痢症ウイルス検出状況(2010/11)

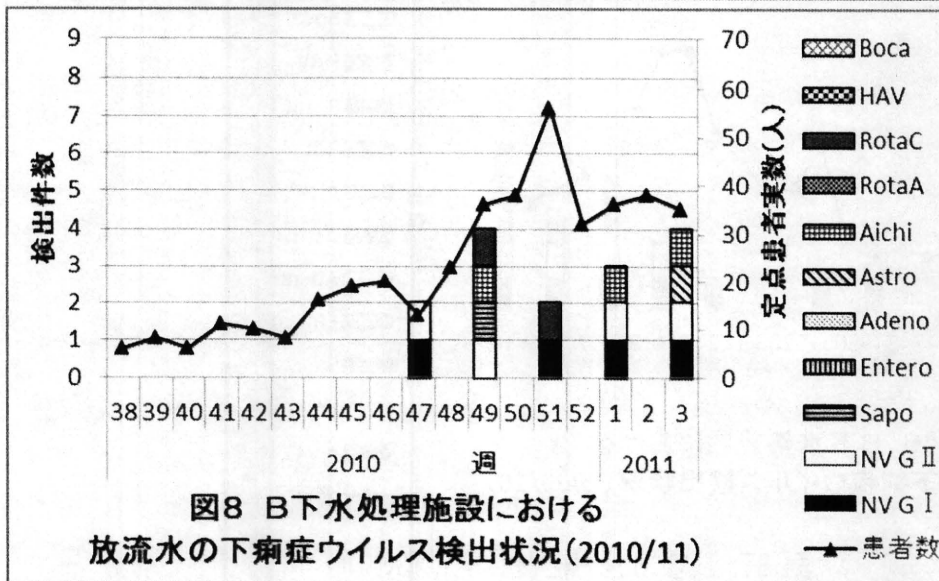


図8 B下水処理施設における  
放流水の下痢症ウイルス検出状況(2010/11)

表5 B下水処理場における下痢症ウイルス検出状況(2010/11)

年	流入水								放流水								
	2010				2011				2010				2011				
	38	43	45	47	49	51	1	3	38	43	45	47	49	51	1	3	
NV GI		GI/4		GI/8		GI/9	GI/9	GI/9					GI/8		GI/9	GI/9	GI/9
NV GII	GII/2		GII/2	GII/4	GII型不明	GII/4	GII/4	GII/2					GII/4	GII/4		GII/4	GII/2
Sapo					SapoGI/2	SapoGI/2	Sapo	Sapo						SapoGI/2			
Entero	CoxA9	Entero68				Echo25	Echo25	Echo25									
Adeno			Adeno41			Adeno31	Adeno41	Adeno41									
Astro			Astro 1	Astro1	Astro1	Astro1	Astro1	Astro1									Astro1
Aichi			Aichi	Aichi	Aichi	Aichi	Aichi	Aichi					Aichi		Aichi	Aichi	
RotaA	RotaA 1																
RotaC					RotaC	RotaC	RotaC						RotaC	RotaC			
HAV																	
Boca																	

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

## 佐賀県における下水中のウイルス検出状況

研究協力者 増本 久人、南 亮仁、野田 日登美、江口 正宏、  
原崎 孝子、靄田 清典 (佐賀県衛生薬業センター)  
船津丸 貞幸 (佐賀県食肉衛生検査所)

研究分担者 田中 智之 (堺市衛生研究所)

研究分担者 野田 衛 (国立医薬品食品衛生研究所食品衛生部)

### 研究要旨

我々は、食中毒および感染症の原因となる下痢症ウイルスに感染した患者から排出された下水中の汚染実態に注視し、2006年9月から2008年12月まで下水処理場1定点の流入水中に含まれる病原ウイルス遺伝子の検出状況について経時的に調査してきた。今回、2010年6月から12月まで継続調査を行い検出した病原体ウイルスの分子疫学的な解析などを行ったので、過去の検出状況と併せて報告する。今回、下水の流入水中から検出したウイルスの遺伝子は77件で、ノロウイルス(NV)が61件と最も多く、GenogroupI(GI)28件とGenogroupII(GII)33件であった。GIは1型、2型、3型、4型、8型、13型の6種類で、GIIは2型、3型、4型、5型、7型、13型、17型の7種類を検出した。GI/4型とGII/4型の検出が多く、NVの流行期における主流型であった。更に、アストロウイルス(AstV)14件を検出した。その他、サポウイルス(SapV)、アデノウイルス(AdV)各1件などを検出した。月別検出状況では、若干の変動は示すものの、ほぼ年間をとおして種々の下痢症ウイルスが下水中から検出された。

