

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

磯田美穂子, 藤原香代子, 松岡保博, 濱野雅子, 藤井理津志

【資 料】

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

Survey of Norovirus genes in sewage in Okayama prefecture (2009-2015)

磯田美穂子, 藤原香代子, 松岡保博, 濱野雅子, 藤井理津志(ウイルス科)

Mihoko Isoda, Kayoko Fujiwara, Yasuhiro Matsuoka, Masako Hamano, Ritsushi Fujii
(Virology Section)

要 旨

ノロウイルスの環境中における汚染実態を把握し、ウイルス性胃腸炎の感染予防対策及び流行予測に役立つ目的で、下水処理場に流入する下水を継続的に採取し、ノロウイルス遺伝子を定量的に検索した。下水中のノロウイルス遺伝子は、ノロウイルスによる胃腸炎の流行期である冬季に検出量が増加する傾向を示した一方で、患者報告数の少ない時期においても検出されており、一年を通して下水にノロウイルスが流入していることが確認された。ノロウイルスは環境中や食品中では増殖せず、ヒトの腸内で増殖後ふん便中に排せつされ、下水へ流入していると考えられる。したがって、ヒトの糞便中には季節を問わずノロウイルスが排せつされ、ふん便を介した感染が、流行期以外の時期であっても起こる可能性が示唆された。このことを念頭においた感染予防対策が必要である。

[キーワード：感染症, ノロウイルス, Real-time RT-PCR, 下水]

[Key words: Infectious disease, Norovirus, Real-time RT-PCR, sewage]

1 はじめに

ノロウイルスは、秋から春にかけて幅広い年齢層で流行する急性胃腸炎の主要な病原体である。おう吐や下痢を主症状とし、通常1～2日で軽快するが、小児や高齢者等では、まれに重症化することもある。ふん便やおう吐物を介してヒトからヒトへと感染するほか、しばしば食品を介して感染し食中毒の原因となるなど、公衆衛生上重大な問題となっており、社会的関心は高い。

ノロウイルスによる胃腸炎について、流行状況を明らかにすることは予防や対策をとる上で重要である。しかし、ノロウイルスによる胃腸炎は、感染症発生動向調査事業¹⁾において、他の病原体による胃腸炎と一括した感染性胃腸炎として、患者定点から患者数が報告されているのみである。またその報告対象は小児に限定されていることや、軽症の胃腸炎患者や不顕性感染者では医療機関を受診しない場合も想定されることから、ノロウイルスによる胃腸炎の流行状況は正確に把握できていないといえる。

一般家庭のトイレなどから生活排水が流れ込む下水には、患者だけでなく軽症者や不顕性感染者から排せつさ

れたウイルスが含まれているため、下水を採取し調査することで、流域内においてヒトが感染している種々のウイルスを検索できると考えられる。実際に下水を材料としたポリオウイルス野生株の監視及びエンテロウイルスの検索が実施されており²⁾、ノロウイルスについても成果が示されている³⁾。本県においても、下水に流入するノロウイルスを定量的にモニタリングすることで、ノロウイルスによる胃腸炎の流行状況をタイムリーに把握でき、さらに流行予測に資することができる可能性がある。そこで、県内の1下水処理場において2009年1月から2015年3月まで継続的に採取された流入水を対象に、リアルタイムRT-PCR法によるノロウイルス遺伝子の検出を行い、データの蓄積及び解析を行った。また岡山県感染症発生動向調査における感染性胃腸炎患者数との比較を行った。

2 材料及び方法

2.1 検査対象

県内下水処理場において、2009年1月から2015年3月までの間、月に1～2回(2009年6月は3回、2010年

4月, 2013年8月, 2013年11月は採水せず) 流入水を500mL 採水し, 陰電荷膜吸着誘出法^{4)~6)}を用いて濃縮したものを試験材料とした。陰電荷膜に吸着したウイルスを誘出する工程として, 2009年1月から2014年3月までは, 水酸化ナトリウム水溶液を添加し加圧ろ過を行っていたが^{4)~5)}, 2014年4月以降は, 膜を細かく裁断後にビーフェキストラクト液を添加しよく混和する方法^{5)~6)}に変更した。

2.2 リアルタイム RT-PCR 法

ノロウイルス検出用リアルタイム RT-PCR 法は, 平成19年5月14日付け食安監第0514004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実施した。流入水濃縮検体からQIAamp Viral RNA mini kit(株式会社キアゲン)を用いてRNAを抽出した後, これを鋳型としrandom hexamer(タカラバイオ株式会社)により逆転写反応を行いcDNAを合成した。リアルタイムPCRは, Universal Master Mix(ライフテクノロジーズ株式会社)を用いて, StepOne Plus(ライフテクノロジーズ株式会社)により, 遺伝子群I(以下「G I」という。), 遺伝子群II(以下「G II」という。)の遺伝子群別に検出を試みた。なおノロウイルス遺伝子コピー数については, 既知のコピー数であるコントロールプラスミドとの比較により算出した。最終的な定量値は, 濃縮率等を考慮した上で流入水1Lあたりのコピー数に換算し(検出限界 10^3 コピー/L), 10^n の形で記録することとした。

3 結果

3.1 下水中のノロウイルス遺伝子コピー数の推移

2009年1月から2015年3月までの間に採取された流入水の, リアルタイム RT-PCR 法によるノロウイルス遺伝子検索結果は, 表1のとおりである。ノロウイルス遺伝子は一年を通して検出されており, 調査期間中に一度も検出されない月は無かった。検出量が最大となったのは, G Iでは2011年3月8日に採水された流入水, G IIでは2014年2月18日と2015年3月10日に採水された流入水で, それぞれ 10^7 コピー/Lものノロウイルス遺伝子が含まれていた。

G Iでは, 概ね2月から4月の間にコピー数のピークがみられた。G IIでは2009年では1月から3月にピークが認められたものの, 2010年以降は季節によるコピー数の変化があまりみられず, 明瞭なピークは認められな

かった。また118検体のうち, G Iが検出されたのは85検体(72%), G IIが検出されたのは99検体(84%)で, コピー数定量値では, G IIの方がG Iに比べ2倍程度高濃度に検出された。

採水年ごとに比較すると, 高レベルといえる 10^5 コピー以上/Lが検出された割合は, G Iでは2015年(100%), 2013年(92%), 2010年(90%), 2014年(83%), 2011年(58%), 2009年(41%), 2012年(4%)の順に高かった。G IIでは, 2015年(100%), 2014年(92%), 2010年(55%), 2013年(54%), 2011年(46%), 2009年(36%), 2012年(25%)の順に高かった。

3.2 感染性胃腸炎患者報告数と下水中のノロウイルス遺伝子コピー数との関連性

図1に, 2009年1月から2015年3月までの間に採取された流入水から検出されたノロウイルス遺伝子コピー数を, 岡山県感染症発生動向調査(以下「発生動向調査」という。)における感染性胃腸炎患者の定点あたり報告数の変動とともに示した。

ノロウイルス遺伝子コピー数と感染性胃腸炎患者の定点あたり報告数の変動との相関性では, 患者報告数の増加する時期には, 流入水中のウイルス遺伝子も増加傾向を示した。一方で, 患者報告数が減少した5月~10月であっても, 流入水中のノロウイルス遺伝子は高頻度に検出され続けていることから, 感染性胃腸炎患者数の多少に関わらず, 下水中には1年を通してノロウイルスが流入していることが確認された。また, 2011年の秋頃から2012年の秋頃にかけては, コピー数及び検出頻度が低い状態で推移しているが, この間の感染性胃腸炎患者報告数のピークも他の年の同時期と比較してやや低くなる等, ある程度の関連がみられたものの, その他の年については患者数の多寡と遺伝子コピー数の間に明らかな相関性は無かった。

4 考察

本調査より, 下水処理場に流入する流入水からは, 一年中ノロウイルス遺伝子が検出され, 流行期に最大で 10^7 コピー/Lとなるなど, 大量に含まれていることが確認された。また, 2013年の4月以降では, 2013年の3月以前に比べてG I, G IIとも検出量が多い傾向があるが, 検体濃縮時のウイルス誘出工程を変更したことでウイルス遺伝子を効率よく回収できるようになったと推

表1 下水中のノロウイルス遺伝子コピー数

ノロウイルス遺伝子コピー数/L			ノロウイルス遺伝子コピー数/L			ノロウイルス遺伝子コピー数/L		
採水日	遺伝子群 I	遺伝子群 II	採水日	遺伝子群 I	遺伝子群 II	採水日	遺伝子群 I	遺伝子群 II
2009/1/27	10 ⁵	10 ⁶	2011/1/12	10 ⁴	10 ⁶	2012/10/10	≦10 ³	10 ⁵
2009/2/10	10 ⁶	10 ⁶	2011/1/26	10 ⁵	10 ⁵	2012/10/22	10 ⁴	10 ⁵
2009/2/25	10 ⁵	10 ⁵	2011/2/7	10 ⁴	10 ⁵	2012/11/5	≦10 ³	10 ⁵
2009/3/10	10 ⁶	10 ⁶	2011/2/22	10 ⁵	10 ⁵	2012/11/19	≦10 ³	10 ⁶
2009/3/24	10 ⁶	10 ⁶	2011/3/8	10 ⁷	10 ⁶	2012/12/11	≦10 ³	10 ⁵
2009/4/7	10 ⁵	10 ⁵	2011/3/23	10 ⁶	10 ⁶	2012/12/26	10 ⁴	10 ⁴
2009/4/21	10 ⁴	10 ⁴	2011/4/4	10 ⁶	10 ⁶	2013/1/7	10 ⁵	10 ⁶
2009/5/19	10 ⁵	10 ⁵	2011/4/20	10 ⁶	10 ⁶	2013/1/22	10 ⁴	10 ⁵
2009/6/2	≦10 ³	10 ⁴	2011/5/9	10 ⁶	10 ⁵	2013/2/5	10 ⁴	10 ⁵
2009/6/16	≦10 ³	10 ⁴	2011/5/23	10 ⁵	10 ⁵	2013/3/5	10 ⁴	10 ⁴
2009/6/30	≦10 ³	≧10 ³	2011/6/6	10 ⁵	10 ⁶	2013/3/29	10 ⁶	10 ⁶
2009/7/14	10 ⁵	10 ⁴	2011/6/22	10 ⁵	10 ⁵	2013/4/8	10 ⁶	10 ⁶
2009/7/28	≦10 ³	10 ⁴	2011/7/4	10 ⁴	10 ⁵	2013/5/7	10 ⁶	10 ⁶
2009/8/11	≦10 ³	≧10 ³	2011/7/20	10 ⁵	10 ⁵	2013/6/4	10 ⁵	10 ⁶
2009/8/25	≦10 ³	≧10 ³	2011/8/9	10 ⁴	≦10 ³	2013/7/2	10 ⁴	10 ⁵
2009/9/8	≦10 ³	10 ⁴	2011/8/23	10 ⁴	10 ⁴	2013/7/30	≦10 ³	10 ⁶
2009/10/13	10 ⁴	10 ⁴	2011/9/6	≦10 ³	≦10 ³	2013/9/10	10 ⁵	10 ⁶
2009/10/27	10 ⁴	10 ⁴	2011/9/21	≦10 ³	≦10 ³	2013/10/8	10 ⁵	10 ⁶
2009/11/10	10 ⁴	10 ⁵	2011/10/11	≦10 ³	≦10 ³	2013/12/10	10 ⁴	10 ⁶
2009/11/24	10 ⁴	10 ⁵	2011/10/25	≦10 ³	≦10 ³	2014/1/7	10 ⁵	10 ⁶
2009/12/8	10 ⁴	10 ⁴	2011/11/7	≦10 ³	≦10 ³	2014/2/18	10 ⁵	10 ⁷
2009/12/22	10 ⁴	10 ⁴	2011/11/21	≦10 ³	≦10 ³	2014/3/4	10 ⁶	10 ⁶
2010/1/19	10 ⁵	10 ⁶	2011/12/6	≦10 ³	≦10 ³	2014/4/15	10 ⁶	10 ⁶
2010/2/2	10 ⁵	10 ⁶	2011/12/19	≦10 ³	10 ⁴	2014/5/14	10 ⁶	10 ⁶
2010/2/24	10 ⁵	10 ⁶	2012/1/11	≦10 ³	≧10 ³	2014/6/3	10 ⁵	10 ⁶
2010/3/9	10 ⁶	10 ⁶	2012/1/23	≦10 ³	≦10 ³	2014/7/1	10 ⁵	10 ⁵
2010/5/11	10 ⁵	10 ⁶	2012/2/7	≦10 ³	≦10 ³	2014/8/5	10 ⁴	10 ⁵
2010/5/25	10 ⁵	10 ⁶	2012/2/20	≦10 ³	10 ⁴	2014/9/2	10 ⁵	10 ⁴
2010/6/8	10 ⁵	10 ⁶	2012/3/7	≦10 ³	10 ⁴	2014/10/8	10 ⁵	10 ⁴
2010/6/22	10 ⁴	10 ⁵	2012/3/21	≦10 ³	≦10 ³	2014/11/11	10 ⁵	10 ⁶
2010/7/6	10 ⁴	10 ⁵	2012/4/10	≦10 ³	10 ⁴	2014/12/9	10 ⁵	10 ⁶
2010/7/21	≦10 ³	10 ⁴	2012/4/23	10 ⁴	10 ⁴	2015/1/6	10 ⁵	10 ⁶
2010/8/10	≦10 ³	10 ⁴	2012/5/8	10 ⁴	≦10 ³	2015/2/3	10 ⁵	10 ⁶
2010/8/24	10 ⁴	10 ⁵	2012/5/22	10 ⁴	10 ⁴	2015/3/10	10 ⁵	10 ⁷
2010/9/7	10 ⁴	10 ⁶	2012/6/5	≦10 ³	10 ⁴			
2010/9/22	10 ⁵	10 ⁵	2012/6/19	10 ⁴	10 ⁴			
2010/10/5	10 ⁴	10 ⁵	2012/7/10	10 ⁴	10 ⁴			
2010/10/20	≦10 ³	10 ⁶	2012/7/23	≦10 ³	10 ⁴			
2010/11/10	10 ⁴	10 ⁶	2012/8/6	10 ⁴	10 ⁵			
2010/11/22	10 ⁵	10 ⁶	2012/8/20	10 ⁵	≦10 ³			
2010/12/7	10 ⁵	10 ⁶	2012/9/10	≦10 ³	≦10 ³			
2010/12/21	10 ⁵	10 ⁶	2012/9/25	10 ⁴	≦10 ³			

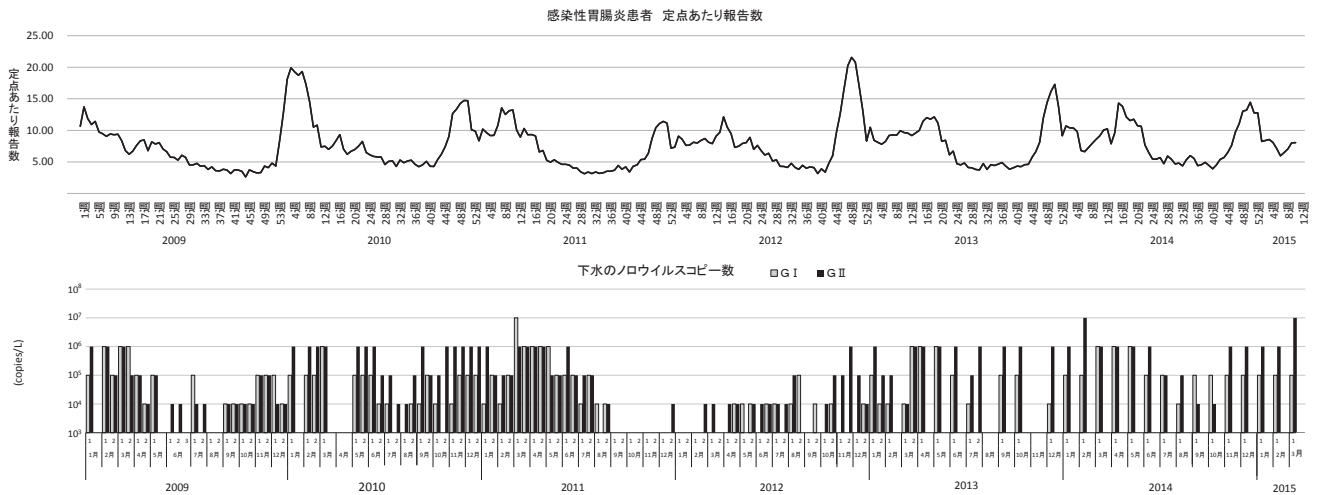


図1 感染性胃腸炎患者報告数と下水のノロウイルスコピー数

察される。

胃腸炎患者から検出される頻度が多いG IIは⁷⁾、G Iに比べて患者ふん便中へ100倍程度多く排出されることが報告されている⁸⁾。しかし今回の調査結果では、G IIの検出頻度がG Iに比べて10%程度高く、かつ2倍程度高濃度となったものの、それほど大きな差異はなく、患者ふん便を検査対象とした場合と、患者だけでなく軽症者や不顕性感染者から排せつされたウイルスが含まれている下水を検査対象とした場合では、G IとG IIの検出割合は異なることがわかった。

感染性胃腸炎患者の報告数が増加する時期には、流入水中のノロウイルス遺伝子も増加傾向を示した一方で、報告数が減少した時期であっても、流行期に匹敵する量のウイルスが検出されている。これは、ノロウイルスによる胃腸炎患者は、症状が治まった後も3週間から1ヶ月以上にわたってノロウイルスを排出する⁹⁾ことが一因となった可能性がある。ノロウイルスによる胃腸炎が秋から春にかけて流行する理由は明らかにされていないが、今回の調査結果から、流行期以外の時期にも、ノロウイルスを排せつしているが発生動向調査では把握されていないヒトが多数存在していることが示唆された。ヒトは、ノロウイルスを10から100個程度体内に取り入れることで感染するとされており⁷⁾、下水中には一年を通して 10^4 コピー以上/L(1mL中に10コピー以上)のノロウイルス遺伝子が流入していることから、ヒトのふん便中にも季節を問わず感染成立に十分な量のウイルスが排出されている可能性がある。ノロウイルスの感染予防

にあたっては、このことを念頭に置き、流行期以外の時期であっても手洗いや消毒等の対策が必要である。

文 献

- 1) 厚生労働省：感染症発生動向調査事業実施要綱，2014
- 2) 伊藤 雅，岩切 章，内野清子，小澤広規，北川和寛：＜速報＞平成25年度感染症流行予測調査事業ポリオ環境水調査期間中(2013年4～12月)に検出されたエンテロウイルスについて，病原微生物検出情報，Vol.35，275-276，2014
- 3) 下水道におけるウイルス対策に関する調査委員会：下水道におけるウイルス対策に関する調査委員会報告書，8，2010
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 厚生労働省健康局結核感染症課：感染症流行予測調査実施要領，5-7，2014
- 7) 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会：ノロウイルス食中毒対策について(提言)，平成19

年10月12日, 別添, 2007

- 8) Chan M. C. W., J. J. Y. Sung, R. K. Y. Lam, P. K. S. Chan, N. L. S. Lee, R. W. M. Lai, W. K. Leung: Fecal viral load and norovirus-associated gastroenteritis, *Emerging Infectious Disease journal*, Vol. 12, 1278-1280, 2006
- 9) 田中智之, 三好龍也, 内野清子, 吉田永祥: 感染後のノロウイルス排出期間および排出コピー数, *病原微生物検出情報*, Vol.28, 286-288, 2007

