

令和4年3月9日

各報道機関 御中

国立大学法人山梨大学

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～

ポイント

- ・ 2022年2月9日に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のステルスオミクロン株（BA.2系統）を検出。
- ・ 1月下旬～2月の下水から検出された新型コロナウイルスはすべてオミクロン株と判明。
- ・ 山梨県内の感染者からの最初の検出報告よりも約1週間早く下水からBA.2系統を検出。
- ・ COVID-19 下水疫学調査が亜種レベルでの変異株の感染流行監視に活用されることが期待。

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と山梨大学総合分析実験センターの瀬川高弘講師の研究グループは、2022年2月に採取した下水から新型コロナウイルスのステルスオミクロン株（BA.2系統）を検出することに成功しました（**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測定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⁾が現在注目を集めています。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⁾、下水中の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⁴⁻⁶⁾等に取り組んでいます。2022年1月には、逆転写定量PCRを用いてオミクロン株に特徴的な変異を下水から検出することに成功しています⁷⁾。

今回、2022年1月～2月に山梨県内の下水処理場で採取した下水12試料に対して次世代シーケンス解析を実施した結果、5試料から新型コロナウイルスの遺伝子配列を取得することに成功し、すべてオミクロン株と判定されました。2月9日に採取した下水から得られた遺伝子配列（約45万本）は、BA.1系統が59.4%、BA.2系統が40.6%を占めていました。山梨県内でCOVID-19感染者からBA.2系統の感染が初めて報告されたのは2月15日であり、感染報告よりも少なくとも約1週間早く下水中にBA.2系統が存在していたことが明らかとなりました。

本研究により、亜種レベルでの詳細な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が示され、今後、下水疫学調査の社会実装に向けた動きの加速が期待されます。

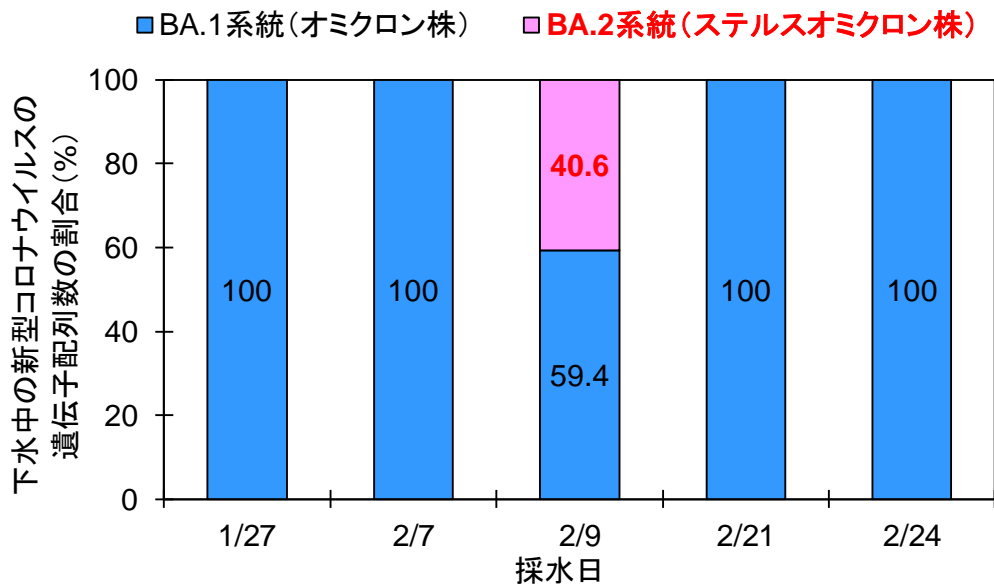


図1 次世代シーケンス解析により下水から検出された新型コロナウイルスの遺伝子配列の分類

【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。

下水疫学調査を社会実装していく上で、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いため、検出が難しいことが課題となっていました。そこで、原本教授は、タカラバイオ(株)との共同研究を通じ、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「SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater」(型番RC390A)⁸⁾を開発し、(公社)日本水環境学会 COVID-19 タスクフォースが公表している手法⁹⁾では検出できない下水の多くから新型コロナウイルス遺伝子を検出することに成功しています⁵⁾。

さらに、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)に置き換わる様子⁵⁾や、第6波に入りオミクロン株(G339D, E484A変異)が出現する様子を捉えることに成功しており⁷⁾、変異株の流行監視にも下水疫学調査が活用できる可能性を示してきています。

【次世代シーケンス解析による下水中の新型コロナウイルス遺伝子の検出】

逆転写定量PCRを用いることで迅速かつ高感度で下水中の新型コロナウイルスの変異を検出することができますが、一般に下水中には複数の感染者から排出される多種類の変異株が含まれているため、個々の変異株の同定まではできないという欠点があります。患者検体からの変異株の同定には全ゲノム解析が用いられていますが、ウイルス濃度が低い下水には適用が困難であり、また、測定に時間を要するという問題もありました。そこで、本研究では、新型コロナウイルスの一部の遺伝子領域を対象とした次世代シーケンス解析を用いることで、下水中に存在する変異株を効率的かつ網羅的に検出することを試みました。

2022年1月11日～2月24日に山梨県甲府市内の下水処理場において採取した下水12試料に対し、ポリエチレングリコール沈殿法による濃縮と遺伝子抽出、逆転写反応に供した後、新型コロナウイルスのS遺伝子(スパイクタンパク質をコードする遺伝子)領域の一部(206塩基対)を増幅する定性

PCRを行いました。その結果、12試料中9試料がPCRで陽性となりました(表1)。これら9試料をさらに次世代シーケンス解析用のPCRに供したところ、5試料が陽性と判定されたため、iSeq 100 シーケンサーシステム(イルミナ社)を用いた次世代シーケンス解析を実施しました。

PCRで使用したプライマー配列を除いた約170塩基対を対象とした解析の結果、5試料から合計2,320,349本の遺伝子配列(1試料あたり286,460~733,768本)を取得することに成功しました(表1)。これらの遺伝子配列は、50種類の遺伝子型に分けることができ、50種類すべてがオミクロン株に分類され、デルタ株等の他の変異株は含まれていないことが分かりました。

表1 次世代シーケンス解析による下水中の新型コロナウイルス遺伝子の検出結果

採水日	新型コロナウイルス 定性PCR	次世代シー ケンス解析 用PCR	遺伝子配列数			遺伝子型数		
			計	BA.1系統	BA.2系統	計	BA.1系統	BA.2系統
1/11	+	-						
1/19	+	-						
1/25	-							
1/27	+	+	286,460	286,460	0	3	3	0
2/1	+	-						
2/3	+	-						
2/7	+	+	298,013	298,013	0	19	19	0
2/9	+	+	450,045	267,103 (59.4%)	182,942 (40.6%)	20	12	8
2/14	-							
2/17	-							
2/21	+	+	733,768	733,768	0	18	18	0
2/24	+	+	552,063	552,063	0	19	19	0
計	9/12	5/9	2,320,349	2,137,407 (92.1%)	182,942 (7.9%)	50	42	8

+ : 検出, - : 非検出

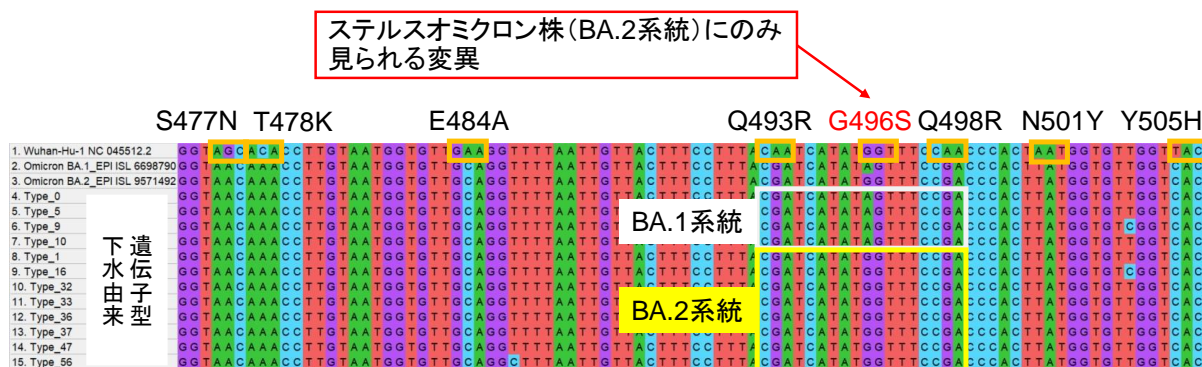


図2 下水から検出されたオミクロン株の遺伝子配列のアライメント結果(抜粋)

オミクロン株は多数の変異箇所を有することが知られており、今回解析対象とした遺伝子領域にはそのうち7ヶ所(S477N, T478K, E484A, Q493R, Q498R, N501Y, Y505H変異)が含まれています。また、最近になり、従来のオミクロン株(BA.1系統)よりも感染力が高いとされるステルスオミクロン株(BA.2系統)による感染拡大が懸念されていますが、BA.2系統のみが有するG496S変異もこの領域に含まれています。すなわち、本研究で解析対象とした遺伝子領域は、オミクロン株を同定するのみならず、BA.1系統とBA.2系統を区別することを可能とします(図2)。

本研究で得られた遺伝子配列のうち、92.1%(2,137,407本)がBA.1系統、7.9%(182,942本)がBA.2系統に分類されました(表1)。遺伝子型別では、42種類がBA.1系統、8種類がBA.2系統となり、下水中には非常に多様なオミクロン株が存在していることが分かりました。

採水日別では、BA.2系統は2月9日に採取した下水からのみ検出され、遺伝子配列数の40.6%を占

めていました。山梨県内において、COVID-19 感染者から BA.2 系統の感染が初めて報告されたのは 2 月 15 日であり、感染報告の 6 日前に採取した下水中にすでに BA.2 系統のオミクロン株が存在していたことが明らかとなりました。また、8 種類の遺伝子型が検出されたという結果は、下水処理場の処理区域内に BA.2 系統のオミクロン株への感染者が複数存在していたことを強く示唆するものであると言えます。

【今後の展望】

次世代シーケンス解析は、亜種レベル、さらには遺伝子型レベルでの変異株を検出可能とするため、変異株の流行状況を詳細に把握する上で有用な手法となり得ます。しかし、逆転写定量 PCR と比べると検出感度が低く、解析にも時間を要するため、下水疫学調査に本格的に組み入れていくためには検出法の改良等による検出感度や解析速度の向上が望まれます。

今回の研究では、BA.2 系統は 2 月 9 日に採取した下水からのみ検出されており、2 月 21 日と 24 日に採取した下水からは BA.1 系統しか検出されませんでした。この理由として、BA.2 系統による感染流行は短期間で収束し、BA.1.1 系統等の BA.1 系統による感染が山梨県内では主流となっていたことが考えられます。今回解析した遺伝子領域では BA.1.1 系統と他の BA.1 系統を区別することはできないため、別の遺伝子領域を対象とした次世代シーケンス解析を試みることで、さらに詳細な変異株の流行状況に関する知見が得られるものと期待されます。

今後、逆転写定量 PCR を用いたスクリーニングと次世代シーケンス解析を併用して活用することにより、下水疫学調査の社会実装に向けた動きがさらに加速することが期待されます。また、インフルエンザウイルスやノロウイルス等の疫学上重要な病原ウイルスへの下水疫学調査の拡張も望まれます。

研究実施者

- 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 教授 原本 英司
- 山梨大学総合分析実験センター 講師 瀬川 高弘
- 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 研究員 Bikash Malla
- 山梨大学大学院医工農学総合教育部工学専攻 博士課程 3 年 Niva Sthapit

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」(課題番号: JPMJJR2001)
- JST 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」(課題番号: JPMJSC20E2)
- 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) 「新型コロナウイルス感染症等の感染症サーベイランス体制の抜本的拡充に向けた人材育成と感染症疫学的手法の開発研究」(課題番号: JPMH20HA2007)

- 「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。
- 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)
- 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)
- 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) 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)
 - 6) JNC (株)・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の磁気分離技術を開発～下水疫学調査に大きく貢献～」
<https://www.yamanashi.ac.jp/wp-content/uploads/2021/12/20211216press.pdf> (2021年12月16日)
 - 7) 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)
 - 8) タカラバイオ (株) ウェブサイト「SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater」
https://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100009513
 - 9) (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)

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