

4. 環境水中 RS ウイルスサーベイランスに基づく

RS ウイルス感染症流行予測モデルの構築

○谷河 翠 (宮城県立こども病院 リウマチ・感染症科)
桜井 博毅 (宮城県立こども病院 リウマチ・感染症科)
馬場 啓聡 (東北大学病院 総合感染症科)
金森 肇 (東北大学病院 総合感染症科)
西山 正晃 (山形大学農学部)

【研究目的】

下水環境中の呼吸器合胞体ウイルス (respiratory syncytial virus: RSV) の実態を明らかにし、下水環境中の RSV 検出状況と地域における RSV 感染症の流行状況とを比較検討することで、下水環境中の RSV サーベイランスに基づく RSV 感染症流行予測モデルを構築する。

【研究の必要性】

RSV は年齢を問わず生涯に渡り人間の気道に顕性感染を起こし、乳児、免疫不全者、高齢者などでは重症化する可能性がある。6 か月未満児の感染例の最大 1~2%が入院し、5 歳未満児の急性呼吸器感染症による入院の最大 3 分の 1 が RSV に起因するとされる他、60 歳以上の急性呼吸器疾患の外来患者の 11%から RSV が検出され、50 歳以上の入院例の死亡率は 6~8%であり 7 日以上入院リスク増加、感染から 1 年以内の死亡率の増加はインフルエンザにも勝るとの報告もあり、RSV の臨床上・公衆衛生上の影響は大きい。重症化予防のためのモノクローナル抗体の投与時期の選定、一般市民向け感染予防の啓蒙、検査診断の適応判断、ワクチン投与の時期決定等には遅滞なく RSV 感染流行初期を覚知することが重要であるが、昨今は RSV 感染症の流行時期に変動がみられ、流行予測が困難となっている。RSV 感染症の流行状況を迅速かつ適格に把握する方法は未だ確立しておらず、RSV 感染症流行サーベイランスは世界的課題である。

【研究計画】

下水に含まれる病原体濃度から集水域の集団における感染者数を推定する下水疫学 (WBE: Wastewater-based epidemiology) は、個人への検査負担なしに集団全体の情報収集が可能であり、ポリオウイルス、ノロウイルス、A 型肝炎、COVID-19 等で有用性が報告されている。我々はこの疫学手法の RSV 感染症への応用可能性を検討した。すなわち、仙台市内環境水中の RSV を検出、流行状況と照合し、両者の相関性を示すことが出来れば、環境水サーベイランスによる RSV 流行予測の確立に繋がる可能性があると考えた。

本研究実施の適否は倫理的、科学的、医学的妥当性の観点から宮城県立こども病院の倫理委員会が審査し、研究機関長の承認を得た。また倫理委員会で承認の得られた情報公開資料を当院ホームページに掲載することにより情報公開を行った。

【実施内容・結果】

仙台市南浦生浄化センターにて 2019 年 7 月から 11 月に月 2 回採取した各日 2 系統（1 系統：合流式、仙台市内中心部、2 系統：分流式）の流入下水中の RSV-RNA 濃度を、PEG 法及びリアルタイム RT-PCR 法により定量的に評価し、同期間の集水域における RSV 患者（感染症発生動向調査に基づく定点報告）数の推移の関係性を比較検討した。

プライマー及びプローブは、既報および国立感染症研究所の RSV 病原体検出マニュアルを参考に米国 CDC 法の配列を用いた。検出感度およびウイルス回収率評価のため、対照として Bacteriophage phi6 を用いた。

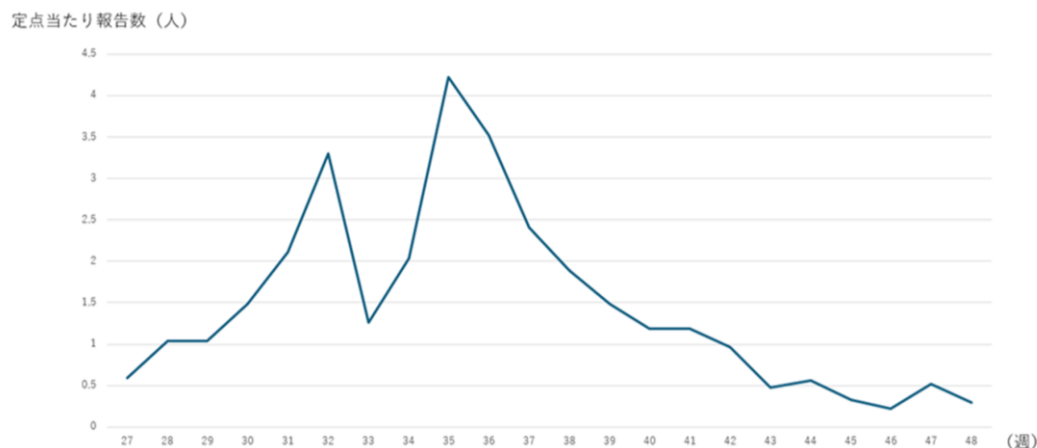
研究期間 5 ヶ月中に得られた下水サンプル合計 20 検体を解析した（表 1）。

プロセスコントロールとして用いた Bacteriophage phi6 は全試料で 1%以上の回収率を満たしており、本研究で用いた流入下水検体においてウイルスの回収は問題なく行えることが確認された。一方で RSV に関しては、臨床における検出プロトコルに基づき Ct 値 40 以降を棄却すると大部分のサンプルから RSV は検出されていないという結果であったが、Ct 値が 40 以下を示した 7 月 16 日、8 月 5 日、8 月 26 日、9 月 2 日については、非常に低濃度である可能性が高いもののサンプル中に RSV が存在している可能性が示された。同期間の仙台市 RSV 感染症定点報告数（図 1）と比較すると、最も Ct 値が低いサンプルの採取された 8 月 26 日は仙台市の週当たり定点報告数が 4.22 と 2019 年で最高値となった第 35 週（8 月 26 日～9 月 1 日）に該当し、次いで Ct 値の低かった 8 月 5 日は、同じくピークを呈した第 32 週（8 月 5 日～8 月 11 日）に該当していた。

表 1 仙台市流入下水中 Bacteriophage phi6 および RSV（2019.7～2019.11）

仙台流入下水		Bacterio phage Phi6							RSV						results	
sampling date	系統	Ct値	average of slope						Ct値	average of slope					phi6	RSV
			16.22	19.63	23.00	26.76	30.21	34.41		22.14	25.47	29.03	32.64	36.77		
			10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²		10 ⁶	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	回収率	濃度 (copies/ml)
2019/7/1	1系	33.1	16.43	19.78	23.03	26.87	30.46	34.37		22.20	25.34	29.27	32.91	36.01	21.2%	
2019/7/16		31.9	16.43	19.78	23.03	26.87	30.46	34.37	39.4	22.20	25.34	29.27	32.91	36.01	43.9%	3.2
2019/8/5		35.9	16.00	19.58	23.13	27.02	30.21	34.80		22.11	25.53	28.90	32.51	37.15	2.7%	
2019/8/26		33.5	16.00	19.58	23.13	27.02	30.21	34.80	43.8	22.11	25.53	28.90	32.51	37.15	12.1%	0.3
2019/9/2		31.9	16.00	19.58	23.13	27.02	30.21	34.80	38.0	22.11	25.53	28.90	32.51	37.15	32.4%	11.0
2019/9/17		36.1	16.20	19.54	22.88	26.48	29.99	34.16		22.11	25.53	28.90	32.51	37.15	2.3%	
2019/9/30		33.5	16.00	19.58	23.13	27.02	30.21	34.80		22.11	25.53	28.90	32.51	37.15	11.9%	
2019/10/15		33.2	16.00	19.58	23.13	27.02	30.21	34.80		22.11	25.53	28.90	32.51	37.15	14.0%	
2019/11/5		32.2	16.43	19.78	23.03	26.87	30.46	34.37	43.0	22.20	25.34	29.27	32.91	36.01	37.8%	0.3
2019/11/18		32.9	16.43	19.78	23.03	26.87	30.46	34.37		22.20	25.34	29.27	32.91	36.01	23.3%	
2019/7/1	2系	33.9	16.43	19.78	23.03	26.87	30.46	34.37		22.20	25.34	29.27	32.91	36.01	12.5%	
2019/7/16		32.4	16.43	19.78	23.03	26.87	30.46	34.37		22.20	25.34	29.27	32.91	36.01	32.7%	
2019/8/5		36.1	16.20	19.54	22.88	26.48	29.99	34.16	35.6	22.11	25.53	28.90	32.51	37.15	2.7%	49.9
2019/8/26		34.4	16.20	19.54	22.88	26.48	29.99	34.16	35.3	22.11	25.53	28.90	32.51	37.15	8.1%	58.5
2019/9/2		34.3	16.20	19.54	22.88	26.48	29.99	34.16	40.1	22.11	25.53	28.90	32.51	37.15	8.8%	3.0
2019/9/17		34.7	16.20	19.54	22.88	26.48	29.99	34.16		22.11	25.53	28.90	32.51	37.15	6.8%	
2019/9/30		34.7	16.20	19.54	22.88	26.48	29.99	34.16		22.11	25.53	28.90	32.51	37.15	6.9%	
2019/10/15		33.9	16.20	19.54	22.88	26.48	29.99	34.16		22.11	25.53	28.90	32.51	37.15	11.7%	
2019/11/5		30.7	16.43	19.78	23.03	26.87	30.46	34.37		22.20	25.34	29.27	32.91	36.01	98.0%	
2019/11/18		31.4	16.43	19.78	23.03	26.87	30.46	34.37		22.20	25.34	29.27	32.91	36.01	60.6%	

図1 仙台市 RSV 感染症定点報告数 (2019.7～2019.11)



【考察と今後の課題】

大部分の排水サンプル中の含有 RSV は定量下限値よりも低い濃度であったものの、その濃度と定点報告数とには相関がある可能性が示唆された。この事実は、環境水中 RSV サーベイランスの感染症流行状況予測への応用可能性を支持するものである。

RSV は、感染患者の喀痰、粘液、唾液、便へ排泄されることが示されており、下水中における RSV の存在は明らかにされつつある。一方で、調査対象や RSV の検出方法について定まったものはなく、WBE による RSV サーベイランスの可能性については既報によって結果が異なる。Hughes らは、米国カリフォルニア州サンフランシスコ ベイエリアの都市化地域にある 2 つの公的所有処理施設 (POTW) の下水汚泥中の RSV RNA 濃度と、同州の RSV 検査陽性率との間に強い相関性が認められたと報告している。一方 Ando らは、開発した環境試料中のウイルス核酸の高感度検出技術である EPISENS 法を用いて、札幌市の下水処理場流入水中の RSV RNA の検出を試みたが、検出された RSV RNA 濃度と、同市において報告された RSV 感染症患者発生数との間に相関は見られなかった。このような研究毎の結果の違いは、より検出感度の高いとされる汚泥沈降固体を用いているかどうかといったサンプル採取方法の違いのほか、RSV-A RNA と RSV-B RNA の流行優位性、下水処理場集水域と定点報告対象地域の合致性、ウイルス RNA の抽出・検出方法の違いなど、様々な要因が考えられる。我々も、今後の解析では RSV-RNA の検出過程で Pre-Amplification 行程を行うことにより、検出感度そのものを上昇させることを検討している。

本研究における排水サンプルの多くから RSV が検出されなかった理由の一つとして、サンプル採取期間であった 2019 年は RSV 感染症の流行自体が比較的小規模であったことが可能性として考えられる。今回僅かながら RSV が検出されたサンプルの採取日が定点報告数のピーク期間に含まれていたことから、流行規模の大きさによっては、環境水中により多くの RSV が含まれる可能性が示された。この点について、より大規模な流行がみられた期間における環境水中 RSV 濃度を調べるため、明らかな流行のみられた 2021 年の流入下水における解析を予定している。

また、排泄物中における RSV のウイルス量の少なさが結果に影響した可能性が否定出来ない。糞尿中、排水中における RSV の検出状況については報告自体が少なく、全患者数における排泄物へのウイルス排泄率や排泄期間、排泄ウイルス量など未だ不明な点が多い。RSV と同じく呼吸器感染症である COVID-19 については、原因となる SARS-CoV-2 RNA が感染者の便中に排泄されていること、患者数と排水中の SARS-CoV-2 RNA ウイルスの間に強い相関性が示されている。RSV においても他の呼吸器感染症ウイルス同様、気道分泌物の嚥下によって感染者の便中に含まれると考え、WBE によるサーベイランスの可能性を十分有しているものと推測されるが、一方で RSV 感染症の流行が紙おむつへの排泄を主とする年少者を中心としていることなどが、排水中ウイルス量に影響している可能性などが考えられる。RSV の WBE への適応性を検証するために、今後、実際の RSV 感染患者の排泄物から直接 RSV の検出を試みることで、同一排水サンプル中で RSV RNA と SARS-CoV-2 RNA を検出し比較することなどを検討している。

本研究の現時点での限界として、RSV 検出系の陽性区を設けていないことが挙げられる。一定のウイルスコピー数が存在する検体を検出系に含めることでデータとしての信頼性を担保するため、今後感染患者からの臨床検体を用いた解析を予定している。加えて、検出状況と流行状況について統計学的手法を用いた比較検討を行う予定である。

ワクチンの実用化や長期作用型ヒトモノクローナル抗体の登場など、現在 RSV 感染症予防は過渡期にある。これらの浸透により今後 RSV 感染症は疫学そのものが変化する可能性を孕んでいるが、その疾病負荷を考慮すると、依然としてサーベイランスの重要性は変わらない。引き続き RSV 感染症サーベイランスにおける WBE の有用性を探っていく。

【参考文献】

- Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, et al. N Engl J Med 2009;360:588-98.
- Rha B, Curns AT, Lively JY, et al. Pediatrics 2020;146:e20193611
- Belongia EA, King JP, Kieke BA, et al. Open Forum Infect Dis. 2018;5(12):ofy316.
- Colosia AD, Yang J, Hillson E, Mauskopf J, et al. PLoS One. 2017;12(8):e0182321.
- Ackerson B, Tseng HF, Sy LS, et al. Clin Infect Dis. 2019;69(2):197-203.
- 国立感染症研究所：感染症疫学センター。「感染症発生動向調査 速報データ」(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/idwr.html>)
- Miyama T, Iritani N, Nishio T, et al. Epidemiol Infect. 2021;149:e55.
- 鞍谷沙織, 笠井正志, 大竹正悟 他. 日児誌 2021;125:805-808
- Uda K, Hagiya H, Yorifuji T, et al. BMC Public Health. 2022;22:1517
- ”RSV National Trends”. National Respiratory and Enteric Virus Surveillance System (NREVSS) , Centers for Disease Control and Prevention (CDC) .
<https://www.cdc.gov/surveillance/nrevss/rsv/natl-trend.html>.

Brouwer AF, Eisenberg JNS, Pomeroy CD, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(45):E10625-E10633.

Kazama S, Miura T, Masago Y, et al. Appl Environ Microbiol. 2017;83(9):e03406-16.

McCall C, Wu H, Miyani B, et al. Water Res. 2020;184:116160.

Wu F, Zhang J, Xiao A, et al. mSystems. 2020;5(4):e00614-20.

Fernandez-Cassi X, Scheidegger A, Bänziger C, et al. Water Res. 2021;200:117252.

病原体検出マニュアルヒトオルソニューモウイルス（RSウイルス）国立感染症研究所
<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/RSVirus20230807.pdf>

Suwa R, Kume Y, Kawase M, et al. Pathogens. 2022;11(7):754.

Sarah A. Lowry, Marlene K. Wolfe, Alexandria B. Boehm. medRxiv 2023.02.19.23286146

Hughes B, Duong D, White BJ, et al. Environ Sci Technol. Lett. 2022, 9, 2, 173–178.

Ando H, Ahmed W, Iwamoto R, et al. Sci Total Environ. 2023;880:162694.

Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, et al. Nature. 2020;581(7809):465-469.

Zhang Y, Cen M, Hu M, et al. Clin Transl Gastroenterol. 2021;12(4):e00343.

【経費使途明細】

使 途	金 額
BioRad SsoAdvanced Universal Probes Supermix	119,394 円
BioRad 96well Hard-Shell マイクロプレート	44,352 円
統計解析ソフト StataNow/BE 18	96,800 円
書籍 Fields Virology: RNA Viruses	25,931 円
書籍 Red Book 2024: Report of the Committee on Infectious Diseases, 33rd Edition	20,000 円
合 計	306,477 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円