

下水中の腸管ウイルスの検出状況

伊東愛梨¹⁾ 三浦美穂 保田和里 野町太郎 吉野修司 元明秀成

Surveillance of Enteric Virus in Sewage.

Eri ITO, Miho MIURA, Asato YASUDA, Taro NOMACHI, Shuji YOSHINO, Hidenari GANMYO

要旨

感染症流行予測調査の一環として、流入下水を対象としたポリオウイルス感染源調査(環境水サーベイランス)を実施した。2014年4月から2016年3月まで調査を行った結果、対象地域の下水処理区からポリオウイルスは検出されなかった。その他のウイルスとして、エンテロウイルス(EV)が116株、アデノウイルス5(Ad5)が7株分離された。感染症発生動向調査のウイルス分離、検出状況との比較をすると、下水から検出され、感染症発生動向調査では検出されないウイルス、逆に下水から検出されず、感染症発生動向調査では検出されるウイルスが明らかとなった。しかし、感染症発生動向調査で提出される検体には、採取が容易な咽頭ぬぐい液の検体が多く、下水から検出されるウイルスと比較を行うためには継続して調査が必要であると思われた。

キーワード：ポリオウイルス、生ポリオワクチン、不活化ポリオワクチン、

はじめに

近年、世界でポリオウイルスの根絶に向けての取り組みが進んでおり、日本も根絶に成功した国の一つである。ポリオウイルスは生ポリオワクチン(OPV)を接種した後、便に排泄され手指を介して二次感染(ワクチン由来ポリオ様麻痺:VAPP)を引き起こすことがある。日本では二次感染予防のため、2012年9月に定期予防接種においてOPVから不活化ポリオワクチン(IPV)への切替えが行われた。一方、海外ではいまだOPVを使用している国も存在する。そのような国からポリオを根絶した国へワクチン由来ポリオウイルス(VDPV)の輸入例も報告されており¹⁾²⁾³⁾、日本にもVDPVが輸入される可能性がある。今回、IPVの定期予防接種導入に合わせ、今後想定される輸入ポリオウイルスを監視するため感染症流行予測調査の一環として、流入下水を対象としたポリオウイルス感染源調査(環境水サーベイランス)を行った。また、ポリオウイルスを含む腸管ウイル

スの多くは便に排泄されることから、下水ウイルスを調査することで、人の間で循環するウイルスを顕性、不顕性にかかわらず検出することができる。下水からのポリオウイルスの検出状況と、同時に検出されるポリオウイルス以外のウイルスの検出状況について調査し、併せて感染症発生動向調査で検出されたウイルスとの比較を行ったので報告する。

材料と方法

- 1 対象検体：流入下水約500ml
- 2 採水時期：2014年4月から2016年3月
- 3 採水場所：宮崎処理場(開始区域内処理人口：約15万人、普及率：99.0%、水洗化率：95.7%)
- 4 方法：ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル及び感染症流行予測調査実施要領に基づき実施した

- 1) 下水前処理

a) 流入下水濃縮

下水流入水500mlを室温で3,000rpm, 30分間遠心後, 上清に2.5M塩化マグネシウムを10ml添加した。塩酸を用いてpH3.5に調整後, 1.0 μ mフィルターを用いてプレろ過を行い, 陰電荷膜(孔径0.45 μ m)を用いてろ過を行った。

b) ウイルス誘出

ろ過した陰電荷膜を細かく裁断し, ガラスビーズと3%beef extractを10ml添加した後, 1~3分間ボルテックス攪拌した。その後3000rpm, 5分間遠心し, 上清を1回目誘出液とした。再度, 陰電荷膜に3%beef extractを10ml添加し, 遠心後の上清を2回目誘出液とした。

2) ウイルス分離, 同定

感受性の異なる3種類の細胞(RD-A, HEp-2, Vero)を用いて1回目誘出液を3ウェル, 2回目誘出液を3ウェルの計6ウェルを各細胞に50 μ lずつ接種し, 4継代観察を行った。なお, 2015年4月よりCaco-2を用いた4種類の細胞で実施した。CPE(細胞変性効果)がみられた場合は培養液を回収し, ポリオ特異的細胞であるL20B細胞に50 μ l再接種後, 1継代観察を行った。L20B細胞にCPEがみられた場合は, 培養液を回収し, ポリオ中和試験を行った。感受性の異なる各細胞およびL20B細胞でCPEがみられなかった場合は, 中和試験及び遺伝子検査によりウイルスを同定した。なお下水検体からの直接的な遺伝子検査は行っておらず, 全て培養細胞を用いたウイルス分離を実施した。

5 感染症発生動向調査

2014年4月以降, 宮崎県内の定点医療機関から採取された便検体を対象とし, ウイルス分離, 検出を行った。ウイルス分離にはRD-A, HEp-2, Vero, RD-18s, Caco2の5種類の細胞を用いた。

分離陽性の場合には中和試験, 遺伝子検査を行った。遺伝子検査については, 検体からRNAを抽出後, 各ウイルスに特異的なプライマーを用いてRT-PCRを行い, ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し同定を行った。

結果

1 ポリオウイルス

対象地域の処理区の下水からポリオウイルスは検出されなかった。

2 その他のウイルス

下水より分離されたウイルスを表1に示す。分離された123株のウイルスのうち116株がEVで, 分離されたEVは全てB群エンテロウイルス(EV-B群)であった。またAd5が7株分離された。2014年4月から11月までE11が毎月分離され, 2014年5月から8月, 11月はE6が分離された。2014年11月から2015年1月, 3月から7月, 9月はE3が長期にわたって分離された。2015年10月から2016年3月まではE25が毎月分離された。

3 感染症発生動向調査からのウイルス分離, 検出状況および下水からの分離ウイルスとの比較

調査期間中, 定点医療機関から提出された便検体より分離, 検出されたウイルスを表2に示す。

便134検体のうち49検体からウイルスが分離, 検出された。感染症発生動向調査でのみ分離, 検出されたウイルスは, EV-A群(CA4, CA6, CA10, CA14, EV71)とEV-B群(CB3, E14), Ad2, Ad3であった。なお, パレコイルス(HPeV), ノロウイルス(NV), サポウイルス(Sapo), アストロウイルス(Astro), 水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)は, 遺伝子検査で同定した。

考察とまとめ

今回, 対象地域の下水処理区からポリオウイルスは検出されず, その他の腸管ウイルスとして123株のウイルスが分離された。下水と感染症発生動向調査の結果を比較すると, 両方から分離, 検出されたウイルスは全てEV-B群(CA9, CB4, CB5, E3, E16, E18)であり, 下水からはEV-B群が分離されやすく, EV-A群が分離されにくい傾向がみられた。調査期間中, 下水から長期間分離されたウイルスの中で, E3のみ下水と感染症発生動向調査の両方から分離, 検出されており, それ以外のウイルスについては不顕性感染し伝播していたと考えられる。下水と感染症発生動向調査の結果を比較すると, 下水から検出され, 感染症発生動向調査では検出されないウイルス, 逆に下水から検出されず, 感染症発生動向調査で検出さ

れるウイルスが明らかとなった。

両者で検出されるウイルスに違いがみられる要因として、複数のウイルスが存在している下水中では、ウイルスの抵抗力や細胞培養における増殖速度が影響している可能性があるという報告もされている⁴⁾。また、流入下水を対象とした環境水サーベイランスは下水利用人口の全年齢層を対象としており、顕性、不顕性感染にかかわらず検出することができる。一方、感染症発生動向調査の定点医療機関から提出される検体の多くは主に小児科を対象としていることから、疾患による偏りなども考えられる。感染症発生動向調査で提出される検体は、採取が容易な咽頭ぬぐい液の検体が多く、便検体が少ないため、下水から検出されるウイルスと比較を行うためには継続して調査が必要であると思われた。

国内では2012年10月以降、ポリオウイルスは患者および下水から分離、検出されていなかったが、2014年10月に約2年ぶりに下水からポリオウイルス3型ワクチン株が分離された。分離された地域ではその後引き続き下水の調査を行ったが、ポリオウイルスは分離されておらず、10月に分離されたウイルスは一過性のものであると推測された⁵⁾。

また、2014年12月に熊本市でOPVを接種した患者の便検体からポリオウイルス1型ワクチン株が分離されており、この患者は海外でOPVを接種していた⁶⁾。

日本はIPV導入後、高いワクチン接種率を維持しており、ポリオ患者の発生、ポリオウイルスの伝播のリスクは低いことが想定される。しかしIPVは腸管でのウイルス増殖を抑制する十分な粘膜免疫を誘導しない⁷⁾。そのため、国内へVDPV

や野生株ポリオウイルスが輸入される可能性があり、今後も引き続き、国内及び国外のポリオウイルスの動向に注視する必要がある。

謝辞

本調査にご協力いただいた各医療機関並びに各保健所、下水道施設課の皆様には深謝いたします。

参考文献

- 1) 清水博之：ポリオの病態とポリオワクチン 小児科臨床65 2281-2287, (2012)
- 2) 中村朋史 他：ワクチン由来ポリオウイルス (VDPV)によるポリオ流行の現状とリスク 病原微生物情報, Vol.37.24-26
- 3) 吉田弘 他：感染源調査によるポリオサーベイランス 病原微生物情報, Vol.30.176-178
- 4) 水谷絵美 他：2006年から2010年に流入から分離されたエンテロウイルスの消長 愛知衛所報No.61,11-18, (2011)
- 5) 吉田弘 他：平成26年度感染症流行予測調査事業 ポリオ環境水調査にて検出されたウイルスについて 病原微生物情報, Vol.37.27-29
- 6) 西澤香織 他：海外で経口弱毒性ポリオワクチンを投与された小児の便検体から検出されたポリオウイルスワクチン株について 病原微生物情報, Vol.36.86-87
- 7) ポリオ 2016現在 病原微生物情報, Vol.37.17-18

表1 下水からのウイルス分離、検出状況

	2014												2015												2016			Total
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3				
Polio																									0			
CA9														1											1			
CB4																	2	3							5			
CB5			1	1																					2			
E3								4	2	2		5	7	10	3	12		2							47			
E5															1										1			
E6		2	3	3	1			4										1	4					18				
E11	1	4	1	3	5	5	1	1																21				
E16																				1				1				
E18																				1				1				
E25												1		1				4	3	4	2	2	2	19				
Ad5									4								3							7				
Total	1	6	5	7	6	5	1	9	6	2	0	5	8	11	5	12	2	8	5	9	4	2	2	2	123			

表2 発生動向調査からのウイルス分離、検出状況(便検体)

	2014												2015												2016			Total
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3				
CA4					3																			3				
CA6																2								2				
CA9															2									2				
CA10														1										1				
CA14					1																			1				
EV71	1																							1				
CB3				1																				1				
CB4																		1		1				2				
CB5			1																					1				
E3														1	2	4								7				
E14	1																							1				
E16																1				1				2				
E18																	1							1				
Ad2					1			1																2				
Ad3													1											1				
HPeV1		1	2	1	3											1	1		1					10				
HPeV3		1	1	1																				3				
NVG I																		1						1				
NVG II																			3			1		4				
Sapo									1															1				
Astro											1													1				
VZV																1								1				
Total	2	2	2	4	6	3	0	1	1	0	1	0	1	2	4	9	1	2	4	2	1	0	1	0	49			