

第 66 回日本水環境学会セミナー
(学会設立 50 周年記念事業)

水環境における病原性ウイルス
モニタリング技術の動向

講演要旨集

2021 年 1 月

主催 公益社団法人 日本水環境学会
共催 公益社団法人 日本水環境学会
COVID-19 タスクフォース

第 66 回日本水環境学会セミナー
(学会設立 50 周年記念事業)

水環境における病原性ウイルスモニタリング技術の動向

目次

環境水サーベイランスによる腸管系ウイルス疫学研究への応用	1
国立感染症研究所 吉田 弘	
下水からの新型コロナウイルス感染症流行検知の課題と展望	3
金沢大学理工研究域地球社会基盤学系 本多 了	
下水中ノロウイルス濃度情報発信に関する実証試験の現状と展開	4
山形大学農学部食料生命環境学科 渡部 徹	
下水や環境中でのウイルスの不活化とモニタリングへの影響	6
東北大学大学院環境科学研究科 佐野大輔	
環境水中における病原微生物の汚染実態と微生物指標の活用	7
山梨大学大学院総合研究部附属国際流域環境研究センター 原本英司	

環境水サーベイランスによる腸管系ウイルス疫学研究への応用

国立感染症研究所

吉田 弘

小児まひとして知られているポリオは、ポリオウイルスが糞口ルートで体内に取り込まれ、主に腸管で増殖し感染が成立する。感染後ウイルスは糞便中に大量に排出され、その期間は約3週間程度である。感染の多くは不顕性であるが、発症しても夏かぜ程度の軽症である。しかし稀に麻痺が残存し、乳幼児期に発症すると生涯にわたる疾病負担が極めて大きい。このためわが国では感染症法で2類に指定されており、IHR（国際保健規則）対象疾患でもある。なお日本では1980年を最後にポリオ発生は見られない。2種類のワクチンが利用でき、経口生ワクチン(OPV)は感染防御、不活化ワクチン(IPV)は発症予防に効果的とされている。

世界保健機関(WHO)主導による世界ポリオ根絶計画は、強固な粘膜免疫を誘導するOPVの一斉接種により、ヒト集団中に伝播する野生型ウイルスをワクチン株へ置き換える戦略である。本計画が1988年に開始して以降、世界中のポリオ患者数は激減し根絶目標に近づいてきた。しかしポリオ流行国の治安悪化に伴うワクチンへのアクセス難、患者監視(サーベイランス)活動の停滞、計画当初は想定していなかったワクチン由来ポリオウイルス感染によるポリオの発生、直近では新型コロナウイルス対応への医療資源の振り分け、等の事由により、計画の停滞が余儀なくされているのが2021年時点の状況である。

根絶計画ではワクチン接種の効果を評価するため、ポリオを含む症候群サーベイランス(急性弛緩性麻痺患者サーベイランス)を通じ、疑い患者から糞便を採取し、実験室診断によるポリオウイルス野生株/伝播型ワクチン由来株の鑑別を行う。しかし根絶の最終段階に至り、WHOはより高感度なポリオ環境水サーベイランス手法をリスク国・地域へ導入することを2015年に決議した。

ポリオウイルスは糞便中に長期にわたり排出されるため、下水処理場を定点とし流入下水中のポリオウイルスの有無を把握することで、対象地域全体の感染リスク管理が可能になる。わが国では2012年にOPVからIPVに切り替えに伴い、2013年度より環境水ポリオウイルスサーベイランスを国の事業として全国調査を行っている。

調査では処理場への流入下水を採取し濃縮後、細胞培養によるウイルス分離を行い、ポリオウイルスの有無の確認を第一の目的とする。この時、下水濃縮物には様々な腸管系ウイルスも含まれていることから、ポリオ以外のエンテロウイルス等も分離される。分離不可のノロウイルスなども濃縮物を用いればPCRで検出可能である。このため環境水ポリオサーベイランスを実施する国/地域では腸管系ウイルスに関する研究が国内

外で報告されている。例えば、下水から定期的にウイルスを検出し、病原体サーベイランスによる患者由来株と、ゲノムレベルで比較を行うなど、対象とする病原体の地域流行像を把握するための多くの情報を得ることが可能である。

今般の新型コロナウイルス流行では、本ウイルスも不顕性感染が多く、一部腸管で増殖され糞便に排出されることから、欧米では 2020 年の早期より下水を用いたコロナウイルス探知に関する研究が進められてきた。本セミナーではポリオウイルス監視を目的に継続しているポリオ環境水サーベイランスを活用した新型コロナウイルス検出に関連した研究も併せて紹介したい。

下水からの新型コロナウイルス感染症流行検知の課題と展望

金沢大学理工研究域地球社会基盤学系
本多 了

下水の新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 遺伝子をモニタリングすることで、地域や集団における新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の流行状況を把握する取り組みが世界各国で研究されている。COVID-19 は無症状感染者が約半数を占め、有症状感染者の多くも軽症であることから、医療機関による PCR 検査によって把握できていない感染者が多くいる。下水を監視対象とすることで、これらの医療機関で取り逃した感染者を含む流行状況を把握できること、また、集団における感染者の動向を少ない検査数で効率的に把握できることが期待されている。2020 年の流行初期には医療機関報告よりも早く下水で流行兆候が見られたことが米国やオランダより報告されたことが注目を浴びるきっかけとなった。日本国内でも、日本水環境学会 COVID-19 タスクフォースメンバーを中心に下水からの SARS-CoV-2 検出と COVID-19 流行把握について取り組んでいる。国内でも数例の下水中の SARS-CoV-2 遺伝子検出がされたほか、その手法を 2020 年 12 月には「下水中の新型コロナウイルス遺伝子検出マニュアル (暫定版)」として取りまとめて公表を行った。一方で、これまで日本国内では欧米各国と比較して人口あたりの感染者数が少ないことから下水中の SARS-CoV-2 遺伝子が低く、また、医療機関による積極的な PCR 検査と迅速な集計体制により、早期検知の有効性は海外事例と比べて相対的に低い。本講演では、下水からの新型コロナウイルス遺伝子検出に関する国内外の事例と手法紹介のほか、下水から得られる SARS-CoV-2 検出情報が感染症流行対策に有効な指標となるために必要な今後の研究開発の展望について述べたい。

下水中ノロウイルス濃度情報発信に関する実証試験の現状と展開

山形大学農学部食料生命環境学科

渡部 徹

ノロウイルスによる感染性胃腸炎患者は莫大な数のウイルスを糞便中に排出するため、下水中のウイルス濃度は胃腸炎流行の指標となりうる。一方、ノロウイルスによる胃腸炎は1～2日で症状が改善するため、特に大人の患者では医療機関を訪れるケースは少ない。このことから、感染性胃腸炎が流行する冬季には、医療機関からの患者報告が増える以前に、下水処理場における流入下水のノロウイルス濃度が上昇することが想像され、我々のグループによる先行研究でこれを支持する結果を得た。この結果を根拠として、我々のグループでは現在、下水中のノロウイルスのモニタリングによって感染性胃腸炎の流行の兆しを早期にとらえ、その濃度情報を住民に発信することで、衛生的な行動を喚起するシステムの構築を目指している。2017年10月からは、宮城県仙台市でこのシステムの実証試験を行っている。

実証試験では、仙台市で最大の下水処理場において、週1回の頻度(冬季には週2回)で流入下水を採取し、ノロウイルスの定量検出を行っている。その定量結果が、非流行期に観測されるウイルス濃度比べて著しく上昇したときに胃腸炎の流行を予想し、図1に示すウェブサイトを通じてその情報を発信している。その情報をパソコンやスマートフォンで受け取ることを希望する利用者のために、同ウェブサイトではメールアドレスの登録も受け付けている。また、このウェブサイトには、システム利用者の家庭内での感染予防対策のために、推奨される行動4つも掲載している。



図1．下水中ノロウイルス濃度情報発信サイト (<https://novinsewage.com/>)

この実証試験では、情報発信サイトの利用者（と比較対照としての非利用者）に対するアンケート調査も実施している。本講演では、そのアンケート調査で得られた知見も含めて、実証試験の現状と今後の展開について、以下の通り紹介する。

- 1．2017～2018 年度における実証試験の結果
- 2．新型コロナ禍を経て最近の実証試験の状況
- 3．今後の展開：モニタリング対象としての牡蠣の利用可能性

なお、本講演で紹介する内容の多くは、東北大学、山形大学、仙台市、株式会社日水コンの共同研究体が国土交通省の支援を受けて実施した研究の成果である。アンケート調査の実施では、滋賀県立大学の平山奈央子先生の協力を得た。ここに感謝の意を表す。

下水や環境中でのウイルスの不活化とモニタリングへの影響

東北大学大学院環境科学研究科

佐野大輔

新型コロナウイルスによる感染症 COVID-19 の蔓延により、“PCR”という言葉が一気に世間に浸透した。PCR とは Polymerase Chain Reaction の略であり、遺伝子の特定の領域について、その量を試験管の中で指数的に増やすことができる実験方法である。生物系の実験において必須の技術であり、環境工学分野においても 30 年程度前から導入され、環境微生物の同定などに用いられてきた。水中病原体に関わる研究分野においては、多様な種類が知られている水中病原ウイルスについて、定量 PCR と呼ばれる技術を用いて、水中遺伝子濃度を測定することが行われてきている。調査対象となる環境サンプルには、河川水、湖水、地下水、水道水、水浴場水、下水、下水処理水、海水に加え、河川、湖沼及び海洋の底泥や下水汚泥なども含まれる。これまでに多くの種類のウイルスについて、様々な環境サンプル中の遺伝子濃度が計測され、その濃度レベルや季節変動等が把握されてきた。その結果、例えば胃腸炎を引き起こすノロウイルスの場合、市中で感染者数が増加すると下水中濃度も増加することなどが明らかとされてきている。

一方で、環境サンプル中から PCR によりウイルス由来の遺伝子が検出されたとしても、遺伝子の存在はヒトへの感染性を保持したウイルス粒子の存在を必ずしも保証しないので、検出 = 感染リスク発生とはならない。水中から相当の高濃度でウイルス由来遺伝子が検出されれば話は別だが、下水を含む環境サンプル中のウイルス濃度は概して低い。それでも、環境サンプル中から検出される低濃度のウイルスによって生じる感染リスクを評価したいという要望はやはり存在したので、PCR を行う際に少し工夫を施して、感染性に関する直接的な情報ではなくても、感染性に関連した情報を得るための手法（組織細胞による培養を行わないので、culture-independent な手法と呼ばれる）が数多く開発されてきた。

Culture-independent なウイルス感染性関連情報取得手法には、大きく分けて以下の 5 つの方法が存在する。すなわち、1) タンパク質分解酵素および RNA 分解酵素による前処理、2) アジ化物による前処理、3) 特異的相互作用による選択、4) 外殻タンパク質上の酸化ストレスマーカー検出、および 5) 複数もしくは長いゲノム領域をターゲットとした PCR、である。本セミナーでは、環境中ウイルスの不活化メカニズムを解説し、続いて、上記 5 つの culture-independent なウイルス感染性関連情報取得手法の具体的な内容について解説する。また、culture-independent な手法を新型コロナウイルスに適用した場合に予想されることについても解説する。

環境水中における病原微生物の汚染実態と微生物指標の活用

山梨大学大学院総合研究部附属
国際流域環境研究センター
原本 英司

水系感染性の病原微生物は、病原細菌、原虫およびウイルスの3種類に大別される。培養法や顕微鏡観察法での検出が比較的容易な病原細菌や原虫と比較して、ウイルスの多くは培養法での検出が困難あるいは不可能であり、電子顕微鏡での検出も非効率的であることから、環境水中からのウイルスの検出事例（特に定量的データ）の報告数が増えてきたのは2000年代に入り、リアルタイムPCR(Quantitative polymerase chain reaction, qPCR)法が普及してきてからである。そのため、開発途上国はもとより、先進国においても、環境水中におけるウイルスの汚染実態に関する知見は限定的である。

一般に、PCR法を用いた環境水中からのウイルスの検出法は、濃縮、核酸(DNAまたはRNA)抽出、逆転写(Reverse transcription, RT(RNAウイルスの場合のみ))、PCR法という工程から成り立っている。信頼できる検出・定量データを得るためには、一連の検出工程において安定した高い検出効率(回収率)を得ることが重要であるが、濃縮法によるウイルスの回収率が水質による影響を大きく受けることや、環境水中の様々な共存物質がRTやPCR反応を阻害すること等が知られている。そのため、異なる手法はもちろん、同一の手法を用いて検出調査がなされた場合においても、得られた結果を単純に比較することには慎重さを要する。

この問題に対処するため、いわゆる内標準の測定を採り入れ、検出効率を評価するスキームの導入が、ここ10年ほどで環境試料中のウイルス測定分野で急速に進んでいる。この内標準は、当初はInternal controlと呼ばれていたが、現在ではプロセスコントロール(Process control)という用語が主流となっており、適切なプロセスコントロールを含んだ検出系に基づいた結果でなければ国際学術雑誌への登載は極めて困難となっている。

講演者は、片山浩之教授(東京大学)、佐野大輔准教授(東北大学)、真砂佳史主任研究員(国立環境研究所)、北島正章助教(北海道大学)、端昭彦講師(富山県立大学)、Jason R. Torrey 研究員(スイス連邦工科大学ローザンヌ校)と連名で、環境水中からのウイルス検出法と汚染実態に関する最新の知見をまとめた総説論文を2018年にWater Research誌に発表しており、その中でプロセスコントロールの特徴や使用方法等を整理している。試料中に添加されるポイントによってプロセスコントロールを3種類に分類し、濃縮前の試料に添加することで、検出操作全体での検出効率を評価することが可能

なウイルスを Whole process control (WPC), 核酸抽出から qPCR までの検出効率を評価するためにウイルス濃縮液に添加されるウイルスを Molecular process control (MPC), ウイルス核酸抽出液や cDNA 溶液に添加される人工合成プラスミド DNA 等を (RT-)qPCR control DNA/RNA と定義している。微生物濃度は通常対数値で評価されることから, プロセスコントロールの検出効率に対しては 1% や 10% が閾値として用いられることが多く, これを下回る場合には再測定等の対応が望ましいとされている。

これまでに報告されている環境水中からの様々な病原ウイルスの定量結果の最大値を整理すると, 未処理下水で $10^4 \sim 10^9$ コピー/L 程度, 下水処理水で $10^2 \sim 10^7$ コピー/L 程度, 表流水と海水で $10^2 \sim 10^9$ コピー/L 程度, 地下水で $10^2 \sim 10^6$ コピー/L 程度であり, ウイルスの種類によっても濃度幅があることが分かる。これらの病原ウイルスと比較して, トウガラシ微斑ウイルス (Pepper mild mottle virus, PMMoV) は, 未処理下水から $10^7 \sim 10^{10}$ コピー/L 程度, 下水処理水から $10^6 \sim 10^{10}$ コピー/L 程度で検出される等, 優占して存在していることが明らかとなってきた。植物ウイルスである PMMoV がヒト糞便中に極めて高濃度で存在していることは, メタゲノム解析によって初めて明らかとなり, PMMoV をヒト糞便汚染検知のための微生物遺伝子マーカーや水処理工程での病原ウイルスの挙動指標として活用する研究へと展開されている。

現在, 水質環境基準における衛生指標を大腸菌群数から大腸菌数に変更することが検討されており, 環境水中における糞便汚染レベルをより正確に把握できるようになることが期待されている。しかしながら, 大腸菌の検出に基づくのみでは糞便汚染源は同定できないため, 宿主特異性の高いウイルスを微生物遺伝子マーカーとして活用した糞便汚染源解析手法の開発は, 環境水中の糞便汚染源を同定し, 適切な汚染負荷低減方策を実施する上で有用になると期待される。また, 水処理工程において, 病原ウイルスは大腸菌等よりも低い除去・不活化率を示すことから, 病原ウイルスの挙動の把握に適した管理指標を見出すことも重要となる。

本講演では, 講演者のこれまでの研究成果を中心に, 環境水中における病原微生物の汚染実態や微生物指標の活用に関する知見を紹介する。