

平成 28 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)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

堺市における下水サンプルを用いた
ノロウイルス等の腸管感染ウイルスの流行解析

研究協力者	三好 龍也	堺市衛生研究所
研究協力者	内野 清子	堺市衛生研究所
研究協力者	中谷 誠宏	堺市衛生研究所
研究協力者	岡山 文香	堺市衛生研究所
研究協力者	吉田 永祥	堺市衛生研究所
研究協力者	小林 和夫	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

研究要旨

ノロウイルスをはじめとする腸管感染ウイルスの予防対策や下水の二枚貝の汚染防止対策の基礎的データを得ることを目的として、堺市内の下水サンプルを用いて腸管感染ウイルスの遺伝子検出を行い、臨床サンプルからの結果と合わせて分子疫学的解析を行った。

感染性胃腸炎患者の報告数がピークと同時期に、下水中の NoV 遺伝子量もピークとなり、また報告数が多いほど定量値も大きくなった。臨床サンプルと下水サンプルから検出される遺伝子型に相関がみられ、下水中の NoV 遺伝子を調査することにより、NoV 感染症の流行状況を解析することができると考えられる。サポウイルス等の臨床サンプルから検出の少ない下痢症ウイルスについても下水サンプルからは高頻度に検出され、不顕性感染等の存在が示唆された。

A 型肝炎患者の報告はなかったが、A 型肝炎ウイルスが 3 か所から検出された。遺伝子解析の結果から少なくとも 2 系統の HAV の流行があったと考えられた。

下水サンプルを用いた流行解析は、流入地域におけるウイルス感染の包括的把握が可能と考えられる。さらに感染源や経路を解明する上で有用な情報を提供すると考えられる。

A. 研究目的

下水はカキ等の二枚貝の主要な汚染源となっている。また、下水にはヒトから

排泄された腸管系ウイルスが含まれることから、下水の継続的監視は、流行状況の把握のみならず、流行予測や二枚貝の

汚染防止対策への寄与も期待できる。本研究は、ノロウイルス (NoV) の流行状況を感染性胃腸炎の散発・集団発生事例から得られた患者便等の臨床サンプルと下水処理場の流入水及び放流水の環境サンプルの両面から解析し、堺市における NoV 感染症の流行の全体像を把握、解析することにより、NoV 食中毒予防対策に寄与すること目的とする。

加えて、患者発生の頻度は低いが食中毒の起因ウイルスとなり得る NoV 以外の腸管感染ウイルスの検出も実施し、流行状況を把握する。

B. 研究方法

1. 材料

環境サンプルとして、2014 年 1 月から 2016 年 12 月までに堺市内の 3 つの下水処理場で毎月 1 回採水された流入水 108 検体及び放流水 108 検体、計 216 検体を調査対象とした。臨床サンプルとして、同期間に発生した食中毒及び集団感染事例 8 事例、散発事例 (感染症発生動向調査における感染性胃腸炎患者等) 43 例から得られた糞便を調査対象とした。

2. 下水サンプルの濃縮法

これまでの報告書に準じて行った。すなわち、流入水及び放流水を遠心後 (3,400xg 30min、13,000xg 45min)、上清 1,000ml を分取し、最終濃度 0.05M の MgCl₂ を添加後、HCl で pH3.5 に調整した。調整済み液を HA フィルター (0.45 μm) でろ過し、ウイルスをフィルターに吸着させた。フィルターを細断し、pH10.5 グリシン buffer (流入水 : 5.0ml、放流水 : 2.0ml) で溶出後、HCl で pH6.5 に再調整

し、11,000xg 20min 遠心した上清を RNA 抽出用のサンプルとした。

3. ウイルス遺伝子検出法

臨床サンプルについては、RNA 抽出後、NoV、サポウイルス (SaV)、アストロウイルス (AsV)、アイチウイルス (AiV) については、ウイルス性下痢症診断マニュアルに準じてそれぞれウイルス遺伝子検出を行い、A 型肝炎ウイルス (HAV) については、nested RT-PCR (primers: JCT-2F/1R-A/2R) により遺伝子検出を行った。陽性例については、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、系統樹解析により遺伝子型を判定した。

下水サンプル (流入水) については、濃縮処理後、臨床サンプルと同様にウイルス遺伝子検出を行った。下痢症ウイルスについては、TA クローニングを行い、塩基配列を決定した。遺伝子型は系統樹解析により判定した。NoV の遺伝子型番号は、Norovirus Genotyping Tool Version 1.0 (http://www.rivm.nl/mpf/norovirus_typingtool) に従った。また、流入水及び放流水を用いて NoV リアルタイム PCR を実施し、採取水 1ml 当たりのコピー数を算出した。

(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. NoV 遺伝子検出結果

2016 年は、臨床サンプルから GI で 1 種類 (GI.2)、GII で 4 種類 (GII.1, 2, 3, 4) 計 5 遺伝子型の NoV が検出された。2016

年 12 月には、過去 2 年間検出されていなかった GII.2 型が散発例から高頻度に検出された (図 1)。

下水サンプルでは、GI で 4 種類 (GI.1, 2, 4, 6)、GII で 5 種類 (GII.3, 4, 13, 17, 21) 計 9 遺伝子型が検出された。GI.2, GII.4, GII.17 型が多く検出された (表 1)。

2. 下水中の NoV 遺伝子定量測定結果

下水中の NoV 遺伝子量は、小児の感染性胃腸炎が増加する 10 月から増加し、翌年の 7、8 月に減少する傾向がみられた。

(図 2)。感染症発生動向調査による感染性胃腸炎患者の報告数のピーク値が大きいほど、下水中の NoV 遺伝子量 (GII) が多くなる傾向がみられた (図 3)。

3. NoV 以外のウイルス遺伝子検出結果

SaV については、下水サンプルでは、2016 年は年間を通じてほとんどの月で検出され (GI.1, 2, 3, GII.1, 2, 3)、GI.1, 2, GII.3 型が多く検出された (表 2)。GI.3 型については、過去 2 年間検出がなかったが、臨床サンプルから 5 月に、下水サンプルからは 6 月に検出された (表 2)。

AsV、AiV については、2016 年は臨床サンプルからは検出されなかったが、下水サンプルでは、年間を通じてほとんどの月で検出された (表 2)。

HAV については、2016 年は臨床サンプルからは検出されなかったが、6 月の B 下水処理場の下水サンプル及び 2、5 月の C 下水処理場の下水サンプルから検出され (表 2)、遺伝子型はすべて IIIA 型であった (図 4)。

D. 考察

感染症発生動向調査による感染性胃腸炎患者の報告数がピークとなる 10 月～翌年 2 月にかけて、下水中の NoV 遺伝子量もピークとなり、また報告数が多いほど定量値も大きくなった。臨床サンプルから検出される遺伝子型は、下水サンプルから高頻度に検出された。これらのことから、下水中の NoV 遺伝子を調査することにより、NoV 感染症の流行状況を解析することができると考えられる。

SaV、AsV、AiV については、臨床サンプルからの検出は少数であったが、下水サンプルからは年間を通して高頻度で検出された。この理由として、今回の調査における臨床サンプルは、主に小児の感染性胃腸炎や食中毒のサンプルであり、これらのウイルスについては、臨床症状が NoV に比べて軽症又は不顕性感染が多い、小児以外の成人での感染の可能性などが考えられた。

HAV については、B 及び C 下水処理場の流入水から HAV 遺伝子が検出された。同時期に当該下水処理場の地域では患者発生の報告はなかったが、この地域に HAV 感染者が存在していたと推測された。C 下水処理場から検出された HAV は、2013 年 12 月に C 処理場、2014 年 3 月に B 処理場から検出されたウイルスと近縁であったが、B 下水処理場から検出された HAV はそれらと異なった系統であった。この時期に少なくとも 2 系統の HAV の流行があったと考えられた。

A 型肝炎については、日本国内で平成 28 年では 269 例 (日本国外での感染を含む) の報告があるが (感染症発生動向調査週報 (IDWR) 速報データ)、潜伏期間が約 1

カ月と長期であるため。疫学調査において感染源の特定が一般的に困難な事例が多い。また、不顕性感染も多いため、感染実態の把握をすることも難しい。下水中の HAV 遺伝子を解析することにより、流入地域における不顕性感染を含めたウイルスの浸淫状況を把握することが可能と考えられた。また、下水から HAV が検出されたことから、カキ等の二枚貝が HAV の汚染を受けるリスクがあることが示された。

下水中のウイルス遺伝子検出では、感染者の症状等の情報が得られないため病原性を解析することはできないが、広域的な感染状況は把握するためには有効な手段である。これらのデータを腸管感染ウイルス、特に NoV の流行予測や食中毒や感染症の予防対策にどのように役立てていくかが今後の課題である。

E. 結論

下水サンプルを用いて腸管感染ウイルスの検出を行った。これらの結果より流入地域におけるこれらのウイルスの浸淫状況の包括的把握が可能と考えられる。さらに感染源や経路を解明する上で有用な情報を提供すると考えられる。

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

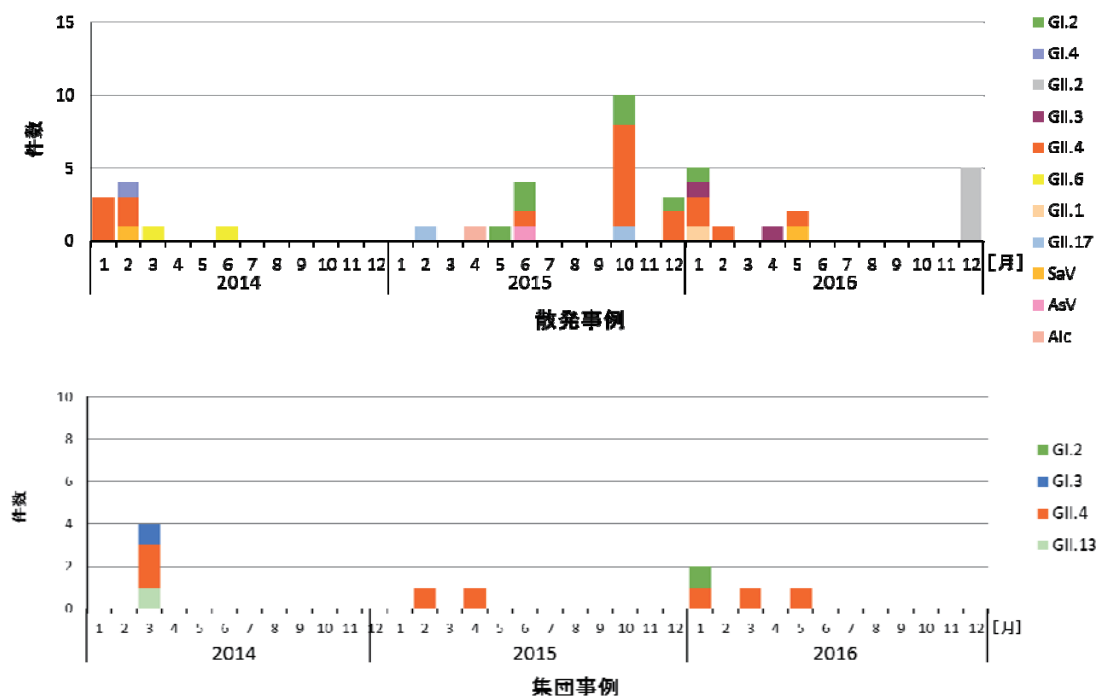
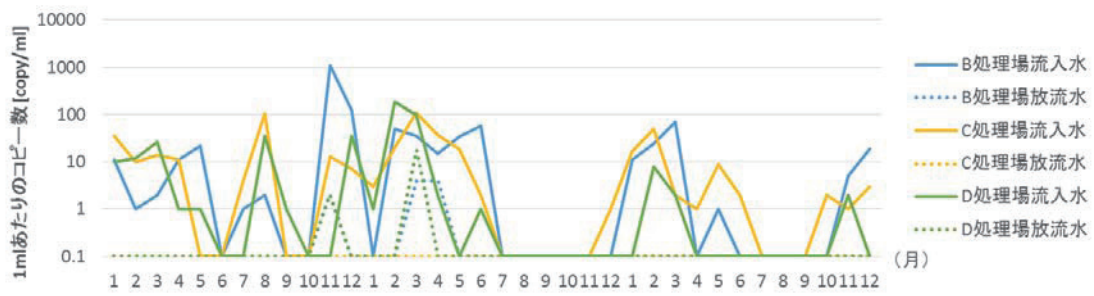
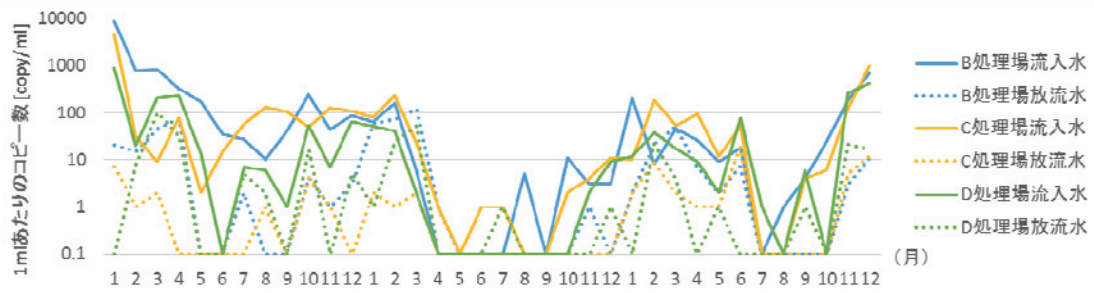


図 1 臨床検体からの下痢症ウイルス検出状況



NoV GI リアルタイム PCR 測定結果



NoV GII リアルタイム PCR 測定結果

図 2 下水中の NoV 遺伝子定量結果

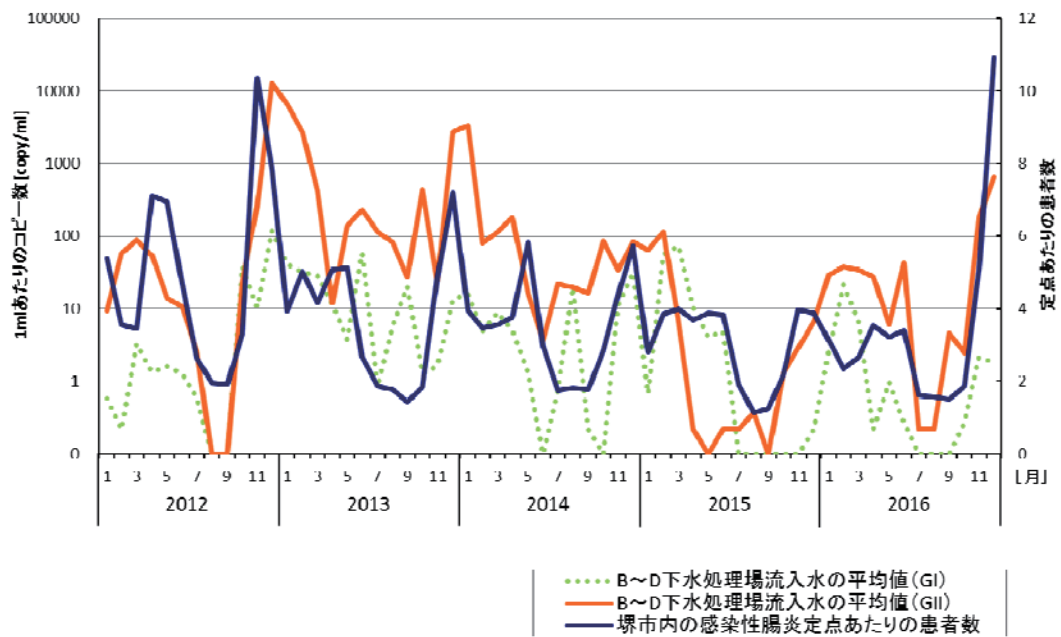


図 3 堺市内の感染性胃腸炎患者数と下水中の NoV 遺伝子定量値

