

沖縄県におけるNLVsの浸淫状況と検査方法の比較検討

糸数清正・大野 惇*・中村正治・久高潤・安里龍二

The Survey on Norwalk-like Viruses in Okinawa Prefecture and Evaluation of the Methods for Detection

Kiyomasa ITOKAZU, Atsushi OHNO, Masaji NAKAMURA, Jun KUDAKA and Ryuji ASATO

要旨：沖縄県の平成11年度における食中毒事例30件のうちはじめてNLVsを原因とする食中毒が3件確認された。また、NLVsの浸淫状況と実態を把握するために、生活排水を処理する下水処理場の未処理下水44件からのNLVs遺伝子の検出を行った。その結果、すべての検体からNLVs遺伝子が検出された。また、新プライマー (P1/P2, Y1/Y2) および従来プライマー (36/35', Yuri52F/Yuri52R, NV82:SM82/NV81, Yuri22F/Yuri22R) でのNLVs遺伝子の検出率を比較したところ、新プライマーでも高率に検出された。

Key Words : Calicivirus, Norwalk-like viruses, SRSV, Nonbacterial food poison

I はじめに

我々は、1998年度に沖縄県におけるウイルス性胃腸炎の浸淫状況と汚染食品の実態を把握するために、感染性胃腸炎患者便18検体からのウイルス検索と県内で流通している市販生カキ8検体及び県内産の二枚貝であるヒメジャコ4検体からNorwalk-like viruses (NLVs) (SRSVの代称)¹⁾の検出調査を行った。その結果、本県では初めて感染性胃腸炎患者糞便2検体からNLVsを検出し、また本県内にもNLVsに汚染された食品が流通販売されることを明らかにして、本県においてもNLVsにおける集団ウイルス性食中毒の発生の可能性があることを示唆してきた。^{2)~4)}今回は1999年度に県内で発生した食中毒のうち非細菌性食中毒事例からウイルスの病原体検索を行った。また、生活環境水におけるNLVsの浸淫状況と実態を把握するために生活排水を処理する下水処理場における未処理下水について調査した。さらに、研究班設計の新プライマー (P1/P2, Y1/Y2) と従来プライマー (36/35', Yuri52F/Yuri52R, NV82:SM82/NV81, Yuri22F/Yuri22R) でのNLVs遺伝子の検出感度の比較とノーウォークウイルス検出キットを用いた結果について報告する。

II 材料及び方法

1. 非細菌性食中毒事例からのウイルスの病原体検索

1999年12月から2000年1月に起こった非細菌性食中毒3事例の患者便からのウイルスの病原体検索を行った。ウイルス抗原検出には、市販のキット、ロタスクリーン (A群ロタ) とC群ロタウイルス検出キット及びノーウォークウイルス検出キット (EIA法) (厚生省新興再興感染症研究事業研究班, デンカ生研株式会社から分与) を使用した。

従来プライマー使用のNLVs検査は、RT-PCR法で行いRNA抽出には、SepaGene RV-R (三光純薬) キットを用い、プライマーは1ST PCRでは、36/35' とNested PCRでは、NV82:SM82/NV81とYuri22F/Yuri22Rを用い、Gene Amp PCR System 9600-R (PERKINELMER) で増幅し、PCR産物は2%アガロース、TAEバッファで泳動後、紫外線照射により検出した。RT-PCRにより得られた増幅産物の特異性確認は、マイクロプレートハイブリダイゼーション法で行った。ゲルからのDNA抽出は、QIAquick PCR Purification Kitを用い、プローブは、国立公衆衛生院より99年度に分与されたG1型 (G199-A, G199-B), G2型 (G299-A, G299-B, G299-C) を用いた。また、図1, 図2に示した新プライマー⁵⁾でのNLVs遺伝子の検出は、One tube法で逆転写反応には、P3プライマーを用い1ST PCRにP1/P2とY1/Y2プライマーを用いて図3の条件設定でRT-PCRを行った。

