

カキのノロウイルス汚染に係る浄化槽・河川からの影響について

研究協力者 保健科学部 蛇口 哲夫、高橋 知子、高橋 雅輝
分担研究者 田中 智之

1. はじめに

ノロウイルス（NV）は冬季を中心に毎年流行し、多くの感染性胃腸炎患者を発生させる。特に2006年/2007年以降は、集団感染事例が全国的に多発している。感染者の腸管で増殖したNVは、糞便とともに排出され、下水道に流入し、下水処理施設での処理によって減少するが、除去しきれない場合に河川等に放流されると考えられている。しかし、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い。特に下水道が整備されていない地区では浄化槽により水洗化が図られているが、浄化槽におけるNV除去の実態については明らかでない。

本研究は、カキを養殖している閉鎖湾で下水道未整備地区においてNVの低減・制御に向けた汚染要因を検討することを目的として、浄化槽に流入されるNVの実態と、処理後のNVの状況を把握するとともに処理水放流先河川へのNVの影響を調査した。また、浄化槽処理水の放流先河川の河口にカキを垂下し、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。

2. 研究材料と方法

1) 調査材料

調査地区はカキ養殖閉鎖湾の下水道が未整備の、世帯数約1500世帯、人口約3860人の地区で、汚水処理は汲取りもしくは浄化槽で行っている。（町全体の浄化槽等による水洗化人口は42%である。）図1及び表1に調査地区及び浄化槽の概要を示した。調査対象の浄化槽は比較的中規模の3施設（役場庁舎、小学校、診療所）で処理前の流入水及び処理後放流水、放流先河川水を検体とし、07年12月から09年2月にかけての2シーズンで調査を行い、07年12月～08年3

月は1ヶ月に2～3回、08年10月～09年2月の時期には概ね1ヶ月に1回（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に垂下したカキを検体とした。カキについては07-08シーズンは07年10月の41週に垂下し08年8週までの9回、08-09シーズンは08年11月の46週に垂下し08年6週までの9回採取した。

2) ウイルス濃縮方法

流入水及び放流水、河川水の検体は静置後の上清を用いPEG沈殿法と超遠心法を併用した。PEG沈殿法後の上清を30%ショ糖液に重層後超遠心（36000rpm150分）を行い、得られた沈殿を蒸留水で再浮遊し、ウイルス濃縮検体とした。

カキは中腸腺を10%乳剤にし、10000rpm、20分間冷却遠心後に、上清に60%PEG、NaCl及びアミラーゼを加え4℃で一晩静置し、10000rpm、20分間冷却遠心した沈渣を滅菌蒸留水400 μ lで再浮遊し、ウイルス濃縮検体とした。

3) NV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COG1F/G1-SKR、COG2F/G2-SKRを、nested-PCRにはそれぞれG1-SKF/G1-SKR、G2-SKF/G2-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法で確認した。NVが検出された検体は、同様のRealtime-PCR法を用いて、濃縮検体の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。

4. 研究結果

1) 役場庁舎の浄化槽のNV検出状況

07-08シーズン、08-09シーズンのNV検出状況を図2、3に示した。07-08シーズンにおいて、流入水は、G I では陰性が2回あったが、定量未満のレベルからNV最大濃度が 5.4×10^3 コピー/mlの検出であり、G II では毎回検出され、 1.5×10^0 コピー/ml～ 9.9×10^3 コピー/mlで、G I に比較してG IIの方が高い濃度レベルで検出される傾向にあった。また、放流水はG I 及びG II 共にあまり除去されずほぼ検出され、G I で1ml当たり 10^3 オーダーのコピー数を示し、流入水と同じ濃度レベルの場合もあった。08-09シーズンにおいては、流入水はG I で5回中2回検出されたのみであったが、G II は陰性から最大濃度 5.0×10^3 コピー/mlまでであった。放流水ではG I は08/43週に1ml当たり 10^1 オーダーのコピー数を示して検出された後概ね陰性であったが、G II は08/50週から検出され09/4週に最大 8.4×10^2 コピー/mlであった。

