

進化速度、及び分岐年代をベイズ法により解析し、クラスター内の共通祖先の分岐時間を推定した。2つのパラメーターセットを用いたクラスター分岐年代および進化速度を表1に示す。

山東省株はA, B, Cの3クラスターに分かれ、クラスターA、B、Cは各々2003年、1996年、1992年と推定された(図1)。またH22年度研究で2010年夏にE6は二つの系統に分かれていることを報告したが、これらの株はクラスターAとCに属し、系統1の共通祖先は2005年、系統2は2003であると推定した。

②2010年2地域で検出されたE11の分子疫学解析

E11はJinan, Linyiで各々22, 32株検出された。2地域の検出状況を図2に示す。

山東省で過去に分離されたE11株の塩基配列と比較解析の結果、山東省由来E11は1-4クラスターに分かれ、クラスター1にはJinan, Linyi株が属し、2010年に通年検出、クラスター4にはLinyi株が属し、4-8月に検出された(図3)。

D. 考察

①E6の分岐年代推定

2010年には無菌性髄膜炎等エンテロウイルス感染症の流行が観察されないのも関わらず下水中よりE6が多数分離され、流行を示唆。2005年と2003年を共通祖先に持つ二つの系統が2010年夏に検出されている。このことは5-7年の間、地域流行があった可能性を示唆する。

②2010年2地域で検出されたE11の分子疫学解析

クラスター1は通年両地域で検出されているが、クラスター4はLinyi限局的であっ

たため、E11の伝播様式が地域で異なっていたと考えられる。2010年にはE6と同様Jinan, Linyi市においてE11によるエンテロウイルス感染症と考えられる流行の報告はされていない。即ち不顕性感染でも異なった伝播像を示唆していることから、下水中のウイルスモニタリングは流行時のベースラインデータとして適応可能と考えられる。

E. 結論

①H22年度研究に引き続き、中国山東省Jinan市で検出された下水由来E6型の塩基配列と分離年代既知の配列を用い、分岐年代を推定した。即ち下水中に存在するウイルスゲノム配列を継時的定点モニタリングをすることでエンテロウイルスの伝播時期と流行期間を推定できることを示唆する。

②また新たに定点として追加したLinyi市とJinan市で検出されたE11の系統解析結果は、地域間で異なった伝播像を示した。監視を継続することにより流行時のベースラインデータとしての適応可能性を示唆する。

G. 論文発表

1) Tao Z, Wang H, Li Y, Xu A, Zhang Y, Song L, Yoshida H, Xu Q, Yang J, Zhang Y, Liu Y, Feng L, Xu W. Environmental surveillance and sequence analysis reveal co-circulation of two transmission chains of echovirus 6 in Jinan city, China. Applied and Environmental Microbiology, 77: 3786 - 3792. 2011.

4) Yang J, Cui N, Wang H, Tao Z, Liu Y, Zhang H, Yoshida H, Song Y, Zhang Y, Song L, Li Y, Lin X, Ji S, Xu W, Xu A. Evaluating the prevalence and molecular

epidemiology of echovirus 11 isolated
from sewage in Shandong Province, China
in 2010. *Virus Genes*. 2012 Feb 7. [Epub
ahead of print]

H. 知的財産権の出願登録状況

3. その他

表 1 2つのパラメーターセットを用いた E6 クラスターの分岐年代および進化速度

Parameter	Mean value of the parameter (95% HPD) as determined by:	
	HKY+UCLD+EG	GTR+UCLD+EG
t_{MRCA} cluster A	2,003.3 (2,001.2–2,005.2)	2,003.3 (2,001.3–2,005.3)
t_{MRCA} cluster B	1,996.9 (1,994.0–1,999.6)	1,996.8 (1,992.6–1,999.2)
t_{MRCA} cluster C	1,992.1 (1,989.1–1,994.7)	1,992.2 (1,989.4–1,994.9)
Root ht (t_{MRCA} global E6)	1,901.7 (1,873.6–1,928.1)	1,901.2 (1,873.5–1,928.1)
Mean evolutionary rate (10^{-3} substitutions/site/yr) ^a	7.047 (5.507–8.803)	7.351 (5.677–9.110)
Coefficient of variation	0.335 (0.209–0.465)	0.323 (0.192–0.455)

^a Rate of molecular evolution given as numbers of nucleotide substitutions per site per year.

図 1 山東省 E6 株の分岐時間推定

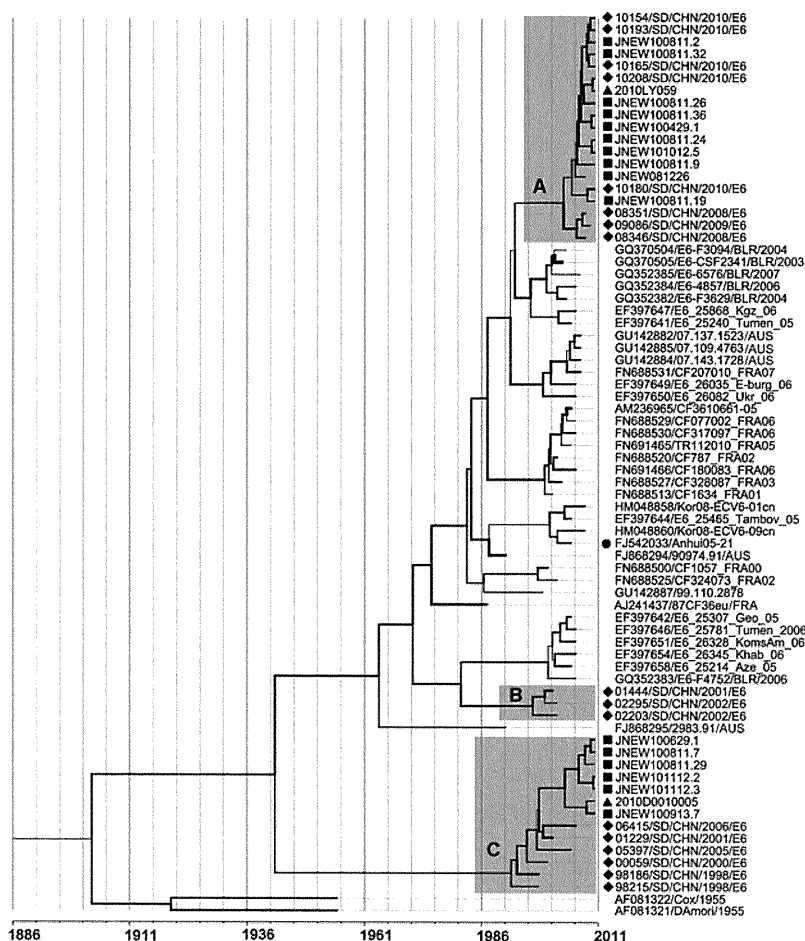


FIG. 3. MCMC tree of the VPI sequences of E6 isolates throughout the world visualized in FigTree. The width of a branch reflects the evolution rate of individual sequences and their reconstructed ancestors. E6 strains from Shandong segregated into three clusters (A, B, and C). A circle indicates an isolate from aseptic meningitis outbreak in the Anhui Province of China, squares indicate Shandong environmental isolates, diamonds indicate isolates from AFP surveillance in Shandong Province, and triangles indicate isolates from aseptic meningitis cases. Names of environmental isolates (JNEW prefix) are shown as described in the legend of Fig. 2. AUS, Australia; AZE, Azerbaijan; BLR, Belarus; CHN, China; FRA, France; GEO, Georgia; KEO, South Korea; KGZ, Kyrgyzstan; RUS, Russia; UKR, Ukraine; USA, the United States of America.

山東省分離株はクラスターA(分岐年推定 2003 年), B(1996 年)、C(1992 年)に分類された。横軸は分岐した年代を示す。

図2 2010年の二つの地域におけるE11の分離月

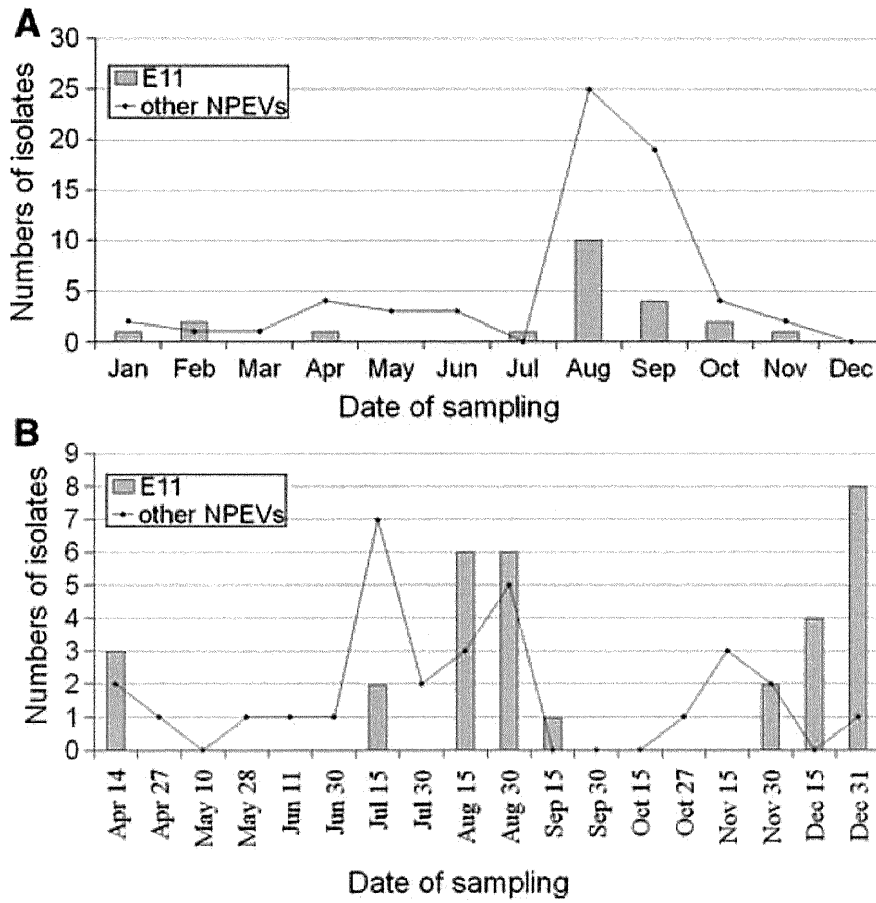
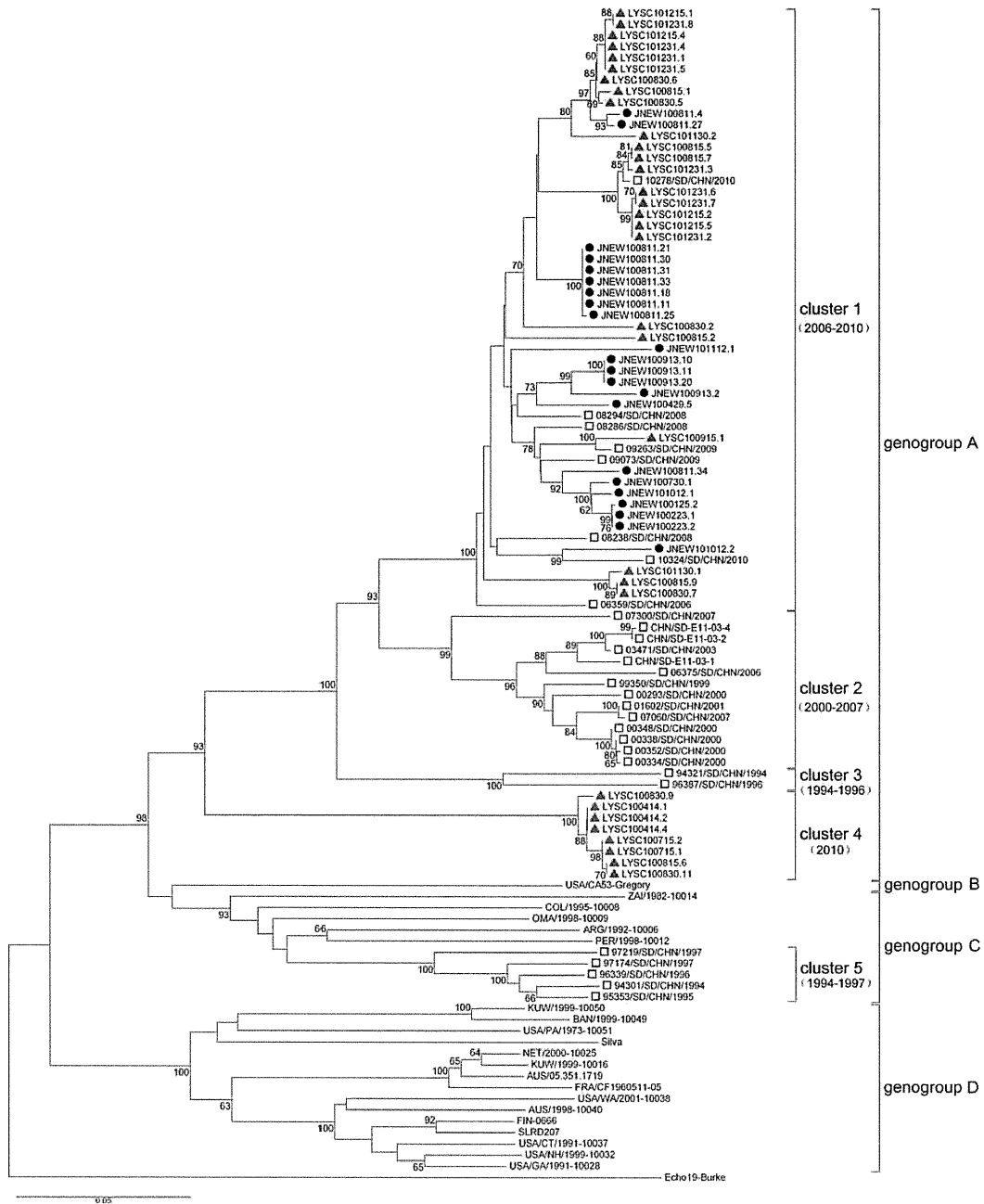


Fig. 1 Monthly distribution of echovirus 11 and other NPEV isolates from sewage collected in Jinan (a) and Linyi (b) sewage treatment plants in 2010

AはJinan、BはLinyi市で検出されたE11を示す。縦軸は分離数。横軸は採水月

図3 山東省 E11 分離株の分子系統樹



図中▲は Linyi 分離株、●は Jinan 分離株を示す。クラスター4 は Linyi のみで検出。クラスター1 は Linyi と Jinan で検出された。

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」
研究報告書

下水流入水中の腸管系ウイルス検出状況（2011年次）および
下水中のウイルス濃縮方法の検討

研究分担者 板持（岩井）雅恵 富山県衛生研究所ウイルス部

研究要旨

富山県における腸管系ウイルス流行状況やポリオウイルス野生株の伝播を監視するために、下水流入水中の腸管系ウイルス検出状況を調査した。2011年次は、19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 Oral poliovirus vaccine (OPV) -like poliovirus であった。ヒトエンテロウイルス B 群 (HEV-B) ではエコーウイルス 3 型の検出頻度が高かった。

また、下水流入水中のウイルス濃縮方法を検討するために、2006年から2010年にかけて採取した下水検体を「フィルター吸着溶出法」及び「PEG沈殿法」により濃縮し、ポリオウイルス、HEV-B、レオウイルス、アデノウイルス分離株数、ノロウイルス、サポウイルス検出件数を比較した。その結果、ノロウイルスやサポウイルスでは、濃縮方法の違いによる検出件数の差は比較的小さかった（1.1～1.3倍）が、すべてのウイルスで「フィルター吸着溶出法」の方が「PEG沈殿法」よりもウイルス分離株数や検出件数が多かった（1.1～3.1倍）。

A. 研究目的

環境中のウイルス汚染状況を把握するために、河川水や下水等の環境水中のウイルス調査が世界各地で行われている。特に、ポリオウイルスは、不顕性感染例が多く、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を監視するために、急性弛緩性麻痺患者の調査 (AFP サーベイ

ランス) とともに環境水調査が実施されている。

我々は、これまでの調査で、ポリオウイルスはワクチン集団接種時期に、エンテロウイルス等の腸管系ウイルスは地域住民における感染状況に応じて、各々下水流入水から検出されることを報告してきた。

本調査では、富山県における腸管系ウイルス流行状況や、ポリオウイルス野生株の伝播を監視するために、毎月 1 回下水流入

水のウイルス調査を行い、腸管系ウイルスの検出状況を調べるとともに、分離されたポリオウイルスの性状解析を行い、それらがワクチン株であることを確認した。

下水中のウイルスの濃縮方法については、ウイルス添加実験において「フィルター吸着溶出法」によるウイルス検出率が「PEG沈殿法」よりも高いことをこれまで報告してきた。今回、2006年から2010年までに採取された下水流入水を対象に、濃縮方法別のウイルス検出頻度を比較したので、あわせて報告する。

B. 研究方法

1. 調査期間及び調査地点

2006年7月から2011年12月まで、富山県内西部地区に位置する下水処理場（分流式）において、月1回下水流入水を採取した。

2. 下水サンプルの濃縮

約2Lの下水流入水を、4°Cで3000rpm、30分間遠心し上清を回収後、「フィルター吸着溶出法」及び「ポリエチレングリコール（PEG）沈殿法」（Iwai M. et al. *Appl Environ Microbiol.* 2009, 75, 1264-1270）により濃縮した。即ち、「フィルター吸着溶出法」では、下水流入水遠心上清1Lに、最終濃度0.05Mとなるように塩化マグネシウムを添加し、0.5Nの塩酸を用いてpH3.5に調整した。この液を陰電荷膜に濾過吸着させた後、陰電荷膜を3% Beef Extract液10mLに浸漬し、ボルテックスミキサーによりウイルスを溶出した。溶出液をポアサイズ0.45µmのフィルターで濾過し、得られた濾液を100倍濃縮下水検体とした。

「PEG沈殿法」では、下水流入水遠心上清1Lから250倍濃縮下水検体4mLを調整した。

3. ウイルス検出同定

濃縮下水検体を培養細胞（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、レオウイルス、及びアデノウイルス抗血清（国立感染症研究所より分与、自家製、またはデンカ生研）を用いた中和試験により同定した。

4. PCR、及び塩基配列解析

RNA抽出キット（QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN）を用いて下水流入水、及びポリオウイルス分離株からRNAを抽出した。抽出RNAにランダムヘキサマー、及びSuper Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen)を加え、cDNAを作製後、ExTaq (TaKaRa)を用いてPCRを行った。プライマーは、ノロウイルス Genogroup I (GI) 用に、GI-SKF、及びGI-SKR、ノロウイルス GII 用に、GII-SKF、及びGII-SKR (Kojima S. et al. *J. Virol. Methods.* 2002, 100, 107-114)を、サポウイルス用に、SV-F11、及びSV-R1 (Okada M. et al. *Arch. Virol.*, 2002, 147, 1445-1451)を、ポリオウイルス用に、UG1、及びUC11 (Balanant, J. et al. *Virology*, 1991, 184, 645-654., Rico-Hesse, R. et al. *Virology*, 1987, 160, 311-322)を用いた。PCR産物は、ダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定した。ポリオウイルス分離株の塩基配列は、ワクチン株 Sabin1、Sabin2、Sabin3の塩基配列（GenBank アクセス番号はそれぞれ AY184219、

あるが、分離培養法と PCR 法の検出方法の違いが一因かもしれず、今後、検討していきたい。

D. 結論

富山県における腸管系ウイルス流行状況やポリオウイルス野生株の伝播を監視するために、毎月 1 回下水流入水の腸管系ウイルス調査を行った。20011 年は 19 株の OPV-like poliovirus が検出された。

