

**下水中の新型コロナウイルス検出  
マニュアル ver 1.1**

令和3（2021）年6月

## 目次

1. 本マニュアルの位置づけ .....	1
2. 全体のフロー .....	2
3. 検体の採水方法 .....	3
3.1 機器 .....	3
3.2 プロトコル .....	3
4. 陰電荷膜法によるウイルス回収・濃縮方法 .....	3
4.1 試薬・機器 .....	3
4.1.1 試薬 .....	3
4.1.2 機器・消耗品 .....	4
4.2 準備 .....	4
4.3 プロトコル .....	5
5. RNA 抽出方法 .....	6
5.1 RNeasyPower Soil Total RNA Kit による RNA 抽出 .....	6
5.1.1 試薬・機器 .....	6
5.1.2 準備 .....	8
5.1.3 プロトコル .....	10
5.2 QIAamp UltraSens Virus Kit による RNA 抽出 .....	15
5.2.1 試薬・機器 .....	15
5.2.2 準備 .....	16
5.2.3 プロトコル .....	17
6. 新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）ゲノムの検出方法 .....	19
6.1 試薬・機器 .....	19
6.2 プロトコル .....	19
6.2.1 陽性コントロールの希釈 .....	19
6.2.2 反応液の調製 .....	19
6.2.3 ABI 7500 Fast による検出 .....	20
7. PMMoV 検出方法 .....	22
7.1 機器・試薬 .....	22
7.1.1 機器 .....	22
7.1.2 試薬 .....	23
7.2 リアルタイム PCR 法による PMMoV 検出 .....	25

7.2.1 2-Step 試薬を用いた方法 .....	25
7.2.2 1-Step 試薬を用いた方法 .....	28
7.3 ポジティブコントロール DNA 調製 .....	29
8. 参考資料 .....	30
9. 執筆者一覧.....	30

### 改訂履歴

バージョン	作成日・改訂日	備考
0.1	2020年9月28日	第1回班会議資料
0.2	2020年10月26日	第7章修正
1.0	2021年2月26日	第3回班会議資料
1.1	2021年5月17日	ウェブ公開用

## 1. 本マニュアルの位置づけ

---

本マニュアルは、令和2年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）「研究課題：環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制を構築するための研究」において実施した下水中の新型コロナウイルス検出の暫定的なマニュアルである。

下水中の新型コロナウイルス検出方法は国内外で様々な報告があるが、本マニュアルはわが国で実施しているポリオ環境水サーベイランス（感染症流行予測調査事業における感染源調査）と併用して実施できるよう検討した手法であることに留意されたい。

（参考）感染症流行予測調査事業実施要領

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/pr/670-yosoku-procedure.html>

ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル

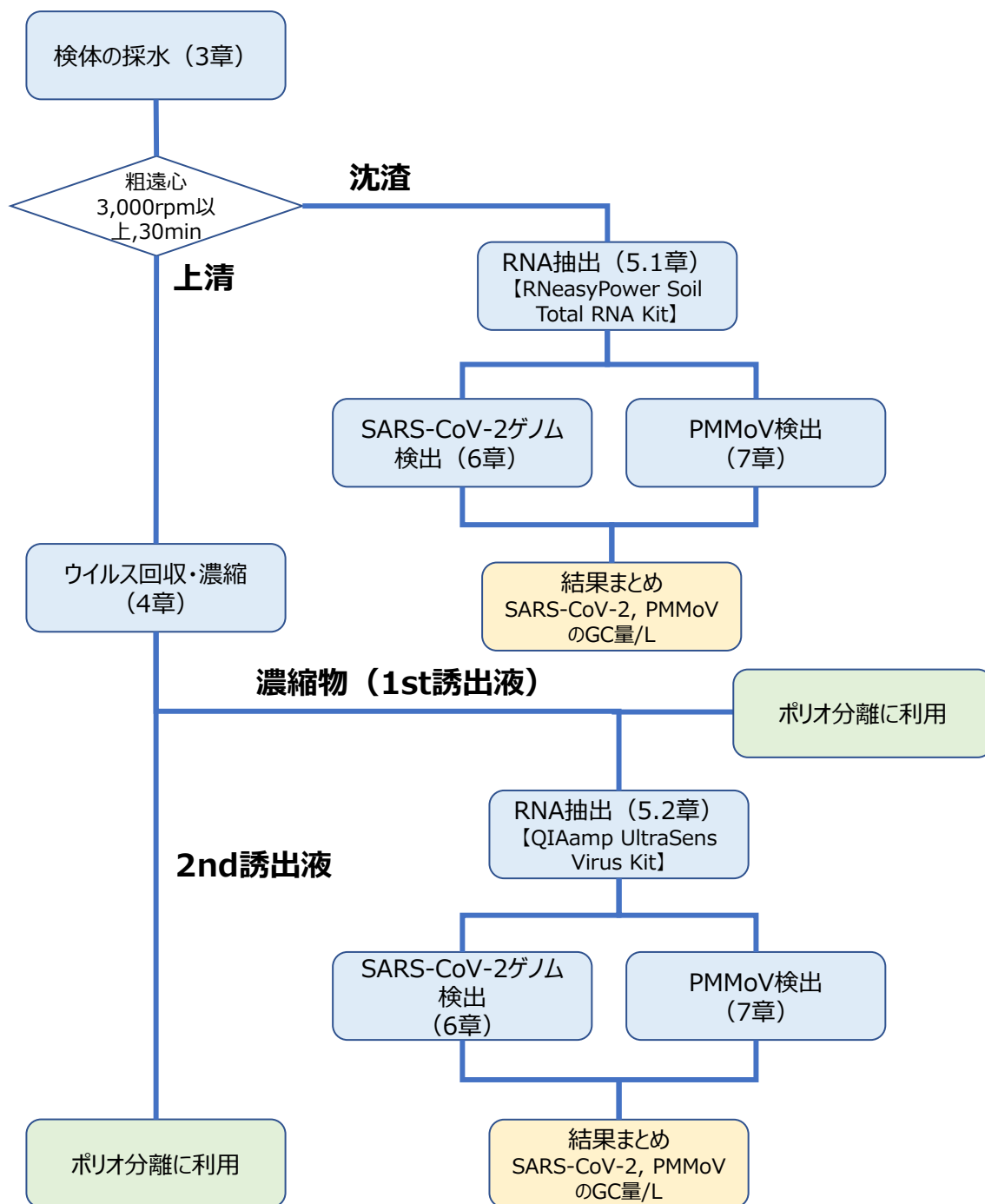
<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/polio.pdf>

本マニュアルは、以下の項目で構成される。

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

## 2. 全体のフロー

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



### 3. 検体の採水方法

---

採水方法はポリオ環境水サーベイランスに準じた流入下水を用いる方法である。

#### 3.1 機器

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

#### 3.2 プロトコル

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

### 4. 陰電荷膜法によるウイルス回収・濃縮方法

---

(注記) ポリオウイルスの場合は陰電荷膜法にて効率よく濃縮できる。流入下水を遠心後、得られた沈殿物と上清を比較した結果、沈殿物から効率よく新型コロナウイルスゲノムが検出できる。令和2年度の研究班では2種類の材料を用いて比較調査を行ったところ、陰電荷膜法の場合も効率よく検出できるとした結果も得られたため (今後の検討課題)、本マニュアルでは本法も記載する。

#### 4.1 試薬・機器

##### 4.1.1 試薬

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

#### 4.1.2 機器・消耗品

- 1) ガラスビーカー (500mL, 1000mL) (滅菌済み)
- 2) 50ml 遠心チューブ (滅菌済み)
- 3) 15mL 遠心チューブ (滅菌済み)
- 4) 2mL チューブ (滅菌済み)
- 5) ハサミ (滅菌済み)
- 6) ピンセット (滅菌済み)
- 7) ピペット (10, 50ml) (滅菌済み)
- 8) シャーレ (滅菌済み)
- 9) シリンジフィルター (0.45 $\mu$ m)
- 10) pH 試験紙又は pH メーター
- 11) プラスティクスホルダー (参考: アドバンテック PP47)
- 12) 混合セルロースエステルタイプ陰電荷膜  
(参考: アドバンテック A045A047A, 孔径 0.45 $\mu$ m、サイズ 47mm)
- 13) 100ml ディスポーザルシリンジ
- 14) 必要に応じてグラスファイバーフィルター (1 $\mu$ m)



プラスティクスホルダー



混合セルロースエステルタイプ陰電荷膜



グラスファイバーフィルター (1 $\mu$ m)

#### 4.2 準備

- 1) 3% ビーフ液
  - 3g ビーフエキストラクトを 100ml の滅菌水に溶解しオートクレーブ滅菌 (121 $^{\circ}$ C, 20 分) する。

## 2) 2.5M MgCl<sub>2</sub> 溶液

- 塩化マグネシウム（6水和物）50.8g をミリ Q 水に溶解し 100ml に調整。オートクレーブ滅菌（121℃, 20分）する。

## 3) 0.5N HCl を準備する。

## 4) フィルターの準備

- プラスティクスホルダーに混合セルロースエステルタイプ陰電荷膜を装着しアルミホイル等で覆い、オートクレーブ滅菌（121℃, 20分）後、乾燥させる。

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



プラスティクスホルダーに混合セルロースエステルタイプ陰電化膜を装着

## 4.3 プロトコル

- (1) 試料を 50ml 遠心チューブ等を用いて粗遠心（3000rpm 以上、30分、4℃）する。
- (2) 上清を 500ml のビーカーに移す。
- (3) (2)のビーカーに攪拌子を入れ、マグネティックスターラー上に設置する。
- (4) 1/50 量の 2.5M MgCl<sub>2</sub> 溶液を添加し（試料 500ml の場合、10ml）攪拌する（最終濃度 0.05M）。
- (5) 0.5N HCl を用いて攪拌しながら pH3.5 に調整する。
- (6) 100ml シリンジで液を吸い上げ、ゆっくりろ過する。廃液は 1000ml ビーカーで受ける。
- (7) プラスティクスホルダーから陰電荷膜を取り出しシャーレに移す。





- (8) ピンセットとハサミで陰電荷膜を細切り、50ml 遠心チューブに移す。
- (9) 3% ビーフ液 5ml を加え 5 分間振とう、或いは 1~3 分間ボルテックス攪拌する (100 倍濃縮の場合)。
- (10) 上清を 15ml 遠心チューブに移す (1 回目誘出)。
- (11) 再び 3% ビーフ液 5ml を 50ml 遠心チューブに加え 5 分間振とう、あるいは 1~3 分間ボルテックス攪拌する。
- (12) 上清を 15ml 遠心チューブに移す (2 回目誘出)。
- (13) 1 回目及び 2 回目の誘出液を入れた 15ml 遠心チューブを遠心 (3000rpm、15 分、4℃) する。
- (14) 上清を 0.45µm のシリンジフィルターでろ過する。ろ液を保管用チューブに移し -20℃で保管する。

## 5. RNA 抽出方法

---

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

### 5.1 RNeasyPower Soil Total RNA Kit による RNA 抽出

#### 5.1.1 試薬・機器

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

※Kit の内容は以下のとおり。

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

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



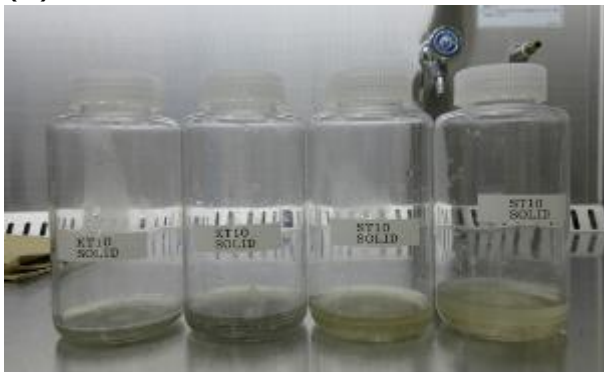
RNeasy PowerSoil Total RNA Kit (QIAGEN) Cat. No. 12866-25

- 2) 15ml チューブを利用可能な遠心分離機 (2500 x g minimum)
- 3) マイクロ遠心分離機 (13,000 x g)
- 4) ピペット (20 µl–1000 µl)
- 5) 血清ピペット (1 ml and 10 ml)
- 6) ボルテックス (Vortex-Genie® 2)
- 7) ボルテックスアダプター-4 (15 ml) チューブ用 (cat. no. 13000-V1-15)

- 8) RNase-free gloves (cat. nos. 1556-S, 1556-M and 1556-L)
- 9) RNase 除去用のラボクリーナー (cat. no. 12095-500)
- 10) フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール溶液
- 11) Heat block set at 45°C (オプション)

### 5.1.2 準備

(1) 粗遠心を行い、静置後上澄みを除く。



静置後、上澄みを除いた下水サンプル



デカントで下水をチューブに移す

遠心前

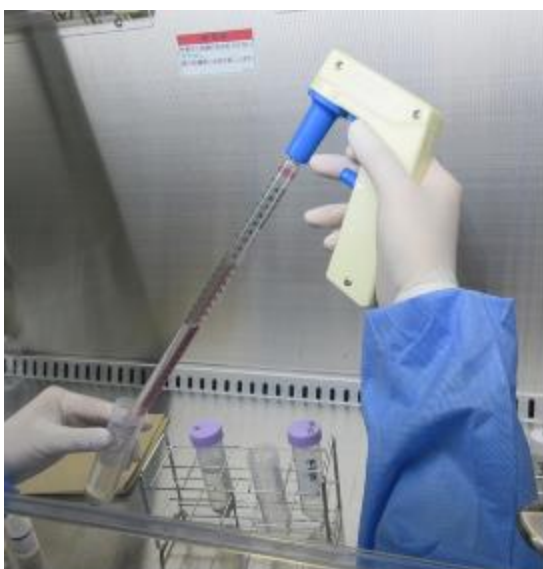


遠心後

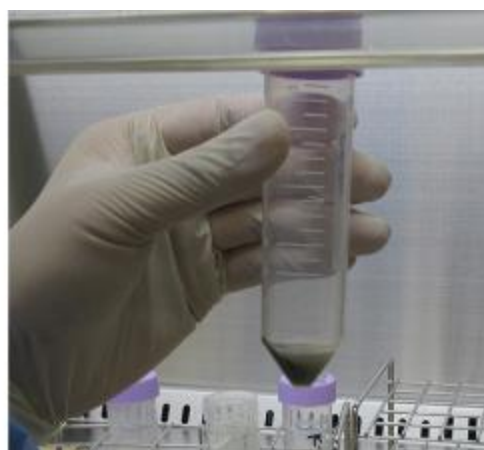


スイングローターで遠心  
(アングルローターでは底にたまらない)





沈殿物を吸い上げないように上清を除く



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

### 5.1.3 プロトコル

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



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



フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを加えた後

注意点：ガラス製のピペットを使用する

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



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

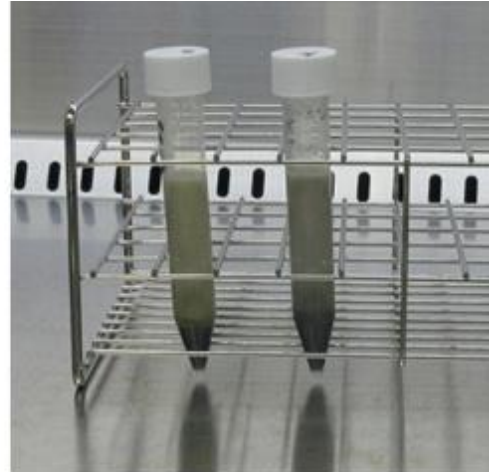


アダプター取り付け





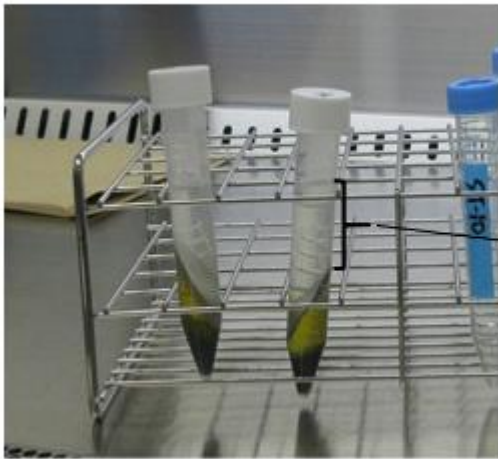
15ml PowerBead Tubeをアダプターにつけてボルテックスしているところ



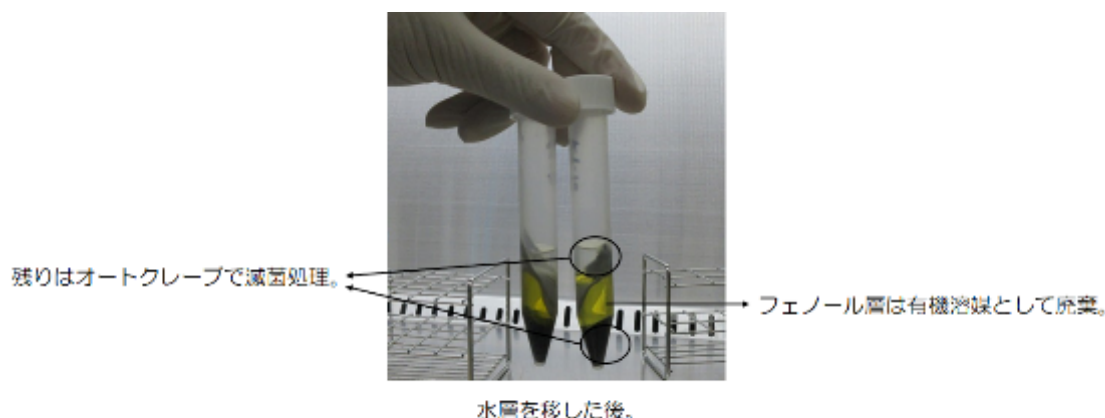
ボルテックス後の様子

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

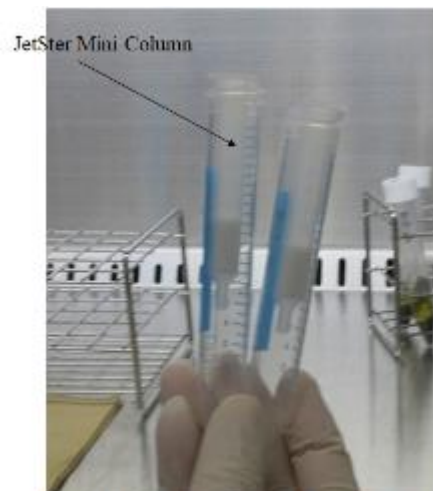
遠心後の様子  
(フェノール層、中間層、水層に分離)



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



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



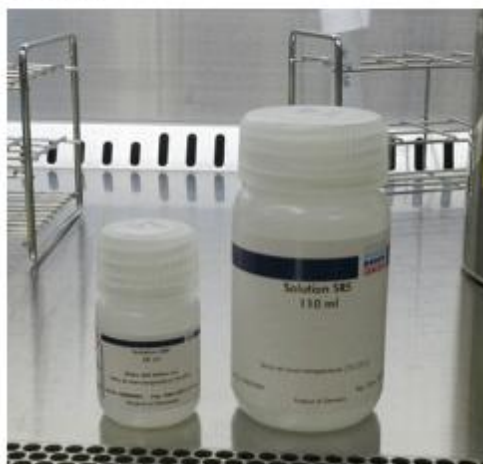
JetStar Mini Column を15ml Collection Tube にセットしたところ



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

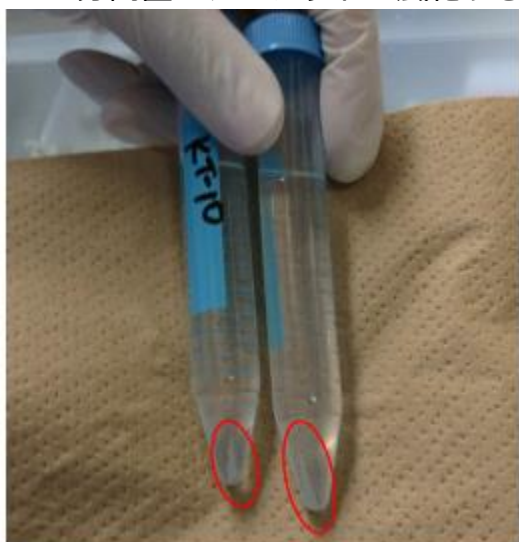
- (14) ステップ 12 の RNA 分離サンプルを JetStar Mini Column に加え、カラムを介して 15 ml Collection Tube に重力で流し込む。
- (15) 1 ml の Solution SR5 を JetStar Mini Column に加え、15 ml Collection Tube に完全に自然落下させる。
- (16) JetStar Mini Column を新しい 15 ml Collection Tube (付属) に移す。Solution SR6 を振って混合し、JetStar Mini Column に 1 ml を加えて、結合し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

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

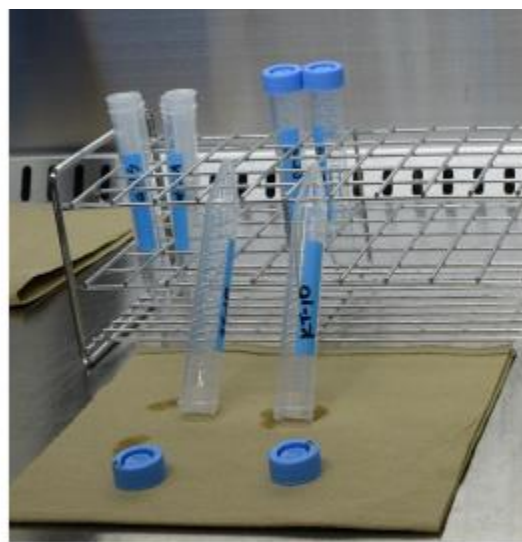




- (17) 溶出した RNA を 2.2 ml Collection Tube (付属) に移す。Solution SR4 を 1ml 加える。少なくとも 1 回転倒混和し、 $-15^{\circ}\text{C}$  から  $-30^{\circ}\text{C}$  で最低 10 分間インキュベートする。
- (18) 2.2 ml Collection Tube を  $13,000 \times g$  で 15 分間遠心して、RNA をペレット化する。
- (19) 上清をデカントし、2.2 ml Collection Tube をペーパータオルの上に 10 分間置き、ペレット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



遠心後の様子 ペレットが目で確認できる



風乾の様子

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

## 5.2 QIAamp UltraSens Virus Kit による RNA 抽出

### 5.2.1 試薬・機器

#### 5.2.1.1 試薬

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

※QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN)の外観



Protocol (13)で使用する

QIAamp スピンカラムと 2ml コレクションチューブ



1.5ml チューブと 2ml のエッペンチューブ (別売)

1.5ml チューブ : 5.2.2 で Buffer AR の分注に使用

2ml エッペンチューブ : 5.2.3 のプロトコル(1)で使用

### 5.2.1.2 機器

1) ミキサーインキュベーター 2台

(Eppendorf thermomixer comfort -1.5ml- )

※ミキサーインキュベーター (Eppendorf thermomixer comfort -1.5ml-) :

5.2.2 と 5.2.3 のプロトコル(11)で使用



ヒーティングブロックあるいは水浴によるインキュベートに代用できる。

### 5.2.2 準備

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

### 5.2.3 プロトコル

(1) 2ml エッペンチューブにサンプル<sup>※1</sup>を 1ml 加える。

※1：陰電荷膜による濃縮物

(2) サンプルに Buffer AC を 0.8ml 加える。

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

(4) フタを閉め 2ml チューブを転倒混和する。

(5) 10 秒間ボルテックスする。

(6) 室温で 10 分間インキュベートする。

(7) 1200 $\times$ g で 5 分間遠心<sup>※2</sup>。室温。

※2：3 分間では沈ペレットが柔らか過ぎるので、5 分に変更した。

沈殿が不十分の場合、遠心時間をさらに長くする。

(8) 1ml ピペットマンを用いて、上清を除去する。



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

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

※5：1 サンプル 22 $\mu$ l として加える。

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

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

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

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

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

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

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

## 6. 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) ゲノムの検出方法

---

### 6.1 試薬・機器

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

### 6.2 プロトコル

#### 6.2.1 陽性コントロールの希釈

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

#### 6.2.2 反応液の調製

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

- クリーンベンチ内で調製 (40  $\mu\text{L}$  用として N=2 で半分に分ける)  
40  $\mu\text{L}$  x (+N+S)

RT-qPCR Mix (2 $\times$ )	20 $\mu\text{L}$
Primer/Probe mix (pink)	4 $\mu\text{L}$
ROX Reference Dye II*(50 $\times$ ) (brown)	0.8 $\mu\text{L}$
RNase Free H <sub>2</sub> O	5.2 $\mu\text{L}$
Total	30 $\mu\text{L}$ プレートに分注

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

- クリーンベンチ内で調製 40  $\mu\text{L}$  x (+N+S)

