

原 著

三重県内の Norwalk virus 動向に関する研究 (2001 年度)

西香南子, 杉山明, 中山治

Norwalk virus(NV)は食中毒を含む集団発生事例以外にも小児における感染症発生動向調査でも検出されており,狭い地域内での集団発生や diffuse outbreak の原因としても着目されている.2001年度の定点のカキの汚染状況と環境因子との関連性について検討を行うとともに,集団発生事例,感染症発生動向調査の NV 検出状況及びその遺伝子解析を行った.定点カキでは海水温が 10 以下になる頃から NV 検出数が増加したことから,海水温との関連性が推測されたが,雨量,海水比重については直接的な関連は認められなかった. NV は感染症発生動向調査で陽性検体数が増加し,同時期に貝類の関与しない集団発生事例が増加した.約 1 ヶ月後に定点カキで陽性数が増加し,貝類の関与が疑われる集団発生事例が増加した.

キーワード: *Norwalk virus*, 感染症発生動向調査, 集団発生事例, 環境因子

はじめに

小型球形ウイルス (SRSV) が原因物質として疑われる食中毒事例では原因食品としてカキが関与しているものが多く見られる⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾.そこで,1997年に改正された食品衛生法では,食中毒の原因物質として SRSV が加えられた.三重県は養殖カキの生産県であるため,生食用生カキの安全性を確保する目的で 1997 年からポリオウイルス Sabin 株を用いた浄化試験,志摩地方の養殖場で定点を定め,カキ,海底泥,海水等における NV 汚染実態調査を始め様々な研究を行ってきた⁵⁾⁶⁾.NV の検査法が統一されたことにより冬季に発生する集団発生事例や感染症発生動向調査³⁾⁴⁾においてウイルス検査を実施すると,カキのような二枚貝の関与しないものもあり,感染症発生動向調査での小児の発生状況との関連が推測され,狭い地域内での集団発生や diffuse outbreak の可能性が考えられた.

今年度はカキの養殖海域 3 海域に 4 カ所の定点を定め,各定点 5 個のカキを採取し,NV の汚染状況を調査した.また,海域の海水を採取し,NV の汚染状況を調査するとともに,気温,雨量等の環境因子の関連性からカキの NV 汚染状況の推定の可能性について検討した.さらに定点カキ,集団発生事例,感染症発生動向調査の NV の検出状況及びその遺伝子解析を行ったので報告する.

材料と方法

1. 採取期間及び検体

県内でカキの養殖を行っている 3 海域のうち 2 海域には各 1 カ所 (A・D),1 海域には 2 カ所 (B・C)の定点を定め,カキの採取を行った.採取は 2001 年 10 月から 2002 年 2 月 25 日まで 9 回実施した.1 回の採取では定点につき 5 個のカキを採取した.海水は定点 A 及び定点 B・C

の海域でカキ養殖筏付近の海水 20L を 2001 年 12 月から 2002 年 2 月 25 日まで 7 回採取した.

集団発生事例は 2001 年 10 月から 2002 年 3 月までに当研究部にウイルス検査依頼のあった 8 事例の糞便及び吐物について検査を実施した.感染症発生動向調査からの検体は 2001 年 4 月から 2002 年 3 月までに定点医療機関より搬入された糞便及び感染性胃腸炎の疑われた咽頭拭い液を用いた.

