

流入下水中の胃腸炎ウイルスの動向(2020~2024年度)

花田裕司、藤沼裕希¹⁾、中村和宏²⁾、小川貴史³⁾、堀田千恵美¹⁾

Trends in gastroenteritis viruses detected in wastewater (2020-2024)

Yuji HANADA, Yuki FUJINUMA, Kazuhiro NAKAMURA, Takashi OGAWA, and Chiemi HOTTA

要旨

感染症の流行状況を把握する方法として、従来から感染症サーベイランス(患者、病原体)が用いられているが、近年、新たな手法として下水サーベイランスが注目されている。今回、2020年9月から2025年3月までの約5年間にわたり、胃腸炎ウイルス(ノロウイルス等)の下水サーベイランスを実施した。調査期間中、2か所の中継ポンプ場から流入下水を採水し、逆転写リアルタイムPCR(RT-qPCR)法を用いて胃腸炎ウイルスを種類別に測定した。結果、下水から複数種類の胃腸炎ウイルスが検出され、検出頻度はウイルス種によって異なることが明らかとなった。

キーワード：下水サーベイランス、流入下水、胃腸炎ウイルス

Keywords : wastewater surveillance, wastewater, gastroenteritis virus

(令和7年9月5日受付 令和7年11月14日受理)

はじめに

感染性胃腸炎の主要な原因病原体となる胃腸炎ウイルスは、ノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、ロタウイルスと複数存在する¹⁾。これらのウイルスは主に小児での感染例が多いが、成人にも感染を引き起こすことが知られている。また、食品衛生上も重要なウイルスであり、食中毒の原因として患者数が最も多い病原体の一つであることから、より詳細な流行状況の把握が求められている²⁻³⁾。感染性胃腸炎は、感染症発生動向調査事業において定点把握疾患に指定されており、患者数の報告は小児科定点医療機関から届出が行われている(以下、患者サーベイランス)。さらに、小児科病原体定点医療機関から感染性胃腸炎患者の検体が、基幹病原体定点医療機関から感染性胃腸炎(ロタウイルスに限る)の検体が提出され、当所にて原因病原体の探索が実施されている(以下、病原体サーベイランス)。これらのサーベイランスは小児を中心とした患者報告や顕性感染により提出された検体に基づくものであり、成人例や不顕性感染例を十分に捉えることは難しい。

これに対し、下水サーベイランスは症状の有無および年齢に関係なく、感染者から排泄されたウイルスを検出できることなどの特性を持つことから、その有用性についてこれまでも報告されている⁴⁾。

当所では以前より、県内に設置された中継ポン

プ場1か所より流入下水を採水し、逆転写リアルタイムPCR(RT-qPCR)法を用いて胃腸炎ウイルスごとに測定を行ってきた⁵⁾。さらに2020年9月より採水箇所を2か所に増設し、下水サーベイランス体制の強化を図った。

今回、2020年9月から2025年3月までの期間(以下、対象期間)に2か所の中継ポンプ場で採水された下水中の胃腸炎ウイルス遺伝子のコピー数を種類別に測定した。

材料と方法

1. 採水方法

対象期間において、県内2か所のポンプ場(A、B)で流入下水を月に1回採水した(55回ずつ計110回)。採水した流入下水は保冷剤入りバッグに入れて搬入し、冷蔵で保管し速やかに前処理を行った。

2. 前処理、核酸抽出方法

前処理方法は感染症流行予測調査事業検査術式(令和元年度改訂)に準じて実施した。流入下水500mLについて粗濾過でゴミを除去し、1,920×gで60分間遠心した。上清を分取し、孔径1μmのシリジフィルターで加圧濾過した。これに塩化マグネシウムを最終濃度が0.05Mになるように添加し、1.0N塩酸でpHが3.5になるように調整した。その後、孔径0.45μmの陰電荷膜(ADVANTEC)を用いて加圧濾過を行い、ウイルスを吸着させた。フィルタ

1) 現：千葉県健康福祉部衛生指導課 2) 現：千葉県市川保健所 3) 現：千葉県夷隅保健所

一をシャーレに回収し、ハサミで細断後、50 mL 遠沈管に回収した。3%beef extract 10 mL を加え 50 倍濃縮し、3 分間ボルテックス処理後、陰電荷膜に吸着したウイルスを溶出させ回収し、検体とした。核酸抽出は QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて行った。

3. 胃腸炎ウイルス検査方法

抽出した核酸について PrimeScript RT reagent Kit(TaKaRa)を用いて逆転写反応を行った。作成した cDNA を鋳型として、ノロウイルス GI(以下、NoV GI)、ノロウイルス GII(以下、NoV GII)、サポウイルス(以下、SaV)、アストロウイルス(以下、AstV)、A 群ロタウイルス(以下、RVA)、C 群ロタウイルス(以下、RVC)の逆転写リアルタイム PCR 反応を実施し、定量した。試薬は TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)、各種ウイルスに特異的なプライマー、プローブを使用した(表 1)。機器は Step One Plus (Applied Biosystems) を使用し、表 1 に示した反応条件で実施した。

スタンダード DNA は NoV GI (accession number : NC001959)、NoV GII (AB447453)、AstV (L23513)、RVA (DQ838650)、RVC (X77258) の塩基配列を元に表 1 のプライマー、プローブが反応する領域を株式会社ファスマックに合成依頼し、作成した。SaV は国立感染症研究所から配布されたスタンダードを用いた。

4. 内部標準

トウガラシ微斑ウイルス(以下、PMMoV)はピーマンやトウガラシに感染する植物ウイルスであり

表 1. 使用したプライマー/プローブ、反応条件

項目	プライマー/プローブ	反応条件	参考文献
NoV GI	COG1F	50°C 2min ⇒ 95°C 10min ⇒ (95°C 15sec ⇒ 56°C 1min) × 45 cycles	6)
	COG1R		
	RING1-TP(a)		
	RING1-TP(b)		
NoV GII	COG2F	50°C 2min ⇒ 95°C 10min ⇒ (95°C 15sec ⇒ 56°C 1min) × 45 cycles	6)
	COG2R		
	ALPF		
	RING2AL-TP		
SaV	SaV124F	50°C 2min ⇒ 95°C 10min ⇒ (95°C 15sec ⇒ 56°C 1min) × 45 cycles	7)
	SaV1F		
	SaV5F		
	SaV1245R		
	SaV124TP		
	SaV5TP		
AstV	HuAstVf2240	50°C 2min ⇒ 95°C 10min ⇒ (95°C 15sec ⇒ 56°C 1min) × 45 cycles	8)
	HuAstVf2140		
	HuAstVf2239T4		
	HuAstVr4123		
	HuAstVf1-8/TP		
RVA	RotaA.fwd1	50°C 2min ⇒ 95°C 10min ⇒ (95°C 15sec ⇒ 60°C 1min) × 40 cycles	9)
	RotaA.fwd2		
	RotaA.rev1		
	RotaA.rev2		
	RotaA.probe1		
	RotaA.probe2		
RVC	CRV7F	50°C 2min ⇒ 95°C 10min ⇒ (95°C 15sec ⇒ 60°C 1min) × 40 cycles	10)
	CRV7R		
	CRV7		

11)、ヒトへの健康影響はないものの、糞便中に高コピー検出されることが知られている¹²⁾。また、下水中でも常に一定の遺伝子コピー数で推移する傾向があり、先行研究では新型コロナウイルスの下水検査において内部標準としての有用性が示されている¹³⁾。この研究では PMMoV と新型コロナウイルス間の相関が前提とされており、この相関を基に測定手法の信頼性が担保されている。一方で、PMMoV と胃腸炎ウイルスごとの相関は明らかにされておらず、個々の検査の適否については困難である。そこで、本報告では下水中 PMMoV の定量値 (copies/mL) を測定し、相対標準偏差 (RSD) を算出した¹⁴⁾。定量値は対数表記で評価し、RSD が 10 未満で「ばらつきなし」と判断し、この基準を胃腸炎ウイルス全体の測定手法の信頼性を担保するための独自指標として設定した。

なお、PMMoV の検査は One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix with UNG (TaKaRa) を使用したリアルタイム PCR で、プライマーは PMMV-FP1-rev、PMMV-RP1、プローブは PMMV-Probe1 を使用した¹⁵⁾。機器は QuantStudio5 (Applied Biosystems) を使用した。PCR 条件は、One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix, with UNG (2×) 10 μL、20 μM プライマー各 0.2 μL、5 μM プローブ 0.8 μL、ROX Reference Dye II (50 ×) 0.1 μL、RNase free water 3.7 μL、RNA 5 μL の総量 20 μL とし、25°C 10 分、52°C 5 分、95°C 10 秒を 1 サイクル、95°C 5 秒、60°C 30 秒を 45 サイクル実施した。スタンダードは「環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制を構築するための研究」研究班で配布されたスタンダード RNA (accession number: M81413) を使用した。

結果

内部標準として、対象期間における PMMoV の定量値の相対標準偏差 (RSD) を算出した。A ポンプ場で 4.36、B ポンプ場で 6.37 となり、いずれも 10 未満であった。このことから「ばらつきなし」と判断し、本報告におけるデータの信頼性が担保されているものと判断した(図 1)。

対象期間において NoV GI、NoV GII、SaV、AstV、RVA が A ポンプ場と B ポンプ場のどちらの下水からも検出された。NoV GI は A、B ポンプ場ともに 81.8% の検出頻度であった。NoV GII は A ポンプ場で 90.9%、B ポンプ場で 96.4% と高頻度で、対象期間でほぼ継続的に検出された。SaV も高頻度で検出され、A ポンプ場で 92.7%、B ポンプ場で 98.2% であった。AstV は A ポンプ場で 63.6%、B ポンプ場で 74.5% と NoV GI、NoV GII、SaV に比べ検出頻度は低かった。RVA は A ポンプ場で 25.5%、B ポンプ場で 49.1% と他のウイルスに比較

し検出頻度が低く、対象期間において下水からの検出は断続的であった(表2、図2-1、図2-2)。RVCはAポンプ場において2024年第36週の1検体のみから検出された。

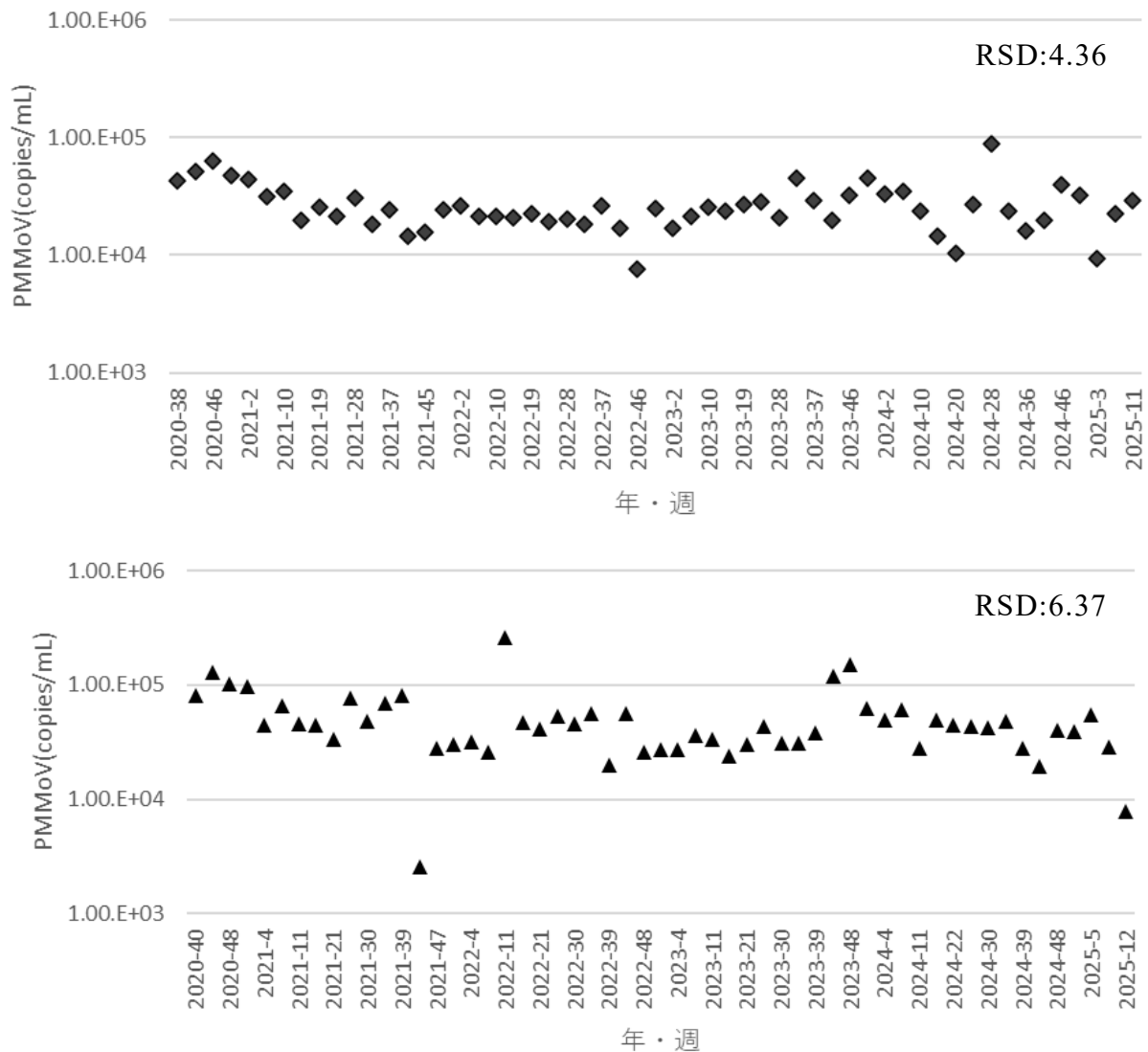


図1.下水中の PMMoV コピー数
(上：Aポンプ場 下：Bポンプ場)

表2.下水からの胃腸炎ウイルス(RVC除く)の検出頻度

	NoV GI	NoV GII	SaV	AstV	RVA
Aポンプ場	45(81.8%)	50(90.9%)	51(92.7%)	35(63.6%)	14(25.5%)
Bポンプ場	45(81.8%)	53(96.4%)	54(98.2%)	41(74.5%)	27(49.1%)

(A、Bポンプ場ともに採水回数55回)

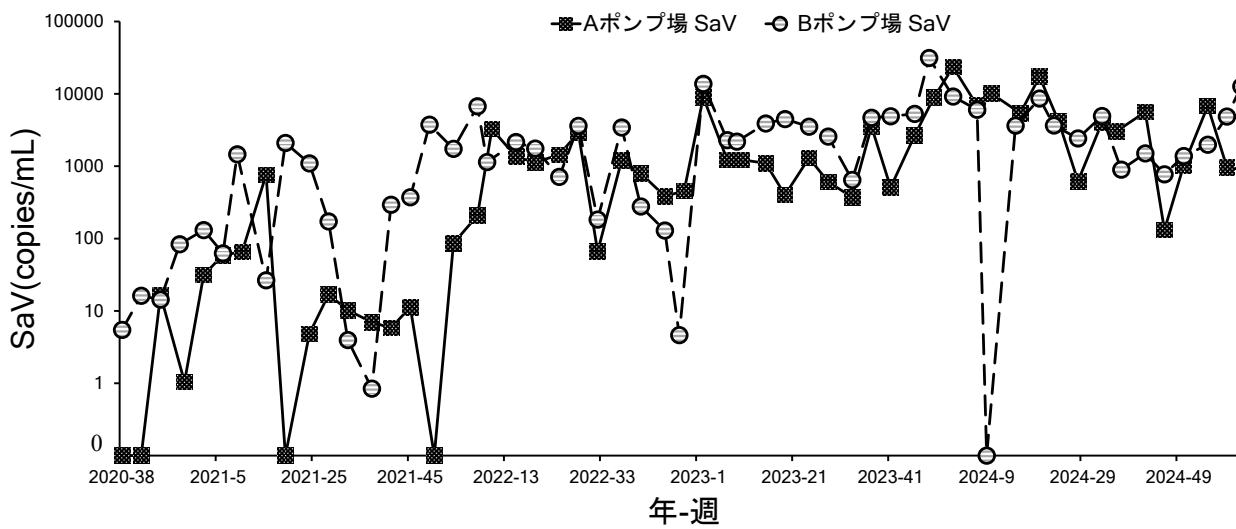
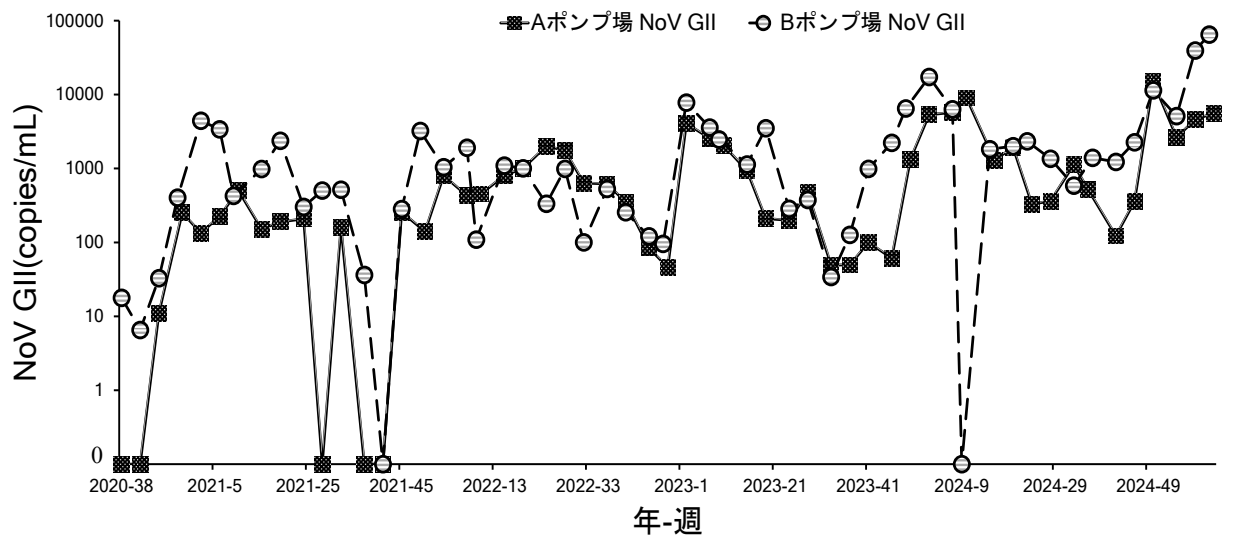
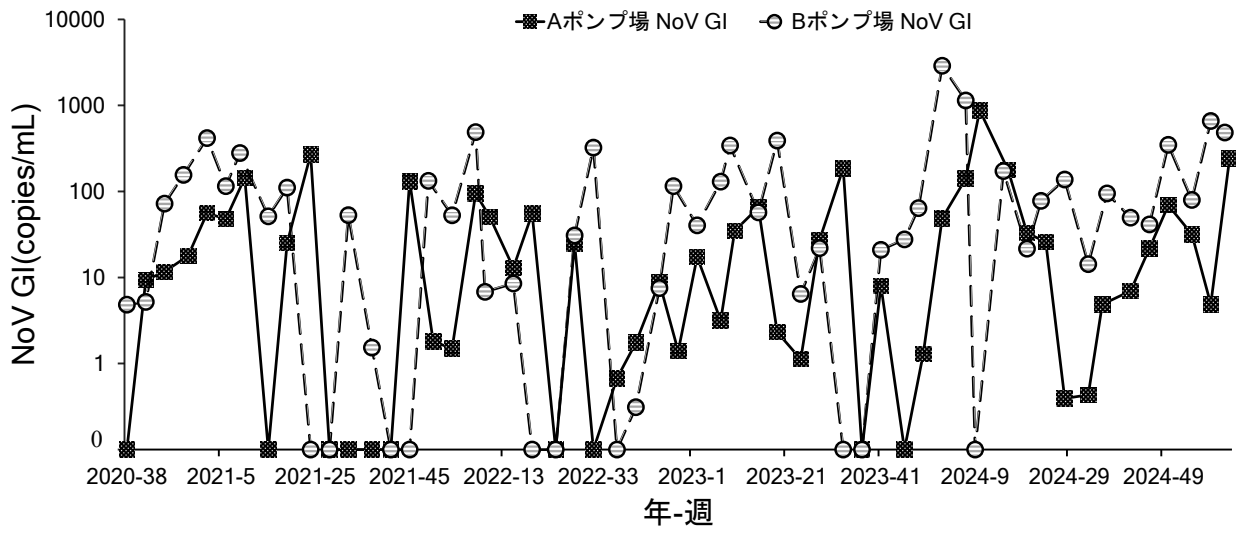


図 2-1.下水中のウイルスコピー数 (上 : NoV GI、中 : NoV GII、下 : SaV)

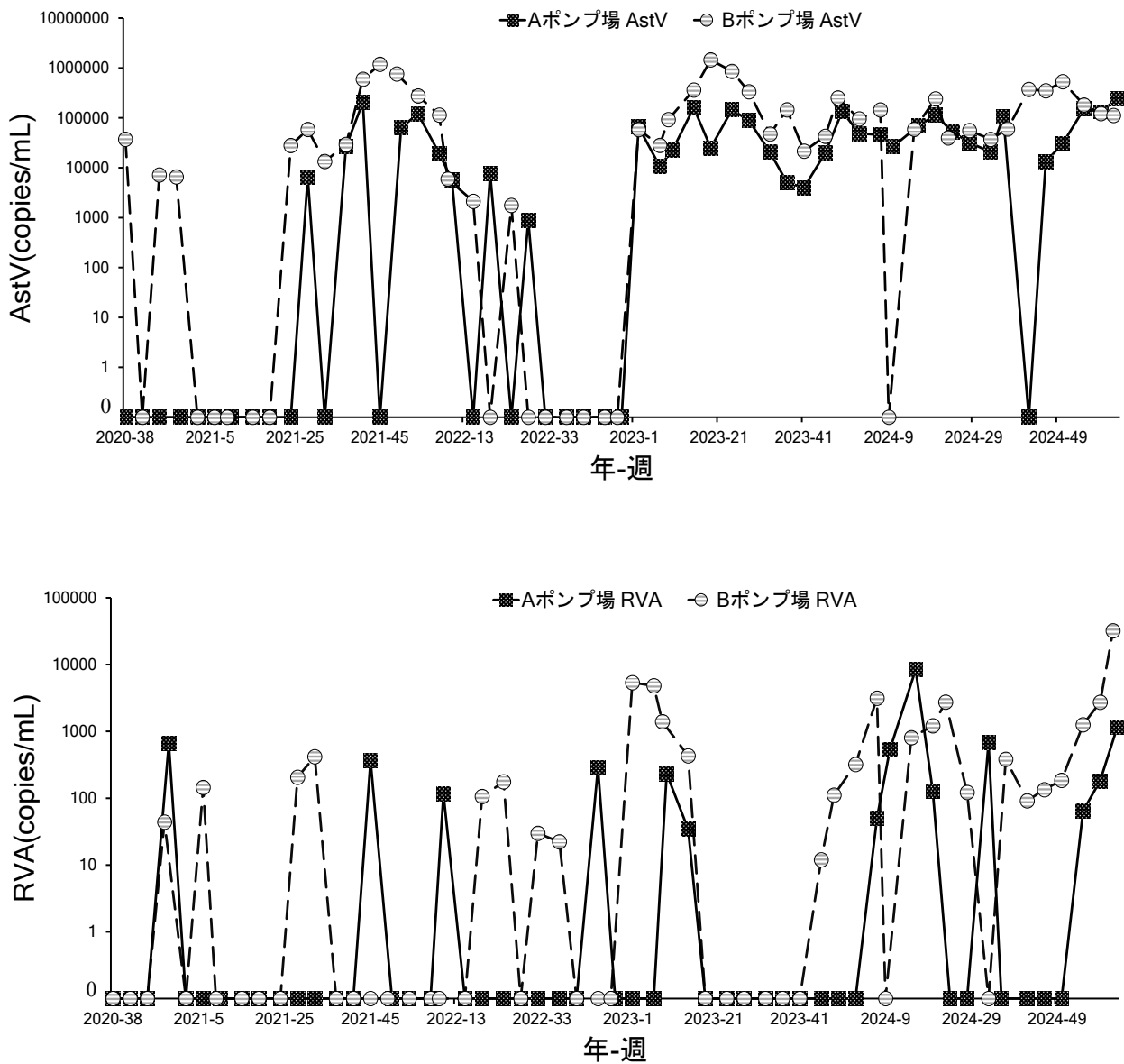


図 2-2.下水中のウイルスコピー数（上：AstV、下：RVA）

まとめ

下水から胃腸炎ウイルスを検出できたことから、胃腸炎ウイルスを網羅的に捕捉する下水サーベイランスは、現行の病原体サーベイランスを補完する極めて有用な手段になり得ると推察された。県内の胃腸炎ウイルスの流行状況をより精度高く捉えるためには、採水頻度を増やすことや採水箇所を増設が有用と考える。

またワクチンの効果等の評価の必要性に言及されている RVA においては¹⁶⁻¹⁷⁾、より詳細な情報を得られる遺伝子型解析が有用な手段になり得ると推察された。遺伝子型解析については、ゲノムの組換えを起こして流行すると言われていた NoV などに対しても有用と考えられる¹⁸⁾。このため、下水サーベイランスにおいて各ウイルスの遺伝子型解析を実施することは極めて重要であると考え。

下水サーベイランスは、従来の感染症サーベイランス体制、特に病原体サーベイランスを補完する手法としての活用が期待される。下水サーベイランスの有用性を評価するためには、今後も継続して胃腸炎ウイルスの下水サーベイランスを実施するとともに、効果的な下水サーベイランス体制の構築に向けて検討を進めていきたい。

謝辞

本報告に使用した下水を供与していただいた本庁下水道課、下水道事務所、中継ポンプ場の関係者の皆様に深謝いたします。

引用文献

- 1) 感染性胃腸炎,-国立健康危機管理研究機構感染症情報提供サイト, (<https://id-info.jihs.go.jp/diseases/ka/intestinal/010/intestinal-intro.html>)
- 2) 食品健康影響評価のためのリスクプロファイル～ ノロウイルス ～, 食品安全委員会, (https://www.fsc.go.jp/risk_profile/index.data/181120NorovirusRiskprofile.pdf)
- 3) 食中毒統計資料, 厚生労働省, (https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html)
- 4) 藤沼裕希, 堀田千恵美, 花田裕司, 佐藤眞一:千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, 公益財団法人大同生命厚生事業団地域保健福祉研究助成 2021 年度研究報告書 (https://www.daido-life-welfare.or.jp/pdf/2021/welfare_06.pdf)
- 5) Hotta, C., Fujinuma, Y., Ogawa, T., Akita, M., Ogawa, T: Surveillance of wastewater to monitor the prevalence of gastroenteritis viruses in Chiba prefecture (2014–2019), *Journal of Epidemiology*, 34(4), 195-202, (2024)
- 6) 病原体検出マニュアルノロウイルス(第1版), (2019)
- 7) Oka, T., Katayama, K., Hansman, G.S., Kageyama, T., Ogawa, S., Wu, F.T., et al: Detection of Human Sapovirus by Real - Time Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction, *Journal of medical virology*, 78(10), 1347-1353, (2006)
- 8) 横井一, 北橋智子: Real-time RT-PCR 法によるアストロウイルス遺伝子の検出, *感染症誌*, 83, 120-126, (2009)
- 9) Logan, C., O'Leary, J.J., O'Sullivan, N: Real-Time Reverse Transcription-PCR for Detection of Rotavirus and Adenovirus as Causative Agents of Acute Viral Gastroenteritis in Children, *Journal of clinical microbiology*, 44(9), 3189-3195, (2006)
- 10) 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, *Journal of Virological Methods*, 191(2), 141-147, (2013)
- 11) Rosario, K., Symonds, E. M., Sinigalliano, C., Stewart, J., Breitbart, M: Pepper mild mottle virus as an indicator of fecal pollution, *Applied and environmental microbiology*, 75(22), 7261-7267, (2009)
- 12) Zhang, T., Breitbart, M., Lee, W. H., Run, J. Q., Wei, C. L., Soh, S. W. L., et al: RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses, *PLoS biology*, 4(1), 108-118, (2006)
- 13) 厚生労働行政推進調査事業費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)「環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制の構築に関する研究」令和2年度総括・分担研究報告書 (https://mhlw-grants.niph.go.jp/system/files/download_pdf/2020/202019035A.pdf)
- 14) Kitajima, M., Sassi, H. P., Torrey, J. R.: Pepper mild mottle virus as a water quality indicator, *NPJ Clean Water*, 1(1), 19, (2018)
- 15) Haramoto, E., Kitajima, M., Kishida, N., Konno, Y., Katayama, H., Asami, M., et al: Occurrence of pepper mild mottle virus in drinking water sources in Japan, *Applied and environmental microbiology*, 79(23), 7413-7418, (2013)
- 16) 藤井克樹: ロタウイルス流行株の変遷, *ウイルス*, 73(1), 33-44, (2023)
- 17) 谷口孝喜: ヒトロタウイルスワクチン, *ウイルス*, 62(1), 87-96, (2012)
- 18) 片山和彦: ウイルス ノロウイルス総説 2020, *ウイルス*, 70(2), 117-128, (2020)