

## 環境水中の腸管系ウイルス等の病原体の調査について

金成篤子 北川和寛 千葉一樹<sup>1)</sup> 鈴木理恵 柏木佳子 吉田学<sup>2)</sup>  
 微生物課 <sup>1)</sup> 総務企画課 <sup>2)</sup> 県南保健福祉事務所

### 要 旨

ポリオウイルスをはじめ腸管系ウイルスの効率的な検索のため、環境水（流域下水道）からのウイルス分離を行った。エコーウイルス 11 型が最も多く分離されたが、2014 年の流行前の 2013 年 12 月から分離があり市中流行予測への有用性が示唆された。また、県内初のコクサッキーウイルス A21 型が分離され、今後の動向に注目していく必要があると思われた。

併せて当該地区の医療機関の患者からの積極的なウイルス検索を行ったところ、手足口病とヘルパンギーナについて流行が大きい年は県全体及び全国と同じ傾向が見られたが、流行が小さい年は地域の独自性が見られた。

キーワード：環境水，エコーウイルス 11 型，コクサッキーウイルス A21 型

#### はじめに

小児麻痺の原因ウイルスであるポリオウイルスは、2012 年 9 月より経口生ワクチンから不活化ワクチンに切り替わった。これに伴い、2014 年度から流行予測調査の感染源調査が、小児の糞便検査から環境水の検査へ完全移行した。ポリオウイルスは国内においては、1980 年を最後に野生株の検出はなく、その後の検出はワクチン株のみである。環境水の検査は、海外からの輸入株の効率的な監視をするために実施している。

当所はポリオウイルスを含むエンテロウイルスの北海道・東北・新潟地区のレファレンスセンターを担当しており、2013 年度より環境水からの腸管系ウイルス等の病原体の調査を開始した。これは、厚生労働科学研究費補助金事業の「不活化ポリオワクチン切り替え後のポリオウイルス感染症発生動向調査に関する研究」（2012 ～ 2014 年度 研究分担者：国立感染症研究所 吉田弘）及び「アジア地域における腸管系ウイルスゲノムの分子疫学研究」（2013 ～ 2015 年度 研究分担者：国立感染症研究所 吉田弘）に参加して行ったものである。

また、環境水の調査に加え、流域下水道区域内の患者からの病原体調査を実施し、地域において流行するウイルスの実態調査も行っ

たので併せて報告する。

#### 材料及び方法

##### 1 環境水調査

###### 1) 調査期間

2013 年 4 月～ 2015 年 3 月

###### 2) 検体採取場所

県北浄化センター（下水処理区域：福島市、伊達市（旧霊山町、月舘町を除く）、桑折町、国見町）

###### 3) 検体採取方法

月 1 回、流入下水を約 1L 採取した。

###### 4) 検査方法

###### (1) 検体の濃縮<sup>1)</sup>

2014 年 9 月から 12 月まで①及び②を並行して実施検討し、その後は②のみで行った。

①陰電化膜吸着誘出法（以下，“膜吸着法”とする。）（図 1）

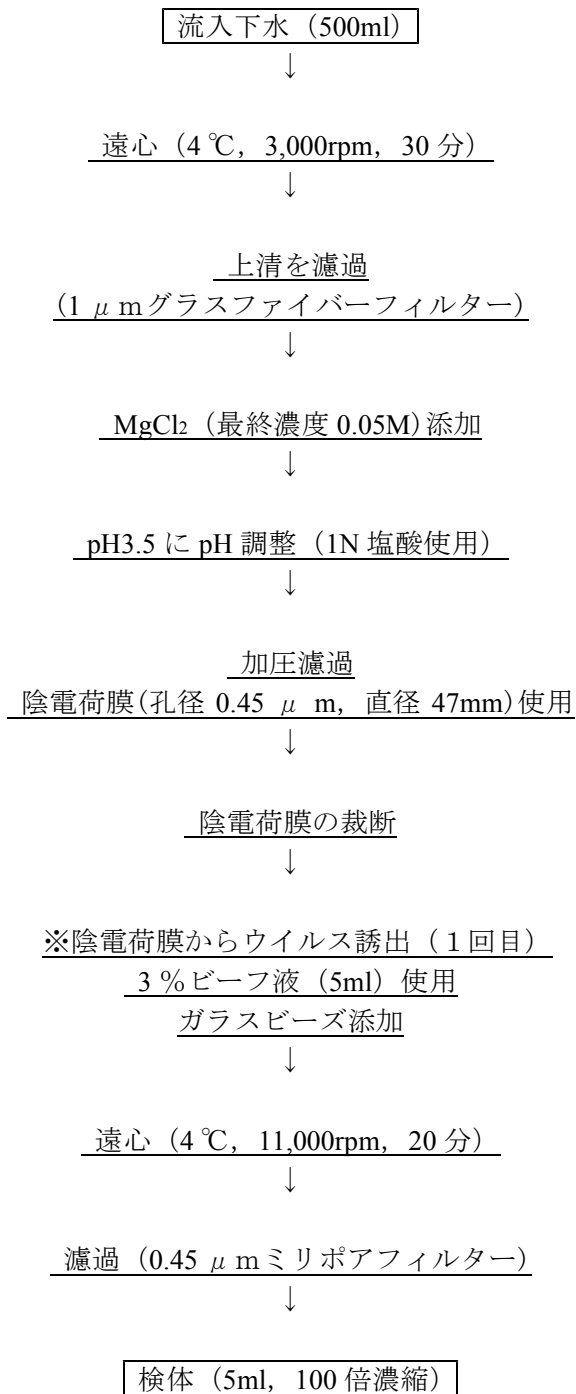
② PEG 濃縮法（以下，“PEG 法”とする。）（図 2）

###### (2) ウイルス分離培養

###### ① 使用細胞

RD-18s, A549, Vero, LLC-MK2, RD-A

2014 年 1 月より RD-A を追加し、2015 年 1 月より RD-18s を除外した。



※から再抽出を行う (2回目)

図1 陰電化膜吸着誘出法

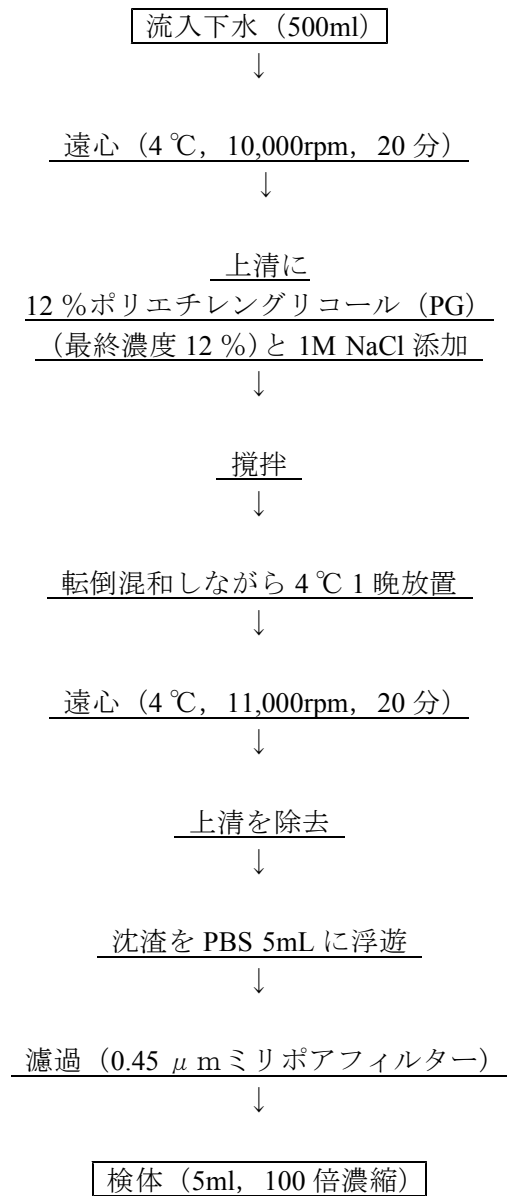


図2 PEG濃縮法

②検体の接種

48 穴組織培養プレートを使用し、1つの細胞について 100  $\mu$  L ずつ 5 穴に検体を接種した。

膜吸着法については、2 回目の抽出液も同様に接種し、1つの細胞あたり合計 10 穴を使用した。PEG 法についても、1つの細胞あたり 5 穴ずつを使用し実施した。

2015 年 1 月からは PEG 法のみ行い、1つの細胞あたり 10 穴を使用し実施した。

それぞれ 2 代継代によりウイルス分離を行った。

(3)ウイルスの同定

抗血清を用いた中和試験法、あるいは PCR-ダイレクトシーケンス法により同定した。

2 ウイルス感染症の病原体調査

1) 調査期間

2013 年 6 月～2015 年 3 月

2) 検体採取協力医療機関

福島市内の 1 小児科医院（感染症発生動向調査事業の小児科患者定点）

3) 検体採取方法

手足口病、ヘルパンギーナ、感染性胃腸炎等の患者で本調査の協力に対し同意の得られた者から咽頭拭い液や糞便の検体を採取した。

4) 検査方法

(1)ウイルス分離培養

使用細胞は環境水と同様で、96 穴培養プレートを使用した。1つの細胞について 2 穴使用し、2 代継代によりウイルス分離を行った。

(2)遺伝子検査

咽頭拭い液については、エンテロウイルス、ライノウイルス、アデノウイルス、RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、糞便についてはノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、ロタウイルス、アデノウイルスについて遺伝子の検索を行った。

(3)ウイルスの同定

抗血清を用いた中和試験法、あるいはダイレクトシーケンス法により同定した。

表 1 環境水からの月別ウイルス分離状況

	2013年度												合計
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	
Echovirus 11									4	6			10
Coxsackievirus B3					1	1	2						4
Adenovirus 2			3										3
Adeno sp.									3				3
合計	0	0	3	0	1	1	2	0	7	6	0	0	20
	2014年度												合計
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	
Echovirus 3								1					1
Echovirus 7					2	2							4
Echovirus 11				1		20		28	6	16	4	3	78
Echovirus 24						1							1
Echovirus 30							17			1			18
Coxsackievirus A21							1	1					2
Reovirus sp.										11	1	10	22
Adeno sp.										3			3
合計	0	0	0	1	2	23	18	30	6	31	5	13	129

結果及び考察

1 環境水調査

1) ウイルスの採取月毎の分離状況

ウイルスの採取月毎の分離状況を表1に示した。

(1)分離状況

ポリオウイルスの分離はなかった。エコーウイルス11型(以下、“E11”とする。)は2013年と2014年に検出があり、最も多く分離された。

2013年は4種類のウイルスのみの分離で分離数も少なかったことから、2014年1月からはRD-A細胞を追加し、その後PEG法も追加検討した。その結果、分離されるウイルスの種類も数も増加した。

エコーウイルスが1種類から5種類と増え、さらにコクサッキーウイルスA21型(以

下、“CA21”とする。)が県内で初めて検出された。エンテロウイルス(以下、“HEV”とする。)は遺伝子の塩基配列に基づく分子系統解析によりHEV-A, B, C, Dの4つの種に分類され<sup>2)</sup>、CA21はポリオウイルスと同じHEV-Cに属する。CA21は、国内では2013年に東京都において感染症発生動向調査によりインフルエンザ様症状を呈した患者2症例の咽頭ぬぐい液から検出された<sup>3)</sup>が、1981年から2013年までに10数例しか報告のない<sup>4)</sup>非常に珍しいウイルスである。環境水の調査においては、福岡県で2010年と2011年に、海外では中国やフィリピン等で検出報告がある<sup>5-6)</sup>。2014年になり全国の感染症発生動向調査で10件報告されており<sup>4)</sup>、今後県内においてもその動向に留意する必要があると思われた。

表2 エコーウイルス11型の検出状況(福島県内)

症例	採取年月日	診断名	発熱(°C)	年齢(歳)	月齢(ヶ月)	性別	検査材料	保健所
1	2010年7月31日	胃腸炎	38.0	5		女	糞便	郡山市
2	2012年7月3日	アデノウイルス感染症	40.0	4	3	男	咽頭ぬぐい液	郡山市
3	2012年7月23日	無熱性けいれん		1	5	女	咽頭ぬぐい液	郡山市
4	2012年7月27日	熱性けいれん	39.4	2	3	男	糞便	相双
5	2012年7月31日	熱性けいれん疑い	39.2	2	7	男	咽頭ぬぐい液	相双
							咽頭ぬぐい液	
6	2014年8月12日	不明熱	38.2	0	2	女	糞便 髄液	郡山市
7	2014年8月18日	発熱	39.4	0	3	男	髄液	郡山市
8	2014年9月24日	急性咽頭炎 脱水症	38.0	4	8	女	咽頭ぬぐい液	県中
9	2014年10月1日	アデノウイルスの疑い	38.4	12	5	男	咽頭ぬぐい液	郡山市
10	2014年10月21日	発熱 髄膜炎疑い	38.2	0	1	女	髄液	郡山市
11	2014年10月22日	急性細気管支炎	39.0	0	5	男	咽頭ぬぐい液	県中
12	2014年10月22日	急性咽頭炎	39.0	4	5	女	咽頭ぬぐい液	郡山市
13	2014年10月23日	急性咽頭炎 熱性けいれん	40.0	2	1	女	咽頭ぬぐい液	県中
14	2014年11月22日	溶連菌感染症	38.1	4	8	男	咽頭ぬぐい液	会津
15	2014年11月29日	急性上気道炎	38.1	0	2	女	咽頭ぬぐい液 糞便	郡山市
16	2014年12月2日	パレコウイルス感染症の疑い 敗血症の疑い	37.7	0	0	男	咽頭ぬぐい液 糞便	郡山市
17	2014年12月22日	インフルエンザの疑い	39.7	1	8	男	咽頭ぬぐい液	郡山市
18	2014年12月23日	発熱	39.0	0	1	男	髄液	郡山市
19	2014年12月24日	RSウイルス肺炎	38.9	1	5	女	咽頭ぬぐい液	県中
20	2015年1月10日	ロタウイルス感染症		0	9	男	糞便	会津

2014年2月から6月までウイルスが分離されなかったが、この時期に多く検出されるノロウイルスやロタウイルスは細胞分離が困難なためと推定された。

(2) 県内の感染症発生動向調査等との比較

E11については、県内における過去の感染症発生動向調査からの検出は2010年に1件、2012年に4件のみで稀であったが、2014年は15症例19件で分離(RD-18s細胞)された(表2)。このうち4件は髄液からの検出であり、いずれも不明熱や無菌性髄膜炎(以下、“AM”とする。)疑いで高熱の症状のある0歳児からの検出であった。AMはエンテロウイルスではエコーウイルスやコクサッキーウイルスB群が原因となることが多く、1997～1998年のエコーウイルス30型(以下、“E30”とする。)や2002年のエコーウイルス13型(以下、“E13”とする。)は全国的に1,000件以上の検出があり<sup>4)</sup>大流行を起こした。E11は、E13やE30のような大流行には至っていないが全国的には3～5年周期で流行があり、検出の多かった年はAMの主要原因ウイルスとなっている<sup>4)</sup>。全国的にも2014年は、エコーウイルスの中では最も多い305件の検出の報告があり、AMの原因ウイルスとしてもE30に次いで2番目であった<sup>7)</sup>。このように2014年に流行したE11が、環境水において2013年12月から2014年1月に複数検出されたことは、環境水の調査について市中流行の予測への有用性が示唆された。

2) 分離細胞・濃縮法の検討

2014年9月から12月の4ヶ月間、分離細胞と濃縮法について検討した結果を表3に示した。

A549細胞からE11が合計9件、RD-18s細胞からはCA21と2種類のエコーウイルスが合計30件、RD-A細胞からはCA21と5種類のエコーウイルスが合計38件分離された。

RD-18s細胞とRD-A細胞は同じヒト横紋筋肉腫細胞の一種であるが、RD-A細胞の方がRD-18s細胞よりも多くの種類及び数のウイルスを分離できることが確認された。

また、濃縮法については、膜吸着法1回目は3種類のウイルス合計31件、2回目は2

種類のウイルス合計19件、PEG法では5種類のウイルス合計27件が分離された。膜吸着法において、2回目は1回目より分離率が低く種類も少なく、1回目で分離されないウイルスが分離されることはなかった。PEG法との比較では、分離率に大差はないが、PEG法がより多くの種類のウイルスを分離した。

表3 細胞別濃縮法別ウイルス分離状況

		膜吸着法		PEG法	合計
		1回目	2回目		
A549	E11	6	1	2	9
	E11	8	6	5	19
RD-18s	E30	5	1	4	10
	CA21			1	1
RD-A	E3			1	1
	E11	9	9	8	26
	E24	1			1
	E30	2	2	3	7
	E7			2	2
	CA21			1	1
合計		31	19	27	77

2 ウイルス感染症の病原体調査

当該医療機関からの受付検体は、咽頭拭い液257件、糞便90件、不明3件であった。採取月別の受付検体数とウイルス検出状況を表4に、診断名別のウイルス検出状況を表5に示した。

1) 採取月別ウイルス検出状況(表4)

エンテロウイルスは、夏から秋にかけての検出であったが、ノロウイルスやアストロウイルス(以下、“As”とする。)等の腸管系ウイルスは、冬期間だけでなく2013年度には6、7月にも検出があった。

分離については、2013年度はアデノウイルス、2014年度はエンテロウイルスが多く分離された。

2) 診断名別ウイルス検出状況(表5)

最も受付検体数の多かった感染性胃腸炎の患者からは、ノロウイルスG II型が最も多く検出され、次いでAs I型、アデノウイル

表4 患者からの採取月別ウイルス検出状況

	2013年度										2014年度								計		
	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月 ～ 7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月		2月	3月
Adenovirus 1	4(4)		1(1)																		5(5)
Adenovirus 2	4(4)						1(1)													1(1)	6(6)
Adenovirus 3			1(1)																		1(1)
Adenovirus 5	1(1)										1(1)										2(2)
Adenovirus 6	2(2)																				2(2)
Adenovirus 31																		1(1)			1(1)
Adenovirus 41	3	1																			4
Coxsackievirus A2		3	2	2																	7
Coxsackievirus A4												1(1)	10(7)		2						13(8)
Coxsackievirus A5														1							1
Coxsackievirus A6		1	8	7	6								7	2							31
Coxsackievirus A8												2(1)	1								3(1)
Coxsackievirus A10													6(2)	3							9(2)
Coxsackievirus A12	2	11	10		1																24
Coxsackievirus A16													3(1)	2(1)	2						7(2)
Echovirus 3															1						1
Echovirus 11														1(1)							1(1)
Enterovirus 68				1(1)																	1(1)
Enterovirus sp.		1																			1
Rhinovirus sp.	5	18	5	2									1	13	5	2	1				52
Human Metapneumovirus	2	3																			5
Norovirus G II	1	1					6	3	7											2	20
Sapovirus G I						2	2														4
Sapovirus G II	1																				1
Astrovirus 1	3	2								1	1										7
Rotavirus A							1														1
(-)	41	71	9	1	8	3	3	0	3	1	1	0	1	2	3	2	0	1	1	3	154
検出株数	28	42	26	12	7	2	10	3	7	1	2	0	4	41	14	6	1	1	0	3	210 (32)
検体数	68	111	32	12	15	5	13	3	10	2	3	0	4	31	14	7	1	2	1	6	340

