

厚生労働行政推進調査事業費補助金

新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

**環境水に含まれる新型コロナウイルス等病原体
ゲノム情報の活用に関する研究**

令和５年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉田 弘

令和６年（２０２４）年 ５月

目 次

I. 総括研究報告

環境水に含まれる新型コロナウイルス等病原体ゲノム情報の活用に関する研究 国立感染症研究所 吉田 弘 -----	1
--	---

資料1 NIJIs Project のデータ解析（地方衛生研究所分）

資料2 「感染者推計ツール」の改修

別紙 感染動向解析ツール 操作マニュアル

資料3 異なる手法による下水サーベイランス調査結果のデータ解析

資料4 阻害物質によるリアルタイム PCR 定量値への影響の評価方法の検討

資料5 複数病原体検出を目的とした高齢者介護施設排水調査

II. 分担研究報告

1. 下水中のコロナウイルス量と感染者数の比較解析 国立感染症研究所 神垣 太郎 -----	80
---	----

2. 数理モデルを用いた下水ウイルス量と感染者数の双方向予測研究 総合研究大学院大学 佐々木 顕 -----	83
---	----

資料1 COVIVIS 解説資料

資料2 COVIVIS 操作マニュアル

資料3 COVIVIS Q&A

3. 環境中の複数種ウイルス検出系の研究 国立感染症研究所 喜多村 晃一 -----	141
---	-----

4. 下水処理場を調査定点とした複数種ウイルス同時検出系の検討	
福岡県保健環境研究所 濱崎 光宏	143
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	182

I．総括研究報告

厚生労働行政推進調査事業費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
総括研究報告書
「環境水に含まれる新型コロナウイルス等病原体ゲノム情報の活用に関する研究」

研究代表者：吉田 弘 国立感染症研究所

分担研究者：神垣太郎 国立感染症研究所
喜多村晃一 国立感染症研究所
佐々木顕 総合研究大学院大学
濱崎光宏 福岡県保健環境研究所

研究協力者：坂 恭平 青森県環境保健センター
筒井理華 青森県健康福祉部
北川和寛 福島県衛生研究所
花田裕司 千葉県衛生研究所
藤沼裕希 千葉県衛生研究所
黒沢博基 埼玉県衛生研究所
濱本紀子 埼玉県衛生研究所
長島真美 東京都健康安全研究センター
熊谷遼太 東京都健康安全研究センター
小澤広規 横浜市衛生研究所
谷 英樹 富山県衛生研究所
川上利恵 富山県衛生研究所
板持雅恵 富山県衛生研究所
葛口 剛 岐阜県保健環境研究所
伊藤 雅 愛知県衛生研究所
中村範子 愛知県衛生研究所
松浦侑輝 奈良県保健研究センター
山本紗也 奈良県保健研究センター
藤本泰之 和歌山県環境衛生研究センター
寺西彩香 和歌山県環境衛生研究センター
望月 靖 岡山県環境保健センター
木田浩司 岡山県環境保健センター
清迫理恵 岡山県環境保健センター
眞榮城徳之 沖縄県衛生環境研究所
平良遥乃 沖縄県衛生環境研究所
鈴木清樹 総合研究大学院大学
大槻亜紀子 総合研究大学院大学
重村浩之 国土交通省国土技術政策総合研究所

研究要旨 新型コロナウイルス感染症が令和5年5月に5類へ移行する

ことを踏まえて国土交通省、厚生労働省連携による新型コロナウイルス下水サーベイランスが開始された。その結果は厚生労働科学研究班（以下、研究班）が解析しウェブサイトで同年 9 月より公表を開始した。なお令和 6 年度より下水サーベイランスは感染症流行予測調査事業に組み込まれることとなり下水中のウイルス情報を活用するための検討も行うこととした。地方衛生研究所の研究協力者が実施する同じ試薬を用いたウイルスゲノム反応系による調査では、定点あたり報告数と下水中のウイルス量の増減を比較したところ処理場ごとに増減傾向が異なるため、下水固有の要因が影響している可能性を示唆した。

一方、同一処理区内にて異なる手法で測定した下水中ウイルス量を比較、検討したところ、検査手法が異なる調査でも、感染動向のトレンド把握には一定の頑健性が確認できた。しかし結果の信頼性を担保するためには検査機関ごとにインハウスの精度管理が必要である。

下水サーベイランスの結果を疫学解析に活用するべく全数報告時のデータを活用して次の基盤的研究を行った。下水中のウイルスコピー数をサーベイランスの閾値として用いるため、内閣官房実証事業による先行調査の公開データを用いて検討したところ、シグナルとしては 1×10^5 GC/L を閾値として設定した場合、もっとも尤度が高くなり、人口 10 万人当たりの報告数が 300 人以上あるいは 100 人以下である確率が高いことがわかった。

下水中ウイルス濃度を用いて処理区域での SARS-CoV-2 の流行を予測する数理疫学モデルを開発した。このモデルを 2020 年以降の A 自治体での下水中ウイルス濃度時系列データに適用することにより、A 自治体での流行の高い精度の予測が可能になった。結果を踏まえ地域固有のパラメータを推計し感染動向を把握するアプリを開発した。

このように下水サーベイランスの結果を感染動向の把握のために活用するには、下水固有の要因を踏まえ処理区ごとに中長期的なデータの蓄積を行い多面的な検討がデータ解析時に必要である。よって下水中の新型コロナウイルス情報は調査対象とする地域固有の要因に依存する情報であり、新型コロナウイルス感染症を把握する定点サーベイランスの補完的な役割として用いることが適当である。

また本研究では下水サーベイランスを活用した下水処理場及び施設排水から下水中の複数種ウイルス等同時検査手法の検討を行った。国内の感染症発生動向調査で報告される呼吸器系、腸管系ウイルス疾患の代表的な起因ウイルス等を同時に検出するため、プライマー・プローブを固相化したカスタムパネルを作成し評価を行ったところ、複数病原体ゲノム検出に対応した簡便な検査系を作成することができた。しかしカスタムパネル作成のコスト面、技術面では呼吸器パネルの検出感度など更なる検討が必要であった。

A. 研究目的

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) を

引き起こす新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は上気道以外に、腸管でも感染が成立し

一定の割合で糞便中に排出される。感染者の鼻汁、唾液、糞便等に含まれるウイルスは下水へ排出される。

環境水サーベイランスは河川水、下水を調査対象とするが、下水サーベイランスは下水に特化しており都市部における感染動向を顕性、不顕性によらず感染者の存在を把握できる。こうした特性により COVID-19 拡大初期から感染動向把握に関する多くの下水サーベイランスが国内外で実施された。下水固有の要因等により感染者推計には多くの課題があるが、検査報告体制の状況次第では有用性が認められている*。

*WHO Environmental surveillance for SARS-CoV-2 to complement other public health surveillance. 12 September 2023.

<https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/372995/9789240080638-eng.pdf>

令和 2 年度以来の先行研究では既存のポリオウイルス環境水サーベイランス（感染症流行予測調査事業）を活用し、SARS-CoV-2 監視体制構築のための以下の研究を行ってきた。

- Ⅰ ウイルスゲノム検出、変異株検出法を新たに開発、検討し全国 12 か所の地方衛生研究所にて下水調査を実施。検出感度の改良等が課題であること。
- Ⅰ 首都圏 A 自治体の調査（5 処理場）にて感染者数と下水中ウイルス量に高い相関関係が見いだされ（ADB へ報告）、データ解析ツールを作成した。地域における活用には行政ニーズ、疫学状況を踏まえた解析が課題であること。
- Ⅰ 感染者の有無を早期探知するため高齢者施設排水中ウイルスゲノム検出法を新たに検討。採水頻度を増やすことにより早期の感染管理に貢献する可能性が認められマニュアル等を作成。普及には施設のニーズに沿った検査コンテンツの検討、コストが課題であること。
- Ⅰ さらに令和 5 年 5 月 8 日より新型コロナ

ナウイルス感染症は 5 類感染症に移行したこと、また令和 4 年に実施された内閣官房実証事業による処理場及び個別施設での実証結果が公表されたこと、令和 6 年度に下水中の SARS-CoV-2 濃度の把握について、次年度から都道府県の地方衛生研究所が参加する感染症流行予測調査事業に組み込まれる方針であることを踏まえ、新たな課題に対応するための研究が必要になった。

新規研究ではウィズコロナ社会を視野に入れ、以下を実施する。

1. 下水中の SARS-CoV-2 量の活用に関する研究

- Ⅰ 国土交通省と連携の下、下水中ウイルス量と感染者数の解析を実施。公表に向けた課題を整理し、発信時の情報基盤を検討
- Ⅰ 全数から定点把握へ移行時の下水中のウイルス量から地域の感染者数の推計法の研究
- Ⅰ 同一処理区内にて異なる手法で測定された下水中ウイルス変動量の比較、検討
- Ⅰ 定点把握方式へ移行後の下水中ウイルスデータ解析手法の検討
- Ⅰ 令和 5 年 5 月以降、あらたに調査を開始する地方公共団体における検査体制の検討

2. 下水処理場及び施設排水を対象とした下水中の複数種ウイルス等同時検査手法の研究

- Ⅰ 感染症発生動向調査事業による対象疾患と比較して下水で検出可能な複数同時検査対象とする病原体の検討を行う。
- Ⅰ 高齢者介護施設でニーズの高いノロウイルス等、排水中の複数病原体を同時検知する研究を行う。

B. 研究方法

1. 下水中の SARS-CoV-2 量等の活用に関する研究

(1) 下水中ウイルス量と感染者数の解析結果の公表に向けた課題整理（担当：吉田）

国土交通省、厚生労働省連携調査による SARS-CoV-2 下水サーベイランスの結果についてウェブサイトを通じて発信するため、地方自治体へヒアリングを実施し、情報発信の項目、内容を検討する。また定期的に情報を発信するためウェブサイトを構築し、情報発信時の課題を整理する。ヒアリングは両省庁と連携して行った。

情報発信を行う対象自治体

情報発信を行う対象自治体は以下の通り

- Ⅰ 国土交通省による調査事業などで得られた自治体のデータ：札幌市、仙台市、横浜市、大津市、大阪市、福岡市、小松市、養父市（8 自治体）
- Ⅰ 厚生労働科学研究班に参加する地方衛生研究所での測定するデータ：福島県、富山県、愛知県、岐阜県（4 自治体）
- Ⅰ 国土交通省、厚生労働省連携調査で得られるデータ：神奈川県、大分市（以上自治体による測定データ）、埼玉県、沖縄県（以上地方衛生研究所で測定するデータ）

データ加工とウェブサイト運営

各自治体にて実施した下水サーベイランスによる調査結果は、国土交通省あるいは各地方衛生研究所から提供を受けた。データ解析はエム・アール・アイ リサーチアソシエイト株式会社に委託し、ウェブサイト運営は一般社団法人 WNP へ委託を行った。

(2) 下水中のコロナウイルス量と感染者数の比較解析（担当：神垣）詳細は分担研究報告書参照

下水中のウイルスコピー数をサーベイランスの閾値として利用を検討するため令和 4 年度「ウィズコロナ時代の実現に向けた主要技術の実証・導入に係る事業計画 下水

サーベイランスの活用に関する実証事業」報告*より得られた各処理場における SARS-CoV-2 の RNA コピー数情報と当該処理区にある保健所単位の疫学データを用いて、その感度、特異度および internal likelihood ratio (ILR) を算出し解析を行った。

*内閣感染症危機管理統括庁「下水サーベイランス」

<https://www.caicm.go.jp/action/survey/surveillance.html>

(3) 全数から定点移行後の下水中ウイルスと感染動向把握の方法

ア. 地方衛生研究所 6 か所で実施した調査結果（担当：吉田、福島県、富山県、愛知県、岐阜県、埼玉県、沖縄県）詳細は別添 資料 1 参照

令和 5 年 5 月 8 日より COVID-19 感染動向把握の方式が全数から定点把握への移行に伴い、下水中のウイルス量と定点データと比較し地域の感染動向の把握方法を検討する。

解析に用いた下水中ウイルス量と疫学データ

令和 5 年第 71 回厚生科学審議会感染症部会*では患者サーベイランスによる COVID-19 発生動向は全数と定点把握が同様のトレンドを示していること、一方、下水サーベイランスでも患者報告数と下水中のウイルスゲノム量の間に高い相関を示すことが報告されている。

なお検査手法のうちリアルタイム PCR による測定法は各自治体で異なり単純比較が難しいため、CDC-N1N2 領域のプライマー・プローブを用いて測定した地方衛生研究所（福島県、富山県、愛知県、岐阜県、埼玉県、沖縄県）の下水中のウイルス量 (GC/L) を用いた。

比較する疫学データは処理区の人口別により下水中のウイルスゲノム量と採水日に対応する患者報告週の定点あたり報告数と比較

した。なお下水処理区が複数の保健所管轄にまたがる場合は、各保健所管轄内の定点医療機関数の総和を分母とし、各保健所への患者報告数の総数を分子として下水処理場流域のウイルスゲノム量と比較している。

調査期間

福島県、岐阜県、愛知県、富山県：令和 5 年 19 週、埼玉県、沖縄県：令和 5 年 35 週からとした（最長 2024 年第 7 週までを解析対象とした）。

＊「新型コロナウイルス感染症に関する 今後の患者の発生動向等の把握方法について」 第 71 回厚生科学審議会感染症部会

https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_30863.htm

1

イ. 感染症流行予測事業に向けた「感染動向解析ツール」の作成（担当：吉田）詳細は別添資料 2 参照

令和 6 年度に SARS-CoV-2 下水サーベイランスが感染症流行予測調査事業に組み込まれる方針であることを踏まえ、下水中の SARS-CoV-2 濃度のデータと定点当たり報告数等の疫学データを用いて、データ整理および加工を実施できる「感染動向解析ツール」開発、マニュアル作成をエム・アール・アイ リサーチアソシエイツ株式会社に委託した。

（４）数理モデルを用いた下水ウイルス量と感染者数の双方向予測研究（担当：佐々木）詳細は分担研究報告書参照

首都圏 A 自治体の週別下水中ウイルス濃度測定データと、同自治体による新型コロナ陽性日別報告数データを用いて、下水ウイルス濃度から地域の感染動向を予測する数理モデルを構築し、データ入力と予測結果の解釈が容易に行えるウェブアプリケーションを開発し、ウェブ上で運用・公開する。

（５）同一処理区内にて異なる手法で測定

された下水中ウイルス変動量の比較、検討（担当：吉田）詳細は別添資料 3 参照

国内 2 か所の下水処理場にて、令和 5 年 10 月より週 2 回採水を 26 週にわたり実施。沈殿物抽出法と EPISENS 法（A 地点）、ポリエチレングリコール沈殿法（B 地点）によるウイルス測定結果を比較する。定点当たり報告数と下水中ウイルス量の測定結果を時系列で整理し、感染動向把握の頑強性を検証する。検査はそれぞれ民間検査事業者に委託、得られた検査結果はエム・アール・アイ リサーチアソシエイツ株式会社に解析を委託した。

（６）新たに調査を開始する地方衛生研究所の検査体制の構築（担当：吉田、沖縄県、埼玉県）

下水サーベイランスは下水固有の要因に考慮した検査体制を検討する必要性が認められている。今般、令和 6 年度からの SARS-CoV-2 に関して感染症流行予測調査事業への組み込みに備え、新たに下水中のウイルス調査を開始する 2 か所の地方衛生研究所に対し、速やかに調査を開始すべく検査体制の要件を検討した。なお 2 自治体の調査は国土交通省との連携により、採水輸送は国土交通省、検査は厚生労働省が担当し、本研究班が検査体制構築の支援を行った。

2. 下水処理場及び施設排水を対象とした下水中の複数種ウイルス等同時検査手法の研究

（１）環境中の複数種ウイルス検出系の研究（担当：喜多村）詳細は分担研究報告書参照

- ア. 市販の SARS-CoV-2 & Flu ダイレクト PCR 検出キットを用いて、マルチプレックス RT-qPCR の条件検討を行った。
- イ. SARS-CoV-2 他複数のウイルスゲノム配列を搭載した人工的な疑似ウイルス粒子である VLP-RNA を用いた環境表面拭き取り検体を作成し、モバイル型リア

ルタイム PCR 機 PicoGene による検出を検討した。

(2) 下水処理場を調査定点とした複数種ウイルス同時検出系の検討

地方衛生研究所の協力を得て環境水中のポリオウイルス検査手法を基盤とし以下の項目を検討する。

ア. 下水より抽出した核酸を用いた複数病原体の同時検出系の検討 (担当: 濱崎、吉田) 詳細は分担研究報告書参照

国内の病原体サーベイランスで比較的良好に検出される呼吸器、腸管系感染症の代表的な起因ウイルスを選定し、陽性コントロール(プール)を合成するとともに、各病原体に対するプライマー及びプローブを PCR プレートへ固相化 (TrueMark Custom Plate、サーモフィッシャー社) 各パネルを用いた測定は 2 step リアルタイム PCR にて各地方衛生研究所で行った。

イ. リアルタイム PCR 阻害物質を効率的に除去する濃縮方法の比較検討 (担当: 研究協力者 小澤) 資料 4 参照

下水中の病原体ゲノム定量値への影響を評価するため、Virus Like Particle (VLP) 及び濃度既知の商用 RNA を用いて、抽出 RNA の回収率及び PCR 効率を確認した。

(3) 複数病原体を対象とした施設排水調査手法の検討 (担当: 吉田) 資料 5 参照

先行研究で実施した施設排水中の SARS-CoV-2 調査を基盤とし高齢者介護施設でニーズの高い季節性インフルエンザウイルス、ノロウイルス、レジオネラ菌など複数病原体の同時検出系を検討した。先行研究と同様、調査はトラップ法 (5 か所)、グラブ法 (1 か所) により採水を行い、1 か所では職員用洗面台から拭き取り検査を行った。トラップ法は採水用コットンを汚水桮に一晩留置後、約 100ml 回収、冷凍下で検査施設

まで輸送した。ダイレクトキャプチャー法 (Promega Wizard Enviro TNA Kit, A2991) により水試料 80ml より 40 μ l の RNA を得た。得られた RNA は異なる 2 種類の検査手法を用いて結果を比較した。即ち①インフルエンザ A/B・SARS-CoV-2 同時検査 (SARS-CoV-2 & Flu ダイレクト PCR 検出キット、タカラバイオ、既製品)、②SARS-CoV-2、インフルエンザ A/B、ノロウイルス G1/G2、肺炎球菌、レジオネラ菌同時検査 (TrueMark Custom Plates、サーモフィッシャー、カスタム品) によって病原体ゲノム検出を行った。なお①は原液 RNA を用いた 1step 法、②は RNA を 1/2 希釈した 2-step 法により測定した。コントロールは①はキット付属。②はプレートに含まれる病原体を対象としたカスタム陽性コントロール。反応条件は処理場調査 (2) アで検討した各種病原体別リアルタイム PCR 検出条件に準じて、逆転写後 TaqPath BactoPure Microbial Detection Master Mix (サーモフィッシャー) を用いて、10 μ l/ウェルで反応を行った (別添 資料)。検査は北里環境科学センターへ委託した。

C. 結果

1. 下水中の SARS-CoV-2 量等の活用に関する研究

(1) 下水中ウイルス量と感染者数の解析結果の公表に向けた課題整理 (担当: 吉田) 調査地点の情報公開について

国土交通省、厚生労働省を通じて 16 自治体にヒアリングを行ったところ、自治体名と処理場名の公開について以下の結果を得た。

- ・自治体名及び採水した下水処理場名のいずれも公表可能: 9 自治体
- ・自治体名のみ公表可能: 7 自治体

なお結果公開にあたりウェブサイトには閲覧者からの質疑の窓口 (研究班) を明記することとした。

公表の内容について

自治体の調査対象の処理区の人口、保健所管轄の人口、調査手法(採水量、採水頻度、濃縮方法、リアルタイム PCR 法など)、検査結果の補正の手法(PMMoV,水量補正など)は各々異なっていることを踏まえ、公表情報は下水中のウイルス量(GC/L)と処理場を含む保健所管轄の定点あたり報告数を比較した未加工データをエクセルと図で示すこととした。これらのデータは利用者がさまざまな手法で2次的に解析することを想定しダウンロード可能とした。

公表時期

自治体と公表内容について調整を行いつつ、下水サーベイランス調査結果を令和5年9月より、順次ウェブサイトを通じて公開を開始した(月1回、月末を原則)。

(2) 下水中のコロナウイルス量と感染者数の比較解析(担当:神垣)詳細は分担研究報告書参照

下水中のコロナウイルス RNA 量を 10^3 、 $10^{3.5}$ 、 10^4 、 10^5 コピー数/L の4つの値を閾値として設定、自治体からの報告データを用いて検討したところ、その感度、特異度および internal likelihood ratio (ILR) を求めた結果、ILR が中等度変化を示したのは、 1×10^5 コピー/L を閾値と設定した場合であり、感度および特異度どちらかが偏っていない条件では変化なしという結果となった。

(3) 全数から定点移行後の下水中ウイルスと感染動向把握の方法

ア. 地方衛生研究所6か所で実施した調査結果(担当:吉田、福島県、富山県、愛知県、岐阜県、埼玉県、沖縄県)詳細は別添資料1参照

令和5年5月以降の調査の結果を処理人口サイズごとに結果を分類し(区分Ⅰ: ~100,000人 なし、区分Ⅱ:100,001~200,000人 福島県、区分Ⅲ:200,001~500,000人 富山県、岐阜県、沖縄県、区分Ⅳ:500,001~1,000,000人 愛知県、区分Ⅴ:1,000,001

人~埼玉県)、検出量と定点あたり報告数の増減を比較したところ、増減傾向が一致、不一致の自治体が見られた。

イ. 感染症流行予測事業に向けた「感染動向解析ツール」の作成(担当:吉田)詳細は別添資料2参照

研究班を構成する地方衛生研究所協力者及び研究班以外に令和6年度感染症流行予測調査事業に参加する予定の地方衛生研究所を対象に、作成した感染動向解析ツールを配布しウェブ説明会を企画した。説明会は新たに作成したマニュアルを用いて計4回(令和6年2月14,16日、3月26日同日2回)開催した。

(4) 数理モデルを用いた下水ウイルス量と感染者数の双方向予測研究(担当:佐々木)詳細は分担研究報告書参照

モデルを用いた流行予測値と、自治体における COVID-19 患者数(対数)とは高い適合性を示した。パラメータのフィッティングにより下水でのウイルス濃度には口腔分泌物が大きく寄与していることが示唆された。また集水域人口10万人当たり一人の感染者により、下水中の RNA 濃度は検出限界(400GC/L)を大きく超える1600 GC/Lだけ上昇すると推定された。

(5) 同一処理区内にて異なる手法で測定された下水中ウイルス変動量の比較、検討(担当:吉田)詳細は別添資料3参照

本分析結果により、検査手法、増幅対象領域によって検出結果には一定のばらつきが見られた。手法が異なっても感染動向の把握には活用可能である一方、絶対定量ではなく、地域ごとの水平比較は定性的な評価(増減のみ)が適当と考えられる。

(6) 新たに調査を開始する地方衛生研究所の検査体制の構築(担当:吉田、沖縄県、埼玉県)

令和5年5月から6月にかけて沖縄県、

埼玉県における下水サーベイランスの実施に向けた準備が開始され、国土交通省と厚生労働省連携調査における地方自治体との役割分担がおおむね整理された。同年 7 月から沖縄県衛生環境研究所、埼玉県衛生研究所が研究班に協力者として参加することとなり、調査開始に向けウェブ会議等を通じ、採水地点の選定、採水法、採水量、輸送法、下水中の RNA 精製法、リアルタイム PCR 法、内部精度管理の方法など、調査フローの工程の説明、討議、加えて必要な消耗品の提供を行った。国土交通省との連携調査の下、同年 9 月には沖縄県と埼玉県で採水が開始され、下水試料を用いた検査系の検討が行われ、同年 10 月から調査結果の公表を開始した。

2. 下水処理場及び施設排水を対象とした下水中の複数種ウイルス等同時検査手法の研究

(1) 環境中の複数種ウイルス検出系の研究 (担当：喜多村) 詳細は分担研究報告書参照

- I 過剰量 (50,000 copies/reaction) の SARS-CoV-2 RNA 存在下でも 5 copies/reaction のインフルエンザウイルス A/B RNA が検出可能。しかし RNA 標準物質の凍結溶解繰り返しによるばらつきは逆転写反応時間を伸ばすことで改善が認められた。
- I 疑似ウイルス粒子を用いた環境表面拭き取り実験では、抽出試薬を使う簡易抽出法に比べて直接検出法で高い検出感度を得た。

(2) 下水処理場を調査定点とした複数種ウイルス同時検出系の検討

ア. 下水濃縮産物より抽出した核酸を用いた複数病原体の同時検出系の検討 (担当：濱崎、吉田) 詳細は分担研究報告書参照

カスタムで作成したパネルの評価を行ったところ、呼吸器感染症の原因ウイルスの

うち、インフルエンザウイルス、RS ウイルス、パラインフルエンザウイルスの 3 種類の病原体は、ほとんどの地方衛生研究所で検出することができなかった。ライノウイルス、ヒトコロナウイルス、パレコウイルスについては、比較的よく検出することができた。

腸管感染症の原因ウイルスについては、ロタウイルス以外で効率よく検出することができた。

イ. リアルタイム PCR 阻害物質を効率的に除去する濃縮方法の比較検討 (担当：研究協力者 小澤) 資料 4 参照

- I 下水沈殿物の VLP 由来 RNA 抽出では概ね 6-15% の回収率であった。下水試料間で約 2-3 倍の差が存在した。
- I Spike-In Control RNA を用いた PCR 効率率は 11-40% であった。下水試料間で約 4 倍の差が存在した。

(3) 複数病原体を対象とした施設排水調査手法の検討 (担当：吉田) 資料 5 参照

5 施設から採取した延べ 48 検体 (下水 40、ふき取り 8 検体) から、①の検査では下水由来のみ 10 検体が SARS-CoV-2 陽性、インフルエンザウイルスはすべて陰性であった。②の検査ではレジオネラ属検出が 1 検体、ノロウイルス G1/G2 が 5 検体から検出され、いずれも下水由来であった。SARS-CoV-2 は検出されなかった。

D. 考察

1. 下水中の SARS-CoV-2 量等の活用に関する研究

(1) 下水中ウイルス量と感染者数の解析結果の公表に向けた課題整理 (担当：吉田)

令和 5 年 5 月 8 日から COVID-19 の感染症法における位置づけが変更され、令和 6 年度には感染症流行予測調査事業として SARS-CoV-2 下水サーベイランスが加わることとなった。先行研究でも示されたように

本調査は下水固有の要因が測定結果に影響するため、患者サーベイランスの補完的な情報として活用されることが期待されている。

公表内容について

内閣官房実証事業による下水処理場報告書*でも指摘のあるように、下水サーベイランス結果の解釈は専門的な知識が必要なため、普及のためにはよりわかりやすく発信する必要がある。自治体よりヒアリングの結果、さまざまな情報を含めて公開を期待する意見もあったが、下水調査に付帯する情報（水量、水温など）の入手アクセスの状況は自治体により異なるため、ミニマムな調査結果（下水中のウイルスゲノム量と定点あたり報告数など）に集約し公開することとした。引き続き自治体側との対話を通じて発信する内容については検討していく必要がある。

*内閣感染症危機管理統括庁「下水サーベイランス」

<https://www.caicm.go.jp/action/survey/surveillance.html>

情報発信の方法について

令和 5 年度の下水サーベイランス調査結果は研究班が運営するウェブサイトを通じて公開してきた。令和 6 年度より感染症流行予測調査事業として地方衛生研究所による調査が実施されるが、公表内容、ウェブサイト運営方法は検討すべき課題があるため自治体を含む関係者間で引き続き検討することが適当である。

（２）下水中のコロナウイルス量と感染者数の比較解析（担当：神垣）詳細は分担研究報告書参照

下水サーベイランスは、測定系における影響、患者サーベイランスとは違う側面を十分に理解した上でデータを解釈する必要があると考えられる。下水中のウイルスコピー数をサーベイランスの閾値として利用

を検討するため、特定のウイルスコピー数を閾値として設定したシグナルとしての感度・特異度を検討した結果、ウイルスコピー数が 1×10^5 コピー/Lという非常に大きい状況でなければ、少なくとも人口 10 万人あたり 100 人以下の確率が高くなることに寄与すること、あるいは 1×10^5 コピー/Lという非常に大きい状況であれば、少なくとも人口 10 万人あたり 300 人以上の確率が高くなることに寄与することが明らかとなった。

（３）全数から定点移行後の下水中ウイルスと感染動向把握の方法

ア．地方衛生研究所 6 か所で実施した調査結果（担当：吉田、福島県、富山県、愛知県、岐阜県、埼玉県、沖縄県）詳細は別添資料 1 参照

令和 4 年度内閣官房実証事業による下水サーベイランスの検証時、新型コロナウイルス感染症は全数把握方式であった。報告書によれば、処理人口が大きい場合、感染傾向を把握できる可能性が示されていた。定点移行後の本分析では定点あたり報告数と比較することになったが実証事業と同様の傾向が認められたものの、処理場ごとに結果が異なることも明らかとなった。下水固有の要因、検査系や、感染者把握状況（処理区と保健所管轄の関係）などが影響している可能性もあり、継続的な調査による比較検討が必要である。現時点では定点サーベイランスの補完的な情報として用いるのが適当である。

イ．感染症流行予測事業に向けた「感染動向解析ツール」の作成 詳細は別添資料 2 参照

感染動向把握ツールは下水中のウイルス量と定点あたり報告数のデータを整理し視覚化するツールであるが、今後もユーザーの意見を反映しつつ改修を行う必要がある。

（４）数理モデルを用いた下水ウイルス量

と感染者数の双方向予測研究（担当：佐々木）詳細は分担研究報告書参照

下水中のウイルス RNA 濃度センサスと数理モデルの結合により、時間遅れが少なく、検出感度の高い高精度の流行予測が行えることが示唆された。

また環境水中のウイルスゲノム濃度モニタリングが、無症候性感染の割合が高い COVID-19 を含む多様なウイルス感染症流行の規模を推定するために有用であることを示した。

（５）同一処理区内にて異なる手法で測定された下水中ウイルス変動量の比較、検討（担当：吉田）詳細は別添資料 3 参照

下水サーベイランスによる新型コロナウイルス感染症の感染動向の把握の上では、各検査手法の選定にあたって検出率やコスト、検出までに要する時間等を総合的に判断する必要がある。また流行している変異株のゲノム情報と対比させつつ、総合的に検討をした上で用いる手法を選択する必要がある。

このように検査手法が異なる調査でも感染動向のトレンド把握には一定の頑健性が確認できたが、結果の信頼性を担保するためには検査機関ごとにインハウスの精度管理が必要であると考えられる。

（６）新たに調査を開始する地方衛生研究所の検査体制の構築（担当：吉田、沖縄県、埼玉県）

令和 5 年 5 月に調査に向けた準備が開始、下水調査に必要な関係機関との調整を踏まえ、採水及び試行的な調査を開始したのは同年 9 月である。このように下水調査のプロセスは関係機関の調整、及び採水、輸送、検査体制の確立、結果の報告、公表、まで運営面、技術面で複雑な要素を含む。令和 6 年度から感染症流行予測調査事業へ SARS-CoV-2 下水サーベイランスが新たに加わることとなった。SARS-CoV-2 下水サーベイレ

ンスの技術面は実施要領に示されるが、新たに調査を開始する地方衛生研究所を対象とした調査体制構築のためのガイダンス作成が望まれる。

２．下水処理場及び施設排水を対象とした下水中の複数種ウイルス等同時検査手法の研究

（１）環境中の複数種ウイルス検出系の研究（担当：喜多村）詳細は分担研究報告書参照

- Ⅰ マルチプレックス RT-qPCR による複数種ウイルスの同時検出は、定期的に下水検査を行う機関において、コスト削減や検査時間の効率化が見込まれる。
- Ⅰ VLP-RNA はカスタム塩基配列が搭載可能であり、下水検体や環境表面検体からのウイルス検出実験において、ポジティブコントロール、精度管理への活用が可能である。

（２）下水処理場を調査定点とした複数種ウイルス同時検出系の検討

ア．下水濃縮産物より抽出した核酸を用いた複数病原体の同時検出系の検討（担当：濱崎、吉田）詳細は分担研究報告書参照

今回我々は、1 枚のリアルタイム PCR プレートで 6 種類のウイルスの定量が可能で、1 種類のコントロール試薬で各ウイルスについて定量できるように簡便な検査系を作成することができた。しかしパネル測定に用いた下水検体を採取した時期に、感染症発生動向調査ではインフルエンザウイルス等呼吸器ウイルスが多く報告されているが、流入水からはほとんど検出することができなかった。これらのウイルスは流入水中に排出されるウイルス量が少ないため、検出することが困難と考えられる。なお今回使用したプライマー、プローブの配列情報は公開されていないことから、別のプライマー、プローブを用いた検証も必要と考えられる。

イ. リアルタイム PCR 阻害物質を効率的に除去する濃縮方法の比較検討（担当：研究協力者 小澤）資料 4 参照

下水試料ごとに VLP 回収率、RT-PCR 反応効率とも変動し、かつ連動しているわけではないため、下水試料ごとに抽出 RNA の質を評価することが、下水を用いた病原体ゲノムサーベイランスの精度管理には必要であると考えられた。

（３）複数病原体を対象とした施設排水調査手法の検討（担当：吉田）資料 5 参照

高齢者施設では SARS-CoV-2 以外にもノロウイルスなどの感染対策が求められる。このため施設単位で複数の病原体ゲノム検査系の検討を行ったが、感度に関しては検査系で異なることが判明した。本研究では主に下水のみの検査であるため、検査の感度特異度を評価するためには更なる検討が必要である。

E. 結論

1. 下水中の SARS-CoV-2 量等の活用に関する研究

（１）下水中ウイルス量と感染者数の解析結果の公表に向けた課題整理（担当：吉田）

令和 5 年度は国土交通省、厚生労働省連携による下水サーベイランスによる調査結果を研究班が運営するウェブサイトで定期的に公表を開始したが、発信内容や運営方法は引き続き検討する必要性がある。

（２）下水中のコロナウイルス量と感染者数の比較解析（担当：神垣）

下水中のウイルスコピー数をサーベイランスの閾値として利用する検討を実施した。実証研究の 11 自治体のデータを用いて検討したところ、シグナルとしては 1×10^5 がもっとも尤度が高くなり、人口 10 万人当たりの報告数が 300 人以上あるいは 100 人以下である確率が高いことがわかった。

（３）全数から定点移行後の下水中ウイルスと感染動向把握の方法

ア. 地方衛生研究所 6 か所で実施した調査結果（担当：吉田、福島県、富山県、愛知県、岐阜県、埼玉県、沖縄県）

定点移行後の定点あたり報告数と下水中のウイルス量の増減を比較したが処理場ごとに増減傾向が異なるため、下水固有の要因が影響している可能性がある。現時点は下水サーベイランスの結果は定点サーベイランスの補完的な役割として用いるべきである。

イ. 感染症流行予測事業に向けた「感染動向解析ツール」の作成

下水中ウイルス量と定点あたり報告数データを整理し、視覚化する感染動向解析ツールを地方衛生研究所に配布した。

（４）数理モデルを用いた下水ウイルス量と感染者数の双方向予測研究（担当：佐々木）

下水中ウイルス濃度を用いて処理域での SARS-CoV-2 の流行を予測する数理疫学モデルを開発した。このモデルを 2020 年以降の A 自治体での下水中ウイルス濃度時系列データに適用する事により、A 自治体での流行の高精度の予測が可能になった。

（５）同一処理区内にて異なる手法で測定された下水中ウイルス変動量の比較、検討（担当：吉田）

検査手法が異なる調査でも、感染動向のトレンド把握には一定の頑健性が確認できたが、結果の信頼性を担保するためには検査機関毎にインハウスの精度管理が必要である。

（６）新たに調査を開始する地方衛生研究所の検査体制の構築（担当：吉田、沖縄県、埼玉県）

地方衛生研究所を対象とした新たに下水

サーベイランスを行うため調査体制構築のためのガイダンス作成が今後の課題である。

2. 下水処理場及び施設排水を対象とした下水中の複数種ウイルス等同時検査手法の研究

(1) 環境中の複数種ウイルス検出系の研究 (担当：喜多村)

マルチプレックス RT-qPCR の条件検討や、複数種ウイルス配列を搭載した標準物質の評価を行った結果、下水など環境検体から複数種のウイルスを検出する際の実験条件や内部精度管理の基盤となりうる。

(2) 下水処理場を調査定点とした複数種ウイルス同時検出系の検討

ア. 下水濃縮産物より抽出した核酸を用いた複数病原体の同時検出系の検討 (担当：濱崎、吉田)

2 step リアルタイム PCR による呼吸器感染症、腸管感染症の原因ウイルスを対象としたカスタムパネルを評価した。1種類のコントロール試薬で複数ウイルスについて定量できるように簡便な検査系を作成することができた。呼吸器パネルは更なる検討が必要である。

イ. リアルタイム PCR 阻害物質を効率的に除去する濃縮方法の比較検討 (担当：研究協力者 小澤)

下水沈殿物を用いた病原体ゲノム定量値は RNA 抽出効率、阻害物質等の影響を受けるため、RT-PCR 効率及び RNA 抽出効率をもとに測定値の精度管理を行う手法を検討した。

(3) 複数病原体を対象とした施設排水調査手法の検討 (担当：吉田)

施設排水調査により複数病原体ゲノムの検査が可能であることを示したが、検査系の感度特異度の検討が今後の課題である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

吉田 弘

- (1) 吉田弘, 喜多村晃一, 梁明秀 SARS-CoV-2 の下水サーベイランス 感染制御と予防衛生 7(1), 42-47, 2023
- (2) 坂 恭平, 岩手県環境保健研究センター, 北川和寛, 藤沼裕希, 小川泰卓, 長島真美, 小澤広規, 愛知県衛生研究所, 葛口 剛, 板持雅恵, 千葉翔子, 藤本泰之, 木田浩司, 濱崎光宏, 喜多村晃一, 吉田弘 下水中の新型コロナウイルス調査 (NIJIs) プロジェクトとポリオ環境水サーベイランスについて 病原微生物検出情報 44(7) 103-105 2023 年 7 月
- (3) Kitamura.K, Minami Kikuchi-Ueno.M, Yoshida.H., Rapid and sensitive on-site detection of SARS-CoV-2 RNA from environmental surfaces using portable laboratory devices. Microbiology Spectrum, 2023;11(6):e0045623. doi:10.1128/spectrum.00456-2

学会発表

- (1) 吉田弘 下水中のウイルス調査からわかったことー施設内感染対策への適応にむけて HU 無料ウェブセミナー 2023 年 4 月 12 日 東京
- (2) 紺野晶裕, 大曾根誠, 喜多村晃一, 小澤広規, 吉田弘, 大久保一郎 感染症サーベイにおける流入下水の活用について 第 43 回衛生微生物技術協議会 2023 年 7 月 6 日 衛生微生物技術協議会
- (3) 吉田弘 下水を用いた感染症サーベイランスと感染管理 第 38 回日本環境感染学会総会・学術集会ランチョンセミナー 2023 年 7 月 22 日 日本環境感染学会
- (4) 吉田弘, 上田真稔, 服部泰臣, 横江公美

高齢者介護施設排水中の新型コロナウイルス調査について(第2報) 第82回日本公衆衛生学会総会 令和5年10月31日-11月2日、つくば

- (5) 喜多村晃一、吉田弘 環境表面の新型コロナウイルスをオンサイトで検出する手法の検討 第82回日本公衆衛生学会総会 令和5年10月31日-11月2日、つくば
- (6) 伊藤雅、皆川洋子、安井善宏、吉田弘 愛知県における流入下水からの新型コロナウイルス遺伝子の検出について 第82回日本公衆衛生学会総会 令和5年10月31日-11月2日、つくば
- (7) 葛口剛、喜多村晃一、吉田弘 岐阜県における流入下水からの新型コロナウイルス遺伝子検出状況 第82回日本公衆衛生学会総会 令和5年10月31日-11月2日、つくば
- (8) 小澤広規、吉田弘、大久保一郎 横浜市における下水中の新型コロナウイルスモニタリングについて(第3報) 第82回日本公衆衛生学会総会 令和5年10月31日-11月2日、つくば
- (9) 古屋花、黒岩裕太、吉田弘、佐々木顕 新型コロナウイルス感染動態把握のための感染者数推計ツールの作成 第82回日本公衆衛生学会総会 令和5年10月31日-11月2日、つくば
- (10) 北川和寛、喜多村晃一、金成由美子、末永美知子、吉田弘 ポリオ環境水サーベイランスを活用した新型コロナウイルス及びエンテロウイルスの監視 第82回日本公衆衛生学会総会 令和5年10月31日-11月2日、つくば
- (11) 大久保一郎、吉田弘、永田紀子、江原勇登、眞榮城徳之 帖佐徹 上田真稔、服部泰臣 自由集会6「環境水中の新型コロナウイルス調査の今後」 第82回日本公衆衛生学会総会 令和5年10月31日-11月2日、つくば
- (12) 吉田弘 環境水サーベイランスに

よって得られた病原体情報の活用について 第13回公衆衛生情報研究部会特別講演 令和5年11月22日 千葉市

喜多村 晃一

論文発表

- (1) 吉田弘,喜多村晃一,梁明秀 SARS-CoV-2の下水サーベイランス 感染制御と予防衛生 7(1),42-47, 2023
- (2) 坂 恭平, 岩手県環境保健研究センター, 北川和寛, 藤沼裕希, 小川泰卓, 長島真美, 小澤広規, 愛知県衛生研究所, 葛口 剛, 板持雅恵, 千葉翔子, 藤本泰之, 木田浩司, 濱崎光宏, 喜多村晃一, 吉田弘 下水中の新型コロナウイルス調査(NIJIs)プロジェクトとポリオ環境水サーベイランスについて 病原微生物検出情報 44(7) 103-105 2023年7月
- (3) Kitamura.K, Minami Kikuchi-Ueno.M, Yoshida.H., Rapid and sensitive on-site detection of SARS-CoV-2 RNA from environmental surfaces using portable laboratory devices. Microbiology Spectrum, 2023;11(6):e0045623. doi:10.1128/spectrum.00456-23

学会発表

- (1) 紺野晶裕, 大曾根誠, 喜多村晃一, 小澤広規, 吉田弘, 大久保一郎 感染症サーベイにおける流入下水の活用について 第43回衛生微生物技術協議会 2023年7月6日 衛生微生物技術協議会
- (2) 喜多村晃一、吉田弘 環境表面の新型コロナウイルスをオンサイトで検出する手法の検討 第82回日本公衆衛生学会総会 令和5年10月31日-11月2日、つくば
- (3) 葛口剛、喜多村晃一、吉田弘 岐阜県における流入下水からの新型コロナウイルス遺伝子検出状況 第82回日本公衆衛生学会総会 令和5年10月31日-

11月2日、つくば

- (4) 北川和寛、喜多村晃一、金成由美子、末永美知子、吉田弘 ポリオ環境水サーベイランスを活用した新型コロナウイルス及びエンテロウイルスの監視 第82回日本公衆衛生学会総会 令和5年10月31日－11月2日、つくば

佐々木 顕

学会発表

- (1) 佐々木顕、数理疫学モデルを用いた環境水ウイルス濃度からの流行予測、第82回公衆衛生学会、2023年、つくば
(2) 古屋花、黒岩裕太、吉田弘、佐々木顕 新型コロナウイルス感染動態把握のための感染者数推計ツールの作成 第82回日本公衆衛生学会総会 令和5年10月31日－11月2日、つくば

神垣 太郎

特になし

濱崎 光宏

坂 恭平，岩手県環境保健研究センター，北川和寛，藤沼裕希，小川泰卓，長島真美，小澤広規，愛知県衛生研究所，葛口 剛，板持雅恵，千葉翔子，藤本泰之，木田浩司，濱崎光宏，喜多村晃一，吉田弘 下水中の新型コ

ロナウイルス調査 (NIJIs) プロジェクトとポリオ環境水サーベイランスについて 病原微生物検出情報 44(7) 103-105 2023年7月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

- ┆ 本研究の調査結果はウェブページにて公開している。

<https://nijis.jp/>

厚生労働省「新型コロナウイルス感染症の国内発生状況等について*」へリンク

*<https://www.mhlw.go.jp/stf/covid-19/kokunainohasseijoukyou.html>

- ┆ 本研究で得られた成果を踏まえて新型コロナウイルス下水サーベイランスは令和6年度感染症流行予測調査事業に新たに感染源調査として追加された。

- ┆ 下水中のウイルス情報を用いたウェブ解析アプリケーション

COVIVIS

(<https://covivis.soken.ac.jp>) を公開。

1. NIJIs Project のデータ解析（地方衛生研究所分）

1.1 処理場キャッチメントエリア自治体における感染者数等の情報整理

本年、16 自治体を対象にデータ下水中の新型コロナウイルスの検出結果を受領した。対象とした自治体及び処理場は以下に示す通りである。なお本稿で解析支援の対象は地方衛生研究所（6 か所）で実施した調査について情報の整理を行った。

表 1-1 今年度の情報整理対象自治体

	自治体	調査実施処理場
1	福島県	非公開（1 か所）
2	埼玉県	荒川水循環センター
3	神奈川県※	柳島水再生センター
4	富山県	非公開（1 か所）
5	岐阜県	各務原浄化センター
6	愛知県	非公開（1 か所）
7	大分市※	非公開（1 か所）
8	沖縄県	宜野湾浄化センター2 地点
9	札幌市※	新川水再生プラザ第 2 処理施設
10	仙台市※	南蒲生浄化センター
11	横浜市※	非公開（1 か所）
12	小松市※	小松市中央浄化センター2 地点
13	大津市※	非公開（1 か所）
14	大阪市※	住之江下水処理場
15	養父市※	非公開（4 か所）
16	福岡市※	中部水処理センター

※の自治体については、国土交通省、または自治体が従来から検査を依頼している民間検査機関よりデータを受領した。

1.2 処理場における感染動態の分析

令和 4 年度に厚労科研において構築した感染者数推計ツールをもとにして、6 か所の地方衛生研究所から提供を受けた新型コロナウイルス検出結果及び収集したキャッチメントエリア（下水処理場の処理区）における新型コロナウイルス感染症について定点あたり報告数に関するグラフを作成した。

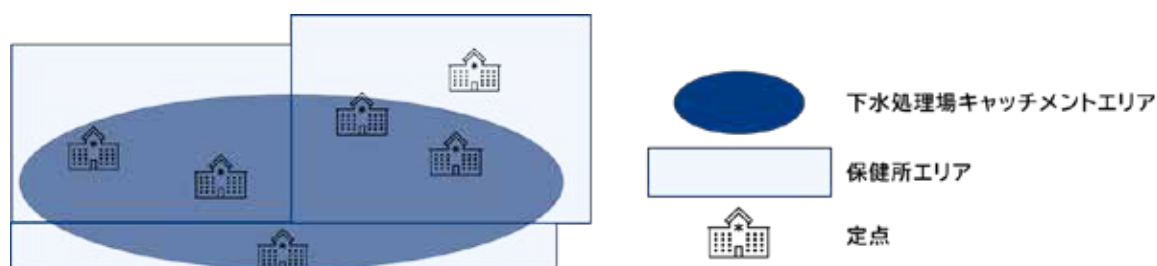
1.2.1 患者の発生動向等の把握方法に関するこれまでの経緯について

新型コロナウイルス感染症は発生当時、感染症法上 2 類相当に位置づけられ、診断医師による全数報告により感染動向を把握していた。その後、重症度の高い変異株は見られないこと、また病床使用率、重症病床使用率が低い水準にとどまっていることを踏まえ、感染症法上の位置づけの変更がなされた。即ち、令和 5 年 5 月 8 日以降、現行のインフルエンザ定点を基本とし、新型コロナウイルス感染症と診断された患者数の発生動向を把握する定点方式に変更された。

なお、感染症部会における検証の結果、令和 4 年 1 週（1 月 3 日）～35 週（8 月 29 日）における定点医療機関の患者発生動向は、概ね全数報告と同様の動向であることが確認されている¹。

1.2.2 感染者データの整理

新型コロナウイルス感染者データは、各自治体で公表している定点当たり報告数に基づき整理を行った。キャッチメントエリアを網羅する保健所管轄区分ごとにデータを収集し、複数の保健所管轄区分にまたがる処理場については、キャッチメントエリア全体の定点あたり報告数を算出した。



キャッチメントエリアの定点当たりの新型コロナウイルス感染症患者報告数＝
各処理場キャッチメントエリアを管轄する保健所への届出報告数の総計／保健所の定点数の総計

1.2.3 HP への掲載

作成したグラフ及びダウンロード用のエクセルファイルデータについては、HP (<https://nijis.jp/>) に掲載した。掲載にあたっては HP の運営会社（一般社団法人 WNP）にデータを送付し、アップデートしていただいた。

¹ 厚生労働省 「新型コロナウイルス感染症に関する 今後の患者の発生動向等の把握方法について」
<https://www.mhlw.go.jp/content/10906000/001055463.pdf>（2024 年 3 月 13 日閲覧）

1.3 各地方衛生研究所等における検査結果及び関連データの取りまとめ

1.3.1 検出方法

本調査では、自治体ごとにサンプルの採取及び検出を実施しており、自治体ごとに検出方法（濃縮方法、用いた試薬等）が異なる。各自治体における検出方法は表 1-2 に示す通りである。

表 1-2 各自治体の濃縮方法

自治体	濃縮手法（ウイルス抽出キット）	
福島県	上清	（Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit）
埼玉県	上清	（Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit）
富山県	上清	（Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit）
岐阜県	沈殿物	沈殿物抽出法
	上清	陰電荷膜法
愛知県	沈殿物	沈殿物抽出法
沖縄県	上清及び沈殿物	（Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit）

1.3.2 理論上の検出下限値（LOD）の算出

各自治体における検出下限値（LOD）は、表 1-3 の通りであった。LOD は、使用した下水試料量と RNA 抽出キットから理論上の検出下限値が算出できることを令和 4 年度の報告書において示しており²、本報告においては算出済みの値を各自治体から受領し、整理を行った。

表 1-3 各自治体の LOD

自治体	LOD	
福島県	上清	LOD：6 月 5 日以前は 1,000GC/L、6 月 12 日以降は 1,500GC/L
埼玉県	上清	1,250GC/L
富山県	上清	2023 年 9 月 7 日以前は 100GC/L、2023 年 9 月 14 日以 降は 200GC/L
岐阜県	沈殿物	1,200GC/L
	上清	1,071GC/L
愛知県	沈殿物	2,500GC/L
沖縄県	上清及び沈殿物	1,500GC/L

² 令和 4 年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）「新型コロナウイルス感染症等の感染症サーベイランス体制の抜本的拡充に向けた人材育成と感染症疫学的手法の開発研究」 研究代表者：鈴木基（国立感染症研究所 感染症疫学センター）

1.3.3 下水中の新型コロナウイルスの検出結果

各自治体の集計期間は表 1-4 に示す通りであり、下水中の新型コロナウイルスの検出状況を「－」（検査未実施）、「×」（検出せず）、「LOD」（LOD 未満での検出）、「○」（定量値）の 4 つに分類して整理した。

表 1-4 集計期間

自治体	集計対象期間
福島県	2023 年 14 週～2024 年 6 週
埼玉県	2023 年 36 週～2024 年 5 週
富山県	2023 年 14 週～2024 年 5 週
岐阜県	2023 年 14 週～2024 年 7 週
愛知県	2023 年 14 週～2024 年 5 週
沖縄県	2023 年 36 週～2024 年 4 週

表 1-5 2023 年 14 週から 25 週の検出状況

自治体	採水頻度	採水日											
		2023 年											
		14 週	15 週	16 週	17 週	18 週	19 週	20 週	21 週	22 週	23 週	24 週	25 週
福島県	1 回/週	LOD	LOD	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
埼玉県	1 回/週												
富山県	1 回/週	○	×	○	○	—	○	LOD	○	○	○	○	○
岐阜県	1 回/週	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
愛知県	1 回/週	×	○	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○
沖縄県	1 回/週												

表 1-6 2023 年 26 週から 37 週の検出状況

自治体	採水頻度	採水日											
		2023 年											
		26 週	27 週	28 週	29 週	30 週	31 週	32 週	33 週	34 週	35 週	36 週	37 週
福島県	1 回/週	LOD	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
埼玉県	1 回/週											○	○
富山県	1 回/週	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
岐阜県	1 回/週	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
愛知県	1 回/週	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
沖縄県	1 回/週											○	○

表 1-7 2023 年 38 週から 49 週の検出状況

自治体	採水頻度	採水日											
		2023 年											
		38 週	39 週	40 週	41 週	42 週	43 週	44 週	45 週	46 週	47 週	48 週	49 週
福島県	1 回/週	○	○	○	LOD	○	LOD	LOD	○	○	LOD	LOD	○
埼玉県	1 回/週	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
富山県	1 回/週	○	○	○	○	○	○	○	LOD	○	—	○	○
岐阜県	1 回/週	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
愛知県	1 回/週	○	○	○	○	○	○	○	○	LOD	○	○	○
沖縄県	1 回/週	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

表 1-8 2023 年 50 週から 2024 年 8 週の検出状況

自治体	採水頻度	採水日										
		2023 年			2024 年							
		50 週	51 週	52 週	1 週	2 週	3 週	4 週	5 週	6 週	7 週	8 週
福島県	1 回/週	LOD	○	LOD	○	○	○	○	○	○		
埼玉県	1 回/週	○	○	○	○	○	○	○	○			
富山県	1 回/週	○	○	—	—	○	○	○	○			
岐阜県	1 回/週	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
愛知県	1 回/週	○	○	○	○	○	○	○	○			
沖縄県	1 回/週	○	○	○	○	○	○	○				

1.3.4 処理区人口別の比較

新型コロナウイルス感染症の定点あたり報告数及び下水中のウイルス検出結果について、処理区の人口別に比較するため、表 1-9 に示す通り、5 つの区分に分類し、比較を行った。感染動向を把握するために各自治体が発表したデータを参照した。即ち処理場のキャッチメントエリアに対応する保健所内の定点における報告数を合算し、処理場流域の定点あたり報告数として整理した。

表 1-9 処理人口ごとの比較区分と対象自治体

区分	処理人口（人）	対象自治体
I	～100,000	なし
II	100,001～200,000	福島県
III	200,001～500,000	富山県、岐阜県、沖縄県
IV	500,001～1,000,000	愛知県
V	1,000,001～	埼玉県

(1) 区分Ⅱ

区分Ⅱでは、処理人口が100,001以上200,000以下の処理場を対象に新型コロナウイルスRNA量と処理場流域の定点当たり報告数を整理した。

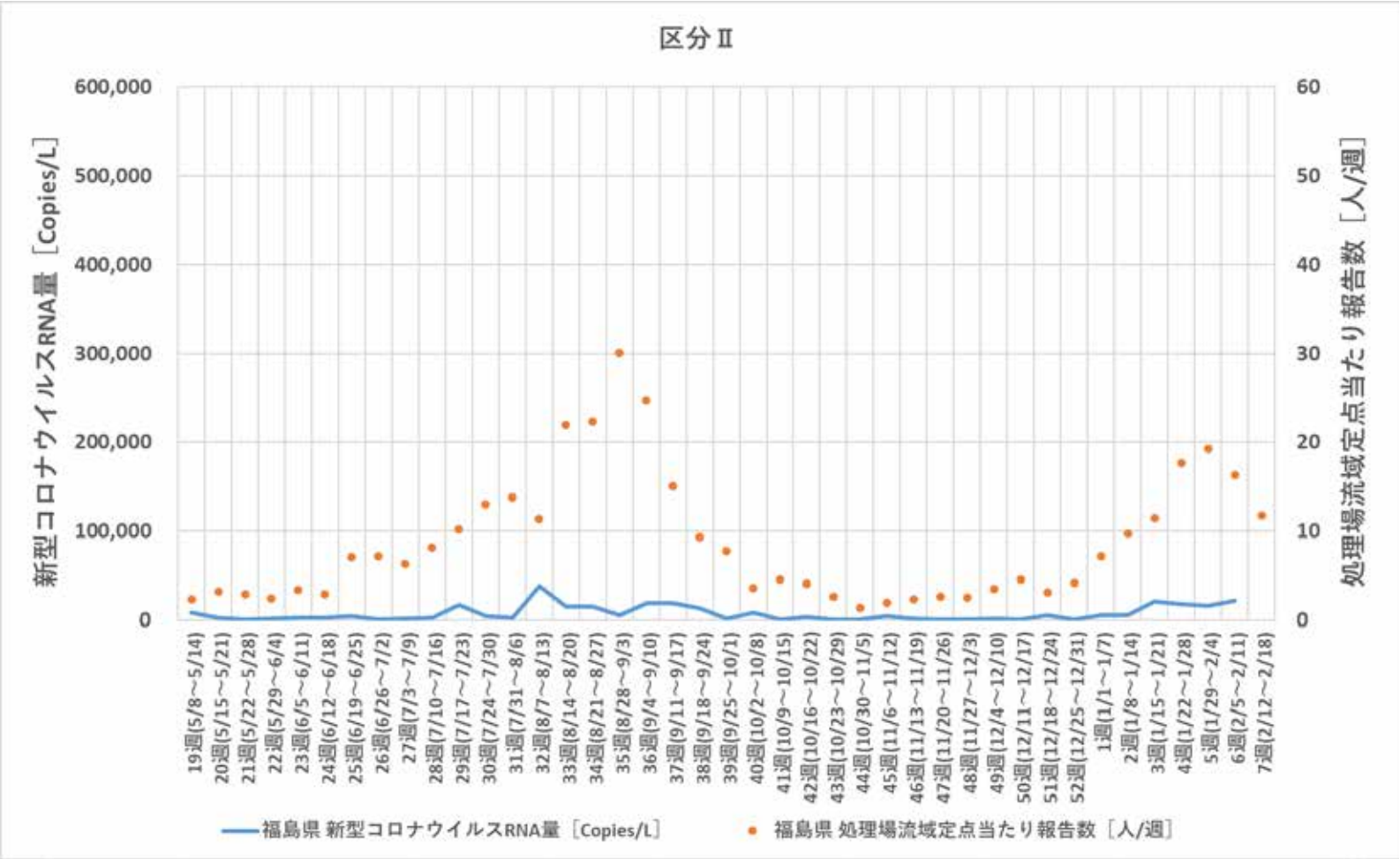


図 1-1 〔区分Ⅱ〕各処理場における処理場流域の定点当たり報告数と新型コロナウイルス RNA 量の推移

(2) 区分Ⅲ

区分Ⅲでは、処理人口が 200,001 以上 500,000 以下の処理場を対象に新型コロナウイルス RNA 量と処理場流域の定点当たり報告数を整理した。

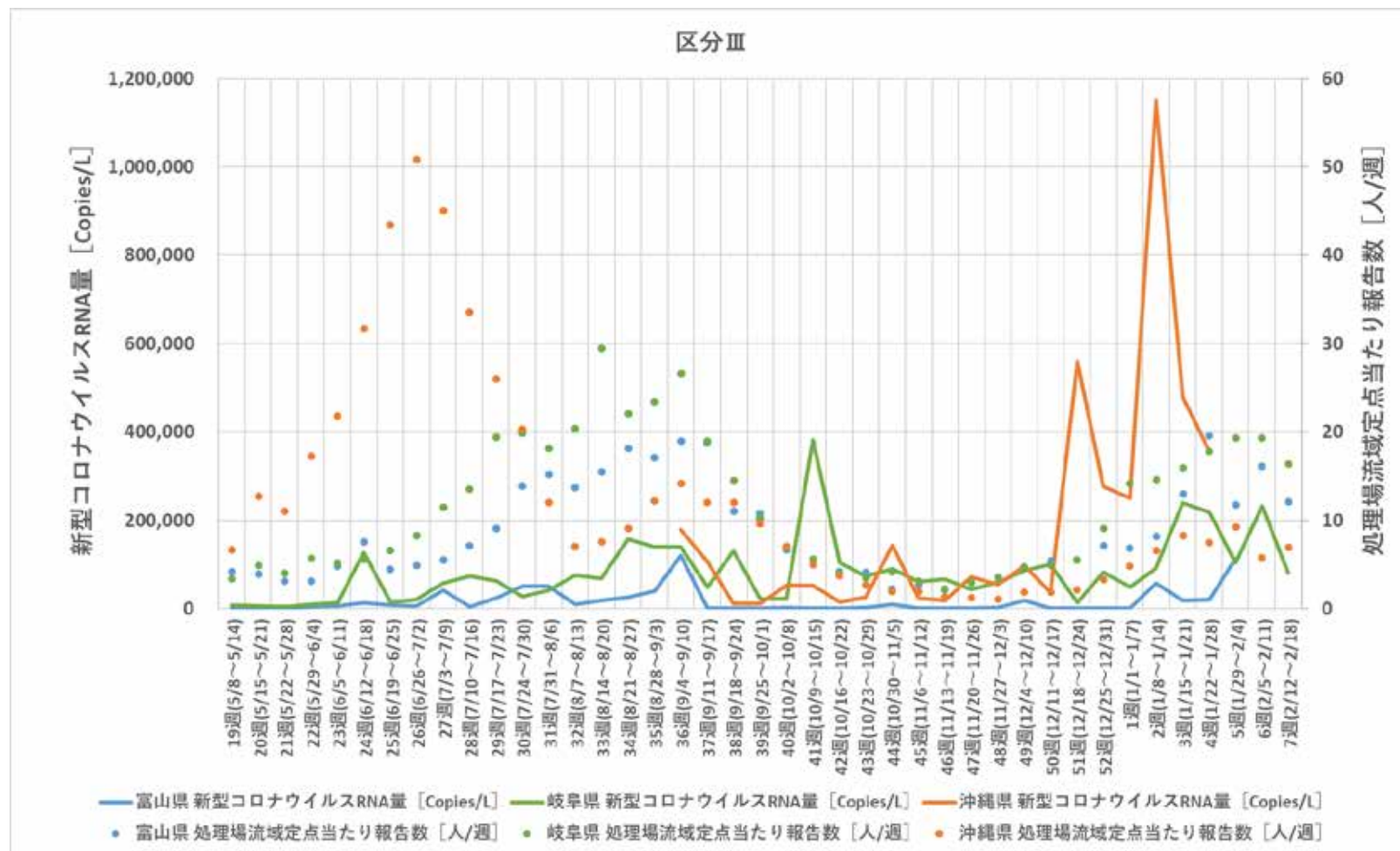


図 1-2 [区分Ⅲ] 各処理場における処理場流域の定点当たり報告数と新型コロナウイルス RNA 量の推移

(※沖縄県の下水中新型コロナウイルス RNA 量は 2 系統の流入水を合算した値)

