

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)

峯岸俊貴* 小川泰卓 篠原美千代 富岡恭子 鈴木典子 青沼えり
内田和江 倉園貴至 丸山信之** 古屋佑樹** 鈴木雅之**

Investigation of Enteric Virus in Influent Waste Water and Effluent Water
in Moto-Arakawa Water Cycle Center (April 2017 - March 2019)

Toshitaka Minegishi*, Yasutaka Ogawa, Michiyo Shinohara, Kyoko Tomioka, Noriko Suzuki,
Eri Aonuma, Kazue Uchida, Takayuki Kurazono, Nobuyuki Maruyama**, Yuuki Furuya**, Masayuki Suzuki**

背景・目的

腸管系ウイルス感染においては、多くの不顕性感染者が存在すること、長期にわたりウイルスを排出し続けることが知られている^{1,2)}。現在、感染症発生動向調査事業病原体サーベイランスで感染性胃腸炎の患者検体のウイルスを検索することで、県内に流行しているウイルスの把握に努めているが、ごく限られた検体数が採取されるにとどまり実態を把握しているとは言えない状態となっている。

一方、下水処理に関しては、ヒトの体内で増殖・排泄されたウイルスが下水道に大量に流入することになるため、処理場におけるウイルスの除去が重要な課題となっている。下水処理施設内外で再利用される場合もあり、感染リスクの低減の観点からも、下水処理施設におけるウイルスの動態や除去能力は重要である。平成20年11月に「下水道におけるウイルス対策に関する調査委員会」が設置され、下水道におけるノロウイルスの挙動等についての調査、検討が行われ、平成22年3月に報告書³⁾が出されたが、その中でも、未解決な部分が多く残されていることから、今後も継続した調査あるいは研究が必要だと述べられている。

下水中のノロウイルスについては、いくつかの地方衛生研究所でも調査がなされているが、その立地条件や処理方法により、ウイルスの濃度や消長に違いがみられることがある³⁻⁵⁾。しかしながら、埼玉県においては下水における腸管系ウイルスについての調査を実施したことがないため、その実態を把握していない。

本研究では、下水中の腸管系ウイルスの動態実態を把握し、県民における腸管系ウイルスの流行状況把握のための下水中のウイルス検査の有用性を探るとともに、将来の下水処理施設更新のための資料を得ることを目的とする。

なお、本研究は埼玉県衛生研究所倫理審査委員会の承認を得て行った。

材料及び方法

1 試料の濃縮法の検討

元荒川水循環センター流入下水を試料として、我々が過去に報告した非晶性リン酸カルシウム微粒子 (ACP) を用いたウイルス濃縮法 (ACP法)⁶⁾及びKatayamaらが報告した陰電荷膜法⁷⁾について検討した。濃縮した試料から核酸を抽出し、逆転写反応をした後、定量リアルタイムPCRによりノロウイルス (NV) GI及びGIIの遺伝子コピー数を求め比較した。

(1) ACP法

試料500mlを3000rpm、4℃で10分間遠心後、1µmグラスファイバーフィルターを用いて加圧濾過をした。濾液に10%となるようACPを添加し、室温で1時間攪拌した。3000rpm、4℃で10分間遠心後、上清を除去した。

ACPの溶解には二つの方法を試した。一つはQIAamp Viral RNA mini Kit(QIAGEN)添付のBufferAVL 0.25ml、TRIzol-LS(Invitrogen) 0.75mlを添加し混和した。その後、クロロホルム0.2mlを添加し混和後、水層を計りとした。水層の0.8倍量のエタノールを加えた後、全量を核酸抽出に用いた。もう一方は、3.3Mクエン酸5mlを加えACPを溶解後、140µlを核酸抽出に用いた。

(2) 陰電荷膜法

試料300mlを3000rpm、4℃で30分間遠心後、2.5M塩化マグネシウム6mlを添加し3分間攪拌した。0.45µmの陰電荷膜3枚に、それぞれ100mlの試料を加圧濾過によりウイルスを吸着させた。その後、0.5M硫酸50mlで陰電荷膜を洗浄後、1M水酸化ナトリウム水溶液5mlで溶出し、溶出液は50mM硫酸75µl及び100×TE buffer(pH8.0)75µlで中和した。中和液をCentriprep YM-50(メルク)を用いた限外濾過により、約0.6mlまで濃縮後、140µlを核酸抽出に用いた。

* 現 本庄保健所

** 公益財団法人 埼玉県下水道公社荒川左岸北部支社

(3) 核酸抽出及び逆転写反応

QIAamp Viral RNA mini Kit(QIAGEN)を用いて, Carrier RNA を添加せずにウイルス核酸を抽出した. 続いて PrimeScript RT reagent kit(TAKARA BIO)を用いて逆転写反応を行い, cDNA を作製した. 核酸抽出及び逆転写反応は, それぞれの製品使用説明書に従った.

(4) 定量リアルタイム PCR

各濃縮法によるウイルス濃縮状況の比較をするため, 後述の3-(6)のとおり NVGI 及び NVGII の定量リアルタイム PCR により遺伝子コピー数を測定した.

2 回収率の測定

前項の試験の結果, NV 遺伝子コピー数の測定値が得られた方法について, 回収率を測定するため NVGII の添加回収試験を行った. 超純水 1L あたり 2.97×10^7 コピーの NVGII を添加した溶液を試料とし, 陰電荷膜法により試料を濃縮した. 添加回収試験では, より濃縮率を高めるために処理試料を 360ml, 陰電荷膜 1 枚あたりの加圧濾過量を 120ml に増量した. その他の手順は変更せず最終的にウイルス濃縮液約 0.6ml を得た. その後, 前項 1-(2)と同様に核酸抽出, 逆転写反応を行い cDNA を作製後, 次項(6)と同様に NVGII の定量リアルタイム PCR を行い, 回収率を測定した.

3 実態調査

(1) 調査期間

2017年8月から2018年8月

(2) 調査(採水)地点

調査地点を表1に, 調査地点略図を図1に示した. 元荒川水循環センター流入下水(A地点), 最初沈殿池出口(B地点), 最終沈殿池出口(C地点), 放流水(D地点), 元荒川河川水(大御堂橋付近)(E地点), 赤堀川河川水(五丁台橋付近)(F地点), 鴻巣中継ポンプ場(G地点), 桶川中継ポンプ場(H地点), 元荒川幹線下流(I地点), 吹上幹線(J地点), 元荒川幹線上流(K地点)の11地点について調査した. このうちA及びG~K地点は下水中の腸管ウイルスの実態調査のために, また, A~F地点は下水処理工程における腸管系ウイルス実態調査のために, 採水地点として設定した.

(3) 採水頻度

原則として毎月第2週にG~K地点, 第4週にB~F地点において採水した. A地点のみ第2週, 第4週の2回採水した.

(4) 試料の濃縮

濃縮法の検討の結果で採用した陰電荷膜法(前項2のとおり)により前処理を行った.

(5) 核酸抽出及び逆転写反応

QIAamp Viral RNA mini Kit(QIAGEN)を用いて, 3-(4)で得られたウイルス濃縮液 140μl を用いて, 1-(2)の方法で cDNA を作製した.

表1 調査地点

A	元荒川水循環センター 流入下水	D	放流水	G	鴻巣中継ポンプ場	J	吹上幹線
B	最初沈殿池出口	E	元荒川河川水	H	桶川中継ポンプ場	K	元荒川幹線上流
C	最終沈殿池出口	F	赤堀川河川水	I	元荒川幹線下流		

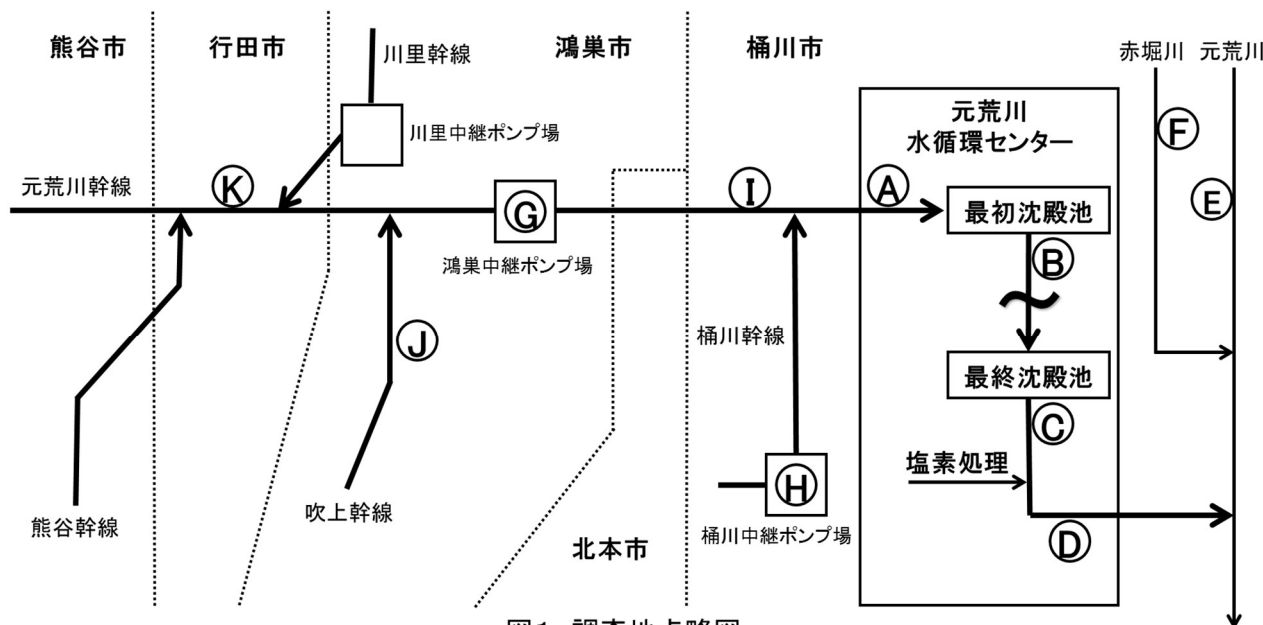


図1 調査地点略図

2 回収率の検討

NVGII を超純水 1L あたり 2.97×10^7 copy 加え、陰電化膜法添加回収実験を 4 回行った。回収量は $5.81 \times 10^5 \sim 6.49 \times 10^6$ コピー、回収率は 1.96~21.88% (平均 12.62%) であった。