2. 検体の前処理

カキは中腸腺を摘出後,4 倍量の PBS(-)を加えホモジナイズした.3,000rpm,15 分遠心後,上清に 24%PEG/1.5M NaCl を加え 4 で一晩放置した.3,000rpm,30 分遠心し,沈渣を 1,1,2-トリクロロ-1,2,2-トリフルオロエタンを加えて攪拌後 9,000rpm,20 分遠心した.上清に 24%PEG/1.5M NaCl を加え 4 30 分以上放置した.12,000rpm,30 分遠心し,沈渣を Eagles' MEM 500 μ L に浮遊し,RNA の抽出に用いた²⁾.海水は 2 月 4 日採取分までは陽電化膜法,2 月 12 日採取分以降は陰電化膜法¹⁾により NV の濃縮を行った.陽電化膜法では海水を pH5~6 に調整後,陽電化フィルター(0.45 μ m)で濾過した.フィルターはアルカリ溶液(3%Beef extract;1%NaCl;15%NaNO₃;pH9.0)に浸し,4 1 時間放置後アルカリ溶液を回収した.3,000rpm,20 分遠心後上清に 16%PEG/0.8M NaCl を等量加え,4 で一晩放置する.3,000rpm,30 分遠心後,上清を廃棄し,沈渣を Eagles' MEM 500 μ L で再浮遊し RNA の抽出に用いた.陰電化膜法では海水を陰電化フィルター(0.45 μ m)で濾過後,1/1,000N H₂SO₄ 2L で洗浄した.1/1,000N NaOH 45mL でフィルターを浸し 5 分放置後,0.1M H₂SO₄,100 \times TE Buffer を入れた遠心管に回収した.回収した液を 35,000rpm,3 時間遠心し沈渣を Eagles' MEM 500 μ L で再浮遊し RNA の抽出に使用した.糞便,吐物及び咽頭拭い液は Eagles' MEM で 10%乳

剤とし 3,000rpm, 20 分遠心し, 上清を RNA の抽出に使用した。

3. RNA の抽出及び cDNA の作製

RNA は QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出し, DNase I で 37°C 30 分反応させ DNA を分解後, カキ及び海水については Super Script RT II (Invitrogen), 糞便, 吐物及び咽頭拭い液については M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) で 42°C 1 時間反応させ cDNA を作製した。

4. PCR による遺伝子検索とシーケンス

作製した cDNA は capsid 領域を標的とする G1-SK 系 (1st:COG1F/G1-SKR,nested:G1-SKF/R), G2-SK 系 (1st:COG2F/G2-SKR,nested:G2-SKF/R), COG1 系 (1st:COG1F/G1-SKR,nested:COG1F/R), COG2 系 (1st:COG2F/G2-SKR,nested:COG2F/R), と polymerase 領域を標的とする NV 系 (1st:NV-35/36,nested:NV-81/82, SM-82), Yuri 系⁷⁾ (1st:Yuri52F/R,MR-3/4,nested:Yuri22F/R) の primer set とし, Ex Taq polymerase (TaKaRa) 又は Z-Taq polymerase (TaKaRa) を用いて PCR を行った。PCR 産物は 1.5% agarose gel で電気泳動を行い, ethidium bromide で染色し, 判定を行った。陽性となった PCR 産物は capsid 領域を標的とするものは国立公衆衛生院,

polymerase 領域を標的とするものは国立感染症研究所にシーケンスを依頼した。また作製した cDNA は国立公衆衛生院に送付し, realtime PCR による定量を行った。

成 績

1. カキおよび海水の NV 検出状況

各定点で採取したカキの NV の検査結果を表 1 に示す。PCR は 6 種類の primer set のいずれかで陽性となったものを NV 陽性とし, 表 1 には陽性となった個数を示した。なお, 海水では全期間をとおして NV は検出されなかった。陽性となった PCR 産物は公衆衛生院及び感染症研究所にシーケンスを依頼した。その結果を capsid 領域は図 1, 2 に示す。カキから検出されている NV は Genogroup2(G2)が G1 よりも多かった。G1 では 1 月 15 日および 1 月 28 日で定点 C のみ各 1 検体が NV 陽性となったが, それぞれ DSV395 と Chiba407 の類似株であり, genotype は異なっていた。G2 では 1 月 15 日に定点 C, D, 2 月 4 日に定点 A で Miami/292 類似株, 1 月 15 日に定点 B, 1 月 28 日に定点 A, C, 2 月 4 日に定点 B で Amsterdam 類似株が見られた。他には 1 月 15 日に定点 B で Hawaii 株, 1 月 28 日に定点 C で MX 株の類似株が見られた。polymerase 領域は 1 検体のみ陽性であり Southampton 類似株であった。

表1 定点で採取したカキのNV検出結果(2001年~2002年)

定点	10/9	11/12	12/10	1/15	1/28	2/4	2/12	2/18	2/25
A	0	0	0	2	1	1	0	0	0
B	0	0	0	3	4	2	0	1	0
C	0	0	0	3	4	1	1	1	0
D	0	0	0	2	3	1	1	1	0

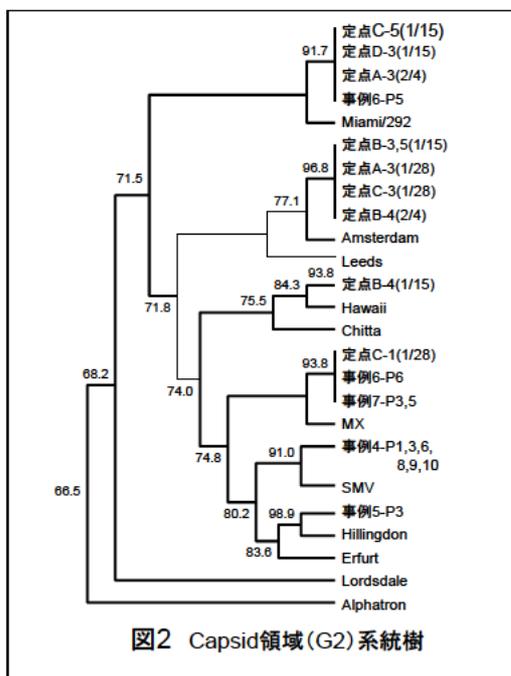


図2 Capsid領域(G2)系統樹

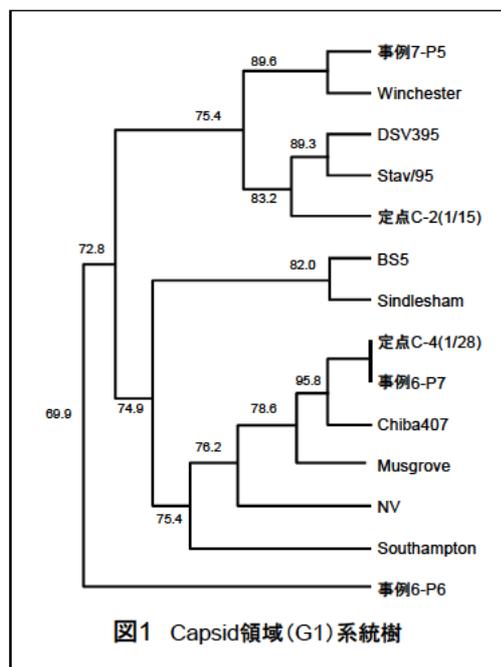
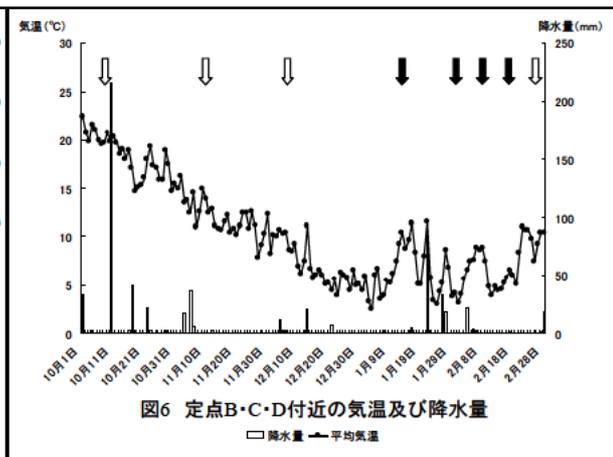
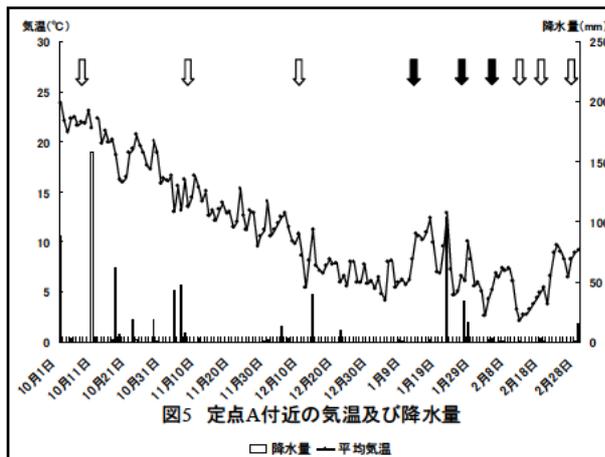
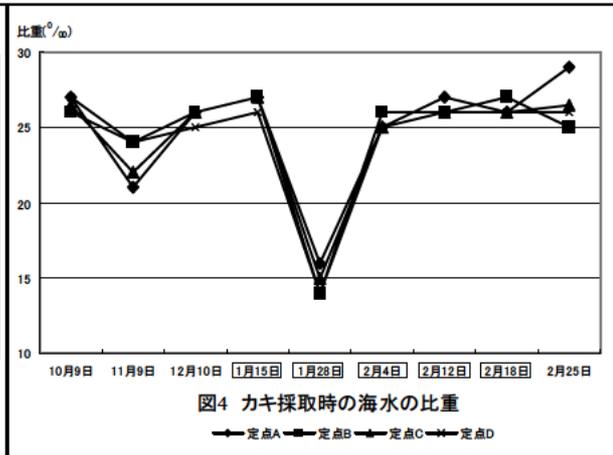
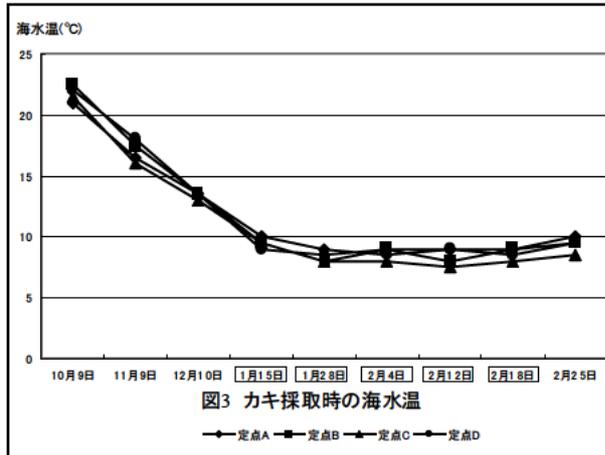


図1 Capsid領域(G1)系統樹

2. カキ採取時の気象状況

定点のカキ採取時に測定した海水の温度及び比重を図3,4に示す. NV が陽性となったカキの採取月日を線で囲った. また, 海域近辺の消防署の観測データに示された12月から2月までの気温及び降水量は図5,6のとおりで, 図中の矢印はカキの採取日を示し, NV が陽性となった採取日の矢印は塗りつぶした.

カキ採取時の海水温が10℃以下になった1月15日以降カキでのNV陽性数が増加し, 2月25日まで1海水温は0℃以下であったが, NVは2月18日まで検出された. カキ採取時の海水の比重は1月28日に3日前の約300ミリの降雨の影響を受け比重の低下が認められたが, 他は約25‰であった. 海水の比重とNVの陽性数についての直接的な関係は認められなかった.



3. RT-PCR と realtime PCR の相関

作製したcDNAは国立公衆衛生院でrealtime PCRによる定量を行った. その結果とRT-PCRの結果の相関を表2に示す.

RT-PCR陰性となったG1では160検体のうちrealtime PCRでは 10^2 copy未満で21検体 10^2 copy以上が陽性となった. また同様にG2ではrealtime PCRでは 10^2 copy未満で29検体が陽性となった.

4. 集団発生事例及び感染症発生動向調査のNV検出状況

2001年10月から2002年3月までに搬入された集団

発生が疑われた事例を表3に示した. 事例1, 2, 4はカキ等の二枚貝の関与のないものであった. 事例5, 7はカキ, 事例8は韓国産あさり原因食品として疑われた事例であった. また事例3, 6は患者が直接二枚貝を喫食していないが, 調理場に二枚貝が存在していた.

事例5は原因として疑われた食品は県内産のカキであったが, 患者から検出されたNVは定点で検出されたものとは異なるgenotypeであった. また, 事例4は発症状況からも施設内の水平感染の可能性が強かったが, シークエンスにおいてもすべて同じものでSMX類似株であった.

表2 realtime PCRとRT-PCRの相関性

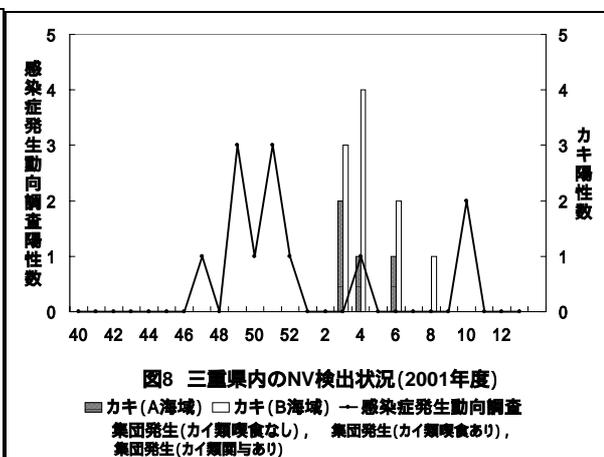
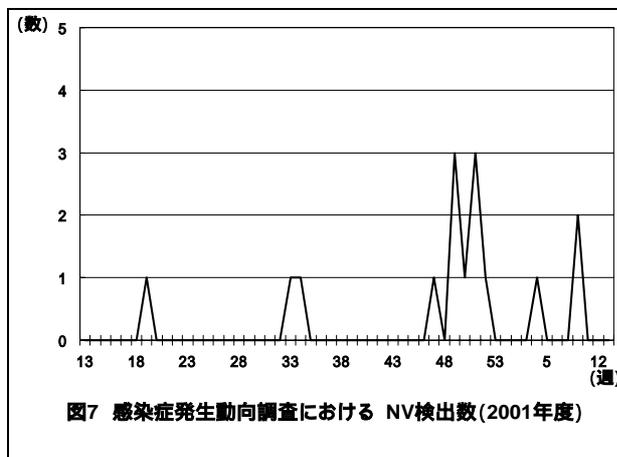
			RT-PCR				
			G1		G2		
			(copy数)	+	-	+	-
realtime PCR	G1	+	~ 10 ²	5	22	N.D.	N.D.
			10 ² ~	0	1	N.D.	N.D.
		-		9	157	N.D.	N.D.
	G2	+	~ 10 ²	N.D.	N.D.	4	29
			10 ² ~	N.D.	N.D.	2	0
		-		N.D.	N.D.	8	151

N.D.:not Data

表3 集団発生事例(2001年12月~2002年3月)

事例	喫食者数	患者数	原因(疑)食	貝類の関与
1	21	19	不明	
2	17	14	不明	
3	29	18	昼食弁当	
4	44	15	不明	
5	2	2	カキ(県内産)	
6	4	4	不明	
7	17	7	カキ(宮城県産)	
8		21	あさり(韓国産)	

○:貝類の喫食あり, □:貝類の喫食はないが、調理場内に貝類あり



2001年4月から2002年3月までに定点医療機関から搬入された糞便及び感染性胃腸炎が疑われた咽頭拭い液からのNVの検出状況を図7に示した。第48週から第52週にNVの検出が増加した。

定点カキ、集団発生事例及び感染症発生動向調査のNV検出状況を図8に示した。感染症発生動向調査でNVの検出が増加するとともに二枚貝の関与のない集団発生事例が増加した。その約1カ月後、定点カキからのNV検出数が増加し、集団発生事例でも二枚貝の関与する事例の発生が増加した。3月に発生した集団発生事例では韓国産あさがり原因食品として疑われており、県内のNVの検出状況とは関連が認められなかった。

考 察

今年度の定点で採取されたカキは1月から2月中旬までNV陽性となり、2月最終週にはすべて検出されなくなった。海域別では定点Aの海域の方は1月から2月第1週まで検出された。定点B・C・Dの海域の方は1月から2月最終週まで検出された。定点Aの海域よりも定点B・C・Dの海域の方がNVが検出された期間が長かった。定点B・C・Dの海域は伊勢湾から太平洋へ放出される海流がある海域であり、定点Dが最も伊勢湾の海流の上流にあたり、定点B・Cはその下流にあっている。それに対し定点Aは太平洋に面した湾となっており、伊勢湾

から放出された海流の影響を直接受けることは少なく、また、流入する大きな河川も存在しないことから、外部から流入する可能性が低いことが考えられ、NV の検出期間、検出数とも少なかったことが考えられる。しかし、今までの調査では定点 A の海域の方が常に少なかったわけではなく、また、検出期間、検出数等も年による変動が大きく今後も調査を継続するとともに、これらの影響を与える因子を解明していく必要性が考えられた。

海水では採取期間をとおして NV は検出されなかった。これには海水から検出可能な量まで NV を十分に濃縮できていないことが考えられる。また、カキは 1 時間に約 18L の海水を取り込んでいると言われており、検査に使用している海水量がカキの採取する海水量に比べて少ないことがカキで検出されていても海水で検出されない原因の 1 つであると考えられる。

カキの NV 汚染状況に影響すると考えられる環境因子として海水の温度、比重、気温及び降水量との関連性を検討した。今までの調査においても海水温が 10 以下になると NV が検出されるカキが増えており、今年度も同様の状況が認められた。これにはカキの生理活性が関与していることが考えられる。カキは海水を濾過してプランクトンなどを取り込み、中腸線の細胞が食作用により細胞内消化を行っている。NV はプランクトン等とともにカキ体内に取り込まれることが推察される。海水温の低下により細胞内消化能力が低下しプランクトンや NV 等の消化が不完全となり、陽性となることが考えられた。降水量・比重については 1 月 28 日には陽性となった個体数が多く、その際の比重は下がっていた。比重の低下は 1 月 26, 27 日の降水量が 1 月 28 日の採取時に海水の比重の低下に影響を与えていたものであるが、それ以外の採取日の比重と NV 陽性に関連性は認められなかった。今までの調査では比重の低下が NV の陽性数の増加に関与していることが推測されたが、今回の調査では降水量や比重の直接的な影響は認められなかった。下水処理場の流入水には年間を通して NV が検出されているが、流出水には NV は検出されていない又は冬季の流行の見られる時期でのみ検出されるという報告がある。今シーズンは 12 月にヒトの間での流行があり、下水処理場には多量の NV が流入していたことが考えられる。降雨によって下水処理場への流入水が増加し NV を含む流出水が放流され、また、多量に河川水が海域内に流入したことにより NV の陽性数が増加したことが推測され、海水の比重との関連性も示唆された。気温については直接影響しているとは考えにくい、海水温の推測をするための一助とすることは可能であると考えられた。

感染症発生動向調査や集団発生と定点カキの NV の検出状況を見ると、感染症発生動向調査で NV の検出数が増加したと同時期に貝類の関与しない集団発生も増加した。その約 1 カ月後定点カキで NV の陽性検体数が増加し、それに伴って貝類の関与した集団発生が増加した。

感染症発生動向調査での NV の検出数の増加と定点カキでの検出数は前年度においても同様のことが見られ、ヒトにおける陸上での NV の流行が下水処理場を通過して海域汚染をし、カキが汚染されるまでに約 1 カ月程度かかることが推測される。また、集団発生においても、貝類の関与しない事例は感染症発生動向調査で NV の検出数が増加したと同時期に発生し、貝類の関与する事例は定点カキでの NV 陽性数の増加にともなって発生することから、感染症発生動向調査のようなヒトでの流行を監視することにより、集団発生や食中毒の発生を予測し、注意を促すことが可能であると考えられる。また、1997 年から使用している polymerase 領域の primer では検出されている遺伝子の塩基配列が県内ではほぼ一致していた。これは A 群口ウイルスで見られるような下痢症ウイルスの土着性の強さと同様と推測され、遺伝子の塩基配列から様々な地域の特定できる可能性が推察される。今年度より capsid 領域の primer による検査が始まったことから、今後 capsid 領域におけるデータを蓄積していくことが必要であると考えられる。

3 月に韓国産あさり原因食として疑われた集団発生事例が発生した。これは原因として疑われた食材が国外であったことから県内での NV の検出状況とは関連のない時期に発生した。昨今、海外から様々な食材が輸入されており、全国的な発生を見た韓国産カキを原因食とする赤痢の食中毒や静岡県で発生した中国産大アサリによる A 型肝炎の食中毒等輸入食品における食中毒事例の発生が認められている。輸入食品についてはウイルス検査はほとんど実施されておらず、今後国内で発生していない病原物質による集団発生事例の可能性も考えられ、また、従来の発生時期と異なる時期に発生することも考えられ十分な注意が必要であると考えられる。集団発生事例ではカキを含め食材がほとんど残存しておらず、食材における検査が困難な状況である。NV が感染症と食中毒としての区別を行政的処分として必要としていることが多く、さらに NV の感染量を検討する上でも食材の確保が重要であると考えられた。

今回の調査では realtime PCR 法による定量を試みている。RT-PCR 法との相関性では RT-PCR 法で陰性となった検体で G1 では 23 検体、G2 では 29 検体が陽性となった。しかし、copy 数の少ないものについては再現性に問題があることが報告されており、realtime PCR 法による定量については検討を続ける必要性があると考えられた。また、定量しているものが cDNA であり、RNA の抽出時点でも RNA のロスが考えられ、primer においてもすべての NV が検出できている状況ではないことから、primer を含めて検査方法についてもさらなる検討が必要である。

NV はウイルスの定量も含めた検査方法、環境中での動向及びカキの汚染状況、下水処理場における NV の不活化の方法、汚染されたカキの浄化方法等広範囲に渡

て未だ不明なことが多く、今後も NV の動向を監視しつつ、NV による健康被害の予防・防止のための方法を検討していく必要があると考えられた。

文 献

- 1) Katayama.H , Shimasaki.A , Ohgaki.S(2000) : Development of A Virus Concentration Method from Marine Water Using Negatively-Charged Membrane with Acid Rinse . 1st World Water Congress of the International Water Association .
- 2) 国立感染症研究所ウイルス第二部, 衛生微生物技術協議会レファレンス委員会 (1999) : ウイルス性下痢症診断マニュアル(第1版), 東京都, 国立感染症研究所ウイルス第二部
- 3) 三重県保健環境研究部(感染症情報センター) (2000) : 三重県感染症発生動向調査事業報告書平成 12 年(2000年)版
- 4) 三重県保健環境研究部(感染症情報センター) (2001) : 三重県感染症発生動向調査事業報告書平成 13 年(2001年)版
- 5) 中 正純, 岡田恵美, 岡山あゆみ, 南川藤雄他 (2000) : かきの養殖海域における SRSV 汚染調査とウイルス浄化試験について . 食品衛生研究, 50, 97-103 .
- 6) 西香南子, 杉山 明, 中山 治(2001): 2000 年度養殖海域におけるノーウォークウイルス汚染調査. 三重保健研年報 ,3,65-72 .
- 7) Saito.H. , Saito.S , Kamada.K , Harata.S et al(1998) : Application of RT-PCR Designed from the Sequence of the Local SRSV Strain to the Screening in Viral Gastroenteritis Outbreaks.Microbiol.Immunol. , 42, 439-446 .
- 8) 関根整治 (1994) : 東京都で発生した非細菌性の集団急性胃腸炎 . New Food Industry , 36(12) , 9-14
- 9) 杉枝正明 他 (1997) : 市販食用カキからの SRSV 遺伝子の検出状況(1995 ~ 1996 年)とその遺伝子解析 . 第 18 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨 .
- 10) 関根大正, 佐々木由紀子 (2000) : 食品と小型球形ウイルス感染症 . 日本食品微生物学雑誌 , 14, 135-143 .

A study on a *Norwalk virus* trend in Mie (2001)

Kanako NISHI, Akira SUGIYAMA and Osamu NAKAYAMA

Key words : Norwalk virus, Infectious disease surveillance, Mass outbreak case, Environmental factor

Norwalk virus (NV) is detected by infectious disease surveillance in an infant in addition to a mass outbreak case including food poisoning, and its attention is paid as a mass outbreak among small areas and a cause of diffuse outbreak. Examined the pollution situation of an oyster of a fixed point of 2001 and relevance with an environmental factor and analyzed a mass outbreak case, the NV search situation of infectious disease outbreak trend investigation and the gene. Relevance with sea water temperature was supposed in a fixed point oyster by the number of NV search having increased since the time when sea water temperature became equal to or less than 10 °C, but the direct connection was not recognized between precipitation and seawater specific gravity. As for NV, the number of positive specimen increased by infectious disease surveillance, and the mass outbreak cases that shellfish did not participate in expecting it increased at the same time. Positive number increased in a fixed point oyster about 1 month later, and the mass outbreak cases that participation of shellfish was doubted increased.