(3) 区分Ⅳ

区分Ⅳでは、処理人口が 500,001 以上 1,000,000 以下の処理場を対象に新型コロナウイルス RNA 量と処理場流域定点当たり報告数を整理した。

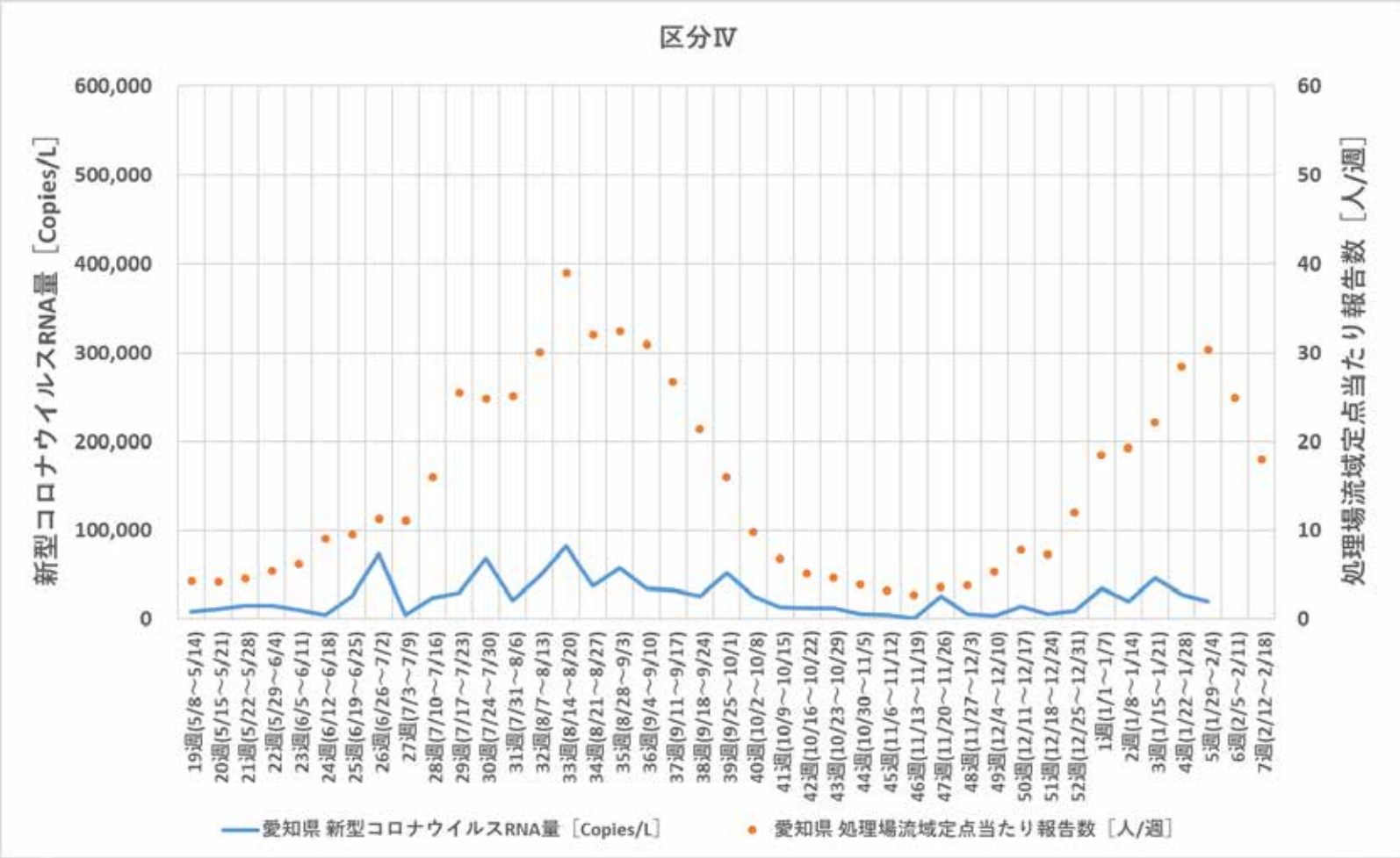


図 1-3 [区分Ⅳ] 各処理場における処理場流域の定点当たり報告数と新型コロナウイルス RNA 量の推移

(4) 区分V

区分Vでは、処理人口が1,000,001以上の処理場を対象に新型コロナウイルスRNA量と処理場流域定点当たり報告数を整理した。



図 1-4 [区分V] 各処理場における処理場流域定点当たり報告数と新型コロナウイルス RNA 量の推移

(5) 結果と考察

処理区人口により規模を区別し、新型コロナウイルス RNA 検出量（以下、検出量とする。）と処理区流域の定点あたり報告数を時系列で整理した。分析結果を以下に示す。

表 1-10 処理人口ごとの比較区分と対象自治体（再掲）

区分	処理人口（人）	対象自治体
I	～100,000	なし
II	100,001～200,000	福島県
III	200,001～500,000	富山県、岐阜県、沖縄県
IV	500,001～1,000,000	愛知県
V	1,000,001～	埼玉県

区分Ⅱでは検出量が少なく、検出量と定点あたり報告数の増減の傾向の一致は認められなかった。

区分Ⅲでは検出量と定点あたり報告数の増減の傾向が概ね一致した。ただし、富山県や沖縄県では感染が収束しつつある状況下においても検出量が多い場合があった。区分Ⅲでは、収束の判断ないしは再度の感染拡大の検知が難しいケースがあることが示唆された。

区分Ⅳでは、検出量と定点あたり報告数の増減が一致する場合と一致しない場合があったが、区分Ⅴでは感染者数の増加に少し遅れる形で検出量が増加することがあった。殆どの場合で非流行期における検出量は少なく、ばらつきが小さい。これは、処理場人口が多いことから下水中のウイルス量がある程度一定でありばらつきが小さいためだと考えられる。

令和4年度の下水サーベイランスの活用に関する実証事業を実施した当時の新型コロナウイルス感染症は全数把握方式であった。調査の結果、処理人口の大きい処理場を中心に、下水中のウイルス RNA 濃度と新規感染者数相関が高い傾向にあった。一方で、処理人口の小さい処理場では、相関係数が高いところもあれば、相関係数が非常に低い処理場もあった。したがって、処理人口が大きい場合、感染傾向を把握できる可能性が示されていた³。本分析では定点あたり報告数と比較することになったが区分Ⅲで検出量と感染者数の増減傾向が一致していた一方で、区分Ⅱ、区分Ⅳでは増減の傾向が一致していない自治体もあった。ある程度、過年度の実証事業と同様の傾向が認められたものの、処理場ごとに結果が異なることも明らかとなった。下水固有の要因、検査系や、感染者把握状況（処理区と保健所管轄の関係）などが影響している可能性もあり、継続的な調査による比較検討が必要である。

³ 三菱総合研究所「下水サーベイランスの活用に関する実証事業（下水処理場実証）報告書」（2024年3月13日閲覧）
https://www.caicm.go.jp/surveillance/pdf/plants_houkokusho.pdf

1.4 下水データの活用方法について

1.4.1 下水データの描画

NIJIs プロジェクトの HP で掲載していたグラフでは、下水データを実数で表現した。実数と対数では以下のように見え方に差異が生じ、下水中のウイルス量の増減が大きく見えやすいため表現の仕方には注意する必要がある。



図 1-5 ウイルス量を対数で示した場合の処理場流域当たり報告数と新型コロナウイルス RNA 量の推移



図 1-6 ウイルス量を実数で示した場合の処理場流域当たり報告数と新型コロナウイルス RNA 量の推移

1.4.2 下水サーベイランスの解釈について

全国の流行状況を評価するためには、国立感染症研究所が提供している感染症発生動向調査⁴をベースに確認することが重要であるが、島根県が公表している感染者情報⁵のように、増減パターンが視覚的に評価できる場合は参考にするとよい。

WHO は、サンプリング方法によってウイルス検出の感度が異なる可能性があることに加え、分析手法も多様であることから、異なる処理場あるいは手法で検出されたウイルス RNA 濃度を直接比較することは困難であると指摘している⁶。

したがって、下水データと疫学データを比較にあたっては、下水データの検査方法が多岐にわたることに留意する必要がある。下水データを他のウイルスで補正するなど、見せ方を工夫する方法もあり、標準的なルールが定まっていないため、データの解釈については様々な側面から情報を精査し、実際の流行状況を加味したうえで活用することが必要だろう。

今年度は、研究班において各自治体が公表している定点当たり報告数の収集に対応した。今後各自治体で下水サーベイランスに取り組む際には、定点当たり報告数の取りまとめを実施している衛生部局に協力いただくことが不可欠と考えられる。

⁴ 国立感染症研究所 IDER 速報データ <https://www.niid.go.jp/niid/ja/data.html>

⁵ 島根県感染症情報センターHP

<https://www1.pref.shimane.lg.jp/contents/kansen/dis/teiten/j502dt.htm#week>

⁶ WHO, “Environmental surveillance for SARS-CoV-2 to complement other public health surveillance”, <https://www.who.int/publications/i/item/9789240080638> (2024 年 3 月 13 日閲覧)

2. 「感染者推計ツール」の改修

2.1 背景

下水サーベイランスによる新型コロナウイルス感染症の感染動向の把握を効果的に実施するためには、下水から得られたデータ、および感染者数等疫学に関するデータを効率的に整理し、適切に可視化することが重要である。本ツール「感染動向解析ツール」は、下水サーベイランスにより得られた下水中の新型コロナウイルス濃度のデータを入力し、定点当たり報告数等の疫学データを入力することにより、こうしたデータ整理および加工を実施できるツールである。

令和 5 年 5 月より、感染症法上 5 類に位置付けられ感染者数の把握方法が定点把握方式に変更された。この変更により、令和 4 年度に作成した「感染者数推計ツール」の疫学データの入力方法等を見直す必要が生じたことから、今年度の業務としてツールの改修を実施した。ツールの改修にあたっては、より簡便に、利用者が下水データを視覚化し、活用できることを目指した。

2.2 ツール改修の実施内容

2.2.1 ツールの構成の変化

令和 4 年度に作成した「感染者数推計ツール」の構成（図 2-1）および本業務での改修後のツール（「感染動向解析ツール」）の構成（図 2-2）を下記のとおり示す。

構成図において、青色の枠が入力データ、赤色の枠がアウトプットを示し、緑色の枠はツール内での処理を表す。

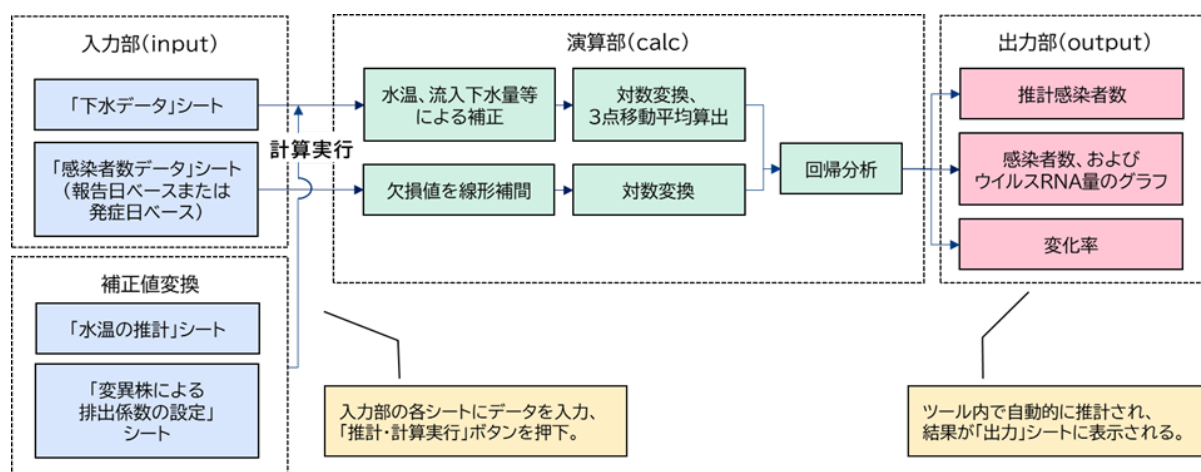


図 2-1 令和 4 年度の「感染者数推計ツール」の構成

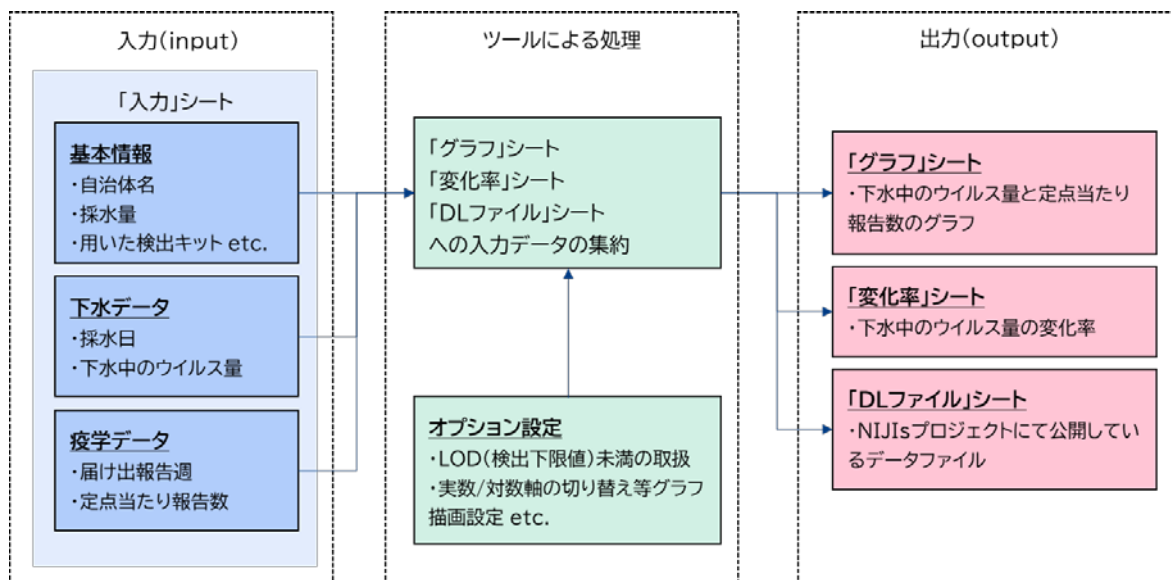


図 2-2 本業務での改修後のツール（感染動向解析ツール）の構成

2.2.2 ツールの主な改修点

令和4年度に作成した「感染者数推計ツール」からの主な改修点を表2-1に示す。

表 2-1 ツールの主な改修点と改修内容

改修項目		改修前	改修後
		感染者数推計ツール (令和4年度)	感染動向解析ツール (令和5年度)
(1)	感染者数推計機能	入力データに基づく感染者数の推計機能を実装	(実装なし)
(2)	入力データの補正機能	流入下水量や水温、流下時間等を入力することで、下水の希釈やウイルスの減衰を補正する機能を実装	(実装なし)
(3)	疫学データ	日次または週次(累積)の感染者数を入力	定点当たり報告数を入力
(4)	下水データと疫学データのグラフ	閲覧用グラフの描画機能を実装	・ 閲覧用および編集用グラフの描画機能を実装 ・ 疫学データの実数軸と対数軸の切り替えや、グラフの画像ファイル出力などオプション機能を拡充
(5)	「DLファイル」シート	(実装なし)	新規実装

(1) 感染者数推計機能

本業務で改修するツールにおける主たる目的として、下水データおよび疫学データのグラフ等による効果的な可視化が挙げられる。ツールのユーザが、必ずしも公衆衛生学の専門的知識を必要とせずともこれらのデータを可視化・整理できることを目的に、入力データの描画機能の改修に主眼を置き、令和4年度に実装した感染者数推計機能は廃止した。

(2) 入力データの補正機能

「感染者数推計ツール」では、流入下水量や水温、流下時間等を入力することにより、下水の希釈やウイルスの減衰効果を補正する機能を実装していた。今回の改修では(1)の感染者数推計機能同様、入力データの描画機能に主眼を置いたため、当該補正機能は廃止した。

(3) 疫学データ

令和4年度の業務遂行時点では、新型コロナウイルス感染症の新規感染者数は「新型コロナウイルス感染者等情報把握・管理支援システム(HER-SYS)」により日次で報告されており、「感染者数推計ツール」も当該データの入力を想定して設計していた。令和5年5月より、感染症法上5類に位置付けられ感染者数の把握方法が定点把握方式に変更となったことに伴い、定点当たり報告数とその報告週の入力が可能な構成へ改修した。

(4) 下水データと疫学データのグラフ

「感染者数推計ツール」では入力された下水データおよび疫学データ（推計値含む）の描画機能を実装していたが、閲覧用のグラフの位置付けであり、ユーザによる編集は想定していない設計であった。本業務における改修では閲覧用のグラフに加えて編集用のグラフも出力することにより、ユーザにてグラフのレイアウトを編集・調整できる設計とした。

また、表 2-2 に示すとおりグラフの描画に係るオプションも拡充した。

表 2-2 グラフ描画に係る追加実装オプション

本業務の改修で実装した グラフの描画オプション	オプションの説明
グラフ複製機能	任意のグラフを複製することができる。ユーザにて複数パターンのグラフを作成する場合を想定して実装。
実数軸と対数軸の切り替え	グラフの疫学データの軸を、実数軸と対数軸に切り替えられる機能を実装。
グラフの画像ファイル出力	グラフを別途画像ファイルとして出力する機能を実装。ファイル形式は PNG および SVG に対応。
特定の値の「×」マーカー表示	不検出 (N.D.) や検出下限値 (LOD) 未満の値がグラフ上でわかるように、「×」マーカーで表示する機能を実装。

(5) 「DL ファイル」シート

「下水中の新型コロナウイルス調査プロジェクト（NIJIs プロジェクト）」の Web ページ¹では、各自治体の下水データおよび疫学データのグラフの閲覧、およびそのバックデータ（グラフ描画に用いているデータ）のダウンロードが可能である。本業務における改修では、バックデータと同様のレイアウトのファイル（「DL ファイル」と呼称）を出力できる機能を実装した。

2.3 ユーザへのツール説明会の実施

本ツールの使用方法の説明会を実施した。実施スケジュール、主な実施事項は下記のとおりである。

表 2-3 ツール説明会の実施内容

説明会	実施日	主な実施事項
第 1 回	2024 年 2 月 14 日	・ ツールのデモンストレーション ・ 説明会参加者からの質疑応答
第 2 回	2024 年 2 月 16 日	・ ツールのデモンストレーション ・ 説明会参加者からの質疑応答
第 3 回	2024 年 3 月 26 日	・ ツールのデモンストレーション ・ 説明会参加者からの質疑応答

2.4 感染動向解析ツールマニュアルの作成

本業務で改修した感染動向解析ツールの操作方法について、別途マニュアルを作成した。ツールを使用する際のデータの入力方法や操作方法の説明のほか、入力前のデータ加工方法等の注意点を記載した。作成したマニュアルは報告書別紙として取りまとめた。

¹ NIJIs 下水中の新型コロナウイルス調査プロジェクト「NIJIs プロジェクトについて」(<https://nijis.jp/>)（2024 年 2 月 7 日閲覧）

感染動向解析ツール_操作マニュアル

Ver1.0

2024 年 3 月

目次

1. はじめに	4
2. 動作環境	5
3. 感染動向解析ツールの使用方法.....	6
3.1 感染動向解析ツールの構成.....	6
3.2 感染動向解析ツールの操作手順	6
3.2.1 インпутデータの準備	7
3.2.2 インпутデータの入力.....	11
3.2.3 グラフの描画・出力.....	16
3.2.4 変化率の算出・出力.....	21
3.2.5 DL ファイルの出力	23
3.2.6 データを更新・修正する場合	25
3.3 エラー発生時の対応方法.....	25

クイックリファレンス（ツールの使用画面別の簡易マニュアル）

【入力編】（「入力」シート）

①基本情報の入力 >P11 参照

「基本情報」の各項目にデータに関する情報を入力。

②疫学データの入力

>P13 参照

「疫学データ」の「各種設定」を選択/入力。設定に応じて入力欄が薄い黄色にハイライトされるので、当該欄にデータ（届け出報告週、定点当たり報告数等）を入力（コピー&ペーストの場合は「値貼り付け」とすること）。

③下水データの入力 >P15 参照

「下水データ」の各項目にデータ（採水日、ウイルスRNA量等）を入力（コピー&ペーストの場合は「値貼り付け」とすること）。（PMMoV等の内部精度管理試験の結果は、ツールの動作上、入力は任意）

① 基本情報				② 疫学データ（処理場流域定点当たり報告数）																		③ 下水データ			
自治体（市区町村名、報道発表名等）	A市	報道発表名等		各種設定		入力データの形式 →																下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
処理場	B処理場			届け出先名（保健所等）（「都道府県単位」および「計算済みの値」の場合は入力不要） →		計算済みの処理場流域定点当たり報告数を入力する																下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
処理場人口（人）	10,000			使用するものに○ →		A保健所 B保健所 C保健所 D保健所 E保健所 F保健所																下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
処理場の行政区	A市、B市、C区																					下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
届け出先（保健所等）	A保健所																					下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
採水量（㎡）	300																					下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
検査に用いた水量（ml）	200																					下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
用いた検体の種類	前週心後の沈																					下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
用いたRNA精製キット																						下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
メーカー名																						下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
商品名																						下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
品番																						下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
検出下限値（LOD）*	100																					下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
用いたSARS-CoV-2検出キット																						下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
プライマーの種類																						下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
定量PCRに用いたウェル数																						下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
*理論上の検出下限値も記載ください。																						下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
*ツールの計算上必要な値のため、検出下限値は必ず記載ください。																						下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
【データの入力手順】																						下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
※薄い黄色でハイライトされた項目は入力必須です。																						下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
①「基本情報」の各項目にデータに関する情報を入力してください。ツールの動作上、「検出下限値」																						下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
Check!																						下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
ツールの動作上、「検出下限値（LOD）」は必ず入力する。																						下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
Check!																						下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
「疫学データ」の入力データの形式を「処理場に該当する…」を選択した場合は、報告数の届け出先の名称（保健所名等）を入力し、グラフ描画等に使用したいデータに○をつける。																						下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
Check!																						下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	
不検出（Not Detected; N.D.）の場合は、「N.D.」と入力する。（半角ピリオドを使用すること）																						下水中のウイルス定量結果		内部精度管理試験の結果	

※詳細な操作方法は「3.2 感染動向解析ツールの操作手順」を参照すること。

【出力編】（「グラフ」シート）

日付	報告週	週開始日	週終了日	横軸	新型コロナウイルスRNA量 [Copies/L]	新型コロナウイルスRNA量 [Copies/L] (常用対数表示用)	処理場流域定点点数 報告数 [人/週]
date	week	date	date	date	GC/L	log10_GC/L	人/週
2023/5/8	第19週	2023/5/8	2023/5/14	第19週(5/8~5/14)	7,000	7,000	#N/A
2023/5/9	#N/A	#N/A	#N/A		#N/A	#N/A	#N/A
2023/5/10	#N/A	#N/A	#N/A		4,500	4,500	#N/A

④グラフの描画オプションの設定

>P16 参照

- 開始日/終了日
 - グラフに表示する期間を設定。
- LOD 未満の値の表示方法
 - LOD 未満の値について、そのままの値で表示するか、LOD の半分の値に置換して表示するかを選択。
 - 「グラフ」シートでは「そのままの値で表示」を推奨。
- ×マーカー表示
 - LOD 未満の値または N.D. をグラフ上「×」で表示するかを選択。
- 自治体名/処理場名
 - グラフタイトルに自治体名および処理場名を表示するか選択。

⑤グラフ出力

>P17 参照

- グラフ描画
 - オプションの設定を変更した場合には押下。
- PNG/SVG 出力
 - ツールの保存されているフォルダにグラフが出力。

2023/6/17	#N/A	#N/A	#N/A		#N/A	#N/A	#N/A
2023/6/18	#N/A	#N/A	#N/A		#N/A	#N/A	7
2023/6/19	第25週	2023/6/19	2023/6/25	第25週(6/19~6/25)	15,000	15,000	#N/A
2023/6/20	#N/A	#N/A	#N/A		#N/A	#N/A	#N/A
2023/6/21	#N/A	#N/A	#N/A		120,000	120,000	#N/A
2023/6/22	#N/A	#N/A	#N/A		#N/A	#N/A	#N/A
2023/6/23	#N/A	#N/A	#N/A		150,000	150,000	#N/A
2023/6/24	#N/A	#N/A	#N/A		#N/A	#N/A	#N/A

描画オプション			
LOD (検出下限値)	開始日	終了日	期間
GC/L	yyyy/mm/dd	yyyy/mm/dd	dd
100	2023/5/8	2023/12/10	217

詳細設定			
LOD未満の値の表示方法	×マーカー表示	自治体名	処理場名
LODの半分の値で表示	LOD未満を×で表示	☐	☐

※入力データが更新されたら押下してください。

※適用したいグラフをクリックしてから押下してください。
※グラフを選択しない状態でボタンを押下すると、「閲覧用グラフ」に適用されます。

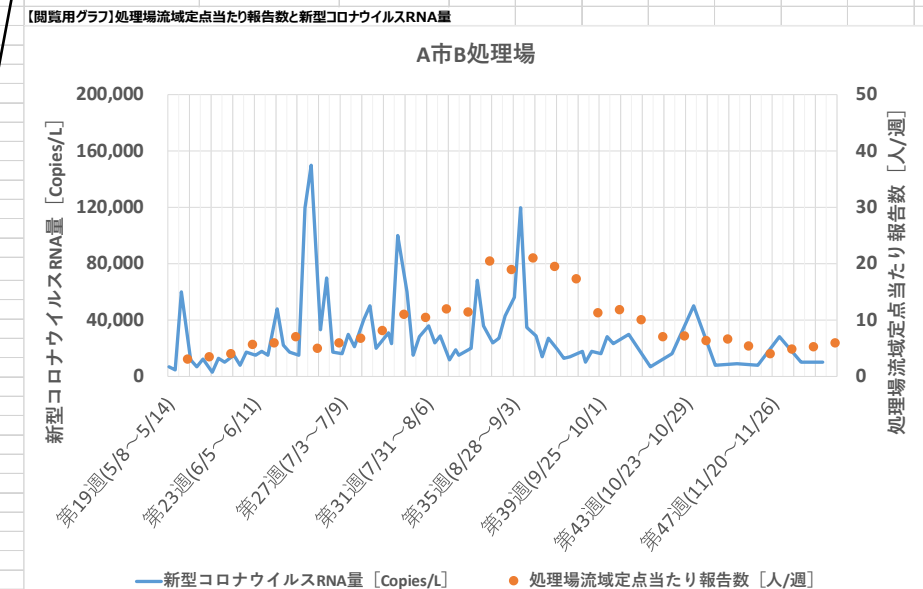
グラフ描画

グラフをコピー 実数軸/対数軸切り替え PNG出力 SVG出力

Check!

出力される画像ファイルのサイズはPCのディスプレイ設定に依存するため、設定を確認しておく。

(詳細は「3.2.3 グラフの描画・出力」の補足を参照)



Check!

画面左側の数表はグラフ描画用の計算領域のため、ユーザでの特段の操作は不要である。

資料 2

(「変化率」シート)

採水日	新型コロナウイルス RNA量[GC/L]	検出濃度 (対数変換)	回帰直線の傾き	変化率			
date	GC/L	LOG10 GC/L	-	%	■変化率（％）の色分けの凡例		
2023/5/8	7,000	3.84509804				～-10.0％	
2023/5/10	4,500	3.653212514				-9.9％～0％	
2023/5/12	60,000	4.77815125	0.233263303	71.1%		0.1％～9.9％	
2023/5/15	12,000	4.079181246	0.060073977	14.8%		10.0％～	
2023/5/17	7,000	3.84509804	-0.19027217	-35.5%			
2023/5/19	12,500	4.096910013	0.004432192	1.0%	値の設定		
2023/5/22	3,000	3.477121255	-0.084095428	-17.6%	LOD未満の値の表示方法		
2023/5/24	13,000	4.113943352	-0.01317251	-3.0%	そのままの値で表示		
2023/5/26	10,000	4	0.130719686	35.1%			
2023/5/29	15,000	4.176091259	0.016082279	3.8%			
2023/5/31	8,000	3.903089987	-0.013217864	-3.0%	Excel出力		
2023/6/2	17,000	4.230448921	0.013589416	3.2%			
2023/6/5	15,000	4.176091259	0.048859243	11.9%			
2023/6/7	18,000	4.255272505	0.003142301	0.7%			

⑥LOD 未満の値の表示方法の設定・Excel 出力 >P21 参照

- ・ LOD 未満の値の表示方法
 - LOD 未満の値について、そのままの値で表示するか、LOD の半分の値に置換して表示するかを選択。
 - 「変化率」シートでは「LOD の半分の値で表示」を推奨。
- ・ Excel 出力
 - シートを別途 Excel ファイルとしてツールの保存されているフォルダに出力。
- ・ 変化率算出は米国 CDC の方法に準ずるが、本ツールは変化率算出に用いるデータを 3 点で固定しているため、採水頻度により変化率を算出するインターバルが変化する点に注意が必要。（詳細は「3.2.4 変化率の算出・出力」の補足（P18）を参照）

(「DL ファイル」シート)

[illegible]

⑦LOD 未満の値の表示方法の設定・Excel 出力 >P23 参照

- ・ LOD 未満の値の表示方法
 - LOD 未満の値について、そのままの値で表示するか、LOD の半分の値に置換して表示するかを選択。
 - 「DL ファイル」シートでは「そのままの値で表示」を推奨。
- ・ Excel 出力
 - シートを別途 Excel ファイルとしてツールの保存されているフォルダに出力。

1. はじめに

下水サーベイランスによる新型コロナウイルス感染症の感染動向の把握を効果的に実施するためには、下水から得られたデータ、および感染者数等疫学に関するデータを効率的に整理し、適切に可視化することが重要である。

本ツール「感染動向解析ツール」は、下水サーベイランスにより得られた下水中の新型コロナウイルス濃度のデータを入力し、定点当たり報告数等の疫学データを入力することにより、こうしたデータの整理および加工を効率的に実施できるツールである。

本ツールは、地方公共団体の保健衛生部局の職員や下水道部局の職員、研究所の職員が使用することを想定しており、各地方公共団体においてサーベイランス結果を取りまとめる際の資料等に活用されることを想定している。データの入力および各入力データに関しては、各地方公共団体で取りまとめられている情報を取得する必要がある。

2. 動作環境

本ツールは、以下の OS およびアプリケーション環境下で動作確認および検証を行った。

OS : Windows® 10 Enterprise ver.22H2 (64bit)

アプリケーション : Microsoft® Excel® for Microsoft 365 MSO (バージョン 2302 ビルド
16.0.16130.20848) 32 ビット

3. 感染動向解析ツールの使用方法

本章では、感染動向解析ツールの使用方法について解説する。

3.1 感染動向解析ツールの構成

本ツールの構成は図 3-1 に示すとおり、大きく「入力」シート、「グラフ」シート、「変化率」シート、「DL ファイル」シートから構成される。

「入力」シートではグラフ描画や変化率算出等、本ツールの動作に必要なデータの入力を行う。それらのデータをツール内で自動的に加工し、「グラフ」、「変化率」、「DL ファイル」シートから各種アウトプットが得られる。

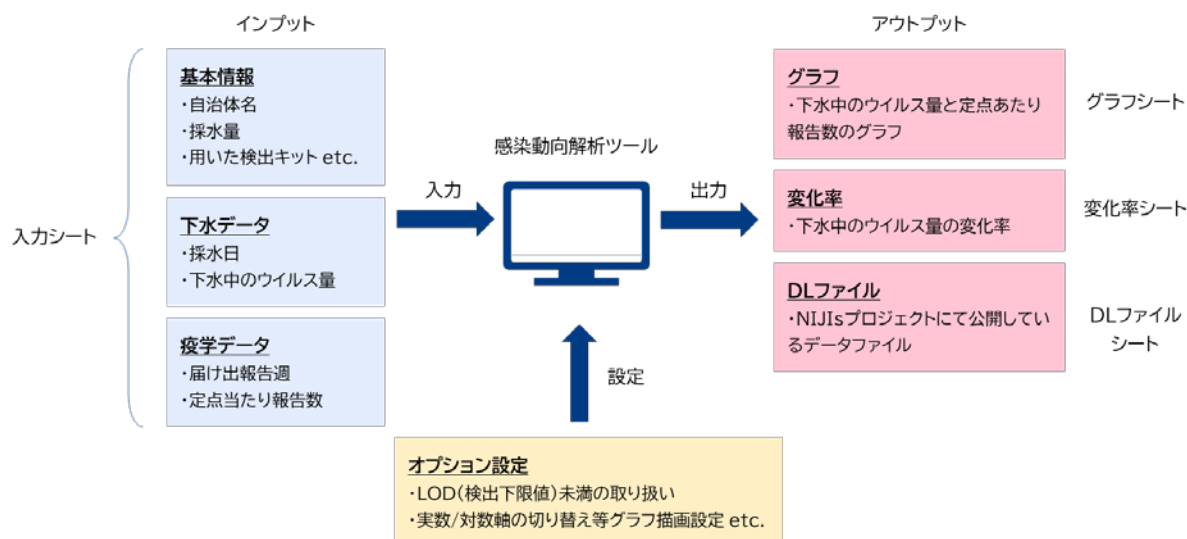


図 3-1 感染動向解析ツールの構成

3.2 感染動向解析ツールの操作手順

本ツールの操作手順は下図に示すとおりであり、ここでは操作方法について解説する。



図 3-2 感染動向解析ツールの操作手順

なお、本マニュアル冒頭の「クイックリファレンス」を参照することで、取り急ぎのアウトプットを得ることを目的としたツールの実行が可能だが、本章ではデータの入力規則等の詳細な操作について解説している。クイックリファレンスに従ってツールを操作する上で不明点が発生した場合等に本章を参照すること。

また、データや入力方法に関する補足は「**補足**」というボックスを、操作の上で特に注意・

確認が必要な点は「**Check!**」というボックスをそれぞれ付しているため、併せて参照すること。

Check!

本ツールはユーザによる操作が想定される箇所以外はロックをかけているが、不意な操作ミスによりツールが破損してしまうことも考えられる。使用前に操作用のツールとしてコピーをとり、本ツールのマスタを別途控えておくことを推奨する。

3.2.1 インプットデータの準備

インプットデータとして疫学データと下水データを準備する。準備にあたっての確認点や注意事項を以下に示す。

(1) インプットデータの準備における確認点・注意事項

本ツールの「入力」シートは国立感染症研究所が配布する「新型コロナウイルス感染源調査票」に準拠しているため、基本的には当該調査票に記録された情報を転記することでツールへのインプットが可能である。ただし、入力にあたり次の点を確認し、必要に応じてデータを加工する。

ア) 不検出 (Not Detected; N.D.) データの表記ルール

本ツールでは、下水データにおいて不検出のデータは一律「N.D.」と入力することとする。

Check!

本ツールでは「N.D.」の表記によって、不検出であることを判別している。このため、例えば「ND」や「N.D」などの表記は不検出であると判別できない。半角ピリオドを使用すること。

イ) 疫学データと下水データの日付と行の一致調整

疫学データ（定点当たり報告数）は週次（1 週間につき 1 つのデータ）である一方、下水データは採水頻度により週次のデータ数が変化する。このとき、例えば週 2 回採水を行う場合、疫学データと下水データをそれぞれ上から詰めて記載する方法（図 3-3）と、適宜空白行を加えて日付が行で一致するように記載する方法（図 3-4）が考えられる。

疫学データ			
患者届け出報告週			定点当たり報告数
第19週	2023/5/8	2023/5/14	3.12
第20週	2023/5/15	2023/5/21	3.42
第21週	2023/5/22	2023/5/28	4.11
第22週	2023/5/29	2023/6/4	5.01

下水データ	
採水日	新型コロナウイルスRNA量 [GC/L]
2023/5/8	7000
2023/5/10	5000
2023/5/12	60000
2023/5/15	12000
2023/5/17	8000
2023/5/19	12500
2023/5/22	3000
2023/5/24	13000
2023/5/26	10000
2023/5/29	15000
2023/5/31	8000
2023/6/2	16000

図 3-3 疫学データと下水データの日付と行を一致させない場合
(特段調整を加えず、疫学データと下水データをそれぞれ上から詰めて記載した場合)

疫学データ			
患者届け出報告週			定点当たり報告数
第19週	2023/5/8	2023/5/14	3.12
第20週	2023/5/15	2023/5/21	3.42
第21週	2023/5/22	2023/5/28	4.11
第22週	2023/5/29	2023/6/4	5.01

下水データ	
採水日	新型コロナウイルスRNA量 [GC/L]
2023/5/8	7000
2023/5/10	5000
2023/5/12	60000
2023/5/15	12000
2023/5/17	8000
2023/5/19	12500
2023/5/22	3000
2023/5/24	13000
2023/5/26	10000
2023/5/29	15000
2023/5/31	8000
2023/6/2	16000

図 3-4 疫学データと下水データの日付と行を一致させる場合
(疫学データに空行を追加することで、下水データの日付と行が一致するように調整した場合)

本ツールはいずれの記載方法のデータでも読み込むことができるが、「DL ファイル」シートのレイアウトは上記のデータの記載方法と同じになるため、「DL ファイル」を日付が行で一致するようにしたい場合は、インプットデータの時点で、手動で空白行を追加して調整する必要がある。なお、月2回の採水を行う場合にも、同様の調整が必要となる。

ウ) 複数ウェルの下水データに対する平均値の計算

採取した下水から抽出した RNA を 2 ウェル以上用いて、リアルタイム PCR によりウイルスゲノムコピー数を測定する場合は、複数ウェルでの検査結果の平均値をとるなどして 1 つの値にまとめた上で、インプットデータとして用いる。

ただし、検出下限値未満の値となったウェルあるいは不検出 (N.D.) が含まれるときは、ツールの入力値としては検出下限値の半分の値に置き換えたものを使用するが、増幅曲線を確認の上、慎重に判断する。

例として、図 3-5 のとおり、検出下限値が 200[GC/L]の場合で 2 つのウェルで採水された下水データを仮定して説明する。基本的には調査票における報告値もツールの入力値も 2 つのウェルの平均値とするが、2023/5/22 のデータは N.D.のウェルが含まれている。N.D.のウェルを除く平均値（すなわちウェル 2 の値そのもの）は 5,000 であり、検出下限値以上ではあるが、ツールの入力値としては検出下限値の半分の値である 100 を入力することとする。

検出下限値[GC/L]：		200
--------------	--	-----

採水日	検出値		→	平均値	
	ウェル1	ウェル2		ツールへの入力値	報告値
2023/5/8	5,500	8,500		7,000	7,000
2023/5/10	2,500	4,000		3,250	3,250
2023/5/12	25,000	75,000		50,000	50,000
2023/5/15	12,000	12,000		12,000	12,000
2023/5/17	6,000	8,500		7,250	7,250
2023/5/19	11,000	20,000		15,500	15,500
2023/5/22	N.D.	5,000		100	5,000
2023/5/24	13,500	14,500		14,000	14,000
2023/5/26	15,000	8,500		11,750	11,750
2023/5/29	14,000	17,000		15,500	15,500
2023/5/31	5,550	8,550		7,050	7,050

1/2ウェルでのみ検出

図 3-5 複数ウェル中に N.D.を含むデータの平均値処理の例

エ) 複数の下水処理場のデータを用いる場合

複数の下水処理場のデータそれぞれについてアウトプットを作成したい場合は、ツールを複製して作成する必要がある。

例として、図 3-6 のとおり、複数の処理場 (A,B,C) が存在する都道府県または自治体のデータを解析する場合を仮定して説明する。データセットが異なる場合は、解析対象のデータそれぞれに対応するようツールを複製し使用する。また、都道府県または自治体全体として解析したい場合等は、別途手動で各処理場のデータを足し合わせたデータを作成し、同様にツールを別途複製して解析する。

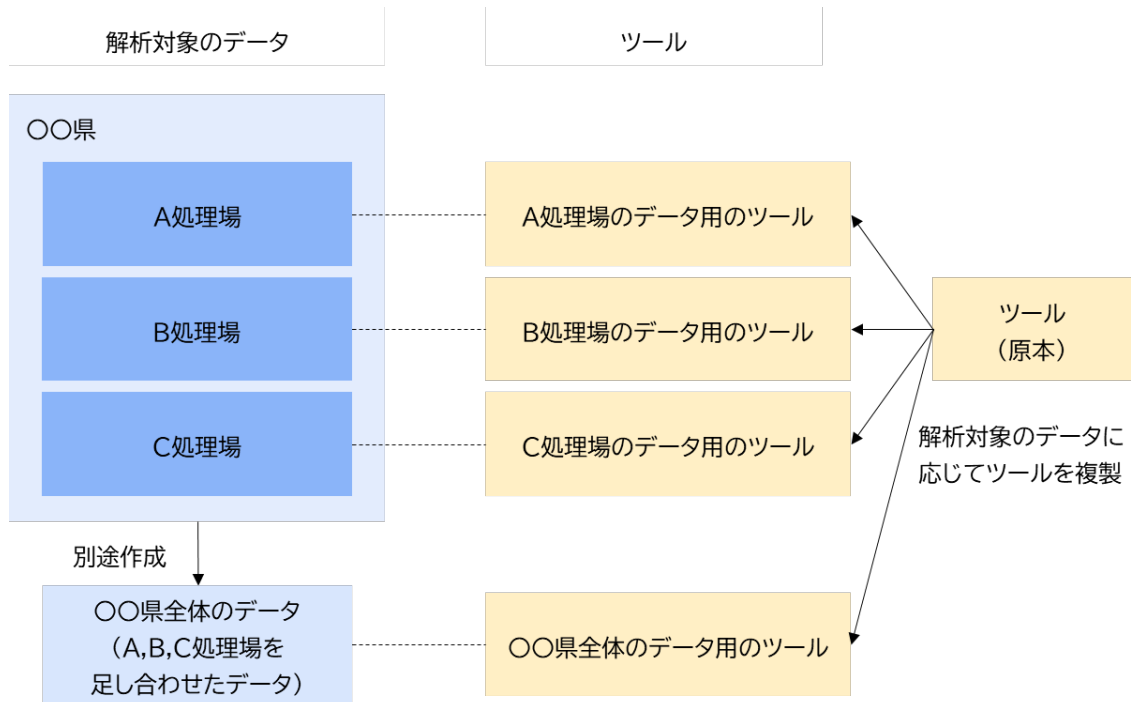


図 3-6 解析対象のデータとツールの対応

3.2.2 インプットデータの入力

(1) ツールの「入力」シートを開く

(2) 「基本情報」を入力する

「入力」シートにオレンジ色で示された、ツールに入力するデータに関する基本情報の入力欄に各項目の情報を入力する。

なお、本ツールでは、入力または選択が必須である項目は薄い黄色にハイライトされるため、必ず入力・選択を行う。

①基本情報	
自治体（市区町村名、都道府県名等）	A市
処理場	B処理場
処理区人口（人）	
処理区の行政区	
届け出先（保健所等）	
採水量（ml）	
検査に用いた水量（ml）	
用いた検体の種類	
用いたRNA精製キット	
メーカー名	
商品名	
品番	
検出下限値（LOD）*	100
用いたSARS-CoV-2検出キット	
プライマーの種類	
定量PCRに用いたウェル数	

各項目に情報を入力する。

図 3-7 「基本情報」の入力欄

Check!

基本情報のうち、「検出下限値（LOD）」はツール動作上、入力必須の項目であるため、必ず入力する。

(3) 「疫学データ（処理場流域定点当たり報告数）」の「各種設定」を設定・入力する

「入力」シートに青色で示された疫学データの入力欄に各情報を入力する。

まず、疫学データの入力にあたり、「各種設定」を設定する。

本ツールでは、新型コロナウイルス感染症が2023年5月8日に感染症法上5類に移行したことを踏まえ、疫学データとして「処理場流域定点当たり報告数」の入力を想定している。処理場流域定点当たり報告数とは、下水サーベイランスの対象となる処理場流域における新型コロナウイルス感染者数の届け出数の和を、当該地域の定点数の和で除した値を指す。

「各種設定」の「入力データの形式」において、入力データの対象地域の単位、および定点当たり報告数への換算の可否に応じて、下記の3種類から入力データの形式を選択できる。

表 3-1 疫学データの設定方法とその内容

入力データの形式	対象地域の単位	定点当たり報告数への換算	内容
都道府県単位の定点当たり報告数と定点数を入力する	都道府県	ユーザにて計算	対象とする都道府県における、定点当たり報告数とその定点数を入力する。
計算済みの処理場流域定点当たり報告数を入力する	処理場流域	ユーザにて計算	対象とする処理場流域における、定点当たり報告数とその定点数を入力する。なお、 <u>当該定点当たり報告数はユーザにて計算した値（処理場流域における報告数の和を定点数の和で除した値）を入力する。</u>
処理区に該当する保健所への報告数と定点数を入力する		ツールにて自動的に計算	対象とする処理場流域における、保健所等届け出先への報告数と定点数を入力することで、 <u>ツールにて定点当たり報告数を自動的に計算される。</u> なお、届け出先が複数ある場合は、入力データとして使用したい届け出先のみ○をつけて選択することが可能である。

(4) 「患者届け出報告週」および「疫学データ」を入力する

疫学データの報告週を入力する。また、前行程 (3) で設定した入力データの形式に応じて定点当たり報告数および定点総数を入力する。

(3) で設定した入力データの形式に応じて疫学データを入力する。

			都道府県単位の疫学情報		下水処理場の処理区に該当する疫学情報	
患者届け出報告週			定点当たり報告数	報告があった定点総数	計算済みの値	
					処理場流域定点当たり報告数	報告があった定点総数
第14週	2023/4/3	2023/4/9	2	40	0.91	22
第19週	2023/5/8	2023/5/14			3.10	10
第20週	2023/5/15	2023/5/21			3.50	10
第21週	2023/5/22	2023/5/28			4.00	10
第22週	2023/5/29	2023/6/4			5.70	10
第23週	2023/6/5	2023/6/11			6.00	10
第24週	2023/6/12	2023/6/18			7.00	10
第25週	2023/6/19	2023/6/25			5.00	10

図 3-8 「疫学データ」の入力のイメージ
(「計算済みの処理場流域定点当たり報告数を入力する」を選択した場合)

Check!

入力欄への記入の際、元となるデータからコピー&ペーストする場合は、「値貼り付け」でペーストすること（元のデータ型がツールと異なる場合、正常に読み取れない場合がある）。

貼り付け先で右クリックをすると、「貼り付けのオプション」が表示される。そのうち、下図赤枠の貼り付け方を選択することで、「値貼り付け」ができる。



報告数の届け出先の名称（保健所名等）を入力し、
入力データとして使用するデータに○をつける。

②疫学データ（処理場流域定点当たり報告数）							
処理区に該当する保健所への報告数と定点数を入力する							
の値」の場合は入力不要） →		A保健所	B保健所	C保健所			
		○	○				
下水処理場の処理区に該当する疫学データ							
①+②（自動算出）		①		②		③	
処理場流域定点 当たり報告数	報告があっ た定点総数	A保健所へ の届け出数	定点数	B保健所へ の届け出数	定点数	C保健所への 届け出数	定点数
記載例							
3.00	12	20	5	16	7	6	10
3.75	8	16	3	14	5		
4.13	8	21	3	12	5		
3.88	8	22	3	9	5		
4.13	8	18	3	15	5		
3.25	8	17	3	9	5		
2.88	8	15	3	8	5		
2.00	8	8	3	8	5		
3.63	8	21	3	8	5		

○をつけたデータに対し、定点当たり報告数
（報告数（届け出数）の和を定点数の和で除し
た値）が自動で計算される。

（3）で設定した入力データ
の形式に応じて疫学データを
入力する。

図 3-9 「疫学データ」の入力のイメージ
（「処理区に該当する保健所への報告数と定点数を入力する」を選択した場合）

（補足）

疫学データの入力欄の右部に「備考」欄を設けている。

ユーザにて特筆すべき事項（イベントの開催等）があった場合に、メモをする箇所として活用可能である。なお、「備考」欄に記載された内容はアウトプットには記載されない。

(5) 「下水データ」を入力する

「入力」シートに緑色で示された、下水サーベイランスにより得られたデータ（本ツールでは「下水データ」と呼称）に関する情報入力欄に、各項目の情報を入力する。

採水日と新型コロナウイルス RNA 量（GC/L）を入力する。

報告週	採水日	新型コロナウイルス RNA量 [GC/L]	測定結果（いずれか/いずれも記載）	
			PMMoV RNA量 (GC/L)	回収率試験*（%） *VLP、φ6など
記載例				
第14週	2023/4/3	14,300	2000000	20
	2023/5/8	7,000		
	2023/5/10	4,500		
	2023/5/12	6,600		
	2023/5/15	12,000		
	2023/5/17	7,000		
	2023/5/19	12,500		
	2023/5/22	3,000		
	2023/5/24	13,000		
	2023/5/26	10,000		

図 3-10 「下水データ」の入力のイメージ

Check!

不検出 (Not Detected; N.D.) のデータは、必ず「N.D.」と入力すること。
 本ツールでは「N.D.」の表記によって、不検出であることを判別している。このため、例えば「ND」や「N.D」などの表記は不検出であると判別できない。半角ピリオドを使用すること。

Check!

入力欄への記入の際、元となるデータからコピー&ペーストする場合は、「値貼り付け」でペーストすること（元のデータ型がツールと異なる場合、正常に読み取れない場合がある）。

(補足)

下水データの入力欄の右部に「備考」欄を設けている。
 ユーザにて特筆すべき事項（採水時の天候等）があった場合に、メモをする箇所として活用可能である。なお、「備考」欄に記載された内容はアウトプットには記載されない。

3.2.3 グラフの描画・出力

(1) ツールの「グラフ」シートを開く

(2) 「描画オプション」を設定する

グラフ描画にあたり、各種オプションを設定する。「グラフ」シートのオレンジ色で示されたオプション設定欄に各項目を設定する。

描画オプション			
LOD (検出下限値)	開始日	終了日	期間
GC/L	yyyy/mm/dd	yyyy/mm/dd	dd
1200	2023/5/8	2023/12/10	217
詳細設定			
LOD未満の値の表示方法	×マーカー表示	自治体名	処理場名
LODの半分の値で表示	N.D.を×で表示	○	○

図 3-11 グラフ描画のオプション設定欄

グラフ描画にあたって設定可能なオプションとその内容・設定方法は下記のとおりである。

表 3-2 グラフ描画オプションの説明と設定方法

オプション	内容	設定方法
LOD (検出下限値)	下水データの取得に使用プロトコルにおける検出下限値 (GC/L) を表示する。	基本的に設定不要 (「入力」シートの「基本情報」に入力された値を自動で参照)
開始日	グラフの描画期間の開始日を指定する。	年月日を YYYY/MM/DD 形式で入力する。
終了日	グラフの描画期間の終了日を指定する。	年月日を YYYY/MM/DD 形式で入力する。
期間	グラフ描画の期間 (日数) を表示する。	基本的に設定不要 (「開始日」と「終了日」より自動で計算)
LOD 未満の値の表示方法	「入力」シートで入力された下水データのうち LOD 未満の値に対し、入力されたままの値で表示するか、LOD の半分の値に置き換えるかを選択する。	表示方法をプルダウンから選択する。

オプション	内容	設定方法
×マーカー表示	LOD 未満の値、または不検出 (N.D.) のデータについて、グラフ上で「×」マークで表示するかを選択する。	表示方法をプルダウンから選択する。
自治体名	グラフのタイトルに「入力」シートで入力した自治体名を表示する。	表示させる場合、プルダウンから「○」を選択する。
処理場名	グラフのタイトルに「入力」シートで入力した処理場名を表示する。	表示させる場合、プルダウンから「○」を選択する。

Check!

グラフ描画にあたり、LOD 未満の値についてはそのままの値で表示するか、LOD の半値に置換して表示するかを選択することが可能であるが、実態のデータを描画するという観点で、特段の理由がない場合、「そのままの値での表示」を選択する。

(3) グラフ描画ボタンを押下する

「グラフ描画」ボタンを押下することで、グラフが表示される。すでに何らかのデータでグラフを描画しており、データに更新・修正があった場合も、「グラフ描画」ボタン (図 3-12) を押すことで最新のデータでグラフが更新・修正される。

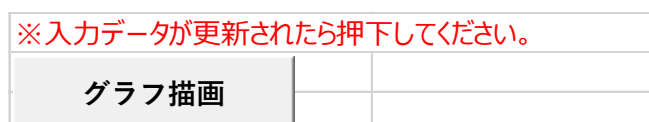


図 3-12 「グラフ描画」ボタン

新型コロナウイルス RNA 量は青色の折れ線、処理場流域定点あたり報告数はオレンジ色のプロットで表示される。

イメージとして、LOD 未満の値を「×」マークで表示した場合のグラフを図 3-13 に示す。

なお、グラフは初期設定では2種類表示されるが、1段目が「閲覧用グラフ」(ロックされており、編集できない)、2段目が「編集用グラフ」(通常の Excel のグラフのように編集が可能)である。「閲覧用グラフ」においては、ウイルス RNA 量は 200,000[GC/L]、処理場流域定点あたり報告数は 50[人/週]を上限として固定している。

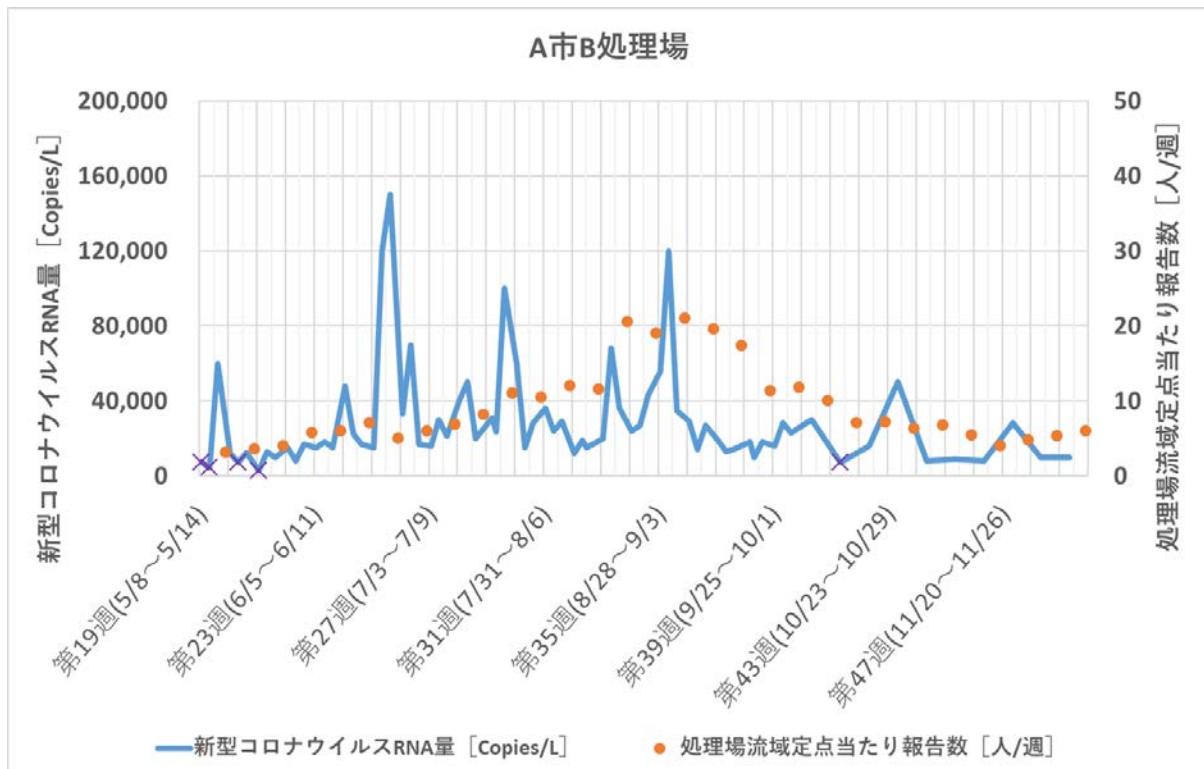


図 3-13 グラフのアウトプットイメージ（検出下限値未満のデータを「×」マークで表示した場合）

(補足)

「グラフ」シート画面左側に入力データが数表として表示されるが、グラフ描画用の計算領域のため、ユーザでの特段の操作・編集は不要である。

(4) (必要に応じて) グラフコピー等オプションボタンを使用する

作成したグラフに対し、グラフのコピー等の操作が可能なオプションボタンが設置されている。
 必要に応じて適用したいグラフを選択し、オプションボタンを押下すると操作が実行される。
 なお、グラフを選択せずにボタンを押下した場合は、「閲覧用グラフ」に対し適用される。

※適用したいグラフをクリックしてから押下してください。			
※グラフを選択しない状態でボタンを押下すると、「閲覧用グラフ」に適用されます。			
グラフをコピー		実数軸/対数軸切り替え	PNG出力
			SVG出力

図 3-14 グラフのオプションボタン

表 3-3 オプションボタンの種類と機能

オプションボタン	機能
グラフをコピー	選択したグラフを複製する。
実数軸/対数軸切り替え	ウイルス RNA 量の軸について、実数軸と対数軸が切り替わる。
PNG 出力	選択したグラフを PNG ファイル(画像ファイル) として出力する。
SVG 出力	選択したグラフを SVG ファイル(画像ファイル) として出力する ¹ 。

¹ SVG (Scalable Vector Graphics) はベクタ形式と呼ばれる画像フォーマットの一種であり、拡大しても画像が粗くならない点がメリットである。一方、一部の未対応ブラウザでは表示できない場合がある。

(補足)

グラフの画像出力の際、使用している PC のディスプレイ設定により、画像ファイルの縮尺が異なる場合がある。本ツールの開発環境 (Windows® 10) では「Windows の設定」>「システム」>「ディスプレイ」より、「拡大縮小とレイアウト」部分を「100%」としている。本ツールの使用時にも同様の設定にすることが望ましい。



3.2.4 変化率の算出・出力

(1) ツールの「変化率」シートを開く

(2) 「値の設定」オプションを設定する

「値の設定」にて、変化率算出にあたり、LOD 未満の値をそのまま用いるか、LOD の半分の値に置き換えたものを使用するか選択する。

値の設定
LOD未満の値の表示方法
LODの半分の値で表示

図 3-15 変化率算出における値の設定欄

入力データに応じて変化率が算出され、図 3-16 に示す凡例のとおり色分けされる。

採水日	新型コロナウイルス RNA量[GC/L]	検出濃度 (対数変換)	回帰直線の傾き	変化率			
date	GC/L	LOG10 GC/L	-	%		■変化率（％）の色分けの凡例	
2023/5/8	4,000	3.602059991				~-10.0%	
2023/5/10	4,000	3.602059991				-9.9%~0%	
2023/5/12	60,000	4.77815125	0.294022815	96.8%		0.1%~9.9%	
2023/5/15	12,000	4.079181246	0.06949681	17.4%		10.0%~	
2023/5/17	4,000	3.602059991	-0.235042337	-41.8%			

図 3-16 変化率のアウトプットイメージ

(補足)

変化率算出は「アメリカ疾病予防管理センター (Centers for Disease Control and Prevention; CDC)」による手法²に基づいている。

CDC の方法では、3 点の常用対数変換したウイルス RNA 量から求まる回帰係数 (slope) を用いて、以下の式により変化率を算出している。

$$\text{変化率} = (10^{\text{slope}} - 1) \times 100 [\%]$$

ただし、式中の *slope* は当日を含む過去 3 点のデータにおける回帰係数を表す。

変化率の考え方について、下図にイメージを示す (イメージでは週 1 回採水を仮定している)。横軸に採水日、縦軸にウイルス RNA 量をとると、日ごとのウイルス RNA 量が下図のようにプロットされる。変化率は、(当日を含む) 過去 3 点のデータで回帰係数 (傾き) を求めることで、各時点における増減のトレンドを算出していることになる。例えば、図中の①の時点では傾きが正のためウイルス RNA 量が増加傾向であることがわかり、逆に③の時点では傾きが負のためウイルス RNA 量が減少傾向であることがわかる。また、①、②はいずれも増加傾向であるが、②に比べて①は増加の程度が緩やかであることがわかる。

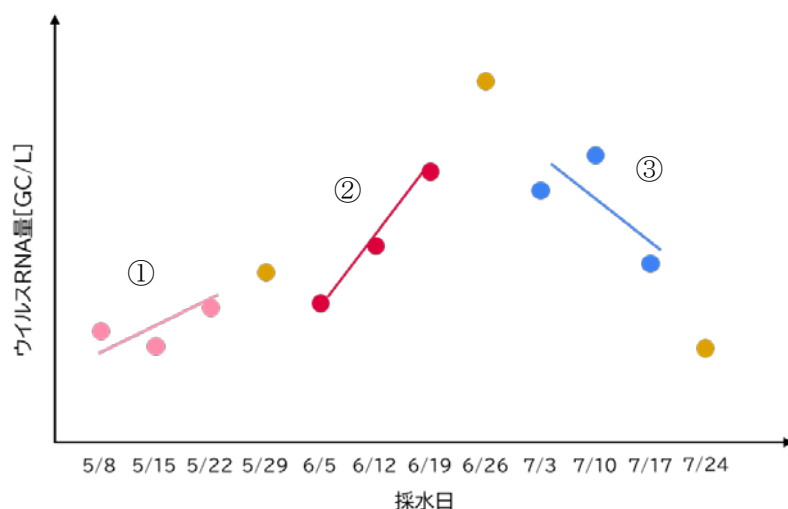


図 変化率の考え方のイメージ

この方法では少なくとも 3 点のデータが必要であることから、例えば週 1 回採水のデータであれば、当日を含む過去 15 日間のデータが必要となる。すなわち、この場合は 15 日間 (2 週間) のインターバルでの変化率を表していることとなる。

本ツールでは、変化率算出に用いるデータを 3 点で固定しているため、採水頻度により変化率算出のインターバルが変化する点に注意が必要である。例えば週 1 回採水の場合は上述のとおり 15 日間 (2 週間) での変化率となるが、週 2 回採水の場合は 8 日間 (1 週間) での変化率となる。月 2 回の採水の場合でも変化率は算出されるが、インターバルが 29 日間 (4 週間) となることに

² Centers for Disease Control and Prevention; Wastewater Surveillance Data Reporting and Analytics (<https://www.cdc.gov/nwss/reporting.html>) (2024 年 1 月 30 日閲覧)

留意する。

Check!

上記のとおり、変化率算出にあたり、LOD 未満の値についてはそのままの値で表示するか、LOD の半値に置換して表示するかを選択することが可能であるが、CDC では LOD 未満の値は LOD の半分の値に置き換えて計算していることから、特段の理由がない場合、「LOD の半分の値で表示」を選択する。

(3) (必要に応じて)「変化率」シートを Excel ファイルとして出力する

「変化率」シート内の「Excel 出力」ボタンを押下すると、使用中のツールが保存されているフォルダ内に、Excel ファイルとして変化率表が出力される。

出力時のファイル名は「変化率_ (出力日) _ (出力時刻) .xlsx」であるが、出力後のファイル名は任意に変更しても問題ない。



図 3-17 Excel 出力ボタン (変化率)

3.2.5 DL ファイルの出力

(1) ツールの「DL ファイル」シートを開く

(2) 「値の設定」オプションを設定する

「値の設定」にて、DL ファイル表示にあたり、LOD 未満の値をそのまま用いるか、LOD の半分の値に置き換えたものを使用するか選択する。

値の設定
LOD未満の値の表示方法
そのままの値で表示

図 3-18 DL ファイル作成における値の設定欄

Check!

上記のとおり、DL ファイル作成にあたり、LOD 未満の値についてはそのままの値で表示するか、LOD の半値に置換して表示するかを選択することが可能であるが、グラフ作成に用いたバツ

クデータを表示するという観点で、特段の理由がない場合、「そのままの値での表示」を選択する。

(3) 「データ更新」ボタンを押下する

「データ更新」ボタンを押下することで、「入力」シートのデータが転記される。

※入力データが更新されたら押下してください。		
データ更新		

図 3-19 「データ更新」ボタン (DL ファイル)

図 3-20 に示すとおり、DL ファイルが作成される。

上部のデータに関する説明欄は自由記述が可能なため、必要に応じて追記・修正する。

A市 (○か所の処理場での検査結果)						
検出方法：○○法 (LOD：○○GC/L)						
定点当たり報告数：○月○日時点でデータを取得。直近○ヶ月分のデータを確認。						
	報告週			処理場流域 定点当たり 報告数	採水日	新型コロナウイルスRNA量 [GC/L]
	第19週	2023/5/8	2023/5/14	3.10	2023/5/8	7,000
	第20週	2023/5/15	2023/5/21	3.50	2023/5/10	4,500
	第21週	2023/5/22	2023/5/28	4.00	2023/5/12	60,000
	第22週	2023/5/29	2023/6/4	5.70	2023/5/15	12,000
	第23週	2023/6/5	2023/6/11	6.00	2023/5/17	7,000
	第24週	2023/6/12	2023/6/18	7.00	2023/5/19	12,500
	第25週	2023/6/19	2023/6/25	5.00	2023/5/22	3,000

図 3-20 DL ファイルのアウトプットイメージ

(4) (必要に応じて) 「DL ファイル」シートを Excel ファイルとして出力する

「DL ファイル」シート内の「Excel 出力」ボタンを押下すると、本ツールが保存されている場所と同じフォルダに、Excel ファイルとして DL ファイルが出力される。

出力時のファイル名は「DL ファイル_ (出力日) _ (出力時刻) .xlsx」であるが、出力後のファイル名は任意に変更しても問題ない。

3.2.6 データを更新・修正する場合

ツールへの入力データに更新・修正がある場合は、「入力」シートのデータを更新・修正する。

「入力」シートのデータを更新・修正後の各アウトプットへのデータ更新・修正の反映方法は下記のとおりである。

表 3-4 入力データの更新・修正の各アウトプットへの反映方法

シート名	データ更新・修正の反映方法
グラフ	「グラフ描画」ボタンを押下する。
変化率	(自動的に更新されるため、特段操作の必要はない)
DL ファイル	「データ更新」ボタンを押下する。

3.3 エラー発生時の対応方法

本ツールは上記の「感染動向解析ツールの操作手順」に従ってデータを入力することで自動的に各アウトプットが得られる設計であるが、予期しない入力や実行時の障害によってエラーメッセージが表示される可能性がある。エラーメッセージが表示された場合は「終了」ボタンを押下し、再度入力データに不備がないかを確認する。

入力データに不備がないにもかかわらずエラーメッセージが繰り返し表示される場合は、一度ツールを保存せずに閉じ、再度起動する。

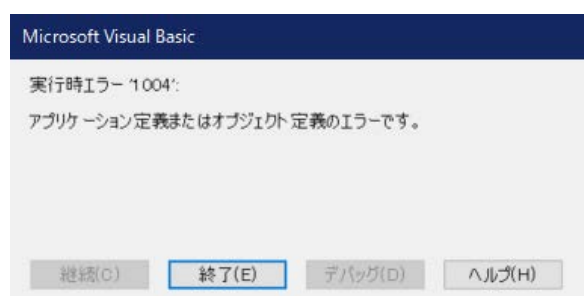


図 3-21 エラーメッセージの例

3. 異なる手法による下水サーベイランス調査結果のデータ解析

3.1 目的

現在、下水中の新型コロナウイルスの検出にあたっては、処理区特性に合わせて様々な手法が用いられており、検出結果の直接的な比較が難しい。原理の異なる手法であった場合でもトレンド把握の頑健性を検証することを目的とし、同一サンプルに対して厚生労働科学研究による新型コロナウイルスの検出手法と、それ以外の複数の検出手法を用いて調査を実施し、その結果を比較した。なお本分析はエム・アール・アイ リサーチアソシエイツ株式会社に解析を委託した。

3.2 分析の考え方と実施方法

3.2.1 分析に用いたデータ

本分析では、2つの対象地域（A 自治体、B 自治体）の下水データ（下水サーベイランスにより得られたウイルス RNA 量）、および疫学データ（定点当たり報告数）を用いて検証を行った。それぞれ比較した検査手法については以下に示すとおりである。

なお、いずれも 2023 年 10 月 2 日（2023 年第 40 週）～2024 年 2 月 25 日（2024 年第 8 週）の期間のデータを用いた（ただし、後述の増減トレンドの一致率の算定にあたっては前週との比較が必要なため、一部 2023 年 9 月のデータを用いた）。

表 3-1 分析に用いた下水データ

		A 自治体	B 自治体	
下水データ	厚生労働省科学研究による検出手法 (単位: GC/L)	沈殿物抽出法 (CDC_N1・N2) (データ数: 38)	沈殿物抽出法 (CDC_N1・N2) (データ数: 42)	
	自治体独自の検査手法 (単位: GC/L)	EPISENS-S™法 (CDC_N1) (データ数: 38)	PEG 沈殿法 (CDC_N1) (データ数: 42)	PEG 沈殿法 (CDC_N2) (データ数: 42)
疫学データ	定点当たり報告数 (単位: 人/週)	各自治体の発表値 (データ数: 20)	各自治体の発表値 (データ数: 20)	

※表中の手法の下括弧内は増幅対象領域を表す。

※データ数は本分析対象に用いたデータ数（上記の分析対象期間におけるデータ数）。

資料 3

分析に用いたデータのグラフを対象地域ごとに示す。疫学データはオレンジ色のプロット、下水データは折れ線グラフで表した。
なお、ウイルス RNA 量について実数軸と対数軸をとったグラフをそれぞれ作成した。

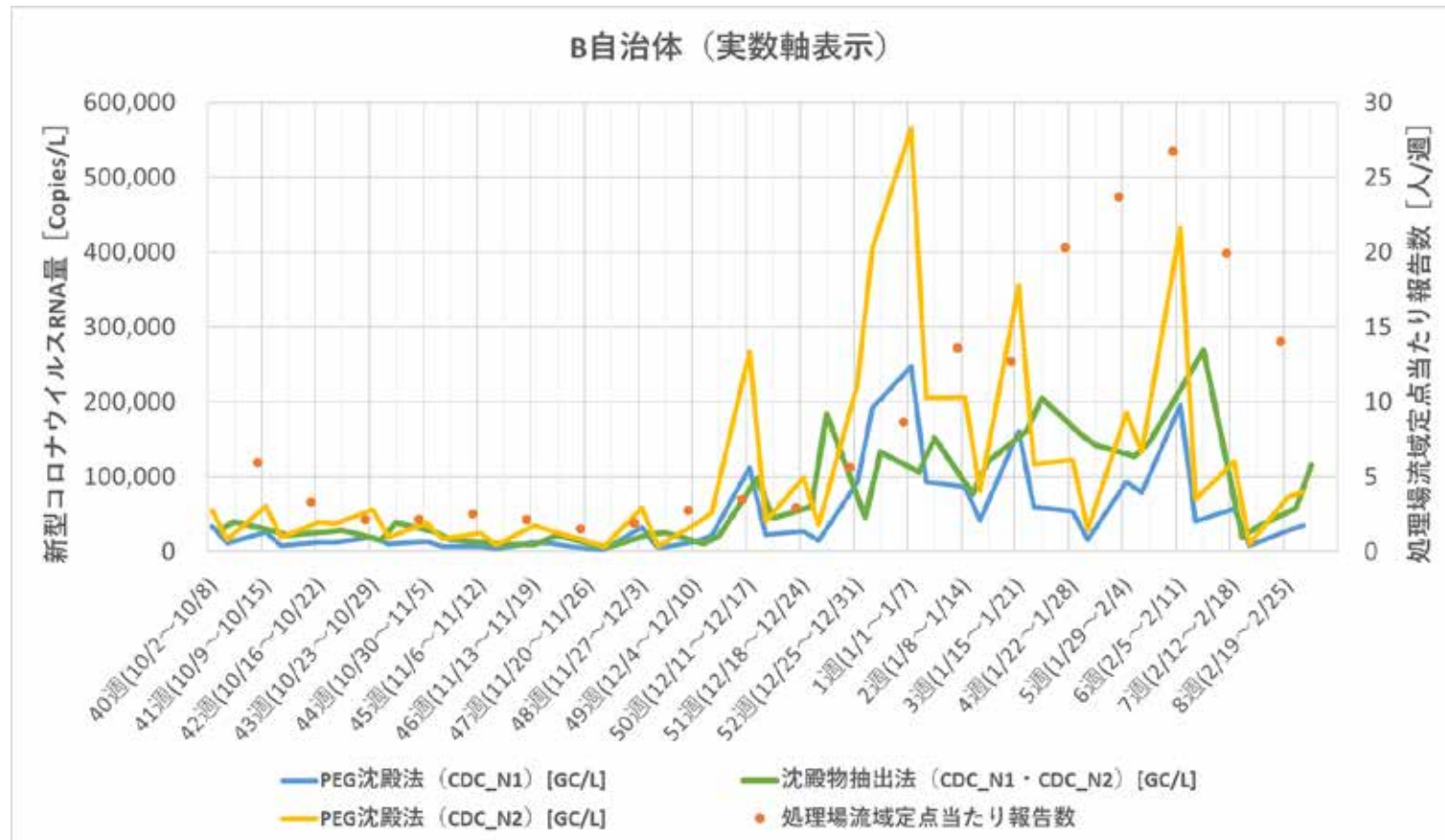


図 3-1 B 自治体のデータ（実数軸表示）（2023/10/2～2024/2/25 の期間で描画）

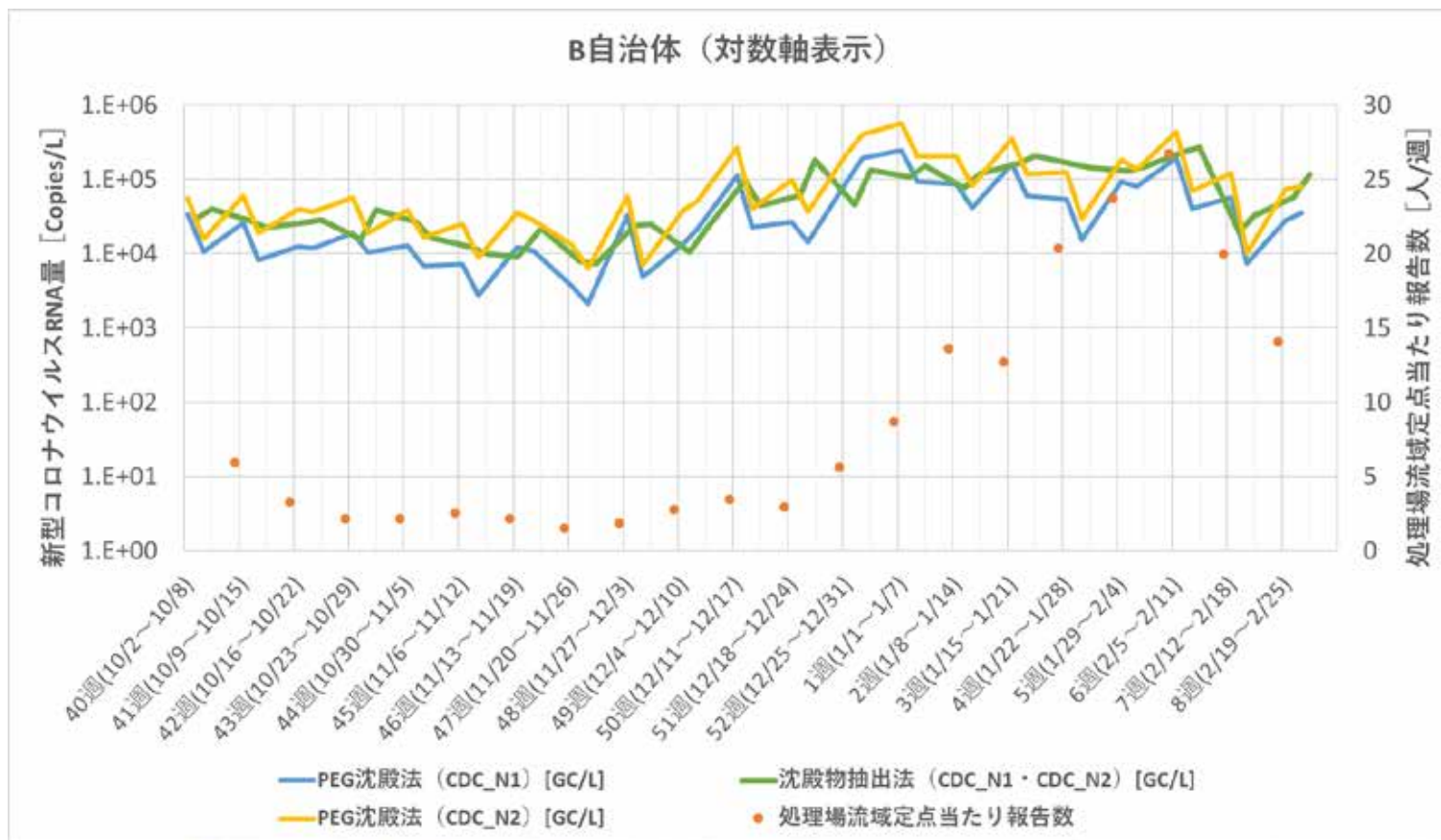


図 3-2 B 自治体のデータ（対数軸表示）（2023/10/2～2024/2/25 の期間で描画）

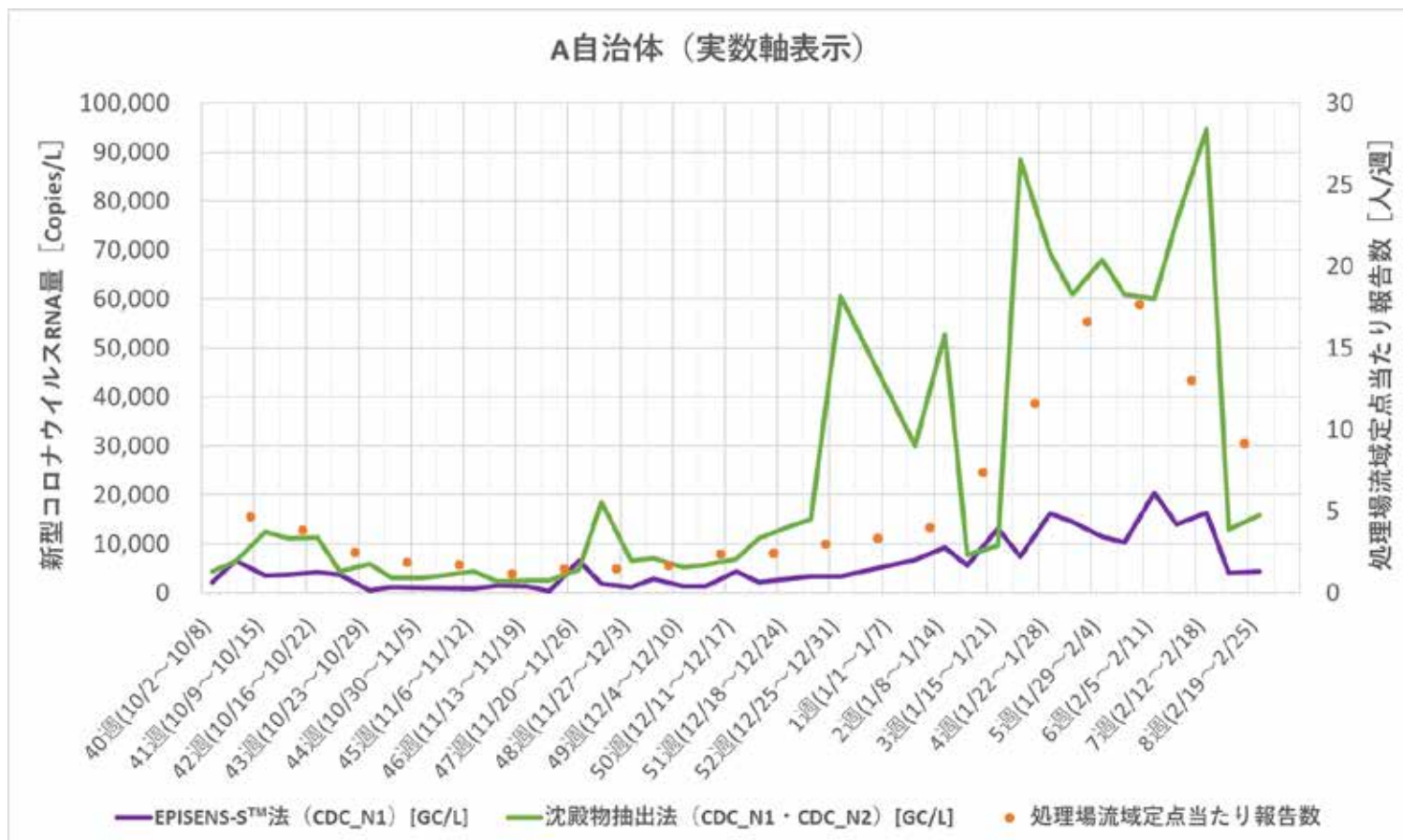


図 3-3 A 自治体のデータ（実数軸表示）（2023/10/2～2024/2/25 の期間で描画）

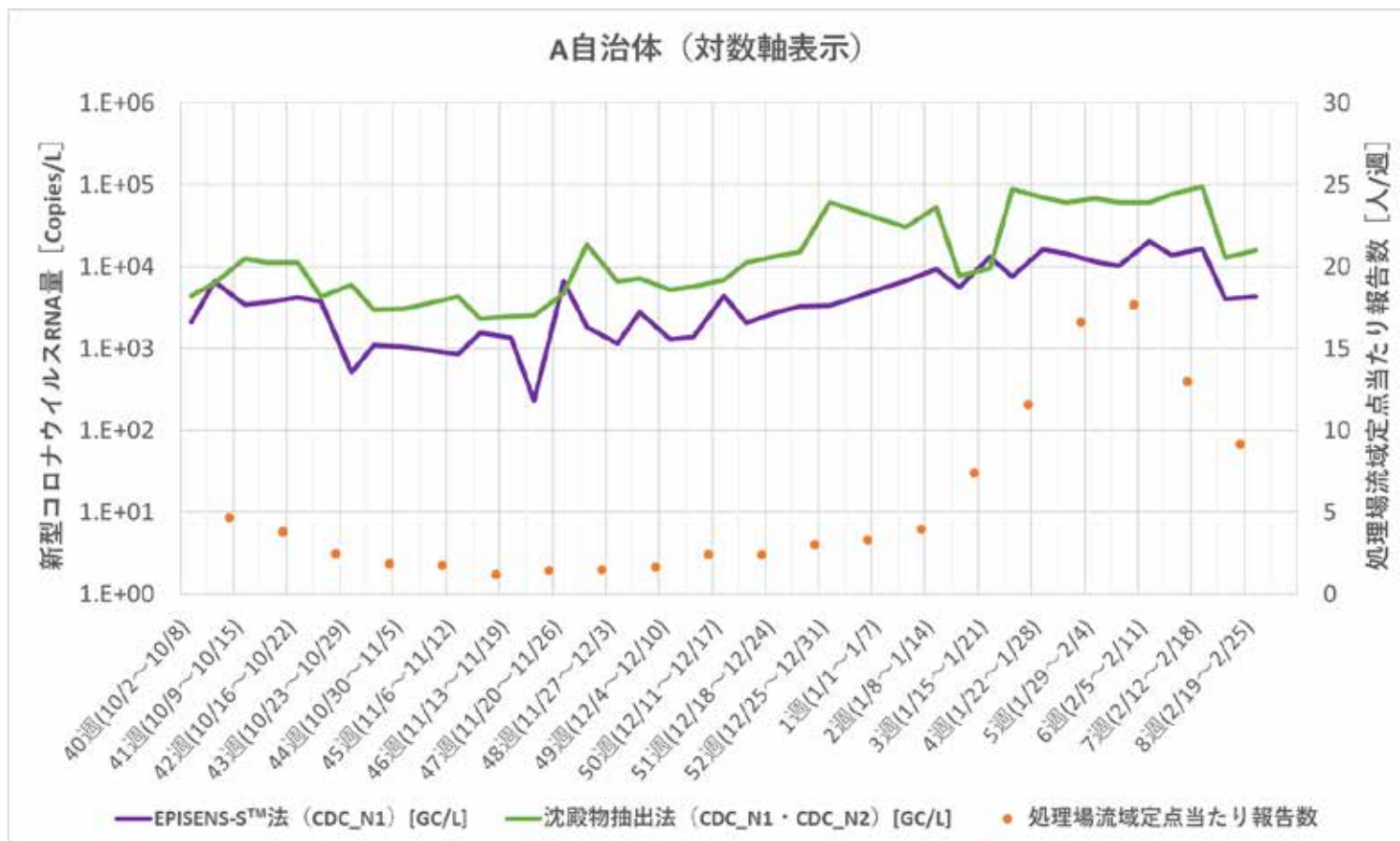


図 3-4 A 自治体のデータ（対数軸表示）（2023/10/2～2024/2/25 の期間で描画）

3.2.2 分析の観点と指標の設定

原理の異なる手法におけるトレンド把握の頑健性を検証することを目的として、下記のとおり分析の観点、およびその観点を評価するための指標を設定した。

表 3-2 分析の観点と指標

分析の観点	指標
下水データと疫学データの増減トレンドの一致率の比較	1 週間または 2 週間での下水データおよび疫学データの平均値の、前週からの増減一致率
下水データと疫学データの相関性の比較	1 週間または 2 週間での下水データと疫学データにおける Spearman の順位相関係数
下水データの分散の比較	下水データの箱ひげ図

(1) 下水データと疫学データの増減トレンドの一致率

下水データおよび疫学データに対し、それぞれ 1 週間または 2 週間での平均値を算出し、前週との増減一致率を算出した。定点当たり報告数は週次の値であることや、新型コロナウイルス感染症の陽性判明と当該罹患者からの下水中へのウイルス排出にはタイムラグが存在することから、本検証ではそれぞれのデータを 1 週間または 2 週間の範囲で平均を取った値を用いることとした。

資料 3

増減トレンドの一致率の具体的な計算方法（1 週間平均値の場合）を図 3-5 を用いて説明する。

- ① 疫学データ、下水データの 1 週間平均値を算出する。
- ② ①の値が、前週の値に比して増加または減少しているかを判定する（図中では増加は「+」、減少は「-」の記号で示している）。
- ③ すべてのデータ数に対する、増減の記号の組合せが一致しているデータ数を計算し、増減一致率とする。図の例では、すべてのデータ数が 5 件あるうち、増減の組合せが一致しているものが 3 件あるため、 $3 \text{ 件} \div 5 \text{ 件} = 60.0 \text{ (\%)}$ と算出される。

①

②

開始日	終了日	報告週	疫学データ [人] (1週間平均値)	下水データ [GC/L] (1週間平均値)	疫学データ 前週からの増減 増加：＋ 減少：－	下水データ 前週からの増減 増加：＋ 減少：－	増減一致
2023/9/25	2023/10/1	2023年39週	11	15000			
2023/10/2	2023/10/8	2023年40週	5.8	22000	-	+	×
2023/10/9	2023/10/15	2023年41週	3.3	17000	-	-	○
2023/10/16	2023/10/22	2023年42週	2.1	13000	-	-	○
2023/10/23	2023/10/29	2023年43週	2.3	15000	+	+	○
2023/10/30	2023/11/5	2023年44週	3.5	11000	+	-	×
						増減一致率	60.0%

図 3-5 増減トレンドの一致率の算出方法のイメージ（1 週間平均値の場合）

(2) 下水データと疫学データの相関性

(1)と同様に、下水データおよび疫学データの 1 週間または 2 週間での平均値について、Spearman の順位相関係数を算出した。なお、相関係数を算出するにあたり、必ずしも下水データと疫学データは同じ分布と仮定できないことから、本分析ではノンパラメトリック（データに正規分布を仮定しない）な手法として Spearman の順位相関係数を採用した。また、Spearman の順位相関係数は各変数の値を順位に変換して相関性を求めるため、外れ値による影響を受けにくいことも利点の一つである。

(3) 下水データの分散

本分析では各検出方法における下水データの分散を視覚的に把握するため、箱ひげ図を作成した。

3.3 分析結果

下水データと疫学データの増減トレンドの一致率

下水データと疫学データの増減トレンドの一致率の比較は表 3-3 に示すとおりである。

1 週間平均値では、いずれの自治体・手法でも概ね 50%程度であることがわかった。最小値は B 自治体の沈殿物抽出法による 47.4%、最大値は A 自治体の沈殿物抽出法による 57.9%であった。

2 週間平均値では、最小値は B 自治体の PEG 沈殿法 (CDC_N2) による 40.0%、最大値は B 自治体の沈殿物抽出法による 88.9%となり、1 週間平均値の結果と比べるとばらつきが大きい結果となった。ただし、2 週間平均値としたことでデータ数が少なくなり (10 回程度)、比率が変化しやすくなっていることに留意が必要である。

下水データと疫学データの相関性

下水データと疫学データの相関性の比較は表 3-3 に示すとおりである。

1 週間平均値では、いずれの自治体・手法でも概ね 0.8 前後であるが、B 自治体の沈殿物抽出法が 0.88、A 自治体の EPISENS-STM法が 0.89 と高い値を示した。

2 週間平均値では、最小値は B 自治体の PEG 沈殿法 (CDC_N2) による 0.78、最大値は B 自治体の沈殿物抽出法による 0.94、および A 自治体の EPISENS-STM法による 0.94 となり、増減トレンドの一致率同様、1 週間平均値と比べるとややばらつきが大きい結果となった。ただし、こちらも 2 週間平均値としたことでデータ数が少なくなり (10 回程度)、比率が変化しやすくなっていることに留意が必要である。

表 3-3 下水データと疫学データの相関性の比較および増減トレンドの一致率の比較

対象自治体	検査手法		増幅対象領域	1週間平均				
				増減一致率	増減一致率算出に 用いたデータ数	Spearmanの 順位相関係数	p値	相関係数算出に 用いたデータ数
B自治体	厚生労働省科学研究に よる検出手法	沈殿物抽出法	CDC_N1+N2	47.4%	19	0.88	0.00	20
		PEG沈殿法	CDC_N1	50.0%	20	0.83	0.00	20
	自治体独自の検査手法	PEG沈殿法	CDC_N2	55.0%	20	0.79	0.00	20
A自治体	厚生労働省科学研究に よる検出手法	沈殿物抽出法	CDC_N1+N2	57.9%	19	0.83	0.00	20
	自治体独自の検査手法	EPISENS-S™法	CDC_N1	52.6%	19	0.89	0.00	20

対象自治体	検査手法		増幅対象領域	2週間平均				
				増減一致率	増減一致率算出に 用いたデータ数	Spearmanの 順位相関係数	p値	相関係数算出に 用いたデータ数
B自治体	厚生労働省科学研究に よる検出手法	沈殿物抽出法	CDC_N1+N2	88.9%	9	0.94	0.00	10
		PEG沈殿法	CDC_N1	50.0%	10	0.85	0.00	10
	自治体独自の検査手法	PEG沈殿法	CDC_N2	40.0%	10	0.78	0.01	10
A自治体	厚生労働省科学研究に よる検出手法	沈殿物抽出法	CDC_N1+N2	77.8%	9	0.88	0.00	10
	自治体独自の検査手法	EPISENS-S™法	CDC_N1	77.8%	9	0.94	0.00	10

※2023/10/2～2024/2/25 の期間におけるデータで分析。

※データ数が一つ少ない項目は、2023 年 9 月のデータが存在せず、増減率が一回分算出できなかった項目である。

下水データの分散の比較

検査手法ごとの下水データの箱ひげ図は図 3-7、図 3-8 に示すとおりである。箱ひげ図の読み取り方は図 3-6 に示した。

箱中の×は平均値を表し、○は外れ値（四分位範囲の 1.5 倍を超えた値）を示す。また、1 段目は実数値で描画した箱ひげ図、2 段目は常用対数を取った値で描画した箱ひげ図である。

なお、前述の増減トレンドの一致率、および相関係数の算出においては疫学データと下水データのデータ数が揃っている必要があるため、疫学データ数（20 回）に合わせていたが、箱ひげ図は下水データのみで描画可能なため、B 自治体では PEG 沈殿法 42 回、沈殿物抽出法 42 回、A 自治体では EPISENS-S™法 38 回、沈殿物抽出法 38 回のデータを使用した。

B 自治体では、PEG 沈殿法（CDC_N1）に比べ、PEG 沈殿法（CDC_N2）および沈殿物抽出法の検出量が平均的に大きいことがわかった。また、PEG 沈殿法（CDC_N2）と沈殿物抽出法は同程度の検出量であるが、PEG 沈殿法（CDC_N2）はばらつきが大きく（図 3-1、図 3-2 参照）、上方の外れ値によりやや平均値が押し上げられる傾向となっている。

A 自治体では、EPISENS-S™法に比べ、沈殿物抽出法の検出量が多いことがわかった。特に沈殿物抽出法は 52 週以降（2023/12/25～）の増加が顕著であった（図 3-3、図 3-4 参照）。

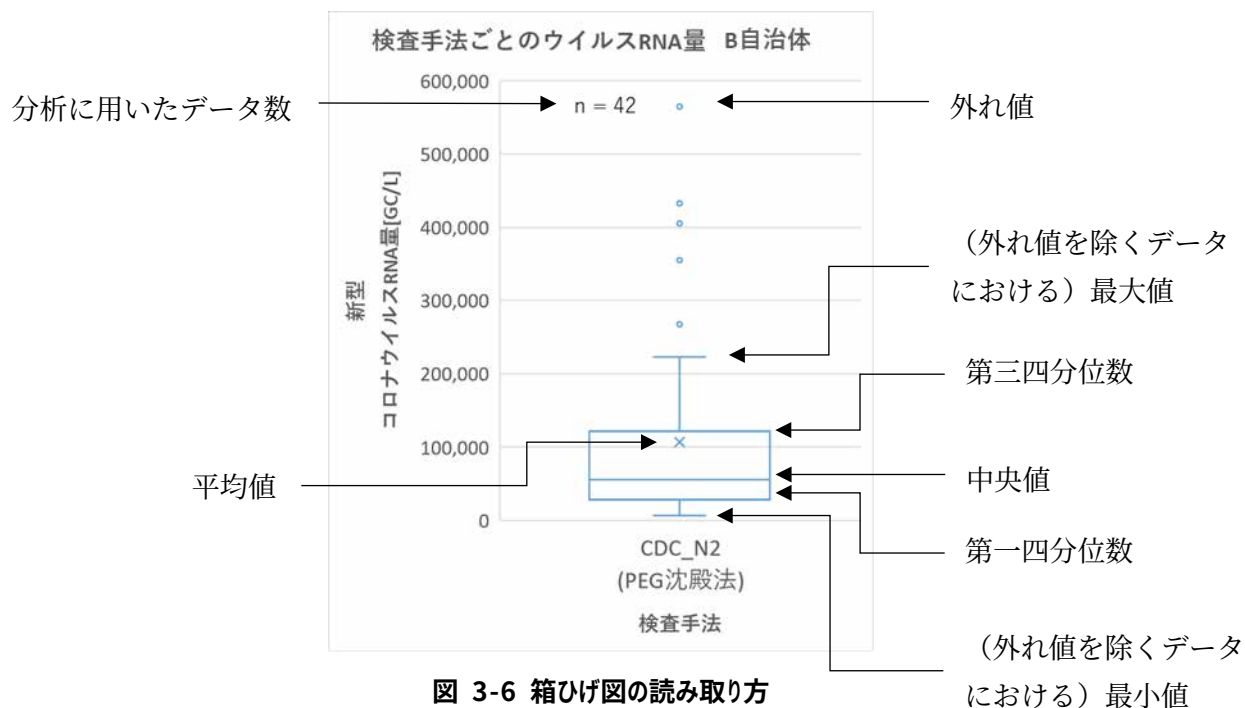


図 3-6 箱ひげ図の読み取り方

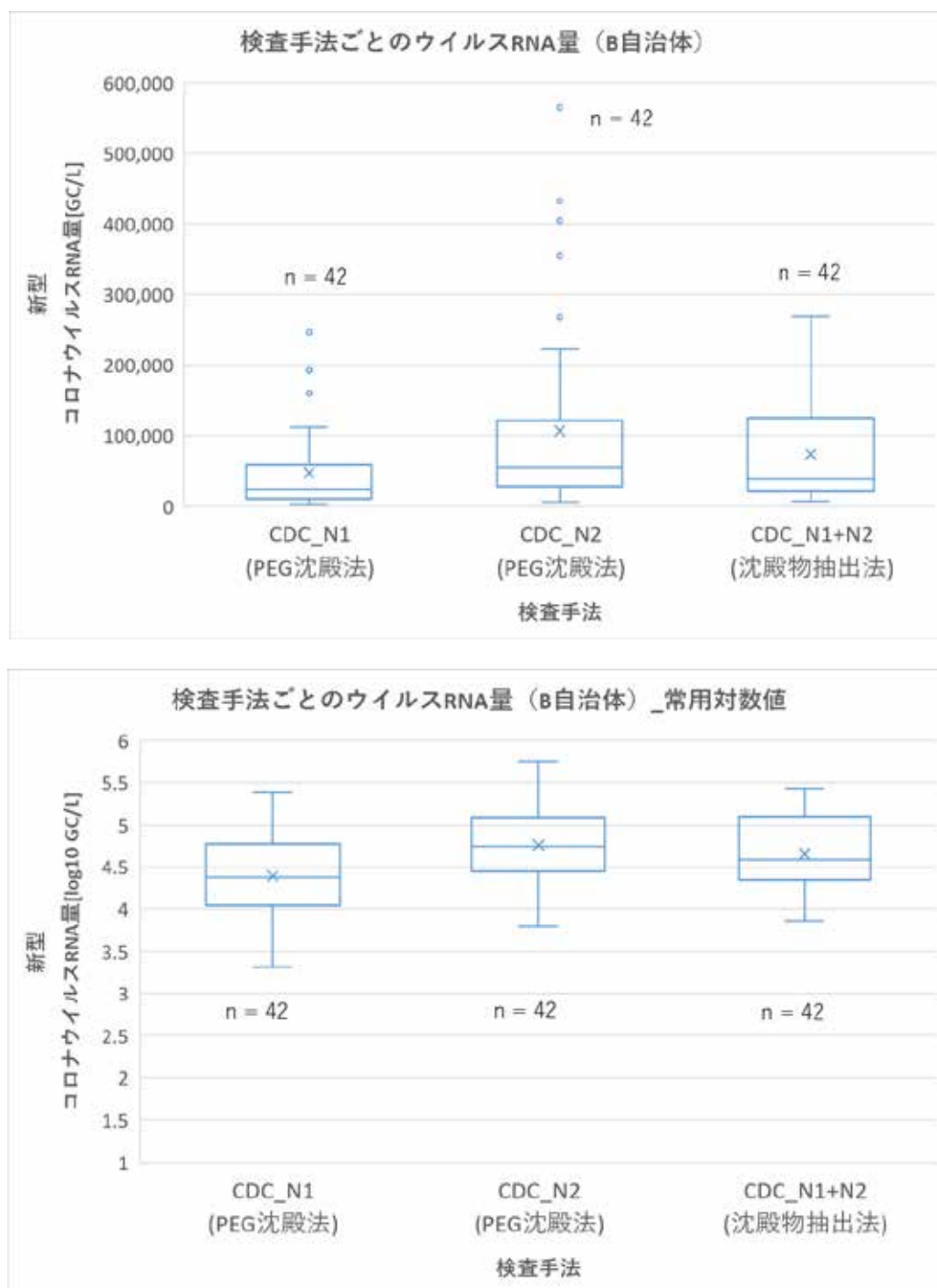


図 3-7 B 自治体の下水データの箱ひげ図

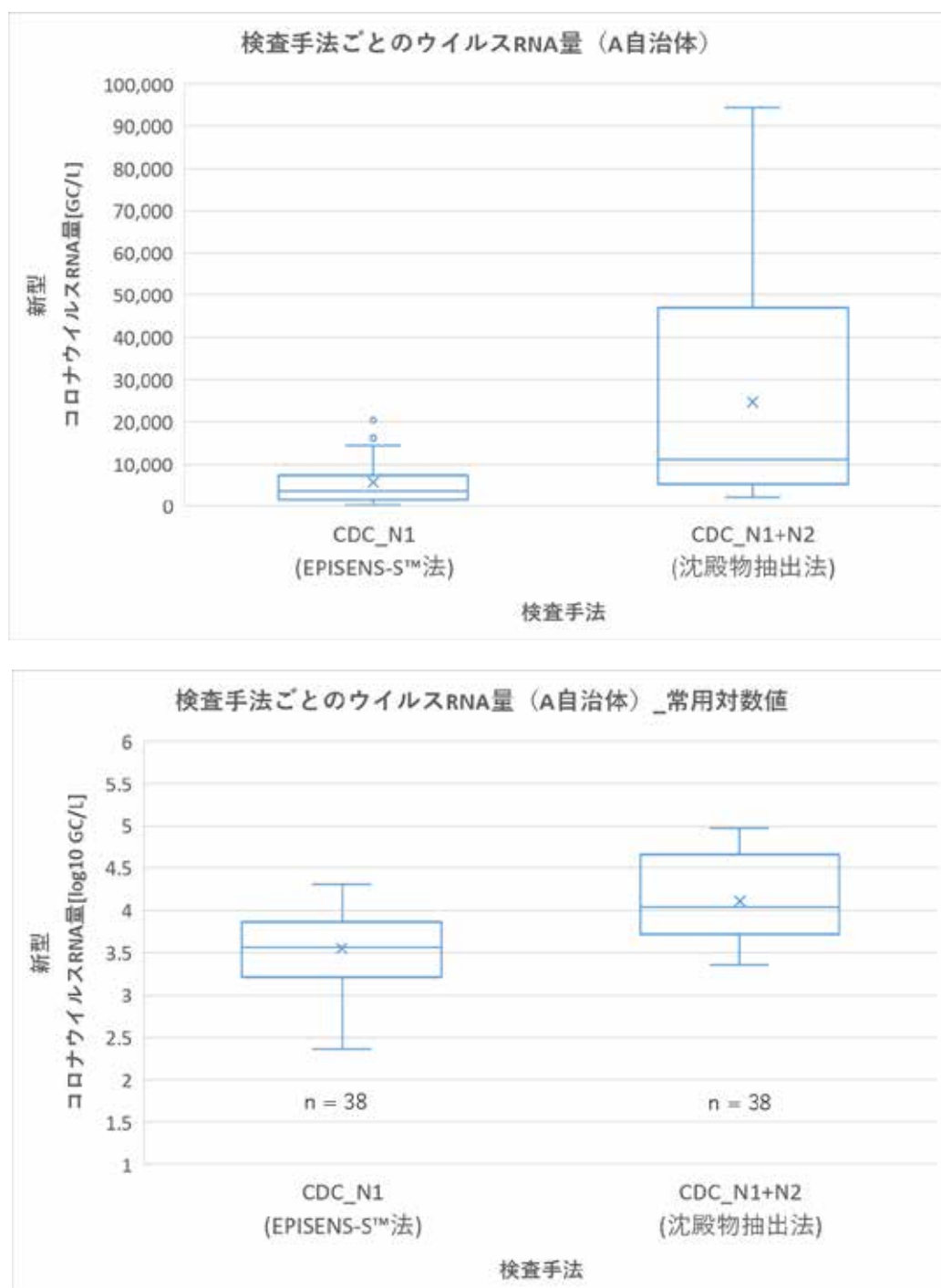


図 3-8 A 自治体の下水データの箱ひげ図

3.4 分析のまとめ

本分析結果により、検査手法、増幅対象領域によって検出結果には一定のばらつきが見られることがわかった。手法が異なっても感染動向の把握には活用可能である一方、絶対定量ではなく、地域ごとの水平比較は定性的な評価（増減のみ）が適当と考えられる。

下水サーベイランスによる新型コロナウイルス感染症の感染動向の把握のうえでは、各検査手法の選定にあたって、検出率やコスト、検出までに要する時間等を総合的に判断する必要がある。また流行している変異株のゲノム情報と対比させつつ、総合的に検討をした上で用いる手法を選択する必要がある。

このように検査手法が異なる調査でも、感染動向のトレンド把握には一定の頑強性が確認できたが、結果の信頼性を担保するためには検査機関毎にインハウスの精度管理が必要であると考えられる。

厚生労働行政推進調査事業費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「環境水に含まれる新型コロナウイルス等病原体ゲノム情報の活用に関する研究」
研究協力報告書

阻害物質によるリアルタイムPCR定量値への影響の評価方法の検討

研究協力研究者：小澤広規 横浜市衛生研究所

研究要旨 下水中にはRT-PCRを阻害しうる物質の存在が考えられる。商用の濃度既知のVirus Like Particle (VLP)及びRNAを用いて、抽出RNAの回収率及びRT-PCR効率を確認し、下水中の病原体ゲノム定量値への影響を評価する方法の検討を目的とした。下水沈殿物を用いた病原体ゲノム定量値はRNA抽出効率、阻害物質等の影響を受ける。本研究で用いた方法で下水沈殿物由来RNAのRT-PCR効率及びRNA抽出効率を推定、評価し、病原体ゲノム定量値の精度管理が行える可能性を示した。

A. 研究目的

先行研究(令和3年度厚生労働科学研究「環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制の構築に関する研究」⁽⁴⁾)では下水中の新型コロナウイルス調査を継続的に行うために、民間検査機関へ委託した。一方で下水中にはPCRを阻害しうる様々な物質の存在が考えられた。そこで濃度既知のVirus Like Particle (VLP)及び濃度既知の商用RNAを用いて、抽出RNAの回収率及びPCR効率を確認し、下水中の病原体ゲノム定量値への影響を評価する方法の検討を目的とした。

B. 研究方法

1. 調査試料

2 か所の水再生センターの採水協力を得て、流入下水の4試料を用いて調査を実施した。

2. 回収率及びPCR効率の評価

計250mLの流入下水を遠心分離し、上清と沈殿物に分けて回収した。沈殿物からRNeasy PowerSoil Total RNA Kitを用いて、計100μLのRNA溶液を得た。

RNA抽出キットを用いた下水中のRNA回収率及びPCR阻害の影響を確認するため、VLP-RNA Extraction Control(Veritas)を下水沈殿物に加え、さらに抽出RNA溶液にSpike-In Control RNA(Takara bio)を添加した。

VLP及びSpike-In Control RNAの定量はRT-qPCRを行い定量し、評価した。

C. 研究結果

1. RNA回収率の評価

RNeasy PowerSoil Total RNA Kitを用いた下水沈殿物のRNA抽出では概ね6-15%の回収率であった。下水試料間で約2-3倍の差が存在した。

2. RT-PCR 効率の評価

Spike-In Control RNAを用いたPCR効率は11-40%であった。下水試料間で約4倍の差が存在した。

3. 総 VLP 回収率の評価

総 VLP 回収率 = VLP 回収率 / PCR 効率として算出した。総 VLP 回収率は19-57%であった。下水試料間で約3倍の差が存在した。

表 RNA 回収率及び RT-PCR 効率の推定

	VLP 回収率	RT-PCR 効率	総 VLP 回収率
試料 1	8%	40%	21%
試料 2	6%	11%	54%
試料 3	15%	27%	57%
試料 4	7%	36%	19%

D. 考察

下水沈殿物からのRT-qPCRによるVLP回収率は15%以下であった。この回収率は抽出RNAに含まれる阻害物質等の影響を受けると考えられる。阻害物質の影響を評価するために新たに加えたSpike-In Control RNAを用いてRT-PCR効率を求めた。さらに阻害物質の影響を補正した総VLP回収率を算出し、RNA抽出効率を推定した。

試料ごとに3つの指標にばらつきがあった。試料2と試料4はVLP回収率が同程度であったがRT-PCR効率に3倍程度の差があった。一方で試料3が示すようにVLP回収率が高いとRT-PCR効率も高いという傾向ではなかった。

従って、下水試料ごとに抽出RNAの質を評価することが、下水を用いた病原体ゲノムサーベイランスの精度管理には必要であると考えられた。

一方で検討した試料が少ないこと、単一の RNA 抽出方法を用いたこと、定量法の交差反応、及び VLP が下水中の標的ウイルス粒子と同様の挙動を示すか不明であることから、これらの指標を下水沈殿物由来 RNA を評価する指標とするには様々な課題があり、更なる検討が必要である。

E. 結論

下水沈殿物由来 RNA の RT-PCR 効率及び RNA 抽出効率を推定、評価し、病原体ゲノム定量値の精度管理を行える可能性を示した。一方で交差反応等の更なる検討が必要である。

参考文献

- 1) 厚生労働行政推進調査事業費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)「環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制を構築に関する研究」研究協力報告書

検出頻度を増やした下水中新型コロナウイルス検出報告 2021 年度

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

複数病原体検出を目的とした高齢者介護施設排水調査

調査目的

2021年1月から2023年2月に3か所（2022年からは5か所）に実施した施設排水調査の結果、SARS-CoV-2の検査方法は概ね確立。

SARS-CoV-2 以外の複数病原体検査系を検討する（下水とふき取り）

調査期間： R5.5～R5.12（月1回）

場所:特養5施設（名古屋市）

方法

採水量：100 ml（プロメガDC法）、供試料 80 ml

精度管理: VLPを用いた回収率評価とPCRコントロール(ISO標準品)測定

- 1) Duplex RT-qPCRによるFluA/B,SARS-CoV-2検出
- 2) カスタムデザインプレートを用いた2 step リアルタイムPCR検査

流入下水中の新型コロナウイルス他、複数病原体検査フロー

採水

グラブ法

2日目：AM10時前後約100 ml（4℃）

トラップ法

1日目：PM16～18時設置

2日目：AM09～10時回収（4℃）

輸送

病原体輸送業者へ委託

凍結（ドライアイス）

採水二日目午後13時～翌日午前 検査委託先着

RNA抽出

ダイレクトキャプチャー法（Promega Wizard Enviro TNA Kit, A2991）

検体（80 ml） 40 ml × 2 本の 50 ml 遠沈管

└ VLP Detection Mix Orangeを添加（32 μl/tube）

└ Wizard Enviro TNA Kitを使用して核酸を抽出する。（Protocol 4 を使用して抽出）

↓
RNA 40 μl

1) Duplex RT-qPCRによるFluA/B,SARS-CoV-2検出

用いたキット

Takara SARS-CoV-2 & Flu ダイレクト PCR 検出キット (15 µl 反応系)

RNAは原液使用

精度管理の手法

- PCR コントロール：AcroMetrix Coronavirus 2019 (COVID-19) RNA Control (RUO)を反応ごとに使用し、Ct 値を確認

- VLPを用いた回収率評価

試薬：VLP Detection Mix Orange (MERMDX069-1)

添加したVLP の回収率を毎回確認

2) カスタムデザインプレートを用いた2 step リアルタイムPCR検査

複数種病原体検出プレート：TrueMark Custom Plates (サーモフィッシャー)

ターゲット：新型コロナウイルス、ノロウイルス (G I, G II)、インフルエンザウイルス (A, B)、肺炎球菌、レジオネラ属菌

検量線用標準核酸 (プール) : Custom DNA control (1×10^5 copies/µl)

逆転写反応

試薬：TaKaRa PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)

RNAは1/2希釈して使用

リアルタイム PCR

試薬：TaqPath™ BactoPure™ Microbial Detection Master Mix, no Rox
(サーモフィッシャー)

10 µl 反応系

複数病原体検出を目的とした高齢者介護施設排水調査の概要

調査期間： R5.5～R5.12（月1回）
場所:特養5施設（名古屋市）
方法
採水量：100m l（プロメガDC法）
精度管理:VLPを用いた回収率評価とPCRコントロール(ISO標準品)測定

- 1) Duplex RT-qPCRによるFluA/B,SARS-CoV-2検出
- 2) カスタムデザインプレートを用いた2 step リアルタイムPCR 検査

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SC_ORF/N		NG1/2		Flu A/B		LP		SP			
B	SC_ORF/N		NG1/2		Flu A/B		LP		SP			
C	SC_ORF/N		NG1/2		Flu A/B		LP		SP			
D	SC_ORF/N		NG1/2		Flu A/B		LP		SP			
E	SC_ORF/N		NG1/2		Flu A/B		LP		SP			
F	SC_ORF/N		NG1/2		Flu A/B		LP		SP			
G	SC_ORF/N		NG1/2		Flu A/B		LP		SP			
H	SC_ORF/N		NG1/2		Flu A/B		LP		SP			

新型コロナウイルス
ノロG1,G2
FluA/B
レジオネラ
肺炎球菌

1.新型コロナウイルス/インフルエンザA,B同時検出キット使用(インフルはすべて陰性、コロナのみ検出)

	5/29-30	6/26-27	7/18-19	8/28-29	9/25-26	10/23-24	11/27-11/28	12/25-12/26
A	N.D.	SC (1.6E+01)	N.D.	5.4E+02	SC (2.2E+02)	N.D.	N.D.	N.D.
B	N.D.	N.D.	SC (4.4E+01)	4.4E+01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	SC (1.6E+02)	SC (1.7E+01)
D	SC (3.0E+00)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.0E+03
E	N.D.	N.D.	N.D.	3.6E+02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C拭き取り	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

2.カスタムプレート使用（1と同じ検体を使用していますが違うPCR検査手法）

採取場所	5/29-30	6/26-27	7/18-19	8/28-29	9/25-26	10/23-24	11/27-11/28	12/25-12/26
A	LP(2.5E+02)	NV- G1G2(4.5E+02)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
B	N.D.	NV- G1G2(1.1E+05)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C	N.D.	NV- G1G2(1.5E+04)	N.D.	NV- G1G2(1.5E+03)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
D	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	NV- G1G2(2.7E+02)	N.D.	N.D.
E	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C拭き取り	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

検出下限値 500 GC/L 赤字は1ウエルのみ反応

2023年 5 月から 1 2 月までの調査（まとめ）

- ・ 高齢者介護施設排水中の新型コロナウイルスゲノム採水、検査法を各種検討
- ・ コロナ、インフル同時測定キットのほうが、カスタムプレートによる検出より感度が高い。
- ・ なおカスタムプレート中の新型コロナ検出系は変異株に対応していないこと、2倍希釈したRNAを用いたことが、原因と考えられる。
- ・ カスタムプレートでノロウイルスとレジオネラ属の検出ができた。
- ・ ふき取りサンプル（職員オフィス）はすべて陰性
- ・ カスタムプレート検査は一枚 5 万円＋試薬代でおよそ 6 ～ 7 万円程度が原価（ 6 種類、 4 施設まで検査可能）ただし採水費用、輸送費用含まず
- ・ 4 施設まとめてなら 1 施設 2 万弱で 6 種類の検査（原価）
- ・ カスタムなので施設の要望で対象病原体のアレンジ可能（現在、最小オーダーは 2 0 枚）
- ・ 施設の健康診断的な活用の可能性

II. 分担研究報告

厚生労働行政推進調査事業費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「環境水に含まれる新型コロナウイルス等病原体ゲノム情報の活用に関する研究」
分担研究報告書

下水中のコロナウイルス量と感染者数の比較解析

分担研究者：神垣 太郎

所属 国立感染症研究所感染症疫学センター第6室

研究要旨

下水中のSARS-CoV-2のゲノムコピー数をモニタリングするいわゆる下水サーベイランスの公衆衛生上の意義は非常に高い。一方で、その結果の解釈については、さらなる研究が必要な状況である。新型コロナウイルス感染症が感染症法の5類定点疾患に移行する前に実施された実証研究の11自治体のデータを用いて患者サーベイランスとinterval likelihood ratioを算出して検討したところ、シグナルとしては 1×10^5 がもっとも尤度が高くなり、人口10万人当たりの報告数が300人以上あるいは100人以下である確率が高いことがわかった。

A. 研究目的

下水などの環境水における SARS-CoV-2 の遺伝子コピー数をモニタリングするいわゆる下水サーベイランスの有用性は論をまたない。これまで2022年度内閣官房による下水サーベイランスの活用に関する処理場実証事業では、下水の採水方法、濃縮・抽出時の試料量や回収率等に影響されることを考慮して下水中のウイルス RNA 量を解釈する前提が確認された。また下水に含まれるウイルス RNA 量は単に新規報告者だけではなく、既報告者および感染未報告者など COVID-19 の自然感染史においてオーバーラップした集団の排泄を反映していると考えられるために、必ずしも新規報告者の動向とは高い相関を認めていないが、処理人口が10万人を超えるところでは週単位の増減一致率が約60%と中等度の相関を認めたことが明らかとなった（参考文献1）。しかし、例えばインフルエンザ定点からの定点当たり報告数を利用した警報・注意報システムのようなサイト横断的に利用できる閾値の設定とシグナルの発出という早期警戒システムとしての利用は将来の研究に委ねられている。また、2023年5月8日より新型コロナウイルス感染症の感染症法における位置づけが新型インフルエンザ等感染症から5類感染症（定点把握）に変更され、それまで新型コロナウイルス感染者等情報把握・管理支援システム（HER-SYS）において発生届が出された症例の全例が報告されていた状況と変化している。そこで、本研究では先の実証研究で収集されたデータを用いて、患者数との比較検討を行った。

B. 研究方法

内閣官房（現内閣感染症危機管理統括庁）が2022年に実施された「ウィズコロナ時代の実現に向けた主要技術の実証・導入に係る事業計画 下水サーベイランスの活用に関する実証事業」において収集された処理場における下水サーベイランスデータを用いて、各処理場における SARS-CoV-2 の RNA コピー数に関する情報を収集した。また HER-SYS データから当該処理区にある保健所単位のデータを収集して、結果の検討に用いた。具体的には11自治体の下水中のウイルスコピー数のデータを収集して、処理区あるいは保健所ごとに集計してものと、当該自治体の処理区がある市町村が含まれる保健所単位の報告数を集計して検討した。

C. 研究結果

11自治体のウイルスコピー数および自治体から報告された人口10万人あたり報告数をプロットしたものを図1に示す。全体の相関係数は0.42であり、中等度の相関であった。次に、HER-SYSのデータを用いて人口10万人あたり報告数とプロットしたものを図2に示す。相関係数は0.41とほぼ変化はなかった。引き続き自治体からの報告データを用いて検討することとする。さらに対数変換したウイルス RNA 量を用いて、 10^3 、 $10^{3.5}$ 、 10^4 、 10^5 コピー数/Lの4つの値を閾値として設定して、その感度、特異度およびinterval likelihood ratioを求めた結果を図3に示す。低い感度かつ高い特異度および高い感度と低い特異度の2つの群に大きく分かれている。前者は 1×10^5 コピー/Lを閾値と設定した場合であり、自明ではあるが 1×10^5 コピー/Lを閾値とした際には報

告レベルが低いことを鋭敏に把握していた。また後者は、特に 1×10^3 コピー/L を閾値とした群であり、報告レベルが高いことを鋭敏に把握していた。感度および特異度がどちらかに偏らなかったのは、下水中のウイルスコピー数の閾値を 1×10^4 コピー/L に設定した際の人口 10 万人あたり 50 人の報告数であった（感度 69.8% (95%信頼区間 65.3%-74.0%)、特異度 64.5%、95%信頼区間 60.2%-68.6%）。Interval likelihood ratio は、ある条件に該当するものを探知できる確率をある条件に該当しないものを探知できる確率で割った尤度比のことであり、複数の閾値が設定できる条件において尤度比として定量化できること、閾値の設定条件から検出確率を推定できることがその利点として知られている。本法を用いて ILR を算出した上で、ILR が 2 以下のものを変化なし (NC)、2 以上 4 未満のものをほとんど変化なし (little use)、4 以上を中等度変化 (moderate use) とカテゴリーに分けて図 3 に表示した。中等度変化を示したのは、 1×10^5 コピー/L を閾値と設定した場合であり、前述の感度および特異度どちらかが偏っていない条件では変化なしという結果となった。

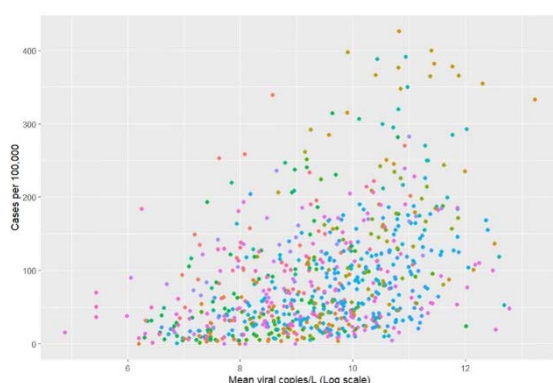


図 1.11 自治体において測定されたウイルスコピー数および自治体からの患者報告数の比較（色は各自治体を表す）

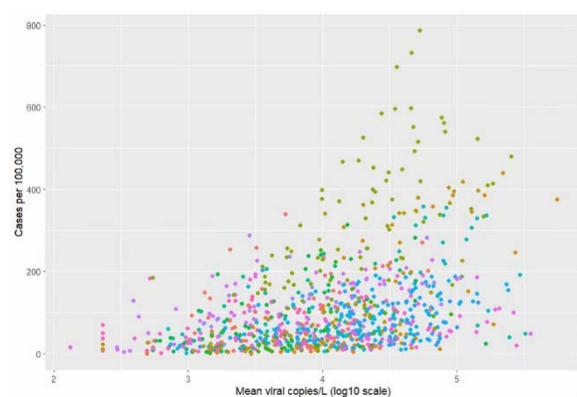


図 2.11 自治体において測定されたウイルスコピー数および HER-SYS での患者報告数の比較（色は各自治体を表す）

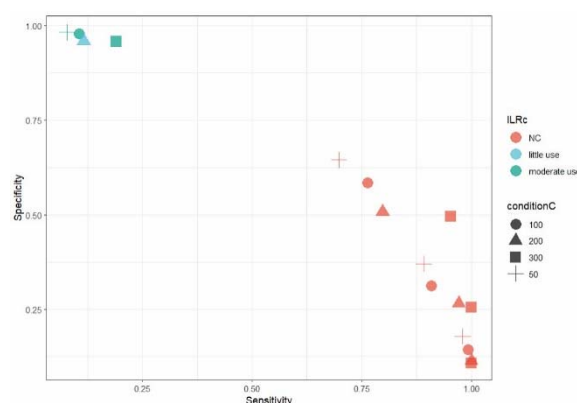


図 3. ウイルス RNA 量の閾値設定と人口 10 万人あたり報告者数探知にかかる感度、特異度および Interval likelihood ratio

D. 考察

下水サーベイランス実証研究で得られたデータのうち 11 自治体からのデータを自治体からの報告または HER-SYS からの報告と併せて検討を行った。すでに時系列に比較して、COVID-19 の発生動向において、処理場人口規模によって変動はあるものの一週間単位では 59% で増減が一致していることが明らかであったが、さらに下水中のウイルスコピー数をサーベイランスの閾値として利用する検討を実施した。

下水サーベイランスは、SARS-CoV-2 のゲノムコピー数をモニタリングするが、採水方法や採水タイミング、阻害物質などの影響、測定方法など様々な測定系における影響を考慮する必要がある。またウイルス排泄するヒト集団においては新規報告者だけではなく、未発症者や

無症候病原体保有者および既報告者からの影響を考慮する必要がある。患者サーベイランスとは違う側面を十分に理解した上でデータを解釈する必要があると考えられる。

本研究では、特定のウイルスコピー数を閾値として設定したシグナルとしての感度・特異度を検討したところ、 1×10^5 コピー/L を閾値と設定した場合の人口 10 万人あたり 50 人、100 人ないし 300 人であった。ここから下水中のウイルスコピー数が 1×10^5 コピー/L という非常に大きい状況でなければ、少なくとも人口 10 万人あたり 100 人以下の確率が高くなることに寄与すること、あるいは 1×10^5 コピー/L という非常に大きい状況であれば、少なくとも人口 10 万人あたり 300 人以上の確率が高くなることに寄与することが明らかとなった。

E. 結論

下水サーベイランスの動向において増減一致率が約 60% であることは先行研究で知られているが、下水中のウイルスコピー数を閾値として使うことを検討すると、 1×10^5 コピー/L のみが interval likelihood ratio が 4 倍以上になり、そのレベルであれば人口 10 万人当たり 300 人以上あるいは以下であれば少なくとも 100 人以下であることに寄与することが明らかとなった。

参考文献

McGee S. Simplifying likelihood ratios. *J Gen Intern Med.* 2002;17(8):646-649. doi:10.1046/j.1525-1497.2002.10750.x

三菱総合研究所. ウィズコロナ時代の実現に向けた主要技術の実証・導入に向けた調査研究業務「下水サーベイランスの活用に関する実証事業」下水処理場レポート

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表
論文発表
1. なし

学会発表
1. なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (あれば記載)
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

数理モデルを用いた下水ウイルス量と感染者数の双方向予測研究

分担研究者：佐々木顕 所属 総合研究大学院大学

研究要旨 国土交通省と連携の下、首都圏のA地方公共団体から提供されたデータを用いて、下水中ウイルス量時系列と感染者数の時系列との関係を解析する数理モデル、およびデータ解析のためのRプログラムを開発した。下水ウイルスRNA濃度から集水域の陽性報告数データと比較することにより、この数理モデルが下水RNA量から集水域の感染動向を高い精度で予測できることが示された(2023年公衆衛生学会総会)。また、この数理モデルを実装したWEBアプリケーションCOVIVISを開発し、下水サーベイランスを行った様々な自治体がこのツールを用いてデータ解析できるための体制を整備した。

A. 研究目的

下水中のウイルス濃度から、地域のウイルス感染状況を把握し、将来流行予測を行うための簡潔で汎用性の高い数理モデルを開発する。またこの数理モデルを用いたデータ解析が行える汎用のウェブアプリケーションを開発し、下水コロナウイルス濃度データを持つ研究者、自治体等が、地域の感染状況把握と予測を行える環境を構築する。対象地域の感染状況と下水中ウイルス濃度の時系列からモデルのパラメータフィッティングを行うプロセスもアプリケーション内に組み込むことにより、地域特性や変異株の置き換わりによるパラメータ変化に自動的に対応させる。感染症サーベイランスと予防政策立案に下水中ウイルス濃度モニタリングが常態的に採用される環境の構築を目指す。

B. 研究方法

1. 厚生労働科学研究班がA市環境創造局下水道施設部の協力を得て実施した首都圏A自治体の下水処理施設における週別ウイルス濃度測定データ(2020年~現在)と、自治体による新型コロナウイルス陽性日別報告数データを用いて、下水ウイルス濃度から地域の感染動向を予測する数理モデルを構築した。モデルは、発症日を基準点として、感染者あたりのウイルス排出曲線をパラメタライズし、モデルによる感染者数予測の予測力を最大化するパラメータを推定した。

2. 上記の数理疫学的な基礎モデルを、データ入力と予測結果の解釈が容易に行えるウェブアプリケーションを開発し、ウェブ上で運用・公開する。また、アプリケーション操作マニュアルや背景説明、解析結果の共有を行うウェブページを整備する。

C. 研究結果

1. 5つの下水処理施設で平均化したウイルスRNA濃度(対数)からモデルを用いた流行予測値と、自治体におけるCOVID-19患者数(対数)とは、決定係数0.7~0.8の高い適合性を示した(図1, 2)。

2. モデルパラメータのフィッティングにより、感染者のウイルス分泌量のピークは発病後0-1日と推定され、ピーク前後の緩和時間は1-2日と急峻であったこと。つまり、気道感染による発症数のピークと、下水でのウイルス濃度のピークがほぼ一致しており、このことから、下水で検出されるウイルス濃度には、気道感染から腸管感染への感染部位の移行後の腸管からの排出よりも、気道感染時の口腔分泌物が大きく寄与していることが示唆された。

3. また集水域人口10万人当たり一人の感染者により、下水中のRNA濃度は検出限界(400GC/L)を大きく超える1600 GC/Lだけ上昇すると推定された。

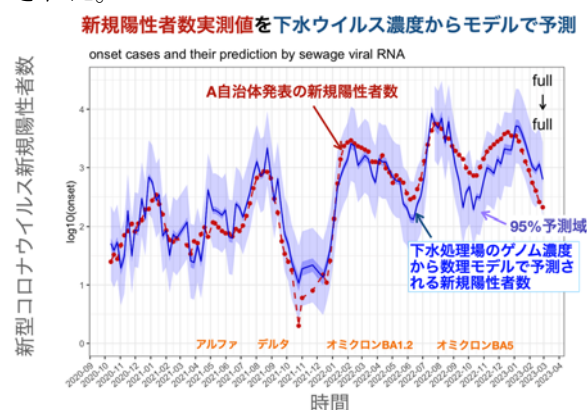


図1. A自治体第3-8波の流行時系列を下水RNA濃度時系列から数理モデルで予測した結果

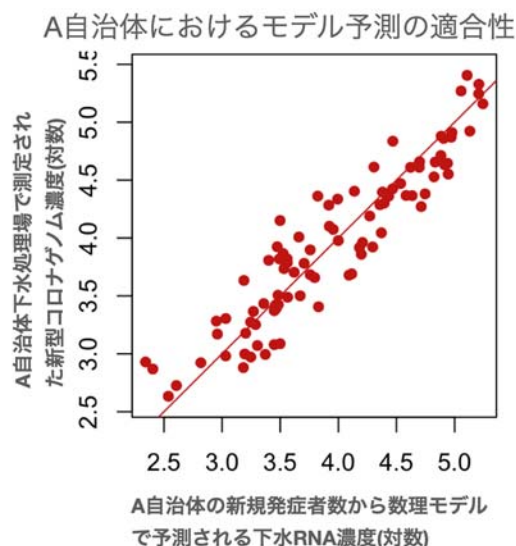


図2. 下水 RNA 濃度からの感染状況予測の適合性

4. 本研究で構築した数理モデルを用いて環境水中の下水 RNA 濃度データからの集水域の流行状況を予測するアプリ COVIVIS を開発した(図3、2024年5月公開予定)。

COVIV 解析ツール ウェブアプリ版



図3. ウェブ解析アプリケーション COVIVIS のホーム画面 <https://covivis.soken.ac.jp>

D. 考察

これらの結果(数理モデルによる高精度予測、発症と下水濃度上昇の時間差の少なさ、集水域での無症候性感染を含む感染状況の下水濃度への高感度の反映)から、下水中のウイルス RNA 濃度センサスと数理モデルの結合により、時間遅れが少なく、検出感度の高い高精度の流行予測が行えることが示唆された。

今回のモデルとデータ解析は、市中環境水中のウイルスゲノム濃度モニタリングが、無症候性感染の割合が高い SARS-CoV-2 を含む多様なウイルス感染症流行の規模を推定するために有用であることを示した。

E. 結論

下水中ウイルス濃度を用いて処理域での新型コロナウイルスの流行を予測する数理疫学モデルを開発した。このモデルを2020年以降のA自治体での下水中ウイルス濃度時系列データに適用する事により、A自治体での流行の高精度の予測が可能になった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

1. 佐々木頭、数理疫学モデルを用いた環境水ウイルス濃度からの流行予測、公衆衛生学会、2023年、つくば国際会議場

H. 知的財産権の出願・登録状況(あれば記載)(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

流行予測ウェブアプリ COVIVIS を開発した(資料 1.2.3)。



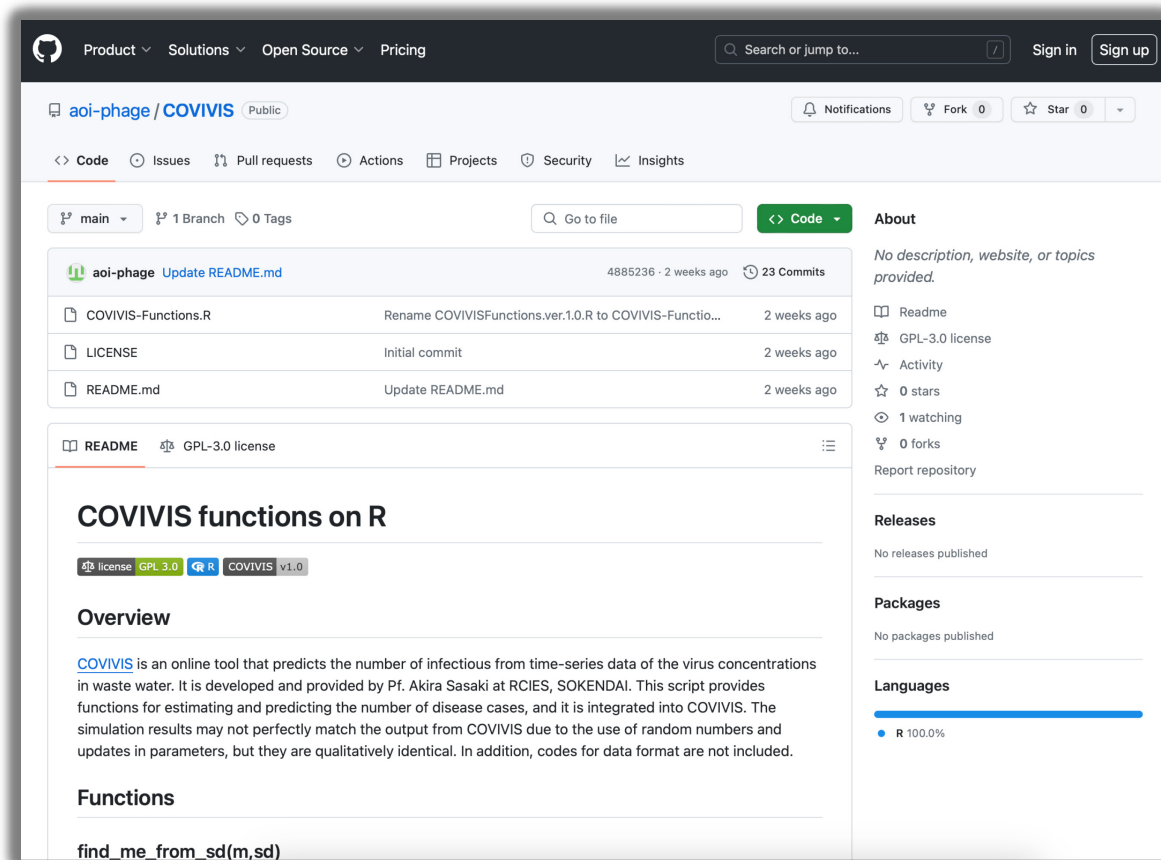
**COVIVIS(コビビス, COVID-19 Virus – infection surveillance tools)は
総合研究大学院大学・統合進化科学研究中心(教授・佐々木顕)が開発・提供する
環境水中のウイルス濃度から流域の感染者数を推定する解析手法
およびウェブツールの総称です。**

このPowerPointファイルまたはその一部について、COVIVISユーザー様が自由に
転載し、報告書やプレゼンにご使用頂くことができます。

ver.1.41 updated! 2024.4.15.

COVIVIS解析ツール Rコード

GitHubにて公開中



<https://github.com/aoi-phage/COVIVIS>

COVIVISの元となったR(統計ソフト)コードでの解析手法をGitHubにて掲載しております. オープンソースとして誰でもご利用頂けます. まずはそちらをご参照ください.

COVIVIS解析ツール ウェブアプリ版



<https://covivis.soken.ac.jp>

2024年4月から β 版を限定公開

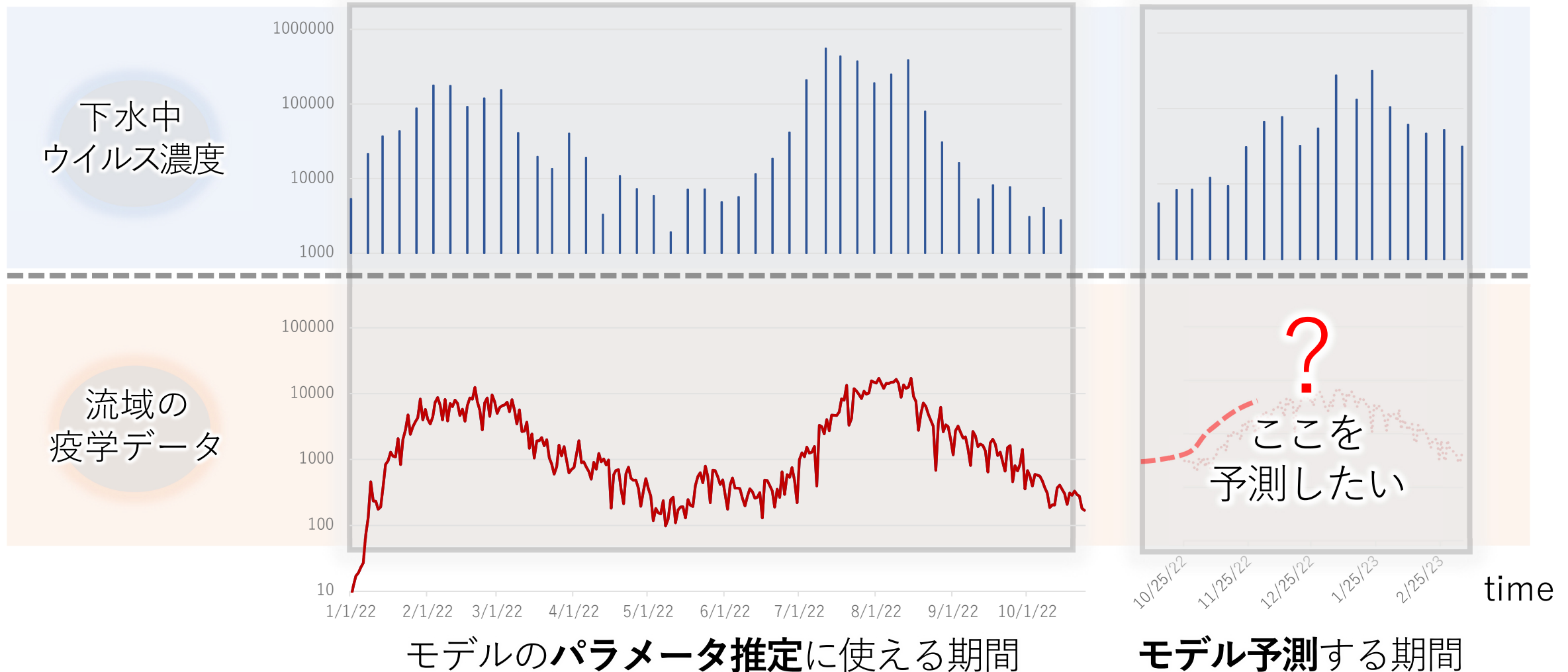
- NIJIs (New Integrated Japanese Sewage Investigation for COVID-19)
- RCIES (総研大統合進化科学研究コース)

COVIVIS解析ツールの目的

※ 架空のデモ用データ使用

双方のデータが十分にある期間

ウイルス濃度データ
に依存する期間

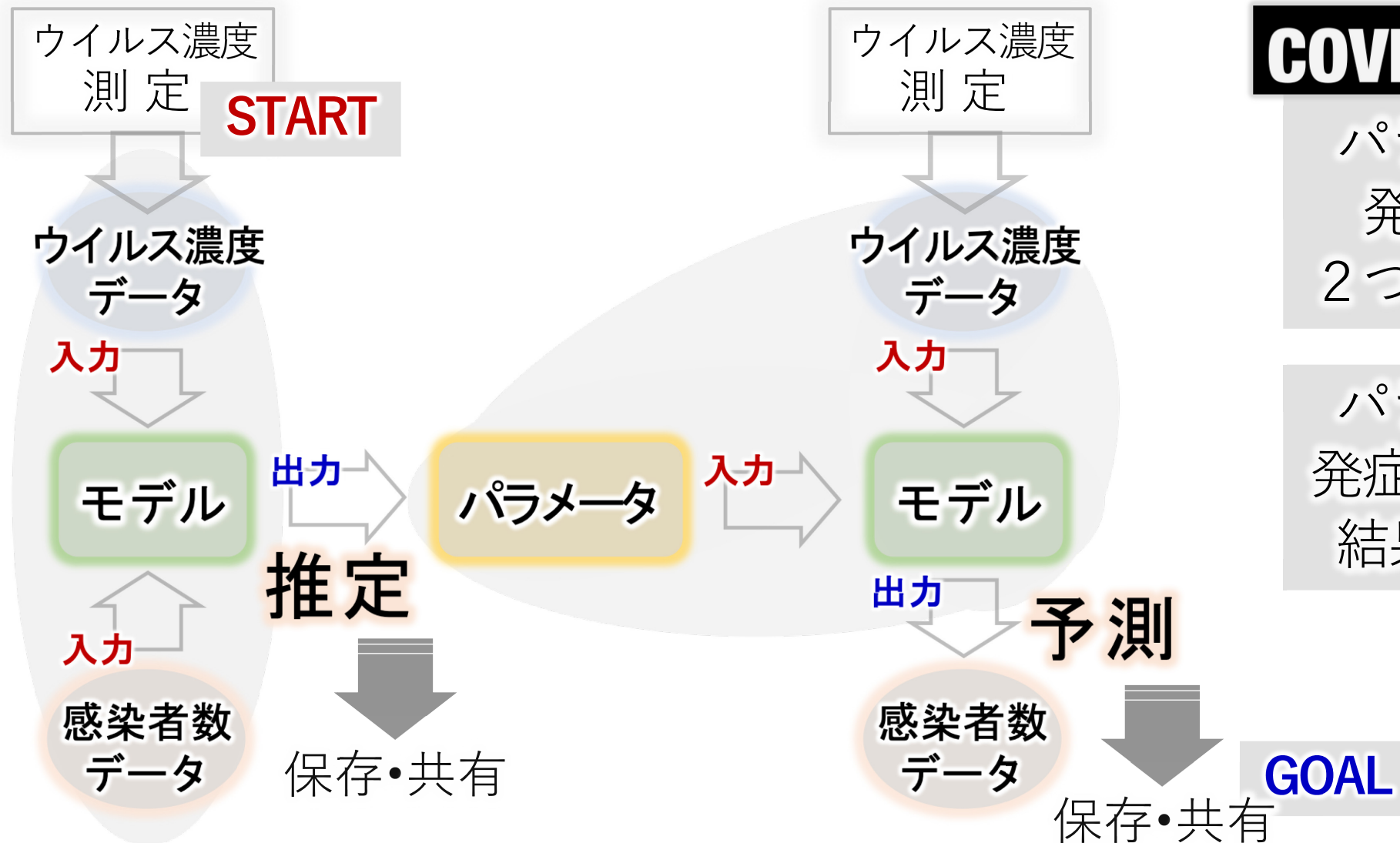


COVIVIS解析ツールとは？

COVIVIS解析ツールでは以下のことを行います。

1. 過去のある期間における、下水中ウイルス濃度とその流域の感染報告数を基に、双方の数値を変換できる数理モデルのパラメータを推定する。
2. さらにこのモデルに、推定したパラメータと予測したい期間の下水中ウイルス濃度を入力し、その期間の発症者数の予測を行う。

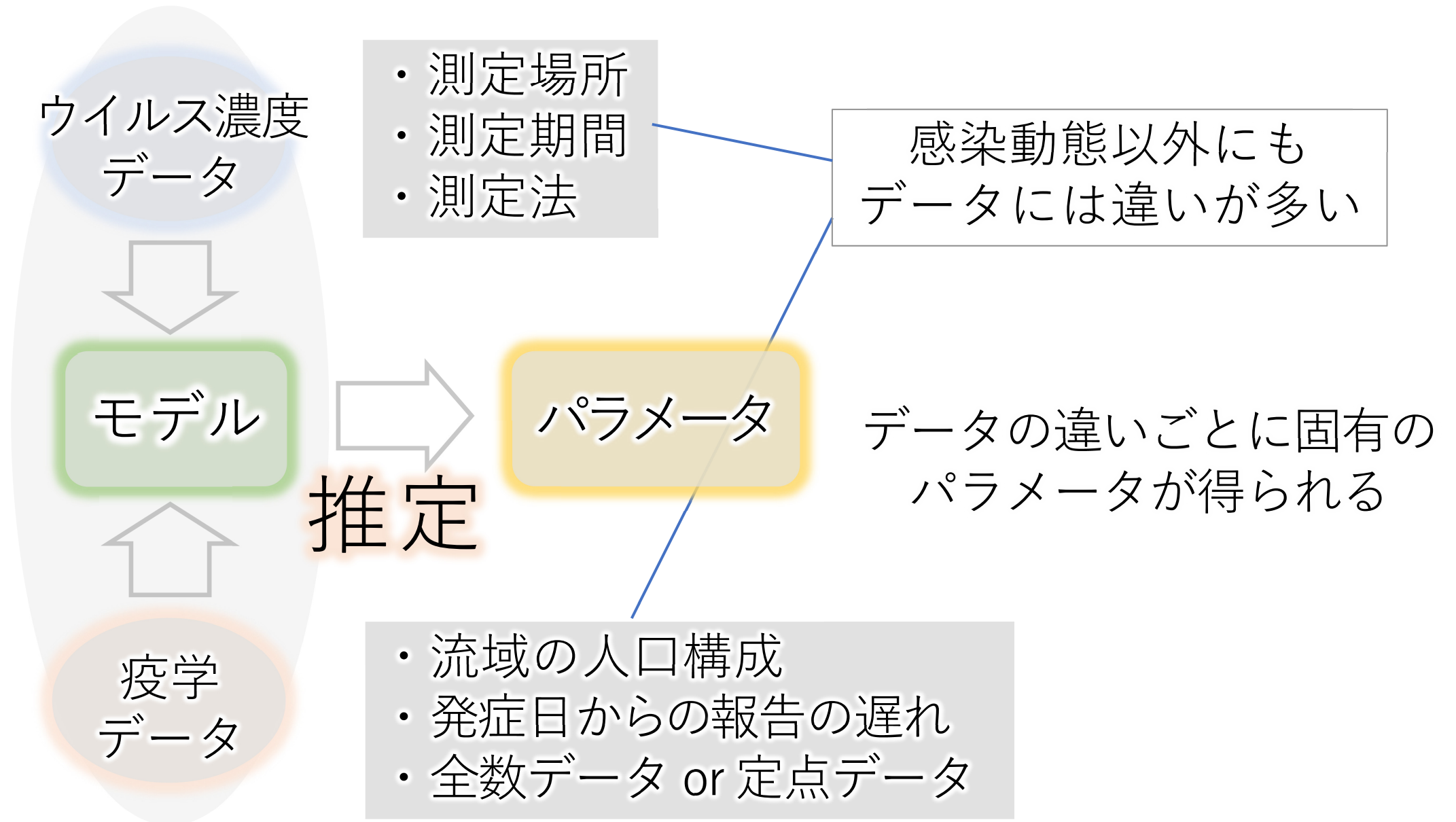
パラメータ推定と発症者数予測とは？



COVIVIS では、
パラメータ推定と
発症者数予測の
2つの計算フォーム

パラメータ推定と
発症者数予測の解析
結果を**保存と共有**

パラメータ推定と発症者数予測とは？



パラメータ推定と発症者数予測とは？



COVIVIS

では、
実測データの下処理を全て
計算フォームから設定可能

多くの下処理が必要

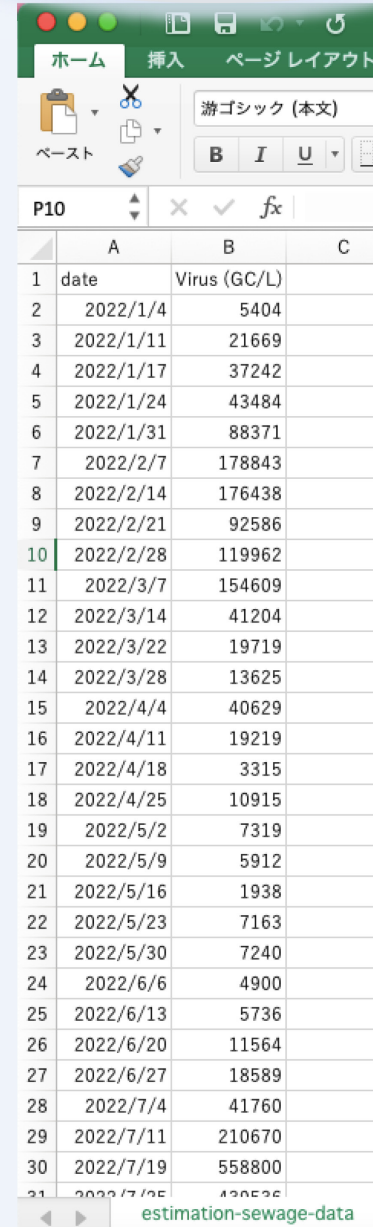
- ・ 移動平均や欠損日の補間
- ・ 1 週間の集計データを日次データに変換
- ・ 報告日データから発症日データを推定

入力データ

- .csvもしくは.tsvのファイル入力
とコピー&ペーストのテキスト入力
(ExcelでOK)
- 日付データと数値データの2カラム
- 1行目や1列目に項目名などが
入っていても自動で除去
- ウイルス濃度と疫学データの
日付が一致していなくても自動で処理

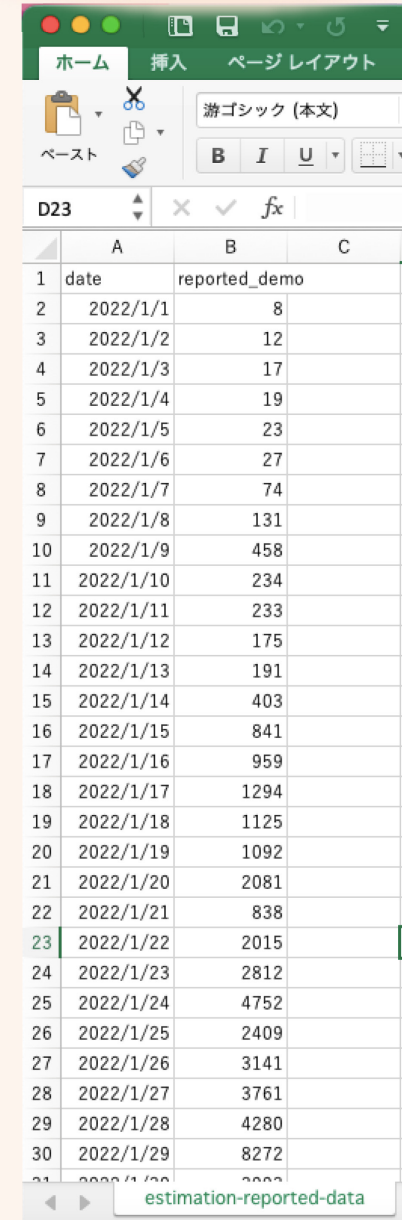
※ 詳しくは操作マニュアル参照

下水中ウイルス濃度



	A	B	C
1	date	Virus (GC/L)	
2	2022/1/4	5404	
3	2022/1/11	21669	
4	2022/1/17	37242	
5	2022/1/24	43484	
6	2022/1/31	88371	
7	2022/2/7	178843	
8	2022/2/14	176438	
9	2022/2/21	92586	
10	2022/2/28	119962	
11	2022/3/7	154609	
12	2022/3/14	41204	
13	2022/3/22	19719	
14	2022/3/28	13625	
15	2022/4/4	40629	
16	2022/4/11	19219	
17	2022/4/18	3315	
18	2022/4/25	10915	
19	2022/5/2	7319	
20	2022/5/9	5912	
21	2022/5/16	1938	
22	2022/5/23	7163	
23	2022/5/30	7240	
24	2022/6/6	4900	
25	2022/6/13	5736	
26	2022/6/20	11564	
27	2022/6/27	18589	
28	2022/7/4	41760	
29	2022/7/11	210670	
30	2022/7/19	558800	

疫学データ

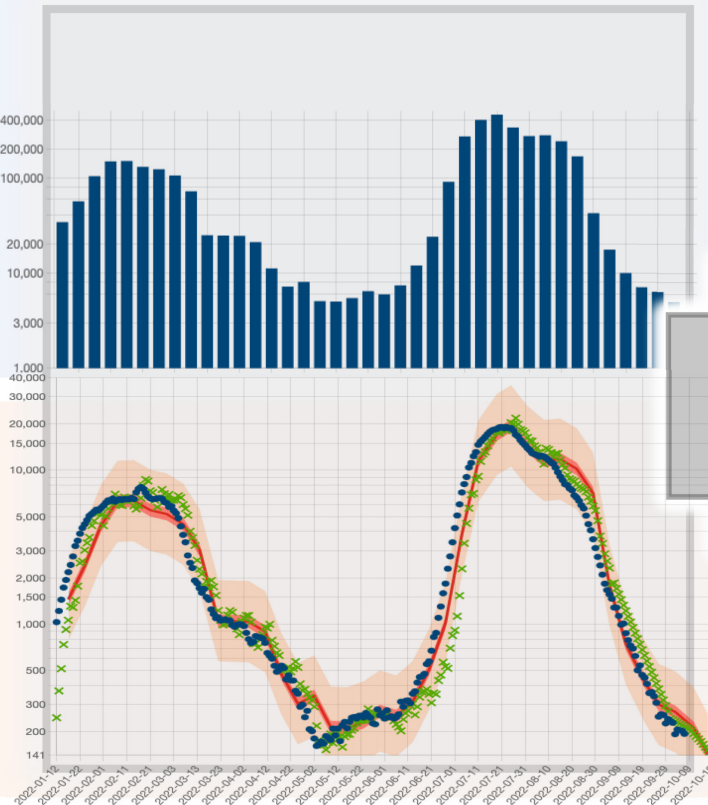


	A	B	C
1	date	reported_demo	
2	2022/1/1	8	
3	2022/1/2	12	
4	2022/1/3	17	
5	2022/1/4	19	
6	2022/1/5	23	
7	2022/1/6	27	
8	2022/1/7	74	
9	2022/1/8	131	
10	2022/1/9	458	
11	2022/1/10	234	
12	2022/1/11	233	
13	2022/1/12	175	
14	2022/1/13	191	
15	2022/1/14	403	
16	2022/1/15	841	
17	2022/1/16	959	
18	2022/1/17	1294	
19	2022/1/18	1125	
20	2022/1/19	1092	
21	2022/1/20	2081	
22	2022/1/21	838	
23	2022/1/22	2015	
24	2022/1/23	2812	
25	2022/1/24	4752	
26	2022/1/25	2409	
27	2022/1/26	3141	
28	2022/1/27	3761	
29	2022/1/28	4280	
30	2022/1/29	8272	

COVIVIS解析ツールでの実際の画像出力

パラメータ推定

下水中
ウイルス濃度



流域の
疫学データ

モデルパラメータ

V	Omega	Gamma
15.7	2.20	2.09

CSVファイルの
ダウンロードも可

time

fitting 期間

発症者数予測

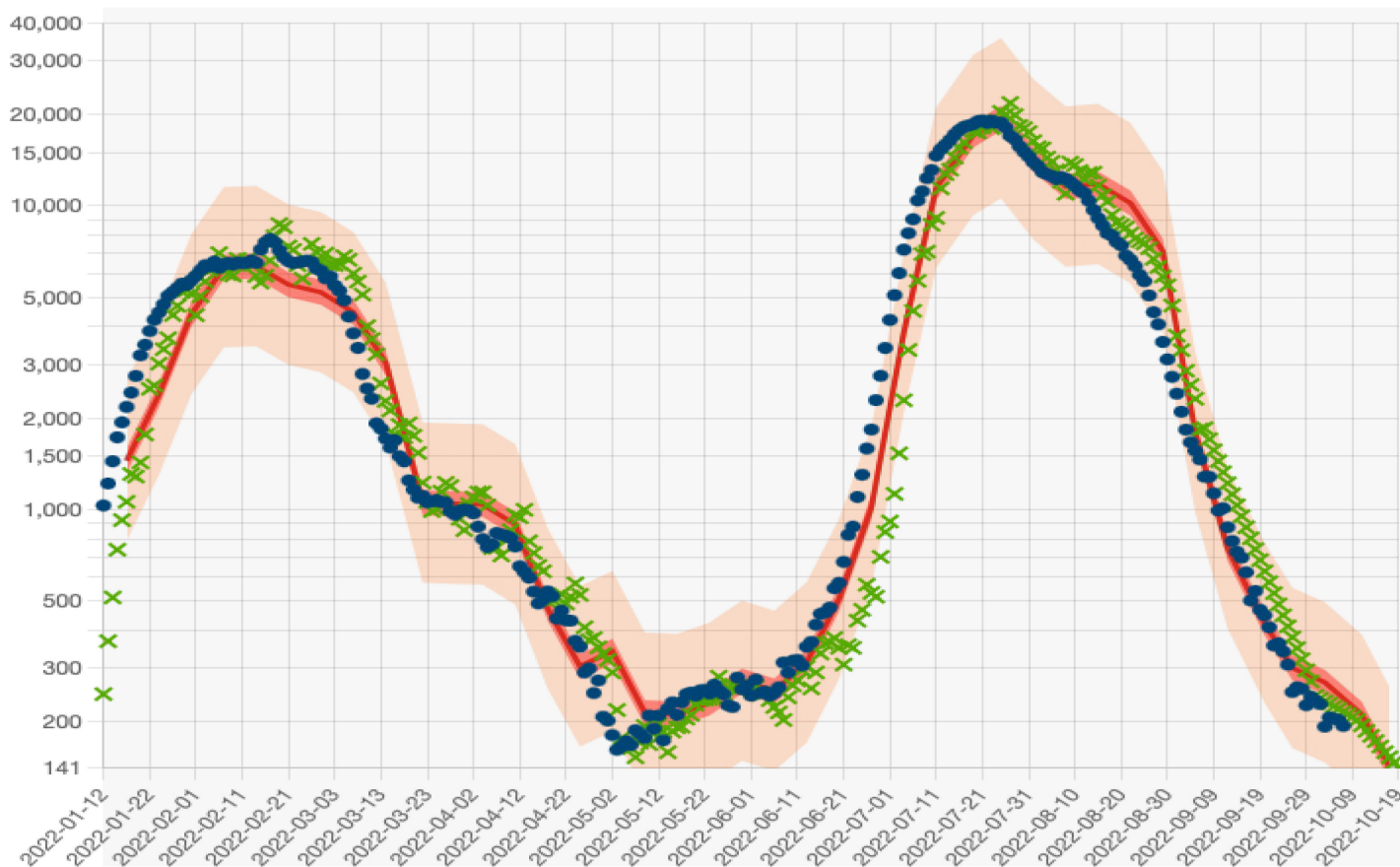


time

予測 期間

モデル予測発症者数の出力結果の一例

人数



日付

モデル予測発症者数

× 補間後報告数

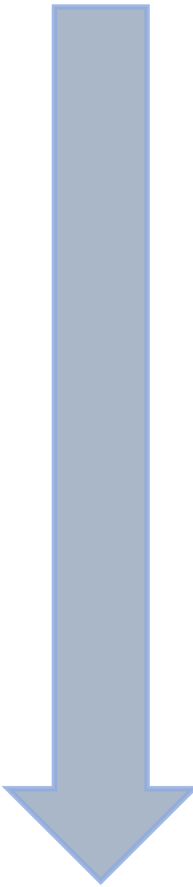
95%信頼区間

モデル予測された曲線が
95% 収まる信頼区間

95%予測区間

基になったデータのプロット
が95% 収まる予測区間

COVIVIS操作マニュアル（※ 解らないことがある時にみる）



手順 1. ログインする

手順 2. モデルパラメータの推定

手順 3. モデルパラメータ推定結果の確認・保存

手順 4. 発症者数の予測

手順 5. 発症者数予測結果の確認・保存

手順 6. 保存結果の読み出し・編集・削除

手順 1. COVIVIS解析ツールへのログイン

はじめにログインフォームが出ます。

A screenshot of a web login form titled "ログイン" (Login). It contains two input fields: "メールアドレス" (Email address) with a placeholder text "@ メールアドレスを入力してください" (Enter email address), and "パスワード" (Password) with a placeholder text "パスワードを入力してください" (Enter password). Below the fields is a black button with the text "ログイン" (Login) in white.

ログイン用メールアドレスとパスワードを入力してください。

アカウント発行はCOVIVIS運営までメールでご連絡ください。

`covivis@ml.soken.ac.jp`

地衛研、自治体、政府所轄機関、大学等の教育機関を中心に、利用者を募っております。アカウント発行の審査基準はCOVIVIS基本方針をご参照ください。

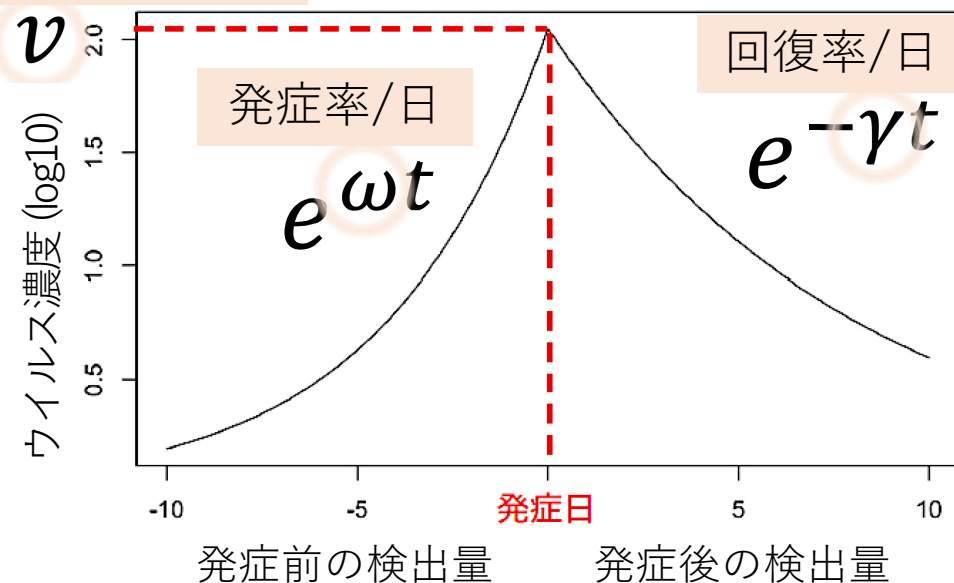
手順 2-1～2-2. 推定モデルの選択

※ これら図は解析ツールでは**非表示**です

- 「疫学モデル(推奨)」と「回帰モデル」のどちらかを選択します.

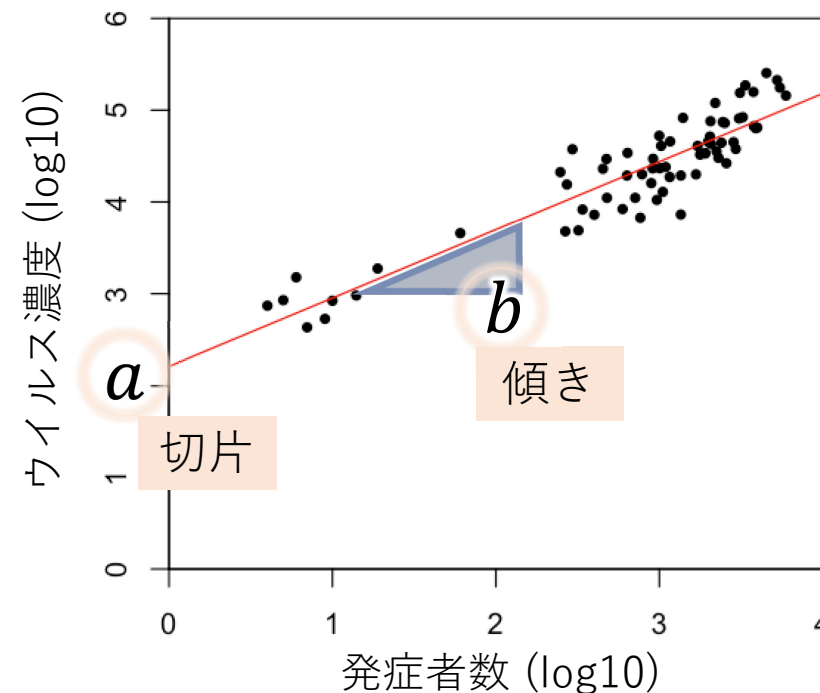
疫学モデル

最大検出量/人



発症者1人あたりのウイルス検出量について、上図のような山形の排出曲線を仮定し、発症者数の時系列データから流域全体のウイルス濃度を計算することで、実測ウイルス濃度の時系列データと最もfittingする最適な**3パラメータ**を推定する.

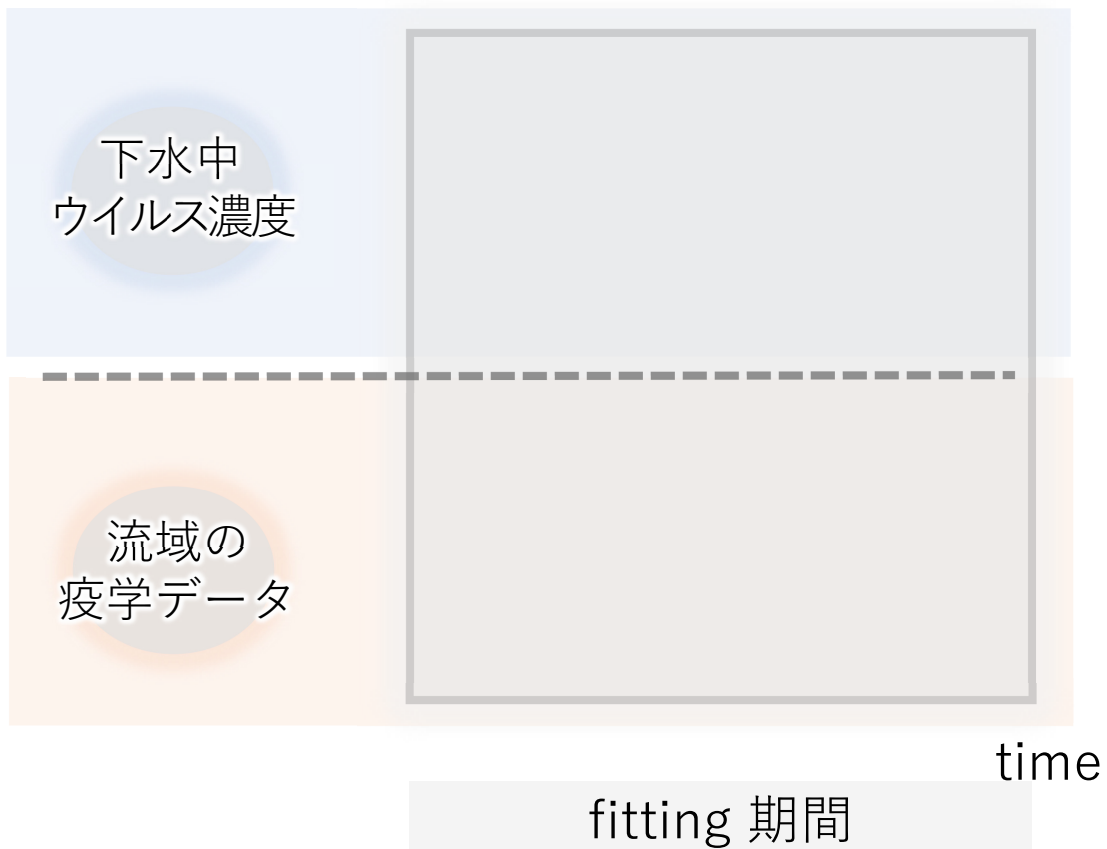
線形回帰モデル



実データを基にした発症者数とウイルス濃度の関係を両対数プロットした散布図. これを直線で回帰し、その傾き(b)と切片(a)をパラメータとして推定する.

手順 2-3. 実測ウイルス濃度データ(fitting期間)の入力

パラメータ推定

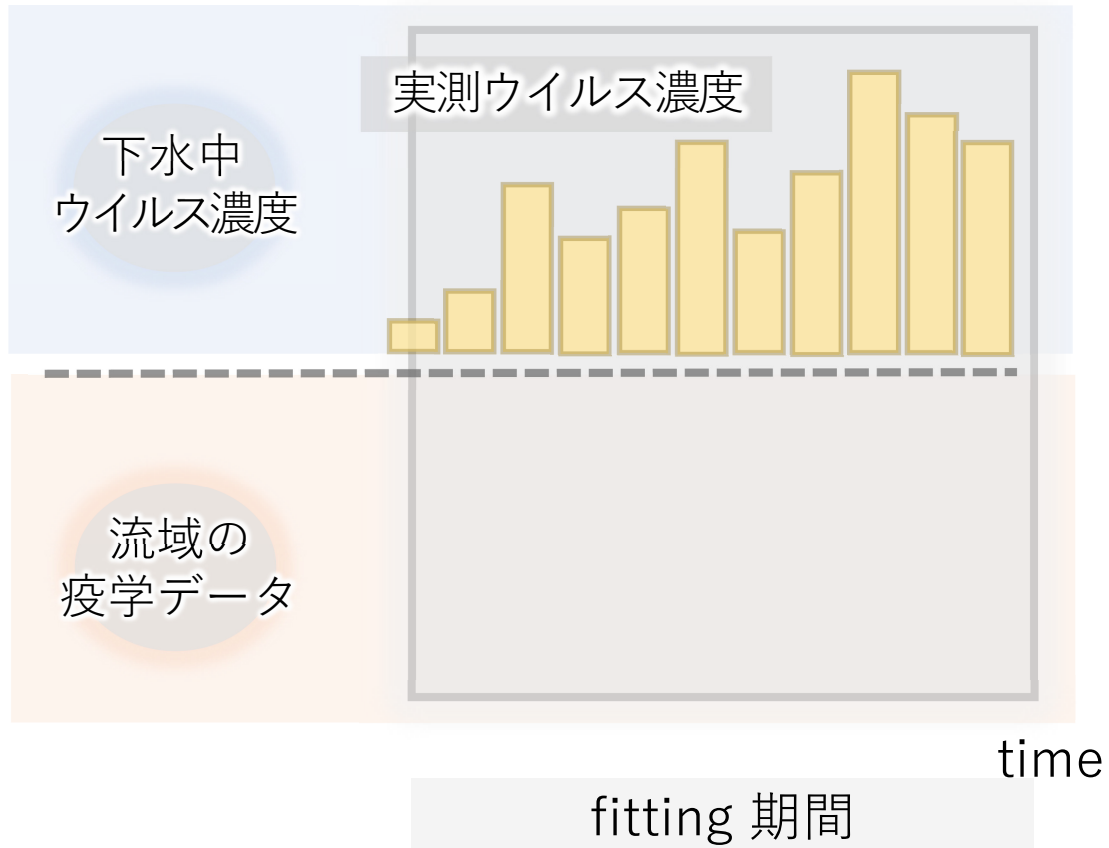


モデルパラメータの推定 → をクリック



手順 2-3. 実測ウイルス濃度データ(fitting期間)の入力

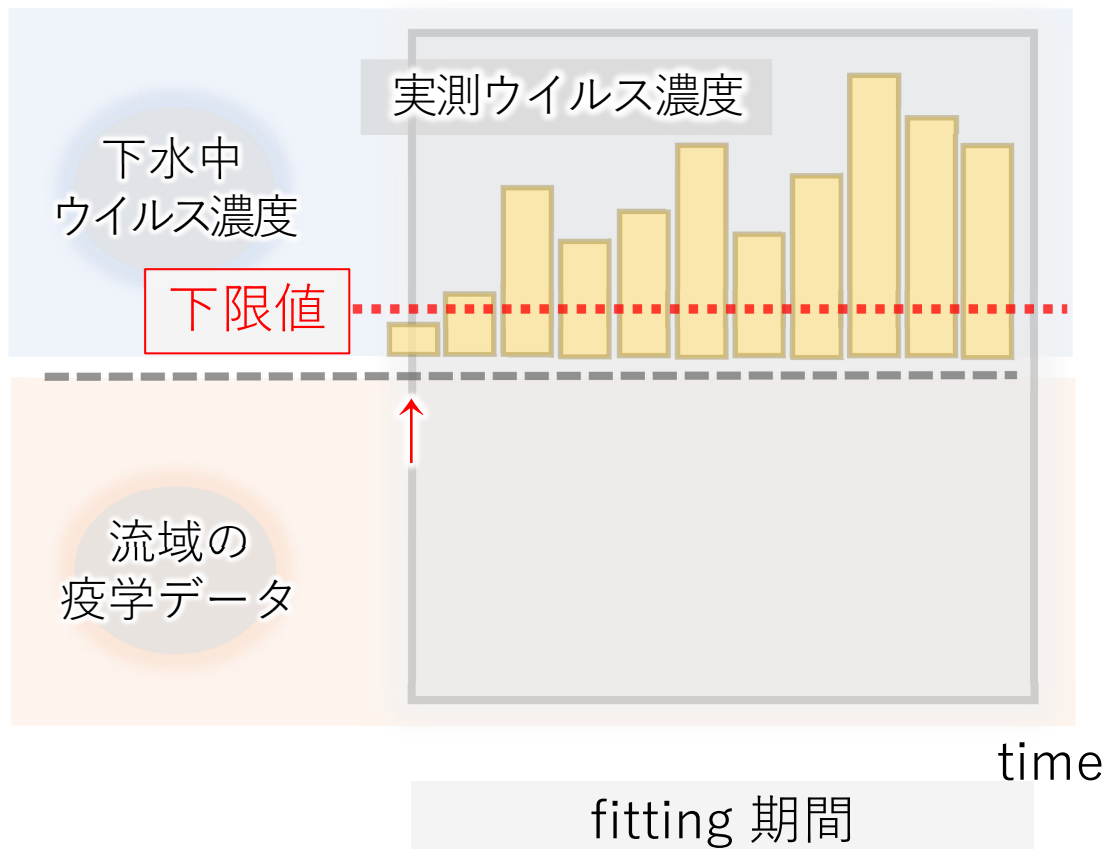
パラメータ推定



- ・ fitting期間実測ウイルス濃度データを入力します.

手順 2-3. 実測ウイルス濃度データ(fitting期間)の入力

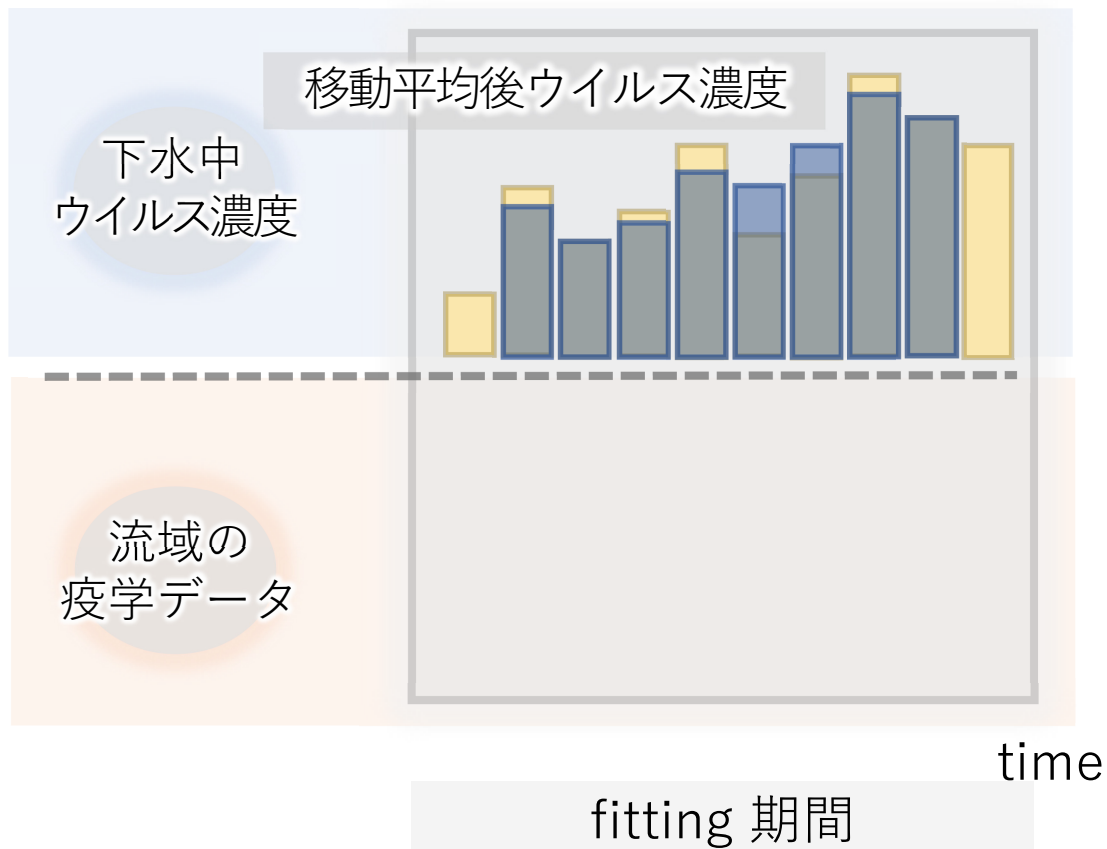
パラメータ推定



- fitting期間実測ウイルス濃度データを入力します.
- 推定に使うウイルス濃度の~~下限値~~を設定します.
→ ~~下限値~~以下のデータは~~除去~~されます.

手順 2-4. 実測ウイルス濃度データ(fitting期間)に移動平均を適用

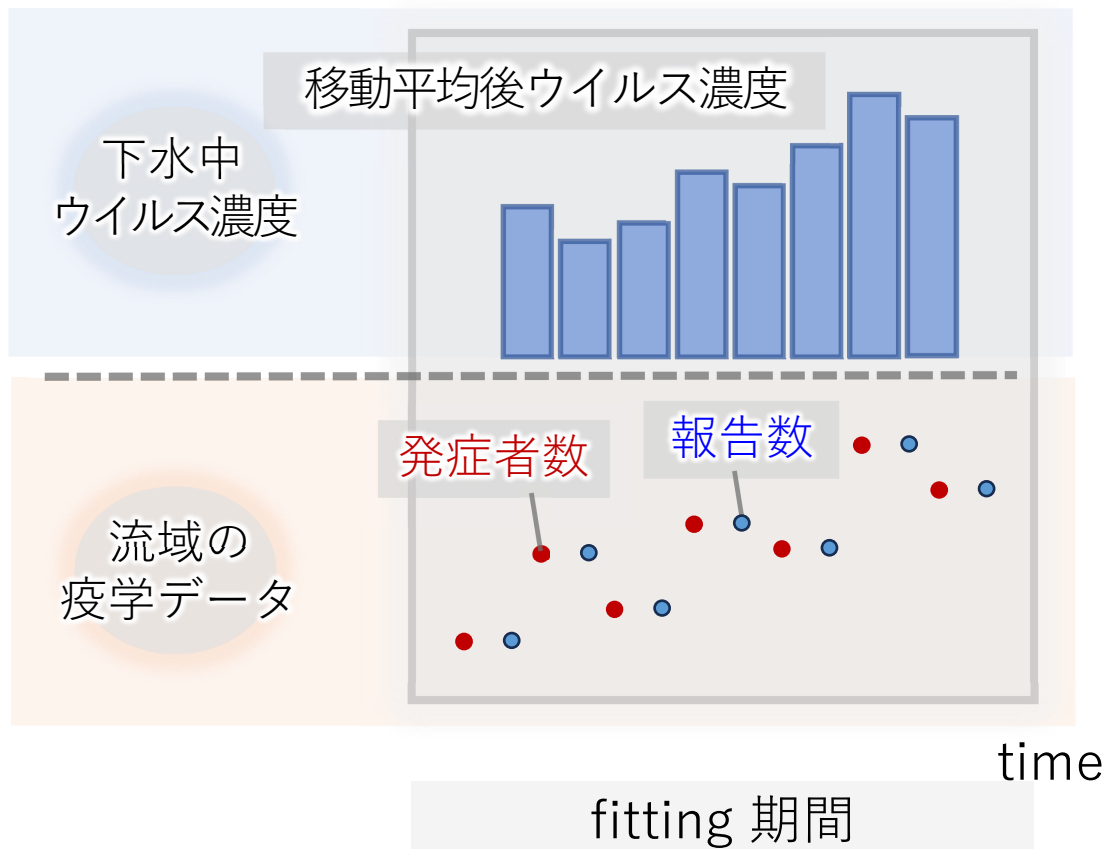
パラメータ推定



- fitting期間実測ウイルス濃度データを入力します.
- 推定に使うウイルス濃度の下限値を設定します.
→ 下限値以下のデータは除去されます.
- 入力された実測ウイルス濃度データに移動平均を適用するか選択できます.
→ 適用しない、3項移動平均、5項移動平均
→ 移動平均を掛けると両端のデータは消えます

手順 2-5. 疫学データ(fitting期間)を入力

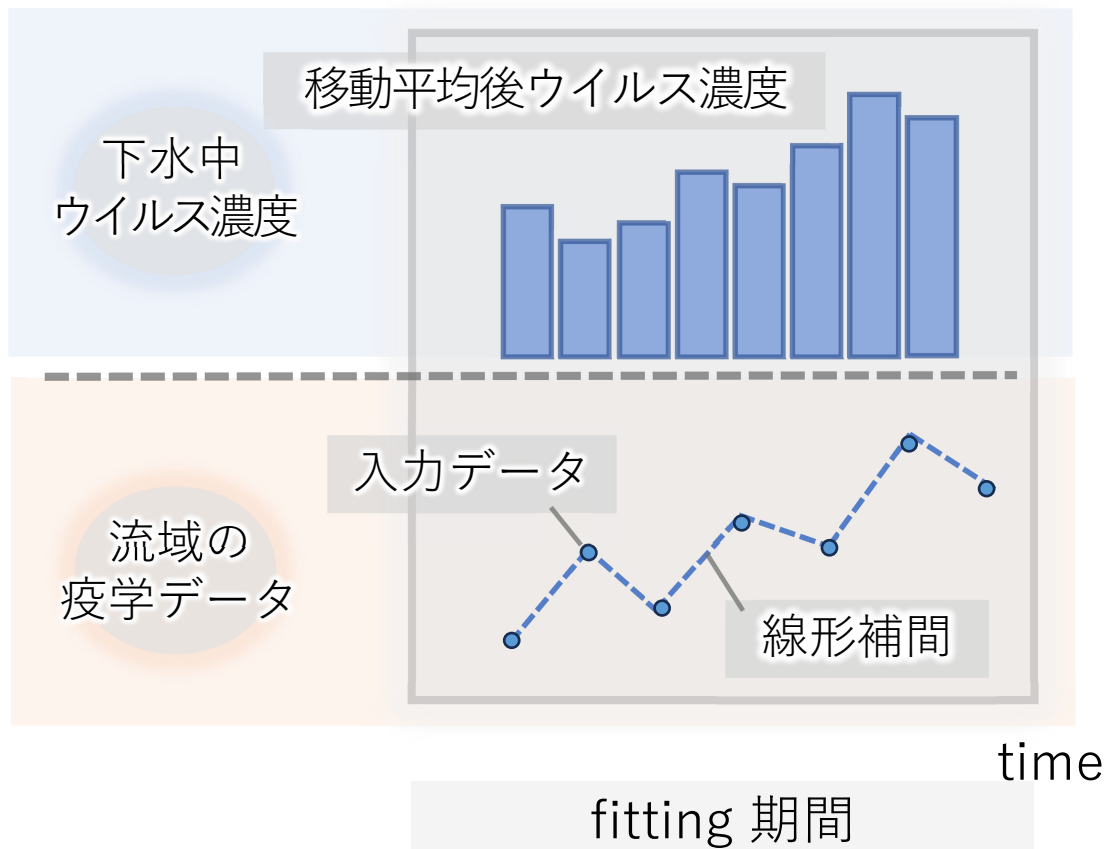
パラメータ推定



- ・ 報告数データ(公表日ベース)の場合は、陽性報告数タグから入力します。
- ・ 旧Her-sysなどの発症日データがある場合は、発症者数タグから入力してください。

手順 2-5. 疫学データ(fitting期間)を入力

パラメータ推定



- ・ 集計入力モードの選択

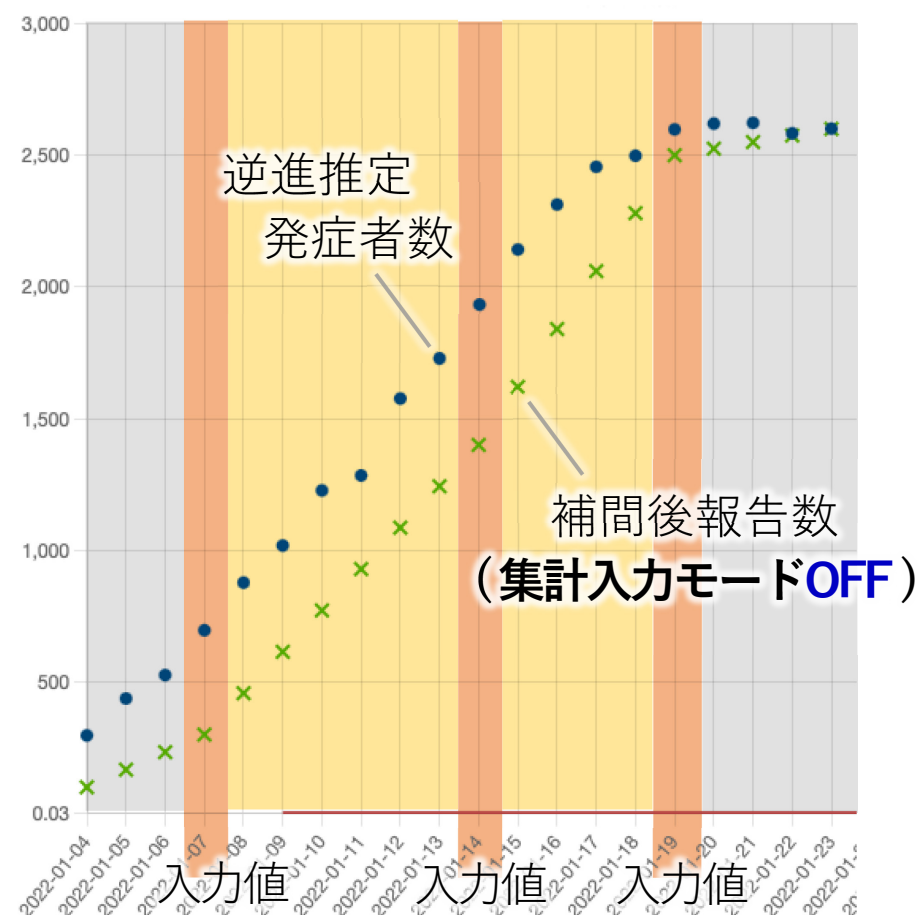
OFFの場合

→ 入力データはそのまま入力され、データ間のブランクは**線形補間**されます。

補足. 集計入力モードOFFの場合

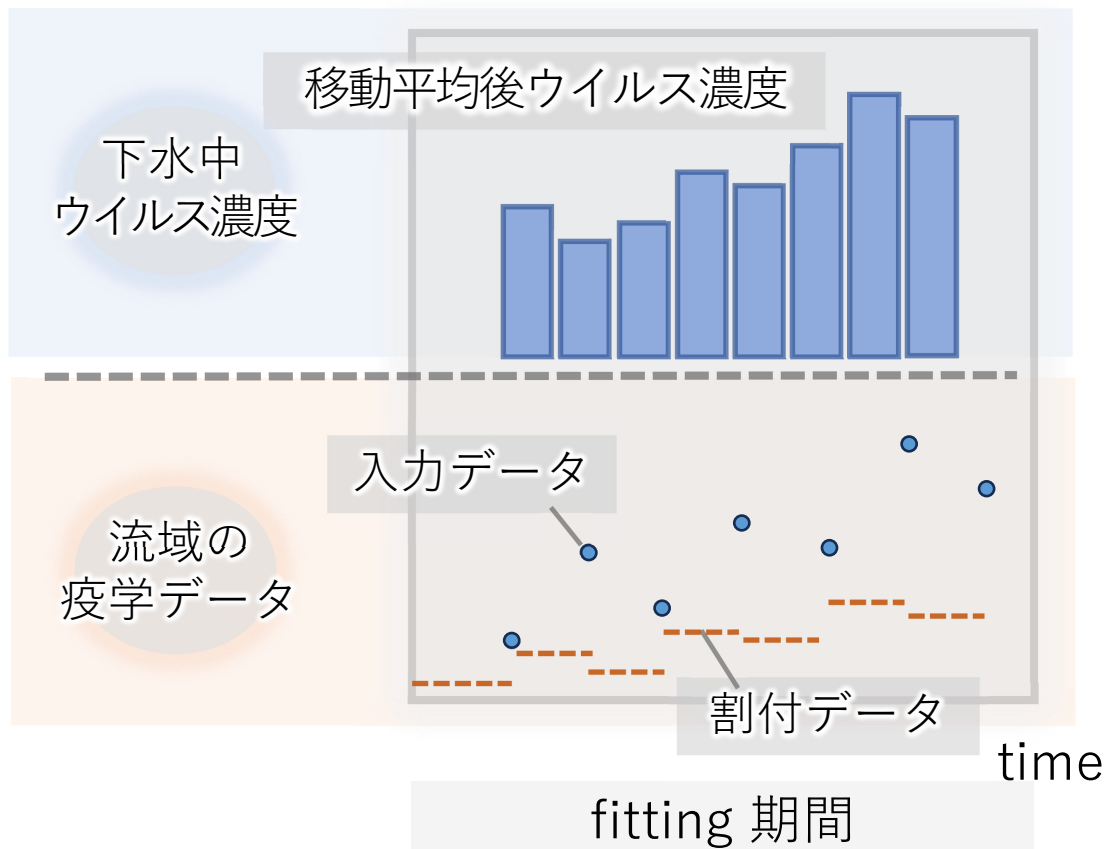
	報告数 日次データ			報告数 補間後データ	
当日分 のみの数値	1月7日	300	線形で 補間	1月7日	300
				1月8日	457
				1月9日	614
データの 欠損期間			線形で 補間	1月10日	771
				1月11日	929
				1月12日	1086
当日分 のみの数値	1月14日	1400	線形で 補間	1月13日	1243
				1月14日	1400
				1月15日	1620
データの 欠損期間			線形で 補間	1月16日	1840
				1月17日	2060
				1月18日	2280
当日分 のみの数値	1月19日	2500		1月19日	2500
				1月20日	
				1月21日	
				1月22日	
				1月23日	

日付に**blank**がある場合、**集計入力モードを切る**と、入力データの間のblankを前後の数値で**線形補間**してblankを埋める入力となります。



手順 2-5. 疫学データ(fitting期間)を入力

パラメータ推定



- ・ 集計入力モードの選択

OFFの場合

→ 入力データはそのまま入力され、データ間のブランクは線形補間されます。

ONの場合

→ 入力値を集計データとみなしてデータ後方(過去)のブランクを含む日数で**均等割**されます。

→ 例えば 1 週間分の報告数をまとめた週次データは**日次データ(1/7の値)に変換**。

→ ブランクが等間隔のインターバルである必要はありません。

補足. 集計入力モード ON の場合

報告数 集計データ		報告数 補間後データ	
		1月6日	100
1月7日	300	1月7日	100
		1月8日	200
		1月9日	200
		1月10日	200
		1月11日	200
		1月12日	200
		1月13日	200
1月14日	1400	1月14日	200
		1月15日	500
		1月16日	500
		1月17日	500
		1月18日	500
1月19日	2500	1月19日	500
		1月20日	
		1月21日	
		1月22日	
		1月23日	

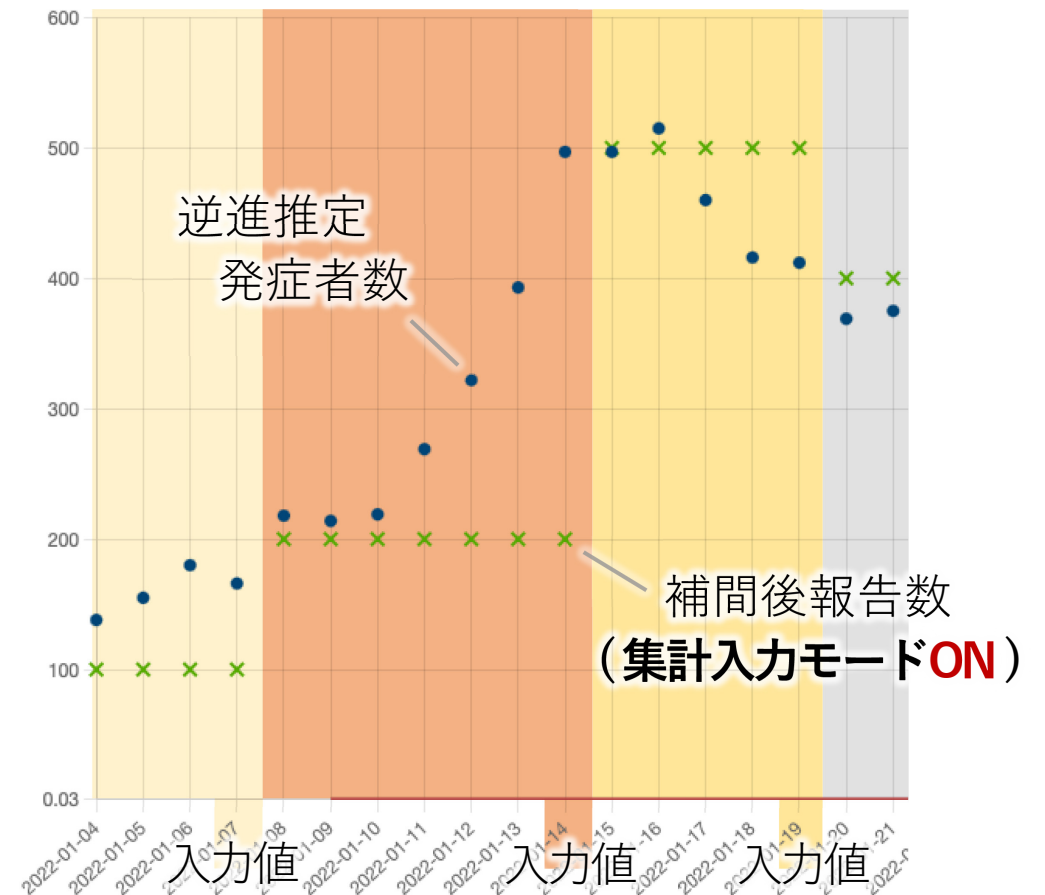
1/7で
均等割

1/5で
均等割

7日分の
合計値

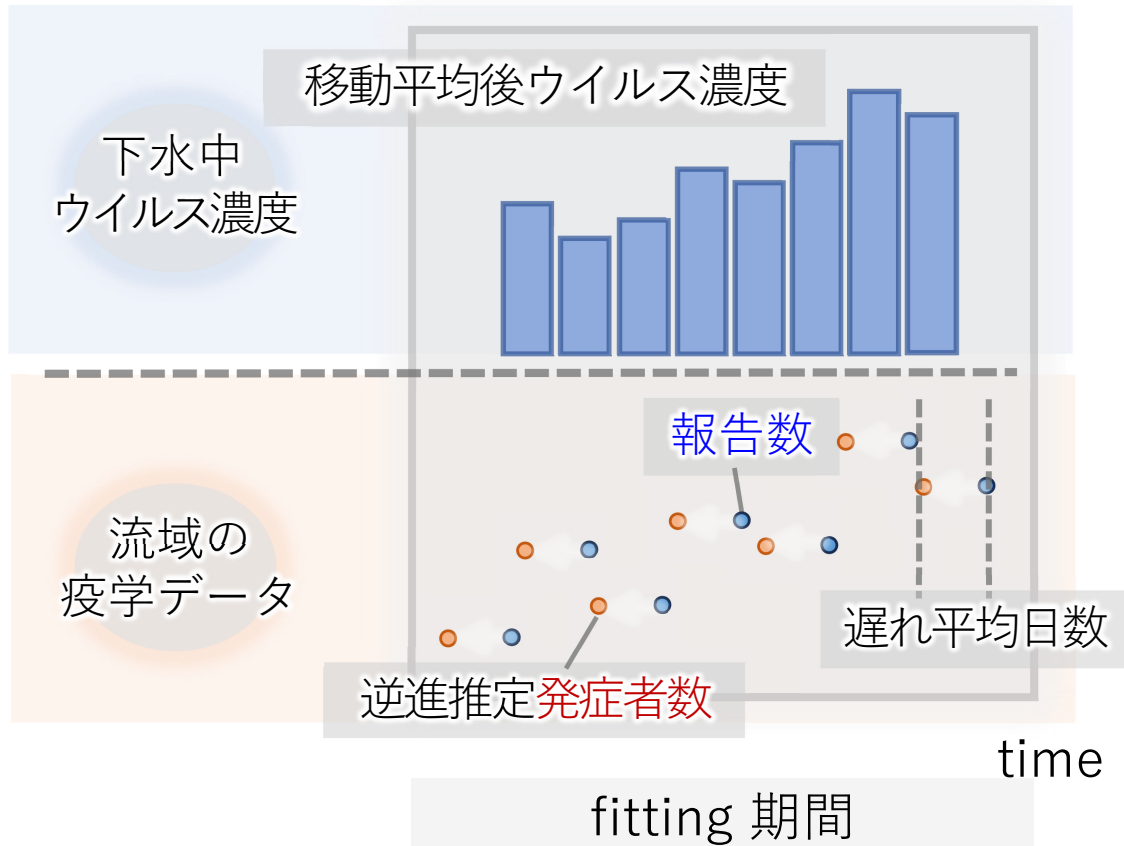
5日分の
合計値

日付に**blank**がある場合、**集計入力モード**を**使う**と、データのblankを含む日数で**数値を均等割**にし、直前のblankを埋める入力を行うことができます。



手順 2-5. 疫学データ(fitting期間)を入力

パラメータ推定



- 報告数→発症者数の**逆進推定パラメータ**の入力
→ 感染者の発症日から報告日への**遅れ平均日数**とその**標準偏差**を入力します。

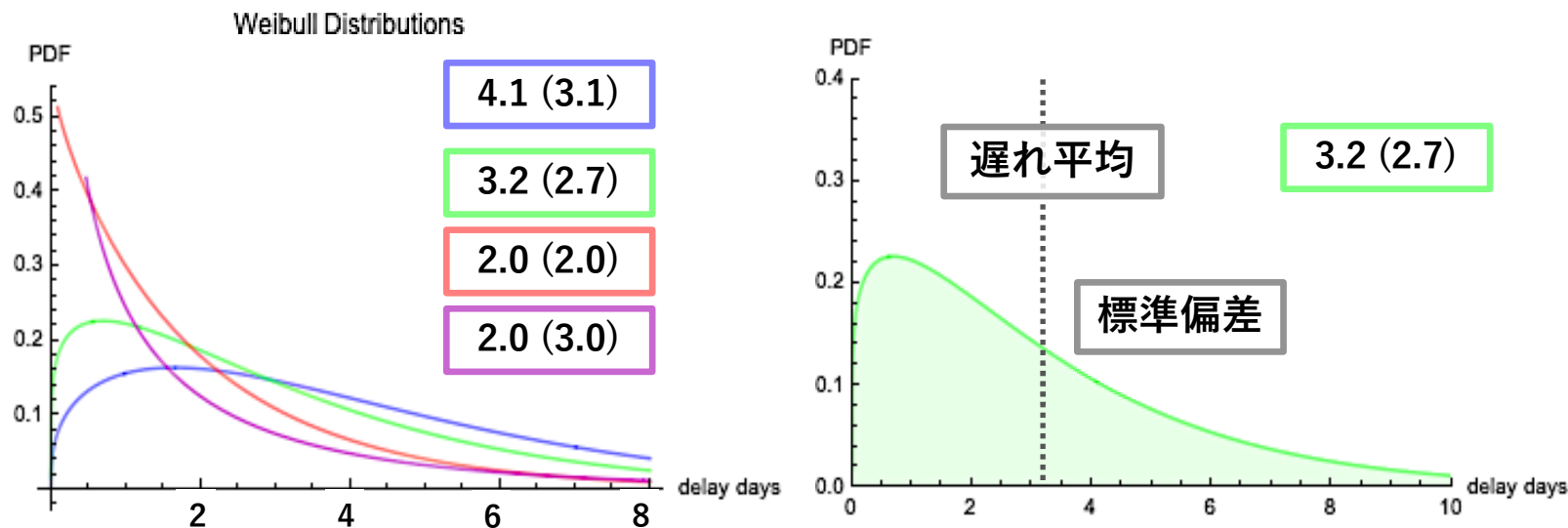
ワイブル分布に従って逆進推定を行い、
発症者数の時系列データが生成されます。

補足. ワイブル分布を用いた逆進推定

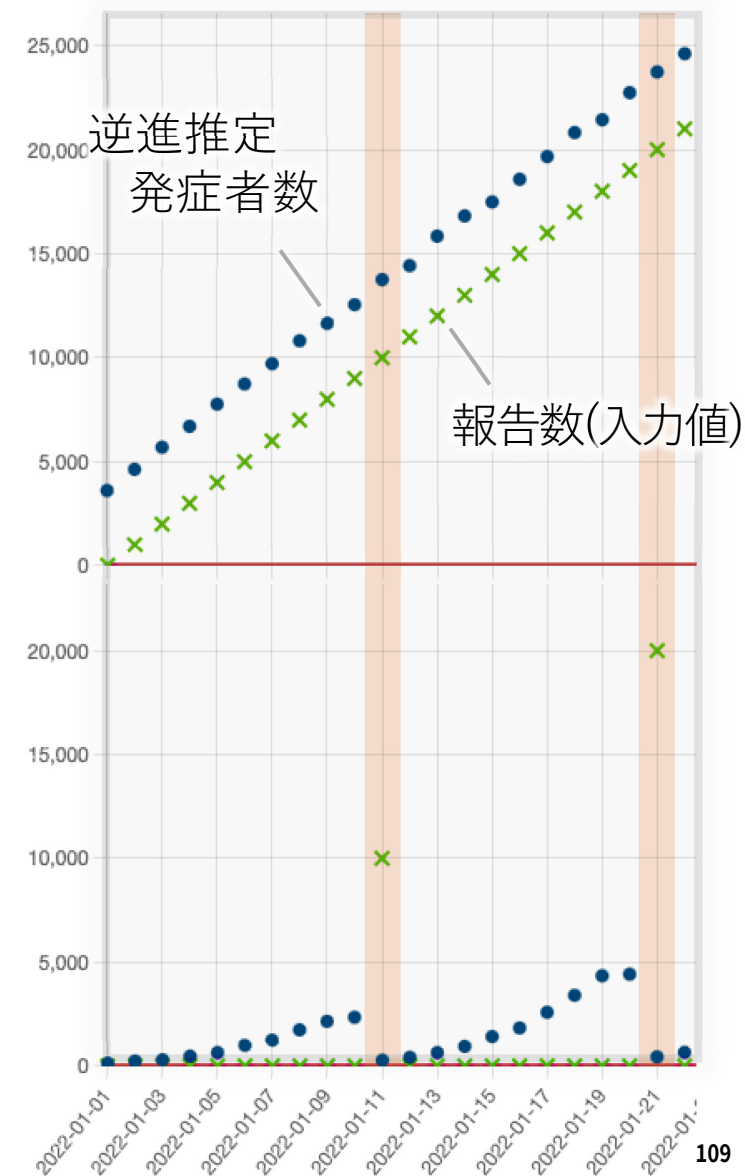
公表日ベースの報告数データから発症日ベースの疫学データを
得るために、**ワイブル分布**を用いた**逆進推定**を行います。

発症から報告までの**遅れ平均日数**と**標準偏差**を逆進推定パラ
メータとして、そのワイブル分布の確率密度に従うモンテカル
ロシミュレーションを行い、報告数を逆進方向へばらします。

連続したデータの場合、遅れ平均日数分だけプロットが逆進方
向に並行移動して見えます。孤立した報告数データでは、逆進
推定発症者数が(左右反転した)ワイブル分布の形状となります。



遅れ平均日数 (標準偏差)
= 3.2 (2.7)



補足. 遅れ平均日数の算出について

右はエクセルで下処理する場合の一例です.

発症日(B列)から**公表日(C列)**を引き算し、**遅れ日数(D列)**を出します.

D列をコピー → 形式を選択してペースト → 数値を選択して**昇降順に並べ替え**たものが**E列**です.

発症日が「調査中」や「空欄」の場合は下部に“#VALUE!”として弾かれ、上部に数値だけが昇降順に並びます. さらに、マイナスの数値や明らかに大きな**外れ値**は使用範囲から外します.

平均値と**標準偏差**の関数を使い、その引数として遅れ日数(**E列**)の適切な数値のみ**範囲指定**します.

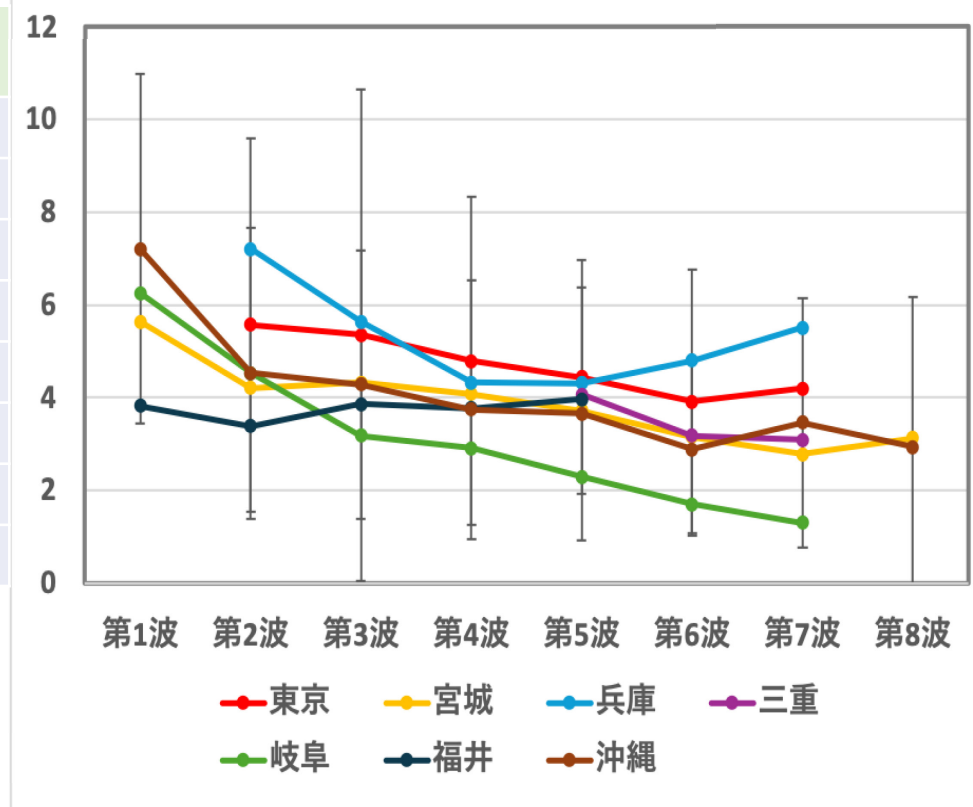
オープンデータを用いて遅れ日数(**E列**)を0～100の範囲で集計した例が次のスライドになります.

	A	B	C	D	E	F
1	No	公表_年月日	発症_年月日	遅れ日数	sorted	
2	888779	9月4日	調査中	#VALUE!	1	
3	888780	9月4日	調査中	#VALUE!	1	
4	888781	9月4日	調査中	#VALUE!	1	
5	888782	9月4日	9月3日	1	1	
6	888783	9月4日	9月2日	2	1	
7	888784	9月4日	9月3日	1	1	
8	888785	9月4日	9月3日	1	1	
9	888786	9月4日	9月3日	1	2	
10	888787	9月5日	調査中	#VALUE!	2	
11	888788	9月5日	調査中	#VALUE!	2	
12	888789	9月5日	調査中	#VALUE!	2	
13	888790	9月5日	9月2日	3	2	
14	888791	9月5日	9月4日	1	2	
15	888792	9月5日	9月2日	3	3	
16	888793	9月5日	9月3日	2	3	
17	888794	9月5日	9月1日	4	3	
18	888795	9月6日	8月27日	10	4	
19	888796	9月6日	9月5日	1	4	
20	888797	9月6日	9月4日	2	5	
21	888798	9月6日	調査中	#VALUE!	10	
22	888799	9月6日	8月22日	15	15	
23	888800	9月6日	9月2日	4	#VALUE!	
24	888801	9月6日	9月4日	2	#VALUE!	
25	888802	9月6日	9月1日	5	#VALUE!	
26	888803	9月6日	調査中	#VALUE!	#VALUE!	
27	888804	9月6日	9月5日	1	#VALUE!	
28	888805	9月6日	9月3日	3	#VALUE!	
29	888806	9月6日	9月4日	2	#VALUE!	
30	888807	9月6日	9月4日	2	#VALUE!	

補足. 県ごとの遅れ平均日数と標準偏差

都県のオープンデータを基にした流行波ごとの遅れ平均日数(標準偏差日数)

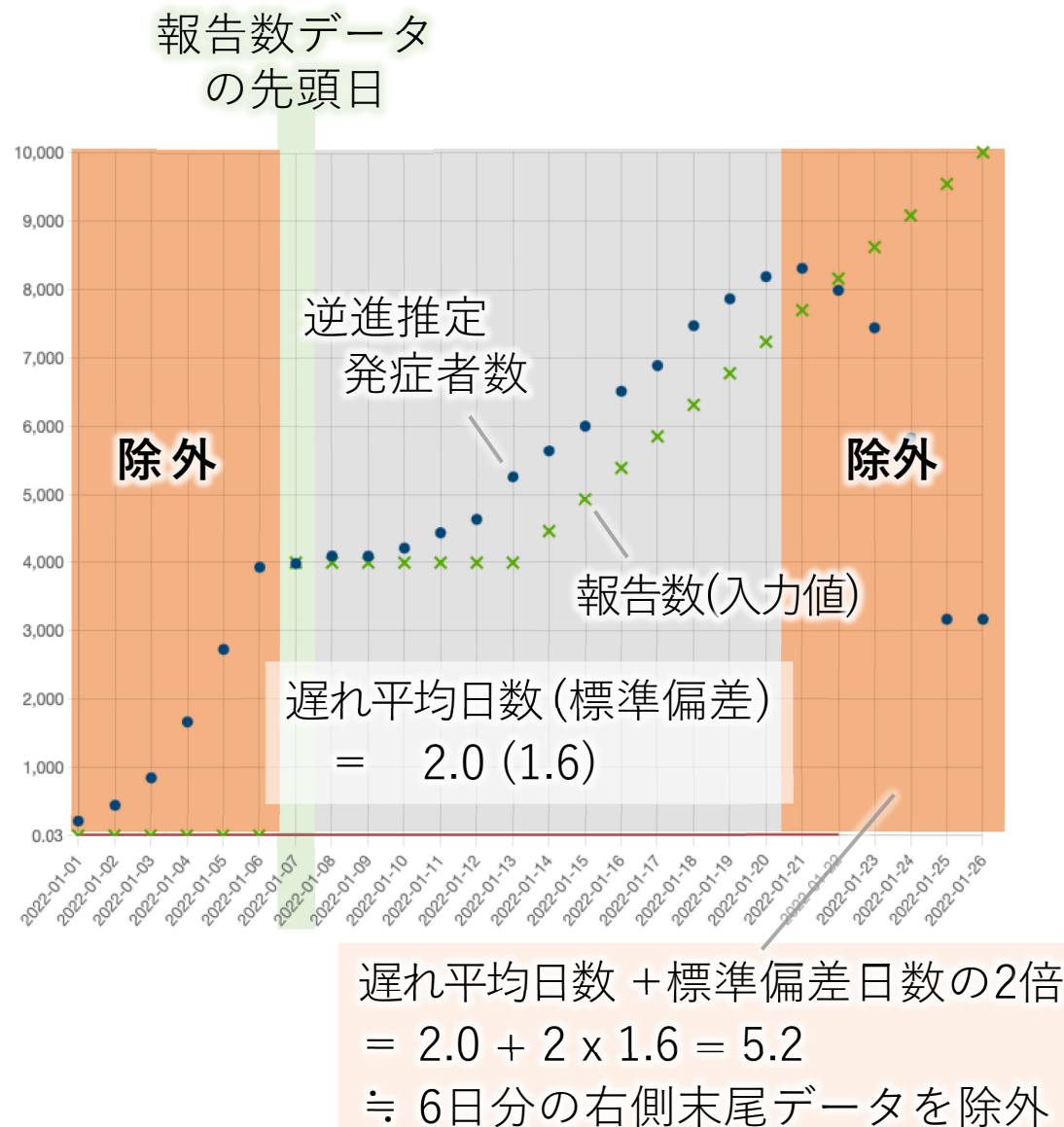
	東京	宮城	兵庫	三重	岐阜	福井	沖縄
第1波		5.63 (3.14)			6.25 (3.74)	3.82 (2.86)	7.21 (3.77)
第2波	5.57 (4.38)	4.21 (3.52)	7.20 (4.28)		4.52 (3.19)	3.38 (2.35)	4.52 (3.15)
第3波	5.35 (4.03)	4.32 (3.39)	5.63 (3.26)		3.17 (3.02)	3.86 (1.73)	4.28 (2.89)
第4波	4.79 (5.31)	4.07 (2.91)	4.31 (3.06)		2.91 (2.82)	3.77 (1.77)	3.74 (2.79)
第5波	4.44 (3.53)	3.71 (2.41)	4.31 (2.58)	4.06 (2.31)	2.28 (2.24)	3.96 (2.18)	3.65 (2.73)
第6波	3.91 (2.52)	3.15 (1.84)	4.79 (3.82)	3.18 (1.66)	1.70 (1.66)		2.88 (1.87)
第7波	4.19 (2.85)	2.78 (1.67)	5.51 (3.59)	3.08 (2.00)	1.29 (1.24)		3.46 (2.69)
第8波		3.12 (2.79)					2.93 (3.25)



期間の定義	
第1波	2020-02-01 ~ 2020-06-30
第2波	2020-07-01 ~ 2020-10-31
第3波	2020-11-01 ~ 2021-02-28
第4波	2021-03-01 ~ 2021-06-30
第5波	2021-07-01 ~ 2021-12-31
第6波	2022-01-01 ~ 2022-06-30
第7波	2022-07-01 ~ 2022-09-30
第8波	2022-10-01 ~

県や流行波ごとに固有の遅れ日数となっております。
波を追うごとに遅れ日数が縮小する傾向はありますが、
全国的な標準値があるわけではないようです。

補足. 逆進推定発症者数データの末端の扱い



逆進推定の原理上、**データの新しい側の末端**では、**発症者数を正確に推定できません。**
(まだ報告されていない発症者が多くなるため)

左図のように、右端のデータ領域(橙色部分)は明らかに**少ない値**となっており、正しく逆進推定されている発症者数のデータ領域は全体的に報告数のおおよそ真左にずれています。

COVIVISでは、この**右側末尾は自動的に除外**されますのでご注意ください。除外範囲は「**遅れ平均 + 標準偏差の2倍**」を整数で繰り上げた日数となります。

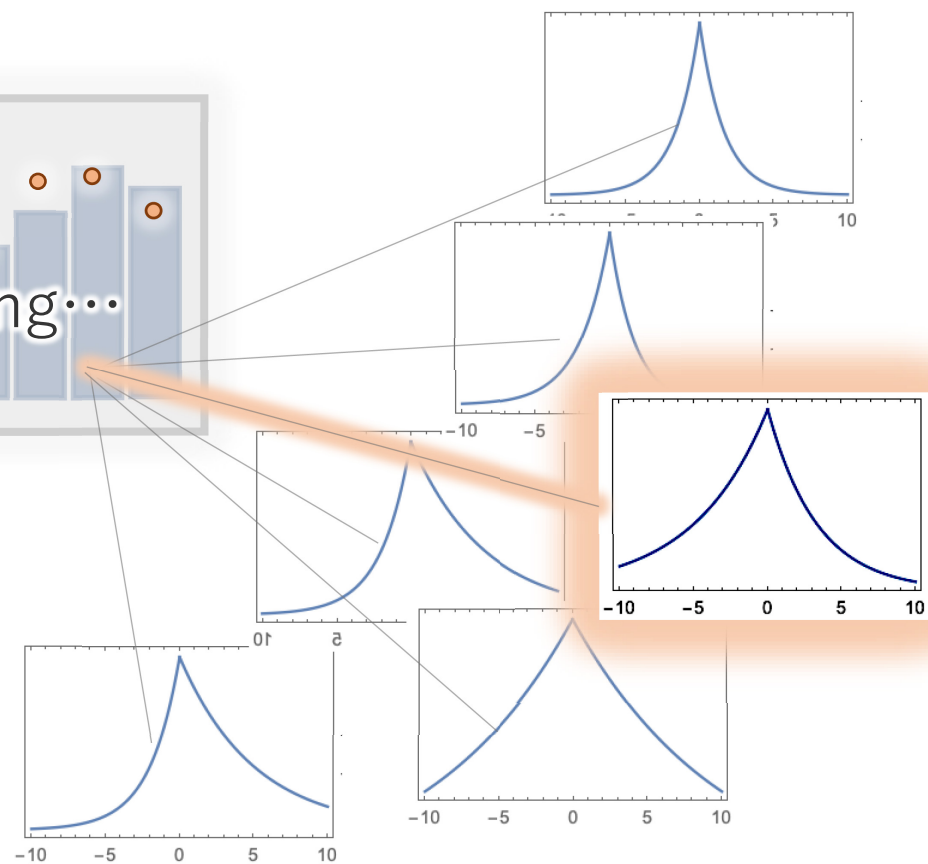
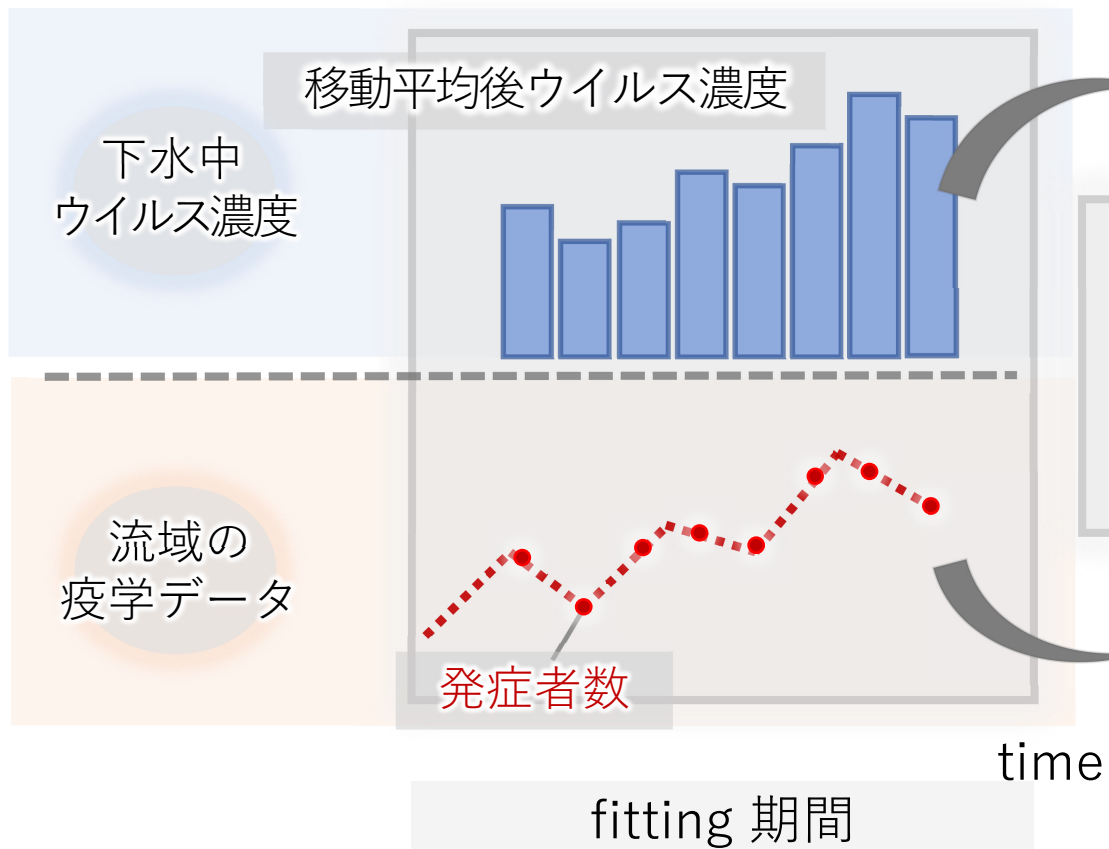
ウイルス濃度データが除外範囲にならないように、**報告数データは長い目**に入力してしてください。

一方、逆進推定発症者数データの**左側末端(最も過去)**は、**報告数データの先頭日**を境に除外されます。

手順 2-6～3-1. モデルパラメータ推定の実行

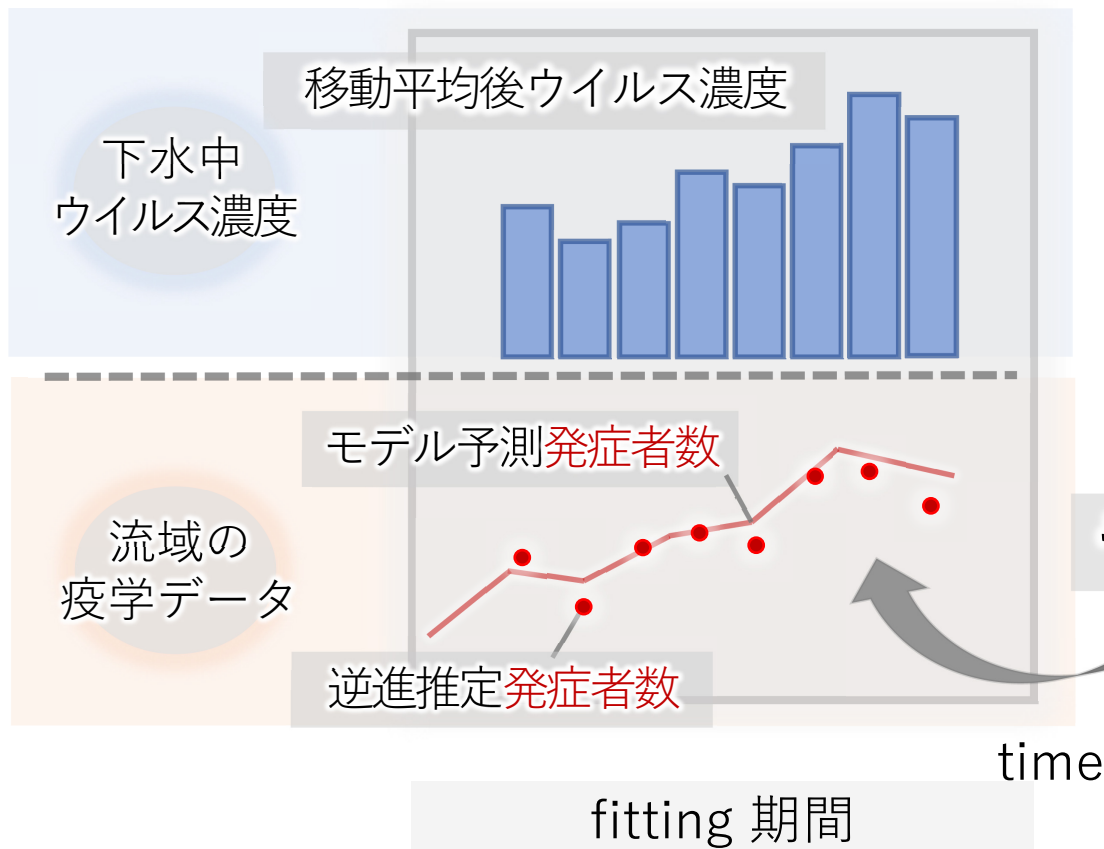
パラメータ推定

- ・ウイルス濃度と発症者数が最も一致する
モデルパラメータを推定します。

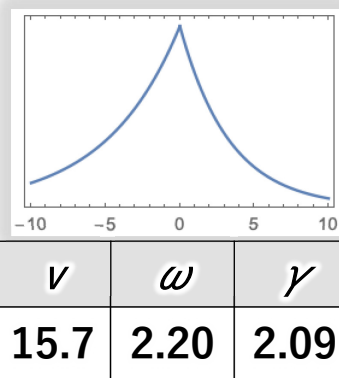


手順 2-6～3-1. モデルパラメータ推定の実行

パラメータ推定



- ・ ウイルス濃度と発症者数を最もフィッティングさせるモデルパラメータを推定します。



モデルパラメータ

逆進推定発症者数

報告数をワイブル分布に従って逆進させたもの

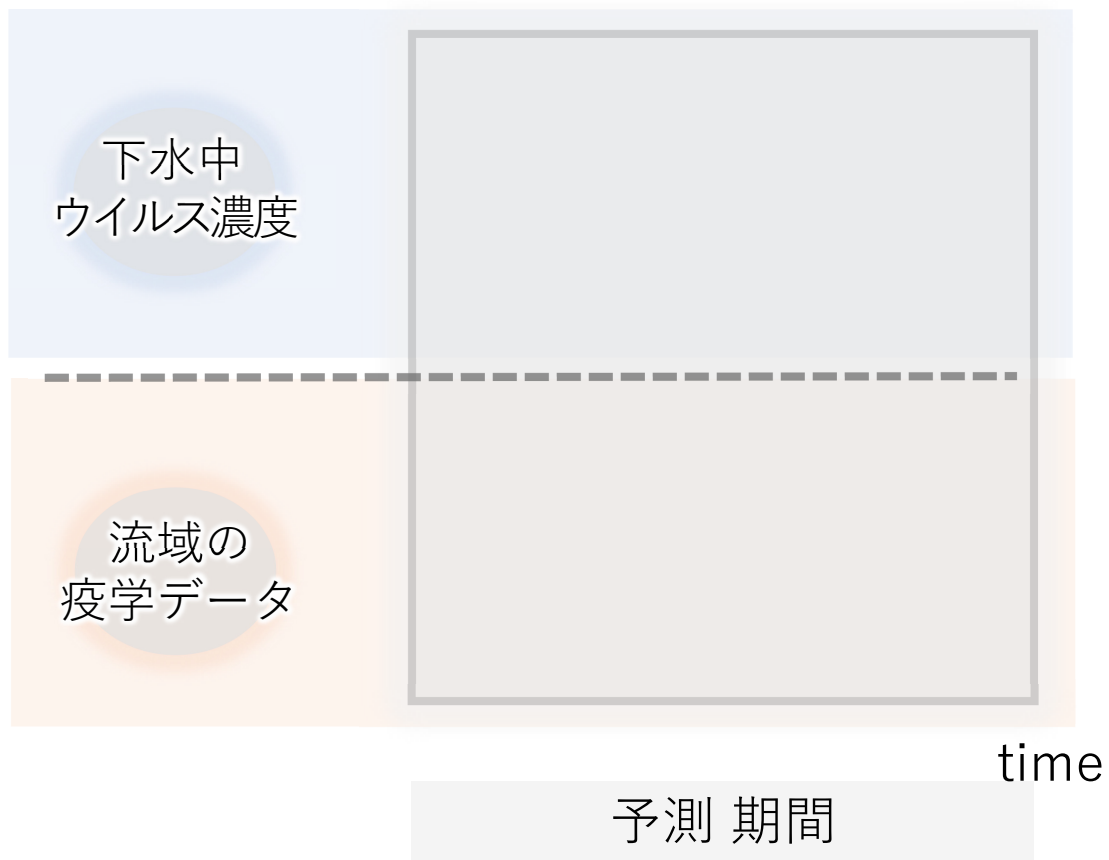
モデル予測発症者数

モデルによって下水中ウイルス濃度から予測されたもの

- ・ ウイルス濃度と推定したモデルパラメータからモデル予測された発症者数の時系列データも合わせて出力されます。

手順 4-1～4-4. 発症者数の予測をする

発症者数予測



発症者数の予測→をクリック



手順 4-1～4-4. 発症者数の予測をする

発症者数予測

モデルパラメータ

ν	ω	γ
15.7	2.20	2.09

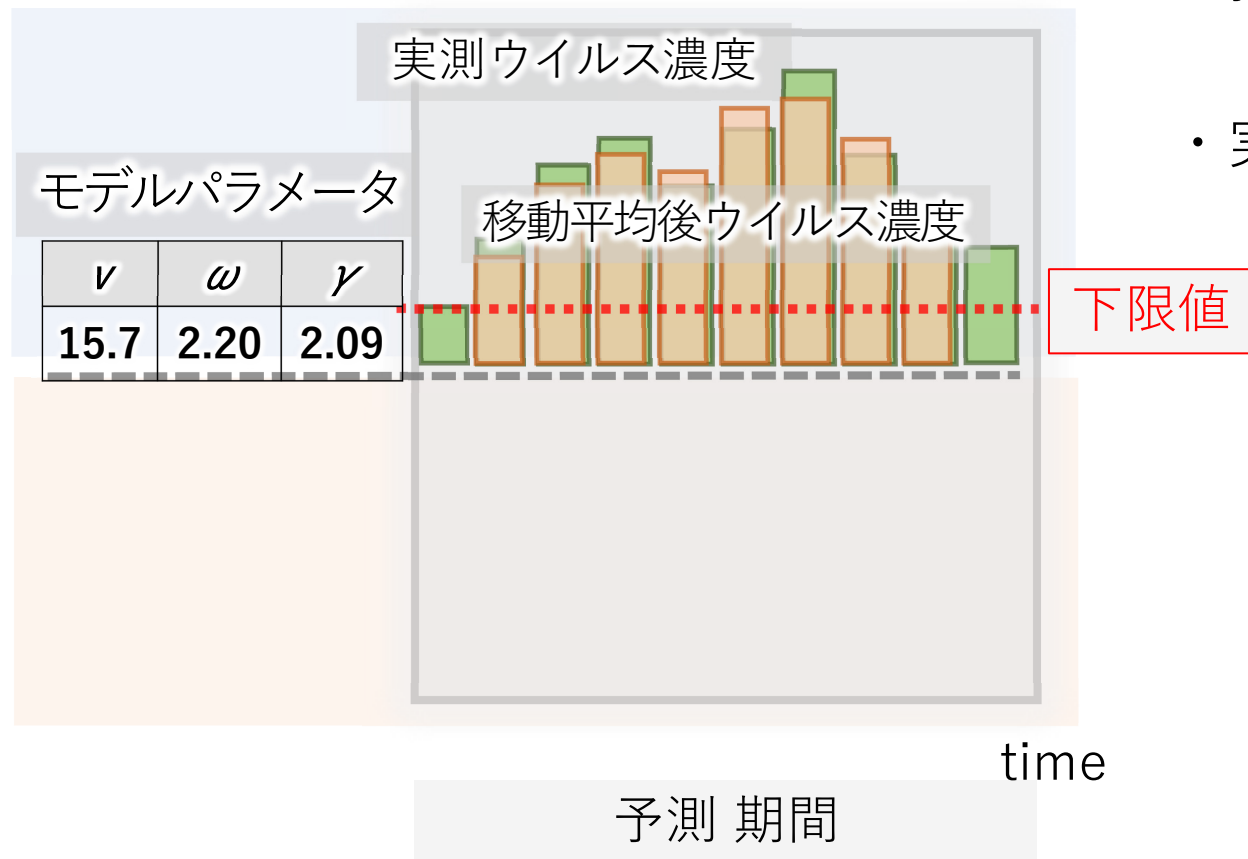
time

予測 期間

- ・ 推定と同じモデルを選択し、
モデルパラメータを入力します.

手順 4-1～4-4. 発症者数の予測をする

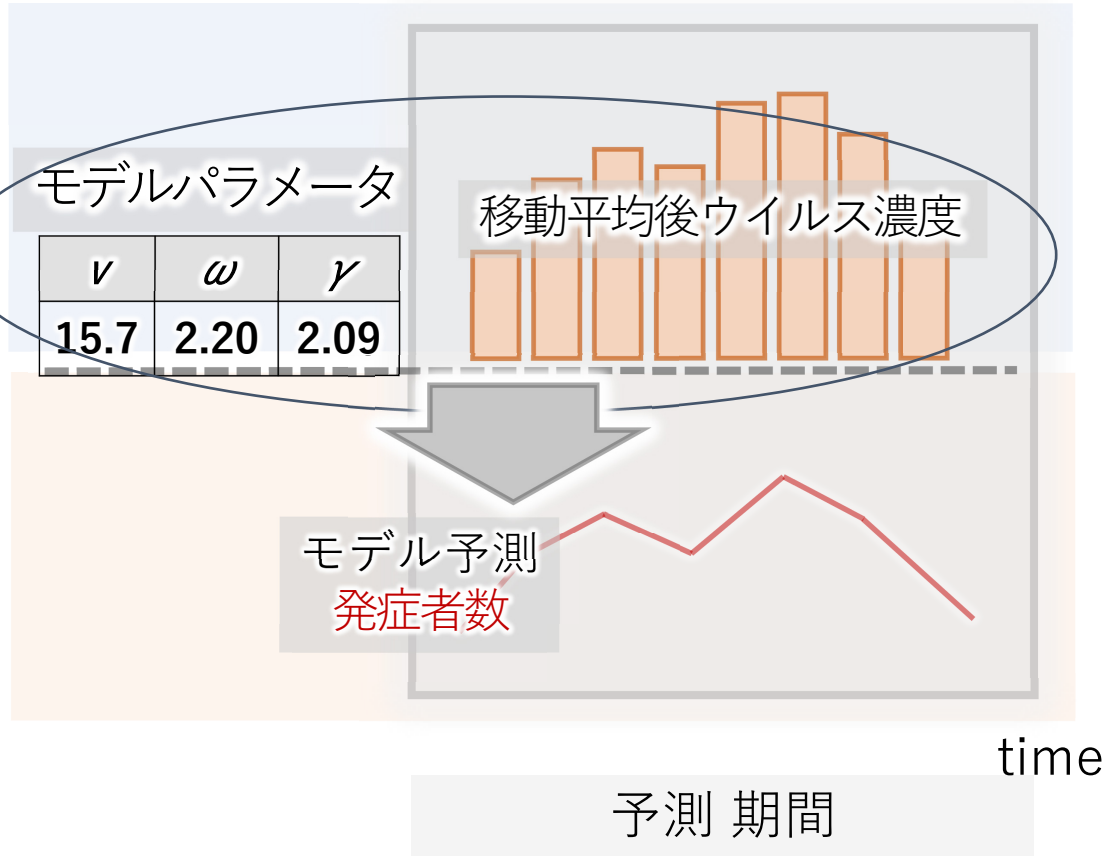
発症者数予測



- ・ 推定と同じモデルを選択し、
モデルパラメータを入力します.
- ・ 実測ウイルス濃度データを入力し、
ウイルス濃度下限値、移動平均の設定をします.

手順 4-1～4-4. 発症者数の予測をする

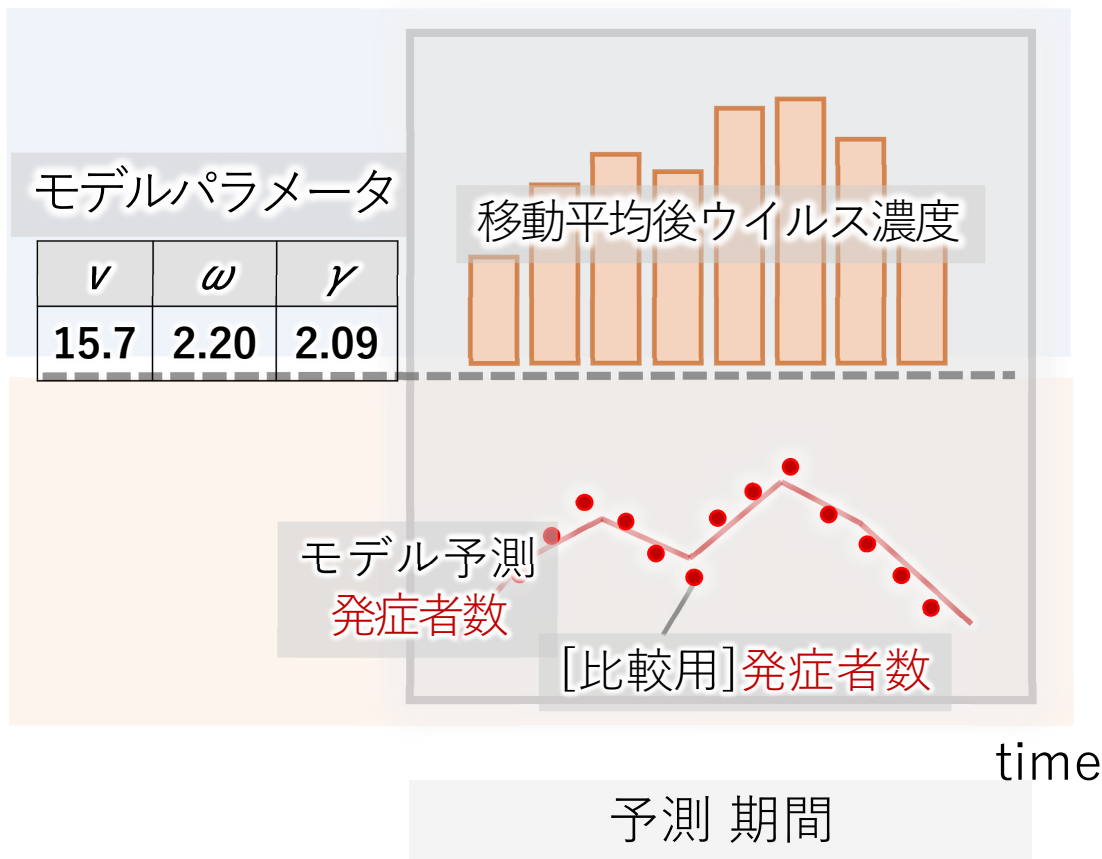
発症者数予測



- ・ 推定と同じモデルを選択し、
モデルパラメータを入力します。
- ・ 実測ウイルス濃度データを入力し、
ウイルス濃度下限値、移動平均の設定をします。
- ・ モデル予測発症者数(予測期間)を出力します。

手順 4-1～4-4. 発症者数の予測をする

発症者数予測

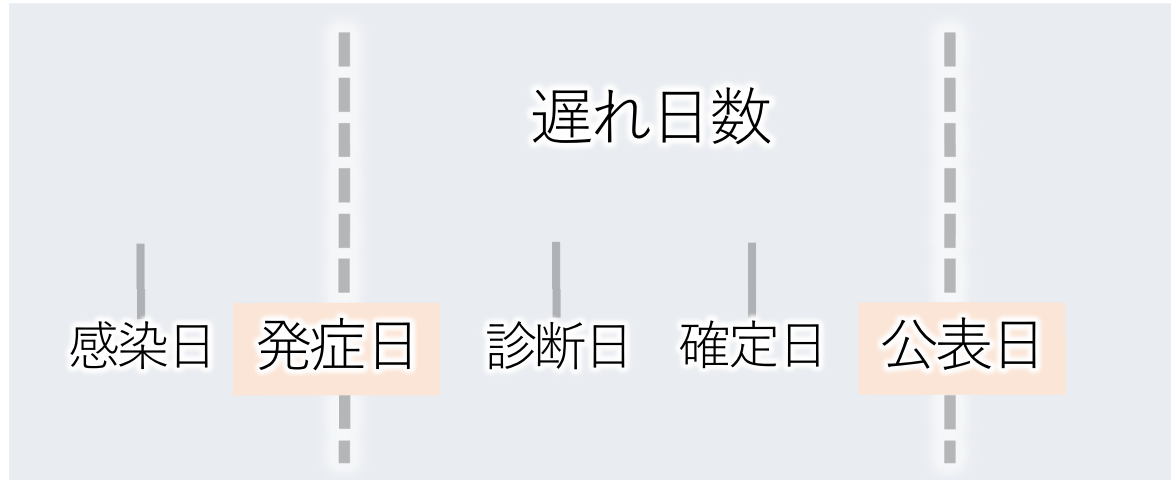


- ・ 推定と同じモデルを選択し、
モデルパラメータを入力します。
- ・ 実測ウイルス濃度データを入力し、
ウイルス濃度下限値、移動平均の設定をします。
- ・ モデル予測発症者数(予測期間)を出力します。
- ・ モデル予測と実際の発症者数を比較したい時は、
追加で予測期間報告数/発症者数データを入力可能。

(※ 詳細は手順 2 を参照)

補足. 報告数データの扱いについて

上記のように、COVIVISでは採水日ベースの下水中ウイルス濃度データと発症日ベースの疫学データをフィッティングします。



COVIVISでは、報告数データに発症日から公表日までの遅れ平均日数とその標準偏差を設定することで、その地域、その流行時期ごとの発症日ベースの疫学データとして解析に使用することができます。

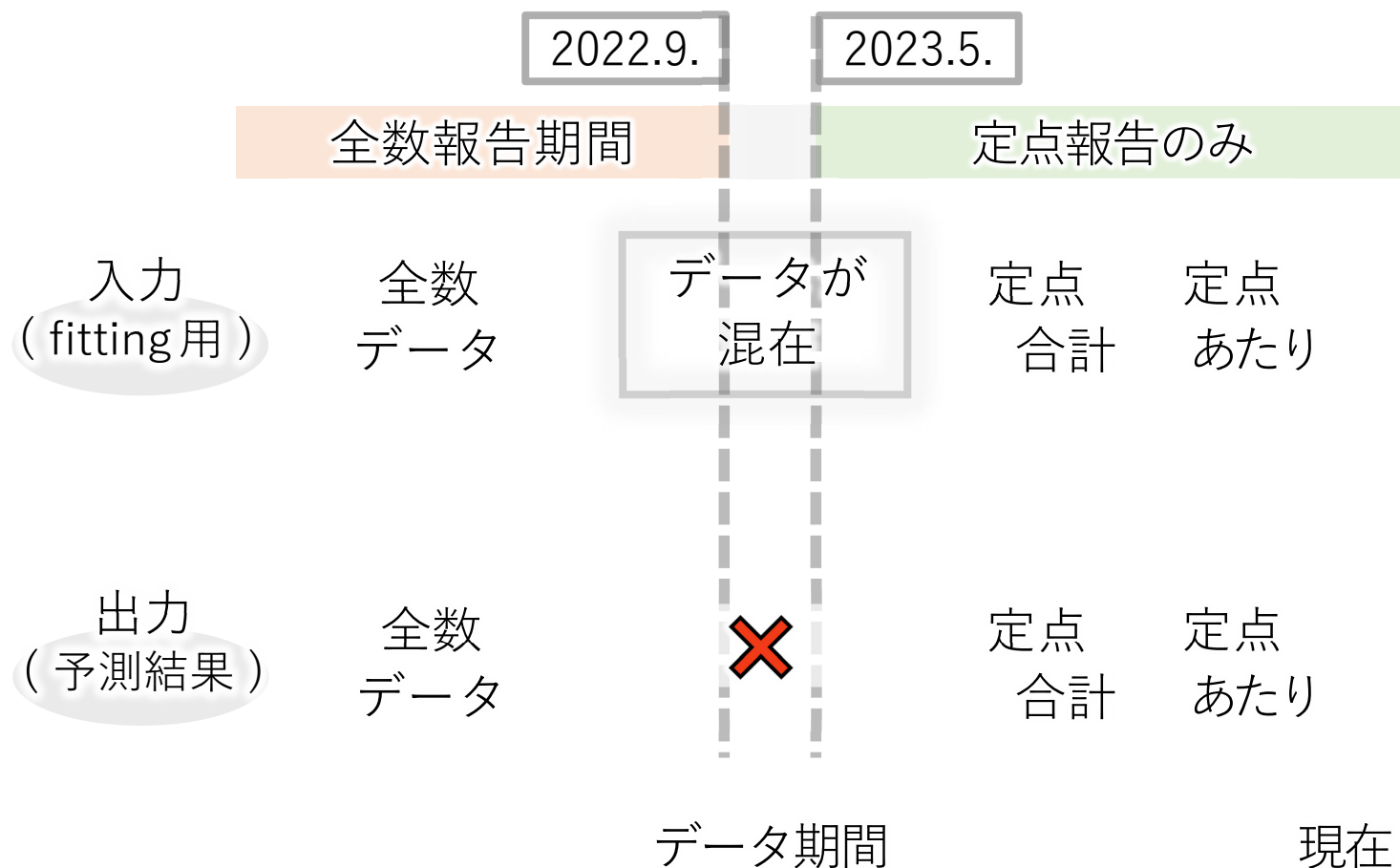
感染者数に関連する日付は多く、定義が曖昧なデータも散見されます。使用する疫学データの日付が何を指し示しているのかご注意ください。ほとんどの疫学データは、公表日をベースに陽性報告数を集計しています。

旧Her-sys等のデータを利用する際には、発症日で集計したデータが十分なサンプルサイズであれば、発症日データを直接入力すれば良いです。操作マニュアル2-5)参照

ただし、旧Her-sysにおいて発症日が判明しているデータは全体の半分程度です。期間によっては発症日がほぼ空欄の場合もあります。また、定点報告データには発症日の属性データはありません。

これらの場合、報告数データから発症日を逆進推定する必要があります。

補足. 全数データと定点データについて



データの時期によって**全数報告**か**定点報告**か種類が異なります。

COVIVISでは、**どのデータの種類のでも使用可能**です。同じように入力してください。

ただし、全数データで推定したモデルパラメータで予測すると、全数換算での発症者数が出ます。定点あたりデータで推定したパラメータでは定点あたり換算の発症者数の予測となります。

また、**全数期間と定点期間を跨ぐデータ**を使用する場合はデータの統一か変換が必要
Q.13, Q.14を参照

補足. 週次集計の定点データの扱い

定点報告数 実際の日次データ			定点報告数 公表データ			定点報告数 集計入力モード	
月曜日	70		月曜日			月曜日	100
火曜日	90		火曜日			火曜日	100
水曜日	100		水曜日			水曜日	100
木曜日	110		木曜日			木曜日	100
金曜日	130		金曜日			金曜日	100
土曜日	110		土曜日			土曜日	100
日曜日	90		日曜日	700		日曜日	100
月曜日			月曜日			月曜日	
火曜日			火曜日			火曜日	
水曜日			水曜日	700		水曜日	
木曜日			木曜日			木曜日	
金曜日			金曜日			金曜日	
土曜日			土曜日			土曜日	
日曜日			日曜日			日曜日	

日付を
付け替え

1週間分
を均等割

1週間の合計数が
次の週に公表される

報告日

公表日

定点報告データは、公表日の前の週の1週間分の報告数の合計となっています。（これをここでは週次集計データと呼びます）

つまり公表日ベースでは数日以上遅れた日付として紐づいています。そのため、週次集計データの報告日の代表日として公表日の前の週の最終日(日曜日)の日付に付け直してデータを整理してください。

このような日付設定をしておくと、集計入力モード(操作マニュアル手順2-5参照)が正しく処理されます。

資料 2

COVIVIS β 版1.0.0. 操作マニュアル ver.4.5 (随時改訂します up 2024.4.11)

次の手順1から手順6まで、上から順に操作を進めてください。

COVIVIS解析ツールは操作マニュアルなしでも各フォームを上から順に入力すれば解析結果が得られます。

不明な点が出た際に本マニュアルをご参照ください。

また、「COVIVIS解説資料」のページも併せてご一読ください。

手順1. ログインする

最初にCOVIVISのアドレスを開くとログインアドレスとパスワードが訊かれます。アカウント用メールアドレスとパスワードを入力し、ログインを完了してください。ヘッダーメニュー右端のアカウント名タグからログアウトできます。また、プロフィールタグを選択すると、プロフィールの確認と編集ページへのリンクへ飛びます。

※ COVIVIS解析ツールの使用にはアカウントの取得が必要です。

COVIVIS基本方針第5条を参照の上、対象の方はアカウント発行を受けてください。

また、同様の解析ができるRコードをオープンソースで公開しております。そちらもご利用ください。

手順2. モデルパラメータを推定する

2-1) 「モデルパラメータの推定→」をクリック

Topページ、もしくはヘッダメニューの「予測する」タグにある「モデルパラメータの推定」ボタンを押します。

パラメータ推定をしない場合は手順4へ。

2-2) 推定モデルの選択

「疫学モデル(推奨)」と「回帰モデル」のどちらかを選択します。

・疫学モデルは3つのパラメータ(v , ウイルス検出量/人、 ω , 発症率/日、 γ , 回復率/日)

・回帰モデルは2つのパラメータ(a , 傾き、 b , 切片)を有します。

資料 2

※ 詳細は手順3-1)参照。疫学モデルの方が細かい推定が可能です。

2-3) 実測ウイルス濃度データ(fitting期間)の入力

①入力方法を選びます。

▷ファイル入力の場合

「ファイル入力」の欄にチェックを入れ、「ファイルを選択」を押します。

次にディレクトリ(フォルダ)から入力ファイルを指定し、「アップロード」を押します。

ファイル形式は .csvと.tsvが対応。

※ ファイル内のデータのフォーマットは以下の「テキスト入力の場合」を参照。

▷テキスト入力の場合

「テキスト入力」の欄にチェックを入れ、デモ用のテキスト情報を消去し、入力データをテキストボックスへコピー&ペーストします。

データのフォーマットは、日付データと数値データの2カラムが必要です。

日付フォーマットはyyyy-mm-ddまたはyyyy/mm/ddとなります。(※日付にピリオド区切りは使えません)

区切りはスペース、コンマ、タブのいずれでも対応できます。ただし、複数の区切りが混在している場合はエラーとなります。

一行目に文字データや一列目に番号などが振られていても、自動で除外されます。

また、測定日が一定間隔である必要はなく、欠損している期間も自動で補間されます。

▷デモデータを入力する場合

デモンストレーション用に架空のウイルス濃度データを入力できます。

ファイル選択ボタンの右横にあるボックスにチェックを入れてください。

②ウイルス濃度下限値を入力します。

ウイルス濃度下限値を設定すると、下限値よりも低い値は入力データから除外されます。

○「有効データ行数」は入力データとして読み取れた行数を表しています。

エラー表示が出たり有効データ数が少なく表示される場合は、区切りやファイルのフォーマットに問題がある可能性があります。

特にコピー & ペーストでテキスト入力した際に、日付と数値のカラムの間に区切りが2つ以上入ってしまうとエラーの原因になります。

テキスト入力は使いやすいですが、元の表計算ソフトの仕様が合わない場合はエラーが出やす

資料 2

いのでご注意ください。

2-4) ウイルス濃度データに移動平均を適用するか

「適用しない」「3 項移動平均」「5 項移動平均」から選択します。

ウイルス濃度の測定は、報告数データに比べてサンプル数(測定頻度)が小さくバラツキも大きいです。移動平均でデータを少し平(なら)すとフィティングの精度が上がる場合があります。

2-5) 疫学データ(fitting期間)を入力

① 疫学データの種類を選択します。

▷報告数を入力する場合

公表日ベースの疫学データの場合、「陽性報告数」のタブをクリックします。

▷発症者数を入力する場合

発症日ベースの疫学データの場合、「発症者数」のタブをクリックします。

▷デモデータの報告数を入力する場合

公表日ベースの疫学データのデモデータを使う場合、デモ報告数ボタンにチェックを入れます。

② 入力方法を選びます。(詳細は手順2-3)と同じです)

※ 感染者の報告数データには、全数調査時の「全数データ」、定点医療機関での報告数の「定点合計」、定点医療機関あたりの報告数である「定点あたり」など、数値の意味が異なります。上記のいずれのデータであってもCOVIVISでは「疫学データ(fitting期間)」として解析することができ、出力されるモデル予測データはここで入力したデータと同じ意味となります。すなわち、全数データで推定したモデルパラメータを使用すると全数データ換算のモデル予測発症者数が出力され、定点あたりで推定したモデルパラメータでは定点あたり換算のモデル予測発症者数が出力されます。また、ここで出力されるモデル予測は全て発症日ベースとなります。(Q&A.13、 14、 15、および解説資料「報告数データの扱いについて」「週次集計の定点データの扱い」参照)

③ 集計入力モードにするかしないかの選択

集計入力モードにチェック ☒ が入ると、入力データは週次や月次で合計されたデータとして扱われます。

資料2

入力データが週次での集計値であった場合を例にとると、入力値は1/7に均等割され、直前の空白日を埋めます。また、この集計入力モードは入力値のインターバルが一定期間である必要がなく、入力日およびその過去側に隣接する連続したブランクを一つの単位として均等割付けを行います。

※ 詳しくは解説資料「集計入力モードOFF/ON」のページ参照。

一方、チェックを外すと入力データのまゝの値が日付に紐づけられた日次データとして扱われ、さらに入力値と入力値の間にブランクがある場合は、前後の入力値を基に線形補間されます。

④報告数→発症者数の逆進推定パラメータの入力

報告日ベースの疫学データを入力する場合、発症日ベースに逆進推定するための「遅れ平均(日数)」と「標準偏差(日数)」を入力します。

※ 詳しくは解説資料「ワイブル分布を用いた逆進推定」を参照。

▷プリセットから選択する場合

入力するデータの「遅れ平均日数」と「標準偏差」が不明な場合、プリセットから目安となる数値を選択してください。オープンデータが公表されている県についてはCOVIVIS運営で割り出した値をあげております。

※ 詳しくは解説資料「県ごとの遅れ平均日数と標準偏差」を参照。

▷手入力の場合

「遅れ平均(日数)」と「標準偏差(日数)」のテキストボックスから直接手入力できます。

入力する報告数データに該当する発症日からの遅れ日数の平均値と標準偏差が判る場合、手入力してください。

※ 入力できる値に制限があります(遅れ平均は1~14日まで)。また、標準偏差についても極端に大きな値を入れると正しく動作しなくなる恐れがあります。

2-6) 「モデルパラメータ推定を実行」ボタンをクリックする

上記の入力フォームの設定を再確認し、間違いがなければ「モデルパラメータ推定を実行」ボタンを押します。

「モデルパラメータの推定結果」の画面が表示されます。

手順3. モデルパラメータの推定結果

3-1) 「モデルパラメータの推定結果」の確認

資料 2

推定結果画面の上から順番に説明します。

▷入力された設定値

今回のパラメータ推定に使用した各設定の一覧です。

▷モデルパラメータ

推定されたモデルパラメータが表示されます。

- ・ 回帰モデルの場合、線形回帰した際の切片と傾き、残差標準偏差が表示されます。
 - ・ 疫学モデルの場合、
 - v (発症者1人あたりのウイルス検出濃度 [GC/L])、測定地点で検出された発症者 1 人あたりのウイルス濃度の平均値(GC/L)、発症日をピークとした感染者のウイルス排出量と検出感度に関係、
 - ω (1日あたりの発症率[1/day])、発症日前の感染者が排出するウイルス量の増加に関係、
 - γ (1日あたりの回復率[1/day])、発症日後の感染者が排出するウイルス量の減少に関係、となります。
 - ・ 残差標準偏差 (入力した実測ウイルス濃度と出力されたモデル予測ウイルス濃度のズレを示す)。
- どちらのモデルも、この値が最小となるようにモデルパラメータが最適化されています。

▷[グラフ表示]の確認

デフォルトではグラフ表示のテーブルがオープンになっています。タブから表示を開閉できます。

- ☒ チェックボックスで対数軸と線形軸の切り替えができます。原則、対数軸を推奨します(Q5参照)
- ☒ また、95%信頼区間/予測区間の表示設定、報告数で入力した場合の「補間後報告数」の表示設定ができます。

グラフ表示で出力されるものは以下の3枚です。

・ ウイルス濃度 (fitting期間)

入力した実測値に移動平均をかけたウイルス濃度が棒グラフで表示されます。

移動平均を適応しない場合は入力値のままです。

両端のデータは移動平均をかけても入力値のまま残されます。

下限値以下のデータは除去されており、パラメータ推定には使用されません。

データが不連続に飛んだ場合(下限値以下のカットも含む)は、移動平均が中断された部位を実測データで補っています。

・ 発症者数 (fitting期間)

資料 2

入力した報告数から遅れ平均日数に従って逆進推定した発症者数と、ウイルス濃度からモデル予測した発症者数を比較することができます。両者が近いほど良くフィッティングできています。

モデル予測曲線の95%信頼区間(濃い赤い帯)、モデル予測に使用した発症者数プロットの95%予測区間(薄い赤い帯)も同時に表示されます。

また、「補間後報告数」のテキスト部分をアクティブにすると、入力した報告者数のプロットが追加表示されます。発症者数データ(発症日ベース)を入力した場合は、報告数データは表示できません。

・発症者数とモデル予測発症者数の関係

同じ日付で紐づけた発症者数とモデル予測発症者数のデータを散布図にしたものです。

両軸とも常対数(log10)となっています。

実測報告数から直接ワイブル分布で推定された逆進推定発症者数、もしくは実測発症者数と、さらにその逆進発症者数をウイルス濃度とフィッティングさせたモデルパラメータに基づくモデル予測発症者数を比較することで、モデル予測の精度が判ります。

プロットが傾き1の直線に近いほどフィッティングが良いです。

▷[テーブル表示]の確認

ウイルス濃度、実測報告数、逆進推定発症者数、モデル予測発症者数の時系列データがテーブル表示されます。

逆進推定によって生成された発症者数の分布が、おおよそ「遅れ平均(日数)」だけ報告数の分布からずれていることが棒グラフから確認できます。

モデル予測発症者数は、fitting期間におけるウイルス濃度と推定したモデルパラメータを導入したモデルから出力した値です。(解説資料「モデルパラメータ推定の実行」参照)

3-2) 「モデルパラメータの推定結果」のダウンロード

モデルパラメータの推定結果を個人の端末にダウンロードします。

▷CSVファイルのダウンロード[グラフ表示]

テーブルの右上にCSVファイルのダウンロードボタン[↓ CSV]があります。

CSVファイルは左から順に以下のカラム構成です。

Date: 日付データ

Prediction: モデル予測発症者数

資料 2

Virus: ウイルス濃度(下限値などの処理済み)
Confidence Interval (Max): 信頼区間の上限値
Confidence Interval (Min): 信頼区間の下限値
Prediction Interval (Max): 予測区間の上限値
Prediction Interval (Min): 予測区間の下限値
Prediction log10: モデル予測発症者数(log10)
Virus log10: ウイルス濃度(log10)
Confidence Interval (Max) log10: 信頼区間の上限値 (log10)
Confidence Interval (Min) log10: 信頼区間の下限値 (log10)
Prediction Interval (Max) log10: 予測区間の上限値 (log10)
Prediction Interval (Min) log10: 予測区間の下限値 (log10)

・[グラフ表示] テーブル内の各グラフは、グラフ右下にダウンロードボタン[↓画像]があります。軸の選択と表示したい項目を選択し、ダウンロードボタンを押します。

・モデルパラメータもCSVファイルとしてダウンロード可能です。「入力された設定値」もこのファイルにコピー＆ペーストで保存しておくくと便利です。

3-3) 「モデルパラメータの推定結果」のサーバーへの保存と共有

①ウインドウ下部の「 < 再入力 」ボタンを押すと、再びモデルパラメータ推定フォームに飛びます。

②「 進む> 」ボタンを押すと、「モデルパラメータを保存する」ページへ飛びます。

ここで出力されたモデルパラメータはデータラベル(名称)、都道府県の選択、自治体・採取施設名等の情報、その他メモ欄への書き込みが可能です。

これら添付情報を記載した後に「保存する」ボタンを押すと、モデルパラメータと本フォームで書き込んだ内容がサーバー内に保存されます。

保存データの読み出しは、Topページの下の方にある「プロフィール・保存データ管理」もしくはヘッダーメニューのアカウント名をクリックし、「保存したモデルパラメーター一覧」から欲しい結果の「詳細を見る>」をクリックします。(手順6参照)

また、保存されたモデルパラメータは、発症者数予測フォームのモデルパラメータ→「プリセットパラメータを使用する」をクリックすると出現するプルダウンリストに登録されます。

さらに、以下の項目にチェックを入れると、他のユーザーともプリセットパラメータやモデルパ

資料 2

ラメータの推定結果を共有できます。

☑ 全ユーザーのプリセットパラメータのリストに追加する

☑ 全ユーザーとこのモデルパラメータ推定結果を共有する

共有するデータラベル(名称)のコード化はユーザー間で取り決めをしてください。

③「保存する」ボタンを押すと「モデルパラメータの保存が完了しました」という確認ダイアログがでます。

④「このモデルパラメータを使って予測をする>」ボタンを押すと、発症者数予測フォームに飛びます。

ここで出力されたモデルパラメータは予測フォームに自動入力されます。

手順4-2)へお進みください。

3-4) 「発症者数の予測」フォームへ飛ぶ

出力されたモデルパラメータに問題がなければ、パラメータ推定は完了し、発症者数の予測へ移ります。

発症者数の予測フォームへ飛ぶには、手順3-3)にある「このモデルパラメータを使って予測する>」ボタンで手順4-2)へ進むか、ヘッダーリストにある「発症者数の予測」もしくはTopページに戻って「発症者数の予測→」ボタンを押します。

手順4. 発症者数を予測する

「発症者数の予測→」をクリックします。

4-1) 予測モデルを選ぶ

「疫学モデル(推奨)」と「回帰モデル」からパラメータ推定に用いたモデルを選択します。

※ 手順2-2)を参照

4-2) 「モデルパラメータ」を入力する

入力方法を選びます。

▷ 直前に推定したパラメータを使う場合

手順3-3)の「このモデルパラメータ値で予測する>」ボタンからジャンプすると、直前に推定し

資料 2

たモデルパラメータが既に入力されています。

▷ 保存したパラメータを使う場合

「プリセットパラメーターを使用する」の欄をクリックし、プルダウンされたリストから選択します。

※Q&AページのQ.4も参照

▷ 任意の値のパラメータを手入力する場合

「手動入力」の欄をクリックし、各パラメータの数値をテキスト入力します。

4-3) ウイルス濃度データ(予測期間)の入力

※ 手順2-3)を参照

4-4) ウイルス濃度データに移動平均を適用するか

「適用しない」「3 項移動平均」「5 項移動平均」から選択します。

※ 2-4)を参照

4-5) [比較用] 疫学データ(予測期間)の入力 (省略可)

モデルパラメータの推定結果と同じように、モデル予測発症者数と逆進推定発症者数(もしくは実測発症者数)との比較をする場合、予測期間における疫学データを別途入力してください。

入力の手順や詳細設定は手順2-5)と同様です。

4-6) 「計算する」ボタンをクリックする。

モデル予測発症者数の出力画面が出ます。

手順5. 発症者数の予測結果

5-1) 「発症者数の予測結果」の確認

入力したモデルパラメータが表示されます

▷[グラフ表示]の確認

・ ウイルス濃度 (予測期間)

入力した実測ウイルス濃度に基づいた棒グラフが表示されます。

※ 操作については手順3-1)を参照

資料 2

・発症者数(予測期間)

モデル予測発症者数が表示されます。

さらに手順4-5)で[比較用]疫学データ(予測期間)の入力をした場合、それに基づく補間後報告数と逆進推定発症者数がプロットされます。

※ ここで表示される95%信頼・予測区間はモデルパラメータ推定の際の残差標準偏差を基にしています。比較用発症者数(予測期間)のデータから得た信頼・予測区間ではありません。あくまでも当てはまりの目安として表示してあります。

▷[テーブル表示]の確認

・予測期間におけるウイルス濃度、および推定したモデルパラメータを導入したモデル用いて出力したモデル予測発症者数の時系列データがテーブル表示されます。

5-2) 「発症者数の予測結果」のダウンロード

グラフの画像、CSVファイル、ともにダウンロードできます。

※ 操作については手順3-2)を参照

CSVファイルのカラム構成もモデルパラメータ推定の際と同様です。

5-3) 「発症者数の予測結果」のサーバー保存と共有

発症者数の予測結果フォームの「保存・共有 >」ボタンをクリックし、「予測結果を保存する」ページに飛びます。

本フォームはモデルパラメータの推定結果と同様に解析結果の保存、添付情報の書き込み、共有設定ができます。手順3-3)参照。

手順6. サーバーへの保存結果を読み出すor編集するor削除する

6-1) 共有された保存結果の読み出し

トップページの「共有済み モデルパラメータの推定結果を見る→」「共有済み 発症者の予測結果を見る→」の項目をクリックすると、他のユーザーが公開した結果も含めて、「詳細を見る>」ボタンを押すとデータを読み出すことができます。

読み出した解析結果からグラフ画像やCSVファイルのダウンロードが可能です。

資料 2

6-2) 自身のアカウントの保存結果の読み出し

自身が保存した結果を読み出すには、トップページ下方の「プロフィール・保存データ管理>」ボタン、もしくはヘッダーメニューのアカウント名をクリックし、「プロフィール」のタグをクリックします。

こちらには公開、非公開双方の保存結果が一覧できます。

個々のリストの「詳細を見る>」ボタンから保存結果が読み出されます。

6-3) 保存結果の編集と削除

「編集する>」ボタンを押すと保存結果の編集フォームへ飛びます。

ここで保存結果の添付情報や公開設定を書き換えることができます。

再度「編集する」ボタンを押すと添付情報と公開設定が更新・保存されます。

保存結果の削除もこの編集フォームの「削除する」ボタンから行います。

COVIVIS Q&A ver.4.0 (2024.3.15.updated)

Q1-1. ウイルス濃度について、どれくらいの計測期間があれば信頼できる推定が可能ですか？

A1-1. 流行 1 波分が目安です。フィッティング期間データについては単純に期間の長さでは決められません。計測する頻度、感染者数など、十分なサンプル数とサンプルサイズが必要です。週一回のウイルス濃度測定であれば、流行の波が 1 つ分あれば十分推定可能です。

Q1-2. 月に 1 ～ 2 回の採水頻度でも信頼できる推定が可能ですか？

A1-2. 流行のピークを捉えているデータ期間であれば月に数回の採水頻度であっても推定は可能です。病気の流行が反映される感染報告数と検出ウイルス濃度を用いることが重要です。フィッティング期間が長期であっても、低いウイルス濃度で推移している場合は推定の精度が低下します。

Q2. 不顕性感染者が下水中に排出するウイルス量はどのように扱われていますか？

A2. 不顕性感染者のウイルス排出も想定した推定モデルとなっています(解説資料〇〇を参照)。通常、不顕性感染者は陽性報告数としてデータ上には直接上がってこないと思いますが、ウイルス濃度のデータには反映されます。このような軽症者や無症状期間も

資料 3

含めた流域のウイルス濃度の変化が、発症者増減の予測に繋がる重要な情報として活かされており、

Q3. ウイルス濃度の測定間隔が一定ではない、もしくは未測定の期間があるデータをそのまま入力しても、正しく推定できるのでしょうか？

A3. 測定日が紐付けられているデータであれば、そのままの形で入力してもパラメータ推定・発症者数予測が可能です。データが欠損している期間については前後のデータから線形補間が行われます。

Q4. 感染者数の推定に他の自治体のモデルパラメータを使用しても問題ないのでしょうか？また、どの自治体のパラメータを選択すれば良いのでしょうか？

A4. 自治体ごとにウイルス濃度測定の仕方や環境要因が異なりますので、当然モデルパラメータも異なります。同じ自治体で同じ手法で計測されたウイルス濃度データであれば近いパラメータ値となる場合がありますが、他の自治体のパラメータをそのまま使用しても正しく推定できません。サンプル数が少なくても自前のデータで推定したパラメータを使う方がフィッティングが良いと思われます。

Q5. ウイルス濃度や発症者数のグラフ表示で対数軸を推奨されていますが、どのような理由がありますか？

資料 3

A5. COVIVISでは、ウイルス濃度と発症者数の双方を対数に変換してからパラメータ推定を行なっております。感染者数のように指数的に増加する傾向のあるデータを対数変換すると線形的になり、統計学上望ましいデータの「等分散性」が満たされやすくなり、より正確な推定値や信頼区間を得やすくなります。

Q6. 同じデータを入力しているのに逆進推定発症者数の結果が毎回微妙に異なりますが、問題ないのでしょうか？

A6. 問題ありません。逆進推定発症者数は乱数（ユーザが指定した発症日～陽性報告日間の遅れの分布に従う乱数）でバラツキを与えており、あくまでもモデルパラメータの推定のために使用しています。

Q7. ウイルス株の変異にはどのように対応していますか？

A7. 過去のフィッティング期間と新規にモデル予測したい予測期間でウイルス株が異なる場合、予測の精度が落ちる可能性があります。その場合、新たなウイルス株でのフィッティング期間データが蓄積されるまで待つのが原則です。また、全数報告から一部報告への制度変更、弱毒化による人々の行動変様など、感染者数のデータ抽出の精度が時と共に変遷しております。過去のデータ期間の全てを使うというのではなく、最もフィッティングの良いデータ期間を模索する必要があります。

資料 3

Q8. 逆に感染者数からウイルス濃度を予測することは出来ないのでしょうか？

A8. 可能です。実際、フィッティング期間のパラメータ推定の部分では感染者数から下水ウイルス濃度を予測する精度が高くなるようにパラメータを推定しています。しかしながら、これらの推定パラメータを利用して、異なる期間の感染者数から下水ウイルス濃度を予測するという現場のニーズがあまりないと思われることを鑑みて、感染報告数からのウイルス濃度を予測するという動線についてはCOVIVIS解析ツールには実装しておりません。

Q9. COVIVISは他の感染症(病原体)にも使用可能ですか？

A9. 原則可能です。ウイルス濃度と感染者数の教師データがあれば、パラメータ推定をして環境水中のウイルス濃度から感染者数の予測が可能です。ただし、環境中での病原体の増減が感染者数の増減と無関係な場合(環境水中で増殖してしまう細菌など)、その限りではありません。

Q10. COVID-19以外にCOVIVISでの推定に向いている感染症の具体例を教えてください。

A10. まだ検証されていませんが想定される感染症は次の通りです。まずポリオについて、日本はポリオフリーなので教師データを集めるのは難しいですが、流行国では詳細な疫学データが入手可能ですので応用可能と考えています。感染性胃腸炎の原因となる

資料 3

ノロウイルスなど腸管系ウイルス量と疫学データの関係、季節性インフルエンザも教師データとなる疫学データがうまく収集されるならば利用できる可能性があると考えます。

Q11. COVIVIS解析ツールで出力されたグラフをそのまま論文や報告書、Webページ等に掲載してもよいですか？

A11. はい、全く問題ありません。COVIVISの取り扱いに関する基本方針の第6条と第7条をご参照ください。

Q12. 使い方の講習会、関連した研究セミナーなどは開催されますか？

A12. COVIVISに関連した公開イベントの案内は、本サイトのTopページでの告知やアカウントメールアドレスへ送信いたします。また、biomath、Jeconet、EVOLVE2、等のメーリングリストからも案内を流す予定です。

Q13. 感染者の報告数について、全数データ(2022年9月以前)と定点データの双方を跨いだデータ期間を利用したいのですが、どうすれば良いですか？

A13. 定点データに統一するのが最も簡単です。全数データから定点に絞って再集計されたデータを入手できれば、そちらを使用してください。また、概算でよければ双方の数値を変換する計算方法がありますが、いずれにしても同じ期間の全数データと定点データを用意する必要があります(解説資料「補足. 全数データと定点データについて」を

資料 3

参照).

Q14. パラメータ推定に用いる全数把握時のデータと下水中ウイルス濃度データを保有してません. 定点あたり報告数と下水中ウイルス濃度データは教師データとなり得ますか？

A14. もちろん可能です. 定点あたり報告数でフィッティングしたモデルパラメータを使用した場合、予測結果は定点あたり報告数で出力されます. また、この数値から対象地域の感染者数に換算(全数データ換算)することも理論的には可能です. 最も簡便な換算方法として、全数報告時の一定期間の全数データと定点データのそれぞれの和を取り、
「定点データの和÷全数データの和＝定点割合」を算出して、以後の「定点データ÷定点割合＝全数データ換算」の参考値としている自治体もあります. また、同じ日付の全数データと定点データとで散布図を出し、回帰直線を引くことで関係式を求めることもできます.

Q15. 定点報告数データを使いたいのですが、週次の集計データとして発表されています. データ入力フォームの「集計入力モード」にチェックを入れるところまでは分かりますが、データの日付をどのようにすればよいのでしょうか？

資料 3

A15. 定点報告数は報告週の月曜から日曜までに集計された感染者を翌週の火曜か水曜に都道府県単位で速報値で公表している自治体が多いと思います。つまり採水週のウイルス量を翌週公表される公表日で紐付けした報告数データで比較してしまうと、およそ1週間後の数値と比較することになる点に留意してください。COVIVIS 上で定点データを扱う際には、1) 集計入力モードにチェックを入れて、週次集計データを日次日別データにすること、2) 定点データの日付は、発表日の前の週の木曜日の日付(木曜が週次データの中点なので、そこを起点に線形補間したいので)に紐付けし直した時系列データで入力すること、が必要です。この辺りのデータ処理の細かい点は操作マニュアルの手順 2-5)、解説資料「補足. 集計入力モード ON/OFF の場合」をご参照ください。

環境中の複数種ウイルス検出系の研究

分担研究者：喜多村 晃一 所属 国立感染症研究所

研究要旨 わが国ではポリオ環境水サーベイランスが地方衛生研究所の協力のもと国内の複数箇所で開催されており、この検査インフラを活用した新型コロナウイルス下水サーベイランスが研究されてきた。さらに近年、インフルエンザウイルスなど複数のウイルス種を下水から探知するというニーズが高まっている。本分担研究では、複数種ウイルスを検知する検査体制の基盤となることを目標に、マルチプレックス RT-qPCR によるウイルスゲノム検出技術の検証や、複数種の腸管系ウイルス配列を持つ新規標準物質 VLP-RNA の評価を行った。マルチプレックス RT-qPCR による同時検出は、定期的な下水検査において、コスト削減や検査時間の効率化が見込まれる。新規標準物質 VLP-RNA は精度管理標準物質として活用できることが示された。本研究の結果は、環境検体の複数種ウイルス検出における実験条件や内部精度管理の基礎情報となると考える。

A. 研究目的

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）を引き起こす SARS-CoV-2 は呼吸器系のウイルスであるが、感染者の一定割合においてウイルスが腸管に存在し数週間糞便に排出されることが報告されている。感染者の鼻汁、唾液、糞便等に含まれるウイルスは下水へ排出されることから、地域レベルでの感染症発生動向の把握に下水から SARS-CoV-2 を検出する試みが国内外で進められている。わが国では下水網を活用したポリオ環境水サーベイランスが地方衛生研究所の協力のもと国内の複数箇所で開催されており、これまでエンテロウイルス、アデノウイルス等が副次的に検出されてきた。さらに COVID-19 パンデミックを契機にこの検査インフラを活用した SARS-CoV-2 下水サーベイランスが研究されている。近年さらに下水からインフルエンザウイルスの検出も報告されており、また以前より高齢者介護施設ではノロウイルス検知のニーズが高い。本分担研究では、複数種ウイルスを検知する検査体制の基盤となることを目標に、マルチプレックス RT-qPCR によるウイルスゲノム検出技術の検証や、新規に導入する複数種ウイルス配列を持つ標準物質 VLP-RNA の評価を行った。またこれに関連して、高齢者介護施設等で迅速なリスク評価を行う手段となることを目指して、環境表面に存在する SARS-CoV-2 等のオンサイト検出技術の開発を行った。

B. 研究方法

1. マルチプレックス RT-qPCR によるウイルス検出

市販の体外診断用医薬品である SARS-CoV-2 & Flu ダイレクト PCR 検出キット（Takara 社）及び RNA 標準物質である新型コロナウイルス・A/B 型インフルエンザウイルスコントロールセットを用いて、マルチプレックス RT-qPCR の条件検討を行った。標準曲線による精度の確認とともに、SARS-CoV-2 RNA が過剰量あった場合でも正確にインフルエンザウイルス RNA が検出されるか検討した。

2. 環境表面ウイルスのオンサイト検出及び VLP-RNA の活用

SARS-CoV-2、ポリオウイルス、エンテロウイルス、ノロウイルスの PCR 検査標的配列を搭載した人工的な疑似ウイルス粒子である VLP-RNA を用いた環境表面拭き取り検体を作成し、モバイル型リアルタイム PCR 機 PicoGene による検出を検討した。また、低コピー数の SARS-CoV-2 疑似粒子 NATtrol SARS-CoV-2 の拭き取り検体を用いて、遠心機能を持つポータブル装置 Bento Lab による RNA 抽出を行い、PicoGene による PCR 検査の評価を行った。

C. 研究結果

1. マルチプレックス RT-qPCR によるウイルス検出

過剰量 (50,000 copies/reaction) の SARS-CoV-2 RNA 存在下でも 5 copies/reaction のインフルエンザウイルス A/B RNA が検出可能で

あった。市販の検出キット推奨のプロトコルによって概ね精度の高い標準曲線が示された。しかし、RNA 標準物質のわずか 2,3 回の凍結溶解繰り返しで検出結果がばらつくことが分かった。このため条件検討を行ったところ、逆転写反応時間を伸ばすことで改善が認められた。類似製品あるいは in-house のプライマー/プローブの使用時でも同様の可能性が見込まれる。

2. 環境表面ウイルスのオンサイト検出及び VLP-RNA の活用

疑似ウイルス粒子を用いた環境表面拭き取り実験では、抽出試薬を使う簡易抽出法に比べて直接検出法で高い検出感度を得た。VLP-RNA が、SARS-CoV-2、ポリオウイルス、エンテロウイルス、ノロウイルスそれぞれの陽性コントロールとして活用しうることが示された。ポータブル機器による RNA 抽出を含めた PCR 検査の評価では、500 copies/test を滴下した環境表面拭き取り検体を陽性として検出できた。物体表面に滴下した疑似ウイルス粒子の検出について、スワブ溶液を直接検査する迅速法とポータブル遠心機を活用した RNA 抽出法での PCR 検査を評価し、サンプル調製から PCR 検査までポータブル機器のみでの検査、すなわちオンサイト検出が可能であることを確認した。

D. 考察

マルチプレックス RT-qPCR による複数種ウイルスの同時検出は、定期的に下水検査を行う機関において、コスト削減や検査時間の効率化が見込まれる。一方で、市販されている SARS-CoV-2 とインフルエンザウイルスの同時検出キットは本研究期間である 2023 年度中に販売終了したものもあり、継続的な活用が困難であった。しかし本研究による条件検討の結果は他のキットや in-house で調製するマルチプレックス RT-qPCR プロトコルにも適用しうると考える。今回は SARS-CoV-2 の検出には Cy5、インフルエンザウイルスには FAM の蛍光色素を用いており、この組み合わせでない場合は別途事前検討が必要である。人工的な疑似ウイルス粒子である VLP-RNA はカスタム塩基配列が搭載可能であり、本研究では SARS-CoV-2、ポリオウイルス、エンテロウイルス、ノロウイルスの PCR 検査標的配列を合成した RNA を使用した。この VLP-RNA は下水検体や環境表面検体からのウイルス検出実験において、ポ

ジティブコントロールとして使用することができ、これらのウイルス検査を行う際の精度管理への活用が可能である。また、本研究では環境表面拭き取り検体から、ポータブル機器のみを用いて迅速高感度にウイルス RNA を検出する技術を開発した。このオンサイト PCR 検査技術は、高齢者介護施設等、検査ラボへのアクセスが困難な施設などにおいて、施設下水検査とともにリスク評価や早期感染対策への活用が期待できる。

E. 結論

本分担研究では、マルチプレックス RT-qPCR の条件検討や、複数種ウイルス配列を搭載した標準物質の評価を行った。これらの結果は、下水など環境検体から複数種のウイルスを検出する際の実験条件や内部精度管理の基盤となりうる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

論文発表

Kitamura K, Ueno MK, Yoshida H. Rapid and sensitive on-site detection of SARS-CoV-2 RNA from environmental surfaces using portable laboratory devices. Microbiol Spectr. 11(6):e0045623, 2023.

学会発表

1. 喜多村晃一「ポリオ環境水サーベイランスを活用した下水中の新型コロナウイルスの検出」第43回衛生微生物技術協議会、2023年7月5日～6日、じゅうろくプラザ(岐阜)
2. 喜多村晃一, 上野(菊池)みなみ, 吉田弘「環境表面の新型コロナウイルスをオンサイトで検出する手法の検討」第82回日本公衆衛生学会総会、2023年10月31日～11月2日、つくば国際会議場
3. 喜多村晃一, 上野(菊池)みなみ, 吉田弘「ポータブル機器による環境表面新型コロナウイルスRNAの高感度検出法」2023年12月6日～8日、神戸国際展示場

H. 知的財産権の出願・登録状況(あれば記載) (予定を含む。)

該当なし

厚生労働行政推進調査事業費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「環境水に含まれる新型コロナウイルス等病原体ゲノム情報の活用に関する研究」
分担研究報告書

下水処理場を調査定点とした複数種ウイルス同時検出系の検討

研究代表者	吉田 弘	国立感染症研究所
研究分担者	濱崎光宏	福岡県保健環境研究所
研究協力者	坂 恭平	青森県環境保健センター
研究協力者	北川和寛	福島県衛生研究所
研究協力者	藤沼裕希	千葉県衛生研究所
研究協力者	花田裕司	千葉県衛生研究所
研究協力者	黒沢博基	埼玉県衛生研究所
研究協力者	濱本紀子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	長島真美	東京都健康安全研究センター
研究協力者	熊谷遼太	東京都健康安全研究センター
研究協力者	小澤広規	横浜市衛生研究所
研究協力者	板持雅恵	富山県衛生研究所
研究協力者	川上利恵	富山県衛生研究所
研究協力者	葛口 剛	岐阜県保健環境研究所
研究協力者	伊藤 雅	愛知県衛生研究所
研究協力者	中村範子	愛知県衛生研究所
研究協力者	松浦侑輝	奈良県保健研究センター
研究協力者	藤本泰之	和歌山県環境衛生研究センター
研究協力者	寺西彩香	和歌山県環境衛生研究センター
研究協力者	望月 靖	岡山県環境保健センター
研究協力者	木田浩司	岡山県環境保健センター
研究協力者	清迫理恵	岡山県環境保健センター
研究協力者	眞榮城徳之	沖縄県衛生環境研究所
研究協力者	平良遥乃	沖縄県衛生環境研究所

研究要旨 終末処理場の流入水から効率よく複数種の病原体を同時に検出するために、対象病原体、リアルタイムPCR条件の検討を行った。対象としたウイルスは、インフルエンザウイルス、RSウイルス、ライノウイルス、パラインフルエンザウイルス、ヒトコロナウイルス、パレコウイルス、ノロウイルス、アストロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス、ヒトエンテロウイルス、アデノウイルスの12種類を選定した。1枚のリアルタイムPCRプレートを用いて、6種類の病原体が1度に定量できる様にプレートをデザインした。また、1種類のコントロール試薬で12種類全ての病原体の検量線が作成できるようにした。検査の結果、インフルエンザウイルス、RSウイルス、パラインフルエンザウイルスについては、ほとんど検出することができなかったが、他の病原体については、 $2.3 \times 10^2 \text{GC/L}$ から $3.4 \times 10^7 \text{GC/L}$ の範囲で効率よく検出することができた。

A. 研究目的

我が国では、流行している病原体の把握は、主に感染症発生動向調査により行われている。定点把握疾患については、病原体定点医療機関で採取された臨床検体から病原体を検出し、その情報を元に流行している病原体の把握を行っている。しかし、病原体定点医療機関を受診した有症者を検査の対象としていることから、不顕性感染者を含めた感染症の全体像を把握することが困難である。

一方、終末処理場の流入水を調査することで、顕性、不顕性を問わずに感染者の存在を把握できることが知られている。そこで、本研究では、不顕性感染者を含めた感染症の全体像を把握することを目的とし、終末処理場の流入水を用いた病原体検出の検討を行った。本年度は、検査手法の簡便化を図るため、複数種の病原体の同時検出について検討を行った。

B. 研究方法

1. 対象病原体

対象とした病原体は呼吸器感染症の原因ウイルスとして、インフルエンザウイルス（A 型、B 型）、RS ウイルス（A 型、B 型）、ライノウイルス（A 型、B 型、C 型）、パラインフルエンザウイルス（1 型、2 型、3 型）、ヒトコロナウイルス（HCoV-229E、HCoV-HKU1、HCoV-NL63、HCoV-OC43）、パレコウイルスの 6 種類を選定した。さらに、腸管感染症の原因ウイルスとして、ノロウイルス（GⅠ型、GⅡ型）、アストロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス（A 群）、ヒトエンテロウイルス、アデノウイルスの 6 種類を選定した。各プライマー及びプローブの合成及び 0.2ml の 96 穴リアルタイム PCR プレートへの固相はサーモフィッシャーサイエンティフィック社へ依頼した。1 枚のリアルタイム PCR プレートで 4 検体、6 種類の病原体の検査ができるようにデザインした（図 1）。

2. リアルタイム PCR

検体、RNA 抽出方法の選定及びリアルタイム PCR は、各地方衛生研究所で行った。抽出した RNA について、Prime Script RT Master Mix（TaKaRa Bio 社）を用い 37℃で 30 分、85℃で 5 秒の逆転写反応で cDNA を合成した。得られた cDNA について、TaqPath BactoPure Microbial Detection Master Mix（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いて、25℃2 分、85℃10 分、95℃2 分のインキュベーションを行い、95℃5 秒、60℃30 秒の PCR 反応を 40 サイクル行った。陽性コントロールは、Custom DNA control（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いた。陽性コントロールを 10 倍段階希釈し、 1×10 gene copies/ μ l から 1×10^3 gene copies/ μ l になるように調整し、作成した検量線から流入水 1L 当たりのウイルスのゲノムコピー数（GC/L）を算出した。1 検体につき 2 回測定し、2 回とも遺伝子の増幅が認められたものを陽性とし、その平均値を算出した。

3. 実験結果の共有

各地方衛生研究所で実施した実験結果は、令和 6 年 3 月 13 日に開催された第二回研究班会議で共有された。

C. 研究結果

1. リアルタイム RT-PCR 結果

7 施設の地方衛生研究所から 12 種類全ての病原体について、結果が得られた。2 施設の地方衛生研究所については、今回使用した 0.2ml のリアルタイム PCR プレートが施設が所有するリアルタイム PCR 装置に対応していなかったため、検査結果が得られなかった。得られた検査結果を表 1 に示す。

呼吸器感染症の原因ウイルスのうち、インフルエンザウイルス、RS ウイルス、パラインフルエンザウイルスの 3 種類の病原体は、ほとんどの地方衛生研究所で検出することができなかった。ライノウイルス、ヒトコロナウイルス、パレコウイルスについては、 2.3×10^2 GC/L から 5.1×10^5 GC/L の範囲で比較的よく検出することができた。

腸管感染症の原因ウイルスについては、ロタウイルス以外で 1.0×10^3 GC/L から 3.4×10^7 GC/L の範囲で効率よく検出することができた。また、同一の RNA を使用して 12 種類のウイルスの検査を行うことから 1 回の検査で使用する RNA は 120 μ l を要する。1 回の RNA 抽出作業でおおよそ 60 μ l 程度しか RNA が得られないため、ある程度希釈して RNA を使用する必要がある。今回、RNA を 5 倍又は 10 倍希釈で検査を行ったところ、ほぼ問題なく検査可能であることが確認された。

D. 考察

2023 年の感染症発生動向調査による病原微生物検出情報¹⁾では、インフルエンザウイルス（A 型及び B 型の合計）の検出数は 7881 件、RS ウイルスの検出数は 720 件、パラインフルエンザウイルスの検出数は 449 件と多く検出されているが、流入水からはほとんど検出することができなかった。これらのウイルスは流入水中に排泄されるウイルス量が少ないため、検出することが困難と考えられる。今回使用したプライマー、プローブの配列情報は公開されていないことから、別のプライマー、プローブを用いた検証が必要と考えられる。

前述と同様¹⁾に感染性胃腸炎の患者から検出されたウイルスは、ノロウイルスが 1376 件、アストロウイルスが 105 件、サポウイルスが 251 件と良く検出されており、流入水からもこれらのウイルスは高濃度で検出することができた。今後、各ウイルスのゲノムコピー数から感染者数の推定や患者から検出されたウイルスとの比較に使用されることが期待される。しかし、ロタウイルスについては、ほとんど検出することができなかった。全国のロタウイルスを原因とする感染性胃腸炎の患者報告数²⁾は、2016 年に 5266 件をピークに減少しており、2023 年は 154 件と減少している。2020 年の 10 月よりロタウイルスワクチンが定期接種になったことにより患者数が減少したため、流入水中に排泄されるウイルス量が減少したためと考えられる。

今回我々は、1 枚のリアルタイム PCR プレートで 6 種類のウイルスの定量が可能で、1 種類のコントロール試薬で各ウイルスについて定量できるように簡便な検査系を作

成することができた。

E. 結論

今回検討した呼吸器感染症の原因ウイルスの検査系において、インフルエンザウイルス、RSウイルス、パラインフルエンザウイルスについては、別のプライマー、プローブを用いた検証が必要と考えられる。残りのライノウイルス、ヒトコロナウイルス、パレコウイルス及び、6種類の腸管感染症の原因ウイルスについては、今回使用した検査系で十分使用できると考えられる。また、1種類のコントロール試薬で12種類のウイルスについて定量できるように簡便な検査系を作成することができた。

参考文献

- 1) 国立感染症研究所ホームページ IASR 速報集計表 (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-table/1493-iasrtv.html>)
- 2) 国立感染症研究所ホームページ IDWR 速報データ (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/data.html>)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

(A)

呼吸器感染症の原因ウイルス											
	Flu A/B	RS A/B		Rhino A-C		ParaFlu 1-4		Corona	Parechovirus		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
10 ³	A										
10 ²	B										
10 ¹	C										
NC	D										
sample1	E										
sample2	F										
sample3	G										
sample4	H										

(B)

腸管感染症の原因ウイルス											
	NV-G1/G2	Astro (pool)		Sapo(pool)		RotaA pool		entero	Adeno		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
10 ³	A										
10 ²	B										
10 ¹	C										
NC	D										
sample1	E										
sample2	F										
sample3	G										
sample4	H										

図1 デザインしたPCRプレート

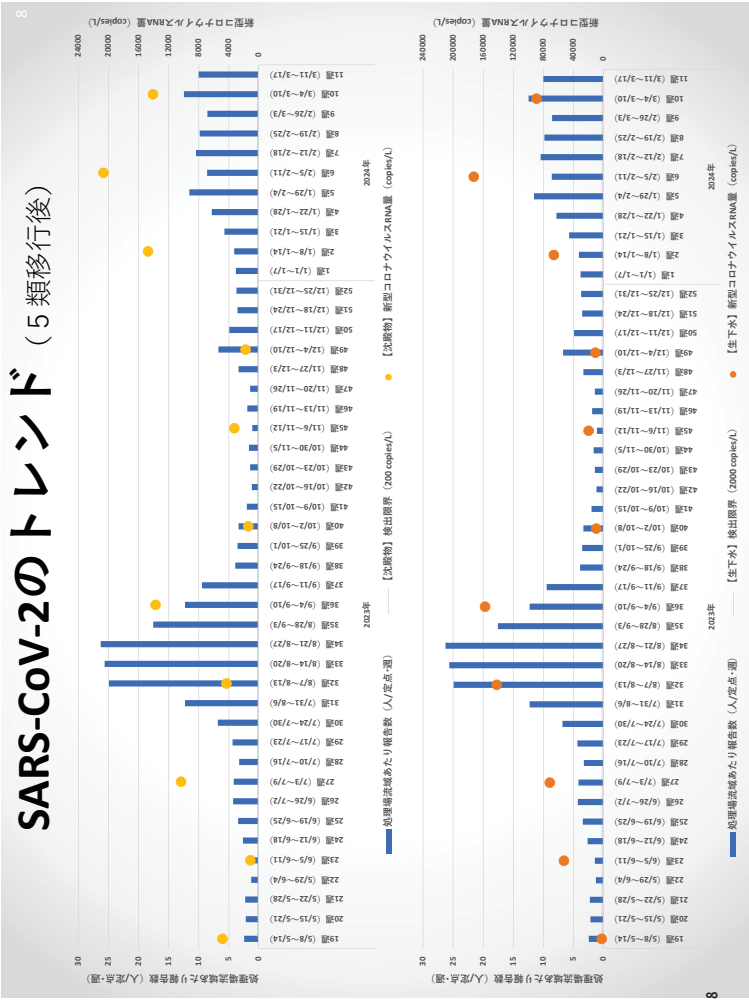
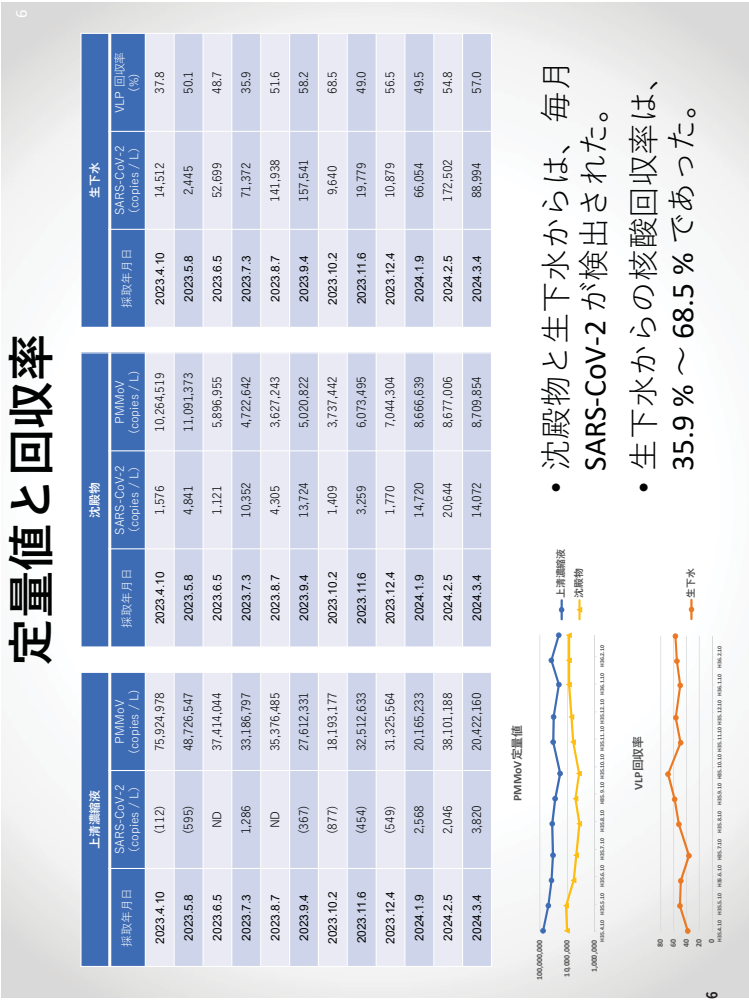
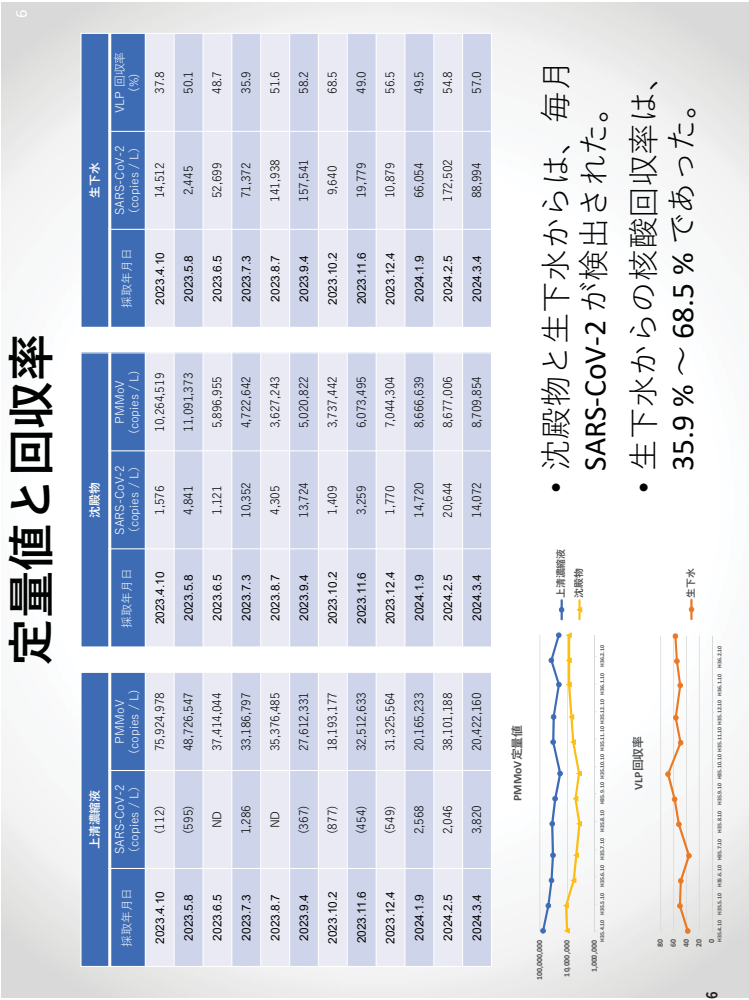
A：呼吸器感染症の原因ウイルス検査用プレート

B：腸管感染症の原因ウイルス検査用プレート

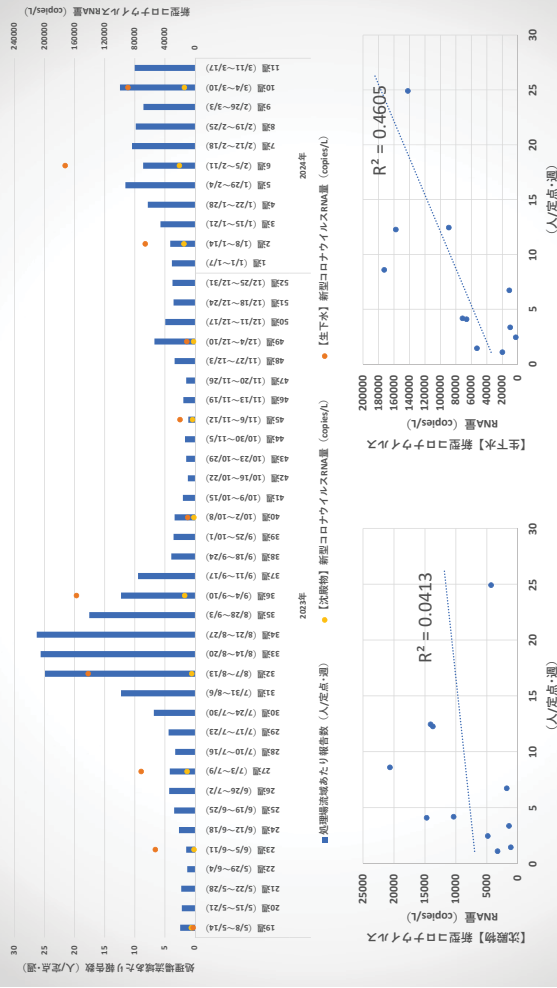
表1 流入水中の各ウイルスのゲノムコピー数 (GC/L)

地方衛生 研究所	検体	呼吸器感染症の原因ウイルス						腸管感染症の原因ウイルス					
		インフル エンザウ イルス	RSウイル ス	ライノウ イルス	パラインフ ルエンザウ イルス	ヒトコロナ ウイルス	パレコウ イルス	ノロウイ ルス	アストロ ウイルス	サポウイ ルス	ロタウイ ルス	エンテロ ウイルス	アデノウ イルス
A	R5. 7. 3_Promega	ND	ND	2. 3E+02	ND	ND	5. 1E+05	1. 8E+05	3. 8E+07	6. 6E+03	ND	6. 3E+05	3. 9E+05
	R5. 7. 3_PEG	ND	ND	3. 3E+03	ND	ND	4. 7E+05	2. 7E+05	1. 9E+07	ND	ND	4. 0E+04	5. 5E+05
	R5. 12. 4_Promega	ND	ND	8. 1E+02	ND	6. 1E+03	2. 0E+03	1. 9E+05	4. 5E+04	2. 2E+05	ND	6. 4E+04	1. 7E+05
	R5. 12. 4_PEG	ND	ND	ND	ND	ND	3. 6E+04	1. 2E+05	1. 0E+04	8. 9E+03	ND	3. 0E+04	5. 9E+04
	R5. 12. 18_Promega	ND	ND	3. 9E+02	ND	2. 6E+03	4. 0E+03	4. 1E+05	5. 5E+06	4. 8E+04	ND	1. 5E+05	6. 6E+05
	R5. 12. 18_PEG	ND	ND	1. 1E+03	ND	ND	3. 4E+04	3. 0E+05	1. 3E+06	4. 6E+03	ND	6. 8E+04	2. 5E+05
	R6. 2. 5_Promega	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4. 0E+06	2. 7E+07	1. 8E+06	4. 7E+03	1. 8E+04	2. 1E+05
B	R6. 2. 5_PEG	ND	ND	ND	ND	ND	4. 6E+03	1. 4E+06	9. 6E+06	8. 4E+04	ND	1. 7E+04	1. 3E+05
	12-2 (希釈なし)	ND	ND	3. 0E+04	ND	1. 5E+03	7. 6E+03	3. 0E+05	5. 3E+06	8. 2E+05	1. 5E+02	1. 7E+04	8. 9E+05
	12-2 (10倍希釈)	ND	ND	3. 0E+03	ND	2. 7E+02	1. 2E+03	8. 9E+04	1. 4E+06	2. 4E+05	5. 7E+02	3. 8E+03	1. 0E+05
	1-5 (希釈なし)	1. 6E+03	ND	2. 0E+04	ND	1. 2E+03	2. 2E+03	1. 4E+06	5. 1E+06	9. 0E+05	2. 8E+03	3. 3E+03	6. 8E+04
C	1-5 (10倍希釈)	1. 8E+02	ND	2. 0E+03	ND	4. 2E+02	8. 1E+02	1. 9E+05	7. 2E+06	1. 3E+05	4. 7E+03	1. 4E+07	5. 9E+03
	12月-1沈査 (希釈なし)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5. 4E+03	7. 1E+04	1. 8E+04	ND	ND	1. 4E+05
	12月-1沈査 (10倍希釈)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8. 5E+04	6. 9E+05	2. 4E+05	ND	ND	3. 0E+03
	12月-1上清濃縮物	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1. 6E+05	8. 6E+05	3. 2E+04	3. 4E+01	8. 5E+03	4. 3E+03
	12月-2沈査 (希釈なし)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1. 1E+03	3. 1E+04	4. 5E+03	ND	ND	ND
	12月-2沈査 (10倍希釈)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4. 3E+03	5. 1E+04	9. 8E+03	ND	ND	ND
	12月-2上清濃縮物	ND	ND	1. 2E+04	ND	ND	ND	2. 0E+05	9. 1E+05	7. 2E+04	4. 7E+04	6. 3E+03	1. 3E+04
	1月-1上清濃縮物	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5. 1E+05	1. 2E+06	6. 6E+04	2. 2E+03	4. 7E+03	3. 1E+03
	1月-2上清濃縮物	ND	ND	ND	ND	ND	2. 6E+03	1. 1E+06	2. 6E+06	3. 6E+04	1. 1E+05	2. 1E+03	2. 8E+03
D	K-11 2023年11月採水	ND	ND	3. 6E+02	ND	ND	1. 3E+03	1. 2E+05	2. 6E+06	8. 6E+05	ND	3. 9E+04	1. 5E+05
	T-11 2023年11月採水	ND	ND	8. 2E+03	ND	ND	5. 2E+02	1. 3E+05	1. 5E+05	2. 2E+06	ND	8. 5E+04	1. 1E+05
	K-21 2024年1月採水	ND	ND	4. 4E+02	ND	1. 8E+03	5. 1E+02	1. 2E+06	3. 0E+06	1. 6E+06	ND	1. 6E+04	1. 4E+05
	T-21 2024年1月採水	ND	ND	ND	ND	1. 2E+03	2. 5E+02	1. 6E+06	5. 4E+06	6. 5E+06	1. 1E+02	1. 2E+04	5. 5E+06
E	12月採水検体 (希釈なし)	ND	ND	ND	ND	ND	2. 1E+05	2. 6E+05	2. 3E+07	5. 6E+05	ND	3. 5E+05	4. 0E+05
	12月希釈検体 (5倍希釈)	ND	ND	ND	ND	ND	3. 1E+05	4. 0E+04	3. 4E+07	5. 9E+05	ND	4. 3E+05	4. 5E+05
	2月採水検体 (希釈なし)	ND	ND	ND	ND	1. 6E+04	2. 5E+04	3. 0E+06	4. 9E+06	6. 0E+05	ND	1. 3E+05	7. 8E+04
	2月希釈検体 (5倍希釈)	ND	ND	ND	ND	2. 3E+04	ND	3. 5E+06	6. 9E+06	6. 5E+05	ND	1. 8E+05	1. 0E+05
F	2023年11月	ND	ND	ND	1. 5E+02	ND	ND	2. 8E+03	3. 8E+03	3. 7E+04	ND	6. 2E+02	1. 1E+04
	2023年12月	ND	ND	ND	ND	2. 9E+02	ND	7. 5E+04	8. 4E+06	2. 7E+05	ND	5. 0E+03	2. 3E+03
	2024年1月	ND	ND	ND	ND	6. 9E+02	ND	6. 8E+04	1. 7E+06	1. 3E+05	ND	8. 7E+02	2. 4E+03
	2024年2月	ND	ND	ND	ND	1. 1E+02	ND	8. 8E+04	4. 3E+04	6. 9E+04	ND	5. 8E+02	1. 0E+03
G	20240208_1_PowerSoil×5	ND	ND	ND	4. 3E+03	2. 3E+03	ND	1. 7E+04	2. 9E+04	1. 8E+04	ND	ND	ND
	20240208_1_PowerSoil×10	ND	ND	ND	6. 9E+03	ND	ND	4. 4E+04	6. 3E+04	2. 2E+04	ND	ND	ND
	20240208_1_TNA×5	ND	ND	2. 1E+03	4. 9E+04	2. 2E+04	ND	3. 2E+06	4. 5E+06	5. 6E+06	ND	1. 5E+04	2. 0E+04
	20240208_1_TNA×10	ND	ND	1. 3E+04	3. 6E+04	1. 8E+04	ND	ND	4. 7E+06	5. 4E+06	ND	4. 4E+04	7. 6E+03

ND:測定限界以下



沈殿物と生下水の比較（5 類移行後）



● 報告数の増加に伴う定量値の上昇は、Direct capture 法を用いる生下水の方が顕著であった。

まとめ

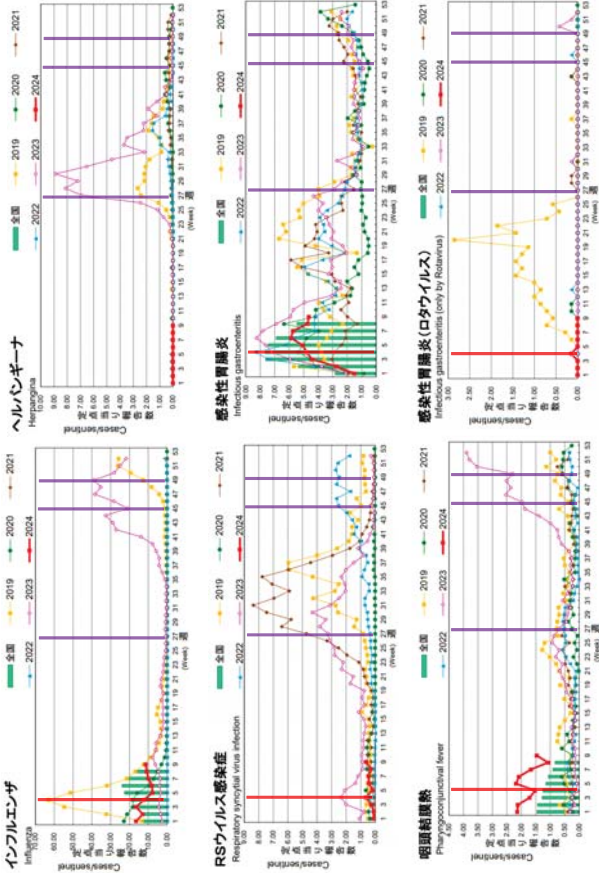
- Direct capture 法によって、短時間で核酸抽出ができ、高効率に検出ができた。
 - SARS-CoV-2 以外の項目を要検証
- VLP の添加回収試験によって、各検体間の相対的な回収率が比較できた。
 - 食品からの抽出においても活用できるか
- PMMoV については、定量値が大きく外れた時のトラブルシューティングとしても使える可能性がある。
 - VLP 添加前の検体について、均一性や供試料量など
- 令和 6 年度は、感染症流行予測調査として、月 2 回の採水と Direct capture 法によって、調査を継続したい。
 - ポリオ感染源調査も並行して実施

材料及び方法

1. 材料
 - ・2023年7月3日、12月4日、12月18日、2024年2月5日採水の環境水
2. 方法
 - (1)核酸抽出
 - ・ 上清 + 沈殿物 : Wizard® Enviro Total Nucleic Acid kit (Promega)
 - ・ 上清 (PEG) : QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN)
 - (2)cDNA合成 (反応条件は吉田先生の方法と同一)
 - ・Takara PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)
 - (3)qPCR (反応条件は吉田先生の方法と同一)
 - ・試薬 : TaqPath™ BactoPure™ Microbial Detection Master Mix, no Rox (10 uL 反応系)
 - ・プレート : TrueMark Custom Plates (カスタマイズ)
 - ・検量線用標準核酸 : Custom DNA control (1 x 10⁵ copies/μL) , WWS_control_1

福島県の下水検体を用いた複数検査系qPCRの評価

福島県衛生研究所 北川和寛



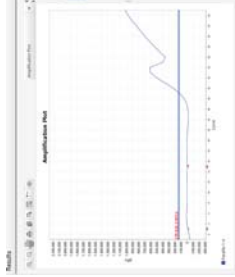
福島県感染症週報

採水日

- ・2023.7.3
- ・2023.12.4
- ・2023.12.18
- ・2024.2.5

検量線の結果

Respiratory System	Flu A/B	RS A/B	Rhino A-C	Parainflu 1-4	CoV (Seasonal)	Parecho
	Slope R2	-3.602 0.971	-3.539 0.999	-2.961 0.912	-4.185 0.994	-3.843 0.996
Promega						
PEG	Slope R2	-3.817 0.998	-3.678 0.999	-3.401 0.950	-4.321 0.994	-3.739 0.998
Gastro	NV-G1/G2	Astro	Sapo	RotA	Entero	Adeno
	-4.019 R2	-3.426 0.999	-3.739 0.951	-3.434 0.999	-3.379 0.998	-3.524 0.987
Promega						
PEG	Slope R2	-3.329 0.963	-3.265 0.999	-3.594 0.999	-2.804 0.909	-3.401 0.999

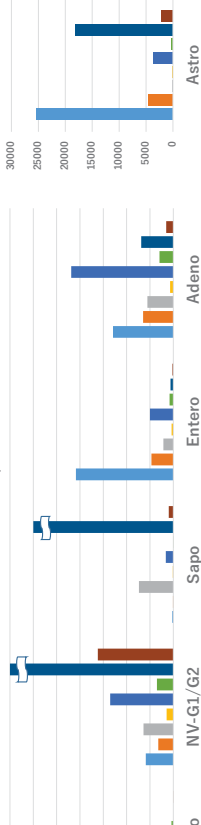


ParainfluのB77アレルが2/2枚に問題

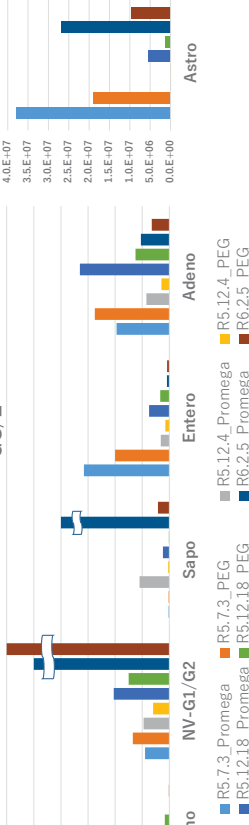
() 1/2のみ検出

GC/Reaction	Flu A/B	RS A/B	Rhino A-C	Parainfl 1-4	CoV (Seasonal)	Parecho	NV-G1/G2	Astro	Sapo	RotA	Entero	Adeno
R5.7.3_Promega	ND	ND	0.2	ND	ND	337.3	117.5	25394.1	4.4	(1.1)	417.5	258.4
R5.7.3_PEG	ND	ND	0.8	ND	ND	108.8	64.0	4498.2	(1.5)	ND	93.7	129.2
R5.12.4_Promega	ND	ND	0.5	ND	4.1	1.3	127.5	29.8	147.4	ND	42.4	110.6
R5.12.4_PEG	ND	ND	(0.0)	ND	(0.7)	8.5	28.7	2.4	2.1	ND	7.1	13.7
R5.12.18_Promega	ND	ND	0.3	ND	1.7	2.7	270.7	3647.6	31.9	ND	99.8	437.3
R5.12.18_PEG	ND	ND	0.2	ND	ND	8.0	70.1	301.6	1.1	ND	15.8	59.0
R6.2.5_Promega	ND	ND	ND	ND	ND	2693.9	18095.2	18095.2	1219.0	3.1	11.9	137.5
R6.2.5_PEG	ND	ND	ND	ND	ND	1.1	323.2	2229.2	19.5	ND	4.0	30.3
GC/L	Flu A/B	RS A/B	Rhino A-C	Parainfl 1-4	CoV (Seasonal)	Parecho	NV-G1/G2	Astro	Sapo	RotA	Entero	Adeno
R5.7.3_Promega	ND	ND	2.3.E+02	ND	ND	5.1.E+05	1.8.E+05	3.8.E+07	6.6.E+03	(1.7.E+03)	6.3.E+05	3.9.E+05
R5.7.3_PEG	ND	ND	3.3.E+03	ND	ND	4.7.E+05	2.7.E+05	1.9.E+07	(6.6.E+03)	ND	4.0.E+05	5.5.E+05
R5.12.4_Promega	ND	ND	8.1.E+02	ND	6.1.E+03	2.0.E+03	1.9.E+05	4.5.E+04	2.2.E+05	ND	6.4.E+04	1.7.E+05
R5.12.4_PEG	ND	ND	(8.0.E+01)	ND	(3.2.E+03)	3.6.E+04	1.2.E+05	1.0.E+04	8.9.E+03	ND	3.0.E+04	5.9.E+04
R5.12.18_Promega	ND	ND	3.9.E+02	ND	2.6.E+03	4.0.E+03	4.1.E+05	5.5.E+06	4.8.E+04	ND	1.5.E+05	6.6.E+05
R5.12.18_PEG	ND	ND	1.1.E+03	ND	ND	3.4.E+04	3.0.E+05	1.3.E+06	4.6.E+03	ND	6.8.E+04	2.5.E+05
R6.2.5_Promega	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.0.E+06	2.7.E+07	1.8.E+06	4.7.E+03	1.8.E+04	2.1.E+05
R6.2.5_PEG	ND	ND	ND	ND	ND	4.6.E+03	1.4.E+06	9.6.E+06	8.4.E+04	ND	1.7.E+04	1.3.E+05

GC/Reaction



GC/L



Materials and Methods

流入下水500 mlを50 mlずつ分け 3000 × g, 60 minで遠心

→ 上清は陰電荷膜法へ

500 mlの沈渣に対して0.5 mlのBeef extractで再懸濁

千葉県における流入下水中のSARS-CoV-2 遺伝子量とCOVID-19新規患者数の相関

千葉県衛生研究所
藤沼裕希、花田裕司

全ての懸濁液を50 ml遠沈管に移し、
ジルコニアビーズを入れボルテックス (15 min)

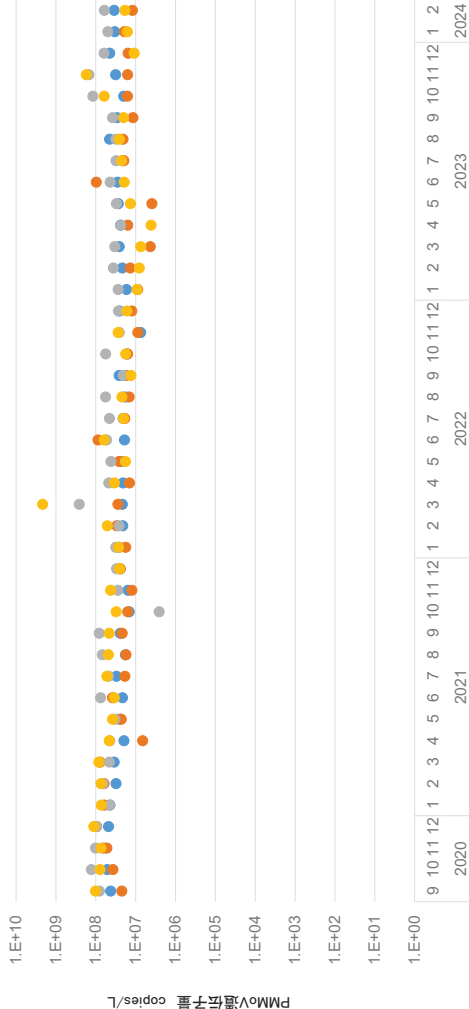
遠心 (10,000 × g, 20 min)

QIAamp® Viral RNA Mini kitでRNA抽出

SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (Takara) 及び
One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix with UNG (Takara) で遺伝子を確認

18

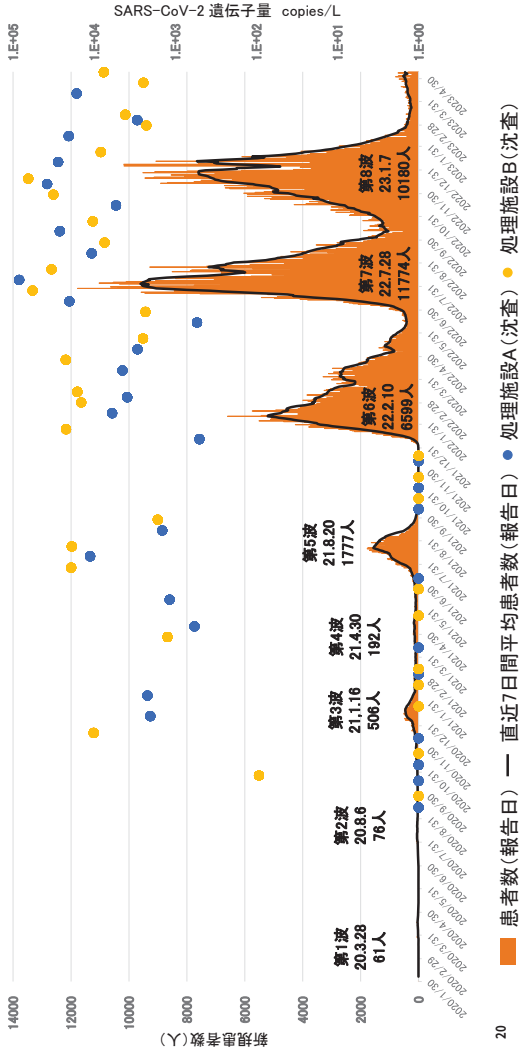
Result - PMMoV -



19

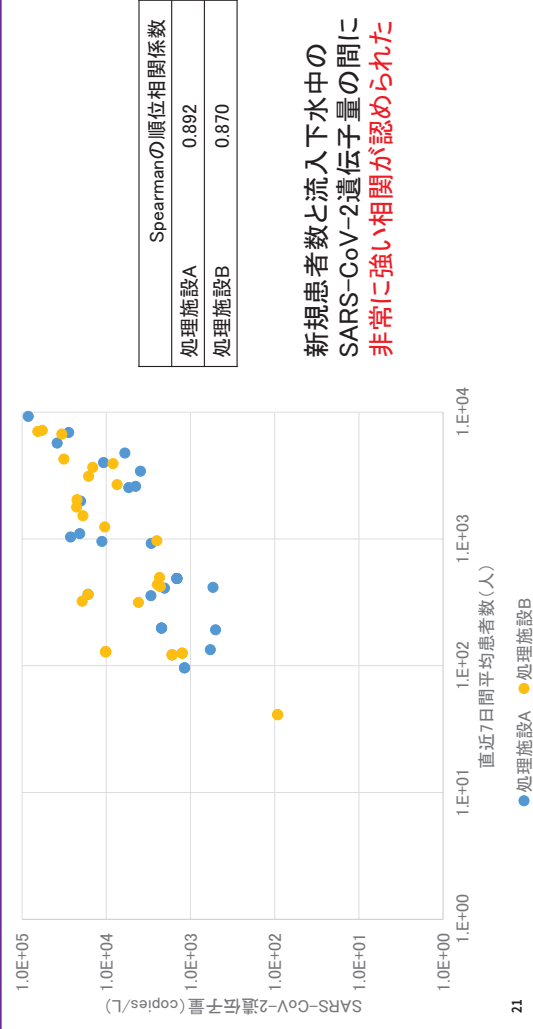
152

Result - SARS-CoV-2 vs Patients 1 -



20

Result - SARS-CoV-2 vs Patients 2 -



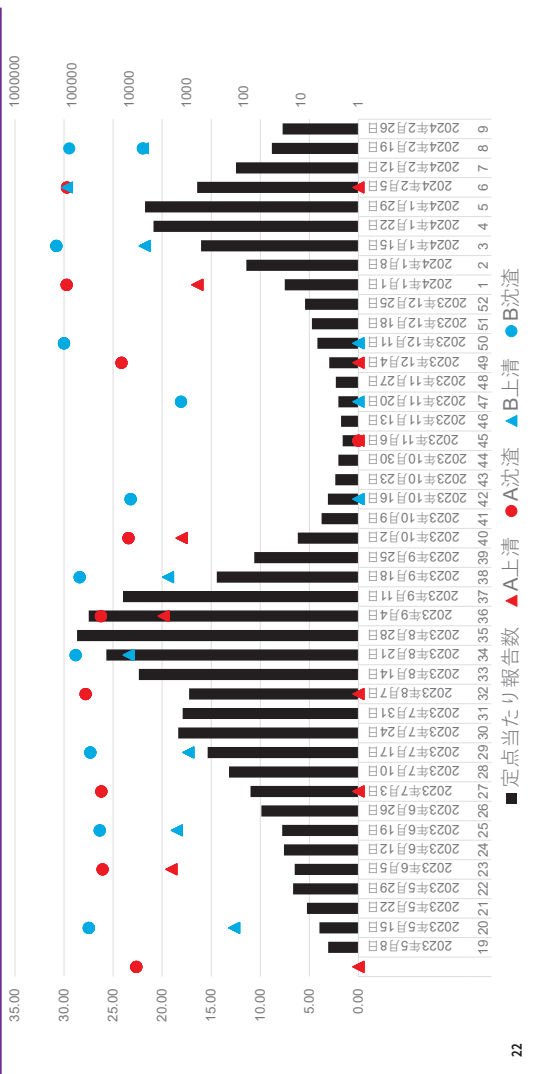
21

Result - SARS-CoV-2 vs Patients 4 -

Spearmanの順位相関係数				N=10
処理施設A		処理施設B		
上清	沈渣	上清	沈渣	
0.232148	0.793939	0.828283	0.50303	

23

Result - SARS-CoV-2 vs Patients 3 -



22

Discussion & Conclusion

- 流入下水中のSARS-CoV-2遺伝子量と新規患者数の間には、非常に強い相関があった。
- これは、流入下水中のSARS-CoV-2遺伝子量のモニタリングが、感染状況を示す指標として有用であることを示唆している。
- 今月中にパネルの検証実施予定。

