

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するための研究」
分担研究報告書

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

研究分担者：小澤 広規（横浜市衛生研究所）
研究代表者：吉田 弘（国立感染症研究所）

研究要旨 2020年10月から週1回、流入下水中のスポット採水を実施し、下水沈殿物と下水濃縮物からの新型コロナウイルス（以下、SARS-CoV-2）の検出を国立感染症研究所が技術移転、契約した北里環境科学センターに業務委託した。SARS-CoV-2感染者（以下、感染者）と下水中のSARS-CoV-2の濃度の関係を調査することを目的とした。我が国では、感染者の全数把握が実施されているが、不顕性感染者を含めた地域全体を調査手法が望まれる。本研究では全ての下水沈殿物からSARS-CoV-2が検出され、その有用性が確認された。一方、調査期間内に新技術検証等の人の密集するイベントが行われたが、その後の下水中SARS-CoV-2濃度の大幅な変化は確認されなかった。感染者が一定数以上存在する地域では継続的な下水中SARS-CoV-2濃度の変化の監視でき、採水頻度の上昇によって急激な地域内の感染者増加の影響を監視できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

新型コロナウイルス感染者は糞便中に起因ウイルスであるSARS-CoV-2の排出されることが報告されている。オーストラリア、アメリカ、フランス等の研究では、SARS-CoV-2が未処理の下水から検出されている。下水からの検出は不顕性感染や軽症例があり、感染者の全体像を把握が難しい新型コロナウイルス感染症において、集団レベルの感染者の把握手法として健康リスク管理の観点から公衆衛生上の意義がある。一方で、指定感染症である新型コロナウイルス感染症のヒトのSARS-CoV-2検査は地方衛生研究所においても求められている。感染者増加に伴い、検査数も増加し、下水調査との平行実施は困難である。そこで、民間検査機関に検査委託することで下水検査に検査キャパシティを割かれることなく、対象地域の集団レベルのSARS-CoV-2感染者の動向を調査できる。

本研究では、継続的に下水調査を行うために、国立感染症研究所が契約した民間検査機関へ委託し、信頼性確保や課題について検討した。さらに得られた結果から調査期間内の下水中のSARS-CoV-2の検出結果と自治体が公表する新型コロナウイルスの感染者数との関係の解明を目的とした。

B. 研究方法

1. 調査地点

2020年10月から2021年2月までの期間、東日本の自治体の5か所の下水処理場

の協力を得て調査を実施した。各下水処理場を定点とし、流入下水を週1回採水している。下水利用人口は延べ200~300万人である。

2. 検出方法

北里環境科学センターに以下の方法で業務委託した。

下水流入水を、4℃で3,000rpm、30分間遠心分離を行い、上清と沈殿物に分けて回収した。上清は塩化マグネシウムを添加（最終濃度0.05M）し、塩酸でpH3.5に調整後、陰電荷膜を用いてウイルスを吸着し、3%ビーフエキストラクトを用いて膜からウイルス誘出を行い、100倍濃縮液を得た。1mLの100倍濃縮溶液からQIAamp UltraSens Virus Kitを用いて60μLのRNA溶液を得た。遠心後の沈殿物全量からRNeasy PowerSoil Total RNA Kitを用いて、100μLのRNA溶液を得た。リアルタイムPCRはSARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (Takara bio)を用いてSARS-CoV-2の定量を行った。

下水濃縮、抽出操作を担保するため、プロセスコントロールとしてトウガラシ微斑ウイルス（以下、PMMoV）検出を原本らの方法¹で行った。

3. SARS-CoV-2感染者報告数と下水中SARS-CoV-2濃度の比較

各自治体・行政単位毎に発表されるSARS-CoV-2新規感染者数（以下、感染者数）と下水中のSARS-CoV-2の濃度変化との関係を解析した。下水処理場が関係する

表1 下水処理場の情報

処理場	処理人口	指定医療機関または 宿泊療養施設	商業集積地 事業所数
A処理場	50万人～	あり	約3000
B処理場	～20万人	あり	約1500
C処理場	30～50万人	あり	約3500
D処理場	50万人～	なし	約1500
E処理場	30～50万人	あり	約1000

※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
 ※商業集積地とは、都市計画法第8条に定める「用途地域」のうち、近隣商業地域及び商業地域であって、商店街を形成している地域をいう。
 概ね一つの商店街を一つの商業集積地とする。一つの商店街とは、小売店、飲食店及びサービス業が近接して30店舗以上あるものをいう。
 また、「一つの商店街」の定義に該当するショッピングセンターや多事業所ビル(駅ビル、寄合百貨店等)は、原則として一つの商業集積地とする。
 ※処理場別の感染者数は、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。
 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。

行政単位の人口が異なるため、1週間あたりの感染者数を10万人あたりに換算した。採水日の属する週の10万人あたりの感染者数と下水中SARS-CoV-2濃度を用いて比較した。

C. 研究結果

1. SARS-CoV-2の検出

2020年10月から2021年2月までの間、5か所の下水処理場を定点とし、SARS-CoV-2の検出を試みたところ、調査期間中の全定点、全採水日でSARS-CoV-2が検出された。

調査期間内の下水濃縮物の最大値は 1.4×10^3 、最小値は 1.2×10^1 、平均値は 2.7×10^2 、中央値は 2.0×10^2 、沈殿物の最大値は 2.7×10^5 、最小値は 1.4×10^2 、平均値は 9.9×10^3 、中央値は 3.2×10^3 であった(図1)。

2. トウガラシ微斑ウイルスの検出

RNA抽出のプロセスコントロールとしてPMMoVの検出を試みたところ、調査期間中の全定点、全採水日でPMMoVが検出され、下水の処理からRNA抽出までの工程に問題ないことが確認された。

調査期間内の下水濃縮物の最大値は 2.2×10^8 、最小値は 8.7×10^6 、平均値は 5.0×10^7 、中央値は 3.9×10^7 、沈殿物の最大値は 1.6×10^8 、最小値は 5.8×10^6 、平均値は 3.3×10^7 、中央値は 2.4×10^7 であった(図1)。

3. SARS-CoV-2感染者数と下水中SARS-CoV-2濃度の比較結果

各自治体・行政単位毎に発表されるSARS-CoV-2新規感染者数(以下、感染者)と下水中SARS-CoV-2濃度を10万人あたりに換算した結果を比較した(図2)。

2020年10月から11月にイベント等の場における新技術の実証や2021年1月に

成人式等の人が集まるイベントが開催された。技術実証後の本調査エリアの感染者は増加し、下水中SARS-CoV-2濃度も上昇したが、全国的にも第3波と呼ばれる感染者が増加していった。成人式開催後は本調査エリアの感染者は減少傾向になり、下水中SARS-CoV-2濃度も減少傾向になった。

D. 考察

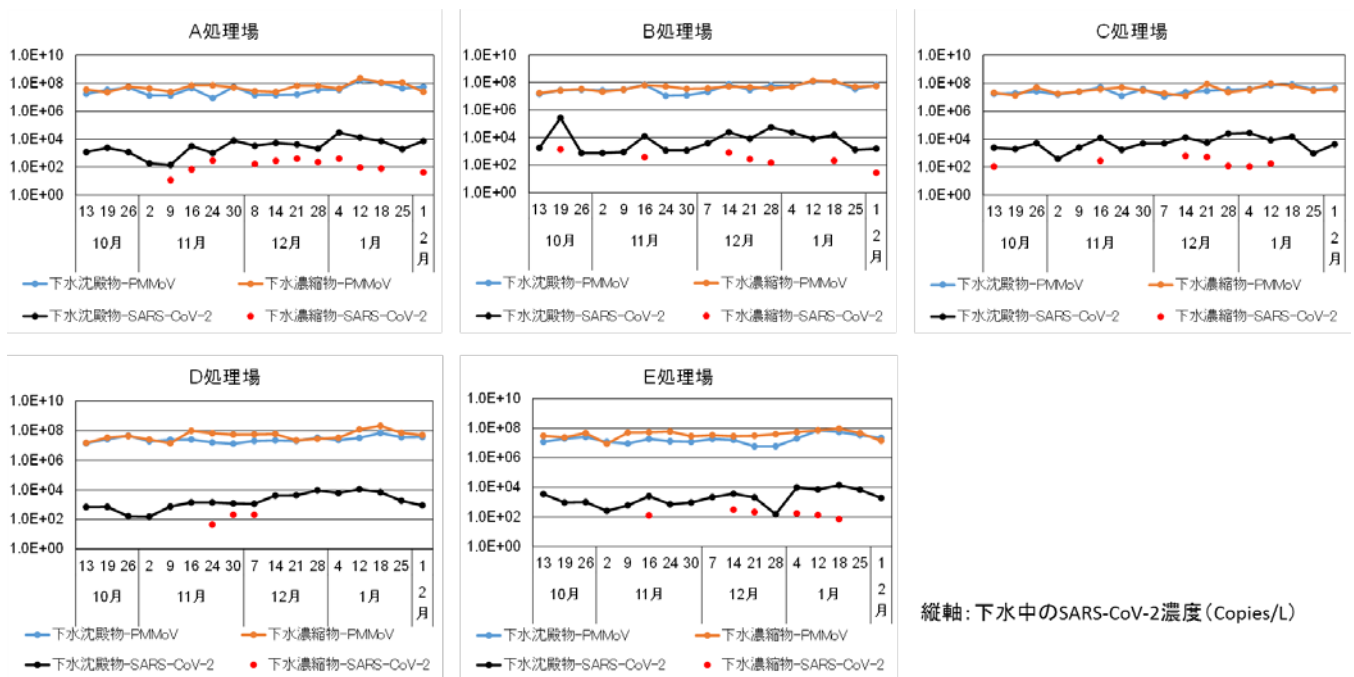
1. 検出方法

下水濃縮物と下水沈殿物を検査に供した。両試料を比較したところ、前者は約45%が検出されたのに対し、後者は採取した全ての試料で検出された。さらに定量結果についても下水沈殿物の方がより高濃度に検出された。今後の調査ではSARS-CoV-2を検出できる下水沈殿物の利用が効率良いと考えられた。

2. 感染者数との比較

ポリオ環境水サーベイランスでは、月1回の試料採水で行い、少数の感染者の流入を感知することが目的であった。本研究では月1回から週1回の試料採取によって、下水中のSARS-CoV-2濃度の増減と自治体内の感染者数の関係を調査した。

調査開始時、調査した全ての下水処理場は都道府県単位で感染者がそれぞれ100人以下であったが、全ての調査地点で検出された。以降日本国内では新型コロナウイルス感染症の第3波と言われる感染者の増加があったが、下水中のSARS-CoV-2濃度に大きな変化はなかった。下水中のSARS-CoV-2濃度の変化から、一定数の感染者が存在する地域では、継続的に検出されることが示唆された。図2の感染者数は下水処理区域が関わる自治体・行政区の全ての感染者をカウントしている。これは感染者の疫学調査は自治体・行政区ごとに行われる



縦軸：下水中のSARS-CoV-2濃度 (Copies/L)

図1 下水中SARS-CoV-2及びPMMoVの調査結果

ためであるが、実際の値よりも高い数値を示す可能性があり解釈には注意が必要である。

B 下水処理場の 10 月 19 日の採水下水において、前後の週に比べて 100 倍以上の高濃度の SARS-CoV-2 の検出があった。その採水日を含む 1 週間の感染者数は前後 1 週間のそれに比べて少なかった。一過性に下水中の SARS-CoV-2 濃度の上昇の原因は処理区域の感染者の増加もしくは排出ウイルス量の多い感染者の集積が考えられるが、感染者の届出数に大きな変動はなかった。結果的に 11 月から感染者が増加傾向にあったことから把握されていない感染者を推知した可能性が示唆された。

下水中 SARS-CoV-2 濃度と感染者数の考察において以下の点に注意が必要である。
 ①保健所で把握される感染者と下水処理区域が異なること
 ②発生届の提出される保健所と届出提出後の所在地（入院、宿泊療養所、自宅）が異なる場合がある
 ③新型コロナウイルス感染症には不顕性感染が多く、保健所の感染者の全数調査に限界があること、
 ④感染者によって排出される SARS-CoV-2 の量及び期間も一定ではないこと。
 ⑤本研究のある 1 点の時間で採水していること。

これらを解消するには 24 時間の連続採水を利用することで、採水時間の影響が少なくなる可能性はある。しかしながら本研究では連続採水を検討していないため、採水時間内の沈殿物に吸着しているウイルス粒子の挙動が不明であることから今後のさらなる研究が必要であると考えられる。

3. 人流の変化との比較

調査期間に実施された「イベント等の場における新技術の実証」と成人式による人流の変化の影響について、感染者の変化と下水中の SARS-CoV-2 濃度変化を比較した。新技術の実証の際には、人数制限が緩和された大規模イベントが実施された。実施 1～2 週間後、本調査エリアにおける下水中 SARS-CoV-2 濃度が上昇傾向になったが、大規模イベント実施の地域に関わらず、国内で第 3 波と言われる感染者が増加し始めた時期と重なっているため、大規模イベントによる影響かは不明である。しかし、本調査エリアのうち、大規模イベント開催地域のみでの下水中 SARS-CoV-2 濃度ではないことから、大規模イベント開催による影響は少なかったと考えられる。また、成人式開催後は感染者増加が見られた地域や下水処理場はなく、イベント開催による人流の変化や人の集まりが不顕性感染者を水面下に増やしたという結果は得られなかった。これらの結果から大規模イベント等の人流の変化による下水中の SARS-CoV-2 濃度への影響は少ないと考えられた。

一方で前述のように B 処理場において一過性に下水中 SARS-CoV-2 濃度が上昇したが、同時期の調査エリアの感染者に大きな増加はなく、大規模なイベント等は行われていなかった。

4. 民間委託による地方衛生研究所の負担軽減

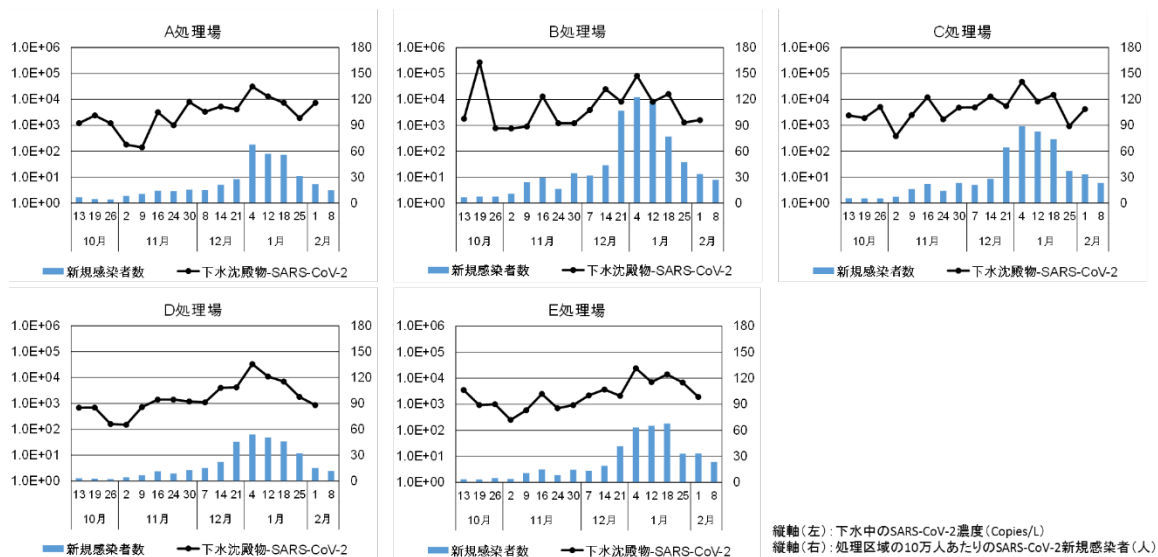


図2 下水沈殿物中のSARS-CoV-2濃度の推移と10万人当たり処理地域の新規感染者の関係

新規感染者数:採水日の属する週の7日間の合計感染者数を採水日に示した。
12/28と1/4は2週間分の合算を1/4に示す。

既存の地方衛生研究所を中心としたポリオ環境水サーベイランスのネットワークを活用することで下水採水、輸送、処理、検査の過程の調整がスムーズになることが予想された。一方で、新型コロナウイルス感染症については地方衛生研究所においても感染者の検査が求められている。さらに2021年2月からはSARS-CoV-2のN501Y変異の解析も求められた。今後も他の変異についても求められる可能性があり、下水検査を行う人員が不足し、調査中止となる事態も想定される。また、本研究で検出されるSARS-CoV-2の濃度は感染者から検出される濃度に比べ非常に低い。従って、感染者の検査を行う地方衛生研究所においてコンタミネーションに注意が必要である。

これら背景を前提に多数の下水処理場で採水された試料を迅速に処理することが課題である。そこで民間検査機関を利用することでこれらの課題の解決を試みた。地方衛生研究所では下水道所管部署との研究計画の調整、検査機関への試料輸送の手配を担い、下水道所管部署と各下水処理場には採水、保管、梱包及び輸送の協力を依頼した。

民間検査機関での検査結果は概ね2週間に1度の頻度で通知された。結果通知から下水道所管部署との結果共有や厚生労働省への結果報告を行う手続きがあるため、試料採水から厚生労働省等への報告まで2~3週間程度であった。健康危機情報の速報として迅速に厚生労働省等への報告が求められる場合、試料数によっては民間検査機関を利用することで、他の新型コロナウイルス感染症の検査を大きく妨げずに実施できることが実証された。

5. 地方衛生研究所の役割

民間検査機関に業務委託を行うにあたって地方衛生研究所は、同日または同月に採水した下水を用いて同様の結果が得られるかを行う精度管理の役割を担うことが考えられる。また限られた人員の中で、民間検査機関から得られた結果の妥当性を評価し、公衆衛生上の基礎データとして解析を行うことも可能となる。

公衆衛生上、重要となるのは下水中の感染性を持ったSARS-CoV-2の存在である。これらの検査は管理区域内で行う必要があり、日常業務でウイルス分離を行っている地方衛生研究所で確認を行うことが可能である。

今後は得られた試料を利用し、SARS-CoV-2の感染性を検査することが必要になると考えられる。

E. 結論

5か所の下水処理場で採水頻度を週1回に増やした結果も、先行研究と同様にSARS-CoV-2の検出に適した試料が下水沈殿物であった。

処理地域内の下水中SARS-CoV-2濃度の変化を示した。感染者数の増減の傾向が類似していたが、処理人口が少ない処理場では下水中SARS-CoV-2濃度と感染者の関係にばらつきが見られた。

民間検査機関を利用することで、下水検査以外の業務を滞らせることなく迅速に結果の報告に繋げることが可能となる。

本研究は、SARS-CoV-2の遺伝子を検出した研究であり、下水中のSARS-CoV-2の感染性については評価していない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 環境水調査による新型コロナウイルスの下水からの検出
小澤広規 井上嵩之 櫻井 光 川上
千春 清水耕平 宇宿秀三 田中伸子
大久保一郎 吉田 弘
IASR Vol. 41 p122-123: 2020年7月
号

学会発表

1. 第79回日本公衆衛生学会
環境水サーベイランスにおける新型コロナ
ウイルスの検出
小澤広規、吉田弘、大久保一郎

H. 知的財産権の出願・登録状況

(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

引用文献

1. Haramoto et al. (2013) Occurrence of pepper mild mottle virus in drinking water sources in Japan. *App. Environ. Microbiol.* 79 (23), 7413-7418.