

原 著

## 合併浄化槽の流入水および放流水におけるノロウイルス遺伝子 検出状況と垂下カキのノロウイルス汚染

高橋知子<sup>1)</sup> 高橋朱実<sup>2)</sup> 高橋雅輝<sup>1)</sup> 蛇口哲夫

### 要 約

2007年10月から2009年2月の間の2流行シーズン(2007/08, 2008/09シーズン)に、カキ養殖が行なわれている閉鎖湾に面した下水道未整備地区において、中規模の合併浄化槽の流入水、放流水についてノロウイルス(NV)汚染状況の調査を行った。2007/08シーズンは、対象とした3カ所の浄化槽すべてからGI/11型が検出され、当該地域においては、全国的な主流行株のGII/4型以外に、GI/11型も流行していた。浄化槽へ流入したNVが十分に除去されずに排出される場合があり、中規模浄化槽が放流先河川や海域のNV汚染源となりうることが示された。放流水からNV遺伝子が検出され始めると、2週間後には河口部に垂下したカキ(垂下カキ)からNV遺伝子が検出されることから、垂下カキのモニタリングが、その地域全体の感染性胃腸炎の流行状況の把握やその先の養殖海域のNV汚染開始の指標となることが示唆された。

キーワード：ノロウイルス，合併浄化槽，放流水，汚染，カキ

カリシウイルス科に属するRNAウイルスであるノロウイルス(NV)は、乳幼児から成人にわたる全年齢層に下痢や嘔吐等の急性胃腸炎をおこす病原体である[1-3]。また、NVは冬季に多発する食中毒や感染性胃腸炎の主要な原因であり、「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」の5類感染症における感染性胃腸炎の主要な原因であり、特に2006/07年シーズン以降、集団感染事例が全国的に多発している。平成20年の全国の食中毒統計では、

総事件数1,369件中NVによる食中毒は303件(22.1%)を占め、カンピロバクター・ジェジュニ/コリの509件(37.2%)に続き第2位、患者数では総患者数24,303人中11,618人(47.8%)で第1位となっている。岩手県においても、平成21年2月に大型リゾート宿泊施設で35都道府県にまたがる患者656人の大規模なNV食中毒が発生したことは、記憶に新しいところである。NVは感染者の小腸粘膜でのみ増殖し、糞便とともに排出され、活水処理施設に流入する。活

<sup>1)</sup> 紫波支会 岩手県環境保健研究センター

<sup>2)</sup> 花巻支会 岩手県南広域振興局

水処理により除去されなかった一部のNVが河川に放流され、海域を汚染する。カキ等の二枚貝は食餌として海水中のプランクトンと一緒に海水中のNVも取り込み、体内に蓄積すると考えられている [4]。現在、下水処理におけるNVの挙動についての定量的な知見は十分ではなく、特に浄化槽によって水洗化が図られている下水道未整備地区での、浄化槽によるNV挙動の実態は明らかにされていない。

本稿では、カキを養殖している閉鎖湾に面した下水道未整備地区において、浄化槽の流入水のNV汚染の実態と、処理後のNVの状況を把握するとともに、放流水の放流先の河川河口部にカキを垂下し、湾に流れ込むNVによりカキが汚染される状況を調査した。

### 材料及び方法

**調査材料：**調査地区はカキ養殖を行なっている閉鎖湾に面した、世帯数約1,500世帯、人口約3,860人の下水道未整備地区で、汚水処理は汲取りもしくは浄化槽で行っており、町全体の浄化槽等による水洗化人口は42%である (図1



図1 調査地区と浄化槽等の概要

表1 合併浄化槽の概要

合併浄化槽	処理方式	人槽	処理水量 m <sup>3</sup> /日	使用人員
1	長時間ばっ気	300	60	200
2	長時間ばっ気	203	46	318
3	接触ばっ気	350	46.2	170

及び表1)。調査対象の浄化槽は300人槽前後の比較的中規模の施設3カ所で、処理前の流入水及び処理後の放流水、放流先の河川水を検体とし、2007年10月から2009年2月の2シーズン(2007/08, 2008/09シーズン)にかけて調査を行い、2007年10月～2008年3月2007/08シーズン)に6回、2008年10月～2009年2月(2008/09シーズン)に5回の計11回、午前11時前後に検体を採取した。また、浄化槽処理水の放流先河川の河口部にカキを垂下し検体とした。カキは、2007/08シーズンは第41週(07年10月)に垂下し08年の第8週までに9回、2008/09シーズンは第46週(08年11月)に垂下し09年第6週までに9回採取した。

**ウイルス濃縮方法：**流入水および放流水、河川水の検体は静置後の上清を用いPEG沈澱法と超遠心法を組み合わせで濃縮を行った。PEG沈澱法後の濃縮液を30%ショ糖液に重層後超遠心(36,000rpm, 150分)を行い、得られた沈澱を滅菌蒸留水で再浮遊し、ウイルス濃縮検体とした。

カキは中腸腺を10%乳剤にし、10,000rpm, 20分間冷却遠心後の上清に60%PEG, NaCl及びアミラーゼを加え4℃で一晩静置し、10,000rpm, 20分間冷却遠心した沈澱を滅菌蒸留水で再浮遊し、ウイルス濃縮検体とした。

**NV遺伝子の検出方法：**各濃縮検体のRNAの抽出は、QIAamp Viral RNA Miniキット(QIAGEN)を用いた。DNase I処理を行った後、ABIのHigh Capacity cDNA 合成キットを用いてcDNAを合成した。

NVのnested-PCRを行い、1st PCRにはCOG 1 F/G 1 -SKR, COG 2 F/G 2 -SKRを、nested-PCRにはそれぞれG 1 -SKF/G 1 -SKR, G 2 -SKF/G 2 -SKRを用いた。増幅産物が確認された検体は、1st PCR産物をUniversal PCR Master Mix (ABI)を用い、Realtime-PCR法で定性確認した。NV遺伝子が検出された検体は、同様のRealtime-PCR法を用いて、濃縮検

表2 合併浄化槽流入水等および垂下カキのNV遺伝子型

年	週	合併浄化槽1		合併浄化槽2		合併浄化槽3		調査河川		カキ(垂下)	
		G I	G II	G I	G II	G I	G II	G I	G II	G I	G II
2007	51	11	4	11	4	—	4	11	13	11	—
	52	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	11	4
2008	2	11	4	—	—	11	4	—	—	11	4.13
	4	—	4	11	—	—	4	—	—	11	4
	6	11	4	11	—	11	4	—	型別不能	11	4.13
	8	—	型別不能	4	—	11	13	—	—	11	4
	10	11	4	4	13	—	4	—	型別不能	NT	NT
2008	43	—	—	—	型別不能	—	—	—	—	NT	NT
	46	11	4	—	—	—	4	—	—	NT	NT
	48	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	—	4
	49	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	14	4
	50	—	4	—	型別不能	—	4	10	型別不能	14	—
	51	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	14	10
	52	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	10

NT：未検査  
—：検出せず

体についてNVコピー数を測定した。

PCR産物についてはダイレクトシーケンス法によりキャプシド領域の塩基配列を決定し、遺伝子型を同定した。

NVの除去率の算出方法：流入水と放流水において、Realtime-PCR法で検出されたNVコピー数を比較し、流入水のNVが放流水でどの程度減少しているか割合を算出し、その平均値を出し、合併浄化槽におけるNVの除去効果の傾向をみる目安とした。

### 成 績

浄化槽流入水及び垂下カキの遺伝子型の状況：2シーズンにおけるNVの遺伝子型は、2007/08シーズンでは浄化槽3施設とも流入水でG I/11型、G II/4型、G II/13型が検出され、それを反映して河口の垂下カキにおいても同様の型のNVが検出された(表2)。2008/09シーズンの浄化槽流入水においては、G Iでは2008年第46週にG I/11型が1施設から検出されたのみで、G IIではG II/4型、G II/10型が検出された。垂下カキではG I/14型、G II/4型、G II/

10型が検出された。

合併浄化槽のNV検出状況：2007/08、2008/09の2シーズンの流入水の調査において、3カ所の合併浄化槽でG I、G IIの両方または一方が検出されたのは、合併浄化槽1では11回の調査中10回、2で9回、3で10回あり、平均87.9%であった。放流水においては、合併浄化槽1で10回、2で6回、3で9回、平均75.8%からNVが検出された(表3)。合併浄化槽1および3の流入水では、ほとんどの調査でG I、G IIの一方もしくは両方が検出された。G IIの方が多く検出される傾向があった。合併浄化槽2では、流入水、放流水ともに3施設中、最もNV検出率が低かった。2007/08シーズンはG Iが多く検出され、2008/09シーズンはG IIが多く検出される傾向があった。合併浄化槽3の流入水からは1mlあたり最大 $10^5$ 近いオーダー、放流水でも $10^4$ を超えるオーダーのNVが検出されることがあった(図2, 3, 4)。流入水および放流水のコピー数から算出したNVの除去率の平均値は、合併浄化槽1で約49%、2で約70%、3で約45%であった。

表3 NVの検出状況および検出率

		検 出 状 況										検出率 (%)		
年		2007					2008							
週		41	42	46	51	52	2	4	6	8	10			
合併浄化槽 流入水	1	NT	NT	NT	●/●	NT	●/●	-/●	●/●	-/●	●/●			
	2	NT	NT	NT	●/●	NT	-/-	●/-	●/-	●/-	●/●			
	3	NT	NT	NT	-/●	NT	●/●	-/●	●/●	●/●	-/●			
合併浄化槽 放流水	1	NT	NT	NT	●/-	NT	●/●	●/●	●/●	●/●	●/●			
	2	NT	NT	NT	-/-	NT	●/●	●/-	●/-	-/-	-/-			
	3	NT	NT	NT	-/-	NT	-/●	●/●	●/●	●/●	●/●			
河川水		NT	NT	-/-	●/●	NT	-/-	-/-	-/●	-/-	-/●			
垂下カキ		垂下	-/-	-/-	●/-	●/●	●/●	-/●	●/-	-/●	NT			

		検 出 状 況										検出率 (%)			
年		2008					2009					G I	G II	G I + G II	
週		43	46	48	49	50	51	52	2	3	4	6			
合併浄化槽 流入水	1	-/-	●/-	NT	NT	-/●	NT	NT	NT	NT	-/●	●/●	55	91	91
	2	-/●	-/-	NT	NT	-/●	NT	NT	NT	NT	-/●	-/●	45	55	82
	3	-/-	-/●	NT	NT	-/●	NT	NT	NT	NT	-/●	●/●	36	91	91
合併浄化槽 放流水	1	●/-	-/-	NT	NT	-/●	NT	NT	NT	NT	-/●	●/●	73	73	91
	2	-/-	-/-	NT	NT	-/-	NT	NT	NT	NT	-/●	●/●	45	36	55
	3	-/-	-/●	NT	NT	-/●	NT	NT	NT	NT	●/●	●/●	55	82	82
河川水		-/-	-/-	NT	NT	-/●	NT	NT	NT	●/●	-/●	17	50	50	
垂下カキ		NT	垂下	-/●	●/●	●/-	●/●	-/●	●/-	-/●	●/●	●/●	71	71	88

G I / G II ●：陽性 -：陰性 NT：未検査

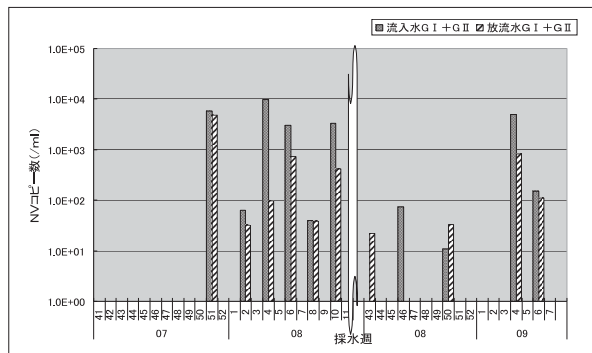


図2 合併浄化槽1のNV検出状況

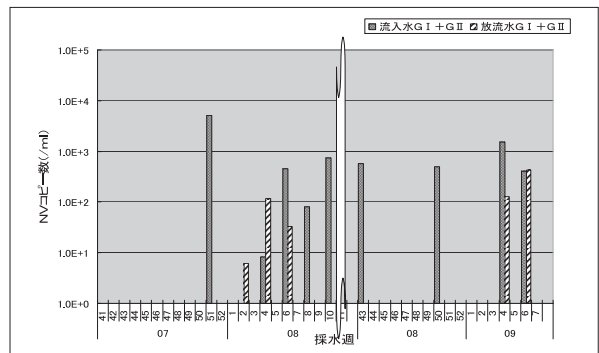


図3 合併浄化槽2のNV検出状況

河川のNV検出状況：浄化槽放流水でNVが比較的高濃度で検出された2007年第51週，2009年第4週等でNV検出がみられ，特に，2009年第4週に調査した3施設の浄化槽放流水からは高濃度のNVが検出されており，合併浄化槽の放流水のNVを反映したものと考えられた。（図

5）。しかし，上流域の浄化槽放流水でNV検出があっても，希釈されるため多くは検出されず，検出しても低レベルの濃度であった。

垂下したカキのNV検出状況およびNVの汚染量：2007/08シーズンは，第41週にカキを垂下したところ，第42週及び46週には汚染が認めら

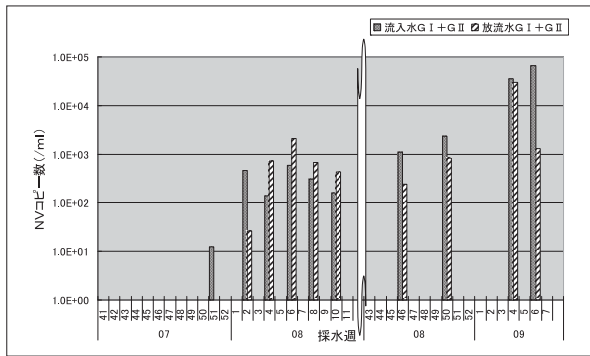


図4 合併浄化槽3のNV検出状況

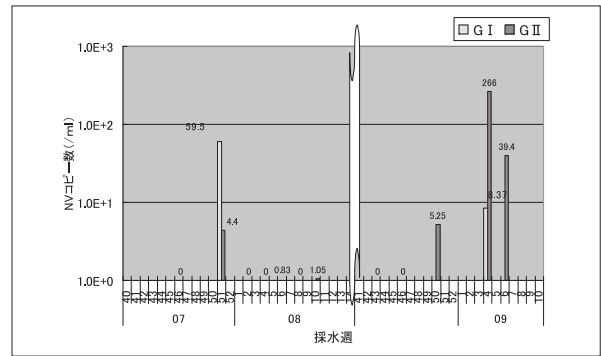


図5 河川水のNV検出状況

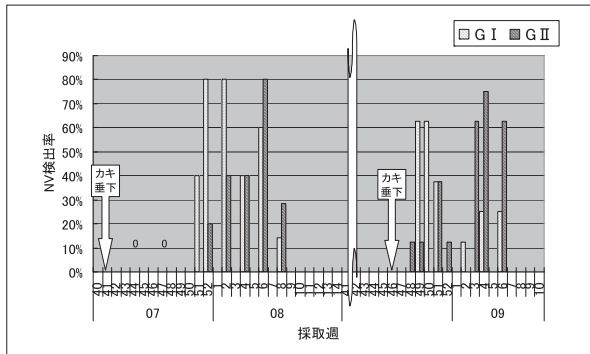


図6 垂下カキのNV検出状況

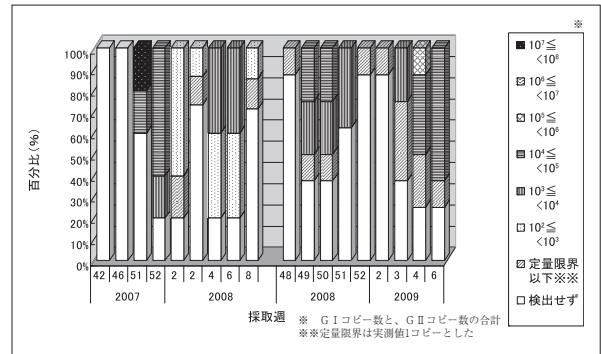


図7 垂下カキのNVコピー数

れなかったが、第51週からNVが検出され、その後は毎回20～80%のカキからNVが検出された(図6)。2008/09シーズンは、46週にカキを垂下し、2週間後の48週からNVが検出され始め、その後、毎回10～75%のカキからNVが検出された(図6)。カキのNV汚染はnested-PCRで増幅産物が認められたものを陽性とし、NVを検出しなかったのは全体の58%であった。NV陽性検体の28%が定量限界以下で、79%はカキ1個あたりのNVコピー数が $10^2$ から $10^5$ のオーダーであった(図7)。

### 考 察

2007/08シーズンは、同時期に3カ所の浄化槽および垂下カキからG I /11型が検出されたことから、NV感染症で多く検出されるG II /4型以外に、G I /11型の地域流行があったことが推察された。

下水処理場等の規模の大きい処理場に流入するNVは、下水処理工程中概ね90～99%以上が除去されているとされている [5]。一方、今回

調査した300人槽前後の比較的中規模の合併浄化槽では、流入水と放流水でのNV除去率平均は、施設1で約49%、2で約70%、3で約45%であるが、個々の除去率は非常にバラツキも多く、合併浄化槽におけるNVの除去効果は期待できないことが示唆された。河川、海域のNV汚染を低減化するためには除去率の向上が望まれるが、評価にあたっては流入水の時間や日による変動、流入から放流までの滞留時間を考慮するとともに、日平均濃度や負荷量等を把握して検討することも必要があると考えられた。

規模の大きい下水処理場等の整備地域におけるNV感染の発生動向を把握するためには、下水処理場への流入下水のNVのモニタリングが有用であると考え、下水道未整備地域の中小規模の合併浄化槽では施設の処理対象人数や利用者が限定され、流入水のNVが利用者のNV感染の有無に左右されるため、単一の浄化槽のモニタリングでは、地域全体の把握は難しい。一方、垂下カキは、浄化槽放流水や河川のNV汚染状況を反映することから、垂下カキのモニ

タリングは、当該地域の感染性胃腸炎の発生動向を推察する上で、有用であると考えられる。なお、海域のカキが汚染されるリスクを検討するにあたっては、その海域でのNV量と養殖カキの垂下状況との関係や、そのNVが不活化されているかどうかも含め、さらに調査検討を進める必要がある。

### 謝 辞

本研究の一部は、平成19年度～平成21年度厚生労働科学研究費補助金・食品の安心・安全確保推進研究事業「食品中のウイルスの制御に関する研究」による助成を受けて実施した。ここに記して謝意を表する。

### 引用文献

- [1] Green KY, Kapikian KZ, Chanock RM : Human calicivirus, Field's Virology vol 2, Lippincott-Raven, 4th ed, 841-874,

New York (2001)

- [2] Inouye S, Yamashita K, Yoshikawa M, Kato N, Okabe N : Surveillance of viral gastroenteritis in Japan : pediatric cases and outbreak incidents, J Infect Dis, 181, 270-274 (2000)
- [3] 中田修二 : ウイルス性胃腸炎, 小児科, 13-20 (2000)
- [4] 齋藤幸一, 佐藤直人, 高橋朱実 : カキのノロウイルス汚染経路に関する検討, 感染症学雑誌, 80, 399-404 (2006)
- [5] 高橋朱実, 蛇口哲夫, 田中智之 : 流入下水中ノロウイルス濃度から推察されるノロウイルス胃腸炎の流行状況と下水処理によるノロウイルス除去, 平成19年度の厚生労働科学研究費 (食品の安心・安全確保推進研究事業) 「食品中のウイルスの制御に関する研究」協力研究報告, 95-102 (2008)

## 文 献 抄 録

分裂指数は犬皮膚肥満細胞腫における余命を予測できる

Romansik EM, Reilly CM, Kass PH, Moore PF and London CA (オハイオ州立大学, 米国) Vet Pathol, 44, 335-341 (2007)

分裂指数 (Mitotic index : MI) は、細胞増殖の間接的な指標であり、いくつかのヒトおよびイヌの癌の転帰において強力な予測材料であることが証明されてきた。この研究の目的は、皮膚肥満細胞腫 (MCT) に罹患したイヌの生物学的挙動や余命の予測としてのMIの実用性を評価することであった。組織学的にMCTと確認された148例の犬から得られた医療記録が検索された。腫瘍グレード、局所再発、転移病巣、死亡日または最終追跡記録、転帰に関する情報が入手された。腫瘍のうち最も分裂活性の高い部位が評価に選ばれ、MI値は高倍視野 (400×, 2.7mm<sup>2</sup>) にお

ける分裂像数/10で決定された。MIの生存データを比較するために、コックス比例ハザード (回帰) モデルが使用された。局所再発と転移病巣発現の基準としてMIを比較するために、マンホイットニー検定が使用された。MIは腫瘍グレードと直接相関していた (P<.0001)。MIが5以下の犬における中央生存期間は、MIが5以上のもの (2カ月) より長く (70カ月)、グレードによらなかった (P<.001)。MI 5以下でグレードIIの腫瘍の中央生存期間 (MST) は、MI 5以上で5カ月であったのに対して、70カ月であった (P<.001)。MI 5以上では2カ月未満であったのに比較し、MI 5以下でグレードIIIの腫瘍に対してMSTは影響を受けなかった。要するに、MIは皮膚MCTの犬の余命における強力な予測材料であり、治療法の選択肢を決定する際の予後指標として含ませるべきである。

(岩手大学獣医病理学研究室)