

の分類法 (Oka et al., Arch Virol. 157: 349-352, 2012) に従った。

(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. SaV 検出状況

食中毒事例 24 検体および 514 検体から従来法で計 36 検体、新規法で 49 検体が SaV 陽性となった (表)。genogrouping 法は比較可能な検体において、従来法とほぼ同じ検出数であった (表)。

リアルタイム RT-PCR 法では食中毒検体では従来法および新規法で陽性となった 12 検体中 11 検体が陽性となった (表)。また、発生動向調査の検体は従来法、新規法いずれかの方法で陽性となった 38 検体すべてについてリアルタイム RT-PCR 法での定量が可能であった。ただし、このうち 2 検体については既報 (Oka et al., 先に掲載) のカットオフ基準値 (25 コピー/ウェル) 以下のシグナルであった。

2. 系統樹解析による遺伝子群の判別

検出された SaV のうち、塩基配列を決定できた従来法 PCR 産物 35 検体、新規法 PCR 産物 48 検体について系統樹解析をおこなったところ、従来法では GI 24 株、GII 9 株、GV 1 株に、新規法では GI 29 株、GII 17 株、GV 2 株が検出された。SaV GI の検出数には 2 つの検出系で大きな差が認められなかったが、SaV GII は新規法が 17 株、従来法が 9 株と 2 倍の検出数であった (表)。genogrouping 法で陽性となった株の遺伝子群は系統樹解析の結果

とすべて一致した (表)。

3. アストロウイルスとの交差反応

PCR 産物の遺伝子解析の結果、新規法で 2010 年の 1 検体、2012 年 4 検体がアストロウイルス 1 型であることが明らかとなった。なお、増幅産物は SaV の Nested PCR 産物 (約 420bp) より若干小さい位置 (約 400bp) に電気泳動像が認められた。

D. 考察

食中毒事例においては、感染ルートの解明を目的として、食用貝などの原因食品、食材ならびに患者糞便検体から検出されたウイルスの部分塩基配列の解析を行い、比較解析することが重要である。そのため、本研究では 3 年間を通じ、塩基配列解析に適した増幅産物を得る事ができる新規系と従来法の有用性を中心に順次、比較検証してきた。

新規法は我々がアサリ中腸腺を対象とした場合と同様、臨床検体についても従来法より高い検出率を示した。

リアルタイム RT-PCR 法による検体中の SaV コピー数、系統樹解析による遺伝子型別の結果から 2 法の検出率の違いは SaV GII 株に対する感度の差が一因であることが示唆された。しかし、環境水を検体とした Kitajima らの報告 (先に掲載) やアサリ中腸腺を検体とした昨年度の我々の研究でも検出系による genogroup の偏りは認められておらず、今後、さらに検討が必要と考えられた。

新規法とリアルタイム RT-PCR 法の検出結果は概ね一致した。これは新規法のプライマーとリアルタイム RT-PCR 法のプライマーに共通のものが多いためと考えら

れる。

また、genogrouping 法は検出数は新規法に劣るものの、遺伝子群は系統樹解析によるタイピング結果と完全に一致し、シーケンス解析をすることなく、簡便に遺伝子群を判定する手法として有用であることが示された。

E. 結論

環境水や食用貝からのサポウイルス検出および遺伝子解析に有用な新規法を胃腸炎患者検体に適用したところ、新規法は従来法、さらに genogrouping 法と比較して高い検出率を示した。なお、新規法でサポウイルス陽性となった検体は概ねリアルタイム PCR 法での定量が可能であった。

しかし、新規法を臨床検体に適用した場合、アストロウイルス 1 型にも反応する例が認められた。そのため、新規法で増幅産物が得られた場合、塩基配列を確認することが望ましい。

F. 研究発表

1. 論文発表

Setsuko Iizuka, Reiko Takai-Todaka, Hitoshi Ohshiro, Masaaki Kitajima, Qihong Wang, Linda J. Saif, Takaji Wakita, Mamoru Noda, Kazuhiko Katayama, Tomoichiro Oka, Detection of multiple human sapoviruses from imported frozen individual clams, Food and Environmental Virology. In press

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. 胃腸炎患者からのSaV検出状況

	ID	従来法	新規法	genogrouping PCR	遺伝子型 (系 統樹解析)	リアルタイムPCRに よる定量値 (copies/g stool)
食中毒事例	D1711	+	+	-	G II	1.9×10^8
	D1729	+	+	GI	G I	2.1×10^{10}
	D1732	+	+	G II	G II	1.2×10^7
	D1736	+	+	G I	G I	6.7×10^9
	D1737	+	+	G II	G II	1.2×10^{10}
	D1738	+	+	G II	G II	7.4×10^8
	D1739	+	+	G II	G II	2.4×10^8
	D1714	+	+	G I	G I	-
	D1718	+	+	G II	G II	3.5×10^8
	D1734	+	+	G I	G I	3.2×10^8
	D1741	+	+	G I	G I	3.9×10^7
	D1743	+	+	GI	G I	3.5×10^5
2010	96-10	+	+	NT	G I	1.7×10^5
	111-10	-	+	NT	G I	7.5×10^7
	169-10	+	-	NT	G I	7.1×10^6
	209-10	+	+	NT	G I	1.4×10^6
	356-10	+	+	NT	G II	1.2×10^8
	412-10	+	+	NT	G II	3.8×10^8
	521-10	-	+	NT	G I	5.3×10^8
	592-10	-	+	NT	G II	7.4×10^9
	606-10	-	+	NT	G II	9.1×10^5
	610-10	-	+	NT	G I	5.1×10^9
614-10	-	+	NT	G II	8.9×10^8	
619-10	-	+	NT	G II	4.1×10^8	
2011	274-11	-	+	G I	G I	$-(1.4 \times 10^4)$
	307-11	+	+	GV	GV	3.4×10^6
	338-11	+	+	G I	G I	3.6×10^7
	341-11	+	+	G I	G I	2.0×10^7
	355-11	-	+	-	G I	1.7×10^7
	366-11	+	+	G I	G I	1.3×10^8
	412-11	+	+	-	G I	$-(1.2 \times 10^4)$
	432-11	-	+	-	GV	3.5×10^5
	437-11	+	+	G I	G I	1.5×10^8
	448-11	+	+	G I	G I	4.7×10^7
	461-11	-	+	-	G II	1.5×10^6
	505-11	-	+	-	G II	3.1×10^5
	513-11	+	+	G I	G I	5.4×10^9
587-11	+	+	G I	G I	7.9×10^8	
593-11	+	+	G I	G I	9.9×10^7	
2012	128-12	+	+	G I	G I	1.3×10^8
	163-12	+	+	G I	G I	4.6×10^9
	167-12	+	+	G I	G I	7.2×10^7
	197-12	+	+	G I	G I	7.4×10^9
	210-12	+	+	G I	G I	1.9×10^8
	227-12	+	+	G I	G I	8.9×10^7
	288-12	+	+	-	G I	2.6×10^7
	372-12	+	+	G II	G II	9.7×10^7
	385-12	-	+	G II	G II	3.1×10^7
	394-12	-	+	G II	G II	3.6×10^9
702-12	+	+	-	ND	1.1×10^7	

