

令和 2 年 6 月 26 日

国立大学法人山梨大学
国立大学法人北海道大学

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に期待～

ポイント

- ・ 国内初となる下水および河川水を対象とした新型コロナウイルスの存在実態調査を実施。
- ・ COVID-19 流行期の塩素消毒前下水処理水から新型コロナウイルス RNA の検出に成功。
- ・ 国内においても COVID-19 流行状況監視に下水疫学調査が活用できる可能性を提示。

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と北海道大学大学院工学研究院環境工学部門の北島正章助教の研究グループは、国内で初めてとなる下水および河川水中における新型コロナウイルスの存在実態調査を実施し、塩素消毒前の下水処理水から新型コロナウイルス RNA を検出することに成功しました (図 1)。

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の病因である新型コロナウイルスは、約半数以上の感染者の糞便中に排出されるため、下水中の新型コロナウイルスを調査することで下水処理場の処理区域内における COVID-19 の流行状況を把握できる可能性があります。原本教授と北島助教らの国際共同研究グループは、COVID-19 の流行状況を把握する上での下水疫学調査¹⁾の重要性を世界に先駆けて提唱し²⁾、国内外の下水等の環境試料中における新型コロナウイルスの存在実態調査や、水試料中の新型コロナウイルスの検出法の開発等に取り組んでいます。

今回、その成果の一部として、山梨県内の下水処理場と河川において 2020 年 3 月 17 日～5 月 7 日に実施した新型コロナウイルスの存在実態調査の結果を取りまとめ、国内で初めて下水試料から新型コロナウイルス RNA の検出に成功したことを報告する査読付き研究論文として *Science of the Total Environment* 誌に発表しました。本論文は、2020 年 6 月 20 日 (土) にオンライン公開されました。

- 1) 「下水疫学」は学問分野である「Wastewater-based epidemiology」の訳語であり、原本教授と北島助教の研究グループが考案。「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.hokudai.ac.jp/news/2020/05/-covid-19.html> (2020 年 5 月 14 日付)

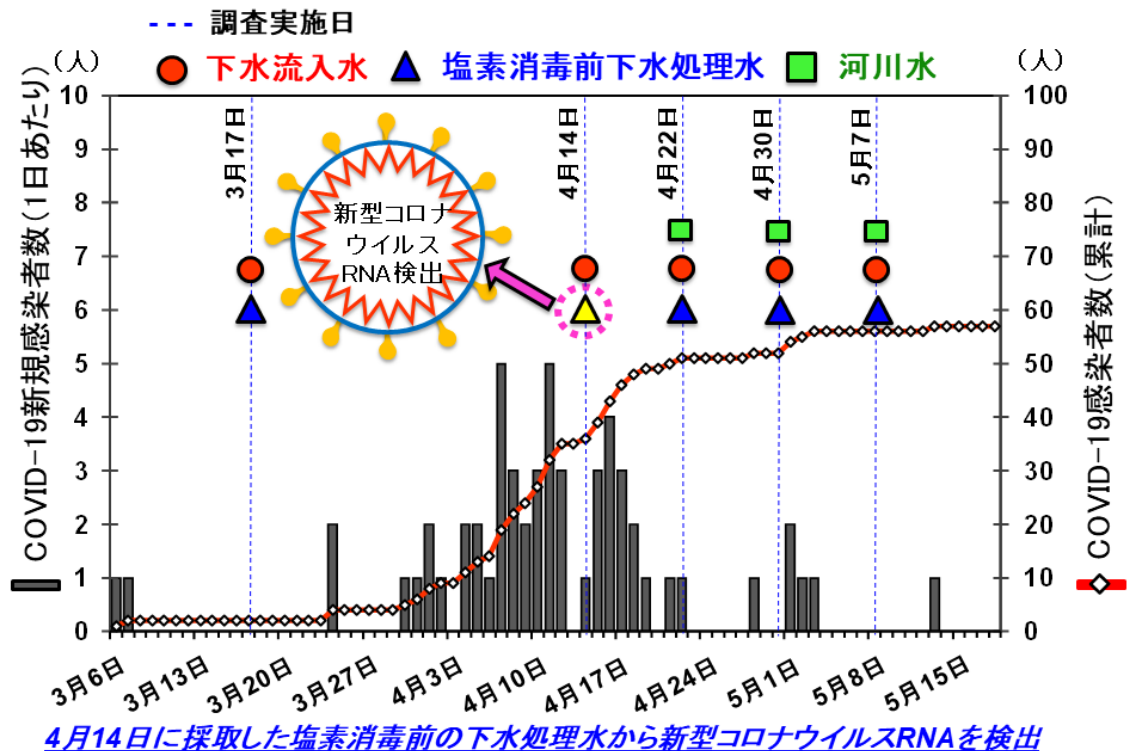


図1 下水・河川水中の新型コロナウイルス RNA の検出結果および山梨県内の COVID-19 感染報告者数の推移

【背景】

2019年12月に中国・武漢に端を発した COVID-19 の世界的感染流行は、2020年6月17日現在で、216の国と地域において8,006,427名の感染者と436,899名の死者を発生させています。新型コロナウイルスは腸管上皮細胞に感染して増殖することが示唆されており、胃腸炎症状を呈さない感染者の糞便中からも高い割合で検出されています。また、新型コロナウイルス RNA は、呼吸気道や血清よりも糞便から長期間にわたって検出されています。下水道が普及している地域においては、不顕性感染者も含めたあらゆる COVID-19 感染者の糞便中に排出される新型コロナウイルスが下水処理場に集積するため、下水中の新型コロナウイルスを定期的にモニタリングする「下水疫学調査」により、処理区域内における COVID-19 の流行状況を把握できることが期待されます。これまでにオーストラリアやイタリア、スペイン、オランダの下水から新型コロナウイルスの RNA が検出されています。COVID-19 の低流行地域の下水や、最初の感染者が報告される前に採取された下水からも検出されていることから、下水疫学調査が感染流行の早期警報システムとして注目を集めています。

本研究では、国内初の取り組みとして、山梨県内の下水と河川水中における新型コロナウイルスの存在実態を調査することを目的としました。山梨県での COVID-19 感染者は2020年3月6日に初めて報告され、6月1日時点での累計報告感染者数は64名にとどまり、低流行地域となっています。

【研究方法】

試料の採取：2020年3月17日～5月7日に山梨県内において、下水処理場（処理方式：標準活性汚泥法）の流入水と塩素消毒前の処理水（最終沈殿池からの流出水）を各5試料、河川水を3試料、計13試料を採取しました。本下水処理場では、処理水は塩素消毒された後に放流されていますが、本研究では放流水は採取しませんでした。

ウイルスの検出手順（図2）：本研究では、2種類のウイルス濃縮法と6種類のPCR法を組み合わせ、下水および河川水中の新型コロナウイルス RNA の検出を試みました。ウイルス濃縮法としては、「陰

電荷膜破碎型濃縮法」と「陰電荷膜吸着-直接 RNA 抽出法」の 2 種類を用い、下水流入水は 200mL、塩素消毒前下水処理水は 5,000mL、河川水は 3,000~4,000mL をろ過濃縮後、ウイルス RNA を抽出しました。陰電荷膜破碎型濃縮法では、MgCl₂ を終濃度 25mM となるように添加した水試料を陰電荷膜（孔径 0.8 μm、直径 90mm、Merck）でろ過後、誘出液中で膜を破碎してウイルスを回収し、遠心式フィルターユニット（Centriprep YM-50、Merck）を用いて 0.42~9.55mL に濃縮しました。このウイルス濃縮液から 140 μL を分取し、QIAamp viral RNA mini kit（QIAGEN）を用いて 60 μL のウイルス RNA 抽出液を得ました。陰電荷膜吸着-直接 RNA 抽出法では、同様に水試料をろ過した後、1/4 に切断した膜から RNeasy PowerWater kit（QIAGEN）を用いて 50 μL のウイルス RNA 抽出液を得ました。その後、逆転写反応によりウイルス RNA から cDNA を合成しました。

PCR 法として、国立感染症研究所の検出マニュアルに記載されているリアルタイム PCR 法（N_Sarbeco 系、NIID_2019-nCOV_N 系）と定性 PCR（ORF1a 系、S protein 系）に加え、米国疾病予防管理センターが推奨する 2 種類のリアルタイム PCR 法（CDC-N1 系および CDC-N2 系）を使用しました。リアルタイム PCR 法には Thermal Cycler Dice Real Time System TP800（タカラバイオ）を使用し、新型コロナウイルス RNA の濃度を定量しました。定性 PCR 法では、Nested PCR 後の PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供し、目的産物の生成を確認しました。

ウイルス検出法の効率の比較：下水や水環境中に高濃度で存在することが近年明らかとなってきたトウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）を対象に、2 種類のウイルス濃縮法による PMMoV-RNA 検出濃度を比較しました。また、ウイルス濃縮液に大腸菌ファージ MS2 を添加し、RNA 抽出-逆転写-リアルタイム PCR 法の一連の検出操作による検出効率を測定しました。

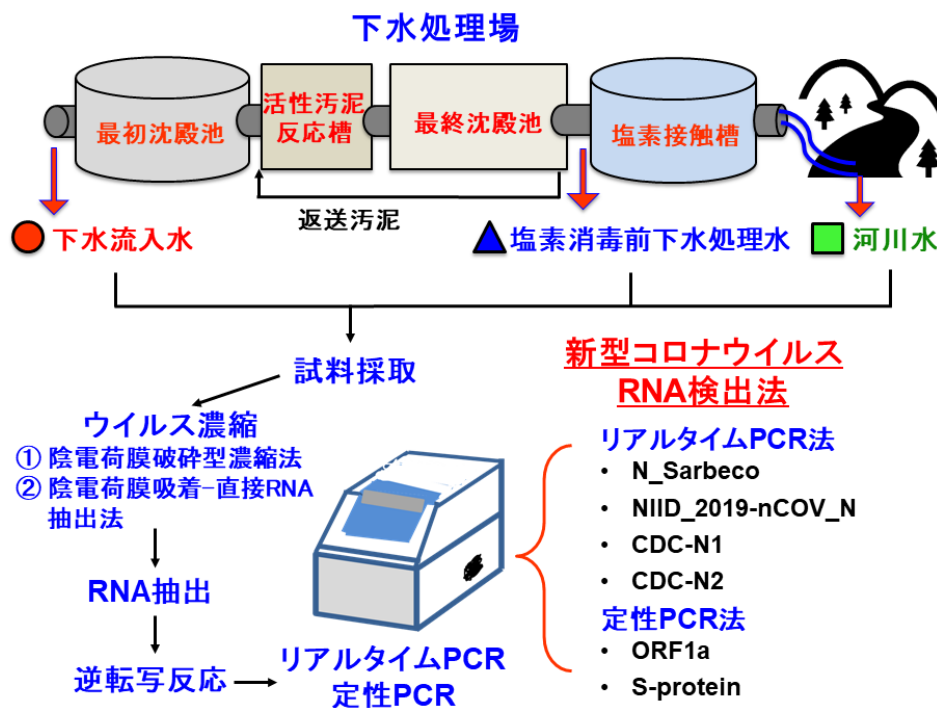


図 2 採取試料と新型コロナウイルス RNA の検出手順

【研究成果】

ウイルス検出法の効率の比較：試料中に元々存在する PMMoV-RNA の検出濃度を比較した結果、陰電荷膜吸着-直接 RNA 抽出法（平均 1.3×10^4 遺伝子コピー/L）よりも陰電荷膜破碎型濃縮法（平均 2.6×10^6 遺伝子コピー/L）による検出濃度の方が高い値を示しました。また、RNA 抽出-逆転写-リアルタイム PCR 法による大腸菌ファージ MS2 の検出効率も、陰電荷膜吸着・直接 RNA 抽出法（平均 8.5%）よりも陰電荷膜破碎型濃縮法（平均 71.6%）の方が高い値を示しました。この結果より、新型コロナウイルスの検出に対しても陰電荷膜破碎型濃縮法が有効となることが期待されます。

塩素消毒前の下水処理水からの新型コロナウイルス RNA の検出：各試料に対し、2種類のウイルス濃縮法と6種類のPCR法の組み合わせによる12種類の検出法（3月17日に採取した下水は陰電荷膜破碎型濃縮法による6種類のみ）を適用した結果、4月14日に採取した塩素消毒前下水処理水1試料から2,400遺伝子コピー/Lの濃度で新型コロナウイルスRNAが検出されました（**図1**）。陽性反応が得られた検出法は、陰電荷膜破碎型濃縮法とN_Sarbeco系リアルタイムPCR法の組み合わせによるもので、それ以外の11種類の検出法では陽性反応は得られませんでした。陽性反応を示した試料中のウイルスRNA量は、逆転写リアルタイムPCR法による検出限界値を僅かに上回る値でした。特に低濃度域ではウイルスRNA定量値が変動しやすいため、今回非検出となった検出法においても、検出限界値未満の濃度でウイルスRNAが存在していた可能性があります。

陽性反応が非特異的なPCR増幅に由来するものではないことを確認するため、陽性反応を示したリアルタイムPCR反応液からPCR産物を回収し、サンガー法を用いたダイレクトシーケンシングによりPCR産物の塩基配列を解読することで、新型コロナウイルスに由来する塩基配列が特異的にPCR増幅されていることを確認しました。また、検出作業中の実験室内汚染による誤陽性の有無を判別可能とするため、N_Sarbeco系において検量線を作成する際に使用した標準試料には新型コロナウイルスに由来しない外部塩基配列を挿入しており、当該試料からはリアルタイムPCR法によって外部塩基配列が増幅されないことを確認しました。さらに、ダイレクトシーケンシングによる塩基配列解読結果からも外部塩基配列は確認されませんでした。これらの結果により、本研究で得られたリアルタイムPCR陽性反応は、塩素消毒前下水処理水中に存在した新型コロナウイルスRNAに由来するものであると判断しました。

下水処理水や放流水中の新型コロナウイルスRNAの存在濃度に関する知見は世界的にもほとんど得られていません。本研究で得られた塩素消毒前下水処理水中の新型コロナウイルスRNA濃度は、スペインから報告されている下水放流水中の濃度（約250,000遺伝子コピー/L）の約1/100の値でした。

塩素消毒前下水処理水から新型コロナウイルスRNAが検出されたものの、リアルタイムPCR法は感染力の有無に関わらずウイルスRNAを検出する手法であるため、検出されたウイルスRNAが感染力を有するウイルスに由来していたかどうかは不明です。また、下水処理水はさらに十分な濃度と接触時間による塩素消毒を施されてから公共用水域に放流されています。一般に、エンベロープを有さないウイルス（ノロウイルス等）と比べて、エンベロープを有するコロナウイルスは塩素消毒に弱く、水中で速やかに不活化されることが知られています。例えば、下水中のSARSコロナウイルスは、10mg/Lの濃度の塩素（遊離残留塩素濃度で0.4mg/L）と10分間、あるいは、40mg/Lの濃度の二酸化塩素（遊離残留塩素濃度で2.19mg/L）と10分間接触することで、完全に活性を失うことが報告されています。また、新型コロナウイルスの不活化に対して、家庭用漂白剤やクロルヘキシジン、塩化ベンザルコニウム等の塩素系消毒剤が有効であることが報告されています。

下水流入水と河川水からは新型コロナウイルス RNA は非検出：下水流入水5試料と河川水3試料からは、塩素消毒前下水処理水から陽性反応が得られた4月14日に採取した流入水も含め、12種類の検出法の組み合わせのいずれを用いた場合にも新型コロナウイルスRNAは検出されませんでした。

下水流入水から新型コロナウイルスRNAが検出されなかった原因として、膜の目詰まりを避けるため、塩素消毒前下水処理水（5,000mL）に比べて下水流入水（200mL）ではろ過水量が少なく、また、ウイルス濃縮液量も十分に減容できなかったため、検出下限値（下水流入水：4,000～82,000遺伝子コピー/L、塩素消毒前下水処理水：140～2,500遺伝子コピー/L、いずれも検出効率を100%と仮定した場合）に大きな差があったことが考えられます。また、下水流入水と塩素消毒前下水処理水はほぼ同時に採取したため、下水処理工程での水理的滞留時間は考慮されておらず、ウイルスRNA濃度の時間変動による影響を受けていた可能性も考えられます。新型コロナウイルスはヒト等の宿主動物の体内以外では増殖不可能であるため、下水処理工程でウイルスの増殖が生じた可能性はありません。

河川水は塩素消毒前下水処理水と同程度の検出下限値でしたが、仮に本研究では測定していない下水放流水や浄化槽排水等に新型コロナウイルス RNA が含まれていた場合でも、河川流量による希釈の影響で検出されなかったものと推察されます。

下水からの新型コロナウイルス RNA の検出結果と COVID-19 感染者数との比較 (図 1) : 山梨県内における COVID-19 累計感染者数は、調査を開始した 3 月 17 日時点では 2 名でしたが、その後増加し、塩素消毒前下水処理水から新型コロナウイルス RNA が検出された 4 月 14 日における累計感染者数は 36 名 (人口 10 万人あたり 4.4 名) であり、県内での感染流行がピークを迎えている時期でした。この数値は、下水処理場の処理区域内の居住者数に対応したのではなく、また、処理区域を越えての人の移動等も考慮されていないことに留意する必要がありますが、臨床データ (いわゆる PCR 検査) から把握されている感染者数が少ない国内の非流行地域においても、下水中から新型コロナウイルス RNA を検出できることが示されました。今後、下水試料中の新型コロナウイルス RNA 検出感度を向上させることで、下水流入水からの検出も可能になることが期待されます。

【今後への期待】

本論文では、現在世界各国で精力的な取り組みが始まっている「下水疫学調査」を国内で初めて実施し、COVID-19 感染流行ピーク時に採取した下水試料から新型コロナウイルス RNA の検出に成功することで、本調査の国内への適用可能性を示しました。本論文で用いたウイルス検出法は、ノロウイルス等の腸管系ウイルスに対して実績のある手法であり、新型コロナウイルスへの有効性は明らかにされていません。今後は、本論文で使用した手法を含む様々な検出法を対象に、新型コロナウイルス検出への有効性を評価し、標準法を確立することが求められます。さらに、その標準法を用いることで、国内の様々な地域を対象とした下水中の新型コロナウイルス RNA の存在実態調査を実施し、将来起こり得る第 2 波以降の感染流行に備え、下水疫学調査の COVID-19 流行状況監視への活用が期待されます。

論文情報

論文名	First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan (日本の下水および河川水中における新型コロナウイルス RNA の存在実態に関する初の環境調査)
著者名	Eiji Haramoto ¹ , Bikash Malla ¹ , Ocean Thakali ² , Masaaki Kitajima ³ (¹ 山梨大学大学院総合研究部, ² 山梨大学大学院医工農学総合教育部, ³ 北海道大学大学院工学研究院)
雑誌名	<i>Science of the Total Environment</i> (環境科学の専門誌)
DOI	10.1016/j.scitotenv.2020.140405
公表日	2020 年 6 月 20 日 (土) (オンライン公開・オープンアクセス)

お問い合わせ先

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 メール eharamoto@yamanashi.ac.jp
URL <http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~eharamoto/>
北海道大学大学院工学研究院 助教 北島正章 (きたじま まさあき)
TEL 011-706-7162/5587 メール mkitajima@eng.hokudai.ac.jp
URL https://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/water/member_MasaakiKitajima.html

配信元

山梨大学総務部総務課広報企画室 (〒400-8510 甲府市武田 4 丁目 4 番地 37 号)
TEL 055-220-8006 FAX 055-220-8799 メール koho@yamanashi.ac.jp
北海道大学総務企画部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北 8 条西 5 丁目)
TEL 011-706-2610 FAX 011-706-2092 メール kouhou@jimu.hokudai.ac.jp