

愛媛県の下水処理施設における流入水の病原ウイルス実態調査

河瀬曜 中西千尋 山下育孝 吉田紗弥子 大塚有加 滝山広志 四宮博人

Keywords : 下水サーベイランス, 濃縮・抽出方法, SARS-CoV-2, インフルエンザウイルス, ノロウイルス

わが国ではポリオウイルスや新型コロナウイルス(以下, SARS-CoV-2)を流入下水(以下, 下水)から検出することで, その流域のウイルス感染症の流行状況を把握, 監視する疫学手法(以下, 下水サーベイランス)が用いられている。本県において同手法によるウイルス感染症流行状況の把握を目的とした研究を進めるため, 下水からウイルス遺伝子を濃縮及び抽出する方法について, 濃縮効率や作業時間の面から検討した結果, 市販の下水用遺伝子濃縮・抽出キット(Promega 社)を採用した。下水から検出された病原ウイルス遺伝子中に, SARS-CoV-2, インフルエンザウイルス, ノロウイルスなどが検出され, ウイルスの種類によって県内の各感染症流行状況と同様の傾向がみられた。

はじめに

下水中にはウイルス感染者の糞便中に排出された病原ウイルスが含まれている。

下水サーベイランスは, 下水中に含まれる感染者から排出されたウイルスを間接的に検出することにより流行状況を把握しようとする疫学的手法で, その歴史は古く, 第二次世界大戦前から行われていた国もある。

わが国においては2013年からポリオウイルスの監視を目的として実施されている¹⁾。また, 2020年にはSARS-CoV-2について, 厚生労働省研究班において下水サーベイランスの研究がされており²⁾, 厚生労働省が実施する感染症流行予測調査事業においても下水中のSARS-CoV-2モニタリングが実施されている³⁾。

下水サーベイランスは, 下水が流入する地域における感染症の原因ウイルスの侵入, 流行状況, 分子疫学及び流行収束を早期に把握できる可能性がある。

現行の感染症発生動向調査は有症者のみが対象となっているが, 下水サーベイランスは不顕性感染者も対象に含まれることから, 医療機関等からの届出に影響を受けることなく, 流行状況を把握することができる可能性があり, 本法は感染症発生動向調査の手法として大変重要であると考ええる。

そこで, 今回, 本県において, SARS-CoV-2を始め, インフルエンザウイルス(以下, IFV), エンテロウイルス属(以下, EnVs), ノロウイルス(以下, NV)等感染性胃腸炎の原因となる病原ウイルスの遺伝子を下水から

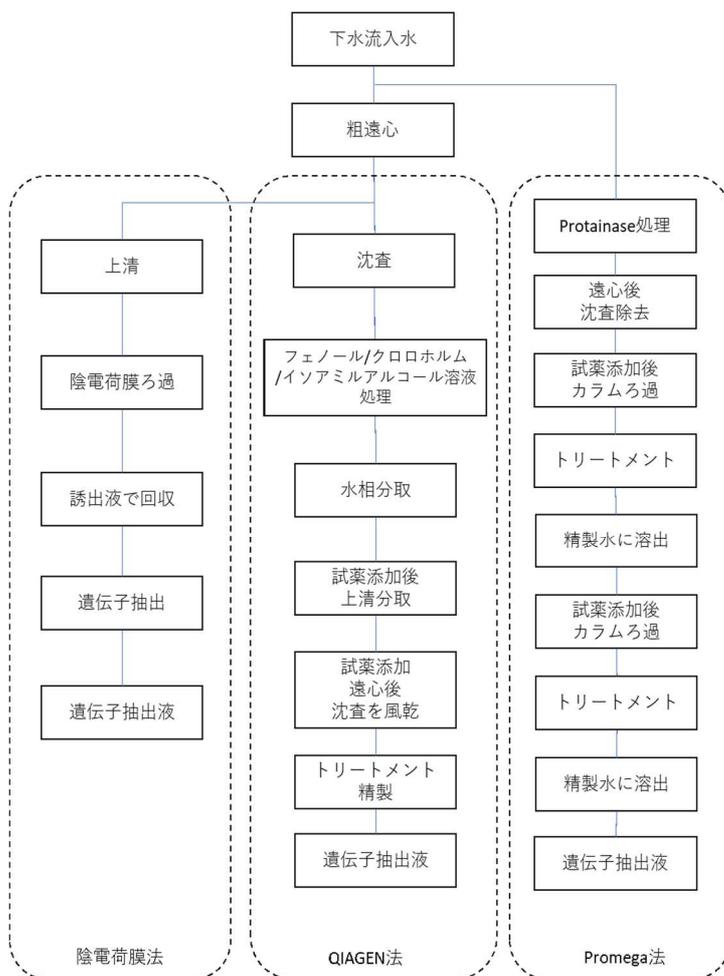


図1 ウイルス遺伝子濃縮・抽出方法のフロー図

検出する手法を確立するため、遺伝子の濃縮及び抽出方法について検討を行った。また、検討結果から採用した抽出方法を用い、病原性ウイルスの検出を実施した。

材料と方法

1 材料

2023年11月に県内1か所の下水浄化場で同日に採取した下水を使用してウイルス遺伝子の濃縮及び抽出方法を検討した。また、2023年9月から2024年3月に同下水浄化場で採取した下水計13検体について、ウイルス遺伝子の検出を実施した。

2 方法

(1) 遺伝子濃縮・抽出法の検討

厚生労働省研究班が公開している下水の上清から陰電荷膜によりウイルス粒子を濃縮する方法(以下、陰電荷膜法)及び沈査から「RNeasyPower Soil Total RNA kit(QIAGEN社)」により遺伝子を抽出する方法(以下、QIAGEN法)⁴⁾と、「Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit(Promega社)」(以下、Promega法)により下水から遺伝子を抽出する方法について比較検討を行った。各濃縮・抽出法のフローを図1に示した。同日に採取した下水をサンプルとし、各濃縮・抽出法につき5回抽出を実施し、SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater(タカラバイオ社)を使用してSARS-

CoV-2及びトウガラシ微斑ウイルス(以下、PMMoV)をターゲットとしたリアルタイムPCR法によりウイルス遺伝子コピー数を比較した。PMMoVはウイルスに感染したピーマン等を食べた人の糞便中に高濃度で排出され、下水検体には大量に含まれているため、下水の浄水処理指標として用いられている植物ウイルスである。今回はウイルス核酸抽出工程とリアルタイムPCR法における核酸増幅工程のプロセスコントロールとして使用した。また、各方法の濃縮・抽出に要する時間及び費用について検討した。

(2) 下水からのウイルス遺伝子検出

SARS-CoV-2, IFV, EnVs, アデノウイルス(以下、AdV), NV, ロタウイルス(以下、RtV), 及びサポウイルス(以下、SaV)について実施した。SARS-CoV-2については、SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater(タカラバイオ社)を使用したリアルタイムPCR法によりウイルス遺伝子コピー数を測定した。IFV及びNVについては、国立感染症研究所病原体検出マニュアル^{5) 6)}に従い、リアルタイムPCR法によりウイルス遺伝子コピー数を測定した。EnVs, AdV, RtV, 及びSaVについては、国立感染症研究所病原体検出マニュアル^{7) 8) 9) 10)}に従い、コンベンショナルPCR法によりウイルス遺伝子の検出を行い、ウイルス遺伝子陽性の場合には必要に応じてシーケンスによるウイルス型別

表 1 遺伝子濃縮・抽出法別遺伝子検出結果

SARS-CoV-2			PMMoV		
陰電荷膜法	QIAGEN法	Promega法	陰電荷膜法	QIAGEN法	Promega法
9.7×10^2	3.4×10^4	6.5×10^5	9.0×10^7	6.0×10^7	7.2×10^9
3.9×10^2	3.8×10^4	8.6×10^5	8.4×10^7	6.0×10^7	8.7×10^9
7.9×10^1	1.7×10^4	1.1×10^6	1.9×10^8	9.7×10^7	7.8×10^9
1.0×10^3	2.1×10^4	1.3×10^6	2.4×10^8	9.1×10^7	6.6×10^9
N.D.	3.9×10^4	1.4×10^6	1.0×10^8	2.2×10^8	8.0×10^9

(copies/L)

表 2 遺伝子濃縮・抽出法による比較

	陰電荷膜法	QIAGEN法	Promega法
所要時間/検体(分)	132	150	94
検査結果(copies/L)/5回平均			
SARS-CoV-2	6.1×10^2	3.0×10^4	1.1×10^6
PMMoV	1.4×10^8	1.1×10^8	7.7×10^9

網かけ: 最良効率

表 3 下水からのウイルス遺伝子検出結果(リアルタイム PCR)

採水日	SARS-CoV-2	NV		IFV		
		G I	G II	AH1	AH3	B(vic)
2023/9/1	3.9×10^5	N.D.	8.6×10^4	N.D.	N.D.	N.D.
2023/9/22	9.0×10^4	2.9×10^3	9.7×10^3	N.D.	N.D.	N.D.
2023/10/6	1.0×10^4	1.6×10^5	3.0×10^5	N.D.	N.D.	N.D.
2023/10/27	6.8×10^3	N.D.	7.8×10^4	N.D.	N.D.	N.D.
2023/11/10	9.3×10^4	8.6×10^2	1.0×10^5	8.6×10^4	4.0×10^5	N.D.
2023/11/24	9.4×10^5	1.3×10^5	5.3×10^5	1.0×10^5	1.5×10^4	N.D.
2023/12/8	2.0×10^5	4.2×10^3	5.6×10^4	N.D.	4.4×10^5	N.D.
2023/12/27	2.5×10^5	3.6×10^4	1.3×10^6	3.5×10^4	N.D.	7.0×10^3
2024/1/5	1.9×10^6	5.2×10^6	9.2×10^6	8.1×10^4	3.8×10^3	N.D.
2024/1/26	7.5×10^5	1.1×10^5	1.5×10^6	2.1×10^4	N.D.	9.9×10^3
2024/2/9	1.4×10^6	2.1×10^5	3.1×10^5	3.3×10^3	N.D.	6.1×10^3
2024/2/29	1.3×10^6	1.5×10^5	4.8×10^5	N.D.	N.D.	1.1×10^3
2024/3/15	6.8×10^5	3.9×10^5	6.3×10^5	N.D.	N.D.	3.9×10^3

(copies/L)

表 4 下水からのウイルス遺伝子検出結果(定性)

採水日	EnVs			AdV	RtV	SaV
	VP2	VP4	Seq			
2023/9/1	+	+	EVB	-	-	+
2023/9/22	-	+		-	-	+
2023/10/6	+	+	CVB5	-	-	+
2023/10/27	-	+		-	-	+
2023/11/10	-	-		-	-	+
2023/11/24	-	+		-	-	+
2023/12/8	+	+		-	-	+
2023/12/27	+	+		-	-	+
2024/1/5	+	+	CVB5	-	-	+
2024/1/26	+	+		-	-	+
2024/2/9	+	+		-	-	+
2024/2/29	-	+		-	-	+
2024/3/15	-	+		-	-	+

の同定を実施した。

また、SARS-CoV-2、IFV、NVは測定結果と発生病患報告数との比較を行った。

結果

1 遺伝子濃縮・抽出方法の検討

各方法の遺伝子検出結果、濃縮・抽出に要する時間及び費用について表 1 及び表 2 に示した。陰電荷膜法では、SARS-CoV-2 が 7.9×10^1 copies/L から 1.0×10^3 copies/L、PMMoV が 8.4×10^7 copies/L から 2.4×10^8 copies/L、QIAGEN法では、SARS-CoV-2 が 1.7×10^4 copies/L から 3.9×10^4 copies/L、PMMoV が 6.0×10^7 copies/L から 2.2×10^8 copies/L、Promega法は、SARS-CoV-2 が 6.5×10^5 copies/L から 1.4×10^6 copies/L、PMMoV が 6.6×10^9 copies/L から 8.7×10^9 copies/L であった。

また、1 検体あたりの濃縮・抽出に要する時間は、陰電荷膜法が 132 分、QIAGEN法が 150 分、Promega法

が 94 分であった。

2 下水からのウイルス遺伝子検出

SARS-CoV-2、IFV及びNVの遺伝子検出結果を表 3 に、EnVs、AdV、RtV、SaVの検出結果を表 4 に示した。SARS-CoV-2 は、コピー数に変動はあるものの 13 検体すべてから検出された。IFVはIFVAH3 が 2023/11/10、11/24、12/8 及び 2024/1/5 採取検体から、IFVAH1pdm09 が 2023/11/10、11/24、12/27、2024/1/5、1/26 及び 2/9 採取検体から、またIFVB(Victria)が 2023/12/27、2024/1/26、2/9、2/29 及び 3/15 採取検体から検出された。NVG I は 2023/9/1 及び 10/27 採取分を除く 11 検体で検出され、NVG II は 13 検体すべてで検出された。EnVsは 2023/11/10 採取分を除く 12 検体で検出された。検出された遺伝子について、シーケンスによる遺伝子解析を実施し解析ができた検体では、2023/9/1 採取分はエンテロウイルスB型(以下、EVB)、2023/10/6 及び 2024/1/5 採

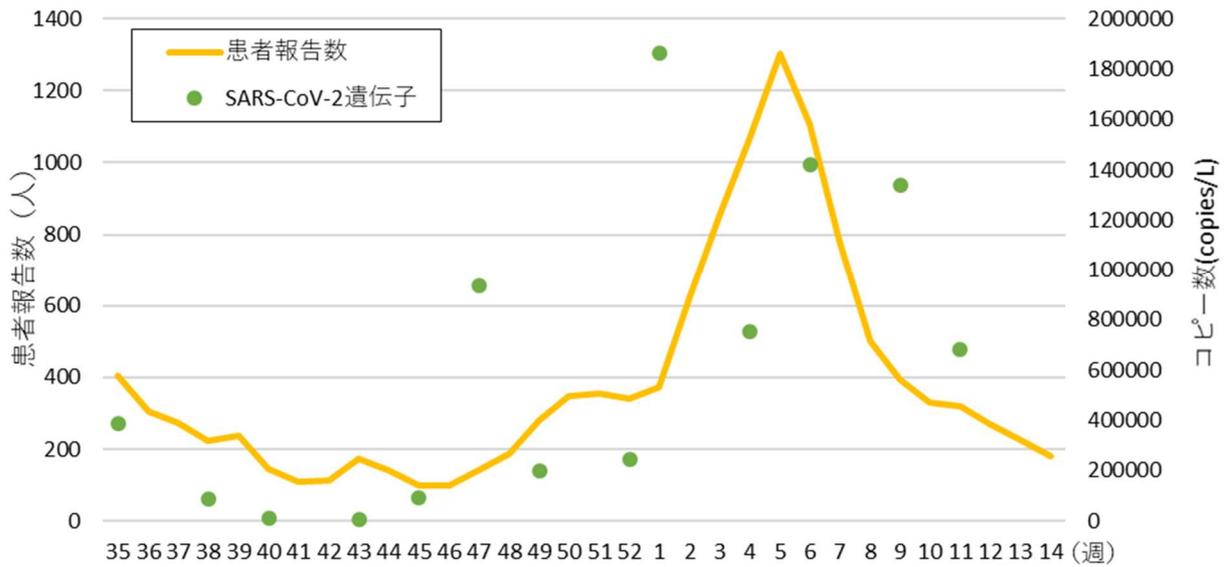


図2 SARS-CoV-2 感染症患者報告数と遺伝子コピー数の比較

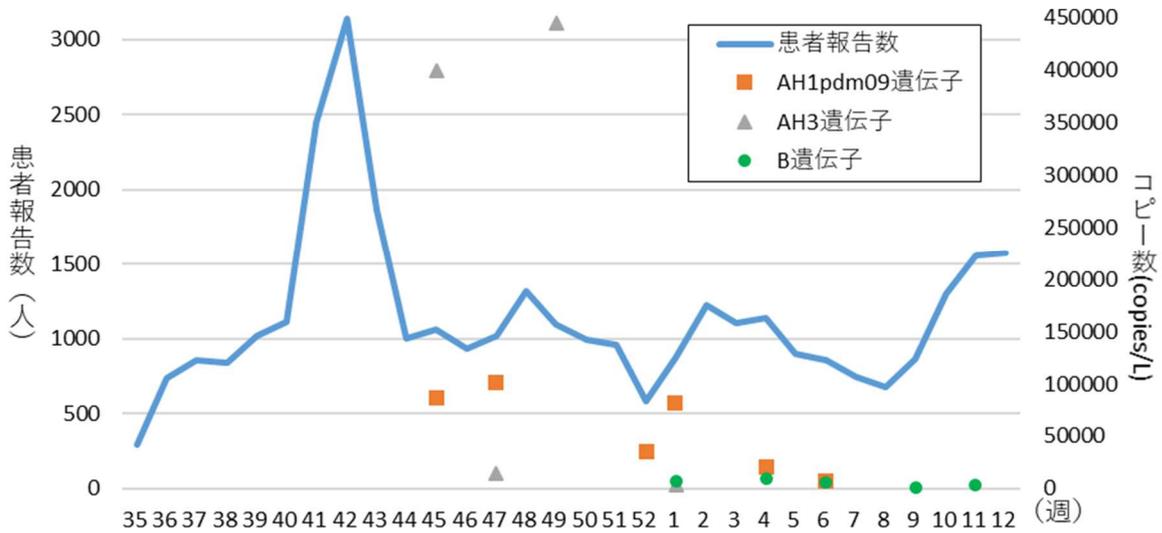


図3 インフルエンザ患者報告数とIFV 遺伝子コピー数の比較

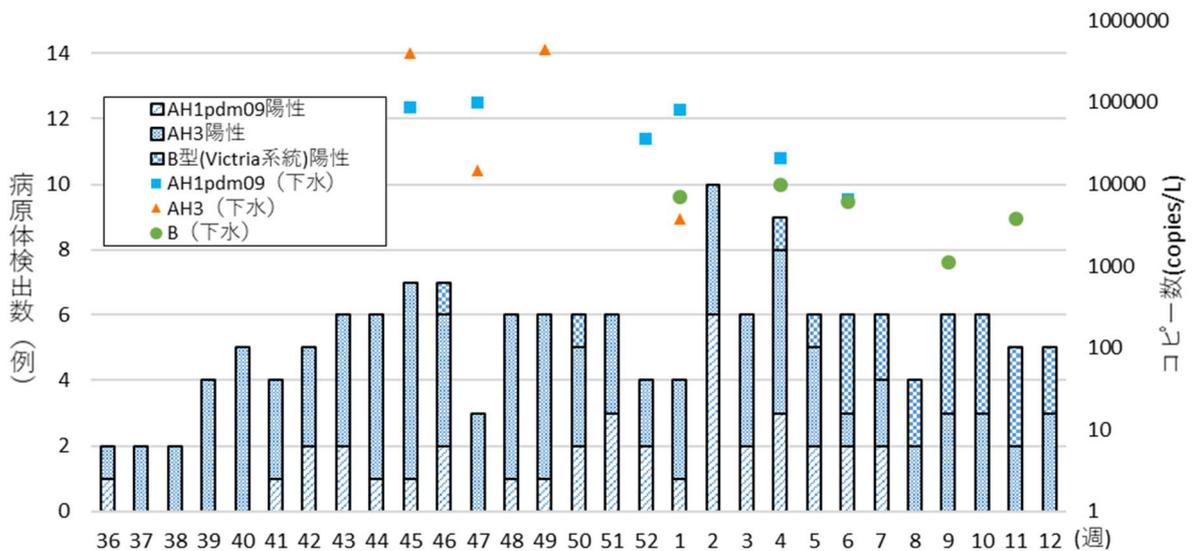


図4 下水からのIFV 遺伝子検出と病原体検出情報との比較

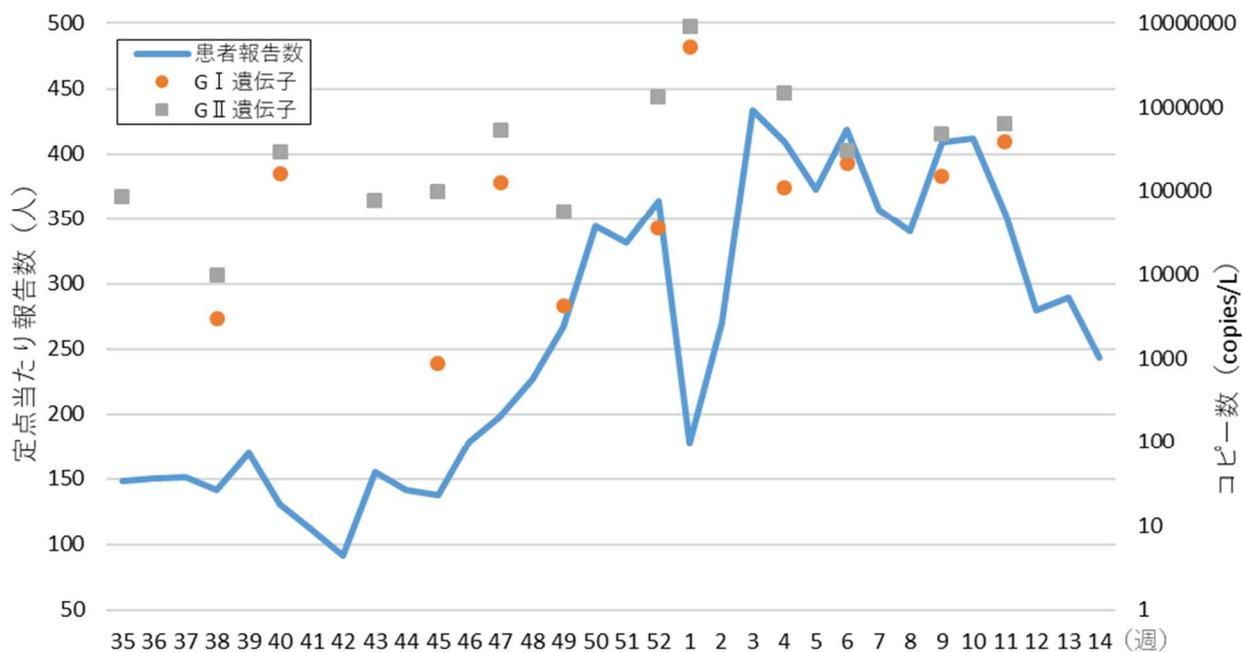


図5 感染性胃腸炎患者報告数と遺伝子コピー数の比較

取分コクサッキーウイルスB5(以下, CVB5)型であった。AdV及びRtVは13検体全てで陰性であった。SaVは13検体全てから検出された。

下水から検出されたSARS-CoV-2 遺伝子コピー数と患者報告数等との比較を図2に示した。検出された遺伝子コピー数は、患者報告数の増減と同様の傾向がみられた。同様にIFVについて検出されたコピー数と患者報告数等との比較を図3に、病原体検出情報との比較を図4に示した。遺伝子コピー数と患者報告数の増減に相関は見られなかったが、同時期の病原体検出情報で報告されたウイルス型と下水から検出されたウイルス型は一致していた。またNVについて感染性胃腸炎患者報告数と検出された遺伝子コピー数との比較を図5に示したが、患者報告数の増減と遺伝子コピー数に相関はみられなかった。

考察

1 遺伝子濃縮・抽出方法の検討

濃縮・抽出後のウイルス遺伝子量はPromega法が最も遺伝子量が多く、濃縮効率が良いと考えられた。陰電荷膜法は行程中ろ過フィルターでとらえたウイルス粒子を溶出液中で振盪することでウイルス粒子を回収するが、全量が回収できずフィルターに残存してしまうため、遺伝子量が少なくなることが考えられる。また、QIAGEN法は、検体遠心後の沈査を対象にウイルス遺伝子を抽出するため、上清中に浮遊しているウイルスは抽出対象とならない。一方、Promega法は、下水全てを対象に、2回のフィルターろ過工程と溶出行程により効率的に遺伝子を濃縮・抽出できたと考えら

れた。また、濃縮・抽出に要する時間はPromega法が最も短時間であった。これらの結果から、下水からのウイルス遺伝子の濃縮及び抽出法として、本調査研究ではPromega法を採用した。

2 下水からのウイルス遺伝子検出

SARS-CoV-2は、同感染症発生報告数の増減と比例して遺伝子量が増加していることから、何らかの相関はあると考えられるが、統計学的な検証にはより多くの検体とその検査結果を合わせて検討する必要がある。また、下水から検出されたIFVは、同時期の病原体検出情報のウイルス型と同様の傾向がみられたが遺伝子コピー数との相関はなかった。IFVが糞便中に排出されることを確認した報告¹¹⁾はあるが、その機序については不明な点が多い。IFV流行株の把握には有用であると考えられるが、患者数との相関についてはさらなる検討が必要である。

一方、NVは、NVG I、NVG IIともに調査期間中ほとんどの下水検体から検出されており、感染性胃腸炎の発生報告数との関連はないと考えられた。同様にSaVについてもすべての下水検体から検出されたことから、感染性胃腸炎との相関はみられないと考えられた。

EnVsについては、2023年10月及び2024年1月に検出されたCVB5は、2023年7月にヘルパンギーナ患者検体から検出されていた¹²⁾ことから、採取当時の流行状況を反映していたとも考えられるが、エンテロウイルスは発生動向調査の対象疾患以外の様々な疾患でヒトから排出されることからデータの解釈には注意が

必要であると考えられる。

今後も定期的に下水から遺伝子検出を実施し、発生動向調査事業における患者報告数との相関を確認するとともに、検査結果の有用な活用方法について検討することとしたい。

まとめ

- 1 愛媛県における下水サーベイランスの手法確立のため、病原ウイルス遺伝子の濃縮・抽出方法として、陰電荷膜法、QIAGEN法及びPromega法を検討し、SARS-CoV-2及びPMMoV遺伝子を対象とした濃縮効率や作業時間の観点からPromega法を採用することとした。
- 2 病原ウイルスの遺伝子検出を実施した結果、SARS-CoV-2、IFV、NV、EnVs、SaVが検出され、SARS-CoV-2では、検出された遺伝子コピー数は患者報告数の増減と同様の傾向がみられ、IFV、EnVsでは、検出されたウイルス型は、同時期の病原体検出情報と同様の傾向がみられた。

文献

- 1) Kitakawa K., *et al*: Environ Microbiol 89: e0185322,(2023)
- 2) 「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」総括報告書

<https://mhlw-grants.niph.go.jp/project/148380>

- 3) IASR Vol. 45 ,100-101(2024)
- 4) 下水中の新型コロナウイルス検出マニュアル ver 1.1
https://www.niid.go.jp/niid/images/vir2/polio/SC2_sewage_manual_1.pdf
- 5) 国立感染症研究所:病原体検出マニュアル,インフルエンザ(2023年8月版)
- 6) 国立感染症研究所:病原体検出マニュアル,感染性胃腸炎(ノロウイルス 2019年6月版)
- 7) 国立感染症研究所:病原体検出マニュアル,手足口病(2023年7月版)
- 8) 国立感染症研究所:病原体検出マニュアル,感染性胃腸炎(アデノウイルス下痢症 2022年5月版)
- 9) 国立感染症研究所:病原体検出マニュアル,感染性胃腸炎(ロタウイルス 2024年5月版)
- 10) 国立感染症研究所:病原体検出マニュアル,感染性胃腸炎(サポウイルス 2021年7月版)
- 11) Laëtitia M.,*et al*: Influenza Other Respir Viruses. 13(4):398-406(2019)
- 12) 愛媛県感染症情報 No.16 (2023)

Investigation of pathogenic viruses in influent waste water in sewage treatment facilities in Ehime Prefecture, Japan

Akira KAWASE, Chihiro NAKANISHI, Yasutaka YAMASHITA, Sayako YOSHIDA,
Yuka OTSUKA, Hiroshi TAKIYAMA, and Hiroto SHINOMIYA

In Japan, epidemiological methods are used to detect poliovirus and Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2(SARS-CoV-2) in sewage effluent in order to understand and monitor the prevalence of viral infections in the area. In order to conduct research in Ehime prefecture to understand the prevalence of viral infections using this method, we investigated methods for concentrating and extracting viral genes from sewage in terms of concentration efficiency and working time, and adopted a commercially available gene concentration and extraction kit for sewage (Promega). SARS-CoV-2, influenza viruses, and noroviruses were detected in the genes extracted using the kit, and some viruses showed similar trends to the status of each infectious disease epidemic in Ehime.