

SARS 診断マニュアル

平成16年10月

目次

SARS の概説

SARS-CoV 検査に関する注意事項 検査材料の採取、輸送

ウイルス学的検査

1. ウイルス分離法
2. RT-PCR 法
3. LAMP 法

血清学的検査

1. 間接蛍光抗体法
2. ELISA
3. 中和試験

SARS-CoV 感染の診断基準

引用文献

執筆者

SARS の概説

SARS (severe acute respiratory syndrome, 重症急性呼吸器症候群) は SARS コロナウ

イルス（SARS-CoV）による感染症で、その集団感染はこれまで一回だけ経験された。2002年11月に中国広東省から発祥し、翌2003年春にかけて広東省から香港を経由して、ベトナム、シンガポール、カナダなどの全世界約30ヶ国に飛び火した。感染者は8,000人以上に及び、その約1割が死亡するという極めて重篤な呼吸器感染症である。SARS-CoVはヒトへの病原性の強さからクラス3の病原体に分類され、SARSは感染症法ではI類に分類される指定感染症である。野生動物由来の感染症であると考えられ、その宿主はコウモリと報告されている。野生動物からヒトに感染し、ヒトの間で感染が拡大するに従い病原性が強くなる可能性が指摘されている。野生動物からヒトへの感染は食用野生動物の取り扱い者や料理人等を経て広がる可能性がある。野生動物からヒトへの感染経路は明らかではないが、血液、体液、排出物との直接接触による感染の可能性が高い。ヒトからヒトへの感染は、感染者から咳などで発せられる飛沫による感染の可能性が高い。その他、感染者の血液、排出物との接触による感染も考えられる。糞口感染、空気感染も可能性は低いものの否定することはできない。実験室診断には、病原体診断法と血清診断法がある（図1）。病原体診断法としては、ウイルスの分離、LAMP法やRT-PCR法による遺伝子検出法がある。血清診断法としては、ELISA、間接蛍光抗体法（FA）、中和試験（NT）が用いられる。中でも中和試験が感度および精度が高く優れている。診断には、臨床症状、患者の渡航歴（SARS発生地区への渡航）に加え、SARS-CoV遺伝子の検出、ウイルス分離あるいは抗体検出などのウイルス学的検査成績が重要な目安になる。

SARS-CoV 検査に関する注意事項

SARS-CoV 感染症のウイルス学的検査において、遺伝子診断（RT-PCR、LAMP法）はBSL2実験室で行うことが出来るが、ウイルス分離試験と中和試験では感染性ウイルスを取り扱うことが必要になるため、BSL3実験室で行われなければならない。また、ELISAやFAにおいても、抗原作製はBSL3実験室で行われる必要がある。今後、ウイルス分離を除く他の検査法は、感染性ウイルスを用いる代わりに組換え蛋白抗原やキメラウイルスを使用することにより、BSL2実験室で行われることが可能になると考えられる。

検体の採取・輸送

1. 検体の採取：SARS-CoV 感染症の診断のための検体には、喀痰、鼻咽頭拭い液あるいは鼻咽頭洗浄液／吸引液、組織、糞便、尿、血清が有用である。

喀痰：滅菌生理食塩水等で複数回うがいをして口腔内雑菌を除いた後、喀痰を採取する。密栓できる喀痰専用容器（滅菌済み）に入れてフタをしてジップ付きプラスチック袋に入れて速やかに提出する。検体採取の際は、周りの人に飛沫が飛ばないように、区切られた部屋で行うなどの対策を講じる必要がある。採痰ブース（陰圧）があればより理想的である。人工呼吸器管理の場合には無菌的な操作のもとに、滅菌されたカテーテルを使って気管吸引液を採取する。

