

下水中の新型コロナウイルス遺伝子検出マニュアル
新技術マニュアル

(公社) 日本水環境学会 水中の健康関連微生物研究委員会

(公財) 日本下水道新技術機構

2023年6月

監修・執筆

(公社) 日本水環境学会 水中の健康関連微生物研究委員会

委員長 片山 浩之 (東京大学 大学院工学系研究科)

幹事長 原本 英司 (山梨大学 大学院総合研究部)

幹事 佐野 大輔 (東北大学 大学院工学研究科)

委員 大石 若菜 (東北大学 大学院工学研究科)

門屋 俊祐 (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)

黒板 智博 ((株) AdvanSentinel 研究開発部)

鳥居 将太郎 (東京大学 大学院工学系研究科)

西山 正晃 (山形大学 農学部)

渡部 徹 (山形大学 農学部)

協力 安藤 宏紀 (北海道大学 大学院工学院)

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. 1-step RT-qPCR 法による SARS-CoV-2 の検出手法.....	3
2.1 概説	3
2.2 必要な機材	3
2.3 試薬・器具類	4
2.4 手順	4
3. RT-Preamp-qPCR 法による SARS-CoV-2 の検出.....	6
3.1 概説	6
3.2 必要な機材	6
3.3 試薬・器具類	6
3.4 手順	6
3.4.1 標準試料の希釈.....	6
3.4.2 反応液の調製.....	7
3.4.3 Preamp 増幅反応.....	7
3.4.4 qPCR	7
4. EPISENS-S 法による SARS-CoV-2 の検出手法	8
4.1 概説	8
4.2 ペレットイングおよび RNA 抽出.....	8
4.2.1 必要な機材	8
4.2.2 試薬・器具等	8
4.2.3 手順.....	8
4.3 1 step RT-Preamp 増幅.....	9
4.3.1 必要な機材	9
4.3.2 試薬・器具等	9
4.3.3 手順.....	10
4.4 qPCR.....	11
5. EPISENS-M 法による SARS-CoV-2 の検出.....	12
5.1 概説	12
5.2 膜ろ過及び RNA 抽出.....	12
5.2.1 必要な機材	12
5.2.2 試薬・器具等	12

5.2.3 手順.....	13
6. COPMAN®法による SARS-CoV-2 の検出.....	14
6.1 概説.....	14
6.2 必要な機材.....	14
6.3 試薬・器具等.....	14
6.3.1 下水沈渣回収用・RNA 精製用キット試薬.....	14
6.3.2 RT 反应用試薬.....	15
6.3.3 Preamp 増幅反应用試薬.....	15
6.3.4 標準品.....	15
6.3.5 qPCR 用試薬.....	15
6.4 手順.....	16
6.4.1 下水試料の処理.....	16
6.4.2 核酸抽出.....	17
6.4.3 RT 反応.....	17
6.4.4 Preamp 増幅反応.....	18
6.4.5 qPCR.....	19
7. 1-step RT-qPCR 法を用いた SARS-CoV-2 変異株の検出.....	21
7.1 概説.....	21
7.2 必要な機材.....	21
7.3 試薬・器具類.....	21
7.4 手順.....	22

1. はじめに

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の世界的大流行 (パンデミック) を受けて 2020 年 5 月に (公社) 日本水環境学会内に設置された COVID-19 タスクフォース (TF)¹では、主要な活動方針の一つとして下水中の新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の検出手法の標準化を掲げ、(公財) 日本下水道新技術機構からの委託研究の支援により、2021 年 3 月に「下水中の新型コロナウイルス遺伝子検出マニュアル (TF マニュアル)」²を公表した。2021 年 9 月末での TF の活動終了後もマニュアルは参照されており、下水疫学調査の社会実装に向けて今後も活用されることが期待される。2022 年 2 月には英語に翻訳したマニュアル「Manual for Detection of SARS-CoV-2 RNA in Wastewater」³も公表している。

TF マニュアルに記載されている検出手法は、COVID-19 のパンデミック当初に SARS-CoV-2 を含むエンベロープウイルスに対して得られていた限定的な知見に基づいて選定されたものである。そのため、TF マニュアルの公表以降に新たに開発された検出手法と比較して検出感度や操作性が高くない場合があることや、当時は問題とはなっていなかった変異株の検出に対応していないこと等、今後の活用の際の課題も生じてきている。

本書は、TF マニュアル公表以降に開発された SARS-CoV-2 を高感度で検出可能な技術のうち、代表的なものを記載しており、TF マニュアルを補足する別冊に位置付けられるものである。本書に記載の検出手法を用いることで、従来は SARS-CoV-2 が検出できなかったような低濃度でウイルスを含む下水試料からも検出が可能となることも期待される。なお、ここで紹介する検出手法の導入に際しては、実際の下水試料を用いて、TF マニュアル記載の手法との検出感度を比較検討した上で導入することを推奨する。

本書では、表 1 に示す 6 種類の検出手法を紹介している。1-step RT-qPCR 法は、ウイルス RNA 抽出後の試料 (RNA 抽出液) に対して適用する手法であり、逆転写 (RT) 反応と定量 PCR (qPCR) の部分が TF マニュアルに記載の検出手法とは異なっている。RT-Preamplification-qPCR 法は、RT 反応後の試料 (cDNA 溶液) に対して前増幅 (Preamplification, Preamp) 反応を行った後に qPCR に供する手法である。EPISSENS-S 法、EPISSENS-M 法および COPMAN[®]法は、いずれも濃縮から qPCR までの全工程で独自の手法をとり入れたものである。これらの手法は、野生株と変異株を区別せずに SARS-CoV-2 を検出することを目的としているが、変異株の流行状況の把握を目的とし、変異株に特徴的に見られる変異箇所を検出が可能な手法として、変異検出用 1-step RT-qPCR 法を紹介している。

¹ (公社) 日本水環境学会 COVID-19 特設ページ <https://www.jswe.or.jp/aboutus/covid19.html>

² https://www.jswe.or.jp/aboutus/pdf/SARS-CoV-2_RNA_Detection_Manual_for_Wastewater.pdf

³ <https://www.jswe.or.jp/aboutus/pdf/Manual-for-Detection-of-SARS-CoV-2-RNA-in-Wastewater.pdf>

表 1 本書で紹介している新技術

検出手法	検出工程			
	濃縮	RNA 抽出	RT 反応	qPCR
1-step RT-qPCR 法	—	—	○	○
RT-Preamp-qPCR 法	—	—	—	○
EPISENS-S 法	○	○	○	○
EPISENS-M 法	○	○	○	○
COPMAN [®] 法	○	○	○	○
変異検出用 1-step RT-qPCR 法	—	—	○	○

○：TF マニュアル記載の手法と異なるものを使用

—：TF マニュアル記載の手法を使用可能

2. 1-step RT-qPCR 法による SARS-CoV-2 の検出手法

2.1 概説

下水中の SARS-CoV-2 の検出感度を向上させるためには、濃縮、RNA 抽出、RT および qPCR のすべての工程での技術開発が求められる。TF マニュアルでは、濃縮工程と RNA 抽出工程では複数の手法が記載されているものの、RT 反応と qPCR 工程では各 1 種類の手法しか示されておらず、改良の余地がある状況であった。

ここで紹介する「SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater」(タカラバイオ)⁴を用いた検出手法は、RT 反応と qPCR を同一チューブ内で連続して実施する 1-step 方式を採用しており、TF マニュアルに記載されている 2-step 方式と比較して、使用できるウイルス RNA 抽出液量が 4 倍となっている上、SARS-CoV-2 の 2 領域 (CDC N1 および CDC N2) を同一蛍光色素 (Cy5) で検出することから、高感度での SARS-CoV-2 の検出が可能である。また、2 種類のプロセスコントロール (トウガラシ微斑ウイルス (PMMoV)、φ6 ウイルス) をマルチプレックス 1-step RT-qPCR で同時に検出することができ、検出効率の評価を容易としている。

本手法は、TF マニュアルに記載の 2-step RT-qPCR では SARS-CoV-2 が検出されなかった試料 (下水由来ウイルス RNA 抽出液) から定量可能な濃度で SARS-CoV-2 を検出することを可能としている⁵。また、RT-qPCR に要する時間は 1 時間以内であり、4 時間程度を要していた従来の手法よりも大幅な時間短縮が可能である。本手法は、TF マニュアルに記載されている濃縮法と RNA 抽出法に加え、他の手法とも組み合わせて使用することが可能である。

2.2 必要な機材

- qPCR 装置 : Cy5, FAM, HEX (または VIC) の 3 種類を検出可能なフィルターを備えたもの。Thermal Cycler Dice® Real Time System IV with PC (タカラバイオ, 型番 TP1010), または, Thermal Cycler Dice® Real Time System III (Cy5) with PC (タカラバイオ, 型番 TP990) にオプションフィルターの Filter Unit Premium (HEX/VIC) for LED (タカラバイオ, 型番 TP704) を搭載したもの等。
- 卓上小型遠心機 : マイクロチューブ, 96 ウェルプレートまたは 8 連チューブをスピンドアウンできるもの。
- ボルテックスミキサー : ボルテックス・ジェニー2 (Scientific Industries) 等。
- マイクロピペット

⁴ https://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100009513

⁵ 原本英司 (2022) 下水中の新型コロナウイルス遺伝子の高感度検出キットの開発, 月刊下水道, 45 (1), 54-58.

2.3 試薬・器具類

- SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater (タカラバイオ, 型番 RC390A) : 以下に示す, マスターミックス, プライマー, プローブ, 陽性コントロール等の必要試薬をすべて含むオールインワンのキットである。
 - One Step RT-qPCR Mix (2×)
 - Primer/Probe SARS-CoV-2 (10×)
 - Primer/Probe PMMoV/φ6 (10×)
 - RNase Free H₂O
 - ROX Reference Dye II (50×)
 - EASY Dilution (for Real Time PCR)
 - Positive Control DNA (SARS-CoV-2) : 10⁶ コピー/μL
 - Positive Control DNA (PMMoV/φ6) : 10⁶ コピー/μL
- マイクロチューブ (容量 1.5mL または 2.0mL)
- 96 ウェルプレートまたは 8 連チューブ : 使用する qPCR 装置に対応したもの。

2.4 手順

1. TF マニュアルに記載されている濃縮法のいずれかを用いて下水中の SARS-CoV-2 を濃縮し, QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) 等によりウイルス RNA 抽出液を得る。なお, 濃縮法と RNA 抽出法のいずれにおいても, TF マニュアルに記載されていない手法あるいは操作条件を改良した記載手法について, TF マニュアルに記載されている手法と同等以上の検出効率が期待できる場合には使用しても良い。
2. EASY Dilution (for Real Time PCR) を用いて陽性コントロールを 10 倍段階希釈する。例えば, Positive Control DNA (SARS-CoV-2) の場合は 10⁴~10⁰ コピー/5μL の 5 段階, Positive Control DNA (PMMoV/φ6) の場合には 10⁵~10¹ コピー/5μL の 5 段階を作製する。
3. 表 2 にしたがって, SARS-CoV-2 および PMMoV/φ6 検出用の 1-step RT-qPCR 反応液をそれぞれ調整する。

表 2 1-step RT-qPCR 反応液の組成

試薬	添加量 (μL)
One Step RT-qPCR Mix (2×)	12.5
Primer/Probe SARS-CoV-2 (10×)	2.5
または Primer/Probe PMMoV&φ6 (10×)	
ROX Reference Dye II (50×) ※	0.5
RNase Free H ₂ O	4.5
計	20.0

※ ウェル間の蛍光シグナルを補正する qPCR 装置を用いる場合に添加する。
 添加しない場合には、RNase Free H₂O の液量を 5.0μL にする。

- 96 ウェルプレートまたは 8 連チューブに 1-step RT-qPCR 反応液 20.0μL を分注し、ウイルス RNA 抽出液、陽性コントロールまたは陰性コントロール (RNase Free H₂O) 5.0μL を添加して 25.0μL とする。ウイルス RNA 抽出液、陽性コントロールおよび陰性コントロール共に、基本的に 2 連もしくは 3 連で反応を行う。
- qPCR 装置にセットし、SARS-CoV-2 とプロセスコントロール (PMMoV/φ6) それぞれに対し、以下の RT-qPCR 反応を実行する。蛍光取得データの設定は、SARS-CoV-2 の場合は Cy5、PMMoV/φ6 の場合は FAM (PMMoV 検出用) と HEX (または VIC) (φ6 ウイルス検出用) とする。ROX Reference Dye 使用機種の場合は、ROX の蛍光データも取得する。なお、プロセスコントロールとして φ6 ウイルス (*Pseudomonas syringae* phage φ6 (製品評価技術基盤機構, 型番 NBRC 105899)) を添加していない場合には、HEX (または VIC) の蛍光データは取得する必要はない。

UNG 処理	25°C	10 min	45 cycles
RT 反応	52°C	5 min	
反応停止	95°C	10 sec	
熱変性	95°C	5 sec	
アニーリング/伸長反応	60°C	30 sec (Data collection)	

- ラン終了後、解析ソフトウェアを用いて Cy5, FAM, HEX (または VIC) それぞれに対して検量線を作成し、各反応チューブ中のコピー数を算出する。ウイルス濃縮液量や RT-qPCR に供した RNA 抽出液量等を勘案し、元の下水中のコピー濃度に換算する。φ6 ファージは回収率を算出し、1%以上であることを確認する。PMMoV は検出濃度を算出し、過去の測定値と大きな差異がないことを確認する。これらの確認後、SARS-CoV-2 の検出結果を判定する。

3. RT-Preamp-qPCR 法による SARS-CoV-2 の検出

3.1 概説

RT 酵素を用いてウイルス RNA を cDNA に逆転写した後に, cDNA の前増幅 (Preamp) を行う。10 サイクル程度の Preamp によってウイルス cDNA が増幅することから, 後段の qPCR における検出感度が大幅に向上する。RT-qPCR 用の希釈済み陽性コントロールおよびネガティブコントロールとして用いる RNase-free water も同時に前増幅を行う。ここでは, *TaKaRa Ex Taq*[®] Hot Start Version (タカラバイオ) を用いた試薬調製および反応条件について紹介する。RT までの工程は TF マニュアルに記載の手法を用いることが可能である。

3.2 必要な機材

- ・ サーマルサイクラー
- ・ 卓上小型遠心機
- ・ ボルテックスミキサー: ボルテックス・ジェニー2 (Scientific Industries) 等。
- ・ マイクロピペット

3.3 試薬・器具類

- ・ *TaKaRa Ex Taq*[®] Hot Start Version (タカラバイオ, 型番 RR006A)
- ・ RNase-free water
- ・ 陽性コントロール: 2019-nCoV_N_PositiveControl (IDT, 型番 10008625)
- ・ プライマー (+): nCOV_N1 Forward Primer Aliquot (IDT, 型番 10006830)
- ・ プライマー (-): nCOV_N1 Reverse Primer Aliquot (IDT, 型番 10006831)
- ・ TE バッファー
- ・ マイクロチューブ (容量 0.2mL, 1.5mL)

3.4 手順

3.4.1 標準試料の希釈

1. 標準試料を TE バッファーで希釈 (用時調製) する。2×10⁵ コピー/μL のストックから 10 倍希釈で 2×10⁰ コピー/μL まで希釈する。
2. 2×10⁴, 2×10³, 2×10², 2×10¹, 2×10⁰ の 5 つを 20μL ずつ陽性コントロールとして使用する。

3.4.2 反応液の調製

以下の表 3 にしたがって反応液を調整する。反応液を混合後、スピンドウンする。

表 3 Preamp 反応液の組成

試薬	添加量 (μL)
RNase-free water	16.75
10 x <i>Ex Taq</i> Buffer	5.0
dNTP Mixture	4.0
<i>TaKaRa Ex Taq</i> HS (5 U/μL)	0.25
Forward primer (10 μM)	2.0
Reverse primer (10 μM)	2.0
Template (cDNA 溶液, 陽性コントロールまたは RNase-free water)	20.0
計	50.0

3.4.3 Preamp 増幅反応

以下の条件で Preamp 増幅反応を行う。

94°C	2 min	10 cycles
94°C	30 sec	
55°C	30 sec	
72°C	1 min	
4°C	∞	

3.4.4 qPCR

TF マニュアル記載の手順にしたがい、qPCR を行う。Preamp 増幅反応を経て cDNA が十分に増えているため、通常は CDC N1 系のみを用いれば良い。

4. EPISENS-S 法による SARS-CoV-2 の検出手法

4.1 概説

EPISENS-S 法 (the **E**fficient and **P**ractical Virus **I**dentification **S**ystem with **E**Nhanced **S**ensitivity for **S**olid) は、下水中の固形物画分に存在するウイルスを高感度に検出する手法である⁶。下水中のコロナウイルスの大部分は固形物画分に存在しているため、EPISENS-S 法はコロナウイルスの検出に適した手法となっている。また、EPISENS-S 法では、SARS-CoV-2 だけでなくプロセスコントロールとして使用される PMMoV も同時に検出可能である。EPISENS-S 法においては、遠心分離で回収した 40mL の下水試料中の固形物(ペレット)全量から RNeasy PowerMicrobiome Kit(QIAGEN) を用いてウイルス RNA を回収する。得られたウイルス RNA 抽出液を 1-step RT-Preamp 増幅工程に供した後に、qPCR で下水中ウイルスコピー数濃度を定量する。この手法は、前処理および RNA 抽出キットの最適化と Preamp 工程の導入の組合せにより、TF マニュアル記載の検出方法よりも 100 倍以上高感度である⁶。加えて、EPISENS-S 法は、新たな高価な機材を必要とせず簡便な手法となっている。

4.2 ペレティングおよび RNA 抽出

4.2.1 必要な機材

- ・ 遠心機：使用する 50mL 遠心チューブを 10,000×g で遠心できるもの。
- ・ サーマルサイクラー
- ・ 卓上小型遠心機
- ・ ボルテックスミキサー：ボルテックス・ジェニー2 (Scientific Industries) 等。
- ・ マイクロピペット

4.2.2 試薬・器具等

- ・ 50mL 遠心チューブ：滅菌済みのもの。
- ・ RNeasy PowerMicrobiome Kit (QIAGEN)
- ・ βメルカプトエタノール (富士フイルム和光純薬)
- ・ マイクロチューブ (容量 1.5 mL)

4.2.3 手順

1. 空の 50mL チューブに試料を 40mL 分注する。
2. 室温、5,000×g で 10 分間遠心した後、上清を捨てペレットを回収する。

⁶ Ando, H., Iwamoto, R., Kobayashi, H., Okabe, S., Kitajima, M. (2022) The Efficient and Practical virus Identification System with ENhanced Sensitivity for Solids (EPISENS-S): A rapid and cost-effective SARS-CoV-2 RNA detection method for routine wastewater surveillance. *Science of the Total Environment*, 843, 157101. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.157101.

3. 55°Cに温めた PM1 650μL (RNeasy PowerMicrobiome Kit に付属) でペレットを懸濁し、全量を 2mL ビーズチューブ (RNeasy PowerMicrobiome Kit に付属) に移す。
4. ペレットと PM1 を含むビーズチューブに βメルカプトエタノール 6.5μL を加える。
5. Vortex を用いて 10 分間、最高速度でビーズビーティングをする。
6. 13,000×g で 1 分間遠心し、上清 450μL を回収する。
 ※ QIAcube (QIAGEN) を使用する場合、上清 450μL をローターチューブ (QIAGEN) に移し、RNeasy PowerMicrobiome Kit で RNA を抽出する。最終液量は 50μL に設定する (変更可能)。
7. 上清 450μL を 1.5mL チューブに移し、150μL IRS (RNeasy PowerMicrobiome Kit に付属) を加え、2~8°Cで 5 分間静置する。
8. 後段の工程は、RNeasy PowerMicrobiome Kit 付属のプロトコルに記載の工程 6 から実施し、RNA を抽出する。最終液量は 50μL とする (変更可能)。

4.3 1 step RT-Preamp 増幅

前項では、RT と Preamp 増幅反応を別個に行う手法を記載しているが、ここでは、iScript™ Explore One-Step RT and PreAmp Kit (Bio-Rad Laboratories) を用いて RT と Preamp 増幅反応を 1 ステップで実施する点に違いがある。

4.3.1 必要な機材

- ・ サーマルサイクラー
- ・ 卓上小型遠心機
- ・ ボルテックスミキサー：ボルテックス・ジェニー2 (Scientific Industries) 等。
- ・ マイクロピペット

4.3.2 試薬・器具等

- ・ iScript™ Explore One-Step RT and PreAmp Kit (Bio-Rad Laboratories)
- ・ RNase-free water
- ・ 陽性コントロール：2019-nCoV_N_PositiveControl (IDT, 型番 10008625)
- ・ SARS-CoV-2 プライマー (+)：nCOV_N1 Forward Primer Aliquot (IDT, 型番 10006830)
- ・ SARS-CoV-2 プライマー (-)：nCOV_N1 Reverse Primer Aliquot (IDT, 型番 10006831)
- ・ PMMoV プライマー (-)：5'-TTGTCGGTTGCAATGCAAGT-3'⁷
- ・ TE バッファー
- ・ マイクロチューブ (容量 0.2mL, 1.5mL)

⁷ Zhang, T., Breitbart, M., Lee, W. H., Run, J. Q., Wei, C. L., Soh, S. W., Hibberd, M. L., Liu, E. T., Rohwer, F., Ruan, Y. (2006) RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses, PLoS Biology, 4 (1), 0108–0118. doi: 10.1371/journal.pbio.0040003.

4.3.3 手順

ア) 標準試料の希釈

1. 標準試料を RNase free water で希釈（用時調製）する。2.5×10⁵ コピー/μL のストックから 10 倍希釈で 2.5×10⁰ コピー/μL まで希釈する。
2. 2.5×10⁴, 2.5×10³, 2.5×10², 2.5×10¹, 2.5×10⁰ コピー/μL の 5 つを 13.5μL ずつ陽性コントロールとして使用する。

イ) 反応液の調整

以下の表 4 および表 5 にしたがって、クリーンベンチ内で反応液を調整する。

表 4 Primer mix 反応液の組成

試薬	添加量 (μL)
RNase-free Water	35.0
CDC N1Forward primer (100 μM)	5.0
CDC N1Reverse primer (100 μM)	5.0
PMMoV Reverse primer (100 μM)	5.0
計	50.0

表 5 RT-Preamp 反応液の組成

試薬	添加量 (μL)
SsoAdvanced Preamp Supermix	15.0
iScript Explore Reaction Booster	0.6
iScript Advanced Reverse Transcriptase	0.6
Primer mix	0.3
Template (RNA 抽出液, 陽性コントロールまたは RNase-free water)	13.5
計	30.0

ウ) RT-Preamp 増幅反応

下記の条件で RT-Preamp 増幅反応を行う。

25°C	5 min	10 cycles
45°C	60 min	
95°C	15 sec	
55°C	4 min	
4°C	∞	

4.4 qPCR

1. RT-Preamp 産物を用いて、表 6 に示す反応液を調製する。

表 6 qPCR 反応液の組成

試薬	添加量 (μL)
2× Master mix	12.5
Forward primer (10 μM)	1.0
Reverse primer (10 μM)	1.0
Probe (10 μM)	0.75
H ₂ O	7.25
Template (cDNA)	2.5
計	25.0

2. 96 well プレーートのウェルに 22.5μL ずつ反応液を入れる。
3. 前増幅サンプルおよび陽性/陰性コントロールを 2.5μL ずつ添加する。陰性コントロールのウェルには H₂O を 2.5μL 添加する。
4. 以下に示す反応条件を設定して、PCR 反応を開始する。以下の条件は、試薬に QuantiTect® Probe PCR Kit (QIAGEN), リアルタイム PCR 装置に Applied Biosystems 7500 または 7500 Fast リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific) を使用する場合の反応条件である。

50°C	2 min	45 cycles
95°C	10 min	
95°C	3 sec	
55°C	30 sec (Data collection)	
4°C	∞	

5. EPISENS-M 法による SARS-CoV-2 の検出

5.1 概説

EPISENS-M 法 (the **E**fficient and **P**ractical Virus **I**dentification **S**ystem with **E**nanced **S**ensitivity for **M**embrane) は、下水中の固形物画分および水面分に存在するウイルスを高感度に検出する手法である⁸。EPISENS-M 法においては、下水試料を陰電荷膜でろ過し、その膜から直接ウイルス RNA を抽出する。その後、EPISENS-S 法と同様に、1-step RT-Preamp を実施した後に、qPCR で下水中ウイルスコピー数濃度を定量する。EPISENS-M 法は、10 万人あたり 1 人報告感染者が存在する感染レベルでも下水中からウイルスを検出可能な世界最高感度な検出法である⁸。また、流入下水だけでなく、固形物画分が少なく EPISENS-S 法が適用できない処理水や環境水にも適用可能である。

5.2 膜ろ過及び RNA 抽出

5.2.1 必要な機材

- ・ 減圧ろ過用フィルターホルダー
- ・ アスピレーター
- ・ 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。
- ・ 遠心機チューブアダプター：5mL チューブを遠心できるもの。
- ・ Precellys 24 tissue homogenizer (Bertin Technologies)
- ・ サーマルサイクラー
- ・ 卓上小型遠心機
- ・ ボルテックスミキサー：ボルテックス・ジェニー2 (Scientific Industries) 等。
- ・ マイクロピペット

5.2.2 試薬・器具等

- ・ 陰電荷膜 (孔径 0.8µm, 直径 90mm, Merck Millipore, 型番 AAWP09000)
- ・ 塩化マグネシウム (MgCl₂, 富士フイルム和光純薬)
- ・ RNeasy PowerWater Kit (QIAGEN)
- ・ TRIzol Reagent (Life Technologies)
- ・ βメルカプトエタノール (富士フイルム和光純薬)
- ・ Precellys 用キャップ (Empty 15 mL tubes and caps, 型番 P000946-LYSK0-A.0)
- ・ ピンセット
- ・ ハサミ

⁸ Ando, H., Murakami, M., Ahmed, W., Iwamoto, R., Okabe, S., Kitajima, M. (2023) Wastewater-based prediction of COVID-19 cases using a highly sensitive SARS-CoV-2 RNA detection method combined with mathematical modeling, *Environment International*, 173, 107743. doi: 10.1016/j.envint.2023.107743.

