

〈特集〉

下水中ウイルスの高感度検出技術の開発と社会実装

北 島 正 章

(前)北海道大学 大学院工学研究院
(〒060-8656 北海道札幌市北区北13条西8丁目 E-mail:mkitajima@eng.hokudai.ac.jp)
(現)東京大学 大学院工学系研究科
(〒113-0032 東京都文京区弥生2丁目11-16 E-mail:kitajima.masaaki@gmail.com)

概 要

下水疫学調査は、臨床検査を補完する調査としてCOVID-19パンデミックを契機に社会的に注目と期待を集めているが、国内において社会実装を実現する上では、下水からのウイルスの検出技術の高感度化が必須であった。本稿では、著者らが開発した高感度検出技術であるEPISENS™法の技術開発の経緯と手法の特長に加え、SARS-CoV-2以外の病原体への検出対象の拡張を含めた技術実証の現状を紹介する。本技術は、既に札幌市での下水疫学調査に活用されており、さらなる普及と全国での社会実装の早期実現が期待される。

キーワード：下水疫学, COVID-19, インフルエンザ, EPISENS™法, PCR

原稿受付 2024.1.29

EICA: 28(4) 46-49

1. はじめに

下水検体を対象として新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)等の病原体を検査する「下水疫学調査」(下水サーベイランス)は、臨床検体に依存せずに集団レベルでの感染流行状況の把握が可能な病原体サーベイランス手法として期待と注目を集めている。下水中には、排泄物や分泌物とともにあらゆる感染者から排出された病原体が含まれる。このため下水疫学調査には、症状の有無、受診行動、検査体制等に関わらずバイアスのない客観的かつ連続的なデータを取得することができる、非侵襲的かつ匿名的(個人情報にも踏み込まず)に地域の感染動向を効率良く把握できる、などの多くの利点があり、臨床検査を補完する調査として大きな可能性を有している¹⁾。

欧米においてはCOVID-19パンデミックの初期から国レベルでの下水疫学調査の社会実装が進んでおり、米国ではCDCが主導する形で1,700箇所以上、EU加盟国には合計1,300箇所の下水処理場で調査が実施されている。日本でも令和4年度に内閣官房の実証事業により全国26地方公共団体が参画して下水処理場での調査が実施されるなど、本技術の社会での活用に向けた検討が進められてきている。下水疫学調査は、国内外において今後公衆衛生上の危機に対抗する上で社会として必要とされる重層的・多面的な感染症監視体制を構成する一つの要素として位置付けられつつある。

本稿では、下水疫学調査の社会実装に向けた下水中ウイルスの高感度検出技術の開発と当該技術の実証・

活用事例について、著者らの研究グループの成果を中心に紹介したい。

2. 下水中ウイルスの高感度検出技術の開発

2.1 高感度検出技術の必要性

COVID-19の下水疫学調査は、2020年の流行の初期段階から概念としては社会に受け入れられたものの、実は日本ではその実用化までは課題が山積した状態であった。最も大きな課題は、諸外国に比べて人口あたりの感染者数が少なかった日本では下水中のSARS-CoV-2濃度が比較的low、従来の水中ウイルス検出技術ではほとんどの試料で非検出または定量下限未満になってしまうという検出感度の問題であった。2020年当時、国内でも下水疫学に対する社会からの期待が高まる一方で、処理区域内で明らかに感染が拡大しているにもかかわらず下水からは「非検出」となるため、国内においては下水疫学調査の有効性は限定的との批判を受けることもあり、下水中のSARS-CoV-2の高感度検出法の開発が急務となっていた。

2.2 EPISENS™法の開発

このような状況の中、著者らの研究グループは、下水疫学調査の実用化を目指す塩野義製薬株式会社と2020年10月に共同研究を開始した。この産学共同研究を通じて、上述の技術的課題を克服する下水中ウイルスの高感度検出技術の開発に成功し、同社による下水疫学調査の事業化が実現した。技術開発にあたり、普及に適した技術、または自動化(スループットの最

大化)に適した技術など、いくつかの方向性があった。結果として、異なる方向性のもとで複数の下水中ウイルス高感度検出技術を開発するに至っているが、ここでは普及に適した高感度検出技術として開発した EPISENS™ 法を紹介する。本法にはさらにいくつかのバリエーションがあり、EPISENS-S 法²⁾と EPISENS-M 法³⁾について以下に手法の概要を解説する。

(1) EPISENS-S 法

EPISENS-S 法は、以前は「北大・塩野義法 (仮称)」と呼んでいた下水中ウイルス高感度検出法であり、正式名称として著者が考案した手法名 (Efficient and Practical virus Identification System with ENhanced Sensitivity for Solids) の略称である。なお、「EPISENS™ (北海道大学の登録商標)」には「疫学 (epidemiology) 情報を高感度 (sensitive) に検知 (sensing) する手法」という意味も込めており、二重の意味を持たせている。EPISENS-S 法は、下水試料を遠心分離することにより得られた固形物の沈渣から市販のキットを用いて RNA を抽出し、逆転写・前増幅反応後に定量 PCR により試料中の SARS-CoV-2 RNA 濃度を測定するものである (「EPISENS-S」は、EPISENS for Solids の略称)。シンプル・迅速なプロトコル (最短 6 時間程度) で、特別な機器を必要とせず費用対効果も高く、かつ高感度な下水中 SARS-CoV-2 RNA の検出・定量を実現している²⁾。

手法の開発にあたっては、まず下水中固形物からの市販の RNA 抽出キットを比較検討したところ、RNeasy PowerMicrobiome Kit (現在は廃盤となっており、後継製品は RNeasy Power Fecal Pro Kit) (Qiagen 社) が最も高い性能を示したため、このキットを採用した。逆転写・前増幅 (10 サイクルの PCR) 反応には手間の少ない 1 ステップ法を採用し、前増幅を経ても定量 PCR による SARS-CoV-2 RNA の定量性は保たれることを確認した。また、本手法は下水中の糞便濃度の指標として広く用いられているトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) RNA も併せて定量可能で、PMMoV RNA を内在性コントロールとして使用して定量分析結果の妥当性の評価や SARS-CoV-2 RNA 濃度の正規化 (雨水による希釈等の影響を補正) も可能としている (Fig. 1)。下水処理場において採取した流入下水試料に熱不活化 SARS-CoV-2 を添加し、EPISENS-S 法による検出感度を評価したところ、(公)社日本水環境学会が公表しているマニュアル記載の方法 (ポリエチレングリコール沈殿法・定量 PCR) よりも約 100 倍感度が高いことが確認された (Fig. 1)。

さらに、EPISENS-S 法を使用して札幌市の 2 箇所の下水処理場において流入下水中の SARS-CoV-2

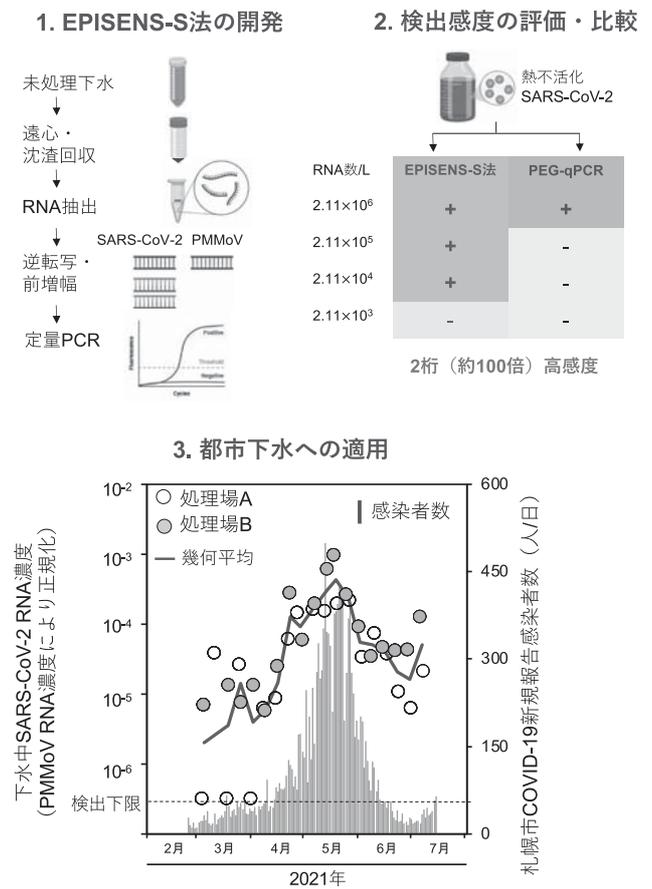


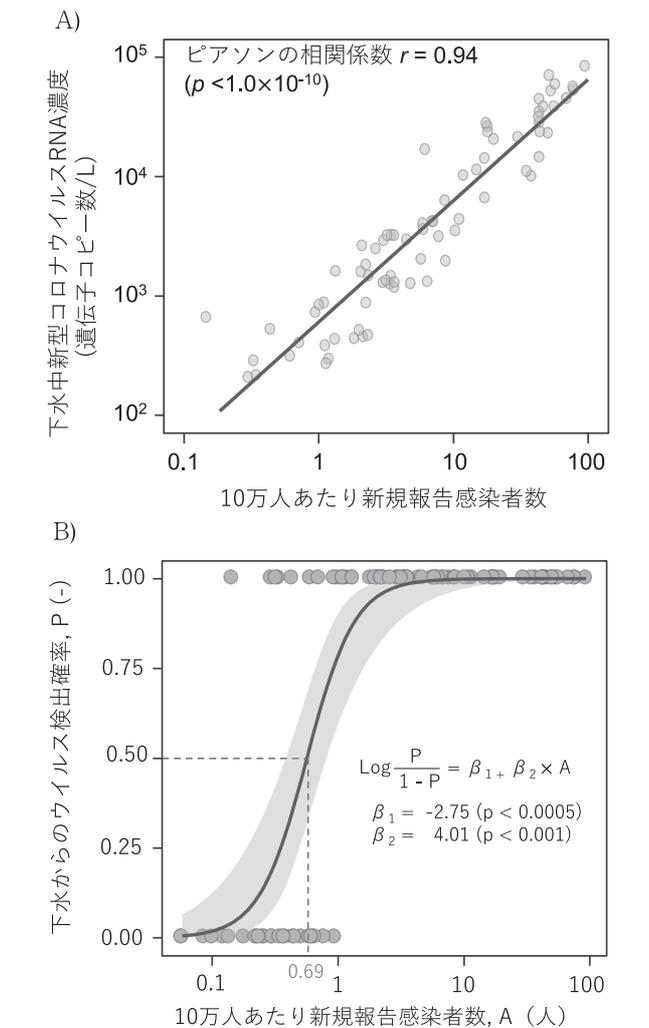
Fig. 1 EPISENS-S 法の開発概要

RNA 濃度の長期定量調査を実施したところ、PMMoV RNA 濃度で正規化した下水中 SARS-CoV-2 RNA 濃度の変動は札幌市内の感染者数の増減と概ね合致し、下水中のウイルス濃度測定により地域の感染動向を把握できることが示された (Fig. 1)。

(2) EPISENS-M 法

EPISENS-M 法は、EPISENS-S 法を改良し更に高感度かつ安定的な下水中ウイルス検出を可能にした技術である。EPISENS-S 法は、下水中の固形物量が少ない場合 (雨水で下水が希釈された場合など) には検出率が低くなってしまうことが課題であった。一方、陰電荷膜で下水を濾過することで SARS-CoV-2 を効率よく捕捉できることが分かっていたため、EPISENS-S 法の遠心による固形物回収工程を陰電荷膜による濾過に置き換え、本手法を完成させた (「EPISENS-M」は、EPISENS for Membrane の略称)。EPISENS-M 法は下水中の固形物画分だけでなく水画分に含まれるウイルスも効率良く回収・検出できることから、固形物が非常に少ない下水処理水等からも高感度にウイルスを検出可能である。

EPISENS-M 法を用いて、札幌市の 2 箇所の下水処理場で採取した流入下水を対象にウイルス定量を調査した結果、下水中ウイルス濃度と新規報告感染者数との間に高い相関関係が認められた (Fig. 2 A)。ロジスティック回帰分析を用いて EPISENS-M 法の感染



A) 下水中新型コロナウイルス RNA 濃度と COVID-19 新規報告感染者数の相関
B) ロジスティック回帰分析による EPISENS-M 法の感染者数ベースの検出感度の評価

Fig. 2 EPISENS-M 法の精度と感度の評価

者数ベースの検出感度を評価したところ、人口 10 万人あたり新規報告感染者 0.69 人/日の流行レベルで下水から SARS-CoV-2 RNA を 50% の確率で検出できることが示された (Fig. 2 B)。これは、EPISENS-M 法が現時点で世界最高レベルの検出感度を誇ることを示すデータと言える。

2.3 EPISENS™ 法の検出対象の拡張

将来のパンデミックに備える意味でも、今後は下水疫学調査の対象を新興・再興感染症や熱帯感染症、薬剤耐性菌などにも拡張していくことが望まれる。現在、EPISENS™ 法のプロトコルを更に修正し、SARS-CoV-2 や PMMoV に限らず、他の様々なウイルス、さらには細菌等にも検出対象を拡張している。これまでに、EPISENS™ 法により下水から検出可能であることが実証されているウイルス等を Table 1 に示す。ウイルス RNA だけでなくウイルス・細菌 DNA にも適用可能であり、感度の高さを活かして従来下水からの検出報告がほとんどないウイルスや細菌も含めて幅

Table 1 EPISENS 法により下水から検出可能なウイルス等

検出対象 ゲノム	微生物名称	疾患等	
RNA	SARS-CoV-2	呼吸器感染症等	
	インフルエンザウイルス	呼吸器感染症等	
	RS ウイルス	呼吸器感染症	
	ヒトメタニューモウイルス	呼吸器感染症	
	ライノウイルス	呼吸器感染症	
	パラインフルエンザウイルス	呼吸器感染症	
	風邪コロナウイルス	呼吸器感染症	
	ノロウイルス	胃腸炎	
	ロタウイルス	胃腸炎	
	アイチウイルス	胃腸炎	
	エンテロウイルス	ヘルパンギーナ、手足口病等	
	PMMoV	糞便指標	
	DNA	エムボックスウイルス	エムボックス (サル痘)
		サイトメガロウイルス	発熱、肝機能異常等
EB ウイルス		発熱、肝機能異常等	
アデノウイルス		胃腸炎、咽頭結膜炎 (いわゆるプール熱) 等	
ボカウイルス		呼吸器感染症、胃腸炎	
肺炎球菌		肺炎	
梅毒トレポネーマ		梅毒	
パラ百日咳菌		パラ百日咳	
crAssphage		糞便指標	
バクテロイデス		糞便指標	

広い病原微生物の下水からの検出に成功している。

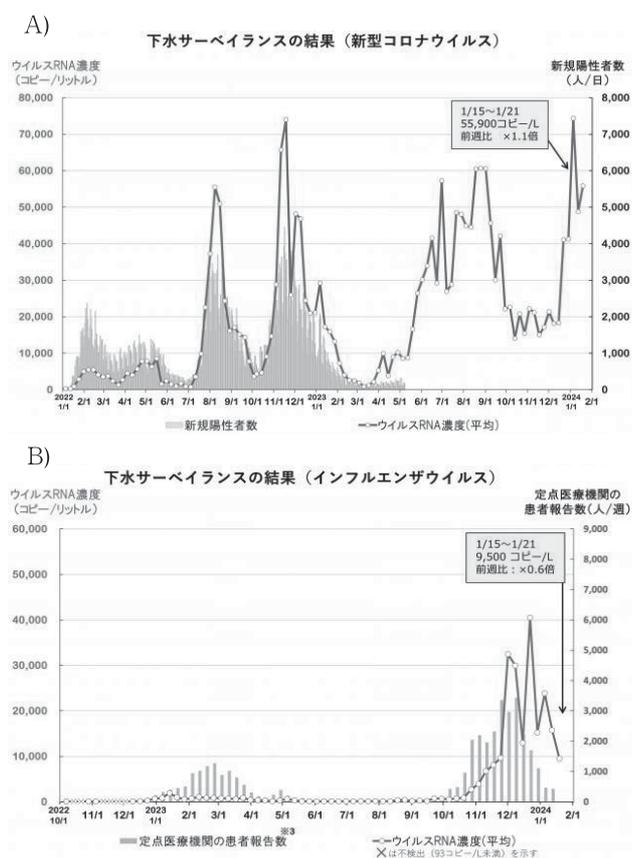
3. 札幌市における下水疫学調査の社会実装

3.1 札幌市による下水疫学調査の概要

EPISENS™ 法の自治体での実際の活用事例として、札幌市の例を紹介したい。札幌市では、自治体からの予算支出を伴う形での全国に先駆けた官学連携の調査研究として、2021 年 2 月より市が予算を組み北海道大学が分析を受託する形での調査が実施されてきた。この委託研究は、下水中の SARS-CoV-2 RNA の濃度と感染者数等との関連性について解析・評価を行い将来的な情報活用方策の検討に繋げることを主な目的としたものであり、札幌市が市内 3 処理場 (創成川、豊平川、新川水再生プラザ) の 5 施設において流入下水を採取し、北海道大学が試料中の SARS-CoV-2 RNA の検出・定量分析を受託する形で調査を実施している。なお、調査対象施設の合計処理人口は同市人口全体の 52% をカバーしており、採水手法は 24 時間コンポジットサンプリングを、分析には EPISENS-S 法を用いている。

3.2 調査結果の活用

調査開始後 1 年半ほどは毎週の調査結果を市内部で共有し感染状況把握の補助的な指標として活用されていたが、2022 年 8 月に同市ウェブサイト⁴⁾での調査結果の公表が始まった。同市は、雨水や融雪水による希釈を流量により補正 (補正濃度 = 測定濃度 × 流入水量 ÷ 晴天時水量) した後、1 週間の全測定結果の幾何平



A) 新型コロナウイルス
B) インフルエンザウイルス

Fig. 3 札幌市のウェブサイトで公表されている下水疫学調査の結果 (2024年1月23日更新)

均値をウェブサイト上で公開している。同年10月からは、下水中インフルエンザウイルスRNA濃度も測定しており、同ウェブサイト上で公開されている。COVID-19の5類移行前のデータから、下水中SARS-CoV-2濃度の増減傾向は新規報告感染者数(全数)の動向と合致することが分かる(Fig. 3 A)。このことから、5類移行後も市中の感染状況を反映する指標として各所で活用されており、例えば北海道大学病院では検査・医療負荷の予測や院内感染対策の判断材料の一つとして役立てられている⁵⁾。また、インフルエンザについては、2023/2024シーズンは下水中のウイルス濃度が11月から12月にかけて急激に増加し、昨シーズン(2022/2023)よりも10倍以上も高いことが分かる(Fig. 3 B)。2023/2024シーズンのインフルエンザの感染拡大を裏付ける結果である。札幌市の事例は、継続的に下水疫学調査を実施することで、過去と比較した感染流行規模に関する客観的かつ定量的なデータが得られることを示す好例であると言える。同市の下水疫学調査の取り組みは、感染状況を示す指標の一つとして活用されており、新聞やテレビなどのメディアを通じた市民への注意喚起などに役立てられている。

なお、北海道大学から札幌市にEPISENS-S法を技術移管し、本年2月からは札幌市による直営分析が始

まっている。

4. おわりに

学術研究として概念実証から始まった下水疫学は、COVID-19流行により学術的にも社会的にも大きな注目を集め、研究開発と社会実装が一気に加速した。昨年5月のCOVID-19の5類移行に伴い感染者数の全数把握は定点把握に切り替わり、感染動向の実態把握が困難になっている中で、下水疫学調査は感染者の定点把握を補完するものとして更に有用性が増してきている。さらに、本稿で紹介したように、SARS-CoV-2に加えて幅広い病原体がEPISENS™法により下水から検出可能であることが実証されてきている。下水疫学調査は、COVID-19のパンデミックを教訓に今後構築すべき重層的・多面的な感染症監視体制を構成する一つの要素として位置付けられつつある中で、下水処理場だけでなく国際空港における感染症の越境流入監視にも活用可能である。有事だけではなく平時においても公衆衛生上有用な情報を提供できることを示すデータや活用事例の蓄積も進んでいる。

一方で、現在、国内で下水疫学データが定期的に公表されているのは本稿で紹介した札幌市をはじめとした10程度の自治体に限られる。下水疫学調査を国レベルで社会実装を推進していくためには、下水中ウイルスの検出手法の統一化、データ共有・可視化システムの構築、予算の確保など、技術面および制度面での課題もある。これらの課題を早急に解決し、全国の自治体での社会実装の早期実現に期待したい。

参考文献

- 1) M. Kitajima, W. Ahmed, K. Bibby, A. Carducci, C. P. Gerba, K. A. Hamilton, E. Haramoto, J. B. Rose, "SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs," *Science of the Total Environment*, 739, p. 139076, 2020.
- 2) H. Ando, R. Iwamoto, H. Kobayashi, S. Okabe, M. Kitajima, "The Efficient and Practical virus Identification System with ENhanced Sensitivity for Solids (EPISENS-S): A rapid and cost-effective SARS-CoV-2 RNA detection method for routine wastewater surveillance," *Science of the Total Environment*, 843, p. 157101, 2022.
- 3) H. Ando, M. Murakami, R. Iwamoto, S. Okabe, M. Kitajima, "Wastewater-based prediction of COVID-19 cases using a highly sensitive SARS-CoV-2 RNA detection method combined with mathematical modeling," *Environment International*, 173, p. 107743, 2023.
- 4) 札幌市, "下水サーベイランス," <https://www.city.sapporo.jp/gesui/surveillance.html>.
- 5) K. Kagami, M. Kitajima, T. Takahashi, T. Teshima, N. Ishiguro, "Association of wastewater SARS-CoV-2 load with confirmed COVID-19 cases at a university hospital in Sapporo, Japan during the period from February 2021 to February 2023," *Science of the Total Environment*, 887, p. 163706, 2023.