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

三浦 尚之^{1*}・風間 しのぶ¹・今田 義光¹・真砂 佳史²・当广 謙太郎³
真中 太佳史³・劉 曉芳³・斉藤 繭子³・押谷 仁³・大村 達夫¹

¹正会員 東北大学 未来科学技術共同研究センター (〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-04)

*E-mail: takayuki.miura.e6@tohoku.ac.jp

²正会員 国際連合大学 サステイナビリティ高等研究所 (〒150-8925 東京都渋谷区神宮前5-53-70)

³東北大学大学院 医学系研究科 (〒980-8575 仙台市青葉区星陵町2-1)

下水道が整備された都市域においては、感染者から排出されたノロウイルスは下水処理場に流入する。本研究では、感染性胃腸炎の流行を早期に検知するために下水中のノロウイルスをモニタリングすることの有用性を評価した。2013年4月から2015年10月までの期間、流入下水試料を毎週収集し、下水中ノロウイルス濃度と地域の感染性胃腸炎患者報告数の相互相関分析を行った。さらに、下水中に検出されたノロウイルスの遺伝子型をパイロシーケンサーを用いて網羅的に解析し、地域の感染性胃腸炎患者便試料から検出された遺伝子型及び株と比較した。その結果、下水中ノロウイルスGII濃度は患者報告数と遅れが±1週未満の範囲で有意に相関すること ($R=0.57\sim0.72$)、及び下水中には患者便試料と同一の遺伝子型及び株が含まれ、それらが経時的に変化することが実証された。患者報告数が集計・公表されるには1~2週間の時間を要することから、下水中のウイルス濃度をモニタリングすることで、医療機関の報告に基づく現在の監視システムよりも早期に流行を検知できる可能性が示された。

Key Words : acute gastroenteritis, norovirus, sewage, early warning system, pyrosequencing

1. はじめに

ノロウイルスは、ヒトに感染すると下痢、嘔吐、発熱などの症状を伴う感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスである。ノロウイルスは遺伝的に多様で、GI, GII, GIVの3つの遺伝子群がヒトに感染し、それぞれの遺伝子群はさらに細かく遺伝子型に分類され、現在では提案中のものも含めて30を超える遺伝子型が存在する¹⁾。Hallらの推計によると、米国ではノロウイルスを原因とした感染性胃腸炎は年間およそ2,000万件発生しており、高齢者を中心に7万人が入院し、800人が命を落としている²⁾。我が国においてもノロウイルスによる感染症は完全には制御できておらず、毎年11月~3月の冬季に流行し問題となっている。

感染性胃腸炎は、感染症法に基づく届出の類型において5類感染症に分類されており、全国約3,000カ所の小児科医療機関(小児科定点)が届出を行う感染症に指定されている。この小児科定点あたりの患者報告数が1週間あたり20人を超えた場合に、各

都道府県の保健・福祉系部局から感染性胃腸炎の流行拡大予防のために注意が喚起される。具体的には、流行状況の報告に加えて、手洗いや食品の十分な加熱、吐瀉物の適切な処理などの感染予防方法について報道発表が行われ、地域及び特に集団感染が危惧される施設に対して衛生的対応が促される。しかしながら、患者報告数が集計・公表されるには1~2週間の時間を要することから、注意喚起の報道発表までに流行がさらに拡大することが懸念される。実際に2014/15シーズンに宮城県では、流行期中頃の2015年1月29日に感染性胃腸炎警報が発令された。今後、感染症に強いより安全で安心な社会を創造していくためには、地域においてまさに流行が起こっていることを知らせる現在の監視システムに加えて、流行が拡大するおそれがある場合にその旨を初期に通知することで注意を促し、流行拡大を防止する新たなシステムの開発が求められる。

感染者の糞便中には、発症後1~2週間、 $10^6\sim10^9$ copies/gの濃度でノロウイルスが排出されるため^{3, 4)}、下水中のノロウイルス濃度はその処理区域における

感染者の発生状況を反映すると考えられている⁵⁾。したがって、下水中のウイルス濃度を頻繁に測定することで、地域における感染性胃腸炎の流行の始まりを早期に検知できる可能性がある。これまでに下水中のノロウイルス濃度は、感染性胃腸炎の流行期に高くなること ($10^4 \sim 10^5$ copies/mL) が報告されてきたが⁶⁻⁸⁾、長期間に渡って下水や河川水中のノロウイルスをモニタリングし地域における感染性胃腸炎の発生状況と比較した研究は極めて少ない⁹⁾。また、下水中には多様なノロウイルスの遺伝子型が含まれることが報告されてきたが¹⁰⁻¹³⁾、下水試料に加えて同時期に収集された感染性胃腸炎患者便試料からもノロウイルスを検出し、その相同性を調査した研究は少なく^{10, 14)}、下水から検出された遺伝子型が疫学的に重要であるかどうかはあまり議論されてこなかった。

以上の背景のもと、本研究では、地域における感染性胃腸炎の流行を早期に検知するために下水中のノロウイルスをモニタリングすることの有用性を評価することを目的として、週に1度の頻度で2年半に渡って下水中のノロウイルスGI及びGIIの濃度を測定し、地域の週毎の感染性胃腸炎患者報告数との相互相関分析を行った。すなわち、同じ週に観測された下水中ウイルス濃度及び患者報告数の2つの時系列データを前後にずらして相関を分析することで、変動の類似度に基づき下水中ノロウイルスモニタリングの有用性を議論した。さらに、下水中に検出されたノロウイルスの遺伝子型をパイロシーケンサーを用いて網羅的に解析し、下水処理場が位置する自治体の医療機関において収集した感染性胃腸炎患者便から検出された遺伝子型及び株と比較した。

2. 方法

(1) 下水及び患者便試料の収集

家庭排水を処理する宮城県内の下水処理場（日平均処理水量＝およそ4,500 m³/日）において、2013年4月から2015年10月の原則毎週水曜日の午前10時に沈砂池越流水を1 L採水した（131試料）。著者らは、流入下水試料を一度冷凍することにより、ポリエチレングリコール沈殿法による試料からのウイルス回収率が有意に向上することを確認しているため¹⁵⁾、試料は採水後速やかに下水処理場において-20℃で冷凍保存し、2ヶ月以内にノロウイルス遺伝子検出のためのウイルス濃縮、RNA抽出、及び逆転写反応に供した。

流入下水試料の収集期間に、下水処理区域内に位

置する2ヶ所の外来医院において感染性胃腸炎患者便を収集した。下痢症で医院を受診した患者のうち、本研究に対するインフォームド・コンセントが得られた患者から直腸拭い液を採取した（210試料）。試料は、採取後2～8℃で冷蔵保存し、毎週著者らの研究室に搬入した。本研究で実施した患者便試料の収集及び病原体検出については、東北大学医学系研究科倫理委員会の承認を得た。

(2) 下水試料からのウイルス濃縮、RNA抽出、逆転写反応

下水中に含まれるウイルス粒子は、ポリエチレングリコール（PEG）沈殿法で濃縮した^{15, 16)}。すなわち、試料40 mLにプロセスコントロールとしてマウスノロウイルスS7-PP3株を100 µL（およそ 10^7 copies）添加し、PEG 6000（和光純薬）、塩化ナトリウムをそれぞれ濃度が8%、2.3%となるように添加し、4℃で12時間ゆるやかに攪拌した。次に試料を9,000×g、4℃で30分間遠心分離した。ペレットに滅菌超純水1 mLを加えてボルテックスし、10,000×g、4℃で10分間遠心分離した後、上清1 mLをウイルス濃縮液とした。

ウイルスRNAは、140 µLのウイルス濃縮液からQIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit及びQIAcube（Qiagen）を用いて抽出した。抽出したRNAからは、iScript Advanced cDNA Synthesis Kit（Bio-Rad）を用いた逆転写反応により、キットの説明書に従ってcDNAを作製した¹⁶⁾。

(3) 下水中ノロウイルス濃度の定量

マウスノロウイルス、ノロウイルスGI及びGIIのcDNA濃度は、CFX96 Real-Time System（Bio-Rad）を用いたreal-time PCR法により定量した。PCRにおける反応液量は20 µLで、5 µLのcDNA、10 µLのSsoFast Probes Supermix（Bio-Rad）、及び表-1に示した濃度の既往のプライマー・プローブを使用した¹⁷⁻¹⁹⁾。温度条件は、95℃で30秒間の熱変性後、95℃で15秒、56℃で60秒、72℃で30秒のサイクルを50回繰り返した。

表-1に示したプライマーによって増幅されるウイルス遺伝子領域と同じ配列を持つ1本鎖オリゴDNAを用いて $10^1 \sim 10^8$ copies/wellの範囲で10倍連続希釈系列を作製し、陽性コントロールとした。この陽性コントロールを試料と同時にreal-time PCRに供することで、横軸を陽性コントロール濃度の常用対数値、縦軸をプローブによる蛍光が有意に上昇したサイクル数として定義されるCq値（quantification cycle）とする検量線を作成した。下水試料に由来する夾雑物

表-1 Real-time PCR 及び nested PCR に用いたプライマー・プローブ

プライマー・ プローブ	塩基配列 (5'-3') ^a	終濃度 [nM]	参考文献
マウスノロウイルス検出のためのreal-time PCR			
MNVF	CGGTGAAGTGCTTCTGAGGTT	400	17
MNVR	GCAGCGTCAGTGCTGTCAA	400	
MNV-TaqMan	FAM-CGAACCTACATGCGTCAG-NFQ-MGB	300	
ノロウイルスGI検出のためのreal-time PCR			
COG1F	CGYTGGATGCGNNTTYCATGA	400	18
COG1R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	400	
RING1(a)-TP	FAM-AGATYGCGATCYCCTGTCCA-TAMRA	300	
RING1(b)-TP	FAM-AGATCGCGGTCTCCTGTCCA-TAMRA	100	
ノロウイルスGII検出のためのreal-time PCR			
COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	400	18
COG2R	TCGACGCCATCTTCATTACACA	400	
RING2AL-TP	FAM-TGGGAGGGGCGATCGCRATCT-TAMRA	100	19
ノロウイルスGI検出のためのnested PCR			
COG1F	CGYTGGATGCGNNTTYCATGA	500	18
G1SKF	CTGCCCGAATTYGTAAATGA	500	22
G1SKR	CCAACCCARCCATTRTACA	500	
ノロウイルスGII検出のためのnested PCR			
COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	500	18
G2SKF	CNTGGGAGGGGCGATCGCAA	500	22
G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	500	

^a プライマー及びプローブに使用されている混合塩基は、以下の通りである。B (T, C, G); H (A, C, T); N, (A, T, C, G); R (A, G); S (C, G); Y (T, C). FAM, 6-carboxy-fluorescein reporter dye; NFQ, Non Fluorescent Quencher; MGB, Minor Groove Binder; TAMRA, tetramethylrhodamine.

によるPCRの阻害を評価するために、合成したcDNAの原液に加えて、10倍および100倍希釈液も同時に反応に供し、Cq値の差 (ΔCq) を検量線の傾き (PCRにおいてテンプレートが1 $\log_{10}$ 増幅するのに要した平均サイクル数) と比較した⁷⁾。すなわち、検量線の傾きの絶対値-1 (Cq値の標準偏差) よりも原液と10倍希釈液の ΔCq が小さい場合には阻害があると判断し、原液ではなく希釈液のCq値を計算に用いた。本研究では、Cq値が40以下の試料を陽性と判定した²⁰⁾。本検出手法による下水中ノロウイルスの検出下限値は、およそ32 copies/mLである。プロセスコントロールとして下水試料に添加したマウスノロウイルスの回収率が1%以上の試料についてノロウイルス濃度を算出することとした。またマウスノロウイルスの回収率は、ノロウイルス濃度の補正には使用しなかった¹⁶⁾。

(4) 感染性胃腸炎患者報告数と下水中ノロウイルス濃度の相互相関分析

地域における感染性胃腸炎の発生状況と下水中におけるノロウイルスGI及びGIIの濃度変動との類似度を評価するために、相互相関分析を行った。全国約3,000カ所の小児科定点が届出を行う感染性胃腸炎には多種の病原体による胃腸炎が含まれるが、

2013年10月14日よりロタウイルスによる感染性胃腸炎が別に報告・集計され始めた。本研究では、感染性胃腸炎の原因のほとんどはノロウイルスであると仮定し、2013年10月14日以降に対象の下水処理場が位置する塩釜保健所管内 (管内人口=およそ45万人)、隣接する仙台市 (108万人)、及び宮城県全体 (232万人) で報告された疫学週毎の値 (105週)²¹⁾を用いて、下水中ノロウイルス濃度の常用対数値との相関を分析した。すなわち、患者報告数に対して下水中ウイルス濃度を遅らせることを+とし、-3週から+6週までのそれぞれの遅れについて相関係数を算出し、有意水準5%で判定した。本研究では、最も大きな相関係数を示す遅れが正しいとし、ノロウイルスのGIのみ、GIIのみ、及びGI + IIの3通りについて分析した。分析には、IBM SPSS Statistics Ver. 19 (IBM) を使用した。

(5) 下水試料に含まれるノロウイルス遺伝子型の網羅的解析

a) PCR産物の作製

パイロシーケンシングにより、下水中から検出されたノロウイルスGI及びGIIの遺伝子型を網羅的に解析するために、(3)で作製したcDNAを鋳型にポリメラーゼからカプシドタンパク質のN/Sドメイン領域

域の一部（N/S領域）を表-1に示したプライマーを用いたnested PCR法により増幅した。すなわち、GIに対するプライマーとして1st PCRにCOG1F/G1SKR, 2nd PCRにはG1SKF/G1SKR, GIIにはそれぞれCOG2F/G2SKR及びG2SKF/G2SKRを用いた^{18, 22)}。反応条件は、NEBNext High-Fidelity 2X PCR Master Mix (New England Biolabs) を用いて、Kazamaらの手法に従った¹⁶⁾。アガロースゲル電気泳動で対象の塩基長（約340 bp）にバンドが確認されたPCR産物をQIAquick PCR Purification Kit及びQIAcubeを用いて精製し、nested PCR産物とした。

b) パイロシーケンシング

1〜2ヶ月に1度の頻度となるように試料を選択し、nested PCR産物の5'末端及び3'末端にパイロシーケンシングに供するためのアダプター配列をfusion PCRにより付加した。アダプター配列として5'末端側にはシーケンシングプライマー配列（FLX Titanium Primer A, Roche Applied Science）、サンプル識別のためのバーコード配列（Multiplex Identifier, Roche Applied Science）、及びG1SKFまたはG2SKFから成る配列を付加した。3'末端側には、シーケンシングプライマー配列（FLX Titanium Primer B, Roche Applied Science）及びG1SKRまたはG2SKRから成る配列を付加した。反応条件は、NEBNext High-Fidelity 2X PCR Master Mixを用いて、Kazamaらの手法に従った¹⁶⁾。得られた産物をQIAquick PCR Purification Kit及びQIAcubeを用いて精製し、fusion PCR産物とした。

Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) 及びM1000 PRO (TECAN) を用いて、fusion PCR産物の濃度を測定した。GS Junior Titanium emPCR Kit (Lib-L)、GS Junior Titanium Sequencing Kit、及びGS Junior Titanium PicoTiter Plate Kit (Roche Applied Science) を用いて、キットの説明書に従ってfusion PCR産物の前処理を行い、3〜5試料を同時にGS Junior+ system (Roche Applied Science) を用いてパイロシーケンシングに供した¹⁶⁾。

c) データ処理と遺伝子型の同定

パイロシーケンシングで得た各試料の塩基配列データに対して、QIIME Ver. 1.8.0²³⁾及びPerseus²⁴⁾ソフトウェアを用いてクオリティーフィルタリング、プライマー配列の除去、パイロシーケンシングで生じたノイズの修正、及びキメラ配列の除去を行った後に97%以上の相同性を持つ塩基配列をoperational taxonomic unit (OTU) としてまとめた。各OTUの代表配列に対してNorovirus Genotyping Tool Ver. 1.0²⁵⁾及びBLASTnを用いてノロウイルスの遺伝子型を同定した¹⁶⁾。OTUを形成したノロウイルスの塩基配

列については、Analytic Rarefaction 2.0ソフトウェア (<http://strata.uga.edu/software/>) を用いてrarefaction curveを作成し、パイロシーケンシングにおけるsequencing depthを確認した。

(6) 患者便試料からのノロウイルス検出及び遺伝子型の同定

患者便試料からRNAを抽出し逆転写反応を行った後、real-time PCR法によりノロウイルス陽性試料をスクリーニングした¹⁶⁾。陽性試料のcDNAを鋳型にN/S領域をEx Taq (Takara Bio) を用いて増幅し^{18, 22)}、QIAquick PCR Purification Kit及びQIAcubeを用いてPCR産物を精製した。キットの説明書に従い、BigDye Terminator v1.1 Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてシーケンシング反応産物を作製し、BigDye XTerminator Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて精製した後、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzerあるいは3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いてシーケンシングした。得られた塩基配列は、MEGA6²⁶⁾を用いてアライメントとプライマー配列の除去を行った後、Norovirus Typing Tool Ver. 1.0²⁵⁾を用いて遺伝子型を同定した。

(7) 系統樹解析

下水及び患者便試料から検出されたノロウイルス株の相同性を評価し、同時に世界から報告されている株と比較するために、本論文ではGII.17と同定された株を対象に系統樹解析を行った。MEGA6²⁶⁾を用いて塩基配列をアライメントした後、最尤法 (Kimura 2-paramer 法) を用いて系統樹を作成した。

3. 結果

(1) 感染性胃腸炎患者報告数と下水中ノロウイルス濃度

下水試料からのウイルス回収・検出のプロセスコントロールとして試料に添加したマウスノロウイルスの回収率は、全ての試料において1%より大きく（1.4〜42%）、算術平均値 ± 標準偏差は、17 ± 9.5%だった。この結果は、ウイルス濃縮及びRNA抽出において重大なロスが無く、またRT及びreal-time PCRにおける阻害が小さいことから、遺伝子検出結果が信頼できることを示している。したがって、全ての下水試料についてノロウイルス濃度を算出した。ノロウイルスGI及びGIIの陽性率はそれぞれ55%、79%であり、濃度の常用対数の平均値および

図-1 下水中ノロウイルス濃度（◆）と胃腸炎患者報告数（棒グラフ）の変動。破線は、下水中ノロウイルスの検出下限値（およそ 32 copies/mL）を示す。

表-2 感染性胃腸炎患者報告数に対する下水中ノロウイルス濃度の相互相関分析結果

遅れ [週] ^b	相関係数 ^a								
	GI			GII			GI + GII		
	塩釜	仙台	宮城	塩釜	仙台	宮城	塩釜	仙台	宮城
-3	-0.068	-0.006	-0.008	0.229	0.083	0.13	0.262	0.085	0.131
-2	-0.067	-0.042	-0.035	0.305	0.208	0.262	0.323	0.212	0.266
-1	0.137	0.027	0.093	0.316	0.279	0.335	0.32	0.279	0.345
0	0.095	0.058	0.131	<u>0.572*</u>	<u>0.656*</u>	<u>0.721*</u>	<u>0.549*</u>	<u>0.619*</u>	<u>0.689*</u>
+1	0.263	0.248	0.313	0.466*	0.413*	0.435*	0.469*	0.441*	0.475*
+2	0.258	0.299	0.347	0.427*	0.333	0.365	0.435*	0.393	0.429*
+3	0.216	0.323	0.303	0.489*	0.337	0.339	0.490*	0.399	0.398
+4	0.215	0.247	0.256	0.451*	0.254	0.286	0.459*	0.312	0.346
+5	0.133	0.096	0.099	0.416*	0.287	0.301	0.428*	0.279	0.294
+6	0.175	0.145	0.144	0.287	0.151	0.154	0.308	0.171	0.174

^a *: $P < 0.05$. 下線部は相関係数が有意かつ最大値となった遅れを示す。

^b 患者報告数に対して下水中ウイルス濃度を遅らせることを+と定義した。患者報告数が集計・公表されるには1～2週間の時間を要することから、遅れが<0において下水中ノロウイルスモニタリングが感染性胃腸炎流行の早期検知に有用となることを示す。

標準偏差は、それぞれ 2.5 ± 0.6 , $3.2 \pm 0.9 \log_{10}$ copies/mL だった。

図-1には、2013年10月から2015年10月までの塩釜保健所管内の感染性胃腸炎患者報告数と下水中ノロウイルス濃度（GI及びGIIの合計濃度）の変動を示した。患者報告数が増加し始める11月頃から下水中ノロウイルス濃度も上昇し、12月には 10^3 copies/mL 台となった。その後1～2月にピークを迎え、濃度の最大値は、2014年は $4.6 \log_{10}$ copies/mL、2015年は $5.6 \log_{10}$ copies/mL だった。それから6月に掛けて、患者報告数と共に下水中濃度も減少する傾向が2014年及び2015年の2シーズンで確認された（図-1）。

(2) 感染性胃腸炎患者報告数と下水中ノロウイルス濃度の相互相関分析

塩釜保健所管内の感染性胃腸炎患者報告数に加えて、隣接しているため患者の発生パターンが類似していると考えられる仙台市、及び宮城県全体の患者報告数に対する下水中ノロウイルス濃度の相互相関分析を行った（表-2）。その結果、患者報告数と下水中ノロウイルスGI濃度の間には、相関が認められなかった。一方で、下水中ノロウイルスGII濃度は、塩釜保健所管内の患者報告数に対して、0から+5週の遅れにおいて有意な相関が見られ、遅れ0において相関係数が最大となった（ $R = 0.572$, 表-2）。ノ

図-2 下水及び患者試料から検出されたノロウイルスの遺伝子型分布。ヒートマップは下水から検出された配列のリード数割合で、GI, GII, 及びGII.4亜型毎に上限100%で示した。中の数値は患者試料の陽性数を示す。

ロウイルスGII濃度は、仙台市及び宮城県の患者報告数に対しても0から+1週の遅れにおいて有意な相関が認められ、遅れ0において最大の相関係数となり、その値は宮城県 (0.721), 仙台市 (0.656) の順に高かった。収集した下水試料中のほとんどにおいて (>90%) GIよりもGIIの濃度の方が高かったため、GI及びGIIの合計濃度と患者報告数の間にも、GIIのみの場合と同様に、塩釜保健所管内で0から+5週、仙台市で0から+1週、宮城県で0から+2週において有意な相関が確認された。

(3) 下水及び患者便試料から検出されたノロウイルスの遺伝子型

収集した210の患者便試料のうちreal-time PCRによりノロウイルスが陽性だったのは60検体あり、内訳はGIが5検体、GIIが58検体で、そのうちGIとGIIによる共感染が3検体含まれていた。Nested PCRとシーケンシングにより遺伝子型が判明したのは、GIが3検体、GIIが58検体であり、GII.4が最も多く (64%), 続いてGII.6及びGII.17が多かった (それぞれ14%)。

下水試料中に検出されたノロウイルスをパイロシーケンサーを用いて解析した結果、19試料の合計で

687,710のノロウイルス塩基配列が得られ、サンプルあたりの平均配列数はGIが21,220, GIIが19,344だった。GIについては、2014年6月、2015年4月及び8月、GIIについては、2013年10月及び12月、2014年6月及び10月、2015年8月の試料を除いたほとんどの試料においてrarefaction curveがプラトーに達しており、sequencing depthが十分であることが確認された。下水試料からは、患者便試料から検出された8遺伝子型を含む15遺伝子型が検出された (図-2)。GI.1, GI.3, GI.6, GI.9, GII.2, GII.7, 及びGII.8の7遺伝子型は、患者便試料からは検出されなかったが下水試料からは検出された。一方で、GII.15は、1つの患者便試料からのみ検出された。2013年及び2014年で患者便試料からの検出率が高かったGII.4は、下水試料中においても配列のリード数割合が高かった。2013/14シーズンに検出されたGII.4は全てSydney 2012亜型であり、患者便と下水試料で結果が一致していた。GI.3及びGI.4は、2013/14シーズンには検出されていたが、2014/15シーズンにはほとんど検出されなくなった。一方で、2014年には検出されなかったGI.2が、2015年の患者便試料からは検出され、4~8月には下水試料中のリード数割合が100%となった (図-2)。GIIについて見てみると、2014/15シ

ーズンは、GII.4よりもGII.17の方が患者便試料からの検出率が高く、下水試料におけるリード数割合も高かった。

(4) 検出されたノロウイルスGII.17株の系統樹解析

ノロウイルスGII.17株を対象に分子系統解析を行った結果、患者から検出された株は、同時期の下水から検出された株と同じクラスターに含まれた（図-3）。本研究で検出されたGII.17株のほとんどはKawasaki308 2015サブクラスターに分類されたが、2014年1月8日に下水試料から検出された株（140108_W）はKawasaki323 2014サブクラスターに含まれた。

4. 考察

(1) 感染性胃腸炎患者報告数と下水中ノロウイルス濃度の相互相関分析

本研究では、下水中ノロウイルス濃度を毎週測定し、週毎に集計された地域の感染性胃腸炎患者報告数と相互相関分析を行ったことにより、下水中ノロウイルスGII濃度は患者報告数と0から+1週の遅れにおいて有意に相関することが初めて明らかになった（表-2）。現行の感染性胃腸炎の監視システムは小児科定点の報告に基づいており、感染者が医療機関を受診しないと検知されない。また、患者報告数が集計・公表されるには1～2週間の時間を要する。一方で、下水中のウイルス濃度は、PEG沈殿法によるウイルス濃縮からreal-time PCRによる定量検出まで、およそ24時間で結果を得ることが可能である。相互相関分析の結果、遅れがない場合において相関係数が最も高くなったことは、患者数の増加と同時に下水中ウイルス濃度も上昇することを示している。したがって、下水中ウイルス濃度を頻繁に測定することで、医療機関の報告に基づく現在の監視システムよりも早期に流行を検知できることが示された。また、ノロウイルスの不顕性感染者は、症状のある患者と同様の糞便中ウイルス濃度及び排出期間でノロウイルスを排出することが報告されており^{3, 4)}、不顕性感染者による感染の伝播が懸念されている。下水処理場の流入下水中には、処理区域内で発生した不顕性感染者も含めた全ての感染者に由来するノロウイルスが含まれると考えられることから、下水中のノロウイルスをモニタリングすることの有用性は極めて高い。

相互相関分析の結果、患者報告数は、下水中ノロウイルスGI濃度との間には有意な相関が認められな

図-3 下水及び患者便試料から検出されたノロウイルスGII.17株のN/S領域の系統樹。本研究で取得した株名は、6桁の年月日（YYMMDD）に続けてW（下水）またはP（患者）で示した。サブクラスターの参照株としてKawasaki323株（GenBank accession number: AB983218）及びKawasaki308株（LC037415）を、アウトグループとしてGII.13 Fayetteville株（AY113106）を用いた。

かった一方で、GII濃度とは有意な相関が見られた（表-2）。これは塩釜保健所管内、仙台市、及び宮城県の患者報告数において、GIよりもGIIの占める割合ははるかに大きかったことが原因と考えられた。下水試料におけるノロウイルスGIの陽性率は55%で、GII（79%）と比較して低かったこと、また、ノロウイルスが陽性だった60の患者便試料のうち、GI陽性が5検体しかなかったことから、調査対象期間はGIによる感染者が少なく、さらに発症して医療機関を受診した患者も少なかったことがわかる。Kishidaらは、2009年10月から2010年9月までの1年間、利根大堰において河川水試料を毎週収集し、ノロウイルスGI及びGIIの濃度が、上流に位置する群馬県の感染性胃腸炎患者報告数と有意に相関することを報告した（スピアマンの順位相関係数はそれぞれ0.77及び0.70）⁹⁾。本研究でノロウイルスGIIのみに有意な相関が見られた理由は、調査の年や場所によって地域で流行する遺伝子型が変化するためと考えられた。したがって、複数の流行期を含めたより長期間のデータに基づき相関を分析することが重要である。遅れが+1週の場合にも相関係数は低いもの

の有意な相関が認められた理由としては、患者報告数は患者が医療機関を受診した週で集計されるのに対し、下水には1人の感染者から発症後1～2週間ノロウイルスが排出され続けるため、濃度は排出期間分の患者数の積算値に比例することが考えられた。また、本研究では、感染性胃腸炎患者報告数の原因のほとんどはノロウイルスであると仮定し相関を調べたが、原因ウイルスには他にサポウイルスやアストロウイルスなども含まれる。本研究で収集した210の患者便試料について著者らが分析した結果、サポウイルス及びアストロウイルスは、それぞれ15検体（7.1%）及び5検体（2.4%）から検出され、ノロウイルス（60検体、29%）と比較して少なかったことから、上記の仮定は概ね妥当と考えられた。

(2) 下水及び患者便試料から検出されたノロウイルスの遺伝子型

2013/14シーズンは、最も多い34の患者便試料からGII.4 Sydney 2012亜型が検出され、対象地域で流行していたことが明らかになった。下水試料におけるGII.4 Sydney 2012亜型のリード数割合も2013年10月から2014年4月まで14～100%と高く（図-2）、この結果は、著者らが行った2012/13シーズンの調査結果とも一致していた¹⁶⁾。一方で、2014/15シーズンは、GII.17がGII.4よりも多く患者便と下水試料から検出された。GII.17株を対象とした系統樹解析の結果、2014年3月に川崎市で分離された新型のGII.17 Kawasaki323株²⁷⁾と近縁な株だった。本研究で2013/14シーズン及び2014/15シーズに検出された株は、それぞれKawasaki323 2014及びKawasaki308 2015サブクラスターに分類され、下水及び患者便試料から同時期に検出された株は同一のクラスターに分類された（図-3）。以上の結果から、下水中には処理区域で流行しているノロウイルス株が検出されることが実証された。

患者便試料からは検出されなかったが下水試料からは検出されたGI.1、GI.3、GI.6、GI.9、GII.2、GII.7、及びGII.8の7遺伝子型（図-3）は、不顕性感染者や症状が軽いために医療機関を受診しない感染者に由来する遺伝子型であった可能性が考えられた。しかしながら、本研究では外来医院を受診した全ての下痢症患者から便試料を収集してはいないため、偶然検出されなかった可能性も否定できない。下水中に検出されたノロウイルスをパイロシーケンサーを含む次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した研究は、著者らの研究グループによる報告^{16, 28)}を除いて存在せず、また下水及び患者便試料を同時に収集・解析した報告も少ないため、下水試料から検出

された遺伝子型の病原性については、これまであまり議論されてこなかった。下水中のノロウイルス検出にパイロシーケンシング法を適用することで、クローニング及びサンガーシーケンシング法では検出が困難な存在比1%未満のマイナーな遺伝子型も同定され、医療機関ベースのサーベイランスでは得ることが難しい疫学的知見が得られた。今後は健康者の糞便試料も解析し、不顕性感染を引き起こした遺伝子型についてもデータを蓄積することで、下水中に含まれるノロウイルスの遺伝子型や株の理解がさらに進むと考えられる。

5. おわりに

本研究では、下水中のノロウイルスをモニタリングすることにより処理区域内で発生した感染性胃腸炎の流行を早期に検知できるかを評価した。以下に結論を示す。

- 1) 2014年4月から2015年10月に毎週収集した流入下水試料のノロウイルスGI及びGIIの陽性率はそれぞれ55%及び79%であり、濃度の常用対数の平均値はそれぞれ 2.5 ± 0.6 及び $3.2 \pm 0.9 \log_{10} \text{ copies/mL}$ だった。
- 2) 2013年10月から2015年10月の下水中ノロウイルスGII濃度は、地域における感染性胃腸炎患者報告数と遅れが±1週未満の範囲で有意に相関した（ $R = 0.57 \sim 0.72$ ）。下水中のウイルス濃度を監視することで、医療機関の報告に基づく現在の監視システムよりも早期に流行を検知できる可能性が示された。
- 3) パイロシーケンサーを用いた解析により、下水中には患者便試料から検出された8遺伝子型を含む15の遺伝子型のノロウイルスが検出された。
- 4) 下水及び患者便試料の分析結果から、研究対象地域では2013/14シーズンはGII.4 Sydney 2012亜型が流行していたが、2014/15シーズンは流行の遺伝子型がGII.17に変化したことが明らかになり、下水試料をパイロシーケンサーで解析することで、地域におけるノロウイルスの流行状況を遺伝子型レベルで経時的に把握できることが示された。

冒頭で述べたように、我が国には感染症の発生動向を監視するシステムがあり、流行状況の把握及び流行拡大防止のために機能している。しかしながら、高齢者や免疫不全者などの社会的弱者を中心に人々が感染性胃腸炎の害を被る状況は、依然として改善されていない。今後、人間活動がさらに複雑化・高度化することにより、病原ウイルスの動きも多様化

し、感染リスクが増大することが懸念される。本研究により、下水中ノロウイルス濃度という量的な情報は、処理区域で発生した感染性胃腸炎の流行を早期に検知するのに有用であること、及び下水から検出されたノロウイルスの株や遺伝子型という質的な情報は、地域の流行状況を把握するのに有用であることが示された。感染性胃腸炎の流行を早期に検知し、流行拡大を抑制できる安全で安心な社会を創っていくことが強く求められる。

謝辞：本研究を遂行するにあたり患者便試料をご提供頂いた小野寺医院・小野寺仁至氏及び中山クリニック・中山大典氏に感謝申し上げます。本研究は、JST - CREST「迅速・高精度・網羅的な病原微生物検出による水監視システムの開発」（研究代表者：大村達夫）の一環として実施された。

参考文献

- 1) Kroneman, A., Vega, E., Vennema, H., Vinjé, J., White, P., Hansman, G., Green, K., Martella, V., Katayama, K., Koopmans, M.: Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping, *Arch. Virol.*, Vol.158, No.10, pp.2059-2068, 2013.
- 2) Hall, A. J., Lopman, B. A., Payne, D. C., Patel, M. M., Gastanaduy, P. A., Vinje, J., Parashar, U. D.: Norovirus disease in the United States, *Emerg. Infect. Dis.*, Vol.19, No.8, pp.1198-205, 2013.
- 3) Ozawa, K., Oka, T., Takeda, N., Hansman, G. S.: Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan, *J. Clin. Microbiol.*, Vol.45, No.12, pp.3996-4005, 2007.
- 4) Teunis, P. F. M., Sukhrie, F. H. A., Vennema, H., Bogerman, J., Beersma, M. F. C., Koopmans, M. P. G.: Shedding of norovirus in symptomatic and asymptomatic infections, *Epidemiol. Infect.*, Vol.143, No.08, pp.1710-1717, 2015.
- 5) Hellmér, M., Paxéus, N., Magnius, L., Enache, L., Arnholm, B., Johansson, A., Bergström, T., Norder, H.: Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis A virus and norovirus outbreaks, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.80, No.21, pp.6771-6781, 2014.
- 6) Katayama, H., Haramoto, E., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H., Ohgaki, S.: One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan, *Water Res.*, Vol.42, No.6-7, pp.1441-1448, 2008.
- 7) Sima, L. C., Schaeffer, J., Le Saux, J. C., Parnaudéau, S., Elimelech, M., Le Guyader, F. S.: Calicivirus removal in a membrane bioreactor wastewater treatment plant, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.77, No.15, pp.5170-5177, 2011.
- 8) Miura, T., Okabe, S., Nakahara, Y., Sano, D.: Removal properties of human enteric viruses in a pilot-scale membrane bioreactor (MBR) process, *Water Res.*, Vol.75, pp.282-91, 2015.
- 9) Kishida, N., Morita, H., Haramoto, E., Asami, M., Akiba, M.: One-year weekly survey of noroviruses and enteric ad-

- enoviruses in the Tone River water in Tokyo metropolitan area, Japan, *Water Res.*, Vol.46, No.9, pp.2905-2910, 2012.
- 10) Iwai, M., Hasegawa, S., Obara, M., Nakamura, K., Horimoto, E., Takizawa, T., Kurata, T., Sogen, S., Shiraki, K.: Continuous presence of noroviruses and sapoviruses in raw sewage reflects infections among inhabitants of Tokyo, Japan (2006 to 2008), *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.75, No.5, pp.1264-1270, 2009.
- 11) Blanco Fernández, M. D., Torres, C., Martínez, L. C., Giordano, M. O., Masachessi, G., Barril, P. A., Isa, M. B., Campos, R. H., Nates, S. V., Mbayed, V. A.: Genetic and evolutionary characterization of norovirus from sewage and surface waters in Córdoba City, Argentina, *Infect. Genet. Evol.*, Vol.11, No.7, pp.1631-1637, 2011.
- 12) Kitajima, M., Haramoto, E., Phanuwat, C., Katayama, H., Furumai, H.: Molecular detection and genotyping of human noroviruses in influent and effluent water at a wastewater treatment plant in Japan, *J. Appl. Microbiol.*, Vol.112, No.3, pp.605-613, 2012.
- 13) Pérez-Sautu, U., Sano, D., Guix, S., Kasimir, G., Pintó, R. M., Bosch, A.: Human norovirus occurrence and diversity in the Llobregat river catchment, Spain, *Environ. Microbiol.*, Vol.14, No.2, pp.494-502, 2012.
- 14) Ueki, Y., Sano, D., Watanabe, T., Akiyama, K., Omura, T.: Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters, *Water Res.*, Vol.39, No.18, pp.4271-4280, 2005.
- 15) 村田有紗, 真砂佳史, 三浦尚之, 今井崇博, 大村達夫: Enzymatic Virus Elution 法を用いた流入下水からのウイルス検出技術の開発, *環境工学研究論文集*, Vol.46, pp.197-203, 2009.
- 16) Kazama, S., Masago, Y., Tohma, K., Souma, N., Imagawa, T., Suzuki, A., Liu, X., Saito, M., Oshitani, H., Omura, T.: Temporal dynamics of norovirus determined through monitoring of municipal wastewater by pyrosequencing and virological surveillance of gastroenteritis cases, *Water Res.*, Vol.92, pp.244-253, 2016.
- 17) 北島正章, 遠矢幸伸, 松原康一, 原本英司, 宇田川悦子, 片山浩之, 大垣眞一郎: 新たな代替指標としてマウス分離株を用いた水道水中のノロウイルスの塩素耐性の解明, *環境工学研究論文集*, Vol.45, pp.361-370, 2008.
- 18) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Takeda, N., Katayama, K.: Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR, *J. Clin. Microbiol.*, Vol.41, No.4, pp.1548-1557, 2003.
- 19) 西尾治: ノロウイルスの検出法, *国立感染症研究所*, 2003.
- 20) Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T.: The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clin. Chem.*, Vol.55, No.4, pp.611-622, 2009.
- 21) 宮城県保健環境センター: 感染症発生動向調査週報, <http://www.pref.miyagi.jp/soshiki/hokans/h26-surveypdf>

- shuho.html (2015 年 5 月 9 日にアクセス)
- 22) Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Shinohara, M., Uchida, K., Natori, K., Takeda, N., Katayama, K.: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses, *J. Virol. Methods*, Vol.100, No.1-2, pp.107-114, 2002.
 - 23) Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Pena, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J. R., Turnbaugh, P. J., Walters, W. A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R.: QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, *Nat. Meth.*, Vol.7, No.5, pp.335-336, 2010.
 - 24) Quince, C., Lanzen, A., Davenport, R. J., Turnbaugh, P. J.: Removing noise from pyrosequenced amplicons, *BMC Bioinformatics*, Vol.12, No.1, pp.1-18, 2011.
 - 25) Kroneman, A., Vennema, H., Deforche, K., Avoort, H. v. d., Peñaranda, S., Oberste, M. S., Vinjé, J., Koopmans, M.: An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses, *J. Clin. Virol.*, Vol.51, No.2, pp.121-125, 2011.
 - 26) Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S.: MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Mol. Biol. Evol.*, Vol.30, pp.2725-2729, 2013.
 - 27) Matsushima, Y., Ishikawa, M., Shimizu, T., Komane, A., Kasuo, S., Shinohara, M., Nagasawa, K., Kimura, H., Ryo, A., Okabe, N., Haga, K., Doan, Y. H., Katayama, K., Shimizu, H.: Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region, *Euro Surveill*, Vol.20, No.26, pii=21173, 2015.
 - 28) 勝又雅博, 真砂佳史, 大村達夫: パイロシーケンシング法による下水中のノロウイルスの同定, 土木学会論文集 G (環境), Vol.69, pp.III-639-III-649, 2013.

(2016. 5. 26 受付)

APPLICABILITY OF NOROVIRUS MONITORING IN SEWAGE AS AN EARLY WARNING SYSTEM OF INFECTIOUS GASTROENTERITIS

Takayuki MIURA, Shinobu KAZAMA, Yoshimitsu KONTA, Yoshifumi MASAGO,
Kentaro TOHMA, Takafumi MANAKA, Xiaofang LIU, Mayuko SAITO,
Hitoshi OSHITANI and Tatsuo OMURA

In urbanized areas where sewage system has been developed, noroviruses excreted from patients are collected in sewage treatment plants. Therefore, the concentration of noroviruses in sewage has been proposed as an indicator of gastroenteritis cases in the treatment area. In this study, we tested the applicability of norovirus monitoring in sewage as an early warning system of infectious gastroenteritis. Sewage samples were collected weekly from April 2013 to October 2015, and the temporal relation between norovirus concentration in sewage and the number of gastroenteritis cases reported in the study area was evaluated using cross correlation analysis. We also compared norovirus genotypes detected in sewage by pyrosequencing and those detected in clinical samples. As a result, significant correlation was observed between norovirus GII concentration in sewage and the number of gastroenteritis cases without a lag time ($R = 0.57-0.72$), implying that the concentration of noroviruses reflects the number of infected people when the sample was collected. Most of the norovirus genotypes or strains detected in stool samples were also found in sewage samples and they changed similarly over time during the study period. Considering that it takes one or two weeks for the number of gastroenteritis cases to be released to the public, norovirus monitoring in sewage is a promising alternative for the early warning system of gastroenteritis.