

富山県内河川のウイルス汚染に関する定点観測

イワイ マサエ ヨシダ ヒロム マツウラク ミユコ
岩井 雅恵* 吉田 弘²* 松浦久美子*

目的 河川のウイルス汚染の経年変化を把握し、水系感染症の流行予測、および予防に役立てることを目的に、富山県内3河川のウイルス調査を長期にわたり実施した。

方法 富山県内の3河川「いたち川」、「千保川」、「小矢部川」の定点から河川水を採取し、濃縮処理後培養細胞に接種してウイルスを分離した。「いたち川」では4回の調査（第1回：1979～1981年、第2回：1983～1985年、第3回：1993～1995年、第4回：2002～2003年）、「千保川」と「小矢部川」では2回の調査（「いたち川」の第3、4回と同時期）を行った。

結果 1) 「いたち川」の4回にわたる調査で、ポリオウイルス、ヒトエンテロウイルスB群(HEV-B)、レオウイルス等、多種類の腸管系ウイルスが分離された。ポリオウイルスは、乳幼児への生ワクチン投与時期に検出されたため、ワクチン由来株であると推測された。第3、4回調査で分離された株のVP3-VP1領域480塩基あるいは474塩基は、ワクチン株と0～2塩基のみの違いであった。ポリオウイルスの検出頻度（全調査回数中、ウイルスが検出された調査回数の割合）は、第1回33.3%、第2回41.7%、第3回2.1%、第4回0%であり、第3回以降、有意に低下した（ $P < 0.001$ ）。これは、乳幼児の紙おむつ使用量が上昇した時期と一致した。HEV-Bは、年ごとに様々な型が検出され、その時期のヒトの臨床分離株と一致する株が多数存在した。レオウイルスは、第1、2回では年間を通して頻繁に検出されたが、第3、4回では春期から夏期の検出頻度が低下した。

2) 「千保川」と「小矢部川」から検出されたウイルスの種類や頻度は、「いたち川」と類似していた。

結論 2002年から2003年の河川水のポリオウイルスおよびレオウイルスの汚染度は1979年から1981年の汚染度よりも低くなっていた。これは、下水道の整備や、乳幼児の紙おむつ使用率の上昇等、生活様式が変化したことによると推測される。HEV-Bの検出頻度に大きな変化が認められず、種類が年ごとに様々であったのは、地域のHEV-B流行状況を反映するためと考えられた。このように、河川のウイルス汚染度は総じて低くなった。しかしながら、いまだ河川は多種類のウイルスに汚染されているため、水系感染症の発生要因となる可能性がある。

Key words : ウイルス検出, 河川水, 環境調査

1 はじめに

A型肝炎やE型肝炎、感染性胃腸炎などの感染症が、飲料水や河川水、海水、あるいは海水中で養殖された貝類等を介して発生し、環境中のウイルス汚染が問題となっている¹⁻⁶⁾。これらの感染症を予防するためには、水系のウイルス汚染状

況を把握し、水中でのウイルスの生態を解明することが重要である。わが国における環境中（下水、河川や海水など）のウイルス汚染状況については、東京都、名古屋市、大阪府、鳥取県、佐賀県、岩手県、北九州市、福岡市、宮城県、横浜市など各地⁷⁻¹⁶⁾で報告されているが、長期間の調査によるウイルス汚染状況の報告は少ない。

以上の観点から、我々は、富山県内の生活水と関わりの深い河川のウイルス汚染状況に関して、1979年から2003年まで断続的に調査（第1回：1979年～1981年、第2回：1983年～1985年、第3

* 富山県衛生研究所

²* 国立感染症研究所

連絡先：〒939-0363 富山県射水市中太閤山17-1
富山県衛生研究所ウイルス部 岩井雅恵

回：1993年～1995年，第4回：2002年～2003年）を実施した。これまでに，第1回から第3回までの調査で検出されたウイルスと富山県内の患者や下水から検出されたウイルスを比較検討した結果，富山県内の河川は多種類の腸管系ウイルスで汚染されていること，検出されたウイルスはほとんどヒト由来であることなどを明らかにしてきた^{17～21)}。今回，第1回から第4回までのウイルス検出状況を比較し，河川におけるウイルス汚染度の推移，すなわちウイルス汚染の経年変化について解析を試みたので報告する。

II 調査方法

1. 調査地点

図1に示した富山県内の3河川にI, S, O定点を設置し，河川水を採取した。I定点は富山市の中心部を流れる「いたち川」の最も下流地域，S定点は高岡市を流れる「千保川」の下流地域，O定点は県の西部を流れる一級河川の本川「小矢部川」の下流地域である。なお，「小矢部川」には「千保川」がS定点の下流地域で合流しており，この「小矢部川」の川幅は他の2河川よりも3倍程大きい。なお，O定点の下流地域に下水道処理施設がある。

2. 調査期間および調査回数

「いたち川」のI定点の調査は，第1回では1979年7月～1981年7月の期間に毎月1～2回，第2回では1983年6月～1985年5月に隔月1回，第3回では1993年10月～1995年9月に毎月2回，第4回では2002年4月～2003年3月に毎月2回河川水を採取した。

