

下水インフラを活用した新型コロナウイルス遺伝子の検出による早期検知

やまもとれいこ いしかわよしひろ すずきひでゆき あくねまさむね きしだ
山本礼子¹・石川美宏¹・鈴木英之¹・阿久根正宗¹・岸田まりな¹

¹ (株) 建設技術研究所 東京本社上下水道部 (〒103-0007 東京都中央区日本橋浜町3-15-1)

新型コロナウイルスは糞便中からも検出されることから、下水中のウイルス遺伝子濃度と感染者数の相関があると報告されているが、日本では低濃度であるため下水中のウイルス濃度分析による高度なトレンド予測は十分に行えていない。そのため、本研究では低ウイルス濃度における感染動向の早期検知を目的とした下水のサンプリング、分析、結果の解析を行った。下水サンプルの繰り返し分析でウイルスが検出された回数により低ウイルス濃度を定量化し、正規分布、ベイズ推定により療養者数の増加確率を推定した。その結果、新型コロナウイルスの動向について早期検知の可能性が示唆され、本手法が下水疫学で活用できる可能性が示された。

Key Words : COVID-19, 下水疫学, 早期検知, モニタリング, 正規分布, ベイズ推定

1. はじめに

(1) 背景

下水サーベイランス（下水中のウイルス検査・監視）は、新型コロナウイルス感染症の地域毎のまん延状況の把握や特定の施設における感染有無の探知等を行い、効果的・効率的な対策に繋げられる可能性がある。このため、国内外で下水調査に関する研究・取組が行われている¹⁾。下水サーベイランスは人からの検体採取が不要であることから、臨床検査よりも網羅的かつ早期に感染状況を把握できる可能性があり、その中で、欧米では新型コロナウイルスの新規感染者数と下水中のウイルス遺伝子（以下、ウイルス）濃度は相関があることや、新規感染者数の報告よりも早期に下水中に兆候が現れることが報告されている²⁾が、日本では欧米に比べ感染者数が少なく、下水中のウイルス濃度の多くが定量下限値以下であるため高度なトレンド予測が困難である。

そこで、下水疫学調査を重要な社会インフラのひとつと位置付け、感染動向を事前に検知することにより、対策に資するよう研究を行った。

(2) 本手法の概要

本研究では、①下水のサンプリング及び分析結果を用い、②低ウイルス濃度における検体の繰り返し分析結果を統計的に解析することで、③正規分布及びベイズ推定による確率分布を用いた早期検知を行った。それらを活用し、社会実装に向けたモニタリング計画手法を検討した。図-1 にフローを示す。

2. 確率分布を用いた流行の早期検知

(1) 下水サンプリング及び分析

A市下水処理場におけるサンプリングの概要を表-1に示す。採水したサンプルは、「下水中の新型コロナウイルス遺伝子検出マニュアル 日本水環境学会」に基づき、1サンプルに対し3回分析を行った。プロセスコントロールはトウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）、濃縮方法はPEG沈殿法、RNA検出はCDC_N2系を用いた。

なお、解析期間はワクチン接種率が50%を超過した2021年10月以降は下水中のウイルスがほぼ検出されなかったため、2021年9月末までの分析結果を対象とした。

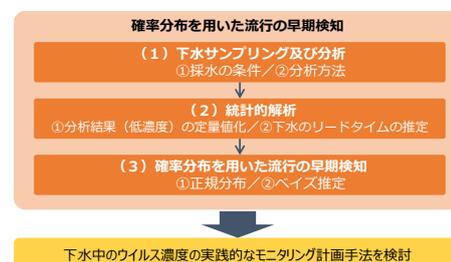


図-1 本研究のフロー

表-1 下水サンプリングの概要

	期間①	期間②
処理能力	約70千m ³ /日 (2020/04時点)	
処理人口	約114千人 (2020/04時点)	
採水場所	沈砂池 (粗目スクリーン手前)	
採水期間	2020/07~2021/03	2021/04~2021/12
頻度	1回/週	2回/週
採水方法	スポット採水 (朝)	コンボジット採水 (朝・昼・夕)
解析対象	2020/07~2021/09	

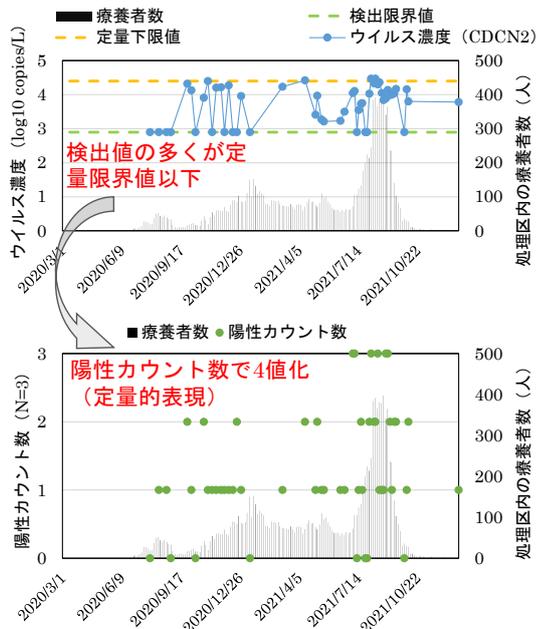


図-2 分析結果の定量値化

(2) 統計的解析

a) 分析結果の定量値化

定量下限値を下回るが検出限界値以上であるウイルス濃度分析結果を定量値化するため、3回の繰り返し分析の中で下水中のウイルスが検出された回数(以下、「陽性カウント数」という。)を用いて0回～3回の4値とした³⁾(図-2)。

b) 下水のリードタイム推定

下水中のウイルス濃度と感染者数との相関は、新規感染者だけでなく療養者もウイルスを排出することから、本研究では療養者数を用いた。ここで、感染動向を把握するにあたり、新規感染者数と療養者数の相関があることを前提とし、PCR検査の手続き等に要する時間だけでなく、不顕性や濃厚接触者がウイルスを保有していてもその時点で陽性となっていない隠れた感染者が陽性と判定されるまでの時間を早期検知することが可能となると考える。

下水中のウイルスは、感染拡大のおよそ1週間前に検出される⁵⁾と言われており、下水に兆候が表れてから同兆候が療養者報告数に表れるまでの日数(以下、「リードタイム」という。)を把握することが必要となる。リードタイムは、検査体制や結果の集計方針等の変化により経時的に変動する可能性が考えられる。そのため、感染の拡大から収束までを1期間として期間ごとに推定を行った。各期間で採水日と療養者数報告日のタイムラグを変化させて、陽性カウント数と1週間の療養者増減数の相関が最も高くなるリードタイムを推定した(図-3)結果、リードタイムは7日～10日と推定された(図-4)。

(3) 確率分布を用いた流行の早期検知

a) 解析目的

下水中のウイルス検出が低濃度の場合、感染者の将来人数のような精緻な予測は難しいため、流行の

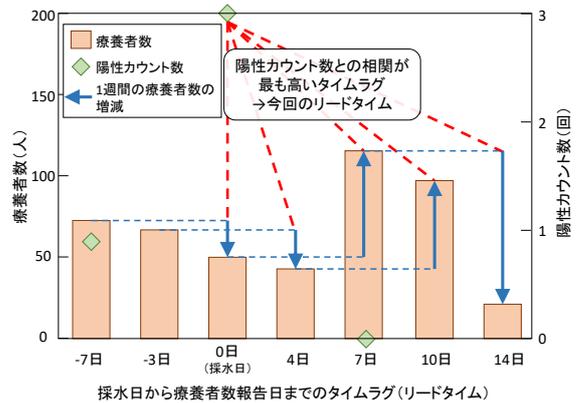


図-3 リードタイム推定のイメージ

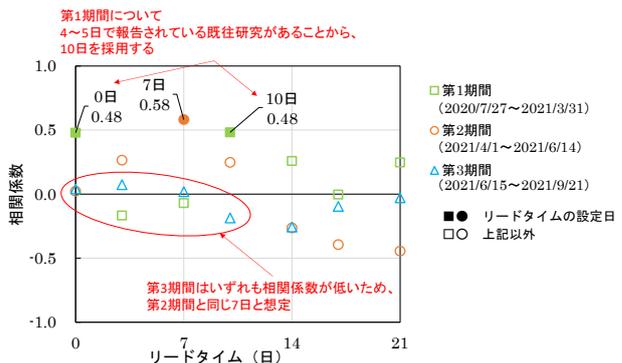


図-4 リードタイムの推定結果

表-2 解析方法の一覧

解析方法	必要なデータ数	使用する療養者数のデータ	本研究の検討内容
①正規分布	多	定量(増減人数)	解析
②ベイズ推定	少～多	定性(増加・非増加)	解析、検証

拡大・収束の早期検知を目的とし、療養者数の増加確率を推定した。療養者数の増加確率は、採水日からリードタイム後の療養者数が、その1週間前の療養者数と比較して増加する確率を示す。

b) 解析方法

陽性カウント数におけるリードタイム後の1週間の療養者増減数のデータから、データ数が比較的多い場合と少ない場合を想定し、①正規分布及び②ベイズ推定の2つの方法で療養者数の増加確率を推定した。解析方法の特徴は表-2に示すとおりである。

c) 正規分布に基づいた増加確率の推定

正規分布は、データ数が十分にある場合の確率予測が可能であり、正規分布に基づいて療養者数の増加確率を推定した。療養者増減数が正規分布に従うと想定して陽性カウント数ごとにフィッティングを行い、得られた確率分布から増減数が正となる確率を増加確率とした。

解析対象期間の全データを使用した結果、全ての陽性カウント数で正規分布にやや従わない傾向が見られた。そこで、以下の期間のデータを除いた。

①2021年8月中旬(お盆の帰省時期)のデータは、被検査者の急増に伴う、療養者に占める不顕性感染者の割合が増加し、他期間と異なることが想定されるため異常値と判断した。

②ワクチン接種率が50%程度に達した2021年9

月以降のデータは、ワクチン接種率の増加に伴い、不顕性感染を含む真の療養者数と臨床検査を基に報告される療養者数に乖離が発生していたと想定されるため、異常値と判断した。

上記条件でデータを選別し、正規分布で療養者増減数をフィッティングした結果、全ての陽性カウント数で測定データが概ね正規分布に従った(図-5)。図中の正の累積確率が療養者数の推定増加確率、負の累積確率が療養者数の減少確率である。

陽性カウント数が0回の場合は療養者数の減少確率が59%であり、下水でウイルス濃度が検出されない場合はリードタイム後の1週間で療養者数が減少する可能性の方が高い。一方で、陽性カウント数が1~2回の場合は療養者数の増加確率が64%、陽性カウント数が3回の場合は97%であった。これより、下水でウイルスが検出され、陽性カウント数が多いほど療養者数が増加する確率が高いことが分かる。

以上より、陽性カウント数と1週間の療養者増減数を用いて療養者数の増減トレンドの予測が可能であると言える。実用方法としては、下水サンプルの測定により陽性カウント数を新たに入手した場合、入手した陽性カウント数における図-5の増加確率が療養者数の推定増加確率と考えることができる。

d) ベイズ推定に基づいた増加確率の推定

データ数が少ない段階でも採用でき、データ数の増加に伴って予測確率を更新することで精度を高めることができるベイズ推定による検討を行った。療養者数が「増加する」か「増加しない(減少または不変)」かは、増加確率 p の二項分布に従うと仮定し、 p をベイズ推定により求めた。共役事前分布をベータ分布の一般分布 $B(1,1)$ として設定した上で、実用を想定した解析のため、ベイズ更新については各陽性カウント数の測定データ10回集積ごとに行った。

また、各更新後の増加確率と次回更新までの実際

の療養者数の増加率を比較することで精度を検証した。実用では、感染拡大~収束の波の途中で何度か更新することが想定される。その際、リードタイムを正確に推定できない可能性があるため、本研究では実用を想定し、リードタイムは7日であると仮定し、ベイズ推定を行った。

なお、ベイズ推定は実用を想定して解析を行ったため、対象期間内の全データを用いて解析し、異常値の除外等は行っていない。

ベイズ推定はデータ数が少ない段階でも使用できる一方、各更新時にデータ数が少ないと、療養者数の細かな変動に結果が大きく依存する。そのため、ある程度の回数の分析結果をまとめてベイズ更新を行うことが望ましいが、陽性カウント数1~3回のそれぞれでデータ数が不十分であり、ベイズ更新が十分にできなかった。そこで、本研究においては、陽性カウント数が0回、1回以上の2分類で整理した結果、データ数が確保され、陽性カウント数0回では4回、陽性カウント数1回以上では5回のベイズ更新を行うことができた。

ベイズ更新による療養者増加確率の推定結果を図-6に示す。療養者数の増加確率の期待値は、陽性カウント数0回の場合は33→41%、陽性カウント数1回以上の場合は33→52%と変化した。陽性カウント数が0回の場合は療養者数が増加しない傾向が分かるが、1回以上の場合は増加確率が50%付近であり、療養者数が増加する確率と増加しない確率が同程度である。これは、本手法では療養者数が少ないケースと多いケースの増減回数を同等に扱っているためだと考えられる。療養者数が少ない場合には、療養者1人の増減が療養者増減の判定に与える影響が大きいため、療養者数に応じて分類して増加確率の推定を行うなどの改善が必要である。一方で、陽性カウント数0回の場合には、陽性カウント数1回以上の場合に比べて全体的に療養者数が少なく、療

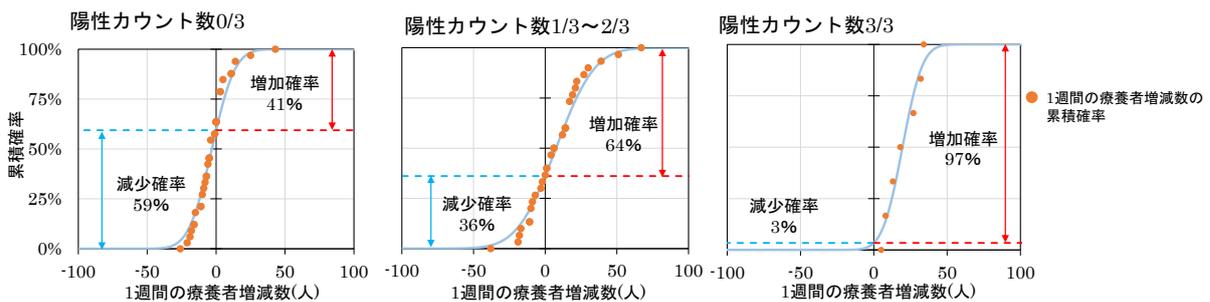


図-5 正規分布に基づく各陽性カウント数における療養者増加確率の推定

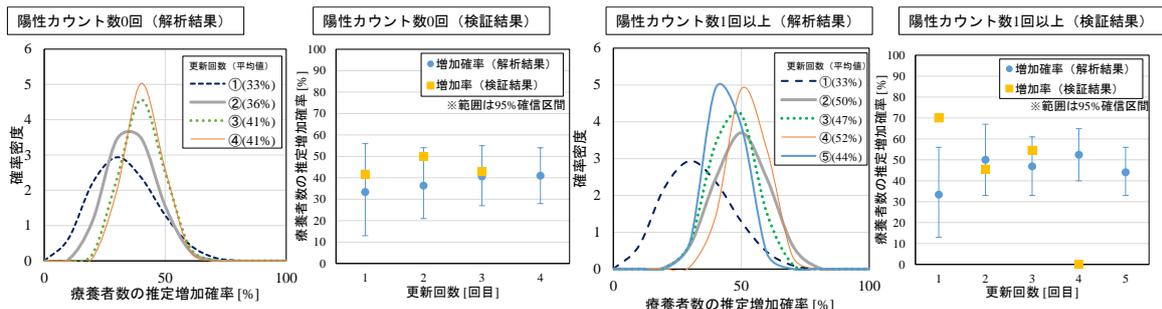


図-6 ベイズ推定に基づく各陽性カウント数における療養者増加確率の推定

養者 1 人の増減が療養者の増減判定に与える影響が同程度であったため、推定が可能となったと考えられる。

また、バイズ推定の検証について、最後のバイズ更新以降のデータは本研究の対象範囲外としたため、各陽性カウント数の最後のバイズ更新結果は検証の対象外である。そのため、陽性カウント数 0 回では 1~3 回目の更新、陽性カウント数 1 回以上では 1~4 回目の更新で検証を行った。

実際の療養者数の増加率が推定増加確率の 95% 確信区間内に含まれたケースは、陽性カウント数 0 回では全ての更新、陽性カウント数 1 回以上では 4 回のうち 2 回であった。バイズ推定は更新を重ねることで精度が上がるため、1 回以上のケースでも更新 2、3 回目は 95% 確信区間内に含まれていることから、本予測方法には再現度があると言える。一方、陽性カウント数 1 回以上における更新 4 回目では、ワクチン接種率の上昇に伴う不顕性感染者の増加により、95% 確信区間の範囲外になった可能性が考えられる。

(4) 早期検知における課題と展望

下水中のウイルス検出濃度が低い場合でも、陽性カウント数を用いることで定量化が可能となった。予測精度改善の余地はあるが、正規分布やバイズ推定での療養者数の増加確率の推定により流行トレンドの早期検知が可能であることが示唆された。

一方、本研究時期におけるワクチン接種率の高い状況では不顕性感染者の割合が増加し、流行の早期検知が困難であった。そのため、実用化に向けてはより一層のウイルスの検出精度向上や予測に用いるデータの最適化が必要である。

3. モニタリング計画手法への今後の展開

(1) モニタリング計画の提案

本検討では早期検知及び分析調査の結果より、社会実装に向けたモニタリング計画手法を以下のとおり取りまとめた。

- トrend把握には週 1 回の採水が必要であり、流行初期等は週 2 回以上の採水が望ましい。
- マンホール採水により、感染者がより多い(少ない)地域を洗い出すことが可能となる。
- 地域特性や人の生活パターンを加味し、採水時間の選定やコンポジットによる採水方法を設定する。

(2) 今後の課題と展望

本研究では、新型コロナウイルスの新しい変異株や、新型コロナウイルスに限らず下水中から検出可能な疫病等に適応できるため、下水疫学において広く活用できると考えられる。

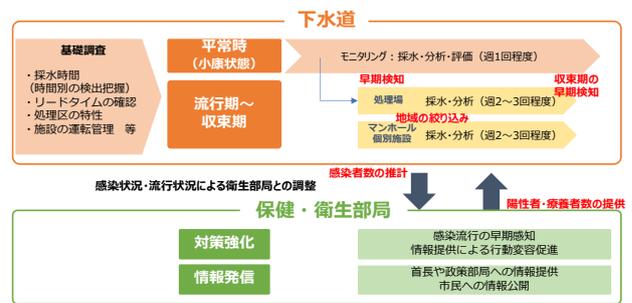


図-7 平常時及び検知時のモニタリングイメージ

下水インフラを活用することで、感染傾向を早期検知できることが確認されたことや、小流域や管渠施設などでも検出ができており、感染震源地(エピセンター)の絞り込みを組み合わせることで、経済活動との両立を進めていくうえでメリハリのある対策を行うことが期待できる。ポストコロナにおいて、処理区内の感染者数が少ない場合でも、不顕性や無症状者などにより下水中のウイルス検出濃度が高いことで警戒発信を行うなど、人を対象とした PCR 検査を行わなくても疫学調査により流行状況を把握することが可能であり、モニタリングの蓄積が重要である。

「下水 PCR 調査を活用した広域監視技術ガイドライン(案) 国土交通省」においても、保健衛生部局と下水道部局の連携手法を図るよう明記されている。本手法では、減少傾向の早期検知も同時に可能であるため、保健衛生部局との連携によるニーズ把握、採水箇所や地域特性に応じた採水時間・頻度についてモニタリング計画を立案し、情報公開と合わせ、平常時~ウイルス検知時~終息期における対策の判断に繋げることも期待される(図-7)。

謝辞: 本研究においては、下水サンプル回収には自治体に協力いただいた。また、金沢大学地球社会基盤学系 本多教授との共同研究により、助言指導いただき、株式会社環境総合リサーチの協力のもと分析を行った。ここで、感謝の意を表する。

参考文献

- 1) 下水サーベイランスに関する促進計画 令和3年11月16日 内閣官房新型コロナウイルス等感染症対策推進室ら
- 2) Artem Nemudryiら: 『Temporal Detection and Phylogenetic Assessment of SARS-CoV-2 in Municipal Wastewater』, Cell Rep Med, 1(6), 2020年9月.
- 3) Bo Zhaoら: 『Tracking community infection dynamics of COVID-19 by monitoring SARS-CoV-2 RNA in wastewater, counting positive reactions by qPCR』, medRxiv, 2021年12月.
- 4) Shufa Zhengら: 『Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study』, BMJ, 2020年4月
- 5) Jordan Pecciaら: 『Measurement of SARS-CoV-2 RNA in wastewater tracks community infection dynamics』, nature biotechnology, 2020年7月