

【資料】

令和元年度感染症流行予測調査（ポリオ感染源調査）

Epidemiological Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases in Okayama Prefecture (2019-2020)
- Surveillance of Poliovirus in Influent Sewage Water -

船橋圭輔, 松岡保博, 石井 学, 長尾和彦, 岡本尚子, 濱野雅子, 木田浩司, 森川大地*

*岡山県保健福祉部

FUNAHASHI Keisuke, MATSUOKA Yasuhiro, ISHII Manabu, NAGAO Kazuhiko,
OKAMOTO Naoko, HAMANO Masako, KIDA Kouji, MORIKAWA Daichi*

要 旨

感染症流行予測調査における感染源調査の一環として、ポリオウイルス野生株の侵入及びワクチン由来ポリオウイルス株の伝播の監視を目的に、県内の下水処理場1施設の流入下水におけるポリオウイルスサーベイランスを実施した。その結果、調査期間を通じてポリオウイルスは分離されなかった。一方で、ポリオウイルス以外のウイルスが71株分離されたため、感染症発生動向調査で検出されたウイルスと比較した。その結果、本調査で使用した細胞で増殖効率の良いコクサッキーウイルスB5型等については両調査で同時期に検出され、本調査によって地域流行の一端を把握できたと考えられた。しかしながら、感染症発生動向調査で検出されたコクサッキーウイルスA5型等、使用した細胞で増殖効率の悪いウイルスについては本調査では全く分離されず、地域流行の把握にはつながらなかった。今後もポリオウイルスの監視を継続するとともに、細胞分離法の改良や遺伝子クローニング技術等の活用によって本調査の充実を図り、ウイルス感染症の地域流行の把握に努めたい。

[キーワード：感染症, サーベイランス, ポリオウイルス, エンテロウイルス, 下水]

[Key words : Infectious disease, Surveillance, Poliovirus, Enterovirus, Sewage water]

1 はじめに

ポリオは急性灰白髄炎とも呼ばれ、エンテロウイルス属のポリオウイルスにより引き起こされる疾患である。免疫を持たない人がポリオウイルスに感染すると、多くは不顕性感染又はかぜ様症状を呈した後に回復するが、まれに麻痺性ポリオを発症する。現在のところ、ポリオに対する有効な治療薬は存在しないため、流行制御の基本はワクチンによる予防接種である。

厚生労働省委託事業である感染症流行予測調査は、予防接種が実施されている様々な感染症に対する集団免疫の把握（感受性調査）及び病原体の検索等の調査（感染源調査）を行うことで、総合的に感染症の流行を予測するとともに、予防接種事業の効果的な運用を図ることを目的としている。ポリオウイルスの感染源調査はその一環であり、流行地域からのポリオウイルス野生株の侵入及び国内でのワクチン由来ポリオウイルス株の伝播を継続的に監視するために実施されている。本調査は、下水処理場への流入下水を対象としていることから、顕性、不顕性感染にかかわらず、地域の人集団で伝播している

ポリオウイルスを効率よく検出することが可能である¹⁾。また、付随して検出される他のウイルスについても疫学解析に利用できる。

今回我々は、平成31年（2019年）4月から令和2年（2020年）3月までの期間に県内の下水処理場1施設から採取した流入下水を対象に、ポリオウイルスの感染源調査を実施した。

2 材料と方法

2.1 材料

平成31年4月から令和2年3月までの期間に、県内のA下水処理場（処理人口約3万7千人）で毎月1回採取した流入下水500 mLを用いた。

2.2 ウイルスの分離及び同定

令和元年度感染症流行予測調査実施要領²⁾及び感染症流行予測調査事業検査術式（令和元年度改定版）³⁾に従い、材料の流入下水を陰電荷膜吸着誘出法により100倍濃縮したものを検体とし、試験に供した。Eagle's MEMを用いて24ウェルプレートに培養した4種類の細胞

(FL, RD-A, Hep2及びVeroE6)のそれぞれ3ウェルに検体を0.1 mLずつ接種し、5%炭酸ガス存在下、35℃で培養した。全てのウェルについて1週間ごとに継代し、2週間の観察期間中の細胞変性効果(cytopathic effect; 以下「CPE」という。)の出現を指標として、ウイルス検索を行った。CPEが出現したウェルの培養液は、L細胞にポリオウイルスレセプターを発現させたL20B細胞に再接種し、同様に培養した。L20B細胞でCPEが認められなかった非ポリオエンテロウイルスは、病原体検出マニュアル「手足口病」⁴⁾に従い、ダイレクトシーケンス法により決定したVP1遺伝子領域の一部の塩基配列を、データベースの既知株と比較し、ウイルスの種及び遺伝子型を同定した。また、L20B細胞でCPEが認められたものの、その形態からポリオウイルスではなくヒトアデノウイルス(以下「HAdV」という。)であると推定されたものについては、病原体検出マニュアル「咽頭結膜熱・流行性角結膜炎」⁵⁾に従い、ダイレクトシーケンス法により決定したヘキソン遺伝子領域の一部の塩基配列を、データベースの既知株と比較して遺伝子型別を実施した。同様に、L20B細胞においてCPEが認められたものの、その形態から哺乳類オルソレオウイルス(以下「MRV」という。)であると推定されたものは、Learyらの方法⁶⁾に従い、RdRp領域の一部を増幅するPCRにより同定した。

3 結果及び考察

調査期間を通じてポリオウイルスが分離されなかったことから、A下水処理場の処理地域におけるポリオウ

ルス野生株の侵入及びワクチン由来ポリオウイルス株の伝播はなかったと考えられる。一方、ポリオウイルス以外のウイルスが71株分離され、その内訳は、エンテロウイルス属については、コクサッキーウイルスB(以下「CB」という。)3型が12月に2株、CB5型が6月～11月に27株、エコーウイルス(以下「E」という。)6型が9月に2株、E11型が12月に1株、E25型が7月に2株であり、その他のウイルスについては、HAdV1型が4月、1月及び2月に3株、HAdV2型が5月、10月、1月及び2月に9株、MRVが4月及び11月を除く月に23株、同定できなかったウイルスが1月に2株であった(表1)。

本調査に付随して分離された非ポリオウイルスについて、正確な地域流行の把握の一助とするため、感染症発生動向調査における検出結果と比較した(表2)。両調査ともに検出されたウイルスは、本調査で使用した細胞でよく増殖するCB5型、E11型、HAdV1型及びHAdV2型であった。これらの結果と昨年度の結果⁷⁾を勘案すると、今年度夏季を中心に流入水から6か月連続して分離されたCB5型や昨年度に続き分離されたE11型、更に今年度は分離されなかったが昨年度両調査で分離されたCB4型等は地域流行の一端を反映しうるものと考えられる。一方、感染症発生動向調査のみで検出されたウイルスのうち、コクサッキーウイルスA(以下「CA」という。)5型、CA6型及びCA16型は本調査で使用した細胞での増殖効率が悪く、HAdV31型及びHAdV41型は増殖しないとされている。そのため、現段階では、本調査の結果を感染症発生動向調査の結果と併せて解析し、

表1 流入下水からの採水月別ウイルス分離状況

分離ウイルス	採水月												合計
	2019.04	2019.05	2019.06	2019.07	2019.08	2019.09	2019.10	2019.11	2019.12	2020.01	2020.02	2020.03	
ポリオウイルス													0
コクサッキーウイルスB3型(CB3)									2				2
コクサッキーウイルスB5型(CB5)			3	5	5	2	2	10					27
エコーウイルス6型(E6)						2							2
エコーウイルス11型(E11)									1				1
エコーウイルス25型(E25)				2									2
ヒトアデノウイルス1型(HAdV1)	1									1	1		3
ヒトアデノウイルス2型(HAdV2)		1					3			1	4		9
哺乳類オルソレオウイルス(MRV)		3	3	2	3	3	3		1	1	3	1	23
未同定ウイルス										2			2
合計	1	4	6	9	8	7	8	10	4	5	8	1	71

多くのウイルス種を網羅する地域流行の把握につなげることは困難であると考える。

本調査では、1月に分離した2株が同定できなかった。VeroE6細胞におけるCPEの形態からMRVであると推定したが、MRVの検出PCRに反応しなかった。その原因として、PCRプライマーのミスマッチや類似したCPEを示す他種ウイルスである等の可能性が考えられるが、今後、網羅的遺伝子検出法等を用いて原因を特定する予定である。

本調査は、ポリオウイルスの伝播の監視が目的であるが、付随して他のウイルスも検出されるため、感染症発生動向調査の結果と併せて解析をすることで、正確な地域流行の把握につながる可能性がある。しかしながら、過去の調査^{7)~9)}では、両調査で検出されるウイルス種には大きな離れが認められており、今回の調査でも同様であった。これは、本調査がポリオウイルスの分離を目的としているため、当該ウイルスがよく増殖する細胞種を選択していることが一因と考えられる。そのため、下水中にウイルスが混在した場合、使用する細胞に対して増殖効率のよいウイルス種のみが分離され、正確な流行把握を困難にしていると推察される。これらのことから、本調査の結果を有効活用するためには、方法の改良が不可欠であると考える。今後は、細胞分離法の改良は

もとより、遺伝子クローニング技術等も活用して本調査の充実を図り、ウイルス感染症の地域流行の把握に努めたい。

文 献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課・国立感染症研究所感染症疫学センター：令和元年度（2019年度）感染症流行予測調査報告書，8-16，2021
- 2) 厚生労働省健康局結核感染症課：令和元年度感染症流行予測調査実施要領，5-8，2019
- 3) 厚生労働省健康局結核感染症課・国立感染症研究所感染症流行予測調査事業委員会：感染症流行予測検査術式令和元年度改訂版，4-21，2019
- 4) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル「手足口病」，17-35，2018
- 5) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル「咽頭結膜熱・流行性角結膜炎」，12-27，2017
- 6) Leary T P, Erker, J C, Chalmers M L, Cruz A T, Wetzel J D, et al. : Detection of Mammalian Reovirus RNA by Using Reverse Transcription-PCR Sequence Diversity within the lambda3-encoding L1 Gene, J.Clin.Microbiol., 40, 1368-1375, 2002

表2 流入下水及び感染症患者からの月別ウイルス検出状況

検出ウイルス	検体採取月											
	2019.04	2019.05	2019.06	2019.07	2019.08	2019.09	2019.10	2019.11	2019.12	2020.01	2020.02	2020.03
流入下水からの検出			CB5	CB5	CB5	CB5	CB5	CB5		CB3		
						E6						
									E11			
				E25								
	HAdV1									HAdV1	HAdV1	
		HAdV2						HAdV2			HAdV2	HAdV2
		MRV										
									NIV			
感染症患者からの検出							CA5					
		CA6	CA6	CA6								
					CA16		CA16					
					CB5				CB5			
									E11			
		HAdV1										
									HAdV2			HAdV2
	HAdV3					HAdV3						
								HAdV31				
		HAdV41										

CA：コクサッキーウイルスA CB：コクサッキーウイルスB E：エコーウイルス HAdV：ヒトアデノウイルス
 MRV：哺乳類オルソレオウイルス NIV：未同定ウイルス

- 7) 松岡保博, 橋本清美, 石井 学, 長尾和彦, 木田浩司
ら：平成30年度感染症流行予測調査（ポリオ感染
源調査), 岡山県環境保健センター年報, 44, 67-69,
2020
- 8) 梶原香代子, 磯田美穂子, 木田浩司, 谷川徳行, 松
岡保博ら：平成28年度感染症流行予測調査（ポリ
オ感染源調査), 岡山県環境保健センター年報, 42,
63-65, 2018
- 9) 橋本清美, 松岡保博, 野宮加代子, 濱野雅子, 木田
浩司ら：平成29年度感染症流行予測調査（ポリオ
感染源調査), 岡山県環境保健センター年報, 43,
111-113, 2019