

II. 分担研究報告

厚生労働行政推進調査事業費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「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」
分担研究報告書
環境水中の新型コロナウイルス検出法開発

研究分担者 原本英司 山梨大学大学院総合研究部 教授
研究分担者 北島正章 北海道大学大学院工学研究院 准教授

研究要旨 本研究では、複数のウイルス濃縮法やウイルスRNA抽出法による新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）RNAの検出濃度の比較等により、下水中のSARS-CoV-2の検出に有効となる手法の開発を試みた。主な成果として、1) 熱不活化処理を行うことでSARS-CoV-2 RNA検出濃度が有意に低下すること、2) ウイルス濃縮法としては、ポリエチレングリコール沈殿法によるSARS-CoV-2 RNAの検出濃度が最も高く、陰電荷膜破砕型濃縮法や限外ろ過膜法でも同程度の高い値が得られること、3) ウイルスRNA抽出キットとしては、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) とQuick-DNA/RNA Viral Kit (Zymo Research) を用いることが有効となり得ること、4) 一連のウイルス検出法の検出効率を評価するためのプロセスコントロールとしてトウガラシ微斑ウイルスを用いることが有効性となることを明らかにした。

A. 研究目的

現在のポリオ環境水サーベイランスで対象としているポリオウイルスは、エンベロープを持たないウイルスであるため、その検出のために開発されてきた既存のウイルス濃縮法（陰電荷膜法やポリエチレングリコール（PEG）沈殿法等）は、エンベロープを有さない新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）に対しては効率的な回収率を示さない可能性がある。SARS-CoV-2 に対して有効となる濃縮法が確立されれば、ポリオ環境水サーベイランスに SARS-CoV-2 を組み入れることが可能となり、効率的な SARS-CoV-2 のモニタリングシステムの構築が期待される。

そこで、本研究では、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）軽症者等宿泊療養施設で採取した下水を用い、様々なウイルス濃縮法やウイルス RNA 抽出法による SARS-CoV-2 RNA の検出濃度を比較すること等により、下水からの SARS-CoV-2 の検出に有効となる手法の開発を試みた。

B. 研究方法

1. 下水試料の採取

2020年10月から12月にかけて、国内のCOVID-19軽症者等宿泊療養施設において、下水試料のサンプリング調査を3回（10月27日、11月27日、12月24日）実施した。この施設の排水は、敷地内に設置されている回分式活性汚泥方式浄化槽（NPKB-II型、ニッコー株式会社製）により全量が処理されている。個人防護具を着用して適切な感染防止対策を施した上で、この浄化槽よ

り流入原水、濃縮汚泥および放流水を採取した。水試料は採取後速やかに冷凍し、バイオメディカル検体専門の輸送業者に依頼し実験室に輸送した。

2. 熱不活化処理

ウイルス不活化を目的とした加熱処理の有無が SARS-CoV-2 RNA の検出濃度に及ぼす影響を評価するため、下水試料を入れた容器を60°Cのウォーターバスに90分間浸した。

3. ウイルス濃縮

ウイルス濃縮法として、PEG沈殿法、陰電荷膜破砕型濃縮（Electonegative membrane-vortex, EMV）法、陰電荷膜吸着-直接RNA抽出法および限外ろ過（Ultra filtration, UF）膜法の4種類を用いた。

PEG沈殿法では、4°Cでの一晚の振とうに代えて遠心を行う IDEXX Laboratories のプロトコルを採用した。下水試料 40mL を遠心（4,700×g, 30分, 4°C）した後、PEG6000 または PEG8000 を終濃度 10%、NaCl を終濃度 0.4mol/L となるように添加して混合し、遠心（12,000×g, 100分, 4°C）後に上清を除去した。再度遠心（12,000×g, 5分, 4°C）し、上清を除去して滅菌水 800 μL で懸濁させてウイルス濃縮液を得た。

EMV法では、2.5mol/L MgCl₂ を 2mL 添加した下水試料 200mL を陰電荷膜（孔径 0.8 μm, 直径 90mm, Merck）でろ過後、膜をフィルターホルダーから剥がし、PET 溶液（0.2g/L Na₄P₂O₇・10H₂O, 0.3g/L C₁₀H₁₃N₂O₈Na₃・3H₂O, 0.1mL/L Tween 80）10mL とフットボール型撹拌子を入れた遠沈管（容量 50mL）内で激しく撹拌して膜を

数 mm 四方以下に破碎した。溶液の全量を新しい遠沈管に移し入れた後、元の遠沈管に PET 溶液 5mL を添加して同様の操作を繰り返し、約 15mL のウイルス濃縮液を得た。2 次濃縮法を組み合わせた場合の検出効率も評価するため、必要に応じて DISMIC (孔径 0.45 μ m, 直径 25mm, Advantec) で濃縮液をろ過し、UF 膜ユニット (Amicon Ultra-15, 分画分子量: 50kDa, Merck) を用いた遠心 (5,000 \times g, 15 分, 4 $^{\circ}$ C) によってウイルス濃縮液をさらに減容した。

陰電荷膜吸着-直接 RNA 抽出法では、2.5mol/L MgCl₂ を 500 μ L 添加した下水試料 50mL を陰電荷膜 (孔径 0.45 または 0.8 μ m, 直径 47mm, Merck) でろ過した。

UF 膜法では、下水試料を遠心 (4,500 \times g, 10 分, 4 $^{\circ}$ C) した後、上清 12mL を Amicon Ultra-15 を用いた濃縮操作に供した。

4. ウイルス RNA 抽出

ウイルス RNA 抽出法として、6 種類のキットを使用した。PEG 沈殿法、EMV 法および UF 膜法で得られたウイルス濃縮液に対しては、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), RNeasy PowerMicrobiome Kit (QIAGEN), QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN), Water DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX Laboratories) および Quick-DNA/RNA Viral Kit (Zymo Research) の 5 種類を使用した。陰電荷膜吸着-直接 RNA 抽出法に対しては、RNeasy PowerWater Kit (QIAGEN) を使用した。

5. 逆転写リアルタイム PCR (Reverse-transcription-quantitative PCR, RT-qPCR)

ウイルス RNA 抽出液からの cDNA 合成には High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用した。qPCR 反応液は Probe qPCR mix, with UNG (タカラバイオ) を用いて調整し、qPCR 装置には Thermal Cycler Dice Real Time System III (タカラバイオ) を使用した。SARS-CoV-2 検出用の qPCR 系として、CDC-N1, CDC-N2, N_Sarbeco および NIID_2019-nCoV_N (NIID) の 4 種類を使用した。また、プロセスコントロールとして、ヒト糞便および下水中に高濃度で存在していることが知られているトウガラシ微斑ウイルス (Pepper mild mottle virus, PMMoV) を対象とし、RT-qPCR を用いて PMMoV RNA を定量した。

C. 研究結果

1. 熱不活化処理の有無による SARS-CoV-2 RNA 検出濃度の比較

4 種類の SARS-CoV-2 検出用の qPCR 系はいずれも同等の検出結果を示したことが

ら、以降の節においては代表して NIID 系による結果を示す。

熱不活化処理の有無による SARS-CoV-2 RNA と PMMoV RNA の検出濃度を比較した結果を表 1 および表 2 にそれぞれ示す。濃縮操作前の遠心の有無も含めた 6 種類の条件による SARS-CoV-2 RNA の検出濃度を比較した結果、熱不活化処理を行った場合の濃度は 7.0 ± 0.6 log copies/L (n = 12) となり、熱不活化処理を行わない場合の濃度 (7.5 ± 0.7 log copies/L, n = 12) よりも有意に低い値を示した ($P < 0.05$)。一方、PMMoV RNA の検出濃度には、熱不活化処理の有無による有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。

表 1 熱不活化処理の有無による SARS-CoV-2 RNA の検出濃度 (NIID 系)

濃縮法	n	濃度 (log copies/L)	
		処理あり	処理なし
EMV 法+DISMIC ろ過+UF 膜法 (全量)	2	6.3 ± 0.6	6.9 ± 0.9
EMV 法+UF 膜法 (全量)	2	6.7 ± 0.6	7.1 ± 1.1
PEG 沈殿法 (PEG8000) (全量)	2	7.3 ± 0.6	7.9 ± 0.5
PEG 沈殿法 (PEG8000) (上清)	2	7.3 ± 0.5	7.6 ± 0.4
PEG 沈殿法 (PEG6000) (全量)	2	7.3 ± 0.5	7.9 ± 0.5
PEG 沈殿法 (PEG6000) (上清)	2	7.3 ± 0.6	7.7 ± 0.5
計	12	7.0 ± 0.6	7.5 ± 0.7

表 2 熱不活化処理の有無による PMMoV RNA の検出濃度

濃縮法	n	濃度 (log copies/L)	
		処理あり	処理なし
EMV 法+DISMIC ろ過+UF 膜法 (全量)	2	8.3 ± 0.2	8.2 ± 0.0
EMV 法+UF 膜法 (全量)	2	8.6 ± 0.2	8.5 ± 0.4
PEG 沈殿法 (PEG8000) (全量)	2	8.9 ± 0.2	8.9 ± 0.2
PEG 沈殿法 (PEG8000) (上清)	2	8.9 ± 0.2	9.0 ± 0.2
PEG 沈殿法 (PEG6000) (全量)	2	8.9 ± 0.1	9.0 ± 0.2
PEG 沈殿法 (PEG6000) (上清)	2	8.9 ± 0.1	9.0 ± 0.3
計	12	8.8 ± 0.2	8.8 ± 0.2

2. ウイルス濃縮法による SARS-CoV-2 RNA 検出濃度の比較

4 種類のウイルス濃縮法に対し、膜の孔径等の濃縮操作条件を変えて実施した SARS-CoV-2 RNA の検出結果の一例を表 3

に示す。SARS-CoV-2 RNA の検出濃度は、使用する PEG および試料（全量および上清）の種類に関わらず、 $7.0 \pm 0.7 \log \text{copies/L}$ となり、最も高い値を示した。EMV 法と UF 膜法、さらに、両者の組み合わせによる手法も同程度の高い検出濃度を示した。一方、陰電荷膜吸着-直接 RNA 抽出法による SARS-CoV-2 RNA 検出濃度は $4.5 \pm 0.1 \log \text{copies/L}$ となり、他の濃縮法と比較して 2 log 以上低い値であった。なお、PEG 沈殿法において、PEG (10, 20%) と NaCl の終濃度 (0.1, 0.2, 0.4 mol/L) を変えても検出濃度に大きな差は見られなかった。

表 3 ウイルス濃縮法による SARS-CoV-2 RNA の検出濃度 (NIID 系)

濃縮法	n	濃度 (log copies/L)	
		全量	上清
EMV 法	3	6.8 ± 0.3	6.7 ± 0.3
陰電荷膜吸着-直接 RNA 抽出法 (孔径 $0.8 \mu\text{m}$)	3	4.5 ± 0.1	測定なし
PEG 沈殿法 (PEG6000)	3	7.0 ± 0.7	7.0 ± 0.7
PEG 沈殿法 (PEG8000)	3	7.0 ± 0.7	7.0 ± 0.7
UF 膜法	3	測定なし	6.9 ± 0.6
EMV 法+UF 膜法	2	6.7 ± 0.6	測定なし

表 4 ウイルス RNA 抽出法による SARS-CoV-2 RNA の検出濃度 (NIID 系)

RNA 抽出キット	n	濃度 (log copies/L)		
		EMV 法 (全量)	PEG 沈殿法 (PEG8000)	
			全量	上清
Water DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX Laboratories)	3	6.2 ± 0.7	6.4 ± 0.5	6.3 ± 0.6
QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)	1	非検出	5.6	5.9
QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)	3	6.8 ± 0.3	7.0 ± 0.7	7.0 ± 0.7
RNeasy Power Microbiome Kit (QIAGEN)	3	6.2 ± 0.4	6.3 ± 0.5	6.2 ± 0.6
Quick-DNA/RNA Viral Kit (Zymo Research)	2	6.5 ± 0.5	6.9 ± 2.9	7.1 ± 0.4

3. ウイルス RNA 抽出法による SARS-CoV-2 RNA 検出濃度の比較

ウイルス濃縮液に対し、5 種類のウイル

ス RNA 抽出キットを用いた場合の SARS-CoV-2 RNA の検出濃度の測定結果の一例を表 4 に示す。EMV 法によるウイルス濃縮液に対しては、QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いた場合に最も高い SARS-CoV-2 RNA 検出濃度 ($6.8 \pm 0.3 \log \text{copies/L}$) が得られた。PEG 沈殿法 (PET8000 使用) による濃縮液に対しては、全量および上清のいずれを用いた場合においても、QIAamp Viral RNA Mini Kit と Quick-DNA/RNA Viral Kit により同程度の高い SARS-CoV-2 RNA 検出濃度 (平均 $6.9 \sim 7.1 \log \text{copies/L}$) が得られた。一方、Water DNA/RNA Magnetic Bead Kit と RNeasy Power Microbiome Kit を用いた場合の SARS-CoV-2 RNA 検出濃度は 0.5 log 程度低く、QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit では非検出となる場合もあった。

4. プロセスコントロールとしての PMMoV の有効性の評価

図 1 に示すように、SARS-CoV-2 RNA と PMMoV RNA の検出濃度を比較した結果、両者の間には有意な正の相関 ($r = 0.66$, $P < 0.05$) が認められた。

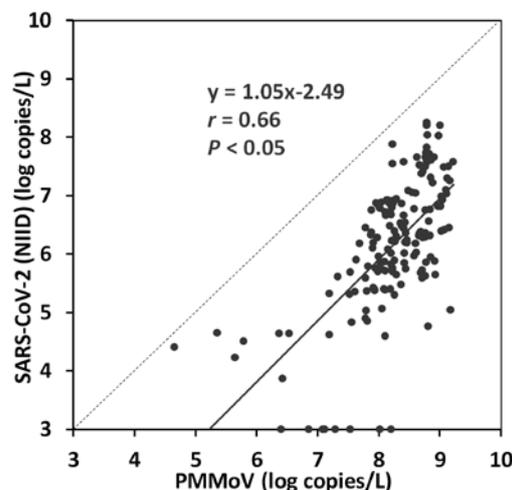


図 1 SARS-CoV-2 RNA (NIID 系) と PMMoV RNA の検出濃度の相関

D. 考察

熱不活化処理を行うことにより、SARS-CoV-2 RNA 検出濃度に有意な低下が見られたことから、熱不活化処理を導入することは推奨されないと示唆された。熱不活化によって PMMoV RNA の検出濃度には変化は見られなかったという結果は、PMMoV が温度に対する高い耐性を有していることに起因していると推察された。

本研究で評価した 4 種類のウイルス濃縮法のうち、PEG 沈殿法が最も高い SARS-CoV-2 RNA 検出濃度を示した。PEG 沈殿法は SARS-CoV-2 RNA の検出に広く用い

られている手法であるが、多くの異なる操作条件が使用されており、最適な条件を決定するための研究が今後も必要である。本研究で採用した IDEXX Laboratories のプロトコルでは、通常一晩程度行われる振とう操作が不要であるため、採水当日に結果を得ることも可能となり、有効な手法となることが期待される。

陰電荷膜破碎型濃縮 (EMV) 法も高い SARS-CoV-2 RNA 検出濃度を示しており、PEG 沈殿法と比較して検査水量の増加が容易であることから、SARS-CoV-2 RNA 濃度が低いことが想定される下水に対して特に有効となることが期待される。

本研究では、濃縮操作前の遠心の有無による SARS-CoV-2 RNA の検出濃度には差は認められず、沈渣分画を除去することによるウイルス RNA の損失は限定的であると判断された。しかしながら、SARS-CoV-2 は固形成分に吸着しやすいことが示唆されており、また、吸着レベルは水質成分により大きく異なることが考えられるため、今後、様々な水質の下水を用いた検討を行うことが求められる。

ウイルス RNA 抽出キットに対しては、濃縮法の種類に関わらず、QIAamp Viral RNA Mini Kit と Quick-DNA/RNA Viral Kit を用いた場合に高い SARS-CoV-2 RNA 検出濃度が得られ、これらのキットの使用が適していると考えられた。ウイルス RNA 抽出においては、ウイルス RNA を高回収率で精製することに加え、後段の RT-qPCR の反応を阻害し得るフミン酸等の共存物質を除去することも重要となることから、今後、阻害物質をより高濃度で含む下水を用いた検討も必要である。

SARS-CoV-2 RNA と PMMoV RNA の検出濃度に有意な正の相関が認められたことから、PMMoV をプロセスコントロールとして用いることの有効性が示唆された。定期的なモニタリングの対象とする下水中の PMMoV RNA 検出濃度の範囲を把握しておくことにより、突発的な検出効率の低下を検知することが可能になることが期待される。

E. 結論

本研究では、様々なウイルス濃縮法やウイルス RNA 抽出法による SARS-CoV-2 RNA の検出濃度の比較等により、下水中の SARS-CoV-2 の検出に有効となる手法の開発を試みた。本研究で得られた知見は以下の通りである。

- 1) 熱不活化処理を行わない場合 ($7.5 \pm 0.7 \log \text{copies/L}$) と比較して、熱不活化処理を行うことで SARS-CoV-2 RNA 検出濃度 ($7.0 \pm 0.6 \log \text{copies/L}$) に有意な

低下が認められ、熱不活化処理の導入は推奨されないことが示唆された。

- 2) 4 種類のウイルス濃縮法に対し、膜の孔径等の濃縮操作条件を変えて SARS-CoV-2 RNA の検出濃度を測定した結果、使用する PEG および試料 (全量および上清) の種類に関わらず、PEG 沈殿法が最も高い値 ($7.0 \pm 0.7 \log \text{copies/L}$) を示した。EMV 法と UF 膜法、さらに、両者の組み合わせた場合にも同程度の高い検出濃度が得られたが、陰電荷膜吸着-直接 RNA 抽出法による検出濃度 ($4.5 \pm 0.1 \log \text{copies/L}$) は他の濃縮法と比較して 2 log 以上低い値であった。
- 3) 5 種類のウイルス RNA 抽出キットのうち、QIAamp Viral RNA Mini Kit と Quick-DNA/RNA Viral Kit を用いた場合に高い SARS-CoV-2 RNA 検出濃度 (平均 $6.5 \sim 7.1 \log \text{copies/L}$) が得られ、これらのキットの使用が適していることが示唆された。
- 4) SARS-CoV-2 RNA と PMMoV RNA の検出濃度の間には有意な正の相関が認められ、PMMoV をプロセスコントロールとして用いることの有効性が示唆された。

F. 健康危険情報

特に該当しない。

G. 研究発表

論文発表

1. なし

学会発表

1. 北島正章, 岩本遼, 佐野大輔, 原本英司, 山口貴世志, 空野すみれ, 山岸拓也, 村上道夫, 小林博幸, 井元清哉, 岡部聡. COVID-19 軽症者等宿泊療養施設の下水からの SARS-CoV-2 の検出: 施設単位の下流水疫学調査の実証. 第 55 回日本水環境学会年会. 2021 年 3 月 10 日-12 日, 京都大学 (オンライン開催), 1-J-09-3, p.85.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし