

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調査

国立感染症研究所ウイルス第二部
主任研究官 吉田 弘

1.ポリオとポリオ根絶計画

2.不活化ポリオワクチン切り替え後のポリオ環境水サーベイランス

3.下水中の新型コロナウイルス調査の現状

令和2年度厚生労働行政推進調査事業費「環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制を構築するための研究」

1.ポリオとポリオ根絶計画

糞便中に排出されるウイルスの例

予防接種法



ウイルス	疾患名、症状等
ポリオウイルス	ポリオ
エンテロウイルス	ヘルパンギーナ、手足口病、無菌性髄膜炎、夏かぜ、発疹、発熱、おう吐等
パレコウイルス	筋炎、他？
A型、E型肝炎ウイルス	Hepatitis
ノロウイルス	下痢(<3days), 嘔吐
サポウイルス	
レオウイルス	unknown
ロタウイルス A,B,C group	下痢 (1wk)
アストロウイルス	下痢
ボカウイルス	呼吸器？
アデノウイルス	下痢, 呼吸器
(新型) コロナウイルス	呼吸器、下痢

R2年度厚生労働研究



はじめに ポリオとは

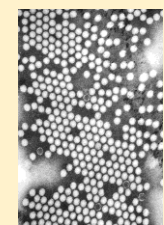
- 古くからある感染症
- +1本鎖RNAウイルス
- 1,2,3血清型
- 経口感染。腸管で増殖、便中に排泄
- 不顕性感染がほとんど（9割！）
- 不活化/生ワクチンにて予防可能な疾患
- 感染症法では第2類で届出



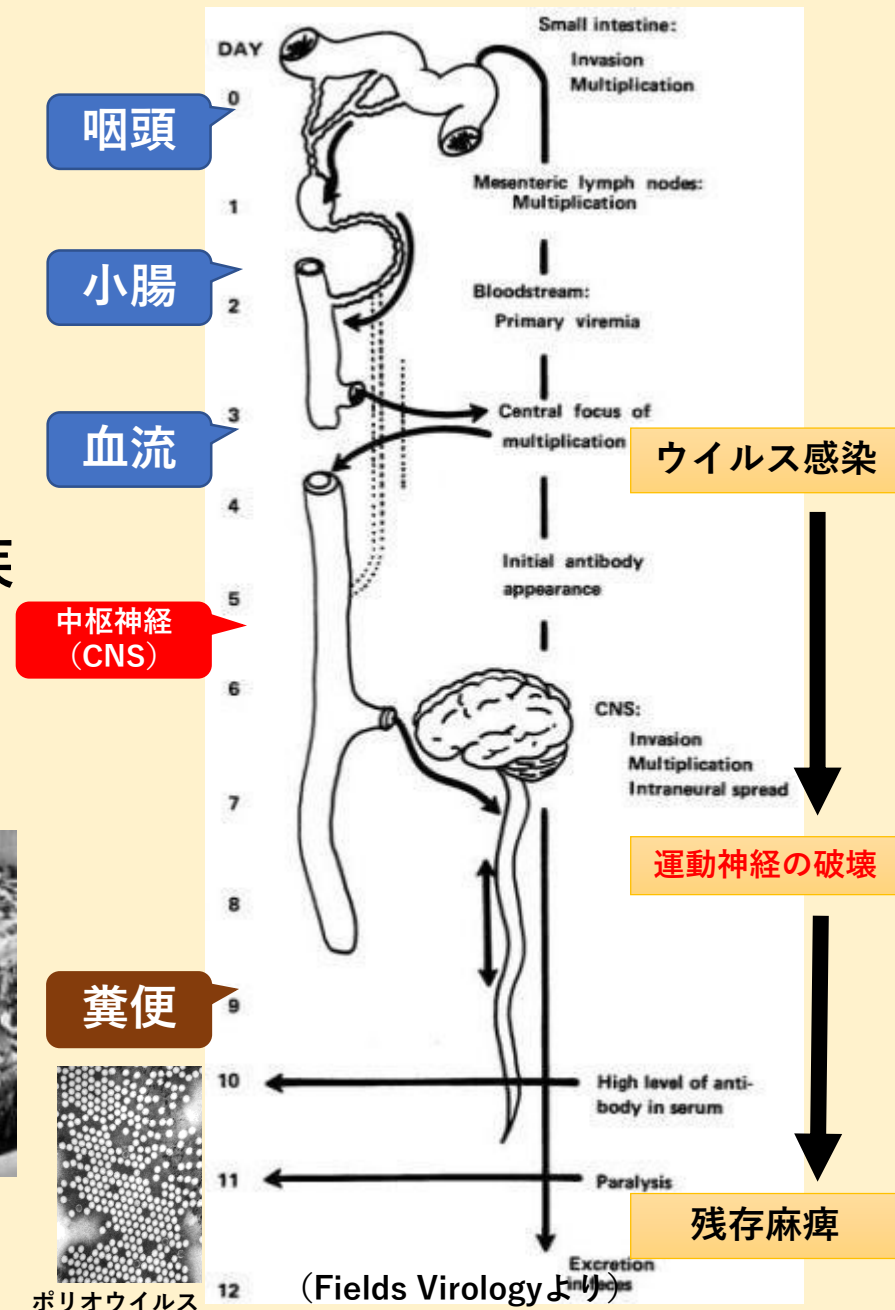
古代エジプトの石版



「鉄の肺」1950年代
(WHO HPより)



ポリオウイルス



ポリオ根絶戦略を単純化すると

ヒト集団

生ワクチンを一斉投与

野生型

ワクチン株

入れ替え

野生型がなくなれば
「生ワクチン」を停止

ウイルス消失
するはず・・・

接種効果の確認の方法

ポリオ疑い患者を捕捉
(急性弛緩性麻痺サーベイランス)

糞便を採取

ワクチンか野生株か調べる
(実験室)

最終段階ではウイルス伝播
状況を感じ度の高い方法で確
認

環境 (水) サーベイランス
Environmental
surveillance

ポリオ根絶計画開始当初から患者数は劇的に減少

出典：<http://www.polioeradication.org/>

1988 35万人以上

1988年世界保健総会で根絶計画を決議

GPEIによる大規模ワクチン接種（OPV）と患者サーベイランスが主な活動

2000 2,971例

2000：西太平洋地域伝播終息

2010 1,349例

流行地は限定されている。

課題について

- ワクチンへのアクセス（セキュリティ）
- VDPV(ワクチン由来ポリオウイルス)によるポリオ発生
- 封じ込め
- **COVID-19対応（新たな課題）**