### A. 研究目的

食中毒・感染症の病原体として腸管系の下痢症ウイルスが関与し、冬季に急増することは知られている。しかし、散発的な感染患者や集団発生が年間を通して報告されている。この状況から、下痢症

ウイルスに罹患した患者や不顕性感染者などから排泄される糞便等に含まれる下水を汚染している状況に注視し、2006年9月から2008年12月までの調査結果を報告した。今回、更に、2010年6月から12月の毎月1回、下水処理施設の流入水を

採取し、下痢症ウイルスについて経時的な検出を試み、年間を通した下水中の病原ウイルスによる汚染状況と分子疫学的な解析などを行った。

## B. 研究方法

### 1. 材料

下水処理施設 1 定点における流入水を材料とした。

2010 年 6 月から 12 月まで毎月 1 回、計 7 検体、合計 35 検体の下水中の下痢症ウイルスの分子疫学的な分析などを行った。

### 2. 各病原体ウイルス遺伝子検出法

採水した 1,000ml の流入水は攪拌し、約 200ml を分取し粗遠心後、アミコンウルトラ-30K (ミリポア) を用い濃縮処理し最終濃度約 200  $\mu$ l を検体として QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いてウイルス RNA を抽出した。下痢症を発症する主な起因ウイルスである NV の他、アストロウイルス (AstV)、サポウイルス (SapV)、A 型肝炎ウイルス (HAV)、アデノウイルス (AdV) などの遺伝子検出について国立感染症研究所の「病原体検出マニュアル」等に準じ、遺伝子検査を行った。検出した増幅産物は 3130xl Genetic Analyzer (ABI) を用い塩基配列を決定し、各ウイルス遺伝子型および亜型別による系統樹解析や相同性検索などの分析を行った。

NV については、リアルタイム PCR 法により COG1F/1R、COG2F/2R 系プライマーと TaqMan Probe を用い 7500 Fast (ABI) で測定し、NV のコピー数を定量測定した。

## 3. 結果の集計

今回の調査結果に加え、前報告の調査結果 (2006 年 9 月から 2008 年 12 月まで毎月 1 回、計 28 検体) を合わせて、検出動向を集計した。

## C. 研究結果

### 1. 下水中のウイルス検出状況 (表 1)

2006 年 9 月から 2008 年 12 月、2010 年 6 月から 12 月の合計 35 検体の流入水から検出した下痢症ウイルス遺伝子は 77 件で、その内訳は、NV 61 件 (79.2%)、AstV 14 件 (18.2%)、SapV 1 件 (1.3%)、AdV 1 件 (1.3%) であった。

NV の 61 件中、GI は 28 件 (45.9%)、GII は 33 件 (54.1%) であった。

GI は 28 件中、GI/4 型 22 件 (78.6%)、GI/1 型 1 件 (3.6%)、GI/2 型 2 件 (7.1%)、GI/3 型 1 件 (3.6%)、GI/8 型 1 件 (3.6%)、GI/13 型 1 件 (3.6%) の 6 種類であった。GI/4 型 22 件のキャプシド領域 291 塩基の相同性は 95~100% であった (図 1)。

GII は 33 件中、GII/4 型 18 件 (54.5%)、GII/2 型 2 件 (6.1%)、GII/3 型 3 件 (9.1%)、GII/5 型 1 件 (3.0%)、GII/7 型 3 件 (9.1%)、GII/13 型 3 件 (9.1%)、GII/17 型 3 件 (9.1%) の 7 種類であった。GII/4 型 33 件のキャプシド領域 302 塩基の相同性は 91~100% であった (図 2)。

AstV は 14 件中、1d 型 8 件 (57.1%)、1a 型 1 件 (7.1%)、2 型 1 件 (7.1%)、3 型 3 件 (21.4%)、6 型 1 件 (7.1%) の 5 種類であった。AstV/1d 型 8 件のキャプシド領域 409 塩基の検体間相同性は 96~100% であった (図 3)。

## 2. 年別検出状況

2006年9月～12月（採水4回）はNV 10件中、GI型5件、GII型5件を検出しGII/4型を全ての採水月から検出した。

2007年1月～12月（採水12回）はNV19件を検出し、GI型10件、GII型9件を検出し、全ての採水月から検出した。

2008年1月～12月（採水12回）は9月を除く、採水検体から30件のウイルス遺伝子を検出し、NV21件中、GI型8件、GII型13件とAstV9件、SapV1件を検出した。

2010年6月～12月（採水7回）は9月を除く、採水検体から18件のウイルス遺伝子を検出し、NV11件中、GI型5件、GII型6件とAstV6件、AdV1件を検出した。

## 3. 2010年調査のNV定量（表2）

2010年のNV月別検体中における推定量については、NVのGIは12月に $1.5 \times 10$  コピー数を示し、その他の月は、すべて10コピー未満であった。GIIは6月から7月と10月から12月に $1.0 \sim 2.0 \times 10^3$  コピー数を示し、8月は10コピー未満であった。

## D. 考察

2006年9月から2008年12月までの計採水28回と2010年6月から12月まで採水7回、総計35回の下水処理場1定点における流入水中の下痢症を引き起こすウイルス遺伝子について経時的な検出調査を行った結果、下痢症ウイルス遺伝子77件を検出した。最も多く検出したウイルスはNVの61件（79.2%）で、GIは6

種類の亜型とGIIは7種類の亜型が検出された。その中でもGI/4型とGII/4型が検出された月数が多く優勢を示し、今回調査を行った採水の流域で下痢症ウイルスによる感染性胃腸炎の流行状況を反映しているものと推測する。

AstVについては、2008年4月から2010年12月までの17回の採水調査から14件のウイルスを検出し、5種類の亜型が分類され、1型が多く検出され国内で主流として報告されている型であった。これまで佐賀県内でのAstVによる検出事例は少なく、過去に小児便からの報告例があるのみである。しかし、下水中からの検出は比較的が多い状況であり、NVと同様に人の生活環境中において感染が蔓延していることが示唆される。佐賀県におけるAstVの積極的な検出サーベイランスも今後の主要な課題として調査を継続して行く必要があると考える。

今回の下水中の調査で検出したウイルスについて、2010年の全国および佐賀県の感染性胃腸炎患者の報告数（図4）と比較したが、例年、冬季に胃腸炎患者の発生は高く、夏季を中心に患者の減少を示す状況は、ほぼ相関する所見であり、今回、下水中から検出した病原体ウイルス遺伝子は、その流域で生活するヒトの感染および流行状況とほぼ相関していることが推察される。この状況からも今回の調査を継続し分子疫学的な解析によるサーベイランスを行うことで下痢症ウイルスが関与すると思われる食中毒の予防対策や発生要因の解明に向けて食品衛生管理における分子疫学的な資料として有用であると推察する。

## E. 結論

2006年から2010年までの期間中に下水中から検出した下痢症ウイルス遺伝子は77件で、環境水中にかなり多くの病原ウイルスによる汚染状況であることが、今回の調査で判明した。その中でも、感染性胃腸炎の主な病原体ウイルスであるNVが61件と最も多く、感染症発生動向調査の報告で主流型とされているGI/4型とGII/4型が高い率で検出され、ヒトの生活する上流域で罹患者が多く感染している亜型であることが示唆される。また、AstVは2008年と2010年の調査のみであるが、14件を検出し1型、2型、3型、6型の4種類を確認したが、この検出状況から生活環境内にかなり浸淫していると推察され、人への感染について継続的な監視が必要である。

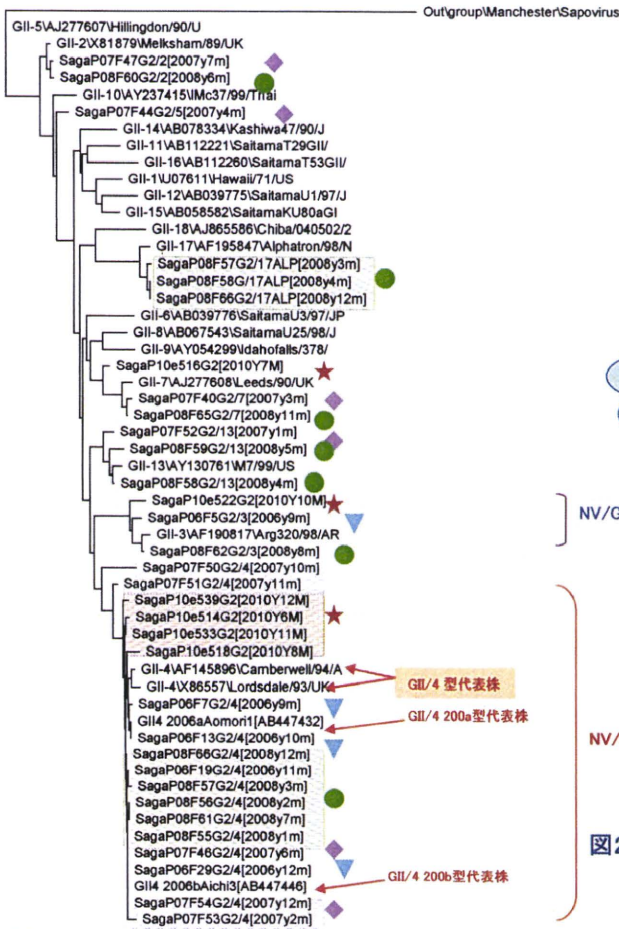
## F. 研究発表

なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. なし





[NV GII 年別検出数=計33件]

- ▼ 2006年(4ヶ月): 5件
- ◆ 2007年(12ヶ月): 9件
- 2008年(12ヶ月): 13件
- ★ 2010年(7ヶ月): 6件

検出例のGII 33件中、4型が18件 (54.5%)と多く検出された。

NV/GII/3型

NV/GII/4型

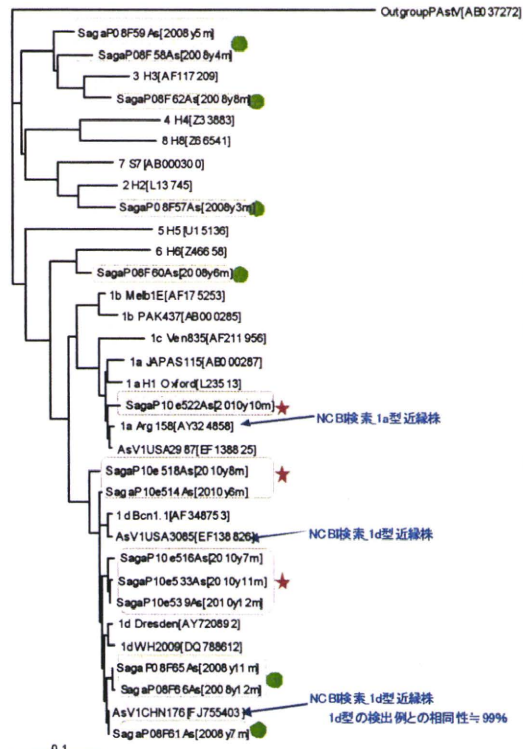
GII/4 型代表株

GII/4 200a型代表株

GII/4 200b型代表株

図2. ノロウイルスGIIの分子系統樹 (キャプシド領域302bp)  
 CLUSTAL W (1.83) Multiple Sequence Alignments  
 2006年9月~2008年12月と2010年6月~12月検出例

0.1



[アストロウイルス 年別検出数=計14件]

