

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：82602

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04359

研究課題名（和文）下水中のA型・E型肝炎ウイルスおよび無承認無許可医薬品の実態把握とリスク評価

研究課題名（英文）Wastewater monitoring for hepatitis A and E viruses and drugs without approval or authorization and their risk assessment

研究代表者

秋葉 道宏（Akiba, Michihiro）

国立保健医療科学院・その他部局等・特任研究官

研究者番号：00159336

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：流入下水試料から効率的にウイルスを濃縮し核酸を抽出する手法を新たに考案した。国内の下水処理場において収集した流入下水試料では、当該手法により従来のポリエチレングリコール沈殿法よりも高い検出率で新型コロナウイルスRNAが検出された。また、無承認無許可医薬品に該当する製品から検出事例がある医薬品成分を含めた242種類の物質（197農薬類、40医薬品、5工業薬品）を測定対象とするターゲットスクリーニング分析法を新規に確立した。収集した16検体の下水試料から無承認無許可医薬品は検出されなかったが、33物質（15農薬類、15医薬品、3工業薬品）が1試料以上から20 ng/L以上で検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国ではこれまでに、下水を対象とした輸入感染症ウイルスや無承認無許可医薬品の調査はほとんど行われてこなかった。本研究では、考案した高効率な分析法を用いて、下水試料から新型コロナウイルス、医薬品類、農薬、人工甘味料、工業用化学物質を検出した。国内での調査事例が限られている防錆剤である4-/5-メチル-1H-ベンゾトリアゾール、ベンゾトリアゾールは、50%以上の試料から検出されることが明らかになった。以上の成果は、水道事業者や地方自治体の環境衛生部局等において環境水中の病原微生物や化学物質によるリスク管理を検討する上で有用な知見となる。

研究成果の概要（英文）：An efficient method for the recovery of nucleic acids from viruses in wastewater samples has been developed in this study. The developed method presented a higher detection rate for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA in wastewater samples collected in a wastewater treatment plant in Japan compared to the conventional polyethylene glycol precipitation method. Target screening methods of 242 compounds (197 pesticides, 40 pharmaceuticals, 5 industrial chemicals) involving pharmaceutical ingredients whose detection in unapproved and unlicensed drugs were reported using liquid chromatography with high resolution mass spectrometry were newly developed. The pharmaceutical ingredients were not detected from 16 wastewater samples, but 33 compounds were detected from at least one sample at > 20 ng/L.

研究分野：水道工学

キーワード：A型肝炎ウイルス E型肝炎ウイルス 医薬品 スクリーニング分析 新型コロナウイルス 下水

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国では、感染症への抵抗力が低下し重症化しやすい高齢者の増加と、訪日客が持ち込む病原微生物による輸入感染症リスクの増加が同時に進行している。わが国で増加する可能性が高い輸入感染症に挙げられている A 型および E 型肝炎は、それぞれ、A 型および E 型肝炎ウイルスの感染によって生じる。感染者の糞便中に高濃度で排出される A 型および E 型肝炎ウイルスは、既存の下水処理プロセスでは十分に除去・不活化することが困難であるため、下水処理場放流水に含まれる形で水環境を汚染し、水や食品を介した新たな感染のリスクとなっている¹⁾。また、グローバル化に伴う感染症以外の健康リスクとして、海外のインターネット通信販売サイトを利用して個人輸入された無承認無許可医薬品があり、服用による健康被害が度々発生している²⁾。新薬が次々と開発され、評価を必要とする無承認無許可医薬品は年々増加する傾向にあるため、対象とする医薬品を効率的にスクリーニングする方法の確立が求められている。

2. 研究の目的

輸入感染症としての A 型・E 型肝炎、および無承認無許可医薬品のリスク管理に資する知見を積み上げ、健康被害の低減につなげることを目的として、本研究では、下水処理場の流入下水を対象としたウイルスおよび医薬品の高効率な分析方法を開発し、実際の下水試料に適用し実態調査を行うことで有効性を評価した。本研究課題の申請時(2019年10月)には、新型コロナウイルスの濃縮・検出手法の検討は計画にはなかったが、わが国において輸入例の割合が高い多種多様な病原微生物や無承認無許可医薬品群の中から、監視すべき微生物や医薬品を選定する際の科学的根拠を得ることを目指しているため、意義のある研究として進めた。

3. 研究の方法

(1) 下水試料

ウイルスの分析手法の検討および実態調査には、近畿地方の下水処理場において2020年5月から2022年4月に掛けて採水された24時間流量比例コンポジットの流入下水試料、計54検体を用いた。医薬品を含む化学物質の実態調査には、上記の試料のうち2020年7月～2021年12月に採水された16試料を用いた。

(2) ウイルスの測定

下水試料40 mL にプロセスコントロールとしてマウスノロウイルス(MNV)を100 μ L ($10^7 \sim 10^8$ copies) 添加し、下水中懸濁物質とともにウイルス粒子を陰電荷膜に吸着させ、膜から直接核酸を抽出する陰電荷膜吸着-直接抽出法³⁾を検討した。また、下水試料からのウイルス濃縮手法として実績があるポリエチレングリコール(PEG)沈殿法⁴⁾も実施し、MNV回収率や測定対象ウイルスの検出率・濃度を比較した。PEG沈殿法の濃縮液からは、QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)またはNucliSENS miniMAG (bioMérieux)を用いてウイルスRNAを抽出した(以下、それぞれPEG-QIA法、PEG-BM法と呼ぶ)。陰電荷膜吸着-直接抽出法ではNucliSENS miniMAGを用いてウイルスRNAを抽出した(NC-BM法)。iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad)を用いて逆転写反応を行ったのちに、SsoAdvanced Universal Probes Supermix (Bio-Rad)を用いたリアルタイムPCR法により、MNV、トウガラシ微斑ウイルス(PMMoV)、SARS-CoV-2、A型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルスの遺伝子を試験した。SARS-CoV-2遺伝子の検出では、5つのリアルタイムPCRアッセイ(CDC_N1, N2, N3, Sarbeco, NIID)を比較した。

(3) 医薬品を含む化学物質の測定

無承認無許可医薬品に該当する製品から検出事例がある医薬品成分を含めた242物質(197農薬類、40医薬品、5工業薬品)を対象とした。異性体は、分離可能な場合は別物質として取り扱った。サロゲートは、正イオン用は5種混合標準溶液(HPC)、負イオン用は2,4-D-¹³C₆を用いた。試薬は、特級以上を用いた。溶液の調製等には、超純水製造装置(IQ7003; Merck Millipore)で製造した超純水を用いた。

超純水で5倍希釈した試料500 mLに、5 mMとなるように酢酸緩衝液を添加しpHを約5に調製し、サロゲートを添加した。コンディショニングしたHLBおよびAC2カートリッジ(いずれもWaters)を直列につなぎ、10 mL/minで試料を400 mL通水した。窒素ガスで乾燥後、5 mLメタノール、4 mLジクロロメタンで溶出し、窒素ガス吹き付け器で0.2 mLまで減容した後、超純水で1 mLとした。これをLC-Orbitrap/MS(Q Exactive; Thermo Fisher)で分析した。2種の溶離液には、5 mM酢酸アンモニウムと0.02%酢酸を添加したそれぞれ水溶液、メタノールを用いた。カラムはACQUITY UPLC HSS C18 (2.1×100 mm; Waters)、流量は0.3 mL/min、注入量は10 μ Lであった。MSのスキャン範囲はm/z 70~1,000、分解能70,000、Data dependent MSMSモード(正、負イオン化法)で分析した。検量線の範囲は、0.2~50 μ g/L(一部の最小、最大濃度は、それぞれ0.1および300~600 μ g/L)とした。正イオン用のサロゲートは、各対象物質について、

5種のうち（相対）回収率が良好であったものを選定した。

水道原水または脱塩素処理した水道水を用いた添加回収試験の結果から、242物質中、回収率が46～164%であった232物質（グループA）および平均回収率が<30%、あるいは試料中の対象物質濃度が高かったため評価できなかった6物質（グループB）の計238物質を対象とした⁵⁾。

4. 研究成果

(1) ウイルスの測定

流入下水試料からの MNV 回収率は、PEG-QIA 法が 12～81%（平均±標準偏差 = 36±17%）、PEG-BM 法が 6.7～44%（20±8.0%）、NC-BM 法が 18～63%（40±12%）であり、NC-BM 法が比較的安定して高かった。PMMoV は、全ての手法で 100%の検出率であり、PEG-QIA 法および NC-BM 法による濃度の平均値が高かった（それぞれ、8.6±0.4, 8.7±0.3 log₁₀ copies/L, 表 1）。

PEG-QIA 法は MNV 回収率および PMMoV 検出濃度が良好だったが、SARS-CoV-2 RNA の検出率に関しては、他の手法よりも低かった（13～19%、表 1）。この原因として、QIAamp Viral RNA Mini Kit に供する濃縮液量が 140 μL と少ないことが考えられた。一方で、濃縮液 1 mL から RNA を抽出する PEG-BM 法は、検出率が 17～37%と PEG-QIA 法よりも高かった。陰電荷膜に吸着させたウイルス粒子から直接 RNA を抽出する NC-BM 法は、検出率が最も高かった（28～61%）。SARS-CoV-2 は流入下水中の固相から多く検出されることが知られており⁶⁾、NC-BM 法では固相分に吸着したウイルスの RNA も効率良く抽出され、高い検出率につながったと考えられた。SARS-CoV-2 の 5 つのアッセイの中では、CDC_N1, N2, N3 が、Sarbeco および NIID よりも検出率が高い傾向が見られた（表 1）。

表 1. PMMoV・SARS-CoV-2 検出結果

アッセイ	PEG-QIA 法		PEG-BM 法		NC-BM 法	
	検出率 [%]	平均濃度 [log gc/L]	検出率 [%]	平均濃度 [log gc/L]	検出率 [%]	平均濃度 [log gc/L]
PMMoV	100	8.6±0.4	100	8.3±0.4	100	8.7±0.3
SARS-CoV-2						
CDC_N1	19	4.9±0.3	37	4.3±0.5	48	4.8±0.6
CDC_N2	11	5.2±0.4	28	4.5±0.4	61	4.8±0.6
CDC_N3	15	5.2±0.4	33	4.8±0.4	50	4.8±1.1
Sarbeco	5.6	5.0±0.3	26	4.5±0.4	28	5.0±0.5
NIID	13	5.4±0.6	17	4.8±0.6	46	5.2±0.6

収集した 54 の流入下水試料から A 型肝炎ウイルスは不検出だった。これは、新型コロナウイルス感染症の流行にともない、訪日客が著しく減少したことが原因の一つとして考えられた。A 型肝炎の報告数は、2014～2019 年は 243～926 例だったが、2020 年は 120 例、2021 年は 71 例と過去 10 年間で最も低いレベルになっていた⁷⁾。2022 年 1 月に採水された 1 試料からは、PEG-QIA 法、PEG-BM 法、NC-BM 法それぞれで E 型肝炎ウイルスが検出された（Ct 値 = 41～43）。遺伝子型を解析するための nested PCR⁸⁾を行ったところ、PEG-QIA 法で濃縮・抽出した RNA 試料から PCR 産物が得られた。シーケンス解析にもとづき決定した塩基配列（277 塩基）を BLAST で検索した結果、2021 年 6 月に国内の献血血液試料から検出された E 型肝炎ウイルス株に最も近縁だった（sequence identity = 99.6%）。

(2) 医薬品を含む化学物質の測定

グループ A, B の物質について実態調査を行った。流入下水試料では、33 物質（15 農薬類、15 医薬品、3 工業薬品）が 1 試料以上から 20 ng/L 以上で検出された。検出された物質について、最高濃度と検出率の点から整理した（表 2）。一部は、作成済みの検量線で定量し、外挿して定量した場合もあった。また、検出された物質のうち、3 物質（アセスルファム、サッカリン、スクラロース）はグループ B であり、これらは実際にはより高い濃度で検出された可能性がある。検出された物質の半分程度は検出率が≥50%であった。これは、同一地点についての調査であったことによると推測された。

流入下水試料で検出率が≥50%で、最高濃度が III に分類された 8 物質は、4-/5-メチル-1H-ベンゾトリアゾール、アセトアミノフェン、イブプロフェン、カフェイン、クロタミトン、スクラロース、ディート、ベンゾトリアゾールで、そのうち 3 物質は最高濃度が 10,000 ng/L を超えていた。

過去の研究と比較すると、検出率や検出した濃度が高かった物質の多くは、同様の傾向にあった。防錆剤である 4-/5-メチル-1H-ベンゾトリアゾール、ベンゾトリアゾールは、国外に比較して国内での調査事例は限られている。これらは、水道原水からも、常に数十 ng/L 程度で検出さ

れており、国内においても広く存在していることが示された。

表2. 検出された対象物質の検出率, 最高濃度による分類

検出率 [%]	最高濃度 [ng/L]		
	I	II	III
≥50	2	8	8
<50	13	2	0

数値は物質数 ; I : 20~100 ng/L, II : 100~1000 ng/L, III : 1000 ng/L ~

参考文献

- 1) Van der Poel WHM. Food and environmental routes of Hepatitis E virus transmission. *Current Opinion in Virology* 4, 91-96, 2014.
- 2) 厚生労働省. 健康被害情報・無承認無許可医薬品情報 (<https://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/>)
- 3) Miura T, Takino H, Gima A, Haramoto E, Akiba M. Recovery of nucleic acids of enteric viruses and host-specific Bacteroidales from groundwater by using an adsorption-direct extraction method. *Appl Environ Microbiol.* 87(18), e00710-21, 2021.
- 4) Kazama S, Masago Y, Tohma K, Souma N, Imagawa T, Suzuki A, Liu X, Saito M, Oshitani H, Omura T. Temporal dynamics of norovirus determined through monitoring of municipal wastewater by pyrosequencing and virological surveillance of gastroenteritis cases. *Water Res* 92, 244-253, 2016.
- 5) 小坂浩司, 小島邦恵, 吉田伸江, 浅見真理, 三浦尚之, 秋葉道宏. LC-HRMS を用いた環境水中の化学物質のターゲットスクリーニング分析. 第59回全国衛生化学技術協議会年会, 186-187, 2022.
- 6) Kitamura K, Sadamasu K, Muramatsu M, Yoshida H. Efficient detection of SARS-CoV-2 RNA in the solid fraction of wastewater. *Sci Total Environ.* 763, 144587, 2021.
- 7) 国立感染症研究所. 発生動向調査年別一覧 (全数把握), 四類感染症 (全数) (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/ydata/11529-report-ja2021-20.html>)
- 8) Miura T, Lhomme S, Le Saux JC, Le Mehaute P, Guillois Y, Couturier E, Izopet J, Abravanel F, Le Guyader FS. Detection of hepatitis E virus in sewage after an outbreak on a French island. *Food Environ Virol.* 8(3), 194-199, 2016.

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 2件）

1. 著者名 小坂浩司, 秋葉道宏	4. 巻 69(5)
2. 論文標題 気候変動影響に対する水道システムの適応策	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 保健医療科学	6. 最初と最後の頁 425-433
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 秋葉道宏	4. 巻 85(2)
2. 論文標題 飲料水の安全, 安心	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 公衆衛生	6. 最初と最後の頁 66-71
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 Miura Takayuki, Kadoya Syun-suke, Takino Hiroyuki, Sano Daisuke, Akiba Michihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Temporal variations of human and animal Rotavirus A genotypes in surface water used for drinking water production	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 912147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.912147	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5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 秋葉道宏
2. 発表標題 飲料水を介した感染症集団発生3事例からの教訓
3. 学会等名 第24回日本水環境学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦尚之
2. 発表標題 下水試料からのSARS-CoV-2 RNA検出：陰電荷膜からの直接RNA抽出法の適用
3. 学会等名 日本水環境学会COVID-19タスクフォース 第2回Webセミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口聡大，高寺正光，細田耕，井澤琢磨，勢川利治，三浦尚之
2. 発表標題 下水中のウイルス分析方法の検討
3. 学会等名 第59回下水道研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小坂浩司，小島邦恵，吉田伸江，浅見真理，三浦尚之，秋葉道宏
2. 発表標題 LC-HRMSを用いた環境水中の化学物質のターゲットスクリーニング分析
3. 学会等名 第59回全国衛生化学技術協議会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦尚之，瀧野博之，前田暢子，東城まゆみ，佐野大輔，秋葉道宏，増田貴則
2. 発表標題 流入下水および表層水試料からの新型コロナウイルスRNA検出手法の検討
3. 学会等名 第57回日本水環境学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 (公社)日本水環境学会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 640
3. 書名 水環境の事典	

〔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	三浦 尚之 (Miura Takayuki) (70770014)	国立保健医療科学院・その他部局等・主任研究官 (82602)	
研究分担者	小坂 浩司 (Kosaka Koji) (60370946)	国立保健医療科学院・その他部局等・上席主任研究官 (82602)	
研究分担者	佐野 大輔 (Sano Daisuke) (80550368)	東北大学・工学研究科・教授 (11301)	

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
---------	---------