

表1 合流水・分流水からのNVG I・NVG II・AstV検出成績

単位：コピー/mL

2012年 週	NVG I		NVG II		AstV	
	合流水	分流水	合流水	分流水	合流水	分流水
2	1.2E+04	1.9E+06	4.0E+04	1.2E+06	4.8E+04	1.1E+06
4	1.1E+04	4.2E+05	3.6E+05	2.5E+05	1.1E+05	6.1E+05
7	5.3E+04	2.3E+05	8.5E+04	1.2E+06	2.3E+04	6.2E+05
9	6.5E+03	6.0E+05	3.3E+04	6.5E+05	5.0E+03	2.9E+05
11	9.0E+03	2.4E+05	4.8E+04	6.8E+05	6.5E+03	2.7E+05
15		1.2E+05		3.5E+05		1.7E+05
18		8.2E+03		8.5E+05		2.1E+05
23		3.4E+03		1.7E+06		8.1E+05
27		9.8E+04		8.1E+04		1.1E+06
7月下旬～11月上旬：下水処理施設工事のため、調査できず						
46		2.5E+04		2.5E+06		1.1E+05
48		1.4E+05		6.8E+05		9.3E+06
50		2.3E+04		4.5E+05		1.5E+06
52		1.6E+05		1.3E+06		2.8E+06

表2 合流水・分流水からのウイルス検出数

	検体数	NVG I	NVG II	AstV	SaV	EV	HAV	RotaV	AdV
合流水	5	5	5	5	0	0	0	0	0
分流水	13	13	13	13	7	6	0	0	1

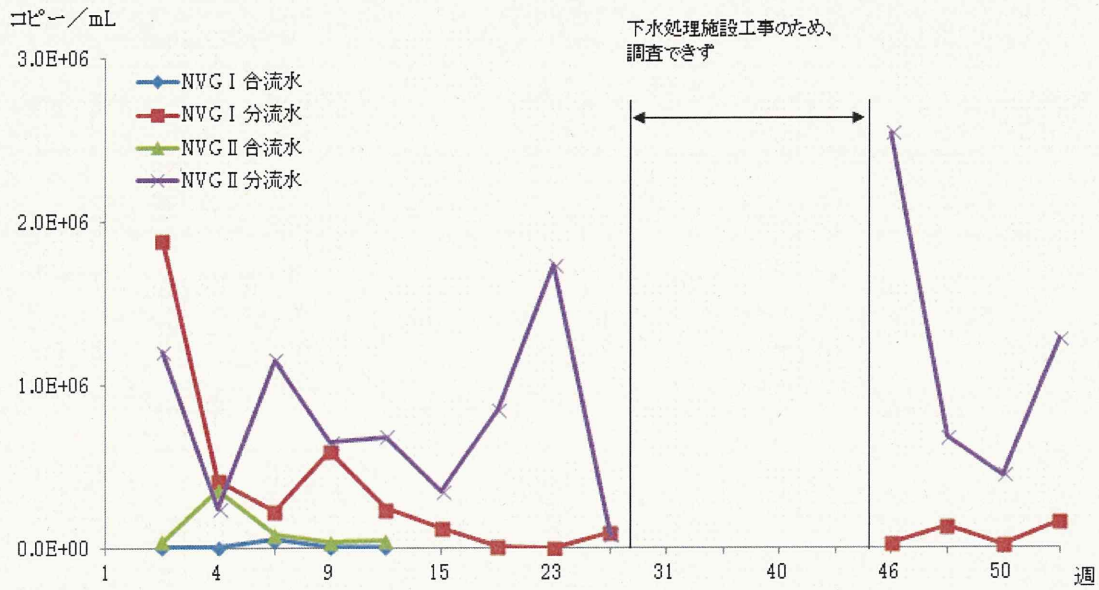


図1 合流水・分流水からのNVG I・NVG IIの検出推移

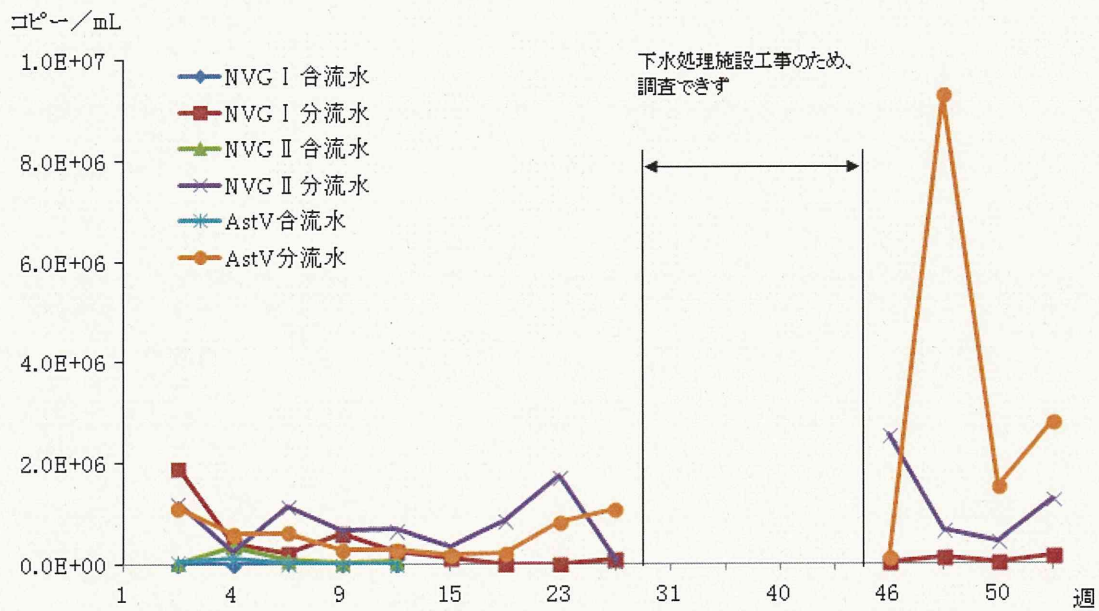


図2 合流水・分流水からのNVG I・NVG II・AstVの検出推移

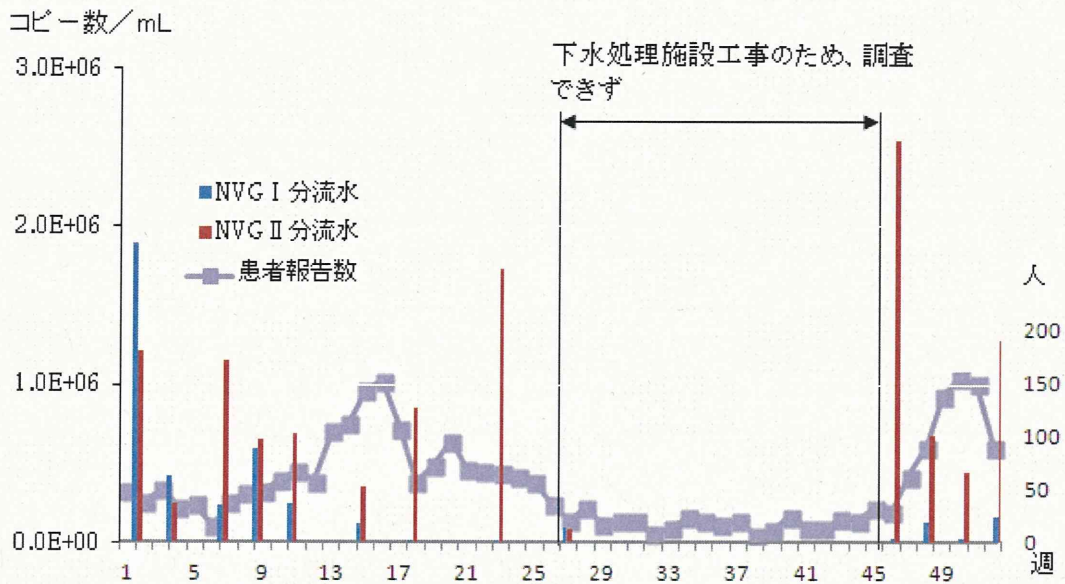


図3 合流水・分流水のNVG I・NVG IIの検出コピー数・感染性胃腸炎患者報告数

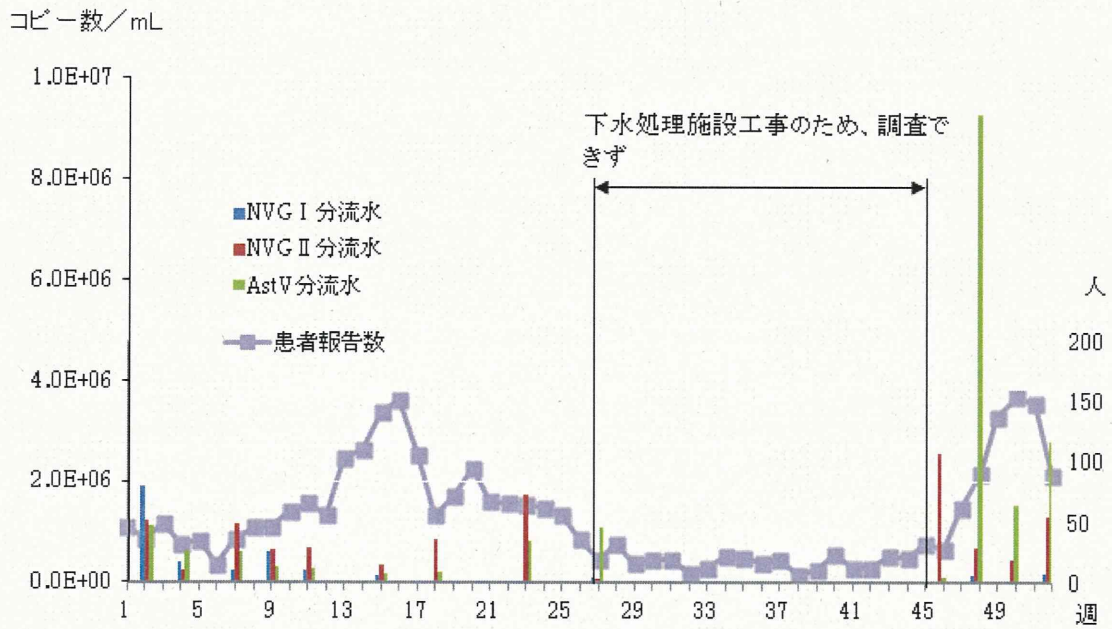


図4 合流水・分流水のAstVの検出コピー数・感染性胃腸炎患者報告数

## 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 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	稲崎 倫子	富山県衛生研究所
研究協力者	板持 雅恵	富山県衛生研究所
研究協力者	嶋 一世	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	小渕 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) の流行状況を調査し、また、岩ガキによるウイルス性食中毒のリスクを推測するため、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. 13、GII. 2、GII. 3、SaV GI. 1 などが検出された。下水流入水からは、NoV GII. 4、GI. 4、GI. 6、SaV GI. 1 などが検出された。岩ガキからは NoV、SaV とともに検出されなかった。2012 年の NoV は例年と同様に NoV GII. 4 が主体であったが、2011/12 シーズンには 2009a と 2006b 亜型が、2012/13 シーズンは 2006b と 2012 亜型が主流であった。2003 年以降の NoV についてキメラウイルスの有無を調べたところ、12 種類が得られた。カプシド領域で GII. 2 や GII. 3 となる NoV では、それぞれ 3 つのタイプのポリメラーゼが存在し、一時的な流行にキメラウイルスが関与した可能性が示唆された。

### A. 研究目的

これまで、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てきた。さらに、2011 年より岩ガキからも NoV、SaV の検出を試みた。引き続き、2012 年の NoV、SaV の流行状況を把握する

とともに、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 のカプシド領域 (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。昨年度報告書では、2003～2011 年の NoV GII. 3 について調査したが、さらに全

ての型を対象に組み換え型（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を目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 2012年の患者検体

富山県において2012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研究に用いた。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の検出には、リアルタイムPCRを用い、PCRには、キメラウイルスの検出と同じプライマー（後述）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。NoVの型別にはカプシド領域を対象としたプライマーG1-SKF/G1-SKR、G2-SKF/G2-SKRの部分を用いた。

### 2. 下水流入水

県西部に位置する下水処理場において、2012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

2012年5月から7月までの計7回、富山県の3漁港で採取した岩ガキ63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、リアルタイムPCRとPCRを用いた。PCR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及びG1-SKF/G1-SKR (GI用)、COG2F/G2-SKR及びG2-SKF/G2-SKR (GII用)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。

### 4. NoVキメラウイルスの検出

2003~2011年に富山県で得られたNoV陽性の患者糞便検体cDNA 435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/G1-SKR及び1364f/G1-SKR (GI用) 1421f/NV2oR及び1364f/G2-SKR (GII用) (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、GI : 496bp、GII : 499bp) とカプシド領域 (ORF2 の 5' 末端側、GI : 295bp、GII : 282bp) を、Norovirus Genotyping Tool ( URL : <http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool#>) を用いてそれぞれ型別した。

#### (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 29 事例あり (表 1)、事例数としては 2010 年の 24 事例と同等で、2011 年の 11 事例に比べ増加した。1 事例からは SaV が検出され、富山県では初めての SaV 単独による集団発生事例であった。それ以外は全て NoV が検出された。29 事例中食中毒事例は 13 事例であり、2011 年の 2 事例より大幅に増加した。3 事例はカキ (4 月 1 事例で加熱カキ、12 月 2 事例で生ガキ) を喫食していた。

小児散発例は、ウイルスが検出された 21 例中 10 例が NoV、2 例が SaV であった (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

集団発生の患者からは NoV GII. 4、GII. 13、GII. 2 などが検出された (表 1)。散発例の患者からは NoV GII. 4、GII. 3、SaV GI. 1 などが検出された。(表 2)。下

水流入水からは、NoV GII. 4、GI. 4、GI. 6、SaV GI. 1 などが検出された (表 3)。岩ガキからは NoV、SaV ともに検出されなかった。

#### 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)。4 月の患者から検出された GI は、型不明であった。下水からは多数の GI. 4 が検出され、塩基配列も多様であった。一方、下水からの GI. 6 は互いに非常に近縁であった (相同性 99.7~100%)。患者由来の NoV と下水由来の NoV は、NoV GII. 3 では相同性 99.7~100%、GII. 13 では相同性 99.3~100%と非常に近縁であった (図 2)。7 月の下水から、型不明の GII が検出された。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)、2012 亜型 (Sydney/NSW0514/2012/AU と近縁; 田村ら, 病原微生物検出状況 (IASR), 33 : 394, 333-334, 2012) に分けられた (図 3)。2009a 亜型は 3 月まで、2012 亜型は 11 月~12 月、2006b 亜型は 1~4 月と 11~12 月のいずれの時期にも検出された。下水の GII. 4 は、5 月まで 2006b 亜型が主流で、11~12 月は全て 2012 亜型であった。

#### 4. キメラウイルスの解析

2003~2011 年に富山県で得られた NoV 陽性の患者糞便検体 cDNA 435 検体のうち、387 検体 (GI : 27 検体、GII : 360 検体) から塩基配列が得られた。Norovirus Genotyping Tool でポリメラーゼ領域とカプシド領域で型別が異なったのは 12 種

類 (GI : 13 検体、GII : 112 検体) であった (表 4)。なお、これらのうち、カプシド領域で GII. 3 のタイプについては昨年度の報告書に掲載した。カプシド領域で GII. 2 の NoV は、年によって流行タイプが異なっていた (図 4)。NoV GII. 2 は 2010 年から 2011 年にかけて多く検出されていたが、GII. 16 とのキメラウイルスの増加が顕著に認められた。また、2002/2003 シーズンには GII. 12 とのキメラウイルスが確認された。

#### D. 考察

患者からも下水からも、例年通り NoV GII. 4 の検出が最も多く、特に 11 月以降主流となっていた。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、2006b 亜型は、2011 年には 1~3 月にしか検出されなかったが、今回は 2011/12、2012/13 の 2 シーズンにまたがるように検出された。一方、2009a 亜型は 2012/13 シーズンには検出されなくなり、代わって 2012 亜型が流行し始めた。2011 年の調査では、2006b 亜型から徐々に 2009a 亜型に置き換わりつつある傾向を示したものの、今回の調査では 2006b が再興し、そこへ 2012 亜型も新たに流行し始めていた。また、11 月以降、患者からは 2006b、2012 亜型ともに検出されたのに対し、下水からは 2012 亜型しか検出されなかったのは、2012 亜型が 2006b 亜型よりもウイルス量が多かったためと考えられる。

2011 年の調査で下水から減少していた NoV GI. 4 は、再び増加する傾向を示した。しかしながら患者からは検出されず、

2010 年の調査報告と同様、依然として不顕性感染が多いと推測された。

NoV GII. 2 は、2011 年に患者、下水、岩ガキから検出されたが、2012 年は患者検体からしか検出されなかった。検出時期は 3、4 月のみであった。他に、1~2 月に GII. 3、3~6 月に GII. 13 の一時的な流行があったと考えられた。

下水や患者から型不明の NoV が検出され、今後、これらの NoV による流行が危惧される。

SaV はこれまで小児散発例から検出されることが多かった。下水からもしばしば検出されており、小児に病原性を示すことが多いが、成人では感染しにくい、不顕性感染していると考えられる。しかしながら、今回、富山県では初めての SaV による集団感染事例が発生した。この集団の年齢構成は 20 代から 50 代であったため、小児に加え、成人での SaV 感染リスクも無視できないと考えられた。

今回、富山県産の岩ガキから NoV や SaV は検出されなかった。しかしながら、2011 年の調査で NoV が検出されていること、岩ガキによる食中毒事例がしばしば報告されていることから、引き続き岩ガキの生食には感染リスクが伴うことを留意する必要があると考えられた。

2003 年以降の NoV についてキメラウイルスの有無を調べたところ、12 種類が得られた。昨年の結果と合わせると、NoV GII. 2 や GII. 3 の一時的な流行 (2005/06、2009/10、2010/11 シーズン) にキメラウイルスが関与した可能性が示唆された。

#### E. 結論

2012年のノロウイルス流行型は例年通りGII.4であったが、2011/12シーズンは2009aと2006b亜型が、2012/13シーズンは2006bと2012亜型が主流であった。NoV GI.4は不顕性感染が多い傾向を示した。

2003年以降のNoVを調査したところ、多数のキメラウイルスが存在していることが示された。中でも、NoV GII.2やGII.3の一時的な流行にキメラウイルスが関与した可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) 佐多徹太郎，名古屋（小原）真弓，滝澤剛則：ノロウイルス組換え株が感染性胃腸炎の流行に与える影響。平成24年度 北陸腸内細菌研究会研究発表会，金沢市，平成24年7月14日

- 2) 名古屋（小原）真弓，板持（岩井）雅恵，稲崎倫子，堀元栄詞，小淵正次，佐多徹太郎，滝澤剛則：ノロウイルスにおけるキメラウイルスが感染性胃腸炎の流行に与える影響。第60回日本ウイルス学会学術集会，大阪市，平成24年11月13～15日

## 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

本研究の実施にあたりご協力いただいた富山県内各厚生センター、富山市保健所、生活衛生課、健康課の皆様に深謝いたします。



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型不明				1									1
	GII.2			2	1									3
	GII.4	1	2	2								4	⑥	15
	GII.6			2										2
	GII.12												1	1
	GII.13			3	③									6
サポ	GI.2			1										1
計		1	2	10	5	0	0	0	0	0	0	4	7	29

(数値：事例数)

○はカキ関連事例（2重丸は2事例あったことを示す）

GI型不明は、塩基配列が得られたものの、型別ができなかったことを示す。

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.3	1	1											2
	GII.4	1										2	4	7
	GI型不明+GII.3	1												1
サポ	GI.1					1	1							2
計		3	1	0	0	1	1	0	0	0	0	2	4	12

(数値：検体数)

GI型不明は、リアルタイムPCRで陽性だったものの、PCRで陰性だったことを示す。

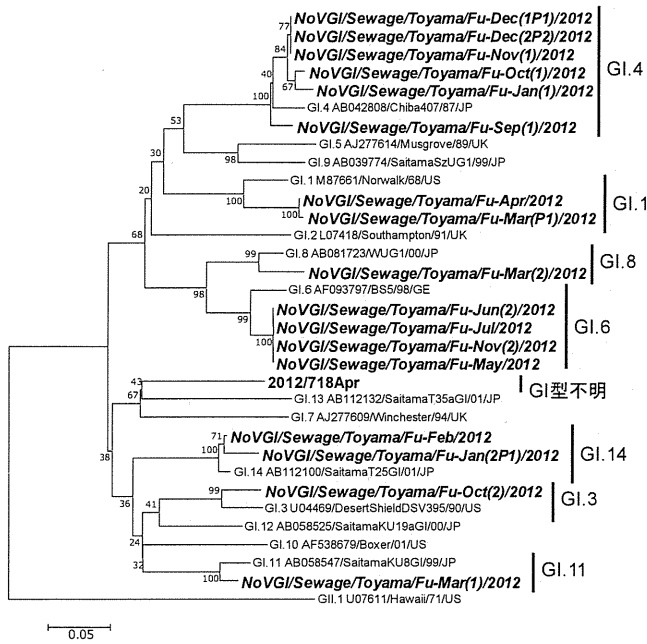
表 3. 下水流入水におけるノロウイルス及びサポウイルス検出状況

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.3												
	GI.4												
	GI.6												
	GI.8												
	GI.11												
	GI.14												
ノロ	GII型不明												
	GII.3												
	GII.4												
	GII.12												
	GII.13												
サポ	GI.1												
	GI.2												

ウイルスが検出された月を灰色で示した。

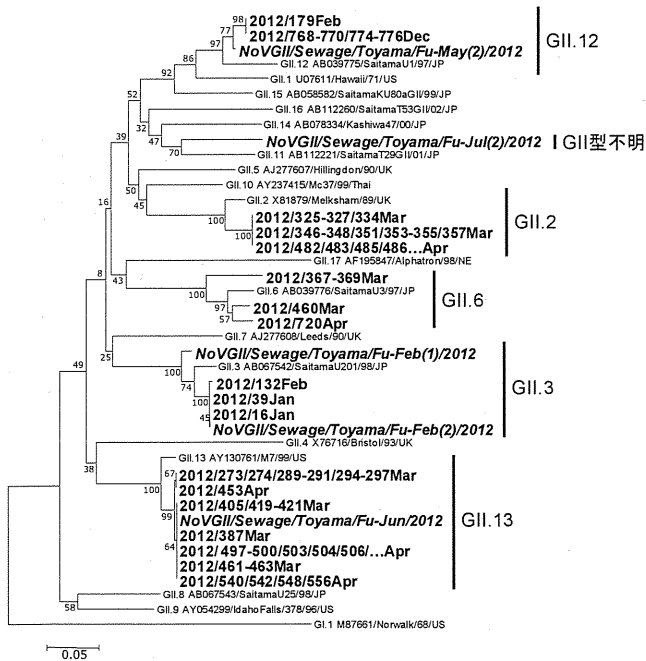
GII型不明は、塩基配列が得られたものの、型別ができなかったことを示す。

図 1. ノロウイルス GI の系統樹



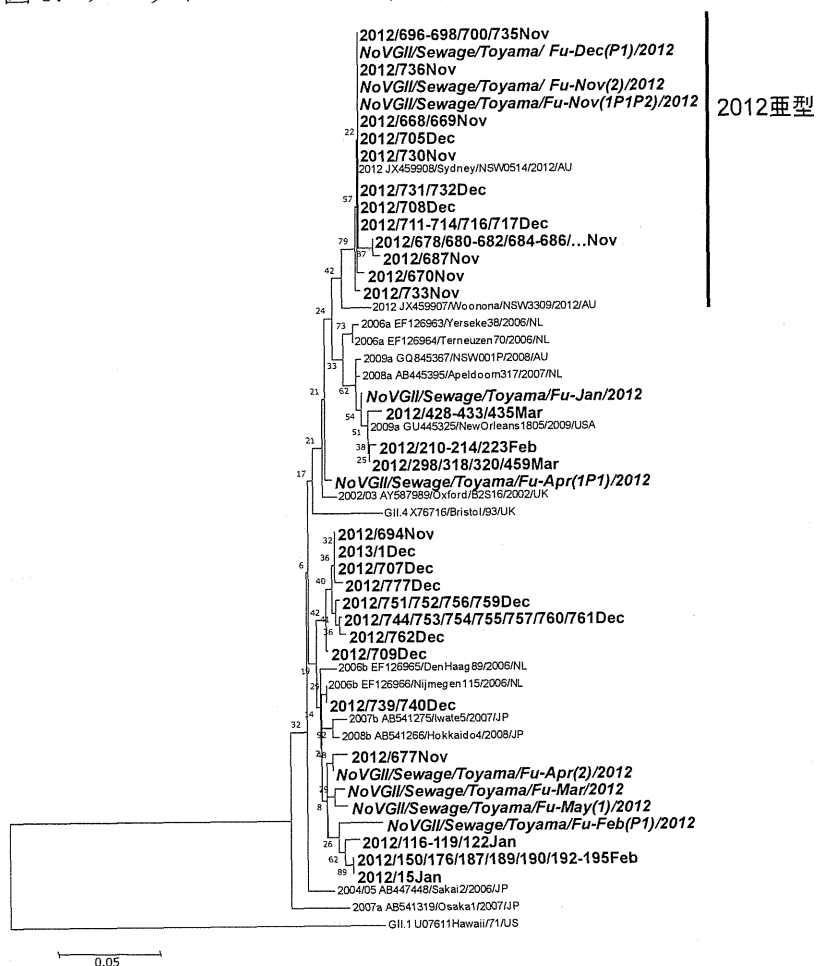
太字のうち斜体は下水流入水から、それ以外は患者から検出されたウイルスを示す。その他は参考株（型別 accession no./株名）を示す。

図 2. ノロウイルス GII の系統樹 (GII.4 除く)



株名については図 1 と同じ。

図 3. ノロウイルス GII.4 の系統樹



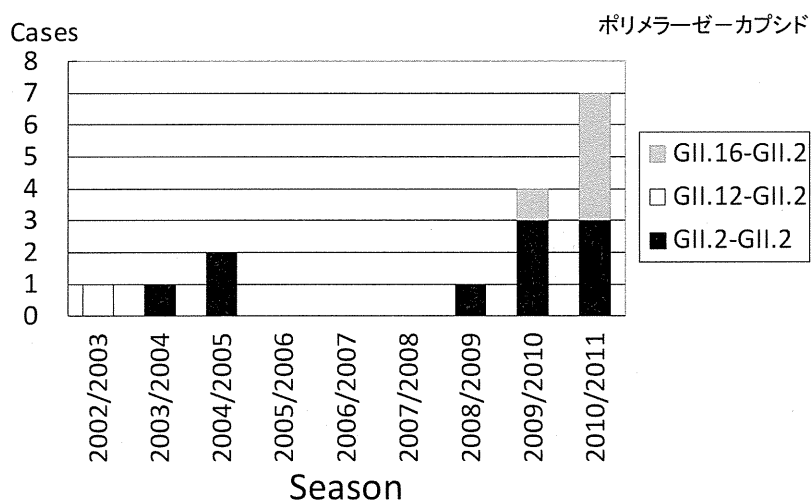
株名については図 1、2 と同じ。GII.4 参考株については (亜型 accession no./株名) で示す。

表 3. 2003～2011 年の検体から得られたノロウイルスのキメラウイルス

ポリメラーゼ(ORF1) 遺伝子型	カプシド(ORF2) 遺伝子型	検体数	検体採取年
GI.d	GI.3	4	2005、11年
GI.b	GI.6	7	2006、08、10年
GI.e	Could not assign	2	2011年
GI合計		13	
GII.12	GII.2	2	2003年
GII.16	GII.2	8	2010、11年
GII.b	GII.3	17	2003、05、06、09、10年
GII.12	GII.3	16	2005、06、10年
GII.12	GII.4	20	2004、05、06年
GII.d	GII.5	2	2006年
GII.7	GII.6	25	2004～09年
GII.g	GII.12	7	2010、11年
GII.7	GII.14	15	2007、08、11年
GII合計		112	

GI. e-Could not assign は国内の分類だと GI. 13-GI. 13 となる。  
 GII. 7-GII. 14 は国内の分類だと GII. 7-GII. 13 となる。

図 4. ノロウイルス GII. 2 のシーズンごとの変化



集団発生は 1 事例 1Case、散发例は 1 症例 1Case として合計を計数した。

平成 24 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

## 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
	三好 龍也	堺市衛生研究所
	久保 裕季子	堺市衛生研究所
	芝田 有理	堺市衛生研究所
	吉田 永祥	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

2012 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と下水由来の環境検体の両面からノロウイルス (NV) や患者発生の頻度は低いですが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、流行の全体像について考察した。

NV 感染では遺伝子型 GII. 4 が流行の優位株であった。GII. 4 2012 変異株は 10 月の臨床検体および環境検体から認められ、10 月以降急速に感染拡大し、変異株優位の流行状況となった。また、臨床検体からは 3 種類の NV 遺伝子型が検出されたのに比べ、環境検体では 13 種類もの検出があったこと、また、SaV、AsV、AiV は臨床検体からの検出頻度は低かったが環境検体からは頻度高く検出されたことから、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。

### 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 や患者発生の頻度は低いですが食中毒の起因ウイルスとなり得る他の下

痢症ウイルスの検出を試み、感染性胃腸炎流行動態の全体像を把握する一助とする。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

期間：2012 年 1 月から 12 月

臨床検体：集団発生 9 事例から得られた NV 9 株と散発発生の感染性胃腸炎患者便

107 検体を用いた。

環境検体：堺市内の下水処理場 3 定点の流入水および放流水各 2000ml を毎月採取した。これら流入水 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。

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し、フィルターを細断し、2.0ml の pH10.5 グリシン buffer で溶出後、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 抽出し、ABI PRISM 7900 で、GI および GII のリアルタイム PCR 法で測定し(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 のウイルス遺伝子をそれぞれ検出した(国立感染症研究所下痢症ウイルス検出マニュアル)。

(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

- 2012 年 1 月から 12 月かけて、集団発生は少なく推移していたが 11 月以降 NV GII.4 型による発生が増加した。関与した NV 遺伝子型は GII.4 のみであった。散発発生でも検出されたウイルスは GII.4 が最も多く 88%を占め、特に 10 月以降多発した。(図 1.)。遺伝子解析の結果 10 月に検出された NV は GII.4 2012 変異株であり、以降に検出された GII.4 は集団・散発発生ともに変異株であった。
- 2012 年の環境検体の NV 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 2.)。
- NV 遺伝子型別検出状況を見ると、臨床検体では GI.4、GII.4、13 計 3 種類が検出された(図 1)。環境検体では GI.1, 2, 10, 13, 14、GII.2, 4, 6, 10, 11, 12, 13, 14 計 13 種類が検出された(表 1.)。この結果から当市では少なくとも、GI が 6、GII が 8、計 14 種類の遺伝子型 NV の浸入・暴露が推測された。
- 環境水の NV 遺伝子の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検出された。特に、GII.4 2012 変異株は 10 月以降の採取水から認められ、検出された GII.4 すべてが変異株であった(図 3.)。
- NV 以外の下痢症ウイルスは臨床検体から SaV 1 例のみの検出であった。しか

し、環境検体では SaV, AiV, AsV ほどの定点からも頻度高く検出された(表 2.)。

#### D. 考察

2012 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 感染では遺伝子型 GII.4 が流行の優位株であった。GII.4 2012 変異株は 10 月の臨床検体および環境検体から認められ、10 月以降急速に感染拡大し、変異株優位の流行状況となった。

NV では臨床検体からは 3 種類の遺伝子型が検出されたのに比べ、環境検体では 13 種類もの検出があった。また、SaV, AsV, AiV は臨床検体からの検出頻度は低かったが環境検体からは頻度高く検出された。これらのことから、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。

これらの結果から下痢症ウイルス感染の全体像の把握には臨床と環境検体の両面からウイルス検出を実施することは有

効な手法であると考えられた。

#### E. 結論

堺市内における下痢症ウイルス浸淫状況を臨床と環境検体の両面から遺伝子学的検索を行い、流行実態との関連性を検討した。

今回の調査から、臨床症状として表面化しない多様な遺伝子に起因する下痢症ウイルスの関与が示唆された。また、変異株の出現による感染拡大の把握にも有効であり、今後も調査研究を継続する必要がある。

#### 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

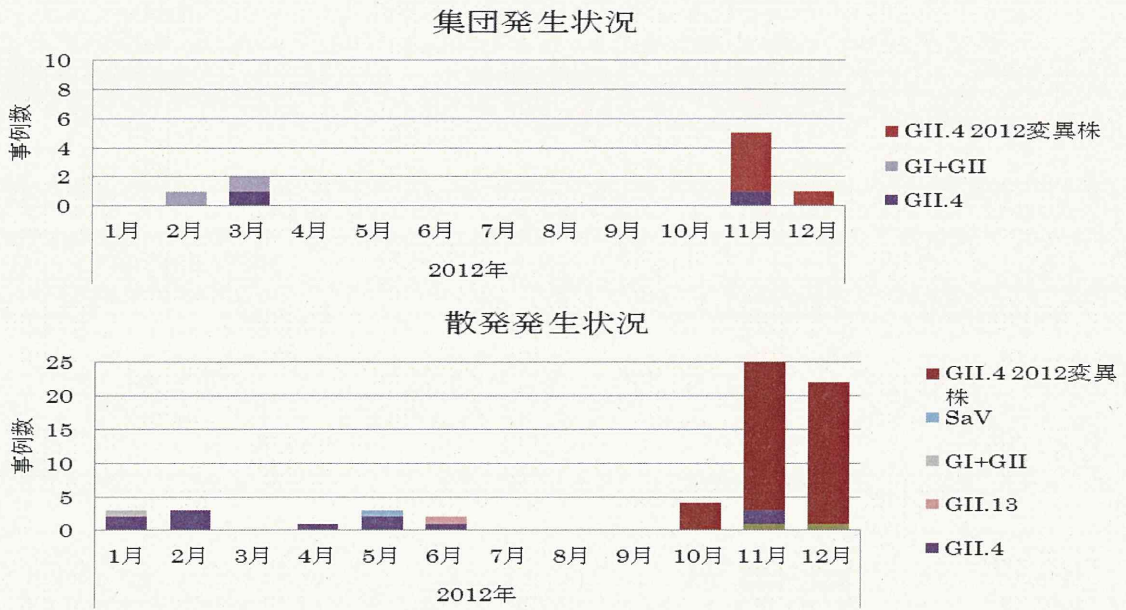


図 1. 下痢症ウイルス検出状況

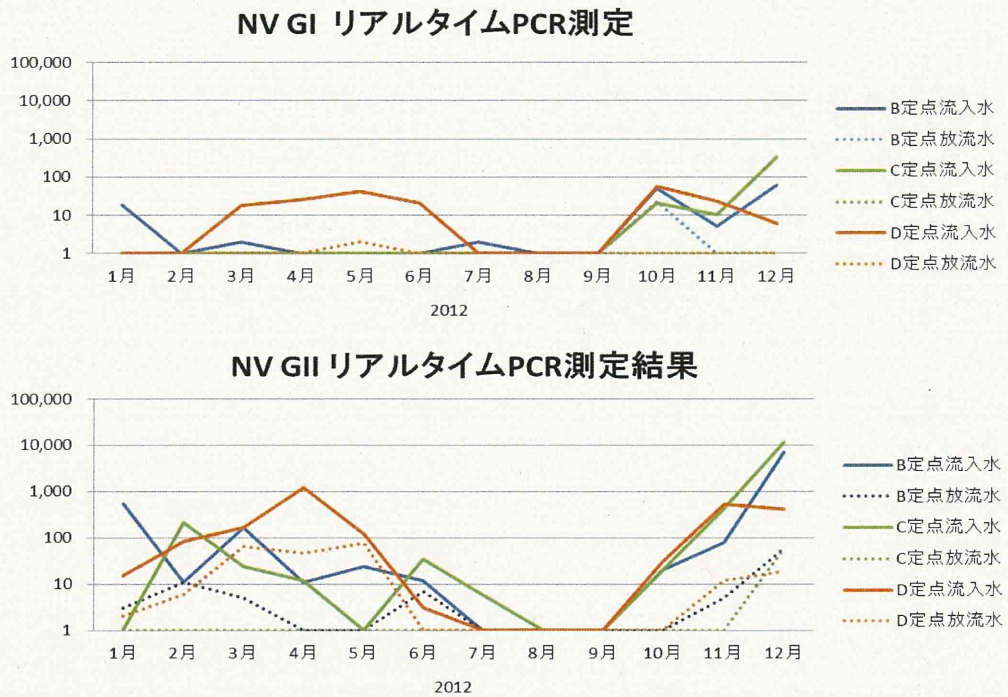


図 2. 環境検体 NV リアルタイム PCR 測定結果



表1. 環境検体のNV遺伝子型検出状況

検出時期		B下水処理場	C下水処理場	D下水処理場
2012年	1月	GI.1 GII.2 <b>GII.4</b> GII.13	GI.1 GII.2 <b>GII.4</b> GII.13	GI.1 GII.2 <b>GII.4</b> GII.13
	2月	GI.1 GII.2 <b>GII.4</b> GII.11	GI.1 <b>GII.4</b> GII.11	GI.1 GI.14 <b>GII.4</b> GII.6 GII.10 GII.14
	3月	<b>GII.4</b> GII.6 GII.12	<b>GII.4</b> GII.11	GI.1 GI.2 <b>GII.4</b> GII.6 GII.11 GII.14
	4月	<b>GII.4</b> GII.6 GII.11	<b>GII.4</b> GII.6	GI.1 <b>GII.4</b> GII.6 GII.11 GII.14
	5月	GI.10	GI.1 GII.6	GI.13
	6月			GI.10
	7月			GI.1
	10月	<b>*GII.4</b>	<b>*GII.4</b>	<b>*GII.4</b> GII.6
	11月	<b>*GII.4</b>	<b>*GII.4</b>	GI.4 <b>*GII.4</b> GII.6
	12月	GI.1 GI.4 <b>*GII.4</b>	GI.1 <b>*GII.4</b>	GI.1 GI.4 <b>*GII.4</b>

\*GII.4 : GII.4 2012変異株

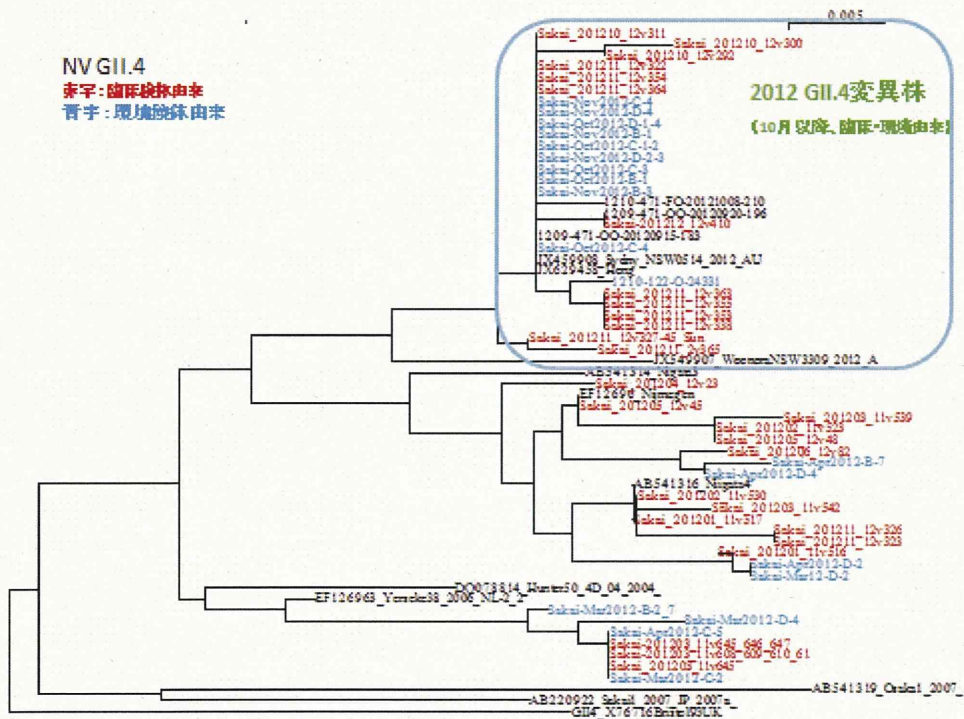


図4. NV GII.4系統樹 (N/S領域281bp)

表2. SaV AsV AiV 検出状況

検体由来	ウイルス	2012年											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
集団発生	SaV												
	AsV												
	AiV												
散発発生	SaV												
	AsV												
	AiV												
環境	SaV												
	AsV												
	AiV												

## 下水道流入水及び放流水からのウイルス検出について

研究協力者	世良暢之	福岡県保健環境研究所
研究分担者	田中智之	堺市衛生研究所
研究協力者	石橋 哲也、中村 朋史、吉富秀亮	福岡県保健環境研究所

### 研究要旨

浄化センターの流入水及び放流水についてエンテロウイルス等を中心とした下痢症ウイルスの検出を試みた。対象とした浄化センターは、汚水処理人口がほぼ同規模であるが、下水道普及率が大きく異なる 2 地域（都市部と非都市部）を選定した。流入水から検出されたエンテロウイルスは両浄化センターでほぼ同様の傾向を示すと同時に、感染症発生動向調査事業等による患者情報と比較的良好に関連していた。また流入水から検出されるノロウイルスは平成 23 年度と比較すると平成 24 年度は早い時期から増加し始め、平成 24 年度のノロウイルス患者の急増を反映していた。このことはエンテロウイルス等を対象とした環境ウイルスサーベイランスが、対象地域におけるウイルスの浸淫状況を把握するのに適した方法の一つであることを示唆している。

### A. 研究目的

世界保健機関は 2010 年～2012 年のポリオ根絶計画において、顕性あるいは不顕性にかかわらず地域に流行しているエンテロウイルスを効率的に分離できる方法として、糞便中に排泄されるウイルスを検出する環境ウイルスサーベイランスの導入を推奨してきた。

当所はこの環境ウイルスサーベイランスを導入して浄化センターにおける流入水及び放流水中のエンテロウイルスを検出することにより、地域におけるエンテロウイルス等の腸管系ウイルスの流行状

況を把握することを目的に、調査を実施した。

なお、本研究は(財)福岡県下水道公社の協力により実施した研究である。

### B. 研究方法

#### 1. 研究期間及び調査地点

平成 23 年 4 月から平成 24 年 12 月まで、毎月 1 回、北部地区（都市部）及び南部地区（非都市部）の浄化センターにおいて、下水流入水及び放流水（各 2L）を採取した。両地区の汚水処理人口は 17～18 万人でほぼ同程度であるが、感染症発生

動向調査事業における対象年齢である小児は北部地区が南部地区の約 1.5 倍ほど多い。また 1 日あたりの下水処理量は北部地区が南部地区の約 10 倍と大規模であり、下水道普及率は北部地区が 80%以上であるのに対し、南部地区は 25%に満たず両者には大きな開きがある。

## 2. 流入水及び放流水の濃縮

良く混釈した流入水及び放流水各 1 L を、4°Cで 3,000rpm、30 分間遠心し、上清に塩化マグネシウムを添加、pH3.5 に調整後、陰電荷フィルターにウイルスを吸着させ、10ml の 3%ビーフエキストラクト存在下で誘出した (図 1)。

## 3. ウイルスの検出

この濃縮液をウイルスに対する感受性の異なる 6 種類の培養細胞 (Vero、FL、RD18s、HEp-2、LLC-MK2 及び L20B) に 0.1ml ずつ接種した。細胞変性効果を指標に分離されたウイルスは、エンテロウイルス抗血清を用いた中和試験により同定した。また濃縮液から直接 RNA を抽出し、厚労省通知法に基づいたリアルタイム PCR によりノロウイルスを定量した。

(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. エンテロウイルスの検出状況

両地区浄化センターの流入水におけるエンテロウイルスは、コクサッキーウイルス B 群及びエコーウイルスが主として検出された (図 2)。また春期から秋期にかけて発生する疾病との関連が疑われた

が、感染症発生動向調査事業による患者情報などを用いたさらなる解析が必要であった (図 3)。

### 2. ノロウイルスの検出状況

流入水中のノロウイルスは GII 群が平成 23 年度は 12 月に増加しはじめ、1 月にピークを迎えた。一方、平成 24 年度は GII 群が既に 9 月以降から増加しはじめ、12 月時点でも依然として増加傾向にあった (図 4)。また一部の放流水中からノロウイルスが検出されたが、なお詳細な検討が必要と考えられた。

## D. 考察

検出されたエンテロウイルスの種類は両地区浄化センターで類似しており、汚水処理人口の年齢構成、下水処理量及び下水道普及率等に影響されないことが示唆された。また感染症発生動向調査事業により把握される患者発生前及び患者発生の終息後においても流入水中からは一部のエンテロウイルスが検出される傾向にあった。これらのことから、エンテロウイルス等の腸管系ウイルスを検出する環境ウイルスサーベイランスは対象とする地域におけるヒト集団で顕性及び不顕性感染として流行しているか否かにかかわらずウイルスの状況を包括的に把握することが重要で、それが可能であることが示唆された。

## E. 結論

流入水及び放流水からのエンテロウイルス等を検出する環境ウイルスサーベイランスは、地域のヒト集団で顕性、不顕性感染として流行している可能性がある