- 2008年(10ヶ月): 8件
- ★ 2010年(7ヶ月): 6件

Astrovirus 2型 ~ 8型

2008年調査例は、1d型、2型、3型、6型など複数の亜型を検出した。

Astrovirus 1b型

Astrovirus 1a型、1c型

検出例の14件中、1d型が8件 (57.1%)と優位を示した。  
 2010年調査例に多く認められた。

Astrovirus 1d型

図3. アストロウイルスの分子系統樹 (キャプシド領域409bp)  
 2008年6月~2008年12月と2010年6月~12月検出例

表2. 2010年下水中のウイルス検出とNV定量

[ 2010年6月～12月/7ヶ月間 ]

検出ウイルス		月別		6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	計	総計	
		Virus	Geno/type (RealtimePCR)										
ノロウイルス	GI	1								★ 2.5×10 <sup>1</sup>	1	5	
		3							★ 10未満		1		
		4	★ 10未満	★ 10未満							2		
		13			★ 10未満						1		
	GII	3							★ 2.0×10 <sup>2</sup>			1	6
		4	★ 1.0×10 <sup>1</sup>		★ 10未満				★ 1.7×10 <sup>2</sup>	★ 1.2×10 <sup>2</sup>	4		
		7		★ 2.5×10 <sup>1</sup>							1		
アストロウイルス	1	a						★			1	6	
		d	★	★	★				★	★	5		
アデノウイルス	41		★								1	1	
*その他、サポウイルス、A型肝炎ウイルス遺伝子は、「検出せず」。												18	

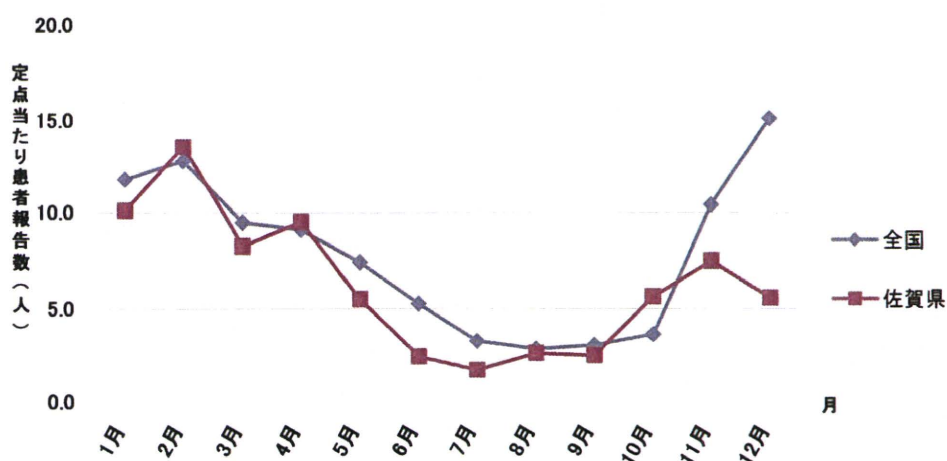


図4. 2010年1月～12月における感染性胃腸炎患者報告数(人/定点)

国立感染症情報センター・佐賀県感染症情報センターより

※感染性胃腸炎による患者報告は、2010年においても例年の感染症情報のとおり冬季に患者発生数は高く、夏季に減少傾向を示す。夏季に患者数が全く“ゼロ”でない状況は、今調査の下水中のウイルス検出状況に比例していると推測する。



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

**食中毒事例から検出されたサポウイルスの遺伝子解析**

研究協力者 小林 慎一 愛知県衛生研究所  
研究分担者 田中 智之 堺市衛生研究所

**研究要旨：**

2010 年の 1 月、愛知県、三重県、岐阜県下の在勤者で給食弁当を原因食とする食中毒事例が発生した。喫食者 3,827 名中 655 名(17.1%)が胃腸炎症状を呈し、有症者と原因施設の従事者からサポウイルス(SaV)が検出された。遺伝子解析の結果、有症者と従事者由来の SaV は互いに高い相同性を示し、GI.2 に分類された。今回の事例では SaV の汚染経路や原因食品を特定できていないが、SaV もノロウイルスと同様に大規模な食中毒事例の病因物質となることが示唆された。

**A. 研究目的**

カリシウイルス科のサポウイルス(SaV)は、主に乳幼児の感染性胃腸炎の原因ウイルスに位置づけられてきたが、近年は全国的に乳幼児よりもむしろ年長者の間で SaV の集団感染が起きている。

2010 年(平成 22 年)1 月、愛知県内の一弁当調理施設を原因とする大規模食中毒が発生し、病因物質として SaV が検出された。そこで、食中毒事例の概要と検出された SaV の遺伝子解析の結果について報告する。

**B. 研究方法**

**1. 材料**

食中毒事例で採取された有症者 9 名と原因施設の従事者 52 名の糞便を検査対象とした。

**2. RNA の抽出**

10%糞便乳剤から High Pure Viral RNA Kit(Roche)を用いて RNA を抽出した。

**3. ノロウイルスの検査法**

Kageyama ら(J Clin Microbiol 41: 1548-1557 2003)のリアルタイム PCR 法に従い、検出検査を実施した。

**4. サポウイルスの検査法**

Oka ら(J Med Virol 78:1347-1353 2006)のリアルタイム PCR に準じて検査した。また、SaV の遺伝子型は構造タンパクの上流域を Okada ら(Arch Virol 151: 2503-2509 2006)のプライマー SV-F13:14/SV-R13:14、SV-F22/R2 を用いて nested RT-PCR 法で増幅後、ダイレクトシーケンス法で決定した。

(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. 食中毒事例の概要

2010年1月に、愛知県内のI弁当調理施設が調製した給食弁当を喫食した愛知県、三重県、岐阜県下の在勤者3,859名の内、680名(17.6%)が食中毒症状を呈した。有症者171名(男性144名、女性27名、平均年齢42.8歳)の主な臨床症状は、下痢158名(92.4%)、嘔気110名(64.3%)、腹痛109名(63.7%)、悪寒75名(43.9%)、嘔吐(38.0%)、倦怠感65名(38.0%)であり、下痢の頻度が最も高かった。図1に日時別の患者発生状況を示した。一峰性であり、平均潜伏時間は、1月21日の13時を基点として、41.9時間と算出された。

### 2 微生物学的検査結果

有症者9名と原因施設従事者52名の細菌学的検査及びNoV検査は、全て陰性であったが、SaVが有症者7名(7/9)と従事者7名(7/52)から検出された。リアルタイム法で検出された糞便1g当たりのSaVコピー数は、有症者で $10^8 \sim 10^{10}$ コピー、従事者(2名が有症)で $10^7 \sim 10^9$ コピーと検出コピー数には有意な差異を認めなかった。

### 3 SaVの遺伝子解析

リアルタイム法でSaV陽性の14検体内、nested RT-PCRでSaV遺伝子を検出できた11検体(有症者6検体と従事者5検体)の系統樹解析の結果、有症者と従事者由来のSaVは互いに高い相同性を示し、検出SaVはGI.2に分類された(図2)。

DDBJのBlast検索で、Sapovirus

Hu/Oshima/2009/JP(AB518056)に99%の相同性を示し、最も近縁であった。

## D. 考察

今回の食中毒事例から検出されたGI.2は、愛知県で過去に検出例のない遺伝子型であったが、本県の2009/10シーズンの感染症発生動向調査では、例年と異なるようなSaV流行は認められなかった。国内のGI.2型SaVの集団感染例として、2009年3月の北海道の小学校や2005年5月の宮崎県の知的障害者施設での事例が報告されているが、両事例ともにヒト-ヒト感染による集団感染である。海外では2007年5月の台湾の大学でのGI.2の集団感染事例はじめ2007年以降、オランダ、スウェーデン、スロベニアなどのヨーロッパ諸国よりGI.2の集団発生が多数報告されている。世界各地で同時多発的にGI.2型の集団発生が起きていると推察されるが、その要因は不明である。近年は、乳幼児よりもむしろ、年長者間のSaV集団発生が目立っている。今回の事例では、弁当調理施設は時間差をもって、一本のコンベアーで3種類の弁当を調製していたが、3種類の弁当喫食者にそれぞれ食中毒患者が認められたことから、特定の食材や調理品の汚染よりも、手洗いの不備や手袋の不適切な使用により複数の調理品を汚染したことが要因と推察された。SaVが調理施設に持ち込まれた経緯は現時点で未解明であるが、本事例を通じて、SaVもNoVと同様に大規模な食中毒事例の病因物質となることが示唆された。

## E. 結論

2010年1月、給食弁当を原因とする大規模な食中毒事件が発生した。有症者及び原因施設の従事者からサポウイルス(SaV)が検出された。遺伝子解析の結果、有症者と従事者由来のSaVは互いに高い相同性を示し、全てGI.2型に分類された。SaVもノロウイルスと同様に大規模食中毒の病因物質となることが示唆されたことから、食品取り扱い者に対する注意喚起が必要と考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 小林慎一, 藤原範子, 水谷絵美, 安達啓一, 伊藤 雅, 安井善宏, 山下照夫, 平松礼司, 下岸 協, 皆川洋子, 大瀧誠司, 林 克巳, 野田耕平, 丹羽哲久, 子安春樹: 給食弁当を原因としたサポウイルスによる大規模食中毒事例-愛知県. 病原微生物検出情報, 31:11-12, 2010

2) 岡 智一郎, 片山和彦, 小林慎一,

飯高順子, 野田 衛: 愛知県と川崎市の食中毒事例から検出されたサポウイルスGI/2の塩基配列の比較. 病原微生物検出情報, 31:13-14, 2010

### 2. 学会発表

1) 小林慎一, 藤原範子, 安井善宏, 山下照夫, 藤浦 明, 皆川洋子: 食中毒事例から検出されたサポウイルスの遺伝子解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010.11, 徳島市

2) 藤原範子, 安達啓一, 水谷絵美, 伊藤 雅, 安井善宏, 小林慎一, 山下照夫, 藤浦 明, 皆川洋子: 愛知県におけるノロウイルスの検出状況. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010.11, 徳島市

## G. 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

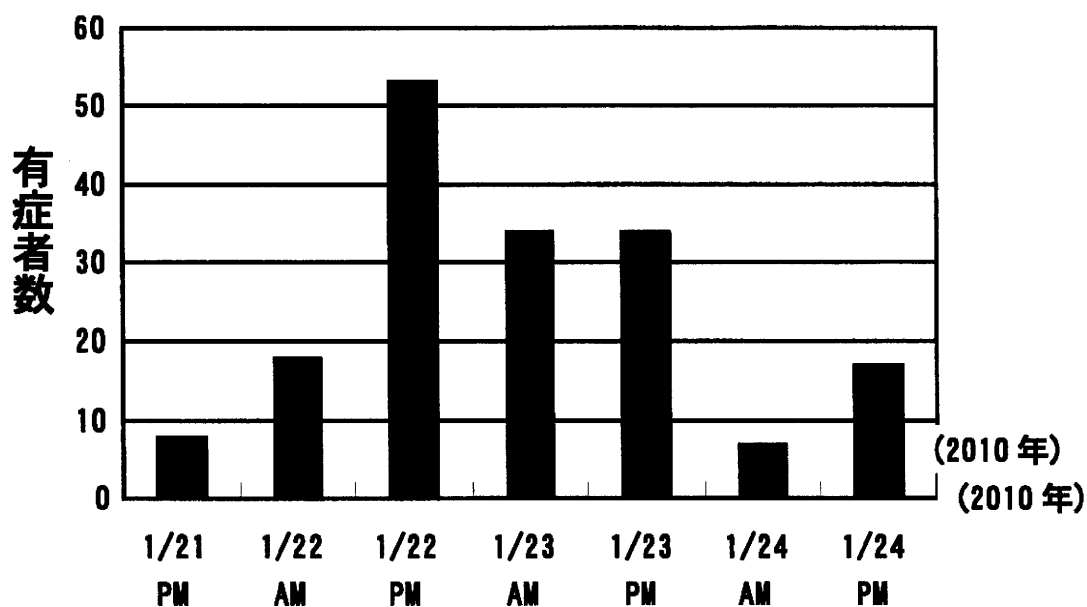


図1 有症者の日時別の発生状況

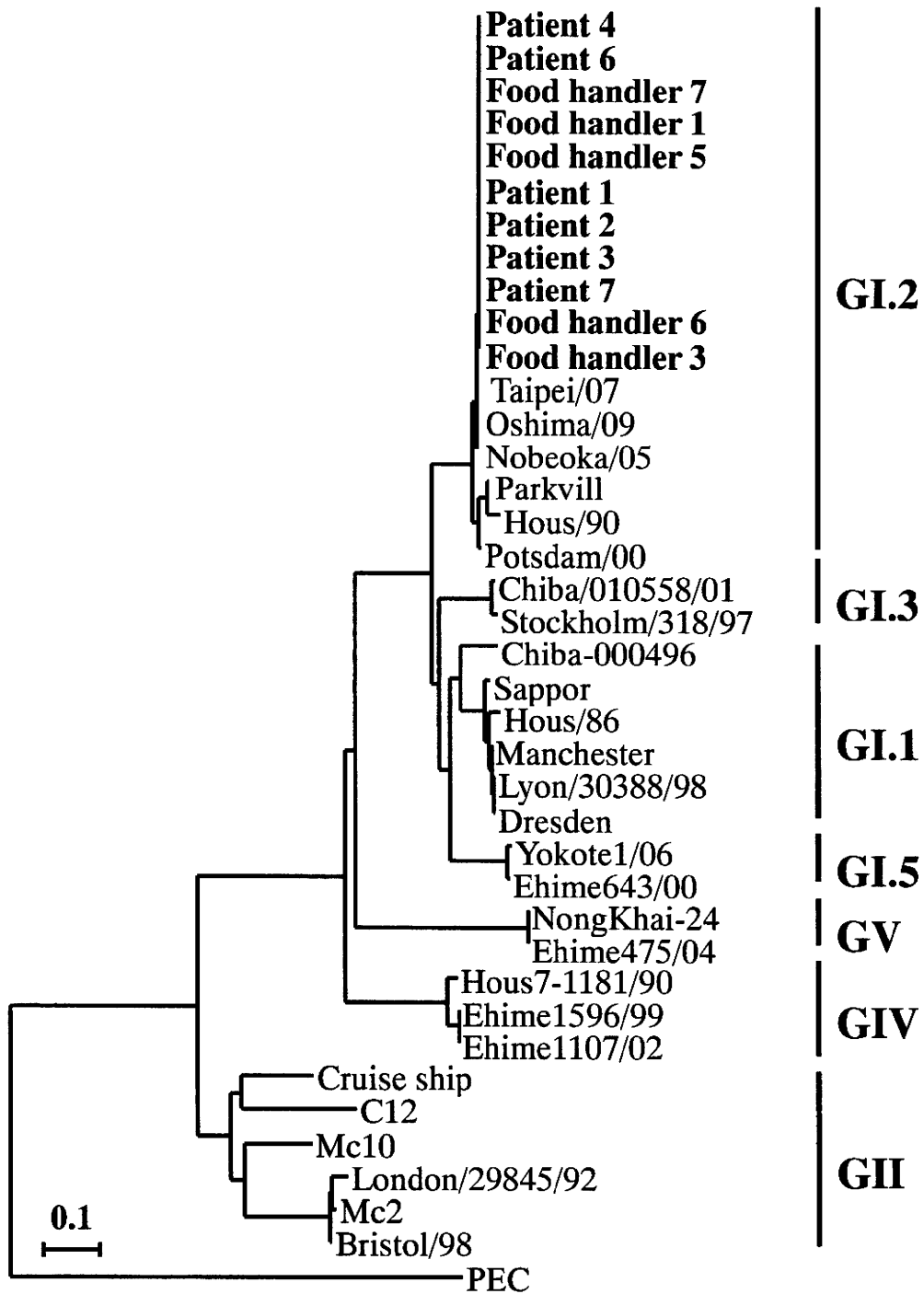


図2 サポウイルスの系統樹解析