

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「持続可能な水利用を実現する革新的な  
技術とシステム」  
研究課題「迅速・高精度・網羅的な病原微生物  
検出による水監視システムの開発」

## 研究終了報告書

研究期間 平成23年10月～平成29年3月

研究代表者：大村達夫  
(東北大学未来科学技術共同  
研究センター、教授)

## 目次

### § 1. 研究実施の概要

1. 実施概要
2. 顕著な成果
  - (1) 優れた基礎研究としての成果
  - (2) 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果

### § 2. 研究実施体制

1. 研究チームの体制について
2. 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

### § 3. 研究実施内容及び成果

1. 病原微生物の網羅的同定・絶対定量技術開発(東北大学 大村グループ)【研究項目1】
2. リスク評価に基づいた監視項目, 体制の確立(山形大学 渡部グループ)【研究項目2】
3. 迅速な病原微生物スクリーニング技術開発(東北大学 大村グループ)【研究項目3】
4. 水監視による感染症流行検知システム構築(東北大学 押谷グループ)【研究項目4】
5. 開発した手法

### § 4. 成果発表等

1. 原著論文発表
2. その他の著作物(総説, 書籍など)
3. 国際学会発表及び主要な国内学会発表
  - (1) 招待講演
  - (2) 口頭発表
  - (3) ポスター発表
4. 知財出願
  - (1) 国内出願
  - (2) 海外出願
  - (3) プログラムの著作物
  - (4) データベースの著作物
5. 受賞・報道等
  - (1) 受賞
  - (2) マスコミ(新聞・TV等)報道
  - (3) その他
6. 成果展開事例
  - (1) 実用化に向けての展開
  - (2) 社会還元的な展開活動
  - (3) 他分野への波及効果

### § 5. 研究期間中の活動

1. 主なワークショップ, シンポジウム, アウトリーチ等の活動

### § 6. 最後に

## § 1. 研究実施の概要

### 1. 実施概要

本研究プロジェクトの最終目標である感染性胃腸炎の流行防止のための水監視システムの構築に向けて、大村グループでは「病原微生物の網羅的同定・絶対定量技術開発」および「迅速な病原微生物スクリーニング技術開発」、渡部グループでは「リスク評価に基づいた監視項目、体制の確立」、押谷グループでは「水監視による感染症流行検知システム構築」を行った。

2013年4月から2016年3月にかけて実施した下水処理場でのノロウイルスモニタリングの結果、下水中のウイルス濃度を頻繁に測定することで現行の医療機関の報告に基づく監視システムよりも早期に感染性胃腸炎の流行を検知できる可能性が示された。また、検出されたノロウイルスの遺伝子型をパイロシーケンサーを用いて網羅的に解析し、地域で発生した感染性胃腸炎患者から検出された遺伝子型と比較したところ、下水中には患者と同一の株や遺伝子型が含まれ、それが経時的に変化していた。以上の結果から、下水中のウイルス濃度という量的な情報に加えて、株や遺伝子型という質的な情報は、処理区域内で発生した感染性胃腸炎の流行状況を把握するのに有用であることが示された。この成果は、下水試料を分析した大村グループと患者便試料を分析した押谷グループの協同による研究成果である。

渡部グループでは、水監視システムにより流域における感染性胃腸炎患者数が減少する波及効果として、養殖海域に流入する病原ウイルスの減少効果を評価することを目的にカキのモニタリングを行った。プロテナーゼ K、アミラーゼ、リパーゼの3種の酵素を用いた高感度なカキからのノロウイルス回収法を開発したことにより、低濃度域(およそ 100 copies/g)も含めたモニタリングが可能となった。このことにより、カキ中のノロウイルス濃度は、下水中のノロウイルス濃度と有意に相関することが初めて示された。さらに、カキ中のノロウイルスの遺伝子型を大村グループが開発したパイロシーケンシング法で網羅的に解析したところ、地域の患者や下水から検出されたノロウイルスと同一の遺伝子型が検出された。すなわち、地域の感染性胃腸炎患者数を低減することで、養殖カキ中のノロウイルス濃度も低減する波及効果が期待できることが示された。

大村グループでは、流入下水中において存在比の小さいヒト腸管系ウイルスを網羅的に検出することを目的として、RNAウイルスを特異的に回収する手法を独自に開発し、ウイルスメタゲノム解析を行った。その結果、本手法を適用しない場合と比べて85倍以上の効率でウイルス遺伝子を検出し、また6倍以上の効率でヒトウイルス遺伝子を検出することができた。ウイルスに分類された配列のうち62%がヒトウイルスであり、8種のヒト腸管系ウイルスが検出された。また、流入下水試料から多数の病原ウイルスを同時に定量検出することを目的として開発・最適化したMFqPCR法を2013年4月から2016年3月にかけて収集した下水試料(N=72)に適用した結果、アデノウイルス、アイチウイルス、エンテロウイルス、A型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、ヒトパレコウイルス、ノロウイルスの濃度変動が明らかになった。

また渡部グループでは、地域社会での感染性胃腸炎の流行を把握するための感染伝播モデル開発を行った。研究対象地域において衛生意識に関するアンケート調査を行い、その結果に基づき、まずは二次感染の可能性が最も高い家庭内での感染伝播モデルを開発した。さらに、モデルを地域社会に拡張するために、家庭の外での感染伝播の機会が多いと予想できる保育園や幼稚園を取り上げて、保育士や幼稚園教諭に対するアンケートによりモデルのパラメータ値を決定し、ノロウイルス感染伝播のシミュレーションが可能となった。総員4人以上で幼児が存在する家族では家庭内二次感染リスクは一次感染リスクの10倍以上であること、吐瀉物由来の感染リスクは糞便由来の1/100程度であることなどが明らかとなった。

押谷グループでは、ロタウイルスワクチン導入後の経時的なロタウイルス流行パターンの変化について、患者および下水検体を用いて調査した。ワクチン導入後、ロタウイルス感染患者数の減少に加え、患者検体におけるロタウイルス遺伝子型の変化が見られた。一方、下水中でも明らかな遺伝子型の変化が認められたが、ピーク時の下水中ウイルス濃度に大きな変化は認められなかったため、軽症あるいは無症候感染者によるロタウイルス感染伝播が疑われた。ワクチン導入後の地域におけるロタウイルス流行状況の調査を通じて、患者及び下水の詳細なモニタリングが有用であることが実証された。

## 2. 顕著な成果

### (1) 優れた基礎研究としての成果

#### ① 環境試料に含まれるノロウイルスの網羅的な遺伝子型解析を目的としたパイロシーケンシング法の開発

概要:パイロシーケンサーを用いて流入下水およびカキ試料に含まれるノロウイルスの遺伝子の一部を RT-PCR により増幅し、得られた増幅産物に含まれる塩基配列をパイロシーケンサー (GS Junior system, Roche Applied Science)を用いてを網羅的に検出する手法を世界で初めて確立した。本手法を用いることで、これまでのサンガーシーケンシング法では検出できなかったマイナーな遺伝子型も含めて、ノロウイルスの遺伝子型分布を明らかにすることができた。下水中のノロウイルスを監視することで、地域におけるノロウイルス感染症の発生状況を遺伝子型レベルで経時的に把握できることを証明した。

#### ② 下水中のポリ A 鎖を有する 1 本鎖(+)RNA ウイルスの選択的メタゲノム解析手法の開発

概要:下水中において存在比の小さいヒト腸管系ウイルスを網羅的に検出することを目的として、ポリ A 鎖を有する RNA ウイルスを特異的に回収する手法を用いてメタゲノム解析を行った。その結果、本手法を適用せず全ウイルスゲノムを検出対象としたこれまでの手法と比べて 85 倍以上の効率でウイルス遺伝子を検出し、また 6 倍以上の効率でヒトウイルス遺伝子を検出することができた。ウイルスに分類された配列のうち 62%がヒトウイルスであり、8 種のヒト腸管系ウイルスが検出された。

#### ③ 下水および患者便試料から検出されたロタウイルスの分子疫学

概要:ワクチン導入後のロタウイルス流行パターンの変化について、患者検体および下水試料を用いて調査した。ワクチン導入後、ロタウイルス感染患者数の減少に加え、患者検体におけるロタウイルス遺伝子型の変化が見られた。一方、下水中でも明らかな遺伝子型の変化が認められたが、下水中ウイルス濃度に変化は認められなかった。下水試料中のロタウイルス濃度の測定により、医療機関では検知できない軽症あるいは無症候感染者によるロタウイルス感染伝播の継続が推定された。

### (2) 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果

#### ① 下水中ノロウイルス濃度モニタリングによる感染性胃腸炎流行の早期検知

概要:数多く存在するノロウイルスの定量系の中から検出感度が最も優れた系を評価・選定し、2013 年 4 月から 2016 年 3 月にかけて毎週収集した 154 検体の下水試料中のノロウイルス濃度を測定した。下水中ノロウイルス濃度と地域の感染性胃腸炎患者報告数について相互相関分析を行った結果、二つの時系列データはラグがなく有意に相関することが証明された。すなわち、下水中のノロウイルス濃度を頻繁に測定することで現行の医療機関の報告に基づく監視システムよりも早期に感染性胃腸炎の流行を検知できる水監視システムの科学的根拠が得られた。

#### ② ノロウイルス感染伝播モデルの開発

概要:ノロウイルスの二次感染(人から人への感染)の可能性を考慮して、家庭内および幼児施設内での感染伝播モデルを開発した。衛生意識に関するアンケート調査にもとづいて、パラメータ値を決定することにより、ノロウイルス感染伝播のシミュレーションが可能となった。総員 4 人以上で幼児が存在する家族では家庭内二次感染リスクは一次感染リスクの 10 倍以上であること、吐瀉物由来の感染リスクは糞便由来の 1/100 程度であることなどが明らかとなった。

#### ③ 下水から検出されたロタウイルス遺伝子型解析に基づくワクチンの有効性評価

概要:2011 年にロタウイルスワクチンが導入された後、2012 年から 2015 年にかけてロタウイルス感染患者数が減少した。2012-2013 年に患者検体で主流であった遺伝子型 G1P[8]は 2014 年以降ほとんど検出されなくなり、G2P[4]型や G9P[8]型の小規模な流行が確認された。パイロシーケンサーによる下水試料の解析においても、検出される遺伝子型に患者検体と同様の変化が観察さ

れた。軽症あるいは無症候性の流行の継続が示唆され、下水試料を用いた監視システムの重要性が示された。

### § 3. 研究実施体制

#### 1. 研究チームの体制について

##### (1)「大村」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
大村 達夫	東北大学未来科学技術 共同研究センター	教授	H23.10～H29.3
原田 秀樹	東北大学未来科学技術 共同研究センター	教授	H23.10～H29.3
風間 しのぶ	東北大学未来科学技術 共同研究センター	助教	H25.4～H29.3
今田 義光	東北大学未来科学技術 共同研究センター	技術補佐員	H24.4～H29.3
沖村 容子	東北大学未来科学技術 共同研究センター	技術補佐員	H24.4～H29.3
寺下 奈緒	東北大学未来科学技術 共同研究センター	技術補佐員	H28.4～H29.3
西村 修	東北大学 大学院工学研究科	教授	H23.10～H29.3
久保田 健吾	東北大学 大学院工学研究科	准教授	H23.10～H29.3
真砂 佳史	国連大学サステイナビ リティ高等研究所	リサーチフェロー	H23.10～H29.3
三浦 尚之	国立保健医療科学院	主任研究官	H27.7～H29.3
植木 洋	宮城県 保健環境センター	上席主任研究員	H23.10～H29.3
上村 弘	宮城県 保健環境センター	上席主任研究員	H23.11～H25.3
羽鳥 伸吾	東北大学 大学院工学研究科	M1～M2	H28.1～H29.3
竹村 泰幸	東北大学 大学院工学研究科	D1～3	H24.4～H27.3
稲葉 愛美	東北大学未来科学技術 共同研究センター	産学官連携研究員	H26.4～H28.3
三原 さくら	東北大学未来科学技術 共同研究センター	技術補佐員	H24.4～H27.3
三浦 麻子	東北大学未来科学技術 共同研究センター	技術補佐員	H27.9～H28.3
沼澤 聡	東北大学 大学院工学研究科	M1～M2	H23.10～H25.3
松橋 仁	東北大学 大学院工学研究科	M2	H24.4～H25.3
高橋 洋	東北大学 大学院工学研究科	M2	H24.4～H25.3

勝又 雅博	東北大学 大学院工学研究科	M1～M2	H25.4～H27.3
-------	------------------	-------	-------------

研究項目

- ・タスク1:病原微生物の網羅的同定・絶対定量技術開発
- ・タスク3:迅速な病原微生物スクリーニング技術開発

(2)「押谷」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
押谷 仁	東北大学 大学院医学系研究科	教授	H23.10～H29.3
鈴木 陽	東北大学病院 小児科	助教	H23.10～H29.3
斉藤 繭子	東北大学 大学院医学系研究科	准教授	H25.10～H29.3
古瀬 祐気	東北大学 大学院医学系研究科	助教	H26.4～H29.3
相馬 奈央	東北大学 大学院医学系研究科	産学官連携研究員	H24.6～H25.10
今川 稔文	浜松医科大学大学院医学系 研究科感染症学講座ウイルス学・寄生虫学分野	特任研究員	H24.4～H29.3
伊藤 久美	東北大学 大学院医学系研究科	技術補佐員	H23.11～H25.4
関根 雅夫	仙台市役所		H24.4～H27.2
Rungnapa Malasao	東北大学 大学院医学系研究科	学生 D1～D4	H25.4～H28.3
Natthawan Chaimongkol	東北大学 大学院医学系研究科	学生 D1～D4	H25.4～H28.3
当广 健太郎	東北大学 大学院医学系研究科	助教	H25.7～H29.3
劉 曉芳	東北大学 大学院医学系研究科	産学官連携研究員	H25.7～H29.3
岡部 みどり	東北大学 大学院医学系研究科	研究支援員	H26.4～H29.3
真中 太佳史	東北大学 大学院医学系研究科	学生 M1～M2	H27.4～H29.3
徐 航	東北大学 大学院医学系研究科	学生 M1～M2	H28.4～H29.3

研究項目

- ・タスク4:水監視による感染症流行検知システム構築

(3)「渡部」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
渡部 徹	山形大学農学部	教授	H23.10～H29.3

福士 謙介	東京大学サステイナビリティ学連携研究機構	教授	H23.10~H29.3
伊藤 紘晃	熊本大学大学院自然科学研究科	助教	H24.4~H29.3
Psyche Fontanos	東京大学サステイナビリティ学連携研究機構	特任研究員	H24.10~H26.3
Tran Anh Thuy	東京大学大学院工学系研究科	D1~D3	H24.10~H29.3
西前 駿太郎	東京大学大学院工学系研究科	M1~M2	H25.4~H27.3
小澤 耕平	山形大学大学院農学研究科	B4~M2	H24.4~H27.3
星 健太	山形大学農学部	B4	H24.4~H25.3
熊谷 卓也	山形大学農学部	B3~B4	H25.1~H26.3
櫻庭 敬之	山形大学大学院農学研究科	B3~M2	H25.1~H28.3
高田 優生	山形大学農学部	B3~B4	H25.1~H26.3
有坂 知朗	山形大学農学部	B3~B4	H25.9~H27.3
益子 拓磨	山形大学農学部	B3~B4	H25.9~H27.3
于 双	山形大学農学部	B3~B4	H25.9~H27.3
三浦 郁修	東京大学大学院工学系研究科	B4~M2	H26.4~H29.3
高橋 智香	山形大学農学部	B4	H26.6~H27.3
金谷祐里	山形大学大学院農学研究科	B4~M2	H26.6~H29.3
伊藤 絵里香	山形大学大学院農学研究科	B3~M1	H26.10~H29.3
倉島 須美子	山形大学農学部	B3~B4	H26.10~H28.3
三浦 逸実	山形大学大学院農学研究科	B3~M1	H26.10~H29.3
Yunita Ajeng Nurmangirasari	山形大学農学部	B4	H26.10~H27.8
Nguyen Thanh Gia	岩手大学大学院連合農学研究科	D1~D2	H27.4~H29.3
Pham Duy Dong	岩手大学大学院連合農学研究科	D1~D2	H27.4~H29.3
Nabila Dhyan Azraini	山形大学農学部	B4	H27.10~H28.7
Ermaya Eka Cahyaningrum	山形大学農学部	B4	H27.10~H28.7
市橋 永吉	山形大学農学部	B3~B4	H27.10~H29.3
蔡 佳	山形大学農学部	B3~B4	H27.10~H29.3
浦 剣	山形大学農学部	助教	H27.10~H29.3

#### 研究項目

- ・タスク2:リスク評価に基づいた監視項目,体制の確立

## 2. 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

### (1) 研究チーム全体

1. バルセロナ大学（2015年5月27日）およびシンガポール国立大学（2015年12月17日）で国際ワークショップを開催し、水監視システムの開発に関する研究成果を発表すると同時に、バルセロナ大学の Prof. Joan Jofre, Prof. Albert Bosch, Prof. Rosa Pinto およびシンガポール国立大学の Dr. Jiangyong Hu らと学術交流を深めた。また、2016年9月12日には東北大学で国際ワークショップを開催し、Prof. Joan Jofre, Prof. Albert Bosch, Prof. Rosa Pinto, アメリカ疾病管理予防センターの Dr. Jan Vinje, およびフランス海洋開発研究所 (Ifremer) の Dr. Françoise S. Le Guyader にノロウイルスや A 型肝炎ウイルスのリスク管理について、最新の知見を講演して頂いた。
2. 本研究プロジェクトの成果である水監視システムの社会実装を目指して、仙台市建設局下水道計画課、仙台市健康福祉局保健所および衛生研究所、日水コンと協議をし、平成 29 年度において水監視システム実証研究に関する共同事業を行うこととなった。

### (2) 「押谷」グループ

1. 米国のジョンスホプキンス公衆衛生大学院の Robert Gilman 教授が海外研究拠点としているカエタノ大学（ペルー）の研究室に対し、ペルーにおけるサポウイルスとノロウイルスの遺伝子解析技術の提供を行っている。これまで発展途上国ではほとんど報告がないサポウイルスの診断と遺伝子解析について技術や知識を提供し、小児下痢症におけるサポウイルス感染についての疫学研究成果を国際的学術雑誌に発表した。今後も、日本とペルー両国で検出されたサポウイルスの遺伝子型比較を行い、共同で研究成果を発表していく予定である。本研究で開発したノロウイルスの遺伝子診断の効率を高められるプライマーについても、多様性に富むペルーの糞便検体と日本で検出された糞便検体を用いて検出効率の検討を進めており、2014年10月に米国 NIH で行われた NIH-Japan-JSPS Symposium 2014 にて共同で発表を行った。また、検体数を増やして感度特異度分析を行った結果を、2016年8月に青森県十和田市で行われた第70回日本細菌学会東北支部総会にて発表した。
2. J-GRID (Japan Initiative for Global Research Network on Infectious Diseases and Grants-in-Aid) において、東北大学は海外研究拠点としてフィリピンの Research Institute for Tropical Medicine (RITM) と共同研究を行っている。RITM でもロタウイルスサーベイランスが行われており、RITM スタッフが東北大学での研修に来日した際に、ロタウイルスの遺伝子解析手法について技術提供を行った。

### (3) 「渡部」グループ

1. インドネシア・ガジャマダ大学からの交換留学生に、本研究課題の活動に参加してもらった縁で、先方の大学の教員とのネットワークが形成された。
2. 本研究のコンセプトを活かして、ベトナム・フエ市における胃腸炎流行を、市街地の下流に生息する牡蠣のノロウイルスをモニタリングすることで評価する試みを、当地のフエ大学との共同研究として開始した。

## § 3. 研究実施内容及び成果

### 1. 病原微生物の網羅的同定・絶対定量技術開発(東北大学 大村グループ) 【研究項目1】

#### (1) 研究のねらい

感染症流行検知のための水監視システムでは、幅広い病原微生物の中から健康リスク、存在量を尺度として監視対象とする微生物を選択することが求められるが、現在用いられている検出技術では、このような多様かつ極低濃度の病原微生物を検出することは不可能である。タスク1では、次世代シーケンシング技術を用いて環境試料(流入下水や牡蠣)中の病原微生物を網羅的に同定する技術、および極低濃度の遺伝子を定量する技術の開発を行う。



## (2) 研究実施方法

### ① 下水中のポリ A 鎖を有する 1 本鎖(+)RNA ウイルスの選択的メタゲノム解析

下水中において存在比の小さいヒト腸管系ウイルスを網羅的に検出するためには、その対象ウイルスに対して特異的にメタゲノム解析する必要がある。そこで、多くのヒト腸管系ウイルスがポリ A 鎖を有する 1 本鎖(+)RNA ウイルスという特徴を利用し、それらを特異的に回収する手法を開発し、メタゲノム解析を行った。下水試料として 2016 年 1 月に宮城県内の下水処理場において採取した流入下水 600 mL を用いた。ポリエチレングリコール沈殿法および超遠心法にて下水試料を濃縮し、ウイルス RNA を抽出した後、全ウイルス RNA からポリ A 鎖を有する RNA を精製した。精製した RNA に対してランダムプライマーを用いて逆転写および増幅し、得られた増幅産物を MiSeq (Illumina) に供して塩基配列を取得した。また、本手法の効果を確認するため、ポリ A 鎖を有する RNA を精製せずに、全ウイルス RNA に対してメタゲノム解析した結果と比較した。

### ② 下水中のノロウイルス濃度モニタリング

数多く存在するノロウイルスのリアルタイム PCR 法による定量系の中から検出感度が最も優れた系を糞便および下水試料を用いて評価・選定した。2013 年 4 月から 2016 年 3 月に宮城県内の下水処理場において、週に 1 度の頻度で流入下水試料を採水した。下水試料 40 mL をポリエチレングリコール沈殿法で濃縮し、核酸抽出および逆転写反応を行い、ノロウイルスの濃度を選定したリアルタイム PCR 法により測定した。下水中ノロウイルス濃度の変動と地域における感染性胃腸炎患者報告数の変動の類似度を評価するために、下水中ノロウイルス濃度と塩釜保健所管内(松島町を含む 13 市町村)で報告された疫学週毎の感染性胃腸炎患者数との相互相関分析を行った。

### ③ パイロシーケンシング法を用いたノロウイルスの網羅的な遺伝子型解析

下水試料からノロウイルスの遺伝子の一部を RT-PCR により増幅し、得られた増幅産物に含まれる塩基配列をパイロシーケンサー (GS Junior system, Roche Applied Science) を用いて解析する手法を開発した。2013 年 4 月から 2016 年 3 月にかけて収集した下水試料から、1 または 2 ヶ月間隔で 1 検体を選択し、開発した手法を用いてノロウイルスの遺伝子型を解析した。また、押谷グループの協力を得て、同時期に同地域の 2 ヶ所の外来医院において胃腸炎患者便を収集し、ノロウイルス陽性試料をスクリーニングした。陽性試料は、サンガー法でシーケンシングし、ノロウイルスの遺伝子型を決定した。さらに、下水および患者便試料から取得した配列を対象に最尤法 (Kimura 2-paramer 法) により系統樹解析を行った。

### ④ MFqPCR 法を用いた下水中のヒト腸管系ウイルスモニタリング

下水中に含まれるアデノウイルス、アイチウイルス、エンテロウイルス、A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルス、ヒトパレコウイルス、ノロウイルス GI, GII, GIV, およびプロセスコントロールとして添加するメンゴウイルスとマウスノロウイルスを一斉に定量検出する Microfluidic quantitative PCR (MFqPCR) 法を開発した。2013 年 4 月から 2016 年 3 月にかけて収集した下水試料から、隔週で 1 検体を選択し (N=72), 開発した手法を用いて 11 種類のウイルスを定量検出した。

## (3) 研究成果

### ① 下水中のポリ A 鎖を有する 1 本鎖(+)RNA ウイルスの選択的メタゲノム解析

多くのヒト腸管系ウイルスがポリ A 鎖を有する 1 本鎖(+)RNA ウイルスという特徴を利用し、それらを特異的に回収してメタゲノム解析する手法を開発した。図 1-1 にメタゲノム解析で得られた配列の分類とその配列数の割合を示す (a は本手法を適用した場合の結果, b は適用しなかった場合の結果)。本手法で得られた遺伝子配列 (649,775 配列) のうち 8.5% (55,392 配列) がウイルスと同定され (図 1-1a), そのうちヒトウイルスは 62% (34,336 配列), ヒト以外の動物ウイルスが 0.01% (6 配列), 植物ウイルスが 1% (598 配列), バクテリオファージが 0.07% (37 配列), および宿主不

明のウイルスが 37% (20,393 配列) だった。一方で、本手法を適用せずに同サンプルを解析した結果、得られた配列 (278,778 配列) のうち 0.1% (113 配列) がウイルスと同定され (図 1-1b), そのうちヒトウイルスは 10% (11 配列), 植物ウイルスが 72% (82 配列), 宿主不明の未分類ウイルスが 19% (21 配列) だった。

表 1-1 には、本手法により検出されたウイルスの分類とその配列数を示す。2016 年 3 月の下水試料から最も多く検出されたウイルスはノロウイルスであり、同サンプルからはリアルタイム PCR 法によっても高濃度 (下水中に  $10^4$  copies/mL) でノロウイルスが検出された。*Mamastrovirus* については 3 種が検出されたが、*Mamastrovirus 6* は Human astrovirus MLB1 に分類され、*Mamastrovirus 8* は Human astrovirus MLB2 に分類された。これらは近年新たな系統として報告されており、日本においても患者数の増加に伴い環境水中からも検出されている。また、未分類ウイルスとして、これまで日本では検出報告のない Lavierivirus UC1, Micalovirus SF1, および Marine RNA virus SF-2 と、我々の研究グループの報告<sup>2)</sup>以外に日本では検出報告の無い Marine RNA virus SF-1, Picalivirus C および Niflavivirus が検出された。これらの結果から、本手法を用いることで下水中の相対的存在濃度が低いウイルスゲノムを効率的に検出できるようになり、これまで報告数が少ないヒト腸管系ウイルスや未分類ウイルスを含め人間社会に存在する種々なウイルスの網羅的検出が可能になった。

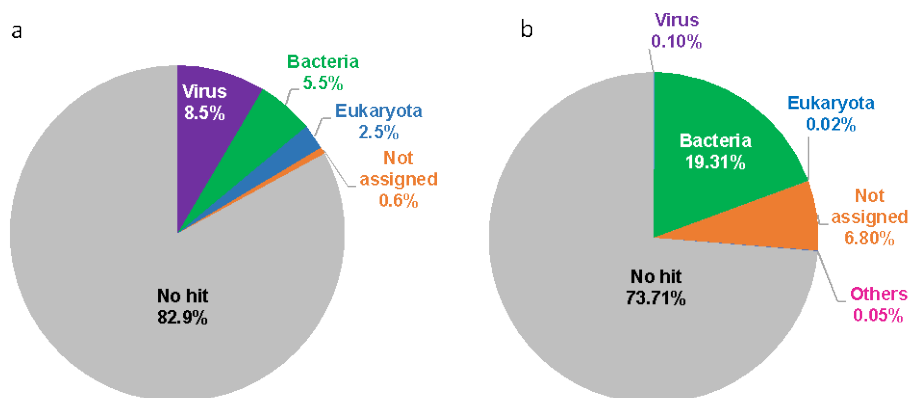


図 1-1. 下水試料のメタゲノム解析で得られた配列の分類と配列数の割合。ポリ A 鎖を有する RNA を特異的に回収する技術を適用した結果を a, 適用しなかった結果を b に示す。

表 1-1. 検出されたウイルスの分類と配列数

Genome	Host	Family	Genus	Species	Num of reads
(+)ssRNA	Human	<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus</i>	<i>Norwalk virus</i>	25,279
(+)ssRNA		unclassified (+)ssRNA viruses		Marine RNA virus SF-2	12,028
(+)ssRNA	Human	<i>Caliciviridae</i>	<i>Sapovirus</i>	<i>Sapporo virus</i>	8,197
		Unclassified virus		Laverivirus UC1	4,718
(+)ssRNA		unclassified (+)ssRNA viruses		Picalivirus B	2,411
		Unclassified virus		Micalovirus SF1	1,220
(+)ssRNA	Human	<i>Astroviridae</i>	<i>Mamastrovirus</i>	<i>Mamastrovirus 6</i>	798
(+)ssRNA	Plant	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Potexvirus</i>	<i>Cymbidium mosaic virus</i>	288
(+)ssRNA	Plant	<i>Secoviridae</i>	<i>Fabavirus</i>	<i>Broad bean wilt virus 2</i>	69
(+)ssRNA	Plant	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Potexvirus</i>	<i>Schlumbergera virus X</i>	57
(+)ssRNA	Plant	<i>Tymoviridae</i>	Unassigned	<i>Poinsettia mosaic virus</i>	49
(+)ssRNA	Human	<i>Astroviridae</i>	<i>Mamastrovirus</i>	<i>Mamastrovirus 8</i>	48
(+)ssRNA	Plant	<i>Potiviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Turnip mosaic virus</i>	41
(+)ssRNA	Plant	<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Carlavirus</i>	<i>Carrot carlavirus WM-2008</i>	36
dsDNA	Bacteria	<i>Myoviridae</i>	<i>T4-like virus</i>	<i>Enterobacteria phage RB59</i>	30
(+)ssRNA		<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Carlavirus</i>	<i>Garlic latent virus</i>	29
(+)ssRNA	Plant	<i>Potiviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Watermelon mosaic virus</i>	18
(+)ssRNA	Plant	<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Carlavirus</i>	<i>Shallot latent virus</i>	11
(+)ssRNA		unclassified (+)ssRNA viruses		Nifavirus	9
(+)ssRNA	Human	<i>Coronaviridae</i>	<i>Alphacoronavirus</i>	<i>Human cosavirus 229E</i>	7
(+)ssRNA	Human	<i>Astroviridae</i>	<i>Mamastrovirus</i>	<i>Mamastrovirus 1</i>	6
(+)ssRNA	Plant	<i>Secoviridae</i>	<i>Sadwavirus</i>	<i>Navel orange infectious mottling viru.</i>	6
(+)ssRNA		unclassified (+)ssRNA viruses		Picalivirus C	5
(+)ssRNA	Plant	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Potexvirus</i>	<i>Cactus virus X</i>	4
(+)ssRNA	Plant	<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Citivirus</i>	<i>Citrus leaf blotch virus</i>	3
(+)ssRNA	Murine	<i>Retroviridae</i>	<i>Gammaretrovirus</i>	<i>Moloney murine leukemia virus</i>	3
dsDNA	Bacteria	<i>Siphoviridae</i>	Unclassified <i>Siphoviridae</i>	<i>Staphylococcus phage SiB20</i>	3
(+)ssRNA	Murine	<i>Retroviridae</i>	<i>Gammaretrovirus</i>	<i>Abelson murine leukemia virus</i>	2
dsDNA	Bacteria	<i>Siphoviridae</i>	<i>Phietaiikevirus</i>	<i>Staphylococcus phage Ipla7</i>	2
(+)ssRNA	Plant	<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Carlavirus</i>	<i>Lily symptomless virus</i>	2
(+)ssRNA		unclassified (+)ssRNA viruses		Marine RNA virus SF-1	2
(+)ssRNA	Plant	<i>Potiviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potato virus Y strain NTN</i>	1
(+)ssRNA	Plant	<i>Potiviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Tulip band breaking virus</i>	1
(+)ssRNA	Plant	<i>Potiviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Lily mottle virus</i>	1
(+)ssRNA	Plant	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Potexvirus</i>	<i>Pepino mosaic virus</i>	1
dsDNA	Bacteria	<i>Siphoviridae</i>	<i>Lambdaliikevirus</i>	<i>Enterobacteria phage lambda</i>	1
(+)ssRNA	Plant	<i>Potiviridae</i>	<i>Macluravirus</i>	<i>Chinese yam necrotic mosaic virus</i>	1
(+)ssRNA	Human	<i>Picornaviridae</i>	<i>Cosavirus</i>	<i>Human cosavirus E</i>	1
dsDNA	Bacteria	<i>Siphoviridae</i>	Unclassified <i>Siphoviridae</i>	<i>Propionibacterium phage PHL113MC</i>	1
(+)ssRNA	Swine	<i>Hepeviridae</i>	<i>Hepevirus</i>	<i>Swine hepatitis E virus</i>	1
(+)ssRNA	Human	<i>Retroviridae</i>		<i>Human Endogenous retrovirus H</i>	1
(+)ssRNA	Plant	<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Carlavirus</i>	<i>Chrysanthemum Virus B</i>	1

② 下水中のノロウイルス濃度モニタリング

図 1-2 には、2013 年 4 月から 2016 年 3 月までの下水中ノロウイルス濃度 (GI および GII の合計濃度) と下水処理場の処理区域が含まれる保健所管内の感染性胃腸炎患者報告数の変動を示した。患者報告数が増加し始める 11 月頃から下水中ノロウイルス濃度も上昇し、12 月には  $10^3$  copies/mL 台となった。その後 1~2 月にピークを迎え、濃度の最大値は、2014 年は  $4.6 \log_{10}$  copies/mL、2015 年は  $5.6 \log_{10}$  copies/mL、2015 年は  $5.3 \log_{10}$  copies/mL だった。それから 6 月に掛けて、患者報告数と共に下水中濃度も減少する傾向が 3 シーズンで確認された。ノロウイルス GI 及び GII の陽性率はそれぞれ 60%、81% であり、濃度の常用対数の平均値および標準偏差は、それぞれ  $2.6 \pm 0.7$ 、 $3.4 \pm 1.0 \log_{10}$  copies/mL だった。

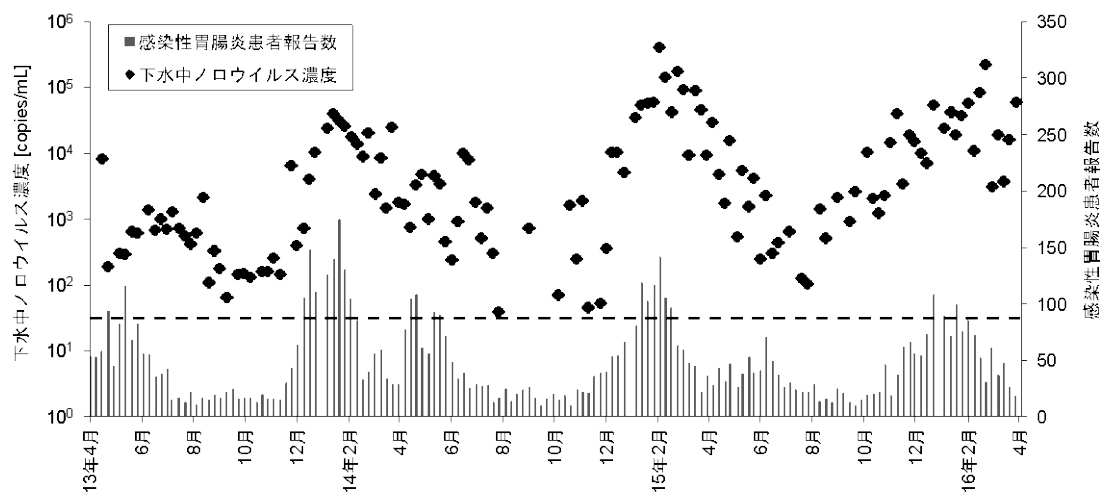


図 1-2. 下水中ノロウイルス濃度(◆)と胃腸炎患者報告数(棒グラフ)の変動。破線は、下水中ノロウイルスの検出下限値(およそ 32 copies/mL)を示す。

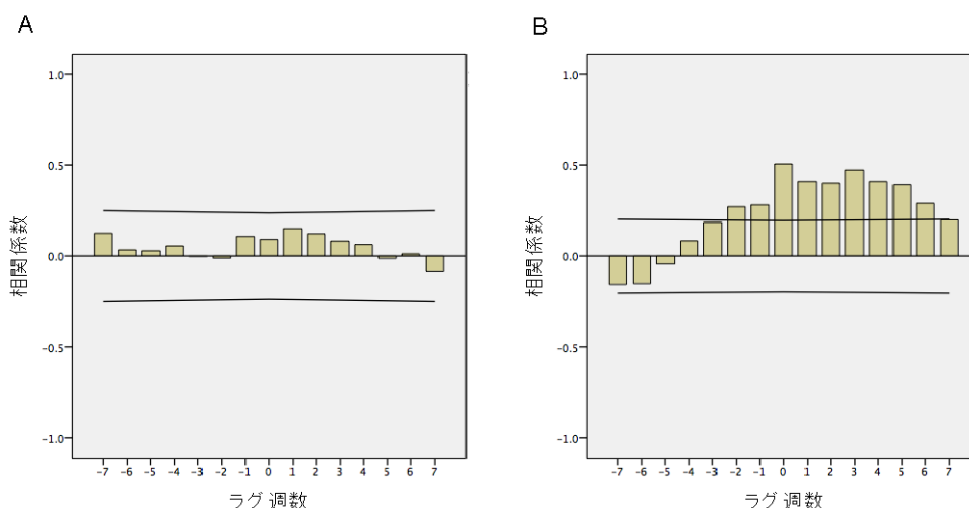


図 1-3. 胃腸炎患者報告数に対する下水中ノロウイルス濃度の相互相関分析結果。A: ノロウイルスGI濃度, B: ノロウイルスGII濃度。図中の横線は、「患者報告数と下水中ノロウイルス濃度が不関連しない」という仮説が、5%の確率で成立する範囲を示す。

下水中ウイルス濃度と患者報告数の2つの時系列データの類似度を評価するために相互相関分析を行った(図 1-3)。その結果、患者報告数と下水中ノロウイルス GI 濃度の間には、相関が認められなかった。一方で、下水中ノロウイルス GII 濃度は、塩釜保健所管内の患者報告数に対して、-2から+6週のラグにおいて有意な相関が見られ、ラグ0において相関係数が最大となった( $R = 0.51$ )。現行の感染性胃腸炎の監視システムは小児科定点の報告に基づいており、感染者が医療機関を受診しないと検知されない。また、患者報告数が集計・公表されるには1~2週間の時間を要する。一方で、下水中のウイルス濃度は、PEG沈殿法によるウイルス濃縮からリアルタイムPCR法による定量検出まで、およそ24時間で結果を得ることが可能である。相互相関分析の結果、ラグがない場合において相関係数が最も高くなったことは、患者数の増加と同時に下水中ウイルス濃度も上昇することを示している。したがって、下水中ウイルス濃度を頻繁に測定することで、医療機関の報告に基づく現在の監視システムよりも早期に流行を検知できることが示された。また、感染性胃腸炎の流行期である2015年11月から2016年2月の4ヶ月間は、週に2度(月曜および水曜)下水試料を採水し、翌日の夕方には下水中ノロウイルス濃度測定結果が得られることを確認した。

ノロウイルス GI 濃度との間には有意な相関が認められなかった一方で、GII 濃度とは有意な相関が見られた理由は、塩釜保健所管内の患者報告数において、GIよりもGIIの占める割合がはるかに大きかったことが原因と考えられた。下水試料におけるノロウイルス GI の陽性率は 60%で、GII (81%)と比較して低かったこと、また、タスク4のサーベイランスの結果から、ノロウイルスが陽性だった 74 の患者便試料のうち、GI 陽性が 13 検体しかなかったことから、調査対象期間は GI による感染者が少なく、さらに発症して医療機関を受診した患者も少なかったことがわかる。ノロウイルス GII 濃度は、患者報告数に対して、ラグが+1~+5 週の場合にも有意な相関が認められた理由としては、患者報告数は患者が医療機関を受診した週で集計されるのに対し、下水中濃度には感染者から発症後に 2~3 週間排出され続けるノロウイルスが積算されることが考えられた。

### ③ パイロシーケンシング法を用いたノロウイルスの網羅的な遺伝子型解析

下水試料からノロウイルスの遺伝子の一部を増幅し、得られた増幅産物に含まれる塩基配列をパイロシーケンサー (GS Junior system, Roche Applied Science) を用いて網羅的に解析する手法を開発した。その手法を用い、収集した下水試料 (1~2 ヶ月間隔で 1 検体を選択) からノロウイルスの遺伝子型を網羅的に検出・同定し、タスク4の課題1で収集・分析した胃腸炎患者便検体と比較した (2016 年 2~3 月の患者便検体は解析中)。その結果、GII.15 を除き患者便から検出された全ての遺伝子型 (10 遺伝子型) を含む 15 遺伝子型が下水から検出された (図 1-4)。検出された GII.17 株について系統樹解析を行った結果、患者から検出されたノロウイルス株は、同時期の下水から検出された株と同一のクラスターに含まれ、相同性が高いことが示された (図 1-5)。すなわち、下水試料を次世代シーケンサーで解析することで、地域におけるノロウイルスの流行状況を遺伝子型レベルで経時的に把握することができた。以上の結果より、下水中に含まれるウイルスの量的な情報と質的な情報は、集水地域で発生した感染性胃腸炎の流行状況を把握するのに有用であることが示された。

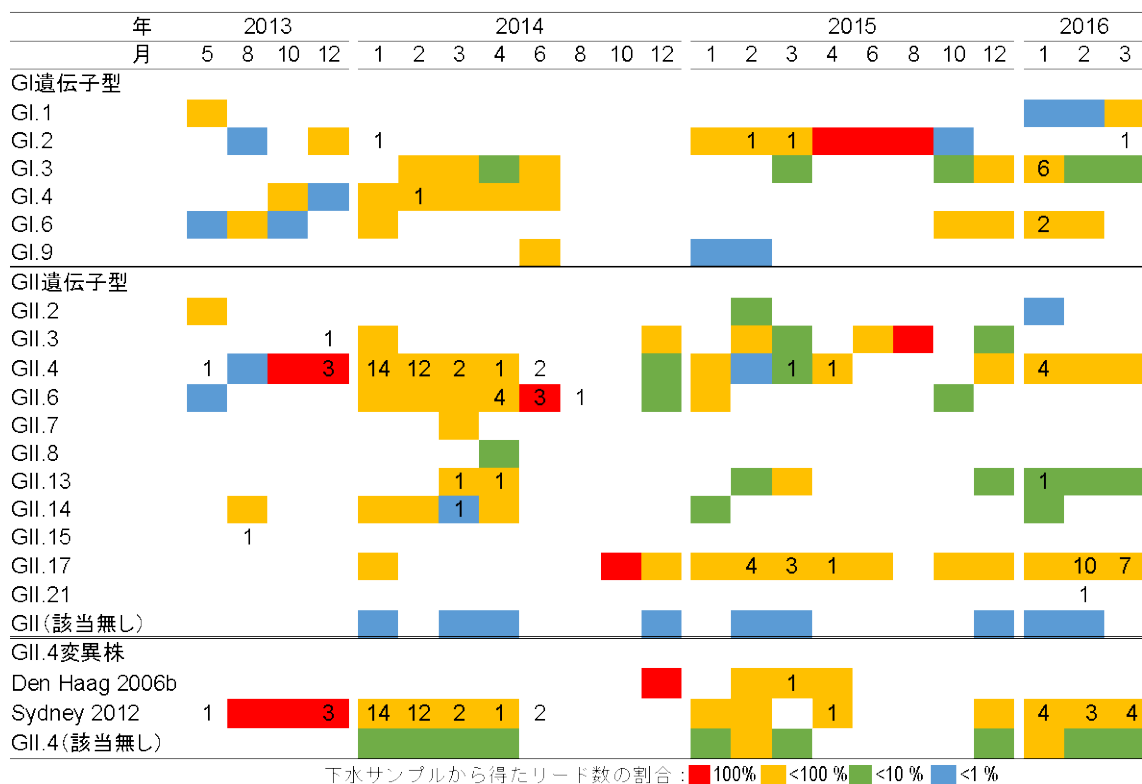


図 1-4. 下水および患者便試料から検出されたノロウイルスの遺伝子型分布。ヒートマップは下水から検出されたリード数割合、その中の数値は患者数を示す。

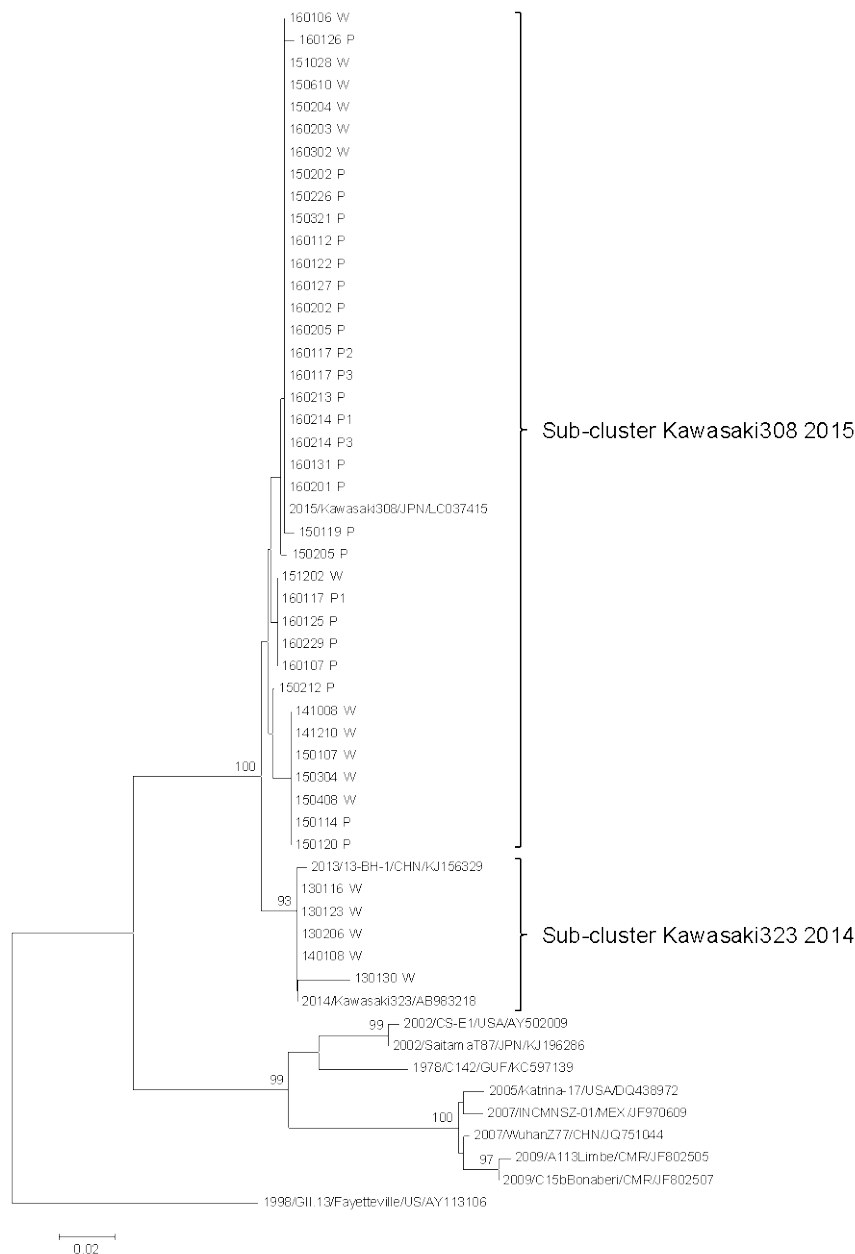


図 1-5. 下水および患者便試料から検出された GII.17 株の系統樹。本研究で検出された配列は、6桁の年月日 (yyymmdd で示した下水サンプリング日または患者の発症日) に続いて S (下水) あるいは P (患者) で示した。

