

都内下水中の定量的新型コロナウイルスモニタリングとヒートマップ評価法の構築

熊谷 遼太^a, 岡田 若葉^a, 高橋 久美子^a, 和田 紀乃^a, 天野 有紗^a, 豊田 奈々佳^a, 磯貝 まや^a,
長島 真美^b, 三宅 啓文^a, 貞升 健志^c, 千葉 隆司^c
(外部機関査読者: 塚越 博之^d)

下水中の新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) モニタリングは, 2024 年度から感染症流行予測調査事業の感染源調査として新たに追加された. 東京都では下水処理施設 1 地点を対象に定量的モニタリング調査を実施・公開しているが, 下水検体特有の環境要因や COVID-19 の感染状況の変化等により, 精度の高い検査及び疫学的に十分な評価ができていたとは言い難い. そこで, 今回, 我々は, モニタリング手法の高精度化を目的として, リアルタイム PCR 法による定量的モニタリング法を構築した. さらに, 2024 年 1 月から 2025 年 3 月までに都内水再生センター20 カ所ので採取された流入下水 1,278 検体を対象に, 既報で構築した全自動遺伝子検査装置による半定量的モニタリング法及び, 定量的モニタリング法を実施し, ヒートマップ形式による都内流行状況の包括的評価を試みた. その結果, 両モニタリング法において, 都内定点医療機関あたりの患者数とヒートマップで連動がみられた. さらに, 定量的モニタリング法は半定量的モニタリング法と比較し, 解像度の高いヒートマップの構築が可能となった. 今後, 継続的に定量的モニタリングを実施し, 都内流行状況の補完データとして COVID-19 対策に活用していきたい.

キーワード: 下水, 新型コロナウイルス, SARS-CoV-2, 定量, 全自動遺伝子検査装置, ヒートマップ, リアルタイムPCR法

はじめに

厚生労働省は, 2023 年 5 月から新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) を感染症法上の 5 類感染症に位置付け, 全数把握から定点把握へ変更した¹⁾. これに伴い, 以前のように実数として COVID-19 の流行規模を把握するのが困難となった. 2025 年 4 月には, COVID-19 はインフルエンザや RS ウイルス感染症等と同様に急性呼吸器感染症 (ARI) に位置付けられ, 5 類感染症の定点把握疾患としてサーベイランスが実施されている²⁾.

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 下水サーベイランスは, COVID-19 のモニタリングツールの 1 つとして期待され, 米国, カナダ, オーストラリア等の諸外国や, 国内のいくつかの地域においても実施されている³⁻⁶⁾. 国内では 2024 年 4 月から感染症流行予測事業 (感染源調査) として新たに追加され, 感染症流行予測調査速報のホームページにより, 自治体ごとに調査結果が公開されている⁶⁾. 都では下水処理施設 1 地点を対象に定量的モニタリング調査を実施・公開しているが, 下水検体特有の環境要因 (雨量や水温, 阻害物質等) や都内 COVID-19 の感染状況の変化や地域差等により, 精度の高い検査及び疫学的な評価が充分にできていたとは言い難い.

WHO は下水モニタリング等の結果を COVID-19 サーベイランス等の結果とともに公開することを推奨しており, 各国が政府公式のホームページやダッシュボードを活用し,

それぞれの形式でモニタリング結果を公開している⁷⁾. 米国においては, National Wastewater Surveillance System (NWSS) を構築し, 1,000 地点以上のモニタリングポイントを対象とした調査が実施されている. 定量的モニタリング結果は, 独自の算出法で Wastewater Viral Activity Level として段階的に基準を設定し, 地域ごとにヒートマップ化することで, 一般市民や医療関係者が理解できるよう視覚化し, 注意喚起を促している³⁾.

我々は, 既報で⁸⁾, 都内 20 地点の下水処理施設で採水された流入下水を対象として, 全自動遺伝子検査装置法による半定量的モニタリング法及びヒートマップ評価法を構築した. 本法は, 簡便で多検体処理が可能であり, コンタミネーションリスクが低いといった利点がある. また, 本法によるヒートマップは定点あたりの患者数と連動する傾向がみられ, 都内の流行状況を視覚化することが可能であると考えられた.

