

カキのノロウイルス汚染経路に関する検討

¹⁾ 岩手県環境保健研究センター保健科学部, ²⁾ 岩手医科大学医学部細菌学講座齋藤 幸一¹⁾ 佐藤 直人¹⁾ 高橋 朱実¹⁾ 堤 玲子²⁾ 佐藤 成大²⁾

(平成 17 年 9 月 15 日受付)

(平成 18 年 3 月 23 日受理)

Key words: norovirus, oyster, pollution, microbiology

要 旨

ノロウイルス (NV) 胃腸炎の主な伝播経路は, ヒト-ヒト感染と食品を介する感染で, このうち食品を介する感染は食中毒として取り扱われる. NV 食中毒では生カキを推定原因食品とする事例が多発している. そこで, カキが NV に汚染される経路について検討することを目的に, カキ養殖が行われている 1 閉鎖湾を対象として, 2001 年 10 月から 2004 年 3 月までの 30 カ月間, 下水処理施設, 河川, 海などの水系とカキから NV の検出を試みるとともに, 同時期に当該地域で発生した小児の胃腸炎症例由来の NV と塩基配列の比較を行った.

その結果, 調査期間中に下水, 河川水, 海水, カキ及び胃腸炎の小児から総計 208 株の NV が検出された. NV は下水処理施設の流入水からはほぼ年間を通して検出され, 他の検査材料からは主に冬季に検出された. 検出された NV は遺伝的に多様で, その中には優勢に検出される株 (優勢株) が存在した. 優勢株は検査材料間に共通するものが多く, 特に, 2002/03 シーズンは下水, 河川水, カキ及び胃腸炎患児の糞便の各優勢株が同一であった. 一つの流行シーズンに検出された株は次の流行シーズンが始まる 11 月, 12 月を境に異なる株に入れ替わり, 流行シーズンごとに検出される NV の種類が異なっていた. 今回の検討により, 小児から検出された NV と環境水及びカキから検出された NV との間に明瞭な関連性が認められ, ヒトから排泄された NV が下水処理施設や河川を経て海に到達し養殖中のカキが NV に汚染されることが確認できた.

〔感染症誌 80:399~404, 2006〕

序 文

ノロウイルス (Norovirus: NV) は乳幼児から成人に至る全年齢層に急性胃腸炎を起す病原体である^{1)~3)}. NV の感染は糞口感染で, 食品を介する場合には行政的には食中毒として取り扱われる. NV 食中毒は毎年多発しており, 平成 16 年の全国での食中毒発生状況を見ると, NV は, 事件数では総事件数 1,666 件のうち 277 件 (16.6%) で第 2 位, 患者数では総患者数 28,175 名のうち 12,537 名 (44.5%) で第 1 位の病因物質であった. NV 食中毒では, 生カキを推定原因食品とする事例が多く発生しており, カキの NV 汚染対策が公衆衛生上の課題となっている. カキは海水中のプランクトンを餌として摂取するために大量の海

水を鰓でろ過するが, この際に, 感染者から排泄された下水処理施設や河川を経て不活化させずに海に到達した NV も同時に体内に取り込むと考えられている⁴⁾. 今回, この仮説を証明するためにカキ養殖が行われている 1 閉鎖湾を対象として 3 シーズンにわたって下水, 河川水, 海水, カキ及び胃腸炎小児から PCR 法により NV を検出し, その塩基配列を比較検討した.

材料と方法

1. 調査対象地域

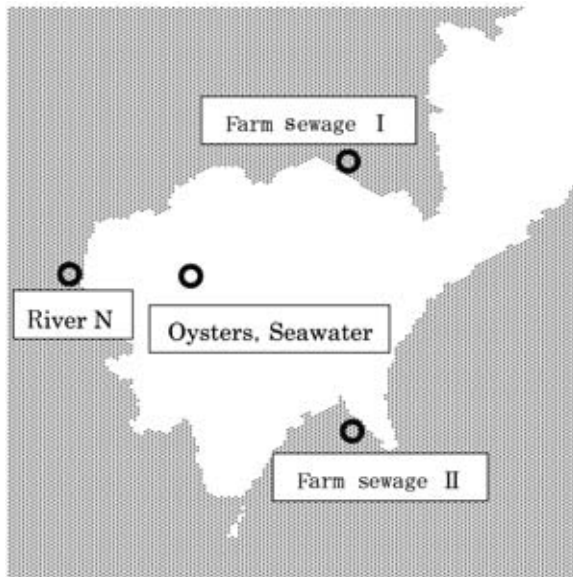
岩手県沿岸中部の Y 湾を対象地域とした (Fig. 1). 周囲を山に囲まれた典型的な閉鎖湾で, 直径約 5km, 湾の東側で太平洋に開口している (開口部の径約 800 m). 湾内は波穏やかで, カキとホタテの養殖が行われている. 湾には 5 つの小河川が流入するが大きな河川はない. 湾の周囲の人口は約 10,000 人で, 2 カ所に下水処理施設 (I, II) が設置されており, それぞれ

別刷請求先: (〒028-3311) 岩手県紫波郡紫波町犬淵字南谷地 57-20

岩手県食肉衛生検査所

齋藤 幸一

Fig. 1 Map of gulf Y and sampling stations
Water samples were collected at two farm sewage areas, a river, and around the oyster bed. Oysters were taken from the same raft throughout the experiment.



約 1,000 人の下水の処理を行っている。両施設とも好気性生物処理法による施設で処理水を Y 湾に直接放流している。また、湾周囲の事業所や一般世帯の一部には合併浄化槽が設置されており、その処理水は河川を経て Y 湾に流入している。なお、湾の周囲にはし尿処理施設は設置されていない。

2. 検査材料

1) 環境水

下水処理施設の下水は、2カ所の下水処理施設において、流入水は 1L、放流水は 5L 採取した。河川水は、Y 湾に流入する河川のうちからその流域に住宅が多い N 川の河口から約 200m 上流の地点において、海水が混入しない干潮時に 1L 採取した。海水は、検査対象としたカキを採取した筏付近の表層から 5L 採取した。各環境水の採取は 2001 年 10 月から 2004 年 3 月までの 30 カ月間に毎月 1 回から 2 回行った。

2) カキ

環境水採取と同日に N 川の河口から 400m 沖に設置されていた筏から養殖中のカキを毎回 10 個採取した。なお、調査には Y 湾に導入してから 1 年以上経過したカキを用いた。

3) 胃腸炎患者の糞便

湾の周囲に居住する 15 歳以下の小児が胃腸炎症状を呈し医療機関を受診した際に糞便 2~3g を採取した。採取は 2001 年 10 月から 2003 年 3 月までの期間に行った。

3. 検査材料の前処理

環境水は、陽電荷フィルター法⁵⁾により前処理を行っ

た。その概要は、1N HCl で検水の pH を 3.5 に調整し、0.5M $AlCl_3$ を 1L あたり 0.1mL 加え混和後、ゼータプラスのディスクフィルター (CUNO 社 #64085-03-1MDS ϕ 142mm) を用い加圧ろ過した。ろ過後のフィルターはストマッカー袋に入れ 10mL のグリシン緩衝液を加えストマッキングし溶出液を試験管に移した。粗遠心 (3,000rpm 30min) を 2 回実施後、得られた上清を 30% ショ糖液に重層し超遠心 ($150,000 \times g$ 150min) を行った。得られた沈殿を 200 μ L の蒸留水で再浮遊し、RNA 抽出用試料とした。

カキは、1 個を 1 検体として、中腸腺を取り出し、マイクロチューブに入れ、凍結後、65°C のヒートブロック上で蒸留水約 1mL を加え融解し、爪楊枝を用いて浮遊液を作成した。続く粗遠心以降の処理は環境水と同様に行った。

糞便は、約 0.5g を用い蒸留水にて 10% 浮遊液を作成した。続く粗遠心以降の処理は環境水と同様に行った。

4. RNA の抽出

RNA の抽出はグアニジン塩化セシウム超遠心法⁶⁾によった。RNA 抽出用試料 100 μ L にグアニジン溶液を 300 μ L 加えよく混和後、ポリアロマー製の超遠心チューブに入れた 5.7M CsCl 溶液 (700 μ L) に重層し、小型超遠心機 (BECKMAN TL-100) で 70,000rpm 3hr 遠心を行った。得られた沈殿を蒸留水 200 μ L に再浮遊し、エタノール沈殿を 2 回実施した。乾固した沈殿を蒸留水 30 μ L で溶解し、抽出 RNA とした。抽出した RNA は使用時まで -80°C に保存した。

5. PCR 反応による NV の検出

NV 遺伝子の増幅は、糞便については RT-PCR により、その他の検査材料については RT-seminested PCR により行った。増幅領域は ORF1 のポリメラーゼ領域で、用いたプライマーは、RT-PCR には Ando ら⁷⁾ の SR プライマーを用いた。RT-seminested PCR では RT-1st PCR には 5' 側には NV82, SM82⁸⁾ を 3' 側には SR33 を、2nd PCR には SR プライマーを用いた。

6. PCR 産物の遺伝子解析

PCR 産物は PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製後、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (AB) によりサイクルシーケンス反応を行った。反応産物はスピンカラム (CENTRI SEP: AB) により精製後、3100 Genetic Analyzer (ABI PRISM) により塩基配列を決定した。塩基配列の異なる株は別株として GENETYX-WIN Ver.5 を用い系統樹解析を行った。

成 績

1. NV の季節的検出状況

総検体数 704 件のうち 179 件から NV が検出された。1 検体から 2 株の NV が検出された検体も有り、

Table 1 Norovirus detection in enviromental water, oysters, and children's feces

Collection date			Farm sewage I		Farm sewage II		River	Sea	Oysters	Feces
year	month	day	Inflow	Outflow	Inflow	Outflow				
2001	10	23	—	—	—	—	—	—	—	—
	11	13	—	—	—	—	—	—	—	—
	12	11	—	—	①	—	—	—	—	—
2002	1	15	●	—	●②	●	—	—	▲▲▲▲▲●●●	●
		29	●▲	●▲	●▲	●	■	●	▲●●■	—
	2	14	●▲	●	●	●▲	●	—	▲●●●●●	◆◆◆
		26	●	●③	●▲	●	●	—	▲●●●	—
	3	12	●▲	●▲	●▲	●	●	—	▲●●	—
	4	9	●④	—	●	—	—	—	▲●	—
	5	14	●	—	●	—	—	—	⑤	—
	6	21	●	—	●	—	—	—	—	—
	7	9	—	—	—	—	—	—	—	—
	8	6	●	—	●	—	—	—	—	—
	9	10	●	—	●	—	—	—	—	—
		22	⑥	—	—	—	—	—	—	—
11	12	●	—	●	—	—	—	—	●	
	26	●	●	●	—	—	—	—	—	
12	10	●	●	■	⑦	—	—	—	⑪⑫⑬●●●●	
	26	●	●	●	●	●	—	●⑧⑨	●●●●●●●●	
2003	1	8	●	●	●	●	●	—	NT	●●⑭
		22	●	●	●	●	●	—	●●⑩	—
	2	13	●	—	●	—	●	—	●●●●●●●	—
		25	●	●	●	—	—	—	●●●●●	—
	3	11	●	●	●	●	—	●	—	—
		25	●▲	●▲	●▲	—	▲	—	●⑮	—
	4	22	●	●	NT	NT	—	—	—	NT
	5	27	●	●	NT	NT	—	—	—	NT
	6	26	●	●	NT	NT	●	—	—	NT
	7	29	—	—	NT	NT	—	—	—	NT
	8	26	●	—	NT	NT	—	—	—	NT
	9	25	—	—	NT	NT	—	—	—	NT
10	17	⑩	—	NT	NT	—	—	—	NT	
11	11	●	—	NT	NT	—	—	—	NT	
	26	—	—	NT	NT	—	—	—	NT	
12	9	■	■	NT	NT	—	—	—	NT	
	26	●	—	NT	NT	—	—	—	NT	
2004	1	5	■	■	NT	NT	■	—	⑰	NT
		23	⑱	—	NT	NT	■	—	●	NT
	2	3	■▲	▲	NT	NT	■▲	—	●●	NT
		24	■▲	▲	NT	NT	▲●	—	■▲▲▲▲	NT
	3	9	■▲	▲●	NT	NT	■▲	—	▲▲▲▲▲▲▲●	NT
		23	■▲	▲	NT	NT	■▲	—	▲▲	NT

PCR was conducted for the RNA extracted from environmental water and 10 oysters on each collection date. Feces samples analyzed were obtained during the corresponding month from two hospitals in the area. Each symbol indicates detection of a NV sequence: different colors, shapes, and circled numbers indicate different sequences. In the text, ●, ○, ■, ▲, △, and ● indicate a, b, c, d, e, and f strains. — : not detected. NT : not tested.

検出株数は208株であった。内訳は、下水処理施設の下水：107株、河川水：20株、海水：2株、カキ：60株、小児の糞便：19株であった。Table 1に各検査材料からのNV検出の有無を各シンボルマークと“—”で示した。各シンボルマークはそれぞれ塩基配列が異なる株であることを示す（後述）。以下に、検査材料毎にNVの検出状況を記す。なお、NV胃腸炎の流行シーズンは11月から3月とされていることから、検出状況は流行シーズンを基準に示した。

1) 環境水

下水処理施設の流入水からは、非流行シーズンにも検出され概ね年間を通してNVが検出された。下水処理施設Iでは43回中35回、下水処理施設IIでは26回中21回の調査でNVが検出された。両施設とも、1月から6月の期間には連続して検出され、7月から12月の期間には検出されないこともあった。一方、放流水からは、主に流行シーズンに検出された。2002年～2003年シーズン（2002/03シーズン）には下水処理施設Iにおいては流行シーズン後も検出が続き、2002年11月から始まった検出が2003年6月まで続いた。なお、初めの2シーズンの調査において下水処理施設I、IIのNV検出状況がほぼ同一であったことから、2003年4月以降は下水処理施設Iのみ調査を行った。

河川水からは主に流行シーズンに検出された。検出状況は下水処理施設の放流水に類似していた。流行シーズン以外では2003年6月の調査において検出された。

海水からは2002年1月と2003年3月の2回、ともに流行シーズンに検出された。

2) カキ

概ね流行シーズンにのみ検出された。カキの養殖期間は2～3年で筏には年間を通してカキが垂下されているが、非流行シーズンである夏季にはNVは検出されなかった。2001/02シーズンでは春先までNV検出が続き5月にも1検体からではあったがNVが検出された。

3) 胃腸炎の小児

2001/02シーズンは18検体、2002/03シーズンは32検体について検査を実施し、それぞれ4株、15株のNVを検出した。NVは流行シーズンにおいてのみ検出され、検出期間は、2001/02シーズンが2002年1月から2月、2002/03シーズンが2002年11月から2003年1月であった。

2. 遺伝子解析結果

解析したNVのポリメラーゼ領域のPCR産物の塩基配列はTable 1に異なるシンボルマークで示したとおり33種類に分類できた。複数株検出されたNVは色マークで、1株のみ検出されたNVは丸囲い数字で

示した。複数株検出されたNVは15種類、1株のみ検出されたNVは18種類であった。各検査材料とも流行シーズン毎に検出されたNVの種類に変化がみられ、次のシーズンが始まる2002年11月と2003年12月を境にそれまでとは異なる種類に入れ替わった。検出数の多かった下水、河川水、カキには優勢株が認められた。下水処理施設の流入水から検出されたNVと同一の塩基配列のNVが下水処理施設の放流水、河川水、海水から検出され、さらに、カキからも検出された。このことは各流行シーズンで共通していた。即ち、2001/02シーズンではa株、2002/03シーズンではb株、2003/04シーズンではc株とd株が検査材料間に共通して検出され、また、各株は下水、河川水及びカキの優勢株であった。

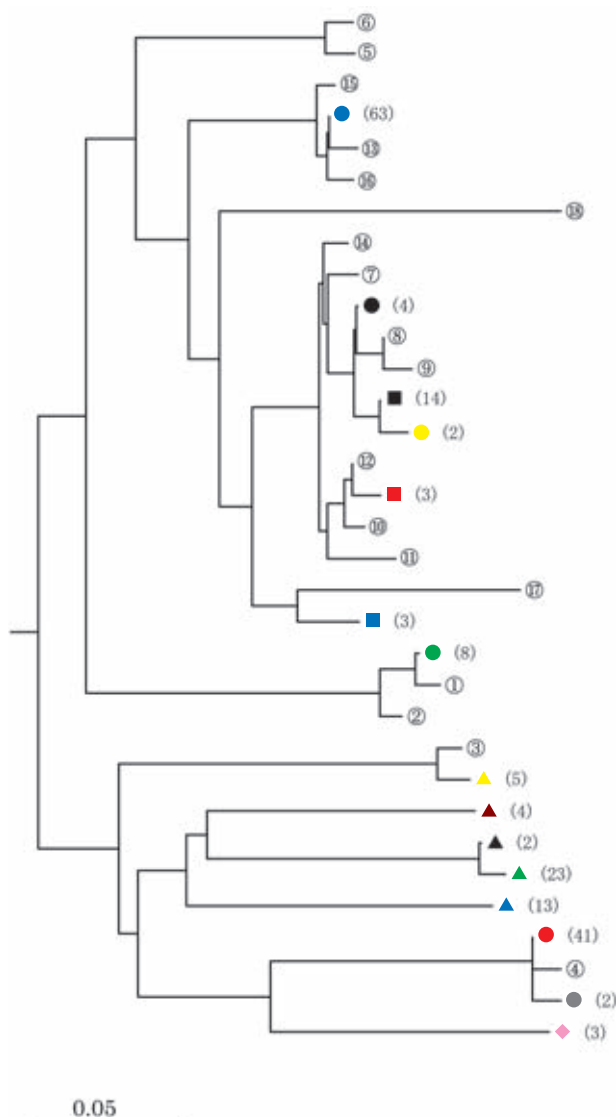
小児から検出された株について他の検査材料から検出された株との関連をみると、2001/02シーズンに1株検出されたf株は同シーズンに下水及びカキからも検出された。2002/03シーズンに8株と小児から優勢に検出されたb株は下水、河川水及びカキにおいても優勢に検出された。検出された33種類のNVを用い近隣結合法（NJ法）で作成した系統樹をFig. 2に示した。検出されたNVは系統樹上も遺伝子的に多様であった。

考 察

今回、カキの養殖環境に着目して環境水におけるNVの挙動を明らかにし、遺伝子の多様性との関連について検討するために、大きな河川の流入がない1閉鎖湾を対象に3シーズンについて調査を行った。その結果、第一にNVは下水処理施設の流入水からほぼ年間を通して検出されることが示された。また、下水処理施設において完全には除去されずに放流されたNVが河川水、海水、カキからも検出されることが塩基配列の解析からも証明された。このことはヒトから排泄されたNVが下水処理施設や河川を経て海に到達し養殖中のカキを汚染していることを示している。

NVは遺伝子的に多様性を有し、多数の遺伝子型の存在が報告されている^{9)~11)}。我々は、これまでに小児におけるNV胃腸炎の疫学について検討し、NVは、小児の胃腸炎の主要な病原で、冬季を流行シーズンとし、1シーズンに数種類の株が同時に流行し、流行株の中には主流株（優勢株）がみられ、優勢株はシーズンにより入れ替わる等の疫学的特徴を有することを報告した¹²⁾。今回の調査で、環境水及びカキから検出されたNVは遺伝子的に多様で、検出された株にはシーズンによりその種類に入れ替わりがみられた。また、検出数の多かった検査材料には優勢株が認められた。これらの結果は、小児におけるNV胃腸炎の疫学的特徴を反映したものと考えられた。

Fig. 2 Dendrogram of detected NVs
Sequences of the polymerase regions of 208 isolates presented in Table 1 were analyzed by the neighbor-joining method. The symbols are the same as shown in Table 1. Number of NVs detected is in ().



2002年に流行シーズン終了後の5月までカキからNVが検出されたことは、流行シーズン中にヒトから排出され海に到達したNVが海水中や海泥に停滞しシーズン終了後も継続してカキを汚染する可能性と一旦カキに取り込まれたNVはしばらくは体内から消失しない可能性が考えられた。後者に関連してはポリオウイルスを用いたカキの浄化試験で浄化開始後10日目までカキからウイルスが検出されたとする福田らの報告がある¹³⁾。しかしながら非流行シーズンである夏季には通年養殖されている養殖1~2年のカキからNVは検出されなかったことからカキのNV汚染は6か月以上の長期にわたっては持続しないと推察される。

Inouyeら²⁾は、冬季以外の非流行シーズンにおいて

も胃腸炎患者の糞便から検出数は少ないもののNVが検出されると報告しているが、今回の調査において下水処理施設の流入水からほぼ年間を通してNVが検出されたことは非流行シーズンにおいても感染者が存在することを示すもので、Inouyeらの報告を支持する結果と考えられた。

