

35. 水中ノロウイルスの検査法確立とそれを用いた河川水中のノロウイルス定量

○千葉翔子（奈良県保健研究センター）

【研究目的】

ノロウイルス(NV)は、ヒトの小腸粘膜でのみ増殖し、患者糞便中に多量に排出されている。浄化槽および下水処理場等を通じ、環境水中に一部放出された NV は、感染性を有したまま、河川を経て海洋まで達するとされる¹⁾。近海での二枚貝類の捕食活動で中腸線等に蓄積・濃縮され、これをヒトが生食あるいは加熱不十分な状態で喫食することにより、食中毒が引き起こされるという汚染サイクルはよく知られている。

本県では、極低濃度で存在すると考えられる環境水中からの NV 検出法について、確立できていない。しかし、近年では、NV に直接汚染された飲用水（井戸水）を原因とする食中毒も発生しており²⁾、原因究明のためには低濃度試料からの NV 検出が必須となりつつある。

環境水中等のウイルス検査法は、一部のポリオウイルスでは検査法が定められているが³⁾、ウイルス培養が不可能な NV については、定められた手法がないのが現状である。そこで、本研究では、本県における水中 NV の検査法を確立し、さらに設定した手法を用いて、極低濃度の NV が存在すると考えられる環境水(河川水)中の NV 調査を実施し、県内の地域的な流行状況の把握を目的とする。

【材料と方法】

1. 水中 NV の検査法

水中 NV は、ヒトの糞便検体と比較すると、ウイルス量が極めて少ないと考えられるため、NV 検出操作の前にウイルス濃縮操作が必要となる。そこで、ウイルス濃縮法を複数検討し、回収率から最も効率のよい濃縮法を決定することとした。回収率については、添加したウイルス原液の RNA コピー数を測定し、算出した。

(1) ウイルス試料水の作成

NV(GⅡ)が陽性であった糞便検体を用いて、10%糞便懸濁液を作成し、これに 1/5 量のクロロホルムを加えてボルテックス後、遠心(14000rpm, 10min, 4℃)した上清をウイルス原液とした。これを MilliQ 水に適宜添加し、十分に混合したものをウイルス試料水とした。

(2) ウイルス濃縮法

(1)で作成したウイルス試料水からのウイルスの濃縮方法について、下記の①～③の 3 法を検討した。

① 陰電荷膜吸着/誘出法(以下、陰電荷膜法)³⁾

ウイルス試料水 400mL に、2.5M 塩化マグネシウム 8mL(最終濃度 0.05M)を添加し、

0.5N 塩酸を用いて攪拌しながら pH3.5 に調整後、混合セルロールエステルタイプ陰電荷膜(HA 膜, Advantech : A045A047A) を用いて吸引ろ過し、HA 膜にウイルスを吸着させた。この HA 膜を遠心管に回収して滅菌したはさみで細断し、ここに 3% ビーフエキストラクト溶液 4mL 及び滅菌ガラスビーズ適量を加え、3 分間ボルテックスして誘出し、遠心(3000rpm, 15min, 4℃)した上清を 0.45µm シリンジフィルター(Merck Millipore : Millex-HV SLHV033RS)にてろ過し、濃縮産物を得た(100 倍濃縮)。

② 陽イオン吸着・酸洗浄・アルカリ誘出法(以下、Mg 法)⁴⁾

ウイルス試料水 250mL に 2.5M 塩化マグネシウム 5mL(最終濃度 0.05M)を添加し、十分に攪拌後、①と同様に HA 膜でろ過し、この HA 膜を 0.5mM 硫酸 200mL を用いて酸洗浄した後、1mM 水酸化ナトリウム 5mL による誘出を行った。膜を透過した誘出液は 100mM 硫酸 25µL と 100× TE バッファー 50µL を入れた遠心管で回収した。次に、2 次濃縮のため、遠心式フィルターユニット(Merck Millipore : Centriprep YM-50)を用いて限外ろ過を行った。遠心式フィルターユニットに濃縮液を全量入れ、遠心(2500rpm, 10min)して内液を捨て、再度遠心(2500rpm, 5min)し、限外ろ過膜を通過しなかった外液 約 500µL~700µL を回収し、濃縮産物を得た(350~500 倍濃縮)。

③ ポリエチレングリコール濃縮法(以下、PEG 法)⁵⁾

ウイルス試料水 400mL にポリエチレングリコール 6000 を 48g(最終濃度 12%)と塩化ナトリウム 23.4g(最終濃度 1M)を加え、4℃で一晩静置した。これを遠心(9000rpm, 20min, 4℃)後、上清を完全に取り除き、沈渣に PBS(-) 4mL を添加し再懸濁した後、超音波処理を加え十分に溶解させ、0.45µm シリンジフィルター(Merck Millipore : Millex-HV SLHV033RS)にてろ過し、濃縮産物を得た(100 倍濃縮)。

(3) ウイルス定量と回収率測定

ウイルス原液および各濃縮産物 140µL から QIAamp Viral RNA MiniKit (Qiagen) を用いて添付のプロトコールに従って RNA を抽出し、Super Script III RT (Invitrogen)を用いて逆転写反応を行った。その後、ABI 7500 Fast によりリアルタイム PCR⁶⁾を実施し、NV(GII)の RNA コピー数を測定した。添加したウイルス原液の RNA コピー数から回収率を算出し、比較検討した。

2. 河川水の調査

(1) 採水地点の選定と採水方法

採水地点については、県内の河川を 2 本選定し、各 1 地点の計 2 地点(A 地点、B 地点)とした。採水方法については、3 月~7 月までの 1 ヶ月に 1 回、午前 10 時~11 時の間に、河川の表層水を 2L 採水し、氷冷して搬入後、当日中に濃縮操作を実施した。なお、採水日は、採水日前において比較的晴天が続き水質が安定している日を選定した。

(2) 河川水のウイルス濃縮

3 法の中から、最も回収率が高かった濃縮法を採用し、河川水のウイルス濃縮を行った。

(3) ウイルス定量

濃縮産物 140μL から QIAamp Viral RNA MiniKit (Qiagen) を用いて添付のプロトコールに従って RNA を抽出し、Super Script III RT (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行った。その後、ABI 7500 Fast によりリアルタイム PCR[®]を実施し、NV(G I、G II)の RNA コピー数を測定した。

【結果】

1. 水中 NV の検査法

各濃縮法による NV 回収率について、表 1 に示した。3 法の中では、陰電荷膜法による濃縮法の回収率が $36.5 \pm 6.5\%$ と最も高かった。Mg 法では最も回収率が低く $4.3 \pm 0.4\%$ であり、PEG 法は $5.4 \pm 0.4\%$ であった。

これらの結果から、最も回収率が高かった陰電荷膜法をウイルス濃縮法として採用することとした。

表 1 各濃縮法によるノロウイルスの回収率

		添加量※ (コピー数)	回収量 (コピー数)	回収率(%)	
					mean±SD
陰電荷膜法	1回目	6367.9	2704.1	42.5	36.5 ± 6.5
	2回目	6934.0	1909.2	27.5	
	3回目	6071.4	2392.8	39.4	
Mg法	1回目	26532.9	1102.9	4.2	4.3 ± 0.5
	2回目	28891.8	1423.9	4.9	
	3回目	25297.5	939.2	3.7	
PEG法	1回目	6367.9	349.8	5.5	5.4 ± 0.4
	2回目	6934.0	404.2	5.8	
	3回目	6071.4	291.6	4.8	

※添加量(コピー数)は、ウイルス原液の実測値より、理論値を算出した値

2. 河川水の NV 定量について

3 月～7 月に 2 地点(A 地点、B 地点)で採水した表層水についてウイルス濃縮および定量を行った。各地点の試料水における NV(G I、G II)RNA コピー数の推移について図 1、図 2 に示した。A 地点では、5 ヶ月間 5 試料中、NVG I は 3 試料(3 月、4 月、7 月)、NVG II は 4 試料(3 月、4 月、6 月、7 月)検出した。NVG I の濃度が最も高かった月は 4 月で、 9.4×10^3 コピー/L であった。NVG II の濃度が最も高かった月は 3 月で、 8.6×10^3 コピー/L であった。B 地点では、5 ヶ月間 5 試料中、NVG I は 3 試料(3 月、4 月、5 月)、NVG II は 4 試料(3 月、4 月、6 月、7 月)検出した。NVG I の濃度が最も高かった月は 4 月で、 2.8×10^4 コピー/L であった。NVG II の濃度が最も高かった月は 3 月で、 9.6×10^3 コピー/L であった。

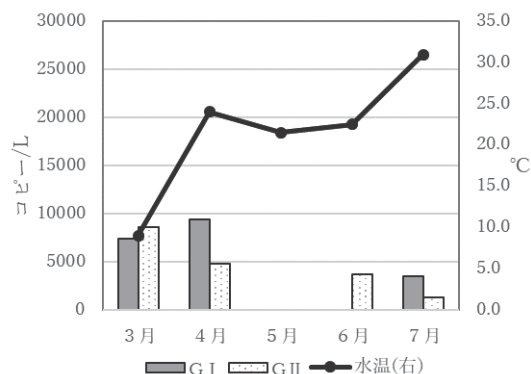


図1 A地点 河川水検出状況

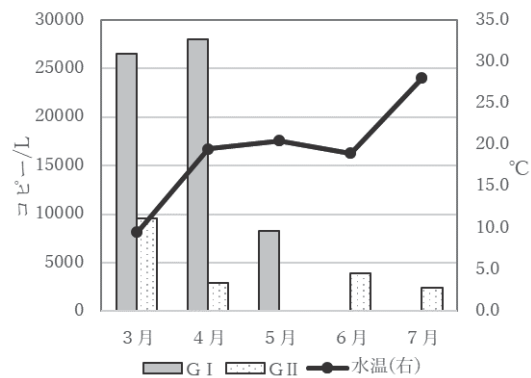


図2 B地点 河川水検出状況

【考察】

本県では、これまで環境水(流入下水)中のポリオウイルス調査を実施してきたが、細胞培養によるウイルス同定を前提としているため、培養のできないNVについては検査を実施できていなかった。また、流入下水の調査で実施している陰電荷膜法は、ビーフエキストラクト溶液を使用するため、PCRに対する阻害作用が見られるという報告があることから⁷⁾、当センターの保有機器状況等を勘案し、検査可能な手法としてMg法とPEG法を追加し、3法について回収率の比較検討を実施した。その結果、これまで実施してきた陰電荷膜法による濃縮法の回収率が最も高く、本県においては他の濃縮法より効率よく濃縮できることがわかった。

陰電荷膜法により河川水の調査を実施した結果、NVが極低濃度で存在すると考えられる河川水中からもNVを検出することができた。飲用水(井戸水)による食中毒事例では、原因水中のNVG Iが 1.1×10^3 コピー/100mLであったと報告されていることから²⁾、本県においても同様の事例が発生した場合、今回設定した検査法によりNVを検出できると考えている。

また、河川水には流域から排出されたNVが含まれているため、河川水の調査で得られた結果は、その流域のNV流行状況を反映していると考えられる。A地点では調査期間を通じてNVG IとNVG IIの検出状況は同程度であり、この河川流域では両遺伝子群とも流行していたと推察される。一方、B地点では3月と4月において、NVG IがNVG IIに比べ高濃度で検出された。NVが1ヶ月程度前から排出されるということを考慮すると、この流域では冬～初春にNVG Iが特に流行していたと推察される。

次に、河川水の調査結果と感染症発生動向調査で得られたNV検出状況について比較した。調査期間中、調査河川流域周辺の病原体定点医療機関から提出された便検体のうち、NVG Iの検出はわずか1検体であり、NVG IIの検出は13検体と多く、これは全国の検出状況と同様であったが、河川水の調査とは異なる結果であった。NV感染者は多くが無症状のままNVを排出し、その排出量は急性感染期の患者の排出量に匹敵すると言われており⁸⁾、河川水には、患者以外の不顕性感染者等から排出されたNVも多く含まれていると考えられる。

このことから、河川水の調査では、感染症発生動向調査で対象とはならない不顕性感染者の発生も把握できていると考えられるが、NVGⅠとNVGⅡに関して河川水等の環境水中での挙動の違いや、NVGⅠの回収率は検討できていないこともあり、河川水の調査結果と感染症発生動向調査における患者発生状況との関係性については見いだすことは出来なかった。

最後に、本研究では極低濃度で存在する環境水中からのNVの検査手法を確立することができた。しかし、濃縮法については、さらなる回収率の向上のため、手法の改善等の必要があると考えている。また今後は、食中毒発生等の際に、施設環境の拭き取り検体や飲料水等の希釈された検体の検査への対応についても検討していくことで、感染源や感染経路等を特定し、事件発生時の原因追及の一助になるよう努めたい。

【引用文献】

- 1) Lodder WJ, Vinje J, Van De Heide, *et al.*: Appl Environ Microbiol, 65, 5624-5627 (1999)
- 2) 吉富秀亮, 芦塚由紀, 中村麻子他: IASR, 37, 159-160 (2016)
- 3) 国立感染症研究所: ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル
- 4) Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S: Appl Environ Microbiol, 68, 1033-1039 (2002)
- 5) 金成篤子, 北川和寛, 千葉一樹他: 福島県衛生研究所年報, 32, 31-40 (2014)
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知「ノロウイルス検出法について」, 食安監発 0514004 号, (平成 15 年 11 月 5 日)
- 7) Schwab SK, De Leon R, Sobsey MD: Appl Environ Microbiol, 61, 531-537 (1995)
- 8) Ozawa K, Oka T, Takeda N, *et al.*: J Clin Microbiol, 45, 3996-4005 (2007)

【謝辞】

本研究を実施するにあたり、研究助成をいただきました公益財団法人大同生命厚生事業団に心から深謝いたします。

【経費使途明細】

使途	金額
リアルタイム PCR 試薬	204,055 円
濃縮操作関連試薬	6,026 円
濃縮および遺伝子検査器具(減圧ろ過用フィルターホルダー等)	34,495 円
濃縮および遺伝子検査消耗品(ピペットチップ、遠沈管等)	53,875 円
事務用品	1,549 円
合計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円