

病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.3

令和2年2月5日

本マニュアルについて:HPでの公開用に多少の文言の修正や追加はありますが、基本的な検査内容は、すでに地方衛生研究所にお配りした「2019-nCoV 検査マニュアル Ver.2.3」と同じになっております。

新型コロナウイルス (2019-nCoV) の遺伝子領域 2 か所、open reading frame 1a (ORF1a) および spike (S) を特異的に検出する 2-step RT-PCR 法、あるいは TaqMan プローブを用いたリアルタイム one-step RT-PCR 法による遺伝子検査により 2019-nCoV を同定する。

【操作法】

1. 検体の採取と保存

「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」(国立感染症研究所 HP) を参照のこと。

2. RNA の抽出

広く使用されている 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、1.5ml エッペンドルフチューブ用高速冷却遠心機、1.5ml 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、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)、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 2+でおこなう。安全キャビネット内で取り扱い、操作中は手袋・マスク等の personal protective equipment (PPE) を着用する。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。

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 1µg/µl の調製

Carrier RNA (凍結乾燥品)310µg の入ったチューブに Buffer AVE を 310µl 添加し、1µg/µl の溶液を調製する。Carrier RNA 溶液は、-20°C 保存で、凍結融解 3 回までなので、適した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、沈殿を溶解した後、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 560µl、Carrier RNA 溶液 5.6µl 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 560µl ずつ分注し、-20°C に保存しておくると便利である。

(4) Buffer AW1、Buffer AW2 の調製

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

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

2) 操作手順

以下の操作はすべて室温で行う。

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

(2) 検体 140µl と Buffer を充分混合するため 15 秒間 vortex にかき、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%)560µl 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 630µl を QIAamp スピнкаラム(2ml 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 2ml のコレクションチューブに移し、残りの(3)の液 630µl 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 500µl 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 2ml 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 500µl 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

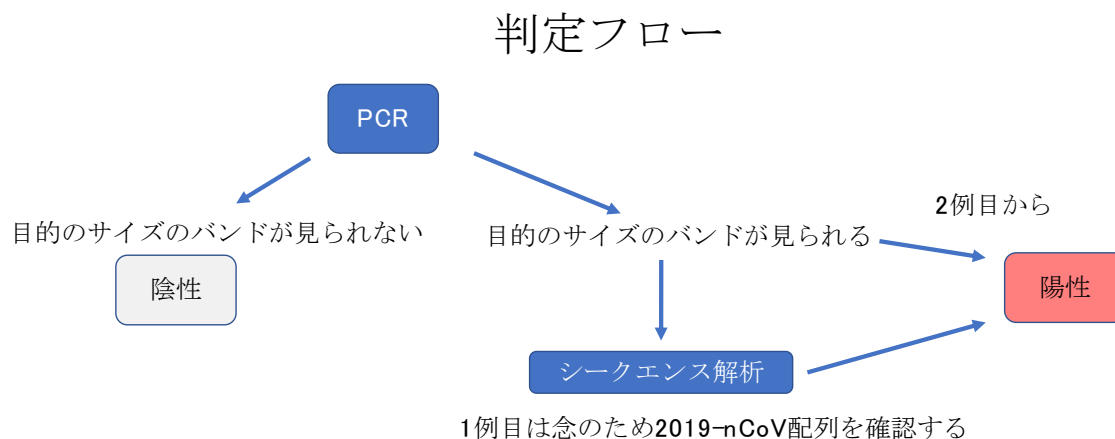
に取り出す。接触した時には(7)を行う。

(7) QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml 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 1.5ml 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 60µl 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. 2-step RT-PCR 法による 2019-nCoV の定性的検出法

以下に検査・結果判定の概要図を示す。



例として SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo) および Quick Taq HS Dymix (Toyobo) を用いた反応条件を示す。詳細はキットに添付のマニュアルを参照すること。尚、本マニュアルではプロトコルを 1 部変更している。なお逆転写反応、PCR 反応に用いる酵素等について、類似品で各施設において運用実績のあるものがあればそれを用いても良い。試薬等の分注操作は全て氷上にて行うことが望ましい。

3.1 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、電気泳動層

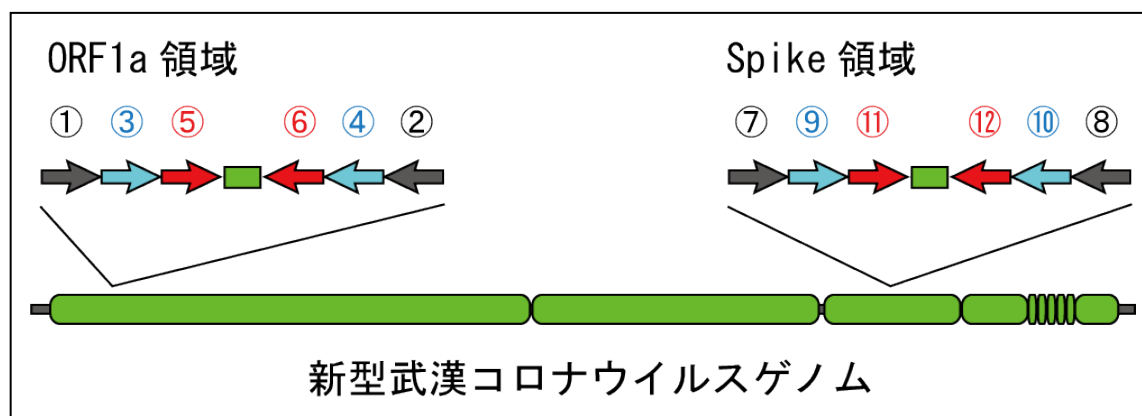
2) 試薬

SuperScript IV Reverse Transcriptase (RT) [Thermo, Cat.No. 18090010. 50, 200 または類似品(PrimeScript RT reagent Kit, Takara RR037A 等)], [Quick Taq HS Dymix Toyobo DTM-101 または類似品(PerfectShot Ex Taq, Takara RR005A 等)], 2019-nCoV 特異的プライマー、Oligo(dT)12-18 Primer (Thermo, 18418012 または類似品)、Random

Hexamers (Thermo, N8080127、または類似品。特に指定はない)、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)、DDW。

No.		Name	direction	sequence (5' to 3')	Expected size (bp)
ORF1a セット					
①	1 st	NIID_WH-1_F501	Sense	TTCGGATGCTCGAACTGCACC	413
②	1 st	NIID_WH-1_R913	Antisense	CTTTACCAGCACGTGCTAGAAGG	
③	2 nd	NIID_WH-1_F509	Sense	CTCGAACTGCACCTCATGG	346
④	2 nd	NIID_WH-1_R854	Antisense	CAGAAGTTGTTATCGACATAGC	
⑤	Seq	NIID_WH-1_Seq_F519	Sense	ACCTCATGGTCATGTTATGG	
⑥	Seq	NIID_WH-1_Seq_R840	Antisense	GACATAGCGAGTGTATGCC	
S セット					
⑦	1 st	WuhanCoV-spk1-f	Sense	TTGGCAAATTC AAGACTCACTTT	547
⑧	1 st	WuhanCoV-spk2-r	Antisense	TGTGGTTCATAAAAATTCCTTTGTG	
⑨	2 nd	NIID_WH-1_F24381	Sense	TCAAGACTCACTTTCTTCCAC	493
⑩	2 nd	NIID_WH-1_R24873	Antisense	ATTTGAAACAAAGACACCTTCCAC	
⑪	Seq	NIID_WH-1_Seq_F24383	Sense	AAGACTCACTTTCTTCCACAG	
⑫	Seq	NIID_WH-1_Seq_R24865	Antisense	CAAAGACACCTTCCACGAGG	

プライマー位置模式図



3.2 1st strand cDNA の合成

1) 陽性コントロールは ORF1a セット、S セットそれぞれ専用のものを用いる。10⁵/μl

に希釈された陽性コントロール RNA 10 μ l に DDW を 990 μ l 添加する。

2) 1)の陽性コントロール RNA 5 μ l に等量の DDW を加えて 10 μ l とし、以下に用いる (5000 コピーを用いる)。5000 コピーの検出が困難であるようならば、事前に検討を行い、検出できる濃度で行ってよい。

3) 抽出された RNA 液および陽性コントロール RNA を用いて、表に示した反応液を調製し、0.2ml チューブに入れる

表 1 逆転写反応液の調製

5 \times SSIV Buffer	5 μ l
Random Hexamers	1 μ l
Oligo(dT)12–18 Primer	1 μ l
dNTP (2mM each)	5 μ l
100 mM DTT	1 μ l
Recombinant RNase Inhibitor	1 μ l
SuperScript IV Reverse Transcriptase	1 μ l
RNA	10 μ l
<hr/>	
Total	25 μ l

4) サーマルサイクラーにて以下のプログラムで反応させる。

23 $^{\circ}$ C	10 min
50 $^{\circ}$ C	10 min
80 $^{\circ}$ C	10 min

5) 反応後、35 μ l の DDW を添加して希釈し、次の PCR 反応に用いる。

3.3 1st PCR 反応

1) 以下のように反応液を調整する。

2 \times Quick Taq HS DyeMix	25 μ l
Forward primer (50 μ M)	0.4 μ l
Reverse primer (50 μ M)	0.4 μ l
DDW	19.2 μ l
cDNA	5 μ l
<hr/>	
Total	50 μ l

ORF1a セットでは①NIID_WH-1_F501 および②NIID_WH-1_R913

S セットでは⑦WuhanCoV-spk1-f および⑧WuhanCoV-spk2-r
を用いる。

2) 陰性対照として DDW 5 μ l を用いる。

3) 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	

3.4 2nd 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)	0.4µl
Reverse primer (50µM)	0.4 µl
DDW	23.2 µl
1 st PCR 反応液	1 µl
<hr/>	
Total	50 µl

ORF1a セットでは③NIID_WH-1_F509 および④NIID_WH-1_R854

S セットでは⑨NIID_WH-1_F24381 および⑩NIID_WH-1_R24873

を用いる。

2) 陰性対照として DDW 1µl を用いる。陰性対照の 1stPCR 産物を 1µl 用いても構わない。

どちらでも非特異増幅が起きないことは確認済みである。

3) 反応条件を以下のように設定し、PCR 反応を行う。

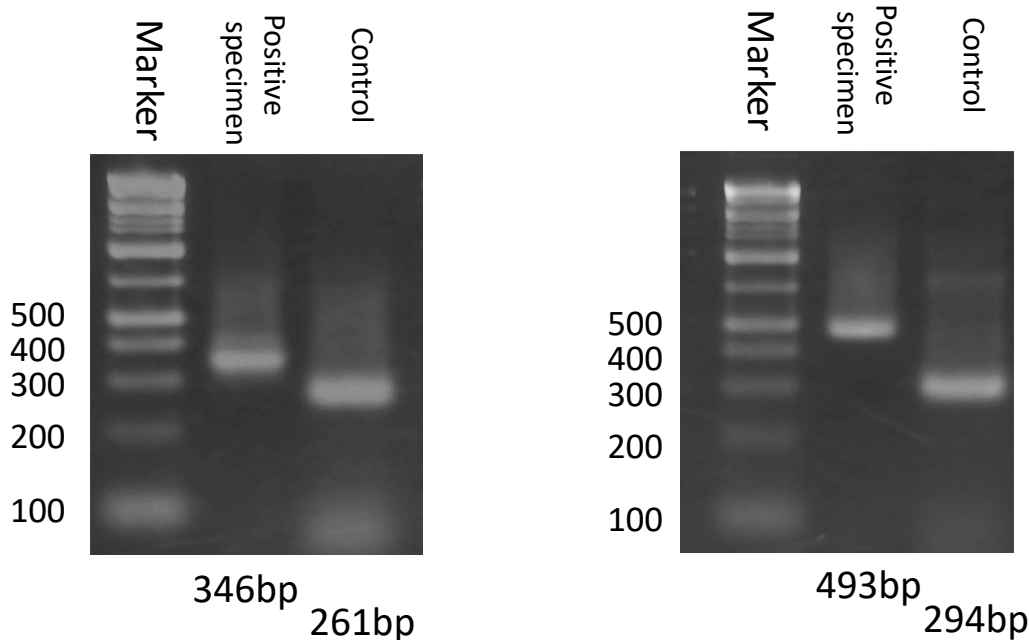
94°C	1 min	} 40 サイクル
94°C	30 sec	
56°C	30 sec	
68°C	1 min	
68°C	5 min	

