

令和3年9月15日

各報道機関 御中

国立大学法人山梨大学

下水中の新型コロナウイルス遺伝子の高感度検出法を開発

～変異株の流行把握をはじめ COVID-19 下水疫学調査の社会実装に貢献～

ポイント

- ・ 下水中の新型コロナウイルス遺伝子を高感度で検出可能な逆転写定量 PCR 法を開発。
- ・ 日本水環境学会の検出マニュアル記載の手法よりも迅速・高感度での検出を実現。
- ・ 検査キット化により COVID-19 に対する下水疫学調査の社会実装の加速が期待。

山梨大学大学院総合研究部附属国際流域環境研究センターの原本英司教授の研究グループは、タカラバイオ株式会社と共同で、下水中の新型コロナウイルス遺伝子を迅速かつ高感度で検出可能な手法を開発しました（図1）。

約半数以上の感染者の糞便中に新型コロナウイルスが排出されることから、下水中の新型コロナウイルスを定期的に調査することで地域や施設における新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の流行状況を捉える「下水疫学調査」¹⁾が現在社会的にも注目されています。原本教授は、国内外の研究者と共に下水疫学調査の有用性を世界に先駆けて提唱し²⁾、下水中における新型コロナウイルスの検出調査³⁾や下水からの検出法の開発⁴⁾等に取り組んでいます。

今回開発した手法は、(公社)日本水環境学会 COVID-19 タスクフォース発行の「下水中の新型コロナウイルス遺伝子検出マニュアル」⁵⁾に記載されている標準法と比較して検出感度が向上しており、標準法では非検出であった下水からも新型コロナウイルス遺伝子を検出することに成功しました。さらに、検出に要する時間が短く（1時間以内）、反応完了までチューブの蓋を開ける必要がないため、実験室内汚染のリスクを低減できるという利点もあります。本手法は、下水中の新型コロナウイルス遺伝子濃度が低い国内でも使用可能な検出感度を有しており、COVID-19 に対する下水疫学調査の社会実装を推進していく際の貢献が期待されます。

本研究の成果は、2021年9月16日に開催される(公社)日本水環境学会 COVID-19 タスクフォース第2回 Web セミナー「COVID-19 タスクフォースの成果と下水疫学の将来展望」⁶⁾において発表される予定です。また、本手法は、必要試薬をオールインワンで含んだ検査キット「SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater」としてタカラバイオ株式会社により製品化され、2021年9月16日の受注開始を予定しております⁷⁾。

- 1) 「下水疫学」は学問分野である「Wastewater-based epidemiology」の訳語であり、原本教授が北島正章准教授（北海道大学）と共に考案。「調査」を付けることで、調査する行為そのものを意味する。
- 2) 北海道大学・山梨大学共同プレスリリース「下水中の新型コロナウイルスに関する世界初の総説論文を発表～ COVID-19 の流行状況を把握する上での下水疫学調査の有用性を提唱～」
<https://www.yamanashi.ac.jp/wp-content/uploads/2020/05/20200514pr.pdf> (2020年5月14日)
- 3) 山梨大学・北海道大学共同プレスリリース「国内初となる下水試料からの新型コロナウイルス RNA の検出に成功～ COVID-19 流行状況監視への下水疫学調査の活用期待～」
<https://www.yamanashi.ac.jp/wp-content/uploads/2020/06/20200626pr.pdf> (2020年6月26日)
- 4) 北海道大学・山梨大学共同プレスリリース「下水中のコロナウイルス濃縮回収率を手法ごとに評価～ COVID-19 の下水疫学調査を実施する上での標準的手法確立に期待～」
<https://www.yamanashi.ac.jp/wp-content/uploads/2020/07/20200710pr.pdf> (2020年7月10日)
- 5) (公社)日本水環境学会 COVID-19 タスクフォース「下水中の新型コロナウイルス遺伝子検出マニュアル」
https://www.jswe.or.jp/aboutus/pdf/SARS-CoV-2_RNA_Detection_Manual_for_Wastewater.pdf (2021年3月30日)
- 6) (公社)日本水環境学会 COVID-19 タスクフォース第2回 Web セミナー「COVID-19 タスクフォースの成果と下水疫学の将来展望」
<https://www.jswe.or.jp/aboutus/pdf/210916COVID19TFseminar.pdf> (2021年9月16日開催)
- 7) タカラバイオ (株) ニュースリリース「下水中の新型コロナウイルスを検出する PCR キットを発売」
https://ir.takara-bio.co.jp/ja/news_all/news_Release/newsr_21m0915Jek2_bv2659fr.html (2021年9月15日)

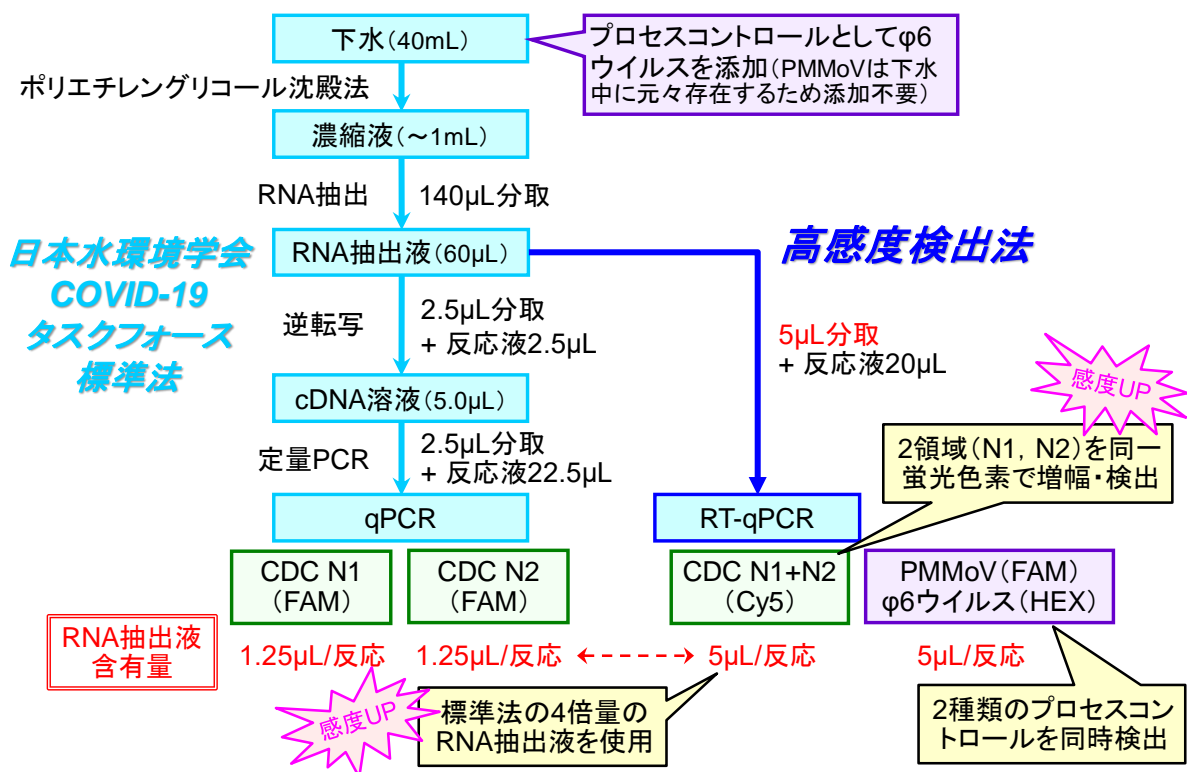


図1 下水中の新型コロナウイルス遺伝子の高感度検出法の検出フローチャートと特徴：測定するRNA抽出液量を4倍にし、新型コロナウイルス遺伝子の2領域を同一蛍光色素で増幅して検出する1ステップ逆転写定量PCR法とすることで、(公社)日本水環境学会COVID-19タスクフォース発行の「下水中の新型コロナウイルス遺伝子検出マニュアル」に記載されている標準法よりも高感度での検出が可能となります。また、2種類のプロセスコントロール（トウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）、φ6ウイルス）を同時に検出することができ、検出効率の評価を容易とします。

【下水中の新型コロナウイルス検出法の高感度化の必要性】

原本教授らが2020年5月に発表したプレスリリース²⁾を契機に、国内でも新型コロナウイルス感染症(COVID-19)に対する「下水疫学調査」¹⁾が、地域や施設におけるCOVID-19の感染流行状況を迅速かつ効率的に把握し、感染拡大防止に貢献し得る科学技術として注目を集めています。2020年6月に原本教授らが山梨県内の下水処理場で採取した下水から新型コロナウイルス遺伝子を検出することに国内で初めて成功したのを皮切りに³⁾、国内各地から続々と調査事例が報告されてきています。しかしながら、諸外国と比較して感染者の割合が低いことに起因して下水中の新型コロナウイルス濃度も低いことが課題となっています。

2020年5月に設立され、原本教授も参加している(公社)日本水環境学会COVID-19タスクフォースでは、検出法の標準化を主要な活動の一つとして位置付け、国内で新型コロナウイルスの検出に実績のある手法を整理し、2021年3月に「下水中の新型コロナウイルス遺伝子検出マニュアル」を公表しています⁵⁾。この検出マニュアルに記載されている手法(タスクフォース標準法)を基に、複数の民間企業で下水中の新型コロナウイルスの受託分析サービスが開始される等、COVID-19に対する下水疫学調査の社会実装に向けた動きが着実に進んでいます。その一方で、タスクフォース標準法を用いた場合でも、再現性のある検出結果を得ることが難しいケースが多く、ウイルス検出法を構成する、「濃縮」「RNA抽出」「逆転写」「定量PCR」の4つの工程それぞれで検出感度を向上させるための様々な新技術の開発が進められています。

【開発した高感度検出法の特徴】

図1に示すように、今回開発した高感度検出法は、以下の特徴を有しています。

- ・ **タスクフォース標準法の4倍量のRNA抽出液を測定することで、約4倍の検出感度向上を実現しています。**タスクフォース標準法では、逆転写と定量PCRを別々の反応チューブで行う「2ステップ方式」を採用しているため、1反応あたりに測定できるRNA抽出液量は1.25 μ Lに限られます。一方、高感度検出法では、逆転写と定量PCRを同一チューブで連続して行う「1ステップ方式」を用いているため、1反応あたりで5 μ LのRNA抽出液を測定することができ、タスクフォース標準法の4倍量となっております。
- ・ 定量PCR法で用いられるPCR系として、タスクフォース標準法では、米国疾病予防管理センター(CDC)が設計したCDC N1とCDC N2の2種類が採用されており、別々のチューブで反応を行うこととなっています。一般に、PCRで陽性反応を得るためには、反応チューブ内に5~10遺伝子コピー程度の新型コロナウイルス遺伝子が含まれている必要があります。しかし、ウイルス遺伝子濃度が高い患者検体とは異なり、下水中の新型コロナウイルス遺伝子濃度はこの検出下限値付近あるいはそれ以下であることが多いため、検出される場合でも2ウェルのうち1ウェルのみが陽性を示すという結果が頻繁に報告されています。今回開発した**高感度検出法では、単一の蛍光色素(Cy5)で修飾した2種類のPCR系(CDC N1, CDC N2)を同一チューブ内で反応させ、1遺伝子コピーあたり2ヶ所の領域を増幅させることで2倍量の蛍光強度が得られるようにし、約2倍の検出感度を実現しました。**
- ・ **RNA抽出液を増やし、2種類のPCR系で測定することで、タスクフォース標準法と比較して約8倍の検出感度が得られると期待されます。**さらに、下水中のウイルス遺伝子の検出の際に問題となる、逆転写・定量PCRでの反応阻害に強い試薬を使用しており、阻害物質の影響を抑えた検出が可能となっています。
- ・ 水試料中のウイルスを検出する際には、「プロセスコントロール」を用いて、濃縮から定量PCRまでの工程における検出効率を評価することが求められています。**本手法では、「下水中の新型コロナウイルス遺伝子検出マニュアル」に記載されているプロセスコントロールであるトウガラシ微**

斑ウイルス (PMMoV) とφ6 ウイルスをマルチプレックス PCR により同時に測定することができます。

- 1 ステップ方式を採用することで、逆転写から定量 PCR の間でチューブの蓋を開ける必要がないため、実験室内汚染 (コンタミネーション) のリスクを低減することができます。
- 測定は 1 時間以内に完了するため、タスクフォース標準法 (3 時間以上) と比較して迅速な新型コロナウイルス遺伝子の検出が可能です。

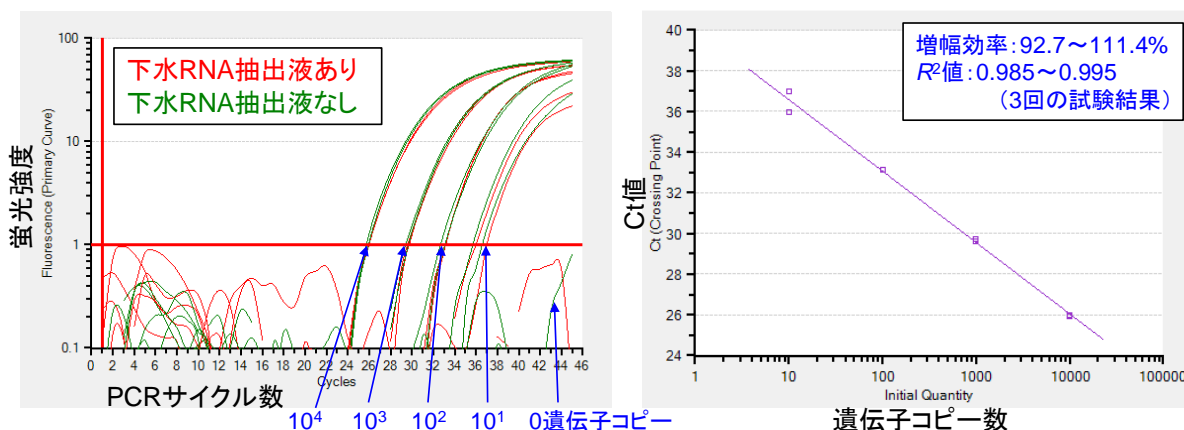


図 2 高感度検出法による新型コロナウイルス遺伝子の検出感度と定量性：ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法で濃縮した下水 (流入下水) から得たウイルス RNA 抽出液 5 μL を添加した場合でも、新型コロナウイルス遺伝子 (陽性コントロール RNA) の増幅には阻害は見られませんでした (左図)。10⁴~10¹ 遺伝子コピーの範囲内で高い定量性が得られ、遺伝子コピー数と Ct 値 (遺伝子増幅に伴い増加する蛍光強度 (対数值) が閾値 (左図の赤色の横線) を超える PCR サイクル数) との間に強い相関が認められました (右図)。

表 1 高感度検出法とタスクフォース標準法による下水中の新型コロナウイルス遺伝子の検出結果の比較：下水 8 試料 (A~H) に対して、高感度検出法とタスクフォース標準法 (CDC N1 および CDC N2 の 2 種類の PCR 系を使用) を用いて新型コロナウイルス遺伝子の検出を試みました (各手法について反応チューブ 2 ウェルを使用)。タスクフォース標準法では、2 ウェルとも陽性となった試料は、CDC N1 で 3 試料 (38%), CDC N2 で 2 試料 (25%) のみでしたが、高感度検出法では 8 試料すべてが陽性となりました。また、高感度検出法の方が低い Ct 値 (すなわち、高い遺伝子コピー数) を示しました。

下水	タスクフォース標準法						高感度検出法			2ウェル陽性 1ウェル陽性 2ウェル陰性
	CDC N1			CDC N2			ウェル1	ウェル2	平均	
	ウェル1	ウェル2	平均	ウェル1	ウェル2	平均				
A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	36.2	37.9	37.0	
B	36.8	ND	36.8	37.0	ND	37.0	35.4	36.3	35.8	
C	37.6	ND	37.6	ND	ND	ND	35.3	35.7	35.5	
D	36.1	ND	36.1	ND	ND	ND	34.0	35.9	35.0	
E	34.3	36.0	35.2	35.5	36.3	35.9	33.3	33.7	33.5	
F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	35.8	37.9	36.8	
G	33.7	33.9	33.8	35.4	35.7	35.5	32.1	31.8	31.9	
H	36.5	36.5	36.5	35.5	ND	35.5	33.7	33.8	33.8	
陽性率	75% (6/8)			50% (4/8)			100% (8/8)			

数値: Ct値 (蛍光強度が閾値を超えたPCRサイクル数), ND: 非検出 (Not detected)

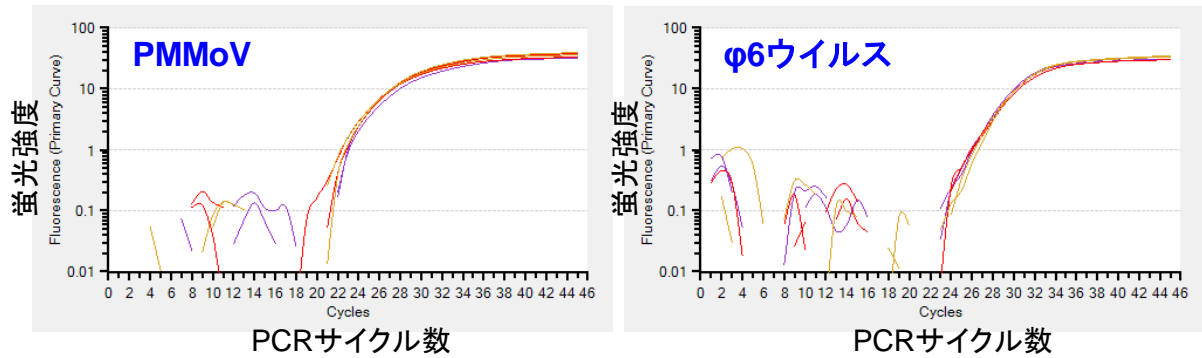


図3 2種類のプロセスコントロールの同時検出：「下水中の新型コロナウイルス遺伝子検出マニュアル」に記載されているプロセスコントロールであるトウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）とφ6ウイルスを同一反応チューブ内で識別して検出することができ、ウイルス検出工程における検出効率を評価することができます。

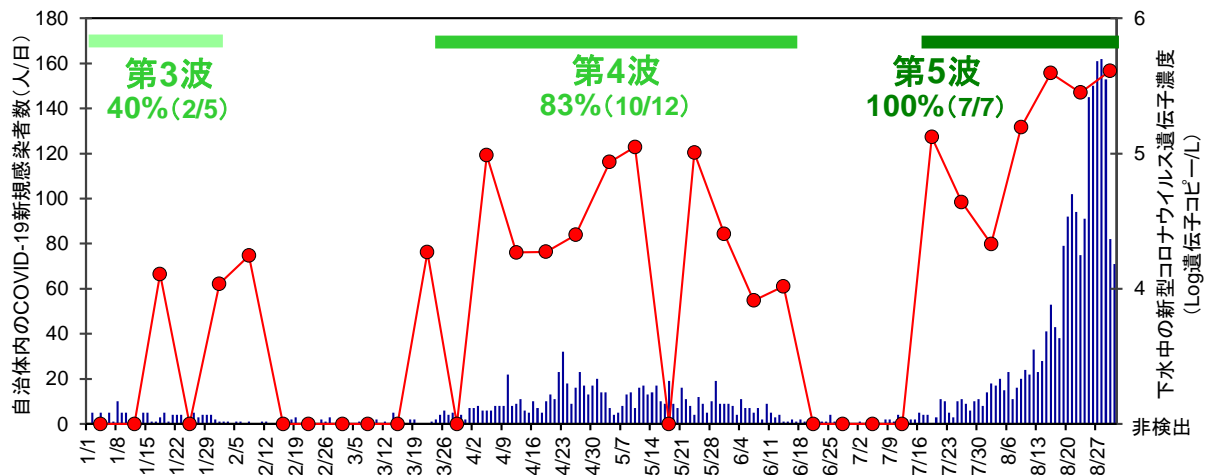


図4 高感度検出法を用いた下水中の新型コロナウイルス遺伝子の長期モニタリング：日永浄化センター（三重県四日市市）において2021年1月～8月に週1回の頻度で採取した下水を検査した結果、35試料中21試料（60%）から新型コロナウイルス遺伝子が検出され、第3波から第5波にかけての陽性率と検出濃度の上昇を明らかにすることができました。なお、タスクフォース標準法でもこれら35試料のうち29試料に対して検査を実施しており、陽性率はCDC N1、CDC N2共に38%（11/29）でした（高感度検出法による同試料の陽性率は66%（19/29））。

【今後の展開】

今回、タカラバイオ株式会社との共同研究によって開発した高感度検出法は、（公社）日本水環境学会 COVID-19 タスクフォースによる標準法と比較して、高い陽性率で下水から新型コロナウイルス遺伝子を検出できることが明らかとなりました。この検出法をオールインワンの検査キットとして製品化することで、下水処理場や施設等の下水中の新型コロナウイルス遺伝子のモニタリングが効率的に実施できるようになり、COVID-19 に対する下水疫学調査の社会実装に向けた動きが加速していくことが期待されます。今後は、濃縮法およびRNA抽出法に対する技術開発にも取り組むことで、さらなる検出感度の向上と一連の検出法のパッケージ化を目指します。

また、下水疫学調査では、変異株の流行状況も把握できることが期待されます。図5に示すように、市販の環境・疫学調査用の逆転写定量PCR試薬を用いて検査したところ、N501Y変異（アルファ株

等), L452R 変異 (デルタ株等) および T478K 変異 (デルタ株) を検出することに成功しました。今後、下水検査用に特化した変異検出用のキットの開発にも取り組む予定です。

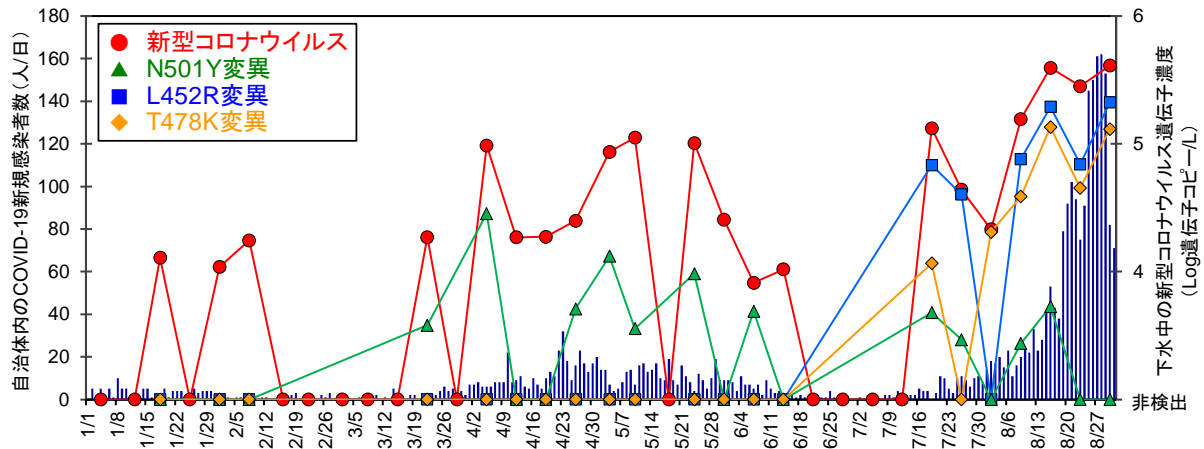


図 5 下水中の新型コロナウイルス変異株遺伝子の検出：図 4 で新型コロナウイルス遺伝子が検出された下水 21 試料に対し、環境・疫学調査用の逆転写定量 PCR 試薬 (SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Core Kit (タカラバイオ, 型番 RC330A)) を用い、4 ヶ所の変異箇所の特異的な逆転写定量 PCR を実施しました。

N501Y 変異 (アルファ株, ベータ株, ガンマ株, ミュー株等) : 陽性率 52% (11/21)

L452R 変異 (デルタ株, カッパ株等) : 陽性率 29% (6/21)

T478K 変異 (デルタ株) : 陽性率 29% (6/21)

E484K 変異 (ベータ株, ガンマ株, イータ株, イオタ株等) : 陽性率 0% (0/21)

N501Y 変異は、第 4 波期間中に主に検出され、第 5 波期間中にも検出されました。L452R 変異と T478K 変異は、第 4 波までは検出されず、第 5 波になってから高濃度で検出されるようになり、デルタ株へと流行株が置き換わっている状況を反映しているものと考えられました。

研究についての問い合わせ先

山梨大学大学院総合研究部 教授 原本 英司 (はらもと えいじ)

TEL : 055-220-8725

E-mail : eharamoto@yamanashi.ac.jp

URL : <http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~eharamoto/>

広報についての問い合わせ先

山梨大学総務部総務課広報企画室

TEL : 055-220-8005, 8006

FAX : 055-220-8799

E-mail : koho@yamanashi.ac.jp