

「感染研・地衛研専用」
SARS-CoV-2 遺伝子検出・ウイルス分離マニュアル Ver.1.1
令和3年2月8日

更新履歴

令和3年2月 Ver1.0→1.1 誤記の修正、表記ゆれの統一、参考文献リンクの修正、追記等を行った。

2019年末中国武漢で発生したコロナウイルス病(COVID-19)の原因ウイルスである重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2型(SARS-CoV-2)の遺伝子検出法並びにウイルス分離法について、感染研における方法の一部を地衛研向けの参照として記載する。

尚、「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1」は本マニュアル記載の方法と比較して劣るものではない。

SARS-CoV-2 遺伝子検出は Nested RT-PCR 法、あるいはリアルタイム one-step RT-PCR 法で行う。ウイルス分離は VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いて行う。

【遺伝子検出法】

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) 最新版を参照のこと。

下気道検体(喀痰等)、上気道検体(鼻咽頭、鼻腔(鼻前庭)、咽頭ぬぐい液)が推奨される。喀痰検体の扱いについては、別添の「喀痰検体の前処理法」を参照のこと。唾液についても同別添を参照のこと。遠心は5-10分とされる。

2. RNA の抽出

下記に広く使用されている QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いた方法を示すが、他の一般的なウイルス RNA 抽出法、抽出キットを用いて構わない。他キット等を用いる場合は添付のマニュアル等、製造元の指示に従うこと。

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(BSL)2+で行う。BSL2 実験施設内の安全キャビネット内で取り扱い、操作中はディスポーザブルのガウン、手袋(2重)マスク(サージカルマスクでよい)、キャップ等の personal protective equipment (PPE, 個人防護具)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。また遠心機が過去の高濃度の陽性検体で汚染することもあるため、DNA・RNA フリー等の薬剤で(蓋の裏も含め)清掃するのも効果的である。
- 3) 核酸抽出の精度はキットに依存する。従って実績のあるキットを精度管理された実験室(内部での定期的実施、外部調査の定期的受検など)で、マニュアル通りに運用できる環境であれば核酸抽出コントロールの設定は必ずしも必要としないが、作業者の経験や手技が不足するなど、運用上設定する必要がある場合にはマニュアル等の制定を行うこと。抽出コントロールは必ずしも SARS-CoV-2 である必要はない。他の病原体とその検出法を用いて評価するので十分である。市販の全長 RNA などを用いることは可能であるが、増幅領域に意図的な配列挿入がないコントロールを利用した場合、コントロールからのコンタミを区別することが出来なくなることに注意する。

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 μ g/ μ L の調製

Carrier RNA (凍結乾燥品)310 μ g の入ったチューブに Buffer AVE を 310 μ l 添加し、1 μ g/ μ L 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 560 μ l、Carrier RNA 溶液 5.6 μ l 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 AVLL/Carrier RNA 混和物

は、あらかじめ 560 μ l ずつ分注し、-20 $^{\circ}$ 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 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 560 μ l を入れる。

(2) 検体 140 μ l と Buffer を充分混合するため 15 秒間 vortex にかき、室温 (15~25 $^{\circ}$ 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 μ l 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 μ l 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 \times 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 630 μ l 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 μ l 入れる。蓋を閉め、6,000 \times 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 500 μ l 入れる。蓋を閉め、20,000 \times 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。

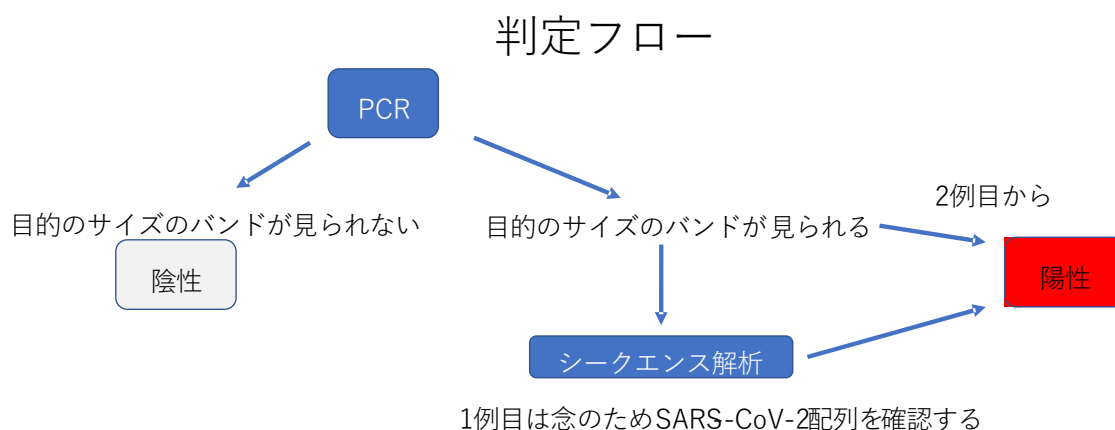
(7) QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のコレクションチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。フルスピード (20,000 \times g)で 1 分間遠心する。

(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 60 μ l 入れ、蓋を閉めて 1 分間置いた後、6,000 \times 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 $^{\circ}$ C が望ましい。

*上記の方法では 140 μ l の検体から抽出し、60 μ l で溶出して、5 μ l を反応に用いるため、約 11.7 μ l の検体を 1 反応で試験していることになる。同一のカラムに 3 倍量まではアプ
ライでき、また溶出量を換えることで RNA の濃縮が可能である。ウイルスの濃度が低いと思われるときなどは RNA の濃縮をして検査をしてもかまわない。

3. Nested RT-PCR 法による SARS-CoV-2 遺伝子検出

以下に Nested RT-PCR 法を用いる場合の検査・結果判定の概要図を示す。



用いる試薬類は下記プライマーセットの動作が確認できれば他のものでもよい。 下記に例として SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo) および Quick Taq HS Dyemix (Toyobo) を用いた反応条件を示す。他の試薬類を用いる場合は付属マニュアル等、製造元の指示に従うこと。 試薬等の分注操作は全て氷上にて行うことが望ましい。

配布している陽性コントロールは合成 RNA であるため、陽性コントロールが検出できれば RT 反応の成功を示す。従って RT のコントロールは、必ずしも必要としないが、設定する場合は各自で評価を行い、マニュアル等の制定を行うこと。

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 等)、(Quick Taq HS Dyemix Toyobo DTM-101 等)、SARS-CoV-2 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)、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。

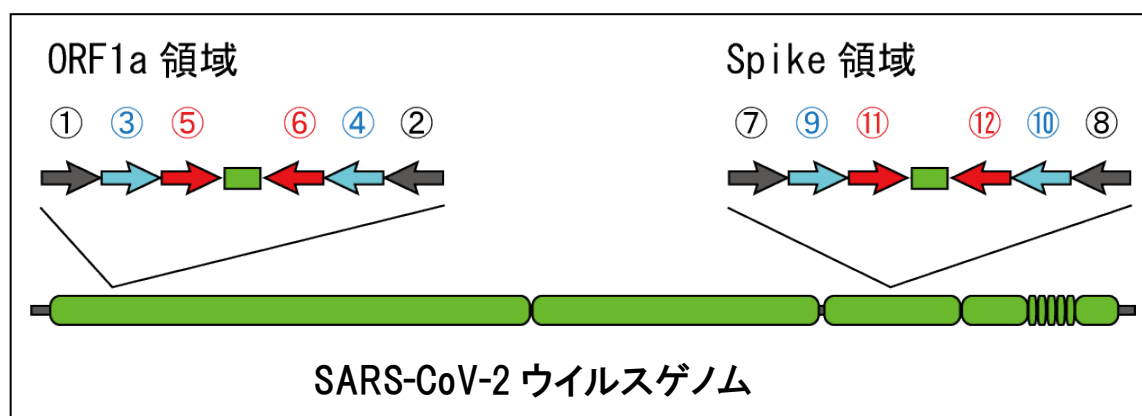
3) プライマー配列

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	ATTTGAAACAAAGACACCTTCAC	
⑪	Seq	NIID_WH-1_Seq_F24383	Sense	AAGACTCACTTTCTTCCACAG	
⑫	Seq	NIID_WH-1_Seq_R24865	Antisense	CAAAGACACCTTCACGAGG	

*: Positions in primer name refer to sequence MN908947.1.

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 10μl に DDW を 990μl 添加する。
- 2) 1)の陽性コントロール RNA 5μl に等量の DDW を加えて 10μl 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×SSIV Buffer	5 μL
Random Hexamers	1 μL
Oligo(dT)12–18 Primer	1 μL
dNTP (2mM each)	5 μL
100 mM DTT	1 μL
Recombinant RNase Inhibitor	1 μL
SuperScript IV Reverse Transcriptase	1 μL
RNA	10 μL
<hr/>	
Total	25 μL

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°C	10 min
50°C	10 min
80°C	10 min

5) 反応後、35μl 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×Quick Taq HS Dyemix	25 μL
Forward primer (50μM)	0.4μL
Reverse primer (50μM)	0.4 μL
DDW	19.2 μL
cDNA	5 μL
<hr/>	
Total	50 μL

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 5μl 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。

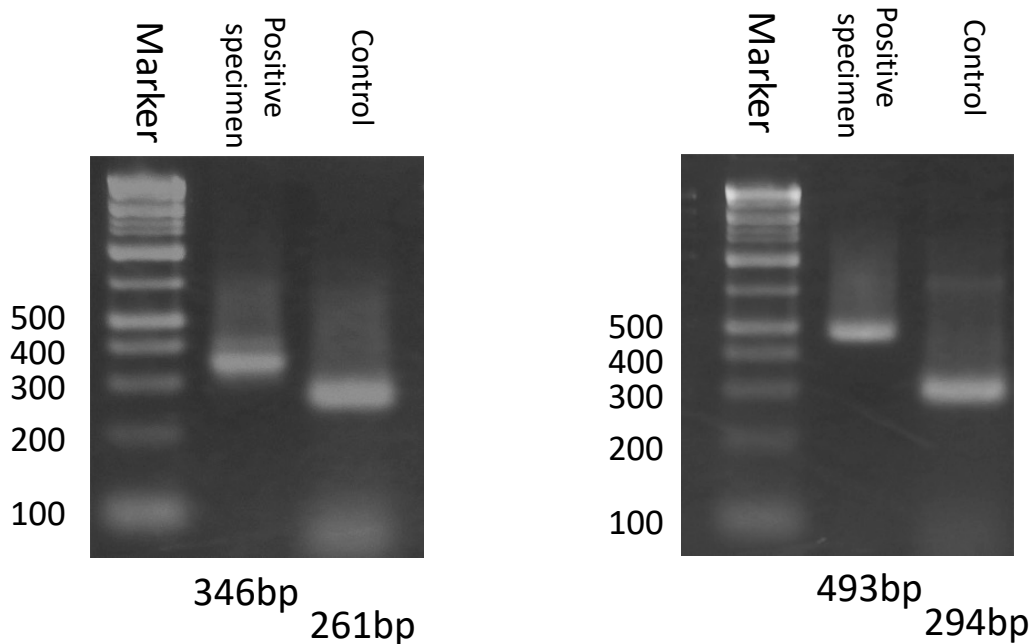
3) 反応条件を以下のように設定し、PCR 反応を行う。

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、2ndPCR 反応液 5uL 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。手
間を省くために 1stPCR は泳動しなくてもよいが、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	1stPCR	292bp
	2ndPCR	261bp
S セット	1stPCR	329bp
	2ndPCR	294bp

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目的サイズのバンドが検出され、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 SARS-CoV-2 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、1~3 コピーと推定される。

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。下記に例として Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を使用したものを示すが、他のクリーンアップ法 (AMPure XP 等) でも構わない。

- 1) 残りの PCR 産物(45 μ l)を PCR 産物と等量 (45ul) の Membrane Binding Solution と混合する。
- 2) SV mini column 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 mini column を戻し、エタノール添加済みの Membrane Wash Solution を 700μl 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 mini column を戻し、エタノール添加済みの Membrane Wash Solution を 500 μl 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 mini column を戻し、16,000 ×g で1分遠心する。
 - 6) SV mini column を 1.5ml チューブに挿入し、30μl 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 SARS-CoV-2 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 SARS-CoV-2 配列が確認できれば陽性と判断する。

4. リアルタイム one-step RT-PCR 法による SARS-CoV-2 の検出

本法以外のリアルタイム RT-PCR 法によって SARS-CoV-2 遺伝子検出を行う場合は、それぞれの方法のマニュアル等に従うこと。

合成 RNA を陽性コントロールとして利用する場合、陽性コントロールが検出できれば RT 反応の成功を示す。従って RT コントロールの設定は必ずしも必要としないが、設定する場合は各自で評価を行い、マニュアル等の制定を行うこと。

