

下水中の新型コロナウイルス遺伝子の検索

大沼正行 北爪美帆

Search for novel coronavirus genes in sewage

Miho KITAZUME and Masayuki OONUMA

キーワード：新型コロナ、下水、発生動向調査

新型コロナウイルス感染症（以下、COVID-19）は、新型コロナウイルス（以下、SARS-CoV-2）が原因となって発症する急性呼吸器感染症である。2019 年以降¹⁾ 国内外で多数の患者発生があり、現在も継続している。感染の拡大を阻止するため、人が大勢集まる各種イベントの自粛要請や居酒屋等の飲食店への休業要請など様々な対策がとられ社会に大きな影響を与えた。

COVID-19 は、咳、発熱、下痢などの症状を呈し³⁾、肺炎等の重症例がある一方で軽症例や症状の無い不顕性感染例もある。軽症例や不顕性感染例は有症者と異なり医療機関を受診する機会がないため隔離・治療を受けることが無く、感染源となっている可能性がある。

正確な感染者数の把握は、様々な対策を行う上での重要な指標であるため、医師の届け出などに基づく全数報告を行ってきたが、2023 年 5 月より全国約 5 千の医療機関からの定点報告に移行して以降⁴⁾、正確な感染者数の把握が困難となった。

今回、糞便中に排泄された SARS-CoV-2 が集積する浄化センターの流入水（下水）中の SARS-CoV-2 遺伝子を「下水中の新型コロナウイルス検出マニュアル ver1.1」(図 1) を参考に検査を行い、得られた SARS-CoV-2 遺伝子量から、地域における COVID-19 感染者数を把握することができるか検討したので報告する。

調査方法

1 調査期間と調査地点

調査期間は、2021 年 4 月から 2023 年 3 月の 2 年間とし、調査地点は県内の 2 カ所の浄化センター（処理区の人口 10 万人以上）とし、処理場流入水（下水）を月 1 回、1L 採水した。

2 検体の前処理と遺伝子抽出

「下水中の新型コロナウイルス検出マニュアル ver1.1」の方法を参考に前処理を行った。検体 400mL を遠心分離し上清と沈渣に分け、上清は塩化マグネシウムの添加、pH の調整を行い、陰電荷膜で濃縮後、QIAamp UltraSens Virus

Kit を用いて遺伝子抽出を行った。沈渣は RNeasy Power Soil Total RNA Kit を用いて遺伝子抽出を行った。

3 リアルタイム PCR 検査

遺伝子抽出後の検体を、SARS-CoV-2 検出用試薬 3 種 (NIIDN2、CDCN1、CDCN2) をそれぞれ用いてリアルタイム PCR 法を行い SARS-CoV-2 遺伝子を検出した。

検体の前処理、遺伝子抽出が適切に行われているか確認するための指標として下水中に高濃度で存在しているトウガラシ微斑ウイルス（以下、PMMoV）の検出を行った。

4 最適な検査条件の検討

前処理後の検体である上清と沈渣のどちらから、より多くの SARS-CoV-2 遺伝子を検出できるのか、3 種あるリアルタイム PCR 検査試薬 (NIIDN2、CDCN1、CDCN2) の各々の感度について比較検討を行った。

5 遺伝子量と感染者数の解析

最適な検査条件から得られた下水中の SARS-CoV-2 遺伝子の定量値と、各浄化センター流域の新規感染者発生数の

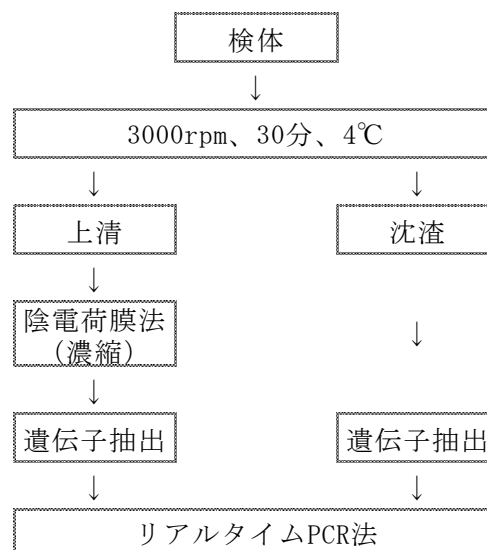


図 1. 下水中の新型コロナウイルス検出マニュアル

ver1.1 の概要

間に相関関係があるかスピアマンの順位相関係数を用いて解析を行った。

結果及び考察

1 上清と沈渣の比較

調査期間2年間における陽性率は上清(A 浄化センター: 26.4%、B 浄化センター: 20.8%) と沈渣(A 浄化センター: 26.4%、B 浄化センター: 19.4%) でほぼ同じであったが、定量値は上清(A 浄化センター: 6.3×10^4 コピー/L、B 浄化センター: 3.1×10^4 コピー/L) と沈渣(A 浄化センター: 9.6×10^3 コピー/L、B 浄化センター: 4.8×10^3) と上清の方が10倍高く(表1)、今回検討したA、B 浄化センターにおいては、沈渣よりも上清検体により多くの SARS-CoV-2 遺伝子が存在すると考えられた。

検査指標である PMMoV 遺伝子は調査期間を通じて上清と沈渣ともに平均して $10^5 \sim 10^6$ コピー/L 検出され検査精度は適正であると考えられた。(図2)

2 リアルタイムPCR 試薬の比較

リアルタイムPCR 試薬別の陽性率を比較すると、NIIDN2 (6.3%)、CDCN1 (41.7%)、CDCN2 (21.9%) と CDCN1 の陽性率が最も高かった。定量値は、NIIDN2 (1.4×10^4 コピー/L)、CDCN1 (3.2×10^4 コピー/L)、CDCN2 (3.6×10^4 コピー/L) と、CDCN1、CDCN2 に大きな差はなかった。CDCN1、CDCN2 は陽性率、定量値ともに NIIDN2 よりも高かった。(図3、表2)

以上の結果から、リアルタイムPCR 試薬は CDCN1 が最も感度よく定量検査できると考えられた。

3 下水中の SARS-CoV-2 遺伝子量と感染者数の関係

新規感染者発生数は「やまなし感染症ポータルサイト/新型コロナウイルス感染症に関する発生状況等」⁵⁾ の値を用い、SARS-CoV-2 遺伝子の定量値は上清検体を CDCN1 で定量した値を用いた。SARS-CoV-2 遺伝子の定量値と検体採取を行った採水週および採水1週間後、採水2週間後の新規感染者発生数との間に相関関係があるかスピアマンの順位相関係数を用いて検定を行った。その結果、採水1週間後が遺伝子定量値と最も高い正の相関を示すことがわかった。(表3、図4) このことから採水頻度が月1回では新規感染者発生数を把握することが困難であるが、週1回の採水を行うことで流域における新規感染者発生数をリアルタイムに把握できる可能性があると考えられた。

まとめ

県内2カ所の浄化センターの流入水を対象に、月1回採水を行い SARS-CoV-2 遺伝子の検出を行った。その結果、今回検討した浄化センターでは、沈渣よりも上清により多くの SARS-CoV-2 遺伝子が存在すると考えられた。3種の試薬を用いてリアルタイムPCR法を行ったところ、CDCN1

が最も感度よく定量検査できると考えられた。新規感染者発生数と SARS-CoV-2 遺伝子の定量値との間に相関関係があるかスピアマンの順位相関係数を用いて検定を行った結果、採水1週間後の新規感染者発生数と最も高い正の相関を示した。このことから週1回の採水を行うことでリアルタイムに新規感染者発生数を把握できる可能性があると考えられた。

表1. 各浄化センターの検体別 SARS-CoV-2 検出状況

		平均陽性数	陽性率 (%)	平均コピー数 (コピー/L)
A浄化センター	上清	6.3	26.4	6.3×10^4
	沈渣	6.3	26.4	9.6×10^3
B浄化センター	上清	5.0	20.8	3.1×10^4
	沈渣	4.7	19.4	4.8×10^3

(検体数=24)

表2. 試薬別 SARS-CoV-2 遺伝子の検出

		陽性数	陽性率 (%)	平均コピー数 (コピー/L)
A浄化センター	NIIDN2	3	12.5	3.9×10^5
	CDCN1	9	37.5	1.3×10^5
	CDCN2	7	29.2	3.2×10^5
B浄化センター	NIIDN2	0	0	0
	CDCN1	11	45.8	1.3×10^5
	CDCN2	4	16.7	2.0×10^5

(検体数=24)

表3. 感染者数と SARS-CoV-2 遺伝子定量値間の順位相関係数

	採水週	採水1週間後	採水2週間後
A浄化センター	0.47	0.50	0.47
B浄化センター	0.54	0.54	0.50

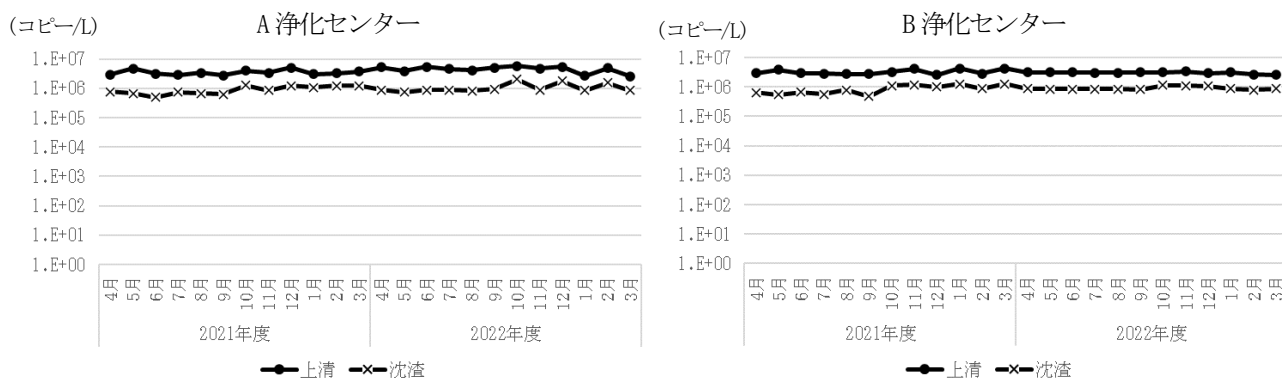


図2. 各浄化センターのPMMoV 遺伝子定量値の推移

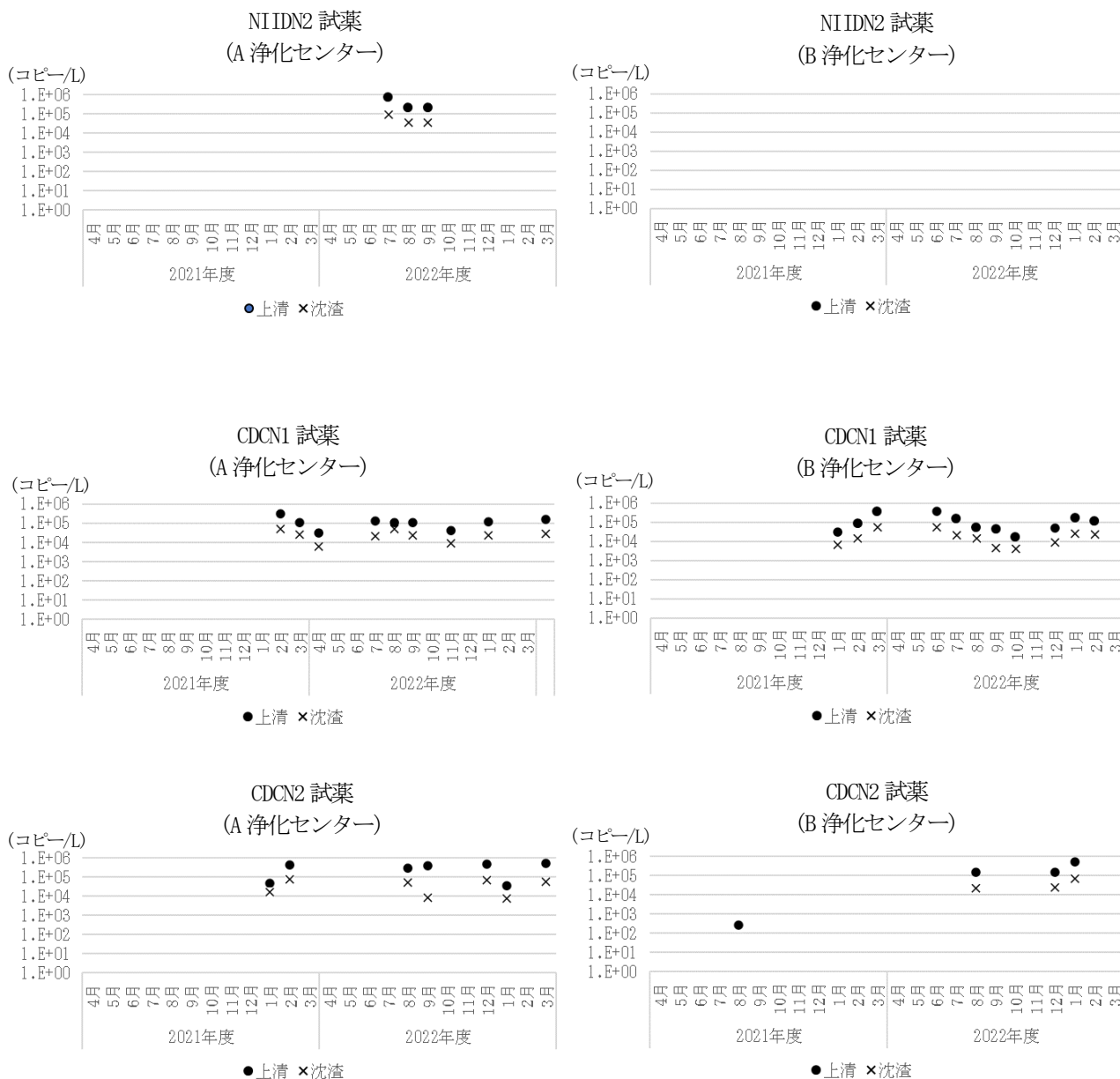


図3. リアルタイムPCR 試薬別 SARS-CoV-2 遺伝子定量値

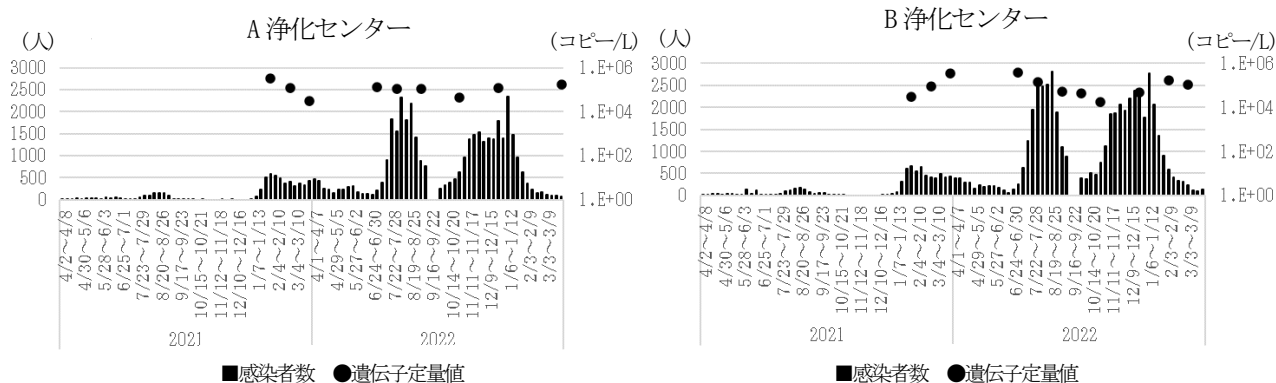


図 4. 各浄化センター流域の感染者数と SARS-CoV-2 遺伝子の定量値の推移

参考文献

1. WHO, Pneumonia of unknown cause - China, URL. <https://www.who.int/csr/don/05-january-2020-pneumonia-of-unkown-cause-china/en/>. (2024年11月5日アクセス可能)
2. 国立感染症研究所, 下水中の新型コロナウイルス検出マニュアル ver1.1, 令和3年(2021)年6月
3. Chan, JF-W · Yuan, S · Kok, K-H · et al.: A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission : a study of a family cluster. Lancet., 395, 514-23 (2020)
4. 厚生労働省, 新型コロナウイルス感染症の5類感染症移行後の対応について, 令和5年5月8日付事務連絡
5. 山梨県: やまなし感染症ポータルサイト, 新型コロナウイルス感染症に関する発生状況等, URL. https://www.pref.yamanashi.jp/kansensho_portal/index.html. (2024年11月18日アクセス可能)