NT: Not tested

ND: Not detectable by direct sequencing

平成 24 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

蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法による下痢症ウイルスの検出と解析

研究協力者	重本 直樹	広島県立総合技術研究所・保健環境センター
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	東久保 靖	広島県立総合技術研究所・保健環境センター
研究協力者	久常 有里	広島県立総合技術研究所・保健環境センター

研究要旨

A 群及びC群ロタウイルス、アデノウイルスの蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法を確立し、これら 3 種のウイルスの同時検査が可能になった。今回開発した検査系と前回までに開発したノロウイルス G I、G II、サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス、ボカウイルス、パレコウイルスの検査系を用い、2010/11 シーズンから現在までの食中毒疑い・感染症事例(32 事例)についてこれらウイルスの感染実態を明らかにした。ノロウイルス G II の優勢ゲノタイプである G II.4 のカプシド領域の特定部位のアミノ酸の変異を調べたところ、2010/11 シーズンと 2011/12 シーズンでは変異のパターンが異なっていることを明らかにした。

A. 研究目的

ノロウイルス以外の下痢症ウイルスを包括的に検出するため A 群及び C 群ロタウイルス、アデノウイルスの蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法を確立する。また、2010/11 シーズンから現在までの食中毒事例等の検体から下痢症ウイルスの検出を行い、ノロウイルス及び他の下痢症ウイルスの感染実態を明らかにする。ノロウイルス G II.4 のカプシド領域における特定部位アミノ酸の変異状況について明

らかにする。

B. 研究方法

1. 材料

2010/11 年～2012/13 シーズン(前半)の食中毒疑い、感染性胃腸炎集団発生事例の有症者便 112 検体(37 事例)、2009/10 年シーズン以前の食中毒疑い、感染性胃腸炎集団発生事例の有症者便 7 検体(4 事例)、2005-12 年までの小児感染性胃腸炎患者便 116 検体を用いた(表 1)。

2. 蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法による下痢症ウイルスの検出

10%糞便乳剤から QIAamp Viral RNA mini Kit (キアゲン) を用いて RNA 抽出を行った。抽出 RNA を Random primer pd(N)9 (タカラバイオ) と ReverTra Ace (TOYOBO) により、30°C, 10 分、42°C, 60 分、99°C, 5 分の逆転写反応を行った後、これをテンプレートにして蛍光マルチプレックス PCR を行った。マルチプレックス PCR には Multiplex PCR Assay Kit (タカラバイオ) を使用し、表 2、表 3 に示すプライマーと PCR 反応条件により実施した。PCR 増幅産物は 2%アガロースゲルで電気泳動した後、泳動ゲルを UV トランスイルミネーター上で UV 照射して蛍光バンドおよび蛍光色を確認した。

3. GⅡ.4 株 VP1 領域のアミノ酸変異検出

ノロウイルス GⅡの G2SKF/G2SKR の PCR 産物、及びノロウイルス GⅡ.4 の GⅡ.4cap_5898-5918/GⅡ.4cap_6415-6394 (福田ら、広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告 2010) の PCR 産物の塩基配列を解析した。QIAquick PCR Purification Kit (キアゲン) により精製した後、SequiThermEXCEL II DNA Sequencing Kit-LC (EPICENTRE Biotechnologies) および LI-COR 4200 series sequencer (LI-COR) を用いてダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。ノロウイルス GⅡの遺伝子型はカプシド遺伝子の翻訳開始点から 264bp の塩基配列を MEGA 5 プログラム (<http://www.megasoftware.net/>) を用いて解析、系統樹を作成して決定した。ノロウイルスの遺伝子型の分類は Kageyama

ら (J. Clin. Microbiol. 2004) および病原体検出情報 (<http://idsc.nih.gov/pathogen/refer/noro-kaisetu1.html>) に示された分類に従った。ノロウイルス GⅡ.4 については、解析した塩基配列から VP1 領域の S ドメインの 6、9、15、45 番目および P2 ドメインの 296-298、393-395、412-414 番目のアミノ酸を決定した。

(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

ロタウイルス、アデノウイルス検出用 (Set C) 蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法の評価

Set C の蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法の有効性について既知検体 126 検体 (2010/11 年シーズンの食中毒疑い、感染性胃腸炎集団発生事例の有症者便 3 検体、2009/10 年シーズン以前の食中毒疑い、感染性胃腸炎集団発生事例の有症者便 7 検体、2005-12 年までの小児感染性胃腸炎患者便 116 検体) を用いて評価した。A 群ロタウイルス陽性検体、C 群ロタウイルス陽性検体、腸管アデノウイルス陽性検体に対し、それぞれ 145bp (緑)、351bp (赤)、300bp (橙) の増幅バンドが確認された (図 1)。一方、これらウイルス陰性であった検体については 4 検体から A 群ロタウイルスが、4 検体からアデノウイルスが、1 検体から A 群ロタウイルス及びアデノウイルスが検出された (表 4)。これらの検体についてリアルタイム PCR 法あるいは増幅産物の塩基配列解析により

再検査を行ったところ、当該ウイルスであることが確認された。Set C の蛍光 RT-マルチプレックス PCR 反応の検出限界を定量済みの cDNA10 倍段階希釈シリーズを用いて調べた結果、検出限界値は反応あたり 130~360 ゲノムコピー程度であった（データ未発表）。

