

SARS-CoV-2 含有試料 PCR 検査の事業化検討及び 環境試料からのウイルス由来核酸検出の試み

一般財団法人九州環境管理協会 技術部 分析試験課 研究員 高島 夏希

要 旨

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) のパンデミックによって、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) が検査対象に存在していないことの証明 (陰性証明) に社会的な需要が生じた。そのため、当協会においても、PCR 法を用いた「安心・安全のための検査」についてその実施の可否を検証し、事業化の可能性について検討した。続いて、環境試料中に含まれる SARS-CoV-2 を検出対象とし、分析作業を行う場所や設備の適合、試料の濃縮方法および SARS-CoV-2 由来核酸断片の検出方法を検討した結果、実際に PCR 検査を運用できる水準にまで達した。本稿では、SARS-CoV-2 の PCR 検査について、基礎知識や背景を整理し、PCR 検査の環境試料への応用について現状をまとめたあと、実際の試料の分析結果について報告する。

1. はじめに

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の感染が拡大してからおよそ 2 年半が経過し、その間、人類社会は既存の枠組みから、新しい枠組みへと大きな変容を強いられてきた。人類は「コロナ禍」を経験し、今後は「with コロナ」へと移り変わろうとしている。

筆者は大学院で、極限環境微生物の膜脂質や DNA 複製タンパク質に関する研究に取り組んできた。そのため、PCR などの分子生物学は専門分野であり、人より多少知識が明るいことから、当協会が PCR 検査の事業化の検討を始める際に、幸いにもプロジェクトを任せただけになった。本稿では 2 年間の研究結果について紹介する。まず初めに COVID-19 とその周辺知識を整理した後、当協会での PCR 検査体制の構築について検討したこと、PCR 検査の環境試料への応用について検討したことを紹介する。

2. 背景

COVID-19 のパンデミック

2019 年 12 月 30 日、中国湖北省の武漢で端を発した新種のコロナウイルスは、2020 年 1 月 9 日に最初の死者を出し、その後、全世界へと感染が拡大した。この感染症の病原ウイルスは新型コロナウイルス (SARS-

CoV-2) と呼称され、その感染者数は、本稿執筆時点 (2022 年 7 月 7 日) において、全世界で感染者数 5.1 億人、死者数 634 万人に及んでいる。日本では、PCR 検査陽性者 944 万人、新型コロナウイルス関連死者数 3.1 万人にのぼり、他国と比較して患者数や死者数は抑制されているものの、いまだに感染の終息は見えない。

コロナウイルス (Coronavirus) は、ニドウイルス目のコロナウイルス科に属する、エンベロープを有する一本鎖 (+) RNA ウイルスである。ウイルス粒子の電子顕微鏡像より、エンベロープ表面に存在する突起上のスパイクタンパク質が日食時における太陽のコロナのように見えることから命名された。ゲノムの大きさは 3 万塩基と RNA ウイルスでは最大級である。人に対して病原性を有するヒトコロナウイルスは現在までに 7 種が知られており、そのうち普通感冒、いわゆる風邪の原因ウイルスとして HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoVHKU1 の 4 種が知られている。これら 4 種のコロナウイルスは、普通感冒の原因の 10~15% (流行期 35%) を占めると推定されており、ほとんどの子どもが 6 歳までに感染するといわれているが、いずれも症状は軽症である¹⁾。最近の研究によると、コロナウイルスは過去にも大流行していた可能性が指摘されている。1889 年から 1895 年にかけて世界で 100 万人が死亡したロシア風邪は、ヒトコロナウイルス HCoV-OC43 が原因である可能性が報告された²⁾。流行の後に、人集団の大多数が後天性免疫を

獲得し、普通感冒へと変化したのだと推測されている³⁾。

近年でも、コロナウイルス感染症は幾度か流行しており、そのたびに新種のコロナウイルスが発見されている。キクガシラコウモリからヒトに感染するようになった重症急性呼吸器症候群 (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) の病原体 SARS-CoV (2002 - 2003 年, 感染者数 8,422 人, 死亡者数 916 人, 致死率 11%), ヒトコブラクダが感染宿主となっている中東呼吸器症候群 (Middle East respiratory syndrome, MERS) の病原体 MERS-CoV (2012 年-現在流行中, 感染者数 2494 人, 死亡者数 858 人, 致死率 36%), そして, COVID-19 の病原体 SARS-CoV-2 と続き, SARS-CoV-2 で 7 種目のヒトコロナウイルスとなる。

SARS-CoV-2 は, ゲノムが RNA であるという性質上, 他の RNA ウイルスと同様突然変異率が高いため, 感染の経過とともに様々な変異株が出現する。これは, SARS-CoV-2 が自身のゲノム複製時に使用する RNA ポリメラーゼの fidelity (精確さ) の低さと, ゲノム RNA の配列に特徴があるためであり, ゲノム複製の過程で様々な変異を含んだウイルスゲノムが生じることに起因する⁴⁾。変異を含んだウイルスゲノムの中には, ウイルス粒子を構成できないもの, ウイルス粒子を構成できても次世代を複製できないものなど多くの不適合粒子が含まれるが, その中で, 次世代のウイルスが複製できるものが変異株と呼ばれる。これら変異株は, それまでに獲得した獲得免疫をすり抜けて感染する可能性があるため, 疫学上無視できない存在であり, SARS-CoV-2 については, α 株や δ 株, オミクロン株などがこれに相当する。

PCR 法によるウイルス由来核酸断片検出

現在, 広く用いられている SARS-CoV-2 の検出方法として, ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) を利用した SARS-CoV-2 由来の核酸断片を検出する方法 (PCR 検査など) と, 抗体による SARS-CoV-2 のタンパク質を検出する方法 (抗原検査) の 2 種類が挙げられる。各方法に長短があり, 検査法による特性の違いを考慮して, 適用する検査法を決めることが必要である⁵⁾。

PCR 法は, 1983 年にキャリー・マリスによって発明さ

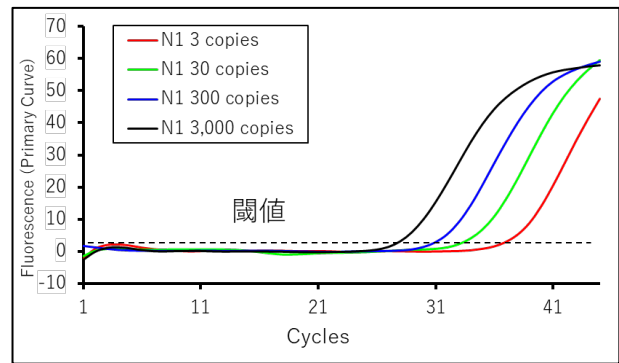


図 1 リアルタイム PCR の増幅曲線の例

れ, 現在の分子生物学には欠かすことのできない技術となっている。本方法は, 二本鎖 DNA の熱による一本鎖 DNA への可逆的な解離反応 (熱変性) と, 好熱菌由来 DNA ポリメラーゼの特性を利用したもので, 任意の配列の DNA を, 温度の上げ下げを繰り返すこと (温度変化の繰り返し単位を 1 サイクルという) で指数関数的に増幅させることができる手法である。基本的には DNA しか増幅することしかできないが, 逆転写酵素を用いて RNA を DNA に変換することで, 結果的に RNA も増幅することができる (ただし, 最終生成物は DNA となる)。

さらに, 上記の方法を改良し, 定量的な検出を行うことができるようにしたのがリアルタイム PCR (定量 PCR) という。これは, 各サイクルでの DNA の増幅を蛍光物質によってモニタリングする手法である。横軸にサイクル数, 縦軸に蛍光強度をプロットした場合, 反応液に含まれている DNA の初期量と, 蛍光強度が示す増幅曲線が立ち上がるサイクル数に相関があることから, あらかじめ既知量の DNA から検量線を作成することにより, 未知試料中の DNA 量を算出することができる。増幅曲線が立ち上がり, 一定の閾値を超えた時点のサイクル数を Ct 値 (cycle threshold) と呼称している (図 1)。Ct 値が小さいほど最初の試料に含まれる DNA 量が多い。

実際に SARS-CoV-2 の PCR 検査を行う場合, 具体的には次のような操作を行う。(i) 検体を採取する。(ii) 検体に含まれるウイルス粒子を破壊し, ゲノム RNA のみを精製, 抽出する。(iii) 精製した RNA のうち, PCR 検査での増幅対象領域を逆転写酵素によって DNA に

変換する。(ix) 変換された DNA をリアルタイム PCR により増幅させ、Ct 値を導出する。日本では Ct 値が 40 以下の場合には陽性、40 より大きい場合は陰性と判断されている⁹⁾。PCR は、専用に調製されたキットが目的と用途に応じて多数販売されており、中には、使用するキットによって、(ii) ~ (ix) の一部、または全てをまとめて行えるものもある。

PCR 検査の問題点

PCR 検査にはいくつかの問題点がある。SARS-CoV-2 はゲノムとして RNA を持つが、RNA は非常に分解されやすいため、精製時、少しでも不適切な操作があれば検出できなくなる。そのため、偽陰性の問題を常に考慮しなければならない。反対に、PCR 検査では理論上核酸が 1 コピーでも存在すれば検出されるため、ほんのわずかなコンタミネーションによっても偽陽性が生じ得る。一般に偽陽性を除去するための判定は検査と並行して行われる。また、PCR 検査は、増幅対象となっているゲノム RNA の一部分だけしか検出できないことに留意しなければならない(極端な例を挙げれば、検体の中に SARS-CoV-2 のゲノム RNA がほんの一断片でも存在すれば PCR 検査は陽性となる)。つまり、感染性のないウイルスの残骸や RNA の欠片、感染性を有するウイルス粒子のいずれも区別なく PCR 検査では検出されてしまう。したがって、「PCR 検査が陽性」であっても「COVID-19 に感染した」とは限らない⁷⁾。また、「PCR 検査で測定された核酸のコピー数」と「感染性を有するウイルス粒子数」は一般的には一致しないことに留意すべきである。通常、リアルタイム PCR で計測されたゲノムのコピー数は、感染性を有するウイルス粒子の数と比較して、10 倍以上大きい値となることが多い。また、ウイルスによる感染が成立するには、1 つの宿主細胞に対して $10^1 \sim 10^3$ 倍のウイルス粒子が必要であることがわかっており、この数はウイルスの種類により異なる。例えば、ノロウイルスは $10^1 \sim 10^2$ 粒子、SARS-CoV-2 は 10^2 粒子程度であると見積もられている⁸⁾。

一方、陽性の判断基準についても色々知見が蓄えられてきた。日本では、Ct 値が 40 以下で陽性と判断されるが、Ct 値が 30 以上の検体からは SARS-CoV-2 を単

離することが難しいことがわかってきた。Ct 値が 30 を超える検体から感染性の SARS-CoV-2 が単離できたという報告はあるが、単離できる確率は低いため、検体が感染力を有するとされる閾値は、Ct 値が 30 以下、ウイルス濃度が 10^6 copies/mL 以上であると見積もられている⁹⁾。

下水中の SARS-CoV-2 由来核酸断片の検出

SARS-CoV-2 は、感染者の上気道粘膜だけでなく、唾液や喀痰、糞便中にも高濃度含まれていることがわかっており、世界各国で下水試料からの SARS-CoV-2 の核酸断片の検出事例が報告されている¹⁰⁾。日本においても、下水試料からの SARS-CoV-2 核酸断片が検出されている¹¹⁾。下水流入水中のウイルス量は、下水流入地域における感染状況を反映していると考えられており、顕性感染者だけでなく、不顕性感染者が排出するウイルス量も反映していることから、地域の包括的な感染状況を把握するための手法として期待されてきた¹²⁾。実際に仙台市では、下水中のノロウイルス濃度を監視し、感染拡大の兆候が見られた場合に注意を促す取組みを行っている。下水中 SARS-CoV-2 の調査について当初、ウイルス量の推移と陽性者数の推移を比較した場合のピークのズレから感染状況の予測を試みていたが、想定していたほどのピークのズレは確認できなかった。一方、下水からのウイルス検出率と日別陽性者数に相関があることが示唆されており、直近 4 週間における下水中からの検出率と実際の陽性者数の相関を AI で解析することで陽性者数の予測ができることが報告された¹³⁾。

「安心・安全のための検査」の社会的需要

COVID-19 の感染拡大に伴い、「安心・安全のための検査」(陰性証明)の社会的需要が高まってきたため、当協会においても、PCR 検査によって SARS-CoV-2 を検出できる体制を整えることが検討された。PCR 検査の対象は患者由来の検体が主であるが、当協会は自身の強みを生かし、環境試料を対象に PCR 検査の実行の可否を検証することにした。日本水環境学会が COVID-19 タスクフォースを立ち上げ、下水試料からの SARS-CoV-2 由来核酸断片の検出方法の検討を始めたことも受け、それを参考にしつつ検討作業を進めた。

本研究は令和 2 年 4 月から令和 4 年 3 月までの 2 年間で、1 年目は当協会で PCR 検査を実施する体制の構築を、2 年目は環境試料からのウイルス由来核酸断片を検出する技術の確立を目的とした。

3. PCR 検査体制の検討

各工程の作業部屋の検討

PCR 法は極微量の核酸断片を検出できる手法であるが、逆を返せば、サンプルや試薬の汚染に敏感な手法と言える。そのため、PCR を行う際には、コンタミネーションの対策が不可欠である。具体的には、「試薬調製と PCR を実施する部屋の分割」、「サンプル調製を最後に行う」、「各種コンタミネーション対策機器の使用」、「ネガティブコントロールによるチェック」などが挙げられる。また、SARS-CoV-2 の場合は RNA の分解を避けるために「RNase フリーの手袋を着用する」ことも重要である⁶⁾。

本研究を開始するにあたり、各段階の操作を実施する実験室の検討を行った。本研究が想定している試料は、下水流入水や使用済み作業用手袋など、ウイルスを含む様々な汚染物質が付着している可能性が高いため、工程と部屋を「前処理：試料の濃縮（1 号館 2 階有機前処理室）」、「反応液調製：核酸抽出および反応溶液の調製（管理棟 2 階生物実験室）」、「測定：PCR 検査（1 号館 1 階 DNA 分析室）」の 3 つに分けることにした。

コントロールウイルスの検討

当協会では、リアルタイム PCR 法を用いた大腸菌 O157 の検出試験や、環境 DNA の分析など、以前より DNA 分析を行ってきたため、細菌や環境試料からの DNA 抽出については実績があるが、RNA ウイルスを対象としたことはなかった。このため、試料からの RNA の分離抽出と RNA から DNA への逆転写反応について検証する必要がある。そこで、まずは既存のウイルスを用いたコントロール実験を行った。コントロール実験には、一般的な化学分析と同様、標準品（すなわち既知量の SARS-CoV-2）を使用できることが理想である。しかし、SARS-CoV-2 の入手が困難であること、取り扱い

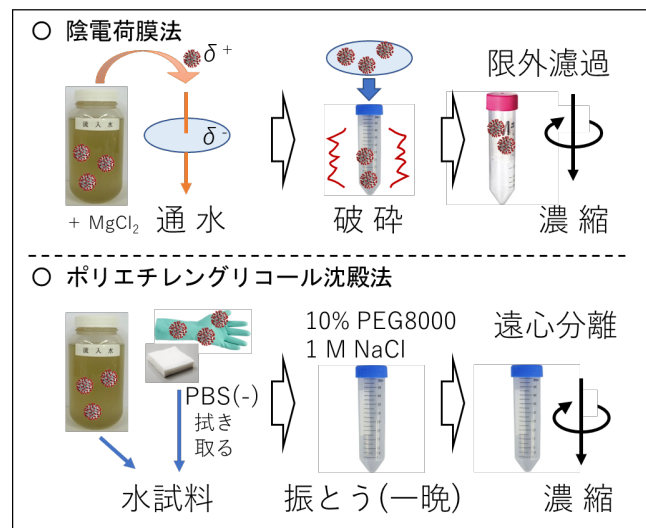


図 2 濃縮方法の概要

にはバイオセーフティレベル 3 以上の施設が必要であることなどから、SARS-CoV-2 を使用するには障壁が高い。研究試験用に SARS-CoV-2 の熱不活性化株は分譲されており、バイオセーフティレベル 1 で取り扱うことができるが、高コストである。そのため本研究では SARS-CoV-2 の代理としてトウガラシ微斑ウイルス (pepper mild mottle virus, PMMoV) を用いた。PMMoV は、トバモウイルス属に分類される一本鎖 (+) RNA ウイルスで、らせん環状をしている。SARS-CoV-2 と異なり、エンベロープを持たず、ゲノム RNA がカプシドというタンパク質でおおわれている構造をしている。人の糞便中に高濃度に含まれており、下水流入水中に年間を通して一定の濃度で存在しているため、PMMoV を含む試料の入手が容易である。また、本ウイルスは、日本水環境学会 COVID-19 タスクフォースが公表した「下水中の新型コロナウイルス遺伝子検出マニュアル」において、一連の操作に問題がないかを評価するプロセスコントロール用の代理ウイルスとして提案されているため、実際に環境試料の分析に応用する場合を考慮すれば、非常に都合がよいといえる¹⁴⁾。以上の理由により、本研究では、コントロールとして PMMoV を使用した。

濃縮・検出方法の検討

一般に、環境試料中のウイルス濃度は低いため、PCR 法で検出を行うためにはウイルスを濃縮する必要がある。いくつかあるウイルスの濃縮方法のうち、下水中

の新型コロナウイルス遺伝子検出マニュアルでは、陰電荷膜法、ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法、限外濾過膜法が提案されている¹²⁾。各手法にそれぞれ長所と短所があるため、実際の分析の状況や事情に合わせて、適切な濃縮法を選択するのが望ましい。今回、下水試料の濃縮方法として、陰電荷膜法および PEG 沈殿法の検討を行った (図 2)。限外濾過膜法は、コストや限外濾過膜の入手に難があり、検討を見送った。陰電荷膜法および PEG 沈殿法の詳細は、先に挙げたマニュアルに記述されている。

各操作終了後の濃縮液からの RNA 抽出と精製には、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を使用し、逆転写反応およびリアルタイム PCR には Hot Start TTx (RNA) Kit (東洋紡) を使用した。PCR に用いるプライマーやプローブ、スタンダードは、マニュアルに記載されている通りに設計し、人工合成した^{9), 14)}。

ウイルス濃縮および検出操作が間違いなく行われていることを確認するため、濃縮前と濃縮後の PMMoV のコピー数を算出し、両方法における回収率を比較した。その結果、PEG 沈殿法の方が陰電荷膜法よりも高い回収率が得られたため、濃縮法として PEG 沈殿法を採用することにした (表 1)。一方の陰電荷膜法は、PEG 沈殿法よりも一度に処理できる試料量が多いことが利点であるが、使用する器具の数が多いために準備が煩雑になること、二次濃縮で用いる限外濾過膜の費用が高いこと、回収率が望めないことなどの理由から採用しなかった。

4. 環境試料の PCR 検査の検討

下水試料のウイルス由来核酸断片検出

濃縮方法ならびに PCR 検査の実効性についての検討を終えたため、続いて環境試料が分析できるかを検討した。下水試料 (流入水および放流水) 中のウイルスを PEG 沈殿法によって濃縮し、ウイルス量を算出した (表 1)。検出対象は、PMMoV, SARS-CoV-2 の N1 領域と N2 領域である。PMMoV は、流入水と放流水両方で検出されたが、流入水の方が放流水よりもウイルス量が多く、回収率も流入水の方が高かった。これは両者のウイルス量の違いが要因として考えられ、PEG 沈殿法では、試料水中に含まれるウイルス量が多い方がウイルス粒子と PEG と会合する機会が多くなり、その結果沈殿しやすくなるためであると推察された。

SARS-CoV-2 の N1 領域と N2 領域についても PCR 法で検出を試みたが、いずれの試料においても検出されなかった (表 1)。

物品表面からのウイルス由来核酸断片検出

ウイルスの感染経路として、飛沫感染、接触感染、飛沫核感染 (空気感染) の 3 つの感染経路が考えられている。このうち、飛沫や飛沫核の飛散、汚染された感染者の手などから、物品表面に感染源が付着し、そこに接触した他者が、自らの粘膜などに汚染された手で触るなどして感染することを接触感染という。SARS-CoV-2

表 1 各方法における検出結果一覧

| 試料種類 | 試料名 | 濃縮方法 | 試料量 | 濃縮量 | SARS-CoV-2 | | PMMoV 濃縮前 | | PMMoV 濃縮後 | | 回収率 |
|------|-----------|-------|--------|---------|------------|------|-----------|-------------------|-----------|-------------------|-----|
| | | | | | N1 | N2 | Ct値 | コピー数 | Ct値 | コピー数 | |
| 下水試料 | 流入水A | 陰電荷膜法 | 50 mL | 0.90 mL | N.D. | N.D. | 28.9 | 2.6×10^6 | 37.3 | 3.3×10^5 | 13% |
| | 放流水A | 陰電荷膜法 | 500 mL | 0.76 mL | N.D. | N.D. | 36.7 | 4.9×10^6 | 31.5 | 3.4×10^4 | 7% |
| | 流入水B | PEG沈法 | 40 mL | 1.5 mL | N.D. | N.D. | 28.9 | 2.2×10^7 | 24.6 | 1.3×10^7 | 58% |
| | 放流水B | PEG沈法 | 40 mL | 1.5 mL | N.D. | N.D. | 34.4 | 5.9×10^5 | 32.5 | 7.4×10^4 | 13% |
| 物体表面 | スミア標準 | PEG沈法 | 30 mL | 0.8 mL | N.D. | N.D. | 27.5 | 3.5×10^5 | 32.1 | 9.2×10^4 | 26% |
| | 作業用手袋 | PEG沈法 | 80 mL | 1.0 mL | N.D. | N.D. | 35.9 | 1.4×10^6 | 30.3 | 1.1×10^6 | 76% |
| 空気 | 0 ~ 50分 | PEG沈法 | 10 L | 0.8 mL | N.D. | N.D. | - | - | N.D. | N.D. | - |
| | 50 ~ 100分 | PEG沈法 | 10 L | 0.8 mL | N.D. | N.D. | - | - | N.D. | N.D. | - |

N.D.: not detected

やインフルエンザウイルス、ノロウイルスなど、種々の感染性のウイルスは接触感染により広がっていくため、周囲の物品がウイルスに汚染されていないかを検査することは安心、安全のためには非常に重要である。

本研究において、表面ふき取り試験によるウイルス核酸断片検出の検討を行うにあたり、次のような試験を行った(図 3)。作業台上の 10 cm × 10 cm の区画に、PMMoV 濃度既知の溶液を塗布し、2 時間室温で放置して乾燥させた。乾燥後、リン酸緩衝液を含ませた滅菌ガーゼを用いてふき取り、30 mL のリン酸緩衝液に懸濁したものを PEG 沈殿法によって濃縮し、ウイルス濃縮液とした。濃縮液から PMMoV の量を定量 PCR 法で算出し、回収率を算出したところ、その回収率は 26%であった(表 1)。以上の結果から、詳細な条件はまだ検討する余地はあるものの、当協会において、ふき取り試験によるウイルス核酸断片の検出試験が実施可能であることが示唆された。

続いて、実試料として、ごみ調査を実際に行った作業用手袋のふき取り試験も行った。上記と同様の操作を行ったが、こちらは付着物が多かったため、緩衝液の量を 80 mL に増やし、洗浄後の液は低速度で遠心分離することで微粒子を取り除いた。回収率を算出したところ、76%であり、初めに行った検討試験よりも回収率が高かった。その理由として、試料の状態の違いが考えられる。検討試験の条件では、ウイルス塗布面を乾燥させたため、ウイルスが飛散した可能性が高い。一方、作業用手袋は乾燥させずにふき取りを行った。これらの差が回収率に現れたのだと考えられる。

今後の課題としては、物品表面からの単位面積当たりの検出下限値を算出することや、単位面積当たりの塗布ウイルス量、回収率、検出ウイルス量それぞれの相関を調べることで、検出の精度や本検出方法の特性について理解を深めることが挙げられる。

空気中からのウイルス核酸断片検出

様々なウイルスのうち、一部のウイルスについては飛沫核感染によって伝搬することが知られているが、飛沫核感染の詳細については不明な点が多い。その理由として、空気中に存在するウイルスを定量的に計測するこ

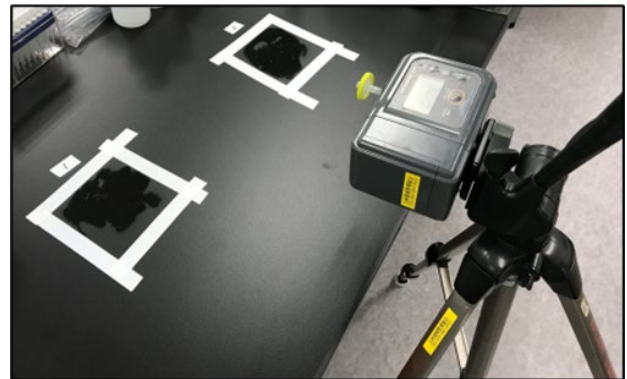
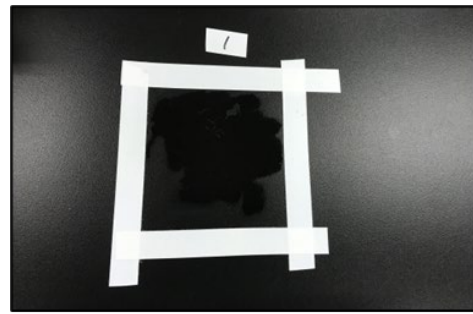


図 3 表面ふき取り試験(上)と空気捕集試験(下)

とが困難であること、さらに発症率につながる感染リスクとの相関が明確にされていないことが挙げられる¹⁵⁾。SARS-CoV-2 について、飛沫核感染の可能性は流行当初から指摘されており¹⁶⁾、コロナ禍になって 2 年が経過したことも相まって、空気中のウイルス捕集技術は飛躍的に発達してきた。ウイルスの捕集のための装置も開発されたため、今後は飛沫核感染について研究が急激に進行すると考えられる。

空間モニタリングの目的で空気中からウイルスの捕集を行う場合、空気中のウイルス濃度が低いことから、1回の分析で数千リットル(毎分 100 L で 60 分間など)の空気を吸引してウイルスの捕集を行う必要がある¹⁵⁾。当協会の設備と器具ではその規模での空気の捕集ができないため、次に示すように、ポンプの近くにウイルスが漂う可能性が高い条件で予備実験を試みた。

ウイルスが飛散しやすいと考えられるウイルス液塗り広げ箇所上方に小型ポンプを設置した(図 3)。ポンプの先端にポリプロピレン製のメンブレンフィルターユニット(0.2 μm, Agilent)を装着し、毎分 0.2 L の流量で 50 分間空気を吸引することでウイルスの捕集を試みた。通気終了後、通気と逆方向からリン酸緩衝液を 10 mL を 2 回通し、ウイルスの溶出を試みた。溶出された緩衝液を

PEG 沈殿法によって濃縮し, PCR 法によって PMMoV の検出を行ったが, 目的の核酸断片は検出されなかった. この実験で検出できなかった要因として, 空気の吸引量が少なかったこと, フィルターの径および材質が不適切であったことなどが考えられる.

安心安全のための検査として, 空気中ウイルス濃度のモニタリングという目的を考えると, 上記の予備試験のような少量ではなく大量に空気を吸引する必要がある. したがって, 空気中からのウイルス捕集について実施を検討するならば, 専用の設備を導入が必要であるだろう.

5. おわりに

本研究では, 当協会における PCR 検査体制の構築と PCR 検査の環境試料への応用について検討してきた. PCR 検査体制の構築および PCR 検査の環境試料への適用について, 課題はあるものの, 概ね体制を整えることができた. 世界のグローバル化は加速し, 人々は容易に国と国の間を行き来することができるようになった今, 再び未知の感染症が拡大する可能性は十分に考えられる. 現在の COVID-19 だけではなく, 未来のパンデミックに備えるという観点からでも, 当協会が PCR 検査体制が構築できたことは意義あることであったと考えている.

参考文献

- 1) 国立感染症研究所: コロナウイルスとは, NIID 国立感染症研究所 HP, (2021).
- 2) Vijgen L., et al.: Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event. *J. Virol.*, 79(3), 1595-604 (2005).
- 3) Fieding B. C.: A brief history of the coronavirus family – including one pandemic we might have missed. *The Conversation*, (2020).
- 4) Woo P. C. Y., et al.: Coronavirus Genomics and Bioinformatics Analysis. *Viruses*, 2(8), 1804-1820 (2010).
- 5) 国立感染症研究所 他: 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 病原体検査の指針 第 1 版, (2020).
- 6) 国立感染症研究所: 病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1, (2020).
- 7) Atkinson B. and Petersen E.: SARS-CoV-2 shedding and infectivity. *Lancet*, 395, 1339-1340 (2020).
- 8) Karimzadeh S., et al.: Review of infective dose, routes of transmission and outcome of COVID-19 caused by the SARS-COV-2: comparison with other respiratory viruses. *Epidemiology & Infection*, 149 (2021).
- 9) Platten M., et al.: SARS-CoV-2, CT-Values, and Infectivity—Conclusions to Be Drawn from Side Observations. *Viruses*, 13(8), 1459 (2021).
- 10) Randazzo W., et al.: SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Res.*, 181, 115942 (2020).
- 11) Haramoto E., et al.: First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan. *Sci. Total Environ.*, 737, 140405 (2020).
- 12) Jones D. L., et al.: Shedding of SARS-CoV-2 in feces and urine and its potential role in person-to-person transmission and the environment-based spread of COVID-19. *Sci. Total Environ.*, 749(20), 141364 (2020).
- 13) Zhu Y., et al.: COVID-19 case prediction via wastewater surveillance in a low prevalence urban community: A modeling approach. *J. Water Health*, 20(2), 459-470 (2022).
- 14) 日本水環境学会: 下水中の新型コロナウイルス遺伝子検出マニュアル. COVID-19 タスクフォース, (2021).
- 15) 成畑 他: 気中浮遊微生物としてのウイルスの計測における捕集技術の課題と目指すべき将来像. *エアロゾル研究*, 34(4), 219-225 (2019).
- 16) Van Doremalen N., et al.: Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N. Engl. J. Med.*, 382(16), 1564-1567 (2020).