

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～

ポイント

- ・新型コロナウイルスに近縁なモデルウイルスを使用し，7種類の濃縮法による回収率を比較。
- ・ウイルス回収率，操作性，汎用性等の観点から各濃縮法の利点及び欠点を体系的に整理。
- ・COVID-19の下水疫学調査を実施する上での標準的手法確立と調査研究の加速への貢献に期待。

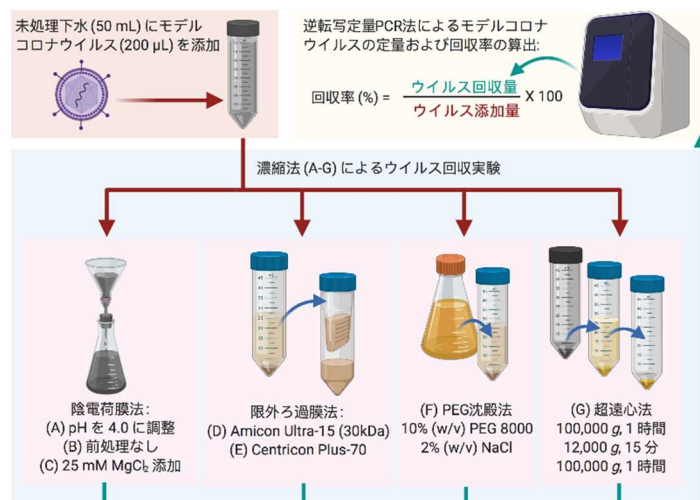
概要

北海道大学大学院工学研究院の北島正章助教と山梨大学大学院総合研究部の原本英司教授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，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，その手法の開発等の研究に取り組んでいます（本稿 p.3「関連する研究成果」を参照）。今回，その成果の一部としてオーストラリア・連邦科学産業研究機構の Warish Ahmed 上級研究者らと共同で複数のウイルス濃縮法による下水中のコロナウイルスの回収率を比較測定した結果をまとめた研究論文を発表しました。

COVID-19の感染拡大防止策の一つとして，国内外で下水疫学調査の重要性が認識されてきています。しかし，既存の下水中ウイルス濃縮法はエンベロップ（脂質と糖タンパクからなる被膜）を持たない腸管系ウイルス（ノロウイルス等）に対して開発及び適用されてきたため，エンベロップを有する新型コロナウイルスに対する有効性を評価する必要があります。本研究では，新型コロナウイルスに近縁なマウス肝炎ウイルスを未処理下水に添加し，7種類のウイルス濃縮法による回収率を逆転写定量PCR法により評価しました。さらに，ウイルス回収率，操作性，汎用性等の観点から各ウイルス濃縮法の利点及び欠点を体系的に整理しました。

本研究成果は，COVID-19の下水疫学調査の大きな課題である下水中の新型コロナウイルスの標準的検出手法確立に大きく貢献するものです。今後，本研究結果に基づき下水中の新型コロナウイルスの検出手法が整備され，国内外におけるCOVID-19の下水疫学に関する調査研究が加速することが期待されます。

なお，本研究成果は，2020年6月5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）。



本研究で評価した7種類の下水中ウイルス濃縮法及びモデルコロナウイルス回収率の算出法

【背景】

新型コロナウイルス感染症(COVID-19)感染者の糞便中及び下水中から新型コロナウイルス RNA が検出されることが報告されています。このことは、下水中の新型コロナウイルスをモニタリングする「下水疫学調査」により、特定の地域における新型コロナウイルスの侵入、流行状況、分子疫学及び流行収束を把握できる可能性を示唆するものです。新型コロナウイルス RNA を下水から検出することに成功したことを報告する最近の研究では、限外ろ過膜法、ポリエチレングリコール沈殿法、超遠心法及び精密ろ過膜（陰電荷膜）法などが使用されています。しかし、これらの手法は、元々はノロウイルスなどのエンベロープを有しない腸管系ウイルスの検出法として開発されたものであり、エンベロープを有する新型コロナウイルスの回収率は不明でした。これは、ウイルス粒子の構造がエンベロープの有無により大きく異なり、ウイルス濃縮法による回収率がエンベロープの有無に大きく影響を受けるためです。

ウイルス濃縮法による回収率測定実験に新型コロナウイルスを使用するためには、非常に厳格な安全管理が要求されるため、新型コロナウイルスと構造や形態が類似したより安全性の高いモデルウイルスを使用するのが現実的です。マウス肝炎ウイルス(Murine hepatitis virus, MHV)は、新型コロナウイルスと同じベータコロナウイルス属に属するウイルス（遺伝的に近縁）であり、ヒトに病原性を示さず比較的容易に取り扱えることから、本研究では MHV を新型コロナウイルスのモデルウイルスとして使用しました。

【研究手法・研究成果】

未処理下水に MHV を添加し、p.1 図で示した 7 種類のウイルス濃縮法 ((A) ~ (G)) で下水中の MHV を濃縮しました。(A) ~ (C) の方法については、下水をろ過した精密ろ過膜から直接ウイルス RNA を抽出し、(D) ~ (G) の方法については濃縮液からウイルス RNA を抽出しました。RNA 抽出液中の MHV の RNA 濃度を逆転写定量 PCR 法で測定し、各ウイルス濃縮法による MHV の回収率を算出したところ、以下のような結果となりました。

≪ウイルス濃縮法を MHV 濃縮回収率の高い順に並べた結果≫※先頭の () 内の数値は平均値

(C : 65.7%) 下水に塩化マグネシウムを添加した後に精密ろ過膜でろ過

(B : 60.5%) 前処理なしの下水を精密ろ過膜でろ過

(D : 56.0%) 下水を遠心した上澄みを限外ろ過膜ユニット Amicon® Ultra-15 (分画分子量 30kDa) で濃縮

(F : 44.0%) ポリエチレングリコール沈殿法

(G : 33.5%) 超遠心法

(E : 28.0%) 下水を遠心した上澄みを限外ろ過膜ユニット Centricon® Plus-70 (分画分子量 10kDa) で濃縮

(A : 26.7%) 塩酸を用いて下水を pH 4.0 に調整した後に精密ろ過膜でろ過

研究グループは、本研究で評価したこれら 7 種類のウイルス濃縮法の利点、欠点及び改善の余地について、MHV 回収率だけでなく操作の容易さや汎用性、コスト等の観点から体系的に整理し、濃縮手法選択にあたって参考となり得る一連の情報をまとめました。

【今後への期待】

COVID-19の下水疫学調査を実施する上では、これまでの下水疫学調査の主な研究対象とされてきた腸管系ウイルスとコロナウイルスとのウイルス粒子の構造上の大きな違い（エンベロープの有無）のため、下水中の新型コロナウイルスの濃縮法が確立されていないことが大きな障壁となっていました。本研究で示した、下水中のウイルス検出に適用された実績のある7種類のウイルス濃縮法によるMHV回収率の比較測定結果は、下水中の新型コロナウイルスの濃縮法を選択する上で広く参照されることが期待されます。また、濃縮法によるウイルス回収率を考慮することにより、逆転写定量PCR法に基づくウイルスRNAの定量結果から下水中の新型コロナウイルスRNAの濃度をより正確に逆算推定することが可能になります。本研究成果は、COVID-19の下水疫学調査の大きな課題である下水中の新型コロナウイルスの標準的検出手法確立に大きく貢献するものであると言えます。

今後、本研究成果に基づき検出手法が整備され、国内外におけるCOVID-19の下水疫学に関する調査研究が加速することが期待されます。

【関連する研究成果】

- ①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～」

発表日：2020年5月14日

URL：<https://www.hokudai.ac.jp/news/2020/05/-covid-19.html>

- ②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に期待～」

発表日：2020年6月26日

URL：<https://www.yamanashi.ac.jp/wp-content/uploads/2020/06/20200626pr.pdf>

【研究費情報】

本研究の一部は、国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）未来社会創造事業（JPMJMI18DB、研究代表：松井佳彦）の支援を受けて実施されたものです。

論文情報

論文名	Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater (未処理下水からのマウス肝炎ウイルス（新型コロナウイルスの指標）の逆転写定量PCRベースでの回収率に基づく複数のウイルス濃縮法の比較)
著者名	Warish Ahmed ¹ , Paul M. Bertsch ¹ , Aaron Bivins ² , Kyle Bibby ² , Kata Farkas ³ , Amy Gathercole ⁴ , Eiji Haramoto ⁵ , Pradip Gyawali ⁶ , Asja Korajkic ⁷ , Brian R. McMinn ⁷ , Jochen F. Mueller ⁸ , Stuart L. Simpson ¹ , Wendy J.M. Smith ¹ , Erin M. Symonds ⁹ , Kevin V. Thomas ⁸ , Rory Verhagen ⁸ , Masaaki Kitajima ¹⁰ (¹ オーストラリア・連邦科学産業研究機構, ² 米国・ノートルダム大学, ³ 英国・バンガー大学, ⁴ オーストラリア・南オーストラリア保健医療研究所, ⁵ 山梨大学大学院総合研究部, ⁶ ニュージーランド・環境科学研究所, ⁷ 米国・環境保護局, ⁸ オーストラリア・クイーンズランド州環境保健科学アライアンス, ⁹ 米国・南フロリダ大学, ¹⁰ 北海道大学大学院工学研究院)
雑誌名	Science of the Total Environment (環境科学の専門誌)
DOI	10.1016/j.scitotenv.2020.139960
公表日	2020年6月5日(金)(オンライン公開, オープンアクセス)

お問い合わせ先

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）

T E L 011-706-7162/5587 F A X 011-706-7162 メール mkitajima@eng.hokudai.ac.jp

U R L https://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/water/member_MasaakiKitajima.html

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）

T E L 055-220-8725 F A X 055-220-8592 メール eharamoto@yamanashi.ac.jp

U R L <http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~eharamoto/>

配信元

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）

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール kouhou@jimuhokudai.ac.jp

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）

T E L 055-220-8006 F A X 055-220-8799 メール koho@yamanashi.ac.jp

【用語解説】

*1 下水疫学調査 … 「下水疫学」は学問分野である「Wastewater-based epidemiology」の訳語であり、北島助教と原本教授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。