1. 集団感染事例（2010/11~2012/13 シーズン前半）におけるウイルス検出状況

2010/11 年から 2012/13 シーズン（前半）までの食中毒疑い、感染性胃腸炎集団発生事例（37 事例 112 検体）について Set A、B、C の蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法を用い、下痢症ウイルスの検出を行った（食中毒事例についてはノロウイルスのコンベンショナルな RT-PCR も併用）。検出された原因ウイルスの事例数はノロウイルス GII が 31 事例、腸管アデノウイルス、A 群ロタウイルス、サポウイルスが各 1 事例、不検出が 3 事例であった（図 2）。また、原因ウイルス以外に複数のウイルスが検出された例が 6 事例あった（表 5）。内訳は、ノロウイルス GII による食中毒疑い 1 事例からノロウイルス GI とアイチウイルスが、ノロウイルス GII を原因とする集団感染症 5 事例からノロウイルス GI、アデノウイルス、パレコウイルスが、アデノウイルス 41 型による集団感染 1 事例からアストロウイルスが検出された。

2. 2011/12 年~2012/13 シーズン（前半）に検出されたノロウイルスの遺伝子型と GII.4 株のアミノ酸変異状況

2011/12 年シーズンに検出されたノロウイルス GII は 6 事例から GII.4、3 事例から GII.2、1 事例から GII.12、1 事例か

ら GII.12、GII.13、1 事例から GII.8、GII.12、GII.13 が検出された。また、2012/13 シーズン前半については 4 事例から GII.4、2 事例から GII.12 が検出された。2012/13 シーズン前半において検出された GII.4 はすべて Sydney/NEW0514/2012/AU 様の新しいサブタイプであった。GII.4 の VP1 領域の S ドメインおよび P2 ドメインの特定部位のアミノ酸（6、9、15、45、296-298、393-395、412-414）を詳細に観察すると 2011/12 シーズンは 4 種類の変異タイプがあり、一方、2012/13 シーズン前半は 1 種類の変異タイプのみであった（表 6）。この 2012/13 シーズンのタイプは 413 番目のアミノ酸が T に変異しており、過去のシーズンの株では認められなかった（表 7）。過去 6 シーズンで観察されたそれぞれのタイプは概ね 1 シーズンもしくは 2 シーズンで消失し、新しいタイプへ移行していた。

D. 考察

Set C（A 群ロタウイルス、C 群ロタウイルス、アデノウイルス）の蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法については過去の陽性検体については対象ウイルスを問題なく検出できることが確認された。一部対象ウイルス陰性検体からも A 群ロタウイルス、アデノウイルスが検出されたが、これらについては別の検出法（リアルタイム PCR 法）や増幅産物の遺伝子解析で当該ウイルスであることが確認された。このことは、過去の検体の A 群ロタウイルス、腸管アデノウイルスの検査法が ELISA 法であったことから、ウイルス量が ELISA 法の検出限界以下であったため当

時陰性と判断されたものと考えられた。また、Set C のアデノウイルス検出プライマーは腸管アデノウイルス以外の型も検出できるため、これらのウイルスが改めて検出されたものと考えられた。これらのことから Set C の蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法は A 群ロタウイルス、C 群ロタウイルス、アデノウイルスの検出において有効であると思われた。

広島県内の 2010/11 年から 2012/13 シーズン前半までの食中毒疑い、感染性胃腸炎集団発生事例について Set A、B、C の蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法で検査した結果、検出ウイルスのほとんどはノロウイルス GII によるものであった。しかしながら、主要因ウイルス以外に一部の患者便からはノロウイルス GI、アイチウイルス、パレコウイルス、アデノウイルスが検出された。複数のウイルスが検出された 6 事例のうち 5 事例は保育所での感染症事例であり、患者がたまたま保有していたケースと考えられる。この中の食中毒疑いの 1 事例は二枚貝が関係していることも疑われることから、ノロウイルス以外のウイルスの関与も否定できない。今回の結果から、Set A、B、C の蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法を用いることにより 10 種類の下痢症ウイルスを包括的に検査できることがわかり、本法は食中毒疑い、感染性胃腸炎集団発生事例における原因ウイルスの究明に有効なツールとして使用できる。また、コスト面でも通常の RT-PCR を対象ウイルス毎に実施する場合に比べ、試算では 67~84% の費用に抑えることができる。

ノロウイルス GII.4 の VP1 領域におけ

る特定部位のアミノ酸の変異について、その変遷を過去 6 シーズンで比較したところ、検出されたタイプは概ね 1 年から 2 年で消失し、新たに別のタイプへ移行していることが明らかになった。このことはノロウイルスが VP1 タンパクを変異させることでヒトの免疫機構から逃れていることを示しているのかもしれない。また、今回のように VP1 領域の特定部位のアミノ酸を流行シーズン毎に追跡することで、流行タイプの変遷を簡便に知ることができることがわかった。また、2012/13 シーズン前半については、これまでの優勢サブタイプであった 2006b に代わり Sydney/NEW0514/2012/AU 様の新しいサブタイプが出現した。特に広島県では検出された GII.4 はすべてこのサブタイプとなっており、これまでの検出されてきた 2006b を席捲する勢いである。2006 年から検出されてきたサブタイプである 2006b がこのまま消えていくのか、この新しいサブタイプが継続して流行の中心になるのか、今後の動向について引き続き注視する必要があると考えられる。

E. 結論

下痢症ウイルス 10 種 (ノロウイルス GI、ノロウイルス GII、サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス、ボカウイルス、パレコウイルス、A 群ロタウイルス、C 群ロタウイルス、アデノウイルス) を 3 つの反応系で包括的に検査できる蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法を開発した。本法は、増幅遺伝子の色とサイズで検査対象ウイルスを容易に判別でき、食中毒・感染症事例の検査に用いることで

各事例におけるウイルスの感染実態を明らかにすることができた。

ノロウイルスGⅡの優勢ゲノタイプのGⅡ.4は、シーズン毎にカプシドの特定部位アミノ酸が変異し、流行タイプが変遷していることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

重本直樹、久常有里、東久保 靖、谷澤由枝、福田伸治、松尾 健、田中智之、野田 衛：Fast PCR 酵素を用いた蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法による下痢症ウイルスの迅速検出，広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告，20，5-10（2012）

2. 学会発表

重本直樹、谷澤由枝、福田伸治、田中智之、野田衛：下痢症ウイルスの検出法（蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法による下痢症ウイルスの検出）、衛生微生物技術協議会第33回研究会、2012年6月、横浜

