

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H00632

研究課題名(和文) 流域におけるノロウイルスの動態把握と流行予測

研究課題名(英文) Dynamics and prediction of epidemics for norovirus in watersheds.

研究代表者

赤松 良久 (Akamatsu, Yoshihisa)

山口大学・大学院創成科学研究科・教授

研究者番号：30448584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,300,000円

研究成果の概要(和文)：水中および大気中のウイルスを対象に、乾燥海綿をフィルターとして効率的に回収する方法を開発した。また、本手法を用いて陸域～河川～海域におけるノロウイルス濃度の定量的結果、下水処理場以外から流入したノロウイルスの存在が、河川水およびカキへの汚染を引き起こしている可能性が示唆された。さらに、3次元環境流体モデル(Fantom Refined)によるシミュレーションによる河川～海域でのノロウイルス濃度の推定から、河川水では処理水からの汚染による負荷を過小評価しており、海域での実際の汚染はより広範囲に広がっている可能性が高いと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、水中および大気中の微量なウイルスを乾燥海綿を活用して効率的に回収可能であることが明らかとなっており、この手法は環境中のDNA/RNAの回収に広く活用される可能性がある。本研究により、陸域～河川～海域の一連の流域におけるノロウイルスの挙動を、実測およびシミュレーションにより把握することが可能であることが示された。本手法を活用して河口域の貝類の汚染を予測・防除することによって、我が国において年間930億円の経済損失をもたらしているともいわれるノロウイルスの根絶の可能性があり、社会的に意義は高い。

研究成果の概要(英文)：A method was developed for the efficient collection of viruses in water and air using dried sponges as filters. The results of the determination of norovirus concentrations in terrestrial, river and marine areas using this method suggest that the presence of noroviruses that entered rivers without being treated at sewage treatment plants may be causing contamination of river water and oysters. Furthermore, the estimation of norovirus concentrations in river to marine areas by simulation using a three-dimensional environmental fluid model (Fantom Refined) suggested that the load in river water was underestimated due to contamination from treated water, and that actual contamination in marine areas was likely to be more widespread.

研究分野：環境水理学

キーワード：ノロウイルス DNA/RNA 環境DNA 流域 海綿 パッシブサンプラー

1. 研究開始当初の背景

ノロウイルス (Human norovirus ; HuNoV) による冬季の感染性胃腸炎の流行は、汚染されたカキなどの二枚貝を加熱不十分なまま喫食することが原因の一つである。カキへの汚染は、胃腸炎患者から排出された HuNoV が、下水処理場や河川を介して、カキへ蓄積する経路が示されている。HuNoV における人から人への感染経路についてはこれまで多くの検討がされているものの、流域内の大気・水中における動態および食品 (特に濾過食性の二枚貝) における蓄積メカニズムは未解明である。

2. 研究の目的

(1) 水中および大気中での HuNoV を効率的に採取する方法を開発することを目的に、ウイルスを回収する素材として海綿に着目した。海綿を水中、大気の内環境中のウイルスを回収可能な素材として検証を行う。

(2) 陸域～河川～海域の環境中における HuNoV の動態把握を目的とした水中・水産物の HuNoV 濃度のモニタリングとして、下水処理場を起点とした周辺環境における、HuNoV の通年動態とカキへの蓄積に関する調査を行った。

(3) 現地観測と河川・海域における流動シミュレーションを組み合わせることで、河川から沿岸域にかけての HuNoV の動態解析を実施することで、HuNoV 流行予測モデルの開発に関して、環境中における HuNoV の時空間変化を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 海綿による水中のウイルスの回収評価は、下水放流水の影響がある河川地点において海綿を浸漬することで行った。24 時間と 72 時間浸漬した海綿を圧搾して回収した試料を、陰電荷膜破砕法¹⁾、または Promega 社の Viral RNA/DNA Concentration and Extraction Kits for Wastewater (Direct Capture 法)より核酸抽出を行った。得られた産物中の HuNoV GI の定量(定量 RT-PCR)により評価した。

大気中のウイルス動態把握を目的とした空気サンプル採取手法の検討として、市販されている 3 種類の乾式サンプラー(サイクロン型 2 種 : コリオリスコンパクト, コリオリスマイクロ, 乾式フィルター型 1 種 : Bobcat)の比較を、ウイルスの代用としてリポソーム封入トレーサーを室内噴霧し行った。また、市販されている乾式フィルター型サンプラーと本研究で開発した低コスト吸引型サンプラーに海綿を設置したものとの比較を、リポソーム封入トレーサーを同様に噴霧し、その回収量を定量 RT-PCR で測定するした。

(2) 試料採取は、山口市内 2 か所の下水処理場 (A 浄化センター, B 浄化センターおよび処理水の放流先である榎野川の 5 地点 (St.A~St.E) で、2022 年 6 月~2023 年 8 月に計 17 回行った (図-1)。下水処理場では下水流入水 (80 mL) および処理水 (1 L), 榎野川では河川水 (1 L) を採取した。2022 年 9 月~2023 年 8 月の同一調査日には、河口部の St.E に生息するマガキ (5 または 10 個体/調査) を採取した。各試料からのウイルス核酸の濃縮・抽出は、流入下水は Direct capture 法 (Promega), 処理水および河川水は陰電荷膜破砕法¹⁾, カキ中腸線からは ISO15216-1:2017(E)²⁾の変法で行った。Maxwell®RSC (Promega) によって精製された核酸精製産物における HuNoV GII の濃度を定量 RT-PCR³⁾により分析した。

(3) HuNoV の動態解析には、3 次元流体モデルの Fantom Refined を用いた。このモデルは、河川、海域などの流れ場および物質輸送を 3 次元的に一体解析可能である。計算期間は、塩分遡上を考慮した 2 周期分の潮汐を含み、2 浄化センターから放流される HuNoV GII の濃度が高い期間 (2023 年 1 月 1 日~2 月 18 日) と濃度が低い期間 (2023 年 3 月 3 日~4 月 26 日) を選定し、最初の 14 日間は助走期間とした。流入・境界条件に関しては、St.A の河川水と各浄化センターの処理水の HuNoV GII 濃度を与え、図-1 に示す計算範囲における HuNoV GII 濃度の動態解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 河川水に浸漬した海綿の圧搾液から HuNoV GI 濃度が定量され、浸漬時間が長い 72 時間の圧搾液から、

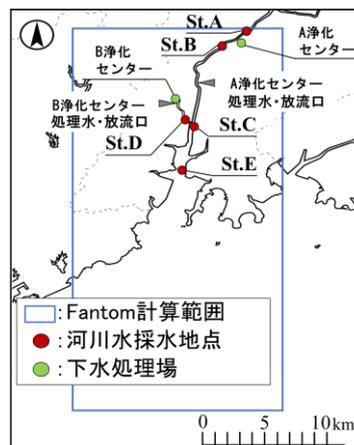


図-1 試料採取地点および計算範囲

より高濃度の HuNoV GI 濃度が定量された。ウイルスは海綿において、浸漬時間に応じて蓄積していくことが確認された (図-2)。また、Direct capture 法によって核酸抽出された圧搾液における HuNoV GI 濃度がより高かった。

市販捕集機器による大気中のウイルスを模擬したリポソーム封入トレーサの回収結果は、Bobcat(0.2%)>コリオリスマコンパクト(0.00182%)>コリオリスマイクロ(0.00019%)の順で回収率が高かった。開発した試作機 2(高吸引力)に Bobcat のフィルターを使用しリポソーム封入トレーサを回収した結果では、回収率が 0.45%とより高い回収率が得られ、本研究で開発した試作機の有効性が確認された。また、2種類の試作機(試作機 1: 静音タイプ, 試作機 2: 高吸引タイプ)において捕集素材に海綿を使用し、リポソーム封入トレーサの回収を実施した。リポソーム封入トレーサの回収率は、試作機 2 に海綿を適用した手法で最も高いことが確認され、海綿が大気中のウイルスの回収に有効である可能性が示された (図-3)。

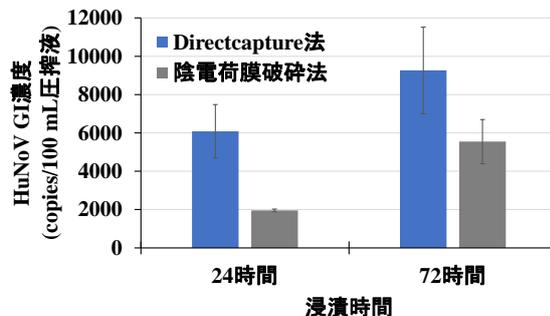


図-2 海綿における HuNoV GI 濃度

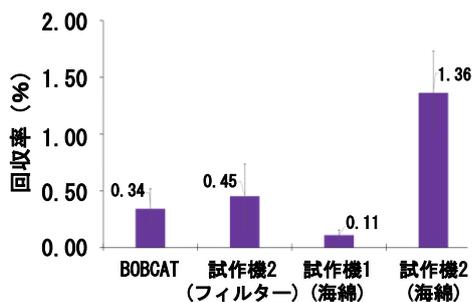


図-3 大気中のリポソーム封入トレーサの回収率

(2) 流入下水中の GII 濃度は、集水域範囲の山口環境保健所で定点把握された HuNoV を含む胃腸炎患者数の増減傾向と一致し、その変動は報告患者数よりも先行していた (図-4)。特に、濃度を下水流入量によって補正し、合計した場合にその傾向が強く、+1 週の報告患者数と最も有意に相関し ($R^2 = 0.55$)、胃腸炎流行を早期検知した可能性があった。処理水中の GII 濃度は、下水流入水に比べ、既報と同等の約 3 Log の減衰が確認された。処理水中の GII は、流入下水中の濃度が上昇する冬季 (2023 年 1 月以降) から定量され、河川への放流が示された。処理水放流口上流の St.A や St.B から GII が定量され、上流の農業集落排水や個別処理、ノンポイントからの GII 汚染負荷が示された。処理水放流口下流の St.C や St.D は、浄化センターからの負荷により GII 濃度が上流地点と比べ増加する傾向が確認された。河川水中の GII 濃度は様々な汚染負荷により、上流から緩やかな減少や移流、または汚染負荷による増加が確認されたが、河口の St.E では海域の著しい希釈効果により定量限界未満の試料が多かった (定量数 = 3/17 試料)。カキからの GII の検出率は年間を通して高く、定量率と濃度は冬季に高く、他の環境試料と同様の傾向が確認された (図-5)。しかし、カキでは、St.E で GII が定量されない場合でも、蓄積効果により検出・定量されていた。

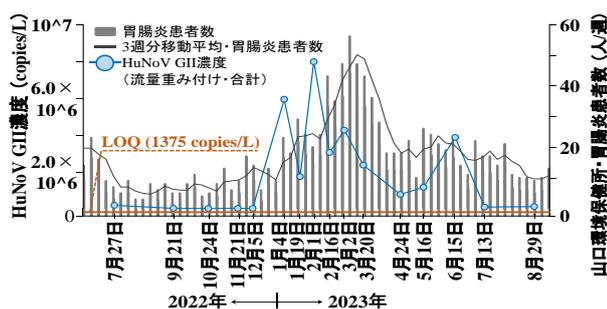


図-4 下水流入水における HuNoV GII 濃度

(3) Fantom Refined により計算した HuNoV 濃度と実測値を比較した結果を図-6 に示す。処理水放流口上流の St.B では、計算期間全体として評価すると、定量値を概ねよく再現していた。しかし、2月16日の実測値に対して大幅に過小評価した。この期間における St.B の実測値は 2088copies/L であり、上流に位置する St.A より高く、シミュレーションで考慮できていない不明な負荷が St.A, B 間に存在したためと考えられる。下流の St.C では、特に放流口からの汚染負荷が大きい1月14日～2月23日で大幅に過小評価した。流入 GII 濃度は放流量を鉛直方向で割り振るように、鉛直一様のフラックスを与えたが、実際は水面付近で負荷が大きくなり、濃度を過小評価した可能性がある。

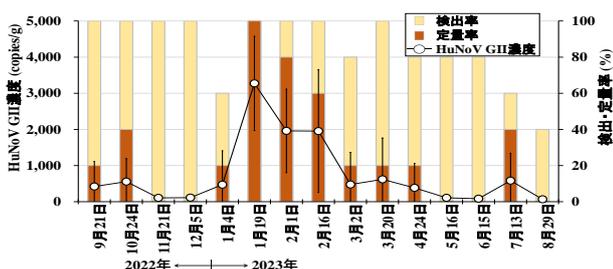


図-5 カキ中腸線における HuNoV GII 濃度

シミュレーションを実施した 2 期間のそれぞれの最終時刻に該当する 2023 年 2 月 18 日と 4 月 26 日における GII の空間分布を図-7 に示す。いずれの期間も、河口から沿岸域にかけて広範囲で GII 濃度が 30×10^3 copies/L 以上になった。2 つの期間の比較では、A および B 浄化センターから負荷される GII 濃度が低い 4 月 26 日で広範囲に高濃度の領域があり、St.A から河口域の全体で 80×10^3 copies/L 以上であった。4 月 26 日に高濃度領域が広いのは、St.A の HuNoV GII 濃度フラックス自体は 4 月 26 日のほうが 2 月 18 日より大きく、かつ St.A が位置する河川水の流量が処理水流量より大幅に大きいことから、St.A の濃度の影響を強く受けたためと推察される。しかし、シミュレーションでは処理水からの汚染による負荷を過小評価していることから(図-6)、実際の汚染はより広範囲に広がっている可能性が高いと考えられた。

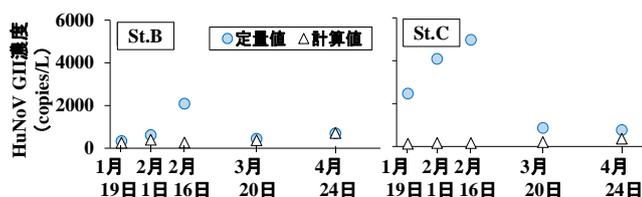


図-6 St.B, C における定量値と計算値の比較

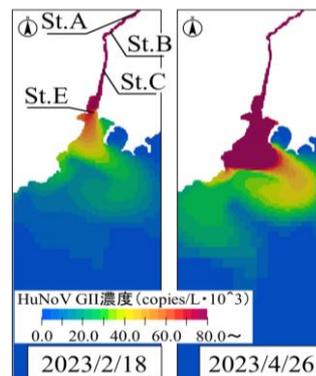


図-7 シミュレーションによる HuNoV GII 濃度の空間分布

<引用文献>

- 1) Harqamoto et al., Development of a novel method for simultaneous concentration of viruses and protozoa from a single water sample. Journal of Virological Methods, 182 (2012) 62-69.
- 2) ISO15216-1:2017(E), Microbiology of the food chain- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR – Part 1: Method for quantification. <https://www.iso.org/standard/65681.html>.
- 3) Kageyama et al., Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. Journal for Clinical Microbiology, 41 (2003) 1548-1557.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 藤井晴香;赤松良久;齋藤和興;齋藤大騎;齋藤亮;福丸大智	4. 巻 27
2. 論文標題 宅配車を活用したクラウド型車載雨量モニタリングシステムの実証実験	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 河川技術論文集	6. 最初と最後の頁 63-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Satsuki Tsuji, Ryohei Nakao, Minoru Saito, Toshifumi Minamoto, Yoshihisa Akamatsu	4. 巻 23
2. 論文標題 Pre-centrifugation before DNA extraction mitigates extraction efficiency reduction of environmental DNA caused by the preservative solution (benzalkonium chloride) remaining in the filters	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Limnology	6. 最初と最後の頁 9-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10201-021-00676-w	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 INUI Ryutei, NAKAO Ryohei, MIYAZONO Seiji, SAITO Minoru, AKAMATSU Yoshihisa, KONO Takanori, KOBAYASHI Kanta	4. 巻 76
2. 論文標題 COMPARISONS OF FISH DETECTION AMONG ENVIRONMENTAL DNA METABARCODING FROM THREE DIFFERENT GLASS-FIBER FILTER PORE SIZES AND CONVENTIONAL COLLECTION SURVEYS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Japan Society of Civil Engineers, Ser. B1 (Hydraulic Engineering)	6. 最初と最後の頁 I_1297 ~ I_1302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2208/jscejhe.76.2_I_1297	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大中臨
2. 発表標題 空気中の環境DNA分析に適したエアースAMPLING法の検討
3. 学会等名 令和3年度環境DNA学会第4回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中尾 遼平
2. 発表標題 環境 DNA 調査のためのパッシブサンプリング法に関する基礎的検討
3. 学会等名 令和3年度環境DNA学会第4回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲葉 愛美
2. 発表標題 乾燥海綿を用いた下水ウイルスのパッシブサンプリング法の開発
3. 学会等名 第56回水環境学会年会2022
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲葉 愛美
2. 発表標題 感染症病棟下水中の SARAS-CoV-2 濃度によるウイルス濃縮法 (Direct capture 法) の評価と入院患者数との相関分析
3. 学会等名 第56回水環境学会年会2022
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水上 洋一
2. 発表標題 ロボット分注装置を用いた新型コロナウイルスPCR検査の迅速解析方法の開発
3. 学会等名 第32回日本医学看護学教育学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 乾 隆帝
2. 発表標題 環境DNAメタバーコーディングの空間解像度調整に関する検討～フィルターの粒子保持径に着目して～
3. 学会等名 応用生態工学会福岡 2020九州地区事例・研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中尾遼平
2. 発表標題 エア－サンプラーを用いた空気中の環境DNA分析の可能性検討
3. 学会等名 第3回環境DNA学会大会・第36回個体群生態学会大会合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲葉愛美, 杉山 優, 岡田経太, 赤松良久
2. 発表標題 SARS-CoV-2 に対する長期下水モニタリングにおけるパッシブサンプラーの適用性と流行の早期検知の可能性
3. 学会等名 第58回日本水環境学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 稲葉愛美, 赤松良久
2. 発表標題 山口県内下水処理場および周辺河川におけるノロウイルスの通年動態とカキへの蓄積
3. 学会等名 第58回日本水環境学会年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中尾 遼平 (Nakao Ryohei) (10814618)	山口大学・大学院創成科学研究科・准教授(特命) (15501)	
研究分担者	嶋寺 光 (Terashima Hikari) (20647367)	大阪大学・大学院工学研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	栗田 喜久 (Kurita Yoshihisa) (40725058)	九州大学・農学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	間普 真吾 (Mabu Shingo) (70434321)	山口大学・大学院創成科学研究科・教授 (15501)	
研究分担者	乾 隆帝 (Inui Ryutei) (20723844)	福岡工業大学・社会環境学部・教授 (37112)	
研究分担者	鬼倉 徳雄 (Onikura Norio) (50403936)	九州大学・農学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	源 利文 (Minamoto Toshifumi) (50450656)	神戸大学・人間発達環境学研究科・教授 (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	水上 洋一 (Mizukami Yoichi) (80274158)	山口大学・大学研究推進機構・教授 (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関