

COVID-19流行期の下水流入水SARS-CoV-2調査

板持 雅恵 川上 利恵 矢澤 俊輔 嵩田 嵩久
佐賀由美子 福山 圭 谷 英樹

Environmental Surveillance for SARS-CoV-2 in Raw Sewage during Pandemic Period of COVID-19

Masae ITAMOCHI, Rie KAWAKAMI, Shunsuke YAZAWA, Takahisa SHIMADA,
Yumiko SAGA, Kei FUKUYAMA, and Hideki TANI

下水流入水中のウイルスは、地域住民由来のウイルスの性状や流行状況を反映することが知られている。ポリオウイルスについては、世界のポリオ根絶にむけて、不顕性感染を含むウイルスの動向を監視する目的で、WHOのポリオ根絶計画のもとで環境サーベイランスが実施されており、我が国においても、厚生労働省感染症流行予測調査事業の一環として全国の自治体で調査が実施されている[1, 2]。2019年から世界的に流行している新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）は、呼吸器のみならず、腸管へも感染し、糞便中にもウイルスが排出されることから[3-4]、下水流入水からの検出状況を地域や施設におけるウイルス流行の把握や予測に活用することが試みられている[5-9]。富山県衛生研究所においても、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の流行下において下水流入水のSARS-CoV-2調査を実施し、地域におけるウイルス流行状況との関連を解析した。また、検査方法の効率化のため、下水流入水からのSARS-CoV-2検出方法、および下水流入水中のSARS-CoV-2の安定性について検証を行ったので、あわせて報告する。

材料と方法：

（１）調査期間および調査地点

下水流入水からのウイルス調査では、富山県内の1下水処理場において、2020年から2022年8月までは月1回、2022年9月から2024年3月までは週1回下水流入水を採取した。

（２）下水流入水の濃縮

下水流入水中のウイルスは、陰電荷膜法[10]、またはWizard Enviro TNA Kit (Promega)、あるいはRNeasy PowerSoil Total RNA kit (QIAGEN)を用いて濃縮した。

陰電荷膜法による濃縮では、下水流入水1 Lを4℃で3,000 rpm、30分間遠心した上清に、最終濃度0.05 Mとなるように塩化マグネシウムを添加し、0.5 Nの塩酸を用いてpH 3.5に調整した。この液を陰電荷膜（セルロース混合エステルメンブレンフィルター、ADVANTEC）に加圧濾過して吸着させた後、陰電荷膜を細切し、3% ビーフエキストラクト（pH 7.4）10 mLを添加してボルテックスミキサーによりウイルスを溶出した。溶出液を回収し、4℃で10,000 rpm、30分間遠心した。遠心上清を回収し、ポアサイズ0.45 μmのフィルターに濾過して得られた濾液を100倍濃縮下水検体とした。これらの濃縮下水検体からQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)またはQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いてウイルスRNAまたはDNAを抽出した。

市販キットを用いたウイルス遺伝子の濃縮では、40 mLの下水流入水からWizard Enviro TNA Kit (Promega)を用いてウイルス遺伝子を抽出した。または、1 Lの下水流入水の沈査からRNeasy PowerSoil Total RNA kit (QIAGEN)を用いてウイルス遺伝子を抽出した。使用方法はキットの添付文書に従った。

（３）リアルタイムPCR

抽出した下水流入水のRNAサンプルについて、SARS-CoV-2および対照としてトウガラシ微斑ウイルス遺伝子の定量を、SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater (タカラバイオ)を用いてリアルタイムPCR法により実施した。

（４）温度と凍結融解回数別の下水流入水中ウイルス量の比較

SARS-CoV-2およびトウガラシ微斑ウイルス遺伝子量既知の下水流入水を40 mLずつ分注し、-20℃、4℃、28℃で1週間、2週間、4週間保

存した。また、 -20°C での凍結と水浴での融解を、凍結1週間、2週間、4週間後に繰り返し、それぞれ計1～3回の凍結融解を行った。Wizard Enviro TNA Kit (Promega) を用いてRNAを抽出し、SARS-CoV-2およびトウガラシ微斑ウイルス遺伝子量をリアルタイムPCRにより定量した。定量値は3回の実験の値を平均した。

(5) COVID-19 患者報告数

下水処理場流域の新規COVID-19患者報告数は、富山県健康対策室および富山県感染症情報センターにおける公表数[11, 12]を集計した。

(6) 統計解析

COVID-19患者数、対数変換した下水流入水中のウイルス遺伝子量について、危険率5%未満を有意とし、SPSS Statistics 27.0 (IBM) を用いて検定を行った。濃縮方法別のウイルス遺伝子量の

比較には、Friedmanの順位付けによる変数の双方向分析、保存条件別のウイルス遺伝子量の比較には、Kruskal-Wallis検定を用いた。COVID-19患者数と、下水流入水中のウイルス遺伝子量との相関はSpearmanの相関係数を用いた。

結果：

(1) 濃縮方法別の下水中ウイルス量

図1に2022年2月から2023年3月の下水流入水を対象とした、濃縮方法別のSARS-CoV-2およびトウガラシ微斑ウイルス遺伝子量を示す。

陰電荷膜法、RNeasy PowerSoil Total RNA kit、およびWizard Enviro TNA Kitにより濃縮、抽出されたSARS-CoV-2遺伝子量の平均値は、それぞれ、 2.2×10^2 copies/L ($0 \sim 9.1 \times 10^3$ copies/L)、 1.9×10^2 copies/L ($0 \sim 7.1 \times 10^3$ copies/L)、

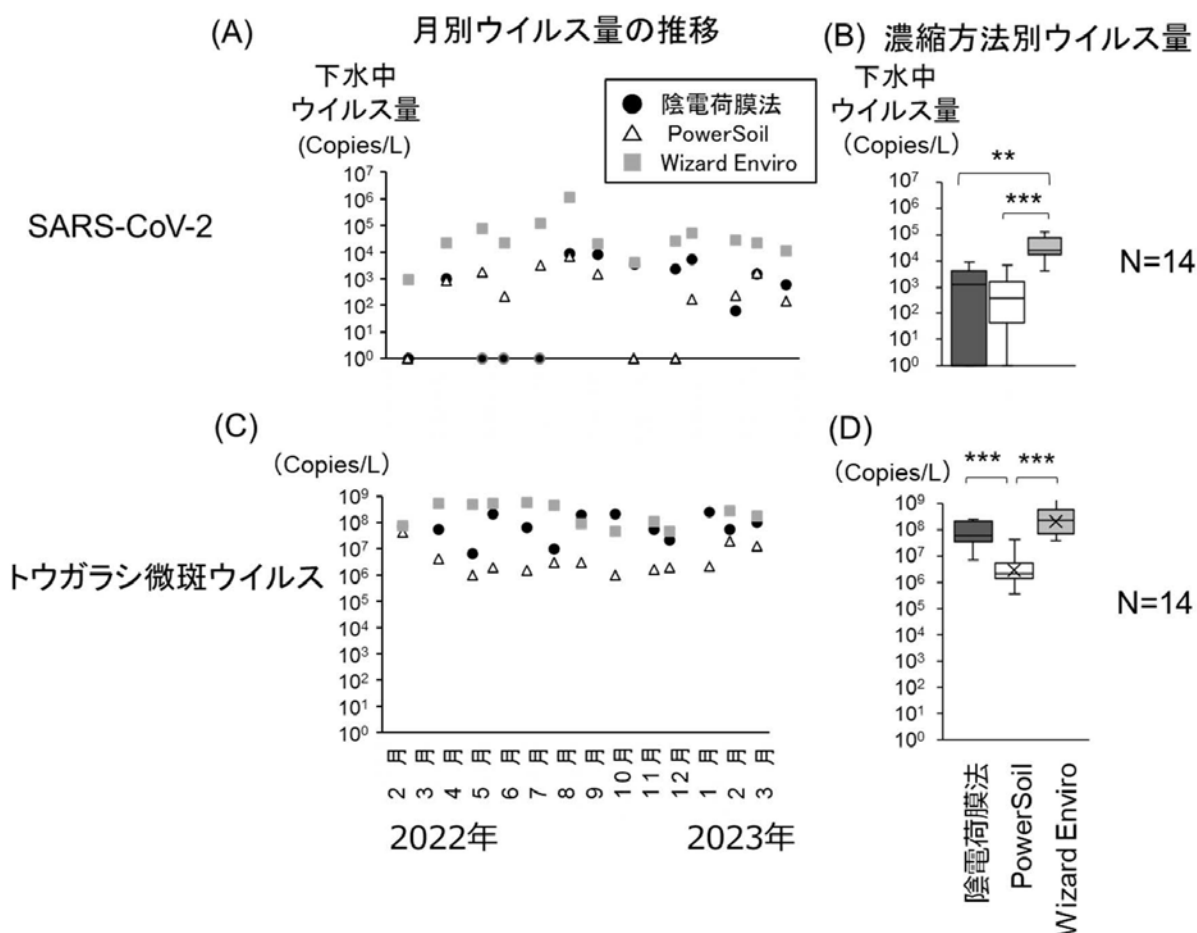


図1. 濃縮方法別の下水流入水中ウイルス量 (2022年2月～2023年3月)

下水中の月別SARS-CoV-2 (A)、濃縮方法別SARS-CoV-2 (B)、月別トウガラシ微斑ウイルス (C)、濃縮方法別トウガラシ微斑ウイルス (D)の遺伝子量をリアルタイムPCRにより定量した。***, $p<0.001$, **, $p<0.01$, Friedmanの順位付けによる変数の双方向分析

2.9×10^4 copies/L ($9.0 \times 10^2 \sim 1.2 \times 10^6$ copies/L) であり, Wizard Enviro TNA Kit により検出された SARS-CoV-2 遺伝子量が有意に多かった (図 1A, 1B)。

下水流入水中のトウガラシ微斑ウイルス遺伝子量の平均値は, 陰電荷膜法, RNeasy PowerSoil Total RNA kit, および Wizard Enviro TNA Kit では, それぞれ, 6.3×10^7 copies/L ($6.8 \times 10^6 \sim 2.6 \times 10^8$ copies/L), 2.9×10^6 copies/L ($3.5 \times 10^5 \sim 4.4 \times 10^7$ copies/L), 2.1×10^8 copies/L ($3.9 \times 10^7 \sim 1.4 \times 10^9$ copies/L) であり, 陰電化膜法および Wizard Enviro TNA Kit による検出の方が多かった (図 1C, 1D)。

(2) 温度と凍結融解回数別の下水流入水中ウイルス量の比較

図 2 に温度と凍結融解回数別の下水流入水中

SARS-CoV-2 およびトウガラシ微斑ウイルス遺伝子量を示す。

下水流入水中の SARS-CoV-2 遺伝子量の平均値は, 保存開始時 2.0×10^4 copies/L が, 28℃での保存では 1 週間で 7.6 copies/L と千分の一以下に減少したが, 4℃での保存では 1 週間で 1.4×10^4 copies/L に半減, 2 週間で 4.0×10^3 copies/L, 4 週間で 2.1×10^3 copies/L に減少した。-20℃での保存では, 1 週間, 2 週間, および 4 週間の保存でそれぞれ 2.3×10^3 copies/L, 1.4×10^3 copies/L, および 1.7×10^3 copies/L であり, いずれも保存開始時から 1 log₁₀ 減少した量で推移した (図 2A)。一方, トウガラシ微斑ウイルスでは, 28℃, 4℃, および -20℃での保存 1 週間, 2 週間, 4 週間後でウイルス遺伝子量の減少はみられなかった (保存温度別のウイルス遺伝子量の比較, 保存期