*沖縄県薬務衛生課

P1 5' GCT GAT TAC TCT(C/G)G(C/G) TGG GA 3'
 P2 5' ACA CAG AGT GAG(C/G)A(A/G) CCA GTG 3'
 P3 5' GT(A/G)(C/G)TC ACA AT(C/T) TCA TCA TC 3'
 Y1 5' TGG GAC TCA ACA CA(A/G) CAG AG 3'
 Y2 5' TCA GA(A/C) AG(G/T) GCA CA(C/G) AGA GT 3'

図1. 新プライマーの配列

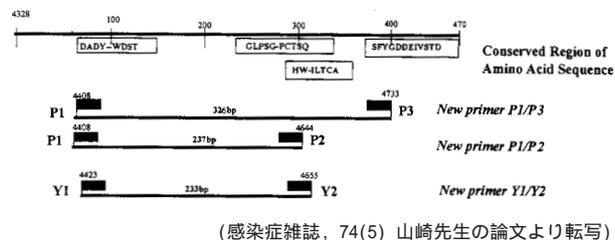


図2. 新プライマーの増幅部位

< R T >

DW	1. 4 μl
5 × R T buffer	3. 0 μl
0.1M D T T	0. 7 μl
2.5mM dNTP	3. 0 μl
RNase inhibitor (38unit/μl)	0. 7 μl
M-MLV RT (200unit/μl)	0. 7 μl
P 3 Primer (100μM)	0. 5 μl
<hr/>	
R N A 抽出物	10. 0 μl
R T 混合液とR N A抽出物を混合して42 で60分反応させる。	5. 0 μl

< P C R >

DW	24. 75 μl
10 × Ex Taq buffer	5. 0 μl
2.5mM dNTP	4. 0 μl
* P 1 Primer (100μM)	0. 5 μl
* P 2 Primer (100μM)	0. 5 μl
E X Taq	0. 25 μl
<hr/>	
R T Sample	35. 0 μl
*別チューブでPrimerをY 1 / Y 2にかえて行う。	15. 0 μl

P C R 反応

94	5分	1回
94	1分	5サイクル
45	2分	
60	4分	35サイクル
94	1分	
50	1分20秒	
72	1分	
72	15分	1回
4	hold	

図3. RT (P3) - PCRの条件設定.

2. 未処理下水からのNLV s 遺伝子検出

検体は、沖縄県流域下水道の3終末処理場 (A処理場：南部地区 B処理場：中部地区西 C処理場：中部地区東) から1999年7月から2000年3月までに下水処理場に

流入する未処理下水44件を供試した。検体の前処理は、図4に示す様に未処理下水50mlを6,000rpmで粗遠心して上清を取り、PEG6000を4g (濃度8%), NaCl 1.05gを加え4, 一晩放置した後、8,000rpmで遠心しその沈渣に200ulのDDWを加え浮遊させたものをRNAの抽出に用いた。

N L V s 遺伝子の検出は、糞便と同様な方法で行なう、1ST PCRにYuri52F/Yuri52Rプライマーを加えた。

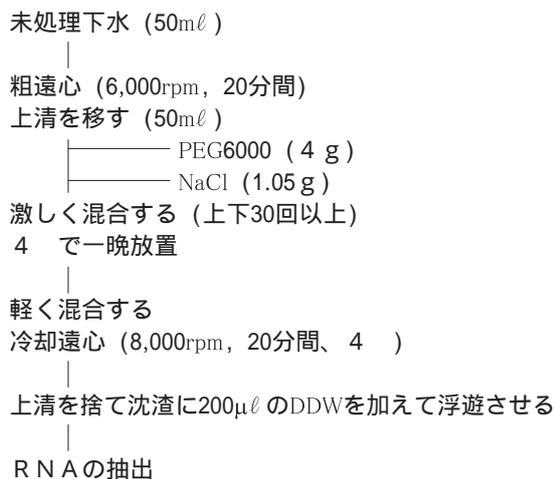


図4. 未処理下水の前処理.