4.1. 機材および試薬

マイクロピペット (10、20、200、1000 μl)、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 プローブ、リアルタイム RT-PCR 試薬。Yeast

RNA(Sigma, R6750 等)。

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

以下の N2 セットおよび S セットを用いる。

・NIID-N2 セット

Name	Sequence (5' to 3')	Position (MN908947.3)	Concentration
SARS-CoV-2_NIID_N2_F2	AAATTTTGGGGACCAGGAAC	29125-29144	500nM
SARS-CoV-2_NIID_N2_R2-2	TGGCACCTGTGTAGGTCAAC **	29282-29263	700nM
SARS-CoV-2_NIID_N2_P2	FAM-ATGTCGCGCATTGGCATGGA- BHQ1(*)	29222-29241	200nM

増幅産物の長さ 158bp

*: TAMRA でも動作確認済み。

https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/73/4/73_JJID.2020.061/_article/-char/en

・NIID-S ver. 2 (S2) セット

Name	Sequence (5' to 3')	Position	Concentration
SARS-CoV-2_NIID_S_F1	CAGTCAGCACCTCATGGTGTA	24722-24742	400nM
SARS-CoV-2_NIID_S_R3	AACCAGTGTGTGCCATTTGA	24870-24851	700nM
SARS-CoV-2_NIID_S_P2	FAM-TGCTCCTGCCATTTGTCATGATGG- BHQ1*	24793-24816	200nM

増幅産物の長さ 149bp

*: TAMRA でも動作確認済み

https://www.niid.go.jp/niid/images/jjid/COVID19/No27_2020-1079R1_20210202.pdf

あらかじめ x20 のプライマープローブミックスを作製し、小分けして-30℃で保管しておく。

ミックス(100μl)の作製例

N2 セット		S2 セット	
Forward (100μM)	10 μL	Forward (100μM)	8 μL
Reverse (100μM)	14 μL	Reverse (100μM)	14 μL
Probe (100μM)	4 μL	Probe (100μM)	4 μL
Water	72 μL	Water	74 μL

4.3. リアルタイム one-step RT-PCR 反応

QIAGEN 社の QuantiTect Probe RT-PCR kit を用いた反応条件を例として示す。 他試薬

を用いても構わない。その場合は各自で感度、特異性等の検証を行った上で実施すること。
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) 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

2×Master mix	10.0 μ L
Primer and probe mix	1.0 μ L
QuantiTect RT mix	0.2 μ L
DDW	3.8 μ L
Template RNA	5 μ L
<hr/>	
Total	20 μ L

N2 セットを 1 施行、S2 セットを 1 施行行う。

- 2) プレートあるいは 8 連チューブのウェルに 15 μ l ずつ反応液を入れる。
- 3) 陰性コントロールを 5 μ L 添加する。陰性コントロールは PCR グレードの DDW あるいは Yeast RNA(10 μ g/ml)添加水等を使用する。
- 4) Template RNA を 5 μ l 加える。
- 5) 陽性コントロールを用意する。陽性コントロール RNA は専用のものを用いる。10⁵/ μ L に希釈された陽性コントロール RNA 10 μ l を DDW に 90 μ 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 μ l を DDW 450 μ l に添加し、十分混合したのちスピンドウンする(10³/ μ L)。これを繰り返して 10³/ μ L ~ 10⁰/ μ L までのものを用意する。陽性コントロール用 RNA は、外来塩基配列を挿入してあるなどして、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ものを用いることを推奨する。
- 5) 段階希釈した陽性コントロール RNA を 5 μ l ずつ加える。濃度の薄いものからウェルに添加する。陽性コントロールによる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。
- 6) 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>

LightCycler 480 (または 480II、96) あるいは QuantaStudio5 を使用する場合は反応条件を示した。

他の機器を用いても構わない。使用する試薬および反応容器の組み合わせ等によって、最適な反応条件は異なるので、必ず事前に各自で検出感度、特異性の確認を行い、それぞれでマニュアルを制定すること。

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	1 sec.	4.4**	None

** :Cooling の Ramp Rate は機器の上限値でよい。

LightCycler を用いる場合、S2 セットについては AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents、THUNDERBIRD Probe One-step qRT-PCR Kit でも試薬マニュアル記載の反応条件で検出できることを確認している。

