

環境中の複数種ウイルス検出系の研究

分担研究者：喜多村 晃一 所属 国立感染症研究所

研究要旨 わが国ではポリオ環境水サーベイランスが地方衛生研究所の協力のもと国内の複数箇所で開催されており、この検査インフラを活用した新型コロナウイルス下水サーベイランスが研究されてきた。さらに近年、インフルエンザウイルスなど複数のウイルス種を下水から探知するというニーズが高まっている。本分担研究では、複数種ウイルスを検知する検査体制の基盤となることを目標に、マルチプレックス RT-qPCR によるウイルスゲノム検出技術の検証や、複数種の腸管系ウイルス配列を持つ新規標準物質 VLP-RNA の評価を行った。マルチプレックス RT-qPCR による同時検出は、定期的な下水検査において、コスト削減や検査時間の効率化が見込まれる。新規標準物質 VLP-RNA は精度管理標準物質として活用できることが示された。本研究の結果は、環境検体の複数種ウイルス検出における実験条件や内部精度管理の基礎情報となると考える。

A. 研究目的

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）を引き起こす SARS-CoV-2 は呼吸器系のウイルスであるが、感染者の一定割合においてウイルスが腸管に存在し数週間糞便に排出されることが報告されている。感染者の鼻汁、唾液、糞便等に含まれるウイルスは下水へ排出されることから、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。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地方衛生研究所の協力のもと国内の複数箇所で開催されており、これまでエンテロウイルス、アデノウイルス等が副次的に検出されてきた。さらに COVID-19 パンデミックを契機にこの検査インフラを活用した SARS-CoV-2 下水サーベイランスが研究されている。近年さらに下水からインフルエンザウイルスの検出も報告されており、また以前より高齢者介護施設ではノロウイルス検知のニーズが高い。本分担研究では、複数種ウイルスを検知する検査体制の基盤となることを目標に、マルチプレックス RT-qPCR によるウイルスゲノム検出技術の検証や、新規に導入する複数種ウイルス配列を持つ標準物質 VLP-RNA の評価を行った。またこれに関連して、高齢者介護施設等で迅速なリスク評価を行う手段となることを目指して、環境表面に存在する SARS-CoV-2 等のオンサイト検出技術の開発を行った。

B. 研究方法

1. マルチプレックス RT-qPCR によるウイルス検出

市販の体外診断用医薬品である SARS-CoV-2 & Flu ダイレクト PCR 検出キット（Takara 社）及び RNA 標準物質である新型コロナウイルス・A/B 型インフルエンザウイルスコントロールセットを用いて、マルチプレックス RT-qPCR の条件検討を行った。標準曲線による精度の確認とともに、SARS-CoV-2 RNA が過剰量あった場合でも正確にインフルエンザウイルス RNA が検出されるか検討した。

2. 環境表面ウイルスのオンサイト検出及び VLP-RNA の活用

SARS-CoV-2、ポリオウイルス、エンテロウイルス、ノロウイルスの PCR 検査標的配列を搭載した人工的な疑似ウイルス粒子である VLP-RNA を用いた環境表面拭き取り検体を作成し、モバイル型リアルタイム PCR 機 PicoGene による検出を検討した。また、低コピー数の SARS-CoV-2 疑似粒子 NATtrol SARS-CoV-2 の拭き取り検体を用いて、遠心機能を持つポータブル装置 Bento Lab による RNA 抽出を行い、PicoGene による PCR 検査の評価を行った。

C. 研究結果

1. マルチプレックス RT-qPCR によるウイルス検出

過剰量 (50,000 copies/reaction) の SARS-CoV-2 RNA 存在下でも 5 copies/reaction のインフルエンザウイルス A/B RNA が検出可能で

あった。市販の検出キット推奨のプロトコルによって概ね精度の高い標準曲線が示された。しかし、RNA 標準物質のわずか 2,3 回の凍結溶解繰り返しで検出結果がばらつくことが分かった。条件検討を行ったところ、逆転写反応時間を伸ばすことで改善が認められた。類似製品あるいは in-house のプライマー/プローブの使用時でも同様の可能性が見込まれる。

2. 環境表面ウイルスのオンサイト検出及び VLP-RNA の活用

疑似ウイルス粒子を用いた環境表面拭き取り実験では、抽出試薬を使う簡易抽出法に比べて直接検出法で高い検出感度を得た。VLP-RNA が、SARS-CoV-2、ポリオウイルス、エンテロウイルス、ノロウイルスそれぞれの陽性コントロールとして活用しうることが示された。ポータブル機器による RNA 抽出を含めた PCR 検査の評価では、500 copies/test を滴下した環境表面拭き取り検体を陽性として検出できた。物体表面に滴下した疑似ウイルス粒子の検出について、スワブ溶液を直接検査する迅速法とポータブル遠心機を活用した RNA 抽出法での PCR 検査を評価し、サンプル調製から PCR 検査までポータブル機器のみでの検査、すなわちオンサイト検出が可能であることを確認した。

D. 考察

マルチプレックス RT-qPCR による複数種ウイルスの同時検出は、定期的に下水検査を行う機関において、コスト削減や検査時間の効率化が見込まれる。一方で、市販されている SARS-CoV-2 とインフルエンザウイルスの同時検出キットは本研究期間である 2023 年度中に販売終了したものもあり、継続的な活用が困難であった。しかし本研究による条件検討の結果は他のキットや in-house で調製するマルチプレックス RT-qPCR プロトコルにも適用しうると考える。今回は SARS-CoV-2 の検出には Cy5、インフルエンザウイルスには FAM の蛍光色素を用いており、この組み合わせでない場合は別途事前検討が必要である。人工的な疑似ウイルス粒子である VLP-RNA はカスタム塩基配列が搭載可能であり、本研究では SARS-CoV-2、ポリオウイルス、エンテロウイルス、ノロウイルスの PCR 検査標的配列を合成した RNA を使用した。この VLP-RNA は下水検体や環境表面検体からのウイルス検出実験において、ポ

ジティブコントロールとして使用することができ、これらのウイルス検査を行う際の精度管理への活用が可能である。また、本研究では環境表面拭き取り検体から、ポータブル機器のみを用いて迅速高感度にウイルス RNA を検出する技術を開発した。このオンサイト PCR 検査技術は、高齢者介護施設等、検査ラボへのアクセスが困難な施設などにおいて、施設下水検査とともにリスク評価や早期感染対策への活用が期待できる。

E. 結論

本分担研究では、マルチプレックス RT-qPCR の条件検討や、複数種ウイルス配列を搭載した標準物質の評価を行った。これらの結果は、下水など環境検体から複数種のウイルスを検出する際の実験条件や内部精度管理の基盤となりうる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

論文発表

Kitamura K, Ueno MK, Yoshida H. Rapid and sensitive on-site detection of SARS-CoV-2 RNA from environmental surfaces using portable laboratory devices. Microbiol Spectr. 11(6):e0045623, 2023.

学会発表

1. 喜多村晃一「ポリオ環境水サーベイランスを活用した下水中の新型コロナウイルスの検出」第43回衛生微生物技術協議会、2023年7月5日～6日、じゅうろくプラザ(岐阜)
2. 喜多村晃一, 上野(菊池)みなみ, 吉田弘「環境表面の新型コロナウイルスをオンサイトで検出する手法の検討」第82回日本公衆衛生学会総会、2023年10月31日～11月2日、つくば国際会議場
3. 喜多村晃一, 上野(菊池)みなみ, 吉田弘「ポータブル機器による環境表面新型コロナウイルスRNAの高感度検出法」2023年12月6日～8日、神戸国際展示場

H. 知的財産権の出願・登録状況(あれば記載) (予定を含む。)

該当なし