

福井県内の下水におけるノロウイルスの消長

東方美保・中村雅子・川畑光政・松本和男*1・浅田恒夫

Survey of Norovirus in Wastewater in Fukui Prefecture

Miho TOHO, Masako NAKAMURA, Mitsumasa KAWABATA, Kazuo MATSUMOTO*1, Tsuneo ASADA

1. はじめに

嘔吐・下痢を主症状とする急性胃腸炎の主要病原体であるノロウイルス（以下NV）は、感染者の腸内で増殖し糞便中に排出され、下水や河川水に流れ込むと考えられる。したがって、ヒトが排出したウイルスによる汚染度が高いと予想される下水を経時的に採取し汚染状況のモニタリングを行うことで、より広い範囲におけるヒトの感染実態を把握することができる可能性がある^{1), 2)}。

そこで、福井県における下水のNV汚染状況の調査として、nested PCR法もしくはリアルタイムPCR法によるNV遺伝子検出検査を行ったので、その結果を報告する。

2. 方法

2. 1 検査材料

坂井地区全体の下水が流入するA地点（九頭竜川浄化センター：処理対象人口約12万人）、坂井地区北部の下水が流入するB地点（竹田川ポンプ場：同約4万人）、福井市北部・西部・南部の下水が流入するC地点（日野川浄化センター：同約14万人）、福井市東部の下水が流入するD地点（境浄化センター：同約6万人）の4地点で、流入する下水を月に1～2回、採取した。採取年度は基本的に4月～翌年3月までとしたが、平成11年度は9月～翌年3月、平成12年度は8月～翌年3月の期間に限った。なお、A地点およびB地点では平成11～19年度、C地点およびD地点では平成15年～19年度にわたって採取した。

2. 2 検査方法

ウイルス性下痢症診断マニュアル^{3), 4)}および厚生労働省通知^{5), 6)}に準じて検査した。

採取した下水は、PEG沈殿法により濃縮（平成11～16年度は400 mL → 4 mLの100倍濃縮、平成17～19年度は40 mL → 1 mLの40倍濃縮）を行った。PEG沈殿法での濃縮手順としては、PEG6000（最終濃度8%）とNaCl（最終濃度0.4M）を加え、振とうして完全に溶解させた後4℃で一晩放置し、6000 rpmで40分遠心した沈殿を蒸留水で懸濁して下水濃縮サンプルとした。

この下水濃縮サンプルから、SV Total RNA isolation system (Promega) または QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) によりRNAを抽出した。逆転写反応につ

いては、基本的にrandom primerを用いてcDNAを合成したが、平成11～12年度は特異的プライマー（各nested PCR系における1st PCRでのアンチセンスプライマー）を逆転写用プライマーとして用いた。

nested PCR法としては、81・82系（1st PCRプライマーに35' /36、2nd PCRプライマーにNV81/NV82/SM82を用いる）、Yuri系（1st PCRプライマーにMR3/MR4、2nd PCRプライマーにYuri 22 F/Yuri 22 Rを用いる）、Capsid G1系（1st PCRプライマーにCOG1F/G1-SKR、2nd PCRプライマーにG1-SKF/G1-SKRを用いる）、Capsid G2系（1st PCRプライマーにCOG2F/G2-SKR、2nd PCRプライマーにG2-SKF/G2-SKRを用いる）の4系統で増幅を行い、アガロースゲルにおける電気泳動で予想される大きさの遺伝子増幅産物が確認された場合、NV陽性とした。

リアルタイムPCR法でのNV遺伝子定量検査は、Genogroup I（以下GI）・Genogroup II（以下GII）の遺伝子群別に行い、コピー数を測定した。測定値で10copies/反応以上の場合をNV陽性とした。最終的な定量値は、濃縮率等を考慮し当初に採取した下水1 mLあたりの遺伝子量（copies/mL）に換算して示した。得られたNV遺伝子量変動パターンを、感染症発生動向調査における感染性胃腸炎患者報告数と比較した。

3. 結果と考察

下水についての採取年度および採取地点別によるNV遺伝子検出検査結果は、表1のとおりであるが、検査方法の違いや検出系の特徴などの影響を考慮しながら、陽性率を評価した。

nested PCR法における4検出系の陽性率を平成13～15年度と比較すると、Capsid G2系（平均97.7%）> Capsid G1系（89.0%）> 81・82系（81.9%）> Yuri系（75.2%）となった。Capsid G2系はGIIを、Capsid G1系はGIをそれぞれ特異的に検出するように設計された系であり、検出可能なウイルスの種類も幅広い。それに対しYuri系はGIIを、81・82系はGIおよびGIIを検出対象としているが、検出可能なウイルスの種類が限られるとされており、今回のデータでも同様の傾向を示した。

平成11～12年度の81・82系およびYuri系での陽性率は、平成13～15年度の81・82系およびYuri系と比較して低い。単純に下水の汚染度が低かった場合や、検出しにくいウイルスでの汚染だった場合などのほか、平成11～12年度の検査系で逆転写用プライマーに特異的プライマーを用いていたことが、random primerを用いた検査系（平成13年度以降）よりも検出感度が劣る方向

*1) 元福井県衛生環境研究センター

表1. 下水の採取年度・採取地点別のNV遺伝子検出検査陽性数および陽性率

年度	採取地点	採取検体数	nested PCR 陽性数				リアルタイム PCR 陽性数		nested PCR 陽性率(%)				リアルタイム PCR 陽性率(%)		
			81-82系	Yuni系	Capsid G1系	Capsid G2系	Genogroup I系	Genogroup II系	81-82系	Yuni系	Capsid G1系	Capsid G2系	Genogroup I系	Genogroup II系	
H11	A	13	5	8	NT	NT	NT	NT	38.5	61.5	NT	NT	NT	NT	
	B	4	0	3	NT	NT	NT	NT	0.0	75.0	NT	NT	NT	NT	
H12	A	16	9	11	NT	NT	NT	NT	56.3	68.8	NT	NT	NT	NT	
	B	8	3	8	NT	NT	NT	NT	37.5	100	NT	NT	NT	NT	
H13	A	21	20	17	21	21	NT	NT	95.2	81.0	100	100	NT	NT	
	B	10	9	9	10	10	NT	NT	90.0	90.0	100	100	NT	NT	
H14	A	22	19	19	20	22	NT	NT	86.4	86.4	90.9	100	NT	NT	
	B	11	8	6	7	9	NT	NT	72.7	54.5	63.6	81.8	NT	NT	
H15	A	24	19	17	21	24	12	13	79.2	70.8	87.5	100	50.0	54.2	
	B	12	9	7	11	12	6	8	75.0	58.3	91.7	100	50.0	66.7	
	C	23	18	20	21	23	9	17	78.3	87.0	91.3	100	39.1	73.9	
	D	23	18	17	20	23	4	19	78.3	73.9	87.0	100	17.4	82.6	
H16	A	23	NT	NT	19	20	9	20	NT	NT	82.6	87.0	39.1	87.0	
	B	12	NT	NT	9	11	6	9	NT	NT	75.0	91.7	50.0	75.0	
	C	22	NT	NT	15	18	8	14	NT	NT	68.2	81.8	36.4	63.6	
	D	22	NT	NT	14	17	6	16	NT	NT	63.6	77.3	27.3	72.7	
H17	A	20	NT	NT	18	16	3	14	NT	NT	90.0	80.0	15.0	70.0	
	B	10	NT	NT	7	9	2	7	NT	NT	70.0	90.0	20.0	70.0	
	C	19	NT	NT	9	17	3	14	NT	NT	47.4	89.5	15.8	73.7	
	D	10	NT	NT	4	9	1	4	NT	NT	40.0	90.0	10.0	40.0	
H18	A	23	NT	NT	NT	NT	7	21	NT	NT	NT	NT	30.4	91.3	
	B	11	NT	NT	NT	NT	3	6	NT	NT	NT	NT	27.3	54.5	
	C	24	NT	NT	NT	NT	7	21	NT	NT	NT	NT	29.2	87.5	
	D	12	NT	NT	NT	NT	2	4	NT	NT	NT	NT	16.7	33.3	
H19	A	22	NT	NT	NT	NT	6	11	NT	NT	NT	NT	27.3	50.0	
	B	11	NT	NT	NT	NT	1	5	NT	NT	NT	NT	9.1	45.5	
	C	22	NT	NT	NT	NT	3	11	NT	NT	NT	NT	13.6	50.0	
	D	11	NT	NT	NT	NT	2	5	NT	NT	NT	NT	18.2	45.5	
陽性数計			137	142	226	261	100	239							
検査数計			187	187	284	284	356	356	73.3	75.9	79.6	91.9	28.1	67.1	

NT:検査せず

に影響した場合も考えられる。

なお平成11年度の検査は、厚生科学全国ウイルス性食中毒研究班での協力研究として行っており、他に北海道、秋田県、静岡県、愛媛県、沖縄県の各地方衛生研究所においても同様に流入下水を検査している⁷⁾。他の5つの地方衛生研究所におけるNV遺伝子検出率は41.7~100%で、当センターでの結果も含め、日本全国の広い範囲にわたる下水汚染が確認できた。

Capsid G1系とCapsid G2系を平成13~17年度と比較すると、Capsid G2系が77.3~100%(平均91.9%)と高いレベルであったのに対し、Capsid G1系は40.0~100%(79.6%)とやや低かった。表2・3に示したとおり、

どちらも7~11月に陰性となりやすい傾向がみられた。

また、リアルタイムPCR法において10copies/反応以上の測定値を示した検体を陽性とした場合の陽性率は、G I系 9.1~50.0%(平均28.1%)、G II系で33.3~91.3(67.1%)であり、nested PCR法による結果と比較するとかなり低かった。平成15~17年度の期間に限れば、同一のcDNAをテンプレートとしているのでnested PCR法でのCapsid G1系とリアルタイムPCR法でのG I系、nested PCR法でのCapsid G2系とリアルタイムPCR法でのG II系の陽性率の差は、量的な検出感度の違い⁸⁾を反映した結果と推定される。

図1に、平成15~19年度に採取した下水についてのリアルタイムPCR法によるNV遺伝子定量値を、感染症発生動向調査における感染性胃腸炎患者報告数の変動と共に示した。4地点で5年間を通し、ほぼ共通してみられた傾向は、以下のとおりであった。

遺伝子群による違いとして、胃腸炎患者から検出される割合が高いG IIが、G Iよりも高頻度かつ高濃度で検出された。G Iは検出頻度自体が少なく、検出された場合でも同時に検出されたG IIの10~100の1の定量値にとどまることが多かった。

NV遺伝子量はヒトでの流行期とされる秋季~春季を中心に高レベルの定量値(G IIで10の3~4乗のオーダー)を示した。一方、夏季においても低レベルでの定量値(G IIで10の1~2乗のオーダー)で検出される例がみられた。

また、NV遺伝子量の変動と、感染性胃腸炎患者報告数の変動にはかなりの相関性がみられた。患者報告数増減の時期は年度により前後するが、下水中のNV遺伝子量の変動も、感染性胃腸炎患者報告数より約半月~1ヶ月遅れで同様のずれを示した。感染者の便中へのNV排出は、症状が治まったのちも通常1~2週間程度続くために、このような遅れが生じるのかもしれない。

一方、年度によって異なる傾向も観察された。下水1mLあたりに換算したNV遺伝子定量値の分布は、図2のとおり、ほぼ同様の傾向を各地点で示した。G II/4に分類されるNVによる大流行が確認された平成18年度⁹⁾に、G IIのNV定量値が特に高値に偏った分布を示すなど、年度ごとで異なる分布傾向が見られた。しかし、

表2. 下水のnested PCR法によるノロウイルスG I遺伝子検査結果(平成13~17年度)

採取年月日	2001												2002											
	5/23	6/6	6/20	7/4	7/18	8/1	8/22	9/5	9/20	10/4	10/17	11/7	10/23	12/3	12/15	1/10	1/23	2/7	2/20	3/6	3/20			
採取地点 A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
採取地点 B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		

表3. 下水のnested PCR法によるノロウイルスG II遺伝子検査結果(平成13~17年度)

採取年月日	2001												2002											
	5/23	6/6	6/20	7/4	7/18	8/1	8/22	9/5	9/20	10/4	10/17	11/7	10/23	12/3	12/15	1/10	1/23	2/7	2/20	3/6	3/20			
採取地点 A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
採取地点 B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		

+ :ウイルス遺伝子が検出された
 - :ウイルス遺伝子が検出されなかった
 NT :検体採取なし

+ :ウイルス遺伝子が検出された
 - :ウイルス遺伝子が検出されなかった
 NT :検体採取なし

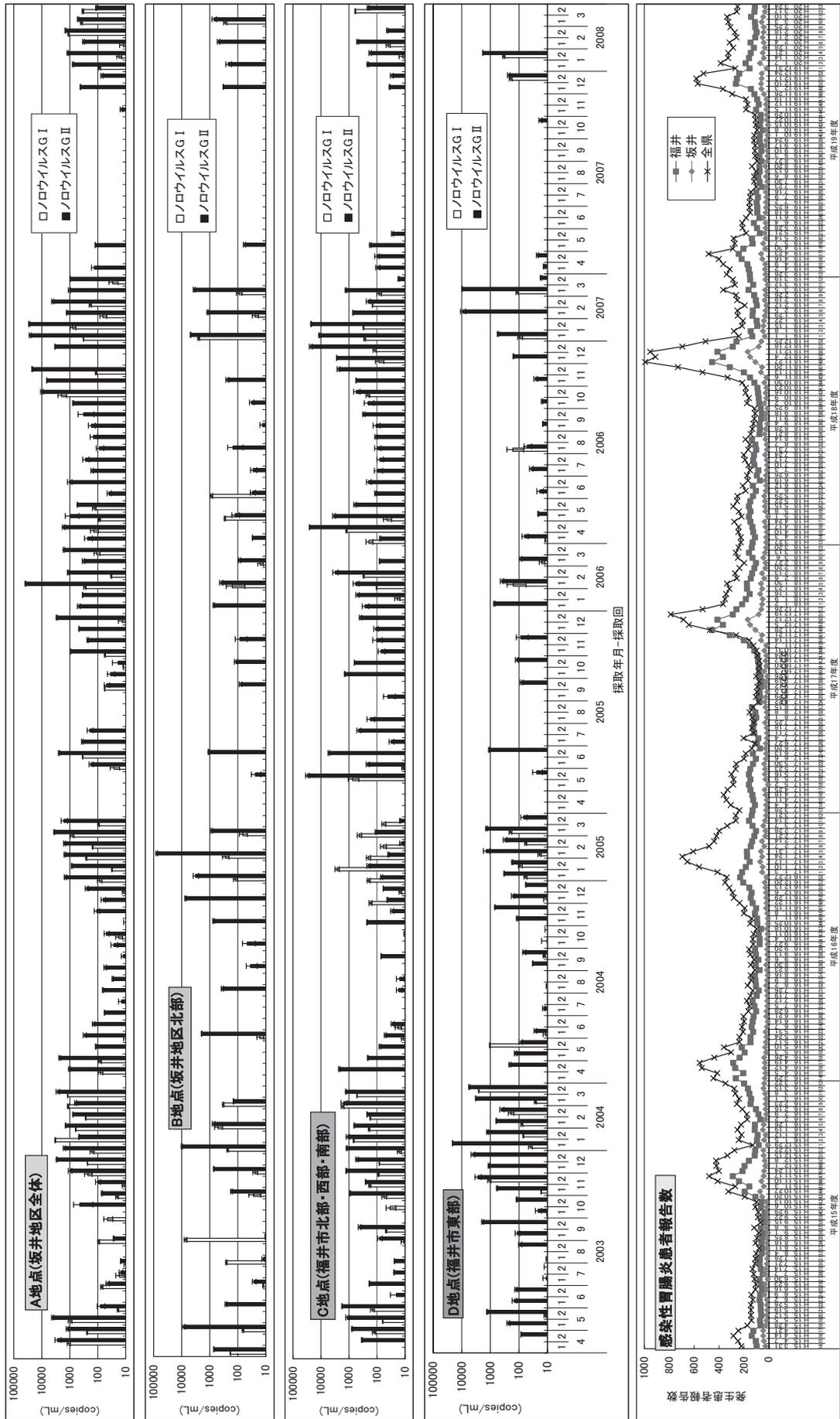


図1. 下水のリアルタイムPCR法によるノロウイルス定量検査結果および感染症発生動向調査における感染性胃腸炎患者報告数(平成15~19年度)

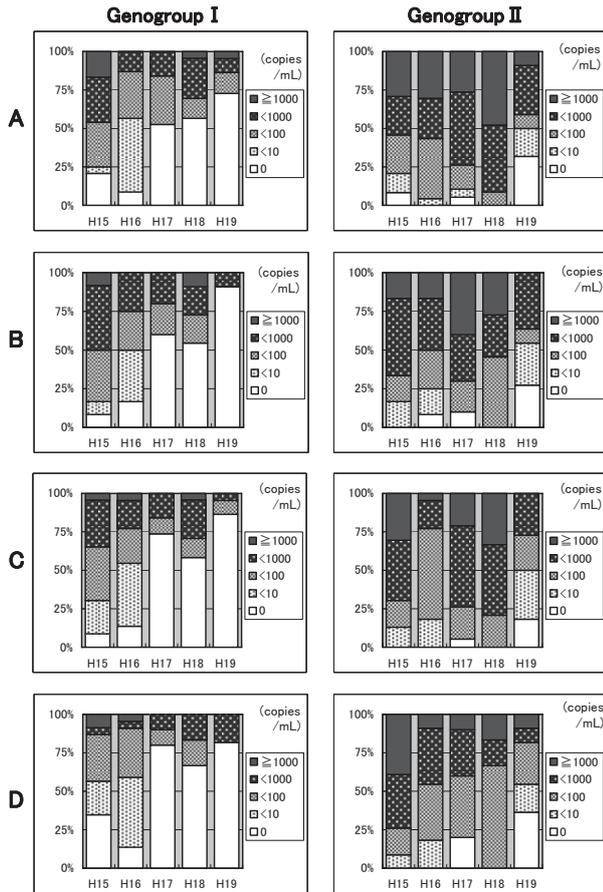


図2. 各地点での下水におけるNV遺伝子定量値の分布

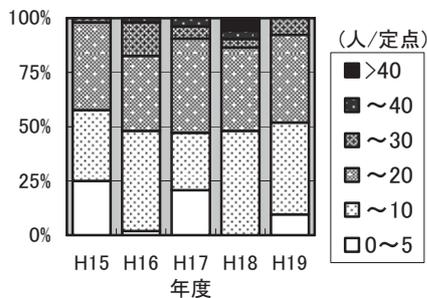


図3. 福井県における感染性胃腸炎患者定点あたり報告数の分布(感染症発生動向調査による週ごとの集計値)

感染性胃腸炎患者報告数の分布を同様にグラフ化した図3と比較すると、各年度で相関性の高い傾向を示した。なお、下水でのNV遺伝子定量値の分布傾向について、平成15~16年度分では(平成17~19年度分比べ)やや高いレベルに偏りがちな印象を受けるが、下水濃縮時の濃縮率の違い(100倍と40倍)による影響かもしれない。また時には、特定の採取地点・採取時期のみでの検出動向も見られた。平成16年度後半(12~3月)のC地点では、G IがG IIよりも高値で検出された。同時期には、G IのNVが検出された胃腸炎患者(複数)の発生をC地点に流入する下水処理地区に隣接した地域で確認しており、C地点の処理地区においても同様に、G IのNVが流行していた可能性も考えられた。

4. まとめ

平成11~19年度にわたり福井県内の4地点において、それぞれ流入する下水を採取し、nested PCR法もしくはリアルタイムPCR法によるNV遺伝子検出検査を行った。NV陽性率は、検出感度が高いnested PCR法で71.3~91.9%、10copies/反応以上の測定値を陽性としたリアルタイムPCR法ではG Iが28.1%、G IIが67.1%であった。nested PCR法での検査結果では、NV遺伝子が下水中にはほぼ1年中存在していると推定され、ヒトでの非流行期にやや遅れる7~11月の時期に陰性となりやすい傾向がみられた。リアルタイムPCR法で得られた下水中のNV遺伝子の量的変動パターンは、Genogroup別での検出傾向の違い(胃腸炎患者由来のNVにG IIが多いことなど)や感染性胃腸炎患者報告数の季節的増減などとの相関をより明確に確認することが可能であった。

謝辞

下水の提供・採取にご協力いただきました、九頭竜川浄化センター、日野川浄化センター、境浄化センターの各下水処理場関係者に深謝いたします。

なお、この研究のうち平成11年度に採取した下水についての研究は、平成11年度厚生科学特別研究事業「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」(厚生科学全国ウイルス性食中毒研究班)の協力研究として行った。

参考文献

- 1) 矢野一好：腸管系ウイルスによる水質汚染と食品汚染,水環境学会誌,29, 124-129(2006)
- 2) 金子光美他：水道の病原微生物対策,丸善株式会社(2006)
- 3) 国立感染症研究所ウイルス第二部他：ウイルス性下痢症診断マニュアル(第2版)(2000)
- 4) 国立感染症研究所ウイルス第二部他：ウイルス性下痢症診断マニュアル(第3版)(2003)
- 5) 厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課長通知：ノーウォーク様ウイルス(NLV)のRT-PCR法について,食監発第267号,平成13年11月16日
- 6) 厚生労働省医薬局食品安全部監視安全課長通知：ノロウイルスの検出法について,食安監発第1105001号,平成15年11月5日
- 7) 厚生科学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,平成11年度厚生科学特別研究事業報告書(1999)
- 8) 東方美保他：リアルタイムPCR法導入によるノロウイルス検査迅速化の検証,福井県衛生環境研究センター年報,3, 189-193(2005)
- 9) 東方美保他：平成14~18年度に福井県で検出されたノロウイルスの遺伝子解析,福井県衛生環境研究センター年報,5, 60-72(2007)