

大村 達夫

東北大学 未来科学技術共同研究センター
教授

迅速・高精度・網羅的な病原微生物検出による水監視システムの開発

§ 1. 研究実施体制

(1) 大村グループ

- ① 研究代表者: 大村 達夫 (東北大学未来科学技術共同研究センター, 教授)
- ② 研究項目
 - ・ 病原微生物の網羅的同定・絶対定量技術開発
 - ・ 迅速な病原微生物スクリーニング技術開発

(2) 押谷グループ

- ① 主たる共同研究者: 押谷 仁 (東北大学大学院医学系研究科, 教授)
- ② 研究項目
 - ・ 水監視による感染症流行検知システム構築

(3) 渡部グループ

- ① 主たる共同研究者: 渡部 徹 (山形大学農学部, 准教授)
- ② 研究項目
 - ・ リスク評価に基づいた監視項目, 体制の確立

§ 2. 研究実施の概要

A. 病原微生物の網羅的同定・絶対定量技術開発

調査対象地域の下水処理場にて流入下水を継続的に採取し、病原ウイルス(ノロウイルス, エンテロウイルス)および糞便汚染指標の候補であるウイルス(トウガラシ微斑ウイルス, アイチウイルス)のモニタリングを行った。測定したウイルスの中ではトウガラシ微斑ウイルスの濃度が最も高く(10^6 - 10^7 copy/mL 程度), これは 2013 年度に行ったメタゲノム解析の結果と一致した。また濃度に季節変動は見られなかった。

2012/2013 シーズンに採取した一部の試料について次世代シーケンシング法によりノロウイルスの遺伝子型分布の評価を行ったところ, GII 群の中で GII.4 型の塩基配列が占める割合は 17% であった。GII.4 型の主要な亜型は, 2012 年 12 月にそれまで主流であった Den Haag 2006b 亜型から Sydney 2012 亜型に移行しており, この亜型レベルの流行の変化は感染症サーベイランスの結果と同様であった。一方で, 感染症サーベイランスでは検出されていない遺伝子型も複数検出されており, これらの遺伝子型も都市域では流行していることが示唆された。

B. リスク評価に基づいた監視項目, 体制の確立

2013 年度に引き続き河川からカキ養殖域にかけての定期的な病原微生物モニタリングを行い, ウイルスの存在状況についてのデータを蓄積した。また, カキに蓄積されたノロウイルスについて次世代シーケンシング法による塩基配列解析を行ったところ, 感染症患者から頻繁に検出される GII.4 Sydney 2012 亜型が主に検出された。

カキからのウイルス定量・検出手法開発について, 2012 年度に開発した pH を下げる操作に加え, プロテナーゼ K, アミラーゼ, リパーゼの 3 種の酵素による有機物の分解操作をカキからのノロウイルス回収時に行うことによって, 検出下限値は食中毒が発生する危険性が増す閾値周辺と考えられる 500 copies/カキ程度まで向上した。

これまでの流入下水等のモニタリングやサーベイランスの結果にもとづいて, 研究対象流域中に適した監視対象微生物の候補を選定した。すなわち, 現段階では, 流入下水からの検出頻度と, 患者数の点から, ノロウイルスとロタウイルスを候補と考えている。また, 家庭内での二次感染のリスク情報の収集のために, 研究対象地域において町民の衛生意識に関するアンケート調査を実施し, そのデータをもとに感染症拡大モデル開発に着手した。

C. 迅速な病原微生物スクリーニング技術開発

これまで開発してきた分子量分画膜を用いた RNA 直接定量法の改良及び環境試料から抽出した RNA のうちの rRNA の配列特異的な検出及び定量を行った。蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブと RNA の交雑のストリンジェンシーを温度制御による調整から変成剤を用いた方法に変更した。様々な変成剤を検討したところ, 本手法には尿素が適していた。尿素なしの場合と比べ, 適切な尿素濃度では, 標的の RNA と非標的の RNA から得られるシグナルの比が約 5 倍に向上した。また, 内部標準法による定量系から外部標準法による定量系の変更を行った。これまで測定していたプローブ由来の蛍光強度測定に加え, RNA 濃度測定(吸光度測定)も同時に行い, 絶対

量ベースでの定量(copies/ng)を行えるようにした。

恒温反応による遺伝子の増幅および検出手法である Q プローブを用いた LAMP 法 (Q-LAMP 法) によるウイルス検出法の開発においては、流入下水と処理水 63 件を対象にノロウイルスの検出を試みたところ、従来法である定量 PCR 法との一致率が 63.5%と臨床検体に比べ低い結果であった。しかし、Q-LAMP 法陽性・定量 PCR 法陰性の検体が 15 件であったのに対し、Q-LAMP 法陰性・定量 PCR 法陽性の検体が 8 件であったことより、Q-LAMP 法は公定法である定量 PCR 法と同等以上の検出感度が確認された。

D. 水監視による感染症流行検知システム構築

2012 年度に続き、研究対象地域にある2つの外来医療機関(内科・小児科を標榜)において感染性胃腸炎サーベイランスを行った。2013 年 4 月から 2014 年 3 月 20 日までに 155 名の急性胃腸炎患者から検体が採取され、そのうち 83 件(54%)でウイルスが検出された。ノロウイルス GII 群陽性検体 44 検体のうち、カプシド領域の遺伝子解析結果を 26 件から得たところ、25 件が GII.4 型、1 件が GII.3 型であった。また、ノロウイルス GII.4 型では 2012 年冬より新しく出現した Sydney 2012 亜型が多数検出され、研究対象地域では 2013 年度も引き続き Sydney 2012 亜型が流行していたと考えられた。

2012 年から 2013 年にかけて得られたデータについて、急性胃腸炎症例、流入下水、牡蠣のそれぞれからノロウイルスが検出された時期について比較検討を行った。下痢症にて外来を受診し、ノロウイルス感染を認めた症例は第 49 週目から増加傾向でありそのほとんどが GII 型であったが、流入下水中のノロウイルス GII 型濃度は症例の増加よりも遅れて 2013 年の第 3 週に増加傾向を認めた。症例と流入下水のどちらにおいても、2012 年から 2013 年の間に GII.4 型に占める変異株の種類が Den Haag 2006b 亜型から Sydney 2012 亜型へ移行したことが確認された。牡蠣のノロウイルスは 2013 年 1 月と 3 月に検出され、1 月に特に多く検出された。

また、本課題で開発する感染症流行早期検知システムの試験的導入に向け、関連自治体および機関との協議を行い、今後研究成果の報告会等を通じて導入に向けた準備を行うことで合意した。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報(国内)

- 1 勝又雅博, 真砂佳史, 大村達夫, パイロシーケンシング法による下水中のノロウイルスの同定, 土木学会論文集 G (環境), 69(7): III_639-III_646, 2013, DOI: 10.2208/jscejer.69.III_639
- 2 伊藤紘晃, 真砂佳史, 植木洋, 渡部徹(2013)低 pH 抽出法及び酵素抽出法を用いた養殖カキからのノロウイルスの定量検出, 土木学会論文集 G (環境), 69, III_657-III_665, DOI: 10.2208/jscejer.69.III_657

論文詳細情報(国際)

- 3 Watanabe, T., Teske, S. S. and Haas, C. N. (2013) Classic dose-response and time postinoculation models for *Leptospira*. *Risk Analysis*, 34(3): 465-484, DOI: 10.1111/risa.12122
[proceedings(査読審査の入るものに限る)]
- 4 Takemura, Y., Sekiguchi, Y., Harada, H. and Kubota, K. (2013) A direct rRNA quantification method using molecular weight cut-off membrane, Proceedings of the 1st International Forum on Asian Water Environment Technology, 8-9.

(3-2) 知財出願

- ① 平成 25 年度特許出願件数 (国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数 (国内 0 件)