今回, 我々は, モニタリング手法の高精度化を目的とし, 半定量的モニタリング法を継続的に実施するとともに, 全自動遺伝子検査装置法の検査残渣及び下水沈渣液から核酸抽出を行い, リアルタイム PCR 法による定量検査を実施した. さらに, 定量的モニタリング結果はウイルス量で 26 段階評価し, ヒートマップ図で定点あたりの患者数と比較した.

^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都企画調整部健康危機管理情報課

^c 東京都健康安全研究センター微生物部

^d 群馬県衛生環境研究所

実験方法

1. 供試材料

2024年1月から2025年3月までに都内20地点の区部（13地点：PL-1～PL-13）及び多摩地域（7地点：TPL-1～TPL-7）の水再生センターで全64回（週1回）、グラブサンプリングにて流入下水（以降、下水）200 mLを採水し、1,278件の試料を供試した。

2. 下水試料の前処理

試料200 mLを4℃で15,700×gで30分間遠心分離を行い、沈渣及び上清に分離した後、沈渣液 2 mLを下水試料として回収した。

3. 測定方法及びヒートマップ評価法

1) 全自動遺伝子検査装置による半定量的モニタリング

熊谷ら⁸⁾の報告を参考に、沈渣液（原液）及び沈渣希釈検体（10倍希釈、100倍希釈）を作製し、Aptima Specimen Transport Tube (HOLOGIC) に各1 mL添加した。アプティマSARS-CoV-2キット (HOLOGIC社) を用いて、全自動遺伝子検査装置（パンサーシステム、HOLOGIC社）による測定を実施した（以降、PS法）。また、結果判定は既報⁹⁾に従い、測定値を3段階で評価し、Total RLU (×1,000)（以降、RLU値）が1,000以上を強陽性、RLU値560以上1,000未満を弱陽性、RLU値560未満を陰性とした。さらに、各地点の測定結果は、各希釈系列の結果をもとに27段階でスコア化し、モニタリング20地点の評価を積み上げ図の形式を用いてヒートマップ図を作成した。ヒートマップと都内患者報告数の相関性を確認するため、境界線となる各スコアの地点数の合計と患者報告数を用い、スピアマンの順

位相関分析を実施した。

2) リアルタイムPCR法による定量的モニタリング法の検討

Kumagaiら⁹⁾の報告を参考に、実験方法3. 1) の検査残渣（原液）からQIAmp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて核酸抽出を実施した（以降、PS抽出法）。米国CDCの2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probesに記載された2種類のプライマー・プローブセット（2019-nCoV_N1, 2019-nCoV_N2）及びOne Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (Takara Bio) を使用し（最終反応量 25 µL）、52℃5分、95℃10秒反応させた後、95℃5秒、60℃30秒のサイクルを45回繰り返した。なお検出機器として QuantiStudio 12K Flex Realtime PCR System (Applied Biosystems) を使用した。検量線作成は、合成RNAを用いて、10 copies/µLから1.0×10⁵ copies/µLまでの希釈系列液を測定した。

遺伝子定量結果から、1Lあたりの下水中ウイルス量を算出した後、5.0×10³ copies/L～1.0×10⁷ copies/Lを指数的に24分割し、各範囲を26段階でスコア化した。さらに、モニタリング20地点の評価を積み上げ図の形式を用いてヒートマップを作成した。

3) 沈渣液上清を対象とした定量的モニタリング

2024年5月第4週から2025年3月までに都内20地点で採取された878検体を対象に、実験方法 2. で前処理した沈渣液 1 mLを14,600×gで1分間遠心分離した後、上清からQIAmp Viral RNA Mini Kitを用いて核酸抽出を行った（以降、沈渣直接抽出法）。さらに実験方法 3.2) と同様の手法でリアルタイムPCR法による定量試験を実施し、ヒートマップ図を作成した。

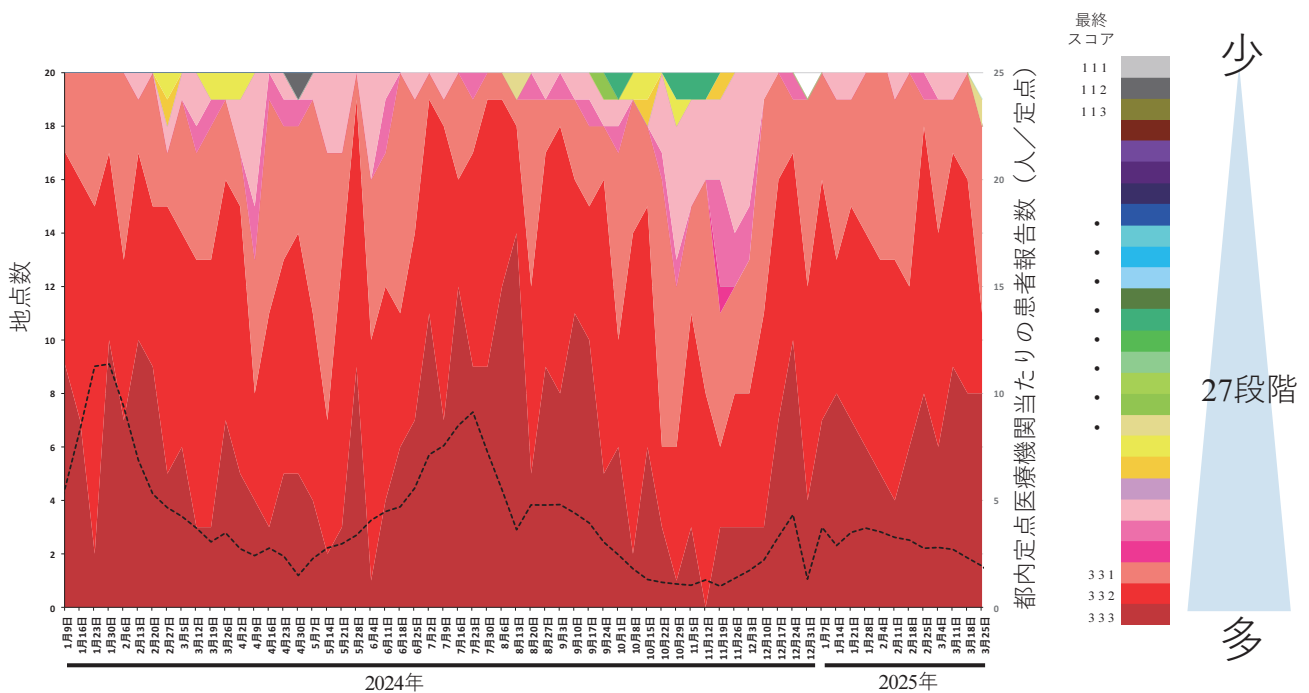


図1. 全自動遺伝子検査装置を用いた半定量的モニタリング法（ヒートマップ図）

結果及び考察

1. 全自動遺伝子検査装置による半定量的モニタリング

都内20地点を対象に、PS法によるSARS-CoV-2モニタリング調査を実施し、半定量的モニタリングによるヒートマップ図⁸⁾を作成した(図1)。20地点のヒートマップ図においては、最終スコアが①【333】、②【333】+【332】、③【333】+【332】+【331】の地点数と都内定点あたりの患者数におけるスピアマンの順位相関係数は①0.57、②0.61、③0.63であり、いずれも相関が有意($p < 0.05$)であった。このことから、半定量法によるヒートマップ図は、高スコア部をモニタリングすることで、都内流行状況を把握することが可能であると推察された。

2. リアルタイムPCR法による定量的モニタリング

1) 各地点における定量的モニタリング検査

全自動遺伝子検査装置によるPS法は、3段階希釈後の定性試験法であり、リアルタイムPCR法と比較し、少ないRNA量でRLU値がプラトー状態(強陽性領域)になる。このことから、希釈検体を測定する半定量的モニタリング法での解析は、ウイルス量が多い場合、流行規模を正確に把握できない可能性が考えられた。そこで、リアルタイムPCR法による定量データの取得及び評価法の構築を試みた。既報⁹⁾では、PS抽出法について、トウガラシ微斑ウイルス(PMMoV)遺伝子が、他の検査法と比較し、回収率が同等またはそれ以上であることを確認しており、SARS-CoV-2遺伝子についても検出が可能であることを報告した。そこで、同様の手法を用いて、検査残渣から核酸抽出を行

い、SARS-CoV-2の定量試験を実施した。

各地点(PL-1~13, TPL-1~7)において、定量可能であったSARS-CoV-2 RNA量は、区部13地点において、PL-1は $2.3 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^6$ copies/L(定量限界未満:4検体)、PL-2は $2.2 \times 10^4 \sim 3.8 \times 10^6$ copies/L、PL-3は $7.5 \times 10^3 \sim 1.8 \times 10^6$ copies/L(4検体)、PL-4は $1.5 \times 10^4 \sim 9.8 \times 10^5$ copies/L、PL-5は $7.7 \times 10^3 \sim 9.5 \times 10^5$ copies/L(5検体)、PL-6は $5.2 \times 10^3 \sim 2.2 \times 10^6$ copies/L(1検体)、PL-7は $1.8 \times 10^4 \sim 2.3 \times 10^6$ copies/L(2検体)、PL-8は $1.5 \times 10^3 \sim 1.7 \times 10^6$ copies/L、PL-9は $2.5 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^6$ copies/L、PL-10は $4.8 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^6$ copies/L、PL-11は $1.7 \times 10^4 \sim 1.7 \times 10^6$ copies/L、PL-12は $1.2 \times 10^4 \sim 3.5 \times 10^6$ copies/L(1検体)、PL-13は $7.8 \times 10^3 \sim 1.9 \times 10^6$ copies/Lであった(図2)。多摩地域においては、TPL-1は $3.5 \times 10^3 \sim 4.3 \times 10^6$ copies/L(定量限界未満:1検体)、TPL-2は $5.9 \times 10^3 \sim 6.4 \times 10^6$ copies/L(2検体)、TPL-3は $1.1 \times 10^4 \sim 2.7 \times 10^6$ copies/L、TPL-4は $9.3 \times 10^3 \sim 4.6 \times 10^6$ copies/L(1検体)、TPL-5は $5.1 \times 10^3 \sim 2.1 \times 10^6$ copies/L(2検体)、TPL-6は $2.0 \times 10^4 \sim 2.3 \times 10^6$ copies/L(1検体)、TPL-7は $3.6 \times 10^3 \sim 3.7 \times 10^6$ copies/L(1検体)であった。また、各地点のウイルス定量値と都内定点あたりの患者数において、スピアマンの順位相関係数は区部13地点で0.10~0.38、多摩地域7地点で0.17~0.33とどちらも低く、ばらつきが見られた。地点ごとの相関傾向には差異があり、各地点でのCOVID-19の状況、処理人口数や下水処理量、PCR阻害物質等の要因が影響していると考えられた。これらのことから、都においては少数地点を対象とした定量的モニタリングでは、都内流行状況の全体での評価が困難であることが考えられた。

