

平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金 (新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)分担研究報告書

「エンテロウイルス感染症制御のための診断・予防治療に関する国際連携研究」

東アジアにおける環境ウイルスサーベイランスの有効性に関する研究

分担研究者 吉田 弘 国立感染症研究所ウイルス二部主任研究官

研究協力者 Tao Zexin, Wang Haiyan, Li Yan, Xu Aiqiang 中国山東省 CDC

研究要旨：中国山東省で継続している環境ウイルスサーベイランスにより、2008 年 2 月から 2010 年 12 月までの間、エコー6 型が 30 株分離された。うち 1 株は 2008 年 12 月に、残り 29 株は 2010 年に分離され、そのうち 21 株は 8 月に分離されている。VP1 遺伝子解析の結果、環境分離株は 2 つのクラスターに分類され、クラスター間で 20-22% の塩基配列の違いがみられた。1998-2010 年の患者由来株と塩基配列を比較したところ、これらの環境由来株と患者由来株は分離時期がよく相関していた。他方下水採取地である山東省済南市では調査期間において無菌性髄膜炎のアウトブレイクの報告がなかったことから、環境サーベイランスは顕性、不顕性に関わらず集団で流行するエンテロウイルスを補足するために有効な手法であると考えられる。

A. 研究目的

WHO が策定した 2010-2012 ポリオ根絶計画行動計画には、患者捕捉のための AFP サーベイランスの補完的な役割として環境ウイルスサーベイランスの導入が取り上げられている。

中国は大都市では流動人口問題を抱え、また日本のような定点サーベイランス網を整備することは困難な状況である。そのため吉田らは 2008 年より中国 CDC-山東省 CDC-広東省 CDC との 2 年間の共同研究により、ポリオ/エンテロウイルスの地域伝播像を把握することを目的として環境ウイルスサーベイランスを行ってきた。

2010 年にインド由来野生株ポリオウイルスによる大規模なアウトブレイクがタジキスタンにて報告された後、中国衛生部は隣接国からの輸入に備え早期探知のため、12 省を対象とした環境ポリオウイルスサーベイランス網を整備を進めることを決定した。なお本事業は、上述の環境ウイルスサーベイランス共同研究により得られた知見をもとに計画されたものである。

本研究では包括的にポリオ/エンテロウイルスを環境サーベイランスにより捕捉し、そのウイルスゲノム情報/疫学情報につい

て解析を進め、アジア域内における疫学情報/ゲノム情報の共有化を目指す。

今年度は中国山東省における先行研究の継続および蓄積したデータの取りまとめを行うことに焦点を置いた。本報告では 2008 年 2 月から 2010 年の間、山東省にて分離されたエンテロウイルスのうちエコー6 型について地域分布像を解析した結果を報告する。

B. 材料と方法

環境水採取エリア：山東省済南市内（人口約 260 万人）に位置する下水処理場の流入下水について、2008 年 2 月から月 1 回の頻度で 2010 年 12 月までサンプリングを行った（現在も継続中）。

ウイルス分離同定：流入下水（0.5-1L）、を出発材料に試料は遠心（3000rpm、30 分）後、上清に MgCl₂ を添加（最終濃度 0.05M）、pH 3.5 に調整後、陰電荷膜にてウイルス吸着。10m l 3% beef extract 存在下、1 分間超音波処理を行いウイルスを誘出を 3 回行った。濃縮産物をウイルスに対する感受性の異なる 4 種細胞（RD, HEp-2, L20B）に 0.2m l ずつ接種。分離されたウイルスは、エンテロプール抗血清（RIVM 抗血清）を用いた中和法にて同定。E6 と同定された株を

遺伝子解析に供した。

患者由来株

山東省 CDC で過去 1998-2010 年の間、検査を行った AFP 或いは無菌性髄膜炎患者より分離された E6 が系統解析のため用いられた。

遺伝子解析

エンテロウイルスゲノム VP1 領域について Oberste 等による 490-492 及び 491-493 プライマーセットを用いて RT-PCR にて増幅。得られた産物をダイレクトシーケンス法により E6 のウイルス塩基配列を決定した。得られた塩基配列は MEGA ソフトウェアを用いて系統解析を行った。

分離株ゲノグループ間の中和抗体価

ゲノグループ間の抗原変異について E6 ポリクローナル抗血清 (デンカ生研) を用い、標準株 D' Amori 株とともに中和抗体価を測定した。

C. 結果

下水からの E6 分離、同定 : 2008 年 2 月から 2010 年 12 月までの間、E6 は 30 株分離された。うち 1 株は 2008 年 12 月に、残り 29 株は 2010 年に分離され、そのうち 21 株は 8 月に分離されている。2009 年には E6 は分離されなかった (図 1)。

下水由来株の遺伝子解析 :

30 株の E6 は 2 つのクラスターに分かれ、クラスター間の塩基配列の違いは 20-22% であり、クラスター内の違いは最大 6.3% であった。また 2010 年 8 月に分離された 21 株も二つに分かれた (図 2)。

他の患者由来株との比較

山東省における代表的な下水由来株 16 株と患者由来 17 株、及び他の地域で伝播して

いた 43 株とともに系統解析を行った。その結果 A-F の 6 つのクラスターに分かれ、山東省株は C5 サブクラスター、B, D クラスターに属していた。現在利用できるデータでは C5, D は他の地域とは異なるタイプであり山東省土着の株である可能性があることを示した (図 3)。

中和抗体価

山東省で分離された株が属する 3 つのクラスターから 3 株ずつ合計 6 株の中和抗体価を測定したところ株間の有意な違いは認められなかったが、標準株 D' Amori とはある程度の違い (3-5 管) が見られた。

D. 考察

中国ではエンテロウイルスに関するサーベイランスはポリオと手足口病にて確立されているが、他のエンテロウイルス感染症に関しては未確立である。山東省では AFP サーベイランス、及び無菌性髄膜炎患者のウイルス検査により得られた分離株を保管しており、過去の分離株と環境分離株を比較することで地域伝播の様相について部分的な知見を得ることができた。即ち

- ① 1998 年から 2010 年の間、山東省では E6 について 3 つのゲノグループが流行していたこと。
- ② 利用できる他の地域の株との比較により 3 つのうち 2 つのゲノグループは、山東省特有である可能性があること。

エンテロウイルスは多くが不顕性感染であること、そして中国ではエンテロウイルス感染症について症例サーベイランスが利用できない状況のため、実際の流行像については不明であるが、かかる状況下で環境サーベイランスはヒト集団で流行しているエンテロウイルスの状況を把握するツールと

して利用できる可能性を示した。

E. 結論

山東省における下水からのエコーウイルス 6 型の分離同定、及びウイルスゲノム解析の結果は、疾患サーベイを構築することなく、ヒト集団で流行しているウイルスをモニタリングツールとしての適用可能性を示唆した。また連携研究を通じ、分離株のゲノム情報を登録することで、国内外のウイルス伝播監視に貢献するものと考えられる。

G. 論文発表

1) Sun LM Zheng HY, Zhen HZ, Guo X, He JF, Guan DW, Kang M, Liu ZH, Ke CW, Li JS, Liu Leng, Guo RN, Yoshida H, Lin JY. Epidemic of enterovirus 71 infection in Guangdong Province of China, 2008: epidemiologic, clinical and virogenic manifestations JJID 2011. 64:13-18.

