

長野県内の下水処理施設の下水流入水における 下痢症ウイルス遺伝子の検出と年変化

塚田竜介^{1,2}・水澤哲也²・西澤佳奈子¹・加茂奈緒子¹・藤井ますみ³・
竹内道子¹・中沢春幸^{1,4}・小野諭子¹・和田純子^{1,5}

下痢症ウイルスの1つであるノロウイルス(以下, NoV)の流行実態を正確に把握し, 下痢症ウイルスの感染予防対策の一助とすることを目的に, 2014年12月から2019年3月まで長野市内A下水終末処理場に流入した下水流入水(以下, 下水)中の下痢症ウイルスのコピー数を月1回モニタリングし, その結果を集計, 解析した。

52検体中NoV GI(以下, GI)またはNoV GII(以下, GII)遺伝子が検出されたのは46検体(88.5%)で, GIおよびGIIともに定量下限値未満だったのは2016年8月~10月, 2017年6月, 8月, 9月の6検体であった。遺伝子群別では, GIは52検体中33検体(63.5%)から検出された。GIコピー数は平均 1.65×10^2 コピー/mLであった。GIIは52検体中45検体(86.5%)から検出され, GIIコピー数は平均 1.34×10^3 コピー/mLであった。

サポウイルスは, 定量下限値未満であった2016年10月を除くすべての月で検出され, 陽性率は98.1%(52検体中51検体)であった。

アストロウイルスは, 定量下限値未満であった2015年3月, 2016年10月, 11月を除くすべての月で検出され, 陽性率は94.2%(52検体中49検体)であった。

A群ロタウイルス(以下, RoV)は52検体中28検体から検出され, 陽性率は53.8%であった。患者届出数の毎年6月頃の小ピークはRoVによる患者の増加に起因しているものと考えられた。

キーワード: ノロウイルス, サポウイルス, ロタウイルス, アストロウイルス, 下水流入水

1 はじめに

下痢症ウイルスの1つであるノロウイルス(以下, NoV)は, 例年冬期を中心に流行し, 下痢, 嘔吐を主徴とする急性胃腸炎を引き起こす^{1),2)}。感染事例としては汚染されたカキをはじめとする二枚貝を原因食品とする食中毒として知られていた³⁾が, 近年, 感染した食品製造者・調理従事者を介して食品がウイルスに汚染されたことで発生する食中毒事例が多発している^{1),2),4)}。また食中毒以外にも, 当該ウイルスの強い感染力からヒト-ヒト感染を起こし集団感染となる事例も認められる^{1),2)}など, 公衆衛生上重大な問題となっている。

ウイルスを原因とする下痢症は, 感染症発生動向調査事業⁵⁾において小児科定点医療機関から届出されている。NoV感染症には不顕性感染も多く存在し¹⁾, その流行実態を把握することは難しい。さらに, 成人での流行実態は把握されていない。

NoVなどの下痢症ウイルスは, 感染すると発症の有無にかかわらず感染者の腸管内で増殖し長期間にわたって糞便中に排出されることが知られている^{1),2)}。「環境水サーベイランス」は, 糞便中に排出されたウイルスが下水道を介し処理場に集積することを利用して, 集積した環境水から種々のウイルスを継続的にモニタリングする手法であるため, 処理場の流域内において症状の有無に関わらず感染者の存在を把握できる。そのため, 下水流入水(以下, 下水)中のウイルスは市中での流行ウイルスの把握や対策に有用な知見となる⁶⁾と考えられている。

実際, 地域におけるポリオウイルスによる潜在的流行の監視やエンテロウイルスの探索に環境水サーベイランスが実施されている^{7),8)}。NoVについても, 環境水サーベイランスによる流行実態の解明などが行われており, 一定の成果が報告されている^{9),10),11)}。これまで本県においてその実態を調査した報告はなく, またNoVと同様に感染性胃腸炎の原因ウイルス

1 長野県環境保全研究所 感染症部 〒380-0944 長野市安茂里米村 1978

2 現:長野県健康福祉部 食品・生活衛生課 〒380-8570 長野市南長野幅下 692-2

3 現:長野県長野保健福祉事務所 検査課 〒380-0936 長野市中御所岡田 98-1

4 現:退職

5 現:長野県大町保健福祉事務所 食品・生活衛生課 〒398-8602 大町市大町 1058-2

スであるサポウイルス(以下, SaV)やアストロウイルス(以下, AsV), RoV を対象とした報告^{12),13)}もない。

そこで, NoV の流行実態を把握し, 下痢症ウイルスの感染予防対策の一助とすることを目的に, 2014年12月から2019年3月まで長野市内A下水終末処理場(以下, A 処理場)に流入した下水中の下痢症ウイルスのコピー数を月1回モニタリングし, その結果を集計, 解析したので報告する。

2 材料および方法

2.1 検査材料

2014年12月から2019年3月まで, 長野市内A処理場に流入した処理前の下水500mLを, 月1回定期的(原則, 毎月第1火曜日)に採水し, 調査対象とした。

2.2 ウイルスの濃縮方法

下水中のウイルスの濃縮は国立感染症研究所が示す「ポリオウイルス実験室診断マニュアル」¹⁴⁾に準拠した。すなわち, 下水500mLを粗遠心後(3,000rpm, 30min), 得られた上清を $\Phi 1\mu\text{m}$ のガラスファイバーフィルターでろ過することにより濁質を除去した。次に MgCl_2 を最終濃度0.05Mとなるよう添加した後, HClによりpH3.5に調整し, 陰電荷膜を用いてウイルスの捕集を行った。陰電荷膜に吸着したウイルスの誘出は3%ビーフェキストラクト溶液を用いて行った。誘出液1mLを30%ショ糖液に重層後超遠心処理(40,000rpm, 2h, 4°C)し, 沈渣をPBS(-)で溶解し濃縮検査試料とした。

2.3 リアルタイムPCR法

濃縮した検査試料からQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いてRNAを抽出後, DNase処理を行い, randomプライマーを用いたRT反応によりcDNAを合成した。NoV遺伝子の定量は, 通知法¹⁵⁾に準じて, SaV, RoV, AsV遺伝子の定量は小和田らの方法に準じて¹⁶⁾リアルタイムPCR法により行った。1系統につき検体2ウェルで測定し, その平均で下水1mLあたりのコピー数を求めた。なお, <10コピー/mLを定量下限値未満とした。

2.4 感染性胃腸炎の患者届出数

長野県感染症情報センターから毎週報告されて

いる感染症情報(週報)¹⁷⁾の, A処理場が管轄する流域の保健所管内定点医療機関(14医療機関)における感染性胃腸炎の患者届出数(以下, 患者届出数)とした。NoV等は感染後数週から1か月程度便中にウイルスの排出が続くため²⁾, 下水中のNoVは採水した週に発生した患者だけでなく, 1か月前の患者の影響も受けていると考えられる¹⁸⁾。このことから採水週と前3週の定点あたりの患者届出数を平均して定点あたりの月平均患者届出数とした。また, RoVは, RoVワクチンの接種開始に伴い, 感染性胃腸炎(病原体がRoVであるものに限る)の中でも特に重症が疑われる症例の報告数を検討するため, 基幹定点医療機関から単独で届出がなされている¹⁹⁾。このため, 基幹定点医療機関(2医療機関)における感染性胃腸炎(病原体がRoVであるものに限る)患者届出数(以下, RoV患者届出数)とも比較した。

患者届出数と下水中の下痢症ウイルス遺伝子検出状況との相関関係は, Kishidaらの報告²⁰⁾を参考にスピアマンの順位相関係数を用いた。また, 解析の有意水準は5%とし, 解析ソフトはエクセル統計Statcel3²¹⁾を使用した。

3 結果

3.1 下水中のウイルスコピー数の推移

2014年12月から2019年3月の間に採取した下水52検体についてリアルタイムPCR法によるNoVコピー数と月平均患者届出数の推移を表1および図1に, SaV, AsVおよびRoVのコピー数と月平均患者届出数の推移を図2, 図3および図4に示す。また, RoVコピー数とRoV月平均患者届出数の推移を図5に示す。

52検体中GIまたはGII遺伝子が検出されたのは46検体(88.5%)でGIおよびGIIともに定量下限値未満だったのは2016年8月, 9月, 10月, 2017年6月, 8月, 9月の6検体であった。

遺伝子群別では, GIは52検体中33検体(63.5%)から検出された。GIコピー数は平均 1.65×10^2 コピー/mLで, 2015年12月, 2016年7月~12月, 2017年3月~9月, 11月, 12月, 2018年7月, 9月, 11月は, すべて定量下限値未満であった。

GIIは52検体中45検体(86.5%)から検出され, GIIコピー数は平均 1.34×10^3 コピー/mLで, 定量下限値未満であった月は, 2015年9月, 2016年8

表1 下水中のノロウイルス遺伝子コピー数

採水年月		ノロウイルス遺伝子コピー数/mL		採水年月		ノロウイルス遺伝子コピー数/mL	
		ノロウイルスGI	ノロウイルスGII			ノロウイルスGI	ノロウイルスGII
2014年	12月	2.18×10^2	1.77×10^2	1月	2.14×10^2	1.00×10^4	
	1月	1.50×10^2	5.27×10^3	2月	5.10×10	8.69×10^3	
	2月	2.55×10^2	4.93×10^3	3月	<10	4.57×10^3	
	3月	3.23×10	2.38×10^2	4月	<10	3.74×10	
	4月	2.72×10	2.84×10^2	5月	<10	1.11×10^2	
	5月	1.10×10^3	8.01×10^2	6月	<10	<10	
2015年	6月	2.87×10^2	1.12×10^2	7月	<10	2.21×10	
	7月	5.78×10	2.55×10	8月	<10	<10	
	8月	2.38×10	1.41×10^2	9月	<10	<10	
	9月	7.48×10	<10	10月	3.33×10	1.30×10^3	
	10月	8.67×10	6.12×10	11月	<10	2.74×10^2	
	11月	3.91×10	6.94×10^2	12月	<10	1.53×10^3	
	12月	<10	1.01×10^3	2017年	1月	5.08×10^2	4.96×10^3
	1月	3.74×10	2.98×10^2	2月	4.45×10^2	4.25×10^3	
	2月	2.21×10	3.38×10^2	3月	3.74×10	4.88×10^2	
	3月	2.38×10	2.11×10^3	4月	2.96×10^2	2.70×10^2	
	4月	4.76×10	3.25×10^3	5月	1.34×10^2	1.73×10^2	
	5月	9.21×10^2	5.59×10^2	6月	1.87×10	1.84×10^2	
2016年	6月	8.33×10	3.57×10^2	7月	<10	8.65×10^2	
	7月	<10	6.29×10	8月	4.91×10^2	7.40×10^2	
	8月	<10	<10	9月	<10	3.74×10	
	9月	<10	<10	10月	1.36×10^2	4.90×10^2	
	10月	<10	<10	11月	<10	1.05×10^3	
	11月	<10	1.65×10^2	12月	2.53×10^2	1.46×10^3	
	12月	<10	1.22×10^3	2018年	1月	1.19×10^3	4.15×10^3
				2月	3.88×10^2	7.60×10^2	
				3月	9.15×10^2	1.08×10^3	
				平均	1.65×10^2	1.34×10^3	

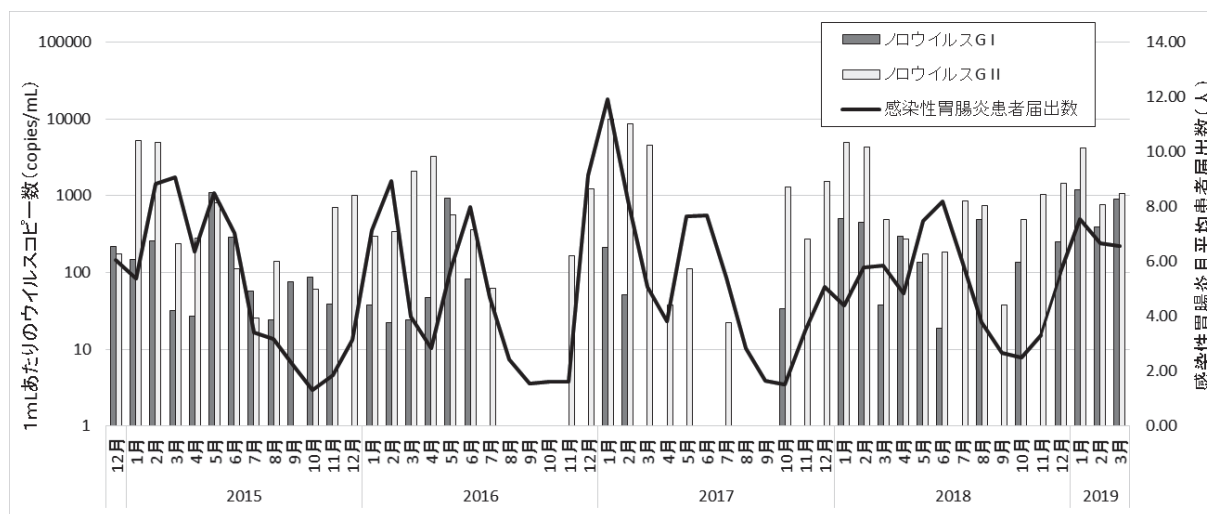


図1 下水中のノロウイルス遺伝子コピー数と感染性胃腸炎月平均患者届出数

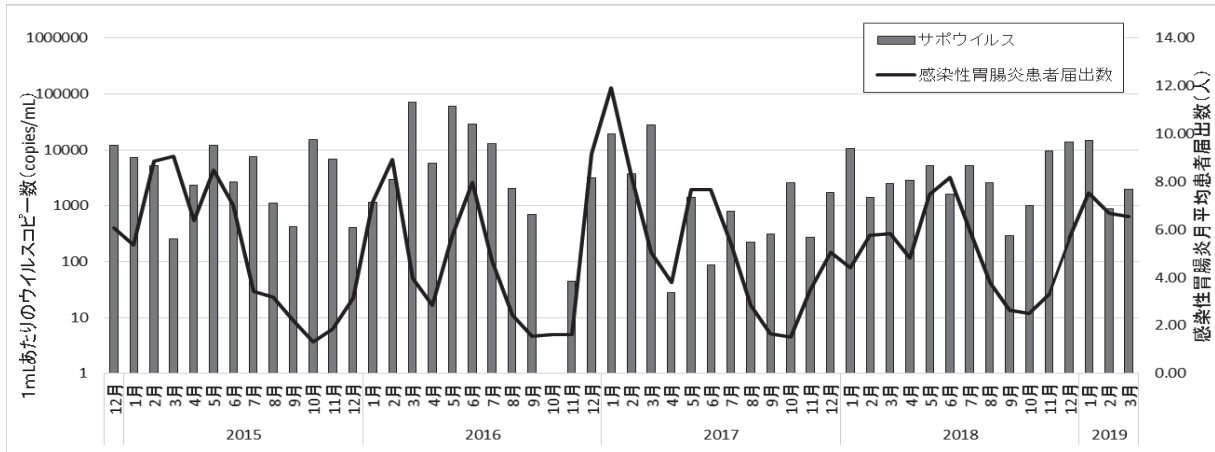


図2 下水中のサポウイルス遺伝子コピー数と感染性胃腸炎月平均患者届出数

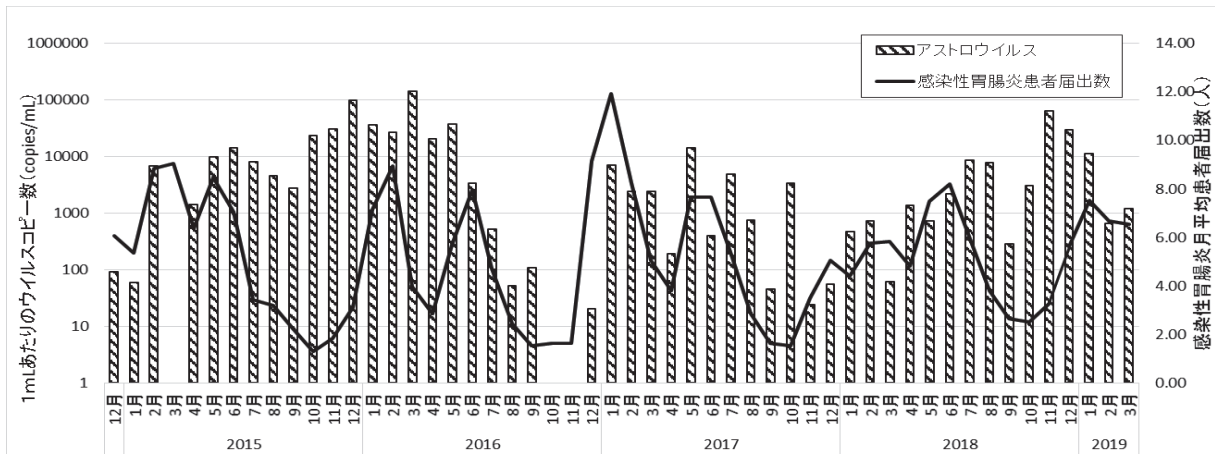


図3 下水中のアストロウイルスコピー数と感染性胃腸炎月平均患者届出数

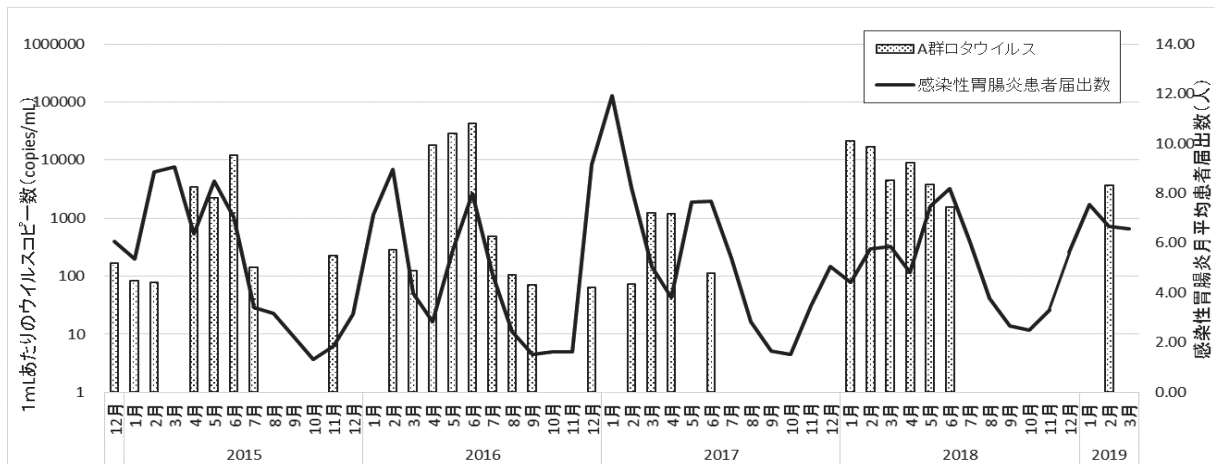


図4 下水中のA群ロタウイルスコピー数と感染性胃腸炎月平均患者届出数

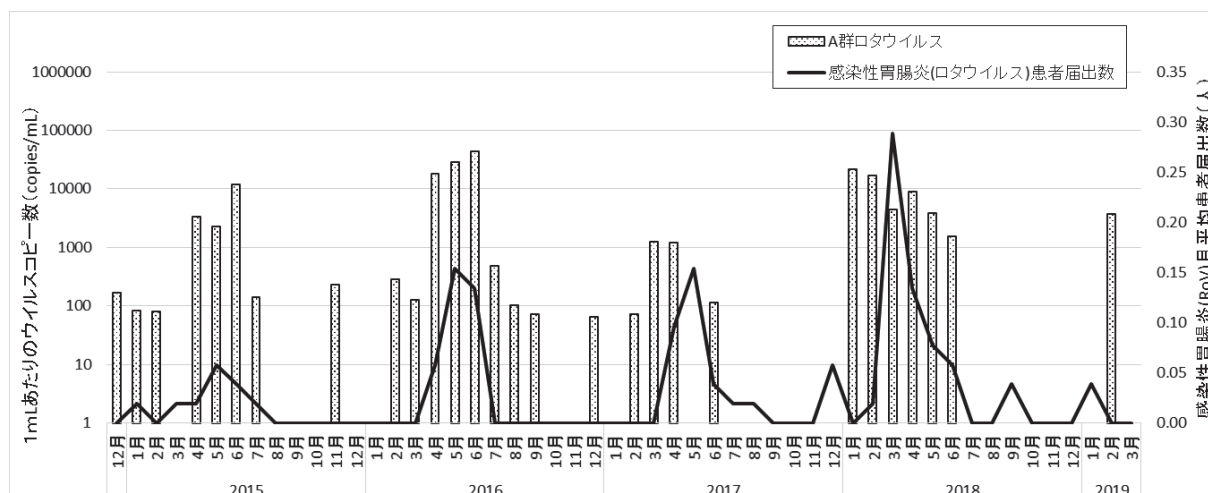


図5 下水中のA群ロタウイルスコピー数と感染性胃腸炎(病原体がロタウイルス)月平均患者届出数

月～10月, 2017年6月, 8月, 9月であった。

GI、GIIコピー数は2016年、2017年には冬季に高く夏季に低い傾向が見られたが、その他の年に明らかな季節性は見られなかった。

下水52検体中NoVコピー数がGIに比べGIIの方が高濃度であるものが38検体(73.1%)と多かった。GIの方が高濃度であったものは8検体(15.4%)あり、採水月は2014年12月, 2015年5月, 6月, 7月, 9月, 10月, 2016年5月, 2018年4月であった。6検体はGIおよびGIIともに定量下限値未満であった。

SaVについては、定量下限値未満であった2016年10月を除くすべての月で検出され、陽性率は98.1%(52検体中51検体)であった。SaVコピー数は平均 7.57×10^3 コピー/mLであった。

AsVについては、定量下限値未満であった2015年3月, 2016年10月, 11月を除くすべての月で検出され、陽性率は94.2%(52検体中49検体)であった。AsVコピー数は平均 1.23×10^4 コピー/mLであった。

SaV, AsVのコピー数に季節性は見られなかった。

RoVについては52検体中28検体から検出され、陽性率は53.8%であった。RoVコピー数は平均 3.33×10^3 コピー/mLであった。定量下限値未満であった月は、2015年3月, 8月～10月, 12月, 2016年1月, 10月, 11月, 2017年1月, 5月, 7月～12月, 2018年7月～12月, 2019年1月, 3月であった。RoVコピー数には季節性が見られ毎年1月～6月にピークが見られた。

3.2 感染性胃腸炎患者届出数と下水中の下痢症ウイルス遺伝子検出状況との関連性

月平均患者届出数と下水から検出されたウイルスコピー数との関連性を検討した(表2)。その結果、各月ごとに検出されたGI, GIIおよびRoVコピー数と月平均患者届出数との間に弱い正の相関($r=0.307$, $r=0.362$ および $r=0.293$ ($P<0.05$))が見られた。しかし、年別の相関分析では相関は見られなかった。

SaVおよびAsVコピー数と月平均患者届出数との間に有意な相関は見られなかった。

さらに、RoV月平均患者届出数とRoVコピー数の相関分析では、中程度の正の相関($r=0.424$ ($P<0.05$))が見られ、年別でも2015年および2016年($r=0.648$ および $r=0.754$ ($P<0.05$))に相関が見られた。

4 考察

年間を通じて下水からNoV GI, NoV GII, SaV, AsVおよびRoV遺伝子が検出されたことから、患者の多少や症状の有無にかかわらずこれらのウイルスの感染者が存在することが明らかとなった。

調査期間中の下水中NoV平均コピー数は、GI(1.65×10^2 コピー/mL)に比べGII(1.34×10^3 コピー/mL)が高く、感染性胃腸炎患者から検出されるNoV遺伝子群はGIIが多いという統計²²⁾とも一致している。季節性は調査年で差異が認められ、2016年および2017年は顕著であったのに比べ、2015年

表2 感染性胃腸炎月平均患者届出数(定点あたり)に対する下水中ウイルス遺伝子コピー数の相関分析

採水年月	n	相 関 係 数					
		ノロウイルス GI	ノロウイルス GII	サポウイルス	アストロウイルス	A群ロタウイルス ⁽¹⁾	A群ロタウイルス ⁽²⁾
2015年 1月~12月	12	0.322	0.357	-0.182	-0.497	0.303	0.648*
2016年 1月~12月	12	0.422	0.547	0.315	0.410	0.389	0.754*
2017年 1月~12月	12	0.349	0.413	0.315	0.497	0.248	0.062
2018年 1月~12月	12	-0.120	-0.133	0.189	-0.126	0.362	0.496
調査全期間	52	0.307*	0.362*	0.265	0.093	0.293*	0.424*

*: p<0.05

(1) 感染性胃腸炎月平均患者届出数(定点あたり)

(2) 感染性胃腸炎(病原体がロタウイルス)月平均患者届出数(定点あたり)

および2018年は患者届出数が減少した6月~10月であっても下水中のGIIコピー数は高頻度に検出された。特に、2018年は9月を除くすべての月でGIIコピー数が $10^2 \sim 10^3$ コピー/mLで推移し、夏期であっても感染者が多数存在していることが推察された。

GIはGII(86.5%)に比べ低率ではあるものの63.5%から検出された。Kitajimaらは、GIが無症状または軽度、散発性の感染症を引き起こす可能性を指摘している²³⁾。本報告においても、GIIよりGIの検出濃度が高かった月(52回中8回)が2015年に集中し(8回中4回)、A処理場が管轄する流域でのGIによる潜在的な流行が存在した可能性が考えられた。

下水から検出されたGIおよびGIIコピー数と月平均患者届出数との相関は顕著ではなかった。三浦らは、GIとの間には有意な相関が見られず、GIIの間には相関係数が最大で0.721と報告している⁹⁾。この相違は、調査の年や地域により流行状況が異なった可能性が考えられる。

SaVとAsVは通年で下水から高頻度で検出され、季節による明瞭なピークは認められなかった。今回の調査では、NoVのコピー数と比較して、むしろSaV、AsVの方が高濃度、高頻度で検出され、軽症あるいは無症状の感染者が多数存在する可能性が考えられた。

RoVは、主に乳幼児に急性胃腸炎を引き起こし、例年1月~6月にかけて患者の発生が認められると報告されている¹¹⁾。下水中RoVコピー数の推移は、1月から6月の冬期から春期にかけてピークを示し、

患者発生状況¹¹⁾と検出状況は一致していた。また、月平均患者届出数との間に弱い相関($r=0.293$)が見られたことから、図2の月平均患者届出数の毎年6月頃の小ピークはRoVによる患者の増加に起因しているものと考えられた。

年別の相関分析では、月平均患者届出数との有意な相関はすべてのウイルスで見られなかった。これは、月平均患者届出数が下痢症患者数との届出であり、原因ウイルスが特定されていないこと、ウイルスコピー数の測定が月1回で相関係数の有意性がデータの数に依存する²¹⁾ことなどによる影響が大きいと考えられた。

RoVコピー数とRoV月平均患者届出数との間には中程度の相関($r=0.424$)が見られ、年別では2015年および2016年($r=0.648$ および $r=0.754$)に相関が見られた。これは、下痢症原因ウイルスが特定されると下水中のウイルスコピー数との相関係数が高くなることを示しており、下水の環境水サーベイランスが様々なウイルスの流行状況の把握に有効であることを示していると考えられた。

以上のことから、本調査は感染症発生動向調査では計上されない流行実態の把握や潜在的な感染者の探知に有効であると考えられた。

謝 辞

下水流入水の提供・採取にご協力いただきました下水終末処理場関係者の皆様、文章についてご助言いただきました長野県環境保全研究所自然環境部高

野宏平研究員に深謝いたします。

文 献

- 1) Ozawa, K., *et al.* (2007) Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan. *J Clin Microbiol*, 45(12), 3996-4005.
- 2) 国立感染症研究所 (2017) ノロウイルス感染症 2015/16 シーズン. 病原微生物検出情報 (IASR), 38, 1-3.
- 3) 吉澄志磨, 他 (2011) 二枚貝関連の食中毒疑い事例における各種胃腸炎ウイルスの関与—北海道. 病原微生物検出情報 (IASR), 32, 361-363.
- 4) 左近直美, 他 (2016) ノロウイルスの流行と遺伝子型. *食微誌*, 33(3), 97-106.
- 5) 厚生省保健医療局長通知(平成 11 年 3 月 19 日) 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律の施行に伴う感染症発生動向調査事業の施行について 安監発第 1105001 号.
- 6) 秦眞美, 他 (2020) 流入下水から検出されたノロウイルス及びサポウイルスの動態と遺伝子解析(2014/15-2018/19 シーズン). *愛知衛所報*, 70, 11-20.
- 7) 板持雅恵, 他 (2016) ポリオ流行予測調査(平成 27 年度). *富山衛研年報*, 39, 80-84.
- 8) 中野守 環境水サーベイランスによる腸管系ウイルスの早期動向把握に関する調査研究. 大同生命厚生事業団(平成 26 年度) 地域保健福祉研究助成報告書 176-180.
- 9) 三浦尚之, 他 (2016) 感染性胃腸炎流行の早期探知を目的とした下水中ノロウイルスモニタリングの有用性. *土木学会論文集*, 72(7), III285-III294.
- 10) 磯田美穂子, 他 (2015) 岡山県内の下水におけるノロウイルス遺伝子調査について. *岡山県環境保健センター年報*, 39, 137-141.
- 11) 松永健司, 他 (2005) ロタウイルス感染症とノロウイルス感染症との比較検討-奈良県感染症サーベイランス一定点より. 病原微生物検出情報 (IASR), 26, 11-13.
- 12) 峯岸俊貴, 他 (2019) 元荒川水循環センター流入水及び放流水における腸管系ウイルス調査 (2017 年度~2018 年度). *埼衛研所報*, 53, 35-44.
- 13) 三好龍也, 他 (2013) 下水サンプルを用いた下痢症ウイルス流行の分子疫学的解析. *堺市衛生研究所年報*, 53-68.
- 14) 国立感染症研究所 (2012 年 10 月) ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル
- 15) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知(2003 年 11 月 5 日) ノロウイルスの検出法について 食安監発第 1105001 号.
- 16) 小和田和誠, 他 (2011) Multiplex real-time PCR を利用した胃腸炎ウイルス検査の検討. *福井県衛生環境センター年報*, 10, 40-44.
- 17) 長野県感染症情報センター, 長野県感染症情報(週報): <https://www.pref.nagano.lg.jp/hoken-shippei/kenko/kenko/kansensho/joho/index.html> (2020 年 12 月確認)
- 18) 小宮義人, 他 (2010) 下水中の病原ウイルス調査. *土木技術資料*, 6, 26-29.
- 19) 国立感染症研究所感染症疫学センター, (2015) <速報> ロタウイルス胃腸炎の発生動向とワクチン導入後の報告数の推移. 病原微生物検出情報 (IASR), 36, 145-146.
- 20) Kishida, N., *et al.* (2012) One-year weekly survey of noroviruses and enteric adenoviruses in the Tone River water in Tokyo metropolitan area, Japan. *Water Res*, 46(9), 2905-2910.
- 21) 柳井久江, (2011) エクセル統計第 3 版(オーエムエス出版): 45-196.
- 22) 国立感染症研究所 感染症疫学センター, ノロウイルス等検出状況(2020/21 シーズン): <http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr-noro.html> (2020 年 12 月確認)
- 23) Kitajima M., *et al.* (2012) Molecular detection and genotyping of human noroviruses in influent and effluent water at a wastewater treatment plant in Japan. *J Appl Microbiol*, 112(3), 605-613.

Survey and annual variations of gastroenteritis virus genes in a wastewater treatment plant in Nagano Prefecture

Ryusuke TSUKADA^{1,2}, Tetsuya MIZUSAWA², Kanako NISHIZAWA¹, Naoko KAMO¹, Masumi FUJII³,
Michiko TAKEUCHI¹, Haruyuki NAKAZAWA¹, Satoko ONO¹ and Junko WADA^{1,5}

- 1 *Infectious Disease Division, Nagano Environmental Conservation Research Institute, 1978 Komemura, Amori, Nagano 380-0944, Japan*
- 2 *Present address: Food and Environmental Sanitation Division, Health and Welfare Department, Nagano Prefectural Government, 692-2 Habashita Minaminagano, Nagano 380-8570, Japan*
- 3 *Present address: Inspection Division, Nagano Health and Welfare Office, 98-1 Okada Nakagoshi, Nagano 380-0936, Japan*
- 4 *Present address: Retirement*
- 5 *Present address: Omachi Health and Welfare Office, 1058-2 Omachi, Omachi City, Nagano Prefecture 398-8602, Japan*