

図5. 環境水から検出されたノロウイルス遺伝子型  
(2011年1~12月)

	B下水処理場	C下水処理場	D下水処理場
1月	GI.2 GII.4 GII.6	GI.4 GII.4	GI.4 GII.4 GII.6
2月	GI.1 GI.2 GII.3 GII.4 GII.13	GI.1 GII.4 GII.12	GI.1 GII.3 GII.4 GII.12
3月	GI.1 GI.11 GII.3 GII.4 GII.13	GI.2 GI.3 GI.7 GI.13 GII.3 GII.4 GII.12	GI.1 GI.11 GII.3 GII.4 GII.11 GII.12. GII.13
4月	GII.2 GII.4 GII.13	GI.14 GII.4	GI.4 GII.2 GII.4 GII.13
5月		GII.2 GII.4	GI.4
6月		GII.2 GII.4 GII.6 GII.17	
7月	GII.2		
11月		GII.4 GII.6	GI.1 GII.6

図6. NV GII.4 系統樹

普通字体: 臨床検体

斜体: 環境検体

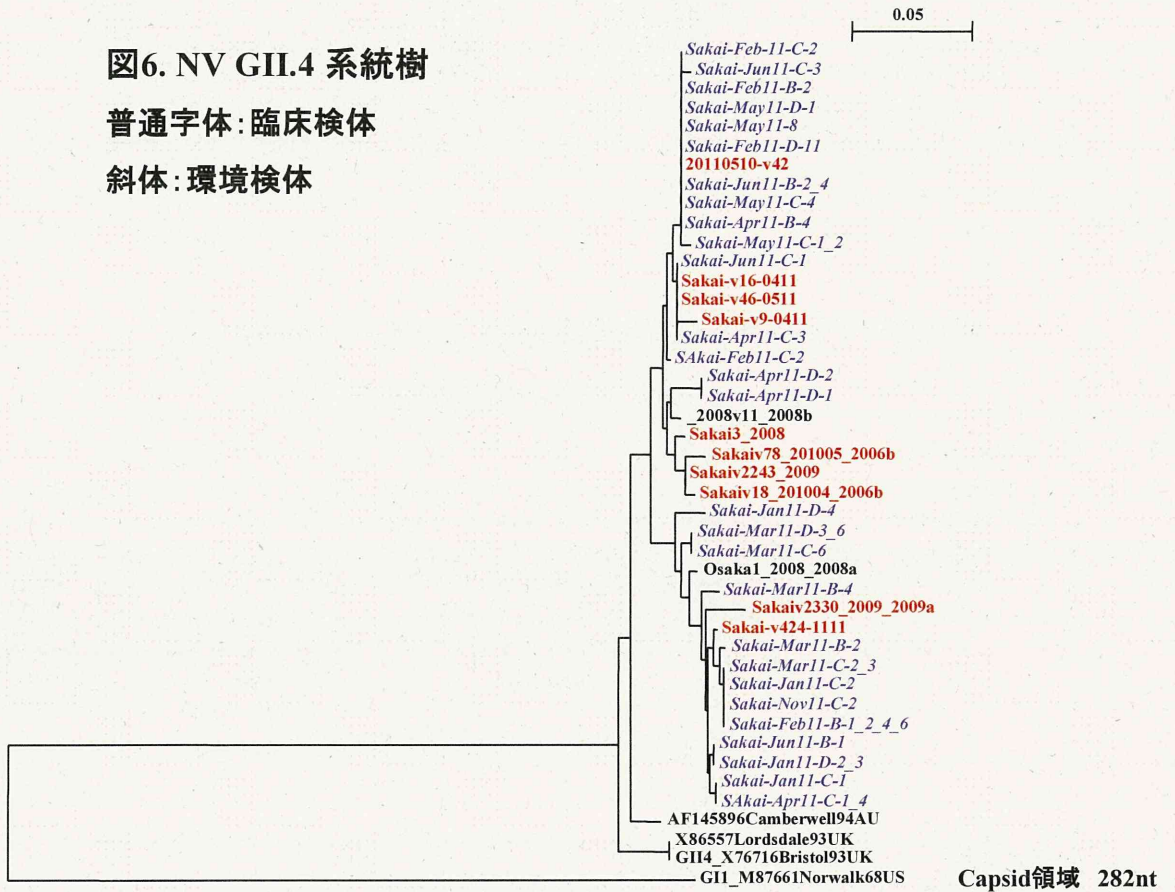


図7. NV GI.4 系統樹

普通字体: 臨床検体

斜体: 環境検体

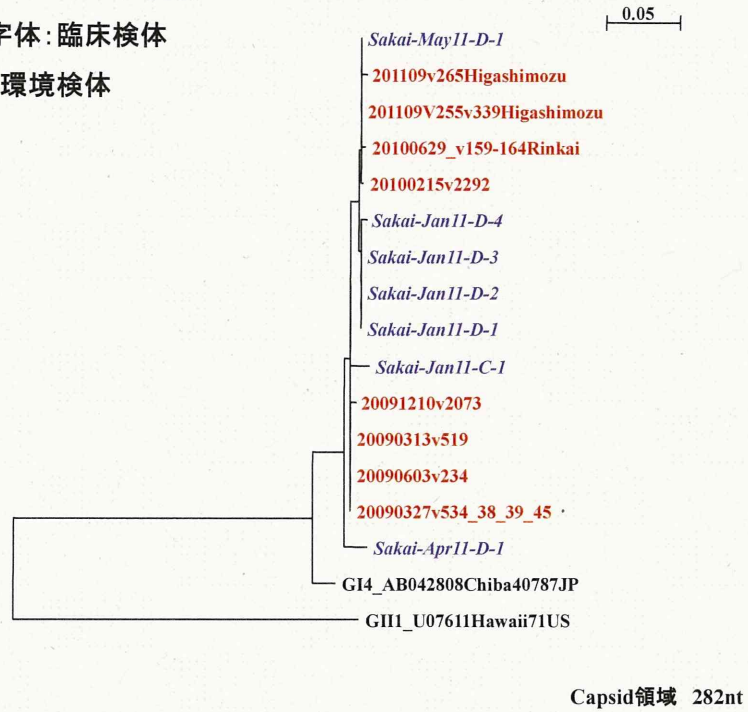


図8. SaV AsV AiV検出状況(2011年1~12月)

ウイルス	下水定点	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
SaV	B	G1 G2		G1		G1 G2	G1	G1 G2		G1		G1	
	C	G2				G1	G1	G2			G1	G1	
	D	G1 G2 G5				G1	G1 G2	G1 G2				G1	
AsV	B	[Green bar]											
	C	[Green bar]											
	D	[Green bar]											
AiV	B	[Blue bar]											
	C	[Blue bar]											
	D	[Blue bar]											