※ ( ) 内は細胞分離件数

※ ( ) 内は細胞分離件数

表5 診断名別ウイルス検出状況

症例数	手足口病	ヘルパン ギーナ	感染性 胃腸炎	発疹症	上気道炎	下気道炎	その他	計
Adenovirus 1	1(1)		1		2(1)	1		5(2)
Adenovirus 2			2	1	3			6
Adenovirus 3		1						1
Adenovirus 5			1			1		2
Adenovirus 6						2		2
Adenovirus 31			1					1
Adenovirus 41			4					4
Coxsackievirus A2		7(2)						7(2)
Coxsackievirus A4	3(2)	9(3)	1(1)					13(6)
Coxsackievirus A5		1						1
Coxsackievirus A6	27(6)	3			1			31(6)
Coxsackievirus A8		3(2)						3(2)
Coxsackievirus A10	1	7(2)		1				9(2)
Coxsackievirus A12		21				2	1	24
Coxsackievirus A16	6(3)	1(1)						7(4)
Echovirus 3				1(1)				1(1)
Echovirus 11		1						1
Enterovirus 68	1							1
Enterovirus sp.		1						1
Rhinovirus sp.	16(10)	12(10)	3(1)	2(1)	11(2)	8	1	53(24)
Human Metapneumovirus					3(1)	2		5(1)
Norovirus G II			19				1	20
Sapovirus G I			3				1	4
Sapovirus G II			1					1
Astrovirus 1			7					7
Rotavirus A			1					1
陽性検体数	44	57	43	4	18	16	4	186
受付検体数	63	71	101	6	61	28	10	340
検出率 (%)	69.8	80.3	42.6	66.7	29.5	57.1	40.0	54.7

※ ( ) 内は同一症例複数ウイルス検出数

ス41型、サポウイルスG I型の順であった。

エンテロウイルスが主な原因となる手足口病とヘルパンギーナについて、当該医療機関と、感染症発生動向調査の病原体検査による県内及び全国の検出状況と比較したものを表6に示した。

手足口病について、2013年度はコクサッキーウイルスA6型（以下、“CA6”とする.）が20件と最も多く検出されたが、この年は全国的に流行があり<sup>8-9)</sup>、ウイルス検出状況は県内及び全国の状況と同様であった。また2014年度は、CA6とコクサッキーウイルスA16型（以下、“CA16”とする.）が多く検出されたが、流行の規模が小さく<sup>8-9)</sup>県内の感染症発生動向調査ではCA6は検出されず、エンテロウイルス71型とCA16が多く検出報告された。全国的にはエンテロウイルス71型、CA16の順で検出報告があった。

ヘルパンギーナについては、2013年はコクサッキーウイルスA12型（以下、“CA12”とする.）が21件、コクサッキーウイルスA2

型（以下、“CA2”とする.）が7件検出されたが、県内ではCA6とCA2が多くCA12の検出報告はなかった。全国的には、CA6とコクサッキーウイルスA8型が主流であった。2014年は、ヘルパンギーナが流行し<sup>9-10)</sup>、コクサッキーウイルスA4型とコクサッキーウイルスA10型が多く検出され、県内また全国的にも同じウイルスの検出報告が多かった。

今回、環境水の調査を実施している地区内の患者からの病原体調査のために1医療機関の協力を得てウイルス検索を行った。その結果、手足口病やヘルパンギーナについては、流行が大きいときは検出されるウイルスが県内また全国とほぼ同様であるが、流行の規模が小さいときは主流の型が異なり地区特有の流行型になることが示唆された。

