

## 分子診断技術による貝および下水からの 下痢症ウイルスの検出の研究

Leera Kittigul<sup>1), 2)</sup>, 早川 智<sup>1)</sup>, 牛島廣治<sup>1)</sup>

### Detection of diarrheal viruses in shellfish and sewage samples by molecular diagnostic techniques

Leera KITTIGUL<sup>1), 2)</sup>, Satoshi HAYAKAWA<sup>1)</sup>, Hiroshi USHIJIMA<sup>1)</sup>

#### 要旨

2016年6月1日から7月1日まで日本大学医学部病態病理学系微生物学分野において、タイ国で採取された貝および下水から8つの下痢症ウイルスの検出を分子診断技法で行った。即ち26検体(7検体のリサイクル水[下水処理後の水], 9検体のリサイクル水後の残りの沈殿物, 10検体のカキ)に対してRT-PCRで下痢症ウイルスを調査した。全体でノロウイルスが65.4%, ポカウイルスが34.6%, アイチウイルスが11.5%, サボウイルスが7.7%, ロタウイルスが3.8%, エンテロウイルスが3.8%に認められた。ノロウイルス64.5%の中でGIとGIIがともに見出されたのは38.5%, GIIのみは23.1%, GIのみは3.8%であった。カキおよび下水中の下痢症ウイルスの存在から公衆衛生上の処理や監視の重要性が判明した。

#### 1. はじめに

地球の温暖化現象によって、東南アジアで見られる感染症が、わが国でも増加している。さらに世界規模で様々な感染症の新規発生や再流行も見られる。タイ国ではウイルス性胃腸炎が感染症の大きな部分を占めている。これまでタイ国の小児を中心としたウイルス性胃腸炎のウイルス学的診断や疫学が報告されているが<sup>1)</sup>、環境中のウイルスを検出しヒトの感染症と比較した研究は少ない。今回、日本大学医学部で研究の機会を得、タイ国での貝や下水中のウイルス検出を行う機会を得たので、研究結果を報告する。

#### 2. 対象と方法

タイ国バンコク近隣の1施設(公共の建物)のリサイクル水およびその水の下に残る沈殿物およびタイ国の南海岸で取れたカキを用いた。検体は定期的に採取した。リサイクル水はフィルター膜法、一方、10%に希釈した沈殿液の上清、カキの中腸線

のホモゲネートの10%希釈上清は吸着排出法で濃縮した<sup>2,3)</sup>。

キアゲンRNA抽出法によりウイルス遺伝子を得、その後逆転写酵素を用いウイルスcDNAを作った。尚この方法でDNAウイルスも同時に捕獲することが可能である。あらかじめマヒドン大学の倫理委員会とバイオセーフティー委員会の承認を得たうえで、抽出過程で感染力を喪失させたこれらのcDNAを研究材料として日本大学に輸送し研究を行った。A群ロタウイルス、アデノウイルス、ノロウイルスGI・GII, サボウイルス, エンテロウイルス, アイチウイルス, ヒトボカウイルス, サフォードウイルス遺伝子は我々が既に報告した方法によるRT-PCR法で増幅した。一部の陽性のウイルスはPCR産物を抽出しシーケンスの解析を行った。

#### 3. 結果

表1に示すように7検体のリサイクル水からノロウイルス(3検体)が認められた。また9検体の沈

1) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野

2) マヒドン大学公衆衛生学部微生物学教室

Leera Kittigul: leera.kit@mahidol.ac.th

表1 リサイクル水, その沈殿物, カキからの分子診断技法による下痢症ウイルスの検出

Type of Sample	Enteric viruses, No. / Total (%)							
	Boca virus	Noro virus	Aichi virus	Sapo virus	Rota virus	Entero virus	Saffold virus	Adeno virus
Recycle water	0	3/7 (42.9)	0	0	0	0	0	0
Sediment	9/9 (100)	9/9 (100)	3/9 (33.3)	2/9 (22.2)	0	0	0	0
Oysters	0	5/10 (50)	0	0	1/10 (10)	1/10 (10)	0	0
<b>Total</b>	<b>9/26 (34.6)</b>	<b>17/26 (65.4)</b>	<b>3/26 (11.5)</b>	<b>2/26 (7.7)</b>	<b>1/26 (3.8)</b>	<b>1/26 (3.8)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

殿物からはヒトボカウイルスとノロウイルスがすべての検体において、一部の検体では同時にアイチウイルス (3検体), サポウイルス (2検体) が見いだされた。しかしロタウイルス, エンテロウイルス, サフォードウイルス, アデノウイルスに由来するシークエンスは見いだせなかった。また10検体のカキからはノロウイルス (5検体), ロタウイルス (1検体) とエンテロウイルス (1検体) が検出された。全体をまとめるとノロウイルスが65.4%, ボカウイルスが34.6%, アイチウイルスが11.5%, サポウイルスが7.7%, ロタウイルスが3.8%, エンテロウイルスが3.8%に認められた。ノロウイルスの中でGIとGIIが見出されたのは38.5%, GIIのみは23.1%, GIのみは3.8%であった。

PCRによりウイルス種を同定した後, PCR産物の遺伝子解析を行った。その結果, 同一検体において複数のウイルスの遺伝子型が検出されることがあった。リサイクル水からはノロウイルスGII.3 (1検体) とGII.4 (1検体), GIで型不明 (2検体) がみられた。沈殿物からはノロウイルスGI.2 (2検体), GI.5 (2検体), GI.9 (2検体), GII.4 (1検体), GII.17 (8検体), サポウイルスGI.2 (2検体), ボカウイルス2A (5検体), 3 (4検体) が見いだされた。10検体のカキからはノロウイルスGI型不明 (1検体), GI.3 (1検体), GII.1 (1検体), GII.4 (1検体), GII.17 (2検体), A群ロタウイルスG2 (1検体), エンテロウイルスA2 (1検体) を検出できた。尚, GII.4はシドニー亜型であった。

#### 4. 考 察

タイ国では使用した生活水の浄化処理施設が十分に備わっておらず, 生活排水がそのまま河川に流れ込むことが多い。一方, 水道による供給やペットボトルで販売される飲料水は貴重なため, リサイクル水を飲用以外に用いることが一般的である。本研究ではリサイクル水およびその時に除かれる沈殿物並びに, プランクトンなどの餌と同時に河川から流入水を吸入するカキの消化管からウイルスが集積する中腸腺において下痢症ウイルスの有無を調べた。リサイクル水からはノロウイルス, 沈殿物からはノロウイルス以外にヒトボカウイルスやアイチウイルス, サポウイルスが高頻度に検出された。またカキからは, ノロウイルス, ロタウイルス, エンテロウイルスが見出された。ヒトボカウイルスはウイルス性下痢症とも関連するが健康人にも見られる。その役割は全く無害な不顕性感染症か, 逆に健康に積極的に役に立っているかは現時点では不明である。ノロウイルスは当時ヒトで流行しているGII.17やGII.4 (シドニー亜型) が見られた。今回の日本大学での研究は, 日本大学の開発した網羅的下痢症ウイルスの検出法<sup>4)</sup>を用いてタイ国での貝や環境物から下痢症ウイルスを検出することを目的とした。その結果, 従来の方法でも検出されたノロウイルス, ロタウイルス以外のウイルスも検出が可能であった。さらに, 帰国してからカキの検体数を増やしたところ日本滞在中に検出されなかった多様なウイルスも見いだされた。本研究の限界として小規模での研究であった点と, ウイルス量の定量がなされていない点がある。今後さらに地域を広げて, また時間経過を追って季節ごとの検体を数多く採取して研究を継続する予定である。本研究はあくまで遺伝子診断で

あり、ウイルスが生きていて宿主で増殖、さらに下痢症を発症可能かどうかは不明である。しかしながら、汚水混入水の飲用やカキの生食でしばしば下痢症を発症することから、これらの環境には発症可能な病原ウイルスが生存している可能性が高い。飲料水の消毒や海産物の加熱の必要性の警鐘を鳴らすという社会的意義のある研究成果と考えている。

## 5. 結語

タイ国での貝、環境物の下痢症ウイルスについて分子診断技法による検出を行った。ノロウイルスが多く認められたが、その他のウイルスも見いだされた。食環境の改善には食物、環境物中の人に経口感染可能なウイルス検査の必要性がある。

## 文献

- 1) Kittigul L, Ushijima H et al. Molecular characterization of rotaviruses, noroviruses, sapovirus, and adenoviruses in patients with acute gastroenteritis in Thailand. *J Med Virol* 2009; 81 (2) : 345-353.
- 2) Kittigul L, Ushijima H et al. Development of a method for concentrating and detecting rotavirus in oysters. *Int J Food Microbiol* 2008; 122 (1-2) : 204-210.
- 3) Kittigul L, et al. Detection and genetic characterization of norovirus in environmental water samples in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2012; 43 (2) : 323-332.
- 4) Thongprachum A, Hayakawa S, Ushijima H et al. Four-year study of viruses that cause diarrhea in Japanese pediatric outpatients. *J Med Virol*. 2015; 87 (7) :1141-1148.



写真1 Leera KITTIGUL (左前)

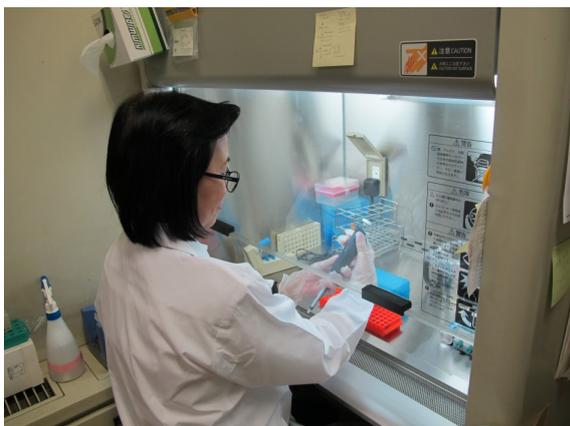


写真2 実験中の Leera KITTIGUL