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

東京都における下水試料中からのSARS-CoV-2調査における検査手法の検討

研究分担者　貞升健志　東京都健康安全研究センター 微生物部

研究協力者　長島 真美　東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
河上 麻美代　同上
林　真輝　同上
熊谷 遼太　同上
吉田　勲　同上
糟谷　文　同上
藤原 卓士　同上
千葉 隆司　同上
樫原 慎久　東京都下水道局
森田 健史　同上
山田 欣司　同上
喜多村 晃一　国立感染症研究所ウイルス第二部
吉田　弘　同上

研究要旨　東京都内2か所の下水処理場で採取された下水の分画（粗遠心後の上清と沈渣成分）からの新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の検出とウイルス分離を試みた。その結果、放流水からはSARS-CoV-2遺伝子は検出されず、流入下水の粗遠心後の沈渣分画から効率的に検出された。VEROE6/TMPRSS2細胞を使用しSARS-CoV-2分離を試みた結果、全ての検体からSARS-CoV-2は分離できなかった。本研究結果から、流入下水の粗遠心後の沈査分画から効率的にSARS-CoV-2遺伝子が検出されるが、SARS-CoV-2分離は困難であり、下水道を通じた環境への拡散はないと推察された。

A．研究目的

近年、世界各地の下水試料から、SARS-CoV-2 RNAの検出報告がなされている。我が国においても、東京都を含む下水における複数の地域での検出報告がある。今回、2020年6月から8月（都内の感染者報告：54人～236人）に、東京都内の2か所の水再生センターで採取された下水（流入下水、放流水）について、粗遠心後の上清と沈査から核酸RNAを抽出し、リアルタイムPCRによりSARS-CoV-2遺伝子を検出するとともに、Vero系細胞であるVeroE6TMPRSS2細胞を用いてSARS-CoV-2の分離培養を試みた。

B．研究方法

1. 材料と方法

流入水は 6 月 30 日～8 月 26 日に計 9 回（500mL を 2 本）採取し、放流水は 7 月 8 日～8 月 19 日に計 4 回（500mL を 2 本採取）採取した。採取場所は、下水処理場 S（10 区からの下水を処理し、東京湾に放流する）と、下水処理場 O（7 区からの下水を処理し、神田川へ放流する）である。各下水処理場では流入水および放流水を採取した。なお、検体は無菌のプラスチックボトルで採取し、分析まで-20℃にて冷凍保管した。

2. 下水からの核酸抽出法

下水検体は、陰電荷膜吸着法と Solid 沈殿法の 2 つの手法で濃縮した（図１）。すなわち、各検体 400mL を 3,000rpm30 分間の遠心後、上清分画（S）と沈渣に分けた。S 分画については、孔径 1.0μm のプレフィルターを通した後、孔径 0.45nm の陰電荷膜吸着法で濃縮した。検体の pH は 2N HCl で pH 3.5 に維持し、吸着したウイルスは牛肉エキス溶液で溶出し、3 mL のうち 1/3 量を QIAamp viral RNA mini kit（QIAGEN）を用いて RNA 抽出した。

遠心処理で得られた沈渣 2 mL については C-Solid 分画とし、そのうちの 800μL を ISOIL for RNA（ニッポンジーン）を用いて RNA 抽出した。

3. SARS-CoV-2 の検出

S 分画および C-Solid 分画それぞれから抽出した RNA を材料とし、SARS-CoV -2 Direct Detection RT-qPCR　Kit（TaKaRa）を使用し、リアルタイム PCR を実施した。また、定量用コントロールは、Takara

SARS-CoV-2 ポジティブコントロール(RNA)（製品コード RC351A）を使用し、AccuPlex ™ SARS-CoV-2 Reference Material Kit（seracare Life Science 社）を定量値の調整で使用した。

サーマルサイクラーは、12K（Thermofisher Scientific 社）を用い、50 ℃30 分→95℃5 分→95℃15 秒 60℃60 秒×45 サイクルの条件で反応させた。なお、本検査の検出限界は 5 コピー/反応であり、L 当たりに換算すると 500 コピーとであった。

全ての PCR 分析では 2 回陽性を陽性と判定した。陽性の基準として、検出感度未満でも明確な陽性曲線の出現があった場合には陽性と判断した。また、コンタミネーション防止策として、試薬調整、検体抽出、遺伝子増幅の全ての工程を別の実験室で実施した。

下水の抽出コントロールとしてトウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）RNA をターゲットとし、QuantiTect Probe RT-PCR Kit（Qiagen 社）によるリアルタイム PCR 法により定量した。なお、陽性コントールは SIGMA 社に委託合成した。

4. SARS-CoV-2 の分離

BSL3 実験室内で、S 分画 100μL および C-Solid 分画 160μL を VeroE6/TMPRSS2 細胞に接種した。1 週間培養し、顕微鏡下で細胞変性効果（CPE）観察を行い、培養液 30μL を新しい細胞に接種した。この過程を 3 週間実施した後、上清を SARS-CoV -2 Direct Detection RT-qPCR Kit（TaKaRa）を使用して、ウイルスの検出を試みた。なお、分離観察中にカビ等が出現した場合には、0.22μm のフィルター濾過を実施し、細胞継代を継続した。

C．研究結果

1. 下水からの SARS-CoV-2 検出

下水処理場 S では 7/22-8/26 の流入下水 7 サンプルの C- Solid 検体から SARS-CoV-2 遺伝子が検出されたが（表 1、S 分画からは検出されなかった（表 2）。同様に下水処理場 O では 7/22-7/29 の 2 サンプルの C-Solid 分画から SARS-CoV-2 遺伝子が検出されたが、S 分画からは検出されなかった。また、放流水からは全ての S 分画および Solid 分画から SARS-CoV-2 遺伝子は検出されなかった。

PMMoV RNA については、流入水の C-Solid では平均 10^6 コピー/L で、S 分画では 10^7 コピー/L と S 分画の方が定量値が高い傾向にあった（表 1、2）。一方、放流水の C-Solid 分画では 10^4～10^5 コピー/L、S 分画では 10^6～10^7 コピー/L と、流入水よりは低く、同様に S 分画の方が多い傾向があった。

2. 下水からの SARS-CoV-2 の分離

全ての沈渣および上清全てから SARS-CoV-2 特有の CPE は認められず、リアルタイム PCR でも確認したが、SARS-CoV-2 は分離されなかった。

D．考察

日本における下水からの SARS-CoV-2 遺伝子の検出は複数報告されている。Kitamura ら(Sci Total Environ. 2021)は、Solid 分画から SARS-CoV-2 遺伝子の検出が可能であることを報告している。本研究では彼らの方法に準じて、検査を実施した。その結果、粗遠心後の S 分画からの SARS-CoV-2 遺伝子検出頻度は著しく低いのに対し、C－Solid 分画において SARS-CoV-2 遺伝子が多くの検体で検出された。しかしながら、Kitamura らが報告する検出量よりもやや少なく、ウイルス量としては全て＜500copies/L であった。

その理由としては、採取物の違い、抽出試薬や定量補正の違い等が考えられた。また、同じ抽出物からの複数回の実施で、陽性であったり陰性となったりする検体があり、リアルタイム PCR による検出感度ギリギリの検体である検体が複数あった。

SARS-CoV-2 の分離に最も適している VeroE6/TMPRSS2 細胞によるウイルス分離を試みた結果、全ての検体から SARS-CoV-2 分離は出来なかった。一般にリアルタイム PCR 検査で Ct 値 30 以上の臨床検体からのウイルス分離は困難であることが報告されている。環境サンプルと臨床サンプルを一概に比較はできないが、多くの流入下水については、100 倍濃縮し Ct 値 40 前後であったことから、1 mL 当たりに換算すると臨床検体の Ct 値 30 検体より 16Ct 値程度薄い計算になる。

このことは、遺伝子は検出されていても、流入下水中の SARS-CoV-2 の分離は不可能に近いことを示している。WHO の報告では、糞便や尿中の SARS-CoV-2 の生存性を示す論文は限られており、大腸から出た SARS-CoV-2 は急速に不活化されるとしている。我が国では、放流水はさらに 0.1% sodium hypochlorite で処理されるため、環境への SARS-CoV-2 の拡散の心配は著しく低いものと考えられる。

東京都内における SARS-CoV-2 感染者数は現在も多く報告されており、下水の有用性の検討には、今後も継続的な調査・研究が必要である。一方で、本検査では 100 倍濃縮後に遺伝子の増幅操作を行うため、十分なコンタミネーション対策や、統一した抽出試薬や検査試薬が必要であり、全国的に

画一的な地衛研等の検査マニュアル等の作成が望まれる。

Ｅ．結論

東京都における下水からの SARS-CoV-2 の検出を試みた。結果、粗遠心後の上清分画より沈渣分画において SARS-CoV-2 遺伝子が検出された。しかしながら、検出量は少なく、ウイルス量としては全臨床検体と比べて著しく少なかった。さらに、 SARS-CoV-2 の分離に最も適している VeroE6TMPRSS2 細胞によるウイルス分離を試みた結果、全ての検体から SARS-CoV-2 分離は出来なかった。

Ｆ．健康危険情報

なし

Ｇ．研究発表

論文発表

1. Kouichi Kitamura K., Sadamasu K., Muramatsu M., Yoshida H.; Efficient detection of SARS-CoV-2 RNA in the solid fraction of wastewater, Sci Total Environ. 2021 Apr 1;763:144587. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144587. Epub 2020 Dec 18.
2. Nagashima M.,et al. Detection of SARS-CoV-2 RNA in concentrated wastewater by RT-qPCR (June-August 2020, Tokyo), JJID（投稿中）
3. 貞升健志、新型コロナウイルス検査試薬と東京都における検査対応（2020 年 1～10 月）、ぶんせき、554、46–51、2021
4. Nagashima M, Kumagai R, Sadamasu K, et al.: Characteristics of SARS-CoV-2 isolated from asymptomatic carrier in Tokyo. Jpn J Infect Dis. 73 320-322. 2020
5. Sekizuka T, Itokawa K, Sadamasu K., et al ： A Genome Epidemiological Study of SARS-CoV-2 Introduction into Japan. mSphere, 5, 1-10, 2020
6. 貞升健志、新型コロナウイルス検査の現場から、Toju Journal、597、10-17、2020
7. 千葉隆司、貞升健志、長島真美、他、健康安全研究センターにおける新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の検査対応（2020 年 1 月～5 月）、東京都健康安全研究センター研究年報、71、Web 公開（印刷中）、2020
8. 浅倉弘幸、長島真美、貞升健志、他、東京都内で検出された新型コロナウイルスの次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析（2020 年 2 月~5 月）、東京都健康安全研究センター研究年報、71、Web 公開（印刷中）、2020
9. 熊谷遼太、長島真美、貞升健志、他、新型コロナウイルスの検査における簡易抽出型リアルタイム PCR 法の有用性の検討、東京都健康安全研究センター研究年報、71、Web 公開（印刷中）、2020

学会発表

1. なし

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

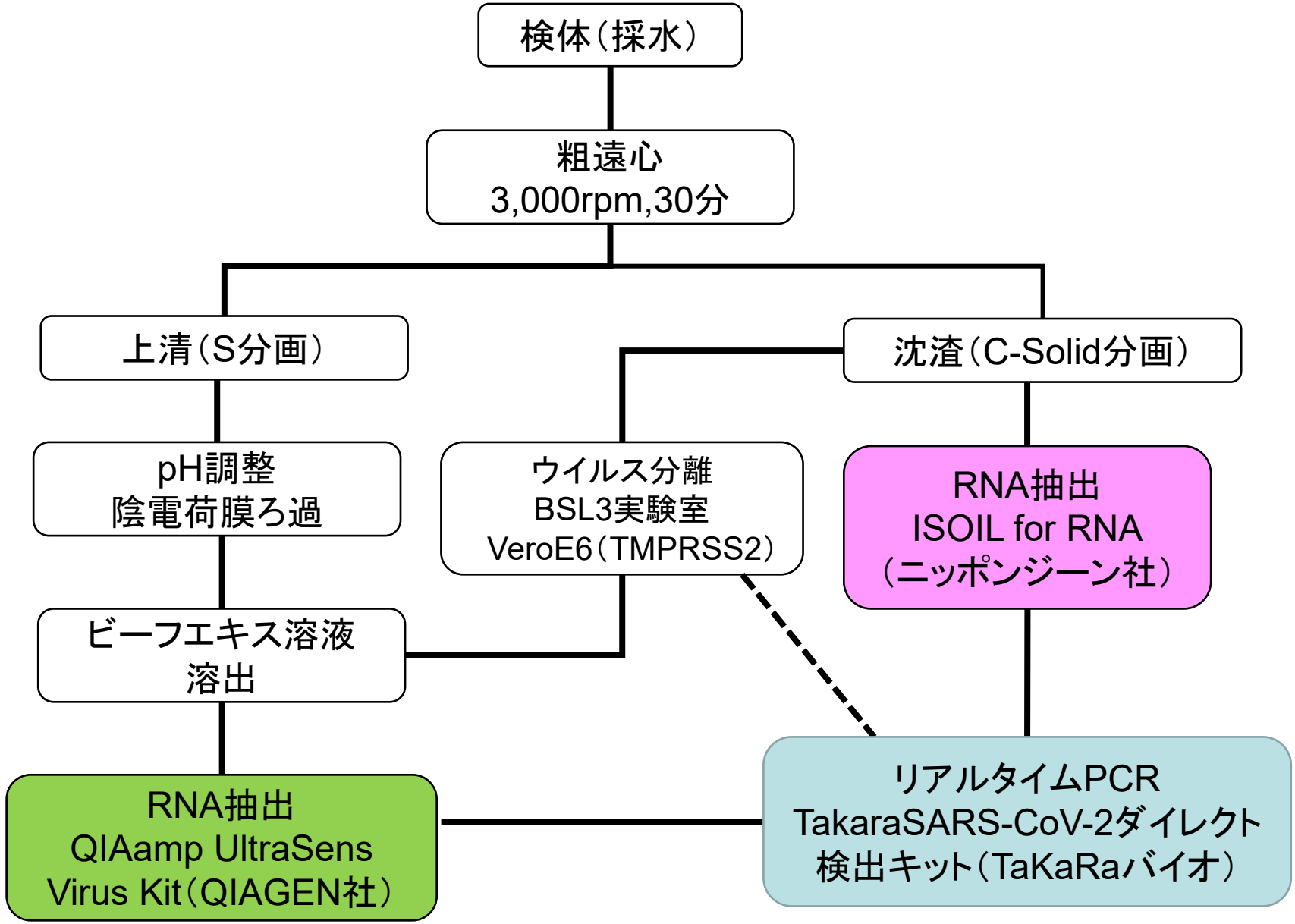

図1　下水試料からのSARS-CoV-2検査

C-Solid分画	採取日	リアルタイムPCR				ウイルス分離	リアルタイムPCR	
		SARS-CoV-2			Copies/L		PMMoV	Copies/L
下水処理場A	30-Jun-20	+	-	-	-	-	+	2.5E+06
	7-Jul-20	-	-		-	-	+	2.1E+06
	16-Jul-20	+	-	+	<500	-	+	3.3E+06
	22-Jul-20	-	+	+	<500	-	+	9.9E+06
	29-Jul-20	+	-	+	<500	-	+	7.1E+05
	5-Aug-20	+	+		<500	-	+	2.7E+06
	12-Aug-20	-	+	+	<500	-	+	2.3E+06
7/9(+)	19-Aug-20	+	+		<500	-	+	1.7E+06
	26-Aug-20	+	+		<500	-	+	1.1E+06
下水処理場B	30-Jun-20	-	-	-	-	-	+	5.6E+05
	7-Jul-20	-	-	-	-	-	+	2.2E+06
	16-Jul-20	-	+	+	<500	-	+	2.6E+06
	22-Jul-20	-	+	+	<500	-	+	1.6E+06
	29-Jul-20	+	-	-	-	-	+	1.5E+06
	5-Aug-20	-	+	-	-	-	+	2.6E+06
	12-Aug-20	-	-		-	-	+	1.0E+07
2/9(+)	19-Aug-20	+	-	-	-	-	+	2.8E+06
	26-Aug-20	-	+	-	-	-	+	6.3E+06

表1　流入下水(C-Solid分画)からのSARS-CoV-2検出結果

S分画	Date	リアルタイムPCR				ウイルス分離	リアルタイムPCR	
		SARS-CoV-2			Copies/L		PMMoV	Copies/L
下水処理場A	30-Jun-20	-	-		-	-	+	3.8E+07
	7-Jul-20	-	-		-	-	+	3.2E+07
	16-Jul-20	-	-		-	-	+	3.1E+07
	22-Jul-20	-	-		-	-	+	3.0E+07
	29-Jul-20	-	-		-	-	+	4.6E+07
	5-Aug-20	-	-		-	-	+	4.0E+07
	12-Aug-20	-	-		-	-	+	3.7E+07
	19-Aug-20	-	-		-	-	+	2.9E+07
0/9(+)	26-Aug-20	-	-		-	-	+	3.8E+07
下水処理場B	30-Jun-20	-	-		-	-	+	1.5E+07
	7-Jul-20	-	-		-	-	+	1.5E+07
	16-Jul-20	-	-		-	-	+	1.7E+07
	22-Jul-20	-	-		-	-	+	2.2E+07
	29-Jul-20	-	-		-	-	+	2.0E+07
	5-Aug-20	-	-		-	-	+	2.0E+07
	12-Aug-20	-	+	-	-	-	+	2.2E+07
0/9(+)	19-Aug-20	-	-		-	-	+	3.5E+07
	26-Aug-20	-	-		-	-	+	3.5E+07

表2　流入下水(S分画)からのSARS-CoV-2検出結果