

## FAQ：下水中の新型コロナウイルス遺伝子検出マニュアル

No.	章	分類	質問	回答
1	2	採水	最適な採水時間や採水方法（スポット、コンポジット）はありますか。	濃度が十分高い他のウイルスでの研究では、24時間コンポジット採水の方が変動が少なく確実な検出に適しているとの報告があります。一方、国内でこれまでに検出された下水中SARS-CoV-2 RNA濃度は低いと、朝の負荷ピーク時間の方が検出されやすい可能性は考えられます。一方、スポット採水は濃度変動が大きいため、ピーク時間や感染者による便排出のタイミング次第では不検出となる可能性があります。
2	2	試料保存	冷凍保存や保存温度によって検出に影響は出ますか。	冷凍におけるSARS-CoV-2 RNA減衰に関する報告はまだありません。一般的には冷凍保存でも一定のRNA減衰があるものと考えますので、できるだけ早く分析することが望ましいとされています。冷蔵（4℃）の場合、下水中SARS-CoV-2 RNAの半減期は8日程度との報告があります。
3	3	濃縮・検出	採水（運搬）から分析結果が得るまでのどれくらいの日数が必要でしょうか。	午前中に採水して実験室に運搬すれば、PEG沈殿法を除き、その日のうちに結果を得ることは可能です。PEG沈殿法の場合は翌日には結果を得ることが可能です。
4	3.1	プロセスコントロール・濃縮	プロセスコントロールと濃縮手法の組み合わせによって検出感度に差は生じますか	検出感度や回収率の差は生じます。同じ組み合わせであっても、サンプルによって変わってきます。タスクフォース内の事例でも、同じところの試料で同じ組み合わせでも、回収率は10%台から100%超まで大きくばらついており、このような状況は現実にあることです。
5	3.1.	プロセスコントロール・濃縮	本マニュアルで使用する試薬や容器等に要求されるグレードはありますか。	遺伝子工学用・分子生物学用等のグレードの試薬の使用が望ましいです。容器等は滅菌済みの使い捨てのものか、オートクレーブ滅菌等を施して使用することが推奨されます。
6	3.1.1	プロセスコントロール	代理ウイルスの添加（＝回収率の確認）は毎回必要でしょうか。	代理ウイルス（プロセスコントロールウイルス）の添加（＝回収率の確認）は毎回必要です。同じ場所から採取したサンプルであっても、日によって水質は異なりますので、プロセスコントロールウイルスの回収率を毎サンプル確認しておかないと、検出阻害の発生を見逃すことになります。
7	3.1.1	プロセスコントロール	プロセスコントロールウイルスの回収率を用いて、ターゲットのウイルス遺伝子濃度を換算することは行わないのはなぜでしょうか。	ターゲットウイルスとプロセスコントロールウイルスの間でPCRにおける遺伝子増幅効率が同じとは限らないため、プロセスコントロールウイルスの回収率を用いてターゲットウイルス遺伝子濃度を換算することを正当化することは難しい、とご理解ください。
8	3.1.1	プロセスコントロール	Salmonella typhimurium WG49の入手先を教えてください。	ATCCより購入可能です。 <a href="https://www.atcc.org/Products/All/700730">https://www.atcc.org/Products/All/700730</a>
9	3.1.2	プロセスコントロール	プロセスコントロールが検出されない頻度はどの程度ありますか。	同じ方法・組み合わせでも試料により違ってくるので一概には言えませんが、マニュアル提示の濃縮・検出方法は、基本的に検出されないというのなかつたものを提示しています。プロセスコントロールウイルスの回収率は1%以上で可といわれていますが、経験的には10%以下では検出される率も低下しています（検出阻害の可能性があるので、10%以上であることが望ましいと考えています）。
10	3.1.2	濃縮	ウイルス濃縮液の保管方法・条件について教えてください。	ウイルス濃縮液は、当日すぐに次の操作（RNA抽出）を行う場合以外は、冷凍保存する必要があります。当日操作を行う場合においても、常温ではウイルスの分解が生じる可能性があるため、冷蔵保存（遮光）する必要があります。なお、凍結融解の繰り返しによりウイルスRNA量が減少する可能性があるため、凍結融解の回数はなるべく少なくすることが望ましいです（この観点から、翌日に次の操作を行う場合には、冷蔵・冷蔵保存のいずれでも対応可能と考えられます。なお、試料を凍結する工程としては、試料採取後、濃縮後、RNA抽出後、逆転写反応後が考えられます。
11	3.1.2	濃縮	ポリエチレングリコール沈殿法の振盪時間の一晚とは何時間ですか。	100 rpmにて、12時間から24時間を目安としています。振とう条件につきましては、試料がよく攪拌されるよう設定いただくのが良いと考えています。
12	3.1.2	濃縮	下水試験方法のノロウイルス分析の濃縮法との違いは何でしょうか。	PEG沈殿法についてはノロウイルス分析に使用されているものと同様ですが、陰電荷膜破砕型濃縮法は回収率を向上させるために膜を破砕させる手法であり、ノロウイルス分析で使用される陰電荷膜法よりも高い回収率が得られると期待されます。今回の暫定マニュアルに記載した手法は、新型コロナウイルスの検出に成功した手法として記載したものであり、新型コロナウイルスの回収率自体は測定されていません。モデルウイルスであるΦ6ファージ等を用いた回収率の測定は各研究者により実施中ですが、その結果を踏まえて操作条件を最適化したものではありません。
13	3.1.2	濃縮	マニュアルの暫定版に掲載された以外の濃縮方法が効率的だとする研究報告もありますが、どのようにお考えでしょうか。	暫定マニュアルでは、タスクフォースメンバーによって下水からの新型コロナウイルスの検出に成功した手法を掲載しています。現在でも新たな知見が続々と得られてきているため、引き続き情報発信を行っていきたくと考えております。
14	3.2	検出	定量下限値はいくらぐらいですか。	今回紹介した方法では、10の4乗（コピー/L）程度です。使用する試料量（濃縮倍率）によっても異なってきますが、濃縮倍率が高くなると、検出の阻害要因となる可能性もあります。
15	3.2	検出	今回の分析方法では、ウイルスの感染力の有無を知ることはできませんか。	今回の分析方法は遺伝子検査法であり、ウイルスの感染性の有無に関わらずウイルスRNAの一部を検出する方法です。
16	3.2	検出	リアルタイムPCRではなくデジタルPCRを用いることは可能でしょうか。	PCRによる検出の部分をリアルタイムPCRからデジタルPCRに変更することで基本的に対応可能です。

