

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）
「環境水に含まれる新型コロナウイルス等病原体ゲノム情報の活用に関する研究」
分担研究報告書

下水処理場を調査定点とした複数種ウイルス同時検出系の検討

研究代表者	吉田 弘	国立感染症研究所
研究分担者	濱崎光宏	福岡県保健環境研究所
研究協力者	坂 恭平	青森県環境保健センター
研究協力者	北川和寛	福島県衛生研究所
研究協力者	藤沼裕希	千葉県衛生研究所
研究協力者	花田裕司	千葉県衛生研究所
研究協力者	黒沢博基	埼玉県衛生研究所
研究協力者	濱本紀子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	長島真美	東京都健康安全研究センター
研究協力者	熊谷遼太	東京都健康安全研究センター
研究協力者	小澤広規	横浜市衛生研究所
研究協力者	板持雅恵	富山県衛生研究所
研究協力者	川上利恵	富山県衛生研究所
研究協力者	葛口 剛	岐阜県保健環境研究所
研究協力者	伊藤 雅	愛知県衛生研究所
研究協力者	中村範子	愛知県衛生研究所
研究協力者	松浦侑輝	奈良県保健研究センター
研究協力者	藤本泰之	和歌山県環境衛生研究センター
研究協力者	寺西彩香	和歌山県環境衛生研究センター
研究協力者	望月 靖	岡山県環境保健センター
研究協力者	木田浩司	岡山県環境保健センター
研究協力者	清迫理恵	岡山県環境保健センター
研究協力者	眞榮城徳之	沖縄県衛生環境研究所
研究協力者	平良遥乃	沖縄県衛生環境研究所

研究要旨 終末処理場の流入水から効率よく複数種の病原体を同時に検出するために、対象病原体、リアルタイムPCR条件の検討を行った。対象としたウイルスは、インフルエンザウイルス、RSウイルス、ライノウイルス、パラインフルエンザウイルス、ヒトコロナウイルス、パレコウイルス、ノロウイルス、アストロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス、ヒトエンテロウイルス、アデノウイルスの12種類を選定した。1枚のリアルタイムPCRプレートを用いて、6種類の病原体が1度に定量できる様にプレートをデザインした。また、1種類のコントロール試薬で12種類全ての病原体の検量線が作成できるようにした。検査の結果、インフルエンザウイルス、RSウイルス、パラインフルエンザウイルスについては、ほとんど検出することができなかったが、他の病原体については、 $2.3 \times 10^2 \text{GC/L}$ から $3.4 \times 10^7 \text{GC/L}$ の範囲で効率よく検出することができた。

A. 研究目的

我が国では、流行している病原体の把握は、主に感染症発生動向調査により行われている。定点把握疾患については、病原体定点医療機関で採取された臨床検体から病原体を検出し、その情報を元に流行している病原体の把握を行っている。しかし、病原体定点医療機関を受診した有症者を検査の対象としていることから、不顕性感染者を含めた感染症の全体像を把握することが困難である。

一方、終末処理場の流入水を調査することで、顕性、不顕性を問わずに感染者の存在を把握できることが知られている。そこで、本研究では、不顕性感染者を含めた感染症の全体像を把握することを目的とし、終末処理場の流入水を用いた病原体検出の検討を行った。本年度は、検査手法の簡便化を図るため、複数種の病原体の同時検出について検討を行った。

B. 研究方法

1. 対象病原体

対象とした病原体は呼吸器感染症の原因ウイルスとして、インフルエンザウイルス（A型、B型）、RSウイルス（A型、B型）、ライノウイルス（A型、B型、C型）、パラインフルエンザウイルス（1型、2型、3型）、ヒトコロナウイルス（HCoV-229E、HCoV-HKU1、HCoV-NL63、HCoV-OC43）、パレコウイルスの6種類を選定した。さらに、腸管感染症の原因ウイルスとして、ノロウイルス（GI型、GII型）、アストロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス（A群）、ヒトエンテロウイルス、アデノウイルスの6種類を選定した。各プライマー及びプローブの合成及び0.2mlの96穴リアルタイムPCRプレートへの固相はサーモフィッシャーサイエンティフィック社へ依頼した。1枚のリアルタイムPCRプレートで4検体、6種類の病原体の検査ができるようにデザインした（図1）。

2. リアルタイムPCR

検体、RNA抽出方法の選定及びリアルタイムPCRは、各地方衛生研究所で行った。抽出したRNAについて、Prime Script RT Master Mix（TaKaRa Bio社）を用い37℃で30分、85℃で5秒の逆転写反応でcDNAを合成した。得られたcDNAについて、TaqPath BactoPure Microbial Detection Master Mix（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いて、25℃2分、85℃10分、95℃2分のインキュベーションを行い、95℃5秒、60℃30秒のPCR反応を40サイクル行った。陽性コントロールは、Custom DNA control（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いた。陽性コントロールを10倍段階希釈し、 1×10 gene copies/ μ lから 1×10^3 gene copies/ μ lになるように調整し、作成した検量線から流入水1L当たりのウイルスのゲノムコピー数（GC/L）を算出した。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、その平均値を算出した。

3. 実験結果の共有

各地方衛生研究所で実施した実験結果は、令和6年3月13日に開催された第二回研究班会議で共有された。

C. 研究結果

1. リアルタイムRT-PCR結果

7施設の地方衛生研究所から12種類全ての病原体について、結果が得られた。2施設の地方衛生研究所については、今回使用した0.2mlのリアルタイムPCRプレートが施設が所有するリアルタイムPCR装置に対応していなかったため、検査結果が得られなかった。得られた検査結果を表1に示す。

呼吸器感染症の原因ウイルスのうち、インフルエンザウイルス、RSウイルス、パラインフルエンザウイルスの3種類の病原体は、ほとんどの地方衛生研究所で検出することができなかった。ライノウイルス、ヒトコロナウイルス、パレコウイルスについては、 2.3×10^2 GC/Lから 5.1×10^5 GC/Lの範囲で比較的よく検出することができた。

腸管感染症の原因ウイルスについては、ロタウイルス以外で 1.0×10^3 GC/Lから 3.4×10^7 GC/Lの範囲で効率よく検出することができた。また、同一のRNAを使用して12種類のウイルスの検査を行うことから1回の検査で使用するRNAは120 μ lを要する。1回のRNA抽出作業でおおよそ60 μ l程度しかRNAが得られないため、ある程度希釈してRNAを使用する必要がある。今回、RNAを5倍又は10倍希釈で検査を行ったところ、ほぼ問題なく検査可能であることが確認された。

D. 考察

2023年の感染症発生動向調査による病原微生物検出情報¹⁾では、インフルエンザウイルス（A型及びB型の合計）の検出数は7881件、RSウイルスの検出数は720件、パラインフルエンザウイルスの検出数は449件と多く検出されているが、流入水からはほとんど検出することができなかった。これらのウイルスは流入水中に排泄されるウイルス量が少ないため、検出することが困難と考えられる。今回使用したプライマー、プローブの配列情報は公開されていないことから、別のプライマー、プローブを用いた検証が必要と考えられる。

前述と同様¹⁾に感染性胃腸炎の患者から検出されたウイルスは、ノロウイルスが1376件、アストロウイルスが105件、サポウイルスが251件と良く検出されており、流入水からもこれらのウイルスは高濃度で検出することができた。今後、各ウイルスのゲノムコピー数から感染者数の推定や患者から検出されたウイルスとの比較に使用されることが期待される。しかし、ロタウイルスについては、ほとんど検出することができなかった。全国のロタウイルスを原因とする感染性胃腸炎の患者報告数²⁾は、2016年に5266件をピークに減少しており、2023年は154件と減少している。2020年の10月よりロタウイルスワクチンが定期接種になったことにより患者数が減少したため、流入水中に排泄されるウイルス量が減少したためと考えられる。

今回我々は、1枚のリアルタイムPCRプレートで6種類のウイルスの定量が可能で、1種類のコントロール試薬で各ウイルスについて定量できるように簡便な検査系を作

成することができた。

E. 結論

今回検討した呼吸器感染症の原因ウイルスの検査系において、インフルエンザウイルス、RSウイルス、パラインフルエンザウイルスについては、別のプライマー、プローブを用いた検証が必要と考えられる。残りのライノウイルス、ヒトコロナウイルス、パレコウイルス及び、6種類の腸管感染症の原因ウイルスについては、今回使用した検査系で十分使用できると考えられる。また、1種類のコントロール試薬で12種類のウイルスについて定量できるように簡便な検査系を作成することができた。

参考文献

- 1) 国立感染症研究所ホームページ IASR 速報集計表(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-table/1493-iasrtv.html>)
- 2) 国立感染症研究所ホームページ IDWR 速報データ (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/data.html>)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

(A)

呼吸器感染症の原因ウイルス

	Flu A/B	RS A/B		Rhino A-C		ParaFlu 1-4		Corona		Parechovirus		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10 ³	A											
10 ²	B											
10 ¹	C											
NC	D											
sample1	E											
sample2	F											
sample3	G											
sample4	H											

(B)

腸管感染症の原因ウイルス

	NV-G1/G2	Astro (pool)		Sapo(pool)		RotaA pool		entero		Adeno		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10 ³	A											
10 ²	B											
10 ¹	C											
NC	D											
sample1	E											
sample2	F											
sample3	G											
sample4	H											

図1 デザインしたPCRプレート

A：呼吸器感染症の原因ウイルス検査用プレート

B：腸管感染症の原因ウイルス検査用プレート

表1 流入水中の各ウイルスのゲノムコピー数 (GC/L)

地方衛生 研究所	検体	呼吸器感染症の原因ウイルス						腸管感染症の原因ウイルス					
		インフル エンザウ イルス	RSウイル ス	ライノウ イルス	パラインフ ルエンザウ イルス	ヒトコロナ ウイルス	パレコウ イルス	ノロウイ ルス	アストロ ウイルス	サボウイ ルス	ロタウイ ルス	エンテロ ウイルス	アデノウ イルス
A	R5. 7. 3_Promega	ND	ND	2. 3E+02	ND	ND	5. 1E+05	1. 8E+05	3. 8E+07	6. 6E+03	ND	6. 3E+05	3. 9E+05
	R5. 7. 3_PEG	ND	ND	3. 3E+03	ND	ND	4. 7E+05	2. 7E+05	1. 9E+07	ND	ND	4. 0E+04	5. 5E+05
	R5. 12. 4_Promega	ND	ND	8. 1E+02	ND	6. 1E+03	2. 0E+03	1. 9E+05	4. 5E+04	2. 2E+05	ND	6. 4E+04	1. 7E+05
	R5. 12. 4_PEG	ND	ND	ND	ND	ND	3. 6E+04	1. 2E+05	1. 0E+04	8. 9E+03	ND	3. 0E+04	5. 9E+04
	R5. 12. 18_Promega	ND	ND	3. 9E+02	ND	2. 6E+03	4. 0E+03	4. 1E+05	5. 5E+06	4. 8E+04	ND	1. 5E+05	6. 6E+05
	R5. 12. 18_PEG	ND	ND	1. 1E+03	ND	ND	3. 4E+04	3. 0E+05	1. 3E+06	4. 6E+03	ND	6. 8E+04	2. 5E+05
R6. 2. 5_Promega	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4. 0E+06	2. 7E+07	1. 8E+06	4. 7E+03	1. 8E+04	2. 1E+05	
R6. 2. 5_PEG	ND	ND	ND	ND	ND	4. 6E+03	1. 4E+06	9. 6E+06	8. 4E+04	ND	1. 7E+04	1. 3E+05	
B	12-2 (希釈なし)	ND	ND	3. 0E+04	ND	1. 5E+03	7. 6E+03	3. 0E+05	5. 3E+06	8. 2E+05	1. 5E+02	1. 7E+04	8. 9E+05
	12-2 (10倍希釈)	ND	ND	3. 0E+03	ND	2. 7E+02	1. 2E+03	8. 9E+04	1. 4E+06	2. 4E+05	5. 7E+02	3. 8E+03	1. 0E+05
	1-5 (希釈なし)	1. 6E+03	ND	2. 0E+04	ND	1. 2E+03	2. 2E+03	1. 4E+06	5. 1E+06	9. 0E+05	2. 8E+03	3. 3E+03	6. 8E+04
	1-5 (10倍希釈)	1. 8E+02	ND	2. 0E+03	ND	4. 2E+02	8. 1E+02	1. 9E+05	7. 2E+06	1. 3E+05	4. 7E+03	1. 4E+07	5. 9E+03
C	12月-1沈査 (希釈なし)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5. 4E+03	7. 1E+04	1. 8E+04	ND	ND	1. 4E+05
	12月-1沈査 (10倍希釈)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8. 5E+04	6. 9E+05	2. 4E+05	ND	ND	3. 0E+03
	12月-1上清濃縮物	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1. 6E+05	8. 6E+05	3. 2E+04	3. 4E+01	8. 5E+03	4. 3E+03
	12月-2沈査 (希釈なし)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1. 1E+03	3. 1E+04	4. 5E+03	ND	ND	ND
	12月-2沈査 (10倍希釈)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4. 3E+03	5. 1E+04	9. 8E+03	ND	ND	ND
	12月-2上清濃縮物	ND	ND	1. 2E+04	ND	ND	ND	2. 0E+05	9. 1E+05	7. 2E+04	4. 7E+04	6. 3E+03	1. 3E+04
	1月-1上清濃縮物	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5. 1E+05	1. 2E+06	6. 6E+04	2. 2E+03	4. 7E+03	3. 1E+03
	1月-2上清濃縮物	ND	ND	ND	ND	ND	2. 6E+03	1. 1E+06	2. 6E+06	3. 6E+04	1. 1E+05	2. 1E+03	2. 8E+03
D	K-11 2023年11月採水	ND	ND	3. 6E+02	ND	ND	1. 3E+03	1. 2E+05	2. 6E+06	8. 6E+05	ND	3. 9E+04	1. 5E+05
	T-11 2023年11月採水	ND	ND	8. 2E+03	ND	ND	5. 2E+02	1. 3E+05	1. 5E+05	2. 2E+06	ND	8. 5E+04	1. 1E+05
	K-21 2024年1月採水	ND	ND	4. 4E+02	ND	1. 8E+03	5. 1E+02	1. 2E+06	3. 0E+06	1. 6E+06	ND	1. 6E+04	1. 4E+05
	T-21 2024年1月採水	ND	ND	ND	ND	1. 2E+03	2. 5E+02	1. 6E+06	5. 4E+06	6. 5E+06	1. 1E+02	1. 2E+04	5. 5E+06
E	12月採水検体 (希釈なし)	ND	ND	ND	ND	ND	2. 1E+05	2. 6E+05	2. 3E+07	5. 6E+05	ND	3. 5E+05	4. 0E+05
	12月希釈検体 (5倍希釈)	ND	ND	ND	ND	ND	3. 1E+05	4. 0E+04	3. 4E+07	5. 9E+05	ND	4. 3E+05	4. 5E+05
	2月採水検体 (希釈なし)	ND	ND	ND	ND	1. 6E+04	2. 5E+04	3. 0E+06	4. 9E+06	6. 0E+05	ND	1. 3E+05	7. 8E+04
	2月希釈検体 (5倍希釈)	ND	ND	ND	ND	2. 3E+04	ND	3. 5E+06	6. 9E+06	6. 5E+05	ND	1. 8E+05	1. 0E+05
F	2023年11月	ND	ND	ND	1. 5E+02	ND	ND	2. 8E+03	3. 8E+03	3. 7E+04	ND	6. 2E+02	1. 1E+04
	2023年12月	ND	ND	ND	ND	2. 9E+02	ND	7. 5E+04	8. 4E+06	2. 7E+05	ND	5. 0E+03	2. 3E+03
	2024年1月	ND	ND	ND	ND	6. 9E+02	ND	6. 8E+04	1. 7E+06	1. 3E+05	ND	8. 7E+02	2. 4E+03
	2024年2月	ND	ND	ND	ND	1. 1E+02	ND	8. 8E+04	4. 3E+04	6. 9E+04	ND	5. 8E+02	1. 0E+03
G	20240208_1_PowerSoil×5	ND	ND	ND	4. 3E+03	2. 3E+03	ND	1. 7E+04	2. 9E+04	1. 8E+04	ND	ND	ND
	20240208_1_PowerSoil×10	ND	ND	ND	6. 9E+03	ND	ND	4. 4E+04	6. 3E+04	2. 2E+04	ND	ND	ND
	20240208_1_TNA×5	ND	ND	2. 1E+03	4. 9E+04	2. 2E+04	ND	3. 2E+06	4. 5E+06	5. 6E+06	ND	1. 5E+04	2. 0E+04
	20240208_1_TNA×10	ND	ND	1. 3E+04	3. 6E+04	1. 8E+04	ND	ND	4. 7E+06	5. 4E+06	ND	4. 4E+04	7. 6E+03

ND: 測定限界以下

環境水に含まれる新型コロナウイルス等
病原体ゲノム情報の活用に関する研究
令和5年度第2回班会議 令和6年3月13日(水)

青森県における下水中からの新型コロナウイルス検出状況 (~2024年3月)

青森県環境保健センター 微生物部
坂 恭平

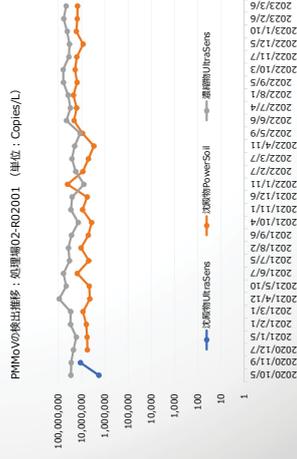
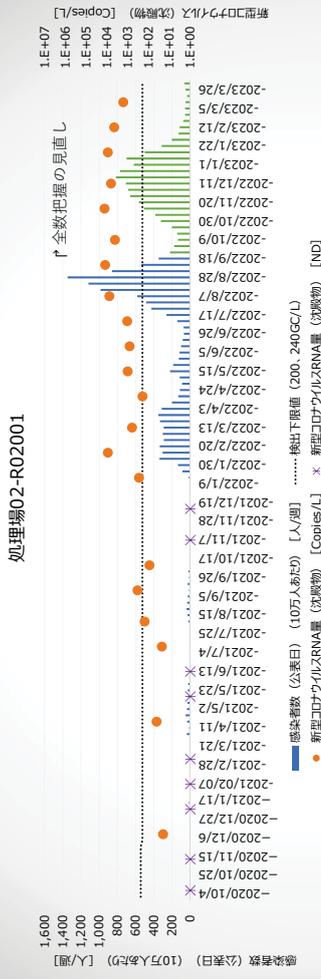
下水処理場情報

- 【統計資料 (令和5年4月1日)】
- 行政人口：164,738人
 - 整備人口：146,000人 (合流：40,190人、分流：105,810人)
 - 普及率：88.6%
 - 流入汚水には、場内返流を含む。
 - 分流の処理能力超過分は、合流で処理する。

【採取方法】

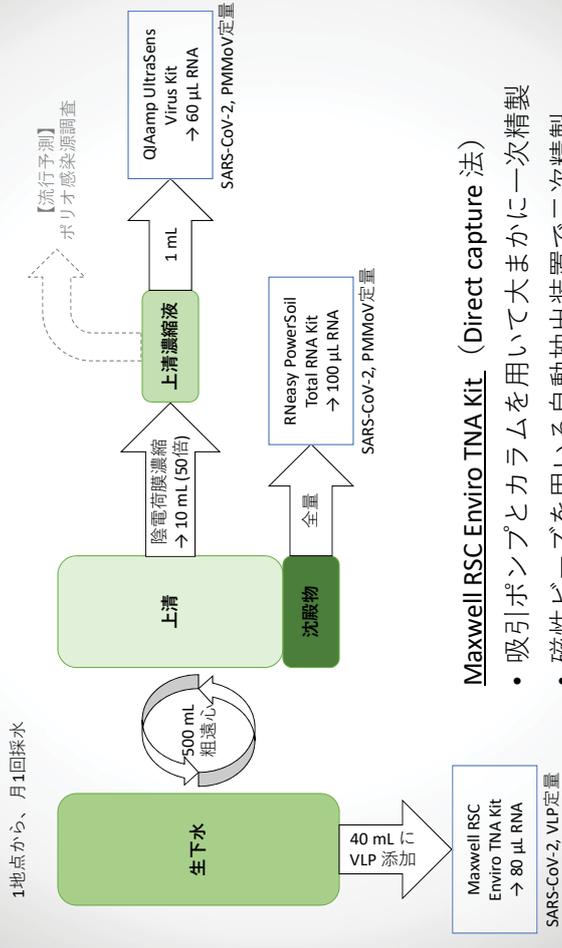
- 当センター職員が公用車で処理場へ赴き、処理場職員立ち合いのもと、当センター職員が採水する。
- 道具は、柄杓のみ処理場のものを借りている (処理場職員も自身の業務のため同時に採水)。
- 当センターと処理場間の距離は、1km未満のため、輸送時に保冷剤等は使用していない。

これまでの調査



- 流入下水を粗速心し、上清濃縮物と沈殿物から、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の定量を行った。
- プロセスコントロールとして、トウガラシ微生物ウイルス (PMMoV) の定量も同時に行った。

令和5年度調査方針



VLP

【原液】

10⁴ copies / μ L (ロットにより異なるらしいので注意)

【検体への添加】

原液 40 μ L を生水 40 mL に添加

↓

80 μ L に溶出させて、

2.5 \times 10⁴ copies / 5 μ L

【検量線の準備】

原液 40 μ L + PBS(-) 160 μ L を Maxwell RSC
Viral TNA Kit で抽出

↓

100 μ L に溶出させて、

5.20 \times 10⁴ copies / 5 μ L

qPCR

【SARS-CoV-2】

SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit

【PMMoV】

One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix, with
UNG

【VLP】

One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix, with
UNG

【反応条件】

25 °C 5 min

52 °C 5 min

95 °C 10 sec

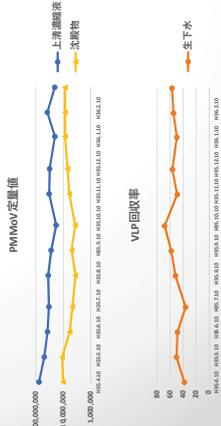
95 °C 5 sec

60 °C 30 sec

6

定量値と回収率

上清濾液			沈殿物			生水		
採取年月日	SARS-CoV-2 (copies/L)	PMMoV (copies/L)	採取年月日	SARS-CoV-2 (copies/L)	PMMoV (copies/L)	採取年月日	SARS-CoV-2 (copies/L)	VLP 回収率 (%)
2023.4.10	(112)	75,924,978	2023.4.10	1,576	10,269,519	2023.4.10	14,512	37.8
2023.5.8	(595)	48,726,547	2023.5.8	4,841	11,091,373	2023.5.8	2,445	50.1
2023.6.5	ND	37,414,044	2023.6.5	1,121	5,896,955	2023.6.5	52,099	48.7
2023.7.3	1,286	33,186,797	2023.7.3	10,352	4,722,642	2023.7.3	71,372	35.9
2023.8.7	ND	35,376,485	2023.8.7	4,305	3,627,243	2023.8.7	141,938	51.6
2023.9.4	(367)	27,612,331	2023.9.4	13,724	5,020,822	2023.9.4	157,541	58.2
2023.10.2	(877)	18,193,177	2023.10.2	1,409	3,737,442	2023.10.2	9,640	68.5
2023.11.6	(454)	32,512,633	2023.11.6	3,259	6,075,495	2023.11.6	19,779	49.0
2023.12.4	(549)	31,325,564	2023.12.4	1,770	7,044,304	2023.12.4	10,979	56.5
2024.1.9	2,568	20,165,293	2024.1.9	14,720	8,666,639	2024.1.9	66,054	49.5
2024.2.5	2,046	38,101,188	2024.2.5	20,644	8,677,006	2024.2.5	172,502	54.8
2024.3.4	3,820	20,422,160	2024.3.4	14,072	8,709,854	2024.3.4	88,994	57.0



6

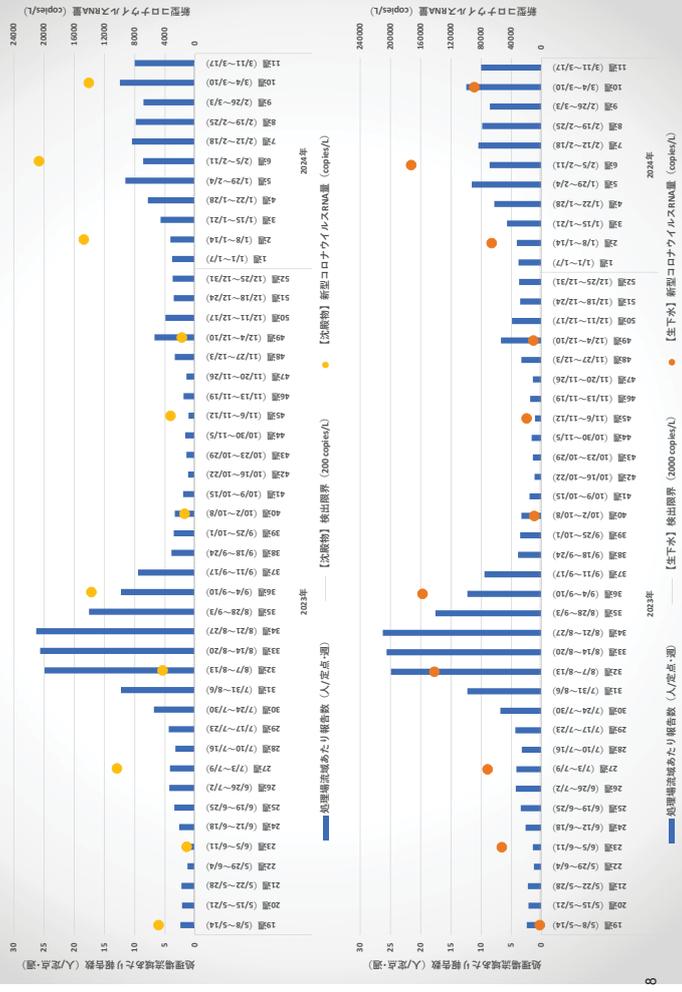
- 沈殿物と生水からは、毎月 SARS-CoV-2 が検出された。
- 生水からの核酸回収率は、35.9% ~ 68.5% であった。

SARS-CoV-2のトレンド (全数把握見直し~5類移行前)



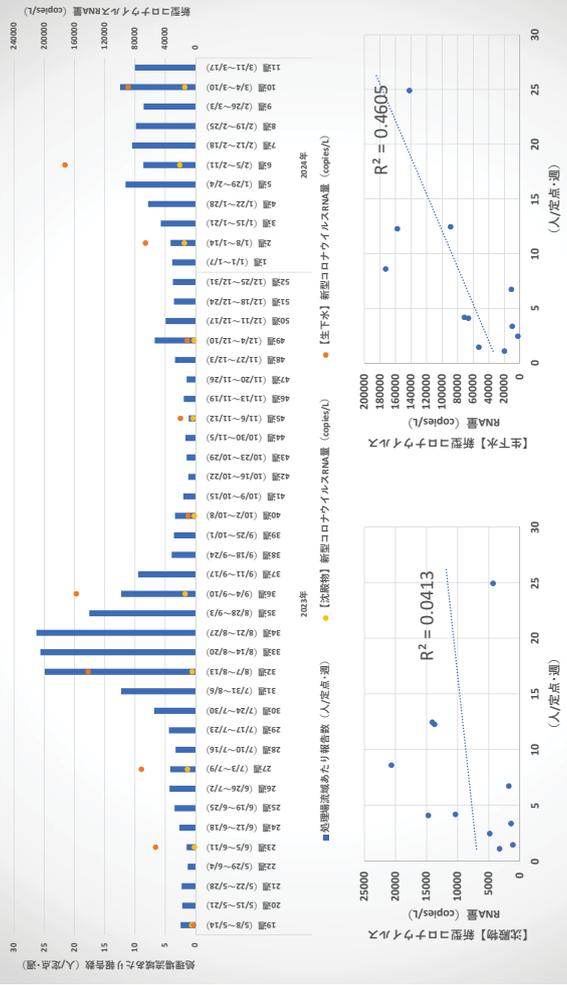
7

SARS-CoV-2のトレンド (5類移行後)



8

沈殿物と生水の比較 (5 類移行後)



● 報告数の増加に伴う定量値の上昇は、Direct capture 法を用いる生水の方が顕著であった。

まとめ

- Direct capture 法によって、短時間で核酸抽出ができ、高効率に検出ができた。
 - SARS-CoV-2 以外の項目を要検証
- VLP の添加回収試験によって、各検体間の相対的な回収率が比較できた。
 - 食品からの抽出においても活用できるか
- PMMoV については、定量値が大きく外れた時のトラブルシューティングとしても使える可能性がある。
 - VLP 添加前の検体について、均一性や供試料量など
- 令和 6 年度は、感染症流行予測調査として、月 2 回の採水と Direct capture 法によって、調査を継続したい。
 - ポリオ感染症調査も並行して実施

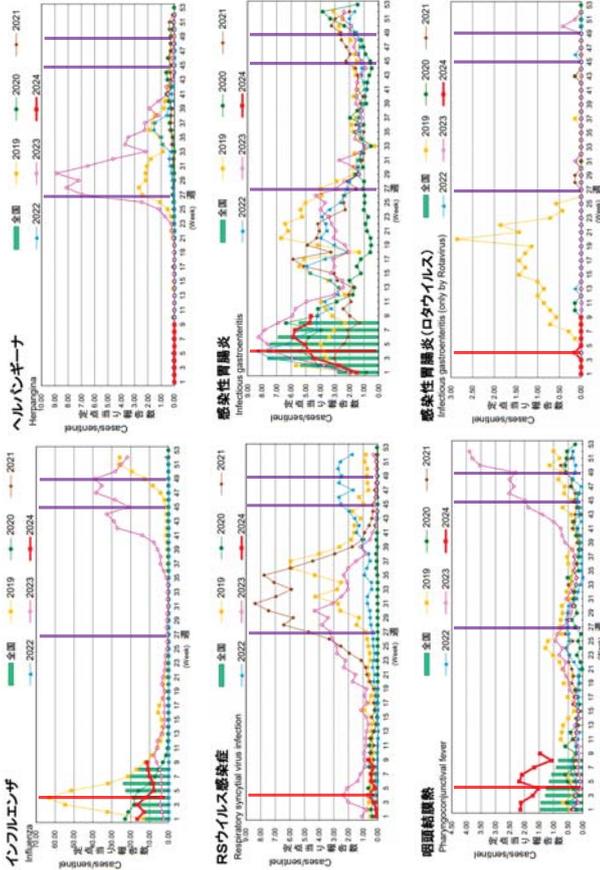
材料及び方法

1. 材料
 - ・2023年7月3日、12月4日、12月18日、2024年2月5日採水の環境水
2. 方法
 - (1)核酸抽出
 - ・ 上清 + 沈殿物 : Wizard® Enviro Total Nucleic Acid kit (Promega)
 - ・ 上清 (PEG) : QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN)
 - (2)cDNA合成 (反応条件は吉田先生の方法と同一)
 - ・TaKaRa PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)
 - (3)qPCR (反応条件は吉田先生の方法と同一)
 - ・試薬 : TaqPath™ BactoPure™ Microbial Detection Master Mix, no Rox (10 uL 反応系)
 - ・プレート : TrueMark Custom Plates (カスタマイズ)
 - ・検量線用標準核酸 : Custom DNA control (1 x 10⁵ copies/μL), WWS_control_1

福島県感染症週報

採水日

- ・2023.7.3
- ・2023.12.4
- ・2023.12.18
- ・2024.2.5

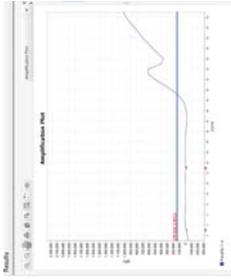


() 1/2のみ検出

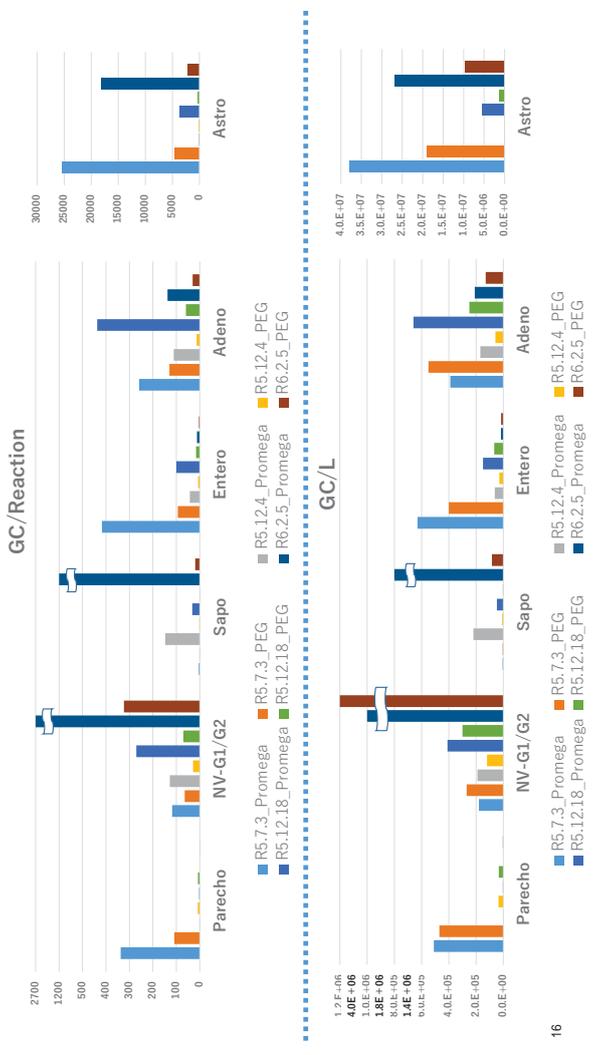
GC/Reaction	Flu A/B	RS A/B	Rhino A-C	Parainfluenza 1-4	CoV (Seasonal)	Parvovirus	NV-G1/G2	Astro	Sapo	RotA	Enterovirus	Adeno
R5.7.3_Promega	ND	ND	0.2	ND	ND	337.3	117.5	25394.1	4.4	(1.1)	417.5	255.4
R5.7.3_PEG	ND	ND	0.8	ND	ND	105.8	64.0	4498.2	(1.5)	ND	93.7	129.2
R5.12.4_Promega	ND	ND	0.5	ND	4.1	1.3	127.5	29.8	147.4	ND	42.4	110.6
R5.12.4_PEG	ND	ND	(0.0)	ND	(0.7)	8.5	28.7	2.4	2.1	ND	7.1	13.7
R5.12.18_Promega	ND	ND	0.3	ND	1.7	2.7	270.7	3647.6	31.9	ND	99.8	437.3
R5.12.18_PEG	ND	ND	0.2	ND	ND	8.0	70.1	301.6	1.1	ND	15.8	59.0
R6.2.5_Promega	ND	ND	ND	ND	ND	2693.9	18095.2	18095.2	1219.0	3.1	11.9	137.5
R6.2.5_PEG	ND	ND	ND	ND	ND	1.1	323.2	2229.2	19.5	ND	4.0	30.3
GC/L	Flu A/B	RS A/B	Rhino A-C	Parainfluenza 1-4	CoV (Seasonal)	Parvovirus	NV-G1/G2	Astro	Sapo	RotA	Enterovirus	Adeno
R5.7.3_Promega	ND	ND	2.3E+02	ND	ND	5.1E+05	1.8E+05	3.8E+07	6.6E+03	(1.7E+03)	6.3E+05	3.9E+05
R5.7.3_PEG	ND	ND	3.3E+03	ND	ND	4.7E+05	2.7E+05	1.9E+07	(6.6E+03)	ND	4.0E+05	5.5E+05
R5.12.4_Promega	ND	ND	8.1E+02	ND	6.1E+03	2.0E+03	1.9E+05	4.5E+04	2.2E+05	ND	6.4E+04	1.7E+05
R5.12.4_PEG	ND	ND	(6.0E+01)	ND	(3.2E+03)	3.6E+04	1.2E+05	1.0E+04	8.9E+03	ND	3.0E+04	5.9E+04
R5.12.18_Promega	ND	ND	3.9E+02	ND	2.6E+03	4.0E+03	4.1E+05	5.5E+06	4.8E+04	ND	1.5E+05	6.6E+05
R5.12.18_PEG	ND	ND	1.1E+03	ND	ND	3.4E+04	3.0E+05	1.3E+06	4.6E+03	ND	6.8E+04	2.5E+05
R6.2.5_Promega	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.0E+06	2.7E+07	1.8E+06	4.7E+03	1.8E+04	2.1E+05
R6.2.5_PEG	ND	ND	ND	ND	ND	4.6E+03	1.4E+06	9.6E+06	8.4E+04	ND	1.7E+04	1.3E+05

検量線の結果

Respiratory System	Flu A/B	RS A/B	Rhino A-C	Parainfluenza 1-4	CoV (Seasonal)	Parecho
Promega	Slope -3.602	-3.539	-2.961	-4.185	-3.843	-3.408
	R2 0.971	0.999	0.912	0.994	0.996	0.999
PEG	Slope -3.817	-3.678	-3.401	-4.321	-3.739	-3.377
	R2 0.998	0.999	0.950	0.994	0.998	0.999
Gastro	NV-G1/G2	Astro	Sapo	RotA	Enterovirus	Adeno
Promega	Slope -4.019	-3.426	-3.739	-3.434	-3.379	-3.524
	R2 0.952	0.999	0.951	0.999	0.998	0.987
PEG	Slope -5.533	-3.329	-3.265	-3.594	-2.804	-3.401
	R2 0.963	0.999	0.953	0.999	0.909	0.999



Parainfluenzaウイルスが2/2枚に問題



Materials and Methods

流入下水500 mlを50 mlずつ分け 3000 × g, 60 minで遠心

→ 上清は陰電荷膜法へ

500 mlの沈渣に対して0.5 mlのBeef extractで再懸濁

全ての懸濁液を50 ml遠沈管に移し、
ジルコニアビーズを入れボルテックス (15 min)

遠心 (10,000 × g, 20 min)

QIAamp® Viral RNA Mini kitでRNA抽出

SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (Takara) 及び
One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix with UNG (Takara) で遺伝子を確認

18

千葉県における流入下水中のSARS-CoV-2 遺伝子量とCOVID-19新規患者数の相関

千葉県衛生研究所
藤沼裕希、花田裕司

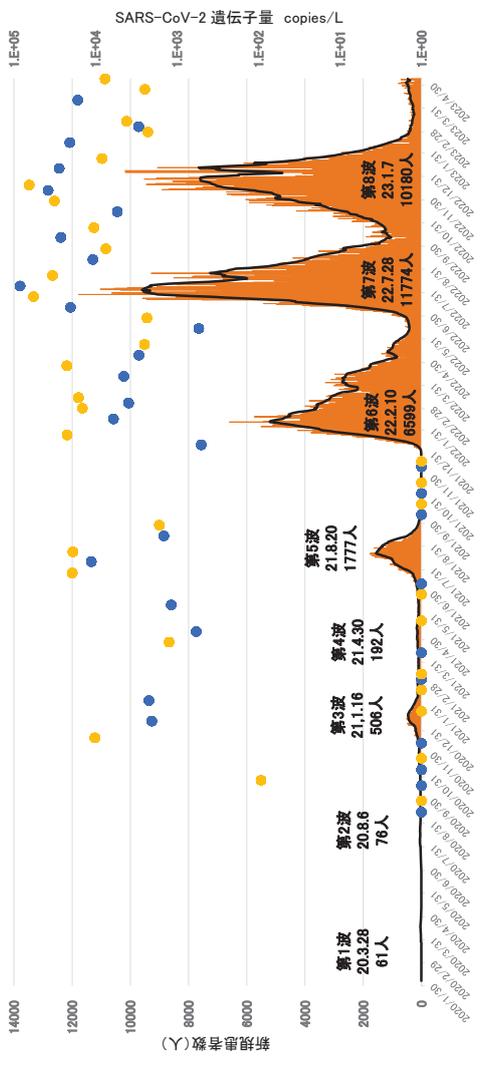
17

Result - PMMoV -



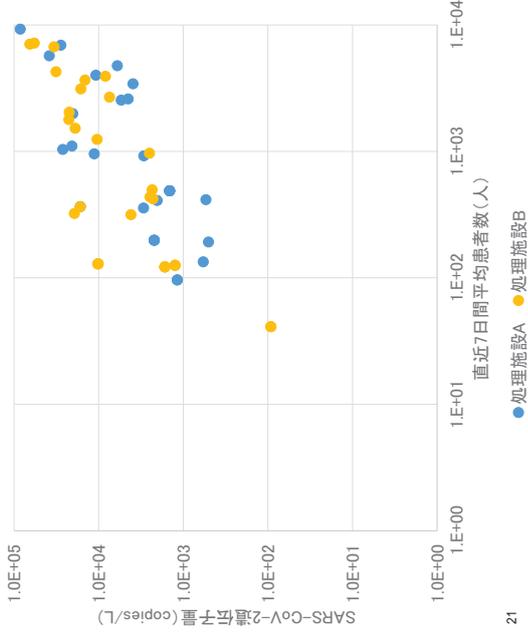
19

Result - SARS-CoV-2 vs Patients 1 -



20

Result - SARS-CoV-2 vs Patients 2 -



Spearmanの順位相関係数	
処理施設A	0.892
処理施設B	0.870

新規患者数と流入下水中のSARS-CoV-2遺伝子量の間には**非常に強い相関が認められた**

21

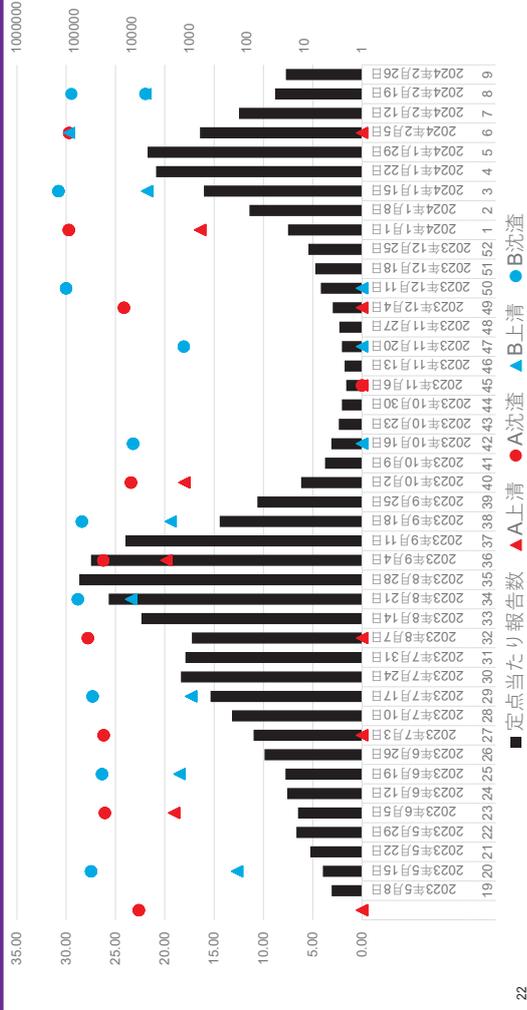
Result - SARS-CoV-2 vs Patients 4 -

Spearmanの順位相関係数

処理施設A		処理施設B		N=10
上清	沈渣	上清	沈渣	
0.232148	0.793939	0.828283	0.50303	

23

Result - SARS-CoV-2 vs Patients 3 -



22

Discussion & Conclusion

- 流入下水中のSARS-CoV-2遺伝子量と新規患者数の間には、**非常に強い相関があった**。
- これは、流入下水中のSARS-CoV-2遺伝子量のモニタリングが、**感染状況を示す指標として有用である**ことを示唆している。
- 今月中にパネルの検証実施予定。