3 実態調査

(1) 下水の実態調査

下水中の腸管ウイルスの動向を A 及び G~K 地点で調査した。

下水中の NVGI が定量できたのは、A 地点で 2017 年 11 月に 5.38×10^3 copy/L、H 地点で 2018 年 5 月に 5.70×10^3 copy/L 及び 8 月に 3.98×10^3 copy/L、J 地点で 2018 年 5 月に 3.86×10^3 copy/L だった。それ以外の測定地点では NVGI は検出されなかった。3 地点で散発的に検出され、季節性は見られなかった。

下水中の NVGII のウイルス量を図 2 に示した。A 地点では 2017 年 10 月から 2018 年 1 月まで、2018 年 5 月及び 2018 年 7 月に検出され、ウイルス量のピークは 2017 年 11 月下旬に 1.12×10^5 copy/L となった。他の 5 地点においても 12 月及び 1 月に、NVGII が検出され、この時期に NVGII が流行していたことが観察できた。また、2018 年 5 月には G 地点から、2018 年 7 月には I 地点及び K 地点から NVGII が検出され、5 月及び 7 月にごく限られた地域で NVGII が流行していたことが推察された。

下水中の RotaA は I 地点で 2017 年 11 月に 1.89×10^4 copy/L 検出された。それ以外の測定地点では RotaA は検出されなかった。

下水中の RotaC はすべての地点で検出されなかった。

下水中の SaV のウイルス量を図 3 に示した。年間を通じて SaV は検出されたが、そのウイルス量は 2017 年 11 月から 2018 年 1 月と 2018 年 4 月から 8 月の 2 峰性を示した。本研究の調査期間中の感染症発生動向調査では 2017 年 12 月、2018 年 1 月、6 月及び 8 月に各 1 検体ずつから SaV が検出されている¹²⁾。感染症発生動向調査では検出数が少なく、流行がなく散発的な検出ととらえられたが、下水からの検出結果を合わせて考えることにより、SaV の流行が捕捉できたものと考えられた。

下水中の Ast のウイルス量を図 4 に示した。2017 年 11 月から 2018 年 1 月まで及び 2018 年 4 月から 8 月までの期間に Ast が検出された。2018 年 8 月以外は 1 から 3 地点で Ast が検出され、ごく限られた地域でのみ Ast が流行していたが、2018 年 8 月には全ての地点から Ast が検出され、広い地域で Ast が流行したと考えられた。

下水中の Aichi のウイルス量を図 5 に示した。年間を通じて複数の地点で検出されており、季節性や流行の傾向はこの調査では判別できなかった。

(2) 下水処理工程の実態調査

A 地点でウイルスが検出されたものについて、下水処理の各段階 (B~F 地点) でのウイルス量を表 3 に示した。B

地点はほぼ流入下水と同程度のウイルス量が検出された。それが C 地点では、2017 年 11 月の SaV (4.53×10^3 copy/L)、2018 年 4 月の Aichi (7.35×10^3 copy/L) を除き、すべて検出限界以下となった。2017 年 11 月は A 地点において NVGI が唯一検出され、NVGII、SaV、Ast、Aichi も 1 年で最大のウイルス量かそれに近い量が検出された。処理施設に大量流入したウイルスは処理量を超えたと考えられた。2018 年 4 月は SaV、Ast、Aichi が検出され、その流入量は 2017 年 11 月と比較しておよそ 1/10 程度だった。流入量が少ないにも関わらず検出されたのは処理能力が低下する何らかの原因があった可能性や、瞬間的に大量のウイルスが流れ込んだ可能性などが考えられるが、その原因については不明であった。D 地点では調査期間を通してすべてのウイルスが検出限界以下となり、処理効果があったと考えられる。しかし、感染症発生動向調査によると、2017/2018 シーズンの埼玉県の感染性胃腸炎は前年の 2016/2017 シーズンの半数程度しか報告がなかった。そのため、腸管系ウイルスの大流行時にどの程度のウイルスが下水中に流れ込み、またどの程度下水処理が有効なのかデータを収集することができなかった。

また、2 か所の河川水 (E 地点、F 地点) ではすべてのウイルスが検出されず、河川水、下水処理水ともにウイルスが検出されなかったことから環境へのウイルス排出は確認されなかった。

毎年冬季に NV の患者が増加するが¹³⁾、下水中の NV も 12 月から 1 月にかけてウイルス量が増加した。一方、小児の感染性胃腸炎の主な原因である Rota はほとんど検出されず、通常のサーベイランスでは NV や Rota と比較して検出の少ない SaV が下水中から年間を通じて大量に検出された。また、下水処理によりこれらのウイルスは検出限界以下にまで減少させることができたが、調査期間内の感染性胃腸炎の流行はほとんどなく、より大量のウイルスが流入した場合、どの程度ウイルスが処理できるかは確認が必要であると考えられる。

4 系統樹解析

(1) NVGI

NVGI の系統樹を図 6 に示した。下水から検出された NVGI は 2018 年 1 月及び 2 月に 1 株ずつ型別できた。また、調査期間中に埼玉県で検出された NVGI は集団事例 3 事例があった。2018 年 3 月 31 日に採取された県内の集団事例で検出された NVGI.7 と近縁の株が下水で 2 か月近く前に検出された。また、NVGI.3 も下水と患者の両方から検出されたが、系統樹上かなり離れた位置となった。一方、患者から検出された NVGI.2 は下水からは検出されなかった。

(2) NVGII

NVGII の系統樹を図 7 に示した。下水からは NVGII.4 が 2017 年 11 月から 2018 年 1 月まで検出された。患者検体からの NVGII.4 は 2017 年 10 月から 2018 年 3 月まで検出された。下水からは他に NVGII.2 及び GII.17 がそれぞれ 2018

年7月及び2017年11月に検出されたが、両遺伝子型とも患者検体から1年を通じて検出されていた。また、集団事例1事例から検出されたNVGII.8は下水から検出されなかった。

(3) SaV

SaVの系統樹を図8に示した。調査期間中に採取された患者検体からはSaVGI.2及びSaVGII.3の2種類のみが検出された。一方、下水からはSaVGIに属する遺伝子型3種類(GI.1, GI.2, GI.3), SaVGIIに属する遺伝子型4種類(GII.2, GII.3, GII.5, GII.8), SaVGVに属する遺伝子型1種類(GV.1), 計8種類の遺伝子型が検出された。特にSaVGI.2は2018年1月以外、通年検出された。また、SaVGI.1は2017年8月から10月及び2018年5月から6月にかけての2回、SaVGI.3は2017年10月から12月にかけて、GII.3は2017年11月から12月にかけて、SaVGII.5は2017年12月から2018年1月にかけて、SaVGV.1は2017年11月から12月及び2018年4月から7月にかけてと時期的に集中して検出されており、調査期間中に様々な遺伝子型が次々に流行したことが推察された。

NV及びSaVの遺伝子型については、NVGIは患者と下水の遺伝子型が一致したのはNVGI.7のみであったが、NVGIIは患者数の多い遺伝子型は下水からも検出することができた。SaVについては患者からは検出されなかった遺伝子型が6種類検出された。

今回、感染症発生動向調査での検出ウイルスと、下水中のウイルス量や遺伝子型は異なる結果となった。しかし、調査期間内の感染性胃腸炎の流行は小さく、本調査のみでの下水中のウイルスと実際の胃腸炎ウイルスの流行状況を比較・評価するのは困難であると考え。さらに、患者検体は埼玉県全域から集められているが、今回下水の調査は北部地域の流入下水のみである。埼玉県全体の腸管系ウイルスの動態を評価するためには、継続的かつ計画的な検査体制の構築が必要であると考え。

本研究は、埼玉県衛生研究所メディカルラボ・コミュニケーション事業の一環として実施した。

文献

- 1) 西尾 治, 秋山 美穂, 愛木 智香子, 他: ノロウイルスによる食中毒について. 食品衛生学雑誌, 46(6), 235-245, 2005
- 2) 新川奈緒美, 川元孝久, 秋山美穂, 他: 吐物が感染源と推察されたノロウイルス集団発生事例について. 臨床とウイルス, 32(3), 189-194, 2004
- 3) 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. 2010
- 4) 高橋朱実, 松館宏樹, 高橋雅輝, 他: 汚水処理施設におけるノロウイルスの消長—岩手県. IASR 2007年10月号, 28(10), 289-290, 2007

- 5) 磯田美穂子, 藤原香代子, 松岡保博, 他: 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(平成26年度), 39, 137-141, 2015
- 6) Michiyo Shinohara, Kazue Uchida, Shin-ichi Shimada et al.: Novel concentration method for the detection of norovirus and sapovirus from water using minute particles of amorphous calcium phosphate. *Journal of Medical Microbiology*, 60, 780-786, 2011
- 7) Hiroyuki Katayama, Akihiro Shimasaki and Shinichiro Ohgaki: Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), 1033-39, 2002
- 8) 「ノロウイルスの検出法について」の一部改正について, 食安監発1022第1号, 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知, 平成25年10月22日付
- 9) 田所健一, 山口敏和, 篠原美千代.: マルチプレックスリアルタイムPCRを用いた感染性胃腸炎ウイルスの網羅的検出法の開発, 臨床と微生物, 36(3), 251-256, 2009
- 10) Tomoichiro Oka, Kazuhiko Katayama, Grant S. Hansman et al.: Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology*, 78(10), 1347-53, 2006
- 11) Jan Felix Drexler, Sigrid Baumgarte, Luciano Kleber de Souza Luna et al.: Aichi Virus Shedding in High Concentrations in Patients with Acute Diarrhea. *Emerging Infectious Diseases*, 17(8), 1544-47, 2011
- 12) 埼玉県: 感染性胃腸炎からのウイルスの検出状況. <http://www.pref.saitama.lg.jp/b0714/surveillance/topics.html>, 2019年3月6日参照
- 13) 厚生労働省: ノロウイルスに関するQ&A. https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/sokuchu/kanren/yobou/040204-1.html#05, 2019年3月4日参照

