

都内における下水中の新型コロナウイルスモニタリング調査と変異株解析

熊谷 遼太^a, 岡田 若葉^a, 矢尾板 優^a, 原田 幸子^a, 高橋 久美子^a, 高橋 明宏^b, 山田 欣司^c
北村 清明^d, 山本 央^d, 斎藤 慎哉^e, 村山 康樹^f, 橋本 旬也^d, 河内 奨^e, 長島 真美^a, 貞升 健志^g
(外部機関査読者: 濱崎 光宏^h)

下水中の新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) モニタリングは, COVID-19 の流行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ている. 今回, 2023 年 5 月から 2024 年 5 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半定量的 SARS-CoV-2 検査を実施し, ヒートマップ形式でウイルス量の変化をモニタリングした. その結果, 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, 流行状況のモニタリングツールとして有用性が示唆された. さらに, 下水検体を対象にリアルタイム PCR 法による遺伝子変異検出 (スパイク蛋白 G339D/H) を試みたところ, 都内感染者の変異株流行状況を反映した遺伝子変異の変遷が確認された.

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

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, 未だ収束には至っていない. 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, 以前のように実際の感染者数として COVID-19 の流行規模を把握するのが困難となっている.

下水中の SARS-CoV-2 モニタリングは, COVID-19 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, 米国やオランダ等の諸外国や国内においても, 既にモニタリング調査が実施されている²⁻⁴⁾. 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, 各地点の下水中ウイルス量の増減傾向がホームページで逐次公開されている²⁾. また, 国内では, これまでに流行予測調査事業の感染源調査として下水中のポリオウイルスサーベイランスが実施されてきたが, 令和 6 年度より SARS-CoV-2 サーベイランスが新たに追加された⁴⁾.

下水中からの SARS-CoV-2 の濃縮や遺伝子抽出・検出においては, ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法等の濃縮法を使用した従来法に加え, 凝集剤を用いた濃縮法や Preamp とリアルタイム PCR 法を組み合わせた高感度な遺伝子検出法が新たに検討され, それに基づいたマニュアルが公開されている⁵⁾. 一方で, 下水中の変異株解析は, 下水中のウイルス量が少ないことや複数の変異株が混在しているため, 次世代シーケンサーを用いた全ゲノム遺伝子解析が困難であり, 検査法の検討が続けられている.

東京都健康安全研究センターでは以前より下水中の SARS-CoV-2 検査に取り組み, 下水中の SARS-CoV-2 モニタリングについて, 多検体処理やコンタミネーションリスクの低下を目的とし, 全自動遺伝子検査装置を用いた検査手法を確立し^{6,7)}, 本法を用いて, 都内 20 地点の下水処理施設で採取された下水を対象にした広域的なモニタリング調査を行ってきた. また, 本法の検査残渣を対象にリアルタイム PCR 法による変異検出を試み, 下水検体の変異株の流行状況を反映する可能性を示唆した⁸⁾.

今回, 我々は, 都内 20 地点の下水処理施設で採取され

^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 東京都水道局浄水部水質担当課

160-0023 東京都新宿区西新宿2-8-1

^c 東京都下水道局森ヶ崎水再生センター

143-0013 東京都大田区大森南5-2-25

^d 東京都下水道局施設管理部環境管理課

160-0023 東京都新宿区西新宿2-8-1

^e 東京都下水道局流域下水道本部技術部施設管理課

190-0011 東京都立川市高松町2-26-12

^f 東京都下水道局西部第二下水道事務所浮間水再生センター

115-0051 東京都北区浮間4-27-1

^g 東京都健康安全研究センター微生物部

^h 福岡県保健環境研究所

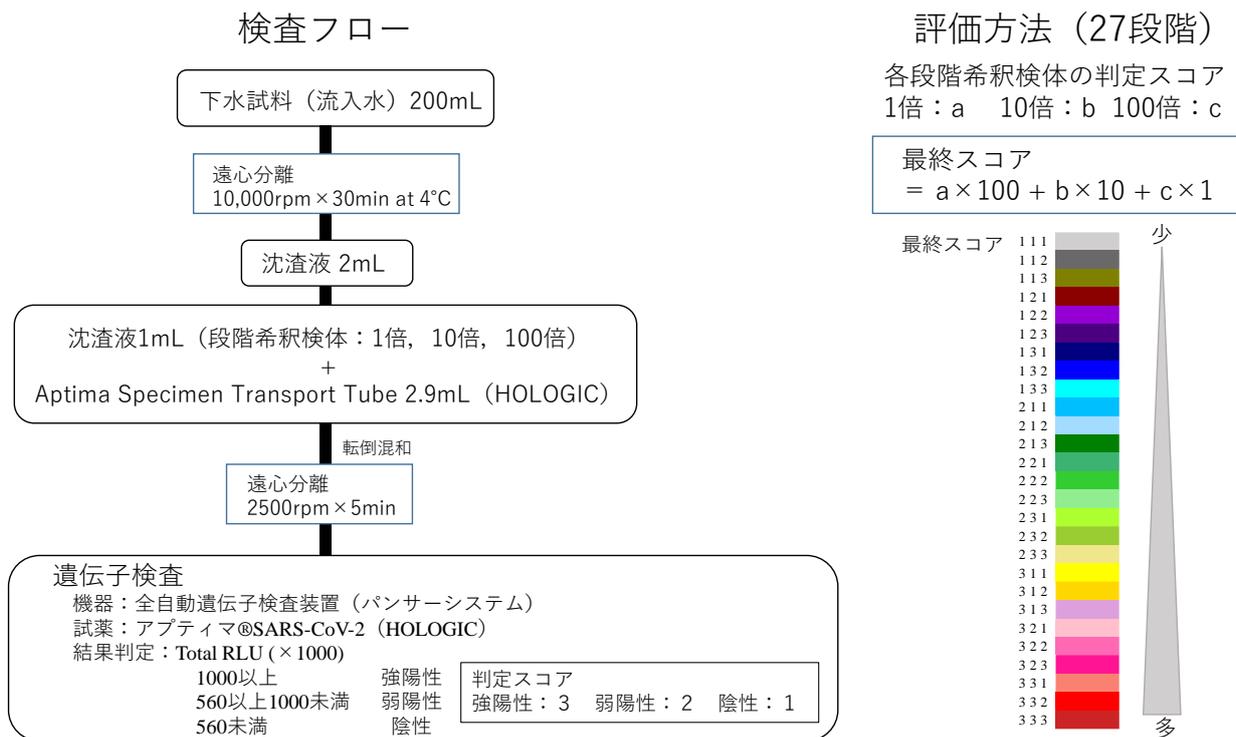


図1. 全自動遺伝子検査装置による半定量的モニタリング法検査フロー及び評価方法

た下水を対象に、全自動遺伝子検査装置による段階希釈検体の測定を行い、検査結果をスコア化、ヒートマップ形式で評価することにより、半定量的なモニタリング法の構築を試みた。さらに、下水中のSARS-CoV-2の変異株の流行状況を把握するため、オミクロン株のBA.2.75系統株やXBB系統株等が保有するスパイク蛋白変異(D339H)を検出するリアルタイムPCR法により下水中のSARS-CoV-2遺伝子変異サーベイランスを実施した。

実験方法

1. 全自動遺伝子検査装置による半定量モニタリング

1) 供試材料

2023年5月第3週から2024年5月第4週までに都内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55回（週1回）、グラブサンプリングにて下水200mLを採水し、1,100件の試料を供試した。

2) 下水試料の前処理

試料200 mLを4°Cで10,000 rpm×30分間の遠心分離を行い、沈渣及び上清に分離した後、沈渣液 2mL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⁷⁾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（HOLOGIC社）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）。また、結果判定は既報⁷⁾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。

4) 段階希釈検体を用いた半定量的モニタリングの検討

沈渣液を10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1.3)で示した手法に従い、各希釈系列試料を測定した（図1）。各地点の測定結果は、各希釈系列の結果をもとに27段階のスコア化し、モニタリング地点の評価を積み上げ図の形式を用いてヒートマップで示した。

2. 下水中SARS-CoV-2を対象とするリアルタイムPCRを用いた変異株モニタリング

1) 供試材料

2022年1月から2023年8月までに区部水再生センター13地点で採水された下水試料を対象に、実験方法1.1)-3)で得られた検査残渣から抽出したRNA抽出液 955件を対象とした。

2) リアルタイムPCR法（Real-time RT-PCR Allelic Discrimination法）

長島ら⁹⁾によるSARS-CoV-2のS領域D339H変異検出系のプライマー、プローブを用いた。標的遺伝子の検出は、RNA抽出液3 μL、各プライマー10 μM 0.5 μL、各プローブ10 μM 0.5 μL および One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (Takata)を使用し（最終反応量 25 μL）、52°C5分、95°C10秒反応させた後、95°C5秒、60°C30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（サーモフィッシャー）を使用し、

