

【調査研究】

## 胃腸炎ウイルスの疫学的研究

— 下水を用いたヒトC群ロタウイルスサーベイランスの有効性—  
Studies on Epidemiology of Viral Gastroenteritis in Okayama Prefecture  
— Efficiency of the survey of human group C rotaviruses by using sewage water —

葛谷光隆, 木田浩司, 溝口嘉範, 濱野雅子, 藤井理津志 (ウイルス科)  
Mitsutaka Kuzuya, Kouji Kida, Yoshinori Mizoguchi, Masako Hamano, and Ritsushi Fujii  
(Department of virology)

### 要 旨

本県におけるヒトC群ロタウイルス (ヒトCRV) の流行実態の解明を目的とし, 2009年1月~2011年8月に県南部の下水処理場で採取された60検体の下水について, リアルタイムPCR法を用いてヒトCRVを定量的に検査するとともに, 同時期に採取された胃腸炎患者糞便1,019検体を対象としたヒトCRV検索を実施した。その結果, ヒトCRVは概ね1月~7月にかけて下水から検出され, 2009年3月には, 1mLあたり最大で4,146コピーという多量のウイルスが存在することがわかった。また, 2010年にはピーク時のウイルス量が2009年の1/10程度となり, 2011年にはさらにウイルス量が減少して明瞭なピークが確認できなくなるなど, 年によりウイルス量に差がみられることも明らかになった。一方, 下水調査期間中に採取された胃腸炎患者糞便からはヒトCRVは1例も検出されなかったが, 全国の検出状況から2009年にはヒトCRVの全国的流行があったものと推察された。したがって, 2009年の下水から多量のウイルスが検出されたことは, この全国流行が本県にも波及していたことを示すものであり, 下水調査に基づくサーベイランスがヒトCRVの流行状況の正確な把握に有効であることが示唆された。

[キーワード: ヒトC群ロタウイルス, Real-time RT-PCR, 定量的検出, 下水, 岡山県]

[Key words: human group C rotavirus, Real-time RT-PCR, quantitative detection, sewage water, Okayama Prefecture]

### 1 はじめに

ヒトC群ロタウイルス (以下「ヒトCRV」という。) は日本をはじめ世界各地に広く分布しており, しばしば食中毒様の集団胃腸炎を引き起すため公衆衛生上問題視されている。国内におけるヒトCRV集団発生事例は, 1988年に福井県で発生した大規模事例以降, 2006年までに計19例が報告されている<sup>1)</sup>。推定感染経路については, ヒト→ヒト感染が大部分を占めるものの, 食品等が原因と思われるケースも散見される。一方, 散発性胃腸炎患者からのヒトCRVの検出頻度は約1%前後と<sup>2), 3)</sup>, 小児等で広く流行しているA群ロタウイルスの頻度 (25~30%) に比べて低率であるにもかかわらず, 住民の半数近くがヒトCRVに対する抗体を保有しているなど<sup>4), 5)</sup>, その流行実態については未だ不明な点が多い。

主にし尿などの生活排水が流れ込む下水には, 患者のみならず不顕性感染者等から排泄されたウイルスが流入するため, その地域におけるウイルス流行の有効な指標となりうることが指摘されている<sup>6)</sup>。実際, これまで多くの機関により下水や河川等の環境水を用いたウイルスサーベラ

ンスが実施されており, ポリオウイルス野生株の監視やエンテロウイルス及びノロウイルス等の流行実態の解明に一定の成果を上げている<sup>6)~9)</sup>。したがって, ヒトCRVについても下水等の調査によりその流行の解明が期待できるが, 環境水を用いたサーベイランスに関しては, Melegら<sup>10)</sup> がハンガリーにおいて行っているのみで, 国内ではほとんど実施されていない。

我々は平成22年度の調査研究において, ヒトCRVを特異的かつ高感度に検出できるリアルタイムRT-PCR法を確立した<sup>11)</sup>。本法は糞便のみならず, 環境水中のヒトCRVを定量的に検出可能であることが明らかになった。そこで, このリアルタイムRT-PCR法を用いて下水中のヒトCRVを定量的に検査するとともに, 県内医療機関を受診した胃腸炎患者糞便を対象としたヒトCRV検索もあわせて行うことで, 本県におけるヒトCRVの流行実態を明らかにすることを試みた。

## 2 材料及び方法

### 2.1 検査材料

下水検体としては、2009年1月～2011年8月に県南部のA下水処理場で概ね2週間毎に採取された60検体の流入下水を、片山らが報告している陰電荷膜濃縮法<sup>12)・13)</sup>により1,250倍に濃縮したものを検査材料とした。一方、胃腸炎患者検体については、下水検査実施期間中に(独)国立病院機構岡山医療センター小児科で採取された15歳以下の小児胃腸炎患者糞便1,019検体を対象とした。なお、年別検体数は2009年が282検体、2010年が398検体、及び2010年が339検体であり、また年齢構成は5歳未満が835名、5歳以上が184名であった。

### 2.2 ヒトCRV検出用リアルタイムRT-PCR法

ヒトCRV検出用リアルタイムRT-PCR法については既報<sup>11)</sup>の方法に従って実施した。すなわち、市販キット(QIAamp Viral RNA mini kit:株式会社キアゲン)により検体からウイルスRNAを抽出後、DNA分解酵素で処理し、VP7遺伝子の両端に相補的なプライマーを用いてcDNAを合成した。合成されたcDNAを鋳型として、ヒトCRVに特異的なプライマー及びTaqManプローブを用いてStepOnePlus(ライフテクノロジーズ株式会社)によりリアルタイムRT-PCRを行った。結果の解析はStepOne Software v2.1(ライフテクノロジーズ株式会社)を用いた。なおウイルスコピー数については、既知のコピー数のコントロールプラスミドとの比較により算出し、2回の測定結果を平均して下水1mLあたりのコピー数を求めた。

### 2.3 ノロウイルス検出用リアルタイムRT-PCR法

ノロウイルス(NoV)検出用リアルタイムRT-PCR法は、平成15年(2003年)11月5日付け食安監第1105001号厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知に準拠し、NoV遺伝子群Ⅱ型についてのみ実施した。すなわち、下水より抽出したRNAを鋳型としてoligo-dT primer(ライフテクノロジーズ株式会社)とrandom hexamer(タカラバイオ株式会社)により逆転写を行い、cDNAを合成した。リアルタイムRT-PCRは、StepOne Plus(ライフテクノロジーズ株式会社)とGene Expression Master Mix(同)でTaqMan法<sup>14)</sup>に基づいて実施した。なお下水1mLあたりのウイルスコピー数は、ヒトCRVの場合と同様の方法により算出した。

### 2.4 ヒトCRV検出用酵素抗体(ELISA)法

ヒトCRV検出用ELISA法については既報<sup>3)</sup>の方法に従い、糞便の10%乳剤上清を検体として測定し、吸光度が0.15を上回った場合を陽性と判定した。

## 3 結果

### 3.1 下水中のヒトCRVコピー数の推移

下水中のヒトCRVコピー数の推移を表1及び図1に示す。ヒトCRVは概ね1月から7月にかけて検出され、それ以外の期間は2010年10月20日を除いていずれも検出限界以下であった。コピー数のピークは2009年3月頃に、2010年5月頃にそれぞれ認められたが、2011年については明瞭なピークはみられなかった。下水中のヒトCRVコピー数の推移を年ごとに比較すると、検出期間及びコピー数とも

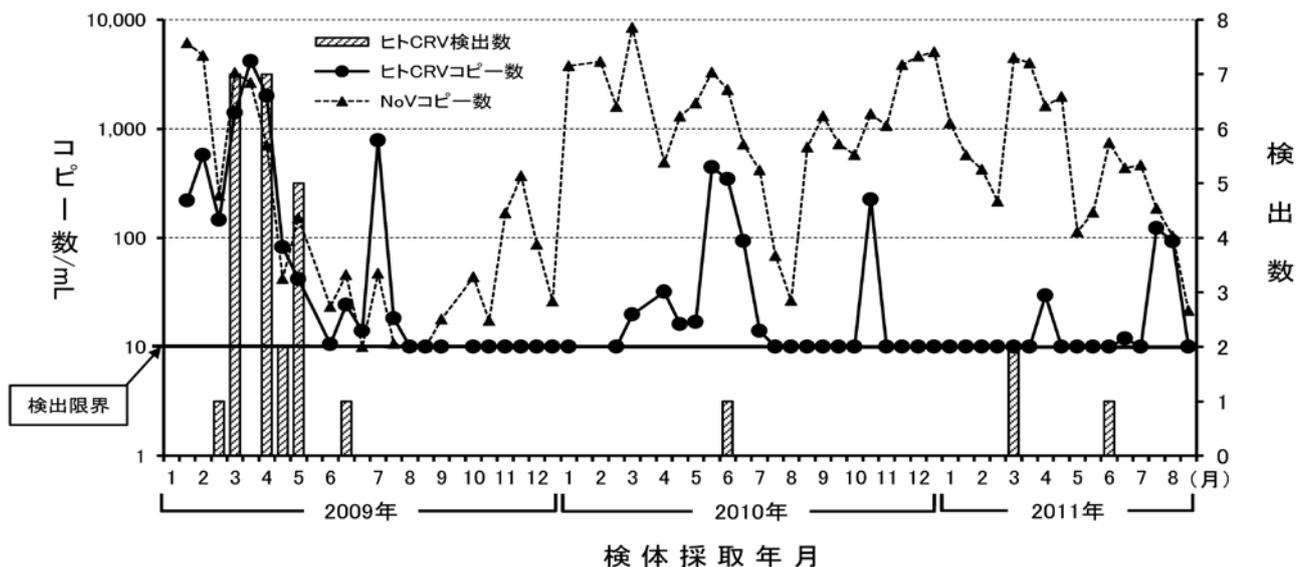


図1 下水のヒトCRV及びNoVコピー数と胃腸炎患者からのヒトCRV検出状況  
折れ線が下水のヒトCRV及びNoVのウイルス量を、  
カラムが全国おける胃腸炎患者からのヒトCRV検出数を示す。

表1 下水中のヒトCRVコピー数および検体採取日前の降水量

| 採取年月日  | コピー数/mL | 降水量(mm)* |      | 採取年月日 | コピー数/mL | 降水量(mm)* |      |      |      |
|--------|---------|----------|------|-------|---------|----------|------|------|------|
|        |         | 前々日      | 前日   |       |         | 前々日      | 前日   |      |      |
| 2009年  | 1月27日   | 220      | 0    | 0     | 6月8日    | 344      | 0    | 0    |      |
|        | 2月10日   | 572      | 0    | 2.0   | 6月22日   | 93       | 29.0 | 0    |      |
|        | 2月25日   | 146      | 5.5  | 1.5   | 7月6日    | 14       | 0    | 1.0  |      |
|        | 3月10日   | 1,408    | 0    | 0     | 7月21日   | ≤10      | 0    | 0    |      |
|        | 3月24日   | 4,146    | 4.0  | 0     | 8月10日   | ≤10      | 0    | 0    |      |
|        | 4月7日    | 2,006    | 0    | 0     | 8月24日   | ≤10      | 0    | 0    |      |
|        | 4月21日   | 82       | 0    | 2.0   | 9月7日    | ≤10      | 0    | 0    |      |
|        | 5月19日   | 42       | 4.5  | 0     | 9月22日   | ≤10      | 1.5  | 0    |      |
|        | 6月2日    | 11       | 0    | 0     | 10月5日   | ≤10      | 17.0 | 1.5  |      |
|        | 6月16日   | 24       | 0    | 0     | 10月20日  | 225      | 0    | 0    |      |
|        | 6月30日   | 14       | 0    | 14.5  | 11月10日  | ≤10      | 1.0  | 0    |      |
|        | 7月14日   | 781      | 0    | 0     | 11月22日  | ≤10      | 0    | 0    |      |
|        | 7月28日   | 18       | 8.5  | 0.5   | 12月7日   | ≤10      | 0    | 0    |      |
|        | 8月11日   | ≤10      | 76.5 | 50.5  | 12月21日  | ≤10      | 0    | 1.5  |      |
|        | 8月25日   | ≤10      | 0    | 0     | 2010年   | 1月12日    | ≤10  | 0    | 0    |
|        | 9月8日    | ≤10      | 0    | 0     |         | 1月26日    | ≤10  | 0    | 0    |
|        | 10月13日  | ≤10      | 0    | 0     |         | 2月7日     | ≤10  | 0    | 0    |
|        | 10月27日  | ≤10      | 0    | 3.0   |         | 2月22日    | ≤10  | 0    | 0    |
|        | 11月10日  | ≤10      | 0    | 0     |         | 3月8日     | ≤10  | 6.5  | 3.0  |
|        | 11月24日  | ≤10      | 2.5  | 0     |         | 3月23日    | ≤10  | 10.5 | 1.0  |
| 12月8日  | ≤10     | 0        | 0    | 4月4日  |         | 30       | 0    | 0    |      |
| 12月22日 | ≤10     | 0        | 0    | 4月20日 |         | ≤10      | 11.5 | 2.0  |      |
| 2010年  | 1月19日   | ≤10      | 0    | 0     |         | 5月9日     | ≤10  | 11.5 | 0    |
|        | 2月2日    | ≤10      | 2.5  | 13.0  |         | 5月23日    | ≤10  | 0    | 8.0  |
|        | 2月24日   | ≤10      | 0    | 0     |         | 6月6日     | ≤10  | 0    | 0    |
|        | 3月9日    | 20       | 5.5  | 0     |         | 6月22日    | ≤10  | 8.5  | 6.5  |
|        | 4月13日   | 32       | 51.0 | 0     |         | 7月4日     | ≤10  | 6.5  | 6.0  |
|        | 4月21日   | 16       | 4.5  | 9.0   |         | 7月20日    | 123  | 7.5  | 27.5 |
|        | 5月11日   | 17       | 0    | 20.0  |         | 8月9日     | 93   | 0    | 0    |
| 5月25日  | 444     | 102.0    | 16.0 | 8月23日 |         | ≤10      | 28.0 | 0.5  |      |

\*岡山市における降水量（気象庁ホームページより）

違いが認められた。すなわち、2009年では1月～7月に最大で4,146コピー/mL検出されたのに対し、2010年には3月～7月に最大で444コピー/mL、さらに2011年には4月～8月に最大で123コピー/mLと検出期間及びコピー数とも年々減少していく傾向が認められた。そこで、この減少傾向が下水中の阻害物質等の影響によるものかどうかを確かめるため、毎年冬期に流行することがわかっているNoVについてウイルスコピー数を測定した。その結果、NoVに関しては冬期～春期をピークとした検出パターンが毎年認められ、ウイルスコピー数の最大値にも大きな変動は認められなかった（図1）。したがって調査期間については、下水中に測定系を阻害するような物質等の混在はなかったものと推察された。また、下水採取前日及び前々日の降水量と検出コピー数との比較を行ったが（表1）、両者間に特に明確な関連性は認められず、下水のウイルス定量値は降水の影響をほとんど受けないものと考えられた。

### 3.2 胃腸炎患者からのヒトCRV検出状況と下水のコピー数との関連性

下水調査期間中に小児胃腸炎患者から採取された糞便1,019検体について、ELISA法によりヒトCRVの検索を行ったが陽性例は1件も認められなかった。また、調査期間中に県内でヒトCRVによる集団胃腸炎事例の発生もみられなかった。そこで、全国の地方衛生研究所等における散発性胃腸炎患者からのヒトCRV検出状況について、国立感染症研究所感染症情報センター発行の病原微生物検出情報（2009年～2011年発行分）をもとに調査したところ、東日本～九州の8府県から合計27例が検出報告されていた。検出状況は図1に示すように、2009年は2月～6月に計23例（埼玉県、神奈川県、三重県、大阪府、愛媛県で検出）、2010年は6月に1例（熊本県で検出）、2011年は3月に2例及び6月に1例（石川県、山口県で検出）が報告されており、2009年にヒトCRVの検出が集中していることがわかった。さらに、ヒトCRVによる集団発生事例について

も同様に調べたところ、2009年の3月～6月に4事例（静岡県、大阪府で発生）、2011年3月に1事例（山口県で発生）が報告されており、散発例の多い時期に集団発生が多発する傾向が認められた。以上の結果について、下水のヒトCRVコピー数との比較を行ったところ（図1）、患者からの検出数が多くなる時期に一致して、下水のヒトCRVコピー数も増加する傾向が認められた。

#### 4 考 察

本研究により、県内の下水におけるヒトCRVの動態について詳細に明らかにすることができた。ヒトCRVは概ね1月～7月にかけて下水から検出され、また1 mLあたり最大で4,146コピーという多量のウイルスが存在することがわかった。Melegら<sup>10)</sup>は、ハンガリーにおいて下水中のヒトCRVを定量的に検査し、ウイルスは2月～8月にかけて検出され、ピーク時期の2月～4月には最大で1 mLあたり $10^5$ コピーのウイルスが検出されたことを報告しているが、我々の2009年の調査結果はこれにほぼ一致していた。その一方で、下水中にヒトCRVが継続的に検出されるものの、年により検出ウイルス量及び検出期間に大きな差があることも明らかになった。2009年には、毎年大きな流行を引き起こすNoVに匹敵する量が存在していたが、2010年にはピーク時のウイルス量が1/10程度となり、検出時期も短くなった。2011年にはさらにウイルス量が減少し、明瞭なピークが確認できなくなった。これまでの胃腸炎患者におけるサーベイランス結果から、ヒトCRVが数年ごとに流行を繰り返すことが示唆されたが<sup>3)、15)</sup>、今回の結果はこの知見と一致するものであった。

今回の調査期間中に、県内の医療機関で採取された胃腸炎患者糞便からはヒトCRVは1例も検出されなかったが、全国的レベルでは少数ながらも散発例及び集団発生例からヒトCRVが検出された。特に検出状況から、2009年にはヒトCRVの全国的流行があったものと推察された。したがって、2009年に県内で採取された下水から多量のヒトCRVが検出されたことは、この全国流行が本県にも波及していたことを示すものと考えられた。一方、2010年～2011年にはヒトCRV検出数が全国的に少なかったが、県内でも当該時期の下水中ヒトCRVコピー数も2009年のレベルに比べて減少していた。以上のことから、下水中のウイルス量はヒトCRV流行規模をほぼ反映しているものと思われ、下水調査に基づくサーベイランスがヒトCRVの正確な流行状況の把握に有効であることが示唆された。

下水調査結果及び全国の検出状況から、2009年に県内でヒトCRVが広く流行していたことがわかったが、同時期に採取した小児胃腸炎患者糞便からはヒトCRVは全く検出

されなかった。このように患者サーベイランスだけではヒトCRV流行が探知し得なかったのは、ヒトCRV感染症の好発年齢と考えられる5歳以上の小児<sup>2)、3)</sup>の検体が184検体と、全体の18%程度とどまっていたことが原因の一つではないかと推察された。一方Melegら<sup>10)</sup>は、流入下水から多量のウイルスが検出されながら、調査期間中にヒトCRV感染者はわずか1名しか確認されなかったことから、ヒトCRVに感染しても明らかな症状を示さない場合が多いのではないかと考察している。今回の結果でも、2009年においてはNoVとほぼ同量のウイルスが下水中に存在していたが、同年における小児胃腸炎患者からのNoV検出率が6.5%<sup>16)</sup>に対し、ヒトCRV陽性者は1名も確認されなかった。したがって、ヒトCRVに感染しても明らかな症状を示さないか、軽症で経過するため医療機関等を受診せず、結果として感染者が探知されなかったという可能性も考えられる。いずれにしても、ヒトCRVの流行実態をより明らかにするためには、胃腸炎患者サーベイランスのみならず、下水の継続的な調査が有効であると思われる。

#### 文 献

- 1) 葛谷光隆：ロタウイルス感染症，公衆衛生，71，991-993，2007
- 2) Castello, A. A., Arguelles, M. H., Villegas, G. A., Olthoff, A., Glikmann, G.: Incidence and prevalence of human group C rotavirus infections in Argentina, *J. Med. Virol.*, 67, 106-112, 2002
- 3) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Nishijima, M., Ogura, H.: Detection and molecular characterization of human group C rotaviruses in Okayama Prefecture, Japan, between 1986 and 2005, *J. Med. Virol.*, 79, 1219-1228, 2007
- 4) James, V. L., Lambden, P. R., Caul, E. O., Cooke, S. J., Clarke, I. N.: Seroepidemiology of human group C rotavirus in the UK, *J. Med. Virol.*, 52, 86-91, 1997
- 5) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Ohata, R., Ogura, H., et al.: Seroepidemiology of human group C rotavirus in Japan based on a blocking enzyme-linked immunosorbent assay, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8, 161-165, 2001
- 6) 矢野一好：下水中のウイルスの消長とその疫学的意味，臨床とウイルス，36，134-140，2008
- 7) 岩井雅恵，松浦久美子，滝澤剛則：富山県における環境水ウイルスサーベイランスの疫学的意味，臨床とウイルス，36，127-133，2008

- 8) 佐藤 卓, 斎藤幸一, 小林良雄, 白藤周司: 下水中の  
病因ウイルスの動態に関する研究, 岩手県衛生研究所  
年報, 43, 19-24, 2000
- 9) 藤浦 明, 小林慎一, 山下照夫, 椛島由佳, 伊藤 雅  
ら: 矢作川浄化センターに流入する下水からのウイル  
ス分離について, 愛知県衛生研究所年報, 53, 21-25,  
2003
- 10) Meleg, E., Banyai, K., Martella, V., Jiang, B.,  
Kocsis, et al.: Detection and quantification of group  
C rotaviruses in communal sewage, *Appl. Environ.  
Microbiol.*, 74, 3394-3399, 2008
- 11) 葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 藤井理津志: 胃腸炎  
ウイルスの疫学的研究— Real-time RT-PCR法による  
ヒトC群ロタウイルス検査法の開発—, 岡山県環  
保七  
年報, 35, 93-97, 2011
- 12) Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K.,  
Ohgaki, S.: Application of cation-coated Filter  
Method to Detection of Noroviruses, Enteroviruses,  
Adenoviruses, and Torque Teno Viruses in  
the Tamagawa River in Japan, *Appl. Environ.  
Microbiol.*, 71, 2403-2411, 2005
- 13) 片山浩之: 新たなウイルス濃縮方法の開発と水道水  
および水道水源調査への適用, *モダンメディア*, 52,  
185-190, 2006
- 14) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M.,  
Uchida, K., Fukushi, S. et al.: Broadly reactive and  
highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based  
on real-time quantitative reverse transcription-PCR,  
*J. Clin. Microbiol.* 41 : 1548-1557, 2003
- 15) Schnagl, R. D., Boniface, K., Cardwell, P.,  
McCarthy, D., Ondracek, C., et al.: Incidence of  
group C human rotavirus in central Australia and  
sequence variation of the VP7 and VP4 genes, *J.  
Clin. Microbiol.* 42, 2127-2133, 2004
- 16) 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 木田浩司, 榎原  
幸二, 濃野 信ら: 胃腸炎ウイルスの疫学的研究—  
岡山県の散発性胃腸炎患者におけるノロウイルス,  
サポウイルスおよびアストロウイルスの流行疫学  
(2008/2009シーズン~2009/2010シーズン)—, 岡山  
県環  
保七  
年報 35, 85-91, 2011