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 使用検体の内訳

検体の種類	事例数	検体数
2012/13年シーズン食中毒疑い, 感染性胃腸炎集団発生事例検体	9	23
2011/12年シーズン食中毒疑い, 感染性胃腸炎集団発生事例検体	12	50
2010/11年シーズン食中毒疑い, 感染性胃腸炎集団発生事例検体	16	39
2009/10年シーズン以前の食中毒疑い, 感染性胃腸炎集団発生事例検体	4	7
2005-12年の小児感染性胃腸炎患者便検体		116

表2 マルチプレックスPCRの使用プライマー

使用プライマー	配列 (5' → 3')	標識蛍光	増幅長 (bp)	濃度 (μM)	引用		
Set A	ノロウイルスGI G1SKF	CTGCCCGAATTGTAAATGA	Alexa488	330	0.4	Kojima <i>et al.</i> (2002)	
	G1SKR	CCAACCCARCCATRTACA					
	ノロウイルスGII	G2SKF	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	Alexa594	344	0.4	Kojima <i>et al.</i> (2002)
		G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT				
		G2ALSKR	CCACCAGCATATGAATTGTACAT				
	サポウイルス	SV-F21	ANTAGTGTGGARATGGAGGG	Alexa532	435	0.2	Okada <i>et al.</i> (2002)
		SV-R2	GWGGGRTCAACMCWGGTGG				
	アストロウイルス	AC1'	ATGGCTAGCAAGTCTGACAAG	Alexa350	230	0.2	Sakon <i>et al.</i> (2000)
		AC230	GGTTTTGGTCCTGTGACACC				
	Set B	アイチウイルス C(+) 6261	ACACTCCCACCTCCCGCCAGTA	Alexa488	519	0.4	Yamashita <i>et al.</i> (2000)
		C(-) 6779	GGAAGAGCTGGGTGTCAAGA				
		ボカウイルス HBoV 01.2	TATGGCCAAGGCAATCGTCCAAG	Alexa546	291	0.2	Albuquerque <i>et al.</i> (2007)
HBoV 02.2		GCCGCGTGAAACATGAGAAACAGA					
パレコウイルス AN345		GTAACASWWGCTCTGGGSCCAAAAG	Alexa594	195	0.4	Nix <i>et al.</i> (2008)	
AN344		GGCCCCWGRTCAGATCCAYAGT					
Set C	A群ロタウイルス RotaA-fwd1	GGATGTCCTGTACTCCTTGTCAAAA	Alexa488	145bp	0.4	Logan <i>et al.</i> (2006)	
	RotaA-fwd2	GGAGGTTCTGTACTCATTGTCAAAA	Alexa488				
	Rota rev1	TCCAGTTTGGAACTCATTTCCA					
	Rota rev2	TCCAGTTTGGAACTCATTTCCATT					
	C群ロタウイルス G8NS1	ATTATGCACAGACTATCGCCAC	Alexa594	351bp	0.4	葛谷ら (2003)	
	G8NA2	GTTTCTGTACTAGCTGGTGAAC					
	アデノウイルス Ad-A1m	GCCGCARTGGTCTTACATGCACATC	Alexa546	300bp	0.2	Allard <i>et al.</i> (1992)	
	Ad-A2	CAGCACGCCGGATGTCAAAGT					

表3 マルチプレックスPCR反応条件

Primer Set	Initial activation	3 step cycling			Final extension
		Denaturation	Annealing	Extension	
A, C	94°C/60sec	94°C/30sec	57°C/90sec	72°C/90sec	40
B			55°C/90sec		

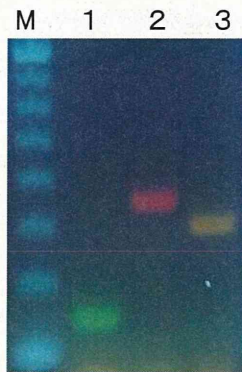


図1.蛍光RT-マルチプレックスPCR(Set C)の電気泳動像

M:100bpラダー, 1:A群ロタウイルス, 2:C群ロタウイルス, 3:アデノウイルス

表4 Set Cの蛍光RT-マルチプレックスPCR検証結果

検体中のウイルス	検体数	蛍光RT-マルチプレックスPCRの検出結果				陰性
		A群ロタウイルス	C群ロタウイルス	アデノウイルス	A群ロタウイルス+アデノウイルス	
A群ロタウイルス	3	3	0	0	0	0
A群ロタウイルス, ノロウイルスGII	1	1	0	0	0	0
A群ロタウイルス, サボウイルス	1	1	0	0	0	0
A群ロタウイルス, サボウイルス, ポカウイルス	1	1	0	0	0	0
A群ロタウイルス, アイチウイルス	1	1	0	0	0	0
C群ロタウイルス	1	0	1	0	0	0
腸管アデノウイルス41	1	0	0	1	0	0
腸管アデノウイルス41, アストロウイルス	1	0	0	1	0	0
ノロウイルスGI	3	0	0	1	0	2
ノロウイルスGII	35	0	0	0	0	35
ノロウイルスGII, アイチウイルス	1	0	0	0	0	1
ノロウイルスGI&GII, アイチウイルス	2	0	0	0	0	2
サボウイルス	4	0	0	1	0	3
アストロウイルス	4	0	0	0	0	4
ポカウイルス	3	0	0	0	0	3
ポカウイルス, エコーウイルス7	1	0	0	0	0	1
パレコウイルス	3	0	0	0	0	3
ポリオウイルス(ワクチン株)	1	0	0	0	0	1
コクサッキーウイルスB-2	1	0	0	0	0	1
陰性	58	4	0	2	1	51
計	126	11	1	6	1	107