また、「フィルター吸着溶出法」と「PEG 沈殿法」の下水濃縮方法別のウイルス検出率を検討した。ノロウイルスやサポウイルスでは、濃縮方法の違いによる検出件数の差は比較的小さかった (1.1~1.3 倍) が、ポリオウイルス、HEV-B、レオウイルス、アデノウイルスで、「フィルター吸着溶出法」の方が「PEG 沈殿法」よりもウイルス分離株数や検出件数が多かった (1.1~3.1 倍)。

E. 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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwai M, Horimoto E, Obara M, Obuchi M, Kurata T, Kawagoshi K, Nakamura S,

Shimizu H, Yoshida H, Takizawa T: Endemic transmission of echovirus 30 in Toyama, Japan in 2010 is verified by environmental surveillance. *Jpn J Infect Dis* 64: 165-167, 2011

2. 岩井雅恵、堀元栄詞、小原真弓、馬淵俊輔、高田厚史、南部厚子、川越久美子、嶋尻悟志、関口健治、滝澤剛則：ポリオ流行予測調査 (平成 22 年度)。富山県衛生研究所年報 34: 62-64, 2011

3. 岩井雅恵、吉田弘、小原真弓、堀元栄詞、倉田毅、滝澤剛則：新規リアルタイム PCR による下水流入水中のワクチン様のポリオウイルスの検出。富山県衛生研究所年報 34: 80-87, 2011

2. 学会発表

Iwai M, Yoshida H, Obara M, Horimoto E, Obuchi M, Kurata T, Takizawa T: Efficient elimination of polioviruses in sewage water after activated sludge process, evaluated by cell culture and newly developed real-time PCR. XV International Congress of Virology (第 59 回日本ウイルス学会)。札幌市、2011 年 9 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

AY184220、AY082683) と比較した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者(ヒト)は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果及び考察

1. 2011年の下水流入水からの腸管系ウイルス検出状況

ポリオウイルス

5月、6月、10～12月に計19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6株、2型が6株、3型が7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、春期が5月6日～25日、秋期が9月14日～10月6日であり、ポリオウイルスはすべてワクチン接種時期から約2ヶ月の間に検出された。これらの分離株のVP1領域(1型906塩基、2型903塩基、3型900塩基)の塩基配列のワクチン株との差異は、0～0.44%であった(表2)。いずれも1%未満の差であるため、WHOの基準によりOPV-like poliovirusと判定された。野生株やVDPVは検出されなかった。これらのことから、富山県における野生株やVDPVの伝播の可能性は低いと考えられた。

ヒトエンテロウイルスB群(HEV-B)

年間を通してエコーウイルス3型が高頻度に分離された(表1)。エコーウイルス3型の下水流入水からの分離は2010年9月から2011年12月現在まで続いている。エコーウイルス3型は、2011年の感染症発生动向調査において、県内の小児の感染性胃腸炎や手足口病患者の便からも検出されて

いるが、無菌性髄膜炎の患者からは検出されていない。エコーウイルス3型による感染症は、比較的軽症例が多かったことが推測された。

2. 下水中のウイルス濃縮方法の検討

図1に、2006年から2010年に毎月1回採取された下水流入水を、「フィルター吸着溶出法」及び「PEG沈殿法」により濃縮した検体のウイルス分離株数、及びウイルス検出件数を示す。

濃縮下水検体各54件について、24wellプレートを用いてVero、MA104、RD-18S、HEp-2、L20B細胞の計426穴に接種したところ、「フィルター吸着溶出法」では、ポリオウイルス33株、HEV-B79株、レオウイルス55株、アデノウイルス34株が分離された。ノロウイルスGI、GII、サポウイルスはそれぞれ40件、41件、27件の濃縮下水検体からPCR法により検出された。一方、「PEG沈殿法」では、ポリオウイルス19株、HEV-B36株、レオウイルス24株、アデノウイルス11株が分離された。ノロウイルスGI、GII、サポウイルスはそれぞれ32件、37件、22件の濃縮下水検体から検出された。

いずれも「フィルター吸着溶出法」の方が「PEG沈殿法」よりも分離株数や検出件数が多かった。しかしながら、ポリオウイルス、HEV-B、レオウイルス、アデノウイルスでは、それぞれ1.7倍、2.2倍、2.3倍、3.1倍と差が大きかったのに対し、ノロウイルスGI、GII、サポウイルスでは、それぞれ1.3倍、1.1倍、1.2倍と、濃縮方法の違いによる検出件数の差が比較的小さかった。ウイルスの違いにより、濃縮方法別の分離株数や検出件数に差が生じた原因は不明で

表 1. 富山県内の下水流入水からの腸管系ウイルス検出状況

ウイルス	2011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
ポリオ 1型					2	4						
2型						5						
3型										4	2	1
HEV-B CoxB1											1	
CoxB2								1				
CoxB4	5	7	5	1			1			1		
CoxB5	3		2							5		1
Echo1					2							
Echo3	10	8	7		6	10	12	13	11	8	1	1
Echo6											5	5
レオ 1型								5				
2型			3						1	2		
アデノ 1型					2							
2型	2										8	
ノロ GI/1												
GI/2												
GI/4												
GI/7												
GI/12												
GII/2												
GII/4												
GII/12												
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		
株名	ワクチン株との差異		株名	ワクチン株との差異	
	VP1(906nt)	VP1(302aa)		VP1(900nt)	VP1(300aa)
Fu/May-4/11	0%		Fu/Oct-10/11	0%	
Fu/May-7/11	0.11%		Fu/Oct-12/11	0%	
Fu/Jun-10/11	0.44%	1(A190T)	Fu/Oct-16/11	0%	
Fu/Jun-15/11	0.44%	2(T106A, L224V)	Fu/Oct-18/11	0%	
Fu/Jun-17/11	0.11%		Fu/Nov-4/11	0%	
Fu/Jun-18/11	0.11%	1(T106A)	Fu/Nov-10/11	0.22%	
			Fu/Dec-8/11	0%	
Type 2					
株名	ワクチン株との差異				
	VP1(903nt)	VP1(301aa)			
Fu/Jun-11/11	0.33%	1(I143T)			
Fu/Jun-13/11	0.33%	1(I143T)			
Fu/Jun-14/11	0.44%	2(I143T, K169R)			
Fu/Jun-16/11	0.22%	1(I143T)			
Fu/Jun-19/11	0.22%	1(I143T)			
Fu/Nov-11/11	0.33%	1(I143T)			

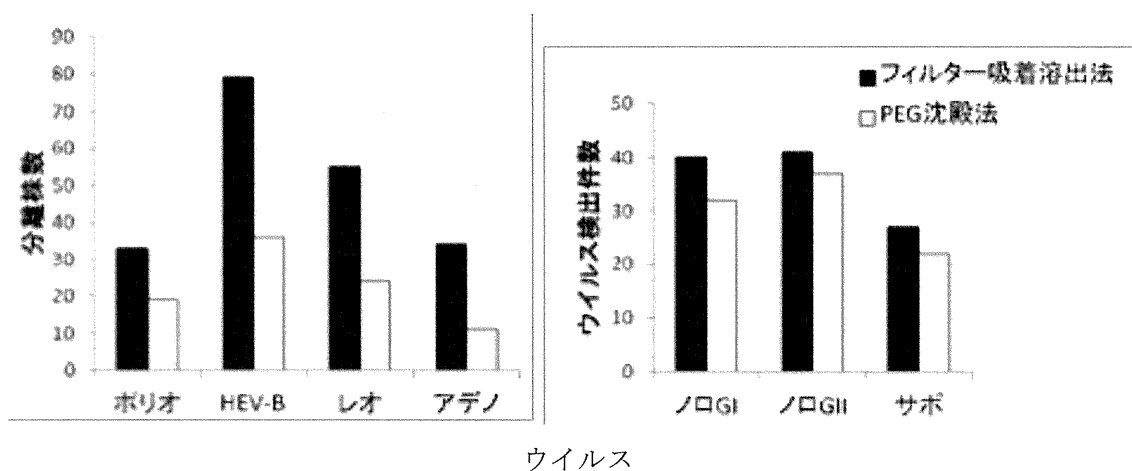


図1. 「フィルター吸着溶出法」及び「PEG沈殿法」による濃縮下水検体からのウイルス分離株数及びウイルス検出件数（2006年7月～2010年12月）

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」

下水から検出されるアイチウイルスの遺伝子型別と消長

分担研究者 清水 博之 国立感染症研究所
研究協力者 山下 照夫、廣瀬 絵美、安達 啓一、伊藤 雅、平松礼司、皆川 洋子
愛知県衛生研究所

研究要旨 VP1 領域に設定したプライマーを用いた RT-PCR 法により、5 年間で下水 274 件中 158 件 (57.7%) からアイチウイルス (AiV) 遺伝子が検出された。A 型は 130 件 (47.4%)、B 型は 30 件 (10.9%)、C 型は 0 件であった。A 型は秋から冬に比較的高率に検出されたが、B 型は年間を通じほぼ一定の検出率であった。系統樹解析によると、A 型は 2 つのクラスターに分かれ毎年検出された。B 型は 1 例を除き 1 つのクラスターを形成した。犬由来のコブウイルスは 11 件から検出されたが、これらは 2 つのクラスターに分かれ、米国で報告されたものとも異なるクラスターを形成した。多様な AiV が流行するとともに、犬由来のコブウイルスが我が国に常在する事が明らかとなった。

A. 研究目的

アイチウイルス (AiV) はピコルナウイルス科コブウイルス属に属し、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。胃腸炎の起因ウイルスと考えられるが小児患者からの検出は少数に留まる。一方、下水中の AiV 遺伝子を調べると高率に検出される事が知られている。今回、VP1 領域に AiV 特異的プライマーを設計し RT-PCR にて下水中の AiV 遺伝子検出と遺伝子型とその消長を調べた。また、2011 年に米国にてイヌ由来のコブウイルス (CKV) が報告され、AiV と近縁である事が判明した。われわれの調べた下水からも CKV 由来の遺伝子が検出されたので概要を報告する。

B. 研究方法

2006 年 6 月～2011 年 9 月の 5 年間に毎週採取された、流入下水 274 件を材料とした。4,500rpm、20 分間遠心した上清にポリエチレングリコール 6,000 を 8%の割合で加え 4℃で一晩静置した。4,500rpm、20 分間遠

心した沈さに精製水を加え 10 倍濃縮液とした。この液から RNA 精製キット (High Pure Viral RNA Kit; Roche) を用いて核酸抽出した。VP1 領域に AiV 特異的プライマー KBP1P (+): 5' -CAG CCM CGC ACC ACY TTC SAS TAC-3' と KBVP1N' (-): 5' -GAA GTA KGA RGT GGG RAT RGC WGA-3' を用いて One step RT-PCR (SuperScript OneStep RT-PCR, Invitrogen) を実施した。2nd PCR は (KBVP1-5(+): 5' -CAC CTT TGA GTA CAC CGA RAA-3' と KBP1N' を用いて PCR (Ex Tqa, Takara) を実施した。2nd PCR 陽性産物 (397 塩基) は pGEM-T ベクター (Promega) に組み込み塩基配列を決定した。

C. 研究結果

VP1 領域に設定したプライマーを用いた RT-PCR 法により、274 件中 158 件 (57.7%) から AiV 遺伝子が検出された。遺伝子型の内訳は A 型 130 件 (47.4%)、B 型 30 件 (10.9%)、C 型 0 件であった (表 1)。いずれの検体もウイルス分離は陰性であった。A 型は毎年検出されたが、B 型は 2006 年～

2007 年の 81 件からは検出されなかった。月別の検出率を図 1 に示した。A 型は秋から冬に比較的高率に検出されたが、B 型は年間を通じほぼ一定の検出率であった。VP1 領域の PCR 産物の塩基配列を調べ、95%以上の相同性を示すグループ毎に分けて系統樹解析を実施して結果を図 2 に示した。A 型は 2 つのクラスターに分かれたが、標準株に近いグループの 10-C24-1 や 10-C11-2 及びそれらとは異なるグループの 11-D7-1 は毎年検出されたが他は全て 1 例のみの検出数であった。B 型は 1 例を除き同一クラスターに属したが 3 年間検出されたのは 08-G27-2 の 1 グループのみで、他は各々 1~2 例の検出数であった (図 3)。

CKV 由来の遺伝子が 11 例 (4.0%) から検出された (表 2)。遺伝子解析の結果、米国で報告された株の配列と 88%の相同性があった。系統樹解析の結果、これらは 2 つのクラスターに分かれ、米国で報告されたものと異なるクラスターを形成した (図 4)。

D. 考察

AiV 遺伝子が 6 年間に亘り流入下水から高率に検出された事から、AiV が我々の間で常に感染を繰り返している事が改めて確認された。我が国の患者から検出される AiV は殆どが A 型で、B 型は東南アジア諸国の患者や旅行者から検出される事が報告されている。今回、我々が検出した B 型遺伝子も 1 クラスターを形成したが、相同性の特に高い 1 グループを除き 1~2 例と少数しか検出さない配列が多く、A 型と比較して検出率に季節変動がない事から海外から持ち込まれた AiV 由来の可能性が高い。このことは、流入下水を調べる事で、海外から侵入する腸管系ウイルスも検出する可能性を示唆している。

CKV は 2010 年に米国で胃腸炎のイヌから検出され、2011 年に報告されたものである。同時期に下水から検出された我々のものと

は塩基配列が異なる事から、今回下水から検出された CKV は、日本国内で流行しているウイルスと考えられた。下水中からイヌ由来のウイルスが検出された理由として、飼い主が散歩中に回収した愛犬の糞便を自宅のトイレで処分した結果と考えられる。CKV は人の AiV がイヌに感染して広まっていたと考えられており、人への感染も否定されていない。CKV の分離報告はないので、今後ウイルス分離を試みるとともに、人の関わりの有無について調べて行きたい。

E. 結論

流入下水から AiV が高率に検出された。殆どが A 型で秋から冬はさらに高率となる。海外から持ち込まれたと予想される AiV も検出された。少数であるがイヌ由来の AiV (CKV) も検出された。日本のイヌにも CKV が流行していると思われる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

山下照夫、「第 5 章消化器症候群 5. アイチウイルス」の項を担当、ウイルス感染症の検査・診断スタンダード、143-145、東京、羊土社、2011

2. 学会発表

Teruo Yamashita, Emi Mizutani, Hirokazu Adachi, Miyabi Ito, Akira Fujiura, and Hiroko Minagawa : Detection and Nucleotide Sequence Analysis of New Aichi Virus in Wastewater Samples, IUMS 2011, Sapporo, Sept 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

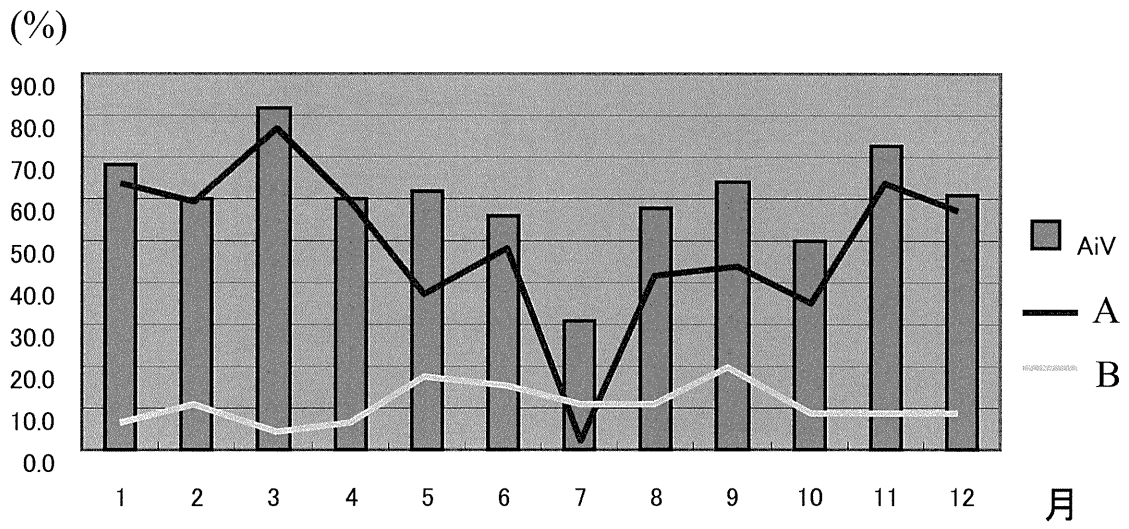


図1. 流入下水における月別アイチウイルス検出率

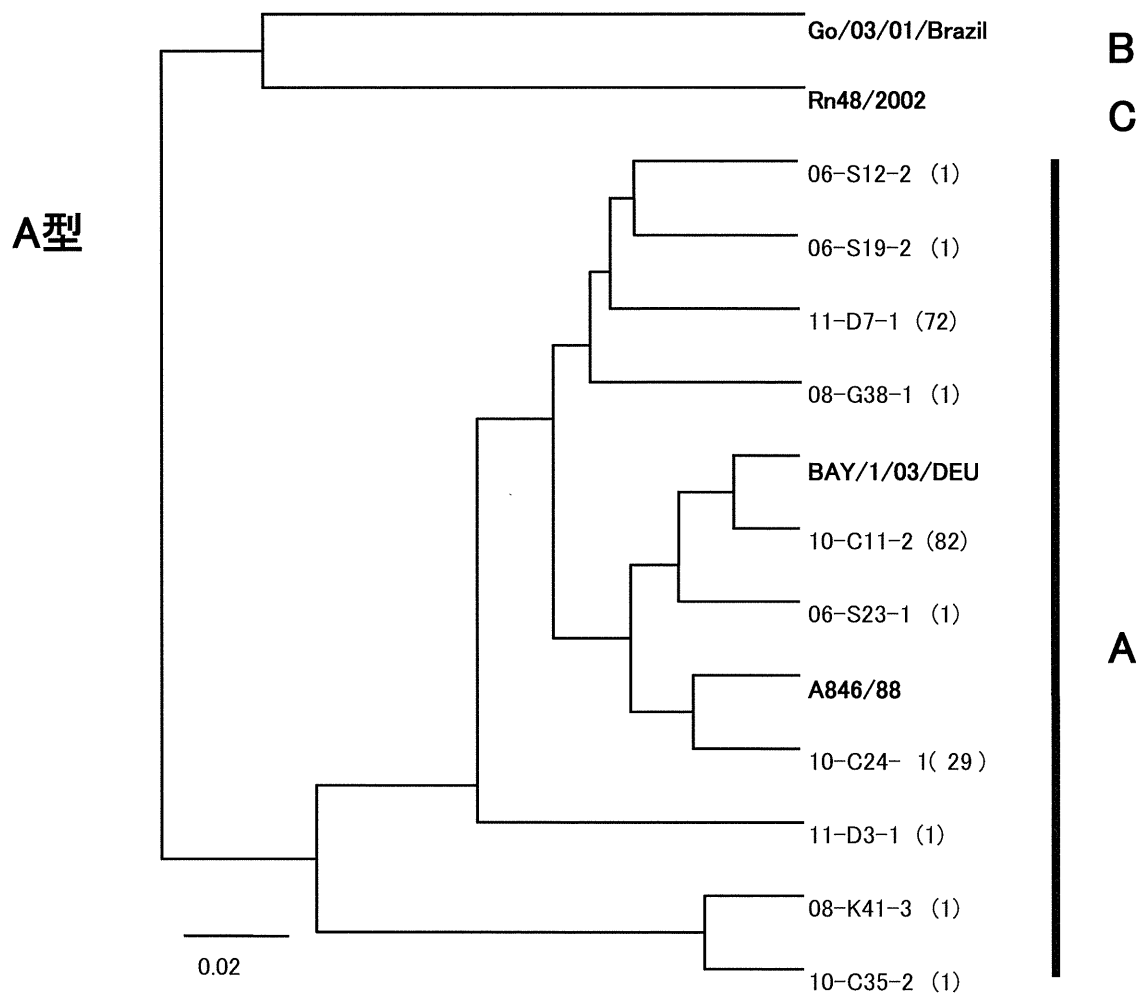


図2. 下水から検出されたA型アイチウイルスのVP1遺伝子の系統樹解析
 注：標準株を太字出示した。〈〉内の数字は検出件数。

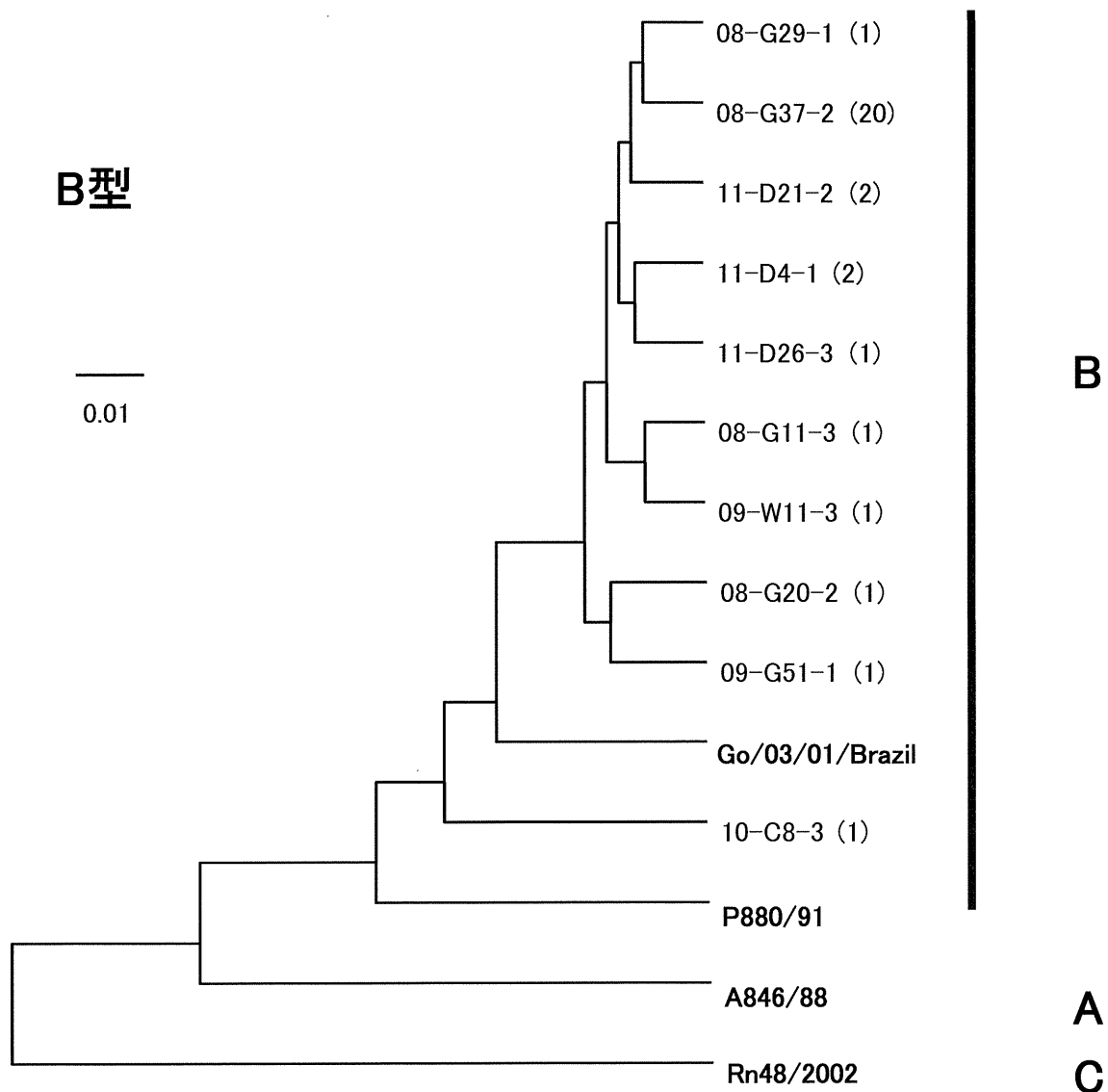


図3. 下水から検出されたB型アイチウイルスのVP1遺伝子の系統樹解析
 注：標準株を太字出示した。〈〉内の数字は検出件数。

Canine Kobuvirus

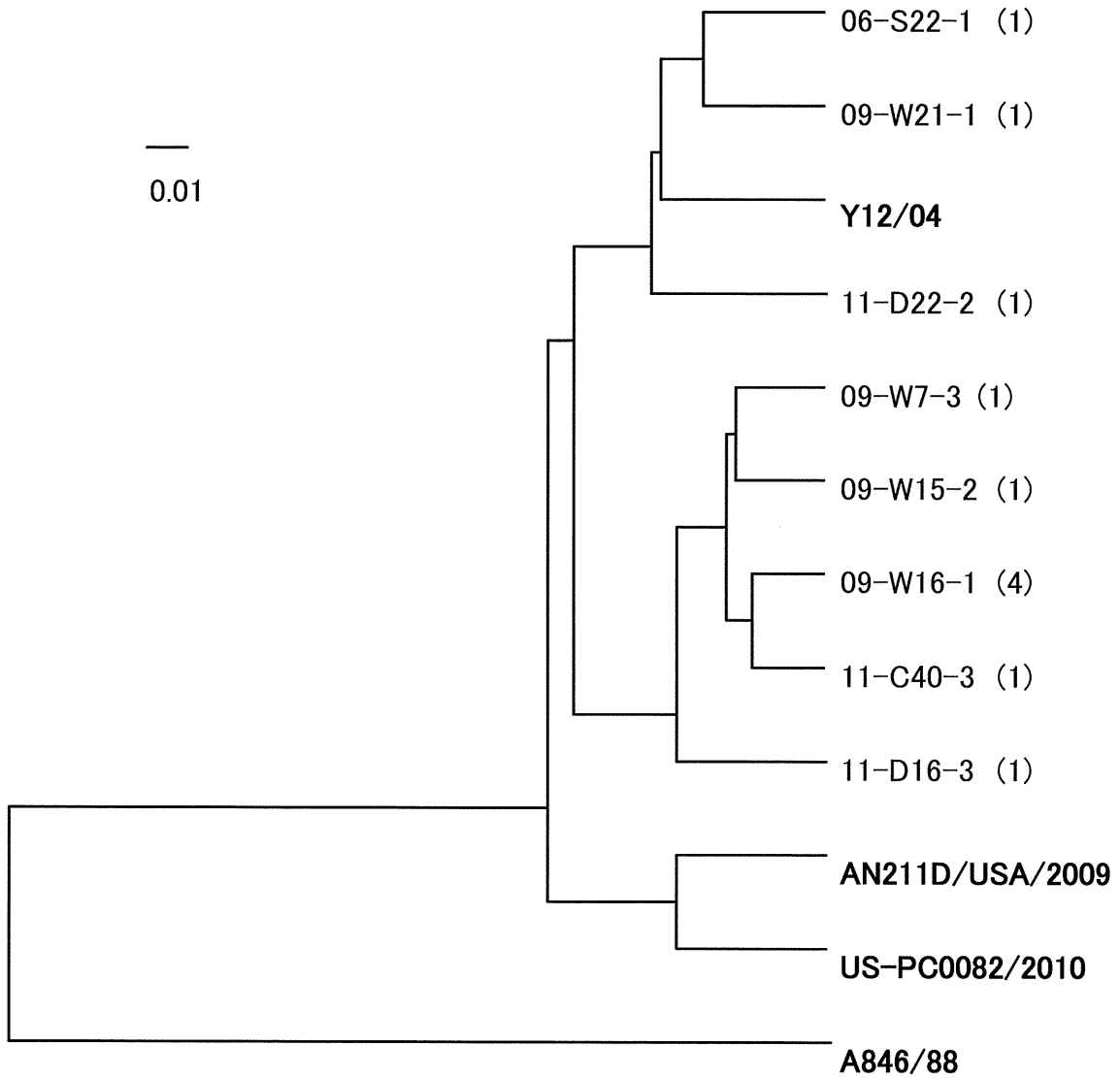


図4. 下水から検出されたイヌコブウイルスのVP1 遺伝子の系統樹解析

注：米国由来標準株を太字で示した。〈〉内の数字は検出件数。A846/88：アイチウイルス標準株。

表1. 流入下水からのアイチウイルス VP1 遺伝子の検出成績

年	検体数	陽性数	遺伝子型検出数	
			A	B
2006	30	17	17	0
2007	51	34	34	0
2008	53	27	18	10
2009	51	37	27	12
2010	51	19	18	2
2011	38	24	16	6
Total(%)	274	158(57.7)	130(47.4)	30(10.9)

表2. 流入下水からのイヌコブウイルス (CKV) VP1 遺伝子の検出成績

年	検体数	CKV
2006	30	0
2007	51	0
2008	53	1
2009	51	7
2010	51	0
2011	38	3
Total (%)	274	11(4.0)

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）
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、前田詠里子、吉富秀亮 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

ポリオウイルスは、福岡県内の北部及び南部地区浄化センターの流入水から、ポリオワクチン接種時期及びその3ヶ月後まで分離された。分離されたポリオウイルスはVP1領域の塩基配列についてポリオウイルスワクチン株との変異率を解析した結果、全てワクチン株であった。ポリオウイルスの分離頻度は北部地区の方がやや高く、南部地区が低い傾向にあった。これは、ポリオワクチン接種対象者数、下水道普及率の差などがその要因のひとつと考えられた。

両地区浄化センター流入水におけるエンテロウイルス（ポリオウイルスを除く）は平成22年度と同様に、コクサッキーウイルスB群、エコーウイルスが主として分離され、分離頻度は両地区浄化センターの一日あたりの処理量が大きく異なるにもかかわらず、ほとんど変わらなかった。このことはエンテロウイルスを対象とした環境ウイルスサーベイランスが、都市部と地方部のいずれにおいても適用可能であることを示唆している。

A 研究目的

日本においては長年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）からの輸入症例等に留意する必要がある。ポリオウイルス等のエンテロウイルスは不顕性感染にとどまり、症状を呈さないことが多いことが知られている。このため、世界保健機関は2010年～2012年のポリオ根絶計画において、顕性あるいは不顕性にかかわらず、地域に流行しているエンテロウイルスを効率的に分離できる方法として、糞便中に排泄されるエンテロウイルスが流れ込む下水流入水

を濃縮して検出する環境ウイルスサーベイランスの導入を推奨している。

当所は平成22年度よりこの環境ウイルスサーベイランスを導入し、毎月1回、2箇所の北部及び南部地区浄化センターにおいて下水流入水を採取し、エンテロウイルスの流行状況について調査を実施した。

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

平成22年4月から平成23年9月まで、毎月1回、福岡県北部地区及び南部地区の浄化セン

ターにおいて、下水流入水（2L）を採取した。

2. 下水流入水ウイルスの濃縮

約 1L の下水流入水を、4°Cで 3,000rpm、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、陰電荷フィルターにウイルスを吸着させ、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

この濃縮液をウイルスに対する感受性の異なる 7 種類の培養細胞 (Vero, FL, RD18s, HEp-2, LLC-MK2, L20B 及び MDCK) に 0.1ml 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

ポリオウイルス分離株は、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 研究結果及び考察

1. ポリオウイルスの分離状況（時系列）

ポリオウイルスは、北部及び南部地区浄化センター流入水において、いずれも対象自治体におけるポリオワクチン接種時期（ポリオワクチン接種時期は北部地区が春期と秋期、南部地区が春期、秋期及び一部で通年）から 3 ヶ月後まで分離された。この傾向は既に富山県衛生研究所が示したデータ (IASR, Vol. 30, p. 180-181、

2009 年 7 月号) と同様であり、ポリオウイルスの環境における消長は地域が異なっても似ていることを示唆していると考えられる。

今回分離されたポリオウイルスの VP1 領域の塩基配列について、ポリオウイルスワクチン株との変異率を解析したところ、1 型及び 3 型では 1%未満、2 型では 0.5%未満であり、全てワクチン株であった。今後も下水流入水から分離されるポリオウイルスの変異について調査していく必要がある。

2. ポリオウイルスの分離状況（地域間相違）

両地区浄化センター流入水におけるポリオウイルスの分離頻度は北部地区がやや高く、南部地区が低い傾向にあった。これは、①北部地区の方が南部地区より接種対象者数が多いこと（総人口は北部地区が約 19 万人、南部地区が約 18 万人、2 歳以下の人口は北部地区が約 7,000 人（総人口の 3.7%）、南部地区が約 4,000 人（総人口の 2.4%））、②下水道普及率（北部地区が 54-99%、南部地区が 25%以下）が異なること、などがその要因のひとつと考えられた。特に南部地区は下水道普及率が低いため、接種を受けた子供から排泄されたポリオウイルスが、下水ではなく、家庭用の浄化槽などの処理設備に流れ込んでいると考えられた。

また、平成 23 年度のポリオウイルスの分離数が平成 22 年度と比較して低くなったが、今後も継続して調査していく必要があると思われる。

3. エンテロウイルス（エンテロウイルスを除く）の分離状況

両地区浄化センター流入水におけるエンテロウイルスは平成 22 年度と同様に、コクサッキーウイルス B 群及びエコーウイルスが主とし