

研 究 報 告

令和 8 年 4 月 6 日

公益財団法人 前田記念工学振興財団

理 事 長 岸 利 治 殿

研究代表者

所 属 : 山梨大学国際流域環境研究センター

氏 名 : 原本 英司

研究課題名：下水疫学調査を用いた新興・再興感染症の流行モニタリング技術の開発

助成金額： 100 万円

研究実施期間：自 令和 7 年 4 月 1 日 ～ 至 令和 8 年 3 月 3 1 日

下水疫学調査を用いた新興・再興感染症の流行モニタリング技術の開発

Development of a technique for monitoring the incidence of emerging
and reemerging infectious diseases using wastewater-based epidemiology

山梨大学国際流域環境研究センター 教授 原本 英司

（研究計画ないし研究手法の概略）

研究の背景及び目的

本研究では、下水処理場の流入水中の病原微生物を測定することで、処理区域内における感染症の流行状況を把握する「下水疫学調査」をウィズコロナ時代に活用していくため、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）以外の新興・再興感染症への適用を可能にする微生物検出技術の開発を試みた。

下水中の新型コロナウイルスの検出に通常用いられているリアルタイム PCR（qPCR）法では、病原微生物ごとに個別に測定を行う必要があるため、対象とする感染症の種類が複数となる場合には、時間・コスト面で効率的ではない。この問題を解決するため、本研究では、異なる蛍光色素で修飾したプローブを用いた識別により、一度に最大 5 種類の遺伝子の測定が可能な 5 プレックスデジタル PCR（5-plex dPCR）法を基盤技術とし、複数種の病原微生物に対して下水疫学調査を展開することに取り組んだ。

本研究で研究対象とする新興・再興感染症として、COVID-19 パンデミック下で抑制されていたものの、2023 年 5 月に COVID-19 が感染症法上で 2 類相当から 5 類に変更された後に大きな流行が見られている感染症として、主に小児に水疱を伴う発疹等を引き起こす手足口病と、いわゆる「人食いバクテリア」とも呼ばれる劇症型溶血性レンサ球菌感染症を引き起こすこともある A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎を選定した。これらは世界的にも下水疫学調査への適用事例がほとんどなく、ウィズコロナ時代における下水疫学調査の推進に資する成果となることが期待される。

研究方法

手足口病は多種類のエンテロウイルスにより引き起こされることから、国内で感染者数が多い上位 4 種類（コクサッキーウイルス A6 型（CVA6）・A10 型（CVA10）・A16 型（CVA16）、エンテロウイルス 71 型（EV71））を測定対象とした。これに A 群溶血性レンサ球菌（GAS）を加えた 5 種類の病原微生物を対象に、5-plex dPCR 法の開発を試みた。本研究で使用した QIAcuity dPCR システム（QIAGEN）を用いた dPCR 法では、8,500 または 26,000 分画のナノプレートに各試料が分注され、各分画では僅か数ナノリットルの試料が反応に供される。そのため、下水中の微生物遺伝子検出の際に問題となる PCR 阻害物質の大幅な軽減が可能となり、低濃度の微生物遺伝子を高精度で定量できるようになると期待される。

まず、標準試料（gBlocks Gene Fragments（Integrated DNA Technologies））を用いた実験により、Singleplex と 5-plex での dPCR 法の検出感度等を比較した。dPCR 反応液は QIAcuity Probe PCR Kit（QIAGEN）を用いて調整した。プローブのレポーター色素は、CVA6 は HEX，CVA10 は ROX，CVA16 は TAMRA，EV71 は Cy5，GAS は FAM とした。GAS においては、2 種類の qPCR 系（*speB*，*spy1258*）を混合したものをを用いた。dPCR で

