

緊急連載 「新型コロナウイルスと分析化学」

500 人程度の新型コロナウイルスの新規感染者が報告される中、私達の生活はウイルスと共存した新しい生活様式への移行が進んでいます。本誌では、コロナウイルスについて、正しく理解するために最小限必要となる基礎的知識を広く会員に提供する必要があると考え、8 号より緊急連載記事を企画しました。本連載は、コロナウイルスの感染状況や感染拡大防止に関して、分析化学的視点に基づき、正しく解釈していただくことを目的としております。

この 11 号においては、下水中に存在するウイルス RNA を検出することで、地域の感染状況を把握する「下水疫学調査」について紹介します。採取した下水試料から新型コロナウイルス RNA の検出例についても報告しています。会員皆様の理解の一助としていただければ幸いです。

下水中の新型コロナウイルスの分析

北 島 正 章, 原 本 英 司

1 はじめに

2019 年 12 月に中国・武漢に端を発した新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の世界的感染流行は、2020 年 7 月 21 日現在で、世界で 14562550 名の報告感染者と 607781 名の死者が報告されている¹⁾。COVID-19 の感染拡大は、世界各地においてヒトの健康や生命のみならず社会経済活動にも甚大な損害を与えている。COVID-19 の病因である新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の主な伝播経路はヒト-ヒト間での飛沫感染や接触感染であるが、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る²⁾。下水道が普及している地域では、不顕性感染者も含めたあらゆる新型コロナウイルス感染者の糞便中に排出されるウイルスが下水処理場に集積する。そのため、下水中の新型コロナウイルスを定期的に分析する「下水疫学調査」(Wastewater-based epidemiology の日本語訳として著者らが考案し公的文書で初めて使用³⁾)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がある²⁾。

著者らは、COVID-19 の流行状況を把握する上での下水疫学調査の重要性を世界に先駆けて提唱し²⁾、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⁴⁾や、分析手法の開発⁵⁾等の研究に取り組んでいる。本稿では、下水中の新型コロナウイルスの分析手法とその適用事例について、著者らの研究成果を中心に紹

介する。

2 下水中における新型コロナウイルスの存在実態と分析の意義

COVID-19 患者の一部には下痢症を含む胃腸炎症状が認められること及び新型コロナウイルスが腸管で増殖する可能性が報告されている。また、数多くの研究により、不顕性感染者を含む新型コロナウイルス感染者の糞便中からウイルス RNA が検出されることが分かっている^{6)~11)}。

新型コロナウイルスについては、これまでに諸外国(本原稿執筆時点で、オーストラリア¹²⁾、オランダ¹³⁾、イタリア¹⁴⁾、スペイン¹⁵⁾、アメリカ¹⁶⁾)だけでなく国内(詳しくは後述)⁴⁾からも下水からのウイルス RNA の検出が論文として報告されてきている。これらの結果をまとめると、未処理下水中のウイルス RNA 濃度は最大で 1 L あたり 10^6 遺伝子コピー以上に達すること、処理下水中からもウイルス RNA が検出されることがあり、その濃度は最大で 1 L あたり 10^5 遺伝子コピー以上に達することが報告されている。

新型コロナウイルスは不顕性感染を引き起こすことが知られており、主に有症者のみを対象とする臨床検査では真の流行状況を把握することが困難であると言える。一方で、下水調査では、感染者の症状の有無に影響を受けず感染流行状況を評価することが可能である。過去には、ノロウイルス等の腸管系ウイルスの感染流行動向の把握のためや、ポリオの根絶計画において公衆衛生的介

入の効果の判断材料として下水調査結果が活用された事例もあり、前述の理由から新型コロナウイルスに関しても下水疫学調査が感染流行実態把握のための有用な知見を提供する可能性がある。実際に、海外で実施された研究の中には、下水疫学調査の結果より公衆衛生的介入（ロックダウンや外出禁止命令）による COVID-19 感染拡大抑制効果を確認できたことを報告する研究事例もある²⁾。

