

# 宮城県内における下水流入水中からのエンテロウイルスD68型検出 と県内流行との関連

Detection of enterovirusD68 in municipal wastewater samples in Miyagi.

佐々木 美江 佐々木 ひとみ 植木 洋 渡邊 節  
Mie SASAKI, Hitomi SASAKI, Yo UEKI, Setsu WATANABE

県内の下水処理施設を対象に2014年9月から2016年3月にかけて採水した下水流入水77試料からエンテロウイルスD68型の検出を試みた。その結果、EV-D68は検出されなかったが22検体（28.5%）からエンテロウイルス属が検出された。コクサッキーウイルスA1型（CV-A1）、コクサッキーウイルスA10型（CV-A10）、コクサッキーウイルスB2型（CV-B2）、コクサッキーウイルスB3型（CV-B3）、コクサッキーウイルスB5型（CV-B5）、エコーウイルス18型、エコーウイルス30型の7血清型が検出された。CV-A1、CV-A10、CV-B2は、一定時期内に断続的にそれぞれ検出され、期間中の処理区内で患者が発生していたことが考えられた。更に、ヘルパンギーナ流行期に、患者及び下水試料からCV-B2が検出され、ヘルパンギーナの地域での患者数増加が下水に反映されていた。本調査では下水流入水からEV-D68は検出できなかったが、腸管系エンテロウイルスの検出は下水処理区内地域の患者増加を捕らえる上で有用であると思われた。

キーワード：エンテロウイルスD68；エンテロウイルス；下水流入水  
Key words：enterovirusD68；enterovirus；municipal wastewater

## 1 はじめに

エンテロウイルスD68型（EV-D68）はピコナウイルス科エンテロウイルスに属するRNAウイルスで、1962年にアメリカの呼吸器感染症の小児患者から初めて分離された。EV-D68感染は無症状のものからくしゃみ、鼻水といった軽症、呼吸困難や肺炎など重症なものまで多彩な症状を呈する。2014年から2015年にかけてアメリカでEV-D68感染による重症呼吸器疾患の増加が確認され、14名の死亡が報告された<sup>1)</sup>。我が国においては2010年から急激にEV-D68の検出数が増加し、2005年から2015年の間に上気道炎、下気道炎の呼吸器症状を呈した乳幼児を中心に272例からEV-D68が検出された<sup>2)</sup>。一部、ポリオ様の急性弛緩性脊髄炎を呈する症例の検出報告もあり、EV-D68感染との関連が疑われている<sup>3)</sup>。また、感染性胃腸炎、急性脳炎等と診断された患者の糞便からもEV-D68が検出されている<sup>2)</sup>。宮城県では2015年9月に仙台市内の医療機関においてに呼吸器症状のある4名の患者からEV-D68が検出された<sup>4)</sup>。

一方、近年、環境水中から感染性胃腸炎の原因となるRNAウイルスを検索する研究がされており、流域の集団感染を察知する有効な手段として報告されている<sup>5)・7)</sup>。

そこで、本研究では、潜在的なEV-D68の地域発生を捕らえることを目的に、県内下水処理場の流入下水からのEV-D68遺伝子の検出を試み患者発生との関連について調査した。

## 2 対象及び検査方法

### 2.1 対象

2014年9月から2016年3月に県内の下水処理場で週1回の頻度で採水した流入下水77試料を対象とした。

### 2.2 方法

#### 2.2.1 濃縮法

試料40mLにポリエチレングリコール6000を8%(w/v)、塩化ナトリウムを2.3%(w/v)添加し、4℃で12時間緩やかに攪拌した。攪拌後、試料を50mL遠心管に移し、4℃で9,000×g 30分遠心分離を行った。遠心分離後、デカンテーションで上清を除去し、残った沈殿物に1mLの滅菌蒸留水を加えピペティングで攪拌し1.5mLチューブに移した。1分間ボルテックスで攪拌後、4℃で10,000×g 30分遠心した上清をウイルス濃縮液とした。

#### 2.2.2 ウイルスRNA抽出

RNA抽出にはQIAamp Viral RNA mini kit(QIAGEN)を用い、キット付属のマニュアルに従ってウイルス濃縮液140μLからウイルスRNAを抽出した。

#### 2.2.3 CODEHOP PCR法

逆転写からPCR反応までは、CODEHOP PCR法<sup>8)9)</sup>に準じて行った。逆転写反応はRNA抽出液 5μL、5×First-StrandBuffer 2μL、2.5mM dNTPs 0.4μL、0.1M DTT 1μL、RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor 0.5μL、SuperScriptII RT 0.5μLに4種類のプライマー（濃度1.66μM）AN32、33、34、35を0.6μLを添加して総量10μLにした後、22℃ 10分、42℃ 45分、95℃ 5分で逆転写反応を行った。1stPCR及びsemi nested PCRでは

EX Taq Hot Start Version(Takara)を用い、感染症研究所の病原体マニュアルに添って実施し、エンテロウイルスのキャプシド蛋白VP1をコードしている領域を増幅した。増幅産物が確認された検体は、ダイレクトシーケンス法を用いて遺伝子配列を決定し、BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) による相同性検索によりウイルスの同定を行った。

### 3 結果

#### 3.1 下水流入水中のエンテロウイルス遺伝子

調査期間中にEV-D68型遺伝子は検出されなかったが、流入下水からエンテロウイルス遺伝子を22件(28.5%)検出した。検出されたエンテロウイルス遺伝子は、エンテロウイルスA群(HEV-A)が3件、エンテロウイルスB群(HEV-B)が8件、エンテロウイルスC群(HEV-C)が11件だった。血清型はコクサッキーウイルスA1型(CV-A1)、コクサッキーウイルスA10型(CV-A10)、コクサッキーウイルスB2型(CV-B2)、コクサッキーウイルスB5型(CV-B5)、エコーウイルス18型(E-18)、30型(E-30)であった。検出時期はウイルスによって異なり、2014年9月及び11月と12月はCV-B2、2014年11月及び2015年1月から4月はCV-

A1、2015年7月はCV-A10、2015年8月から9月はCV-B5であった。CV-B3、E-18、E-30が単発的に検出された(表1)。

#### 3.2 関連疾患の患者数との比較

エンテロウイルス属が引き起こす主な疾患はヘルパンギーナ、手足口病及び感染性胃腸炎である。そこで、下水流入水から検出されたエンテロウイルス遺伝子とエンテロウイルス属が原因となる感染症の発生時期を比較した。感染症情報センターに報告された3疾患の患者報告数を疾患毎にみると、ヘルパンギーナは2014年の第31週から第40週(7月28日～9月5日)、手足口病は2015年の第27週から第38週(6月29日～9月20日)に通常より患者報告数が多かった。感染性胃腸炎は、ほぼ通年、報告があったが2015年第6週(2月2日～2月8日)、第51週(12月14日～12月20日)が特に顕著であった(図1)。一方、下水ではヘルパンギーナの患者報告数が増加した2014年第31週から第40週にはCV-B2、E-30が、感染性胃腸炎の報告が多い2015年第3週から第21週にはCV-A1、手足口病の患者報告の多い2015年第27週から第38週にはCV-10A、E-18、CV-B5がそれぞれ試料から検出された(表2)。

表1 下水流入水からのエンテロウイルス遺伝子検出

| % Positive       | Date of collection | HEV-A(3) |       | HEV-B(8) |       | HEV-C(11) |      |       |
|------------------|--------------------|----------|-------|----------|-------|-----------|------|-------|
|                  |                    | CV A10   | CV B2 | CV B3    | CV B5 | E 18      | E 30 | CV A1 |
| 22/77<br>(28.5%) | 2014               | 9月       |       | 1        |       |           |      |       |
|                  |                    | 10月      |       |          |       |           | 1    |       |
|                  |                    | 11月      |       | 1        |       |           |      | 1     |
|                  |                    | 12月      |       | 1        |       |           |      |       |
|                  | 2015               | 1月       |       |          |       |           |      | 3     |
|                  |                    | 2月       |       |          |       |           |      | 1     |
|                  |                    | 3月       |       |          |       |           |      | 4     |
|                  |                    | 4月       |       |          |       |           |      | 2     |
|                  |                    | 7月       | 3     |          |       |           |      |       |
|                  |                    | 8月       |       |          |       | 1         |      |       |
| 2016             | 2015               | 9月       |       |          | 1     | 1         |      |       |
|                  |                    | 1月       |       |          | 1     |           |      |       |

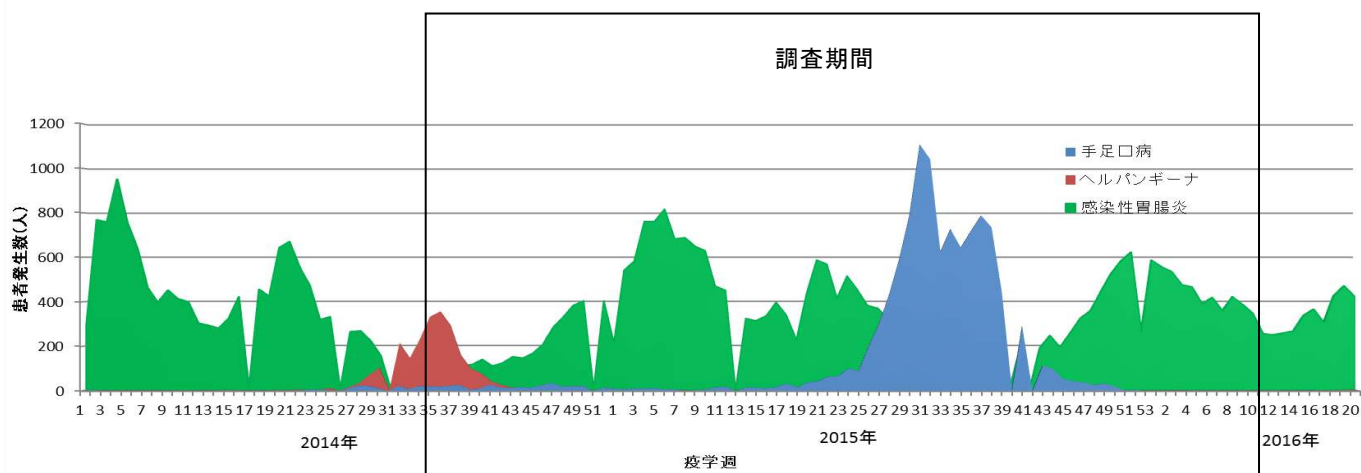


図1 エンテロウイルスと関連する疾患の患者発生数

表2 下水流入水から検出された時期と血清型

| 採材年   | 採材月日   | 疫学週  | 血清型   |
|-------|--------|------|-------|
| 2014  | 9月3日   | 36   | CV-B2 |
|       | 10月1日  | 40   | E-30  |
|       | 11月19日 | 47   | CV-A1 |
|       | 11月26日 | 48   | CV-B2 |
|       | 12月24日 | 52   | CV-B2 |
|       | 2015   | 1月7日 | 2     |
| 1月21日 |        | 4    | CV-A1 |
| 1月26日 |        | 5    | CV-A1 |
| 2月28日 |        | 9    | CV-A1 |
| 3月4日  |        | 10   | CV-A1 |
| 3月11日 |        | 11   | CV-A1 |
| 3月18日 |        | 12   | CV-A1 |
| 3月25日 |        | 13   | CV-A1 |

10A 6件, CV-B2 3件, CV-A6 1件, CV-A16 1件が検出され、2015年の第30週から第31週にCV-A16とCV-6Aがそれぞれ1件検出された(表3)。また、手足口病患者は2014年の第37週から第38週にCV-A16とCV-6Aがそれぞれ1件検出され、2015年の第25週から第34週にCV-A16 15件, CV-A6 2件が検出された(表4)。

表3 ヘルパンギーナ患者からの病原体検出状況

| 検体採取年 | 検体採取週 | 検出病原体  | 検出数 |
|-------|-------|--------|-----|
| 2014  | 32    | CV-A4  | 2   |
|       |       | CV-A10 | 2   |
|       | 34    | CV-A10 | 1   |
|       | 35    | CV-A5  | 1   |
|       | 36    | CV-A4  | 1   |
|       |       | CV-B2  | 1   |
|       |       | CV-A10 | 1   |
|       | 37    | CV-A4  | 3   |
|       |       | CV-A5  | 2   |
|       | 38    | CV-A4  | 2   |

|      |       |    |        |
|------|-------|----|--------|
|      | 4月1日  | 14 | CV-A1  |
|      | 4月28日 | 18 | CV-A1  |
|      | 7月8日  | 28 | CV-A10 |
|      | 7月22日 | 30 | CV-A10 |
|      | 7月29日 | 31 | CV-A10 |
|      | 8月12日 | 33 | CV-B5  |
|      | 9月9日  | 37 | E-18   |
|      | 9月30日 | 40 | CV-B5  |
| 2016 | 1月27日 | 4  | CV-B3  |

### 3.3 患者から検出された病原体

感染症サーベイランスシステム(NESID)の病原体サーベイランスより病原体検出データを集積すると、調査期間中、県内のヘルパンギーナ患者からは、2014年第32週から第49週にCV-4A 11件, CV-5A 4件, CV

|      |    |        |   |
|------|----|--------|---|
|      | 39 | CV-A4  | 2 |
|      |    | CV-A10 | 2 |
|      | 40 | CV-A5  | 1 |
|      | 41 | CV-A4  | 1 |
|      | 49 | CV-B2  | 2 |
| 2015 | 30 | CV-A16 | 1 |
|      | 31 | CV-A6  | 1 |

### 3.4 下水流入水からのエンテロウイルス遺伝子検出及び疾患の流行と患者からの病原体検出

2014年のヘルパンギーナ流行期である第31週から第40週(7月28日~9月5日)に、下水流入水ではCV-B2, E-30が検出され、同時期の患者からはCV-A4, CV-A5, CV-A10, CV-B2が検出された(表2,3)

表4 手足口病患者からの病原体検出状況

| 検体採取年 | 検体採取週 | 検出病原体  | 検出数 |
|-------|-------|--------|-----|
| 2014  | 37    | CV-A5  | 1   |
|       | 38    | CV-A6  | 1   |
| 2015  | 25    | CV-A16 | 1   |
|       | 27    | CV-A16 | 1   |
|       | 28    | CV-A16 | 3   |
|       | 29    | CV-A6  | 1   |
|       |       | CV-A16 | 6   |
|       | 30    | CV-A16 | 3   |
|       | 31    | CV-A16 | 1   |
|       | 34    | CV-A6  | 1   |

#### 4 考察

仙台市内の医療機関で2015年9月7日から9日に集中して呼吸器症状を発症した4名の患者からEV-D68が検出された<sup>4)</sup>。県内においてもEV-D68による感染が想定されたが、感染症法の報告対象外であるため患者の発生状況の正確な把握は困難である。そこで、本調査では地域流行の把握を目的に下水流入水からのEV-D68の検出を試みたが、結果として検出することはできなかった。EV-D68に関する国内の疫学状況によるとEV-D68が検出された522例のうち咽頭ぬぐい液からの検出が504例(97%)と最も多く、次いで喀痰・気管支洗浄液が11例(2%)、糞便も10例(2%)と報告されており<sup>10)</sup>、糞便にもウイルスが排泄されることから、他のエンテロウイルスと同様に下水から検出することが可能であると考えられた。本調査においてEV-D68が検出されなかった理由としては、下水流入水中のEV-D68が他のエンテロウイルスに比べウイルス量が少なかったことが考えられた。海外では磁性粒子を利用した方法で下水からEV-D68 RNAを9.7%の割合で検出したとの報告もあり<sup>11)</sup>、今後、検出方法を含めた検討も必要と考えられる。

一方、本調査で検出されたエンテロウイルス属は、CV-A1, CV-A10, CV-B2, CV-B3, CV-B5, E-18, E-30の7血清型で、手足口病やヘルパンギーナの原因ウイルスであるCV-A10, CV-B2が含まれていた。特にCV-B2はヘルパンギーナ患者報告数が増加した際に下水及び患者から検出されており、下水処理区域での流行を反映したものと推察された。また、CV-B2, CV-A1, 10は一定期間中に断続的な検出が認められ、これらウイルスによる感染症の地域流行を示したものと考えられた。