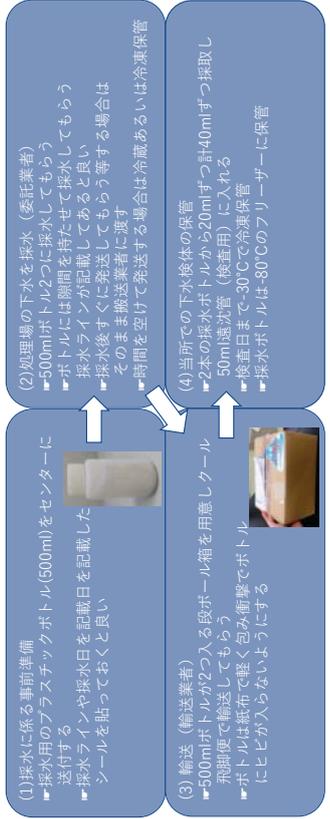
24

埼玉県における下水サーベイランスの 取り組みについて

埼玉県衛生研究所ウイルス担当 黒沢博基 濱本紀子

採水及び検査までの流れについて

- ①採水地点：荒川水循環センター（現況処理人口197万人（2021年度末））
- ②採水間隔及び採水期間：2023年9月5日（火曜日）から開始。原則火曜日に週1回採水を行う。
- ③内容：新型コロナウイルス等感染状況の把握
分析項目：SARS-CoV-2 RNA等濃度解析
成果の取扱：ホームページで公開



埼玉県と環境水サーベイランスとの関わり

- ①2020年度10月～3月：
「環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制構築するための研究」（NIIIs）で当所で検査を実施。
- ②2021年度11月～12月：
「ポストコロナ時代の実現に向けた主要技術の実証・導入に係る事業企画」の公募で採択された企業に県がフィードバックを提供。
- ③2022年度7月～1月：
「ウィズコロナ時代の実現に向けた主要技術の実証・導入に向けた調査研究業務」に参加。検査は外部機関に委託。
- ④2023年度9月～現在：
「環境水に含まれる新型コロナウイルス等病原体ゲノム情報の活用に関する研究」（NIIIs）に再び参加させていただき、現在進行形で当所で検査を実施中。

検査方法について

【材料】

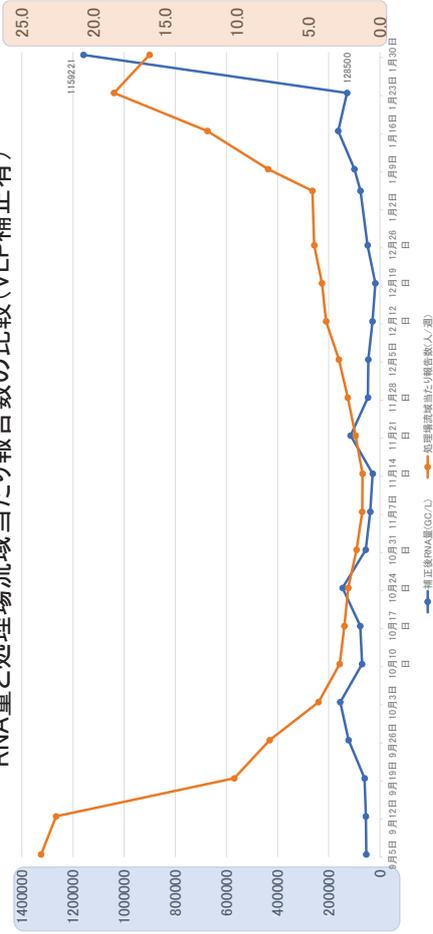
- 埼玉県内1か所の下水処理施設の流入水
- 週に1回採水（検査は月毎にまとめて翌月の下旬に）

【使用試薬】

- 核酸抽出
 - Enviro Total Nucleic Acidキット (Promega) (沈査と上清を混合し核酸抽出)
 - インターナルコントロール
 - VLP-RNA Extraction Control ・リアルタイムPCR
 - SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (コロナ) ※ TaqmanFastVirus1-Step Master Mix (VLP)
- ※2well測定し平均値を算出

検査結果について

RNA量と処理場流域当たり報告数の比較（VLP補正有）



※処理場当たりの報告数は、さいたま市保健所、川口市保健所、南部保健所、鴻巣保健所、鴻巣保健所の報告数の合計を医療機関の合計で割り算

下水に係るPCRパネルの結果について

下水検査の概要

① 抽出：Wizard® Enviro Total Nucleic Acid Kit (Promega)

※・40mlの検体を60μLで抽出。コントロールはVLP

② PCR検査

(1)PCRパネルに添加する検体を選別するための検査

- ・FTD Respiratory pathogens 21（呼吸器感染症病原体検出のPCR試薬）
- ・FTD Viral gastroenteritis（ウイルス性胃腸炎の検出のPCR試薬）

※・QS5を使用

- ・baselineを5-20に設定
- ・Threshold lineを20,000に設定しCt値で比較

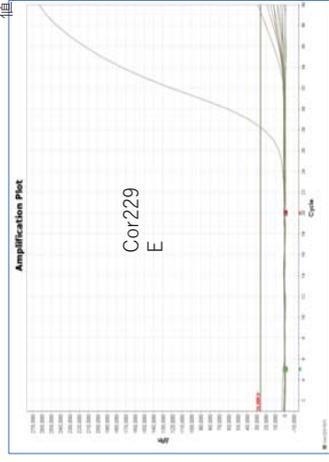
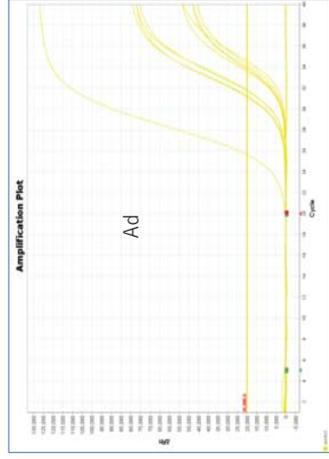
(2)PCRパネル検査

- ・呼吸器系ウイルスパネル
- ・胃腸炎系ウイルスパネル

※・QS5を使用

(1)呼吸器感染症病原体検出のPCR結果（Ct値）

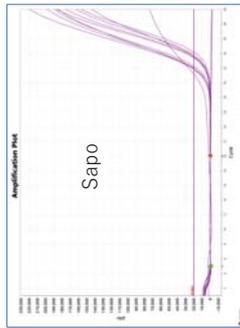
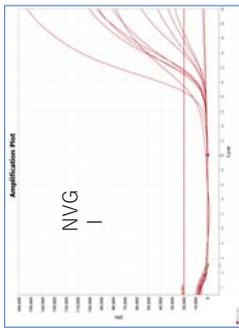
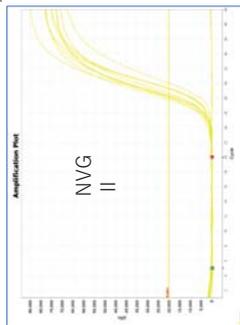
PC	FluA	FluB	FluA/INJ	RhinA	Cor229E	CorS424	CorAN63	CorNOU1	EBV1	HPV14	HPV16	HPV18	RS	RSV2	Ad	HPV16	HPV18	EV
10-1	27.2	28.0	28.4	28.5	28.9	29.0	28.2	28.9	29.9	28.3	28.3	28.4	28.8	28.1	27.4	28.6	27.3	27.6
12-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31.7	31.1	-	-
12-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31.7	31.7	-	-
1-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33.8	-	-	-
1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	34.2	-	-	-
1-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33.8	-	-	-
1-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	34.8	-	-	-



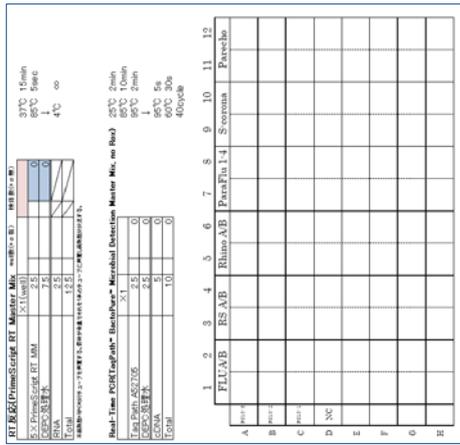
(1) ウイルス性胃腸炎の検出のPCR結果(Ct値)

	NVG I	NVG II	Ad	RotA	Sapo
PC	28.4	28.6	26.3	30.0	31.2
I2-1	33.8	33.7	29.6	28.4	31.8
I2-2	36.7	34.3	29.1	29.1	31.9
I2-3	35.7	33.8	29.5	28.0	32.3
I2-4	34.4	33.0	29.1	27.8	32.0
I-1	29.7	33.4	33.3	29.3	33.5
I-2	31.0	32.0	34.1	28.3	33.4
I-3	31.7	33.0	31.6	29.3	33.8
I-4	31.5	32.5	32.3	29.2	34.2
I-5	31.3	31.5	36.6	28.7	33.6

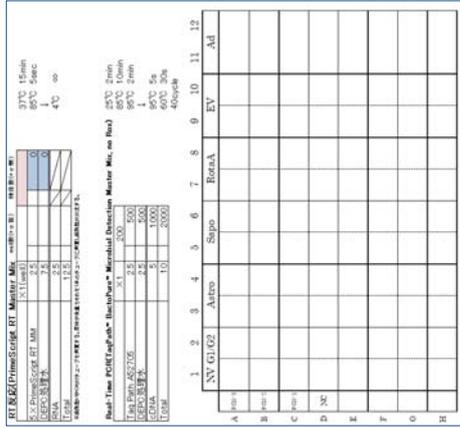
(Ct値)



(2) 呼吸器ウイルスパネル

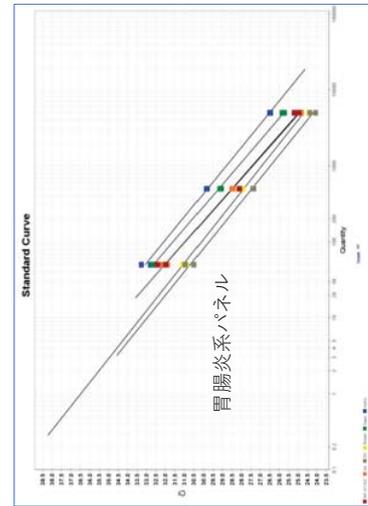
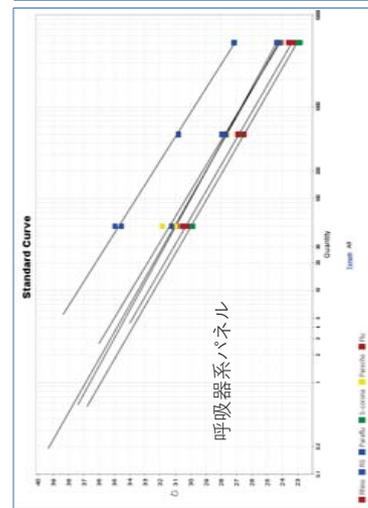


(2) 胃腸炎ウイルスパネル



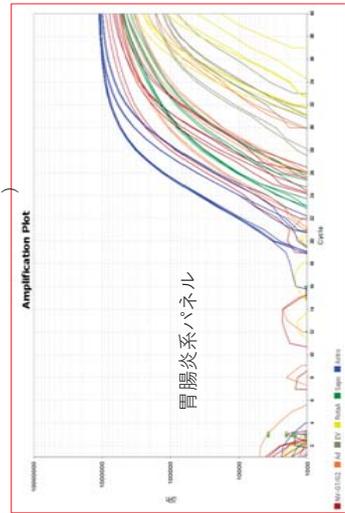
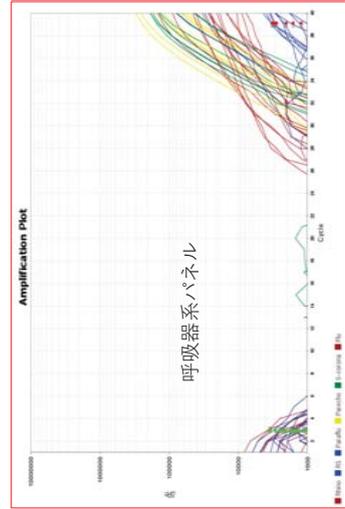
(2) PCRパネル検査のスタンダードカーブについて

	呼吸器ウイルスパネル				胃腸炎ウイルスパネル							
	infA/B	RSA/B	RhinoA/C	ParaInfl/2/3/4	S-coroona	Parecho	NVG1/G2	AstroV	SaV	RVA/C	EV	AdV
slope	-3.413	-3.798	-3.475	-3.304	-3.470	-3.618	-3.561	-3.275	-3.44	-3.184	-3.249	-3.529
R ²	0.998	0.998	0.995	0.991	0.996	0.992	0.990	0.997	0.999	0.994	0.996	0.998



(2) PCRパネル検査の結果について

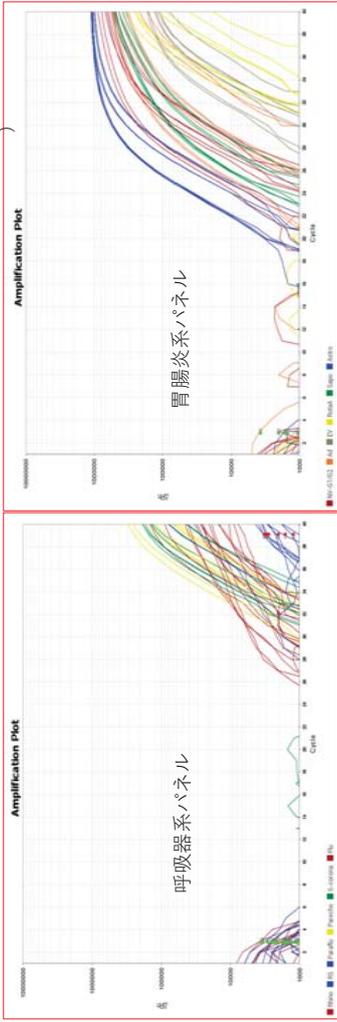
	呼吸器ウイルスパネル				胃腸炎ウイルスパネル							
	infA/B	RSA/B	RhinoA/C	ParaInfl/2/3/4	S-coroona	Parecho	NVG1/G2	AstroV	SaV	RVA/C	EV	AdV
12-2(x1)	1/2	ND	105.4	ND	5.1	25.2	101.2	17823.1	2740.1	0.5	56.7	2977.3
12-2(10 ⁻¹)	1/2	ND	10.2	ND	0.9	3.9	298.0	4793.0	803.9	1.9	12.8	341.3
1-5(x1)	52	1/2	52.2	1/2	4.1	7.2	4757.3	16902.9	2998.9	9.4	11.0	225.3
1-5(10 ⁻¹)	0.6	ND	5.0	ND	1.4	2.7	636.8	2391.4	445.0	15.6	1/2	19.5



(2) PCRパネル検査の結果について

呼吸器系ウイルスパネル		胃腸炎系ウイルスパネル										
infA/B	RSA/B	RhinoA/C	Parainfl/2/3/4	S-cornona	Parecho	NVG1/G2	AstroV	SaV	RVA/C	EV	AdV	
12-2(x1)	1/2	ND	3E+04	ND	1.5E+03	7.8E+03	3.0E+05	5.3E+06	8.2E+05	1.5E+02	1.7E+04	8.9E+05
12-2(10 ⁻¹)	1/2	ND	3E+03	ND	2.7E+02	1.2E+03	8.9E+04	1.4E+06	2.4E+05	5.7E+02	3.8E+03	1.0E+05
1-5(x1)	1.6E+03	1/2	2E+04	1/2	1.2E+03	2.2E+03	1.4E+06	5.1E+06	9.0E+05	2.8E+03	3.3E+03	6.8E+04
1-5(10 ⁻¹)	1.8E+02	ND	2E+03	ND	4.2E+02	8.1E+02	1.9E+05	7.2E+05	1.3E+05	4.7E+03	1.4E+07	5.9E+03

(GC/L)

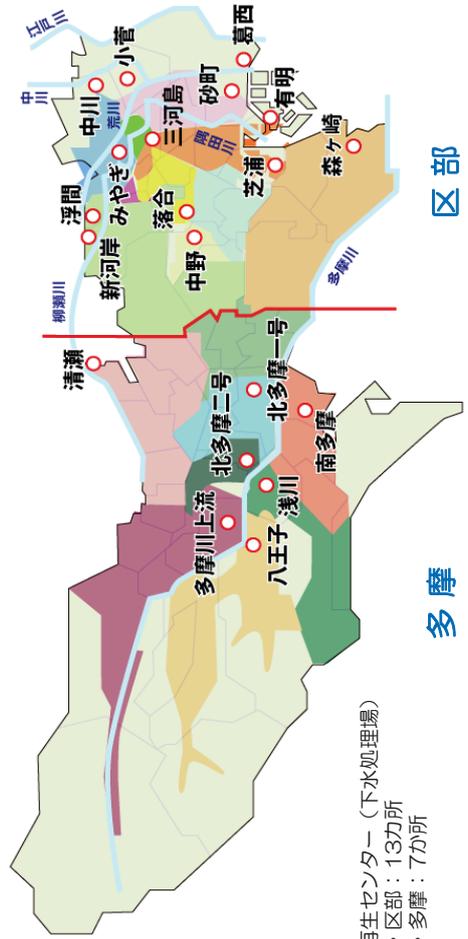


下水に関するプロジェクト: NIJIs Project
環境水に含まれる新型コロナウイルス等
病原体ゲノム情報の活用に関する研究
令和5年度第2回班会議 (2024.3.13.)

東京都における
下水中の新型コロナウイルス調査について

東京都健康安全研究センター
長島真美、熊谷遼太

下水を活用した新型コロナウイルス広域流行状況調査



水再生センター (下水処理場)
・区部: 13カ所
・多摩: 7カ所

全自動遺伝子検査装置法

利点

- ・検査工程が簡便
- ・高度な検査技術を必要としない
- ・作業時間の短縮

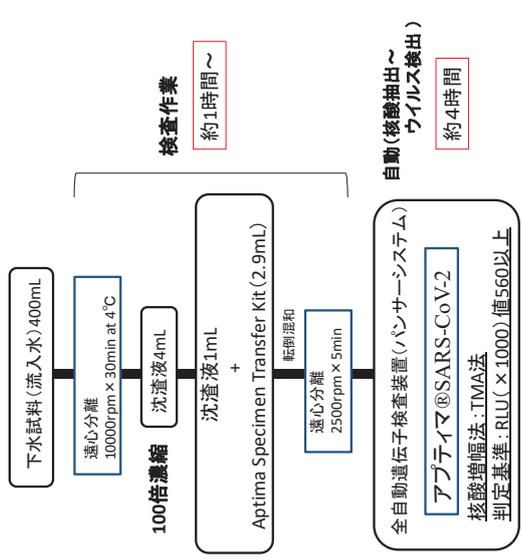
欠点

- ・専用機器、試薬を必要とする
- ・ウイルス定量ができない

コンタミネーションリスクの削減
多検体処理が可能(処理時間の削減)

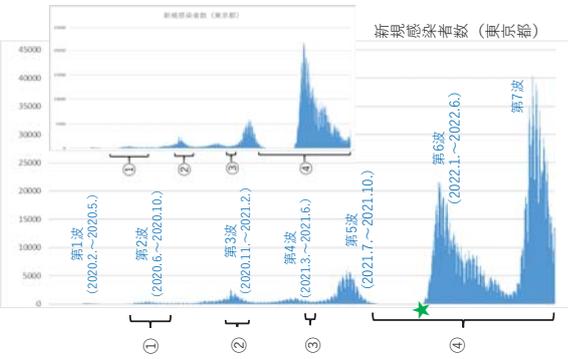
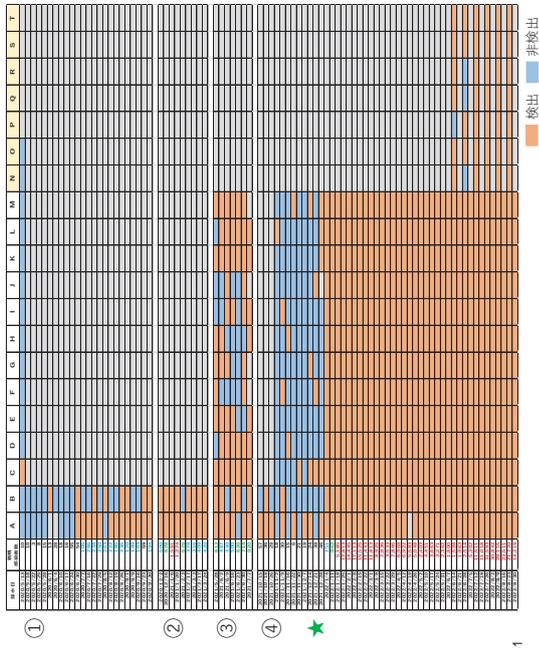
検出感度: 10⁴コピー/mL (沈査)

検査フロー



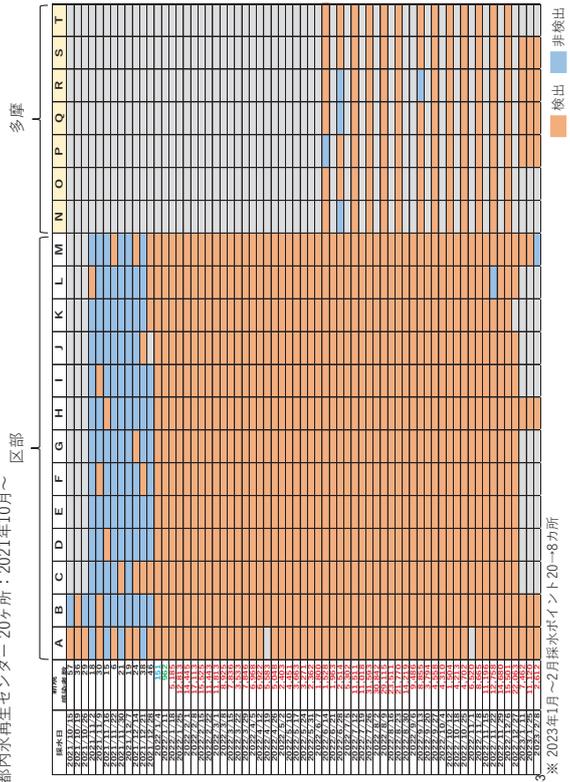
下水を活用した新型コロナウイルス広域流行状況調査

都内水再生センター 20ヶ所：2020年5月～2022年8月



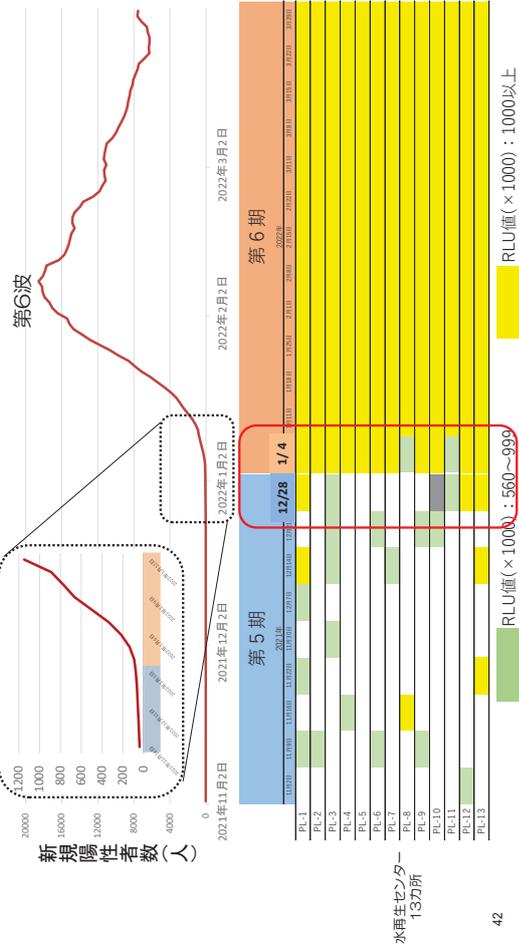
下水を活用した新型コロナウイルス広域流行状況調査

都内水再生センター 20ヶ所：2021年10月～



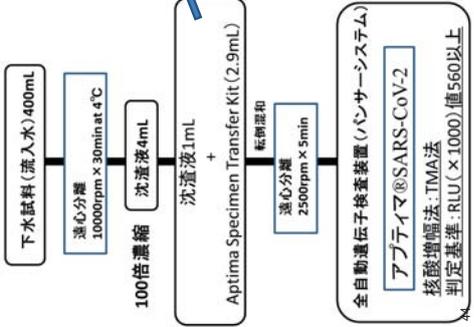
熊谷ら、第63回日本臨床ウイルス学会 (2022.6.東京)

都内下水モニタリング (第5波後～第6波)



下水中の新型コロナウイルス半定量検査

<全自動遺伝子検査装置法>



測定値を3段階に分けて評価 (陰性、弱陽性、陽性)

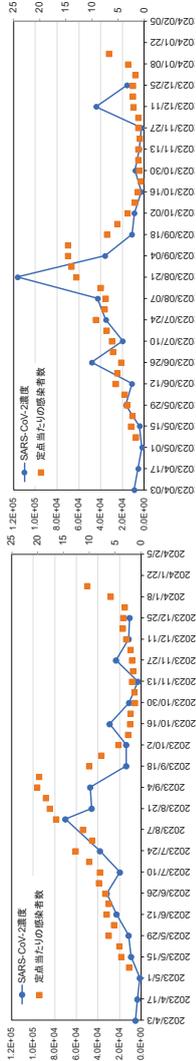
下水沈渣液の段階希釈液を作製 (x1, x10倍, x100倍)

スコア化 (27段階)

ヒートマップとして表示



下水中の新型コロナウイルス濃度と新規感染者数の推移



水再生センター	A (n=17)	B (n=17)	合計 (n=17)
Spearman順位相関係数 (95% CI)	0.68** (0.29-0.87)	0.68** (0.29-0.87)	0.71** (0.34-0.88)
Pearson相関係数 (95% CI)	0.71** (0.34-0.88)	0.66** (0.26-0.86)	0.76** (0.44-0.90)

** : p < 0.01

※A、Bの新型コロナウイルス感染者数は処理区域が関係する行政区の定点当たりの感染者者を合計し、合計はA及びBの定点当たりの感染者数を用いた。

試薬(配布物使用)

抽出：RNeasy PowerSoil Total RNA KitまたはQIAamp Viral RNA Mini
 cDNA合成：PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (10 μl/反応系)
 RNA2.5μL → cDNA12.5μL

反応	
37°C	15min
85°C	5sec
4°C	∞

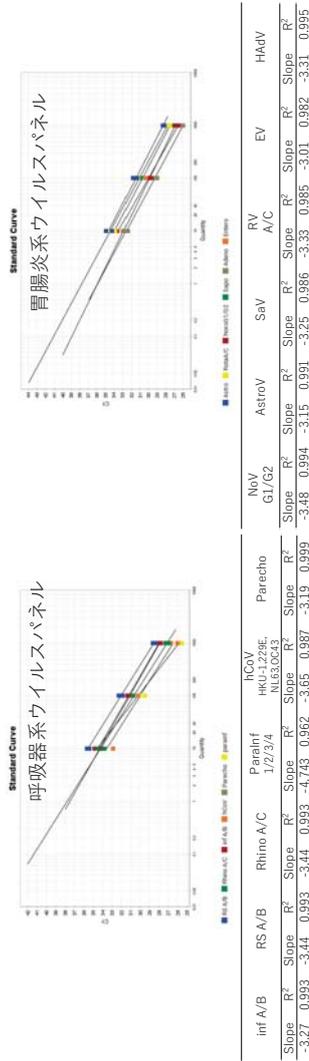
反応試薬：TaqPath™ BactoPure™ Microbial Detection Master Mix, no Rox (10 uL 反応系)

1 wellあたり	
TaqPath	2.5ul
DW	2.5ul
cDNA	5ul
total	10ul
呼吸器パネル：LOT#	8219406
胃腸炎パネル：LOT#	8219407
25°C	2min
85°C	10min
95°C	2min
95°C	5s
60°C	30s



0.2mLプレートでパネル配布のため、0.1mLプレートに移して測定
 陽性コントロールは10³、10²、10¹/reactionで使用

陽性コントロール



カスタムプレートをを用いた複数ウイルス検出の結果

	inf A/B	RS A/B	Rhino A/C	Parainf 1/2/3/4	HCoV	Parecho	NoV GI/G2	Astrov	SaV	RV A/C	EV	HAdV
12月-1 沈査	1/2	ND	ND	ND	ND	ND	5.4E+03	7.1E+04	1.8E+04	ND	1/2	1.4E+05
12月-1 沈査(10倍希釈)	1/2	ND	ND	ND	ND	ND	8.5E+04	6.9E+05	2.4E+05	ND	1/2	3.0E+04
12月-1 上清濃縮物	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.6E+05	8.6E+05	3.2E+04	3.4E+01	1.85E+03	4.3E+03
12月-2 沈査	1/2	ND	ND	ND	ND	ND	1.1E+03	3.1E+04	4.5E+03	ND	ND	ND
12月-2 沈査(10倍希釈)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.3E+03	5.1E+04	9.8E+03	ND	ND	1/2
12月-2 上清濃縮物	ND	ND	1.2E+04	ND	ND	ND	2.0E+05	9.1E+05	7.2E+04	4.7E+04	6.3E+03	1.3E+04
1月-1 上清濃縮物	ND	ND	1/2	ND	ND	ND	5.1E+05	1.2E+06	6.6E+04	2.2E+03	4.7E+03	3.1E+03
1月-2 上清濃縮物	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.8E+03	1.1E+06	2.6E+06	3.6E+04	2.1E+03	2.8E+03

1/2: 2well中 1well陽性
 色付きセル：検出限界以下を含む

分離頻度との比較

	EV		HAdV	
	定量値 (GC/L)	分離頻度* (GC/L)	定量値 (GC/L)	分離頻度*
12月-1 上清濃縮物	8500	17/30	4300	7/10
12月-2 上清濃縮物	6300	19/30	3100	10/10
1月-1 上清濃縮物	4700	8/30	3100	8/10
1月-2 上清濃縮物	2100	2/30	2800	6/10

*CPEの数

富山県における下水流入水の SARS-CoV-2調査と複数種ウイルスのリアルタイムPCR試行

富山県衛生研究所ウイルス部

板持雅恵、川上利恵、谷英樹

令和5年度厚生労働科学研究費補助金指定研究「環境水に含まれる新型コロナウイルス等病原体ゲノム情報の活用に関する研究」第2回班会議 2024年3月13日

方法

富山県：1下水処理場（分流式）処理人口約20万人（流域の定点医療機関数20）											
1)	<table border="1"> <tr> <td>採水頻度</td> <td>週1回</td> </tr> <tr> <td>採水量</td> <td>毎週100mL (-15℃)、月1回2L (4℃)</td> </tr> <tr> <td>衛研への搬入方法</td> <td>月1回の採水日に1か月分を受け取り（公用車）</td> </tr> <tr> <td>一時保管の条件</td> <td>-15℃（下水処理施設の冷凍庫）</td> </tr> <tr> <td>検査スケジュール</td> <td>月1回の採水日に1か月分を検査</td> </tr> </table>	採水頻度	週1回	採水量	毎週100mL (-15℃)、月1回2L (4℃)	衛研への搬入方法	月1回の採水日に1か月分を受け取り（公用車）	一時保管の条件	-15℃（下水処理施設の冷凍庫）	検査スケジュール	月1回の採水日に1か月分を検査
採水頻度	週1回										
採水量	毎週100mL (-15℃)、月1回2L (4℃)										
衛研への搬入方法	月1回の採水日に1か月分を受け取り（公用車）										
一時保管の条件	-15℃（下水処理施設の冷凍庫）										
検査スケジュール	月1回の採水日に1か月分を検査										
2)	<table border="1"> <tr> <td>供試容量、RNA抽出方法</td> <td>毎週40mL：Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit（プロメガ） 月1回1L：陰電荷膜法→QIAamp Viral RNA Mini kit（キアゲン）</td> </tr> </table>	供試容量、RNA抽出方法	毎週40mL：Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit（プロメガ） 月1回1L：陰電荷膜法→QIAamp Viral RNA Mini kit（キアゲン）								
供試容量、RNA抽出方法	毎週40mL：Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit（プロメガ） 月1回1L：陰電荷膜法→QIAamp Viral RNA Mini kit（キアゲン）										
3)	<table border="1"> <tr> <td>コロナ検出キット、検出下限値</td> <td>SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater（タカラバイオ） 検出下限値：プロメガ100コピール、陰電荷膜法1,000コピール</td> </tr> </table>	コロナ検出キット、検出下限値	SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater（タカラバイオ） 検出下限値：プロメガ100コピール、陰電荷膜法1,000コピール								
コロナ検出キット、検出下限値	SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater（タカラバイオ） 検出下限値：プロメガ100コピール、陰電荷膜法1,000コピール										
4)	<table border="1"> <tr> <td>信頼性確保</td> <td>トウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）（タカラバイオのキットに付属）</td> </tr> </table>	信頼性確保	トウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）（タカラバイオのキットに付属）								
信頼性確保	トウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）（タカラバイオのキットに付属）										

カスタムプレートを用いた複数ウイルス検出の結果

	intf A/B	RS A/B	Rhino A/C	Parainf 1/2/3/4	HCoV	Parecho	NoV GI/G2	AstroV	SaV	RV A/C	EV	HAoV
12月-1沈査	1/2	ND	ND	ND	ND	ND	5.4E+03	7.1E+04	1.8E+04	ND	1/2	1.4E+05
12月-1沈査(10倍希釈)	1/2	ND	ND	ND	ND	ND	8.5E+04	6.9E+05	2.4E+05	ND	1/2	3.0E+04
12月-1上清濃縮物	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.6E+05	8.6E+05	3.2E+04	3.4E+01	8.5E+03	4.3E+03
12月-2沈査	1/2	ND	ND	ND	ND	ND	1.1E+03	3.1E+04	4.5E+03	ND	ND	ND
12月-2沈査(10倍希釈)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.3E+03	5.1E+04	9.8E+03	ND	ND	1/2
12月-2上清濃縮物	ND	ND	1.2E+04	ND	ND	ND	2.0E+05	9.1E+05	7.2E+04	4.7E+04	6.3E+03	1.3E+04
1月-1上清濃縮物	ND	ND	1/2	ND	ND	ND	5.1E+05	1.2E+06	6.6E+04	2.2E+03	4.7E+03	3.1E+03
1月-2上清濃縮物	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.8E+03	1.1E+06	2.6E+06	3.6E+04	1.1E+05	2.1E+03

(GC/L)

まとめ

- ・新型コロナウイルスの検出について
 定点当たりの患者数と下水中のウイルス濃度は相関に正の傾向が確認できた。
 一方で、5類移行後の下水検体が少ないため、今後の傾向を確認する必要がある。
- ・カスタムプレートを用いた結果について
 呼吸器系ウイルスはほとんど検出できなかった。
 腸管系ウイルスは検出できた。

背景と目的

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）感染症は、呼吸器疾患であるが、ウイルスが腸管細胞でも増殖し糞便に排出されること、また不顕性感染も存在することから、下水流入水を対象とした環境サーベイランスにより、地域流行をモニタリングする試みが進められている。



そこで、本研究では、定期的に下水流入ウイルス量を測定することにより、SARS-CoV-2等の地域流行の把握に役立てる。また、その他の感染症の定点把握疾患のウイルスについても、ウイルスゲノム量のトレンド分析により、地域の患者サーベイランスを補完する手段となるか検討する。

複数種ウイルスのリアルタイムPCR試行

- サンプル
 - 2023年9月～2024年2月に月1回採取した下水流入水
- RNA抽出

1. 流入水40mL→Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit (Promega) 溶出量40μL
2. 流入水1L→陰電荷膜法 (濃縮液10mL) →QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) 溶出量60μL

• cDNA合成

5XRTmix	2.5ul	37°C	15min
DW	7.5	85°C	5sec
RNA	2.5	4°C	∞
	12.5ul		

• リアルタイムPCR

TaqPath™ BactoPur™ Microbial Detection Master Mix no ROX

使用機器：Quant Studio 5 (100μL) fast mode

対象病原体：

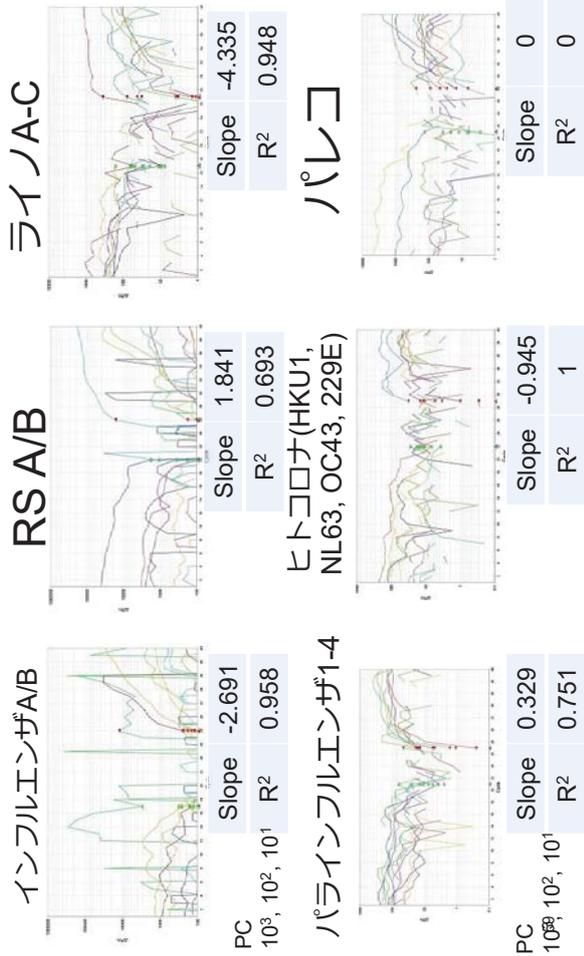
呼吸器パネル (Thermo, 8219 406)：A型/B型インフルエンザウイルス、RSウイルスA/B、ライノウイルスA-C、ヒトコロナウイルス (HKU1, NL63, OC43, 229E)、パレコウイルス
 胃腸炎パネル (Thermo, 8219 407)：ノロウイルスG1/G2、アストロウイルス、サボウイルス、A群ロタウイルス、エンテロウイルス、アデノウイルス

1ウエル	25°C	2min
TaqPathA52705	85°C	10min
DW	95°C	2min
cDNA	95°C	5s
	60°C	30s

x40

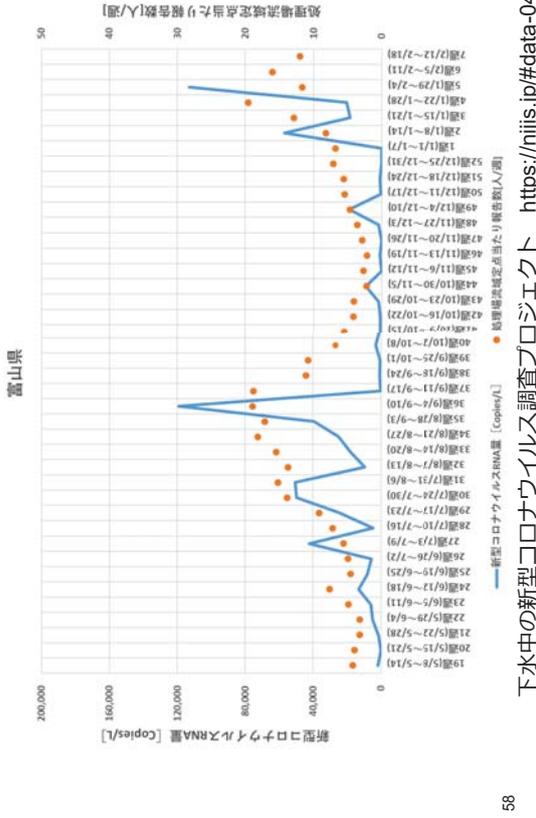
複数種ウイルスのリアルタイムPCR

呼吸器パネル 陽性コントロール (PC) と 下水流入水サンプル (2023年9月～2024年2月)



結果 SARS-CoV-2の検出推移

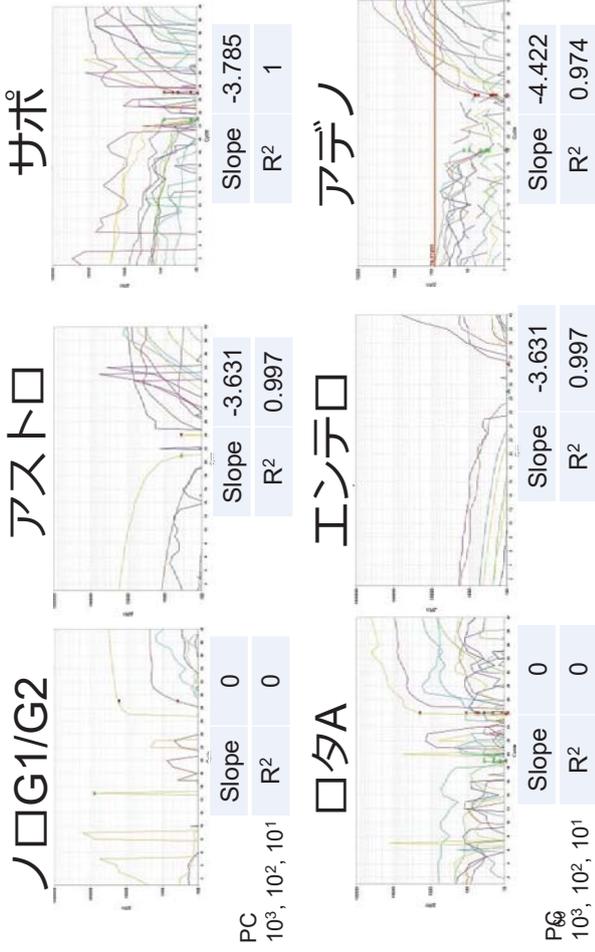
検査方法：週1回：Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit (プロメガ) 遺伝子検出工程のコントロールとしてPMMoVの検出を確認した。



58

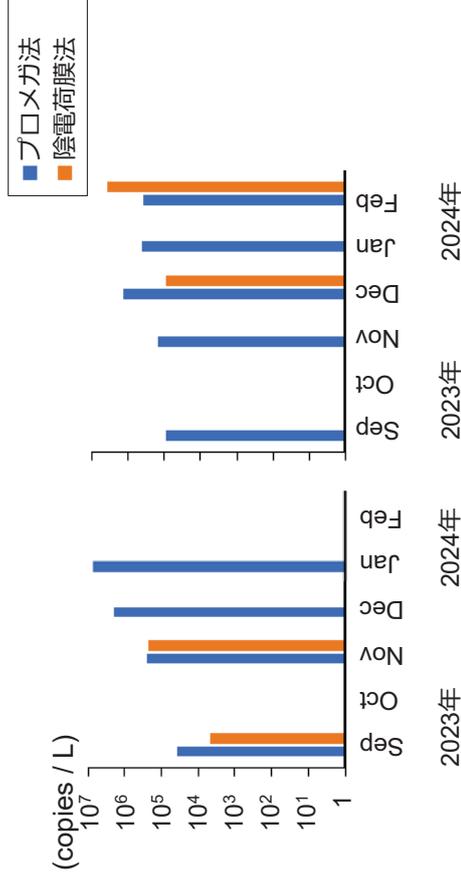
複数種ウイルスのリアルタイムPCR

胃腸炎パネル 陽性コントロール (PC) と 下水流入水サンプル (2023年9月～2024年2月)



下水流入水のウイルス定量 (2023年9月～2024年2月、富山県)

アストロウイルス アデノウイルス



61

まとめ (複数種ウイルス)

- 配布されたプレートは、プライマー・プローブがあらかじめ分注されているため、作業が簡易であることがメリットである。
- しかしながら、各ウイルス遺伝子の増幅曲線が、ベースラインの補正後も、きれいなS字曲線を示さないことがあった (→ROXの添加に関する検討が必要?)。また、陽性コントロールの検量線は、r (ばらつき)、slope (増幅効率) の値が適正ではないものが多いことから、検査系全体の見直しが必要であると考えられた。
- 当所のリアルタイムPCR装置は、100μL用のため、配布パネルからの試薬の移し替えを行った。配布パネルは100μLプレートがありがたい。

63

まとめ (SARS-CoV-2)

- 富山県内1下水処理場の下水流入水調査において、SARS-CoV-2は2022年2月から2024年2月現在までほぼ継続して検出されている。

62

令和5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
「環境水に含まれる新型コロナウイルス等病原体ゲノム情報の活用に関する研究」
第2回班会議 令和6年3月13日

岐阜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状況
(R5年4月～R6年2月)

岐阜県保健環境研究所

64

【採水ポイントに関する情報】

- 岐阜県では1か所にて毎週採水を実施。
- ポイントの処理人口、感染症指定医療機関※の有無、事業所総数※は以下の通り。

処理場	処理人口 (万人)	感染症指定医療機関 有無	事業所総数
21-R02016	約20~50	あり	41,152

※感染症指定医療機関：第一種および第二種感染症指定医療機関に指定されている病院の有無
 ※事業所総数は、令和元年度経済センサスの活動事業所数について、甲乙調査の結果を合わせた数を示す

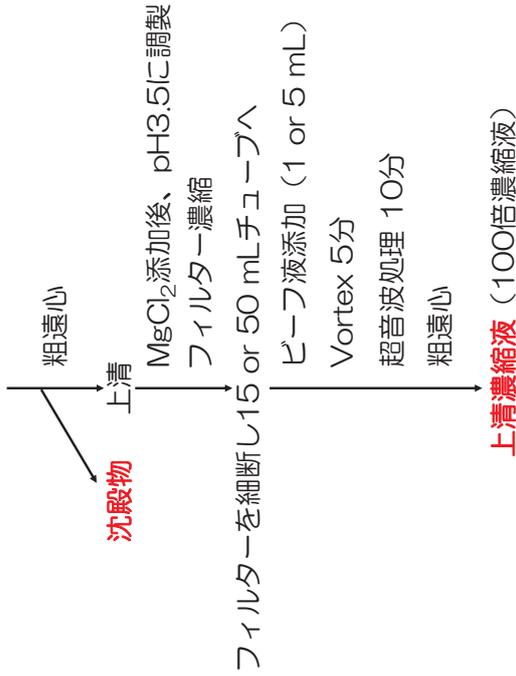
【当該施設流入水の特徴】

- 処理場の上流域からの流入水に**返流水**（高分子凝集剤やポリ硫酸第二鉄などを含む）が流入水全量の約1割注入され、その後、下流域からの流入水が合流した地点での採水である。
- 返流水に含まれる高分子凝集剤などが流入水中ウイルスの挙動に影響している？
- 沈渣だけでなく、上清（濃縮物）からも新型コロナウイルス遺伝子が検出される。

66

下水検体の処理方法

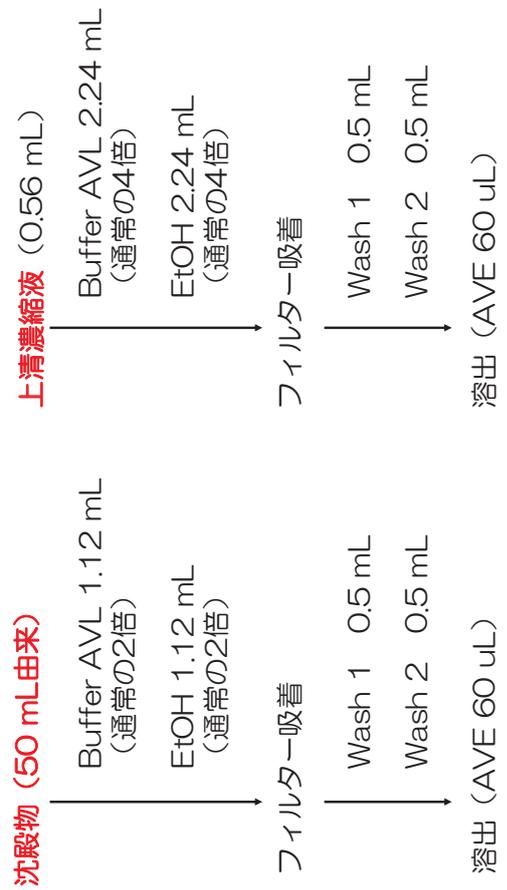
検体サンプル 100 or 500 mL（ポリオ検査時）



66

遺伝子抽出

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)



67

遺伝子検出

使用機器：Quantstudio 5 (Thermo Fisher Scientific)

試薬

コロナ定量：2穴/1 Sample (10 μ L)

SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (TaKaRa)

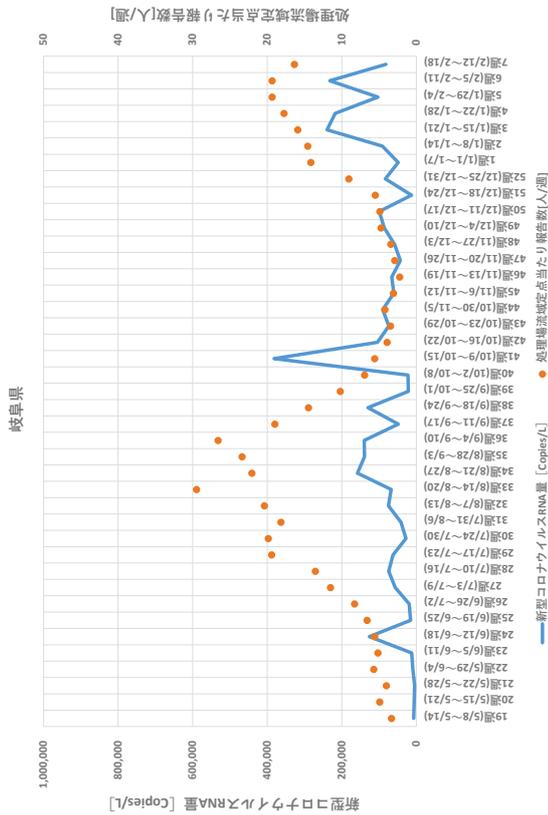
PMMoV定量 (7 プレコントロール)：2穴/1 Sample (5 μ L)
 One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix (TaKaRa)

R6.2.14採取検体より抽出RNAを3倍希釈してからコロナ遺伝子の定量を行うこととした。(ネガティブコントロールへのコンタミネーションが起こり、再検査のための検体を確保するため → 阻害効果軽減にもつながる)

岐阜県の報告 (R5.4~)

【R5年4月~の調査結果】

- 対象処現場における新型コロナウイルスRNA量及び定点あたりの報告数は以下の通り。

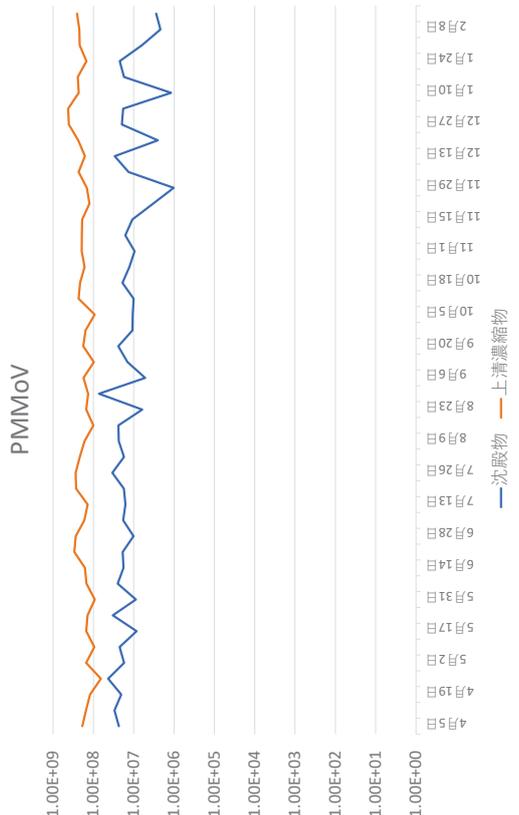


68

岐阜県の報告 (R5.4~)

【R5年4月~の調査結果】

- 対象処現場におけるPMMoV RNA量は以下の通り。

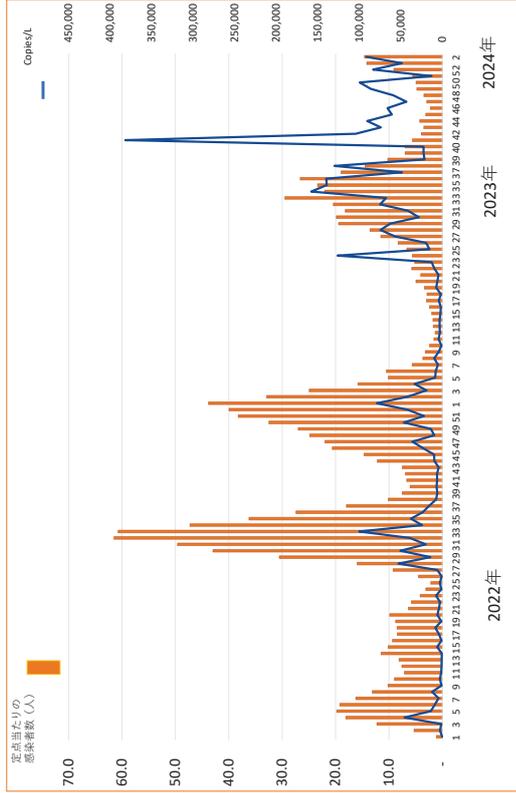


71

岐阜県の報告 (R4.1~)

【R4年4月~の調査結果】

- 対象処現場における新型コロナウイルスRNA量及び定点あたりの報告数は以下の通り。



70

岐阜県の報告 (R5.4~)

まとめ

- 5類移行後、新型コロナウイルス定点当たり報告数の増減に伴い、遺伝子検出量の増減がみられた。一方、定点報告になつた前後の比較では検出ウイルス遺伝子量が多く検出される傾向がみられた。→ 不顕性感染者の増加? 医療機関を受診しない人の増加? → 引き続き動向を注視する必要がある。
- 今回の検査にて、部内で同時並行にて行われているゲノム解析のコンタミが疑われる事案が生じた。これを踏まえ、以後は再検査が必要となった場合の備え、および遺伝子増幅の阻害効果軽減が期待できる希釈したRNA検体で検査を行う予定。
- 本発表までにパネルの検査は行うことができなかったが、近く上清濃縮物と沈査との比較で行う予定。

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および パネル検査の結果について

愛知県衛生研究所
生物学部ウイルス研究室
伊藤 雅、中村範子、廣瀬繪美、諏訪優希、佐々誠紀
石田久仁子、菅川洋子

73

方法概要

- 採水場所
県内下水処理場 1か所 接続人口:約53万人
- 採水頻度・採水量
毎週水曜日、10時頃に採水 500mL (250mLx2) -20℃凍結保存
- 衛研への搬入方法
管轄保健所職員が車や公共交通機関を利用し、不定期に凍結状態で搬入
- 一時保管の条件
-30℃の冷凍室(管理区域内プレハブ冷凍室)
- 検査スケジュール
月単位の検体が揃い次第、感染症流行予測調査(ポリオ感染源)の試料調整と並行して処理し、核酸抽出後-80℃に保存または速やかに検査実施

74

検出法の検討結果(令和2年~4年度)

- 検討① 検体の比較 沈渣 > 上清
→ 新型コロナウイルスは沈渣に存在(ポリオ感染源は上清検体で検査)
- 検討② 核酸抽出法の比較 磁気ビーズ式 ≧ カラム式
→ 磁気ビーズは夾雑物が多い検体に有効
- 検討③ リアルタイムRT-PCR検出領域の比較 CDC法 ≧ NIID法
→ 下水検体で高感度に検出(感染者のスクリーニング検査でも使用)

下水中から新型コロナウイルス遺伝子検出に適した条件を決定

75

方法概要

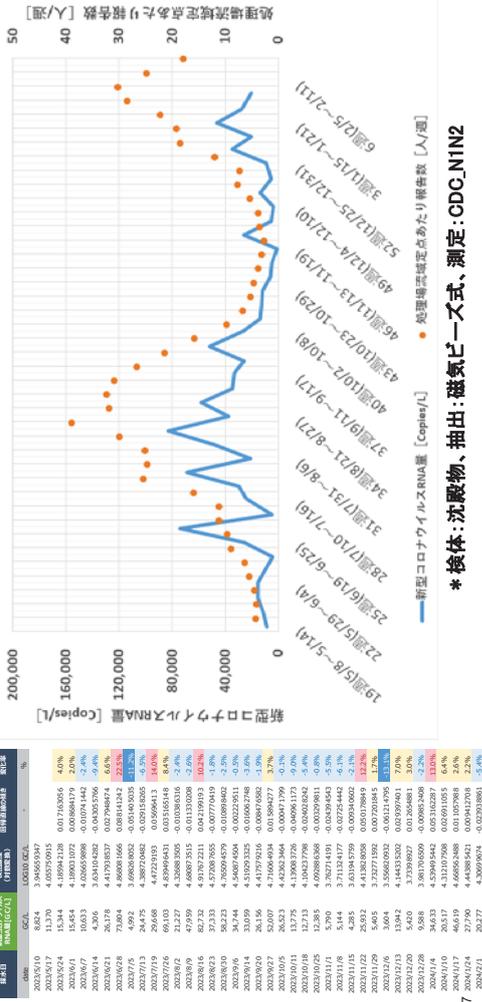
- 検体処理
供試容量 500mL/月 (250 mL/週) 3500rpm、30分処理後、上清を取り分け
沈殿物にガラスビーズを加えボルテックス処理、ウイルス誘出液 5mL(2.5mL)にて
100倍濃縮沈渣検体とする
- RNA抽出法
プロメガ自動 Maxwell® (RSC) Viral TNA (磁気ビーズ式)
- リアルタイムPCR試薬
TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix CDC_N1/N2
- リアルタイムPCR機器
ABI 7500 Fast
- 信頼性確保
トウガラシ微班ウイルス(PMMoV)
- LODの設定方法
月毎処理 50μL × (1000 / ((500mL × 0.2mL) / 5mL))
週毎処理 50μL × (1000 / ((250mL × 0.2mL) / 2.5mL))

76

愛知県の報告 (R5.4~)

【R5年4月～の調査結果】

- 対象処理場における新型コロナウイルスRNA量及び定点あたりの報告数は以下の通り。



* 検体: 沈殿物、抽出: 磁気ビーズ式、測定: CDC_N1N2

PCRパネル検査 材料および方法

- 検体

2023年3月、6月、9月、12月の下水上清及び沈渣から抽出した遺伝子

抽出方法と使用キット

沈渣: 【磁気ビーズ式】 Maxwell® (RSC) Viral TNA
上清: 【カラム式】 QIAamp Viral RNA Mini Kit

- cDNA合成

検体は使用前に95°C5分加熱後急冷

試薬: PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)

	反応
5 x RTmix	2.5ul
DW	7.5ul
RNA	2.5ul
cDNA	12.5ul
	37°C 15min
	85°C 5sec
	4°C ∞

材料および方法

- プライマー&プローブ固相パネル 呼吸器用、胃腸炎用: 各2枚

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000
B	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000
C	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
D	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
E	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
F	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
G	NC											
H	NC											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000
B	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000
C	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
D	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
E	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
F	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
G	NC											
H	NC											

- 陽性コントロールは5000、500、50copies/5ul

材料および方法

- リアルタイムPCR試薬

TaqPath BactoPure Microbial Detection Master Mix, no Rox

胃腸炎 3 & 6月パネルを除く3つのパネルにはTakaRa ROX Dye Iを添加

	1well	反応
TaqPath	2.5ul	25°C 2min
DW	2.5ul	85°C 10min
cDNA	5ul	95°C 2min
total	10ul	95°C 5s
	total	60°C 30s
	1well	
TaqPath	TaqPath	
DW	ROX Dye I	
cDNA	DW	
total	cDNA	
	total	

- リアルタイムPCR機器

ABI 7900 Ht (0.2mLプレート使用可)

まとめ

	呼吸器パネル					胃腸炎パネル						
	Flu A/B	RSV A/B	Rhino A-C	ParaFlu 1-4	coronaHKUJ1L 6429EJ024D	Parechovirus	NV-G1/G2	Astro	Sapov	RotavA	entero	Adeno
3月	2023/03-Seed	2023/03-Seed	2023/03-Seed	2023/03-Seed	2023/03-Seed	2023/03-Seed	2023/03-Seed	2023/03-Seed	2023/03-Seed	2023/03-Seed	2023/03-Seed	2023/03-Seed
	2023/03-Sup.	2023/03-Sup.	2023/03-Sup.	2023/03-Sup.	2023/03-Sup.	2023/03-Sup.	2023/03-Sup.	2023/03-Sup.	2023/03-Sup.	2023/03-Sup.	2023/03-Sup.	2023/03-Sup.
	2023/03-Seed	2023/03-Seed	2023/03-Seed	2023/03-Seed	2023/03-Seed	2023/03-Seed	2023/03-Seed	2023/03-Seed	2023/03-Seed	2023/03-Seed	2023/03-Seed	2023/03-Seed
6月	2023/06-Seed	2023/06-Seed	2023/06-Seed	2023/06-Seed	2023/06-Seed	2023/06-Seed	2023/06-Seed	2023/06-Seed	2023/06-Seed	2023/06-Seed	2023/06-Seed	2023/06-Seed
	2023/06-Sup.	2023/06-Sup.	2023/06-Sup.	2023/06-Sup.	2023/06-Sup.	2023/06-Sup.	2023/06-Sup.	2023/06-Sup.	2023/06-Sup.	2023/06-Sup.	2023/06-Sup.	2023/06-Sup.
	2023/06-Seed	2023/06-Seed	2023/06-Seed	2023/06-Seed	2023/06-Seed	2023/06-Seed	2023/06-Seed	2023/06-Seed	2023/06-Seed	2023/06-Seed	2023/06-Seed	2023/06-Seed
9月	2023/09-Seed	2023/09-Seed	2023/09-Seed	2023/09-Seed	2023/09-Seed	2023/09-Seed	2023/09-Seed	2023/09-Seed	2023/09-Seed	2023/09-Seed	2023/09-Seed	2023/09-Seed
	2023/09-Sup.	2023/09-Sup.	2023/09-Sup.	2023/09-Sup.	2023/09-Sup.	2023/09-Sup.	2023/09-Sup.	2023/09-Sup.	2023/09-Sup.	2023/09-Sup.	2023/09-Sup.	2023/09-Sup.
	2023/09-Seed	2023/09-Seed	2023/09-Seed	2023/09-Seed	2023/09-Seed	2023/09-Seed	2023/09-Seed	2023/09-Seed	2023/09-Seed	2023/09-Seed	2023/09-Seed	2023/09-Seed
12月	2023/12-Seed	2023/12-Seed	2023/12-Seed	2023/12-Seed	2023/12-Seed	2023/12-Seed	2023/12-Seed	2023/12-Seed	2023/12-Seed	2023/12-Seed	2023/12-Seed	2023/12-Seed
	2023/12-Sup.	2023/12-Sup.	2023/12-Sup.	2023/12-Sup.	2023/12-Sup.	2023/12-Sup.	2023/12-Sup.	2023/12-Sup.	2023/12-Sup.	2023/12-Sup.	2023/12-Sup.	2023/12-Sup.
	2023/12-Seed	2023/12-Seed	2023/12-Seed	2023/12-Seed	2023/12-Seed	2023/12-Seed	2023/12-Seed	2023/12-Seed	2023/12-Seed	2023/12-Seed	2023/12-Seed	2023/12-Seed

感染者：当所の発生動向調査事業で、その検体採取月に陽性例が検出されている

〈呼吸器パネル〉

インフルエンザウイルス、RSV、パラインフルエンザウイルスの検出はなかった。

〈胃腸炎パネル〉

沈渣の方が陽性率が高い(全てではないがCt値も沈渣の方が低い)印象

今後の予定

令和6年度流行予測調査事業

来年度も、新型コロナウイルス遺伝子検査結果を定期的に研究班に報告

パネル陽性検体について

今回のパネル検査で陽性だった検体について、可能であれば追加の解析(分離培養やコンベンショナルPCR・シーケンス等)を実施

(患者検体由来のウイルス遺伝子型との比較。下水中で優勢な遺伝子型?)

奈良県における 下水中新型コロナウイルス検出状況 およびPCRパネル検査結果報告

下水中新型コロナウイルス 検出状況 (R5.2-R5.12)

奈良県保健研究センター
ウイルス・疫学情報担当

奈良県の報告 (R5.2-R5.12)

【採水ポイントに関する情報】

- 奈良県では1か所で採水を実施。各ポイントの処理人口、感染症指定医療機関の有無、コロナ陽性者療養施設の有無、事業所総数※は以下の通り。

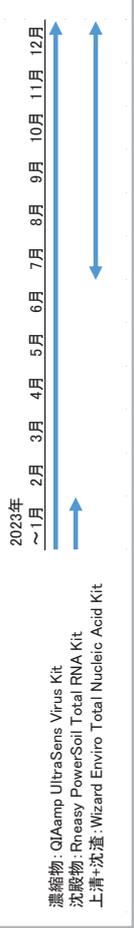
処理場	処理人口 (万人)	感染症指定医療機関有無	事業所総数
29-R03002	約20~50	あり	17,846

※感染症指定医療機関：第一種および第二種感染症指定医療機関に指定されている病院の有無
 ※事業所総数は、令和元年度経済センサスの活動事業所数(注)について、甲乙調査の結果を合わせた数を示す

試薬変更：QuantiTect Probe RT-PCR kit(～2021年11月)
 One Step Primescript™ III RT-qPCR Mix, with UNG (2021年12月～)

抽出法の変更

- 沈殿物 (Rneasy PowerSoil Total RNA Kit) (～2023年1月)
- 上清+沈澱 (Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit) (2023年7月～)



奈良県の報告 (R5.2-R5.12)

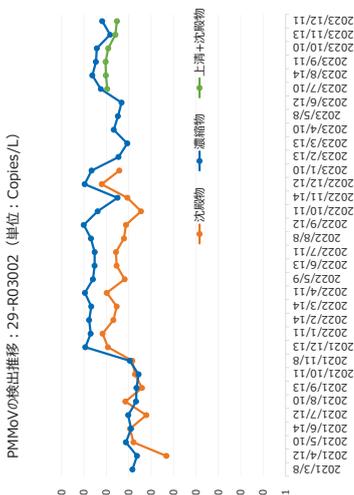
【R3年3月～R5年12月の調査結果】

- 1月1回の採水を実施。下水中のコロナ検出状況 (Copies/L) は以下に示す通り。

29-R03002	下処理	濃縮物	上清+沈澱物
2021/3/8	ND	ND	ND
2021/4/12	954	616	899
2021/5/10	71	899	770
2021/6/14	ND	ND	224
2021/7/12	ND	ND	1,117
2021/8/10	752	1,439	17,958
2021/9/13	1,439	1,439	1,439
2021/10/11	38	124	473
2021/11/8	473	21	2,524
2021/12/13	134	361	13,238
2022/1/14	502	325	8,364
2022/2/14	824	554	6,133
2022/3/14	543	649	327
2022/4/11	396	37,127	19,889
2022/5/9	649	ND	11,165
2022/6/13	649	ND	8,019
2022/7/11	327	ND	19,430
2022/8/8	37,127	ND	6876.36
2022/9/12	ND	277	11,690.88
2022/10/11	277	396	1260.12
2022/11/14	396	420	1016.76
2022/12/12	420	3,426	2,289.72
2023/1/10	45,871	16,008.6	14,922.32
2023/2/13	6876.36	9,991.56	2,631.4.96
2023/3/13	11,690.88	16,393.68	2,127.5.68
2023/4/10	1260.12	3,231.48	2,059.0.4
2023/5/8	1016.76	3,802.92	4,696.3.52
2023/6/12	2,289.72	10,608.96	3,049.9.28
2023/7/10	16,008.6	14,922.32	14,922.32
2023/8/14	9,991.56	2,631.4.96	2,631.4.96
2023/9/11	16,393.68	2,127.5.68	2,127.5.68
2023/10/11	3,231.48	2,059.0.4	2,059.0.4
2023/11/13	3,802.92	4,696.3.52	4,696.3.52
2023/12/11	10,608.96	3,049.9.28	3,049.9.28

・沈澱物：下水汚泥を遠心分離した泥状試料
 ・ND：not detected (検出されず)
 ・赤字はZwell (12月以降は3well) 中1wellで検出、あるいは3well検出だが 1copy/5ul未満

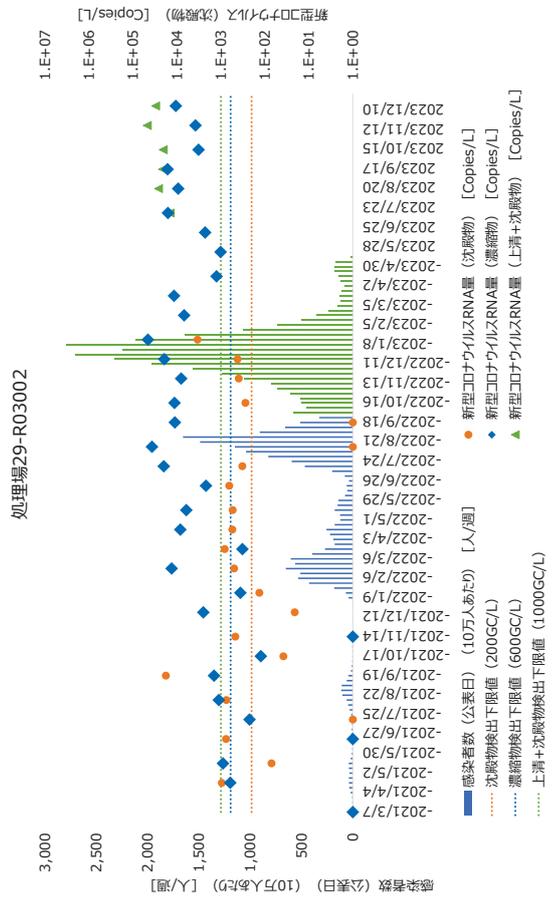
- 各処理場における内部コントロール (トウガラシ微生物ウイルス (PMMOV)) の検出結果は以下の通り。



奈良県の報告 (R5.2-R5.12)

【R3年3月～R5年12月の調査結果】

- 1月1回の採水を実施。下水中のコロナ検出状況 (Copies/L) と各処理場のキャッチメントエリアの新規感染者数の推移は以下の通り。

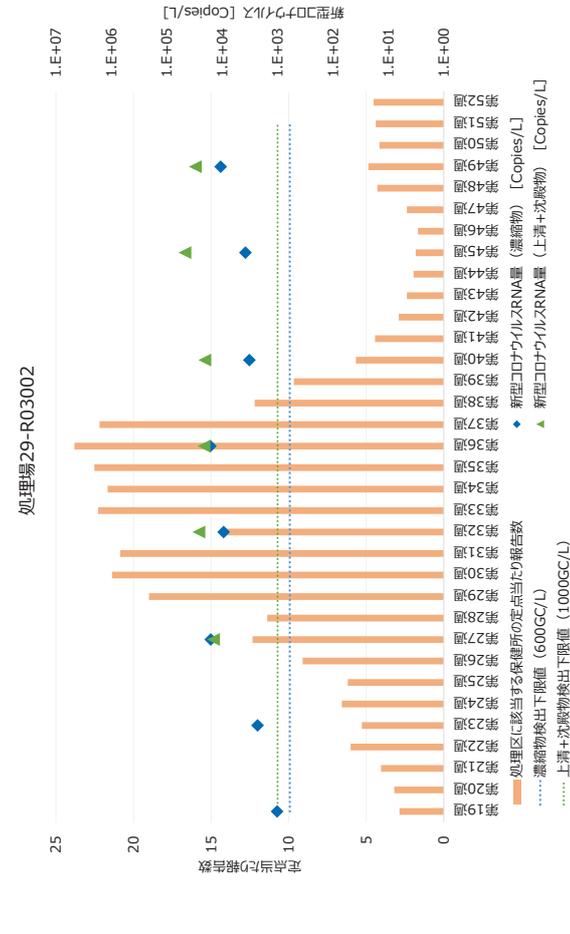


※処理場別の感染者数は、処理場のキャッチメントエリアに対応する自治体から把握し、当該自治体における感染者数の情報を整理。
 ※処理場別の感染者数は、処理場のキャッチメントエリアに対応する自治体から把握し、当該自治体における感染者数の情報を整理。
 ※2022/9/27以降の感染者数(緑の棒グラフ)は、全数把握困難により、市町別別の集計が不可能になったため、県全体の陽性確認件数を整理。

奈良県の報告 (R5.2-R5.12)

【R5年5月～R5年12月の調査結果】

- 1月1回の採水を実施。下水中のコロナ検出状況 (Copies/L) と処理場に該当する定点当たり報告数の推移は以下の通り。



※処理場別の感染者数は、処理場のキャッチメントエリアに対応する自治体から把握し、当該自治体における感染者数の情報を整理。
 ※処理場別の感染者数は、処理場のキャッチメントエリアに対応する自治体から把握し、当該自治体における感染者数の情報を整理。
 ※2022/9/27以降の感染者数(緑の棒グラフ)は、全数把握困難により、市町別別の集計が不可能になったため、県全体の陽性確認件数を整理。

抽出法： Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit (Promega)

対象： 2023年11月～2024年2月採水検体

・cDNAの合成

試薬： PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)

ウエルあたり		反応	
5XRTmix	2.5 ul	37 °C	15min
DW	7.5 ul	85 °C	5sec
RNA	2.5 ul	4 °C	∞
total	12.5 ul		

・リアルタイムPCR

試薬： TaqPath™ BactoPure™ Microbial Detection Master Mix, no Rox

呼吸器パネル Lot： 8219406

消化器パネル Lot： 8219707

PC： Custom DNA control(10³~10¹ copy/uL)

1 ウエル		反応	
TaqPath	2.5 ul	25 °C	2min
DW	2.5 ul	85 °C	10min
cDNA	5 ul	95 °C	2min
total	10 ul	95 °C	5s
		60 °C	30s

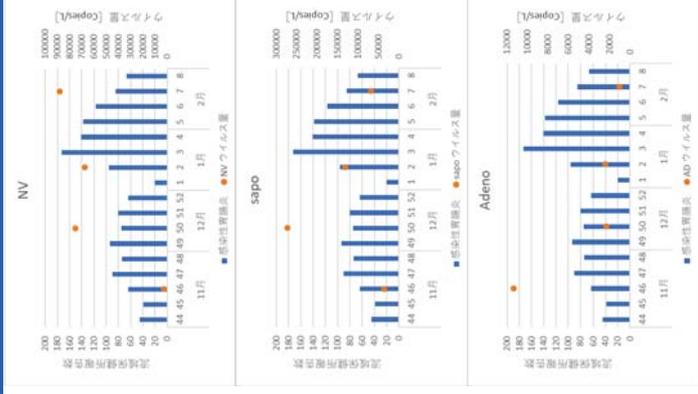
x40

PCRパネル検査

年	月	Flu		RS		Rhino		ParaFlu		corona		Parecho	
		Slope	R ²	Slope	R ²	Slope	R ²	Slope	R ²	Slope	R ²	Slope	R ²
2023	11	-3.59	0.999	-3.457	0.997	-3.697	0.988	-3.271	0.996	-3.366	0.995	-3.36	0.992
	12	120.24	58.72	ND	ND	ND	ND	151.44	45.2	47.52	285.12	93.60	ND
2024	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	46.24	693.92	110	ND	ND	ND
	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	110	ND	ND	ND	ND
年	月	NV		Astro		sapo		Rota		entero		Adeno	
		Slope	R ²	Slope	R ²	Slope	R ²	Slope	R ²	Slope	R ²	Slope	R ²
2023	11	-3.29	0.996	-3.293	0.997	-3.436	0.997	-3.239	0.998	-3.504	0.998	-3.811	0.976
	12	2761.04	75338.24	3801.68	8397095.04	36747.84	272812.16	ND	ND	616.40	5006.72	11370.72	2328.32
2024	1	67632.16	88081.44	1672093.60	42872.80	132114.08	68709.04	871.12	578.16	2412.40	1036.00	ND	ND
	2	88081.44	42872.80	68709.04	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

・赤字は2well中1wellで検出

感染性患者報告数と各ウイルス量比較



和歌山県の下水処理場における 下水中新型コロナウイルスの検出状況 (2023年4月～2024年2月)

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
藤本 泰之、寺西 彩香

94

下水中新型コロナウイルスの検出

- 調査期間：2023年4月～2024年3月
今回報告分：2023年4月～2025年2月
- 採水回数：毎月1回
- 採水処理場：和歌山県内2か所
 - 浄化センター①
 - 浄化センター②
- 検査材料：流入下水 500mL（ホリオ流行予測で使用する）+ 50mL（TNAキット用）
- ゲノム検出方法
 - RNA抽出
 - RNAeasy PowerSoil Total RNA Kit (QIAGEN, Cat#:12866-25) : PowerSoilキット
 - Wizard® Enviro Total Nucleic Acid Kit (Promega, Cat#:A2991) : TNAキット

**来年度の流行予測では、
どちらを、どのように使用するのが良いのか？**

- Real-time RT-PCR
- 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2)
 - Takara RC300A SARS-CoV-2 direct Detection RT-qPCR kit
 - トクガワシ 検出ウイルス (PMMeV)
- Takara OneStep PrimeScript III RT-qPCR Mix with UNG
 - VLP
 - Takara OneStep PrimeScript III RT-qPCR Mix with UNG

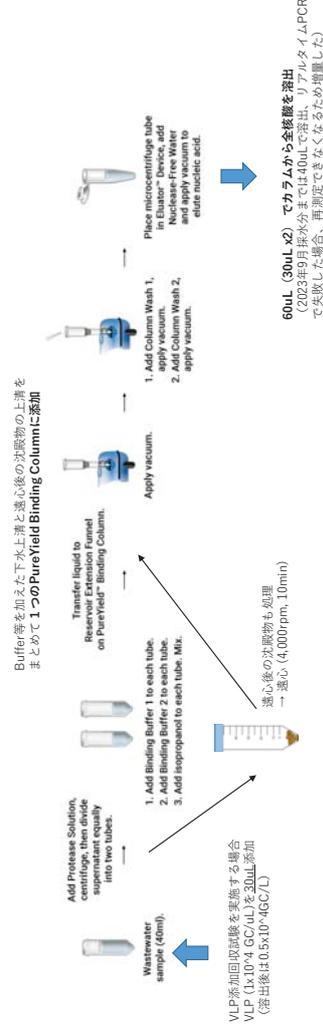
サンプルRNAおよび陽性コントロールの希釈にはTAKARAのPCRキット付属のEASY Dilution (for Real Time PCR)を使用した。

95

171

Wizard® Enviro Total Nucleic Acid Kit (Promega, Cat#:A2991) (TNAキット)

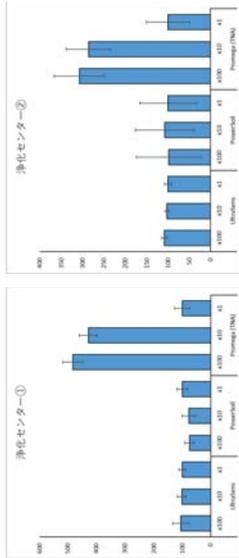
使用下水量：40mL
1度に4検体を処理
粗遠心後の沈渣もカラムに吸着



TNAキット抽出物のリアルタイムPCR反応の阻害の有無を評価

TNAキット抽出物のリアルタイムPCR反応の阻害の有無を評価

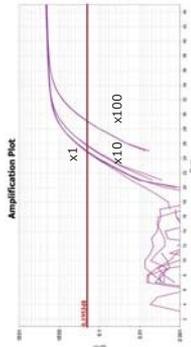
使用検体：R5年4月～7月に採水した浄化センター①および②の流入下水
 TNAキットで抽出したRNAをEASY Dilutionで10および100倍に希釈（x10、x100）
 PMMoVをリアルタイムPCRで測定。



ほかの下水からのRNA抽出方法（Ultrasons、PowerSoil）と比較しても、TNAキットではPCR反応への影響が大きい。
 → TNAキットを使用する場合は少なくとも10倍希釈した検体も使用するほうが良い？

PMMoVリアルタイムPCR反応組成

	[μ L]
DDW	3.7
ROX Dye II	0.1
Primer/Probe Mix	1.2
One step prime Mix (2x)	10
RNA	5



〈参考データ（別検体R6年2月下旬PMMoV）〉

TNAキット抽出物のリアルタイムPCR反応の阻害の有無を評価

VLP添加回収試験でも希釈の影響を評価
 PowerSoilキット → VLP50 μ L添加 → 100 μ L溶出 f.c. 0.5x10⁻⁴~4GC/ μ L
 TNAキット → VLP30 μ L添加 → 60 μ L溶出 f.c. 0.5x10⁻⁴~4GC/ μ L

VLP添加回収試験 反応条件

	[μ L/反応]
DDW	4.2
VLP Detection mix (Orange)	0.8
One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (2x)	10.0
RNA	5.0
total	20.0

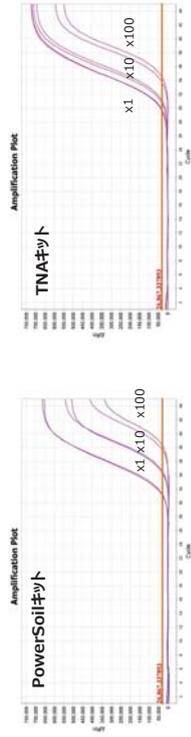
(反応条件)	
UNG処理	25°C 10min
逆転写反応	52°C 5min
変性	95°C 10sec
変性	95°C 5sec
アニーリング/伸長	60°C 45cycles
	→Detection

- VLPを単独のリアルタイムPCR系で測定
- 使用しているリアルタイムPCRの機械（QuantStudio7Flex）ではHEX色素が検出できないため、VIC検出系を使用
- また、HEX色素の蛍光波長がROXの検出系に漏れ出すため、Reference DyeとしてROXは添加しなかった。

98 VLPの陽性コントロールは1x10⁻⁴~4GC/Lを75°Cヒートショック処理後、EASYDilutionで10倍希釈系列を調整。

TNAキット抽出物のリアルタイムPCR反応の阻害の有無を評価

copy/well	Ct Mean	Sample	copy/5 μ L	回収率(%)
5	37.76	x1	31.0	4.8
50	35.78	x10	34.3	4.0
500	32.20	x100	37.8	2.8
5000	29.41	x1	29.6	14.0
50000	25.74	x10	30.8	55.9
R ²	Slope	x100	34.0	51.2
0.987	-3.043			

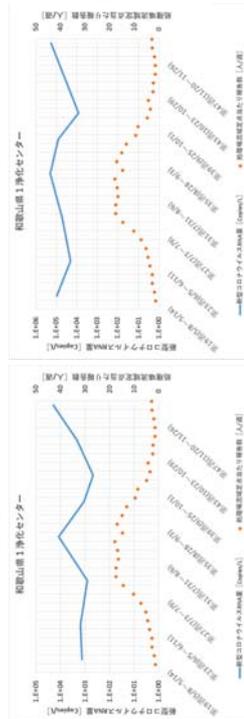


和歌山県浄化センター①

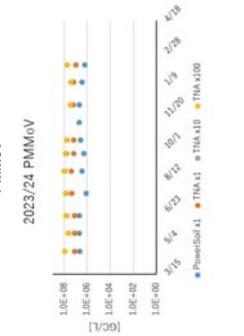
R5年4月～06年3月の調査結果
 月に1回の採水を実施
 2well中2wellで陽性反応が検出された場合、陽性とし、平均値から流入下水1L当たりのゲノムコピー数を算出
 TNAキット：9月までは40 μ L(20 μ Lx2)、10月以降は60 μ L(30 μ Lx2)で溶出

採水日	2023/4/20	2023/5/18	2023/6/15	2023/6/21	2023/8/24	2023/9/21	2023/10/12	2023/11/9	2023/12/7	2024/1/12	2024/2/8	2024/3/5
PowerSoil x1	2.2E+03	1.3E+03	1.6E+03	8.1E+02	1.2E+04	1.1E+03	4.8E+02	2.1E+03	2.0E+04	5.2E+03	1.2E+04	1.2E+04
NIN2	1.9E+04	6.6E+04	6.2E+03	2.6E+04	1.0E+05	4.0E+04	3.4E+03	1.1E+05	1.4E+04	2.4E+04	2.4E+04	2.4E+04
[GC/L]	4.1E+04	9.6E+04	2.0E+04	5.3E+04	2.0E+05	8.1E+04	8.2E+03	1.8E+05	3.1E+04	9.3E+04	9.3E+04	9.3E+04
TNA x100	5.8E+04	1.3E+05	2.7E+04	4.9E+04	2.5E+05	3.8E+04	1.8E+05	1.8E+05	6.4E+04	1.1E+05	1.1E+05	1.1E+05

PowerSoil x1



PMMoV



VLPの添加回収試験においてもTNAキットにより抽出した全核酸はリアルタイムPCR反応への阻害作用があることが確認できた。
 → 新型コロナウイルスを測定する場合も希釈したほうが良い？

PowerSoil比とTNAキットの両方で、定点当たりの影響報告数を運動して下水中新型コロナウイルスのゲノム量が運動するデータが得られた。
 PowerSoilキットよりもTNAキットのほうが流入下水1L当たりのゲノムコピー数が大きくなる。

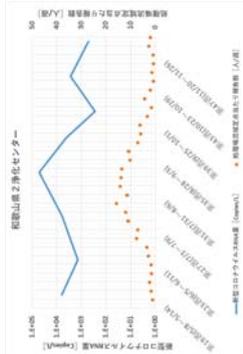
和歌山県浄化センター②

【R5年6月～R6年5月の調査結果】

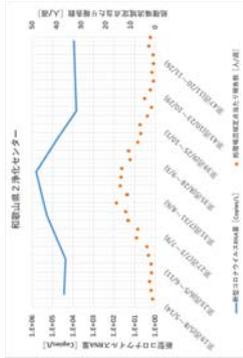
月に1回の採水を実施
2well中2wellに陽性反応が認められた場合に、平均値から流入下水1L当りのゲノムコピー数を算出
TNAキット：9月までは40uL(20uLx2)、10月以降は50uL(30uLx2)で測定

採水日	2023/6/20	2023/6/28	2023/6/15	2023/7/20	2023/8/24	2023/9/21	2023/10/12	2023/11/9	2023/12/7	2024/1/12	2024/2/8	2024/3/5
PowerSoil x1	4.8E+01	6.1E+03	1.4E+03	6.0E+03	5.2E+04	4.0E+03	2.7E+02	2.7E+03	4.9E+02	5.9E+03	4.2E+04	1.2E+05
NIN2 [GC/L]	2.9E+02	2.2E+04	5.7E+03	1.5E+05	3.2E+05	2.3E+04	7.2E+03	6.0E+04	7.2E+03	6.0E+04	1.1E+05	3.4E+05
TNA x10	2.7E+04	2.3E+04	1.9E+05	6.4E+05	6.4E+05	5.1E+04	9.0E+03	1.0E+05	1.0E+05	1.0E+05	3.4E+05	4.8E+05
x100	1.6E+04	8.5E+03	1.3E+05	3.9E+04	3.9E+04	3.9E+04	1.2E+05	1.2E+05	1.2E+05	1.2E+05	4.8E+05	4.8E+05

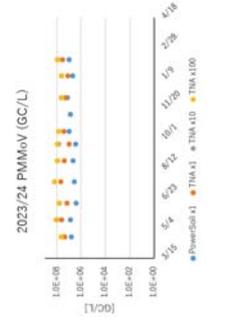
PowerSoil x1



TNA x10



PMMoV



PowerSoil kitとTNAキットの両方で、定点当りの患者報告数と運動した下水中新型コロナウイルスのゲノム量が運動するデータが得られた。
PowerSoilキットよりもTNAキットのほうが流入下水1L当りのゲノムコピー数が大きくなる。
下水中の新型コロナウイルス量が少なく、希釈したTNAキットの抽出物では検出できなくなる、あるいは定量、検出限界以下になる場合がある。

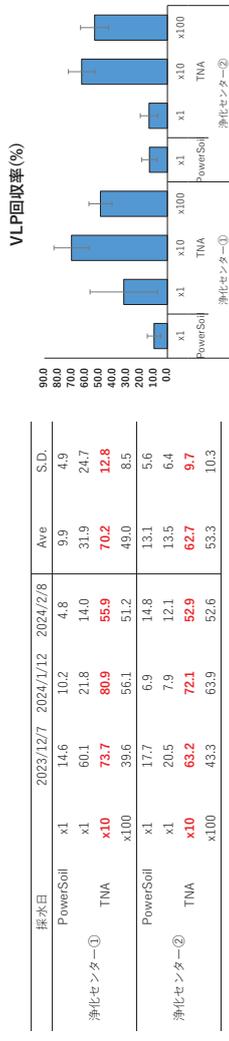
- TNAキットを用いた場合、PowerSoilキットと比較して下水中新型コロナウイルス遺伝子量を高い値で検出することができた。
- TNAキットは、PowerSoilキットと同様に下水中新型コロナウイルス遺伝子量が処理区域保健所管内の定点当たり患者報告数と運動する。
- TNAキットではリアルタイムPCR阻害の影響が大きいいため正確に定量するためにはある程度希釈した検体を利用する必要がある。

実施方法 (予定)

採水量：100mL
下水試料：40mL
処理検体数：4検体
抽出方法：TNAキット (Wizard® Enviro Total Nucleic Acid Kit)
粗遠心後の上清 + 沈殿分画
核酸溶出：60uL (30uLx2)
検体希釈：x1 (原液) - x10希釈 (EASY Dilution)

VLP回収率 (%)

使用検体：R5年12月～R6年2月に採取した浄化センター①および②の流入下水
TNAキットで抽出したRNAをEASY Dilutionで10および100倍に希釈 (x10, x100)
VLPをリアルタイムPCRで測定。



102

Custom PCR plate 下水サンプルの希釈の影響テスト

試薬： Powersoil kit (QIAGEN)
TNA kit (Promega)
0.2つの抽出サンプルで比較

cDNA合成
試薬： TaKaRa PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)

No.	サンプル名	希釈倍率	Reaction mixture [uL/rxn]	50
1	R6.2. Powersoil	x5	5x RT mix	2.5
2	R6.2. Powersoil	x10	DDW	7.5
3	R6.2. TNA	x5	total	375
4	R6.2. TNA	x10	total	500

DDWでx5およびx10希釈したものを逆転写反応に使用。
(RTへの希釈の影響の評価？)

リアルタイムPCR

試薬： TaqPath™ BactaPure™ Microbial Detection Master Mix, no Rox
プレート： TrueMark Custom Plates (カス、タマイズ)

検体希釈標準液： Custom DNA control (1 x 10⁵ copies/μL), WWIS_control 1
→ 10¹, 10², 10³, 5uL (reaction) に希釈

Reaction mixture	[uL/rxn]	110
2x Master Mix	2.5	275
DDW	2.5	275
cDNA	5	550
total	10	1100

検体希釈標準液： Custom DNA control (1 x 10⁵ copies/μL), WWIS_control 1
→ 10¹, 10², 10³, 5uL (reaction) に希釈

検体希釈標準液： Custom DNA control (1 x 10⁵ copies/μL), WWIS_control 1
→ 10¹, 10², 10³, 5uL (reaction) に希釈

検体希釈標準液： Custom DNA control (1 x 10⁵ copies/μL), WWIS_control 1
→ 10¹, 10², 10³, 5uL (reaction) に希釈

検体希釈標準液： Custom DNA control (1 x 10⁵ copies/μL), WWIS_control 1
→ 10¹, 10², 10³, 5uL (reaction) に希釈

検体希釈標準液： Custom DNA control (1 x 10⁵ copies/μL), WWIS_control 1
→ 10¹, 10², 10³, 5uL (reaction) に希釈

104

103

173

測定条件

使用機器：QuantStudio7Flex (0.2mL 96well plate 対応)
 Standardモード、サブCReporter：FAM、Quencher：NFQ-MGB、
 ReferenceDye：Noneで測定



プレートレイアウト

リアルタイムPCRプレート

呼吸器	Flu A/B		RS A/B		Rhino A-C		ParaFlu 1-4		corona		Parecho
	NV-G1/G2	Astro (pool)	Sapo (pool)	Rhino A-C	Sapo (pool)	Rhino A-C	ParaFlu 1-4	entero	entero		
胃腸炎											Adeno
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B											
C											
D											
E											
F											
G											
H											

P 10³ copy/5ul
 P 10² copy/5ul
 P 10¹ copy/5ul
 N NC
 1 1R6.2, PowerSoil
 2 1R6.2, PowerSoil
 3 1R6.2, TNA
 4 1R6.2, TNA
 x5
 x10
 x5
 x10

10⁴adenovirusについては希釈した下水核酸抽出サンプルを5ulずつ添加

結果 (呼吸器パネル LOT#:8219406) サンプル

[Copy/well]	Flu A/B		RS A/B		Rhino A-C		ParaFlu 1-4		corona		Parecho
	NV-G1/G2	Astro (pool)	Sapo (pool)	Rhino A-C	Sapo (pool)	Rhino A-C	ParaFlu 1-4	entero	entero		
120240208_I_PowerSoilx5	N.D.	(0/2)	N.D.	(0/2)	N.D.	(0/2)	4.34	(1/2)	2.25	(2/2)	N.D.
220240208_I_PowerSoilx10	N.D.	(0/2)	N.D.	(0/2)	N.D.	(0/2)	3.46	(1/2)	0.70	(1/2)	N.D.
320240208_I_TNAx5	N.D.	(0/2)	N.D.	(0/2)	0.29	(2/2)	6.60	(1/2)	2.94	(2/2)	N.D.
420240208_I_TNAx10	N.D.	(0/2)	N.D.	(0/2)	0.86	(2/2)	2.42	(1/2)	1.21	(2/2)	N.D.

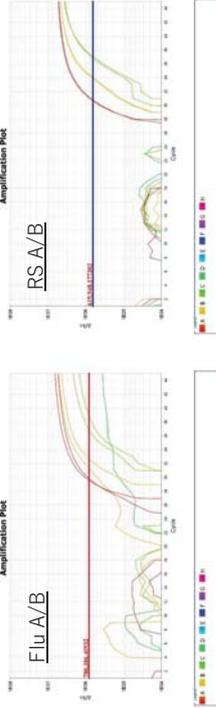
2wellで検出

TNAキットで抽出したRNAでライノウイルスとコロナウイルスが検出できたが、希釈の影響は不明
 PowerSoilキットではコロナウイルスのみ検出できた。(定量下限10コピー未満)

インフルは両抽出方法での検出できなかった。

結果 (呼吸器パネル LOT#:8219406) スタンダード

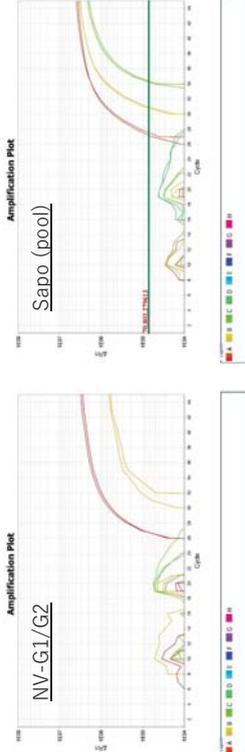
	Flu A/B		RS A/B		Rhino A-C		ParaFlu 1-4		corona		Parecho
	Ct	R ²	Ct	R ²	Ct	R ²	Ct	R ²	Ct	R ²	
10 ³ copy/5ul	23.7	0.9017	29.5	0.9984	28.7	0.9961	27.4	0.9375	26.9	0.9822	29.1
10 ² copy/5ul	31.2	0.9984	32.6	0.9984	31.9	0.9961	30.0	0.9375	30.0	0.9822	32.1
10 ¹ copy/5ul	36.7	0.9984	38.8	0.9984	34.8	0.9961	35.6	0.9375	34.0	0.9822	35.4
NC	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.
Slope	-4.0787	0.9017	-3.1161	0.9984	-2.9287	0.9961	-4.6058	0.9375	-3.4748	0.9822	-3.0789
R ²	0.9017		0.9984		0.9961		0.9375		0.9822		0.9983



インフルおよびパラインフルは10コピー/wellにおいてCt値がばらつき、R²値が低くなった。

結果 (消化器パネル LOT#:8219407) スタンダード

	NV-G1/G2		Astro (pool)		Sapo (pool)		RotaA (pool)		entero		Adeno
	Ct	R ²	Ct	R ²	Ct	R ²	Ct	R ²	Ct	R ²	
10 ³ copy/5ul	25.2	0.9552	28.6	0.946	27.2	0.9884	28.2	0.9936	27.5	0.9917	25.9
10 ² copy/5ul	31.2	0.9552	32.1	0.946	30.8	0.9884	31.4	0.9936	31.2	0.9917	29.0
10 ¹ copy/5ul	N.D.		N.D.		34.2	0.9884	35.0	0.9936	33.8	0.9917	31.5
NC	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.
Slope	-4.9136	0.9552	-3.9275	0.946	-3.4013	0.9884	-3.2658	0.9936	-3.1881	0.9917	-2.9652
R ²	0.9552		0.946		0.9884		0.9936		0.9917		0.9918



ノロおよびエンテロは10コピー/wellにおいて2wellでの増幅が確認できなかった。

[Copy/well]	NV_GI/G2	Astro (pool)	Sapo (pool)	RotaA (pool)	entero	Adeno
120240208_1_PowerSoilx5	17.3 (2/2)	29.2 (2/2)	17.7 (2/2)	N.D. (0/2)	N.D. (0/2)	1.1 (1/2)
220240208_1_PowerSoilx10	22.2 (2/2)	31.5 (2/2)	11.1 (2/2)	N.D. (0/2)	N.D. (0/2)	N.D. (0/2)
320240208_1_TNAx5	428.5 (2/2)	602.1 (2/2)	746.8 (2/2)	N.D. (0/2)	2.0 (2/2)	13.6 (2/2)
420240208_1_TNAx10	296.8 (1/2)	311.1 (2/2)	362.7 (2/2)	N.D. (0/2)	2.9 (2/2)	2.5 (2/2)

2wellで検出

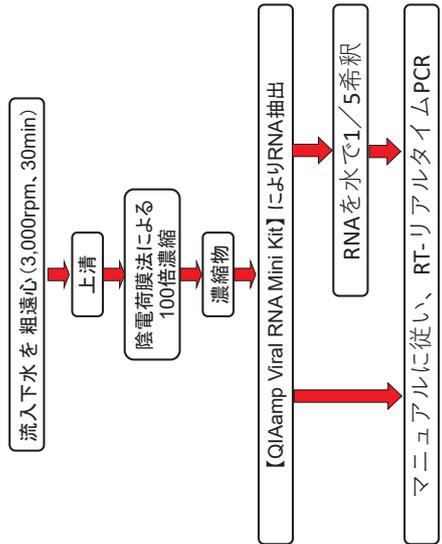
- PowerSoil (下水沈査) よりもTNAキット (下水上清+沈査) で多くのウイルスを検出可能で、1反応あたりのコピー数も高くなった。
- アストロウイルスおよびサポウイルスでは検出ウイルスコピー数が希釈倍率と相関している。
→ TNAキットで抽出したRNAでは逆転写反応時に5倍希釈すれば
検出系への逆転写あるいはPCR反応への影響はない?
(原液を用いて逆転写したものと比較が必要?)

1 複数種ウイルスの検出検討 (パネル検査)

採水場所
処理人口50~100万人規模の下水処理場流入水 (33-R02021)

検体

2023年12月採水検体 (当県で今期インフルエンザ報告数が最も多かった月)
2024年2月採水検体 (今期下水から最も高濃度でノロウイルスが検出された月)

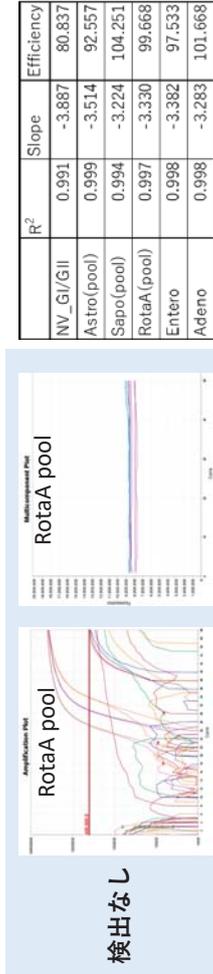


岡山県における流入下水からの複数種ウイルスの検出検討及び新型コロナウイルス検出状況

岡山県環境保健センター



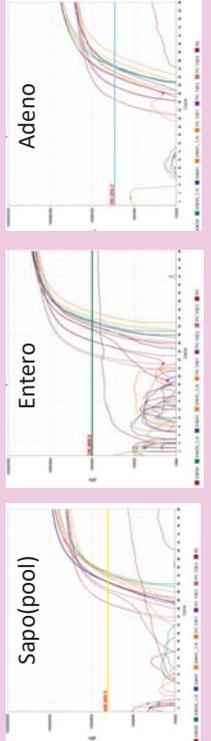
胃腸炎系パネル

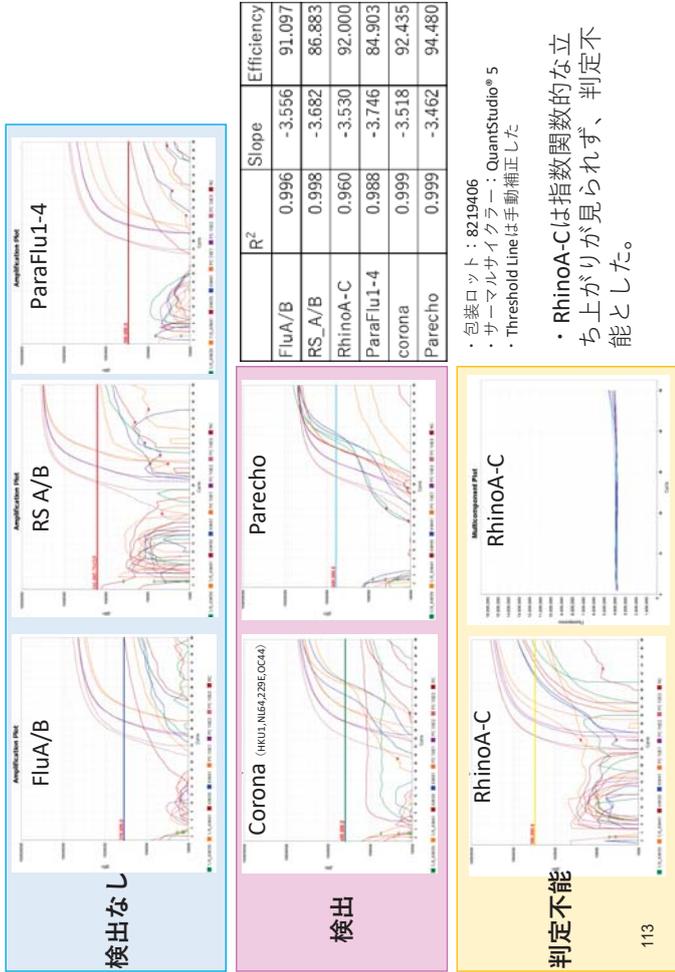


- 包装ロット: 8219407
- サーマルサイクラー: QuantStudio® 5
- Threshold Lineは手動補正した

- RotaA以外はすべて検出。
- RotaAはmulti-component plotで増幅が見られず、検出なしとした。

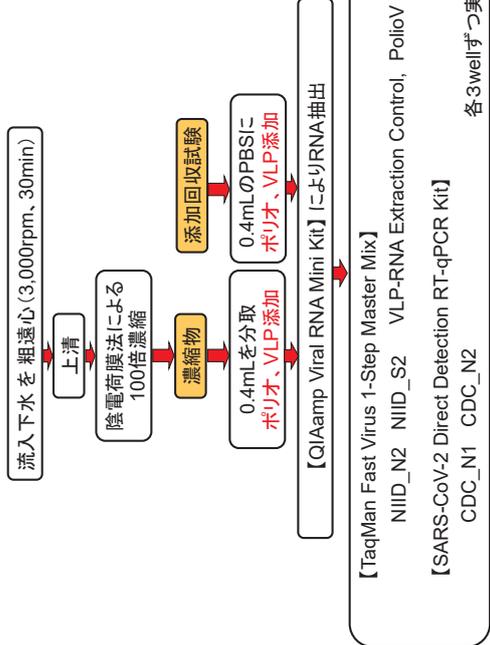
検出





2 新型コロナウイルス検出状況

- 採水場所
 処理人口10万人未満規模の下水処理場流入水 (33-R02020)
 処理人口50~100万人規模の下水処理場流入水 (33-R02021)
- ・調査期間：2023年4月～2024年2月
 - ・採水頻度：月1回



1/5希釈の検討

値は2 wellの平均

ウイルス	NV_GI/GII		Astro(pool)		Sapov(pool)		RotaA(pool)		Entero		Adeno	
	Qn/5μL	Qn/L	Qn/5μL	Qn/L	Qn/5μL	Qn/L	Qn/5μL	Qn/L	Qn/5μL	Qn/L	Qn/5μL	Qn/L
12月採水検体 (希釈なし)	61.53	2.94E+05	5370.17	2.30E+07	130.55	5.69E+05	N.D.	N.D.	81.16	3.48E+05	93.71	4.02E+05
12月採水検体 (1/5希釈)	18.65	4.00E+05	1595.56	3.42E+07	27.31	5.85E+05	N.D.	N.D.	20.21	4.33E+05	20.75	4.45E+05
12月希釈と原液の比		1.52		1.49		1.05				1.25		1.11
2月採水検体 (希釈なし)	710.14	3.04E+06	1142.79	4.90E+06	139.75	5.99E+05	N.D.	N.D.	30.41	1.30E+05	18.08	7.75E+04
2月採水検体 (1/5希釈)	162.23	3.48E+06	319.65	6.85E+06	30.44	6.52E+05	N.D.	N.D.	8.17	1.75E+05	4.87	1.04E+05
2月希釈と原液の比		1.14		1.40		1.09				1.34		1.35

ウイルス	FluA/B		RS A/B		RhinoA-C		ParaFlu1-4		corona		Parecho	
	Qn/5μL	Qn/L	Qn/5μL	Qn/L	Qn/5μL	Qn/L	Qn/5μL	Qn/L	Qn/5μL	Qn/L	Qn/5μL	Qn/L
12月採水検体 (希釈なし)	N.D.	—	N.D.	—	判定不能	—	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	48.14	2.06E+05
12月採水検体 (1/5希釈)	N.D.	—	N.D.	—	判定不能	—	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	14.21	3.05E+05
12月希釈と原液の比		—		—		—					1.48	—
2月採水検体 (希釈なし)	N.D.	—	N.D.	—	判定不能	—	N.D.	N.D.	3.76	1.61E+04	5.72	2.45E+04
2月採水検体 (1/5希釈)	N.D.	—	N.D.	—	判定不能	—	N.D.	N.D.	1.07	2.39E+04	N.D.	—
2月希釈と原液の比		—		—		—			1.43	—	—	—

- ・1/5希釈を行った系の方がRNA原液より1.05~1.52倍高い濃度となった。
 - ・希釈を行ったことにより検出されない検体もあった。
- 検出率を重視する場合は希釈なしの方がよい。

新型コロナウイルス検出結果 (CDC_N1N2、NIID_N2及びS2の比較)

33-R02020 (処理人口10万人未満) 33-R02021 (処理人口50~100万人)

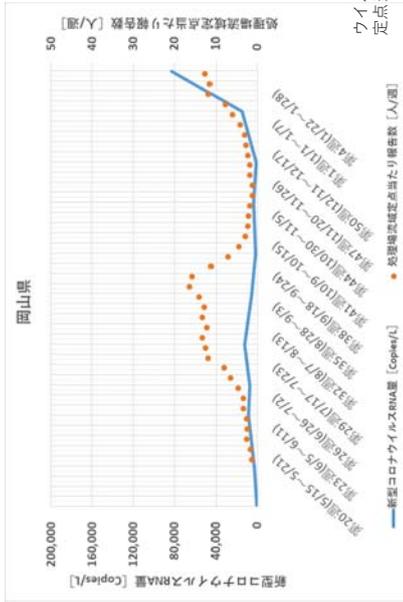
検出日	CDC_N1N2		NIID_N2		NIID_S2	
	Qn/5μL	Qn/L	Qn/5μL	Qn/L	Qn/5μL	Qn/L
2023年4月12日	385	2570	2631	671	2570	N.D.
2023年5月9日	1884	2453	4407	3083	1306	3503
2023年6月13日	2789	1222	N.D.	8895	3732	5647
2023年7月4日	3730	2420	3300	7262	5333	8474
2023年8月1日	5094	3800	8478	12409	6877	6179
2023年9月5日	18720	8716	7867	5482	5667	4817
2023年10月3日	1714	98	1046	1880	1920	N.D.
2023年11月7日	661	N.D.	870	3618	2515	N.D.
2023年12月5日	1758	3588	2632	1196	2539	2476
2024年1月9日	3684	3917	4295	14781	15384	16266
2024年2月6日	5008	6312	4758	82892	49302	45678

※1検体につき、3well検査を実施
 ※赤字の定量値は3well中1well/2wellで陽性反応あり。
 ※検出の場合は測定値の平均

copy/L

CDCプライマー系のほうが検出率が高かった。

新型コロナウイルス検出状況 33-R02021 処理人口：約50～100万人



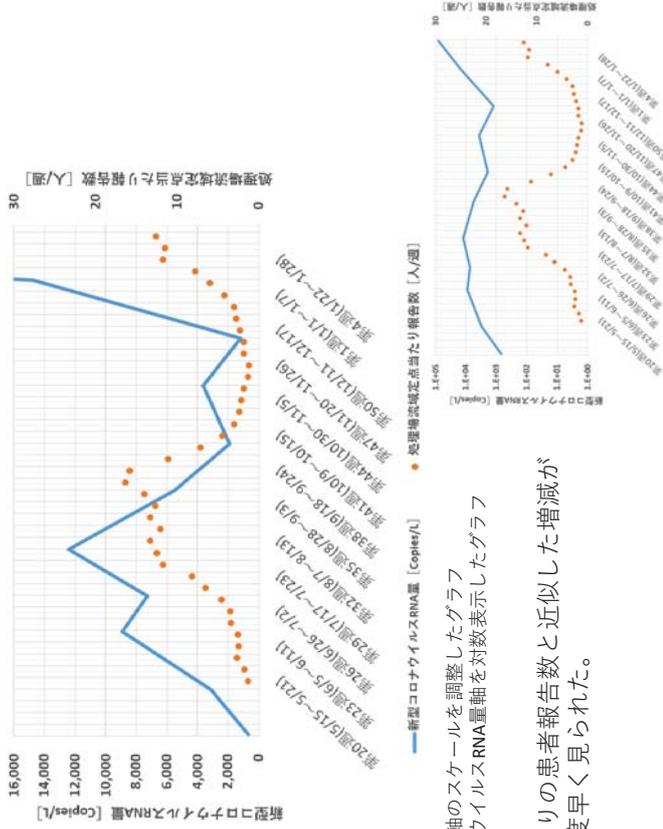
ウイルスRNA量は4月採水以降
定点当たり報告数は19週以降を計上

採水日	新型コロナウイルスRNA量 (GC/L)	検出濃度 (対数変換)	回帰係数の積	変化率
date	LOG10 GC/L			%
2023/4/12	671	2.827029574		
2023/5/9	3,083	3.488959513		
2023/6/13	8,895	3.949169037	0.017859967	4.2%
2023/7/4	7,262	3.861034083	0.007307929	1.7%
2023/8/1	12,409	4.093746605	0.003240313	0.7%
2023/9/5	5,482	3.73892304	-0.002274317	-0.5%
2023/10/3	1,880	3.274099871	-0.012892553	-2.9%
2023/11/7	3,618	3.558494935	-0.002413548	-0.6%
2023/12/5	1,196	3.077752582	-0.002655878	-0.6%
2024/1/9	14,781	4.169706242	0.010582788	2.5%
2024/2/6	82,892	4.918514736	0.029299604	7.0%

- ・年度末に提供のあった「【試作版】感染動向解析ツール v1.9.xlsx」を使用
- ・上図「処理区に該当する保健所への報告数と定点数を入力する」により抽出したグラフ。CDCプライマリー系の結果を使用
- ・左図 変化率表

抽出したままのグラフではRNA量の変化は見取れなかった。

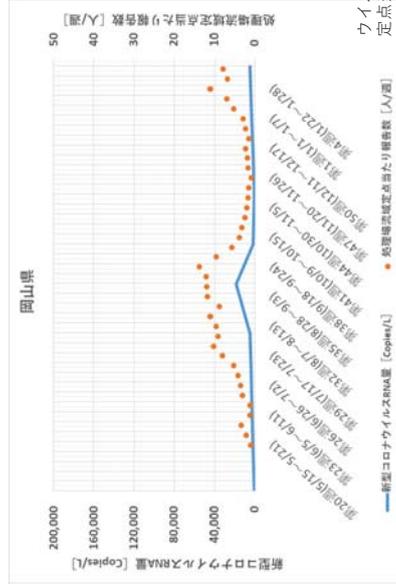
新型コロナウイルス検出状況 33-R02021 処理人口：約50～100万人



- ・上図) 軸のスケールを調整したグラフ
- ・右図) ウイルスRNA量を対数表示したグラフ

定点あたりの患者報告数と近似した増減が1ヶ月程度早く見られた。

新型コロナウイルス検出状況 33-R02020 処理人口：10万人未満



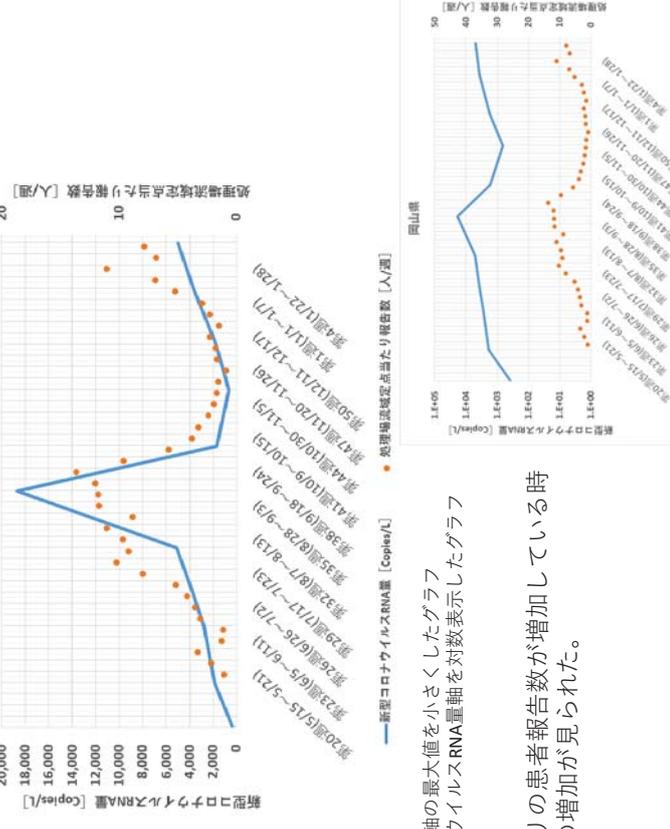
ウイルスRNA量は4月採水以降
定点当たり報告数は19週以降を計上

採水日	新型コロナウイルスRNA量 (GC/L)	検出濃度 (対数変換)	回帰係数の積	変化率
date	LOG10 GC/L			%
2023/4/12	385	2.585201809		
2023/5/9	1,884	3.274994203		
2023/6/13	2,789	3.445509058	0.013441094	3.1%
2023/7/4	3,730	3.571706048	0.005254898	1.2%
2023/8/1	5,094	3.707049916	0.005310333	1.2%
2023/9/5	18,720	4.272298633	0.011326642	2.6%
2023/10/3	1,714	3.234041139	-0.006538484	-1.5%
2023/11/7	661	2.820017647	-0.022592127	-5.1%
2023/12/5	1,758	3.245126409	-0.00031606	-0.1%
2024/1/9	3,684	3.56631161	0.001736542	2.7%
2024/2/6	5,008	3.699676553	0.007295477	1.7%

- ・年度末に提供のあった「【試作版】感染動向解析ツール v1.9.xlsx」を使用
- ・上図「処理区に該当する保健所への報告数と定点数を入力する」により抽出したグラフ。CDCプライマリー系の結果を使用
- ・左図 変化率表

抽出したままのグラフではRNA量の変化は見取れなかった。

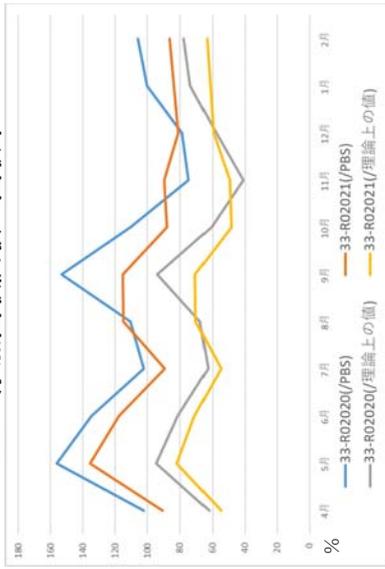
新型コロナウイルス検出状況 33-R02020 処理人口：10万人未満



- ・上図) 軸の最大値を小さくしたグラフ
- ・右図) ウイルスRNA量を対数表示したグラフ

定点あたりの患者報告数が増加している時にRNA量の増加が見られた。

VLP^{※1}添加回収試験 回収率^{※2}



33-R02020：処理人口10万人未満
33-R02021：処理人口50~100万人

※1 VLP-VLP-RNA Extraction Control (1 × 10⁶ GC/μL) MERMIDX069-1

※2 (PBS)：(ポリオS1及びVLP添加検体Qty) / (ポリオS1及びVLP添加PBSQty) × 100
(理論上の値)：(ポリオS1及びVLP添加検体Qty) / (100%の効率で抽出した値) × 100
検体、PBSともに3well実施

121 下水からの阻害は大きく受けていないように見受けられました。

まとめ

- 1 複数種ウイルスの検出
 ・ 検出した検体では、胃腸炎系パネルからノロ、アストロ、サポ、エンテロ、アデノウイルスを検出した。ロタウイルスは検出できなかった。
 ・ 呼吸器系パネルからコロナ、パレコウイルスを検出した。インフルエンザ、RS、パラインフルエンザウイルスは検出できず、ライノウイルスは判定不能とした。
 ・ RNA1/5希釈を行った系のほうがRNA原液より高い濃度が得られたが、希釈したことにより検出されない検体もあった。
- 2 新型コロナウイルスの検出
 ・ 【試作版】感染動向解析ツールを使用してCDC_N1N2プライマーの系を解析したところ、処理人口が50~100万人規模の下水処理場検体では定点あたりの患者報告数と近似した増減が見られた。
 ・ 処理人口10万人未満の下水処理場検体では、定点あたりの患者報告数増加時に高い濃度で検出された。
 ・ 添加回収試験では、VLP、ポリオウイルス添加系ともに下水からの阻害はさほど受けていことが分かった。ポリオウイルス添加系の方がばらつきは小さかった。

123

ポリオウイルスS1添加回収試験 回収率^{※3}



※3 (ポリオS1及びVLP添加検体Qty) / (ポリオS1及びVLP添加PBSQty) × 100
検体、PBSともに3well実施

- ・ 下水からの阻害は大きく受けていないように見受けられました。
- ・ VLPよりばらつきは小さかった。

122

福岡県における流入水からの新型コロナウイルス検出について

福岡県保健環境研究所
濱崎光宏

目的

- 2か所の終末処理場から得られた流入水について、沈殿物及び上清濃縮物から**新型コロナウイルスの検出を行う**。

- 呼吸器感染症パネル及び腸管感染症パネルを用いた複数病原体検出を試みる。

125

方法

RNA抽出

- 沈殿物 RNeasy® PowerSoil® Total RNA Kitを使用
- 未処理の流入水 Wizard® Enviro TNA Kit を使用

リアルタイムRT-PCR

- 下水中の新型コロナウイルス検出マニュアル ver 1.1 SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewaterを使用
- TaqPath及び呼吸器感染症パネル及び腸管感染症パネル

179

検体

排除方式	処理人口
A終末処理場 分流式	約19万人
B終末処理場 分流式	約4万人

1か月に1回各浄化センターで採水された流入水を用いた。

検体処理

流入水200mlをスインゴローターで遠心*1 (2500 x g, 60分間)



スインゴローターで遠心したもの

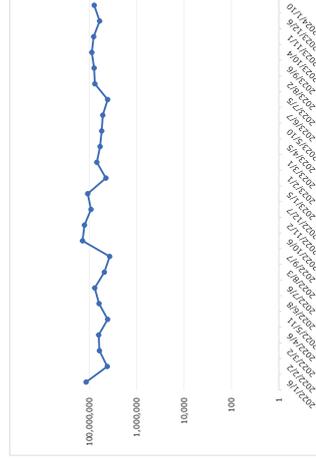
すぐに検査しない場合は、沈査を冷凍保存 (-80℃)

126

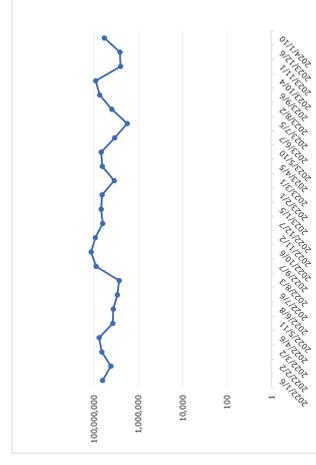
結果 福岡県 (R3.1-R6.1)

【R3年1月～R6年1月の調査結果】

- 各処理場における内部コントロール（トウガラシ微斑ウイルス（PMMoV））の検出結果



PMMoVの検出推移（単位：Copies/L）



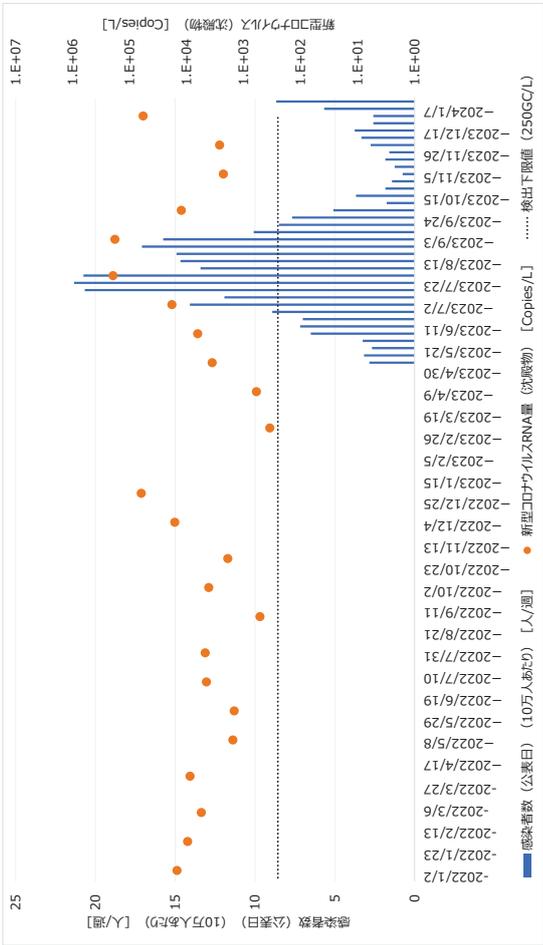
PMMoVの検出推移（単位：Copies/L）

127

結果 福岡県 (R3.1-R6.1)

【R3年1月～R6年1月の調査結果】

- ・ 月1回の採水を実施。下水中（沈殿物）のコロナ検出状況（Copies/L）と各処理場のキャッチメントエリアの新規感染者数の推移は以下の通り。



A処理場におけるSARS-CoV-2検出状況

129

結果 福岡県 (R3.1-R6.1)

【採水ポイントに関する情報】

- ・ 福岡県では2か所にて採水を実施。各ポイントの処理人口、感染症指定医療機関の有無、コロナ陽性者療養施設の有無、事業所総数※は以下の通り。

処理場	処理人口 (万人)	感染症指定医療機関有無	コロナ陽性者療養施設有無	事業所総数
A終末処理場	約10~20	あり	あり	8,414
B終末処理場	約~10	あり	なし	8,537

※感染症指定医療機関：第一種および第二種感染症指定医療機関に指定されている病院の総数
※事業所総数は、令和元年国勢調査センサス活動事業所数について、自己消費の場数を合わせた数を示す

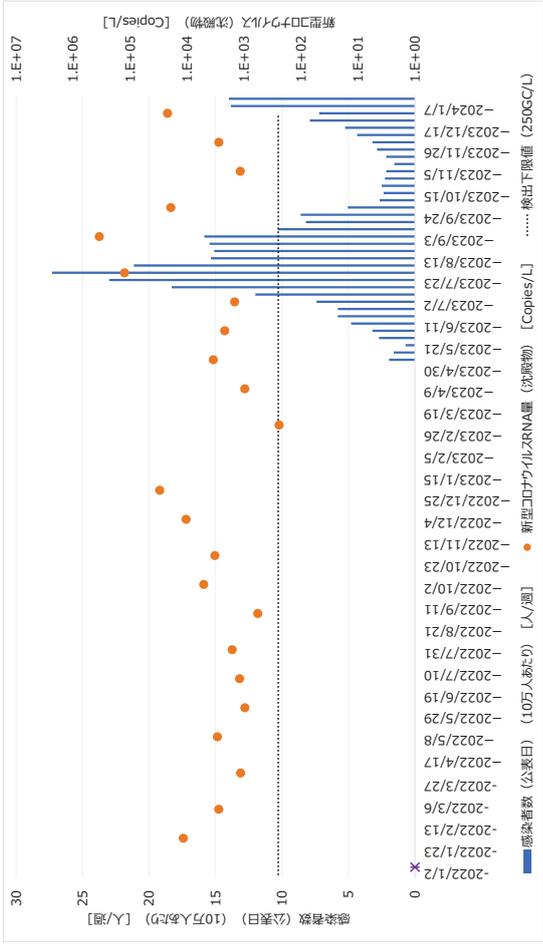
A処理場	新型コロナウイルスコピー数 (Copies/L)	
	検出下限値 (250GC/L)	検出上限値 (250GC/L)
2022/1/6	14,688	ND
2022/2/2	9,561	11,623
2022/3/2	5,509	2,776
2022/4/6	8,668	1,152
2022/5/11	1,540	2,929
2022/6/8	1,461	964
2022/7/6	4,488	1,196
2022/8/3	4,699	1,614
2022/9/7	515	574
2022/10/6	4,072	5,096
2022/11/2	1,895	3,244
2022/12/7	16,108	10,404
2023/1/5	62,447	30,243
2023/2/1	298	2,186
2023/3/1	346	242
2023/4/5	596	969
2023/5/10	3,549	3,464
2023/6/7	6,391	2,188
2023/7/5	18,078	1,462
2023/8/2	194,970	124,939
2023/9/6	180,119	348,079
2023/10/4	12,363	19,296
2023/11/1	2,265	1,165
2023/12/6	2,627	2,773
2024/1/10	57,804	22,081

131

結果 福岡県 (R3.1-R6.1)

【R3年1月～R6年1月の調査結果】

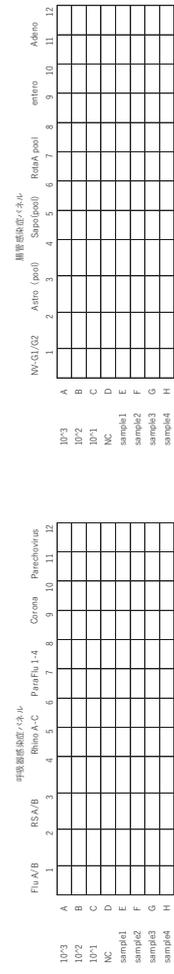
- ・ 月1回の採水を実施。下水中（沈殿物）のコロナ検出状況（Copies/L）と各処理場のキャッチメントエリアの新規感染者数の推移は以下の通り。



B処理場におけるSARS-CoV-2検出状況

130

結果 福岡県 パネルを用いた複数病原体の検出



呼吸器感染症パネルでの増幅曲線

腸管感染症パネルでの増幅曲線

いずれのパネルでも増幅できなかった。

まとめ

- 2022年1月以降は毎月SARS-CoV-2が検出されていることから、SARS-CoV-2が**定着**していると考えられる。
 - 月に1回のサンプリングでは**流行状況**をモニタリングすることは難しいと考えられる。
 - 流行状況のモニタリングは難しいが、**侵入と消失**のモニタリングは可能と考えられる。
 - 呼吸器感染症パネル及び腸管感染症パネルを用いた複数病原体検出では、いずれのパネルでも増幅することができなかった。
- ➡ 当所のリアルタイムPCRのベースが0.1mlタイプのため、試薬を移し替える際、完全に試薬を移すことができなかったためと考えられる。