

3 1. 神戸市における流入下水からの新型コロナウイルス・ノロウイルス定量による流行検知

○谷本 佳彦 (神戸市健康科学研究所 感染症部)

伊藤 絵里香 (神戸市健康科学研究所 感染症部)

【研究目的】

現在世界的な流行をもたらしている新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、その原因ウイルス (SARS-CoV-2) が患者の糞便中にも排出されることが知られている。このため、下水中に存在する SARS-CoV-2 の定量を行うことで、その排水地域における COVID-19 患者数を予測できる可能性が期待されている。また、ノロウイルスについては、下水中のウイルス定量結果が地域の感染性胃腸炎報告数と有意に相関することが既に示されている¹。これらのことは、下水中のウイルス定量結果を市民に情報提供し、市民の感染症に対する危機意識を醸成することで、感染症の拡大封じ込め策の行政政策のひとつとして応用できる可能性を示している。本研究では、行政政策としての応用を見据え、下水中のウイルス定量の科学的知見を蓄積することを目的とした。

【材料と方法】

1) 流入下水サンプル採取および RNA 抽出

流入下水は、神戸市建設局下水道部の協力の下に、神戸市内の都市部 2 か所の下水処理場 (処理場 A および B) で、週 1 回スポット採水した。採取したサンプルは、RNA 抽出処理をするまで -20°C で保存した。流入下水サンプル 160 mL を、40 mL ずつ 50 mL チューブ 4 本に分注し、遠心分離 (10,000 × g, 30 min, 4°C) を行って沈殿物 (固形画分) と上清に分けた。固形物は NucleoBond RNA soil (Macherey-Nagel) を用いて RNA を抽出した (以下、Solid RNA)。上清へはポリエチレングリコール 8000 (10%, w/v; Promega) および NaCl (終濃度 1M; Wako) を加え、4°C で一晩ゆっくり攪拌し、遠心分離 (10,000 × g, 60 min, 4°C) した沈殿物をリン酸緩衝液 (pH 7.0, 0.067 mol/L; Nacalai Tesque) 500 μL で再懸濁した。この懸濁液 140 μL から、QIAamp Viral RNA Kit (Qiagen) を用いて RNA 抽出を行った (以下、PEGRNA)。また、濃縮前の流入下水を 140 μL 用いて、QIAamp Viral RNA Kit (Qiagen) で RNA 抽出した (以下、Raw RNA)。

2) リアルタイム PCR によるウイルス定量

ウイルス RNA の定量は、Thermal Cycler Dice Real Time System III (Takara Bio) を用いて、逆転写定量リアルタイム PCR (RT-qPCR) を行った。トウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) の定量には One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (Takara Bio) を、SARS-CoV-2 の定量には

TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems) を用いた。Run ごとにポジティブコントロールから標準曲線を作製し、Ct 値から RNA コピー数を算出した。プライマーは、PMMoV 検出には PMMV-FP1-rev, PMMV-RP1, PMMV-Probe1^{2,3} を, SARS-CoV-2 検出には CDC 2019-nCoV_N1 および CDC 2019-nCoV_N2⁴ を混合したものをそれぞれ用いた。

3) 統計処理

COVID-19 患者数は、神戸市保健所からそれぞれの処理場域内の患者数データを供与いただいた。統計解析は、GraphPad Prism 8 ソフトウェアを用いた。下水処理の RNA コピー数の比較には Mann-Whitney U 検定を、患者数と RNA コピー数の相関係数 (r) は Spearman の相関係数を、患者数と RNA コピー数の関係は線形回帰分析をそれぞれ用いた。

【結果と考察】

1) RNA 抽出評価と回収率

RNA 抽出のインターナルコントロールとして、PMMoV を用いて回収効率の評価を行った。PMMoV はヒトに対する病原性はないが、植物感染性のため、それを摂取するヒトの糞便から多く検出されることで知られており、環境中からの検出率も高い³。PMMoV の定量は、Raw RNA から $1.2 \times 10^9 - 1.6 \times 10^{10}$ copy/L, Solid RNA から $1.5 \times 10^7 - 2.0 \times 10^8$ copy/L, PEG RNA から $3.1 \times 10^7 - 5.5 \times 10^8$ copy/L, の範囲で検出され、Solid RNA に比べて PEG RNA は有意に検出率が高かった (図 1A)。PMMoV のコピー数を基に算出した回収率は、Solid が 0.5–3.8%, PEG が 1.7–20% であり、PEG の方が有意に高かった (図 1B)。これらのことは、PMMoV がノンエンベロップウイルスであり、固形画分よりも上清中での存在率が高いという報告⁵と一致している。また、先行研究において、PMMoV RNA のコピー数は、液体画分では $8.2 \times 10^6 - 3.1 \times 10^8$ copy/L、固体画分では $1.6 \times 10^2 - 1.0 \times 10^7$ copy/L の範囲であった⁶。本研究における PMMoV のコピー数は、過去の研究での範囲から大きく逸脱しておらず、下水の濃縮工程が適切に行われていることが示された。