III 結果

1. 非細菌性食中毒事例からのウイルスの病原体検索

1999年12月から2000年1月の期間に発生した非細菌性食中毒事例3事例のウイルスの病原体検索結果を表1に示した。

事例1は、飲食店で発生し、有症者は9名で生カキを喫食しており、糞便が回収できた5名中2名から、NLV s 遺伝子が検出された。

事例2も飲食店で発生し、有症者は9名で、生カキは喫食してはいなかったが、糞便が回収できた9名中4名からNLV s 遺伝子が検出された。その後の調査でこの飲食店では、生カキを扱っていたことが判明し、他の食品への二次汚染が考えられた。

事例3は、家庭内発生で親戚6名で生カキを喫食し5名に下痢等の症状があり、その内4名中3名からNLV s 遺伝子が検出された。なお、症状がなかった一人は、幼児で熱を通したカキを喫食していた。また、この3事例で検出された9患者のNLV s 遺伝子はハイブリダイゼーション法ですべてG型と確認された。

3事例からの糞便17検体の各プライマーにおける

表1. 非細菌性食中毒事例の病原体検索結果(1999.12~2000.1).

事例	発生年月	発生場所	生カキの喫食	有症者数	検査件数	RT-PCR陽性数	ハイブリダイゼーションによる型別
1	1999/12	飲食店	有り	9	5	2	G
2	2000/1	飲食店	無し	9	9	4	G
3	2000/1	家庭内	有り	5	4	3	G
計				23	18	9	

表2. 各プライマーにおけるNLVs遺伝子の検出結果

事例	番号	性別	年齢	発病日	検体採取日	1st PCR			Nested PCR		特異性確認 ハイブリダイゼーション	EIAキット	備考 () 指数
						36/35'	P1/P2	Y1/Y2	NV82, SM82/NV81	Yuri22F/Yuri22R			
	*1	女	33	12月23日	12月24日	-	+	+	-	+	G II (A・B)	-	
1	*2	女	33	12月23日	12月25日	-	-	-	-	-		-	
	*3	女	33	12月23日	12月25日	-	-	-	-	+	G II (A・B)	-	
	4	男	37	12月25日	12月25日	-	-	-	-	-		-	
	5	女	50	1月5日	1月9日	-	-	-	-	-		-	再検査
	6	男	23	1月6日	1月9日	-	+	+	-	+	G II (A・B)	G II	再検査
	7	男	26	1月6日	1月9日	-	-	-	-	-		-	
2	8	男	27	1月5日	1月9日	-	+	+	-	-		-	
	9	女	28	1月5日	1月10日	-	-	-	-	-		-	再検査(0.83)
	10	女	22	1月6日	1月9日	-	+	-	-	+	G II (A・B)	-	
	11	男	なし		1月9日	-	-	-	-	-		-	
	12	男	16	1月6日	1月10日	-	-	-	-	+	G II (A)	-	再検査(0.93)
	13	女	13	1月5日	1月10日	-	+	+	-	+	G II (A・B)	G II	
	14	男	29	1月11日	1月16日	-	+	-	+	+	G II (C)	-	
3	15	男	30	1月11日	1月17日	-	-	-	-	-		-	
	16	女	31	1月11日	1月17日	-	+	+	-	+	G II (C)	G II	再検査
	17	女	26	1月11日	1月16日	-	-	-	-	+	G II (C)	G II	再検査

*印の検体は同一患者 - : 陰性 + : 陽性

NLVs 遺伝子検出結果とEIAキットによるNLVs 抗原検出結果を表2に示した。

従来プライマーでは、1ST PCRで用いた36/35'では1検体もNLVs 遺伝子を検出できなかったが、Nested PCRでは、NV82:SM82/NV81で1検体、Yuri22F/Yuri22Rで9検体のNLVs 遺伝子を検出した。

新プライマーでは、図5、図6に示す様にP1/P2で7検体、Y1/Y2で5検体のNLVs 遺伝子を検出した。

No10の検体は、P1/P2プライマーで目的の長さより短いDNAバンドを検出したが、再度アガロースを2.5%にしたゲルで電気泳動したところ図7に示す様にNLVs 遺伝子を検出した。

また、単独検出数(そのプライマーのみで検出された数)は、Yuri22F/Yuri22Rで3検体あった。

なお、EIA法では、4検体がG 陽性であった。

2. 下水処理場の未処理下水からのNLVs 遺伝子の検出
表3 (A処理場: 南部地区)、表4 (B処理場: 中部

地区西)、表5 (C処理場: 中部地区東)にそれぞれの下水処理場における各プライマーによるNLVs 遺伝子検出結果を示した。

3カ所の下水処理場から採取された未処理下水44検体は、すべていずれかのプライマーによりNLVs 遺伝子を検出された。3地区のNLVs 遺伝子検出率には地域差はないが、プライマー別による検出率には地域差があり、特にC処理場ではY1/Y2プライマーで1検体もNLVs 遺伝子を検出されなかった。

また、各プライマーによるNLVs 遺伝子検出率を図8に示した。1ST PCRで使用した従来のプライマー36/35'とYuri52F/Yuri52Rでは1検体もNLVs 遺伝子を検出できなかったが、新プライマーP1/P2で43%、Y1/Y2で32%の検出率であった。また、Nested PCRで使用したプライマーNV82:SM82/NV81で57%、Yuri22F/Yuri22Rでは86%でもっとも高い検出率であった。

単独検出数は、NV82:SM82/NV81で4検体、Yuri22F/Yuri22Rで5検体、Y1/Y2で1検体で合計10検体であった。

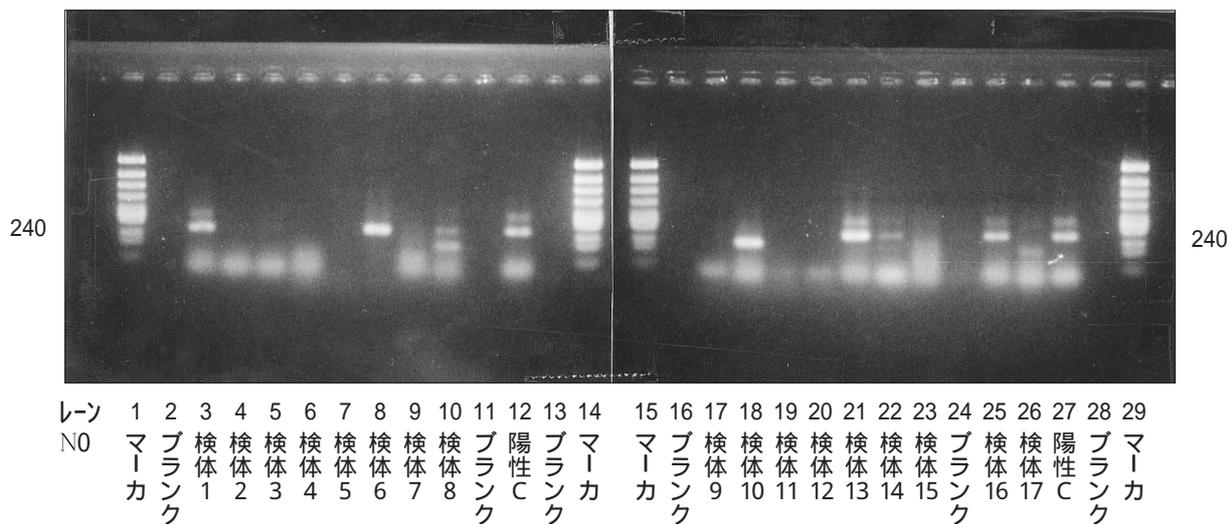


図5. P1/P2プライマーによるN L V s 遺伝子検出

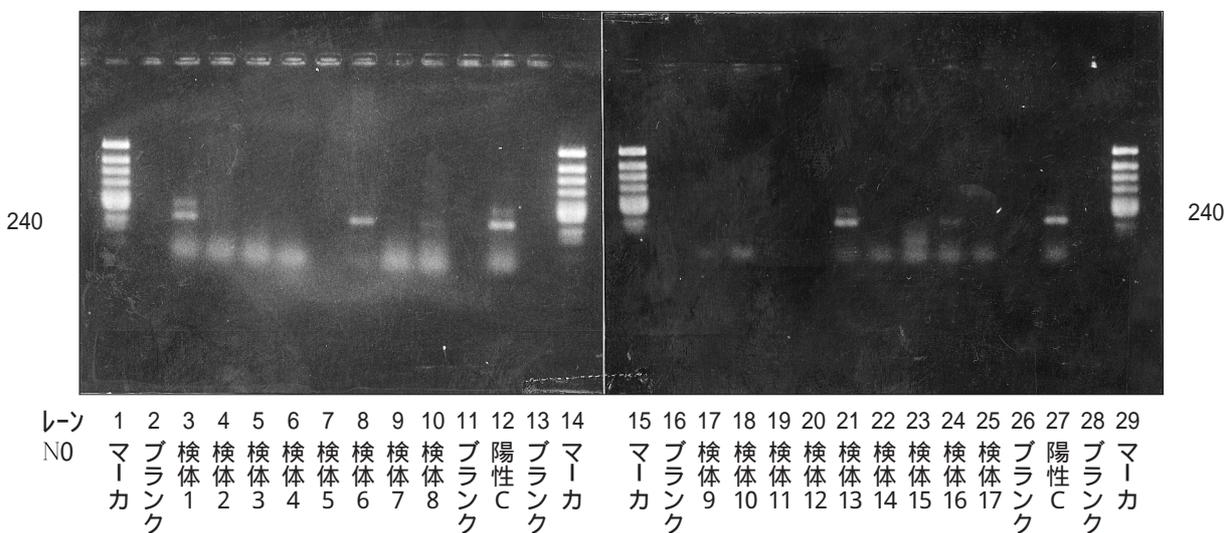


図6. Y1/Y2プライマーによるN L V s 遺伝子検出.

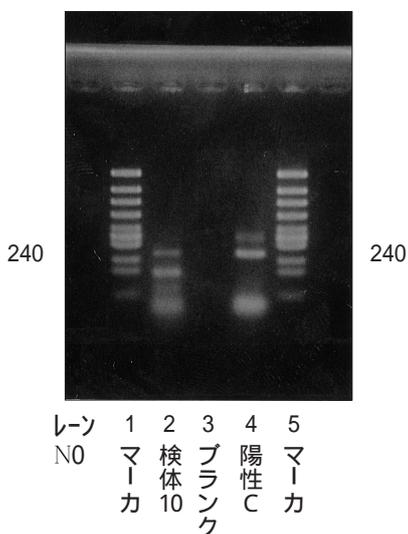


図7. 検体10の再電気泳動の結果.

IV 考察

我々は、1998年度の調査で本県内にもN L V sに汚染された食品が流通販売されていることを明らかにし、本県においてもN L V sにおける集団ウイルス性食中毒の発生の可能性が示唆されたことを報告した。

今回、非細菌性食中毒3事例の患者下痢便からウイルスの病原体検索を行ったところ、3事例18患者中9患者(50%)からN L V sが検出され、本県ではじめてN L V sによる食中毒事例を確認した。また、3事例中2事例は生カキを喫食していたが、他の1事例は生カキを喫食していなかった。しかし、その後の調査でこの飲食店においても生カキを調理しており、飲食店の厨房における汚染食品からの二次汚染による可能性が示唆された。

表3. A処理場(南部地区)のプライマー別NLVs遺伝子検出結果

検体採取 年月日	採取時間	1st PCR			Nested PCR		
		36/35'	Yuri52F/R	P1/P2	Y1/Y2	NV82:SM82/NV81	Yuri22F/R
1999/8/30	10:40	-	-	-	-	+	+
1999/9/9	10:30	-	-	-	-	+	+
1999/9/27	10:30	-	-	-	-	+	-
1999/10/14	10:15	-	-	-	-	+	+
1999/10/26	10:20	-	-	-	-	+	-
1999/11/11	10:15	-	-	-	+	-	+
1999/11/22	10:20	-	-	+	-	-	+
1999/12/6	10:20	-	-	-	-	-	+
1999/12/20	10:50	-	-	+	-	+	+
2000/1/6	10:30	-	-	+	+	-	+
2000/1/25	10:20	-	-	+	+	+	+
2000/2/3	10:15	-	-	+	-	-	+
2000/2/16	10:15	-	-	+	+	+	+
2000/3/9	10:40	-	-	-	+	-	+
合計(検出数)		0	0	6	5	8	12

表4. B処理場(中部地区西)のプライマー別NLVs遺伝子検出結果.

検体採取 年月日	採取時間	1st PCR			Nested PCR		
		36/35'	Yuri52F/R	P1/P2	Y1/Y2	NV82:SM82/NV81	Yuri22F/R
1999/7/30	9:30	-	-	-	-	+	+
1999/8/18	14:00	-	-	-	-	+	+
1999/8/30	10:40	-	-	-	-	+	+
1999/9/9	10:30	-	-	-	-	+	+
1999/9/27	10:30	-	-	-	-	+	-
1999/10/14	10:15	-	-	-	-	+	+
1999/10/26	10:20	-	-	-	-	+	+
1999/11/11	10:15	-	-	-	+	-	-
1999/11/22	10:20	-	-	+	+	-	+
1999/12/6	10:20	-	-	-	+	-	+
1999/12/20	10:50	-	-	+	+	-	+
2000/1/6	10:30	-	-	+	+	+	+
2000/1/25	10:20	-	-	+	+	-	+
2000/2/3	10:15	-	-	+	+	+	+
2000/2/16	10:15	-	-	+	+	+	+
2000/3/9	10:40	-	-	-	+	-	+
合計(検出数)		0	0	6	9	10	14

表5. C処理場(中部地区東)のプライマー別NLVs遺伝子検出結果

検体採取 年月日	採取時間	1st PCR			Nested PCR		
		36/35'	Yuri52F/R	P1/P2	Y1/Y2	NV82:SM82/NV81	Yuri22F/R
1999/8/30	10:40	-	-	-	-	+	+
1999/9/9	10:30	-	-	+	-	+	-
1999/9/27	10:30	-	-	-	-	+	-
1999/10/14	10:15	-	-	-	-	+	+
1999/10/26	10:20	-	-	-	-	-	+
1999/11/11	10:15	-	-	+	-	-	+
1999/11/22	10:20	-	-	+	-	-	+
1999/12/6	10:20	-	-	-	-	-	+
1999/12/20	10:50	-	-	-	-	-	+
2000/1/6	10:30	-	-	+	-	+	+
2000/1/25	10:20	-	-	+	-	+	+
2000/2/3	10:15	-	-	+	-	-	+
2000/2/16	10:15	-	-	-	-	+	+
2000/3/9	10:40	-	-	+	-	-	+
合計(検出数)		0	0	7	0	7	12

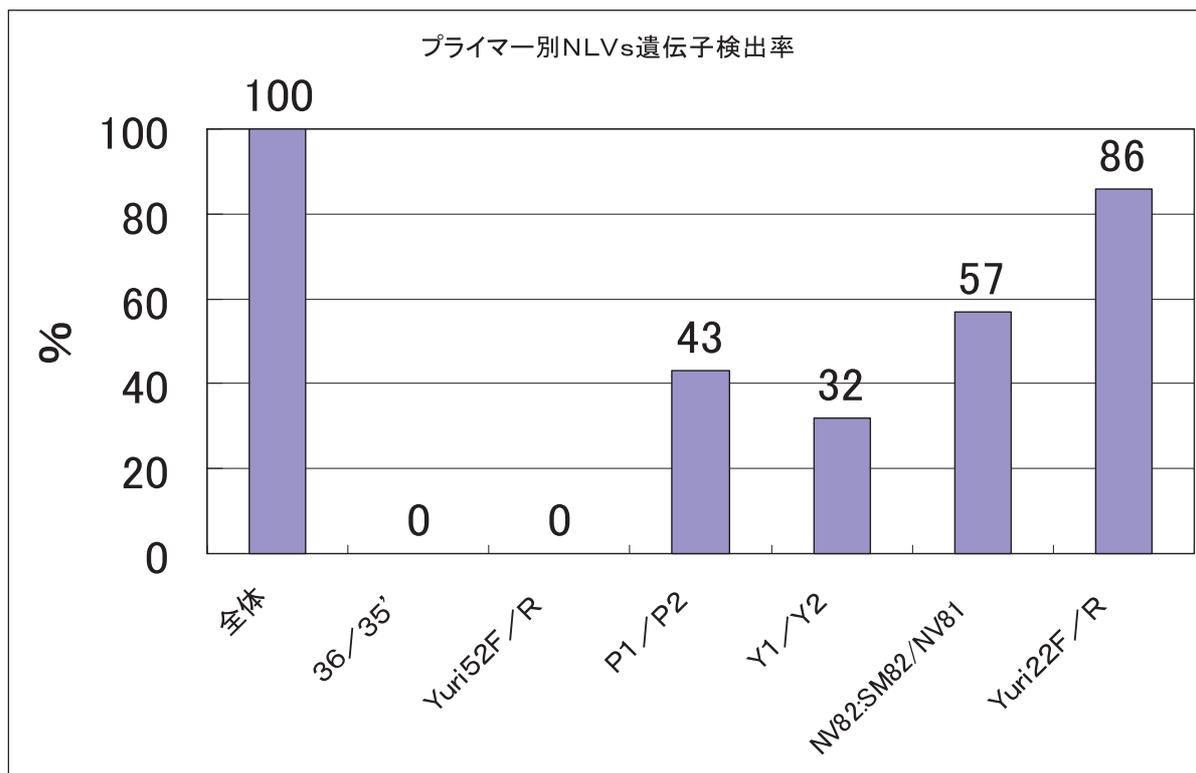


図8. 各プライマーによるNLVs遺伝子検出率.

食中毒事例の患者便からのNLVs遺伝子の検出感度は、Nested PCRで用いたYuri22F/Yuri22Rが最も高いが、Nested PCRを行う時間やコンタミ等を考慮すると、新プライマーによるOne TubeでのRT-PCR法が実用的であろうと思われた。

また、EIA法では4検体がG陽性であったが、感度的にRT-PCR法より劣り、糞便の非特異反応が高く判定に支障をきたす検体もあったので、今後さらに便の非特異反応を取り除く工夫が望まれる。

生活環境水におけるNLVsの実態を把握するため、本県の3カ所の下水処理場に流入する未処理下水44件を調査した結果、採取月日を問わずすべての未処理下水よりNLVs遺伝子が検出された。また、3カ所の下水処理場の流入水は、家庭排水や事業所排水のみの分流式(雨水は含まない)であり、検体採取時間帯の10時から11時頃は、下水処理場に入る到達時間を考慮に入れると人間の朝の活動時間に排出される家庭排水が主であると考えられた。このことから、検出されたNLVs遺伝子は家庭排水由来であろうと推測された。なお、採取月日に関係なくNLVs遺伝子が検出されたことは、たえずヒトからヒトへの感染サイクルが確立されているのではないかと推測された。また、プライマーによって地区別

にNLVs遺伝子検出数に大きな差があることは、NLVsの種類が多様であり、地区別で流行するNLVsの種類が違うことが示唆された。

新プライマーと従来プライマーの検出感度を比較すると1ST PCRで使用した従来プライマー36/35', Yuri52F/Yuri52Rでは、検出されないが新プライマーP1/P2, Y1/Y2で43, 32%の検出率があり、従来プライマーより感度は高かった。また、より感度をあげるNested PCRでは、従来プライマーNV82:SM82/NV81, Yuri22F/Yuri22Rで、57, 86%と新プライマーより高い検出率であった。また、未処理下水の各プライマーにおける単独検出数は、3種類のプライマーで10検体もあり、特に従来プライマーNV82:SM82/NV81, Yuri22F/Yuri22Rで9検体もあることから、未処理下水からNLVs遺伝子の検出は、今後もNested PCRや数種類のプライマーを組み合わせることで検出感度を高める必要性はあると思われた。

V まとめ

今回調査した非細菌性食中毒患者下痢便からのウイルスの病原体検索によって、本県ではじめてNLVsによる食中毒が確認された。これは、本県でも食品の流通機構によってNLVsに感染する環境は本土と変わらな

を示唆している。

また、採取された下水処理場に流入する未処理下水すべての検体から月日を問わずNLV s 遺伝子が検出されたことは、たえず下水に大量のNLV s が排出されていることを示唆し、ヒトからヒトへの感染サイクルが確立されていることが推測された。これは、ヒトからヒトへの感染や、ヒトの便により二次汚染された食品からの感染が推測され、カキの喫食や季節にかかわらずNLV s による食中毒発生の可能性が示唆された。昨今は、非カキ関連食中毒も多数報告されており^{6)~9)}、全国ウイルス性食中毒研究班によると、各都道府県でも本県同様に下水や河川から全ての季節でNLV s が検出されており、NLV s はすでにヒトからヒトへの水平伝播循環が確立され、日本全地域に浸淫定着していることが報告されている¹⁰⁾。

なお、今回、使用した研究班設計新プライマーは、従来プライマーより検出感度は優れていたが、NLV s の多種多様性から今後も数種類のプライマーを組み合わせることが必要である。また、下水等の環境水においては、検出感度を高めるためにNested PCRも必要であろうと思われた。

最後に、今回、下水処理場の未処理下水の検査は、RT-PCRでNLV s 遺伝子を検出したただけであり、今後さらにハイブリダイゼーション法や塩基配列決定解析法による型別や食中毒で検出されたNLV s と下水から検出されたNLV s の遺伝子解析を行ない、NLV s の多様性とその由来解析が課題として残される。

<謝辞>

稿を終えるにあたり、本研究にご協力いただきました浄化センターの職員各位並びに下水道維持管理事務所の職員及び水質管理課員各位に深謝いたします。

なお、本研究は平成11年度厚生科学特別研究事業全国ウイルス性食中毒研究班、研究課題：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、主任研究者(班長) 岐阜県生物産業技術研究所 川本尋義先生により行った。

VI 参考文献

- 1) 武田直和・名取克郎・宮村達男 (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(6) : 169-179
- 2) 厚生科学全国ウイルス性食中毒研究班 (1999). 厚生科学特別研究事業平成10年度研究報告書 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 : pp200
- 3) 糸数清正・大野惇・中村正治・久高潤・安里龍二・宇田川悦子 (1999). 沖縄県における食品媒介ウイルス性胃腸炎の実態調査 : 沖縄県衛生環境研究所報, 33 : 43-50
- 4) 大野惇・糸数清正・中村正治・久高潤・安里龍二・宇田川悦子・川本尋義 (2000). 沖縄県における食品媒介ウイルス性胃腸炎の実態調査 : 沖縄県獣医師会年報 (平成11年度), 23 : 37-41
- 5) 山崎謙治・大山徹・宇田川悦子・川本尋義 (2000). 1989~1998年に日本国内で検出されたNorwalk-like viruses (NLV s) の遺伝子的特徴および統一プライマーの検討. 感染症学雑誌, 74(5) : 470-475
- 6) 松田由美子・阿蘇品早苗・本田れい子・植野裕子・杉山征治 (1999). 仕出し弁当を原因食品とした小型球形ウイルスによる集団食中毒事例 - 熊本市. 病原微生物検出情報, 20(2) : 6-7
- 7) 吉澄志摩・玉手直人・沢田春美 (1999). 幼稚園でみられたSRSVによる胃腸炎の集団発生. 第73回日本感染症学会総会学術講演抄録 : pp
- 8) 中村信也・杉枝正明・宮卒秀樹 (1999). 静岡県におけるSRSV食中毒の大規模集団発生事例について. 感染症雑誌, 73(4) : 356-360
- 9) 原みゆき・古屋由美子・片山丘・渡辺寿美・斉藤隆行・今井光信 (2000). 小学校で発生した小型球形ウイルスによる嘔吐下痢症 - 神奈川県. 病原微生物情報, 21(2) : 6-7
- 10) 厚生科学全国ウイルス性食中毒研究班 (2000). 厚生科学特別研究事業平成11年度研究報告書 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 : pp132