

2020年4月

**キーワードまたはフレーズ:**

ゼラチンフィルター、MD8エアポート、MD8エアスキャン、ウイルスサンプリング、エアモニタリング、収集効率、ヒト病原性ウイルスの検出、水溶性、少量サンプル、サンプル調製、RNA抽出、RT-qPCR

# ゼラチンフィルターによる空中浮遊ヒト病原性ウイルスのサンプリングとPCRによる検出

Claudia Scherwing<sup>1</sup>、Dr. Diana Patzelt<sup>1</sup>

1.Product Development Lab Essentials Application, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Germany

\*連絡先

電子メール: [claudia.scherwing@sartorius-stedim.com](mailto:claudia.scherwing@sartorius-stedim.com)

## 1. はじめに

感染症の発生は世界的に重要な公衆衛生問題です。世界経済および医療システムに広範囲の課題と脅威をもたらします。ウイルス感染は治療法がない場合特に脅威となるため、感染源と感染経路、またこのような要因が疾患の拡大にどう寄与するかを理解することで、効果的な予防と規制措置の導入を促すことができます。

現在、新型コロナウイルス感染症のパンデミックは、経時的および空間的なヒト病原性ウイルスの感染と伝染について洞察することの重要性を証明しています。

飛沫の吸入に加え、感染者との濃厚接触または汚染した面との接触、ウイルスのエアロゾル感染などを考慮する必要があります<sup>1,4,5,8,9-11</sup>。

詳細: [www.sartorius.com](http://www.sartorius.com)

現在、ウイルスを含有するエアロゾルのサンプリングが困難であることと、低濃度では定量化が困難であることから、エアロゾルを含む空中浮遊 SARS-CoV-2 の特徴、その濃度パターン、空気感染時の挙動に関する情報はほとんどありません。このようにウイルスへの理解が不足しているため、新型コロナウイルス感染症の効果的なリスク評価、予防、制御には限界があります<sup>8</sup>。

しかし、この点、すなわちウイルスの感染経路としての空気的重要性に焦点を当てた研究はすでに数件報告されています<sup>1,7,8</sup>。

これらの研究結果は、種によって差はあるものの、空中浮遊ウイルスに一定の安定性があることを示しており、考えられる感染源を検出し、感染経路を特定するため、空気モニタリングの重要性を強調しています<sup>1</sup>。

さらに、ノロウイルスの局所的パンデミックが発生したクルーズ船で行った隔離措置や清掃、浄化処置などの有効性に注意する必要があります<sup>8</sup>。

Van Doremalen (2020) は、病原性ウイルスは環境中で長時間存在し、エアロゾルとして数時間存続すると指摘しました。ウイルスゲノムの存続は、放出後 24 時間以上検出可能でした<sup>9,11</sup>。

病原性ウイルスが長い距離を空中浮遊する可能性もあります<sup>3</sup>。したがって、空気サンプルの定量的なウイルス検出のさまざまな方法を開発し、改善することは重要です<sup>4</sup>。

現在、空中浮遊ウイルスを定期的にモニターする公的な規制はありませんが、この問題に着目し、アウトブレイク発生時にエアモニタリングを行う必要性を強く支持する科学者もいます<sup>1</sup>。

図1：MD8 エアスキャンおよびポータブル型 MD8 エアポートとディスポーザブルゼラチンフィルターを用いたエアサンプリング装置の設置例。



## 2. 空中のウイルスサンプリング用ゼラチンフィルター

ゼラチンフィルター法は空中浮遊病原性微生物およびウイルスをモニタリングするための簡単で、非常に効率的、そして感度の高い方法です<sup>1,2,4,6,8</sup>。

水溶性ゼラチンフィルターがウイルスのサンプリングに特に適していることがすでに検証、証明されています<sup>1,4,6,7,8,10,11</sup>。

ゼラチンフィルターはウイルス回収効率に優れ、保持率は最高 99.76% に達します<sup>2,6</sup>。

さらに、ゼラチンフィルターを使用したエアサンプリング法では、 $10^2$  粒子 /  $m^3$  まで検出限界を下げられる可能性があります<sup>6</sup>。ゼラチンフィルターを使用することでサンプリング時間の延長（最大 8 時間）、容量の増大（2000L など）、流速の増大（最高 50L/分）、フィルター面積の増大（ $\varnothing 80mm$  の場合  $50\text{ cm}^2$ ）、溶解する溶媒量の減少（ $80 \sim 100\ \mu\text{L}/\text{cm}^2$  フィルター）など様々なオプションが可能になります<sup>4,6,8</sup>。

$\varnothing 47\text{ mm}$  など小さなサイズのフィルター（フィルター面積  $17\text{ cm}^2$ ）も利用できるため、溶媒量はさらに  $1.5 \sim 2.0\text{ mL}$  まで削減できます。

ゼラチンフィルターの高い適合性については、Jaschhof (1992a、1992b) および Friese が証明しており、彼らは個々のケースでゼラチンフィルターが他のウイルスサンプリング法よりも優れていることを報告しています。

また、特別な前処理や後処理なしでこの有効性が確認されています<sup>6</sup>。

ゼラチンフィルターは、あらかじめ組み立てられたレディトゥユースのユニットとして提供されます。

ポータブルで軽量のエアポート MD8 サンプラーと一緒に用いることで、ゼラチンフィルター法は非常に使いやすく、持ち運んでの利用に最適です<sup>4,6</sup>。

また、Jaschhof (1992b) は、サンプリング期間および  $30^\circ\text{C}$  で  $80 \sim 85\%$  までの相対湿度はウイルスの保持に悪影響を与えないことを示し、保持率は平均 99.76% になることを証明しました。

ヒト病原性ウイルスのサンプリング時に液体が必要ないため、分析検査スタッフへの感染リスクが軽減されることも大きな利点の一つです。

また、ゼラチンフィルターによるサンプリングの後、ウイルスの感染性が減弱することが報告されており、捕集サンプルが非感染性材料と考えることもできることが示されています<sup>1,4</sup>。

さらに、捕集後にゼラチンフィルターを保存したり<sup>1</sup>、ゼラチンフィルターを溶解する前にラボに送ることができることも利点です。

### 3. PCR によるウイルス検出のためのゼラチンフィルターの処理

ゼラチンフィルターを脱イオン水または他の適切な緩衝液や溶媒に溶解後すぐに、次の処理や PCR での検出に用いることができます<sup>1,4,8,10,11</sup>。

特定のウイルスの存在を迅速で感度・特異性が高く、また信頼性の高い結果を得るために定量的リアルタイム PCR が用いられます<sup>1,2,4,8</sup>。

ゼラチンフィルター法と定量 PCR を組み合わせることで、扱いにくい RNA も検出可能です<sup>1,4,8,11</sup>。

ただし、RNA 抽出はサンプル調製において非常に重要な工程です。したがって、遺伝子材料の損失を防ぐため、この工程では特に注意を払う必要があります<sup>2,4</sup>。

ゼラチンフィルターでのエアサンプリング後の PCR 分析が他の検出方法よりも高い回収率を示すことが報告されており、ゼラチンフィルターによるエアサンプリングと PCR の組み合わせは空中浮遊ウイルスの正確かつ実用的な検出法であるということが出来ます<sup>4,7</sup>。

### 4. ゼラチンフィルターを用いた標準的なエアサンプリング手順と、PCR による空中浮遊ウイルス検出のためのサンプル調製

- 1) ディスポーザブル Ø 80 mm ゼラチンフィルターを開封する (製品番号 17528--80----ACD)
- 2) ザルトリウス MD8 エアサンプラー (AirPort MD8 (製品番号 16757) または MD8 Airscan (製品番号 16746SHBCOM/16746SHTCOM)) に装着したフィルターホルダーにディスポーザブルゼラチンフィルターを載せる
- 3) この際フィルターに触れて汚染させないように注意すること
- 4) 例えば 20 分間、50 L/分などの条件でエアサンプリングを開始する (1000 L が標準的なサンプリング量)
- 5) サンプリング後、反時計回りに回して MD8 からディスポーザブルフィルターと一緒にフィルターホルダーを外す
- 6) フィルターホルダー上部は、反時計回りに回すことでベースから外れる
- 7) Ø 80 mm フィルターを 15 mL Falcon チューブに入れる。フィルターは壊れやすい (オプションの Ø 47 mm も使用可)
- 8) 使用時まで保存 / または解析用にラボまで発送
- 9) 4 ~ 5 mL の溶媒 (滅菌脱イオン水もしくは適当な緩衝液) を加える (Ø 47 mm フィルターの場合は 1.5 ~ 2 mL)
- 10) 遠心分離機で 3000 x g で短時間遠心する
- 11) サーモシェーカー (120 rpm) またはヒーティングブロックで 10 分間 37° C で加温、ゼラチンを溶解する
- 12) 必要に応じてウイルスを不活性化する
- 13) 取扱説明書に従って、RNA を抽出する
- 14) RNA を溶解する
- 15) 必要に応じて RNase 阻害剤を加える
- 16) 直ちに氷上に静置するか、- 80° C で保存する
- 17) サーマルサイクラーを用い、市販のキットで逆転写による cDNA 合成を行う
- 18) - 20° C で cDNA を保存する
- 19) PCR (qPCR など) を行う

## 5. 空中浮遊ヒト病原性ウイルス検出の 応用分野

清掃や浄化処置の有効性のモニタリング

病院の各種エリアにおけるウイルスエアロゾル感染のモニタリング：

- 患者エリア
- 医療スタッフエリア（特に更衣室）
- 隔離エリアに隣接する部屋
- 一般公開エリア
- 保管エリア
- 室内換気
- 患者用トイレ

公共輸送機関のモニタリング：

- 飛行機
- クルーズ船
- 電車
- 鉄道車内
- フェリーボート

人の多い公共エリアのモニタリング：

- 空港
- 鉄道駅

感染源、感染方法、またはホットスポットの特定とモニタリング：

- 家畜小屋
- 集会場

## 6. ウイルスサンプリングおよび PCR 検出 に用いるゼラチンフィルターの主な特長

- 高い捕集効率（最高 99.9% のウイルス粒子捕集率）
- 大量のエアサンプリングによる高い感度
- 30°C、80 ~ 85%RH までの環境条件で効率的な捕集率
- 少量の液体に可溶なため（最小 80 ~ 100  $\mu$  L/cm<sup>2</sup> フィルター）、高い感度を実現
- 高い核酸回収率
- サンプリング時に液体不要
- ヒト病原性ウイルスの感染力低下
- サンプリング後に保存可能
- サンプリング後に乾燥状態で発送可能、回収率低下の回避
- 溶解後のゼラチンフィルターは PCR 等で更なる分析が可能
- 際立った使いやすさ



図 2：個別包装のディスプレイザブルゼラチンフィルター。

## 参考文献

1. Azhar EI, Hashem AM, El-Kafrawy SA, Sohrab SS, Aburizaiza AS, Farraj SA, Hassan AM, Al-Saeed MS, Jamjoom GA, Madani TA. 2014. Detection of the Middle East respiratory syndrome coronavirus genome in an air sample originating from a camel barn owned by an infected patient. *mBio* 5(4).
2. Burton NC, Grinshpun SA, Reponen T. 2007. Physical collection efficiency of filter materials for bacteria and viruses. *Ann Occup Hyg*.51(2):143-51.
3. Dee S, Otake S, Oliveira S, & Deen J. 2009. Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary research*, 40(4), 39.
4. Friese A. 2010. Aerogene Ausbreitung von Viren: Eine Studie verschiedener Sammelgeräte und Quantifizierungsmethoden zur Virusisolierung aus der Luft. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.) am Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig.
5. Ijaz MK, Karim YG, Sattar SA, Johnson-Lussenburg CM. 1987. Development of methods to study the survival of airborne viruses. Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, University of Ottawa.
6. Jaschhof H. 1992a. Sampling virus aerosols—comparative studies on the efficiency of gelatin membrane filters, impaction collectors and impingers. *Bio Tec*; 4 (English translation).
7. Jaschhof H. 1992b. Sampling virus aerosols using the gelatin membrane filter—collection using a membrane filter at a high sampling rate. *Bio Tec*; 6 (English translation).
8. Liu Y, Ning Z, Chen Y, et al. 2020. Aerodynamic characteristics and RNA concentration of SARS-CoV-2 aerosol in Wuhan hospitals during COVID-19 outbreak. *bioRxiv*.
9. van Doremalen N, Bushmaker T, Munster VJ. 2013. Stability of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) under different environmental conditions. *Euro Surveill*.18(38).
10. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, et al. 2020. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med*.
11. Walenda T. 2007. Transmission von Viren über raumlufttechnische Anlagen. Diplomarbeit am Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum in Bad Oeynhausen.

## Sales and Service Contacts

For further contacts, visit  
[www.sartorius.com](http://www.sartorius.com)

### お問い合わせ先

ザルトリウス・ジャパン株式会社

#### 東京本社

〒140-0001

東京都品川区北品川 1-8-11

Daiwa 品川 North ビル 4 階

Phone: 03 6478 5200 Fax: 03 6478 5494

Email: [hp.info@sartorius.com](mailto:hp.info@sartorius.com)

#### 名古屋営業所

〒461-0002

名古屋市東区代官町 35-16

Phone: 03 6478 5204 Fax: 03 6478 5497

#### 大阪営業所

〒532-0003

大阪市淀川区宮原 4-3-39

Phone: 03 6478 5203 Fax: 03 6478 5496