

# ウイルス性下痢症研究会第 32 回学術集会プログラム

## オンライン開催

2021 年 11 月 15 日 (月) 12:00 から接続開始予定

「総会」 12:15 — 12:30

司会：上間 匡 (国立医薬品食品衛生研究所)、岡 智一郎 (国立感染症研究所)

「話題提供」 12:30 — 13:00

「近年におけるノロウイルス胃腸炎の流行低迷に関する一考察」

齋藤博之<sup>先生</sup> (秋田県健康環境センター)

「トピックス」 13:00 — 17:20

1. 「ロタウイルスワクチンの定期接種化とサーベイランス」

神谷元<sup>先生</sup> (国立感染症研究所)

2. 「ウイルス性下痢症の予防を考える-小児からのネコロタウイルスの検出」

津川毅<sup>先生</sup> (札幌医科大学)

3. 「動物からの下痢症ウイルス検出-deep sequence と分離培養によるアプローチ」

長井誠<sup>先生</sup> (麻布大学)

4. 「CaliciWEB から GatVirusWEB とその後の展開」

三瀬敬治<sup>先生</sup> (札幌医科大学)

5. 「メタゲノム解析による臨床検体や環境試料からの病原体探索」

元岡大祐<sup>先生</sup> (大阪大学)

6. 「下痢症関連アデノウイルスについて」

藤本嗣人<sup>先生</sup> (国立感染症研究所)

7. 「水道水源におけるロタウイルスの遺伝的多様性解析」

三浦尚之<sup>先生</sup> (国立保健医療科学院)

8. 「地下式受水槽のノロウイルス汚染を原因とする食中毒事例と近年の神戸市で発生した下痢症ウイルス事例について」

有川健太郎<sup>先生</sup> (神戸市健康科学研究所)

9. 「臨床検体と環境水からのサポウイルスの検索に向けた取り組み」

小林孝行<sup>先生</sup> (福岡県保健環境研究所)

10. 「下水疫学調査による新型コロナウイルスの流行状況の把握と変異株の早期検知」

北島正章<sup>先生</sup> (北海道大学)

「話題提供」 17:20 — 17:50

「腸管系ウイルス培養における新知見 =ヒトの生理からウイルス増殖を考える=」

高木弘隆<sup>先生</sup> (国立感染症研究所)

閉会挨拶

# 抄録

## 近年におけるノロウイルス胃腸炎の流行低迷に関する一考察

秋田県健康環境センター 齋藤博之

所謂“第 5 波”として猖獗を極めた新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の報告数が 9 月に入ってから急速に減少に転じ、その原因として「お盆休みの影響が薄れた」、「国民の行動変容」、「ワクチン 接種の進展」、「様々な要因が複合」等、諸説が論じられている。一般に、“なぜ失敗したのか”といったネガティブ事象に関する検証は真剣に行われるが、“なぜ成功したのか”といったポジティブ事象に関しては結果オーライという形で放置されることが多い。将来の再燃を防ぐためにも、こうした議論が行われることは、今すぐに確証が得られないにせよ健全な流れと言える。翻って本会で取扱う下痢症ウイルスに関してであるが、近年ノロウイルス (NoV) の発生が少なくなっていることについて何が考えられるのかといったテーマを与えられた。我が国で初めて COVID-19 が確認された日の前日に当たる 2020 年 1 月 15 日のことであった。当然の如く、NoV の流行低迷は COVID-19 の問題とは関係が無い。地方衛生研究所では、日々の業務として下痢症ウイルスを含む様々な病原体のサーベイランスや食中毒 発生時の検査、患者情報の収集・還元を行っており、その中でいわば“肌感覚”として NoV が少なくなってきたことは認識していたが、一般の学会で発表するような形でまとめるのは難しいところがあった。本会の目的と意義は、学会とは異なる切り口で会員相互の情報交換を行うところにあるので、話題提供として考察を加えてみたい。

最初に状況を整理する。感染症発生動向調査 (患者サーベイランス) における定点当たりの感染性胃腸炎の報告数は、2012/2013 年シーズンの 382.87 (年間総数) から 2019/2020 年シーズンの 172.29 まで半減している (COVID-19 の影響を避けるため 2020/2021 年シーズンは除外した)。NoV の流行が反映されやすいように、報告数のピーク値で見ると 2012/2013 年シーズンの 19.65 から 2019/2020 年シーズンの 7.46 まで 3 分の 1 に減少している。病原体サーベイランスでは、2012/2013 年シーズンには 4,058 例 (NoV とサポウイルスの合計) が報告されているが、2019/2020 年シーズンでは 1,409 例にとどまっている。食中毒統計で公表されているウイルス性食中毒の患者数は、2012 年は 18,637 人であったが、2019 年では 7,031 人と 6 割減である。このように複数の統計資料を俯瞰すると、多少の増減はあるものの流行は右肩下がりで推移しているのは事実である。この間で、減少傾向がより明確になったのは 2014/2015 年シーズンからである。

次に流行低迷の理由として考えられることをいくつか挙げてゆくことにする。食品衛生法にウイルス性食中毒が規定されたのは 1997 年であるが、NoV が一般社会に広く認知されるようになったのは 2005 年の広島県福山市の高齢者施設における死亡例の報道からである。これまで 20 年以上にわたって、衛生行政当局は予防対策や啓発活動に力を入れてきたのであって、その取り組みが功を奏したということならば重畳であるが、それだけを流行低迷の理由とするのは楽観的に過ぎよう。今般の“緊急事態宣言”によって、図らずも人の行動を継続的に制御するのは困難であることが証明されたところである。それでは、他の感染症との関係はどうなっているのだろうか。COVID-19 の流行と同時にインフルエンザの流行が起こらなくなったことはすでに確認されており、原因として人の行動変容やウイルス干渉等が論じられている。インフルエンザが流行すると NoV が流行しないといった経験は多々あるが、感染症発生動向調査の報告数をインフルエンザと感染性胃腸炎で比較すると、一部は事実で一部は違うとい

う結果になった。週単位でながめると毎年 48 週前後(12 月中旬)に感染性胃腸炎のピークが見られ、約 2 か月後にインフルエンザのピークが来ることが多く、2009 年(インフルエンザウイルス A(H1N1)pdm09 の流行年)だけは逆に became。いずれにせよ両者のピークが重なった年はなく、その意味では「インフルエンザが流行すると NoV が流行しない」というのは事実である。一方で、年間総数で比較すると両者に明確な関係性というものは観察されず、2014/2015 年シーズン以降は感染性胃腸炎のピークそのものが不明瞭になっている。インフルエンザとの関係に、近年の NoV 流行の低迷理由を求めるのは無理があるが、2014/2015 年という年に何かのヒントが隠されているのかも知れない。

