

下水疫学による新型コロナウイルス感染症の流行把握と変異株の早期検知

Understanding the Prevalence of COVID-19 and Early Detection of Variants via Wastewater-based Epidemiology

○北島正章

北海道大学大学院工学研究院環境工学部門

論文要旨

本論文では、下水中の新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）を測定することで集団レベルの感染流行状況を把握する下水疫学について、その社会実装の早期実現に向けた技術開発および実証調査事例を紹介する。我々は、塩野義製薬と共同で下水中 SARS-CoV-2 RNA の高感度検出技術を開発した。この技術を適用することで、下水疫学による都市内感染者数の動向把握および変異株の早期検知の可能性を実証し、東京オリンピック・パラリンピックにおける感染対策の一環として実施された選手村内での下水調査により感染状況の把握に貢献した。

This paper describes technical development and implementation of wastewater-based epidemiology (WBE) for COVID-19. We have developed a highly sensitive method for SARS-CoV-2 RNA detection in wastewater, in collaboration with Shionogi & Co. Ltd. By using this method, we have demonstrated the possibilities of tracking COVID-19 infection dynamics and early detection of SARS-CoV-2 variants via WBE. In addition, we implemented WBE in the Tokyo 2020 Olympic and Paralympic Village as a tool to understand COVID-19 incidence in the village.

キーワード：新型コロナウイルス, 下水疫学, 変異株

1. はじめに

2019年12月に中国・武漢に端を発した新型コロナウイルス感染症（COVID-19, coronavirus disease 2019）の世界的感染流行は、現在も国内外においてヒトの健康や生命のみならず社会経済活動にも甚大な損害を与え続けており、この2年足らずの間に全世界の人々の生活を激変させてきている。ワクチンの接種が進むことによる感染収束が期待されるが、複数の変異株の相次ぐ出現も相まって現在も全世界で感染拡大が続いており、予断を許さない状況にある。

COVID-19の病因である新型コロナウイルス（SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2）の主な伝播経路はヒト-ヒト間での飛沫感染や接触感染であり、気道や肺などの呼吸器が主な感染部位である。ところが、SARS-CoV-2は呼吸器のみならず腸管でも増殖し、不顕性感染者を含むCOVID-19患者の糞便中にウイルスが排出される。このため、下水中には複数の感染者から排出された唾液由来（歯磨きやうがいなどによる）に加えて糞便由来のSARS-CoV-2が集積すると考えられている。

COVID-19の現行の臨床検査には、PCR検査能力拡充の限界、無症状感染者の把握困難、陽性者に対する差別や偏見、感染から報告までに時間を要すること（報告遅れ）など、数多くの課題がある。一方で、下水中に含まれるSARS-CoV-2を分析する「下水疫学調査」は、下水中にSARS-CoV-2が集積することを利用して一度の検査で集団レベルでの感染流行状況の把握が可能であり、臨床検査の複数の課題を同時に克服する画期的な早期検知・大量検査法となり得る¹⁾。このため、国内外でCOVID-19の下水疫学に関する調査研究が精力的に進められている。

本論文では、下水疫学の社会実装の早期実現に向けた技術開発および実証事例について、著者らの最新の研究成果を紹介する。

2. 北海道大学と塩野義製薬の共同研究による下水中 SARS-CoV-2 の検出技術の高度化

北海道大学と塩野義製薬株式会社は、2020年10月から下水疫学調査の事業化のための共同研究を実施しており、この産学協働により技術開発が大きく加速している。この共同研究では、これまで主に下水中の SARS-CoV-2 RNA 検出技術の高度化とその技術を用いた実証調査を実施してきている。具体的には、下水中 SARS-CoV-2 RNA の高感度検出技術の開発、自動解析体制の構築、変異株の検出、大阪府におけるモニタリング調査などに取り組んでいる。国内で下水疫学を社会実装するにあたっては下水からの SARS-CoV-2 RNA の検出感度の向上が大きな課題となっていたが、本共同研究により従来の手法よりも100倍程度感度の高い検出手法（仮称：北大・塩野義法）の開発に成功し、国内でも下水中 SARS-CoV-2 の定量的なデータが取得できるようになった。塩野義製薬は、2021年6月14日から上記の北大・塩野義法を用いた下水疫学調査サービスの提供を開始しており、事業化が実現している²⁾。また、COVID-19 流行下における下水の SARS-CoV-2 リスク管理を目的とした取り組みの一つとして、細胞培養（IMPRSS2 発現 Vero E6 細胞）に基づく下水中の SARS-CoV-2 の感染性評価法を確立した³⁾。この手法は、下水中における感染性 SARS-CoV-2 の存在実態調査だけではなく、オゾン処理を含む各種水処理による SARS-CoV-2 の不活化効果や環境中・水中における SARS-CoV-2 の生残性の定量的評価にも適用可能である。

3. 札幌市における COVID-19 下水疫学の実証調査

著者らの研究グループでは、2020年度から札幌市の複数の下水処理場において下水試料を採取し、これまで1年半程度にわたり SARS-CoV-2 の検出調査を続けている。2021年2月中旬からは、下水中の SARS-CoV-2 RNA の濃度と感染者数等との関連性について解析・評価を行い将来的な情報活用方策の検討に繋げることを主な目的とした、札幌市からの受託研究を実施している。札幌市における一連の実証調査研究の成果の一例として、2020年5月から2021年9月にかけて札幌市内二箇所の水再生プラザ（新川、豊平川）において採取した流入下水中の SARS-CoV-2 RNA 濃度（上述の北大・塩野義法を使用して測定）と札幌市における日毎の新規報告感染者数の経時変化をまとめた結果を図1に示す。本調査では市内10処理場のうち2処理場のみを対象としているため、市内における下水中

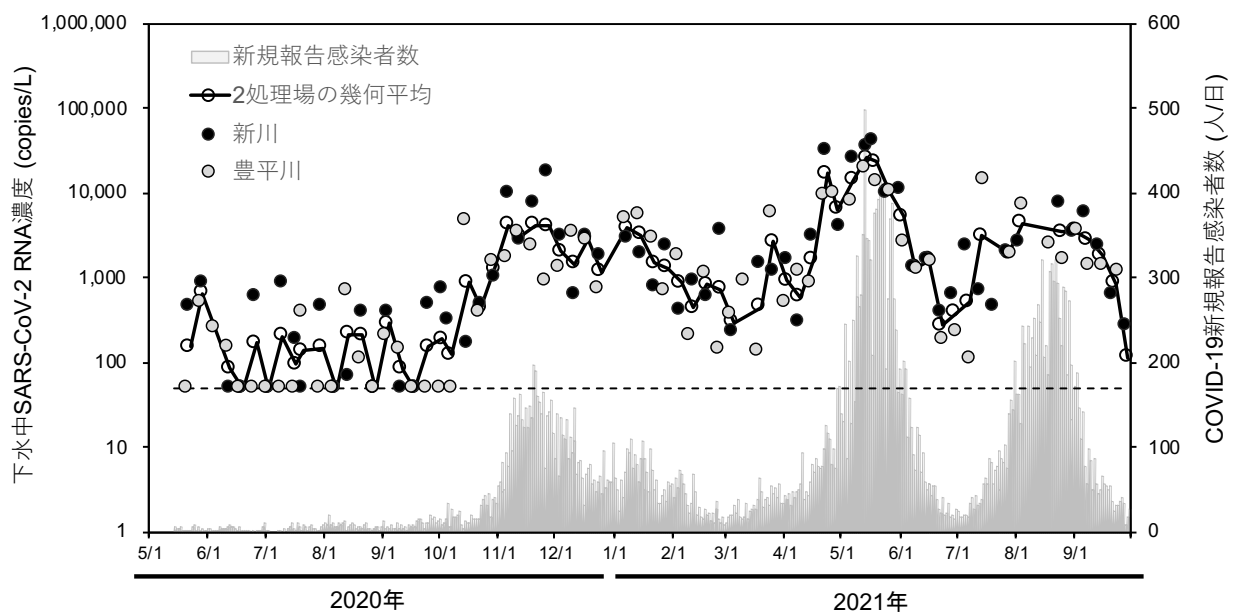


図1. 札幌市における下水中 SARS-CoV-2 RNA 濃度と市内の新規報告感染者・患者数の経時変化

ウイルス量の代表値として週ごとの処理場間のウイルス濃度の幾何平均値を算出し、図中に折れ線を表示している。この幾何平均値と市内の新規報告感染者数の増減のパターンは概ね合致しており、これは下水中 SARS-CoV-2 RNA 濃度を経時的に測定することで処理区域内における感染流行の動向を把握することができる可能性を示唆する結果である。また、2021 年 2 月後半から 3 月前半の感染者数が少ない時期においても多くの試料から SARS-CoV-2 RNA が検出されており、北大・塩野義法の検出感度の高さを報告感染者・患者数の推移とともに実測データにより実証するものであると言える。

著者らは、札幌市を含む全国の主要 5 都市において昨年度から下水中 SARS-CoV-2 RNA の長期定量調査を実施しており、調査対象のいずれの都市においても上述の札幌市と概ね同様の結果が得られている。

4. 下水疫学による変異株の早期検知

下水から検出されたウイルス遺伝子を解析することで、変異株を検出することも可能である。著者らの研究グループでは、塩野義製薬および東京大学医科学研究所の井元清哉教授・山口貴世志講師らのグループと共同で、ゲノム解析に基づく下水からの SARS-CoV-2 変異株検出法を確立し、都市下水からの検出調査を実施している。具体的には、SARS-CoV-2 ゲノムのうちスパイクタンパク質をコードする領域の一部を PCR で増幅した後、その PCR 産物の塩基配列を次世代シーケンシング技術により解読することでウイルス遺伝子にコードされているアミノ酸変異を検出し株を分類している。その結果の一例として、2020 年 11 月から 2021 年 8 月に国内某都市の下水処理場において採取した流入下水からの変異株の検出動向を表 1 に示す。注目すべきは、 α 株および δ 株がそれぞれ 2020 年 12 月 4 日および 2021 年 5 月 19 日に採取した下水試料から検出されたことである。この都市において臨床検体からこれらの株が初めて確認されたのはそれぞれ 2021 年 3 月および 6 月になってからであり、この結果は下水中の SARS-CoV-2 のゲノム解析を定期的実施することで特定の地域における変異株の侵入・発生を早期に検知できる可能性を示すものである。また、下水中 SARS-CoV-2 のゲノム解析を実施した時期は国内における第 3 波、第 4 波および第 5 波と言われる感染流行期を含むが、これらの時期に下水中に優占していた SARS-CoV-2 株はそれぞれ従来型等、 α 株および δ 株であり、臨床検体からの検出動向と概ね合致するものである。すなわち、下水疫学に基づき地域で流行している変異株の変遷等に関する遺伝子レベルの疫学（分子疫学）情報も把握することが可能であることも同時に実証する結果であると言える。

表 1. 都市下水からの変異株の検出動向* ** ***

処理場・施設	2020			2021									
	11/19	12/4	1/7	5/14	5/17	5/19	5/21	5/28	5/31	7/28	7/30	8/2	
A 処理場				従来型等	α (10.6%) 従来型等			α (99.8%)			δ (99.8%)	α (76.4%)	α (37.5%) 従来型等 δ (57.2%)
B 処理場 第一施設						α (6.1%) δ (6.6%) 従来型等			従来型等	δ (89.7%) 従来型等	従来型等	δ (24.6%) 従来型等	
第二施設	従来型等		α (12.4%) 従来型等	α (92.8%) 従来型等		α (12.0%) 従来型等	α (100.0%)			α (98.7%)	δ (100.0%)	γ (39.6%) 従来型等	
C 処理場 第一施設		α (5.9%) 従来型等		α (9.1%) 従来型等	α (98.1%)					α (51.5%) δ (30.4%) γ (5.5%)	δ (100.0%)	δ (97.6%)	
第二施設						α (6.0%) 従来型等				α (24.8%) δ (61.8%) 従来型等	δ (100.0%)	α (6.0%) δ (92.2%)	

