

環境水のウイルス汚染実態調査について

宮代 守¹・和佐野 ちなみ²・樋脇 弘¹・馬場 純一³

Studies of Viral Contamination in Environmental Water

Mamoru MIYASHIRO, Chinami WASANO

Hiroshi HIWAKI and Junichi BABA

要 旨

2001年7月から2002年3月にかけて毎月1回、福岡市内の5ポイントから環境水を採取し、ノーウォーク様ウイルス、A型肝炎ウイルス、アストロウイルスの汚染状況を調査した。これらのウイルス検出はreverse transcription-polymerase chain reactionで行った。リアルタイムPCRによる添加回収試験では約8割のウイルスが捕捉されたが、採取した45検体からウイルスは検出されなかった。

Key Words：ノーウォーク様ウイルス Norwalk-like viruses, A型肝炎ウイルス Hepatitis A virus, アストロウイルス Astrovirus, 福岡市 Fukuoka City

は じ め に

腸管系ウイルスの環境汚染経路としては、ヒトに感染したウイルスの一部はふん便中に排泄され、下水処理後も残存して河川へ放流された結果、海が汚染され、最終的には生息するカキ等の二枚貝へ取り込まれると言われている¹⁾。

今回、ウイルス性食中毒の大半を占め、冬期に多数の健康被害をもたらすノーウォーク様ウイルス (NLVs), まれに二枚貝などから感染し一過性の肝炎を引き起こすA型肝炎ウイルス (HAV), 乳児下痢症の原因の一つであるアストロウイルス (AstV) について環境水中の汚染状況を調査したので報告する。

材料および方法

調査は図1のとおり名島、室見1、室見2、今津1、今津2の5ポイントについて2001年7月から2002年3月にかけて毎月1回実施した。

採水は各ポイント20Lとした。必要に応じ粗ろ過を実施し、pH5～6に調整した後、ゼータプラスフィルター (Cuno社6485-03-IMDS)で限外ろ過を行った。取り出したフィルターは溶出液 (3%Beef extract, 1%NaCl, 15%NaNO₃, pH9.0)20mlに浸し4 1時間静置後、表面をCell Scraperで掻き取り遠沈管に集めた。これに等量のクロロホルムを加え攪拌後、2500rpm30分遠心し上清を採取した。さらに等量のポリエチレングリコール(PEG)溶液 (1%PEG6000, 0.8MNaCl)を加え4 1晩静置後、3500rpm30分遠心し上清を除き、沈査を500μlの蒸留水で浮遊させたものをRNA抽出に用いた²⁾。

また、添加回収試験としてポリオウイルス2型を20Lの水に希釈し同様に濃縮した。



図1 調査地点

1. 福岡市保健環境研究所 微生物部門

2. 福岡市保健環境研究所 微生物部門

(現所属:食肉衛生検査所)

3. 福岡市保健環境研究所 微生物部門

(現所属:福岡市保健環境研究所 衛生化学部門)

RNA抽出はQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用い、添付の吸引プロトコールに従って実施した。抽出したRNAは、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) に続きnested PCRを行い3%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色を行い目的とするバンドの存在を確認した。

また、ポリオウイルスはウイルス原液・希釈後・濃縮後のサンプルについてそれぞれRNA抽出、逆転写反応後、QuantiTect SYBR Green PCR Kit(QIAGEN)を用いたリアルタイムPCR(iCycler: BIORAD)によりDNAの定量を行った。

(1)NLVs用プライマー

2系統で実施した³⁾。 RT-1stPCR:35/36, nestedPCR: NV81およびSM81/SM82 RT-1stPCR:MR3/4およびYuri52F/R, nestedPCR:Yuri22F/R。

(2)HAV用プライマー

RT反応にP2, 1stPCRにP1, nestedPCRにP3/P4を用いた⁴⁾。

(3)AstV用プライマー

RT-1stPCRにPreCAP1/12Gr, nestedPCRにMon244/82bを用いた⁵⁾。

(4)ポリオウイルス用プライマー

SB2-R1, SB2-F1を用いた⁵⁾。

結果および考察

7月から3月までに45検体の採水を実施したが、いずれの検体からもNLVs, HAV, AstVは検出されなかった。

環境水からのウイルス検出報告はいくつかあり、その方法も様々でメンブレンフィルター法⁶⁾、DEAEセルロース法、PEG法などがある^{7,8)}。DEAEセルロース法は塩濃度の高い海水等においては不適当とされているため⁹⁾、今回はゼータプラスフィルターによる限外ろ過でウイルスを捕捉した後、PEGにより吸着、遠心する方法を用いた²⁾。しかし、セルロース法で海水から検出した⁹⁾、フィルターを使わずPEG法と超遠心法を組み合わせた方が高率に検出できたという報告もあり⁷⁾、効果的な濃縮法の確立が必要と思われた。

今回行ったリアルタイムPCRを用いたポリオウイルスの添加回収試験では、ウイルス原液と濃縮後のサンプルからポリオウイルスが検出され、希釈後のサンプルからは検出されなかった。また、濃縮後は原液に対し約82%の遺伝子量であり、検水20L中のウイルスの約8割を捕捉できる良好な濃縮法であると考えられた。

平成13年12月には、輸入「大アサリ」の喫食によるNLVsとHAVの同時感染事例も報告されており¹⁰⁾、二枚貝の不

適切な取り扱いには多くの健康被害をもたらす可能性が高い。その予防には食品の取り扱いに注意するのみならず、それが生産される環境を監視することも重要である。厚生省通知では生食用かきの生産海域の海水が規格基準(海水100ml当たり大腸菌最確数が70以下)に適合していることを定期的に確認することと定められているが、実際流通している生食用カキからはNLVsが毎年検出されている¹¹⁾。

このため、ウイルスの生活環をどこかで絶たなければならず、環境水の汚染や浄化の確認には大腸菌以外(何らかのウイルス)による代替指標を選定し、リアルタイムPCR等による定量的手法で評価することが必要になってくるものと思われる。

文 献

- 1) 中田修二：ノーウォークウイルス(小型球形ウイルス)、臨床と微生物、27, 553～557, 2000
- 2) 田中真弓他：都市河川からのウイルス分離について、鳥取県衛生研究所、32, 49～51, 1992
- 3) Hiroyuki Saito et al: Application of RT-PCR Designed from the Sequence of the Local SRSV Strain to the Screening in Viral Gastroenteritis Outbreaks, Microbiol.Immunol, 42, 439～446, 1998
- 4) 北橋智子他：千葉市内の福祉更正施設で発生したA型肝炎の集団発生 - CTAB法を用いたHAV遺伝子検出 -, 感染症学雑誌, 72, 794～800, 1998
- 5) 国立感染症研究所ウイルス第二部衛生微生物協議会レファレンス委員会：ウイルス性下痢症診断マニュアル(第2版)
- 6) 黒田孝一他：河川水中ウイルスの検索, 日本公衆衛生学雑誌, 26, 17～23, 1979
- 7) 秋山和夫他：過去4年間に於けるかき及び環境水中のSRSV検出状況, 宮城県保健環境センター年報, 18, 49～55, 2000
- 8) 全国ウイルス性食中毒研究班：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, 厚生科学特別研究事業平成11年度研究報告書
- 9) 横井一他：千葉市における下水処理施設, 海水, カキからのアストロウイルス遺伝子の検出, 感染症学雑誌, 75, 263～269, 2001
- 10) 国立感染症研究所・厚生労働省健康局結核感染症課：病原微生物検出情報月報, 23, 5, 2002
- 11) 和佐野ちなみ他：RT-PCR法による二枚貝からのノーウォーク様ウイルスの検出, 福岡市保健環境研究所報, 27, 2002(本誌投稿予定)