下水処理施設における流入水及び放流水の腸管系ウイルス実態調査 (2019 年度~2020 年度)

宮下広大 小川泰卓*1 篠原美千代 鈴木典子 江原勇登 大﨑哲 青沼えり 内田和江 福島浩一 町田秀之*2 澤井綾香*2 丸山信之*3 蓮沼弘行*4

Investigation of Enteric Virus in Influent Waste Water and Effluent Water in Sewage treatment facilities in Saitama (April 2019 - March 2021)

Kodai Miyashita, Yasutaka Ogawa^{*1}, Michiyo Shinohara, Noriko Suzuki, Hayato Ehara, Satoshi Daisaki, Eri Aonuma, Kazue Uchida, Hirokazu Fukushima, Hideyuki Machida^{*2}, Ayaka Sawai^{*2}, Nobuyuki Maruyama^{*3} and Hiroyuki Hasunuma^{*4}

背景•目的

ノロウイルス,サポウイルス,ロタウイルス等の腸管感染症を起こすウイルス(腸管系ウイルス)は,顕性感染と不顕性感染がある^{1,2)}.有症となる顕性感染では,患者の受診等により感染症発生動向調査や食中毒報告等による把握がされやすいが,医療機関を受診しない軽症者や不顕性感染者の把握はほぼ不可能である.不顕性感染者を含めた感染者から排出されたウイルスが下水中に流入することが知られており,下水中のウイルスの動向を把握することで,不顕性感染者を含めた腸管系ウイルスの地域流行の実態を把握しようとする調査が各地で実施され成果が報告されている³⁻⁶⁾.

一方で、下水中の病原ウイルスは下水処理後には、ほぼ除去されていることが望ましく、処理後放流水における除去率やウイルスの有無を確認することは公衆衛生上重要である。当所でも2017年度から2018年度にわたり、県のメディカル・ラボコミュニケーション事業の一環として下水中の腸管系ウイルス検査法の検討及び実態調査を行った⁷⁾.

本研究ではメディカル・ラボコミュニケーション事業による調査結果から得られた知見をもとに、サンプリングポイントとなる下水処理施設を増やし、下水及び放流水中の腸管系ウイルスの検査を実施した。この調査では流行ウイルスを地域ごとに把握すること、県内の患者報告数との相関の有無を検討することを目的とした。あわせて下水処理後の放流水の腸管系ウイルスの検査を実施し、下水処理によるウイルスの除去率を把握すること、また、次世代シーケンサーでウイルス遺伝子の解析を行い、これまでに患者検体から検出のない、あるいは少ない遺伝子型を捕捉することで、次の流行を引き起こす可能性のある遺伝子型の候補を探索した。

材料及び方法

1 調査期間

2019年4月から2021年3月. なお,遺伝子型別については, 2019年4月から2020年12月までとした.

2 材料

県内5か所の下水処理施設 (A, B, C, D, E) の流入下水 (試料 A~E) を試料とした. 試料 A のみ月2回, それ以外 は月1回採水した. また, 腸管系ウイルスが下水処理後に除去される程度を確認するために,下水処理施設2か所 (A 及び B) の放流水 A 及び放流水 B を月1回採水し試料とした.

3 試料の濃縮

試料はポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法 8 により濃縮した. 試料50 mL を10,000×G, 4 Cで10分間遠心後,分取した上清45 mL に PEG6000 3.6 g (終濃度8%), NaCl 1.05 g (終濃度0.4 M) を添加し,撹拌して完全に溶解させた. 4 Cで一晩静置した後, 4 Cで30分間遠心し,上清を除去した. 滅菌超純水200 4 L を加え沈殿物を再懸濁させた後,全量を核酸抽出に用いた.

4 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 を作成した.なお、ロタウイルス検出用の cDNA を作製する時は、核酸抽出液を97℃で5分間、加熱した後に逆転写反応を行った.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.

^{*1} 現 狭山保健所 *2 公益財団法人 埼玉県下水道公社荒川左岸北部支社水質調査センター

^{*3} 公益財団法人 埼玉県下水道公社古利根川支社 *4 化学保安課

5 定量リアルタイム PCR

ノロウイルス遺伝子群 I (NVGI), ノロウイルス遺伝子群 II (NVGII), A 群ロタウイルス (RotaA), C 群ロタウイルス (RotaC), サポウイルス (SaV), アストロウイルス (Ast) 及びアイチウイルス (Aichi) について, 既報⁹⁻¹¹⁾に準じ定量リアルタイム PCR を行った. 定量のための検量線は, 既知濃度の合成遺伝子を用いて作成した.

使用したプライマー及びプローブを表1に示した. SaV は 2x QuantiTect Probe PCR Master Mix(QIAGEN) , SaV 以外は TaqMan^M Universal PCR Master Mix(Thermo Fisher Scientific) 17.5 μ l にフォワードプライマー,リバースプライマー及びプローブを表1に示した終濃度になるようそれぞれ添加し,ジエチルピロカーボネート(DEPC)処理水を加え31 μ L とした後、cDNA を4 μ L 加えた. 反応条件は, 50° C 2分, 95° C 10分の初期反応後, 95° C 15秒, 56° C 1分の反応を45サイクル行った.実測値 cDNA コピー数が10コピー(試料1 L に換算した場合6.67× 10° コピー)以上を陽性とした.

6 PEG 沈殿法による NV 回収率の確認

回収率を確認するため NVGII の添加回収試験を行った. 超純水1 L あたり 2.97×10^7 コピーの NVGII を添加した溶液 を試料とし、PEG 沈殿法により試料を濃縮した。その後、 核酸抽出、逆転写反応を行い cDNA を作製後、NVGII の定量 リアルタイム PCR を行い、回収量を測定した.

7 遺伝子型別

NVGI, NVGII 及び SaV が陽性だった流入下水検体について、それぞれの VP1領域を PCR により増幅後、次世代シーケンサーMiSeq (illumina) により塩基配列を解読し、CLC Genomics Workbench Version12.0.1(Filgen)を用いて de novo 解析した. 感染性胃腸炎及び食中毒事例の患者検体から得られた株、ならびに GenBank 上に登録された既報の株とともに NVGI, NVGII 及び SaV それぞれの VP1領域約300 bp,約280 bp 及び約430 bp を用いて近隣結合法(NJ法)により分子系統樹を作成し遺伝子型別を試みた. また、必要に応じて BLAST 検索による相同性解析を行った.

表1 リアルタイムPCR用プライマー及びプローブ配列

用途	名称	配列(5'-3')	終濃度	position※
ノロウイルス G I	COG1F	CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA	400nM	5291-5310
	COG1R	CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C	400nM	5354-5375
	RING1-TP(a)	FAM-AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA-TAMRA	300nM	5340-5359
	RING1-TP(b)	FAM-AGA TCG CGG TCT CCT GTC CA-TAMRA	100nM	5340-5359
ノロウイルス G II	COG2F	CAR GAR BCN.ATG TTY AGR TGG ATG AG	400nM	5003-5028
	COG2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	400nM	5080-5100
	RING2-TP	FAM-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT-TAMRA	100nM	5048-5067
A群ロタウイルス	ARV NSP3-F	GGC TTT TAA TGC TTT TCA GTG GTT G	200nM	1-25
	ARV NSP3-R	ACA CTG CAG CTT CAA AAG AAG	200nM	75-96
	ARV probe	FAM-TGC TCA AGA TGG AGT CTA CTC AGC AGA TGG-BHQ	100nM	27-56
C群ロタウイルス	CRV VP6-F	GGA AGC GTC ATG GGT TTA AGA TA	200nM	542-564
	CRV VP6-R	CAT TTT CAG CTA GGG TGG AA	200nM	604-623
	CRV probe	FAM-TAT ACA ACA AGT AAT ACT TGT CAA ATT GCA GCA TTT G-BHQ	100nM	566-602
	SaV124F	GAY CAS GCT CTC GCY ACC TAC	400nM	5078-5098
	SaV1F	TTG GCC CTC GCC ACC TAC	400nM	700-717
サポウイルス	SaV5F	TTT GAA CAA GCT GTG GCA TGC TAC	400nM	5112-5135
	SaV1245R	CCC TCC ATY TCA AAC ACT A	400nM	5163-5181
	SaV124TP	FAM-CCR CCT ATR AAC CA-MGB	200nM	5105-5118
	SaV5TP	FAM-TGC CAC CAA TGT ACC A-MGB	200nM	5142-5157
アストロウイルス	AstV cap-F	TAC CTG AYY TWG AAT CAC TCC	200nM	4126-4147
	AstV cap-R	GAA GCT GCT TTG CAG TCC	200nM	4235-4252
	AstV probe	FAM-AGT TGC TTG CTG CGT TCA TGG CAG A-TAMRA	100nM	4169-4193
アイチウイルス	AiV-F274	CCA GCC TGA CGT ATC ACA GG	600nM	274-293
	AiV-R313	CAC AAT TGC CAC GTG AGC AGC TT	600nM	335-313
	AiV-P294	FAM-CTG TGT GAA GYC C-MGB	320nM	294-306

※positionは以下の参照株に基づく

サポウイルス SaV124F、SaV1245R、SaV124TP: AY237430(GII Mc10)

SaV1F: U73124 (GI Parkville) SaV5F, SagV5TP: AY646856 (NK24)

アストロウイルス: L23513 アイチウイルス: AB040749

結果及び考察

1 PEG 沈殿法による回収率の測定

超純水1 L あたり 2.97×10^7 コピーの NVGII を添加した溶液を試料とし、添加回収試験を4回実施した.

NVGII の回収量は $2.26 \times 10^6 \sim 2.67 \times 10^6$ コピー/L,回収率は $7.62 \sim 8.98\%$ (平均8.14%,標準偏差0.65)であった.

一方,過去に当所で行った下水中のウイルス調査⁷¹において,陰電化膜法を用いた同様の回収率測定を行い,回収率は1.96~21.88%(平均12.62%,標準偏差8.18)であった.PEG 沈殿法は陰電化膜法と比較し,平均回収率は若干低いが,ばらつきが小さく回収率が安定していることから,本研究ではPEG 沈殿法を用いることとした.

2 流入下水の実態調査

(1) NVGI

下水中の NVGI のウイルス遺伝子量を図1に示した. なお, 各月の右端にある黒一色のグラフは, 2回目に採取した試料 A の結果である. 感染性胃腸炎がヒトにおいて検知された流行 (以下市中流行という) が見られた 12 2019年12月から2020年3月以外は 7 11× 7 10 3 ~ 5. 7 × 10 4 コピー/Lの間で各試料とも散発的に検出された. 4月から11月の間の検出頻度は, 2020年の方が高かった. 2年間の測定結果から, NVGI は市中流行期以外は概ね 7 コピー/ 1 L で推移しており, 市中流行があると, 検出量は 10 6 以上増加すると考えられた.

市中流行期以外で、2020年8月の試料 A で4.15×10⁵コピール と高いウイルス遺伝子量が検出されたことから、下水処理施設 A の処理地域で一過性に NVGI が流行した可能性が示唆された。2020年11月以降は市中流行は見られなかったが、下水中のウイルス遺伝子量の増加傾向が認められており、感染者の増加が推測された。

(2) NVGII

下水中の NVGII のウイルス遺伝子量を図2に示した. 2019年4月から6月にはウイルス遺伝子量が 10^5 コピー/Lを超えたが、7月から10月にはそれ以下となった。2019年11月以降ウイルス遺伝子量は増加し、NVGIと同様に2020年1月から3月にかけてピークを形成した。市中流行が見られなかった2019年7月から10月及び2020年4月以降のデータから、NVGII は常時 10^4 から 10^5 コピー/Lの間で下水から検出されることが判明した。市中流行が見られた2019年11月から2020年3月には6試料全てからウイルス遺伝子が検出された。一方、検出量は各試料で最大50倍程度の開きがあった。

(3) RotaA

下水中の RotaA のウイルス遺伝子量を図3に示した. RotaA は通年で検出されており、特に試料 B 及び C では全ての月で検出された。検出ウイルス量は NV より10倍ほど多く 10^4 から 10^6 コピー/L の範囲であった。2019年4月から7月の試料では、ほぼ全ての試料で 10^6 コピー/L を超える

ウイルス遺伝子が検出された.この時期はヒトにおけるロタウイルスの流行の時期と一致していた¹²⁾.市中流行があると、下水からの検出量が10倍以上増加すると考えられた.

(4) RotaC

下水中の RotaC のウイルス遺伝子量を図4に示した. RotaC は散発的に検出された. 2020年10月以降は全ての試料で検出されなかった. また, 試料 E では一度も検出されなかった.

(5) SaV

下水中の SaV のウイルス遺伝子量を図5に示した. SaV は通年で検出された. 2019年4月から2019年10月までは概ね $10^5 \sim 10^6$ コピー/L のウイルス遺伝子が検出された. 2019年11月からウイルス遺伝子量は増加し、2020年3月にかけてピークを形成した. ウイルス遺伝子量が最も多かったのは2月の試料 C で1. 01×10^7 コピー/L だった. 2020年4月以降はウイルス遺伝子量は減少し、2020年5月以降は 10^5 コピー/L を下回った. NV 同様、市中流行が見られない時期には、 10^4 から 10^5 コピー/L の SaV が検出されることが判明した. また、2019年8月の試料 B のように明らかな市中流行が探知されなくても、前の月と比較して下水中の遺伝子量が少なくとも10倍から1006倍増加することがあり、ヒトからの排出の増加を下水で探知できると考えられた.

(6) Ast

下水中のAstのウイルス遺伝子量を図6に示した.2019年4月から2020年4月の期間では、ほぼ全ての試料でAstが検出された.2019年4月から2019年11月までは概ね10⁶コピー/L以下のウイルス遺伝子量だったが、その後増加し、2020年1月から2020年3月にかけてピークを形成した.ウイルス遺伝子量が最も多かったのは2020年1月の試料Eで1.00×10⁷コピー/Lだった.2020年4月以降は10⁵コピー/L以下のウイルス遺伝子量となり、検出頻度も大きく減少した.下水からの検出結果を見ると2019年は少なからず流行があったのではないかと推測された.一方、2020年は検出頻度が極端に低くなった.これは、市中流行のない時期のAstの検出レベルが他のウイルスと異なり、今回用いている濃縮方法、定量リアルタイム PCR の検出限界よりも低い可能性が考えられた.

(7) Aichi

下水中の Aichi のウイルス遺伝子量を図7に示した. Aichi はほぼ全ての試料で通年で検出された. 検出ウイルス遺伝子量は概ね10⁶コピー/L 以下だったが, 2020年1月から3月及び2021年1月から3月の試料で10⁶コピー/L を超えるウイルス遺伝子量が検出され, 1月から3月の冬季にウイルス遺伝子量が増加する傾向が認められた. しかし,市中流行が見られた2019年,流行が見られなかった2020年とも同様のパターンを示していることから, Aichi に関しては, 胃腸炎の流行との関連は小さいのではないかと考えられた.

埼玉県の2019年冬季の感染性胃腸炎患者報告数は例年よ

りやや少ないものの、2019年12月から2020年2月頃にかけて増加が認められた¹²⁾. 一方、2020年3月以降の患者報告数は過去最低の水準で推移し、2020年12月以降も冬季の患者報告数は増加しなかった. 特に2020年度ほど小規模のものは過去5年間をさかのぼる限り見られなかった¹¹⁾. 従って、本調査で得られた2020年度のデータは感染性胃腸炎の市中感染が極めて小さい1年間における、いわばベースラインの下水中ウイルス遺伝子量の推移と近似していると考えられた.

流入下水中のNVGI,NVGII,SaV及びAst遺伝子は感染性胃腸炎患者報告数の増加に伴い,2019年11月から2020年3月に増加した.一方,市中流行が認められなかった2020年度は流入下水中のウイルス遺伝子量は季節性の変化はみられたものの,2019年度のような大きな変動はなかった.このことは流入下水のウイルス遺伝子量が顕性,不顕性を問わず感染者の増加を反映していることを示しており,下水中のウイルス遺伝子調査で各ウイルスの流行状況を把握可能であることを示唆している.また,各処理地域のウイルス遺伝子の変動をみることで,地域ごとに流行をとらえることも可能であろう.

RotaA に関しては、市中流行が認められない場合でも、NV 等よりも多くのウイルス遺伝子量が流入下水から検出された. これは RotaA に感染した場合には NV 等に感染した場合よりも多量のウイルス (便1 g あたり10¹⁰個)を排泄すると報告されていること¹³⁾、また、ワクチン接種後の一定期間にウイルスが糞便中に排泄されること等による影響ではないかと推察される. さらに、ロタウイルスは感染を何度も繰り返し、繰り返すごとに症状が軽度になり、成人では不顕性感染も多いとも報告されている¹⁴⁾. このような特徴から、流入下水中のウイルス遺伝子量も年間を通して多いのではないかと思料された.

RotaC は感染性胃腸炎患者から検出されることもまれなウイルスであるため、ほとんど検知することができない状態であり、流入下水からの検出も非常に散発的であった.しかし、散発的であっても流入下水から検出されているということは RotaC の感染者がある程度存在したことを示しており、アウトブレイク発生時に流入下水の調査により察知できる可能性がある.今後検討していく価値があると考えられた.

Aichi はNV やSaV が検出された患者便から重複して検出されることが多くあるが、2019年、2020年ともに同じような検出状況を示していた. 近年他の地域の調査でも Aichi が通年でほぼ一定量が検出されることが報告されており¹⁵⁾、感染性胃腸炎の市中流行とは連動していないと考えられた.

3 放流水の実態調査

放流水 A 及び B の除去率を表2及び表3に示した.

放流水 A では、試料 A で通年で検出量の多かった RotaA 及び Aichi が、ほかのウイルスが2019年の夏季から秋季にかけて、除去率100%なのに対し、複数回検出された.また、ウイルス検出量が多かった2019年4月と5月及び2020年1月

から3月で各ウイルス遺伝子が検出された.この期間以外では大部分が100%除去されており、検出された場合もほとんどが95%以上の除去率であった.また2020年1月から3月についても RotaA を除き95%以上の除去率であった.これらのことから下水処理で各ウイルスは適切に処理されていると考えられた.しかし、2019年4月及び5月は各ウイルスの除去率の多くが80%以下であった.この間に試料 A で検出されたウイルス遺伝子量は他の月と比較して特別に多くはないため、活性汚泥処理した後の汚泥と処理水の固液分離時に汚泥の微細フロックが処理水に混入したなどの原因が考えられた.

放流水Bでも放流水Aと検出時期及び検出ウイルスの傾向は同じであったが、放流水Aよりもウイルス遺伝子量が多く検出頻度が高い傾向にあった。また、2019年8月及び2020年1月に、RotaAが試料Bよりも放流水Bの方が遺伝子量が多く検出された。活性汚泥処理した後の汚泥と処理水の固液分離時に汚泥の微細フロックが処理水に混入したなどの原因が考えられた。

埼玉県感染症発生動向調査の患者報告数によると,調査期間内の感染性胃腸炎の流行はほとんどなかった¹¹⁾.数年に一度,NVによる感染性胃腸炎の大流行が発生しているため,より大量のウイルスが下水処理施設に流入した場合に,どの程度ウイルスが処理できるのか確認することは今後の課題であり,継続的な調査が必要であると考えられる。今回の調査では,ウイルスの流入量によって除去率に影響を与える可能性が示唆された.

4 遺伝子型別

(1) NVGI

NVGIの分子系統樹を図8に示した.調査期間中に埼玉県内の集団事例及び散発事例において NVGI の検出はなかったため、当所に搬入された県外事例の患者株及び GenBankに登録された株と合わせて分子系統樹を作成した. GI.1、GI.2、GI.3、GI.4、GI.5、GI.6、GI.7の7種類の遺伝子型が検出された. 検出時期及び下水処理施設で検出された遺伝子型の偏りは認められなかった.

GI.1, GI.4及び GI.5は検出された同じ遺伝子型の塩基配列は類似していた.

GI. 2は試料 D の一部 (図8中の A) がやや離れた場所に位置した. 他の検出株との相同性は約94%で, GenBank にもこれ以上相同性の高い株は登録されていなかった. 最も相同性が高かった株は2019年に韓国で下水から検出された株だった.

GI.3は大きく5つのサブクラスター (3A~3E) にわかれ たが、それぞれのサブクラスター内での塩基配列は類似 していた.

GI. 6は2つのサブクラスターにわかれ、一方は2019年に韓国で下水から検出された株に、もう一方は2015年中国及び2016年にロシアで臨床検体から検出された株と最も相同性が高かった.

GI.7は検出された数が少なく、同様に検出数の少なかった GI.1と比較し各株の相同性が低い傾向にあった.

(2) NVGII

NVGII の分子系統樹を図9に示した. GII. 2, GII. 3, GII. 4, GII. 6, GII. 7, GII. 12, GII. 13, GII. 17の8種類の遺伝子型が検出され、検出時期及び下水処理施設で検出された遺伝子型の偏りは認められなかった. また,同じ遺伝子型の検出株の塩基配列は類似していた.

検出件数が多かった遺伝子型は GII. 2, GII. 3, GII. 4, GII. 17で調査期間中の患者検体からも検出されたことから、複数の遺伝子型が流行していたことが示唆された. GII. 4の検出株の中に、2016年に大阪市から報告された GII. P16-GII. 4 Sydney2012変異株¹⁶⁾ が含まれるサブクラスター(図9中のAI)が検出された. また、オーストラリアで臨床検体から検出された GII. 4 Sydney2012変異株が含まれるサブクラスター(図9中のA2)も検出された. NVは頻繁に遺伝子組み換えによる変異を起こし、その組み換えウイルスが大きな流行をもたらすことがある. 今回、下水の検査においても組み換えウイルスを検出できたことから、下水の検査をすることで新たな組み換えウイルスの早期探知ができる可能性が示唆された. 今後の臨床検体から検出される遺伝子型のデータと照合し、仮説を検証する必要があると考える.

(3) SaV

SaV の分子系統樹を図10に示した. GI が GI.1, GI.2, GI.3, GI.4の4種類, GII が GII.1, GII.2, GII.3, GII.4, GII.5, GII.7の6種類, その他にGIV及びGV.1が検出され, 合わせて12種類の遺伝子型が検出された. 同じ遺伝子型の検出株の塩基配列は類似していた. 検出件数が多かった遺伝子型はGI.1, GI.2, GII.1, GV.1で, 複数の遺伝子型が流行していた可能性が示唆された. しかし, 調査期間中の患者検体は GII.1が1件検出されたのみだったため, 感染性胃腸炎患者の実態がどの程度下水に反映されているか検討することはできなかった.

まとめ

全国における NV, SaV, RotaA の検出報告数は,2019/20シーズン,2020/21シーズンと連続して減少傾向にあり¹⁷⁾,今回の調査における下水中のウイルス遺伝子量も減少傾向にあった。このことから流行状況と遺伝子量にはある程度の相関があることが示唆された。埼玉県における感染性胃腸炎の報告数や食中毒も件数が減少し,2019/20シーズンでは例年より早く件数の減少がみられ,2020/21シーズンにおいては冬季のピークがほぼ見られなかった。このような状態であったことから,市中流行が見られない時期の各ウイルスの下水からの検出状況を把握することができた。

放流水中のウイルス遺伝子量は市中流行期には除去率が 低下する傾向にあった.本調査期間以上に,大量のウイル スが下水に流入した場合に除去率にどの程度影響を与える かを調査するのは今後の課題である.

近年臨床検体から検出・報告されている主要な遺伝子型は下水から検出される割合も多い傾向にあった。一方で、市中流行が見られない時期に、市中流行期には検出されなかった遺伝子型のウイルスも検出された。下水中のウイルスを調査していくことで、新たな変異株等の検出や、ロタウイルスにおけるワクチン株の影響などの把握が可能となると期待される。

また、今回検出された遺伝子型が今後の胃腸炎の流行の原因ウイルスとなる可能性もあるため、今後も腸管系ウイルスの流行状況を注視していくことは重要である.

文献

- 1) 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
- 同一検体からサポウイルスとアストロウイルスが重 複検出された胃腸炎集団事例.病原微生物検出情報, 37(3),54-55,2016
- 3) 葛谷光隆, 木田浩司, 溝口嘉範, 他: 胃腸炎ウイルス の疫学的研究 —下水を用いたヒトC群ロタウイルスサ ーベイランスの有効性—. 岡山県環境保健センター報, 36, 95-99, 2012
- 4) 大沼正行, 西潟剛: 県内におけるノロウイルスの検出 状況. 山梨衛生環境研究所年報, 62, 49-51, 2018
- 5) 菅原直子, 小泉光, 佐々木美江, 他: 流入下水中の水中 病原ウイルスの挙動. 宮城県保健環境センター年報, 35, 31-35, 2017
- 6) 三浦尚之,風間しのぶ,今田義光,他:感染性胃腸炎流行の早期検知を目的とした下水中ノロウイルスモニタリングの有用性.土木学会論文集 G,72 (7), III_285-294,2016
- 7) 峯岸俊貴,小川泰卓,篠原美千代,他: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),埼玉県衛生研究所報, 53,35-44,2019
- 8) 陶山明子, 諏訪守, 鈴木穣, 他:下水試料からのノロウイルス定量法の検討,環境工学研究論文集,43,2006
- 9) 「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
- 10) 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
- 11) Oka T, Katayama K, Hansman GS et al.: Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology*, 78(10), 1347-53, 2006

- 12) 埼玉県,定点把握対象疾患の動向 https://www.pref.saitama.lg.jp/b0714/surveillance /ryuukou.html, 2021年5月14日参照
- 13) 厚生労働省, ロタウイルスに関する Q&A. https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkakukansenshou19/Rotavirus/index.html, 2021年7月14日 参照
- 14) 国立感染症研究所,ロタウイルス感染性胃腸炎とは. https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/3377-rota-intro.html, 2021年7月19日参照
- 15) Kitajima M, Gerba CP: Aichi Virus 1: Environmental Occurrence and Behavior. *Pathogens*, 4, 256-258, 2015
- 16) 集団胃腸炎事例からのノロウイルス GII.P16-GII.4 Sydney_2012の検出―大阪市病原微生物検出情報, 37 (7), 136-138, 2016
- 17) ノロウイルス等検出状況 2020/21シーズン (2021年 3月31日現在報告数)

https://www.niid.go.jp/niid/ja/norovirus-m/2082-idsc/iasr-noro/5701-iasr-noro-150529.html, 2021年5月14日参照

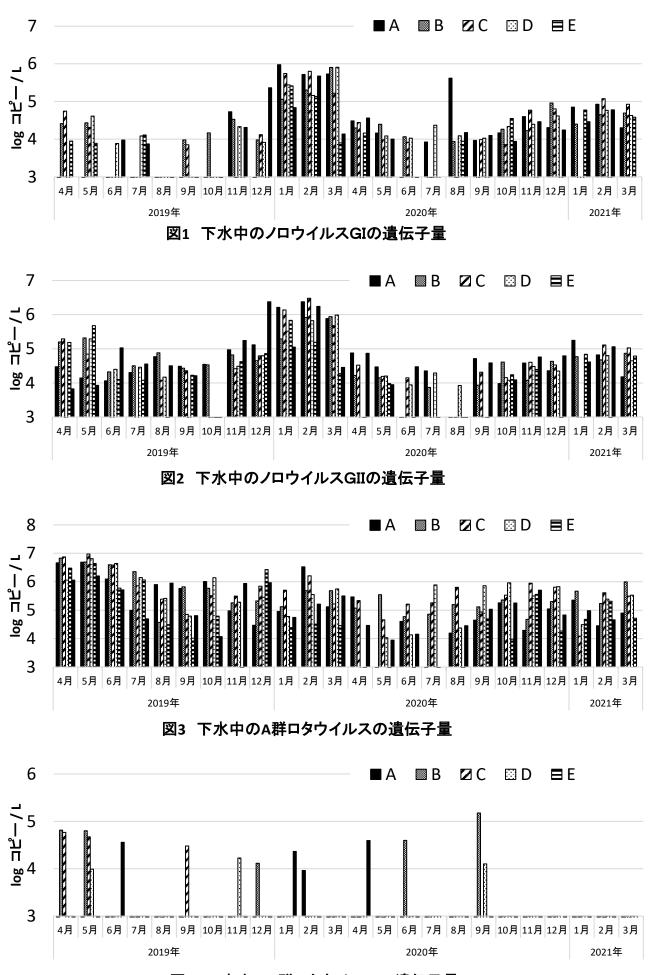
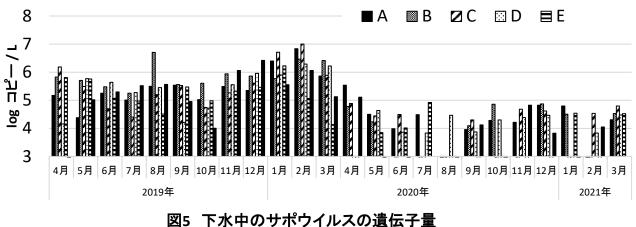
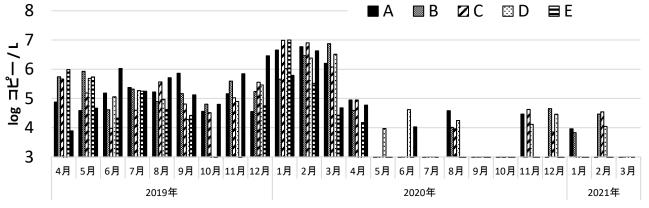


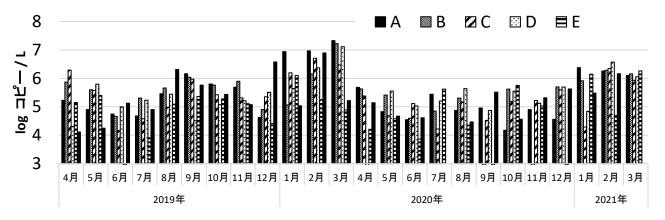
図4 下水中のC群ロタウイルスの遺伝子量



下水中のサポウイルスの遺伝子量



下水中のアストロウイルスの遺伝子量



下水中のアイチウイルスの遺伝子量 図7

表 2 放流水 A の除去率

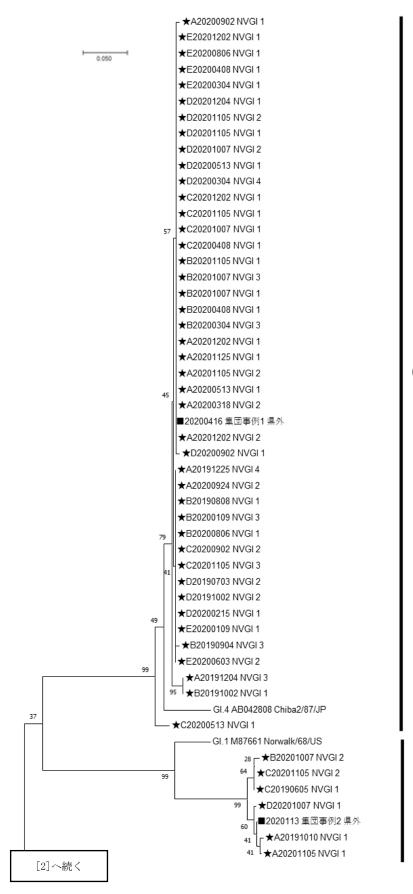
採水月	NVGI	NVGII	RotaA	RotaC	SaV	Ast	Aichi
2019年4月	_	49.15%	56.82%	_	90.81%	73.67%	82.59%
2019年5月	_	42.96%	71.90%	_	100.00%	80.39%	79.66%
2019年6月	_	100.00%	98.15%	_	100.00%	100.00%	100.00%
2019年7月	_	100.00%	100.00%	_	100.00%	100.00%	100.00%
2019年8月	_	100.00%	97.47%	-	100.00%	100.00%	100.00%
2019年9月	_	100.00%	97.44%	-	100.00%	100.00%	96.61%
2019年10月	_	100.00%	95.06%	-	100.00%	100.00%	96.94%
2019年11月	100.00%	100.00%	100.00%	_	100.00%	100.00%	100.00%
2019年12月	_	100.00%	100.00%	_	100.00%	100.00%	100.00%
2020年1月	100.00%	98.57%	90.96%	_	99.32%	100.00%	100.00%
2020年2月	96.99%	98.84%	99.51%	100.00%	99.81%	98.94%	100.00%
2020年3月	96.71%	95.68%	82.40%	_	97.96%	98.23%	99.62%
2020年4月	100.00%	100.00%	100.00%	-	100.00%	100.00%	100.00%
2020年5月	100.00%	100.00%	-	-	100.00%	-	100.00%
2020年6月	_	-	100.00%	-	100.00%	-	100.00%
2020年7月	100.00%	100.00%	_	-	100.00%	-	100.00%
2020年8月	100.00%	-	100.00%	-	-	100.00%	100.00%
2020 年 9 月	100.00%	100.00%	100.00%	-	100.00%	-	100.00%
2020年10月	100.00%	100.00%	100.00%	-	100.00%	-	100.00%
2020年11月	100.00%	100.00%	100.00%	_	100.00%	100.00%	100.00%
2020年12月	100.00%	100.00%	100.00%	-	100.00%	_	100.00%
2021年1月	100.00%	100.00%	93.86%	-	100.00%	100.00%	100.00%
2021年2月	100.00%	100.00%	100.00%	-	-	_	100.00%
2021年3月	100.00%	100.00%	_	-	100.00%	_	99.18%

