

東京都におけるポリオウイルス環境水サーベイランス (2019年度)

熊谷 遼太^a, 長島 真美^a, 根岸 あかね^a, 加来 英美子^a, 林 志直^a, 河上 麻美代^a, 林 真輝^a
山崎 貴子^a, 浅倉 弘幸^a, 永野 美由紀^a, 北村 有里恵^a, 矢尾板 優^a, 藤原 卓士^a, 長谷川 道弥^a
森 功次^a, 吉田 勲^b, 内田 悠太^a, 鈴木 愛^a, 小杉 知宏^a, 千葉 隆司^a, 貞升 健志^c

2012年9月, わが国の定期接種用ポリオワクチンが経口生ワクチン(OPV)から不活化ワクチン(IPV)へ変更された。しかしながら, 国外の一部地域においてはポリオウイルスまたはワクチン由来ポリオウイルス患者が依然として確認されており, インバウンド等による国内へのポリオウイルスの侵入が危惧されている。このことから, 2019年度から東京都においてもポリオウイルスの侵入を効率的に補足する目的で, 環境水中(下水流入水)のウイルスサーベイランスを開始した。その結果, 2019年度において, 年間を通しポリオウイルスは分離されず, ポリオウイルス以外のエンテロウイルス(エコーウイルス11型, エコーウイルス6型, コクサッキーウイルスB群3型等)やアデノウイルス(1型, 31型等), レオウイルスが分離された。

キーワード: 環境水サーベイランス, 下水, ポリオウイルス, エンテロウイルス, アデノウイルス, レオウイルス

はじめに

急性灰白髄炎(ポリオ)は, ポリオウイルスが中枢神経に侵入することで四肢の急性弛緩性麻痺を主症状とする二類感染症(感染症法)である。主に糞口感染を感染経路とし, 世界では汚染水を通じた感染が知られている。

我が国では1964年から経口生ポリオワクチン(Oral polio vaccine: OPV)の定期接種が開始されて以降, 1980年を最後に野生株ポリオウイルスによる患者の発生はない^{1,2)}。しかし, 1970年以降, ワクチン関連麻痺型ポリオが散発したため, 2012年9月以降, 定期接種用ワクチンはOPVから, より安全な不活化ポリオワクチン(Inactivated polio vaccine: IPV)に変更された³⁾。一方, アフガニスタンやパキスタンを中心に野生株ポリオウイルスは継続的に伝播しており, フィリピンやナイジェリアではワクチン由来ポリオウイルスの流行が報告されている⁴⁾。我が国においても国際化の進展や大型マスコガザリングイベント等に伴うインバウンドによる国内への来訪者増加のため, ポリオ流行国やOPV使用国からのポリオウイルスの侵入が危惧されている。そこで, 東京都では2019年度から感染症法に基づく感染症流行予測事業(感染源調査)として, ポリオウイルスの環境水サーベイランスを開始した。

今回, 東京都健康安全研究センターにおいて, 2019年度感染症流行予測調査における感染源調査の一環として実施した下水(流入水)からのポリオウイルスおよびその他のウイルス(エンテロウイルス, アデノウイルス等)の分離・検出状況について報告する。

実験方法

1. 供試材料

2019年4月~2020年3月の間, 月1回の頻度で都内1か所の水再生センターより下水(流入水)500 mLを採水し, 供試した。

2. 検体の濃縮(陰電荷膜法)

Ozawaら⁵⁾およびNakamuraら⁶⁾の報告を参考に試料500 mLを4°Cで10,000 rpm×30分間遠心分離を行った後, 1.0 μm孔径ガラスファイバーフィルターによりろ過を行った。塩化マグネシウムを終濃度0.05 Mになるよう添加し, 塩酸でpH3.5に調整後, 上清を陰電荷膜(0.45 μm孔径フィルター)でろ過吸着した。陰電荷膜を裁断した後, 3%ビーフェキス10 mL(50倍濃縮)を用いてウイルス誘出を実施し(1回目誘出液), 再度3%ビーフェキス10 mLによりウイルス誘出を行った(2回目誘出液)。

3. ウイルス分離試験

ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル⁷⁾を参考にL20B細胞, RD-A細胞, A549細胞, HEp-2細胞を用いてウイルス分離試験を行った。1回目誘出液を4ウェル, 2回目誘出液を2ウェルに各50 μLずつ接種し, 3代継代を行った。細胞変性効果(CPE)が確認された際は, 培養上清液を回収し, ウイルス同定を行った。なお, L20B細胞を除く細胞でCPEが確認された場合は, 培養上清液をL20B細胞へ継代し観察を行った。

^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

^c 東京都健康安全研究センター微生物部

4. 培養上清液及び下水濃縮液からの核酸抽出

培養上清液および下水（流入水）濃縮液 140 μL から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて核酸抽出を行い、核酸抽出液 60 μL を得た。

5. ウイルス同定検査

1) 遺伝子検査および遺伝子型別

ウイルスの同定については、ポリオウイルスおよび他のエンテロウイルス、アデノウイルス、レオウイルスを対象とした遺伝子検査を実施した。エンテロウイルスは国立感染症研究所の無菌性髄膜炎病原体検査マニュアル⁸⁾、アデノウイルスは同所の咽頭結膜熱・流行性角結膜炎検査、診断マニュアル⁹⁾を、レオウイルスはSpinnerら¹⁰⁾によるプライマー配列を参考に設定し、標的遺伝子の増幅を行った。なお、エンテロウイルス（ポリオウイルスを含む）およびレオウイルスは培養上清液、アデノウイルスは培養上清液および下水（流入水）濃縮液由来の核酸抽出液を試料として用いた。PCR反応産物を電気泳動し、特異バンドを切り出した後、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて遺伝子精製を行い、DNA液30 μLを得た。シーケンシング反応には、それぞれのプライマーを用いBig Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (サーモフィッシャー) 試薬を使用し、DNA液5.0 μLを混合し、94℃15秒、50℃15秒、60℃4分のサイクルを25回繰り返した。シーケンシング反応産物はCentri-Sep Columns (PRINCETON SEPARATIONS) を用い、ABI Prism 3130 Genetic Analyzer

(サーモフィッシャー) を用いて塩基配列を決定した。エンテロウイルスにおいては、取得した塩基配列をNCBIのGenBankを利用したBLAST解析と、National Institute for Public Health and the Environmentが提供している型別分類ウェブサービス

(<http://www.rivm.nl/mpf/enterovirus/typingtool/#/>) による解析により血清型分類を行った。また、アデノウイルスおよびレオウイルスはNCBIのGenBankを利用したBLAST解析により遺伝子型別を実施した。

2) NGSを用いたウイルス同定

分離株由来検体において塩基配列が複数感染等により同定できない場合は、次世代シーケンサー (NGS) を用いて塩基配列の取得を行った。NGS のライブラリー作成にはNEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB) 等を使用し、Miseq (illumina) を用いて塩基配列データを取得した。これら塩基配列データは、国立感染症研究所のVirusTap¹¹⁾を用い、解析およびウイルス同定を実施した。

結果及び考察

1. ウイルスの分離・検出状況

1) ポリオウイルスおよびその他のエンテロウイルス

年間を通しポリオウイルスおよびワクチン由来ポリオウイルスは分離されなかった。

ポリオウイルスを除くエンテロウイルスは、5月から12月にかけて7種類分離された (表1)。多く分離された順にエコーウイルス11型が7株 (採取時期：6月～12月)、エコー

表 1. 環境水サーベイランスにおけるエンテロウイルスの分離状況 (2019 年度)

ウイルス	型	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
エコーウイルス (分離試験)	11型	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	6型	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	3型	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	7型	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	25型	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
コクサッキーウイルス (分離試験)	B群3型	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
	B群5型	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

+: ウイルス分離試験において1株以上ウイルスが分離

-: ウイルス分離試験においてウイルス分離せず

表 2. 環境水サーベイランスにおけるアデノウイルスおよびレオウイルスの分離・検出状況 (2019 年度)

ウイルス	型	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
アデノウイルス (分離試験)	1型	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	2型	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5型	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	6型	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	31型	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
アデノウイルス (遺伝子検査)	40型	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	41型	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
レオウイルス (分離試験)		-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-

+: ウイルス分離試験または遺伝子検査において1株 (件) 以上ウイルスが分離・検出

-: ウイルス分離試験または遺伝子検査においてウイルス分離・検出せず

ウイルス6型が4株（7～10月）、コクサッキーウイルスB群3型が4株（7月, 9月, 10月, 12月）、エコーウイルス25型が3株（7月, 10月, 11月）、エコーウイルス3型が2株（5月, 9月）、エコーウイルス7型が1株（12月）、コクサッキーウイルスB群5型が1株（11月）であった。

今回の調査において、ウイルス同定検査でエンテロウイルスの特異バンドが確認されたものの、ダイレクトシークエンスによる遺伝子型別不可の分離株が3株あった。分離培養上清を用いてNGSによる遺伝子解析を行った結果、エコーウイルス6型の単独分離が2株、エコーウイルス3型および11型の2種の分離が1株確認された。また、NGSによる解析では、ほぼ全長もしくは数千ベースのウイルスの塩基配列が取得できた。遺伝子型別の困難時においては、NGSを用いた解析は複数株の分離時の対応だけでなく、より長い塩基配列が取得できるため精度の高い解析が可能となると考えられる。

2) アデノウイルスおよびレオウイルス

アデノウイルスは5種類の遺伝子型が分離され、C種1型が3株（採取時期：6月, 10月, 11月）、2型が1株（6月）、5型が2株（5月, 7月）、6型が1株（2月）、A種31型が2株（1月, 2月）であった（表2）。

下水（流入水）濃縮液からの核酸抽出液を用いた遺伝子検査においては、アデノウイルスF種の41型が12件（採取時期：4月～3月）と同種40型が1件（3月）検出された。アデノウイルス40型および41型は、主に感染性胃腸炎を引き起こすとされ、急性期患者糞便中に多くウイルスが排出される。そのため、糞便中ウイルスを直接反映させる下水

（流入水）濃縮液から細胞分離を介さずに検出できたと考えられる。また、患者発生に季節性があまりないことが知られており、今回の調査期間においても年間を通して検出された。

レオウイルスは、9月および1月に分離された。なお、9月に分離されたレオウイルスは、NGSによる解析を実施した結果、レオウイルス2型および3型と同定された。

2. 感染症発生動向調査データとの比較

同調査期間における東京都の感染症発生動向調査事業において、インフルエンザ定点および小児科定点、内科定点、基幹定点、眼科定点の病原体定点として搬入された検体と環境水サーベイランスでのエンテロウイルスおよびアデノウイルスの分離・検出状況を比較した。

1) エンテロウイルス

2019年度の感染症発生動向調査においては、夏季を中心にヘルパンギーナや手足口病等の疾患においてエンテロウイルスが検出されていた。環境水サーベイランスおよび感染症発生動向調査の両方において分離・検出されたウイルスは、エコーウイルス11型および25型、コクサッキーウイルスB群3型および5型であり、これらの検出時期はおおむね近い時期であった（表3）。感染症発生動向調査においては、コクサッキーウイルスA群（5型, 6型, 10型, 16型）が遺伝子検査で多く検出されていたが、環境水サーベイランスにおいては細胞感受性が低く、分離しにくいウイルスであるため分離できなかったと考えられた。一方で、環境水サーベイランスではエコーウイルス3型, 6型, 7型

表 3. 感染症発生動向調査および環境水サーベイランスの両方において検出されたエンテロウイルスの検出時期

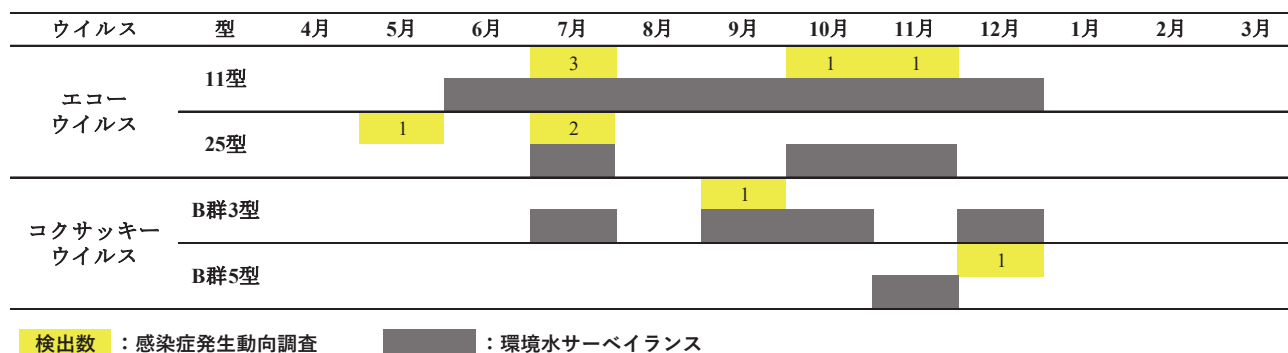
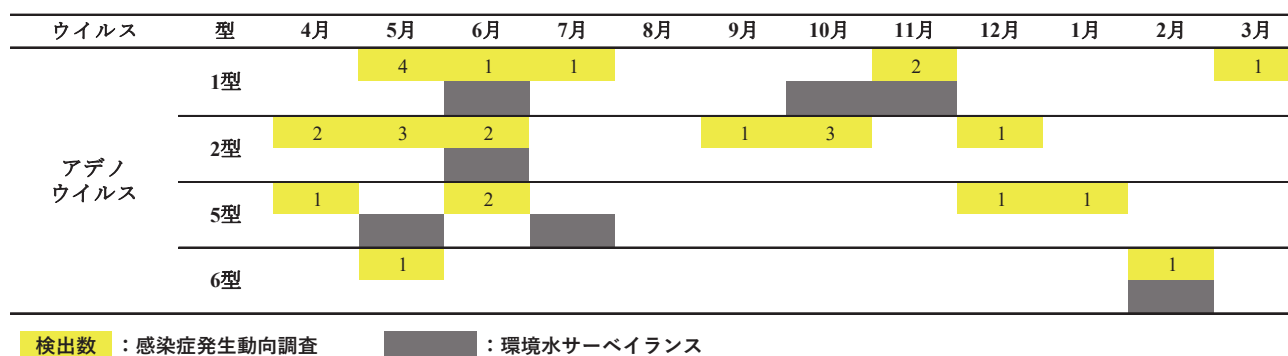


表 4. 感染症発生動向調査および環境水サーベイランスの両方において検出されたアデノウイルスの検出時期



が分離されているが、感染症発生動向調査では検出されなかった。

2) アデノウイルス

環境水サーベイランスおよび感染症発生動向調査の両方において分離・検出されたウイルスは、アデノウイルスC種の1型、2型、5型、6型であり、おおむね同じ時期に検出されていた(表4)。感染症発生動向調査においてはアデノウイルス3型、4型、7型、54型、56型等の流行性結膜炎や急性呼吸器疾患を引き起こすとされる遺伝子型株が検出されており、環境水サーベイランスにおいては31型や40型、41型等の感染性胃腸炎を引き起こす遺伝子型株が検出された。アデノウイルスは遺伝子型により疾患が異なる傾向があるが、環境水サーベイランスおよび感染症発生動向調査を併用することで、それぞれ異なる特性をもつ遺伝子型を併せたサーベイランスになることが示唆される。

国立感染症研究所の報告によると、ポリオウイルス環境水サーベイランスにおいて、2014年と2016年、九州の調査地点で採取された検体より、いずれも3型ワクチン由来ポリオウイルスが検出されている^{12,13)}。2019年度は、東京都における環境水サーベイランスにおいて、ポリオウイルスは分離されなかった。環境水サーベイランスは調査対象の下水道利用地域に限定され、感染源の特定は困難である。一方で感染症発生動向調査においては、都内広域的な患者を対象としており、不顕性患者を捕捉できない可能性が高い。これら両方を用いたサーベイランスを拡大・継続して実施することで、ポリオウイルス等の都内への侵入の早期探知が可能となると考えられる。

2020年1月より国内において新型コロナウイルス患者の発生が報告されている。また、新型コロナウイルスは患者糞便中から検出されることが報告されており、山梨県や横浜市における環境水調査においても新型コロナウイルスが検出されている^{14,15)}。このように、環境水サーベイランスは流行しているウイルスの探知が可能であることが示唆され、東京都においてもポリオウイルスに限らず新型コロナウイルス等、対象を拡大し環境水サーベイランス調査を実施していくことが求められる。

今回、我々は年間を通し環境水サーベイランスを実施した。ポリオウイルスは分離されなかったものの、その他のエンテロウイルスやアデノウイルスが分離された。都内流行状況との関連性を調査するためにも、継続的なサーベイランスを実施していくことが重要である。

ま と め

2019年度より感染症流行予測調査における感染源調査の一環としてポリオウイルス環境水サーベイランスを実施した。年間を通しポリオウイルスは分離されず、他のエンテロウイルスやアデノウイルス、レオウイルスが分離された。

文 献

- 1) Hara, M. Arita, M. Yamazaki, Z., *et al.*: *Microbiol Immunol*, **31**, 327-336, 1987.
- 2) 中野貴司: モダンメディア, **65**, 93-100, 2019.
- 3) 平山宗弘: 小児感染免疫, **19**, 189-196, 2007.
- 4) The Global Polio Eradication Initiative (GPEI), <http://polioeradication.org/> (2020年8月7日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 5) Ozawa, H. Yoshida, H. Usuku, S., *et al.*: *Appl Environ Microbiol*, **85**, e01604-19, 2019.
- 6) Nakamura, T. Hamasaki, M. Yoshitomi, H., *et al.*: *Appl Environ Microbiol*, **81**, 1859-1864, 2015.
- 7) 国立感染症研究所: ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル, <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/polio.pdf> (2020年8月7日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 8) 国立感染症研究所: 無菌性髄膜炎病原体検査マニュアル, <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/AsepticMening20180222.pdf> (2020年8月7日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 9) 国立感染症研究所: 咽頭結膜熱・流行性角結膜炎検査, 診断マニュアル(第3版), https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/adeno_v3.pdf (2020年8月7日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 10) Spinner, L. M. Di Giovanni, D.G.: *Appl Environ Microbiol*, **67**, 3016-3020, 2001.
- 11) Yamashita, A. Sekizuka, T. Kuroda, M.: *Front Microbiol*, **7**, 1-5, 2016.
- 12) 吉田 弘, 安藤克幸, 伊藤 雅, 他: 病原微生物検出情報, **37**, 27-29, 2016.
- 13) 吉田 弘, 後藤明子, 筒井理華, 他: 病原微生物検出情報, **39**, 67-69, 2018.
- 14) Haramoto, E. Malla, B. Thakalib, O., *et al.*: *Sci Total Environ*, **737**, 140405, 2020.
- 15) 小澤広規, 井上嵩之, 櫻井 光, 他: 病原微生物検出情報, **41**, 122-123, 2020.

Environmental Surveillance of Poliovirus in Sewage in Tokyo (April 2019- March 2020)

Ryota KUMAGAI^a, Mami NAGASHIMA^a, Akane NEGISHI^a, Emiko KAKU^a, Yukinao HAYASHI^a, Mamiyo KAWAKAMI^a,
Masaki HAYASHI^a, Takako YAMAZAKI^a, Hiroyuki ASAKURA^a, Miyuki NAGANO^a, Yurie KITAMURA^a,
Yuu YAOITA^a, Takushi FUJIWARA^a, Michiya HASEGAWA^a, Kohji MORI^a, Isao YOSHIDA^a,
Yuta UCHIDA^a, Ai SUZUKI^a, Tomohiro KOSUGI^a, Takashi CHIBA^a and Kenji SADAMASU^a

Japan switched from vaccination with the live oral polio vaccine (OPV) to the inactivated poliovirus vaccine (IPV) in September 2012. As high vaccination coverage has been maintained, the risk of polio outbreaks is considered low in Japan. Environmental surveillance can act as an early warning system to detect wild-type poliovirus or vaccine-derived poliovirus in low-risk areas, such as Japan.

In this study, we conducted environmental surveillance at a sewage plant in an urban area in Tokyo from April 2019 to March 2020. During the surveillance, poliovirus was not detected. However, 7 types of non-polio enteroviruses, including Echovirus 11, Echovirus 6, and Coxsackievirus B3; 7 types of adenoviruses, including Ad1 and Ad31; and reovirus were detected.

Keywords: environmental surveillance, sewage, poliovirus, enterovirus, adenovirus, reovirus

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan