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

研究予算：運営費交付金
研究期間：平 30～令 3
担当チーム：材料資源研究グループ（資源循環）
水環境研究グループ（水質）
研究担当者：重村浩之、山下洋正、諏訪守、李善太

【要旨】 本研究は、平成 30～令和 3 年度にかけ、①感染症情報と遺伝子情報の照合により、早期検知の可能性を評価、②感染価評価のための新たな前処理手法の提案、③的確な消毒効果の評価手法の提案、の各項目を達成目標に掲げ実施した。令和 3 年度は研究期間の最終年度であり、本項では、4 年間で得られた成果をとりまとめた。①の成果では、網羅・継続的な下水遺伝子調査による感染症流行把握・予測の有効性を明らかにし、今後のパンデミック要因となる病原微生物の早期同定、流行予測に繋がる成果が得られた。また、ウイルス遺伝子のヒット（検出）数と感染性胃腸炎、新型コロナウイルス患者数には相関関係があり、感染症の流行予測に活用できることを明らかにした。②の成果は、新たな前処理法の提案として、試料の前培養を行い PCR による定量（Integrated Culture-PCR:IC-PCR 法）により、感染価の評価手法を提案できた。③の成果として、IC-PCR 法による検出 F 特異 RNA ファージ（F-specific RNA bacteriophage; FRNAPH）のグループ分けによって消毒耐性に応じた指標の選択が可能となり、的確な消毒効果の評価に活用できる成果が得られた。
キーワード：次世代シーケンス、ヒト病原ウイルス、FRNAPH 、網羅的検出、感染症モニタリング 、感染価評価

1. はじめに

現在、新型コロナウイルスによる感染症（coronavirus disease 2019; COVID-19）のパンデミックによる問題が深刻化する中で、感染拡大防止と社会経済活動再開に向けた適切な政策決定のための判断材料の一つとして、下水疫学（Wastewater-based epidemiology）の活用が期待されている。下水には、その地域の人々が流した様々な情報が含まれており、特に感染者から排出される病原微生物の情報は、地域の感染症の流行状況を反映していると考えられる。実際に日本国内における感染性胃腸炎の主な原因ウイルスであるノロウイルス（NoV）の下水中の存在濃度と、その地域の感染性胃腸炎の患者数と相関があることが報告されている [1),2)]。 新型コロナウイルスに対しても感染者の糞便 [3),4)]や尿 [5)]から検出されたことが報告され、下水中でも検出されたことが日本 [6),7)]のみならずオーストラリア [8)]やアメリカ [9)]、イタリア [10)]、オランダ [11)]など世界各国において報告されている。

複数個所の下水管渠において下水を採取し、アウトブレイクの発生地域を徐々に絞り込むことができれば、公衆衛生当局が感染拡大リスクの高い地域を対象に迅速な感染症拡大防止策を講じることにつながる可能性がある。併せて、下水処理場では病原微生物の流入状況に応じた水質管理の徹底、適切な消毒の実施により、地域の感染症の拡大防止に貢献できる可能性がある。

現状でのウイルスの検出・定量法は、ウイルス種に応じて個々に PCR 法により検出を行うため、新たな感染症やグローバル化にともなう輸入感染症などの想定外のウイルスを含めた同時検出には適していない。しかし、次世代シーケンス（Next-Generation Sequencing, NGS）技術により試料中に含まれる遺伝子配列を網羅的に解読することが近年可能となったことから、下水中に存在する複数のウイルスが同時に検出・同定された報告例がある [12), 13)]。このことから、NGS により下水中のヒト病原ウイルスを網羅的にモニタリングできれば、地域の様々な感染症の流行状況を同時に把握することができると考えらえる。

一方、NoV を含む多くのヒト病原ウイルスは培養法が確立されておらず、消毒による不活化効果が評価できないため、ウイルスの代替指標であるファージの利用が検討されている。その中でも大腸菌を宿主する FRNAPH は、大きさや構造が NoV 等のヒト腸管系ウイルスと類似しているため、指標ウイルスとして注目されている。

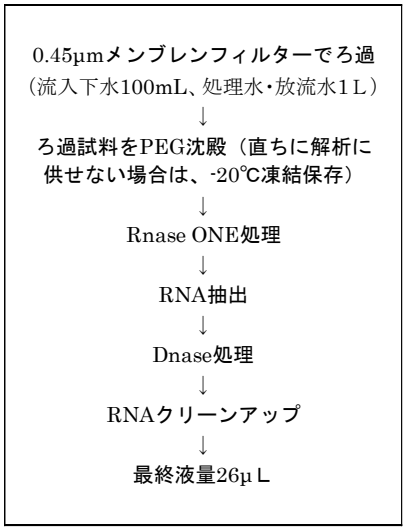
本研究では、NGS 技術により下水処理場の病原ウイルスを網羅的、継続的に検出し、その地域の感染症情報と照合することで、対象地域で流行している感染症の網羅的なモニタリングの可能性を評価した。次いで、FRNAPH を指標として、感染価評価のための新たな前処理手法および的確な消毒効果の評価手法の提案を行った。

2. 研究方法

2. 1 感染症の網羅的なモニタリングの可能性評価

2.1.1 新型コロナウイルス感染症流行前の試料の採取と前処理法

A 下水処理場の流入下水を 2018 年 8 月から 2020 年 1 月までの間に月 1 回採取し、18 試料を得た。BLAST（Basic Local Alignment Search Tool：局所的な塩基配列の検索手法）解析のための NGS による下水試料の前処理法の概略は図-1 のとおりである。ウイルスより大きな生物（細菌、藻類等）を取り除くため、採取した下水試料 を 0.45μm のメンブレンフィルターによりろ過し、ろ過水をポリエチレングリコール（PEG）沈殿法 [14]により濃縮を行った。濃縮した試料中の浮遊 RNA を RNase ONE （Promega）を用いて分解した後、QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit（Qiagen）および QIAcube（Qiagen） にて RNA を抽出した。抽出した RNA 液中の残存 DNA を Baseline-Zero DNase（Arbrown）により分解することで、RNA をクリーンアップをした。なお、直ちに BLAST 解析に供せない場合には、PEG 沈殿法により濃縮した試料を冷凍保存（-20℃）した。



図－1　試料の前処理法

2.1.2 新型コロナウイルス感染症流行中の試料の採取と前処理法

新型コロナウイルス感染症の流行期間中として、A 下水処理場の流入下水を 2020 年 7 月から、処理水と放流水を 9 月から、それぞれ 2021 年 4 月までの間に月 4 回採取した。2021 年 3 月から調査対象地域において新型コロナウイルス患者数の増加が見られたため、2021 年度の 4 月までの結果を含めて整理した。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、放流水は次亜塩素酸ナトリウムの添加により消毒されていた。BLAST 解析のための NGS による下水試料の前処理法は上記 2.1.1 と同様である。

2.1.3 各試料のシーケンスおよび BLAST 解析

BLAST 解析に供した試料は、新型コロナウイルスの流行前において採取した流入下水の 18 試料である。また、新型コロナウイルスの流行中に採取した流入下水の 38 試料については、下水処理場管内での感染症の流行状況を勘案してその中から 12 試料を選定し BLAST 解析に供した。さらに、処理水、放流水の各 27 試料については、感染症の流行状況を勘案して各々15 試料を選定したが、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、選定した試料を混合することで処理水・放流水を各 4 試料に調整した。

試料は KAPA mRNA Hyper Prep Kit（日本ジェネティクス）を使用してライブラリ調製を行い、次世代シーケンサーの Miseq（Illumina）に供しシーケンスデータを得た。Trimmomatic による トリミングと FastQC によるクオリティチェックを行い、SPAdes による de novo assembly を行って contig（得られたシーケンスの断片配列を重ね合わせ連結させた配列）を得た。次いで、NCBI の塩基配列データベースを基にウイルスのデータベースを作成し、得られた contig を BLAST 解析（Ver. 2. 7. 1+）し、相同性が高かったウイルス種を同定した。

なお、上記 2.1.1 で得られた contig については、新型コロナウイルス塩基配列を含む最新の GenBank のデータベースで BLAST 解析を行っていない。このため、流行以前における新型コロナウイルスの存在有無を評価するため、2.1.2 で得られた contig の BLAST 解析と合わせて、2.1.1 で得られた contig についても新型コロナウイルス塩基配列を含む最新の GenBank のデータベースで再解析を行った。

2.1.4 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、自治体の衛生部局が HP 上で公表している感染症患者数の週報を基に整理を行った。

2.2 感染価評価のための新たな前処理手法の提案

2.2.1 前培養＋PCR 法の評価

感染価評価のための前処理手法としては、試料中に存在する FRNAPH の前培養を行うものであり、その増殖量を PCR 法により定量を行うものである。この方法では、*Salmonella enterica serovar Typhimurium* WG49 株により試料中に存在する感染力を有した FRNAPH を液体培養し、PCR 法により定量を行い増殖を確認、定量には MPN 法を用い、0.01～100mL までの試料を 10 倍段階の 3 連で定量値（MPN/L）を得た。また、消毒後には試料中に存在する感染力を有した FRNAPH の濃度が低く

なることが想定されたため、試料中に存在するFRNAPHを人為的に培養して高濃度FRNAPH 液を作成した。二次処理水への培養液の添加にあたっては、培養液中の宿主菌や培地成分が二次処理水の水質性状に影響を与えないよう遠心分離・ろ過により除菌、培地成分の除去はAmiconUltra-15により行った。なお、本項で対象としたFRNAPH はGⅠ～GⅣにグループ分けしたものである。

消毒実験に利用した試料は、A 下水処理場内に設置された活性汚泥処理装置の二次処理水とし、その二次処理水の消毒強度は塩素ではCT値（5分間隔で測定した残留塩素の積算値から算出）で20～24mg･min/L であった。さらに、前培養＋PCR法（IC-PCR法）による定量値の比較対象として、二次処理水を塩素消毒しPCR法[15]のみの定量値とプラーク法（培養法）による定量値を得た。この時のCT値は約9～42mg･min/Lであった。

2.2.2 抗原抗体法による簡易評価

次いで、前処理手法の一環として、迅速かつ簡易にウイルスの定性（存在の有無）が行える抗原抗体反応を原理とした検出キットを利用して、感染価の評価の可能性を検討した。検討には市販されているNoVの検出キットを用い、NoVの陽性コントロールを塩素消毒した試料を評価対象とした。塩素消毒は添加濃度を0～30mg/L、接触時間を20分間とし、消毒後の試料を検出キットにかけ、抗原抗体反応による陽性・陰性の判定結果を基に消毒効果の有無を定性した。

3. 研究結果

3.1 感染症の網羅的なモニタリングの可能性評価

3.1.1 新型コロナウイルス感染症流行前に採取した試料の出力リード数とcontig数

新型コロナウイルス感染症の流行前に採取した流入下水試料の出力リード数とcontig数を**表-1**に示す。次世代シーケンスにより得た配列（出力リード数：27 万～104万）に対してトリミングとクオリティチェックおよびde novo assemblyを実施し、829－9,156のcontigを得た。

3.1.2 新型コロナウイルス感染症流行中に採取した試料の出力リード数とcontig数

新型コロナウイルス感染症の流行中に採取した流入下水と処理水および放流水試料の出力リード数とcontig数を**表-2**に示す。次世代シーケンスにより得た配列（出力リード数：72 万–180 万）に対してトリミングおよびクオリティチェックとde novo assemblyを実施し、2～912のcontigが得られた。流入下水、処理水および放流水を合わせた20試料の内3試料についてはcontig数が2～30と極端に低い状況であった。また、新型コロナウイルス感染症流行中に採取した試料のcontig数は、流行前の試料のcontig数に比較して全体的に低かった。

表-1 流入下水試料の出力リード数とcontig数（新型コロナウイルス感染症流行前）

試料	採取月	出力リード数	contig数
流入下水	H30.8	496,960	2,873
	H30.9	1,044,339	2,532
	H30.10	361,977	4,341
	H30.11	552,006	829
	H30.12	283,652	2,424
	H31.1	766,001	1,943
	H31.2	442,863	2,214
	H31.3	372,803	940
	H31.4	365,637	2,272
	R1.5	274,518	5,037
	R1.6	419,504	5,317
	R1.7	279,653	4,868
	R1.8	436,910	3,477
	R1.9	306,201	4,019
	R1.10	403,474	3,093
	R1.11	654,794	1,567
	R1.12	717,445	9,156
	R2.1	342,945	1,436

表-2 各試料の出力リード数とcontig数（新型コロナウイルス感染症流行中）

試料	採取日	出力リード数	contig数
流入下水	R2.8.18	1,223,594	597
	R2.9.15	1,391,250	498
	R2.10.20	1,795,072	21
	R2.10/27+11/4(混合)	1,596,174	598
	R2.11.10	1,306,454	614
	R2.11.18	1,106,687	430
	R2.11/24+12/1(混合)	1,119,610	377
	R2.12.22	1,165,097	538
	R3.1.26	1,102,146	471
	R3.2.9	1,192,007	842
	R3.3.2	1,252,078	437
	R3.4.26	719,080	321
処理水	R2.9/16+23+30(混合)	1,476,842	912
	R2.11/11+18+25+12/2+9(混合)	1,399,788	2
	R3.1/6+13+20(混合)	1,678,937	855
	R3.1.27	1,244,184	516
放流水	R2.9/16+23+30(混合)	1,439,548	756
	R2.11/11+18+25+12/2+9(混合)	1,139,944	30
	R3.1/6+13+20(混合)	1,237,129	403
	R3.1.27	1,734,760	522

3.1.3 感染症情報との照合

① 新型コロナウイルス感染症の流行前試料のBLAST解析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。調査期間中において、全検出ウイルスに対し感染性胃腸炎の原因ウイルスであるノロウイルス（ヒット数：1～42）、サポウイルス（2～29）、アストロウイルス（0～19）の

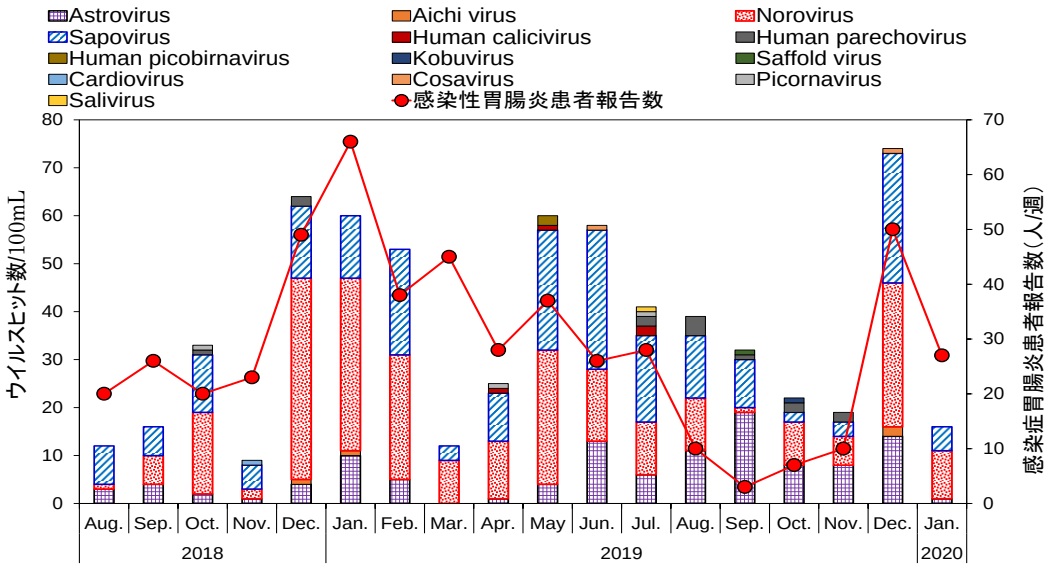


図-2 感染性胃腸炎患者報告数と各種のウイルスヒット数

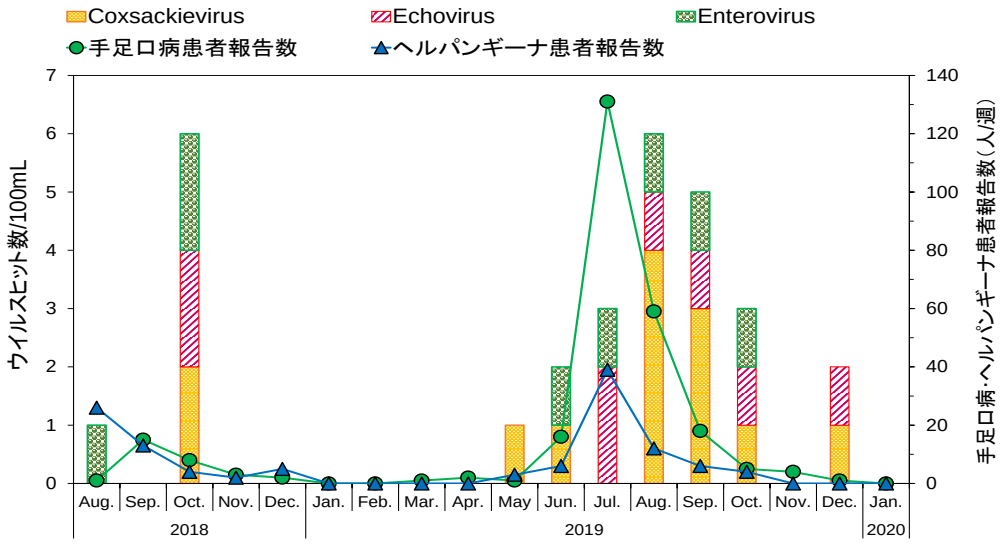


図-3 手足口病・ヘルパンギーナ患者報告数と各種のウイルスヒット数

ヒット数が 66～98%を占める状況にあった。感染性胃腸炎の主要因であるノロウイルスでは、冬季に最大で 69%を占める状況も見られ、この時の患者数は最大で約 50～70 人/週にも及び、患者報告数とウイルスの検出ヒット数の傾向が一致していた。また、感染性胃腸炎以外の感染症として手足口病、ヘルパンギーナの患者報告数と、それらの原因ウイルスとしてコクサッキーウイルス、エンテロウイルスなどのヒット数の関係について**図-3** に示す。特に、コクサッキーウイルス（ヒット数：0～4）とエンテロウイルス（0～2）がヒットした 2019 年の 5､6 月以降に手足口病、ヘルパンギーナ患者数が上昇していた。このように、網羅的、継続的なモニタリングが感染拡大の兆候の検知につながる可能性が示唆された場合もあったが、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）もあったことから、不顕性感染の影響も含め、複合的な要因があるものと推定された。

② 新型コロナウイルス感染症の流行中試料の BLAST 解析結果と感染症情報との照合

本項では、ヒト由来ウイルス以外のウイルスとしてファージや植物性ウイルス等を含め整理を行った。それらのウイルスのヒット数を**表-3** に示す。データベース上の配列に同定されたウイルス（上記の全てを含む）のヒット数の合計は流入下水で 6～190、処理水･放流水では 1～154 であったが、contig 数が極端に少なかった表中の No.3､14､18 の試料では、ヒット数も低い状況であった。

同定されたウイルスの内、ヒトを宿主とするものは、新型コロナウイルス、ロタウイルスおよび、ヒトとブタを宿主とするE型肝炎ウイルスの3種類のみであった。

流入下水では12試料の内5試料から新型コロナウイルスが検出されヒット数が1～12であった。同様にロタウイルスは12試料の内11試料から3～9のヒット数、E型肝炎ウイルスは2試料から各々のヒット数は1であった。また、ヒト由来ではあるが未分類（不明）のウイルスが3～88ヒット数であり、同定、不明分を合わせたヒト由来のウイルスの割合は、その他のウイルスを含めた全ヒット数に対し39～54%を占めていた。

処理水、放流水の8試料からは新型コロナウイルスが不検出であったが、ロタウイルスのヒット数は1～3であった。その他、ヒト由来ではあるが未分類（不明）のウイルスが0～66ヒット数であり、同定、未分類を合わせたヒト由来のウイルスの割合は、その他のウイルスを含めた全ヒット数に対し13～67%で推移していた。

感染症情報との照合として、A下水処理場管内において採水期間中（2020年7月から2021年4月までの間）に多くの患者数が報告された感染症は主に新型コロナウイルスと感染性胃腸炎であった。新型コロナウイルス患者数と流入下水の新型コロナウイルスヒット数の関係を**図-4**に示す。流入下水の新型コロナウイルスは、12試料の内7試料が不検出であったが、2020年の第46週と翌2021年の第9週にはヒット数が3～12に高まった。このようにヒット数の高まりの後に管内の新型コロナウイルス患者数が104、46人/週と増加しており、網羅的、継続的なモニタリングにより原因ウイルスの動向を把握できる可能性が示された。

一方で患者数が報告された週でもウイルスのヒット数の高まりが見られないケースもあり、感染症拡大の早期検知に関わる精度向上のため、さらなるデータの蓄積が必要と考えられた。

表-3 BLAST解析によるヒト由来ウイルス等のヒット数

試料 No.		ヒト由来			その他のウイルス		ヒト由来・その他のウイルスのヒット数の合計	ヒト由来ウイルスの割合(%)
		同定		不明	植物性ウイルス等含	ファージ		
		腸管系	コロナ					
流入下水	1	6(ロタ)	1	72	43	34	156	51
	2	7(ロタ)	1	64	42(E型1)	26	140	51
	3	N.D	N.D	3	1	2	6	50
	4	4(ロタ)	N.D	22	16	25	67	39
	5	6(ロタ)	3	76	77	27	189	45
	6	5(ロタ)	1	88	75	21	190	49
	7	5(ロタ)	N.D	32	23	9	69	54
	8	9(ロタ)	N.D	46	43(E型1)	32	130	42
	9	5(ロタ)	N.D	33	33	9	80	48
	10	3(ロタ)	N.D	25	15	21	64	44
	11	5(ロタ)	12	24	25	23	89	46
	12	4(ロタ)	N.D	27	25	13	69	45
処理水	13	N.D	N.D	6	27	12	45	13
	14	N.D	N.D	N.D	N.D	1	1	–
	15	N.D	N.D	5	9	8	22	23
	16	3(ロタ)	N.D	66	65	20	154	45
放流水	17	N.D	N.D	16	13	9	38	42
	18	N.D	N.D	10	2	3	15	67
	19	1(ロタ)	N.D	43	39	11	94	47
	20	2(ロタ)	N.D	41	37	18	98	44

（ロタ）ロタウイルス、（E型）E型肝炎ウイルス

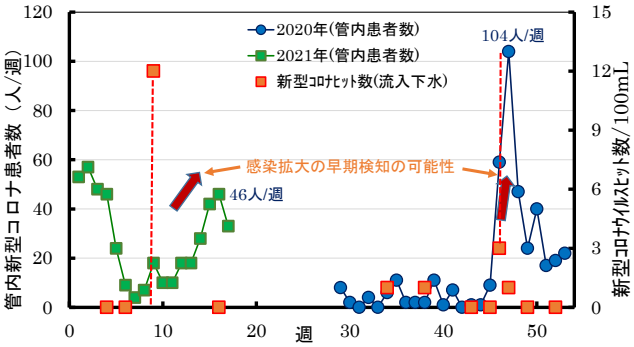


図-4 下水処理場管内の新型コロナウイルス患者数とヒット数の関係

次いで、感染性胃腸炎を引き起こすウイルスの一種であるロタウイルスのヒット数との関係を**図-5**に示すが、報告された患者数の多くが10～20人程度/週で推移しており、新型コロナウイルス患者数と比較して変動幅が小さかった。流入下水の12試料の内、11試料におけるロタウイルスのヒット数は3～9であり、一定数の患者が継続して存在することで感染症の原因となるウイルスがヒットするものと考えられた。

一方、本調査期間中において冬季における感染性胃腸炎の主要因であるノロウイルスがヒットされなかった。また、例年流行が生じているヘルパンギーナ、手足口病、RSウイルスなどの他の感染症の患者報告数が皆無であった。これらの感染症の非流行要因は手洗い、マスク着用の徹底、3密の回避などによる新型コロナウイルス感染症対策の効果であると推定された。

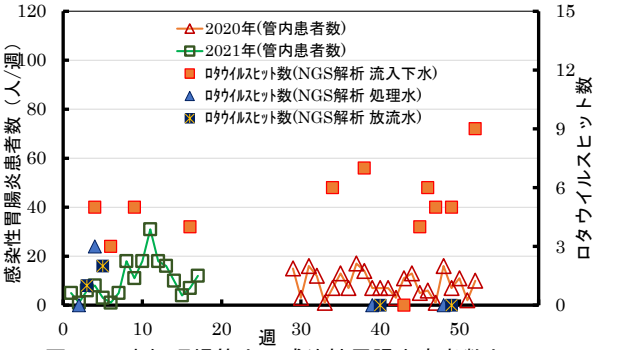


図-5 下水処理場管内の感染性胃腸炎患者数とロタウイルスヒット数の関係

3.1.4 BLAST解析データの再解析

新型コロナウイルス感染症の流行以前の流入下水において、新型コロナウイルスの存在有無を評価するため、最新のデータベースを基に2018、2019年の調査にて取

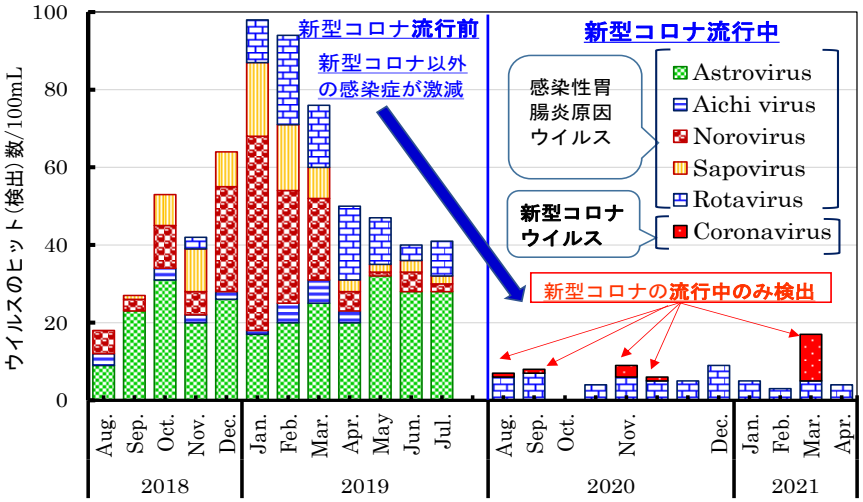


図-6 新型コロナウイルス流行前後の再解析結果

得した核酸情報を再解析した。

2020、2021 年の調査時に用いた最新のデータベースによる再解析結果を図-6 に示す。新型コロナウイルスによる感染症の流行前では、新型コロナウイルスがヒットしないことが確認できた（図-6 左側の新型コロナ流行前）。ヒットしたウイルスは感染性胃腸炎の代表的なウイルスである NoV 以外にも、複数の感感染性胃腸炎の原因ウイルスが確認され、1 度の調査において網羅的なウイルスのモニタリングが可能であった。2020 年からの新型コロナウイルス感染症の流行中では、新型コロナウイルスと感染性胃腸炎の原因ウイルスであるロタウイルスのみの検出に限定された。2020 年以降の調査期間中では、新型コロナウイルス症が流行し、その拡大防止策としての数々の対策が実施されており、その結果、下水処理場管内における患者報告数は、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無であった。断定的な根拠は得られず不明であるが、このような感染症の流行状況下により、流入下水から検出されたヒトを宿主とするウイルスが新型コロナウイルスとロタウイルスに限定されたものと推定された。BLAST 解析データの再解析した結果を基に、感染症の流行状況として、その地域における感染症患者数と流入下水のウイルスヒット数の関係を図-7 に整理した。ウイルス遺伝子のヒット（検出）数と感染性胃腸炎、新型コロナウイルス感染症の患者数には相関関係があり、感染症の流行予測に活用できることを明らかにした。

網羅･継続的な下水調査により、今後、パンデミック要因となる病原微生物の早期同定、流行予測に繋がる成果が得られた。

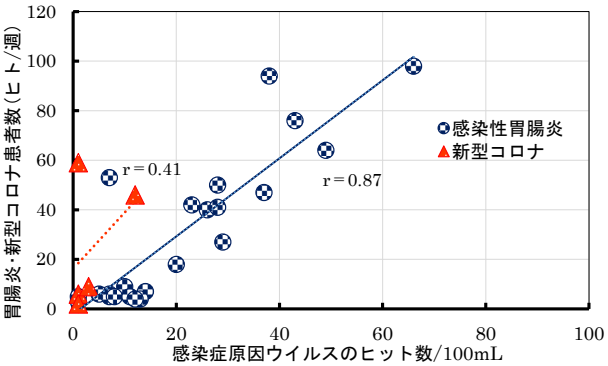


図-7 ウイルスヒット(検出)数と患者数の関係

3.2 感染価評価のための新たな前処理手法の提案

3.2.1 前培養＋PCR 法の評価

二次処理水の塩素消毒前後の試料を対象に、従来の定量手法である PCR 法と、その前処理手法として前培養を適用した IC-PCR 法での FRNAPH GⅡの定量結果を図-8 に示す。遺伝子の定量値である PCR 法に比較して前培養を適用した IC-PCR 法の定量値では、感染性を有する FRNAPH のみが定量されると推定され、各々の定量値に違いが生じたものと考えられた。

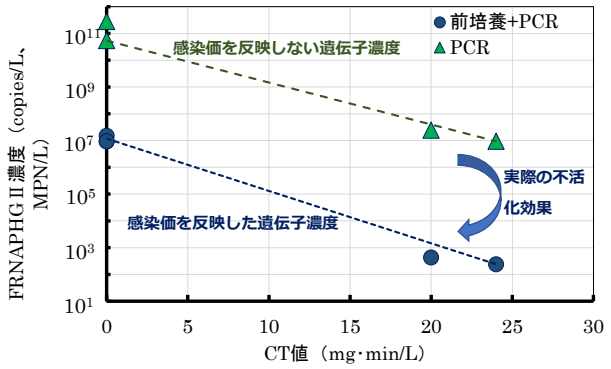


図-8 前培養の有無が感染価の評価へ及ぼす影響

この時の塩素消毒前後における FRNAPH グループの構成情報を整理した結果を図-9 に示す。IC-PCR 法では評価対象としている FRNAPH GⅠ～GⅣの存在割合に変化が見られたが、PCR 法での存在割合は GⅡが多くを占める状況にあった。このことは PCR 法で検出された GⅡ遺伝子の大部分が感染力を有していない状態で存在しているものと考えられた。

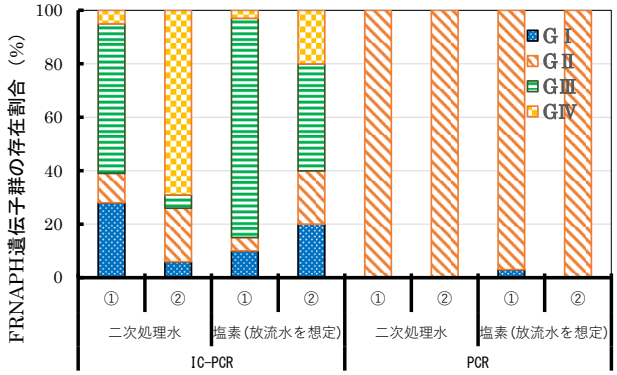


図-9 塩素消毒前後におけるFRNAPH遺伝子群の構成

また、IC-PCR 法による不活化効果の妥当性を評価するため、塩素消毒による不活化効果を FRNAPH の培養法と IC-PCR 法で整理を行った。2 法による不活化効果の値はほぼ一致しており、IC-PCR 法によっても不活化効果の評価が可能であることが示唆された（図-10）。

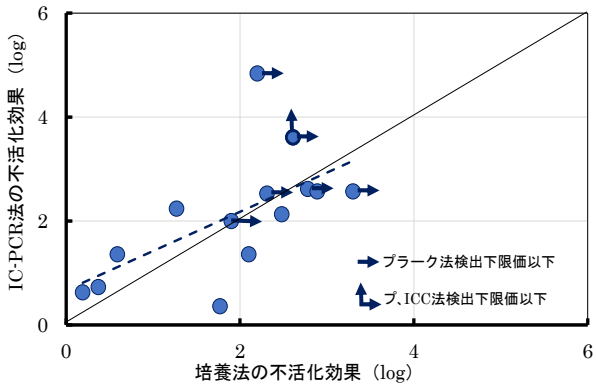


図- 10 培養法とIC-PCR法の不活化効果の関係

加えて、CT 値と FRNAPH の不活化効果の関係について培養法と IC-PCR 法で各々整理した。評価結果を図-11、12 に示すが、培養法では CT 値（消毒強度）を高めることで得られる定量値が限定的となったが、IC-PCR 法ではほぼ全てのケースで定量値が得られていた。培養法による検出下限値の向上には、培養のための多量の培養液、多数のシャーレが必要となることから、定量の実務に限界が生じる。さらに、培養法では検出 FRNAPH のグループ分けが不可能である。

一方、IC-PCR 法では検出 FRNAPH のグループ分けが容易である利点を有する。下水処理での除去特性や、消毒耐性が FRNAPH のグループごと異なっており、適切な除去・消毒効果の評価のためには、指標とする FRNAPH のグループ分けが必要である。グループ分けによる指標の選択は、第 4 期における主要研究での調査研究にも活用されており、今後も活用される。

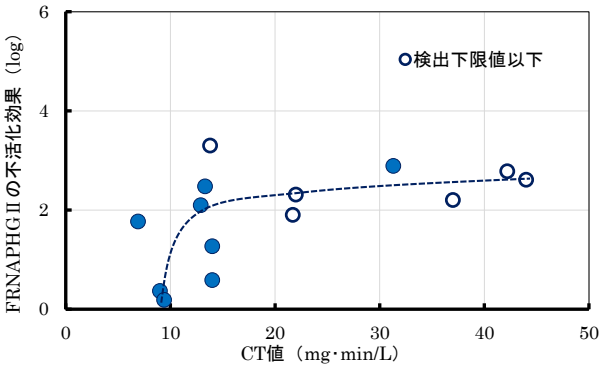


図-11 培養法によるFRNAPHGⅡの不活化効果の評価

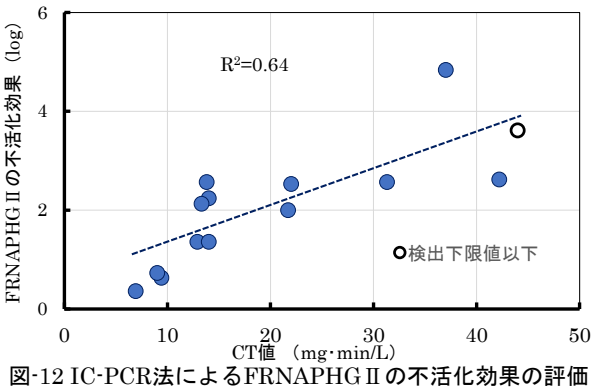


図-12 IC-PCR法によるFRNAPHGⅡの不活化効果の評価

3.2.2 抗原抗体法による簡易評価

NoV の陽性コントロールを対象に、塩素消毒効果の有無を抗原抗体キットにより評価を行った。評価結果を表-4 に示す。評価のため 2 回の実験を行ったが、迅速・簡易に NoV の定性結果が得られる反面、判定結果にバラツキがあり、感染価の評価のためには課題が残された。

上記 3.1.4 に示すとおり新型コロナウイルス感染症の流行前後において、NoV のヒット（検出）数に大きな違いが生じていたが、本評価では、新型コロナウイルス感

染症の流行時の下水試料を利用したため、下水中の NoV 濃度が低い状況であった。このため、人工的に作成された NoV の陽性コントロールを用いて評価を行った。断定的な根拠は得られず不明であるが、評価結果のバラツキの要因は、下水中に存在する NoV と人工的に作成されたコントロールの性状等の違いに起因するものと推定される。

表-4　抗原抗体法による不活化効果の推定結果

塩素添加濃度	実験1	実験2
接触時間20分間	判定	
0（mg/l）	陽性	陽性
5	陰性	陽性
10	陰性	陽性
15	－	陽性
20	陰性	陽性
30	－	陽性

4. まとめ

本研究では、NGS 技術により下水処理場の病原ウイルスを網羅的、継続的に検出し、その地域の感染症情報と照合することで、対象地域で流行している感染症の網羅的なモニタリングの可能性を評価した。次いで、FRNAPH を指標として、感染価評価のための新たな前処理手法および的確な消毒効果の評価手法の提案を行った。以下に得られた結果を示す。

1) 網羅・継続的な下水遺伝子調査により、地域の感染症の流行状況を適切に評価できることを明らかにした。

2) ウイルス遺伝子のヒット（検出）数と感染性胃腸炎、新型コロナウイルス患者数には相関関係があり、感染症の流行予測に活用できることを明らかにした。

3) 新たな前処理法の提案として、試料の前培養を行い PCR による定量（IC-PCR 法）により、感染価の評価の可能性を示せた。

4) IC-PCR 法による検出 FRNAPH のグループ分けによって消毒耐性に応じた指標の選択が可能となり、的確な消毒効果の評価に活用できる成果が得られた。

参考文献

1) Kazama, S., Masago, Y., Tohma, K., Souma, N., Imagawa, T., Suzuki, A., Liu, X., Saito, M., Oshitani, H., Omura, T.: Temporal dynamics of norovirus determined through monitoring of municipal wastewater by pyrosequencing and virological surveillance of gastroenteritis cases, Water Res., 92, pp. 244–253, 2016

2) Kazama, S., Miura, T., Masago, Y., Konta, Y., Tohma, K., Manaka, T., Liu, X., Nakayama, D., Tanno, T., Saito, M., Oshitani, H., Omura, T.: Environmental Surveillance of Norovirus Genogroups I and II for Sensitive Detection of Epidemic Variants, Appl. Environ. Microbiol., 83(9), e03406- 16, 2017

3) Wölfel, R., Corman, V.M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M.A., Niemeyer, D., Jones, T.C., Vollmar, P., Rothe, C., Hoelscher, M., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Ehmann, R., Zwirglmaier, K., Drosten, C., Wendtner, C.: Virological assessment of hospitalized patients with COVID□2019, Nature, pp. 1–10, 2020.

4) Wu, Y., Guo, C., Tang, L., Hong, Z., et al.: Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. Lancet Gastroenterol, Hepatol. 5, pp. 434–435, 2020.

5) Sun, J., Zhu, A., Li, H., Zheng, K., Zhuang, Z., Chen, Z., Shi, Y., Zhang, Z., Chen, S., Liu, X., Dai, J., Li, X., Huang, S., Huang, X., Luo, L., Wen, L., Zhuo, J., Li, Y., Wang, Y., Zhang, L., Zhang, Y., Li, F., Feng, L., Chen, X., Zhong, N., Yang, Z., Huang, J., Zhao, J., Li, Y.: Isolation of infectious SARS-CoV-2 from urine of a COVID-19 patient, Emerg Microbes Infect, 9(1), pp. 991−993, 2020.

6) Haramoto, E., Malla, B., Thakali, O., Kitajima, M.: First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan, Science of The Total Environment 737, pp. 140405, 2020.

7) Hata, A., Honda, R., Hara-Yamamura, H., Meuchi, Y.: Detection of SARS-CoV-2 in wastewater in Japan by multiple molecular assaysimplication for wastewater-based epidemiology (WBE), medRxiv, 2020.

8) Ahmed, W., Angel, N., Edson, J., et al.: First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: a proof of concept for the wastewater surveillance of COVID□19 in the community, Sci. Total Environ., 2020.62

9) Sherchan, S.P., Shahin, S., Ward, L.M., Tandukar, S., Aw, T.G., Schmitz, B., Ahmed, W., Kitajima, M.: First detection of SARS□CoV-2 RNA in wastewater in North America: A study in Louisiana, USA, Science of The Total Environment 743, pp. 140621, 2020.

10) La Rosa, G., Iaconelli, M., Mancini, A., Bonanno, F., Veneri, Bonadonn, L., Lucentini, Suffredini, E.: First

detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy, Sci. Total Enviro. 736, pp. 139652, 2020.

11) Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R.: 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., pp. 511–516 2020.

12) Aw, T.G., Howe, A., Rose, J.B.: Metagenomic approaches for direct and cell culture evaluation of the virological quality of wastewater, J. Virol. Methods, 210, pp. 15–21, 2014

13) 風間 しのぶ, 真砂 佳史, 沼澤 聡, 大村 達夫: 下水中の ポリ A 鎖を有する 1 本鎖（+）RNA ウイルスの選択的 メタゲノム解析手法の検討, 環境工学研究論文集, 71(7), pp. III_339-III_349, 2015

14) Lee, S., Suwa, M., Shigemura, H.: Occurrence and reduction of F-specific RNA bacteriophage genotypes as indicators of human norovirus at a wastewater treatment plant, J. Water Health, 17(1), pp. 50–62, 2019

15) 農林水産消費安全技術センター:飼料分析基準(平成28 年一部改定)、pp16-17,2016.

STUDY ON EARLY DETECTION OF PATHOGENIC MICROORGANISMS USING GENETIC ANALYSIS

Research Period: FY2018-2021
Research Team: Water quality Team, Water Environment Research Group
Innovative Materials and Resources Research Center
Author: YAMASHITA Hiromasa
SHIGEMURA Hiroyuki
SUWA Mamoru
Lee Suntae

Abstract:

In this study, we evaluated the possibility of comprehensive monitoring of infectious diseases prevalent in the target area by comprehensively and continuously detecting pathogenic viruses at sewage treatment plants using Next-Generation Sequencing (NGS) technology and comparing them with infectious disease information in the area.

Furthermore, using F-specific RNA bacteriophage as an indicator, we proposed a new pretreatment method for assessing the infectivity value and a method for evaluating the effectiveness of disinfection.

As a result, it was clarified that comprehensive and continuous sewage surveys could appropriately assess the epidemic situation of infectious diseases in the region. It was possible to evaluate the infectivity value by pre-culture of the sample and quantification by PCR (Integrated Culture PCR method : IC-PCR method). By applying the IC-PCR method, it has become possible to accurately evaluate the effectiveness of disinfection.

Keywords: Next-Generation Sequencing, Virus, F-specific RNA bacteriophage, Comprehensive detecting, Infection monitoring, Infectivity value