

平成 28 年度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」
研究協力報告

流入下水からの腸管系病原ウイルス遺伝子の検出

研究協力者	植木 洋	宮城県保健環境センター
	菅原 直子	
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

腸管系ウイルス性感染症の流行状況を早期に察知し、被害拡大防止や二枚貝の汚染防止に寄与するための手法として、下水処理場へ流入する流入下水中に含まれる病原ウイルスの挙動の把握が注目されている。流入下水中の各種病原ウイルス遺伝子の検出を試みた結果、主要な胃腸炎起因ウイルスであるサポウイルスおよびノロウイルスの遺伝子は通年検出された。特に感染症発生動向調査の感染性胃腸炎患者報告数と流入下水中のノロウイルス濃度の推移は一致がみられ、流行期には患者およびカキから検出された遺伝子型と流入下水から検出された遺伝子型も一致していた。

A. 研究目的

現在、感染症の流行状況の把握と感染拡大防止のための注意喚起等は、感染症発生動向調査の定点医療機関からの患者報告数が根拠となっている。

しかしこの患者報告数は、発症患者の受診後に集計を行うため、報告数が注意報・警報レベルに達し、注意喚起を行う頃には、すでに流行が拡大している。また、感染性胃腸炎は、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ウイルスなどの病原微生物が直接流れ込むため、

流入下水を継続的に監視することにより、流行の早期探知が可能となり、潜在的な流行についても把握できる。さらに、カキ等の二枚貝のノロウイルス(NoV)等の腸管系ウイルスの主要な汚染源は下水であることから、下水中のウイルスの動態に関するリアルタイムの情報は二枚貝の汚染防止対策にも寄与できる可能性がある。

そこで、流入下水中の病原ウイルスの挙動の把握がそれらによる感染症の被害拡大防止や二枚貝の汚染防止に寄与できるかを検証することを目的として、胃腸炎起因ウイルスの NoV とサポウイルス(SaV)について、real-time PCR 法を用い

で定量的に検出し、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の流行期の患者数の推移を比較した。

B. 研究方法

1. 材料

宮城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～平成 28 年 12 月の毎週 1 回採水し、計 25 検体を試料とした。

2. ウイルス遺伝子の検出

1) 流入下水の濃縮

流入下水を混和後 25 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、4°C で 1 夜攪拌した後、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、沈渣に滅菌蒸留水を加え、5.0mL のクライオチューブに洗い込み、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 140 μ L について QIAGEN viral RNA mini kit を用いてウイルス RNA を抽出した。

逆転写反応および各ウイルス遺伝子の検出は、図 1 に示した方法で行った。

real-time PCR 法による NoV および SaV 遺伝子の検出は、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検量線を作成し、試料中のコピー数を算出し、下水 1L あたりに換算した。

各ウイルス遺伝子が検出された場合は、それぞれ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 または Norovirus typing tool 用いて遺伝子型を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. SaV の検出状況 (図 2)

調査期間中の全検体から検出され、 $3.5 \times 10^3 \sim 3.7 \times 10^6$ copies/L の濃度で推移し、10 月 26 日に最大値となった。検出された SaV の遺伝子群は G I および G II であった。

2. NoV の検出状況 (図 3, 表 1)

SaV 同様、全検体から検出され、G I 群は $0 \sim 1.6 \times 10^5$ copies/L, G II 群は $1.3 \times 10^4 \sim 4.3 \times 10^7$ copies/L で、G I 群と比較し全体的に G II 群が高い濃度で推移した。県内の感染症発生動向調査で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 日採水の検体が最高値を示した。

また、検出された遺伝子型は、G I 群は全期間で多種の遺伝子型が検出され、G II 群は感染性胃腸炎の非流行期である 7 月～10 月は G II.17 を中心に多種類の遺伝子型が、流行期となる 10 月末～12 月は G II.2 のみが検出され、同時期には感染性胃腸炎集団事例の患者や市販生食用カキからも G II.2 が検出されていた。

D. 考察

流入下水中から水中病原ウイルスであ

る、SaV, NoV の定量的な検出を試みた。その結果、胃腸炎ウイルス一つの SaV は、全期間で検出された。また、感染症発生動向調査で胃腸炎患者から検出された SaV と同じ遺伝子型が下水からも検出されたことから、散発的な発生は通年的に起きていることが推測された。

