

宮城県内で検出されたサポウイルスの遺伝子型について

Genotype of sapovirus detected from patient with gastroenteritis and oyster in Miyagi prefecture.

庄司 美加*¹ 阿部 美和 植木 洋
佐藤 由紀 上村 弘*² 沖村 容子
御代田恭子

Mika SHOJI, Miwa ABE, Yo UEKI
Yuki SATO, Hiroshi UEMURA, Yoko OKIMURA
Yasuko MIYOTA

過去2シーズンに県内で発生した食中毒事例や感染性胃腸炎集団発生事例で患者便から検出されたサポウイルス(Sapovirus:以下SV)遺伝子と下水処理水受容河川に垂下したカキおよび市販生食用カキから検出されたSV遺伝子を対象に分子疫学的解析を行った。その結果、2007/08年シーズン(以下07/08年シーズン)は患者便、垂下カキおよび生食用カキから検出されたSV株は、すべてGIV/1近縁株であったのに対し、2008/09年(以下08/09年シーズン)シーズンは患者便と垂下カキから、GI/1とGI/3近縁株が検出された。さらに昨シーズンは生食用市販カキからもSV遺伝子のGIV/1近縁株が検出されており、ヒトから排泄されたウイルスが環境水を汚染していることが示唆された。

キーワード：サポウイルス；遺伝子型；胃腸炎患者；カキ

Key words : sapovirus ; genotype ; gastroenteritis ; oyster

1 はじめに

感染性胃腸炎の病原体の一つであるSVはノロウイルス(NoV)と同様に自然界での循環については不明な点が多い。SVによる環境水汚染の実態を明らかにするための一つの方法として、ろ過食性生物であるカキを下水処理水受容河川に垂下し、垂下したカキからRT-PCR法でSV遺伝子の検出を行った。併せて市販生食用カキについてもSV遺伝子の検索を行った。さらに、08/09年シーズンに県内で発生した食中毒・感染性胃腸炎集団発生事例で検出されたSVの遺伝子型を分子疫学的に解析し、07/08年シーズンに検出された株と比較検討した。

2 材料と方法

2.1 対象材料

カキは、下水処理水受容河川に感染性胃腸炎の流行期に約2ヶ月間垂下したものを垂下カキとした。なお、07/08年シーズンは2007年10月下旬、08/09年シーズンは2008年11月上旬に垂下した。検体は2シーズンともに12月に2回(上旬、下旬)、翌年1月に1回(上旬)採取した。07/08年シーズンは合計16個体、08/09年シーズンは合計67個体について検査を行った。

また、市販生食用カキは2007年と2008年の12月にそれぞれ県内で市販されていた16パック48個体(1パック3個体)を調査対象とした。

SVの遺伝子解析は、2007年4月から2009年3月までに県内で発生した胃腸炎事例で、SV遺伝子が検出された事例の内4事例14株を用いた。さらに、07/08年シーズンに垂下カキおよび生食用市販カキから検出された4株についても解析を行った。

2.2 カキからのSV遺伝子の抽出

垂下カキは採取後、1個体ずつ中腸腺を摘出し細胞破砕法¹⁾でウイルスを抽出した。市販生食用カキは1パックから3個体取り出しそれぞれ1個体ずつ中腸腺の摘出後、垂下カキと同じ方法でウイルス抽出を行った。ウイルスRNAの抽出はQIAmp viral RNA mini kitを用いて行った。

2.3 SV遺伝子の検出

ウイルスRNAはSV遺伝子のVP1領域の一部を増幅するプライマーを用いたOkadaらの方法でRT-PCRとnested-PCRを行った²⁾。

2.4 分子疫学的解析

電気泳動でSV遺伝子の増幅産物が確認された検体は、ABI310でダイレクトシーケンスを実施して塩基配列を決定した。その後、Clustal Xを用いてアライメントしNeighbor-joining Method(NJ法)で系統樹を作製した。

3 結果および考察

07/08年シーズンは垂下カキ3個体(検出率18.8%)同じく08/09年シーズンは2個体(3.0%)からSV遺伝子が検出された。一方市販生食用カキは、2007年は1個

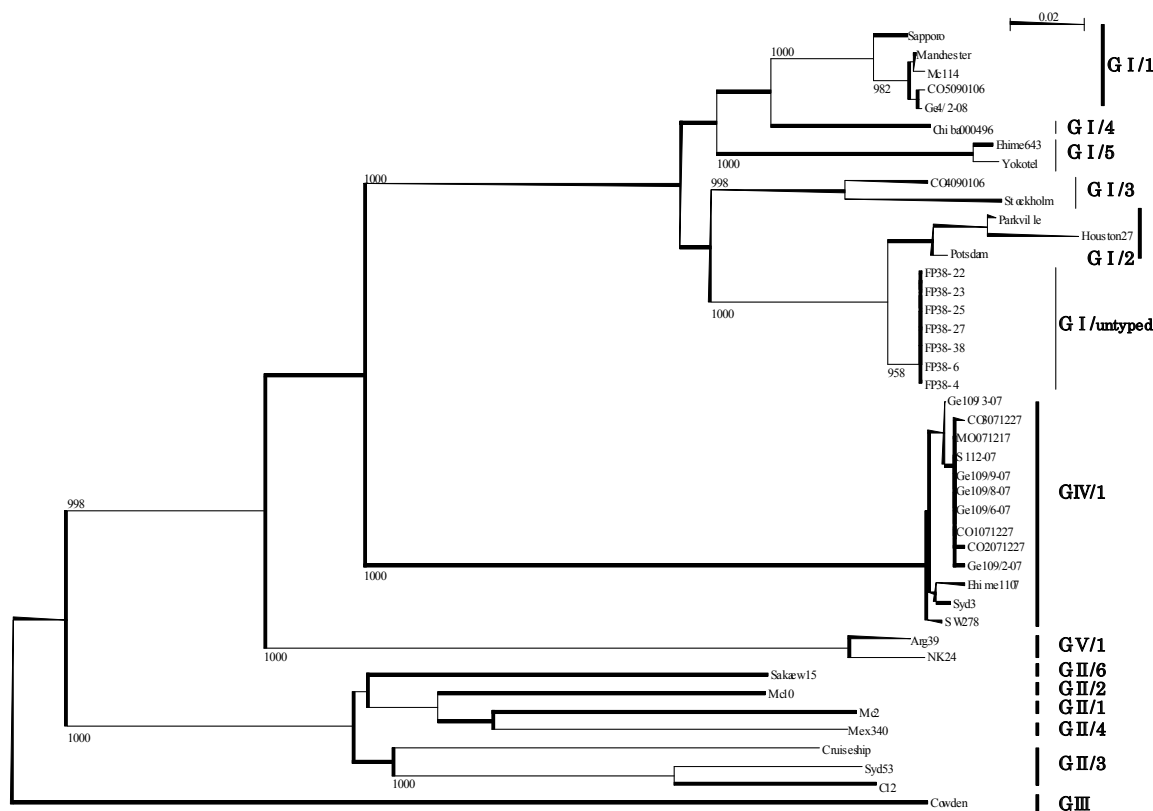
* 1 仙南保健福祉事務所

* 2 仙南・仙塩広域水道事務所

表 1 カキからの SV 遺伝子の検出結果

	2007/08年シーズン	2008/09年シーズン	合計
市販生食用カキ	1/14 (2.1%)	0/48 (0%)	1/69 (1.4%)
垂下カキ	3/16 (18.8%)	2/67 (3.0%)	5/83 (6.0%)

() 内は検出率



図中、FPは食中毒事例、Gelは胃腸炎集団事例、Sは散発事例、COは垂下カキ、MOは生食用市販カキから検出された株を示す。参照株のアクセッション番号は以下のとおり

Arg39, AY289803; Bristol, HCA249939; C12, AY603425; Chiba000496, AJ412800; Chiba010658, AJ606696; Cruise ship, AY289804; Dresden, AY694184; Ehime643, DQ366345; Ehime1107, DQ058829; Houston27, U95644; Manchester, X86560; Me2, AY237419; Me10, AY237420; Me114, AY237422; Mex340, AF435812; NK24, AY646856; Parkville, U73124; PEC, AF182760; Potsdam, AF294739; Sapporo, U65427; SK15, AY646855; StockholmF194182; SW278, DQ125333; SyB, DQ104357; Syd53, DQ104360; and Yokotel, AB253740

図 1 SV 遺伝子の VP1 の一部の塩基配列 (321nt) に基づく系統樹

体 (2.1%) から遺伝子が検出されたが、2008 年には SV 陽性検体は確認されなかった。

SV の VP1 をコードする遺伝子の一部の 321nt について塩基配列を決定しそのデータに基づき解析した系統樹を図 1 に示した。07/08 年シーズンに、感染性胃腸炎患者便、垂下カキおよび生食用カキから検出された SV の遺伝子型はすべて GIV/1 であった。特に、07/08 年のシーズンに SV による胃腸炎の集団事例、散発事例、市販生食用カキおよび垂下カキから検出された SV 株の塩基配列が 100% 一致する株が 6 株確認された。

一方、08/09 年シーズンに患者便と垂下カキから検出された SV 遺伝子は GI/1 と GI/3 の近縁株で、07/08 年シーズンに検出された遺伝子型とは異なっていた。

これまでに、カキが原因食品と推定される SV による食中毒事例の報告はあるが³⁾、カキから SV 遺伝子を検出した例はない。今回の結果は、カキが SV による食中毒の原因食品となり得る可能性を示唆するもので、喫緊に何らかの対策を講ずる必要がある。カキの SV 汚染についてはその原因は明らかではない。しかし、Haramoto らが下水処理施設を対象に行った SV の調査では、流入下水からは通年 SV 遺伝子が検出され、特に処理水からは夏季には検出されないが感染性胃腸炎の流行する冬季には検出頻度が高いことを報告しており⁴⁾、今回の調査で下水処理水の影響が大きいと考えられる垂下カキから SV 遺伝子が検出されたことと併せて考えると、処理水中に含まれる SV がカキの汚染源となってい

ることも示唆される。病原微生物による環境水の汚染防止の観点から処理場の果たしている役割は非常に大きい。処理水の再利用や、魚貝類を含めた生物に与える影響を十分に考慮した処理法の検討が望まれる。また、07/08年の調査においてSVを原因とした胃腸炎の患者便とカキから検出されたSV株の遺伝子型がGIV/1で、さらに塩基配列においても高い相同性が確認されたことにより、SVもNoVと同じようにヒトで流行した株が環境水を通じてろ過性生物にまで影響を及ぼしている可能性の高いことが推測された。このことは自然界におけるSVの循環メカニズムを解明する上で非常に大きい知見であると考えられる。

さらに、食中毒事例で検出されたSV株（図1中FP38）については、系統解析の結果GI群の新しいgenotypeになり得る可能性が推測された。この事例はカキの喫食が確認されてはいたが、原因推定食品は特定できなかった。また、同一人からGI群NoV遺伝子とSV遺伝子が同時に検出されていた例が6例あり、SVとNoVの混合感染が認められた。本事例で検出されたSV株については、遺伝子のVP1からVP2にかけての領域2.3kntについて塩基配列を決定し遺伝子型を検討する必要がある。

4 まとめ

胃腸炎患者便と処理水放流口付近に垂下したカキや市販食用カキからRT-PCR法でSV遺伝子を検出した。特に市販カキからの検出報告例はこれまでにない。さら

に、これらの検体から検出したSV株を分子疫学的に解析した結果、ウイルス遺伝子のVP1をコードしている一部の領域の塩基配列が100%一致している例が確認された。このことにより、SVによる胃腸炎患者の糞便中に排泄されたウイルスが環境水を通して養殖カキまで汚染している可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Ueki Y, Sano D, Watanabe T, Akiyama K, Omura T. Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. *Water Res.* 2005; **39**: 4271-80.
- 2) Okada M, Yamashita Y, Oseto M, Shinozaki K. The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers. *Arch Virol.* 2006; **151**: 2503-2509.
- 3) Nakagawa-Okamoto R, Arita-Nishida T, Toda S, Kato H, Iwata H, Akiyama M, Nishio O, Kimura H, Noda M, Takeda N, Oka T. Detection of multiple Sapovirus genotypes and genogroups in oyster-associated outbreaks. *Jpn J Infect Dis.* 2009; **62**: 63-66.
- 4) Haramoto E, Katayama H, C. Phanuwat, Ohgaki S. Quantitative detection of sapoviruses in wastewater and river water in Japan. *Lett Appl Microbiol.* 2008; **46**: 408-413.