

# 下水検体を用いたエンテロウイルスD68遺伝子型別サーベイランスの試みとヒト臨床検体との比較解析

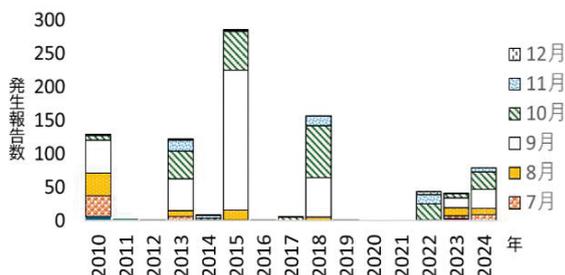
島根県保健環境科学研究所

○安達 俊輔 藤澤 直輝 和田 美江子  
田原 誉利子 川瀬 遵

## 1 はじめに

エンテロウイルスD68（以下「EV-D68」とする。）は、主に小児に呼吸器感染症を引き起こすウイルスで、1962年にアメリカで初めて分離された。2000年代後半以降、世界的に検出報告が増加し、2014～2015年には大規模な流行が発生した。この流行では急性弛緩性麻痺の症例が多く確認されたため、日本では「急性弛緩性麻痺（急性灰白髄炎を除く）」が五類感染症の全数把握対象疾患に追加されるなど、社会的に強い関心を集める感染症となった。

日本では、2010年に検出数が急増して以来、2～3年周期で秋季に流行を繰り返してきたが、2022年から3年連続で多数の検出が報告されている（第1図）。



第1図 全国のEV-D68検出報告数 2010年～2024年 (NESID病原体検出情報2025年6月1日時点を図示)

EV-D68は主要な抗原が含まれているVP1領域の塩基配列に基づき、A～Cの遺伝子型と複数の亜型に分類され、近年はA2型およびB3型が主に検出されている。遺伝子型ごとに抗原性が異なり、優勢な遺伝子型の変化が流行に関与した例が報告された[1]。また、流行のおよそ1年前からVP1領域に変異を有するEV-D68が出現し、その後の流行株として拡大したことを示唆する報告もある[2]。これらのことから、遺伝子型や変異株の動向を平時から継続的に把握することが、流行予測に有用と考えられるが、非流行期に臨床検体から検出されることは稀で、継続的な監視は困難なことが課題である。したがって、この課題を解決するには、臨床検体以外の検体でも監視できる方法を構築することが有効と考える。

最近海外で行われた研究で、下水中のEV-D68の

動態が臨床的な流行状況と一致する傾向にあると複数報告された[3,4,5]。そこで、今回、県内のEV-D68監視に下水検体を用いることが有効であるか検討するため、2024年に採水した下水及び臨床検体からEV-D68検出を試み、陽性率を比較した。また、下水検体から、県内に浸潤しているEV-D68の遺伝子型の構成を明らかにできるかを複数の方法で検討し、これらと過去10年間の臨床検体検出事例を含めて分子系統解析を行ったので報告する。

## 2 材料及び方法

### (1) 供試検体

- 下水検体：2024年9月～12月に下水処理場1か所で採水した8検体  
[採水日 9/11、9/24、10/8、10/22、11/15、11/26、12/10、12/24]
- 臨床検体：2024年9月～12月に医療機関から提供された臨床検体262検体  
[年齢別内訳 10歳以下：150検体 11-59歳：76検体 60歳以上：36検体]  
2015年～2018年にEV-D68が検出された臨床検体14検体(全て10歳以下)

### (2) 核酸抽出とリアルタイムRT-PCR

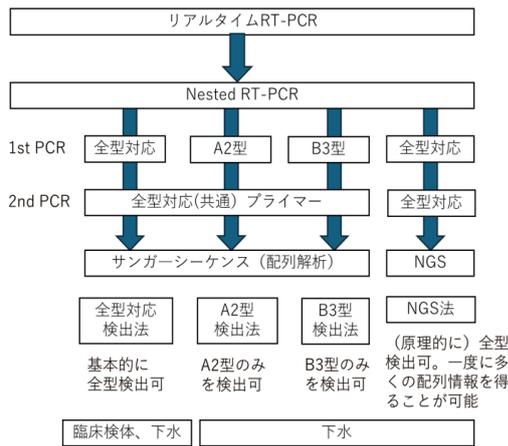
下水検体40mlをEnviro Total Nucleic Acid Kits for Wastewaterで1mlまで濃縮した後、200 $\mu$ l分取し、磁性ビーズ法で50 $\mu$ lの核酸抽出液を作製した。また、臨床検体200 $\mu$ lから磁性ビーズ法で50 $\mu$ lの核酸抽出液を作製した。

作製した核酸抽出液はIkuseら[6]の方法によりEV-D68に特異的なリアルタイムRT-PCRを行った。

### (3) EV-D68の遺伝子解析

上記のリアルタイムRT-PCRで陽性となった検体に対して、EV-D68のVP1領域を標的としたNested RT-PCRを実施した。1st PCRはTedcastleらの方法[4]を参考に行い、下水検体についてはすべての遺伝子型に対応可能な共通プライマー（全型対応検出法）、A2型特異的プライマー（A2型検出法）およびB3型特異的プライマー（B3型検出法）を用いてそれぞれ実施した（第2図）。

臨床検体については全型対応検出法のみ実施した（第2図）。



第2図 下水及び臨床検体のEV-D68検出・解析手順

2nd PCRはIkuseらの方法[6]に準じて行った。続く電気泳動で約390 bp付近に確認された増幅産物断片について、サンガーシーケンス解析を実施した(第2図)。また、下水検体を用いてNGS解析を行うため、全型対応検出法で得られた1st PCR産物を鋳型としたアンプリコンPCR実施した後、ライブラリーを調製し、MiSeqにより解析を行った(第2図)。MiSeqから得たFastqファイルデータは、CLC Genomics Workbenchで、OTU Clustering解析を行い、97%以上の相同性を有する配列ごとにクラスタリングを行った。さらに各検体ごとに得られたリード数(塩基配列単位)の総数を基準とし、その中で占める割合(以下「存在比」とする。)が0.5%未満の配列群は解析対象から除外した。

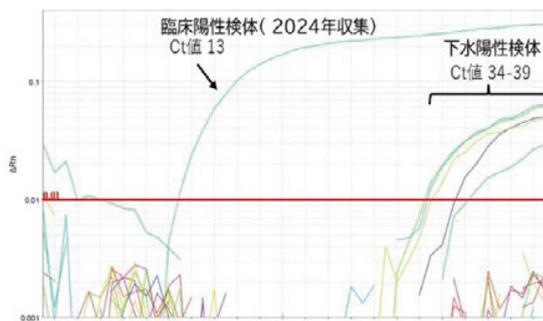
サンガーシーケンスおよびNGS解析で得られた配列情報は、Enterovirus Genotyping Tool Version 0.1を用いて遺伝子型を決定し、Nextstrain[7]により時間軸に沿った分子系統樹を作成した。分子系統樹の作成には、NCBIから取得した3116件の参照配列を用いた。

### 3 結果

#### (1) リアルタイムRT-PCR

リアルタイムRT-PCRの結果、下水検体8検体のうち9/24～11/26に採水された5検体で陽性(陽性率62.5%)であった(第3図)。

臨床検体については、2024年に収集した262検体のうち1検体陽性(陽性率0.4%)であった(第3図)。また、過去に陽性が確認された14検体は、今回の検査でも全て陽性であった。



第3図 リアルタイムRT-PCR結果

#### (2) EV -D68の遺伝子解析

下水検体5検体を用いたNested RT-PCRの結果は、全型対応検出法で5検体、A2型検出法で4検体及びB3型検出法で3検体に特異的な増幅産物断片が認められた(第4図)。



