

調査研究

下水中の 新型コロナウイルス遺伝子の 高感度検出キットの開発



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

① はじめに

筆者は、北島正章准教授（北海道大学）や海外の研究者と共同で、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の流行状況を把握するうえでの「下水疫学調査」の有用性を2020年4月に世界に先駆けて提唱し¹⁾、5月に発表したプレスリリース²⁾を通じて、国内における下水疫学調査の認知度の向上と推進に貢献してきている。6月には、国内初となる下水試料からの新型コロナウイルス遺伝子の検出に成功しており^{3)、4)}、その後、国内各地からも調査事例が続々と報告されている。

また、2020年5月に設立され、筆者も幹事として参加していた(公社)日本水環境学会 COVID-19 タスクフォース（TF）では、検出法の標準化を主要な活動の一つとして位置付け、国内で新型コロナウイルス遺伝子の検出に実績のある手法を整理し、2021年3月に「下水中の新型コロナウイルス遺伝子検出マニュアル」を公表している⁵⁾。

この検出マニュアルに記載されている手法（TF標準法）をもとに、複数の民間企業で下水中の新型コロナウイルスの受託分析サービスが開始される等、下水疫学調査の社会実装に向けた動

きが着実に進んでいる。その一方で、TF標準法を用いた場合でも再現性のある検出結果を得ることが難しいケースが多く、ウイルス検出法を構成する、「濃縮」「RNA抽出」「逆転写（RT）」「定量PCR（qPCR）」の4つの工程それぞれで検出感度を向上させるための新技術の開発が求められる。

本稿では、筆者がタカラバイオ(株)と共同で開発した、下水中の新型コロナウイルス遺伝子を迅速かつ高感度で検出可能なキット「SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater」^{6)、7)}の特徴や実下水試料を用いた検証実験の結果について紹介する。

② 高感度検出キットの特徴

図-1に示すように、今回開発した高感度検出キットでは、濃縮からRNA抽出までの工程はTF標準法と同様の手順を用いており、所有機器等に応じて、濃縮法は3種類、RNA抽出法は2種類から選択可能である。TF標準法では、RTとqPCR法を別々の反応チューブで行う2ステップ方式が採用されているため、1反応あたりに測定できるRNA抽出液量は1.25 μ lに限られる。一

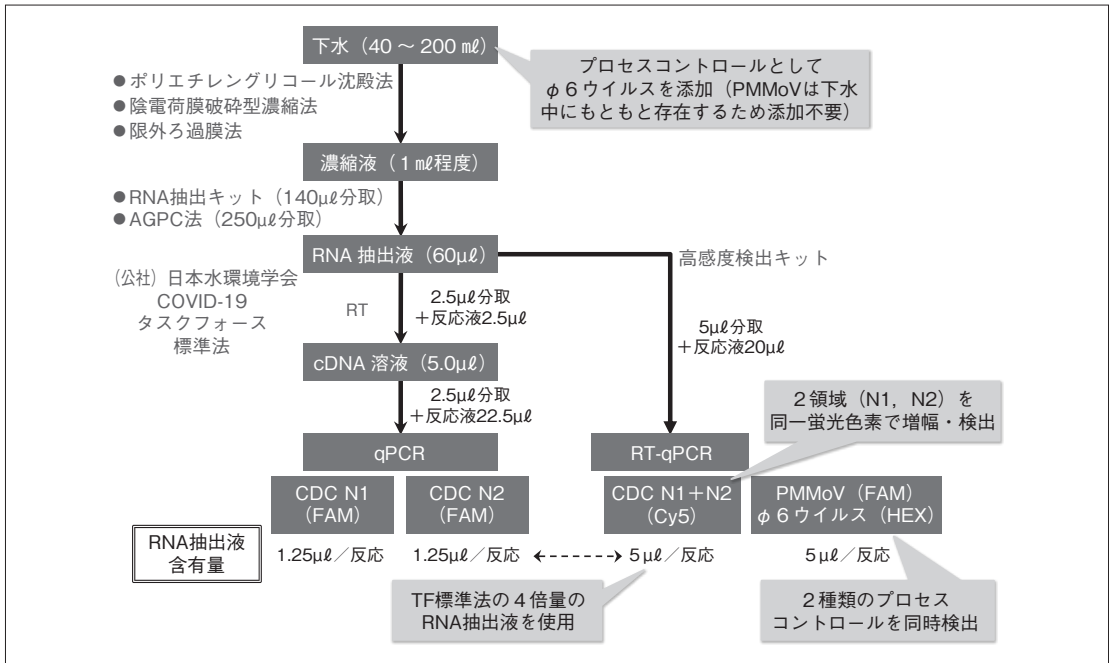


図-1 開発した高感度検出キットの検出フローチャートと特徴

方、高感度検出キットでは、RTとqPCR法を同一チューブで連続して行う1ステップ方式を用いているため、TF標準法の4倍量となる1反応あたり5μlのRNA抽出液の測定が可能である。

また、qPCR系（プライマー2種類と蛍光プローブ1種類）として、TF標準法では米国疾病予防管理センター（CDC）が設計したCDC N1とCDC N2の2種類が採用され、別々のチューブで反応を行うこととなっている。ウイルス濃度が高い患者検体とは異なり、下水中の新型コロナウイルスRNA濃度は検出下限値（1反応あたり5～10遺伝子コピー程度）付近あるいはそれ以下であることが多いため、2～3連で測定してもすべてのウェルが陽性を示さないという結果が頻繁に報告されている。

そこで高感度検出キットでは、単一の蛍光色素（Cy5）で修飾した2種類のqPCR系（CDC N1、CDC N2）を同一チューブ内で反応させ、1遺伝子コピーあたり2カ所の領域を増幅させることで約2倍量の蛍光強度が得られるようにした。

測定するRNA抽出量を4倍にし、1遺伝子

コピーから得られる蛍光強度を約2倍にすることで、理論上、TF標準法と比較して約8倍の検出感度を実現している。RT（逆転写）からqPCR法の間でチューブの蓋を開ける必要がないため、コンタミネーションのリスクを低減することができる。また、ウラシルDNAグリコシラーゼ（UNG）を含む試薬を使用しているため、PCR産物のキャリアオーバーによる偽陽性を防ぐことも可能である。測定は1時間以内に完了するため、TF標準法（3時間以上）と比較して迅速な新型コロナウイルス遺伝子の検出が可能である。

③ 高感度検出キットの検出感度と定量性

TF標準法にしたがい、ポリエチレングリコール（PEG）沈殿法で濃縮した下水（流入下水）から得たウイルスRNA抽出液5μlをRT-qPCR反応液に添加した場合でも、新型コロナウイルス遺伝子（陽性コントロールRNA）は阻害を受けずに増幅され（図-2A）、 $10^4 \sim 10^1$ 遺伝子コピーの範囲内で、遺伝子コピー数とCt値（遺伝子増