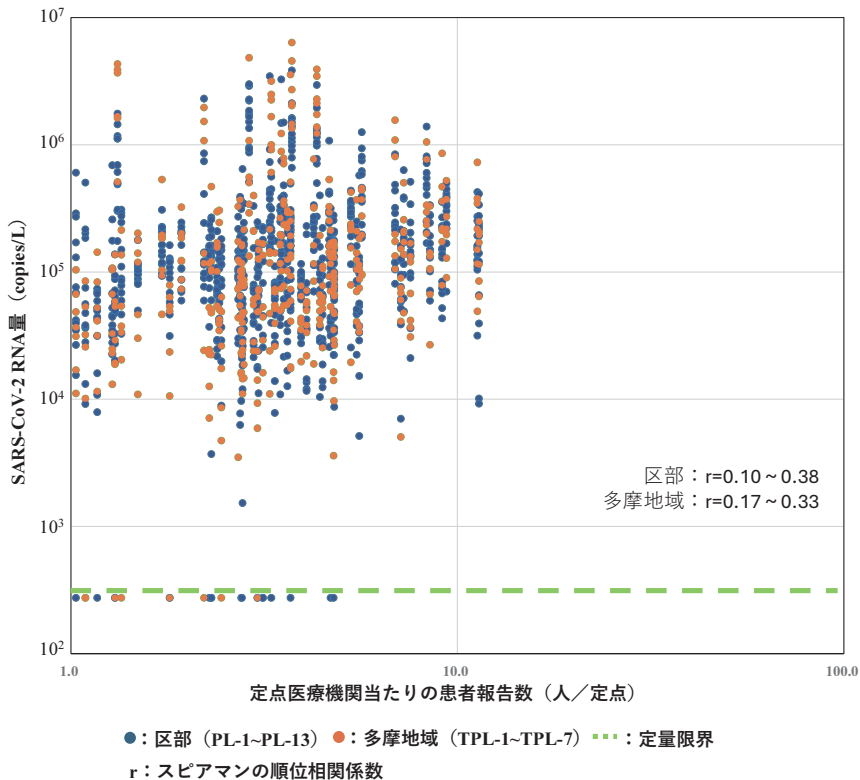


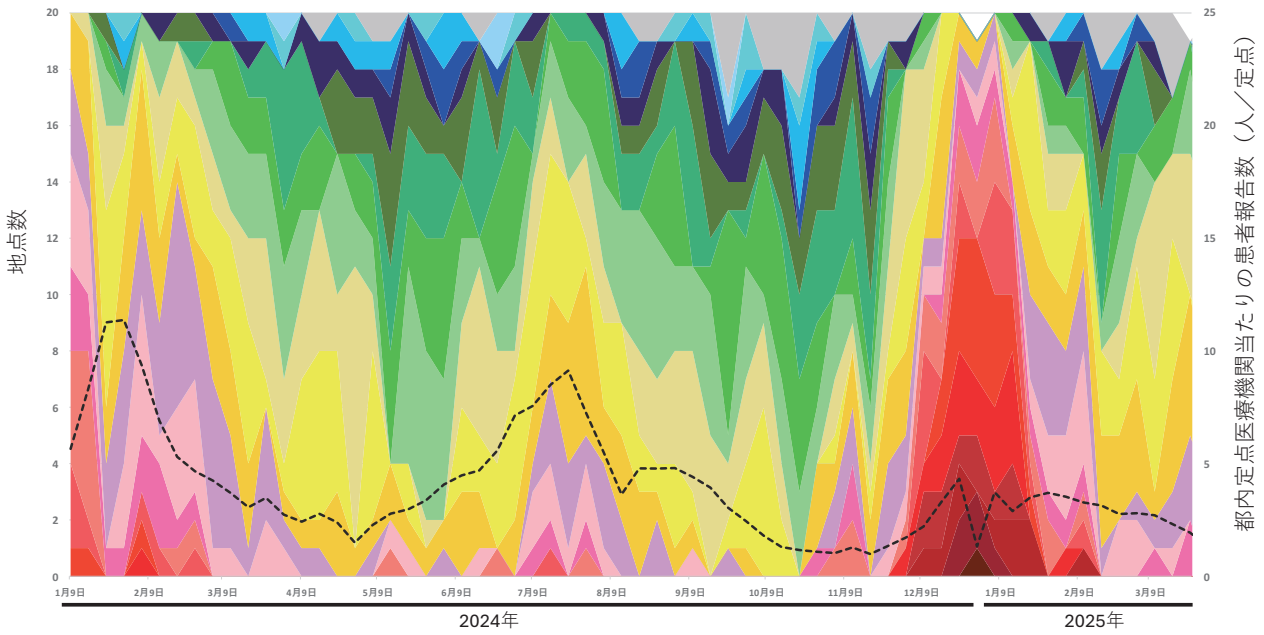
図2. 下水中のSARS-CoV-2 RNA量と都内定点医療機関当たりの患者報告数

2) 定量データを用いたヒートマップによる包括的評価

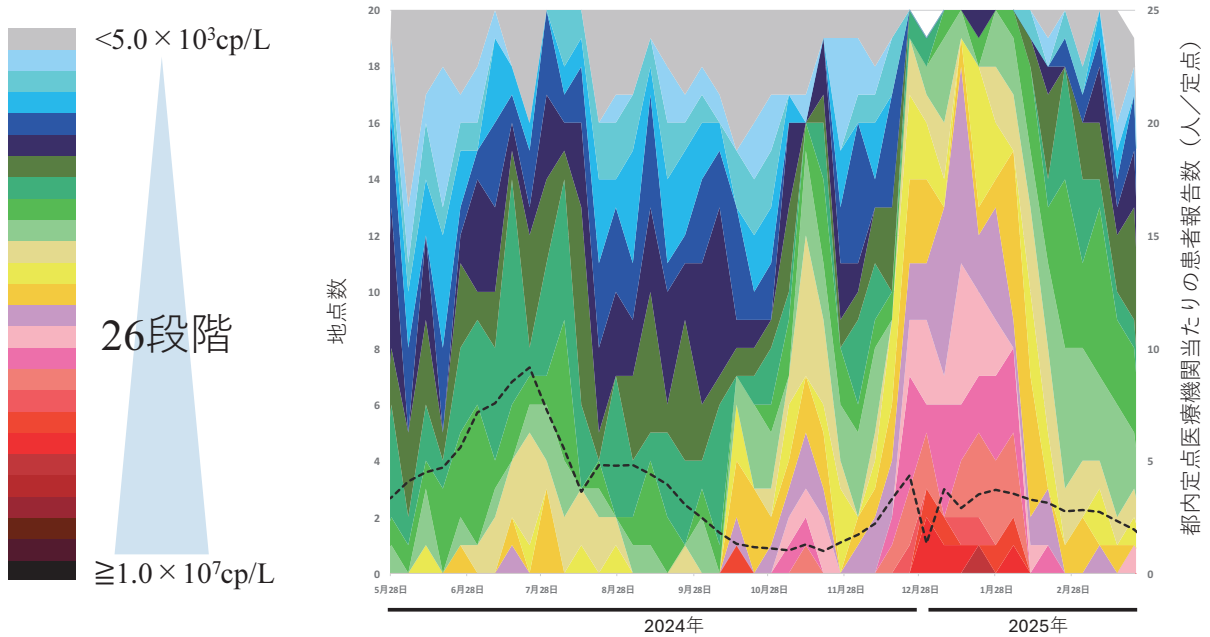
20地点の包括的な評価法として、半定量的モニタリング法を参考にウイルス定量結果を26段階で評価し、積み上げ方式でのヒートマップを作製した(図3a)。その結果、半定量的モニタリング法と同様に、定点あたりの患者数の増減と連動する傾向が確認された。さらに、定量データをスコア化したことで、より高い解像度のヒートマップが構築された。

本法によるヒートマップでは、2024年12月から2025年2月の流行(定点医療機関当たりの患者数のピーク:4.33人/定点)で、定点患者数ベースで大きな流行と考えられる

2023年12月から4月の流行(11.38人/定点)、2024年5月から9月の流行(9.13人/定点)と比較し、ウイルス量が多い傾向が確認された。同期間において、同様の傾向が富山県や山梨県でも確認されており⁶⁾、無症候患者が多くいることや同期間に都内で流行した変異株(XEC株等)の影響も考えられた。本法によるヒートマップは、半定量的モニタリング法と比較し、流行規模をより解像度高く把握できる可能性が示唆された。一方で、PS抽出法は検査残渣を用いており、検体処理液の影響や検体希釈の影響を考慮し、より簡便な沈渣直接抽出法を用いた定量データの取得とヒートマップの作成を行った。



(a) PS抽出法による定量的モニタリング(ヒートマップ図)



(b) 沈渣直接抽出法による定量的モニタリング(ヒートマップ図)

図3. リアルタイムPCR法を用いた定量的モニタリング(ヒートマップ図)

3. 抽出法の違いによるヒートマップ図の比較検討

2024年5月第4週から2025年3月までに都内20地点で採取された下水検体を対象に、より簡便な抽出法として、沈渣液上清からRNA抽出を行い、リアルタイムPCR法による定量試験を実施した。

1 L下水中のSARS-CoV-2 RNA量において、沈渣直接抽出法が、PS抽出法と比較し、2倍以上増加したのは878検体中93検体、1/2以下に低下したのは501検体であった。定量限界未満の検体数については、沈渣直接抽出法では29検体、PS抽出法では22検体であったが、共通して定量限界未満である検体は2検体のみであった。これは、採水時点・地点ごとの下水の性質（阻害物質の量等）の違いが抽出効率に影響していると考えられた。さらに、これら定量データを用いてヒートマップを作成したところ、PS抽出法と比較しRNA量の全体的な低下傾向がみられるものの、患者数の増減とウイルス量で連動する傾向が確認された（図3b）。このことから、より簡便な沈渣直接抽出法においても、ヒートマップ形式による定量的モニタリング評価が有効と考えられた。

下水を対象としたウイルスモニタリングは、雨水による検体希釈の影響や水温、阻害物質の量や種類等の様々な要因がモニタリングデータに影響を与える。バラツキの補正方法として、ヒト糞便含有量の指標であるPMMoVを用いることがあるが、SARS-CoV-2とPMMoVのRNA濃度の挙動は必ずしも一致しないことが報告されている¹⁰⁾。また、今回の調査検討においても、同じ検体であっても抽出法により回収率がそれぞれ異なることが確認された（データ公開なし）。これは各下水の性質の差（水温や阻害物質の質・量等）が関連していると推察され、補正によるバラツキ解消は難しい。

我々は単独または少数の地点による流行状況の評価は困難であると考え、20地点の定量データをスコア化し、広域的な視点で解析することで都内全域のCOVID-19流行状況を視覚的に把握することが可能と考えている。定点当たりの患者数は、5類感染症以降後、年々ピークが低くなっているのに対し（図1）、定点当たりの報告数の多い時期の下水中のSARS-CoV-2のRNA量は高い。SARS-CoV-2が感染しやすくなる方向で変異しても、軽症化が継続し、都民が病院へ行かない社会状況になってくると、定点当たりの患者数とSARS-CoV-2量の乖離はますます進むものと思われる。もしそうであれば、単独または少数でのモニタリングは今後さらに困難になると想定されるが、我々の方法であれば、正確なモニタリングが可能と思われる。

各国によるウイルスモニタリング結果の評価・公開方法は様々で、米国やカナダでは、独自の算出法によりWastewater Viral Activity Levelという評価法を構築している。これは複数のモニタリングポイントを包括的に評価することが可能であり、州単位でスコアに応じた色分けを実施し、地図上に可視化している。今回、我々が、構築したリアルタイムPCR法による下水中のSARS-CoV-2モニタリング法

は、ヒートマップを用いることで、既報の全自動遺伝子検査装置による半定量的モニタリング法と同様に都内全域のCOVID-19流行のトレンド把握が可能であった。また、より解像度の高いヒートマップ図が作成されることから、流行規模を視覚的に把握することができ、潜在的な感染者の把握が可能であると推察された。米国では、COVID-19だけでなく、インフルエンザA型、RSウイルス等の呼吸器感染症やエムボックスウイルスを下水モニタリングの対象としている。国内では札幌市や神奈川県でインフルエンザウイルスの下水モニタリングを実施しており^{11, 12)}、新型コロナウイルス以外のウイルスについても活用が期待されている。我々が構築した定量的モニタリング法は、目的とする病原体遺伝子を対象としたプライマー・プローブを設計・変更することで、モニタリング対象の適応拡大が行えるため、汎用性の高いモニタリング法であると考えられた。

ま と め

2024年1月から2025年3月までに都内水再生センター20カ所で採取された下水を対象に、全自動遺伝子検査装置による半定量的モニタリング法及び、リアルタイムPCR法による定量的モニタリング法を実施し、ヒートマップ評価を行った。その結果、どちらのモニタリング法においても都内定点医療機関あたりの患者数とヒートマップにおいて連動する傾向が確認されたが、定量的モニタリング法においては、流行規模をより解像度高く把握することができた。今後、リアルタイムPCR法による継続的な定量的モニタリング調査を行い都内流行状況の補完データとしてCOVID-19対策に活用すると共に、他のウイルスへの適応拡大についても検討していきたい。