H. 知的財産権の出願登録状況

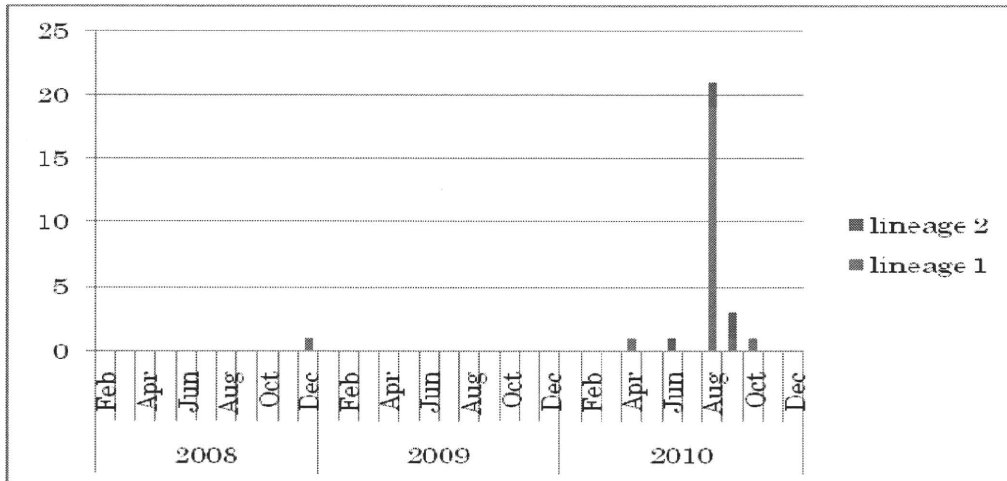
3. その他

遺伝子配列の GenBank への登録

GU272016, GQ329778-GQ329785,

HQ399470-HQ399495, HQ829944-HQ829961.

図1 山東省下水処理場の流入下水におけるポリオウイルス分離 (2008.2-2010.12)