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

### 6.2.3 ABI 7500 Fast による検出

- (1) ABI 7500Fast を起動
- (2) PC 起動、USER/PASS 入力、7500 software 起動、login as guest
- (3) Advanced Setup
- (4) 検査名入力 (例 SC2\_yymmdd\_kitamura)
- (5) 7500 Fast (96 well、Quantitation - standard curve、Taqman reagent)
- (6) Standard (~2hrs to...) に変更
- (7) Plate Setup
- (8) Define Target で add new target して Assay, Target, Reporter を入力
  - ✓ SC2\_NIID は FAM, SC2\_CDCN1N2 は Cy5
  - ✓ Quencher は両方とも none
- (9) Define Samples で必要なサンプル数まで add new sample してサンプル名入力
- (10) Assign Targets and Samples
- (11) Passive reference は ROX (Takara 製品 ROX Reference Dye II 使用)
- (12) View Plate Layout ワークシートに基づいて assign 設定
- (13) 陰性コントロール"N"、陽性コントロール"S"、サンプル"U"を設定、S はコピー数入力
- (14) "U"には step9 で入力したサンプル名を選択
- (15) Run Method (Standard mode)
  - 50°C, 30 min
  - 95°C, 15 min
  - 45 cycles
  - 95°C, 15 sec
  - 60°C, 60 sec, Data Collection

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



## 7. PMMoV 検出方法

---

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

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

### 7.1 機器・試薬

#### 7.1.1 機器

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

### 7.1.2 試薬

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

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

#### ① プライマー<sup>1</sup>

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

PMMV-RP1: TTG TCG GTT GCA ATG CAA GT

#### ② プローブ

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

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

#### ③ ポジティブコントロール

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

TTATGGCATACACAGTTACCAGTGGTAATGGTAGCTGTGGTTTCAAATGAG  
AGTGGTTTTGACCTTAACGTTTTGAGAGGCCTACCGAAGCAAATGTCGCACTT  
GCATTGCAACCGACAATTACATCAAAGGAGGAAGGTTTCGTTGAAGATTGTA  
CGTGGGCTACAACCTCCTTAACC

#### ④ 逆転写試薬

High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit

【ThermoFisher SCIENTIFIC (4368814)】

SuperScript II Reverse Transcriptase

---

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

【ThermoFisher SCIENTIFIC (18064022)】  
PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)  
【TaKaRa (RR036A,B)】

⑤ 2-Step PCR 用試薬

Premix Ex Taq (Probe qPCR) \*、(Perfect Real Time)  
【TaKaRa (RR390A)、(RR039A)】

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

TaqMan Universal PCR Master Mix  
【ThermoFisher SCIENTIFIC (4304437)】  
QuantiTect Probe PCR Kit  
【QIAGEN (204343)】

⑥ 1-Step PCR 用試薬

One Step PrimeScript III RT-qPCR 【TaKaRa (RR600S)】  
QuantiTect probe RT-PCR kit 【QIAGEN (204443)】

## 7.2 リアルタイム PCR 法による PMMoV 検出

### 7.2.1 2-Step 試薬を用いた方法

#### 1) 逆転写

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

試薬	容量 ( $\mu\text{L}$ )
5 $\times$ Master Mix	2
RNase free Water	3
template RNA	5
Total 容量	10

- RT 処理条件は以下のとおり  
37 $^{\circ}\text{C}$  30min  
85 $^{\circ}\text{C}$  5sec  
4 $^{\circ}\text{C}$

## 2) リアルタイム PCR

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

### (1) ABI 7500 Fast を用いる場合

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

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

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

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

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

(2) QuantStudio 5 を用いる場合

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

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

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

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

### 7.2.2 1-Step 試薬を用いた方法

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

(1) Quant Studio5 を用いる場合

試薬	容量 ( $\mu$ L)	最終濃度	
2x Master Mix	10	$\times 1$	
For. PMMV-FP1-rev(20 $\mu$ M)	0.2	0.2	( $\mu$ M)
Rev. PMMV-RP1(20 $\mu$ M)	0.2	0.2	( $\mu$ M)
PMMV-Probe1(5 $\mu$ M)	0.8	0.2	( $\mu$ M)
ROX Dye II	0.1	$\times 0.25$	
RNase free Water	3.7		
template RNA <sup>*</sup>	5		
Total 容量	20		

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

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

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

### 7.3 ポジティブコントロール DNA 調製

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

#### ※溶解方法の例

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

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

アボガドロ数を  $6.02 \times 10^{23}$  とすると、

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

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

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

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



## 8. 参考資料

---

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

## 9. 執筆者一覧

---

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

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