

【調査研究】

## 岡山県における下水を活用した感染性胃腸炎ウイルスの地域流行調査

Regional Epidemic Surveillance of Infectious Gastroenteritis Viruses Using Sewage in Okayama Prefecture

清迫理恵, 秋山三紀恵, 石井 学, 牧本智恵, 佐藤 淳,

友實直美, 鶴海 剛, 馬場聡好, 木田浩司

SEIZAKO Rie, AKIYAMA Mikie, ISHII Manabu, MAKIMOTO Tomoe, SATO Atsushi,

TOMOZANE Naomi, TSURUMI Go, BABA Akiyoshi, KIDA Kouji

### 要 旨

感染性胃腸炎の地域流行を把握するため、2023年4月から2024年6月の期間、下水処理場への流入水を用いて、リアルタイム RT-PCR によりノロウイルス、サポウイルス及びアストロウイルスの定量を行った。50万人規模の下水処理場流入水においては、冬期には、前半にサポウイルス及びアストロウイルス、後半にノロウイルスの下水中濃度のピークが認められ、下水道処理区域の患者発生状況とおおむね一致していた。また、ノロウイルスについては、大腸菌を用いてプラスミドベクターに VP1 領域の遺伝子クローニングを実施し、月ごとの下水中の遺伝子型比率を調査した。遺伝子群 I (以下「GI」という。)の遺伝子型に関しては、2023年4月から9月にかけて GI.3 及び GI.6 の比率が高かったが、10月以降、GI.1 へ主要遺伝子型の移り替わりが見られた。遺伝子群 II (以下「GII」という。)についても同様に、2023年10月以降、GII.2 から GII.7 への主要遺伝子型の変遷が見られ、地域流行の一端を把握することができた。

[キーワード：下水、感染性胃腸炎、地域流行調査、ノロウイルス]

[Key words : Sewage, Infectious Gastroenteritis, Regional Epidemic Surveillance, Norovirus]

### 1 はじめに

感染性胃腸炎とは、下痢やおう吐等を主症状とする感染症の総称で、ウイルス、細菌等様々な病原体によって引き起こされる。ウイルス性の起因病原体としては、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、アデノウイルス等が挙げられる。なかでもノロウイルスは、保育所、幼稚園、小学校や高齢者施設等で集団感染を引き起こし<sup>1)</sup>、食品衛生分野においては食中毒の主要な原因物質となる<sup>2)</sup>等社会的な関心は高い。

また、2015年から2023年の厚生労働省統計情報部「人口動態統計」<sup>3)</sup>によると、国内の腸管感染症による死亡数は年間約2,000人超であり、ウイルス性はこのうち数%を占める。新型コロナウイルス流行期を除き、ノロウイルスを死因とする死亡者数は年間10名から50名に上り、公衆衛生上のリスクは重大である。

ノロウイルスを含めた胃腸炎ウイルスの流行期の把握は、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(平成十年法律第百十四号)(以下「感染症法」という。)及び食品衛生法(昭和二十二年法律第二百三十三号)における予防啓発や集団発生調査時の原因究明において重要なデータとなる。しかしながら、感染症法では、胃腸炎ウイルスによる様々な感染症の多くが五類感染症の

感染性胃腸炎として定義されており、同法に基づく感染症発生動向調査事業では、細菌、ウイルス、寄生虫などの起因病原体を区別することなく小児科の指定届出機関(以下「定点」という。)から患者数が報告され、1週間を調査単位とした1定点あたりの患者報告数の平均値(以下「定点あたり報告数」という。)により流行の評価が行われるため、原因ウイルス別の流行状況は把握できない。また、当該事業では、報告の対象は小児に偏り、全年代の感染状況を網羅的に収集できないことや、軽症あるいは不顕性感染者では受診行動につながらないことも、胃腸炎ウイルスの地域流行の正確な把握を困難にしている。

感染者の年代や顕性・不顕性による受診行動等の影響を受けず、地域の感染状況を客観的にモニタリングする材料として、下水の活用が注目されている。感染者から排せつされるふん便、唾液、鼻水等は生活排水として下水道管を通り最終的に下水処理場に集積する。そのため、処理場への流入水を調査することで、下水処理区域でどのようなウイルスが、どの程度流行しているか把握することができると考えられる。

そこで我々は、県内の下水処理場2か所において、2023年4月から2024年6月までに採水された流入水を

対象に、リアルタイム RT-PCR 法によるノロウイルス、サポウイルス及びアストロウイルスの遺伝子検出を行い、下水処理場の処理区域における定点あたり報告数と比較した。また、ノロウイルス遺伝子群 I (以下「GI」という。)及び II (以下「GII」という。)については、遺伝子クローニングによる遺伝子型調査を行い、地域の流行状況の把握を試みた。

## 2 材料及び方法

### 2.1 調査対象施設及び検体

県内の 50 万人規模の下水処理場(以下「下水処理場 A」という。)及び 5 万人規模の下水処理場(以下「下水処理場 B」という。)において、2023 年 4 月から 2024 年 6 月までの期間、各施設で流入水 500 mL 以上を月 1 回採水し、検体とした。

### 2.2 リアルタイム RT-PCR 法によるウイルス定量

厚生労働省健康局結核感染症課「令和 5 年度感染症流行予測調査実施要領」ポリオウイルス感染源調査術式に従い、陰電荷膜法により検体 500 mL を 5 mL に 100 倍濃縮した。濃縮産物は QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN 社)を用いて RNA を抽出した後、これを鋳型とし random hexamer (タカラバイオ社)により逆転写反応を行い cDNA を合成した。

リアルタイム PCR には、QuantStudio 5 リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific 社)を用いた。ノロウイルス GI 及び GII については、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課「ノロウイルスの検出法について」(平成 19 年 5 月 14 日食安監発第 0514004 号)に準拠し、TaqMan Universal Master Mix II, with UNG (Thermo Fisher Scientific 社)により、各検体 3 併

行で定量した。サポウイルスについては、国立健康危機管理研究機構「病原体検出マニュアル サポウイルス (第 1 版)」に準拠し、QuantiTect Virus+ROX Vial Kit (QIAGEN 社)により、各検体 3 併行で定量した。また、アストロウイルスについては、横井らの方法<sup>4)</sup>に準拠し、QuantiTect Virus+ROX Vial Kit (QIAGEN 社)により、各検体 3 併行で定量した。

リアルタイム PCR により求めたウイルスコピー数の平均値から、濃縮倍率等を考慮し、1 L あたりのコピー数を算出した。

### 2.3 感染性胃腸炎における流域保健所の定点あたり報告数と流行期の定義

下水道処理区域の自治体を管轄する保健所において、定点から報告された感染性胃腸炎の患者数の和を定点数で除した数(以下「流域保健所の定点あたり報告数」という。)を下水処理場ごとに算出した。また、下水処理場 A については、流域保健所の定点あたり報告数の経時的推移から、2023 年第 13 週(4月上旬)から第 29 週(7月中旬)を「春期の流行期」、また、第 43 週(10月下旬)から年末年始の谷期を挟んだ 2024 年第 15 週(4月上旬)の間を「冬期の流行期」と定義した(図 1)。

### 2.4 遺伝子クローニングによるノロウイルス遺伝子型調査

下水処理場 A の検体を用い、2.2 に示した方法により cDNA を作成した。次に、KOD-Plus-Ver.2 (東洋紡社)を使用した semi-nested PCR により POL 及び VP1 領域の一部を増幅した。プライマー配列は厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課「ノロウイルスの検出法について」(平成 19 年 5 月 14 日食安監発第 0514004 号)に従い、ノロウイルス GI については、一次プライマー

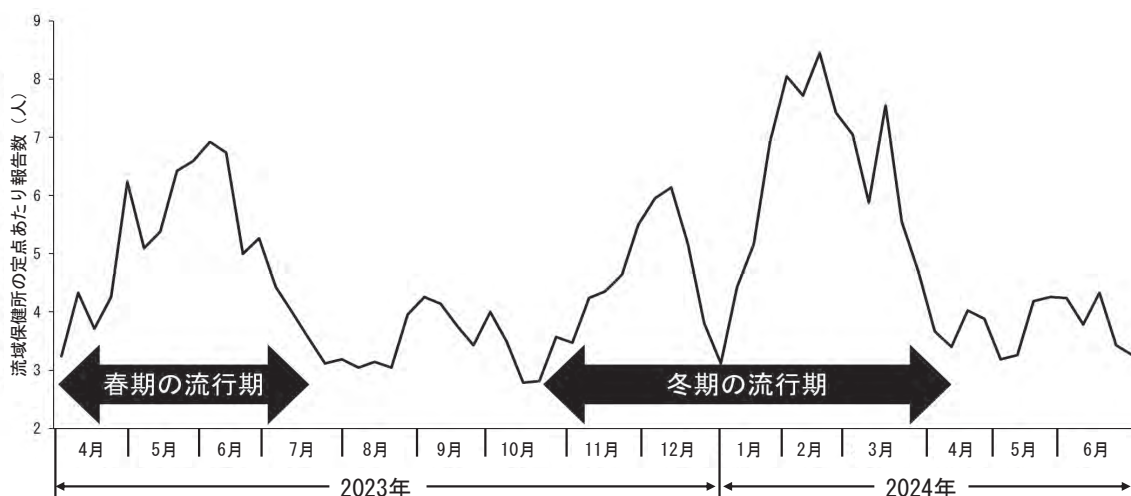


図 1 下水処理場 A における流域保健所の定点あたり報告数とその流行期

に COG1/G1-SKR を、二次プライマーに G1-SKF/G1-SKR を使用した。また、ノロウイルス GII については、一次プライマーに COG2/G2-SKR を、二次プライマーに G2-SKF/G2-SKR を使用した。これらの増幅産物は、それぞれ精製してプライマー成分を除去した後、T4 DNA Ligase (タカラバイオ社) を用いて SmaI (タカラバイオ社) で切断した pUC19 ベクターに挿入した。これを大腸菌 JM109 株に形質転換し、青白スクリーニング法により 10 株を選別した後、ポイル法で DNA を抽出した。挿入部分の塩基配列を確認するため、M13 系プライマーの M4 (5'-GTTTCCAGTCACGAC-3') 及び RV (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') で増幅し、3500 シリーズジェネティックアナライザ (Thermo Fisher Scientific 社) を使用してサンガー法により塩基配列を確認した。得られた塩基配列は GENETYX 遺伝情報処理ソフトウェア (日本サーバ社) により解析した後、オランダ国立公衆衛生環境研究所が提供する遺伝子型分析ツール Norovirus Typing Tool Version 2.0 (<https://mpf.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>) 及びアメリカ国立生物工学情報センター (NCBI) が提供する BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) により遺伝子型を決定した。

### 3 結果

#### 3.1 下水処理場 A におけるウイルスの定量結果

下水処理場 A では、ノロウイルス GI は、2023 年 6 月を除いた月で検出された。また、ノロウイルス GII は、全ての月で検出された。ノロウイルス GI 及び GII の下水中濃度が  $10^4$  copies/L 以上の経時的推移を図 2 に示す。

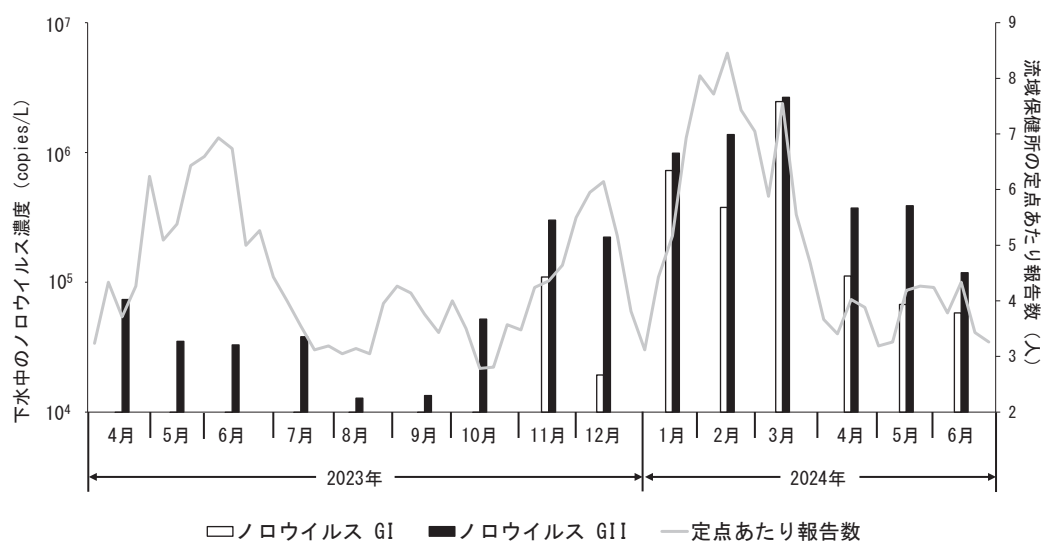


図 2 下水処理場 A におけるノロウイルス濃度及び流域保健所の定点あたり報告数

ノロウイルス GI の下水中濃度は、2023 年 11 月から上昇傾向となり、2024 年 3 月にピーク ( $2.5 \times 10^6$  copies/L) を迎えた後、減少に転じた。また、ノロウイルス GII の下水中濃度は、2023 年 4 月から 9 月までは漸減したが、10 月から漸増に転じ、2024 年 3 月採水分をピーク ( $2.7 \times 10^6$  copies/L) とした後、6 月にかけて漸減した。

サポウイルスは、全ての月で検出された。サポウイルスの下水中濃度が  $10^6$  copies/L 以上の経時的推移を図 3 に示す。サポウイルスの下水中濃度は 2023 年 4 月から 8 月までは大きな変動がなく横ばいだったが、9 月から増加に転じ、12 月にピーク ( $8.5 \times 10^8$  copies/L) を迎えた後、2024 年 4 月まで漸減し、再び横ばいとなった。

アストロウイルスは、全ての月で検出された。アストロウイルスの下水中濃度が  $10^6$  copies/L 以上の経時的推移を図 4 に示す。アストロウイルスの下水中濃度には、2 つの波が見られ、1 つ目は 2023 年 4 月から 8 月までの期間で 5 月をピーク ( $3.3 \times 10^8$  copies/L) とした波、2 つ目は 2023 年 12 月から 2024 年 3 月までの期間で 12 月をピーク ( $1.4 \times 10^8$  copies/L) とした波であった。

#### 3.2 下水処理場 B におけるウイルスの定量結果

下水処理場 B では、ノロウイルス GI は 2023 年 6 月、7 月及び 8 月を除いた月で検出された。また、ノロウイルス GII は、全ての月で検出された。ノロウイルス GI 及び GII の下水中濃度が  $10^4$  copies/L 以上の経時的推移を図 5 に示す。ノロウイルス GI の下水中濃度は、2024 年 1 月に急激に上昇し、2024 年 3 月ピーク ( $2.9 \times 10^6$  copies/L) を迎えた後、減少に転じた。ノロウイルス GII の下水中濃度は、2023 年 4 月には既に高い濃度 ( $4.3 \times 10^5$  copies/L) であったが、その後は 9 月まで増減を

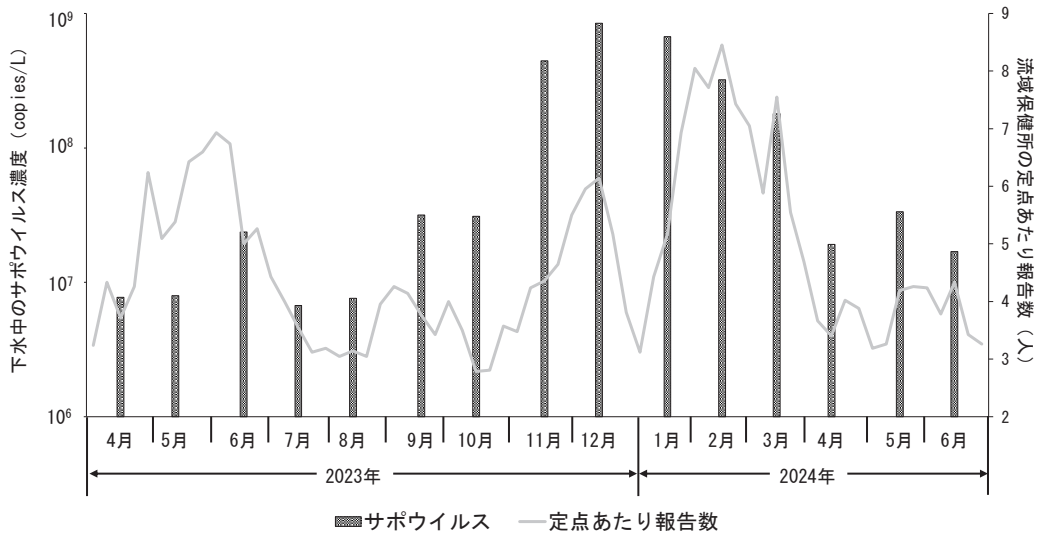


図3 下水処理場 A におけるサポウイルス濃度及び流域保健所の定点あたり報告数

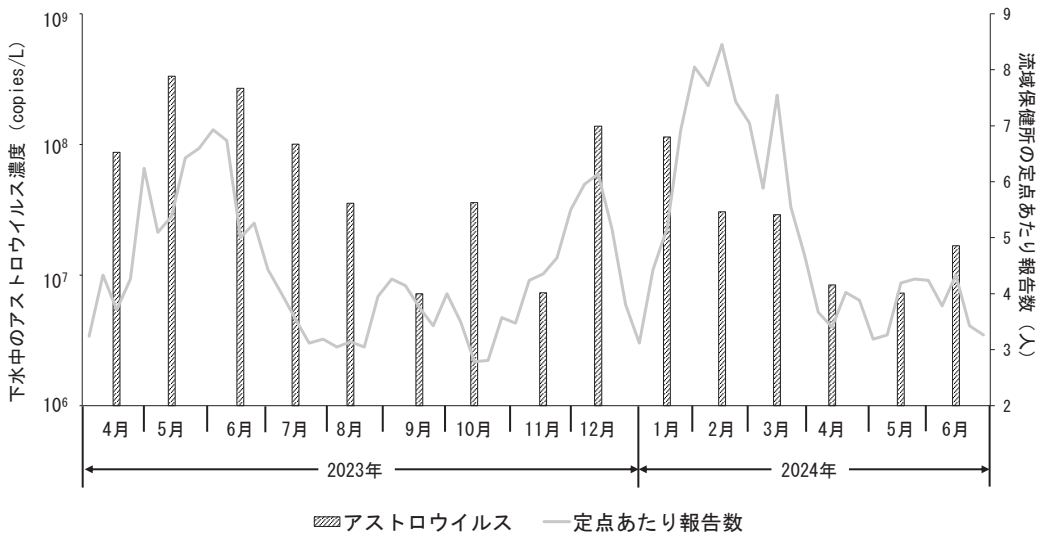


図4 下水処理場 A におけるアストロウイルス濃度及び流域保健所の定点あたり報告数

繰り返しつつ漸減した。11月には再び増加傾向となり、2024年3月にピーク ( $4.3 \times 10^6$  copies/L) を迎えた後、減少に転じた。

サポウイルスは、全ての月で検出された。サポウイルスの下水中濃度が  $10^6$  copies/L 以上の経時的推移を図6に示す。サポウイルスの下水中濃度は2023年9月以降上昇し、2024年1月にピーク ( $7.1 \times 10^8$  copies/L) を迎えた後、減少に転じた。

アストロウイルスは、全ての月で検出された。アストロウイルスの下水中濃度が  $10^6$  copies/L 以上の経時的推移を図7に示す。アストロウイルスの下水中濃度は、2023年6月をピーク ( $1.9 \times 10^8$  copies/L) とした波が認められたが、8月には急減し、それ以降は明確な濃度増加の波は見られなかった。

### 3.3 下水処理場 A におけるノロウイルスの遺伝子クローニング結果

下水処理場 A において調査期間中に遺伝子クローニングにより毎月10株ずつ、合計で150株を決定したノロウイルス GI の遺伝子型の内訳は、GI.1が55株、GI.2が20株、GI.3が27株、GI.4が8株、GI.6が38株及びGI.7が2株であった。その経時的推移を図8に示す。2023年4月から9月にかけてはGI.6及びGI.3が主流 genotype であったが、2023年10月から2024年5月にかけてGI.1への移り代わりが見られた。

遺伝子クローニングで150株を決定したノロウイルス GII の遺伝子型の内訳は、GII.2が52株、GII.3が19株、GII.4が25株、GII.6が4株、GII.7が44株、GII.12が2株、GII.17が3株及びGII.21が1株であった。その経時

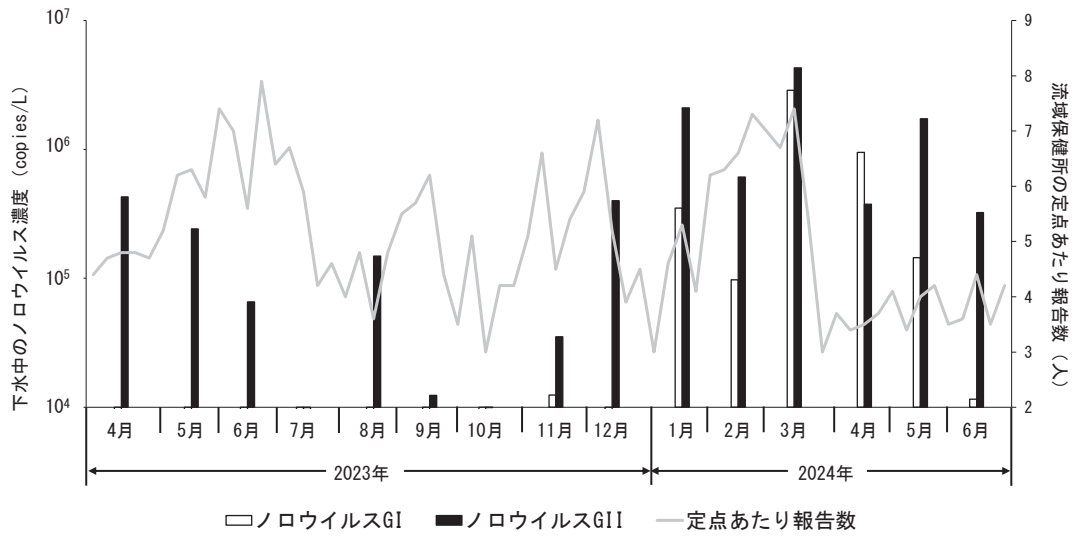


図5 下水処理場 B におけるノロウイルス濃度及び流域保健所の定点あたり報告数

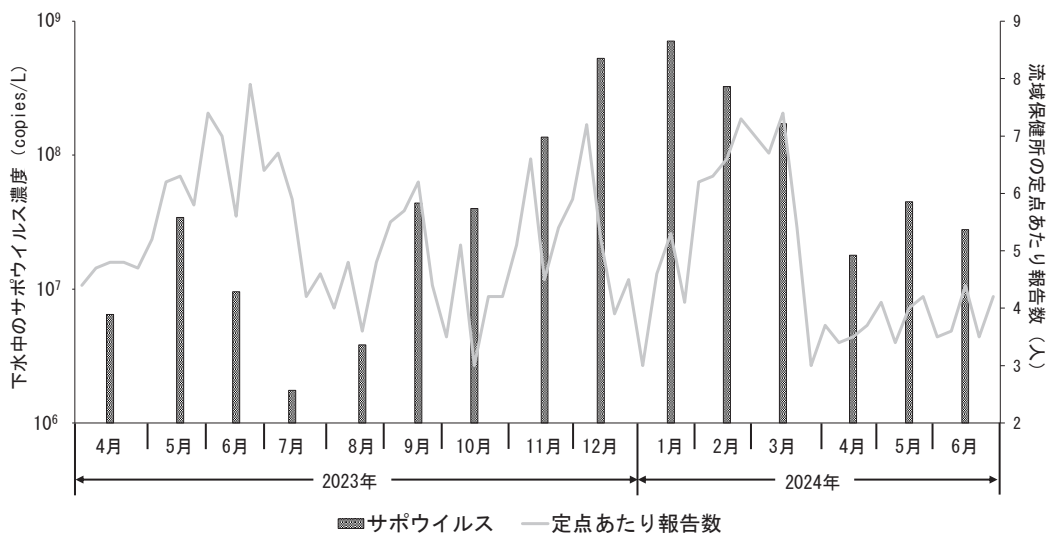


図6 下水処理場 B におけるサポウイルス濃度及び流域保健所の定点あたり報告数

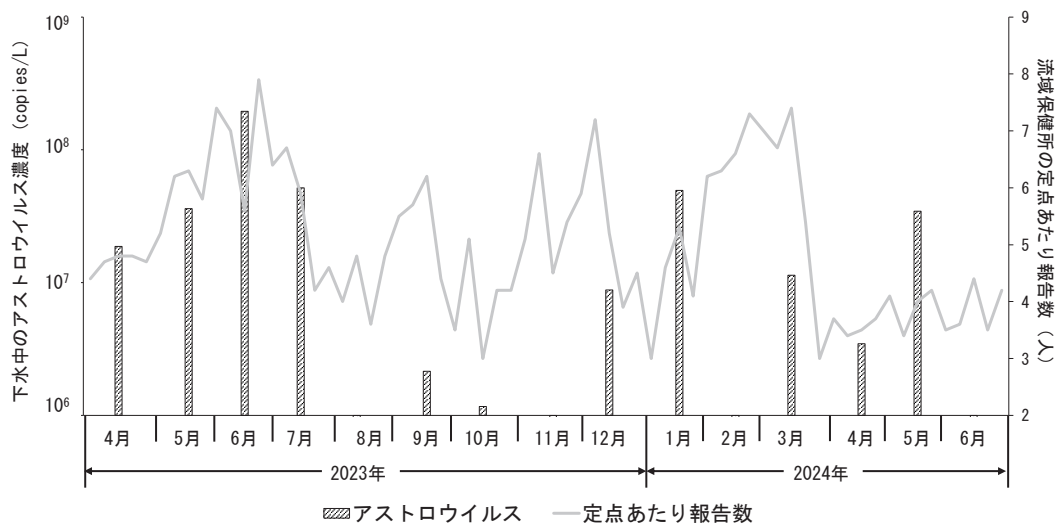


図7 下水処理場 B におけるアストロウイルス濃度及び流域保健所の定点あたり報告数

的推移を図9に示す。2023年4月から9月までは6月を除き GII.2 が高い割合を占めていた。しかしながら、10月から2024年6月までは GII.7 が毎月検出され、また、 GII.4 も断続的に検出されるなど、主流型の変遷が見られた。なお、 GII.4 の亜型は全て Sydney\_2016 であった。

#### 4 考察

下水処理場 A における感染性胃腸炎の流域保健所の定点あたり報告数(図1)とウイルスの下水中濃度(図2~4)を照らし合わせると、春期の流行期においてはアストロウイルスの下水中濃度が最も高かった。アストロウイルス感染症の大部分は無症候と考えられている<sup>5)</sup>

が、小児の感染性胃腸炎の数%から10%程度を占めるとされている<sup>6)~8)</sup>。また、感染症発生動向調査事業では、感染性胃腸炎は小児科を定点としていることを勘案すると、春期の流行期の主原因は、アストロウイルスであったと考えられる。他方、冬期の流行期(図1)における各ウイルスの下水中濃度は、前半はサポウイルス及びアストロウイルス、後半にかけてノロウイルス GI 及び GII が増加していた(図2~4)。このことから、冬期の流行期は、これらのウイルスの流行が混合して形成されたものと考えられる。

下水処理場 B におけるウイルスの下水中濃度の経時的推移をみると、2023年の春から初夏にかけてアストロウイルスが、また、2023/2024年冬期から春期にかけ

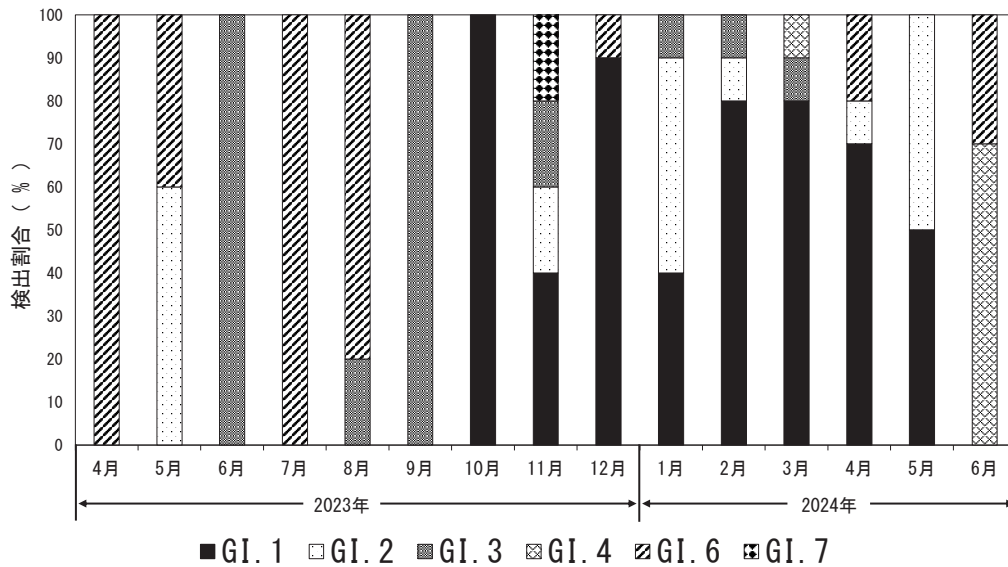


図8 下水処理場 A におけるノロウイルス GI の遺伝子型比率

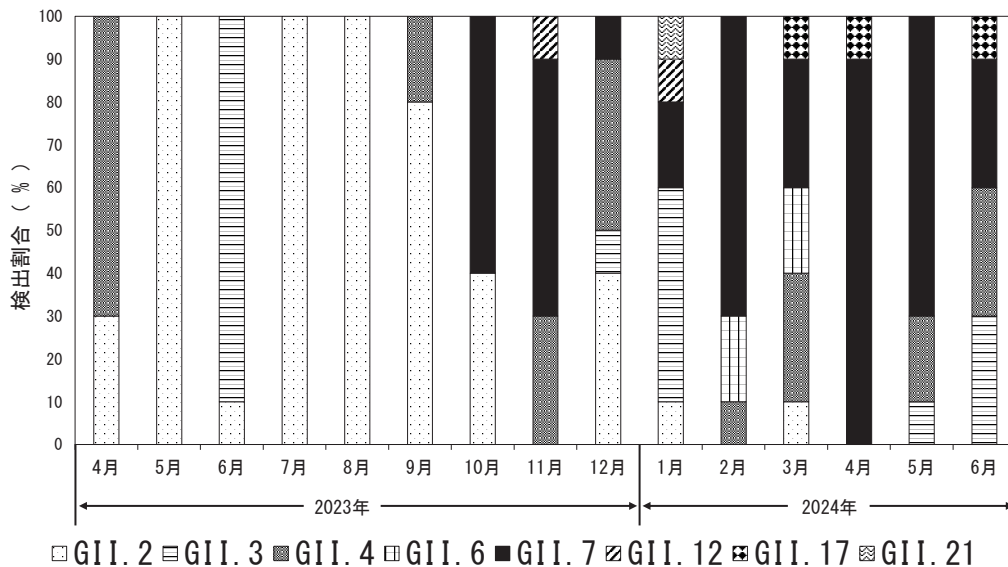


図9 下水処理場 A におけるノロウイルス GII の遺伝子型比率

ではノロウイルス及びサポウイルスの濃度が上昇しており、この時期に各ウイルスの流行があったと考えられる。他方、流域保健所の定点あたり報告数の経時的推移からは、感染性胃腸炎の明確な流行期は認められなかった。定点は人口に応じて割り振られるため、下水処理場Bのように人口の少ない地域では定点数が限られ、定点あたり報告数から地域流行を把握することは難しい。しかし、今回の調査結果から、下水サーベイランスを活用すればこれを補完できることが示唆された。

下水処理場AにおけるノロウイルスGIの遺伝子型調査では、2023年4月から9月にかけてはGI.6及びGI.3が主流型であったが、2023年10月から2024年5月にかけてGI.1への移り代わりが見られた(図8)。これを感染性胃腸炎の流域保健所の定点あたり報告数とウイルスの下水中濃度の経時的推移(図2)と照らし合わせると、ノロウイルスGIの下水中濃度が高まっていた2024年1月から3月までの主流型は、GI.1であったと考えられる。また、ノロウイルスGIIの遺伝子型を同様に感染性胃腸炎の流域保健所の定点あたり報告数とウイルスの下水中濃度の経時的推移(図2)と照らし合わせると、ノロウイルスGIIの下水中濃度が高まっていた2023年10月から2024年6月は、GI.7を主としたGI.3, GI.4, GI.6等との混合流行であったと考えられる。

近年は、感染症流行の統計に足る患者検体数を収集することが困難となっている。しかしながら、本調査の結果は、下水中のウイルス濃度や遺伝子型の存在比率を感染症発生动向調査のデータと併せて解析することで、より正確な地域の流行状況の把握が可能となることを示唆するものであった。感染性胃腸炎の下水調査は、不顕性感染者から排出される病原体も検出されること、また多数の起因病原体の全てを対象とすることは困難であることを念頭に置く必要があるが、流行の一端を把握できる有用な手法であると考えられる。我々は、今後も本調査を継続し、胃腸炎ウイルスの地域流行の正確な把握に努めていく予定である。

## 謝 辞

本調査の実施に際し、下水を採取・提供いただきました各下水処理場の皆様に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) 国立健康危機管理研究機構：集団発生病原体票 推定感染・摂取場所の割合ノロウイルス2012/2013-2023/2024 シーズン, <https://idinfo.jihs.go.jp/>

[surveillance/iasr/graphdata/040/norosui4\\_240729.gif](https://surveillance/iasr/graphdata/040/norosui4_240729.gif)(2025.7.1 アクセス)

- 2) 厚生労働省：4. 食中毒統計資料, [https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html) (2025.7.1 アクセス)
- 3) 独立行政法人統計センター：政府統計の総合窓口 e-Stat 感染症による死因(感染症分類)別にみた年次別死亡数及び死亡率(人口10万対), <https://www.e-stat.go.jp/dbview?sid=0003411673> (2025.6.18 アクセス)
- 4) 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, 感染症学雑誌, 83(2), 120-126, 2009
- 5) Valerie Cortez, Victoria A. Meliopoulos, Erik A. Karlsson, Virginia Hargest, Cydney Johnson, and Stacey Schultz-Cherry：Astrovirus Biology and Pathogenesis, Annual Review of Virology, 4, 327-348, 2017
- 6) 大石 功, 左近直美：アストロウイルス, ウイルス, 50(2), 197-207, 2000
- 7) 福田伸治, 高尾信一, 桑山 勝, 島津幸枝, 宮崎佳都夫：小児感染性胃腸炎におけるアストロウイルスの検出状況と血清型, 広島県保健環境センター研究報告, 12, 29-32, 2004
- 8) 上田紗織, 小林孝行, 中村麻子, 金藤有里, 芦塚由紀：福岡県におけるヒトアストロウイルスの包括的検出と流行状況の把握(2018～2022年), IASR, 45, 47-49, 2024