Genotyping モードで検査を行った。すなわち、リアルタイムPCR反応の前後に蛍光強度の測定を行い、G339HをX軸に、G339DをY軸にそれぞれの蛍光強度差をプロットし、X軸側にプロットされるものをG339H変異、Y軸側にプロットされるものをG339D変異、間にプロットされたものをG339D/H mixと判定した。

あった。弱陽性であった8件は2023年10月3日から11月28日の期間で確認され、定点あたりの患者数は1.17人から3.62人であった。また、陰性は2023年11月7日、2024年4月30日で採水された各1地点のみであり、その際の定点あたりの患者数は1.2人、1.49人であった。定点あたりの患者数の大幅な減少では、弱陽性または陰性が検出される傾向が確認されたが、多くの感染者が潜在的にいる状況では詳細な流行状況の把握が困難であるため、段階希釈検体測定による半定量的なモニタリングを試みた。

結果及び考察

1. 全自動遺伝子検査装置による下水モニタリング

1) 全自動遺伝子検査装置による定性モニタリング

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た(図2)。1,100件中強陽性が1,090件(99.1%)、弱陽性が8件(0.7%)、陰性が2件(0.2%)で

2) 段階希釈検体測定による半定量的モニタリング

都内20地点で採水された検体の10倍段階希釈液(1倍, 10倍, 100倍)を作製し、それぞれPS法による測定を行った。さらに、各判定結果に基づき、27段階にスコア化したし、

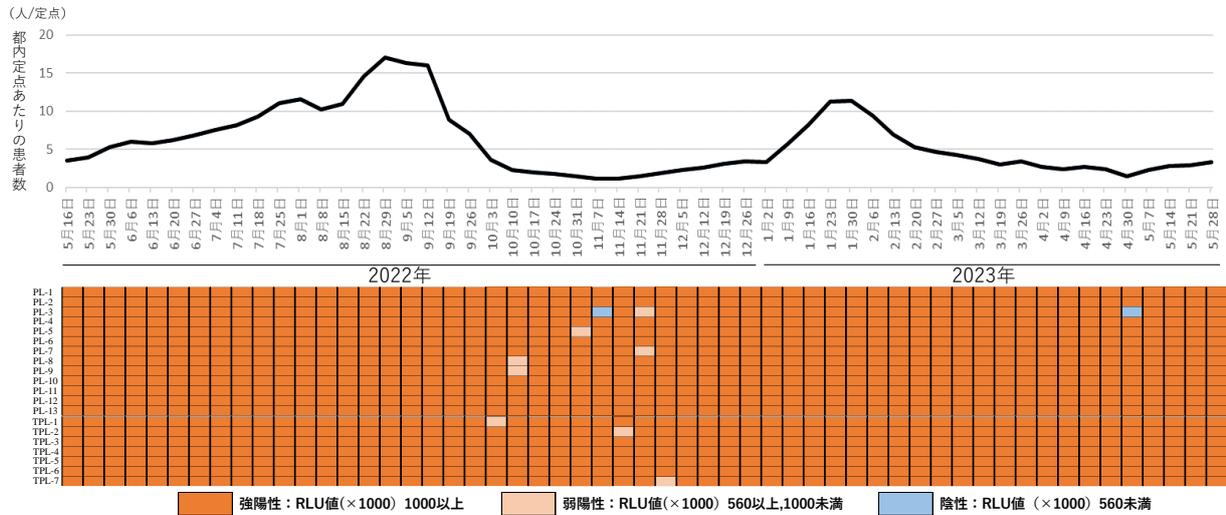
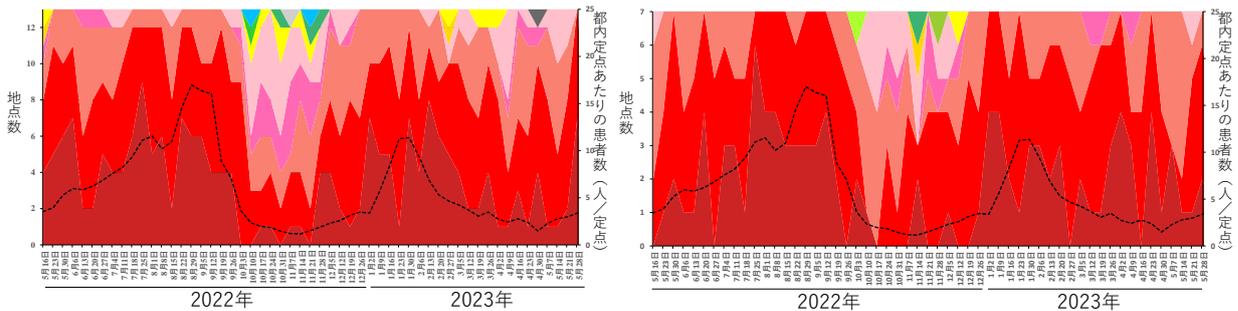


図2. 全自動遺伝子検査装置法による定性モニタリング

(a) 区部13地点

(b) 多摩地域7地点



(c) 都内20地点 (区部13地点+多摩地域7地点)

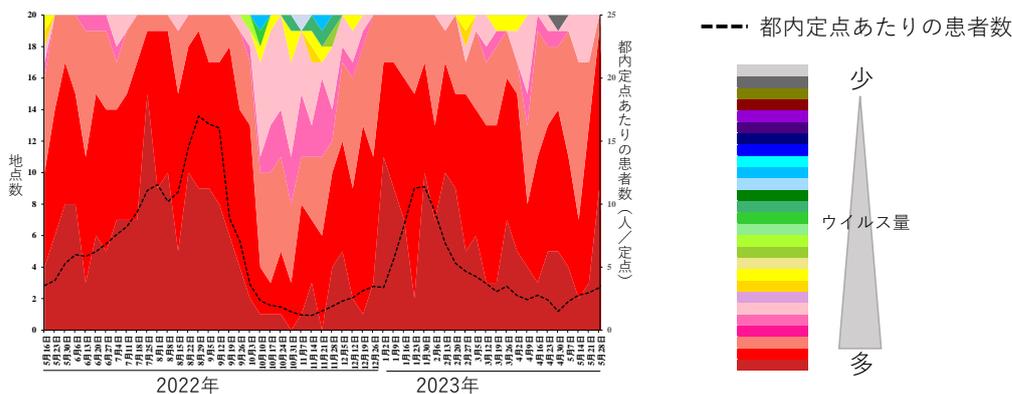


図3. 全自動遺伝子検査装置法による半定量モニタリング(ヒートマップ図)

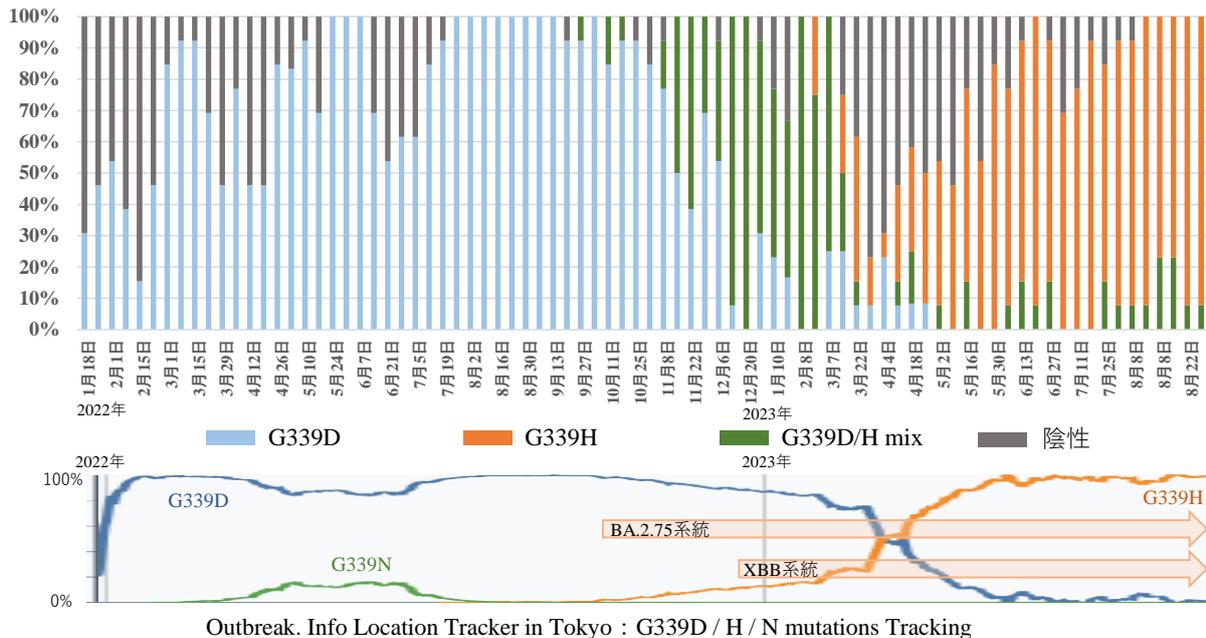


図4. 都内下水における SARS-CoV-2 G339D/H 変異サーベイランス

ヒートマップ形式化した。

区部13地点，多摩地域7地点，都内20地点のいずれにおいても，都内定点医療機関あたり患者数とヒートマップ図で連動する動きが確認された（図3）。また，都内20地点のモニタリング結果は，区部13地点，多摩地域7地点のモニタリング結果と比較し，解像度の高いモニタリング図が構築された。

2023年の5採水日（6月13日，8月15日，10月10日，11月7日，12月12日），2024年の11採水日（1月23日，2月20日，3月12日，26日，4月9日，23日，30日，5月7日，14日，21日，28日）については，前日または当日が雨天であった。特に，2023年の2採水日（6月13日，8月15日）及び2024年の3採水日（1月23日，4月9日，4月14日）において，ヒートマップ図でのウイルス量の落ち込みが認められた。

下水を対象としたウイルスモニタリング法は，雨水による検体希釈の影響のほか，阻害物質や水温等の様々な環境要因がモニタリングデータに影響を与えることが報告されている。そのため，多くの補正（放水量補正等）が行われているが，それでも単独の定点のみのスコア評価及びモニタリングは困難と考えている。本法のように，都内20地点を対象とした広域的な視点で解析を行うことで，雨天状況にも左右されない都内全体のCOVID-19流行のトレンド把握が可能と考えられた。

2. リアルタイムPCRによるD339H変異サーベイランス

区部13地点の下水試料から抽出されたRNAを対象に，リアルタイムPCR法を用いてD339H遺伝子変異のモニタリング調査を実施した（図4）。

2022年1月から2022年9月20日までの期間ではBA.2系統株やBA.5系統株が保有するG339D変異のみが検出されていたが，2022年9月27日採水分にG339D/H mix（以降，mix）

が1地点から検出されて以降，mixの割合が増加し，2023年5月9日にはG339Hの割合（BA.2.75系統株及びXBB系統株）が100%（陰性を除く）となった。また，Outbreak.info内のLocation Tracker¹⁰による都内感染者のS領域G339D/H/N変異のモニタリングデータにおいても，2022年10月から徐々にG339Hの割合が増加し，2023年6月に入れ替わることがモニタリングされている。このことから，下水を対象としたリアルタイムPCR法による遺伝子変異のモニタリングは，ある程度においては，都内感染者の変異株の流行状況を把握することができると考えられた。なお，本モニタリング期間におけるG339H変異は，BA.2.75系統株やXBB系統株が保有している遺伝子変異のみであり，それ以外の詳細な型別は今回は実施していない。

SARS-CoV-2には複数の変異株が存在しているため，次世代シーケンサー（NGS）を活用した詳細な遺伝子解析が求められるが，解析に時間を要することや下水中のウイルス量が少なく，NGS解析そのものが困難である場合が多い。一方で，リアルタイムPCR法を用いた変異サーベイランスは，変異株に特徴的な遺伝子変異のみの検出ではあるが，迅速かつ検出感度が高いため，変異株のリアルタイムなモニタリングが可能となる。WHOが定めるvariants of interest（VOIs）やvariants under monitoring（VUMs）¹¹等の変異株における特徴的な遺伝子変異を随時確認し，ターゲットとすべき遺伝子変異の変更や追加等の検出系をアップデートしていくことで，注視すべき変異株の流行状況の把握も可能と考えられた。

新型コロナウイルス感染症患者は，不顕性感染や軽症患者も多く必ずしも医療機関を受診しなくなった。そのため，定点あたりの患者数から想定される感染状況は過小評価される可能性がある。今回，我々が，構築した下水中のSARS-CoV-2モニタリング法は，都内全域における

COVID-19流行のトレンド把握が可能であり、感染症発生動向調査における定点患者報告数と組み合わせることで、より正確な流行状況の把握につながるものと考えられた。さらに、リアルタイムPCR法を用いた遺伝子変異サーベイランスを行うことで、注視すべき変異株の浸潤状況についてもモニタリングが可能であると考えられた。

我々は、下水中のSARS-CoV-2を対象に全自動遺伝子検査装置を用いた半定量的なモニタリング法を構築するとともに、リアルタイムPCR法による遺伝子変異モニタリング法の有用性を確認した。今後、これらの継続的な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、他のウイルスへの応用ができるようリアルタイムPCR法等を用いたモニタリング法及び評価法の構築についても検討していきたい。

ま と め

2023年5月第3週から2024年5月第4週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を用いたSARS-CoV-2半定量モニタリングを実施し、ヒートマップ評価を行った。その結果、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。さらに、本検査法残渣から抽出したRNAを対象にリアルタイムPCR法による遺伝子変異検出法を試みたところ、変異株流行状況を把握できる可能性が示唆された。

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) CDC : National Wastewater Surveillance System (NWSS), <https://www.cdc.gov/nwss/rv/COVID19-nationaltrend.html> (2024年7月1日現在. URLは変更または抹消の可能性はある)
- 3) RIVM : Coronavirus particles in wastewater, <https://www.rivm.nl/en/wastewater-research/covid-19> (2024年7月1日現在. URLは変更または抹消の可能性はある)
- 4) NIJIs : 下水中の新型コロナウイルス調査プロジェクト, <https://nijis.jp/> (2024年7月1日現在. URLは変更または抹消の可能性はある)
- 5) 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 新技術マニュアル, https://www.jswe.or.jp/aboutus/pdf/SARS-CoV-2_RNA_Detection_Manual_for_Wastewater_2.pdf (2024年7月1日現在. URLは変更または抹消の可能性はある)
- 6) 熊谷遼太, 河上麻美代, 林 真輝, 他 : 東京健安研七 年報, **72**, 87-92, 2021.
- 7) 熊谷遼太, 岡田若葉, 糟谷 文, 他 : 東京健安研七 年報, **74**, 75-79, 2023.
- 8) Kumagai, R., Kawakami, M., Kasuya, F., *et al.*: *VirusDisease*, **35**, 520-524, 2024. doi: <https://doi.org/10.1007/s13337-024-00880-z> (2024年7月1日現在)
- 9) 長島真美 : 東京健安研七 年報, **73**, 15-24, 2022.
- 10) Outbreak.info : SARS-CoV-2 (hCoV-19) Mutation Reports Location Tracker, <https://outbreak.info/location-reports?loc> (2024年7月1日現在. URLは変更または抹消の可能性はある)
- 11) WHO : Tracking SARS-CoV-2 variants, <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (2024年7月1日現在. URLは変更または抹消の可能性はある)

**Sewage Monitoring of SARS-CoV-2 in Tokyo (May 2023–May 2024): Semi-quantitative Monitoring
Using a Fully Automated Genetic Testing Platform**

Ryota KUMAGAI^a, Wakaba OKADA^a, Yuu YAOITA^a, Sachiko HARADA^a, Kumiko TAKAHASHI^a,
Akihiro TAKAHASHI^b, Kinji YAMADA^c, Kiyooki KITAMURA^c, Teru YAMAMOTO^c, Shinya SAITO^c,
Kouki MURAYAMA^c, Junya HASHIMOTO^c, Shou KAWACHI^c, Mami NAGASHIMA^a, and Kenji SADAMASU^a
(Reviewed by Mitsuhiro HAMASAKI^d)

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) monitoring in sewage is expected to be one of the tools for observing the prevalence of COVID-19. In this study, we conducted semi-quantitative SARS-CoV-2 testing using a fully automated genetic testing (transcription mediated amplification [TMA]) platform on influent sewage collected at 20 wastewater treatment plants in Tokyo (13 in Tokyo 23 wards and 7 in the Tama region) from May 2023 to May 2024, and monitored changes in virus levels using a heat map. As a result, the number of patients per fixed-point medical institution in Tokyo was linked to the heat map, suggesting the usefulness of the test as a tool for understanding the epidemic situation. Furthermore, we attempted to detect genetic mutations (Spike protein G339D/H) in sewage samples using a real-time PCR method, and confirmed that the changes in genetic mutations reflected the prevalence of variant strains among infected persons in Tokyo.

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 Bureau of Waterworks, Tokyo Metropolitan Government
2-8-1, Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023, Japan
^c Bureau of Sewerage, Tokyo Metropolitan Government
2-8-1, Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023, Japan
^d Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences