

(66) 遺伝子相同性にもとづく Norovirus(NV)のカキへの汚染経路の解明

Analysis of contamination route of oysters with Norovirus (NV) on the basis of the genetic homology

植木 洋*, 秋山和夫*, 渡部 徹**, 大村達夫**

You UEKI*, Kazuo AKIYAMA*, Toru WATANABE**, Tatsuo OMURA**

ABSTRACT; Since raw oysters have been eaten in Japan, gastroenteritis by oysters contaminated with norovirus(NV) has become a serious medical or environmental problem. However, owing to the inability to cultivate NV in cell lines, behaviors of NV in the water environment have been hardly known. Therefore, the contamination route of oysters with NV has not been to determine yet. The objective of this study is to prove the contamination route by the genetic analysis of NV taken from patients of gastroenteritis, river water and oysters. When the outbreak of gastroenteritis by NV around city A in Miyagi prefecture was reported, NV genes were isolated from patients of gastroenteritis in city A, river B locating near city A and oysters cultivated in bay C into which river B flowed. The base sequence of capsid region in NV genes isolated from oyster was the same as those taken from river B. The similar sequence was detected in NV taken from patients in city A. High homology(>97.9%) was obtained also in polymerase region among these viruses. According to these results, it could be proved that river B and oysters in bay C were contaminated with NV excreted from patients of gastroenteritis in city A.

KEY WORDS; Norovirus (NV); Oysters; Genetic homology; Contamination route; Patients of gastroenteritis; River water.

1. はじめに

カリシウイルス科に属する Norovirus (NV) は、核酸の長さが約 7.6kb のプラス一本鎖の RNA ウイルスであり、capsid および polymerase をコードする遺伝子の塩基配列により G1 型と G2 型に分類されている¹⁾。NV は冬季に流行する感染性胃腸炎の主因物質であるとともに、主に生カキ摂食に関連する食中毒の原因物質でもある。感染性胃腸炎の病原体は、カンピロバクター、サルモネラ、腸炎ビブリオ、腸管出血性大腸菌 (EHEC) を除く下痢原性大腸菌などの細菌、および、NV、ロタウイルス、エンテロウイルス、アデノウイルスなど多種多様である。この中でも NV およびロタウイルスを原因とした感染性胃腸炎が圧倒的多数であることが知られている²⁾。

一方、平成 14 年度の我が国における食中毒事例数および患者数については、それぞれ 1,710 件、25,812 名が届け出されている。その中で NV による食中毒事例数は 243 件であり、その患者数は 6,838 名と単独の病因物質としては最も多かった (厚生労働省ホームページより)。NV による食中毒の原因食品は、患者数の規模によって若干の差はあるものの小規模、中規模事例では生カキおよび加熱用カキの加熱不十分などカキに

* 宮城県保健環境センター (Miyagi Prefectural Institute of Public Health and Environment)

** 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 (Department of Civil Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University)

起因する場合が多い³⁾。養殖カキのNVによる汚染は、カキがプランクトンを摂餌する際にNVと一緒に消化盲嚢部へ取り込まれ蓄積されることが原因と考えられている⁴⁾。そのため、一般にNVの養殖カキへの汚染経路は、感染性胃腸炎患者～河川水～海域～カキと推測されるが、その検証事例はほとんどない。

本研究では、宮城県内のある地区で流行した感染性胃腸炎患者から検出したNV遺伝子と、同地区に隣接する町を流れる河川、および同河川が流入している海域で養殖したカキから同時期に検出したNV遺伝子について塩基配列を決定し、その系統解析にもとづいて養殖カキのNVによる汚染経路を明らかにすることを目的とした。従来、胃腸炎患者便、河川水および養殖カキからそれぞれ検出されたNVの遺伝子型についての報告^{5),6),7)}は多いが、同時期に同一地区で採取したそれぞれの検体から検出されたNVの遺伝子型を比較検討した報告は少ない。養殖カキへの汚染経路の解明は、カキ汚染の有効な対策を検討する上で非常に重要であり、カキに起因する水系感染症のリスク軽減に大きく貢献できるだけでなく、カキの安全性向上による商品価値の向上にもつながるものである。

2. 実験材料と方法

2. 1 サンプルの採取

図1に研究対象地域を示した。平成13年11月下旬から12月にA地区で流行した感染性胃腸炎患者便で12月13日に採取した4件、同時期に隣接する町を流れている河川Bから11月26日、12月5日、12月17日、平成14年1月15日に採水した河川水4件、さらに河川Bが流入する海域Cで養殖されているカキで11月21日、12月13日に採取した2件をサンプルとし、これらのサンプルから検出されたNV遺伝子を解析に用いた。河川Bには、A地区に隣接したB地区の下水処理場からの放流水が流入している。なお、この処理場ではオキシデーションディッチ法で下水処理が行われており、B地区の下水道普及率は64%である。また、下水処理場の上流には単独および合併浄化槽で生活排水やし尿を処理している地域がある。海域Cには河川Bの他にも一つの小河川が流入しており、この小河川の上流にも単独浄化槽、合併浄化槽の設置が確認されている。平成12年度に宮城県保健環境センターで行った調査によれば、10月から3月までの6ヶ月間毎月1回この2河川を対象にNV遺伝子の検出検査を行った結果、河川Bでの検出率が16.7%に対し、もう一方の小河川では0%であった。

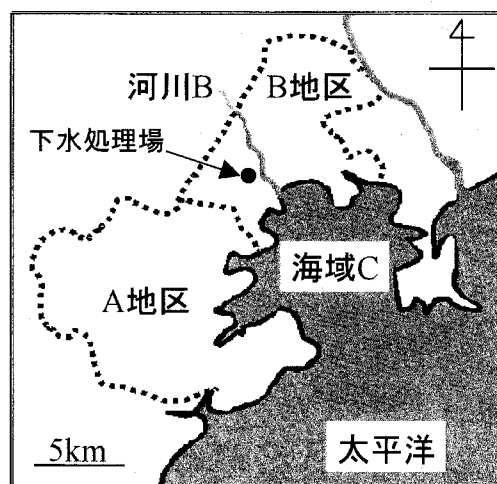


図1. 研究対象地域 (D及びE地区は、この地域より約50km北に位置する)

また、NV 遺伝子の相同性に対する地理的な影響を調べるために、同じ時期に A 地区から約 50km 離れた D 地区の小学校で流行した感染性胃腸炎患者便から検出した NV 遺伝子（2 件）を比較対象として用いた。さらに、時間的な影響を検討するために、翌年 2 月下旬から 3 月にかけて県北東部の E 地区の小学校で流行した感染性胃腸炎患者便から検出した NV 遺伝子（2 件）についても同様な解析を行った。表 1 に、NV 遺伝子解析に用いたサンプル数をまとめた。

表 1. 遺伝子解析に用いたサンプル

種類	A地区	河川B	海域C	D地区	E地区
患者便	2(4)			1(2)	2(0)
河川水		3(1)			
カキ			2(1)		

()外の数字は、capsid領域増幅用primerを用いた遺伝子解析数。

()内の数字は、polymerase領域増幅用primerを用いた遺伝子解析数。

2. 2 サンプルからのウイルスの抽出・濃縮

(1)患者便からのウイルス抽出

蒸留水を用いて 10%乳剤を作成し、室温で $9,200 \times g$ 、10 分間遠心分離した上清をウイルス抽出液とした。

(2)カキからのウイルス抽出

カキの中腸腺を無菌的に取り出し、中腸腺 5 個を 1 サンプルとした。サンプルは -80°C に一晩放置後、20 ～30 分室温に放置し 70°C に加温した蒸留水を等量加えた。10～15 分間室温に放置した後、滅菌竹串で軽く中腸腺を粉砕し上清を無菌的に分取した。分取液を $9,200 \times g$ 、10 分間遠心分離し、その上清をウイルス抽出液とした。

(3)河川水からのウイルス抽出

河川水 1L に Polyethylene Glycol 6000（和光純薬工業株式会社）を 100g、NaCl 23g を加え 4°C 下で一晩攪拌後、全量を 10,000rpm で 30 分間遠心分離した。上清を吸引除去し沈査を 2ml の蒸留水で懸濁し回収した。回収液を $9,200 \times g$ で 10 分間遠心分離し、その上清をウイルス抽出液とした。

2. 3 ウイルス RNA の抽出

ウイルス抽出液 $200 \mu\text{l}$ と等量の 6M Guanidin Thiocyanate（和光純薬工業株式会社）を混合し vortex を用いて攪拌した。混合液に glass powder（DNA 分離精製用試薬 旭硝子株式会社）を $6 \mu\text{l}$ 加え 10 分攪拌後 $9,200 \times g$ で 10 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を吸引除去し、キットに添付の洗浄 buffer $500 \mu\text{l}$ を加え vortex で攪拌後、3,000rpm で 3 分間遠心分離を行った。上清を吸引除去し、同じ操作を 2 回繰り返した。次に 99.5% エタノール $600 \mu\text{l}$ を加え攪拌後、 $9,200 \times g$ で 6 分間遠心分離した。上清を吸引除去し、デシケータ中で乾燥後 $30 \mu\text{l}$ の蒸留水で glass powder を懸濁した。 $13,200 \times g$ で 6 分間遠心分離した上清をウイルス RNA 液とした。

2. 4 RT-PCR

cDNA の作成は蒸留水 $2.5 \mu\text{l}$ 、10 倍 PCR buffer $1.5 \mu\text{l}$ 、2.5mM dNTP $4 \mu\text{l}$ 、20U/ μl RNase inhibitor $0.5 \mu\text{l}$ 、25pmol/ μl primer $1 \mu\text{l}$ 、50U/ μl reverse transcriptase $0.5 \mu\text{l}$ 、ウイルス RNA 液 $5 \mu\text{l}$ を用いて 37°C 、1 時間反応後、 98°C 5 分間加熱し酵素を失活させて行った。なお、PCR の primer に関しては、RdRp（RNA dependent RNA polymerase）領域増幅のための 1stPCR には p36 と p35⁽⁸⁾を用い、nested-PCR には G1 型の株である Norwalk virus および G2 型株の Snow Mountain virus の polymerase 領域の塩基配列に基づいて設計された NV82・SM82 と NV81⁽⁹⁾を用いた。また、capsid 領域増幅のための 1stPCR には、G1 型 NV 検出用の COGIF⁽¹⁰⁾/GISKR⁽¹¹⁾、

表 2. RT-PCRに用いたprimer^{4)~7)}

primer	1st PCR	2nd PCR	対象サンプル
RdRp領域増幅用	p36/35'	NV82・SM82/NV81	患者便・河川水・カキ
capsid領域増幅用	G1 COG1F/G1SKR	G1SKF/R	河川水・カキ
	G2 COG1F/G2SKR	G2SKF/R	
	G1 G1SKF/R	-*	患者便
	G2 G2SKF/R	-	

*capsid領域増幅用primerを用いた患者便からのNV遺伝子検出では、nested-PCRは実施しなかった。

G2型NV検出用のCOG2F¹⁰⁾/G2SKR¹¹⁾をそれぞれ用い、nested-PCRにはそれぞれG1・G2SKF/R primer¹¹⁾を用いた。通常、患者便には大量のNVが存在しているため、capsid領域増幅用primerを用いた患者便からのNV遺伝子の検出ではnested-PCRを実施しなかった。以上のRT-PCR法に用いたprimerを表2にまとめた。また図2には、NVの遺伝子構造と各プライマーの増幅領域を示す。この図に示すように、NVは3つのOpen Reading Frame(ORF)より成っておりORF1はヘリカーゼ(helicase)、プロテアーゼ(protease)およびポリメラーゼ(polymerase)などの非構造タンパク、ORF2は構造タンパクをコードしているが、ORF3についてはその機能がまだよく解明されていない。また、ORF1の5'末端にはVPg(virion protein genome)が結合しているが機能についてはよく分かっていない。ORF3の3'末端はポリアデニル化(AAA)されている。NV遺伝子のRdRp領域およびcapsid領域は、それぞれORF1、ORF2に含まれる。従来ORF1のC末端にあるRdRpをコードしている遺伝子領域の一部が増幅領域として使われていた。しかし近年、遺伝子型特異的領域であるORF2のcapsid領域の一部についても増幅領域として使われはじめ、RdRpおよびcapsid領域の一部について塩基配列やアミノ酸配列のデータが数多くデータベースに登録され遺伝子解析に利用されている。

RdRp領域増幅のためのPCRでは、1st PCRおよびnested PCRとも、蒸留水30μl、10倍PCR buffer 2.5μl、25pmol/μl primer 1μl、5U/μl Taq DNA polymerase 0.5μl、cDNA 15μlの混合液を用いて、denature (94℃, 1分)、annealing (50℃, 1分)、extension (72℃, 1分)の反応を40cycle行った。capsid領域増幅のための1stPCRも、同じ混合液と反応条件の下で行った。nested-PCRは、蒸留水37.5μl、10倍PCR buffer 5μl、2.5mM dNTP 4μl、25pmol/μl primer 1μl、5U/μl Taq polymerase 0.5μl、1stPCR増幅産物1μlの混合液を用いて、1stPCRと同じ反応条件で行った。

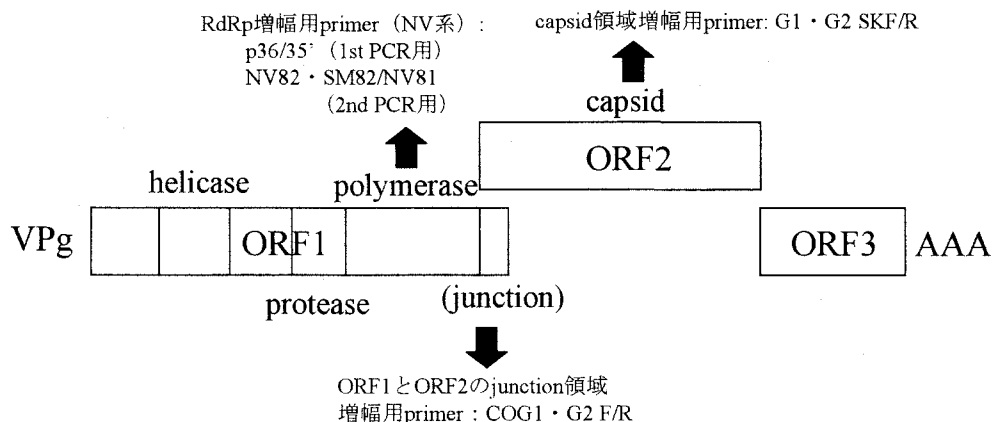


図 2. NVの遺伝子構造とprimer

2. 5 NV 遺伝子の確認

PCR 増幅産物は、2%アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色を行い、紫外線照射下で増幅産物が存在することを確認した。増幅産物は、サイズマーカー (Marker 9 ニッポンジーン) を基準として、RdRp 領域増幅用 primer を用いた nested-PCR では 330bp, capsid 領域増幅用 primer では G1 型は 381bp, G2 型は 387bp, nested-PCR ではそれぞれ G1 型 330bp, G2 型 344bp 付近にバンドがあることを確認した。

さらに、増幅産物をアガロースゲルで泳動後、サザンハイブリダイゼーションにより NV 遺伝子の確認を行った。RdRp 領域増幅用 primer による nested-PCR の増幅産物については、SR47d, SR61d, SR63d, SR65d, SR67d, SR69d probe¹²⁾を用いた。capsid 領域増幅用 primer による増幅産物については、G1 型には G1-1, G1-2, G1-3, G1-4 probe を、G2 型には G2-1, G2-2, G2-3 probe¹³⁾ をそれぞれ用いた。

2. 6 Cloning

増幅産物を Gel-M™ Gel Extraction System(VIOGENE)で精製後、PCR-Script™ Amp Cloning kit でクローニングを行った。方法はキット添付のプロトコールに従った。すなわち、クローン化 Pfu DNA ポリメラーゼ (キット添付) で精製した増幅産物の平滑化後、制限酵素の SrfI (キット添付) および連結酵素の T4DNA リガーゼで (キット添付) pPCR-Script Amp SK(+)クローニングベクター (キット添付) への挿入を行い、ベクターで XL-10GOLD KAN ウルトラコンピテントセル (キット添付) を形質転換した。形質転換されたセルを 10mM Isopropyl-β-D(-)-thiogalactopyranoside (IPTG) (和光純薬工業株式会社) および 2%の 5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside (X-Gal) (タカラバイオ株式会社) をそれぞれ 100 μl を予め塗りつけたアンピシリン加 LB 寒天培地で 37℃で一晩培養し、白く発色しているコロニーを最低 5 個滅菌爪楊枝で各々釣菌し蒸留水 100 μl が入っているチューブで懸濁した。96℃ 3 分加熱後、9,200×g で 1 分遠心し上清を用いて前述のプライマーセットで PCR を行った。PCR 産物は 2%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色し紫外線照射下で目的の増幅産物の確認を行った。

2. 7 遺伝子解析

クローニングされた増幅産物は、MicroSpin™ S-300 HR Columns (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) で精製し BigDye cycle sequence kit を用いてシーケンス PCR を行った。シーケンス用 PCR 産物は AutoSeq G-50 column (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) でプライマーおよびその他の非特異的増幅産物を除去し、ABI Gene analyzer 310 system (Applied biosystems) を用いてシーケンスを行った。シーケンスデータは DNASIS (日立ソフトウェア) で塩基配列を決定し、Clustal W で alignment 後、Kimura's 2 parameter method¹⁴⁾を用いた近隣結合法 (Neighbor Joining 法; NJ 法) で系統解析を行った。

3. 実験結果および考察

3. 1 感染症発生動向と NV 遺伝子の検出

平成 11 年 4 月施行の「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律 (感染症法)」にもとづいて開始された「感染症発生動向調査事業」では、全国の保健所～衛生研究所～国立感染症研究所のオンラインシステムにより感染症情報を収集し、その解析を行っている。宮城県では、宮城県保健環境センター内に宮城県基幹地方感染症情報センターを設置し、県内の 142ヶ所の医療機関 (宮城県 81ヶ所、仙台市 61ヶ所) を患者定点として感染症発生件数を収集・分析し、その情報を県民や医療関係者等へ提供している。A 地区における定点当たりの感染性胃腸炎患者の報告数を図 3 に示す。この地区での感染性胃腸炎患者の報告数は毎年 2 から 3 月にかけて最初のピークが認められ、次に 11 月下旬から 12 月にかけて二番目のピークが確認される。この状況は、全国の胃腸炎患者の報告状況と非常に類似しており前者が主にロタウイルス

