

愛媛県における下水処理施設の流入水を使用した病原ウイルスサーベイランス(2024年度)

河瀬曜 吉田紗弥子 山下育孝 松本純子 大野智也佳 四宮博人

Keywords : 下水サーベイランス, SARS-CoV-2, インフルエンザウイルス, ノロウイルス, 次世代シーケンサー(NGS)

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. 2023年度から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ており, 2024年度に採取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(以下, IFV), ノロウイルス(以下, NV)などが検出され, 各疾患の患者報告数との間に相関が確認された. また次世代シーケンサー(以下, NGS)を使用したメタゲノム解析による網羅的遺伝子解析の実施の可能性について検討した.

はじめに

下水中にはウイルス感染症の患者の糞便中に排出された病原ウイルスが含まれている.

わが国では, 2013年からポリオウイルスの監視を目的として下水サーベイランスが実施されている. 2020年からは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検証を実施した¹⁾ほか, 厚生労働省が実施する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²⁾.

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病因ウイルスの侵入, 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, 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られる.

当所では, 2023年度から, SARS-CoV-2をはじめ, IFV, エンテロウイルス, NV等感染性胃腸炎の原因となる病原ウイルス遺伝子を下水から検出する手法を確立する研究を進めており, これまでに遺伝子の濃縮及び抽出方法の検討を行うとともに, 病原性ウイルスの検出を実施してきた.

今回, 2024年度に実施した病原ウイルス遺伝子の

検出状況と, 感染症発生動向調査事業における各疾患の定点当たり患者報告数(以下, 報告数)との相関について解析を実施した. また, NGSを使用したメタゲノム解析による下水からの病原ウイルス遺伝子の検出について検討を行った.

材料と方法

1 材料

2024年6月から県内3か所(A地区, B地区, C地区)の下水浄化場で, 毎月1検体または2検体の頻度で採取した下水計37検体について, ウイルス遺伝子の検出を実施した.

また, メタゲノム解析は県内1か所の下水浄化場で2024年9月, 12月及び2025年3月に採取した下水を使用した.

2 方法

(1) 病原ウイルス遺伝子の検出及び, 届出数との相関の解析

遺伝子の濃縮及び抽出はWizard Enviro Total Nucleic Acid Kit(Promega社)を使用した.

SARS-CoV-2, IFV, NVについて遺伝子検査を実施した. SARS-CoV-2については, SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater(タカラバイオ)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, 国立健康危機管理

研究機構国立感染症研究所病原体検出マニュアル^{3),4)}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。また、SARS-CoV-2、IFV、NVは測定結果と下水流域を包括する地域の患者報告数との相関について解析を行った。

(2) NGSを使用したメタゲノム解析

遺伝子の濃縮及び抽出は(1)の方法により抽出した生成物をInvitrogen TURBO DNase(Thermo社)によりDNase処理を行った後、ライブラリ作成に用いた。ライブラリの調製はNEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina(NEW ENGLAND Biolabs社)及びNEBNext Multiplex Oligos for Illumina(NEW ENGLAND Biolabs社)を、メーカーのマニュアルに従

い実施した。NGSはMiSeq(Illumina社)を使用し、MiSeq Reagent Kit v3(150Cycles)でペアエンドリードにより解析を実施した。NGSで作成されたデータはオンラインプラットフォームであるCZID(<https://czid.org/>)を使用して解析を行った。

結果

1 病原ウイルス遺伝子の検出及び、届出数との相関の解析

(1) SARS-CoV-2

採取場所ごとのSARS-CoV-2の測定結果を表1に示した。いずれの下水からもSARS-CoV-2遺伝子が検出されており、A地区下水で $1.8 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^6$ copies/L、B地区下水で $6.8 \times 10^3 \sim 1.6 \times 10^6$ copies/L、C地区下水で $3.2 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^6$ copies/Lであった。

表1 下水の病原ウイルス遺伝子検出状況

		6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	
SARS-CoV-2	A地区	未採取	3.0×10^5	1.2×10^6	1.6×10^5	1.1×10^5	6.4×10^4	1.8×10^4	9.2×10^5	1.3×10^5	4.4×10^5	
	B地区	上期	未採取	8.7×10^5	9.8×10^5	1.7×10^5	2.7×10^5	2.0×10^4	5.1×10^4	2.1×10^5	2.3×10^5	8.7×10^4
		下期	2.6×10^5	2.6×10^5	3.9×10^5	2.9×10^5	1.3×10^4	7.1×10^4	6.8×10^5	1.8×10^5	1.1×10^5	6.0×10^5
	C地区	未採取	1.1×10^6	3.9×10^5	8.2×10^4	6.8×10^4	1.7×10^5	3.2×10^4	2.4×10^5	2.6×10^5	7.3×10^4	
	GI	A地区	未採取	1.4×10^3	1.0×10^4	1.6×10^6	7.1×10^3	5.1×10^3	1.7×10^6	2.0×10^6	1.1×10^6	5.1×10^5
		B地区	上期	未採取	8.6×10^4	5.7×10^5	6.3×10^3	1.6×10^7	1.5×10^4	7.4×10^5	1.9×10^6	2.6×10^6
下期			1.7×10^4	N.D.	4.0×10^3	5.3×10^4	2.1×10^4	5.3×10^4	1.2×10^6	3.4×10^7	1.6×10^6	5.9×10^5
NV	C地区	未採取	6.0×10^3	3.1×10^3	N.D.	1.8×10^3	8.8×10^3	N.D.	2.7×10^6	4.6×10^4	3.6×10^4	
GII	A地区	未採取	2.9×10^4	1.1×10^3	N.D.	N.D.	1.5×10^4	1.7×10^5	2.9×10^6	5.3×10^6	3.3×10^7	
	B地区	上期	未採取	2.2×10^6	2.3×10^6	9.0×10^4	1.1×10^6	1.0×10^5	4.2×10^6	1.2×10^7	1.6×10^7	1.7×10^8
		下期	3.6×10^6	8.7×10^6	1.0×10^5	2.1×10^5	3.4×10^6	7.8×10^5	5.8×10^5	1.3×10^8	7.6×10^8	3.2×10^7
	C地区	未採取	1.7×10^5	1.3×10^4	4.1×10^3	2.4×10^5	2.4×10^5	1.7×10^4	1.4×10^5	1.5×10^7	4.9×10^7	
AH1 pdm09	A地区	未採取	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.9×10^2	1.7×10^3	2.9×10^3	4.0×10^2	1.0×10^3	
	B地区	上期	未採取	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.0×10^3	7.0×10^3	N.D.	N.D.
		下期	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.6×10^1	1.7×10^4	1.4×10^2	N.D.	N.D.
C地区	未採取	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	9.7×10^3	N.D.	N.D.		
IFV	AH3	A地区	未採取	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.8×10^2	
		B地区	上期	未採取	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.7×10^3	N.D.
			下期	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.0×10^3	N.D.	1.0×10^3
	C地区	未採取	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
	B Victria	A地区	未採取	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7.7×10^3	N.D.
		B地区	上期	未採取	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.8×10^3	N.D.
下期			N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.3×10^3	8.4×10^2	8.2×10^2	N.D.
C地区	未採取	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		

N.D.:未検出

(copies/L)

この測定結果と採取した地域の新型コロナウイルス感染症の週毎の報告数の推移を図1に示した。2024年6月から2025年3月のSARS-CoV-2の測定結果と2024年第26週～2025年第13週(以下、同期間)の新型コロナウイルス感染症の報告数との相関係数は、それぞれA地区下水で0.752, B地区下水で0.354, C地区下水で0.158であった。

(2) NV

採取場所ごとのNVの測定結果を表1に、測定結果と採取した地域の感染性胃腸炎の報告数の推移を図2に示した。2024年6月から2025年3月のNVGI及びNVGIIの測定結果と同期間の感染性胃腸炎の報告数との相関係数は、それぞれA地区下水でNVGIが0.179, NVGIIが0.878, B地区下水でNVGIが-0.078, NVGIIが0.556, C地区下水でNVGIが-0.199, NVGII

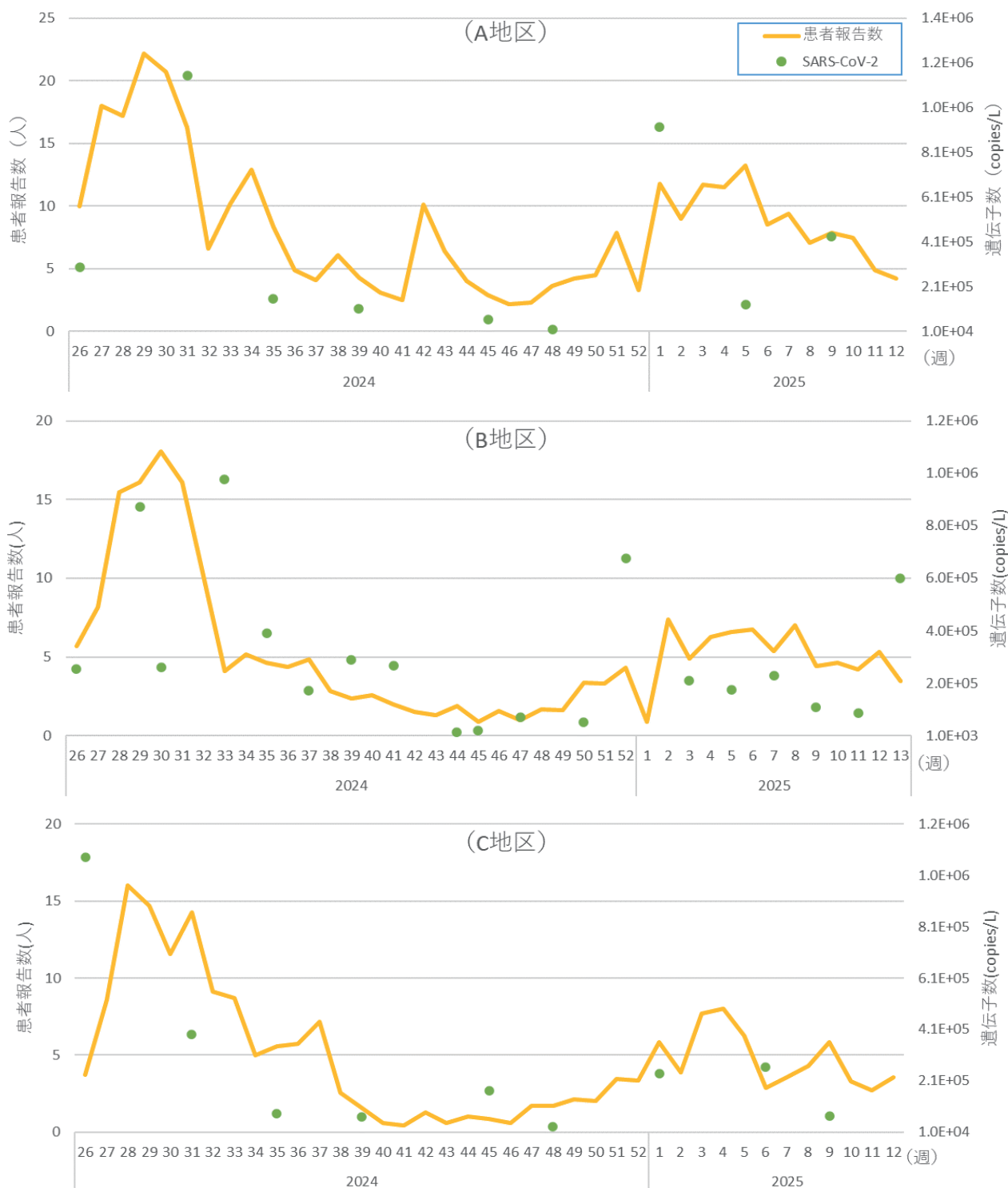


図1 各地区の下水のSARS-CoV-2 遺伝子検出数と新型コロナウイルス感染症の定点当たり報告数

が0.979であった。

(3) IFV

採取場所ごとのIFVの測定結果を表1に、測定結果と採取した地域のインフルエンザの報告数の推移を図3に示した。2024年6月から2025年3月のIFVAH1pdm09型の測定結果と同期間の感染性胃腸炎の報告数との相関係数は、それぞれA地区下水で0.88, B地区下水で0.92, C地区下水は調査期間中検出されたのは1検体のため相関係数は算出できなかった。IFVAH3型は、B地区下水で0.77, A地区下水は検出期間中の検出が1検体のため、またC地区下水は調査期間中の検出がなかったため、相関係数は

算出できなかった。IFVB型はB地区下水で0.29, A地区下水及びC地区下水は相関係数の算出はできなかった。

2 NGSを使用したメタゲノム解析

解析結果を図4に示した。いずれの検体も分類できた総リード数(37万~43万)に対し99%以上が細菌に関連する遺伝子であり、ウイルスに分類される遺伝子は0.021%から0.034%と1%にも満たなかった。次にウイルスに分類されたもの上位10種を表4に示した。病原ウイルスの遺伝子に分類されたものでは、2024年12月採取でSARS-CoV-2(リード数84), 2025年3月採取分でNV(リード数6)のほか、サポウイルス, アスト

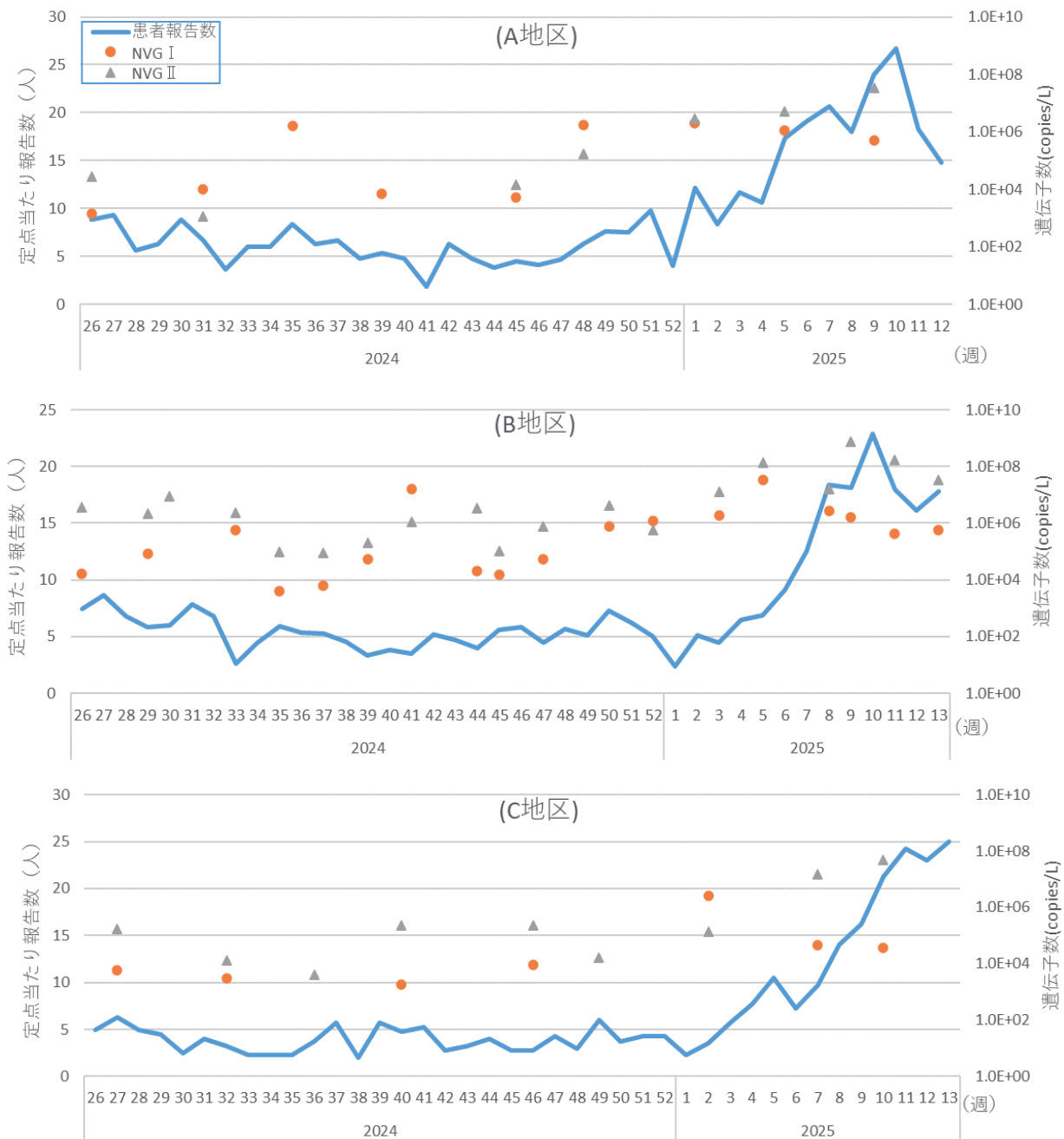


図2 各地区の下水のNV遺伝子検出数と感染性胃腸炎の定点当たり報告数

ロウイルス、ロタウイルスが検出されたが、いずれの遺伝子もリード数はわずかであった。

考察

1 病原ウイルス遺伝子の検出及び届出数との相関の解析

(1) SARS-CoV-2

A地区を包括する地域の新型コロナウイルス感染症の患者報告数とA地区の下水の遺伝子検出数には強い正の相関が、またB地区を包括する地域の同患者報告数とB地区の下水の遺伝子検出数には弱い正の相関が認められたが、C地区下水では相関は認められなかった。A地区下水及びB地区下水は相関が認められ、患者報告数の増減が遺伝子検出数に反映されて

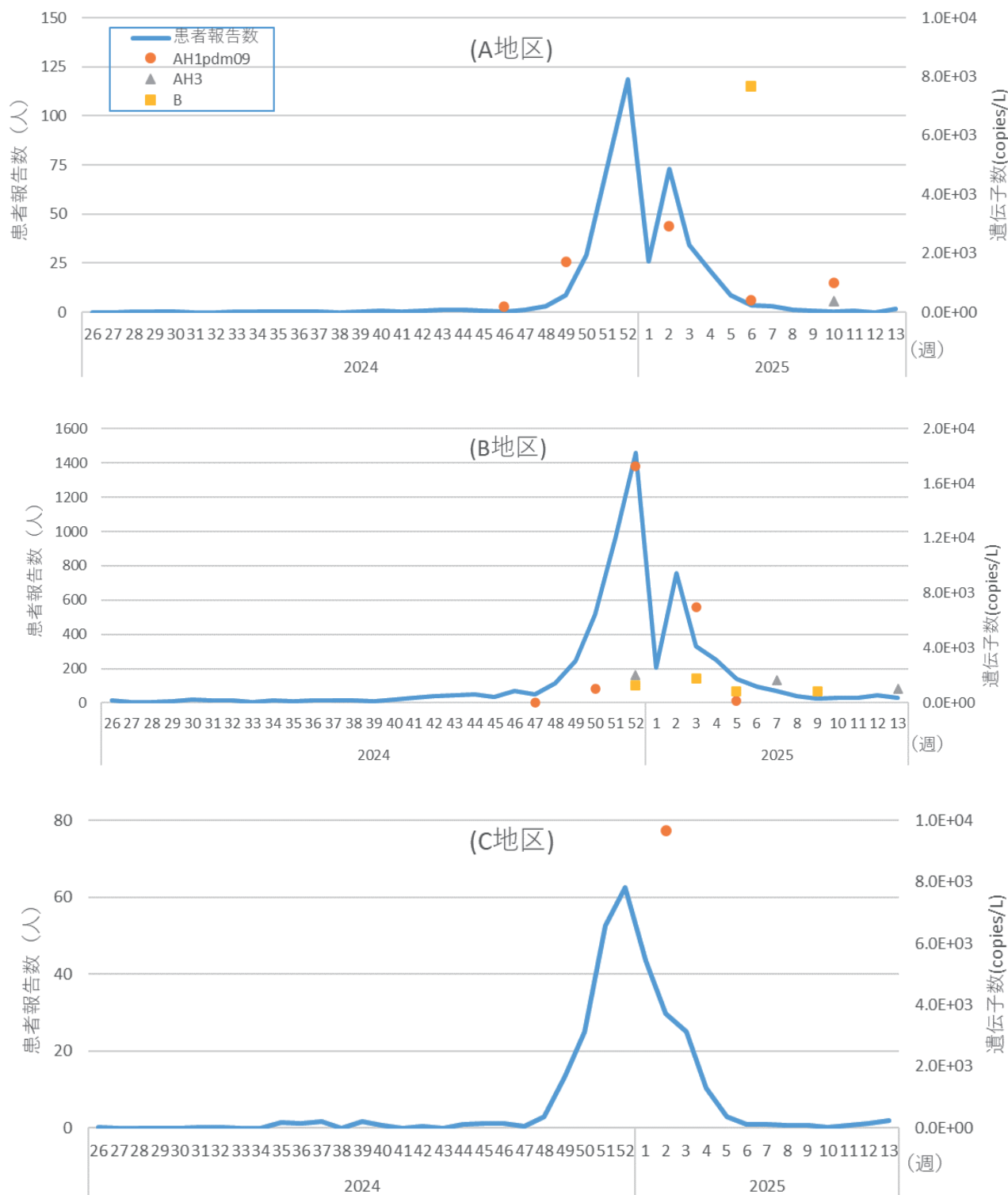


図3 各地区の下水のIFV遺伝子検出数と季節性インフルエンザの定点当たり報告数

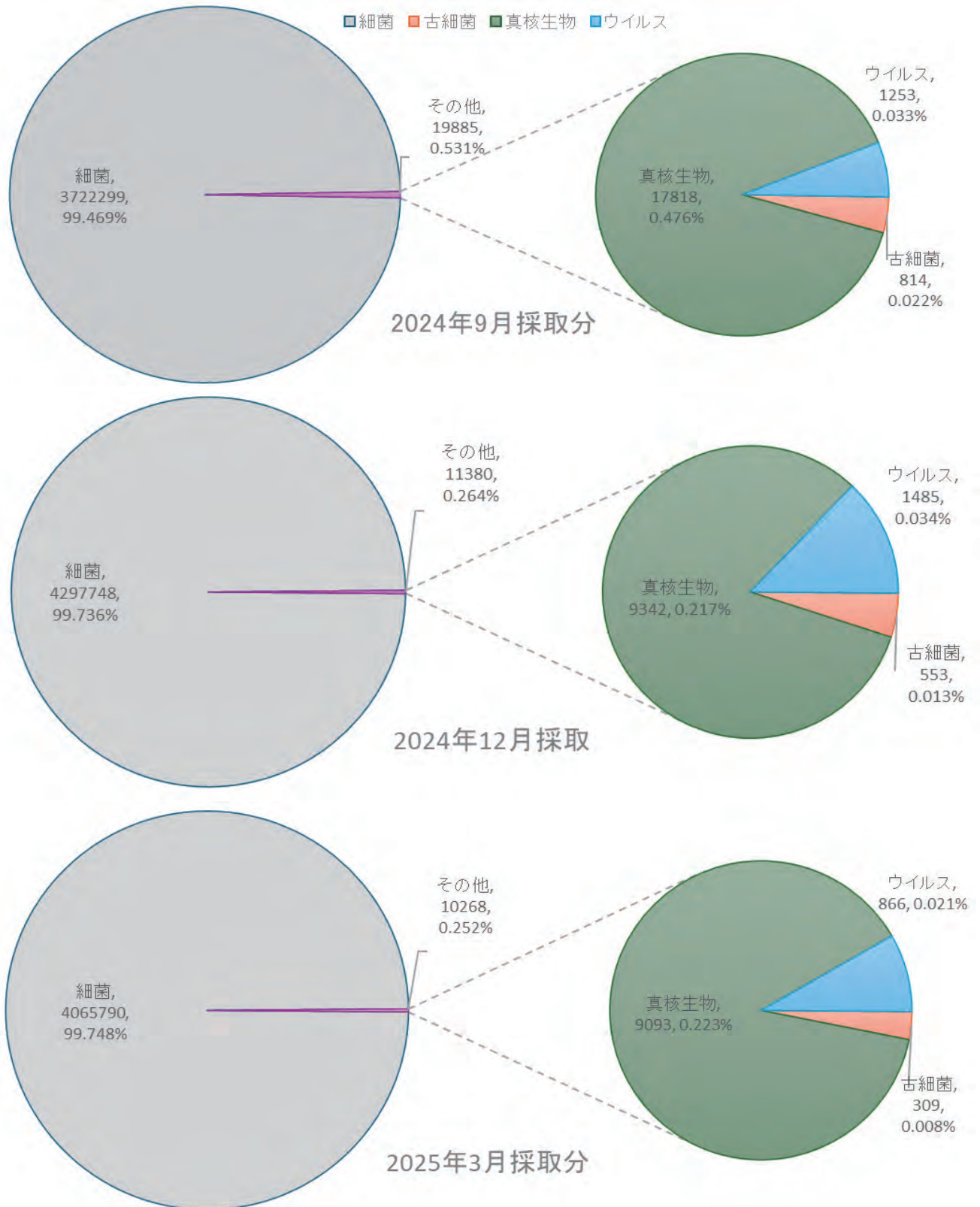


図4 NGS 解析結果(病原体別割合)

いたことから、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発症者の発生規模や増減の推測が可能と考えられた。C地区下水は流域の利用人口が他の2地区と比較すると少ないことから、この地区を包

括する地域の患者報告数とC地区流域の住民の感染状況に乖離があり、これが遺伝子検出結果に影響を与えた可能性が考えられた。

(2) NV

表 4 NGS 解析結果(ウイルス上位 10 種)

2024 年 9 月採取分	
ウイルス種別	リード数
uncultured human fecal virus	375
Caudoviricetes sp.	312
Partitiviridae sp.	147
Sobemovirus sp.	25
Hubei picorna-like virus 63	21
Hubei picorna-like virus 62	19
Mitoviridae sp.	18
Mamastrovirus 1	14
Cytomegalovirus macacinebeta3	7
Tobacco mild green mosaic virus	6
2024 年 12 月採取分	
ウイルス種別	リード数
uncultured human fecal virus	613
Caudoviricetes sp.	290
Partitiviridae sp.	180
SARS-CoV-2	84
Sobemovirus sp.	50
Mitoviridae sp.	19
Picobirnavirus sp.	6
Porcine picobirnavirus	5
Cytomegalovirus macacinebeta3	5
Alphacarmovirus dianthi	4
2025 年 3 月採取分	
ウイルス種別	リード数
uncultured human fecal virus	283
Caudoviricetes sp.	233
Partitiviridae sp.	66
Sobemovirus sp.	56
Picobirnavirus sp.	8
Noro virus	6
Mitoviridae sp.	6
Tobacco mild green mosaic virus	4
Siphoviridae sp. ctBLh2	4
Laverivirus UC1	4

NVGIIの遺伝子検出数と患者報告数の間に、A地区下水及びC地区下水で強い正の相関が、B地区下水で中程度の正の相関が認められた。調査期間中に実施した食中毒事例及び発生動向調査における感染性胃腸炎の検査からNVGIIが県内に流行していたと考えられ、本調査の結果とも合致していたことから、NVGIIの遺伝子検出数から感染性胃腸炎患者の発生規模や増減の推測は可能と考えられた。NVGIはすべての地区下水で相関は認められなかったが、発生動向調査における感染性胃腸炎の検査でNVGIは検

出されていないことから、県内での大規模な流行はしていなかったと考えられる。このことから、報告数と相関がなかったことにも整合性があったと考えられた。

(3) IFV

IFVAH1pdm09 で相関がみられ、A地区下水及びB地区下水で強い相関が認められた。調査期間中の発生動向調査におけるインフルエンザの検査ではIFVAH1pdm09 が多く検出されていることから、同期間中のインフルエンザの流行はIFVAH1pdm09 の流行によるところが大きいと考えられ、本調査の結果とも合致していたことから、インフルエンザ患者の発生規模や増減の推測は可能と考えられた。ただし、インフルエンザの流行がIFVAH3 やIFVBによるものであった場合に、下水サーベイランスに反映されるかは不明であるため、結果の取扱いは慎重に行う必要がある。

2 NGSを使用したメタゲノム解析

実施したすべての検体でウイルスに分類される遺伝子の割合が1%にも満たないわずかなリード数しか検出できなかった。下水中には多くの細菌由来 DNA とともに細菌由来の RNA も存在することから、DNase 処理を行ったとしても、多量に存在する細菌由来RNAの検出割合が、下水中に存在する病原ウイルス由来RNAに比べ圧倒的に多いことが示唆され、病原ウイルス遺伝子の検出感度が低いことが課題となることがわかった。このような中で病原ウイルスの遺伝子を検出するためには、病原ウイルス遺伝子を選択的に増幅する必要がある。メタゲノム解析においてターゲットエンリッチメント方式を利用して遺伝子情報が明らかな既知のウイルス遺伝子をターゲットとして選択的に精製、増幅する方法⁵⁾があるが、これには高額な試薬が必要となるため下水サーベイランスの継続的な実施を考慮すると、実施費用が課題となる。また、対象とするウイルス以外のウイルス遺伝子はライブラリの調製過程で排除されるため、対象を外れるウイルスや遺伝子情報が未確認なウイルスの検出には不適と考えられた。

まとめ

1 病原ウイルスの遺伝子検出を実施した結果、SARS-CoV-2、IFVAH3 及び NVGII は検出された遺伝子コピー数と患者報告数の増減に相関が確認されたことから下水サーベイランスによる患者の増減の推定が可能であると考えられた。

2 NGS を使用したメタゲノム解析によるウイルス遺伝子の検出について検討を行ったが、下水中のウイルス由来遺伝子の占める割合が細菌由来遺伝子よりも極

めて少なく,これを補完する方法もあるが高額な試薬を必要とするため,継続的な実施には課題があることがわかった.

文献

- 1) 「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>
- 2) 国立健康危機管理研究機構:感染症情報サイト
<https://id-info.jihs.go.jp/surveillance/nesvpd/>
- 3) 国立健康危機管理研究機構国立感染症研究所:病原体検出マニュアル,インフルエンザ(2023年8月版)
- 4) 国立健康危機管理研究機構国立感染症研究所: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)
- 5) Mejías-Molina *et al*: Human Genomics Volume 18, article number 10, (2024)
<https://doi.org/10.1186/s40246-024-00580-1>

Pathogenic Virus Surveillance Using Influent Wastewater from Wastewater Treatment Facilities in Ehime Prefecture, Japan,2024

Akira KAWASE, Sayako YOSHIDA, Yasutaka YAMASHITA,
Junko MATSUMOTO, Chiyaka OHNO, and Hiroto SHINOMIYA

In Japan, wastewater surveillance methods are used to detect poliovirus and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) from influent sewage in order to understand and monitor the prevalence of viral infections in the drainage basin.

Since fiscal year 2023, we have been conducting research in Ehime Prefecture aimed at understanding the prevalence of viral infectious diseases using this wastewater surveillance method. From wastewater samples collected in fiscal year 2024, pathogenic virus genes detected included SARS-CoV-2, influenza virus, and norovirus, among others, and correlations were confirmed between the detection of these pathogens and the number of reported cases of each disease. Additionally, we examined the feasibility of conducting comprehensive genetic analysis using metagenomic analysis with next-generation sequencing (NGS).