2シーズン中の流入下水中のNV濃度は、G I に比較してG IIの方が高い濃度で検出されることが多かったが、G Iの方が高い濃度で検出されたのは07/51週、08/2週等のシーズン早い時期であった。

2) 小学校の浄化槽のNV検出状況

07-08シーズン、08-09シーズンのNV検出状況を図4、5に示した。07-08シーズンの流入水はG I が主に検出され、G II の検出は2回/6回であったが、08-09シーズン流入水ではG IIのみが検出された。

放流水では約半数は検出されず、最高値でG I が115コピー/ml、G II で426コピー/mlあったが、概ね90%以上は除去されていた。

3) 診療所の浄化槽のNV検出状況

07-08シーズン、08-09シーズンのNV検出状況を図6、7に示した。07-08シーズンは、流入水のG I は3回/6回検出、G II は毎回検出し、放流水においてもほぼ検出され、放流水が流入水より高濃度で検出される場合がかなりあった。08-09シーズンは、流入水で

G I は概ね検出されなかったが、G II は 10^4 コピー/mlのオーダーの高濃度まで検出され、放流水からも検出され、除去されているとは言いがたい状況にあった。

4) 河川と垂下したカキのNV検出状況

調査河川のNV検出状況を図9に示した。調査河川では、07/51週、09/4週等でNV検出がみられたが、上流域の浄化槽放流水でNV検出があっても、希釈される等で概して検出されず、検出しても低レベル濃度であった。なお、浄化槽放流水でNVが比較的高濃度で検出された場合には河川でも検出される傾向が認められた。特に、09/4週では調査した3施設の浄化槽放流水から高濃度で排出があり、それを反映して調査河川においても検出されていた。

垂下したカキのNV検出状況を図8に示し、NVの汚染量を表2に示した。

07-08シーズンは、41週にカキを垂下し、42週及び46週には汚染が認められず、51週からNV汚染に転じ、その後は毎回NV陽性となった。浄化槽及び河川の調査は51週から開始し、51週の河川ではG I 及びG II 共に陽性であったが、カキの汚染状況から51週以前にも河川で汚染があったものと推察される。

08-09シーズンは、46週にカキを垂下し、2週間後の48週からNV陽性となり、その後は毎回陽性であった。河川では50週でNVが検出されているが、浄化槽放流水では43週から検出されており、河川で検出限界未満であったがNVの存在が推察され、垂下したカキは浄化槽放流水と放流先河川の汚染状況に反映してNV汚染につながると推察された。カキの汚染はnested-PCRで陽性となってからは定量限界未満もあるものの概ねカキ1個あたり 10^2 から 10^4 のオーダーのコピー数であった。

5) 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の遺伝子型を図3に示した。07-08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、反映して河口の垂下カキにおいても同様の型の検出をみた。08-09シーズンにおいては、浄化槽流入水からG I は08年46週にG I /11型が1施設から検出されたのみであまり検出されず、G II では G II /4型、G II /10型が

検出されており、垂下カキではG I /11型、G II /4型、G II /10型が検出された。

5 . 考察

浄化槽では流入水より放流水の NV 濃度の高い場合等があったが、流入水の時間変動、日間変動や流入から放流までの処理される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必要があることが示唆された。下水道終末処理場等の規模の大きい処理場に流入する NV は、下水処理によって、概ね 99.9%以上の除去に対して、個別処理の比較的中規模の浄化槽では排水量は多くないものの、NV は十分に除去されないまま排出され、放流先河川及び海域を汚染する可能性が認められた。なお、河川や海域を汚染するリスクを検討するに当たっては NV 濃度だけでなく、河川水量等や排出負荷量との関係を考慮することが必要と考えられる。

07-08 シーズンで浄化槽 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、全国的に胃腸炎を流行させた G II /4 型以外に G I /11 型による地域流行があったものと推察された。なお、調査地区に感染症発生動向調査による小児科定点医療機関がないため感染性胃腸炎の発生状況は把握していないが、集団発生及び食中毒の届出がなかったことから、症状の軽いあるいは、不顕性感染の可能性が示唆された。

食中毒を含めた NV 感染症発生のリスクの管理を行うにあたって、地域の NV 感染症の発生動向を把握し、下水道等大規模処理施設での流入下水の NV のモニタリングは有用とされるが、中小規模の浄化槽では施設の処理対象人数が限られて特定の集団に限定されており、流入水の NV はその対象利用者が感染しているか否かに左右されることから、地域全体の下水道等処理施設と異なり把握、調査が難しいと思量された。なお、海域の NV 汚染モニタリング方法として、河川水は希釈され流行時期にも検出されない場合があるので有用とはいえない。下水に流入され始めると、あまり期間をおかずに河口部のカキでも同じ型の NV が検出され始めることから、モニタリング方法として放流先の河口部等のカキ

でのモニタリングは、その先の養殖海域の汚染開始をモニタリングするのに有用と考えられる。

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とその NV が不活化されているかどうかも含めてさらに調査検討を進める必要がある。

6 . 結論

1.比較的中規模の浄化槽にも NV が流入しており、除去している浄化槽もあるものの、十分に除去されないまま放流される場合がある。また、放流先河川では希釈等により検出されることは多くないが、浄化槽から排出される NV 量によっては河川でも検出されており、中規模浄化槽は放流先河川や海域の汚染源となりうる。

2. 下水の NV のモニタリングは、特定地域の NV 感染症の発生動向を知る指標となりうるが、07-08 シーズンは同時期に 3 箇所の浄化槽から G I /11 型が検出されたことから、全国的に胃腸炎を流行させた G II /4 型以外に、G I /11 型の地域流行があったと推察された。

3. 河口に垂下したカキは浄化槽放流水と放流先河川の汚染状況に反映して比較的短期間でも NV を取り込んで汚染される。NV が下水に流入され始めると、あまり期間をおかずに河口部のカキでも同じ型の NV が検出され始めることから、放流先の河口部等のカキでのモニタリングは、その先の養殖海域の汚染開始をモニタリングするのに有用と考えられる。

図1 調査地区と浄化槽等の概要

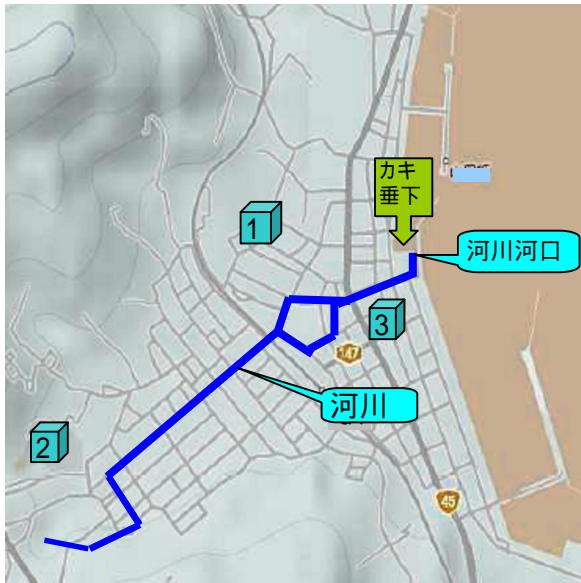
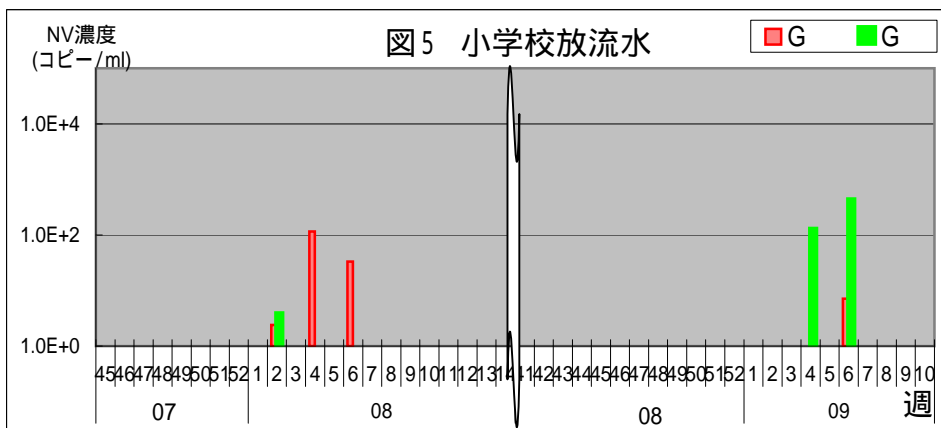
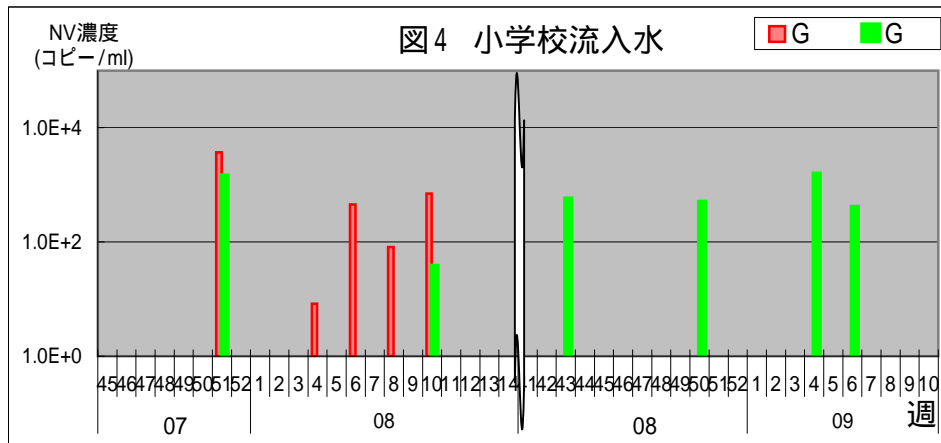
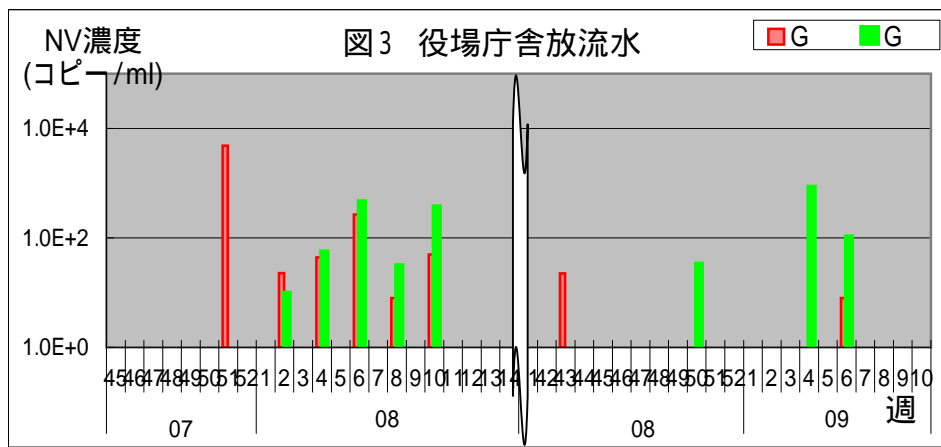
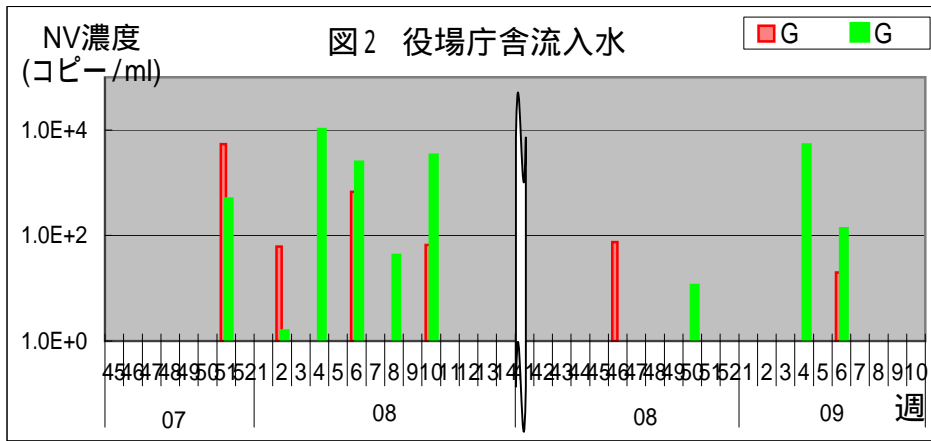