謝 辞 本調査研究を実施するにあたり、下水試料の採取及び送付に御協力頂いた東京都下水道局の職員皆様方に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生労働省、事務連絡：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
- 2) 厚生労働省、通知：感染症発生動向調査事業実施要綱の一部改正について
- 3) CDC : National Wastewater Surveillance System (NWSS), <https://www.cdc.gov/nwss/index.html> (2025年7月1日現在。URLは変更または抹消の可能性がある)
- 4) Government of Canada : Wastewater monitoring dashboard, <https://health-infobase.canada.ca/wastewater/> (2025年7月1日現在。URLは変更または抹消の可能性がある)
- 5) Government of Western Australia : COVID-19 wastewater surveillance, https://www.health.wa.gov.au/articles/a_e/coronavirus/covid-19-wastewater-surveillance (2025年7月1日現在。URL

- は変更または抹消の可能性がある)
- 6) 国立健康危機管理研究機構：感染症流行予測調査速報, 環境水からの新型コロナウイルス RNA 検出状況
<https://id-info.jihs.go.jp/surveillance/nesvpd/rapid/index.html> (2025年7月1日現在. URLは変更または抹消の可能性がある)
 - 7) WHO : WHO COVID-19 dashboard,
<https://data.who.int/dashboards/covid19/wastewater> (2025年7月1日現在. URLは変更または抹消の可能性がある)
 - 8) 熊谷遼太, 岡田若葉, 矢尾板 優, 他 : 東京健安研七年報, **75**, 119–124, 2024.
 - 9) Kumagai, R., Kawakami, M., Kasuya, F., *et al.*: *VirusDisease*,
doi: <https://doi.org/10.1007/s13337-024-00880-z> (2025年7月1日現在)
 - 10) 国土交通省：下水データの取扱いに関する検討結果,
<https://www.mlit.go.jp/mizukokudo/sewerage/content/001599161.pdf> (2025年7月1日現在. URLは変更または抹消の可能性がある)
 - 11) 神奈川県 HP：下水疫学調査について,
<https://www.pref.kanagawa.jp/docs/h2d/covid19/simulation.html> (2025年7月1日現在. URLは変更または抹消の可能性がある)
 - 12) 札幌市 HP：下水サーベイランス,
<https://www.city.sapporo.jp/gesui/surveillance.html> (2025年7月1日現在. URLは変更または抹消の可能性がある)

Sewage Monitoring of SARS-CoV-2 in Tokyo: Heat-map Visualization of SARS-CoV-2 RNA Levels in Sewage

Ryota KUMAGAI^a, Wakaba OKADA^a, Kumiko TAKAHASHI^a, Kotono WADA^a, Arisa AMANO^a,
Nanaka TOYODA^a, Maya ISOGAI^a, Mami NAGASHIMA^a, Hirofumi MIYAKE^a, Kenji SADAMASU^a and Takashi CHIBA^a

(Reviewed by Hiroyuki TSUKAGOSHI^b)

In Tokyo, quantitative severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) monitoring surveys are ongoing at one sewage treatment facility. However, due to environmental factors affecting sewage samples and changes in COVID-19 infection patterns and regional differences, it remains unclear whether accurate genetic testing and appropriate epidemiological evaluation are sufficient.

In the present study aimed to evaluate changes in SARS-CoV-2 levels using a heatmap, we conducted semi-quantitative monitoring using a fully automated genetic testing device and quantitative monitoring using real-time polymerase chain reaction on 1278 samples collected at 20 wastewater treatment plants in Tokyo, including 13 plants across 23 wards in Tokyo and 7 plants in the Tama region, between January 2024 and March 2025. Our analyses with quantitative monitoring enabled the creation of a high-resolution heatmap, revealing a correlation between the number of patients with COVID-19 infection in Tokyo and SARS-CoV-2 levels in sewage.

Keywords: sewage, COVID-19, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, sediment
high-throughput, fully-automated platform, real-time PCR

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b Gunma Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences