

2-2-2 下水中の新型コロナウイルス RNA の検出

及び感染性に関する調査

施設管理部 環境管理課 石井 裕樹
檜原 慎久
森田 健史

1. はじめに

新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の主な感染経路は飛沫感染や接触感染であるが、感染者の糞便中においても新型コロナウイルス(SARS-CoV-2: 図1)が排出されることから、下水を介したヒトへの暴露の可能性が懸念されている。世界保健機関(WHO)によると、これまで下水を介して感染した事例は報告されていないが¹⁾、下水から新型コロナウイルスのRNAを検出した事例は数多く報告されており、海外ではオーストラリア、アメリカ、オランダ、フランス等、国内では山梨県、石川県、富山県、横浜市の下水处理場における報告事例がある。これらの報告は、感染流行状況の把握や感染流行予測への活用を目指したものが多く、下水中の新型コロナウイルスの感染性について検証した事例は国内ではまだなく、海外でも少ない。そのため、下水の安全性について、流入下水に触れる可能性のある下水道作業従事者の方々や放流先の都民の方々の懸念が払拭されていない状況にある。

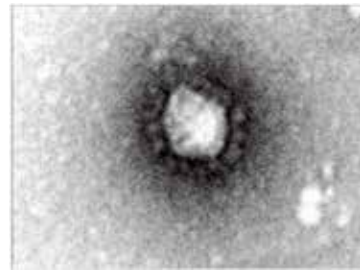


図1 新型コロナウイルス写真
(東京都健康安全研究センターHPより)

そこで、東京都では、感染拡大の第2波である2020年6月末から8月末にかけて、処理区域内において感染者が多いと推定される2か所の水再生センターで流入下水及び放流水を採取し、新型コロナウイルスに関してリアルタイム RT-PCR法によるRNAの存在の有無の調査及びウイルス培養試験による感染性の有無の調査を行った。さらに、新型コロナウイルスRNAの検出状況と処理区域内における新規感染者数を比較したのでそれぞれ報告する。

なお、リアルタイム RT-PCR法とは、RNA分子から逆転写反応により生成されたDNA分子を対象として実施するリアルタイム PCR法のことである。また、リアルタイム PCR法とは PCR反応産物を PCR反応のサイクルごとに測定することで、試料中の鋳型 DNAの濃度を定量する手法である。

2. 調査方法

2.1 対象施設

調査は、合流式下水道であり、かつ処理区域内の感染者が多いと推定される芝浦水再生センター及び落合水再生センターで行った（図 2）。

芝浦水再生センターの処理区面積は約 6,400 ha で、処理区域は千代田区、中央区、港区、新宿区、渋谷区の大部分と品川区等の一部であり、オフィスビルの立ち並ぶ都心の市街地の中に位置している。処理能力は 83 万 m^3 /日、令和元年度の処理実績は約 62 万 m^3 /日で、標準活性汚泥法による処理の後、塩素消毒を行い、東京湾に放流している。処理水の一部をオゾン処理及び膜処理後に周辺地区へ再生水として供給するとともに、施設内には立体都市計画制度を利用して建築された大型複合ビル「品川シーズンテラス」がある等、良好な都市環境の創出に貢献している。

一方、落合水再生センターの処理区面積は約 3,500 ha で、処理区域は中野区、新宿区、杉並区等の一部であり、新宿副都心に近い住宅地の中に位置している。処理能力は 45 万 m^3 /日、令和元年度の処理実績は約 32 万 m^3 /日で、標準活性汚泥法と砂ろ過法による高度処理の後、塩素消毒を行い、神田川に放流している。処理水の一部を再生水として西新宿及び中野坂上地区に供給するとともに、水の流れがほとんどなくなった城南三河川（渋谷川・古川、目黒川、呑川）に送水し、清流を復活させる事業にも取り組んでいる。なお、処理区域内には落合水再生センターの処理能力を補完するため中野水再生センターが稼働しており、中野区、杉並区の一部を処理区域としている。

2.2 試料採取

感染拡大の第 2 波である 2020 年 6 月末から 8 月末にかけて、芝浦水再生センター及び落合水再生センターの流入下水及び放流水を採取した（図 3）。採取頻度は、流入下水について週 1 回、放流水について 2 週に 1 回とし、降雨の影響を受けていない平日の午前 10 時に採取した。試料量は約 400 ml であり、放流水については、採取後すみやかにチオ硫酸ナトリウムを添加し残留塩素を除去した。試料は -18°C 以下で凍結保存した後、東京都健康安全研究センターに運搬し、検査・試験を行った。検査・試験フローを図 4 に示す。



図 2 水再生センター位置

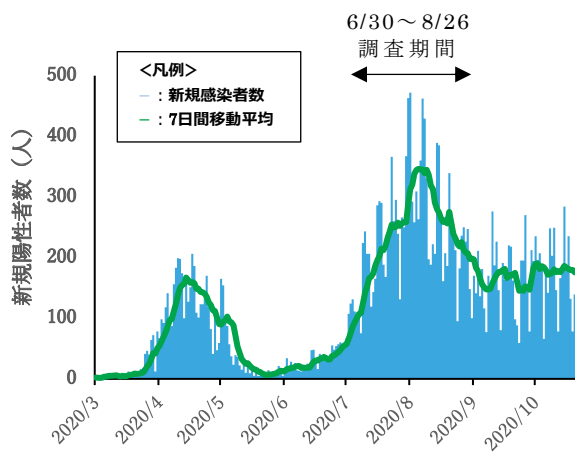


図3 東京都 COVID-19 新規感染者数推移

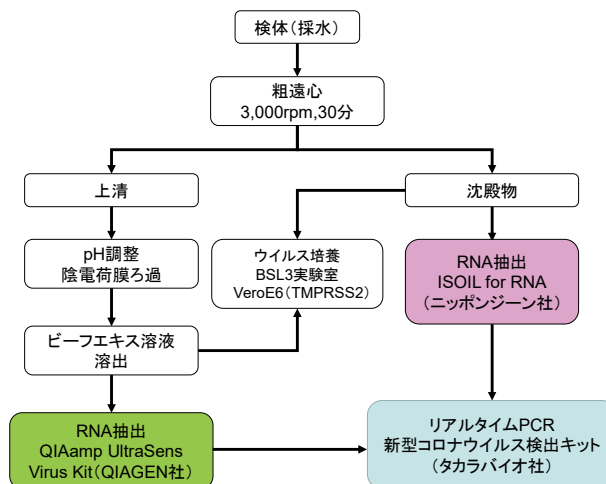


図4 検査・試験フロー

2.3 ウイルス濃縮及び RNA 抽出

下水中の新型コロナウイルス RNA 濃度は臨床検体と比較して低濃度であるため、濃縮操作が必須となる。一般的なウイルスの濃縮操作として、陰電荷膜法、ポリエチレングリコール沈殿法、限外ろ過膜法等が知られているが、本調査では操作の容易性から陰電荷膜法を採用した。

手順は、まず、試料 400 ml を 3,000rpm で 30 分遠心分離し、沈殿物を分離した。上清の濃縮は、孔径 1 μm のグラスファイバーでろ過した 200 ml の試料に MgCl₂ を最終濃度が 0.05M となるように添加し、0.5N の塩酸により pH を 3.5 に調整した後、孔径 0.45 μm の陰電荷膜（アドバンテック東洋社 A045A047A）2 枚でろ過した。陰電荷膜は、裁断後、3% のビーフェキス溶液 4 ml を加え、ウイルスを誘出回収する作業を 2 回行った。2 回の誘出液は、3,000rpm で 15 分遠心分離した後、0.22 μm シリンジフィルターでろ過し、ウイルス濃縮液とした。このウイルス濃縮液 1 ml から QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN 社) により RNA を抽出し、抽出液 60 μl を得た。

また、通常ウイルス検査では沈殿物を検査対象としないが、流入下水において沈殿物から新型コロナウイルス RNA が検出されやすいという報告があることから²⁾、遠心分離により得られた沈殿物についても検査を行った。沈殿物は濃縮操作を行わず、800 μl から ISOIL for RNA (ニッポンジーン社) により RNA を直接抽出し、抽出液 40 μl を得た。

2.4 リアルタイム RT-PCR 法

既往の報告では、N 遺伝子、E 遺伝子、ORF1ab 遺伝子、RdRp 遺伝子等の特定領域をターゲットにして新型コロナウイルス RNA 濃度を定量している（図 5）。本調査では、検出キットとして、N 遺伝子内の 2 か所の増幅領域（表 1、N1: 72bp、N2: 67bp）をターゲットとしている SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (タカラバイオ社) を使用した。2 か所の増幅領域は同じ蛍光のプロンプ (Cy5) を使用しており、同じウェル内で同時に反応させ、同じ蛍光を捕捉することで高感度な検出が可能となっている。

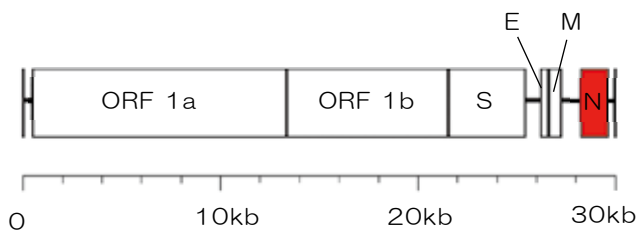


図5 新型コロナウイルス RNA の各遺伝子領域

表1 プライマー・プローブ塩基配列

遺伝子領域	プライマー・プローブ名	プライマー・プローブ配列 (5'>3')
N1	2019-nCoV_N1-F	GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT
	2019-nCoV_N1-R	TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG
	2019-nCoV_N1-P	Cy5-ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC-BHQ1
N2	2019-nCoV_N2-F	TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA
	2019-nCoV_N2-R	GCG CGA CAT TCC GAA GAA
	2019-nCoV_N2-P	Cy5-ACA ATT TGC CCC CAG CGC TTC AG-BHQ1

装置は、QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) を使用し、50℃ 30分、95℃ 5分の条件で逆転写反応を行った後、95℃ 15秒、60℃ 60秒の条件で45サイクルまでPCR処理を行った。

検査結果の判定は、検査キットの説明書に従い、40 サイクル未満を陽性とした。また、40～45 サイクルであっても増幅曲線の立ち上がりが認められたものは陽性（検出限界以下）とし、立ち上がりが無い陰性と区別した。各検体は2ウェルずつ検査を行い、異なる結果がでた場合にはさらに1ウェルの追加検査を行って判定した。

検出限界は5コピー/1反応であり、試料の濃縮倍率に基づき1Lあたりに換算すると、定量下限値は上清で600コピー/L、沈殿物で500コピー/Lである。

なお、全ての検査について、ポジティブコントロールにおいて増幅曲線が立ち上がること及びネガティブコントロールにおいて増幅曲線がないことを確認するとともに、プロセスコントロールとして下水中に存在するトウガラシ微斑ウイルスのRNA濃度を測定し、既知の濃度と大差がないことを確認した。

2.5 ウイルス培養試験

リアルタイム RT-PCR 法で陽性となった試料についてウイルス培養試験を行った。培養細胞は、国立感染症研究所の開発したTMPRSS2発現Vero E6細胞を使用し、リアルタイム RT-PCR 法と同様、ウイルス濃縮操作後の上清と沈殿物のそれぞれについて試験した。試験は、バイオセーフティレベル3 (BSL3) の実験室で行った。

手順は、24穴プレートに単層培養したTMPRSS2発現Vero E6細胞に試料を100 μl接種し、37℃で1時間静置した。その後、試料を取り除き、ダルベッコ変法イーグル培地「ニッスイ」(日水製薬社)に10%ウシ胎児血清 (BioWest 社) と1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液5,000U/ml (MP Biomedicals 社) を添加した維持培地を1ml加え、37℃、5%CO₂下で3週間培養した。この間、倒立顕微鏡で細胞変性効果 (CPE) を毎日観察した。なお、1週間毎に新たな培養細胞を培養上清に入れ継代した。

3. 結果と考察

3.1 新型コロナウイルス RNA 検出状況

新型コロナウイルス RNA 検出状況を表2に示す。

流入下水について、上清からは新型コロナウイルス RNA が検出されなかったのに対し、沈殿物では芝浦水再生センターの7試料(7/16～8/26)、落合水再生センターの2試料(7/22、7/29) から新型コロナウイルス RNA が検出された。なお、検出された全ての試料で新型コ

コロナウイルス RNA 濃度は定量下限値の 500 コピー/L を下回っており、流入下水に新型コロナウイルス RNA は存在するものの、その濃度は著しく低いことが分かった。新型コロナウイルス RNA 濃度が定量できなかった理由は、海外の流行地域と比較して人口あたりの感染者数が少なかったためであると考えられる。また、新型コロナウイルス RNA が沈殿物から検出され上清から

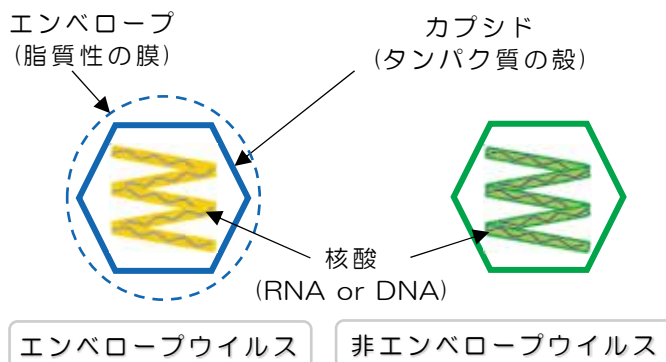


図 6 ウィルス模式図

検出されなかった理由は、非エンベロープウイルス（図 6 右）が上清側に移行しやすいのに対し、新型コロナウイルス等のエンベロープウイルス（図 6 左）は下水中の浮遊物質と結合して沈殿物に移行することが報告されており²⁾、そうしたことが影響したと考えられる。

一方、放流水は、検査した全ての試料において新型コロナウイルス RNA は検出されなかった。この理由として、新型コロナウイルスは沈殿池において物理的除去、反応槽において生物学的分解、消毒工程において酸化・分解等されていることが報告されており¹⁾、そうしたことが影響したと考えられる。

表 2 新型コロナウイルス RNA 検出状況及び培養状況

	芝浦水再生センター								落合水再生センター							
	流入下水				放流水				流入下水				放流水			
	PCR 上清	PCR 沈殿物	ウイルス培養 上清	ウイルス培養 沈殿物	PCR 上清	PCR 沈殿物	ウイルス培養 上清	ウイルス培養 沈殿物	PCR 上清	PCR 沈殿物	ウイルス培養 上清	ウイルス培養 沈殿物	PCR 上清	PCR 沈殿物	ウイルス培養 上清	ウイルス培養 沈殿物
2020/6/30	n.d.	n.d.	—	—	—	—	—	—	n.d.	n.d.	—	—	—	—	—	—
2020/7/7	n.d.	n.d.	—	—	n.d.	n.d.	—	—	n.d.	n.d.	—	—	n.d.	n.d.	—	—
2020/7/16	n.d.	<500	No CPE	No CPE	—	—	—	—	n.d.	n.d.	—	—	—	—	—	—
2020/7/22	n.d.	<500	No CPE	No CPE	n.d.	n.d.	—	—	n.d.	<500	No CPE	No CPE	n.d.	n.d.	—	—
2020/7/29	n.d.	<500	No CPE	No CPE	—	—	—	—	n.d.	<500	No CPE	No CPE	—	—	—	—
2020/8/5	n.d.	<500	No CPE	No CPE	n.d.	n.d.	—	—	n.d.	n.d.	—	—	n.d.	n.d.	—	—
2020/8/12	n.d.	<500	No CPE	No CPE	—	—	—	—	n.d.	n.d.	—	—	—	—	—	—
2020/8/19	n.d.	<500	No CPE	No CPE	n.d.	n.d.	—	—	n.d.	n.d.	—	—	n.d.	n.d.	—	—
2020/8/26	n.d.	<500	No CPE	No CPE	—	—	—	—	n.d.	n.d.	—	—	—	—	—	—

PCR 検査の「n. d.」は不検出、「<500」は定量下限値未満（コピー/L）
 ウィルス培養試験の「No CPE」は陰性
 「—」は試験未実施

3.2 新型コロナウイルス培養状況

リアルタイム RT-PCR 法で陽性となった芝浦水再生センターの流入下水 7 試料と落合水再生センターの流入下水 2 試料について、上清と沈殿物に分けてウイルス培養試験を行った。新型コロナウイルス培養状況を表 2 に示す。

全ての試料において新型コロナウイルス特有の細胞変性効果（CPE）は観察されず、新型コロナウイルスの感染性は失われていることが推察された。

新型コロナウイルス RNA が検出されているにもかかわらず、ウイルス培養試験結果が陰性となる理由は、流入下水中の新型コロナウイルス RNA 濃度が著しく低いことに加えて、エンベロープウイルスは一般的に環境中で不安定であり、エンベロープ等が損傷すると感染力を失うことが報告されていることから¹⁾、そうしたことが影響したと考えられる。

3.3 新規感染者数データとの比較

新型コロナウイルス RNA 検出状況と 10 万人あたりの新規感染者数の推移を図 7 に示す。新型コロナウイルス RNA の検出状況と 7 日間移動平均による新規感染者数を比較すると、いずれの水再生センターにおいても、感染拡大の初期では新型コロナウイルス RNA が検出されず、10 万人あたりの新規感染者数が 4 人を超えている際に概ね検出されていた。ただし、落合水再生センターでは 4 人を超えていても検出されない時もあるなど、感染流行状況を十分に反映した結果は得られなかった。また、流入下水の新型コロナウイルス RNA 濃度が定量できなかったことから、新型コロナウイルス RNA 濃度と感染者数の相関を調べることはできなかった。

以上のことから、東京都の現状では、下水試料の検査結果を感染流行状況の把握や感染流行予測に用いることは困難であると考えられる。なお、これらの傾向は、様々な仮定(例: 報告感染者数は真値であり、処理区域内人口は一定)に基づき加工(例: 新規感染者数の 7 日間移動平均の算出や面積比率による処理区域内新規感染者数の推計)した結果得られたものであるため、それらの妥当性について今後さらに検証が必要である。

新型コロナウイルス RNA 検出状況と受水量あたりの新規感染者数の推移を図 8 に示す。芝浦水再生センターにおいては 7 日間移動平均による新規感染者数が 0.6 人/万 m³ を超え

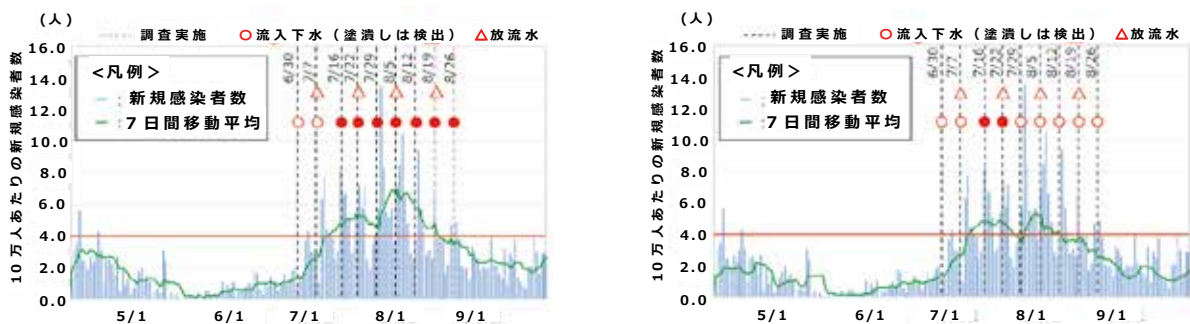


図 7 新型コロナウイルス RNA 検出状況と 10 万人あたりの新規感染者数の推移
(左：芝浦水再生センター 右：落合水再生センター)

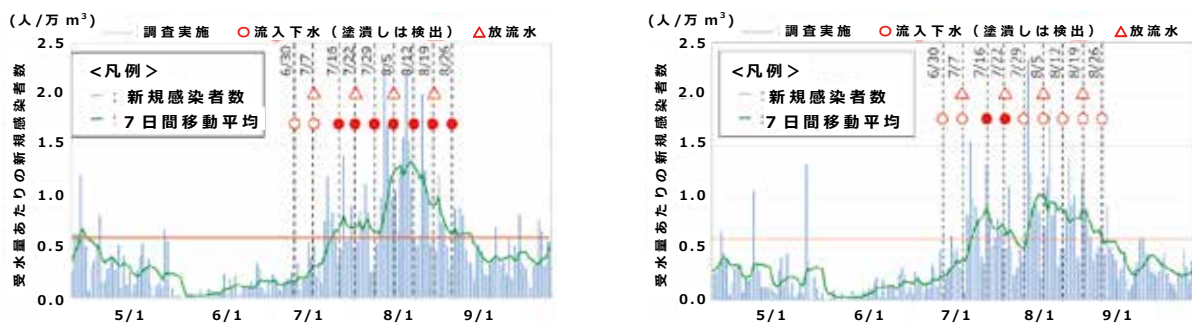


図 8 新型コロナウイルス RNA 検出状況と受水量あたりの新規感染者数の推移
(左：芝浦水再生センター 右：落合水再生センター)

た時に新型コロナウイルス RNA が検出されていたのに対し、落合水再生センターにおいては検出されていないデータの方が多く、受水量あたりに換算しても統一した傾向を見出すことはできなかった。この結果についても、下水の流達時間や流入水質等が影響しているのかについて、今後の検証が必要である。

4. まとめ

新型コロナウイルス感染症の感染拡大の第2波である2020年6月末から8月末にかけて、処理区域内において感染者が多いと推定される都内2か所の水再生センターで流入下水及び放流水を採取し、リアルタイム RT-PCR 法による RNA の存在の有無及びウイルス培養試験による感染性の有無の調査を行った。その結果、以下のことが分かった。

- ・一部の流入下水から新型コロナウイルス RNA が検出されたものの、その濃度は定量下限値未満であり著しく低かった。
- ・放流水から新型コロナウイルス RNA は検出されなかった。
- ・リアルタイム RT-PCR 法で陽性となった流入下水の試料についてウイルス培養試験を行った結果、全ての試料について新型コロナウイルス特有の細胞変性効果は観察されず、感染性は失われていることが推察された。
- ・流入下水における新型コロナウイルス RNA の検出状況と7日間移動平均による新規感染者数を比較すると、いずれの水再生センターにおいても、10万人あたりの新規感染者数が4人を超えている際に新型コロナウイルス RNA が概ね検出されていた。
- ・流入下水における新型コロナウイルス RNA 濃度が定量下限値未満であったこと等から、現状では下水試料の検査結果を感染流行状況の把握や感染流行予測に用いることは困難であると考えられる。

下水中の新型コロナウイルスの挙動は未だ不明な点が多く、その感染性について検証した事例も少ないことから、下水の安全性に関する懸念が払拭されていない状況にある。本調査が、流入下水に触れる可能性のある下水道作業従事者の方々や放流先の都民の方々、ひいてはその他の下水道関係者や広く一般市民の安心の一助となれば幸いである。

参考文献

- 1) World Health Organization, Water, Sanitation, hygiene, and waste management for SARS-CoV-2, the virus that causes COVID-19 Interim guidance, 2020/07
- 2) K. Kitamura, K. Sadamasu, M. Muramatsu, et al., Efficient detection of SARS-CoV-2 RNA in the solid fraction of wastewater, Science of the Total Environment, 763 (2021) 144587, 2020/12