-:流入水でウイルス遺伝子が不検出であった検体

表3 放流水Bの除去率

採水月	NVGI	NVGII	RotaA	RotaC	SaV	Ast	Aichi
2019年4月	100.00%	89.25%	72.68%	100.00%	97.28%	96.24%	95.64%
2019年5月	100.00%	94.51%	84.77%	100.00%	100.00%	98.42%	95.56%
2019年6月	-	100.00%	89.02%	_	100.00%	100.00%	100.00%
2019年7月	-	100.00%	90.09%	-	100.00%	100.00%	91.19%
2019年8月	-	100.00%	*	-	99.72%	100.00%	100.00%
2019年9月	100.00%	100.00%	85.34%	-	95.81%	100.00%	83.96%
2019年10月	100.00%	100.00%	84.30%	-	100.00%	100.00%	92.44%
2019年11月	100.00%	100.00%	82.98%	_	100.00%	100.00%	95.30%
2019年12月	100.00%	79.89%	80.14%	100.00%	96.13%	93.21%	100.00%
2020年1月	86.70%	44.94%	*	-	62.13%	50.55%	18.80%
2020年2月	94.21%	89.23%	78.24%	-	93.13%	92.23%	96.14%
2020年3月	91.20%	85.59%	78.41%	-	94.11%	96.62%	98.74%
2020年4月	100.00%	100.00%	87.63%	_	100.00%	100.00%	96.13%
2020年5月	100.00%	100.00%	89.30%	-	100.00%	-	97.14%
2020年6月	100.00%	-	75.77%	100.00%	_	-	62.35%
2020年7月	-	100.00%	75.81%	_	_	-	86.14%
2020年8月	100.00%	-	88.83%	-	-	100.00%	95.71%
2020年9月	-	100.00%	56.43%	100.00%	100.00%	-	-
2020年10月	100.00%	100.00%	95.13%	-	100.00%	-	100.00%
2020年11月	100.00%	100.00%	100.00%	-	_	-	_
2020年12月	100.00%	100.00%	83.24%	_	100.00%	100.00%	100.00%
2021年1月	100.00%	100.00%	85.93%	_	100.00%	100.00%	96.75%
2021年2月	100.00%	100.00%	83.81%	-	-	100.00%	98.98%
2021年3月	100.00%	75.15%	100.00%	-	100.00%	-	96.73%

-:流入水でウイルス遺伝子が不検出であった検体 ※流入水より放流水でウイルス遺伝子量が多くなった検体



GI.4

VP1 領域(約300 塩基)

★:下水検体

アルファベットは試料(A~E)を, 続く数字は検体採取年月日を示す. 最後の数字は各検体から得られた 配列に異なる番号を振った.

■:患者検体(集団事例) 検体採取年月日,事例番号, 発生場所の順に記載した. ☆:2019年に韓国の下水から 検出された株(MW532429) ☆2:2015年に中国の臨床検体 から検出された株(KU724081) ☆3:2016年にロシアの臨床検体 から検出された株(KY210910)

GI.1

図 8 NVGI 系統樹解析 (NJ 法) [1]

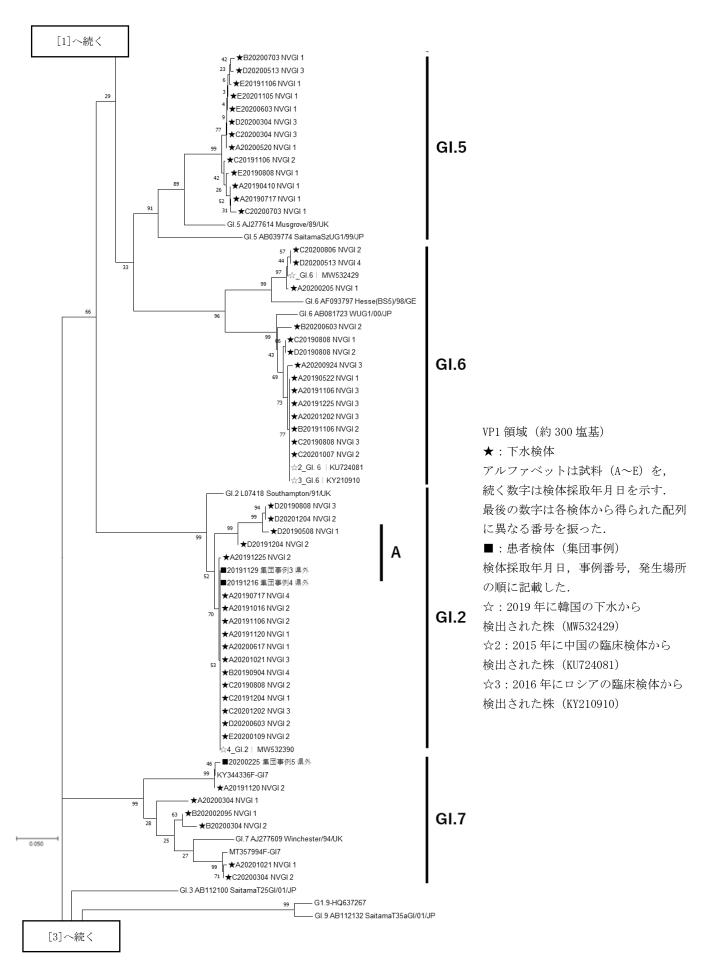


図 8 NVGI 系統樹解析 (NJ 法) [2]

