

下水中の新型コロナウイルス遺伝子検出マニュアル

(公社) 日本水環境学会 COVID-19 タスクフォース

(公財) 日本下水道新技術機構

2021年3月

監修・執筆

日本水環境学会 COVID-19 タスクフォース

大村 達夫（東北大学 未来科学技術共同研究センター）

井原 賢（京都大学 大学院工学研究科）

片山 浩之（東京大学 大学院工学系研究科）

北島 正章（北海道大学 大学院工学研究院）

佐野 大輔（東北大学 大学院環境科学研究科）

田中 宏明（京都大学 大学院工学研究科）

鳥居将太郎（東京大学 大学院工学系研究科）

端 昭彦（富山県立大学 工学部）

原本 英司（山梨大学 大学院総合研究部）

本多 了（金沢大学 地球社会基盤学系）

渡部 徹（山形大学 農学部）

本書は（公財）日本下水道新技術機構による（公社）日本水環境学会への委託
研究事業の一環として作成された。

目次

1. はじめに.....	1
2. 採水・保存手法.....	2
2.1 試料採取.....	2
2.2 輸送・保存.....	2
3. 分析手法.....	4
3.1 ウイルス濃縮.....	4
3.1.1 プロセスコントロール.....	4
(1)マウス肝炎ウイルス.....	4
(2)φ6 ウイルス.....	5
(3)F フェージ.....	7
(4)トウガラシ微斑ウイルス.....	10
3.1.2 濃縮手法.....	12
(1)ポリエチレングリコール沈殿法.....	12
(2)陰電荷膜破碎型濃縮法.....	14
(3)限外ろ過膜法.....	17
3.2 定量 PCR によるウイルス RNA 検出.....	19
3.2.1 RNA 抽出.....	19
(1)核酸抽出キット QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いる方法.....	19
(2)AGPC (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction) 法 ..	20
3.2.2 RT-qPCR による検出.....	21
4. 試料取扱上の安全管理について.....	26
4.1 下水試料の取り扱い.....	27
4.2 遺伝子検査のための実験室設備および作業方式における安全管理.....	28
4.3 その他病原体管理に関する参考情報.....	31

1. はじめに

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の世界的流行は、人命や健康の被害だけでなく、社会経済活動にも甚大な損害を与えている。新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の主な伝播経路はヒト-ヒト間での飛沫感染や接触感染であるが、ヒト糞便からもウイルス遺伝子が検出されることから、世界中で下水からの検出が試みられている。下水からの SARS-CoV-2 遺伝子の測定により、処理区域における流行状況を映し出すことが可能と考えられる。

本稿では、下水中の SARS-CoV-2 の測定方法について、解説する。測定法の選択においては、正確性および検出感度に加えて、消耗品コスト、人的コスト、備品、迅速性、効率性などを総合的に判断するものと考えられる。そのため、ここでは様々な有効な測定法を例として挙げ、測定法の選択の際に参照できるようにすることを目指した。そのため、これまでの研究成果に基づき、現時点で推奨できる方法を記載している。

なお、SARS-CoV-2 の検出の最後の工程は PCR 法を想定しており、ウイルス遺伝子の検出を行っているため、感染性のあるウイルス粒子の存在を意味するわけではない。そのため、処理区域の流行状況についての情報としては使えるが、下水の感染リスクを表しているわけではないことに留意する必要がある。

2. 採水・保存手法

2.1 試料採取

下水試料の採水容量は、後述の濃縮方法によっても異なるが、未処理下水の場合は概ね100～250mL程度、二次処理水・放流水の場合は概ね1～10L程度を採水する。塩素消毒後の放流水を採取する場合には、塩素中和のためにチオ硫酸ナトリウム溶液を採水後の最終濃度が50mg/L程度になるように採水容器に予め入れておき、採水後によく混和する。

下水試料の採水容器は、密閉可能な滅菌済のプラスチック製容器またはガラス瓶を用いる。滅菌済採水容器が利用可能でない場合は、1%次亜塩素酸ナトリウムで内部を洗浄して数分放置後、十分量の純水で5回以上すすいで塩素を取り除いた容器を用い、採取時には試料による十分な共洗いを行ってから採取する。

下水試料の採取時には、マスク・手袋等の保護具を装着し、飛沫暴露のおそれがある場合には必要に応じて保護メガネ、フェイスシールド、防護服などを装着する^{1,2}。保護具脱着後には速やかに手指洗浄と消毒を行う。（詳細は4.1に後述）

採取後の容器表面は、水道水で洗浄拭き取り後、消毒用エタノールもしくは5%塩素系漂白剤を噴霧して拭き取り消毒する。

2.2 輸送・保存

採取した下水試料は、密閉した上で保存・輸送する。採取後24時間以内に分析に供する場合には氷上または冷蔵庫（10℃以下）にて保存・輸送する。それ以降に分析を行う場合は冷凍保存を行う。冷凍温度は-80℃が望ましいが、-20℃もしくは家庭用冷凍庫で保存する場合はできるだけ早く分析を行う。

下水処理場外の施設へ輸送する場合は、三重梱包の上で冷蔵または冷凍輸送を推奨する。三重梱包では、密閉した一次容器（＝採水容器）を緩衝材・防漏用吸収材（キムタオルなど）とともに密閉性・気密性を有する二次容器（バイオパウチ、ジップロックなど）に入れる。さらに二次容器を輸送に耐える強度を持つ三次容器（堅牢な段ボール箱など）に入れて輸送する。適切に三重梱包が行われる場合は、他の荷物と同様に扱って差し支えない^{3,4}。

なお、輸送および保存時の安全性に万全を期す必要がある場合は、恒温槽にて56～60℃で30～60分間の熱不活化を行う。ただし、熱不活化処理は潜在的な感染リスクの低減に一

¹（公社）日本下水道管路管理業協会：「下水道管路管理業務における新型コロナウイルス感染症対策ガイドライン」

https://www.jascoma.com/topics/2020/coronavirus_disease/images/20200514/information_001.pdf

²（一社）日本下水道施設管理業協会：「下水道施設運転管理業務における新型コロナウイルス感染予防ガイドライン」https://www.gesui-kanrikyo.or.jp/pdf/news_2020051401.pdf

³厚生労働省：新型コロナウイルス感染症病原体検査の指針 第1版（<https://www.mhlw.go.jp/content/000678571.pdf>）

⁴国立感染症研究所：病原体等の輸送用包装容器—基本三重梱包の構成（<https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-biosafe/947-youkisb.html>）

定の効果があると考えられるが、完全な不活化を保証するものではないため、輸送時や試料分析時の取り扱いについては、不活化を行っていない試料と同様の安全管理を行うこと。なお、この温度・時間条件下での熱不活化によるウイルス RNA 量の減少は限定的であることが報告されている⁵。



図 1 下水試料輸送時の三重梱包の例

⁵ Pastorino et al. (2020). Heat inactivation of different types of SARS-CoV-2 samples: What protocols for biosafety, molecular detection and serological diagnostics? *Viruses*, 12(7), 735.

3. 分析手法

3.1 ウイルス濃縮

3.1.1 プロセスコントロール

ウイルス濃縮・検出過程では何らかの影響により阻害が生じ、ウイルス遺伝子濃度の正確な定量が妨げられる。ここで言う阻害には、ウイルス濃縮時及びウイルス遺伝子抽出時の損失、逆転写反応効率の低下、及び PCR における遺伝子増幅効率の低下が含まれる。ウイルス濃縮・検出過程で著しい阻害が生じた場合には、正確なウイルス遺伝子定量を行うことができないので、濃縮操作からのやり直しやデータの不採用（破棄）等が行われる。この阻害の検出に用いられるのがプロセスコントロール用代理ウイルスである。以下に示す4種類のウイルスのうち、トウガラシ微斑ウイルス（Pepper mild mottle virus, PMMoV）およびFファージ以外は実験室で予め準備して、濃縮前サンプルに既知量を添加（または存在量を定量）し、最終的に何%が回収されたかを計算する。PMMoV またはFファージを用いる場合には、下水中にもともと高濃度で存在しているため、濃縮操作前後の濃度を測定して回収率を計算する（Fファージを用いた場合にはRNA抽出以降の阻害を検出することができないことに留意すること）。10%以上の回収率が得られていれば大きな阻害は生じていなかったと判断するが、1%以上の回収率で問題ない（濃縮操作からのやり直しやデータの不採用（破棄）は行わない）と判断する場合もある。一般的に、プロセスコントロール用代理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。

以下にプロセスコントロール用代理ウイルスとして使用可能な4種類のウイルスを示すが、少なくともこれらのうちのいずれか、もしくはいずれかに準ずるウイルスをプロセスコントロール用代理ウイルスとして用いないで得られた分析結果は、陰性結果が偽陰性（本当は陰性ではないのに阻害により陰性となる）である可能性を否定できないため、公式な結果として採用すべきではない。また、下水サンプルの濃縮、RNA抽出、逆転写及びリアルタイムPCRの方法が本マニュアルと完全に一致していなくても、プロセスコントロール用代理ウイルスの回収率（PMMoVの場合は検出濃度の確認でも可）が問題なく得られていれば、得られた分析結果を採用することは問題ない。

(1) マウス肝炎ウイルス

マウス肝炎ウイルス（Murine hepatitis virus, MHV）は、SARS-CoV-2と同じベータコロナウイルス属（genus *Betacoronavirus*）に属する一本鎖(+)RNAウイルスであり、マウスに感染するがヒトには病原性がないため、BSL2施設で取り扱い可能である。ATCCから複数のMHV株が供給されている（例：A59株、VR-764）。MHVはL2細胞やDBT細胞などを用いて培養が可能である⁶。

⁶ Leibowitz et al. (2011) Coronaviruses: Propagation, quantification, storage, and construction of recombinant Mouse Hepatitis Virus. *Current Protocols in Microbiology*, 15E.1.1-15E.1.46.

MHV の qPCR 系は複数報告されており、RT-qPCR により RNA を定量可能である。ここでは、比較的広く使用されている Besselsen et al. (2002)⁷の系を一例として紹介する。プライマーおよびプローブの配列等は表 1 の通りである。

表 1 MHV の qPCR のプライマーおよびプローブの塩基配列⁵

プライマー・プローブ	塩基配列 (5'-3')
プライマー (+)	GGAACTTCTCGTTGGGCATTATACT
プライマー (-)	ACCACAAGATTATCATTTTCACAACATA
プローブ	FAM-ACATGCTACGGCTCGTGTAACCGAACTGT-BHQ1

検量線作成用標準物質としては、MHV A59 株 (ATCC アクセッション番号: X00509) におけるリアルタイム PCR 増幅箇所である以下の塩基配列を有する人工合成 DNA 等を使用する。TE バッファー等で適宜希釈して使用する。

GGAACTTCTCGTTGGGCATTATACTACTCTTTATTACTATCATACTACAGTTCGGTT
ACACGAGCCGTAGCATGTTTATTTATGTTGTGAAAATGATAATCTTGTGGT

qPCR 反応条件は、一例として、Besselsen et al. (2002)⁵は (95°C, 15 秒→60°C, 1 分) を 40 サイクルとしている。

(2) φ6 ウイルス

バクテリオファージ φ6 は、シストウイルス科 (*Cystoviridae*) に属し、グラム陰性細菌である *Pseudomonas syringae* に感染する。直径は約 85nm で、二本鎖 RNA エンベロープウイルスである。このウイルスは、病原性を有すエンベロープウイルス (ヒトコロナウイルスやインフルエンザウイルスなど) の代理ウイルスとしてよく用いられてきた^{8,9}。最近の研究では、包括内標準¹⁰や分子生物標準¹¹として採用された実績もある。表 2 に φ6 の利点と限界を示す。φ6 およびその宿主である *Pseudomonas syringae* は、ヒトに対して、病原性を示さず、最小限の実験設備 (すなわち、BSL1) で取り扱いが可能である。また、比較的容易に培養

⁷ Besselsen et al. (2002) Detection of rodent coronaviruses by use of fluorogenic reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *Comparative Medicine*, 52(2), 111-116.

⁸ Casanova, L.M., Weaver, S.R., 2015. Inactivation of an Enveloped Surrogate Virus in Human Sewage. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2, 76-78.

⁹ Ye, Y., Ellenberg, R.M., Graham, K.E., Wigginton, K.R., 2016. Survivability, Partitioning, and Recovery of Enveloped Viruses in Untreated Municipal Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 50, 5077-5085.

¹⁰ Torii, S., Furumai, H., Katayama, H., 2021. Applicability of polyethylene glycol precipitation followed by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction for the detection of SARS-CoV-2 RNA from municipal wastewater. *Sci. Total Environ.* 143067.

¹¹ Sherchan, S.P., Shahin, S., Ward, L.M., Tandukar, S., Aw, T.G., Schmitz, B., Ahmed, W., Kitajima, M., 2020. First detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater in North America: A study in Louisiana, USA. *Sci. Total Environ.* 140621

でき、高い濃度（最大 10^{10} PFU/mL 程度）を得ることも可能である。したがって、ヒト病原性エンベロープウイルスの代理ウイルスとして、取り扱いやすいという利点がある。

一方で、φ6 は二本鎖 RNA および *Pseudomonas syringae* 由来のエンベロープを有し、これは、SARS-CoV-2 の特性を完全に反映していない可能性がある。これまで、φ6 の回収率が SARS-CoV-2 の回収率と同様の挙動を示したことを明示的に示した研究はない。φ6 のプロセスコントロール用代理ウイルスの適用可能性には、さらなる検討が必要である。

表 2 φ6 ウイルスのプロセスコントロール用代理ウイルスとしての適用の利点と限界

適用に際しての利点	限界点
<ul style="list-style-type: none"> • SARS-CoV-2 との形態学的類似性 エンベロープを有する。例えば、ノンエンベロープウイルスである MS2 と比較して、マウス肝炎ウイルス (MHV) に似た吸着特性を示す。 • BSL1 を満たした実験施設で利用可能 BSL2 設備では不要 (MHV 等のエンベロープ代理ウイルスの取扱いは BSL2 が必要)。 • 培養が容易 <i>Pseudomonas syringae</i> と φ6 は高濃度で容易に培養できる。 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 本鎖 RNA を有す点 定量までのプロセスにおいて、追加のステップ (例えば、逆転写前の dsRNA の熱変性) を必要とする。 • SARS-CoV-2 と回収率の挙動が比較可能か明示的な証明はされていない。 φ6 と SARS-CoV-2 との構造的な違いが、回収効率に影響を与えている可能性がある。

a) 試薬・器具類

【培養】

- φ6 ファージ：(独) 製品評価技術基盤機構 (NITE) より提供を受けることができる。NBRC 105899
- *Pseudomonas syringae*：(独) 製品評価技術基盤機構 (NITE) より提供を受けることができる。NBRC 14084

【PCR】

- プライマー、プローブ：表 3 の塩基配列を有するオリゴ DNA を使用する。

表3 φ6 ウイルスの qPCR のプライマーおよびプローブの塩基配列¹²

プライマー・プローブ	塩基配列 (5'-3')
プライマー (+)	TGGCGGCGGTCAAGAGC
プライマー (-)	GGATGATTCTCCAGAAGCTGCTG
プローブ	FAM-CGGTCGTCGCAGGTCTGACACTCGC-BHQ1

- ・ 検量線作成用標準物質：φ6 (ATCC アクセッション番号：NC_003714) におけるリアルタイム PCR 増幅箇所である以下の塩基配列を有する人工合成 DNA 等を使用する。TE バッファー等で適宜希釈して使用する。

TGGCGGCGGTCAAGAGCAACCCGGTCGTCGCAGGTCTGACACTCGCTCAGATC
GGAAGCACCGGTTATGACGCCTATCAGCAGCTTCTGGAGAATCATCC

(3) F ファージ

F ファージは F 繊毛を有する大腸菌に感染するウイルスであり、ヒトを始めとした動物体内で増殖し、糞便と共に排出される。F ファージは大きく FDNA ファージと FRNA ファージに大別される。前者は核酸として DNA を有するものであり、桿状構造をとることが知られている。後者は核酸として一本鎖 RNA を有し、多くの腸管系ウイルスと同様に直径 20-30 nm 程度の正二十面体構造をとる¹³。汚染の起源及び形態学的な類似性から、特に FRNA ファージは腸管系ウイルスの汚染指標や処理指標として有望視されている (IAWPRC, 1991)。FRNA ファージは GI-GIV の 4 つの遺伝子群/血清群に分類される。それぞれの代表株は MS2, GA, Qβ, SP ファージとされる。また、FDNA ファージ, FRNA ファージのいずれもエンベロープを持たないウイルスである。

下水中の F ファージは、培養法により検出、定量が可能である。培養法による検出を念頭に置いた場合、F ファージをプロセスコントロール用代理ウイルスとして用いるメリットとして、試料へのウイルス添加が必要ないほか、核酸抽出、PCR も必要ないため低コストで濃縮回収率が推定可能な点が挙げられる。また、核酸抽出や PCR を用いないため、これらのプロセスでのロスや検出阻害といったバイアスがなく、純粋な濃縮回収率のみを推定可能である。一方で、デメリットとしては、結果が出るまでに一晩かかることや、F ファージはエンベロープを持たないウイルスであるため、その濃縮回収率は SARS-CoV-2 の濃縮回収率を必ずしも反映しないと考えられることが挙げられる。また、F ファージは多様性のある集団であることから、株、遺伝子型等により濃縮回収率に差異がある可能性もある。このほか、培養による検出を前提としているため、試料の不活化処理を施した場合には適用不可となり、また、試料を長期保管した際には濃度が著しく低下する可能性もある点には留意しな

¹² Gendron et al. (2010) Evaluation of filters for the sampling and quantification of RNA phage aerosols. *Aerosol Sci. Technol.* 44, 893-901.

¹³ IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology, 1991. Bacteriophage as model viruses in water quality control. *Water Research*, 25, 529-545.

