

都内下水中の新型コロナウイルスモニタリング調査 (2021年度～2022年度)

熊谷 遼太^a, 岡田 若葉^a, 糟谷 文^a, 原田 幸子^a, 矢尾板 優^a, 長谷川 道弥^a, 高橋 明宏^b, 山田 欣司^c
山本 央^b, 斎藤 慎哉^c, 村山 康樹^b, 河内 奨^c, 藤原 卓士^a, 三宅 啓文^d, 長島 真美^a, 貞升 健志^d
(外部機関査読者: 平井 昭彦^e)

東京都では、2020年1月に新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 患者が確認されて以降、2023年5月現在、累計400万人以上の感染者が報告されている。新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は、感染者の唾液や喀痰、糞便等から排出されるため、これらが集積される下水処理施設の流入下水を対象とした、SARS-CoV-2 モニタリングが注目され、各国で実施されている。今回、2021年5月から2023年3月までに都内水再生センター20カ所 (区部13カ所、多摩地域7カ所) で採取された流入下水を対象に、全自動遺伝子検査装置を用いた高感度な検出法による SARS-CoV-2 モニタリングを実施した。その結果、区部においては第6波以前では下水試料203件中86件、第6波以降では741件中738件、多摩地域においては第7波以降の142件中137件が陽性となった。さらに、前処理した下水試料を10倍段階希釈し検査することで、都内における流行状況を多面的に把握できる可能性が示唆された。

キーワード: 下水, 新型コロナウイルス, SARS-CoV-2, 沈渣, 全自動遺伝子検査装置

はじめに

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) を原因とする感染症で、国内のみならず世界的な感染拡大が繰り返されており、現在においても収束には至っていない。都内では2020年1月にCOVID-19患者が初めて報告されて以降、400万人以上の感染者が確認されている (2023年5月現在)¹⁾。

COVID-19は発熱や呼吸器症状等を主徴とし、SARS-CoV-2は、感染者の唾液や喀痰、糞便等から排出される。そのため、これらが集積される下水処理施設の流入下水 (以降、下水) を対象とした SARS-CoV-2 モニタリングが注目され、各国で実施されている²⁻⁵⁾。一方、厚生労働省は、2023年5月からCOVID-19を感染症法上の5類感染症に位置づけ、全数把握から定点把握へ変更した⁶⁾。これに伴い、感染者数を実数で把握できず、以前のように実数的

にCOVID-19の流行規模を把握するのが困難であるため、下水モニタリングは、感染状況のモニタリングツールの一つとなることが期待され、検討が続けられている。

下水からのSARS-CoV-2の濃縮・遺伝子抽出方法については、様々な方法が試みられており、ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法、Electronegative membrane-vortex (EMV) 法、限外ろ過法、超遠心分離等が用いられ^{7,8)}、それに基づいたマニュアルが公開されている^{9,10)}。汚泥試料を対象とした検査では固形分から直接核酸抽出するキットが使用されている。これらの方法で、世界各国の下水 (上清、沈渣) からSARS-CoV-2遺伝子の検出が報告されている^{4,5)}。また、遠心分離後の下水上清と比較し、下水沈渣 (固形分) で遺伝子が優位に検出されることが確認されており¹¹⁾、下水沈渣からの効率的な抽出方法について検討が進められてきた。

表1. 都内水再生センターで採水された下水検体の採水時期と検体数

	1期		2期		3期	
	開始日	終了日	開始日	終了日	開始日	終了日
	2021年5月28日	2021年7月7日	2021年11月2日	2021年12月28日	2022年1月4日	2021年6月7日
区部 (PL-1～PL-13)	87 検体 (1回/週)		116 検体 (1回/週)		298 検体 (1回/週)	
	4期		5期		6期	
	開始日	終了日	開始日	終了日	開始日	終了日
	2021年6月14日	2022年10月25日	2022年11月1日	2023年2月21日	2023年3月7日	2023年3月28日
区部 (PL-1～PL-13)	260 検体 (1回/週)		131 検体 (1回/週～1回/2週)		52 検体 (1回/週)	
多摩地域 (TPL-1～TPL-7)	63 検体 (1回/2週)		51 検体 (1回/2週)		28 検体 (1回/週)	