*表中の割合は、全 SARS-CoV-2 リード中の当該変異株の割合
* α : アルファ株、 γ : ガンマ株、 δ : デルタ株
***空欄は未解析

5. 東京オリンピック・パラリンピック選手村における下水調査の実施

著者も参画している有志研究グループ MARCO (Mass gathering risk control and communication, 代表：井元清哉教授) は、東京大学大学院工学系研究科の片山浩之教授の研究グループや塩野義製薬と共同で東京オリンピック・パラリンピックにおける COVID-19 対策の一環として選手村における下水調査を実施した⁴⁾。調査期間は、オリンピックについては7月14日から8月11日の29日間、パラリンピックについては8月17日から9月8日の23日間であった。選手村内3地点のマンホールから、選手村の居住棟全てをカバーする7分割のエリアそれぞれから下水を毎日サンプリングした。サンプリング方法としてはパッシブサンプリングおよびグラブサンプリングの2種類の方法を採用し、それぞれ調査期間内に計361サンプルおよび計329サンプル(合計690サンプル)を取得した。下水サンプル中の SARS-CoV-2 RNA の分析には、上述の北大・塩野義法を使用し、内在性コントロール(トウガラシ微斑ウイルス RNA) の定量により精度管理を実施した。原則として、各サンプリング日の翌日までに SARS-CoV-2 RNA 濃度データを東京オリンピック・パラリンピック競技大会組織委員会に報告した。

オリンピックおよびパラリンピック期間を通じて、陽性者の報告がないエリアの下水からも SARS-CoV-2 RNA が検出される場合が多くあった。その理由として、今回の下水調査に使用した「北大・塩野義法」の検出感度が高く、一般的に感染性がないとされている既感染者やウイルス量の少ない不顕性感染者から排出されたウイルス RNA も検出していたことなどが考えられる。下水(パッシブサンプリング)から3日間連続して SARS-CoV-2 RNA が検出されなかった場合には、そのエリアでは概ね人からも陽性は確認されなかった。また、ゲノム解析により SARS-CoV-2 配列を確認し、変異株が検出された。

6. まとめ

COVID-19 の世界的感染流行を受け、下水疫学は大きな社会的注目を集めている。下水疫学情報は、今後の COVID-19 の感染拡大防止と社会経済活動再開に向けた適切な政策決定のための判断材料の一つとして、また今後の感染流行の実態把握のためのツールとしての活用が期待されている。SARS-CoV-2 との闘いが長期化し感染拡大防止対策の新たなアプローチが求められている中で、本論文で紹介したように、北大・塩野義法の開発をはじめとした検出技術の高度化により実測データが蓄積され COVID-19 に対する下水疫学の概念実証が進んでいる。塩野義製薬などの民間企業による下水中 SARS-CoV-2 RNA 分析サービスも開始され、社会実装が実現しつつある。下水疫学は、COVID-19 に加えて将来起こり得る次なるパンデミックの際にも有効である可能性が高く、感染症に対して強靱な未来社会を構築する上で新たに整備すべき重要な社会インフラの一つである。今後、本論文で示したような下水疫学調査の有効性に関する科学的エビデンスおよび都市下水や施設下水を対象とした実証事例が積み重ねられて全国規模での実装が実現し、社会システムの中で下水疫学情報が有効に活用されることを期待したい。

参考文献

- 1) Kitajima, M.; Ahmed, W.; Bibby, K.; Carducci, A.; Gerba, C. P.; Hamilton, K. A.; Haramoto, E.; Rose, J. B. SARS-CoV-2 in Wastewater: State of the Knowledge and Research Needs. *Sci. Total Environ.* 2020.
- 2) 塩野義製薬株式会社. 下水疫学調査サービス. (<https://www.shionogi.com/jp/ja/innovation/wbe.html>)
- 3) 安藤良徳, 北島正章. COVID-19 流行下における下水のリスク管理を目的とした SARS-CoV-2 の感染性評価法の確立. *土木学会論文集*. (印刷中)
- 4) 東京オリンピック・パラリンピック競技大会組織委員会 専門家ラウンドテーブル (2021年9月28日開催) 資料「東京2020大会オリンピック・パラリンピック選手村における新型コロナウイルス下水調査」