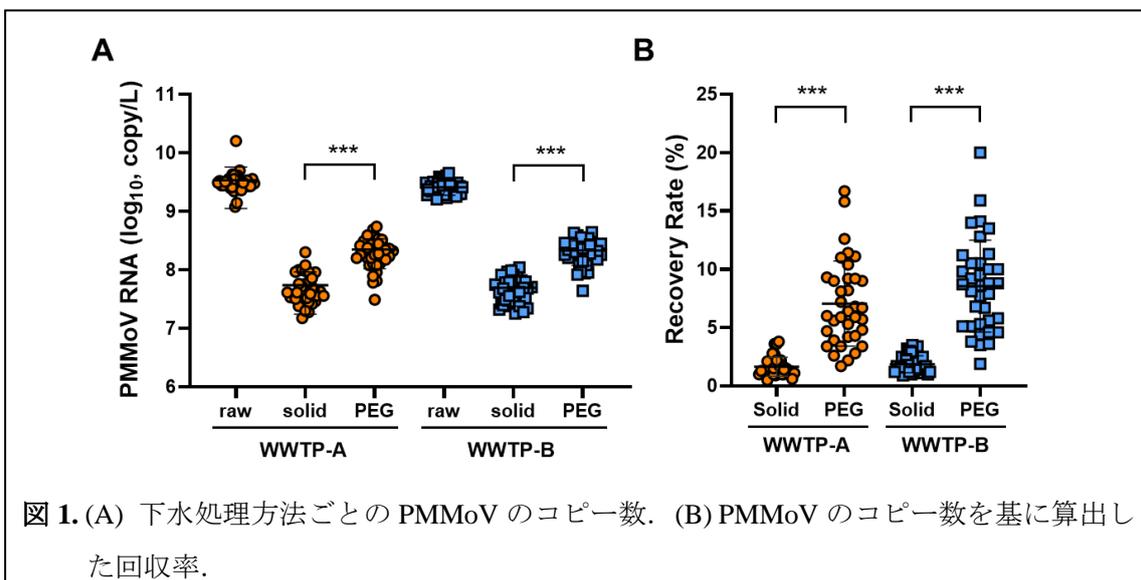
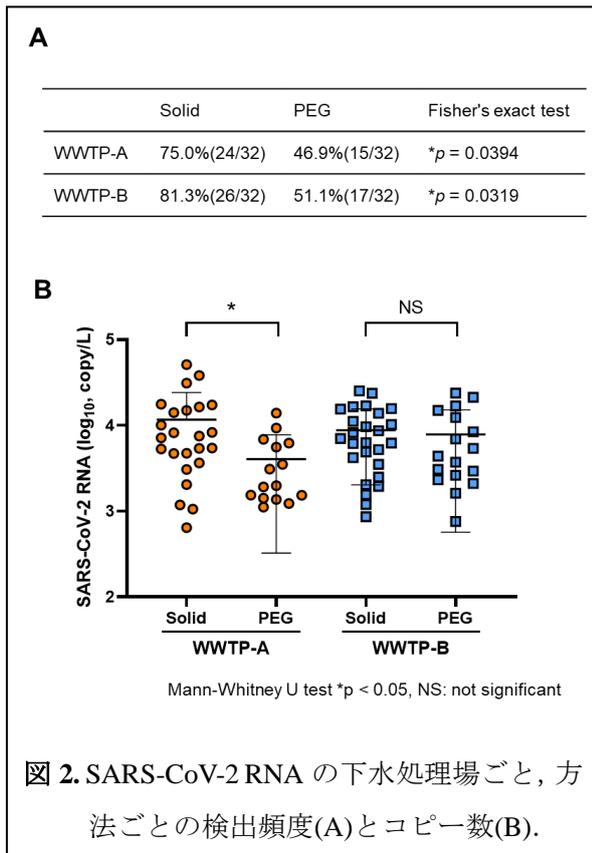


図 1. (A) 下水処理方法ごとの PMMoV のコピー数. (B) PMMoV のコピー数を基に算出した回収率.

2) SARS-CoV-2 RNA の下水分画ごとの検出

Solid RNA および PEG RNA から、それぞれ SARS-CoV-2 の検出を行った。SARS-CoV-2 の検出率は、処理場 A は Solid RNA が 75.0% (24/32), PEG RNA が 46.9% (15/32) であり、処理場 B は Solid RNA が 81.3% (26/32), PEG RNA が 51.1% (17/32) であり、それぞれの処理場において Solid RNA の検出頻度が有意に高かった (図 2A)。また、検出されたサンプルのコピー数を比較すると、処理場 A では Solid RNA の方が有意に高かったものの、処理場 B では有意な差ではなかった (図 2B)。PMMoV とは違い、液相と固相の間に明確な検出率の差が認められず、このことは先行研究においても同様の傾向がみられており、両者を回収することが推奨されている⁷。



3) SARS-CoV-2 RNA 濃度と流域内 COVID-19 患者数の関係

固形画分中の SARS-CoV-2 RNA コピー数は、2021年2月24日から2021年10月27日の間に報告された処理場流域内 COVID-19 症例数と高い相関があった (処理場 A: $r = 0.8205$, $p < 0.001$; 処理場 B: $r = 0.8482$, $p < 0.001$; 図 3)。COVID-19 陽性患者数は、他国でも下水中の SARS-CoV-2 RNA と相関している⁸⁻¹⁰が、SARS-CoV-2 RNA 検出が COVID-19 患者数より先に増加するか、同時かについては結果が異なっている。下水中のウイルス量は、いくつかの研究^{8,11-14}では臨床データより4日から2週間先行した一方で、他の研究^{6,15}では時間差はないと報告された。我々のデータでも、COVID-19 の症例数と SARS-CoV-2 の RNA 量を相関させたところ、時間差はなかった。これらの傾向の違いは、感染者数の認知期間の違い、すなわち、パンデミックの初期には報告が比較的遅くなるため感染者数の把握が難しく、ウイルス RNA の検出が感染者数に先行するためであると思われる。神戸市では、積極的疫学調査を積極的に実施し、感染者数の把握に努めていたため、患者数の報告までの時間差が少なく、ウイルス RNA 量と患者数は明らかな時間差なく相関した可能性がある。また、処理場 B からの SARS-CoV-2 RNA の検出は、処理場 A よりも早く起こっていた。実際、処理場 B 流域の COVID-19 患者数は処理場 A より早くピークに達する傾向にあった。

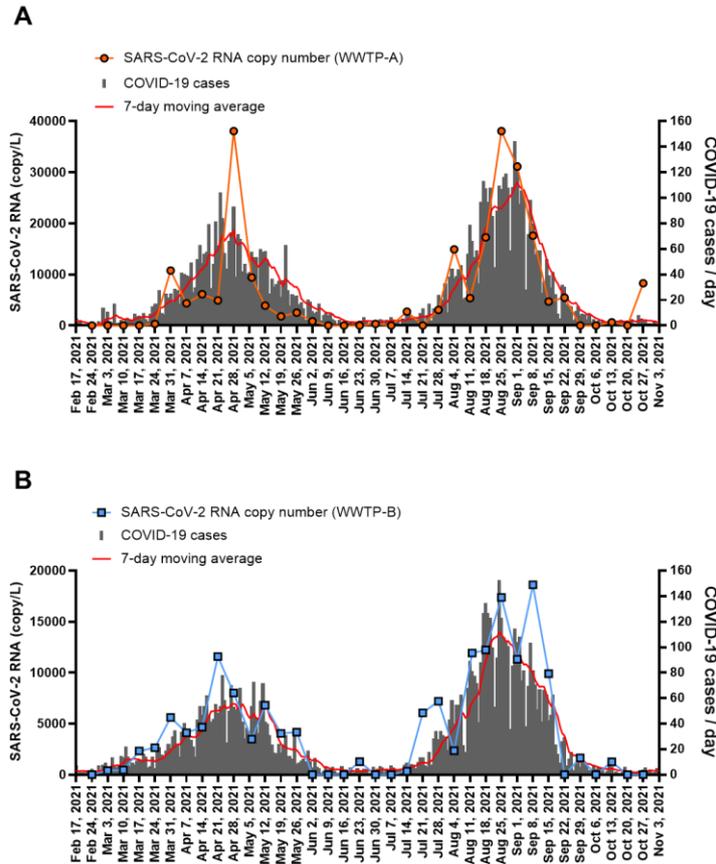


図 3. SARS-CoV-2 RNA (Solid RNA)の下水処理場 A (A) および B (B) におけるコピー数と流域内患者数。

下水処理場流域における SARS-CoV-2 RNA と COVID-19 症例の関係を線形回帰分析で評価した (図 4)。本研究では、RT-PCR による SARS-CoV-2 RNA の検出限界は 2.5 copy/reaction であり、固形物画分では 625 copy/L と算出された。また、勾配を用いて計算した 10 万人あたりの COVID-19 の捕捉限界は、処理場 A で 0.75 例、処理場 B で 1.20 例であった。先行研究では、1 日の COVID-19 陽性率が 1 万人あたり 1 人未満でも検出可能であったこと¹⁶や、下水処理場流域地域の人口の約 0.09 および 0.12% で検出できたこと¹⁷が報告されている。日本の研究では、5 つの下水処理場から採取した排水サンプル中の SARS-CoV-2 は、流域圏で 10 万人あたり 10 人以上の COVID-19 の確定患者が発生すると検出されやすくなるが、10 万人あたり 1 人の患者数になる前でも検出可能だったことが報告されている¹⁸。今回の研究では、COVID-19 症例の捕捉は、これまでの研究と同等かそれ以上であることがわかった。また本研究では、10 万人当たりの COVID-19 症例が 0.77–34.4 人の範囲にあるとき、RNA 濃度は 7.6×10^2 – 2.4×10^4 copy/L の範囲で検出された。先行研究では、10 万人あたりの COVID-19 の症例数が 4.8–57.3 人のときに 1.7×10^3 – 3.8×10^5 copy/L¹⁹、0.1–100 人のときに 1.2×10^1 – 2.2×10^3 copy/L⁸、30–174 人のときに 3.0×10^3 – 2.0×10^4 copy/L²⁰であったことが報告されている。また、Medema らは、人口中の COVID-19 感染者数と下水中の SARS-CoV-2 RNA 濃度のシミュレーションモデルを報告し、10 万人あたり 10–100 人の症例で RNA コ

ピー数は約 10^2 – 10^5 copy/L と推定している²¹。今回の結果は、これらの先行研究と一致し、RNA 濃度が COVID-19 感染者数を反映していることが示唆された。

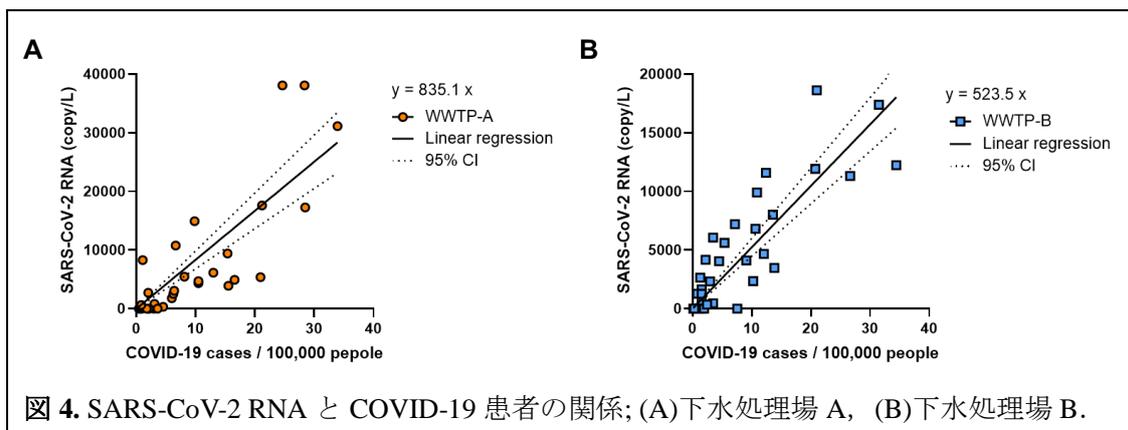


図 4. SARS-CoV-2 RNA と COVID-19 患者の関係; (A)下水処理場 A, (B)下水処理場 B.

【まとめ】

今回の研究で評価した COVID-19 の第 4 波と第 5 波中における下水中 SARS-CoV-2 RNA のデータは、症例数のモニタリングに有用であり、下水中の SARS-CoV-2 RNA の検出が、COVID-19 感染の動向をモニターし予測するために使用できることを示している。このモニタリングは、ワクチン接種により臨床現場で COVID-19 と診断される患者数が少なくなっても、貴重なデータを提供する可能性がある。今後は、ワクチンの集団接種によって無症状者の増加が予想され、地域社会における実際の患者数の把握が困難になる可能性がある。地域内の感染者数、無症状者数を把握できる下水道疫学の有用性は今後ますます高まると思われる。我々の研究結果は、下水道流域内での対応や健康警報の発令など、下水道モニタリングの公衆衛生への活用の可能性を示している。

【今後の課題】

ノロウイルスについては、一部の研究サンプルで定量と遺伝子型別を行い一定の傾向を見出したが、本研究期間内に全てを行うことができず本報告書からは割愛した。さらなる研究を進め、下水道疫学がノロウイルス検知についても有用であるかどうかを確かめたい。

【謝辞】

下水サンプリングに際して多大なご協力をいただきました。神戸市建設局の児玉 かなな様、森本隆夫様 (現環境局)、岡 直弘様、森 智裕様、白井 さつき様に深謝申し上げます。また、本研究の遂行に協力していただいた、当研究所感染症部の宮本 園子様 (現保健所保健課)、森 愛様、野本 竜平様、中西 典子様、岩本 朋忠様、および多大な助言をいただきました同生活科学部の向井 健悟様 (現感染症部) に感謝申し上げます。

【論文発表】

以上の結果について、第4波第5波の新型コロナウイルスの動向を論文発表した。

Yoshihiko Tanimoto, Erika Ito, Sonoko Miyamoto, Ai Mori, Ryohei Nomoto, Noriko Nakanishi, Naohiro Oka, Takao Morimoto, Tomotada Iwamoto. (2022). SARS-CoV-2 RNA in wastewater was highly correlated with the number of COVID-19 cases during the fourth and fifth pandemic wave in Kobe City, Japan. *Front. Microbiol.* 13:892447. doi: 10.3389/fmicb.2022.892447

【参考文献】

- [1] Kazama, S., Miura, T., Masago, Y., Konta, Y., Tohma, K., Manaka, T., et al. (2017). Environmental surveillance of Norovirus genogroups I and II for sensitive detection of epidemic variants. *Appl. Environ. Microbiol.* 83. doi:10.1128/AEM.03406-16.
- [2] Haramoto, E., Kitajima, M., Kishida, N., Konno, Y., Katayama, H., Asami, M., et al. (2013). Occurrence of pepper mild mottle virus in drinking water sources in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(23), 7413–7418. doi: 10.1128/AEM.02354-13.
- [3] Zhang, T., Breitbart, M., Lee, W. H., Run, J. Q., Wei, C. L., Soh, S. W., et al. (2006) RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol.* 4(1), e3. doi: 10.1371/journal.pbio.0040003.
- [4] Centers for Disease Control and Prevention (2020) 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) real-time rRT-PCR panel primers and probes. U.S. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primerprobes.html>.
- [5] Ye, Y., Ellenberg, R. M., Graham, K. E., and Wigginton, K. R. (2016). Survivability, partitioning, and recovery of enveloped viruses in untreated municipal wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 50, 5077–5085. doi:10.1021/acs.est.6b00876.
- [6] Kitamura, K., Sadamasu, K., Muramatsu, M., and Yoshida, H. (2021). Efficient detection of SARS-CoV-2 RNA in the solid fraction of wastewater. *Sci. Total Environ.* 763:144587. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144587
- [7] Ahmed, W., Simpson, S. L., Bertsch, P. M., Bibby, K., Bivins, A., Blackall, L. L., et al. (2022). Minimizing errors in RT-PCR detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA for wastewater surveillance. *Sci. Total Environ.* 805:149877. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149877
- [8] Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R., and Brouwer, A. (2020). Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in sewage and correlation with reported COVID-19 prevalence in the early stage of the epidemic in the Netherlands. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 7, 511–516. doi: 10.1021/acs.estlett.0c00357
- [9] Carrillo-Reyes, J., Barragán-Trinidad, M., and Buitrón, G. (2021). Surveillance of SARS-CoV-2 in sewage and wastewater treatment plants in Mexico. *J. Water Process Eng.* 40:101815. doi: 10.1016/j.jwpe.2020.101815,101815

- [10] Wurtz, N., Lacoste, A., Jardot, P., Delache, A., Fontaine, X., Verlande, M., et al. (2021). Viral RNA in city wastewater as a key indicator of COVID-19 recrudescence and containment measures effectiveness. *Front. Microbiol.* 12:664477. doi: 10.3389/FMICB.2021.664477
- [11] Randazzo, W., Truchado, P., Cuevas-Ferrando, E., Simón, P., Allende, A., and Sánchez, G. (2020). SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Res.* 181:115942. doi: 10.1016/J.WATRES.2020.115942
- [12] Trottier, J., Darques, R., Ait Mouheb, N., Partiot, E., Bakhache, W., Deffieu, M. S., et al. (2020). Post-lockdown detection of SARS-CoV-2 RNA in the wastewater of Montpellier, France. *One Heal* 10:100157. doi: 10.1016/J.ONEHLT.2020.100157
- [13] Claro, I. C. M., Cabral, A. D., Augusto, M. R., Duran, A. F. A., Graciosa, M. C. P., Fonseca, F. L. A., et al. (2021). Long-term monitoring of SARS-COV-2 RNA in wastewater in Brazil: a more responsive and economical approach. *Water Res.* 203:117534. doi: 10.1016/j.watres.2021.117534
- [14] Wu, F., Xiao, A., Zhang, J., Moniz, K., Endo, N., Armas, F., et al. (2022). SARS-CoV-2 RNA concentrations in wastewater foreshadow dynamics and clinical presentation of new COVID-19 cases. *Sci. Total Environ.* 805:150121. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2021.150121
- [15] Peccia, J., Zulli, A., Brackney, D. E., Grubaugh, N. D., Kaplan, E. H., Casanovas-Massana, A., et al. (2020). Measurement of SARS-CoV-2 RNA in wastewater tracks community infection dynamics. *Nat. Biotechnol.* 38, 1164–1167. doi: 10.1038/S41587-020-0684-Z
- [16] Wilder, M. L., Middleton, F., Larsen, D. A., Du, O., Fenty, A., Zeng, T., et al. (2021). Co-quantification of crAssphage increases confidence in wastewaterbased epidemiology for SARS-CoV-2 in low prevalence areas. *Water Res.* X. 11:100100. doi: 10.1016/j.wroa.2021.100100
- [17] Chavarria-Miró, G., Anfruns-Estrada, E., Martínez-Velázquez, A., Vázquez-Portero, M., Guix, S., Paraira, M., et al. (2021). Time evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in wastewater during the first pandemic wave of COVID-19 in the metropolitan area of Barcelona, Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 87, e02750–e02720. doi: 10.1128/AEM.02750-20
- [18] Hata, A., Hara-Yamamura, H., Meuchi, Y., Imai, S., and Honda, R. (2021). Detection of SARS-CoV-2 in wastewater in Japan during a COVID-19 outbreak. *Sci. Total Environ.* 758:143578. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2020.143578
- [19] D’Aoust, P. M., Mercier, E., Montpetit, D., Jia, J. J., Alexandrov, I., Neault, N., et al. (2021). Quantitative analysis of SARS-CoV-2 RNA from wastewater solids in communities with low COVID-19 incidence and prevalence. *Water Res.* 188:116560. doi: 10.1016/j.watres.2020.116560
- [20] Westhaus, S., Weber, F. A., Schiwy, S., Linnemann, V., Brinkmann, M., Widera, M., et al. (2021). Detection of SARS-CoV-2 in raw and treated wastewater in Germany – suitability for COVID-19 surveillance and potential transmission risks. *Sci. Total Environ.* 751:141750. doi:

10.1016/J.SCITOTENV.2020.141750

- [21] Medema, G., Been, F., Heijnen, L., and Petterson, S. (2020b). Implementation of environmental surveillance for SARS-CoV-2 virus to support public health decisions: opportunities and challenges. *Curr. Opin. Environ. Sci Health*. 17, 49–71. doi: 10.1016/j.coesh.2020.09.006

【経費使途明細】

使 途	金 額
NucleoBond RNA soil (Macherey-Nagel) 2 箱	99,990 円
One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (Takara) 2 箱	89,980 円
コニカルチューブ 50 mL (Falcon) 2 箱	40,730 円
マイクロチューブ 1.5 mL (ワトソン) 2 箱	11,220 円
マイクロピペット 200 μ L (ニチリョー) 1 本	28,160 円
マイクロピペット 20 μ L (ニチリョー) 1 本	28,600 円
振込手数料	1,320 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円