

【調査研究】

## 岡山県でプラック分離法により下水から検出されたエコーウイルス 11 型 New lineage 1

Echovirus 11 New Lineage 1 Detected by Plaque Isolation Methods from Sewage Water in Okayama Prefecture

友實直美, 牧本智恵, 石井 学, 清迫理恵, 佐藤 淳, 鶴海 剛, 馬場聡好, 秋山三紀恵, 木田浩司  
TOMOZANE Naomi, MAKIMOTO Tomoe, ISHII Manabu, SEIZAKO Rie, SATO Atsushi,  
TSURUMI Go, BABA Akiyoshi, AKIYAMA Mikie, KIDA Kouji

### 要 旨

今回我々は、昨年に報告したプラック分離法を用い、2023年11月から2025年3月までの期間に県内の下水処理場で採取した流入下水から、エンテロウイルス（以下「EV」という。）の分離を試みた。その結果、4種のEVが分離され、また、同一検体から複数の血清型のEVを分離することに成功した。さらに、同調査期間の患者検体から検出されたEVの血清型と比較したところ、3種の血清型が共通しており、また採取時期にも大きな乖離は認められなかったことから、下水中のEVの存在比率をある程度反映した分離結果を得ることができたと考えられる。このうちエコーウイルス（以下「E」という。）11型は、2024年8～11月に下水検体から22株、2024年11月に患者検体から2株が分離又は検出され、系統樹解析を行ったところ、その全てが2022年以降、フランスにおけるE11型に起因した新生児重症例で分離された新しい遺伝子系統(New lineage 1)に属していた。このことから、当該系統は、患者発生前の2024年8月には既に県内に侵淫していたことが明らかとなった。

[キーワード：プラック，エンテロウイルス，エコーウイルス11型，New Lineage 1，下水]

[Key words：Viral Plaque，Enterovirus，Echovirus 11，New Lineage 1，Sewage Water]

### 1 はじめに

エンテロウイルス（以下「EV」という。）は、ゲノムにプラス一本鎖のRNAを有するピコルナウイルス科エンテロウイルス属のウイルスであり、A～Dの4種に分類される。その血清型は更に細分化され、ポリオウイルス1～3型、コクサッキーウイルスA群（以下「CA」という。）1～22型及び24型、コクサッキーウイルスB群（以下「CB」という。）1～6型、エコーウイルス（以下「E」という。）1～9型、11～21型、24～27型及び29～33型並びにEV68～71型が知られている<sup>1)</sup>。

EVは、血清型によってヒトに重症度の異なる様々な病態を引き起こし、主な感染症として急性灰白髄炎、手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎などが知られている。特に新生児においては、特定の血清型のEVによって、髄膜炎、脳炎・脳症、麻痺性疾患、心筋炎などの重篤な症状を呈することがあり、この原因となる血清型は、CBやEに属するものが多いとされている<sup>2)</sup>。このうち、E11型については、新生児死亡例が他の血清型よりも多く、これまでに新生児のアウトブレイクが複数の国で発生している<sup>2)</sup>。近年では、フランスで2022年7月以降、E11型による肝不全及び多臓器不全を伴う新生児重症例

が増加していることが世界保健機関（WHO）から報告され<sup>3)</sup>、それに続いて複数の欧州諸国でも、E11型による類似の新生児重症例の発生が報告された<sup>4), 5)</sup>。フランスの新生児重症例から分離されたE11型株は、これまでとは異なる新しい遺伝子系統（以下「New lineage 1」という。）に属しており<sup>3), 6)</sup>、本邦で2024年8～11月に発生した急性肝不全による3例の新生児死亡例でも、同系統のE11型が検出されている<sup>7)～9)</sup>。

本センターは、2014年度から国の実施する下水中のポリオウイルスを対象とした感染症流行予測調査事業に参画しており、当該事業で副次的に分離されたEVについて、感染症発生動向調査事業で患者から分離又はPCR等で検出されたEVと比較することで、流行疫学解析への活用を試みてきた。しかしながら、下水検体から同時に複数の血清型のEVが検出されることはまれで、また、下水検体と患者検体は、同時期に採取しても異なる血清型のEVが分離又は検出されることが多く、流行疫学解析への活用は困難であった<sup>10)～14)</sup>。これは、下水中には様々な血清型のEVが混在し、分離に使用するRD-A細胞への指向性がそれぞれ異なることが原因と考えられた。そこで我々は、下水検体に混在する様々