QuantoStudio5 等を使用する場合

機器の設定は以下の通り

Standard モード

Quencher は None

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

QuantoStudio5 を用いる場合 S2 セットについては QuantiTect Probe RT-PCR kit での動作は確認済み。他試薬を用いる場合は条件設定を各自で行うこと。

7) 50 コピーまでの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カットオフ値より前に見られないときに試験が成立するとみなす。

陽性コントロールは、おおむね 5 コピーまで検出可能である。50 コピーは必ず検出されるはずであるので、検出できない場合は検出できる条件を各自で条件検討を行うこと。

2nd derivative 法で計算される機器の場合(Cp あるいは Cq 値)、N2 セット、S2 セットど

ちらも 40 未満の値を陽性と考える。Fit Points 法あるいは Crossing point 法(Ct 値)で計算される機器の場合、基本的にはオートで判定を行った上、上記の値をカットオフとして問題ないと思われるが、試薬と機器の組み合わせ、機器のメンテナンス状態等で Ct 値が 40 を超える場合もある。そのような場合は段階希釈した陽性コントロールを検出し、検量線を作成したうえで、それぞれの測定条件における 1 コピーの Ct 値を参考にすることを勧める。また、あきらかな増幅曲線が見られなくとも自動判定で値が計算されること、またその逆のパターンもありうる。そのため、必ず波形の確認を行った上で判定すること。

Threshold に固定値を用いる場合は各自で評価を行い、判定基準を制定すること。

4.4 内部標準について (オプション)

ヒト検体における内部標準を検出する方法として以下のものを参考にあげる。

Name	Sequence (5' to 3')	Concentration
RNase_P-F	AGATTTGGACCTGCGAGCG	375nM
RNase_P-R	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	375nM
RNase_P-P	HEX-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG- BHQ1 *	125nM

*: 使用機器の都合等で標識を変更しても問題ないと思われる。

Emery et al., (2004). Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. *Emerg. Infect. Dis.* 10:311-6.

反応条件は 4.3 の通りである。検出感度を確実にするために SARS-CoV-2 セットとは別のシングルアッセイで行う。他の検出法を用いることでも構わない。水のようにさらさらの鼻汁など、検体の種類によっては細胞成分がほとんど含まれておらず、内部標準が検出されないこともあるので、内部標準が検出されなければ検体採取が成功していないということではないことを注意する。

マルチアッセイが必要であれば市販のキット[Thermo 社 TaqPath 新型コロナウイルスリアルタイム PCR 検出キット(A48067)等]でプロセスコントロール添付のものを使用を勧める。

4.5 インフルエンザウイルスと同時に検査する場合 (オプション)。

N2 セットは Thermo 社の AgPath-ID 試薬を用いることで、インフルエンザウイルス診断マニュアル(第 4 版)記載の TaqMan Probe 法による同定と同じ PCR 反応条件での運用が可能である。

すなわち

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*	10min.	4.4	None
Denature	None	1	95	10min.	4.4	None
PCR	Quantification	45	95	15sec.	4.4	None
			56	30sec.	2.2	Single
			72	15sec.	4.4	None
Cooling	None		40	30sec.	4.4**	None

** : Cooling の Ramp Rate は機器の上限値でよい。

QuantoStudio5 等を使用する場合

Standard モード

Quencher は None

50°C 10min.

↓

95°C 10min.

↓

95°C 15sec.

56°C 30sec.(Data Collection)

72°C 15sec.

} ×45 cycles

である。これらを用いることで同一プレートにおけるインフルエンザウイルスと SARS-CoV-2 の検出が可能である。N2 セットのプライマー濃度は本マニュアルと同じでよい。

インフルエンザウイルスの検出法に関する詳細はインフルエンザ診断マニュアル 第 4 版

「6.2 リアルタイム RT-PCR(TaqMan Probe 法)による同定」を参照のこと

<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/influenza20190116.pdf>

【ウイルス分離法】

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) 最新版を参照のこと。

喀痰検体の扱いについては、別添の「喀痰検体の前処理法」を参照のこと。

2. 材料、機器、器具および試薬

VeroE6/TMPRSS2 細胞(JCRB 1819)、CO₂培養器(37°C、5%CO₂)、DMEM(Sigma D5796 または類似品)、ウシ胎児血清(FCS、非働化済)、Penicillin-Streptomycin 溶液 (和光純薬 168-23191 または類似品)、Geneticin (G418) (Sigma A1720 または類似品)、トリプシン(コージンバイオ 16208004 または類似品)、PBS(GIBCO 10010023 または類似品)、ゲンダマイシン(Sigma G1397 または類似品)、アンホテリシン B (GIBCO 15290-018 または類似品)、セルカルチャーフラスコ、デイスポーザブルピペット、マイクロピペット、保存チューブ。

3. 細胞の継代

3.1 増殖用培地の調整

DMEM に FCS を終濃度約 10%になるように添加し、ペニシリンストレプトマイシンを終濃度 100 unit/mL あるいは 100 ug/mL になるように添加して調整する。細胞の維持のためには G418 を 1 mg/ml の濃度で添加しておく。

3.2 細胞の起こし方、および維持

- 1) 凍結細胞を適量の増殖用培地を含んだフラスコに添加する(T-25 であれば 5ml 等)。
- 2) 細胞がコンフルエントになったら PBS を用いて細胞表面を洗浄したのち、EDTA-Trypsin 液を用いて細胞を分散する。
- 3) 増殖用培地を用いて目的の細胞濃度に調整した細胞浮遊液を作成し、37°C、5～7日間隔で継代培養する(T-75 であれば 10ml)。通常の継代は4-5倍程度の希釈にする。用途に応じて希釈を変更する。

4. ウイルス分離

4.1 操作上の注意

ウイルス分離は BSL3 でおこなう。法令を遵守し、各施設におけるバイオセキュリティに関する規定に則って作業を行うこと。

遺伝子検査により陽性になった検体を用いる場合、QuantiTect Probe RT-PCR kit および LightCycler480 を用いた場合の Cp 値がおおむね 32 未満の検体で分離できる可能性がある。それ以上の Cp 値の場合は接種量を増やすことで分離できることもある。

4.2 ウイルス分離方法

- 1) 基本的には検査材料を 3,000rpm, 15 分間遠心沈澱した上清を出発材料とするが、状態によってはそのまま接種して構わない。
- 2) (オプション)検査材料の 10 倍階段希釈 (10-0~10-2) を作製する。
- 3) あらかじめ単層培養 (24~96 穴プラスチックプレート) させた VeroE6/TMPRSS2 細胞に検体 50~100 μ l 接種し, CO₂ インキュベーター内で 1~2 時間静置する。検体中にゲンダマイシン(50ug/mL)、アンホテリシン B(2.5 μ g/mL)添加しておいても構わない。Cp 値次第でウェルの大きさ、接種量の調整をして構わない。
- 4) 吸着後、検体を除き、DMEM で 2 回洗ったのち、1~2%FCS-DMEM を添加し、CO₂ インキュベーター内で培養する。2 回目の洗い液を保存しておく。
- 5)2~3 日の培養で細胞融合などの CPE が 観察された場合、培養上清を 1000rpm で 5 分遠心し、回収する。
- 6)洗い液、培養上清を用いて上記リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子検出を行い、洗い液中のウイルス RNA 量と比較して培養上清中のウイルス RNA 量が著しく上昇(おおむね 1000 倍以上)していれば分離成功とみなせる。ウイルス液は-70°C以下で保存する。

参考文献

Shirato K et al. (2020). Development of genetic diagnostic methods for novel coronavirus 2019 (nCoV-2019) in Japan. Jpn J Infect Dis. 2020 Volume 73 Issue 4 Pages 304-307. DOI: [10.7883/yoken.JJID.2020.061](https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2020.061).

Matsuyama S, et al. (2020). Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Mar 31;117(13):7001-7003.

Shirato K et al., (2020). Performance evaluation of real-time RT-PCR assays for detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 developed by the National Institute of Infectious Diseases, Japan. Jpn J Infect Dis. 2021. https://www.niid.go.jp/niid/images/jjid/COVID19/No27_2020-1079R1_20210202.pdf.

国立感染症研究所 作成

喀痰検体の前処理法 ver. 2

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 μ 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(-) (できれば細胞培養グレード、pHは問わない)、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)

PBS(-)の代わりに生理食塩水でも可

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」の「検体の輸送」に関する記載に従って行う。

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℃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℃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 μ 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 μ L を用いて溶解する (溶解後の DNase 濃度は 2.7 units/ μ 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 μ 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 $^{\circ}$ Cで保存する(9 ヶ月保存可能)。2-8 $^{\circ}$ 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 μ L の溶解液に 50 μ L の Buffer RDD および 5 μ 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