ければならない¹⁴。

以下に、宿主としてサルモネラ菌株 (*Salmonella typhimurium* WG49) を用いた平板培養法 (ブラック形成法) による手法を紹介する。なお、*Salmonella typhimurium* WG49 の使用にあたり、BSL2 実験室が必要となる。

a) 試薬・器具類

- ・ シャーレ：滅菌済みのものを使用する。
- ・ *Salmonella typhimurium* WG49 (ATCC® 700730™)：BSL2 実験室で取り扱う必要がある。グリセロールストックを作成し、-80°C で保管する (下記「*Salmonella typhimurium* WG49 のグリセロールストックの作成」を参照)。本菌を含む寒天培地、シャーレ等はオートクレーブののち廃棄する。
- ・ グリセロール：グリセロールストックの作成に用いる。
- ・ Trypton：Thermo Fisher Scientific, 211705 など。培地の成分として用いる。
- ・ D(+)-Glucose：和光純薬, 047-31161 など。培地の成分として用いる。
- ・ NaCl：培地の成分として用いる。
- ・ CaCl₂・2H₂O：精製水もしくは超純水 1 mL に対し試薬 0.40 g を混合した水溶液 (0.3 g/mL 塩化カルシウム水溶液) を作成しておき、これを使用する。培地の成分として用いる。
- ・ MgSO₄・7H₂O：精製水もしくは超純水 1 mL に対し試薬 0.31 g を混合した水溶液 (0.15 g/mL 硫酸マグネシウム水溶液) を作成しておき、これを使用する。培地の成分として用いる。
- ・ 寒天：Bacto™ Agar (BD, 214010) など。培地の成分として用いる。
- ・ カナマイシン硫酸塩：Sigma Aldrich, K4000-5G など。予め 20 g/L とした水溶液を作成、冷凍保存しておき、これを使用する。培地の成分として用いる。
- ・ ナリジクス酸ナトリウム塩：Sigma Aldrich, N4382-5G など。予め 100 g/L とした水溶液を作成、冷凍保存しておき、これを使用する。培地の成分として用いる。
- ・ 液体培地：表 4 に従い試薬を混合し、オートクレーブすることで作成する。室温に戻したのちに使用する。WG49 の培養に用いる。
- ・ 寒天培地：表 4 の組成に従い試薬を混合し、オートクレーブすることで作成する。液体培地に寒天を混入したものである。50°C 程度に保つことで固化させずに保管することができる。
- ・ リン酸緩衝液：和光純薬, 161-12191 など。試料の希釈に用いる。
- ・ インキュベーター：37°C 程度 (大腸菌群等の検出時と同様) に設定する。

¹⁴ Olson et al. (2004) Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. J. Virol. Methods, 122(2), 147–152.

表 4 F フェージ検出に用いる液体培地, 寒天培地の組成

試薬類	単位	液体培地	寒天培地
精製水もしくは超純水	mL	500	500
Trypton	g	5	5
D(+)-Glucose	g	0.5	0.5
NaCl	g	4	4
CaCl ₂ 水溶液 (0.3 g/mL に調整後)	mL	0.5	0.5
MgSO ₄ 水溶液 (0.15 g/mL に調整後)	mL	0.5	0.5
Bacto Agar	g	-	5.5
カナマイシン硫酸塩 (20 g/L に調整後)	mL	-	0.5 [※]
ナリジクス酸ナトリウム塩 (100 g/L に調整後)	mL	-	0.5 [※]
液体培養後の WG49	mL	-	20 [※]

※カナマイシン, ナリジクス酸, WG49 はプレーティングの直前に添加する。

b) 手順¹⁵

- ・ Salmonella typhimurium WG49 のグリセロールストックの作成
 1. 100%グリセロール 63 g を 100 mL までメスアップし, 50%グリセロールとする。
 2. 50%グリセロールをオートクレーブに供し, 室温に戻す。
 3. 液体培地に *Salmonella typhimurium* WG49 のグリセロールストックを 100 倍希釈程度で添加し, 37°C 程度に設定したインキュベーターで 4 時間程度培養する。可能であれば振とう培養とする。
 4. 培養操作後の液体培地の濁りを目視で確認する。濁りが見られないようであれば, さらに 1-2 時間程度培養操作を継続する。
 5. スクリューキャップチューブに培養操作後の液体培地 100 μL と 50%グリセロール 100 μL を添加し, 混ぜ合わせる。
 6. ディープフリーザー (-80°C) にてグリセロールストックを保管する。
- ・ 下水試料からの F フェージの検出
 1. 寒天培地を準備する。シャーレ 1 枚につき 20 mL 程度の使用を想定する。使用の直前まで 50°C 程度に保ち, 固化しないようにする。
 2. 液体培地を準備する。寒天培地 500 mL につき 20 mL の使用を想定する。
 3. *Salmonella typhimurium* WG49 のグリセロールストックを解凍する。
 4. 液体培地に *Salmonella typhimurium* WG49 のグリセロールストックを 100 倍希釈程度で添加し, 37°C 程度で 4 時間程度培養する。可能であれば振とう培養とする。対数増殖期のものを使用する。培地の濁りが目安となる。
 5. シャーレに試料を撒く。1 シャーレあたりの試料量は 100 μL もしくは 1 mL 程度が

¹⁵ 食品衛生検査指針 微生物編 改訂第 2 版 2018, 公益社団法人日本食品衛生協会

適切である。また、流入下水中の F フェージ濃度は 10^2 から 10^4 PFU/mL 程度となるのが一般である¹⁶。1 シャーレに形成するブラック数 (F フェージ数) が 10~100 程度となるよう、10 倍段階で複数の試料量を用意する。また、各試料量につき 2 連以上での測定とする。100 μ L 未満の試料量とする場合、リン酸緩衝液により試料を 10 倍段階で希釈して用いる。濃縮液を対象とする場合は、濃縮による減容率と想定される回収率 (1~100%程度) を見込み、試料量を決定する。

6. 寒天培地 (45°C 程度が望ましい、素手で握って問題ない程度) に *Salmonella typhimurium* WG49, カナマイシン 硫酸塩, ナリジクス酸 ナトリウム塩を添加する (添加量は表 4 参照)。
7. シャーレに寒天培地を適量添加し、室温で固化させる。
8. 37°C のインキュベーターにシャーレを転倒静置し、一晚培養する。
9. ブラック数が 10~100 程度となった試料量のシャーレを選定し、ブラックを計数する。
10. 計数したブラック数をもとに試料中の F フェージ濃度を算出する。例えば、試料量 100 μ L (2 連) でのブラック数が 40 個, 60 個であった場合、F フェージ濃度は 500 PFU/mL となる。
11. 使用後のシャーレや寒天培地はオートクレーブののち廃棄する。

(4) トウガラシ微斑ウイルス

トウガラシ微斑ウイルス (Pepper mild mottle virus, PMMoV) は、ピーマン等のトウガラシ属に感染する植物ウイルスであるが、ヒトの糞便中に極めて高濃度で存在することが知られており、世界中の下水や環境水中からも高頻度・高濃度で検出されている¹⁷。下水中の PMMoV の存在濃度は明確な季節変動を示さず、比較的一定であることから、下水試料中に元々存在する PMMoV を測定することで、一連の検出工程に大きな問題が生じていない可能性が高いことを確認することができる。試料への PMMoV の添加操作が不要であることが利点である。

a) 試薬・器具類

- ・ プライマー (+), プライマー (-), TaqMan MGB プローブ: 表 5 の塩基配列を有するオリゴ DNA を使用する。プローブのクエンチャー色素は TAMRA や BHQ 等ではなく、NFQ-MGB であることに注意する。
- ・ 検量線作成用標準物質: PMMoV (ATCC アクセッション番号: NC_003630) におけるリアルタイム PCR 増幅箇所である以下の塩基配列を有する人工合成 DNA 等を使用する。

¹⁶ Jofre et al. (2016) Coliphages as model organisms in the characterization and management of water resources. Water (Switzerland) 8, 1–21.

¹⁷ Kitajima et al. (2018) Pepper mild mottle virus as a water quality indicator. npj Clean Water. 1:19.

TE バッファー等で適宜希釈して使用する。

GAGTGGTTTGACCTTAACGTTTGAGAGGCCTACCGAAGCAAATGTCGCACTTGC
ATTGCAACCGACAA

表 5 PMMoV の qPCR のプライマーおよびプローブの塩基配列

プライマー・プローブ	塩基配列 (5'-3')
プライマー (+) ¹⁸	GAGTGGTTTGACCTTAACGTTTGA
プライマー (-) ¹⁹	TTGTTCGGTTGCAATGCAAGT
TaqMan MGB プローブ ¹⁸	FAM-CCTACCGAAGCAAATG-NFQ-MGB

b) 手順

1. PMMoV は添加せず、濃縮操作と RNA 抽出操作によってウイルス RNA 抽出液を得る。
2. 2-step リアルタイム PCR の場合は、逆転写反応によって cDNA 溶液を得る。逆転写反応液の組成や反応条件は、各試薬の標準プロトコルにしたがう。
3. 2-step リアルタイム PCR の場合はリアルタイム PCR 反応液、1-step リアルタイム PCR の場合は逆転写リアルタイム PCR 反応液を調整し、cDNA 溶液または RNA 抽出液と混合して PMMoV の検出反応を行う。プライマーとプローブは上記の表に記載のものを使用する。反応液の組成や反応条件は、各試薬の標準プロトコルにしたがうが、反応性に問題がある場合には最適条件を実験的に検討する。
4. 1-step、2-step リアルタイム PCR のいずれにおいても、cDNA 溶液または RNA 抽出液の代わりに、Ct 値が 25~30 程度で検出されるように TE バッファー等で適宜希釈した標準試料をポジティブコントロール、PCR-grade water をネガティブコントロールとして使用する。定量を行う際には、標準試料を TE バッファー等で 10 倍段階希釈し、 $10^1 \sim 10^6$ コピー/反応程度の範囲内で検量線を作成する。
5. 解析ソフトウェアにより、各試料から得られる Ct 値を決定する。これまでの測定値と大きな差がない場合には、検出工程に特段の問題はなかったものと判断する。
6. なお、濃縮作業の前に下水を 1mL 程度分取しておき、その試料と濃縮液の両方において PMMoV を定量し、試料・濃縮液量等を勘案することで、元の下水中に存在していた PMMoV 量と濃縮液中の PMMoV 量を算出し、PMMoV の回収率を求めることも可能である。

¹⁸ Haramoto et al. (2013) Occurrence of pepper mild mottle virus in drinking water sources in Japan. *App. Environ. Microbiol.* 79 (23), 7413–7418.

¹⁹ Zhang et al. (2006) RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol.* 4 (1), 0108–0118

3.1.2 濃縮手法

(1) ポリエチレングリコール沈殿法

ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法は、ウイルスに限らず、タンパク成分の濃縮法として広く用いられる手法である。ウイルスの濃縮法としても、Lewis and Metcalf (1988)²⁰ らの報告をはじめ、古くから用いられている。PEG 沈殿法においては、水溶性ポリマーのポリエチレングリコールと水試料を混合し、ポリエチレングリコールを試料中のタンパク質に会合させ、これを遠心操作により沈殿、上清を捨てたのちに少量の緩衝液で再浮遊するものである。本手法は未処理下水試料の一次濃縮法や、その他水試料の二次濃縮法として用いられている^{21,22,23}。PEG 沈殿法により 100 mL 程度の液量を一度に 1 mL 程度以下まで減容できる。用いられる PEG としては、分子量 6,000 もしくは 8,000 のもの（それぞれ PEG6000, PEG8000）が広く用いられ、また、PEG とともに塩化ナトリウムが試料に添加される。効率的なウイルス濃縮法として、PEG の種類や、PEG、塩化ナトリウムの添加量（濃度）、混合条件（温度や時間）、遠心条件等が検討されてきているが、ここでは Jones and Johns (2009)²⁴ の手法を参考にした。

a) 必要な機材

- ・ 冷却機能付き振とう器、もしくは冷蔵庫等に設置可能な振とう器
- ・ 冷却機能付き遠心機：使用する 50 mL 遠心チューブを 10,000×g で遠心できるもの。固定角ローターが望ましい。

b) 試薬・器具類

- ・ PEG8000：和光純薬，593-09765 など。
- ・ 塩化ナトリウム：和光純薬，191-01665 など。
- ・ 50 mL 遠心チューブ：滅菌済みのもの。
- ・ PEG 沈用 50 mL 遠心チューブ：滅菌済みのもの，予め PEG8000 4.0 g, NaCl 2.35 g を添加しておく。
- ・ リン酸緩衝液 (PB)：和光純薬，161-12191 など。
- ・ 1.5 mL チューブ：濃縮液の回収に用いる。

²⁰ Lewis and Metcalf (1988) Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(8), 1983–1988.

²¹ Dovas et al. (2010) Detection and quantification of infectious avian influenza A (H5N1) virus in environmental water by using real-time reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(7), 2165–2174.

²² Hewitt et al. (2013) Evaluation of human adenovirus and human polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment. *Water Res.* 47, 6750–6761.

²³ Thongprachum et al. (2018) Detection of nineteen enteric viruses in raw sewage in Japan. *Infect. Genet. Evol.* 63, 17–23.

²⁴ Jones and Johns (2009) Improved detection of F-specific RNA coliphages in fecal material by extraction and polyethylene glycol precipitation. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(19), 6142–6146.

c) 手順

80 mL の試料を 50 mL チューブを用い、1 試料 40 mL×2 本を濃縮する際の方法を示す。

1. 【PEG 沈殿の試薬準備】遠沈管に PEG8000 を 4g, NaCl を 2.35g 加え、ふたを閉める。
2. 空の 50 mL チューブ 2 本に試料を 40 mL ずつ分注する。
3. (プロセスコントロール用代理ウイルスを添加する場合) 各試料に、用意した代理ウイルスを加える。
4. (プロセスコントロール用代理ウイルスを添加する場合) 代理ウイルスと下水成分との吸着平衡状態になるまで、ウイルス添加後、冷蔵庫で 1 時間以上静置する。
5. 3,500×g, 5 min の条件で遠心し、上澄みを採取し試料とする。ただし、下水中の SARS-CoV-2 のうち高い割合が固形物に吸着している状態で存在している場合もあるため、RNA 抽出以降の操作に支障がなければ遠心(固液分離)の工程は省略しても良い。また、上澄みを採取した後の残渣に対して RNA 抽出を行い、上澄みとは別に分析することも可能である。
6. 試料を PEG, NaCl 入り遠沈管に移す。軽く振ることで底に PEG と NaCl が溜まらないようにする。(大きめの沈殿物が入った場合、1 mL チップなどで吸い取る)
7. 冷却機能付き振とう器で 4 °C で一晩振とうする
8. 翌朝、試料と PEG, NaCl の混合液を 10,000×g, 30 min の遠心に供する。
9. 沈殿を 500 μL のリン酸緩衝液により再浮遊する。沈殿はチューブ壁面に付着しているので、ピペッティングによりできる限り全量が再浮遊するよう努める。1 試料につき、2 本のチューブを使うが、1 本目の沈殿の再浮遊に用いた液を 2 本目のチューブにも使い回す。なお、リン酸緩衝液の代わりに精製水、超純水もしくは TRIzol Reagent (Invitrogen, 15596018 等) を使用することも可能である。
10. 遠沈管を数秒間遠心に供し、懸濁液を底に集める。
11. 懸濁液全量を 1.5 mL チューブに移し、濃縮液とする。最終液量を測定する。通常、0.5 ~1 mL 前後となる。
12. 代理ウイルスと濃縮液を RNA 抽出に供す。引き続き RNA 抽出操作を行わない場合には、ウイルス濃縮液を -20°C 以下で保存する。

なお、他の PEG 沈殿の条件の一例として、Wu et al. (2020)²⁵は固液分離の過程で 0.22 μm の PES 膜による膜ろ過、塩濃度として 0.3 M、振とう時間として 15 分、遠心時間として 2 時間を選択し、SARS-CoV-2 RNA の検出に成功している。PEG 沈殿法には、この例を含め多数の変法が存在する。

²⁵ Wu et al. (2020) SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *mSystems* 5, e00614-20.

(2)陰電荷膜破碎型濃縮法

腸管系ウイルスの濃縮に広く使用されてきている陰電荷膜を用い、陽イオンの共存下でウイルスを静電的引力によって膜に吸着させ、誘出液中で膜を激しく攪拌して破碎することで、濁質と共にウイルスを回収する手法である^{26,27}。2次濃縮法として、遠心式フィルターユニットを用いた手法を用いる。本手法は、下水や河川水、地下水等の様々な水試料中のノロウイルス等の腸管系ウイルスやプロセスコントロール用代理ウイルスの一つであるPMMoVの濃縮に使用されてきた実績があり、山梨県内の下水処理場でのSARS-CoV-2 RNAの検出調査でも用いられている²⁸。なお、本手法は、遠心後の沈渣を用いることで、ウイルスのみならず、原虫（クリプトスポリジウム、ジアルジア等）や細菌も同時に濃縮・検出することが可能である。

a) 必要な機材

- ・ 吸引ろ過ポンプ
- ・ ろ過ビン
- ・ ガラス製フィルターホルダー（直径90mm）：オートクレーブ滅菌時にはアルミホイルで開放部分を覆う。Advantec, 型番 KG-90 または同等品。
- ・ 遠心機：4°Cに冷却できるものが望ましいが、冷却機能は必須ではない。
- ・ スイングローター：50mL 遠沈管を最大 2,000×g 程度で遠心できるもの。固定ローターを使用する場合には、最適な遠心条件が異なる可能性があるため、事前に検討しておくことが望ましい。なお、2次濃縮法としてアミコンウルトラを使用する場合には、固定ローターも必要となる。

b) 試薬・器具類

- ・ 混合セルロース膜（直径90mm, 孔径0.8μm）：セルロースエステルとニトロセルロースからなる混合セルロース膜（Merck Millipore, 型番 AAWP09000 または同等品）。ガラス製フィルターホルダーにセットしてアルミホイルで開放部分を覆い、オートクレーブ滅菌を行った後、アルミホイルを付けた状態で保管する。
- ・ MgCl₂ 溶液（2.5mol/L）：MgCl₂・6H₂O を精製水に溶解して作製し、オートクレーブ滅菌する（常温保存）。水試料 100mL あたり 1mL を添加する。
- ・ フットボール型攪拌子（25×φ10mm 程度）：アズワン, 型番 7-217-01 または同等品。
- ・ 誘出液（100×）：Na₄P₂O₇・10H₂O（関東化学, 型番 37256-00 または同等品）2g, C₁₀H₁₃N₂O₈Na₃・3H₂O（和光純薬, 型番 342-01875 または同等品）3g および Tween 80 (Sigma-

²⁶ 原本ら（2010）河川水からのウイルス及び原虫の同時濃縮法の開発. 水道協会雑誌 79, 2-11.

²⁷ Haramoto et al. (2012) Development of a novel method for simultaneous concentration of viruses and protozoa from a single water sample. J. Virol. Methods 182, 62–69.

²⁸ Haramoto et al. (2020) First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan. Sci. Total Environ. 731, 140405.