一方、調査期間中には集団感染事例の患者からの SaV の検出はなかったが、10 月下旬に濃度の上昇がみられ、下水処理区域内での小規模な流行などの可能性も考えられた。

NoV の推移については、SaV と同様に全検体より検出され、SaV と比較し高い濃度で推移した。このことは、SaV 同様に NoV による胃腸炎も通年的に発生しており、SaV 感染者よりも NoV 感染者の割合が高いことが考えられた。感染症発生動向調査における患者報告数の少ない時期であっても流入下水から検出されることから、散発的な患者発生に加えて不顕性感染者の存在も示唆された。また、NoV のうち、G I 群および G II 群の汚染量を比較すると、G I 群と比べ G II 群の濃度が高い傾向を示し、G II 群感染者の存在割合が高いことが推察された。

感染性胃腸炎の流行期となった、10 月下旬からは NoV G II 群遺伝子濃度が上昇し、12 月初旬に最大値を示した。この時期、宮城県内ではノロウイルスによる感染性胃腸炎の集団事例が多発し、感染症発生動向調査の定点あたり患者報告数も急増した。これら事例の患者から検出された遺伝子型は G II.2 であり、同時期の下水からも G II.2 が検出された。このことから、流入下水から検出されるウイ

ルス遺伝子が流域での感染性胃腸炎流行状況を直接的に反映していると考えられた。また、患者数推移と流入下水中の NoV G II 群遺伝子の濃度推移を比較すると、流入下水中の遺伝子濃度の上昇がより早期に確認された。(図 4) このことは、流入下水の NoV 遺伝子を継続的に監視することにより、感染性胃腸炎流行の早期探知の可能性が示された。

E. 結論

下水処理施設に流入する流入下水について、水中病原ウイルスの NoV, SaV 遺伝子の検出を試みた。その結果、各ウイルス遺伝子は通年的に検出され、下水から検出された NoV と SaV 遺伝子は、感染性胃腸炎患者から検出された遺伝子型と同じ遺伝子型であった。

また、下水中の NoV 遺伝子濃度は感染性胃腸炎患者報告数の増加よりも、早期に上昇することが確認され、感染性胃腸炎流行の早期探知の可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他

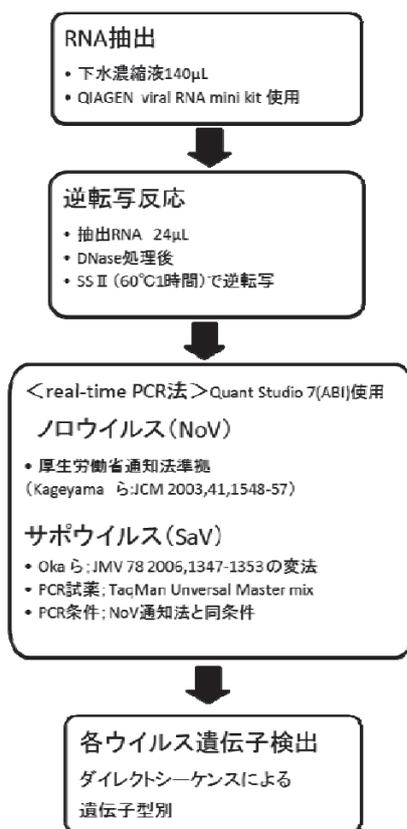


図1 各ウイルス遺伝子の検出方法

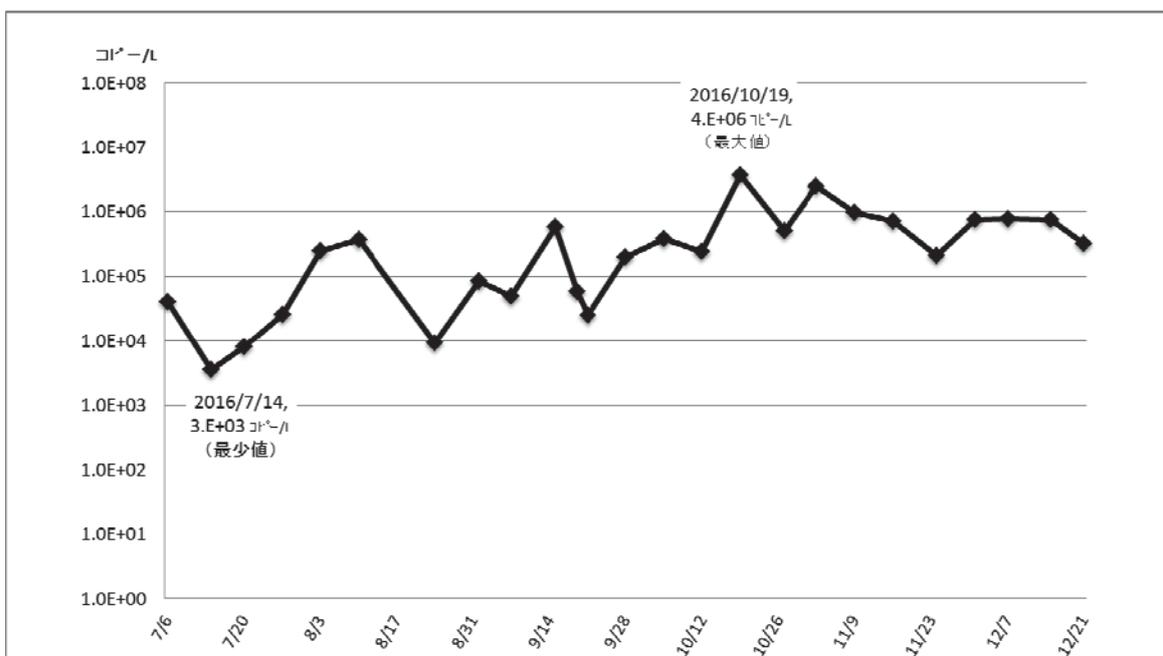


図2 流入下水中のサポウイルス遺伝子の濃度推移

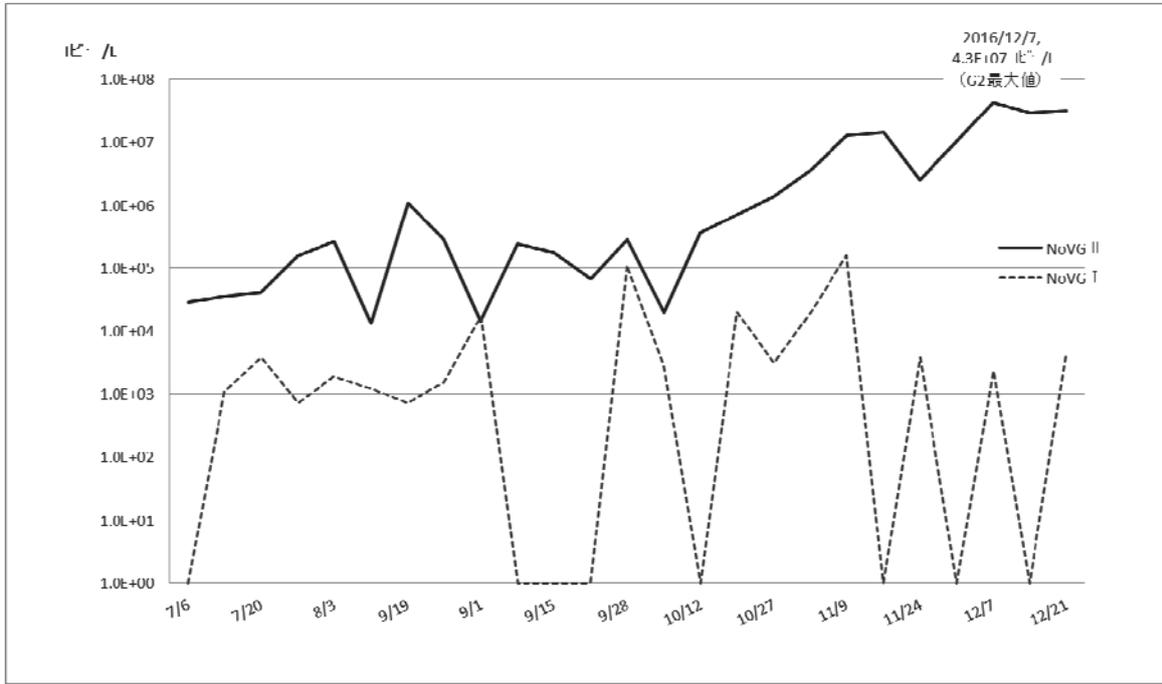


図3 流入下水中のノロウイルス遺伝子濃度推移

表1 検出されたノロウイルスの遺伝子型別 (■は検出された遺伝子型)

<NoVG I 群>		7/6	7/14	7/20	7/27	8/3	8/10	8/19	8/24	9/1	9/7	9/15	9/21	9/28	10/5	10/12	10/19	10/27	11/2	11/9	11/16	11/24	12/1	12/7	12/15	12/21
GI.1		■								■										■						■
GI.2																										
GI.3							■								■		■									
GI.4																										
GI.6								■													■					
GI.9																										

<NoVG II 群>		7/6	7/14	7/20	7/27	8/3	8/10	8/19	8/24	9/1	9/7	9/15	9/21	9/28	10/5	10/12	10/19	10/27	11/2	11/9	11/16	11/24	12/1	12/7	12/15	12/21
GI.2					■	■													■	■	■	■	■	■	■	■
GI.3										■																
GI.4							Sydney2012																			
GI.5																										
GI.6		■											■	■												
GI.7																										
GI.17			■	■					■								■									

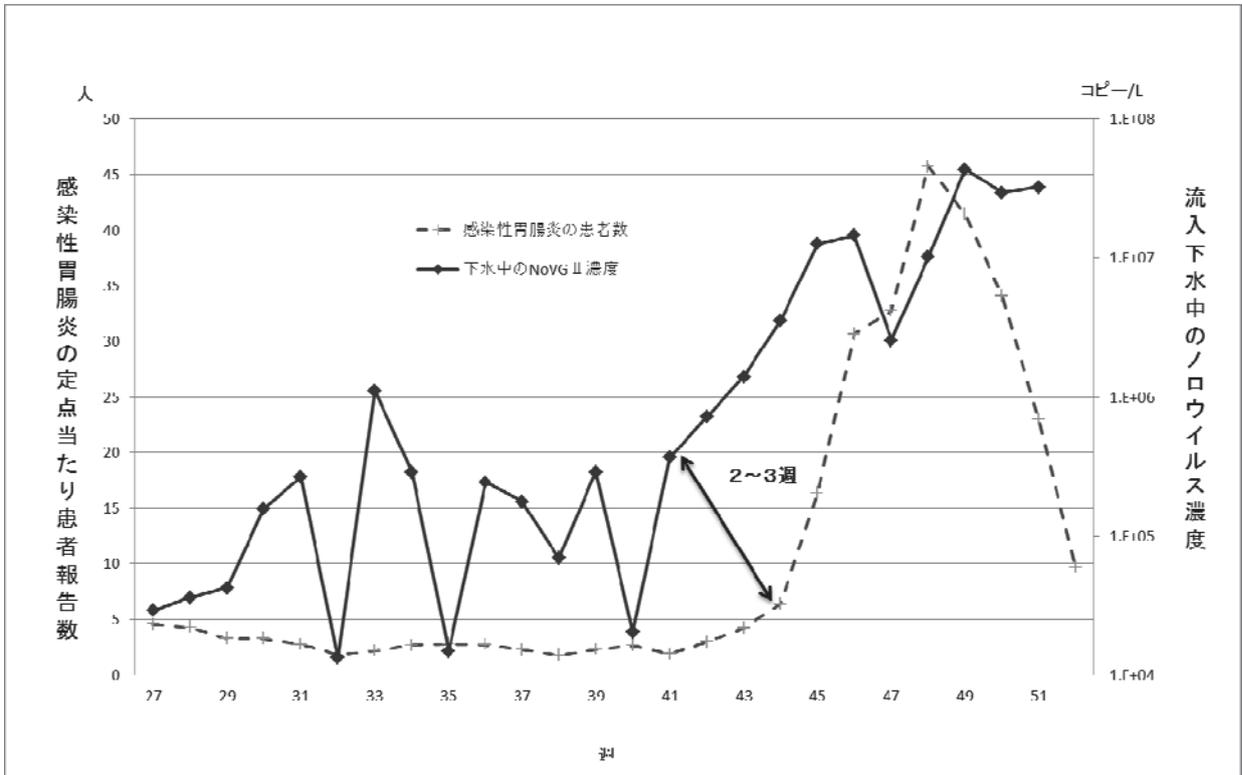


図4 感染性胃腸炎の定点あたり報告数と流入下水中の NoV G II 群濃度推移