12月検査中

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

佐賀県における下水中の下痢症ウイルス検出状況

研究協力者 増本 久人、南 亮仁、野田 日登美、江口 正宏、  
古川 義朗、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

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汚染実態に注視し、2006年9月から2010年12月まで下水処理施設1定点の流入水中に含まれる下痢症ウイルス遺伝子の検出動向について経時的に調査してきた。さらに、2011年1月から12月まで継続調査を行ったので既報と併せて報告する。今回、下水中から検出した下痢症ウイルスの遺伝子は41件でノロウイルス (NoV) 21件と最も多く、次いでサポウイルス (SaV) 11件、アストロウイルス (AsV) 7件、アイチウイルス (AiV) 2件であった。特に今回はサポウイルス (SaV) の検出系プライマーなどを改変した結果、高感度にSaVが検出され良好な結果が得られた。また、月別の検出状況では、季節的な変動を示すものの、ほぼ年間を通して種々の下痢症ウイルスが混在している検出状況であった。これはヒトの生活環境内に病原ウイルスがかなりの割合で浸淫していることが推察された。

A. 研究目的

食中毒・感染症の病原体として下痢症ウイルスが関与し、散発および集団発生として年間を通して感染者が報告されている。この状況から、下痢症ウイルスに罹患した有症者や不顕性感染者が排泄する糞便等の汚物が下水汚染をしている状況に注視し、2006年9月から2008年12月と2010年6月から12月までの調査結果は既報のとおりであった。継続調査と

して2011年1月から12月までの下水処理施設における流入水を毎月1回採取し、下痢症ウイルスについて経時的な検出調査を行い、年間を通した下水中の病原ウイルスの汚染実態と分子疫学的な解析調査を行った。また、既報と合わせて検出ウイルスの動向分析も行った。

B. 研究方法

1. 材料

2011年1月から12月まで毎月1回、下水処理施設1定点における流入水を採水し調査材料とした。

## 2. 各病原体ウイルス遺伝子検出法

採水した流入水約100mlを分取し粗遠心処理後、アミコンウルトラ-30K（ミリポア社製）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NoVの他、AsV、SaV、AiVの他にA型肝炎ウイルス（HAV）などのウイルス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、PCR検査などを行った。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。

なお、今回は既報におけるSaVの検出率が低いことからSaV検出法を北島らの方法（Appl. Environ. Microbiol., 2010）に改め、2010年6月から2011年12月までの19検体についてSaVのRT-PCR法による検出を試みた。

リアルタイムPCR法については、NoVの検出系であるCOG1F/1R、COG2F/2R系プライマーとTaqMan Probeを用い7500 Fast（ABI）でNoVのコピー数を定量測定した。

## C. 研究結果

### 1. 2011年のウイルス検出状況（表1）

2011年1月から12月まで毎月1回採水の12検体の下水流入水から検出した下痢

症ウイルスは41件であった。その内訳は、NoV21件（51.2%）と最も多く、次いでSaV11件（26.8%）、AsV7件（17.1%）、AiV2件（4.9%）を検出した。

NoVは21件中、GIは10件で、GI/1型1件、3型3件、7型1件、8型3件、14型1件の5種類と不明型1件を検出した。GIIは11件で、GII/1型1件、2型2件、3型4件、4型3件、18型1件の5種類の亜型を検出した。

SaVは11件中、GI/1型6件、GI/2型4件、GV型1件の3種類の亜型を検出した。

AsVは7件中、1a型6件、3型1件の2種類の亜型を検出した。

AiVはA型2件を検出した。

### 2. 2011年NoVの定量測定結果

（表1）（図1、2）

2011年1月から12月まで毎月1回、採水12検体のNoVリアルタイムPCR法における測定結果、GIは1月に $1.5 \times 10^2$ 、2月に $1.1 \times 10^2$ の高いコピー数で3月、4月、12月も $10^1$ コピー数を示したが、その他の月では10コピー未満であった。GIIは4月の $4.0 \times 10^3$ 、2月に $2.3 \times 10^3$ と高いコピー数で1月、3月、5月、8月、11月、12月も $10^3$ から $10^1$ コピー数を示したが、6月、7月、9月、10月は10コピー未満であった。

### 3. 検出ウイルスの年/月別集計（表2）

2006年9月から2008年12月、2010年6月から2011年12月まで毎月1回の採水で計47検体から検出した下痢症ウイルスの総数は123件であった。なお、今回、SaVの検出系マニュアルを改変し2010年

と2011年の採水検体について検出を試みた。

2006年9月～12月(採水4回)はNoV10件中、GI型5件、GII型5件を検出しNoVの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NoV19件中、GI型10件、GII型9件を検出しNoVのGI/4型が優位を示した。また、全ての採水月からウイルスを検出した。

2008年1月～12月(採水12回)は、NoV21件中、GI型8件、GII型13件とAsV8件、AiV1件の計30件を検出し、NoVのGI/4型とGII/4型が優位であった。9月採水の検体からウイルスは未検出であった。

2010年6月～12月(採水7回)はNoV11件中、GI型5件、GII型6件とAsV6件、AiV1件の他、今回はSaV検出系の改変によりSaV5件を検出した結果、計23件であった。9月採水の検体からはウイルスは未検出であった。

2011年1月から12月(採水12回)はNoV21件中、GI/10件、GII/11件とAsV7件、SaV11件、AiV2件の計41件と年別集計で最も多いウイルス検出であった。また、全ての採水月からウイルスを検出した。

#### D. 考察

2011年1月から12月までの下水12検体と2006年9月から2010年12月までの既報例35検体を含めた計47検体から検出した下痢症ウイルスは123件であった。その内、NoVが82件(66.7%)と最も多く、NoV/GIは38件で8種類の亜型を検出、NoV/GIIは44件とやや多く9種類の亜型を検出した。その中でもGI/4とGII/4の

亜型が優位を示す検出結果であった。

この検出状況は、上流域に住むヒトの生活環境内でNoVなどによる感染や流行が発生していることが推測される。また、全国的なNoV検出報告や集計状況とも相關する所見であった。

その他、NoV以外で当所においては通常、ヒトの検体から検出されることが稀な下痢症ウイルスが下水中から多く検出された。特に、SaVについては、今回、検出系マニュアルを改め、既報の2010年分を含む検体から高い検出率を示す結果が得られた。AsVについても下水検体からは、数種の遺伝子型を多く検出した。この高い検出状況は、ヒトの生活環境中で軽症の感染または不顕性感染症として蔓延していることも推察される。その反面、研究者によっては、下水などの環境水から検出される下痢症ウイルス例が必ずしもヒト由来のみではないとの意見もある。これら疑問の解明のためにも継続した下水中(環境水)の下痢症ウイルス検出とデータ蓄積による分析が重要と思われる。