は、95℃ 2 分間の加熱の後、95℃ 15 秒間と 60℃ 30 秒間からなる PCR サイクルを 45 回繰り返した。

次に、2025 年 4 月～2026 年 3 月の 1 年間に山梨県内の下水処理場で月 2 回の頻度で採取した流入下水(24 試料)80mL をポリエチレングリコール沈殿法を用いて約 2mL に濃縮し、200 μ L を分取して AllPrep PowerViral DNA/RNA Kit (QIAGEN) を用いた DNA/RNA 抽出操作によって抽出液 100 μ L を得た後、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fischer Scientific) による逆転写反応および開発した 5-plex dPCR 法に供した。

(実験調査によって得られた新しい知見)

標準試料を用いた 5-plex dPCR 法の検出感度の検討結果

5 種類の標準試料を混合したものを 7 段階に希釈して dPCR に供した結果を表 1 に示す。8,500 分画のナノプレートを使用し、有効分画数は、Singleplex dPCR 法では 8,189 $\pm$ 197 個、5-plex dPCR 法では 8,242 $\pm$ 64 個であったことから、十分な反応数を確保できたことが確認できた。5 種類の病原微生物いずれに対しても 3 log₁₀ 以上にわたって高い定量性が得られ、決定係数は Singleplex dPCR 法が 0.993～0.999、5-plex dPCR 法が 0.986～0.999 であった。10 copies/ μ L 以下の低濃度領域でも定量が可能であり、高い検出感度を有する 5-plex dPCR 法が開発できたと判断した。

表 1 Singleplex および 5-plex dPCR 法による標準試料の測定結果 (各 n = 2)

dPCR 法	希釈倍率 (log ₁₀)	標準試料濃度 (log ₁₀ copies/ μ L)				
		CVA6	CVA10	CVA16	EV71	GAS
Singleplex	-1	3.67 $\pm$ 0.01	3.42 $\pm$ 0.02	3.58 $\pm$ 0.01	3.62 $\pm$ 0.00	3.26 $\pm$ 0.00
	-2	2.64 $\pm$ 0.01	2.43 $\pm$ 0.01	2.55 $\pm$ 0.02	2.57 $\pm$ 0.01	2.19 $\pm$ 0.00
	-3	1.52 $\pm$ 0.05	1.43 $\pm$ 0.03	1.55 $\pm$ 0.06	1.57 $\pm$ 0.05	1.20 $\pm$ 0.01
	-3.6	0.97 $\pm$ 0.04	0.74 $\pm$ 0.00	0.93 $\pm$ 0.03	1.02 $\pm$ 0.12	0.47 $\pm$ 0.02
	-4	0.36 $\pm$ 0.04	0.62 $\pm$ 0.13	0.48 $\pm$ 0.09	0.62 $\pm$ 0.17	0.07 $\pm$ 0.00
	-4.3	0.09 $\pm$ 0.00	0.31 $\pm$ 0.09	0.26 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.00	ND
	-4.6	ND	0.09 $\pm$ 0.00	0.21 $\pm$ 0.00	ND	ND
5-plex	-1	3.68 $\pm$ 0.00	3.45 $\pm$ 0.00	3.63 $\pm$ 0.02	3.58 $\pm$ 0.00	3.23 $\pm$ 0.01
	-2	2.63 $\pm$ 0.00	2.43 $\pm$ 0.02	2.69 $\pm$ 0.01	2.60 $\pm$ 0.00	2.19 $\pm$ 0.01
	-3	1.61 $\pm$ 0.00	1.47 $\pm$ 0.03	1.67 $\pm$ 0.01	1.53 $\pm$ 0.02	1.26 $\pm$ 0.01
	-3.6	1.01 $\pm$ 0.13	0.83 $\pm$ 0.05	0.93 $\pm$ 0.07	1.01 $\pm$ 0.05	0.60 $\pm$ 0.04
	-4	0.40 $\pm$ 0.10	0.29 $\pm$ 0.09	0.63 $\pm$ 0.08	0.60 $\pm$ 0.04	0.29 $\pm$ 0.09
	-4.3	0.20 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.00	0.43 $\pm$ 0.12	0.31 $\pm$ 0.25	ND
	-4.6	0.09 $\pm$ 0.00	0.21 $\pm$ 0.00	0.26 $\pm$ 0.17	ND	ND

ND, not detected (< limit of detection).

流入下水試料への 5-plex dPCR 法の適用結果

開発した 5-plex dPCR 法を下水処理場で 1 年間にわたって採取した流入下水 (24 試料) に適用した結果を表 2 に示す。手足口病を引き起こす 4 種類のエンテロウイルスのうち、

EV71 が 16 試料 (67%), CVA16 が 3 試料 (13%) からそれぞれ $4.9 \pm 0.5 \log_{10} \text{ copies/L}$, $4.4 \pm 0.1 \log_{10} \text{ copies/L}$ の濃度で検出された。一方, CVA6 と CVA10 はいずれの試料からも検出されなかった。同じ下水処理場で 2022 年 3 月~2023 年 3 月に採取した流入下水からは qPCR 法によって CVA6 のみが検出されており (Shrestha et al. 2023), 本研究の検出結果とは大きく異なるものであった。

GAS は 12 試料 (50%) から検出され, 検出濃度は $4.3 \pm 0.2 \log_{10} \text{ copies/L}$ であった。2023 年 3 月~2024 年 2 月に採取した流入下水からの qPCR 法による検出率は 81% (42/52), 検出濃度は $3.8 \pm 0.3 \log_{10} \text{ copies/L}$ であり (Shrestha et al. 2024), 2 年前よりも検出率・濃度ともに高い値であった。なお, 19 試料 (79%) から測定した 5 種類の病原微生物のいずれか 1 種類以上が検出されており, そのうち 2 試料 (8%) からは 3 種類が検出された。

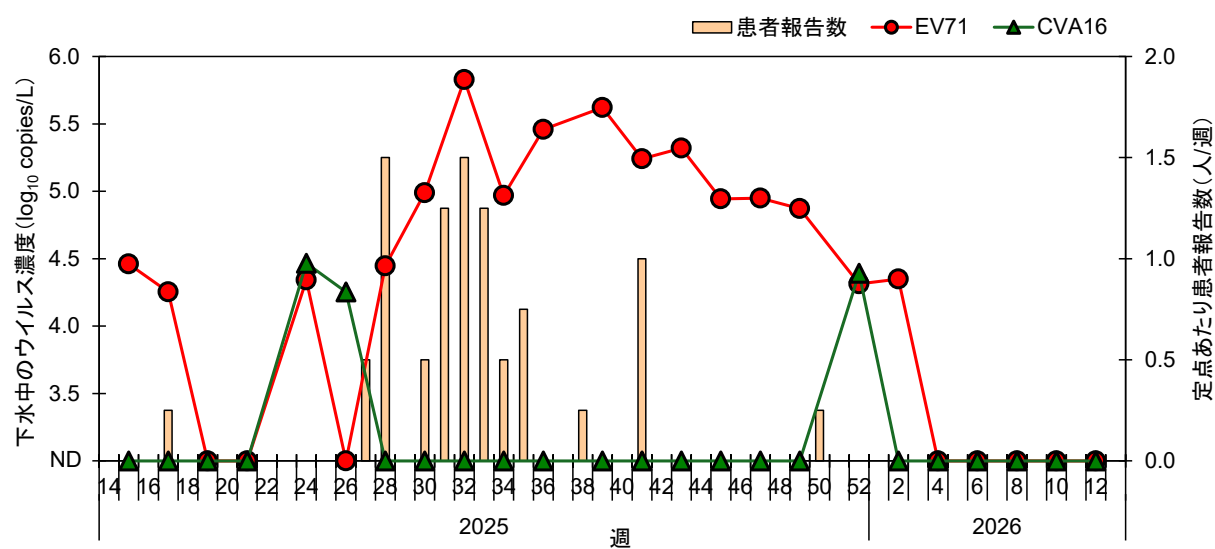
図 1 に示すように, 下水処理場が位置する保健所管内の手足口病の定点患者報告数 (山梨県感染症対策センター 2026) が多い時期に流入下水中の EV71 濃度が最も高い値を示していたが, 患者報告数が少ないあるいはまったく報告されていない時期でも高い濃度で検出されていた。これは, 患者報告数が定点医療機関からの報告に限られることや, 不顕性感染や症状が軽度な場合には医療機関を受診しないこと等に起因している可能性がある。GAS についても同様に, 下水中の GAS の濃度と定点患者報告数との間に明確な関係性は見られなかった。

図 2 に示すように, 手足口病を引き起こすエンテロウイルス (CVA6 と EV71 の合計濃度) と GAS のいずれに対しても, 下水採取日と同一週に公表された定点患者報告数との間に相関は認められなかった (A)。下水疫学調査の先行性を検討するため, 下水採取日の翌週 (B) および 2 週間後 (C) に公表された定点患者報告数と病原微生物濃度との相関も解析したが, いずれも有意な正の相関は認められなかった。定点患者報告数は実際の感染報告者数を過小評価している可能性が高いことを勘案すると, この結果は, 手足口病と A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎の流行状況のより正確な把握に下水疫学調査が有効となり得ることを示唆する結果であると言える。ただし, 感染者から排出される病原微生物の濃度や排出期間等には個人差があること等から, 下水疫学調査を定量的に活用していくためにはさらなる検討が必要であり, 今後の研究で評価がなされることが期待される。

表 2 5-plex dPCR 法による流入下水からの病原微生物の検出結果

病原微生物	検出試料数 (検出率)	検出濃度 ($\log_{10} \text{ copies/L}$)
EV71	16 (67%)	4.9 ± 0.5
CVA6	0 (0%)	—
CVA10	0 (0%)	—
CVA16	3 (13%)	4.4 ± 0.1
GAS	12 (50%)	4.3 ± 0.2
計 (1 種類以上検出)	19 (79%)	

A) EV71, CAV6, CAV10, CAV16



B) GAS

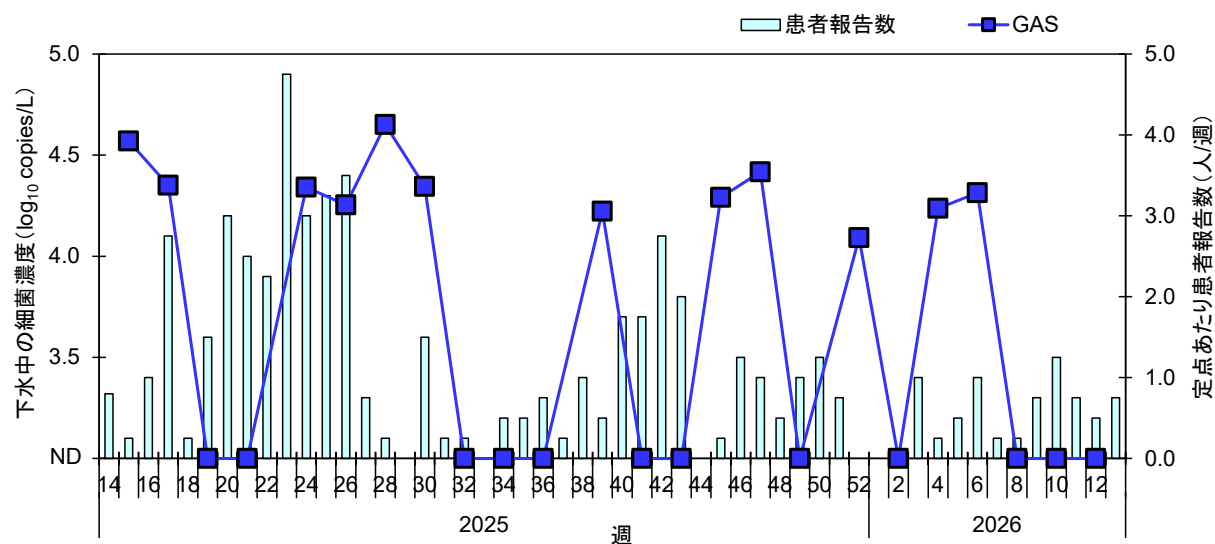
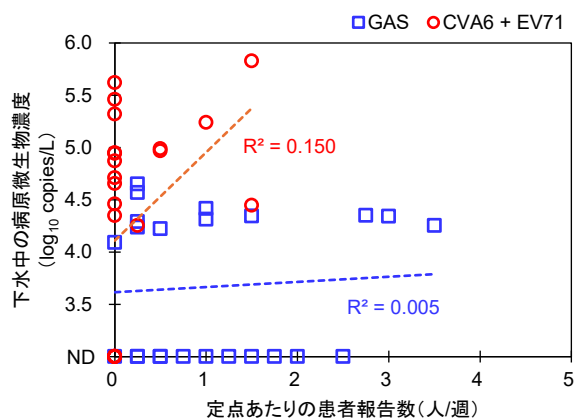
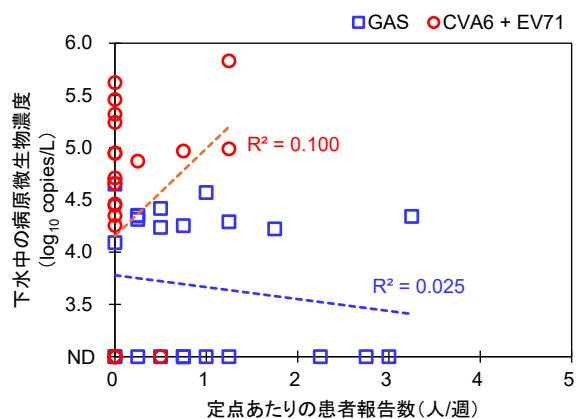


図 1 5-plex dPCR 法を用いた下水中の病原微生物の検出濃度と定点患者報告数の推移

A) 採水日と同一週公表の患者報告数



A) 採水日の翌週公表の患者報告数



C) 採水日の2週間後に公表の患者報告数

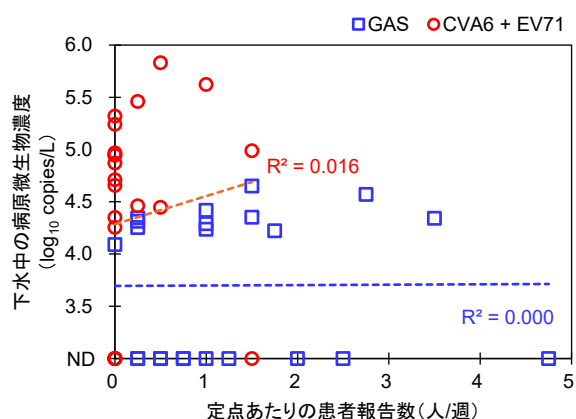


図 2 下水中の病原微生物濃度と患者報告数との相関

参考文献

1. Sadhana Shrestha, Bikash Malla, Eiji Haramoto. 2023. Monitoring hand foot and mouth disease using long-term wastewater surveillance in Japan: Quantitative PCR assay development and application. Science of the Total Environment. 901:165926.
2. Sadhana Shrestha, Bikash Malla, Eiji Haramoto. 2024. Group A *Streptococcus pyogenes* in wastewater: Applicability of wastewater-based epidemiology for monitoring the prevalence of GAS pharyngitis during the late COVID-19 pandemic phase. Science of the Total Environment. 928:172447.
3. 山梨県感染症対策センター. 2026. やまなし感染症ポータルサイト. https://www.pref.yamanashi.jp/kansensho_portal/hasseidoko/index.html.

(発 表 論 文)

現在、英語で論文を執筆中である。