

大村達夫

国立大学法人東北大学大学院工学研究科・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 (東北大学大学院工学研究科、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

(2) 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. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

A. 病原微生物の網羅的同定・絶対定量技術開発

都市域の感染性胃腸炎発生の網羅的把握を目的に、下水中の+鎖 RNA ウイルスのメタゲノム解析を行った。下水に含まれる+鎖 RNA ウイルスゲノムを非特異的に増幅することで下水ウイルスライブラリを作成し、パイロシーケンサーGS Junior を用いてライブラリ中のウイルス遺伝子を網羅的に同定した。構築した手法は試料中の構成比を保ったまま+鎖 RNA を非特異的に増幅し、同定できることを確認した。メタゲノム解析の結果、得られた 55,311 リードの塩基配列の中で既知のヒト病原ウイルスに分類された配列は 0.49% (276 リード)であった。これはウイルスゲノム全体を対象とした報告と比べ約 90 倍高く、開発した手法により効率よくヒト病原ウイルスを同定できることが示された。病原ウイルスとしてノロウイルス、アストロウイルス等が検出されたほか、Pepper Mild Mottle Virus, アイチウイルス等下水汚染マーカーとして提案されている配列が多く検出された。

また、ノロウイルスの流行状況把握のためノロウイルスゲノムを対象としたアンプリコンシーケンシングを行った。GI では GI/14 型, GII では GII/4 型が優占しており、これらのウイルスによる感染が多かったことが示唆された。

さらに、カキ中腸腺からのウイルス検出の高感度化を図り、細胞破碎に用いる緩衝液は pH が低い方がよいことを明らかにした。

B. リスク評価に基づいた監視項目、体制の確立

下水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開始した。具体的には、宮城県松島浄化センターにおける流入下水(2012年2月22日から週1回)、松島浄化センター下流の河川と松島湾内の4地点の水(2012年9月から月1回)、さらに、松島湾内の4地点における養殖カキ(2012年9月から月1回)の継続的な採取を始め、病原微生物の検出と定量を行った。平成24年度は、ノロウイルス GI, GII の定量を行った。下水に関してはノロウイルス GI, GII に加え、エンテロウイルスも定量した。下水からは、冬場から初夏にかけてノロウイルス GII が検出された。エンテロウイルスの下水中濃度に関しては季節的な変動は見られなかった。河川及び湾内の水からはノロウイルスは検出されなかった。養殖カキからは2013年1月からノロウイルス GI, GII が検出されはじめた。各種水源から得られたサンプルの一部は冷凍保存しており、病原微生物の網羅的同定・絶対定量技術を適用することにより、監視対象微生物や指標微生物を決定していく予定である。

二次感染を考慮した感染症モデル構築のために、家庭内での感染症伝播モデルのプロトタイプを開発した。平成25年度に研究対象地域においてアンケート調査を行う予定である。また、上述した通り、各種水源からのノロウイルスの検出結果が蓄積されてきていることに加え、病原体別下痢症サーベイランスの成果から、流域内におけるノロウイルス感染者数のデータも蓄積されつつある。平成25年度以降もこれらのデータ収集を継続するとともに、アンケート調査による関連情報の収集

も行い、上記のプロトタイプを当該流域に適した伝播モデルに発展させていく予定である。

C. 迅速な病原微生物スクリーニング技術開発

人工合成 RNA を用いて、プローブ、蛍光物質、濃度、反応条件などについて、更に条件検討を行った。用いる蛍光物質の種類が感度および膜透過性に与える影響、プローブ鎖長と塩基配列が与える影響、プローブと RNA の濃度比および反応温度や反応環境について、データの精度を高めるための検討を行い、環境中から抽出した RNA を標的として検出を行う際のプロトコル確立のためのノウハウを蓄積した。また、蛍光プレートリーダーの選定を行い、ここでもプレートリーダーの蛍光感度について、様々な蛍光物質を用いて行い、本手法に最適と思われるプレートリーダーを選定し、購入した。また、プレートリーダーの他に、シーケンサーを用いた高感度検出の可能性についても検討を行ったが、シーケンサーを用いると、感度が高い反面、塩基配列によってピークが得られる時間に若干の誤差が生じやすく、今後解析を行っていく際に不都合が生じる可能性が高いと判断し、当面は蛍光プレートリーダーを用いて検出するための技術開発を中心に研究を推進することとした。

また、ABC-LAMP 法を用いたウイルス検出法においては、下水中のノロウイルスの検出を試みたところ、定量 PCR 法との一致率が臨床検体、牡蠣検体に比べ、低い可能性があることが明らかになった。サンプル数が少ないため、現時点においては不正確な値であるが、60%-70%程度となる可能性があることが明らかになった。

D. 水監視による感染症流行検知システム構築

平成 24 年度は、環境サンプリングを行っている研究対象地域にある外来医療機関(内科・小児科を標榜)と近隣の総合病院小児科において感染性胃腸炎サーベイランスを開始した。これら 2 つの医療機関を急性胃腸炎症状(下痢症もしくは嘔吐症)で受診した患者を対象として、平成 23 年度に確立した検出方法を用いてノロウイルス、ロタウイルス、アデノウイルスの検出および遺伝子型の同定を行った。また、これらのウイルス以外で感染性胃腸炎の起原菌として挙げられるサポウイルス、アストロウイルス、エンテロウイルス、パレコウイルスの検出も real time PCR を用いて試みた。H24 年 11 月から H25 年 2 月末までに 87 人の急性胃腸炎患者から検体が採取され、そのうち 43 件(49%)でウイルスが検出された。検出されたウイルスの内訳は、ノロウイルス GII が 24 件(56%)、ノロウイルス GI が 5 件(12%)、ロタウイルスが 1 件(2%)、サポウイルスが 7 件(16%)、アストロウイルスが 2 件(5%)、パレコウイルスが 1 件(2%)、ノロウイルス GII と他のウイルスとの重複感染が 3 件(7%)であった。遺伝子解析が可能であったノロウイルス GII 陽性検体 27 件中、25 件が GII/4、2 件が GII/14 であった。また、ノロウイルス GII/4 には H24 年冬より新しく出現した Sydney 2012 変異株も多数検出されており、研究対象地域では従来のもとの変異株とが同時に流行していたと考えられた。その他に、地理情報システムを用いて感染性胃腸炎の伝播パターンを観察する解析のトライアルを行った。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報
なし