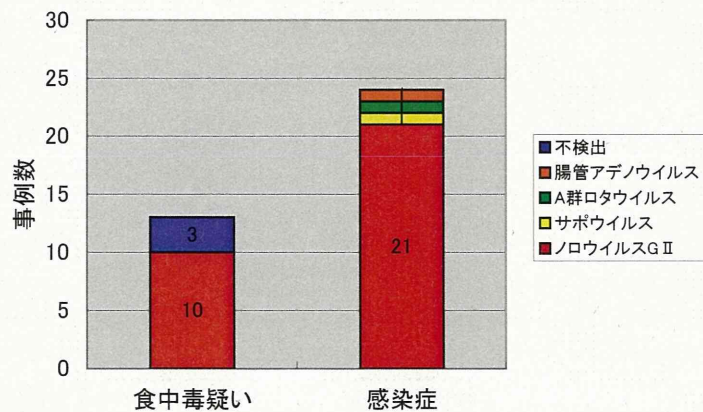


図2 2010/11~2012/13シーズン前半までの食中毒・下痢性感染症事例の原因ウイルス

表5 複数のウイルスが検出された事例の検出状況

分類	主要因ウイルス	その他の検出ウイルス
ケース1 食中毒疑い	ノロウイルスGII	ノロウイルスGI, アイチウイルス
ケース2 感染症	ノロウイルスGII	アデノウイルス2, パレコウイルス
ケース3 感染症	ノロウイルスGII	ノロウイルスGI, アデノウイルス1
ケース4 感染症	ノロウイルスGII	アデノウイルス41
ケース5 感染症	アデノウイルス41	アストロウイルス
ケース6 感染症	ノロウイルスGII	アデノウイルス1

表6 2011/12~2012/13シーズン前半のNoV GII.4検出株のVP1領域における特定アミノ酸の変異状況
アミノ酸の位置

シーズン・事例番号	検体番号	アミノ酸の位置													
		Sドメイン				P2ドメイン									
		6	9	15	45	296	297	298	393	394	395	412	413	414	
2011/12	244	17	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
	246	1	N	S	A	Q	S	H	N	G	T	T	N	V	P
	247	15	N	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	D	V	P
	248	1	N	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	D	V	P
	249	2	N	S	A	Q	S	R	N	G	T	T	N	V	P
	252	1	N	S	A	Q	S	R	N	G	T	T	N	V	P
2012/13	258	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	T	P
	260	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	T	P
	262	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	T	P
	264	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	T	P

表7 流行シーズン毎にみた変異タイプの変遷

変異タイプ ¹⁾	流行シーズン						
	06/07	07/08	08/09	09/10	10/11	11/12	12/13(前半)
NNATSRNSTTNVH (2006b Nijmegen115/2006/NL)	● ²⁾	△					
NNAQTRNGTTNVH	●						
NNAQSRNSTTNVH	●	△	●		△		
NSAQSRNSTTNVH	△ ³⁾						
SNAQSRNSTTNVH	△						
NNAQSRNGTTNVP		●		●			
NNATSRNSTTNAQ		△					
NNATSRNGTTNVH		△					
NNAQSRNGTTNVH			●				
NNAQSHNGTTNVQ				△			
SNTQSRNSTTNIH (2009a NewOrleans1805/2009/USA)				●	●		
SNTQSRNSTTNTNTH				△			
SNAQSRNSTTNVP					●	△	
NNAQSRNSTTNVP					△		
NSAQSHNGTTNVP						△	
NNAQSRNSTTDVP						●	
NSAQSRNGTTNVP						●	
SNAQSRNGTTNTNTH (2012 Sydney/NEW0514/2012/AU)							
SNAQSRNSTTNTP							●

¹⁾ VP1領域の6, 9, 15, 45, 296-298, 393-395, 412-414番目のアミノ酸を示す

²⁾ 複数事例から確認されたタイプ

³⁾ 単発事例でのみ確認されたタイプ

Multiplex real-time PCR を 利用した腸管系ウイルス検査の検討

研究協力者	小和田 和誠	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	山本 希	福井県衛生環境研究センター
研究協力者	平野 映子	福井県衛生環境研究センター
研究協力者	大村 勝彦	福井県衛生環境研究センター

研究要旨

食中毒などの集団発生事例において迅速な検査対応を可能とするために、複数のウイルスを同時に検索する Multiplex real-time PCR 法の導入を目的とした。今年度は、これまでに設計した二種類の検査系を用いて、患者糞便等からの腸管系ウイルスの検索を実施し、本法の有用性を検討した。その結果、2012 年内に採取された感染性胃腸炎疑い小児散発例患者の糞便 26 検体中 17 検体および食中毒等の集団発生 13 事例 149 検体中 2 事例 2 検体からウイルスを検出した。また、2009 年 4 月以降に採取された小児散発例患者の糞便 122 検体および食中毒等の集団発生 64 事例 598 検体の中で、本法によって検出されたウイルスの遺伝子型を調査した結果、多種類の遺伝子型のウイルスを検出していることを確認した。本法は、短時間で多様な腸管系ウイルスの検索が可能なることから、感染症発生動向調査および集団発生時の緊急検査の両者で有用であると考えられた。

A. 研究目的

非細菌性食中毒あるいは地域流行として小児に蔓延する感染性胃腸炎は、毎年患者発生数が多い疾病の一つであり、その発症要因として多様なウイルスの関与が指摘されている。しかしながら、ウイルスの個別検査は操作が煩雑なうえに多くの時間や経費を要し、食中毒などの集団発生事例への迅速な検査対応が困難と

なる。そこで、複数のウイルスを同時に検索する Multiplex real-time PCR 法の導入を検討し、より迅速な検査体制の構築を目的とした。

これまでに、サポウイルス (SaV)、アストロウイルス (AstV)、C 群ロタウイルス (RVC) の同時検出系と、A 群ロタウイルス (RVA)、アデノウイルス (AdV)、エンテロウイルス (EntV) の同時検出系の

2種類の Multiplex real-time PCR 検査系を設計した。本法を用いて、福井県内の下痢症集団発生患者糞便および小児散発例患者糞便等からの腸管系ウイルスの検索を実施し、本法の有用性を検討する。

B. 研究方法

1. 材料

2009年4月から2012年12月の間に採取された感染性胃腸炎疑い小児散発例患者の糞便122検体および食中毒等の集団発生64事例の598検体（糞便532検体、直腸拭い液33検体、嘔吐物5検体、牡蠣2検体、拭き取り26検体）を用いた。

2. 方法

1) Multiplex real-time PCR

糞便および嘔吐物は滅菌水で10%乳剤とし、8,500G、10分間冷却遠心後の上清を試料とし、直腸拭い液は粗遠心後の上清を試料とした。牡蠣は中腸腺摘出後、滅菌水で10%乳剤とし、30%ショ糖を用いた超遠心（36,000rpm、2hr）で濃縮したものを試料とした。試料から、QIAamp Viral RNA mini kit[QIAGEN]を用いて核酸を抽出した。そして、その核酸10 μ Lをテンプレートとして、5 \times First Strand buffer[Life technologies] 4 μ L、DTT（100mM）[Life technologies] 2 μ L、dNTP mix（10mM）[Promega]1 μ L、ランダムプライマー（Nona-deoxyribonucleotide mixture）（1 μ g/ μ L）[TaKaRa] 0.5 μ L、RNase inhibitor（40 U/ μ L）[Wako] 0.25 μ L、Super Script III Reverse Transcriptase[Life technologies]（200 U/ μ L）1 μ L および滅菌水 1.25 μ Lで構成される逆転写反応液を用い、30 $^{\circ}$ C：10分、50 $^{\circ}$ C：60分、98 $^{\circ}$ C：

5分処理する逆転写反応を実施した。得られたcDNA 2 μ Lをテンプレートとして、QuantiTect 2 \times Multiplex PCR Master mix [QIAGEN] 10 μ L、primer/probe set（each 0.2 μ M）3 μ L および滅菌水 5 μ Lで構成されるPCR反応液を用い、95 $^{\circ}$ C：15分処理後、94 $^{\circ}$ C：60秒と57 $^{\circ}$ C：90秒を45回処理する反応条件でMultiplex real-time PCRを実施した。プライマーおよびプローブは、これまでに報告されている（表1）ものを利用し、Aセット（SaV・AstV・RVC）もしくはBセット（EntV・AdV・RVA）の組み合わせで使用した。real-time PCR装置は、StepOne Plus [Life technologies]を使用した。

2) NoVの遺伝子検査

ノロウイルス（NoV）は前述と同様にcDNA合成後、国立感染症研究所発行のウイルス性下痢症診断マニュアル（第3版）のリアルタイムPCR法に準じて検査した。

3) 検出ウイルスの遺伝子型別

NoVは片山ら（Virol. 299, 225-239（2002））、SaVは岡田ら（Arch Virol. 151, 2503-2509（2006））の方法に準じてCapsid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、型別分類を実施した。RVA、AstVについては、国立感染症研究所発行のウイルス性下痢症診断マニュアル（第3版）の方法に準じて、型別のRT-PCRを実施し、型別分類を実施した。また、増幅産物をダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、BLAST検索によってウイルスの型別を確認した。AdVについては、国立感染症研究所発行の咽頭結膜熱・流行性角結膜炎検査診断マニュアル（第2版）に掲載の[PCR_方法 2-1]に準

じて、hexon 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、型別分類を実施した。EntV については、CODEHOP-PCR により、VP1 領域の増幅産物を得て、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、BLAST 検索によってウイルスの遺伝子型を決定した。

(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. 2012 年の小児散発例患者からの検出

2012 年 1 月から 2012 年 12 月の間に採取された感染性胃腸炎疑い小児散発例患者の糞便 26 検体について腸管系ウイルスの検索を実施した結果、NoV は 5 検体から検出された。その他の腸管系ウイルスは、Multiplex real-time PCR によって合計 17 検体 (65.4%) から検出され、その中の 2 検体は NoV 陽性検体であった。検出されたウイルスの内訳は、SaV が 2 検体、AstV が 3 検体、RVA が 11 検体、AdV が 1 検体および EntV が 1 検体であった。この中には混合感染の 1 検体 (RVA と AstV の同時検出) が含まれていた。

2. 2012 年の集団発生事例からの検出

2012 年 1 月から 2012 年 12 月の間に採取された食中毒等の集団発生 13 事例 149 検体について腸管系ウイルスの検索を実施した結果、NoV は 10 事例 66 検体 (44.3%) から検出された。その他の腸管系ウイルスは、Multiplex real-time PCR によって合計 2 事例 2 検体 (1.3%) から SaV が検出され、その中の 1 検体は

NoV 陽性検体であった。

3. ウイルスの遺伝子型別

2009 年 4 月から 2012 年 12 月の間に採取された感染性胃腸炎疑い小児散発例患者の糞便 122 検体および食中毒等の集団発生 64 事例の 598 検体の中で、Multiplex real-time PCR の実施によりウイルスが検出された検体について、ウイルスの遺伝子型別を実施した。

SaV は、GI.1 が 5 検体、GI.2 が 2 検体、GI.3、GII.1、GII.2、GII.5、GIV および GV が各 1 検体であった。AstV は、4 型が 3 検体、1 型および 3 型が各 1 検体であった。RVA は、G1 が 20 検体、G3 が 6 検体、G2 が 1 検体であった。AdV は、41 型が 4 検体、1 型が 3 検体、31 型が 2 検体、2 型および 3 型が各 1 検体であった。EntV は、エコーウイルス (Echo) 25 型が 4 検体、B 群コクサッキーウイルス (CoxB) 2 型が 2 検体、Echo 3 型、Echo 6 型、Echo 9 型、CoxA 6 型、CoxA 9 型、CoxA 16 型、CoxB 1 型および CoxB 4 型が各 1 検体型別された。また、ワクチン株のポリオウイルス (Polio) 1 型が 1 検体、Polio 2 型および Polio 3 型が各 2 検体型別された (表 2)。

D. 考察

感染性胃腸炎疑い小児散発例患者からは、NoV 以外にも RVA や SaV などが検出されており、福井県内においても様々な腸管系ウイルスの流行形態が確認された。今後、これらの NoV 以外のウイルスが集団発生の誘発因子となる可能性があると考えられた。

2012 年の集団発生 13 事例のうち、10 事例 (76.9%) の発生要因は NoV であり、

ウイルスに起因する集団発生事例では NoV が大半を占めるといふこれまでの結果と同様であった。そのため、集団発生の際には、まず初めに NoV の検査を実施し、NoV の関連性が低いと推定された場合に他のウイルス関与の検索を実施することが効率的だと考えられた。

2012 年の集団発生事例において、NoV 以外のウイルスが検出された検体は 2 事例 2 検体 (表 3) であった。いずれも有症者ではなく、調理従事者からの検出であり、集団発生への関与は特定できず、不顕性の散发例が検出されたケースと推定した。Multiplex real-time PCR では複数のウイルスの有無を検索することが可能なため、今回のように想定外のウイルスの検出をすることがある。そのため、ウイルスの流行動態を客観的に把握する方法としても、本法は有用であると考えられた。

検出されたウイルスの型別検査を実施した結果、様々な遺伝子型のウイルスが検出可能であった。本法で検出した遺伝子型のウイルスについては、本法の利用で検索が可能であるウイルスに限られているが、検出されていない遺伝子型のウイルスについては、今後も検査数を増やして検索可能であるか検討する必要がある。

E. 結論

本研究で設計した Multiplex real-

time PCR 法により、NoV 以外の 6 種類の腸管系ウイルスの存在が示唆された。集団発生では NoV が著しく多いため、NoV の検査後に他のウイルス関与の検索を実施することが効率的である。本法は、短時間で様々な遺伝子型の腸管系ウイルスが検出可能であり、客観的にウイルスを検索することから、感染症発生動向調査および集団発生時の緊急検査の両者で有用であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

小和田和誠, 東方美保, 山本希, 平野映子, 中村雅子, 大村勝彦: Multiplex real-time PCR 法を利用した福井県内の胃腸炎ウイルスの検出. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月, 大阪府大阪市

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

表1 Multiplex real-time PCR で使用するプライマーおよびプローブ

	プライマー	プローブ	標的領域	出典
S a V	SaV124F、SaV1F SaV5F、SaV1245R	SaV124TP、 SaV5TP	Polymerase	Oka, et al. (2006)
A s t V	HastV.fwd、HastV.rev	HastV.probel+2	Capsid	Logan, et al. (2007)
R V A	JVKF、JVKR	JVKP	NSP3	Jothikumar, et al. (2009)
R V C	CRV7F、CRV7R	CRV7	VP7	Mori, et al. (2012)
A d V	JTVXF、JTVXR	JTVXP	Hexon	Jothikumar, et al. (2005)
E n t V	Enteroprimer1F、 Enteroprimer1R	Enterotaqman1	5'-UTR	Nijhuis, et al. (2002)

表2 Multiplex real-time PCR で検出されたウイルス

	2009	2010	2011	2012	Total
S a V	G I . 1 (1)	G I . 1 (2) G I . 2 (1) G II . 2 (1) G II . 5 (1) G V (1)	G I . 1 (2)	G I . 2 (1) G I . 3 (1) G II . 1 (1) G IV (1)	13
A s t V		Type3 (1) Type4 (1)		Type1 (1) Type4 (2)	5
R V A	G3 (1) G3 (1)	G1 (5)、G2 (1) G3 (2)	G1 (2)、G1 (1) G3 (3)	G1 (11)	27
R V C			(4)		4
A d V	Type2 (1) Type3 (1) Type41 (2)	Type31 (1)	Type1 (1) Type1 (1) Type31 (1) Type41 (2)	Type1 (1)	11
E n t V	CoxA9 (1) CoxB4 (1) Echo9 (1) Echo25 (4) Polio1 (1)	CoxA16 (1) CoxB1 (1) CoxB2 (2) Enterov71 (1)	CoxA6 (1) Echo3 (1) Polio2 (2) Polio3 (2)	Echo6 (1)	20

※ (内)・・・陽性検体数

※太字・・・集団発生事例からの検出

表3 集団発生事例からの Multiplex real-time PCR によるウイルスの検出

No.	初発患者 発生年月日	発生施設	発症者 数	NoV 陽性数 ／検査数	Multiplex 陽性数／検査数	Multiplex 陽性ウイルス [患者種別]	推定 感染経路
1	2012. 2. 21	社員食堂	26	6/8	1/8	SaV (G I . 2) [従事者 1 名]	ヒト-ヒト 感染
2	2012. 3. 20	飲食店	3	0/6	1/6	SaV (G I . 3) [従事者 1 名]	不明

終末処理場の処理前の下水における
ノロウイルス等汚染実態調査

研究協力者	三上 稔之	青森県環境保健センター
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
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	東海林 彰	青森県環境保健センター
研究協力者	古川 紗耶香	青森県環境保健センター

研究要旨

地域のノロウイルス (NV) や A 型肝炎ウイルス (HAV) 等の汚染実態を明らかにするため、下水処理施設に流れ込む処理前の下水を経時的に採水し、ウイルス検出を実施した。検出されたウイルス遺伝子濃度と感染症発生動向調査の感染性胃腸炎患者情報との相関について検討した。下水を経時的に採取し、モニタリングした結果、合流水では、NVG I 型、NVG II 型、アストロウイルス (AstV) は 5 検体全てから検出された。分流水では、NVG I 型、NVG II 型、AstV は 13 検体全て、サポウイルス (SaV) は 7 検体、エンテロウイルス (EV) は 6 検体、アデノウイルス (AdV) は 1 検体から検出された。合流水から A 型肝炎ウイルス (HAV)、SaV、EV、RotaV 及び AdV は検出されなかった。分流水から HAV、RotaV は検出されなかった。

A. 研究目的

NV、SaV、AstV、EV、RotaV および AdV 等は、下痢等を主症状とする急性胃腸炎の原因ウイルスである。それらのウイルスは感染者の腸管内で増殖し、糞便中に排泄され、各家庭の汚物が下水に流入することから、下水処理施設に流れ込む処理前の汚水を経時的に採水し、ウイルス検出を実施することで、地域の NV 等の汚染実態を明らかにすることができる。

本研究では、検出されたウイルス遺伝子濃度と感染症発生動向調査の感染性胃腸炎患者情報との相関について検討した。

B. 研究方法

1. 材料

2012 年 1 月～12 月に下水処理施設の流入水である合流水を 5 検体と分流水を 13 検体 (1～2 回/月) 採取し、ウイルス検出に用いた。

2. 方法

(1) 検体処理

合流水及び分流水の濃縮は、各 1L を 3,000 rpm、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%、0.5 M NaCl になるように添加し（以下、PEG 濃縮という）、常温で 2 時間攪拌後、3,000 rpm、20 分間冷却遠心を行い、沈渣を (-)PBS1.0 mL に懸濁し、再度 3,000 rpm、20 分間遠心を実施した。

(2) RNA 抽出とウイルス遺伝子検出

RNA 抽出は、QIAamp Vial RNA Mini Kit(QIAGEN)により行った。cDNA 合成は DNase 処理後、RT 反応により行った。

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

下水流入水からの NV、AstV および HAV はリアルタイム PCR 法により、SaV、EV、および RotaV は RT-PCR 法により、AdV は PCR 法により行った。

NV は、Kageyama らの方法 (J. Clin. Microbiol. 2003) 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。

SaV は、Yan らの方法 (J. Virol. Methods. 2003.) により、SLV5317/SLV5749 (434 bp) を用い、反応条件は熱変性 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 で実施した。

AstV は、Yokoi らの方法 (感染症雑誌.2009) により、フォワードプライマーに HuAstVf2240、HuAstVf2140 及び HuAstVf2239T4 を、リバースプライマーに HuAstVr4123 を、プローブに HuAstV/1-8/TP を用いて実施した。

EV は、Ishiko らの方法 (J. Infect. Dis. 2002) により、OL68-1/EVP2 プライマーを用い、反応条件は熱変性 95 °C 2 分、アニーリング 50 °C 30 秒、伸長反応 72 °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。AdV は、Miura-Ochiai らの方法 (J. Clin. Microbiol. 2007) により、AdnU-S' 20743/AdnU-A2 21296 (554 bp) を用い、反応条件は熱変性 94 °C 30 秒、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 で実施した。RotaV は、ウイルス性下痢症診断マニュアル (第 3 版) により、Beg9 1/End9 1062 (1062 bp) を用い、反応条件は熱変性 94 °C 1 分、アニーリング 42 °C 2 分、伸長反応 72 °C 3 分を 1 cycle として、30 cycle で実施した。

(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、不要である。

C. 研究結果

2012年1月～12月に採取した下水処理施設の合流水5検体および分流水13検体について、ウイルス遺伝子検出成績を表1に示した。流水では、NVGⅠ型、NVGⅡ型、AstVは5検体全てから検出された。NVGⅠ型の検出コピー数は、最小コピー 6.5×10^3 ～最大コピー 5.3×10^4 コピー/mL、NVGⅡ型は 3.3×10^4 ～ 3.6×10^5 コピー/mL、AstVは 5.0×10^3 ～ 1.1×10^5 コピー/mLの範囲で検出された。分流水では、NVGⅠ型、NVGⅡ型、AstVは13検体全てから検出された。NVGⅠ型の検出コピー数は、最小コピー 3.4×10^3 ～最大コピー 1.9×10^6 コピー/mL、NVGⅡ型は 8.1×10^4 ～ 2.5×10^6 コピー/mLであった。AstVは 1.1×10^5 ～ 9.3×10^6 コピー/mLの範囲で検出された(表1、図1、図2)。その他、分流水からSaVは7検体、EVが6検体、AdVが1検体から検出された。合流水からHAV、SaV、EV、RotaVおよびAdVは検出されなかった。分流水からHAV、RotaVは検出されなかった(表2)。

D. 考察

合流水と分流水のNVGⅠ型のコピー数を比較すると、合流水では 6.5×10^3 ～最大コピー 5.3×10^4 コピー/mL 分流水では 3.4×10^3 ～最大コピー 1.9×10^6 コピー/mLと雨水を含まない分流水は雨水を含む合流水よりもウイルス量は10～100倍多く検出された。合流水と分流水のNVGⅡ型のコピー数の比較では、NVGⅡ型は合流水では 3.3×10^4 ～ 3.6×10^5 コピー/mL 分流水では 8.1×10^4 ～ 2.5×10^6 コピー/mLであり、NVGⅠ型の結果と同様に雨水を含ま

ない分流水は雨水を含む合流水よりもウイルス量は10～100倍多く検出された。合流水と分流水のAstVのコピー数の比較では、合流水では 5.0×10^3 ～ 1.1×10^5 コピー/mL 分流水では 1.1×10^5 ～ 9.3×10^6 コピー/mLとNVと同様に分流水の方が10～100倍多く検出された。これらのことから、合流水は雨水等の影響を受けることが考えられるが、分流水は雨等の天候による影響を受けないと考えられ、地域のNV等の汚染実態を把握する科学的データとして有効であると考えられる。

また、下水からのNVGⅠ型とNVGⅡ型のウイルス検出コピー数は、NVGⅠ型とNVGⅡ型原因の集団事例や散发事例の発生状況と同様、秋から春に多く検出され、中でもNVGⅡ型が多く検出された。このことは、NVGⅡ型がNVGⅠ型よりもヒトに感染しやすいことやヒトの腸内で増殖しやすいことが推測される。また、発症者が大量のNVを排泄し、下水から大量のNVが検出されていると考えられる。

図3に示したようにNVによる感染者は、感染性胃腸炎患者報告数の増加後にNVが多く検出され、集団事例や散发事例の発生時、多くの患者ら排泄されたウイルスが下水に混入することにより、流行していることが推測される。一方、患者報告数の増加前にもNVが検出されたことから、散发事例の発生動向を監視するとともに下水から極少量のNV検出においては、NV患者増加の前兆と考えられる。

図4ではAstVについて、冬季はNV(図3)と同様の傾向を示し、患者発生の動向の推測が考えられる。AstVは、初冬に多く検出され、冬季の感染性胃腸炎患者

の中には NV 以外に AstV も含まれていたと推測される。また、AstV が多く検出された初冬と検出が少ない冬から春の患者報告数を比較すると、患者報告数が増加していない状況から、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、受診しても胃腸炎として診断されないことが推測される。本研究において、年間を通して、下水から 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、患者便やその付着物等を適切な消毒方法により処理することが重要である。

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 EV が下水から検出され、NV 等急性胃腸炎ウイルス以外の感染症に起因するウイルスも下水から検出された。地域の感染症の発生動向を推測する一手段になると考えられる。検出された EV は、複数のウイルス遺伝子の存在が考えられ、複数の EV を解析することにより地域の発生状況や原因ウイルスを把握することができ、感染症の拡大防止対策の科学的根拠に寄与することができると考えられる。

E. 結論

合流水では、NVG I 型、NVG II 型及び

AstV は 5 検体全てから検出された。分流水では、NVG I 型、NVG II 型及び AstV は 13 検体全て、SaV は 7 検体、EV は 6 検体、AdV は 1 検体から検出された。合流水から HAV、SaV、EV、RotaV 及び AdV は検出されなかった。分流水から HAV、RotaV は検出されなかった。

NV による感染者は、感染性胃腸炎患者報告数の増加後に NV が多く検出され、集団事例や散発事例の発生時、多くの患者ら排泄されたウイルスが下水に混入することにより、流行していることが推測される。一方、患者報告数の増加前にも NV が検出されたことから、散発事例の発生動向を監視するとともに下水から極少量の NV 検出においては、NV 患者増加の前兆と考えられる。

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