エンテロウイルスは、手足口病、ヘルパンギーナ、髄膜炎、不明熱の原因ウイルスとして認知されており、特に新生児においては重症化することが多い。2003年には無菌性髄膜炎の患者からE30を検出しており<sup>12)</sup>、2016年にはCV-B5による脳炎も報告されている。CV-B2は1960年以降、3年ごとに流行を繰り返しており、これらの流行を早期に察知できれば感染予防に有効な対策を講じることができると考える。2014年の感染症流行予測調査事

業の報告書では、我々が検出したE30, CV-B5を含むコクサッキーウイルス、エコーウイルス、ポリオウイルス、アデノウイルス、ヒトパレコウイルス、レオウイルスが全国の流入下水14地点から検出されており、ポリオウイルスを含む腸管系ウイルスの監視が環境水サーベイランスで可能であると報告している<sup>7)</sup>。

これまで我々は、下水流入水からノロウイルスやパレコウイルスの検出を試み、潜在的流行を早期に察知できることを報告した<sup>5) 6)</sup>。今回、EV-D68は下水流入水から検出できなかったが、下水流入水を利用したサーベイランスは腸管系エンテロウイルスの流行を察知する上で有用であると思われた。

#### 5 謝辞

本研究は、平成28年度宮城県公衆衛生研究振興基金の研究助成により行われたものであり、関係者の方々に感謝いたします。

#### 参考文献

- 1) Enterovirus D68, CDC: <https://www.cdc.gov/non-polio-enterovirus/about/ev-d68.html>
- 2) 国立感染症研究所, IASR: <http://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/a/ev-d68/2335-idsc/iasr-news/5167-pr4181.html>
- 3) 豊福悦史, 益田大幸, 谷口留美, 小島あきら, 越野由紀, 野田あんず, 古谷憲孝, 西本創, 高見澤勝: 病原微生物検出情報: 36, 226-227, 2015
- 4) 川村和久, 岡本道子, 押谷仁: 病原微生物検出情報: 37, 14-15, 2016
- 5) Ueki Y, Sano D, Watanabe T, Akiyama K, Omura T: *Water Research.*, 39, 4271-4280, 2005
- 6) Abe M, Ueki Y, Miura T, Kimura S, Suzuki Y, Sugawara N, Masago Y, Omura T, Watanabe S: *Japanese Journal of Infectious Disease*, 69, 414-417, 2015
- 7) 吉田弘ら, 病原微生物検出情報: 37, 208-209, 2016
- 8) W.Allan Nix, M. Steven Oberste, Mark A. Pallansch: *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 2698-2704, 2006
- 9) 手足口病病原体マニュアル, 国立感染症研究所: <http://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/HFMdis.pdf> エンテロウイルスD68型(EV-D68)に関する国内の疫学状況のまとめ(更新)(2016年1月20日現在), IASR: <http://www.niid.go.jp/niid/ja/id/2339-disease-based/a/ev-d68/idsc/iasr-in/6263-kj4322.html>
- 10) エンテロウイルスD68(EV-D68)感染症とは, 国立感染症研究所: <http://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi.html?start=93>

- 11) Soile Blomqvist, Carita Savolainen-Kopra, Anja Paananen, Tapani Hovi, Merja Roivainen: *Journal of General Virology*, 90, 1371–1381, 2009
- 12) Weil M, Mandelboim M, Mendelson E, Manor Y, Shulman L, Ram D, Barkai G, Shemer Y, Wolf D, Kra-Oz Z, Weiss L, Pando R, Hindiyeh M, Soffer D: *Journal of Clinical Virology*, 86, 52-55, 2017
- 13) 無菌性髄膜炎関連エンテロウイルスの動向 2008年12月現在, IASR: [http://idsc.nih.go.jp/iasr/30/347/t\\_pc347-j.html](http://idsc.nih.go.jp/iasr/30/347/t_pc347-j.html)