

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

ポリオ環境水調査の新型コロナウイルス監視への応用

研究分担者 国立感染症研究所 ウィルス第二部 喜多村晃一

研究要旨 新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）は一部の感染者では糞便中に排出されていることから、下水を活用した環境水サーベイランスの試みが進められている。しかし現在のところ、このウイルスに適した下水からの回収検出方法は確立されていない。本研究では、4種類のウイルス回収法と2種類のPCR検出法について比較検討を行った。その結果、下水上清を用いた既存の手法（陰電荷膜法、PEG沈殿法、限外ろ過膜法）に比べて、下水沈殿物（solid画分）からのウイルス回収では、極めて効率よくSARS-CoV-2 RNAが検出できることが明らかとなった。また、PCR法では複数のウイルスゲノム領域を同時に検出するduplex RT-qPCRが効果的であった。下水沈殿物はポリオ環境水サーベイランスでは通常使用されず残るため、これを活用した新たな新型コロナウイルス環境水調査の可能性が示された。

A. 研究目的

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）感染症は軽症例や不顕性感染が多く、感染者数の把握には多大な時間とリソースを必要とすることが大きな課題である。SARS-CoV-2は呼吸器系のウイルスであるが、感染者のうち一定割合においてウイルスが腸管で増殖し数週間糞便に排出されることが報告されている。このことから、地域レベルでの感染症発生動向の把握に下水からSARS-CoV-2を検出する試みが国内外で進められている。加えてわが国では下水網を活用したポリオ環境水サーベイランスが、全国20カ所で地方衛生研究所の協力のもと実施されており、この検査インフラを活用したSARS-CoV-2環境水サーベイランスが期待できる。しかし、既存の下水中ウイルス回収法は、エンベロープを持たないポリオウイルスやノロウイルス等の腸管系ウイルスに対して開発してきたため、エンベロープを持つ新型コロナウイルスに適した新たな回収方法の開発が求められている。そこで本分担研究では、ポリオ環境水調査と並行して行うことを前提に、効率の良いSARS-CoV-2検出方法の検討を行った。

B. 研究方法

1. 下水中新型コロナウイルス回収方法の検討

ポリオ環境水サーベイランスでは、下水を粗遠心した上清を用いた陰電荷膜法によるウイルス回収が行われている。その他、上清ではポリエチレングリコール（PEG）沈殿法、限外ろ過膜法が非エンベロープ型ウイルス回収法として広く利用されている。

一方でSARS-CoV-2などのエンベロープ型のウイルスは、その表面の性状の違いから下水中の固体物（solid）に吸着しやすいと考えられ、下水検体の粗遠心で生じる沈殿物に多く存在している可能性がある。そこで本研究では、提供を受けた32の下水検体から、陰電荷膜法、PEG沈殿法、限外ろ過膜法、solid画分沈殿法の4種類のウイルス回収法を行い比較した。

2. 新型コロナウイルス PCR 検出の検討

臨床検体からのSARS-CoV-2検査にはウイルスRNAを検出するRT-qPCRが行われており、そのプライマー/プローブセットとしてNIID_N2法やCDC_N1、CDC_N2法が広く用いられている(ShiratoらJapan. Jpn. J. Infect. Dis. 2020年、CDC 2020年)。本研究では前述の4種類の手法で回収したウイルスRNAそれぞれに対して、NIID_N2法及びCDC_N1N2法の2種類によるPCR検出を検討した。また、ウイルスRNAが回収されていることの確認として、internal controlにトウガラシ微斑ウイルス(PMMoV)のPCR検出も併せて行った。PMMoVはヒトの糞便や下水中に高濃度に安定して存在しているため、下水中ウイルスRNA検出の指標に用いられている。

3. 下水中新型コロナウイルス配列解析

PCR検出で陽性となった検体に対してRT-PCRにより広いウイルスゲノム領域（ORF1a及びスパイクタンパク質領域）を增幅し、配列解析により新型コロナウイルスであることの確認を行った。

C. 研究結果

1. 下水中新型コロナウイルス回収方法の

検討

下水検体を用いた4種類のウイルス回収法のうち、solid画分沈殿法において安定してSARS-CoV-2 RNAが検出された。一方でその他3つの回収法では、ほとんどが不検出であった。指標ウイルスであるPMMoVでは、テストした全ての回収法から十分な量のウイルスRNAが検出された。また、下水採水地域あるいは採取日の比較から、検出されたSARS-CoV-2 RNA量と感染者数に一定の相関が見られた。

2. 新型コロナウイルスPCR検出の検討

2種類のプライマー/プローブセットの比較では、NIID_N2よりCDC_N1N2の方が高い検出感度を示した。ウイルス分離株から調製したRNAに対するPCR検査では両者の検出感度に大きな差はなく、今回の違いは下水検体に特有の結果であると考えられた。

3. 下水中新型コロナウイルス配列解析

PCR検査で高いウイルスコピー数を示した検体において配列解析も可能である傾向が見られた。今回解析した検体からは1塩基を除いて変異は見られなかった。

D. 考察

下水の粗遠心上清を用いる既存のウイルス回収法に比べて、粗遠心沈殿物(solid画分)を用いたSARS-CoV-2回収は非常に効率よくウイルスRNAが検出された。SARS-CoV-2 RNAがほとんど検出されないその他3つの回収方法は、いずれも粗遠心上清を用いていることから、下水中ではSARS-CoV-2は固形物に吸着しており、その多くが粗遠心で沈殿しているものと考えられる。また、PCR検査では2ヶ所を同時に検出するCDC_N1N2 duplexセットを用いることで、より高感度にウイルスRNAが検出された。このような結果は下水検体では見られるが、分離株RNAでは確認できない現象であり、下水中ではウイルス及びウイルスRNAの分解が進んでいることを反映している可能性がある。solid画分から得られたSARS-CoV-2 RNAはサンガーフラッシュ法によるウイルスゲノム解析が少なくとも部分的には可能であり、今後、次世代シークエンス解析や変異株検出にも応用できるものと考えられる。ポリオ環境水サーベイランスでは、ポリオウイルス検出のために下水上清を使用している。その過程で残った下水沈殿物をSARS-CoV-2検出に活用できることが本研究で明らかとなり、新型コロナウイルス環境水サーベイランスを行う際には効率の良い検査体制の構築が可能と考えられる。

E. 結論

本研究から、下水中新型コロナウイルス

検出には粗遠心沈殿物(solid画分)を用いたPCR検出が効果的であることが示された。下水中ではウイルスRNAが分解されている可能性があるため、複数の遺伝子領域を增幅するPCRが重要と考えられた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

論文発表

1. 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, 2021, 763, 144587.

学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

該当なし