鼻咽頭拭い液あるいは鼻咽頭洗浄液／吸引液（疾患初期及び病状悪化時に採取されるべき検体）：通常の方法にて、鼻咽頭拭い液の場合には両方の鼻孔内を、咽頭拭い液の場合には咽頭後壁および扁桃領域を綿棒を用いて拭い、それを2ml [注：綿棒が乾燥する状態や、大量の液体に浸した状態ではウイルスの検出が困難になる。1.5～2 ml であれば綿棒が適度に液体に浸る程度となり、ウイルスの検出に最適である。] のウイルス輸送液体培地（EMEM+0.5%ゼラチン+ペニシリンG 500 U/ml, ストレプトマイシン 500 μg/ml）又は生理食塩水内に入れ、柄を折りとったのち、蓋をする。洗浄液／吸引液の場合には、1～1.5ml の生理食塩液を鼻腔内に注入し、その後鼻咽頭分泌物を吸引する。もう一方の鼻孔についても同様に行い、吸引液は清潔試験管に入れる。

便（発症早期から発症1カ月頃までRT-PCR法でSARS-CoV 遺伝子の検出が可能であるが、発症10日前後には、ウイルス遺伝子の陽性率が最も高くなる。）：20～50%の乳剤として遠心分離後、上清2～3mlを蓋付き容器に入れ、パラフィルムにてシールし、ビニール袋に入れる。

尿（発症後3日間はSARS-CoV 遺伝子は検出されないため、少なくとも発症4日以降に採取されるべき検体。発症10日頃の検出率は50%程度で、その後検出率は漸減する。）：50mlの尿を3000 rpmで15分間遠心し、沈渣を2～3mlの上清に懸濁させ、コンカル試験管（ファルコンなど）に入れ、パラフィルムにてシールする。

2. 検体の輸送：全ての検体について、48時間以内に検体を輸送することが可能な場合には、検体採取後直ちに冷蔵庫に保存し、保冷剤を用いたりして保冷下で輸送する。48時間以内に輸送することが不可能な場合は、検体採取後直ちに施設内で-70℃以下の冷凍庫に保存し、ドライアイスを用いて冷凍したまま輸送する。ドライアイスは密閉した容器に入れないこと。検体輸送には、郵政省告示第618号（平成9年12月4日）に基づき、検体が外部に漏れないように包装の上、感染性物質であることを明示して輸送する。梱包の方法は感染症研究所のホームページ

(<http://idsc.nih.gov/disease/sars/index.html>) を参照のこと。

ウイルス学的検査法

ウイルス抗原・ゲノム検出法

1. ウイルス分離法：

ウイルス分離検査はBSL 3 実験室で行う。Vero E6 細胞が SARS-CoV の分離に適している。ただし、ウイルス分離検査を行う場合には、ほかの呼吸器ウイルスを分離するための細胞も用いられるべきである。SARS-CoV が分離できれば SARS が確定される。信頼性の高い基本的診断法である。

A) 試薬・機材

- 1) Vero E6 細胞および他の呼吸器ウイルス分離用の細胞
- 2) CO₂ 培養器 (35〜37°C)
- 3) イーグル MEM (EMEM)
- 4) 抗生物質 (ペニシリン、ストレプトマイシン等)
- 5) ウシ胎仔血清 (FBS、56°C 30 分処理による熱非働化されたもの)
- 6) 24 ウエルマイクロプレート、96 ウエルマイクロプレートや細胞培養用カルチャーボトル

B) 検体の処理

咽頭スワブ、鼻腔スワブ：送られてきた検体を 4°C で、3,000 回転 15 分間遠心し、その上清液を細胞に接種する。スワブを数時間以内に培養細胞に接種できる場合には、スワブのついた綿棒を輸送培地の代わりに維持培地 (EMEM+ペニシリン G 500 U/ml, ストレプトマイシン 500 μg/ml+2%FBS) に攪拌してもよい。

気管洗浄液、鼻腔吸引液および喀痰：生理食塩水や PBS で得られた気管洗浄液や鼻腔洗浄液を、維持培地で 10 倍程度に希釈し、4°C で、3,000 回転 15 分間遠心して得られた上清液を細胞に接種する。喀痰で粘性が高い場合は、10 倍程度の PBS を加え、ホモジェナイズし、上記の条件で遠心後、その上清を用いる。