^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 東京都下水道局施設管理部環境管理課

^c 東京都下水道局流域下水道本部技術部施設管理課

^d 東京都健康安全研究センター微生物部

^e 女子栄養大学短期大学部

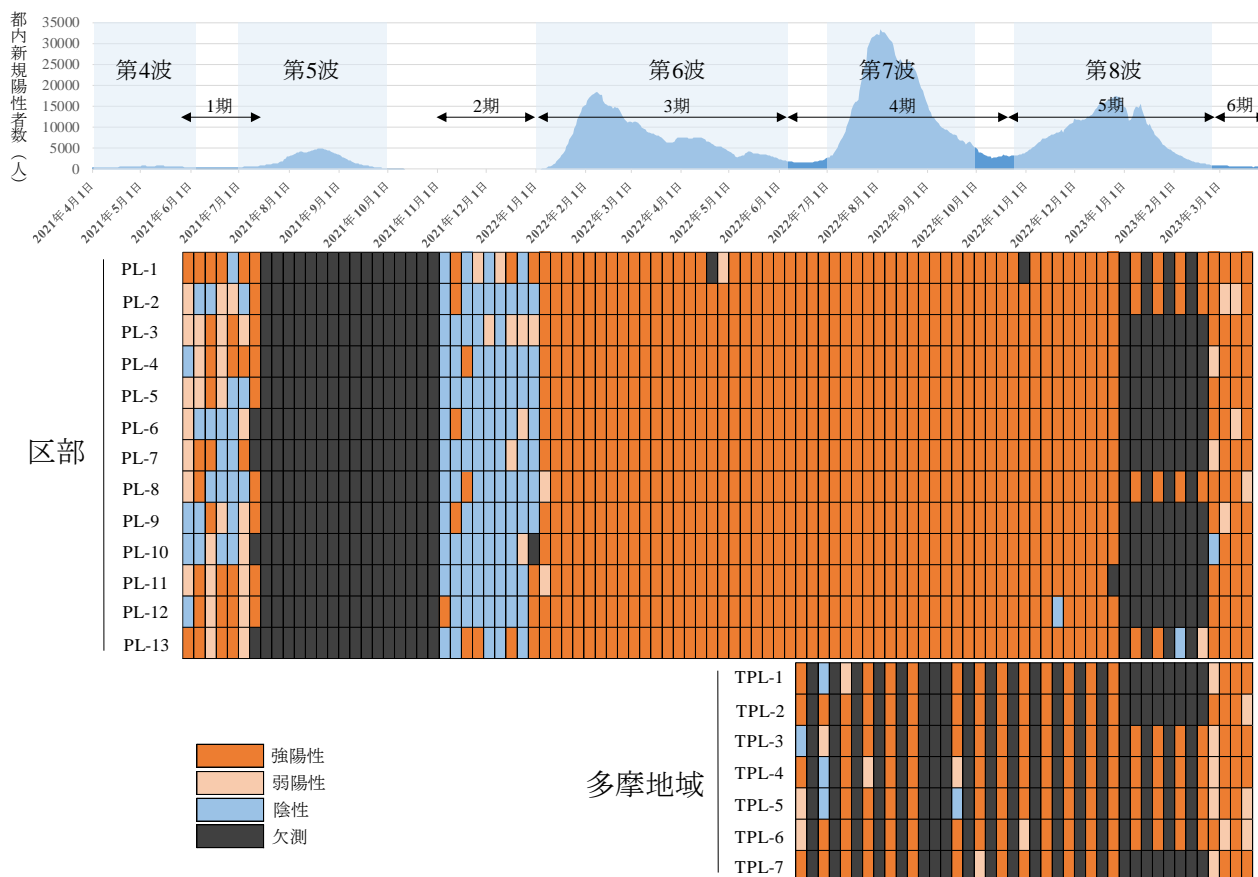


図1. 全自動遺伝子検査装置による下水中 SARS-CoV-2 モニタリング調査結果 (2021 年度～2022 年度)

我々は先行研究として、コンタミネーション防止や多検体処理を目的とし、全自動遺伝子検査装置を用いた沈渣試料からの遺伝子検査法の有用性を報告した¹²⁾。また、2020年5月より本検査法を用い、都内区部の2地点の都内下水処理施設(水再生センター)で採取された下水を中心に、SARS-CoV-2のモニタリングを実施してきた。

今回、都内の20カ所(区部13カ所、多摩地域7カ所)の水再生センターで採水された下水を対象に、全自動遺伝子検査装置による検証およびモニタリング調査を行ったので、検出状況を報告する。

実験方法

1. 供試材料

1) 区部

2021年5月から2023年3月までに区内13カ所(一部欠測あり)の区部水再生センター(PL-1～PL-13)で80回、グラブサンプリングにて下水400mLを採水し、944件の試料を得た。また、採水時期や感染者数を考慮し、1期から6期に区間を分け、それぞれの検体数及び採水頻度を表1に示した。

2) 多摩地域

2022年6月から2023年3月までに多摩地域内7カ所(一部欠測あり)の多摩地域水再生センター(TPL-1～TPL-7)で22回、区部施設と同じ手法で下水を採水し、142件の試料を得た(表1)。

2. 下水試料の前処理

試料400 mLを4°Cで10,000 rpm×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 4mLを下水試料として回収した。

3. SARS-CoV-2遺伝子検査(全自動遺伝子検査)

熊谷ら¹²⁾の報告を参考に、全自動遺伝子検査装置(パンサーシステム, HOLOGIC社)専用の検体チューブ(Aptima Specimen Transport Tube)の保存液2.9 mLに、沈渣液1mLを添加した。これを十分に転倒混和した後、2,500 rpm×5分で遠心分離し、アプティマSARS-CoV-2キットを用いて全自動遺伝子検査装置による遺伝子検査を実施した(以降、PS法:パンサーシステム検査法)。結果判定は、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、560未満を陰性とした。

4. 沈渣液の段階希釈検体を用いたPS法の比較試験

第7波ピーク時に採水した20地点(区部13検体、多摩地域7検体)の沈渣液2回分(2022年8月9日及び8月23日採水分)及び、第8波収束時に採水した20地点の2回分(2023年3月7日及び3月14日採水分)の計80検体を供試した。沈渣液を10倍段階希釈し、1倍希釈、10倍希釈、100倍希釈の沈渣液1mLを作製した。さらに、実験方法3で示した手法に従い、全自動遺伝子検査装置による遺伝子検査を実施した。

結果及び考察

1. 下水モニタリング調査

1) 区部

区部においては、13施設の流入下水を対象にSARS-CoV-2モニタリング調査を実施した(図1)。1期(都内新規陽性者数:375-632人,平均467人)では87件中強陽性が35件(40.2%),弱陽性が27件(31.0%),陰性が25件(28.7%),2期(14-39人,20人)は116件中強陽性が15件(12.9%),弱陽性が9件(5.6%),陰性が92件(79.3%),3期(90-18,562人,7,520人)は298件中強陽性が295件(99.0%),弱陽性が3件(1.0%),4期(1,565-33,424人,12,528人)は260件中強陽性が260件(100%),5期(1,240-17,423人,9,267人)は131件中強陽性が128件(97.7%),弱陽性が1件(0.8%),陰性が2件(1.7%),6期(572-791人,702人)は52件中強陽性が44件(84.6%),弱陽性が7件(13.5%),陰性が1件(1.9%)であった。1日あたりの都内新規陽性者数が50人未満であった2期では陽性となる地点は少なく,採水日毎に陽性地点数をみると最も多い日は13地点中5地点,最も少ない日は12地点中1地点であった。陽性者数が500人以上の3期(第6波)以降では,741件中738件(99.6%)が陽性であり,陰性となった地点に偏りはみられなかった。また,地点毎の陽性率に差はみられなかった。

2) 多摩地域

多摩地域では,4期以降から7施設を対象にSARS-CoV-2モニタリング調査を実施した。4期では63件中強陽性が51件(81.0%),弱陽性が7件(11.1%),陰性が5件(7.9

%),5期は51件中強陽性が50件(98.0%),弱陽性が1件(2.0%),6期は28件中強陽性が19件(67.9%),弱陽性が9件(32.1%)であった。さらに詳細をみていくと,弱陽性または陰性が第6-第7波間(都内新規陽性者数:1,565-2,157人,平均1,760人)で14件中7件(弱陽性:3件,陰性:4件),第7波-第8波間(2,626-7,432人,3,457人)で28件中4件(3件,1件),第8波収束後(572-791人,701人)では28件中9件(9件,0件)であり,各流行の収束時において増加する傾向がみられた。また,地点毎の陽性率に差はみられなかった。

2. 全自動遺伝子検査装置を用いた段階希釈検体の測定

今回のモニタリングに用いたPS法はTMA法を原理とした定性試験であり,高感度であるものの定量検査ではない。そこで,第7波ピーク時及び第8波収束時の検体を対象に,添加試料の希釈系列を作製し,PS法による測定を試みた。その結果,2022年8月9日採水分をみると,原液では強陽性が19件,弱陽性が1件,陰性が0件,10倍希釈液では強陽性が17件,弱陽性が2件,陰性が1件,100倍希釈液では強陽性が5件,弱陽性が8件,陰性が7件であり,希釈倍率を上げていくことで強陽性の割合が少なくなる傾向がみられた。また,各採水日の100倍希釈液の結果を比較すると,第7波ピーク時(新規陽性者数,2022年8月9日:30,891人,8月23日:24,331人)では強陽性は5件と7件,第8波収束時(2023年3月7日:791人,3月14日:744人)ではともに0件であり,感染者数に応じて減少する傾向がみられた。

	第7波(ピーク時)						第8波(収束時)					
	2022年8月9日			2022年8月23日			2023年3月7日			2023年3月14日		
都内新規陽性者数 (7日間移動平均)	30,891人			24,331人			791人			744人		
沈渣液希釈倍率	1倍	10倍	100倍	1倍	10倍	100倍	1倍	10倍	100倍	1倍	10倍	100倍
区部	PL-1	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性
	PL-2	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性
	PL-3	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性
	PL-4	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性
	PL-5	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性
	PL-6	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性
	PL-7	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性
	PL-8	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性
	PL-9	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性
	PL-10	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性
	PL-11	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性
	PL-12	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性
	PL-13	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性
多摩地域	TPL-1	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性
	TPL-2	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性
	TPL-3	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性
	TPL-4	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性
	TPL-5	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性
	TPL-6	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性
	TPL-7	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性	強陽性

図2. 全自動遺伝子検査装置法による段階希釈検体の試験結果

下水中の SARS-CoV-2 遺伝子量から感染状況を把握する試みは、世界各地で実施されており、Ando らの報告¹³⁾では、ウイルス量と感染者数が相関することが報告されている。一方で、下水試料からの SARS-CoV-2 遺伝子の検出法には種々のマニュアルが公開されているが^{9, 10)}、下水中の SARS-CoV-2 遺伝子量の測定において、濃縮・遺伝子抽出工程に PEG や陰電荷膜法を使うなど操作が煩雑で多検体処理に適さず、継続的に検査を行うにはコンタミネーションリスクが高いといった課題があった。我々が検討している PS 法は、操作が遠心分離のみと簡便で、遺伝子抽出から検出までを全自動で実施できることから、多検体においても迅速に処理が可能であり、またコンタミネーションリスクが極めて低い利点がある。さらに、他の先行研究では採水ポイントが数カ所である場合が多いが、本研究では都内の 20 カ所の下水を広域に検討できる点が強みである。

今回、都内広域の検体を集めモニタリングする方法を試みた結果、感染者の増加により強陽性が増え、感染者の減少により弱陽性または陰性が増える傾向がみられた。このことから PS 法は感染状況を反映していることが考えられ、下水中の SARS-CoV-2 モニタリングに有用であると考えられた。さらに、希釈系列を用いた検査法を組み合わせることで、流行状況を多面的に把握できる可能性が示唆された。

COVID-19 は 2023 年 5 月より定点把握対象疾患となり、定点医療機関あたりの患者報告数を用いて感染動向をモニタリングしている。一方で、最近では軽症や無症候の COVID-19 患者が多く、必ずしも検査を実施しないことから、感染者数が過少評価される可能性がある。そのため、潜在的な感染者を含めた評価が可能な下水中のウイルスモニタリングは、感染実態を把握できる有用なモニタリングツールの一つとして有用と考えられる。

一方で、mRNA ワクチン接種や自然感染により、必ずしも症状が出ない不顕性感染が増加していると考えられ、全数報告時のパラメーターと下水中のウイルス量は必ずしも合致しなくなることが予想される。今後、本法による包括的なモニタリング調査を継続的に行うことで、定点把握データとの関連性について検討していきたい。

ま と め

2021 年 5 月から 2023 年 3 月までに都内水再生センター 20 カ所（区部 13 カ所、多摩地域 7 カ所）で採取された下水を対象に、全自動遺伝子検査装置を用いた SARS-CoV-2 モニタリングを実施した。その結果、区部では第 6 波以前は 203 件中 86 件、第 6 波以降は 741 件中 738 件、多摩地域では第 7 波以降の 142 件中 137 が陽性となった。さらに、希釈系列検体を用いた比較検討を行った結果、流行状況を多面的に把握できる可能性が示唆された。

