

流入下水中の水中病原ウイルスの挙動

Behaviour of water pathogenic viruses in sewage water

菅原 直子*¹ 小泉 光 佐々木 美江 植木 洋
渡邊 節 沖村 容子*²

Naoko SUGAWARA, Hikari KOIZUMI, Mie SASAKI, Yo UEKI
Setsu WATANABE, Yoko OKIMURA

感染症の流行状況を早期察知を目的に、流入下水中の病原ウイルスの挙動の把握が注目されている。そこで今回、流入下水を用いて、継続的に各種病原ウイルス遺伝子の検出を試みた。胃腸炎起因ウイルスであるサボウイルスおよびノロウイルス遺伝子はリアルタイムPCR法、A型肝炎およびE型肝炎ウイルスは、RT-PCR法により検出を行った。ノロウイルス・サボウイルスは全ての期間で検出された。特にノロウイルス流行期には、感染症発生动向調査の胃腸炎患者報告数と流入下水中のウイルス遺伝子濃度が一致した。さらに下水中のノロウイルス遺伝子濃度は患者報告数よりも早期に増加が認められ、流行の早期探知の可能性が示唆された。一方、E型肝炎ウイルスは調査期間中の限られた時期の3検体から検出され、処理区内での散発的発生が示唆された。以上のことから、流入下水中のウイルス遺伝子の継続的な監視により、詳細な感染症流行状況が把握可能であると考えられた。

キーワード：流入下水；感染症発生动向調査；感染性胃腸炎

key words : sewage water ; NESID ; infectious gastroenteritis

1 はじめに

現在行われている感染症流行状況の把握と感染拡大防止のための注意喚起等は、感染症発生动向調査¹⁾(発生动向調査)の定点医療機関(定点)からの患者報告数が根拠となっている。しかし、患者報告数は、発症患者の受診数を元に集計を行うため、注意報・警報等、注意喚起の時点で、すでに流行が拡大していることも少なくない。また、感染性胃腸炎等の疾患は、小児科定点からの患者数報告のみで、成人での流行状況は把握されていない。

一方、下水道処理施設へ流入する流入下水中には、ヒトから排泄された病原微生物が直接流れ込むことから、継続的な監視により、感染症流行の早期探知と潜在的な病原微生物の挙動把握も可能となるとの知見がある。²⁾

そこで、流入下水中の水中病原ウイルスの挙動把握を目的として、胃腸炎起因ウイルスであるノロウイルス(NoV)とサボウイルス(SaV)について、real-time PCR法を用いて定量的に検出し、季節的なウイルス遺伝子の消長を把握した。さらに、下水中のNoV遺伝子濃度と感染性胃腸炎流行期の患者数の推移を比較した。また、近年、再興感染症として問題とされている、A型(HAV)およびE型肝炎ウイルス(HEV)遺伝子の検出を行った。

2 材料および方法

2.1 材料

県内の都市部に所在する下水処理場に流入する流入下水を平成28年7月から平成29年1月まで毎週1回採水し、計30検体を試料とした。

2.2 方法

1) 流入下水の濃縮

流入下水を混和後に25mLまたは50mLを測り取りポリエチレングリコールおよびNaClを終濃度がそれぞれ0.08g/mL、0.021g/mLとなるように加えた。4℃で1晩攪拌した後、10,000rpmで20分間冷却遠心した。上清をアスピレーターで取り除き、沈渣を1.0mLから1.5mLの滅菌蒸留水で懸濁させ下水濃縮液とした。

2) ウイルスRNAの抽出と各ウイルス遺伝子の検出

下水濃縮液140μLからQIAGEN viral RNA mini kitを用いてウイルスRNAを抽出し、逆転写反応を行った。その後、NoVはKageyamaら³⁾、SaVはOkaら⁴⁾の方法でreal-time PCR法により遺伝子の検出を行った。検量線は国立感染症研究所より分与された既知濃度の陽性コントロールを用いて作成し、試料中のコピー数を算出した。HAVおよびHEVの検出は国立感染症省研究所病原体検出マニュアルに基づき実施した。(図1)

*1 現 東部下水道事務所

*2 現 東北大学未来科学総合研究センター

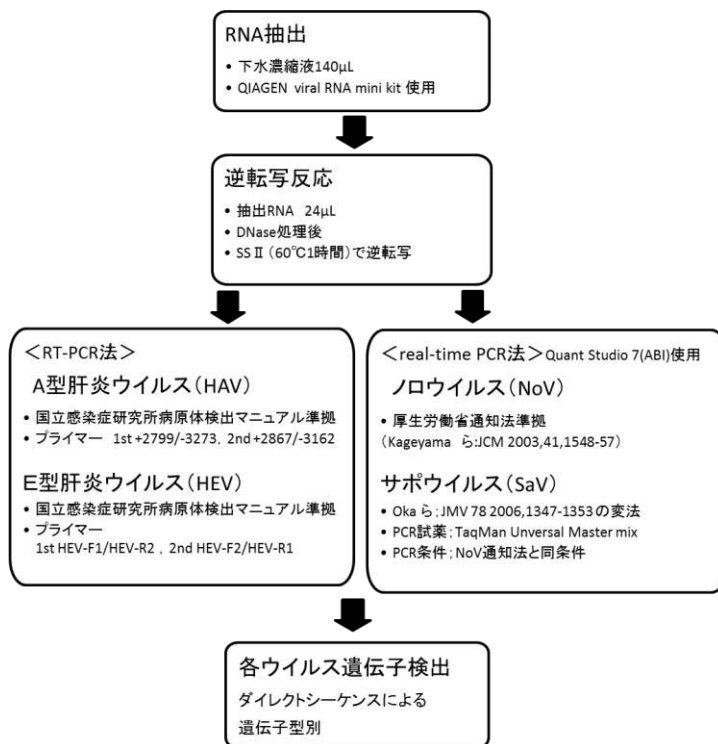


図1 各ウイルス遺伝子の検出方法

各ウイルス遺伝子が検出された場合は、それぞれのウイルスについてダイレクトシーケンスを行い、MEGA6でアライメント後、Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) またはNorovirus typing tool (<http://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>) を用いて遺伝子型を決定した。

3 結果

3.1 SaV の検出状況

調査期間中の全検体から検出された。ウイルス遺伝子数は $3.5 \times 10^3 \sim 4.4 \times 10^6$ copies/L の濃度で推移し、10月26日が最大であった(図2)。検出された遺伝子型は G I および G II であった。

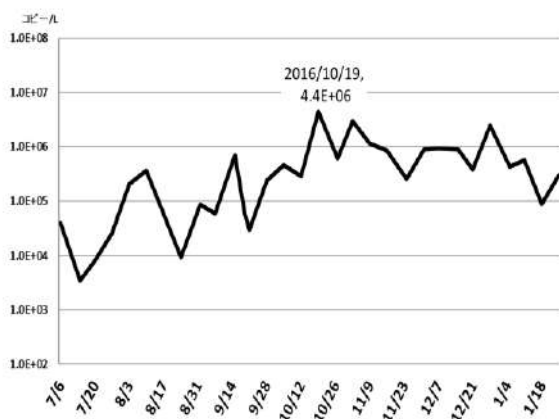


図2 SaV 遺伝子の濃度推移

3.2 NoV の検出状況

SaV 同様、全検体から検出された。G I 群は $1.0 \sim 2.6 \times 10^5$ copies/L, G II 群は $1.3 \times 10^4 \sim 5.2 \times 10^7$ copies/L で、G II 群が高い傾向を示した。県内の感染性胃腸炎の患者報告数が急増した11月からは、下水中の G II 群遺伝子濃度が急激に増加し、12月7日にピークを示した(図3)。

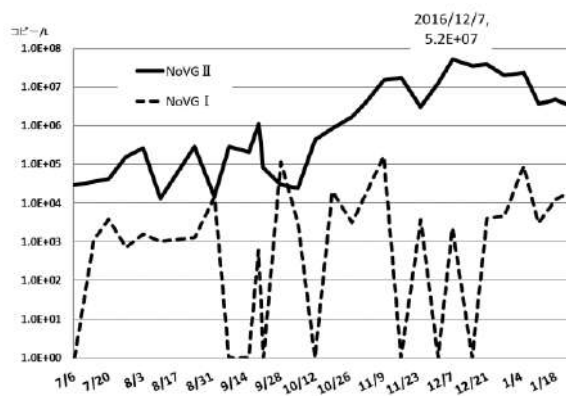


図3 NoV 遺伝子の濃度推移

また、検出された遺伝子型は、G I 群 G II 群ともに5種類の遺伝子型であった。G I 群は G I . 6 が12月後半から1月までの1ヶ月間継続的に検出されたが、それ以外の遺伝子型の検出は散発的であった。G II 群は10月までは多様な遺伝子型が検出されたが、流行期となる10月末～1月は G II . 2 のみが検出された(表1)。同時期の感染性胃腸炎集団事例の患者や生食用カキ由来 G II 群について、遺伝子系統解析により比較を行ったところ、ほぼ全てが G II . 2 に分類された。

表1 検出されたNoVの遺伝子型別 (■は検出された遺伝子型)

	7月	8月	9月	10月	11月	12月	H29.1月
G I.1	■		■		■	■	
G I.2							■
G I.3		■		■	■		
G I.4							
G I.6		■				■	■
G I.9					■		
	7月	8月	9月	10月	11月	12月	H29.1月
G II.2		■	■		■	■	■
G II.3			■				
G II.4		■					
G II.5							
G II.6	■		■	■			
G II.7							
G II.17	■	■	■	■			

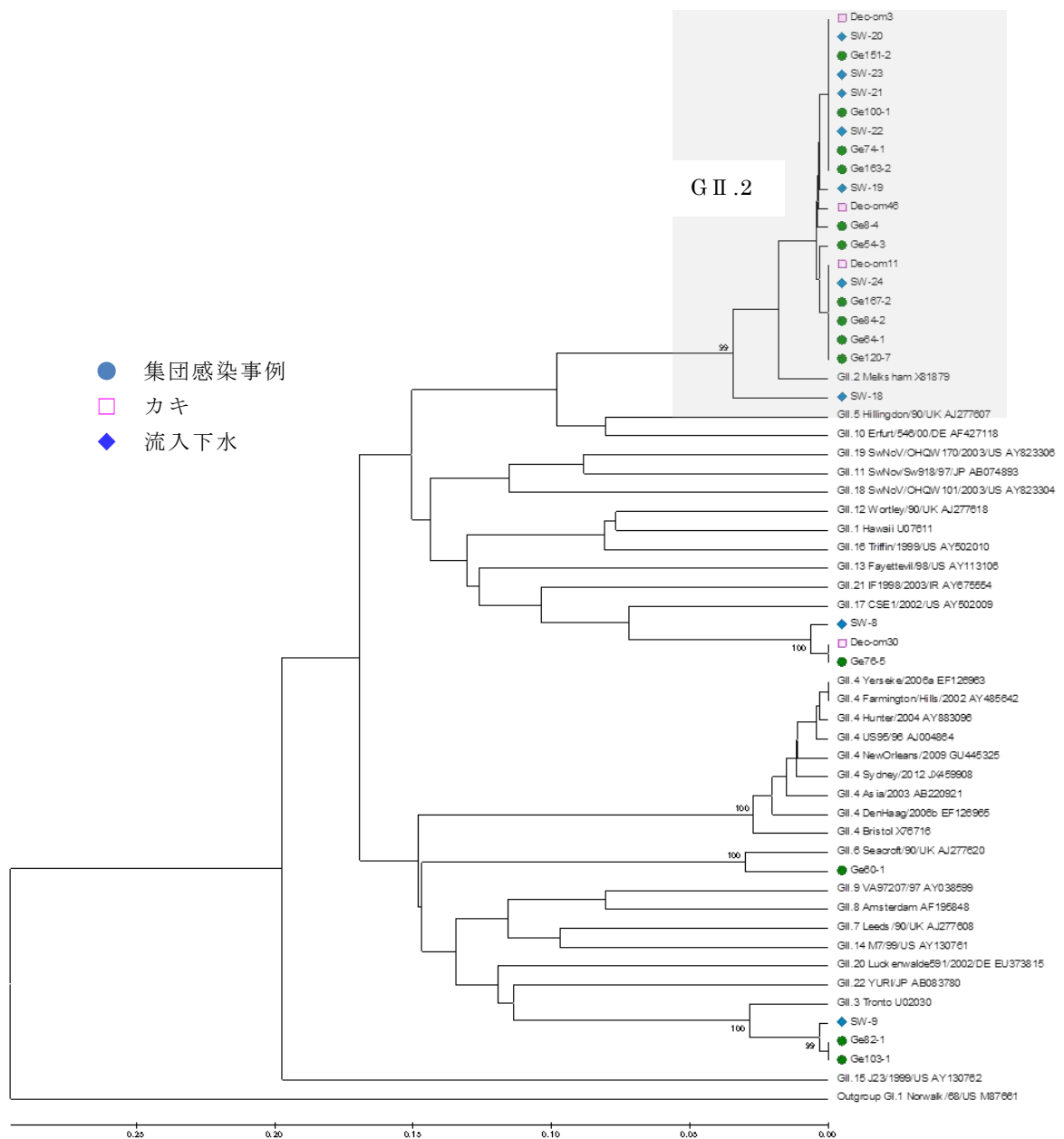


図4 流入下水・患者・生食用カキから検出されたNoVGIIの遺伝子解析結果

表 2 HAV・HEV 遺伝子の検出状況（－は検出せず）

採水日	7月			8月			9月			10月			11月			12月			H29.1月		
HAV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HEV	-	-	-	-	-	-	3型	-	3型	-	3型	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.3 HAV および HEV の検出状況

HAV 遺伝子は検出されなかった。一方、HEV 遺伝子は、8月24日、9月7日、9月21日に採水した3検体から検出され、遺伝子型はいずれも3型であった（表2）。

4 考察

流入下水中より水中病原ウイルスである SaV, NoV 遺伝子の定量的な検出と HAV および HEV 遺伝子の検出を試みた。調査期間中、集団感染事例や発生動向調査の胃腸炎患者からの SaV の検出は1例のみであったが、下水中からは継続的にウイルス遺伝子が検出され、10月下旬には遺伝子濃度の上昇も確認された。このことは、下水処理区域内での散発的発生や不顕性感染など、潜在的な SaV 感染者が存在したためと考えられた。

また、NoV 遺伝子は SaV と同様に調査期間中全ての検体から検出され、SaV に比較し高い濃度で推移した。このことは、SaV 同様に NoV 不顕性患者も通年発生していることを示唆するものと思われた。

また、GI 群および GII 群の推移を比較すると、GI 群と比べ GII 群の濃度が高い傾向が認められ、GII 群感染者の存在割合が高いことが推察された。

特に、感染性胃腸炎の流行期である、10月下旬からは GII 群遺伝子濃度が上昇し、12月初旬に最大値を示した。同時期に、県内では NoV による感染性胃腸炎の集団事例が多発し、発生動向調査の定点患者報告数も急増した。患者および下水共に検出された遺伝子型は GII.2 であり、流入下水の NoV 濃度が流域での感染性胃腸炎流行状況を反映していると考えられた。そこで、患者数の推移と流入下水中の GII 群遺伝子濃度の推移を比較すると、流入下水中の遺伝子濃度の上昇がより早期に確認されることが明らかとなった（図5-①）。また、1月以降患者報告数は減少したにもかかわらず、流入下水中のウイルス遺伝子濃度は高値のまま推移し（図5-②）、このことは、感染後のウイルス排出や定点で把握できない感染者の影響が考えられた。

一方、HAV および HEV ウイルス遺伝子は、HAV は検出されなかったものの、HEV は8月末～9月の限られた期間の3検体より検出され、この時期に散発的な患者の発生があったことが示唆された。

以上のことから、流入下水中の水中病原ウイルス遺伝子の継続的な監視は、潜在的な感染者や希少感染症の探知だけではなく、感染症の流行の早期探知や、流行状況の把握に利用可能であると考えられた。

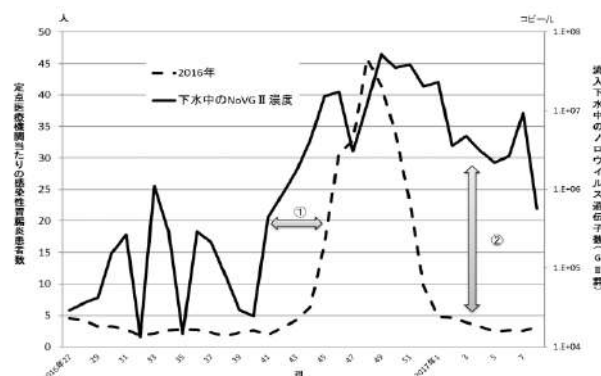


図 5 感染性胃腸炎の定点当たり報告数と流入下水中の NoVG II 群濃度推移

<謝辞>

本研究は、厚生労働科学研究費補助金・食品の安全確保推進研究事業「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」の一環として実施した。研究代表者、国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部、野田衛室長に感謝する。

参考文献

- 1) 感染症発生動向調査週報(IDWR):国立感染症研究所 <http://www.niid.go.jp/niid/ja/idwr.html>
- 2) Shinobu Kazama, Takayuki M, Yoshifumi MM, Yosimitsu K, Kentaro T, Takafumi M, Xiaofang L, Daisuke N, Takashi T, Mayuko S, Hitoshi O, Tatsuo O. Environmental Surveillance of Norovirus Genogroups I and II for Sensitive Detection of Epidemic Variants. Appl. Environ. Microbiol. vol. 8. e03406-16. (2017)
- 3) Kageyama, M., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Takeda, N. And Katayama, K. 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)

- 4) Tomohiro Oka, Kazuhiko K, Grant S.H, Tsutomu K, Satoko O, Fang-Tzy W, Peter A.W,

Naokazu T. Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* October vol. 78, 1347-1353 (2006)