尿：4°C で 3,000 回転 15 分間遠心し、その上清液を接種する。

便：通常の 5 倍量の抗生物質が入った PBS で便の懸濁液を作る。マイクロ遠心機で 4°C、

6,000 回転 5 分間遠心し、その上清を接種する。

組織：約 10 倍程度の容積の維持培地に肺組織を加え、滅菌された器具を用いて組織を破壊し、懸濁液を作る。4°C で 3,000 回転 15 分間遠心し、その上清液を接種する。

C) 検査方法

- 1) 96、24 ウエルマイクロプレート、細胞培養用カルチャーボトル等に単層培養された Vero E6 細胞を準備する (EMEM+ペニシリン G 500 U/ml, ストレプトマイシン 500 μ g/ml +5%FBS を使用する)。
- 2) 細胞を PBS で一回洗浄し検体を接種する。
- 3) 各検体の上清を 37°C で 1 時間細胞吸着させる。細胞毒性が強い尿、便などの検体の場合には吸着時間を 30 分とする。
- 4) 被検液を取り除き、維持培地 (EMEM+ペニシリン G 500 U/ml, ストレプトマイシン 500 μ g/ml+2%FBS) を用いて細胞を培養する。細胞毒性が強い尿や便などの検体の場合には、吸着後細胞を PBS で 2-3 回洗浄した後、維持培地で細胞を培養する。ただし、輸送培地に攪拌された咽頭スワブや鼻腔スワブの検体のように細胞毒性が低い検体の場合には、被検液を取り除くことなく、維持培地をさらに加え細胞を培養してもよい。
- 5) 毎日細胞変成効果 (cytopathic effect, CPE) 出現の有無を確認する。
- 6) 1 週間観察して CPE が認められない場合、維持培地を新鮮なものに換えてさらに 1 週間観察する。
- 7) CPE が認められた場合、SARS-CoV によるものか否かを、抗 SARS 抗体を用いた間接蛍光抗体法や中和試験で確認する (ウイルス同定)。もし、SARS-CoV 以外のウイルスであることが確認された場合には、他のウイルスに対する同定検査を行う。CPE が認められない場合、SARS 陰性とする。

2. RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)

国立感染症研究所ウイルス第 3 部で行われている RT-PCR には、RT のプライマーとして random hexamer を用い、作製された cDNA を SARS-CoV 特異的プライマーを用いて増幅する two-step PCR 法が採用されている。RT-PCR 法のためのプライマー (10 μ M) には通常以下の 2 種類を使用する。

A: SARS1s 5' CCTCTCTGTTCTTGCTCGCA 3'
SARS1as 5' TATAGTGAGCCGCCACACATG3' (ORF1b 内の 121bp の PCR)

産物が得られる)

B : NPconS2 5' ACCCAATCAAACCAACGTAGTG 3'
NPconAs1 5' CGGTAGTAGCCAATTTGGTCATC 3'

(N 遺伝子内の 251bp の PCR 産物が得られ、制限酵素 XhoI で 37°C、1 時間処理すると 188bp + 63bp に切断される。)

A) 試薬・機材

- 1) マイクロ遠心器
- 2) サーマルサイクラー
- 3) サーマルサイクラー用チューブ (0.2 ml)
- 4) 試薬特級 100%エタノール 500ml (RNA 抽出用、未開封のものが望ましい)
- 5) PCR グレード滅菌蒸留水 (陰性コントロールとして使用)
- 6) RNA 抽出キット (QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit(50) Cat.#52904)
- 7) アガロースゲル電気泳動装置
- 8) SeaKem GTG agarose
- 9) Promega 100bp DNA Ladder Cat.#G2101
- 10) TBE バッファー

B) 手順

a) RT : (Ready-to-Go RT-PCR beads, Amersham を用いる場合)

- 1) 検体 140 μ l から RNA 分離用キット(QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit(50)Cat.#52904 等)を用いて精製 RNA 液 50 μ l を得る。方法はキットの取り扱い説明書を参照のこと。また、必ず正常血清等の陰性コントロールを置く。喀痰で粘性の高い場合には、等容の NALC バッファー(0.9% NaCl, 10g/L N-acetyl-L-cysteine)を添加し、穏やかに 30 分間振盪する。遠心して上清を 140 μ l を抽出に使用する (N Engl J Med. 2003 348:1967-1976)。
- 2) ビーズの入ったチューブに精製 RNA 液 50 μ l および、PCR グレード滅菌蒸留水 50 μ l を加える。
- 3) チューブを 5 分間氷中に静置する。
- 4) Ready-to-Go RT-PCR beads, Amersham キットに備え付けの random primer (0.5 μ g/ μ l) 1 μ l を加え、vortex を用いて攪拌する。

- 5) 42°Cで30分間インキュベートする。
- 6) 95°Cで5分間インキュベートする。

b) PCR : (PCR Master Mix, Promega, Cat. #M7502 を使用する場合)

1) 以下のミックスを調整する。

RT sample	5	μl
Primer 1	1	
Primer 2	1	
2xMM	25	
H ₂ O	18	
Total	50	μl

2) 以下の条件で、サーマルサイクラーを用いて反応させる。

95°C (4 min)	} x 40 cycle
95°C (30 sec)	
56°C (30 sec)	
72°C (1 min)	
72°C (7 min)	

c) 電気泳動および産物の検出

- 1) PCR 産物を 2 % agarose gel を用いて電気泳動する。
- 2) プライマーセット B で RT-PCR を行った場合に 251bp の産物が検出されたら、PCR 産物をさらに XhoI で処理し、電気泳動を行う。
- 3) 更に正確に診断するためには、得られた DNA フラグメントの塩基配列を決定する。

3. LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法

LAMP 法は遺伝子増幅法としては、感度及び特異性が高く、短時間で診断出来る極めて優れた方法である。濁度計を用いて測定する方法と目視判定で行う方法があり、後者の場合には検査に特殊な機器を必要としない。SARS 診断用 LAMP キット (LoopampSARS コロナウイルス検出試薬キット) は栄研化学 (株) から市販されているので、その説明書を参照されたい。また、濁度測定のための機器としては栄研化学からリアルタイム濁度測定装置

LA320-Cなどが市販されている。

血清学的検査法

以下に記述される SARS の血清学的検査に必要な抗原の準備には、感染性 SARS-CoV が必要とされるので、血清学的検査は当分の間は感染研ウイルス第 3 部及びウイルス第 1 部が行う。

血清学的診断法に用いる血清には感染性 SARS-CoV が含まれている可能性があるので、検査する前に 56°C30 分加熱する。この操作により、抗体検出法における非特異的反応が弱まり、また、SARS-CoV の感染性は完全に消失する。

1. 間接蛍光抗体法：

SARS-CoV 感染細胞および非感染細胞を適した割合で混ぜて、蛍光抗体用スライドグラスに吸着させ、アセトン固定した上で抗原とする。感染細胞のウイルス抗原に反応する抗体が被検血清中にあるか否かを調べることにより、SARS-CoV に対する特異的抗体を検出する方法である。検査用抗原を準備しておけば比較的簡単に検査が出来る。ただし、SARS-CoV に対する抗体は他のコロナウイルスにも交差結合すると報告されているので、その試験成績の解釈には注意を要する。尚、蛍光抗体検査用スライドグラスへのウイルス抗原準備は、BSL 3 実験室で行う。

A) 試薬・機材

- 1) Vero E6 細胞
- 2) 細胞増殖培地 (EMEM に 5%非働化済み FBS を含む)
- 3) 細胞培養用プラスチックボトル
- 4) 蛍光抗体検査用スライドグラス (14 ウェル、AR Brown 社)
- 5) リン酸緩衝液 (PBS)
- 6) 細胞消化用トリプシン EDTA 液 (0.25%トリプシン-0.02%EDTA を含む PBS)
- 7) FITC 標識抗ヒト IgG 抗体

B) 検査法

- 1) 細胞増殖培地でプラスチックボトルに培養した Vero E6 細胞に細胞 1 つあたり 1 つの

感染性 SARS-CoV を感染させる条件で (multiplicity of infection, m. o. i. が約 1) で SARS-CoV を感染させる。

- 2) ウイルス接種後約 20 時間後に PBS で細胞を洗浄し、トリプシン処理により細胞を回収する。細胞を更に 1 回 PBS で洗浄後、約 3×10^6 cells/ml となるように PBS に浮遊する。非感染細胞を同様に処理し、感染細胞および非感染細胞を等量混和する。蛍光抗体用スライドガラスの各ウェルに細胞浮遊液を 10 μ l ずつ分配し、完全に乾燥させる。乾燥後 100%アセトンで 5 分間固定後アセトンを蒸発させ、ウイルスを完全に不活化させる目的で UV を 1 時間以上照射する。尚、以上の操作は BSL 3 実験室の安全キャビネット内で行う。
- 3) 被検血清を PBS で 20 倍から 2 倍段階希釈し、その 10–30 μ l を各ウェルにのせ、37°C 1 時間反応させる。被検血清とともに抗体陽性、陰性コントロール血清も同時に反応させる。
- 4) PBS でスライドガラスを洗浄し、PBS で 50–100 倍に希釈された FITC 標識 IgG 抗体を各ウェルにのせ、37°C 1 時間反応させる。
- 5) PBS でスライドを洗浄後、10%グリセリン入り PBS で封入する。
- 6) 蛍光顕微鏡で特異蛍光を検鏡する。特異的な染色像が認められた場合に抗体陽性と判定し、抗体陽性を示した最高希釈倍数を抗体価とする。

2. ELISA

SARS-CoV 感染細胞抗原を 96 ウェルマイクロプレートに吸着させ、そこに結合する SARS-CoV 特異抗体を検出する方法で、一度に多数の検体を処理できるという利点がある。

A) 試薬・機材

- 1) Vero E6 細胞
- 2) 細胞増殖培地 (EMEM に 5 %非働化済み FBS を含む)
- 3) 96 ウェル ELISA プレート
- 4) リン酸緩衝液 (PBS)
- 5) 0.05 % Tween-20 含有 PBS (T-PBS)
- 6) Nonidet P-40 (NP40)
- 7) 5%スキムミルク含有 T-PBS (M-T-PBS)
- 8) ペルオキシダーゼ標識抗ヒト抗体 (HRPO 標識抗体)

- 9) ABTS 発色基質 (Roche Diagnostics, ABTS tablet 及び buffer for ABTS)
- 9) ELISA リーダー
- 10) ELISA ウォッシャー

B) 方法

- 1) m. o. i. が約 2 になるようにウイルスを Vero E6 細胞に感染させ、感染 24 時間後に感染細胞を回収する。同時に非感染細胞も回収する。感染、非感染細胞をそれぞれ 1% NP40 含有 PBS で溶解し、4°C、12000 回転で 10 分遠心し、その上清を抗原として用いる。SARS-CoV 感染 VeroE6 細胞および非感染細胞から得られた抗原をそれぞれ陽性抗原、陰性抗原とする。
- 2) 陽性、陰性抗原を 50 mM carbonate buffer (pH 9.6) であらかじめ検討して設定した倍率で希釈し、陽性抗原 100 μ l を 96 ウエルプレートの A-D レーンに、陰性抗原を E-H レーンに加え、室温で 2 時間又は 4°C で一晩置く。
- 3) 各ウエルを ELISA ウォッシャーで洗浄後、各ウエルに 200 μ l の M-T-PBS を加え、37°C で 1 時間反応させる (ブロッキング)。
- 4) 各ウエルを ELISA ウォッシャーで洗浄後、各ウエルに M-T-PBS を 100 μ l 加える。次いで M-T-PBS で 25 倍希釈した被検血清 33 μ l を陽性抗原ウエルレーン A と陰性抗原ウエルレーン E にそれぞれ加え (最終的に 100 倍希釈になる)、レーン A からレーン D およびレーン E からレーン H まで、順次 4 倍階段希釈 (100 倍から 6400 倍) し、37°C で 1 時間反応させる。
- 5) ついで各ウエルを ELISA ウォッシャーで洗浄後、M-T-PBS で 1000 倍希釈された HRPO 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体 100 μ l を各ウエルに加え、37°C で 1 時間反応させる。
- 6) 各ウエルを ELISA ウォッシャーで洗浄後、各ウエルに ABTS 発色基質液 100 μ l を加え、遮光下で 37°C、30 分反応させる。
- 7) ELISA リーダーを用いて、OD (波長 490nm のフィルターを対照として波長 405nm のフィルターで測定) を測定する。抗原陽性ウエルの OD から対応する抗原陰性ウエルの OD を差し引いた値を抗 SARS 抗体による OD 値とする。

3. 中和試験

SARS-CoV の中和試験は、他のコロナウイルスとの交差反応もなく特異性が高く、また、感度も高い。急性期と回復期 (発症 3 週後で検査し、陰性の場合には 4 週後) のペア血清を同時に検査することが重要である。中和試験では、感染性 SARS-CoV が用いられるため、

BSL 3 実験室で行われなければならない。

A) 試薬・機材

- 1) Vero E6 細胞
- 2) 細胞増殖培地 (EMEM に 5 %非働化済み FBS を含む)
- 3) 細胞維持培地 (EMEM に 2%非働化済み FBS を含む)
- 4) 96 ウエルマイクロプレート
- 5) 5ml プラスチックチューブ
- 6) 10%ホルマリン
- 7) 1%クリスタルバイオレット染色液

B) 検査法

- 1) 96 ウエルマイクロプレートに VeroE6 細胞が単層になるように細胞増殖培地で培養する。
- 2) 細胞維持培地を用いて 100TCID₅₀/50 μ l のウイルス液を作成する。
- 3) 上記のウイルス液 200 μ l と細胞維持培地で 10 倍から 2 倍階段希釈された被検血清 200 μ l を混合し、37°C で 1 時間反応させる。対照として、SARS 抗体陰性ヒト血清を用いる。
- 4) 96 ウエルプレートの培養液を除き、中和反応後の各希釈段階におけるウイルス液 100 μ l を 4 つのウエルにそれぞれ加える。37°C で 3 日間培養後、各ウエルの CPE の有無を倒立顕微鏡を用いて観察する。
- 5) ウイルス液を被検血清と中和させることにより CPE が抑えられている場合には中和抗体陽性と判定し、2 ウエル以上で CPE 出現が抑制された最高希釈倍数を中和抗体価とする。
- 6) 尚、プレートに培養されている細胞をホルマリンで 2 時間固定後、クリスタルバイオレット液で染色すると、CPE の判定が容易になる場合があり、さらにプレートを保存できる。

SARS-CoV 感染症の診断基準

- 1) 被検検体から SARS-CoV が分離された場合。
- 2) 被検検体から RT-PCR 又は LAMP 法などの遺伝子検出法により SARS-CoV 遺伝子が検出された場合。

3) 中和試験法により SARS-CoV 中和抗体が認められ、急性期と回復期に採取されたペア血清の抗体価が有意に上昇した場合。

但し、次の場合 SARS-CoV 感染症を否定することはできない。

発症 10 日前までに SARS 発生地区に居住もしくは旅行した経験があり、SARS 様症状を示した患者由来検体から SARS-CoV が分離出来ない場合、もしくは SARS-CoV 遺伝子が検出されない場合。

引用文献

- 1) Ksiazek TG, Erdman D et al (2003) A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. N Eng J Med. 348: 1953-66
- 2) Drosten C, Gunther S et al. (2003) Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. N Eng J Med. 348: 1967-76
- 3) Rota PA, Oberste MS et al. (2003) Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. Science 300: 1394-99
- 4) 国立感染症研究所ホームページ (<http://idsc.nih.go.jp/disease/sars/index.html>)
- 5) 栄研化学(株) ホームページ (<http://loopamp.eiken.co.jp/j/index.html>)
- 6) 小田切孝人、二宮愛 et al. (2004) SARS 診断法の開発と SARS 検査の結果 インフルエンザ 5: 35-42
- 7) 田口文広、田代真人、納富継宣 (2004) SARS ウイルス迅速診断、日本小児科医科会報 27: 43-6

執筆者

田口文広：国立感染症研究所

西條政幸：国立感染症研究所

松山州徳：国立感染症研究所

森川 茂：国立感染症研究所

貞升健志：東京都健康安全研究センター

岡田峰幸：千葉県衛生研究所

図 1 : SARS 診断検査の流れ

SARS 診断検査