ワクチン由来ポリオウイルス(VDPV)によるポリオの発生（アフリカ、アジアの一部）

生ワクチン接種者から排出されたウイルス



低接種率（集団免疫が低下）エリアに侵入し伝播



伝播を繰り返すうちに変異が蓄積、毒性復帰

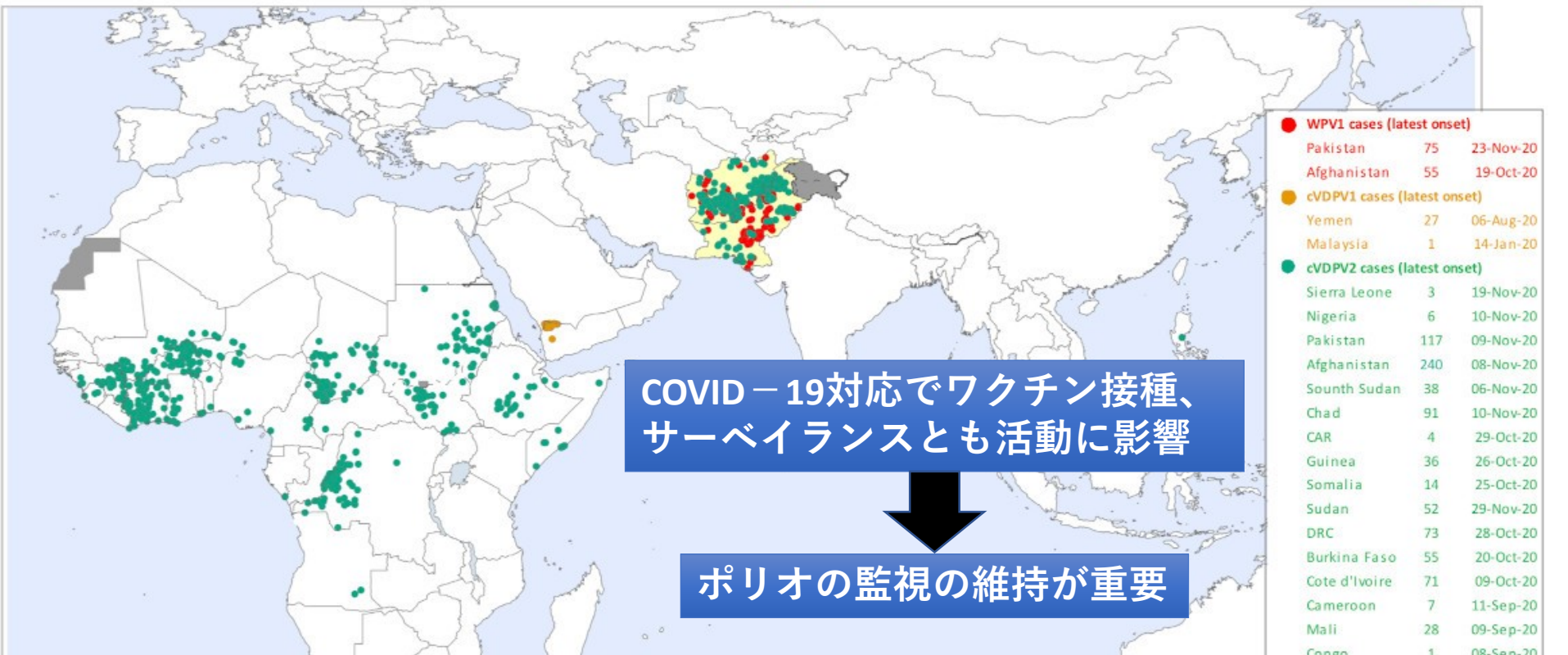
特に、2型生ワクチンの全世界で使用停止後*（2016年）、2型c VDPVによるポリオの対策が課題

* 2型は1998年が最後の野生株。当初、2型生ワクチン停止による自然消滅を目標とした

過去1年間のポリオ発生の状況（2021年1月12日時点）*

*環境水由来の検出データは含まれない

Global WPV1 & cVDPV Cases¹, Previous 12 Months²



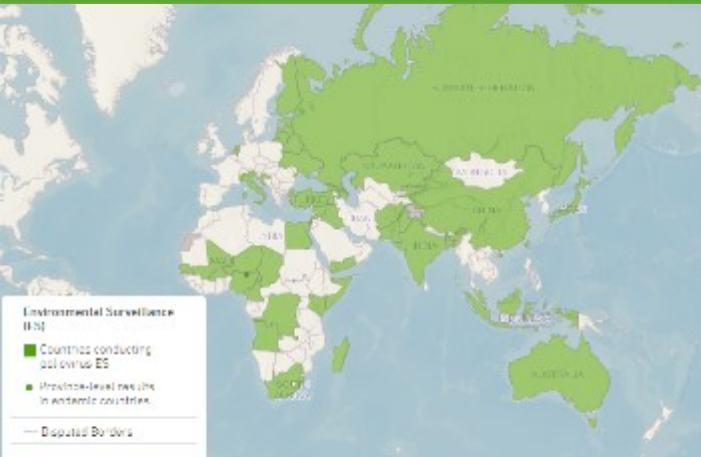
Total cases	Total in 2020		Total in 2019	
	WPV	cVDPV	WPV	cVDPV
Globally	140	932	176	378

出典： <http://polioeradication.org/polio-today/polio-now/>

野生株報告数の減少に伴い環境サーベイランス 実施国/地域が拡大

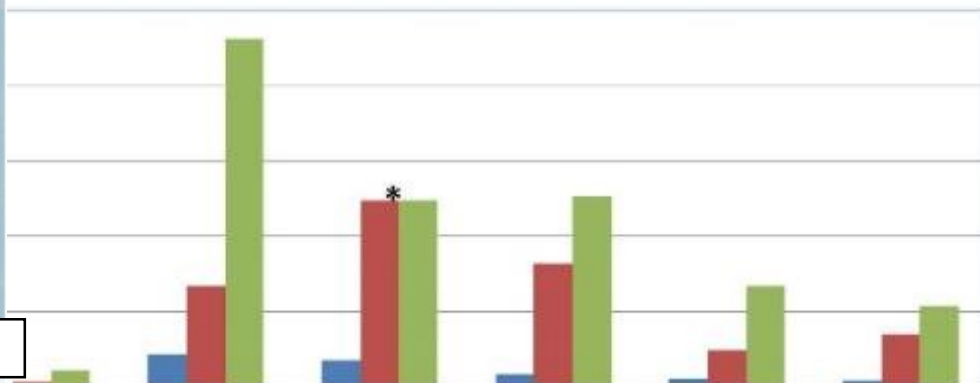
Environmental Surveillance Network

緑色が実施国/地域（2019年現在）



Global ES counts
(countries reporting to WHO)