Aldrich, 型番 P1754-25ML または同等品) 1mL を約 70mL の精製水で溶解後, 塩酸を添加して pH を 7.2 に調整し, 100mL にメスアップしてオートクレーブ滅菌する (冷蔵保存)。

- ・ 誘出液 (1×) : 100 倍濃度の誘出液を精製水で 100 倍希釈し, オートクレーブ滅菌する (冷蔵保存)。
- ・ ピンセット : アルミホイルで包んでオートクレーブ滅菌しておく。
- ・ トランスファーピペット : 滅菌済みの使い捨てのもの。
- ・ 遠心式フィルターユニット : セントリプレップ (Centriprep YM-50, Merck Millipore, 型番 4311 (96 個入)), アミコンウルトラ (Amicon Ultra-15, Merck Millipore, 型番 UFC905008 (8 個入)) または同等品。
- ・ ディスポーサブルフィルターユニット (孔径 0.45 μ m, 直径 25mm) : アドバンテック, 型番 25CS045AS または同等品。
- ・ シリンジ (容量 20mL 程度) : テルモ, 型番 SS-20ESZ または同等品。
- ・ 電動ピペッター : プラスチックピペットを装着して使用する。ニチリョー, 型番 NEO00-PMNEO または同等品。
- ・ プラスチックピペット : 滅菌済みのもの。容量 10mL, 25mL 等があると良い。
- ・ マイクロピペット
- ・ マイクロピペットチップ : 20, 200, 1000 μ L 等。フィルター付きが望ましい。
- ・ マイクロチューブ : 容量 1.5mL または 2.0mL のもの。
- ・ プラスチックパラフィンフィルム : パラフィルム (アズワン, 型番 6-711-01 など)。

c) 手順

1. 水試料 100mL あたり MgCl₂ 溶液 (2.5mol/L) 1mL を添加して転倒混和し, 数分間静置する。
2. 直径 90mm の混合セルローズ膜を装着したガラス製フィルターホルダーで水試料をろ過する。通常, 流入下水に対しては 200mL のろ過が可能であるが, 水の性状によりろ過が困難となる可能性もあるため, 目詰まりの様子を確認しながらろ過水量を調整する。下水処理水・放流水を検査する場合には, 5~10L 程度のろ過も可能である。なお, 直径 47mm の膜を使用する場合には, 流入下水で 50mL 程度, 処理水・放流水で 1~2L 程度がろ過水量の目安である。また, 直径 47mm の膜を使用する場合には, 2 枚以上の膜を用いて同一試料のろ過を行っても良いが, 最大でも 4 枚までとする。
3. 誘出液 10mL とフットボール型攪拌子をあらかじめ入れておいた遠沈管 (容量 50mL) に, ろ過後の膜をピンセットでフィルターホルダーから剥がし, 折りたたんで移し入れる。膜が破れても問題はないが, ろ過部分には触れないように注意する。2 枚以上の膜でろ過を行った場合には, すべての膜を 1 本の遠沈管に入れる。なお, 2 次濃縮法としてアミコンウルトラを使用する場合は, 固定ローターでの遠心時に試料が漏出するおそ

れがあるため、誘出液量を 8mL とする。直径 47mm の膜を 1 枚使用する場合においても、最終濃縮液量を減容する目的で誘出液量を 8mL とすることも可能である。

4. 遠沈管のキャップのまわりにプラスチックパラフィンフィルムを巻き付ける。
5. ボルテックスミキサーで遠沈管を激しく攪拌し、膜を数 mm 四方以下に破砕する。攪拌に偏りが生じないように、適宜転倒混和して均一に攪拌されるようにする。概ね 5 分程度で十分に膜が破砕される。
6. トランスファーピペットを用いて溶液の全量を回収し、新しい遠沈管（容量 50mL）に移し入れる。破砕された膜は極力回収しないように注意する。
7. 元の遠沈管に誘出液 5mL（1 回目の誘出操作で 8mL 使用した場合には 4mL）を添加し、ボルテックスミキサーで 30 秒程度攪拌した後（プラスチックパラフィンフィルムは不要）、トランスファーピペットで回収した溶液の全量を上述の遠沈管に移し入れる。その際、遠沈管の内壁やキャップの内側についた溶液を可能な限り回収するようにする。これにより、新しい遠沈管内の溶液量は約 15mL（1 回目の誘出操作で 8mL 使用した場合には約 12mL）となる。
8. スイングローターを用いて遠沈管を遠心（2,000×g, 10 分, 4°C）し、上清をトランスファーピペットで回収する。温度設定は 4°C が望ましいが、必須ではない（以降同じ）。遠心機のブレーキはオフにしておく。
9. 回収した上清は、ディスクローサブルフィルターユニット（直径 25mm）を装着したシリンジ（容量 20mL）に移し入れて加圧ろ過し、ろ液を回収する。ろ液の回収は、セントリプレップを用いる場合は外側ユニットを使用し、アミコンウルトラを使用する場合は内側ユニットで回収する。
10. 以下に、2 次濃縮法としてセントリプレップまたはアミコンウルトラを使用する場合の手順を示す。セントリプレップを使用する場合は手順 11～14、アミコンウルトラを使用する場合は手順 15～16 の操作を行う。なお、適切な遠心式フィルターユニットが入手できない場合には、濃縮液の十分な減容ができずに検出感度が低下するものの、2 次濃縮を省略し、手順 9 で得られた溶液をウイルス濃縮液とすることも可能である。
11. 【セントリプレップ】セントリプレップの内側ユニットを外側ユニットに装着し、スイングローターを用いて遠心（2,000×g, 10 分, 4°C）する。
12. 【セントリプレップ】内側ユニットと外側ユニットがしっかりと装着されていることを確認し、内側ユニットのキャップを外して逆さにし、内側ユニット内の溶液を捨てる。
13. 【セントリプレップ】外側ユニット内の液量をさらに減らすため、再度遠心（2,000×g, 5 分, 4°C）する。
14. 【セントリプレップ】内側ユニットを取り外し（内側ユニット内の溶液は不要）、外側ユニット内の溶液をマイクロピペットを用いて、液量を記録しながらマイクロチューブ（容量 1.5 または 2.0mL）に回収し、ウイルス濃縮液とする。液量は 10μL 単位で記録す

- る。液量が 1mL を超える場合には、1mL のみを濃縮液として保存し、残りの溶液は廃棄して良いが、濃度計算を行う際に必要となるため、総液量は記録しておくようにする。
15. 【アミコンウルトラ】内側ユニットを外側ユニットに装着した状態でアミコンウルトラを遠心 (5,000×g, 15 分, 4℃) する。
 16. 【アミコンウルトラ】内側ユニット内の残液をマイクロピペットを用いて、液量を記録しながらマイクロチューブ (容量 1.5 または 2.0mL) に回収し、ウイルス濃縮液とする。液量は 10μL 単位で記録する。液量が 1mL を超える場合には、1mL のみを濃縮液として保存し、残りの溶液は廃棄して良いが、濃度計算を行う際に必要となるため、総液量は記録しておくようにする。
 17. 引き続き RNA 抽出操作を行わない場合には、ウイルス濃縮液を -20℃ 以下で保存する。

(3)限外ろ過膜法

限外ろ過膜法は、分画分子量 10~100 kDa 程度の限外ろ過膜を使用した”ふるい効果”によりウイルス粒子を濃縮する方法である。下水中の SARS-CoV-2 の検出にあたっては、オランダ²⁹や米国³⁰などにおける調査で使用され、実際に検出に成功した実績がある。商品化された限外ろ過膜ユニット (Merck Millipore 社の Centricon Plus-70 など) を使用するため操作が比較的簡便であるという利点がある。一方で、使い捨て限外ろ過膜ユニットのコストが高く (Centricon Plus 70 では約 4,000 円/個)、下水中の夾雑物も同時に濃縮してしまうことから検出阻害の影響を受けやすいという欠点がある。ここでは、Merck Millipore 社の Centricon Plus-70 を使用した方法を紹介する。

a) 必要な機材

- ・ 減圧濾過用フィルターホルダー
- ・ アスピレーター
- ・ スイングローター付き遠心機
- ・ ピンセット

b) 試薬・器具類

- ・ Centricon Plus-70 100kDa (メーカー：メルクポリア, 品番：UFC710008)
- ・ 親水性 PTFE 膜 (孔径 0.2 μm)

²⁹ Medema et al. (2020) Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in sewage and correlation with reported COVID-19 prevalence in the early stage of the epidemic in The Netherlands. Environ. Sci. Technol. Lett. 7, 511–516.

³⁰ Sherchan et al. (2020) First detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater in North America: A study in Louisiana, USA. Sci. Total Environ. 743, 140621.

c) 手順

1. 下水試料を親水性 PTFE 膜(孔径 0.2 μm)でろ過する (ただし, 下水中の SARS-CoV-2 のうち高い割合が固形物に吸着している状態で存在している場合もあるため, RNA 抽出以降の操作に支障がなければろ過 (固液分離) の工程は省略しても良い)。
2. 限外ろ過膜(Centricon Plus-70)を使用し, PTFE 膜のろ液 120 mL を 1,900 $\times g$, 8 分の条件で 2 回に分けて遠心した後, 800 $\times g$, 2 分の条件で逆さで遠心し, ろ液を回収する。この方法により, 下水試料 120 mL から約 400~700 μL に濃縮することが可能である。
3. 引き続き RNA 抽出操作を行わない場合には, ウイルス濃縮液を-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

3.2 定量 PCR によるウイルス RNA 検出

RNA 抽出以降の操作において検出結果に影響を与えるレベルのコンタミネーションが生じていないことを確認するため、RNA 抽出を行う際には、下水濃縮液に加え、陰性コントロールとして、下水濃縮液と同じ液量の分子生物学用の水（RNase free water, 例：Water for molecular biology (Merck, 型番 95284-100ML)）も RNA 抽出操作に供し、SARS-CoV-2 とプロセスコントロール用代理ウイルスの RT-qPCR を行うことが推奨される。この陰性コントロールは、RNA 抽出を行う際には毎回 1 サンプル含めることが望ましく、SARS-CoV-2 とプロセスコントロール用代理ウイルスのいずれか一方または両方が検出された場合には、RNA 抽出以降の操作でコンタミネーションが生じていることとなり、SARS-CoV-2 RNA の検出結果を採用してはならない。なお、この陰性コントロールを用いた場合においても、qPCR 工程単独でのコンタミネーションの有無を判別するため、qPCR 用の陰性コントロールを含める必要がある。

3.2.1 RNA 抽出

(1)核酸抽出キット QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いる方法

a) 必要な機材

- ・ ボルテックスミキサー
- ・ マイクロチューブ遠心機（14,000×g で使用できるもの）

b) 試薬・器具類

- ・ QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen 52906)
- ・ エタノール（96-100%）

c) 手順

1.5 mL チューブに下水濃縮液 140 μ L と Buffer AVL 560 μ L を分注し、パルスボルテックスを行い、室温で 10 分間インキュベートする。PEG 沈殿法で得られた沈殿物を TRIzol Reagent 中に再浮遊させた場合には、パルスボルテックスを行った下水濃縮液 140 μ L を Buffer AVL 560 μ L と混合し、再度パルスボルテックスを行って室温で 10 分間インキュベートする。エタノール 560 μ L をサンプルに添加しパルスボルテックスを行う。これをカラムにアプライし、6,000×g（8,000 rpm）で 1 分間遠心操作を行い、ろ液の入ったコレクションチューブを捨てる。全てのサンプルをカラムにアプライした後、カラムに 500 μ L の洗浄バッファー（Buffer AW1）を添加し、6,000×g（8,000 rpm）で 1 分間遠心操作を行い、ろ液の入ったコレクションチューブを捨てる。さらに 500 μ L の洗浄バッファー（Buffer AW2）を添加し、最高速度（20,000×g, 14,000 rpm）で 3 分間遠心分離し、ろ液の入ったコレクションチューブを捨てる。キャリーオーバーを避けるため新しいコレクションチューブを装着し、最高速度で 1 分間遠心操作を行う。新しい 1.5 mL チューブにカラムをセットし、Buffer AVE を 60 μ L 添加した後、6,000×g（8,000 rpm）で 1 分間遠心操作を行う。これによって得

られたろ液が RNA 抽出液である。なお、引き続き RT 反応を行わない場合には、RNA 抽出液を-20℃以下（可能であれば-80℃）で保存する。

(2) AGPC (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction) 法

AGPC 法は細胞や組織からの total RNA を分離する目的で開発された RNA 抽出・精製方法である³¹。PEG 沈殿後の RNA 抽出手法として、使用された実績がある^{32,33}。Torii et al. (2021) は PEG 沈殿の後段で、AGPC 法による RNA 抽出を使用することにより、φ6 の回収率が向上することを報告した。AGPC 法の実施の際には、フェノールとグアニジンイソチオシアネートを含む TRIzol (Thermo Fisher Scientific 社) や TRI Reagent (Sigma Aldrich) などが広く使用されている。また、TRIzol と市販の RNA 抽出キットを使用した変法も使用されている。以下では、TRIzol と RNeasy Mini Kit を使用した TRIzol + RNeasy Mini Kit 法を紹介する。

なお、TRIZOL® LS にはフェノール (有毒, 腐食性) とグアニジンイソチアシアネート (刺激性) が含まれているため、取り扱い時の安全管理に注意を要する。

1. 【オプションとして、マウスノロウイルス (MNV) の添加】PEG 濃縮物 250 μL に、MNV を 10 μL ずつ添加する。また、対照試料として、MilliQ 250 μL に Working stock 10 μL を添加した試料を 2 連で用意する。
2. 750 μL の TRIzol® LS 試薬を加えて Fast-prep 24 を用いて、30 秒程度ホモジナイズする。ボルテックスで強く攪拌しても良い。その後、室温で 5 分インキュベーションする。
3. 200 μL のクロロホルムを加え、15 秒程度再度ホモジナイズする。室温で 2 – 15 分間静置する。
4. 4℃ 15 分間 12,000 ×g で遠心する。
遠心後の溶液は暗赤色のフェノール-クロロホルム相、中間相および無色の水相に分離する。RNA は水相に溶解している。得られる水相のボリュームは、使用した TRIZOL® LS 試薬の約~70%になる。
5. 遠心を待っている間に、1.5 mL チューブを準備し、70%エタノールを 650 μL ずつ分注しておく。
6. 【RNA のエタノール沈殿】チューブを 45 度に傾け、注意深く水相を回収し、用意した 70%エタノール入りチューブに移す。その際、ピペッティングにより良く混合する。
7. 【RNA のシリカメンブレンへの吸着】700 μL の混合液をスピンカラムに入れ、ふたを閉め、8,000 ×g で 15 秒間遠心する。

³¹ Chomczynski and Sacchi (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162, 156–159.

³² Torii et al. (2021) Applicability of polyethylene glycol precipitation followed by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction for the detection of SARS-CoV-2 RNA from municipal wastewater. Sci. Total Environ. 143067.

³³ Wu et al. (2020) SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. mSystems 5, e00614-20.

8. Collection tube の液体を捨て、残りの混合液（600～700 μL ）を再度スピнкаラムに入れる。7.と同様にふたを閉め、8,000 $\times g$ で15秒間遠心する。
9. 【洗浄】 Collection tube の液体を捨て、Buffer RW1 700 μL をスピнкаラムに入れる。ふたを閉め、8,000 $\times g$ で15秒間遠心する。
10. 【洗浄】 Collection tube の液体を捨て、Buffer RPE 500 μL をスピнкаラムに入れる。ふたを閉め、8,000 $\times g$ で15秒間遠心する。
11. 【洗浄】 Collection tube の液体を捨て、Buffer RPE 500 μL をスピнкаラムに入れる。ふたを閉め、8,000 $\times g$ で2分間遠心する。
12. 【乾燥】 Collection tube の液体を捨て、12,000 $\times g$ で1分間遠心する。
13. 【RNA 誘出】スピнкаラムを新たに用意した1.5 mL チューブに装着し、30 μL の RNase-free water をシリカメンブレンに加える。1分間室温でインキュベーションし、8,000 $\times g$ で1分間遠心処理を行う。
14. 【RNA 誘出】スピнкаラムのふたを再度開け、さらに30 μL の RNase-free water を加え、13.と同様にインキュベーションを行う。その後、8,000 $\times g$ で1分間遠心処理を行い、計60 μL の RNA 抽出液を得る。なお、引き続き RT 反応を行わない場合には、RNA 抽出液を -20°C 以下（可能であれば -80°C ）で保存する。

3.2.2 RT-qPCR による検出

a) 必要な機材

- ・ リアルタイム PCR 装置（例：ABI 7500, Light Cycler 480）
- ・ PCR 装置（サーマルサイクラー）

b) 試薬・器具類

- ・ 逆転写キット（例：High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific)）
- ・ リアルタイム PCR マスターミックス（例：QuantiTect Probe qPCR kit (QIAGEN)）
- ・ 96 well リアルタイム PCR 反応プレート
- ・ 8 連ストリップキャップまたはプレートシール
- ・ プライマー（表 6）
- ・ TaqMan プローブ（表 6）
- ・ RNase free water

表6 SARS-CoV-2のqPCR系のプライマーおよびプローブの配列³⁴

アッセイ	プライマー・ プローブ	名前	塩基配列 (5'-3') ^a
CDC N1	プライマー (+)	2019-nCoV_N1-F	GACCCCAAATCAGCGAAAT
	プライマー (-)	2019-nCoV_N1-R	TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG
	プローブ	2019-nCoV_N1-P	FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ1
CDC N2	プライマー (+)	2019-nCoV_N2-F	TTACAAACATTGGCCGCAAA
	プライマー (-)	2019-nCoV_N2-R	GCGCGACATTCCGAAGAA
	プローブ	2019-nCoV_N2-P	FAM-ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG-BHQ1

これまでの国内外の研究事例において、下水試料からの SARS-CoV-2 RNA の検出にあたっては CDC N1 および CDC N2 の qPCR 系が最も広く使用されており高い検出感度を示すことが報告されているため、これらの qPCR 系の使用を推奨する。但し、今後の研究の進展により更に優れた検出感度に優れた qPCR 系が発表されるなどすることにより他の系を使用することも差し支えない。その場合は、プライマー・プローブに変更は生じるが基本的な検出手順は本マニュアル記載の方法と同様である。

c) 手順

逆転写酵素を用いてウイルス RNA を cDNA (complementary DNA) に逆転写した後にリアルタイム PCR により cDNA を定量する。例として、Thermo Fisher Scientific 社の High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を用いた逆転写および QIAGEN 社の QuantiTect[®] Probe PCR kit を用いたリアルタイム PCR の反応条件を示した。詳細はキットに添付のマニュアルを参照すること。なお、試薬等の分注操作は全て氷上にて行う。

【逆転写反応】

RNA 抽出液を同量の逆転写反応液と混合して逆転写反応に供する。25°C で 10 分間保持した後、37°C で 120 分間の cDNA 合成プロセスを行い、85°C で 5 分間の加熱によって逆転写酵素を失活させ、4°C に冷却する。作成した cDNA は、24 時間以内に使い切る場合は 4°C で保存し、長期保存する場合は凍結保存する。反応液の組成は表 7 の通りである。

³⁴ CDC (2020) Research use only 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) real-time RT-PCR primers and probes. (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>)

表 7 逆転写反応液の調製

サンプル (RNA 抽出液)	10.0 μL
10 \times Reverse Transcription buffer	2.0 μL
25 \times dNTPs	0.8 μL
10 \times Random Primers	2.0 μL
MultiScribe™ Rverse Transcriptase (50U/ μL)	1.0 μL
RNase inhibitor (20 U/ μL)	1.0 μL
H ₂ O	3.2 μL
Total	20.0 μL

【リアルタイム PCR 反応】

1. 陽性コントロールを 10 倍段階希釈する。
2. 逆転写反応を行ったサンプルを用いて、表 8 に示した反応液を調製する。

表 8 リアルタイム PCR 反応液の調製

2 \times Master mix	10.0 μL
Forward primer (10 μM)	1.0 μL
Reverse primer (10 μM)	1.0 μL
TaqMan probe (10 μM)	0.75 μL
H ₂ O	9.75 μL
Template (cDNA)	2.5 μL
Total	25.0 μL

3. 96 well プレートのウェルに 22.5 μL ずつ反応液を入れる。1 サンプル当たりのウェル数は 2 以上とする。
4. 陽性コントロールおよびサンプル cDNA を 2.5 μL ずつ添加する。陰性コントロールのウェルには H₂O を 2.5 μL 添加する。陽性コントロールのコンタミネーション等を防ぐため、シーリングあるいはアルミ箔によるカバー等による工夫を推奨する。
5. 反応条件を設定して、反応を開始する。ただし、使用するリアルタイム PCR 装置、試薬および反応容器等によって、最適な反応条件は異なるので、必ず事前に検出感度等の確認をしておく。表 9 には、試薬に QIAGEN 社 QuantiTect® Probe PCR Kit, リアルタイム PCR 装置に Applied Biosystems 社 Applied Biosystems 7500 または 7500 Fast リアルタイム PCR システムを使用する場合の反応条件を示した。

表9 リアルタイムPCRの反応条件の一例 (Standardモードを選択)

95°C	15 min	
	↓	
95°C	3 sec	×45 cycles
55°C	30 sec (Data collection)	

6. 陽性コントロールの増幅曲線の立ち上がりがみられ、かつ陰性コントロールの増幅曲線の立ち上がりが見られないときに試験が成立するとみなす。
7. ウイルス遺伝子コピー数の定量値を得るためには、陽性コントロール希釈列に対して得られたサイクル数を用いた検量線を作成する。横軸に陽性コントロールコピー数の常用対数値、縦軸にサイクル数を取った場合の検量線の決定係数は概ね0.99以上、傾きは-3.3付近であり、少なくとも1ウェルあたり10コピー以上（5コピー以上がより望ましい）の場合に定量性が得られていることを確認する。増幅効率を算出する場合には90%以上であることを目安とする。
8. 同一サンプルのウェル全てで増幅曲線の立ち上がりが見られた場合には、各ウェルで得られたサイクル数の平均をそのサンプルのサイクル数とする。同一サンプルのウェル全てで増幅曲線の立ち上がりが見られた場合でも、ウェル間でサイクル数1以上の違いが生じていた場合には、そのサンプルについてリアルタイムPCRをやり直すことを推奨する。
9. 同一サンプルのウェル間で増幅曲線が立ち上がるものと立ち上がらないものが得られた場合には、そのサンプルについてリアルタイムPCRをやり直すことを推奨する。リアルタイムPCRをやり直しても結果が変わらない場合には、サンプル中にウイルス由来遺伝子が非常に低濃度で存在している可能性が高いため、検量線を用いたコピー数の算出はせずに単なる陽性と判定し、参考値としてCt値を報告する。
10. サンプルのサイクル数が、希釈率が最も高い陽性コントロールのサイクル数よりも小さい場合には、検量線を用いてコピー数を算出する。サンプルのサイクル数が陽性コントロールのサイクル数よりも大きい場合には、コピー数は計算せずに単なる陽性と判定し、参考値としてCt値を報告する。
11. 陽性と判定されたサンプルを含むPCRプレートやチューブは、特異的なPCR増幅であったかどうかを確認するためのシーケンス解析を将来行う可能性があるため、-20°C以下で凍結保存しておくことを推奨する。保存の際は、キャップやシールが剥がれ

ることによるコンタミネーションが生じないように十分注意すること。また、PCR後のプレート等をオートクレーブ滅菌することは、コンタミネーションを生じる可能性があるため避けること。

4. 試料取扱上の安全管理について

下水から感染性のある SARS-CoV-2 が検出された例はまだないが³⁵、非衛生的な環境において下水経由の COVID-19 感染が疑われている報告もある³⁶。また、下水試料には SARS-CoV-2 以外のノロウイルスや腸管出血性大腸菌などの他のウイルスや病原菌を含む可能性がある。これらを考慮した上で、試料取扱者や近隣の安全や懸念に配慮した適切な対策を行うことが望ましい。

具体的な安全管理は、試料採取時及び分析時に行われる必要がある。SARS-CoV-2 を含む可能性のある下水試料の取り扱いに関する法令基準等はない(2021年2月時点)。そのため、実際の安全管理は、関連業界団体の指針や、現場の状況や流行状況に応じて必要と思われる対策を講じることを推奨する。なお、下水試料採取時の安全管理に関しては、(公社)日本下水道管路管理業協会が公表している「下水道管路管理業務における新型コロナウイルス感染症対策ガイドライン」、及び(一社)日本下水道施設管理業協会が公表している「下水道施設運転管理業務における新型コロナウイルス感染予防ガイドライン」も参考とされた。

未処理下水試料の分析時においても、分析現場の状況や流行状況に応じて必要と思われる対策を講じることを推奨する(図2)。最大限の安全管理対策としては、医療検体と同様に保護具着用の上で Class II の生物学的安全キャビネット内で行い、分析終了後の試料および下水試料が付着した可能性のある容器・チューブ類は高圧蒸気滅菌処理して廃棄することが考えられる。一方、市中流行状況や現場の状況等により下水からの感染リスクが他の病原微生物と比較して低いと考えられる場合には、従来通りの下水の取り扱いで十分な場合も考えられる。安全管理策の策定の参考になる情報として、以下では UNICEF/WHO と国立感染症研究所による関連したガイドラインを紹介し、これらの安全策の下水試料試験への応用における考え方を記す。

³⁵ UNICEF / WHO 合同：新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) に対する水と衛生、廃棄物処理について暫定ガイダンス (2020年7月29日版) (https://extranet.who.int/kobe_centre/sites/default/files/G55_20200729_JA_IPC_Wash.pdf) (原文：<https://www.who.int/publications/i/item/water-sanitation-hygiene-and-waste-management-for-covid-19>)

³⁶ Yuan et al. (2020). Sewage as a possible transmission vehicle during a coronavirus disease 2019 outbreak in a densely populated community: Guangzhou, China, April 2020. *Clinical Infectious Diseases*, April, 1–14.

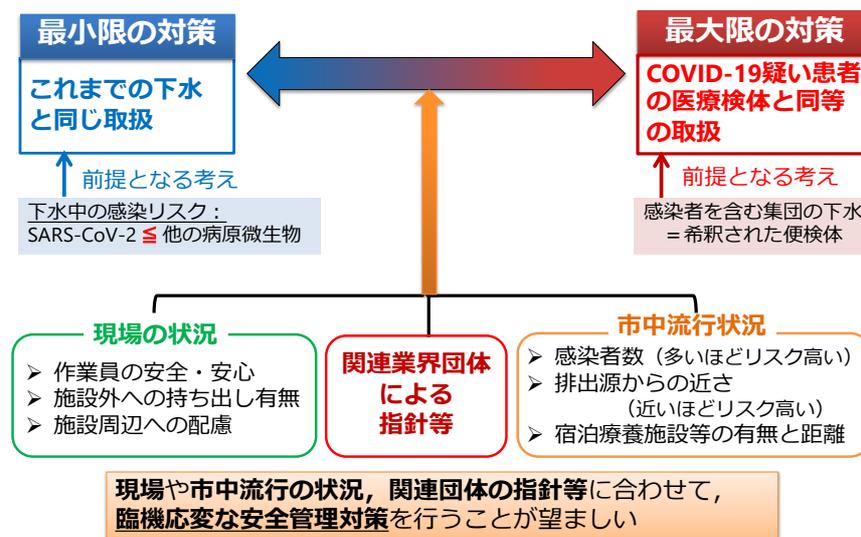


図2 SARS-CoV-2を含む可能性のある下水試料取り扱いにおける安全管理の考え方

4.1 下水試料の取り扱い

保護具着用の目的は、下水飛沫の曝露防止と非汚染区域への持ち込みを防ぐことであり、市中流行状況や採水場所などから考えられる感染リスクに応じて適切に選択する。また、着用した保護具は、非汚染区域立ち入り前に外すことが重要である。下水試料からの感染リスクが高いかどうかは、市中流行状況や採水場所に応じて判断する。一般的には、感染者が多いほど感染リスクも高くなり、採水場所については下水排出場所に近い（下水管路など）ほどリスクが高く、下水処理水のリスクは未処理下水と比べると低いと考えられる。

COVID-19のリスクが高い未処理下水の取り扱いについて、（公社）日本下水道管路管理業協会による「下水道管路管理業務における新型コロナウイルス感染症対策ガイドライン」³⁷及び（一社）日本下水道施設管理業協会による「下水道施設運転管理業務における新型コロナウイルス感染予防ガイドライン」³⁸においては、次のことを推奨している。

- ・ 勤務中のマスク、手袋等の保護具の装着を促す。未処理汚水に接触する可能性がある業務を実施する場合には、作業に伴い飛沫が直接目に入ることを防ぐため、必要に応じて保護メガネなどの着用を促す。
- ・ 下水の付着した衣服及び器具等については、洗浄、消毒等、適切に処置する。
- ・ 現場作業終了後は、その場で速やかに手指の洗浄等を行い、オフィスやコンビニ等の立ち寄り先にウイルスを持ち込まないようにする。

³⁷ （公社）日本下水道管路管理業協会：「下水道管路管理業務における新型コロナウイルス感染症対策ガイドライン」

https://www.jascoma.com/topics/2020/coronavirus_disease/images/20200514/information_001.pdf

³⁸ （一社）日本下水道施設管理業協会：「下水道施設運転管理業務における新型コロナウイルス感染予防ガイドライン」 https://www.gesui-kanrikyo.or.jp/pdf/news_2020051401.pdf

UNICEF/WHO による「新型コロナウイルス感染症（COVID-19）に対する水と衛生，廃棄物処理について暫定ガイダンス（2020年7月29日版）」において，次のことを推奨している。

感染症のリスクが高い未処理下水を扱う作業員には，標準的な PPE（防護服，頑丈な手袋，ブーツ，ゴーグルまたはフェイスシールド）を着用させるべきである。排泄物を取り扱う際や野外に運搬する際には常に着用し，飛沫の飛散や放出に注意する必要がある。下水の作業員は，タンクをくみ上げたり，ポンプ車を降ろしたりすることも含まれる。廃棄物を処理し，それ以上の曝露の可能性がなくなったら，個人は輸送車両に乗り込む前に安全に PPE を外し，手指衛生を行うべきである。汚れた PPE は，後で安全に洗濯できるように密閉された袋に入れておく必要がある（環境清掃と洗濯を参照）。労働者は，これらの保護バリアが破られないように，PPE の着脱方法について適切に訓練されるべきである。PPE が使用できない，または PPE の供給が制限されている場合は，正しい手指衛生の頻度を高め，作業員は感染疑い例または確定例から少なくとも 1m の距離を保つ必要がある。

また，COVID-19 のリスクが高い試料との接触後には，下記の方法にて十分な手指衛生を行うことが推奨される。手指衛生は，PPE（保護具）の着用前と着用後，手袋交換時，下水の周囲の環境と接触した後にも行うことを推奨する。また，可能であれば消毒マット等による靴底消毒も実践することが望ましい。

手が目に見えて汚れていない場合には，擦式アルコール製剤を使用して，適当な手技で 20-30 秒間擦るのが好ましい。手が目に見えて汚れている場合は，石鹸と水で 40-60 秒間，適切な手技で洗浄する。

実験中にこぼした下水試料などに対しては，十分量の消毒用エタノールを噴霧して紙タオル等で拭き取るのが一般的であるが，より安全を期すためには 5% のブリーチ液（漂白剤）が適当である。試料と接触した可能性のある容器等（試料を拭き取った紙タオルを含む）は高圧蒸気滅菌した上で廃棄することが望ましい。

4.2 遺伝子検査のための実験室設備および作業方式における安全管理

市中流行状況や採水現場の状況から感染リスクの高い下水試料を取り扱う場合などで最大限の安全管理対策が必要となる場合には，下水試料は希釈された便検体と同等と考えて SARS-CoV-2 を含む可能性のある医療検体と同等の安全管理を行うことで一定の安全性を確保できると考えられる。SARS-CoV-2 を含む可能性のある医療検体の取り扱いとしては，国内では，国立感染症研究所が策定した暫定ルールが広く用いられており，参考のために紹介する。なお，この指針は，医療機関における診断（他の身体症状や感染者との接触履歴等）

から SARS-CoV-2 への感染疑いのある患者の鼻拭い液検体の取り扱いを主に想定している。下水から感染性のある SARS-CoV-2 が検出された例はまだなく³⁹、医療検体と比べて想定されるリスクは小さいことから、下水試料の取扱において医療検体よりも厳重な安全管理は現時点では必要ないと考えられる。

国立感染症研究所では、暫定的な所内ルール⁴⁰として

1. 新型コロナウイルス 2019-nCoV の病原体の取り扱いは、BSL3/ABSL3 取り扱いとする。
2. 新型コロナウイルス 2019-nCoV 感染疑い患者由来の臨床検体は BSL2 取り扱いとする。

と取り決めている（2020年2月21日付）。これに準じて、国立感染症研究所による 2019-nCoV 病原体検出マニュアル（Ver. 2.9.1）⁴¹では、操作上の注意を次のように記述している。

検体の取り扱いは、（中略）BSL2 実験施設内の安全キャビネット内で取り扱い、操作中はディスポーザブルのガウン、手袋(2重)マスク(サージカル・マスクでよい)、キャップ等の personal protective equipment (PPE)を着用する。チューブの蓋を開ける時には遠心し、チューブオープナーなどを用い、エアロゾルの発生を極力防止する。

国立感染症研究所による試料操作上の注意は、WHO による「集団発生期後の SARS-CoV 検体と培養の取り扱いに関するバイオセーフティ指針（2003年12月18日）」⁴²に準じたものである。同指針では、SARS コロナウイルスを含む疑いのある検体の取扱について、次のように定めている。

<感染予防措置が必要な作業>

- ・ 検体の分注、または希釈
- ・ 細菌あるいは真菌の培養液を加える
- ・ 試験管内 (in vitro)、生体内 (in vivo) のいずれにおいても、ウイルス病原体の増殖を伴わない臨床診断検査を行う
- ・ 未処理検体にかかわる核酸抽出手技
- ・ 顕微鏡検査のための塗抹試料の化学的あるいは加熱固定による作成

³⁹ UNICEF / WHO 合同：新型コロナウイルス感染症（COVID-19）に対する水と衛生、廃棄物処理について暫定ガイダンス（2020年7月29日版）（https://extranet.who.int/kobe_centre/sites/default/files/G55_20200729_JA_IPC_Wash.pdf）

⁴⁰ 国立感染症研究所内での新型コロナウイルス SARS-CoV-2 取り扱いについて（<https://www.niid.go.jp/niid/ja/byougen-kanri/9367-n-cov-bio.html>）

⁴¹ <https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ka/corona-virus/2019-ncov/9492-2019-ncov-17.html>

⁴² 国立感染症研究所 感染症情報センターによる日本語訳：<http://idsc.nih.gov/disease/sars/update101-BS.html>（原文：https://www.who.int/csr/sars/biosafety2003_12_18/en/）

<実施する感染予防措置>

- エアロゾルを産生すると考えられる手技はすべて、生物学的安全キャビネット内で行わなければならない（例：音波破碎，ボルテックス器による振動攪拌）。
- 実験/研究室スタッフは，特定の操作手技を行う際のエアロゾル発生リスクと曝露のリスクに基づいて，使い捨ての手袋，前開きでない，あるいは全身を包み込むようになっているガウン，前腕部をすべて覆うようになっている袖のついたスクラブ・スーツかつなぎ，頭を覆うカバー，そして必要な場合は靴カバーや専用の履き物，防護眼鏡，サージカル・マスクかフルフェイス・シールド（顔面を完全に覆うもの）などの防護用具を，特定の実験操作を行う際に，エアロゾル産生や飛沫曝露の危険がある時には着用すべきである。
- 検体の遠心は，密閉型遠心用ローターあるいは，蓋付きの遠心管を用いて行うこと。これらのローターや遠心管からの検体の取り出しは，生物学的安全キャビネット内で行う。
- 作業台の表面や実験器具は，検体を処理した後に除染を行う必要がある。製造者の推奨している方法に従い，エンベロープを持つウイルスに対して効果のある一般的な除染剤を用いれば，十分なはずである。一般的には，バイオハザードとなる実験中にこぼした検体などに対しては，5%のブリーチ液（漂白剤）が適当である。消毒と除染に関するより詳細な情報は，「WHO 実験室バイオセーフティマニュアル，改訂2版」（英文/PDF）にある。
- SARS 疑い例や確定例の検体，あるいは SARS-CoV で汚染された生物学的汚染廃棄物は，「WHO 実験室バイオセーフティマニュアル，改訂2版」（英文/PDF）⁴³に概略が示されているように，処理する必要がある。
- 生物学的安全キャビネット内で手技や検査の一部を行うことができない場合には，個人的防御装備（例：防毒マスクのような呼吸防護器具（respirator），フェイスシールド）と物理的封じ込め装置（例：遠心分離用安全容器，密閉型ローター）を適切に組み合わせて必ず用いなければならない。
- 分析終了後の試料は高圧蒸気滅菌処理して廃棄することを推奨する。

なお，臨床検体の検査機関において病原体が特定された場合には速やかに滅菌廃棄することが定められている。下水試料においても，SARS-CoV-2 が検出された試料に使用予定がない場合は速やかに高圧蒸気滅菌処理して廃棄することが望ましい。

⁴³ <https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Labbiosafety.pdf>

4.3 その他病原体管理に関する参考情報

- 厚生労働省：感染症法に基づく特定病原体等の管理規制について

https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kekkaku-kansenshou17/03.html

- 国立感染症研究所：病原体等の輸送用包装容器—基本三重梱包の構成

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-biosafe/947-youkisb.html>