

令和元年6月24日現在

機関番号：82602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14752

研究課題名(和文) 水中懸濁物質への吸着特性に着目した水道水源における病原ウイルス汚染の実態解明

研究課題名(英文) Contamination of drinking water sources with pathogenic viruses associated with suspended solids

研究代表者

三浦 尚之(Miura, Takayuki)

国立保健医療科学院・その他部局等・主任研究官

研究者番号：70770014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：水道水源として利用される表流水中のノロウイルスGIIとロタウイルスAの存在形態を調査した。表流水試料を1カ所の浄水場において月に1回、21カ所の浄水場において9月及び1月の年に2回の頻度で採取し、孔径10 μ m及び0.45 μ mのメンブレンフィルターでろ過することで、懸濁態と溶存態画分のウイルスをリアルタイムPCR法を用いて定量的に検出した。ノロウイルスGII濃度は、懸濁態と溶存態画分で差は認められなかったが、ロタウイルスA濃度は溶存態画分の方が有意に高かった。ロタウイルスAはノロウイルスGIIと比較して懸濁物質への親和性が低く、表流水中において溶存態画分に含まれる割合が多い可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに河川水や湖沼水等の表流水に含まれる病原ウイルスは調査されてきたが、ウイルスが細菌や粘土等の懸濁物質に吸着しているのか、単独の粒子として存在しているのかは報告がなかった。水道原水として取水されている表流水を対象にして、感染性胃腸炎の主な原因ウイルスであるノロウイルスとロタウイルスがどのような形態で含まれているのか調査した結果、ノロウイルスは細菌や粘土等の懸濁物質に良く吸着して存在し、ロタウイルスは単独の粒子として存在する割合が多いことがわかった。本研究により、ノロウイルスが表流水中において感染性を保持しているメカニズムを解明するための重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate the present forms of norovirus GII and rotavirus A in surface water used for drinking water production. Surface water samples collected at a drinking water treatment plant (DWTP) monthly for two years, from 2017 to 2019, were fractionated by filtration through 10- and 0.45- μ m-pore-size membranes, and viruses present in suspended and dissolved forms were quantitatively detected by using a real-time PCR method. We also analyzed surface water samples from 21 DWTPs all over Japan twice a year (i.e. non-epidemic and epidemic seasons of gastroenteritis). Norovirus GII concentrations were comparable between suspended and dissolved forms, while rotavirus A was predominant in dissolved form, indicating that rotavirus A was less associated with suspended solids in the surface water samples compared to norovirus GII.

研究分野：公衆衛生微生物学

キーワード：ノロウイルス ロタウイルス 懸濁物質 表流水

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ヒトに感染すると、下痢、発熱、嘔吐、胃痛等の症状を引き起こすノロウイルス等の水中病原ウイルスによる感染性胃腸炎の流行が、途上国のみならず我が国を含めた先進国においても問題となっている。感染者の糞便中に高濃度で排出される病原ウイルスは、既存の下水処理プロセスでは十分に除去・不活化することが困難であるため、下水処理放流水に含まれる形で表流水や地下水等の水道水源を汚染している。その結果、国内においても小規模の水道を中心にノロウイルスやロタウイルスによる集団感染が発生している¹⁾。

水道水源における病原細菌及び原虫の汚染に対しては、一般細菌や大腸菌を用いた水質基準の設定、及び「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」によりそれぞれ対策が取られているが、水中病原ウイルスについては汚染実態すら十分に明らかにされていないのが現状である。水道水源流域における病原ウイルスの動態は、地域における感染症の発生状況によって遺伝子型や株が季節的にまたはランダムに変化すること、及び水中においてウイルスが様々な懸濁物質へ吸着することから、非常に複雑であり、理解が十分に進んでいない。これまでに、水道原水中の濁度の上昇に伴い指標細菌やクリプトスポリジウム濃度が上昇することが報告されているが²⁾、表流水中の懸濁物質に吸着したウイルスに着目した調査研究はほとんど行われてこなかった。

2. 研究の目的

表流水を水源とする国内 21 箇所の浄水場において原水試料を採取し、感染性胃腸炎の主な原因ウイルスであるノロウイルス及びロタウイルスの汚染レベル、及びそれらの季節変動を明らかにする。さらに、試料を孔径の異なるろ過膜で分画することにより、土粒子、藻類、細菌等の懸濁物質が含まれる画分、及び 0.45 μm 以下の溶存態画分に含まれるウイルスを調査することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 表流水試料の収集

2017 年 6 月～2019 年 3 月に河川水を取水する国内の浄水場 E において原水試料を月に 1 度の頻度で採取した (N=22)。また、2017 年 9 月、2018 年 1 月、9 月、及び 2019 年 1 月に河川、湖沼、ダムを水源とする国内 21 箇所の浄水場 A～U において、水道原水試料を収集した (N=84)。試料は、冷蔵状態で国立保健医療科学院に輸送し、採水から 48 時間以内に分析に供した。

(2) 試料の分画、ウイルス濃縮、RNA 抽出

病原ウイルスの汚染レベルを調査することに加えて、ウイルスの存在形態を明らかにするために、試料を孔径の異なるろ過膜を用いて分画し、懸濁態と溶存態画分に含まれるウイルスを測定した。すなわち、試料 1 L 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 株をおよそ 10^8 copies 添加・混合し、孔径 10 μm 、直径 90 mm の親水性 PTFE 膜 (JCWP09025, Merck) でろ過し、回収したろ液を孔径 0.45 μm 、直径 90 mm の混合セルローズエステル (MCE) 膜 (HAWP09000, Merck) でろ過した。それぞれの膜を回収し、 $>10 \mu\text{m}$ および 0.45–10 μm 懸濁態画分とした。続いて、回収したろ液を陰電荷膜法により 10 mL まで濃縮し³⁾、溶存態画分とした。回収したそれぞれの画分から、NucliSENS mini MAG (bioMérieux) を用いてウイルス RNA を抽出・精製した。

(3) ウイルス遺伝子の定量検出

マウスノロウイルス、ノロウイルス GII、及びロタウイルス A の RNA 濃度は、既往のプライマー・プローブ⁴⁻⁹⁾、RNA UltraSense One-Step Quantitative RT-PCR System (Thermo Fisher Scientific)、及び LightCycler 480 System II (Roche) を用いたリアルタイム RT-PCR 法により定量した。

(4) ノロウイルスの遺伝子型解析

リアルタイム PCR 法によりノロウイルス GII 遺伝子が検出された試料に対しては、カプシド N/S 領域を標的とした RT-PCR を行い¹⁰⁾、塩基配列を解析することで遺伝子型を同定した。

4. 研究成果

(1) マウスノロウイルスの回収率

毎月採水した浄水場 E の原水試料に添加したマウスノロウイルスは、一部は懸濁物質に吸着し、 $>10 \mu\text{m}$ 及び 0.45–10 μm 懸濁態画分から検出されたが（それぞれ平均値は 0.21%、1.4%）、ほとんどは溶存態画分から検出された（平均値：29%、範囲：7.0–68%）。また、国内 21 箇所の浄水場 A～U の原水試料のマウスノロウイルス回収率の平均値は、浄水場 E の原水試料と同様に、 $>10 \mu\text{m}$ 懸濁態画分が 0.57%、0.45–10 μm 懸濁態画分が 3.2%、溶存態画分が 33%（範囲：11–67%）だった。このことから、分画におけるケーキろ過の影響が小さいこと、及びウイルス濃縮、RNA 抽出、リアルタイム RT-PCR においてロスや阻害が小さいことが確認され、遺伝子

の定量検出結果が信頼できると判断した。

(2) 浄水場 E の原水中ウイルス濃度

胃腸炎の非流行期である 6～10 月の試料からはノロウイルス GII が散発的に検出され、流行期の 11～3 月の試料では毎月陽性となり、 $4 \log_{10}$ copies/L を超える濃度が観測された (図 1)。すなわち、浄水場 E の原水 (河川水) におけるノロウイルス GII 濃度は、上流域におけるノロウイルス感染症の発生状況を反映して変動しており、これまでの報告¹¹⁾と同様の傾向だった。3 つの画分のうち、最も濃度が高かったのは溶存態画分であるが、一部の試料 (2017 年 9 月, 2018 年 1 月, 2018 年 7 月の 3 試料) では、懸濁態画分の濃度が高い場合もあった。特に、水温が高い ($19.0\sim 27.0^{\circ}\text{C}$) 6～9 月の試料では、懸濁態として検出される割合が高い傾向が認められ、ノロウイルス GII の水環境中動態に関して新たな知見が得られた。

一方、ロタウイルス A は 1 年を通じて $4 \log_{10}$ copies/L 以上の濃度で毎月検出された (図 1)。冬季から春先 (4 月) にかけて濃度が上昇しており、ヒト集団におけるロタウイルス感染症の発生状況を反映していたが、患者の発生がほとんど報告されない非流行期でも検出されていたことから、ウシやブタなどの動物由来のロタウイルス株も原水試料には含まれていたと考えられた。また、ノロウイルス GII と異なり、溶存態画分に含まれるウイルス濃度の方が、懸濁態画分よりも常に高かった (対応のある t 検定, $P < 0.01$)。

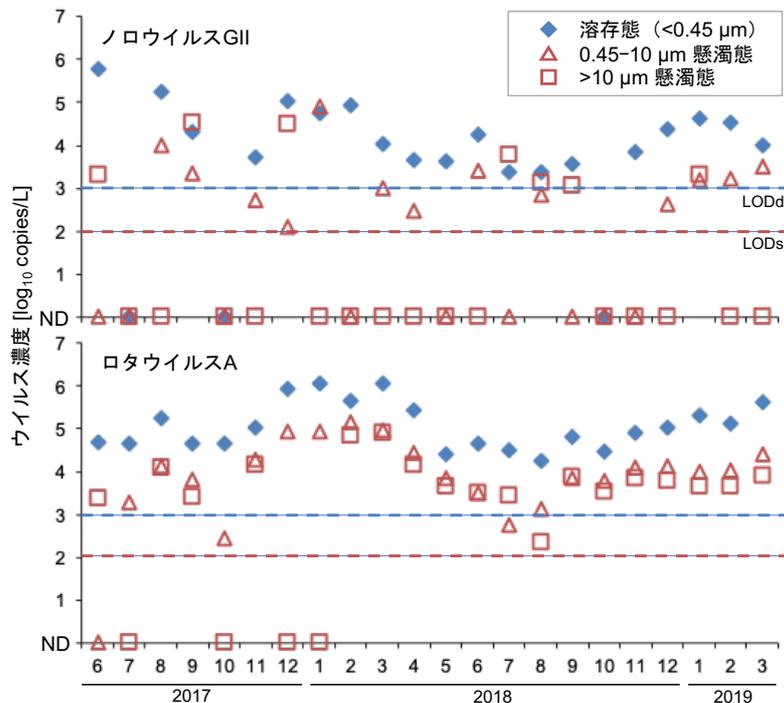


図 1. 浄水場 E の原水におけるノロウイルス GII 及びロタウイルス A 濃度の季節変動 (ND : 不検出, LODd 及び LODs : 溶存態及び懸濁態の検出下限値)

(3) 国内 21 浄水場の原水中ウイルス濃度

胃腸炎の非流行期である 2017 年 9 月の試料では、ノロウイルス GII は $0.45\sim 10 \mu\text{m}$ 懸濁態画分から最も高い頻度で検出され (29%), 各画分の合計濃度の幾何平均値は $3.2 \log_{10}$ copies/L だった (表 1)。この傾向は 2 年目にも認められ、2018 年 9 月の試料は懸濁態画分からのみ検出され、濃度の幾何平均値は $2.9 \log_{10}$ copies/L だった。胃腸炎の流行期には、ノロウイルス GII の検出率が増加し、2018 年 1 月の試料で 81%, 2019 年 1 月の試料で 62% だった。濃度の幾何平均値も $1.0\sim 1.7 \log_{10}$ 増加し、 $4.2\sim 4.6 \log_{10}$ copies/L だった (表 1)。2018 年 1 月の試料は、非流行期と同様に $0.45\sim 10 \mu\text{m}$ 懸濁態画分の検出率が最も高く (67%), 溶存態画分の濃度と差が認められなかった (対応のある t 検定)。

表 1. 全国 21 箇所の浄水場原水中のノロウイルス GII 濃度

	>10 μm 懸濁態画分	0.45–10 μm 懸濁態画分	溶存態画分	合計
2017 年 9 月				
濃度 [\log_{10} copies/L]	2.9 \pm 0.3	2.6 \pm 0.5	3.7 \pm 0.3	3.2 \pm 0.7
検出率 [%]	9.5	29	14	48
2018 年 1 月				
濃度 [\log_{10} copies/L]	3.7 \pm 0.5	4.0 \pm 0.7	4.6 \pm 0.4	4.6 \pm 0.6
検出率 [%]	43	67	57	81
2018 年 9 月				
濃度 [\log_{10} copies/L]	3.2	2.8 \pm 0.6	—	2.9 \pm 0.6
検出率 [%]	4.8	24	0	24
2019 年 1 月				
濃度 [\log_{10} copies/L]	3.1 \pm 0.6	3.2 \pm 0.6	4.3 \pm 0.4	4.2 \pm 0.5
検出率 [%]	14	48	52	62

表 2. 全国 21 箇所の浄水場原水中のロタウイルス A 濃度

	>10 μm 懸濁態画分	0.45–10 μm 懸濁態画分	溶存態画分	合計
2017 年 9 月				
濃度 [\log_{10} copies/L]	3.9 \pm 0.7	3.7 \pm 0.6	4.7 \pm 0.4	4.8 \pm 0.5
検出率 [%]	76	76	90	95
2018 年 1 月				
濃度 [\log_{10} copies/L]	4.2 \pm 0.8	4.2 \pm 1.0	4.9 \pm 0.7	5.1 \pm 0.7
検出率 [%]	62	81	86	86
2018 年 9 月				
濃度 [\log_{10} copies/L]	3.3 \pm 0.6	3.2 \pm 0.5	4.4 \pm 0.6	4.3 \pm 0.7
検出率 [%]	38	81	71	81
2019 年 1 月				
濃度 [\log_{10} copies/L]	3.4 \pm 0.4	3.7 \pm 0.5	4.6 \pm 0.6	4.7 \pm 0.6
検出率 [%]	43	67	76	76

ロタウイルス A は、胃腸炎の流行期・非流行期に関わらず高い頻度で検出された (76~95%, 表 2)。流行期の濃度の幾何平均値 (4.7~5.1 \log_{10} copies/L) は非流行期 (4.3~4.8 \log_{10} copies/L) よりも高く、ヒト集団から排出されたロタウイルス A 株による水源の汚染を示していた。また、非流行期の濃度も比較的高かったことから、収集した表流水試料には動物由来のロタウイルス A 株も含まれていたことが考えられた。それぞれの画分に検出されたロタウイルス A 濃度を比較すると、ノロウイルス GII とは異なり、懸濁態よりも溶存態画分の濃度が有意に高かった (対応のある t 検定, $P < 0.01$)。すなわち、表流水中においてロタウイルス A は、フリーで或いは溶存有機物と吸着して存在する割合が多いことが全国的な傾向としても示された。

(4) 水道原水から検出されたノロウイルス GII の遺伝子型

2017–2018 年 (調査 1 年目) の流行期に検出されたノロウイルス GII の遺伝子型は、GII.4 Sydney

2012 が最も多く、続いて GII.2 及び GII.17 だった。また、翌年の 2018-2019 年の流行期も 2017-2018 年と同様に GII.4 Sydney 2012 が優占していた。この傾向は、全国の胃腸炎患者から分離されたノロウイルスの遺伝子型分布¹²⁾とも同様であり、濃度の季節変動データに加えて、水道水源流域における感染者の発生状況を反映して水道原水にノロウイルスが含まれることを示す結果が得られた。

<引用文献>

- 1) 厚生労働省. 水質汚染事故等の発生状況. <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/topics/bukyoku/kenkou/suido/kikikanri/03.html> (アクセス日: 2019年6月24日)
- 2) Swaffer BA, Vial HM, King BJ, Daly R, Frizenschaf J, Monis PT. Investigating source water *Cryptosporidium* concentration, species and infectivity rates during rainfall-runoff in a multi-use catchment. *Water Res.* 67, 310-320, 2014.
- 3) Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Appl Environ Microbiol.* 68(3), 1033-1039, 2002.
- 4) Kitajima M, Oka T, Takagi H, Tohya Y, Katayama H, Takeda N, Katayama K. Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses. *J Virol Methods.* 169(2), 269-273, 2010.
- 5) Loisy F, Atmar RL, Guillon P, Le Cann P, Pommepuy M, Le Guyader FS. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J Virol Methods.* 123(1), 1-7, 2005.
- 6) Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, 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.* 41(4), 1548-1557, 2003.
- 7) Pang XL, Lee B, Boroumand N, Leblanc B, Preiksaitis JK, Yu Ip CC. Increased detection of rotavirus using a real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. *J Med Virol.* 72(3), 496-501, 2004.
- 8) Pang X, Cao M, Zhang M, Lee B. Increased sensitivity for various rotavirus genotypes in stool specimens by amending three mismatched nucleotides in the forward primer of a real-time RT-PCR assay. *J Virol Methods.* 172(1-2), 85-87, 2011.
- 9) Miura T, Schaeffer J, Le Saux JC, Le Mehaute P, Le Guyader FS. Virus type-specific removal in a full-scale membrane bioreactor treatment process. *Food Environ Virol.* 10(2), 176-186, 2018.
- 10) Kazama S, Masago Y, Tohma K, et al. Temporal dynamics of norovirus determined through monitoring of municipal wastewater by pyrosequencing and virological surveillance of gastroenteritis cases. *Water Res.* 92, 244-253, 2016.
- 11) Kishida N, Morita H, Haramoto E, Asami M, Akiba M. One-year weekly survey of noroviruses and enteric adenoviruses in the Tone River water in Tokyo metropolitan area, Japan. *Water Res.* 46(9), 2905-2910, 2012.
- 12) 国立感染症研究所 感染症疫学センター. ノロウイルス等検出状況 (2019年5月30日現在報告数). <https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-noro.html> (アクセス日: 2019年6月24日)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Miura T, Gima A, Akiba M. Detection of norovirus and rotavirus present in suspended and dissolved forms in drinking water sources. *Food Environ Virol.* 11(1), 9-19, 2019.

[学会発表] (計4件)

- ① 儀間ありさ, 三浦尚之, 荒川直子, 篠原成子, 松村諭, 秋葉道宏. 表流水中の懸濁物質に吸着した病原ウイルスの検出, 第52回日本水環境学会年会, 2018年3月, 札幌市.
- ② 三浦尚之, 儀間ありさ, 秋葉道宏. 水道水源における胃腸炎ウイルス汚染実態調査, 第5回環境水質工学シンポジウム, 2018年6月, 佐渡市.
- ③ 三浦尚之. ノロウイルスの水環境中動態: ヒトからカキへ, 第17回ウイルス学夏の学校 みちのくウイルス塾, 2018年7月, 仙台市.
- ④ 三浦尚之, 鈴木知美, 儀間ありさ, 越後信哉, 秋葉道宏. 病原ウイルスの表流水中存在形態を考慮した汚染指標に関する検討, 第53回日本水環境学会年会, 2019年3月, 甲府市.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

特記事項無し