

大村 達夫

国立大学法人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, 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

本研究プロジェクトの最終目標である感染性胃腸炎の流行防止のための水監視システム(概念図を図1に示す)の構築に向けた2015年度の研究実績を以下に示す。研究は(1)～(4)の4つのタスクからなっている。

### (1)病原微生物の網羅的同定・絶対定量技術開発

流入下水中において存在比の小さいヒト腸管系ウイルスを網羅的に検出することを目的として、これまでに開発したRNAウイルスを特異的に回収する手法を用いてウイルスメタゲノム解析を行った。その結果、本手法を適用しない場合と比べて85倍以上の効率でウイルス遺伝子を検出し、また6倍以上の効率でヒトウイルス遺伝子を検出することができた。ウイルスに分類された配列のうち62%がヒトウイルスであり、8種のヒト腸管系ウイルスが検出された。すなわち、本手法を用いることで、流入下水中のヒトウイルスを効率的に検出可能であることが実証された。

また、流入下水試料から多数の病原ウイルスを同時に定量検出することを目的として、2015年度までに開発・最適化してきたデジタルPCR法を2013年11月から2015年11月にかけて収集した下水試料(N=41)に適用した結果、アデノウイルス、アイチウイルス、エンテロウイルス、A型肝炎ウイルス、ノロウイルスGI, GII, GIV、およびロタウイルスの濃度変動が明らかになった。

さらに、2013年4月から2016年3月にかけて実施した下水処理場でのノロウイルスモニタリングの結果、下水中のウイルス濃度を頻繁に測定することで現行の医療機関の報告に基づく監視システムよりも早期に感染性胃腸炎の流行を検知できる可能性が示された。また、下水中のウイルス濃度という量的な情報に加えて、株や遺伝子型という質的な情報は、集水地域で発生した感染性胃腸炎の流行状況を把握するのに有用であることが示された。

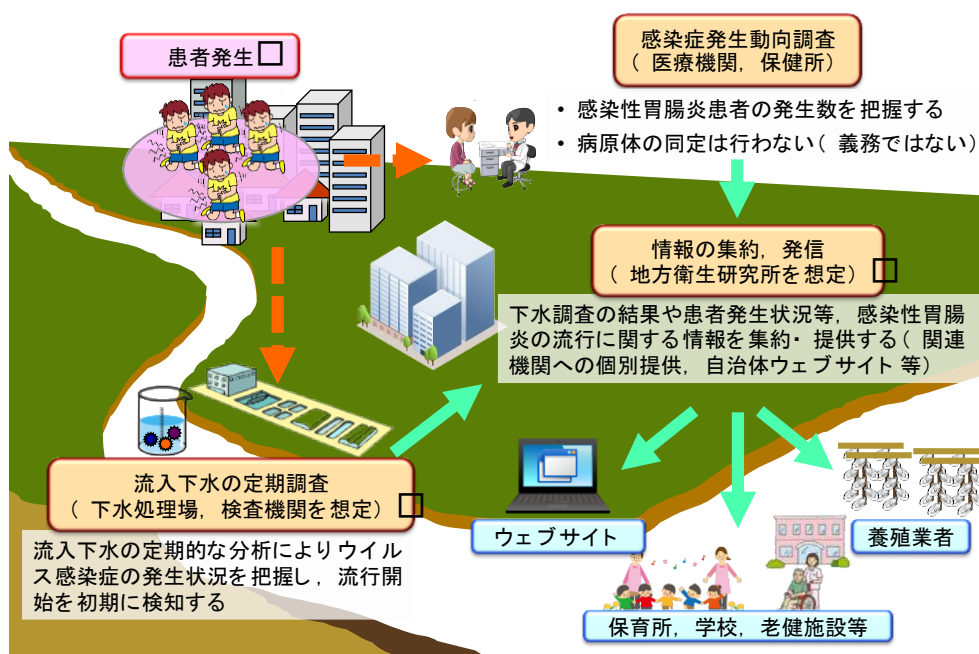


図1. 感染性胃腸炎の流行防止のための水監視システムの概念図

## (2) リスク評価に基づいた監視項目、体制の確立

2014年度までにモニタリング対象に決めた監視対象微生物のノロウイルスと指標微生物としてのアイチウイルスおよびトウガラシ微斑ウイルスについて、養殖カキからの定期的な検出を行った。週1回のモニタリングの結果、カキからノロウイルスが検出される時期には、同時に AiV も検出されており、二者の季節性には共通点があったものの、AiV の検出頻度や RNA 量は多くなかった。一方、PMMoV をカキから検出したのは本研究が初めてであったが、その検出頻度と RNA 量はともに多く、PMMoV はカキのノロウイルス汚染指標として活用できる可能性が示された。

さらに、地域社会での感染性胃腸炎の流行を把握するためのモデル開発のため、家庭の外での感染伝播の機会が多いと予想できる保育園や幼稚園を取り上げて、そこでの感染伝播をモデル化した。保育士や幼稚園教諭に対するアンケートにより、モデルのパラメータ値を決定した。

## (3) 迅速な病原微生物スクリーニング技術開発

簡易で迅速にノロウイルス遺伝子を検出可能な Q-LAMP 法を 2014 年 3 月から 2016 年 3 月にかけて収集した流入下水試料(103 試料)に適用し、厚生労働省通知法である RT-qPCR 法との結果と一致率および検出率を比較した結果、ノロウイルス GI に対する Q-LAMP 法の有用性が示唆された。

病原微生物を迅速に検出・定量可能な RNA 直接定量法をハイスループットな技術とするために、これまでの膜を用いた方法から磁気ビーズを用いた方法に変更し、その適用性を評価した。ビーズキットによるプローブの除去効率、RNA の回収効率について検討を行った後、検出を試みたが、定量値が理論値を上回る結果となり、プロトコルのさらなる最適化が必要であることがわかった。

## (4) 水監視による感染症流行検知システム構築

2015 年 4 月から 2016 年 3 月にかけても感染性胃腸炎のサーベイランスを継続して行った。また、患者検体数の増加を図るため、2015 年 12 月より、サーベイランスを行う病院(内科外来)を新たに追加した。さらに、2016 年の 2 月から同地域内の老人保健施設に依頼し、症状の有無にかかわらず、入所者から月毎の定期的な検体採取を行うコホート研究を開始した。これにより、これまで収集されていなかった無症候時のウイルス感染について調査を進める予定である。

ロタウイルスワクチン導入後の経時的なロタウイルス流行パターンの変化について、患者および下水検体を用いて調査した。ワクチン導入後、ロタウイルス感染患者数の減少に加え、患者検体におけるロタウイルス遺伝子型の変化が見られた。一方、下水中でも明らかな遺伝子型の変化が認められたが、ピーク時の下水中ウイルス濃度に大きな変化は認められなかったため、軽症あるいは無症候感染者によるロタウイルス感染伝播が疑われた。ワクチン導入後の地域におけるロタウイルス流行状況を調査するにあたり、患者及び下水の詳細なモニタリングが有用であると考えられた。

以上の結果を踏まえ、研究対象地域において図1に示した水監視システムの実証実験を行うことを目的として、下水道、漁業、観光、食品・衛生、医療の関係者、および研究プロジェクトメンバーで構成される懇談会を組織し、2016 年 2 月に第 1 回目の会合および地域住民に対するシンポジウムを開いた。懇談会では、実証実験の実施が期待されると同時に、実施に向けた意見や課題が

出された。

【代表的な原著論文】

- 1) Kazama, S., Masago, Y., Tohma, K., Souma, N., Imagawa, T., Suzuki, A., Liu, X., Saito, M., Oshitani, H. and Omura, T. (2016) Temporal dynamics of norovirus determined through monitoring of municipal wastewater by pyrosequencing and virological surveillance of gastroenteritis cases, *Water Research*, **92**, 244–253.
- 2) 風間しのぶ, 真砂佳史, 沼澤聡, 大村達夫 (2015) 下水中のポリ A 鎖を有する1本鎖(+) RNA ウイルスの選択的メタゲノム解析手法の検討, 土木学会論文集 G(環境), **71(7)**, III\_339–III\_349.
- 3) 勝又雅博, 真砂佳史, 大村達夫, 原田秀樹 (2015) ハイブリダイゼーション法を用いた下水中の対象ウイルスゲノム回収手法の開発, 土木学会論文集 G(環境), **71(7)**, III\_329–III\_338.