- ・ マイクロチューブ（容量 1.5mL）

5.2.3 手順

1. 下水試料に塩化マグネシウムを終濃度 25mM になるように添加する。
2. 流入下水 300mL を陰電荷膜でろ過する。
3. 膜をハサミで 1/4 にカットし, その 1/4 に切った膜を 5mL ビーズチューブ (RNeasy PowerWater Kit に付属) に移し入れる。
4. 55°C に温めた PM1 850 μ L (RNeasy PowerWater Kit に付属), TRIzol Reagent 150 μ L, β メルカプトエタノール 10 μ L をビーズチューブに添加する。
5. 10,000 $\times g$, 20 秒間を 3 セットの条件で Precellys を用いてビーズビーティングをする。
 - ※ Precellys でのビーズビーティング工程における上からの圧力で, ビーズチューブの蓋が破損し, 液体が流出する恐れがある。そのため, ビーズチューブに Precellys 用のキャップを被せる (写真 1)。

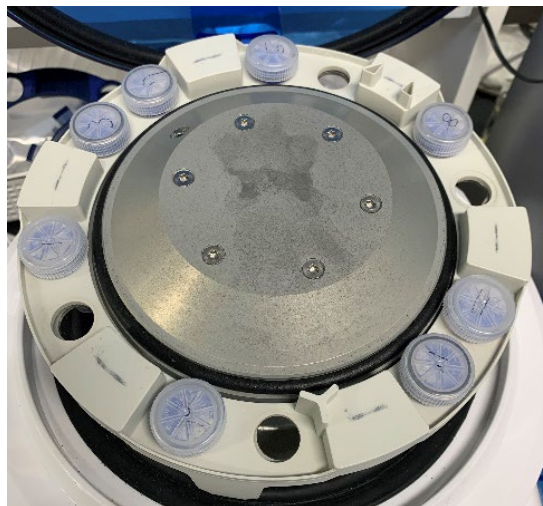


写真 1 Precellys の実施の様子

6. 13,000 $\times g$ で 3 分間遠心し, 上清 450 μ L を回収する。
7. 以降の抽出工程, 1-step RT-Preamp 増幅および qPCR は, EPISENS-S 法と同様のため省略する。

6. COPMAN[®]法による SARS-CoV-2 の検出

6.1 概説

COPMAN 法 (Coagulation and Proteolysis method using Magnetic beads for detection of Nucleic acids in wastewater) は、凝集剤を用いることにより、液相・固相の両画分に含まれるウイルスを回収することが可能な高感度なウイルス検出手法である。

COPMAN 法では、10mL の下水試料から凝集剤を用いてウイルスを濃縮し、COPMAN viral RNA extraction kit for wastewater (AdvanSentinel) を用いてウイルス RNA を精製する。得られた RNA に対し、Preamp 工程を含む qPCR によって下水中のウイルスコピー数を定量する。

この手法は、遠心操作工程を減らし、核酸精製に磁性ビーズを用いることにより、汎用自動機器を用いた高スループットな精製が可能である。TF マニュアル記載の検出方法と比較し、検出が困難であった下水試料からもウイルス検出可能な手法であることに加え、核酸抽出工程では時間短縮が期待できる手法となっている⁹。

6.2 必要な機材

以下の実験機器を使用する。ただし、同等の性能を有する他の機器を使用してもよい。

- ・ マイクロピペット
- ・ スイングローター式遠心機 (KUBOTA, 型番 5922)
- ・ ブロックインキュベーター: MiniT-C (ワケンビーテック)
- ・ マグネティックラック (多摩川精機, 型番 TA4899N12)
- ・ ボルテックスミキサー: ボルテックス・ジェニー2 (Scientific Industries) 等。
- ・ 微量遠心機: MX-301 (TOMY)
- ・ サーマルサイクラー: VeritiPro (Thermo Fisher Scientific)
- ・ qPCR 装置: QuantStudio3 (Thermo Fisher Scientific)
- ・ (オプション) 超微量分光光度計: Nanodrop ND2000 (Thermo Fisher Scientific)

6.3 試薬・器具等

6.3.1 下水沈渣回収用・RNA 精製用キット試薬

- ・ 1mol/L (±) -ジチオトレイトール溶液 (1MDTT) (富士フィルム和光純薬, 型番 044-33871)
- ・ フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール 25:24:1, 核酸抽出用 (PCI) (ナカライテスク, 型番 26058-96 等)
- ・ 99.5%エタノール (ナカライテスク等)
- ・ Nuclease-free water (Thermo Fisher Scientific 等)

⁹ Katayama, Y. A., Hayase, S., Ando, Y., Kuroita, T., Okada, K., Iwamoto, R., Yanagimoto, T., Kitajima, M., Masago, Y. (2023) COPMAN: A novel high-throughput and highly sensitive method to detect viral nucleic acids including SARS-CoV-2 RNA in wastewater. *Science of the Total Environment*, 856, 158966. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.158966.

- COPMAN®下水中ウイルス RNA 抽出キット (COPMAN® viral RNA extraction kit for wastewater) (AdvanSentinel, 型番 241-21500-91)
 - 試薬 1 : 前処理剤 (Pretreatment Reagent)
 - 試薬 2 : 緩衝液 (Lysis Buffer)
 - 試薬 3 : 添加剤 (Proteinase)
 - 試薬 4 : 磁性ビーズ (Magnetic Beads)

6.3.2 RT 反应用試薬

- nCOV-N1 Rv Primer 100 μM : 5'-TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG-3' (IDT, 型番 10006831)
- PMMoV Rv Primer 100 μM : 5'-TTGTCGGTTGCAATGCAAGT-3' (IDT) ¹⁰
- Reliance Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, 型番 12012801)
 - 5× Reliance Select cDNA Synthesis Reaction Buffer
 - Reliance Reverse Transcriptase
- Nuclease-free water (Thermo Fisher Scientific 等)

6.3.3 Preamp 増幅反应用試薬

- nCOV-N1 Fw Primer 100 μM : 5'-GACCCCAAATCAGCGAAAT-3' (IDT, 型番 10006830)
- nCOV-N1 Rv Primer 100 μM : 5'-TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG-3' (IDT, 型番 10006831)
- BIOTAQ HS (Bioline, 型番 BIO-21047)
 - 10× ImmoBuffer
 - 10 mM dNTP Mix
 - 50 mM MgCl₂
 - Biotaq HS DNA Pol
- Nuclease-free water (Thermo Fisher Scientific 等)

6.3.4 標準品

- nCOV-N1 プラスミド DNA (Eurofins, 型番 5004-CDC001 等)
- PMMoV プラスミド DNA : 以下の配列を含むカスタムプラスミド

5'-GAGTGGTTTGACCTTAACGTTTGAGAGGCCTACCGAAGCAAATGTCGCACTT
GCATTGCAACCGACAA-3'

6.3.5 qPCR 用試薬

- Environmental master mix 2.0 (Applied Biosystems, 型番 4396838)

¹⁰ Zhang, T., Breitbart, M., Lee, W. H., Run, J. Q., Wei, C. L., Soh, S. W., Hibberd, M. L., Liu, E. T., Rohwer, F., Ruan, Y. (2006) RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses, PLoS Biology, 4 (1), 0108–0118. doi: 10.1371/journal.pbio.0040003.

- Fw primer (10 μ M) (IDT)
 - nCOV-N1 : 5'-GACCCCAAATCAGCGAAAT-3' (IDT, 型番 10006830)
 - PMMoV : 5'-GAGTGGTTTGACCTTAACGTTTGA-3'
- Rv primer (10 μ M) (IDT)
 - nCOV-N1 : 5'-TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG-3' (IDT, 型番 10006831)
 - PMMoV : 5'-TTGTCGGTTGCAATGCAAGT-3'
- Probe (10 μ M)
 - nCOV-N1 : FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ1 (IDT, 型番 10006832)
 - PMMoV : FAM-CCTACCGAAGCAAATG-NFQ-MGB (Applied Biosystems)
- Nuclease-free water (Thermo Fisher Scientific 等)

6.4 手順

6.4.1 下水試料の処理

「下水試料の処理」および「核酸抽出」の工程は、COPMAN®下水中ウイルス RNA 抽出キット (AdvanSentinel, 型番 241-21500-91) の取扱説明書に準じて行う。

1. 下水を凍結保存していた場合、融解し、数回転倒混和してから使用する。
2. 融解後、懸濁し均一となった未処理下水 10mL を 15mL 遠心管に入れる。
3. 手順 2 の下水試料に COPMAN キットの前処理剤 (試薬 1) を 1 μ L 添加し、約 30 回激しく振って攪拌する。
4. 室温で 10 分間インキュベートする。
5. 手順 4 の下水サンプルをスイングローター式遠心機にて 3,000 \times g, 10 分間, 4 $^{\circ}$ C で遠心分離する。アングル式の場合は, 8,000 \times g, 10 分間, 4 $^{\circ}$ C で遠心分離する。
6. 上清をデカンテーションで廃棄する。
7. スイングローター式遠心機にて 3,000 \times g, 3 分間, 4 $^{\circ}$ C で遠心分離する。アングル式の場合は, 8,000 \times g, 3 分間, 4 $^{\circ}$ C で遠心分離する。
8. 残った僅かな上清をマイクロピペットで廃棄する。
9. COPMAN キットの緩衝液 (試薬 2) を 37~45 $^{\circ}$ C に加温して析出物を溶解し室温に戻す。この溶液に DTT が終濃度 2mM になるよう 1M DTT を添加し (250 μ L の試薬 2 に対して 1M DTT 0.5 μ L の割合), Lysis buffer とする。調製した Lysis buffer は当日中に使い切る。
10. Lysis buffer 250 μ L を手順 8 の沈渣に加えて, P1000 ワイドボアチップ (あるいはチップ先端を滅菌済のはさみ等で切った先切りチップでも良い) を用いて, 数回ピペッティングしながら沈渣を崩し, 1.5mL チューブに沈渣を Lysis buffer ごと移す。
11. COPMAN キットの添加剤 (試薬 3) 14.25 μ L を沈渣に添加し, 10 回程度なるべく泡立てないようにピペッティング, または, ボルテックスで 4 回 (各 2 秒間) 混合する。
12. ブロックインキュベーターにて 56 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱した後, 室温で 3 分間静置する。
13. 安全キャビネット内で PCI を 550 μ L 加えて 15 秒間ずつ 4 回ボルテックス (振動強度最大)

後、1 分間静置する。

14. 微量遠心機にて室温 19,000×g で 10 分間遠心し、水層（PCI 抽出水層）200～300μL 前後を取得し、新しい 1.5 mL DNA LoBind チューブに移し替える。水層を回収する際、蛋白質成分を含む中間層と底のフェノール層が混入しないように注意する。当日中に以降のステップで使用しなかった水層は-80°C で保存する。

6.4.2 核酸抽出

1. COPMAN キットの試薬 4（以降、磁気ビーズと略記する）のボトルを 30 秒間ボルテックスする。
2. 99.5%以上のエタノールと Nuclease-free water を 7:3 の容量比で混合し、70%エタノール(EtOH)を調製する。調製した 70% EtOH は当日中に使い切る。
3. 取得した PCI 抽出水層 100μL を新しい 1.5 mL DNA LoBind チューブへ分注する。
4. 180μL の磁気ビーズを PCI 抽出水層に加える。
5. チップ先でかきまぜながら 15 回ピペッティングする。
※ 添加時に白濁が出現するが、ピペッティングにより一様な溶液になる。
6. 室温で 5 分間静置する。
7. 上記のチューブをマグネティックラックにセットし、磁気ビーズが完全に吸着するまで室温で 5～10 分間静置する。
8. 上清を除去する。上清は白濁することがあるが、磁気ビーズが浮いていなければそのまま廃棄して良い。70% EtOH を 500μL 加えて 30 秒間以上静置し、上清を廃棄する。
9. 手順 8 をさらに 4 回繰り返す（Wash は合計 5 回となる）。
10. ピペットにて上清を完全に捨て、蓋を開けて約 10 分間室温で静置し乾燥させる。
※ 長時間放置してひび割れが起きたら乾燥しすぎとなるので注意する。
11. マグネティックラックから離し、磁気ビーズの上から Nuclease-free water 30μL を加え、10 回のピペッティングにより磁気ビーズを懸濁し、3 分間室温静置する。
12. マグネティックラックにチューブをセットして 5 分間静置し、完全に磁気ビーズを集める。
13. 核酸を含む上清（下水由来核酸）を 25μL 回収する。その際、磁気ビーズを吸わないように注意する。RT 反応を実施しない場合は、この時点で-70°C 以下に保存する。
14. (オプション) 超微量分光光度計で、回収した上清の核酸濃度を測定する。

6.4.3 RT 反応

1. 1.5 mL チューブに Nuclease-free water を 48.0μL とり、100 μM nCOV-N1 Rv Primer および 100 μM PMMoV Rv Primer をそれぞれ 1.0μL ずつ添加してよく混合し、遠心して N1_Rv & PMMoV_Rv primer mix（各 2μM）を調製する（計 50.0μL、約 48 反応分を用時調製）。
2. 表 7 に記載の各試薬を氷上で融解し、酵素はタッピング、他の試薬はボルテックスで混合し、遠心する。使用するまで氷上に置く。

3. 以下の表 7 に従って反応液（計 20.0 μ L）を調製し、ピペッティングにて混合し、スピンドウンする。

表 7 RT 反応液の組成

試薬	添加量 (μ L)	終濃度
5x Reliance Select cDNA Synthesis Reaction Buffer	4.0	1x
Reliance Reverse transcriptase	1.0	—
N1_Rv & PMMoV_Rv primer mix	1.0	各 0.1 μ M
下水由来核酸	4.0 [※]	—
Nuclease-free water	10.0	—
計	20.0	

※ 添加する核酸量は 1 μ g を目安とし、添加量を 1~14 μ L の範囲で変更することができる。合計 20 μ L となるように、Nuclease-free water を調整する。

4. サーマルサイクラーで以下の RT 反応を実施する。RT 反応産物（cDNA 溶液）は-80 $^{\circ}$ C で保存が可能である。

50 $^{\circ}$ C 60 min
 95 $^{\circ}$ C 1 min
 4 $^{\circ}$ C ∞

6.4.4 Preamp 増幅反応

1. 1.5mL チューブに Nuclease-free water を 9.0 μ L とり、100 μ M nCOV-N1 Fw Primer および 100 μ M nCOV-N1 Rv Primer をそれぞれ 3.0 μ L ずつ添加してよく混合し、遠心して N1_Fw & N1_Rv primer mix (各 20 μ M) を調製する（計 15.0 μ L、約 48 反応分を用時調製）。

※ PMMoV は試料中に多量に存在するため、RT のみを行い、Preamp 増幅は行わない。

2. (オプション) 検量線を作成する場合は、標準品プラスミド溶液を調製する。
 3. 表 8 に記載の各試薬を氷上で融解し、酵素はタッピング、他の試薬はボルテックスで軽く混合し、スピンドウンする。使用するまで氷上に置く。
 4. 以下の表 8 にしたがって増幅反应用 mix を調製する。増幅反應用 mix は使用当日に調製する。

表 8 増幅反応用 mix の組成

試薬	添加比率 (10 反応分) (μL)	反応用試薬 終濃度	反応液 終濃度
10× ImmoBuffer	30.0	3×	1×
10 mM dNTP Mix	6.0	0.6mM	0.2mM
50 mM MgCl ₂	12.0	6mM	2mM
Biotaq HS DNA Pol	7.0	—	—
N1 Fw & Rv primer mix (各 20μM)	4.5	各 0.9μM	各 0.3μM
Nuclease-free water	40.5	—	—

- 前項「RT 反応」で調製した cDNA 溶液 20.0μL の反応チューブもしくは標準品プラスミド溶液 20.0μL に増幅反応用 mix 10.0μL をピペットで直接添加し、合計 30.0μL の反応液とする。
※ 連続分注器等は添加時にコンタミネーションのリスクがあるため使用せず、ピペットを用いて注意して添加する。
- 反応液を静かにピペッティングにて混合し、必要に応じて軽く遠心する。
- サーマルサイクラーで以下の Preamp 増幅反応を実施する。Preamp 増幅反応産物は-80°C で保存可能である。

95°C	10 min	10 cycles
95°C	15 sec	
55°C	15 sec	
72°C	30 sec	
4°C	∞	

6.4.5 qPCR

- 表 9 に記載の各試薬を氷上で融解し、酵素 mix はタッピング、他の試薬はボルテックスで軽く混合し、軽く遠心する。使用するまで氷上に置く。
- 以下の表 9 にしたがって qPCR 試薬 mix を必要量調製し、qPCR 用 96 well プレート等に 17.5μL ずつ必要数分注する。

表 9 qPCR 反応液の組成

試薬	添加比率 (10 反応分) (μL)
Environmental master mix 2.0 (2x)	100.0
Fw primer (10 μM)	10.0
Rv primer (10 μM)	10.0
Probe (10 μM)	7.5
Nuclease-free water	47.5
計	175.0

- ※ PreAmp 産物によるコンタミネーションに十分気を付ける。
- ※ SARS-Cov-2 と PMMoV は別々のウェルで qPCR を実施するため、プライマーとプローブの組み合わせは間違えないようにする。

3. 前項「Preamp 増幅反応」で調製した Preamp 産物 2.5μL を添加し、ピペッティングにて静かに混合した後、遠心する。
4. QuantStudio3 等を用いて qPCR を実施する (計 20.0μL)。SARS-CoV-2 と PMMoV を別々のウェルで検出する系となっている。

95°C	10 min	45 cycles
95°C	15 sec	
60°C	30 sec (Data collection)	

7. 1-step RT-qPCR 法を用いた SARS-CoV-2 変異株の検出

7.1 概説

下水疫学調査の活用方法の一つとして、SARS-CoV-2 の変異株の流行状況の把握が挙げられる。変異株の同定には、変異が生じているスパイクタンパク質領域の塩基配列を解析する必要があり、下水中には複数の変異株が含まれることから、次世代シーケンス（NGS）解析を用いることが一般的であるが、解析に時間を要するという課題もある。

ここでは、簡便かつ迅速に SARS-CoV-2 変異株の存在状況を把握するための手法として、変異株に特徴的に見られる変異箇所を RT-qPCR を用いて検出する技術を紹介する。本手法を用いることで、第 4 波期間中（2021 年 5 月～6 月）には当時流行していたアルファ株が有する N501Y 変異が下水中から検出されていたのに対し、第 5 波（2021 年 7 月～9 月）ではデルタ株が主に有する変異（L452R 変異，T478K 変異），第 6 波以降（2022 年 1 月～）では主にオミクロン株が有する変異（G339D 変異，E484A 変異）へと優占する変異株が置き換わる様子が捉えられている¹¹。

変異箇所を RT-qPCR で検出する際の留意点として、SARS-CoV-2 は頻繁に新たな変異が生じているため、増幅領域内の変異によってプライマーやプローブの反応効率が低下し、以前は有効であった qPCR 系が使用できなくなる可能性のあることが挙げられる。そのため、qPCR 系の使用に際しては、使用している qPCR 系の有効性について最新の情報を確認しておく必要がある。実際に、ここで紹介している G339D 変異を対象とした qPCR 系は、オミクロン株を広く増幅可能な系であるが、一部の系統は増幅できないことが報告されている¹²。

7.2 必要な機材

- qPCR 装置：Cy5 と FAM の 2 種類を検出可能なフィルターを備えたもの。Thermal Cycler Dice[®] Real Time System IV with PC（タカラバイオ，型番 TP1010），Thermal Cycler Dice[®] Real Time System III (Cy5) with PC（タカラバイオ，型番 TP990）等。
- 卓上小型遠心機：マイクロチューブ，96 ウェルプレートまたは 8 連チューブをスピンドアウンできるもの。
- ボルテックスミキサー：ボルテックス・ジェニー2（Scientific Industries）等。
- マイクロピペット：

7.3 試薬・器具類

- One Step PrimeScript[™] III RT-qPCR Mix, with UNG（タカラバイオ，型番 RR601A または RR601B）
- Primer/Probe G339D (SARS-CoV-2)（タカラバイオ，型番 RC323A）：G339D 変異を有する SARS-CoV-2 配列を Cy5，G339D 変異を有さない SARS-CoV-2 配列を FAM でマルチプレックス検出

¹¹ 原本英司（2022）下水中の新型コロナウイルス遺伝子の高感度検出キットの開発，月刊下水道，45（1），54-58.

¹² https://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100009522

するためのプライマーとプローブを 10 倍濃度で含む試薬。

- Positive Control RNA Set (Omicron) (タカラバイオ, 型番 RC379A) : オミクロン株のスパイクタンパク質遺伝子の全長を有する合成 RNA。
 - Negative Control : 陰性コントロールとして使用。
 - Positive Control RNA (wild) : 10^7 コピー/ μL
 - Positive Control RNA (Omicron) : 10^7 コピー/ μL
 - EASY Dilution (for Real Time PCR)
- マイクロチューブ (容量 1.5mL または 2.0mL)
- 96 ウェルプレートまたは 8 連チューブ : 使用する qPCR 装置に対応したもの。

7.4 手順

1. 「2. 1-step RT-qPCR 法による SARS-CoV-2 の検出手法」と同様に, 下水中の SARS-CoV-2 を濃縮して RNA 抽出を行い, ウイルス RNA 抽出液を得る。
2. EASY Dilution (for Real Time PCR) を用い, Positive Control RNA (wild) と Positive Control RNA (Omicron) を等量ずつ含む陽性コントロールの 10 倍段階希釈 (例 : 各 $10^5 \sim 10^0$ コピー/ $5\mu\text{L}$ の 6 段階) を作製する。例えば, EASY Dilution (for Real Time PCR) $48\mu\text{L}$ と 2 種類の Positive Control RNA $1\mu\text{L}$ ずつを混合して各 10^6 コピー/ $5\mu\text{L}$ の濃度の陽性コントロールを作製した後, 10 倍段階希釈を行う。
3. 表 10 にしたがって G339D 変異検出用 1-step RT-qPCR 反応液を調整する。

※ One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix, with UNG に代えて, SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater (タカラバイオ, 型番 RC390A) に付属の One Step RT-qPCR Mix を用いることも可能である。その際の One Step RT-qPCR Mix の添加量は One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix, with UNG と同じ (1 反応あたり $12.5\mu\text{L}$) で良い。

表 10 G339D 変異検出用 1-step RT-qPCR 反応液の組成

試薬	添加量 (μL)
One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix, with UNG (2×)	12.5
Primer/Probe G339D (SARS-CoV-2) (10×)	2.5
ROX Reference Dye または ROX Reference Dye II (50×) ※	0.5
RNase Free H ₂ O	4.5
計	20.0

※ ウェル間の蛍光シグナルを補正する qPCR 装置を用いる場合に添加する。添加しない場合には, RNase Free H₂O の液量を $5.0\mu\text{L}$ にする。

4. 96 ウェルプレートまたは 8 連チューブに G339D 変異検出用 1-step RT-qPCR 反応液 20.0 μ L を分注し，ウイルス RNA 抽出液，陽性コントロールまたは陰性コントロール（Negative Control または RNase Free H₂O）5.0 μ L を添加して 25.0 μ L とする。ウイルス RNA 抽出液，陽性コントロールおよび陰性コントロール共に，基本的に 2 連もしくは 3 連で反応を行う。
5. qPCR 装置にセットし，以下の RT-qPCR 反応を実行する。蛍光取得データの設定は，Cy5（G339D 変異検出用）と FAM（G339D 変異以外の検出用）とする。ROX Reference Dye 使用機種の場合は，ROX の蛍光データも取得する。

UNG 処理	25°C	10 min	
RT 反応	52°C	5 min	
反応停止	95°C	10 sec	
熱変性	95°C	5 sec	
アニーリング/伸長反応	60°C	30 sec (Data collection)	45 cycles

6. ラン終了後，解析ソフトウェアを用いて Cy5 と FAM それぞれに対して検量線を作成し，各反応チューブ中のコピー数を算出する。ウイルス濃縮液量や RT-qPCR に供した RNA 抽出液量等を勘案し，元の下水中のコピー濃度に換算する。原理的には，Cy5 で得られたコピー数と FAM で得られたコピー数を足し合わせたものが SARS-CoV-2 のコピー数となるが，「2. 1-step RT-qPCR 法による SARS-CoV-2 の検出手法」に記載の手法よりも検出感度が低いこと等により，その結果と必ずしも一致するとは限らない。