

# 次世代シーケンス技術を活用した下水中のウイルス遺伝子情報の網羅的検出による感染症の流行評価

諏訪 守・山下洋正・李 善太・重村浩之

## 1. はじめに

下水中には、その地域の人々が流した様々な情報が含まれており、ノロウイルスなどの遺伝子情報と地域の感染性胃腸炎の流行状況との関連性について、土木研究所では2018年から調査研究を実施してきた。新型コロナウイルス感染者のふん便等からもウイルス遺伝子が検出されることから、感染症の流行を機に、その遺伝子情報は下水疫学（Wastewater-based epidemiology）として活用が期待されている。

地域に張り巡らされた下水管きよの下水を採水し、ウイルス遺伝子の検出結果から感染症の拡大地域を絞り込むことができれば、地域の感染症拡大防止に貢献できる可能性がある。また、地域の感染者数の把握には、医療機関と自治体の保健部局の連携のもと多大な労力を要しているため、遺伝子情報が活用できれば、感染症の流行状況の迅速かつ効率的な把握に繋がると考えられる。さらに、下水処理場でもウイルスの流入状況を踏まえ必要に応じて消毒の強化等を行うことにより、水系におけるリスクの管理に寄与できる可能性がある。このようにウイルス遺伝子情報は、「地域の感染症拡大防止への貢献」や「感染症の流行状況の効率的な把握」に活用できる可能性がある。

本報告では、下水試料を利用して地域における感染症の効率的な流行評価を行う手法の提案を目的に、次世代シーケンス技術（Next-Generation Sequencing、以下「NGS技術」という。）を活用した下水中のウイルス遺伝子情報の網羅的な検出法の有効性を検討した。

## 2. 新型コロナウイルスの流行による国における下水道での取組例

国土交通省では、下水道における新型コロナウイルスに関する調査検討委員会を設置し、遺伝子情報を活用した保健衛生部局との連携や、感染対策のための政策決定への支援方法などについてガイドラ

イン（案）を作成している<sup>1)</sup>。また、内閣府が行った下水サーベイランスの実証事業での取組結果では、遺伝子調査によって1週間程度先の感染傾向を把握できる可能性があるとされている<sup>2)</sup>。

## 3. 研究方法

### 3.1 下水試料の採水

下水試料の採水は、A下水処理場を対象に2018年8月から2021年4月の間（2020年2月から7月を除く）に行った。この間、新型コロナウイルスのパンデミックにより感染症の流行状況に大きな変化が生じた。このため、新型コロナウイルス感染症の流行前、流行中の下水試料として分けて評価を行った。

#### 3.1.1 新型コロナウイルス感染症の流行前における試料

新型コロナウイルス感染症流行前の試料は、2018年8月から2020年1月の間に流入下水を月1回採水したものとし、18試料を得てウイルス遺伝子情報の検出に供した。

#### 3.1.2 新型コロナウイルス感染症の流行中における試料

流行中での試料は、流入下水、下水処理水および放流水を2020年8月（処理水と放流水は9月から採水）から2021年4月までの間に月4回採水した。下水処理過程の新型コロナウイルスの消長について、知見が少なかったため処理水等を加えた。下水処理水は生物学的高度処理法の嫌気無酸素好気法（A2O法）によるものであり、放流水は下水処理水を次亜塩素酸ナトリウムで消毒したものである。全採水試料の内、下水処理場管内での新型コロナウイルス患者報告数（週報）の増加前と増加中の期間に採水した試料として、流入下水では12試料、処理水と放流水は各々15試料を選定した。処理水等は流入下水に比較してウイルスヒット数が少なくなることが想定されたため、選定した15の試料を3～4試料ごとに混合することで各4試料に調整した。流入下水と処理水等を合わせて計20試料をウイルス遺伝子情報の検出に供した。

### 3.2 ウイルス遺伝子情報の検出

#### 3.2.1 ウイルス遺伝子情報の検出法の選定

ウイルス遺伝子情報の一般的な検出法としては、PCR装置（写真-1左）によりウイルス遺伝子を定量するPCR（polymerase chain reaction）法が用いられている。迅速・定量性に優れていることから、土木研究所でも感染性胃腸炎の原因ウイルスの1つであるノロウイルスなどを対象として、下水処理過程での除去性能や環境水での存在実態などの評価に利用しているが、PCR法では複数のウイルスを同時に検出することができない。

一方、NGS技術では、次世代シーケンサー（写真-1右）を用いて様々なウイルスを含む微生物の遺伝子情報を網羅的に取得できる利点を有する。このため、新たな感染症やグローバル化にともなう輸入感染症として、新型コロナウイルスなどの想定外のウイルスを含めた同時検出に適していると考えられる。ただし、ウイルス種の同定には網羅的に取得した遺伝子情報の解析が必要となることから、そのための労力・時間を要する。

今後も新たな感染症等の流行が危惧され、想定外のウイルスにも対応が必要となることが想定されることから、本報告では、NGS技術を活用して下水中のウイルス遺伝子情報を網羅的に検出することとした。



写真-1 PCR装置（左）、次世代シーケンサー（右）

#### 3.2.2 NGS技術によるウイルス遺伝子の検出法

NGS技術によるウイルス遺伝子の検出法の概要を以下に示す。

採水した試料は、ウイルス遺伝子の検出のために図-1に示した前処理を行った。ウイルスを優先的に検出するため、採取した下水試料を0.45 $\mu$ mのメンブレンフィルターによりろ過し、ウイルスより大きな生物（細菌、藻類等）を取り除いた。さらに、ろ過した試料をポリエチレングリコール（PEG）沈殿法により遠心濃縮を行い、濃縮試料中のウイルス濃度を高め、抽出キット・機器により濃縮試料から遺伝子を抽出し、精製を行った<sup>3)</sup>。

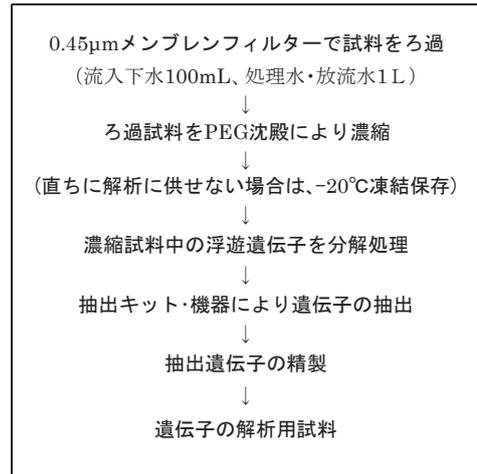


図-1 下水試料の前処理法の概要

抽出した遺伝子は、次世代シーケンサーに供するために、断片化し解読できる長さに調整した。次世代シーケンサーによって得られた解読データをBLAST（Basic Local Alignment Search Tool：局所的な塩基配列の検索手法）検索することでウイルス種を同定した。BLAST検索やウイルス種の同定に至るまでの詳細な手順は文献<sup>3)</sup>のとおりとした。

なお、検出対象としたウイルスは、ヒトに感染し腸管内で増殖、排出される腸管系ウイルスに分類されるウイルスおよび、新型コロナウイルスとした。これらのウイルスは感染者のふん便とともにウイルス遺伝子が下水道へ排出されるためである。

### 3.3 感染症情報の把握と照合

採水期間中における感染症の流行状況の把握は、A下水処理場の処理区域である自治体の衛生部局がHP上で公表している感染症患者報告数の週報を基に整理を行った。

## 4. 研究結果

#### 4.1 新型コロナウイルス感染症の流行前試料のウイルス遺伝子検出結果と感染症情報との照合

新型コロナウイルス感染症の流行前である2018年8月から2020年1月に実施した調査結果を図-2に示す。調査期間中に採水した流入下水から13種のウイルスが検出（ヒット：データベース上に登録されたウイルスの塩基配列と一致した塩基配列が存在しており（図中の縦棒表記）、NGS技術によってウイルス遺伝子の網羅的な検出が可能であった。特にヒット数が高かったウイルスは感染性胃腸炎の原因ウイルスであるノロウイルスであった。各流入下水100mLの試料中から得られた塩基配列の内、ノ

ロウイルスの塩基配列と一致した塩基配列の数（ヒット数）が1~42、同様にサポウイルス（2~29）、アストロウイルス（0~19）であった。この時の感染性胃腸炎患者報告数を図中に折れ線で表記したが、患者報告数とウイルスのヒット数の増減傾向が一致していた。また、2018年12月にノロウイルス等のヒット数の高まりが見られ、その後、患者報告数が増加していた。次いで、感染性胃腸炎原因ウイルス以外のウイルスの検出結果について図-3に整理したが、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、エンテロウイルスがヒット（図中の縦棒表記）した。これらのウイルスは手足口病、ヘルパンギーナの原因ウイルスであることから、これら疾患の患者報告数を図中に折れ線で表記したが、コクサッキーウイルス（ヒット数：1）とエンテロウイルス（1）がヒットした2019年の5、6月以降に手足口病とヘルパンギーナ患者報告数が増加していた。一方で、ウイルスのヒット数が高まっても患者報告者数が増加していない場合（2018年10月）もあったこ

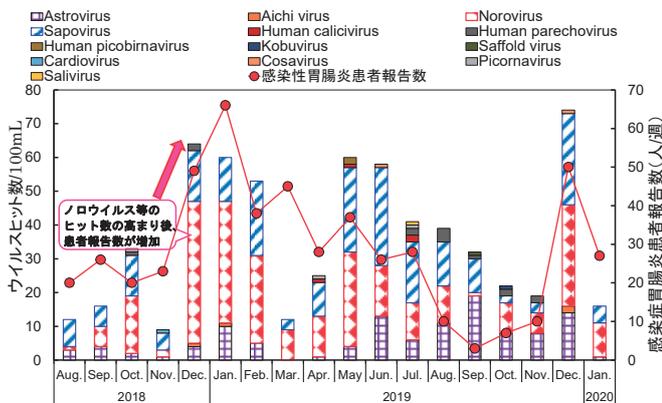


図-2 新型コロナウイルス感染症流行前の調査結果（感染性胃腸炎原因ウイルスヒット数と感染性胃腸炎患者報告数）

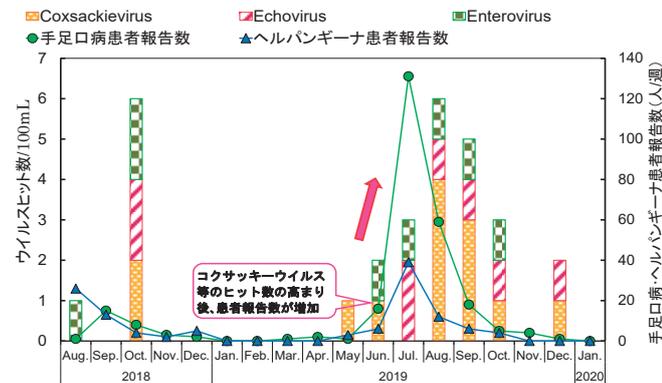


図-3 新型コロナウイルス感染症流行前の調査結果（手足口病等の原因ウイルスヒット数と手足口病・ヘルパンギーナ患者報告数）

とから、不顕性感染（感染しても発症しない）の影響も含め、複合的な要因があるものと推定された。

#### 4.2 新型コロナウイルス感染症の流行中試料のウイルス遺伝子検出結果と感染症情報との照合

新型コロナウイルスの流行中であった2020年8月から2021年4月に実施した調査結果を図-4に示す。新型コロナウイルス患者報告数（週報）の増加前後にあたる2020年10月では2試料、11月は3試料を対象にウイルスの検出を試み、その他の月では1試料とした。流入下水から主に検出されたウイルスは新型コロナウイルスであり、ヒット数は1~12であった（図中の縦棒表記。表記のない試料はヒット数が0）。2020年11月にヒット数の高まりが見られ、その後、患者報告数が増加していた。一方、2021年の3月では、ヒット数の高まりに対して患者報告数の大幅な増加が見られず、不顕性感染の影響可能性も考えられた。

なお、下水処理水と放流水の新型コロナウイルスのヒット数は0（不検出）であった。

一方、4.1で示したとおり新型コロナウイルス感染症の流行前の流入下水では、冬季において感染性胃腸炎の原因ウイルスであるノロウイルス、サポウイルスおよび、アストロウイルスのヒット数の高まりが見られたが、新型コロナウイルス感染症の流行中ではこれらのウイルスがヒットされなかった。2020年以降の調査期間中では、新型コロナウイルス感染症が流行し、その拡大防止策としての3密対策を含め数々の対策が実施されていた。その結果、下水処理場の処理区域における各種の感染症患者報告数は、新型コロナウイルスの流行前と比較して感染性胃腸炎患者報告数が概ね半減、手足口病、ヘルパンギーナの患者報告数はほぼ皆

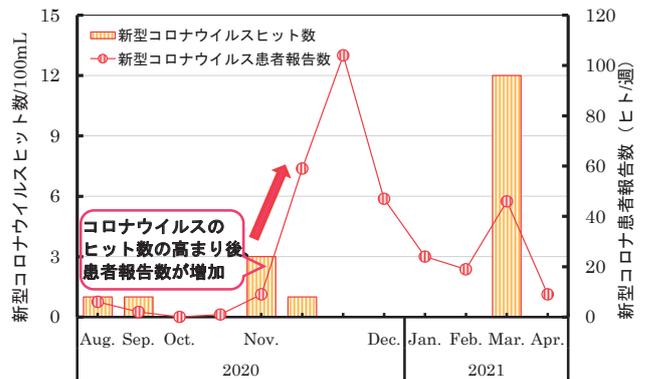


図-4 新型コロナウイルス感染症の流行中の調査結果（新型コロナウイルスヒット数と新型コロナウイルス患者報告数）

無であった。このような感染症の流行状況下のため、流入下水から検出されたヒトを宿主とするウイルスが主として新型コロナウイルスであるものと推定された。

4.1、4.2に示した結果から、NGS技術により下水中のウイルス遺伝子を網羅・継続的に検出することで、様々な感染症の流行状況を同時に評価できるものと考えられた。また、不顕性感染の影響が不明な状況であるが、ウイルスヒット数の高まりの後には、患者報告数が増加する傾向があることから、ウイルス遺伝子の網羅・継続的な検出によって、様々な感染症拡大の兆候を早期に把握できる可能性が見出された。

### 4.3 ウイルスのヒット数と患者報告数の関係

流入下水のウイルスヒット数とその地域における感染症患者報告数の関係について4.1と4.2から得られたデータを基に図-5に整理した。なお、新型コロナウイルス感染症の流行後には、その遺伝子情報がウイルス種の同定のためのデータベースに追加されたため、4.1で得られたウイルスの遺伝子情報は、4.2で用いたデータベースを基に解析を行った。感染症ウイルス遺伝子のヒット数と感染性胃腸炎患者数には明確な正の相関を確認できた。また、新型コ

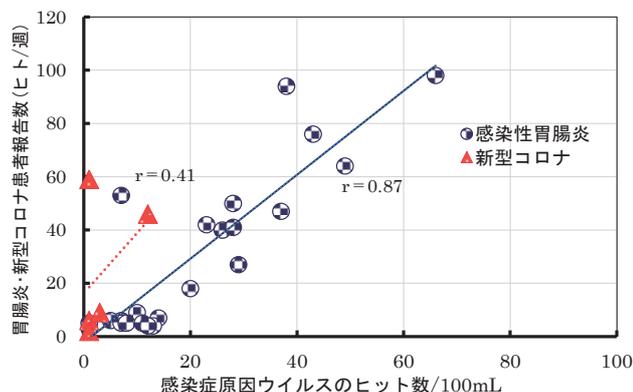


図-5 ウイルスヒット（検出）数と患者報告数の関係

コロナウイルスでも弱い相関を見出しうることから、下水中の感染症原因ウイルスのヒット数により、下水処理場の処理区域における各種感染症患者数の推移を把握できる可能性が示唆された。

## 5. まとめ

本報告では、下水試料を利用して地域における感染症の効率的な流行評価を行う手法の提案を目的に、NGS技術を活用した下水中のウイルス遺伝子情報の網羅的な検出法の有効性を検討した。以下に得られた結果を示す。

- 1) NGS技術により下水中のウイルス遺伝子を網羅・継続的に検出することで、様々な感染症の流行状況を同時に評価でき、各種感染症患者数の推移を把握できる可能性が示唆された。
- 2) ウイルスヒット数の高まりの後には、患者報告数が増加する傾向があることから、ウイルス遺伝子の網羅・継続的な検出によって、様々な感染症拡大の兆候を早期に把握できる可能性が見出された。

なお、本報告の内容は、新型コロナウイルス感染症の流行前後である平成30年から令和3年度にかけ実施した「遺伝子情報を活用した病原微生物の早期検出に関する研究」で得られた成果の一部である。

### 参考文献

- 1) 国土交通省水管理・国土保全局下水道部、新型コロナウイルスの広域監視に活用するための下水PCR調査ガイドライン（案）、令和4年3月22日版。  
<https://www.mlit.go.jp/mizukokudo/sewerage/content/001472805.pdf>
- 2) 内閣官房新型コロナウイルス等感染症対策推進室  
[https://corona.go.jp/surveillance/pdf/summary\\_of\\_results.pdf](https://corona.go.jp/surveillance/pdf/summary_of_results.pdf)
- 3) 令和2年度下水道関係調査研究年次報告書集、土木研究所資料第4423号

諏訪 守



土木研究所 流域水環境研究グループ水質チーム 総括主任研究員、博士（工学）  
Dr. SUWA Mamoru

山下洋正



土木研究所 流域水環境研究グループ水質チーム 上席研究員、博士（工学）  
Dr. YAMASHITA Hiromasa

李 善太



研究当時 土木研究所 iMa RRC 研究員、現 八戸工業高等専門学校 准教授、博士（工学）  
Dr. LEE Suntae

重村浩之



研究当時 土木研究所 iMa RRC 上席研究員、現 国土交通省国土技術政策総合研究所下水道研究部 下水処理研究室長  
SHIGEMURA Hiroyuki