4) 反応終了後、1stPCR、2ndPCR 反応液ともに 5µL の増幅産物を用いて 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。1stPCR 終了後に 1st PCR のみの電気泳動を行っても構わない。泳動に際し、必ずマーカーを置き、バンドサイズの確認ができるようにする。2~4%のアガロースゲルを用いることを推奨するが、他濃度でもバンドサイズの確認ができるようであれば用いて構わない。

陽性コントロールの増幅サイズは以下のとおりである。

ORF 1 a セット	1 st PCR	292bp
	2 nd PCR	261bp
S セット	1 st PCR	329bp

2019-nCoV nested PCR 参考泳動図



陽性検体とコントロールのnested PCRのPCR産物を泳動するとこのような位置関係になります。

- 5) 陽性コントロールでバンドが検出され、陰性コントロールで検出されないときに試験成立とする。2nd PCR で目的のサイズに近い大きさのバンドが検出された場合は陽性とする。されなければ陰性とする。Nested RT-PCR においてはバンドが確認されれば陽性と考えることができるが、各施設における1例目の検出においては、シーケンス解析を行う事を推奨する。増幅産物から2019-nCoV配列が確認されれば2例目からはシーケンス解析を行わなくてもよい。本Nested RT-PCRの検出感度は遺伝子配列解析に成功した検体中のコピー数から、3コピー前後と推定される。

3.5. (シーケンス解析を行う場合)PCR産物のクリーンアップ

PCR産物のクリーンアップをしたのち、シーケンス解析を行う。例として Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を使用したものを示す。なお、他のクリーンナップ (Agencourt AMPure XP 等) を使用してもよい。

- 1) 残りのPCR産物(45 μ l)をPCR産物と等量(45 μ l)のMembrane Binding Solution

と混合する。

- 2) SV minicolumn を Collection tube に挿入し、1) をアプライし、室温で1分間培養し、16,000 ×g で1分遠心する。
- 3) Collection tube 中の廃液を捨て、SV minicolumn を戻し、エタノール添加済みの Membrane Wash Solution を 700 μ l アプライし、16,000 ×g で1分遠心する。
- 4) Collection tube 中の廃液を捨て、SV minicolumn を戻し、エタノール添加済みの Membrane Wash Solution を 500 μ l アプライし、16,000 ×g で5分遠心する。
- 5) Collection tube 中の廃液を捨て、SV minicolumn を戻し、16,000 ×g で1分遠心する。
- 6) SV minicolumn を 1.5ml チューブに挿入し、30 μ l の TE バッファー(あるいは DDW) をアプライし、室温で1分間培養し、16,000 ×g で1分遠心する。溶出液をシーケンス解析に用いる。

3.6. (シーケンス解析を行う場合)シーケンス解析

ORF1a セットでは⑤NIID_WH-1_Seq_F519 および⑥NIID_WH-1_Seq_R840

S セットでは⑩NIID_WH-1_Seq_F24383 および⑫NIID_WH-1_Seq_R24865

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、MN908947 の配列と比較し、ほぼ一致(おおむね 95%以上)するようであれば陽性とする。一致しない場合、ヒト染色体配列など明らかに 2019-nCoV と異なる配列であった場合は陰性とする。シーケンス解析で波形が重なるなどして明瞭な配列が得られなかった場合、シーケンサーのメンテナンス状況を考慮したうえで、シーケンス解析をサイクルシーケンスから改めて行う。2 回目の解析でも明瞭な配列が得られない場合は、なんらかの非特異増幅である可能性が高いと考えられるため、陰性とする。

・ORF1a セット、S セットのどちらか一方で 2019-nCoV 配列が確認できれば陽性と判断する。

4. TaqMan プロブを用いた one-step RT-PCR 法を用いる場合

4.1. 機材および試薬

マイクロピペット (10、20、200、1000 μ l)、DDW、滅菌微量遠心チューブ (1.5ml)、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、リアルタイム PCR 装置、プライマー、TaqMan プロブ、QuantiTect® Probe RT-PCR Kit (QIAGEN Cat#204443) [AgPath-ID One-step RT-PCR Reagents (Thermo Cat# AM1005)、TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Cat # 4,444,432)のライトサイクラーでの動作は確認済み、ABI 機器での動作報告有。他試薬でも検出感度の担保ができれば使用可能。

4.2. 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

Nセット

	Name	Sequence (5' to 3')	Position*	Concentration
①	N_Sarbeco_F1	CACATTGGCACCCGCAATC	28723-28741	600nM
②	N_Sarbeco_R1	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	28850-28831	800nM
③	N_Sarbeco_P1	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BHQ (または QSY**)	28770-28794	200nM

増幅産物の長さ 128bp

参照：

https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf?sfvrsn=d381fc88_2

Nセット No.2 (N2セット)

	Name	Sequence (5' to 3')	Position*	Concentration
④	NIID_2019-nCOV_N_F2	AAATTTTGGGGACCAGGAAC	29142-29161	500nM
⑤	NIID_2019-nCOV_N_R2	TGGCAGCTGTGTAGGTCAAC***	29299-29280	700nM
⑥	NIID_2019-nCOV_N_P2	FAM-ATGTCGCGCATTGGCATGGA-BHQ(ま たは QSY)	29239-29258	200nM

増幅産物の長さ 158bp

*:Position は Wuhan seafood market pneumonia virus isolate Wuhan-Hu-1 MN908947.1 由来である。

** : TAMRA でも動作確認済み。

*** : Ver3 配列とミスマッチがあるが、ウイルス RNA の検出感度に影響がないことを確認済み。

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

例として QIAGEN 社の QuantiTect® Probe RT-PCR kit を用いた反応条件を示した。詳細はキットに添付のマニュアルを参照すること。なお、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) 陽性コントロール RNA は Nセット用、N2セット用それぞれ専用のものを用いる。 $10^5/\mu\text{l}$ に希釈された陽性コントロール RNA $10\mu\text{l}$ を DDW に $90\mu\text{l}$ 添加し、十分混合したのちスピンドウンする。次に希釈した陽性コントロール RNA $50\mu\text{l}$ を DDW $450\mu\text{l}$ に添加し、十分混合したのちスピンドウンする ($10^3/\mu\text{l}$)。陽性コントロール用 RNA は、実験室内

コンタミネーションを起こした場合に、判別可能な外来塩基配列 (BamH I サイトおよび H5 陽性コントロールチェック用の配列) を挿入してあるので、所定のコントロールを必ず用いる。

- 2) 1)の陽性コントロールを $5 \times 10^3/5\mu\text{l}$ から $5 \times 10^6/5\mu\text{l}$ コピーまで 10 倍階段希釈する。希釈方法は例えば DDW $450\mu\text{l}$ にコントロール RNA $50\mu\text{l}$ を添加し、十分混合したのち次の希釈へ移る。陽性コントロールの検出精度が確認されていれば 1 点を用いでも構わない。
- 3) RNA 抽出を行ったサンプルを用いて、表に示した反応液を調製する。

