

Lineage 1 に属する株 (151 株) を用いて進化速度、及び分岐年代をベイズ法により解析し、1a, 1b の分岐時間を計算したところ、2010 年 12 月と推定された。即ち 1a の共通祖先は 2010 年 8 月から 12 月頃に、Jinan 地区から Linyi 地区に伝播したものと考えられる (図 2)。

D. 考察

環境ウイルスサーベイランス手法の特徴は顕性、不顕性に関わらず 10 万人当たり数人の感染者を把握可能なことであり、しかも下水定点を設置することで、分離時期が明確な株を入手可能である。またエンテロウイルスは糞便中に 1-3 カ月排泄されることを考慮すると、症例報告に基づくサーベイランスに比べ、ヒト集団に循環する長期間ウイルスの追跡が可能である。

本研究は 2 地区の定点から検出した株の塩基配列情報をもとに、祖先配列の推定、伝播時期、伝播様式の推定を試みた。その結果、伝播時期について推定可能なことを示した。

環境水濃縮物を細胞接種後、増殖の遅い HEV-A, C 群等は HEV-B 群の選択圧の影響を受け分離困難であるため、HEV-B が検出されやすい傾向にある。従ってヒト集団に存在しているウイルス集団の全体を反映しているわけではないことに留意する必要がある。

こうした欠点にもかかわらず長期間の定点観測を行うことで、様々なエンテロウイルスの伝播時期を推定可能性を示唆している。このことは他の腸管系ウイルスにも適応可能性かもしれない。

E. 結論

中国山東省 Jinan 地区、Linyi 地区で 2010-2011 年に検出された下水由来 E6 型分離株の塩基配列を用いて、共通祖先配列の推定、及び伝播時期の推定を試みた。その結果 2010 年 8 月から 12 月の間に、Jinan 地区から Linyi 地区にウイルスの伝播が起こったことが推定された。このように分離時期が明確なウイルス塩基配列を用い、分子進化的解析 (ベイズ推定) を行うことで、環境ウイルスサーベイランスは腸管系ウイルスの伝播解析に貢献する可能性を示唆している。

G. 研究発表

論文発表

1. Tao Z, Song Y, Wang H, Zhang Y, Yoshida H, Ji S, Xu A, Song L, Liu Y, Cui N, Ji F, Li Y, Chen P, Xu W. Intercity Spread of Echovirus 6 in Shandong Province, China: Application of Environmental Surveillance in Tracing Circulating Enteroviruses. *Appl Environ Microbiol.* 78 (19) ; 6946-6953, 2012

2. Li, Y., Yoshida, H., Wang, L., Tao, Z., Wang, H., Lin, X., Xu, A., An optimized method for elution of enteroviral RNA from a cellulose-based substrate, *Journal of Virological Methods* 186 (1-2) : 62-67, 2012.

学会発表

1. 中村 朋史、吉富 秀亮、石橋 哲也、前田 詠里子、世良 暢之、吉田 弘 下水流入水からのエンテロウイルス分離 第 60 回日本ウイルス学会 大阪市、2012 年 11 月

H. 知的財産権の出願登録状況

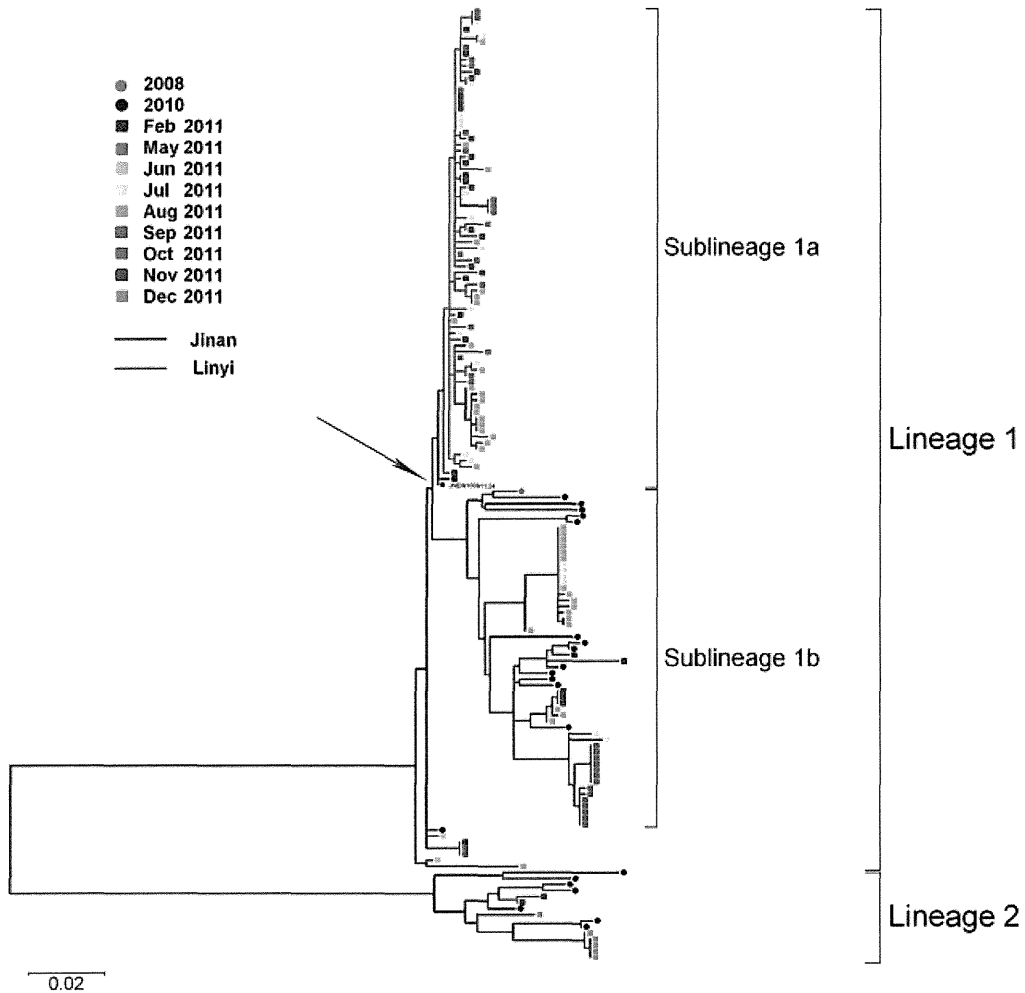
なし

<http://sd.people.com.cn/n/2012/0405/c217073-16910376.html>

3. その他

山東省との共同研究は人民報オンライン版でも紹介された。

図1 山東省 E6 株の分子系統解析



Lineage1 は更に 1a と 1b に分類される。1a、1b には Jinan、Linyi 分離株が含まれている。2010-11 年の両地域の配列解析より、1a の共通の祖先配列が 2010 年の Jinan 流行株にみいだされた。

図 2

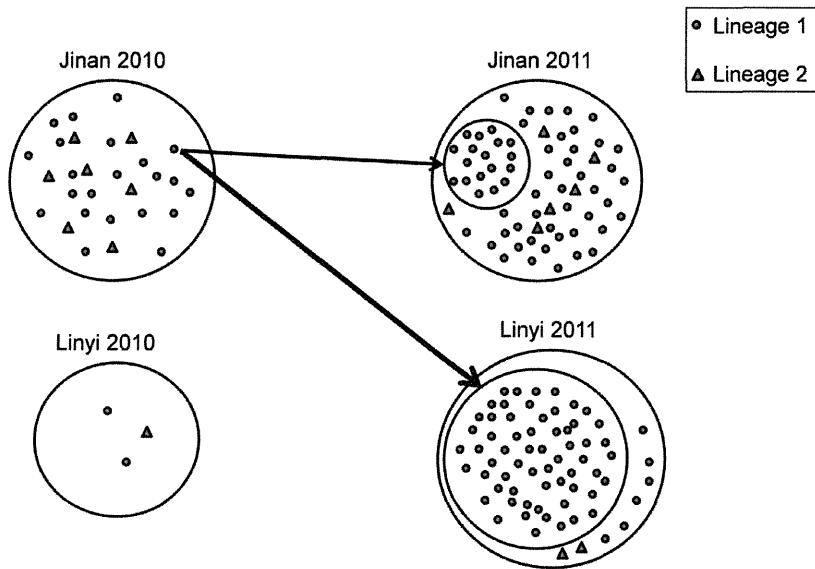


図 1 を模式的に表した。2010 年には Jinan, Linyi とも分離頻度は少ないながらも、Lineage 1, 2 とも存在している。2011 年には両地域の E6 分離頻度が大きくなり、Lineage 1 に属する Jinan 由来株が 2010 年 8 月から 12 月頃、Linyi 地区に入り込み、2011 年に伝播拡大している様子を示す。

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

富山県における下水流入水からの腸管系ウイルス検出（平成 19～24 年）

研究分担者 滝澤剛則、富山県衛生研究所ウイルス部
研究協力者 板持（岩井）雅恵、嶋 一世、富山県衛生研究所ウイルス部

富山県におけるエンテロウイルス流行状況を把握するために、フィルター吸着溶出法を用いて毎月 1 回下水流入水のウイルス調査を行った。下水からは生ワクチン接種後 2 ヶ月の間にワクチン様ポリオウイルスが検出された。本研究班で作製したワクチン様ポリオウイルスを対象とした高感度のリアルタイム PCR 法でも、同様の結果だった。したがって、下水サーベイランスはポリオワクチンの接種状況をよく反映しているものと考えられた。また、下水流入水からは毎月多種のヒトエンテロウイルス B (HEV-B) 群が検出され、同じ血清型の HEV-B 群も発生動向の検体からほぼ同時期に検出される傾向を示したことから、下水サーベイランスは不顕性感染も含む地域における HEV-B 群の流行状況をよく反映しているものと考えられた。一方、コクサッキーウイルス A (CoxA) 群は発生動向の検体からは検出される一方、下水流入水からはほとんど検出されなかったため、分離培養以外の検出法を導入する必要があると考えられた。

A. 研究目的

エンテロウイルスは不顕性感染者が多く存在するため、地域におけるエンテロウイルスの感染状況を網羅的に把握するには、下水流入水中のウイルス調査を行うことが効果的であると考えられる。また、一旦発症すると重篤になる可能性のある野生株あるいはワクチン由来ポリオウイルス変異株 (VDPV) の輸入と、地域における伝播を監視するためにも、下水流入水調査が重要であると考えられる。

我々は、これまで下水サーベイランスを改良するため、フィルター吸着溶出法とポ

リエチレングリコール沈殿法 (PEG 沈法) によるウイルス濃縮法の比較検討や、下水処理工程における処理物へのウイルス吸着を検討してきた。本年度は、PEG 沈法より分離効率の高いことが判明したフィルター吸着溶出法を主に使用して、下水サーベイランスを行った。また、平成 24 年 9 月にポリオウイルスワクチンが生ワクチンから不活化ワクチンに切り替えられたため、それが下水流入水から検出されるポリオウイルスにどのような影響を及ぼすか検討した。同時に、ワクチン様ポリオウイルスのより簡便な検出法として平成 11 年に板持班員

が開発したリアルタイム PCR 法を本年度の下水流入水にも応用し、その有用性を検討した。

最後に、過去 6 年間の調査において下水流入水から検出されたウイルスを、同年間の発生動向調査、ポリオ流行予測感染源調査から検出されたウイルスと比較し、下水流入水から検出されるウイルスが顕性感染の流行状況をどの程度反映するか検討した。

B. 研究方法

1. 調査期間及び調査地点

2011 年 4 月から 2012 年 11 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。また、2006 年から 2011 年 3 月までのウイルス検出記録を参照した。

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、得られた遠心上清を既報の「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)に従って濃縮した。フィルター吸着溶出法では 100 倍濃縮検体を、PEG 沈殿法では 250 倍濃縮検体をそれぞれ調整した。

3. ウイルス分離同定

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、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、ダイレクトシーケ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 アクセッション番号はそれぞれ AY184219、AY184220、AY082683) と比較した。

5 リアルタイム PCR

既報に従って行った (富山県衛生研究所年報 34: 80-87, 2011)。

6 感染症発生動向調査およびポリオ流行予測調査

感染症発生動向調査では、感染症発生動向調査事業実施要綱 (平成 15 年) に従って無菌性髄膜炎、および感染性胃腸炎の患者から採取された各検体について、前述した「3. ウイルス分離同定」に従ってウイルス検索を行った。流行予測調査では、既報 (厚生労働省健康局結核感染症課, 国立感染症研究所流行予測調査事業委員会 (平成 14 年). 感染症流行予測調査事業検査術式, 1-8) に従ってウイルス検索を行った。

(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. 2012 年の下水流入水からの腸管系ウイルス検出状況（表 1）

1) ポリオウイルス

下水流入水からは、5 月、6 月に計 8 株のポリオウイルスが分離された。血清型別では 1 型が 2 株、2 型が 4 株、3 型が 2 株分離された。春期のポリオウイルスはすべて生ワクチン接種時期から約 2 ヶ月の間に検出され、不活化ワクチンに切り替えられた秋期以降には検出されなかった。また、5 月には感染性胃腸炎の検体からも 3 型が 1 株分離された。分離株の VP1 領域の塩基配列のワクチン株との差異はいずれも 1%未満であったため、WHO の基準により OPV-like poliovirus と判定された。

本研究班において板持班員が作製したワクチン様ポリオウイルスを対象とした高感度リアルタイム PCR を本年度も使用したところ、分離と同じ検出傾向を示した。したがって、下水からのポリオウイルスの検出は、分離培養とリアルタイム PCR 法いずれもワクチンの変更をよく反映しているものと考えられた。しかしながら、リアルタイム PCR は野生株や VDPV を検出できないため、分離培養は今後も継続する必要があると考えられる

2) ヒトエンテロウイルス B (HEV-B) 群

年間を通してエコーウイルス (Echo) 6 型および 7 型が下水流入水から高頻度に分離された。Echo 6 型の分離は 2011 年 11 月から 2012 年 3 月まで続き、次いで Echo 7

型が、2012 年 8 月から 1 月現在まで継続している。Echo 7 型は下水からの分離頻度が高く、さらに 10 月の感染症発生動向の検体からも検出されていることから、県内において広く流行しているものと推定される。発生動向検体から検出されているコクサッキーウイルス B5 (CoxB5) は 2012 年の下水からは検出されていないが、2011 年およびそれ以前では両者から検出されているため、HEV-B 群に関しては、下水流入水は県内のエンテロウイルスの流行状況をよく反映していると考えられる。

2. 過去 6 年間の発生動向および下水流入水サーベイランスの比較（表 2）

ワクチン様ポリオウイルス 1~3 型は、生ワクチンの定期接種後 2 ヶ月の間に、分離培養法で毎年検出された。リアルタイム PCR でも、調査した年において分離培養とほぼ同じ結果であった。また、不活化ワクチンに切り替えられた 9 月以降に検出されていない傾向も、両法で同様であった。したがって、両法ともほぼ同じ検出感度でワクチン様ウイルスを検出可能であることを確認した。前述したように、リアルタイム PCR は野生株や VDPV を検出できないため、分離培養は今後も必要と考えられるが、不活化ワクチンに切り替え後のワクチン株の消失のスクリーニングに、簡便なリアルタイム PCR が使用できると考えられる。

下水流入水からは分離培養により多種の HEV-B 群が検出された。CoxB 群や Echo は下水から検出された血清型と同じ型が発生動向の検体からもほぼ同時期に検出されていることから、下水流入水は不顕性感染を含め地域に流行している HEV-B 群を網羅的に検出していると考えられる。一方、CoxA 群

は、発生動向の検体からは検出されるが、下水流入水からはほとんど検出されなかった。これは、下水流入水からのウイルス検出を分離培養により行っているため、一般的に分離されにくい CoxA 群が、分離されやすい HEV-B 群により隠されている可能性が考えられる。CoxA 群を検出するためには、分離培養に加えて、CoxA 群を対象としたプライマーを用いた PCR 法などを加える必要があると考えられる。

下水流入水からレオウイルスが多数検出されているが、発生動向からはまったく検出されないため、それらの由来、病原性は不明である。それらの由来を明らかにすることは、今後の検討課題と考えられる。

D. 結論

富山県における腸管系ウイルス流行状況を把握するために、毎月 1 回下水流入水の腸管系ウイルス調査を行った。下水からは生ワクチン定期接種後 2 ヶ月の間にワクチン様ポリオウイルスが検出された。本研究班で作製したワクチン様ポリオウイルスを対象とした高感度のリアルタイム PCR 法でも、同様の結果だった。したがって、下水サーベイランスはワクチンの接種状況をよく反映しているものと考えられた。また、下水流入水からは毎月多種の HEV-B 群が検出され、下水サーベイランスは不顕性感染も含む地域における HEV-B 群の流行状況をよく反映しているものと考えられた。一方、CoxA 群は下水からはほとんど検出されなかったため、分離培養以外の検出法を導入する必要があると考えられた。

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. 板持(岩井)雅恵、堀元栄詞、小淵正次、名古屋(小原)真弓、馬淵俊輔、保科瑛子、大井哲夫、南部厚子、川越久美子、星山典江、關口健治、滝澤剛則：ポリオ流行予測調査（平成 23 年度）. 富山県衛生研究所年報 35: 62-67, 2012

2. 学会発表

なし

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. 富山県内の下水流入水からのエンテロウイルス検出状況（平成 24 年）

年・月 ウイルス		2012 年(平成 24 年)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ポリオ	Polio1					1+	1+	+					
	Polio2					3	1+						
	Polio3					1(1)+	1+						
HEV-B	CoxB2		1										
	CoxB5				(1)			(1)					
	Echo6		4	1									
	Echo7								20	16	18(1)	10	
レオ	Reo2	5							5	8			
アデノ	Ad5					1	(1)						

表中の数値はウイルス分離株数を示す。



()の数値は発生動向検体からの分離株数を示す。

+はリアルタイム PCR 陽性を示す。

表 2. 富山県内の下水流入水からのエンテロウイルス検出状況（平成 19～24 年）

年・月 ウイルス	2007年(平成19年)												2008年(平成20年)												2009年(平成21年)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
ポリオ	Polio1												3+												3	2	1+									2	
	Polio2												1+	+											+	1+	+										1+
	Polio3												2+	4(1)+	1+										+	4+											1+
HEV	CoxB1																																				
	CoxB2						(1)																														
	CoxB3																																				
	CoxB4																																				
	CoxB5	(1)																																			
	CoxA6																																				
	CoxA9																																				
	CoxA10																																				
	CoxA16																																				
	EV71																																				
	Echo1																																				
	Echo3																																				
	Echo4																																				
	Echo5																																				
	Echo6																																				
	Echo7																																				
Echo9																																					
Echo11																																					
Echo18																																					
Echo25																																					
Echo30																																					
レオ	Reo1																																				
Reo2																																					
not typed																																					
アデノ	Ad1	(3)																																			
Ad2	(2)																																				
Ad5	(1)																																				
Ad6																																					
not typed																																					

ウイルス	年・月	2010年(平成22年)												2011年(平成23年)												2012年(平成24年)																								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12													
ポリオ	Polio1				2	3						4								2	(1)	4													1+	1+	+													
	Polio2				5	(1)	1					1								5															3	1+														
	Polio3				(1)	9	5	1				5	(1)	4							(1)														4	2	1				1	(1)	+							
	CoxB1																					(1)																												
	CoxB2																						1																											
	CoxB3																																																	
	CoxB4							(1)																																										
	CoxB5							(1)																																										
	CoxA6							(7)	(2)	(1)	(1)																																							
	CoxA9								(1)																																									
CoxA10																																																		
CoxA16																																																		
HEV	EV71							(1)	(1)	(1)		(1)																																						
	Echo1																																																	
	Echo3									9	10	10	15	10	8	7																																		
	Echo4																																																	
	Echo5																																																	
	Echo6																																																	
	Echo7																																																	
	Echo8																																																	
	Echo9																																																	
	Echo11				1		1	4																																										
	Echo18																																																	
	Echo25																																																	
Echo30																																																		
レオ	Reo1																																																	
	Reo2																																																	
アデノ	not typed																																																	
	Ad1																																																	
	Ad2																																																	
	Ad5																																																	

 下水流入水 (数値は分離株数 ; + はリアルタイム PCR 陽性 ; 2007~8 年の一部は数値無し)
 ヒト検体 (() 内数値は分離株数)

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」

下水からのアイチウイルス及びイヌ由来コブウイルスの検出と遺伝子解析

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 2011年9月から2012年10月までに毎週採取された流入下水56検体中のアイチウイルスを調べたところ、48検体（85.7%）からアイチウイルスが、8検体（14.3%）からイヌ由来コブウイルスが検出された。遺伝子解析の結果アイチウイルスA型が22検体（39.3%）、B型が33検体（58.9%）から検出された。2007年まで検出されなかったB型陽性検体数が増加し、今回はじめてA型を上回った。系統樹解析によりA型は2つのクラスターに分かれ、1クラスターは、過去に胃腸炎患者の糞便からの検出報告のないものであった。イヌ由来のコブウイルスは米国で報告されたものと異なっていた。イヌの飼い主が散歩中に回収したイヌの便を下水に流すためと推測された。

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ことが知られている。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遺伝子を検出し遺伝子型とその消長を2006年より調べている。また、2011年に米国にてイヌ由来のコブウイルス (CaKV) が報告され、AiVと近縁であることが判明した。われわれの調べた下水からもCaKV由来の遺伝子が検出されたことを報告した。今年度も引き続き検査を実施し、流行株の遺伝子型の特徴を調べた。

B. 研究方法

2011年9月から2012年10月までに毎週採取された流入下水56検体を材料とした。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°C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) を用いて核酸を抽出した。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、48検体 (85.7%) からAiVが、8検体 (14.3%) からCaKVが検出された。AiV遺伝子型の内訳はA型が22検体 (39.3%)、B型が33検体 (58.9%) から検

出されたが、C型は0件であった(表1)。B型がA型の検出数を初めて上回った。いずれの検体もウイルス分離は陰性であった。8週間ごとに7期間に分けた場合の検出率を図1に示した。7期間中6期間でB型の検出数がA型を上回った。VP1領域のPCR産物の塩基配列から系統樹解析を実施した結果を図2に示した。A型は2つのクラスターに分かれたが、標準株を始めヒト糞便から検出されたウイルスは全て1つのクラスターに収束した。B型は、2000年以降にヒト糞便から検出されたウイルスと我々が下水から検出した配列が近縁な関係であることが判った(図3)。

CaKV由来の遺伝子が8例(14.3%)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、下水検体から検出される配列は全て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

昨年度までの検査成績と合わせAiV遺伝子が7年間に亘り流入下水から高率に検出されたことから、AiVが我々の間で常に感染を繰り返していることが改めて確認された。下水から検出されるAiVは2006年～2007年は全てがA型で、2008年～2010年まではA型の検出数がB型を上回っていた。しかし、今回、B型の検出数がA型を初めて上回った。B型は東南アジアの患者からの検出例が殆どであったが、これらウイルスが日本にも多く侵入してきたものと考えられた。

下水から検出されるA型ウイルスは、2つのクラスターに分かれた。ヒトから検出されたA型ウイルスは全て同じクラスターに属していた。これには1989年から2012年までにヒトから検出されたウイルスが含まれており、ヒト糞便からの検出例がないクラスターに属するウイルスの由来や病原

性などに興味を持たれた。

CaKV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。2002年～2012年に採水された下水から検出された我々のものとは塩基配列が異なることから、下水から検出されるCaKVは、日本国内で流行しているイヌ由来の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。CaKVは人のAiVがイヌに感染して広まったものと考えられており、人への感染も否定されていない。我が国においては、イヌからのCaKVの検出や分離報告はないので、今後イヌからのウイルス検出や分離を試みるとともに、人との関わりの有無について調べていきたい。

E. 結論

流入下水からAiVが高率に検出された。B型の検出数がA型を上回り、AiVの流行株の変遷がうかがわれた。A型は2つのクラスターに分かれたが、1つのクラスターはヒトからの検出例がないウイルスであった。少数であるがイヌ由来のAiV(CaKV)も検出された。日本のイヌにもCaKV感染が生じていると思われる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 伊藤 雅、山下照夫、廣瀬絵美、安達啓一、平松礼司、皆川洋子、愛知県で2000年～2011年に検出されたエンテロウイルス71型の遺伝子解析、愛知県衛生研究所報63:1-7, 2013.

2) 山下照夫、「第4章ウイルス 2各論
4. ウイルス別検査法 (4) アイチウイルス」の項を担当、食品衛生検査指針、東京、
日本食品衛生協会(編集中)

2. 学会発表

1) Teruo Yamashita, Emi Hirose, Hirokazu Adachi, Miyabi Ito, Reiji Hiramatsu, and Hiroko Minagawa : Detection and Nucleotide Sequence Analysis of Aichi Virus and Canine Kobuvirus in Sewage Samples, EUROPIC 2012, Saint Raphael, France, June 2012.

2) Teruo Yamashita, Miyabi Ito, Emi Hirose, Hirokazu Adachi, Reiji Hiramatsu, and Hiroko Minagawa: Enterovirus 71 Surveillance in Aichi Prefecture, Japan,

2000-2011, Symposium "Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia-Pacific Region", Tokyo, August 2012.

3) 山下照夫、安達啓一、廣瀬絵美、藤原範子、伊藤 雅、安井善宏、小林慎一、皆川洋子：下水からのアイチウイルス及びイヌ由来コブウイルスの検出と遺伝子解析。第60回日本ウイルス学会、大阪、2012年11月

4) 小栗 信、広瀬かおる、山下照夫、椛島由佳、水野英明、皆川洋子：愛知県感染症発生動向調査からみた定点把握疾病の長期動向及び2011年にみられた流行、第26回公衆衛生情報研究協議会研究会、那覇市、2013年1月

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

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(2011年9月~2012年10月)

年	検体数	陽性数	遺伝子型検出数	
			A	B
2011	14	14	4	10
2012	42	34	18	23

Total(%)	56	48(85.7)	22(39.3)	33(58.9)

表2. 流入下水からのイヌコブウイルス
CaKV)VP1 遺伝子の検出成績(2011年
9月~2012年10月)

年	検体数	CaKV
2011	14	2
2012	42	6
Total (%)	56	8(14.3)

(件)

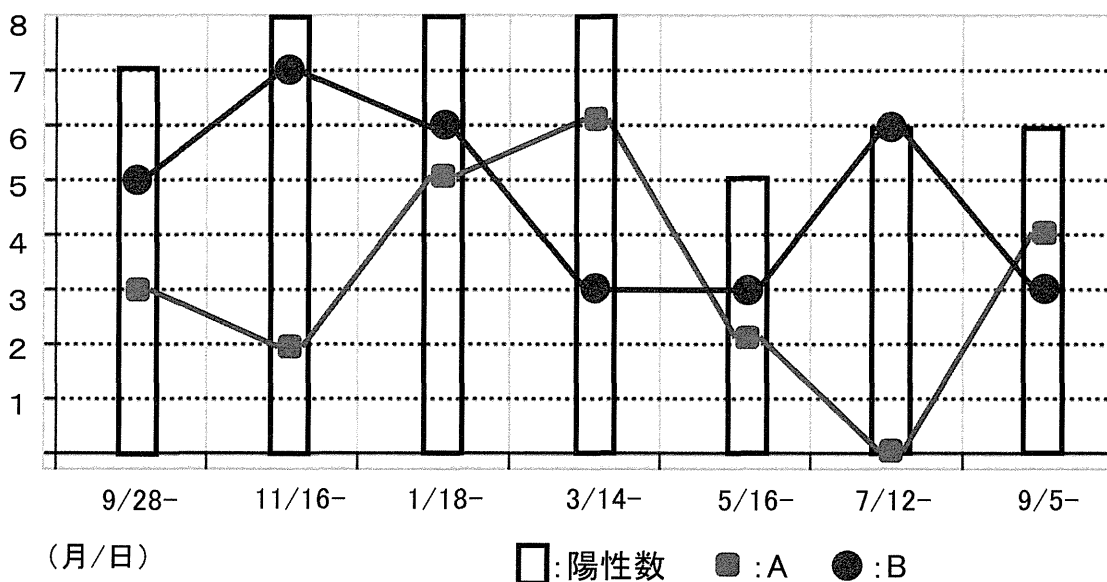


図1. 流入下水における8週間ごとのアイチウイルス検出成績

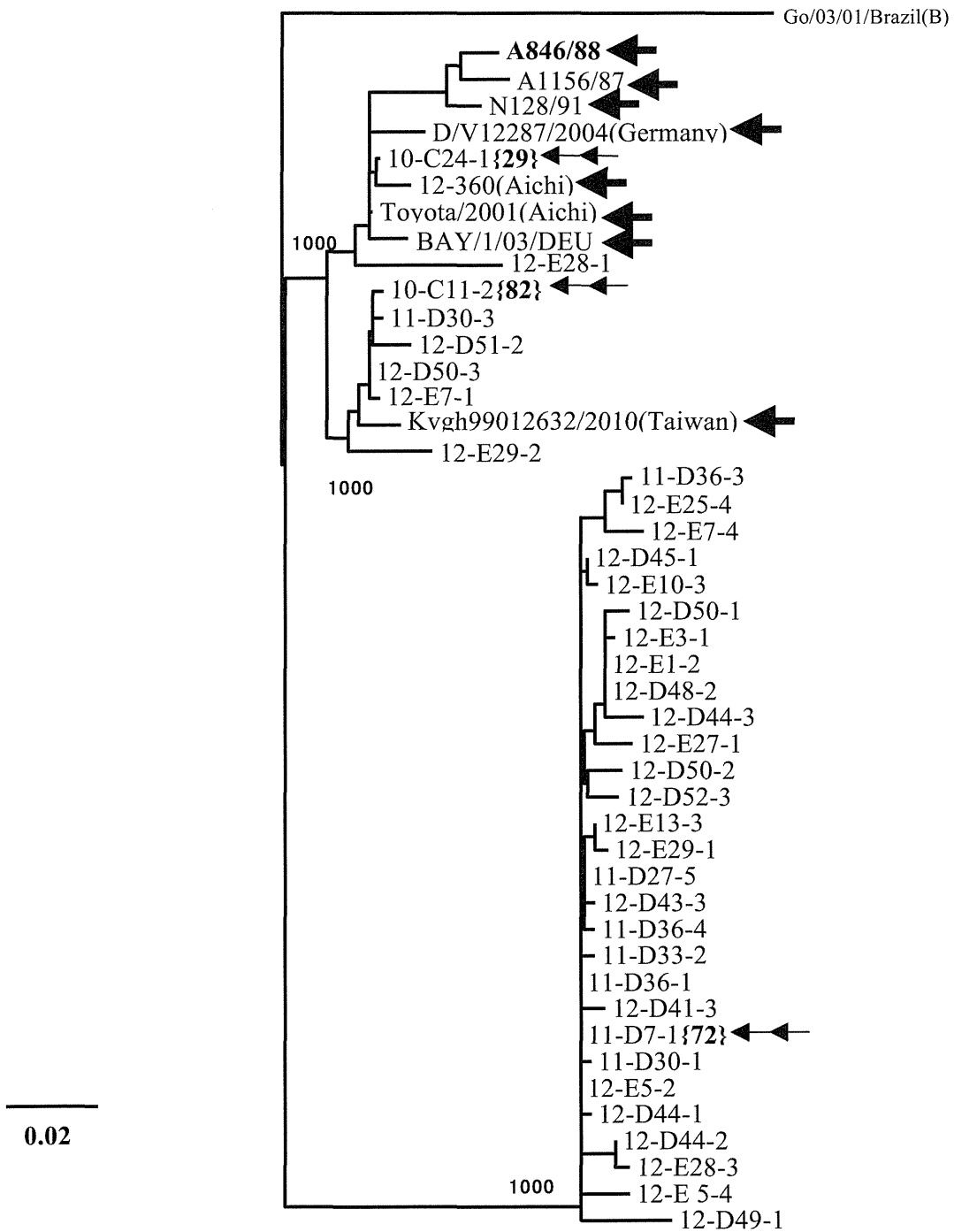


図2. 下水から検出されたA型アイチウイルスのVP1遺伝子の系統樹解析 (NJ法)

(注) 標準株を太字で示した。←: 胃腸炎患者から検出されたウイルス。←←: 過去に多く下水から検出された配列の代表例 { }内の数字は件数。

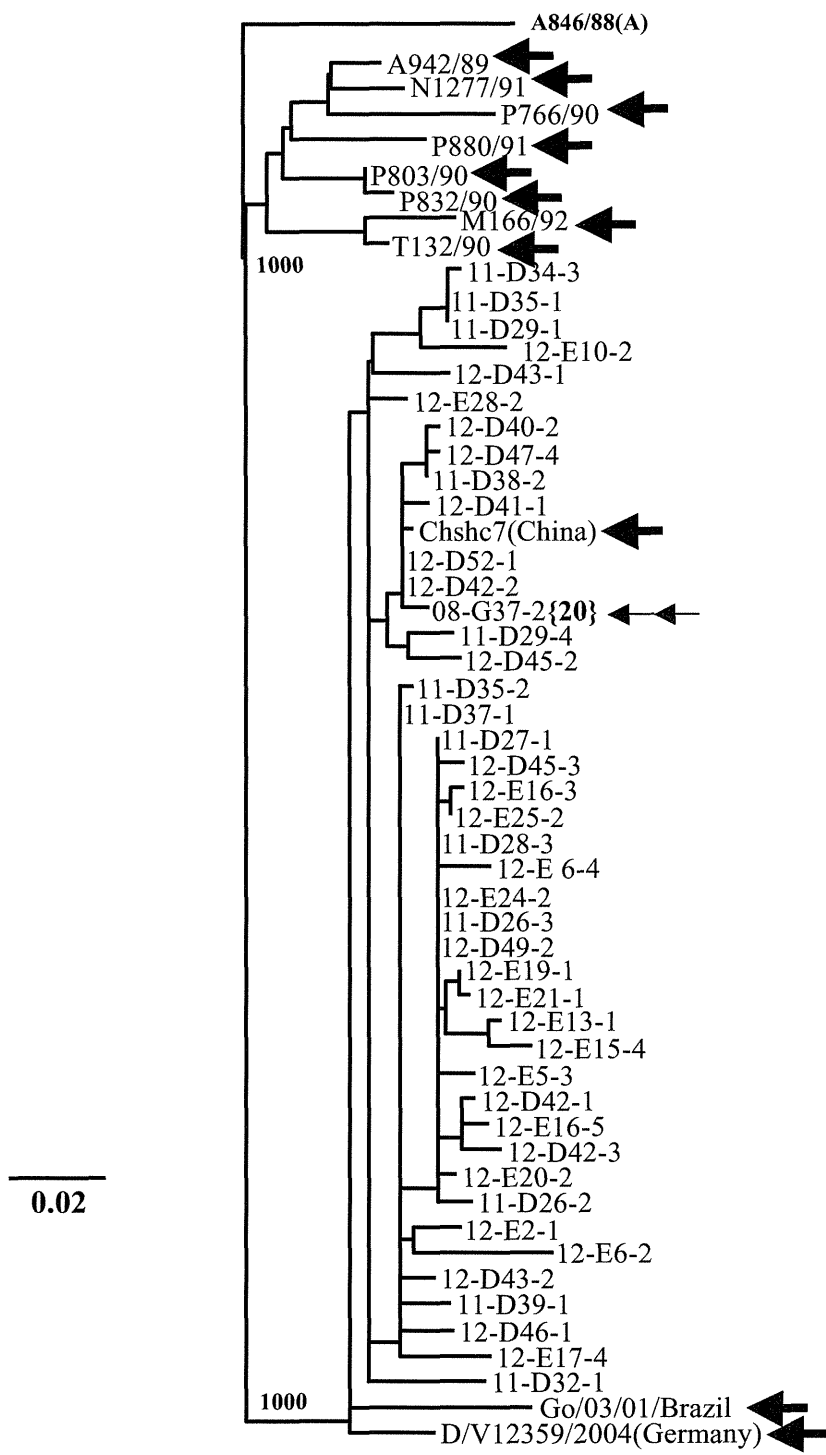


図 3. 下水から検出された B 型アイチウイルスの VP1 遺伝子の系統樹解析 (NJ 法)

(注) ← : 胃腸炎患者から検出されたウイルス。←← : 過去に多く下水から検出された配列の代表例 { } 内の数字は件数。

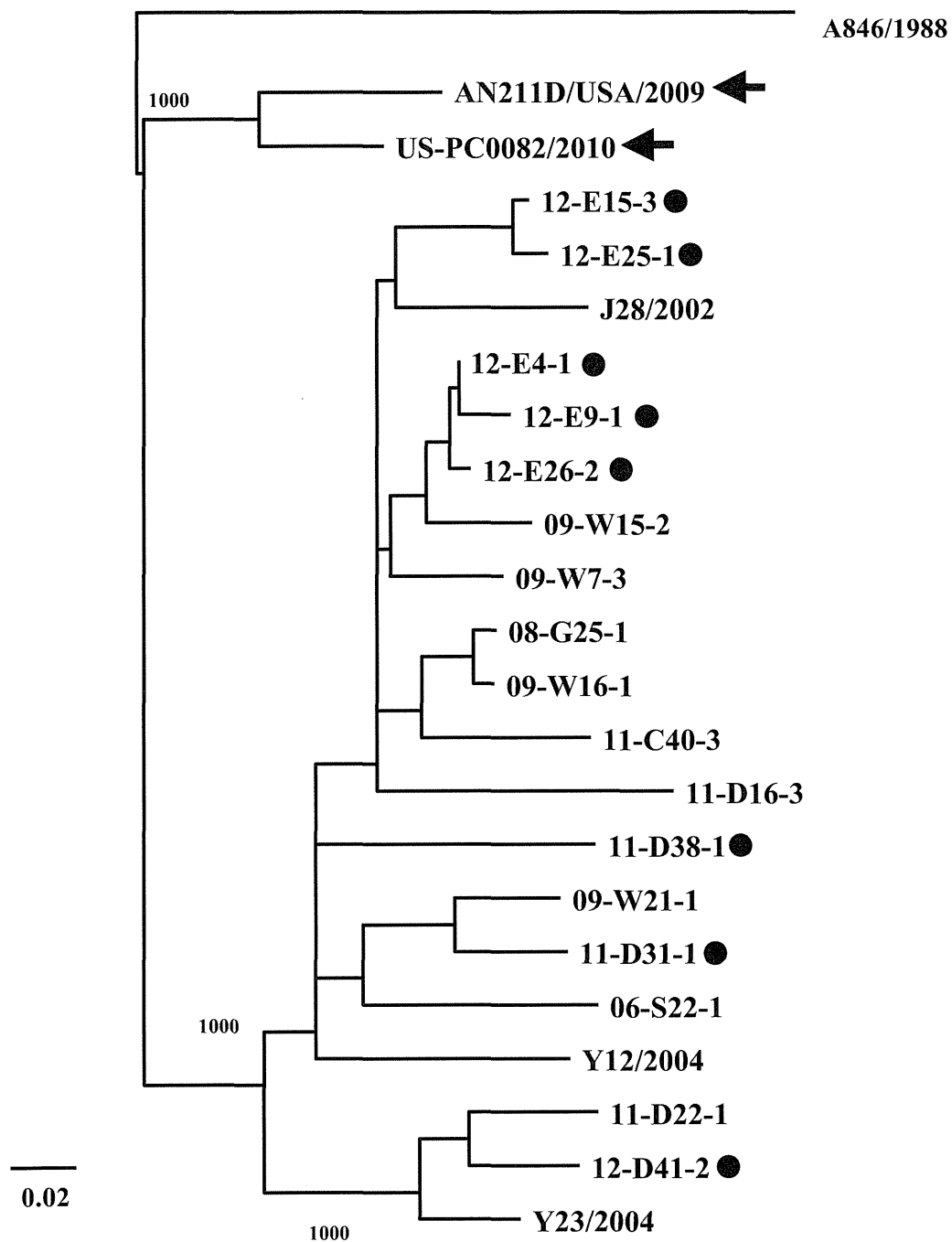


図4. 下水から検出されたイヌ由来コブウイルスのVP1領域の系統樹解析 (NJ法)
 ← : 米国のイヌから検出されたウイルス。● : 今回検出された検体。

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 中村朋史、吉富秀亮、石橋哲也、世良暢之 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

日本においては、平成 24 年 9 月に不活化ポリオワクチン（IPV）が導入された。IPV 導入のアナウンス後、福岡県内 2 ヶ所の浄化センターで採取した流入水からのポリオウイルス分離数は減少し、平成 24 年 5 月を最後に未分離が続いた。IPV 導入に伴う生ポリオワクチンの打ち控えによる環境中からのポリオワクチン株の消失がその主因と考えられる。また、これまでに分離されたポリオウイルスの VP1 全領域の塩基配列を解析した結果、全て、変異数が WHO 基準以下のワクチン株であった。

両地区の浄化センター流入水におけるエンテロウイルス（ポリオウイルス以外）の分離では、コクサッキーウイルス B 群が中心であった。特に、今年度は夏場を中心にコクサッキーウイルス B5 型の検出が大部分を占めた。一方、エコーウイルスの分離は少数にとどまり、例年に比べて分離数・ウイルス種数ともに減少した。

人口や下水処理量などが大きく異なる両地区の浄化センターで分離効率が変わらなかったことから、環境ウイルスサーベイランスの有効性が示された。

A 研究目的

日本においては平成 24 年 9 月に不活化ポリオワクチン（IPV）が導入された。IPV 導入アナウンス後には全国的に経口生ポリオワクチン（OPV）の接種率が低下したことが報告された。接種率低下による打ち控えや腸管免疫未獲得によるポリオウイルス感染やワクチン由来株によるポリオの出現などが危惧されている。本研究では下水流入水から分離されるポリオウイルスについて遺伝子変異も含めて監視することを本研究の目的とした。

主に腸管で増殖するエンテロウイルスはヒトに対して多様な病原性を示し、小児において

はときに重篤な症状を引き起こす。しかしながら、エンテロウイルスは不顕性感染となることも多く、対象疾病患者からのウイルス分離・同定のみからでは、その発生動向や地域における流行を把握することは難しい。本研究では、糞便中に排出され下水中に流れ込むウイルスを濃縮して検出する環境サーベイランスを行ってきた。下水等に排出されたウイルスの消長を追跡することにより、エンテロウイルス流行の指標として本環境サーベイランスが利用可能かどうかを検討すること、また、分離株遺伝子をアジア周辺の登録株と比較することにより、ウイルス移入等を監視することも目的とした。

当所は平成 22 年度より環境ウイルスサーベイランスを導入している。毎月 1 回、北部（都市部）及び南部（農村部）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 25 年 1 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（2 L）を採取した。

2. 下水流入水ウイルスの濃縮

1 L の下水流入水を、4℃で 3,000 rpm、30 分間遠心し、上清に塩化マグネシウムを添加、pH 3.5 に調整後、陰電荷フィルターにウイルスを吸着させた。得られたフィルターは 10 mL の 3%ビーフエキストラクト存在下で破碎し、ウイルス誘出を行った。

3. 細胞への接種および分離

濃縮液を、ウイルスに対する感受性の異なる 6 種類の培養細胞（Vero E6、FL、RD-18s、HEp-2、LLC-MK2 及び MDCK）に 0.1 mL ずつ接種した。1-2 週間培養を行い、細胞変性効果を指標にウイルス分離を判定した。分離したウイルスは抗血清による中和試験及び遺伝学的手法による同定に供した。

4. 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 RNA を抽出した。ポリオウイルス VP1 全領域については、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し、ワクチン株 Sabin1、Sabin2 及び Sabin3 の塩基配列と比較した。

その他の分離株に関してもポリオウイルスと同様の手法を用いて RNA 抽出を行った。汎用される CODEHOP VP1 RT-snPCR を中心とした遺伝子解析を行い、BLAST を用いた相同性検索等によって同定した。

C 研究結果及び考察

1. ポリオウイルスの分離状況

図 1 に 3 年間のポリオウイルスの分離状況を示した。平成 24 年度において、ポリオウイルスは北部地区浄化センター流入水のみから分離された（4 月は 1 型が 3 株、5 月は 2 型が 2 株及び 3 型が 1 株）。分離時期は北部地区浄化センター周辺の対象自治体における春季のポリオワクチン接種時期と重なっていた。しかしながら、分離株数はこの 3 年間で最小であり、IPV 導入アナウンス後からの打ち控えがあったことが示唆される結果となった。一方、南部地区浄化センター流入水からは、平成 23 年 11 月を最後にポリオウイルスは分離されていない。南部地区浄化センター周辺のワクチン対象人口が少ないこと（北部地区の約半数）、に加えて、下水道普及率も低いこと（約 25% 以下）、即ち、接種後の小児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み、未分離となっていることが予想された。

2. ポリオウイルスの遺伝子解析

平成 24 年度に分離された 6 株のポリオウイルスの VP1 全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、全て 0.5%～1% 未満であり、WHO の基準を満たしたワクチン株であった。また、しばらくは OPV 接種を任意で選択することも可能であることから、今後も継続してポリオウイルスの消長を遺伝子変異も含めて追跡する必要があると思われる。

3. エンテロウイルスの分離状況

平成 24 年度の両地区浄化センター流入水におけるエンテロウイルス分離状況を図 2 に示す。分離状況はこれまでの年度と若干異なり、コクサッキーウイルス B 群 (CB) が主として分離された。特に春季～秋季においては CB5 が大半を占める結果となり、環境中にかなりの CB5 が排出されていたことが疑われた。主に上気道炎や無菌性髄膜炎の原因ウイルスとして知られる CB5 であるが、福岡県内における臨床検体からの CB5 検出は同時期においても数例しか報告が無いため、不顕性感染に終わっている可能性が考えられた。一方、これまで CB とともに分離数の多かったエコーウイルスが大幅に減少し、秋季に数株が分離されるにとどまった。また、数株の CA21 が分離されたものの、CA 群ウイルスの分離効率はかなり低かった。

両地区浄化センターにおけるエンテロウイルスの分離頻度は、南部地区浄水センターにおいてポリオウイルスが検出されなかったことを除いては、ほとんど差は見られなかった。両地区浄化センターの 1 日あたりの処理量が大きく異なるにもかかわらずウイルス分離に差が見られないことは、エンテロウイルスを対象とした本環境ウイルスサーベイランスが、環境が異なる地域へも適用可能であることを示唆している。

また、両地区で分離されたコクサッキーウイルス B 群やエコーウイルスは、VP1 部分領域の

相同性解析結果から、中国などアジア地域との近縁な関係があることが伺われた。今後は、分離時期、分離地域及び患者分離株等を詳しく比較する必要があると思われる。

D 結論

本研究では、国内では分離例の非常に少ない CA21 ウイルスが数株分離されているものの、CB 群ウイルスおよびエコーウイルスの分離頻度が依然として高い傾向にある。CA 群ウイルスは一般的に細胞分離が困難なことが知られている。環境ウイルスサーベイランスの精度を高めていくためにも、夏季の手足口病やヘルパンギーナ等の主因ウイルスである CA 群ウイルスを分離する効率的な手法や細胞の開発が待たれる。

IPV 導入を果たした日本において、地域における不顕性を含めた発生動向や流行を把握できること、アジア地域の分離株との関係を推察できることなどから、本サーベイランスは対象地域における疾病患者からのウイルス同定・分離を補完できるものと考えられた。併せて、下水流入水からのエンテロウイルス分離によって得られる知見は多く、環境ウイルスサーベイランスによりポリオウイルスを継続的に監視することは非常に意義深いと思われる。

G 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

中村朋史、吉富秀亮、石橋哲也、前田詠里子、世良暢之、吉田弘：下水流入水における環境ウイルスサーベイランス。第 60 回日本ウイルス学会学術集会。大阪市、2012 年 11 月

H 知的所有権の取得情報

なし

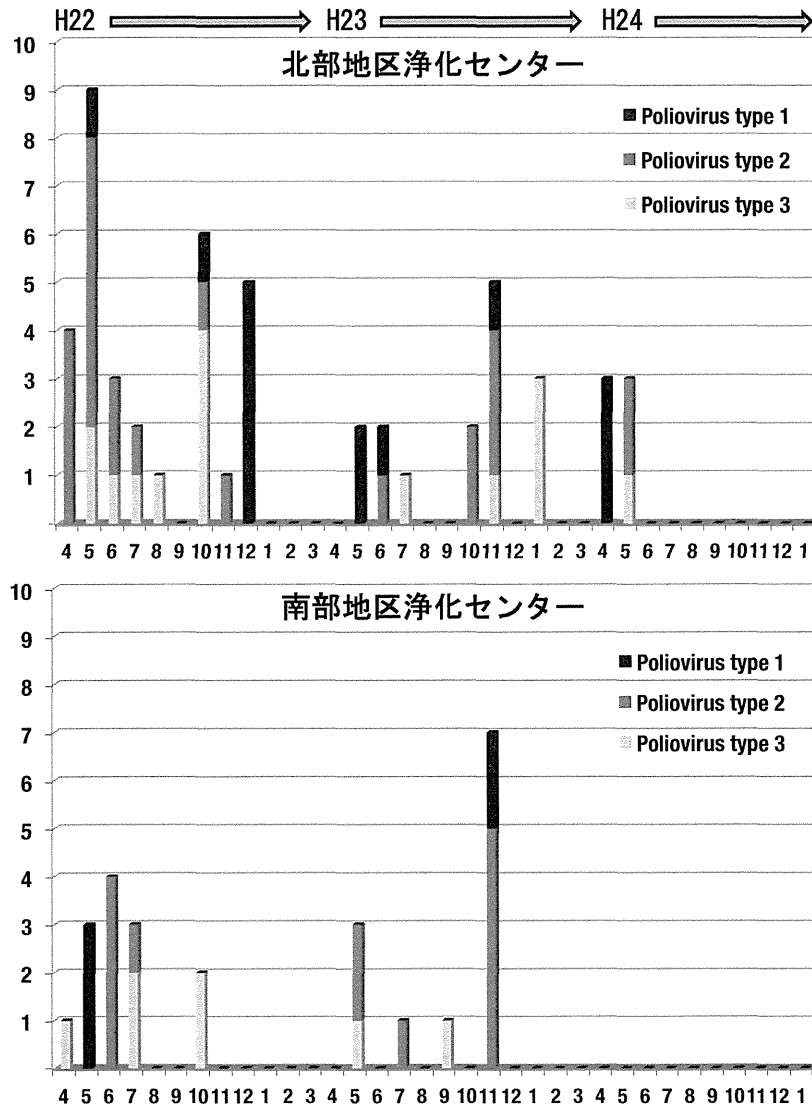


図1 浄化センター流入水から分離されたポリオウイルス(平成22~25年)

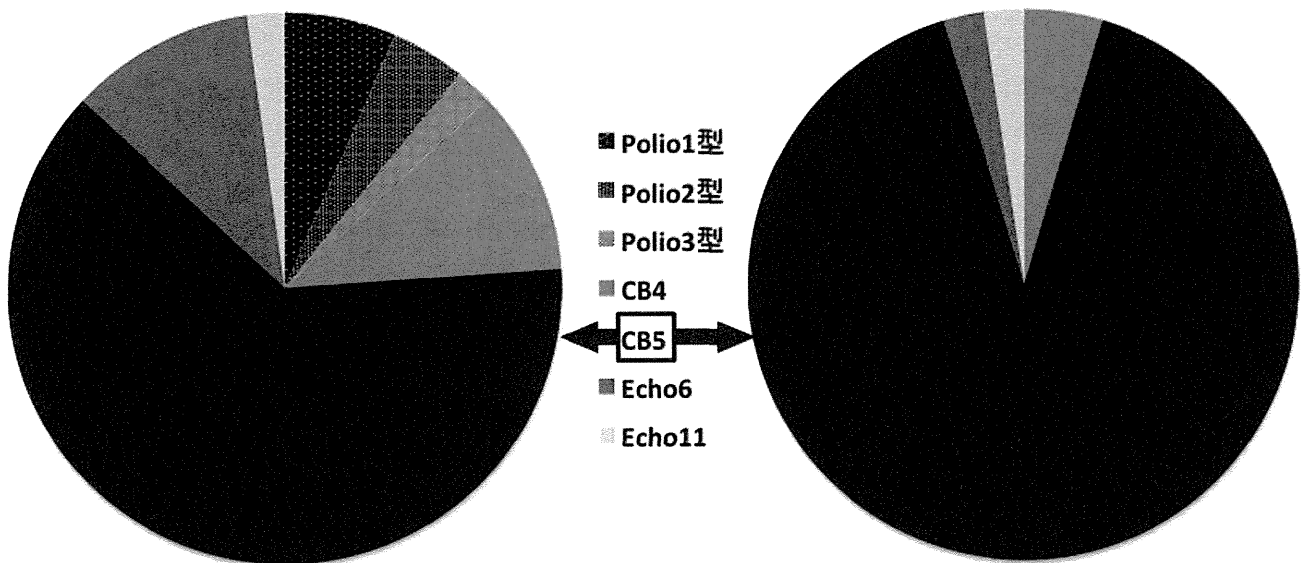


図2 浄化センター流入水から分離されたエンテロウイルス(平成24年度)