

平成 23 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2008～2010

課題番号：20686035

研究課題名 (和文) 水系散発感染を検出するための下水試料ウイルス調査法の開発

研究課題名 (英文) Development of Detection Method of Sporadic Viruses from Wastewater

研究代表者

片山 浩之 (KATAYAMA HIROYUKI)

東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号：00302779

研究成果の概要 (和文)：

下水は健康状態に関わらず全てのヒトから排出されたウイルスを含むため、臨床研究よりも集水域における胃腸炎ウイルスの真の流行状況および分子疫学を網羅的に把握することができると考えられる。ここでは、これらノロウイルスに加え、比較的高濃度で検出されるアイチウイルスの下水および河川水中における存在状況ならびに遺伝的多様性を調べる手法を開発した。

ノロウイルスを対象として、水試料中におけるウイルス遺伝子の存在状況を RT-PCR 法により調べ、PCR 産物をクローニングすることにより、その塩基配列を決定することが可能であった。結果として、下水および河川水のいずれについても、GI ノロウイルスのほうが GII ノロウイルスよりも高頻度に検出された。GI ノロウイルスはこれまで考えられてきた以上にヒトの間に広く感染していることが示唆された。選択的な検出手法の開発に関しては、ピコルナウイルスの一種であるアイチウイルスについて、遺伝子型別に検出するプライマー、プローブを設計した。アイチウイルスについても、ノロウイルスと同様の方法で多様性を調べたところ、非常に多様なウイルス株が検出された。

以上より、当初からの目的であった、ウイルスの株ごとの検出手法の開発に成功した。

研究成果の概要 (英文)：

Examining wastewater samples could be an effective approach to understand the actual prevalence and epidemiology of the viruses, since wastewater contains viruses shed from all populations, regardless of symptoms. In this study, we developed methodology and investigated the prevalence and genetic diversity of Norovirus and Aichivirus in wastewater.

Noroviruses were found abundantly in wastewater samples by RT-PCR methods, from which we succeeded in determining nucleic acid sequences by the cloning and sequencing method. Norovirus GI was more frequently and abundantly found from river water samples than Norovirus GII. This result implies that Norovirus GI was more popular than expected from epidemiological result. Aichivirus was also tested with similar method and revealed to be more diverse than expected previously.

In conclusion, we successfully detected targeted viruses from wastewater.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2009年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2010年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
総計	19,500,000	5,850,000	25,350,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：用排水システム・ヒト腸管系ウイルス

1. 研究開始当初の背景

ウイルス濃縮法の開発やウイルスの遺伝子配列に関する知見が蓄積されてきたことから、下水流入水や処理水からウイルスを定量できるようになってきた。ウイルス濃縮の回収率は比較的安定しており、ウイルス遺伝子の増幅反応に対する下水試料由来の阻害因子の除去などが課題である。また、ウイルス遺伝子を増幅後にクローニングすることによりウイルス遺伝子を単離して増幅することが可能であり、その遺伝子配列を解析することが可能である。

2. 研究の目的

下水におけるウイルス発生状況を把握するためのウイルス測定法を開発することを試みる。具体的には、下水中に含まれる全ウイルス数を把握するために幅広くウイルスを定量する手法、特定のウイルスを排他的に測定する手法、さらには混在するウイルスを単離してそれぞれの遺伝子配列を決定する方法を開発する。

3. 研究の方法

下水試料および多摩川の水試料を対象として、RT-PCR法によりノロウイルスおよびアイチウイルスを定量した。

アイチウイルスおよびサポウイルスに対しては、効率的な増幅が可能となるようなプライマーを設計した。また、アイチウイルス、ノロウイルスに対しては、Nested RT-PCRにより遺伝子を増幅したのち、Cloning法を用いて遺伝子を単離し、もともとの1試料から8クローンを対象として、シーケンサーにより遺伝子配列を決定した。

4. 研究成果

開発したプライマーにより、サポウイルス、アイチウイルスは従来の方法よりも高い濃度で環境試料からウイルスを検出できた。このことから、従来よりも広く属内のウイルスを検出できる方法を開発することに成功したと言える。

ノロウイルス GI および GII に対して、Nested RT-PCR と Cloning 法により得られた塩基配列を系統樹解析した結果を図1および図2にそれぞれ示す。

ノロウイルス GI の多様性が目立つが、1試料から複数の異なる塩基配列が得られてい

ることを示しており、多様なウイルスが水試料から得られたことを示す。また、GI/4 が多く検出されているが、疫学的にはほとんど注目されていない株であり、今後、研究対象として非常に興味深い結果が得られた。

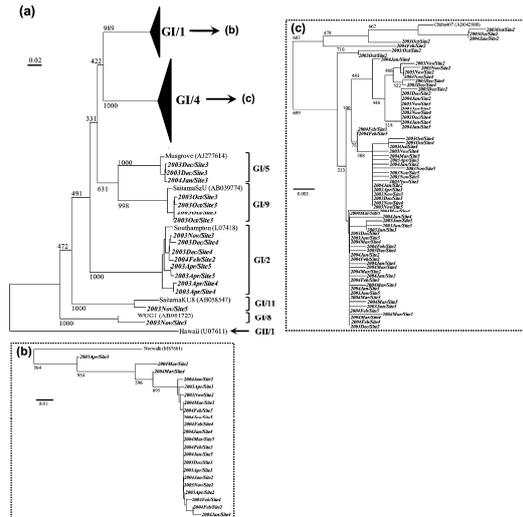


図1 ノロウイルス GI の多様性

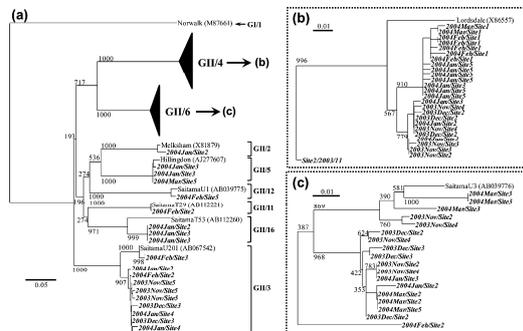


図2 ノロウイルス GII の多様性

また、アイチウイルスに対して同様に得られた結果について、下水から得られた結果を図3に、河川水から得られた結果を図4にそれぞれ示す。

アイチウイルスについては、病原性がはっきりしないためにこれまで研究の蓄積が少なかったが、水環境中に高濃度で含まれることを見出し、その多様性を調べた。環境試料に多様な遺伝子配列が得られていることから、幅広くウイルスの保有者がいることが示唆された。今後はアイチウイルスをヒトの腸管系ウイルスの存在を示す指標として用いることを検討する。

以上より、ウイルスの株ごとの検出手法の

開発に成功した。

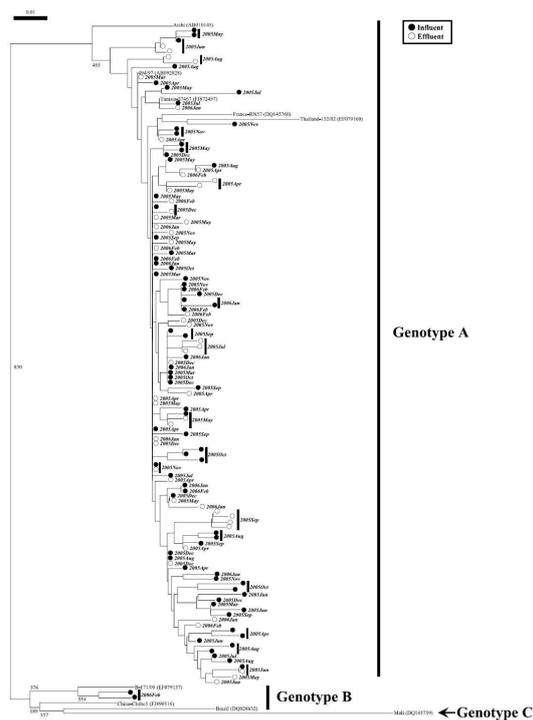


図3 下水中のアイチウイルスの多様性

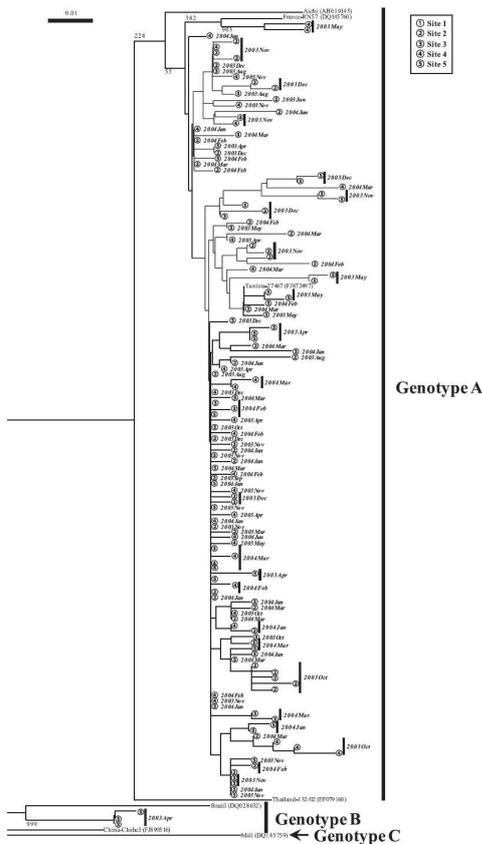


図4 河川水中のアイチウイルスの多様性

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

Masaaki Kitajima, Koichi Matsubara, Sathy Sour, Eiji Haramoto, Hiroyuki Katayama, and Shinichiro Ohgaki. (2009) First detection of genotype 3 hepatitis E virus RNA in river water in Cambodia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 103(9):955-957.

Masaaki Kitajima, Tomoichiro Oka, Eiji Haramoto, Naokazu Takeda, Kazuhiko Katayama, and Hiroyuki Katayama (2010) Seasonal distribution and genetic diversity of genogroups I, II, and IV noroviruses in the Tamagawa River, Japan. Environmental Science & Technology. 44(18):7116-7122.

Masaaki Kitajima, Tomoichiro Oka, Eiji Haramoto, Chanetta Phanuan, Naokazu Takeda, Kazuhiko Katayama and Hiroyuki Katayama. (2010) Genetic diversity of genogroup IV noroviruses in wastewater in Japan. Letters in Applied Microbiology Vol. 52, Issue 2, pp. 181-184.

Masaaki Kitajima Eiji Haramoto, Chanetta Phanuan, Hiroyuki Katayama. (2011) Prevalence and Genetic Diversity of Aichi Viruses in Wastewater and River Water in Japan Applied and Environmental Microbiology, 77 (6) , 2184-2187.

Masaaki Kitajima Eiji Haramoto, Chanetta Phanuan and Hiroyuki Katayama. Genotype Distribution of Human Sapoviruses in Wastewater in Japan, Applied and Environmental Microbiology. In press.

[学会発表] (計6件)

北島正章、岡智一郎、片山和彦、原本英司、片山浩之、武田直和、大垣眞一郎 (2008) 河川水中のノロウイルスを指標にした地域流行株の把握 第56回日本ウイルス学会学術集会抄録集、p194

片山浩之 水環境中のウイルスの挙動 ウィルス性下痢症研究会 第21回学術集会特別企画 2009.10.24, 国立感染症研究所戸山庁舎

端昭彦, 北島正章, 山下照夫, 皆川洋子, 片山浩之, 大垣眞一郎. 2009 Real-time RT-PCRによるアイチウイルスの核酸検

出および遺伝子型識別法の開発 第 57
回日本ウイルス学会学術集会抄録集、
p131.

片山浩之 第6回日本小児消化管感染症研究
会 基調講演 「水中の腸管系ウイルス
の挙動—下水・環境・水道の存在状況—」
2010.1. 26、東京大学医学部

Akihiko Hata, Masaaki Kitajima, Hiroyuki
Katayama, Shinichiro Ohgaki, 2009.
Removal characteristics of enteric
viruses and genotyped F-specific RNA
coliphages at a full-scale wastewater
reatment plant. Proc. of 15th
International Symposium on
Health-Related Water Microbiology、
May 31-Jun 05, 2009, Naxos, Greece
Sunhee Suk, Masaaki Kitajima, Koichi
Matsubara, Yukinobu Tohya, Kumiko
Oguma, Hiroyuki Katayama, and
Shinichiro Ohgaki. 2009. Disinfection
efficiency of UV combined with silver
on murine norovirus and fecal
indicators. 15th International
Symposium on Health-Related Water
Microbiology. May 31-Jun 05,
2009, Naxos, Greece

6. 研究組織

(1)研究代表者

片山 浩之 (KATAYAMA
HIROYUKI)

東京大学 工学系研究科
都市工学専攻 准教授

研究者番号：00302779

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし