

Publication: 2020.7.27

**Keywords**

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)

環境ゲノム解析

エアサンプリング

## 環境中の新型コロナウイルスを含む病原体の検出系構築

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)モデル粒子および弱毒化風疹ウイルスを用いた  
接触面およびエアロゾル解析に基づく病原体RNA検出系を構築する試み  
(READYFORクラウドファンディング報告)

### 要旨

新型コロナウイルス感染症(COVID-19)は罹患者から排出された飛沫が直接または間接的に体内に侵入することで発症すると考えられる。感染経路となる接触面およびエアロゾル中の病原体を検出することができれば、予防策および適切な消毒により感染拡大を未然に防げる可能性がある。本研究では、新型コロナウイルスモデル粒子、および弱毒化風疹ウイルスを用いて表面素材、エアロゾル中から病原体を検出する解析系を構築することを目的とした。表面素材上からは擦過法を用いてSARS-CoV-2モデルRNAを検出することができ、検出限界は100コピー/ヶ所だった。エアロゾル中からはゼラチンフィルター法を用いてSARS-CoV-2モデル粒子を検出でき、検出限界は152粒子/Lだった。また電気集塵法を用いた検出にも成功した。さらに実際にCOVID-19患者が発生した医療機関を含む、2施設でフィールドワークを実施した。本研究は環境中の病原体解析に基づく新たなCOVID-19対策に発展する可能性がある。

## 背景

新型コロナウイルス感染症(COVID-19)が世界的に拡大し、パンデミックとなっている。2020年7月現在、感染者数は世界で1300万人を超える死者も57万人に達している。本邦においても約2万2000人が感染し900人以上が亡くなっている。新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)は感染者から飛沫を介して伝播すると考えられるため、COVID-19拡大を防ぐ目的で、多くの都市において社会的距離戦略(Social Distance)が取られている。今後も感染規模の拡大や都市封鎖、経済活動停滞の長期的影響が懸念されている。

SARS-CoV-2が体内に存在するかどうかを判定する目的で、主に咽頭拭い液や唾液を用いたPCR検査が広く実施されている。しかしながら、COVID-19の主症状である発熱や咳嗽を呈する前から感染力を持ったウイルスが患者から排出されることが確実視されており、感染拡大を防ぐことは容易ではない。

そこで、本研究では接触面や空間中エアロゾルといったSARS-CoV-2感染を媒介する環境そのものに着目し、モデル粒子を用いて環境中からSARS-CoV-2を含む病原体を検出する系の構築を目的とした。これにより、不特定多数が触れるハイタッチサーフェスや人々が密閉・密接・密集して存在する空間のエアロゾルを評価することにより、アラートを発したり、消毒の指標とする新たな予防策を創出することを目指した。

特にエアロゾル解析は細菌、真菌、ウイルス、花粉、化学物質などの検出を目的として様々な手法が提案されており、SARS-CoV-2検出にとって有用な手法が明確ではなかった。本研究ではゼラチンフィルター法と電気集塵法を選択し、実際にモデル粒子の検出が可能かどうか評価した。さらに、実際にCOVID-19患者が発生した医療機関を含む施設でフィールドワークを行った。

本研究の成果は、環境中の病原体解析に基づく新たな感染症対策に発展する可能性がある。

## 方法

### 病原体モデル粒子

SARS-CoV-2のモデルとしてRdRp領域を含む部分RNA配列(PrimerDesign)を用いた。またウイルス粒子のモデルとしてSARS-CoV-2と同様に1本鎖RNAウイルスである弱毒化風疹ウイルス(武田薬品工業)を用いた。コピー数およびPFUを調整し、表面素材への滴下およびエアロゾル中への噴霧を行った。

### 病原体モデル粒子の検出

検出法はOne Step RT-qPCR法を用いた。Viral RNA mini Kit (QIAGEN)を用いて検体からRNAを抽出した。病原体特異的プライマーとTaqmanプローブ(PrimerDesign)によりRealtime PCR装置(Thermo Fisher Scientific)を用いて検出した。

### 表面素材上からの病原体モデル粒子の検出

人が生活でよく触れる素材であるステンレスとポリエステル板上に、SARS-CoV-2部分RNAを既知のコピー数( $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10$ , 0)含む5 μlのNuclease Free Waterを滴下した(図1)。5分後に小児用綿棒を用いて滴下部を擦過した。Nuclease Free Water 200 μlを含む1.5 mlチューブに綿棒を入れ、ボルテックス後140 μlを吸引し、560 μlのAVL buffer (QIAGEN)と混和して4°Cで保管した。同様に弱毒化風疹ウイルスを用いて素材表面上から検体を回収した。

### 病原体エアロゾルモデル

SARS-CoV-2モデル粒子をネブライザー(OMRON)を用いて39 x 53 x 32 cm (66 L)のチャンバー内に10分間噴霧した。既知のコピー数( $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10$ , 0)RNAを含む1 mlの溶液が完全にチャンバー内に噴霧されたことを確認した。



図2. エアロゾル解析用チャンバー

### 病原体エアロゾルモデルの検出

#### (フィルター法)

エアロゾルをフィルターに吸着後、検出するフィルター法を検討した(図3)。直径47 mm, 孔径3 μmのゼラチンフィルター(SARTORIUS)をフィルターホルダー(FH-1G, アズワン)に設置しチャンバー内でエアポンプ(AP-6, Enklov)を用いて400 L/分で10分間吸引した。フィルターを50 mlチューブ(Falcon)に移し、AVL buffer 560 μl+Nucleic Free Water 140 μlを添加後37°C15分で融解した。Viral RNA mini Kit (QIAGEN)を用いてRNA抽出を行った。

#### (電気集塵法)

エアロゾルを静電気的に収集する電気集塵法による検出を検討した。電気集塵機(AMANO, 詳細非公開)を用いバイアル瓶中に集塵し、検体とした。

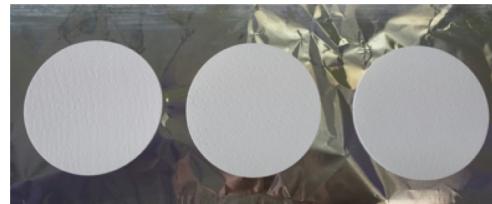


図3. ゼラチンフィルター

### フィールドワーク

下記の2ヶ所の施設において同意を得た上でフィールドワークを行った。

A病院：COVID-19患者が院内で発生し、医療スタッフにも複数の感染者が出た病院。患者が使用した人工呼吸器のマスク、チューブ(消毒後)を表面素材とした。

B施設：不特定多数の来訪者が訪れるビル。エレベーターのスイッチを表面素材、廊下空間のエアロゾルを検体とした。

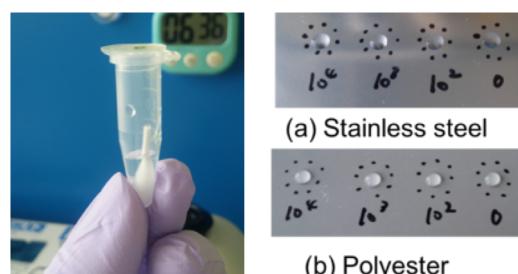


図1. 表面素材からの検出

# 結果と考察

## 病原体モデル粒子の検出

SARS-CoV-2部分RNA、弱毒化風疹ウイルス、弱毒化麻疹ウイルスをRT-qPCR法により特異的に検出できることを確認した(図4.)。なお、SARS-CoV-2部分RNAの検出限界は10 Copy/反応だった。

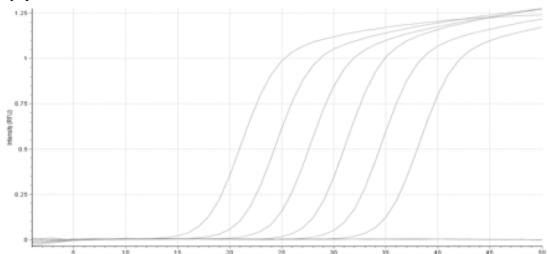


図 4. RT-qPCR結果

## 表面素材上からの病原体モデル粒子の検出

綿棒を用いた擦過法により、表面素材上から病原体モデル粒子を検出することができた。SARS-CoV-2部分RNAの表面素材上からの検出限界は100 コピー/ヶ所だった。弱毒化風疹ウイルスの検出限界は2 PFU/ヶ所だった。

## 病原体エアロゾルモデルの検出

フィルター法を用いて、エアロゾル中のSARS-CoV-2部分RNAを検出することができた。検出限界は152 粒子/Lだった。同様に電気集塵法を用いてSARS-CoV-2モデル粒子を検出することができた(詳細非公表)。その際に、コロナ放電によるモデルRNAの分解は確認されなかった。

## フィールドワーク

実際に院内でCOVID-19患者が確認され、医療スタッフの感染も確認されたA病院にて、患者が使用した人工呼吸器のマスク、チューブ表面を擦過法にて解析した(図5)。その結果、SARS-CoV-2は検出されなかった(検出限界以下)。その後、院内で同じ人工呼吸器を使用した患者に感染者は確認されなかった。また医療スタッフに唾液PCR検査を行い、新たな感染者は確認されなかった。



図 5. A病院でのフィールドワーク

不特定多数の来訪者が訪れるB施設にて、エレベータスイッチの擦過と、廊下空間のエアロゾル解析を実施した(図6)。いずれの検体からもSARS-CoV-2は検出されなかった。



図 6. B施設でのフィールドワーク

## 展望

本研究により環境(表面、エアロゾル)からSARS-CoV-2を検出できる可能性が示唆された。環境DNA解析を用いた新たな感染症対策への発展が期待される。

## 謝辞

本研究は2020年3月10日～4月17日まで実施されたREADYFORクラウドファンディングにより得られた研究費を用いて実施した。

ご支援をいただきました方々に心からの御礼を申し上げます。

### ▼法人30万円

itomakiweb-corp/itomakiweb/

Let's enjoy Learning us

南福岡自動車学校

### ▼個人5万円

M.Iwai

DAIBOUCHOU

平川貴康

山中隆

### ▼個人3万円

原田未来

曾根原滋

井上隆智

平尾譲二

折田純久

新谷啓行

曾根原正晃

石部雄紀

Akihiko Adachi

大村範幸

丹羽佑輔

Mikita Fuchita

横山理佳

105名の方から計1,972,000円のご支援をいただきました。心からの御礼を申し上げます。今後も本研究を更に発展させると共に、早期の実用化に向けて進んでまいります。進捗はゲノムクリニックHP([www.genome-clinic.co.jp](http://www.genome-clinic.co.jp))にて公開いたします。引き続きどうぞよろしくお願ひいたします。

Names and Address of the Authors:

Dr. Hiroki Sonehara, M.D.

Yoichi Aso

Genome Clinic

2-5-1, Chuou, Chuou-ku, Chiba-shi, Chiba, Japan