な血清型の EV の存在比率を反映した分離結果を得ることを目的としてブラック分離法の至適条件を検討し、昨年にその成果を報告した<sup>15)</sup>。

今回我々は、本分離法を用い、2023年11月から2025年3月までの期間(17か月間)に県内の下水処理場1施設で採取した流入下水からEVを分離し、流行疫学解析を実施した。その結果、若干の知見を得たので報告する。

## 2 材料及び方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 流入下水

2023年11月から2025年3月までの期間(17か月間)に、県内のA下水処理場(処理人口約3万7千人)で毎月1回採取した流入下水500 mLを用いた。

#### 2.1.2 株化細胞

株化細胞として、ヒト横紋筋腫由来のRD-A細胞を用いた。培養には、Eagle's Minimum Essential Mediumにペニシリン-ストレプトマイシンを1単位/mLとなるよう添加し、更にウシ胎児血清を増殖用としては5%、維持用としては2%(以下「維持培養液」という。)となるよう添加した培養液を用いた。

### 2.2 方法

#### 2.2.1 検体処理

感染症流行予測調査実施要領<sup>16)</sup>、<sup>17)</sup>及び感染症流行予測調査事業検査術式令和元年度改訂版<sup>18)</sup>に従い、材料の流入下水を陰電荷膜吸着/誘出法により100倍濃縮した後、当該濃縮液を10倍希釈したものを下水検体とし、試験に供した。

#### 2.2.2 ブラック分離法によるウイルスの分離及び同定

ブラック分離法による下水検体からのウイルス分離は、寒天濃度、培養時間、染色液濃度及び染色時間を昨年に報告した至適条件<sup>15)</sup>で実施した。すなわち、RD-A細胞を単層培養した60 mmシャーレを1下水検体当たり5枚用意し、下水検体を200 µLずつ接種し、1時間吸着させた。その後ウイルス液を除去し、45℃に維持した15%寒天培地(維持培養液に寒天を添加したもの)を5 mLずつ重層し、37℃、5%CO<sub>2</sub>ガス気相下で72時間培養した。培養後、染色液(2-(p-ヨードフェニル)-3-(p-ニトロフェニル)-5-フェニル-テトラゾリウムクロリド(以下「INT」という。))を0.1%となるよう添加した1.0%寒天培地を5 mL重層し、37℃、5%CO<sub>2</sub>ガス気相下で8時間静置し、ブラックの染色を行った。

INT染色されたブラックからウイルスを回収し、24ウェルプレートに培養したRD-A細胞に接種し、37℃、

5%CO<sub>2</sub>ガス気相下で培養した。1下水検体当たり10個以上のブラックが生じた場合には、10個のブラックを無作為に選定した。細胞変性効果(cytopathic effect;以下「CPE」という。)が出現したウェルについて2代継代し、2代目でCPEが認められたウェルについて、培養上清中のウイルスのゲノムRNAをQIAamp Viral RNA mini kit(QIAGEN社)を用いて抽出した。当該RNA抽出液を用いて、MoniqueらのリアルタイムRT-PCR法<sup>19)</sup>により、EVの存在を確認した後、病原体検出マニュアル「手足口病」<sup>20)</sup>及び「無菌性髄膜炎」<sup>21)</sup>に従い、ダイレクトシーケンス法により決定したVP1遺伝子領域の一部の塩基配列をデータベースの既知株と比較し、血清型を同定した。

#### 2.2.3 系統樹解析

本調査期間に下水検体及び患者検体から分離又は検出されたE11型株のVP1遺伝子領域の一部(312塩基)について、MEGA7を用いて、近隣結合法による系統樹解析を実施した。比較対象株として、2013~2023年に欧州、米国及び中国において検出されたE11型69株並びに2024年に日本において新生児死亡例から検出されたE11型3株を用いた。なお、New lineage 1は、Ikuseらの報告<sup>9)</sup>を参考に分類を行った。

## 3 結果

### 3.1 ブラック分離法による下水検体からのEVの分離結果

調査期間におけるブラック分離法による下水検体からのEVの分離結果を図1に示す。4種類のEVが分離され、その血清型の内訳は、CB4型が5株、E3型が12株、E11型が22株、E25型が1株であり、全てEV-B種であった。最も多く分離されたE11型については、2024年8月から11月まで継続して分離された。

同調査期間において、感染症発生动向調査事業で患者検体から分離又は検出されたEVの検出結果と比較したところ(表1)、下水検体及び患者検体から共通して分離又は検出された血清型は、CB4型、E3型及びE11型であり、その時期に大きな乖離は認められなかった。また、これらの血清型が検出された患者は、全て無菌性髄膜炎と診断されていた。なお、E11型については、2024年11月に2株が検出された。

他方、手足口病又は急性脳炎の患者検体から検出されたEV-A種のEV71型や手足口病の患者検体から検出されたEV-A種のCA6型及びCA16型については、下水検体からは分離されなかった。



- 岡山県において下水検体から分離されたE11型株 (n=22)
- ▲ 岡山県において無菌性髄膜炎の患者検体から分離されたE11型株 (n=2)
- 日本において新生児急性肝不全による死亡例から分離されたE11型株 (n=3)

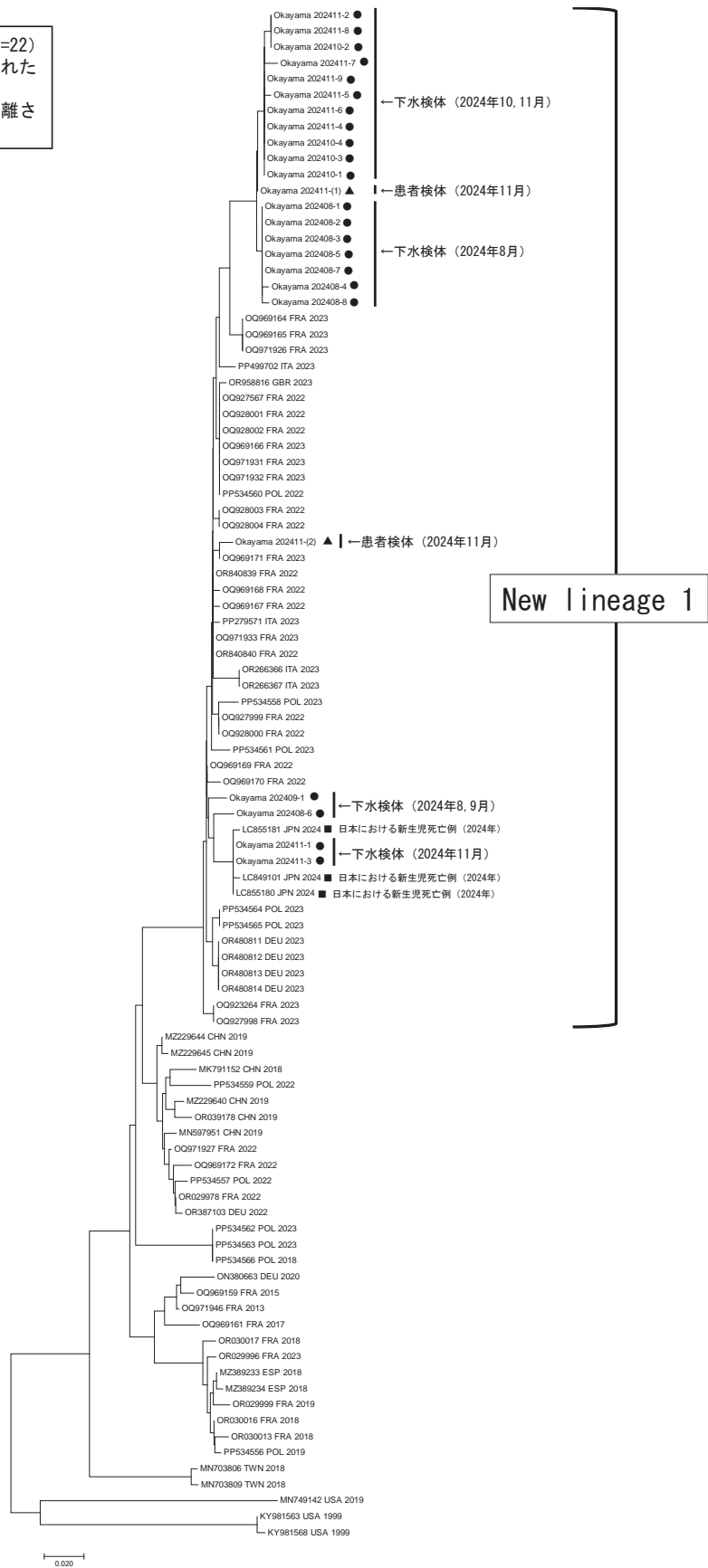


図2 下水検体及び無菌性髄膜炎の患者検体から分離された E11 型株の系統樹解析  
 VP1 遺伝子 (312 塩基) について、近隣結合法による系統樹解析を実施した (1000 Bootstrap)。  
 ※比較対象株については、「アクセッション番号 検出国 検出年」により表記している。  
 本県で分離された株については、「Okayama 検出年月 - 検体番号」により表記している。

## 4 考察

今回我々は、昨年報告したブラック分離法<sup>15)</sup>により、下水検体からのEVの分離を試みた。その結果、調査期間中に4種の血清型のEVを分離した(図1)。また、同一検体から複数の血清型のEVを分離することにも成功した。さらに、患者検体から検出されたEVの血清型と比較したところ(表1)、3種の血清型が共通しており、検体採取時期にも大きな乖離は認められなかった。これらのことから、本調査では、当初の目的どおり、下水検体に混在する様々な血清型のEVの存在比率をある程度反映した分離結果を得ることができたと考えている。

下水から分離された血清型のうち、最も多かったE11型は、新生児期又は乳児期の患者からも2株が検出され、全て無菌性髄膜炎と診断されていた。無菌性髄膜炎は、夏季を中心に流行する感染症であるが、秋～冬にも発生が認められ<sup>21)</sup>、EVに起因する場合、血清型はCBやEといったEV-B種のウイルスによることが多い<sup>1)</sup>。これまで、Iwaiら<sup>22)</sup>及び西嶋ら<sup>23)</sup>により、流入下水と無菌性髄膜炎患者から分離されるEV-B種のウイルスに関連があることが報告されているが、本調査においても、流入下水から分離されたEV-B種の血清型株数の経時的推移は、無菌性髄膜炎の患者発生動向の一端を反映していると考えられる(図1)。

他方、EVを起因とする手足口病については、2024年の定点当たり報告数が過去10年で最も多かったにもかかわらず<sup>24)</sup>、患者検体から検出されたEV-A種のEV71型、CA6型及びCA16型は、下水検体からは分離されなかった。EV-A種は、EV-B種の血清型と比較して、今回用いたRD-A細胞での増殖能が低いが、本ブラック分離法は、増殖能が異なる血清型についても、存在比率が大きく乖離していなければ、増殖能に依存することなくEVを分離できる。このことから、本調査の流入下水においては、EV-A種の血清型の存在比率がEV-B種の血清型と比較して非常に低かったと考えられる。また、これらのEV-A種の血清型がRD-A細胞による初代培養ではCPEを認めづらいう、すなわちブラック形成が不十分でウイルスを回収できなかった可能性もあるが、現段階で結論づけることは困難であり、今後の課題である。

E11型 New lineage 1による国内の新生児死亡例は2024年8～11月に3例の発生が報告されているが<sup>7)</sup>、本調査によって、本県では流入下水から同時期に22株、患者から11月に2株が分離又は検出されており、流入下水からは患者発生に先んじて当該系統が分離されてい

たことが明らかとなった。このことから、流入下水を対象にしたEV調査は、EV感染症の地域流行やEVの遺伝子系統の変異などを、実際の患者発生よりも早い段階で把握するための有用な手段の一つとなることが期待される。今後はより正確な流入下水中のEVの存在状況を把握すべく、必要に応じて本ブラック分離法の更なる改良も検討し、県内のEVの流行状況の正確な把握に努めていきたい。

## 文 献

- 1) 細矢光亮：小児のエンテロウイルス感染症，環境感染誌，32(6)，344-354，2017
- 2) 欧州疾病予防管理センター(ECDC)：Epidemiological update：Echovirus 11 infections in neonates，<https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-echovirus-11-infections-neonates>(最終アクセス：2025年8月1日)
- 3) 厚生労働省検疫所FORTH：エンテロウイルス感染症－フランス共和国，[https://www.forth.go.jp/topics/2023/20230606\\_00002.html](https://www.forth.go.jp/topics/2023/20230606_00002.html)(最終アクセス：2025年8月1日)
- 4) 世界保健機関(WHO)：Enterovirus-Echovirus 11 Infection - the European Region，<https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON474>(最終アクセス：2025年8月1日)
- 5) 厚生労働省検疫所FORTH：エンテロウイルス・エコーウイルス11型感染症－ヨーロッパ地域，[https://www.forth.go.jp/topics/2023/202300707\\_00001.html](https://www.forth.go.jp/topics/2023/202300707_00001.html)(最終アクセス：2025年8月1日)
- 6) Mathilde Grapin, Audrey Mirand, Didier Pinquier, Aurelie Basset, Matthieu Bendavid, et al.：Severe and fatal neonatal infections linked to a new variant of echovirus 11, France, July 2022 to April 2023, *Eurosurveillance*, 28(22), 2-8, 2023
- 7) 松井俊大, 幾瀬樹, 庄司健介, 河野直子, 山田全毅ら：エンテロウイルスによる新生児重症感染症，病原微生物検出情報(IASR)，46(1),14-16，2025
- 8) 感染症疫学センター，地方衛生研究所全国協議会：病原微生物検出情報システムに登録されたエンテロウイルス属及びエコーウイルス11の記述疫学，2018－2024年(2024年11月28日現在)，<https://id-info.jihs.go.jp/diseases/a/entero/010/index.html>(最終アクセス：2025年8月1日)

- 9) Tatsuki Ikuse, Toshihiro Matsui, Kensuke Shoji, Naoko Kono, Masaki Yamada, et al. : Neonatal acute liver failure cases with echovirus 11 infections, Japan, August to November 2024, *Eurosurveillance*, 30(1), 9-14, 2025
- 10) 梶原香代子, 磯田美穂子, 木田浩司, 谷川德行, 松岡保博ら : 平成 28 年度感染症流行予測調査(ポリオ感染源調査), 岡山県環境保健センター年報, 42, 63-65, 2018
- 11) 橋本清美, 松岡保博, 野宮加代子, 濱野雅子, 木田浩司ら : 平成 29 年度感染症流行予測調査(ポリオ感染源調査), 岡山県環境保健センター年報, 43, 111-113, 2019
- 12) 松岡保博, 橋本清美, 石井 学, 長尾和彦, 濱野雅子ら : 平成 30 年度感染症流行予測調査(ポリオ感染源調査), 岡山県環境保健センター年報, 44, 67-69, 2020
- 13) 船橋圭輔, 松岡保博, 石井 学, 長尾和彦, 岡本尚子ら : 令和元年度感染症流行予測調査(ポリオ感染源調査), 岡山県環境保健センター年報, 45, 47-50, 2021
- 14) 船橋圭輔, 長尾和彦, 石井 学, 土本祐栄, 岡本尚子ら : 令和 2 年度感染症流行予測調査(ポリオ感染源調査), 岡山県環境保健センター年報, 46, 57-58, 2022
- 15) 牧本智恵, 石井学, 土本祐栄, 清迫理恵, 佐藤淳ら : 血清型が異なるヒトエンテロウイルスが混在する検体からのブラック分離法の検討, 岡山県環境保健センター年報, 48, 55-59, 2024
- 16) 厚生労働省健康局結核感染症課 : 令和 3 年度感染症流行予測調査実施要領, 9-12, 2021
- 17) 厚生労働省健康局結核感染症課 : 令和 4 年度感染症流行予測調査実施要領, 9-12, 2022
- 18) 厚生労働省健康局結核感染症課・国立感染症研究所感染症流行予測調査事業委員会 : 感染症流行予測調査事業検査術式令和元年度改訂版, 4-21, 2019
- 19) Monique Nijhuis, Noortje van Maarseveen, Rob Schuurman, Sandra Verkuijlen, Machiel de Vos, et al. : Rapid and Sensitive Routine Detection of All Members of the Genus Enterovirus in Different Clinical Specimens by Real-Time PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 40(10), 3666-3670, 2002
- 20) 国立健康危機管理研究機構 : 病原体検出マニュアル「手足口病」, 12-29, 2023
- 21) 国立健康危機管理研究機構 : 病原体検出マニュアル「無菌性髄膜炎」, 3 及び 17-33, 2024
- 22) Masae Iwai, Hiromu Yoshida, Kumiko Matsuura, Tsuguto Fujimoto, Hiroyuki Shimizu, et al. : Molecular Epidemiology of Echoviruses 11 and 13, Based on an Environmental Surveillance Conducted in Toyama Prefecture, 2002-2003, *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (9), 6381-6387, 2006
- 23) 西嶋陽奈, 堀田千恵美, 平良雅克, 秋田真美子, 篠崎邦子ら : 無菌性髄膜炎患者からのコクサッキーウイルス B 群の検出状況 - 千葉県, 病原微生物検出情報 (IASR), 38(2), 39-40, 2017
- 24) 岡山県感染症情報センター : 岡山県感染症週報, 2024 年第 52 週, 18, 2025