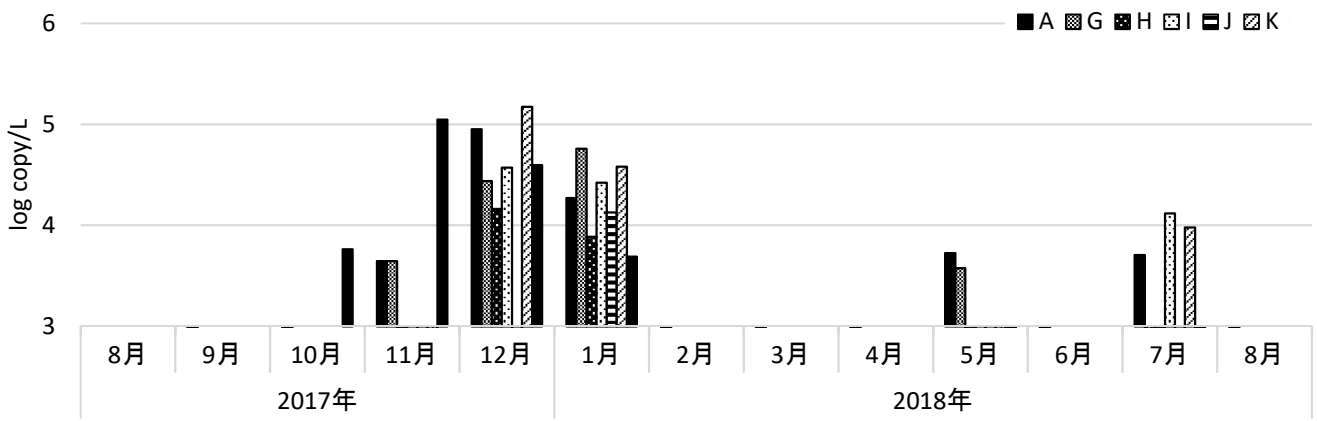


図2 下水中のNVGIIのウイルス量

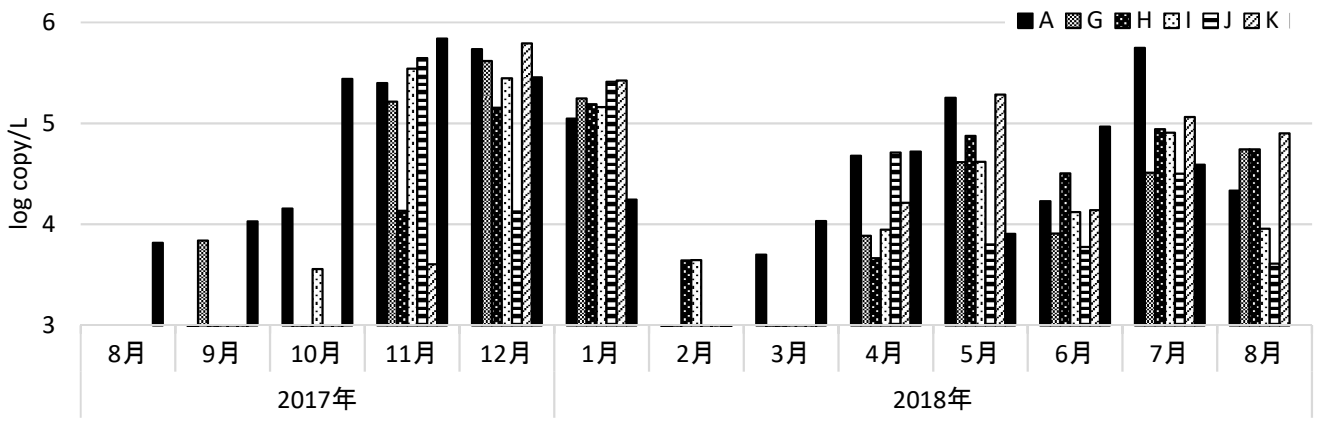


図3 下水中のSavのウイルス量

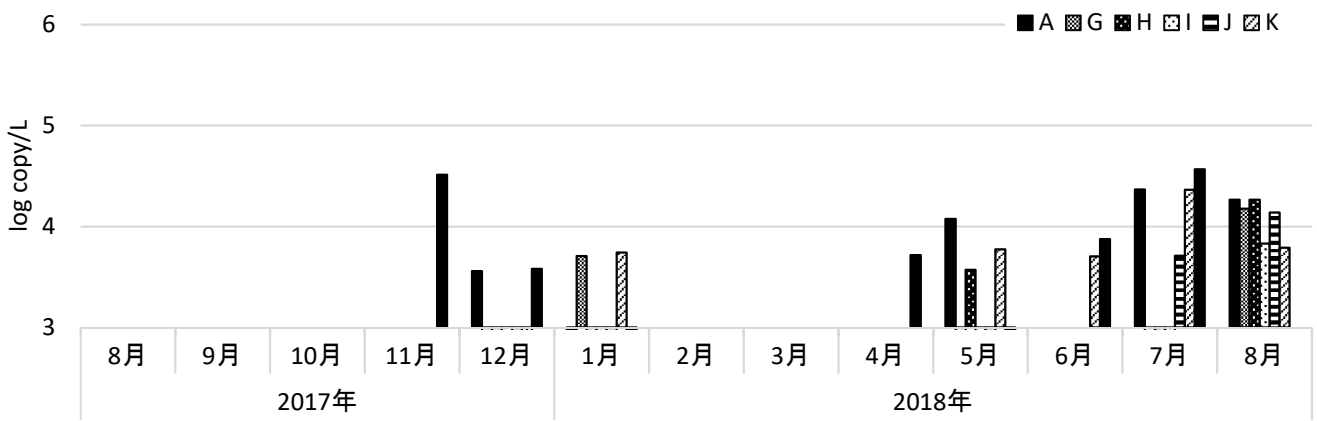


図4 下水中のAstのウイルス量

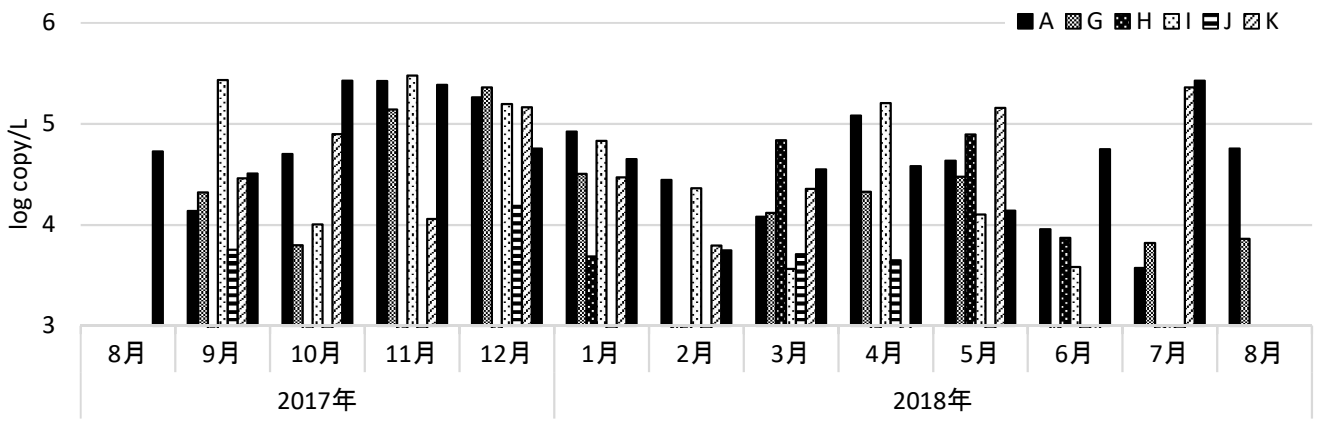
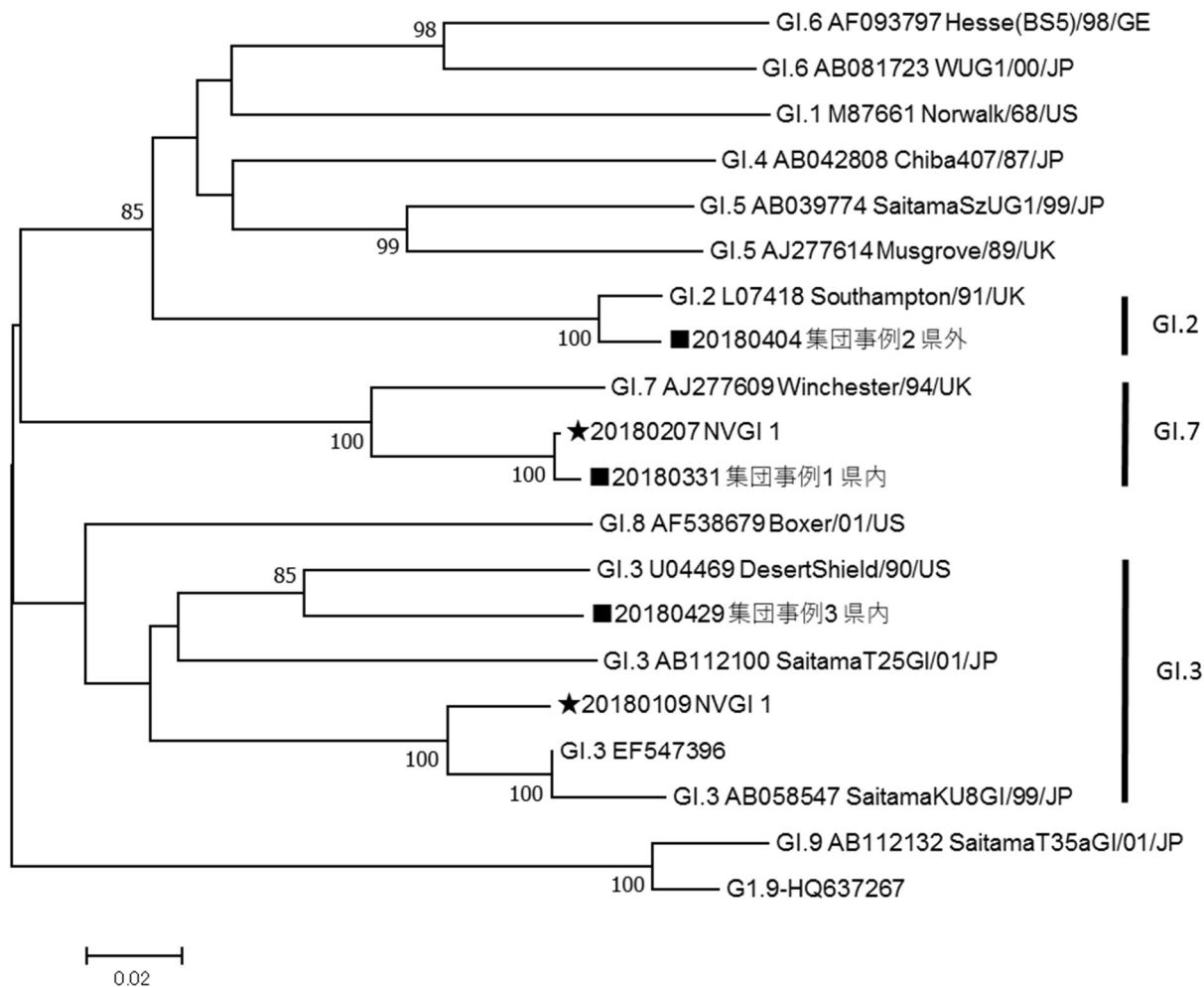


図5 下水中のAichiのウイルス量

表3 下水処理工程中のウイルス量

検出ウイルス	採水年月	A 地点 copy/L	B 地点 copy/L	C 地点 copy/L	D 地点 copy/L
NVGI	2017年11月	5.38×10^3	ND	ND	ND
NVGII	2017年10月	5.81×10^3	ND	ND	ND
	2017年11月	1.12×10^5	1.05×10^5	ND	ND
	2017年12月	3.95×10^4	1.31×10^5	ND	ND
	2018年1月	4.92×10^3	ND	ND	ND
SaV	2017年8月	6.56×10^3	ND	ND	ND
	2017年9月	1.07×10^4	4.31×10^3	ND	ND
	2017年10月	2.76×10^5	4.07×10^4	ND	ND
	2017年11月	6.90×10^5	8.17×10^5	4.53×10^3	ND
	2017年12月	2.86×10^5	1.12×10^6	ND	ND
	2018年1月	1.76×10^4	ND	ND	ND
	2018年3月	1.08×10^4	4.63×10^4	ND	ND
	2018年4月	5.27×10^4	3.89×10^4	ND	ND
	2018年5月	8.06×10^3	8.82×10^3	ND	ND
	2018年6月	9.29×10^4	1.63×10^5	ND	ND
	2018年7月	3.90×10^4	4.99×10^4	ND	ND
Ast	2017年11月	3.25×10^4	2.56×10^4	ND	ND
	2017年12月	3.82×10^3	9.41×10^3	ND	ND
	2018年4月	5.23×10^3	ND	ND	ND
	2018年6月	7.51×10^3	5.66×10^3	ND	ND
	2018年7月	3.70×10^4	6.23×10^4	ND	ND
Aichi	2017年8月	5.36×10^4	1.24×10^5	ND	ND
	2017年9月	3.22×10^4	4.46×10^3	ND	ND
	2017年10月	2.69×10^5	2.83×10^4	ND	ND
	2017年11月	2.45×10^5	4.25×10^5	ND	ND
	2017年12月	5.73×10^4	1.01×10^6	ND	ND
	2018年1月	4.49×10^4	2.76×10^4	ND	ND
	2018年2月	5.61×10^3	1.81×10^4	ND	ND
	2018年3月	3.55×10^5	1.07×10^5	ND	ND
	2018年4月	3.83×10^4	3.49×10^4	7.35×10^3	ND
	2018年5月	1.38×10^4	1.51×10^4	ND	ND
	2018年6月	5.62×10^4	1.81×10^5	ND	ND
	2018年7月	2.68×10^5	3.58×10^4	ND	ND

ND : Not Detected

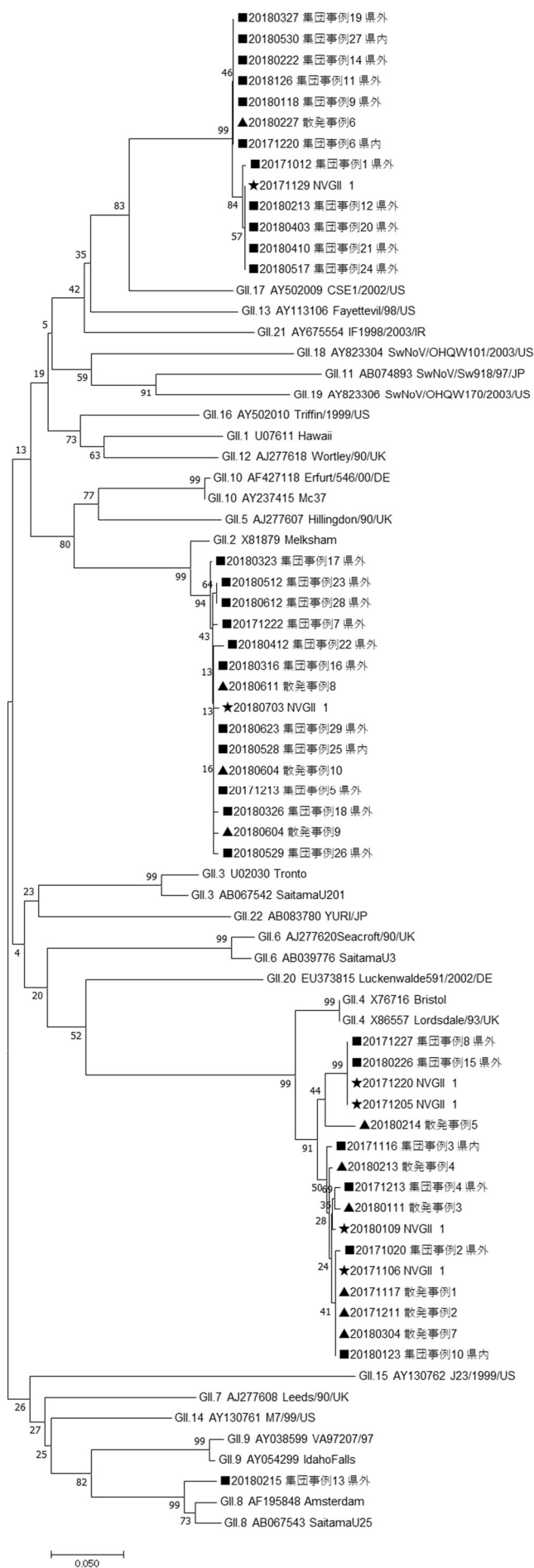


★：下水検体

■：患者検体（集団事例）

各記号以下の数字は検体採取年月日を示す。

図6 NVGI 系統樹解析



II.17

II.2

II.4

★ : 下水検体
 ■ : 患者検体 (集団事例)
 ▲ : 患者検体 (散発事例)
 各記号以下の数字は検体採取年月日を示す。

図7 NVGII 系統樹解析

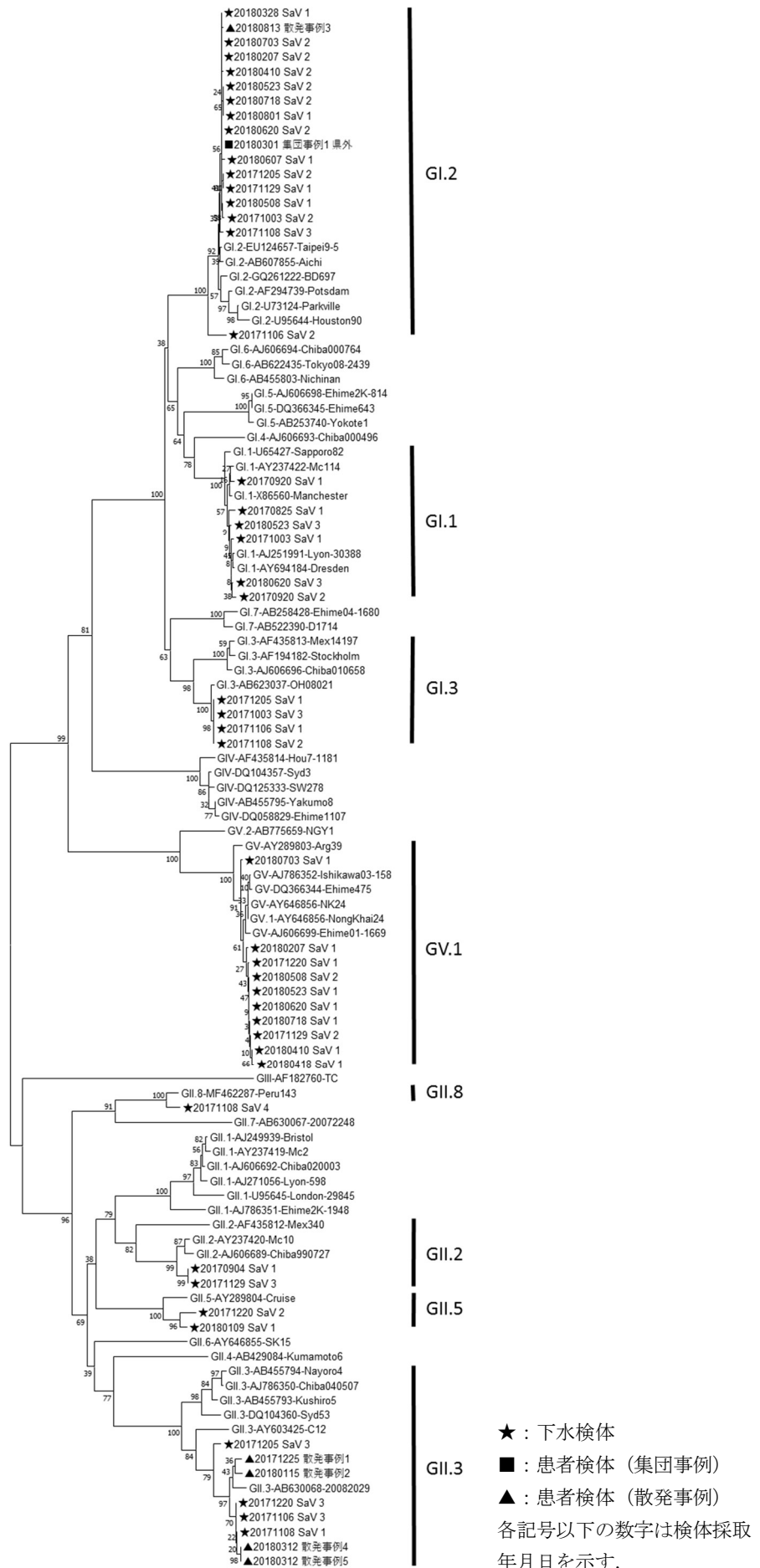


図8 SaV系統樹解析