

## 4. 下水を利用した環境中の病原ウイルスのモニタリングに関する研究

○斎藤博之（所属 秋田県健康環境センター）

### 1 目的

現在、感染症法下において実施されている感染症発生動向調査事業は、地域に存在、または流行しているウイルスを継続的に監視し、必要に応じて行政上の対策を講ずるために重要な役割を果たしている。調査のための検体は、あらかじめ検査定点を設置した病院で外来患者から採取されているが、対象患者を選定する段階でどうしても採取者の主観が混じるところが難点である。そのため、実験室内でのウイルス検出結果が地域流行の実態と乖離する局面が多々見受けられるようになってきた。また、最近のノロウイルスの流行報道等に見られるように「過去最大規模の流行」と認識されながらも、社会的な関心の高まりから届出件数が増加したものなのか、実際に環境中のウイルス量が増えたからなのかは未だはっきりしていないケースもある。地域の感染症対策に感染症発生動向調査事業は不可欠であるが、上記のような問題点に鑑み検体採取者の主観や社会的要因の入らない客観的な指標を導入することは意義があると考えられる。また、技術的な面に目を向けると、下水検体を定量的に濃縮精製する手法については確立しているとは言いがたい状況であるため、適切な方法の開発も合わせて行った。

### 2 材料と方法

#### 1) 下水検体の採取とRNA抽出

下水検体は秋田市・及びその周辺から流入する下水を処理する施設の協力を得て、2007年5月から2008年4月にかけて表1に示すスケジュールに従って流入水と放流水を採取した。濃縮精製段階の定量性を確保するための内部標準として、下水検体100mlにあらかじめ濃度を測定したネコカリシウイルス培養液を一定量添加した。次に3000rpm 20分の粗遠心により濁質を除去し、上清をさらに45000rpmで4時間超遠心することでウイルスを含む沈澱を得た。沈澱を少量の蒸留水に懸濁してグラスミルク法<sup>1)</sup>により核酸を抽出した。

#### 2) リアルタイムPCRによるウイルスの定量

定量したウイルスは、ネコカリシウイルス<sup>2)</sup>、ノロウイルスGI及びGII型<sup>3)</sup>、ロタウイルスA群及びC群<sup>4)</sup>、アデノウイルス<sup>4)</sup>、エンテロウイルス<sup>5)</sup>、サポウイルス<sup>6)</sup>の8種である。測定方法はそれぞれの引用文献に従った。アデノウイルスについてはDNAウイルスであるため、抽出した核酸画分をそのまま使用した。他のウイルスについてはランダムプライマーを用いてcDNAを合成してから測定を行った。このう

表1 採水日とウイルス回収効率

| 採水月日   | 回収効率(%) |       |
|--------|---------|-------|
|        | 流入水     | 放流水   |
| 5月16日  | 2.99    | 7.76  |
| 6月22日  | 3.73    | 5.54  |
| 7月26日  | 2.13    | 6.63  |
| 8月14日  | 2.57    | 6.17  |
| 9月21日  | 3.14    | 5.50  |
| 10月17日 | 3.05    | 4.44  |
| 11月20日 | 3.92    | 13.21 |
| 12月21日 | 4.15    | 7.41  |
| 1月18日  | 3.09    | 7.67  |
| 2月26日  | 4.25    | 25.17 |
| 3月24日  | 6.33    | 15.68 |
| 4月25日  | 3.31    | 6.48  |

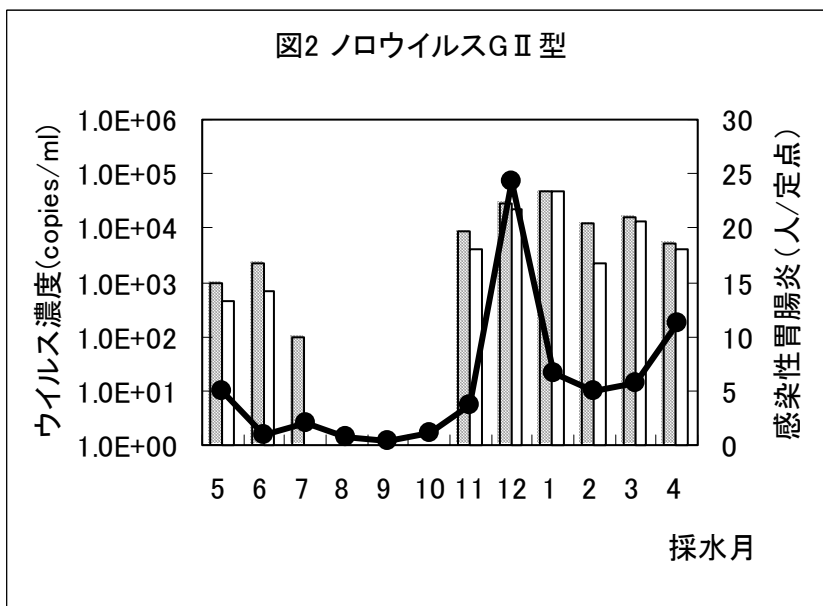
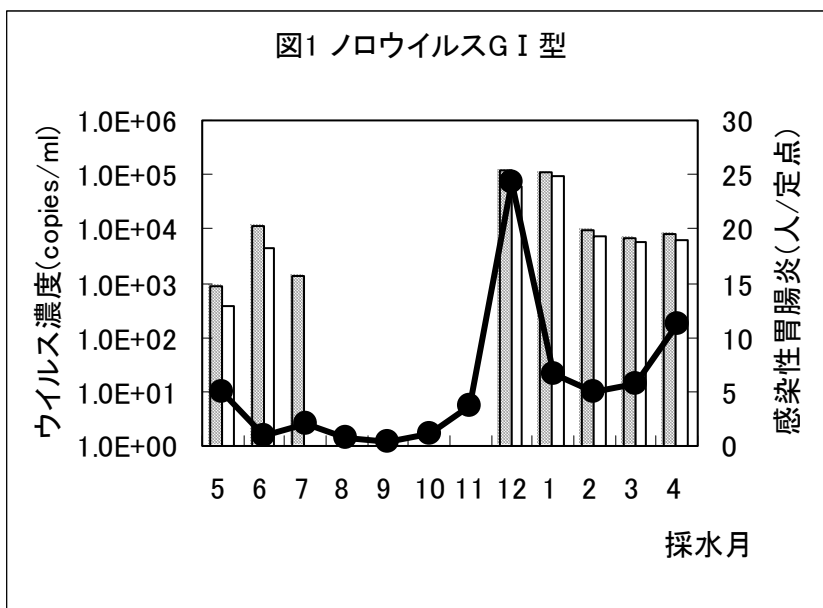
ち内部標準として用いたネコカリシウイルスについては投入量に対する回収効率を計算し、それ以外のウイルスの測定値を補正した。

### 3 結果

表 1 に内部標準であるネコカリシウイルスの測定値から算出した回収効率を示した。流入水よりも放流水の方で回収効率が高くなる傾向が認められ、その数値は濃縮精製を行うたびに大きく変動した。

図 1～図 5 にそれぞれノロウイルス G I 型、ノロウイルス G II 型、A 群ロタウイルス、C 群ロタウイルス、アデノウイルスの濃度(対数目盛り、斜線棒グラフは流入水、白抜き棒グラフは放流水)と相当する時期の感染性胃腸炎の患者報告数(折れ線グラフ)を示した。感染性胃腸炎の患者報告数は 12 月にピークが認められ、新年になると急減した。しかし、下痢症ウイルスであるノロウイルスとロタウイルスの下水中の

濃度推移をみると冬季のみならず初夏にかけて検出されていた。アデノウイルスは胃腸炎だけではなく感冒等の様々な疾患を引き起こす病原体であるが、通年にわたって検出されていた。最近になって注目されるようになった下痢症ウイルスであるサポウイルスは 12 月 21 日採取の検体からのみ検出され、濃度は流入水においては  $9.90 \times 10^4$  copies/ml、放流水では  $4.65 \times 10^4$  copies/ml であった。次に夏季に流行するエンテロウイルスについて図 6 に示した。エンテロウイルスは多様な疾患を引き起こすが、ここでは参考値として手足口病の患者報告数(折れ線グラフ)を併記した。2007 年は手足口病やヘルパンギーナなどのエンテロウイルスによって起こる疾患の大きな流行が見られなかったため、夏であるにも関わらず下水中のエンテロウイルスが検出されなかった月もあった。一方で、5 月や 11 月など流行とは無関係に検出されている月もあり、下痢症ウイルスと比べると明確な傾向を見出すことはできなかった。