日本は19自治体25
サイト（2019年）



<http://polioeradication.org/polio-today/polio-now/>

	AMR	AFR	EUR	EMR	SEAR	WPR
Countries	1	22	18	9	6	5
cities	4	67	124*	82	25	36
sites	11	231	124	127	67	54

	Countries	cities	sites
	61	338	614

61 国で実施

* underestimated



2.不活化ポリオワクチン切り替え後のポリオ環境水サーベイランス

日本のポリオ（感染症法では2類感染症）

ワクチンの種類

IPV

OPV



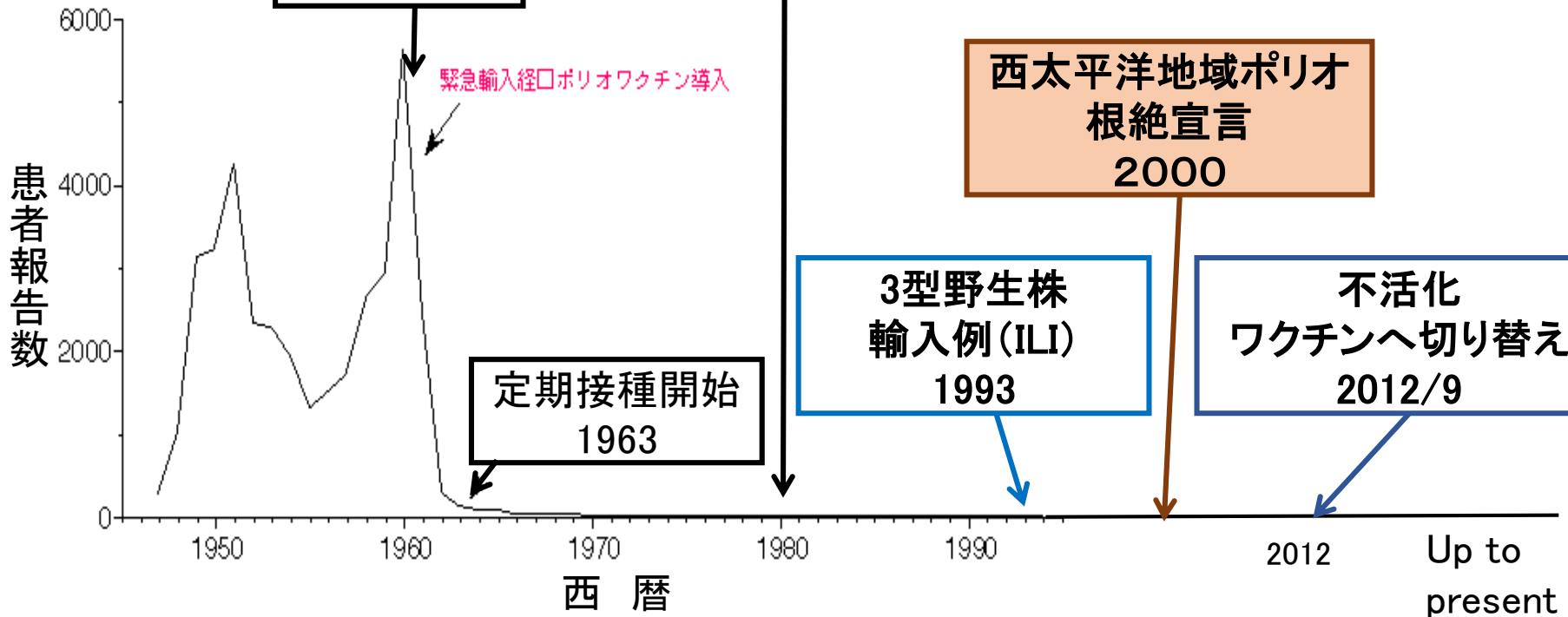
cIPV
2012/09

DPT+sIPV
2012/10

DPT+cIPV
2015/12

最後の野生型ポリオ（1型）
1980

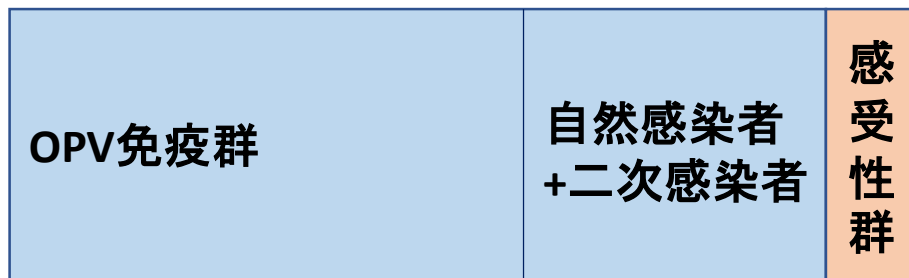
IPV in 1961



なぜ高感度な環境水ウイルスサーベイランスが必要か？

不活化ポリオワクチン(IPV)導入前

生ワクチン(OPV)による集団免疫効果で伝播抑制



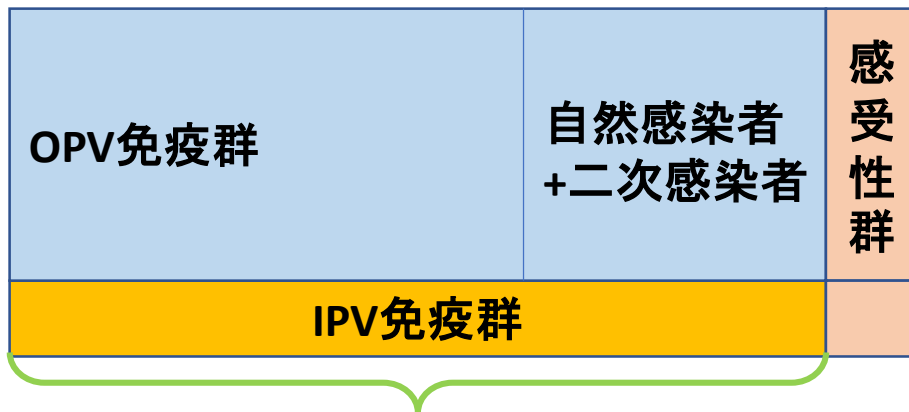
未接種者
+
抗体レベルが
低い群

IgG+IgA保持

IPV導入後

IPVはポリオウイルス感染による発症を抑えるが、感染は起こる。

今後毎年蓄積してゆく ➡ {



IgG保持

IPV免疫群へ侵入しても感染者の探知困難

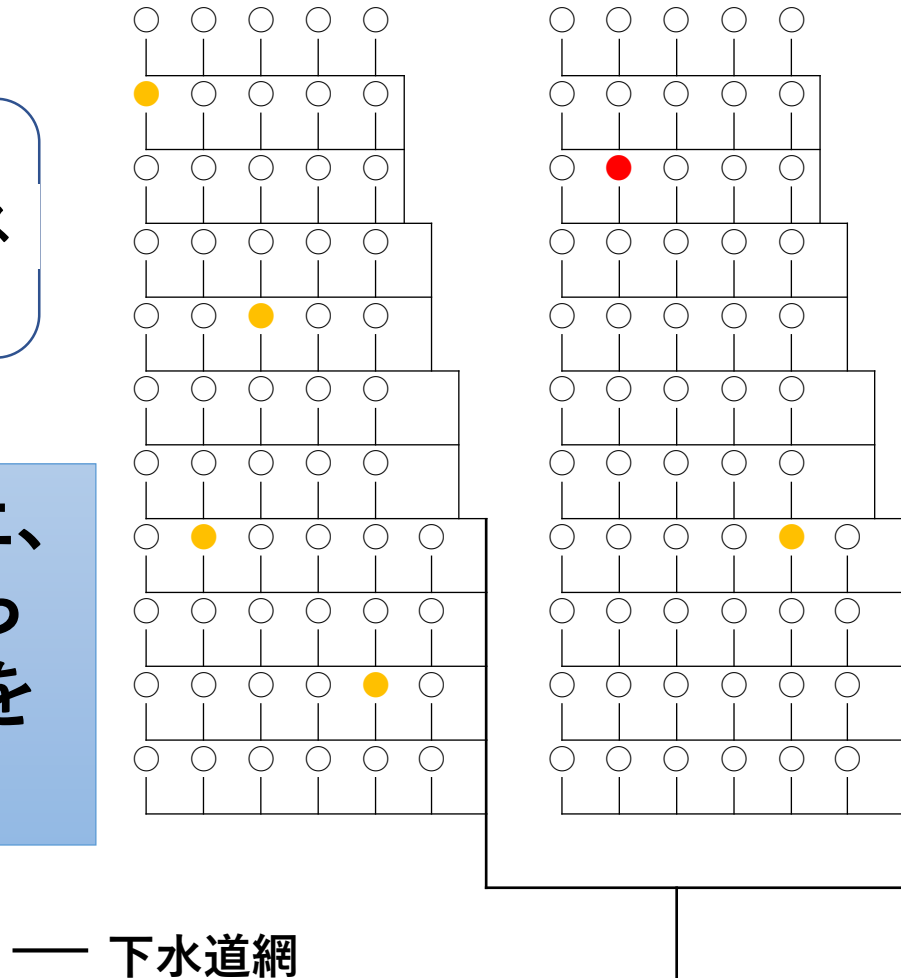
糞便から検出？
下水から検出？

環境水サーベイランスとは

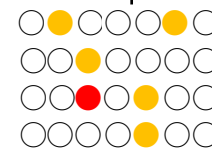
環境水サーベイランスは顕性、不顕性に関わらず、ヒトから排出されたウイルスを検出でき、かつ下水道を使用する人口全体を対象としたウイルス監視法

- 顕性感染者由来ウイルス
- 不顕性感染者由来ウイルス
- 健常者

濃縮することで理論上、
10万人あたり1人から
数名の感染者の存在を
把握可能



下水道には症状の有無に関わらず糞便中のウイルス等が流れ込む



下水を濃縮し検出

日本のポリオサーベイランス

感染症法（感染症発生動向調査事業）

2類感染症 ポリオ

5類急性弛緩性麻痺（AFP）

5類定点把握疾患（病原体サーベイランス）

予防接種法（感染症流行予測調査事業）

抗体保有率調査（およそ1500血清採取。6-7都道府県で毎年実施）

感染源調査による環境水サーベイランスを開始(2013年度)

感染源調査；かつてはポリオ糞便検査。全国15都道府県（2012年度実績）の地方衛生研究所の協力を得て、OPV接種後2カ月以上経過した健康児の糞便よりポリオウイルスの有無を調べるもの

感染症流行予測調査事業によるポリオ環境水サーベイランス

ポリオ根絶計画が順調に進めば2023年に根絶証明



2012年9月わが国で不活化ポリオワクチンを導入。

輸入が想定されるポリオウイルス(ワクチン株、VDPV, 野生株のいずれも)の監視強化

接種率を高く維持し、十分な抗体レベルを保持

海外から侵入する可能性のあるポリオウイルスを効率よく捕捉するべく環境水サーベイランス(下水調査)を2013年度より感染症流行予測調査事業として開始。

地方衛生研究所による調査概要 (R1年度実施要領より)

- 定点となる下水処理場 (人口10-30万人を対象。下水普及率7-8割) を定め、月1回流入下水 (0.5Lを目安) を採取し、濃縮処理後、ポリオウイルス分離/同定を行う。
- 調査期間は通年を想定。
- ポリオウイルスが万が一検出された場合は、速やかに結核感染症課、感染症疫学センターへ連絡し、ウイルス行政検査を感染症研究所で実施

国内でポリオウイルス（野生株/VDPV）が検出された時の対応

ヒト由来：感染症法に基づき2類感染症として届け出

→感染症健康危機管理実施要領に基づき対応を検討

「第4回不活化ポリオワクチンの円滑な導入に関する検討会」資料4
野生株ポリオウイルスまたは伝播型ワクチン由来ポリオウイルスが検出された際の対応の概要（案）

<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002gxwdatt/2r9852000002gy06.pdf>

環境水由来：環境水調査の強化(4週間を目処) によるリスク評価

→患者が地域に存在し、他の患者が発生することを想定し、医療機関等に対し、急性弛緩性麻痺（AFP）患者のポリオウイルス感染を疑うように周知。

検出された場合には直ちに二類感染症として届出を行うよう周知に努めるなど、地域において、患者サーベイランスを強化。

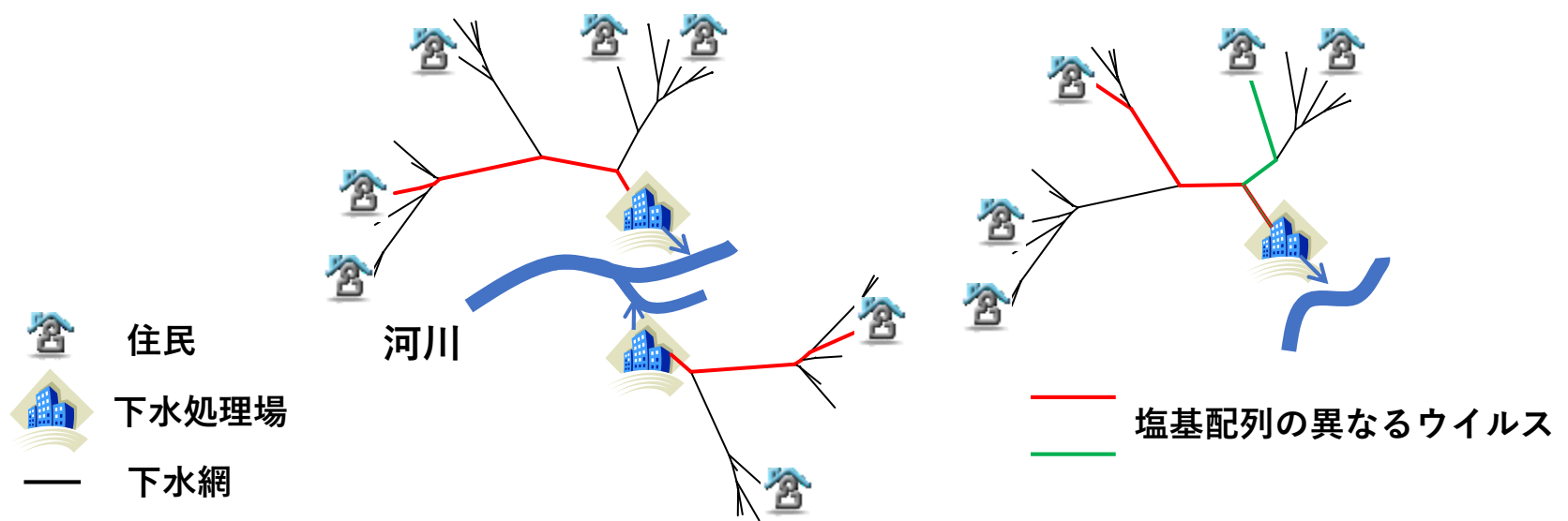
野生株 (VDPV) 検出時、環境水サーベイランス強化による対応 (実施要領参考資料)

採水頻度を増やす
(例: 月1回→週1回)
別の下水処理場でも採水/検査

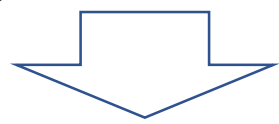
(ア) 数週にわたり複数回検出される場合

(イ) 複数の下水処理場でもウイルス検出

(ウ) 異なる遺伝子配列のウイルス株を検出



2か所以上の下水処理場にてウイルスが検出された場合



複数の遺伝子配列を持つウイルスが検出された場合

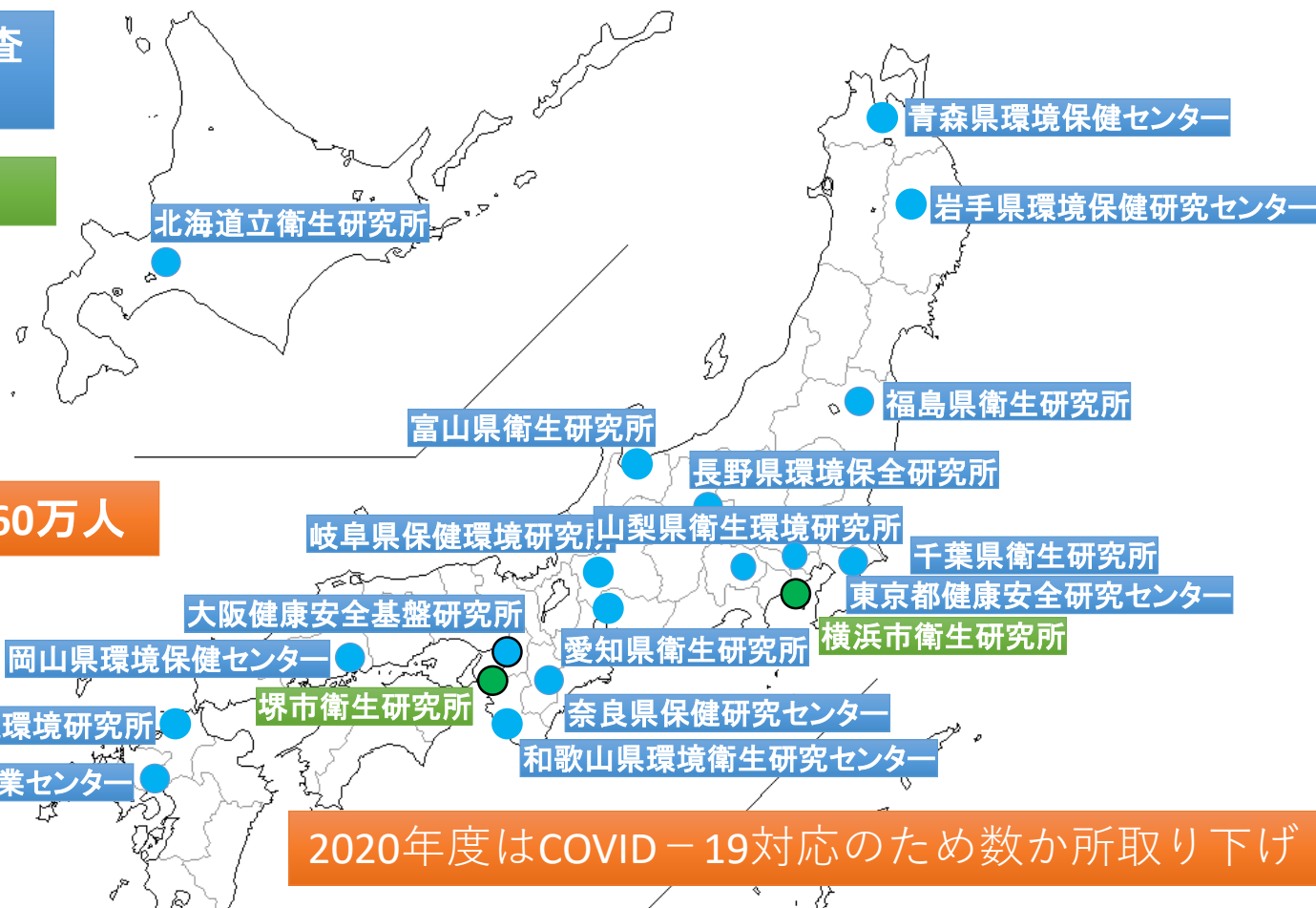
(ア) - (ウ) いずれも判明しなければ通常のサーベイランスに戻す

いずれか判明した場合は、ポリオ患者が発生したことを想定した対応

環境水ポリオサーベイランス(2019年度の調査状況)

R1年度流行予測調査事業(17か所)

調査研究(2か所)



下水利用人口は約660万人

2020年度はCOVID-19対応のため数か所取り下げ

	~H21 (2009以前)	H22 (2010)	H23 (2011)	H24 (2012)	H25 (2013)	H26 (2014)	H27 (2015)	H28 (2016)	H29 (2017)	H30 (2018)	R1 (2019)
調査場所	1	2	2	4	13 (8)	19 (14)	18 (16)	18 (16)	18 (16)	18 (16)	19 (17)
備考				事業化 準備	事業開始	→					

() H25年度流行予測調査事業開始以降、事業参加衛研数

IPV切り替え後（2012年10月以降）のポリオウイルス分離は いずれもワクチン株

2014年、ポリオウイルスワクチン株が異なる時期に、異なる2か所で分離されていた

- 感染症流行予測調査事業(環境水サーベイランス)にて2014年10月1日採水分の環境水濃縮検体より3型ワクチン株が分離された。翌月以降は検出なし。

(IASR Vol. 37 p. 27-29: 2016年2月号)

- 感染症発生動向調査事業にて、感染性胃腸炎患者(11月4日検体採取)より、1型ワクチン株が分離された。本例は10月海外渡航先でワクチン接種歴有り。

(IASR Vol. 36 p. 86-87: 2015年5月号)

2016年7月、ポリオウイルス3型ワクチン株が環境水から分離

- 感染症流行予測調査事業にて2016年7月採水分の環境水濃縮検体より3型ワクチン株が分離された。翌月以降は検出なし。

(IASR Vol. 37 p.208-209: 2016年10月号)


3.下水中の新型コロナウイルス調査の現状

令和2年度厚生労働行政推進調査事業費「環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制を構築するための研究」

新型コロナウイルスの検出

先行研究:山東省CDC

Tao Z, Wang Z, Lin X, et al. One-year Survey of human enteroviruses from sewage and the factors affecting virus adsorption to the suspended solids. Scientific Reports. 2016 Aug;6:31474. DOI: 10.1038/srep31474.



陰電荷膜法にて濃縮しエンテロウイルス分離
Solidをビーフ液 (pH9) で再懸濁 (超音波)、遠心後上清を使用

横浜市衛生研究所

小澤広規 井上嵩之 櫻井光 川上千春 清水耕平 宇宿秀三 田中伸子 大久保一郎 吉田弘
環境水調査による新型コロナウイルスの下水からの検出
IASR Vol. 41 p122-123: 2020年7月号

陰電荷膜法による濃縮液、Solidから新型コロナウイルスを検出
(NIID N2プライマーセット)

国立感染症研究所、東京都健康安全研究センター

4種類のウイルス濃縮方法 (陰電荷膜吸着法、PEG沈殿法、限外ろ過膜法、solid沈殿法) を比較

Kouichi Kitamura, Kenji Sadamasu, Masamichi Muramatsu, Hiromu Yoshida
Efficient detection of SARS-CoV-2 RNA in the solid fraction of wastewater, Science of The Total Environment, Vol 763, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144587>.

ウイルス検出に関する基盤技術の検討

山梨大学、北海道大学（水環境学会TFメンバーとも適宜情報共有）

情報交換・技術連携

ポリオ環境水調査の新型コロナウイルス検出応用研究

準備段階

①行政機関（地方衛生研究所）の試行調査

技術検討
横浜市、福岡県、感染研
制度検討
東京都、感染研、
国土技術政策総合研究所

協力
依頼

青森、岩手、福島、千葉、
（東京）、埼玉、愛知、
岐阜、富山、和歌山、岡
山、福岡
（11自治体、18地点）

大都市での応用*

技術移転 ↓ ↑ データ報告

②民間検査機関 による試行調査

民間検査機関への検査委託

検体 ↑ 送付

横浜市にて
実施

A 処理場

B

C

D

E

5か所（人口200万人程度をカバー）

データ回収、
情報整理**

調査結果の評価

報告

主たる研究班の活動

*分担研究者の調査の一部を民間検査を委託するイメージ

**業務委託

ポリオ環境水サーベイランスをベースとした新型コロナウイルス検出（基本的な考え）

・下水処理場（人口数万-30万人を対象）

既存のポリオ検査のフロー

濃縮により10万人当たり1名～数名の感染者を捕捉可能（ポリオは確立）

全国20カ所で調査を実施

北海道、青森、岩手、福島、千葉、長野、山梨、東京、(横浜)、静岡、愛知、岐阜、富山、奈良、和歌山、大阪、(堺)、岡山、佐賀、福岡

流入下水の採水
(月1回、0.5Lを目安)

遠心
(微粒子除去)

遠心上清

塩化マグネシウム添加
pHを調整

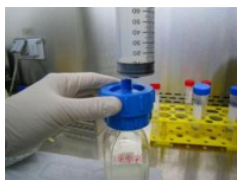
陰電荷膜にろ過吸着

陰電荷膜から誘出

遠心・ろ過
(微粒子の除去)

濃縮液

ポリオウイルス分離/同定



既存のポリオ検査のための新しい処理フローの構築に基づく新型コロナウイルス検出

新型コロナウイルス検出の新たなフロー

沈澱物からRNA抽出、検査

12カ所が参加

青森、岩手、福島、千葉、埼玉、(東京)、横浜、愛知、岐阜、富山、和歌山、岡山、福岡

課題対応（研究班で対応）

糞便中の新型コロナウイルス量は少ない
(ノロ等に比べ2-3log低い)等

○検査手法の改良

- ・新型コロナウイルス検出のための濃縮条件の検討
- ・反応条件(プライマー等)の変更

等

○調査対象の検討

- ・適正な処理場のサイズ（感染者数と下水中のウイルス量の関係）
- ・採水頻度
- ・ハイリスク施設における直接採水（希釈の影響をあまり受けないため）
- ・検出時の対応

等

新型コロナウイルスの検出（qPCR）

令和2年度 厚生労働行政推進調査事業費 (令和2年8月～令和3年3月)

「環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制を構築するための研究」

NIJIs Project (New Integrated Japanese Sewage Investigation for COVID-19)

研究目的

1. 下水からの新型コロナウイルス検出方法の検討

- これまで下水調査の実績があるウイルスは、エンペロープを持たない型
- エンペロープを持つSARS-CoV-2を下水から回収する手法は確立されていない

本日の内容

2. ポリオウイルス環境水サーベイランスネットワークを活用した全国展開

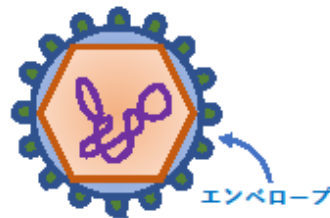
- 12地方衛生研究所が参加、約20か所(下水処理場等)での採水

ポリオウイルス、
ノロウイルス等

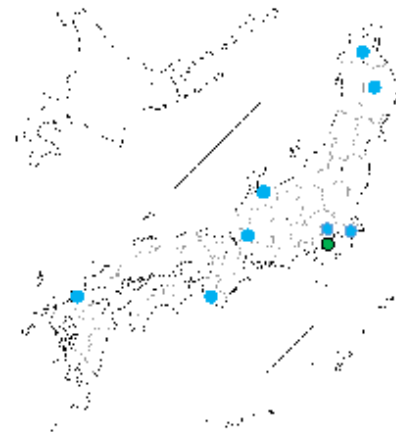


下水調査の
実績がある

コロナウイルス等



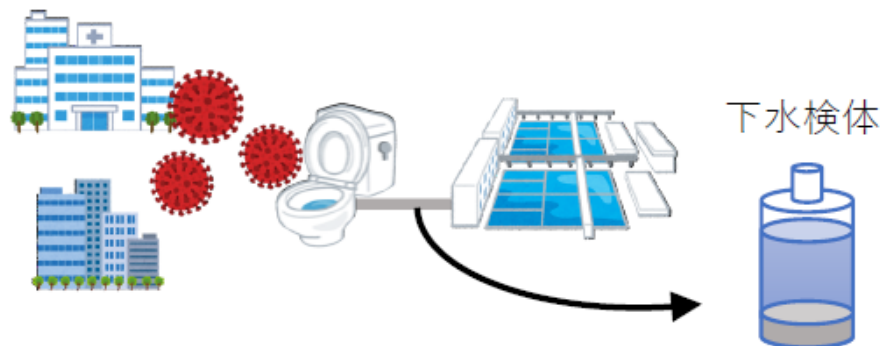
ウイルス回収手法が
確立されていない



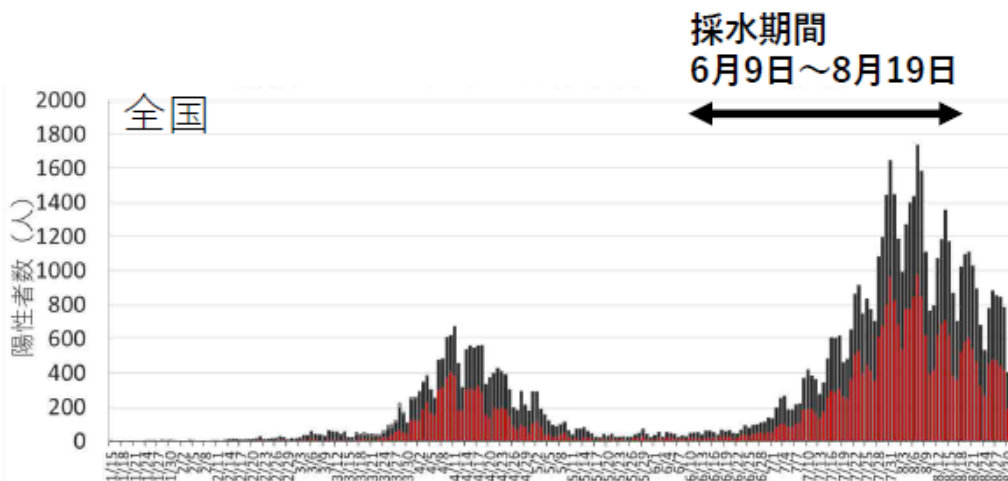
青森、岩手、埼玉、
千葉、横浜、岐阜、
富山、和歌山、福
岡、他調整中

下水検体の採水

- ^{あんきょ}暗渠からの直接採水1か所
下水処理施設への流入下水2か所
- 毎週1回500 mLを採取、冷凍し
感染研へ送付



- 期間 2020年6月9日～8月19日
(11週 x 3か所)
- 暗渠10週目採水なし
(計32検体)



新型コロナウイルス検出方法の検討

下水検体



4種類のウイルス回収法を比較

陰電荷膜法

国内ポリオウイルス下水検査の手法
横浜市衛生研究所で報告 (病原微生物検出情報, 2020)
山梨で報告 (Science of total environment, 2020)

ポリエチレン
グリコール

PEG沈殿法

石川・富山で報告 (medRxiv, 2020)

限外濾過膜法

オランダKWR等で報告

沈殿物 (solid)

これまで検討が少ない
横浜市衛生研究所で報告
(病原微生物検出情報, 2020)

処理可能な
量が少ない

比較的簡便

M. Kitajima et al. / Science of the Total Environment 739 (2020) 139076

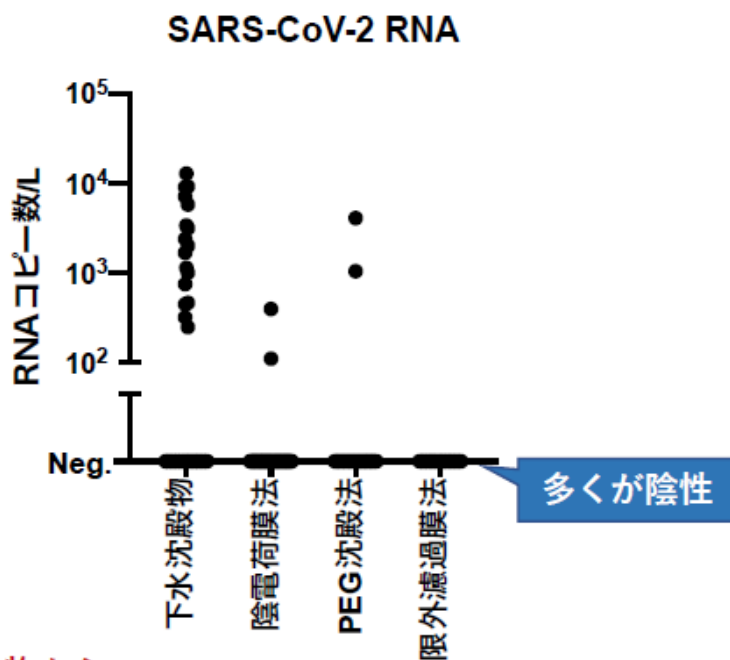
Table 2

Details of reported molecular detection of SARS-CoV-2 in wastewater.

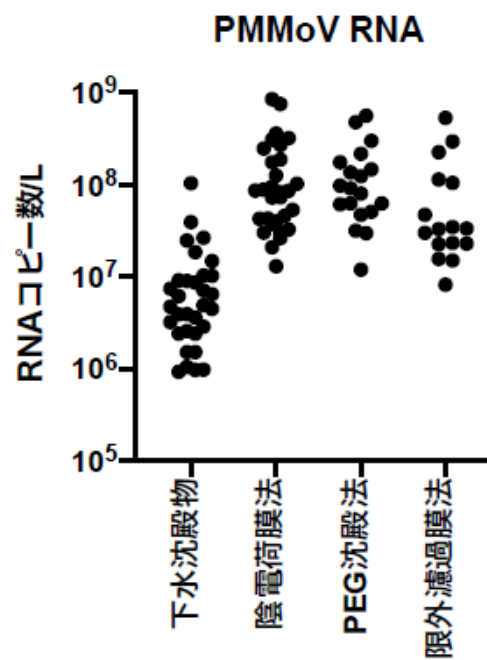
Sampling location		Water type	Virus detection methods			Detection results		Reference
Country	State/city		Virus concentration method	qPCR assay ^a	Sequence confirmation	Positive rate	Maximum concentration (copies/L)	
Australia	Brisbane, Queensland	Untreated wastewater	Electronegative membrane-direct RNA extraction; ultrafiltration	N_Sarbeco NIID_2019-nCoV	Direct sequence of qPCR products (Sanger + MiSeq)	2/9 (22%)	1.2×10^2	(Ahmed et al., 2020)
The Netherlands	Amsterdam, The Hague, Utrecht, Apeldoorn, Amersfoort, Schiphol, Tilburg	Untreated wastewater	Ultrafiltration	CDC N1, N2, N3 E_Sarbeco	Not done	14/24 (58%)	Not available	(Medema et al., 2020)
USA	Massachusetts	Untreated wastewater	PEG precipitation	CDC N1, N2, N3	Direct sequence of qPCR products (Sanger)	10/14 (71%)	$>2 \times 10^5$	(F. Wu et al., 2020b)
France	Paris	Untreated wastewater	Ultracentrifugation	E_Sarbeco	Not done	23/23 (100%)	$>10^{6.5}$	(Wurtzer et al., 2020)
		Treated wastewater	Ultracentrifugation	E_Sarbeco	Not done	6/8 (75%)	$\sim 10^5$	
USA	Bozeman, Montana	Untreated wastewater	Ultrafiltration	CDC N1, N2	Re-amplification by regular PCR followed by Sanger sequencing	7/7 (100%)	$>3 \times 10^4$	(Nemudryi et al., 2020)

最適な手法が未確立

下水検体のPCR検査結果



下水沈殿物から
SARS-CoV-2を
効率よく検出



PMMoV: トウガラシ微斑ウイルス

- トウガラシなど野菜に含まれている植物ウイルス（ヒトには病原性なし）
- ヒトの糞便や下水中に高濃度に存在
- 検出手法の妥当性評価に利用



下水検体

ポリオウイルス、ノロウイルスの
検出に使用されている

今回の調査で新型コロナウイルス
が多く含まれていることが示唆

これまでの課題と今後について

技術的課題

- 1) 沈殿物のRNA抽出
海外製商業キットの入荷が不安定のため、沈殿物に限らず検出試料の更なる検討が必要
- 2) 検出法の改良（リアルタイムPCR用プライマーセット、反応条件の検討による感度の向上）
- 3) 下水の様々な要素（decay,希釈等）が測定結果へ影響→感染者数との比較・解析へ影響

運営面の課題

- 1) 情報共有範囲と共有方法、内容について（データ公表を想定した場合）
- 2) 検出時の追加調査
伝播確認をどうするか（週1、隔週採水、等の採水頻度の変更）
検査キャパシティ
関連部署からの承諾
- 3) 民間検査の活用、行政検査機関の役割の整理（精度管理等）

検出結果の解析

- データ解析方法は未知の領域（どのように解釈するか）。
- 処理区のサイズ、対応する感染者数と下水中のウイルス量の関係についてデータを蓄積していく