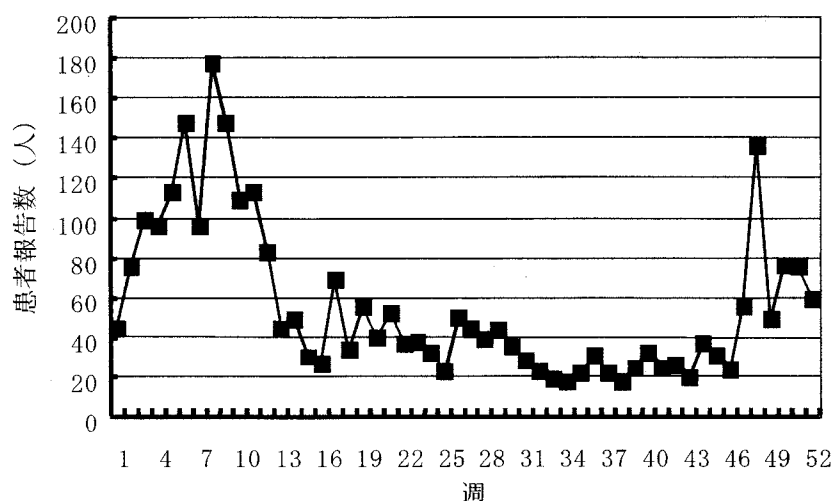


図3. A地区における感染性胃腸炎患者の報告状況
(平成13年、第1週は1月1日から始まる)

ス、後者が主にNVによるものと考えられている¹⁵⁾。

第46週までは30人前後で推移していたが、47週を境に急増し、11月下旬の第48週にピークとなった(図3)。この期間中の12月13日にA地区の小児科定点で採取した感染性胃腸炎患者便からRT-PCR法で、G2型のNVが検出された。前述のとおり流行時期から考えても、この感染性胃腸炎はNVが原因である可能性が高い。また、海域Cで養殖しているカキからは、11月下旬から翌年2月の中旬まで毎週NV遺伝子が検出された。さらに河川Bにおいてもこの期間の11月26日、12月5日、12月17日、翌年1月15日の4回検査を行い、すべて陽性の結果が得られた。

3. 2 NV 遺伝子の相同性

A地区の感染性胃腸炎患者、河川Bの河川水、海域Cの養殖カキから検出されたNV遺伝子のcapsid領域およびpolymerase領域についてシーケンスを行った結果、図4に示すようにcapsid領域およびpolymerase領域のそれぞれで243bp、246bpの塩基配列を決定することができた。

このデータをもとにNJ法で系統解析を行った結果を図5に示す。capsid領域の相同性については、海域Cで12月13日に採取した養殖カキ、河川Bで12月5日と12月17日および翌年の1月15日に採水した河川水から100%塩基配列が一致するNVが検出された。また、12月13日にA地区より採取した感染性胃腸炎患者便2件から検出されたNVもこれらの株に96%以上の相同性を示しており、同一の遺伝子型と考えられいずれもMX近縁株であった。なお、12月13日に採取した養殖カキからは2株のNV遺伝子が検出された。また、polymerase領域についても、A地区の感染性胃腸炎患者便、河川B、海域Cのカキから検出されたNV遺伝子はそれぞれ97%以上の相同性が得られており、すべて同一型のNV遺伝子であることが確認された。なお、A地区の胃腸炎患者2名(A1、A3)からそれぞれ2株のNV遺伝子が検出された。一方、海域Cで11月21日に採取した養殖カキから検出されたNVについては、遺伝子型がcapsid領域において上述のグループと異なることが確認され、この時期の海域Cでは複数のウイルス株によるカキへの汚染が起こっていた。

また、A地区の下水普及率は97.1%で処理は南に隣接する町の下水処理場で行われており、その処理水は河川Bに流入しないにも関わらず、河川BからはA地区の胃腸炎患者から検出されたNVと同じ遺伝子型の株が検出された。さらに、宮城県感染症発生動向調査によると、この時期に県内各地で感染性胃腸炎の

流行が報告されており、B 地区でも隣接する A 地区と同じ遺伝子型の NV による感染性胃腸炎の流行があった可能性は高い。

(a) capsid領域 (243bp)

G1

City E 1 (6 Mar. 2002) 1 CGCCC CAACA AACAT GGATG GCACC AGTGG TGCCG GCCAG CTGGT ACCAG 50
51 AGGCA AACAC AGCTG AGCCT ATATC AATGG AGCCC GTGGC TGGGG CAGCA 100
100 ACAGC TGCCG CAACC GCTGG CCAAG TTAAT ATGAT TGACC CCTGG ATAAT 150
151 GAATA ATTAT GTGCA AGCCC CTCAA GGTGA ATTCA CCATA TCGCC TAACA 200
201 ACACA CCAAG TGATA TTTTG TTTGA TTTAC AATTA GGCCC CCA

G2

River B (5 Dec. 2001) 1 GAAGA TGGCG TCGAA TGACG CTGCT CCATC TAATG ATGGT GCCGC CGGCC 50
Oyster C (13 Dec. 2001)
City A 2 (13 Dec. 2001)
City A 1 (13 Dec. 2001)
City D 1 (10 Dec. 2001)
Oyster C (21 Nov. 2001) -C- -C- -TA- G-
River B (5 Dec. 2001) 51 TCGTC CCAAG GATCA ACAAT GAGGC AATGG CGCTA GAGCC AGTGG CGGGC 100
Oyster C (13 Dec. 2001)
City A 2 (13 Dec. 2001) -C- -T
City A 1 (13 Dec. 2001) -C- -T
City D 1 (10 Dec. 2001) -C- -T
Oyster C (21 Nov. 2001) -C- -A- -CC-CC -TT- G -A- -T- -T-
River B (5 Dec. 2001) 101 GCAGC GATAG CAGCG CCCCT CACTG GCCAG CAAA TATAA TTGAT CCCTG 150
Oyster C (13 Dec. 2001) A-
City A 2 (13 Dec. 2001) A- T- -T-
City A 1 (13 Dec. 2001) A- T- -G-
City D 1 (10 Dec. 2001) A- T-
Oyster C (21 Nov. 2001) A- -C- -T- -T- G- A -T-
River B (5 Dec. 2001) 151 GATTA TGAAT AATTT TGTGC AAGCA CCTGG TGGTG AGTTT ACAGT GTCAC 200
Oyster C (13 Dec. 2001)
City A 2 (13 Dec. 2001) -C-
City A 1 (13 Dec. 2001) -C-
City D 1 (10 Dec. 2001) -C-
Oyster C (21 Nov. 2001) GA-CA -A- -CAA- -A- -C- -T- -C-
River B (5 Dec. 2001) 201 CTAGG AATTT CCCTG GTGAA GTGCT TCTTA ATTG GAATT AGG
Oyster C (13 Dec. 2001)
City A 2 (13 Dec. 2001) -C- -G-
City A 1 (13 Dec. 2001) -C- -G-
City D 1 (10 Dec. 2001) -C- -G-
Oyster C (21 Nov. 2001) -A- -C- -C- -A- -A-T- -T- A- -A- -G- -G-

(b) polymerase領域 (246bp)

G2

River B (26 Nov. 2001) 1 GCGGG CAGTG TTGGC AGCAG CACTT GAGAT CATGG TGAGG TTCTC TGCTG 50
City A 3-2 (13 Dec. 2001)
City A 1-2 (13 Dec. 2001) -A-
City D 1 (10 Dec. 2001)
River B (26 Nov. 2001) 51 AACCA CAGCT AGCAC AAATA GTGGC TGAGG ACCTG CTAGC ACCAA GTGTG 100
City A 3-2 (13 Dec. 2001)
City A 1-2 (13 Dec. 2001)
City D 1 (10 Dec. 2001)
River B (26 Nov. 2001) 101 GTTGA TGTGG GTGAC TTTAA GATCA CCATC AATGA AGGCC TACCT TCCGG 150
City A 3-2 (13 Dec. 2001)
City A 1-2 (13 Dec. 2001) -C- -G- -T-
City D 1 (10 Dec. 2001) -C-
River B (26 Nov. 2001) 151 TGTGC CTTGC ACCTC ACAGT GGAAC TCCAT TGCCC ACTGG TTGCT TACTT 200
City A 3-2 (13 Dec. 2001) -T-
City A 1-2 (13 Dec. 2001) -C-
City D 1 (10 Dec. 2001) -C-
River B (26 Nov. 2001) 201 TGTGT GCCCT TTCTG AAGTG ACAGG ACTAG GCCCT GACAT CATA C A
City A 3-2 (13 Dec. 2001) -C-
City A 1-2 (13 Dec. 2001)
City D 1 (10 Dec. 2001)

図 4. 検出された NV 株の capsid 領域および polymerase 領域における塩基配列

(図中の City A, D, E は、それぞれ A, D, E 地区における胃腸炎患者便から検出された株を示す。A, D, E の後に続く数字は患者番号である。River B と Oyster C は、河川 B の河川水、および海域 C の養殖カキから検出された NV 遺伝子をそれぞれ表す。() 内の日付は、各サンプルの採取日である。同一のサンプルから、塩基配列が完全に一致する複数の株が検出された場合には、そのうちの一株だけを示した。記号 - は、最上段の株と同じ塩基であることを示す。)

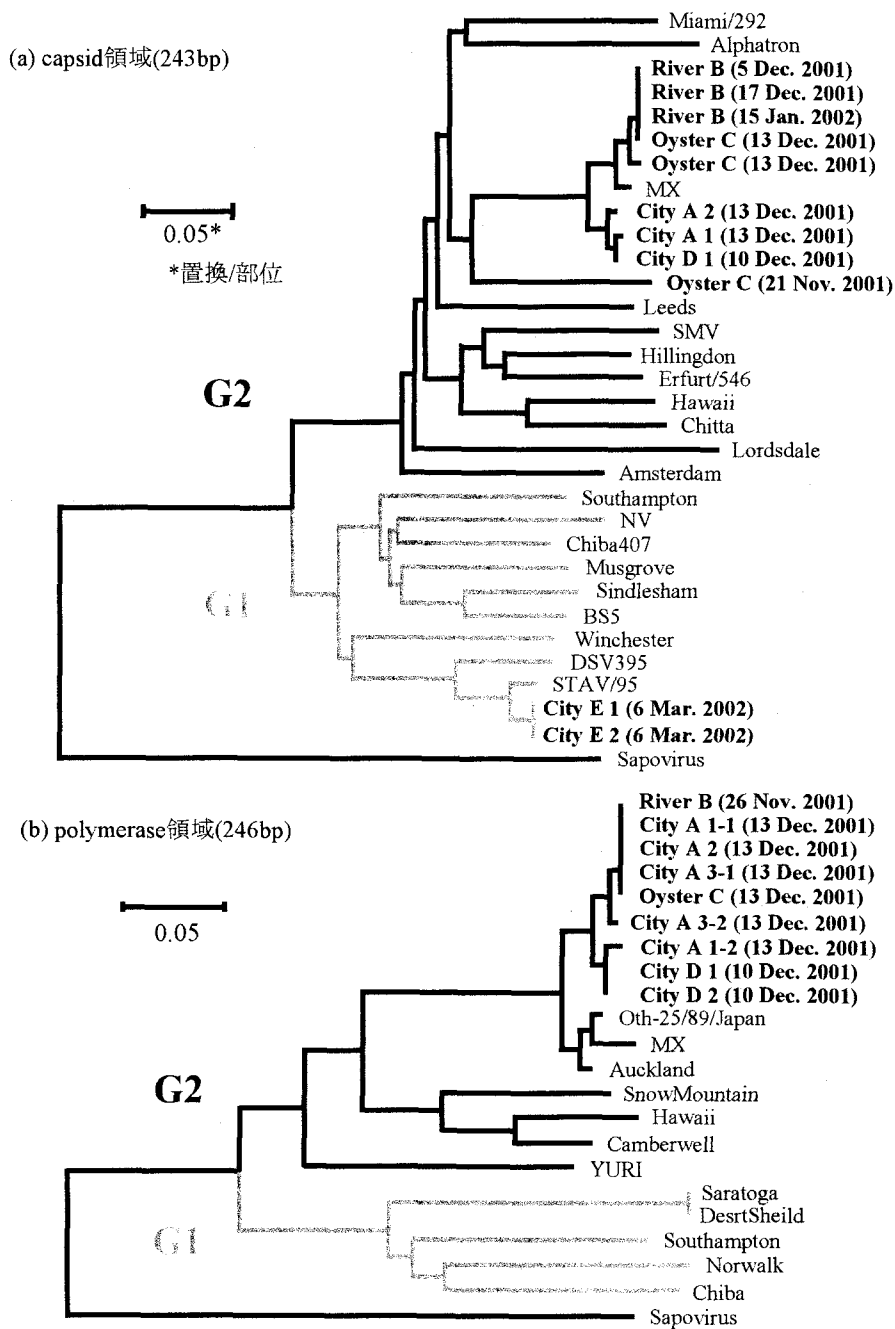


図5. NV遺伝子の系統解析結果 (NJ法)

3. 3 地理的・時間的な要因による影響

D地区の小学校で12月初旬に集団発生した感染性胃腸炎事例で12月10日に採取した患者便から検出さ

れたNV遺伝子は、capsid領域、polymerase領域ともに、A地区の感染性胃腸炎患者便（12月13日）から検出されたNV遺伝子と高い相同性を示した（図5）。このことから、約50km離れた2つの地区において、同じ型のNVによる感染性胃腸炎が同時期に広範囲に流行していたことが明らかになった。また、2002年3月にE地区の小学校で流行した感染性胃腸炎患者便2件からは、それぞれcapsid領域で100%塩基配列が一致するNVが検出され、G1型でSTAV/95の近縁株であることが分かった（図5）。2001年11月～12月にかけてA地区、河川B、海域Cにおいて検出されたNVはG2型であったことから、A地区周辺で流行した感染性胃腸炎と、E地区で流行した胃腸炎とは原因のウイルスは異なっていた。

3. 4 NVによるカキ汚染経路

同時期に同一地区で採取したNVによる感染性胃腸炎患者便、カキ養殖海域に流入している河川水、カキのそれぞれから検出されたNVの遺伝子は、capsid領域およびpolymerase領域ともに高い相同性が確認されたことから、これらの株はすべて同一型の遺伝子であると考えられた。従来、NVの養殖カキへの汚染経路は、患者～河川～海域～養殖カキと考えられており、その一部である河川～海～養殖カキについては、著者らがそれぞれのサンプルから検出したNV遺伝子の相同性解析によって示唆した¹⁶⁾が、汚染経路へのヒト（患者）の関与について検証した報告はほとんどなかった。本研究で患者便、河川、カキから同一型のNV遺伝子が確認されたことにより、NVの養殖カキへの汚染経路は胃腸炎患者～河川～海域～カキと推測された。今後、下水処理場および屎処理場の流入水、処理水を対象としたNVの検出とその遺伝子解析を実施し、汚染経路をさらに明らかにしていく必要がある。

NVのカキへの汚染経路の立証は、経路の遮断による汚染対策を検討する上で意義があり、本研究の結果から、汚染経路を効果的に遮断できる場の一つとして、下水処理場を挙げることができる。従来の研究においても、下水処理水中には、塩素等による消毒にも関わらず、NVをはじめとする腸管系ウイルスが存在していることが明らかになっている¹⁷⁻²⁰⁾。本研究により胃腸炎患者からカキに至る汚染経路が推測されたことから、NVによるカキ汚染を防止し、カキに起因する感染リスクを飛躍的に低減させるためには、下水処理過程における有効なNV除去手法について検討する必要がある。

4. 結論

本研究では、宮城県のある地区で発生したNVによる感染性胃腸炎の流行時において、患者便、河川水、カキからそれぞれ検出されたNV遺伝子について系統解析を行った。その結果、患者便、河川水、カキから同一型と見られる遺伝子が検出された。このことは、これまで懸念されていた感染者～河川～海域～カキというNVのカキへの汚染経路を裏付ける重要な結果である。この結果をもとに、今後、汚染経路が立証されれば、NVによるカキ汚染の防止に向けた有効な対策が進み、カキに起因する感染リスクの飛躍的な低減が期待できる。

参考文献

- 1) 武田直和他(1999)：ヒトカリシウイルス感染による急性胃腸炎，モダンメディア，**45**，pp169－179.
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センター(2001)：Infectious Diseases Weekly Report Japan，**3**：8－9.
- 3) 病原微生物検出情報(1999)：ウイルス性胃腸炎集団発生 1997. 10～1999. 10，**20**：265-266.
- 4) 染谷雄一(2000)：カリシウイルス. ウイルス. **50**：173－184.
- 5) Shigeno Matsuno, Rie Sawada, Kazuhiro Kimura, Hiroshi Suzuki, Shigeki Yamanisi, Kuniko Shinozaki Masaaki Sugieda, and Ayako Hasegawa(1997)：Sequence analysis of SRSV in fecal specimens from an epidemic of infantile gastroenteritis, October to December 1995, Japan. *J. Med. Virol.* **52**：377－380

- 6) 入谷展弘, 勢戸祥介, 春木孝祐, 川本尋義, 西尾 治, 久保英幸, 村上 司, 養城昇次, 綾田 稔, 小倉 壽(2002) : 河川水からの Norwalk virus の検出. *生活衛生*. **46** : 137-143
- 7) F. Le. Guyader, L. Haugarreau, L. Miossec, E. Dobois, and M. Pommepuy(2000) : Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** : 3241-3248.
- 8) Moe , C. L. , J. Gentsch, T. Ando, G. Grohmann, S. S. Monroe, X. Jiang, J. Wang, M. K. Estes, Y. Seto, and C. Humphrey (1994) : Application of PCR to detect Norwalk virus in fecal specimens from outbreaks of gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* **32** : 642-648.
- 9) 林 直志他 : 未発表データ
- 10) Kageyama, T. , S. Kojima, M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F. B. Hoshino, N. Takeda, and K. Katayama (2003) : Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **41** : 1548-1557.
- 11) S. Kojima , Kageyama. T , S. Fukushi , F. B. Hoshino , M. Shinohara, K. Uchida, K. Natori, N. Takeda, and K. Katayama (2002). : Genogroup-specific PCR primers from detection of Norwalk-like viruses, *J. Virol. Methods*. **100** : 107-114.
- 12) Ando , T. , Q. Jin, J. R. Gentsch, S. Monroe, J. Noel, S. F. Dowell, H. G. Cicirello, M. A. Khon, and R. I. Glass(1995) : Epidemiologic application of novel molecular methods to detect and differentiate small round structured viruses (Norwalk-like viruses). *J. Med. Virol.* **47** : 145-152.
- 13) 石古博昭他 : 未発表データ
- 14) 宮田 隆(1998) : 分子進化. 共立出版.
- 15) 中田修二(2002) : カリシウイルス. ウイルス. **52** : 7-13.
- 16) 植木 洋他(2002) : Genetic analysis of Norwalk virus(NV) detected in the river water and the oysters. 宮城県保健環境センター年報. **20** : 45-46.
- 17) W. J. Lodder, J. Vinje, R. VANDE Heide, A. M. DE RODA HUSMAN, E. J. T. M. Leenen, and M. P. G. Koopmans(1999) : Molecular detection of Norwalk-like caliciviruses in sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 5624-5627.
- 18) Havelaar, A. H. , M. V. Olphen and Y. C. Drost(1993) : F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 2956-2962.
- 19) Yano, K. , Y. Yoshida, T. Shinkai , and M. Kaneko(1993) : A Practical Method for the Concentration of Viruses from Water Using Fibriform Cellulose and Organic Coagulant. *Water Science and Technology*. **27** : 295-298
- 20) 川本尋義他 : ウイルス性食中毒原因の遺伝子検査標準法確立と全国行政対応整備に関する研究, 厚生科学特別研究事業平成 11 年度研究報告書.