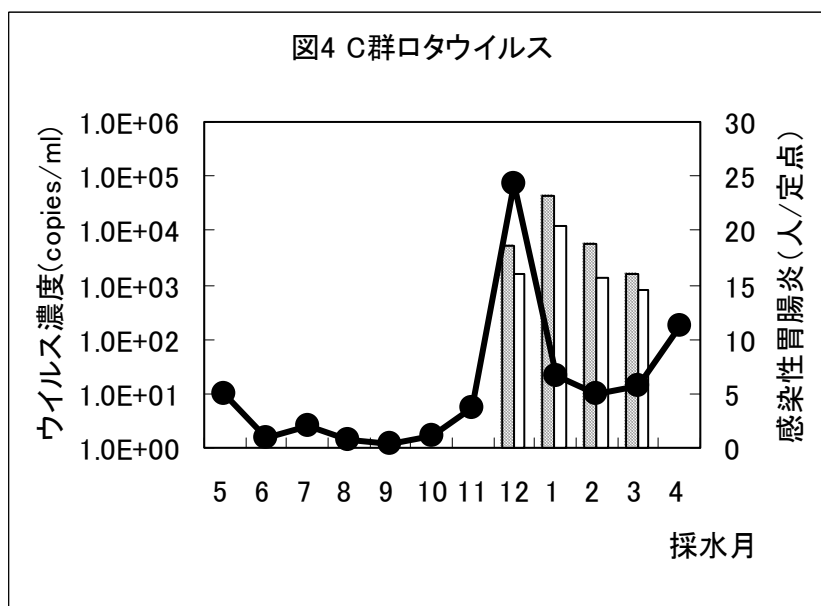
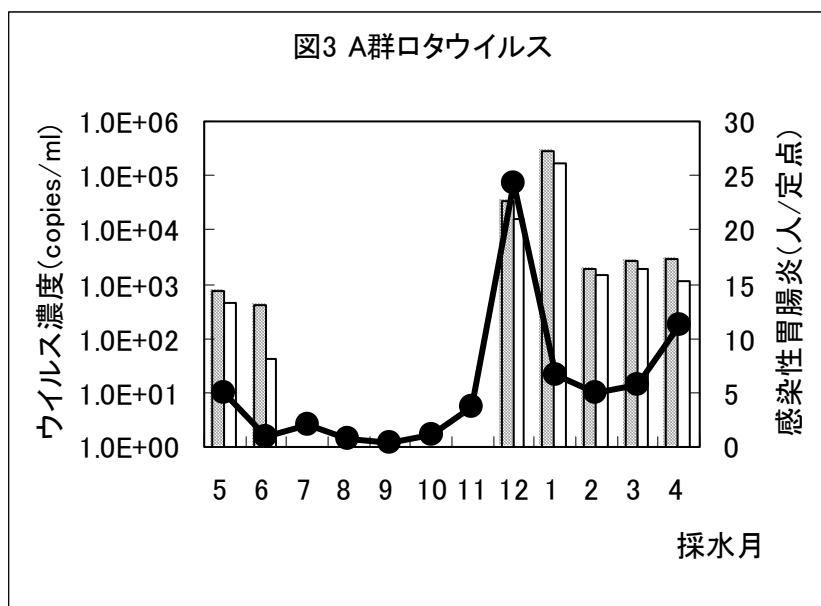
流入水と放流水を比較することで、下水処理によってどの程度ウイルスが除去されているかを見ると、夏季では放流水中のウイルスはほとんど検出されなくなり浄化がうまく機能していることがわかった(図1、2、5、6)。しかし、冬季になるとウイルス除去の効率が低下していた。アデノウイルスは冬季でも比較的除去効率が保たれていたが、それでも夏季の結果と比べるとその低下は明確であった。

#### 4 考察

表1に示したウイルスの回収効率は、最低で 2.13%、最高で 25.17%と 10 倍以上の変動があった。実際の濃縮作業にあたっては大型の遠心チューブを用いて微量のウイルスを取り扱うことになるため、沈澱をムラ無く回収することが困難であったことが原因の一つとして挙げられる。また、放流水よりも流入水における回収率

が低いのは、単純にウイルス量だけの問題ではなく、未処理の下水であるがゆえの酵素反応阻害物質が混入し、結果としてリアルタイム PCR による測定結果に影響を及ぼしていると考えられる。定量的な回収方法の開発は望ましいことであるが、本研究では内部標準を導入して回収率の変動を補正するという方法をとった。これにより、作業ごとの回収率の変動について考慮する必要がなくなり、簡便に濃縮精製を行うことができた。

図1～5 まででは下痢症を起こすウイルスについて感染性胃腸炎の患者報告数と対比して示した。感染性胃腸炎の患者報告は 12 月が最大のピークで新年になると急減し、春に小さなピークがきているがこれは例年の傾向である。下水中のウイルス濃度はノロウイルスとロタウイルスについては 12 月～1 月にピークがくるものの初夏まで検出されており、環境中には依然として存在していることがわかる。感染しても受診しないで自宅静養している場合は患者報告数に反映されないため、報道などで社会的に流行がクローズアップされると報告数は



大きくなり、注目されなくなると小さくなる可能性がある。同様に医療機関において調査のために採取される検体も外来受診者を対象にしている以上、こうした社会的な注目の過多に影響されることは否めない。下水中のウイルスのモニタリングはこうした社会的影響を受け難いため、客観的指標として感染症発生動向調査事業を補完する意義が生じるものと考えられる。一方で、ノロウイルス G I 型が G II 型と同程度に検出されていることは注目に値する。感染症発生動向調査に伴う病原体検査や食中毒事例、老人施設等での集団感染事例ではほとんどで G II 型が検出されており、G I 型は稀少である。下水において検出されているということはそれに相当する感染者が存在しているということであり、にもかかわらず上記のような健康被害事例に現れないということである。こうした不一致の原因

として、G I 型に感染しても無症状か極めて軽症で経過して受診しないケースが多いのではないかと考えられる。ロタウイルスについても、実際に検査などで検出されるのは A 群がほとんどで C 群は稀である。感染対象となるのは A 群が乳幼児であるのに対して C 群が年長児であるため、受診率の違いや採取検体の偏りといった要因を通じて不一致が起きている可能性がある。アデノウイルスは感染性胃腸炎のみならず、感冒や咽頭結膜熱といった多様な疾患の原因となっているため、通年にわたって検出されていた。特定の疾患が大規模に流行した場合には下水中のウイルス濃度も上昇するものと思われる。サポウイルスについてはグラフには示さなかったものの、12 月の下水からのみ検出された。実際に患者検体から検出されることは稀であり、将来的に大流行があった場合などは下水中にもそれなりの量が検出されると思われるが、現在のところはその傾向は認められていない。エンテロウイルスは夏季に流行するウイルスであるが、2007 年は患者検体からほとんど検出