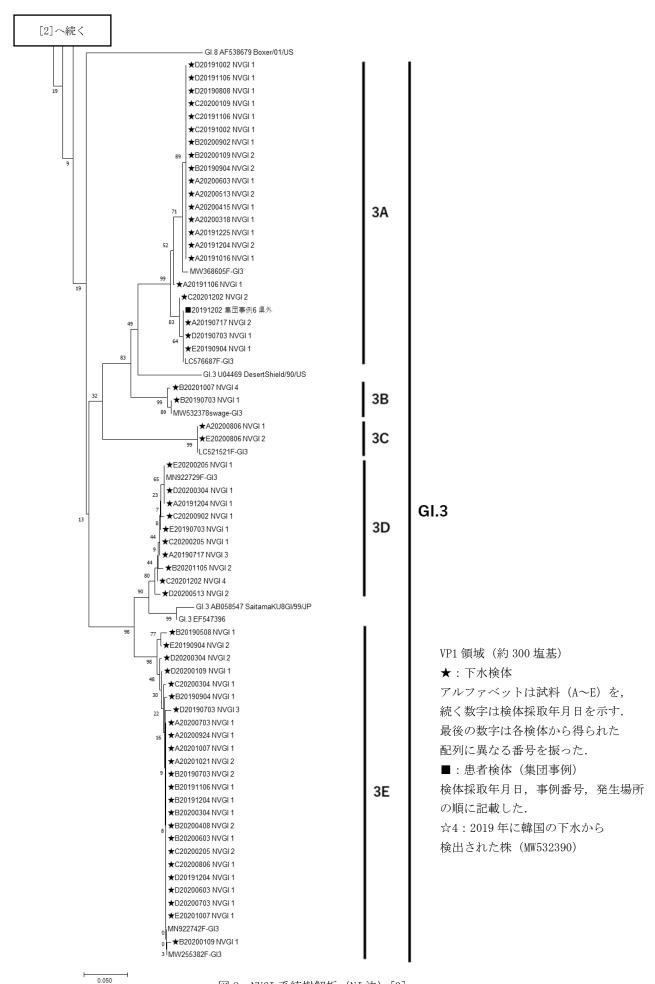
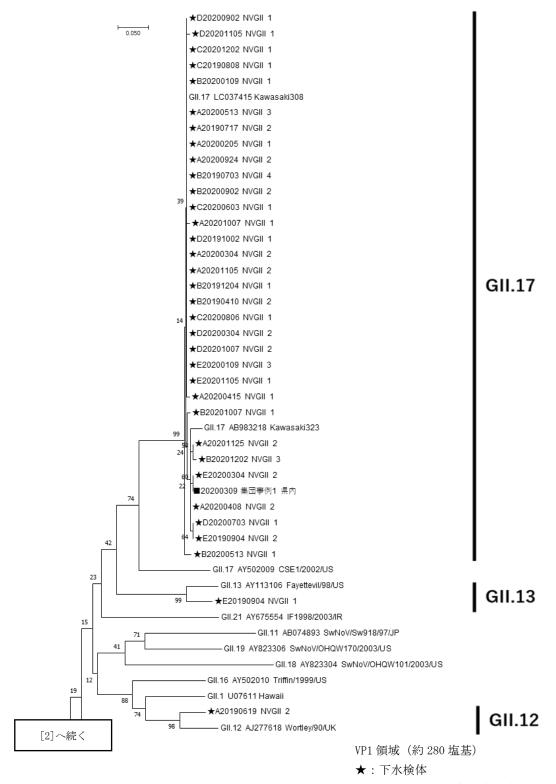


図 8 NVGI 系統樹解析 (NJ 法) [3]



アルファベットは試料 (A~E) を,続く数字は検体採取年月日を示す.

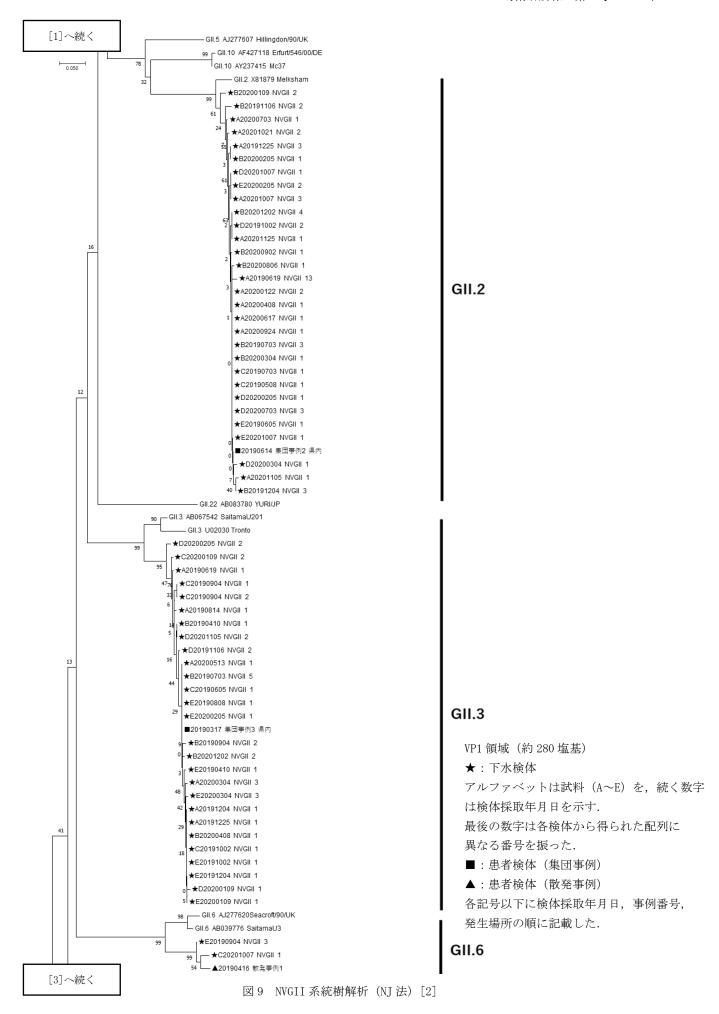
最後の数字は各検体から得られた配列に異なる番号を振った.

■:患者検体(集団事例)

▲:患者検体(散発事例)

各記号以下に検体採取年月日,事例番号, 発生場所の順に記載した.

図 9 NVGII 系統樹解析 (NJ法) [1]



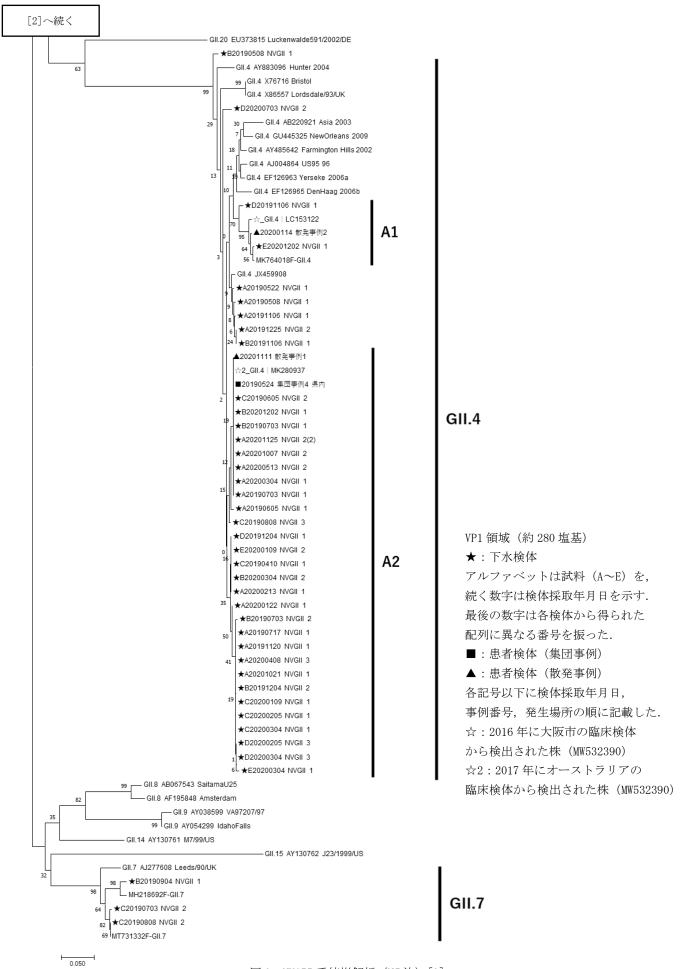


図 9 NVGII 系統樹解析 (NJ法) [3]

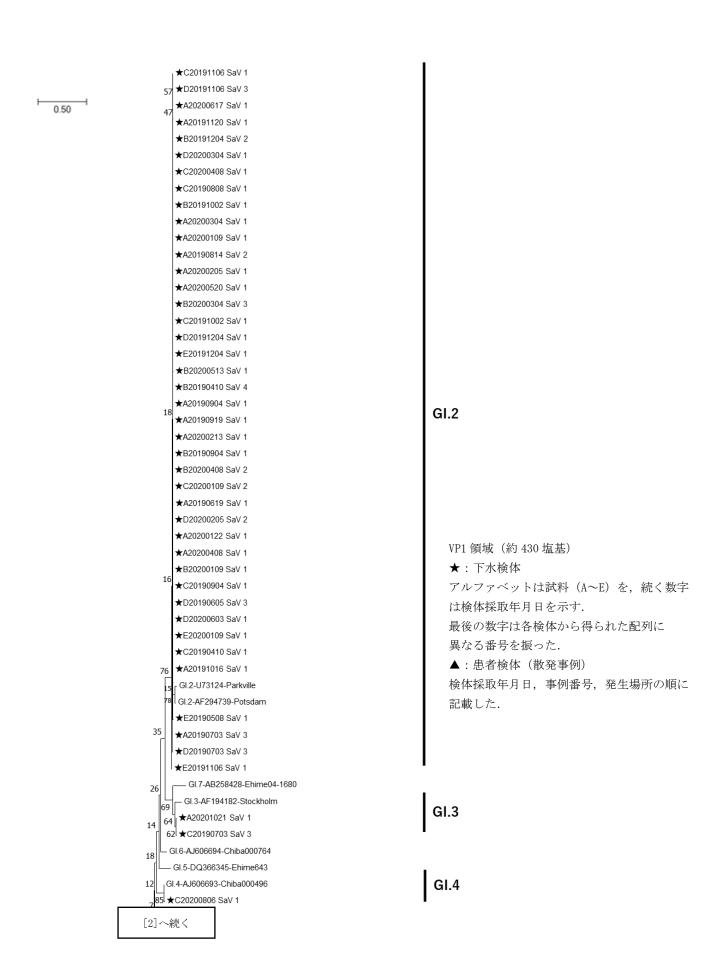


図 10 SaV 系統樹解析 (NJ 法) [1]

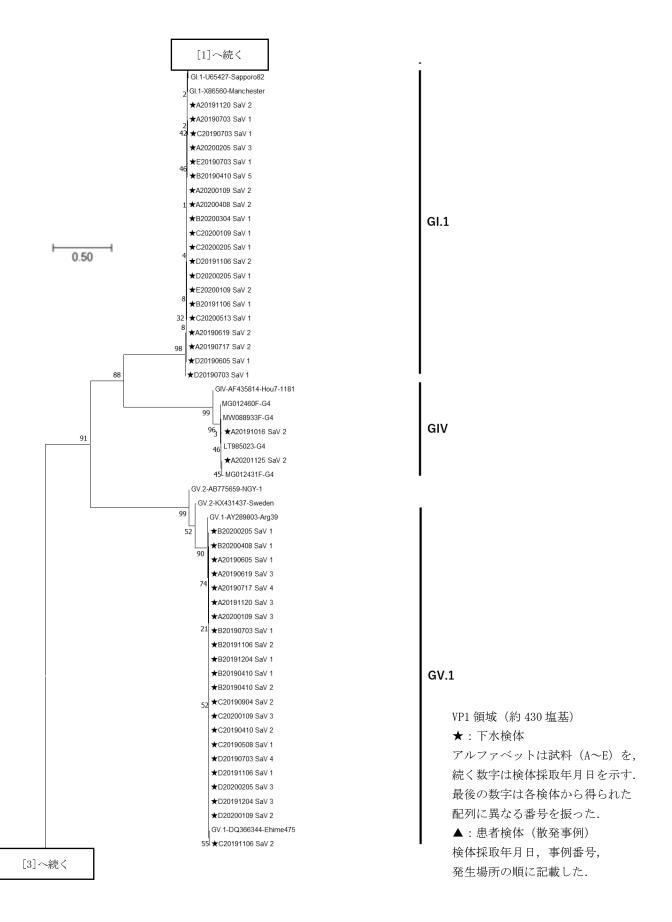
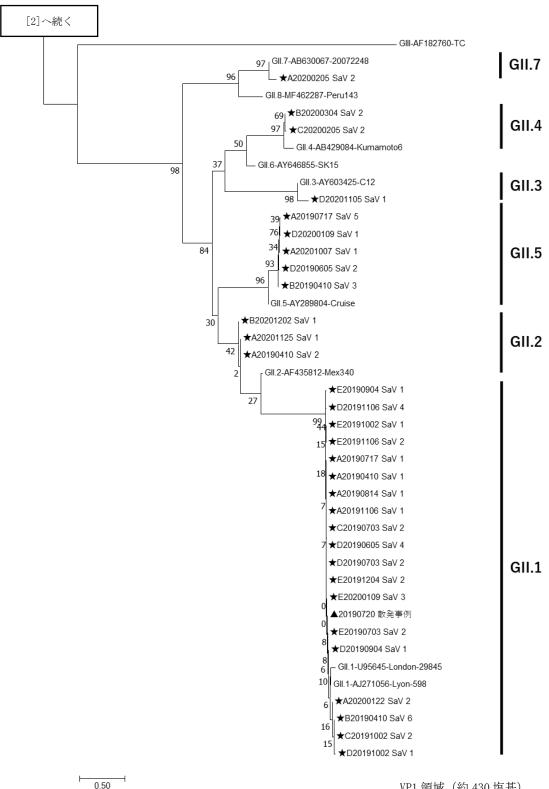


図 10 SaV 系統樹解析 (NJ 法) [2]



VP1 領域(約 430 塩基)

★:下水検体

アルファベットは試料 (A~E) を, 続く数字は 検体採取年月日を示す. 最後の数字は各検体 から得られた配列に異なる番号を振った.

▲:患者検体(散発事例)

検体採取年月日,事例番号,発生場所の順に 記載した.

図 10 SaV 系統樹解析 (NJ 法) [3]