表1 浄化槽の概要

浄化槽	処理方式	人槽	処理水量 m3 / 日	使用人員	陽性率 (流入水)	陽性率 (放流水)
1 役場	長時間ばっ気	300	60	200	10/11	10/11
2 小学校	長時間ばっ気	203	46	318	9/11	6/11
3 診療所	接触ばっ気	350	46.2	170	10/11	9/11



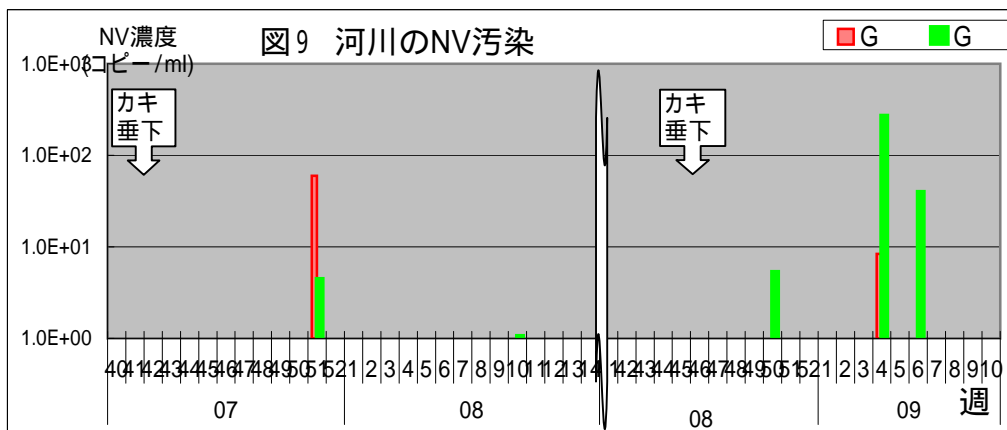
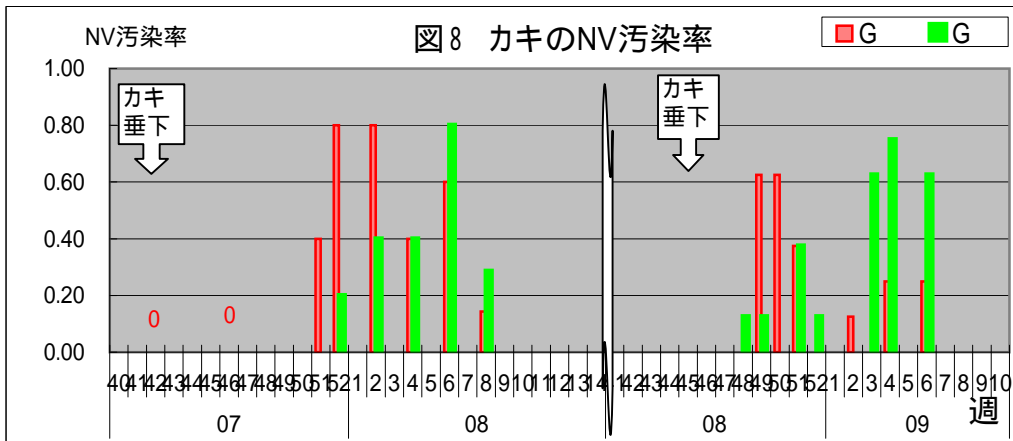
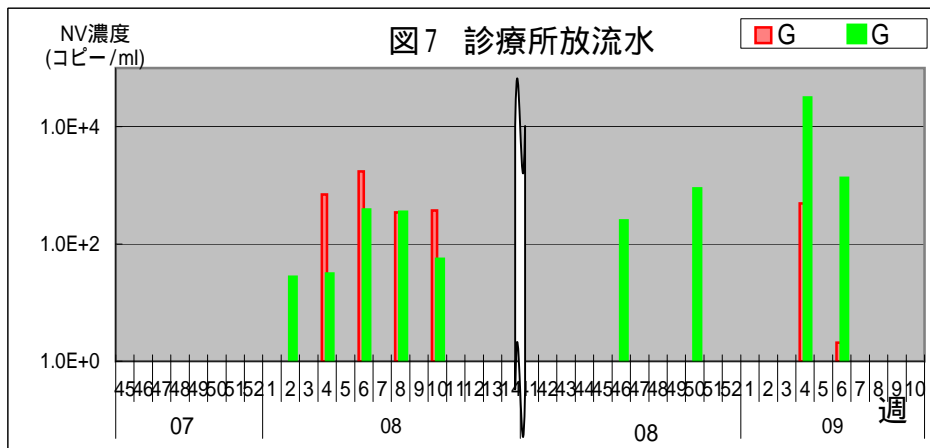
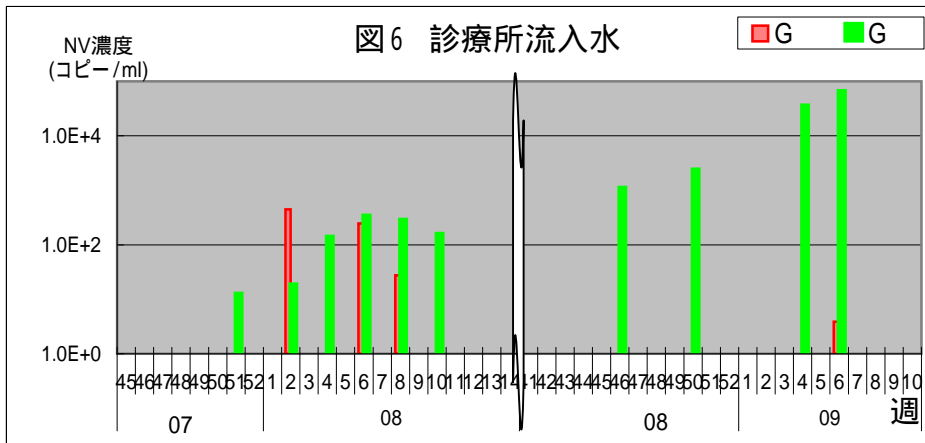


表2 カキ(垂下)のウイルス量

年	週	陽性個数 /検査個 数 (nested PCR法)	定量限 界以下	ウイルス量毎の個数 (realtime PCR 法)						
				copies/中腸腺1個						
				10 ² <10 ³	10 ³ <10 ⁴	10 ⁴ <10 ⁵	10 ⁵ <10 ⁶	10 ⁶ <10 ⁷	10 ⁷ <10 ⁸	
2007	42	0/5								
	46	0/5								
	51	2/5				1				1
	52	4/5			1	3				
2008	2	4/5	1	3						
	2	8/30	4	4						
	4	4/5		2	2					
	6	4/5		2	2					
	8	2/7	1	1						
2008	48	1/8	1							
	49	5/8	1		2	2				
	50	5/8	1		2	2				
	51	3/8			3					
	52	1/8	1							
2009	2	1/8	1							
	3	5/8	3		2					
	4	6/8	2			3	1			
	6	6/8	1			5				

G コピー数と、G コピー数の合計
定量限界は実測値1コピーとした

表3 浄化槽及びカキ(垂下)の遺伝子型

年	週	役場(流入水)		小学校(流入水)		診療所(流入水)		調査河川		カキ(垂下)	
		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
07	51	11	4	11	4	-	4	11	13	41週に垂下(注1)	
	52									11	-
	1									11	4
08	2	11	4	-	-	11	4	-	-	11	4,13
	4	-	4	11	-	-	4	-	-	11	4
	6	11	4	11	-	11	4	-	-	11	4,13
	8	-	?	4	-	11	13	-	-	11	4
	10	11	4	4	13	-	4	-	?		
08	43	-	-	-	?	-	-	-	-		
	46	11	4	-	-	-	4	-	-	46週に垂下	
	48									-	4
	49									14	4
	50	-	4	-	?	-	4	-	10	14	-
	51									14	10
	52									-	

(注1) 42週及び46週はG G とともに検出せず