

原著

終末処理場の流入水を利用したポリオウイルス環境水サーベイランス

濱崎光宏・吉富秀亮・芦塚由紀・中村麻子・世良暢之・吉田弘*

2012年9月、経口生ポリオワクチン（OPV）に替わり不活化ポリオワクチン（IPV）が我が国の定期予防接種に加えられた。本研究では、OPVからIPVへの移行期において環境中に存在するポリオウイルス（PV）の消長を追跡するため、九州北部に位置する2箇所の終末処理場で採水された流入水を用いてエンテロウイルス特にPVを中心とした環境水サーベイランスを行った。2010年4月から2015年3月までの60か月間で62株のPVが分離された。PVの分離頻度は都市部の終末処理場で高く、農村部の約1.7倍となった。VP1領域の遺伝子配列解析の結果、得られたPVは全てがワクチン株であり、2型が最も多かった。主にPVが分離されたのはOPV中止前であったが、IPV移行後も流域に侵入したPVを分離することが出来た。我々の研究からOPVからIPVへの移行期においてOPVワクチン接種者から排出されるポリオウイルスワクチン株を高感度に分離し、ワクチン由来ポリオウイルスや野生株の出現を監視することの重要性が改めて示唆された。

[キーワード：ポリオウイルス、環境水サーベイランス]

1 はじめに

ポリオウイルス（PV）は、ピコルナウイルス科のエンテロウイルス属に所属しエンベロープを持たない一本鎖RNAウイルスである¹⁾。PV粒子は、直径約30nmの正二十面体構造であり、抗原決定部位であるVP1を含む4つの異なるカプシドタンパクで構成されている²⁾。PVの感染経路は、他のエンテロウイルス（NPEVs）と同様に糞便-経口感染であり、ウイルスは腸管で効率的に増殖する²⁾。感染したPVは、約2ヶ月間糞便に排泄されることが知られている³⁾。PVが感染した人の大部分は不顕性感染であるが、まれに一部の患者においてウイルス血症から灰白髄炎（ポリオ）となり、結果として後遺性の弛緩性麻痺を呈する場合がある。

1960年代に多くの先進国で経口ポリオワクチン（OPV）が導入されたため、ポリオの流行は一部の地域を除いて見られなくなった。1988年、世界保健総会において、ポリオを世界中から根絶する決議が採択され、「ポリオ撲滅のためのグローバルイニシアティブ」が世界保健機関（WHO）、国際ロータリー、米国疾病予防管理センター及びユニセフにより押し進められている。大規模なOPV接種が功を奏しポリオ患者は激減した。2016年現在のポリオ常在国は、パキスタンとアフガニスタンである。WHOは、野生株及びワクチン由来PV（VDPV）の動向について監視を強化している。

日本で確認されたPV野生株は、1980年にポリオ患者から分離されたPVが最後であり、以後、患者由来の野生株は確認されていない⁴⁾。また、ポリオの排除状態を維持するため、OPVを約50年間、主に春と秋に定期予防接種を行ってきた。しかし、OPVは生ワクチンのため、ワクチン関連の麻痺性灰白髄炎（VAPP）が希に発生する。この問題を解決するために、2012年9月に不活化ポリオウイルスワクチン（IPV）が導入された。2012年11月からは4種混合ワクチン（DTP-IPV）として定期予防接種（生後3か月から12か月の間に3回接種、生後12か月から18か月の間に1回接種）に導入されている⁵⁾。ワクチン接種率を比較すると2009年から2011年春までは83.4%から99.4%の間で推移していたが、OPVからIPVへ切り替わる直前の2012年春のワクチン接種率は、67.2%とかなり低い水準であった⁶⁾。これは、VAPPの懸念があったため一時的なワクチン接種控えによるものと考えられている⁷⁾。

環境水サーベイランスは、下水や河川等の環境水から病原体を検出する方法で、顕性、不顕性に関わらずヒト集団内で流行しているウイルスを検出することが可能である。感染源の特定ができないと言う短所はあるが、不顕性感染が多いPVの様なエンテロウイルスを検出するのに有効な方法で多くの国で実施されている⁸⁻¹⁰⁾。ポリオ排除国において、ポリオ常在国からの野生株の輸入やVDPVの出現を監視することは、ポリオ排除状態を維持するためには重要である。WHOポリオ根絶の最終段階戦略とその実施計画において、環境水サーベイランスの強化が推奨されている¹¹⁾。

福岡県保健環境研究所（〒818-0135 太宰府市大字向佐野 39）
*国立感染症研究所ウイルス第二部（〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1）

また、エンテロウイルス感染症において、患者サーベイランスと環境水サーベイランスは関連があり、環境水サーベイランスで検出されたウイルスが流域で流行しているウイルスを反映していることが知られている¹²⁾。本研究では、OPVからIPVへ移行期を含む2010年4月から2015年3月の60ヵ月間において、2カ所の終末処理場の流入水からのPVの分離状況について報告する。

2 材料と方法

2・1 検体

検体は、九州北部にある2カ所の終末処理場(AおよびB)から流入水を毎月2L入手し検体とした。A終末処理場は都市部に位置し、高い下水道普及率(80%以上)であるが、B終末処理場は農村部に位置し、低い下水道普及率(30%以下)である¹³⁾。流域人口は、A終末処理場が約19万人、B終末処理場が約18万人であり二つの終末処理場間でほぼ同程度であった。OPVを接種する推奨年齢(0-2歳)の子供の人口は、A終末処理場が7000人、B終末処理場が4200人であった(表1)。採取した流入水は、濃縮処理するまで4℃で保存した。

2・2 検体の濃縮

検体の濃縮はNakamuraらの方法に従って行った¹⁴⁾。流入水1Lを4℃で1,500g×30分遠心分離を行った。塩化マグネシウムを終濃度0.05Mになるように上清に添加し、塩酸でpH3.5に調整した。上清を陰電化フィルター(0.45μmの孔径のフィルター、アドバンテック、東京、日本)で濾過した。MediFASTH2ホモジナイザー(オムニ・インターナショナル)を用いて3%牛肉エキス10mLでフィルターに結合したウイルスを溶出した。16,000g×30分遠心分離を行い破碎したフィルターを除去し、0.22μmの孔径PVDF膜フィルター(ミリポア)で濾過し100倍濃縮検体とした。100倍濃縮検体は、細胞へ接種するまで4℃で保存した。

2・3 ウイルス分離

ウイルス分離に使用した細胞は、Vero-E6細胞、FL細胞及びRD-18S細胞の3種類を用いた。Vero-E6細胞及びFL細胞は、American Type Culture Collection(ATCC)から購入し、RD-18S細胞は愛知県衛生研究所から分与してもらった。細胞は、10%FBS(ウシ胎児血清)添加ダルベッコ改変イーグルMEM培地に約 2×10^5 個/mLの細胞浮遊液とし24穴マルチプレートに1mLずつ分注した。100倍濃縮検体を各細胞4穴に0.1mLずつ接種し34℃、5%炭酸ガス存在下で1週間観察した。細胞変性効果(CPE)が認められなかった検体は、新しい細胞浮遊液に接種し、34℃、5%炭酸

ガス存在下でさらに1週間観察した。CPEが認められた検体は、PV確認のためL20B細胞へ接種し34℃、5%炭酸ガス存在下で1週間観察した¹⁵⁾。

2・4 PVの血清型の同定

L20B細胞でCPEが認められた検体のPVの確認と血清型は、中和試験(NT)により決定した。培養上清を分取しウイルス力価を測定し、100CCID₅₀に調整した。NTは、ポリオ型特異的プール血清であるエンテロウイルスNT試薬「生研」混合A、混合B、混合C、混合D(デンカ生研)及びポリオウイルスNT試薬「生研」を用いて行った。NTは、抗血清20Uと、100CCID₅₀のウイルス溶液を等量混合し、2時間中和反応を行った後、L20B細胞に接種し34℃、5%炭酸ガス存在下で1週間観察した。

2・5 PVのVP1領域のシーケンス

分離されたPVがワクチン株かどうかを決定するためPVのVP1領域を標的にしたPCRを行い、塩基配列を決定した。ウイルスRNAをQIAamp Viral RNA Mini Kit(Qiagen社)を用いてウイルス培養液から抽出し、UG1/UC11特異的プライマーセット¹⁶⁾とOne Step RT-PCR Kit(Qiagen社)を用いてRT-PCRを行った。PCR産物の確認は2%アガロースゲル電気泳動で行い、増幅が認められたPCR産物は、Illustra ExoStar(GE Healthcare社)で精製した。塩基配列の決定は、BigDyeターミネーターv3.1サイクルシーケンシングキット(Applied Biosystems社)を用いてサイクルシーケンスを行い、3130XLジェネティックアナライザー(Applied Biosystems)を用いて塩基配列を決定した。PVのVP1配列の完全長は、MEGA5ソフトウェア¹⁷⁾を用いて多重整列を行いワクチン株と比較した。本研究で用いたワクチン株の参照配列は、PV1型Sabin1株(AY082688、906塩基対)、PV2型Sabin2株(AY082679、903塩基対)及びPV3型Sabin3株(AY082683、900塩基対)を用いた。

3 結果

九州北部の2カ所の終末処理場から得られた流入水を3種類の細胞(Vero E6細胞、FL細胞及びRD-18S細胞)に接種した。2010年4月から2013年1月までの検出結果は、Nakamuraらの報告¹⁴⁾を引用した。調査期間である2010年4月から2015年3月までの60ヵ月間で646検体の陽性検体を得た。CPE陽性検体をL20B細胞へ再接種した後、L20B細胞で159検体のCPEを確認した。そのうち、PVは62株、ポリオウイルス以外のエンテロウイルス(NPEV)が97株検出された(表1)。検出されたPVの内訳は、PV1型が17株、PV2型が27株、PV3型が18株であった。分離されたPVのVP1領域の塩基配列をSabin株と比較した。PV1型及びPV3型は塩基配

表1 採水した2箇所の終末処理場において分離されたポリオウイルス

終末処理場	流域の環境	流域人口	2歳以下の 流域人口	下水道普 及率	CPE陽性数*	L20B細胞 でのCPE 陽性数*	ポリオウ イルス分 離株数*	分離株の血清型*		
								ポリオ1型	ポリオ2型	ポリオ3型
A	都市部	190,000	7,000	80%以上	330(171)	99(51)	39	13	18	8
B	農村部	180,000	4,200	30%以下	316(194)	60(35)	23(2)	4	9	10(2)
合計					646(365)	159(86)	62	17	27	18(2)

* : () 内の数は2013年2月から2015年3月までの期間に検出された数。2010年4月から2013年1月までの期間に検出された数はNakamuraらの報告¹⁴⁾を引用した。

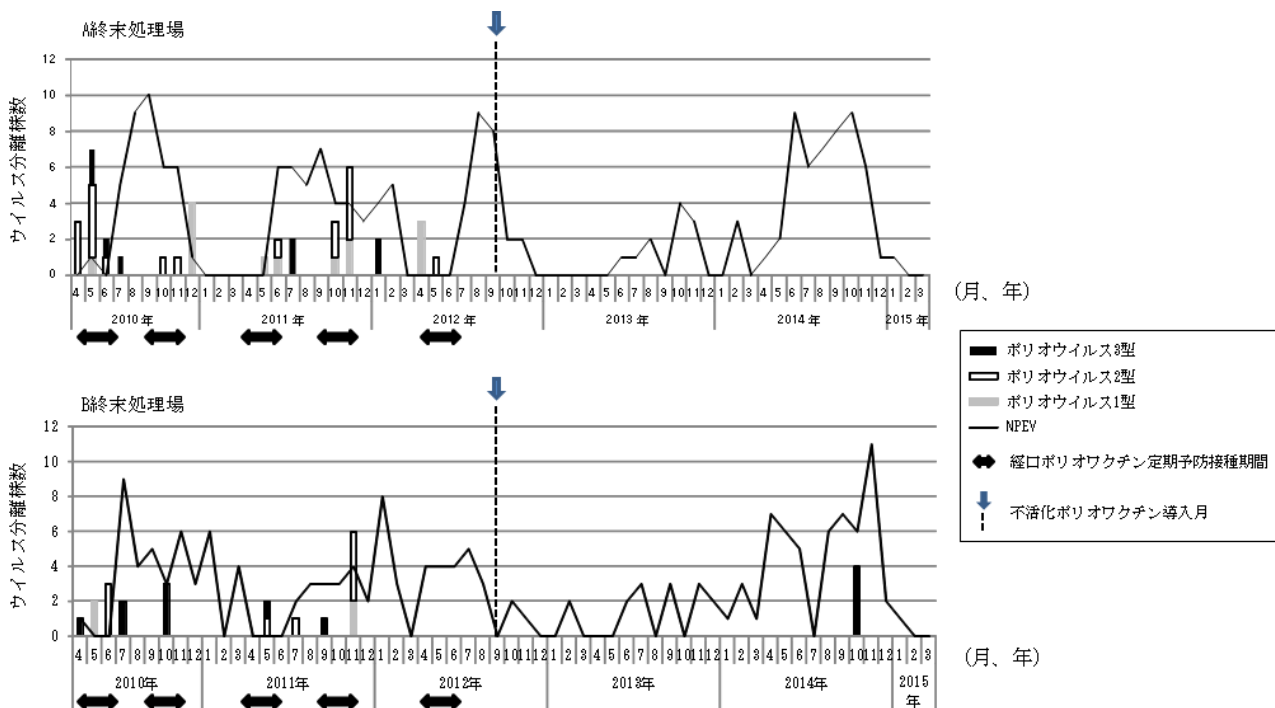


図1 採水した2箇所の終末処理場から分離されたポリオウイルスとポリオ以外のエンテロウイルス (NPEV) 2010年4月から2013年1月までの期間に検出された数はNakamuraらの報告¹⁴⁾を引用した。

列の変異率が1%未満、PV2型は0.6%未満をワクチン株とした。その結果、分離された全てのPVはワクチン株であった。各終末処理場のPVの分離率を比較すると、A終末処理場から分離されたPVの数はB終末処理場から分離されたPVの約1.7倍多かった。

研究期間中に検出されたPVとNPEVの検出数を図1に示す。PVは定期予防接種後、約2か月から3か月間分離されており、PVの分離は定期予防接種を反映したものと考えられる。

IPVへ移行する前（2012年9月以前）、A終末処理場では2012年5月、B終末処理場では2011年11月までPVは分離された。2012年9月以降、IPVの予防接種は全国で行われている。PVは、OPVからIPVに移行する前に終末処理場の流入水から

消失していた。一方、NPEVsは、ほぼ毎月検出されている。

また、2014年10月にB終末処理場からPV3型が分離された。流域の下水道普及率が高いA終末処理場からのPVの分離は無く、B終末処理場においても11月以降のPVの分離は無かったため、分離されたPVは一過性のものであったと考えられる。PVが県内に流行していないことを確認するため、2014年4月から10月にかけて感染症発生動向調査で搬入された無菌性髄膜炎、感染性胃腸炎、手足口病及びヘルパンギーナ患者由来の検体についてL20B細胞へ接種しPVの分離を試みたが、全て陰性であった。なお、感染症流行予測調査術式に従いウイルス分離を行った結果、PV3型は6株分離され全てワクチン株であることが確認された。

4 考察

環境水サーベイランスは、腸管に感染するウイルスを顕性、不顕性に関係なく検出できるため、不顕性感染が多いPV感染症のサーベイランスには適している。特に世界的なポリオ根絶のためには、PVが排除された地域において、PVの環境サーベイランスは患者サーベイランスと並んで重要である。我々はOPVからIPVへ移行する際、環境中でのPVの動向を調査するため、九州北部にある都市部と農村部に位置する2つの終末処理場の流入水を用いて60カ月間、環境水サーベイランスを実施した。分離された62株のPVは、全てワクチン株であった。2つの終末処理場の流入水から分離されたPVの分離株数の差は、下水道普及率と2歳児以下の流域人口数の違いを反映したものと考えられる。また、IPVに移行後、流域内に侵入したPVを検出することが出来た。依然として近隣諸国ではOPVを使用しており、観光客が持ち込んだものと推測されるが侵入経路は不明である。

日本では、使い捨ておむつの使用頻度が高い(約80%以上)ことが知られている¹⁸⁾。OPVを接種した子供の糞便を含む使い捨ておむつが適切に処理され、廃棄されている場合、流入水からのPV分離率はかなり低くなると考えられる。しかし、今回の我々の研究結果から、定期接種時期とほぼ重なる時期にPVが検出されている。このことは、OPVを接種した子供達の便、又は、OPVを接種した子供から感染したヒトの便が下水に流入していることを示している。実際に、OPVを接種した子供からの家族内感染事例が報告されている¹⁹⁾。家族内感染以外では、幼稚園などの学校施設での感染も考えられるが²⁰⁾、NPEVは家族内感染を広く引き起こすことが報告されており²¹⁾、PVに関しても同様に主に家族内感染が起こっていると考えられる。また、今回我々の研究からPVが分離される時期はOPVの定期接種時期と関連があることを示している。Huangらの報告²²⁾やMuellerらの報告²³⁾では、OPVからIPVへ移行する際、OPV接種中止後2~3か月以内に下水からPV分離数が急速に減少することを示している。今回の我々の報告では、OPVからIPVに移行する前に下水からPVが消失していた。2012年5月に政府がOPVからIPVへの移行を発表して以降、VAPPの懸念からOPVの接種率が減少したことに起因していると考えられる⁷⁾。今後、OPVからIPVへ移行後のVAPP症例について注視していく必要がある²⁴⁾。

環境水サーベイランスは高感度にPVを検出できる方法であり、我々は定期予防接種でOPVを接種した集団からPVを検出することが出来た。また、IPV移行後も侵入経路は不明であるが、流域地域内に侵入してきたPVを検出することが出来た。OPVからIPVへの移行は、PVの世界的な根絶に向けての必要不可欠な過程であるが、その際、OPVの接種率を高く保ったままIPVへ移行することが重要である。IPV

へ移行した後もPVは、感染した場合、ほとんどが不顕性感染でありヒトの腸管内で増殖中に変異を起こしVDPVが出現することが懸念される²⁵⁾。環境水サーベイランスは流行地域から野生型PVの侵入だけでなく、ポリオ根絶の最終段階であるOPVからIPVへの世界的な移行前のVDPV出現を監視するために重要な役割を果たすと考えられる。

文献

- 1) Committee on Enteroviruses. : *Virology.*, 16, 501-504, 1962.
- 2) M. Pallansch & R. Roos : *Fields Virology 5th edition.*, 840-893, 2007.
- 3) Alexander JP Jr, Gary HE Jr & Pallansch MA. : *J. Infect. Dis.*, 175, 176-182, 1997.
- 4) Hara M *et al.* : *Microbiol. Immunol.*, 31, 327-336, 1987.
- 5) K. Okada *et al.* : *J. Infect. Dis.*, 208, 275-283, 2013.
- 6) 厚生労働省：平成24年度春 急性灰白髄炎（ポリオ）予防接種率の調査結果まとめ，<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/polio/dl/121102-1.pdf>（2016/06/22アクセス）
- 7) M. Hosoda *et al.* : *Lancet.*, 379, 520, 2012.
- 8) HG. van der Avoort *et al.* : *Epidemiol. Infect.*, 114, 481-491, 1995.
- 9) H. Yoshida *et al.* : *J. Gen. Virol.*, 83, 1107-1111, 2002.
- 10) L. El Bassioni *et al.* : *Am. J. Epidemiol.*, 158, 807-815, 2003.
- 11) World Health Organization. : 2013 Polio Eradication and Endgame Strategic Plan 2013-2018, <http://www.polioeradication.org/resource/library/strategyandwork.aspx>（2016/06/22アクセス）
- 12) Pathogen surveillance system in Japan and Infectious Agents Surveillance Report. : *IASR.*, 31, 69-70, 2010.
- 13) 国土交通省九州地方整備局：下水道処理人口普及率，http://www.qsr.mlit.go.jp/n-park/city/index_e02_a.html（2016/06/22アクセス）
- 14) T. Nakamura *et al.* : *Appl. Environ. Microbiol.*, 81, 1859-1864, 2015.
- 15) DJ. Wood, B. Hull : *J Med Virol.*, 58, 188-192, 1999.
- 16) S. Guillot *et al.* : *J. Virol.*, 74, 8434-8443, 2000.
- 17) K. Tamura *et al.* : *Mol. Biol. Evol.*, 28, 2731-2739, 2011.
- 18) 竹下友子, 甲斐今日子, 乳幼児のおむつ使用の実態

- と今日の課題:佐賀大学文化教育学部研究論文集, 15, 237-247, 2011.
- 19) M. Sugieda *et al.* : *Jpn. J. Infect. Dis.*, 59, 277-278, 2006.
- 20) M. Benyesh-Melnick *et al.* : *Am. J. Epidemiol.*, 86, 112-136, 1967.
- 21) M. Iwai *et al.* : *Clin. Vaccine Immunol.*, 17, 764-770, 2010.
- 22) Q.S. Huang *et al.* : *Lancet.*, 366, 394-396, 2005.
- 23) J.E. Mueller *et al.* : *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 1395-1401, 2009.
- 24) L.N. Alexander *et al.* : *JAMA.*, 292, 1696-1701, 2004.
- 25) E. Anis *et al.* : *Euro Surveill.*, 18, 20586, 2013.

(英文要旨)

Environmental Surveillance of Poliovirus in Sewage

Mitsuhiro HAMASAKI, Hideaki YOSHITOMI, Yuki ASHIZUKA, Asako NAKAMURA, Nobuyuki SERA, and Hiromu YOSHIDA*

Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,

Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan

** Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases,*

4-7-1 Gakuen, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan

To trace polioviruses (PVs) within communities, environmental surveillance was conducted at two independent sewage plants in urban and rural areas in the northern prefectures of Kyushu, Japan. Over 60 months from April 2010 to March 2015, 62 PVs were isolated. The frequency of PV isolation at the urban plant was 1.7-times that at the rural plant. Molecular sequence analysis of the viral VP1 gene identified all three serotypes, and the most prevalent serotype was type 2. Nearly all PV isolates exhibited more than one mutation from the Sabin vaccine strains. During this study, inactivated poliovirus vaccine (IPV) was introduced for routine immunization on September 1, 2012, replacing the live oral poliovirus vaccine (OPV). Much of the PV was isolated from the sewage before OPV cessation. However, some of the PV that entered the basin was isolated after the transition from OPV to IPV. Our study highlights the importance of environmental surveillance during the OPV to IPV transition period to detect the excretion of PVs in an OPV-immunized population.

[Key words ; poliovirus , environmental surveillance]