3 下水中の新型コロナウイルスの分析法

3.1 ウイルス濃縮法

糞便中に排出された新型コロナウイルスは下水中で希釈されるため、その検出のためには濃縮操作が必須となる。下水中のウイルス濃縮法として、これまでノロウイルス等の腸管系ウイルスに対して多くの手法が開発されてきており、ウイルス粒子が水中で主に負に帯電していることを利用して陽・陰電荷膜への吸着により濃縮する手法や、限外ろ過膜法、超遠心法、ポリエチレングリコール沈殿法等が開発されている¹⁷⁾。これまでに下水から新型コロナウイルス RNA の検出に成功した事例では、これらの既存の濃縮法が使用されている²⁾。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ップ（脂質と糖タンパクからなる被膜）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、エンベロップを有する新型コロナウイルスの回収率は不明であった。これは、ウイルス粒子の構造がエンベロッ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ップの有無に大きく影響を受けるためであ

る。

そこで著者らは、オーストラリア・連邦科学産業研究機構の Warish Ahmed 上級研究員らと共同で複数のウイルス濃縮法による下水中の新型コロナウイルスの回収率を比較測定した⁵⁾。ここではその論文の概要を紹介したい。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ある。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た。未処理下水に MHV を添加し、図 1 に示す 7 種類のウイルス濃縮法（A）～（G）で下水中の MHV を濃縮した。（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 を抽出した。RNA 抽出液中の MHV の RNA 濃度を逆転写定量（リアルタイム）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。

本研究で評価した 7 種類の下水中ウイルス濃縮法による MHV 濃縮回収率は、表 1 に示すような結果となった。

著者らは、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

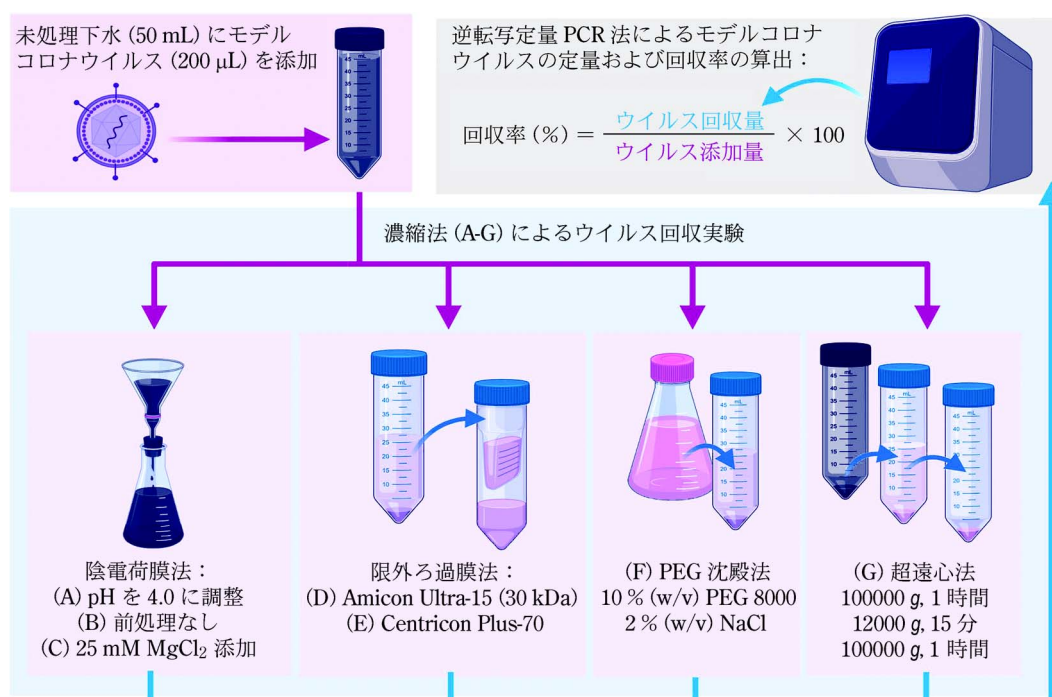


図 1 著者らの論文⁵⁾で評価した 7 種類の下水中ウイルス濃縮法及びモデルコロナウイルス回収率の算出法

表1 著者らの論文⁵⁾で評価した7種類の下水中ウイルス濃縮法によるMHV濃縮回収率の順位

順位	方法	平均回収率(%)	濃縮手順・方法
1	C	65.7	下水に塩化マグネシウムを添加した後に陰電荷膜でろ過
2	B	60.5	前処理なしの下水を陰電荷膜でろ過
3	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 30 kDa) で濃縮
4	F	44.0	ポリエチレングリコール沈殿法
5	G	33.5	超遠心法
6	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 10 kDa) で濃縮
7	A	26.7	塩酸を用いて下水を pH 4.0 に調整した後に陰電荷膜でろ過

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る。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となる。

3・2 ウイルス検出法

新型コロナウイルスの検出は主にリアルタイムPCR法により行われており、国立感染症研究所や米国疾病予防管理センター (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) 等により多くの検出系が開発されている。しかし、これらのリアルタイムPCR法は、限られた数・地域の感染者から同定された新型コロナウイルスの遺伝子情報に基づいて開発されていることから、偽陰性等の問題を解決し、世界標準となる手法の構築に向けてさらなる研究が必要とされている。特に、下水をはじめとする環境試料からの新型コロナウイルス遺伝子の検出を行う際には、臨床検体に比べて存在濃度が低いために非特異的増幅が起こりやすく、PCR増幅産物の塩基配列を解読し、偽陽性ではないことを確認することが推奨される。

ウイルスRNAの検出法として、専用の機器を必要とするリアルタイムPCR法よりも簡便で実施が容易なLoop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法等の手法の開発も望まれる。下水中の新型コロナウイルスが感染力を有しているかどうかは現時点では不明であ

るため、感染力を判別できる手法の開発と適用が期待される。

4 国内における環境水中の新型コロナウイルスの分析事例

4・1 分析対象試料

著者らは、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国内初の環境調査を実施し、論文として報告した⁴⁾。ここでは、その報告について分析手法を中心に紹介する。この研究では、分析対象試料として、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(最終沈殿池流出水)を各5試料、河川水(当該下水処理場からは十分離れた地点)を3試料、計13試料を採取した。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るが、本研究では放流水は採取しなかった。

4・2 分析手順と方法

本研究で採取した試料と新型コロナウイルスの分析手順を図2に示す。この図に示すように、2種類のウイルス濃縮法と6種類のPCR法を組み合わせる下水および河川水中の新型コロナウイルスRNAの検出を試みた。ウイルス濃縮法としては、陰電荷膜破碎型濃縮法¹⁸⁾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200 mL、塩素消毒前下水処理水は5000 mL、河川水は3000～4000 mLをろ過濃縮(図3)後、ウイルスRNAを抽出した。陰電荷膜破碎型濃縮法では、MgCl₂を終濃度25 mM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90 mm、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(Centrifuge YM-50, Merck)を用いて0.42～9.55 mLに濃縮した。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抽出液を得た。陰電荷膜吸着-直接RNA抽出法では、陰電荷膜破碎型濃縮法と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抽出液を得た。その後、逆転写反応によりウイルスRNAからcDNAを合成した。

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)¹⁹⁾に加え、米国CDC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)²⁰⁾を使用した。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の濃度を定量した(図4)。定性PCR法では、Nested PCR後のPCR産物を

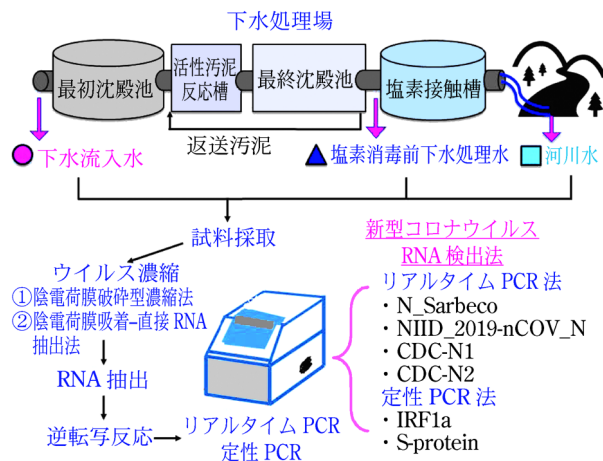


図2 著者らの論文⁴⁾における試料採取と新型コロナウイルスの分析手順

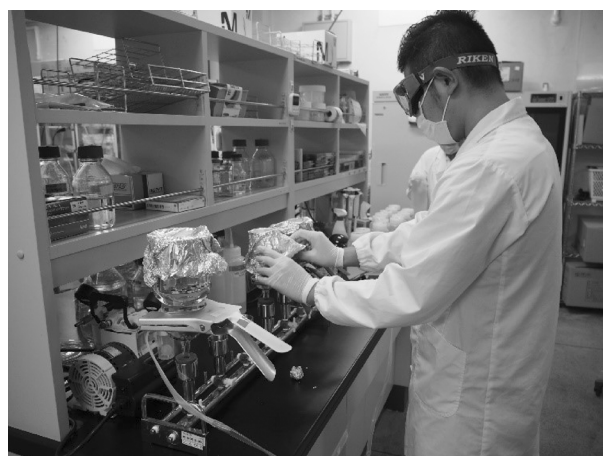


図3 ウイルス濃縮法のろ過作業の様子

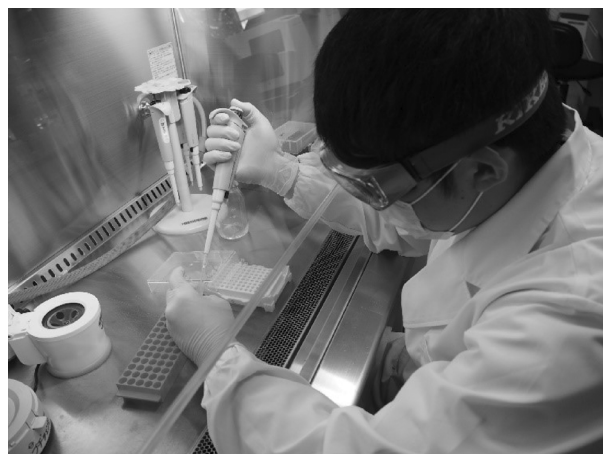


図4 リアルタイム PCR 法の試薬調整作業の様子

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た。

4.3 分析結果

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砕型濃縮法による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2400遺伝子コピー/Lの濃度で新型コロナウイルスRNAが検出された。陽性反応が得られた検出法は、陰電荷膜破砕型濃縮法と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なかった。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あった。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る。

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た。また、検出作業中の実験室内汚染による偽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なかった。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に由来するものと判断した。

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かかわらずウイルス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ある。

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は検出されなかった。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（5000 mL）に比べて下水流入水（200 mL）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：4000～82000 遺伝子コピー/L、塩素消毒前下水処理水：140～2500 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る。また、下水流入水と塩素

消毒前下水処理水はほぼ同時刻に採取したため、下水処理工程での水理学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る。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ない。

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あったが、本論文研究では測定していない下水放流水や浄化槽排水等に仮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る。

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 名であったが、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あった²²⁾。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ものではなく、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るが、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る。

5 今後への期待

著者らは、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 回収率の比較測定を実施するとともに、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 の検出に成功した。今後は、これらの研究で使用した分析法を含む様々な方法を対象に、新型コロナウイルス検出への有効性を評価し、標準的な分析法を確立することが求められる。さらに、その標準法を用いることで、国内外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る。

文 献

- World Health Organization : WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard, available from <<https://covid19.who.int>> (accessed 2020-07-22).
- M. Kitajima, W. Ahmed, K. Bibby, A. Carducci, C. P. Gerba, K. A. Hamilton, E. Haramoto, J. B. Rose : *Sci. Total Environ.*, **739**, 139076 (2020).
- 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～, available from <<https://www.hokudai.ac.jp/news/2020/05/-covid-19.html>> (accessed 2020-07-22).
- E. Haramoto, B. Malla, O. Thakali, M. Kitajima : *Sci. Total Environ.*, **737**, 140405 (2020).
- W. Ahmed, P. M. Bertsch, A. Bivins, K. Bibby, K. Farkas, A. Gathercole, E. Haramoto, P. Gyawali, A. Korajkic, B. R. McMinn, *et al.* : *Sci. Total Environ.*, **739**, 139960 (2020).
- Y. Wu, C. Guo, L. Tang, Z. Hong, J. Zhou, X. Dong, H. Yin, Q. Xiao, Y. Tang, X. Qu, *et al.* : *Lancet Gastroenterol. Hepatol.*, **1253**, 20 (2020).
- R. Wölfel, V. M. Corman, W. Guggemos, M. Seilmaier, S. Zange, M. A. Mueller, D. Niemeyer, P. Vollmar, C. Rothe, M. Hoelscher, *et al.* : *Nature*, **581**, 465 (2020).
- J. Gu, B. Han, J. Wang : *Gastroenterology*, **158**, 1518 (2020).
- Y. Song, P. Liu, X. Shi, Y. Chu, J. Zhang, J. Xia, X. Gao, T. Qu, M. Wang : *Gut*, **69**, 1143 (2020).
- M. Holshue, C. DeBolt, S. Lindquist, K. Lofy, J. Wiesman, H. Bruce, C. Spitters, K. Ericson, S. Wilkerson, A. Tural, *et al.* : *N. Engl. J. Med.*, **382**, 929 (2020).
- A. Tang, Z.-D. Tong, H.-L. Wang, Y.-X. Dai, K.-F. Li, J.-N. Liu, W.-J. Wu, C. Yuan, M.-L. Yu, P. Li, *et al.* : *Emerg. Infect. Dis.*, **26**, 1337 (2020).
- W. Ahmed, N. Angel, J. Edson, K. Bibby, A. Bivins, J. W. O'Brien, P. M. Choi, M. Kitajima, S. L. Simpson, J. Li, *et al.* : *Sci. Total Environ.*, **728**, 138764 (2020).
- G. Medema, L. Heijnen, G. Elsinga, R. Italiaander, A. Brouwer : *Environ. Sci. Technol. Lett.*, **7**, 511 (2020).
- S. G. Rimoldi, F. Stefani, A. Gigantiello, S. Polesello, F. Comandatore, D. Mileto, M. Maresca, C. Longobardi, A. Mancon, F. Romeri, *et al.* : *Sci. Total Environ.*, **744**, 140911 (2020).
- W. Randazzo, P. Truchado, E. CX. Ferrando, P. Simon, A. Allende, G. Sanchez : *Water Res.*, **181**, 115942 (2020).
- S. P. Sherchan, S. Shahin, L. M. Ward, S. Tandukar, T. G. Aw, B. Schmitz, W. Ahmed, M. Kitajima : *Sci. Total Environ.*, **743**, 140621 (2020).
- E. Haramoto, M. Kitajima, A. Hata, J. R. Torrey, Y. Masago, D. Sano, H. Katayama : *Water Res.*, **135**, 168 (2018).
- E. Haramoto, H. Katayama, M. Asami, M. Akiba : *J. Virol. Methods*, **182**, 62 (2012).
- K. Shirato, N. Nao, H. Katano, I. Takayama, S. Saito, F. Kato, H. Katoh, M. Sakata, Y. Nakatsu, Y. Mori, *et al.* : *Jpn. J. Infect. Dis.*, **73**, 304 (2020).
- Centers for Disease Control and Prevention: Research Use Only 2019–Novel Coronavirus (2019–nCoV) Real-time RT–PCR Primers and Probes, available from <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>> (accessed 2020-09-07).
- 山梨県：新型コロナウイルス感染症に関する発生状況等, available from <https://www.pref.yamanashi.jp/koucho/coronavirus/info_coronavirus_prevention.html> (accessed 2020-07-22).



北島正章 (Masaaki KITAJIMA)
北海道大学大学院工学研究院環境工学部門
(〒060-8628 北海道札幌市北区北13条西
8丁目)。東京大学大学院工学系研究科都
市工学専攻博士課程修了。博士(工学)。
《現在の研究テーマ》新型コロナウイルス
の下水疫学。《趣味》ランニング, 読書,
英会話。
E-mail : mkitajima@eng.hokudai.ac.jp



原本英司 (Eiji HARAMOTO)
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 (〒400-8511 山梨県甲府
市武田4-3-11)。東京大学大学院工学系
研究科都市工学専攻博士課程修了。博士
(工学)。《現在の研究テーマ》微生物指標
を活用した水環境管理。《趣味》ウエイト
トレーニング。
E-mail : eharamoto@yamanashi.ac.jp

~~~~~

## 原稿募集

### I & D 欄の原稿を募集しています

内容：実際に分析を行っている現場での分析法や分析  
技術にまつわるちょっとしたアイデア, 実験器  
具の創案あるいは改良, コンピュータなどのソフ  
トウェアなど。I は Idea, Information あるいは  
Innovation の I, D は Design, Development ある  
いは Device の D を意味しています。

執筆上の注意：1) 2000 字以内 (図・表は 1 枚 500  
字に換算) とする。2) 簡単な図などを積極的に

入れる。

◇採用の可否は編集委員会にご一任ください。原稿の  
送付および問い合わせは下記へお願いします。

〒141-0031 東京都品川区西五反田 1-26-2

五反田サンハイツ 304 号

(公社)日本分析化学会「ぶんせき」編集委員会

[E-mail : bunseki@jsac.or.jp]