24

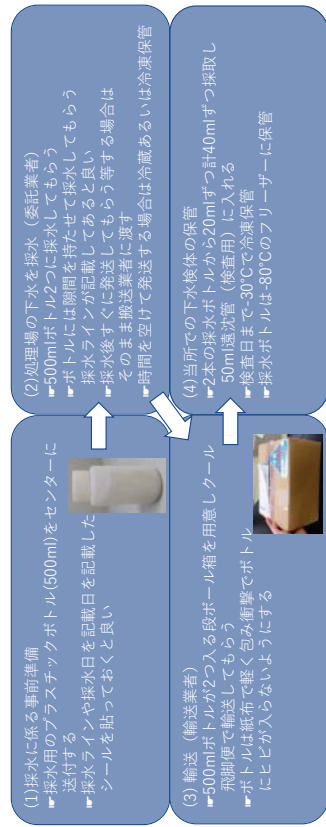
25

埼玉県における下水サーベイランスの 取組みについて

埼玉県衛生研究所ウイルス担当 黒沢博基 濱本紀子

採水及び検査までの流れについて

- ①採水地点：荒川水循環センター（現況処理人口197万人（2021年度末））
- ②採水間隔及び採水期間：2023年9月5日（火曜日）から開始。原則火曜日に週1回採水を行う。
- ③内容：新型コロナウイルス等感染状況の把握
- 分析項目：SARS-CoV-2 RNA等濃度解析
- 成果の取扱：ホームページで公開



埼玉県と環境水サーベイランスとの関わり

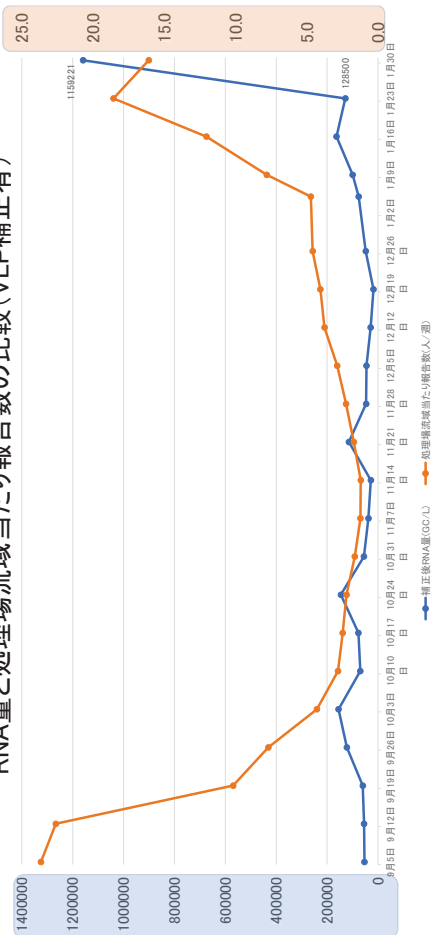
- ①2020年度10月～3月：
「環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制構築するための研究」（NIJIs）で当所で検査を実施。
- ②2021年度11月～12月：
「ポストコロナ時代の実現に向けた主要技術の実証・導入に係る事業企画」の公募で採択された企業に県がフィールドを提供。
- ③2022年度7月～1月：
「ウィズコロナ時代の実現に向けた主要技術の実証・導入に向けた調査研究業務」に参加。検査は外部機関に委託。
- ④2023年度9月～現在：
「環境水に含まれる新型コロナウイルス等病原体ゲノム情報の活用に関する研究」（NIJIs）に再び参加させていただき、現在進行形で当所で検査を実施中。

検査方法について

- 【材料】
 - ・埼玉県内1か所の下水処理施設の流入水
 - ・週に1回採水（検査は月毎にまとめて翌月の下旬に）
- 【使用試薬】
 - ・核酸抽出
 - Enviro Total Nucleic Acidキット (Promega)（沈査と上清を混合し核酸抽出）
 - ・インターナルコントロール
 - VLP-RNA Extraction Control ・リアルタイムPCR
 - SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit(コロナ)※
TaqmanFastVirus1-Step Master Mix(VLP)
- ※2well測定し平均値を算出

検査結果について

RNA量と処理場域当たり報告数の比較（VLP補正有）



※処理場域当たりの報告数は、さいたま市保健所、川口市保健所、南部保健所、鴻巣保健所の報告数の合計を医療機関の合計で割り算

下水に係るPCRパネルの結果について

下水検査の概要

① 抽出：Wizard® Enviro Total Nucleic Acid Kit (Promega)

※・40mlの検体を60μLで抽出。コントロールはVLP

② PCR検査

(1)PCRパネルに添加する検体を選別するための検査

- ・FTD Respiratory pathogens 21（呼吸器感染症病原体検出のPCR試薬）
- ・FTD Viral gastroenteritis（ウイルス性胃腸炎の検出のPCR試薬）

※・QS5を使用

- ・baselineを5-20に設定
- ・Threshold lineを20,000に設定しCt値で比較

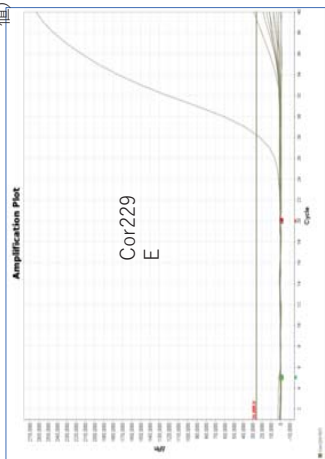
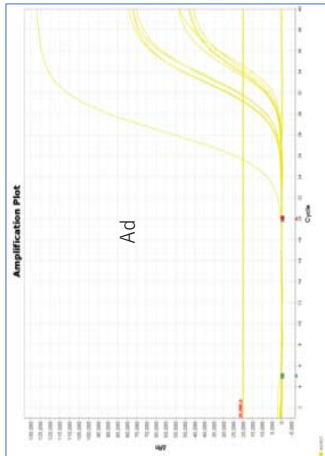
(2)PCRパネル検査

- ・呼吸器系ウイルスパネル
- ・胃腸炎系ウイルスパネル

※・QS5を使用

(1)呼吸器感染症病原体検出のPCR結果（Ct値）

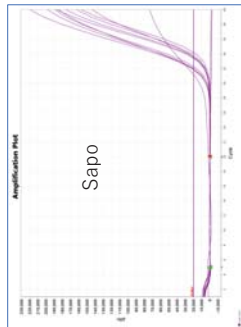
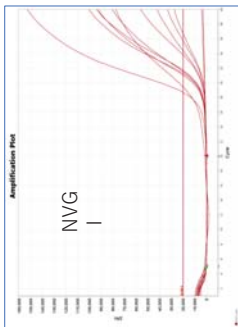
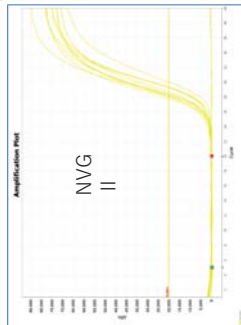
	FluA	FluB	FluM(N)	RhinA	Cor229E	CorG43	CorAN63	CorHKU1	MPXV1	MPXV2	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV35	HPV39	HPV45	HPV58	HPV59	EV
PC	27.2	28.0	28.4	28.5	28.5	28.0	28.2	28.9	29.9	29.9	28.3	28.3	31.3	28.4	28.8	27.4	27.4	25.8	27.3	27.6
19-4	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2
12-4	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2
1-1	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2
1-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2
1-3	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2
1-4	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2	12-2



(1) ウイルス性胃腸炎の検出のPCR結果(Ct値)

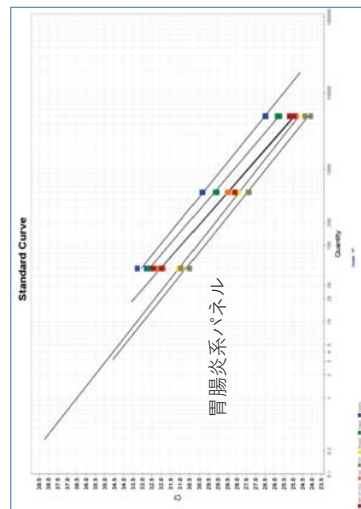
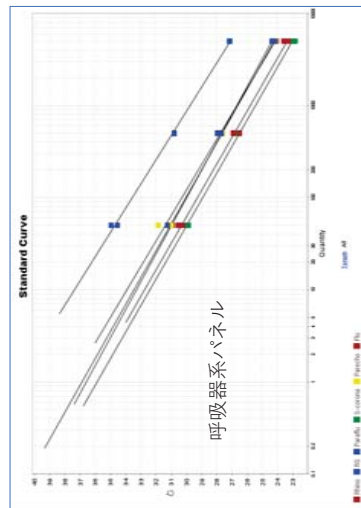
	NVG I	NVG II	Ad	RotA	Sapo
PC	29.4	28.6	26.3	30.0	31.2
12-1	33.8	33.7	29.6	28.4	31.8
12-2	36.7	34.3	29.1	28.1	31.9
12-3	35.7	33.8	29.5	28.0	32.3
12-4	34.4	33.0	29.1	27.8	32.0
1-1	28.7	33.4	33.3	29.3	33.5
1-2	31.0	32.0	34.1	28.3	33.4
1-3	31.7	33.0	31.6	29.3	33.8
1-4	31.5	32.5	32.3	29.2	34.2
1-5	31.3	31.5	36.6	28.7	33.6

(Ct値)

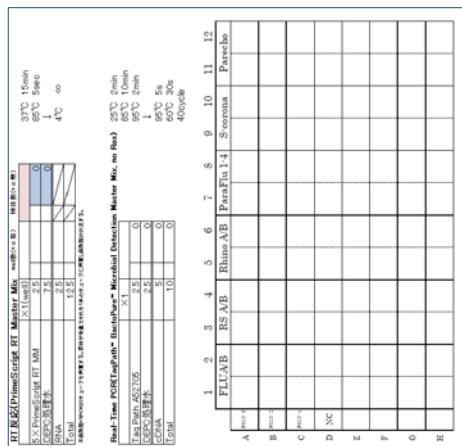


(2) PCRパネル検査のスタンダードカーブについて

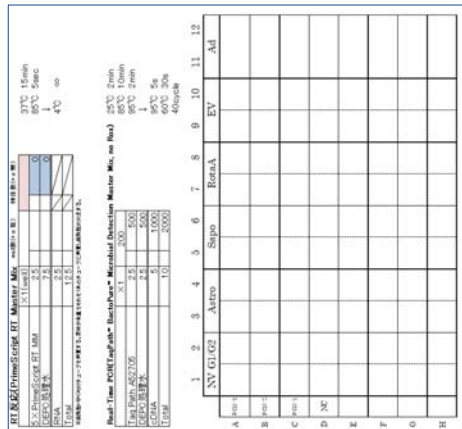
	呼吸器系ウイルスパネル					胃腸炎系ウイルスパネル				
	infA/B	RSA/B	RhinoA/C	Parecho	S-corona	infA/B	RSA/B	RhinoA/C	Parecho	S-corona
slope	-3.413	-3.798	-3.475	-3.304	-3.470	-3.413	-3.798	-3.475	-3.304	-3.470
R ²	0.998	0.998	0.995	0.991	0.996	0.998	0.998	0.995	0.991	0.996



(2) 呼吸器系ウイルスパネル

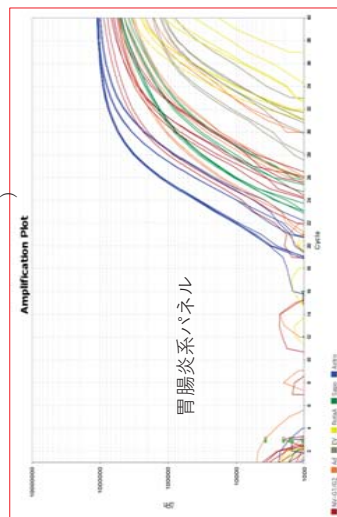
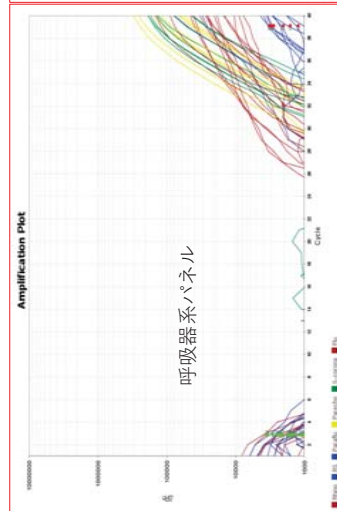


(2) 胃腸炎系ウイルスパネル



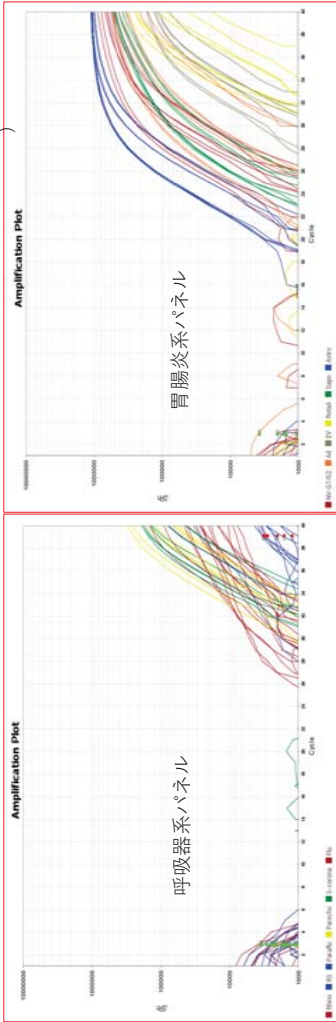
(2) PCRパネル検査の結果について

	呼吸器系ウイルスパネル					胃腸炎系ウイルスパネル				
	infA/B	RSA/B	RhinoA/C	Parecho	S-corona	infA/B	RSA/B	RhinoA/C	Parecho	S-corona
12-2(x1)	1/2	ND	105.4	ND	5.1	25.2	56.7	2977.3	341.3	225.3
12-2(10 ⁻¹)	1/2	ND	10.2	ND	0.9	3.9	12.8	11.0	19.5	1.9
1-5(x1)	52	1/2	52.2	1/2	4.1	7.2	4757.3	2998.9	9.4	11.0
1-5(10 ⁻¹)	0.6	ND	5.0	ND	1.4	2.7	636.8	2391.4	15.6	1/2

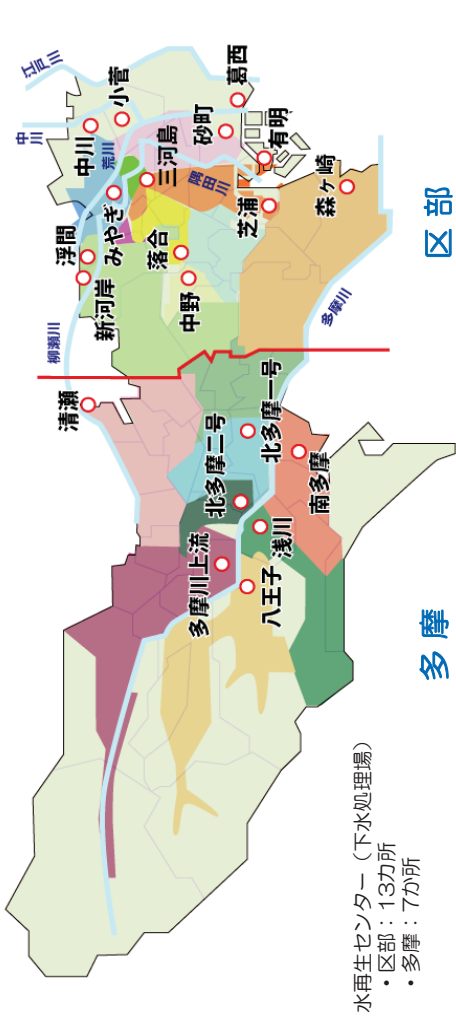


(2) PCRパネル検査の結果について

	呼吸器系ウイルスパネル				胃腸炎系ウイルスパネル			
	infA/B	RSA/B	RhinoA/C	Parainfl/2/3/4	SaV	RVB/C	EV	AdV
12-2(x1)	1/2	ND	3E+04	ND	1.5E+03	7.8E+03	3.0E+05	5.3E+05
12-2(10 ⁻¹)	1/2	ND	3E+03	ND	2.7E+02	1.2E+03	8.9E+04	1.4E+06
1-5(x1)	1.6E+03	1/2	2E+04	1/2	1.2E+03	2.2E+03	1.4E+06	5.1E+05
1-5(10 ⁻¹)	1.8E+02	ND	2E+03	ND	4.2E+02	8.1E+02	1.9E+05	7.2E+05



下水を活用した新型コロナウイルス広域流行状況調査



水再生センター（下水処理場）
・区部：13カ所
・多摩：7カ所

東京都における
下水中の新型コロナウイルス調査について

下水に関するプロジェクト：NUIs Project
環境水に含まれる新型コロナウイルス等
病原体ゲノム情報の活用に関する研究
令和5年度第2回班会議（2024.3.13.）

東京都健康安全研究センター
長島真美、熊谷遼太

熊谷ら、第63回日本臨床ウイルス学会
（2022.6.東京）

全自動遺伝子検査装置法

利点

- ・検査工程が簡便
- ・高度な検査技術を必要としない
- ・作業時間の短縮

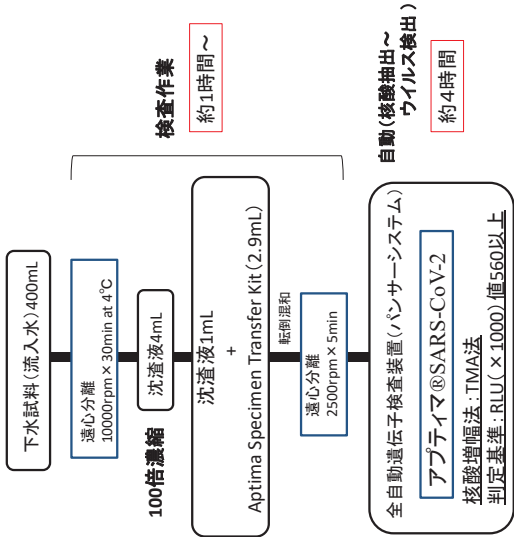
欠点

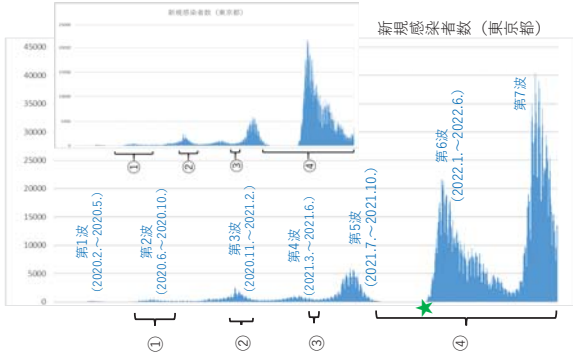
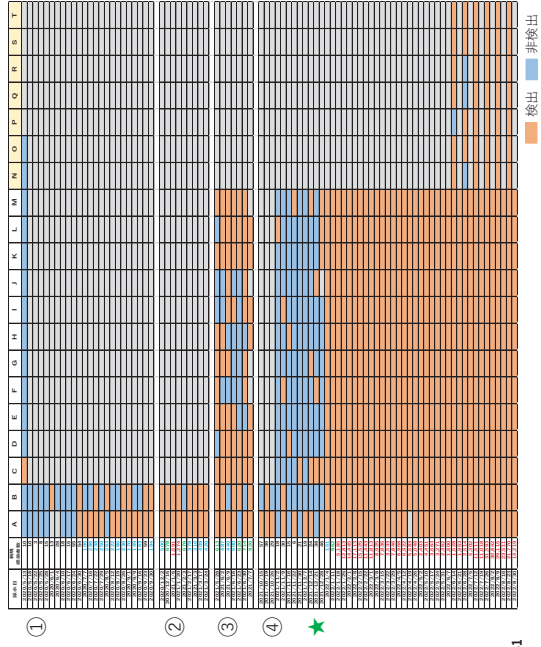
- ・専用機器、試薬を必要とする
- ・ウイルス定量ができない

コンタミネーションリスクの削減
多検体処理が可能（処理時間の削減）

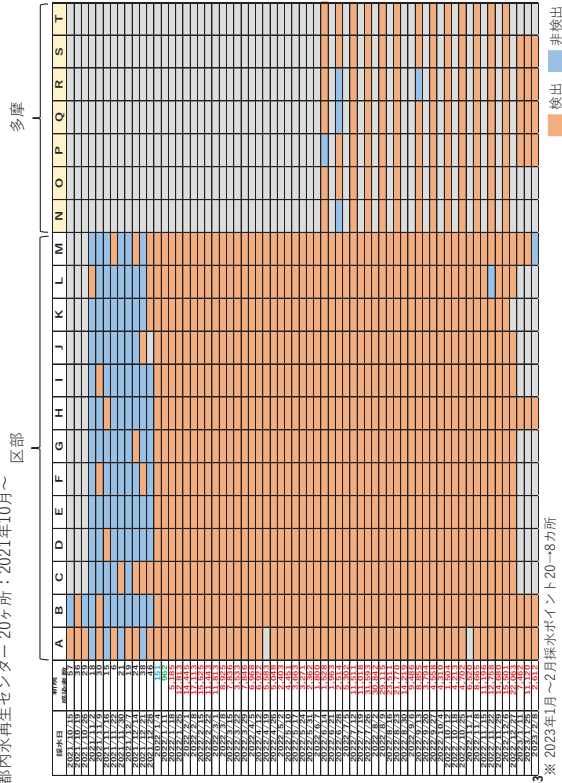
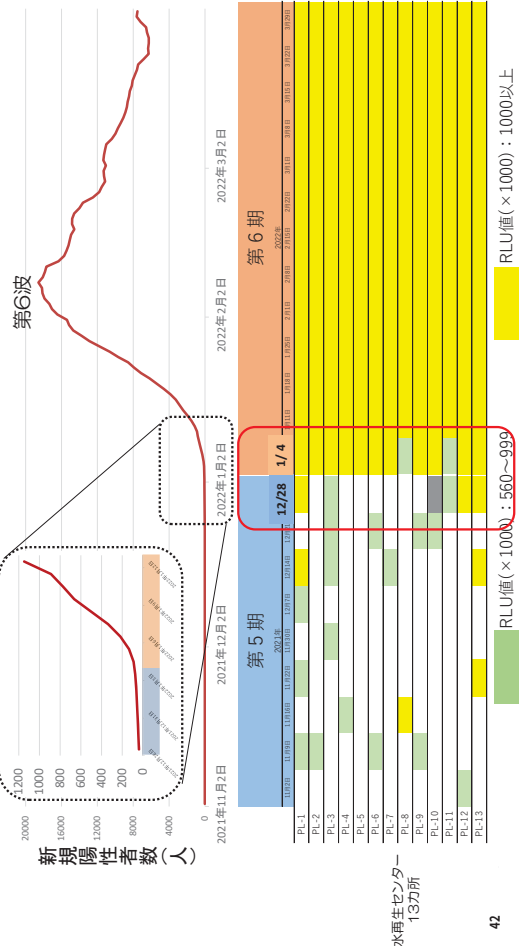
検出感度：10⁴コピー/mL（沈査）

検査フロー



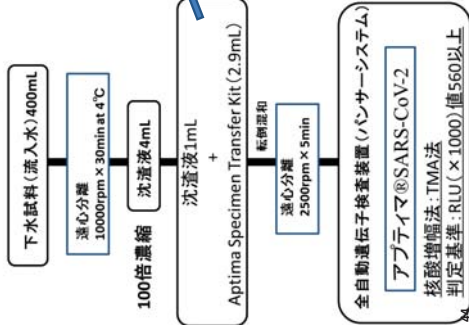


都内下水モニタリング (第5波後～第6波)



下水中の新型コロナウイルス半定量検査

＜全自動遺伝子検査装置＞

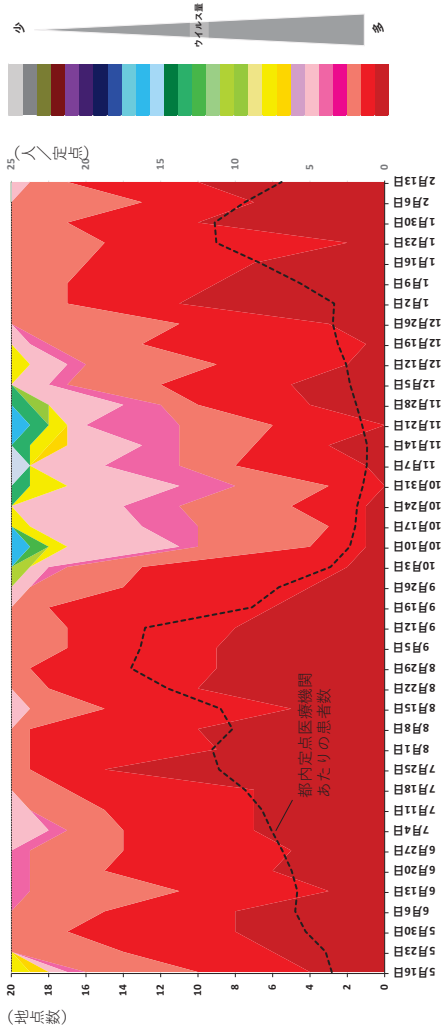


測定値を3段階に分けて評価
(陰性、弱陽性、陽性)

スコア化 (27段階)
ヒートマップとして表示



都内下水中の新型コロナウイルスモニタリング結果
(2023年5月16日～2024年2月13日)



PCRパネルの検討結果

検討サンプル4検体 (S-1～S-4)
→都内下水処理施設：4地点4サンプル (2024年1月採取)

	呼吸器パネル						胃腸炎パネル									
	FluA/B	RS A/B	Rhino A-C	ParaFlu1-4	Corona	Parecho	NV-G1/G2	Astro	Sapo	Rota A	entero	Adeno				
S-1	-	-	-	-	-	-	32.9	33.7	34.0	34.3	31.7	31.2	-	-	41.2	37.2
S-2	-	40.2	39.7	-	-	-	32.1	32.5	31.4	31.3	29.3	29.1	-	-	37.7	40.5
S-3	-	-	-	-	-	-	33.0	33.4	34.5	34.5	30.4	30.7	-	-	39.8	35.7
S-4	-	-	-	-	-	-	32.6	33.2	33.4	33.2	30.1	30.3	-	-	-	-

	slope	Y-intercept	R ²	Eff%
FluA/B	-4	40.7	0.986	77.0
RS A/B	-3.9	41.5	0.987	80.9
Rhino A	-3.90	40.8	0.997	80.4
ParaFlu	-3.8	40.5	0.997	84.4
Corona	-3.8	40.2	0.996	84.8
Parecho	-3.70	39.9	0.995	86.3
NV-G1/G2	-2.5	36.7	0.958	155.3
Astro	-2.5	36.2	0.962	156.0
Sapo	-2.1	35.3	0.923	194.5
Rota A	-1.9	35.2	0.810	244.8
entero	-2.5	36.3	0.908	152.7
Adeno	-2.3	34.6	0.876	166.5

リアルタイムPCR (腸管系)						
	G1	G2	Astro	Sapo	RotaA	Adeno
S-1	35.2	29.8	32.7	—	33.9	—
S-2	34.3	28.2	30.5	34.9	—	37.8
S-3	34.5	28.8	32.1	38.5	36.2	34.2
S-4	35.8	28.7	31.2	35.3	—	35.9

「環境水に含まれる新型コロナウイルス等病原体ゲノム情報の活用に関する研究」
第2回班会議
令和6年3月13日 (水) 9：30 ～ 12：00

横浜市内における下水中のウイルス調査結果

下水中の新型コロナウイルス検査の試料・方法について

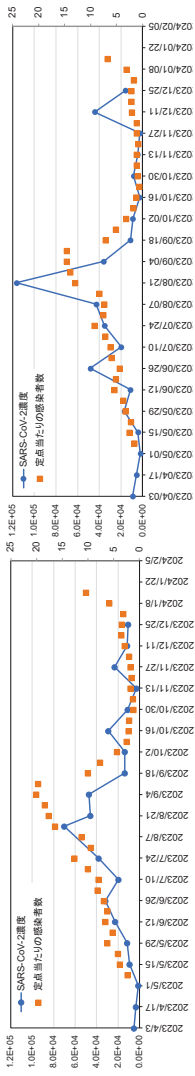
1. 試料

採水地点：2か所の水再生センター (処理人口：各約30万人～60万人)
調査期間：2023年4月～2023年12月
頻度・試料：1回/2週・下水沈殿物

2. 方法

- ・国立感染症研究所の下水中の新型コロナウイルス検出マニュアルに従い、実施した。

下水中の新型コロナウイルス濃度と新規感染者数の推移



水再生センター		A (n=17)	B (n=17)	合計 (n=17)
Spearman順位相関係数 (95% CI)		0.68** (0.29-0.87)	0.68** (0.29-0.87)	0.71** (0.34-0.88)
	Pearson相関係数 (95% CI)	0.71** (0.34-0.88)	0.66** (0.26-0.86)	0.76** (0.44-0.90)

** : p<0.01

※A、Bの新型コロナウイルス感染者数は処理区域が関係する行政区の定時点当たりの感染者者を合計し、合計はA及びBの定時点当たりの感染者数を用いた。

試薬(配布物使用)

抽出：RNeasy PowerSoil Total RNA KitまたはQIAamp Viral RNA Mini
cDNA合成：PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (10 μl/反応系)
RNA2.5μL→cDNA12.5μL

反応試薬：TaqPath™ BactoPure™ Microbial Detection Master Mix, no Rox (10 uL 反応系)

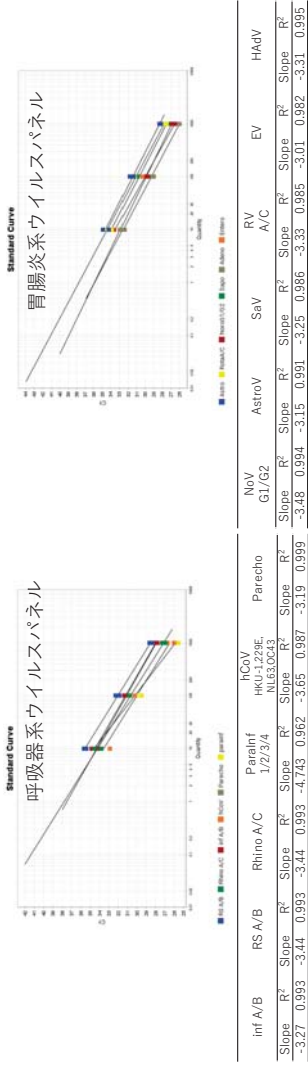
1 wellあたり		反応
TaqPath	2.5ul	25°C 2min
DW	2.5ul	85°C 10min
cDNA	5ul	95°C 2min
total	10ul	95°C 5s
		60°C 30s

呼吸器パネル：LOT# 8219406
胃腸炎パネル：LOT# 8219407

0.2mLプレートでパネル配布のため、0.1mLプレートに移して測定
陽性コントロールは10³、10²、10¹/reactionで使用



陽性コントロール



カスタムプレートを用いた複数ウイルス検出の結果

	inf A/B	RS A/B	Rhino A/C	Parainf 1/2/3/4	HCoV	Parecho	NoV GI/G2	AstroV	SaV	RV A/C	EV	HAdV
12月-1 沈査	1/2	ND	ND	ND	ND	ND	5.4E+03	7.1E+04	1.8E+04	ND	1/2	1.4E+05
12月-1 沈査(10倍希釈)	1/2	ND	ND	ND	ND	ND	8.5E+04	6.9E+05	2.4E+05	ND	1/2	3.0E+04
12月-1 上清濃縮物	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.6E+05	8.6E+05	3.2E+04	3.4E+01	8.5E+03	4.3E+03
12月-2 沈査	1/2	ND	ND	ND	ND	ND	1.1E+03	3.1E+04	4.5E+03	ND	ND	ND
12月-2 沈査(10倍希釈)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.3E+03	5.1E+04	9.8E+03	ND	ND	1/2
12月-2 上清濃縮物	ND	ND	1.2E+04	ND	ND	ND	2.0E+05	9.1E+05	7.2E+04	4.7E+04	6.3E+03	1.3E+04
1月-1 上清濃縮物	ND	ND	1/2	ND	ND	ND	5.1E+05	1.2E+06	6.6E+04	2.2E+03	4.7E+03	3.1E+03
1月-2 上清濃縮物	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.8E+03	1.1E+06	2.6E+06	3.8E+04	2.1E+03	2.8E+03

(GC/L)

1/2・2well中 1well 陽性
包封セル：検出限界以下を含む

分離頻度との比較

EV		HAdV	
定量値 (GC/L)	分離頻度*	定量値 (GC/L)	分離頻度*
8500	17/30	4300	7/10
6300	19/30	13000	10/10
4700	8/30	3100	8/10
2100	2/30	2800	6/10

*CPEの数

カスタムプレートを用いた複数ウイルス検出の結果

	inf A/B	RS A/B	Rhino A/C	Parainf 1/2/3/4	HCoV	Parecho	NoV GI/G2	AstroV	SaV	RV A/C	EV	HAoV
12月-1 沈査	1/2	ND	ND	ND	ND	ND	5.4E+03	7.1E+04	1.8E+04	ND	1/2	1.4E+05
12月-1 沈査(10倍希釈)	1/2	ND	ND	ND	ND	ND	8.5E+04	6.9E+05	2.4E+05	ND	1/2	3.0E+04
12月-1 上清濃縮物	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.6E+05	8.6E+05	3.2E+04	3.4E+01	8.5E+03	4.3E+03
12月-2 沈査	1/2	ND	ND	ND	ND	ND	1.1E+03	3.1E+04	4.5E+03	ND	ND	ND
12月-2 沈査(10倍希釈)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.3E+03	5.1E+04	9.8E+03	ND	ND	1/2
12月-2 上清濃縮物	ND	ND	1.2E+04	ND	ND	ND	2.0E+05	9.1E+05	7.2E+04	4.7E+04	6.3E+03	1.3E+04
1月-1 上清濃縮物	ND	ND	1/2	ND	ND	ND	5.1E+05	1.2E+06	6.6E+04	2.2E+03	4.7E+03	3.1E+03
1月-2 上清濃縮物	ND	ND	ND	ND	ND	2.8E+03	1.1E+06	2.6E+06	3.6E+04	1.1E+05	2.1E+03	2.8E+03

(GC/L)

まとめ

- ・新型コロナウイルスの検出について
定当たりの患者数と下水中のウイルス濃度は相関に正の相関が確認できた。
一方で、5類移行後の下水検体が少ないため、今後の傾向を確認する必要がある。
- ・カスタムプレートを用いた結果について
呼吸器系ウイルスはほとんど検出できなかった。
腸管系ウイルスは検出できた。

富山県における下水流入水の
SARS-CoV-2調査と複数種ウイルス
のリアルタイムPCR試行

富山県衛生研究所ウイルス部

板持雅恵、川上利恵、谷英樹

令和5年度厚生労働科学研究費補助金指定研究「環境水に含まれる新型コロナウイルス等
病原体ゲノム情報の活用に関する研究」第2回班会議 2024年3月13日

背景と目的

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 感染症は、呼吸器疾患であるが、ウイルスが腸管細胞でも増殖し糞便に排出されること、また不顕性感染も存在することから、下水流入水を対象とした環境サーベイランスにより、地域流行をモニタリングする試みが進められている。



そこで、本研究では、定期的に下水流入水ウイルス量を測定することにより、SARS-CoV-2等の地域流行の把握に役立てる。
また、その他の感染症法の定点把握疾患のウイルスについても、ウイルスゲノム量のトレンド分析により、地域の患者サーベイランスを補完する手段となるか検討する。

方法

富山県：1下水処理場（分流式）処理人口約20万人 （流域の定点医療機関数20）		
1)	採水頻度	週1回
	採水量	毎週100mL (-15℃)、月1回2L (4℃)
	衛研への搬入方法	月1回の採水日に1か月分を受け取り（公用車）
	一時保管の条件	-15℃（下水処理施設の冷凍庫）
	検査スケジュール	月1回の採水日に1か月分を検査
2)	供試容量、RNA抽出方法	毎週40mL：Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit（プロメガ） 月1回1L：陰電荷膜法→QIAamp Viral RNA Mini kit（キアゲン）
3)	コロナ検出キット、検出下限値	SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater（タカラバイオ） 検出下限値：プロメガ100コピー/L、陰電荷膜法1,000コピー/L
4)	信頼性確保	トウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）（タカラバイオのキットに付属）

複数種ウイルスのリアルタイムPCR試行

- サンプル
2023年9月～2024年2月に月1回採取した下水流入水
- RNA抽出

- 流入水40mL→Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit (Promega) 溶出量40μL
- 流入水1L→陰電荷膜法（濃縮液10mL）→QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) 溶出量60μL

cDNA合成

1 ウェル	
5XRTmix	2.5ul
DW	7.5
RNA	2.5
	12.5ul

PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)

リアルタイムPCR

TaqPath™ BactoPur™ Microbial Detection Master Mix no ROX
使用機器：Quant Studio 5 (100μL) fast mode

対象病原体：

呼吸器パネル (Thermo, 8219 406)：A型/B型インフルエンザウイルス、RSウイルスA/B、ライノウイルスA-C、ヒトコロナウイルス (HKU1, NL63, OC43, 229E)、パレコウイルス
胃腸炎パネル (Thermo, 8219 407)：ノロウイルスG1/G2、アストロウイルス、サボウイルス、A群ロタウイルス、エンテロウイルス、アデノウイルス

1 ウェル		25℃	2min
TaqPathA52705	2.5ul	85℃	10min
DW	2.5ul	95℃	2min
cDNA	5ul	95℃	5s
	10ul	60℃	30s

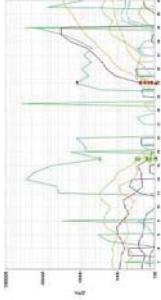
x40

複数種ウイルスのリアルタイムPCR

呼吸器パネル

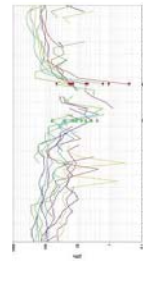
陽性コントロール (PC) と
下水流入水サンプル (2023年9月～2024年2月)

インフルエンザA/B



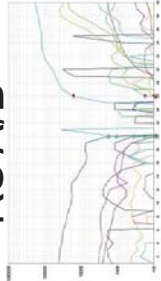
Slope	-2.691
R ²	0.958

パラインフルエンザ1-4



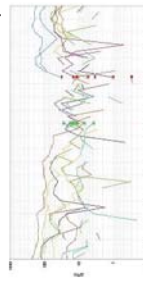
Slope	0.329
R ²	0.751

RS A/B



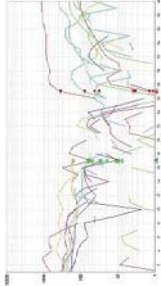
Slope	1.841
R ²	0.693

ヒトコロナ(HKU1, NL63, OC43, 229E)



Slope	-0.945
R ²	1

ライノA-C



Slope	-4.335
R ²	0.948

パレコ

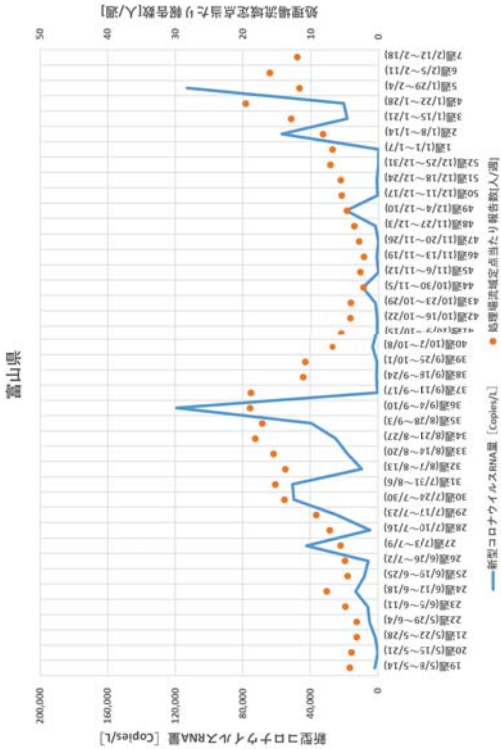


Slope	0
R ²	0

結果

SARS-CoV-2の検出推移

検査方法：週1回：Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit (プロメガ)
遺伝子検出工程のコントロールとしてPMMoVの検出を確認した。



58

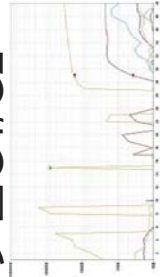
下水中の新型コロナウイルス調査プロジェクト <https://nijis.jp/#data-04>

複数種ウイルスのリアルタイムPCR

胃腸炎パネル

陽性コントロール (PC) と
下水流入水サンプル (2023年9月～2024年2月)

ノロG1/G2



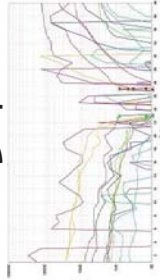
Slope	0
R ²	0

アストロ



Slope	-3.631
R ²	0.997

サポ



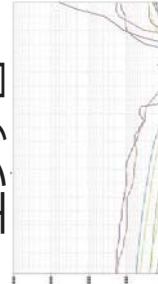
Slope	-3.785
R ²	1

ロタA



Slope	0
R ²	0

エンテロ



Slope	-3.631
R ²	0.997

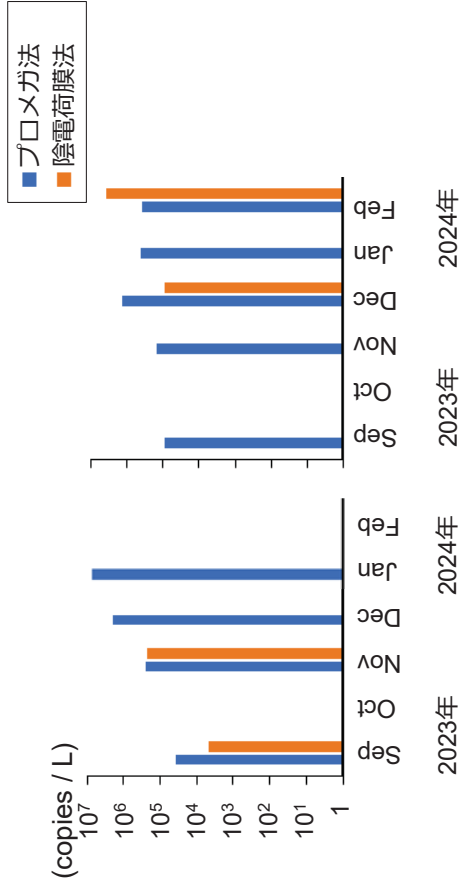
アデノ



Slope	-4.422
R ²	0.974

下水流入水のウイルス定量 (2023年9月～2024年2月、富山県)

アストロウイルス アデノウイルス



61

まとめ (複数種ウイルス)

- 配布されたプレートは、プライマー・プローブがあらかじめ分注されているため、作業が簡易であることがメリットである。
- しかしながら、各ウイルス遺伝子の増幅曲線が、ベースラインの補正後も、きれいなS字曲線を示さないことがあった
(→ROXの添加に関する検討が必要?)。また、陽性コントロールの検量線は、r (ばらつき)、slope (増幅効率) の値が適正ではないものが多いことから、検査系全体の見直しが必要であると考えられた。
- 当所のリアルタイムPCR装置は、100μL用のため、配布パネルからの試薬の移し替えを行った。配布パネルは100μLプレートがありがたい。

63

まとめ (SARS-CoV-2)

- 富山県内1 下水処理場の下水流入水調査において、SARS-CoV-2は 2022年2月から2024年2月現在までほぼ継続して検出されている。

62

令和5年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
新興・再興感染症及び予防政策推進研究事業
「環境水に含まれる新型コロナウイルス等病原体ゲノム情報の活用に関する研究」
第2回班会議 令和6年3月13日

岐阜県における下水検体からの 新型コロナウイルス遺伝子検出状況 (R5年4月～R6年2月)

岐阜県保健環境研究所

64

【採水ポイントに関する情報】

- 岐阜県では1か所にて毎週採水を実施。
- ポイントの処理人口、感染症指定医療機関※の有無、事業所総数※は以下の通り。

処理場	処理人口 (万人)	感染症指定医療機関 有無	事業所総数
21-R02016	約20~50	あり	41,152

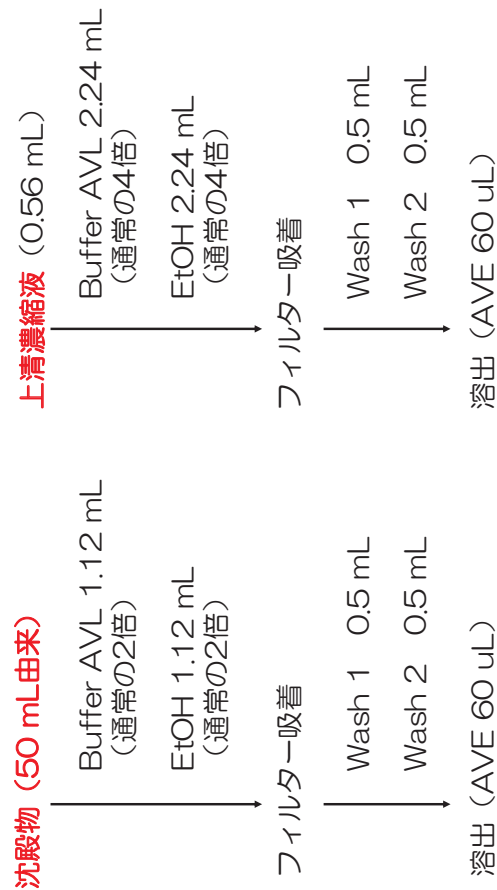
※感染症指定医療機関：第一種および第二種感染症指定医療機関に指定されている病院の有無
※事業所総数は、令和元年度経済センサスの活動事業所数について、甲乙調査の結果を合わせた数を示す

【当該施設流入水の特徴】

- 処理場の上流域からの流入水に**逆流水**（高分子凝集剤やポリ硫酸第二鉄などを含む）が流入水全量の約1割注入され、その後、下流域からの流入水が合流した地点での採水である。
- 逆流水に含まれる高分子凝集剤などが流入水中ウイルスの挙動に影響している？
- 沈査だけでなく、上清（濃縮物）からも新型コロナウイルス遺伝子が検出される。

65

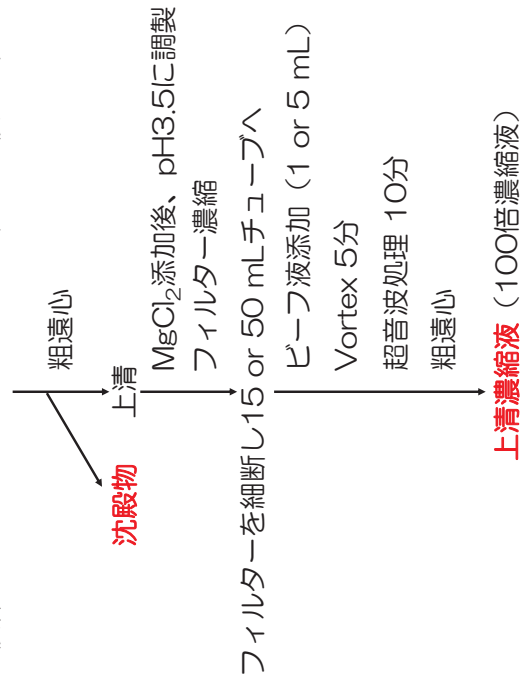
遺伝子抽出 QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)



67

下水検体の処理方法

検体サンプル 100 or 500 mL (ポリオ検査時)



66

遺伝子検出

使用機器：Quantstudio 5 (Thermo Fisher Scientific)

試薬

コロナ定量：2穴/1 Sample (10 μ L)

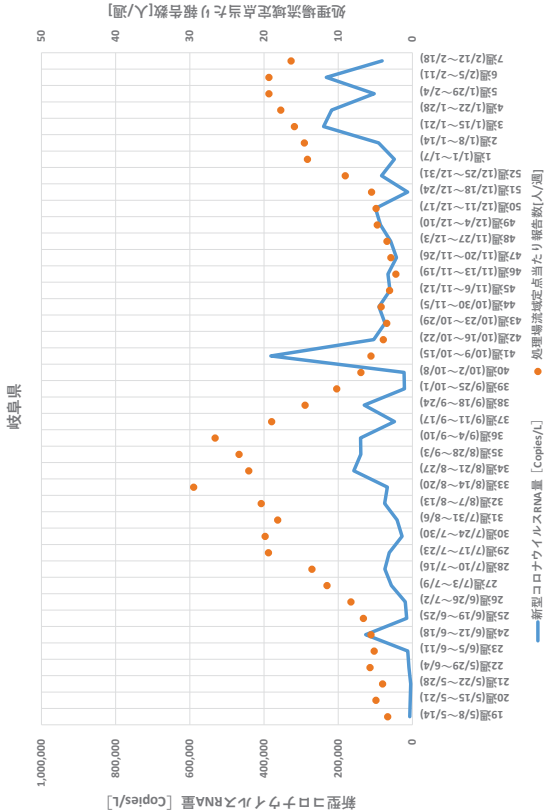
SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (TaKaRa)

PMMoV定量 (7 μ L/1 Sample)：2穴/1 Sample (5 μ L)

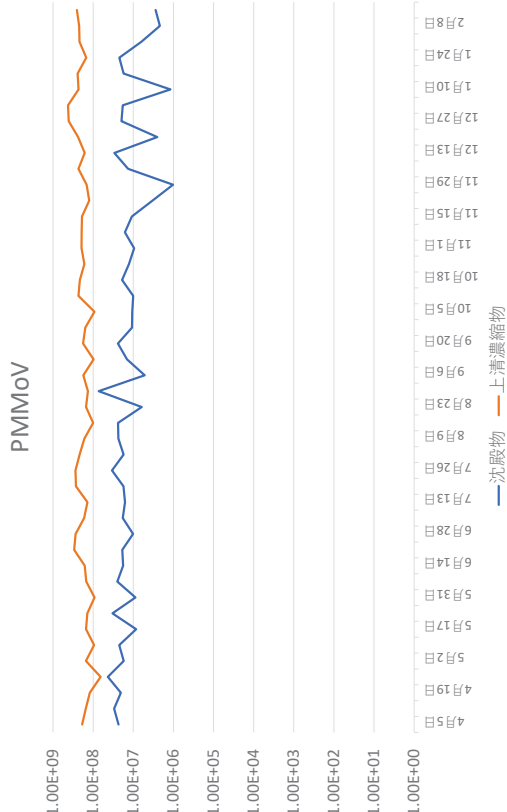
One Step PrimeScriptTM III RT-qPCR Mix (TaKaRa)

R6.2.14採取検体より抽出RNAを3倍希釈してからコロナ遺伝子の定量を行うこととした。(ネガティブコントロールへのコンタミネーションが起こり、再検査のための検体を確保するため → 阻害効果軽減にもつながる)

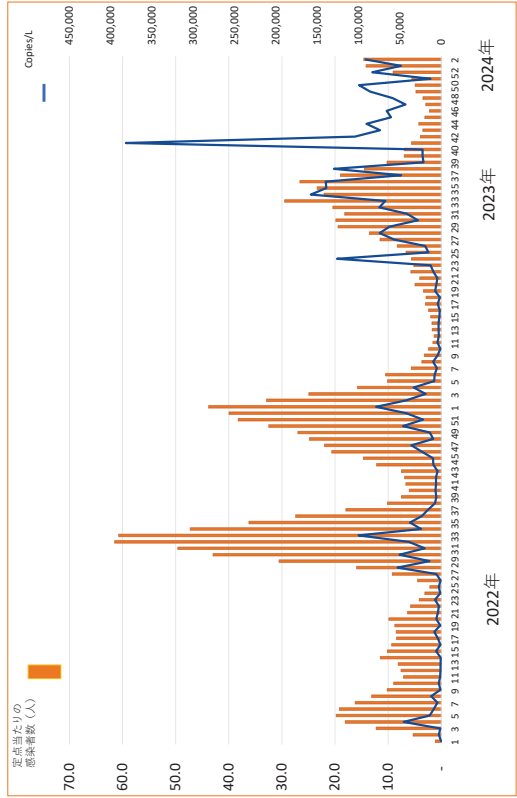
【R5年4月~の調査結果】
・対象処理場における新型コロナウイルスRNA量及び定点あたりの報告数は以下の通り。



【R5年4月~の調査結果】
・対象処理場におけるPMMoV RNA量は以下の通り。



【R4年4月~の調査結果】
・対象処理場における新型コロナウイルスRNA量及び定点あたりの報告数は以下の通り。



まとめ

- ・5類移行後、新型コロナウイルス定点当たり報告数の増減に伴い、遺伝子検出量の増減がみられた。一方、定点報告になった前後の比較では検出ウイルス遺伝子量が多く検出される傾向がみられた。→ 不顕性感染者の増加？ 医療機関を受診しない人の増加？ → 引き続き動向を注視する必要がある。
- ・今回の検査にて、部内で同時並行にて行われているゲノム解析のコンタミが疑われる事案が生じた。これを踏まえ、以後は再検査が必要となった場合の備え、および遺伝子増幅の阻害効果軽減が期待できる希釈したRNA検体で検査を行う予定。
- ・本発表までにパネルの検査は行うことができなかったが、近く上清濃縮物と沈査との比較で行う予定。

愛知県における下水検体からの 新型コロナウイルス遺伝子検出および パネル検査の結果について

愛知県衛生研究所
生物学部ウイルス研究室
伊藤 雅、中村範子、廣瀬絵美、諏訪優希、佐々誠紀
石田久仁子、菅川洋子

73

方法概要

- 採水場所
県内下水処理場 1か所 接続人口:約53万人
- 採水頻度・採水量
毎週水曜日、10時頃に採水 500mL (250mL×2) -20℃凍結保存
- 衛研への搬入方法
管轄保健所職員が車や公共交通機関を利用し、不定期に凍結状態で搬入
- 一時保管の条件
-30℃の冷凍室(管理区域内プレハブ冷凍室)
- 検査スケジュール
月単位の検体が揃い次第、感染症流行予測調査(ポリオ感染源)の試料調整と並行して処理し、核酸抽出後-80℃に保存または速やかに検査実施

74

検出法の検討結果(令和2年～4年度)

- 検討① 検体の比較 沈渣 > 上清
→ 新型コロナウイルスは沈渣に存在(ポリオ感染源は上清検体で検査)
- 検討② 核酸抽出法の比較 磁気ビーズ式 ≧ カラム式
→ 磁気ビーズは夾雑物が多い検体に有効
- 検討③ リアルタイムRT-PCR検出領域の比較 CDC法 ≧ NIID法
→ 下水検体で高感度に検出(感染者のスクリーニング検査でも使用)

下水中から新型コロナウイルス遺伝子検出に適した条件を決定

75

方法概要

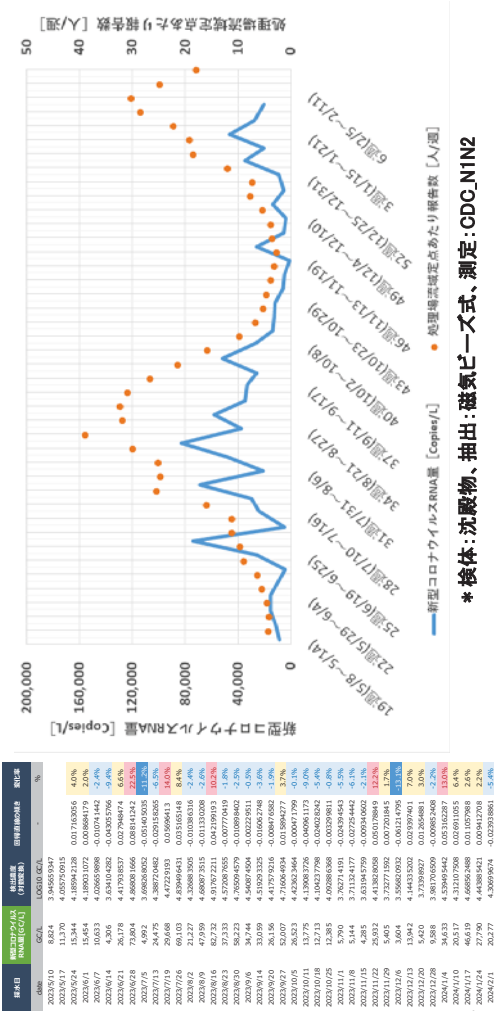
- 検体処理
供試容量 500mL/月 (250 mL/週) 3500rpm、30分処理後、上清を取り分け
沈殿物にガラスビーズを加えボルテックス処理、ウイルス誘出液 5mL(2.5mL)にて
100倍濃縮沈渣検体とする
- RNA抽出法
プロメガ自動 Maxwell® (RSC) Viral TNA (磁気ビーズ式)
- リアルタイムPCR試薬
TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix CDC_N1/N2
- リアルタイムPCR機器
ABI 7500 Fast
- 信頼性確保
トウガラシ微生物ウイルス(PMMoV)
- LODの設定方法
月毎処理 50μL × (1000/((500mL × 0.2mL)/5mL))
週毎処理 50μL × (1000/((250mL × 0.2mL)/2.5mL))

76

愛知県報告 (R5.4~)

【R5年4月～の調査結果】

- 対象処理場における新型コロナウイルスRNA量及び定点あたりの報告数は以下の通り。



* 検体: 沈殿物、抽出: 磁気ビーズ式、測定: CDC_N1N2

77

PCRパネル検査
材料および方法

- 検体

2023年3月、6月、9月、12月の下水上清及び沈渣から抽出した遺伝子

抽出方法と使用キット

沈渣:【磁気ビーズ式】Maxwell®(RSC) Viral TNA
上清:【カラム式】QIAamp Viral RNA Mini Kit

- cDNA合成

検体は使用前に95℃5分加熱後急冷

試薬: PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)

	5 × RTmix	2.5ul	反応
DW	7.5ul		37℃ 15min
RNA	2.5ul		85℃ 5sec
cDNA	12.5ul		4℃ ∞

材料および方法

- プライマー&プロブ固相パネル 呼吸器用、胃腸炎用: 各2枚

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5000	2023/03-Sed	5000	2023/03-Sed	5000	2023/03-Sed	5000	2023/03-Sed	5000	2023/03-Sed	5000	2023/03-Sed
B	5000	2023/03-Sed	5000	2023/03-Sed	5000	2023/03-Sed	5000	2023/03-Sed	5000	2023/03-Sed	5000	2023/03-Sed
C	500	2023/03-Sup	500	2023/03-Sup	500	2023/03-Sup	500	2023/03-Sup	500	2023/03-Sup	500	2023/03-Sup
D	500	2023/03-Sup	500	2023/03-Sup	500	2023/03-Sup	500	2023/03-Sup	500	2023/03-Sup	500	2023/03-Sup
E	50	2023/06-Sed	50	2023/06-Sed	50	2023/06-Sed	50	2023/06-Sed	50	2023/06-Sed	50	2023/06-Sed
F	50	2023/06-Sed	50	2023/06-Sed	50	2023/06-Sed	50	2023/06-Sed	50	2023/06-Sed	50	2023/06-Sed
G	NC	2023/06-Sup	NC	2023/06-Sup	NC	2023/06-Sup	NC	2023/06-Sup	NC	2023/06-Sup	NC	2023/06-Sup
H	NC	2023/06-Sup	NC	2023/06-Sup	NC	2023/06-Sup	NC	2023/06-Sup	NC	2023/06-Sup	NC	2023/06-Sup
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5000	2023/09-Sed	5000	2023/09-Sed	5000	2023/09-Sed	5000	2023/09-Sed	5000	2023/09-Sed	5000	2023/09-Sed
B	5000	2023/09-Sed	5000	2023/09-Sed	5000	2023/09-Sed	5000	2023/09-Sed	5000	2023/09-Sed	5000	2023/09-Sed
C	500	2023/09-Sup	500	2023/09-Sup	500	2023/09-Sup	500	2023/09-Sup	500	2023/09-Sup	500	2023/09-Sup
D	500	2023/09-Sup	500	2023/09-Sup	500	2023/09-Sup	500	2023/09-Sup	500	2023/09-Sup	500	2023/09-Sup
E	50	2023/12-Sed	50	2023/12-Sed	50	2023/12-Sed	50	2023/12-Sed	50	2023/12-Sed	50	2023/12-Sed
F	50	2023/12-Sed	50	2023/12-Sed	50	2023/12-Sed	50	2023/12-Sed	50	2023/12-Sed	50	2023/12-Sed
G	NC	2023/12-Sup	NC	2023/12-Sup	NC	2023/12-Sup	NC	2023/12-Sup	NC	2023/12-Sup	NC	2023/12-Sup
H	NC	2023/12-Sup	NC	2023/12-Sup	NC	2023/12-Sup	NC	2023/12-Sup	NC	2023/12-Sup	NC	2023/12-Sup

- 陽性コントロールは5000、500、50copies/5ul

79

材料および方法

- リアルタイムPCR試薬

TaqPath BactoPure Microbial Detection Master Mix, no Rox

胃腸炎 3 & 6月パネルを除く3つのパネルにはTakaRa ROX Dye I を添加

	1well	1well	反応
TaqPath	2.5ul	TaqPath	25℃ 2min
DW	2.5ul	ROX Dye I	85℃ 10min
cDNA	5ul	DW	95℃ 2min
total	10ul	cDNA	95℃ 5s
		total	60℃ 30s

- リアルタイムPCR機器

ABI 7900 Ht (0.2mLプレート使用可)

まとめ

	呼吸器パネル					胃腸炎パネル						
	Flu A/B	RS A/B	Rhino A-C	ParvFlu 1-4	coronaHKU1/JL64228L0040	Parechovirus	NV-G1/G2	Astro	Sapo	RotA	entero	Adeno
3月	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者
	2023/03-Sup 陽性者	2023/03-Sup 陽性者	2023/03-Sup 陽性者	2023/03-Sup 陽性者	2023/03-Sup 陽性者	2023/03-Sup 陽性者	2023/03-Sup 陽性者	2023/03-Sup 陽性者	2023/03-Sup 陽性者	2023/03-Sup 陽性者	2023/03-Sup 陽性者	2023/03-Sup 陽性者
	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者	2023/03-Seq 陽性者
6月	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者
	2023/06-Sup 陽性者	2023/06-Sup 陽性者	2023/06-Sup 陽性者	2023/06-Sup 陽性者	2023/06-Sup 陽性者	2023/06-Sup 陽性者	2023/06-Sup 陽性者	2023/06-Sup 陽性者	2023/06-Sup 陽性者	2023/06-Sup 陽性者	2023/06-Sup 陽性者	2023/06-Sup 陽性者
	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者	2023/06-Seq 陽性者
9月	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者
	2023/09-Sup 陽性者	2023/09-Sup 陽性者	2023/09-Sup 陽性者	2023/09-Sup 陽性者	2023/09-Sup 陽性者	2023/09-Sup 陽性者	2023/09-Sup 陽性者	2023/09-Sup 陽性者	2023/09-Sup 陽性者	2023/09-Sup 陽性者	2023/09-Sup 陽性者	2023/09-Sup 陽性者
	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者	2023/09-Seq 陽性者
12月	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者
	2023/12-Sup 陽性者	2023/12-Sup 陽性者	2023/12-Sup 陽性者	2023/12-Sup 陽性者	2023/12-Sup 陽性者	2023/12-Sup 陽性者	2023/12-Sup 陽性者	2023/12-Sup 陽性者	2023/12-Sup 陽性者	2023/12-Sup 陽性者	2023/12-Sup 陽性者	2023/12-Sup 陽性者
	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者	2023/12-Seq 陽性者

感染者：当所の発生動向調査事業で、その検体採取月に陽性例が検出されている

- 〈呼吸器パネル〉
- インフルエンザウイルス、RSV、パラインフルエンザウイルスの検出はなかった。
- 〈胃腸炎パネル〉
- 沈渣の方が陽性率が高い(全てではないがCt値も沈渣の方が低い)印象

今後の予定

- 令和6年度流行予測調査事業
- 来年度も、新型コロナウイルス遺伝子検査結果を定期的に研究班に報告

パネル陽性検体について

今回のパネル検査で陽性だった検体について、可能であれば追加の解析(分離培養やコンベンショナルPCR・シーケンス等)を実施(患者検体由来のウイルス遺伝子型との比較。下水中で優勢な遺伝子型?)

奈良県における
下水中新型コロナウイルス検出状況
およびPCRパネル検査結果報告

下水中新型コロナウイルス
検出状況
(R5.2-R5.12)

奈良県保健研究センター
ウイルス・疫学情報担当

奈良県の報告 (R5.2-R5.12)

【採水ポイントに関する情報】

- 奈良県では1か所で採水を実施。各ポイントの処理人口、感染症指定医療機関※の有無、コロナ陽性者療養施設の有無、事業所総数※は以下の通り。

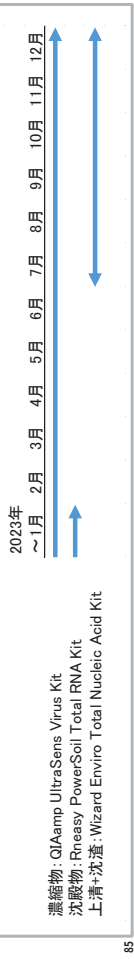
処理場	処理人口 (万人)	感染症指定医療機関有無	事業所総数
29-R03002	約20～50	あり	17,846

※感染症指定医療機関：第一種および第二種感染症指定医療機関に指定されている病院の有無
※事業所総数は、令和元年度経済センサスの活動事業所数について、甲乙調査の結果を合わせた数を示す

試薬変更：QuantiTect Probe RT-PCR Kit(～2021年11月)
One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix, with UNG
(2021年12月～)

抽出法の変更

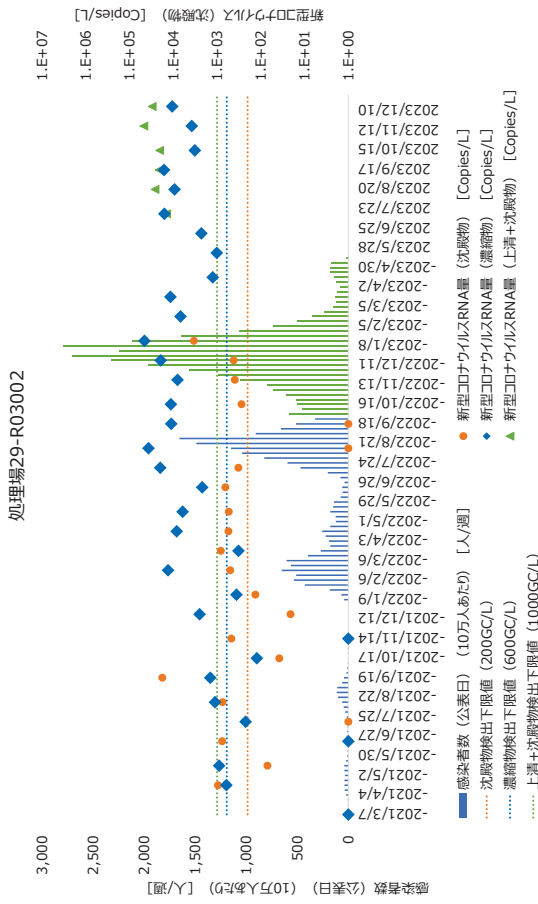
- 沈殿物(Rneasy PowerSoil Total RNA Kit) (～2023年1月)
- 上清+沈澱(Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit) (2023年7月～)



奈良県の報告 (R5.2-R5.12)

【R3年3月～R5年12月の調査結果】

- 月1回の採水を実施。下水中のコロナ検出状況 (Copies/L) と各処理場のキャッチメントエリアの新規感染者数の推移は以下の通り。

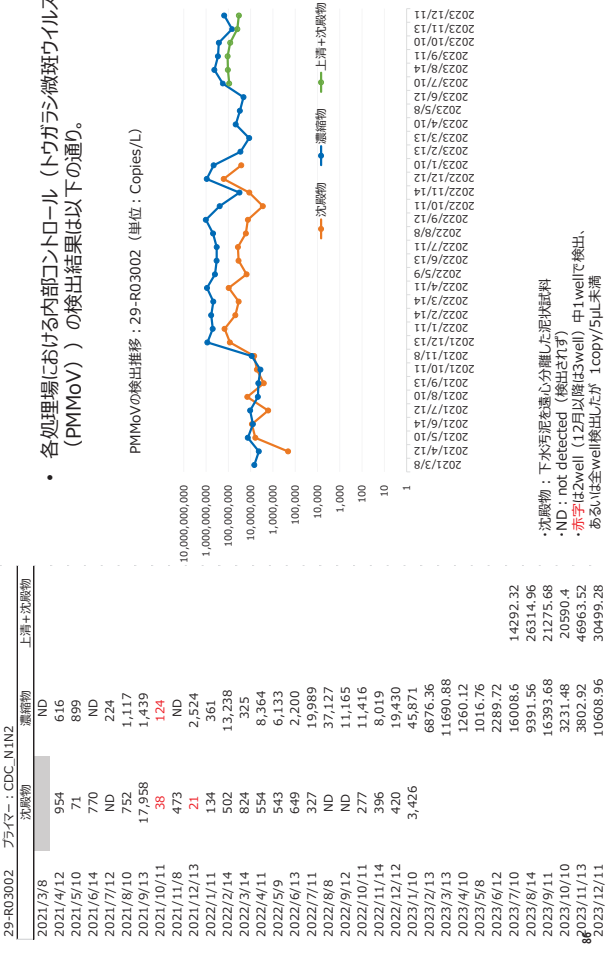


※処理場の感染者数は、処理場のキャッチメントエリアに対応する自治体を公表情報から把握し、当該自治体における感染者数の情報を整理。
8地域によっては自治体の一部のみが対象になることがあるが、その際は当該自治体全体の感染者数を整理。
※2022/9/27以降の感染者数(緑の棒グラフ)は、全数把握回数により、市町別別の集計が不可能になったため、県全体の属性確認件数を整理。

奈良県の報告 (R5.2-R5.12)

【R3年3月～R5年12月の調査結果】

- 月1回の採水を実施。下水中のコロナ検出状況 (Copies/L) は以下に示す通り。

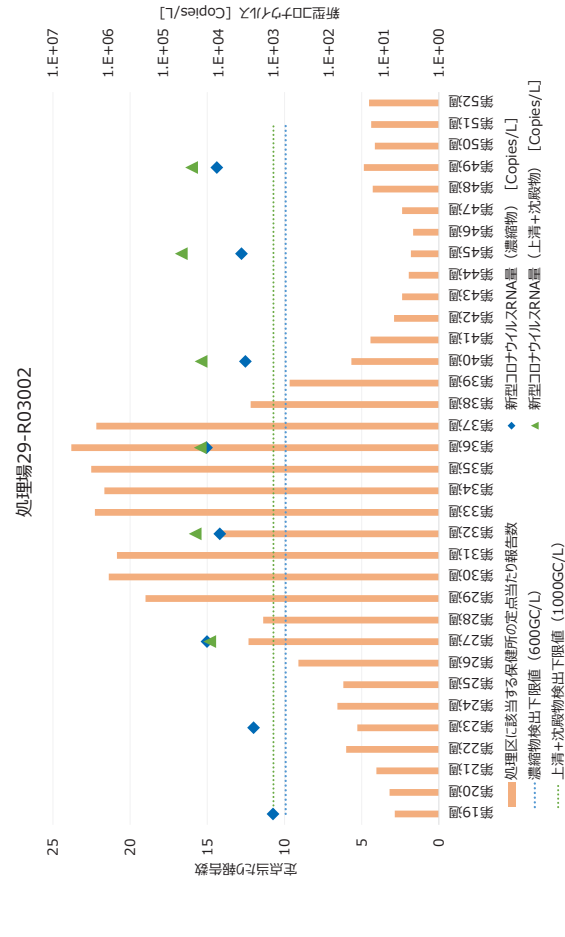


- 各処理場における内部コントロール (トウガラシ微生物ウイルス (PMMOV)) の検出結果は以下の通り。

奈良県の報告 (R5.2-R5.12)

【R5年5月～R5年12月の調査結果】

- 月1回の採水を実施。下水中のコロナ検出状況 (Copies/L) と処理区に該当する定点当たり報告数の推移は以下の通り。



抽出法：Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit (Promega)

対象：2023年11月～2024年2月採水検体

・cDNAの合成

試薬：PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)

ウイルスあたり		反応	
5XRTmix	2.5 ul	37 °C	15min
DW	7.5 ul	85 °C	5sec
RNA	2.5 ul	4 °C	∞
total	12.5 ul		

・リアルタイムPCR

試薬：TaqPath™ BactoPure™ Microbial Detection Master Mix, no Rox

呼吸器パネル Lot：8219406

消化器パネル Lot：8219707

PC：Custom DNA control(10³～10¹ copy/uL)

1 ウェル		反応	
TaqPath	2.5 ul	25 °C	2min
DW	2.5 ul	85 °C	10min
cDNA	5 ul	95 °C	2min
total	10 ul	95 °C	5s
		60 °C	30s

90

PCRパネル検査

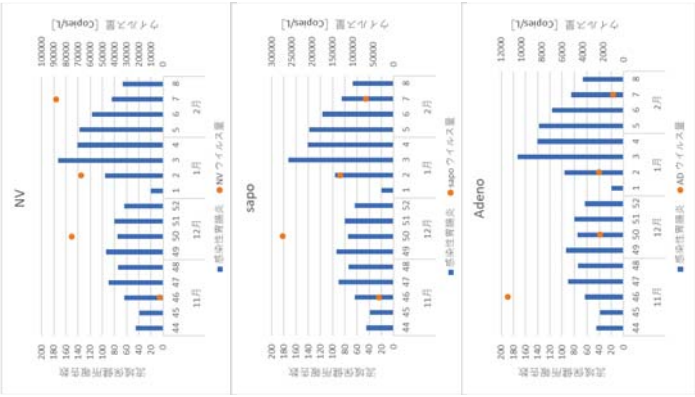
	Flu	RS	Rhino	ParaFlu	corona	Parecho
Slope	-3.59	-3.457	-3.697	-3.271	-3.366	-3.36
R ²	0.999	0.997	0.988	0.996	0.995	0.992
	NV	Astro	sapo	Rota	entero	Adeno
Slope	-3.29	-3.293	-3.436	-3.239	-3.504	-3.811
R ²	0.996	0.997	0.997	0.998	0.998	0.976

年	月	Flu	RS	Rhino	ParaFlu	corona	Parecho
2023	11	120.24	ND	ND	151.44	47.52	ND
	12	58.72	ND	ND	45.2	285.12	93.60
2024	1	ND	ND	ND	46.24	693.92	ND
	2	ND	ND	ND	ND	110	ND

年	月	NV	Astro	sapo	Rota	entero	Adeno
2023	11	2761.04	3801.68	36747.84	ND	616.40	11370.72
	12	75338.24	8397095.04	272812.16	ND	5006.72	2328.32
2024	1	67632.16	1672093.60	132114.08	ND	871.12	2412.40
	2	88081.44	42872.80	68709.04	ND	578.16	1036.00

・赤字は2well中1wellで検出

91



92

和歌山県の下水処理場における 下水中新型コロナウイルスの検出状況 (2023年4月～2024年2月)

和歌山県環境衛生研究センター 衛生研究部 微生物グループ
藤本 泰之、寺西 彩香

94

下水中新型コロナウイルスの検出

- 調査期間：2023年4月～2024年3月
今回報告分：2023年4月～2025年2月
 - 採水回数：毎月1回
 - 採水処理場：和歌山県内2か所
 - 1. 浄化センター①
 - 2. 浄化センター②
 - 検査材料：流入下水 500mL（ポリオ流行予測で使用する） + 50mL（TNAキット用）
 - ゲノム検出方法
- RNA抽出
- RNeasy PowerSoil Total RNA Kit (QIAGEN, Cat#:12866-25) : PowerSoilキット
 - Wizard® Enviro Total Nucleic Acid Kit (Promega, Cat#:A2991) : TNAキット

Real-time RT-PCR

- 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2)
- Takara RC300A SARS-CoV-2 direct Detection RT-qPCR kit
- トウガラシ擬斑ウイルス (PMoV)
- Takara OneStep PrimeScript III RT-qPCR Mix with UNG
- VLP
- Takara OneStep PrimeScript III RT-qPCR Mix with UNG

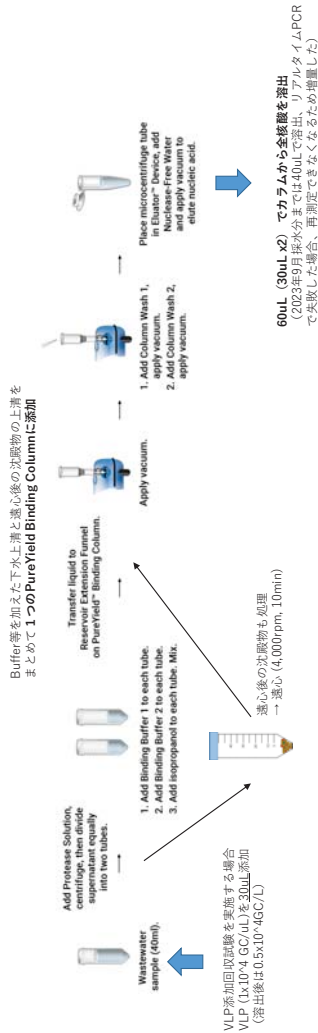
サンプルRNAおよび陽性コントロールの希釈にはTAKARAのPCRキット付属のEASY Dilution (for Real Time PCR)を使用した。

95

来年度の流行予測では
どちらを、どのように使用するのが良いのか？

Wizard® Enviro Total Nucleic Acid Kit (Promega, Cat#:A2991) (TNAキット)

使用下水量：40mL
1度に4検体を処理
粗遠心後の沈査もカラムに吸着



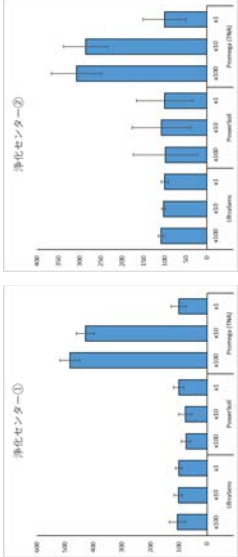
TNAキット抽出物のリアルタイムPCR反応の阻害の有無を評価

96

171

TNAキ ャ ャ ャ 抽出物のリアルタイムPCR反応の阻害の有無を評価

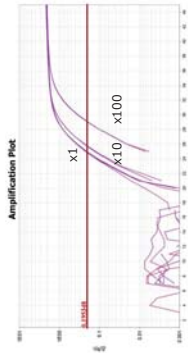
使用検体：R5年4月～7月に採水した浄化センター①および②の流入下水
TNAキ ャ ャ ャ 抽出したRNAをEASY Dilutionで10および100倍に希釈（x10、 x100）
PMMoVをリアルタイムPCRで測定。



ほかの下水からのRNA抽出方法（Ultrasons、PowerSoil）と比較しても、TNAキ ャ ャ ャ 中でも、TNAキ ャ ャ ャ 反応への影響が大きい。
→ TNAキ ャ ャ ャ を使用する場合は少なくとも10倍希釈した検体も使用するほうが良い？

PMMoVリアルタイムPCR反応組成

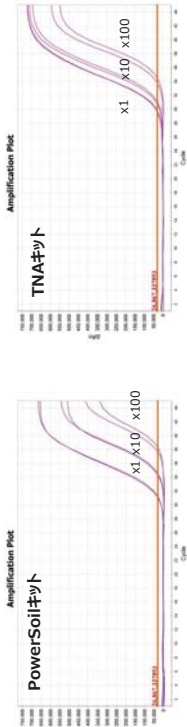
	[μ L]
DDW	3.7
ROX Dye II	0.1
Primer/Probe Mix	1.2
One step prime Mix (2x)	10
RNA	5



〈参考データ（別検体R6年2月下旬水PMMoV）〉

TNAキ ャ ャ ャ 抽出物のリアルタイムPCR反応の阻害の有無を評価

copy/well	CtMean	Sample	Ct Mean	copy/5 μ L	回収率(%)
5	37.76	x1	31.0	1199.1	4.8
50	35.78	PowerSoil x10	34.3	99.4	4.0
500	32.20	x100	37.8	7.1	2.8
5000	29.41	x1	29.6	3488.9	14.0
50000	25.74	x10	30.8	1398.7	55.9
R ²	Slope	x100	34.0	127.9	51.2
0.987	-3.043				



VLPの添加回収試験においてもTNAキ ャ ャ ャ により抽出した全核酸はリアルタイムPCR反応への阻害作用があることが確認できた。
→ 新型コロナウイルスを測定する場合も希釈したほうが良い？

TNAキ ャ ャ 抽出物のリアルタイムPCR反応の阻害の有無を評価

VLP添加回収試験でも希釈の影響を評価
PowerSoilキ ャ ャ ャ ：VLP50 μ L添加 → 100 μ L溶出 f.c. 0.5x10⁴~4GC/ μ L
TNAキ ャ ャ ャ ：VLP30 μ L添加 → 60 μ L溶出 f.c. 0.5x10⁴~4GC/ μ L

VLP添加回収試験 反応条件

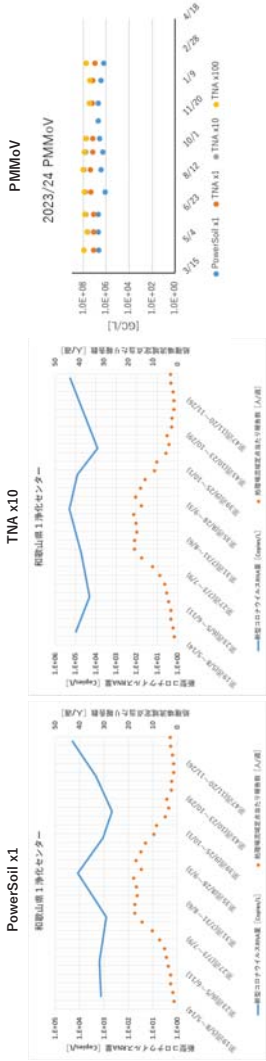
VLP (HEX)	[μ L/反応]
DDW	4.2
VLP Detection mix (Orange)	0.8
One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (2 $\times$)	10.0
RNA	5.0
total	20.0
〈反応条件〉	
UNG処理	25 $^{\circ}$ C 10min
逆転写反応	52 $^{\circ}$ C 5min
変性	95 $^{\circ}$ C 10sec
変性	95 $^{\circ}$ C 5sec
アニーリング/伸長	60 $^{\circ}$ C 45cycles --Detection

- VLPを単独のリアルタイムPCR系で測定
- 使用しているリアルタイムPCRの機械（QuantStudio7Flex）ではHEX色素が検出できないため、VIC検出系を使用
- また、HEX色素の蛍光波長がROXの検出に漏れ出すため、Reference DyeとしてROXは添加しなかった。
- VLPの陽性コントロールは1x10⁴~4GC/Lを75 $^{\circ}$ Cヒートショック処理後、EASYDilutionで10倍希釈系列を調製。

和歌山県 浄化センター①

R5年4月～R6年2月の調査結果）
目に1回の採水と重複
2well中2wellで陽性反応が見られた場合、陽性とし、平均値から流入下水1L当たりのゲノムコピー数を算出
TNAキ ャ ャ ャ ：9月までは40 μ L(20 μ Lx2)、10月以降は50 μ L(30 μ Lx2)で溶出

採水日	2023/4/20	2023/5/18	2023/6/15	2023/6/24	2023/7/20	2023/8/24	2023/9/21	2023/10/12	2023/11/9	2023/12/7	2024/1/12	2024/2/8	2024/3/5
PowerSoil	x1	2.2E+03	1.3E+03	1.6E+03	1.2E+04	8.1E+02	1.1E+04	4.8E+02	2.1E+03	2.0E+04	5.2E+03	1.2E+04	
NIN2	x1	1.9E+04	6.6E+04	6.2E+03	2.6E+04	1.0E+05	4.0E+04	3.4E+03	1.1E+05	1.4E+04	2.4E+04		
[GC/L]	TNA	x10	4.1E+04	9.6E+04	2.0E+04	5.3E+04	2.0E+05	8.1E+04	8.2E+03	1.8E+05	3.1E+04	9.3E+04	
	x100	5.8E+04	1.3E+05	2.7E+04	4.9E+04	2.5E+05	3.8E+04		1.8E+05	6.4E+04	1.1E+05		

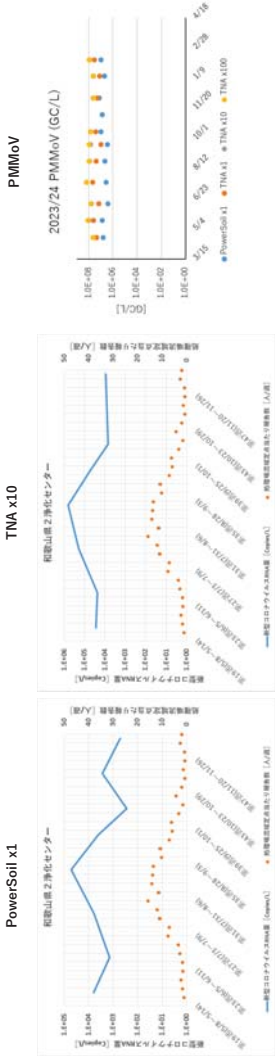


PowerSoilとTNAキ ャ ャ ャ の両方で、定常値の異なる報告数と運動して下水中新型コロナウイルスのゲノム量が運動するデータが得られた。
PowerSoilキ ャ ャ ャ よりもTNAキ ャ ャ ャ のほうが流入下水1L当たりのゲノムコピー数が大きくなる。

和歌山県 浄化センター②

【5月6日～6月30日の調査結果】
月に1回の採水を実施
2well中2wellで陽性検出の場合、陽性とし、平均値から流入下水1L当りのゲノムコピー数を算出
TNAキット：9月までは40uL(20uLx2)、10月以降は60uL(30uLx2)で抽出

採水日	2023/4/20	2023/5/18	2023/6/15	2023/7/20	2023/8/24	2023/9/21	2023/10/12	2023/11/9	2023/12/7	2024/1/12	2024/2/8	2024/3/5
PowerSoil	x1	4.8E+01	6.1E+03	1.4E+03	5.2E+04	4.0E+03	2.7E+02	2.7E+02	4.9E+02	5.9E+03	4.2E+04	
NIN2	x1	2.9E+02	2.2E+04	5.7E+03	3.2E+05	2.3E+04	2.3E+03	2.3E+03	7.2E+03	6.0E+04	1.1E+05	
[GC/L]	x10	2.7E+04	2.3E+04	1.9E+05	6.4E+05	5.1E+04	6.9E+03	9.0E+03				
TNA	x100	1.6E+04	8.5E+03	1.3E+05	7.1E+05	3.9E+04						



PowerSoil kitとTNAキットの両方で、定点当りの患者報告数と連動して下水中新型コロナウイルスのゲノム量が運動するデータが得られた。
PowerSoilキットでもTNAキットのほうが流入下水1L当りのゲノムコピー数が大きくなる。
下水中のコロナウイルス量が少なくない、希釈したTNAキットの抽出物では検出できなくなる、あるいは定量、検出限界以下になる場合がある。

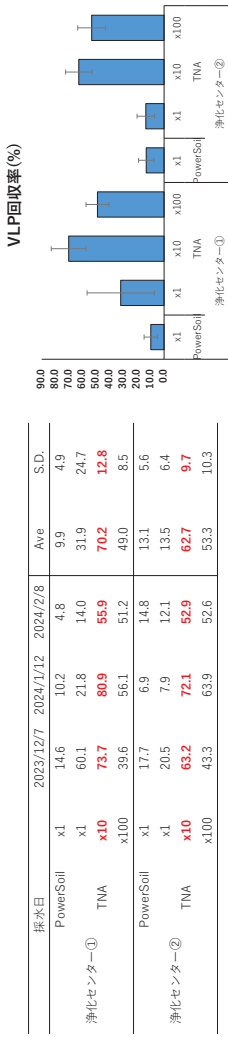
- TNAキットを用いた場合、PowerSoilキットと比較して下水中コロナウイルス遺伝子量を高い値で検出することができた。
- TNAキットは、PowerSoilキットと同様に下水中新型コロナウイルス遺伝子量が処理区域保健所管内の定点当たり患者報告数と連動する。
- TNAキットではリアルタイムPCR阻害の影響が大きいいため正確に定量するためにはある程度希釈した検体を利用する必要がある。

実施方法 (予定)

採水量：100mL
下水試料：40mL
処理検体数：4検体
抽出方法：TNAキット (Wizard® Enviro Total Nucleic Acid Kit)
粗遠心後の上清+沈殿分画
核酸溶出：60uL (30uLx2)
検体希釈：x1 (原液) - x10希釈 (EASY Dilution)

VLP回収率 (%)

使用検体：R5年12月～R6年2月に採取した浄化センター①および②の流入下水
TNAキットで抽出したRNAをEASY Dilutionで10および100倍に希釈 (x10、x100)
VLPをリアルタイムPCRで測定。



102

Custum PCR plate 下水サンプルの希釈の影響テスト： Powersoilkit (QIAGEN)

- TNA kit (Promega)
- 02つの抽出サンプルで比較

No.	サンプル名	希釈倍率	cDNA合成	試薬：TakaRa PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)	Reaction mixture	[uL/rxn]	50
1.	R6.2. Powersoil	x5					
2.	R6.2. Powersoil	x10					
3.	R6.2. TNA	x5					
4.	R6.2. TNA	x10					

DDWでx5およびx10希釈したものを逆転写反応に使用。
(RTへの希釈の影響の評価？)

5x RT mix	2.5	125
DDW	7.5	375
total	500	→10uLずつ分注→希釈済みRNA2.5uLを添加
RNA	2.5	
total	12.5	

RT反応

37℃	15min
85℃	5sec
4℃	∞

リアルタイムPCR

試薬： TaqPath™ Microbial Detection Master Mix, no Rox

プレート： TrueMark Custom Plates (カスタマイズ)

検体線用標準検体： Custom DNA control (1 x 10⁵ copies/μL), WWVS_control_1
→10¹, 10², 10³, 5uL (1 reaction)に希釈

Reaction mixture	[uL/rxn]	110	操作手順	リアルタイムPCR反応
2x Master Mix	2.5	275	1	Custom PCR plateを遠心
DDW	2.5	275	2	2xMasterMix:DDW=1:1で混ぜた反応液をPCRチューブに分注
		550	3	12連ビペットで5uLずつ96wellプレートに分注
cDNA	5		4	陰性コントロール用のDDWを5uLずつ添加 (2well)
total	10		5	サンプルDNAを5uLずつ添加 (2well)
			6	陽性コントロールを分注する (2well)
			7	遠心後、プレート用シェーカーで洗浄
			8	遠心後、リアルタイムPCR

104

103

測定条件

使用機器：QuantStudio7Flex (0.2mL 96well plate 対応)
Standardモード、すべてReporter：FAM, Quencher：NFQ-MGB、
ReferenceDye：Noneで測定



プレートレイアウト

リアルタイムPCRプレート

呼吸器	Flu A/B		RS A/B		Rhino A-C		ParaFlu 1-4		corona		Parecho	
	NV-G1/G2		Astro (pool)		Sapo (pool)		RotaA (pool)		entero		Adeno	
胃腸炎	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												P 10 ³ copy/5uL
B												P 10 ² copy/5uL
C												P 10 ¹ copy/5uL
D												N NC
E												11 R6.2. Powersoil
F												21 R6.2. Powersoil
G												x5
H												31 R6.2. TNA
												x10
												41 R6.2. TNA
												x10

10xdenovirusについては希釈した下水核酸抽出サンプルを5uL ずつ添加

結果 (呼吸器パネル LOT#8219406) サンプル

[Copy/well]	Flu A/B	RS A/B	Rhino A-C	ParaFlu 1-4	corona	Parecho
120240208_I_PowerSolk5	N.D. (0/2)	N.D. (0/2)	N.D. (0/2)	4.34 (1/2)	2.25 (2/2)	N.D. (0/2)
120240208_I_PowerSolk10	N.D. (0/2)	N.D. (0/2)	N.D. (0/2)	3.46 (1/2)	0.70 (1/2)	N.D. (0/2)
320240208_I_TNAx5	N.D. (0/2)	N.D. (0/2)	0.29 (2/2)	6.60 (1/2)	2.94 (2/2)	N.D. (0/2)
420240208_I_TNAx10	N.D. (0/2)	N.D. (0/2)	0.86 (2/2)	2.42 (1/2)	1.21 (2/2)	N.D. (0/2)

2wellで検出

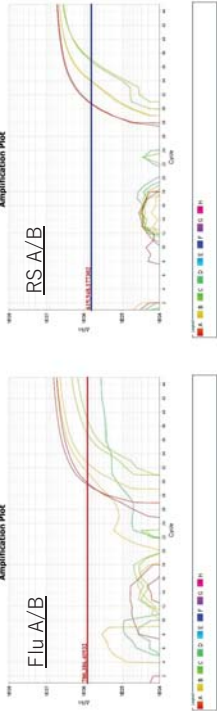
TNA キットで抽出したRNAでライノウイルスとコロナウイルスが検出できたが、希釈の影響は不明
PowerSoilキットではコロナウイルスのみ検出できた。（定量下限10コピー未満）

インフルは両抽出方法での検出できなかった。

結果 (呼吸器パネル LOT#8219406) スタンダード

	Flu A/B		RS A/B		Rhino A-C		ParaFlu 1-4		corona		Parecho	
	Ct		Ct		Ct		Ct		Ct			
10 ³ copy/5uL	29.7	29.5	30.6	30.7	28.7	28.8	27.4	27.2	26.9	26.9	29.1	29.2
10 ² copy/5uL	31.2	32.6	33.8	33.9	31.9	32.0	30.0	30.4	30.0	29.8	32.4	32.1
10 ¹ copy/5uL	36.7	38.8	37.0	36.7	34.8	34.5	35.6	37.4	34.0	33.7	35.2	35.4
NC	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Omit	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Slope			Slope		Slope		Slope		Slope		Slope	
	-4.0787	0.9017	-3.1161	0.9984	-2.9287	0.9961	-4.6058	0.9375	-3.4748	0.9922	-3.0789	0.9983

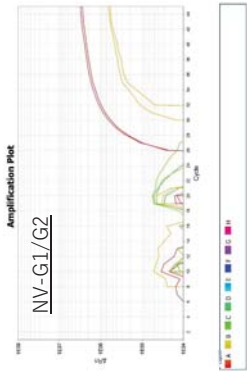
インフルおよびパラインフルは
10コピー/wellにおいてCt値が
ばらつき、R²値が低くなった。



106

結果 (消化器パネル LOT#8219407) スタンダード

	NV-G1/G2		Astro (pool)		Sapo (pool)		RotaA (pool)		entero		Adeno	
	Ct		Ct		Ct		Ct		Ct		Ct	
10 ³ copy/5uL	25.2	25.5	28.6	28.7	27.2	27.5	28.2	27.5	27.6	25.9	25.7	
10 ² copy/5uL	31.2	29.4	32.1	32.0	30.8	30.7	31.4	31.2	30.7	29.2	29.0	
10 ¹ copy/5uL	N.D.	N.D.	37.8	35.3	34.2	34.0	35.0	34.4	33.8	N.D.	31.9	
NC	17.5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	8.6	N.D.	N.D.	N.D.	
	Slope	R ²	Slope	R ²	Slope	R ²	Slope	R ²	Slope	R ²	Slope	R ²
	-4.9136	0.9352	-3.9275	0.946	-3.4013	0.9984	-3.2558	0.9936	-3.1881	0.9917	-2.9652	0.9918



108

ノロおよびエンテロ
は10コピー/wellにお
いて2wellでの増幅が
確認できなかった。

107

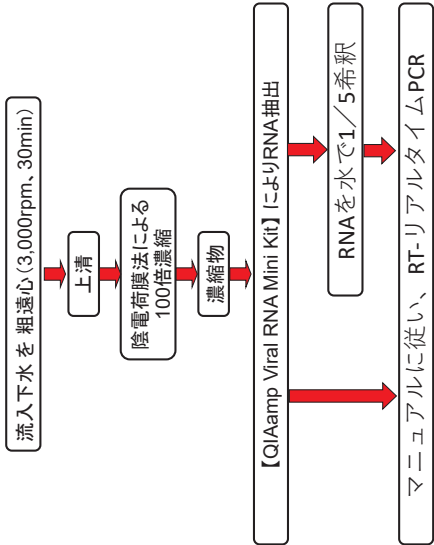
[Copy/well]	NV_GI/G2	Astro (pool)	Sapo (pool)	RotaA (pool)	entero	Adeno
120240208_L PowerSolk5	17.3 (2/2)	29.2 (2/2)	17.7 (2/2)	N.D. (0/2)	N.D. (0/2)	1.1 (1/2)
220240208_L PowerSolk10	22.2 (2/2)	31.5 (2/2)	11.1 (2/2)	N.D. (0/2)	N.D. (0/2)	0(2)
320240208_L TNAx5	428.5 (2/2)	602.1 (2/2)	746.8 (2/2)	N.D. (0/2)	2.0 (2/2)	13.6 (2/2)
420240208_L TNAx10	296.8 (1/2)	311.1 (2/2)	362.7 (2/2)	N.D. (0/2)	2.9 (2/2)	2.5 (2/2)
2wellで検出						

- PowerSoil（下水沈査）よりもTNAキット（下水上清＋沈査）で多くのウイルスを検出可能で、1反応あたりのコピー数も高くなった。
- アストロウイルスおよびサポウイルスでは検出ウイルスコピー数が希釈倍率と相関している。
→ TNAキットで抽出したRNAでは逆転写反応時に5倍希釈すれば
検出系への逆転写あるいはPCR反応への影響はない？
（原液を用いて逆転写したものと比較が必要）

1 複数種ウイルスの検出検討（パネル検査）

採水場所
処理人口50～100万人規模の下水処理場流入水（33-R02021）

検体
2023年12月採水検体（当県で今期インフルエンザ報告数が最も多かった月）
2024年2月採水検体（今期下水から最も高濃度でノロウイルスが検出された月）



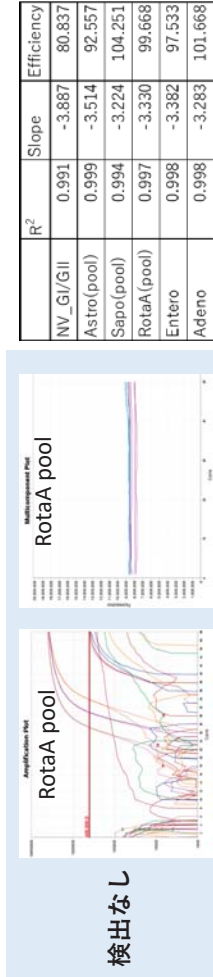
岡山県における流入下水からの 複数種ウイルスの検出検討及び 新型コロナウイルス検出状況

岡山県環境保健センター



© 岡山県「ももっぴらっち」

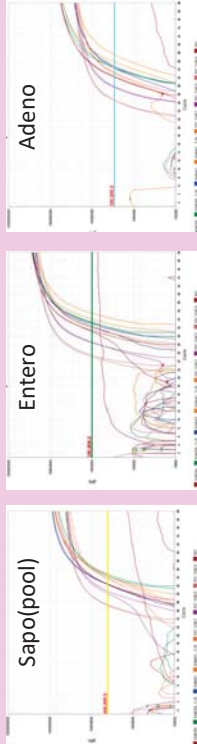
胃腸炎系パネル



- ・包莖ロット：8219407
- ・サーマルサイクラー：QuantStudio® 5
- ・Threshold Lineは手動補正した

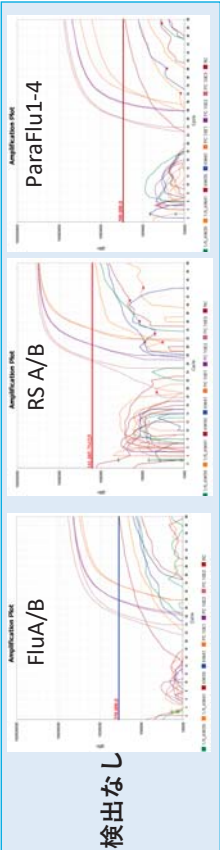
- ・ RotaA以外はすべて検出。
- ・ RotaAは multi component plotで増幅が見られず、検出なしとした。

検出



1／5希釈の検討

値は2 wellの平均

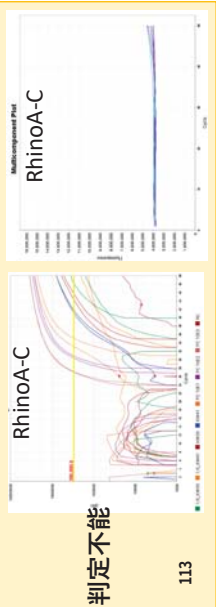


	R ²	Slope	Efficiency
FluA/B	0.996	-3.556	91.097
RS_A/B	0.998	-3.682	86.883
RhinoA-C	0.960	-3.530	92.000
ParaFlu1-4	0.988	-3.746	84.903
corona	0.999	-3.518	92.435
Parecho	0.999	-3.462	94.480

- ・包装ロット：8219406
- ・サーマルサイクラー：QuantStudio® 5
- ・Threshold lineは手動補正した

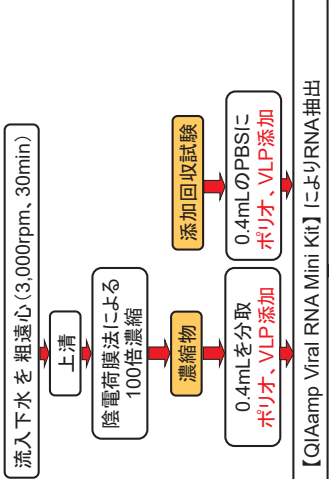
判定不能

・RhinoA-Cは指数関数的な立ち上がりが見られず、判定不能とした。



2 新型コロナウイルス検出状況

- 採水場所
- 処理人口10万人未満規模の下水処理場流入水（33-R02020）
- 処理人口50～100万人規模の下水処理場流入水（33-R02021）
- ・調査期間：2023年4月～2024年2月
 - ・採水頻度：月1回



【TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix】

NIID_N2 NIID_S2 VLP-RNA Extraction Control, PolioV Sabin1型

【SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit】

CDC_N1 CDC_N2

各3wellずつ実施

ウイルス	Qy/5μL	Qy/L	Astro(pool)	Sapo(pool)	RotaA(pool)	Entero	Adeno
12月採水検体（希釈なし）	61.53	2.84E+05	5370.17	130.55	5.69E+05	81.16	3.48E+05
12月採水検体（1/5希釈）	18.65	4.09E+05	1595.56	27.31	5.85E+05	20.21	4.39E+05
12月・希釈と原液の比	710.14	3.04E+06	1142.79	139.75	5.99E+05	30.41	1.39E+05
2月採水検体（希釈なし）	162.23	3.48E+06	319.65	6.85E+06	30.44	8.17	1.75E+05
2月・希釈と原液の比		1.14	1.40		1.09	1.34	1.35

ウイルス	Qy/5μL	Qy/L	RS_A/B	RhinoA-C	ParaFlu1-4	corona	Parecho
12月採水検体（希釈なし）	N.D.	N.D.	N.D.	判定不能	N.D.	N.D.	48.14
12月採水検体（1/5希釈）	N.D.	N.D.	N.D.	判定不能	N.D.	N.D.	14.21
12月・希釈と原液の比							1.48
2月採水検体（希釈なし）	N.D.	N.D.	N.D.	判定不能	N.D.	3.76	1.61E+04
2月採水検体（1/5希釈）	N.D.	N.D.	N.D.	判定不能	N.D.	1.07	2.39E+04
2月・希釈と原液の比						1.43	

- ・1／5希釈を行った系のの方がRNA原液より1.05～1.52倍高い濃度となった。
 - ・希釈を行ったことにより検出されない検体もあった。
- 検出率を重視する場合は希釈なしの方がよい。

新型コロナウイルス 検出結果（CDC_N1N2、NIID_N2及びS2の比較）

33-R02020（処理人口10万人未満）				33-R02021（処理人口50～100万人）			
	CDC_N1N2	NIID_N2	NIID_S2		CDC_N1N2	NIID_N2	NIID_S2
2023年4月12日	385	2570	2631	2023年4月12日	671	2570	N.D.
2023年5月9日	1884	2453	4407	2023年5月9日	3083	1306	3503
2023年6月13日	2789	1222	N.D.	2023年6月13日	8895	3732	5647
2023年7月4日	3730	2420	3300	2023年7月4日	7262	5333	8474
2023年8月1日	5094	3800	8478	2023年8月1日	12409	6877	6179
2023年9月5日	18720	8716	7867	2023年9月5日	5482	5667	4817
2023年10月3日	1714	98	1046	2023年10月3日	1880	1920	N.D.
2023年11月7日	661	N.D.	870	2023年11月7日	3618	2515	N.D.
2023年12月5日	1758	3588	2632	2023年12月5日	1196	2539	2476
2024年1月9日	3684	3917	4295	2024年1月9日	14781	15384	16266
2024年2月6日	5008	6312	4758	2024年2月6日	82892	49302	45678

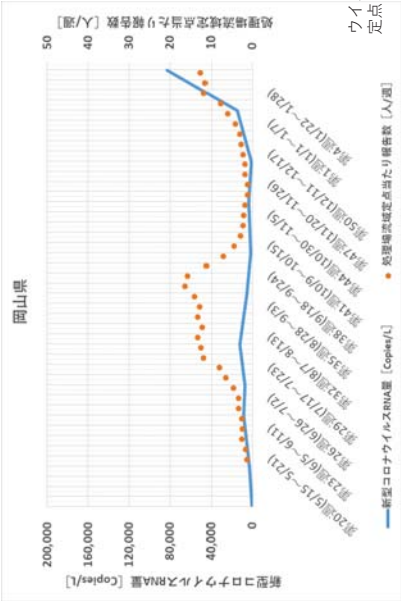
※1検体につき、3well検査を実施

※赤字の定量値は3well/1well/2wellで陽性反応あり。

※検出の場合は測定値の平均

copy/L

CDCプライマー系のの方が検出率が高かった。

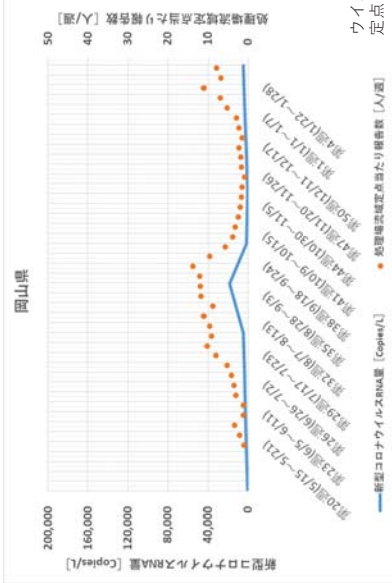


- ・年度末に提供のあった「【試作版】感染動向解析ツール v1.9.xlsx」を使用
- ・上図「処理区に該当する保健所への報告数と定点数を入力する」により抽出したグラフ。CDCプライマリー系の結果を使用
- ・左図）変化率表

抽出したままのグラフではRNA量の変化は見取れなかった。

採水日	date	新型コロナウイルスRNA量 (GC/L)		検出濃度 (対数変換)		回帰直線の傾き		変化率	
		GC/L	LOG10 GC/L	検出濃度	対数変換	回帰直線の傾き	変化率		%
2023/4/12	671	2.827029574							
2023/5/9	3,083	3.488959513							
2023/6/13	8,895	3.949169037	0.017859967					4.2%	
2023/7/4	7,262	3.861034083	0.007307929					1.7%	
2023/8/1	12,409	4.09374605	0.003240313					0.7%	
2023/9/5	5,482	3.73892304	-0.002274317					-0.5%	
2023/10/3	1,880	3.274099871	-0.012892533					-2.9%	
2023/11/7	3,618	3.558494935	-0.002413548					-0.6%	
2023/12/5	1,196	3.077752582	-0.002655878					-0.6%	
2024/1/9	14,781	4.169706242	0.010582788					2.5%	
2024/2/6	82,892	4.918514736	0.029299604					7.0%	

ウイルスRNA量は4月減水分以降
定点当たり報告数は19週以降を計上

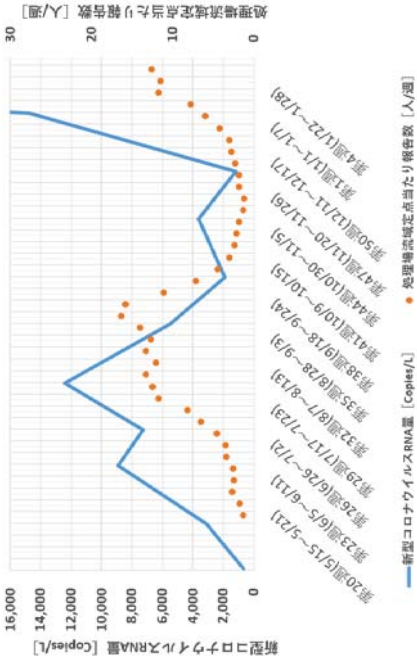


ウイルスRNA量は4月減水分以降
定点当たり報告数は19週以降を計上

採水日	date	新型コロナウイルスRNA量 (GC/L)		検出濃度 (対数変換)		回帰直線の傾き		変化率	
		GC/L	LOG10 GC/L	検出濃度	対数変換	回帰直線の傾き	変化率		%
2023/4/12	385	2.585201809							
2023/5/9	1,884	3.274994203							
2023/6/13	2,789	3.445509058	0.005254898					3.1%	
2023/7/4	3,730	3.571706048	0.005310333					1.2%	
2023/8/1	5,094	3.707049916	0.011326642					2.6%	
2023/9/5	18,720	4.272298633	0.011326642					-1.5%	
2023/10/3	1,714	3.234041139	-0.006538484					-5.1%	
2023/11/7	661	2.820017647	-0.022592127					-0.1%	
2023/12/5	1,758	3.245176409	-0.00031606					2.7%	
2024/1/9	3,684	3.56631161	0.001736542					1.7%	
2024/2/6	5,008	3.699676553	0.007295477						

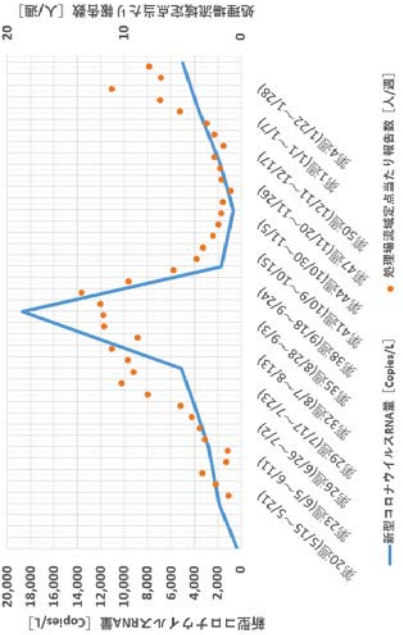
- ・年度末に提供のあった「【試作版】感染動向解析ツール v1.9.xlsx」を使用
- ・上図「処理区に該当する保健所への報告数と定点数を入力する」により抽出したグラフ。CDCプライマリー系の結果を使用
- ・左図）変化率表

抽出したままのグラフではRNA量の変化は見取れなかった。



- ・上図）軸のスケールを調整したグラフ
- ・右図）ウイルスRNA量軸を対数表示したグラフ

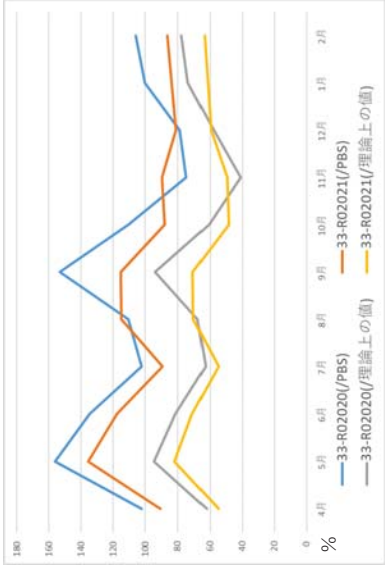
定点あたりの患者報告数と近似した増減が
1ヶ月程度早く見られた。



- ・上図）軸の最大値を小さくしたグラフ
- ・右図）ウイルスRNA量軸を対数表示したグラフ

定点あたりの患者報告数が増加している時
にRNA量の増加が見られた。

VLP※1添加回収試験 回収率※2



33-R02020：処理人口10万人未満
33-R02021：処理人口50～100万人

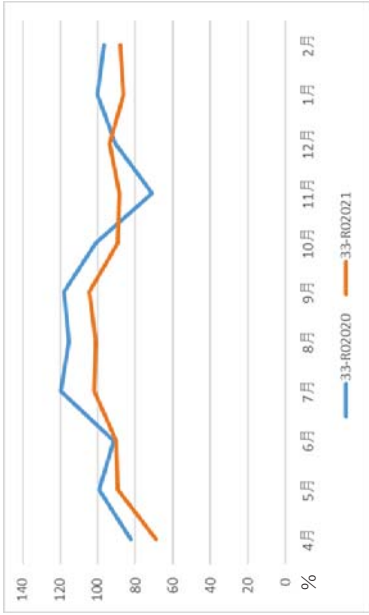
※1 VLP-VLP-RNA Extraction Control (1×10⁴ GC/μL) MERMDX069-1
※2 (PBS)：(ポリオS1及びVLP添加検体Qty) / (ポリオS1及びVLP添加PBSQty) × 100
(理論上の値)：(ポリオS1及びVLP添加検体Qty) / (100%の効率で抽出した値) × 100
検体、PBSともに3well実施

121 下水からの阻害は大きく受けていないように見受けられました。

まとめ

- 1 複数種ウイルスの検出
・ 検証した検体では、胃腸炎系パネルからノロ、アストロ、サポ、エンテロ、アデノウイルスを検出した。ロタウイルスは検出できなかった。
・ 呼吸器系パネルからコロナ、パレコウイルスを検出した。インフルエンザ、RS、パラインフルエンザウイルスは検出できず、ライノウイルスは判定不能とした。
・ RNA1/5希釈を行った系の方がRNA原液より高い濃度が得られたが、希釈したことにより検出されない検体もあった。
- 2 新型コロナウイルスの検出
・ 【試作版】感染動向解析ツールを使用してCDC_N1N2プライマーの系を解析したところ、処理人口が50～100万人規模の下水処理場検体では定点あたりの患者報告数と近似した増減が見られた。
・ 処理人口10万人未満の下水処理場検体では、定点あたりの患者報告数増加時に高い濃度で検出された。
・ 添加回収試験では、VLP、ポリオウイルス添加系ともに下水からの阻害はさほど受けていたことが分かった。ポリオウイルス添加系の方がばらつきは小さかった。

ポリオウイルスS1添加回収試験 回収率※3



	回収率 (%)	回収率平均 (%)	標準偏差
33-R02020 (処理人口10万人未満)	71.2~119.8	98.7	14.9
33-R02021 (50~100万人)	68.7~104.6	91.1	9.7

※3 (ポリオS1及びVLP添加検体Qty) / (ポリオS1及びVLP添加PBSQty) × 100
検体、PBSともに3well実施

- ・ 下水からの阻害は大きく受けていないように見受けられた。
- ・ VLPよりばらつきは小さかった。

福岡県における流入水からの新型コロナウイルス検出について

福岡県保健環境研究所
濱崎光宏

目的

- 2か所の終末処理場から得られた流入水について、沈殿物及び上清濃縮物から新型コロナウイルスの検出を行う。
- 呼吸器感染症パネル及び腸管感染症パネルを用いた複数病原体検出を試みる。

125

方法

RNA抽出

- 沈殿物 RNeasy® PowerSoil® Total RNA Kitを使用
- 未処理の流入水 Wizard® Enviro TNA Kit を使用

リアルタイムRT-PCR

- 下水中の新型コロナウイルス検出マニュアル ver 1.1 SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewaterを使用
- TaqPath及び呼吸器感染症パネル及び腸管感染症パネル

検体

排除方式	処理人口
A終末処理場	分流式 約19万人
B終末処理場	分流式 約4万人

1か月に1回各浄化センターで採水された流入水を用いた。

検体処理

流入水200mlをスイングローターで遠心*1 (2500 x g, 60分間)



すぐに検査しない場合は、沈査を冷凍保存 (-80℃)

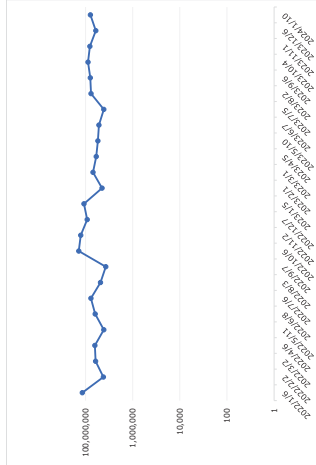


スイングローターで遠心したもの

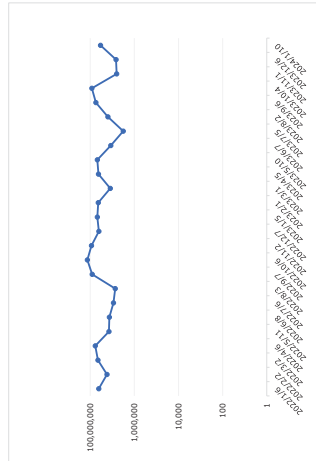
126

結果 福岡県 (R3.1-R6.1)

- 【R3年1月～R6年1月の調査結果】
- 各処理場における内部コントロール（トウガラシ微生物ウイルス（PMMoV））の検出結果



PMMoVの検出推移：A処理場（単位：Copies/L）



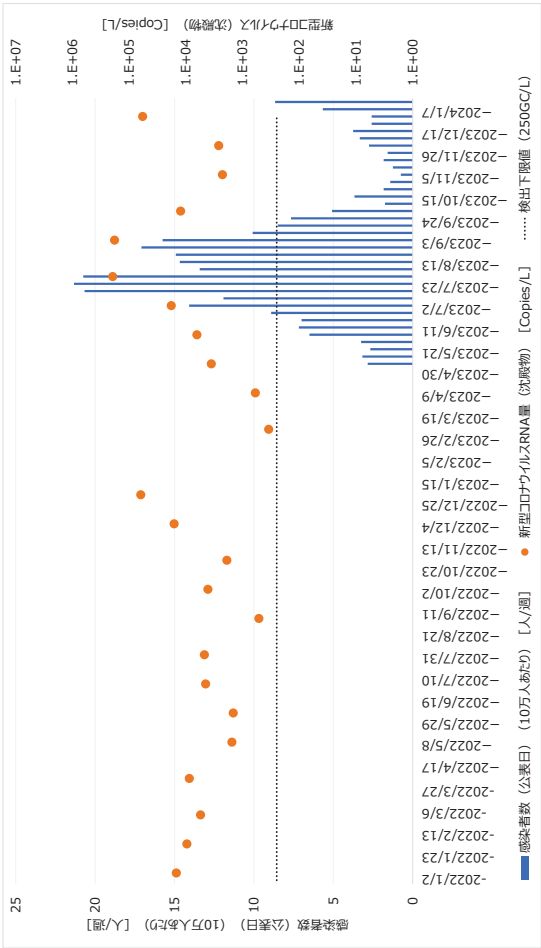
PMMoVの検出推移：B処理場（単位：Copies/L）

127

結果 福岡県 (R3.1-R6.1)

[R3年1月～R6年1月の調査結果]

- ・ 月1回の採水を実施。下水中（沈殿物）のコロナ検出状況（Copies/L）と各処理場のキャッチメントエリアの新規感染者数の推移は以下の通り。



A処理場におけるSARS-CoV-2検出状況

129

結果 福岡県 (R3.1-R6.1)

[採水ポイントに関する情報]

- ・ 福岡県では2か所で採水を実施。各ポイントの処理人口、感染症指定医療機関の有無、コロナ陽性者療養施設の有無、事業所総数※は以下の通り。

処理場	処理人口 (万人)	感染症指定医療機関有無	コロナ陽性者療養施設有無	事業所総数
A終末処理場	約10～20	あり	受入施設なし	8,414
B終末処理場	約～10	あり	受入施設なし	8,537

※感染症指定医療機関：第一種および第二種感染症指定医療機関に指定されている機関の総数
※事業所総数は、令和元年度経産省の活動事業所数について、市乙調査の結果を合わせた数

処理場	新型コロナウイルス21日-数 (Copies/L)
A処理場	新型コロナウイルス21日-数 (Copies/L)
2022/1/6	14,688
2022/2/2	9,561
2022/3/2	5,509
2022/4/6	8,668
2022/5/11	1,540
2022/6/8	1,461
2022/7/6	4,488
2022/8/3	4,699
2022/9/7	515
2022/10/6	4,072
2022/11/2	1,895
2022/12/7	16,108
2023/1/5	62,447
2023/2/1	298
2023/3/1	346
2023/4/5	596
2023/5/10	3,549
2023/6/7	6,391
2023/7/5	18,078
2023/8/2	194,970
2023/9/6	180,119
2023/10/4	12,363
2023/11/1	2,265
2023/12/6	2,627
2024/1/10	57,804

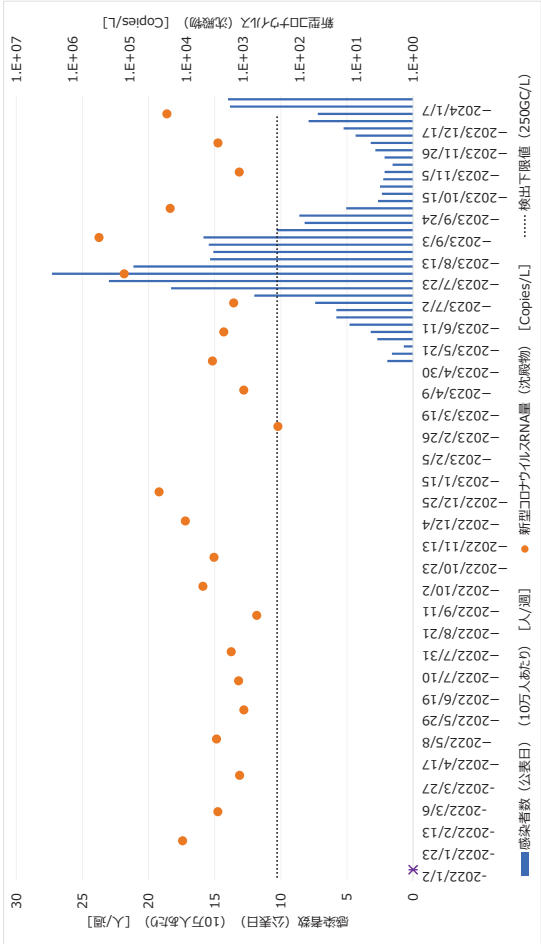
処理場	新型コロナウイルス21日-数 (Copies/L)
B処理場	新型コロナウイルス21日-数 (Copies/L)
2022/1/6	ND
2022/2/2	11,623
2022/3/2	2,776
2022/4/6	1,152
2022/5/11	2,929
2022/6/8	964
2022/7/6	1,196
2022/8/3	1,614
2022/9/7	574
2022/10/6	5,096
2022/11/2	3,244
2022/12/7	10,404
2023/1/5	30,243
2023/2/1	2,186
2023/3/1	242
2023/4/5	969
2023/5/10	3,464
2023/6/7	2,188
2023/7/5	1,462
2023/8/2	124,939
2023/9/6	348,079
2023/10/4	19,296
2023/11/1	1,165
2023/12/6	2,773
2024/1/10	22,081

131

結果 福岡県 (R3.1-R6.1)

[R3年1月～R6年1月の調査結果]

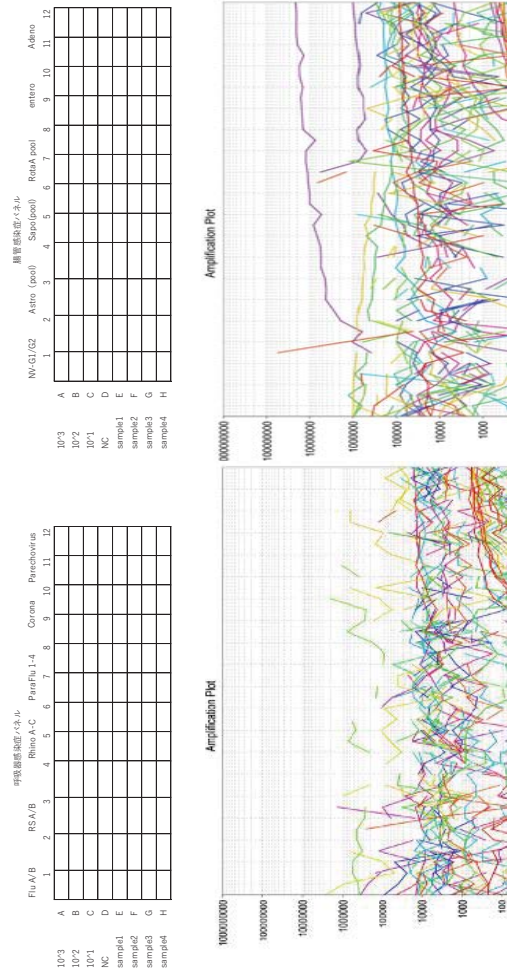
- ・ 月1回の採水を実施。下水中（沈殿物）のコロナ検出状況（Copies/L）と各処理場のキャッチメントエリアの新規感染者数の推移は以下の通り。



B処理場におけるSARS-CoV-2検出状況

130

結果 福岡県 パネルを用いた複数病原体の検出



呼吸器感染症/パネルでの増幅曲線

腸管感染症/パネルでの増幅曲線

いずれのパネルでも増幅できなかった。

132

まとめ

- 2022年1月以降は毎月SARS-CoV-2が検出されていることから、SARS-CoV-2が**定着**していると考えられる。
 - 月に1回のサンプリングでは**流行状況**をモニタリングすることは難しいと考えられる。
 - 流行状況のモニタリングは難しいが、**侵入と消失**のモニタリングは可能と考えられる。
 - 呼吸器感染症パネル及び腸管感染症パネルを用いた複数病原体検出では、いずれのパネルでも増幅することができなかった。
- ➡ 当所のリアルタイムPCRのベースが0.1mlタイプのため、試薬を
移し替える際、完全に試薬を移すことができなかったためと考え
られる。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
吉田弘	特集：下水モニタリングによる地域感染状況把握技術 ポリオの環境水サーベイランス	EICA（環境システム計測制御学会誌）	28 巻 4 号	54-57	2024
吉田弘,喜多村晃一,梁明秀	SARS-CoV-2の下水サーベイランス	感染制御と予防衛生	7(1)	42-47	2023
坂 恭平, 岩手県環境保健研究センター, 北川和寛, 藤沼裕希, 小川泰卓, 長島真美, 小澤広規, 愛知県衛生研究所, 葛口 剛, 板持雅恵, 千葉翔子, 藤本泰之, 木田浩司, 濱崎光宏, 喜多村晃一, 吉田弘	下水中の新型コロナウイルス調査 (NIJIs) プロジェクトとポリオ環境水サーベイランスについて	病原微生物検出情報	44(7)	103-105	2023
Kitamura.K, Kikuchi-Ueno.M, Yoshida.H.	Rapid and sensitive on-site detection of SARS-CoV-2 RNA from environmental surfaces using portable laboratory devices.	Microbiology Spectrum.	11(6).	e0045623	2023

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 脇田 隆子

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

2. 研究課題名 環境水に含まれる新型コロナウイルス等病原体ゲノム情報の活用に関する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) ウイルス第二部・主任研究官

(氏名・フリガナ) 吉田 弘・ヨシダ ヒロム

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口チェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 脇田 隆字

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
2. 研究課題名 環境水に含まれる新型コロナウイルス等病原体ゲノム情報の活用に関する研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) ウイルス第二部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 喜多村 晃一 (キタムラ コウイチ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐	☒	☐		☐

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

2024年3月26日

厚生労働大臣
~~(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿~~
~~(国立保健医療科学院長)~~

機関名 総合研究大学院大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 永田 敬

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
2. 研究課題名 環境水に含まれる新型コロナウイルス等病原体ゲノム情報の活用に関する研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 統合進化科学研究センター 教授
- (氏名・フリガナ) 佐々木 顕 (ササキ アキラ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☐ 無 ☒ (無の場合は委託先機関: 国立感染症研究所)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和6年4月10日

厚生労働大臣
—(国立医薬品食品衛生研究所長)— 殿
—(国立保健医療科学院長)—

機関名 福岡県保健環境研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 白石博昭

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
2. 研究課題名 環境水に含まれる新型コロナウイルス等病原体ゲノム情報の活用に関する研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 保健科学部ウイルス課・ウイルス課長
(氏名・フリガナ) 濱崎光宏 (ハマサキ ミツヒロ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	☐	☒	☐		☐

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容：)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 脇田 隆字

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

2. 研究課題名 環境水に含まれる新型コロナウイルス等病原体ゲノム情報の活用に関する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 感染症疫学センター第6室室長

(氏名・フリガナ) 神垣 太郎 (カミガキ タロウ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐	☒	☐		☐

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。