謝辞：本研究の遂行にあたり御協力いただきましたもりおかこども病院金濱誠己博士、山田町役場内田明氏、岩手県水産技術センター平嶋正則氏、岩手県農林水産部水産振興課加賀克昌氏に深謝いたします。本研究の一部は平成15年度厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）を受けて行われた。

文 献

- 1) Green KY, Kapikian KZ, Chanock RM : Human calicivirus. Field's Virology vol 2 (4th ed). Lippincott-Raven, New York, 2001 ; p. 841—74.
- 2) Inouye S, Yamashita K, Yoshikawa M, Kato N, Okabe N : Surveillance of viral gastroenteritis in Japan : pediatric cases and outbreak incidents. J Infect Dis 2000 ; 181 (Suppl.2) : S270—4.
- 3) 中田修二 : ウイルス性胃腸炎. 小児科 2000 ; 41 (1) : 13—20.
- 4) Metcalf TG : Viruses in shellfish growing waters. Environ Int 1982 ; 7 : 21—7.
- 5) 日本水道協会 : 水中ウイルスの濃縮及び回収方法. 2001. 上水試験方法 解説編 2001年版 894—9.
- 6) 中山広樹, 西方敬人 : RNA の抽出. バイオ実験イラストレイテッド 2 遺伝子解析の基礎 秀潤社, 東京, 1995 ; p. 153—66.
- 7) Ando T, Monroe SS, Gentsch JR, Jin QI, Lewis DC, Glass RI : Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. J Clin Microbiol 1995 ; 33 (1) : 64—71.
- 8) 林 直志, 他 : 未発表.
- 9) Ando T, Noel JS, Fankhauser RL : Genetic classification of "Norwalk-like viruses". J Infect Dis 2000 ; 181 : S336—348.
- 10) Vinje J, Green J, Lewis DC, Gallimore CI, Brown DWG, Koopman MPG : Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses". Arch Virol 2000 ; 145 : 223—41.
- 11) Gallimore CI, Green J, Lewis D, Richards AF, Lopman BA, Hale AD, *et al.* : Diversity of noroviruses cocirculating in the north of England from 1998 to 2001. J Clin Microbiol 2004 ; 42 (4) : 1396—401.
- 12) 齋藤幸一, 佐藤 卓, 熊谷 学, 小林良雄, 堤玲子, 高橋清実, 他 : 急性胃腸炎の集団事例及び散発事例から検出された SRSV の遺伝子解析結果. HACCP 2000 ; 6 (7) : 54—9.
- 13) 福田美和, 川田一伸, 矢野拓弥, 杉山 明, 中山 治, 西尾 治, 他 : 養殖カキのウイルス浄化試験. 感染症誌 2003 ; 77 (2) : 95—102.

Study on Pollutant Pathway of Norovirus Contamination in Oysters

Koichi SAITO¹⁾, Naoto SATO¹⁾, Akemi TAKAHASHI¹⁾, Reiko TSUTSUMI²⁾ & Shigehiro SATO²⁾

¹⁾Department of Health Science, Research Institute for Environmental Science and Public Health of Iwate Prefecture,

²⁾Department of Bacteriology, School of Medicine, Iwate Medical University

Noroviruses (NVs) cause human gastroenteritis through person-to-person transmission and via contaminated foods. In food poisoning, a major suspected cause is the consumption of raw oysters. We detected NVs from environmental water and oysters around a closed gulf where oysters are cultivated. We collected oyster and water samples once or twice a month for 30 months from October 2001 to March 2004. We then studied monthly changes in virus occurrence and in genetic relationships among 208 NVs isolated from water and oyster samples and from the feces of children suffering from acute gastroenteritis during the same period in the same region.

In the analysis of untreated water flowing into farm sewage, NVs were detected year round. In other water samples -processed sewage, river water, and seawater-, oysters, and children's feces, NVs were detected mainly in winter. A comparison of NV nucleotide sequences showed genetic diversity, but some strains predominated in certain winter seasons. These predominant strains were detected across sample materials. In 2002/03, an identical strain was detected in sewage, river water, seawater, oysters, and feces. We also found that NV genetic types changed at the beginning of the season, in November or December, in both 2001/02 and 2002/03.

This study showed a clear relationship between NVs detected in children's feces and those in environmental water and oysters. These results support the idea that NVs are transmitted from the feces of infected persons to oysters by the flow of water through farm sewage, rivers, and the sea, finally accumulating in the mid-gut gland of oysters.