表 1 リアルタイム RT-PCR 反応液の調製

	N セット	N2 セット
2×Master mix	10.0 μl	10.0 μl
Forward primer (10 μM)	1.2 μl	1.0 μl
Reverse primer (10 μM)	1.6 μl	1.4 μl
TaqMan probe (5 μM)	0.8 μl	0.8 μl
Quantitect RT mix	0.2 μl	0.2 μl
DDW	1.2 μl	1.6 μl
Template RNA	5 μl	5 μl
Total	20 μl	20 μl

プライマー・プローブはあらかじめ混合して mix' を作製し、 -30 度に保存して置いて構わない。

- 4) プレートあるいは 8 連チューブのウェルに $15\mu\text{l}$ ずつ反応液を入れる。陰性コントロールを $5\mu\text{L}$ ずつ 2 ウェルに添加する。
- 5) RNA を $5\mu\text{l}$ ずつ 2 ウェルに加える。
- 6) 陽性コントロール RNA を $5\mu\text{l}$ ずつ 2 ウェルに加える。(段階希釈したものを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。
- 7) 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>

使用するリアルタイム PCR 装置、試薬および反応容器等によって、最適な反応条件は異なるので、必ず事前に検出感度等の確認をしておく。以下に、試薬に QIAGEN 社 QuantiTect® Probe RT-PCR Kit、リアルタイム PCR 装置に Applied Biosystems 社 Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムもしくは Roche Diagnostics 社 LightCycler 480 (または 480II、96) を使用する場合の反応条件を示した。

Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムを使用する場合
 機器の設定は以下の通り

(Standard モードで使用)

50°C* 30min.
 ↓
 95°C 15min.
 ↓
 95°C 15sec. } ×45 cycles
 60°C 60sec.(Data Collection)

Assay	Absolute Quantification (Standard Curve)
Run Mode	Standard 7500
Reporter	FAM
Quencher	None

LightCycler 480 II (480、96)を使用する場合

	Analysis Mode	Cycle	Temperature (°C)	Time	Ramp Rate (°C/sec)	Acquisition Mode
RT	None	1	50*	30min.	4.4	None
Denature	None	1	95	15min.	4.4	None
PCR	Quantification	45	95	15sec.	4.4	None
			60	60sec.	2.2	Single
Cooling	None		40	30sec.	4.4**	None

*:BHQ プローブの場合は 55°Cでも構わない。TAMRA プローブの場合は 50°Cが良い。

** :Cooling の Ramp Rate は機器の上限値でよい。

8) 陽性コントロールの増幅曲線の立ち上がりが 40 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見られないときに試験が成立するとみなす。検体において、どちらか一方あるいは両方のプローブセットについて、2つのウェルのうち、一方あるいは両方で 40 サイクル以内に増幅曲線の立ちあがりが見られた場合に陽性とみなす。

40 サイクル以内に増幅曲線の立ち上がりが無い場合は陰性とする。2nd derivative 法による自動判定などでは曲線が見られなくとも陽性と判断される場合がある。必ず増幅曲線、曲線の立ち上がりについてコントロールのものと比較して確認する。

分離ウイルスから抽出した RNA(Accession LC521925)を使って本リアルタイム RT-PCR 法の検出感度を測定したところ、N セットは 7 コピー、N2 セットは 2 コピーのウイルス RNA を検出できる計算である。

5. 問い合わせ先

・技術情報および陽性コントロールについての問合せは、国立感染症研究所にご相談いただくようお願い致します。また本マニュアル記載以外の反応試薬での反応条件等の情報提供、共有は大変貴重ですのでよろしくお願い致します。

情報提供先アドレス：info-nCoV@nih.go.jp

・ 国立感染症研究所ウイルス第三部
〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1
Phone:042-561-0771, Fax:042-565-3315

執筆者一覧

白戸憲也 直亨則 松山州徳 竹田誠 (国立感染症研究所ウイルス第三部)
調恒明 (山口県環境保健センター)
四宮博人 (愛媛県立衛生環境研究所)