

rpm、2時間超遠心した。沈渣に滅菌蒸留水400  $\mu$ Lを添加し測定検体とした。

## (2) RNA抽出とウイルス遺伝子検出

RNAは、QIAamp Vial RNA Mini Kit(QIAGEN)により抽出し、DNase処理後、RT反応によりcDNA合成を行った。

遺伝子検出において、リアルタイムPCR法は、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用い、ABI PRISM 7500(Applied Biosystems)で行った。RT-PCR法は、Ex Taq (Takara)を用い、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)で行った。

下水流入水中のNV、AstVおよびHAVはリアルタイムPCR法により、SV及びEVはRT-PCR法により、以下のとおり行った。

NVは、Kageyamaら(J. Clin. Microbiol. 41:1548, 2003)の方法により、NVG IはCOG1F/1Rプライマー及びRING1-TP(a)/TP(b) Taq Manプローブ、NVG IIはCOG2F/2R、ALPFプライマー及びRING2AL-TP Taq Manプローブを用いて実施した。SVは、Yanら(J. Virol. methods, 14, 37-44, 2003)の方法により、SLV5317/SLV5749 (434 bp)を用い、反応条件は熱変性94  $^{\circ}$ C 30秒、アニーリング55  $^{\circ}$ C 30秒、伸長反応72  $^{\circ}$ C 1分を1 cycleとして、35 cycleで実施した。

AstVは、Yokoiら(感染症誌. 83:120-126, 2009)の方法により、フォワードプライマーにHuAstVf2240、HuAstVf2140及びHuAstVf2239T4を、リバープライマーにHuAstVr4123を、プローブにHuAstV/1-8/TPを用いて実施した。

EVは、Ishikoら(J Infect Dis. 5:

744-754, 2002)の方法により、OL68-1/EVP2プライマーを用い、反応条件は熱変性95  $^{\circ}$ C 2分、アニーリング50  $^{\circ}$ C 30秒、伸長反応72  $^{\circ}$ C 1分を1 cycleとして、40 cycleで実施した。

HAVは、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知「A型肝炎ウイルスの検出法」(平成21年12月1日、食安監発1201第2号)により、HAV+449/HAV-557プライマーおよびHAV+482-P-FAMプローブを用いて実施した。

市販生カキ及びパック水について、NV、SV、AstV及びHAVは、RT-PCR法により以下のとおり行った。

NVは、1stPCRにCOG1F/G1SKRとCOG2F/G2SKRプライマー、2ndPCRにG1SKF/G1SKRとG2SKF/G2SKRプライマーを用いて実施した。

SV及びAstVは、Yanら(J. Virol. methods, 14, 37-44, 2003)のマルチプレックスRT-PCR法により、SVプライマーにSLV5317/SLV5749 (434 bp)を、AstVプライマーにPreCAP1/82b (719 bp)を用い、下水流入水と同様の増幅条件で実施した。

HAVは、A型肝炎ウイルスの検出法により、HAV+2799/HAV-3273 (498 bp)プライマーを用い、反応条件は熱変性94  $^{\circ}$ C 1分、アニーリング50  $^{\circ}$ C 1分、伸長反応72  $^{\circ}$ C 2分を1 cycleとして、40 cycleで実施した。

## (3) 遺伝子解析

NVについて、COG1F/G1SKRプライマーを用いてRT-PCR法により増幅した。ダイレクトシーケンス法によった。即ち、QIAquick PCR Purification Kitで精製し

た PCR 産物をオートシーケンサーABI PRISM310 (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。

解析は、Kimura(J Molecular Evolution, 16, 111-120. 1980) の two parameter 法により Clustal W でアライメント (塩基配列比較) を行い、系統樹は NJ 法 (bootstrap1000 回) により作成した。

#### (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) 下水流入水

平成 23 年 1 月～12 月に採取した下水処理施設の合流水及び分流水各 29 検体について、ウイルス遺伝子検出状況を表 1 に示した。合流水では、NVG I は 25 検体され、最小コピー数 0.2～最大コピー数 306.6 コピー数/2.5 $\mu$ L の範囲であった。NV G II は 26 検体から 0.3～98.3 コピー数/2.5 $\mu$ L 検出され、AstV は 27 検体から 0.8～1544.0 コピー数/2.5 $\mu$ L 検出された。分流水では、NVG I は 29 検体全てから検出され、検出コピー数は 0.9～1810.3 コピー数/2.5 $\mu$ L、NV G II は 29 検体全てから検出され、3.2～2621.7 コピー数/2.5 $\mu$ L であった。AstV は 29 検体から 12.6～69572.7 コピー数/2.5 $\mu$ L の範囲で検出され、SV は 1 検体検出された (図 1、2)。合流水から HAV、EV 及び SV は検出されなかった。分流水から HAV 及び EV は検出されなかった (表 2)。

合流水及び分流水から NV GI、G II が検

出された検体について、ダイレクトシーケンス法にて、Capsid 領域の遺伝子解析を実施したが、複数の遺伝子が混在しており、遺伝子型を特定することができなかった。

#### (2) 市販生食用カキ

平成 23 年 1 月～3 月に購入した生カキの中腸腺とパック内浮遊水から、NV・SV・AstV 及び HAV 遺伝子は検出されなかった。

### D. 考察

流入水中の NV は冬季に多く検出され、春から秋にかけて検出が少ない状況は、感染性胃腸炎患者報告数と同様の傾向を示した (図 3)。また、AstV について冬季は NV 及び患者数と同様の傾向を示したが、春から秋にかけて  $10^3$ ～ $10^5$  コピー数/2.5 $\mu$ L が検出され、NV ウイルス検出状況や胃腸炎患者報告数とは異なる傾向を示した。このことは、AstV は一般的に症状が軽く、嘔吐や発熱症状が少なく数日間で軽快するため、医療機関を受診しないかあるいは受診しても経過観察等胃腸炎として診断されるケースが少ないことや発生动向調査による患者報告数は小児科定点が多く、成人の患者報告数が少ないことが関与しているのではないかと推測される。また、AstV は高齢者施設での急性胃腸炎発生事例や免疫不全患者における報告がある。年間を通して、AstV が検出されていることから、高齢者施設や家庭内における感染を防ぐため注意が必要であり、患者便やその付着物等を適切な方法にて処理することが重要である。

合流水と分流水の NV GI・G II ウイルス

量を比較すると、胃腸炎患者報告数の多い冬季では、分流水の方が NV GI、GII ともに  $10\sim 10^2$  倍多く検出された。AstV については、年間を通して合流水及び分流水からウイルスが検出されており、分流水の方が  $10\sim 10^3$  倍多く検出されていた。以上のことから、合流水は、家庭排水の他に雨や雪等も含まれ、最終処理施設へ運ばれるため、天候の影響を受けやすく、患者発生状況との比較に使用するデータとしては適切ではないと考えられた。一方、分流水は、家庭排水のみであり、天候等環境影響に左右されにくいため、ウイルス濃度の変動が少なく、ウイルス発生動向を把握する科学的データとして有効であると推測された。

例年、初夏から初冬に感染症発生動向調査による患者報告数が増加する手足口病やヘルパンギーナ等の主な原因ウイルスであるエンテロウイルスやポリオウイルス株も、下水に流入していると考えられるがエンテロウイルス及びポリオウイルスは検出されなかった。今回の調査期間中、ウイルスが検出されなかった原因について、試料中にウイルスが存在しなかった、あるいは水の濃縮を含めた検出系に問題があるのか検討が必要である。

流入水は、複数の NV 遺伝子が含まれていると考えられるため、クローニングすることにより複数の NV 遺伝子を検出・解析することが重要となる。地域で発生している原因ウイルス型と比較・解析することにより、食中毒拡大防止対策の科学的根拠にすることができると考えられた。また、AstV・SV についても NV 同様に流入水のウイルス汚染実態調査を継続し、

クローニングを実施する必要がある。

平成 19 年～平成 23 年までの生カキの調査の結果、同一パック内の中腸腺から複数の NV 遺伝子が検出されたが、ダイレクトシーケンス法ではいずれも 1 個の中腸腺及び 1 パック水からは 1 種類のみ検出されていただけであった。1 個の生カキの中腸腺及びパック水から、複数の NV 遺伝子が蓄積されているとの報告があるため、クローニングすることが必要であると考えられた。今シーズンの食中毒は、特に生カキが関与していると推測される事例が多発している。また、同一事例の発症者から NV GI 及び NV GII が同時に検出されるケースが多発しており、生カキおよび発症者便の NV 遺伝子解析は発症者由来株との比較解析が可能であり、原因究明等食中毒対策の科学的手段と考えられた。

## E. 結論

合流水では、NVGI は 25 検体、NVGII は 26 検体、AstV は 27 検体から検出された。分流水では、NVGI、NVGII 及び AstV は 29 検体、SV は 1 検体検出された。合流水から HAV、EV 及び SV は検出されなかった。分流水から HAV 及び EV は検出されなかった。

生カキの中腸腺とパック内浮遊水から、NV・SV・AstV 及び HAV 遺伝子は検出されなかった。

また、流入水の NV は冬期に多く検出され、春から秋にかけて少ない状況は、感染性胃腸炎患者報告数と同様の傾向を示していた。また、AstV について冬季は NV 及び患者数と同様の検出傾向を示した。

しかし、春から秋にかけて  $10^3 \sim 10^5$  コピー数/ $2.5 \mu\text{L}$  が検出され、冬季の NV ウィルス量と同等量のウィルスが検出されていたことから、胃腸炎患者報告数とは異なる傾向を示した。

#### 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 合流水・分流水からの NVG I・GII・AstV 検出状況

(単位：コピー数/2.5 $\mu$ L)

2011年 週	GI		GII		AstV	
	合流水	分流水	合流水	分流水	合流水	分流水
1週	3.6	599.6	41.6	2488.8	8.8	1722.5
2週	9.7	1554.1	149.5	2158.8	58.0	586.4
3週	21.4	523.1	29.2	2621.7	10.4	1068.5
4週	3.2	1162.5	54.8	1545.5	96.0	1379.0
5週	33.7	413.2	10.2	1878.0	2.3	6244.1
6週	6.6	169.7	3.3	802.2	2.8	3184.4
7週	3.7	219.8	2.2	70.3	8.6	65.3
8週	17.4	71.3	42.4	180.0	20.3	215.1
9週	10.0	80.5	5.1	215.3	47.7	361.7
10週	17.9	136.4	29.6	526.9	100.8	1914.1
12週	10.0	41.1	11.2	76.1	0.8	275.4
15週	1.3	497.9	10.4	307.1	1016.3	10086.1
17週	0.0	7.5	20.3	581.6	29.3	2929.7
19週	7.2	43.5	19.0	749.9	558.2	3860.2
21週	13.8	23.8	30.6	272.9	59.2	1900.8
24週	0.2	157.1	55.6	202.3	1146.5	8228.2
26週	12.0	17.9	14.6	1196.5	313.0	32917.8
28週	1.3	7.5	2.6	48.7	94.9	3474.9
30週	2.5	2.2	6.5	155.1	1544.0	6819.7
32週	5.0	0.9	7.7	20.9	134.2	2627.2
34週	0.0	2.3	0.3	3.2	22.3	21303.9
37週	0.0	15.7	0.0	3.9	0.0	12.6
39週	1.2	10.5	0.0	135.8	4.6	301.5
41週	25.5	2.0	0.0	30.8	162.8	208.3
43週	0.3	2.1	1.5	15.2	0.0	543.1
46週	0.0	42.9	9.9	207.0	49.5	3155.4
48週	21.8	1150.2	13.2	786.8	25.8	69572.7
50週	306.6	1810.3	98.3	933.7	243.2	20288.7
52週	27.4	1752.2	95.9	2250.5	369.8	25330.4

表2 合流水・分流水からのHAV、SV、EV検出状況

(単位：HAV：コピー数/5 $\mu$ L)

2011年 週	HAV (リアルタイム PCR)		SV (RT-PCR)		EV (RT-PCR)	
	合流水	分流水	合流水	分流水	合流水	分流水
1週	0.0	0.0	-	-	-	-
2週	0.0	0.0	-	-	-	-
3週	0.0	0.0	-	-	-	-
4週	0.0	0.0	-	-	-	-
5週	0.0	0.0	-	-	-	-
6週	0.0	0.0	-	-	-	-
7週	0.0	0.0	-	-	-	-
8週	0.0	0.0	-	-	-	-
9週	0.0	0.0	-	-	-	-
10週	0.0	0.0	-	-	-	-
12週	0.0	0.0	-	-	-	-
15週	0.0	0.0	-	-	-	-
17週	0.0	0.0	-	-	-	-
19週	0.0	0.0	-	-	-	-
21週	0.0	0.0	-	-	-	-
24週	0.0	0.0	-	-	-	-
26週	0.0	0.0	-	-	-	-
28週	0.0	0.0	-	-	-	-
30週	0.0	0.0	-	-	-	-
32週	0.0	0.0	-	-	-	-
34週	0.0	0.0	-	-	-	-
37週	0.0	0.0	-	-	-	-
39週	0.0	0.0	-	-	-	-
41週	0.0	0.0	-	-	-	-
43週	0.0	0.0	-	-	-	-
46週	0.0	0.0	-	-	-	-
48週	0.0	0.0	-	+	-	-
50週	0.0	0.0	-	-	-	-
52週	0.0	0.0	-	-	-	-

＋：陽性、－：陰性

コピー数/2.5  $\mu$ L

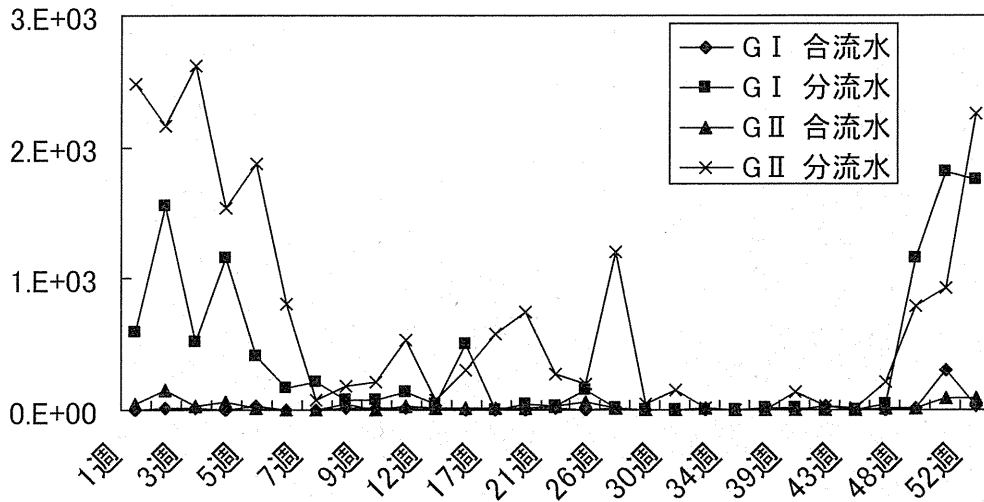


図1 合流水・分流水からの NVG I・G II の検出状況

コピー数/2.5  $\mu$ L

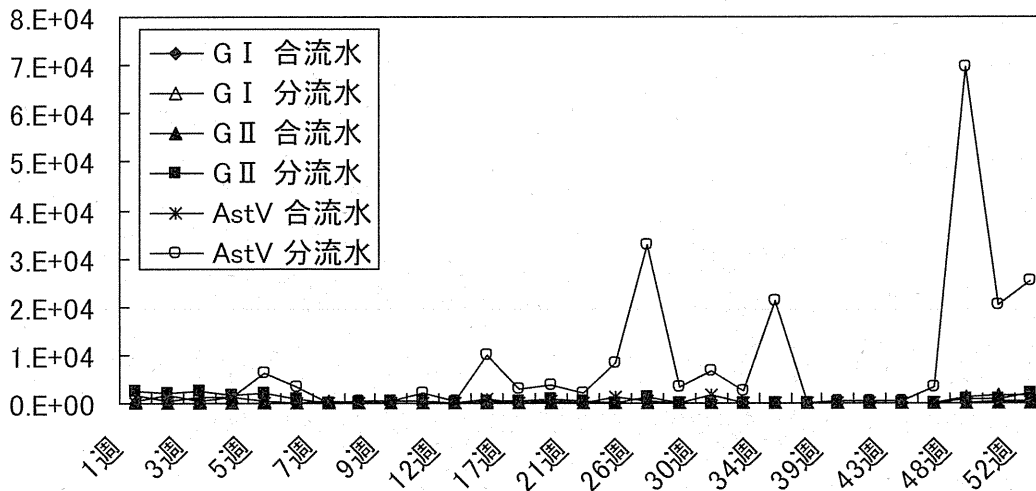


図2 合流水・分流水からの NVG I・G II・AstV の検出状況

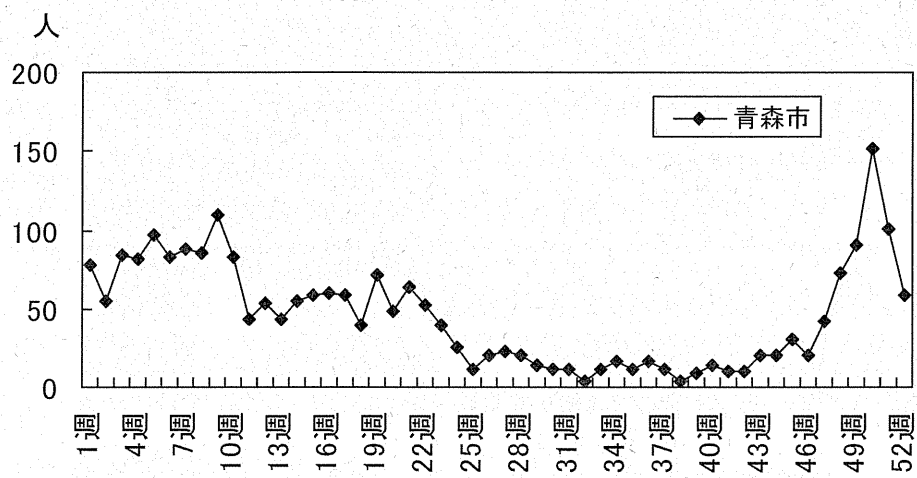


図3 感染性胃腸炎患者報告数（青森市内）



平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の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

## 富山県におけるノロウイルス・サポウイルス検出状況

研究協力者	名古屋 (小原) 真弓	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	板持 (岩井) 雅恵	富山県衛生研究所
研究協力者	堀元 栄詞	富山県衛生研究所
研究協力者	小淵 正次	富山県衛生研究所
研究協力者	滝澤 剛則	富山県衛生研究所

### 研究要旨

富山県におけるノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) の浸淫状況を調査するため、感染性胃腸炎患者、下水流入水、岩ガキからウイルスを検出した。患者からは、NoV GII. 4、GII. 2、GII. 13 が比較的多く検出された。下水流入水からは、NoV GII. 4、GII. 2、GI. 1、SaV GI. 1、GI. 2 などが検出された。岩ガキ 18 検体中、5 月、6 月の 2 検体から NoV GII. 2 が検出された。2011 年の NoV は例年と同様に NoV GII. 4 が主体であったが、6 月には NoV GII. 2 型が患者、下水、岩ガキの全てから検出され、この時期の流行型であると考えられた。

2003 年以降の NoV GII. 3 についてキメラウイルスの有無を調べたところ、GII. 10 または GII. 12-GII. 3 と GI Ib-GII. 3 の 2 つのタイプの組み換え NoV が主に流行していた。これらのキメラウイルスは GII. 3 が流行した 2005/06、2009/10 シーズンの主流であったと考えられた。

#### A. 研究目的

昨年度は、胃腸炎患者や下水流入水からノロウイルス (NoV)・サポウイルス (SaV) を検出し、患者での流行型、不顕性感染を含めた地域の流行状況を把握した。今年度も同様に調査することで、今年度の流行状況を把握するとともに、岩ガキからも NoV 遺伝子の検出を試み、岩ガキによるウイルス性食中毒のリスクを推測することを目的とした。

また、通常国内では NoV の capsid 領域 (ORF2) をもとに型別が行われているが、近年、NoV が ORF1 と ORF2 の間で高頻度に組み換えを起こすことが知られているため、年により流行・非流行のある NoV GII. 3 を対象に NoV 遺伝子の組み換え型 (キメラウイルス) を検出し、流行に与える影響を推測することとした。

#### B. 研究方法

### 1. 2011年の患者検体

富山県において2011年1月から12月に発生した食中毒、感染性胃腸炎（集団発生例及び小児散発例）から得られた糞便を用いた。検体採取は管轄の厚生センター、保健所が行った。

糞便検体の10%乳剤上清から、厚生労働省通知（食安監発115001号）に基づきRNAを抽出し、DNase処理、逆転写反応及びPCRを行った。NoVのPCRには、ポリメラーゼ領域3'末端からカプシド領域を対象としたG1-SKF/G1-SKR、G2-SKF/G2-SKRを用いた。SaVの検出には、カプシド領域を対象としたプライマーSV-F11/SV-R1及びSV-F2/SV-R2によるnested PCR(Okada et al., Arch. Virol., 147: 1445-1451, 2002)を用いた。PCR産物から、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。

### 2. 下水流入水

県西部に位置する下水処理場において、2011年1月から12月の毎月1回下水流入水1リットルを採取した。

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。また、PEG沈殿法により250倍濃縮下水検体も調整した。濃縮下水検体から、ヒト検体と同様にRNA抽出、DNase処理、逆転写反応、PCRを行った。

### 3. 岩ガキ

2011年4月から6月までの毎月2回、富山県の3漁港で採取した岩ガキ54個を用いた。

岩ガキは中腸腺を取り出したあと、同一ロット3個分を1検体としてPBS(-)にて10%乳剤にした。 $\alpha$ -アミラーゼを加えて37°C1時間消化したのち、遠心上清を12%PEG6000及び5.8%NaClにて凝集させ遠心した。0.5% Zwittergent加PBS(-)にて沈殿を再浮遊させ、濃縮カキ検体とした。

濃縮カキ検体から、ヒト検体と同様にRNA抽出、DNase処理、逆転写反応を行った。NoVの検出には、ポリメラーゼ領域3'末端からカプシド領域を対象としたプライマーCOG1F/G1-SKR、COG2F/G2-SKRを用いたのち、G1-SKF/G1-SKR、G2-SKF/G2-SKRを用いてSemi-nested PCRを行った。SaVの検出は、ヒト検体と同様に行った。PCR産物から、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。

### 4. NoV GII/3 キメラウイルスの検出

2003~2010年に富山県で得られたNoV GII/3陽性の患者糞便検体cDNA41検体を用い、ORF1/ORF2ジャンクション領域を対象としたプライマー1421f/NV2oR及び1364f/G2-SKR(Nakamura et al., Jpn J. Infect. Dis., 62: 394-398, 2009)を用いたnested PCRを行った。塩基配列を決定し、ポリメラーゼ領域(ORF1の3'末端側)の499bpとカプシド領域(ORF2)の282bpをそれぞれ型別した。

(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. 患者からの NoV、SaV 検出状況

ウイルス性感染性胃腸炎及び食中毒等の集団発生は 11 事例あり (表 1)、事例数としては昨年度 24 事例に比べ少なかった。全て NoV が検出されたが、1 事例からは SaV も検出された。11 事例中食中毒事例は 2 事例あり、有症苦情は 6 事例であった。2 事例はカキ (2 月に生ガキ、10 月にカキフライ) を喫食していた。

小児散発例からは、24 例中 6 例より NoV が、3 例より SaV が検出された (表 2)。

### 2. 患者、下水流入水、岩ガキから検出された NoV 及び SaV の型別

患者からは NoV GII. 4、GII. 2、GII. 13、GII. 12、SaV GI. 2、GII. 3 などが検出された。(表 1、2)。下水流入水からは、NoV GII. 4、GII. 2、GI. 1、SaV GI. 1、GI. 2 などが検出された (表 3)。岩ガキは、5 月と 6 月の計 2 検体から NoV GII. 2 が検出され、SaV は検出されなかった。

### 3. 検出された NoV の比較

得られた NoV の塩基配列を用いた系統樹を図 1~3 に示す。NoV GI には下水と患者で共通の遺伝子型はなかった (図 1)。患者由来の GII. 2 と、下水由来の GII. 2 のうち 1 株、岩ガキの GII. 2 は非常に近縁であり、採取時期は主に 6 月であった (図 2)。GII. 12 は患者と下水から検出され、両者の相同性は 98.2~98.6% であった。GII. 4 は下水も患者も主に 2006b 亜型 (Nijmegen115/2006/NL と近縁) と 2009a 亜型 (New Orleans1805/2009/USA と近縁) に分けられた (図 3)。

### 4. キメラウイルスの解析

カプシド領域で GII. 3 と分類された NoV のうち、2003 年から 2010 年までの集団発生事例 14 事例と小児散発例 10 例から塩基配列が得られた。ポリメラーゼ領域でも GII. 3 と分類されたのは 2004 年の 1 例のみであった (図 4)。12 例は GIIb とのキメラで、そのうち 7 例は 2009/10 シーズンに検出された。11 例は GII. 10 もしくは GII. 12 とのキメラで、そのうち 8 例は 2005/06 シーズンに検出された。

## D. 考察

患者からも下水からも、例年通り NoV GII. 4 の検出が最も多かった。さらに、系統樹解析により、GII. 4 の亜型について検討したところ、2006/2007 シーズンの NoV 大流行の主流となり 2010 年も大部分を占めていた 2006b 亜型は、1~3 月に流行したものの、それ以降には検出されなかった。一方、2009a 亜型は 2011 年 2 月、10 月、12 月と 2 シーズンにまたがるように検出された。以上のことから、2011 年の NoV GII. 4 の流行は 2006b 亜型が主流であったが、徐々に 2009a 亜型に置き換わりつつある傾向を示した。

前年の調査で下水からの検出頻度が多かった NoV GI. 4 は、2011 年は 5 月に 1 回検出されたのみであった。これまでの調査 (Iwai et al., Appl Environ Microbiol 75:1264-1270, 2009) でも下水からは NoV GI. 4 が多く検出されていたが、2011 年は何らかの理由により環境から NoV GI. 4 が減少したと考えられる。

NoV GII. 2 は、2010 年 1~6 月に患者から、4 月、6 月に下水から検出されたが、

2011年は主に6月に集中して検出された。岩ガキからも検出されたことから、ヒト、環境、岩ガキの中で循環していたと考えられる。しかしながら、7月以降全く検出されなくなった原因は不明である。他に、GII.13、GII.12も一時的な流行があったと考えられた。

生ガキの喫食による集団発生事例の患者からSaVが検出され、SaVはカキによる食中毒の原因になりうると考えられた。この事例では他にNoV GI.11やGII.13も検出されたことから、多様なウイルスがカキの中に蓄積されており、カキの個体差やヒト側の感受性の差などで主に増殖するウイルスの存在が示唆された。

今回、富山県産の岩ガキからNoVが検出された。岩ガキの出荷時期は春から夏であり、NoVの流行時期である冬とはずれているものの、NoVを蓄積していることが確認された。また、岩ガキは真ガキよりも生で食べる人が多い食材である。2011年に県内で岩ガキによる食中毒事例は報告がなかったが、6月に他自治体で富山県産の生岩ガキを原因とする食中毒事例が発生したとの情報があり、今回調査でNoV陽性となった時期と一致していた。従って、岩ガキの生食には感染リスクが伴うことが改めて示唆された。

例年、富山県ではNoV GII.4が流行株であるが、2005/06、2009/10シーズンには比較的GII.3が流行した。そこで今回、2003年以降のNoV GII.3を調べたところ、主にGII.10またはGII.12、GIIBとの2つのタイプのキメラウイルスである事が判明した。キメラウイルスはGII.3が流行した2005/06、2009/10シーズンの主流

なウイルスであったと考えられた。

## E. 結論

2011年のノロウイルス流行型は例年通りGII.4であったが、2011年6月にはGII/2が患者、下水、岩ガキの全てから検出され、この時期の流行型であったと考えられた。岩ガキからNoVが検出され、生食による感染リスクが示唆された。

2003年以降、NoVのGII.3型はキメラウイルスがほとんどであったことが判明した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

Mayumi Obara, Masae Iwai, Masatsugu Obuchi, Eiji Horimoto, Takeshi Kurata, Takenori Takizawa . Recombinant noroviruses of GII/3 prevalent from 2003 to 2010 in Toyama prefecture, Japan. XV International Congress of Virology, September 2011, Sapporo

## 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

## H. 謝辞

調査に協力いただいた富山市保健所、各厚生センター、富山県生活衛生課、健康課の関係各位に深謝いたします。

表1. 集団発生事例からのノロウイルス及びサポウイルス検出状況

ウイルス		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	計
ノロ	GI.13			1										1
	GII.2						1							1
	GII.4	1	1										2	4
	GII.12										1		1	2
	GII.13		1	1										2
混合	ノロGI.11+GII.13+サポGI.2		1											1
計		1	3	2	0	0	1	0	0	0	1	0	3	11

(数値：事例数)

○はカキ関連事例

表2. 小児散発例からのノロウイルス及びサポウイルス検出状況

ウイルス		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	計
ノロ	GII.2						2							2
	GII.4	2		1									1	4
サポ	GI.2						1							1
	GII.3		1				1							2
計		2	1	1	0	0	4	0	0	0	0	0	1	9

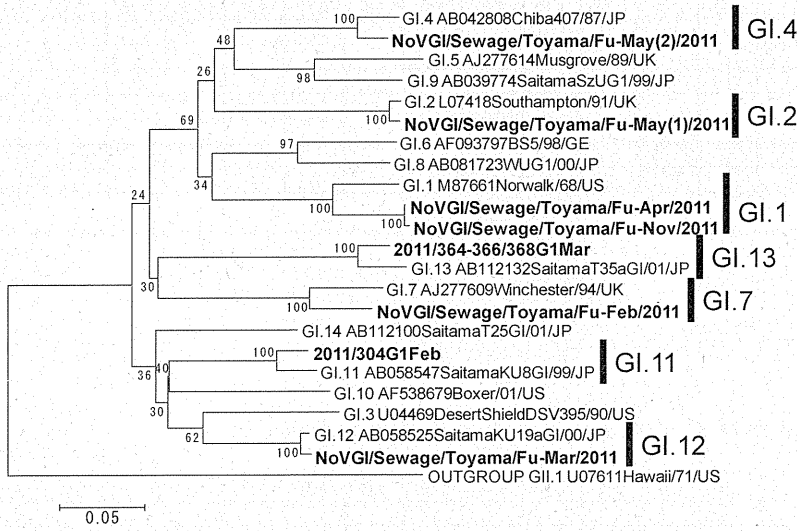
(数値：検体数)

表3. 下水流入水におけるノロウイルス及びサポウイルス検出状況

ウイルス		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.1												
	GI.2												
	GI.4												
	GI.7												
	GI.12												
	GII.2												
	GII.4												
	GII.12												
サポ	GI.1												
	GI.2												

ウイルスが検出された月を灰色で示した。

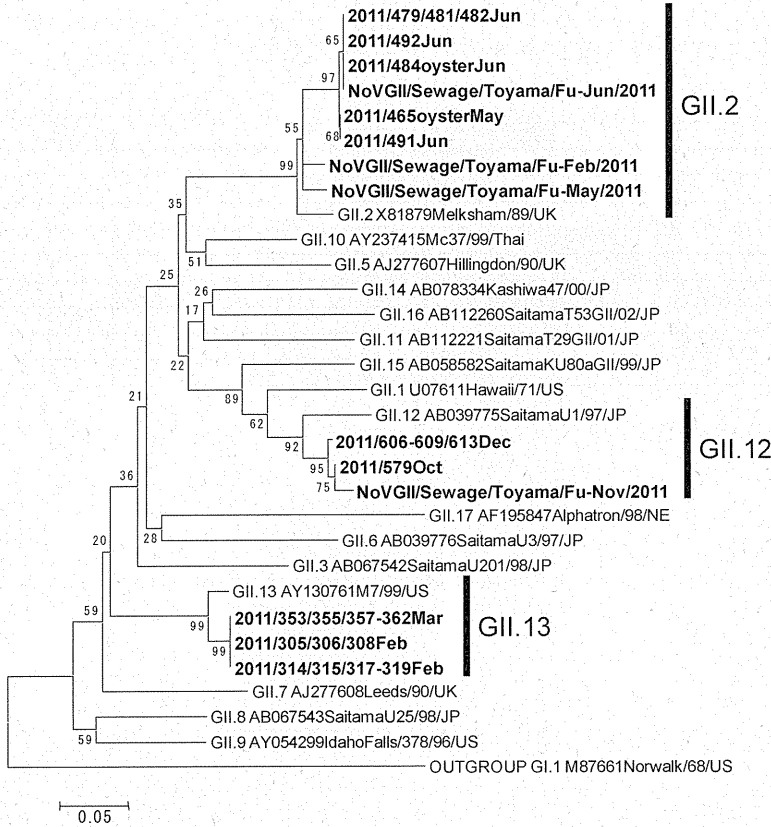
図 1. ノロウイルス GI の系統樹



太字は今回得られたウイルスを示し、その他は参考株を示す。

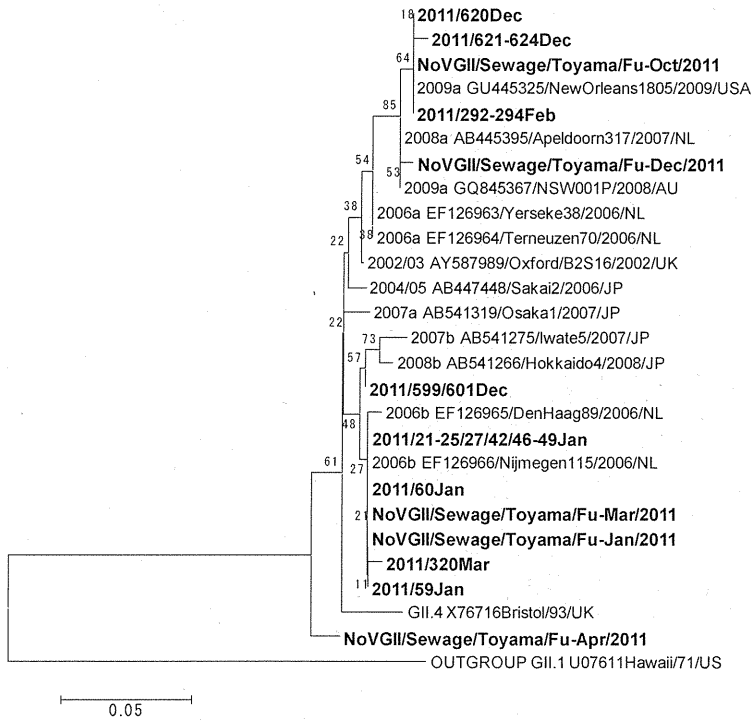
太字のうち Sewage は下水流入水から、それ以外は患者から検出されたウイルスを示す。

図 2. ノロウイルス GII の系統樹 (GII.4 除く)



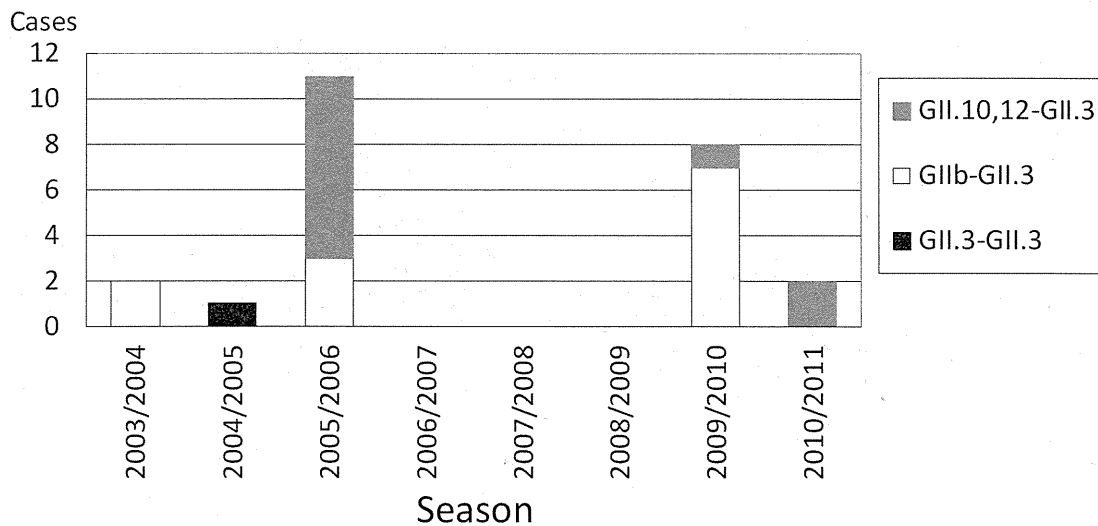
oyster は岩ガキから得られたウイルスを示す。それ以外は図 1 と同じ。

図 3. ノロウイルス GII.4 の系統樹



株名については図 1、2 と同じ。

図 4. ノロウイルス GII.3 キメラウイルスのシーズンごとの変化



## 環境と臨床検体からみた下痢症ウイルスの動態

研究協力者	内野 清子	堺市衛生研究所
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所

### 研究要旨

2011 年 1 月から 12 月にかけて、堺市内の散発・集団発生の感染性胃腸炎由来の臨床検体および下水由来の環境検体からノロウイルス (NV) および食中毒の起因ウイルスとなり得るサポウイルス (SaV)、アストロウイルス (AsV)、アイチウイルス (AiV) の検出を実施した。NV の集団・散発発生は遺伝子型に偏りはなく多様であったが、散発発生では GII. 4 が最も多く (64%)、環境検体からも GII. 4 が高頻度に検出された。検出された遺伝子型は臨床検体では GI. 2, 4, 8、GII. 2, 3, 4, 12, 13、計 8 種類、環境検体では GI. 1, 2, 3, 4, 7, 11, 13, 14、GII. 2, 3, 4, 6, 11, 12, 13, 17 計 16 種類であった。この結果から GI が 9、GII が 8、計 17 種類の遺伝子型 NV の浸入・暴露が推測された。

SaV 感染では食中毒事例および散発例で SaV G1 が各 1 事例のみの検出であったが、環境検体から SaV G1 が高頻度に検出された。AsV、AiV 感染では臨床検体からの遺伝子の検出はみられなかったが、環境検体では両ウイルスとも高頻度に検出された。特に AiV は通年的にどの定点からも検出された。

臨床と環境の両面から下痢症ウイルス感染をみると、臨床症状として表面化しない多様な下痢症ウイルスの浸淫が示唆された。

### A. 研究目的

下痢症ウイルス感染は散発・集団発生として表面化するばかりでなく、不顕性感染等も存在するため全体像を広く捕らえることは難しい。

堺市内の散発・集団発生の感染性胃腸炎由来の臨床検体と下水由来の環境検体の両面から NV を含め食中毒の起因ウイルスとなり得る下痢症ウイルスの検出を試み、感染性胃腸炎の全体像を把握する一

助とすることを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

期間：2011 年 1 月から 12 月

臨床検体：集団発生 11 事例から得られた NV 10 株、SaV 1 株と散発発生の感染性胃腸炎患者便 40 検体を用いた。

環境検体：堺市内の下水処理場 3 定点(図 1) の流入水および放流水各 2000ml を毎



月採取した流入水 36、放流水 36、計 72 検体を用いた。

## 2. 方法

臨床検体：便検体は 10%乳剤とし、RNA 抽出後、マニュアル(国立感染症研究所下痢症ウイルス検出マニュアル)に準じ、NV、SaV、AsV、AiV のウイルス遺伝子をそれぞれ検出した。NV 陽性株は、NV 遺伝子 Capsid 領域の 5' 側約 282bp の塩基配列を決定し、系統樹解析により遺伝子型を判定した。SaV 陽性株は、Okada らの方法(Okada, Arch Virol, 151:2006)に従い SaV 遺伝子型別を行った。

環境検体：採取した 2,000ml の水は粗遠心後、上清 1,000ml を分取し、HCl で pH3.5 に調整後、HA フィルター(450 $\mu$ m)でウイルスを吸着濾過、フィルターを細断後、2.0ml の pH10.5 グリシン buffer で溶出し、HCl で pH6.5 に再調整しサンプルとした。サンプルから Qiamp viral mini RNA キットにて RNA 抽出、ABI PRISM 7900 で、GI および GII のリアルタイム PCR を測定し(国立感染症研究所下痢症ウイルス検出マニュアル)、採取水 1ml 当たりのコピー数を算出した。

NV 遺伝子型別は Capsid 領域を増幅し、TA クローニンベクターに挿入し、判定した。また、SaV、AsV、AiV のウイルス遺伝子も同マニュアルに準じて検出した。

(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. 2011 年 1 月から 12 月かけて、感染

性胃腸炎の患者発生は少なく低流行であった(図 2)。

集団発生数は 11 事例と少なく、原因 NV 遺伝子型に偏りはなく多様であった。散発発生数は 11 例で、検出されたウイルスは GII.4 が 7 例と最も多く 64%を占めた(図 3)。

臨床検体全体では GI.2, 4, 8、GII.2, 3, 4, 12, 13、計 8 種類が検出された。

2. 2011 年の環境検体の NV リアルタイム PCR 測定結果では、GI および GII ともに感染性胃腸炎流行にほぼ呼応して増減がみられ、NV 遺伝子コピー数は、GI よりも GII の方が高い測定値であった(図 4)。遺伝子型別では GII.4 がどの定点からも最も高頻度に検出された。

環境検体全体では

GI. 1, 2, 3, 4, 7, 11, 13, 14、

GII. 2, 3, 4, 6, 11, 12, 13, 17

計 16 種類が検出された(図 5)。

3. 当市全体では少なくとも

GI では GI.1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 13, 14 の 9 遺伝子型、GII では GII.2, 3, 4, 6, 11, 12, 13, 17 の 8 種類、計 17 種類の遺伝子型を持つ NV の浸淫・暴露が推測された。

4. NV 遺伝子塩基配列の解析では、同時期に臨床検体から検出された NV 遺伝子と相同性の高いウイルスが環境水からも検出された(図 6、7)。

5. SaV を原因とする食中毒が 3 月に 1 事例発生し、遺伝子型別では G1 であった。散発例では 4 月に 1 例のみ検出され、遺伝子型は G1 であった。環境検

体からは2、4、8月を除いて検出がみられ、G1が高頻度に検出された(図3,8)。

6. 臨床検体からのAsV、AiV遺伝子検出はなかったが、環境検体では両ウイルスとも高頻度に検出された。特にAiVはどの定点からも通年的に継続して検出された(図3,8)。

#### D. 考察

2011年の堺市における下痢症ウイルス感染の実態を臨床と環境検体の両面から解析した。

NV感染では臨床検体から8種類、環境検体から計16種類のNV遺伝子が検出され、堺市全体では少なくとも17種類の多様な遺伝子型のNVの浸入・暴露が認められ、且つ、GII.4が流行の主流であったことが推測された。また、同時期に臨床検体から検出されたNV遺伝子と相同性の高いウイルスが環境検体からも検出され、NV感染症と環境汚染は関連性の深いことが示唆された。

SaV感染では食中毒および散発例から各1事例のみ検出され、遺伝子型は各事例ともG1であったが、環境検体からはG1が頻度高く検出され、感染症として表面化しないウイルスの浸淫があることやG1が流行の主流であったことが推測された。

AsV、AiVは臨床検体からの検出はなかったが、環境検体からは頻度高く検出され、NVやSaVと同様、感染症として表面化しないウイルスの浸淫があることが示唆された。

#### E. 結論

2011年の堺市における下痢症ウイルス感染の実態を臨床と環境の両面から調査したところ、臨床症状として表面化しない下痢症ウイルスの浸淫状況があることが示唆された。ウイルス性胃腸炎の全体像を把握し、感染予防に役立てるために本調査研究は継続する意義がある。

#### 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

図1. 堺市下水処理場定点(B~D)

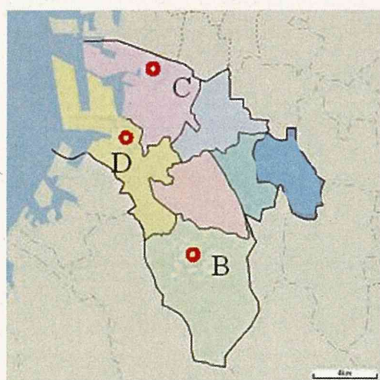
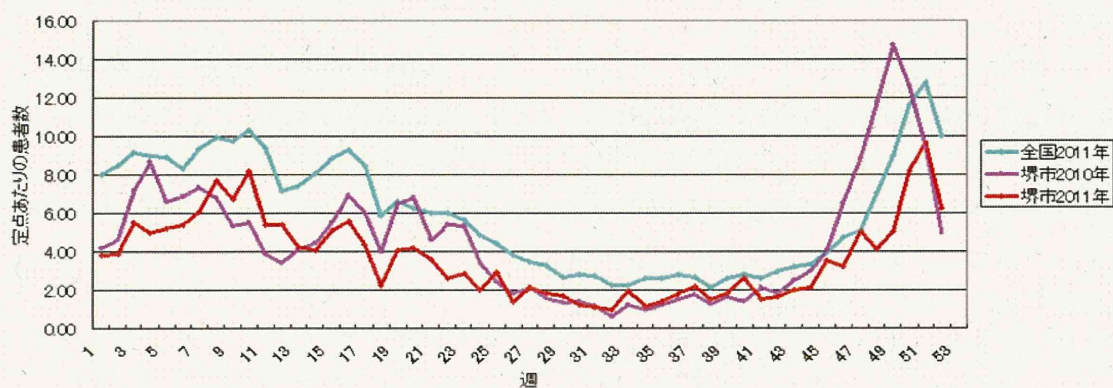


図2. 感染症動向調査における感染性胃腸炎患者発生状況



国立感染症研究所 感染症情報センター  
堺市感染症情報センター

図3. 臨床検体NV遺伝子型別結果(2009年1月～2011年12月)

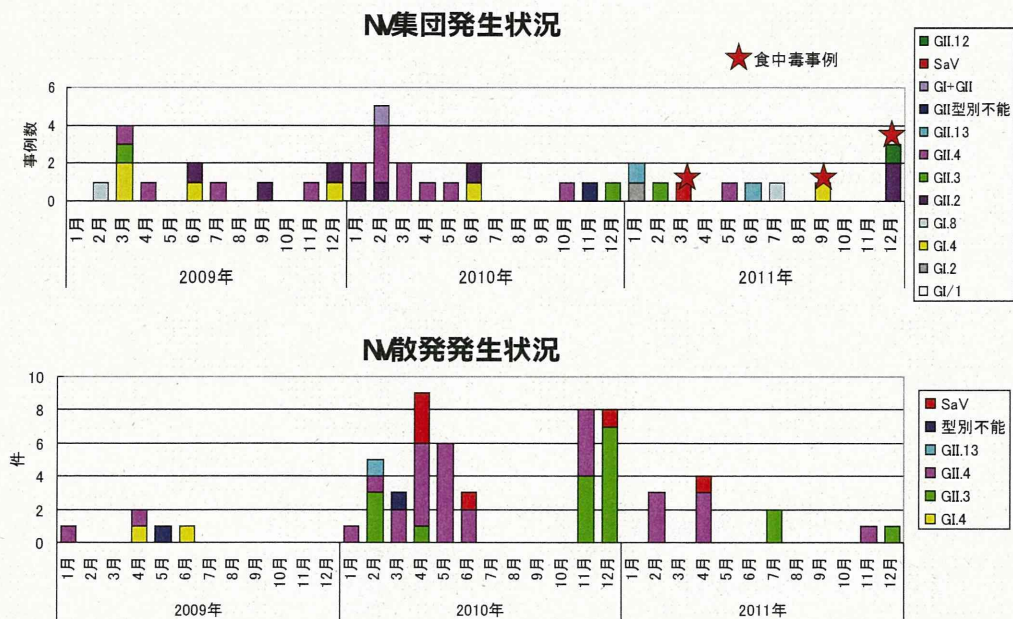


図4. 堺市下水処理場定点N測定結果(2009年1月～2011年12月)

