

令和4年9月29日

国立大学法人山梨大学
国立大学法人北海道大学

下水中の新型コロナ変異株・病原ウイルスの一斉検出法を開発

～ウィズコロナ社会における下水疫学調査の新技术としての活用に期待～

ポイント

- ・ 新型コロナウイルスと変異株が有する特徴的な9ヶ所の変異、ノロウイルス等の病原ウイルスも含めた22種類の一斉検出が可能なハイスループット定量PCR法を開発。
- ・ COVID-19 軽症者等宿泊療養施設および下水処理場の下水から、感染者の報告と同時期あるいは先行してアルファ株やデルタ株が有する変異を検出。
- ・ ノロウイルスやアイチウイルス等の病原ウイルスも多くの下水から検出。
- ・ 様々な感染症に対応する下水疫学調査の新技术としてウィズコロナ時代での活用に期待。

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と同大学総合分析実験センターの瀬川高弘講師、北海道大学大学院工学研究院環境工学部門の北島正章准教授の研究グループは、ウィズコロナ時代の「下水疫学調査」¹⁾に貢献する技術として、新型コロナウイルスとその変異株が有する特徴的な変異（9種類）に加え、ノロウイルスやA型インフルエンザウイルス等の病原ウイルス（5種類）も対象とした計22種類のアッセイ（定量PCR系）を用い、一度に最大48サンプルの測定が可能なハイスループット定量PCR法を開発しました（**図1**）。

この手法を用いることで、2020年12月に新型コロナウイルス感染症（COVID-19）軽症者等宿泊療養施設で採取した下水から、同月に国内で感染者が初確認されたアルファ株が有する変異（N501Y, S69-70 del）が検出され、また、2021年4月に下水処理場において採取した下水からも感染者の報告に先行してデルタ株が有する変異（L452R）が検出されました。さらに、ノロウイルスやアイチウイルス等の病原ウイルスも下水から高頻度で検出され、COVID-19の流行下においてもこれらのウイルスによる感染症が多く発生していたことが示唆されました。

今回開発したハイスループット定量PCR法は、測定するアッセイの組み合わせを容易に変更できることから、新型コロナウイルスの新たな変異株や、ウイルスに限らず新たな病原微生物が出現した際にも迅速な測定体制を構築することが可能であり、ウィズコロナ時代で下水疫学調査を推進していく上で有用な技術となることが期待されます。

本研究成果は、2022年9月9日（金）公開の *Science of the Total Environment* 誌（オンライン版）に掲載されました（オープンアクセス）。

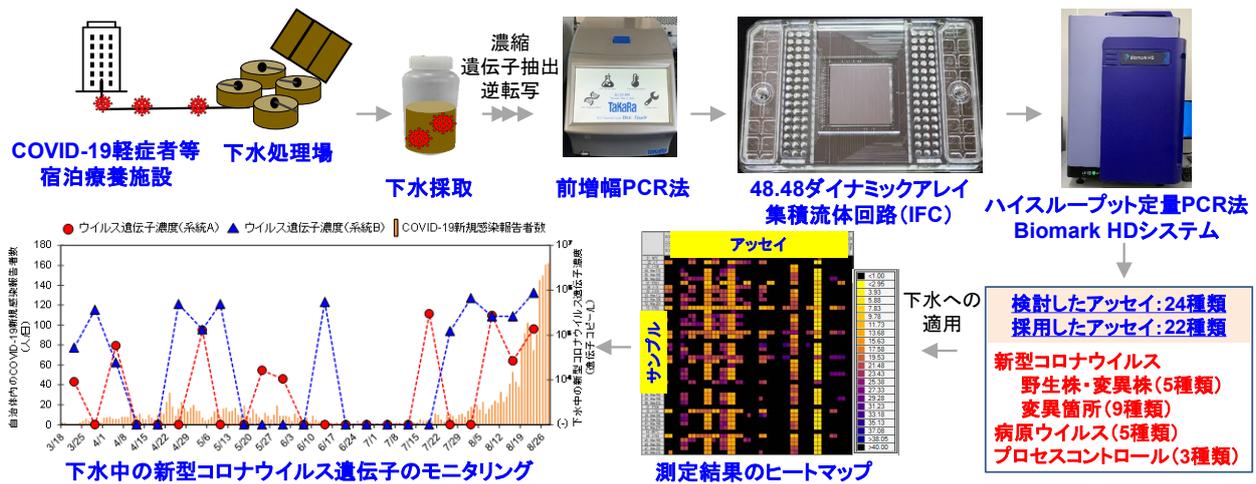


図1 下水疫学調査へのハイスループット定量 PCR 法の適用

【COVID-19 の下水疫学調査に関するこれまでの研究の展開】

原本教授と北島准教授が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月に原本教授と北島准教授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検出事例が報告されてきています。

下水疫学調査を社会実装していく上で、下水中に低濃度で存在する新型コロナウイルスを高感度で検出する手法を確立することは必要不可欠と言えます。そこで、原本教授は、タカラバイオ (株) と共同で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 キットを開発する⁴⁾と共に、変異株が特徴的に有する変異箇所を検出対象とする逆転写定量 PCR 法を用いることで、第4波時に流行していたアルファ株 (N501Y 変異) が第5波時にデルタ株 (L452R, T478K 変異) に置き換わり⁴⁾、第6波時にはオミクロン株 (G339D, E484A 変異) が出現する様子を捉えることに成功しています⁵⁾。さらに、瀬川講師と共同で、次世代シーケンス解析によって下水からステルスオミクロン株 (BA.2 系統) をいち早く検出することにも成功しており⁶⁾、亜種レベルでの変異株の感染流行状況の把握に対しても下水疫学調査が有効となることを示しています。また、北島准教授も、塩野義製薬 (株) と共同で高感度検出技術 (EPISENS 法) を開発し⁷⁾、国内複数の下水処理場に加え、東京2020オリンピック・パラリンピック選手村で実証試験を実施する⁸⁾等、下水疫学調査の社会実装に向けた活動を展開してきています。

このような中、COVID-19 以外の様々な感染症への下水疫学調査の活用も期待されていますが、通常の定量 PCR 法では病原微生物ごとに個別に反応を行う必要があるため、多くの種類を測定対象とすることは費用や時間等の点で効率的ではありません。

【本研究で開発したハイスループット定量 PCR 法の概要】

本研究では、ウィズコロナ時代の下水疫学調査に貢献し得る技術として、マイクロ流体工学技術に基づくハイスループット定量 PCR 法に着目し、Biomark HD システム (スタンダード・バイオツールズ社 (旧・フリューダイン社)) を用いた下水中の新型コロナウイルスおよび他の病原ウイルスの一斉検出法を開発しました (図2)。本研究で使用した 48.48 ダイナミックアレイ集積流体回路 (IFC) は、サンプルインレットに 48 試料、アッセイインレットに 48 種類の定量 PCR 反応液を添加し、2,304 個 (48×48) の反応チャンバーで試料とアッセイの組み合わせが異なる定量 PCR 反応を行うことができます。すなわち、通常の定量 PCR 法では 1 枚のプレートで一度に最大 96 反応しか行うことができないのに対し、48.48 IFC を用いた場合にはその 24 枚分に相当する反応を行うことが可能となります。

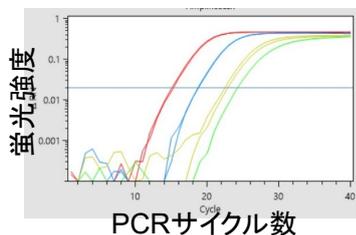
本研究では、まず、標準試料を用いて以下の 24 種類のアッセイの検出感度等を評価しました。その結果、新型コロナウイルスの ND3L 変異と A 群ロタウイルスを除いた 22 種類のアッセイは良好な検出が可能であったため、これらを実際の下水に適用することとしました。

- ・ **新型コロナウイルス** (野生株・変異株の両方を検出) : 5 種類 (CDC N1, CDC N2, CDC N1+N2, NIID, N_Sarbeco)
- ・ **新型コロナウイルス変異株に特徴的な変異箇所** : 10 種類 (N501Y, E484K, L452R, S69-70 del, D80A, E484Q, K417N, T19R, T478K, ND3L (下水への適用では除外))
- ・ **病原ウイルス** : 6 種類 (A 型インフルエンザウイルス, ノロウイルス GI, ノロウイルス GII, エンテロウイルス, アイチウイルス, A 群ロタウイルス (下水への適用では除外))
- ・ **プロセスコントロール** (検出効率評価用) : 3 種類 (Phi6 ファージ, MS2 ファージ, トウガラシ微生物ウイルス)

Biomark HDシステム
(スタンダード・バイオツールズ社)

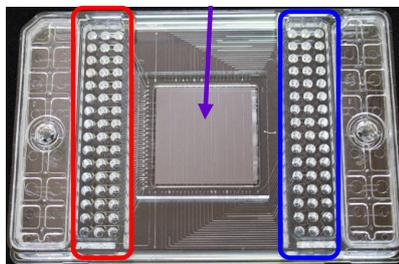


蛍光増幅曲線



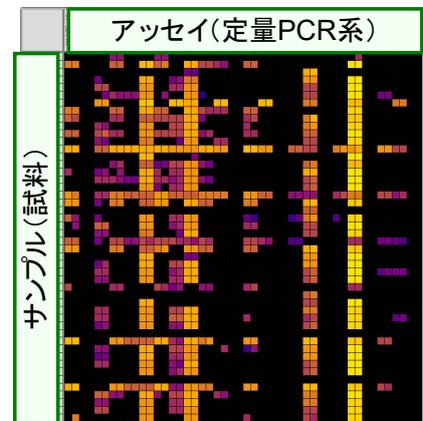
48.48ダイナミックアレイ
集積流体回路(IFC)

反応チャンパー: 2,304個
(反応容量: 約10nL)



アッセイインレット (定量PCR反応液) サンプルインレット (試料)

ヒートマップ(一斉検出結果)



下水中から22種類のアッセイを一斉検出

- ・ **新型コロナウイルス**: 5種類(野生株・変異株)
- ・ **新型コロナウイルス変異**: 9種類(N501Y, E484K, L452R等)
- ・ **病原ウイルス**: 5種類(A型インフルエンザウイルス, ノロウイルス等)
- ・ **プロセスコントロール**: 3種類(Phi6ファージ等)

図 2 本研究で開発したハイスループット定量 PCR 法の概要

【COVID-19 軽症者等宿泊療養施設の下水へのハイスループット定量 PCR 法の適用】

2020 年 10 月～2021 年 2 月に COVID-19 軽症者等宿泊療養施設内の浄化槽で採取した下水 (4 試料) に対し、ハイスループット定量 PCR 法の適用を試みました。下水 40mL をポリエチレングリコール沈殿法によって濃縮した後、RNA 抽出と逆転写反応に供し、PCR の鋳型となる cDNA を合成しました。この cDNA 溶液を 14 サイクルの前増幅 PCR 法に供した後、48.48 IFC のサンプルインレットに添加し、17 種類のアッセイ反応液 (当時は限られた変異株のみが出現していたため、変異検出アッセイは 4 種類のみを測定) をアッセイインレットに添加して 40 サイクルの定量 PCR を実行し、蛍光データを取得・解析しました (表 1)。

新型コロナウイルスは 5 種類の定量 PCR 系すべてで検出され (平均濃度: 約 10^7 遺伝子コピー/L), 2020 年 12 月に採取した試料が N501Y 変異と S69-70 del 変異に陽性を示しました。N501Y 変異は主にアルファ株やベータ株, ガンマ株, S69-70 del 変異はアルファ株やイータ株に見られる変異であり, 当月に国内で初めて感染者の報告がなされたアルファ株の検出に成功していたことが示唆されます。また, 新型コロナウイルスに加えて, ノロウイルス GII とエンテロウイルス, アイチウイルスも検出され, これらのウイルスへの感染者も施設内に存在していたと推察されました。

表1 COVID-19 軽症者等宿泊療養施設の下水からのウイルスの一斉検出結果

試料採取日	新型コロナウイルス									A型インフルエンザウイルス	ノロウイルス GI	ノロウイルス GII	エンテロウイルス	アイチウイルス
	CDC N1	CDC N2	CDC N1+N2	NIID	N_Sarbeco	変異								
						E484K	L452R	N501Y	S69-70 del					
2020/10/27	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2020/11/27	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2020/12/24	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+
2021/2/21	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

+: 検出, -: 非検出

【下水処理場の下水へのハイスループット定量 PCR 法の適用】

2021年3月～8月に日永浄化センター（三重県四日市市）の2系統（系統A：合流式下水道，系統B：分流式下水道）で採取した下水（各23試料）に対し，ハイスループット定量PCR法を適用しました（表2）。新型コロナウイルスは，系統Aでは9試料（39%），系統Bでは12試料（52%）からいずれか1種類以上のアッセイで検出されました。ウイルス濃度が低い下水処理場の下水に対しては，複数のアッセイを用いた測定は検出率を高める上で有効になると期待されます。

5月に採取した試料から主にアルファ株に見られるN501Y変異とS69-70 del変異が検出されました。この時期はいわゆる第4波の最中であり，三重県内でアルファ株が主に流行していたことと一致するものでした。また，4月に採取した試料からは主にデルタ株が有するL452R変異が検出されており，三重県でデルタ株の感染報告がなされた5月に先行して下水中にはデルタ株が存在していたと考えられました。

7月からの第5波期間に入ると，新型コロナウイルスが高頻度で検出されるようになる（図3）と共に，L452R変異とT19R変異が検出され，デルタ株の感染流行を反映しているものと考えられました。

23回の試料採取日のうち，アイチウイルスは23回すべて，ノロウイルス GIIは20回（87%），ノロウイルス GIは7回（30%），エンテロウイルスは6回（26%）で系統A・Bのいずれかまたは両方から検出され，COVID-19の感染流行下においてもこれらのウイルスによる感染が多く生じていることが示唆されました。一方，A型インフルエンザウイルスが検出されたのは1試料のみでした。

表2 下水処理場の下水からのウイルスの一斉検出結果（2021年3月～8月）

試料採取日	新型コロナウイルス													A型インフルエンザウイルス	ノロウイルス GI	ノロウイルス GII	エンテロウイルス	アイチウイルス	
	CDC N1	CDC N2	CDC N1+N2	NIID	N_Sarbeco	変異													
						D80A	E484K	E484Q	K417N	L452R	N501Y	S69-70 del	T19R						T478K
3/22	-/-	-/+	-/+	-/-	+/-		-/-			-/-	-/-	-/-			-/-	-/-	+/+	+/+	+/+
3/29	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+		-/-			-/-	-/-	-/-			-/-	-/-	+/+	-/-	+/+
4/5	+/+	+/-	+/-	-/-	-/+		-/+			-/+	-/-	-/-			-/-	-/-	+/+	-/-	+/+
4/12	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		-/-			-/-	-/-	-/-			-/-	-/-	+/+	-/-	+/+
4/19	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		-/-			-/-	-/-	-/-			-/-	-/-	+/+	-/-	+/+
4/26	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+		-/-			-/-	-/-	-/-			-/-	-/-	+/+	-/-	+/+
5/4	-/+	+/-	+/-	+/-	-/+		-/-			-/-	-/-	+/-			-/-	-/-	+/+	-/-	+/+
5/10	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+		-/-			-/-	+/-	-/-			-/-	+/+	+/+	-/-	+/+
5/18	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		-/-			-/-	-/-	-/-			-/-	-/-	+/+	-/-	+/+
5/24	-/-	+/-	+/-	+/-	-/-		-/-			-/-	+/-	+/-			-/-	-/-	+/+	-/+	-/+
5/31	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-		-/-			-/-	-/-	-/-			-/-	-/-	-/+	-/-	+/+
6/7	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		-/-			-/-	-/-	-/-			-/-	-/-	+/+	-/-	+/+
6/14	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+		-/-			-/-	-/-	-/-			-/-	-/-	-/-	-/-	+/-
6/21	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+
6/28	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+	-/-	-/+
7/5	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+
7/12	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+	-/-	+/-
7/19	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-		-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	+/-	-/+
7/26	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+	-/-	-/+
8/2	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-		-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	+/-	+/-
8/9	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/+	+/+
8/16	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+		+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/+	+/-
8/23	-/+	-/+	-/+	-/+	+/-		-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/-	-/+

左: 系統A, 右: 系統B, +: 検出, -: 非検出, 空欄: 未測定

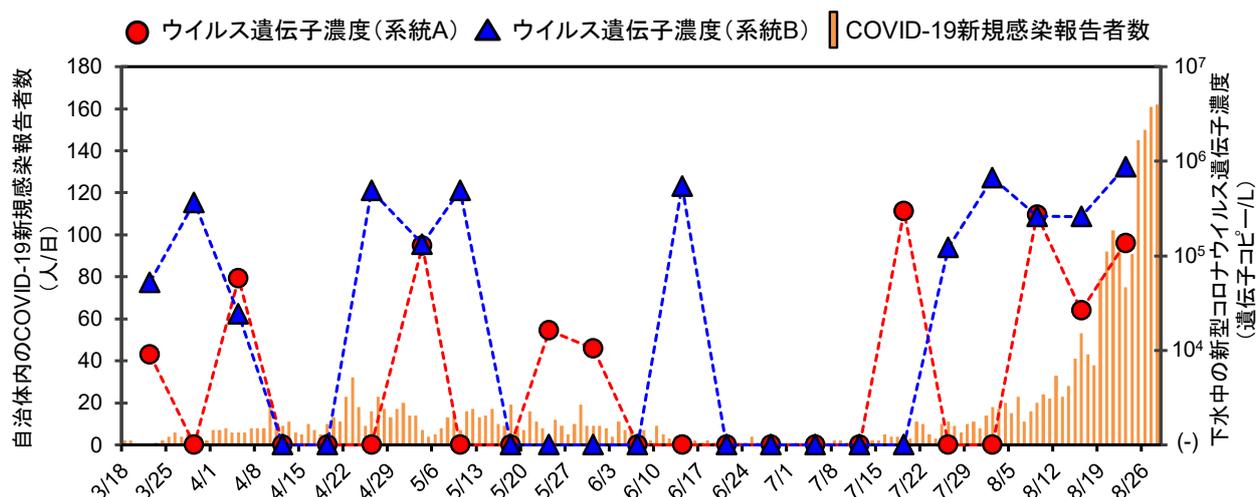


図3 下水中の新型コロナウイルス遺伝子濃度と COVID-19 新規感染報告者数 (2021年3月～8月)

【今後の展望】

COVID-19 感染者の全数把握の見直しの動きが進む中、感染流行状況を把握するための手法として下水疫学調査の積極的な活用が期待されます。本研究で開発したハイスループット定量 PCR 法の特徴の一つとして、測定するアッセイの組み合わせを容易に変更できることが挙げられます。今回使用した下水は2020年10月～2021年8月の第3波～第5波期間中に採取したものであり、当時流行していたアルファ株やデルタ株が有する変異を検出対象としていました。現在では、オミクロン株による感染が主流であることから、オミクロン株に特徴的な変異を検出するアッセイを含めて測定を実施しています。さらに、今後出現する可能性のある新型コロナウイルスの新たな変異株や、未知の感染症を引き起こす病原微生物が出現した際にも速やかにアッセイの追加が可能であり、ウィズコロナ時代で下水疫学調査を推進していく上で有用な技術となることが期待されます。

研究支援

- ・ 国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST)
 - 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 関連国際緊急共同研究・調査支援プログラム (J-RAPID)
 - 「下水疫学調査による新型コロナウイルスの感染流行状況のリアルタイム監視」(JPMJJR2001)
 - e-ASIA 共同研究プログラム「COVID-19 および疾病 X の被害最小化に向けた下水情報に基づく早期警報システムの構築」(JPMJSC20E2)
 - ・ 独立行政法人日本学術振興会
 - 科学研究費補助金 基盤研究 (B)「宿主特異的ウイルス遺伝子マーカー群の検出に基づく水環境中の糞便汚染評価法の構築」(JP20H02284)
- 1) 「下水疫学」は学問分野である「Wastewater-based epidemiology」の訳語であり、原本教授と北島准教授が考案。「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.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) 山梨大学プレスリリース「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～」
<https://www.yamanashi.ac.jp/wp-content/uploads/2021/09/202109015pr.pdf> (2021年9月15日)

- 5) 山梨大学プレスリリース「下水からオミクロン変異を有する新型コロナウイルス遺伝子を検出～変異株の流行監視への下水疫学調査の有効性を実証～」 <https://www.yamanashi.ac.jp/wp-content/uploads/2022/01/20220114pr.pdf> (2022年1月14日)
- 6) 山梨大学プレスリリース「下水から新型コロナウイルスのステルスオミクロン株を検出～亜種レベルでの変異株の流行監視への下水疫学調査の有効性を実証～」 <https://www.yamanashi.ac.jp/wp-content/uploads/2022/03/20220309pr.pdf> (2022年3月9日)
- 7) 北海道大学・塩野義製薬株式会社共同プレスリリース「普及に適した下水中新型コロナウイルスの高感度検出技術 (EPISENS-S 法) を開発～本技術の普及による下水疫学調査の社会実装の加速に期待～」 https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/220808_pr3.pdf (2022年8月8日)
- 8) 北海道大学・大阪大学・東京大学共同プレスリリース「東京 2020 オリンピック・パラリンピック選手村の下水中新型コロナウイルス量と陽性者数との関連を解明～下水疫学調査と個人検査は相互補完的、集団を対象とした検査戦略としての普及に期待～」 https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/220823_pr.pdf (2022年8月23日)

論文情報

論文名 Application of a high-throughput quantitative PCR system for simultaneous monitoring of SARS-CoV-2 variants and other pathogenic viruses in wastewater
(下水中の新型コロナウイルス変異株および他の病原ウイルスの同時モニタリングへのハイスループット定量 PCR システムの適用)

著者名 Bikash Malla¹, Ocean Thakali², Sadhana Shrestha^{1,3}, Takahiro Segawa⁴, Masaaki Kitajima⁵, Eiji Haramoto¹ (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国連大学サステナビリティ高等研究所, ⁴山梨大学総合分析実験センター, ⁵北海道大学大学院工学研究院)

雑誌名 *Science of the Total Environment*

URL <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158659>

掲載日 2022年9月9日 (金) (オープンアクセス)

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/>

北海道大学大学院工学研究院 准教授 北島正章 (きたじま まさあき)

TEL : 011-706-7162

E-mail : mkitajima@eng.hokudai.ac.jp

URL : https://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/water/member_MasaakiKitajima.html

広報についての問い合わせ先

山梨大学企画部広報企画課 (〒400-8510 甲府市武田 4 丁目 4 番地 37 号)

TEL : 055-220-8005, 8006

FAX : 055-220-8799

E-mail : koho@yamanashi.ac.jp

北海道大学社会共創部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北 8 条西 5 丁目)

TEL : 011-706-2610

FAX : 011-706-2092

E-mail : jp-press@general.hokudai.ac.jp