

6. 千葉県における新型コロナウイルス流行以降の流入下水中に存在するウイルスの動向

- 藤沼 裕希（千葉県衛生研究所）
- 堀田 千恵美（旧所属千葉県衛生研究所 現所属千葉県衛生指導課）
- 花田 裕司（千葉県衛生研究所）
- 佐藤 眞一（千葉県衛生研究所）

【研究目的】

流入下水中にはヒトから排出されたウイルスが多数存在すると報告されており、これを調査することでその地域の流行実態を把握できると考えられる。新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の流行により人々の生活様式は大きく変化し COVID-19 以外の感染症は減少している。本研究では公衆衛生上重要な感染性胃腸炎ウイルスに着目し流入下水中の動向を確認することで、COVID-19 流行下の流行実態を把握し1つの感染症が大流行したときの他の感染症への影響について理解の一助とすることを目的とした。

【研究の必要性】

感染性胃腸炎は主に細菌、ウイルス、寄生虫などにより引き起こされ、ウイルスではノロウイルス（NoV）、サポウイルス（SaV）、アストロウイルス（AstV）、A群・C群ロタウイルス（RVA, RVC）等のウイルスによって引き起こされる。これらのウイルスはしばしば幼稚園、保育園、小学校、高齢者施設等で集団胃腸炎の原因となり、公衆衛生上大きな問題となる。

COVID-19 は 2019 年中国武漢で発生して以来、現在まで世界中で猛威を振るっているが、これまで1つの感染症が数年にわたり大流行したときに、それまで日常的にみられた感染症の発生状況について調査したデータはない。

わが国では感染症発生動向調査における小児科定点疾患として感染性胃腸炎のモニタリングが実施されており、この調査でも COVID-19 流行開始以降、感染性胃腸炎は減少の傾向が見られる¹⁾。しかしながらこの調査は原因物質をウイルスに限定したのではなく、また、感染性胃腸炎は小児だけに限定して発生する疾患ではない。さらに、COVID-19 流行開始後は COVID-19 患者への対応による報告漏れや、軽症患者の受診控え等により実際の感染者数より過小評価されている可能性がある。

これに対して下水道はその流域に住むほぼ全ての住民が年齢層に関係なく使用し、不顕性感染者から排出されるウイルス遺伝子も検出することができるため、流入下水を測定することでその地域の流行実態をより正確に把握できる可能性がある。

COVID-19 は 2 類感染症相当に位置付けられたことから、感染対策も徹底的に行われた。その結果、外出機会の減少、マスクの着用、アルコール消毒の機会の増加、3密の回避等、人々の生活様式は大きく変化し、感染性胃腸炎を含む COVID-19 以外の感染症の多くは減少した。しかしながら、感染性胃腸炎ウイルスにはエンベロープを欠き、エタノールによる消毒に効果を示さないものが多く存在しており、これらのウイルスに対しては COVID-19 の感染対策に用いられる方法では不十分であると考えられる。

これらのことから、地域の流行実態を正確に把握できる可能性のある下水により調査をすることが必

要であると考える。

【研究計画】

2020年4月から7月までを除く2015年4月から2022年3月までの間、月1回、千葉県内の下水道ポンプ場で流入下水を採取し、6種類の感染性胃腸炎ウイルス遺伝子量をリアルタイムPCR法で測定した。その結果を基に千葉県内における感染性胃腸炎ウイルスの流行状況をCOVID-19流行開始前後で評価する。なお、今回の調査では2015年度～2019年度までを流行開始以前、2020年度以降を流行開始以降として解析した。

【実施内容・結果】

実施内容

1) 下水の採取

2015年4月から2022年3月までの間（2020年4月から7月までを除く）、月1回、千葉県内の下水道ポンプ場で流入下水を採取した。採取した流入下水は保冷材を入れたクーラーボックスで持ち帰り、濃縮までの間4℃で保存した。

なお、調査を行ったポンプ場を含む下水処理設備は分流式で、下水と雨水は別々に処理されている。

2) サンプルの濃縮

サンプルの濃縮は感染症流行予測調査事業のポリオ環境水調査に用いられている方法²⁾で実施した。採取した流入下水サンプルは、採取日から1週間以内に濃縮を行なった。ザルでごみを除去した下水サンプル500 mLを3,000 rpm (1,920 × g) で60分間遠心分離して上清を分取し、孔径1 μmのシリンジフィルターで加圧ろ過した。これにMgCl₂を最終濃度が0.05 Mになるように添加し、1.0 N塩酸でpHが3.5になるように調整した。

調整後、孔径0.45 μmの陰電荷膜 (ADVANTEC) を用いて加圧ろ過を行い、ウイルスを吸着させた。最後に3%beef extract 10 mLを加え5分間ボルテックスで攪拌することで陰電荷膜に吸着したウイルスを溶出させた。

3) 感染性胃腸炎ウイルス遺伝子の検出

ウイルスRNAの抽出はQIamp virul RNA mini kit (Qiagen)とMagNa Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (日本ジェネティクス)を用いた自動核酸抽出装置 MagNA Pure LC 2.0 (Roche Diagnostics)で実施した。その後、PrimeScript RT reagent kit (Perfect Real Time) (Takara)を用いて、cDNAを合成した。ウイルス遺伝子は、感染性胃腸炎の主な原因として検出されるNoV GI, GII, SaV, AstV, RVA, RVCについてreal-time PCR法³⁻⁷⁾で定量を実施し、流入下水1 ml中のゲノムコピー数を計算した。

4) 測定値の補正

下水の状態や、濃縮および抽出段階における回収率のばらつきを補正するため、内部標準としてヒトトウガラシ微斑ウイルス (Pepper Mild Mottle Virus : PMMV) のウイルス遺伝子量をreal-time PCR法で定量し、得られた定量値の比で以下のように感染性胃腸炎ウイルスの定量値を補正し、解析を実施した⁸⁾。

PMMV は Tobamovirus 属に属する植物ウイルスで、ヒトの糞便中に最も多く含まれる RNA ウィルスである。様々な水源に多く存在し、季節による大きな変動はなく水中において顕著な安定性を示す。水環境におけるヒトの糞便汚染のウイルス指標となり、PMMV 濃度が増加すると病原性腸管ウイルスがより頻繁に検出されることが報告されている⁹⁾。

$$\frac{\text{感染性胃腸炎ウイルス定量値}}{\text{全体のPMMV定量値平均}} = \text{感染性胃腸炎ウイルス補正定量値}$$

結果

内部標準として測定を実施した PMMV 定量値については図 1 のとおりであった。

感染性胃腸炎ウイルス検出状況は NoV GI、GII、SaV は、COVID-19 流行開始以前は継続して検出されていたが、COVID-19 流行開始以降では検出されない月も多く、断続した検出であった。AstV は、COVID-19 流行開始以前は 2017 年度を除く継続した検出が認められたが、COVID-19 流行開始以降では 2020 年度は検出が認められず、2021 年度は断続した検出であった。RVA の検出は、2015 年度、2016 年度は継続していたが、2017 年度以降断続的であった。RVC は断続的な検出であり、2018 年度、2020 年度、2021 年度は検出されなかった (図 2)。

COVID-19 流行開始前後で感染性胃腸炎の測定値を比較したところ、測定したいずれのウイルスも t 検定において $p < 0.05$ であり COVID-19 流行開始後に有意にウイルス遺伝子量が減少していることが確認された (図 3)。

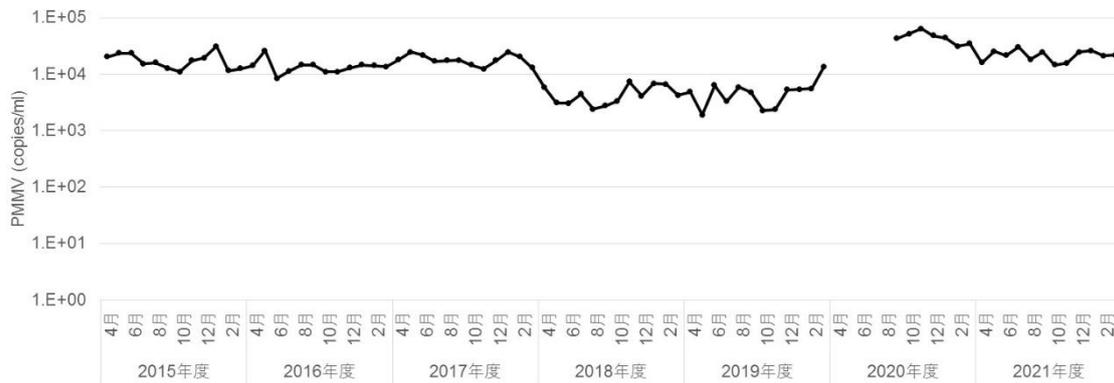


図 1 PMMV 測定値

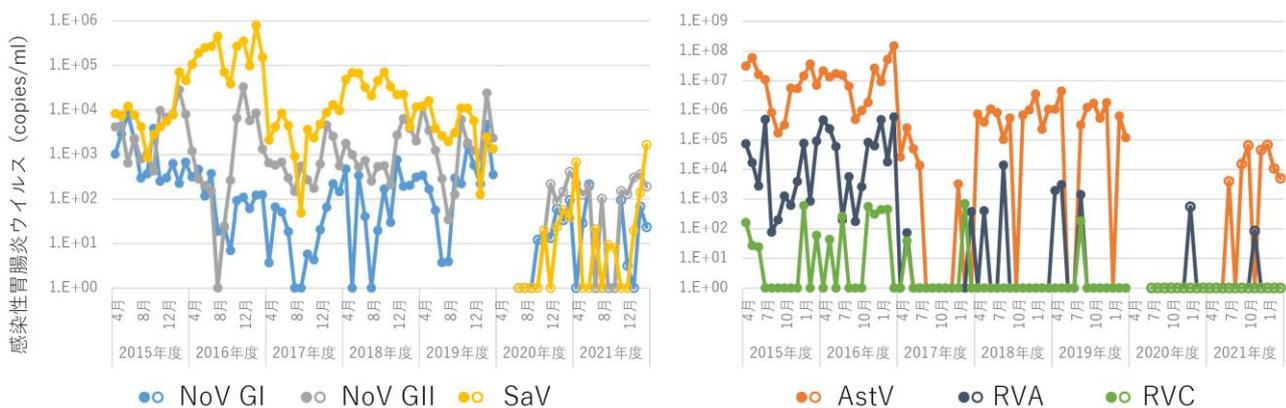


図 2 感染性胃腸炎ウイルス測定値

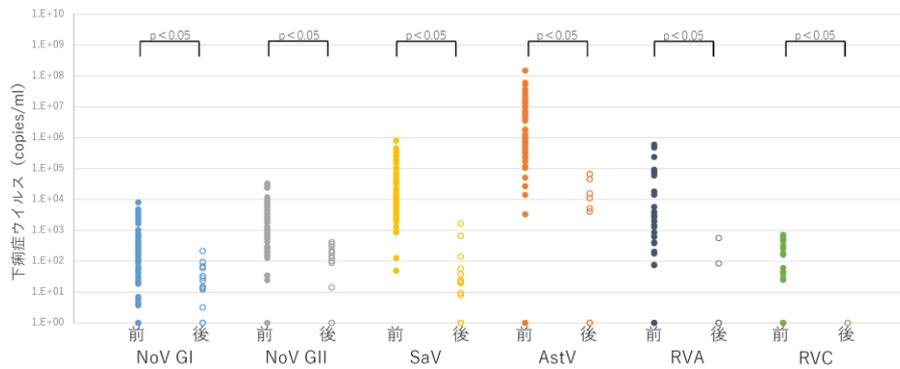


図3 COVID-19 流行前後での比較

【考察と今後の課題】

COVID-19 流行開始以降、流入下水中の各種感染性胃腸炎ウイルス量は減少していた。これは COVID-19 の流行による人と人との接触機会の減少といったヒト-ヒト感染の機会の減少や、次亜塩素酸ナトリウム等の感染性胃腸炎ウイルスに有効な消毒薬の使用頻度の増加等が影響していると考えられる。

しかし、SaV, AstV については 2021 年度の終盤には COVID-19 流行開始前とほぼ同程度まで流入下水中のウイルス量が増加していた。これは、感染症発生動向調査における千葉県における感染性胃腸炎患者の報告と同様の傾向であった (図4)。このことから、流域住民において、SaV および AstV が COVID-19 流行開始前と同程度まで感染が増加していると推測される。この理由として、人々の生活様式が徐々に COVID-19 流行開始前に戻りつつあることが推察され、それによりその他のウイルスによる感染性胃腸炎もこれから患者数が増加していくことが危惧されることから、今後も継続して監視していく必要があると考えられる。

また、感染性胃腸炎ウイルス以外のウイルスについても流入下水中の動向を確認し、COVID-19 の流行に伴い流域の感染状況がどのように変化してきたのかを確認していくことも必要であると考えられる。

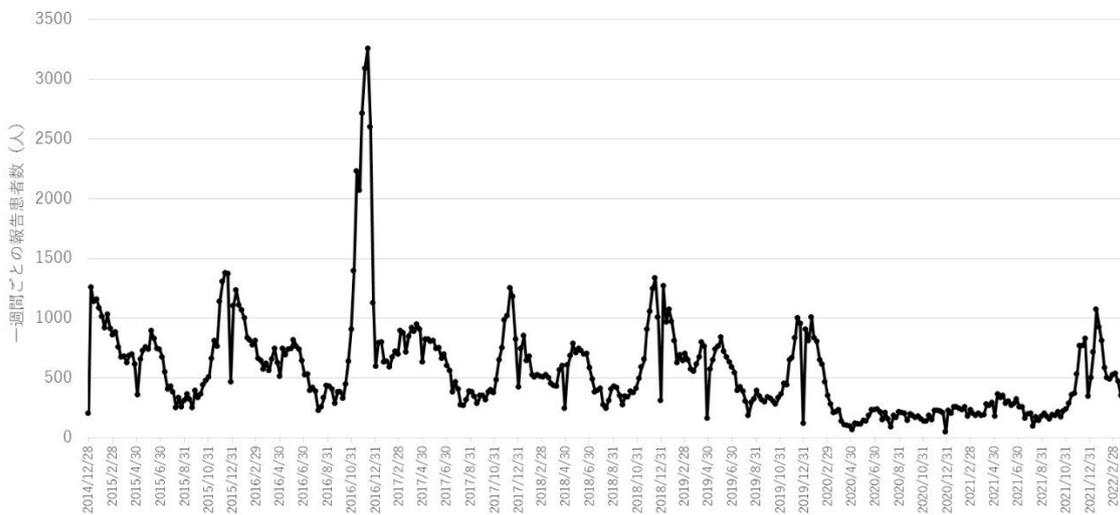


図4 千葉県における感染性胃腸炎患者報告数

【参考文献】

- 1) 国立感染症研究所ホームページ, 感染症発生動向調査週報
- 2) 厚生労働省健康局結核感染症課、国立感染症研究所感染症流行予測調査事業委員会, 感染症流行予測調査事業検査術式令和元年度改訂版
- 3) Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2003;41:1548-57. doi:10.1128/JCM.41.4.1548-1557.2003.
- 4) Oka T, Katayama K, Hansman GS, Kageyama T, Ogawa S, Wu F-T, et al. Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 2006;78:1347-53. doi:10.1002/jmv.20699.
- 5) Logan C, O' Leary JJ, O' Sullivan N. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *J Clin Microbiol* 2006;44:3189-95. doi:10.1128/JCM.00915-06.
- 6) Mori K, Hayashi Y, Akiba T, Nagano M, Tanaka T, Hosaka M, et al. Multiplex real-time PCR assays for the detection of group C rotavirus, astrovirus, and Subgenus F adenovirus in stool specimens. *J Virol Methods* 2013;191:141-7. doi:10.1016/j.jviromet.2012.10.019.
- 7) 横井 一 他, Real-time RT-PCR 法によるアストロウイルス遺伝子の検出, 感染症学雑誌, 2009 年 83 卷 2 号 p. 120-126
- 8) Haramoto, E., Kitajima, M., Kishida, N., Konno, Y., Katayama, H., Asami, M., & Akiba, M. (2013). Occurrence of pepper mild mottle virus in drinking water sources in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7413-7418. <https://doi.org/10.1128/aem.02354-13>
- 9) Kitajima, M., Sassi, H. P., & Torrey, J. R. (2018). Pepper mild mottle virus as a water quality indicator. *Npj Clean Water*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/s41545-018-0019-5>

【経費使途明細】

使途	金額
消耗品費 (シリンジフィルター)	8,676 円
試薬費 (TaqMan Universal PCR Master Mix, One Step Prime Script III RT-qPCR KIT, Qiamp Viral RNA Mini Kit, プライマー等の人工合成遺伝子 等)	288,594 円
振込手数料	2,530 円
合計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円