横軸は採取月、縦軸は分離数を示す。Lineage 1と2の関連は図2参照。

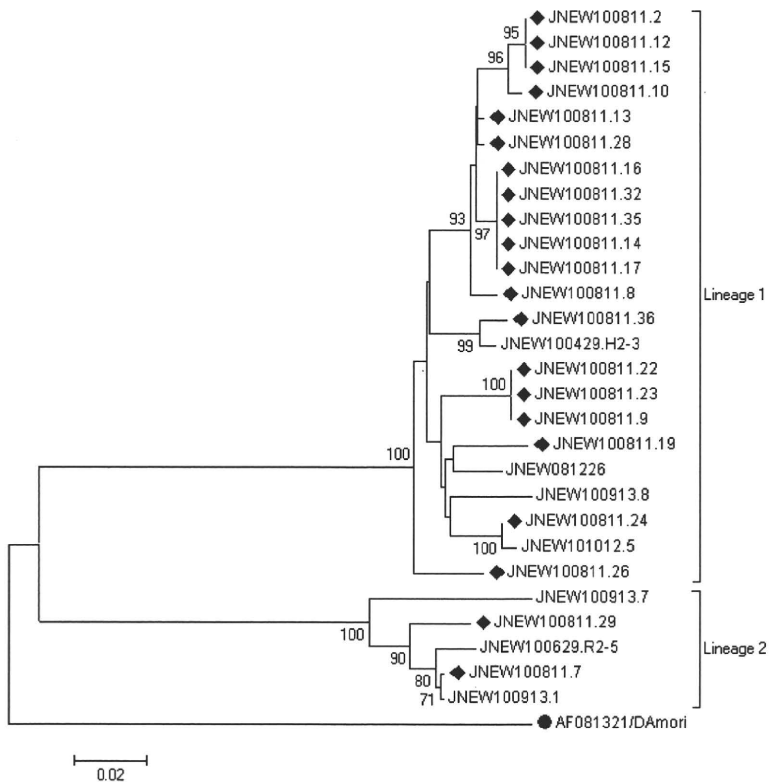


図2 2008-2010年に分離されたE6下水分離株の系統解析(VP1)領域

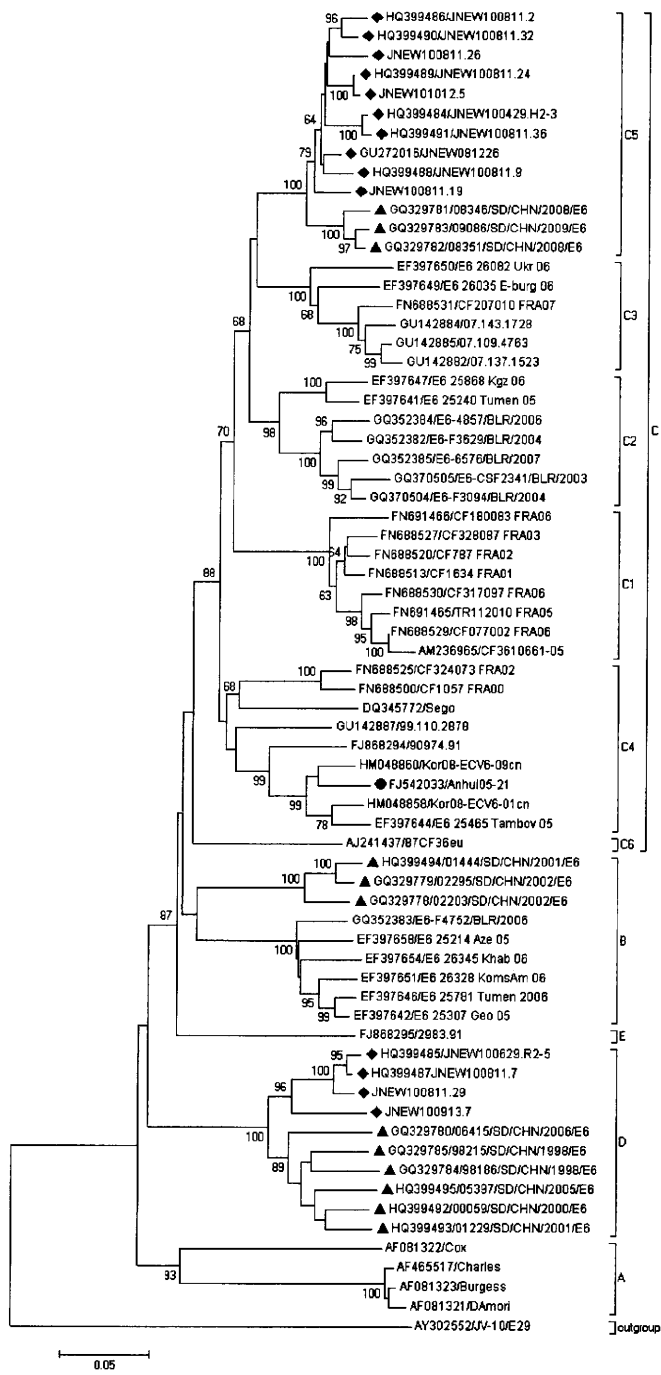


図3 下水由来株と他の患者由来株との比較 (VP1 領域)

■は下水由来、▲は患者由来株。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討」
研究報告書

下水中のポリオウイルス性状解析と
下水処理過程におけるエンテロウイルス量の変化に関する調査

研究分担者 岩井雅恵 富山県衛生研究所

研究要旨

これまでの環境水ウイルス調査において、富山県内の下水流入水からポリオウイルスはワクチン集団接種時期に、エンテロウイルスは通年、検出されている。2010年は、48株のポリオウイルスが下水から検出され、VP1領域の塩基配列解析によりすべて OPV-like poliovirus であることを確認した。

また、エンテロウイルスの下水処理効果を調べるために、下水処理工程ごと（流入水、二次処理水、放流水、生汚泥、余剰汚泥）のウイルス量を測定したところ、二次処理水中のウイルス量は流入水よりも 10^{-1} ～ 10^{-2} 少なく、生汚泥に吸着されなかったウイルスは活性汚泥に吸着または取り込まれることで、二次処理水中のウイルス量が減少したことが推測された。

A. 研究目的

河川水や下水等のウイルス調査は、環境水のウイルス汚染状況を把握するために世界各地で行われている。特に、ポリオウイルスに関しては、不顕性感染例が多く、ポリオ麻痺患者が報告されていない地域でも河川や下水からワクチン由来ポリオウイルス（VDPV）や野生株が検出されることから、ポリオウイルスの伝播の伝播を監視するため、また、AFPサーベイランス（急性弛緩性麻痺患者の報告とウイルス検査）を補完するために、実施されている。

我々は、これまでの調査で、下水流入水からはポリオウイルスはワクチン集団接種時期に、エンテロウイルスは通年、検出されていることを報告してきた。

本調査では、引き続き下水流入水のウイルス調査を行い、下水から分離されたポリオウイルスの性状解析を行った。また、エンテロウイルスの下水処理効果を明らかにするために、下水処理工程ごとのウイルス量の変化を調べたので、あわせて報告する。

B. 研究方法

1. 調査期間及び調査地点

「下水流入水中の腸管系ウイルスの季節消長に関する調査」では、富山県内西部地区に位置する1下水処理場（分流式）において、月1回下水流入水を採取した。また、平成22年4月から6月までは、上流の砺波地区における管渠においても月1回同様に

調査を行った。下水処理工程ごとのウイルス量の変化に関する調査」では、平成 21 年 5 月 20 日、5 月 28 日、10 月 22 日、10 月 28 日に、下水流入水、二次処理水、放流水、生汚泥、余剰汚泥を採取した。

2. 下水サンプルの濃縮

約 2L の下水流入水を、4℃で 3000rpm、30 分間遠心し上清を回収後、「ポリエチレングリコール法」及び「フィルター吸着溶出法」(Appl Environ Microbiol. 2009, 75, 1264-1270)により濃縮した。生汚泥、余剰汚泥は、Albert and Schwartzbrod らの方法 (Water Sci. Technol. 1991, 24, 225-228) に準じ、10g を 3%Beef Extract 加ホウ酸塩緩衝液 200mL 中で攪拌後、ポリエチレングリコール沈殿法により 20 倍濃縮し、ウイルス濃縮液とした。

3. ウイルス分離同定

下水濃縮液を培養細胞 (Vero, MA104, RD-18S, HEp-2, L20B) に接種し、細胞変性効果を指標にウイルスを分離した。分離株は、エンテロウイルス NT 試薬 (国立感染症研究所より分与、またはデンカ生研) を用いた中和試験により同定した。

4. ポリオウイルス分離株の塩基配列解析

分離株は、RNA 抽出キット (QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。抽出 RNA にランダムヘキサマーおよび Super Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen) を加え、逆転写反応で cDNA を作製後、ExTaq (TaKaRa) を用いて PCR を行った。PCR 産物は、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。分離株の塩基配列は、ワクチン株

Sabin1、Sabin2、Sabin3 の塩基配列 (GenBank アクセション番号はそれぞれ AY184219、AY184220、AY082683) と比較した。

5. エンテロウイルスの定量

エンテロウイルス量、及び遺伝子量は、それぞれマイクロタイター法、及びリアルタイム PCR 法により定量した。マイクロタイター法は、96well プレートに培養した RD-18S、L20B 細胞に、10 倍段階希釈したウイルス濃縮液を希釈系列ごとに各細胞の 32well に 25 μ L ずつ接種し、50%組織培養感染値量 (TCID₅₀/25 μ L) を求めた。また、エンテロウイルスのリアルタイム PCR は Katayama H. ら (Appl Environ Microbiol. 2002, 68, 1033-1039) の方法を用いた。

C. 研究結果及び考察

1. 下水流入水からのポリオウイルス検出状況

2010 年 4 月から 12 月まで、48 株のポリオウイルスが分離された (表 1)。血清型別では、1 型が 10 株、2 型が 13 株、3 型が 25 株分離された。下水処理場流域のポリオワクチン集団接種時期は、西部地区の春期が 4/20-5/18、秋期が 9/15-10/12、砺波地区の春期が 4/21-5/26、秋期が 9/15-10/27 であり、ポリオウイルスは 8 月に検出されたポリオウイルス 3 型 1 株を除き、ワクチン接種時期から約 2 ヶ月の間に検出された。また、これらの分離株について、VP1 領域 (1 型 906 塩基、2 型 903 塩基、3 型 900 塩基) の塩基配列の差異は、1 型では、0~0.44%、2 型では、0~0.33%、3 型では、0~0.67%であった (表 2)。いずれもワクチ

ン株と1%未満の差であるため、WHOの基準によるOPV-like poliovirusであった。野生株やVDPVは検出されなかった。

2. 下水処理工程ごとのエンテロウイルス量の変化

腸管系ウイルスの下水処理工程ごとのウイルス量の変化を知るために、下水流入水、二次処理水、放流水、生汚泥、余剰汚泥中のエンテロウイルス量及び遺伝子量を定量した。下水流入水2.5mL中のエンテロウイルス量は、L20B細胞では0~5.6TCID₅₀、RD-18S細胞では0~16.6TCID₅₀であり、エンテロウイルス遺伝子量は40.0~130.4コピーであった。二次処理水からはいずれの調査日もエンテロウイルスは分離されなかったが、ウイルス遺伝子は10月22日に11.2コピー検出された。放流水からはエンテロウイルス、遺伝子ともに検出されなかった(表3)。汚泥25mg中のエンテロウイルス量及び遺伝子量は、生汚泥の方が余剰汚泥よりも多かったため(表4)、下水処理初期の汚泥に多くのウイルスが含まれている可能性が示唆された。二次処理水中のウイルス量は流入水よりも10⁻¹~10⁻²少なかったため、生汚泥に吸着されなかったウイルスは活性汚泥に吸着または取り込まれることで、二次処理水中のウイルス量が減少したことが推測された。

D. 謝辞

本調査を実施するにあたり、検体採取等にご協力いただいた下水道処理施設の関係各位に深謝いたします。

E. 結論

富山県におけるポリオウイルス野生株の侵入やVDPVの伝播を監視するために、毎月1回下水流入水のポリオウイルス調査を行った。20010年は、富山県内の下水流入水から48株のポリオウイルスが分離されたが、すべてOPV-like poliovirusであった。

また、エンテロウイルスの下水処理効果を調べるために、流入水、二次処理水、放流水、生汚泥、余剰汚泥のウイルス量を測定した。二次処理水中のウイルス量は流入水よりも10⁻¹~10⁻²少なく、活性汚泥処理後、ウイルス量が減少していた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwai M, Yoshida H, Obara M, Horimoto E, Nakamura K, Takizawa T, Kurata T, Mizuguchi M, Daikoku T, Shiraki K: Widespread circulation of echovirus type 13 demonstrated by increased seroprevalence in Toyama, Japan, between 2000 and 2003. Clin Vaccine Immunol 17: 764-770, 2010

2. 岩井雅恵、堀元栄詞、小原真弓、小淵正次、倉田毅、川越久美子、中村純香、清水博之、吉田弘 滝澤剛則: 2010年に富山県で検出されたエコーウイルス30型の遺伝子解析. 病原微生物検出情報月報 31: 298-300, 2010

3. 岩井雅恵、堀元栄詞、小原真弓、長谷川澄代、倉田毅、中村純香、高田厚史、南部厚子、清原美千代、春木加奈、植田陽子、滝澤剛則：ポリオ流行予測調査（平成 21 年度）. 富山県衛生研究所年報 33: 82-87, 2010

2.学会発表

岩井雅恵、小原真弓、堀元栄詞、倉田毅、滝澤剛則、高井宗央、山本博英：下水流入水中の腸管系ウイルスの季節消長と下水処理工程ごとのウイルス量の変化. 第 47 回下水道研究発表会. 名古屋市、2010 年 7 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

表 1. 下水処理場別の下水流入水からの腸管系ウイルス検出状況

西部地区												砺波地区				
ウイルス		2010年										ウイルス				
		4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	4月				5月	6月
ポリオ	1型	2	3						4			ポリオ	1型		1	
	2型	5	1	1				1			2型			5		
	3型		9	5		1		5	4		3型				1	
HEV-B	CoxB4							9	10	10	13	HEV-B				
	Echo3										15					
	Echo11	4														
	Echo25				1	1										
	Echo30	1	3	11	7	5							Echo30	4	4	10
レオ	2型	2				6	21	12	10							
アデノ	2型	1				1			1							
	5型								1	1						
ノロ	GI/1										ノロ	GI/1				
	GI/4											GI/7				
	GI/14											GI/2				
	GII/2											GII/4				
	GII/4															
	GII/13															
サポ	GI/1										サポ	GI/1				
											GI/2					

表中の数値はウイルス分離株数を、灰色の四角はPCRによってウイルスが検出された調査月を示す。

表 2. 下水由来ポリオウイルス分離株の VP1 領域塩基配列のワクチン株との差異

Type 1				Type 3			
地区	株名	ワクチン株との差異		地区	株名	ワクチン株との差異	
		VP1(906nt)	VP1(302aa)			VP1(900nt)	VP1(300aa)
西部	Fu/Apr-12/10	0%		西部	Fu/May-11/10	0.11%	
	Fu/Apr-6/10	0%			Fu/May-12/10	0.11%	
	Fu/May-10/10	0.44%	2 (K103R, T106A)		Fu/May-13/10	0%	
	Fu/May-2/10	0.22%	1(I90L)		Fu/May-14/10	0.11%	1(K20R)
	Fu/May-9/10	0.22%	1(T106A)		Fu/May-15/10	0.11%	
	Fu/Oct-10/10	0.22%			Fu/May-3/10	0%	
	Fu/Oct-11/10	0.22%	2(K99N, V253I)		Fu/May-6/10	0%	
	Fu/Oct-14/10	0.11%			Fu/May-7/10	0.11%	
	Fu/Oct-9/10	0%			Fu/May-8/10	0.44%	2(A54T, V265I)
砺波	Tn/May-10/10	0%			Fu/Jun-13/10	0.22%	
					Fu/Jun-14/10	0.22%	
					Fu/Jun-15/10	0.33%	
					Fu/Jun-17/10	0.22%	
					Fu/Jun-9/10	0.11%	
					Fu/Aug-7/10	0.44%	3(A54V, M105T, N287D)
				Fu/Oct-12/10	0.11%		
				Fu/Oct-13/10	0%		
				Fu/Oct-15/10	0%		
				Fu/Oct-16/10	0.11%	1(A54V)	
				Fu/Oct-20/10	0.22%	1(A54T)	
				Fu/Nov-13/10	0.33%	1(A54V)	
				Fu/Nov-14/10	0.33%	1(A54V)	
				Fu/Nov-17/10	0.67%	3(S24G, A34T, A54V)	
				Fu/Nov-9/10	0.11%		
砺波	Tn/Jun-11/10	0.11%	1(I143T)	砺波	Tn/Jun-11/10	0.33%	1(A54V)
			1(I143T)				
			1(I143T)				
			1(I143T)				
			1(I143T)				
			1(I143T)				

表 3. 下水流入水、二次処理水、放流水、各 2.5mL 中のエンテロウイルス量

ウイルス定量方法	測定対象	調査日	流入水	二次処理水	放流水
マイクロタイター法: L20B細胞(TCID ₅₀)	ポリオウイルス 感染値量	2009/5/20	5.6	0	0
		5/28	0	0	0
		10/22	4.2	0	0
		10/28	0	0	0
マイクロタイター法: RD-18S細胞(TCID ₅₀)	エンテロウイルス 感染値量	2009/5/20	0	0	0
		5/28	3.7	0	0
		10/22	16.6	0	0
		10/28	8.7	0	0
リアルタイムPCR法 (コピー数)	エンテロウイルス 遺伝子量	2009/5/20	77.9	0	0
		5/28	110.2	0	0
		10/22	130.4	11.2	0
		10/28	40.0	0	0

表 4. 生汚泥、余剰汚泥、各 25mg 中のエンテロウイルス量

ウイルス定量方法	測定対象	調査日	生汚泥	余剰汚泥
マイクロタイター法: L20B細胞(TCID ₅₀)	ポリオウイルス 感染値量	2009/5/20	10.7	5.2
		5/28	6.0	4.2
		10/22	11.6	4.5
		10/28	8.1	3.4
マイクロタイター法: RD-18S細胞(TCID ₅₀)	エンテロウイルス 感染値量	2009/5/20	3.9	3.4
		5/28	4.2	0
		10/22	15.4	4.5
		10/28	6.0	5.2
リアルタイムPCR法 (コピー数)	エンテロウイルス 遺伝子量	2009/5/20	325.2	12.8
		5/28	560.2	23.6
		10/22	131.8	0
		10/28	133.5	0

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「エンテロウイルス感染症制御のための診断・予防治療に関する国際連携研究」

アイチウイルスの検出と遺伝子解析—下水から検出されるアイチウイルス遺伝子

研究代表者 清水 博之 国立感染症研究所
研究協力者 山下 照夫、水谷 絵美、安達 啓一、伊藤 雅、藤浦 明、皆川 洋子
愛知県衛生研究所

研究要旨 アイチウイルス (AiV) 遺伝子の 3D 領域を検出するプライマーで、流入下水検体を調べたところ既知の遺伝子型に属さないものが存在したため、その検体を用いて VP3 領域下流から 3D 領域中流に至る 4,987 塩基の配列を解明した。遺伝子解析の結果、既知の AiV とは血清型の異なる新型ウイルスが存在すると考えられた。VP1 領域に設定したプライマーを用いた RT-PCR 法により、137 件中 19 件 (13.9%) から新型 AiV 遺伝子が検出された。これらは 4 つのグループに分かれ、多様な新型 AiV が侵淫しているものと思われた。

A. 研究目的

アイチウイルス (AiV) の既知の血清型は単一であるが 3 つの遺伝子型 (A 型、B 型及び C 型) に分類されている。下水中の AiV を RNA ポリメラーゼ領域の一部 (588 塩基) を増幅する RT-PCR 法を用いて検査したところ、一部の検体から A, B, C 型の いずれにも属さない AiV 遺伝子断片が検出された。血清型の異なるウイルスの存在が予測されたため、構造タンパク領域を中心に塩基配列を調べた。また、VP1 領域に特異的プライマーを設計し RT-PCR にて下水中の新型 AiV 遺伝子検出とともにウイルス分離を試みた。

B. 研究方法

VP1 全領域を増幅するプライマー (KBP1(+)) :
5'-CTCYTTCATCTCYMAMTCCTACTGG-3'、
KBN1(-): 5'-AAGTGGGTRCAGTTGTTGG-3') とその内側 453 塩基を検出するプライマー (KpP1P(+):
5'-CAGCCMCGCACCACYTTCSASTAC-3'、
KbP1N(-): 5'-GAAGTAKGARGTGGGRATRCAGA-3') を、全塩基配列が判明しているウイルス 4 株 (AiV 3 株、

ウシコブウイルス 1 株) を基に作成した。検出された 3D 領域 588 塩基の配列から新型 AiV が含まれると推定された下水 7 件を調べたところ、2 件から新型 AiV 由来と思われる VP1 領域 453 塩基の遺伝子が検出された。新たに得られた VP1 領域と、既知の 3D 領域の配列を基点に新型ウイルス遺伝子を RT-PCR 法で調べた。また、VP1 領域に新型 AiV 特異的なプライマー (KBVP1-5(+): 5'-CACCTTTGAGTACACCGARAA-3'、Y12/VP1N2(-): 5'-GGAGATGAGAGTAGTGTGGATTC-3') を設計し 2008 年 1 月から 2010 年 8 月までに集められた流入下水 137 件について新型 AiV の有無を調べるとともに、Vero、HeLa、RD-18S 細胞を用いウイルス分離を試みた。

C. 研究結果

新型 AiV が存在すると考えられた Y12/04 検体を調べたところ、VP3 領域下流から 3D 領域中流に至る 4,987 塩基の配列が判明した。AiV 標準株との相同性は VP1 領域で 69.1%、2A 領域で 73.6%、以下 2B で 76.8%、2C で 80.0%、3AB で 68.5%、3C で 81.0%、であった。また 3AB 領域に塩基数は 363 塩基で標準株より 3 塩基少なかった (表 1)。各

領域の系統樹解析の結果 Y12/04 は既知の AiV と比べ独立して存在し、その遺伝子距離はエンテロウイルスにおける血清型の違いに匹敵していた (図 1)。VP1 領域に設定したプライマーを用いた RT-PCR 法により、137 件中 77 件 (56.2%) から AiV 遺伝子が検出された。遺伝子型の内訳は A 型 52 件 (41.6%)、B 型 20 件 (14.6%)、新型 19 件 (13.9%)、C 型 0 件であった (表 2)。いずれの検体もウイルス分離は陰性であった。新型 AiV 由来 VP1 領域の PCR 産物の塩基配列を調べたところ、10% の相違で 4 グループに分かれ、別の 1 件は 27% の相違が認められた (図 2)。

D. 考察

既知 AiV と新型 AiV の VP3 から 3D 領域にいたる配列の相同性は同じ種内の異なる血清型に匹敵し、AiV にも血清型の異なるものが存在することが示唆された。新型 AiV の中で 27% の相違が認められた 1 件は、新たな血清型か否かさらに検討が必要である。新型 AiV が 4 グループに分けられたことから、既知 AiV 以外に多様な新型 AiV が侵淫しているものと思われた。新型 AiV の分離には成功しなかったが、その原因としては、水中には多くのウイルスが存在し AiV の様に増殖の遅いウイルスは分離し難いものと考えられた。今後、患者糞便中の新型 AiV の有無を調べ、ウイルス分離を試みるとともに、病気との関わりを調べて行きたい。

E. 結論

ウイルス分離には至っていないが、アイチウイルスに血清型の異なるものの存在が

示唆された。下水中からの検出件数は既知の A 型アイチウイルスと比較して少ないが、新型ウイルス由来の PCR 産物を解析すると多様であった。他の 1 件はこれらとも 27% の相違が認められ、更に新たな型が存在する可能性がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

水谷絵美 安達啓一 藤原範子 伊藤雅 山下照夫 藤浦 明 皆川洋子、2006年から2010年に流入下水から分離されたエンテロウイルスの消長、愛知県衛生研究所報 61, 2011.

2. 学会発表

山下照夫、伊藤 雅、皆川洋子：新型アイチウイルス遺伝子の検出、第 57 回日本ウイルス学会学術集会 東京 2009 年 10 月

水谷絵美、安達啓一、藤原範子、伊藤 雅、山下照夫、藤浦 明、皆川洋子：流入下水から分離されるエンテロウイルスについて、第 58 回日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

図の説明

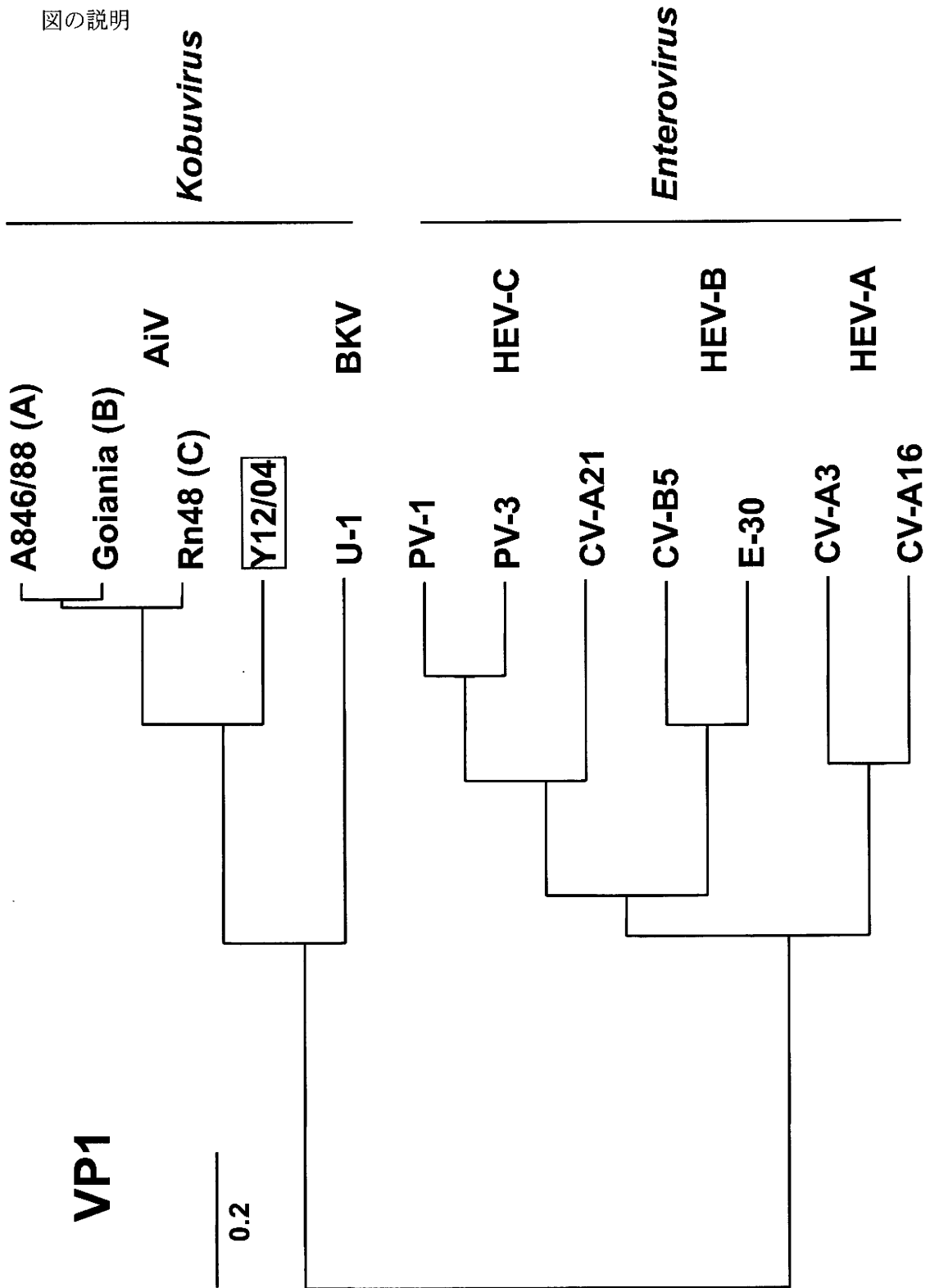


図1. VP1領域の系統樹解析によるイチウイルスとエンテロウイルスとの比較（アミノ酸配列）

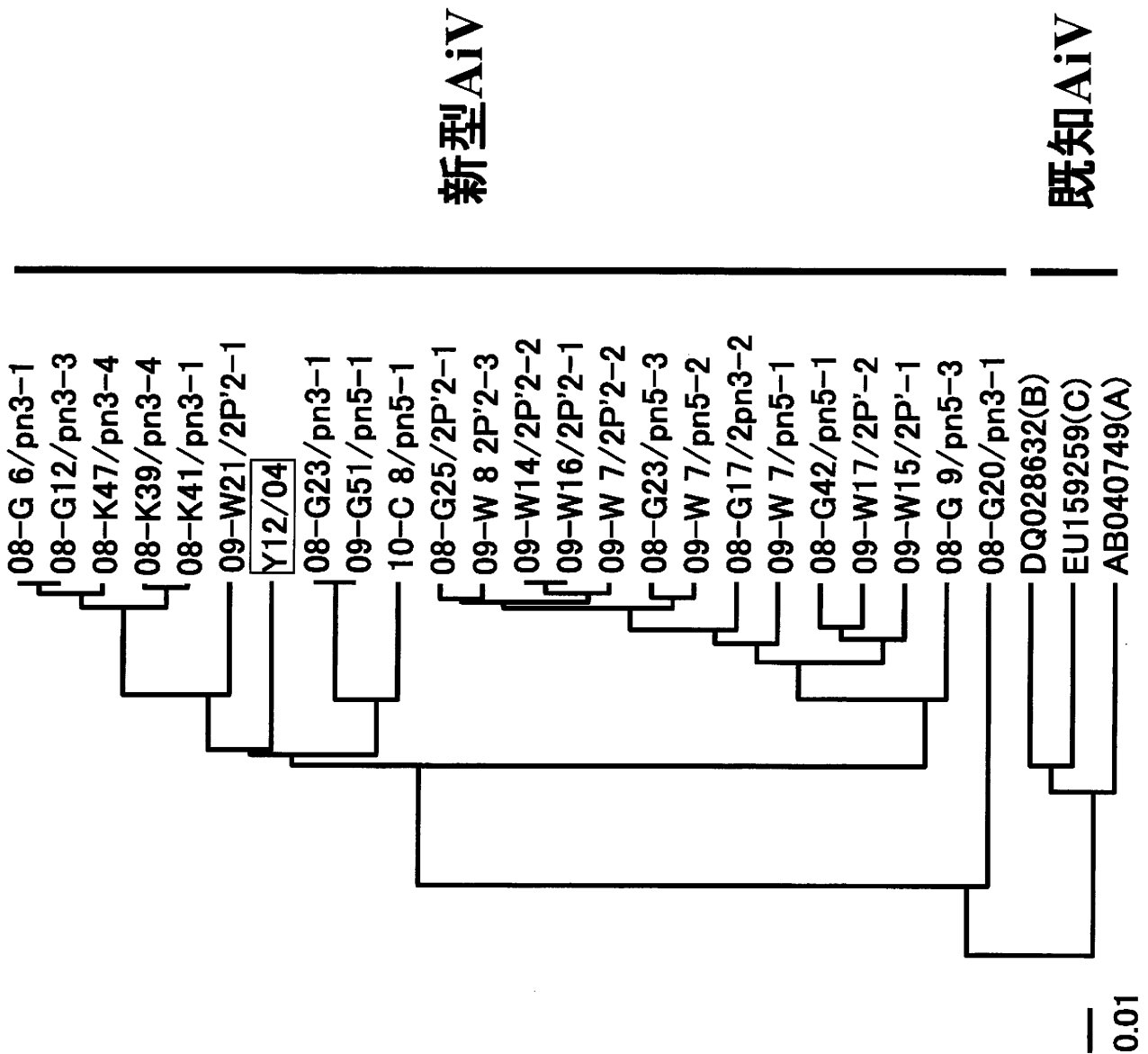


図2. 下水から検出された新型アイチウイルスのVP1 遺伝子の系統樹解析
 * : 4,987 塩基の配列を調べた下水検体 12/04 を黒枠で囲った。

表1、Y12/04 株遺伝子とアイチウイルス標準株との比較

領域	遺伝子長(A型)	標準株(A型)との相同性(%)		
		B型	C型*	Y12/04
VP1	759	87.2	83.0	69.1
2A	408	90.0	-	73.6
2B	495	87.3	-	76.8
2C	1005	91.7	-	80.0
3AB	366	89.6	-	68.5**
3C	570	90.7	-	81.0

*:C型はVP1領域の662塩基のみ判明

**：核酸数は363塩基

表2、下水から検出されるアイチウイルス遺伝子型

年	検体数	検出数(%)	型別検出数(%)		
			A型	B型	新型
2008	53	29	16	10	9
2009	51	37	25	10	9
2010	33	11	11	0	1
合計	137	77(56.2)	57(41.6)	20(14.6)	19(13.9)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

研究報告書

「エンテロウイルス感染症制御のための診断・予防治療に関する国際連携研究」

「浄化センターへの下水流入水からのウイルス分離について」

研究協力者 世良暢之、石橋哲也、吉富秀亮、田上四郎 福岡県保健環境研究所

研究分担者 吉田 弘 国立感染症研究所

研究要旨

地域におけるポリオウイルスの環境実態を把握し、ポリオウイルス野生株の浸入防止及び監視に役立てることを目的に、県内の北部地区及び南部地区浄化センターにおける下水流入水からのウイルス分離を実施した。2010年4月から9月に、30株のポリオウイルスが分離されたが、VP1領域における塩基配列の変異が1%未満であったことから、これらは全てワクチン株であることが判明した。また同時にコクサッキーウイルス、アデノウイルス及びエコーウイルス等のエンテロウイルスが検出された。これらのことから環境ウイルスサーベイランスは、腸管系ウイルスの環境実態を包括的に把握する手法として有用な手段であることが示唆された。

A 研究目的

ポリオ症例はポリオワクチン（Oral Polio Vaccine, OPV）によって予防が可能な疾病のひとつであり、世界保健機関（WHO）により根絶計画が進められている。西太平洋地域では2000年（平成12年）にポリオフリー宣言が出された。日本においては30年近くにわたりポリオウイルス野生株によるポリオ症例は発生していないが、ポリオ流行地（アフガニスタン、インド、ナイジェリア及びパキスタン等）で感染し、帰国後に発症する症例（輸入症例）に留意する必要がある。

2010年～2012年のポリオ根絶計画では環境ウイルスサーベイランスの導入が盛り込まれ、ポリオウイルス野生株根絶の有効な手段となっている。この環境ウイルスサーベイランスはヒト糞便中に排泄されたウイルスが下水等の

環境水に排泄されているかどうかを調べることで、顕性あるいは不顕性にかかわらず地域に流行するウイルスを効率的に分離することができる手法である。そこで、本研究では下水流入水中のポリオウイルスの分離と性状解析により、ポリオウイルス野生株、ワクチン由来ポリオウイルス（Vaccine-derived Poliovirus, VDPV）の監視を行うことを目的とした。また日本ではOPVから不活化ポリオワクチン（Inactivated Polio Vaccine, IPV）への切替が予定されており、ヒト集団からのワクチン株の消失確認のため本法の有用性を事前評価する必要がある。平成22年度は、福岡県北部地区及び南部地区の2箇所の下水流入水について、ポリオウイルスを含めたエンテロウイルスの包括的な分離を検討した。

なお、本研究は（財）福岡県下水道公社の協力により実施した研究である。

B 研究方法

1. 研究期間及び調査地点

2010年4月から9月にかけて、月1回、福岡県北部地区に位置する1浄化センター及び南部地区に位置する1浄化センターの2箇所において、下水流入水を採取した。

2. 下水流入水の濃縮

約1Lの下水流入水を、4℃で3000rpm、30分間遠心し、上清に塩化マグネシウムを添加、pH3.5に調整後、陰電荷フィルターでウイルス吸着、10mlの3%ビーフエキストラクト存在下でウイルス誘出を行った。

3. ウイルスの分離同定

この濃縮産物をウイルスに対する感受性の異なる6種類の培養細胞（Vero、FL、RD18s、HEp-2、LLC-MK2、L20B及びMDCK）に0.1mずつ接種した。細胞変性効果を指標に分離されたウイルスはポリオウイルス抗血清及びエンテロウイルス抗血清を用いた中和試験により同定した。

4. ポリオウイルス分離株の塩基配列解析

分離株は、RNA抽出キット（QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN）を用いてウイルスRNAを抽出した。ポリオウイルスVP1領域について、UG1、UC11プライマーセットを用いてRT-PCRで増幅、得られたPCR産物をダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定、ワクチン株Sabin1、Sabin2及びSabin3の塩基配列と比較した。

C 研究結果

1. 下水流入水からの月毎のポリオウイルス分離状況

2010年4月から9月まで、30株のポリオウイルスが分離された（表1）。血清型別では1型が4株（北部地区浄化センター1株、南部地区浄

化センター3株）、2型が18株（北部地区13株、南部地区5株）及び3型が8株（北部地区5株、南部地区3株）分離された。北部地区浄化センター地域のポリオワクチン集団接種時期は4月から5月末であり、ポリオウイルスはワクチン接種時期から約2ヶ月の間に分離された。南部地区浄化センター地域のポリオワクチン集団接種時期は4月から9月であり、ポリオウイルスはワクチン接種期間中に分離された（図1）。これらのポリオウイルスのVP1領域について、ポリオウイルスワクチン株との変異を解析したところ、1型では1塩基置換以下、2型では2塩基置換以下、3型では4塩基置換以下であった。WHOによるVDPVの基準はVP1領域における1%以上の塩基置換であることからいずれの分離株もワクチン株であり、VDPVおよび野生株は分離されなかった。

2. 下水流入水からのエンテロウイルス分離状況

下水流入水から分離されたエンテロウイルスは、北部地区浄化センター下水流入水からはコクサッキーウイルスB3型が29株と最もよく分離され、それ以外にコクサッキーウイルスB1型及びB2型、アデノウイルス3型、5型及び41型、エコーウイルス3型、6型及び25型が分離された（表2）。南部地区浄化センター下水流入水からはコクサッキーウイルスB2型が29株と最もよく分離され、それ以外にコクサッキーウイルスB3型及びB4型、アデノウイルス1型及び5型、エコーウイルス6型が分離された。これらの99株は全てDDBJに登録した。

D 考察

福岡県で下水流入水から分離されたポリオウイルスはすべてワクチン株であり、分離時期はワクチン接種期間中及びその約2ヶ月以内であった。このことは将来OPVからIPV切替後に、

地域におけるワクチン株の消失確認に適応できる可能性がある。

両地区においてはワクチン接種時期（北部地区では春期、南部地区では春期から秋期）、ワクチン接種年齢（北部地区が約7,000人、南部地区が約4,000人）、下水道の普及状況（北部地区は都市部に隣接し下水道が普及しているのに対し、南部地区は下水道よりも浄化槽の普及率が高い）などに差が認められるが、ポリオウイルスの分離状況に大きな差は認められなかった。

また、両地区で分離されたエンテロウイルスの種類等は類似しており、コクサッキーウイルスがよく分離され、それ以外にもアデノウイルス、エコーウイルスが分離された。このことからこれらのウイルスが両地域の住民の間で流行していた可能性が推測された。

E 結論

下水流入水からのウイルス分離はポリオウイルス及びエンテロウイルス等の腸管系ウイルスの環境ウイルスサーベイランスとして有用であり、地域のヒト集団で顕性、不顕性感染として流行している可能性があるウイルスの状況を包括的に把握することが可能であることが示唆された。

G 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H 知的所有権の取得情報

なし

表1 月毎のポリオウイルス分離状況

	北部地区浄化センター						合計
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	
ポリオウイルス1型	0	1	0	0	0	0	1
ポリオウイルス2型	4	6	2	1	0	0	13
ポリオウイルス3型	0	2	1	1	1	0	5

	南部地区浄化センター						合計
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	
ポリオウイルス1型	0	3	0	0	0	0	3
ポリオウイルス2型	0	0	4	1	0	0	5
ポリオウイルス3型	1	0	0	2	0	0	3

合計	5	12	7	5	1	0	30

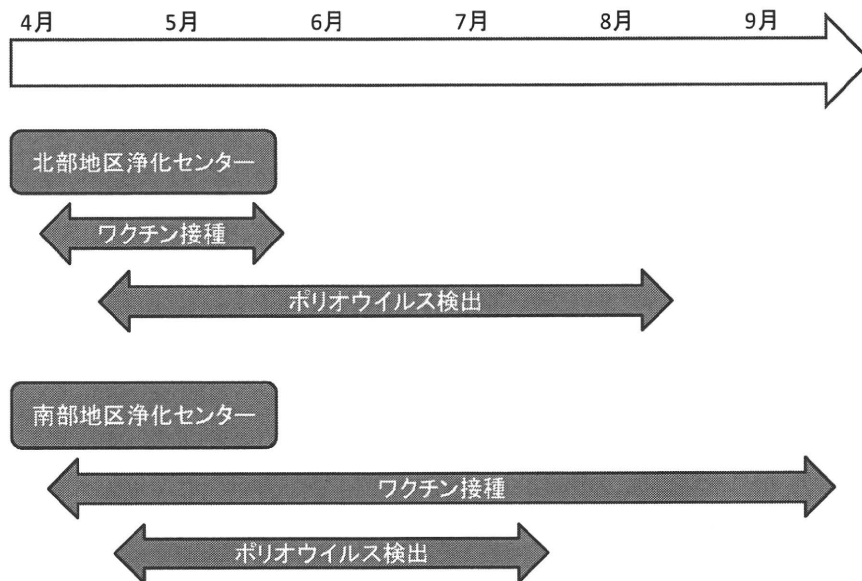


図1 ポリオワクチン接種時期とポリオウイルス分離時期の関連

表2 下水流入水からのウイルス分離状況

ウイルス名		浄化センター	
		北部地区	南部地区
コクサッキー ウイルス	B1型	5	0
	B2型	6	29
	B3型	29	3
	B4型	0	1
アデノウイルス	1型	0	1
	3型	1	0
	5型	7	4
	41型	8	0
エコーウイルス	3型	3	0
	6型	1	1
	25型	3	0
合計		63	39