ノロウイルスの水環境中動態：ヒトからカキへ

国立保健医療科学院
三浦　尚之

自己紹介

2001年3月　宮城県仙台第二高等学校 卒業

2010年3月　東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 博士課程後期修了
- 河口・沿岸域におけるノロウイルスの動態

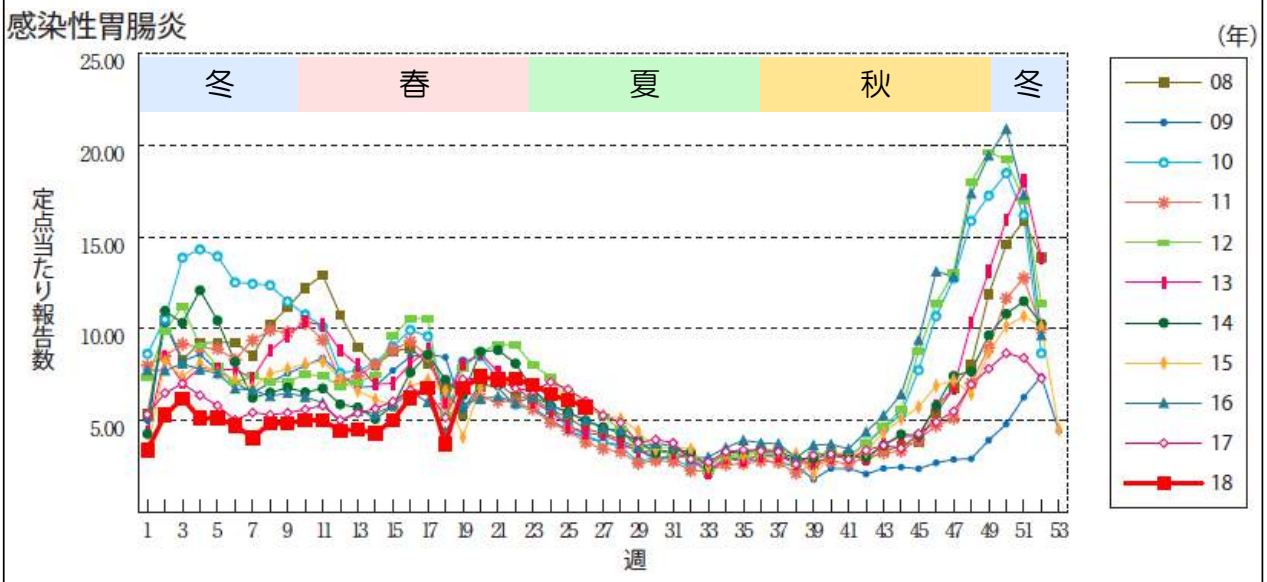
2010年4月　北海道大学大学院工学研究院環境創成工学部門 博士研究員
- ノロウイルスを特異的に吸着するヒト腸内細菌の分離
- 下水処理プロセスにおける胃腸炎ウイルスの除去メカニズム

2012年7月　フランス海洋開発研究所 博士研究員
- ヒトノロウイルスを一斉に定量検出するリアルタイムPCR法の開発
- 下水処理プロセスにおける胃腸炎ウイルスの除去メカニズム

2015年7月　東北大学未来科学技術共同研究センター 准教授
- 下水中のノロウイルス濃度・遺伝子型の変動
- カキに蓄積したノロウイルスの濃度・遺伝子型の変動

2016年10月　国立保健医療科学院生活環境研究部 主任研究官
- 水道水源における胃腸炎ウイルス汚染実態の解明

日本における感染性胃腸炎の流行

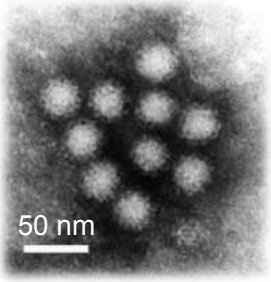


国立感染症研究所 感染症疫学センター，感染症発生動向調査週報，2018年第26週（6月25日～7月1日）

- ノロウイルスやロタウイルスが主要な原因，秋～春にかけて毎年流行
- 患者総数は，年間およそ1000万人（およそ10人に1人が発症）
- 2017年の流行期は過去10年間で2番目に低い水準，2018年流行期は最も低い水準で推移

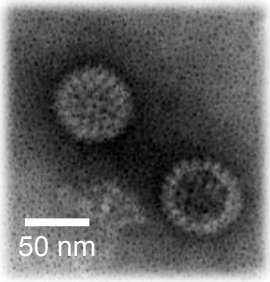
ノロウイルスとロタウイルスの特徴

ノロウイルス



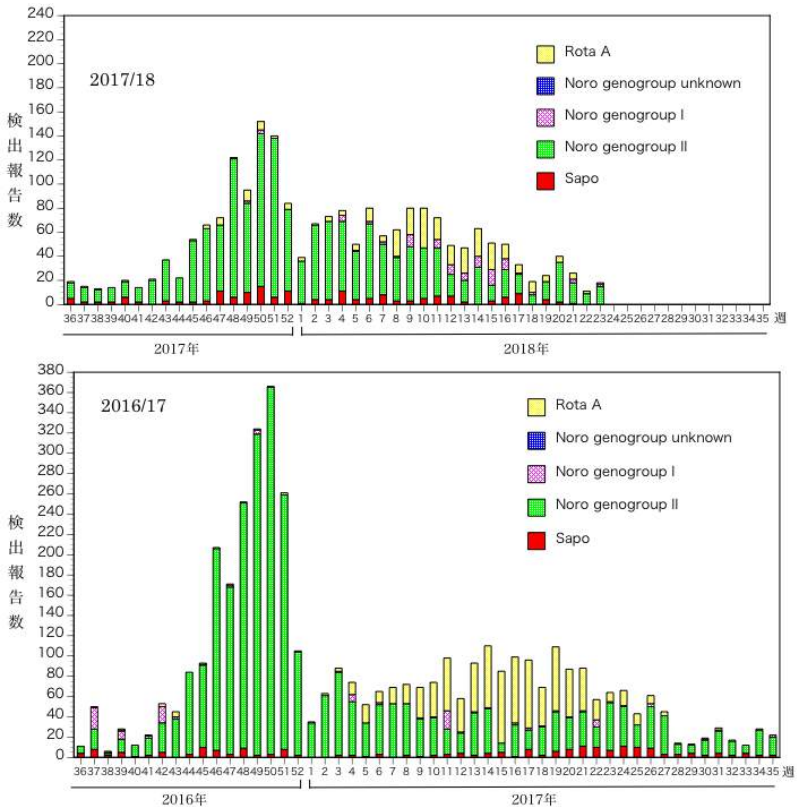
- 嘔吐，下痢，発熱等を伴う胃腸炎の主な原因
- エンベロープを持たないおよそ**40 nm**のカプシド
- **＋鎖1本鎖RNA**のゲノム (7.4–7.7 kb)
- GI～GVIIの遺伝子群に分類され，**GI**，**GII**，**GIV** がヒトに感染する

ロタウイルス



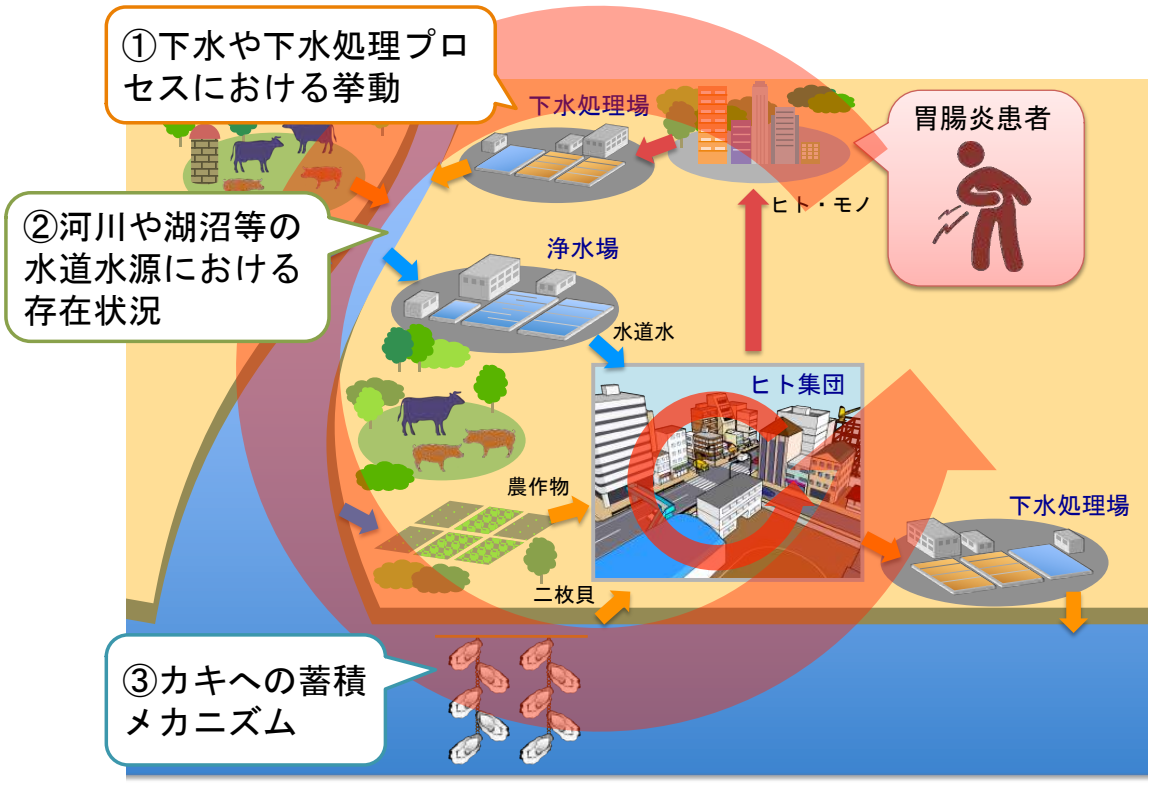
- 小児における胃腸炎の主な原因
- エンベロープを持たないおよそ**100 nm**のカプシド
- 外殻，内殻，コアタンパクからなる三重構造
- 11分節からなる**2本鎖RNA**のゲノム
- 内殻を構成するVP6の抗原性によりA～G群に分類され，ヒトで流行する主要なグループはA群

過去２シーズンの胃腸炎ウイルス分離報告数



国立感染症研究所 感染症疫学センター，ノロウイルス等検出速報，2018年6月13日現在

ノロウイルスの水環境中動態



下水・下水処理プロセスにおける挙動

□ 下水中のノロウイルス濃度は，どのように変動するか

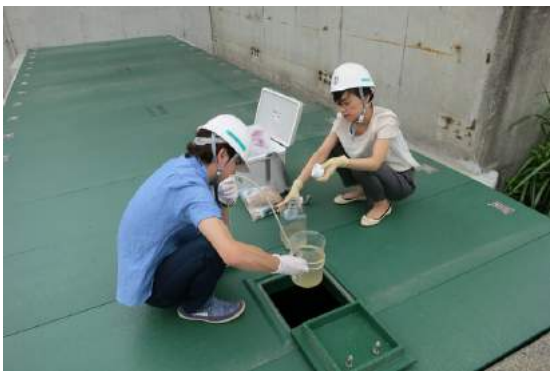
□ 下水からはどんな遺伝子型が検出されるか

□ 下水処理プロセスでは，ウイルスがどのように除去されているか

試料の収集

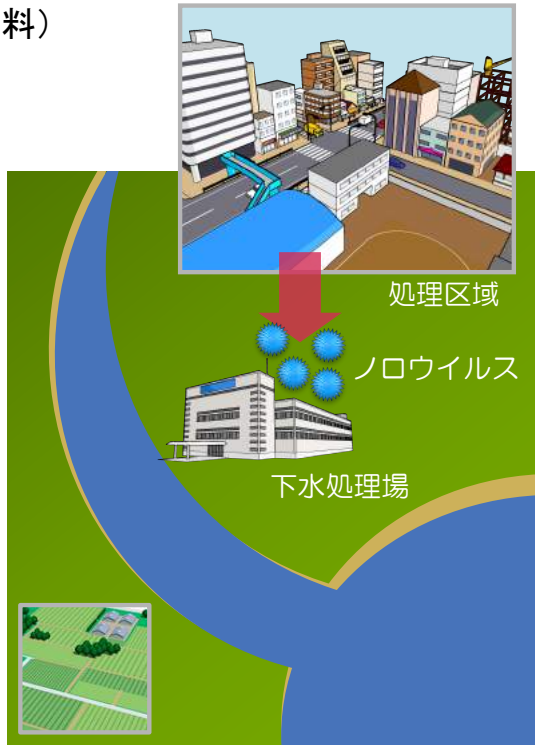
下水試料

- 宮城県内の下水処理場，流入下水（1 L）
- 2013年4月～2016年3月の毎週水曜（156試料）



患者便試料

- 下水処理区域内に位置する外来医院を受診した感染性胃腸炎患者
- 2013年4月～2016年3月（296試料）



下水試料中のノロウイルス濃度測定方法

試料の分析手順

Kazama et al. 2016

流入下水試料（1 L）

マウスノロウイルス（プロセスコントロール）

PEG沈殿法（40 mL→ 1 mLに濃縮）

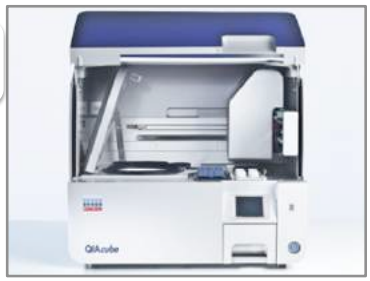
RNA抽出（QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen）

RT（iScript Advanced cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad）

リアルタイムPCR（SsoFast Probes Supermix, Bio-Rad）

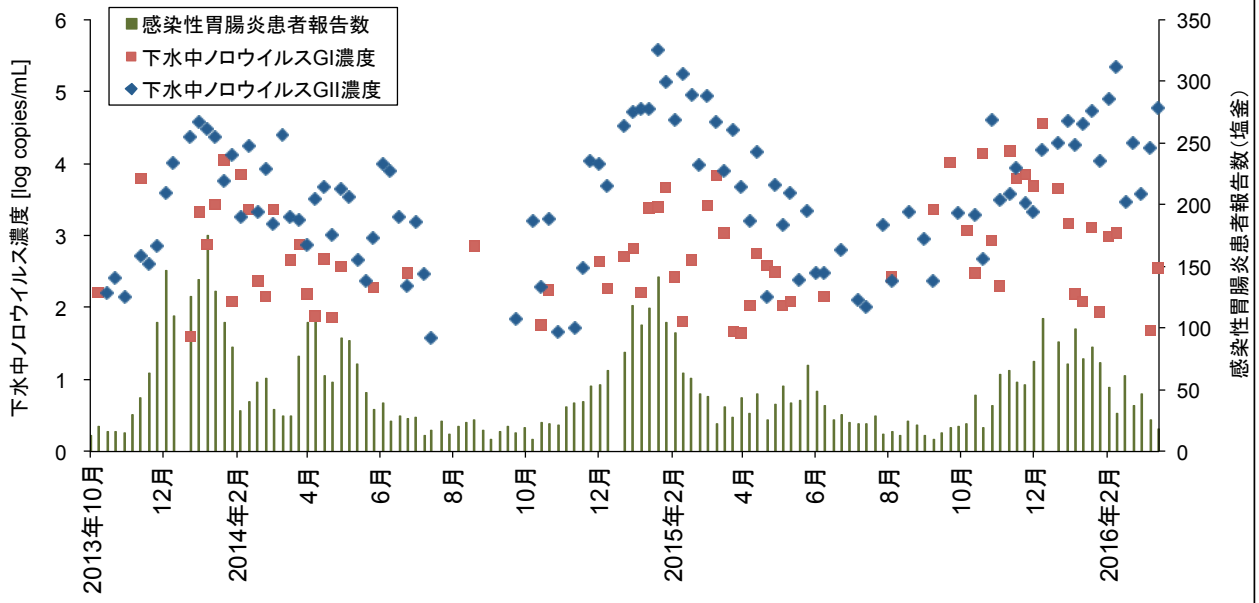
プライマーおよびプローブ（Kageyama et al. 2003）

	GI	GII
Fプライマー	COG1F	COG2F
Rプライマー	COG1R	COG2R
TaqManプローブ	RING1(a)-TP RING1(b)-TP	RING2AL-TP



マウスノロウイルスの回収率≧1%の試料について，ノロウイルスGI・GII濃度を定量（ISO/TS 15216-1: 2017）

胃腸炎患者報告数と下水中ノロウイルス濃度

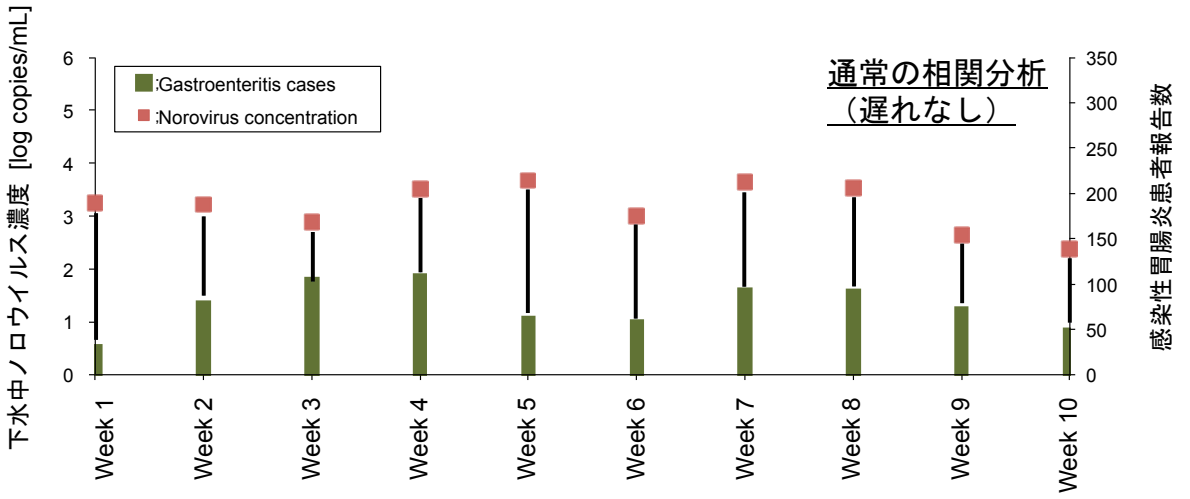


- 下水中ノロウイルス濃度は患者報告数と共に季節的に変動
- 濃度は10月下旬から上昇し，1～2月に最大（GI: 10^4, GII: 10^5 copies/mL）となり，6月にかけて減少する傾向

Kazama et al. 2017

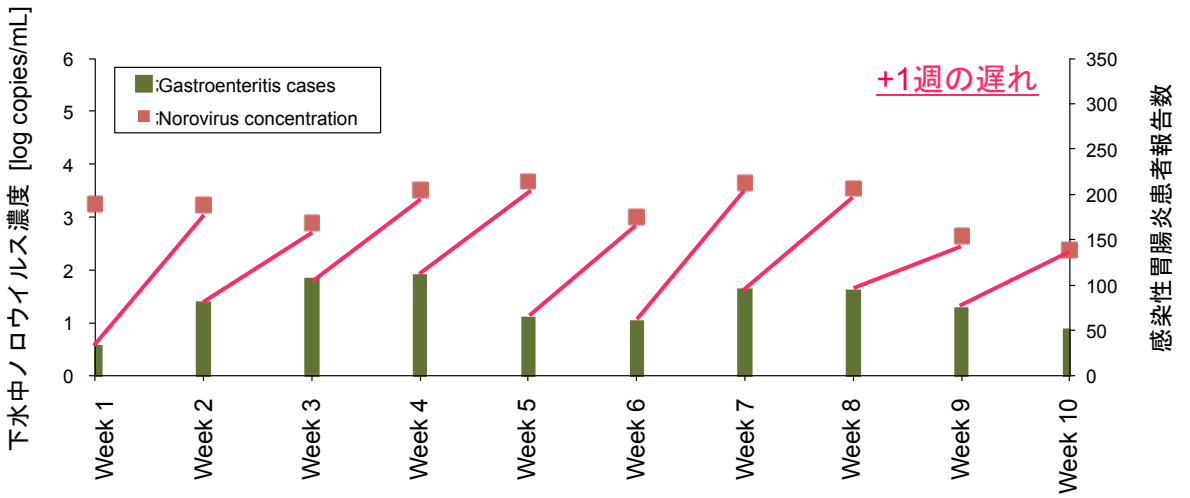
患者報告数と下水中ウイルス濃度の相互相関分析

二つの時系列データを前後にずらして相関を分析



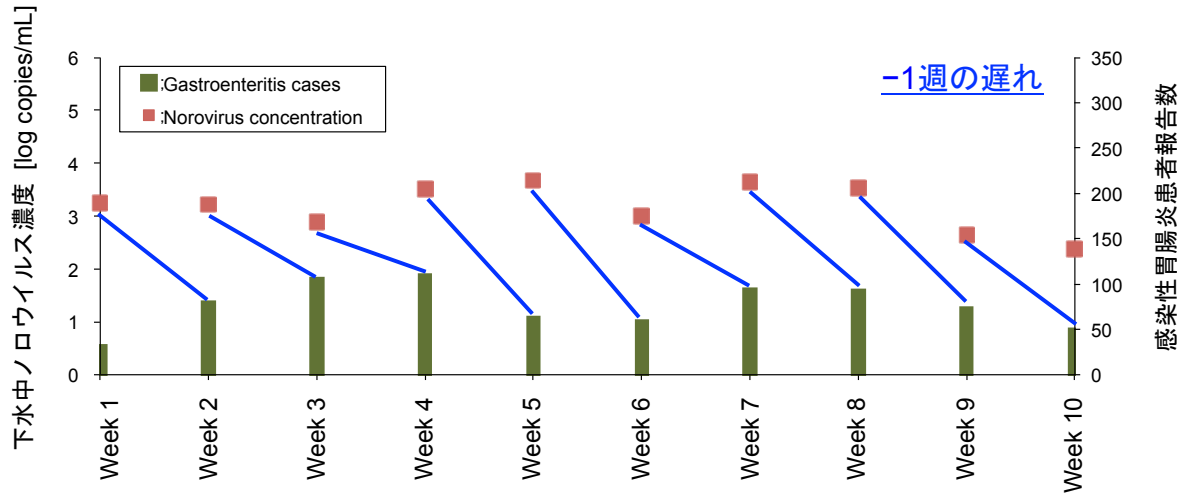
患者報告数と下水中ウイルス濃度の相互相関分析

二つの時系列データを前後にずらして相関を分析

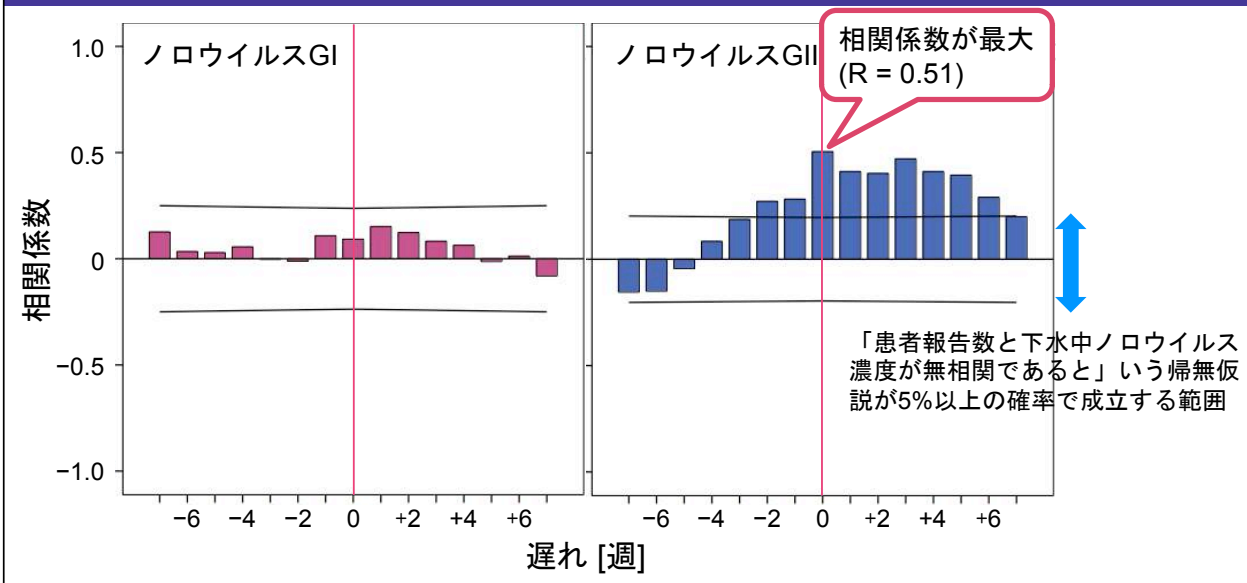


患者報告数と下水中ウイルス濃度の相互相関分析

二つの時系列データを前後にずらして相関を分析



患者報告数と下水中ウイルス濃度の相互相関分析



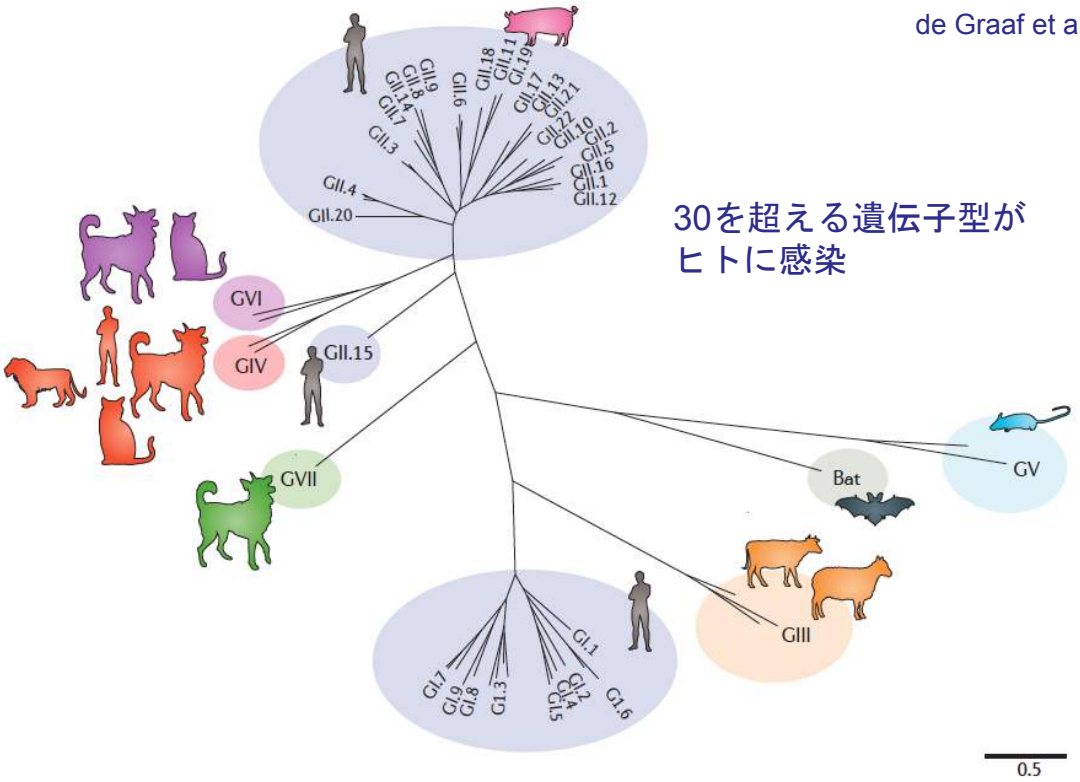
- ノロウイルスGI濃度と患者報告数の間には，相関が認められなかった
- ノロウイルスGII濃度は，患者報告数に対して−2から+6週の遅れにおいて有意な相関が見られ，遅れ0週において相関係数が最大となった（R = 0.51）

患者数が集計・公表されるには1〜2週間かかることから，1日程度で測定できる下水中ノロウイルス濃度は，流行の早期検知に利用できる可能性

遺伝的に多様なノロウイルス

カプシドタンパク質（VP1）遺伝子の塩基配列に基づいた系統樹

de Graaf et al. 2016



30を超える遺伝子型がヒトに感染

パイロシーケンサーを用いた下水中ノロウイルスの遺伝子型解析

試料の分析方法

Kazama et al. 2016

流入下水試料（1 L）

PEG沈殿法（40 mL→ 1 mLに濃縮）

RNA抽出（QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen）

RT (iScript Advanced cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad)

Semi-nested PCR (NEBNext High-Fidelity 2X PCR Master Mix, New England Biolabs)

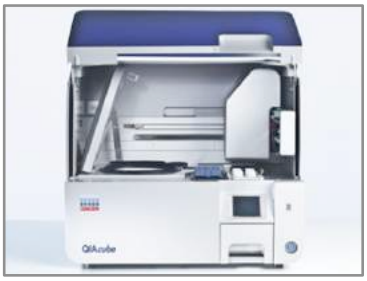
プライマー（Kojima et al. 2002; Kageyama et al. 2003）

	GI	GII
1st PCR	COG1F/G1SKR	COG2F/G2SKR
2nd PCR	G1SKF/G1SKR	G2SKF/G2SKR

パイロシーケンシング（GS Junior+ System, Roche）

データ処理と遺伝子型の同定（Norovirus Genotyping Tool）

系統樹解析（N-J法, Kimura 2-parameter model, MEGA6）



糞便中ノロウイルスの遺伝子型解析

試料の分析方法

Kazama et al. 2016

直腸拭い液

1 mLのPBSに分散

RNA抽出（QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen）

RT (SuperScript III RTase, Thermo Fisher Scientific)

リアルタイムPCR法によるスクリーニング（TaqMan Fast Advanced Master Mix, Thermo Fisher Scientific）

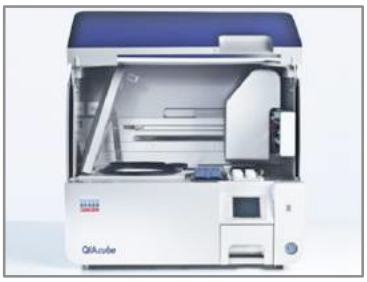
ノロウイルス陽性試料

PCRまたはnested PCR

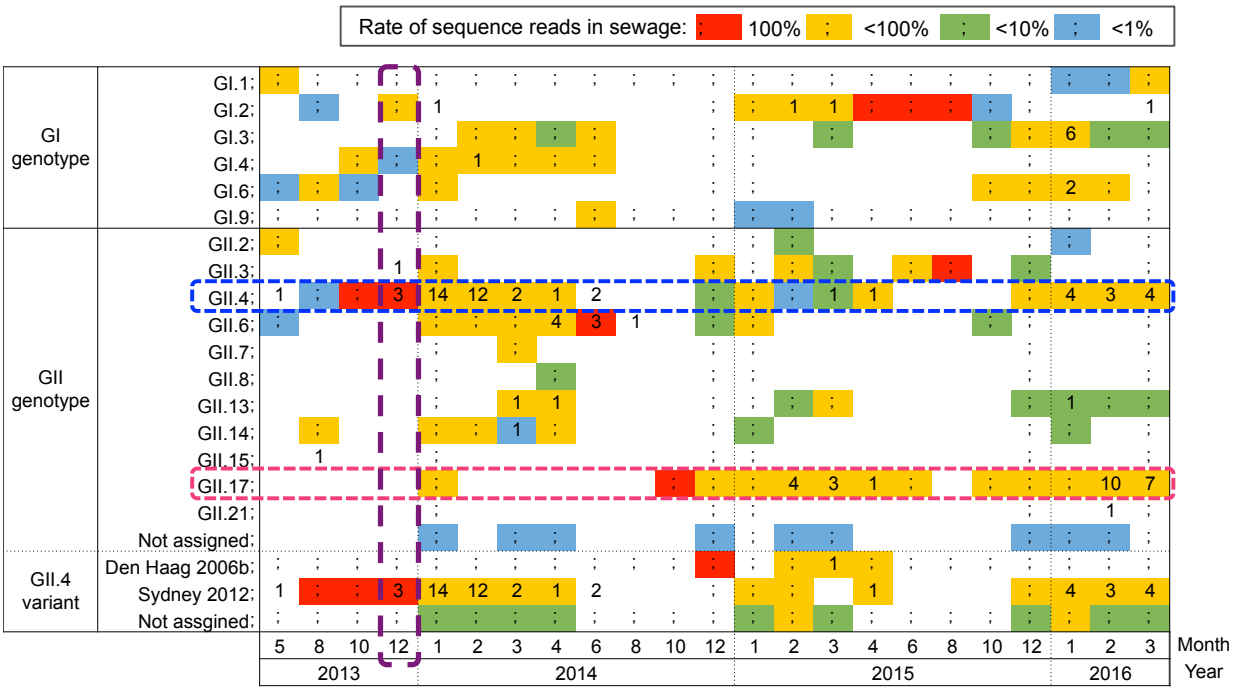
サンガーシーケンシング

遺伝子型解析（Norovirus Genotyping Tool）

系統樹解析（N-J法, Kimura 2-parameter model, MEGA6）



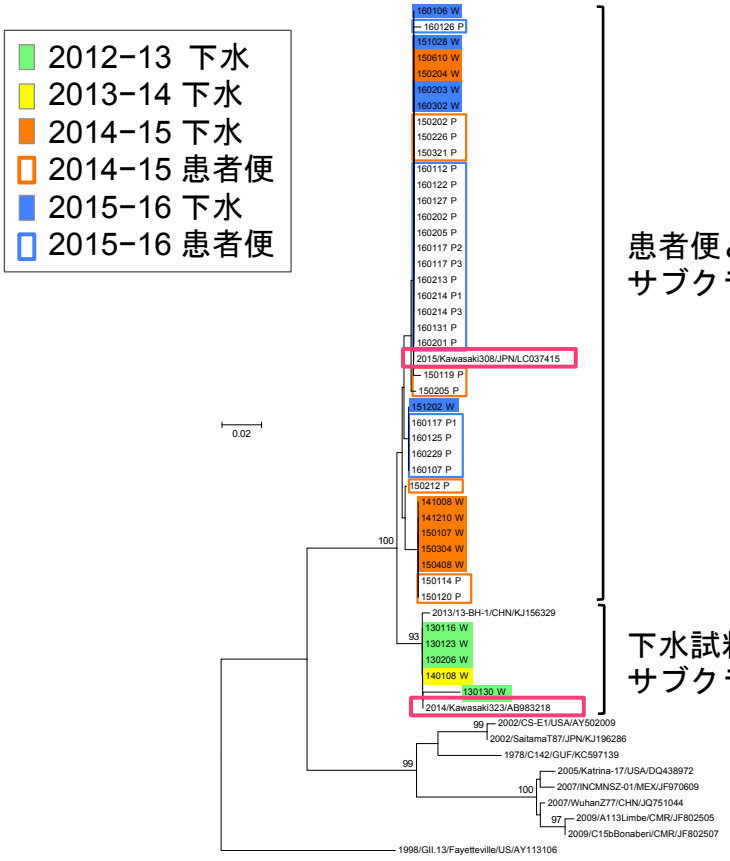
下水と患者便から検出されたノロウイルスの遺伝子型



- 患者から検出された10遺伝子型を含む，15遺伝子型が下水から検出された
- 2013−14シーズンはGII.4 Sydney 2012が，2014−15シーズンはGII.17が優占していた

Kazama et al. 2017

下水と患者便から検出されたノロウイルスGII.17株

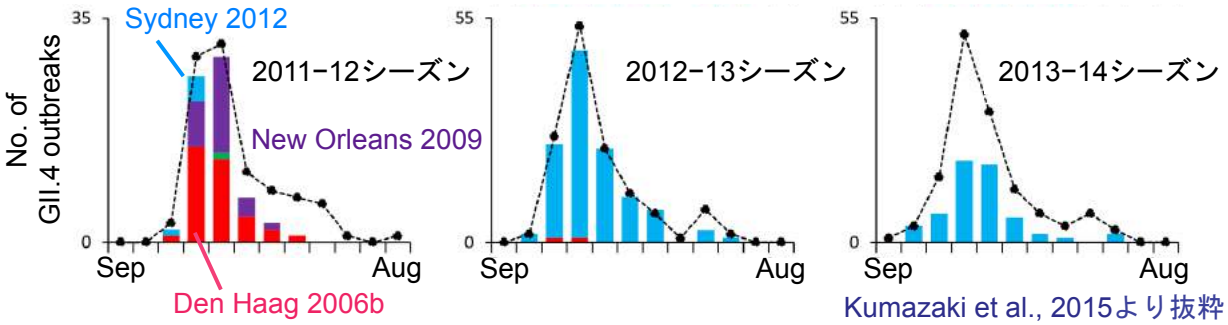


患者便と下水試料から検出されたGII.17株
サブクラスター **Kawasaki 308 2015**

下水試料からのみ検出されたGII.17株
サブクラスター **Kawasaki 323 2014**

Kazama et al. 2017

日本におけるGII.4亜型の分離



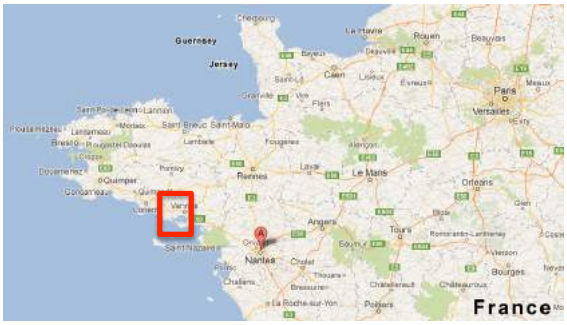
Kumazaki et al., 2015より抜粋

- 2011−12シーズンに分離された株の5%は，Sydney 2012亜型だった
- 2005−06シーズンに分離された株の6%は，Den Haag 2006b亜型（Motomura et al., 2008）

新型の変異株は，流行を引き起こす前のシーズンに，マイナーな集団としてヒト集団中に潜在している可能性があるため，多様なノロウイルス遺伝子型分布の変化を注視する必要があり，下水はノロウイルスの分子疫学的解析のソースとして有用である

下水処理プロセスにおける胃腸炎ウイルスの除去特性

カキ養殖海域を抱えるフランスの集落に建設された膜分離活性汚泥（MBR）法による下水処理プラント



下水処理プロセスにおける胃腸炎ウイルスの除去特性

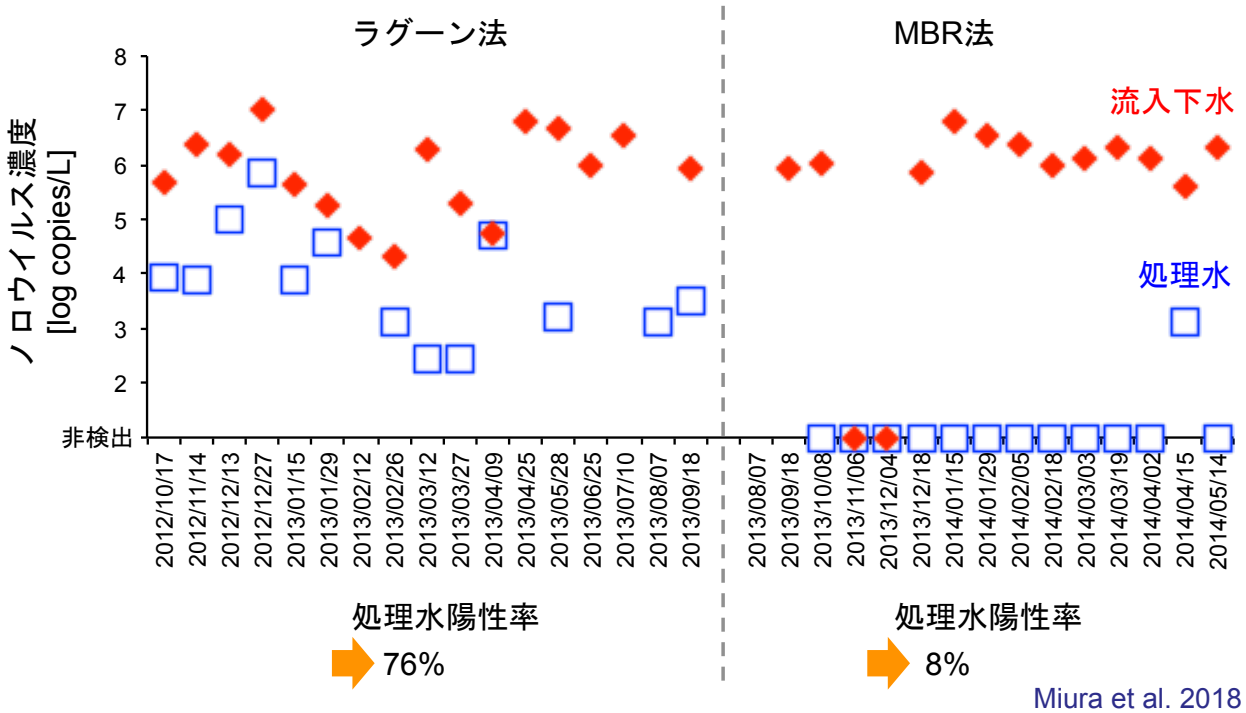
カキ養殖海域を抱えるフランスの集落に建設された膜分離活性汚泥（MBR）法による下水処理プラント

下水処理プロセスにおける胃腸炎ウイルスの除去特性

カキ養殖海域を抱えるフランスの集落に建設されたMBRプラント

下水処理プロセスにおける下痢症ウイルスの除去特性

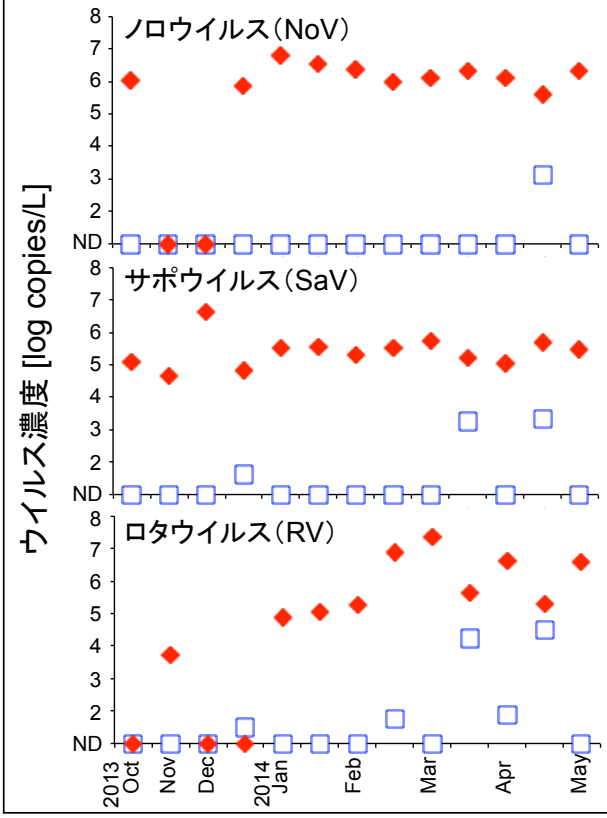
カキ養殖海域を抱えるフランスの集落に建設されたMBRプラント



Miura et al. 2018

下水処理プロセスにおける胃腸炎ウイルスの除去特性

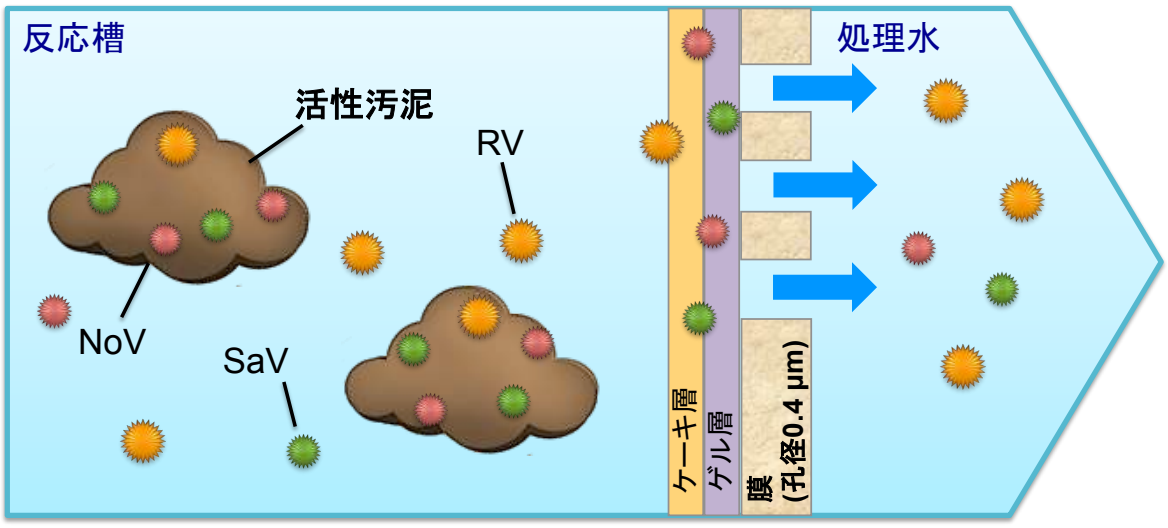
カキ養殖海域を抱えるフランスの集落に建設されたMBRプラント



サンプル	濃度（幾何平均）	陽性率
流入下水:	1.5×10^6 copies/L	85%
処理水:	1.3×10^3 copies/L	**8%**
流入下水:	2.5×10^5 copies/L	100%
処理水:	5.5×10^2 copies/L	**23%**
流入下水:	5.4×10^5 copies/L	77%
処理水:	5.9×10^2 copies/L	**38%**

Miura et al. 2018

下水処理プロセスにおける胃腸炎ウイルスの除去特性

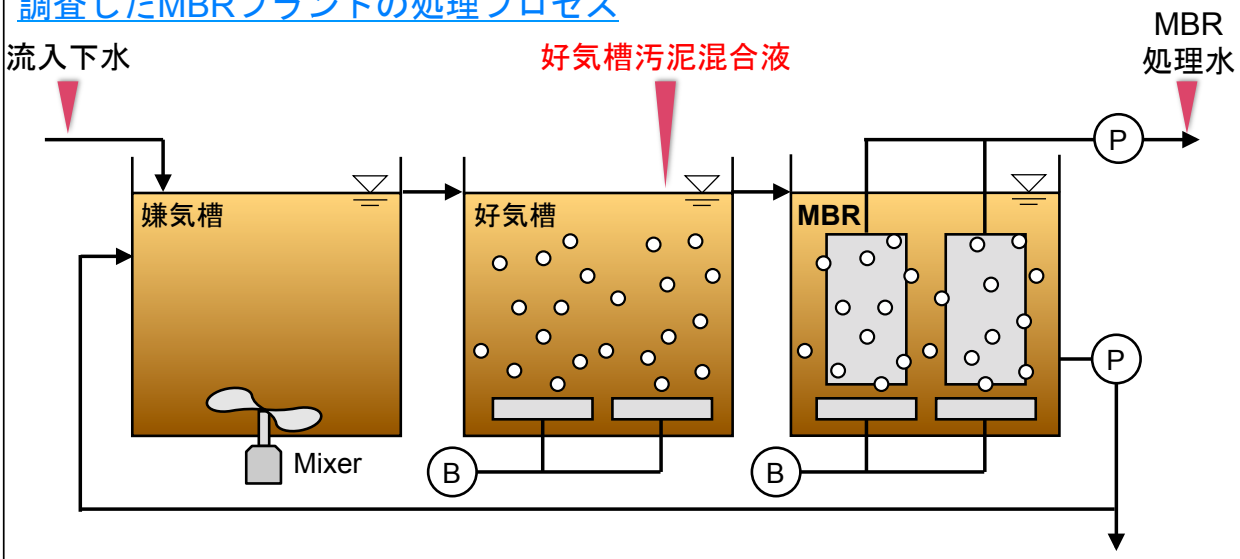


- RVはNoVおよびSaVと比較して活性汚泥への親和性が低く，膜ろ過での除去性が低いかもしれない

Miura et al. 2018

下水処理プロセスにおける胃腸炎ウイルスの除去特性

調査したMBRプラントの処理プロセス



サンプル

2014年10月から2015年5月まで毎月収集（N = 8）
- 流入下水，MBR処理水（24時間コンポジットサンプル）
- 好気槽汚泥混合液（2 L, グラブサンプル）

Miura et al. 2018

下水処理プロセスにおける胃腸炎ウイルスの除去特性

サンプル中ウイルス濃度の測定

流入，MBR処理水
(40 mL)

汚泥混合液（40 mL）

遠心分離

液相

固相

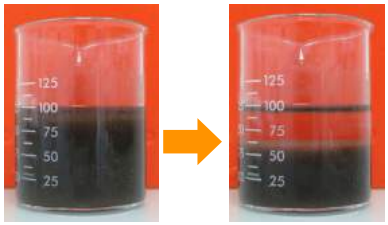
ウイルス誘出
（10%ビーフエキス）

ポリエチレングリコール（PEG）沈殿

RNA抽出（NucliSENS kit, bioMérieux）

rRT-PCR (RNA UltraSense One-Step qRT-PCR, Invitrogen)

好気層汚泥混合液サンプル



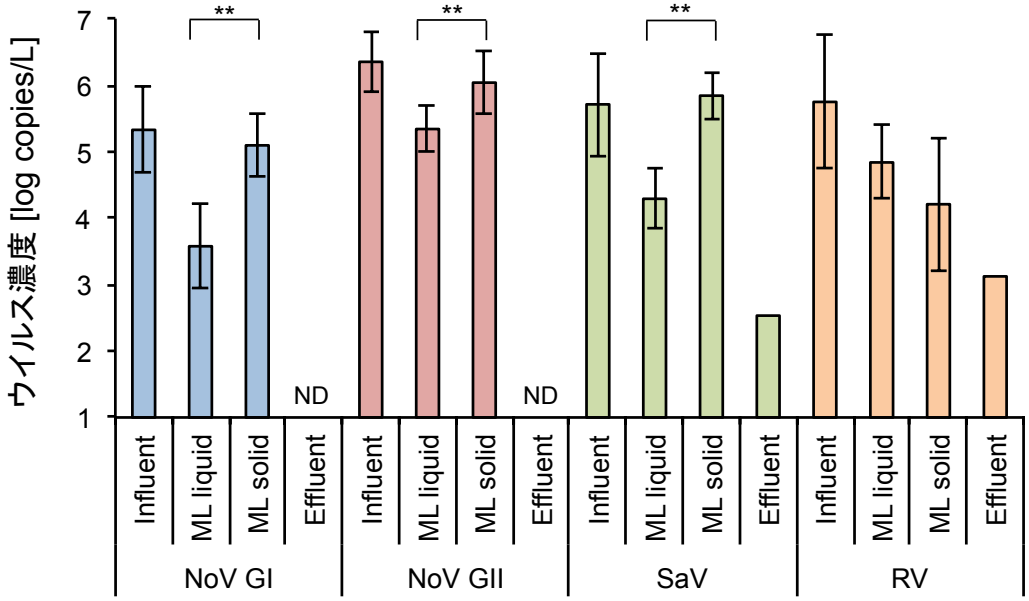
検出対象ウイルス

- NoV (Kageyama et al., 2004; Loisy et al., 2005; Miura et al., 2013)
- SaV (Oka et al., 2006)
- RV (Pang et al., 2004 & 2011)

Miura et al. 2018

下水処理プロセスにおける胃腸炎ウイルスの除去特性

サンプル中ウイルス濃度の幾何平均値



- 好気槽汚泥混合液の固相に含まれるNoV GI，NoV GII，SaVの濃度は，液相と比較して有意に高かった（$^{**}P < 0.01$, t-test）
- RVの濃度は液相と固相で差が認められず，RVの活性汚泥への親和性はNoVおよびSaVと比較して低いことがわかった

Miura et al. 2018

ノロウイルスとロタウイルスで異なる吸着特性

吸着性が異なる要因の候補

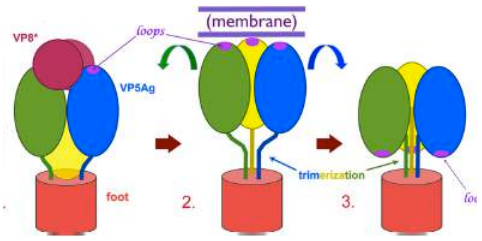
1) ウイルス粒子の等電点

- RV SA11:	8.0
- NoV GI:	4.3−6.0
- NoV GII.4:	4.2−6.9
- SaV　Cowden:	5.4
- 汚泥混合液のpH:	6.9−7.4

Michen and Graule 2010;
Wang et al. 2012;
Samandoulgou et al. 2015

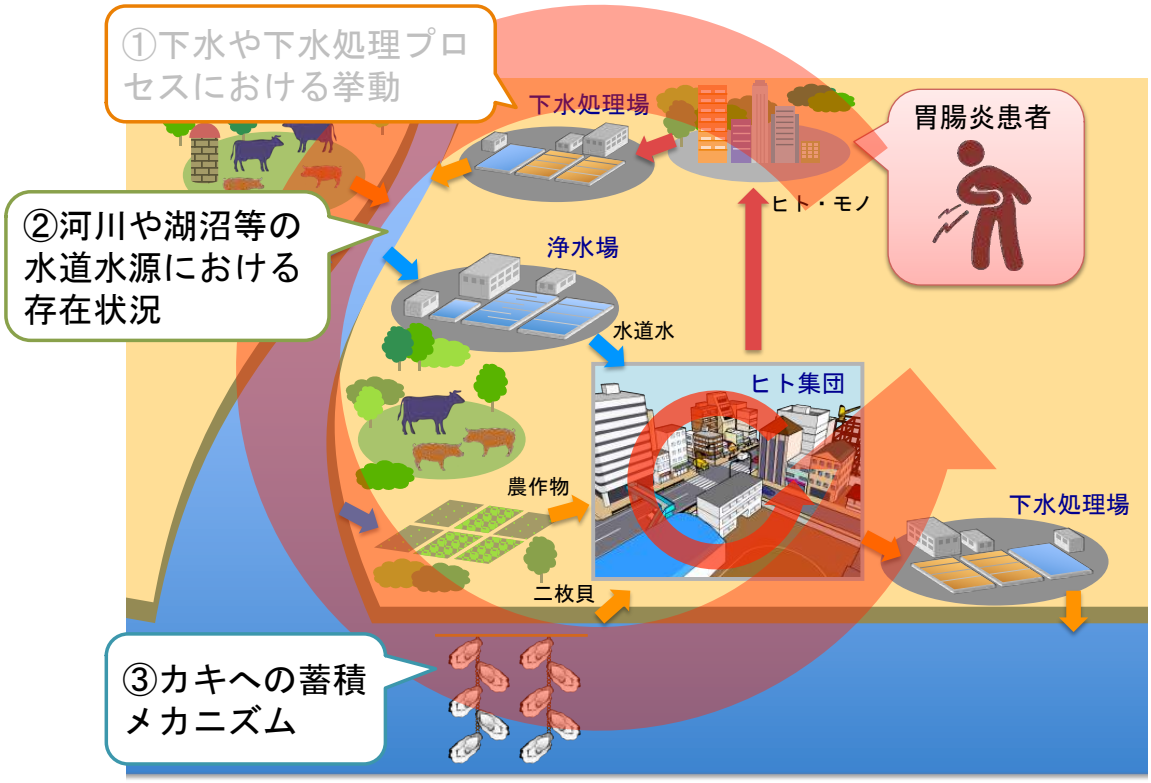
2) カプシドタンパク質の疎水性

- RVカプシドタンパク質の疎水性部位（VP5の一部）は，環境水中では露出していない
- NoVカプシドタンパク質（P2 domain）とHBGAの結合には，疎水性相互作用が関与している（Hansman et al., JVI 2011）



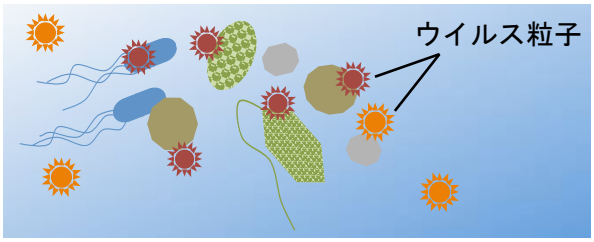
Kim et al. 2010

ノロウイルスの水環境中動態



河川や湖沼等の水道水源における存在状況

表流水中の胃腸炎ウイルス

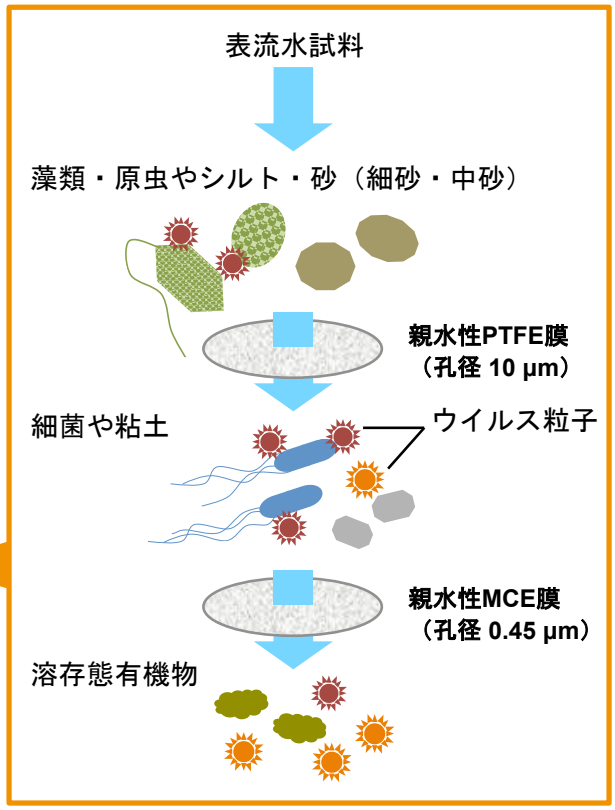


試料

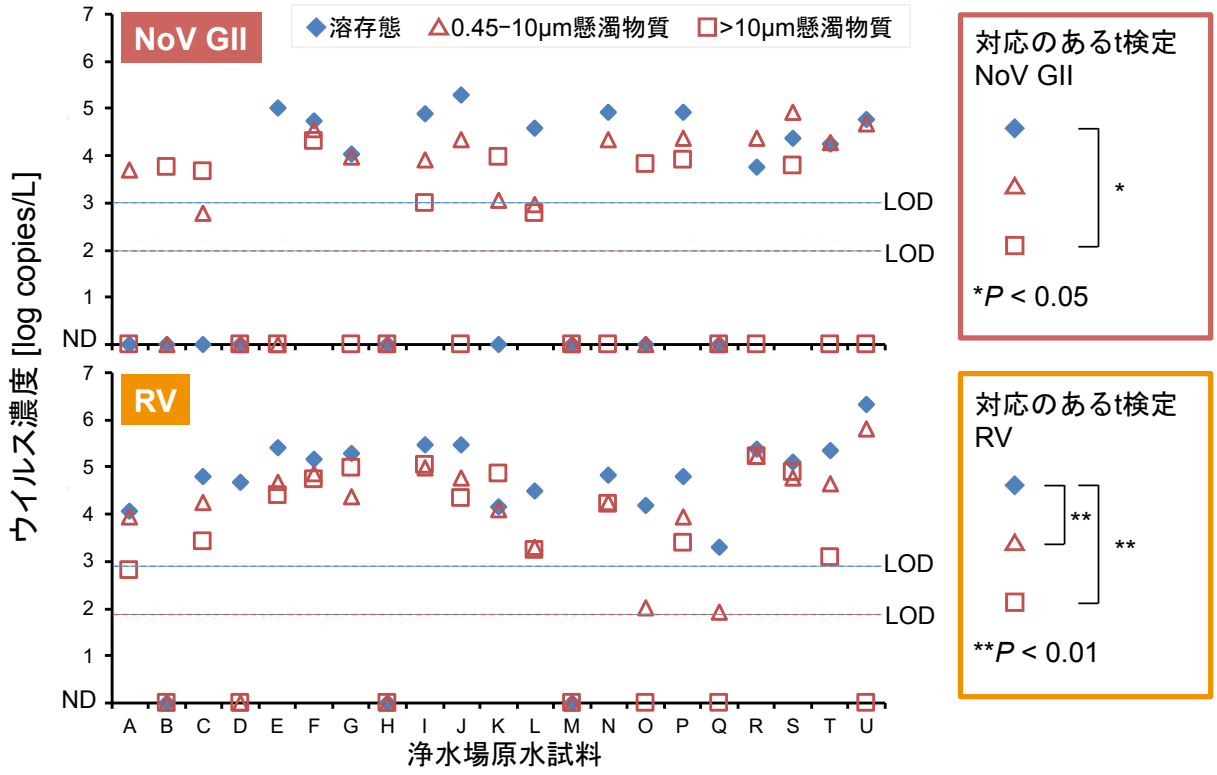
2018年1月9−11日
- 表流水を水源とする国内21箇所の浄水場原水

分析

1) 孔径10，0.45 μmの膜で試料を分画
2) 0.45 μmの膜のろ液を陰電荷膜法で濃縮
Katayama et al. 2002
3) 膜，濃縮液からウイルスRNAを抽出
4) リアルタイムPCR法でNoV GII，RVを定量検出



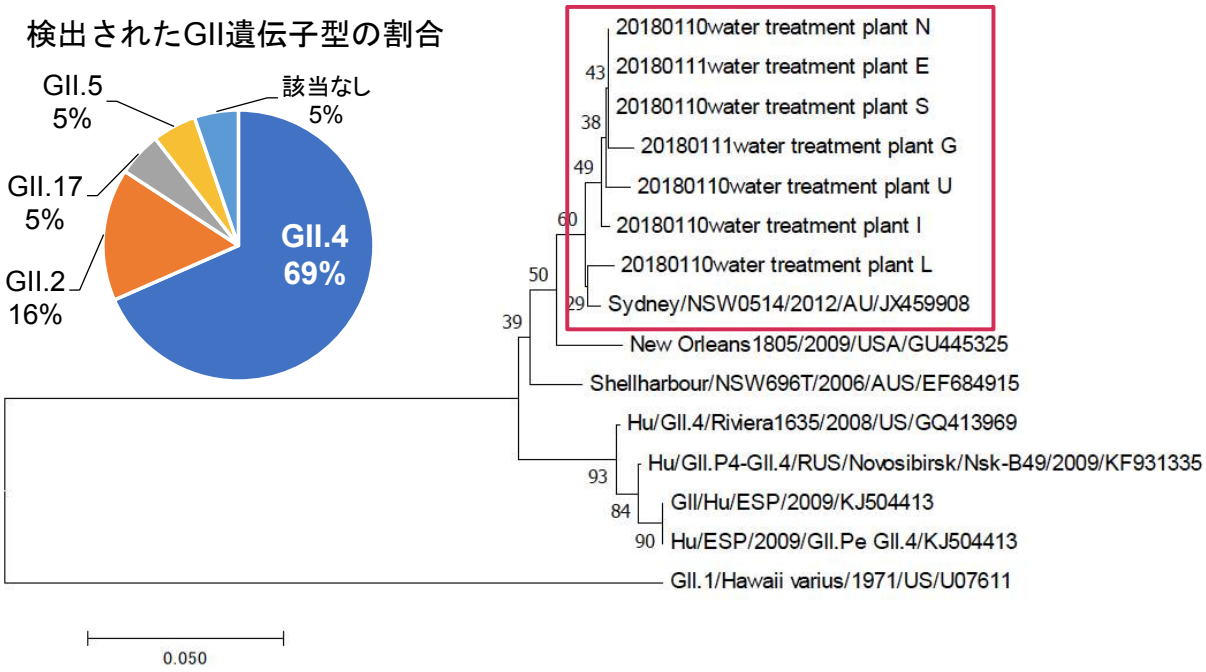
河川や湖沼等の水道水源における存在状況



- RVはNoV GIIと比較して懸濁物質への親和性が低く，表流水中において溶存態として存在する割合が多い可能性がある

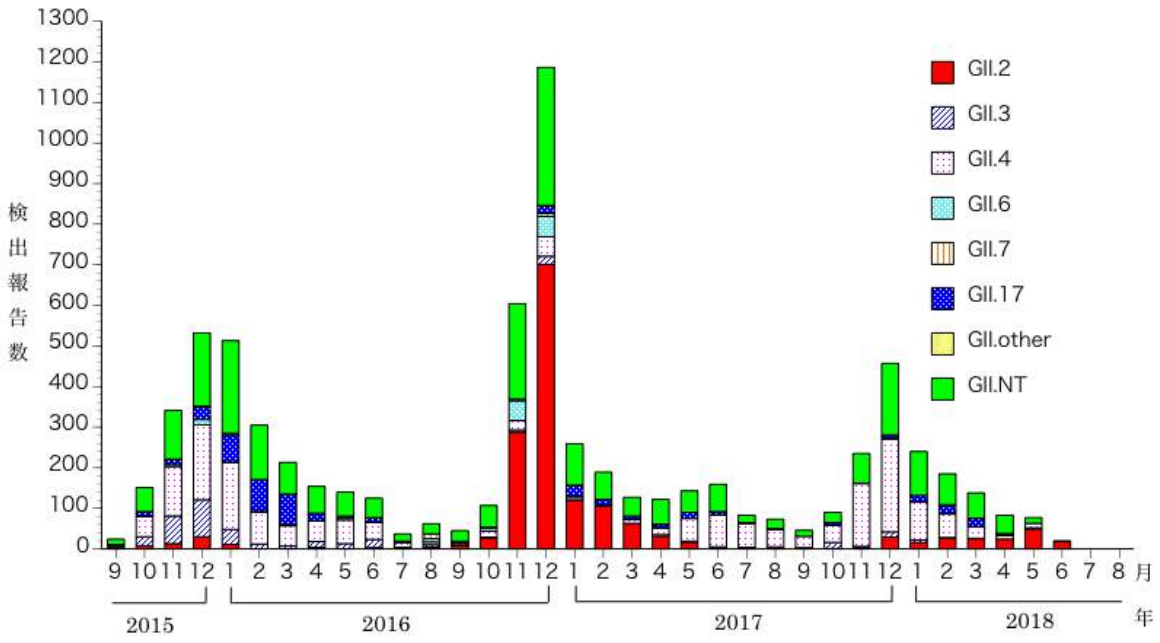
2017-2018シーズンのノロウイルスGIIの遺伝子型

検出されたGII遺伝子型の割合



- GII.4が最も多く検出され（69%），Sydney 2012株に近縁な株だった
- 2016-2017シーズンに流行したGII.2が2番目に多かった（16%）

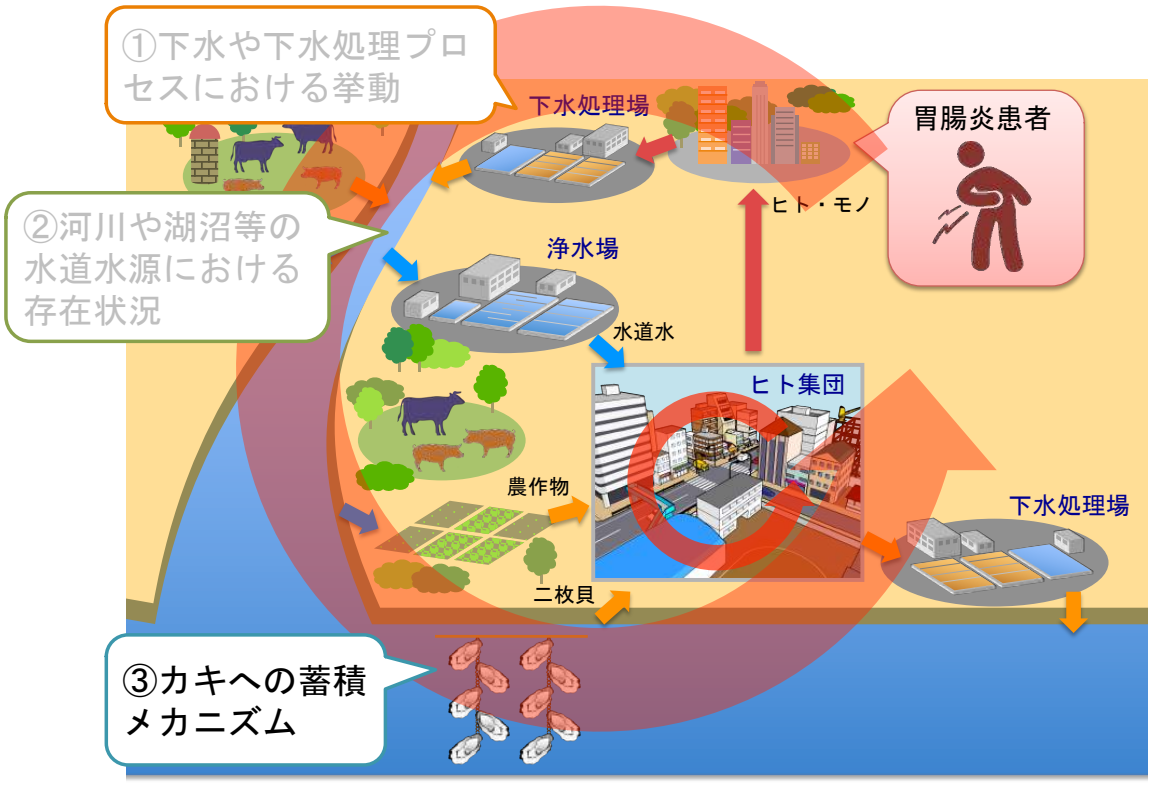
近年のノロウイルスGII遺伝子型検出報告数



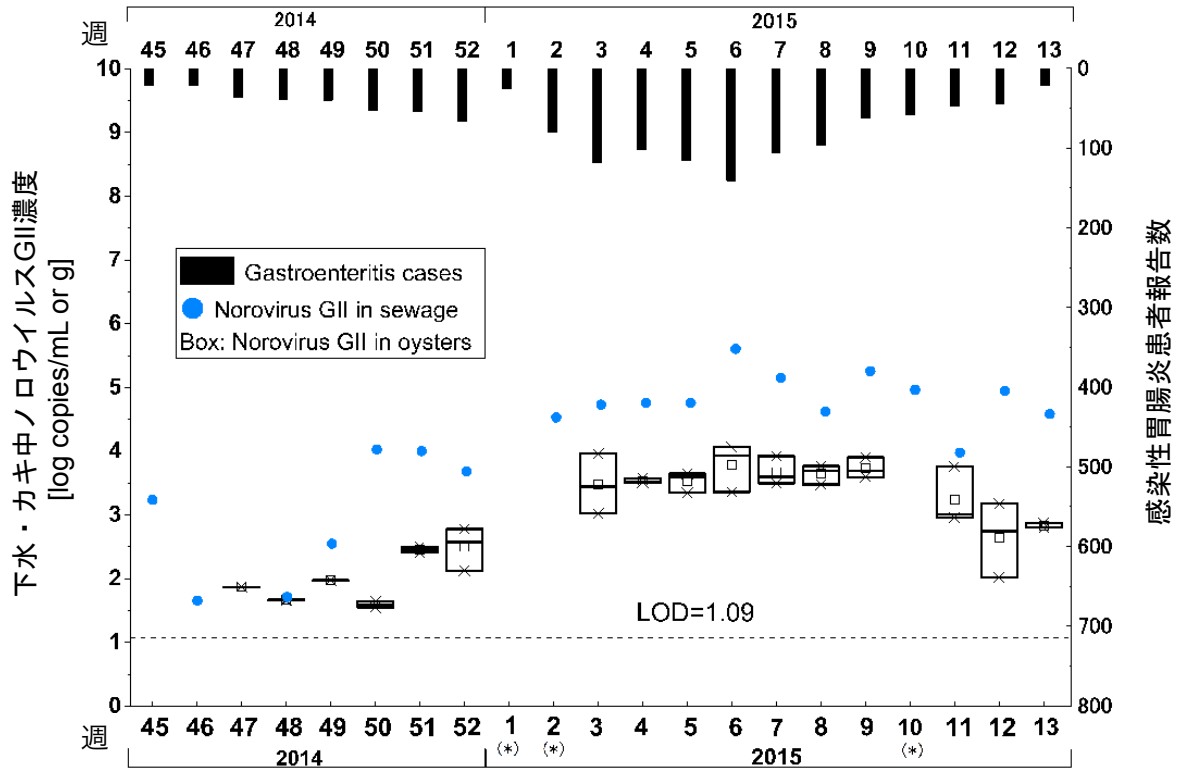
国立感染症研究所 感染症疫学センター，ノロウイルス等検出速報，2018年6月13日現在

- 2017−2018シーズンは，GII.4 (Sydney 2012)が主要な遺伝子型であり，続いてGII.2とGII.17が多く検出されていた

ノロウイルスの水環境中動態



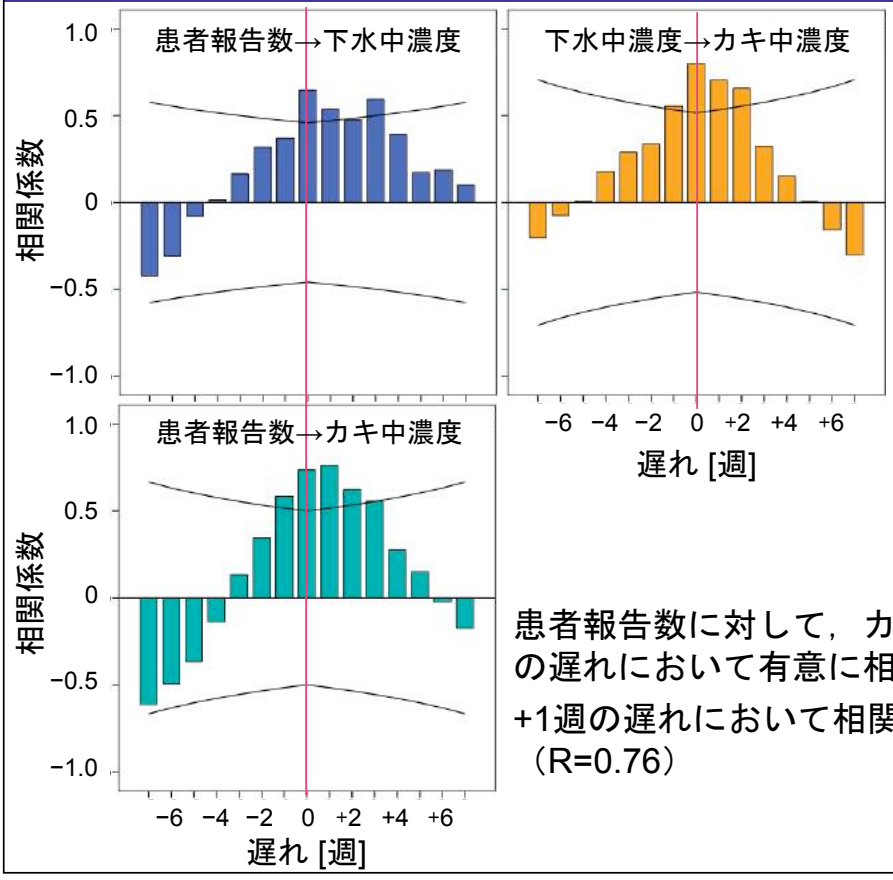
カキにおけるノロウイルス濃度の変動



- カキのノロウイルスGII濃度は，下水中濃度と共に変動

Pu et al. 2018

患者報告数と下水・カキ中NoV GII濃度の相互相関分析



下水中濃度に対して，カキ中濃度は0～+2週の遅れにおいて有意に相関

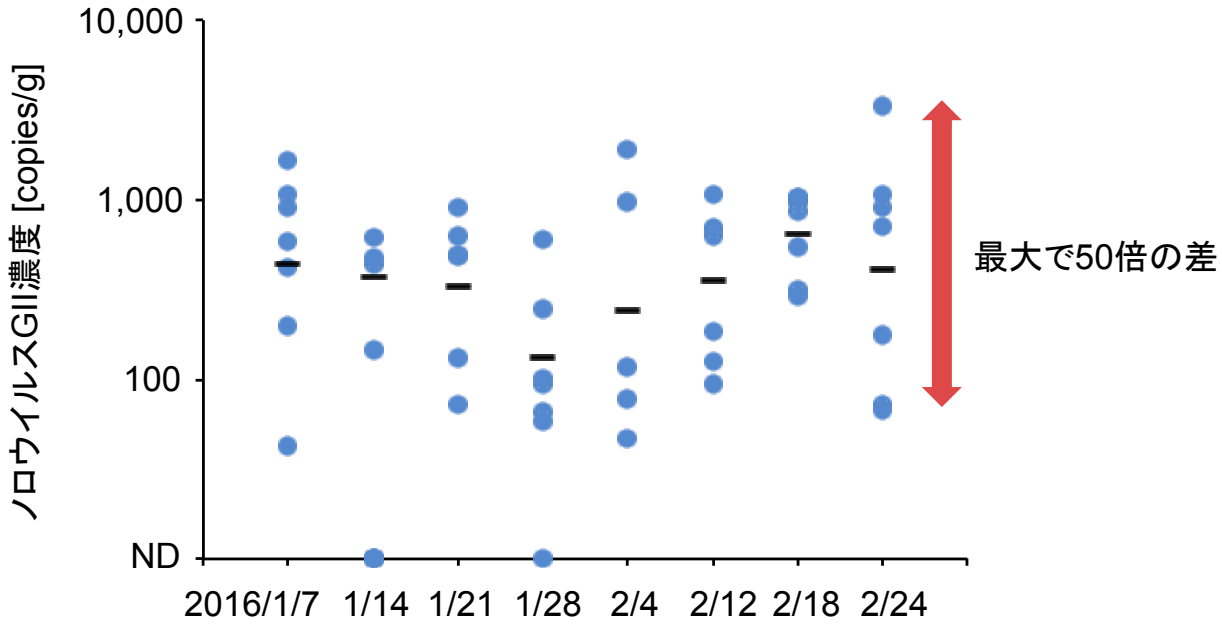
患者報告数に対して，カキ中濃度は−1～+2週の遅れにおいて有意に相関

+1週の遅れにおいて相関係数が最大（R=0.76）

Pu et al. 2018

カキにおけるノロウイルス濃度の個体差

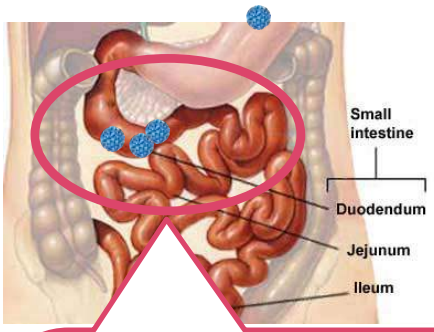
河口付近に設置した同じカキ棚から採取したカキ7個体のノロウイルスGII濃度

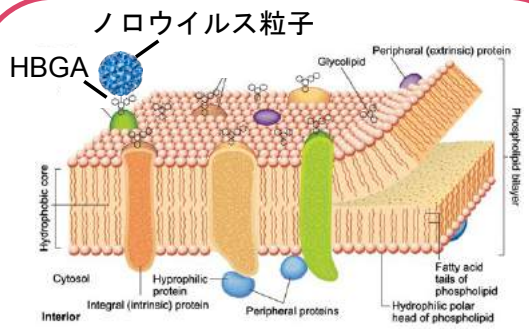


- カキ個体によってノロウイルスGII濃度は大きく異なっていた（不検出～3,000 copies/g）

カキへのノロウイルス蓄積メカニズム

ノロウイルスが特異的に結合する糖鎖

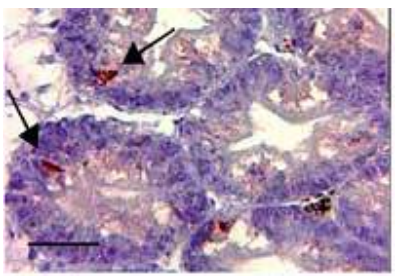




ノロウイルスは，組織血液型決定抗原（HBGAs）に特異的に結合する

Lindesmith et al. 2003

マガキ
（*Crassostrea gigas*）



ノロウイルスは，カキ消化組織上のA抗原類似糖鎖に特異的に結合する

Le Guyader et al. 2006；Maalouf et al. 2011

まとめ

- ☑ 下水にはノロウイルスGIIが最大10^5 copies/mLの濃度で含まれ，地域の胃腸炎患者報告数に対して遅れなく変動する
- ☑ 下水からは軽症の或いは無症状の感染者に由来する遺伝子型も含めて多様な遺伝子型が検出され，それらが経時的に変化する
- ☑ 膜分離活性汚泥（MBR）法による下水処理プロセスにおいて胃腸炎ウイルスは良好に除去されるが，ロタウイルスは活性汚泥への親和性が低く，ノロウイルスやサポウイルスと比較して除去性が低い
- ☑ 河川や湖沼等の表流水にはノロウイルスGIIが最大10^5 copies/Lの濃度で含まれ懸濁物質にも吸着して存在するが，ロタウイルスは溶存態として存在する割合が多い
- ☑ 2018年1月に採水された国内21箇所の浄水場原水から検出されたノロウイルスGII株の多くは，GII.4 Sydney2012に近縁な株だった

まとめ（つづき）

- ☑ カキのノロウイルスGII濃度は，下水のノロウイルス濃度に対して0～+2週の遅れ，患者報告数に対して−1～+2週の遅れにおいて有意に相関する
- ☑カキ個体によってノロウイルスGII濃度は大きく異なっており（不検出～3,000 copies/g），カキ消化組織の糖鎖発現量の違いが影響している可能性がある
- ☑ 植物・動物プランクトン画分からノロウイルスGIIが最大10^4 copies/Lの濃度で検出された

謝辞

共同研究者

東京大学 大学院工学系研究科　風間しのぶ講師

国際連合大学 サステイナビリティ高等研究所　真砂佳史博士

東北大学 未来科学技術共同研究センター
今田義光氏，大村達夫教授

東北大学 大学院医学系研究科
当广謙太郎博士，真中太佳史氏，劉暁芳博士，
斉藤繭子准教授，押谷仁教授

東北大学 大学院工学研究科
Mohan Amarasiri助教，佐野大輔准教授

東洋大学 情報連携学部情報連携学科　浦剣助教

山形大学 農学部　渡部徹教授

愛媛大学 大学院理工学研究科　渡辺幸三教授

東京工業大学 環境・社会理工学院　藤井学准教授

Ifremer
Mr. Julien Schaeffer, Ms. Cécile Le Mennec,
Mr. Sylvain Parnaudeau, Mr. Jean-Claude Le Saux,
Dr. Françoise S. Le Guyader