### 3) 環境水調査結果との比較検討

今回環境水で多く検出されたE11について、調査した医療機関の患者からの検出は、

表6 年別の協力医療機関、県内、全国での検出ウイルス

	手足口病						ヘルパンギーナ					
	2013年			2014年			2013年			2014年		
	医療機関	県内	全国	医療機関	県内	全国	医療機関	県内	全国	医療機関	県内	全国
Coxsackievirus A2							7	4	54			87
Coxsackievirus A4				3		20			6	9	7	323
Coxsackievirus A5			4			5		1	33	1	2	56
Coxsackievirus A6	20	7	928	7		22		5	133	3	5	4
Coxsackievirus A8			15						111	3		11
Coxsackievirus A10			5	1	1	22		1	19	7	6	98
Coxsackievirus A12							21					
Coxsackievirus A16		2	80	6	2	219				1	1	
Echovirus 11									3	1		16
Enterovirus 68	1											
Enterovirus 71		10	345		4	121			16			8
Enterovirus sp.							1					
その他	7	13	419	10	0	200	3	3	176	10	5	236
合計	28	32	1796	27	7	609	32	14	551	35	26	839



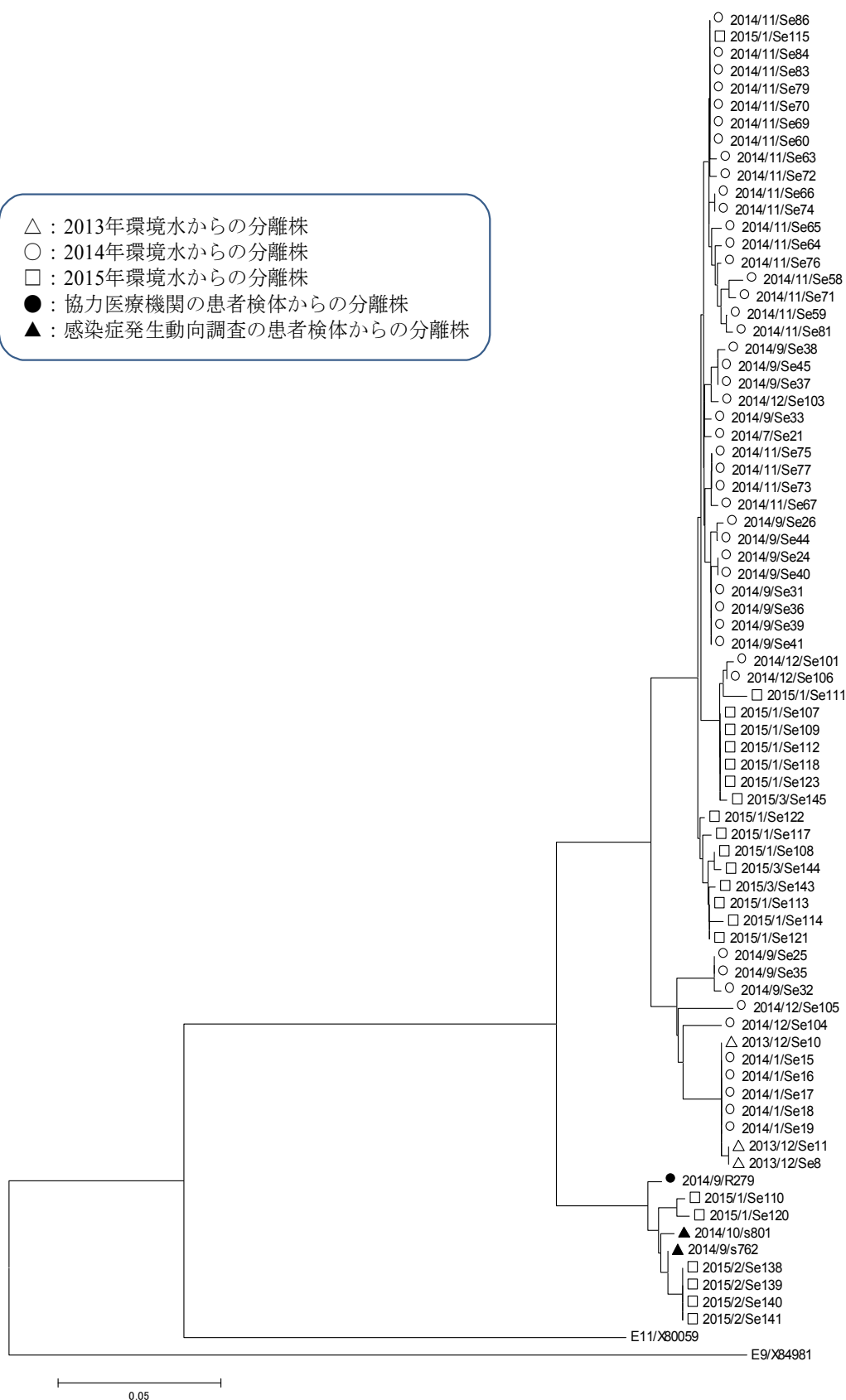


図3 エコーウイルス11型分離株の系統樹解析 (VP1 486bp)

2014年9月のヘルパンギーナの患者からの1件のみであった。これは本医療機関が市中の小児科医院であるためAM等の重症患者の受診がなかったためと思われる。

E11について、環境水から分離された株及び感染症発生動向調査で分離された株と合わせて遺伝子解析を行った(図3)。その結果、大きく2つのグループに分かれ、協力医療機関と感染症発生動向調査からの分離株は、環境水からの分離株の2015年1月採取2株と2015年2月採取4株の入った少数派のグループに属し、同時期の環境水からの分離株とは異なるグループに属した。

なお、感染性胃腸炎の原因となる腸管系ウイルスやヘルパンギーナと手足口病の主要原因となるコクサッキーウイルスA群については、細胞分離が困難であることから、環境水での分離ウイルスとの単純な比較はできない。

今後、感染症発生動向調査の病原体定点、特に基幹定点について患者からの検体採取についてより一層の協力をお願いし、より多くの患者検体と環境水からの病原体について分子疫学的解析を進めていきたいと考えている。

### 謝 辞

ご指導いただきました国立感染症研究所の吉田弘先生、並びに本研究に協力いただきました県北浄化センターの方々、協力医療機関の方々及び検体提供いただいた患者様方に感謝します。

### 引用文献

- 1) ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル. 28-37.
- 2) 清水博之. ヒトエンテロウイルスの分類と命名. 臨床とウイルス 2005; 33(4): 211-218.
- 3) 新開敬行, 原田幸子, 吉田勲, 他. 散发2事例からのコクサッキーウイルスA群21型の検出—東京都. IASR 2014; 35: 48-49.
- 4) 国立感染症研究所 IASR 過去の集計表ウイルス <http://www.nih.go.jp/niid/ja/typhi-m/iasr-reference/230-iasr-data/5492-iasr-table-v-p.html>

2015/11/20

- 5) Zichun Xiang, Richard Gonzalez, Zhong Wang, et al. Coxsackievirus A21, Enterovirus 68, Acute Respiratory Tract Infection, China. Emerging Infectious Diseases 2012; 18: 821-824
- 6) Lea Necitas G. Apostol, Tomifumi Imagawa, Akira Suzuki, et al. Genetic diversity and molecular characterization of enteroviruses from sewage-polluted urban and rural rivers in the Philippines. Virus Genes 2012; 45: 207-217
- 7) 国立感染症研究所 病原微生物検出情報 <http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr/511-surveillance/iasr/tables/1493-iasrtv.html> 2015/11/20
- 8) 国立感染症研究所 手足口病とは <http://www.nih.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/44-1-hfmd.html> 2015/11/27
- 9) 福島県感染症発生動向調査週報 2014年第52週 2014; 52: 6-8.
- 10) 国立感染症研究所 IDWR 過去10年との比較グラフ(週報) —ヘルパンギーナ <http://www.nih.go.jp/niid/ja/10/2096-weeklygraph/1653-11herp.html> 2015/11/27