「千保川」のS定点，「小矢部川」のO定点の調査は，「いたち川」のI定点の第3回，第4回

調査と同時期に実施した。

3. 河川水からのウイルス分離

I, S, O 定点にタンポン（約50g 脱脂綿）2個を2日間河川水中に浸漬し，そのタンポンから搾り出した河川水約800 mLを調査試料とした。採取した河川水を3,000 rpm 30分間（4℃）遠心し，その上清にMgCl₂を0.05Mとなるように加え，さらに0.5NHClを加えてpH 3.5に調整後，陰電荷膜のcellulose nitrate membrane filter (pore size 0.45 μm, ADVANTEC) でろ過してウイルスをフィルターに吸着させた。このフィルターを細断して，10 mLの3%Beef extract (和光純薬工業 KK) 液に入れ，微量サンプル用超音波ホモジナイザー (KontesK-881440) で5分間超音波処理しウイルスを誘出させた。次に，この上清を10,000 rpm 1時間（4℃）で2回遠心後，上清に抗生物質を添加した。この濃縮試料を培養細胞などに0.2 mLずつ接種し，2代継代培養を行った。細胞変性効果 (CPE) やヒトO型赤血球との凝集性を指標としてウイルス分離を行った。

4. ウイルス分離に用いた培養細胞の種類

ウイルス分離に用いた細胞は，第1回調査：Vero, MK, HeLa, HEL, HEK細胞および乳呑みマウス，第2回調査：MK, MA104細胞，第3回調査：Vero, MK, MA104, RD-18S細胞，第4回調査：Vero, MA104, RD-18S, HEp-2細胞である。

5. ウイルス同定

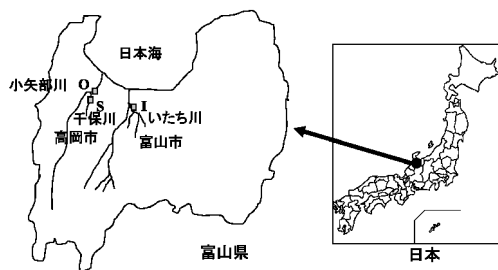
分離ウイルスの同定は，抗エンテロウイルスプール血清（国立感染症研究所分与，デンカ生研），エンテロウイルス単味抗血清（デンカ生研），抗レオウイルス血清（国立感染症研究所分与，自家製）を用いた中和試験あるいは赤血球凝集抑制試験によって行った。なお，これらの抗血清で同定できなかった場合は，未同定細胞障害因子と表し，本調査におけるウイルス汚染度の解析から除いた。

6. ポリオウイルス型内鑑別試験

第3回および第4回調査で分離したポリオウイルスについてVP3-VP1領域の遺伝子解析 (PCR-RFLP法，塩基配列解析) を行い，分離株とワクチン株や野生株との比較を試みて型内鑑別を行った。RCR-RFLP法はBalanant等²²⁾の方法に準じた。ポリオウイルスのRNAを抽出後，RT-PCRを行い，VP3-VP1領域のDNA断片

図1 河川水採取地点

I：いたち川；S：千保川；O：小矢部川



(1, 2型480塩基, 3型474塩基)を増幅した。3種類の制限酵素 (Hae III, Dde I, Hpa II) とDNA断片を37°C, 2時間反応させて消化し, 電気泳動によって切断パターンを調べた。塩基配列の解析は, RT-PCRによって増幅したDNA断片を1.5% Seakem GTG Agaroseにて泳動後バンドを切り出し, SUPREC-01 (TaKaRa)を通してエタノール沈殿して精製,あるいはMin Elute PCR Purification Kit (QIAGEN)で精製した。精製したPCR産物は, Big Dye Terminator V1 Cycle Sequence Kit (ABI)によるシークエンス反応後, Centri-Sep スピカラム (ABI)で精製してオートシークエンスABI PRISM 310 (ABI)により, 塩基配列を決定した。解析を行ったポジションは, 1型 2422-2860, 2型 2424-2862, 3型, 2419-2851である。ワクチン株 (Sabin株)と野生株は国立感染症研究所から分与された。

III 調査結果

1. 1979年から2003年までの河川のウイルス汚染状況の推移

表1, 2, 3に「いたち川」, 「千保川」および「小矢部川」のウイルス検出状況を示した。検出されたウイルスの種類は, ポリオウイルス, ヒトエンテロウイルスB群 (HEV-B; エコーウイルス, コクサッキーウイルスB群, エンテロウイルス69型を含む), レオウイルスの区分に分けてそれぞれ表に示した。表には示さなかったが, そのほかにアデノウイルスおよび未同定細胞障害因子が検出された。表4には3河川からのウイルス種類別の検出頻度を示す。検出頻度はウイルス検出陽性河川水サンプル数を河川水調査サンプル数で除したもので表した。

1) いたち川

I定点における第1回から第4回調査までのウイルス種類別検出状況, 検出頻度は次のようであった。

ポリオウイルス: 1型 (P1), 2型 (P2), 3型 (P3) が検出された (表1-a)。第1回および第2回調査では, ポリオウイルスが検出された時期は, 乳幼児へのポリオ生ワクチン集団接種 (富山県では春期4月~6月, 秋期9月~10月) 後の5月~6月と11月~12月に必ず検出された。第3回調査では1995年6月のみ検出され, 第4回調査で

は検出されなかった。調査年ごとの検出頻度は, 第1回33.3%, 第2回41.7%, 第3回2.1%, 第4回0%であり, 第3回調査以降の検出頻度が顕著に低下した (表4)。第2回と第3回の検出頻度には有意な差が認められた ($\chi^2=12.6, P<0.001$)。

HEV-B: エコーウイルス3型 (E3), 11型 (E11), 13型 (E13), 25型 (E25), コクサッキーウイルスB2型 (CB2), B4型 (CB4), B5型 (CB5) が検出された (表1-b)。HEV-Bの検出時期は, 季節に関係なく年間を通して散発的に検出されていた。しかし, 調査年ごとに検出されたウイルスの型が入れ替わり, とくにエコーウイルスで年ごとに違いがみられた。すなわち, E25は1980年10月および1981年3月, E3は1994年2, 3, 6, 9月, E11は2002年12月および2003年1月, E13は2002年6月に検出された。HEV-Bの調査年ごとの検出頻度は, 第1回33.3%, 第2回8.3%, 第3回10.4%, 第4回12.5%であり, 検出頻度の差は統計学的に認められなかった (表4)。第2回調査では, ウイルス分離に用いた培養細胞の種類がMK細胞とMA104細胞の2種類と少ないこともあり, 検出されたウイルスは種類, 検出頻度ともに少なかった。

レオウイルス: 河川水から検出されたウイルスの中でレオウイルスは最も高い検出率であり, 1型 (R1), 2型 (R2), 3型 (R3) が検出され, とくにR2が多かった (表1-c)。レオウイルスの検出時期は, 第1回および第2回調査では年間を通してほぼ調査毎に検出された。第3回および第4回調査では, 冬期にはよく検出されたが, 春期から夏期における検出頻度が低下した。調査年ごとの検出頻度は, 第1回87.5%, 第2回91.7%, 第3回54.2%, 第4回29.2%であり, ポリオウイルスほど顕著に減少しなかったが, 第2回と第3回調査の検出頻度には有意な差が認められた ($P<0.05$) (表4)。

アデノウイルス: 表1には示していないが, 1980年1, 2月に5型, 1981年3月に2型が検出された。アデノウイルスが検出されたのは, 「いたち川」の第1回調査時のみであった。

以上の「いたち川」のウイルス検出状況, 検出頻度から, 2002年~2003年のウイルス汚染度は総じて1979年頃より低下した。

表1 いたち川 (I 定点) におけるウイルス検出状況

1-a. ポリオウイルス

調査	年	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
第1回	1979						→			Ns		P1 P2 P3	P2 P3
	1980			Ns		P1 P2						P2 P3	
	1981			P2		P2	P2	←					
第2回	1983						→		Ns		Ns	P2	Ns
	1984		Ns	P2	Ns	P2 P3	Ns		Ns		Ns	P2	Ns
	1985		Ns		Ns	P2	←						
第3回	1993									→			
	1994												
	1995						P3			←			
第4回	2002			→									
	2003				←								

1-b. ヒトエンテロウイルス B 群 (HEV-B)

調査	年	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
第1回	1979						→			Ns			CB4
	1980			Ns		CB5	CB5	CB5			E25		CB4
	1981			E25 CB2 CB4				←					
第2回	1983						→		Ns		Ns		Ns
	1984		Ns		Ns		Ns	CB5	Ns		Ns		Ns
	1985		Ns		Ns		←						
第3回	1993									→			
	1994		E3		E3		E3				E3	CB5	
	1995									←			
第4回	2002			→									E11 CB2
	2003	E11			←								

1-c. レオウイルス

調査	年	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
第1回	1979						→					R2 R3	R1 R2 R3
	1980	R2 R3	R1 R2	Ns	R2 R3	R2 R3	R1 R2	R2	R2		R1 R2	R2	R1 R2
	1981		R2	R2	R2	R2	R2	←					
第2回	1983						→	R2	Ns	R2	Ns	R1 R2	Ns
	1984	R2	Ns	R2	Ns	R2	Ns	R1 R2	Ns		Ns	R2	Ns
	1985	R1 R2	Ns	R1 R2 R3	Ns	R2	←						
第3回	1993									→	R2	R2 R2 R2	R2
	1994	R2 R2	R2	R2 R2				R2 R2				R2 R2 R2	
	1995	R2 R2	R2 R2	R2		R2	R2	R2 R2	R1 R2	←			
第4回	2002			→			R1		R2		R2		R2 R2 R2
	2003	R1 R3			←								

ウイルス種類別の検出状況を年月別に示した。

P, ポリオウイルス; E, エコーウイルス; CB, コクサッキーウイルス B 群; R, レオウイルス
→, 調査開始; ←, 調査終了; Ns, 調査未実施

表2 千保川(S定点)におけるウイルス検出状況

2-a. ポリオウイルス

調査	年	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
第3回	1993									→			
	1994		P3								P3		
	1995										←		
第4回	2002				→							P2	
	2003				←								

2-b. ヒトエンテロウイルスB群(HEV-B)

調査	年	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
第3回	1993									→		E3 E11	E3 E3 E11
	1994	E11	E3	E3	E3		E3				E3	CB1	
	1995		E25							CB3	←		
第4回	2002				→					E11 E13 CB3			E11 E13 CB3 CB4 E11
	2003	E11	E7		←								

2-c. レオウイルス

調査	年	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
第3回	1993									→	R2	R2	R2
	1994		R2	R2	R2	R2		R1			R2		R2
	1995	R2	R2	R1	R2				R2	R2	R2	←	
第4回	2002				→	R2		R2	R2		R2	R2	R2
	2003	R2	R2	R2	R2								←

ウイルス種類別の検出状況を年月別に示した。

P, ポリオウイルス; E, エコーウイルス; CB, コクサッキーウイルスB群; R, レオウイルス
→, 調査開始; ←, 調査終了

2) 千保川

S定点は「いたち川」の第3回調査時期からウイルス汚染状況の調査を開始した。

ポリオウイルス: P3が1994年2月、10月に検出され、P2が2002年11月に検出された(表2-a)。10月から11月がポリオワクチンの集団接種後の時期であるので、2月の検出は接種後の時期から約4か月ずれていた。調査年ごとの検出頻度は、第3回、第4回調査ともに4.2%であった(表4)。

HEV-B: E3, E7, E11, E13, E25, CB1, CB2, CB3, CB4が検出された(表2-b)。HEV-Bの検出時期は、「いたち川」における検出状況と同様

に、季節に関係なく年間を通して散発的に検出されていた。調査年ごとに検出されたエコーウイルス(E)の種類も「いたち川」と類似しており、E3が1993年11月、12月、1994年2月、3月、5月、9月に、E11が2002年9月、10月、12月、2003年1月に、E13が2002年5月、7月、9月、12月に検出された。HEV-Bの調査年ごとの検出頻度は、第3回25.0%、第4回37.5%であった(表4)。

レオウイルス: R1とR2が検出されたが、ほとんどがR2であった(表2-c)。検出時期は、冬期に多く検出され、春期から夏期では検出されない月もあった。調査年ごとの検出頻度は、第3回

表3 小矢部川（O 定点）におけるウイルス検出状況

3-a. ポリオウイルス

調査	年	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
第3回	1993									→	P2		
	1994						P2						
	1995						P2				←		
第4回	2002			→									
	2003				←								

3-b. ヒトエンテロウイルス B 群（HEV-B）

調査	年	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
第3回	1993									→			
	1994	E3	E3	E3			E3						
	1995										←		
第4回	2002			→		E13		E13		E13			CB3
	2003	E11			←								

3-c. レオウイルス

調査	年	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
第3回	1993									→	R2	R2	R2
	1994	R2	R2	R2	R2	R2						R2	R2
	1995							R1		R1	←		
第4回	2002			→					R2				R1
	2003	R2	R2	R2	R2	R2	←						R2

ウイルス種類別の検出状況を年月別に示した。

P, ポリオウイルス；E, エコーウイルス；CB, コクサッキーウイルス B 群；R, レオウイルス

→, 調査開始；←, 調査終了

50.0%，第4回45.8%であり，検出頻度には差はなかった（表4）。

以上の「千保川」における調査では，第3回と第4回調査でウイルス検出状況，検出頻度に大きな差は認められなかった。

3) 小矢部川

O 定点も「千保川」と同じく，「いたち川」の第3回調査時期からウイルス汚染状況の調査を開始した。

ポリオウイルス：P2が第3回調査の1993年10月，1994年6月，1995年6月に検出され，検出頻度6.3%であった（表3-a，表4）。検出時期はポリオワクチン集団接種後の時期であった。第4回調査ではポリオウイルスは検出されなかった。

HEV-B: E3, E11, E13, CB3が検出された（表3-b）。検出されたウイルスの種類は，同時期に調査した他の2河川と類似していた。検出時期についても同様であり，E3が1994年1, 2, 5月に検出され，E11が2003年1月に，E13が2002年5, 7, 9月に，CB3が2002年12月に検出された。調査年ごとの検出頻度は，第3回8.3%，第4回20.8%であった（表4）。

レオウイルス：R1およびR2が検出され，検出時期は夏期が少なく冬期に多いという傾向は，同時期に実施した他の2河川と同様であった（表3-c）。調査年ごとの検出頻度は，第3回31.3%，第4回37.5%であった（表4）。

以上の「小矢部川」における調査でも，第3回

表4 河川水からのウイルス型別検出頻度

調査 定点 ウイルス	第1回 (1979-1981年)		第2回 (1983-1985年)		第3回 (1993-1995年)			第4回 (2002-2003年)		
	I. いたち川 検出* 頻度 (%)	I. いたち川 検出* 頻度 (%)	I. いたち川 検出* 頻度 (%)	S. 千保川 検出* 頻度 (%)	O. 小矢部川 検出* 頻度 (%)	I. いたち川 検出* 頻度 (%)	S. 千保川 検出* 頻度 (%)	O. 小矢部川 検出* 頻度 (%)		
P1	2/24 (8.3)									
P2	8/24 (33.3)	5/12 (41.7)				3/48 (6.3)		1/24 (4.2)		
P3	4/24 (16.7)	1/12 (8.3)	1/48 (2.1)	2/48 (4.2)						
P計	8/24 (33.3)	5/12 (41.7)	1/48 (2.1)	2/48 (4.2)	3/48 (6.3)			1/24 (4.2)		
E3			4/48 (8.3)	8/48 (16.7)	4/48 (8.3)					
E7								1/24 (4.2)		
E11				3/48 (6.3)		2/24 (8.3)	5/24 (20.8)	1/24 (4.2)		
E13						1/24 (4.2)	4/24 (16.7)	3/24 (12.5)		
E25	2/24 (8.3)			1/48 (2.1)						
CB1				1/48 (2.1)						
CB2	2/24 (8.3)					1/24 (4.2)	1/24 (4.2)			
CB3				1/48 (2.1)			2/24 (8.3)	1/24 (4.2)		
CB4	3/24 (12.5)						1/24 (4.2)			
CB5	3/24 (12.5)	1/12 (8.3)	1/48 (2.1)							
HEV-B計	8/24 (33.3)	1/12 (8.3)	5/48 (10.4)	12/48 (25.0)	4/48 (8.3)	3/24 (12.5)	9/24 (37.5)	5/24 (20.8)		
Ad2	1/24 (4.2)									
Ad5	2/24 (8.3)									
Ad計	3/24 (12.5)									
R1	6/24 (25.0)	4/12 (33.3)	1/48 (2.1)	2/48 (4.2)	2/48 (4.2)	2/24 (8.3)		1/24 (4.2)		
R2	20/24 (83.3)	11/12 (91.7)	26/48 (54.2)	22/48 (45.8)	13/48 (27.1)	5/24 (20.8)	11/24 (45.8)	9/24 (37.5)		
R3	5/24 (20.8)	1/12 (8.3)				1/24 (4.2)				
R計	21/24 (87.5)	11/12 (91.7)	26/48 (54.2)	24/48 (50.0)	15/48 (31.3)	7/24 (29.2)	11/24 (45.8)	9/24 (37.5)		
未同定細胞 障害因子	1/24 (4.2)	5/12 (41.7)	2/48 (4.2)	4/48 (8.3)	3/48 (6.3)		3/24 (12.5)			

*：検出頻度＝ウイルス検出陽性の河川水サンプル数/河川水調査サンプル数

()内の数字は、ウイルス検出頻度を百分率であらわしたもの。

河川水調査サンプル数：第1回目調査，24；第2回目調査，12；第3回目調査，48；第4回目調査，24

P，ポリオウイルス；E，エコーウイルス；CB，コクサッキーウイルスB群；

HEV-B，ヒトエンテロウイルス属B群；Ad，アデノウイルス；R，レオウイルス

と第4回の調査でウイルス検出状況に大きな差は認められなかった。ポリオウイルスは第4回調査では全く検出されなかった。

2. 3河川のウイルス汚染状況の比較

第3回と第4回調査における3河川のウイルス検出頻度を比較した(表4)。

第3回調査：ポリオウイルスの検出頻度は「いたち川」2.1%、「千保川」4.2%、「小矢部川」6.3%であり3河川ともに同程度であった。HEV-Bは「いたち川」ではE3とCB5の2種類の型のウイルスが検出され、検出頻度が10.4%、「千保川」ではE3、E11、E25、CB1およびCB3の5種類の型が検出され25.0%、「小矢部川」ではE3のみが検

出され8.3%であった。HEV-Bの種類は3河川で類似していたが、「千保川」からの種類が多く、検出頻度も他の2河川に比較して高かった。レオウイルスの検出頻度は「いたち川」54.2%、「千保川」50.0%、「小矢部川」31.3%であり、3河川で同程度であった。

第4回調査：ポリオウイルスは「千保川」のみから検出され、検出頻度4.2%であった。HEV-Bは、「いたち川」ではE11、E13、CB2の3種類の型が検出され、検出頻度12.5%、「千保川」ではE7、E11、E13、CB2、CB3およびCB4の6種類が検出され、検出頻度37.5%、「小矢部川」ではE11、E13、CB3の3種類が検出され検出頻度

20.8%であった。HEV-Bの種類と検出時期は3河川で類似していたが、「千保川」から多種類のHEV-Bが検出され、検出頻度も他の2河川に比較して多かった。レオウイルスは「いたち川」29.2%、「千保川」45.8%、「小矢部川」37.5%であり、3河川同程度であった。

以上の3河川におけるウイルス検出状況より、「千保川」では、他の2河川に比べてHEV-Bの型の種類や検出頻度が多かったが、調査年ごとに検出されたHEV-Bの検出状況は3河川で同じ傾向がみられた。また、ポリオウイルスとレオウイルスでは、3河川で大きな差は認められなかった。

3. ポリオウイルス型内鑑別

第3回調査で検出されたポリオウイルス2型3株、3型3株、第4回調査において検出されたポリオウイルス2型1株、合計7株についてVP3-VP1領域の遺伝子を調べた。PCR-RFLP法では6株はワクチン株と同一の制限酵素切断パターンであった。残り1株は3種類の酵素(Hae III, Dde I, Hpa II)のうちHae III, Hpa IIの切断パターンは一致したが、Dde Iでは異なっていた。一方、塩基配列解析では3株はワクチン株の塩基配列と一致したが、4株はワクチン株の塩基配列とは1~2塩基異なっていた。2つの解析方法の結果、河川水からの分離株とワクチン株の塩基配列の違いは0.4%以内と小さく、7株ともワクチン由来株と判断される。

IV 考 察

1979年から2003年まで、4回にわたり断続的に富山県内の河川におけるウイルス汚染状況を調べてきた。4回の調査のウイルス検出方法は、培養細胞の種類が一部異なること以外はほぼ同一である。試料の濃縮には陰電荷膜、陽電荷膜、セルロース、ガラスパウダーなどに吸着させる方法^{23~25)}などが報告されている。我々は陰電荷膜に吸着させた後、超音波処理(ソニケーション)によって膜からウイルスを誘出させた。ソニケーション法の報告は少ないが、試料濃縮の予備実験^{18,26)}により、効果的にウイルスを回収できることを確認している。

4回にわたる調査で検出されたウイルスは、ポリオウイルスやHEV-B、レオウイルス、アデノウイルスであり、富山県内の河川は多種類の腸管

系ウイルスで汚染されていたことが判明した。これらのウイルスは主に口を通して体内に入り、咽頭と腸管で増殖し、糞便中に大量に排出される²⁷⁾。感染例の大部分が無症候であるとされているが、エンテロウイルスやアデノウイルスでは身体の多くの器官系で様々な臨床症状をおこす²⁷⁾。ヒトから排泄されたウイルスは、生活排水などを通し、不完全な処理によって河川に流入したと推察される。

ヒトや下水から検出された腸管系ウイルスが同時期に河川から検出されることについて、第1回から第3回までの調査に関しては既報^{17~21)}で述べてあるが、第4回調査の2002年5月から12月に3河川から検出されたE13は、富山県内のヒト(無菌性髄膜炎患者)からも同年6月および7月に分離されている²⁸⁾。全国でもこの年、夏期をピークとして、E13による無菌性髄膜炎が流行していた²⁹⁾。また2002~2003年に富山県内の3河川からE11も検出されたが、E11は全国の無菌性髄膜炎患者からE13に次いで多く検出されていた²⁹⁾。CBは、調査期間中全国の無菌性髄膜炎やヘルパンギーナ等の患者から検出されていた^{29,30)}。このように河川からのウイルス型とヒトからの型が一致し、河川水中のウイルスは地域における流行状況を反映していた。

