

ヒトオルソニューモウイルス  
(RS ウイルス)  
病原体検出マニュアル 2.0 版  
令和2年6月12日

ヒトオルソニューモウイルスは *Pneumovirus* 科 *Orthopneumovirus* 属に分類される ssRNA ウィルスであり、RS ウィルス (Respiratory syncytial virus, RSV) と呼ばれる。世界中に広く分布しており、症状は軽症の感冒様症状から下部気道感染にいたるまで様々で、成人になってからも容易に再感染を起こす。特に、生後 8 週から 30 週齢の乳幼児が感染すると最も重症化しやすく、ウィルス性下気道炎 (気管支炎・肺炎) で入院する幼児の 70% が RSV 感染によると推定されている。また、老人や骨髄移植などで免疫抑制がなされている患者等でも重症化し、院内感染や家庭内感染の防止が重要とされている。しかしながら、かつて 1960 年代に行われたホルマリン不活化ワクチンの治験では、ワクチン接種群が未接種群に比べ、呼吸器症状が悪化したためワクチン開発が中止された経緯がある。現存する唯一の RS ウィルス感染予防薬として、ヒト化モノクローナル抗体の Palivizumab が商品化されて予防的投与に用いられているが、月一回の筋肉注射を半年近く接種し続ける必要がある。

2020 年時点で、承認されたワクチンはまだない。しかし NovaVax 社のナノパーティクルワクチン (ResVax) が第 3 層臨床試験中であり、世界保健機関 (WHO) ではその承認を見越してグローバルサーベイランスを立ち上げようとしている。

WHO のグローバルサーベイランスでは全年齢層を対象として、重症呼吸器感染症、インフルエンザ様疾患といった症例定義における RS ウィルス感染症の割合の算出が要求されている。国内では五類感染症として、小児科定点 (約 3000 定点) でサーベイランスが行われている。定点サーベイランスは、流行動向の把握には有用であるが、検査数の分母がないために WHO の要求するサーベイランスに対応していない。また、日本国内では主に迅速抗原検出キットによる臨床診断が一般的であるが、抗原検出キットは感度と特異度は、他法 (PCR 法など) に比し低い。さらに、成人では鼻腔あるいは咽頭ぬぐい液に含まれるウィルス量の不足により、偽陰性の頻度が高くなる可能性もある。よって、抗原検出キットは、全年齢層を対象とするグローバルサーベイランスでは使用が認められていない。現在では、このような背景から、グローバルサーベイランスでは、米国 CDC の開発したリアルタイム RT-PCR 法 (qPCR) が採用されている (PLoS One 2010;5:e15098)。本マニュアルでは、米国 CDC 法を基盤とした qPCR による RSV 遺伝子検出法について記載する。

## 【操作法】

### 1. 検体の採取と保存

対象の年齢によって採取検体が異なる。鼻腔あるいは咽頭ぬぐい液は、ウィルス輸送液等

に保存する。可能な限りナイロンのフロックスワブを用いる。PCR を阻害する可能性のある綿棒やアルギン酸カルシウムスワブは用いない。

1) 乳幼児および低年齢小児

中鼻甲介から採取した鼻咽頭ぬぐい液あるいは鼻腔ぬぐい液を用いる。もしくは鼻咽頭吸引液を用いる。

2) 年長児、青年および成人

鼻咽頭ぬぐい液あるいは鼻腔ぬぐい液を同じチューブに集めたものを用いる。

3) 高齢者

喀痰を用いてもよい。別添「喀痰処理法(抜粋)」を参照のこと

検査材料は採取容器から内容物が漏出しないよう適切な包装をした後、非凍結状態(4~8°C)での保持が望ましい。48 時間以内に検査が出来ないようであれば-70°C以下で検査依頼機関へ送付する。検査材料には必要事項(個体識別等)を明記するとともに、検査材料送付リストを添付する。検査材料を受理した後、直ちに検査が実施されることが望ましいが、出来ない場合は-70°C以下で保存する。

## 2. RNA の抽出

本マニュアルにおいては、QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いた方法を示すが、他のウイルス RNA 抽出キットを用いてもよい。

### 2.1. 材料、機器、器具および試薬

1) 機器・器具

冷却遠心機、1.5 ml エッペンドルフチューブ用高速冷却遠心機、1.5 ml エッペンドルフチューブ用卓上遠心機、ボルテックスミキサーならびに各チューブ。

2) 試薬

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN、Cat.No.52904)、エタノール、Distilled water (Deionized, Sterile, autoclaved, DNase free, RNase free、和光純薬工業、Cat No. 318-90105 など(以下 DDW)ならびに陽性コントロール RNA。

### 2.2. 操作上の注意

1) 検体の取り扱いは、バイオセーフティーレベル(BSL2)でおこなう。BSL2 実験施設内の安全キャビネット内で取り扱う。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。

2) 実験室内遺伝子コンタミネーション防止と RNase の混入防止に細心の注意を払う。コンタミネーション防止には、試薬調製場所と PCR 産物などサンプルを扱う場所を物理的に分けることが望ましい。できない場合は、それぞれの操作を別々のキャビネット内で行

う。また、試薬などの混合は、タッピングならびにスピンドウンを原則とし、むやみなピペッティングは避ける。

### 2.3. QIAamp Viral RNA Mini キットによる RNA の抽出

#### 1) 使用前に行う試薬の調製等

(1) サンプルを室温 (15~25°C)に戻す。

(2) Carrier RNA 溶液 1 µg/µl の調製

Carrier RNA (凍結乾燥品)310 µg の入ったチューブに Buffer AVE を 310 µl 添加し、1 µg/µl の溶液を調製する。Carrier RNA 溶液は、-20°C 保存、凍結融解は 3 回までとし、適切な量に分注して保存する。Buffer AVL が沈殿を生じていた場合は、80°C でインキュベートし、沈殿を溶解後、調製に使用する。

#### (3) Buffer AVL/Carrier RNA 混和物の調製

1 サンプルあたり Buffer AVL 560 µl、Carrier RNA 溶液 5.6 µl になるように Buffer AVL/Carrier RNA 混和物を調製する(詳細はキット添付の Handbook Table1.を参照)。2~8°C で保存すると沈殿物が生じるので、使用直前に 80°C でインキュベートし溶解する。このインキュベートは、5 分以内とする。なお、Buffer AVL/Carrier RNA 混和物は、あらかじめ 560 µl ずつ分注し、-20°C に保存しておくとう便利である。

(4) Buffer AW1、Buffer AW2 の調製

Buffer AW1 (Kit Cat.No.51104)に 96~100%エタノールを 25 ml 加える。

Buffer AW2 (Kit Cat.No.51104)に 96~100%エタノールを 30 ml 加える。

#### 2) 操作手順

以下の操作はすべて室温で行う。

(1) 1.5 ml チューブに Buffer AVL/Carrier RNA 560µl を入れる。

(2) 検体 140 µl と Buffer を充分混合するため、ボルテックスミキサーにより 15 秒間振とう混和し、室温 (15~25°C)に 10 分間置く。チューブの壁面等に付着している液体を落とすため卓上遠心機で数秒間遠心する (スピンドウン)。

(3) エタノール (96~100%)560 µl をチューブに加え、15 秒間 vortex をかけた後、チューブをスピンドウンする。

(4) (3)の液 630 µl を QIAamp スピнкаラム(2 ml コレクションチューブ中)に入れ、蓋を閉め、6,000×g (8,000 rpm)、1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2 ml のコレクションチューブに移し、残りの(3)の液 630 µl を入れ、同様に遠心し、全ての液が無くなるまで行う (この操作は 2 回で終わる)。

(5) QIAamp スピнкаラムを開け、Buffer AW1 を 500 µl 入れる。蓋を閉め、6,000×g (8,000 rpm)、1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2 ml のコレクションチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。

(6) QIAamp スピнкаラムを開け、Buffer AW2 を 500 µl 入れる。蓋を閉め、20,000×g (14,000

rpm)、3 分間遠心する。スピнкаラムとろ液等が接触することが無いよう静かに取り出す。接触した時には(7)を行う。

(7) QIAamp スピнкаラムを新しい 2 ml のコレクションチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。フルスピード (20,000×g) で 1 分間遠心する。

(8) QIAamp スピнкаラムを新しい蓋つき 1.5 ml のチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。QIAamp スピнкаラムの蓋を開け、室温に戻した Buffer AVE を 60 µl 入れ、蓋を閉めて 1 分間置いた後、6,000×g (8,000 rpm)、1 分間遠心し、ろ液を回収する。なお、抽出 RNA を保存するときは -80°C が望ましい。

### 3. 米国 CDC 法による RS ウイルスの検出

#### 3.1 リアルタイム RT-PCR 用プライマーおよびプローブについて

Name	Sequence (5' to 3')
Forward	GGCAAATATGGAAACATACGTGAA
Reverse	TCTTTTCTAGGACATTGTAYTGAACAG
Probe	FAM-CTGTGTATGTGGAGCCTTCGTGAAGCT-BHQ

増幅産物の長さ 84bp

参照

Fry AM, Chittaganpitch M, Baggett HC, et al. The burden of hospitalized lower respiratory tract infection due to respiratory syncytial virus in rural Thailand. PloS one. 2010;5:e15098.

#### 3.2. 陽性コントロール RNA

- ・ RSV subtype A スタンダード RNA: Long 株由来。
- ・ RSV subtype B スタンダード RNA: CH18537 株由来。

(Long 株の 2965-3380 に相当する配列で、両端に T7 及び SP6 配列を含むテンプレートから SP6 を用いて作製されたアンチセンス鎖である。末端に T7 配列を含むため、実験室内コンタミネーションのチェックが可能である)。

#### 3.3. リアルタイム RT-PCR(TaqMan プローブ法)法の一例

- 1) ABI7500 Fast Real-Time PCR system (Thermo Fisher scientific)を使用した one-step および Two-step RT-PCR 法。
- 2) LightCycler (96, 480, 480II) (Roche Life Science)を使用した one-step RT-PCR 法を以下に示す。いずれを用いてもよいが、いずれの方法でも他機器を使用する場合等は試薬や測定条件の至適化が必要である。

##### 3.3.1 ABI7500 Fast Real-Time PCR system (Thermo Fisher scientific)を使用した one-step および Two-step RT-PCR 法の一例

### 3.3.1.1. 機材および試薬

リアルタイム PCR 装置 (ABI7500 Fast Real-Time PCR System 等)

- 96-well リアルタイム PCR 反応プレート (例: MicroAmp<sup>®</sup> Fast Optical 96-Well Reaction Plate, Thermo Fisher SCIENTIFIC, Cat.No. 4346907)
- 8 連ストリップキャップまたはプレートシール (例: MicroAmp<sup>®</sup> Optical 8-cap Strip, Thermo Fisher SCIENTIFIC, 4323032)
- マイクロピペット
- 滅菌微量遠心チューブ及び PCR チューブ
- One-Step リアルタイム PCR 試薬 (例: AgPath-ID<sup>™</sup> One-Step RT-PCR Reagents, Thermo Fisher SCIENTIFIC, AM1005)
- cDNA 合成試薬 (例: PrimeScript<sup>™</sup> reagent Kit (Perfect Real Time, Takara, RR037A))
- リアルタイム PCR 試薬 (例: FastStart Universal Probe Master (Rox, Roche, 04913949001))
- プライマー及び TaqMan プローブ
- 陽性コントロール用スタンダード RNA

### 3.3.1.2. One-Step Real-time PCR 反応

表 AgPath-ID<sup>™</sup> One-Step RT-PCR Reagents を用いた反応液組成

試薬	容量 (μl)	終濃度 (nM)
DDW	4.125	
2×RT-PCR Buffer	12.5	
Forward primers (10 μM)	1.25	500
Reverse primers (10 μM)	0.75	300
TaqMan probes (10 μM)	0.375	150
25×RT-PCR Enzyme Mix	1	
Template RNA	5	
Total volume per reaction	25	

- 1) Template RNA 以外の試薬を必要な数量分調製し、プレートのウェルに 20 μl ずつ反応液を入れる。
- 2) 陰性コントロールとして DDW 5 μl をウェルに添加する。
- 3) RNA サンプルを 5 μl ずつウェルに加える。
- 4) 各濃度の陽性コントロール RNA を 5 μl ずつウェルに加える。
- 5) キャップまたはプレートシールで封をした後、反応液を軽くスピンドウンする。
- 6) 反応条件を以下のように設定して反応を開始する。

48°C	10 min	
95°C	5 min	
95°C	15 sec	45
55°C	1 min	cycles

### 3.3.1.3. Two-Step Real-time PCR 反応

#### 3.3.1.3.1. cDNA 合成

PrimeScript™ reagent Kit (Perfect Real Time)を用いた反応液の組成を表に示す。必要に応じてスケールアップすることも可能である。

試薬	容量 (μl)
DDW	0.5
5×PrimeScript Buffer	2.0
Random 6mers (100 μM)	2.0
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5
Template RNA	5
Total volume per reaction	10

- 1) Template RNA 以外の試薬を調製し、PCR チューブに 5 μl ずつ反応液を分注する。
- 2) 陰性コントロールとして DDW 5 μl をチューブに添加する。
- 3) RNA サンプルを 5 μl ずつチューブに添加する。
- 4) 各濃度の陽性コントロール RNA を 5 μl ずつチューブに加える。
- 5) 37°C 15 分、85°C 5 秒の加熱により cDNA 合成と逆転写酵素の不活化を行う。

#### 3.3.1.3.2. リアルタイム PCR 反応

表 FastStart Universal Probe Master (Rox) を用いた反応液組成

試薬	容量 (μl)	終濃度 (nM)
DDW	0.125	
2×Master Mix	12.5	
Forward primers (10 μM)	1.25	500
Reverse primers (10 μM)	0.75	300
TaqMan probes (10 μM)	0.375	150
cDNA	10	
Total volume per reaction	25	

- 1) cDNA 以外の試薬を調製し、プレートのウェルに 15 μl ずつ反応液を入れる。

- 2) cDNA を 10  $\mu$ l ずつウェルに添加する。
- 3) キャップまたはプレートシールで封をした後、反応液を軽くスピンドウンする。
- 4) 反応条件を以下のように設定し、反応を開始する。

95°C	10 min	
95°C	15 sec	45 cycles
55°C	3 min	

#### 3.3.1.4. 試験成立条件及び判定

陰性コントロールが陰性 ( $C_t > 45$ ) であり、陽性コントロール ( $1 \times 10^2$  コピー/反応) が  $C_t \leq 45$  となった場合に試験が成立する。上記条件が満たされないときは再試験を行う。

その上で、反応時間内に増幅曲線の立ち上がりが認められた場合を「陽性」、認められない場合を「陰性」とする。ただし、必ず増幅曲線、曲線の立ち上がりについて陽性コントロールと比較して確認する。なお、スタンダード RNA を用いた検討では、One-step、Two-step とともに 5~50 コピーを検出可能である。

### 3.3.2. LightCycler (96, 480, 480II) (Roche Life Science)を使用した one-step RT-PCR 法

#### 3.3.2.1 機材および試薬

マイクロピペット (10、20、200、1000  $\mu$ l)、DDW、滅菌微量遠心チューブ (1.5 ml)、96well リアルタイム PCR 反応プレート等、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、TaqMan プローブ、リアルタイム RT-PCR 試薬(AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents, AM1005, 4387424 または 4387391)、LightCycler (96, 480, 480II)ならびに陽性コントロール。

LightCycler を使用する場合、プライマー、プローブは以下の濃度で用いる。

Name	Sequence (5' to 3')	Concentration
Forward	GGCAAATATGGAAACATACGTGAA	500nM
Reverse	TCTTTTCTAGGACATTGTAYTGAACAG	250nM
Probe	FAM-CTGTGTATGTGGAGCCTTCGTGAAGCT-BHQ	50nM

あらかじめ 20 倍濃度のプライマーミックスを作成し、 $-30^\circ\text{C}$ で保管も可能。

表 プローブ・プライマー混合液(100  $\mu$ l)の作製例

Forward (100 $\mu$ M)	10 $\mu$ l
Reverse (100 $\mu$ M)	5 $\mu$ l
Probe (100 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Water	84 $\mu$ l

### 3.3.2.2. リアルタイム one-step RT-PCR(TaqMan プローブ法)反応

非特異反応を低減させるために AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents を用いること。試薬等の分注操作は全て氷上にて行う。

反応プレートの準備と解析

1) RNA 抽出を行ったサンプルを用い、表に示した反応液を調製する。

表 反応系容量	25 $\mu$ l	12.5 $\mu$ l
x2 Master mix	12.5 $\mu$ l	6.25 $\mu$ l
x20 Primer & Probe mix	1.25 $\mu$ l	0.625 $\mu$ l
Enzyme mix	1.0 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
DDW	5.25 $\mu$ l	2.625 $\mu$ l
Template RNA	5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>	<b>12.5 <math>\mu</math>l</b>

2) プレートあるいは8連チューブのウェルに 20  $\mu$ l (10  $\mu$ l)ずつ反応液を入れる。陰性コントロール(DDW あるいはキャリア RNA 添加 DDW)を 5  $\mu$ l (2.5  $\mu$ l)添加する。

3) RNA を 5  $\mu$ l (2.5  $\mu$ l)加える。

4) 陽性コントロール RNA を 5  $\mu$ l (2.5  $\mu$ l)加える。(段階希釈したものを用いる場合は濃度の薄いものからウェルに添加する)。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勧める。

5) 反応条件を以下のように設定して反応を開始する。

<反応条件>

以下に例として LightCycler 480 (または 480II、96)を使用する場合の反応条件を示した。他機器については機器のマニュアル等を参考のこと。機器によって、最適な反応条件は異なるので、必ず事前に検出感度ならびに非特異反応等を確認し、条件設定を行うこと。

	Analysis Mode	Cycle	Temperature (°C)	Time	Ramp Rate (°C / sec)	Acquisition Mode
RT	None	1	50	600 sec	4.4	None
Denature	None	1	95	600 sec	4.4	None
PCR	Quantification	40	95	15 sec	4.4	None
			58	60 sec	2.2	Single

Cooling	None	1	40	30 sec	4.4	None
---------	------	---	----	--------	-----	------

6) 陽性コントロールの増幅曲線の立ち上がりが 35 サイクル以内にみられ、かつ陰性コントロールの増幅曲線の立ち上がりが 35 サイクル以内に見られないときに試験が成立するとみなす。Cp 値 35.0 以内を陽性とする。

#### 4 サブグループの決定

米国 CDC 法は 2 つのサブグループの 1 種類のプライマー・プローブセットで検出することが可能である。従って定まった症例定義の集団を対象とする検査には有用である。

サブグループの決定は F 蛋白質遺伝子領域の RT-PCR 増幅産物のシーケンス解析あるいはリアルタイム RT-PCR 法によって行う。

#### 4.1. F タンパク遺伝子領域の RT-PCR 増幅産物のシーケンス解析

##### 4.1.1. 必要な器具と試薬

###### 1) 器具

サーマルサイクラー、マイクロピペット、チューブ、電気泳動槽

###### 2) 試薬

SMART MMLV Reverse Transcriptase (Takara-Bio, Cat.No. Z9522N 等または類似品)、Quick Taq HS Dymix (Toyobo DTM-101 等または類似品)、Random Hexamers (Thermo, N8080127、または類似品)、Recombinant RNase Inhibitor (Takara-Bio, 2313A、または類似品)、PCR クリーンアップキット(Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega A9281、または類似品)ならびに DDW。

##### 4.1.2. プライマー配列

Name	Sequence (5' to 3')
HRSVMPFO <sub>2</sub>	AACAGTTTAAACATTACCAAGTGA
HRSVMPRW <sub>2</sub>	TCATTGACTTGAGATATTGATGC

増幅産物長:380 bp

参照

Fry AM, Chittaganpitch M, Baggett HC, et al. The burden of hospitalized lower respiratory tract infection due to respiratory syncytial virus in rural Thailand. PloS one. 2010;5:e15098

##### 4.1.3. 1<sup>st</sup> strand cDNA の合成

3.3.1.3.1.と同様あるいは以下の通りを行う。

- 1) 抽出された RNA 液を用い、表に示した反応液を調製し、0.2 ml チューブに入れる  
表 逆転写反応液の調製

5× Buffer	4 μl
Random Hexamers	1 μl
dNTP (2mM each)	2 μl
100 mM DTT	2 μl
Recombinant RNase Inhibitor	1 μl
SMART MMLV Reverse Transcriptase	1 μl
RNA	9 μl
<hr/>	
Total	20 μl

- 4) サーマルサイクラーにて 42°C で 60 分(50~90 分)培養したのち、70°C で 15 分培養する。
- 5) 反応後、30 μl の DDW を添加して希釈し、次の PCR 反応に用いる。

#### 4.1.3. PCR 反応

- 1) 以下のように反応液を調整する。

2×Quick Taq HS DyeMix	25 μl
Forward primer (50μM)	0.2μl
Reverse primer (50μM)	0.2 μl
DDW	19.6 μl
cDNA	5 μl
<hr/>	
Total	50 μl

- 2) 反応条件を以下のように設定し、PCR 反応を行う。

94°C	1 min	} 40 サイクル
94°C	30 sec	
56°C	30 sec	
68°C	1 min	
68°C	5 min	

- 3) 反応終了後、40 μL の増幅産物を用いて 1.5~2%アガロースゲル(アガロース ME, 岩井化学または同等品)で TAE バッファー(ニッポンジーンなど)電気泳動し、エチジウムブロマイド(または代用品)による染色後、バンドの有無について確認を行う。380bp のバンドを切り出して精製する。Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System などを用いる。詳細はキット添付書を参考にする。
- 4) PCR に用いたものと同じプライマーを用いてサイクルシーケンス反応を行い、定法通りにシーケンス解析を行う。配列が得られたら Blast 解析等を行い、サブグループ

を決定する。

## 4.2. リアルタイム one-step RT-PCR 法によるサブグループの決定

### 4.2.1. サブグループ決定用リアルタイム RT-PCR 用プライマーおよびプローブ

プライマー名	配列 (5'to 3')	
Forward	GGAAACATACGTGAACAAGCTTCA	900nM
Reverse (A)	CATCGTCTTTTTCTAGGACATTGTATT	900nM
Reverse (B)	TCATCATCTTTTTCTAGAACATTGTAAGTGA	900nM
probe	FAM-TGTGTATGTGGAGCCTT-MGB	200nM

サブグループ A、B 検出のために Reverse プライマーのみが異なるセットを利用する。あらかじめ x20 濃度のプライマーミックスを作成し、-30°C で保管しておくことよい。

表 プローブ・プライマー混合液(100 µl)の作製例

Forward (100 µM)	18 µl	Forward (100 µM)	18 µl
Reverse(A) (100 µM)	18 µl	Reverse(B) (100 µM)	18 µl
Probe (100 µM)	4 µl	Probe (100 µM)	4 µl
Water	60 µl	Water	60 µl

#### 参照

Kuypers J, Wright N, Morrow R. Evaluation of quantitative and type-specific real-time RT-PCR assays for detection of respiratory syncytial virus in respiratory specimens from children. *J Clin Virol.* 2004;31(2):123–129. doi: 10.1016/j.jcv.2004.03.018.

### 4.2.1. リアルタイム one-step RT-PCR 反応

2 で抽出された RNA を用い、3.3.2 記載の通りに行う。12.5 µl の系でよく、コントロールは必要ない。A、B セットで Cp 値の低いほうをそのサブグループとする。0.001 でも低い方を採用してよい。本法によるサブグループ分類において、33 検体を用いてシーケンス解析法と比較したところ一致率は 100%であった。なお、本法によるサブグループピングを他機器を用いて行う場合は検証を行った上、各々 SOP を制定すること。

#### 参考文献

World Health Organization. (2017). WHO strategy to pilot global respiratory syncytial virus surveillance based on the Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS).

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259853/9789241513203-eng.pdf>

Fry AM, Chittaganpitch M, Baggett HC, et al. The burden of hospitalized lower respiratory tract

infection due to respiratory syncytial virus in rural Thailand. PloS one. 2010;5:e15098.

Kuypers J, Wright N, Morrow R. Evaluation of quantitative and type-specific real-time RT-PCR assays for detection of respiratory syncytial virus in respiratory specimens from children. J Clin Virol. 2004;31(2):123–129. doi: 10.1016/j.jcv.2004.03.018.

Shrato K, Nao N, Kawase M, and Kageyama T. 2020. An ultra-rapid real-time RT-PCR method for detecting human orthopneumovirus using PCR1100. Jpn J Infect Dis. Doi: 10.7883/yoken.JJID.2020.182.

平成 29～31 年度 AMED 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業  
「国内ならびにグローバルサーベイランスのための RS ウイルス感染症に関する検査システムの開発研究」代表 竹田 誠

執筆者

白戸憲也（国立感染症研究所）

松山州徳（国立感染症研究所）

竹田誠（国立感染症研究所）

木村博一（群馬パース大学大学院）

安達啓一（愛知県衛生研究所）

塚越博之（群馬県衛生環境研究所）

駒根綾子（川崎市健康安全研究所）

筒井理華（青森県環境保健センター）

高橋雅輝（岩手県環境保健研究センター）

五十嵐映子（福井県衛生環境研究センター）

岡部信彦（川崎市健康安全研究所）

## 別添 1

### 喀痰検体の前処理法 ver. 1

鼻腔拭い液、咽頭拭い液、鼻汁、鼻洗浄液などに比べて、喀痰は粘性が非常に高いため、ピペット操作でそのまま検体を取り扱って検査を行う事は困難である。

喀痰を PBS(-)等で懸濁した場合は、喀痰表面に存在するウイルスを浮遊させる事は可能だが、喀痰内部に閉じ込められたウイルスまでは効率よく浮遊させる事ができないと考えられる。さらに PBS(-)等の懸濁液を多く添加する事によって喀痰そのものが希釈されてしまうため浮遊ウイルス濃度が薄くなり、ウイルス RNA の抽出効率やウイルス分離の効率が低くなる可能性がある。

一方、喀痰を溶解した場合は、喀痰内部に閉じ込められたウイルスも浮遊させるため、ウイルス RNA の抽出およびウイルス分離の高効率化が期待できる。しかし、喀痰に含まれるゲノムなどの夾雑物も同時に溶出される事になるため、DNase 処理や溶解液の希釈などの処理を行うなどして、ウイルス RNA の抽出またはウイルス分離の効率に影響しないようにする事が重要である。

本マニュアルでは、PBS(-)等を用いた喀痰懸濁法と DTT を用いた喀痰溶解法による喀痰検体の前処理法について、参考までに例示する。また、例示した前処理法以外にも、ビーズ式破砕機を利用した破砕法などの前処理方法もあるので、施設毎に検討して実施していただくことも可能である。

#### 1. ウイルス遺伝子検査のための喀痰検体の前処理方法について

DTT 溶解液または PBS(-)懸濁液の上清を RNA 抽出に使用する。これら溶液の粘性は非常に高く、そのままではピペット操作が困難であるため、先切りチップ\*1を使用するとよい。

\*1 コンタミネーション防止のため、あらかじめ試薬調製用のキャビネット内などのきれいな環境下でアルミホイルを敷くなどして、カミソリ・カッターナイフ・ハサミ等（コンタミネーションを防ぐために常に新品もしくは専用のものを

使用する) でチップの先を切った先切りチップを準備しておく。

### 1.1. 喀痰処理に必要な器具および試薬

マイクロ遠心機、マイクロピペット (200、1000 $\mu$ L)、滅菌遠心チューブ (15mL、50mL など)、カミソリの刃・カッターナイフ・ハサミ等、滅菌微量遠心チューブ (1.5mL、2.0mL)、PBS (-) (細胞培養グレード)、ジチオトレイトール (dithiothreitol, DTT: 分子生物学用グレードを推奨、Wako Cat#044-29221, 29223)、滅菌蒸留水、(使い捨てピンセットなど)

### 1.2 喀痰検体の輸送と保存

空容器に採取された喀痰検体は下記 1.3.1 もしくは 1.3.2 の方法で前処理を行う。ウイルス輸送培地等に採取された喀痰検体は PBS(-)をウイルス輸送培地等に読み替えて、下記 1.3.2 の方法において前処理を行う (フローチャート図を参照)。なお、空容器またはウイルス輸送培地等に採取された喀痰検体の輸送と保存については、「2019-nCoV (新型コロナウイルス ) 感染を疑う患者の検体採取・輸送マニュアル」に準じて行う。

#### 1.3.1 喀痰検体を DTT で溶解する場合

- 1) PBS(-)を用いて 10% w/v DTT 溶液を作製する (用時調製\*2、以下 10% DTT in PBS とする)。
- 2) 喀痰に対して容量で 1 倍量の 10%DTT in PBS を加えボルテックスミキサーおよび転倒混和により懸濁する。(あらかじめ喀痰を別のチューブに取り分ける場合は、デカンタもしくは使い捨てピンセット等を用いて分取するとよい。)
- 3) 室温で 15 分間インキュベートする。(この段階で喀痰の粘性が低下し扱いやすくなる。口径の広いチップであれば先を切らないでも使用出来る場合がある。)
- 4) 溶解液を用いてウイルス分離を行う。RNA 抽出を行う場合は事前に 2 の DNase 処理を行う。

\*2 10% DTT in PBS は用時調製が望ましいが、あらかじめ小分け分注したものを-20 $^{\circ}$ Cで 1 年程度保存する事も可能である。凍結融解は避ける。

### 1.3.2 喀痰検体を PBS(-)で懸濁する場合

- 1) 喀痰に対して容量で1~3倍量のPBS(-)を加えボルテックスミキサーおよび激しい転倒混和により懸濁する。(あらかじめ喀痰を別のチューブに取り分ける場合は、デカンタもしくは使い捨てピンセット等を用いて分取するとよい。喀痰により粘性が異なるので、容量の変更は適宜行う。)
- 2) 先切りチップで懸濁液(1mL程度)を1.5 mLもしくは2 mL滅菌微量遠心チューブに移す。
- 3) 20000 x g、30分間、4°Cで遠心する。
- 4) 懸濁液の上清を用いてウイルス分離およびRNA抽出を行う。

## 2 RNA抽出を行う前のDNase処理について

QIAamp Viral RNA Mini Kitを用いてRNA抽出を行う際、喀痰成分はBuffer AVLを加える事で溶解する。しかし、Buffer AVL溶解液中の喀痰由来のゲノム等の夾雑物により、RNA抽出効率が著しく低下する事があるため、10%DTT in PBS溶解液をRNA抽出に供する場合は溶解液を事前にDNase処理する必要がある。

### 2.1 DNase処理に必要な器具および試薬

マイクロピペット(10、200、1000 $\mu$ L)、滅菌微量遠心チューブ(1.5mL、2.0mL)、シリンジ、針、RNase-Free DNase Set (QIAGEN Cat#79254)

### 2.2 喀痰検体のDNase処理

- 1) RNase-Free DNase Set (QIAGEN Cat#79254)に添付のDNase I, RNase-Freeを添付のRNase-Free Water 550 $\mu$ Lを用いて溶解する(溶解後のDNase濃度は2.7 units/ $\mu$ Lである)。溶解時にDNase(凍結乾燥品)の散逸を防ぐため、ゴム蓋は開けずに針付きのシリンジをゴム蓋に刺してバイアル内に直接RNase-Free Water 550 $\mu$ Lを加え、転倒混和にてDNaseを溶解するとよい(ボルテックスは使用しない)。溶解したDNase I, RNase-Freeは凍結融解を避けるため小分けにして-20°Cで保存する(9ヶ月保存可能)。2-8°Cで保存する場合は6週間以内に使い切る。
- 2) 10%DTT in PBS溶解液の一部に1/10量のBuffer RDD (RNase-Free DNase Set)と1/100量のDNase I, RNase-Free (RNase-Free DNase Set)を加える。(例：

445 $\mu$ L の溶解液に 50 $\mu$ L の Buffer RDD および 5 $\mu$ L の DNase I, RNase-Free を加える。)

3) 室温で 10 分間インキュベートした後、QIAamp Viral RNA Mini Kit 等を用いて RNA 抽出を行う。

\* 本マニュアルでは DNase に RNase-Free DNase Set (QIAGEN Cat#79254) を用いた方法を例示したが、他社製品を使用してもよい。ただし、他社製品を使用する場合は室温反応で問題がないかどうか、また、RNA 抽出に影響を及ぼさないかどうかを事前に検討しておく必要がある。

本マニュアルは、インフルエンザウイルス遺伝子検査およびウイルス分離のための喀痰検体の前処理（第 1 版）国立感染症研究所インフルエンザ研究センター（平成 25 年 10 月）を参考に記載されています。

図 喀痰検体前処理方法フローチャート