2014/2015 年シーズンに何が合ったかを想起すると、NoV GII.P17-GII.17 Kawasaki 株(以下 GII.17 と表記)が出現した年である。2014/2015 年シーズンの秋田県での病原体サーベイランスにおいては、GII.4 Sydney 2012 が 65%、GII.17 は 15%であった。カキ非関連集団感染事例では、GII.4 Sydney 2012 が 52%、GII.17 は 19%であり、サーベイランスの結果と類似していた。しかし、2015/2016 年シーズンでは、サーベイランス(GII.4 Sydney 2012: 60%、GII.17: 14%)とカキ非関連集団感染事例(GII.4 Sydney 2012: 25%、GII.17: 44%)とでは大きく乖離していた。カキ関連集団感染事例では 7 事例中 4 事例から GII.17 が検出された。市販カキの中腸腺からは、15 パック中 10 パックから GII.17 が検出された。ある成人の症例を検討すると、GII.17 には初感染であるにもかかわらず、下痢はなく、ガスが貯留することによる腹部膨満感が主訴であった。こうした症状も 17 時間後には軽快し、5 日後には糞便中のウイルスも検出されなくなった。ここで GII.17 が弱毒であるとするならば、次のような仮説が成り立つであろう。

- 1) サーベイランスの検体は病院外来で採取されるため、症状の軽い人は受診しないので対象外。
- 2) 集団事例として保健所が探知した場合、本来受診しない人の検体も採取される。
- 3) 症状が軽く、受診しない人であってもウイルスを排泄しており、カキ中腸腺からは GII.17 が優位に検出される(下水を経由する)。
- 4) 以上のことから、GII.17 は環境中に広く蔓延している可能性があり、一方、弱毒で症状が軽いため流行として顕在化しにくい。

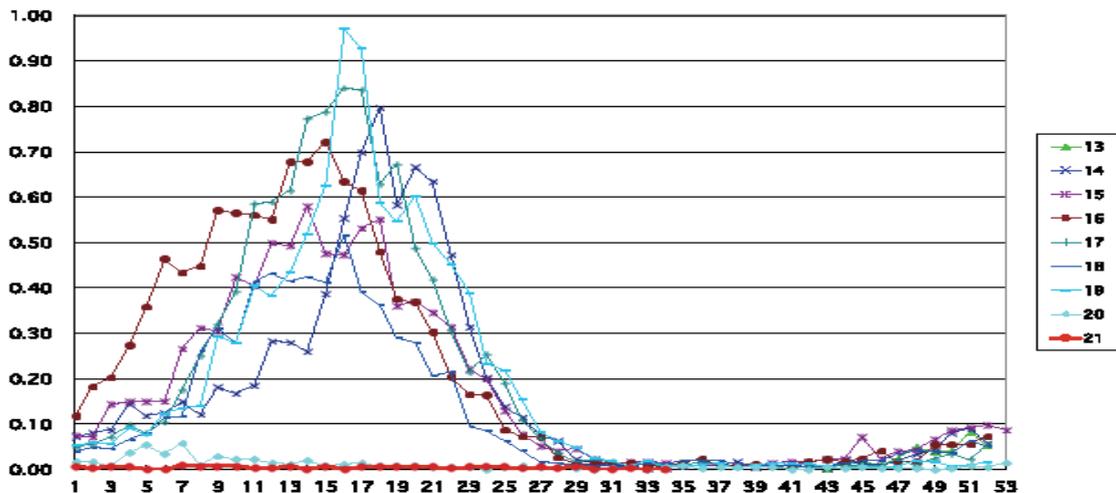
また、同症例において GII.17 感染時の血清を ELISA で測定したところ、GII.17 の他に GI.3、GII.3、GII.4、GII.6 に対する IgG と IgA が検出された。この結果が、免疫応答によるものか抗体の交差反応によるものかは検討の余地があるが、他の遺伝子型に対してもある程度の防御効果が見込めるものと期待できそうである。ここで、唐突ではあるが別分野の紹介をしておく。農学分野では植物ウイルスによる農作物被害を防ぐ手段として、同類の弱毒ウイルスをビニールハウス内で用いることで効果を上げている例がある。トマト、ピーマン、キュウリ等に用いるための弱毒ウイルスが農薬の一種として市販されている。植物には抗体を産生するというメカニズムが存在しないことから、防御効果はウイルス干渉によってもたらされていると考えられる。話を NoV に戻すと、現在のサーベイランスで GII.17 はほとんど検出されなくなったが、下水やカキ中腸腺からは恒常的に検出されている。このことは、GII.17 の潜在的感染者が常に存在していることを意味している。先に述べたとおり、健康被害を感じないくらい弱毒の GII.17 が蔓延していることで、交差免疫あるいはウイルス干渉によって、他の(強毒の)型の流行を抑え込んでいるのだとしたら、近年の NoV の流行が低迷している(ように見える)ことの説明理由の一つにはなるであろう。この推論は 2015 年 9 月 16 日に「GII.17 は“環境ワクチン”と呼べるような代物かも知れない」と思い至ったものであり、何かのエビデンスがあるわけではない。今後、下水やカキから GII.17 が検出されなくなった時点で流行が再燃するのか、様々に考えを巡らせるために話題提供とさせていただきます。

## ロタウイルスワクチンの定期接種化とサーベイランス

国立感染症研究所実地疫学研究センター  
神谷 元

2020年10月、国内がCOVID-19対応で一色の中、静かに日本国内においてロタウイルスワクチンが定期接種化されました。定期接種化前から任意接種であったにもかかわらず、ほぼすべての子どもが罹患する疾患であること、ワクチンの効果が高いこと、針を使わない経口接種であることなどもあり、比較的高い接種率を達成していましたが、定期接種化されることにより、より確実にロタウイルス感染症が予防され、重症化に伴う入院の減少が期待されました。

図：定点当たりの感染性胃腸炎（病原体がロタウイルスであるものに限る）の報告数の推移（発生動向調査より）2021年第36週現在



上の図は定期接種に先立って開始されたロタウイルス感染性胃腸炎の定点サーベイランスです。国内のロタウイルス感染性胃腸炎の患者は春から夏にかけて認められる傾向がわかります。定点当たりの報告数は、2020年以降ほとんど症例が届けられていませんが、これがワクチンの効果によるものなのか、COVID-19対策による行動変容などが影響しているのかは、今後さらに詳細な調査が必要です。また、ロタウイルスワクチンの副反応として知られている腸重積症の発症状況についても現在のところ詳細な情報はありません。

COVID-19 の世界的なパンデミックという非常に稀な環境下において定期接種化されたロタウイルスワクチンの疫学的な影響や副反応のモニタリングに関してサーベイランスの観点からご紹介させていただきたいと思います。

## ウイルス性下痢症の予防を考える-小児からのネコロタウイルスの検出

札幌医科大学 小児科 津川 毅

ロタウイルス胃腸炎は先進国・開発途上国を問わず、5歳までにほとんどの子供が罹患し、ワクチン導入前は5歳未満の急性胃腸炎による入院の半数程度がロタウイルスによるものとされていた。ロタウイルスワクチンの重症胃腸炎の予防効果は先進国で約90%とされ、わが国では2011年11月に任意接種として導入され、2020年10月に定期接種化された。

A群ロタウイルスは、レオウイルス科に属する11分節型の二本鎖RNAウイルスであり、ヒト以外の哺乳類や鳥類に広く感染し、それぞれに固有のロタウイルスが感染する。しかし、動物種の壁を越えて、ロタウイルスが感染することもある(種間伝播: interspecies transmission)。

A群ロタウイルスの分類は、外殻蛋白の中和抗原であるVP7(G遺伝子型)とVP4(P遺伝子型)の組合せにより規定される。G遺伝子型は41種類、P遺伝子型は57種類あり、ヒトではG1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G4P[8]、G9P[8]の5種類が90%以上を占めていることが知られていた。2008年にロタウイルス全11分節の遺伝子型の表記法が提案され、ヒトロタウイルスの大部分は、ブタ由来のWa-like (G1/3/4/9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1)、ウシ由来のDS-1-like (G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2)に属し、一部はネコ由来のAU-1-like (G3-P[9]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3)に属することが示された。

AU-1株は1982年に日本で分離され、RNA-RNA hybridizationによりネコからヒトへの種間伝播が示唆された(Nakagomi & Nakagomi, 1989)。その後の遺伝子解析により、ネコロタウイルスはG3P[9](human-feline系, AU-1/FRV-1)とG3P[3](feline-canine系, Cat 97)の2つの群に大別されることが明らかとなった(Tsugawa & Hoshino, 2008)。

今回は我々が解析した、日本や世界各国の小児のネコロタウイルスを中心に概説したい。



## 動物からの下痢症ウイルス検出

### -deep sequence と分離培養によるアプローチ

麻布大学獣医学部獣医学科伝染病学研究室 長井 誠

家畜産業において下痢症は生産性低減につながる要因であり、米国での調査では子牛の下痢症による被害額は年間 100-200 億円と試算されている。家畜の下痢症のうちウイルスが原因となるものは、牛では牛 A 群ロタウイルス、牛コロナウイルス、牛アデノウイルスおよび牛ウイルス性下痢ウイルス(下痢が主にみられるのは粘膜病の病型)、豚では伝染性胃腸炎ウイルス、豚流行性下痢ウイルスおよび豚ロタウイルスなどがよく知られている。近年におけるウイルス遺伝子情報の蓄積や新たな培養細胞や技術の開発により、新規のウイルスの発見やこれまで分離できなかったウイルスの培養系の確立がなされている。遺伝子診断技術の進歩により、家畜保健衛生所、食肉衛生検査所などでは PCR 法および RT-PCR 法による診断法がルーチンで行われるようになり、かつてウイルス分離法しか病原診断の手法がなかった頃に比較すると、診断可能な症例が増えている。しかしながら PCR 法はプライマー情報のある疾患しか診断できないこともあり、現在でも原因が特定されず原因不明と診断される症例は少なくなく、感染性と考えられる下痢症の原因調査では依然として何割かは原因が特定されていないのが現状である。近年、次世代シーケンサーの登場で、培養不能の病原体のメタゲノム解析が可能となり、これまで原因不明であった症例への応用が期待されている。本演題では、これまで演者らが実施してきた次世代シーケンサーを用いた家畜の糞便中のウイルスを網羅的な探索と培養細胞を用いた家畜糞便からのウイルス分離について最近の知見を述べる。

次世代シーケンス(NGS)では糞便からは多様なウイルスが検出される。下痢症 および健康な糞便に共通して NGS で検出されるウイルスで検出頻度が高いのは、牛ではアストロウイルス、エンテロウイルス E および F、ネボウイルス、牛ノロウイルス、牛コブウイルス、牛コロナウイルス、牛トロウイルス、ロタウイルス A、B および C、Boosepi ウイルス、ピコビルナウイルスなどがある。アストロウイルスの特定の株はアストロウイルス脳炎を引き起こすことが明らかとなり、我が国でもその株の存在が明らかとなり注目されている。Boosepi ウイルスは我々が発見したピコルナウイルス科のウイルスで、健康な牛の糞便にもふつうにみられるので下痢症との関連は不明であるが、最近ピコルナウイルス科の中の独立した属(Boosepi ウイルス属)となった。豚ではアストロウイルス、サポウイルス、エンテロウイルス G、サペロウイルス、テシオウイルス、豚コブウイルス、ポサウイルス、ロタウイルス A、B、C および H、ピコビルナウイルス、パシウイルス、Tottori ウイルスなどがみられる。このうち Tottori ウイルスは健康な豚の糞便に見られるウイルスで、Boosepi ウイルス同様

ピコルナウイルスの新しい属となった。その他にサペロウイルスと近縁でピコルナウイルスの新たな属の候補となる豚ピコルナウイルスジャパンも我が国の健康な豚の糞便から検出されている。以上のように多くのウイルスが見つかるが、下痢症の原因となるウイルス以外に家畜に対する影響は現在のところ無視できる範囲内と思われるウイルスも少なくない。しかし、次世代シーケンスで検出されたウイルス遺伝子全体を解析してみると、遺伝子再集合や遺伝子組み換えでウイルスが進化している状況が確認され、現在無視できるレベルの糞便ウイルスが突然病原性を獲得する可能性も否定できないことが示されている。現在、次世代シーケンスはコストもかかり、得られた膨大なデータの解析にも高価なソフトが必要であり、ルーチンで行うことができるようになるには時間がかかると思われる。しかし糞便中のウイルスを監視していくことは意義のあることと考えられるため、新規ウイルスを含む糞便中に存在するウイルスデータの集積を続けていくため今後も効率的なサーベイランスが必要と考えられる。

ウイルス分離は従来から家畜保健衛生所で行われてきたベーシックな方法であるが、糞便からのウイルス分離は容易ではなく、遺伝子検査が応用されるまでは原因不明で終わる案件も少なくなかった。遺伝子検査で診断に至る件数が増えて的確な農家 指導が行われるようになったことは喜ばしいことであるが、遺伝子でしか検出できないウイルスは中和試験による抗体検査が不能であり、ワクチンの開発も困難である。これらのことから遺伝子検査と並行してウイルス分離は行うべきと思われる。当研究室は 細胞培養を行っていなかったが、昨年から機材を整えて細胞培養を行い、ウイルス分離を開始した。使用している細胞は MA-104、MARC145、HRT-18、MDBK、PK15、Vero といった従来から使われてきたベーシックな細胞であるが、数種類のウイルスが分離された。不思議なことに、NGS の結果をもとに検体を選定して特定のウイルスを 狙って分離をかけているが、NGS の結果と異なるウイルスが分離されることが少なからずある。例えば当研究室で一番多いケースは、NGS の結果にないオルソレオウイルスが分離される例で、豚で 3 例確認された。このようにまだウイルス分離は試行錯誤で行っているところだが、これまでに報告のないピコルナウイルスの分離に成功したので、このことは発表で述べさせていただきたい。

## CaliciWEB から GatVirusWEB とその後の展開

三瀬敬治 (札幌医科大学)

GatVirusWEB (<http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~gatvirus/> :QR コード 1) は 2004 年に公開した、カリシウイルス研究者情報サイト「カリシウェブ」がその原型となっている。

国立遺伝学研究所の DDBJ; DNA Data Bank of Japan は欧州の ENA; European Nucleotide Archive および 米国の NCBI; National Center for Biotechnology Information と、インターネットを経由したデータと情報の相互交換と、定期的開催する会議を通じて密接に連携し、INSDC; International Nucleotide Sequence Database を構築している。(https://www.ddbj.nig.ac.jp/about/insdc.html より一部引用)

しかしながら、これらのデータベースは登録数があまりに膨大であるため、目的の配列にたどり着くのが一苦勞である。そこでカリシウイルス研究者にとって使い勝手の良いものを目指して、DDBJ に登録されたデータから、カリシウイルスに特化したデータベースを構築し、これを 2008 年に公開した。(http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~gatvirus/ddbj2/ :QR コード 2)

この試みは三瀬が 2009 年から国立感染症研究所(当時)の寺嶋淳先生が代表者である厚労省科研費(後に国立感染症研究所の泉谷秀昌先生が代表者)の研究分担者となったことから継続され、現在に至っている。

母体となったカリシウェブでは、標準化した系統樹を作成する試みなども行われ、カリシウイルスのみならず、下痢症ウイルス全般へと守備範囲を広げるため、GatVirusWEB として機能の拡張などが進んだが、近年は残念ながら、ウイルスデータベース以外の利用は低迷している。

ウイルスデータベースの登録情報は、公開当初、Norovirus, Sapovirus, Vesivirus, Lagovirus, そしてごく初期に登録されたものを想定して SRSV のデータベースであったが、本研究会で紹介した際に寄せられた要望に応えるべく、カリシウイルスではないが Rotavirus もデータベースに加えた。

公開当初は全てのウイルスを合わせても 7,369 レコードでしかなかったが、DDBJ から毎日公開される新規登録配列からそれぞれのウイルスのデータを自動的に選択し、データベースへ登録するプログラムにより、2021 年 9 月 9 日現在で、Norovirus が 51,191 レコード、Sapovirus が 5,995 レコード、Vesivirus が 2,020 レコード、Lagovirus が 2,810 レコード、Rotavirus が 107,933 レコードとなっている。

今後も多くの人に利用してもらい、フィードバックをいただけることを期待している。

また、2018 年には、島津製作所の許可を得て、同社製の MultiNA で得られた Rotavirus の type 別適合度を算出する「ROTA analyzer」(<http://multiweb.sapmed.ac.jp/rota.cgi> :QR コード 3) も構築したが、検証段階で作業が停止している。手持ちのデータをオンラインに流すことには抵抗があると思われるが、セキュリティには非常に配慮している。ご興味のある方は利用登録をするので、ご一報いただきたい(mailto:mise@sapmed.ac.jp)。



QRコード1 : GatVirusWEB



QRコード2 : データベース  
GatVirusWEB



QRコード3 : ROTA analyzer  
GatVirusWEB

## メタゲノム解析による臨床検体や環境試料からの病原体探索

大阪大学 微生物病研究所 感染症メタゲノム研究分野  
元岡大祐

感染症は未だに高い死因の1つであり、世界の死亡要因トップ10に下気道感染症、下痢症と結核が入り、全死亡の約2割を占めている。特に発展途上国の小児においては、5歳未満で亡くなる子供は10%を超える。近年、感染症は発展途上国のみの問題にはとどまらず、本国においてもこの10年間で、デング熱、ジカ熱、はしかなどの輸入感染症の危機に直面してきた。格安航空会社の参入により海外旅行者が急増しており、ひとたび感染が流行すると世界的なパンデミックへと繋がりやすくなっている。新型コロナウイルス感染症の流行からみてとれるように、一度感染症が流行すると、その流行は継続的に繰り返して発生し、死者数を増加させるのみならず、経済的損失も計り知れないものである。しかし新興・再興感染症は、いつどこで発生するか予想することは難しく、発生した場合に早期に診断、治療を行う体制をいかに早く構築するかが重要である。

病原体同定法としては主に、分離・培養、形態観察やPCR法などが行われているが、それぞれの微生物に適した手法を用いる必要がある。またマイクロアレイ法では、既知の細菌とウイルスの数万種を同時に検査できるキットも発売されているが、全ての細菌やウイルスには対応しておらず、また真菌や原虫などにも対応していないため網羅性に欠ける。一方で、我々が取り組む次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析法(臨床メタゲノミクス)は、病原体ごとに異なる処理は必要とせず、臨床検体中の遺伝情報を網羅的に探索することで、すべての既知の病原体はもちろん、未知の病原体をも検出・同定し得るものである。さらに全核酸の配列をシーケンスしているため、病原体の検出と同時に病原体ゲノムの遺伝子型のタイピングも実施可能である。従来法により病原体が確定している場合においても、多くの原因微生物が難培養性であり、その遺伝子型の同定にもメタゲノム解析法は有用である。さらには共感染例も同時に検出することが可能である。

CDCの報告に依ると感染症による死亡要因としては、肺炎に次いで下痢症が多く、特に下痢感染症では1日に2,000人以上の子供が亡くなっており、適切な診断を施すことが重要であると考えている。本発表では、特に下痢感染症におけるメタゲノム解析について、我々が原因不明食中毒例からメタゲノム解析により病原体を検出した例や同定済みの病原体以外のウイルスが検出された例などをご紹介します。

メタゲノム解析は上述のごとく、網羅的解析法であるため最善の解析手法に思えるかもしれない。しかし実際には、網羅的解析ゆえに圧倒的に多く存在する宿主由来の核酸量が原因で、感度が低下したり、様々なコンタミネーションが見えたりするなど、混乱を招くような結果が得られることもしばしばである。そもそも我々が参照配列として利用するNCBI-ntデータベースなどにも誤登録例が散見される。本発表では、メタゲノム解析の利点のみならず、実際に適用する上での問題点や課題点などについても触れさせて頂きたい。



## 下痢症関連アデノウイルスについて

国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター

○藤本嗣人、高橋健一郎、花岡希

アデノウイルスは、小児感染性胃腸炎の原因の約 10%を占めているとされ<sup>1)</sup>、乳幼児施設でアウトブレイクを起こすこともある<sup>2)</sup>ため注意が必要な病原体である。本口演ではアデノウイルスが原因となる感染性胃腸炎のウイルス学的特徴、臨床症状、検査方法、治療、予後、予防について実際の症例を加えて解説する。

### 1. ウイルス学的特徴

アデノウイルスはアデノウイルス科、マストアデノウイルス属の 2 本鎖 DNA ウイルスでエンベロープは持たない。正二十面体の構造で、240 個のヘキソンと、二十面体の各頂点から 12 個のペントンベース、さらにファイバーが外側へと伸びている。2007 年までアデノウイルスの同定はウイルス分離とその後の血清学的同定法を基本としていたが、2008 年以降ウイルスの全塩基配列による型別がなされるようになり、現在では 90 を超える型に分類されている。このうち、感染性胃腸炎を主に起こすのは、F 種の 40 型と 41 型、A 種の 31 型だが、呼吸器感染症を主に引き起こす B 種、C 種、E 種でも 10～20%程度で胃腸炎症状が見られる<sup>3)</sup>。

### 2. キットによる診断

臨床現場ではイムノクロマトキットによる迅速検査がアデノウイルス感染性胃腸炎の診断に広く使われている。2016 年 4 月～2017 年 3 月外来患者レセプトデータによると糞便に対するアデノウイルス抗原定性検査は、15,524 回行われており、そのうち 5 歳未満が約 60%を占めていた。アデノウイルスのイムノクロマトキットには呼吸器検体用、眼科検体用、消化器検体用と 3 種類あり、適切な検体とキットを用いる必要がある。ディップスティック '栄研'アデノ®、BD Rota/Adeno エグザマン™スティック®、ラピッドテスタ® ロターアデノ II®、クイックチェイサー Rota/Adeno®、イムノカード SD ロタ・アデノ®が販売されている。注意点としては、F 種や A 種を特異的に判別しているわけではない点である。C 種は糞便中に長期的、持続的に排泄されることが知られており<sup>1)</sup>、糞便アデノウイルスがキットで陽性でも必ずしも病原体を捉えていない可能性がある。渡部ら<sup>4)</sup>は、クイックチェイサー Rota/Adeno®をロタあるいはアデノが疑われる感染性胃腸炎患者 109 名で検討したところ、リアルタイム PCR を標準検査としてアデノウイルスの感度は 66.7%、特異度 100%と報告しており、偽陰性に注意が必要である。

### 3. 実験室診断

アデノウイルスの構造蛋白はヘキソン (hexon)、ファイバー (fiber)、およびペントン (penton) の 3 種類からなる。ヘキソンは中和抗原性を持つ領域であり、この領域の配列による型別が 1990 年代以降行われてきた。しかし全塩基配列解析の結果と照合した結果、ヘキソン領域のみでは全塩基

のごく一部を代表しているに過ぎないことから、ファイバーおよびペントンベース領域も調べることの重要性が認識され型別に用いられている。

#### 4. 臨床症状

潜伏期間は約 8～10 日。発熱、嘔吐、下痢といった消化器症状がメインとなり、他の胃腸炎を引き起こすウイルスと比較して下痢の期間が長く、14 日以上続くことも稀ではない<sup>5)</sup>。服部ら<sup>6)</sup>の便中アデノウイルス抗原陽性胃腸炎入院例の検討では、ロタウイルスと比較して発熱と下痢の持続期間はアデノウイルスが有意に長く、嘔吐の回数や持続期間はロタウイルスの方が有意に長かったと報告している。

#### 5. 治療、予後、予防

抗ウイルス薬といった特異的な治療法はなく、対症療法が基本である。前述の服部らの検討では、便中アデノウイルス抗原陽性胃腸炎 28 例のうち、痙攣発作 4 例 (14%)、腸重積症 1 例 (4%) 認めた<sup>7)</sup>が、いずれも後遺症なく軽快した<sup>7)</sup>。アデノウイルス感染が腸重積症のリスクファクターの可能性が指摘されており<sup>8)</sup>、経過中腸重積症の発症には留意すべきである。アデノウイルス胃腸炎では長期間に渡って下痢が続くため、患者に接触した後の手洗いやマスク着用が重要となる。アデノウイルスはエンベロープを持たないため、消毒剤への抵抗が強い。次亜塩素ナトリウムによる消毒が有効である。

#### 参考文献

- 1) White DO, Fenner FJ: Adenoviridae. Medical Virology 4<sup>th</sup> ed., 306-316, Academic press, San Diego, 1994.
- 2) 志水哲也, 志水麻実子, 皆川洋子・他: アデノウイルス 41 型による感染性胃腸炎の一乳幼児施設内流行. 小児科診療 73: 668-672, 2010.
- 3) 藤本嗣人, 井手忍, 柴原乃奈・他: アデノウイルス胃腸炎. 臨床と微生物 40: 65-68, 2013.
- 4) 渡部雅勝, 武蔵由紀, 鈴木千代子・他: イムノクロマトグラフィーを用いたロタウイルス・アデノウイルス同時迅速診断キットの臨床評価. 医学と薬学 71: 2319-2329.
- 5) Uhnoo I, Wadell G, Svensson L et al.: Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. J Clin Microbiol 20:365-72, 1984.
- 6) 服部文彦, 西村直子, 日尾野宏美・他: 便中アデノウイルス抗原陽性胃腸炎入院例の臨床的検討—ロタウイルス胃腸炎との比較—. 小児感染免疫 27: 271-277, 2015.
- 7) 服部文彦・他: 小児感染免疫 27: 271-277, 2015.
- 8) Bines JE, Liem NT, Justice FA et al.: Risk factors for intussusception in infants in Vietnam and Australia: adenovirus implicated, but not rotavirus. J Pediatr. 149: 452-60, 2006

## トピックス

# 水道水源におけるロタウイルスの遺伝的多様性解析

三浦尚之<sup>1</sup>, 門屋俊祐<sup>2, 3</sup>, 瀧野博之<sup>1</sup>, 佐野大輔<sup>2</sup>, 秋葉道宏<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 国立保健医療科学院 生活環境研究部 (〒351-0197 和光市南 2-3-6, Email: miura.t.aa@niph.go.jp)

<sup>2</sup> 東北大学 大学院工学研究科

<sup>3</sup> 東京大学 大学院工学系研究科 (現在の所属)

### 1. はじめに

厚生労働科学研究「化学物質等の検出状況を踏まえた水道水質管理のための総合研究」(研究代表者: 北海道大学 松井佳彦 教授)の微生物分科会ウイルス WG では、浄水処理におけるウイルスの除去・不活化を保証する運転パラメータ、ウイルス除去を示す遺伝子マーカーの試験方法・管理目標値を提案し、水道におけるウイルスのリスク管理に資することを目的とした調査研究を行っている。これまでの研究において、ヒトの糞便中に高濃度で含まれるトウガラシ微斑ウイルスは、水道水源においてアデノウイルスやエンテロウイルス、ノロウイルスよりも高濃度で検出されること<sup>1)</sup>、浄水処理プロセスにおける除去性が種々な腸管系ウイルスと類似していること<sup>2)</sup>が明らかにされ、ウイルスの除去を示す遺伝子マーカーとして有用であることが示されつつある。一方で、ロタウイルス A(RVA)は、河川や湖沼などの水道水源から最大  $10^6$  copies/L のオーダーで検出され<sup>3)</sup>、一部の水源ではトウガラシ微斑ウイルスよりも濃度が高い場合があることが確認されている。これまでに、臨床試料に含まれる RVA の遺伝子型を特定するために種々の PCR アッセイが開発されているが、検出感度の面から環境試料への適用は困難だった。そのため、環境試料から検出される RVA 株について、野生株かワクチン株かの判別も含め、ヒトか動物かの由来が十分に理解されていなかった。

以上の背景のもと、本研究では、適切にヒト健康リスクを評価することを目的とし、水道水源における RVA 遺伝子型分布を明らかにするために、環境試料からでも高感度に遺伝子型特定領域を増幅し、取得したアンプリコンを次世代シーケンサーを用いて解析する手法を開発した。具体的には、RVA の VP7, VP6, および VP4 遺伝子を対象に nested PCR アッセイを新たに開発し、開発したアッセイを実際の水道原水試料に適用することで検出感度を評価した。また、検出された配列を解析し、水道原水に含まれる遺伝子型分布を調査した。

### 2. 方法

塩基配列データベース GenBank から RVA の VP7, VP6, および VP4 の配列をそれぞれ 14~33 配列取得し、アライメントを行った後、保存領域を対象に Primer3Plus を用いて増幅塩基長 209~272 bp の 8 つのプライマーセットを設計した。検討には、水道原水試料(都市排水を含む河川水, RVA 濃度  $4.1 \sim 5.5 \log_{10}$  copies/L)から濃縮・抽出した RNA 試料を用いた。次に、増幅が確認されたプライマーセットの外側に、nested PCR の 1st PCR 用のプライマーを設計し、水道原水試料(河川水や湖沼水, RVA 濃度  $3.4 \sim 6.3 \log_{10}$  copies/L, N = 30)に適用しながら検出感度を評価した。Nested PCR の条件は、1st および 2nd PCR とともにアニーリング  $55^{\circ}\text{C}$  で 35 サイクルによる増幅を行うこととした。

2019 年 4 月から 2020 年 3 月に掛けて毎月収集した水道原水試料(N = 12)から取得した VP7, VP6, および VP4 のアンプリコン(N = 43)について、アダプター配列を付加し、DNA ライブラリーを調整した後、FASMAC 社に MiSeq 解析を委託した。得られた配列データは、CLC Genomics Workbench を用いて Similarity スコア 97%で OTU クラスタリングを行い、決定した OTU 配列について BlastN で検索し、遺伝子型・近縁配列を特定した。

### 3. 結果および考察

設計した 8 つのプライマーセットのうち、ヒト RVA VP7 の 1 つ、ヒトおよび動物 RVA VP6 の 2 つ、ヒト RVA VP4 の 1 つの計 4 つで増幅が確認された。それらのプライマーセットに対して、VP7 で 2 つ(A・B), VP6 で 2 つ(C・D), VP4 で 2 つ(E・F)の nested PCR 用プライマーセットを設計し、原水試料に適用した。

表1. VP4 のアンプリコン解析において検出された P 遺伝子型の割合[%]

採水月	P[8]	P[5]	P[6]	P[8]	P[6]	P[4]	P[9]	P[5]	Undeter- mined
	Human	RotaTeq	Porcine	RotaTeq	Human	Human	Human	Bovine	
4月	96.8	0	0	0	0	2.0	1.3	0	0
5月	97.8	0	0	0	0	0	1.8	0	0.4
6月	73.4	19.3	0.6	0	0	2.1	0	3.7	1.0
7月	31.1	32.2	34.6	0	0	0	0	0	2.0
8月	100	0	0	0	0	0	0	0	0
9月	42.2	0	54.5	2.9	0	0	0	0	1.6
10月	86.4	0	2.14	0	1.4	0	0	0	3.8
11月	89.1	0	10.9	0	0	0	0	0	0
12月	0	0	66.7	0	0	0	0	0	33.3
1月	22.2	64.4	12.1	0	0	0	0	0	1.3
2月	53.2	0	45.2	0	0	0	0	0	1.6
3月	0	84.9	8.4	0	0	0	0	0	6.7

その結果, Aを除いた B~F の 5 セットで増幅が認められた。RVA 濃度が最も低い試料 (3.4 log<sub>10</sub> copies/L) でも B~E の 4 セットで増幅が確認され, リアルタイム PCR と同程度の検出感度だった。しかしながら, 次に濃度が低い 1 試料 (3.5 log<sub>10</sub> copies/L) では, 全てのプライマーセットで増幅されなかった。当該試料は台風の影響で高濁度であり (濁度 219 度), 抽出後の RNA 試料に RT-PCR 阻害物質が残存していたか, プライマーとミスマッチがある RVA 株が含まれていた可能性が考えられた。

開発した B~F の nested PCR アッセイによって取得した VP7, VP6, および VP4 のアンプリコンを次世代シーケンサーを用いて解析した結果, ヒトおよび動物に由来する複数の遺伝子型が検出された。表1には, 一例としてヒト RVA VP4 のアンプリコン解析によって特定された P 遺伝子型の割合を示した。ヒトの野生株としては, P[8], P[6], P[4], P[9] の 4 つの遺伝子型が, ワクチン株としては, RotaTeq に由来する P[5] および P[8] の遺伝子型が検出された。ヒト RVA 株の配列に基づき設計したプライマーセットであるが, P[6] のブタ, P[5] のウシに近縁な配列も検出された。検出頻度が最も高かった遺伝子型は, 国内においてヒトでの流行が認められている P[8]<sup>4)</sup> であり, 12 月および 3 月を除いた 10 試料において 22~100% の配列数割合で検出された。

#### 4. おわりに

本研究では, 高感度に RVA の VP7, VP6, および VP4 遺伝子を増幅する nested PCR アッセイを開発し, 実際の水道原水試料に適用した。取得したアンプリコンを次世代シーケンサーを用いて解析した結果, ヒトおよび動物に由来する複数の遺伝子型およびワクチン株 (RotaTeq) に由来する配列が検出された。本手法により, ヒトに感染する可能性のある RVA の水源汚染実態の解明と適切なリスク評価につながることを期待される。

謝辞: 水道原水試料の採取にあたり, 水道事業者の関係者各位には多大なるご協力を頂いた。本研究の一部は, 厚労科研 (19LA1005) および JSPS 科研費 (19K04680) の助成を受けた。ここに記して深く 謝意を表す。

#### 参考文献

- 1) Canh et al., 2021. Water Research 189, 116674.
- 2) Shirasaki et al. 2018. Water Research 129, 460-469.
- 3) Miura et al., 2019. Food and Environmental Virology 11(1), 9-19.
- 4) 藤井, 2019. 病原微生物検出情報 (IASR). 40(12), 204-205.

## 地下式受水槽のノロウイルス汚染を原因とする食中毒事例と 近年の神戸市で発生した下痢症ウイルス事例について

○有川 健太郎、野本 竜平、花房 剛志、米澤 武志、  
濱 夏樹、中西 典子、田中 忍、岩本 朋忠  
神戸市健康科学研究所・感染症部

**【背景・目的】**平成 31 年 2 月、地下埋設式受水槽を有する雑居ビルにテナントとして入居する飲食店においてノロウイルスによる食中毒が発生し、保健所の疫学調査により飲食店の給水栓水が原因である可能性が疑われた。その後の調査で、患者便と飲食店の給水栓水及び受水槽に隣接する湧水槽よりノロウイルスが検出されたため、ビルの地下式受水槽がノロウイルスに汚染されたことが本食中毒事例の原因であると判明した。雑居ビルに置ける水道事故により、ノロウイルス食中毒が発生した珍しい事例であるため、その概要について報告する。また、近年神戸市で発生した下痢症ウイルスを原因とした食中毒事例についても紹介したい。

**【材料・方法】**採取した水道水及び湧水槽の水について、約 340 ml を超遠心機(himac, 日立)を用いて 40,000 rpm で 2 時間遠心した。沈渣を 1 ml の滅菌 PBS で懸濁したものを濃縮サンプルとして RNA 抽出に供した。RNA 抽出は QIAamp Viral RNA Mini キットを用いて、製品プロトコルに従い実施し、50  $\mu$ l の 溶出液で溶出した。ノロウイルスの検出は「ノロウイルスの検出法について(食安監発第 0514004 号)を参考に Nested リアルタイム RT-PCR 法にて実施した。すなわち、抽出した RNA を TaKaRa qPCR Norovirus (GI/GII) Typing Kit (TaKaRa Bio)を用いて逆転写反応を行い、合成した cDNA を鋳型として GI では COG1F/G1-SKR、GII では COG2F/G2-SKR のプライマーセットで 1<sup>st</sup> PCR を行った。続いて、1<sup>st</sup> PCR の増幅産物を 100 倍希釈したものを鋳型として TaKaRa qPCR Norovirus (GI/GII) Typing Kit (TaKaRa Bio)を用いてリアルタイム PCR を実施し、増幅が確認されたサンプルをノロウイルス陽性とした。陽性となったサンプルは、G1SKF/G1SKR または G2SKF/G2SKR を用いた Nested RT-PCR の増幅産物をダイレクトシーケンシスにより塩基配列を決定し、NJ 法により系統解析を実施した。

**【結果・考察】**検査した患者便 5 検体全てでノロウイルス GI または GII が検出され、その遺伝子型は GI.2、GII.4 sydney\_2012 と型別された。飲食店の給水栓水及び、雑居ビルの湧水槽からも GI.2 と GII.4 sydney\_2012 が検出され、その配列は GI.2 の糞便 1 検体を除き、GI・GII ともにそれぞれ 100%一致した。RNA を直接リアルタイム RT-PCR で検査すると殆どの検体が陰性であったため、RNA コピー数の定量はできなかった。本事例では平成 31 年 1 月 1 日に受水槽から高置水槽に揚水する配管が老朽化のため破裂したことが判明しており、その漏水により湧水槽の水位が上昇し、そのオーバーフロー水が受水槽に逆流したことで受水槽の水が汚染されたものと考えられた。地下埋設式受水槽は現在では設置が禁止されているが、過去に設置されたものがまだ多数存在しており、同様の事例の発生が危惧される。今後、当該施設に入居する食品関係事業者への指導啓発等の対策が必要であると考えられる。



## 臨床検体と環境水からのサポウイルスの検索に向けた取り組み

小林孝行、中村麻子、上田紗織、芦塚由紀

福岡県保健環境研究所ウイルス課

胃腸炎ウイルスにはノロウイルスを始め、サポウイルス(SaV)やアストロウイルス等の様々なウイルスが存在する。一般的に、地域における胃腸炎ウイルスの流行状況の把握には医療機関で採取された感染性胃腸炎患者の臨床検体や、環境水からのウイルス検出により評価されている。ウイルス検出には様々な方法があるが、近年ではRT-PCR やリアルタイム PCR などの遺伝子検査が広く使用されている。これらの検出法は迅速な検査法である一方、導入するにあたっては多様な遺伝子型に対する網羅性や検出感度をよく検討し、採用する必要がある。

SaV はノロウイルスと比較すると報告数は少ないが食中毒事例や集団感染事例も報告されており、公衆衛生上で重要なウイルスである。SaV はカリシウイルス科サポウイルス属のウイルスであり、G I、G II、GIVおよびGVの4つの遺伝子群に分類される。このうちG Iは7種(G I.1-G I.7)、G IIは9種(G II.1-G II.8、GII.NA1)、GIVは1種(GIV.1)、GVは2種(GV.1-GV.2)の合計19種類の遺伝子型が確認されている。SaVの検出系には多数の報告があり臨床検体や環境水への使用実績のある検出系が多数報告されているが、一部の遺伝子型に対して反応性の低い検出系も報告されている。近年、SaVの全ての遺伝子型への反応性が確認された新規プライマーセットとして、M13F-SaV1245Rfwd / M13R-SV-G1R, -G2R, -G4R, -G5R プライマーセット(M13-genogrouping プライマー)が報告された。本プライマーセットは2021年7月に国立感染症研究所の病原体検出マニュアルに掲載されたが、まだ間もないことから使用実績は少なく、環境水への適用例もない。

そこで今回、臨床検体および環境水におけるM13-genogrouping プライマーを用いた検出系の検証と福岡県における流行実態把握に向けてSaVの検出を行った。その結果、M13-genogrouping プライマーを用いた検出系はこれまで当所で使用してきた検出系と比較して高い検出率を示した。また、環境水から検出された遺伝子型は臨床検体から検出された遺伝子型とよく一致しており、県内の流行を反映していると考えられた。さらに、環境水から高頻度にGIVとGVが検出され、臨床検体からもGVが複数検出された。特に環境水においてGIVおよびGVが継続的に検出された報告は少なく、興味深い点であった。

本発表ではこれらの結果の詳細についてご紹介する。



トピックス

## 下水疫学調査による新型コロナウイルスの流行状況の把握と 変異株の早期検知

○北島正章（北海道大学大学院工学研究院）

原本英司（山梨大学大学院総合研究部）

2019年12月に中国・武漢に端を発した新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の世界的感染流行は、国内外においてヒトの健康や生命のみならず社会経済活動にも甚大な損害を与え続けており、この2年足らずで全世界の人々の生活を激変させてきている。ワクチンの接種が進むことによる感染収束が期待されるが、複数の変異株の相次ぐ出現も相まって現在も全世界で感染拡大が続いており、予断を許さない状況にある。

COVID-19の病因である新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の主な伝播経路はヒト-ヒト間での飛沫感染や接触感染であり、気道や肺などの呼吸器が主な感染部位である。ところが、COVID-19患者の一部には下痢症を含む胃腸炎症状が認められること、SARS-CoV-2が腸管で増殖する可能性および不顕性感染者を含むSARS-CoV-2感染者の糞便中からウイルスRNAが検出されることが感染流行の早い段階から報告されていた。演者らはこのことにいち早く着目し、海外の研究者と共同に関連する200以上の文献を精査して下水中のSARS-CoV-2に関する世界初の総説論文（2020年4月26日受理）を発表した<sup>1</sup>。この論文では、COVID-19の流行状況を把握する上で下水中のSARS-CoV-2の検出調査の重要性を世界に先駆けて提唱している。演者らが上記の論文を発表した際、下水調査に基づき疫学情報を取得するアプローチである”Wastewater-based epidemiology”の日本語訳として「下水疫学（調査）」（学問分野を指す場合には「下水疫学」、調査する行為を指す場合には「下水疫学調査」）を考案し、現在では広く用語として普及するに至っている。

SARS-CoV-2が不顕性感染を引き起こすことは既に広く知られているが、数多くの研究により、不顕性感染者を含むSARS-CoV-2感染者の糞便中からウイルスRNAが検出されることも報告されている。主に有症者のみを対象とする臨床検査では真の流行状況を把握することが困難であるが、下水調査では感染者の症状の有無に影響を受けず感染流行状況を評価することが可能である。過去には、ノロウイルス等の腸管系ウイルスの感染流行動向の把握や、ポリオの根絶計画において公衆衛生的介入の効果の判断材料として下水調査結果が活用された事例もあり、SARS-CoV-2に関しても下水疫学調査が感染流行実態把握のための有用な知見を提供する可能性があると言える。

著者らは、流行の初期の段階で下水および河川水中におけるSARS-CoV-2 RNAの存在実態に関する国内初の環境調査を実施し、論文として報告した<sup>2</sup>。この研究では、2020年3月17日～5月7日に山梨県内において採取した下水処理場（処理方式：標準活性汚泥法）の流入水と塩素消毒前の処理水（最終沈殿池流出水）中のSARS-CoV-2 RNAの検出を試みた結果、2020年4月14日に採取した塩素消毒前下水処理水からSARS-CoV-2 RNAが検出された。陽性反応を示したqPCR反応液

から PCR 産物を回収し、サンガー法を用いたダイレクトシーケンシングにより PCR 産物の塩基配列を解読することで、SARS-CoV-2 に由来する塩基配列が特異的に PCR 増幅されていることを確認した。本研究は、国内で初めて下水試料から SARS-CoV-2 RNA を検出することに成功した事例である。その後、下水試料からの SARS-CoV-2 RNA の検出事例が国内外から多数報告されているが、これらは総じて調査対象地域における COVID-19 感染者数と下水からの SARS-CoV-2 RNA の検出頻度・濃度との間に相関が認められることを報告しており、演者らが提唱した概念が実測データにより実証されている段階にある。

下水疫学調査は、下水処理場の普及区域内においては、処理区域内に存在するあらゆる SARS-CoV-2 感染者の排泄物が下水処理場に集積するという下水道インフラの特性を活用した疫学調査であり、下水中の SARS-CoV-2 を定期的に分析することで、特定の地域における SARS-CoV-2 の侵入、流行状況、分子疫学および流行収束を把握できる可能性がある(図 1)。下水疫学に対する社会からの関心と期待の高まりは、下水中のウイルスを除去すべき対象としてのみだけでなく感染疫学を把握するための情報源として捉え直す契機となっている。下水疫学調査は、COVID-19 に加えて将来起こり得る次なるパンデミックの際にも有効である可能性が高く、感染症に対して強靱な未来社会を構築する上で新たに整備すべき重要な社会インフラの一つである。本講演では、下水疫学調査による COVID-19 の流行把握と下水中ウイルスゲノムの解析に基づく変異株の早期検知に関する研究・技術開発動向について、上述の研究背景・経緯に加え、著者らの研究成果を中心に最新の知見を紹介する。

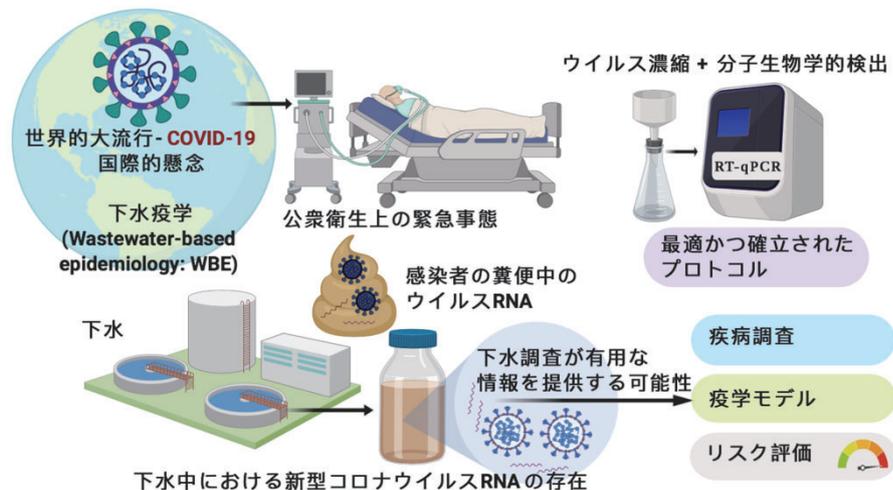


図 1. COVID-19 の流行状況を把握する上での下水疫学調査の有用性と研究ニーズ

#### References

<sup>1</sup> Kitajima, M.; Ahmed, W.; Bibby, K.; Carducci, A.; Gerba, C. P.; Hamilton, K. A.; Haramoto, E.; Rose, J. B. SARS-CoV-2 in Wastewater: State of the Knowledge and Research Needs. *Sci. Total Environ.*, 739, 139076 (2020).

<sup>2</sup> Haramoto, E.; Malla, B.; Thakali, O.; Kitajima, M. First Environmental Surveillance for the Presence of SARS-CoV-2 RNA in Wastewater and River Water in Japan. *Sci. Total Environ.*, 737, 140405 (2020)

## 腸管系ウイルス培養における新知見 =ヒトの生理からウイルス増殖を考える=

高木 弘隆 岡 智一郎 (国立感染症研究所)

2018 年の第 30 回学術集会において、蔵書や論文では知りえない腸管系ウイルスに関わるいくつかの細胞培養技術に加え、特にヒトサポウイルス(hSaV)の細胞培養に関するブレークスルーをトピックとして紹介させていただいた。その後さらに培養効率のよい HuTu80 細胞の発見により、2020 年 12 月に PNAS に、その結実した結果を発表するに至った<sup>1)</sup>。またこの検討過程において 発見されたヒトパレコウイルス(HPeV)のうち、特に HPeV3 細胞培養術、titration assay 及び中和試験についても、本年 8 月末に投稿論文が受理された<sup>2)</sup>。

hSaV については当初より、①培養及び回収率の向上②遺伝子検出以外での検出技術(Ag-ELISA)開発③ウイルスパネル作成 を目標として現在もなお検討継続中である。様々な技術改良、HuTu80 細胞 cloning、既存抗血清による Ag-ELISA 系構築などにより、10 を超える genotype のパネル化に成功している。一方未だ成功に至っていない、もしくはウイルス回収が極端に低い genotype も存在し、これらについては鋭意 検討している。

一方同時並行で検討を進めた HPeV については、HuTu80 細胞での type1-6 の増殖性や CPE 発現性など、従来使用されていた手法を凌ぐ結果が得られ、環境水の一部からも分離(RT-PCRは陰性)に成功している。このことから検査・調査の現場での活用が期待される。

この 2 つのウイルスに共通して用いている当該細胞は多様な細胞の集合体であり、その継代・維持方法によりそれぞれのウイルスに対し相反する興味深い挙動も認められている。hSaV 増殖性の異なるクローン細胞の作出にも成功していることから、継代・維持による、ある種の選択淘汰がかかっているのでは?と推察している。

加えて、hSaV 論文にもあるが要となるサプリメントは胆汁酸類であり、豚サポウイルスやヒトノロウイルス(hNoV)の培養においても、その必要性が示唆されている。しかし腸管における生理現象を考えれば至極 当然のことであり、hSaV・HuTu80 細胞での培養に抱合型胆汁酸の要求があったことは腸管上部において、常在細菌叢による代謝を受ける前段の状況とも合致するのである。筆者らは癌細胞を主とするが、十二指腸～小腸～回盲部～大腸に至る各箇所培養細胞、およびそれらのクローンを有しており、今後目的とする ウイルスの増殖指向性を研究してゆく上で大いに興味を抱いている。また近年数報ではあるが、上気道系 からの hSaV および hNoV の検出報告もあり、これまで起こった数百人～千数百名規模のノロウイルス集団食中毒事例を紐解くキッカケになるのでは、と考え、現在自治体衛生研究所の協力の元、調査を進めている。

このように「ヒトの生理」側から感染経路・感染様式を考え、培養に向けたアプローチをしてゆくと非常に興味深い事象にも遭遇している。今回は hSaV 論文における内容とその後のアップグレード状況、パレコウイルス培養に関する知見や新たなアプローチによる新知見などを紹介したい。

- 1) Takagi H, Oka T, et al, Human sapovirus propagation in human cell lines supplemented with bile acids, Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Dec 15;117(50):32078–32085. doi: 10.1073/pnas.2007310117. Epub 2020 Nov 30
- 2) Takagi H, et al, A human intestinal cell line suitable for the propagation of Type1–6 human parechovirus with a clear cytopathic effect, Short Communication, JJID, Aug 2021 accepted.