第4図 下水検体のNested RT-PCR結果  
各条件左から順に9/24～11/26採水検体、陰性対照

臨床検体15検体は全型対応検出法で全て特異的な増幅産物断片が認められた。

下水検体の増幅産物のサンガーシーケンス解析で、EV-D68 A2型及びB3型が検出された。一方、全型対応検出法の一部で、塩基の重なり(波形データの重複)が認められたため、型別できない検体もあった(第1表)。

第1表 下水検体のサンガーシーケンス解析結果

採水日	9/24	10/8	10/22	11/15	11/26
全型対応検出法	A2	A2	型別不能	型別不能	A2
A2型検出法	A2	A2	A2	PCR陰性	A2
B3型検出法	PCR陰性	B3	B3	B3	PCR陰性

臨床検体の増幅産物のサンガーシーケンス解析の結果は全てB3型であった。

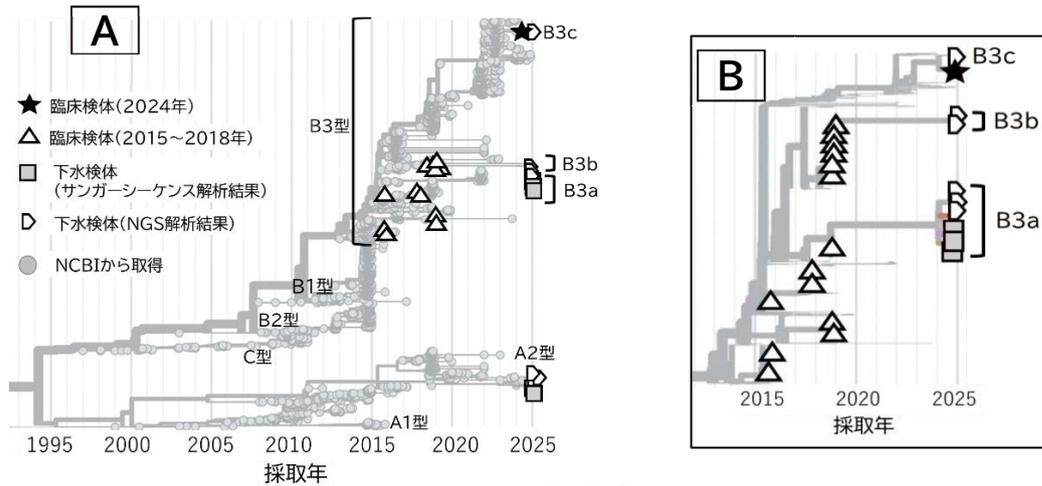
下水検体のNGS解析については、OTU Clustering解析により分類された配列情報群ごとに遺伝子型が決定された。A2型とB3型が検出され、B3型は3つの異なるクラスターに分けられた(以下「B3a型」「B3b型」「B3c型」とする)。また、調査期間を通してA2型の存在比が最も高かった(第2表)。

第2表 下水検体のサンガーシーケンス及びNGS解析結果

採水日	9/24			10/8			10/22			11/15				11/26	
サンガーシーケンス	遺伝子型			遺伝子型			遺伝子型			遺伝子型				遺伝子型	
サンガーシーケンス	A2	A2	B3a	A2	B3a	B3b	A2	B3a	B3b	B3c	A2	B3a	B3b	B3c	A2
NGS	存在比(%) <sup>*</sup>			存在比(%) <sup>*</sup>			存在比(%) <sup>*</sup>			存在比(%) <sup>*</sup>				存在比(%) <sup>*</sup>	
	100			94 6 97			1 1 96			2 1 1 99				99	

<sup>\*</sup> 存在比が0.5%未満の配列群のデータは省略した

下水及び臨床検体の塩基配列と参照配列をもとに、分子系統樹を作成したところ、1994年を境にA型を含むクラスターとB型及びC型を含むクラスターに大きく分類された(第5図のA)。サンガーシーケンス及びNGSで得られた下水由来A2型は近年検出数が増加している系統に属していた(第5図のA)。一方、B3型に属する検体は次のとおりであった。2015～2018年の臨床検体は偏りがあるものの多系統であり、その一部から進化したと考えられる配列情報が下水検体から検出された(第5図のA、B)。これらは過去に流行していた遺伝系統に近縁であつ



第5図 EV-D68の系統樹  
A) 系統樹全体像を示した図 B) B3型について県内で検出されたEV-D68を強調した図

た。2024年の臨床検体は近年検出数が増加している系統B3c型に属し、NGSで得られた下水検体でも近縁なタイプが検出されたが、サンガーシーケンスではこのような結果は得られなかった（第5図のA、B、第2表）。

#### 4 考察

今回、下水検体からEV-D68を検出することに成功した。また、2024年に採取した下水及び臨床検体の陽性率を比較したところ、下水検体の方が約150倍高かった。陽性率が高い理由として、臨床検体は受診した患者の一部のみを対象としているのに対し、下水検体は流域内すべての住民から排出されたEV-D68が対象となるためと考えられた。

EV-D68の遺伝子型別によって、様々な系統のEV-D68が検出され、下水検体と臨床検体で検出される遺伝系統に傾向の一致が認められた。しかし、検体間や手法の違いで、結果に違いが確認された。まず、下水検体からA2型が検出されたが、臨床検体からは検出されなかった。一般的にEV-D68は10歳未満で好発するが、A2型のみ60歳以上の高齢者でも好発することが知られている [2]。今回、60歳以上の検体は少なく小児が中心であったため、臨床検体からA2型が検出できなかった可能性がある。次に、手法ごとの違いであるが、サンガーシーケンスをベースにした3つの方法（全型対応、A型、B型検出法）間でも結果の違いが確認され、複数の遺伝子型の混在によって型別できない場合や増幅産物が得られない偽陰性の検体が確認された。サンガーシーケンスをベースにした方法を実施する場合は、3つの方法を実施し、総合的に結果判定することが必要と考えられた。

最後に、サンガーシーケンス法とNGS法の結果の違いである。下水検体からサンガーシーケンス法でB3bとB3c型を検出できなかったが、NGS法では検出できた。結果の違いの原因として、下水中のB3bとB3c型の割合が低く、サンガーシーケンス法

では他の優勢な系統を検出したためと推察された。NGS法は検体中に占める割合が低い系統でも検出できるという点で優れていることが示唆された。さらに、下水由来のB3c型は2024年の臨床検体と近縁であることから、下水サーベイランスによるヒトの流行の追跡は可能であると考えられた。

臨床検体を大量に収集できれば、臨床検体のみの調査でEV-D68を監視できる可能性があるが、医療機関からの収集検体数は減少傾向にあり、将来的なことを考慮すると、下水サーベイランスを進めていくことが有効と思われる。下水検体を用いた調査については、NGS法はより詳細なデータを取得することが可能であるが、コスト面を考慮すると、検体数のある程度まとめて実施せざるを得ない。さらに、今回検討したNGS法は実績がまだ少ないため、サンガーシーケンス法を定期で実施しながら、検体がまとまったところでNGS法を行うことによって、結果を総合判定するのが現時点で妥当と考えている。

結論として、EV-D68の流行状況を把握するため、下水検体を用いたサーベイランス法を検討した。その結果、下水からEV-D68を高い確率で検出することが可能であり、最近の流行状況を把握するための手法として有効であることが示唆された。新しい試みとして実施したNGS法はまだ検討の余地があるが、EV-D68の遺伝子型別法として、詳細な情報を提供する有用な方法である。

#### 5 参考文献

- [1] 押谷仁ほか. 科研費報告書. 2022.
- [2] Hodcroft EB et al. PLoS Pathog. 2022.
- [3] Erster O et al. viruses. 2022.
- [4] Tedcastle A et al. viruses. 2022.
- [5] Alexandria B et al. Emerg Infect Dis. 2023.
- [6] Ikuse T et al. J Clin Microbiol. 2021.
- [7] Hadfield et al. Bioinformatics. 2018.