一方、ポリオウイルスに関しては、第1回および第2回調査で検出された分離株について型内鑑別試験を実施していないが、ワクチン接種後の時期に高い頻度で検出されたことにより、ワクチン由来株と推測される。第3回および第4回の河川水調査で検出されたポリオウイルスは、遺伝子解析を行った結果、全てワクチン由来と判断された。「千保川」で1994年2月にワクチン接種時期から4か月ずれて検出されたウイルス株は、VP3-VP1領域の塩基配列解析でワクチン株と474塩基中2塩基異なっていた。このように、ワクチン接種時期とずれた時期に検出される株は、下水のウイルス調査でも少数認められ²¹⁾、ワクチン接種者からの長期排泄³¹⁾、ヒトからヒトへのウイルスの伝播³²⁾、また、水中におけるウイルスの長期生存¹⁸⁾などによると推測される。

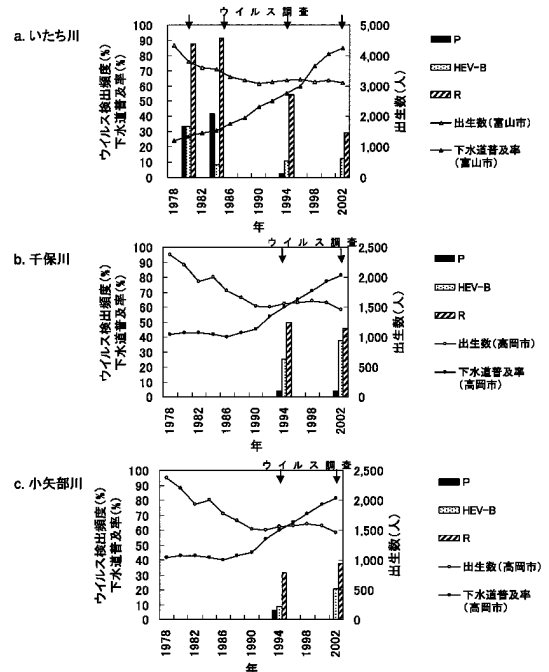
河川から最も検出頻度の高かったレオウイルスは、既報の河川水と下水からの分離株についての electrophoretic type による分子疫学的調査¹⁹⁾および

ヒトや動物（豚、牛、野鼠）の抗体保有状況調査¹⁸⁾により、動物由来も含まれるが、ほとんどヒト由来であると考えられた。

アデノウイルスの検出は第1回調査のみであったが、これは、アデノウイルスに感受性の高いHeLa細胞を用いてウイルス分離を行ったためと推測される。第2回調査以降はHeLa細胞を用いていなかった。

「いたち川」における計4回の河川水ウイルス調査結果を比較すると、ポリオウイルスは第1回と第2回調査時には生ワクチンの接種時期である春と秋に必ず分離されていたが、第3回と第4回調査における検出頻度は顕著に低下した。また、レオウイルスも第1回および第2回調査では年間を通して頻繁に検出されたが、第3回および第4回調査では春期から夏期にかけて検出されないことがあった。第2回から第3回の調査間にウイルス検出頻度が下がった要因として、①富山県の下水道普及率が図2にみられるように³³⁾、1985～87年頃から急激に上昇し、衛生環境の整備が進んだこと、②乳幼児の紙おむつ使用者が増加したこと（日本衛生材料工業連合会の調査による乳児用紙おむつ生産トン数：1982年3万4千トン、2000年20万6千トン³⁴⁾）、③子供の出生数が減少傾向であること（図2）³⁵⁾などが挙げられる。とくに生ワクチン由来ポリオウイルスの検出頻度の低下には、0～1歳の乳児の紙おむつ使用が大きく関わっていた可能性が考えられる。その後、第3回および第4回調査においては、HEV-Bやレオウイルスの検出頻度に大きな差が認められなかった。これに関しては、推論として、下水道普及率は上昇したが、まだ完全ではなく、生活排水が下水処理されていないケースも多々あるために、ウイルスが河川に流入したことが一因として挙げられる。また、HEV-Bのように、地域に流行を起こすウイルス群の検出頻度は、調査時期や流行の大きさに影響された結果、検出頻度にバラツキが生じた可能性も考えられる。第4回調査時には、E13による感染症が日本だけでなく、世界的に流行していた³⁶⁾。すなわち、下水や生活排水の処理がまだ不完全であることを示唆し、ヒト（主に1歳以上の幼児から学童、成人まで）におけるウイルスの浸淫状況を反映していると考えられる。「いたち川」と同時期に実施した「千保川」およ

図2 3河川のウイルス検出頻度と周辺地域における下水道普及率・出生数の推移



資料：富山県土木部下水道課、富山県の下水道³³⁾
富山県厚生部、保健統計年報³⁵⁾より

び「小矢部川」の第3回と第4回調査との間にもポリオウイルスやHEV-B、レオウイルスの検出頻度に大きな差は認められなかった。

3河川のウイルス汚染状況を比較すると、「千保川」のS定点がウイルスの種類が最も多く、また検出頻度も高かった。「小矢部川」のO定点は、「千保川」のS定点の下流であり、2河川が合流した地域に設置した定点であるが、「千保川」のS定点よりも検出されたウイルスの種類や頻度が少なかった。このことは、「小矢部川」の流量が多く、ウイルスが希釈された為でないかと推測される。富山県土木部の調査によると、2002年における年平均日流量は、「小矢部川」長江（O定点から約3 km 上流地点）で68.90 m³/s、「千保川」志貴野橋（S定点から約200 m 上流地点）で7.61 m³/s、「いたち川」四ツ屋橋（I定点付近）で9.53 m³/sであった。

本調査で、2002年～2003年における河川水のウイルス汚染度は1979年～1981年より総じて低くなったことが判明した。「千保川」と「小矢部川」については第1回および第2回調査を実施しなか

ったが、第3回および第4回調査におけるウイルス検出状況は3河川ともほぼ同じ傾向を示していたことにより、この2河川も1979年頃は「いたち川」のウイルス汚染状況と同様であったと推察される。下水道普及率の上昇、紙おむつ使用等の生活様式の変化や環境改善につれてウイルス汚染度は下がったと考えられるが、河川は依然としてウイルスに汚染され、水系感染症をおこす可能性が残る。毎年、貝類の喫食による食中毒の発生事例など³⁷⁾、水系感染症が各地で発生している現状では、生活排水の完全処理が進んでいないことを示している。したがって、公衆衛生的見地から、生活排水の完全処理の実現のために、ウイルス汚染度を指標とする河川水などの定点観測による監視が必要であると考えられる。一方、腸管系ウイルスはヒトには不顕性感染する 경우가多く、患者調査だけでは地域に広がっているウイルス感染状況の把握が困難な面がある。本調査は、間接的にはあるが、地域におけるウイルス感染状況の把握が可能であり、疾病予防対策にとって重要と考えられる。なお、本報告では、ノロウイルスについては培養細胞での検出が未だ不可能なために述べていない。しかしながら、最近、食中毒や感染性胃腸炎の集団発生を起こすことで大きな問題となっているため、現在、下水流入水中のノロウイルスの遺伝子検出を実施中であり、地域住民における流行状況の把握を試みている。今後は河川水についてもノロウイルス検出を実施し、他の腸管系ウイルスの動向とあわせて環境水のウイルス汚染要因を解析予定である。

分離ウイルスの同定用抗血清を分与いただいた国立感染症研究所、ならびに論文のご指導ご校閲を賜りました永井美之前富山県衛生研究所長、滝澤剛則ウイルス部長に深謝いたします。

(受付 2005.11.30)
(採用 2007. 2.19)

文 献

- 1) 古田敏彦, 竹内寛行, 東谷市郎, 他. 大アサリの喫食を原因とするノロウイルスとA型肝炎ウイルスによる食中毒事例, 病原微生物検出情報 2002; 23: 119-120.
- 2) 平田 強, 大村達夫, 石橋良信, 他. 世界の水系疾病の動向—飲料水起因の微生物感染症—. 水環境

学会誌 1997; 20: 124-128.

- 3) Maila HT, Bowyer SM, Swanepoel R. Identification of a new strain of hepatitis E virus from an outbreak in Namibia in 1995. *J Gen Virol* 2004; 85 (Pt1): 89-95.
- 4) 長谷川澄代, 松浦久美子, 中山 喬, 他. ノロウイルス様ウイルス (NLV) による急性胃腸炎の集団発生について (2000年度). 平成12年度富山県衛生研究所年報 2001; 24: 110-115.
- 5) 徳竹由美, 中村友香, 横内文子, 他. 長野県における食中毒集団発生事例からのノロウイルスの検索. 長野県衛公研報告 2003; 26: 16-22.
- 6) 川本 歩, 松本尚美, 谷尾進司, 他. ヒトと環境およびカキから検出した Norwalk Virus の疫学的検討. 鳥取県衛生研究所報 2001; 41: 35-39.
- 7) 矢野一好. SRSV による水系汚染. 水環境学会誌 2003; 26: 8-13.
- 8) 川本 真. 水中ウイルスに関する疫学的研究. 名市大医誌 1981; 32: 258-269.
- 9) 山崎謙治, 大津啓二. 下水からのウイルス分離—その季節消長について—. 大阪府立公衛研所報 1978; 16: 9-18.
- 10) 田中真弓, 岸本直子, 川本 歩, 他. 都市河川からのウイルス分離について. 鳥取県衛生研究所年報 1993; 33: 35-36.
- 11) 安藤克幸, 江頭泰子, 下平裕之. 生食用カキ及び生食用カキの採取海域海水からのノロウイルスの検出. 佐賀県衛生薬業センター所報 2000・2001; 27: 134-137.
- 12) 佐藤 卓, 斎藤幸一, 小林良雄, 他. 下水中の病原ウイルスの動態に関する研究. 岩手県衛生研究所年報 2000; 43: 19-24.
- 13) 梨田 実, 下原悦子, 杉島伸禄, 他. 限外ろ過による下水及び河川水中ウイルスの検出について. 水処理技術 1988; 29: 697-701.
- 14) 宮代 守, 和佐野ちなみ, 桶脇 弘, 他. 環境水のウイルス汚染実態調査について. 福岡市保環研報 2002; 27: 181-182.
- 15) 植木 洋, 菊地奈穂子, 山木紀彦, 他. 下水処理施設および河川水におけるノロウイルス (NV) の挙動. 宮城県保健環境センター年報 2004; 22: 54-56.
- 16) 野村泰弘, 小島基義, 遠藤貞郎, 他. 横浜市内の河川水のウイルス汚染. 横浜市衛生研究所年報 1981; 20: 85.
- 17) Matsuura K, Hasegawa S, Nakayama T, et al. Viral pollution of the rivers in Toyama City. *Microbiol. Immunol* 1984; 28: 575-588.
- 18) Matsuura K, Hasegawa S, Nakayama T, et al. Ecological studies on reovirus pollution of rivers in Toyama Prefecture. *Microbiol Immunol* 1988; 32: 1221-1234.
- 19) Matsuura K, Ishikura M, Nakayama T, et al. Eco-

- logical studies on reovirus pollution of rivers in Toyama Prefecture. II. Molecular epidemiological study of reoviruses isolated from river water. *Microbiol Immunol* 1993; 28: 575-588.
- 20) 松浦久美子, 石倉康宏, 長谷川澄代, 他. 河川水中のウイルス: 富山県内河川のウイルス汚染に関する定点観測 (1993年~1995年). 平成8年度富山県衛生研究所年報 1997; 20: 114-119.
- 21) Matsuura K, Ishikura M, Yoshida H, et al. Assessment of poliovirus eradication in Japan: Genomic analysis of poliovirus isolated from river water and sewage in Toyama prefecture. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 5087-5091.
- 22) Balanant J, Guillot S, Candrea A, et al. The natural genomic variability of poliovirus analyzed by a restriction fragment length polymorphism assay. *Virology* 1991; 184: 645-654.
- 23) 片山浩之, 島崎明寛, 大垣眞一郎. 陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出によるウイルス濃縮法の開発. *水環境学会誌* 2002; 25: 469-475.
- 24) Yano K, Yoshida Y, Shinkai T, et al. A practical method for the concentration of viruses from water using fibriform cellulose and organic coagulant. *Wat Sci Tech* 1993; 27: 295-298.
- 25) Vilagines P, Sarrete B, Danglot C, et al. *Wat Sci Tech* 1982; 14: 281-290.
- 26) 松浦久美子, 長谷川澄代, 森田修行, 他. 河川水中のウイルス: 河川水からのエンテロウイルス検出方法. 昭和55年度富山県衛生研究所年報 1981; 4: 39-42.
- 27) White DO, Fenner FJ. 医学ウイルス学. 北村敬訳. 東京: 近代出版, 1996; 277-281, 349-352, 469-470.
- 28) 岩井雅恵, 中山 喬, 長谷川澄代, 他. 富山県における平成14年度のウイルスおよびリケッチア検出状況. 平成14年度富山県衛生研究所年報 2003; 26: 155-156.
- 29) 国立感染症研究所感染症情報センター. 無菌性髄膜炎関連エンテロウイルスの動向. 病原微生物検出情報月報 2002; 23: 193-218.
- 30) 国立感染症研究所感染症情報センター. ウイルス検出状況. 病原微生物検出情報月報 2003; 24: 79-102.
- 31) Yang CF, Chen HY, Jorba J, et al. Intratypic recombination among lineages of type 1 vaccine-derived poliovirus emerging during chronic infection of infection of an immunodeficient patient. *Journal of Virology* 2005; 79: 12623-12634.
- 32) 鎌塚 眞, 上田竜生, 右田雄二, 他. ポリオワクチン被投与児及びその母親からのウイルス分離. *臨床とウイルス* 2000; 28: 143-150.
- 33) 富山県土木部下水道課. 富山県の下水道. 昭和55年~平成16年.
- 34) 社団法人 日本衛生材料工業連合会. 日衛連紙おむつ News 2001; 36: 4.
- 35) 富山県厚生部. 保健統計年報. 2002; 54: 32-33.
- 36) 国立感染症研究所感染症情報センター. 欧州を中心とする最近のエコーウイルス13型および30型の流行. 病原微生物検出情報月報 2002; 23: 69-70.
- 37) 国立感染症研究所感染症情報センター. ノロウイルス感染集団発生 2000. 1~2003. 10. 病原微生物検出情報月報 2003; 24: 309-320.
-

EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE FOR VIRAL POLLUTION OF RIVERS IN TOYAMA PREFECTURE

Masae IWAI*, Hiromu YOSHIDA^{2*} and Kumiko MATSUURA*

Key words : Virus detection, River water, Environmental surveillance

Objective Virus pollution of three rivers in Toyama Prefecture was surveyed over a long period in order to predict and to prevent water-born infection.

Methods Water samples were collected from three rivers (Itachi, Sembo, Oyabe), then concentrated and inoculated into cultured cells to isolate viruses. The survey at Itachi River was carried out 4 times: in 1979–1981, 1983–1985, 1993–1995, and 2002–2003. The surveys at Sembo and Oyabe Rivers were carried out twice (together with the 3rd and 4th surveys of Itachi River).

Results 1) Various species of enteric viruses, i.e., poliovirus, human enteroviruses B (HEV-B), and reovirus were isolated from Itachi River. Since polioviruses were isolated at the same time as the oral vaccination of babies, these isolates appeared to be derived from vaccine strains. Consistently, isolates in the 3rd and the 4th surveys had only 0–2 base differences in the 480 or 474 nucleotide sequences of the VP3-VP1 region, compared with vaccine strains. The poliovirus detection rates, defined as the ratios of times viruses were detected to the total investigation times, were 33.3%, 41.7%, 2.1% and 0% for the Itachi River from the 1st to 4th surveys, respectively. The lowering between the 2nd and the 3rd surveys was significant ($P < 0.001$), this being associated with the widespread introduction of paper diapers for babies. The types of HEV-B were various and coincided well with those of prevalent clinical isolates. Reoviruses were frequently detected throughout the year in the 1st and the 2nd surveys, but fell in spring and summer in the 3rd and 4th surveys.

2) The types and the rates of viruses detected from Sembo and Oyabe Rivers were similar to those from Itachi River.

Conclusions The detection rates of poliovirus and reovirus in the river water during 2002 to 2003 were lower than during 1979 to 1981. This may be due to the improvement of sewerage system or sewerage and the increase in use of paper diapers for babies. The reason that the detection rate of HEV-B did not similarly decrease, and the fact that various types of HEV-B were isolated every year seemed to reflect the epidemic status of HEV-B among inhabitants. Thus, while virus pollution of river water has generally decreased, there is still a possibility of outbreak of water-born infections, since rivers continue to be contaminated with various species of viruses.

* Toyama Institute of Health

^{2*} National Institute of Infectious Diseases