

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
終末処理場の流入水沈査からのRNA抽出方法の検討

研究分担者 濱崎光宏 福岡県保健環境研究所
研究協力者 芦塚由紀 福岡県保健環境研究所

研究要旨 終末処理場の流入水から効率よく新型コロナウイルス（以下「SARS-CoV-2」という。）を検出する手法を確立するため、RNA抽出方法の検討を行った。終末処理場の流入水の沈殿物について、RNeasy Power Soil Total RNA kit、Stool Total RNA Purification kit、QIAamp Viral RNA Mini kit及びQIAamp Ultra Sens Virus kitの4種類のRNA抽出キットを比較した。その結果、終末処理場の流入水の沈殿物に対してRNeasy Power Soil Total RNA kitを用いてRNA抽出したものからSARS-CoV-2が検出された。終末処理場の流入水の上清を陰電化膜で濃縮したものより沈殿物の方がSARS-CoV-2を検出するのに適していると考えられた。また、一部の終末処理場の流入水については、SARS-CoV-2の感染者数が増加すると終末処理場の流入水から検出される傾向が認められた。SARS-CoV-2が検出された検体が少ないことから、今後も継続的にモニタリングを行いSARS-CoV-2の感染者数と終末処理場の流入水から検出されるSARS-CoV-2のコピー数の関係を検討する必要がある。

A. 研究目的

新型コロナウイルス感染症において、無症状病原体保有者が存在することが知られており、その正確な流行状況を捉えることが難しい。一方、終末処理場の流入水を調査することで、症状の有無を問わずに腸管由来の病原微生物の流行状況を明らかにすることが知られている。原因ウイルスである新型コロナウイルス（以下「SARS-CoV-2」という。）は、感染者のうち一定の割合で腸管で増殖し数週間糞便に排出されることが知られており、米国、フランス等では終末処理場の流入水を用いて、地域の感染者数の推計などを行っている。

本研究では、終末処理場の流入水から効率良く SARS-CoV-2 を検出する手法を確立するため、RNA 抽出方法の検討を行った。

B. 研究方法

1. 検体

検体は、九州北部にある2カ所の終末処理場（AおよびB）から流入水を2020年7月から2021年1月まで毎月2L入手した。A終末処理場は高い下水道普及率（80%以上）であるが、B終末処理場は低い下水道普及率（30%以下）である。流域人口は、A終末処理場が約20万人、B終末処理場が約17万人でありほぼ同程度であった。採取した終末処理場の流入水は、濃縮処理するまで4℃で保存した。

2. 検体処理及び上清の濃縮

終末処理場の流入水 200mL を 4℃ で 1,500g×60分遠心分離を行った。沈殿物はそのままRNA抽出に用いた。上清は、塩化マグネシウムを終濃度0.05Mになるように添加し、塩酸でpH3.5に調整した。上清を陰電化膜（0.45 μmの孔径のフィルター、アドバンテック、東京、日本）で濾過し陰電荷膜にウイルスを吸着させた。陰電荷膜より3%牛肉エキス4mlでフィルターに結合したウイルスを溶出した。16,000g×30分遠心分離を行い破碎したフィルターを除去し、0.22 μmの孔径PVDF膜フィルター（ミリポア）で濾過し50倍濃縮検体とした。

3. 濃縮検体からのRNA抽出

濃縮検体からのRNA抽出は、QIAamp Ultra Sens Virus Kit（QIAGEN社）を用い、付属の説明書に従ってRNA抽出を行った。

4. 沈殿物からのRNA抽出

沈殿物からのRNA抽出方法を比較するため、RNeasy Power Soil Total RNA kit（QIAGEN社）、Stool Total RNA Purification kit（Norogen社）、QIAamp Viral RNA Mini kit（QIAGEN社）及びQIAamp Ultra Sens Virus kitの4種類のRNA抽出キットを用いた。

RNeasy® Power Soil Total RNA kitは最大検体処理量が2gのため、終末処理場の流入水200mlの沈殿物を用い、付属の説明書に従ってRNA抽出を行った。

Stool Total RNA Purification kitは、

最大検体処理量が 0.2g のため、終末処理場の流入水 50ml 分の沈殿物を用い、付属の説明書に従って RNA 抽出を行った。

QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN 社) 及び QIAamp Ultra Sens Virus kit は液体からの RNA 抽出キットのため、200ml の終末処理場の流入水を遠心分離し、沈殿物を 2ml の PBS に懸濁した。その懸濁液を付属の説明書に従い QIAamp Viral RNA Mini kit は 140 μ l、QIAamp Ultra Sens Virus kit は 1ml を用いて RNA 抽出を行った。

5. トウガラシ微斑ウイルスのリアルタイム PCR

内部標準物質及び RNA 抽出キットの比較する際の指標として使用するため、トウガラシ微斑ウイルス (以下「PMMoV」という。) のコピー数を測定した。抽出した RNA について、Prime Script RT Master Mix (TaKaRa Bio 社) を用い 37°C で 30 分、85°C で 5 秒の逆転写反応を行った。Haramoto ら (Haramoto et al., Appl Environ Microbiol, 79:7413-7418, 2013) のプライマー及びプローブ、Probe qPCR Mix, with UNG (TaKaRa Bio 社) を用い 95°C 3 秒、60°C 30 秒の PCR 反応を 45 サイクル行った。1 検体につき 2 回測定し、2 回とも遺伝子の増幅が認められたものを陽性とした。陽性コントロールは、対象となる 175bp の合成 DNA (Thermo Fisher Scientific 社) を用いた。陽性コントロールを 10 倍段階希釈し、 1×10^2 gene copies/ μ l から 1×10^5 gene copies/ μ l になるように調整し、作成した検量線からウイルスのコピー数を算出した。

6. SARS-CoV-2 のリアルタイム PCR による検出

SARS-CoV-2 の検出は、SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR kit (TaKaRa Bio 社) を用い ABI 7500 Fast サーマルサイクラー (Thermo Fisher Scientific 社) にて RT-qPCR を行った。52°C 5 分、95°C 10 秒の逆転写反応後、95°C 5 秒、60°C 30 秒の PCR 反応を 45 サイクル行った。1 検体につき 2 回測定し、2 回とも遺伝子の増幅が認められたものを陽性とした。付属の陽性コントロールを 10 倍段階希釈し、 1×10^0 gene copies/ μ l から 1×10^3 gene copies/ μ l になるように調整し、作成した検量線からウイルスのコピー数を算出した。

7. SARS-CoV-2 の感染者数

SARS-CoV-2 の感染者数は、該当する自治体のホームページを参照した。

C. 研究結果

1. RNA 抽出キットの比較

終末処理場の流入水の沈殿物について、RNeasy Power Soil Total RNA kit、Stool Total RNA Purification kit、QIAamp Viral RNA Mini kit 及び QIAamp Ultra Sens Virus kit の 4 種類の RNA 抽出キットについて、抽出効率を比較するため PMMoV のコピー数を測定した (図 1)。PMMoV は毎月検出されており、QIAamp Viral RNA Mini kit が最も抽出効率が高かった。

2. 終末処理場の流入水から SARS-CoV-2 の検出

抽出した RNA について、SARS-CoV-2 の検出を行った (表 1.1、表 1.2)。SARS-CoV-2 は、終末処理場の流入水の沈殿物を RNeasy Power Soil Total RNA kit を用いて RNA 抽出したものからのみ検出された。

SARS-CoV-2 のリアルタイム PCR の検出限界値を 5 コピーと仮定した場合、それぞれの RNA 抽出キットの終末処理場の流入水 1L 当たりの検出限界値を示す (表 2)。終末処理場の流入水の沈殿物から SARS-CoV-2 を検出する場合、RNeasy Power Soil Total RNA kit が最も効率が良かった。

3. 検出された SARS-CoV-2 のコピー数と感染者数

検出された SARS-CoV-2 のコピー数と感染者数の関係を図 2 に示す。2020 年 8 月は全国的な SARS-CoV-2 の流行が確認されており、A、B いずれの終末処理場の流入水の沈殿物からも SARS-CoV-2 が検出された。また、2020 年 12 月から 2021 年 1 月にかけての流行期では、A 終末処理場の流入水の沈殿物から SARS-CoV-2 が検出された。

D. 考察

終末処理場の流入水から効率が良い SARS-CoV-2 の検出方法を確立するため、RNA 抽出キットの比較を行った。RNA 抽出効率は、使用する RNA 抽出キットにより差があり、終末処理場の流入水の上清を陰電化膜で濃縮したものより沈殿物の方が SARS-CoV-2 を検出するのに適していると考えられる。しかし、終末処理場の流入水の沈殿物から RNeasy Power Soil Total RNA kit を用いて RNA 抽出を行った場合と、終末処理場の流入水の上清を陰電化膜で濃縮したものを QIAamp Ultra Sens Virus kit を用いて RNA 抽出を行った場合では、RNA の抽出効率はほぼ同程度であることから、今後、濃縮方法について検討が必要と考えられる。

A 終末処理場の流入水からは、SARS-CoV-2 の感染者数が増加すると終末処理場の流入水から検出される傾向が認められたが、B 終末処理場では、2020 年 12 月及び 2021 年 1 月の終末処理場の流入水からは SARS-

CoV-2を検出することができなかった。このことは下水道普及率の影響と推察されるが、SARS-CoV-2が検出された検体が少ないため、今後も継続的にモニタリングを行い SARS-CoV-2の感染者数と検出される SARS-CoV-2のコピー数について検討する必要があると考えられる。

また、PMMoVは、今回検討した全てのRNA抽出キットからも毎月検出されていることから、内部標準物質として有用であると考えられる。

E. 結論

終末処理場の流入水の沈殿物から RNeasy Power Soil Total RNA kit を使用すること

で、SARS-CoV-2を検出することができた。SARS-CoV-2が検出された検体が少ないことから、継続的にモニタリングを行い SARS-CoV-2の感染者数と検出される SARS-CoV-2のコピー数との関係を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

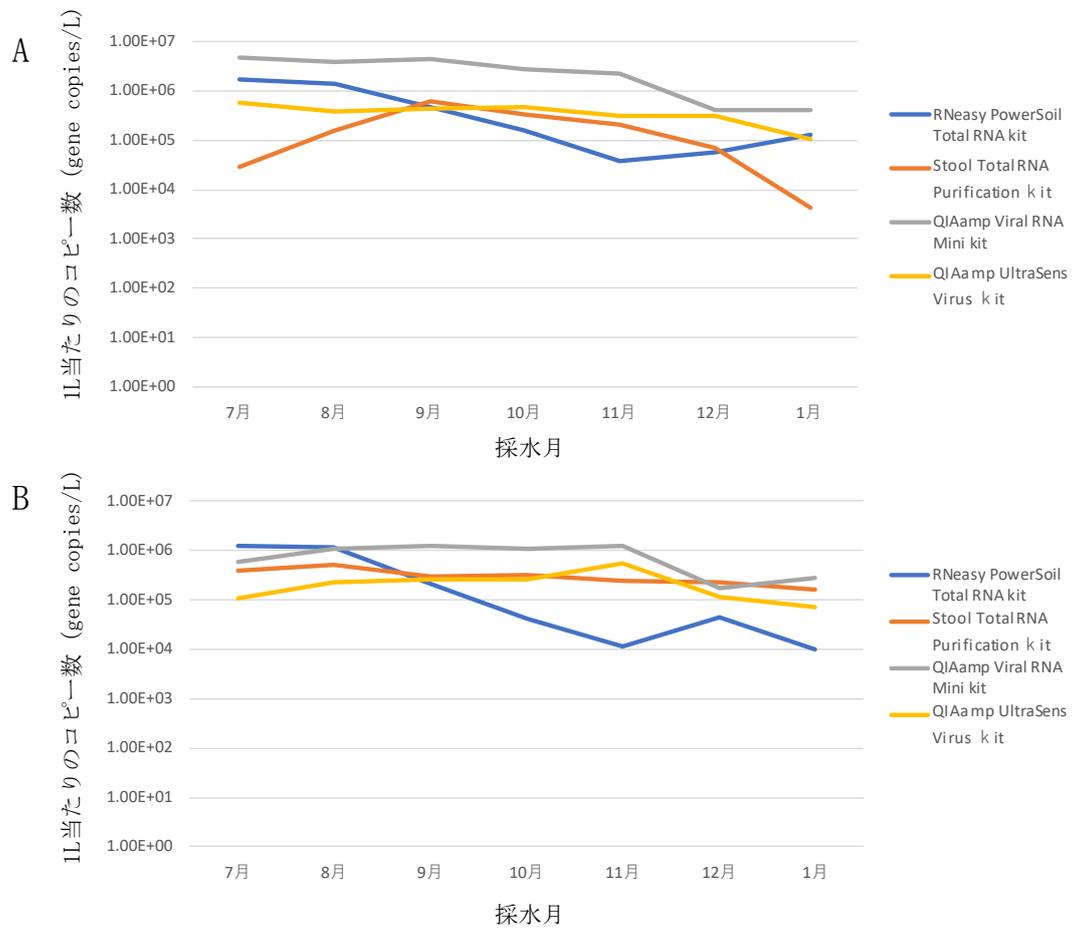


図1 各終末処理場の流入水の沈殿物から検出されたトウガラシ微斑ウイルスのコピー数
 パネルA：A終末処理場からの流入水の沈殿物、パネルB：B終末処理場からの流入水の沈殿物、2020年7月から2021年1月までに採水された流入水について、各RNA抽出キットを使用しPMMoVのコピー数を比較した。

表1.1 A終末処理場の流入水から検出された新型コロナウイルスのコピー数

採水月	終末処理場の流入水の沈殿物				陰電化膜濃縮	
	RNeasy PowerSoil Total RNA kit	Stool Total RNA Purification kit	QIAamp Viral RNA Mini kit	QIAamp UltraSens Virus kit	QIAamp UltraSens Virus kit	QIAamp UltraSens Virus kit
7月	ND*1	ND	ND	ND	ND	ND
8月	1.13E+03	ND	ND	ND	ND	ND
9月	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10月	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11月	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12月	7.35E+01	ND	ND	ND	ND	ND
1月	5.89E+02	ND	ND	ND	ND	ND

表1.2 B終末処理場の流入水から検出された新型コロナウイルスのコピー数

採水月	終末処理場の流入水の沈殿物				陰電化膜濃縮	
	RNeasy PowerSoil Total RNA kit	Stool Total RNA Purification kit	QIAamp Viral RNA Mini kit	QIAamp UltraSens Virus kit	QIAamp UltraSens Virus kit	QIAamp UltraSens Virus kit
7月	ND*5	ND	ND	ND	ND	ND
8月	7.20E+01	ND	ND	ND	ND	ND
9月	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10月	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11月	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12月	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1月	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*1:検出限界以下

表2 リアルタイムPCRの検出限界値を5コピーとしたときの各RNA抽出キットの流入水1L当たりの限界値

終末処理場の流入水の沈殿物				陰電化膜濃縮	
RNeasy PowerSoil Total RNA kit	Stool Total RNA Purification kit	QIAamp Viral RNA Mini kit	QIAamp UltraSens Virus kit	QIAamp UltraSens Virus kit	QIAamp UltraSens Virus kit
2.50E+02	7.50E+03	1.07E+04	1.50E+03	3.00E+02	

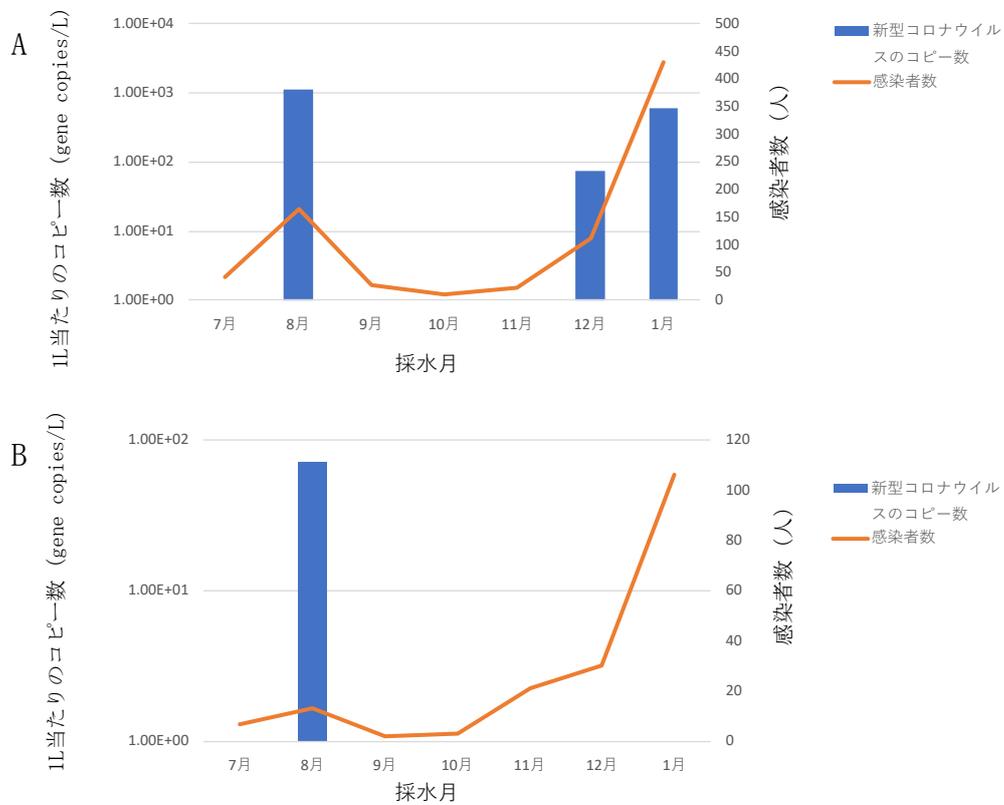


図2 各終末処理場の流入水の沈殿物から検出された新型コロナウイルスのコピー数と感染者数
 パネルA：A終末処理場からの流入水の沈殿物、パネルB：B終末処理場からの流入水の沈殿物、2020年7月から2021年1月までに採水された流入水について、検出された新型コロナウイルスのコピー数と流域の感染者数を比較した。