HAVについては、2010年、2011年に県内から患者発生を見たことから下水中への浸淫状況を確認するため2010年から検索を行っているがHAVは本年の検体からも未検出であった。

次に、2006年から2011年まで下水中のウイルス調査期間中の各定点報告数と佐賀県の食中毒・感染症発生事例を比較した(図3)。その結果、例年、冬季に胃腸炎患者の発生ピークが高値を示し、夏季を中心に患者および事例発生数は減少傾向を示す状況は、ほぼ相關する所見であった。また、NoV定量値の冬季と夏季のコ

ピー数の差においても同様であった。

以上の結果からも下水中の病原ウイルス調査を継続することは必要であり、下痢症ウイルスが関与する食中毒予防対策や発生要因解明および食品の安全確保などに向けた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2011年までの期間中に下水中から検出した下痢症ウイルスは123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本調査で判明した。特に、下痢症ウイルスの主要なウイルスはNoVが6割を占め最も多く、既報ではGI/4型とGII/4型が優位を示していた。しかし、この優位な亜型の検出状況はNoV以外についても年別一覧で観察すると、年別、月別で若干の“バラツキ”（ブレ）が認められた。この要因についてヒトへの感染頻度、亜型別免疫獲得状況、亜型別流行周期、リコンビナントなど様々なことが推測される。これらを解明するためにも下水中の病原ウイルス調査を継続することが必要である。

## F. 研究発表

なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. なし

表 1. 佐賀県における下水中の下痢症ウイルス検出一覧  
〔調査期間：2011年1月から12月〕

検出ウイルス Virus	Geno/type (RealtimePCR)	月別												小計	総計	率	
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月				
ノロウイルス	GI	1				★ 10未満									1	10	24.4%
		3	★ 1.5x10 <sup>2</sup>				★ 10未満		★ 10未満						3		
		7									★ 10未満				1		
		8		★ 1.1x10 <sup>2</sup>								★ 10未満	★ 1.3x10 <sup>1</sup>		3		
		14			★ 1.9x10 <sup>1</sup>										1		
	不明				★ 1.6x10 <sup>1</sup>									1			
	GII	1						★ 10未満							1		
		2				★ 4.0x10 <sup>2</sup>		★ 10未満							2		
		3		★ 2.3x10 <sup>2</sup>	★ 2.6x10 <sup>2</sup>				★ 1.4x10 <sup>1</sup>	★ 10未満					4		
		4	★ 9.3x10 <sup>2</sup>									★ 2.1x10 <sup>2</sup>	★ 6.8x10 <sup>1</sup>		3		
18						★ 1.7x10 <sup>2</sup>								1			
アストロウイルス	1	★	★	★	★	★	★							6	7	17.1%	
	3										★			1			
サポウイルス	I					★	★	★	★			★	★		6	11	26.8%
	2	★		★	★								★	4			
V			★											1			
アイチウイルス	A	★	★											2	2	4.9%	
															計	41	

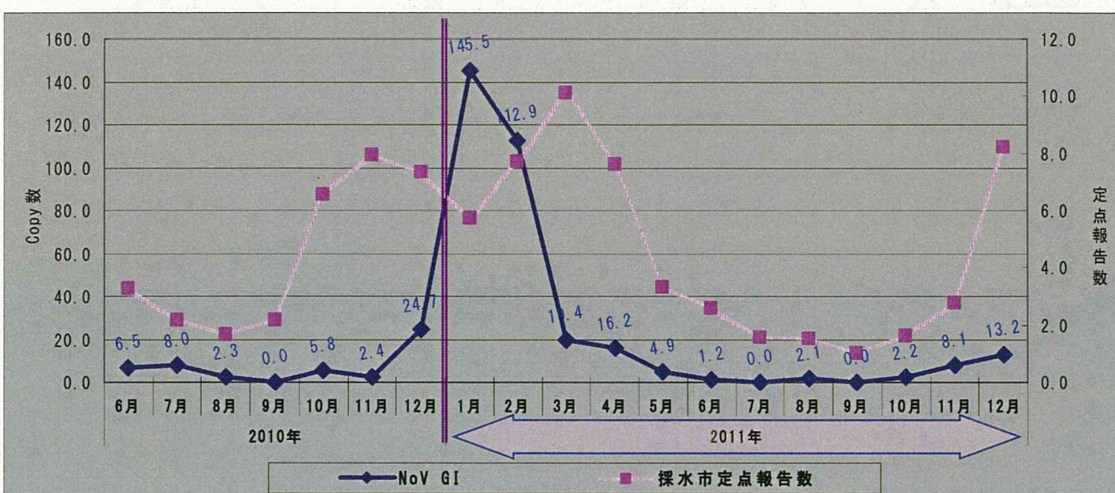


図 1. 下水中のNoV/GI 定量値と胃腸炎患者の定点あたり月別報告数  
〔調査期間：2010年6月から2011年12月〕

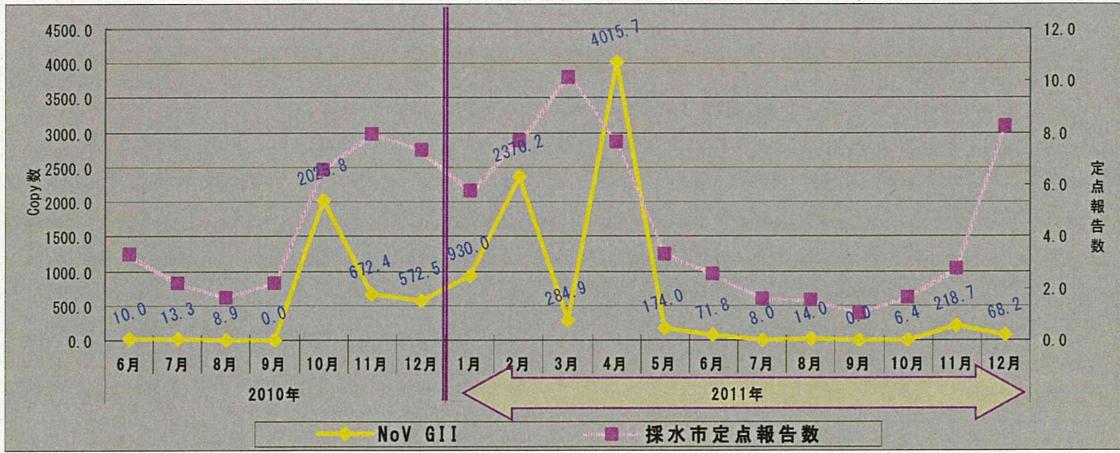


図 2. 下水中のNoV/GII 定量値と胃腸炎患者の定点あたり月別報告数  
 [ 調査期間：2010年6月から2011年12月 ]

表 2. 佐賀県における下水中の下痢症ウイルス検出一覧

[ 調査期間：2006年9月から2010年12月 (既報) ・2011年1月から12月 ]

検出ウイルス	重型	年別		2006年												2007年												2008年												2010年												2011年												合計	累計
		月別	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																
			月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月																							
NoV	GI	1																																						2	38 30.9%																								
		2			*	*																																	2																										
		3																																						4																									
		4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	22																									
		7																																					1																										
		8			*																																*	*	4																										
		13																																				*	1																										
		14																																				*	1																										
NoV	GII	1																																				1	44 35.8%																										
		2								*																												*		4																									
		3	*																																			7																											
		4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		21																									
		5							*																													1																											
		7					*																															3																											
		13				*										*	*																					3																											
		17													*	*																						3																											
アストロ	1	a																																				1	21 17.1%																										
		d														*	*																			*	8																												
		2															*																				1																												
		3															*	*	*	*	*														*		4																												
サポ	I	1																													*	*	*	*	*	*	*	6																											
		2	*	*																															*	*	6																												
		1			*	*																													*	*	2																												
V	1																				*															1																													
	2																						*													2																													
アイチ	A	型不明																																*	*	2																													
		型不明																						*	*										*	2																													
計		4ヶ月	10	12ヶ月												19	12ヶ月												30	7ヶ月	23	12ヶ月												41	123																				



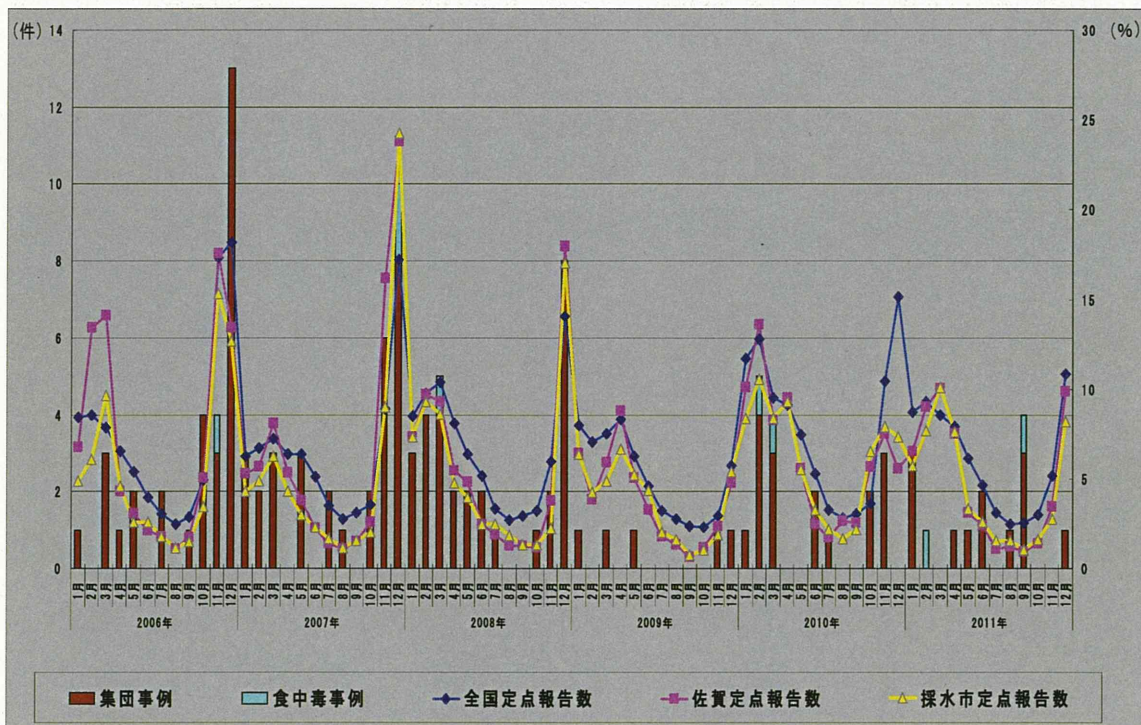


図3. 佐賀県の食中毒・感染症発生事例と胃腸炎患者の定点あたり報告数一覧  
 [ 調査期間：2006年9月から2011年12月 ]

## 垂下カキと汚水処理施設における下痢症ウイルスの動態

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
研究協力者	高橋 雅輝	岩手県環境保健研究センター
研究協力者	齋藤 幸一	岩手県環境保健研究センター

### 研究要旨

カキを試験的に河口部に垂下し、下痢症ウイルスの検出を行ったところ、上流地域で発生している感染性胃腸炎を反映した下痢症ウイルスが検出された。このことから、カキ等の二枚貝の喫食は、ノロウイルスのみでなく、他の下痢症ウイルスによる健康被害発生の原因となる可能性があると考えられた。また、河川上流地域の放流水が集約する河口部へ、カキを垂下し下痢症ウイルスをモニタリングすることにより、上流域で発生している感染性胃腸炎の起因ウイルスの動向を推測することが可能と考えられた。

### A. 研究目的

昨年度の調査において、汚水処理施設の放流水から多種の下痢症ウイルスが検出され、カキ等二枚貝がそれらのウイルスに汚染される可能性が示唆された。本年度は、カキ等の二枚貝喫食による健康被害発生の可能性について検討するために、試験的に河口部に垂下したカキ（以下、垂下カキ）における下痢症ウイルスの検出状況を調査した。併せて、上流地域の感染性胃腸炎の発生状況を把握するために、漁業集落排水処理施設および合併浄化槽の流入水、放流水および河川水（以下、環境水）を対象として下痢症ウイルスの検出を行っ

た。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

・以前に行った調査におけるカキの垂下試験(2008年11月～2009年2月)で、ノロウイルスが検出されたカキ37個を対象とした。

・2008年7月～2009年3月に、垂下カキの上流域の合併浄化槽(3施設)、同湾周囲に位置する漁業集落排水処理施設(2施設)の流入水、放流水および河川水(2か所)を5～9回に亘り採水した。

#### 2. ウイルス濃縮法

カキは、中腸腺を PBS (-) で 10%乳

剤にし、12,000rpm、20 分間冷却遠心後、上清に 60%PEG、NaCl およびアミラーゼを添加し 2 時間水平振とうした。その後、12,000rpm、20 分間冷却遠心した沈渣を滅菌蒸留水 400  $\mu$  l で再浮遊し、ウイルス濃縮検体とした。環境水は、PEG 沈殿法後の上清を 30%ショ糖液に重層し、36,000rpm、150 分間超遠心を行い、得られた沈渣を蒸留水で再浮遊し、ウイルス濃縮検体とした。

### 3. 下痢症ウイルス検出方法

カキは、QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN) を用いて、環境水は、QIAamp Viral RNA MiniKit (QIAGEN) 用いて RNA 抽出を行った。DNase I 処理後、Prime Script RT reagent Kit (TAKARA) を用いて c DNA を合成し、以下のプライマーセットで PCR 反応を行った。

- ・ノロウイルス
  - 1st COG1F/G1SKR, COG2F/G2SKR
  - nest G1SKF/G1SKR, G2SKF/G2SKR
- ・サポウイルス
  - 1st SV-F13, SV-F14/SV-R13, SV-R14
  - nest SV-F22/SV-R2
- ・エンテロウイルス
  - EVP4/OL68-1
- ・アストロウイルス
  - 1st Mon244/82b
  - 2nd AST-S1, AST-S2, AST-S3, AST-S4, AST-S5, AST-S6, -S7, AST-S8/END
- ・アイチウイルス
  - C94b(+)/264K(-)
- ・A 群ロタウイルス
  - : 1st Beg9/End9
  - nest aAT8, aBT1, aCT2, aDT4, aET3, aFT9/RVG9

- ・A 型肝炎ウイルス
    - : 1st HAV+2799/HAV-3273
    - nest HAV+2907/HAV-3162
  - ・C 群ロタウイルス (カキのみ)
    - 1st G8S/G8A
    - 2nd NG8S1/NG8A2
  - ・アデノウイルス (カキのみ)
    - AdnU-S' 2/AdnU-A2
- (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. 環境水における下痢症ウイルス検出 (図 1~3)

調査期間中、各污水处理施設流入水からは、ノロウイルス GII が多くの処理施設から検出された。その他のウイルスは、ノロウイルス GI、サポウイルス、アイチウイルス、エンテロウイルス、アストロウイルス、A 群ロタウイルスが検出された。アイチウイルス、サポウイルスは、連続して検出された。流入水における下痢症ウイルスの検出件数は、当該調査地域の定点あたりの感染性胃腸炎の患者実数に沿って増減していた。(図 1)

放流水における下痢症ウイルスは、流入水と同様にノロウイルス GII が多く検出された。その他、ノロウイルス GI、サポウイルス、アイチウイルス、エンテロウイルス、アストロウイルス、A 群ロタウイルスが検出され、流入水と同様であった。また、感染性胃腸炎の患者数の少ない時期には、放流水からは下痢症ウイルスが検出されないか、検出件数が少ない傾向にあった。2009 年、第 1 週からの患

者数の増加に伴って下痢症ウイルスは検出され始め、2009年第6週における検出件数は、流入水より多かった。(図2)

河川水からは、感染性胃腸炎患者数の発生のピーク時にノロウイルスGI、GII、サポウイルス、エンテロウイルス、アイチウイルスが検出された。(図3)

A型肝炎ウイルスは、環境水のいずれからも検出されなかった。

## 2. 垂下カキにおける下痢症ウイルス検出(図4)

垂下カキからも、ノロウイルス以外に、サポウイルス、アイチウイルス、エンテロウイルスが検出され、汚水処理施設流入水、放流水での検出状況を反映するものであった。アストロウイルス、A群、C群ロタウイルス、アデノウイルスおよびA型肝炎ウイルスは検出されなかった。垂下を開始した2008年第48週以降、感染性胃腸炎患者数が増加し始め、垂下カキからは、ノロウイルスGIが多数検出された。2009年第2週以降は、ノロウイルスGIIが多数検出された。ノロウイルス以外には、エンテロウイルス、サポウイルス、アイチウイルスが検出された。サポウイルスは、垂下期間の前半に、アイチウイルスは後半に連続して検出された。

## D. 考察

汚水処理施設流入水からの下痢症ウイルスの検出状況は、上流地域でノロウイルス以外にもアイチウイルス、サポウイルス、エンテロウイルスの下痢症ウイルスによる感染性胃腸炎の発生があったことを示唆する成績であった。放流水

からの下痢症ウイルスの検出状況から、胃腸炎患者数の少ない時期および患者数の増加初期には、汚水処理施設の処理工程中に効果的に除去されているが、患者数増加が継続すると、一部が除去されず、検出されるウイルスが増加すると考えた。

垂下カキから検出される下痢症ウイルスは、上流地域の感染性胃腸炎患者発生を反映しており、カキ等の二枚貝がノロウイルス以外の下痢症ウイルスも蓄積することを示唆するものであった。このことは、カキ喫食による健康被害発生の大きな要因となる可能性が考えられた。垂下カキにおけるノロウイルスの検出頻度が高い成績は、胃腸炎患者数の多さや、持続的な感染もしくは流行があったものと考えられた。上流地域の放流水が集約する河口部へカキを垂下し、下痢症ウイルスをモニタリングすることは、河川上流地域で流行している感染性胃腸炎ウイルスの動向を推測することが可能であると同時に、検出された時点での迅速な予防対応の啓発は、感染拡大防止に貢献できると考えられた。

## E. 結論

カキ等の二枚貝の喫食のある食中毒事例では、ノロウイルスが陰性の場合、ノロウイルス以外の下痢症ウイルスについても検討する必要がある。人口集落地域の放流水が集約する河口部での垂下カキによる下痢症関連ウイルスのモニタリングは、集落における下痢症ウイルスの動向を反映していると考えられた。

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

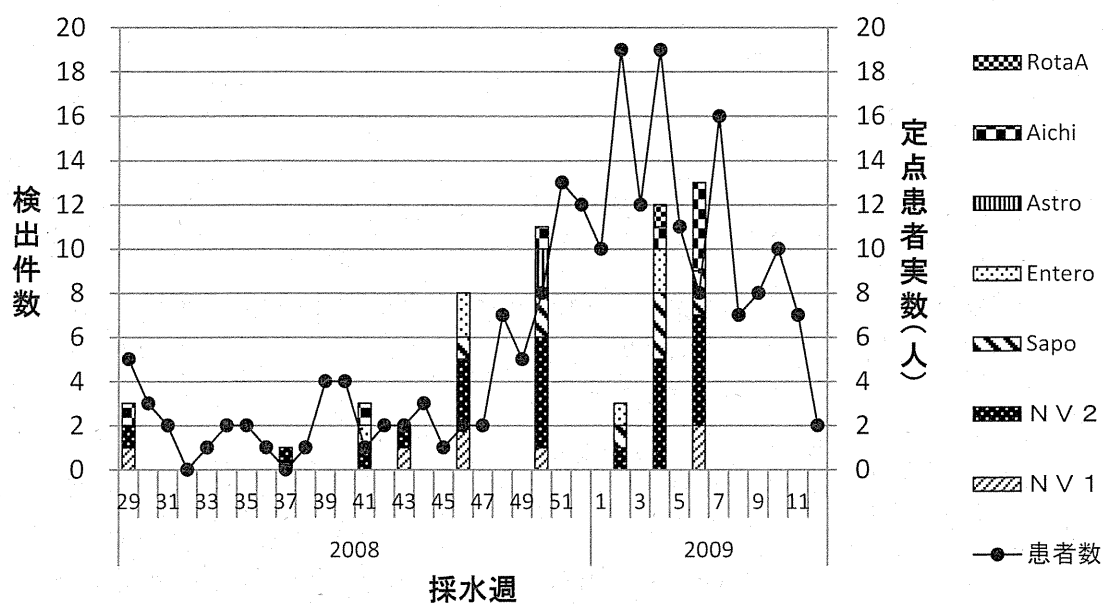


図1. 流入水における下痢症ウイルスの検出

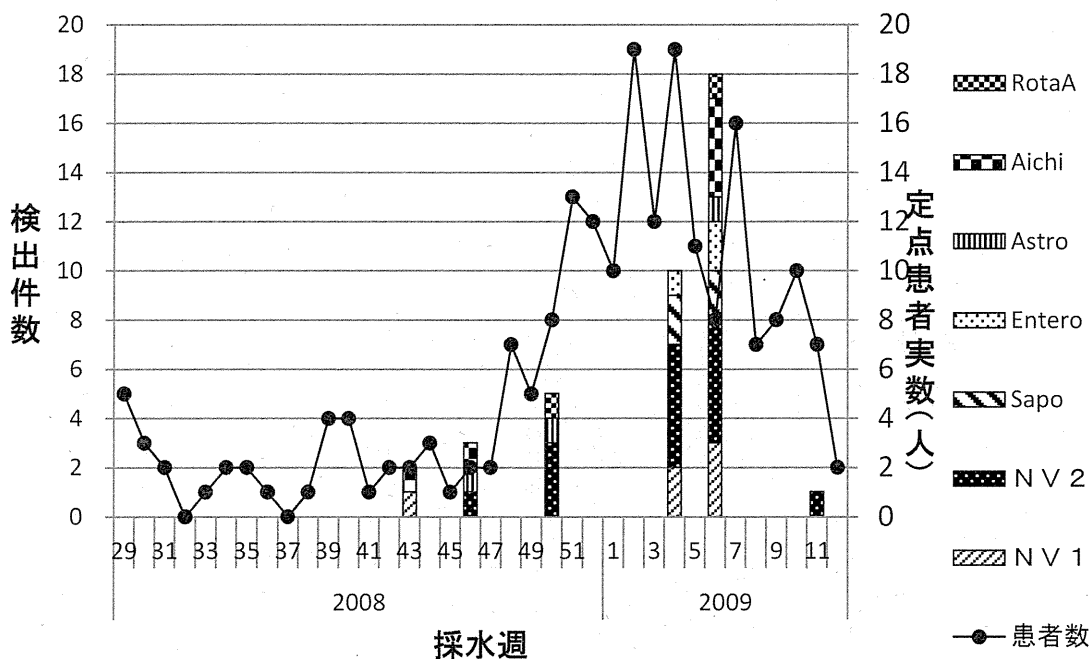


図2. 放流水における下痢症ウイルスの検出

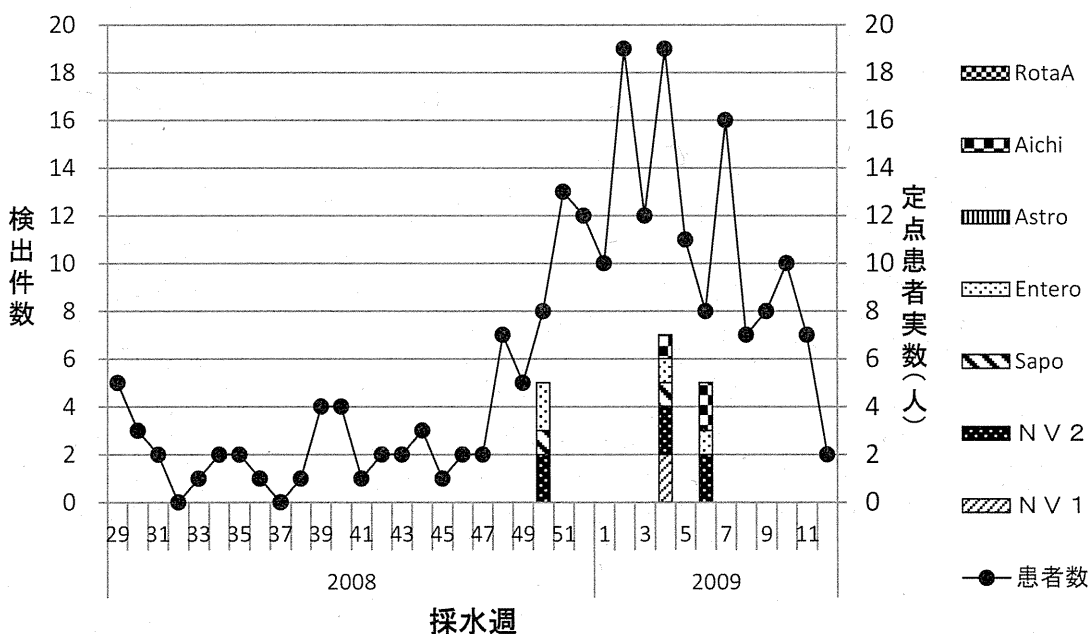


図3. 河川水における下痢症ウイルスの検出

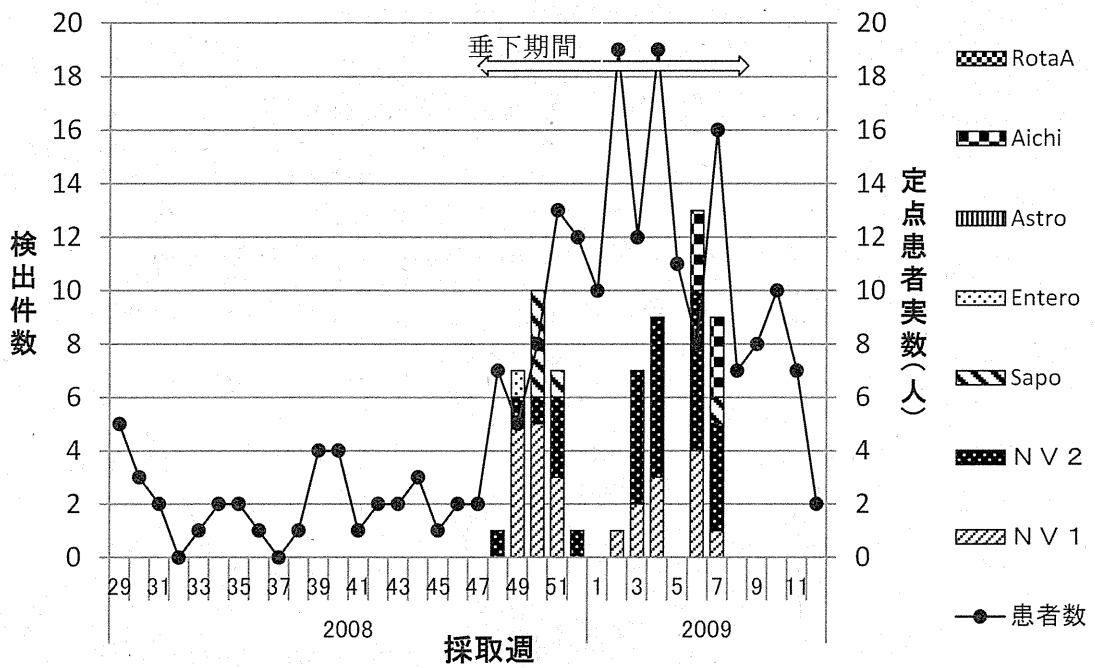


図4. 垂下カキにおける下痢症ウイルスの検出

## カキ中のヒト糞便由来 F 特異 RNA 大腸菌ファージの検出法の検討

研究協力者	阿部 勝彦	広島市衛生研究所
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	田中 寛子、藤井 慶樹、山本美和子	広島市衛生研究所

### 研究要旨

感染性のあるヒト糞便由来病原ウイルスの汚染指標としての F 特異 RNA 大腸菌ファージ(F ファージ)の有用性を検証することを目的として、プラーク法及びリアルタイム PCR 法によるカキ中の F ファージの検出等を行った。プラーク法によるカキ中の F ファージ感染価は 50%カキ中腸腺乳剤遠心上清 1ml 当り 0~46 個であり、多くのカキ検体は陰性であった。リアルタイム PCR 法により II 群、III 群 F ファージが検出されることが多く、プラーク法で検出された F ファージはヒト糞便由来である可能性が示唆された。プラーク法による F ファージの検出とリアルタイム PCR 法による F ファージ検出とは必ずしも一致しなかった。ノロウイルスの検出はプラーク法による F ファージの検出より、リアルタイム PCR 法での II 群または III 群の F ファージの検出と一致する傾向にあった。プラーク法による F ファージの感染価が予期した値より低いことおよび検査結果に乖離が認められたことなどから、検査法の改良とともにさらなるデータの蓄積等が必要と考えられた。

#### A. 研究目的

ノロウイルス(NoV)、サポウイルス(SaV)、A型肝炎ウイルス(HAV)など食中毒の原因となるウイルスは培養が不可能か困難なため、その検出はPCR法等の遺伝子検査に依存している。遺伝子検査は言うまでもなく、感染性ウイルスだけを検出している訳ではない。特に、カキ等の二枚貝や下水放流水、海水等の環境には紫外線や下水処理場の塩素等で不活化されたウイルスも含まれる可能性がある。そのため、二枚貝のウイルス

の汚染リスクや安全性を遺伝子検査によって正確に把握することはできない。

また、カキ等の二枚貝が関連する食中毒は主にNoVによるが、二枚貝にはNoV以外の各種の胃腸炎ウイルスおよびHAVなど、ヒトの糞便に由来するウイルスの汚染リスクがある。従って、二枚貝の安全性を確保するためには、NoVのみならずヒトの糞便に由来するウイルス全般の汚染の有無をモニタリングするシステムが必要とされる。

水環境中における糞便由来ウイルスの代



替指標として、F 特異RNA大腸菌ファージ (Fファージ) がある。その中でⅡ群ファージは主にヒトの糞便から検出され、Ⅲ群ファージはヒトの糞便に由来することが知られている。本研究は、感染性のあるヒト糞便由来病原ウイルスの汚染指標としてのFファージの有用性を検証することを目的として、カキ中のFファージをプラーク法で検出するとともに、リアルタイムPCR法でFファージおよびNoVの検出を行った。

## B. 研究方法

### 1. プラーク法

#### (1) 試薬等の調整方法

(a)液体培地: Bacto Tryptone10g, D(+)-グルコース 1g, NaCl 8g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.3g および  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.15g を蒸留水 1L に溶解後、滅菌した。

(b)培養液: 液体培地 20mL にナルジキシン酸溶液 20 $\mu\text{L}$  およびカナマイシン溶液 20 $\mu\text{L}$  を加えたものを宿主菌の培養に供した。

(c)Fファージ感受性菌株の培養: 宿主菌は *Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49(WG49)を用いた。WG49は *Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG45に大腸菌のF絨毛を組み込んだ宿主菌で、F特異大腸菌ファージ感受性、体表面吸着大腸菌ファージ非感受性、*Salmonella*ファージ感受性という特徴を有している。一般的に環境水中に *Salmonella*ファージはほとんど存在しないとされているので、WG49は環境水中から主にFファージを検出することができる。凍結WG49菌液を融解後、培養液 20mL に約 1mL 加えて攪拌し、37°Cで3~4時間

振とう培養を行った。

(d)寒天培地: 液体培地 1L に Bacto agar 9g を加えて滅菌後、50°Cに保温し、使用前に、ナルジキシン酸溶液 1mL、カナマイシン溶液 1mL を加え、培養したWG49を適量加えて使用した。

(e)WG49の宿主菌としての有効性の確認: 宿主菌としての有効性を確認するため、培養したWG49を MacConkey Agar で培養し、大腸菌のF絨毛を有していることを意味するラクトース分解性である赤色コロニーが、全体の9割以上であることを確認した。

#### (2) 50%カキ中腸腺乳剤

カキ中腸腺 5個に等量のPBSと $\alpha$ アミラーゼ 50mgを添加後、ストマッカーで3分間処理して乳剤とし、37°C1時間インキュベートし、2mlのマイクロチューブに採取後、12,000rpm、5分遠心後の上清をその後の検査に用いた。

#### (3) ファージ測定手順(単層寒天培地法)

50%カキ中腸腺乳剤遠心上清 1ml をシャーレに加え、(d)の寒天培地 10mL 程度を添加して十分に混和後、静置凝固させ、37°C18~24時間培養し、形成したプラークを計数した。単位は、PFU/mL(Plaque Forming Unit/mL)。

### 2. リアルタイムPCR法

50%カキ中腸腺乳剤遠心上清 280 $\mu\text{l}$  から QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて RNA 抽出を行い、AVL バッファー 60 $\mu\text{l}$  に溶出した。溶出液 50 $\mu\text{l}$  を RT 反応に用い、100 $\mu\text{l}$  の cDNA を得た。cDNA 液 5 $\mu\text{l}$  をリアルタイムPCR法に用い、FファージⅠ群~Ⅳ群、また NoV GI、NoV GII それぞれのリアルタイムPCR法を実施した。ヒ

ト糞便は 10%乳剤の遠心上清 140  $\mu$ L を出発材料に、同様に処理した。

### 3. MS2 ファージ (I 群) のプラーク数およびリアルタイム PCR 法における CT 値との関連性

陽性コントロールとして用いている MS2 ファージ (I 群) を WG49 に感染させ 18~24 時間培養後に、10 倍階段希釈して上述のプラーク法及びリアルタイム PCR 法を実施し、プラーク数と CT 値との関連性を調べた。

(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. プラーク法による F ファージの検出

ロットの異なるカキ 26 検体について、プラーク法による F ファージの検出を試みた。その結果、最大 46 個のプラーク形成された検体もあったが、プラーク形成がある検体でも数個のプラークしかなく、多くの検体はプラーク陰性であった(表 1)。

### 2. リアルタイム PCR 法による群特異的 F ファージの検出

ロットの異なるカキ 57 検体について、ファージ群別プライマーを用いたリアルタイム PCR 法により、I 群~IV 群別の F ファージの検出を試みた。II 群ファージは 19 検体から、III 群ファージは 5 検体から検出され、ヒト糞便汚染が示唆された。I 群ファージは 2 検体から検出され、動物由来の糞便汚染の可能性が示された。IV 群ファージ

は検出されなかった。36 検体は全ての F ファージが検出されなかった。

### 3. プラーク法とリアルタイム PCR 法の比較

プラーク法とリアルタイム PCR 法により F ファージの検出を行った 21 検体について関連性をみると、両法で共に陽性あるいは共に陰性の検体も認められたが、プラーク法陽性でリアルタイム PCR 法陰性、逆にプラーク法陰性でリアルタイム PCR 法陽性的の場合も認められ、両者の検出は必ずしも一致しなかった。

一方、NoV の検出と F ファージのプラーク法あるいはリアルタイム PCR 法による II 群あるいは III 群の F ファージの検出の関連性についてみると、後者の一致率が高い傾向にあった(表 3)。

### 4. ヒト糞便におけるリアルタイム PCR 法での F ファージの検出

ヒト糞便における F ファージの検出率およびファージ数を把握するために、リアルタイム PCR 法での F ファージの検出を試みた。検討した 8 検体からは F ファージは検出されなかった(表 2)。

### 5. MS2 ファージ (I 群) のプラーク数およびリアルタイム PCR 法における CT 値との関連性

MS2 ファージの培養液のファージ数をプラーク法及びリアルタイム PCR 法で測定した結果、 $10^{-6}$  乗希釈で 35CT 値、 $10^{-7}$  乗希釈で 38CT 値、プラーク法では  $10^{-7}$  乗希釈で 548 個、 $10^{-8}$  乗希釈で 93 個のプラークがそれぞれ形成された。その結果から、培養後の MS2 ファージはおよそ  $10^{10}$  個/ml の濃度であり、 $100\sim 1000$  個/ml のプラ

ーク数を示すファージのリアルタイム PCR 法の CT 値は約 38、10~100 個/ml では約 41 であることが推定された。

#### D. 考察

カキ中の F ファージ測定をプラーク法およびリアルタイム PCR 法により検討した。検出された検体のプラーク数は最大で 50%カキ中腸腺乳剤遠心上清 1ml 当たり 46 個で、10 個以下であることが多く、多くの検体は陰性であった。この結果は当初想定していた汚染量や汚染率より低い傾向にあった。その原因を把握するために、陽性コントロールとして用いている MS2 ファージについてプラーク数とリアルタイム PCR 法の CT 値との関連性を調べた結果、100~1000 個/ml のプラーク数は約 38CT 値、10~100 個/ml は約 41CT 値に相当すると推定された。このことから、今回プラーク法で得られた F ファージの数はリアルタイム PCR 法から推定される数より少ない傾向にあった。この理由として、カキには不活化した F ファージが含まれておりリアルタイム PCR 法で陽性となるが、プラーク法では陰性となった可能性が考えられる。一方、カキ中にプラーク形成を阻害する要因が存在し、見掛け上低く定量されている可能性も否定できない。

また、プラーク法とリアルタイム PCR 法による F ファージの検出は必ずしも一致せず、NoV の検出と F ファージの検出も必ずしも一致しなかった。しかし、例数は少ないもののリアルタイム PCR 法による NoV の検出はプラーク法よりもリアルタイム PCR 法による II 群あるいは III 群の F

ファージの検出と関連性が高い結果であった(表 2)。この結果も、カキには不活化された NoV が含まれる可能性を示唆する。

一方、カキにおける F ファージの保有量や保有率が低かったことから、ヒト糞便中の F ファージの検出を試みた結果、8 検体は全て陰性であった。健康人の F ファージの保有率は 2~6%とされており、この結果は必ずしも想定外の結果ではないが、今後例数を重ねて、検査法の妥当性の検証を含め、ヒトの糞便における F ファージの保有率や保有量を明らかにする必要がある。

いずれにしろ、現時点においては、プラーク法による F ファージの感染価が予期した値より低い値であったこと、検査結果に乖離が認められたことなどの明確な理由は不明である。今後、検査法についてさらなる検討を加えるとともに、データの蓄積等を行う必要があると考えられる。

#### E. 結論

カキ中の F ファージの検出をプラーク法およびリアルタイム PCR 法により実施し、以下の結果を得た。

カキ中の F ファージプラーク数はリアルタイム PCR 法から推定される数より低い傾向にあった。

プラーク法による F ファージの検出はリアルタイム PCR 法による検出と必ずしも一致しなかった。

NoV の検出はプラーク法よりリアルタイム PCR 法での F ファージの検出と一致する傾向にあった。

プラーク法による F ファージの感染価

が予期した値より低いことおよび検査結果に乖離が認められたことなどから、検査法のさらなる検討とともにデータの蓄積等が必要と考えられた。

3. その他：なし

#### 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