文 献

- 1) 東京都：新型コロナウイルス感染症対策サイト、
<https://stopcovid19.metro.tokyo.lg.jp/>（2023 年 5 月 8 日現在）
- 2) WHO : Water, sanitation, hygiene, and waste management for SARS-CoV-2, the virus that causes COVID-19, July 29, 2020. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/333560/WHO-2019-nCoV-IPC_WASH-2020.4-eng.pdf（2023 年 7 月 31 日現在。なお本 URL は変更または抹消の可能性がある）
- 3) Haramoto, M., Malla, B., Thakali, O., et al.: *Sci Total Environ*, **737**:140405, 2020. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140405（2023年7月31日現在）
- 4) Westhaus, S., Weber, FA., Schiwiy, S., et al.: *Sci Total Environ*, **751**:141750, 2021. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141750（2023 年 7 月 31 日現在）
- 5) Rimoldi, G. S., Stefani, F., Gigantiello, A., et al.: *Sci Total Environ*, **744**:140911, 2020. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140911（2023 年 7 月 31 日現在）
- 6) 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
- 7) Ahmed, W., Bivins, A., Bertsch, MP., et al.: *Curr Opin Environ Sci Health*, **17**, 82–93, 2020.
- 8) Kim, S., Kennedy, LC., Wolfe, MK., et al.: *Environ Sci Water Res Technol*, **8**, 757–770, 2022.
- 9) 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 ver 1.1, https://www.niid.go.jp/niid/images/vir2/polio/SC2_sewage_manual_1.pdf（2023年7月31日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある）
- 10) 日本水環境学会 COVID-19 タスクフォース：下水中の新型コロナウイルス遺伝子検出マニュアル, https://www.jswe.or.jp/aboutus/pdf/SARS-CoV-2_RNA_Detection_Manual_for_Wastewater.pdf（2023 年 7 月 31 日現在。なお本 URL は変更または抹消の可能性がある）
- 11) Kitamura, K., Sadamasu, K., Muramatsu, M., et al.: *Sci Total Environ*, **763**:144587, 2021. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144587（2023年7月31日現在）
- 12) 熊谷遼太，河上麻美代，林 真輝，他：東京健安研 7 年報，**72**, 87–92, 2021.
- 13) Ando, H., Iwamoto, R., Kobayashi, H., et al.: *Sci Total Environ*, **843**:157101, 2022. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.157101（2023年7月31日現在）

Sewage monitoring of SARS-CoV-2 in Tokyo (May 2021–March 2023)

Ryota KUMAGAI^a, Wakaba OKADA^a, Fumi KASUYA^a, Sachiko HARADA^a, Yuu YAOITA^a, Michiya HASEGAWA^a, Akihiro TAKAHASHI^b, Kinji YAMADA^b, Teru YAMAMOTO^b, Shinya SAITO^b, Kouki MURAYAMA^b, Shou KAWACHI^b, Takushi FUJIWARA^a, Hirofumi MIYAKE^a, Mami NAGASHIMA^a, and Kenji SADAMASU^a
(Reviewed by Akihiko HIRAI^c)

In Tokyo, more than 4 million cases of novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) had been confirmed as of May 2023. Since severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is shed in saliva, sputum, and feces of COVID-19 patients, SARS-CoV-2 RNA is often present in sewage systems. Thus, several countries worldwide have been using the levels of SARS-CoV-2 RNA in sewage as a monitoring tool for COVID-19 prevalence. In this study, SARS-CoV-2 monitoring was conducted using a fully automated genetic testing system on influent sewage collected at 20 wastewater plants across Tokyo (13 in wards and 7 in the Tama area) from May 2021 to March 2023. Our results showed that 86 of the 203 samples before the 6th wave and 738 of the 741 samples after the 6th wave in the ward areas tested positive for SARS-CoV-2, whereas 137 of the 142 samples after the 7th wave in the Tama area tested positive for the same. Furthermore, we established a comprehensive SARS-CoV-2 monitoring method in Tokyo by testing diluted samples of sewage sediment.

Keywords: wastewater, COVID-19, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, sediment high-throughput, fully-automated platform

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan
^b Bureau of Sewerage, Tokyo Metropolitan Government
^c Junior College of Kagawa Nutrition University