

3 市の下水より一時的に検出され系統発生的な遺伝子解析をおこなった SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 はエアロゾルで広がるのみならず糞便でも感染することがわかっている。米国モンタナ州立大学の Wiedenheft ら¹⁾は、下水は感染が拡大しているのか減少しているのかを地域レベルでモニターするのに利用できると考え、以下の検討を行った。

モンタナ州ボーズマンの下水処理場よりサンプルを収集した。それは、17 のこととなった日時に 74 日間にわたり、24 時間の流量に相当するものを自動採取した。これは、前日の下水の状況を反映することがわかっている。下水は、限外ろかおよびスピン濃縮をおこない、RNA サンプルとした。ワンステップ RT-qPCR (プライマーは核カプシド蛋白である N1, N2) を行い、ウイルスを同定した。その結果、3 月下旬から 4 月上旬のサンプルより SARS-CoV-2 が同定され、次第に減少して行った。また、5 月下旬から陽性となり、これは地域での感染を反映していた (図 1A)。

最初の感染爆発である 3 月中旬では、SARS-CoV-2 の RNA は、症状発現から 8 日遅れて出現した (相関係数, $r=0.989$)。また、各個人の検査結果より 2 日早かった (相関係数, $r=0.969$) (図 1B)。5 月の再増加では、症状発現から 5 日遅れており ($r=0.92$)、検査結果より 4 日早かった ($r=0.953$) (図 1C)。症状発現時期は、検査陽性からさかのぼって質問することで得られる情報のため、感染暴露から 10 日後でないとはわからない。すなわち、われわれの下水の検査が最も早 SARS-CoV-2 の感染状況を捉えることができる (図 1D)。

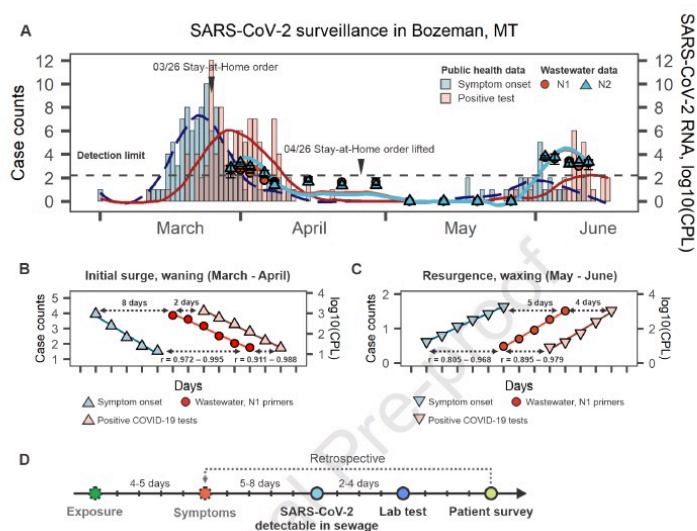


図1 ボーズマン市の下水における SARS-CoV-2 の調査

RT-qPCR の結果がウイルスそのものを捉えているのかを検討するために、10 種類のプライマーの組を用いて PCR をおこなった。これにより、ウイルスの先祖や出所を見るのに用いる多形領域に接している、保存された領域を標的とすることができる。3月27日のサンプルを用いて PCR を行い、遺伝子配列はサンガー法を用いて MUSCLE により参照配列と並べられた。これらの結果には配列の多様性はなかった。同じ RNA 資料は、ほぼ完全長(98.5%)の SARS-CoV-2 遺伝子解析に用いられた。2020年8月13日現在で、GISAID には91カ国から~82,000種類のウイルスゲノムが登録されており、これによってウイルスの起源や進化が理解できる。系統発生的な解析により、ウイルス拡散の分子的な追跡ができる。3月27日現在、モンタナ州ボーズマンで蔓延しているウイルス株の先祖を決定するために、OxfordNanopore により遺伝子配列を決定した。アンプリコンライブラリーを構築するために2,000コピーのウイルス RNA が用いられた。これによって、配列決定の平均的な深度は6,875倍であり、98.5%の SARS-CoV-2 ゲノムをカバーした。全体で、11箇所の単一核酸変異(SNVs)がみつかった。これらが純粋な変異かどうかを Mendeley にて検討する段階で、A23122T はトリミングアーチファクトだということがわかった。他の10種類にはそういったことがなかった。この結果を74カ国より報告された14,970種類の SARS-CoV-2 ゲノムと比較をした。この結果、ボーズマンから単離されたウイルスゲノムに最も近かったのは米国カリフォルニアの株と、オーストラリアビクトリア株であった。 Wuhan WA1 系列の3つの変異(C8782T, C18060T, T28144C) はボーズマン WW ゲノムでは認められなかった。この結果を系統発生地図にした。その結果、A28851T 変異がもっとも最近に起こったものであり、それはカリフォルニア株由来であることがわかった。 下水からのサンプルによる一時的な遺伝子配列決定により、特定の地域で循環しているウイルス株を同定できる可能性がある。

今回の検討により、下水中のウイルスをモニタリングすることで、地域におけるリアルタイムのウイルス拡散状況がわかる。すなわち、遺伝子検査で感染が確認される2-4日前に下水中の結果が出ることになる。検査による診断確定だとウイルス拡散から遅れが生じ、現在のパンデミックを過小評価する可能性がある。米国で医療機関を受診する SARS-CoV-2 感染者は全体の32%でしか

い。このような現状であっても、下水のウイルス検査をすることで地域における個人全員のデータを総合して捉え、糞便中のウイルス量の中央値、ウイルスの崩壊速度、治療施設へ行くまでの時間、州あたりの水使用量などのデータをもとにしたモデルを解析すれば、より正確な感染状況を推定できる可能性がある。このように下水におけるウイルスモニタリングは、感染爆発を追跡し、それに対する政策にも反映させることができる。この研究は、下水調査、COVID-19の疫学、SARS-CoV-2の感染拡大様式の追尾と遺伝子配列決定を結びつけることにより、急速に出現する一連の仕事を補うものである。

文献

- 1) Artem Nemudryi, et al. Temporal detection and phylogenetic assessment of SARS-CoV-2 in municipal wastewater. *Cell Reports Medicine*. 2020.
doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100098