#### ④ MFqPCR 法を用いた下水中のヒト腸管系ウイルスモニタリング

Ishii ら(2014) が開発した 11 種類のヒト腸管系ウイルスを一斉に定量検出できる MFqPCR 法に、近年新生児や乳児において敗血症や髄膜脳炎などの重篤な感染症を引き起こすことで注目されているヒトパレコウイルスを新たに検出対象に追加したアッセイを開発した。さらに E 型肝炎ウイルスに対するプライマーおよびプローブを選定し直し、検出感度を 10~100 倍向上させることに成功した。この改良した MFqPCR 法を 2013 年 4 月から 2016 年 3 月にかけて収集した流入下水試料 (N=72) に適用したところ、アデノウイルス、アイチウイルス、エンテロウイルス、A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルス、ヒトパレコウイルス、ノロウイルス、ロタウイルスの濃度変動が明らかになった (表 1-2)。また、改良した MFqPCR 法に検出対象として含めなかったアストロウイルスおよびサポウイルスについては、リアルタイム PCR 法の測定結果を表 1-2 にまとめて示した。

表 1-2. MFqPCR 法による下水試料からのヒト腸管系ウイルス一斉定量検出結果

採水日	下水中ウイルス濃度 [log copies/mL]											
	AdV	AiV	AstV*	EV	HAV	HEV	HPeV	NoV GI*	NoV GII*	NoV GIV	RV	SaV*
2013/4/10	1.4	3.0	2.6	ND	ND	ND	ND	3.4	2.3	ND	ND	3.1
2013/4/24	1.3	2.5	3.5	ND	ND	ND	ND	3.0	2.0	ND	ND	4.0
2013/5/8	2.0	3.0	3.6	ND	ND	ND	ND	3.2	2.6	ND	ND	ND
2013/5/22	ND	ND	3.6	ND	ND	ND	ND	3.3	2.8	ND	ND	ND
2013/6/12	3.9	2.5	2.8	ND	ND	ND	ND	3.1	3.7	ND	ND	1.8
2013/6/26	4.5	5.3	3.0	2.4	ND	ND	ND	1.4	3.7	ND	ND	1.5
2013/7/9	3.8	3.3	ND	3.1	ND	ND	ND	3.8	3.1	ND	ND	ND
2013/7/24	2.4	3.4	2.7	3.5	ND	ND	ND	2.9	3.3	ND	ND	ND
2013/8/14	3.6	3.4	ND	2.9	ND	ND	2.3	2.9	3.9	ND	ND	ND
2013/8/28	1.4	2.6	2.3	5.2	ND	ND	ND	2.7	1.9	ND	2.0	ND
2013/9/11	ND	2.6	ND	2.8	ND	ND	2.8	1.3	2.5	ND	ND	ND
2013/9/25	1.3	2.4	ND	3.6	ND	ND	2.7	2.7	2.2	ND	ND	ND
2013/10/9	ND	2.4	ND	2.8	ND	ND	ND	3.0	1.4	ND	ND	ND
2013/10/23	2.3	3.3	1.9	3.0	ND	ND	2.4	1.4	ND	ND	ND	5.3
2013/11/14	2.5	2.6	ND	3.3	ND	ND	1.9	1.0	2.6	ND	ND	ND
2013/11/27	1.7	2.8	2.5	3.2	ND	ND	ND	3.4	3.3	ND	1.9	3.1
2013/12/11	1.8	4.4	2.6	3.9	ND	ND	ND	1.8	4.1	ND	ND	3.1
2013/12/25	2.0	3.1	ND	3.2	ND	ND	ND	3.1	5.4	ND	ND	3.2
2014/1/15	2.7	5.5	ND	3.4	ND	ND	ND	5.3	6.1	ND	ND	2.4
2014/1/29	2.8	3.8	ND	3.2	2.6	ND	ND	5.1	5.6	1.9	2.4	2.5
2014/2/12	2.2	5.3	3.6	ND	ND	ND	ND	3.7	5.2	ND	2.5	1.7
2014/2/26	ND	ND	2.2	3.7	ND	ND	ND	5.0	5.5	ND	ND	4.3
2014/3/12	ND	4.6	ND	ND	ND	ND	ND	3.6	6.0	ND	2.3	3.1
2014/3/26	1.3	2.1	3.6	2.6	ND	ND	ND	2.6	6.5	ND	ND	3.1
2014/4/9	ND	3.5	ND	ND	ND	ND	ND	4.3	5.6	ND	ND	2.8
2014/4/23	ND	ND	2.0	2.7	ND	ND	ND	3.8	6.0	ND	ND	2.4
2014/5/7	2.9	2.8	3.5	ND	ND	ND	ND	3.9	5.8	ND	ND	2.2
2014/5/21	ND	ND	5.0	ND	ND	ND	ND	1.7	6.0	ND	ND	2.4
2014/6/11	ND	3.0	3.5	ND	ND	ND	ND	3.8	5.3	ND	ND	1.5
2014/6/25	1.8	2.8	3.9	ND	ND	ND	2.7	2.8	6.1	ND	ND	2.8
2014/7/9	ND	3.7	3.0	ND	ND	ND	ND	3.7	3.5	ND	ND	2.1
2014/7/23	ND	ND	5.4	2.4	ND	ND	2.2	1.9	3.2	ND	ND	ND
2014/8/13	ND	ND	4.1	2.9	ND	ND	3.3	ND	ND	ND	ND	3.2
2014/8/27	ND	ND	ND	2.4	ND	ND	2.4	ND	ND	ND	ND	ND
2014/9/10	ND	2.8	ND	3.2	ND	ND	ND	ND	2.6	ND	ND	3.3
2014/9/24	ND	ND	ND	2.7	ND	ND	1.7	2.4	ND	ND	ND	ND
2014/10/8	ND	4.1	ND	4.1	ND	ND	ND	ND	2.9	ND	ND	2.6
2014/10/22	ND	ND	ND	3.7	ND	ND	ND	ND	4.2	ND	ND	2.5
2014/11/12	1.7	2.5	ND	3.0	ND	ND	ND	ND	2.5	ND	ND	4.1
2014/11/26	2.1	3.1	ND	2.8	ND	ND	ND	ND	2.6	ND	ND	4.3
2014/12/10	ND	3.0	2.7	ND	ND	ND	ND	ND	4.6	ND	ND	4.2
2014/12/24	ND	1.7	2.4	ND	ND	ND	ND	2.9	4.3	ND	ND	3.8
2015/1/14	3.6	4.5	4.0	3.1	ND	ND	ND	3.6	5.5	ND	2.4	3.8
2015/1/28	ND	ND	3.5	3.0	ND	ND	ND	4.1	5.5	ND	ND	3.2
2015/2/11	ND	5.1	3.8	2.5	ND	ND	ND	4.5	5.9	ND	ND	4.9
2015/2/25	1.4	2.5	2.4	3.6	ND	ND	ND	2.5	5.9	ND	ND	ND
2015/3/11	2.3	4.4	3.2	3.4	ND	ND	ND	1.1	4.7	ND	ND	2.7
2015/3/25	3.2	4.1	4.0	2.9	ND	ND	ND	5.1	5.8	ND	ND	2.3
2015/4/8	2.5	4.3	4.1	ND	ND	ND	ND	1.7	4.5	ND	2.3	3.0
2015/4/22	2.4	3.4	5.6	ND	ND	ND	ND	2.0	3.2	ND	ND	2.4
2015/5/7	1.9	ND	3.9	2.3	ND	ND	ND	2.6	2.1	ND	ND	2.8
2015/5/20	1.5	ND	3.0	ND	ND	ND	ND	2.0	3.1	ND	ND	4.0
2015/6/10	1.8	2.3	5.2	ND	ND	ND	ND	ND	3.4	ND	ND	3.9
2015/6/24	ND	1.9	5.4	ND	ND	ND	ND	2.2	2.5	ND	ND	3.2
2015/7/8	2.2	3.3	4.6	1.6	ND	ND	ND	ND	2.8	ND	ND	1.9
2015/7/22	1.3	2.5	3.7	2.4	ND	ND	ND	ND	2.1	ND	ND	3.5
2015/8/12	1.7	3.6	ND	3.4	ND	ND	2.3	ND	3.1	ND	ND	2.3
2015/8/26	ND	ND	ND	2.7	ND	ND	2.0	ND	ND	ND	ND	ND
2015/9/9	2.0	ND	ND	2.2	ND	ND	2.0	ND	ND	ND	ND	ND
2015/9/23	ND	ND	ND	2.4	ND	ND	ND	3.4	2.4	ND	ND	ND
2015/10/7	ND	2.4	ND	ND	ND	ND	2.5	4.0	ND	ND	ND	2.5
2015/10/21	1.3	2.4	4.1	1.9	ND	ND	1.9	3.1	ND	ND	ND	2.1
2015/11/11	ND	ND	2.2	ND	ND	ND	ND	2.9	4.6	ND	ND	ND
2015/11/26	ND	ND	4.6	2.9	ND	ND	ND	4.2	3.6	ND	ND	3.0
2015/12/9	2.4	3.4	2.5	3.1	ND	ND	ND	3.8	3.4	ND	ND	4.8
2015/12/24	1.5	2.6	3.2	2.9	ND	ND	ND	4.6	4.2	ND	ND	4.3
2016/1/14	ND	3.8	4.2	3.1	ND	ND	ND	3.2	4.6	ND	ND	3.9
2016/1/27	ND	1.1	4.9	2.6	ND	ND	ND	2.1	4.6	ND	ND	2.6
2016/2/10	ND	4.0	4.9	ND	ND	ND	ND	1.9	4.0	ND	ND	2.7
2016/2/24	ND	ND	4.6	ND	ND	ND	ND	3.0	5.3	ND	ND	2.8
2016/3/9	ND	3.8	2.5	ND	ND	ND	ND	ND	4.3	ND	ND	2.3
2016/3/23	ND	ND	3.1	2.4	ND	ND	ND	1.7	4.2	ND	ND	3.8

AdV: アデノウイルス, AiV: アイチウイルス, AstV: アストロウイルス, EV: エンテロウイルス, HAV: A 型肝炎ウイルス, HEV: E 型肝炎ウイルス, HPeV: ヒトパレコウイルス, NoV: ノロウイルス, RV: ロタウイルス, SaV: サボウイルス。  
\*AstV, NoV GI, NoV GII, および SaV は, リアルタイム PCR 法による定量結果を示した。

測定した 12 種類のうち、E 型肝炎ウイルスを除いた 11 種類のヒト腸管系ウイルスが下水試料から検出された。最も高い頻度で検出されたのはノロウイルス GII であり、陽性率は 89%、濃度の範囲は 1.4~6.5 log<sub>10</sub> copies/mL だった。既往の研究においても下水中のノロウイルス GII について同様の陽性率および濃度が報告されている (Katayama et al. 2008)。続いて、ノロウイルス GI (79%)、サポウイルス (75%)、アイチウイルス (74%)、アストロウイルス (68%)、エンテロウイルス (65%) の順に陽性率が高かった。ノロウイルス GI およびサポウイルスは、それぞれの流行期である冬季に 5.3 log<sub>10</sub> copies/mL の最大濃度で検出された。またエンテロウイルスは、流行期である夏季に最大濃度が観測された (5.2 log<sub>10</sub> copies/mL)。ノロウイルス GI およびエンテロウイルスの濃度は、既往の報告 (Katayama et al. 2008) よりも 1~2 オーダー高かったが、本研究では調査期間およびウイルス回収手法が異なることが原因として考えられた。サポウイルス濃度は、本研究と同じ PEG 沈殿法によって濃縮された場合の測定値 (Miura et al. 2015) と同程度だった。アデノウイルス (54%) およびノロウイルス GIV (1%) は、既往の報告よりも陽性率および濃度が低かった (Francy et al. 2012; Kitajima et al. 2009)。また、唯一二本鎖 RNA を有するロタウイルスの陽性率が 10% と低かったため、逆転写反応において効率よく cDNA が合成されていない可能性が考えられた。今後、二本鎖 RNA を対象とした逆転写反応のプロトコルを見直す必要がある。A 型肝炎ウイルスは 1 検体のみ陽性であり、濃度は 2.6 log<sub>10</sub> copies/mL だった。我が国において患者からの A 型肝炎ウイルス分離報告は、全国で 1 週間に 0 から数件程度であることから、本調査で明らかになった下水試料の低い陽性率は妥当であると考えられた。3 年の調査期間に渡って、12 種類のヒト腸管系ウイルスの濃度を一斉に調査した報告は本研究を除いて存在しないことから、今後もモニタリングを継続することでさらに貴重なデータとなる。

**参考文献:** Ishii et al. *Apple Environ Microbiol.* 2014, 80, 7505-7511; Katayama et al. *Water Res.* 2008, 42, 1441-1448; Miura et al. *Water Res.* 2015, 75, 282-291; Kitajima et al. *Lett Appl Microbiol.* 2009, 49, 655-658; Francy et al. *Water Res.* 2012, 46, 4164-4178.

## 2. リスク評価に基づいた監視項目、体制の確立 (山形大学 渡部グループ) 【研究項目2】

### (1) 研究のねらい

水監視システムにおける監視の基準値を設定するために、各種水源における病原微生物の検出データから、水利用を介した感染症のリスクを定量評価するための数値モデルを開発することを研究のねらいとした。最終的には、そのモデルを用いて、水源での監視体制を提案することを目指した。

### (2) 研究実施方法

以下の 4 つの課題を定めて研究を実施した。

#### 課題 1: 各種水源からの病原微生物の検出と感染症動向との関連に関する研究

各種水源における病原微生物を検出し、高頻度で検出される病原微生物の種類と、その濃度分布の特徴を明らかにする。この課題は大村グループとの協働で実施し、そこで開発される新規検出手法も積極的に適用する。

#### 課題 2: 一次感染のリスクにもとづく監視対象微生物の選定

課題 1 における検出結果から一次感染のリスクを評価し、そのリスクが高い微生物を「監視対象微生物」に選定する。

#### 課題 3: 二次感染を考慮した感染症拡大モデルの構築

監視対象微生物の二次感染 (人から人への感染伝播) のリスクについて、対象地域の人口規模や住民の移動・交流などを考慮して、監視対象微生物感染症の拡大をシミュレーションできるモデルを構築する。東北大学・押谷グループが明らかとする感染症流行の動向をもとに、構築されたモデルの検証を行う。

#### 課題 4: リスク予測にもとづく水監視体制の提案

課題 1~3 の成果をもとに、研究対象地域における各種水源が汚染されたケースでの一次感染、



それに引き続き発生する二次感染を予測するシミュレーションを行う。感染症流行に関する警報を実施した場合の効果についても、シミュレーションにより検討する。様々なケースでの警報の効果を検討することにより、対象地域に適した水監視体制(対象試料, 基準値, 監視頻度)を提案する。

### (3) 研究成果

#### ① 課題1: 各種水源からの病原微生物の検出と感染症動向との関連に関する研究

2012年度以降、カキ養殖海域において定期的な病原微生物モニタリングを行った。具体的には、養殖がおこなわれている湾内の4地点の海水と湾内へ流入する主要河川水(2012年9月から2013年5月にかけて月1回)、および湾内の4地点における養殖カキ(2012年9月から2015年の晩秋から初夏にかけて月1回、および2014年9月から2015年7月にかけて週1回)の継続的な採取を行い、病原微生物の検出と定量を行った。養殖カキからのノロウイルス検出結果を図2-1に示した。河川水と海水試料については、本研究で用いた分析法(陰電荷膜法)ではウイルス回収率が非常に低く(<0.002%), 全ての試料がノロウイルス陰性であった。

養殖カキからのノロウイルス検出件数は、1月又は2月にピークが見られた(図2-1)。調査期間中に養殖カキからのウイルス検出手法の改善を行っており、このことがシーズンを経るごとの検出件数増加に大きく寄与したと考えられる。2012-2013年シーズンはウイルス抽出時にpHを下げる手法を用いており、2012年1-3月にのみ、少数の養殖カキからノロウイルスが検出された(陽性率1%)。一方、2013-2014年シーズンはpHを下げる前に酵素処理を行って検出を行い、2013年の11月から2014年の3月にかけてより高い陽性率(38%)でノロウイルスが検出された。また、2014-2015年シーズンは処理過程において生じている試料のロスを抑え、2014年の12月から2015年の3月にかけてさらに高い陽性率(88%)でノロウイルスが検出された。

2012-2013年シーズンは、養殖カキからのウイルス抽出時にpHを下げる手法により、実験用に添加したウイルスの回収率は10%程度であった。2013-2014年シーズンには、pHを下げる操作に加え、プロテナーゼK、アミラーゼ、リパーゼの3種の酵素による有機物の分解操作を行う手法に変更し、ウイルス回収率は10%から50%、検出下限値は2,000 copies/カキから500 copies/カキ程度に改善された(図2-2)。

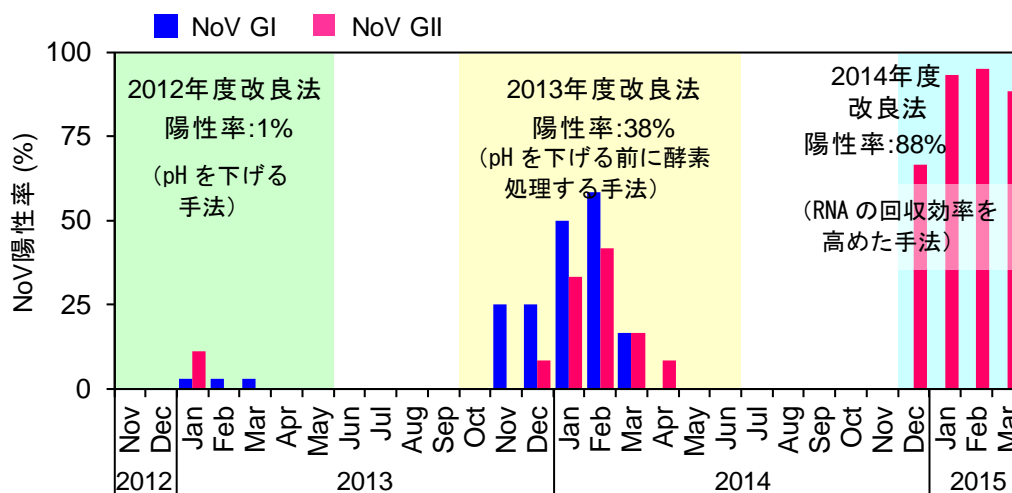


図 2-1. 養殖カキの月次モニタリングにおけるノロウイルス陽性率。モニタリングを行った月の背景に色を付けて示している。2014-2015年シーズンはNoV GIIのみを調べた。シーズンを追うごとに検出感度が高くなっているため、シーズン間を比較する際には注意が必要である。2012-2013年シーズンは低pHにおけるウイルス抽出法を、2013-2014年シーズンはこれに酵素処理を加えたウイルス抽出法を用いた、2014-2015シーズンはさらにRNA回収効率を高めた。

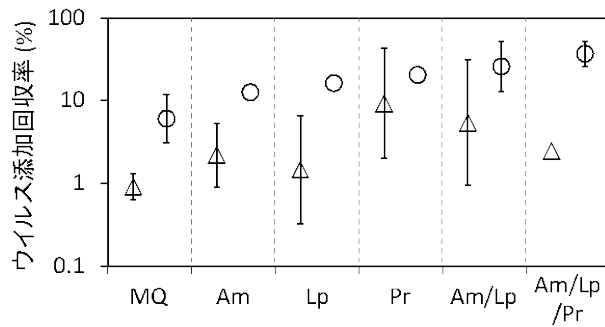


図 2-2. 各種酵素と低 pH 処理の比較。Δと○はそれぞれ中性付近 pH と pH 2.5 における結果を表す。エラーバーは幾何平均の標準偏差を表す。MQ: Milli-Q, Am: アミラーゼ, Lp: リパーゼ, Pr: プロテナーゼ K。

さらに、2014-2015 年シーズンには、大容量サンプルに対応したウイルス RNA 抽出システムを採用し(市販のキットの切り替えによる)、ノロウイルス回収後の分析において生じている試料のロスを抑えることによって、検出下限値は 100 copies/カキ程度に改善された。既往の研究では、1,000 copies/カキ以上の汚染レベルで頻繁に食中毒が生じるようになり、100 copies/カキ以下であればほとんど食中毒は生じないと見積もられている。

2013-2014 年および 2014-2015 年シーズンは、流入下水から湾内へのノロウイルスの流出拡散とカキへの蓄積の関係を調べる目的で 4 地点でのモニタリングを行った(表 2-1, 図 2-3)。2013-2014 年シーズンは地点間の違いが見られなかった。一方、時間変化に関して、ノロウイルス GII は、いずれの地点でも 2013 年 11 月まで全て非検出であったものが、2013 年 12 月から同程度の陽性率で検出された。また、ノロウイルス GI は、シーズン内の全検体中 2 検体のみ陽性であった。2014-2015 年シーズンは、前シーズンと比較して陽性率が高くなり、それに伴いカキに含まれるノロウイルスの量に関する定量的な特性について解析することが可能となった(図 2-3)。地点間については、湾内への河川流入部からの距離が遠い地点で養殖されたカキほどノロウイルス量が低くなる傾向が示された。また、垂下式のカキ養殖における深度について、上・中・下層に分類し比較したところ、中層にて生育したカキに最も多くノロウイルスが含まれる傾向が見られた。このことは、中層が最もカキの生育に適した環境であることと関連していると考えられる。

表 2-1. 2013-2014 年および 2014-2015 年シーズンにおける月毎 4 地点のカキ中ノロウイルス陽性率 (%)<sup>a</sup>

採取日	ノロウイルス GI				ノロウイルス GII			
	地点 A	地点 B	地点 C	地点 D	地点 A	地点 B	地点 C	地点 D
2013 年 10 月	0	0	0	0	0	0	0	0
2013 年 11 月	0	0	0	0	0	0	0	0
2013 年 12 月	0	0	0	0	17	17	33	0
2014 年 1 月	0	0	0	0	0	33	0	33
2014 年 2 月	0	33	0	0	17	17	17	33
2014 年 3 月	0	0	0	0	17	33	0	17
2014 年 4 月	0	0	0	0	0	0	0	17
2014 年 5 月	0	0	0	0	0	0	0	0
2014 年 6 月	0	0	0	0	0	0	0	0
2014 年 7 月	0	0	0	0	0	0	0	17
2014 年 8 月	0	0	0	- <sup>b</sup>	0	0	0	- <sup>b</sup>
2014 年 12 月	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	50	56	78	88
2015 年 1 月	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	87	100	93	93
2015 年 2 月	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	93	60	73	80
2015 年 3 月	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	100	80	87	87

<sup>a</sup>リアルタイム PCR において 40 サイクル以内に蛍光の増幅が認められたものを陽性とした。地点 A が湾内で最も陸から離れており、B, C, D の順に陸に近い。サンプル数は 2013 年 10 月-2014 年 8 月に 6 サンプル、2014 年 12 月に 8-10 サンプル、2015 年 1-3 月に 15 サンプル;<sup>b</sup>サンプリングできず;<sup>c</sup>測定せず。

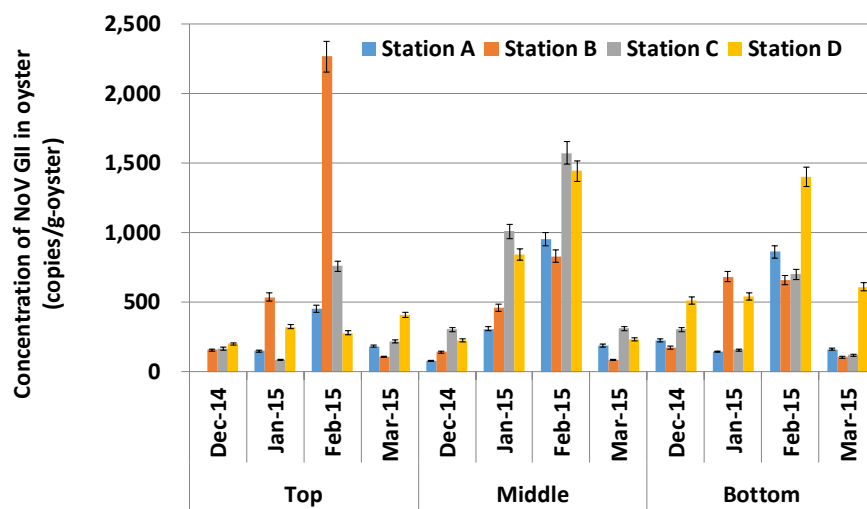


図 2-3. 地点・深度・月別のカキ中に含まれるノロウイルス量(2014-2015年シーズン)

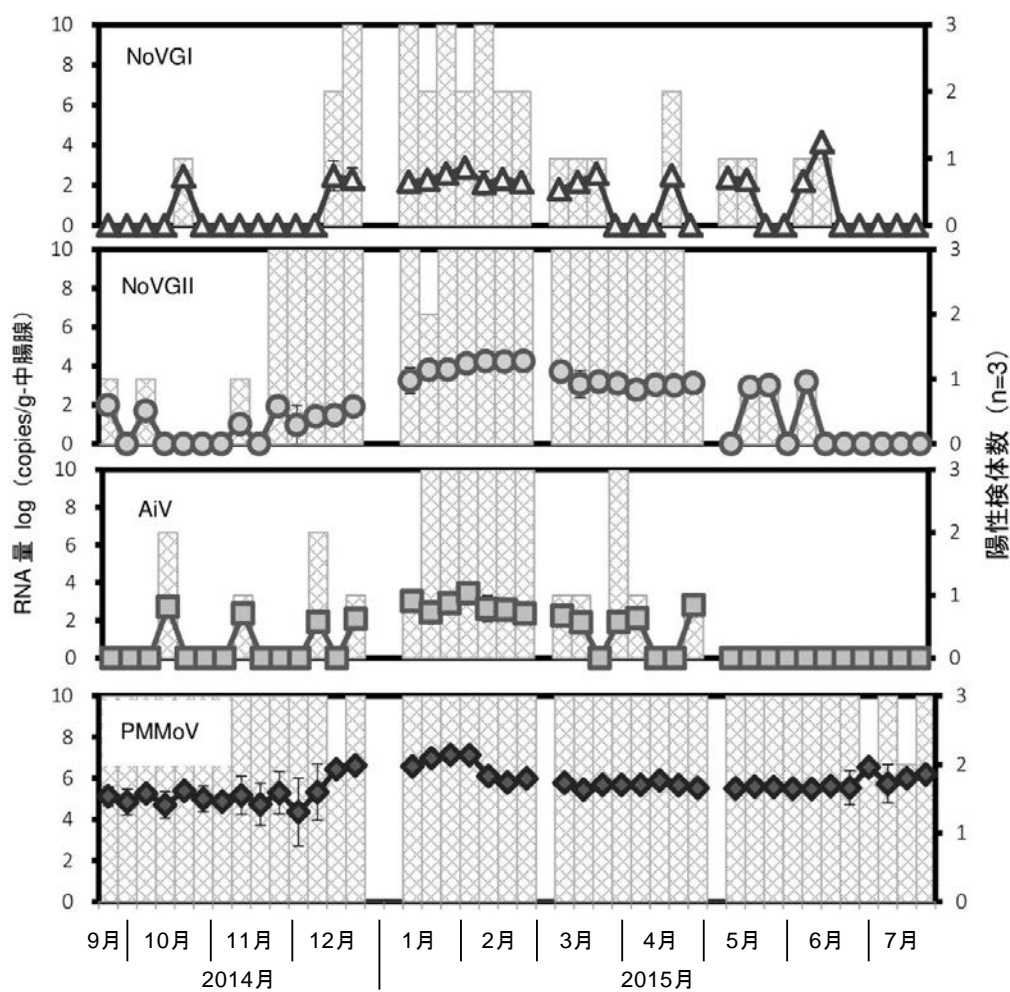


図 2-4. 各ウイルスの検出結果(棒グラフは陽性検体数, 折れ線グラフは陽性検出中のウイルス RNA 量の平均値で 0 は非検出を示す)

2014-2015年シーズンには4地点でのモニタリングに加えて、時間的な動向をより詳しく調べるために2地点における週1回のモニタリングを行った(図2-4)。時間変化に関して、ノロウイルスGIは、2014年12月初旬までは殆ど検出されなかった。12月中旬より検出され始めると同時にRNA量が増加し始め、2015年3月まで $10^2$  copies/g-中腸腺から $10^3$  copies/g-中腸腺で検出された。2015年4月以降もRNA量に変化は無かったが、検出されない週が増えた。2015年6月に高いRNA量で検出されたが、その前後の週のRNA量が低いことや陽性検体数が1個だったこと、内部標準ウイルス(マウスノロウイルス)の回収率が約900%という非常に高い値であったことから、異常値と考えられた。

ノロウイルスGIIは、2014年12月までは $10^2$  copies/g-中腸腺以下で推移しているが、非検出の週も多く見られた(図2-4)。2014年12月より陽性検体数が増加し、2015年1月よりそれに続く形でRNA量が増加し、ピーク時には $10^4$  copies/g-中腸腺を超えた。2015年2月下旬ころからRNA量が減少し始めたが、増加前の時期よりも高いRNA量の $10^2$ ~ $10^3$  copies/g-中腸腺で推移していた。また、陽性検体数も減少せず、3個のままであった。その後2015年4月下旬以降、陽性検体数が減少し、非検出の週が見られるようになった。

後述する課題2においては、水監視システムにおける監視対象微生物をノロウイルスに、指標微生物をトウガラシ斑紋ウイルス(PMMoV)及びアイチウイルス(AiV)にすることが提案された。これらの指標微生物は、ノロウイルスの流行状況に合わせて、下水中の濃度に増減が見られることが確認されている。2015年度以降も、上記の監視対象微生物および指標微生物について、下水、河川水および養殖カキからのモニタリングを継続して行った(図2-4)。

その結果から、PMMoVおよびAiVのノロウイルス汚染指標性について検討した。PMMoVが4月下旬までRNA量を維持しているのは、ノロウイルスGIIと同じ傾向だった。しかし、PMMoVは5月以降も高い値を維持しており、これはノロウイルスとは異なる傾向だった。各ウイルスの増加のタイミングは必ずしも一致しないが、いずれのウイルスも、12月から1月の間においてRNA量や陽性率が上昇していた。汚染の度合いが進むと、RNA量に先んじてまず陽性率が上昇し、少し遅れてRNA量が増加し始める、という傾向があった。しかし減少の時期に関しては、PMMoV、AiVが2015年2月頃から減少し始めるのに対し、ノロウイルスGIIは1か月ほど遅れて減少が始まった。このずれは、ノロウイルスGIIがカキ体内へ特異的に結合する性質があるからではないかと考えられた。ノロウイルスGIにも同様に特異性を持つものがあるが、今回は減少の時期のずれは見られなかった。先行研究においても、カキからノロウイルスが検出される時期には、同時にAiVも検出されており、二者の季節性には共通点があったものの、検出頻度やRNA量は多くなかった。一方、PMMoVをカキから検出したのは本研究が初めてであったが、その検出頻度とRNA量はともに多かった。ノロウイルスの流行状況に合わせて下水中の濃度に増減が見られるこれら2種のウイルスのうち、PMMoVはカキのノロウイルス汚染指標として活用できる可能性がある。

また、2013-2014年および2014-2015年シーズンの養殖カキ試料に対して次世代シーケンシング法による塩基配列解析を行い、養殖カキに蓄積されているノロウイルスGII群の遺伝子型を調べた(表2-2)。2013年12月と2014年1月の養殖カキから検出されたノロウイルスは、感染症サーベイランスと下水モニタリングにより流行が認められているノロウイルスGII.4 Sydney 2012 亜型が96%で極めて多かった。また、残りの4%はGII.6型であった。2015年1月および2月の養殖カキから検出されたノロウイルスは、感染症サーベイランスと下水モニタリングにより流行が認められているノロウイルスGII.17型が多かった。また、この他にGII.3、GII.4 Den Haag 2006b 亜型、GII.4 Sydney 2012 亜型の存在が認められた。2014-2015年シーズンに2013-2014年シーズンよりも多くの遺伝子型が見られた理由としては、2013-2014年にノロウイルスGII.4 Sydney 2012 亜型が大流行していたこと、および、2014-2015年シーズンに多量のウイルスを回収することができたことが考えられる。なお、2014-2015年冬場の17週間のカキサンプルから、GII.3、GII.4、GII.6とGII.13を含めて、多数のノロウイルス遺伝子型が検出された。GII.3およびGII.17が一番多く検出された。2014年までは、GII.4 遺伝子型が主流であったが、2015年の冬から急にGII.17が主流となった。2014-2015年シーズン養殖カキから検出されたノロウイルスは、感染症サーベイランスと下水モニタリングにより流行が認められているノロウイルスGII.17型が多かった。遺伝子の系統樹によると、カキ、下水および患者の糞便から検出されたGII.17は同じ遺伝子クラスターKawasaki308

2015 に属していることが示された(図 2-5)。また、この他に GII.3, GII.4 Den Haag 2006b 亜型, GII.4 Sydney 2012 亜型の存在が認められた。2014-2015 年シーズンに 2013-2014 年シーズンよりも多くの遺伝子型が見られた理由としては、2013-2014 年にノロウイルス GII.4 Sydney 2012 亜型が大流行していたこと、および、2014-2015 年シーズンに多量のウイルスを回収できたことが考えられる。

表 2-2. 次世代シーケンシング法を用いて検出されたカキ中のノロウイルス遺伝子型(%)

Collection date of oyster samples	GII Genotype					GII.4 subtypes			
	GI.3	GI.4	GI.6	GI.13	GI.17	NA <sup>b</sup>	Den Haag 2006b	Sydney 2012	NA <sup>b</sup>
Dec 2013	0	100	0	0	0	0	0	100	0
Jan No.1	0	85	15	0	0	0	0	85	0
2014 <sup>a</sup> No.2	0	100	0	0	0	0	0	100	0
No.3	0	100	0	0	0	0	0	100	0
No.4	0	90	10	0	0	0.1	0	90	0
Nov 5 <sup>th</sup>	100	0	0	0	0	0	0	0	0
2014 12 <sup>th</sup>	99.9	0	0	0	0	0.01	0	0	0
19 <sup>th</sup>	100	0	0	0	0	0	0	0	0
26 <sup>th</sup>	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Dec 10 <sup>th</sup>	100	0	0	0	0	0	0	0	0
2014 17 <sup>th</sup>	100	0	0	0	0	0	0	0	0
24 <sup>th</sup>	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Jan 14 <sup>th</sup>	19.6	6.4	0	0	74.0	0	0	6.4	0
2015 22 <sup>th</sup>	24.7	12.5	0	0	62.5	0.3	11.9	0.5	0.03
28 <sup>th</sup>	78	5.2	0	0	16.1	0.7	0	5.0	0.2
Feb 4 <sup>th</sup>	4.8	2.2	0	0	93.0	0	0	2.2	0
2015 12 <sup>th</sup>	35.7	0	1.3	0	63.0	0	0	0	0
19 <sup>th</sup>	56.0	3.6	0	0	40.4	0.1	0	3.6	0
25 <sup>th</sup>	0.1	0	0	98.9	0	1.0	0	0	0
Mar 12 <sup>th</sup>	64.5	0	0	0	34.5	1.0	0	0	0
2015 18 <sup>th</sup>	63.2	0	0	0	36.8	0	0	0	0
26 <sup>th</sup>	76.1	0	0	0	23.4	0.5	0	0	0

<sup>a</sup> 2014 年 1 月は同じ日に採取された 4 つのサンプルを解析した; <sup>b</sup> NA: could not be assigned  
2014-2015 年シーズンは週ベースに採取された 1 つずつの composite (3 つのサンプル) サンプルを解析した。

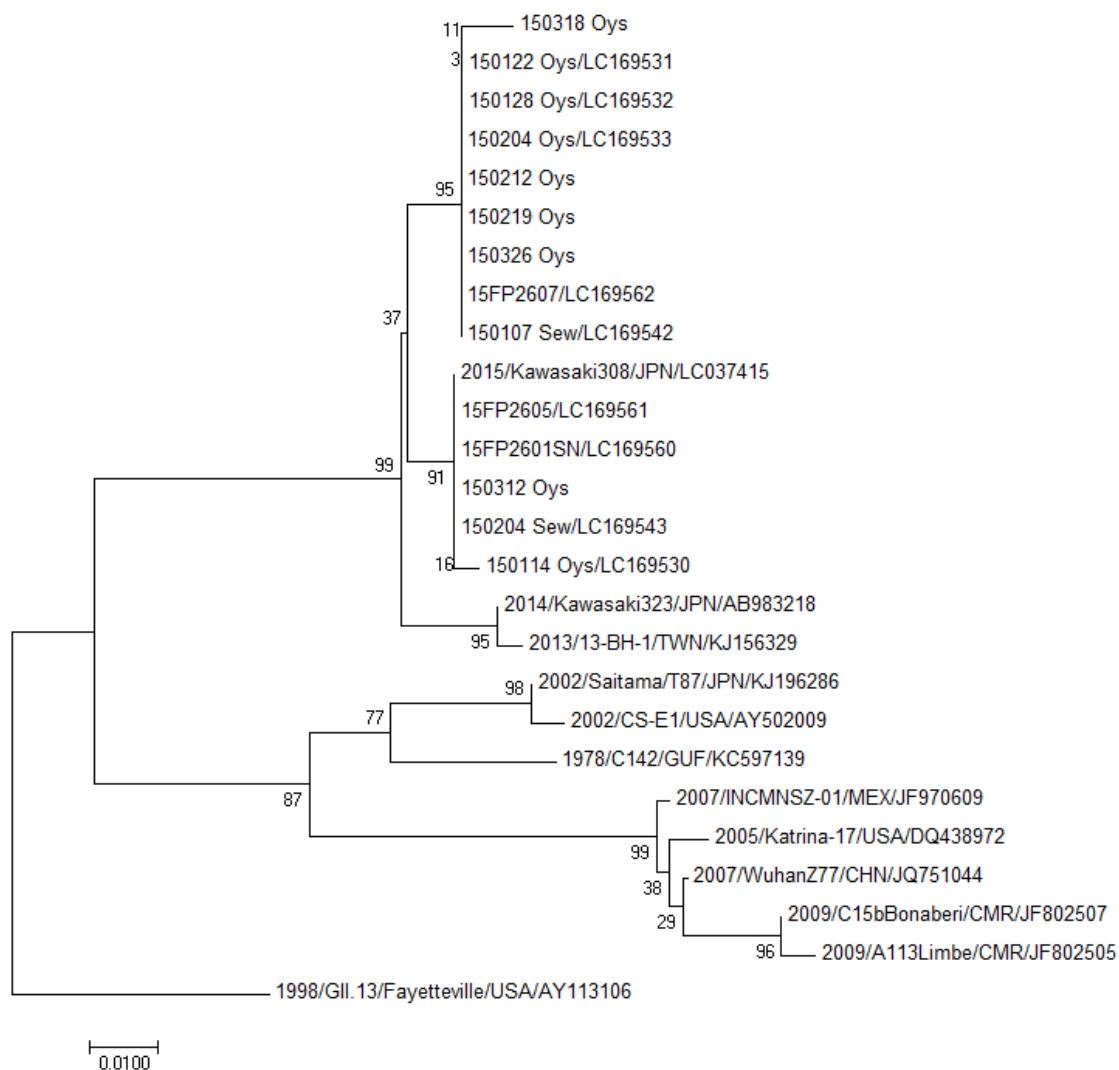


図 2-5. カキ試料から検出された GII.17 株の系統樹

② 課題 2: 一次感染のリスクにもとづく監視対象微生物の選定

研究対象流域に適した監視対象微生物について、2013 年度には、その検出頻度と感染力の高さから、一次感染のリスクが高いノロウイルスとロタウイルスを候補として選定し、2014 年度にその検証を行った。2014 年度の松島町における疫学調査では、感染性胃腸炎患者数が少なく、ノロウイルス、ロタウイルスともにはっきりした流行のピークは認められなかった。ただし、ノロウイルスに関しては、下水中及び養殖カキ中におけるノロウイルス濃度がピークを迎えた 2015 年 1 月と 2 月に患者からも検出された。この事実から、ノロウイルスを監視対象微生物に決めた。また、下水中において、ノロウイルスの流行と同時期にアイチウイルス及びトウガラシ斑紋ウイルスの濃度が上昇していることから、指標微生物としての有用性が認められた。

③ 課題 3: 二次感染を考慮した感染症拡大モデルの構築

2012 及び 2013 年度は、感染症の二次感染(ヒトからヒトへの感染伝播)リスクについて集団感染事例を収集した他、研究対象地域における感染症発生动向調査のデータの収集と解析、対象地域の人口などに関する既存情報の検索を行ってきた。

2013 年度には、宮城県松島町において衛生意識に関するアンケート調査を実施し、二次感染の可能性が最も高い家庭内での感染伝播モデルを開発した。特に、調査対象地域において実施したアンケートの結果に基づいて、家族構成員(父、母、子、幼児)毎に接触や行動習慣に関して詳細なパラメータを定め、シミュレーションを実行した。その結果から、流行のピークの推定に本モデルが有用であること、および家族構成に応じて家庭内二次感染リスクは一次感染リスクよりも大きくなることが定量的に示された。一方で、あくまで本モデルでは家庭内での二次感染のみを考慮しているため、家庭外で感染症の伝播が生じやすい人が多く集まる施設での二次感染を考慮した感染症伝播モデルの開発に着手した。

2015 年度には、2013 年度と同様の手順(モデル開発およびアンケート調査によるパラメータ同定)で、保育園及び幼稚園を対象に感染症伝播のシミュレーションを行った。このモデル内において長期間(最大で 180 日間)の二次感染リスクを考える場合にも、吐瀉物由来の感染リスクは糞便由来の 1/100 程度であった。床掃除等による吐瀉物の除去が不十分な場合を想定してもなお、吐瀉物由来の二次感染リスクは糞便の 1/10 程度であることが示された。

2016 年度には、研究対象地域全体での感染症伝播のシミュレーションを行うために、勤務や通勤・通学などによる各施設と家庭の移動を考慮した感染症伝播シミュレーションを行った。特に、疫学分野における既往研究や前述の 2 つの研究結果から、幼児・子供による感染拡大への寄与が大きいことに着目し、園児(保育園もしくは幼稚園に通う家庭内の幼児および子供)が家庭と児童施設を移動する感染症伝播モデルの構築し、家庭内や園内における接触などのパラメータ値は前述の研究結果を利用して、感染症伝播のシミュレーションを実行した。

結果の一例として、4 属性(父・母・子・幼児)が 1 人ずつ存在する 4 人家族の感染リスクを推定した。その結果、児童の移動を想定した場合には、各属性の感染リスクが上昇するものの、感染流行のピークは同時期に生じることがわかった(図 2-6)。

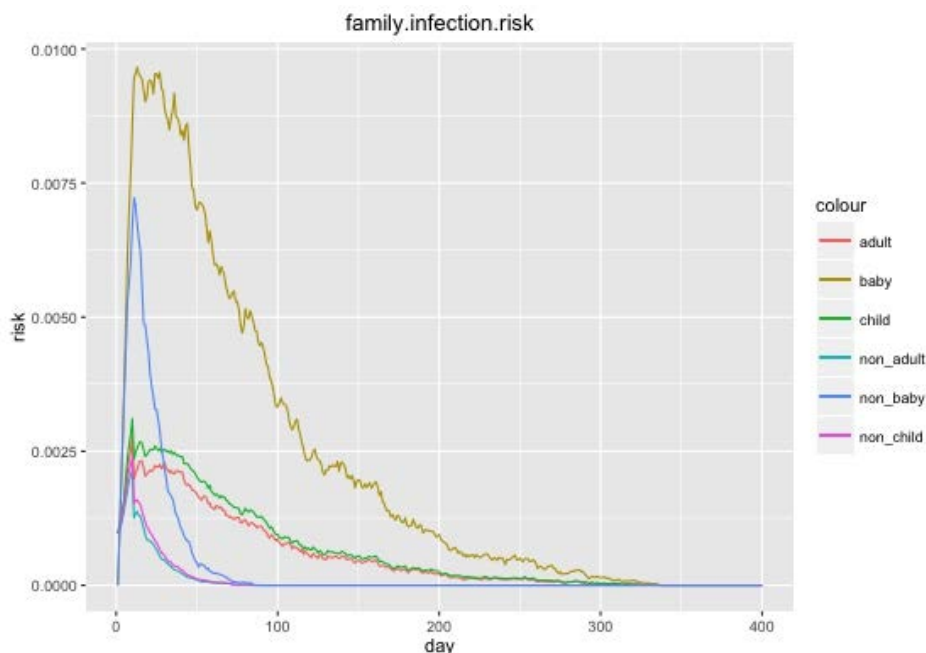


図 2-6. 幼児および子供の通園を考慮した場合と考慮しない場合の感染リスク

#### ④ 課題 4: リスク予測にもとづく水監視体制の提案

課題 3 のモデルが完成し、感染症伝播のシミュレーションが可能となった時点で、モデルを用いた水監視体制の有効性に関する検討を行う予定であったが、実証対象地域が変わったことによりモデルの方で対応ができなかった。ただし、架空の都市を取り上げて、感染リスクを低減するような施策がどの程度有効であるか、その定量的な評価を行うことは試みた。具体的には、以下の2つのシナリオを検討した。

【シナリオ-1:感染者増大時に学級閉鎖を行う場合】

現在インフルエンザで実施されているものと同様に、ノロウイルスの感染者数が増大した場合に学級閉鎖を行うシミュレーションを実施した。具体的には、流行のピーク(30日目)より児童施設を7日間閉鎖することを想定したシナリオ分析を行った。この7日間は、家庭内では感染が生じてしまうものの、児童施設での感染は防ぐことができる。

【シナリオ-2:手洗いの励行により住民がみな石鹸での手洗いを行う場合】

本プロジェクトで実施した調査票調査から、約6割が石鹸での手洗いを行い、3割強が水で手を洗うこと、1割弱が手洗いをしないことが明らかになった。ここで、手洗いの励行により、全員が石鹸による手洗いを実施するシナリオのもと、感染拡大がどの程度縮小されるか評価した。

上記の2つのシナリオについて、これらの施策を実行しないベースラインのシナリオと比較してどれだけの感染リスクが低減できるかを属性別に算出した。ここでは、感染リスクを「1シーズン中に少なくとも1度感染する確率」として算出している。

その結果、どちらのシナリオでも各属性の感染リスクが減少するものの、感染流行のピークはベースラインのシナリオと同時期に生じることがわかった(図2-6)。各シナリオによって、各属性の感染リスクは表2-3に示すように低減された。学級閉鎖は一定の効果はあるものの、手洗いの励行の低減率がより大きい結果となり、最大で80%もの感染を防ぐことができた。これは、ノロウイルスは家庭内での感染拡大が大きい疾病であるために、手洗い等による感染予防が非常に重要であることを示している。

このように、リスク評価手法を用いた本モデルでは、ウイルス監視に基づいて励行された施策がどの程度の効果を発揮するかを定量的に評価できる。こうした定量性を持ったツールによって、施策を実施するための経済的コストとのトレードオフや異なる施策間の比較を行うことが容易になり、ステークホルダーの意思決定に大きく資するものと考えられる。

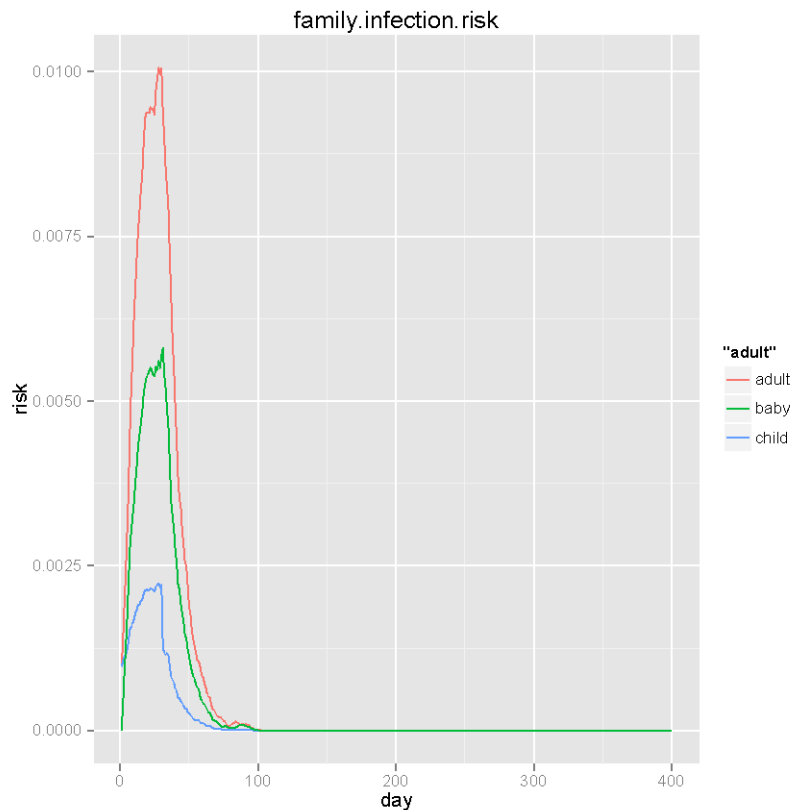


図 2-7. すべての人が石鹸による手洗いを行った場合のシミュレーション結果



表 2-3. 各シナリオのリスク低減率

	大人	子ども	幼児
シナリオ 1 (学級閉鎖)	0.16	0.15	0.07
シナリオ 2 (手洗い励行)	0.33	0.86	0.81

### 3. 迅速な病原微生物スクリーニング技術開発(東北大学 大村グループ) 【研究項目3】

#### (1) 研究のねらい

病原微生物の迅速な検出方法の一つとして開発した Quenching probe (Qprobe) を用いた LAMP 法 (Q-LAMP 法) によるノロウイルス遺伝子の検出法の流入下水検体への適用を図る。また, RNA を逆転写や PCR を介することなく直接定量可能な分子量分画膜を用いた新規技術を開発し, 技術の妥当性の評価及び環境試料への適用を図る。

#### (2) 研究実施方法

##### ① Q-LAMP 法

##### i) 検出感度の検討

濃度既知のノロウイルス遺伝子 cDNA を 10 倍連続希釈して, それぞれ  $10^0 \sim 10^3$  c opies/ $\mu$ L に調整したものを 1 ウェルに 5  $\mu$ L 使用して Q-LAMP 法で確認を行った。

##### ii) 検出可能な遺伝子型の検討

ノロウイルス遺伝子で検出頻度の高い GI. 1, GI. 2, GI. 3, GI. 4, GI. 6, GI. 7, GI. 8, GII. 2, GII. 3, GII. 4, GII. 5, GII. 6, GII. 14, GII. 17 の GI 群 7 遺伝子型, GII 群 7 遺伝子型について Q-LAMP 法で遺伝子の検出を行った。

##### iii) リアルタイム PCR 法との比較

県内の下水処理施設で 2013 年 3 月から 2016 年 3 月まで採取した流入下水 152 件を対象として, 通知法のリアルタイム PCR 法と Q-LAMP 法の結果の比較を行った。

Q-LAMP 法は, 「ノロウイルス G1 検出試薬キット」と「ノロウイルス G2 検出試薬キット」(栄研化学)を用い, 添付書に従い遺伝子群別に試薬を調整した。すなわち, 1 テストあたり, 2 倍 Reaction Mix 12.5  $\mu$ L, Primer Mix 2.5  $\mu$ L, Distilled Water 3.0  $\mu$ L を加え 95°C で 5 分加温後, 5 分氷冷した。その後 Enzyme Mix 1.0  $\mu$ L と 10  $\mu$ M の QProbe 1.0  $\mu$ L 添加し抽出 RNA を 5  $\mu$ L 加えた。63°C で 90 分反応後, 解離曲線解析を行った。経時的蛍光強度の測定は Applied Biosystems の PRISM 7900HT Fast リアルタイム PCR システムを用いた。プローブの塩基配列は, GI および GII 群に対してそれぞれ, GIQP : GATGGCGTCTAAGGAC, GIIQP : ATGAAAGATGGCGTTCGAATGAC (下線は LNA) とし, 各プローブの 3' 末端を蛍光色素で標識した。Q-LAMP 法の結果の解析は, 以下に示す 2 つの方法で行った。

A. 解離曲線解析にて検体ごとに蛍光値を測定した。次に, 95°C の蛍光強度値に乗ずることで当該蛍光強度値が 1 となる補正係数を検体毎に求め, この係数を, 各検体で得られた全ての蛍光強度値に乗じて補正蛍光強度値を求めた。その後, 更に各検体の補正蛍光強度値を, 陰性コントロールにおける同一温度の補正蛍光強度値にて割り, その値に 100 を乗じた値を蛍光消光率とした。得られた蛍光消光率を, 温度に対してプロットしたグラフを作成し, 陽性コントロールのグラフと比較した。

B. 解離曲線解析にて検体ごとに微分蛍光値を取得した。次に, 90°C の微分蛍光値に乗ずることで, 当該微分蛍光値が 1 となる補正係数を検体毎に求め, この補正係数を, 各検体で得られた全ての微分蛍光値に乗じて補正微分蛍光値を求めた。その後, 各検体の補正微分蛍光値から, 陰性コントロールにおける同一温度の補正微分蛍光値を差し引いて得られたデータを温度に対してプロットし, 得られたグラフを, 同様の方法で作成した陽性コントロールのグラフと比較した。

リアルタイム PCR 法は, 食安監発第 0514004 号の通知 (以下, 通知法) に準じて行った。すなわち, ノロウイルス GI の検出にはプライマー COG1F 及び COG1R (各 100 pmol/ $\mu$ L), TaqMan プローブ RING1-TP (a) 及び RING1-TP (b) (各 4 pmol/ $\mu$ L) を, ノロウイルス GII の検出にはプラ

イマー COG2F, COG2R, ALPF (各 100 pmol/μL), TaqMan プローブ RING2AL-TP (4pmol/μL)を用いて GI 群, GII 群別々に反応を行った。反応条件は 50°Cで 2 分, 95°Cで 10 分の熱処理後, 95°Cで 15 秒, 56°Cで 1 分の反応を 45 回で行い, 各遺伝子群の増幅曲線および検量線を確認した。リアルタイム PCR 用ノロウイルス GI および GII の陽性コントロール DNA は, 国立感染症研究所 感染症情報センター第六室より分与されたものを用いた。また, 定量値は蛍光強度が閾値に達した場合に検量線から求めた値を用い, 通知法に従い各遺伝子群 duplicate で 10 copies/well 以上を陽性とした。

## ② 分子量分画による RNA 定量法の開発

### i) 技術コンセプトの立証および環境試料への適用

新規 RNA 直接定量法は, 分子量分画膜を用いて標的 RNA と交雑したプローブを他のプローブから分画分離することを特徴としている。まず, 蛍光標識 DNA オリゴヌクレオチドプローブ (6~8 kDa)と rRNA (16S の場合は約 500 kDa)を分画可能な分子量分画膜を用意する。プローブは rRNA との交雑により見かけ上では高分子化するため分画膜上に捕捉されるため, これを回収し, プローブ由来の蛍光値を測定することで標的 RNA の定量が可能となる。

本法の妥当性の評価は人工合成 RNA を用いた。人工合成 RNA は, 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を標的とし, T7 プロモーターを付加したプライマーを用いて得られた PCR 産物を鋳型に, T7 RNA ポリメラーゼにより合成し (RiboMAX T7 Express System, Promega), DNA-Free RNA Kit (Zymo Research) により精製した。適用対象とした環境試料は, 下水処理場の活性汚泥槽, 余剰汚泥を処理する嫌気性消化槽から採取した汚泥とした。採取した汚泥は, pH5.1 バッファーで洗浄した後, フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール法により全核酸を抽出し, RNeasy Mini Kit (Qiagen) により RNA を精製・回収した。人工合成 RNA 及び環境試料より抽出した RNA の濃度は吸光度により測定した (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific)。

RNA 直接定量法は, 大きく5つの工程, RNA 抽出・交雑反応・分子量分画膜によるろ過・交雑物の回収・解析からなる。まず, 抽出・精製した 1.5 μg の RNA (人工合成 RNA では 0.5 μg)と 50 pmol の蛍光標識プローブを適切な濃度の尿素を含む交雑バッファー (20 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, pH8.0) に入れた反応溶液 (200 μl) を 0.5 ml チューブ内に作製した。交雑反応は, 95°C で 2 分間加熱して RNA を変性させた後に, 60°C で 15 分間行った。RNA と交雑したプローブと余剰プローブの分画は, YM-100 (Millipore) を用いて吸引ろ過にて分画した (-10 kPa)。その後, 余剰プローブを十分洗浄するため, 交雑バッファー (400 μl) をろ過した。ろ過後, 膜の裏面に付着した水滴をふるい落とし, 膜の裏面に 12 μl の TE バッファーを滴下して逆遠心 (1,000×g) により回収した。回収した溶液の蛍光値は NanoDrop 3300 (Thermo Fisher Scientific), 吸光度は NanoDrop 2000c により測定した。なお, 交雑反応から解析までに要する時間は 1.5 時間程度であった。

検出の特異性を向上させるため, 変性剤として尿素を用いた。プローブは, *Bacteria* を標的とした EUB338 (標的 RNA: *Escherichia coli*, 非標的 RNA: *Methanosarcina mazei*), *Archaea* を標的とした ARC915s (標的: *Ms. mazei*, 非標的: *E. coli*), *Methanosaetaceae* を標的とした MX825m (標的: *Methanosaeta concilii*, 非標的: *Ms. mazei*), *Methanomicrobiales* を標的とした MG1200m (標的: *Methanolinea* clone, 非標的: *Mst. concilii*) を用いて, 標的 RNA と非標的 RNA について同様の検出実験を行った。

### ii) 技術のハイスループット化

RNA 直接定量法の原理は, 低分子であるプローブを高分子である核酸と交雑することにより, 対象の核酸を見かけ上高分子化したプローブとして検出することである。この原理を適用できるものとして核酸精製キットが挙げられる。中でも磁気ビーズを用いる方法は, 96 ウェルあるいは 384 ウェルのプラットホームが存在し, ハイスループット化が容易であると考えられる。磁気ビーズと核酸の結合には, 物理的な吸着, または可逆的な化学反応などが利用されているが, ポリエチレングリコール (PEG) により核酸の凝集効率を上げることで標的核酸のビーズへの吸着効率をさらに向上させたキットを利用し, RNA 直接定量法のハイスループット化について検討を行った。具体的には,

Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) および SPRIPlate 96R Ring Super Magnet Plate (Beckman Coulter) を用いて、試料中より DNA および RNA の回収、余剰プローブを始めとする夾雑物の除去を行った。操作は、キット付属のプロトコルに一部修正を加えて従った。

AMPure XP は本来 PCR 産物の精製を目的としたキットであるため、核酸定量のために用いることが可能であるかを実証する目的で、以下のような性能評価を行った。プローブには、SRB385-Alexa Fluor 488, EUB338-Alexa Fluor647, および ARC915\_18-Alexa Fluor 546 の 3 種を用いた。これらのプローブが 50 pmol 存在する溶液を調整し、その溶液から AMPure XP を用いてプローブの除去を行った。プローブの蛍光の測定には、Infinite M1000 PR (TECAN) を用いた。また、核酸の回収性能評価には、*Escherichia coli* の 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を PCR により増幅した DNA 断片を用いた。

### (3) 研究成果

#### ① Q-LAMP 法

検出感度について検討した結果、ノロウイルス G I 群、G II 群遺伝子とも 50 copies/well であることが明らかになった。また、検出可能な遺伝子型については、今回対象とした GI 群 7 遺伝子型 (GI.1, GI.2, GI.3, GI.4, GI.6, GI.7, GI.8), GII 群 7 遺伝子型 (GII.2, GII.3, GII.4, GII.5, GII.6, GII.14, GII.17) の検出が可能であった。

2013 年 3 月 21 日～2016 年 3 月 2 日に掛けて採水された流入下水検体 (N=152) を対象に Q-LAMP 法とリアルタイム PCR 法の検出結果を比較した結果、両法の間には 71.1% の一致率が確認された (図 3-1)。遺伝子群別では GI 群が 72.4% であったのに対し、GII 群は 59.9% と GII 群遺伝子の一致率が低かった。Qprobe を用いない市販の Loopamp Norovirus Detection Kit (栄研化学株式会社) の検出感度も GI 群が 60 copies/test であるのに対し、GII 群は 200 copies/test と GII 群遺伝子の検出感度が低く、このことが Qprobe を用いた場合でも結果に反映されていることが示唆された。ノロウイルスの遺伝子型は、GI 群は GI.1 から GI.9 の 9 種類に対し、GII 群は GII.1 から GII.22 の 22 種類の存在が報告されウイルス遺伝子の多様性は GII 群の方が高く、1 セットのプライマーおよびプローブでは検出されにくい遺伝子型もあり、そのことが検出感度に影響していることが推測された。

Q-LAMP 法とリアルタイム PCR 法の結果の一致率に関しては、非常に興味深いことに 2014 年 7 月 2 日以降に採取した検体 (N=86) を比較すると、76.7% の一致率が確認され、遺伝子群別でも GI 群が 79.1%, GII 群は 76.7% であった。さらに、偶然の一致を差し引いた  $\kappa$  係数 (Cohen's Kappa (カップパ係数), 値の範囲は  $-1 \leq \kappa \leq 1$  であり数値が 1 に近いほど分類が一致していることを示す) も 0.52 で中等度の一致が認められた。一方、2013 年 3 月 21 日から 2014 年 6 月 25 日の期間に採取した検体 (N=66) の両方法の一致率は 63.6% で、GI 群一致率は 63.6% であったが GII 群は 39.4% と著しく低く  $\kappa$  係数も 0.08 であった。この理由はわからないが、下水検体はウイルス濃縮後にウイルス核酸抽出を行っており、抽出した核酸は通常 -80°C で保存しているが、場合によっては再検査を行うために凍結溶解を繰り返すことにより核酸がダメージを受ける。2014 年 7 月 2 日前に採取した検体から抽出した核酸は凍結融解を何度か繰り返し検査を行ったため、このような結果になったことも考えられた。

A. GI		リアルタイムPCR			
		陽性	陰性		
Q-LAMP	陽性	49	22		
	陰性	20	61		
				一致率	72.4 %
B. GII		リアルタイムPCR			
		陽性	陰性		
Q-LAMP	陽性	40	6		
	陰性	55	51		
				一致率	59.9 %
C. GIおよびGII		リアルタイムPCR			
		陽性	陰性		
Q-LAMP	陽性	80	14		
	陰性	30	28		
				一致率	71.1 %

図 3-1. Q-LAMP 法とリアルタイム PCR 法の検出結果比較

## ② 分子量分画による核酸定量法の開発

### i) 技術コンセプトの立証および環境試料への適用

技術コンセプトを立証するために RNA とプローブを交雑させ、分子量分画膜による分画後のプローブに由来する蛍光値を測定したところ、RNA の増加に伴い蛍光値が増加する傾向が見られた。そこで交雑反応をより特異的にするために、反応液の組成について検討を行ったところ、尿素濃度を増加させることで蛍光値/吸光度の値が減少する傾向が見られ、尿素による交雑ストリンジエンシーの制御が可能であることが分かった。反応液中の尿素の濃度は、標的 RNA と非標的 RNA の比 (S/N 比) が最大になるところを最適濃度とした。また、EUB338, ARC915s, MX825m についてはいずれも尿素濃度 4 M においても最適濃度時とほぼ同等の S/N 比が得られたため (図 3-2)、同時に使用できることがわかった。そこでまず、EUB338 と ARC915s を同時に用いて、*Bacteria* と *Archaea* の定量性能の評価を行った。*E. coli* と *Ms. mazei* の人工合成 RNA を様々な割合 (それぞれ 0, 1.25, 2.5, 5, ...100%) で混合した系について定量したところ、既知の割合と測定結果に高い相関 ( $R^2=0.99$ ) が示された。次に、EUB338, ARC915s に加え、MX825m も加えた 3 種のプローブを *E. coli* RNA : *Ms. mazei* RNA : *Mst. concilii* = 1 : 1 : 1 で混合した系について適用したところ、EUB338, ARC915s, MX825m はそれぞれ  $33.4 \pm 2.4$ ,  $61.8 \pm 7.9$ ,  $30.0 \pm 3.0\%$  となり、想定した値 (それぞれ 33.3, 66.7, 33.3%) に近似した値を示した。さらには、環境試料から抽出した RNA の定量にも成功した。

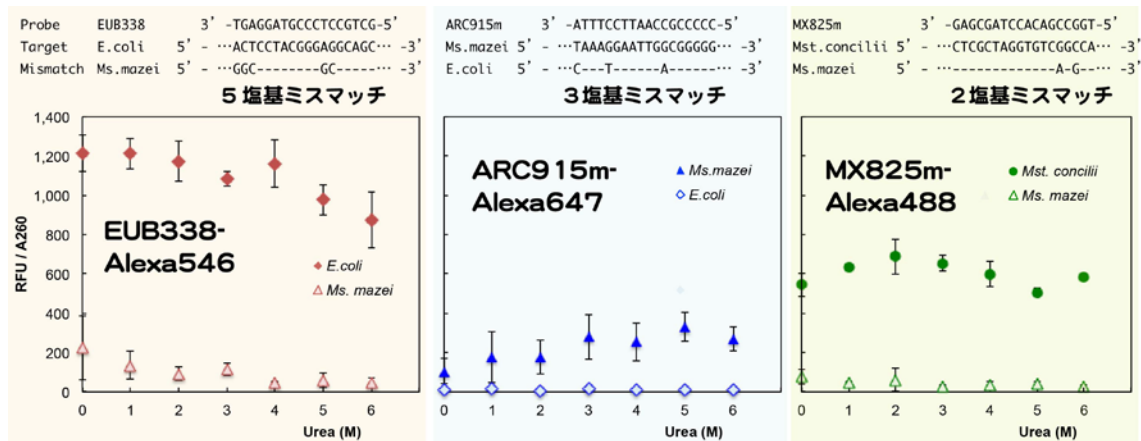


図 3-2. 各プローブの最適尿素濃度の検討

新規定量法における実験工程のうち交雑反応において、尿素を変性剤として用いる方法に改良し、交雑ストリンジェンシーの制御が温度制御よりも容易となった。また、複数種の同時定量が可能であり、高い定量性能をもつことがわかった。さらに、環境試料から抽出した RNA にも適用可能であった。

#### ii) 技術のハイスループット化

プローブの除去性能については、SRB385-AlexaFluor488, EUB338-AlexaFluor647, ARC915\_18-AlexaFluor546 の 3 種のプローブ全てで 99.9%以上のプローブ除去が可能であった。EUB338 については、99.99%以上の除去が可能であった。核酸の回収性能についても、十分な回収性能を有していることが分かった。

RNA とプローブの交雑反応実験においては、プローブと交雑させた RNA を蛍光強度で定量したところ、定量値が理論値を上回ってしまった。プローブの非特異的な結合を防ぐために、プローブの除去をより確実にを行い、かつ非特異的な交雑を最小化するようにプロトコルを見直したところ、40°C 条件下では 80.6 ± 0.6%、60°C 条件下では 73 ± 6% の RNA 回収率を示し、適切な温度環境下で実験全体を行うことが有効であることがわかった。

## 4. 水監視による感染症流行検知システム構築(東北大学 押谷グループ)【研究項目4】

### (1) 研究のねらい

病原体別感染性胃腸炎サーベイランスを活用し、地域における流行状況の把握に務める。また、サーベイランスにより得られた患者データおよび下水試料中からの病原体検出データをもとに、地域における感染症流行状況をより早期に把握するシステムの確立を目指す。さらに、老人保健施設におけるコホート研究を実施し、軽症あるいは無症候時のウイルス感染について調査する。

### (2) 研究実施方法

医療施設において急性胃腸炎のサーベイランスを開始し、急性胃腸炎の起因ウイルスの検出を行った。環境サンプリングを行っている研究対象地域の医療機関をサーベイランスの定点に設定し、これらの医療機関で急性胃腸炎症状(下痢症もしくは嘔吐症)として受診した患者を対象に、ノロウイルス、ロタウイルス、アデノウイルス、サポウイルス、アストロウイルスの検出を行った。ノロウイルス・ロタウイルス・サポウイルスに関してはサンガー法により遺伝子配列を解読し、遺伝子型の同定を行った。ウイルスの流行の動向及び遺伝子型の変化について評価し、検出方法の評価、改良も行った。また、下水試料から検出されるウイルスのうち、急性胃腸炎症状の起因ウイルスと考えられるものについて、患者検体及び下水試料中での検出時期や遺伝子型の変化について比較を行った。2016 年の 2 月から同地域内の老人保健施設に依頼し、症状の有無にかかわらず入所者から月毎の定期的な検体採取を行うコホート研究を開始した。これにより、医療機関では収集できな

い無症候時のウイルス感染について調査を進めた。さらに、流行発生に関して社会へ発信するシステムについて検討を行っている。

### (3) 研究成果

#### ① 急性胃腸炎のサーベイランスの実施

環境サンプリングを行っている研究対象地域(松島町)にあるA 医院(内科・小児科を専門, 2012年11月-2013年10月), 近隣の総合病院小児科B(2012年11月-12月), 研究対象地域にあるC 医院(内科・小児科を専門, 2013年10月-現在), 研究対象地域にある病院内科外来D(2015年12月-現在)において, 急性胃腸炎サーベイランスを実施した。研究対象地域外(仙台市)の小児専門科(2 医院)においては, 2011年より同様の急性胃腸炎サーベイランスを継続して行い, ウイルスの遺伝型の経緯を観察した。また2016年2月から研究対象地域内の老人保健施設に依頼し, 症状の有無にかかわらず入所者から月毎の定期的な検体採取を行うコホート研究を開始した。入所者もしくは家族の同意を得た上でコホートに登録し, 入所時の疫学情報, 日毎の症状・活動記録を収集した他, 月毎の定期的な検体および急性胃腸炎発症時の検体を採取し, ウイルス感染調査を行った。

研究対象地域において, 2012年11月から2016年7月までに急性胃腸炎患者から検体を採取した。合計427例について上記のウイルス診断を行い, そのうちウイルスが検出されたのは50%(213/427)であった。検出されたウイルスの内訳と経過について図4-1に示す。2012年11月から2013年9月までの検体の多くはA 医院から(A 医院:149/158, B 病院:9/158), 2013年10月から2015年11月までの検体はすべてC 医院(164/164), 2015年12月から2016年7月までの検体はC 医院(34/105)及びD 病院(71/105)からであった。検出されたウイルスの内訳は, ノロウイルスGII 群が最も多く(113/427, 26%), 次いでロタウイルス(31/427, 7%), サポウイルス(26/427, 6%)が主に検出された。ノロウイルスについては秋から冬にかけての明らかな流行ピークを認め, ロタウイルスでは春季に緩やかな流行が見られた。

ノロウイルス陽性例のうち, 遺伝子解析が可能であったノロウイルスGII 群陽性検体について, 遺伝子型の内訳の経過を図4-2に示す。ノロウイルスGII 群の遺伝子型は国内外で報告されているようにGII.4型が主であるが, その他にも複数の遺伝子型が散見された。特に, 2015年から2016年にかけては, 日本及び近隣のアジア諸国で2014/2015年シーズンに流行が報告されたGII.17型が多く検出された。また, サポウイルスについても遺伝子解析を行った。サポウイルスの内訳はGI 群が最も多く, GI.2型が11 検体, 次いでGI.1型(3 検体), GIV 型(3 検体)が多く検出された。ロタウイルスについては, ワクチン導入後の遺伝子型の変化を調査するため, 患者検体及び下水試料を用いて詳細に解析した(後述③)。

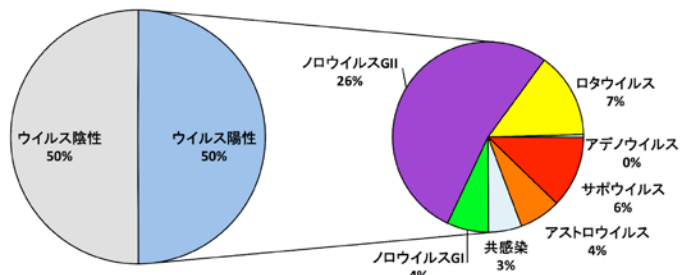
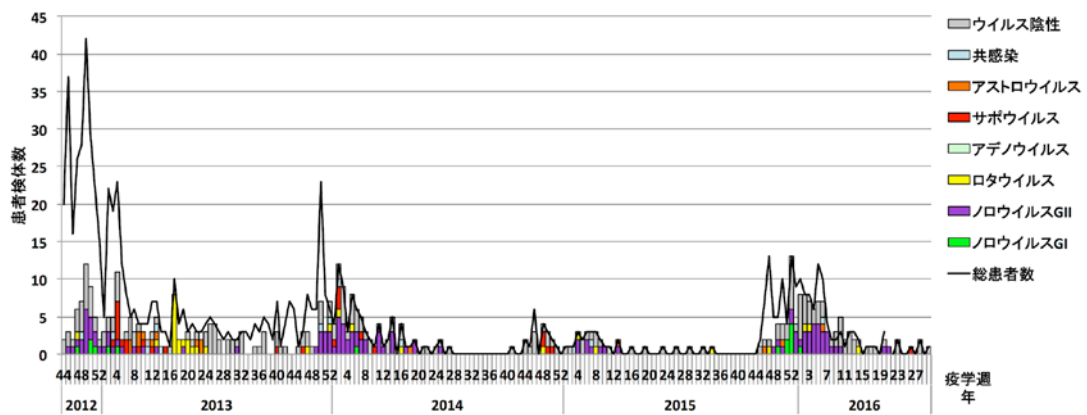


図 4-1. 急性感染性胃腸炎患者から検出されたウイルスの推移(上図, 2012 年 11 月 -2016 年 7 月, 松島町)及び, その内訳(左図)

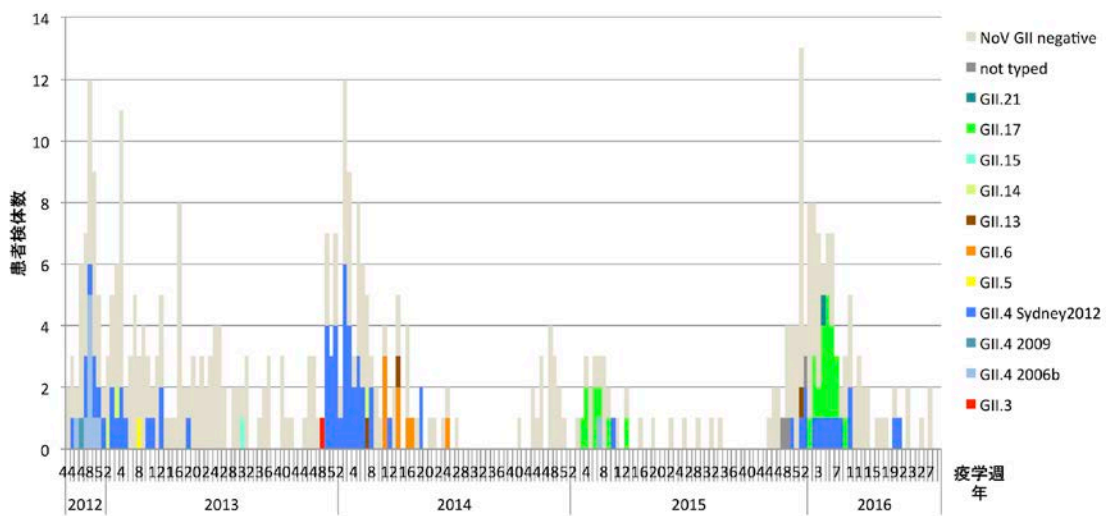


図 4-2. ノロウイルス GII 群の遺伝子型の推移

## ② ノロウイルス遺伝子型の新規同定法の開発

ノロウイルスが組換えを起こしやすい点を考慮し、検出方法の改良を行った。近年、遺伝子組み換えの多いノロウイルスの遺伝子型同定には、組み換えの起こりやすいカプシド領域とポリメラーゼ領域を合わせて遺伝子型同定する必要性が認識されてきた。そこで、ポリメラーゼ領域とカプシド領域を共に増幅し、両者の遺伝子型を同時に同定できる新たなプライマーの開発とプロトコル作成を検討した。これまでに、ノロウイルス GII 群に属する全ての遺伝子型を対象としたユニバーサルプライマーを開発し、リアルタイム PCR にてノロウイルス GII 群陽性あるいは陰性と診断された臨床検体(各 169 及び 127 検体)を用いて感度特異度分析を行った。カプシド領域のみを対象とした従来法(プライマー:G2SKF, G2SKR を用いた PCR)と比較したところ、従来法の感度が 76.3%、特異度が 96.9%であったのに対し、新規法では感度が 79.9%、特異度が 97.6%と、同等の感度・特異度が得られた(表 4-1)。また、従来法及び新規法による PCR の結果は非常によく一致すること(Cohen's kappa=0.87)が示された。ノロウイルス GII 群陽性検体 129 検体についてサンガー法による遺伝子解析を行ったところ、121 検体(90%)の塩基配列を解読することができた。その 121 検体中 5 検体については解読したポリメラーゼ領域の配列が短く、Norovirus Typing Tool (NoroNet)での遺伝子型同定が困難であったが、121 検体中 116 検体については遺伝子型の同定を行うことができた。従来法ではカプシドに基づく 14 の遺伝子型(GII.4 の亜型を含む)が検出されたのに対し、新規法ではポリメラーゼに基づく 13 の遺伝子型とカプシドに基づく 14 の遺伝子型の計 18 種類の組み合わせまでを分別することができた。この内、11 種類が遺伝子型間の組換えウイルスであった。また、2014/15 の冬季シーズンに初めて検出された新規遺伝子型 GII.P17-GII.17 についても、ポリメラーゼ領域・カプシド領域ともに問題なく遺伝子配列を解読することができた。以上より、新規法を用いることで、より詳細な分子疫学像を示すことができ、その有用性を示すことができた。

表 4-1. ノロウイルス GII 型 ORF1・2 領域の同定を目的とした新規法の感度特異度分析

プロトコル		リアルタイム PCR		感度 (%)	特異度 (%)
		(+)	(-)		
新規法	(+)	135	3	79.9	97.6
	(-)	34	124		
従来法	(+)	129	4	76.3	96.9
	(-)	40	123		
計		169	127		

## ③ ワクチン導入後のロタウイルス流行動向モニタリング

2011 年および 2012 年に 2 種類のロタウイルスワクチンが日本に導入されたが、ワクチン導入による新たなロタウイルス変異株の出現、ワクチン由来株の出現、あるいは流行遺伝子型の変化が危惧されている。そこで、2011 年 10 月から 2016 年 7 月にかけて、松島町(2012 年 11 月-2016 年 7 月)と仙台市(2011 年 10 月-2016 年 7 月)の急性胃腸炎患者及び松島町の下水試料(2012 年 2 月-2015 年 10 月)中のロタウイルスモニタリングを行った(図 4-3, 表 4-2)。下水試料中に含まれるロタウイルスの遺伝子型(G 型を決定する VP7 遺伝子)をパイロシーケンシング法により解析した結果、胃腸炎患者検体から得られた結果と同様、2012 年時に主要な遺伝子型であった G1 型が、2012 年 5 月、2013 年 3 月、および 2013 年 5 月の下水試料からも主として検出された。しかし、G1P[8]型のロタウイルス感染患者が大きく減少した 2014 年には、G2 型(2014 年 1 月)、さらに G3 型(2014 年 3 月)が G1 型と入れ替わるように下水から検出されており、患者・下水の両方で G1 型の減少が認められた。2014 年 5 月に主に検出された G3 型の遺伝子配列は、2013 年に仙台市の小児科に受診した症例で認められた G3P[4]型の G3 型と同一性が高かった。これらの G3 型は、ウマ由来のロタウイルスとして GenBank に報告されていたウイルス(Accession number:DQ981479)と同一性が高く、稀なロタウイルスとして我々が 2014 年に報告したものであ



る。下水中で G3 型が主要な遺伝子型として検出された時期に、胃腸炎患者検体に G3 型は認められず、サーベイランス範囲が不十分であることや医療機関を受診しない比較的軽症例や無症候性感染との関連などが示唆された。2016 年 4 月には神戸市保健所からも同様の G3 型遺伝子配列を持つロタウイルスが報告されており、今後も注意が必要であると考えられた。2015 年以降も引き続きロタウイルス感染患者の減少が観測されたが、患者検体から再び G1P[8]が検出され、下水試料中においても G3 型(但し、2014 年 1 月に検出された G3 型とは異なる、イヌ/ネコ由来ヒトロタウイルス[Accession number: HQ661117]と高い相同性を持つウイルス)の減少とともに G1 型の割合が増加していた。2012-2013 年には G1 型が多く急性胃腸炎を引き起こしていたが、2015 年に再び G1 型による感染が増加した際には、その多くが軽症あるいは無症候性の感染であることが示唆された。2012-2013 年に流行していた G1 型と 2015 年に検出された G1 型の遺伝子配列は相同性が高く、ワクチン接種もしくは 2012-2013 年の流行により獲得した免疫の影響で、感染は免れなかったものの重症例が減少した可能性が考えられた。尚、下水中にはロタウイルスワクチンに含まれている G 型の遺伝子と相同性の高い配列は認められず、本研究の対象地域では下水に含まれるワクチン由来株の濃度は検出限界以下であったと考えられた。これらの比較検討から、胃腸炎患者検体におけるロタウイルス遺伝子型の経時変化と同様に、下水中でも明らかな遺伝子型の変化が認められ、患者検体及び下水試料を用いたロタウイルス遺伝子解析調査が地域に流行しているロタウイルス遺伝子型の詳細なモニタリングに有用と考えられた。なお、この後 2016 後半期から 2017 年 3 月(研究終了時)までにロタウイルスの流行は認められなかった。

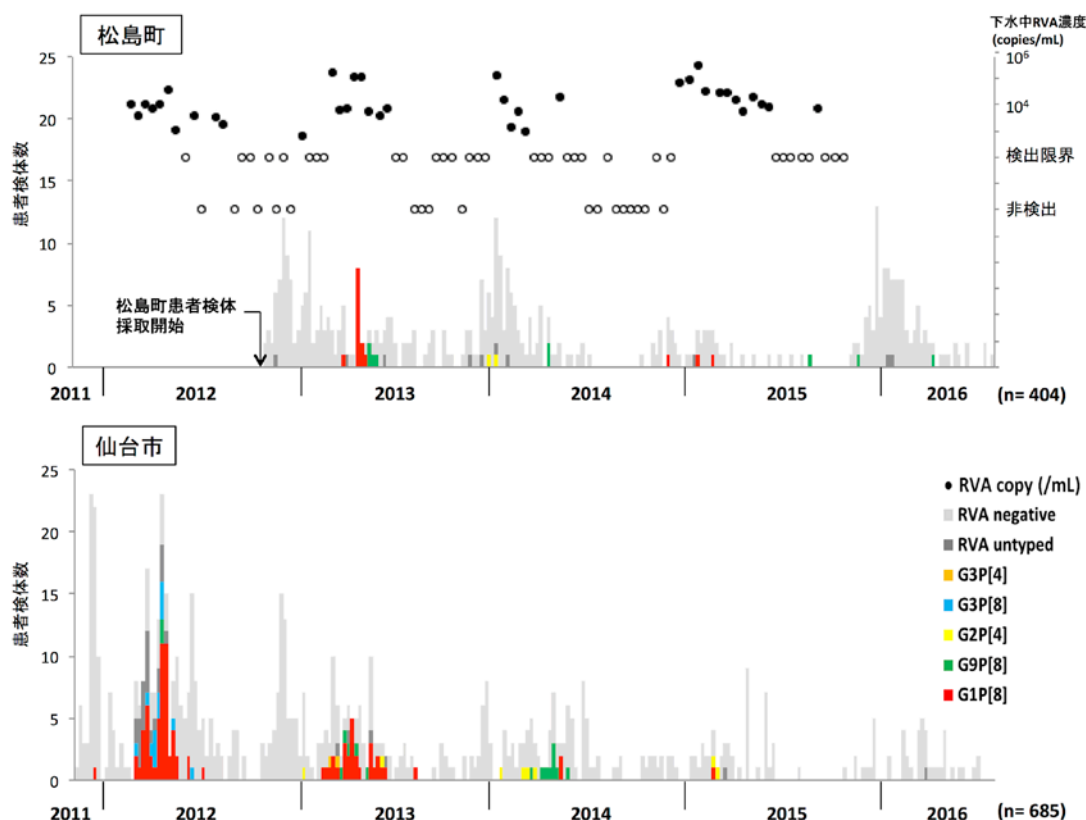


図 4-3. ワクチン導入後、松島町及び仙台市で得られた急性胃腸炎患者検体から検出されたロタウイルス(RVA)の経時変化と、同時期に松島町で採取された下水試料中の RVA 濃度の経時変化

表 4-2. 松島町で採取した下水試料中のロタウイルスの G 型の分布

	2012 年 5 月 2 日	2013 年 3 月 6 日	2013 年 5 月 1 日	2014 年 1 月 8 日	2014 年 5 月 7 日	2015 年 1 月 7 日	2015 年 1 月 21 日
G1 型	6257 (98.4%)	75591 (100%)	38217 (100%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	19005 (63.7%)	40634 (97.7%)
G2 型	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	19752 (100%)	11 (0.0%)	12 (0.0%)	971 (2.3%)
G3 型	99 (1.6%)	2 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	64873 (100%)	10830 (36.3%)	0 (0.0%)

#### ④ 老人保健施設における胃腸炎起因ウイルス感染のコホート調査

研究対象地域内の老人保健施設にて 2016 年 2 月より開始したコホート研究では、同意が得られた入所者について入所時の疫学情報と日毎の症状・活動記録を収集し、月毎の定期的な検体を採取した。検体採取を開始した 2016 年 3 月から 2017 年 3 月までの 13 ヶ月間に、計 13 名の入所者から症状の有無に関わらず 126 検体を採取した。同期間に得られた検体は全て無症候時の定期採取による検体であり、いずれのウイルスも検出されなかった。我々の先行研究では、急性胃腸炎を呈したノロウイルス感染者のみでは下水から検出されたノロウイルスの遺伝子型多様性を説明することができなかった。そのため、病院に来院しない軽症のノロウイルス感染者や無症候感染者が地域におけるノロウイルスの感染流行に寄与している可能性について調査した。2016 年の冬期では仙台市内および、隣接する病院の外来で GII.P16\_GII.2 型のノロウイルスが検出されていたものの、検査対象となった老人保健施設では、全ての検体でノロウイルスは陰性であった。2016 年冬季まで、本コホートを継続した。当該施設では 2012 年に起こったアウトブレイク以降、ノロウイルス感染予防対策(手洗い、生ものの差し入れの禁止など)を行っていたこと、経管栄養を行っている入居者が含まれていたこと、また便検体採取の難しさから、参加者が合計 13 名と少なかったことなどから、ノロウイルスの感染機会が少なかったと考えられた。

#### ⑤ 水監視システムからの感染流行検知システムの構築

松島町において水監視システムの実証実験を行うことを目的として、下水道、漁業、観光、食品・衛生、医療の関係者、および研究プロジェクトメンバーで構成される懇談会を組織し、2016 年 2 月 19 日に第 1 回目の会合を開いた。タスク1で明らかになった、松島浄化センター流入下水中のノロウイルス濃度と塩釜保健所管内の感染性胃腸炎患者報告数との有意な相関、および下水と患者便検体から検出されたノロウイルス株の高い相同性に基づいて、下水中に含まれる病原ウイルス監視と感染症対策の意義について説明した。懇談会では、実証実験の実施が承認されると同時に、以下の意見や課題が出された。

- ・ ノロウイルスは糞便中に大量に排出されるために下水処理で 99.9%除去しても処理水中に残存してしまうことから、環境中への排出を最低限にするには、感染予防対策といった住民の協力が必要である。
- ・ 情報の伝わり方や理解不足による風評被害や混乱を防ぐために、関係者やマスコミが正確な情報を発信し、住民に理解してもらうことが重要である。
- ・ 感染者の排泄物や吐瀉物の処理に注意するなどの具体的な二次感染対策を周辺の市や町と連携して実施できるような情報の共有が必要である。
- ・ 迅速な情報の収集および共有のためには、感染症の流行や食品衛生に関わっている保健所関連部局の参入が重要である。
- ・ 将来的に市町村や県の事業となった場合に、費用の負担や分析業務をどの部局が担当するのか。

地域の関係者や住民から幅広い理解と協力を得ることを目的として、第 1 回懇談会の開催日と同

日に研究プロジェクトの内容を説明するシンポジウムを開催した。会場にはおよそ 300 人が来場し、研究プロジェクトメンバーから水監視システムおよび感染予防対策について講演を行った後、漁業および観光の関係者を加えたパネルディスカッションを行った。シンポジウムでは、上述の懇談会から出された意見に加えて、来場者から以下のコメントを頂いた。

- ・ 松島ではノロウイルスによる胃腸炎に対して水監視システムに基づく対策をしているので、日本一、世界一安全なカキが食べられる、という PR をできることを目指す必要がある。
- ・ 2009 年にインフルエンザが大流行した際に、衛生的行動を促すことで胃腸炎患者数も減ったという事実をもっと公表し、水監視システムで情報が出た場合に、全地域の人が衛生的行動を実行すれば早く流行拡大を抑えることができ、それが安全につながるということをもっと強調すべきである。

来場者に対して行ったアンケート調査の結果、89%がノロウイルスによる胃腸炎の対策がより必要だと感じていること、67%がノロウイルスによる胃腸炎の対策に水監視システムが役立ちそうだと感じたことがわかった。

## 5. 開発した手法

本研究にて開発した手法について表 5 に示す。

表 5 本研究で開発した手法とその新規性・革新性

手法	目的	計測対象物	従来技術	本研究における計測方法・装置	新規性・革新性 (国内外比較)
パイロシーケンス法	下水・カキに含まれるノロウイルスの網羅的遺伝子型解析	ノロウイルス GI・GII	(クローニング+) サンガーシーケンス法	パイロシーケンス法・GS Junior system (Roche)	ノロウイルスの遺伝子型解析領域への適用及び下水中ウイルスへの適用は世界初
MFqPCR 法	下水中の病原ウイルスの網羅的かつ迅速な定量検出	AdV, AiV, AstV, EV, HAV, HEV, HPeV, NoV GI・GII・GIV, RV, SaV <sup>1)</sup>	AdV, AiV, AstV, EV, NoV GI・GII・GIV, RV, SaV, HAV, HEV <sup>1)</sup> を検出する MFqPCR 法	MFqPCR 法・BioMark HD system (Fluidigm)	Ishii ら (2014) の手法に HPeV を追加、及び HEV の検出感度を 10~100 倍向上させることに成功 Coudray-Meunier ら (2016) がコロナウイルス、パルボウイルス、コサウイルス、ボカウイルスを検出対象に追加し、臨床試料に適用
Q-LAMP 法	下水中のノロウイルスの迅速な検出	ノロウイルス GI・GII	リアルタイム PCR 法	7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)	本研究で設計した Quenching probe を LAMP 法に取り入れ、下水中のノロウイルス遺伝子を検出する方法は世界初

分子量分画膜を用いた新規 RNA 直接定量法	下水中の微生物の迅速な検出	微生物	逆転写・リアルタイム PCR 法	分子量分画膜を用いた RNA 直接定量法・蛍光分光光度計	逆転写反応を伴わずに、RNA を直接的に検出することに成功。また最大 3 種類の RNA を同時に定量することが可能。RNA を直接、複数種定量できる技術の中では、その迅速性は世界トップレベル。
新たなプライマーの開発及びプロトコル作成	糞便中のノロウイルスの遺伝子型解析	ノロウイルス GII	ポリメラーゼ領域及びカプシド領域を別々に PCR	パイロシーケンス法を適用することを前提にポリメラーゼからカプシド領域のおよそ 600 塩基を増幅	1 回の PCR で、国際的に多く使用されているカプシド領域の遺伝子型解析方法（国内発）と同等の感度でポリメラーゼ領域の遺伝子型解析もできるという点で新規性を持つ
カキ中腸腺からのウイルス回収法	カキ中の病原ウイルス定量検出のための前処理	病原ウイルス	中腸腺の物理的破碎による超純水へのウイルス誘出	誘出液の pH を下げる操作に加え、プロテナーゼ K、アミラーゼ、リパーゼの 3 種の酵素による有機物の分解	従来技術と比較してウイルスの検出感度を 40 倍向上させることに成功

#### §4. 成果発表等

##### 1. 原著論文発表 (国内(和文)誌 8件, 国際(欧文)誌 10件)

1. Watanabe, T., S. S. Teske, and C. N. Haas, Classic dose-response and time postinoculation models for *Leptospira*. *Risk Analysis*, 34(3): 465-484, 2013 (DOI: 10.1111/risa.12122).
2. 勝又雅博, 真砂佳史, 大村達夫. パイロシーケンシング法による下水中のノロウイルスの同定, 土木学会論文集 G(環境), 69(7): III\_639-III\_646, 2013, 2013 (DOI: 10.2208/jscejer.69.III\_639).
3. 伊藤紘晃, 真砂佳史, 植木洋, 渡部徹. 低 pH 抽出法及び酵素抽出法を用いた養殖カキからのノロウイルスの定量検出, 土木学会論文集 G(環境), 69, III\_657-III\_665, 2013 (DOI: 10.2208/jscejer.69.III\_657).
4. Takemura, Y., Sekiguchi, Y., Harada, H. and Kubota, K. A direct rRNA quantification method using molecular weight cut-off membrane, *Proceedings of the 1st International Forum on Asian Water Environment Technology*, 8-9, 2013.
5. 三浦郁修, 渡部徹, 渡辺幸三, 福士謙介. 家庭内での二次感染を考慮したノロウイルス感染症伝播モデルの構築, 土木学会論文集 G(環境), 70, III\_295-III\_304, 2014 (DOI: 10.2208/jscejer.70.III\_295).
6. 伊藤紘晃, 熊谷卓也, 風間しのぶ, 真砂佳史, 植木洋, 渡部徹. パイロシーケンシング法による養殖カキ中のノロウイルス GII の網羅的遺伝子解析, 土木学会論文集 G(環境)70, III\_305-III\_311, 2014 (DOI: 10.2208/jscejer.70.III\_305).
7. Malasao, R., Saito, M., Suzuki, A., Imagawa, T., Nukiwa-Soma, N., Tohma, K., Liu, X., Okamoto, M., Chaimongkol, N., Dapat, C., Kawamura, K., Kayama, Y., Masago, Y., Omura, T., Oshitani, H. Human G3P[4] rotavirus obtained in Japan, possibly emerged through a human-equine rotavirus reassortment event. *Virus Genes*, 50(1), 129-133, 2015 (DOI: 10.1007/s11262-014-1135-z).
8. 勝又雅博, 真砂佳史, 大村達夫, 原田秀樹. ハイブリダイゼーション法を用いた下水中の対象ウイルスゲノム回収手法の開発, 土木学会論文集 G(環境), 71(7), III\_329-III\_338, 2015 (DOI: 10.2208/jscejer.71.III\_329).
9. 風間しのぶ, 真砂佳史, 沼澤聡, 大村達夫. 下水中のポリ A 鎖を有する1本鎖(+)RNA ウイルスの選択的メタゲノム解析手法の検討, 土木学会論文集 G(環境), 71(7), III\_339-III\_349, 2015 (DOI: 10.2208/jscejer.71.III\_339).
10. 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 Research*, 92, 244-253, 2016 (DOI: 10.1016/j.watres.2015.10.024).
11. Liu, X., Jahuirra, H., Gilman, R.H., Alva, A., Cabrera, L., Okamoto, M., Xu, H., Windle, H.J., Kelleher, D., Varela, M., Verastegui, M., Calderon, M., Sanchez, G., Sarabia, V., Ballard, S.B., Bern, C., Mayta, H., Crabtree, J.E., Cama, V., Saito, M., Oshitani, H. Etiological role and repeated infections of sapovirus among children aged less than two years in a cohort study in a peri-urban community of Peru. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(6), 1598-15604, 2016 (DOI: 10.1128/JCM.03133-15).
12. Abe, M., Ueki, Y., Miura, T., Kimura, S., Suzuki, Y., Sugawara, N., Masago, Y., Omura, T., Watanabe, S. Detection of human parechoviruses in clinical and municipal wastewater samples in Miyagi, Japan, 2012-2014, *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 69(5), 414-417, 2016 (DOI: 10.7883/yoken.JJID.2015.551).
13. Masago, Y., Konta, Y., Kazama, S., Inaba, M., Imagawa, T., Tohma, K., Saito, M., Suzuki, A., Oshitani, H., Omura, T. Comparative evaluation of real-time PCR methods for human noroviruses in wastewater and human stool. *Plos One*, 11(8):e0160825, 2016 (DOI: 10.1371/journal.pone.0160825).

14. Miura, F., Watanabe, T., Watanabe, K., Takemoto, K., Fukushi, K. Comparative assessment of primary and secondary infection risks in a norovirus outbreak using a household model simulation. *Journal of Environmental Sciences*, 50, 13-20, 2016.
15. 伊藤絵里香, 伊藤紘晃, 浦劍, Nguyen Thanh Gia, 渡部徹. トウガラシ微斑ウイルスおよびアイチウイルスの牡蠣への蓄積とノロウイルス汚染指標としての利用可能性, 土木学会論文集 G(環境), 72(7), III\_295-III\_304, 2016.
16. 三浦尚之, 風間しのぶ, 今田義光, 真砂佳史, 当廣謙太郎, 真中太佳史, 劉曉芳, 齊藤繭子, 押谷仁, 大村達夫. 感染性胃腸炎流行の早期検知を目的とした下水中ノロウイルスモニタリングの有用性, 土木学会論文集 G(環境), 72(7), III 285-III295, 2016.
17. Pu, J., Kazama, S., Miura, T., Azraini, ND., Konta, Y., Ito, H., Ueki, Y., Cahyaningrum, EE., Omura, T., Watanabe, T. Pyrosequencing analysis of norovirus genogroup II distribution in sewage and oysters: first detection of GII.17 Kawasaki 2014 in oysters. *Food and Environmental Virology*, 8, 310-312, 2016 (DOI: 10.1007/s12560-016-9261-5)
18. Kazama, S., Miura, T., Masago, Y., Konta, Y., Tohma, K., Manaka, T., Liu, X., Nakayama, D., Tanno, T., Saito, M., Oshitani, H., Omura, T. Environmental surveillance of norovirus genogroups I and II for sensitive detection of epidemic variants. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(9), 2017, (DOI: 10.1128/AEM.03406-16).

## 2. その他の著作物(総説, 書籍など)

1. Kitajima, M., Watanabe, T. Risk assessment of highly pathogenic avian influenza virus infections through water, in: *Avian Influenza: Molecular Evolution, Outbreaks and Prevention/Control* (Eds. Taylor, K. M. and O'connor, B.), Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, U.S.A.
2. 真砂佳史, 水中の健康関連微生物検出に関する研究動向と新たなリスクの考え方, 水環境学会誌, 36(5): 146-150, 2013.
3. 植木洋, 木村俊介, 鈴木優子, 阿部美和, 菅原直子, 渡邊節, 木村博一, 片山和彦, 過去 4 シーズンに宮城県内で検出されたノロウイルス遺伝子の分子疫学, 病原微生物検出情報, 35(7), 7-8, 2014.
4. 水中の健康関連微生物研究委員会(片山浩之, 安井宣仁, 猪又明子, 田中宏明, 岸田直裕, 原本英司, 渡部徹, 真砂佳史, 浅田安廣, 端昭彦, 佐野大輔, 井原賢, 稲葉愛美), 水中の健康関連微生物に関する研究動向, 水環境学会誌, 37(A), 424-433, 2014.
5. 真砂佳史, 稲葉愛美, 風間しのぶ, 水環境のウイルスシーケンシング技術の発達により生態系での働きが明らかに, 生物の科学・遺伝, 69(4), 268-271, 2015.
6. 井原賢, 稲葉愛美, 佐野大輔, 衛生環境工学分野におけるマイクロバイオーム研究, 臨床と微生物, 42(6), 685-689, 2015.
7. Sano, D., Amarasiri, M. Hata, A., Watanabe, T., Katayama, H. Risk management of viral infectious diseases in wastewater reclamation and reuse: Review, *Environmental International*, 91, 220-229, 2016 (DOI: 10.1016/j.envint.2016.03.001).
8. 大村達夫, 下水中のウイルス監視に基づく地域の感染性胃腸炎流行状況の把握, 公衆衛生情報みやぎ, 457, 4-6, 2016

## 3. 国際学会発表及び主要な国内学会発表

(1) 招待講演 (国内会議 0 件, 国際会議 4 件)

1. Masago, Y.(東北大学), Human pathogens in water environment and its risk to human health. JSPS Workshop on Water and Urban Environment 2012, Lyon, France, June 20, 2012.

2. Masago, Y.(東北大学), Water sanitation and health in tropical countries, RSET Biomass Seminar 4, Kanazawa, Japan, December 1, 2013.
3. Omura, T.(東北大学), Early warning system for epidemics based on environmental survey data, Special Workshop on Health-Related Environmental Virology, Barcelona, Spain, May 27, 2015.
4. \*Omura, T.(東北大学), Construction of alert system for preventing the prevalence of infectious gastroenteritis with monitoring pathogenic viruses in raw sewage to WWTP, Asia-Pacific Wastewater Treatment and Reuse Conference, Singapore, June 29, 2015.

(2) 口頭発表 (国内会議 49 件, 国際会議 24 件)

1. 菅野未聖(東北大学), 真砂佳史, 大村達夫, 酵素を用いた流入下水からのウイルス誘出手法の比較検討, 平成 23 年度土木学会東北支部技術研究発表会, 秋田, 2012 年 3 月 3 日
2. 竹村泰幸(東北大学), 久保田健吾, 関口勇地, 原田秀樹, 分子量分画膜を用いた新規核酸定量法による環境微生物群の定量, 第 46 回日本水環境学会年会, 東京, 2012 年 3 月 16 日
3. 鈴木陽(東北大学), 2011/2012 冬期 仙台市内における下痢症ウイルスサーベイランス, 第 213 回日本小児科学会宮城地方会, 仙台, 2012 年 6 月 6 日
4. 星健太(山形大学), 伊藤紘晃, 渡部徹, 真砂佳史, 梶原晶彦, クエン酸緩衝液を用いたカキからのノロウイルス抽出, 第 18 回庄内・社会基盤技術フォーラム, 酒田, 2013 年 1 月 24 日.
5. 沼澤聡(東北大学), 真砂佳史, 大村達夫, 流入下水中の(+)一本鎖RNAウイルスのメタゲノミック解析, 2012 年度土木学会東北支部技術研究発表会, 仙台, 2013 年 3 月 9 日.
6. 勝又雅博(東北大学), 真砂佳史, 大村達夫, パイロシーケンサーを用いたウイルス同定技術の開発, 2012 年度土木学会東北支部技術研究発表会, 仙台, 2013 年 3 月 9 日.
7. 星健太(山形大学), 伊藤紘晃, 渡部徹, 真砂佳史, 植木洋, 梶原晶彦, 養殖カキに対するノロウイルス汚染の時空間的変動, 2012 年度土木学会東北支部技術研究発表会, 仙台, 2013 年 3 月 9 日.
8. 福士謙介(東京大学), 小規模コミュニティにおける水を介した感染症, 東京大学・天津市政府共同研究プロジェクト「都市と農村の融合に基づく持続的発展」2012 年度第2回日中共同セミナー, 東京, 2013 年 3 月 21-23 日.
9. Katsumata, M. (東北大学), Masago, Y., Omura T. Exhaustive identification of *Norovirus* by using pyrosequencing method. Water and Environment Technology Conference 2013, Tokyo, June 16, 2013.
10. Liu, X. (東北大学), Suzuki, A., Imagawa, T., Toma, K., Omura, T., Oshitani, H. Molecular detection of human sapovirus and astrovirus in acute gastroenteritis in Sendai and Matsushima, 日本細菌学会東北支部総会, 仙台, 2013 年 8 月 31 日.
11. Malasao, R. (東北大学), Suzuki, A., Imagawa, T., Oshitani, H., Genetic reassortment between unusual human G3P[4] *Rotavirus* strains and Equine Rotavirus in Sendai, Japan, 日本細菌学会東北支部総会, 仙台, 2013 年 8 月 31 日.
12. 渡部徹(山形大学), 伊藤紘晃, 真砂佳史, 植木洋, 梶原晶彦, 流入河川の影響に着目した養殖カキのノロウイルス汚染解析, 土木学会 2013 年度全国大会第 68 回年次学術講演会, 習志野, 2013 年 9 月 6 日.
13. Ito, H. (山形大学), Hoshi, K., Masago, Y., Ueki, Y., Watanabe, T., Seasonal accumulation of *Norovirus* to oyster in relation with epidemic situation around watershed, The 5th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition, Daejeon, Korea, September 11, 2013.
14. Ito, H. (山形大学), Hoshi, K., Masago, Y., Ueki, Y., Watanabe, T., *Norovirus* accumulation to oysters in estuary and its relationship to epidemic of gastroenteritis, 17th International Symposium on Health-Related Water

- Microbiology, Florianópolis, Brazil, September 15-20, 2013.
15. Masago, Y. (東北大学), Numazawa, S., Omura, T. Vast identification of positive-stranded RNA viruses in wastewater using pyrosequencing, The 17th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (WaterMicro2013), Florianópolis, Brazil, September 15-20, 2013.
  16. 伊藤紘晃(山形大学), 真砂佳史, 植木洋, 渡部徹, 養殖カキはどのようにしてノロウイルスに汚染されるのか?, 第9回もがみがわ水環境発表会, 山形, 2013年11月10日.
  17. 勝又雅博(東北大学), 真砂佳史, 大村達夫, パイロシーケンシング法による下水中のノロウイルスの網羅的同定, 第50回環境工学研究フォーラム, 札幌, 2013年11月19-21日.
  18. 伊藤紘晃(山形大学), 真砂佳史, 植木洋, 渡部徹, 低pH抽出法及び酵素抽出法を用いた養殖カキからのノロウイルスの定量検出, 第50回環境工学研究フォーラム, 札幌, 2013年11月21日.
  19. Anh, T.T.(東京大学), Jian, P., Fukushi, K. Transfer of microorganisms from hands to fomites after successive touches, JSPS-AASPP/GRENE Joint International Symposium on Water and Health in Urban Area, Hue, Vietnam, December 15-16, 2013.
  20. Nishimae, S.(東京大学), Jian, P., Fukushi, K. An improvement of dose-response model with immunologic and epidemiologic approach, JSPS-AASPP/GRENE Joint International Symposium on Water and Health in Urban Area, Hue, Vietnam, December 15-16, 2013.
  21. Takemura, Y.(東北大学), Sekiguchi, Y., Harada, H., Kubota, K. A direct rRNA quantification method using molecular weight cut-off membrane, The 1st International Forum on Asian Water Environment Technology, New Delhi, India, December 19, 2013.
  22. Masago, Y.(東北大学), Kazama, S., Numazawa, S., Omura, T. Identification of positive-strand RNA viruses in wastewater using pyrosequencing. The 2nd Global Leadership Initiative Special Workshop on Water Virology, Kusatsu, Japan, January 21, 2014.
  23. 熊谷卓也(山形大学), 伊藤紘晃, 梶原晶彦, 渡部徹, 真砂佳史, 植木洋, 養殖域におけるカキのノロウイルス汚染の消長, 第19回庄内・社会基盤技術フォーラム, 酒田, 2014年1月28日.
  24. 熊谷卓也(山形大学), 伊藤紘晃, 渡部徹, 真砂佳史, 植木洋, 梶原晶彦, 養殖カキに蓄積したノロウイルスの網羅的な検出・同定, 2012年度土木学会東北支部技術研究発表会, 八戸, 2014年3月8日.
  25. 風間しのぶ(東北大学), 真砂佳史, 大村達夫, +鎖RNAウイルスゲノムの完全長増幅における諸条件の検討, 第46回日本水環境学会年会, 仙台, 2014年3月17-19日.
  26. 伊藤紘晃(山形大学), 熊谷卓也, 渡部徹, 真砂佳史, 風間しのぶ, 植木洋, 養殖カキからのノロウイルス抽出における各種酵素の有効性の比較, 第48回日本水環境学会年会, 仙台, 2014年3月19日.
  27. 竹村泰幸(東北大学), 久保田健吾, 関口勇地, 原田秀樹, 分子量分画膜を用いた迅速・簡便なrRNA直接定量法による廃水処理微生物群の定量, 第48回日本水環境学会年会, 仙台, 2014年3月19日.
  28. Kazama, S.(東北大学), Masago, Y., Tohma, K., Souma, N., Imagawa, T., Suzuki, A., Liu, X., Saito, M., Oshitani, H., Omura, T. Detection and genotyping of *Norovirus* from gastroenteritis surveillance and wastewater monitoring in 2012-2013 winter. 4th International Conference on Food and Environmental Virology, Corfu, Greece, September 2-5, 2014.
  29. Ito, H.(山形大学), Kumagai, T., Kazama, S., Masago, Y., Ueki, Y., Watanabe, T., Application of new generation sequencing technique for *Norovirus* GII in oysters. 4th International Conference on Food and Environmental Virology, Corfu, Greece, September 2-5, 2014.



30. 風間しのぶ(東北大学), 真砂佳史, 当广謙太郎, 相馬奈央, 今川稔文, 鈴木陽, Xiaofang Liu, 齊藤繭子, 押谷仁, 大村 達夫, 下水モニタリングと感染性胃腸炎サーベイランスによるノロウイルス流行状況調査, 第 17 回水環境学会シンポジウム, 彦根, 2014 年 9 月 8-9 日.
31. 真砂佳史(東北大学), 風間しのぶ, 当广謙太郎, 齊藤繭子, 今川稔文, 鈴木陽, 押谷仁, 大村達夫, ノロウイルス GI, GII 群を対象としたリアルタイム PCR 法の比較, 第 17 回水環境学会シンポジウム, 彦根, 2014 年 9 月 8-9 日.
32. 三浦郁修(東京大学), 渡部徹, 渡辺幸三, 福士謙介, 家庭内での二次感染を考慮したノロウイルス感染症伝播モデルの構築, 第 51 回環境工学研究フォーラム, 甲府, 2014 年 12 月 20-22 日.
33. 伊藤紘晃(山形大学), 熊谷卓也, 風間しのぶ, 真砂佳史, 植木洋, 渡部徹, パイロシークエンシング法による養殖カキ中のノロウイルス GII の網羅的遺伝子解析, 第 51 回環境工学研究フォーラム, 甲府, 2014 年 12 月 20-22 日.
34. 有坂知朗(山形大学), 伊藤紘晃, 真砂佳史, 植木洋, 梶原晶彦, 渡部徹, 高感度検出法を用いたノロウイルスによる牡蠣汚染のモニタリング, 第 20 回庄内・社会基盤技術フォーラム, 酒田, 2015 年1月 14 日.
35. 有坂知朗(山形大学), 伊藤紘晃, 真砂佳史, 植木洋, 梶原晶彦, 渡部徹, 2014~2015 年シーズンの感染性胃腸炎流行期に至るまでの養殖牡蠣のノロウイルス汚染の動向, 2014 年度土木学会東北支部技術研究発表会, 多賀城, 2015 年 3 月 7 日.
36. 伊藤紘晃(山形大学), 有坂知朗, 真砂佳史, 植木洋, 渡部徹, パッシブサンプラーを用いた水中のウイルス連続モニタリングの実現可能性, 第 49 回水環境学会年会, 金沢, 2015 年 3 月 16-18 日.
37. 勝又雅博(東北大学), 真砂佳史, 原田秀樹, 大村達夫, ハイブリダイゼーション法を用いた下水中のウイルスゲノム回収手法の開発, 第 49 回日本水環境学会年会, 金沢, 2015 年 3 月 16-18 日.
38. 風間しのぶ(東北大学), 真砂佳史, 大村達夫, 下水中のポリ A 鎖を有するウイルスゲノムの選択的増幅手法の検討, 第 49 回日本水環境学会年会, 金沢, 2015 年 3 月 16-18 日.
39. 稲葉愛美(東北大学), 真砂佳史, 大村達夫, セライトを用いた下水流入水中のウイルス濃縮法の改善, 第 49 回日本水環境学会年会, 金沢, 2015 年 3 月 16-18 日.
40. 風間しのぶ, 真砂佳史, 当广謙太郎, 今田義光, 相馬奈央, 今川稔文, 鈴木陽, Liu Xiaofang, 齊藤繭子, 押谷仁, 大村達夫, 次世代シーケンサーを用いた下水モニタリングによるノロウイルス流行状況の把握, NGS 現場の会第4回研究会, つくば, 2015 年 7 月 1-3 日.
41. 真中太佳史(東北大学), 当广謙太郎, 風間しのぶ, 今川稔文, 嘉山益子, 川村和久, 中山大典, 齊藤繭子, 真砂佳史, 大村達夫, 押谷仁, ワクチン導入前後における下水および下痢症患者から検出されたロタウイルスの遺伝子型の変化, 第 69 回日本細菌学会東北支部総会, 郡山, 2015 年 8 月 22 日.
42. Miura, F.(東京大学), Watanabe, T., Watanabe, K., Fukushi, K., Importance of secondary infection within households in epidemic of waterborne infectious diseases, The 6th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition, Beijing, China, September 22, 2015.
43. 伊藤紘晃(山形大学), 養殖カキのウイルス汚染モニタリング, 2015 年度日本水環境学会東北支部セミナー, 鶴岡, 2015 年 10 月 17 日
44. Masago, Y.(国連大学), Kazama, S., Omura, T., Genotype distribution of Norovirus in wastewater from a wastewater treatment plant in Japan, 2015 International Environmental Engineering Conference (IEEC 2015), Busan, South Korea, October 30, 2015.
45. 風間しのぶ(東北大学), 真砂佳史, 沼澤聡, 大村達夫, 下水中のポリ A 鎖を有する1本鎖(+)RNA ウイルスの選択的メタゲノム解析手法の検討, 第 52 回環境工学研究フォーラム, 郡山, 2015 年 11 月 29 日.

46. 勝又雅博(東北大学), 真砂佳史, 大村達夫, 原田秀樹, ハイブリダイゼーション法を用いた下水中の対象ウイルスゲノム回収手法の開発, 第 52 回環境工学研究フォーラム, 郡山, 2015 年 11 月 29 日.
47. 三浦尚之(東北大学), 下水中の病原ウイルス監視による胃腸炎流行早期検知システムの開発, 日本水環境学会・水中の健康関連微生物研究委員会シンポジウム, 東京, 2015 年 12 月 15 日.
48. 真砂佳史(国連大学), 国内外の浴用水質基準の現状と課題, 日本水環境学会・水中の健康関連微生物研究委員会シンポジウム, 東京, 2015 年 12 月 15 日.
49. Miura, T.(東北大学), Detection of pathogenic viruses in sewage for an early warning system of gastroenteritis, Workshop on CREST Project, Singapore, December 17, 2015.
50. Saito, M.(東北大学), Epidemiology and genetic diversity of viral agents causing acute gastroenteritis, Workshop on CREST Project, Singapore, December 17, 2015.
51. Tohma, K.(東北大学), Molecular epidemiology of infectious diseases and next generation sequencing, Workshop on CREST Project, Singapore, December 17, 2015.
52. Watanabe, T.(山形大学), QMRA and its application, Workshop on CREST Project, Singapore, December 17, 2015.
53. 伊藤絵里香(山形大学), Nguyen Thanh Gia, 伊藤紘晃, 梶原晶彦, 渡部徹, 牡蠣からのノロウイルス, アイチウイルス, トウガラシ微斑ウイルスの検出, 第 21 回庄内・社会基盤技術フォーラム, 酒田, 2016 年 1 月 21 日.
54. 大村達夫(東北大学), 地域と家庭で取り組む感染症胃腸炎対策, Beautiful and Healthy 松島シンポジウム, 松島, 2016 年 2 月 19 日.
55. 押谷仁(東北大学), 地域と家庭で取り組む感染症胃腸炎対策, Beautiful and Healthy 松島シンポジウム, 松島, 2016 年 2 月 19 日.
56. 伊藤絵里香(山形大学), 伊藤紘晃, Nguyen Thanh Gia, 浦剣, 渡部徹, トウガラシ微斑ウイルスの養殖牡蠣ノロウイルス汚染指標としての可能性, 2015 年度土木学会東北支部技術研究発表会, 盛岡, 2016 年 3 月 5 日.
57. 風間しのぶ(東北大学), 三浦尚之, 今田義光, 真砂佳史, 当広謙太郎, 真中太佳史, 相馬奈央, 今川稔文, 鈴木陽, 劉曉芳, 斉藤繭子, 中山大典, 押谷仁, 大村達夫, 流入下水監視によるノロウイルス感染症発生動向調査, 第 50 回日本水環境学会年会, 徳島, 2016 年 3 月 18 日.
58. Xu, H.(東北大学), Liu, X., Tohma, K., Masago, Y., Nakayama, D., Kayama, Y., Kawamura, K., Gilman, R.H., Mayta, H., Tandoc III AO., Mercado, E.S., Saito, M., Omura, T., Oshitani, H. A novel sensitive protocol for genotyping of norovirus genogroup II recombinants, 第 70 回日本細菌学会東北支部総会, 青森, 2016 年 8 月 19 日.
59. 伊藤絵里香(山形大学), 伊藤紘晃, Pu Jian, Nguyen T. Gia, 渡部徹, 養殖牡蠣ノロウイルス汚染指標としての PMMoV とアイチウイルスの利用可能性, 土木学会第 71 回年次学術講演会, 仙台, 2016 年 9 月 9 日.
60. Saito, M.(東北大学), Kazama, S., Tohma, K., Masago, Y., Konta, Y., Miura, T., Imagawa, T., Manaka, T., Liu, X., Omura, T., Oshitani, H. Wastewater monitoring, filling gaps between clinical and environmental pathogens, 5th Food and Environmental Virology Conference, Kusatsu, Japan, September 14, 2016.
61. Miura, T.(東北大学), Kazama, S., Konta, Y., Masago, Y., Tohma, K., Manaka, T., Liu, X., Saito, M., Oshitani, H., Omura, T. Sewage monitoring of noroviruses for an early warning system of gastroenteritis, 5th Food and Environmental Virology Conference, Kusatsu, Japan, September 14, 2016.
62. Ito, E.(山形大学), Ito, H., Masago, Y., Ueki, Y., Watanabe, T. Investigation of Aichi virus and Pepper mild mottle virus for indicators of Norovirus contamination in

- oysters. ISFEV2016, Kusatsu, Japan, September 16, 2016.
63. Saito M. (東北大学), Epidemiological evidences for antigenic diversity of norovirus and sapovirus in community studies, Lorentz Center Workshop. Innate Immunity of Crops, Livestock and Fish: “The Dawn of Agricultural Immunology”, the Netherlands, September 21, 2016.
  64. Miura, T. (東北大学), Kazama, S., Konta, Y., Masago, Y., Tohma, K., Manaka, T., Liu, X., Saito, M., Oshitani, H., Omura, T. Sewage sample analysis using pyrosequencing: temporal change in norovirus genotypes circulating in Miyagi, Japan, 2013–2016, The 6th International Calicivirus Conference, Savannah, GA, USA, October 9-13, 2016.
  65. 三浦尚之(東北大学), 風間しのぶ, 今田義光, 真砂佳史, 当廣謙太郎, 真中太佳史, 劉曉芳, 斉藤繭子, 押谷仁, 大村達夫, 感染性胃腸炎流行の早期検知を目的とした下水中ノロウイルスモニタリングの有用性, 第 53 回環境工学研究フォーラム, 北九州, 2016 年 12 月 6 日.
  66. 伊藤絵里香(山形大学), 伊藤紘晃, 浦劍, Nguyen Thanh Gia, 渡部徹, トウガラシ微斑ウイルスおよびアイチウイルスの牡蠣への蓄積とノロウイルス汚染指標としての利用可能性, 第 53 回環境工学研究フォーラム, 北九州, 2016 年 12 月 6 日.
  67. Shinobu Kazama (東北大学), Takayuki Miura, Yoshifumi Masago, Yoshimitsu Konta, Kentaro Tohma, Takafumi Manaka, Xiaofang Liu, Daisuke Nakayama, Takashi Tanno, Mayuko Saito, Hitoshi Oshitani, Tatsuo Omura. Norovirus monitoring in sewage as a tool for detecting infectious gastroenteritis and genotypes circulating in human populations. The 2017 Japan-NIH joint Symposium on Advances in Biomedical Research and Disease, Workshop 1: Infectious Diseases, Seiryō Auditorium, Tohoku University, February 17, 2017.
  68. Saito, M. Genetic Diversity of Norovirus and Saporvirus in Multiple Infection Among Birth Cohort Children. NIH –Japan JSPS Symposium, Highlights from the frontiers of biomedical science from NIH and Japan. Sendai, Japan, February 16-17, 2017.
  69. 浦劍(山形大学), 伊藤絵里香, 風間しのぶ, 三浦尚之, 今田義光, 渡部徹, Temporal genotype variation of Norovirus genogroup II in oysters analyzed by pyrosequencing, 平成 28 年度土木学会東北支部技術研究発表会, 仙台, 2017 年 3 月 4 日.
  70. 三浦尚之(国立保健医療科学院), 風間しのぶ, 真砂佳史, 今田義光, 大村達夫, ノロウイルス GII.4 Sydney 2012 および GII.17 Kawasaki 2014 株のカキへの蓄積性, 第 51 回日本水環境学会年会, 熊本, 2017 年 3 月 15 日.
  71. 風間しのぶ(東北大学), 三浦尚之, 今田義光, 真砂佳史, 大村達夫, ハイスループット qPCR 法による流入下水中ヒト消化器系ウイルスの一斉モニタリング, 第 51 回日本水環境学会年会, 熊本, 2017 年 3 月 15 日.
  72. Pu Jian (山形大学), Kazama Shinobu, Miura Takayuki, Ito Erika, Konta Yoshimitsu, Watanabe Toru. Temporal variation of Norovirus genogroup II in Japanese oysters by applying pyrosequencing analysis. 2017 Water Microbiology Conference, Chapel Hill, NC, USA, May 15-19, 2017.
  73. Fuminari Miura(東京大学), Toru Watanabe, Kozo Watanabe, Kensuke Fukushi. Time series analysis of seasonal correlation between concentration of norovirus in sewage and clinical cases of acute gastroenteritis. 19th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, Chapel Hill, NC, USA, May 15-19, 2017.
- (3)ポスター発表 (国内会議 4件, 国際会議 19件)
1. Takemura, Y. (東北大学), Sekiguchi, Y., Harada, H., Kubota, K. A novel direct rRNA quantitative detection method using molecular weight cut-off membrane. 14th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-14), Copenhagen, Denmark, August 21, 2012.

2. Masago, Y. (東北大学), Numazawa, S., Omura, T. Metagenomic analysis of positive stranded viruses in wastewater in Japan. The 5th Congress of European Microbiologists (FEMS 2013), Leipzig, Germany, July 24, 2013.
3. Takemura, Y. (東北大学), Sekiguchi, Y., Harada, H. and Kubota, K., Development of a novel RNA quantification method using molecular weight cut-off membrane, 5th Congress of European Microbiologists FEMS2013, Leipzig, Germany, 2013年7月23日.
4. Ueki, Y. (宮城県保健環境センター), Kawabata, Y., Sato, T., Okimura, Y., Masago, Y., Konta, Y., Omura, T. Detection of *Norovirus* from oyster by bead beating with low pH buffer, The 17th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (WaterMicro2013), Florianópolis, Brazil, September 15-20.
5. 植木洋 (宮城県保健環境センター), 木村俊介, 鈴木優子, 阿部美和, 佐藤俊郎, 真砂佳史, 大村達夫. Q(Quenching)プローブを用いた LAMP 法によるノロウイルスの検出, 第34回日本食品微生物学会学術総会, 東京, 2013年10月3-4日.
6. Anh, T. T. (東京大学), Fukushi, K. Transmission of microorganisms from contaminated common fomite to hands after successive contacts for microbial health risk assessment, Water and Environment Technology Conference 2014, Tokyo, Japan, June 28-29, 2014.
7. Takemura, Y. (東北大学), Sekiguchi, Y., Harada, H., Kubota, K. Multiplex quantification of methanogens in anaerobic bioreactors by a novel direct rRNA quantification method, 15th International Symposium on Microbial Ecology (ISME15), Seoul, South Korea, August 25, 2014.
8. Masago, Y. (東北大学), Kazama, S., Tohma, K., Saito, M., Suzuki, A., Oshitani, H., Omura, T. Amplification efficiency of real-time PCR assays targeting Norovirus GI and GII. 4th International Conference on Food and Environmental Virology, Corfu, Greece, September 2-5, 2014.
9. Tohma, K. (東北大学), Masago, Y., Gilman, R.H., Jahuir, H., Omura, T., Saito, M., Oshitani, H. Novel protocol to detect recombinant Noroviruses and its application to the next generation sequencing. NIH-Japan-JSPS Symposium 2014, National Institutes of Health (NIH), Bethesda, USA, October 23-24, 2014.
10. Masago, Y. (国連大学), Katsumata, M., Kazama, S., Harada, H., Omura, T., Selective metagenomic approach to identify viral RNA genome in sewage, 18th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (WaterMicro2015), Lisbon, Portugal, September 15, 2015.
11. Kazama, S. (東北大学), Masago, Y., Saito, M., Liu, X., Gilman, R.H., Mayta, H., Jahuir, H., Sanchez, G., Oshitani, H., Omura, T., Presence of pepper mild mottle virus in infant stools: How can it be?, 18th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (WaterMicro2015), Lisbon, Portugal, September 15, 2015.
12. Ueki, Y. (宮城県保健環境センター), Kimura, S., Watanabe, S., Okimura, Y., Masago, Y., Konta, Y., Miura, T., Sano, D., Omura, T., Detection of Norovirus in sewage by quenching probe based loop-mediated isothermal amplification (Q-LAMP) method, 18th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (WaterMicro2015), Lisbon, Portugal, September 15, 2015.
13. Ito, H. (山形大学), Arisaka T., Ueki Y., Watanabe T., Aichivirus A and pepper mild mottle virus as indicators of Norovirus in oysters, 18th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (WaterMicro2015), Lisbon, Portugal, September 15, 2015.
14. Manaka, T. (東北大学), Tohma, K., Kazama, S., Imagawa, Y., Kayama, Y., Kawamura, K., Nakayama, D., Saito, Y., Masago, T., Omura, T., Oshitani, H. Comparison of group A rotavirus VP7 gene in between clinical and sewage water

- samples after rotavirus vaccine introduction, 第 63 回日本ウイルス学会, 福岡, 2015 年 11 月 23 日.
15. 羽鳥伸吾(東北大学), 久保田健吾, 李玉友, 磁性ビーズを用いた新規核酸定量法の開発, 第 50 回日本水環境学会年会, 徳島, 2016 年 3 月 16 日.
  16. Kazama, S.(東北大学), Masago, Y., Miura, T., Konta, Y., Omura, T. Development of a selective-metagenomic method for human enteric viruses in wastewater, 5th Food and Environmental Virology Conference (ISFEV2016), Kusatsu, September 14, 2016.
  17. Cahyaningrum, EE., Azraini, ND., Ito H.(山形大学), Pu, J. Watanabe, T. Spatio-temporal distribution of Norovirus GII accumulated in oysters at a farming area in Japan. 5th Food and Environmental Virology Conference (ISFEV2016), Kusatsu, Japan, September 14, 2016.
  18. Azraini, ND., Cahyaningrum, EE., Pu, J.(山形大学), Shinobu Kazama, Konta, Y., Miura, T., Omura, T., Ito, H. Watanabe, T. Genotyping of Norovirus GII detected in oysters during 2014 gastroenteritis-epidemic season in Japan. 5th Food and Environmental Virology Conference (ISFEV2016), Kusatsu, Japan, September 14, 2016.
  19. Manaka, T.(東北大学), Tohma, K., Kazama, S, Imagawa, T., Konta, Y., Kayama, Y., Kawamura, K., Nakayama, D., Saito, M., Miura, T., Omura, T., Oshitani, H. Comparison of group A rotavirus G genotype in between clinical and sewage water samples after rotavirus vaccine introduction, 5th Food and Environmental Virology Conference (ISFEV2016), Kusatsu, September 14, 2016.
  20. Kazama, S.(東北大学), Masago, Y., Miura, T., Konta, Y., Omura, T. Distribution of human caliciviruses identified in municipal wastewater by metagenomic analysis using a newly developed method, The 6th International Calicivirus Conference, Savannah, GA, USA, October 9-13, 2016.
  21. Tohma, K.(東北大学), Jahuir, H., Gilman, RH., Cabrera, L., Omura, T., Saito, M., Oshitani, H. Intra-host norovirus population and transmission dynamics among family members, The 6th International Calicivirus Conference, Savannah, GA, USA, October 9-13, 2016.
  22. 風間しのぶ(東北大学), 真砂佳史, 三浦尚之, 今田義光, 大村達夫. 下水中のヒト消化器ウイルスの検出を目的とした 選択的メタゲノム解析手法の開発, 第 53 回環境工学研究フォーラム, 北九州, 2016 年 12 月 6 日.
  23. Hang Xu(東北大学), Xiaofang Liu, Kentaro Tohma, Yoshifumi Masago, Daisuke Nakayama, Yasuko Kayama, Kazuhisa Kawamura, Takafumi Manaka, Robert H. Gilman, Holger Mayta, Amado O. Tandoc, Edelwisa S. Mercado, Mayuko Saito, Tatsuo Omura, Hitoshi Oshitani. The new norovirus GII typing assay amplifying polymerase and capsid regions. NIH –Japan JSPS Symposium, Highlights from the frontiers of biomedical science from NIH and Japan. Sendai, Japan, February 16-17, 2017.

#### 4. 知財出願

- (1) 国内出願 (0 件)
- (2) 海外出願 (0 件)
- (3) プログラムの著作物 (0 件)
- (4) データベースの著作物 (0 件)

## 5. 受賞・報道等

### (1) 受賞

1. 土木学会 第 50 回環境工学研究フォーラム論文奨励賞, 受賞者:勝又雅博, 受賞論文:パ  
イロシーケンシング法による下水中のノロウイルスの同定, 土木学会論文集 G(環境), 69(7):  
III\_639-III\_646, 2013.
2. 2014 年度土木学会研究業績賞, 大村達夫, 2015 年 6 月.
3. \*土木学会 第 52 回環境工学研究フォーラム論文賞, 受賞者:風間しのぶ, 真砂佳史, 沼澤  
聡, 大村達夫, 受賞論文:下水中のポリ A 鎖を有する1本鎖(+)RNA ウイルスの選択的メタ  
ゲノム解析手法の検討, 土木学会論文集 G(環境), 71(7), III\_339-III\_349, 2015.
4. The 5th Food and Environmental Virology Conference, Best Poster Award, 受賞者:  
Kazama S, Masago Y, Miura T, Konta Y, Mamoru Ihara, Hiroaki Tanaka, and  
Omura T, Title: Development of a selective-megatenomic method for human  
enteric viruses in wastewater
5. 土木学会 第 53 回環境工学研究フォーラム論文賞, 受賞者:三浦尚之, 風間しのぶ, 今田  
義光, 真砂佳史, 当戸謙太郎, 真中太佳史, 劉曉芳, 斉藤繭子, 押谷仁, 大村達夫. 感染  
性胃腸炎流行の早期検知を目的とした下水中ノロウイルスモニタリングの有用性, 土木学会  
論文集 G(環境), 72(7), III\_285-III\_295, 2016

### (2) マスコミ(新聞・TV等)報道

1. 日本水道新聞, 2012 年 11 月 15 日.
2. 水道産業新聞, 2013 年 1 月 3 日.
3. 日本水道新聞, 「水の未来 50 年後の姿」 持続可能な水利用を実現する革新的な技術創  
出へ, 2013 年 1 月 24 日.
4. NHK てれまさむね, 暮らし安心・安全「ウイルス流行 いち早く把握」, 2014 年 10 月 21 日.
5. NHK 情報まるごと, 「ノロウイルスの季節へ・流行の兆し素早く探知」, 2014 年 10 月 28 日.
6. 河北新報, 「胃腸炎流行 迅速把握, 東北大グループが手法開発 宮城・松島で実証試験  
へ」, 2016 年 1 月 24 日.
7. 日本下水道新聞, 「東北大学 処理場でノロウイルス監視」, 2016 年 2 月 17 日.
8. 河北新報, 「下水監視し感染症予防, ノロウイルス測定システム実証へ, 東北大グループ宮  
城・松島でシンポ」, 2016 年 2 月 20 日.
9. 朝日新聞, 「下水監視でノロ流行防げ 東北大, 松島で」, 2016 年 4 月 4 日.
10. 朝日新聞, 「ノロウイルスが猛威 幼児中心に例年の数倍」, 2016 年 12 月 6 日

### (3) その他

なし。

## 6. 成果展開事例

### (1) 実用化に向けての展開

なし。

### (2) 社会還元的な展開活動

- 得られた成果について「クエン酸緩衝液を用いたカキからのノロウイルス抽出」という題目(講  
演者:星健太)で, 第 18 回庄内・社会基盤技術フォーラム(酒田, 2013 年 1 月 24 日)におい  
て, 研究紹介を行った。
- 得られた成果について「養殖ガキはどうしてノロウイルスに汚染されるのか?」という題目(講演  
者:伊藤紘晃)で, 第 9 回もがみがわ水環境発表会(山形, 2013 年 11 月 10 日)において, 研  
究紹介を行った。
- 得られた成果について「養殖域におけるカキのノロウイルス汚染の消長」という題目(講演者:  
熊谷卓也)で, 第 19 回庄内・社会基盤技術フォーラム(酒田, 2014 年 1 月 28 日)において,

研究紹介を行った。

- 得られた成果について「Viral pathogens in the water environment」という題目(講演者:真砂佳史)で, GRANDE Café(La Paz, Bolivia, July 19, 2012)において, 研究紹介を行った。
- 得られた研究成果を紹介し, 感染症の予防を考える「Beautiful and Healthy 松島」シンポジウムを開催し, 300名の観客を集めた。その中で, 「病原微生物検出による水監視システムについて」(講演者:大村達夫)および「地域と家庭で取り組む感染性胃腸炎対策」(講演者:押谷仁)という題目で講演を行った。
- 得られた成果について「高感度検出法を用いたノロウイルスによる牡蠣汚染のモニタリング」という題目(講演者:有坂知朗)で, 第20回庄内・社会基盤技術フォーラム(酒田, 2015年1月14日)において, 研究紹介を行った。
- 得られた成果について「養殖カキのウイルス汚染モニタリング」という題目(講演者:伊藤紘晃)で, 2015年度日本水環境学会東北支部セミナー(鶴岡, 2015年10月17日)において, 研究紹介を行った。
- 得られた成果について「牡蠣からのノロウイルス, アイチウイルス, トウガラシ微斑ウイルスの検出」という題目(講演者:伊藤絵里香)で, 第20回庄内・社会基盤技術フォーラム(酒田, 2016年1月21日)において, 研究紹介を行った。
- 得られた成果について「水が結ぶ生活環境と農・畜・水産業」という題目(講演者:渡部徹)で, 平成28年度山形大学農学部公開講座(鶴岡, 2016年6月4日)において, 研究紹介を行った。

(3) 他分野への波及効果

なし。

## §5. 研究期間中の活動

### 5-1. 主なワークショップ, シンポジウム, アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2011年 10月18-19日	サイトビジット	東北大学, 松島町	9人	領域アドバイザーとの打ち合わせ, 現地視察
2012年 8月20日	西浦博先生, 本村和嗣先生講演会	東北大学	30人	学術交流
2012年 10月20日	1st symposium on innovation of water monitoring system with rapid, highly precise and exhaustive pathogen detection technologies	東北大学	35人	学術交流
2012年 11月19日	2nd special lecture on innovation of water monitoring system with rapid, highly precise and exhaustive pathogen detection technologies	東北大学	35人	学術交流
2013年 6月12-13日	CREST 横断ミーティング	東北大学	14人	成果報告, 討議
2013年 10月22日	CREST 横断ミーティング	京都大学	50人	成果報告
2013年 10月29日	東北医学会特別講演会	東北大学	50人	学術交流
2013年 11月28日	第7回ノロウイルス勉強会	仙台市 漁信基ビル	11人	CREST 研究概要の説明
2015年 5月27日	国際ワークショップ	バルセロナ大学	50人	成果発表, 学術交流
2015年 7月30-31日	サイトビジット	山形大学	18人	成果報告, 討議
2015年 12月17日	国際ワークショップ	シンガポール 国立大学	30人	成果発表, 学術交流
2016年 9月12日	国際ワークショップ Special Workshop: How to deal with the infection risk of waterborne pathogenic viruses	東北大学	70人	成果発表, 学術交流
2016年 9月14日	ISFEV2016 CREST Special Session	草津市	120人	成果発表, 学術交流



2017年 2月16-17日	NIH –Japan JSPS Symposium, Highlights from the frontiers of biomedical science from NIH and Japan "Workshop 1: Infectious Diseases "	東北大学	33人	成果発表, 学術交流
-------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------	-----	------------

## §6. 最後に

水監視システムの開発を目的とした本 CREST プロジェクトを通じて、学術的に重要な知見が数多く得られ、それが原著論文として国内誌および国際誌に掲載された。水監視システムの社会実装に向けて、それらの成果を明確な科学的根拠として示すことができた。また、社会実装に向けた取り組みを通じて、下水道や公衆衛生の行政担当者および技術者との交流が深まり、下水道や公衆衛生のニーズに合致した今後の研究展開を考案するに至った。最後に、本プロジェクトメンバーの思い出に残る実験室や下水処理場の様子を写真で紹介する。

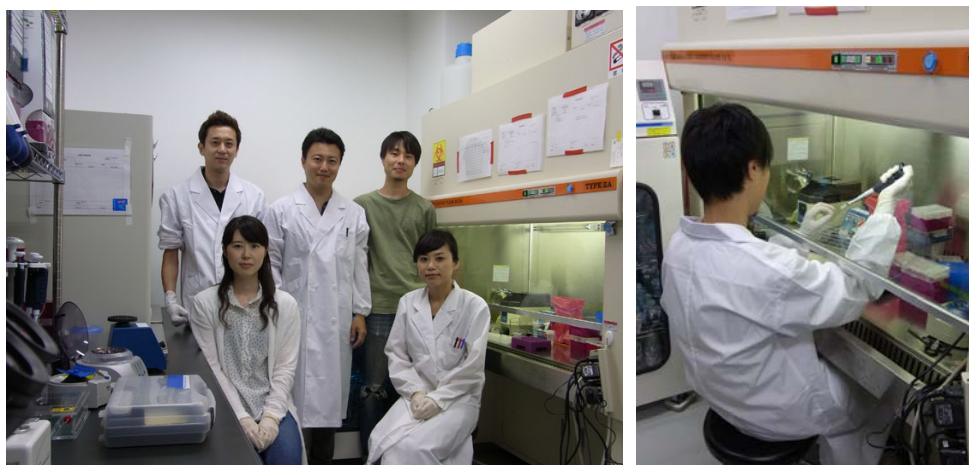


写真 1. 東北大学大学院工学研究科・社会環境工学実験棟・病原微生物実験室



写真 2. カキサンプルの分析作業風景(山形大学農学部)



写真 3. 松島浄化センター視察(2011年10月19日サイトビジット, 東北大学)



写真 4. カキからのウイルス回収操作の実演(2015年7月30日サイトビジット, 山形大学農学部)