

下水処理施設および河川水におけるノロウイルス(NV)の挙動

The Behavior of *Norovirus* (NV) in the Wastewater Treatment Plant and the River

植木 洋 菊地 奈穂子 山木 紀彦
後藤 郁男 沖村 容子 秋山 和夫

Yo UEKI, Naoko KIKUCHI, Norihiko YAMAKI
Ikuo GOTO, Yoko OKIMURA, Kazuo AKIYAMA

感染性胃腸炎の流行期に患者便、下水処理場流入水・放流水および河川水から検出される*Norovirus* (NV) を定量PCR法で測定した。その結果、下水流入水のNV遺伝子数の推移は感染性胃腸炎患者数の増減と連動することが明らかとなった。また、今回調査対象とした下水処理場におけるNVの除去効率は、 $1.3 \log_{10}$ から $2.6 \log_{10}$ であった。

キーワード：ノロウイルス；下水処理場；NV除去効率；定量PCR

Keywords : *norovirus* (NV) ; the wastewater treatment plant ; removal efficiency of NV ; Real-time PCR

1 はじめに

ノロウイルス (NV) は感染性胃腸炎やウイルス性食中毒の主な病原因子である。NVは1997年に食品衛生法施行規則の一部改正により食中毒病原物質に追加されて以降、NVによる食中毒の実態が明らかになり、特に届け出患者数では平成12年以降平成14年までの毎年、単独の病原物質としては最も多く報告されている¹⁾²⁾。国立感染症研究所の調査によると、NVが原因の食中毒事例において患者数が2名から8名の小規模事例および9名から32名の中規模事例では、34%から41%の事例がかきを原因食品と推定しており、NVによる食中毒はカキの喫食と密接に関係していることを報告している³⁾。NVの養殖カキへの汚染経路について、我々はこれまでに汚染経路の一つとして、ヒト～下水処理場～河川～カキであることをNV遺伝子の分子疫学的解析により明らかにした⁴⁾。下水処理過程でのNVの挙動に関し、定性的に調査した報告⁵⁾はあるが定量的に実態を把握した報告は少ない。今回我々は感染性胃腸炎の流行期に患者便、下水処理流入水・放流水、下水放流水が排水されている河川を対象にNVの検出検査を定量PCR法で行い、それぞれの検体から検出されるNVの量的実態把握、下水処理場におけるNVの除去効率の評価を目的に調査を実施したので報告する。

2. 材料および方法

2.1 材料

2.1.1 感染性胃腸炎患者便：A地区の医療機関で2003年12月1日～2004年1月28日の期間中に採取した26件

2.1.2 下水処理場流入水（以下流入水）：A地区の下水処理場で2003年12月12, 18, 25日, 2004年1月6, 15, 26日に採取した6件

2.1.3 下水処理場放流水（以下放流水）：2.1.2と同時に採取した6件

2.1.4 河川水：A地区の下水処理場放流水が流れ込む同地区内の河川で2003年11月28日, 12月12, 25日, 2004年1月6, 15, 26日に採取した6件

2.2 方法

2.2.1 ウイルスの濃縮

イ. 感染性胃腸炎患者便：便は蒸留水で約10%乳剤を作成し、10,000rpm, 10分間遠心後上清をウイルス抽出液とした。

ロ. 下水流入水・放流水, 河川水：検体1 Lにpolyethylene Glycol 100 g, NaCl 23g加え4℃で一夜攪拌後、10,000 rpm, 30分間遠心した。上清を吸引除去後、沈渣を2 mlの蒸留水で懸濁しウイルス濃縮液とした。

2.2.2 ウイルスRNAの抽出

QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN) でウイルスRNAを抽出した。なおRNA誘出量は60 μ lとした。

2.2.3 NV遺伝子の検出ならびに定量

影山らの方法⁶⁾に従った。すなわち抽出したRNAをDNase処理後、Random primerを用いた逆転写反応によりcDNAを作成した。cDNAを鋳型にG I型はCOG1F/R primerおよびRING1-TP (a), RING1-TP (b) probe, G II型はCOG 2 F/R primerとRING 2-TP probeにより定量PCRを行った。

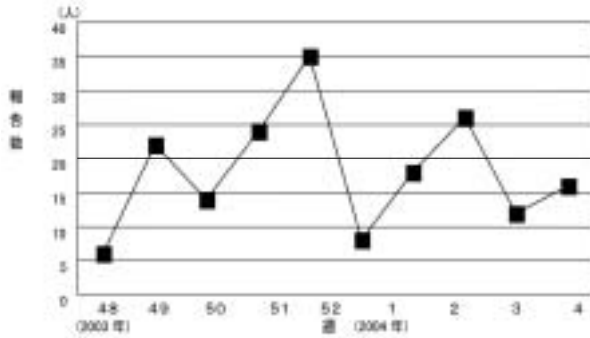


図1 A地区における感染性胃腸炎患者報告数(人)

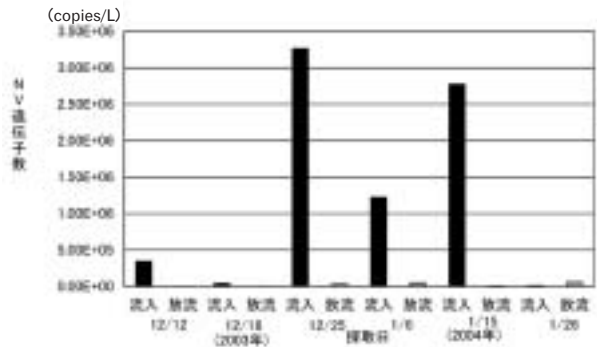


図3 下水処理場流入水および放流水中のNV遺伝子数の推移

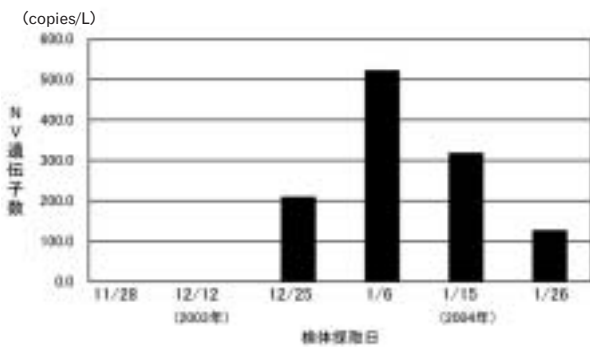


図2 河川中のNV遺伝子数の推移

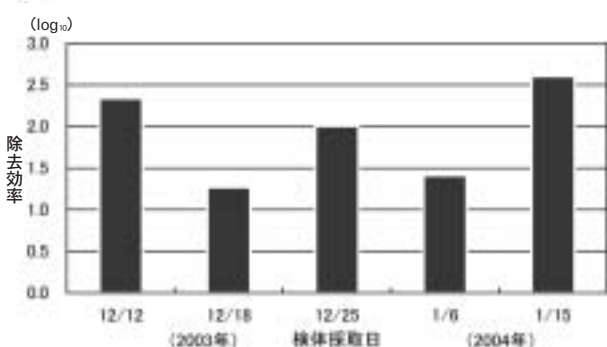


図4 下水処理場でのNVの除去状況

3 結 果

3.1 A地区における感染性胃腸炎患者の推移

A地区における感染性胃腸炎患者数は、2003年の第48週（11月24日から11月30日）まで10人以下で推移していたが、49週から急増し第52週（12月22日から12月28日）にピークに達した（図1）。

調査期間中、感染性胃腸炎と診断された患者26名より糞便を採取し病原因子を検索した結果、16名（61.5%）からNV遺伝子が検出され、この期間に流行が認められた感染性胃腸炎の主な病原物質はNVであることが確認された。

3.2 各種検体から検出されたNV遺伝子数

3.2.1 感染性胃腸炎患者便

感染性胃腸炎患者便26件を対象に定量PCR法によるNV遺伝子の検出検査を行った結果、陽性便1gに含まれるNV遺伝子数は、最も少ない検体で 1.9×10^2 copyで最大値は 4.3×10^7 copyで平均 5.5×10^6 copyであった。なお、検出されたNVの遺伝子型はすべてG II型であった。

3.2.2 河川水

河川水からは12月25日以降毎回NV遺伝子が確認された。検出されたNV遺伝子はすべてG II型であった。NVが検出された検体の1L中の遺伝子数は、最大で521.7 copy、最小で126.1 copyであった。（図2）

3.2.3 下水処理場流入水・放流水

流入水および放流水からは調査期間中毎回NV遺伝子が確認された。12月25日、1月6日、15日の流入・放流水、

1月26日の放流水からはG IおよびG II両型のNVが検出された。それ以外に検出されたNVの遺伝子型はすべてG II型であった。流入水1L中のNV遺伝子数の最大値は12月25日に検出された 3.3×10^6 copyであった。同様に放流水1L中では1月26日の検体から検出された 5.9×10^4 copyが最大値であった。（図3）なお、1月26日に採水した流入水の定量値が著しく低いのはPEG法でウイルス濃縮した際に、通常確認されない高い粘性が認められ、そのことがウイルスRNAの抽出に影響を及ぼし、定量値に反映されたと考えられる。

3.4 下水処理場でのNVの除去効率

流入水と放流水に含まれるNV遺伝子を定量し、下水処理場でのNVの除去効率を調査した結果、 $1.3 \log_{10}$ から $2.6 \log_{10}$ の除去が確認された。なお、今回調査を行った下水処理場は流入から放流までの処理時間が通常の状態では約30時間であり、除去効率を確認するためには時間差を考慮する必要があると考えられた。しかし、12月25日、1月6日、15日の調査結果では流入水のNV定量値に大きな変化が確認されなかったことからこの期間中において処理時間の影響は少ないと考えられた。（図4）

4 考 察

今回調査対象とした下水処理場は、オキシデーショニング法により処理が行われており、この下水処理場におけるNVの除去効率は、感染性胃腸炎の流行期で $1.3 \log_{10}$ から $2.6 \log_{10}$ と他の腸管系ウイルスの除去効率⁷⁾と

大きな変化は認められなかった。遺伝子型別の平均除去効率はG I 型が $1.63 \log_{10}$ であったのに対し、G II 型は $1.90 \log_{10}$ とG II 型の方がやや高い値であった。佐野らは下水処理場の活性汚泥中にPolio virus binding-protein (PBP)の存在を明らかにしている⁸⁾。G I 型とG II 型の除去効率の差が同じ様なメカニズムから生じるか否かについては興味深い問題である。

下水流入水でのNVの消長は、この地区の胃腸炎患者数の増減と同じような挙動を示しており、両者の間には密接な関連が推測された。

カキの浄化法については現在検索中であり、画期的な方法の確立までにはまだ時間を要すると考えられる。今回の調査結果より、養殖カキのNV汚染リスクを抜本的に軽減するためには、カキへ蓄積されるまでのメカニズムの解明はもちろんのこと、汚染経路の一つである下水処理過程でのNVの除去は重要であると示唆された。

参 考 文 献

- 1) 厚生省生活衛生局長通知“食品衛生法施行規則の一部を改正する省令の施行について”平成9年5月30日, 衛食第155号 (1997).
- 2) 厚生労働省“食中毒・食品監視関連情報”, <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/>, (2004. 2. 23).
- 3) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報, 20, 265 (1999).
- 4) 植木 洋, 秋山和夫, 渡部 徹, 大村達夫: 環境工学論文集, 40, 607 (2003).
- 5) 全国ウイルス性食中毒研究班: “厚生科学特別研究事業平成11年度研究報告書”, (2000) (厚生科学特別全国ウイルス性食中毒研究班).
- 6) Kageyama, T., S.Kojima, M.Shinohara, K.Uchida, S.Fukushi, F.B.Hoshino, N.Takeda, and K.Katayama: *Appl.Environ.Microbiol.*, 41, 1548 (2002).
- 7) Y. C. Leong: *Water Science and Technology*, 15, 91 (1983).
- 8) Daisuke, S., T.Matsuo, and T.Omura: *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 3434 (2004).