

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2016

課題番号：26303011

研究課題名(和文) 日本で発生しうる輸入感染症予見を目的としたスペインにおける下水中病原微生物の同定

研究課題名(英文) Identification of pathogens in sewage collected in Spain in order to predict imported infectious agents in Japan

研究代表者

佐野 大輔 (Sano, Daisuke)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80550368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、南米からの輸入食品の流通が多いスペインにおいて、下水中に存在する病原体の同定を試みた。ウイルス及び細菌の同時検出手法を開発し、同時にスペイン国内でのサンプリング及びサンプル解析を行った。サンプルは日本に持ち帰り、病原体由来遺伝子の網羅的検出を行った。サンプル解析では、下水検体及び臨床検体中から得られたノロウイルス遺伝子の次世代シーケンス解析を行い、その塩基多様度を評価した。遺伝子型ごとのモニタリングを可能とするために、ノロウイルスGII.3、GII.4、GII.6及びGII.17に由来する遺伝子をそれぞれ定量することが可能なプライマー・プローブセットを設計した。

研究成果の概要(英文)：This study aims to identify pathogens in wastewater collected in Spain. Firstly, a simultaneous detection method of pathogenic viruses and bacteria was developed. Wastewater samples and fecal samples from gastroenteritis patients were collected in Spain, and applied to the newly developed method. As a result, norovirus GII was found to be the most important infectious agent in wastewater. Norovirus genome sequences were then analyzed by next-generation sequencing, and its nucleotide diversity was evaluated. Also, primer and probe sets for separately quantifying multiple genotypes of norovirus were designed and validated.

研究分野：土木環境システム

キーワード：病原体 下水 スペイン

1. 研究開始当初の背景

ノロウイルスによる感染症が生じた場合、感染者に現れる症状は免疫レベル等の個体差によって大きく異なり、全く症状が出ない感染者（不顕性感染者）も少なからず存在する。この不顕性感染者が、ノロウイルスに感染しているという自覚が無いために日常通りに活動し、感染拡大に寄与していることが報告されている。不顕性感染者でなくても、症状が軽い下痢止まりであった感染者は、通院することなく日常生活を送るであろう。その結果、病院からの報告で成り立つ厚生労働省などによる「病原微生物検出情報」等における情報は、感染症の動向を見極める観点からは非常に重要であるものの、報告の絶対数に関しては氷山の一角を捉えているに過ぎない。

それに対し、都市下水には大変有用な疫学情報が含まれている。都市下水には下痢症患者のみならず不顕性感染者からの糞便も含まれるので、我が国のように下水道システムが発達した社会であれば、集水域の住民が罹患した胃腸炎に関わる病原微生物が全て下水処理場に流れ込むことになる。申請者のグループは、下水処理場への流入下水が集水域における有用な疫学情報を含むことを実証してきた。例えば宮城県内のカキ養殖地域において、下水、養殖カキ及び急性下痢症患者糞便に由来するノロウイルス遺伝子を解析したところ、それらの間に高い相関が見られることから、「感染者→下水処理水→河川→養殖カキ→感染者」という感染ルートが存在することを報告した (Ueki et al., 2005. *Water Res.*, 39, 4271-4280)。この成果は、下水中の病原微生物をモニタリングすることにより、発症者だけでなく感染者全体の情報を得ることが可能であることを示している。

本研究では、この都市下水に含まれる病原微生物に着目し、スペインにおいて輸入感染症に関わる病原微生物を同定することを試みた。歴史・文化上の強い繋がりから、スペインは欧州連合における中南米諸国との窓口になっている。そのため、例えばスペイン料理に欠かせないムール貝などの二枚貝を中南米諸国から大量に輸入している。その結果、輸入食材を原因とする食中毒が度々発生している。例えば1999年と2008年にはバレンシアを中心とする地域において、ペルーから輸入した二枚貝 (*Donax sp.*) を原因としたA型肝炎ウイルスによる集団感染が発生した (Polo et al., 2010. *Emer. Infect. Dis.*, 16(6), 1036-1038)。1999年のケースの場合、輸入した二枚貝は欧州連合により設定された基準値を満たしていたが、検査対象となった二枚貝の75%がA型肝炎ウイルスに汚染されていたことが判明した (Bosch et al., 2001. *Water Sci. Tech.*, 43(12), 61-65)。2008年のケースの場合、学童を対象としたA型肝炎ウイルスワクチンプログラムが1999年にスペインで開始されて10年近く経過した後発生した

事例であったことから、スペイン国内及び欧州連合の衛生担当部署が対応を迫られる事態となった。このような経験を有するスペインは、環太平洋パートナーシップ (Trans-Pacific Partnership: TPP) 協定の交渉が進むなど、今以上にグローバル化が進むことが見込まれる日本において将来的に発生しうる輸入感染症を予見する上で、非常に貴重なフィールドであると言える。

2. 研究の目的

本研究では、上述したような経験を有するスペインにおいて、下水処理場への流入下水をサンプリングし、輸入感染症を引き起こしうる病原微生物の同定を試みた。研究代表者が研究協力を進めてきたバルセロナ大学腸管系ウイルスグループ (Albert Bosch 教授) の研究室をベースとし、スペイン国内の下水処理場から下水サンプルを採取し、下水中に含まれる病原ウイルス及び病原細菌を探索した。さらに、Bosch 教授はスペイン各地の病院から感染症患者検体の提供を受けるネットワークを有している他、食中毒の原因と推測された食品サンプルも入手可能であることから、それらのサンプルから得られた病原微生物の遺伝子解析を同時に行うことで、輸入食品に関連した感染症を絞り込むことを試みた。

3. 研究の方法

本研究では、病原ウイルス (ノロウイルス、A型肝炎ウイルス及びサポウイルス) 及び病原細菌 (病原性大腸菌、サルモネラ及びカンピロバクター) を検出対象とした。高感度かつ網羅的な病原微生物定量手法として、マイクロ流体工学に基づく高感度マルチサンプル・マルチターゲット病原因子遺伝子定量手法 (MFQ 病原細菌チップ) を採用した。このMFQ 病原細菌チップでは Booster と呼ばれる手法を導入し、微量な目的遺伝子も検出可能である。本研究では、新たに複数の遺伝子型の病原ウイルスも同時に検出できるチップ、すなわちMFQ病原体チップの開発を試みた。MFQ 病原体チップは、多サンプルについて存在量の少ない複数の病原微生物を同時一斉に検出・定量することが可能であるため、多検体を扱う必要がある日常的モニタリングに適している。MFQ 病原体チップの開発後、スペインで収集した濃縮下水サンプル、食中毒原因食品及び胃腸炎患者由来サンプルに対して適用し、病原体由来遺伝子を検出した。陽性サンプルから得られた遺伝子については、網羅的遺伝子解析方法により配列情報を得た。

4. 研究成果

研究初年度である平成26年度は、下水からのウイルス及び細菌の同時回収手法の開発、及びスペイン国内でのサンプリングを行った。下水からのウイルス及び細菌の同時回

収手法の開発では、ポリエチレングリコール沈殿法を採用し、試験細菌及びウイルスである *Pseudogulbenikania* sp. NH8B_3960tnp 及びマウスノロウイルスを同時に回収することが可能であることが確認された。さらに、同手法を日本国内で得られた下水サンプルに適用し、複数種細菌・ウイルス同時回収検出を行ったところ、アイチウイルス、アストロウイルス、エンテロウイルス、A 型肝炎ウイルス、ノロウイルス、ロタウイルス、サポウイルス、病原性大腸菌及びウェルシュ菌に由来する遺伝子が高頻度の検出されたことから、本研究で確立した細菌・ウイルス同時回収・検出技術が実用可能であることが確かめられた。スペインには計 2 回訪問し、研究協力者である Albert Bosch 教授の協力を得てサンプリングを行った。その結果、下水濃縮サンプル、食中毒患者由来サンプル、及び食中毒原因食品サンプルを得ることができた。

平成 27 年度には、研究初年度に得たサンプルに関する解析を進めた。スペイン・バルセロナ大学に 2 週間滞在し、Albert Bosch 教授の研究室において、病原体由来遺伝子の抽出及び逆転写反応を行った。サンプルは日本に持ち帰り、Microfluidic PCR による病原体由来遺伝子の網羅的検出を行った。その結果、ノロウイルス GII に由来する遺伝子を含むサンプルが複数得られた。これらのサンプルについて、ノロウイルス GII 由来遺伝子を通常の PCR により増幅し、次世代シーケンスによるアンプリコン解析を行った。また、2 週間のバルセロナ大学滞在中には、「Special Workshop on Health-Related Environmental Virology」と題してワークショップを開催した。スピーカーは研究代表者と研究分担者 2 名（東北大学・大村達夫教授、東京大学・片山浩之准教授）及びバルセロナ大学から 2 名（Anicet Blanch 教授及び Susana Guix 助教授）の計 5 名であり、約 40 名の参加者が聴講した。研究代表者はこのワークショップにおいて、本研究の意義と進捗状況を報告した。

平成 28 年度には、これまでに得たサンプルの解析を進めた他、国際学会・国内学会での成果発表を行った。サンプル解析では、下水検体及び臨床検体中から得られたノロウイルス遺伝子の次世代シーケンス解析を行い、その塩基多様度を評価した。ノロウイルス遺伝子の調査領域は、ORF1 と ORF2 の重複領域を含む NS 領域である。その結果、下水検体由来ノロウイルス遺伝子は、臨床検体由来のそれよりも塩基多様度が有意に高いことが確認された。また、同様の配列データに関し、多型サイト数を Brunner-Munzel 検定により比較したところ、下水検体由来配列と臨床検体由来配列の間に統計的に有意な差が確認された。これらの結果は、下水検体中には複数のヒトから排出されたノロウイルス遺伝子が含まれており、1 回のサンプリングで複数人分の疫学情報を取得することが可能であることを示すものである。このこと

は同時に、多様な遺伝子型が存在するノロウイルスに関しては、遺伝子型ごとに下水中濃度をモニタリングすることの必要性を示していると言える。そこで、遺伝子型ごとのモニタリングを可能とするために、ノロウイルス GII.3、GII.4、GII.6 及び GII.17 に由来する遺伝子をそれぞれ定量することが可能なプライマー・プローブセットを設計した。これらの成果は、2016 年 9 月に群馬県草津町で開催された国際食品・環境ウイルス学会において、研究協力者である Albert Bosch 教授を招聘して口頭発表された他、2017 年 3 月に熊本大学で開催された日本水環境学会年会で報告された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

(1) Tsuyoshi Kato, Ayano Kobayashi, Toshihiro Ito, Takayuki Miura, Satoshi Ishii, Satoshi Okabe and Daisuke Sano. Estimation of concentration ratio of indicator to pathogen-related gene in environmental water based on left-censored data. *Journal of Water and Health*, 14, 14-25, 2016. doi: 10.2166/wh.2-15.029

(2) Nowaki Hijikata, Rui Tezuka, Shinobu Kazama, Masahiro Otaki, Ken Ushijima, Ryusei Ito, Satoshi Okabe, Daisuke Sano, Naoyuki Funamizu. Bactericidal and virucidal mechanisms in the alkaline treatment of a compost using calcium lime and ash. *Journal of Environmental Management*, 181, 721-727, 2016. doi: 10.1016/j.jenvman.2016.08.026

(3) Thi Nguyen Hoa-Tran, Toyoko Nakagomi, Daisuke Sano, Jeevan B. Sherchand, Basu D. Pandey, Nigel A. Cunliffe and Osamu Nakagomi. Molecular epidemiology of noroviruses detected in Nepalese children with acute diarrhea between 2005-2011: increase and predominance of minor genotype GII.13. *Infection, Genetics and Evolution*. 30, 27-36, 2015. doi: 10.1016/j.meegid.2014.12.003

(4) Satoshi Ishii, Takamitsu Nakamura, Shuji Ozawa, Ayano Kobayashi, Daisuke Sano and Satoshi Okabe. Water quality monitoring and risk assessment by simultaneous multi-pathogen quantification. *Environmental Science and Technology*, 48(9), 4744-4749, 2014. doi: 10.1021/es500578s

〔学会発表〕(計 16 件)

(1) 宮村明帆、北島正章、岡部聡、佐野大輔。水環境におけるノロウイルスの遺伝子型別存在実態の把握。第 51 回日本水環境学会年会。2017 年 3 月 15 日～17 日。熊本大学（熊本県熊本市）

(2) 小林直央、押木守、伊藤寿宏、瀬川高弘、幡本将史、井口晃徳、大久保努、上村繁樹、多川正、久保田健吾、高橋優信、原田秀樹、山口隆司、本山毅宜、荒木信夫、佐野大輔 . 微小ナノ流路デバイスを用いた DHS (Downflow Hanging Sponge)リアクターにおけるヒト感染性ウイルスの定量評価 . 日本水環境学会・水中の健康関連微生物研究委員会シンポジウム「水中の病原微生物によるリスク制御への総合対策に向けて」. 2015年12月15日 . 発明会館地下ホール (東京都港区)

(3) 伊藤寿宏、加藤毅、長谷川洵、片山浩之、岡部聡、佐野大輔 . ベイズモデルを用いた下水処理過程における病原ウイルス除去効率の定量評価 . 日本水環境学会・水中の健康関連微生物研究委員会シンポジウム「水中の病原微生物によるリスク制御への総合対策に向けて」. 2015年12月15日 . 発明会館地下ホール (東京都港区)

(4) Y. Ueki, S. Kimura, S. Watanabe, Y. Okimura, Y. Masago, Y. Konta, T. Miura, D. Sano and T. Omura. Detection of norovirus in sewage by quenching probe based loop-mediated isothermal amplification (Q-LAMP) method. WaterMicro2015. 2015年9月13日~19日 . The grand auditorium of Faculdade de Medicina Dentaria (Lisbon, Portugal)

(5) 佐野大輔 . 下水再生利用に関わる下水処理装置の性能評価及び運転管理手法の提案 . 環境工学委員会・次世代下水道小委員会講演会「次世代の下水道における衛生的課題とその対応」. 2015年8月10日 . 北海道大学・フロンティア応用科学研究棟 (北海道札幌市)

(6) Toshihiro Ito, Tsuyoshi Kato, Hiroyuki Katayama, Satoshi Okabe and Daisuke Sano. Bayesian estimation of virus removal efficiency in wastewater treatment plant based on left-censored dataset. WET2015. 2015年8月5日~6日 . 日本大学駿河台キャンパス (東京都千代田区)

(7) Toshihiro Ito, Satoshi Ishii, Takahiro Segawa, Yoshihito Nakahara, Satoshi Okabe and Daisuke Sano. Evaluation of virus removal efficiency in a pilot-scale MBR with microfluidic quantitative PCR. WEF-EESS Asia-Pacific Wastewater Treatment and Reuse Conference 2015. 2015年6月30日~7月1日 . Stephen Riady Centre in UTown, NUS (Singapore)

(8) Daisuke Sano, Takayuki Miura, Kozo Watanabe, Tatsuo Omura, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi and Satoshi Okabe. Genetic variations of norovirus GII.4 within a single host and among hosts. Special Workshop on Health-Related Environmental Virology. 2015年

5月27日 . University of Barcelona (Barcelona, Spain)

(9) 伊藤寿宏、加藤毅、石井聡、瀬川高弘、岡部聡、佐野大輔 . Microfluidic Dynamic Arrayを用いたパイロットスケール MBR プラントにおける複数種病原ウイルスの同時定量 . 第2回環境水質工学シンポジウム . 2015年5月9日 . 山形大学農学部 (山形県鶴岡市)

(10) 風間しのぶ、真砂佳史、大村達夫 . 下水中のポリ A 鎖を有するウイルスゲノムの選択的増幅手法の検討 . 第49回に本水環境学会年会 . 2015年3月16日~18日 . 金沢大学 (石川県金沢市)

(11) 勝又雅博、真砂佳史、原田秀樹、大村達夫 . ハイブリダイゼーション法を用いた下水中のウイルスゲノム回収手法の開発 . 第49回に本水環境学会年会 . 2015年3月16日~18日 . 金沢大学 (石川県金沢市)

(12) 加藤毅、岡部聡、佐野大輔 . 左側打切りデータに対する MAP 推定の適用 . 第49回に本水環境学会年会 . 2015年3月16日~18日 . 金沢大学 (石川県金沢市)

(13) Tsuyoshi Kato, Satoshi Okabe and Daisuke Sano. Bayesian modeling of virus removal efficiency in wastewater treatment processes. IWA World Water Congress 2014. 2014年9月21日~26日 . Lisboa Congress Centre (Lisbon, Portugal)

(14) 加藤毅、岡部聡、佐野大輔 . 異なる測定限界における切断分布のベイズ推定の適用 . 第17回日本水環境学会シンポジウム . 2014年9月8日~9日 . 滋賀県立大学 ()

(15) Daisuke Sano, Tsuyoshi Kato, Ayano Kobayashi, Toshihiro Ito, Satoshi Ishii and Satoshi Okabe. Estimation of quantitative relationship between pathogens and indicator microorganisms in water using left-censored data. 4th Food and Environmental Virology Conference. 2014年9月2日~5日 . Ionian Academy (Corfu town, Greece)

(16) Satoshi Ishii, Gaku Kitamura, Ayano Kobayashi, Takayuki Miura, Daisuke Sano and Satoshi Okabe. Quantification of multiple enteric viruses from environmental water samples by using microfluidic quantitative PCR. ASM2014. 2014年5月17日~20日 . Boston Convention & Exhibition Center (Boston, USA)

〔図書〕(計1件)

(1) 片山浩之 . 食品衛生検査指針・微生物編 . 第4章ウイルス2各論4ウイルス別検査法(8)糞便系ファージ . 公益社団法人日本食品衛生

協会 . 731-740, 2015.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特記事項無し

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐野 大輔 (DAISUKE SANO)
北海道大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号 : 80550368

(2)研究分担者

大村 達夫 (TATSUO OMURA)
東北大学・未来科学技術共同研究センター・教授
研究者番号 : 30111248

(3)研究分担者

片山 浩之 (HIROYUKI KATAYAMA)
東京大学・工学 (系) 研究科 (研究院)・准教授
研究者番号 : 00302779