図5 アデノウイルス

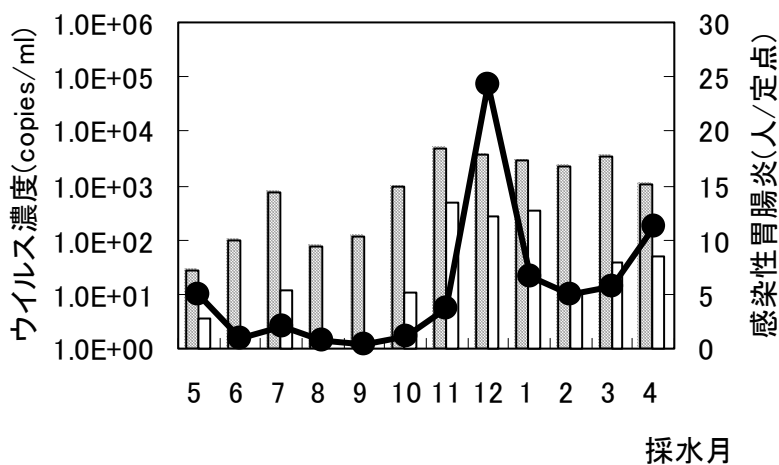
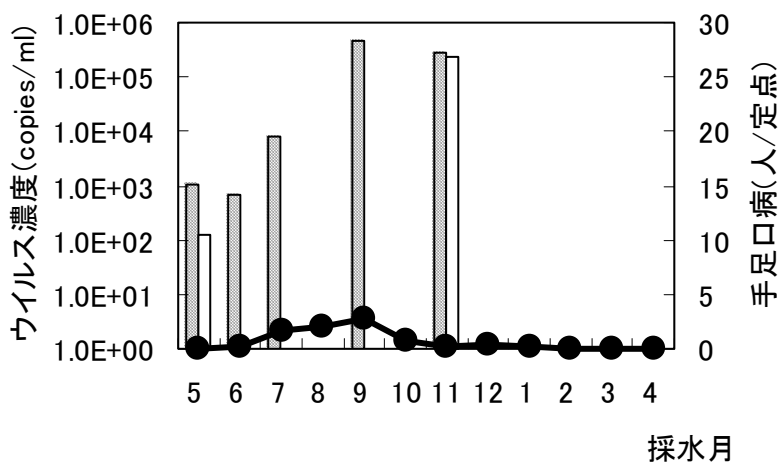


図6 エンテロウイルス



されず、また引き起こされる疾患についても大きな流行は認められなかった。下水中のエンテロウイルスも夏季であるにもかかわらず検出されない月があるなど、こうした流行状況を反映した結果であった。ただし、5月や11月といった本来の流行期とは無関係に検出されている月があり、この時期にポリオ生ワクチンの集団予防接種が行われていたことが確認されているためその影響が現れているものと考えられる。従って、下水中のエンテロウイルスのモニタリングに関しては人為的な要因が入り込む可能性があり、測定方法の改良も含めて更なる検討が必要である。

流入水と放流水を比較することで下水処理工程でのウイルスの除去がどの程度有効であるかがわかるが、季節によって除去効率が違ってくることが、上記のグラフから見て取れる。アデノウイルスやエンテロウイルスのグラフを見ると夏季ではほぼ完全にウイルスは除去されているが、冬季ではその効率は低下し、ノロウイルスではほとんど除去されない月もあった。こうした結果には水温や降水量なども含めて広範な要因が複合しているため、容易に原因を指摘することはできない。また、下水処理施設の方式や能力については各地域によって大きな差があるため今回の結果をそのまま他の地域にあてはめることは適切ではない。ただし、放流水にウイルスが含まれるということは環境汚染につながるためいずれは解決を目指していく必要がある。

## 5 引用文献

- 1) 斎藤博之、他、ノーウォーク様ウイルス(NLV)の検査における一本鎖高次構造多型(SSCP)解析の応用、臨床とウイルス 30、No.3、163-171、2002
- 2) 森功次、他、Norovirus の代替指標としての Feline Calicivirus を用いた手洗いによるウイルス除去効果の検討、感染症学雑誌 80、No.5、496-500、2006
- 3) Kageyama T., 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
- 4) Logan C., et. al., Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children., J. Clin. Microbiol., 44, 3189-3195, 2006
- 5) Nijhuis M., et. al., Rapid and sensitive routine detection of all members of the genus Enterovirus in different clinical specimens by real-time PCR., J. Clin. Microbiol., 40, 3666-3670, 2002
- 6) Oka T., et. al., Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction., J. Med. Virol., 78, 1347-1353, 2006

## 経費使途明細

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| 検体採取のための交通費・運搬費等          | 86,510 円  |
| 検体からの遺伝子抽出等の処理に関する試薬代     | 115,520 円 |
| リアルタイム PCR による定量解析に関する試薬代 | 297,970 円 |
| 合計                        | 500,000 円 |