No.	章	分類	質問	回答
17	3.2	検出	リアルタイムPCRでの測定において、CDCN-1とCDCN-2をそれぞれのプライマーを用いた結果からどのように最終的なウイルス濃度を算出すればよいのでしょうか。	CDC-N1またはN2のどちらで測定した結果かを明記した上で、それぞれの検出系での濃度をお示しください。（少なくとも、N1とN2の濃度は合算できる性質のものではありません。）
18	3.2.2	検出	SARS-CoV-2のPCR用ポジコンはどこで入手可能でしょうか。	SARS-CoV-2のqPCR用のポジコンは市販で購入することが可能です。
19	4	安全管理	試料分析後の廃液は滅菌処理後に廃棄する必要がありますか？通常の水質検査を行った後の下水も滅菌処理する必要がありますか。	安全管理対策については、分析の現場や市中流行の状況によって大きく異なり、それに応じて臨機応変に対応していただくものと考えております。（例えば、運搬や廃棄処理については処理場敷地内の実験室と民間企業等による処理場外の実験室で取り扱いが異なることも想定されます。）集水域の感染者が多い場合や試料からウイルスが検出された場合、可能なら滅菌処理してから廃棄した方が安全です（特に、処理場外で分析・廃棄処理する場合）が、処理場内の実験室で排液が直接処理プロセスに戻る場合などもあると思いますので、現場や市中流行状況、関係業界団体のガイドライン等に従ってに合わせて適切と思われる対応をとってください。
20	4	安全管理	処理場内の流入水では、流下距離や界面活性剤（LAS等）の影響で、ウイルスの感染力は弱まっていると考えてよいでしょうか。	下水中のSARS-CoV-2の感染力についてはほとんどわかっていません。検出に影響するRNAの減衰については、一般的な下水流下時間（数時間～半日程度）による減衰は限定的との報告があります。
21		その他	分析を委託する場合、どのような分析機関ならば対応可能でしょうか。	濃縮～検出の操作は、特別な機材や熟練を必要とするものではなく、PCR検査が実施可能な機関なら対応可能と思われます。プロセスコントロールの意義を十分に理解し、適切に実施・評価できるところであれば問題ないと考えられます。
22		その他	マニュアルで示された分析方法を利用して得られた情報を、今後どのように感染症対策に活用していけばよいでしょうか。	今回の暫定マニュアル公開の目的の一つは、大学・研究機関だけでなく自治体や民間企業などで分析データ蓄積を行っていただけるようにすることにあります。データの流行把握への利用については各TFメンバーでも研究を進めていますが、事業者・民間企業含めた多くの関係機関でデータ蓄積と流行把握の検証に本マニュアルを活用していただけることを期待しています。