

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）
「環境水に含まれる新型コロナウイルス等病原体ゲノム情報の活用に関する研究」
研究協力報告書

阻害物質によるリアルタイムPCR定量値への影響の評価方法の検討

研究協力研究者：小澤広規 横浜市衛生研究所

研究要旨 下水中にはRT-PCRを阻害しうる物質の存在が考えられる。商用の濃度既知のVirus Like Particle (VLP)及びRNAを用いて、抽出RNAの回収率及びRT-PCR効率を確認し、下水中の病原体ゲノム定量値への影響を評価する方法の検討を目的とした。下水沈殿物を用いた病原体ゲノム定量値はRNA抽出効率、阻害物質等の影響を受ける。本研究で用いた方法で下水沈殿物由来RNAのRT-PCR効率及びRNA抽出効率を推定、評価し、病原体ゲノム定量値の精度管理が行える可能性を示した。

A. 研究目的

先行研究(令和3年度厚生労働科学研究「環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制の構築に関する研究」⁽⁴⁾)では下水中の新型コロナウイルス調査を継続的に行うために、民間検査機関へ委託した。一方で下水中にはPCRを阻害しうる様々な物質の存在が考えられた。そこで濃度既知のVirus Like Particle (VLP)及び濃度既知の商用RNAを用いて、抽出RNAの回収率及びPCR効率を確認し、下水中の病原体ゲノム定量値への影響を評価する方法の検討を目的とした。

B. 研究方法

1. 調査試料

2 か所の水再生センターの採水協力を得て、流入下水の4試料を用いて調査を実施した。

2. 回収率及びPCR効率の評価

計250mLの流入下水を遠心分離し、上清と沈殿物に分けて回収した。沈殿物からRNeasy PowerSoil Total RNA Kitを用いて、計100μLのRNA溶液を得た。

RNA抽出キットを用いた下水中のRNA回収率及びPCR阻害の影響を確認するため、VLP-RNA Extraction Control(Veritas)を下水沈殿物に加え、さらに抽出RNA溶液にSpike-In Control RNA(Takara bio)を添加した。

VLP及びSpike-In Control RNAの定量はRT-qPCRを行い定量し、評価した。

C. 研究結果

1. RNA回収率の評価

RNeasy PowerSoil Total RNA Kitを用いた下水沈殿物のRNA抽出では概ね6-15%の回収率であった。下水試料間で約2-3倍の差が存在した。

2. RT-PCR 効率の評価

Spike-In Control RNAを用いたPCR効率は11-40%であった。下水試料間で約4倍の差が存在した。

3. 総 VLP 回収率の評価

総 VLP 回収率=VLP 回収率/PCR 効率として算出した。総 VLP 回収率は19-57%であった。下水試料間で約3倍の差が存在した。

表 RNA 回収率及び RT-PCR 効率の推定

	VLP 回収率	RT-PCR 効率	総 VLP 回収率
試料 1	8%	40%	21%
試料 2	6%	11%	54%
試料 3	15%	27%	57%
試料 4	7%	36%	19%

D. 考察

下水沈殿物からのRT-qPCRによるVLP回収率は15%以下であった。この回収率は抽出RNAに含まれる阻害物質等の影響を受けると考えられる。阻害物質の影響を評価するために新たに加えたSpike-In Control RNAを用いてRT-PCR効率を求めた。さらに阻害物質の影響を補正した総VLP回収率を算出し、RNA抽出効率を推定した。

試料ごとに3つの指標にばらつきがあった。試料2と試料4はVLP回収率が同程度であったがRT-PCR効率に3倍程度の差があった。一方で試料3が示すようにVLP回収率が高いとRT-PCR効率も高いという傾向ではなかった。

従って、下水試料ごとに抽出RNAの質を評価することが、下水を用いた病原体ゲノムサーベイランスの精度管理には必要であると考えられた。

一方で検討した試料が少ないこと、単一の RNA 抽出方法を用いたこと、定量法の交差反応、及び VLP が下水中の標的ウイルス粒子と同様の挙動を示すか不明であることから、これらの指標を下水沈殿物由来 RNA を評価する指標とするには様々な課題があり、更なる検討が必要である。

E. 結論

下水沈殿物由来 RNA の RT-PCR 効率及び RNA 抽出効率を推定、評価し、病原体ゲノム定量値の精度管理を行える可能性を示した。一方で交差反応等の更なる検討が必要である。

参考文献

- 1) 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に関する研究」研究協力報告書

検出頻度を増やした下水中新型コロナウイルス検出報告 2021 年度

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし