

I . 総括研究報告

厚生労働行政推進調査事業費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制を構築するための研究」
総括研究報告書

研究代表者：吉田 弘 国立感染症研究所

研究分担者：原本英司 山梨大学
北島正章 北海道大学
田嶋 淳 国土交通省国土技術政策総合研究所
貞升健志 東京都健康安全研究センター
濱崎光宏 福岡県保健環境研究所
小澤広規 横浜市衛生研究所
喜多村晃一 国立感染症研究所

研究協力者：坂恭平 青森県環境保健センター
筒井理華 青森県健康福祉部
高橋雅輝 岩手県環境保健研究センター
藤森亜紀子 岩手県環境保健研究センター
植木洋 宮城県保健環境センター
渡部徹 山形大学
西山正晃 山形大学
北川和寛 福島県衛生研究所
小川貴史 千葉県衛生研究所
藤沼裕希 千葉県衛生研究所
長島真美 東京都健康安全研究センター
河上麻美代 東京都健康安全研究センター
林真輝 東京都健康安全研究センター
熊谷遼太 東京都健康安全研究センター
吉田勲 東京都健康安全研究センター
糟谷文 東京都健康安全研究センター
藤原卓士 東京都健康安全研究センター
千葉隆司 東京都健康安全研究センター
檜原 慎久 東京都下水道局
森田健史 東京都下水道局
山田欣司 東京都下水道局
小川泰卓 埼玉県衛生研究所
宮下広大 埼玉県衛生研究所
大石和徳 富山県衛生研究所
谷英樹 富山県衛生研究所
板持雅恵 富山県衛生研究所
佐賀由美子 富山県衛生研究所
稲崎倫子 富山県衛生研究所
畷田嵩久 富山県衛生研究所
五十嵐笑子 富山県衛生研究所
葛口剛 岐阜県保健環境研究所
伊藤雅 愛知県衛生研究所
濱島洋介 和歌山県環境衛生研究センター
望月靖 岡山県環境保健センター
木田浩司 岡山県環境保健センター
芦塚由紀 福岡県保健環境研究所

研究要旨 下水中の新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）監視体制を構築するためポリオ環境水サーベイランスを活用した調査体制について研究を行った。基盤的な検出手法の研究を行いつつ、暫定マニュアルの作成、ウェブ研修を行い、全国12か所の地方衛生研究所への水平展開を行った。更に調査を通じ実装化に向け技術面、運用面の課題について整理を行った。その結果、以下の知見が得られた。

1. 下水中のSARS-CoV-2定点を全国に構築することにより、地域毎の感染者の有無を定性的に示すことができたが感染者推計には更なる研究が必要である。

2. 採水頻度を増やした調査事例では感染者数の変動の早期探知への適用可能性を示したが検査キャパシティが課題である。

3. 技術面では下水中のコロナウイルス量は少ないため、検出法の改良は今後も必要である。また下水固有の特性（水量等）を考慮した処理区内のウイルス量の推計モデルの開発が望まれ、感染者数と連動したデータを蓄積する必要がある。

4. 運用面では関係部局間の情報共有範囲と共有方法、検出時の行政対応の在り方、データの公表時のリスクコミュニケーション、民間検査の活用と行政検査機関の役割（精度管理等）について更に検討する必要がある。

下水中の新型コロナウイルス調査を継続しつつ上記課題の解決を図るとともに、下水の特性により測定結果に影響を受けにくいハイリスク施設、エリア等へ本調査の適用を検討することも必要である。

A. 研究目的

新型コロナウイルス感染症患者のうち一定割合で起因ウイルスである SARS-CoV-2 が腸管で増殖し数週間糞便に排出されることが報告されている。また不顕性感染例も多く報告されており、米国、フランスなどでは下水を検査材料として用い、SARS-CoV-2 ゲノム検出により地域の感染患者数の推計などの応用研究が報告されている。

他方、わが国では下水網を活用したポリオ環境水サーベイランスを、全国 20 カ所（下水利用人口のべ 660 万人）にて実施中である。本調査はポリオウイルスが経口感染し腸管で増殖後、糞便中に排出されることを利用した (Yoshida H., Lancet, 356:1461-1463,2000) サーベイランス手法である。また、ポリオウイルス感染の多くが不顕性であり、効率よくウイルスを検出するため、不活化ポリオワクチン導入後 2013 年度より全国の地方衛生研究所と協力してウイルス監視が行われてきた (Nakamura.T., Appl Environ Microbiol,81:1859-1864,2015)。

このように SARS-CoV-2、ポリオウイルスとも不顕性感染が多いため、集団レベルの感染者の把握手法は健康リスク管理の観点から公衆衛生上の意義がある。

わが国で継続している環境水サーベイランスはポリオウイルス検出を目的としているため、SARS-CoV-2 検出系と異なる点も多いが、ポリオウイルス以外のウイルス検出、手法の研究等国内外で実施してきた実績がある (Tao Z., Sci.Rep. doi:10.1038/srep31474,2016)。さらに、地方衛生研究所からなる環境水サーベイランスネットワークは世界でも類を見ないシステムであり、この検査インフラを活用した SARS-CoV-2 検出研究により患者サーベイランスとの詳細な分析が可能になる。本研究では、以下を実施した。

1. 水環境中の SARS-CoV-2 検出に関する基盤的技術の比較検討
2. 確立した手法の水平展開を図るための検査マニュアルの作成
3. ポリオウイルス監視と並行して実施可能な SARS-CoV-2 検出方法の確立
4. 下水を用いた SARS-CoV-2 調査の運営面の課題の整理

B. 研究方法

1. 水環境中の SARS-CoV-2 検出に関する基盤的技術の比較検討

ア. 環境水中の新型コロナウイルス検出法開発(分担研究者 原本、北島)

1) 下水試料の採取

COVID-19 軽症者等宿泊療養施設において、浄化槽の流入水を計 3 回採取した。

2.) 熱不活化処理

ウイルス不活化を目的とした加熱処理の有無が SARS-CoV-2 RNA の検出濃度に及ぼす影響を評価するため、下水試料を入れた容器を 60°C のウォーターバスに 90 分間浸した。

3) ウイルス濃縮

ウイルス濃縮法として、PEG 沈殿法、陰電荷膜破砕型濃縮 (EMV) 法、陰電荷膜吸着-直接 RNA 抽出法および限外ろ過 (Ultra filtration、UF) 膜法の 4 種類を用いた。PEG 沈殿法では、IDEXX Laboratories のプロトコルを採用した。下水試料 40mL を遠心後、PEG6000 または PEG8000 を添加して混合し、遠心後に上清を除去した。再度遠心し、上清を除去して滅菌水で懸濁させてウイルス濃縮液を得た。EMV 法では、MgCl₂ を添加した下水試料を陰電荷膜でろ過後、膜をフィルターホルダーから剥がし、PET 溶液 (Na₄P₂O₇ · 10H₂O 、 C₁₀H₁₃N₂O₈Na₃ · 3H₂O、Tween 80) と攪拌子を入れ攪拌し膜を破砕した。溶液の全量を新しい遠沈管に移し入れた後、元の遠沈管に PET 溶液を添加して同様の操作を繰り返す。ウイルス濃縮液を得た。2 次濃縮法を組み合わせた場合の検出効率も評価するため、必要に応じて DISMIC (孔径 0.45μm) で濃縮液をろ過し、UF 膜ユニット (50kDa) を用いた遠心によってウイルス濃縮液をさらに減容した。陰電荷膜吸着-直接 RNA 抽出法では、MgCl₂ を添加した下水試料 50mL を陰電荷膜でろ過した。UF 膜法では、下水試料を遠心後、上清 12mL を Amicon Ultra-15 を用いた濃縮操作に供した。

4. ウイルス RNA 抽出

ウイルス RNA 抽出法として、6 種類のキットを使用した。PEG 沈殿法、EMV 法および UF 膜法で得られたウイルス濃縮液に対しては、5 種類を使用した。陰電荷膜吸着

-直接 RNA 抽出法に対しては、RNeasy PowerWater Kit (QIAGEN) を使用した。

5. 逆転写リアルタイム PCR (RT-qPCR)

ウイルス RNA 抽出液からの cDNA 合成には High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用した。qPCR 反応液は Probe qPCR mix, with UNG (タカラバイオ) を用いて調整し、qPCR 装置には Thermal Cycler Dice Real Time System III (タカラバイオ) を使用した。SARS-CoV-2 検出用の qPCR 系として CDC-N1、CDC-N2、N_Sarbeco および NIID_2019-nCoV_N (NIID) の 4 種類を使用した。また、プロセスコントロールとして、ヒト糞便および下水中に高濃度で存在していることが知られているトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) を対象とし、RT-qPCR を用いて PMMoV RNA を定量した。

イ. ポリオ環境水調査の新型コロナウイルス監視への応用 (分担研究者 喜多村)

1) 下水中新型コロナウイルス回収方法の検討

本研究では、提供を受けた 32 の下水検体から、陰電荷膜法、PEG 沈殿法、限外ろ過膜法、solid 画分沈殿法の 4 種類のウイルス回収法を行い比較した。

2) 新型コロナウイルス PCR 検出の検討

4 種類の手法で回収したウイルス RNA それぞれに対して、NIID_N2 法及び CDC_N1N2 法の 2 種類による PCR 検出を検討した。また、ウイルス RNA が回収されていることの確認として、internal control にトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) の PCR 検出も併せて行った。

3) 下水中新型コロナウイルス配列解析

PCR 検出で陽性となった検体に対して RT-PCR でより広いウイルスゲノム領域 (ORF1a 及びスパイクタンパク質領域) を増幅し、配列解析により新型コロナウイルスであることの確認を行った。

2. 確立した手法の水平展開を図るための検査マニュアルの作成と研修の実施（研究協力者：北川、坂、高橋、小澤、喜多村、濱崎）

原本、北島、喜多村分担研究者の研究結果をもとに、ポリオウイルス検査フローへ下水沈殿物を用いた SARS-CoV-2 検出手法、プロセスコントロールとしてトウガラシ微斑ウイルス検出手法を加えたマニュアルを作成するため、令和 2 年 8 月から 9 月にかけて研究協力者の施設で試薬、異なる装置を用いて検出系の比較、条件検討を行った。次に厚生労働科学研究班（レファレンスネットワーク班）で実施するエンテロウイルスレファレンスの活動と連携の上、研究協力者を中心とし水平展開を目的としたウェブ研修を企画した。

3. ポリオウイルス監視と並行して実施可能な SARS-CoV-2 検出方法の確立

ア. 東京都における下水試料中からの SARS-CoV-2 調査における検査手法の検討（分担研究者貞升）

1) 材料と方法

流入水は 6 月 30 日～8 月 26 日に計 9 回（500mL を 2 本）採取し、放流水は 7 月 8 日～8 月 19 日に計 4 回（500mL を 2 本採取）採取した。採取場所は、下水処理場 S と、下水処理場 O である。各下水処理場では流入水および放流水を採取した。

2) 下水からの核酸抽出法

下水検体は、陰電荷膜吸着法と Solid 沈殿法の 2 つの手法で濃縮した。すなわち、各検体 400 mL を遠心後、上清分画（S）と沈渣に分け S 分画については、プレフィルター後、陰電荷膜吸着法で濃縮した。3mL のうち 1/3 量を QIAamp viral RNA mini kit（QIAGEN）を用いて RNA 抽出した。遠心処理で得られた沈渣 2 mL については C-Solid 分画とし、そのうちの 800 μ L を ISOIL for RNA（ニッポンジーン）を用い

て RNA 抽出した。

3) SARS-CoV-2 の検出

S 分画および C-Solid 分画それぞれから抽出した RNA を材料としリアルタイム PCR を実施した。AccuPlex™ SARS-CoV-2 Reference Material Kit を定量値の調整で使用した。本検査の検出限界は L 当たり換算すると 500 コピーであった。

全ての PCR 分析では 2 回陽性を陽性と判定した。陽性の基準として、検出感度未満でも明確な陽性曲線の出現があった場合には陽性と判断した。下水の抽出コントロールとしてトウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）RNA をターゲットとし、リアルタイム PCR 法により定量した。

4) SARS-CoV-2 の分離

BSL3 実験室内で、S 分画および C-Solid 分画を VeroE6/TMPRSS2 細胞に接種、1 週間培養し、細胞変性効果（CPE）観察を行い、培養液 30 μ L を新しい細胞に接種した。この過程を 3 週間実施した後、上清を SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit（TaKaRa）を使用して、ウイルスの検出を試みた。

イ. 検出頻度を増やした下水中新型コロナウイルス検出報告（分担研究者 小澤、吉田）

1) 調査地点

2020 年 10 月から 2021 年 2 月までの期間、東日本の自治体の 5 か所の下水処理場の協力を得て調査を実施した。各下水処理場を定点とし、流入下水を週 1 回採水している。下水利用人口は延べ 200～300 万人である。

2) 検出方法

北里環境科学センターに以下の方法で業務委託した。下水流入水を遠心分離を行い上清と沈殿物に分けて回収。陰電荷膜吸着法にて 100 倍濃縮液を得て RNA を精製した。沈殿物全量から RNeasy PowerSoil Total RNA Kit を用いて、100 μ L の RNA 溶

液を得た。リアルタイムPCRはSARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (Takara bio) を用いて SARS-CoV-2 の定量を行った。下水濃縮、抽出操作を担保するため、プロセスコントロールとしてトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) 検出を行った。

3) SARS-CoV-2 感染者報告数と下水中 SARS-CoV-2 濃度の比較

各自治体・行政単位毎に発表される SARS-CoV-2 新規感染者数と下水中の SARS-CoV-2 の濃度変化との関係を解析した。下水処理場が関係する行政単位の人口が異なるため、1週間あたりの感染者数を10万人あたりに換算した。採水日の属する週の10万人あたりの感染者数と下水中 SARS-CoV-2 濃度を用いて比較した。

ウ. 終末処理場の流入水沈査からの RNA 抽出方法の検討 (分担研究者 濱崎)

1) 検体

検体は、九州北部にある終末処理場 (A、B) から流入水を2020年7月から2021年1月まで毎月2L入手した。A処理区内の流域人口、下水道普及率は約80%以上、B処理区内は30%以下である。流域人口は、Aが約20万人、Bが約17万人でありほぼ同程度である。

2) 検体処理及び上清の濃縮

流入水200mLを1,500g×60分遠心分離を行い沈殿物はそのままRNA抽出に用いた。上清は、塩化マグネシウムを添加、pH3.5に調整した。上清は濾過により陰電荷膜へウイルスを吸着後、陰電荷膜を破碎し3%牛肉エキスでウイルスを溶出した。16,000g×30分遠心分離を行い破碎したフィルターを除去し、PVDFフィルターで濾過し50倍濃縮検体とした。

3) 濃縮検体からの RNA 抽出

濃縮検体からのRNA抽出は、QIAamp Ultra Sens Virus Kit (QIAGEN) を用い、RNA抽出を行った。

4) 沈殿物からの RNA 抽出

沈殿物からのRNA抽出方法を比較するため4種類のRNA抽出キットを用いた。そのうちRNeasy® Power Soil Total RNA kitは最大検体処理量が2gのため、終末処理場の流入水200mlの沈殿物を用い、付属の説明書に従ってRNA抽出を行った。またStool Total RNA Purification kitは、最大検体処理量が0.2gのため、終末処理場の流入水50ml分の沈殿物を用い、付属の説明書に従ってRNA抽出を行った。QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN社) 及びQIAamp Ultra Sens Virus kitは液体からのRNA抽出キットのため、200mlの終末処理場の流入水を遠心分離し、沈殿物を2mlのPBSに懸濁した。その懸濁液を付属の説明書に従いQIAamp Viral RNA Mini kitは140μL、QIAamp Ultra Sens Virus kitは1mlを用いてRNA抽出を行った。

5) トウガラシ微斑ウイルスのリアルタイムPCR

内部標準物質及びRNA抽出キットの比較する際の指標として、トウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) のコピー数を測定した。抽出したRNAについて、Prime Script RT Master Mix (TaKaRa) を用い逆転写反応を行った。Haramotoらのプライマー及びプローブ、Probe qPCR Mix with UNG (TaKaRa) を用いPCR反応を行った。1検体につき2回測定し、2回とも遺伝子の増幅が認められたものを陽性とした。陽性コントロールは、対象となる175bpの合成DNAを用いた。陽性コントロールを10倍段階希釈し、作成した検量線からウイルスのコピー数を算出した。

6) SARS-CoV-2 のリアルタイム PCR による検出

SARS-CoV-2 の検出は、SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR kit (TaKaRa) を用いABI 7500 Fast サーマルサイクラーにてRT-qPCRを行った(45サイクル)。1検体につき2回測定し、2回とも遺伝子の増幅が認められたものを陽性とした。付属

の陽性コントロールを 10 倍段階希釈し、作成した検量線からウイルスのコピー数を算出した。

7) SARS-CoV-2 の感染者数

SARS-CoV-2 の感染者数は、該当する自治体のホームページを参照した。

エ. 地方衛生研究所による試行調査（研究協力者：青森県、岩手県、福島県、千葉県、埼玉県、横浜市、富山県、岐阜県、愛知県、和歌山県、岡山県、福岡県）

「2. 確立した手法の水平展開を図るための検査マニュアルの作成と研修の実施」で作成したマニュアルを参照に、12 自治体の 23 処理場で採水を実施し、新型コロナウイルス調査を行った。（以下 A～M 自治体、①～⑭箇所とする）

オ. 研究班会議の開催

下水を用いた SARS-CoV-2 調査の技術面、運営面の課題を検討するため、研究班会議（対面＋ウェブ）を 3 回（令和 2 年 9 月 28 日、12 月 4 日、令和 3 年 2 月 26 日）実施した。

4. 下水を用いた SARS-CoV-2 調査の運営面の課題の整理

ア. 下水からの新型コロナウイルス検出作業における感染リスク評価（研究協力者 渡部）

1) リスク評価モデルに関する文献調査
水や食品を介して病原微生物に感染するリスクを評価する際は、しばしば用量反応モデルが用いられる。これまでに多くの病原細菌や病原ウイルスに対する用量反応モデルが開発されてきた。新型コロナウイルスのリスク評価に使用できる新規のモデル、あるいは、それに援用できる既存のモデルについて、文献調査を行った。

2) リスク評価

1 の調査で得られた用量反応モデルを用いて、下水サンプルから新型コロナウイルス

を検出する作業における感染リスクを評価した。

この評価のために、実際の都市下水処理場から流入下水サンプルを継続的に採取し、実験室に輸送した後に冷凍保存を行った。そのサンプルを解凍し、PEG 沈で濃縮処理をした後、N1, N2 遺伝子をそれぞれ CDC および NIID が推奨する検出系を用いて、リアルタイム PCR 法により定量した。その際、プロセスコントロールとしてファージ Φ6 を用いた。

イ. 下水中の新型コロナウイルス調査運用上の課題について（分担研究者 田嶋、吉田）

下水中のウイルス調査時に考慮すべき技術的な要因を海外の調査事例より収集、国内で実施上の課題、感染者数推定時の課題について以下の通り整理することとした。

- 1) 海外の下水中の新型コロナウイルス調査情報の収集
- 2) 地方衛生研究所を通じた下水道部局のヒアリング
- 3) 下水中の新型コロナウイルス量と感染者数の比較

C. 研究結果

1. 水環境中の SARS-CoV-2 検出に関する基盤的技術の比較検討

ア. 環境水中の新型コロナウイルス検出法開発（分担研究者 原本、北島）

1) 熱不活化処理の有無による SARS-CoV-2 RNA 検出濃度の比較

4 種類の SARS-CoV-2 検出用の qPCR 系はいずれも同等の検出結果を示したことから、以降の節においては代表して NIID 系による結果を示す。

熱不活化処理の有無による SARS-CoV-2 RNA と PMMoV RNA の検出濃度を比較した結果、濃縮操作前の遠心の有無も含めた 6 種類の条件による SARS-CoV-2 RNA の検出濃度を比較した結果、熱不活化処理を行った場合の濃度は、熱不活化処理を行わ

ない場合の濃度よりも有意に低い値を示した。一方、PMMoV RNA の検出濃度には、熱不活化処理の有無による有意差は認められなかった。

2.) ウイルス濃縮法による SARS-CoV-2 RNA 検出濃度の比較

4 種類のウイルス濃縮法に対し、膜の孔径等の濃縮操作条件を変え SARS-CoV-2 RNA の検出した結果、SARS-CoV-2 RNA の検出濃度は、使用する PEG および試料（全量および上清）の種類に関わらず、最も高い値を示した。EMV 法と UF 膜法、さらに、両者の組み合わせによる手法も同程度の高い検出濃度を示した。一方、陰電荷膜吸着-直接 RNA 抽出法による SARS-CoV-2 RNA 検出濃度は、他の濃縮法と比較して 2 log 以上低い値であった。なお、PEG 沈殿法において、PEG と NaCl の終濃度を変えても検出濃度に大きな差は見られなかった。

3) ウイルス RNA 抽出法による SARS-CoV-2 RNA 検出濃度の比較

ウイルス濃縮液に対し、5 種類のウイルス RNA 抽出キットを用いた場合の SARS-CoV-2 RNA の検出濃度の測定の結果、EMV 法によるウイルス濃縮液に対しては、QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いた場合に最も高い SARS-CoV-2 RNA 検出濃度が得られた。PEG 沈殿法 (PET8000 使用) による濃縮液に対しては、全量および上清のいずれを用いた場合においても、QIAamp Viral RNA Mini Kit と Quick-DNA/RNA Viral Kit により同程度の高い SARS-CoV-2 RNA 検出濃度が得られた。一方、Water DNA/RNA Magnetic Bead Kit と RNeasy Power Microbiome Kit を用いた場合の SARS-CoV-2 RNA 検出濃度は 0.5 log 程度低く、QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit では非検出となる場合もあった。

4) プロセスコントロールとしての PMMoV の有効性の評価

図 1 に示すように、SARS-CoV-2 RNA と PMMoV RNA の検出濃度を比較した結果、

両者の間には有意な正の相関が認められた。

イ. ポリオ環境水調査の新型コロナウイルス監視への応用 (分担研究者 喜多村)

1) 下水中新型コロナウイルス回収方法の検討

ウイルス回収法のうち、solid 画分沈殿法において安定して SARS-CoV-2 RNA が検出された。その他 3 つの回収法では、ほとんどが不検出であった。指標ウイルスである PMMoV では、テストした全ての回収法から十分な量のウイルス RNA が検出された。また、下水採水地域あるいは採取日の比較から、検出された SARS-CoV-2 RNA 量と感染者数に一定の相関が認められた。

2) 新型コロナウイルス PCR 検出の検討

2 種類のプライマー/プローブセットの比較では、NIID_N2 より CDC_N1N2 の方が高い検出感度を示した。

3) 下水中新型コロナウイルス配列解析

PCR 検査で高いウイルスコピー数を示した検体において配列解析も可能である傾向が見られ、今回解析した検体からは 1 塩基を除いて変異は見られなかった。

2. 確立した手法の水平展開を図るための検査マニュアルの作成と研修の実施 (研究協力者 北川、坂、高橋、小澤、喜多村、濱崎)

研究班の分担研究者及び研究協力者が連携し令和 2 年 9 月 2 日、9 月 3 日、9 月 16 日にマニュアルドラフティングのため、地方衛生研究所向けトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) 検出系の打ち合わせ (Web) (参加衛研: 横浜、青森、岩手、福島、福岡、感染研) を行った。

下水中の新型コロナウイルス検出マニュアルを作成し、第 1 回班会議 (令和 2 年 9 月 28 日) 時に研究協力者へ配布した。検出手法の水平展開を図るためのウェブ研修を 10 月 15 日から 10 月 30 日まで、下記のスケジュールで 4 回開催した。マニュアルと

ウェブ研修資料を別添 資料 1、資料 2 に示す。

10月15日 PMMoV 検出説明会 1 回目 (Web)
和歌山、千葉、埼玉、富山

10月22日 RNA 抽出説明会 1 回目 (Web)
東京、岡山、千葉、埼玉、富山、青森

10月27日 PMMoV 検出説明会 2 回目 (Web)
東京、岡山、愛知、岐阜

10月30日 RNA 抽出説明会説明会 2 回目 (Web)
和歌山、愛知、岐阜、福島

3. ポリオウイルス監視と並行して実施可能な SARS-CoV-2 検出方法の確立

ア. 東京都における下水試料中からの SARS-CoV-2 調査における検査手法の検討 (分担研究者 貞升)

1) 下水からの SARS-CoV-2 検出

下水処理場 S では 7/22-8/26 の流入下水 7 サンプルの C-Solid 検体から SARS-CoV-2 遺伝子が検出された。下水処理場 O では 7/22-7/29 の 2 サンプルの C-Solid 分画から SARS-CoV-2 遺伝子が検出されたが、S 分画からは検出されなかった。また、放流水からは全ての S 分画および Solid 分画から SARS-CoV-2 遺伝子は検出されなかった。

PMMoV RNA については、流入水の C-Solid では平均 10^6 コピー/L で、S 分画では 10^7 コピー/L と S 分画の方が定量値が高い傾向にあった。一方、放流水の C-Solid 分画では $10^4 \sim 10^5$ コピー/L、S 分画では $10^6 \sim 10^7$ コピー/L と、流入水よりは低く、同様に S 分画の方が多い傾向があった。

2) 下水からの SARS-CoV-2 の分離

全ての沈渣および上清全てから SARS-CoV-2 特有の CPE は認められず、リアルタイム PCR でも確認したが、SARS-CoV-2 は分離されなかった。

イ. 検出頻度を増やした下水中新型コロナウイルス検出報告 (分担研究者 小澤、吉田)

1) SARS-CoV-2 の検出

2020年10月から2021年2月までの間、5か所の下水処理場を定点とし、SARS-CoV-2 の検出を試みたところ、調査期間中の全定点、全採水日で SARS-CoV-2 が検出された。

調査期間内の下水濃縮物の最大値は 1.4×10^3 、最小値は 1.2×10^1 、平均値は 2.7×10^2 、中央値は 2.0×10^2 、沈殿物の最大値は 2.7×10^5 、最小値は 1.4×10^2 、平均値は 9.9×10^3 、中央値は 3.2×10^3 であった。

2) トウガラシ微斑ウイルスの検出

RNA 抽出のプロセスコントロールとして PMMoV の検出を試みたところ、調査期間中の全定点、全採水日で PMMoV が検出され、下水の処理から RNA 抽出までの工程に問題ないことが確認された。

3) SARS-CoV-2 感染者数と下水中 SARS-CoV-2 濃度の比較結果

各自治体・行政単位毎に発表される SARS-CoV-2 新規感染者数と下水中 SARS-CoV-2 濃度を 10 万人あたりに換算した結果を比較した。2020年10月から11月にイベント等の場における新技術の実証や 2021年1月に成人式等の人が集まるイベントが開催された。技術実証後の本調査エリアの感染者は増加し、下水中 SARS-CoV-2 濃度も上昇したが、全国的にも第3波と呼ばれる感染者が増加していった。成人式開催後は本調査エリアの感染者は減少傾向になり、下水中 SARS-CoV-2 濃度も減少傾向になった。

ウ. 終末処理場の流入水沈査からの RNA 抽出方法の検討 (分担研究者 濱崎)

1) RNA 抽出キットの比較

流入水の沈殿物について、4種類の RNA 抽出キットについて抽出効率を比較するため PMMoV のコピー数を測定した。PMMoV は毎月検出されており、QIAamp Viral RNA Mini kit が最も抽出効率が高かった。

2) 終末処理場の流入水から SARS-CoV-2 の

検出

抽出した RNA について、SARS-CoV-2 の検出を行った。SARS-CoV-2 は、終末処理場の流入水の沈殿物を RNeasy Power Soil Total RNA kit を用いて RNA 抽出したものからのみ検出された。

SARS-CoV-2 のリアルタイム PCR の検出限界値を 5 コピーと仮定した場合、それぞれの RNA 抽出キットの終末処理場の流入水 1L 当たりの検出限界値を求めた。終末処理場の流入水の沈殿物から SARS-CoV-2 を検出する場合、RNeasy Power Soil Total RNA kit が最も効率が良かった。

3) 検出された SARS-CoV-2 のコピー数と感染者数

下水中に検出された SARS-CoV-2 のコピー数と感染者数を比較した。2020 年 8 月は全国的な SARS-CoV-2 の流行が確認されており、A、B いずれの終末処理場の流入水の沈殿物からも SARS-CoV-2 が検出された。また、2020 年 12 月から 2021 年 1 月にかけての流行期では、A 終末処理場の流入水の沈殿物から SARS-CoV-2 が検出された。

エ. 地方衛生研究所による試行調査（研究協力者：青森県、岩手県、福島県、千葉県、埼玉県、横浜市、富山県、岐阜県、愛知県、和歌山県、岡山県、福岡県）

1) 取りまとめ結果

12 自治体の 23 処理場で採水を実施し、新型コロナウイルス調査を行った（以下 A～M 自治体、①～③箇所とする）結果、各地点における下水中の新型コロナウイルスの検出状況を別添 資料 3 「1.取りまとめの結果」に示す。

検出にはリアルタイム PCR 法を用いたが、各地方衛生研究所で実施する検査系に基づき検出限界値を基準に定性的な結果を示した。検出限界値は使用した下水試料量と RNA 抽出キットより算出。リアルタイム PCR の検出限界を 5GC/反応とし、各検出限界の 10 倍までの値については検出限

界値付近での検出として定性的な表記を行っている。

2) 処理区人口別の比較

23 の処理区の人口別に分けた検出結果の比較を資料 3 「2.処理区人口別の比較」に示す。その結果人口の少ない処理区は検出頻度が高い傾向が見られた。

3) 採水方法別の比較

ポリオ環境水調査のフローで用いる陰電荷膜濃縮物と沈殿物からの新型コロナウイルス検出結果の比較を資料 3 「3.濃縮物と沈殿物の比較」に示す。比較調査の結果、沈殿物の方が検出に適していると考えられたが一部陰電荷膜濃縮物から良好な検出が見られたため、今後も検討の必要性が認められた。

4) 方法面から見た比較

調査を行った地方衛生研究所毎に採水法（コンポジット、グラブ）、採水スケジュール、採水量、濃縮法、用いた試料、濃縮倍率、RNA 抽出法、検出法が異なるため資料 3 「4.方法面から見た比較」に整理した。研究開始当初、PEG による濃縮法は沈殿物による検出に比べ効率が悪い結果が得られたが、試行調査の結果、必ずしも沈殿物が高いとは限らないデータが得られたため、更に検討が必要と考えられる。

オ. 研究班会議の開催

分担研究者、研究協力者に加えオブザーバー（内閣官房、国土交通省下水道部、厚生労働省結核感染症課、感染研所長、感染症疫学センター長他）が参加し、以下の日時に開催した。分担研究者、研究協力者が研究の進捗状況を報告し、技術面、運営面などの課題も討議した。概要は別添 資料 4 に示した。

第 1 回目

日時：令和 2 年 9 月 28 日（14：00～16：00）

場所：TKP 新橋汐留ビジネスセンター カンファレンスルーム 304

参加人数：36名（オブザーバー8名、事務局3名含む）

第2回目

日時：令和2年12月4日（10：30～15：30）

場所：TKP 飯田橋ビジネスセンター カンファレンスルーム 3D

参加人数：37名（オブザーバー8名、事務局3名含む）

第3回目

日時：令和3年2月26日（10：00～14：30）

場所：国立感染症研究所共用第1会議室

参加人数：40名（オブザーバー10名、事務局5名含む）

4. 下水を用いた SARS-CoV-2 調査の運営面の課題の整理

ア.下水からの新型コロナウイルス検出作業における感染リスク評価（研究協力者渡部）

1) リスク評価モデルに関する文献調査

新型コロナウイルスのパンデミック以降、臨床検体や環境試料からウイルスを検出する研究だけでなく、それらを介した感染リスクを評価する試みが世界中で行われている。それらの研究では、新型コロナウイルスの用量反応モデルが提案されることはなく、SARS-CoV-1 のモデルが援用されている。スパイクタンパク質の違いから、そのモデル援用に対する批判もあるが、現時点では、それに代わるモデルはなかった。

2) リスク評価

流入下水のサンプリングから、ウイルス遺伝子の検出までの作業で、新型コロナウイルスに曝露される可能性がもっとも高いのは、サンプル採取とその輸送、そして、熱変性処理（例えば 60°C で 90 分間）までの作業である。逆に、熱変性後の作業のリスクは無視できるだろう。また、我々が分析した流入下水の新型コロナウイルス濃度は、1,000～100,000 コピー/1L の範囲にあった。

本研究のリスク評価でも、SARS-CoV-1 のモデルを援用した。新型コロナウイルスの遺伝子コピー数と感染価の関係については不明であるが、仮に遺伝子コピー数：感染価＝100：1 とすると、サンプリング中に流入下水 1mL を鼻から吸引した場合の感染リスクは 2.4×10^{-5} ～ 2.4×10^{-3} と推定される。

イ. 下水中の新型コロナウイルス調査運用上の課題について（分担研究者 田嶋 吉田）

1) 下水中のウイルス調査時に考慮すべき要因の情報収集（付属資料 海外の事例整理）。

① 調査目的と公表方法

調査目的は、地域におけるウイルス量のモニタリングと、施設を対象としたモニタリングに大別できる。前者は自治体が定点モニタリング結果として公表しているが、後者はリスク施設を対象としたリスク管理（大学、企業による調査）として実施されている。

国、地域によって、調査結果の公表内容が異なっていた。即ち、下水中の新型コロナウイルス検出限界値（リアルタイム PCR）を示したうえで新型コロナウイルスの測定値を公表している例（米国の州政府、オランダ等）と、定性的な公表の場合（オーストラリア、スペインなど）がみられる。

また公表主体も、調査主体独自の公表の場合（スペイン・環境部局）と、感染状況の疫学データと同時に公表（カナダ・オタワ州）する場合がみられた。

② 新型コロナウイルス検出時に考慮すべき下水道に関連する要因について

新型コロナウイルス調査結果に与える可能性がある下水道の特性として、水量他多くの要因について各国のガイドラインにて示されており、感染者数の推計にはこれらの要因を踏まえた解析が必要とされている。要因は非常に複雑であり、下水中のウイ

ルス量から地域全体のウイルス量を把握するためには、各々の変動因子を考慮した推計モデルの研究が必要であるとされている。

③ 検出時の対応について

環境系の調査実施主体では調査結果の公表や衛生部局への情報提供を主としているが具体的に検出地域住民への PCR 検査の奨励等の取り組み事例も見られる。

2) 地方衛生研究所を通じた下水道部局のヒアリング

12 地方衛生研究所の分担研究あるいは研究協力者を通じて、下水調査の実施上の要件をヒアリングした。調査開始時には風評被害の防止の観点から処理場の匿名化に加え、データ公表時の事前の協議が求められている。

2020 年 10 月以降、調査を開始し、データ分析時にさらに以下の課題を認識することとなった。

感染者数と下水中のウイルス量の相関を分析するためには、処理区内の自治体の感染者数が必要となるが、処理区の人口、感染者が滞在する処理区内の軽症者療養施設、感染症指定医療機関の所在の有無から、調査対象地域が特定できる可能性がある。調査結果の解釈には様々な課題があることも考慮のうえ、あらかじめ下水道部局と衛生部局と情報共有内容、公表内容についても協議を行うことが望ましい。

3) 下水中の新型コロナウイルス量と感染者数の比較時の考慮点

①感染者数情報の収集

下水中のコロナウイルス量と感染者数を比較するためには、感染者の発症日、あるいは推定感染日データを入手する必要がある。研究開始時（令和 2 年 8 月）は、感染者情報データが限定的であったこともあり、研究協力いただいている 12 地方衛生研究所が属する地方公共団体の公表日を基準とした新規感染者数を収集した。

その結果、下水中のコロナウイルス量と処

理区内の感染者数を比較するにあたり以下の要因を考慮する必要があると考えられた。

②新規感染者公表日と発症日の関係

下水調査では不顕性、顕性感染者より排出されたウイルスを検出するが、これらのウイルスは、採水日より以前の感染者が糞便中に排出したものである。

新型コロナウイルス感染の検査には、鼻咽頭ぬぐい液、唾液等が用いられ、発症者の場合は感染日を推定できるが、不顕性感染者（積極的疫学調査による接触者や自費検査による PCR 陽性者等）の場合は困難である。また鼻咽頭ぬぐい液などに比べ、糞便中のウイルス排泄期間、排泄量の経時的变化の情報も限られており、糞便中には数週から 3 か月程度ウイルス RNA が検出されるという報告もある。このように採水日には感染日が異なる顕性、不顕性感染者から排泄されたウイルスが下水中に含まれる。

公開されている新規感染者数（公表日ベース）と下水中のコロナウイルス量とで比較する場合、不顕性感染者、顕性感染者の割合、発症日情報の有無などの制約要因を考慮しつつ、解析を行う必要性が認められた。

④ 下水処理区と届け出が行われた保健所管轄地域の関係

下水中のウイルス量と感染者数を比較する場合、下水処理区と感染者の届け出を行う保健所管轄は、行政区分が必ずしも一致していないことに留意する必要がある。さらに行政検査以外の自費検査の拡大により、居住地と異なる保健所へ届け出が行われる場合があることや、届け出後の感染者が病院へ搬送、軽症者療養施設に滞在するか自宅療養の別により、下水中のウイルス量に与える影響などにも留意する必要があると認められた。

B. 考察

1. 水環境中の SARS-CoV-2 検出に関する基盤的技術の比較検討

ア. 環境水中の新型コロナウイルス検出法

開発(分担研究者 原本、北島)

熱不活化処理を行うことにより、SARS-CoV-2 RNA 検出濃度に有意な低下が見られたことから、熱不活化処理は推奨されないと示唆された。PMMoV が温度に対する高い耐性を有していると推察された。

本研究で評価した 4 種類のウイルス濃縮法のうち、PEG 沈殿法が最も高い SARS-CoV-2 RNA 検出濃度を示した。PEG 沈殿法は SARS-CoV-2 RNA の検出に広く用いられている手法であるが、多くの異なる操作条件が使用されており、最適な条件を決定するための研究が今後も必要である。本研究で採用した IDEXX Laboratories のプロトコルでは、通常一晩程度行われる振とう操作が不要であるため、採水当日に結果を得ることも可能となり、有効な手法となることが期待される。

陰電荷膜破碎型濃縮 (EMV) 法も高い SARS-CoV-2 RNA 検出濃度を示しており、PEG 沈殿法と比較して検査水量の増加が容易であることから、SARS-CoV-2 RNA 濃度が低いことが想定される下水に対して特に有効となることが期待される。

本研究では、濃縮操作前の遠心の有無による SARS-CoV-2 RNA の検出濃度には差は認められず、沈渣分画を除去することによるウイルス RNA の損失は限定的であると判断された。しかしながら、SARS-CoV-2 は固形成分に吸着しやすいことが示唆されており、また吸着レベルは水質成分により大きく異なることが考えられるため、今後様々な水質の下水を用いた検討を行うことが求められる。

ウイルス RNA 抽出キットに対しては、濃縮法の種類に関わらず、QIAamp Viral RNA Mini Kit と Quick-DNA/RNA Viral Kit を用いた場合に高い SARS-CoV-2 RNA 検出濃度が得られ、これらのキットの使用が適していると考えられた。ウイルス RNA 抽出においては、ウイルス RNA を高回収率で精製することに加え、後段の RT-qPCR

の反応を阻害し得るフミン酸等の共存物質を除去することも重要となることから、今後阻害物質をより高濃度で含む下水を用いた検討も必要である。

SARS-CoV-2 RNA と PMMoV RNA の検出濃度に有意な正の相関が認められたことから、PMMoV をプロセスコントロールとして用いることの有効性が示唆された。定期的なモニタリングの対象とする、下水中の PMMoV RNA 検出濃度の範囲を把握しておくことにより、突発的な検出効率の低下を検知することが可能になることが期待される。

イ. ポリオ環境水調査の新型コロナウイルス監視への応用 (分担研究者 喜多村)

粗遠心沈殿物 (solid 画分) を用いた SARS-CoV-2 回収は非常に効率よくウイルス RNA が検出され下水中では SARS-CoV-2 は固形物に吸着しているものと考えられる。PCR 検査では 2 ヶ所を同時に検出する CDC_N1N2 dulpex セットを用いることで、より高感度にウイルス RNA が検出された。ポリオ環境水サーベイランスでは、ポリオウイルス検出のために下水上清を使用している。その過程で残った下水沈殿物を SARS-CoV-2 検出に活用できることが本研究で明らかとなり、新型コロナウイルス環境水サーベイランスを行う際には、効率の良い検査体制の構築が可能と考えられる。

2. 確立した手法の水平展開を図るための検査マニュアルの作成と研修の実施 (研究協力者 北川、坂、高橋、小澤、喜多村、濱崎)

研究結果の実装化には、各検査施設の検査体制を踏まえ手法の条件設定など比較検討が必要である。今般ポリオ環境水サーベイランス、エンテロウイルスレファレンスネットワークなど、我が国の既存のインフラを活用することで短期間に調査を立ち上げることができた。しかし検査キャパシティは限られていることから、より効率がよ

く、簡便な手法の検討、持続的な人材開発体制が必要である。

3. ポリオウイルス監視と並行して実施可能な SARS-CoV-2 検出方法の確立

ア. 東京都における下水試料中からの SARS-CoV-2 調査における検査手法の検討 (分担研究者 貞升)

C-Solid 分画において SARS-CoV-2 遺伝子が多くの検体で検出された。しかしながら、Kitamura らが報告する検出量よりもやや少なく、ウイルス量としては全て < 500copies/L であった。その理由としては、採取物の違い、抽出試薬や定量補正の違い等が考えられた。

VeroE6/TMPRSS2 細胞によるウイルス分離を試みた結果、全ての検体から SARS-CoV-2 分離は出来なかった。多くの流入下水については、100 倍濃縮し Ct 値 40 前後であったことから、1mL 当りに換算すると臨床検体の Ct 値 30 検体より 16Ct 程度薄い計算になる。このことは、遺伝子は検出されていても、流入下水中の SARS-CoV-2 の分離は不可能に近いことを示している。本検査では 100 倍濃縮後に遺伝子の増幅操作を行うため、十分なコンタミネーション対策や、統一した抽出試薬や検査試薬が必要であり、全国的に画一的な地方衛生研究所等の検査マニュアル等の作成が望まれる。

イ. 検出頻度を増やした下水中新型コロナウイルス検出報告 (分担研究者 小澤、吉田)

1.) 検出方法

下水濃縮物と沈殿物を検査に供したしたところ、前者は約 45% が検出されたのに対し、後者は採取した全ての試料で検出された。定量結果についても下水沈殿物の方がより高濃度に検出された。

2) 感染者数との比較

調査開始当初、全ての下水処理場は都道府県単位で感染者がそれぞれ 100 人以下で

あったが、全ての調査地点で検出された。以降日本国内では新型コロナウイルス感染症の第 3 波と言われる感染者の増加があったが、下水中の SARS-CoV-2 濃度に大きな変化はなかった。一定数の感染者が存在する地域では、継続的に検出されることが示唆された。

B 下水処理場の 10 月 19 日の採水下水において、前後の週に比べて 100 倍以上の高濃度の SARS-CoV-2 が検出された。一過性の SARS-CoV-2 濃度の上昇の原因は処理区域の感染者の増加もしくは排出ウイルス量の多い感染者の集積が考えられるが、感染者の届出数に大きな変動はなかった。結果的に 11 月から感染者が増加傾向にあったことから把握されていない感染者を感知した可能性が示唆された。

下水中 SARS-CoV-2 濃度と感染者数の考察において、以下の点に注意が必要である。①保健所で把握される感染者と下水処理区域が異なること、②発生届の提出される保健所と届出提出後の所在地(入院、宿泊療養所、自宅)が異なる場合がある、③新型コロナウイルス感染症には不顕性感染が多く、保健所の感染者の全数調査に限界があること、④感染者によって排出される SARS-CoV-2 の量及び期間も一定ではないこと、⑤本研究のある 1 点の時間で採水していること

これらを解消するには 24 時間の連続採水を利用することで、採水時間の影響が少なくなる可能性はある。また採水時間内の沈殿物に吸着しているウイルス粒子の挙動が不明であることから今後のさらなる研究が必要と考える。

3) 人流の変化との比較

調査期間に実施された「イベント等の場における新技術の実証」と成人式による人流の変化の影響について、感染者の変化と下水中の SARS-CoV-2 濃度変化を比較した。「新技術の実証」の際には、人数制限が緩和された大規模イベントが実施された。実施

1～2週間後、本調査エリアにおける下水中 SARS-CoV-2 濃度が上昇傾向になったが、大規模イベント実施の地域に関わらず、国内で第3波と言われる感染者が増加し始めた時期と重なっているため、大規模イベントによる影響かは不明である。しかし本調査エリアのうち、大規模イベント開催地域のみで下水中 SARS-CoV-2 濃度ではないことから、大規模イベント開催による影響は少なかったと考えられる。また、成人式開催後は感染者増加が見られた地域や下水処理場はなく、イベント開催による人流の変化や人の集まりが不顕性感染者を水面下に増やしたという結果は得られなかった。これらの結果から大規模イベント等の人流の変化による下水中の SARS-CoV-2 濃度への影響は少ないと考えられた。

一方で前述のように B 処理場において一過性に下水中 SARS-CoV-2 濃度が上昇したが、同時期の調査エリアの感染者に大きな増加はなく、大規模なイベント等は行われていなかった。

4) 民間委託による地方衛生研究所の負担軽減

新型コロナウイルス感染症については地方衛生研究所においても感染者の検査に加え、2021年2月からは変異株の解析も求められている。下水から検出される SARS-CoV-2 の濃度は感染者由来に比べ非常に低いため、施設内コンタミネーションに注意が必要である。

こうした背景のもと多数の下水処理場で採水された試料を迅速に処理するために、民間検査機関を利用することで課題の解決を試みた。地方衛生研究所は下水道所管部署との研究計画の調整、検査機関への試料輸送の手配を担い、下水道所管部署と各下水処理場には採水、保管、梱包及び輸送の協力を依頼した。

民間検査機関での検査結果は概ね2週間に1度の頻度で通知された。結果通知から下水道所管部署との結果共有や厚生労働省

への結果報告を行う手続きがあるため、試料採水から厚生労働省等への報告まで2～3週間程度であった。健康危機情報の速報として迅速に厚生労働省等への報告が求められる場合、試料数によっては民間検査機関を利用することで、他の新型コロナウイルス感染症の検査を大きく妨げずに実施できることが実証された。

5) 地方衛生研究所の役割

民間検査機関に業務委託を行うにあたって地方衛生研究所は、同日または同月に採水した下水を用いて同様の結果が得られるかを行う精度管理の役割を担うことが考えられる。

また限られた人員の中で、民間検査機関から得られた結果の妥当性を評価し、公衆衛生上の基礎データとして解析を行うことも可能となる。

公衆衛生上、重要となるのは下水中の感染性を持った SARS-CoV-2 の存在である。これらの検査は管理区域内で行う必要があり、日常業務でウイルス分離を行っている地方衛生研究所で確認を行うことが可能である。今後は得られた試料を利用し、SARS-CoV-2 の感染性を検査することが必要になると考えられる。

ウ. 終末処理場の流入水沈査からの RNA 抽出方法の検討 (分担研究者 濱崎)

終末処理場の流入水から効率が良い SARS-CoV-2 の検出方法を確立するため、RNA 抽出キットの比較を行った。RNA 抽出効率は、使用する RNA 抽出キットにより差があり、終末処理場の流入水の上清を陰電化膜で濃縮したものより沈殿物の方が SARS-CoV-2 を検出するのに適していると考えられる。しかし、終末処理場の流入水の沈殿物から RNeasy Power Soil Total RNA kit を用いて RNA 抽出を行った場合と、終末処理場の流入水の上清を陰電化膜で濃縮したものを QIAamp Ultra Sens Virus kit を用いて RNA 抽出を行った場合では、

RNA の抽出効率はほぼ同程度であることから、今後、濃縮方法について検討が必要と考えられる。

A 終末処理場の流入水からは、SARS-CoV-2 の感染者数が増加すると終末処理場の流入水から検出される傾向が認められたが、B 終末処理場では、2020 年 12 月及び 2021 年 1 月の終末処理場の流入水からは SARS-CoV-2 を検出することができなかった。このことは下水道普及率の影響と推察されるが、SARS-CoV-2 が検出された検体が少ないため、今後も継続的にモニタリングを行い SARS-CoV-2 の感染者数と検出される SARS-CoV-2 のコピー数について検討する必要があると考えられる。また、PMMoV は、今回検討した全ての RNA 抽出キットからも毎月検出されていることから内部標準物質として有用であると考えられる。

エ. 地方衛生研究所による試行調査（研究協力者：青森県、岩手県、福島県、千葉県、埼玉県、横浜市、富山県、岐阜県、愛知県、和歌山県、岡山県、福岡県）

令和 2 年 10 月より全国 12 ヶ所の地方衛生研究所と連携し、下水を用いた新型コロナウイルス監視体制を暫定的に構築したが、技術面、運用面では以下の課題が認められた。

1) 技術面

①消耗品

検査に用いる消耗品の供給が不安定なため、一部代替品を用いることとなったが、検査キャパシティの関係上、十分な検討は困難であった。

②条件検討

また検出感度、検査プロセス（時間の短縮）の改善についても今後も検討することが必要と認められた。

③データ解析

検出結果の解析では以下の課題が明らかになった。

データ解析方法の検討

感染者数と下水中のウイルス量についてのデータ蓄積、評価

今後データの蓄積を図るとともに解析手法の開発が必要である。

2) 運用面

①情報共有範囲と共有方法、内容についての検討

下水中の新型コロナウイルス検出情報を、自治体内部（下水道部局、衛生部局）、あるいは自治体間（都道府県と保健所設置）で共有する場合、情報共有範囲と共有方法、内容について今後も整理の必要性が認められた。

②検出時の追加調査

下水中の新型コロナウイルス検出時に伝播確認の有無など検査キャパシティとの調整が認められた。

③民間検査の活用、行政検査機関の役割（精度管理等）

現状の地方衛生研究所の検査キャパシティからは追加調査は困難であり、民間検査機関の活用も考慮する必要がある。

4. 下水を用いた SARS-CoV-2 調査の運営面の課題の整理

ア. 下水からの新型コロナウイルス検出作業における感染リスク評価（研究協力者 渡部）

流入下水のサンプリング作業では、無視できない程度の感染リスクが推定された。ただし、流入下水中の新型コロナウイルスの感染性や、サンプリング作業中に鼻から入る下水の量などは不明であり、それらの設定によって、推定結果が大きく変わることに注意が必要である。

モデルの選択は、リスク評価にさらに大きな影響を与える。今後、新型コロナウイルスの曝露実験のデータが公表され、それにもとづく用量反応モデルが提案されることが期待される。

イ. 下水上の課題について（研究分担者 田嶋、吉田）

下水中のウイルス調査時に以下のような複雑な要因を想定しつつ、下水中のウイルス量を求め、感染者を推計するための研究が必要である。

1) 下水の特性

感染者数と下水中のウイルス量の相関を解析するには、下水に関連する様々な要因が測定値に影響を与える可能性があるため、これらの要素を考慮した測定のあり方を検討するとともに、下水中のウイルス量を推定するためのモデルを開発する必要がある。

2) 結果の公表

感染がコントロールされている状況下では下水中のウイルス量は少なく、かつ下水固有の要因で減衰する可能性がある。このような条件下では、検査結果の再現性には困難が生じる。よって検査系の検出限界値に留意の上、信頼性を確保しないかぎり検査結果の定量値の公表は慎重にすべきである。同時に情報共有内容及び公表内容に関して、下水道部局と衛生部局との十分な連携が必要である。

3) 感染者と下水中のウイルス量の比較

下水には顕性、不顕性感染者由来のウイルスが含まれているが、不顕性感染者の発症日の推定は困難であり、また感染日が異なる糞便由来ウイルスが含まれる。このため下水調査時のウイルス量は、採水日前の感染者由来ウイルスの累積量である。よって下水中のウイルス量から感染者数を推定するためのモデル開発が必要である。

C. 結論

1. 水環境中の SARS-CoV-2 検出に関する基盤的技術の比較検討

ア. 環境水中の新型コロナウイルス検出法開発(分担研究者 原本、北島)

本研究では、様々なウイルス濃縮法やウイルス RNA 抽出法による SARS-CoV-2 RNA の検出濃度の比較等により、下水中の SARS-CoV-2 の検出に有効となる手法の開

発を試みた。本研究で得られた知見は以下の通りである。

①熱不活化処理を行わない場合 ($7.5 \pm 0.7 \log \text{copies/L}$) と比較して、熱不活化処理を行うことで SARS-CoV-2 RNA 検出濃度 ($7.0 \pm 0.6 \log \text{copies/L}$) に有意な低下が認められ、熱不活化処理の導入は推奨されないことが示唆された。

②4 種類のウイルス濃縮法に対し、膜の孔径等の濃縮操作条件を変えて SARS-CoV-2 RNA の検出濃度を測定した結果、使用する PEG および試料 (全量および上清) の種類に関わらず、PEG 沈殿法が最も高い値 ($7.0 \pm 0.7 \log \text{copies/L}$) を示した。EMV 法と UF 膜法、さらに、両者の組み合わせの場合にも同程度の高い検出濃度が得られたが、陰電荷膜吸着-直接 RNA 抽出法による検出濃度 ($4.5 \pm 0.1 \log \text{copies/L}$) は他の濃縮法と比較して 2 log 以上低い値であった。

③5 種類のウイルス RNA 抽出キットのうち、QIAamp Viral RNA Mini Kit と Quick-DNA/RNA Viral Kit を用いた場合に高い SARS-CoV-2 RNA 検出濃度 (平均 $6.5 \sim 7.1 \log \text{copies/L}$) が得られ、これらのキットの使用が適していることが示唆された。

④SARS-CoV-2 RNA と PMMoV RNA の検出濃度の間には有意な正の相関が認められ PMMoV をプロセスコントロールとして用いることの有効性が示唆された。

イ. ポリオ環境水調査の新型コロナウイルス監視への応用 (分担研究者 喜多村)

本研究から、下水中新型コロナウイルス検出には粗遠心沈殿物 (solid 画分) を用いた PCR 検出が効果的であることが示された。下水中ではウイルス RNA が分解されている可能性があるため、複数の遺伝子領域を増幅する PCR が重要と考えられた。

2. 確立した手法の水平展開を図るための検査マニュアルの作成と研修の実施 (研究協力者 北川、坂、高橋、小澤、喜多村、濱崎)

研究結果の実装化には、各検査施設の検査体制を踏まえ検査手法の条件設定など比較検討が必要である。今般ポリオ環境水サーベイランス、エンテロウイルスレファレンスネットワークなど、我が国の既存のインフラを活用することで、短期間に調査を立ち上げることができた。しかし検査キャパシティは限られていることから、より効率かつ簡便な手法の検討、持続的な人材開発体制が必要である。

3. ポリオウイルス監視と並行して実施可能な SARS-CoV-2 検出方法の確立

ア. 東京都における下水試料中からの SARS-CoV-2 調査における検査手法の検討 (分担研究者 貞升)

東京都における下水からの SARS-CoV-2 の検出を試みた。結果、粗遠心後の上清分画より沈渣分画において SARS-CoV-2 遺伝子が検出された。しかし検出量は少なく、ウイルス量としては臨床検体と比べて著しく少なかった。さらに SARS-CoV-2 の分離に最も適している VeroE6TMPRSS2 細胞によるウイルス分離を試みた結果、全ての検体から SARS-CoV-2 のウイルス分離は出来なかった。

イ. 検出頻度を増やした下水中新型コロナウイルス検出報告 (分担研究者 小澤、吉田)

5か所の下水処理場で採水頻度を週1回に増やした調査結果は、SARS-CoV-2 の検出に適した試料は下水沈殿物であることを示した。処理地域内の下水中 SARS-CoV-2 濃度の変化は感染者数の増減の傾向が類似していたが、処理人口が少ない処理場では下水中 SARS-CoV-2 濃度と感染者の関係にばらつきが見られた。民間検査機関を利用することで、下水検査以外の業務を滞らせることなく迅速に結果の報告に繋げることが可能となる。本研究は、SARS-CoV-2 の遺伝子を検出した研究であり、下水中の SARS-CoV-2 の感染性については評価して

いない。

ウ. 終末処理場の流入水沈査からの RNA 抽出方法の検討 (分担研究者 濱崎)

終末処理場の流入水の沈殿物から RNeasy Power Soil Total RNA kit を使用することで、SARS-CoV-2 を検出することができた。SARS-CoV-2 が検出された検体が少ないことから、継続的にモニタリングを行い SARS-CoV-2 の感染者数と検出される SARS-CoV-2 のコピー数との関係を検討する必要がある。

エ. 地方衛生研究所による試行調査 (研究協力者: 青森県、岩手県、福島県、千葉県、埼玉県、横浜市、富山県、岐阜県、愛知県、和歌山県、岡山県、福岡県)

令和2年10月より全国12ヶ所の地方衛生研究所にて、下水を用いた新型コロナウイルス監視定点を構築することにより、地域毎の感染者の有無を定性的に示すことができたが、技術面では検査に必要な消耗品の供給、検査キャパシティを勘案した上での検査プロセスの簡素化と感度の改善、データ解析手法の確立等の検討が必要である。運用面では関係部局間の情報共有範囲と共有方法、内容についての検討、検出時の行政対応の在り方、民間検査の活用、行政検査機関の役割(精度管理等)について更なる検討が必要と考えられる。

4. 下水を用いた SARS-CoV-2 調査の運営面の課題の整理

ア. 下水からの新型コロナウイルス検出作業における感染リスク評価 (研究協力者 渡部)

下水からの新型コロナウイルス検出作業における感染リスクは、下水のサンプリング時に大きくなることが予想され、そのリスクは 2.4×10^{-5} ~ 2.4×10^{-3} と推定された。このリスクの上限値は、410回のサンプリングで1回感染が成立する程度の大きさである。

イ. 下水中の新型コロナウイルス調査運用

上の課題について(研究分担者 田嶋、吉田)

新型コロナウイルスにかかわる下水調査では、定点把握を目的とする場合、下水道部局と衛生部局が連携し情報共有内容及び公表内容を検討する必要がある。

感染者数の推計を目的とする場合、下水固有の特性を勘案した処理区内のウイルス量推計モデル開発に加え、新型コロナウイルス感染者側の因子(排泄期間、排泄量等)を踏まえた感染者推計モデルが望まれる。

F. 健康危険情報

特になし。なお新型コロナウイルス感染症対策分科会 大都市の歓楽街における感染拡大防止対策ワーキンググループ(第3回 令和2年10月13日)にて「下水からの新型コロナウイルス調査について」報告を行っている。

G. 研究発表

吉田弘

論文発表

1. Kitamura K, Sadamasu K, Muramatsu M, Yoshida H. Efficient detection of SARS-CoV-2 RNA in the solid fraction of wastewater. *Sci Total Environ.* 2021;763:144587. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.144587
2. 吉田弘 ポリオの概要と世界の状況 *バムサジャーナル* 32(4),13-16,2020
3. 小澤広規 井上嵩之 櫻井光 川上千春 清水耕平 宇宿秀三 田中伸子 大久保一郎 吉田弘 環境水調査による新型コロナウイルスの下水からの検出 *IASR Vol. 41 p122-123: 2020年7月号*

学会発表

1. 吉田弘、三好龍也、小澤広規、木田浩司、後藤明子、筒井理華、高橋雅輝、濱島洋介 5年間の環境水サーベイランスにより検出されたエンテロウイルス伝播の解析 第79回日本公衆衛生学会 令和2年10月20-22日、京都(オンライン開催)、ポスター
2. 吉田弘、三好龍也 堺市における環境水サーベイランスにて検出されたエンテロウイルスについて 第79回日本公衆衛生学会 令和2年10月20-22日、京都(オンライン開催)、ポスター
3. 小澤広規、吉田弘、大久保一郎 環境水

サーベイランスにおける新型コロナウイルスの検出 第79回日本公衆衛生学会 令和2年10月20-22日、京都(オンライン開催)

4. 吉田弘 「水環境における病原性ウイルスモニタリング技術の動向」第66回日本水環境学会セミナー(オンラインセミナー) 2021.01.22、口頭
5. 吉田弘：下水中のポリオウイルスと新型コロナウイルス検査 日本薬学会第141年会 環境・衛生部会衛生試験法シンポジウム：微生物検査による食品・環境衛生管理の新展開(オンラインシンポジウム) 2021.03.29、口頭

原本英司、北島正章

学会発表

1. 北島正章, 岩本遼, 佐野大輔, 原本英司, 山口貴世志, 空野すみれ, 山岸拓也, 村上道夫, 小林博幸, 井元清哉, 岡部聡. COVID-19軽症者等宿泊療養施設の下水からのSARS-CoV-2の検出: 施設単位の下水疫学調査の実証. 第55回日本水環境学会年会. 2021年3月10日-12日, 京都大学(オンライン開催), 1-J-09-3, p.85.

喜多村晃一

論文発表

1. Kitamura K, Sadamasu K, Muramatsu M, Yoshida H. Efficient detection of SARS-CoV-2 RNA in the solid fraction of wastewater. *Sci Total Environ.* 2021;763:144587. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.144587

貞升健志

論文発表

1. Kitamura K, Sadamasu K, Muramatsu M, Yoshida H. Efficient detection of SARS-CoV-2 RNA in the solid fraction of wastewater. *Sci Total Environ.* 2021;763:144587. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.144587.
2. Nagashima M, et al. Detection of SARS-CoV-2 RNA in concentrated wastewater by RT-qPCR (June-August 2020, Tokyo), *JJID* (投稿中)
3. 貞升健志、新型コロナウイルス検査試薬と東京都における検査対応(2020年1~10月)、*ぶんせき*、554、46-51、2021
4. Nagashima M, Kumagai R,

- Sadamasu K, et al.: Characteristics of SARS-CoV-2 isolated from asymptomatic carrier in Tokyo. Jpn J Infect Dis.73;320-322. 2020
5. Sekizuka T, Itokawa K, Sadamasu K., et al : A Genome Epidemiological Study of SARS-CoV-2 Introduction into Japan. mSphere, 5, 1-10, 2020
 6. 貞升健志、新型コロナウイルス検査の現場から、Toju Journal、597、10-17、2020
 7. 千葉隆司、貞升健志、長島真美、他、健康安全研究センターにおける新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の検査対応 (2020年1月~5月)、東京都健康安全研究センター研究年報、71、Web公開 (印刷中)、2020
 8. 浅倉弘幸、長島真美、貞升健志、他、東京都内で検出された新型コロナウイルスの次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析 (2020年2月~5月)、東京都健康安全研究センター研究年報、71、Web公開 (印刷中)、2020
 9. 熊谷遼太、長島真美、貞升健志、他、新型コロナウイルスの検査における簡易抽出型リアルタイム PCR 法の有用性の検討、東京都健康安全研究センター研究年報、71、Web 公開 (印刷中)、2020

小澤広規

論文発表

1. 小澤広規 井上嵩之 櫻井 光 川上千春 清水耕平 宇宿秀三 田中伸子 大久保一郎 吉田 弘 環境水調査による新型コロナウイルスの下水からの検出
IASR Vol. 41 p122-123: 2020年7月号

学会発表

1. 小澤広規、吉田弘、大久保一郎 環境水サーベイランスにおける新型コロナウイルスの検出 第79回日本公衆衛生学会 令和2年10月20-22日、京都 (オンライン開催)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

(謝辞) 本研究班の進捗管理等はエム・アルアイ・リサーチ・アソシエーツ株式会社に業務委託を行った。同社の長田侑子様、古屋花様、他関係者の皆様に厚くお礼を申し上げます。

下水中の新型コロナウイルス検出 マニュアル

目次

1. 本マニュアルの位置づけ.....	1
2. 全体のフロー.....	2
3. 検体の採水方法.....	3
3.1 機器.....	3
3.2 プロトコル.....	3
4. 陰電荷膜法によるウイルス回収・濃縮方法.....	3
4.1 試薬・機器.....	3
4.1.1 試薬.....	3
4.1.2 機器・消耗品.....	3
4.2 準備.....	4
4.3 プロトコル.....	5
5. RNA 抽出方法.....	6
5.1 RNeasyPower Soil Total RNA Kit による RNA 抽出.....	6
5.1.1 試薬・機器.....	6
5.1.2 準備.....	7
5.1.3 プロトコル.....	9
5.2 QIAamp UltraSens Virus Kit による RNA 抽出.....	14
5.2.1 試薬・機器.....	14
5.2.2 準備.....	15
5.2.3 プロトコル.....	16
6. 新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）ゲノムの検出方法.....	18
6.1 試薬・機器.....	18
6.2 プロトコル.....	18
6.2.1 陽性コントロールの希釈.....	18
6.2.2 反応液の調製.....	18
6.2.3 ABI 7500 Fast による検出.....	19
7. PMMoV 検出方法.....	21
7.1 機器・試薬.....	21
7.1.1 機器.....	21
7.1.2 試薬.....	22
7.2 リアルタイム PCR 法による PMMoV 検出.....	24

資料 1

7.2.1 2-Step 試薬を用いた方法	24
7.2.2 1-Step 試薬を用いた方法	27
7.3 ポジティブコントロール DNA 調製.....	28
8. 参考資料.....	29
9. 執筆者一覧.....	29

改訂履歴

バージョン	作成日・改訂日	備考
0.1	2020年9月28日	第1回班会議資料
0.2	2020年10月26日	第7章修正
1.0	2021年2月26日	第3回班会議資料

1. 本マニュアルの位置づけ

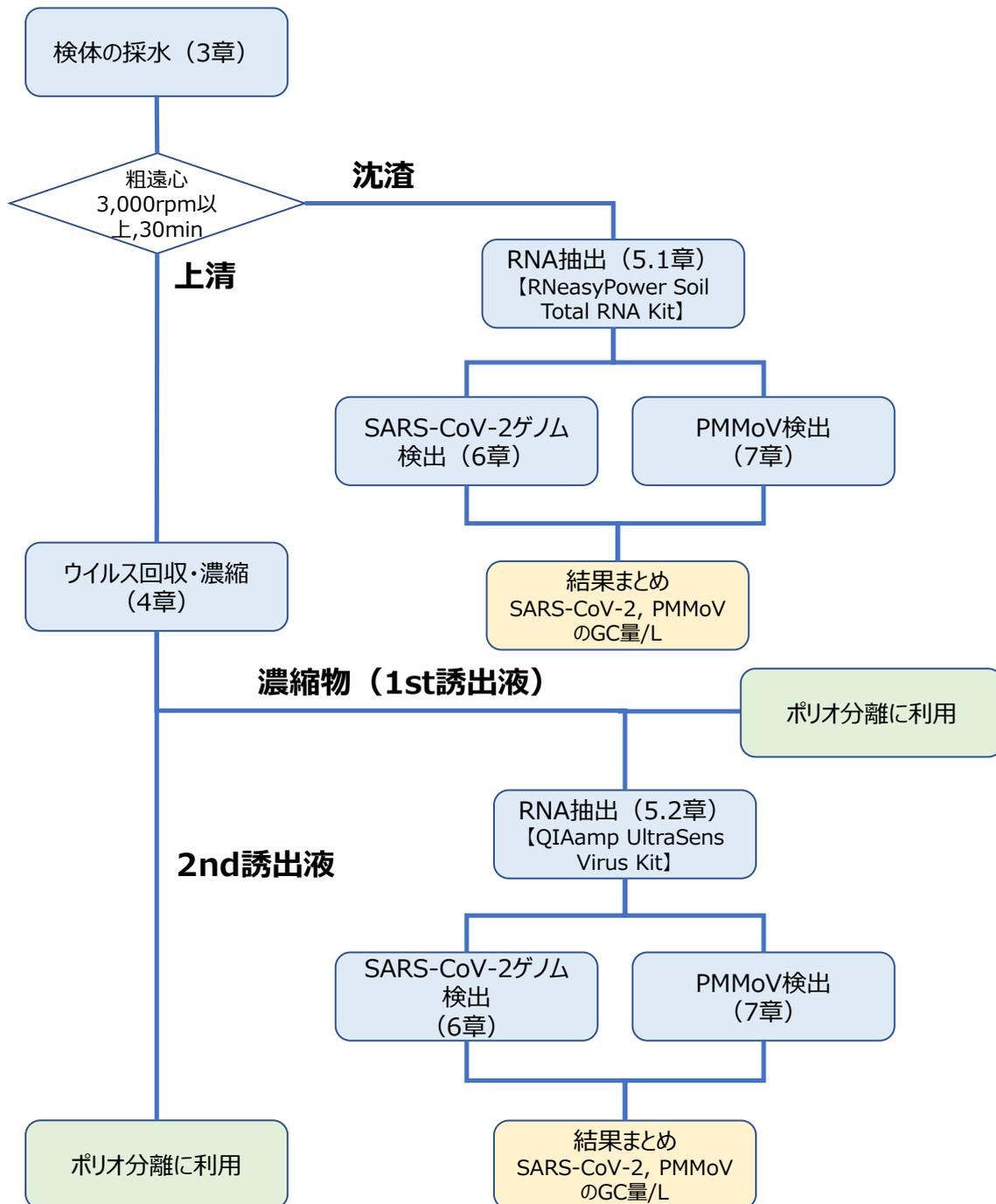
本マニュアルは、令和2年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）「研究課題：環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制を構築するための研究」において実施する、下水中の新型コロナウイルスのサーベイランスの検討において用いるものである。

本マニュアルは、以下の項目で構成される。

- 検体の採水方法【3章】
- 陰電荷膜法によるウイルス濃縮方法【4章】
- RNA抽出方法【5章】
- 新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）ゲノムの検出方法【6章】
- PMMoV 検出方法【7章】

2. 全体のフロー

下水の沈渣と濃縮物から SARS-CoV-2 ゲノムを検出する全体のフローは以下に示すとおりである。各ステップの詳細は、3 章～7 章に整理する。



3. 検体の採水方法

3.1 機器

- 1) 採水用ボトル (0.5 L 程度の容量)
- 2) 保冷容器 (採水ボトルが入るもの)

3.2 プロトコル

- (1) 月 1 回流入下水 (0.5 L 強を目安) を採取、実験室へ輸送 (4~8℃) する。
- (2) 即日濃縮を行わない場合は、凍結保存する (-30℃)
- (3) 3,000rpm 以上で 30min 粗遠心する。

4. 陰電荷膜法によるウイルス回収・濃縮方法

4.1 試薬・機器

4.1.1 試薬

- 1) 塩化マグネシウム (6 水和物)
- 2) ビーフエキストラクト
- 3) 塩酸

4.1.2 機器・消耗品

- 1) ガラスビーカー (500mL, 1000mL) (滅菌済み)
- 2) 50ml 遠心チューブ (滅菌済み)
- 3) 15mL 遠心チューブ (滅菌済み)
- 4) 2mL チューブ (滅菌済み)
- 5) ハサミ (滅菌済み)
- 6) ピンセット (滅菌済み)
- 7) ピペット (10, 50ml) (滅菌済み)
- 8) シャーレ (滅菌済み)

資料 1

- 9) シリンジフィルター (0.45 μ m)
- 10) pH 試験紙又は pH メーター
- 11) プラスティクスホルダー (参考 : アドバンテック PP47)
- 12) 混合セルロースエステルタイプ陰電荷膜
(参考 : アドバンテック A045A047A,孔径 0.45 μ m、サイズ 47mm)
- 13) 100ml ディスポーザルシリンジ
- 14) 必要に応じてグラスファイバーフィルター (1 μ m)



プラスティクスホルダー



混合セルロースエステルタイプ陰電荷膜



グラスファイバーフィルター (1 μ m)

4.2 準備

- 1) 3% ビーフ液
 - 3g ビーフエキストラクトを 100ml の滅菌水に溶解しオートクレーブ滅菌 (121 $^{\circ}$ C, 20 分) する。
- 2) 2.5M MgCl₂ 溶液
 - 塩化マグネシウム (6 水和物) 50.8g をミリ Q 水に溶解し 100ml に調整。オートクレーブ滅菌 (121 $^{\circ}$ C, 20 分) する。
- 3) 0.5N HCl を準備する。
- 4) フィルターの準備
 - プラスティクスホルダーに混合セルロースエステルタイプ陰電荷膜を装着しアルミホイル等で覆い、オートクレーブ滅菌 (121 $^{\circ}$ C, 20 分) 後、乾燥させる。

資料 1

※100ml 当たりフィルターを 1 枚使用する。500ml を濃縮する場合、前述の滅菌フィルターを 5 組準備する。



プラスチックホルダーに混合セルロースエステルタイプ陰電化膜を装着

4.3 プロトコル

- (1) 試料を 50ml 遠心チューブ等を用いて粗遠心 (3000rpm 以上、30 分、4℃) する。
- (2) 上清を 500ml のビーカーに移す。
- (3) (2)のビーカーに攪拌子を入れ、マグネティックスターラー上に設置する。
- (4) 1/50 量の 2.5M $MgCl_2$ 溶液を添加し (試料 500ml の場合、10ml) 攪拌する (最終濃度 0.05M)。
- (5) 0.5N HCl を用いて攪拌しながら pH3.5 に調整する。
- (6) 100ml シリンジで液を吸い上げ、ゆっくりろ過する。廃液は 1000ml ビーカーで受ける。
- (7) プラスチックホルダーから陰電荷膜を取り出しシャーレに移す。
- (8) ピンセットとハサミで陰電荷膜を細切し、50ml 遠心チューブに移す。
- (9) 3% ビーフ液 5ml を加え 5 分間振とう、或いは 1~3 分間ボルテックス攪拌する (100 倍濃縮の場合)。
- (10) 上清を 15ml 遠心チューブに移す (1 回目誘出)。
- (11) 再び 3% ビーフ液 5ml を 50ml 遠心チューブに加え 5 分間振とう、あるいは 1~3 分間ボルテックス攪拌する。
- (12) 上清を 15ml 遠心チューブに移す (2 回目誘出)。
- (13) 1 回目及び 2 回目の誘出液を入れた 15ml 遠心チューブを遠心 (3000rpm、15 分、4℃) する。



資料 1

(14) 上清を 0.45 μ m のシリンジフィルターでろ過する。ろ液を保管用チューブに移し-20℃で保管する。

5. RNA 抽出方法

沈渣から RNA を抽出する場合は、RNeasy Power Soil Total RNA Kit を用いる。濃縮物から RNA 抽出する場合は、QIAamp UltraSens Virus Kit を用いる。それぞれの方法は以下に示すとおりである。

5.1 RNeasyPower Soil Total RNA Kit による RNA 抽出

5.1.1 試薬・機器

1) RNeasy® PowerSoil® Total RNA Kit 【QIAGEN】

※Kit の内容は以下のとおり。

RNeasy PowerSoil Total RNA Kit	(25)
Catalog no.	12866-25
Number of preps	25
PowerBead Tubes, Carbide	25
PowerBead Solution	2 x 42 ml
Solution SR1	7 ml
Solution IRS	2 x 15 ml
Solution SR3	42 ml
Solution SR4	6 x 27.5 ml
Solution SR5	110 ml
Solution SR6	28 ml
Solution SR7	2 x 1.5 ml
JetStar 2.0 Mini Columns	25
Collection Tubes (2.2 ml)	25
Collection Tubes (15 ml)	2 x 50
Quick Start Protocol	1

出所 : RNeasy® PowerSoil® Total RNA Kit Handbook (June 2017) p.3

資料 1



RNeasy PowerSoil Total RNA Kit (QIAGEN) Cat. No. 12866-25

- 2) 15ml チューブを利用可能な遠心分離機 (2500 x g minimum)
- 3) マイクロ遠心分離機 (13,000 x g)
- 4) ピペット (20 μ l–1000 μ l)
- 5) 血清ピペット (1 ml and 10 ml)
- 6) ボルテックス (Vortex-Genie® 2)
- 7) ボルテックスアダプター4 (15 ml) チューブ用 (cat. no. 13000-V1-15)
- 8) RNase-free gloves (cat. nos. 1556-S, 1556-M and 1556-L)
- 9) RNase 除去用のラボクリーナー (cat. no. 12095-500)
- 10) フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール溶液
- 11) Heat block set at 45°C (オプション)

5.1.2 準備

(1) 粗遠心を行い、静置後上澄みを除く。



静置後、上澄みを除いた下水サンプル



デカントで下水をチューブに移す

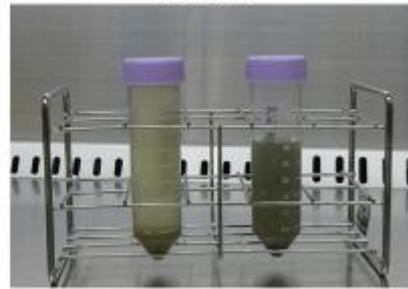
資料 1



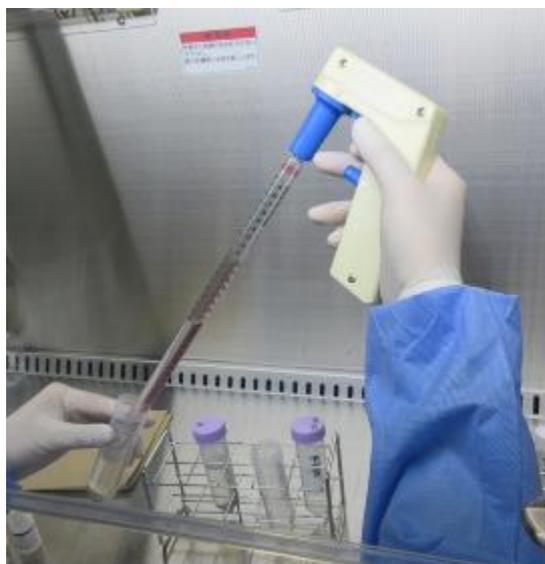
スイングローターで遠心
(アングルローターでは底にたまらない)



遠心前



遠心後



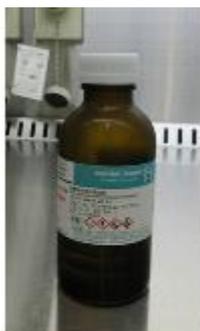
沈殿物を吸い上げないように上清を除く



上清を除いた後。5mlを超えると
PowerBead Tubeに移して試薬を入れる
過程であふれてしまう。

5.1.3 プロトコル

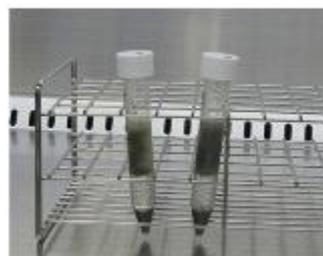
- (1) 試料（最大 2g）を 15ml PowerBead Tube（付属）に入れる。
- (2) 2.5 ml の PowerBead Solution、0.25 ml の Solution SR1、0.8 ml の Solution IRS を追加。
- (3) 3.5 ml のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール溶液（pH 6.5～8.0）を追加。PowerBead Tube にフタをしてボルテックスし、層が消えるまで混合。



フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール（ナカライ/25967-74）



注意点：ガラス製のピペットを使用する



フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを加えた後

- (4) PowerBead Tube をボルテックスアダプターに置き、最高速度で 15 分間ボルテックスする。



15ml チューブ用アダプター
(Cat. No. 13000-V1-15 / QIAGEN)

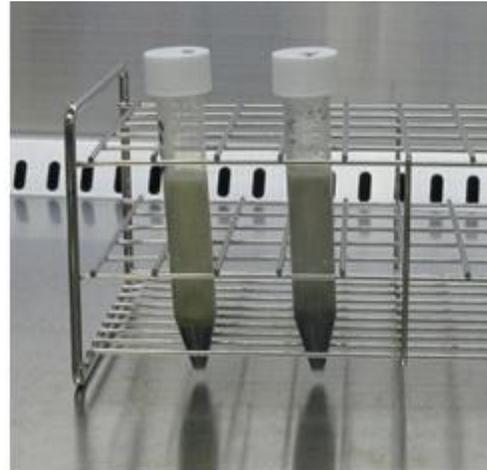


アダプター取り付け

資料 1



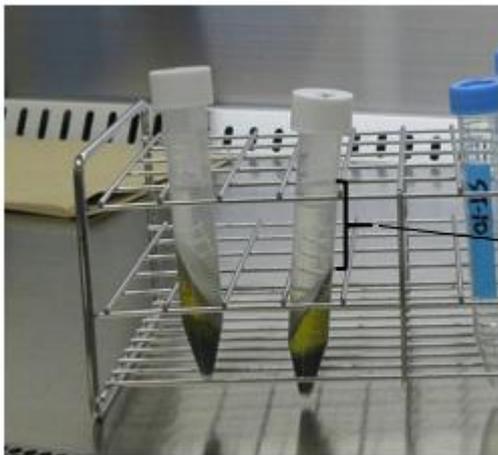
15ml PowerBead Tubeをアダプターにつけてボルテックスしているところ



ボルテックス後の様子

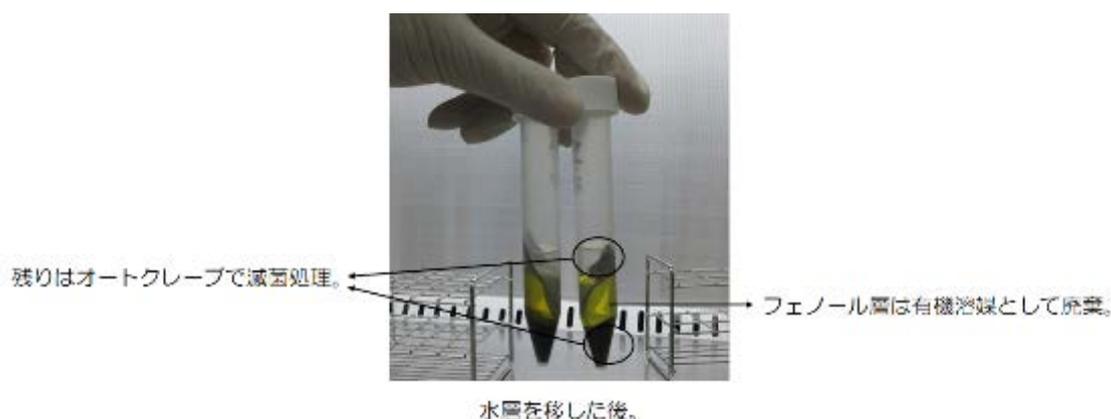
- (5) PowerBead Tube を取り外し、 $2,500 \times g$ で 10 分間遠心する。
(6) 上部の水相（中間相と下部のフェノール層を避ける）を清潔な 15 ml Collection Tube（付属）に移し、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール溶液を捨てる。

遠心後の様子
(フェノール層、中間層、水層に分離)



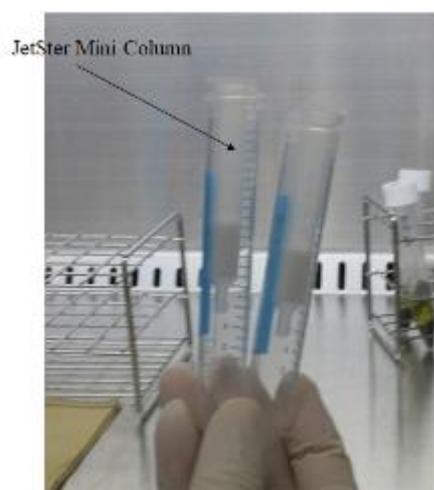
1mlロングチップを使って水層を移す。
中間層を吸い込まないように注意する。

資料 1



- (7) 1.5 ml の Solution SR3 を水相に加え、ボルテックスして混合する。2～8℃で 10 分間インキュベートし、室温で 2,500 x g で 10 分間遠心する。
- (8) ペレット（存在する場合）を乱さないようにして、上清を新しい 15 ml Collection Tube（付属）に移す。
- (9) Collection SR の上清に 5 ml の Solution SR4 を加え、転倒またはボルテックスして混合する。室温で 30 分間インキュベートする。
- (10) 2500 x g で 30 分間遠心する。
- (11) 上清をデカントし、15 ml の Collection Tube をペーパータオルの上で 5 分間反転する。
- (12) Solution SR5 を振って混合し、1 ml を 15 ml Collection Tube に加える。繰り返しピペティングまたはボルテックスすることにより、ペレットを完全に再懸濁する。
注：ペレットの再懸濁が困難な場合は、チューブをヒートブロックまたは 45℃のウォーターバスに 10 分間入れ、ボルテックスする。ペレットが再懸濁するまで繰り返す。
- (13) RNA 分離サンプルごとに 1 つの JetStar Mini Column（付属）を準備する。
 - 13a 15 ml コレクションチューブ（付属）のキャップを外し、その中に JetStar Mini Column を置く。カラムが Collection Tube にぶら下がる。
 - 13b JetStar Mini カラムに Solution SR5 2 ml を追加する。重力でカラムに流し、15 ml の Collection Tube に集める。
注：RNA 分離サンプルをロードする前にカラムを乾燥させないこと。

資料 1



JetStar Mini Column を15ml Collection Tube にセットしたところ



Solution SR5 をカラムに通しているところ
(自然に落ちるのを待つ。カラムにより落下速度に差がある)

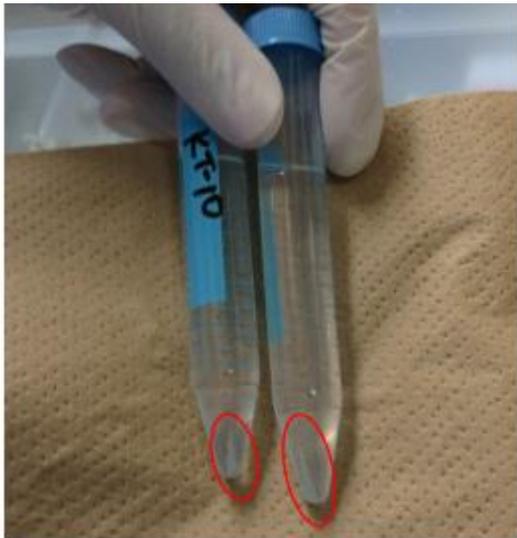
- (14) ステップ 12 の RNA 分離サンプルを JetStar Mini Column に加え、カラムを介して 15 ml Collection Tube に重力で流し込む。
- (15) 1 ml の Solution SR5 を JetStar Mini Column に加え、15 ml Collection Tube に完全に自然落下させる。
- (16) JetStar Mini Column を新しい 15 ml Collection Tube (付属) に移す。Solution SR6 を振って混合し、JetStar Mini Column に 1 ml を加えて、結合した RNA を溶出する。Solution SR6 を 15 ml Collection Tube に自然落下させる。

Solution SR5 と Solution SR6 はよく混ぜてから使う

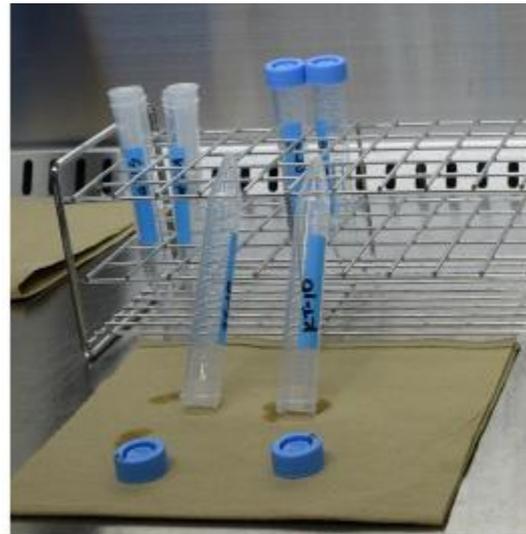


資料 1

- (17) 溶出した RNA を 2.2 ml Collection Tube (付属) に移す。Solution SR4 を 1ml 加える。少なくとも 1 回転倒混和し、 -15°C から -30°C で最低 10 分間インキュベートする。
- (18) 2.2 ml Collection Tube を $13,000 \times g$ で 15 分間遠心して、RNA をペレット化する。
- (19) 上清をデカントし、2.2 ml Collection Tube をペーパータオルの上に 10 分間置き、ペレットを風乾する。



遠心後の様子 ペレットが目で確認できる



風乾の様子

- (20) RNA ペレットを $100 \mu\text{l}$ の Solution SR7 で再懸濁する。

5.2 QIAamp UltraSens Virus Kit による RNA 抽出

5.2.1 試薬・機器

5.2.1.1 試薬

- 1) QIAamp UltraSens Virus Kit 【QIAGEN】
- 2) 1.5ml チューブ 【Thermo/ 1.5ml クリア/ #3448】
- 3) 2ml エッペンチューブ 【Eppendorf / safe-Lock Tubes 2.0ml / 0030 120.094】
- 4) エタノール (99.5) 【Wako /Ethanol (99.5)500ml / 057-00456】
(新しくキットを開けた時、Buffer AB、AW1、AW2 の調整に必要。)

※QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)の外観



Protocol (13)で使用する

QIAamp スピнкаラムと2ml コレクションチューブ



1.5ml チューブと2mlのエッペンチューブ (別売)

1.5ml チューブ : 5.2.2 で Buffer AR の分注に使用

2ml エッペンチューブ : 5.2.3 のプロトコル(1)で使用

5.2.1.2 機器

- 1) ミキサーインキュベーター 2台
(Eppendorf thermomixer comfort -1.5ml-)

※ミキサーインキュベーター (Eppendorf thermomixer comfort -1.5ml-) :
5.2.2 と 5.2.3 のプロトコル(11)で使用



ヒーティングブロックあるいは水浴によるインキュベートに代用できる。

5.2.2 準備

- キャリア RNA、Buffer AB・AW1・AW2 を調整しておく。
- ミキサーインキュベーターを 40℃と 60℃に設定する。
- 1 サンプルあたり 330 μ l として、Buffer AR を 1.5ml チューブに分注し、60℃に温めておく (5.2.3 のプロトコル (9)でサンプル数+a のマスターミックスを作成)。Buffer AR を温めることでペレットが溶解しやすくなり、proteinase K の活性が増す。

5.2.3 プロトコル

(1) 2ml エッペンチューブにサンプル^{※1}を 1ml 加える。

※1：陰電荷膜による濃縮物

(2) サンプルに Buffer AC を 0.8ml 加える。

(3) (1)のチューブのフタにキャリア RNA を 5.6 μ l のせる。

(4) フタを閉め 2ml チューブを転倒混和する。

(5) 10 秒間ボルテックスする。

(6) 室温で 10 分間インキュベートする。

(7) 1200 \times g で 5 分間遠心^{※2}。室温。

※2：3 分間では沈ペレットが柔らか過ぎるので、5 分に変更した。

沈殿が不十分の場合、遠心時間をさらに長くする。

(8) 1ml ピペットマンを用いて、上清を除去する。



ペレットを壊さないように可能な限り取り除く。1ml ロングチップ (ART 1000 REACH BF / 2079-HRPK) 推奨。

(9) 60 $^{\circ}$ Cに温めた Buffer AR に proteinase K^{※5}を加え、マスターミックスとする。

※5：1 サンプル 22 μ l として加える。

(10) ペレットに(9)のマスターミックス 320 μ l を加えてボルテックスし、ペレットを完全に溶かす。

(11) ミキサーインキュベーターを最大スピード (14000rpm) にセットし、40 $^{\circ}$ Cで 10 分間インキュベートし、スピンドウン。ヒーティングブロックあるいは水浴の場合は、5 分間インキュベート後に 5 秒間ボルテックス、さらに 5 分間インキュベート後に 5 秒間ボルテックスし、スピンドウン。

(12) Buffer AB を 300 μ l 加える。ボルテックスでよく混ぜスピンドウン。

(13) カラムの縁を濡らさないように QIAamp スピンカラム^{※6}に全量^{※7}を移す。

資料 1

※6：付属の QIAamp スピнкаラムがセットされた 2ml コレクションチューブ

※7：付属のプロトコルには 700 μ l とあるが、700 μ l ない場合が多い

- (14) キャップを閉めて 3000 \times g で 1 分間遠心（室温）。 回転数に注意する
- (15) QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml コレクションチューブにセットする。
(ろ過液の入ったチューブは捨てる)
- (16) Buffer AW 1 を 500 μ l 加える。
- (17) 6000 \times g で 1 分間遠心（室温）。 回転数に注意する
- (18) QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml コレクションチューブにセットする。
(ろ過液の入ったチューブは捨てる)
- (19) Buffer AW2 を 500 μ l 加える。
- (20) 20, 000 \times g (14000rpm) で 3 分間遠心（室温）。 回転数に注意する
- (21) QIAamp スピнкаラムを新しい 1.5ml コレクションチューブにセットする。
(ろ過液の入ったチューブは捨てる)
- (22) QIAamp スピнкаラムに Buffer AVE を 30 μ l 加える。
- (23) カラムのふたを閉めて 6000 \times g で 1 分間遠心（室温）。
回転数に注意する
- (24) QIAamp スピнкаラムに Buffer AVE を 30 μ l 加える。
ろ過液を捨てないように気を付ける。
- (25) カラムのふたを閉めて 6000 \times g で 1 分間遠心（室温）。
- (26) -20 $^{\circ}$ C で凍結保存。
※ 長期保存の場合は -80 $^{\circ}$ C で保存する

6. 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) ゲノムの検出方法

6.1 試薬・機器

- 1) SARS-CoV-2 Realtime RT-PCR (NIID N2)
- 2) SARS-CoV-2 Realtime RT-PCR (CDC N1N2)
- 3) Takara RR600A One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix
- 4) Takara XD0008 Primer/Probe N2 (2019-nCoV)
- 5) Takara XA0142 Positive Control RNA Mix (2019-nCoV)
- 6) Takara RC300A SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit

6.2 プロトコル

6.2.1 陽性コントロールの希釈

- (1) Positive Control RNA (US N1/N2) と Positive Control RNA Mix (2019-nCoV) を希釈 (用時調製)
- (2) いずれも 10^7 ストックから 100 倍希釈で 10^5 、以下、EASY Dilution 45 μL で 10^0 まで段階希釈
- (3) (10^3 ,) 10^2 , 10^1 , 10^0 の 4 つを 5 μL ずつ陽性コントロールとして使用 ($5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^0$)

6.2.2 反応液の調製

6.2.2.1 SARS-CoV-2 Realtime RT-PCR (CDC N1N2)

- クリーンベンチ内で調製 (40 μL 用として N=2 で半分に分ける)
- | | |
|------------------------------------|--------------------------|
| 40 μL x (+N+S) | |
| RT-qPCR Mix (2x) | 20 μL |
| Primer/Probe mix (pink) | 4 μL |
| ROX Reference Dye II*(50x) (brown) | 0.8 μL |
| RNase Free H ₂ O | 5.2 μL |
| Total | 30 μL プレートに分注 |

6.2.2.2 SARS-CoV-2 Realtime RT-PCR (NIID N2)

- クリーンベンチ内で調製 40 μL x (+N+S)

資料 1

One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (2×)	20 μL
5×NIID_2019-nCOV_N_ Primer/Probe mix	8.0 μL
ROX Reference Dye or Dye II*(50×)	0.8 μL
RNase Free H2O	1.2 μL
Total	30 μL プレートに分注

6.2.3 ABI 7500 Fast による検出

- (1) ABI 7500Fast を起動
- (2) PC 起動、USER/PASS 入力、7500 software 起動、login as guest
- (3) Advanced Setup
- (4) 検査名入力 (例 SC2_yymmdd_kitamura)
- (5) 7500 Fast (96 well、Quantitation - standard curve、Taqman reagent)
- (6) Standard (~2hrs to...) に変更
- (7) Plate Setup
- (8) Define Target で add new target して Assay, Target, Reporter を入力
 - ✓ SC2_NIID は FAM, SC2_CDCN1N2 は Cy5
 - ✓ Quencher は両方とも none
- (9) Define Samples で必要なサンプル数まで add new sample してサンプル名入力
- (10) Assign Targets and Samples
- (11) Passive reference は ROX (Takara 製品 ROX Reference Dye II 使用)
- (12) View Plate Layout ワークシートに基づいて assign 設定
- (13) 陰性コントロール“N”、陽性コントロール“S”、サンプル“U”を設定、S はコピー数入力
- (14) “U”には step9 で入力したサンプル名を選択
- (15) Run Method (Standard mode)
 - 50°C, 30 min
 - 95°C, 15 min
 - 45 cycles
 - 95°C, 15 sec
 - 60°C, 60 sec, Data Collection

資料 1

- (16) START RUN をクリック。ファイルの保存（自分のフォルダー→日付フォルダ作成）
- (17) Estimated Time Remaining が表示されれば OK
約 3 時間で RUN は完了するので右上の“X”をクリックしファイルをセーブ（Yes）

7. PMMoV 検出方法

トウガラシ微斑ウイルス (Pepper Mild Mottle virus, PMMoV) はピーマン等にモザイク病を引き起こす植物ウイルスである。これをヒトが摂取すると糞便に多量の PMMoV が排泄されることが知られている。また、下水中に含まれる動物・植物ウイルスの中でも最もコピー数が高いとされている。

本章ではリアルタイム PCR による PMMoV の検出方法を示した。下水濃縮工程のバリデーションのほか、糞便汚染の指標として PCR 反応の Internal control として利用可能である。

7.1 機器・試薬

7.1.1 機器

- 1) マイクロ遠心機
 - 2) マイクロピペット
 - 3) RNase-free 滅菌蒸留水
 - 4) 滅菌微量遠心チューブ (2.0mL、1.5mL、0.5mL)
 - 5) リアルタイム PCR 反応プレート (8 連ストリップチューブ)
 - 6) 8 連ストリップキャップ (プレートシール)
 - 7) サーマルサイクラー
 - 8) リアルタイム PCR 装置
- 以下の 3 機種が利用可能である。
 - ①7500Fast
 - ②QuantStudio 5
 - ③StepOnePlus

7.1.2 試薬

1) プライマー・プローブ・ポジティブコントロール・逆転写試薬・PCR 試薬

- 一部の PCR 試薬では、リアルタイム PCR 装置の種類に応じて補正用 ROX の濃度を変えたほうがよい。
- 以下の逆転写試薬、2-step PCR 用試薬、1-step PCR 用試薬は、いずれも例示であり、類似品を利用してもよい。

① プライマー¹

PMMV-FP1-rev: GAG TGG TTT GAC CTT AAC GTT TGA

PMMV-RP1: TTG TCG GTT GCA ATG CAA GT

② プローブ

PMMV-Probe1 FAM-MGB: FAM-CCT ACC GAA GCA AAT G-NFQ-MGB

※TAMRA や BHQ などの NFQ-MGB 以外のクエンチャーでは反応性がよくない。

③ ポジティブコントロール

MC1-QC (175bp) 合成二本鎖 DNA 断片 (GeneArt Strings DNA Fragments) またはプラスミド二本鎖 DNA

TTATGGCATACACAGTTACCAGTGGTAATGGTAGCTGTGGTTTCAAATGAG
AGTGGTTTGACCTTAACGTTTGAGAGGCCTACCGAAGCAAATGTCGCACTT
GCATTGCAACCGACAATTACATCAAAGGAGGAAGGTTTCGTTGAAGATTGTA
CGTGGGCTACAACCTCCTTAACC

④ 逆転写試薬

High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit

【ThermoFisher SCIENTIFIC (4368814)】

SuperScript II Reverse Transcriptase

¹ プライマー、プローブ、コントロールの試薬は、以下の文献を参照している。
Haramoto et al., Appl Environ Microbiol, 79 (23) :7413-7418 2013

資料 1

【ThermoFisher SCIENTIFIC (18064022)】

PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)

【TaKaRa (RR036A,B)】

⑤ 2-Step PCR 用試薬

Premix Ex Taq (Probe qPCR) *、(Perfect Real Time)

【TaKaRa (RR390A)、(RR039A)】

* Probe qPCR Mix, with UNG (RR392A) でもよい

TaqMan Universal PCR Master Mix

【ThermoFisher SCIENTIFIC (4304437)】

QuantiTect Probe PCR Kit

【QIAGEN (204343)】

⑥ 1-Step PCR 用試薬

One Step PrimeScript III RT-qPCR 【TaKaRa (RR600S)】

QuantiTect probe RT-PCR kit 【QIAGEN (204443)】

7.2 リアルタイム PCR 法による PMMoV 検出

7.2.1 2-Step 試薬を用いた方法

1) 逆転写

- ここでは、PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) を用いた試薬調製および反応条件について例示する。

試薬	容量 (μ L)
5 \times Master Mix	2
RNase free Water	3
template RNA	5
Total 容量	10

- RT 処理条件は以下のとおり

37 $^{\circ}$ C 30min

85 $^{\circ}$ C 5sec

4 $^{\circ}$ C

資料 1

2) リアルタイム PCR

- ここでは、TaKaRa Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (RR039A) を用いた試薬調整及び反応条件について例示する。

(1) ABI 7500 Fast を用いる場合

試薬	容量 (μL)	最終濃度
2x Master Mix	10	×1
For. PMMV-FP1-rev(20μM)	0.2	0.2 (μM)
Rev. PMMV-RP1(20μM)	0.2	0.2 (μM)
PMMV-Probe1(5μM)	0.8	0.2 (μM)
ROX Dye II	0.4	×1
RNase free Water	6.4	
template cDNA [※]	2	
Total 容量	20	

※事前調査により十分な RNA 量が確認できれば、cDNA を節約するために RNase DNase free Water、TE バッファー、逆転写試薬に付属する DNA 希釈液などで 10~100 倍に希釈して使用する。

- 下記の条件でリアルタイム PCR 反応を行う。
- ただし、増幅条件は使用機器によって異なるのでそれぞれ最適化を行うこと。

95℃	30 sec	} 45cycles
95℃	3 sec	
60℃	30 sec	

※Fast モードより Standard モードの方が良好な結果が得られる。

資料 1

(2) QuantStudio 5 を用いる場合

試薬	容量 (μL)	最終濃度
2x Master Mix	10	×1
For. PMMV-FP1-rev(20μM)	0.2	0.2 (μM)
Rev. PMMV-RP1(20μM)	0.2	0.2 (μM)
PMMV-Probe1(5μM)	0.8	0.2 (μM)
ROX Dye II	0.1	×0.25
RNase free Water	6.7	
template cDNA [※]	2	
Total 容量	20	

※事前調査により十分な RNA 量が確認できれば、cDNA を節約するために RNase DNase free Water、TE バッファー、逆転写試薬に付属する DNA 希釈液などで 10~100 倍に希釈して使用する。

- 下記の条件でリアルタイム PCR 反応を行う。
- ただし、増幅条件は使用機器によって異なるのでそれぞれ最適化を行うこと。

95℃	30 sec	} 45cycles
95℃	3 sec	
60℃	30 sec	

7.2.2 1-Step 試薬を用いた方法

- ここでは、TaKaRa OneStep PrimeScript III RT-qPCR Mix with UNG (RR601A)を用いた試薬調製及び反応条件について例示する。

(1) Quant Studio5 を用いる場合

試薬	容量 (μL)	最終濃度
2x Master Mix	10	$\times 1$
For. PMMV-FP1-rev(20 μM)	0.2	0.2 (μM)
Rev. PMMV-RP1(20 μM)	0.2	0.2 (μM)
PMMV-Probe1(5 μM)	0.8	0.2 (μM)
ROX Dye II	0.1	$\times 0.25$
RNase free Water	3.7	
template RNA [※]	5	
Total 容量	20	

※事前調査により十分な RNA 量が確認できれば、RNA を節約するために RNase DNase free Water で 10~100 倍に希釈して使用する。

- 下記の条件でリアルタイム PCR 反応を行う。
- ただし、増幅条件は使用機器によって異なるのでそれぞれ最適化を行うこと。

25 $^{\circ}\text{C}$	10 min	
52 $^{\circ}\text{C}$	5min	
95 $^{\circ}\text{C}$	10sec	} 45cycles
95 $^{\circ}\text{C}$	5sec	
60 $^{\circ}\text{C}$	30sec	

7.3 ポジティブコントロール DNA 調製

- 定性の場合、検出感度として 10^2 コピー/well が検出できれば良い。
- 定量する場合は、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 コピー/ $2\mu\text{L}$ or $5\mu\text{L}$ の 4 段階を用いてスタンダードとする。
- 合成二本鎖 DNA 断片の MC1-QC175 (GeneArt Strings DNA Fragments) またはプラスミド二本鎖 DNA を用いる。

※溶解方法の例

塩基長が 175 bp、収量が 650 ng のとき、1 bp あたりの分子量を 660 Da とすると、

$$\text{モル数が } 650 \times 10^{-9} / 175 \times 660 \text{ mol}$$

アボガドロ数を 6.02×10^{23} とすると、

$$\text{コピー数は、} (650 \times 10^{-9}) \times (6.02 \times 10^{23}) / 175 \times 660 \text{ copies}$$

これを $100\mu\text{L}$ (水または TE buffer 使用) で溶解すると、

$$(650 \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}) / (175 \times 660 \times 100) = 3.39 \times 10^{10} \text{ copies}/\mu\text{L}$$

- 凍結乾燥品を添付書に従い DNase RNase free Water で調製する。
- 10^7 コピー/ 2 or $5\mu\text{L}$ を小分けして -70°C 以下に保存するとよい。
- 用時調製を行うこととする。

8. 参考資料

- Occurrence of Pepper Mild Mottle Virus in Drinking Water Sources in Japan, Haramoto et al., Appl Environ Microbiol, 79 (23) :7413–7418 2013
- Efficient detection of SARS-CoV-2 RNA in the solid fraction of wastewater, Kitamura et al., Science of The Total Environment Volume 763, 1 April 2021, 144587

9. 執筆者一覧

氏名	所属	職名
吉田 弘	国立感染症研究所ウイルス第二部	主任研究官
喜多村 晃一	国立感染症研究所ウイルス第二部	主任研究官
濱崎 光宏	福岡県保健環境研究所病理細菌課	病理細菌課長
小澤 広規	横浜市衛生研究所微生物検査研究課	研究員
北島 正章	北海道大学院工学研究院	助教
原本 英司	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
田嶋 淳	国土交通省国土技術政策総合研究所下水道研究部下水処理研究室	室長
貞升 健志	東京都健康安全研究センター 微生物部	部長
高橋 雅輝	岩手県環境保健研究センター 保健科学部	上席専門研究員
藤森 亜紀子	岩手県環境保健研究センター 保健科学部	主査専門研究員
植木 洋	宮城県保健環境センター 微生物部	総括研究員
渡部 徹	山形大学農学部食料生命環境学科	教授
北川 和寛	福島県衛生研究所 微生物課 (ウイルス)	主任医療技師
坂 恭平	青森県環境保健センター微生物部	技師
筒井 理華	青森県健康福祉部保健衛生課	感染症対策 G 主幹
濱島 洋介	和歌山県環境衛生研究センター 衛生研究部 微生物グループ	副主査研究員
木田 浩司	岡山県環境保健センター	ウイルス科長
望月 靖	岡山県環境保健センター	所長

資料 1

氏名	所属	職名
小川 貴史	千葉県衛生研究所ウイルス・昆虫医科学研究室	
藤沼 裕希	千葉県衛生研究所ウイルス・昆虫医科学研究室	
伊藤 雅	愛知県衛生研究所生物学部ウイルス研究室 生物学部ウイルス研究室	室長
大石 和徳	富山県衛生研究所	所長
谷 英樹	富山県衛生研究所	ウイルス部長
板持 雅恵	富山県衛生研究所	主任研究員
佐賀 由美子	富山県衛生研究所	主任研究員
稲崎 倫子	富山県衛生研究所	主任研究員
鳶田 嵩久	富山県衛生研究所	研究員
五十嵐 笑子	富山県衛生研究所	研究員
葛口 剛	岐阜県保健環境研究所	主任専門研究員
小川 泰卓	埼玉県衛生研究所ウイルス担当	主任
宮下 広大	埼玉県衛生研究所ウイルス担当	技師
長島 真美	東京都健康安全研究センター ウイルス研究科	主任研究員

RNeasy® PowerSoil® Total RNA Kit を用いた流入水沈査からのRNA抽出

福岡県保健環境研究所 濱崎光宏

内容

- RNeasy® PowerSoil® Total RNA Kitを用いたRNA抽出方法
- 使用するフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールのpHについて
- QIAamp® Viral RNA Mini kitを使用した方法との比較

RNeasy® PowerSoil® Total RNA Kitを使用したRNA抽出

【材料】

- 流入水：500 mL
- RNeasy® PowerSoil® Total RNA Kit（キアゲン社Cat No. 12866-25）
- フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール
- 15-mLチューブ用アダプターVortex Adapter (cat. no. 13000-V1-15)
- 遠心機
- ボルテックスミキサー（MS機器 VORTEX-GENIE 2 Mixer）
- ヒートブロック又は恒温槽（45℃）

準備

流入水400mlをスイングローターで遠心*1（2500 x g, 60分間）

*1：アングルローターだと底に集まらない

上清は陰電荷膜法へ ←



沈査（上清を4ml程度残す*2）

*2：5ml以上だとRNA抽出の際、あふれる

すぐに検査しない場合は、沈査を冷凍保存（-80℃）



アングルローターで遠心したもの



スイングローターで遠心したもの

ボルテックスミキサーの準備



15-mLチューブ用アダプターVortex Adapterを装着



RNA抽出

沈殿物を含む流入水4 mLを15 ml PowerBead Tubeに移す



ボルテックス前



Vortex Adapterに装着し
ボルテックス



- ← 2.5mlのPower Bead Solution
- ← 0.25mのSolution SR1
- ← 0.8mlのSolution IRS
- ← 3.5mlのフェノール/クロロホルム/
イソアミルアルコール

ボルテックス



Vortex Adapterに装着し最大スピードで15分間ボルテックス



ボルテックス後



遠心 (2500 x g, 10分間)



上清の水層*3を新しい15mL Collection Tubeへ移す



- ← 1.5mlのSolution SR3

ボルテックス



冷蔵庫 (2-8°C) に10分間静置



遠心 (2500 x g, 10分間)



上清を新しい15mL Collection Tubeに移す



- ← 5mlのSolution SR4

ボルテックス



室温に30分間静置



遠心 (2500 x g, 30分間)



水層
中間層
フェノール層



遠心後



遠心後沈殿が
認められる

上清を捨てて、ペーパータオルの上に逆さに置いて5分間乾燥

ペーパー
タオル上
で乾燥



← 1mlのSolution SR5 (よく振って混ぜる)

ピペティングかボルテックス



ヒートブロック45°C、10分間とボルテックスを解けるまで繰り返す

カラムの準備

JetStar Mini Columnを新しい
15mL Collection Tubeにセット



← 2mlのSolution SR5

しばらく静置してカラムを通す

乾燥注意!

Solution SR5を
カラムに通す



懸濁した溶液をカラムに加える



← 1mlのSolution SR5 (よく振って混ぜる)

完全にチューブへ落ちきるまで待つ

カラムを新しい15-mL Collection Tubeにセット



← 1mlのSolution SR6 (よく振って混ぜる)

完全にチューブへ落ちきるまで待つ (RNAの溶出)



2.2 ml Collection Tubeに移す



← 1mlのSolution SR4

転倒混和で混ぜる



冷凍庫 (-15°C~-30°C) で一晩静置*4

*4:少なくとも10分間



遠心 (13,000 x g, 15分間)



上清を捨て、ペーパータオルの上に逆さに置いて10分間乾燥



← 100 µLのSolution SR7

懸濁



遠心後沈殿が
認められる

使用するフェノール/クロロホルム/ イソアミルアルコールのpHについて

RNeasy® PowerSoil® Total RNA Kitで使用する異なるpHのフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールについて、PMMoVコピー数を測定し比較する。

比較したフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール

pH5.2：ナカライテスク 26058-54

pH7.8：ニッポンジーン 311-90151

pMMoVのコピー数 (well当たり)

	pH5.2	pH7.8
A浄化センター10月採水	3.5×10^2	4.7×10^2
B浄化センター10月採水	2.2×10^2	1.3×10^2

QIAamp® Viral RNA Mini kitを使用した結果

RNeasy® PowerSoil® Total RNA Kit (以下 PowerSoilという。) と QIAamp® Viral RNA Mini kit (以下 Mini kitという。) について、PMMoVコピー数を測定し比較する。

沈査の懸濁液4mlにガラスビーズ (直径4.7-5.6mm) を
入れボルテックス



遠心 (10,000 x g, 20分間)



上清を140μlとりMini kitを用いてRNA抽出



ガラスビーズを入れてボルテックスしたところ

pMMoVのコピー数 (well当たり)

	Mini kit	PowerSoil
A浄化センター10月採水	5.4×10^2	4.7×10^2
B浄化センター10月採水	2.7×10^2	1.3×10^2

まとめ

- 遠心時間が長いので検体処理で90分程度要する。
- RNeasy® PowerSoil® Total RNA Kitを使用した場合、RNA抽出に5～6時間程度要する。
- RNeasy® PowerSoil® Total RNA Kitで使用するフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールのpH5.2とpH7.8では差がないと考えられる。
- RNeasy® PowerSoil® Total RNA Kit と QIAamp® Viral RNA Mini kitでは差がないと考えられる。

リアルタイムPCR法による濃縮環境水からの トウガラシ微斑ウイルス(PMMoV)検出について

岩手県環境保健研究センター 保健科学部

高橋 雅輝

藤森亜紀子

1

なぜPMMoVを利用するのか？

- PMMoVは野菜に多く含まれており、喫食したヒトの糞便に排泄される
- **下水中には多量のPMMoVが含まれている**（下水中に存在する動植物ウイルスの中で最も多い、9/28原本先生プレゼン）
- 環境水からのSARS-CoV-2検出法は、感染症流行予測調査ポリオ感染源（環境水）と環境水濃縮工程を共通化しているため、**濃縮工程のバリデーション**に利用できる
- 一連の**PCR反応のInternal control**として利用できる
- 食品検査への応用

トウガラシ微斑ウイルスおよびアイチウイルスの牡蠣への蓄積とノロウイルス汚染指標としての利用可能性（伊藤ら、土木学会論文集、2016年）

リアルタイムPCR法検出系の検討-装置

装置 (例示)	ブロックタイプ	光路補正※1	ランモード	Threshold line
ABI 7500Fast	0.1 mL	低ROX ※2	standard	0.1
ABI QuantStudio 5	0.1 mL	低ROX ※2	standard	0.2
ABI StepOnePlus	0.1 mL	高ROX	standard	-----

※1 <http://pdbu-support.bio-rad.co.jp/techbrief/bulletins201906.html>

※2 低ROXタイプの機種でも一部の試薬ではROX濃度を変更するほうが良い結果が得られた。7500Fastでx1濃度の場合、QuantStudio 5では1/4濃度を推奨。

3

リアルタイムPCR法検出系の検討-試薬・PCR条件

	試薬等	備考
ポジコンの種類	MC1-QC175 合成二本鎖DNA断片	
プライマー/プローブ Haramoto et al. (2013)	PMMV-FP1-rev 5'-GAGTGGTTTGACCTTAACGTTTGA PMMV-RP1 5'-TTGTCGGTTGCAATGCAAGT PMMV-Probe1 5'-(FAM)CCTACCGAAGCAAATG(MGB)	TAMRA、 BHQクエン チャーは不可
逆転写試薬	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(AB) SuperScript™ II Reverse Transcriptase(INV) Takara PrimeScript RT Master Mix(TKR)	何でも良い
2-step PCR用試薬	Premix Ex Taq(Probe qPCR) (Perfect Real Time) (TKR) TaqMan Universal PCR Master Mix(Thermo) QuantiTect Probe PCR Kits (QIA)	何でも良い
1-step PCR用試薬	One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix with UNG (TKR) QuantiTect probe RT-PCR (QIA)	何でも良い

PCR条件

	最終濃度	反応条件
For. プライマー	0.2 μM	反応総量20μL アニーリング60℃、45サイクル そのほかは試薬添付書記載に 準ずる。
Rev. プライマー	0.2 μM	
プローブ	0.2 μM	

プライマー・プローブについて

名称	塩基数	Tm値	アニーリング温度
PMMV-FP1-rev	24	58.3℃	約63℃ (ThermoFisher Tm calculator)
PMMV-RP1	20	58.8℃	
PMMV-Probe1	16	TAMRAで46.1℃ (30ntに伸ばすと67.5℃になる) MGBで70.0℃	TAMRAで53.2℃ (Primer express)

5

リアルタイムPCR法検出系の検討-試薬・PCR条件

Premix Ex Taq(Probe qPCR) or (Perfect Real Time) (TaKaRa)
スタンダードモード
95℃ 30秒(1サイクル)、95℃ 3秒、60℃ 30秒(45サイクル)

7500Fast

	final conc.	
2x Master Mix	10.0	x1
For. PMMV-FP1-rev(20μM)	0.2	0.2 μM
Rev. PMMV-RP1(20μM)	0.2	0.2 μM
PMMV-Probe1(5μM)	0.8 0.2	0.2 μM
ROX Dye II	0.4	x1
DDW	6.4	
Template cDNA	2.0	
	to 20.00	

QuantStudio 5

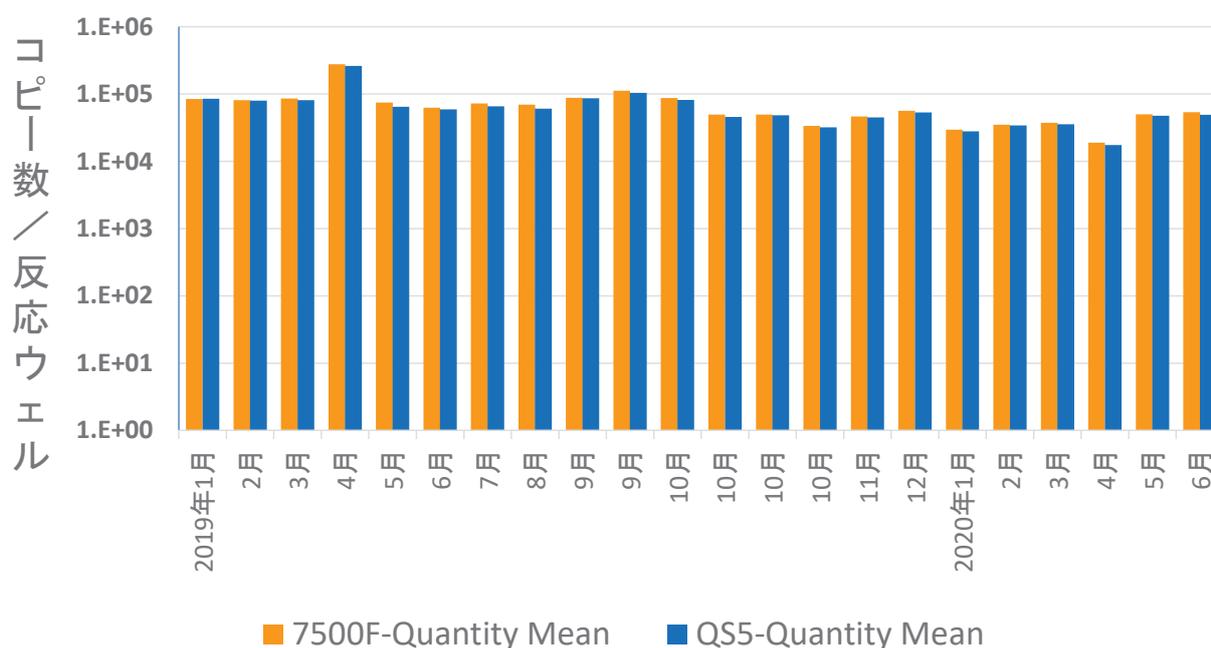
	final conc.	
2x Master Mix	10.0	x1
For. PMMV-FP1-rev(20μM)	0.2	0.2 μM
Rev. PMMV-RP1(20μM)	0.2	0.2 μM
PMMV-Probe1(5μM)	0.8 0.2	0.2 μM
ROX Dye II	0.1	x0.25
DDW	6.7	
Template cDNA	2.0	
	to 20.00	

テンプレートとポジティブコントロール

材 料	使用上の注意
テンプレートcDNAまたはRNA	下水処理場規模によりPMMoV濃度に差があるため事前にコピー数を測定すること。 高濃度の場合は10倍～100倍希釈してからの使用を推奨する。
ポジティブコントロール MC1-QC175	<u>175bpの合成二本鎖DNA断片</u> (GeneArt Strings DNA Fragments)(Thermo) または、 <u>プラスミドDNA</u> 分子量1bp=660 Daとして総コピー数を算出し、溶解後10倍階段希釈して用いる。コピー数については二本鎖であることに注意する。

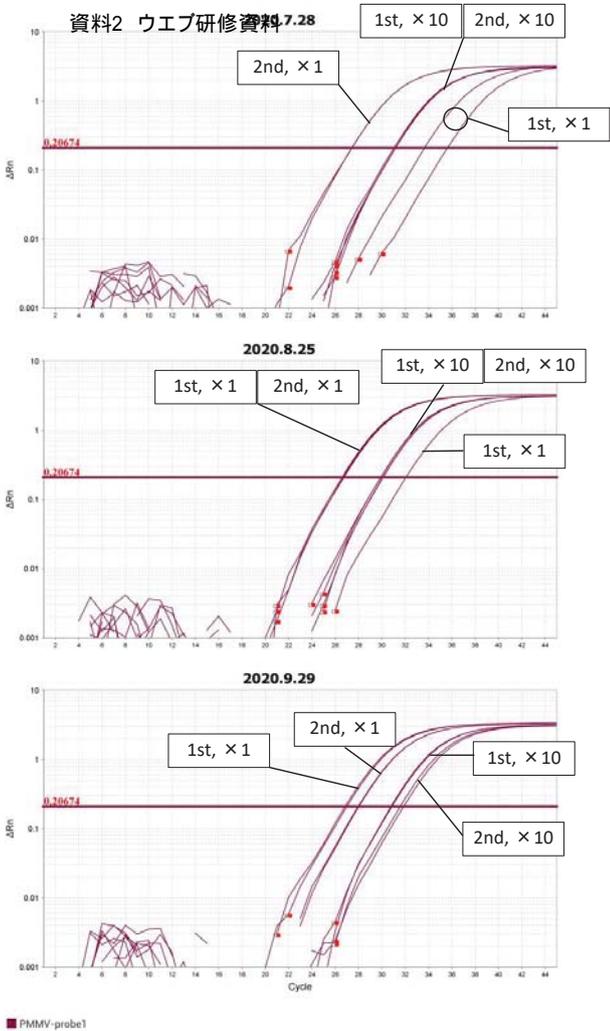
PCR機種別・採水月別のPMMoV定量値

2019年1月から2020年6月まで
流入下水100倍濃縮、2-step RT-PCR



PCR阻害物質の存在

1stは一番だし, 2ndは二番だし
 ×1はcDNA原液、×10はcDNAを10倍希釈



7.28検体
 原液では一番だしと二番だしのコピー数が逆転している。
 10倍希釈液では同数になっている。

8.25検体
 原液では一番だしが大きくブレている。
 本来一番も二番も同数か？
 10倍希釈液でも同数になっている。

9.29検体
 原液では一番だし、二番だしの順。
 10倍希釈液でも同順になっている。

ポジティブコントロールの調製

GeneArt Strings DNA Fragmentsの例

塩基長 175 bp

収量 650 ng

=====

1 bpあたりの分子量を660 Daとして、

モル数が $650 \times 10^{-9} / 175 \times 660$ mol

アボガドロ数を 6.02×10^{23} として、

コピー数が $(650 \times 10^{-9}) \times (6.02 \times 10^{23}) / 175 \times 660$ copies

これを100μL (水またはTE buffer使用) で溶解すると、

$(650 \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}) / (175 \times 660 \times 100)$

$= 3.39 \times 10^{10}$ copies/μL

ただし二本鎖であることに注意

収量X ng, 産物の長さY bp, 溶解液量Z μLとすると、

#Formula#

$(X \times 10^{(-9)} \times (6.02 \times 10^{23})) / ((Y \times 660) \times Z)$ copies/μL

国内における下水中の新型コロナウイルスの検出結果

1. 取りまとめ結果

本調査における採水は 12 自治体の 23 処理場で実施した。(以下 A~L 自治体、①~③箇所とする) 各地点における下水中の新型コロナウイルスの検出状況は以下に示すとおりであった。

資料3

表 1-1 2020年7月～2021年2月における処理場ごとの検出結果（※：検出限界値付近での検出¹⁾）

自治体	処理場	療養施設 ²⁾	商業集積地 事業所数 ³⁾	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月
A	①	あり (R2.5～)	794	沈殿物			なし	なし	なし	なし	なし
				濃縮物			なし	なし	なし	なし	なし
B	②	公表なし/不明	1,159	沈殿物			なし	あり※	あり※	あり※	
				濃縮物			なし	なし	なし	なし	
C	③	なし	1,340	沈殿物	なし	あり※	なし	あり※	あり※	なし	なし
				濃縮物	なし	なし	なし	あり	あり	あり※	なし
	④	なし	1,325	沈殿物			なし	なし	あり※	あり※	あり※
				濃縮物			あり※	なし	なし	あり	あり
D	⑤	あり (R2.12～)	802	沈殿物			なし	なし	なし	なし	なし
				濃縮物			なし	なし	なし	なし	なし

¹⁾ 検出限界値は使用した下水試料量とRNA抽出キットより算出。リアルタイムPCRの検出限界を5GC/5μlとし、各検出限界の10倍までの値については検出限界値付近での検出とした。

²⁾ 新型コロナウイルス陽性者の療養施設の有無について各自治体のホームページを参考に情報を収集

³⁾ 商業集積地とは、都市計画法第8条に定める「用途地域」のうち、近隣商業地域及び商業地域であって、商店街を形成している地域をいう。概ね一つの商店街を一つの商業集積地区とする。一つの商店街とは、小売店、飲食店及びサービス業が近接して30店舗以上あるものをいう。また、「一つの商店街」の定義に該当するショッピングセンターや多事業所ビル(駅ビル、寄合百貨店等)は、原則として一つの商業集積地区とする。

資料3

自治体 処理場 療養施設 ⁴			商業集積地 事業所数 ⁵	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月
D	⑥	あり (R2.6~/12~)	2,955	沈殿物			なし	なし	なし	なし	なし
				濃縮物			なし	なし	なし	なし	なし
	⑦	あり (R2.5~/12~)	4,472	沈殿物			なし	なし	なし	なし	なし
				濃縮物			なし	なし	なし	なし	なし
E	⑧	あり (R2.4~/12~)	1,031	沈殿物			なし	なし	なし	あり※	あり※
				濃縮物			なし	なし	なし	なし	あり※
	⑨	あり (R2.4~/5~R3.1/8~12/R3.1~)	4,049	沈殿物			なし	なし	なし	あり	なし
				濃縮物						あり	なし
F	⑩	あり (R2.5~)	3,320	沈殿物			あり※	あり	あり	あり	あり
				濃縮物			なし	あり※	あり※	あり※	あり※
	⑪	あり (R2.8~)	1,562	沈殿物			あり	あり	あり	あり	あり
				濃縮物			あり	あり※	あり※	あり※	あり※
	⑫	あり (R2.9~)	3,683	沈殿物			あり	あり	あり	あり	あり
				濃縮物			あり	あり※	あり※	あり※	なし
	⑬	なし	1,679	沈殿物			あり※	あり※	あり	あり	あり※

⁴ 新型コロナウイルス陽性者の療養施設の有無について各自治体のホームページを参考に情報を収集

⁵ 商業集積地とは、都市計画法第8条に定める「用途地域」のうち、近隣商業地域及び商業地域であって、商店街を形成している地域をいう。概ね一つの商店街を一つの商業集積地区とする。一つの商店街とは、小売店、飲食店及びサービス業が近接して30店舗以上あるものをいう。また、「一つの商店街」の定義に該当するショッピングセンターや多事業所ビル(駅ビル、寄合百貨店等)は、原則として一つの商業集積地区とする。

資料3

自治体 処理場 療養施設 ⁴			商業集積地 事業所数 ⁵	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月
							なし	あり※	あり※	あり※	なし
	⑭	なし	1,074				あり※	あり※	あり※	あり	あり※
							濃縮物	なし	あり※	あり※	あり※
G	⑮	受入施設なし	1,111			なし	なし	なし	なし	なし	なし
							濃縮物	なし	なし	なし	なし
H	⑯	受入施設なし	1,539				なし	なし	あり※	あり※	
							濃縮物	なし	なし	あり	あり
I	⑰	あり (R2.4~12/12~)	1,525				なし	なし	なし	なし	
							濃縮物	なし	なし	あり※	あり※
J	⑱	公表なし/不明	193				なし	あり※	あり	あり※	なし
							濃縮物	なし	なし	なし	なし
	⑲	公表なし/不明	127				なし	なし	なし	なし	なし
							濃縮物	なし	なし	なし	なし
K	⑳	受入施設なし	87				なし	なし	なし	なし	なし
							濃縮物	なし	なし	なし	なし
	㉑	あり (R2.7~)	1,167				なし	なし	なし	なし	なし
							濃縮物	なし	なし	なし	なし
L	㉒	受入施設なし	314	なし	あり※	なし	なし	なし	あり※	あり※	

資料3

自治体 処理場 療養施設 ⁴		商業集積地 事業所数 ⁵	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月
			濃縮物	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし
⑳	受入施設なし	225	沈殿物	なし	あり※	なし	なし	なし	なし	なし
			濃縮物	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし

2. 処理区人口別の比較

処理区の人口別に比較するため、以下表 1-2 に示す通り 5 つの区分に分類し、感染者情報の結果及び下水中のコロナウイルス検出結果について比較を行った。感染者情報は各自治体が発表したデータを参照、処理場のキャッチメントエリアに対応する市区町村の感染者数を合算し、処理場ごとの感染者数として整理した。処理場⑩～⑮については、感染者情報データの週区切りが他と異なるため、括弧内に記載した。

表 1-1 処理人口ごとの比較区分

区分	処理人口
I	～100,000 人
II	100,001～200,000 人
III	200,001～500,000 人
IV	500,001～1,000,000 人
V	1,000,001 人～

2.1 区分 I

区分 I では処理人口が 100,000 人以下の処理場を対象に比較を実施した。

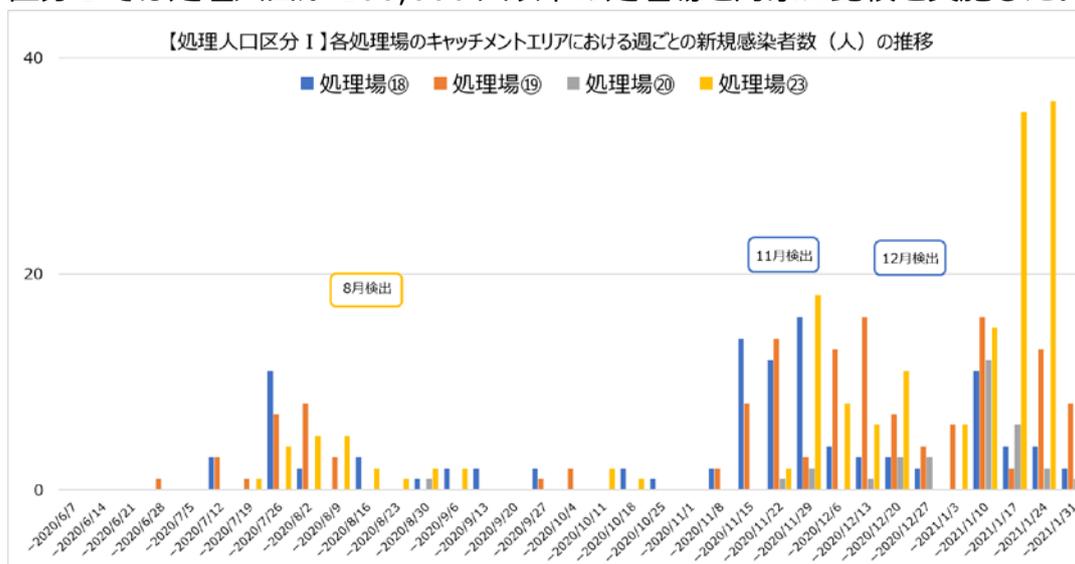


図 1-1 区分 I における週ごとの新規感染者数の推移

（「○月検出」の記載と処理場の凡例は一致している）

資料 3

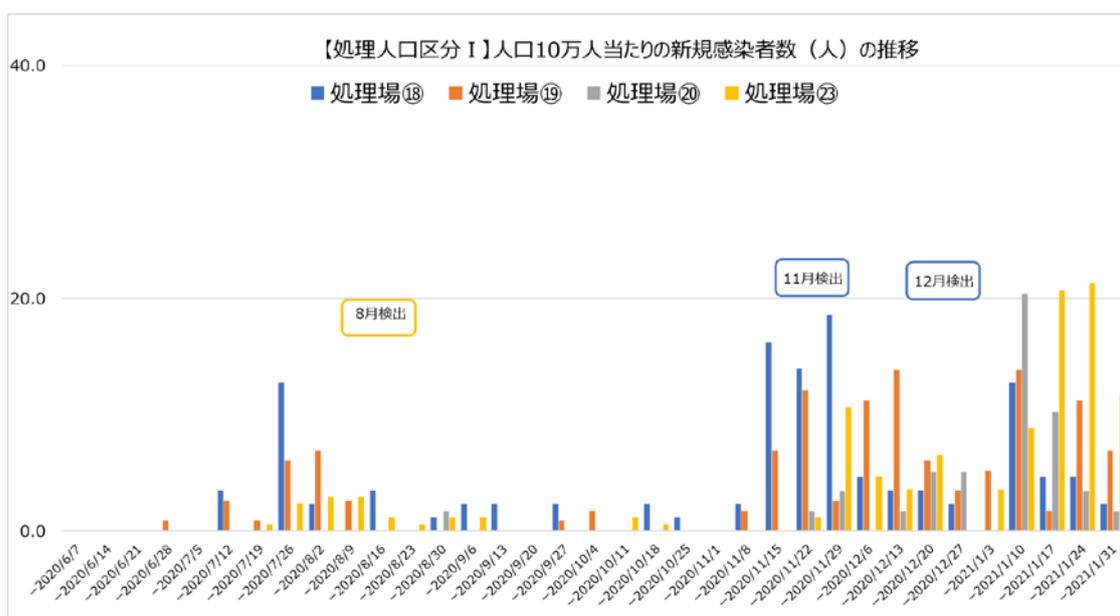


図 1-2 区分 I における 10 万人当たりの週ごとの新規感染者数の推移

8 月には処理場㉓の沈殿物より新型コロナウイルスが検出された。キャッチメントエリアにおける 1 週間の感染者数が最大 5 人程度であったが、感染者数の増加を検知できた可能性がある。また、処理場⑱では 11 月、12 月に沈殿物より新型コロナウイルスが検出された。これは 11 月中盤以降の急激な感染者数増加に伴い下水中から検出が可能になった可能性が示唆される。

表 1-2 区分 I における検出結果

処理場		7 月	8 月	9 月	10 月	11 月	12 月	1 月	2 月
⑱	沈殿物				なし	あり※	あり	あり※	なし
	濃縮物				なし	なし	なし	なし	なし
⑲	沈殿物				なし	なし	なし	なし	なし
	濃縮物				なし	なし	なし	なし	なし
⑳	沈殿物				なし	なし	なし	なし	なし
	濃縮物				なし	なし	なし	なし	なし
㉓	沈殿物	なし	あり※	なし	なし	なし	なし	なし	
	濃縮物	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	

2.2 区分Ⅱ

区分Ⅱでは処理人口が 100,001~200,000 人の処理場を対象に比較を実施した。

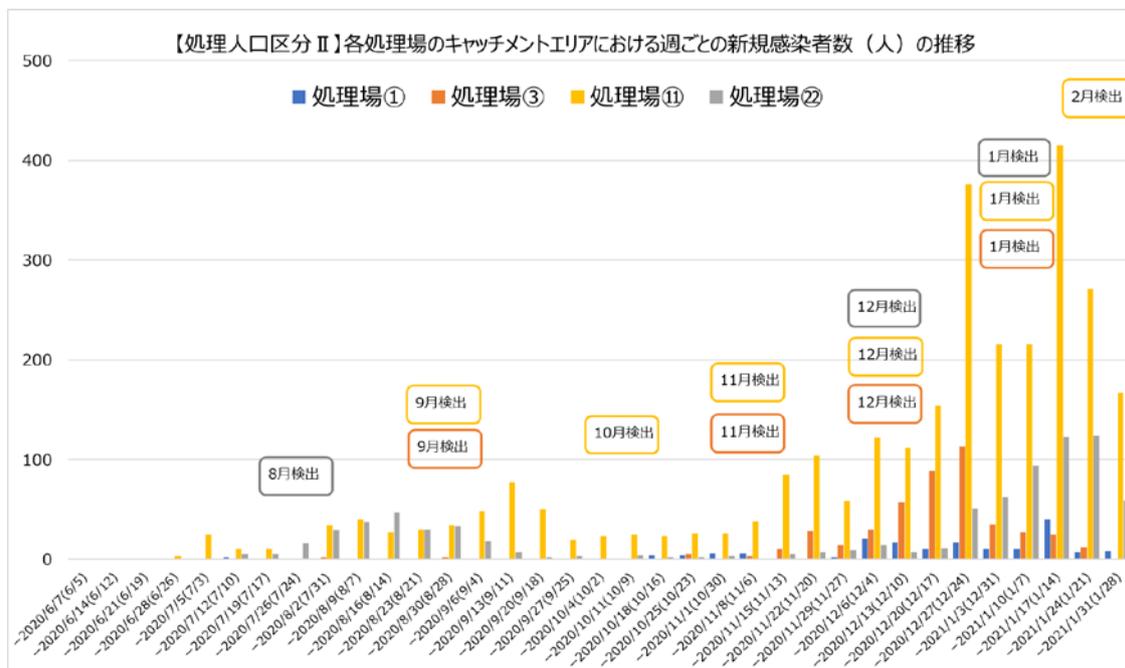


図 1-3 区分Ⅱにおける週ごとの新規感染者数の推移
 (「○月検出」の記載と処理場の凡例は一致している)

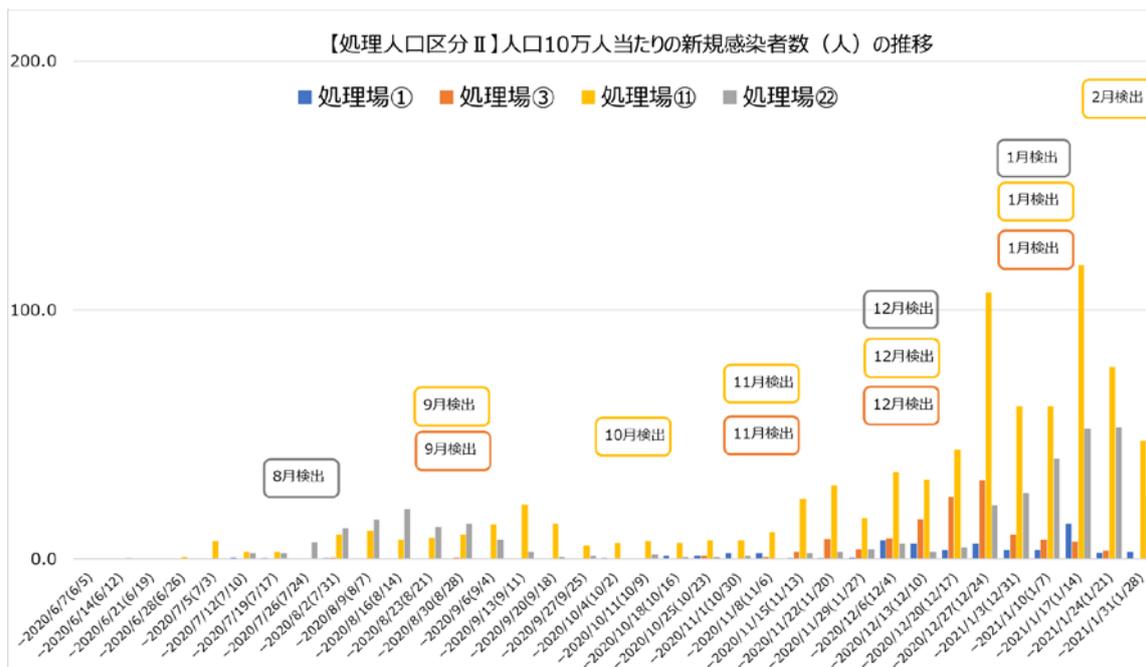


図 1-4 区分Ⅱにおける 10 万人当たりの週ごとの新規感染者数の推移

資料 3

処理場⑪では、キャッチメントエリアにおける感染者数が多く、10月以降の検査データでは毎月検出されていた。処理場③では感染者数が週に1~2名程度であった9月、週に10~50人程度の感染者が報告された11月以降にも下水中のコロナウイルスが検出された。処理場③では複数の検査手法によってコロナウイルスの検出を試みており、9月と11月では検査手法が異なっていることから、検査手法による精度については別途検討することとした。

表 1-3 区分Ⅱにおける検出結果

処理場		7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月
①	沈殿物				なし	なし	なし	なし	なし
	濃縮物				なし	なし	なし	なし	なし
③	沈殿物		なし	あり※	なし	あり※	あり※	なし	なし
	濃縮物		なし	なし	なし	あり	あり	あり※	なし
⑪	沈殿物				あり	あり	あり	あり	あり
	濃縮物				あり	あり※	あり※	あり※	あり※
⑫	沈殿物	なし	あり※	なし	なし	なし	あり※	あり※	
	濃縮物	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	

資料 3

処理場⑫, ⑭では下水中のコロナウイルスが検出された 10 月以降、週 20 人以上の感染者数が報告されており、11 月中旬からは 100 人を超える感染者の報告があった。これらの感染増加に伴い、下水中のコロナウイルスが検出できている可能性が示唆された。

処理場④でも、下水中のコロナウイルスが検出されている 10 月では最大で週に 44 人、12 月には最大 14 人の感染者数が報告されている。処理場④ではキャッチメントエリアの感染者数が 20 名程度であれば、下水中からコロナウイルスが検出できている可能性が示唆された。処理場②でも同様に、一週間に最大 38 人の感染者数の報告に対し下水中のコロナウイルスが検出できている可能性が示唆された。一方で、処理場⑤では 12 月のある週における感染者数は 100 人となっているにもかかわらず、下水中のコロナウイルスが検出されなかった。検査方法が異なることに加え、晴天時 1 日最大処理量 (m³/日) に 1.5 倍程度の違いがあり、これらがキャッチメントエリアの人口以外にも下水中のコロナウイルス検出に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

表 1-4 区分Ⅲにおける検出結果

処理場		7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月
②	沈殿物				なし	あり※	あり※	あり※	
	濃縮物				なし	なし	なし	なし	
④	沈殿物				なし	なし	あり※	あり※	あり※
	濃縮物				あり※	なし	なし	あり	あり
⑤	沈殿物				なし	なし	なし	なし	なし
	濃縮物				なし	なし	なし	なし	なし
⑫	沈殿物				あり	あり	あり	あり	あり
	濃縮物				あり	あり※	あり※	あり※	なし
⑭	沈殿物				あり※	あり※	あり※	あり	あり※
	濃縮物				なし	あり※	あり※	あり※	あり※
⑮	沈殿物			なし	なし	なし	なし	なし	なし
	濃縮物			なし	なし	なし	なし	なし	なし
⑯	沈殿物				なし	なし	あり※	あり※	
	濃縮物				なし	なし	あり	あり	

2.4 区分Ⅳ

区分Ⅳでは処理人口が 500,001~1,000,000 人の処理場を対象に比較を実施した。

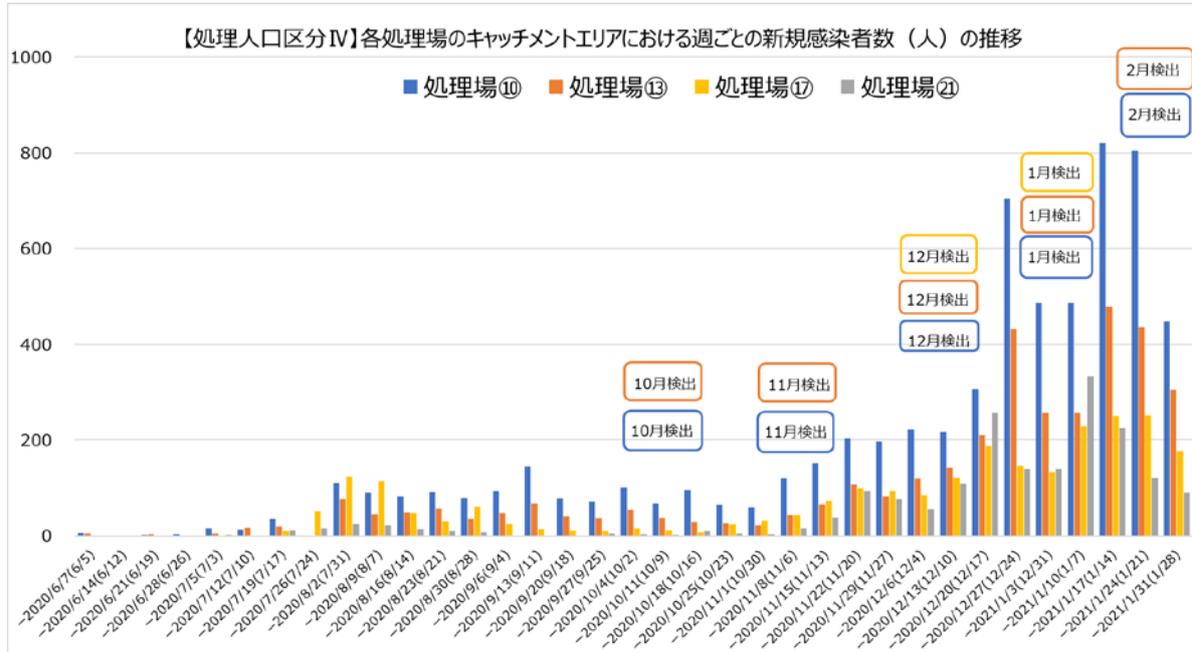


図 1-9 区分Ⅳにおける週ごとの新規感染者数の推移
 (「○月検出」の記載と処理場の凡例は一致している)

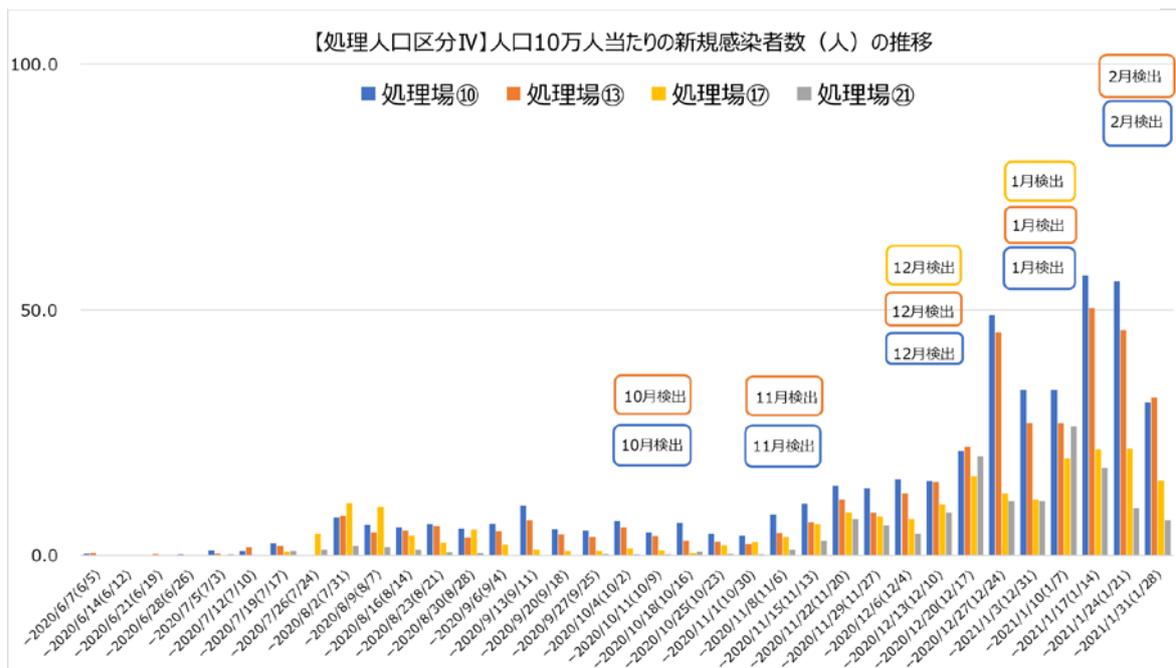


図 1-10 区分Ⅳにおける 10 万人当たりの週ごとの新規感染者数の推移

資料 3

処理場⑩、⑬のいずれにおいても沈殿物では10月以降、濃縮物では11月以降に下水中からコロナウイルスが検出された。10月は週に30～100人程度の感染者数であった一方、11月では100人を超える感染者数が報告されており、このような感染者数増加が濃縮物からの検出を可能にしている可能性が示唆された。また処理場⑰では12月、1月の濃縮物からコロナウイルスが検出された。

表 1-5 区分Ⅳにおける検出結果

処理場		7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月
⑩	沈殿物				あり※	あり	あり	あり	あり
	濃縮物				なし	あり※	あり※	あり※	あり※
⑬	沈殿物				あり※	あり※	あり	あり	あり※
	濃縮物				なし	あり※	あり※	あり※	なし
⑰	沈殿物				なし	なし	なし	なし	
	濃縮物				なし	なし	あり※	あり※	
⑳	沈殿物				なし	なし	なし	なし	なし
	濃縮物				なし	なし	なし	なし	なし

2.5 区分V

区分Vでは処理人口が 1,000,001 人以上の処理場を対象に比較を実施した。

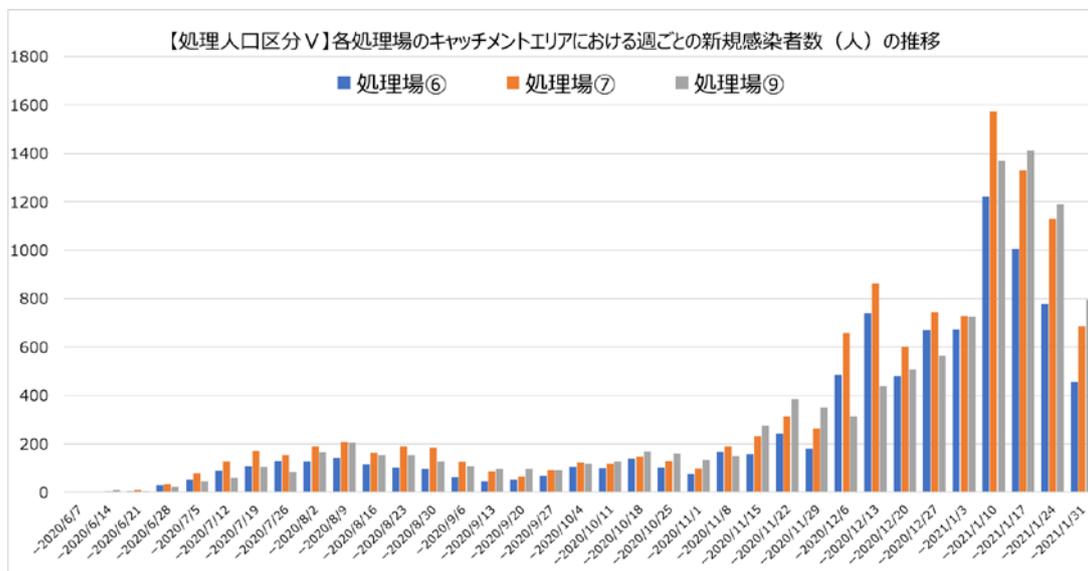


図 1-11 区分Vにおける週ごとの新規感染者数の推移
 (「〇月検出」の記載と処理場の凡例は一致している)

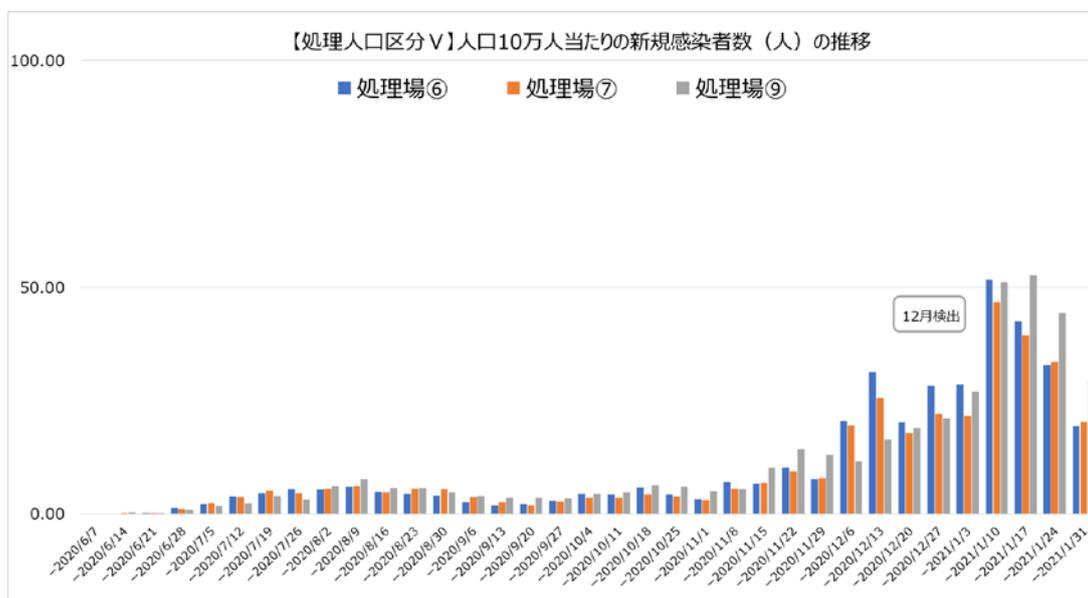


図 1-12 区分Vにおける10万人当たりの週ごとの新規感染者数の推移

区分Vの処理施設では、新型コロナウイルスが検知されたのは処理場⑨の12月分データのみであった。処理場⑨では11月までは週400人以下の感染者数

資料 3

だったが、12月中旬からさらに感染者数が増加しており、これらの結果を反映している可能性が考えられた。

また、区分Vの処理施設の比較として晴天時 1 日最大処理量を比較してみると、処理場⑥と⑦ではそれぞれ約 870,000 (m³/日) と約 610,000 (m³/日) である一方、処理場⑨は 460,000 (m³/日) であった。これらの処理量の差が新型コロナウイルスの検出に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

表 1-6 区分Vにおける検出結果

処理場	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月
⑥	沈殿物			なし	なし	なし	なし	なし
	濃縮物			なし	なし	なし	なし	なし
⑦	沈殿物			なし	なし	なし	なし	なし
	濃縮物			なし	なし	なし	なし	なし
⑨	沈殿物		なし	なし	なし	あり	なし	なし
	濃縮物					あり	なし	なし

3. 濃縮物と沈殿物の比較

F自治体の処理場⑩～⑭の結果に基づき、濃縮物と沈殿物の結果の比較を実施した。PMMoVの検出結果では沈殿物、濃縮物ともに検出結果に大きな差はなかったが、新型コロナウイルスの検出では図 1-14 に示す通り沈殿物サンプルにおける検出効率が高く、一定の検出結果が得られた。F自治体では採取した下水サンプルを 3,000rpm、30 分の粗遠心の処理後、沈殿物は RNeasy Power Soil Total RNA kit を用いて RNA 抽出を実施、濃縮物は陰電荷膜法で 100 倍濃縮したのち QIAamp UltraSens Virus Kit を用いて RNA を抽出している。これらの使用キットやプロトコルによる抽出効率に影響を及ぼしている可能性もしくは、新型コロナウイルスが下水中の沈殿物分画に含まれやすい特性を保持している可能性が示唆された。

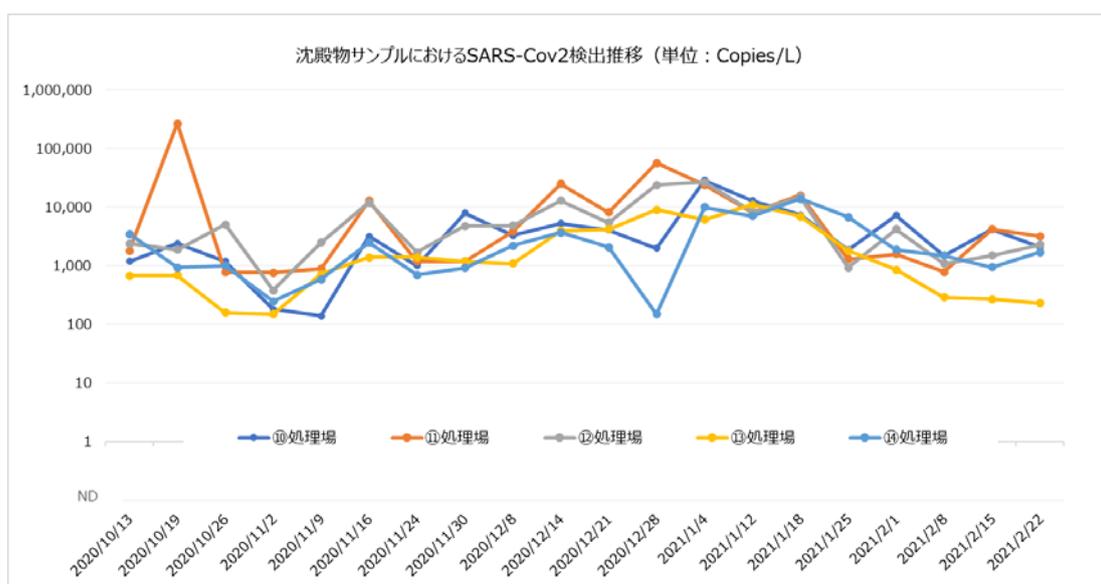


図 1-1 沈殿物サンプルにおける新型コロナウイルス検出推移

資料 3

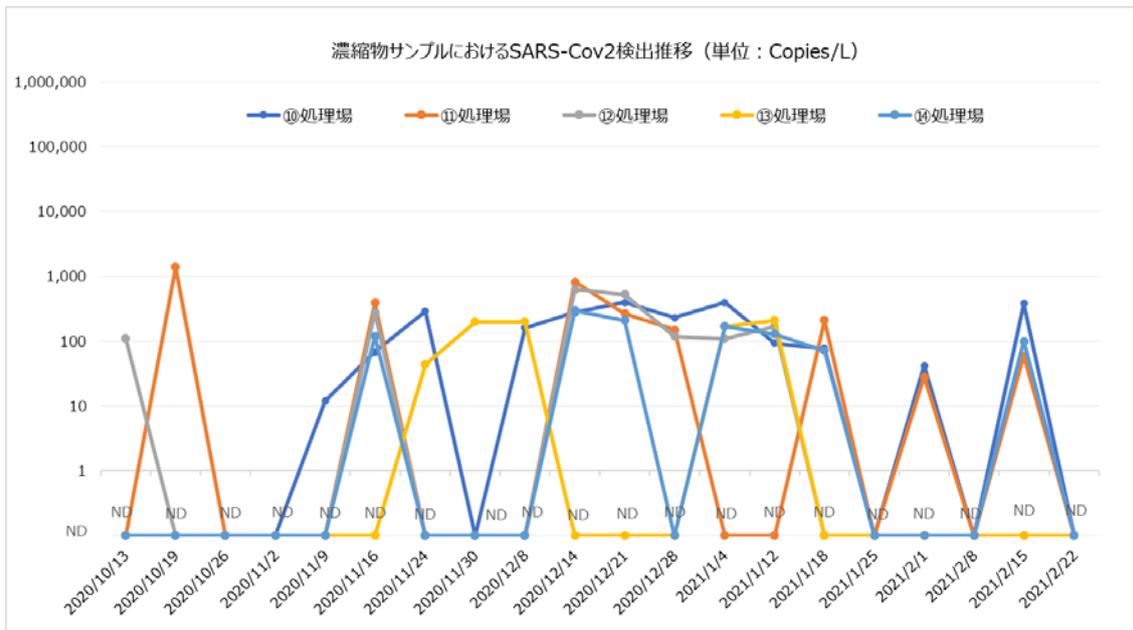


図 1-2 濃縮物サンプルにおける新型コロナウイルス検出推移

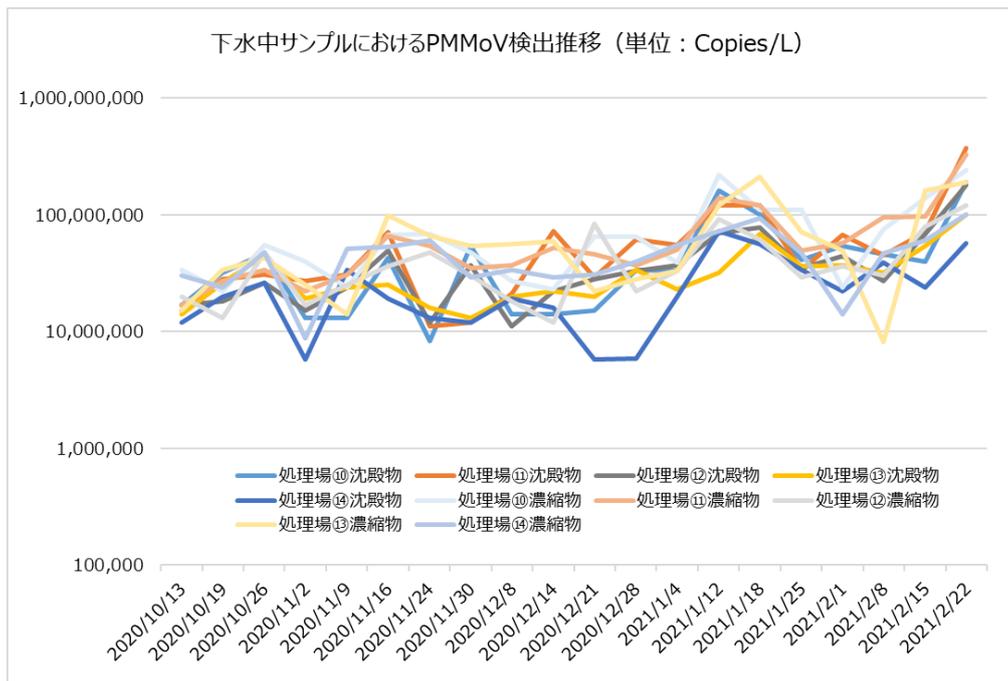


図 1-3 下水中のサンプル（沈殿物・濃縮物）における PMMoV の検出推移

資料 3

4. 方法面から見た比較

本調査では、自治体ごとにサンプル採取及び検出を実施した。なお、自治体ごとに実施プロトコルや試薬が異なっている。各自治体における採水方法等について以下のとおり整理した。

表 1-1 自治体ごとの実施プロトコル一覧

自治体	採水量	使用試料量	誘出バッファー液量	採水法	採水頻度	輸送方法	粗遠心処理方法
A	1,000ml	500ml	10ml	直接採水	1 回/月	室温 5 分で輸送	10,000rpm、30 分、4℃
B	500ml	400ml	4ml	直接採水	1 回/月	常温	20,000×g、30 分、400mL
C	1,000ml	沈殿物：400～500mL/濃縮物：270～360mL	2.7～3.6ml	連続採水/直接採水法	8 月：1 回/月 9～3 月：毎週	自ら輸送または宅配便	4,000rpm、60 分、400～500mL
D	500ml	沈殿物：500mL/濃縮物：45ml	200μl	連続採水 2 時間毎 24 時間のブレンド採水	処理場⑤のみ 2 回/月、他は 1 回/月	冷蔵	2,300×g、30 分、2 回
E	2,000ml	500ml	10ml		1 回/月	クーラーボックス	2,500×g、60 分、500 ml
F	250ml	250ml	2.2ml				3,000rpm 以上、30 分
G	1,000ml	1,000ml	10ml	直接採水	1 回/月	室温 30 分で輸送	3,000rpm、30 分、4℃、1,000mL
H	500ml	500ml	5ml	直接採水	1 回/月	採水日に職員自ら回収、輸送	3,000 rpm、30 分
I	250ml×2	500ml	5ml	直接採水	1 回/週	凍結下水を職員が車にて輸送	3,000rpm、30～40 分、1 回
J	500ml	500ml	10ml	直接採水	1 回/月	採水後、保冷容器に入れ冷蔵輸送	3,000rpm、30 分
K	1,000ml	沈殿物：700mL/濃縮物：500ml	5ml	直接採水	1 回/月	採水日に職員自ら回収、輸送	700ml
L	2,000ml	200ml	4ml		1 回/月		1,500×g、60 分、4℃

4.1 濃縮法及び濃縮倍率について

濃縮物は主に陰電荷膜濃縮法及び PEG 沈殿法の 2 つの方法を用いて、処理を実施した。沈殿物からの RNA 抽出方法は、マニュアルに記載した RNeasy PowerSoil Total RNA (キアゲン) の入手が遅れたため、調査開始時には既存の商業キットも使用して検査を行っている。それぞれの処理場の採水試料に対応する濃縮物、沈殿物処理の方法、用いたキット名を表 1-9 のとおり整理した。

資料 3

表 1-2 濃縮法及び濃縮倍率、RNA 抽出法

処理場	濃縮物				その他	RNA 抽出キット		沈殿物
	陰電荷膜法		PEG 沈			RNA 抽出キット	RNA 抽出キット	RNA 抽出キット
	検出	濃縮倍率	検出	濃縮倍率				
①	なし	50 倍				QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	RNeasy PowerSoil Total RNA (QIAGEN)	
②	なし	100 倍				QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	RNeasy Power Soil Total RNA Kit(QIAGEN)/その他	
③			あり	100 倍		QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	RNeasy PowerSoil Total RNA (QIAGEN)	
④			あり	100 倍		QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	RNeasy PowerSoil Total RNA (QIAGEN)	
⑤			なし	225 倍		QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN)	QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN)	
⑥			なし	225 倍		QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN)	QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN)	
⑦			なし	225 倍		QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN)	QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN)	
⑧	あり	50 倍				QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN)	QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN)	
⑨	あり	50 倍				QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN)	QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN)	
⑩	あり	100 倍				QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	RNeasy PowerSoil Total RNA (QIAGEN)	
⑪	あり	100 倍				QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	RNeasy PowerSoil Total RNA (QIAGEN)	
⑫	あり	100 倍				QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	RNeasy PowerSoil Total RNA (QIAGEN)	
⑬	あり	100 倍				QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	RNeasy PowerSoil Total RNA (QIAGEN)	
⑭	あり	100 倍				QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	RNeasy PowerSoil Total RNA (QIAGEN)	

資料 3

処理場	濃縮物				RNA 抽出キット	RNA 抽出キット	
	陰電荷膜法		PEG 沈				その他
	検出	濃縮倍率	検出	濃縮倍率			
⑮	なし	100 倍			QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	RNeasy PowerSoil Total RNA Kit (QIAGEN) / その他	
⑯	あり	100 倍			QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	RNeasy PowerSoil Total RNA (QIAGEN)	
⑰	なし	100 倍			QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN) / その他	
⑱	なし	50 倍			QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	RNeasy PowerSoil Total RNA (QIAGEN) / QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN)	
⑲	なし	50 倍			QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	RNeasy PowerSoil Total RNA (QIAGEN) / QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN)	
⑳	なし	100 倍			QIAamp Viral RNA Kit	QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN)	
㉑	なし	100 倍			QIAamp Viral RNA Kit	QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN)	
㉒	なし	50 倍			QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	RNeasy PowerSoil Total RNA (QIAGEN) / QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN) / その他	
㉓	なし	50 倍			QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	RNeasy PowerSoil Total RNA (QIAGEN) / QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN) / その他	

資料 3

陰電荷膜法を用いて濃縮を実施した処理場において、バリデーション方法の一つとして評価に用いた PMMoV 検出結果と処理人口を比較した結果を以下に示す。処理場ごとの処理人口区分、処理量やプロトコルは表 1-10 に記載したとおりである。

これらの結果から、処理人口区分が異なる地域において PMMoV の測定結果に大きな差はなく、ある程度一定の値で検出されることが示唆された。処理場①では、処理人口区分がⅡ（100,001~200,000 人）だが PMMoV の検出量が他の処理場と比較して少ないことから、今後はこれらの結果を考慮し新型コロナウイルス検出結果と比較する必要性も考えられる。

資料 3

表 1-3 陰電荷膜法による濃縮を実施した処理場における処理区分及び検出方法一覧

処理場	処理人口区分	採水量	濃縮法 (濃縮倍率)	RNA 抽出キット	リアルタイム PCR 試薬
①	Ⅱ	1000ml	陰電荷膜法 (50 倍)	QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	Prime Script RT Master Mix (Perfect Real Time) Premix Ex Taq (Probe qPCR)
②	Ⅲ	500ml	陰電荷膜法 (100 倍)	QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	Prime Script RT Master Mix (Perfect Real Time) Premix Ex Taq (Perfect Real Time)
⑨	Ⅴ	2000ml	陰電荷膜法 (50 倍)	QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN)	One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix
⑩	Ⅳ	250ml	陰電荷膜法 (100 倍)	QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix
⑪	Ⅱ	250ml	陰電荷膜法 (100 倍)	QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix
⑫	Ⅲ	250ml	陰電荷膜法 (100 倍)	QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix
⑬	Ⅳ	250ml	陰電荷膜法 (100 倍)	QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix
⑭	Ⅲ	250ml	陰電荷膜法 (100 倍)	QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix

資料 3

処理場	処理人口区分	採水量	濃縮法 (濃縮倍率)	RNA 抽出キット	リアルタイム PCR 試薬
⑱	I	500ml	陰電荷膜法 (50 倍)	QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix, with UNG
⑲	I	500ml	陰電荷膜法 (50 倍)	QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)	One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix, with UNG

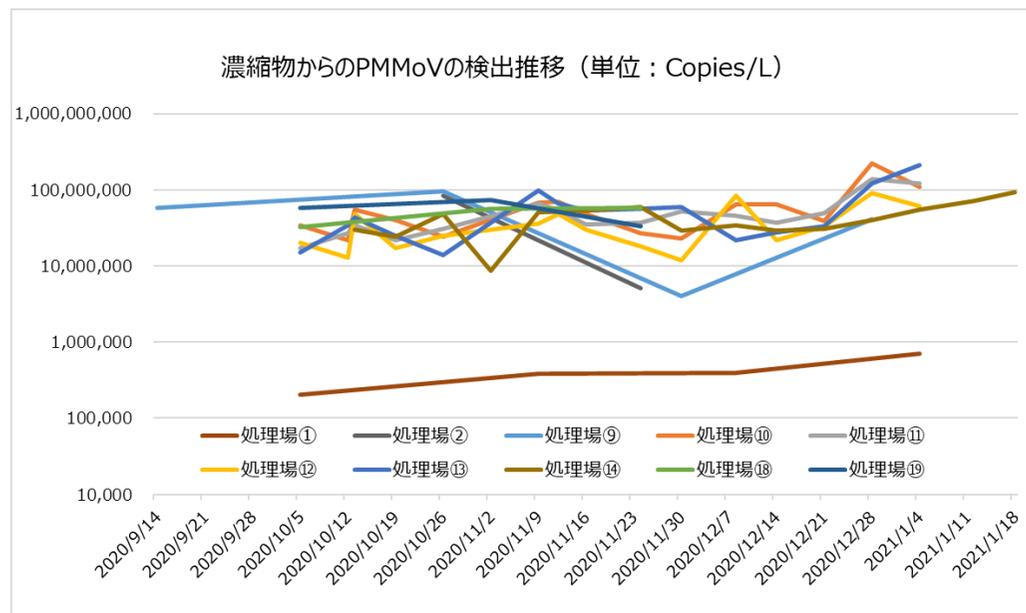


図 1-1 下水中のサンプル（濃縮物）における PMMoV の検出推移

下水に関するプロジェクト：NIJIs Project (New Integrated Japanese Sewage Investigation for COVID-19)

第1回班会議 議事録

- 日時：2020年9月28日(水) 14:00～16:00
- 場所：TKP 新橋汐留ビジネスセンターカンファレンスルーム 304
※ウェブ会議併用
- 出席者：別紙(第一回班会議出席者リスト)の通り

1. 挨拶

2. NIJIs Project について

- 研究代表者よりNIJIs Projectについて説明。

3. 各研究計画と進捗状況の発表・質疑応答

- 各先生に研究内容について発表いただいた。質疑応答は以下のとおり。
 - 1) ポリオ環境水サーベイランスへの組み込みに適した新型コロナウイルス検出法の開発
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 原本先生
 - 2) 新型コロナウイルスの下水疫学調査：国内外における研究成果
北海道大学院工学研究院 助教 北島先生

【質疑応答】

- ウイルス濃縮方法の違いによる RNA 抽出、RT-PCR の効率評価の比較に際し、Centricon 後の RNA 抽出ではキットは何を使用しているのか。
 - どちらの濃縮方法においても、QUIAGEN の QIAamp viral RNA mini kit を使用している。
 - このキットでは、PCR 阻害剤を除去するような仕組みはあるか。
 - キットでは阻害剤の除去の有無について明言されていない。キットの内容に関し、メーカーが公表していない可能性がある。

3) 環境検体からの新型コロナウイルス検出方法の検討

国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官 喜多村先生

【質疑応答】

- マンホールからの採水する場合には、管轄の道路局などへの許可が必要と思うが、どのような手続きをとっているか。
 - 国土交通省から東京都下水道局に依頼して採水していただいた。
- 4) ポリオ環境水調査の新型コロナウイルス監視への応用
横浜市衛生研究所微生物検査研究課 小澤先生

4. 技術情報の提供

- 各先生に技術情報について発表いただいた。質疑応答は以下のとおり。

1) リアルタイム PCR 法による濃縮環境水からのトウガラシ微斑ウイルス(PMMoV) 検出について～検出系の構築と使いみち～

岩手県環境保健研究センター 保健科学部 高橋先生

2) SARS-CoV-2 不活化条件の検討及び COVID - 19 患者検体の遺伝子量とウイルス分離状況について

福島県衛生研究所 微生物課 (ウイルス) 北川先生

【質疑応答】

- 56℃ 30 分では不活化条件として足りないかもしれない、との話だったが、ウイルス感染価は 10 の 5 乗減少するという理解でよいか。
 - ご認識の通りである。
 - 10 の 5 乗減少しているのであれば、下水の処理に関しても不活化処理時間を短くすることも可能かと思うが、熱処理に際し、何乗減少したことを不活化したとみなせばよいか。
 - まず今回の調査では、下水サンプルよりも濃い濃度で実施しており、下水サンプルではあまり心配する必要はないかもしれない。ウイルス不活化の結果についてどの程度減少することが適正か、不明である。
- 実際の下水サンプル使ったウイルス培養を実施しているのか。
 - 以前実施したことがあるが、うまくいかなかった。
- アメリカでは、下水サンプルの不活化条件は 60℃90 分が主流になりつつあるが、60 分でも十分に不活化できていることが今回のデータでもよく分かった。リアルタイム PCR の結果によれば、RNA は不活化処理後もある程度残っているが、ウイルス株間での違いがあるという認識でよいか。
 - 一部再現性が取れていない検体があるため、株間による違いがあるかについては、追加で調査する必要がある。

5. スケジュール

- 資料 3-3 下水中の新型コロナウイルス検出マニュアル (案) については、今後皆様からのご意見を踏まえてブラッシュアップを進めていく旨、研究代表者より報告

以上

出席者リスト

1	吉田 弘	国立感染症研究所	代表
2	喜多村 晃一	国立感染症研究所	分担
3	濱崎 光宏	福岡県保健環境研究所	分担
4	小澤 広規	横浜市衛生研究所	分担
5	田嶋 淳	国土交通省国土技術政策総合研究所	分担
6	小川 貴史	千葉県衛生研究所	協力者
7	藤沼 裕希	千葉県衛生研究所	協力者
8	貞升 健志	東京都健康安全研究センター	分担
9	長島 真美	東京都健康安全研究センター	協力者
10	高橋 雅輝	岩手県環境保健研究センター	協力者
11	北島 正章	北海道大学院工学研究院	分担
12	原本 英司	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	分担
13	藤森 亜紀子	岩手県環境保健研究センター	協力者
14	植木 洋	宮城県保健環境センター	協力者
15	北川 和寛	福島県衛生研究所	協力者
16	坂 恭平	青森県環境保健センター	協力者
17	濱島 洋介	和歌山県環境衛生研究センター	協力者
18	望月 靖	岡山県環境保健センター	協力者
19	木田 浩司	岡山県環境保健センター	協力者
20	伊藤 雅	愛知県衛生研究所	協力者
21	谷 英樹	富山県衛生研究所	協力者
22	板持 雅恵	富山県衛生研究所	協力者
23	葛口 剛	岐阜県保健環境研究所	協力者
24	小川 泰卓	埼玉県衛生研究所	協力者
25	宮下 広大	埼玉県衛生研究所	協力者

オブザーバー（8名）

内閣官房新型コロナウイルス対策推進室
国土交通省 水管理・国土保全局下水道部
厚生労働省結核感染症課
国立感染症研究所
北海道立衛生研究所
北里環境科学センター

事務局（3名）

下水に関するプロジェクト：NIJIs Project (New Integrated Japanese Sewage Investigation for COVID-19)

第2回班会議 次第

- 日時：2020年12月4日(金) 10:30～14:30
- 場所：TKP 飯田橋ビジネスセンター カンファレンスルーム 3D
※ウェブ会議併用
- 出席者：別紙（第一回班会議出席者リストと概ね同じ）の通り

1. 挨拶

2. NIJIs Project 全体の進捗について

- 研究代表よりNIJIs Projectの全体進捗について説明。

3. 各研究進捗状況の発表（第1部）

1) 施設単位のCOVID-19下水疫学調査の実証試験

北海道大学院工学研究院 北島先生

2) 下水からの新型コロナウイルスRNAの検出方法の検討

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 原本先生

- 下水処理場の流入下水は希釈の影響が大きいですが、施設の処理水は効率的に検出できるのではないかと考えている。
- 素遠心処理なしの場合、沈渣が詰まることは無いか。
 - 施設の下水では沈渣が少ないので大きな問題はなかった。都市下水では難しいこともあるかと思う。現在下水中の測定ではシュドモナスファージφ6がコントロールとして活用できるか検討しているが、合流式、分流式などによっても結果が異なるため、今後も検討が必要かもしれない。

3) 定量的微生物リスク評価（QMRA）の利用可能性

山形大学農学部食料生命環境学科 渡部先生

- 今回お示しいただいたデータではエンドポイントを death とし、これをヒトの発症相当としているという認識である。最近の論文では infection をエンドポイントとしているものも多いのではないか。
 - 動物の場合、発症イコール死亡と考えてエンドポイントを設定している。ヒトの場合は治療があるので、ヒトへの外挿を考えた場合には、死亡よりも発症が近いと考えていただけるとよい。
- SARS-CoV-2での用量反応モデル開発の見通しについてお伺いしたい。
 - 動物を使った用量反応データが出てくれば可能になる。ワクチン開発に際して発表されるデータもあることが期待されるが、低いばく露量のデータ等が揃うことも必

要である。

- 4) 民間検査機関の協力による採水頻度を増やした下水中の新型コロナウイルス調査
横浜市衛生研究所 小澤先生
 - PMMoV の結果で、沈渣と上清の量がほぼ一致している。SARS-CoV-2 は沈渣に多く含まれることを考えると、コントロールとして PMMoV を使用することが適切か検討する必要があるかもしれない。
 - 事前調査の段階では、異なる傾向が見えていたが今回はこのような結果となった。
- 5) 福島県の報告 (R2.8-11)
福島県衛生研究所 北川先生

4. 各研究進捗状況の発表 (第 2 部)

- 1) 東京都における流入下水からの SARS-CoV-2 の検出
東京都健康安全研究センター 貞升先生
 - 下水からのウイルス分離はできなかったとの結果だが、他のウイルスの感染や干渉は起こりうるか。エンテロウイルスのほうが増えやすい等の影響はないか。
 - 他のウイルス分離は実施しておらず不明であるが、これまでの経験から複数のウイルスが分離できるため、干渉があるとは考えづらい。
 - 患者の糞便からもウイルス分離は実施したのか。
 - 実施したが、分離はできなかった。
- 2) 環境検体からの新型コロナウイルスゲノム解析の検討
国立感染症研究所ウイルス第二部 喜多村先生
- 3) 青森県における下水からの新型コロナウイルス検出状況について
(令和 2 年 10 月～11 月)
青森県環境保健センター 坂先生
- 4) 岩手県における下水からの新型コロナウイルス検出状況について
岩手県環境保健研究センター 高橋先生
- 5) 千葉県における下水からの新型コロナウイルス検出状況
千葉県衛生研究所 小川先生
 - 添加回収試験は、ウイルスではなく RNA を添加する実験を想定しているのか。ウイルスでの試験も計画しているが、まずは RNA での検出可否を確認したい。
 - RNA 添加試験の結果も興味があるため、結果出れば共有いただきたい。
- 6) 下水中の新型コロナウイルス遺伝子検出結果
埼玉県衛生研究所 小川先生
 - PMMoV 検出では希釈して測定を行っているのか。

- プレートには 10 倍希釈して載せている。
- PMMoV と SARS-CoV-2 は同一条件で測定しているという認識でよいか。
 - その通りである。

5. 各研究進捗状況の発表（第 3 部）

1) 富山県における下水流入水中の新型コロナウイルス検査状況（2020 年）

富山県衛生研究所 板持先生

- DNA mini kit を使用しているが、なにか理由があつての選択か。
 - 次世代シーケンサーを使用する際に polyA が含まれていないほうがよいかと思い採用した。感度などの課題から RNA mini kit を使用したほうがよいかもしれないと考えている。
 - ノロウイルスなどの検出を行う際には DNA mini kit で検出できているのか。
 - 検出できている。

2) 愛知県における下水検体からの新型コロナウイルス検出法の検討

愛知県衛生研究所 伊藤先生

- 採水したサンプルは冷凍サンプルが納入されてくるのか。
 - その通りである。
- 下水サンプルはどの程度納入されるか。
 - 250ml、2 本に分けて納入される。
 - PowerSoil であれば検出される可能性もあり、引き続き調査を進めていただきたい。

3) 和歌山県における NIJIs プロジェクトへの取り組み

和歌山県環境衛生研究センター 濱島先生

- 11 月の採水日は決まっているか。感染者数が増加しているタイミングで採水されていると参考になるかもしれない。
 - 11 月 12 日に採水を実施しており、結果は追って報告する。

4) Poliovirus Sabin1 を用いた RNA 抽出キットの比較検討

岡山県環境保健センター 木田先生

5) 流入水沈渣からのウイルス RNA 抽出について

福岡県保健環境研究 濱崎先生

- 8 月に検出されているが、感染者が発生したタイミングで検出できていると考えてよいか。
 - ご認識の通り、その様に考えている。

6. 全体の質疑応答、討議

- 沈渣からの検出傾向が高いことが徐々に明らかになってきている。固形物に付着している可能性を踏まえると、下水汚泥を調査対象とすることで平均的なデータを取得

できる可能性があるのではないかと考えている。皆様の意見も伺いたい。

- 沈殿池の汚泥や、濃縮汚泥を対象にウイルスのサンプリングを検討したこともあるが、吸着したウイルスの回収方法については検討する必要があると感じた。
- 下水のサンプルと生きたウイルスを混ぜて、どの層に残るかについては今後調査可能かもしれない。北島先生とも協力し、調査を検討したい。
- ウイルスの脱吸着については、時間や温度変化に依存する可能性もある。ぜひ一緒に検討させていただきたい。
- 現在の結果では下水沈渣で多くウイルスが検出されているとのこと、処理水に出てくる可能性は低いかと思う。一方で合流式では大雨の際に下水道越流水が流れ出ることがあり、水道での検出可能性については懸念が残る。

以上

下水に関するプロジェクト：NIJIs Project (New Integrated Japanese Sewage Investigation for COVID-19)

第 3 回班会議 次第

- 日時：2021 年 2 月 26 日（金） 10:00～14:30
- 場所：国立感染症研究所共用第 1 会議室
※ウェブ会議併用
- 出席者：別紙（第一回班会議出席者リストと概ね同じ）の通り

1. 挨拶

2. NIJIs Project 全体の進捗について

- 研究代表者より NIJIs Project の全体進捗について説明。

3. 各研究進捗状況の発表（第 1 部）

1) 発表無し

北海道大学院工学研究院 北島先生

2) 下水からの新型コロナウイルス RNA の検出方法の検討

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 原本先生

- QIAamp Viral RNA Mini Kit で検出できる結果だが、環境水用のキットを使用しなくても十分という認識でよいか。

- その通りである。入手のしやすさ等総合的に考えても、環境水専用のキットでなくともよいのではないか。

3) 下水からの新型コロナウイルス検出作業における感染リスク評価

山形大学農学部食料生命環境学科 渡部先生

- 無視できない程度のリスクがあるというご発表だが、逆に無視できるリスクはどの程度であると考えられるか。

- 新型コロナウイルスの例では、感染後の死亡率なども考慮した評価をする必要があると考えている。個人的な判断も含むが 410 回に 1 回の感染リスクは無視できる程度とは言えないと考えている。

- 0.01mL の下水へのばく露の場合、感染リスクは 2.4×10^{-7} とのことだが、こちらについても無視できないリスクと考えているか。

- 明言は避けたいが、無視できるかできないかを検討する価値のあるリスクレベルと考えている。

4) 検出頻度を増やした下水中新型コロナウイルス検出報告

横浜市衛生研究所 小澤先生

- 調査期間中でのイベント実施についても紹介いただきたい。
 - 10月に大規模施設での観客を増やした実証実験と、1月には成人式が開催された。A～C 処理場がキャッチメントエリアに当たるが、検出には影響がなかった。
- 10万人当たりの感染者数と濃度での比較結果があるが、ウイルス濃度を10万人当たりに換算した意図は何かあるのか。感染者数の割合が変わらなければ検出結果は一定であると考え、換算する必要性について教えていただきたい。
 - 10万人当たりに換算した場合には相関がみられたため、今回報告をさせていただいた。
 - 処理場のサイズが異なるため比較してみた段階である。様々な要素を検討する必要があり、一概に比較できるものではないと考えている。

5) 流入水沈査からのウイルス RNA 抽出について

福岡県保健環境研究 濱崎先生

- 最終的に 1L 当たりに換算する際に用いた試料の量により結果にぶれが生じる。

- 休憩 (10 分) -

4. 各研究進捗状況の発表 (第 2 部)

0) 吉田先生より、施設排水の検出結果についてご発表いただいた

- 検査不成立については、他の大腸菌の検出データなどはあるのか。糞便負荷の少ないサンプルか、検出阻害が起きているかの判断はできるのか。
 - 他の指標での検出は行っていない。サンプル採取時には明らかにお湯が大量に使われていると感じたサンプル群であった。
 - 施設排水の場合は、別の指標も併用してもよいかもしれない。

1) 東京都における流入下水からの SARS-CoV-2 の検出

東京都健康安全研究センター 貞升先生

- ペロ細胞の培養では CPE も見られないのか。
 - CPE は見られず、培養上清の PCR から検出されなかった。
 - 他のウイルスの培養等を行っているのか。
 - 下水道局との取り決めで、他のウイルスについては検査できていない。

2) 環境検体からの新型コロナウイルス検出手法の検討

国立感染症研究所ウイルス第二部 喜多村先生

- CDC_N1 と N2 を個別に足し合わせた場合と N1N2 同時に検出した場合の結果は一貫性があるか。
 - 分離株に対してはスタンダードで補正し概ねコピー数になっていることは確認している。下水検体では異なる結果がみられている。

- 下水検体における CDC_N1N2 では非特異的に検出されている可能性もあるか。
 - 可能性はある。以前はシーケンスも確認していた。
- SARS-CoV-2 以外のウイルス検出結果について、PMMoV が 2020 年とそれ以前で検出量が異なる理由は何が考えられるか。
 - サンプルの採取場所が違うため、キャッチメントエリアの人口が異なることが大きな要因ではないか。
- 3) 青森県における下水からの新型コロナウイルス検出状況について（令和2年10月～令和3年2月）
青森県環境保健センター 坂先生
- 消耗品の入手については感染研も同様の状況である。次年度は消耗品もストック、配布できるように準備したい。
- 4) 岩手県における下水からの新型コロナウイルス検出状況について
岩手県環境保健研究センター 高橋先生
- キットの入手ができず、協力研究者の皆様全員に同じキットを配布することができなかったため、次年度の課題としたい。
- 5) 福島県における環境水からの SARS-CoV-2 検出状況
福島県衛生研究所 北川先生
- 6) 千葉県における下水からの新型コロナウイルス検出状況について
千葉県衛生研究所 小川先生
- 7) 下水中の新型コロナウイルス遺伝子検出結果（2020年10月～2021年2月）
埼玉県衛生研究所 小川先生
- お昼休憩（60分） -
5. 各研究進捗状況の発表（第3部）
- 1) 富山県における下水流入水中の新型コロナウイルス検査状況（2020年12月～2021年2月）
富山県衛生研究所 板持先生
- 富山県では一度も検出されていないが、感染者数も少ない状況と理解している。感染者の状況を踏まえ、慎重に解釈する必要があると考えている。

2) 愛知県における下水検体からの新型コロナウイルス遺伝子検出結果

愛知県衛生研究所 伊藤先生

- 磁器ビーズを用いた評価は実施していない。海外では核酸抽出の自動化装置との相性がよく、新型コロナウイルスの検出に使用されている事例もあるようだ。

3) 和歌山県における NIJIs プロジェクトへの取り組み(R2.10-R3.2)

和歌山県環境衛生研究センター 濱島先生

- 処理場 A は大阪に近いこともあり、大阪圏に勤務している患者さんもいる可能性がある。

4) 岡山県における流入下水からの新型コロナウイルス検出状況（2020年10月～2021年2月）

岡山県環境保健センター 木田先生

- PolioV Sabin1 の回収率は算出しているか。
 - 算出はしていないが、1 サイクル以上の遅れが認められないため 50%以上の回収率と考えている。

5) 岐阜県における下水からの新型コロナウイルス検出状況について

岐阜県保健環境研究所 葛口先生

- 超音波の処理は、陰電荷膜法で処理したのち膜をビーズエキスに入れて処理しているという理解でよいか。膜自体は残るといふことか。
 - ご認識の通りである。フィルターで裁断したのち断片を浮かせて超音波処理している。

6. 報告書のとりまとめについて

7. 全体の質疑応答、討議

- 多くの自治体で公表に関する懸念があるとのことで、データをどのように活用していくかが今後の課題になると考えている。逆に積極的に政策決定や市民へのコミュニケーションの一つとして活用したいなどの意向がある自治体があれば教えていただきたい
 - 早期検知となればよいかもしれないが、現状では周知情報としての利用となるため、活用は積極的ではないかもしれない。
 - 公表の仕方を自治体が判断するのは難しい。流行予測に使えるかどうか、慎重にデータを精査するしかないのが現状である。

8. その他

- 報告書の作成を進めており、ドラフト案ができた段階で皆様にお送りする。公表については協力研究者の皆様の意向を踏まえ、情報を丸めて報告書にとりまとめる予定である。関係部署のコメント等を頂き、まとめ方などご意見を頂きたい。

以上