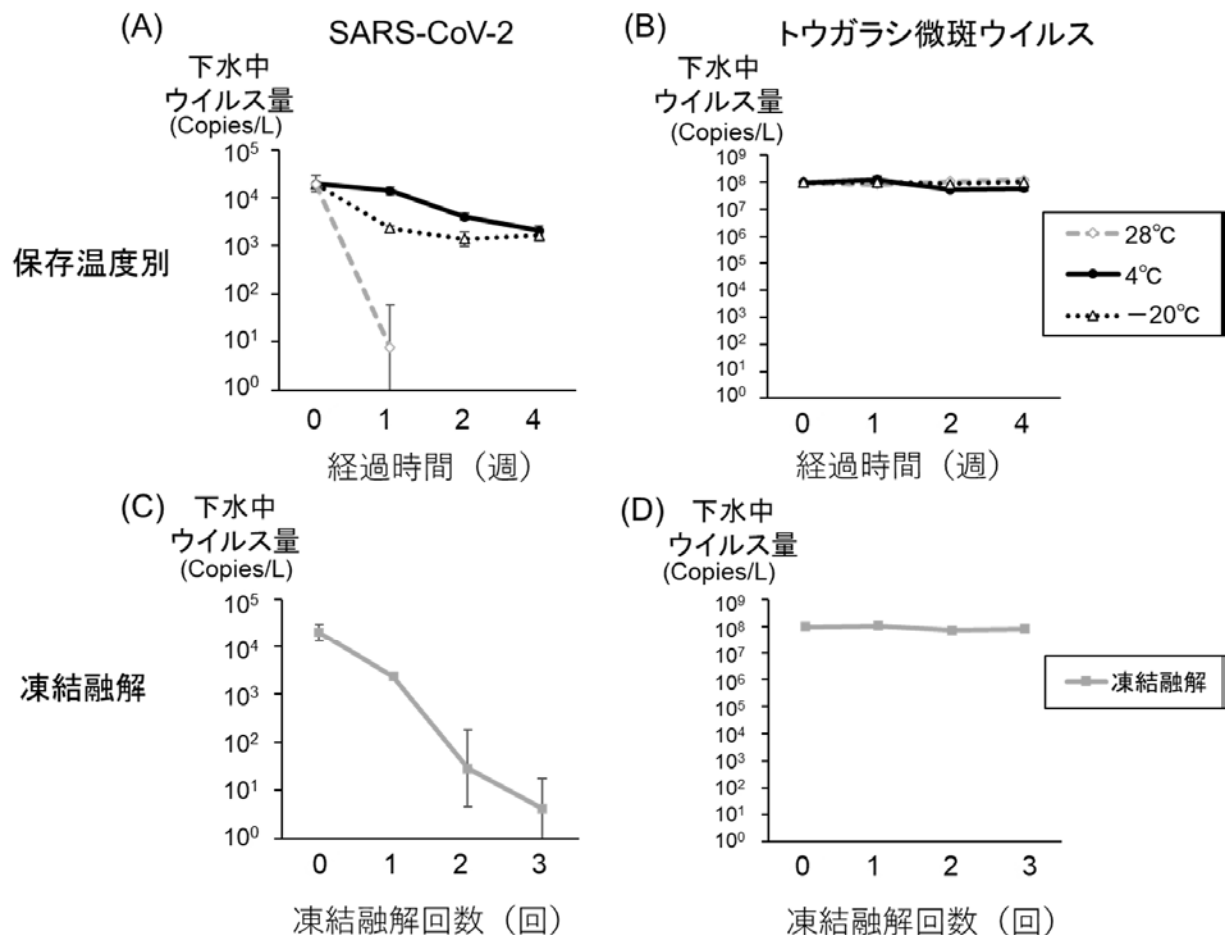


図 2. 温度と凍結融解回数別の下水流入水中ウイルス量

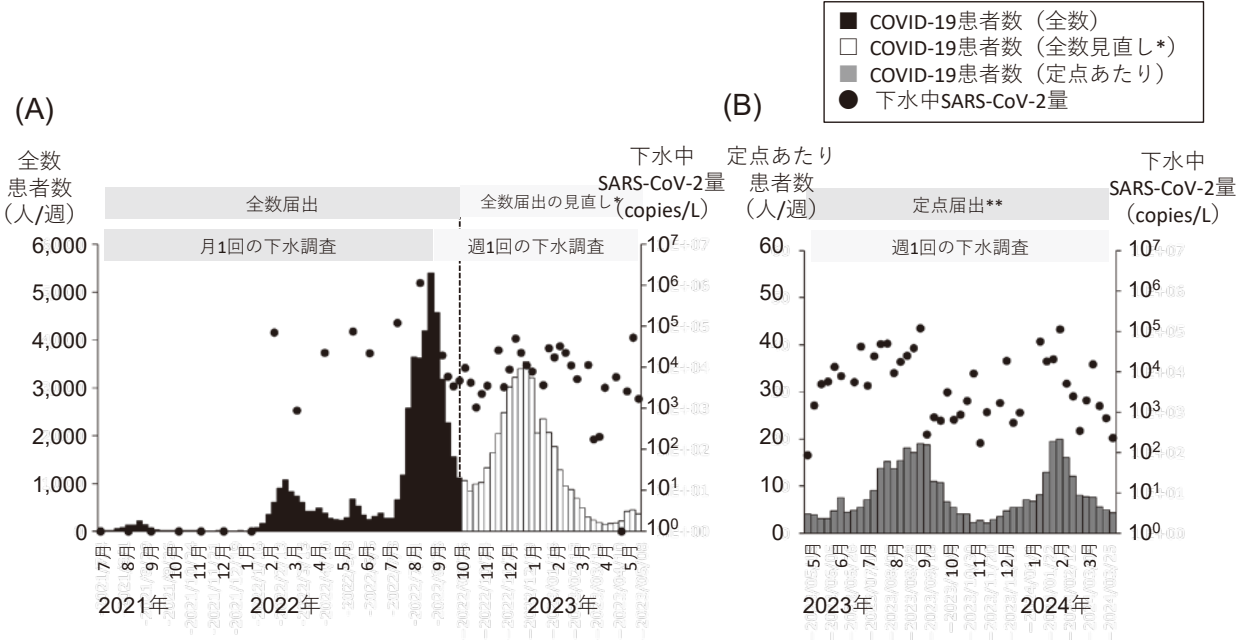
A : 28℃, 4℃, -20℃で1, 2, 4 週間保存した場合の下水流入水中の SARS-CoV-2 (A) およびトウガラシ微斑ウイルス (B), -20℃の凍結と水浴による融解を1~3 回繰り返した場合の下水流入水中の SARS-CoV-2 (C) およびトウガラシ微斑ウイルス (D) の遺伝子量をリアルタイム PCR 法により定量した。

間別のウイルス遺伝子量の比較, それぞれ Kruskal-Wallis 検定, $p>0.05$, それぞれ $n=3$) (図 2B).

下水流入水を -20°C での凍結融解を, 1 週間 (凍結融解 1 回), 2 週間 (凍結融解 2 回), および 4 週間 (凍結融解 3 回) 後に繰り返すと, SARS-CoV-2 遺伝子量の平均値は, それぞれ 2.3×10^3 copies/L, 2.9×10^1 copies/L, および 4.2 copies/L であり, 凍結融解 1 回ごとに $1 \log_{10}$ ずつ減少した (図 2C). 一方, トウガラシ微斑ウイルスでは, 凍結融解を 1 ~ 3 回繰り返しても, ウイルス遺伝子量の減少はみられなかった (Kruskal-Wallis 検定, $p>0.05$, それぞれ $n=3$) (図 2D).

(3) 富山県の環境サーベイランスにおける SARS-CoV-2 検出状況

図 3 に富山県内 1 下水処理場の下水流入水からの SARS-CoV-2 検出状況と流域の COVID-19 感染者数の推移を示す. 本調査では, 2022 年 1 月までの下水流入水からは SARS-CoV-2 が検出されず, COVID-19 流行のいわゆる第 6 波である, 2022 年 2 月以降の下水流入水から継続的に SARS-CoV-2 が検出された (図 3A, 3B). また, 流域の COVID-19 患者の全数報告数が 144 人/週 (すなわち人口 10 万人あたり新規感染者数が約 72 人/週), または定点あたり報告数が 2 人/週を超えた場合に下水流入水から SARS-CoV-2 が検出された. 調査期間中の下水流入水中の SARS-CoV-2 遺伝子量の平均値は 6.1×10^4 copies/L であり, 最も多かったのは, 2022 年 8 月上旬の 1.2×10^6 copies/L であった.



調査期間	COVID-19 報告方法	下水調査の頻度	下水 SARS-CoV-2 量と COVID-19 報告数との Spearman の相関
2022 年 2 月***~2022 年 8 月 31 日	全数報告	毎月	$R=0.429$, $p=0.337$, $n=7$
2022 年 9 月 1 日~2022 年 9 月 25 日	全数報告	毎週	$R=0.300$, $p=0.624$, $n=5$
2022 年 9 月 26 日~2023 年 5 月 7 日	全数報告の見直し*	毎週	$R=0.465$, $p<0.05$, $n=26$
2023 年 5 月 8 日~2024 年 3 月 31 日	定点報告**	毎週	$R=0.476$, $p<0.01$, $n=43$

図 3. 下水流入水 SARS-CoV-2 量と処理場流域における COVID-19 患者数との推移

富山県内 1 下水処理場における下水流入水中の SARS-CoV-2 遺伝子は, Wizard Enviro TNA Kit により抽出し, リアルタイム PCR により定量した. SARS-CoV-2 の検出下限値は, 200 copies/L であった.

* 全数届出の見直し: 医療機関からの発生届出の対象を 65 歳以上の者, 入院を要する者, 重症化リスクがあり, 新型コロナウイルス感染症治療薬の投与又は新たに酸素投与が必要と医師が判断する者, および妊婦に限られた. その他の軽症者は, 医療機関, 健康フォローアップセンター登録による感染者数の全数把握となった.

** 定点あたり患者数: 下水処理場流域の 20 定点医療機関からの COVID-19 患者報告数の平均.

***2022 年 2 月以降, 当該処理場の下水流入水から SARS-CoV-2 が検出された.

下水流入水中 SARS-CoV-2 遺伝子量と COVID-19 患者数との関連性を図 3C に示す。下水流入水中 SARS-CoV-2 遺伝子量と COVID-19 患者数は、2022 年 2 月～9 月 25 日の調査 (COVID-19 は全数報告、下水調査の頻度は毎月または毎週) では有意な相関はみられなかった。一方、2022 年 9 月 26 日から 2023 年 5 月 7 日の調査 (COVID-19 は全数報告、下水調査の頻度は毎週)、および 2023 年 5 月 8 日から 2024 年 3 月 31 日の調査 (COVID-19 は定点報告、下水調査の頻度は毎週) では、中等度の相関がみられた (Spearman の相関) (図 3C)。

考察：2022 年 2 月から 2023 年 3 月の下水流入水について、濃縮方法別のウイルス遺伝子量を比較したところ、SARS-CoV-2 では Wizard Enviro TNA Kit による検出量が多かった。以前報告した下水流入水サンプルへのウイルス添加実験でも、Wizard Enviro TNA Kit による SARS-CoV-2 の回収率が高く、高感度であることが示されており、本調査の結果と一致する [13]。一方、トウガラシ微斑ウイルスでは Wizard Enviro TNA Kit および陰電荷膜法による検出量は同等であった。ウイルスによって濃縮方法別の検出量に差がみられたのは、SARS-CoV-2 はトウガラシ微斑ウイルスよりも下水流入水中の安定性が低いことや (図 2)、陰電荷膜法では下水を pH3.5 に調整する工程があるため、酸に対する感受性が影響した可能性が推測される [14-16]。

また、下水流入水サンプルの保存条件を検討したところ、 -20°C で 4 週間保存した場合の SARS-CoV-2 遺伝子量は、 -20°C で 1 週間保存した場合とほぼ同等であったため、 -20°C では SARS-CoV-2 遺伝子量の減少は比較的少ないものと考えられた。

一方、凍結融解を繰り返すと、SARS-CoV-2 遺伝子量は、1 回ごとに $1 \log_{10}$ 減少した。 4°C での保存では、SARS-CoV-2 ゲノム量は 4 週間で $1 \log_{10}$ 減少した。これまでの研究により、下水流入水中の SARS-CoV-2 の $1 \log_{10}$ 減少時間は、 4°C 、 15°C 、 25°C 、 37°C それぞれ 27.8 日、20.4 日、12.6 日、8 日と高温ほど速く不活化されること、不活化の機序はウイルス蛋白質の変性が主であることが報告されている [14-16]。本調査結果から、下水流入水のサンプルは、 4°C で速やかに検査に供することが望ましいが、速やかな検査が困難な場合は冷凍し、凍結融解を繰り返さないという基本に従うことが重要と考えられた。

本調査では、流域の COVID-19 患者の全数報告数が 144 人 / 週 (すなわち人口 10 万人あたり新規感染者数が約 72 人 / 週)、または定点あたり患者報告数が 2 人 / 週を超えた場合に、下水流入水から $2 \times 10^2 \sim 1.2 \times 10^6$ copies/L の SARS-CoV-2 が検出された。2022 年 9 月 26 日以降、下水流入水中の SARS-CoV-2 遺伝子量は、感染者数と中等度の相関がみられていることから、地域における COVID-19 流行の目安になることが示された。

SARS-CoV-2 の感染者における糞便中へのウイルス排出量は $3 \log_{10}$ copies/mL から $5 \log_{10}$ copies/mL 程度と少なく [17]、尿中への SARS-CoV-2 の排出量も少ないため [18]、流域の感染者数が一定数を超えないと下水流入水から SARS-CoV-2 が検出されないことが推測される。今後、高感度で簡便なウイルス検出方法を検討し、継続的な調査に適用することで、地域流行の状況をリアルタイムに捉えることが期待できる。

謝 辞

本調査を実施するにあたり、検体採取等にご協力いただいた富山県内下水道処理施設、富山県都市計画課および感染症対策課、その他関係各位に深謝いたします。本研究の一部は、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」 (代表：鈴木基) (課題番号：20HA2007) および厚生労働科学研究費補助金指定研究 (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」 (代表：吉田弘) (課題番号：23HA2015) の助成を得て実施した。

文 献

1. WHO. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation 2003. http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/WHO_V-B_03.03_eng.pdf. (2024 年 5 月 30 日アクセス可能)
2. 国立感染症研究所. ポリオ 2023 年現在. (IASR Vol. 44 p113-114: 2023 年)
3. Lamers M M, Beumer J, van der Vaart J, et al. (2020). Science, 369, 50-54

4. Xiao F, Sun J, Xu Y, et al. (2020). *Emerg Infect Dis*, 26, 1920–1922
5. Tanimoto Y, Ito E, Miyamoto S, et al. (2022). *Front Microbiol*, 13, 892447
6. Tiwari A, Lipponen A, Hokajärvi AM, et al. (2022). *Water Res*, 215, 118220.
7. Sharif S, Ikram A, Khurshid A, et al. (2021). *PLoS One*, 16: e0249568
8. Kitajima M, Murakami M, Kadoya SS, et al. (2022). *JAMA New Open*, 5, e2226822
9. 坂恭平, 北川和真, 藤沼裕希, 他. (2023) *IASR*, 44, 103–105
10. 国立感染症研究所, 全国地方衛生研究所. (2012). ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル, 28–38
11. 富山県健康対策室. 新型コロナウイルス感染症に関する情報. 2024. <https://www.pref.toyama.jp/120507/kurashi/kenkou/kenkou/covid-19/kj00021798.html> (2024 年 5 月 30 日アクセス可能)
12. 富山県感染症情報センター. 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 2024. <https://www.pref.toyama.jp/1279/kansen/topics/covid19/index.html> (2024 年 5 月 30 日アクセス可能)
13. 板持雅恵, 稲崎倫子, 佐賀由美子, 他. (2022). *臨床とウイルス*, 50, 177–182
14. Atoui A, Cordevant C, Chesnot T, et al. (2023). *Sci Total Environ*, 881, 163453
15. Xiling G, Yin C, Ling W, et al. (2020). *J Hosp Infect*, 106, 226–231
16. Chan KH, Sridhar S, Zhang RR, et al. (2021). *Front Microbiol*, 12, 667956
17. Cheung KS, Hung IFN, Chan PPY, et al. (2020). *Gastroenterology*, 159, 81–95
18. Sun J, Zhu A, Li H, et al. (2020). *Emerg Microbes Infect*, 9, 991–993