

事務連絡  
平成15年5月16日

各〔 都道府県  
政令市  
特別区 〕衛生主管部（局）担当課 御中

厚生労働省健康局結核感染症課

「SARS コロナウイルスの行政検査要領」について  
(SARS対策第13報関係)

「SARS コロナウイルスの行政検査要領」については、「症例定義の改正とそれに伴うSARS コロナウイルスの行政検査の実施等について(SARS対策第13報)」(平成15年5月8日付け健感発0508002号)において、骨子を通知したところですが、今般、別添のとおりとりまとめたのでご了知の上、よろしくご対応願います。

なお、本要領は、SARSに関する新たな科学的知見に応じて改訂し、結核感染症課事務連絡と共に、国立感染症研究所感染症情報センターホームページで情報提供を行うこととしております。

# SARS コロナウイルスの行政検査要領

## 1 医療機関における対応

### (1) 疑い例と可能性例の検体採取

検体の採取にあたっては、保健所の指示に従う。

採取前に保健所に連絡し、採取方法、採取至適時期、検体の種類を確認したうえで採取時期を決定し、採取を行う(参考1)。

採取する検体の種類は、検査指針の3に基づく

(ウイルス分離同定用検体については、その至適採取時期を考慮し、必ず抗体検査用のペア血清(急性期と発症後21日以降の回復期)を確保する必要がある)

疑い例の検体採取にあたっては、事前に本人の了解を得て行う。

### (2) 検体の送付

検体の送付に際しては保健所に連絡する。

### (3) SARS コロナウイルス以外の検査について

SARS コロナウイルス以外の病原体の検査については、従来の基準に従う。

## 2 保健所における対応

(1) 医療機関から連絡を受けた保健所は、検体の採取方法、採取時期について地方衛生研究所と調整し、地方衛生研究所への検体送付/搬入等の事務を行う。

(2) 「疑い例」・「可能性例」の報告様式中の症例IDを厚生労働省結核感染症課に確認し、医療機関に教示すると共に、今後の情報管理に使用する。

(3) (2)については、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律の施行に伴う感染症発生動向調査事業の実施について」(厚生省保健医療局長通知平成11年3月19日付け健医発第458号)に基づいて行う。

## 3 地方衛生研究所における対応

### (1) 検体の取扱について

医療機関における検体採取方法(参考1)

医療機関における検体採取方法等について、技術的な支援を行うとともに、搬入/送付時間、方法等を打ち合わせて受け入れ態勢を準備する。

医療機関からの検体取扱（参考1）

届いた検体は適切な方法で処理を行い、SARS コロナウイルスの検査を行う場合には、必ずオリジナルの臨床検体を適切な形で-80℃にて保存する。

国立感染症研究所への検体送付方法（参考1）

検体を送付する際には、事前に国立感染症研究所情報センターに検体提出票にて連絡し、入手した検体 ID を検体にラベル貼付して送付する。

## （2）検査方法について

PCR 検査（参考2）

ウイルス分離（参考3）

## （3）検査結果の取扱いについて

国立感染症研究所への連絡

検査結果は陰性陽性にかかわらず、感染症情報センターに連絡し、陽性の場合には、確認検査の依頼を行う。

管轄の保健所および医療機関への連絡

あらかじめ地域で合意された方法に従って、医療機関および保健所に検査結果とその後の対応を連絡する。

## 4 国立感染症研究所における対応

### （1）検査方法について

PCR 検査

SARS-コロナウイルスに特異的なプライマーで RT-PCR を行う。現時点で、感染研で使用しているプライマー、PCR 条件については、参考2を参照。

ウイルス分離

地衛研から送付されたウイルス分離用検体について、VeroE6 細胞を用いて SARS-コロナウイルスの分離を行う。検体の処理法等については、参考3を参照。

抗体検査

中和試験、ELISA、間接蛍光抗体法などによって、急性期と回復期のペア血清で抗体価の上昇によって判定する。現在、地衛研への配布が可能な抗体検査用の抗原を開発中であるが、当面は、抗体検査は感染研で行

う。なお、血清の採取時期などについては、感染研情報センターHP に掲載する予定である

( 2 ) 検査結果の取扱いについて

地方衛生研究所への連絡

RT-PCR、ウイルス分離および抗体検査で陽性結果が確認された場合は、感染研情報センターから速やかに連絡する。

厚生労働省への連絡

RT-PCR、ウイルス分離および抗体検査で陽性結果が確認された場合は、感染研情報センターから速やかに連絡する。

**参考**

( 以下の参考文献については、国立感染症研究所感染症情報センターホームページで、随時、最新情報を提供中 )

<http://idsc.nih.go.jp/others/urgent/update.html>

**参考 1** SARS コロナウイルスに関する検査対応について

( 国立感染症研究所 感染症情報センター )

**参考 2** RT-PCR 法による SARS コロナウイルス遺伝子の検出

( 国立感染症研究所 ウイルス第三部第 1 室 )

**参考 3** SARS コロナウイルス検出のためのウイルス分離用検体の採取・  
処理法およびウイルス分離

( 国立感染症研究所 ウイルス第三部第 1 室 )

(参考1)

## SARS コロナウイルスに関する検査対応について

(国立感染症研究所 感染症情報センター)

### 1. SARS における病原体検査方針

(1) 国立感染症研究所ウイルス第三部第1室(以下感染研)ではSARS コロナウイルスに関する特異的検査を行うが、それ以外の既知の病原体の検査は地衛研もしくは病院検査部で行う。

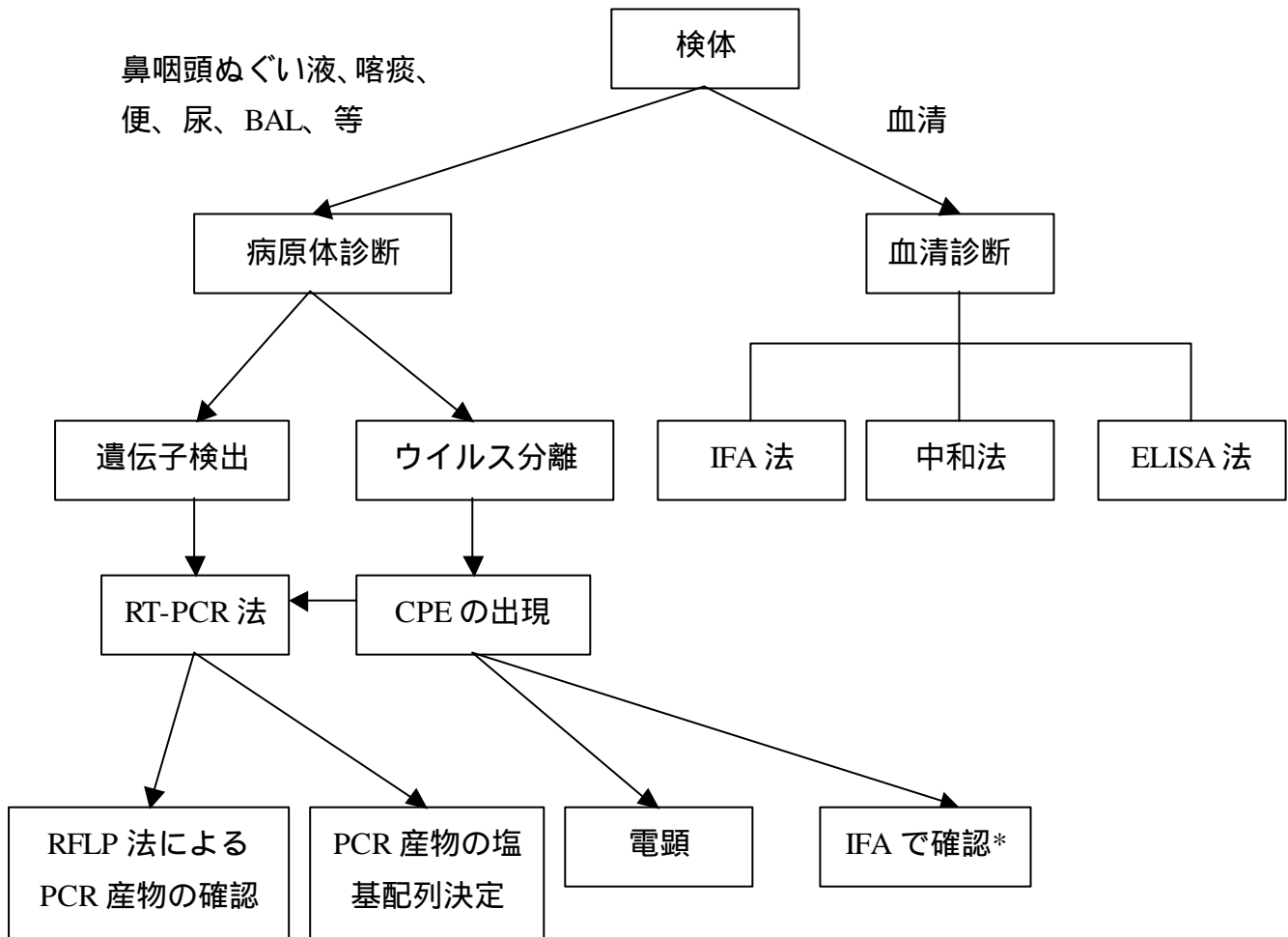
(2) 疑い例(suspected case)、可能性例(probable case)全員についてSARS コロナウイルス特異的ウイルス学的検査を実施する。

疑い例(suspected)でSARS コロナウイルス特異的検査において、複数の施設の結果が陽性であった場合、その時点で可能性例(probable case)として扱う。

#### (3)-1 (SARS コロナウイルス以外の病原体検査)

すべての疑い例(Suspected case)、可能性例(Probable case)について、原則的には地衛研もしくは病院検査部において、通常の病原体取り扱いに準じて飛沫感染、接触感染の予防に特に留意をしながらBSLレベル2で既知の肺炎を起こす(異型肺炎含む)病原体の一次スクリーニングを行うものとする。これには、一般細菌培養、迅速診断法(連鎖球菌など一般細菌、レジオネラ、クラミジア、マイコプラズマ、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、RSウイルス、その他について、地域における患者発生状況を考慮して、必要な病原体について検討する)、血清学的方法(マイコプラズマ、クラミジア)を含む。

### (3)-2 SARS コロナウイルスの検査対応



\* 現時点では、SARS コロナウイルス同定用の抗血清が無いいため、基本的には RT-PCR 法により同定検査を行う

#### (3)-2a (SARS コロナウイルスの分離)

(3)-1 に加えて、すべての疑い例(Suspected case)、可能性例(Probable case) について、ウイルス分離が可能な BSL レベル 3 施設を有する地衛研では SARS コロナウイルスを目的としたウイルス分離を行う。SARS コロナウイルス分離に使用する培養細胞は VeroE6 とする。LLCMK2 細胞は当初疑われていた human metapneumovirus について感受性があるが、SARS コロナウイルスには感受性はない。CPE が出現した場合には培養上清、培養細胞、当該臨床検体を感染研に送付する。地衛研においてウイルス分離が困難である場合は、臨床検体を感染研

に送付する。感染研に送付する場合は、いずれの場合も行政検査として対応するため、4. の検体受付に基づいて実施する。

### (3)-2b ( SARS コロナウイルスの遺伝子検索 )

SARS : 診断検査の入手状況と検査方法の実際 ( 5 月 1 日 5 訂 )

- ・ 臨床検査結果の解釈に関する提言
- ・ SARS の臨床検査に対する提言

<http://idsc.nih.go.jp/others/urgent/update45-lab.html> を参照のこと。

RT-PCR 法を用いて SARS コロナウイルスの検出を試みる際は、上記マニュアルを参照に地衛研において実施する。複数の施設での陽性確認が必要であるため、陽性結果が得られた場合は感染研にも検体を送付する。地衛研において実施が困難である場合は、臨床検体を感染研に送付する。送付に際してはウイルス分離と同様行政検査として 4. の検体受付に基づいて実施する。

## 2. 病原体検査のための検体採取方針

SARS の診断検査のための検体採取について ( WHO 4 月 2 9 日 )

<http://idsc.nih.go.jp/others/urgent/update41-ss.html> を参照のこと。

### 1 ) 検体の採取時期

- (ア) 鼻咽頭拭い液は、特に疾患初期の検体が有用である。
- (イ) 尿は RT-PCR 法を用いても発症早期の場合ウイルスが検出されないため、少なくとも発症 4 日以降の検体を用いる。
- (ウ) 便については、RT-PCR 法を用いると発症早期より検出が可能であり、発症 1 0 日頃をピーク ( ほぼ 100% 検出可能 ) として、発症 1 カ月頃まで検出が可能である。尚、発症 1 カ月後の便の感染性については不明である。
- (エ) 血清はできれば 1 週間毎に 1-2ml を冷凍保存し、可能な限り多くの病日で経時的に抗体価を測定する。少なくとも発症早期と発症 2 0 日以降の 2 検体については必須とする。

地域における SARS 関連コロナウイルス肺炎の集団発生での臨床経過中のウイルス量の前向き研究（4月30日）

<http://idsc.nih.gov/jp/others/urgent/update44-HKong.html> を参照のこと。

## 2) 検体毎の採取方法と検体送付方法

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、4℃（保冷剤）で輸送する。48 時間以上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、冷凍（ドライアイス）にて輸送する。ドライアイスは密閉した容器に入れないこと。梱包の方法は（送付容器 PDF 版）を必ず参照のこと。

(ア) 便（発症早期から発症 1 カ月頃まで RT-PCR 法で検出可能であるが、発症 10 日頃の検体の陽性率が最も高くほぼ 100%。）： 10～50ml の便を 50ml の生食に懸濁し、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、ビニール袋にいれる。

(イ) 喀痰（疾患初期及び病状悪化時の検体）： 通常の方法にて、自分で出せる場合には滅菌生理食塩水もしくは水道水で複数回うがいをして口腔内雑菌を除いた後、喀痰を採取してもらおう（唾液の混入は可能な限り避け、口腔内常在菌の混入を抑える。）。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。採痰容器は密栓できる喀痰専用容器（滅菌済み）に採取後、ジップ付きプラスチック袋に入れて速やかに提出する。

(ウ) 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の検体）： 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、口腔鼻咽頭拭い液の場合には咽頭後壁および扁桃領域を拭い、スワブを 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ります。1.5～2ml 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す。] のウイルス輸送



液体培地、ない場合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いれる。

(エ)尿(発症後3日間は検出されないため、少なくとも発症4日以降。発症10日頃の検出率は50%程度。その後検出率は漸減。): 50ml の尿を遠心分離し、沈査を2 3ml の上清に懸濁させ、コニカル試験管(ファルコンなど)にいれ、パラフィルムにてシールする。

(オ)血清(最低限、急性期と発症20日以降の2点。): 急性期血清はSARSが疑われた時点で即座に、回復期血清は発症20日以降に採取、輸送する。血液は血清に分離した後、それぞれ血清で1 2ml 程度が必要である。できれば、1週間毎に1-2ml づつ血清を保存し、可能な限り多くの病日の検体を輸送する。

### 3. コロナウイルスについて、SARS コロナウイルスの安定性、抵抗性について

コロナウイルスはヒトではこれまで風邪症候群の原因ウイルスの一つでしかなかったが、動物ではかなり様々な病気をおこす。実験動物の分野ではマウス肝炎ウイルス、家畜の分野では豚伝染性胃腸炎、鶏伝染性気管支炎など、愛玩動物の分野では猫伝染性腹膜炎等々がある。コロナウイルスに属するウイルスは3つの血清型に分けられる。ウイルス粒子の表面にはS (spike, surfaceあるいはE2), M (membrane), E (small membrane), HE (hemagglutinin esterase) 蛋白、内部にN (nucleocapsid)蛋白がある。このうち、HE 蛋白は1部のウイルスにのみ存在する。S 蛋白は中和活性、膜融合、レセプターとの結合を担っている。コロナウイルスの特徴として mutation 及び RNA recombination の頻度が高いことが挙げられる。

検体の採取、検査の実施にあたっては、以下の情報をよく理解しておくことが重要である。

WHO 研究施設ネットワークが集積した SARS コロナウイルスの安定性と抵抗性に関する最初のデータ (5月4日)

<http://idsc.nih.gov/others/urgent/update47-data.html> を参照のこと。

- 1) 37℃で4日間保存すると、検出限界以下にウイルス量は減少する。
- 2) 4℃では、21日目にも感染性が残る。4℃4日間保存のウイルス量は10の5.7乗程度。
- 3) 再凍結(-80℃)4日間保存でのウイルス量は10の6.7乗程度。
- 4) 室温でプラスチックなどに乾燥した状態でウイルスが付着していると2日間程度感染性がある。
- 5) 便中、特にpHの高い下痢便中では4日間程度生存する。
- 6) 血清については、56℃30分の通常の処理で感染性はなくなる。
- 7) エタノールでは10分程度でウイルスは不活化する。
- 8) アセトン20分間処理あるいはエーテル10分間処理で、完全にウイルスが不活化されない報告もあり注意が必要。
- 9) 0.1%程度のNP40では20分処理しても感染性が残る(ドイツの研究所からの報告)。
- 10) 石鹼やリタージェントでの感染性の不活化は困難である。

#### 4. 感染研での検査の範囲と結果報告

- (1) 感染研において行う検査は、SARS コロナウイルスについての特異的検査とする。
- (2) 暫定的結果の報告は可及的速やかに行うものとする。
- (3) 結果は情報センターを通して、行政担当部局と医療機関への同報送信とする。
- (4) 情報センターでは、すべての情報をいれたデータベースを維持するものとし、結果報告の管理も行う。

#### 5. 検体受付

- (1) 感染研による検査は、医療機関、保健所、都道府県、地衛研などの合意の元、行政からの依頼によるものとする。病院からの直接の問い合わせについては、情報センターにて、ここに記載する原則を説明することとする。
- (2) 上記1の(3)のクライテリアに合致するものは、まず情報センターにて受付を行い、情報センターが患者および各検体に対して各々ID番号をつける。今後は、すべての連絡にこのID番号を使用する。この際、医療機関担当者、検査担当者、行政担当者のコンタクトリストを受け取るものとする。

(注) 症例 ID は、都道府県番号 + 患者イニシャル + 感染研にて受付順のシリアルナンバー (001 より始まる) + 診断カテゴリー (S : Suspected ; P : Probable ; D : Discarded R ; research とし、これはカテゴリーが変わった場合には、SP (S から P) SD (S から D) のように連続して付記する) とし、検体 ID は、症例 ID に引き続く、\_ (アンダーバー) + 検体種別 (P 鼻咽頭ぬぐい液・洗浄液 ; S 喀痰 ; R 肺胞洗浄液 ; B 血液 ; U 尿 ; F 便 ; M その他) + 検体採取日時 (患者から採取した日付で、例えば 2003 年 4 月 4 日午後 3 時 5 分であれば、0304041505 とする。午前 9 時 5 分であれば、0304040905(AM)とする。) + (同時に数検体とった場合には順に 1、2 と括弧内に入れる) ものとする。CPE 陽性培養上清の場合には、検体種別の前に Y を入れる。

(3) この情報とともに、情報センターは、ウイルス 3 部第 1 室に検体受付を連絡し、ウイルス 3 部第 1 室が具体的な検体送付方法とタイミングについて先方の担当者と相談する。

(4) 検体の搬送方法は、基本的に天然痘の検査材料の輸送方法 (添付 2) に準じるものとし、上記 (3) によって合意された時間指定で送付するか、持参するものとする。

(5) 検体受付時間は、原則として勤務時間帯 (9 : 00 17 : 00) とし、土曜日、日曜日、祝祭日は検体を受けることはできない。但し、緊急の場合には、個別に対応する。

(添付) 検体の送付方法はこの中に詳しく説明されています。

1. 「重症急性呼吸器症候群 (SARS) 管理指針」 ([PDF](#) 100K)
2. 「検査材料の採取・送付に関する追加情報」 ([PDF](#) 64K)

## 連絡先

国立感染症研究所感染症情報センター

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1  
TEL03-5285-1111 (代) FAX03-5285-1129

#### **検体送付先**

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  
TEL042-561-0771、FAX042-561-0812

(注) この検査対応方針は、現時点までの知見に基づく、暫定的なものであって、今後の新たな知見の発見、あるいは国内の状況によって、随時更新されるものとする。

(参考2)

## RT-PCR 法による SARS コロナウイルス遺伝子の検出

国立感染症研究所ウイルス第三部第1室

はじめに

現在 WHO web サイト (<http://www.who.int/csr/sars/primers/en/>) には、RT-PCR 法で SARS-コロナウイルスのポリメラーゼ遺伝子を検出するための7種類のプライマーセットが公表されている。これらは、特異性は高いものの感度が鈍いという欠点があり、このため使用するプライマーセットによっては偽陰性による見落としの可能性もある。感染研においても、これらプライマーを用いて至適条件を検討しているが、陽性の臨床検体が限られていることから、現在のところ臨床材料から高感度にウイルス遺伝子を検出できる条件を決定するには至っていない。しかしながら、今回各地方衛生研究所等で SARS-コロナウイルスの遺伝子検出試験が実施されるに際して、不完全ではあるが感染研で行っている RT-PCR 法について解説し、参考として供することとした。

PCR の感度は使用する酵素のメーカーや PCR チューブの材質、サーマルサイクラーの機種によっても大きく影響を受けることが知られている。現在まで感染研が行った検討においては SAR1s/as のプライマーセットを用いると、比較的高感度にウイルス遺伝子を検出できると考えているが、米国 (CDC)、香港、フランクフルト等の研究施設から SARS-コロナウイルスの全塩基配列が報告されていることから、今後さらに検出感度の高いプライマーの設計、RT-PCR 条件の改良等を行っていく予定である。

従って、実施される各地方衛生研究所等の現場担当者の方々からの提案等についても検討をして、共同で検出方法の手順の標準化を行っていきたいので、ご協力をお願い致します。

### <原則>

現時点では、ここに示すプライマーを用いた RT-PCR 法は、感度、検体の採取日、個人差等で偽陰性となることがあるので、陰性の検査結果は SARS コロナウイル

ス感染を否定するものではないことに注意していただきたい。

<PCR 陽性検体が確認された場合の対応>

1 陽性結果が出た際には、直ちに陽性と判断してはならない。異なる検査施設においてダブルチェックを行うとのWHOの指針に基づいて、最初の臨床検体を感染研に送付し、確認試験を行った上で最終的に判定すること。

2 現時点では、PCR陽性となる病日、検体の種類、個人差などの成績が十分に集積していないので、1検体のみでの判定では信頼性が低い。PCRの結果の解釈に関しては、PCRの結果およびウイルス分離結果を、ペア血清における抗体価の測定結果と比較検討していく必要がある。

3 PCRで陽性例が検出されたときの具体的な対応としては、異なるプライマーセットで再度PCRを行い、予想されるバンドが増幅されるか確認し、さらに塩基配列の決定によりPCR産物を確認する（詳細はマニュアルを参照）。

<RT-PCR法の実際>

1. プライマーについて：

感染研ではWHOから公表されている7種類のプライマーについて、分離ウイルスを陽性対照として種々のPCR条件で検出感度を検討した。それらの中で比較的感度が高かったプライマーは下記の3セットである。

SAR1s：

(sense) CCT CTC TTG TTC TTG CTC GCA

SAR1as：

(antisense) TAT AGT GAG CCG CCA CAC ATG

Fragment length 121 bp

BNIinS：

(sense) GAA GCT ATT CGT CAC GTT CG

BNlAs :

(antisense) CTGTAGAAA ATC CTA GCT GGA G

Fragment length 108 bp

BNloutS2:

(sense) ATGAAT TAC CAA GTC AAT GGT TAC

BNoutAs :

(antisense) CAT AAC CAG TCG GTA CAG CTA C

Fragment length 189 bp

(Fragment length は N. Engl. J. Med. April 10, 2003 を引用)

\* ) BNlinS/As, BNloutS/As プライマーセットは、ネスト PCR 用に開発されたものであるが、実験室内コンタミネーションを極力防ぐために、感染研ではネスト PCR を行っていない。

2 . 上記 3 種類のプライマーセットでの感度の比較。

SAR1s/as > BNlinS/As > BNloutAs/S2

3 . 海外からの臨床検体陽性例の RT-PCR 産物の部分塩基配列を決定した例 (NIID, Tokyo):

SAR1s/as fragment:

CDC が報告している SARS-コロナウイルスの塩基配列 3098 から 3158 に相当し、その配列は 100 %同一であった。

AAACATAACACTTGCTGTAACCTTATCACACCGTTTCTACAGGTTAGCTAACGAGTGTGCGC

BNloutAs/S2 fragment: BNlinS/As fragment included.

CDC が報告している SARS-コロナウイルスの塩基配列 5988 から 6127 に相当し、その配列は 100 %同一であった。

ATATGTTTATCACCCGCGAAGAAGCTATTCGTACGTTTCGTGCGTGGATTGGCTTTGATGTAGAGGGCTG  
TCATGCAACTAGAGATGCTGTGGGTAACCTACCTCTCCAGCTAGGATTTTCTACAGGTGTTAACTTA

BNlinS/As fragment:

CDC が報告している SARS-コロナウイルスの塩基配列 6027 から 6074 に相当し、その配列は 100 %同一であった。

GTGCGTGGATTGGCTTTGATGTAGAGGGCTGTCATGCAACTAGAGATG

#### 4. 感染研で現在行っている検体からの RNA 抽出および RT-PCR 法の詳細:

感染研では SARS の病原体検索を SARS-コロナウイルス同定以前より実施しており、他の病原体検索を可能にするために、逆転写反応 (RT) と PCR を独立して行っている。SARS-コロナウイルスのみを対象とするのであれば、1 チューブ反応とすることも可能である。

##### < RNA 抽出 >

ウイルス RNA の抽出には市販のキット (例えば RNeasy Mini Kit (QIAGEN)) を使用し、方法は添付のマニュアルに準拠している。

##### 検体の処理方法について

血清、尿、検体を接種した細胞培養上清等の液体状のサンプルは 50 100 $\mu$ l を RLT buffer ( -ME+) 350 $\mu$ l で処理して、それ以降のステップに使用している。その他の主な検体の処理方法は以下の通りである。

##### 喀痰:

50 100 $\mu$ l を RLT と混合する。20 ゲージの注射針をつけた 1ml ディスポーザブルシリンジで、粘性がなくなるまで混合液を数回出し入れする。夾雑物がある場合は遠心し、上清を使用する。

##### 鼻咽頭拭い液、洗浄液、吸引液:

50 100 $\mu$ l を RLT と混合する。洗浄液、吸引液に粘性がある場合は喀痰と同様の処理をする。夾雑物がある場合は遠心し、上清を使用する。

##### 便:



適量を RLT buffer に入れ、ペッスルで破碎する。遠心し、その上清を使用する。  
水様便の場合は、50 100 $\mu$ l を RLT と混合した後、遠心して上清を使用する。

組織：

適量を RLT buffer に入れ、ペッスルで破碎する。20 ゲージの注射針をつけた  
1ml ディスポーザブルシリンジで混合の出し入れを繰り返し、さらに細かく破碎  
した後、遠心して上清を使用する。

### RNA の溶出について

最終的に 50 $\mu$ l の RNase を含まない蒸留水で溶出し、全量を逆転写 (RT) 反応に  
使用する。

< 逆転写 (RT) 反応 >

市販のキット (現在は Ready-to-Go RT-PCR Beads\* (Amersham Biosciences))  
を使用して RT 産物を合成している。プライマーは付属の pd(N)<sub>6</sub> プライマーを  
0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l に希釈して使用する。

このように精製した RNA から cDNA を合成しておくことによって再検用に使  
用でき、RNA を保存したものより安定した結果が得られる。

\* Ready-to-Go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences) は One-step で PCR まで  
行うことのできるキットだが、感染研では試薬調製の手間を省くためこれを RT  
反応に使用し、RT 産物の一部を次の PCR に使用している。

RNA	50 $\mu$ l
pd(N) <sub>6</sub> primer (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

以上を Beads の入ったチューブに入れる

42	30 分
95	5 分

5  $\mu$ l を PCR へ、残りを -80 で再検用に保存。

< PCR >

市販のキット ( PCR Master Mix ( Promega ) ) を使用している。

#### 検出に使用している primer について

現時点では以下の 3 種類のプライマーセットを使用している。

SARS1s – SARS1as ( 121bp、アニーリング温度 : 56 )

BNloutS2 – BNloutAs ( 189bp、アニーリング温度 : 50 )

BNlinS – BNlinAs ( 108bp、アニーリング温度 : 50 )

- ・ SARS1s – SARS1as で最初のスクリーニングを行う。
- ・ 陽性のバンドが検出された場合は、以下の方法で陽性の確認を行っている。  
PCR 産物を鋳型にして SARS1s – SARS1as で再度 PCR を行う。陽性であればより鮮明なバンドが検出される。

RT 産物からそれぞれ BNloutS2 – BNloutAs、BNlinS – BNlinAs を用いて PCR を行う ( これらのプライマーは、SARS1s – SARS1as set より感度が低いので、1 回目の PCR ではバンドは検出されない。また、これらのプライマーによって増幅される領域は SARS1s – SARS1as セットによって増幅される領域とは別である )。その PCR 産物を鋳型にして同じプライマーで 2 回目の PCR を行い、陽性のバンドの有無を確認する。

できるだけ RT-PCR 産物の塩基配列を決定する。

PCR の条件設定 ( サーマルサイクラーは BioRad iCycler ( 0.2ml チューブ仕様 ) を使用 )

RT product	5 $\mu$ l
Forward Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Nuclease free water	18 $\mu$ l
<u>PCR Master Mix, 2X</u>	<u>25<math>\mu</math>l</u>

95 4分

95		30秒	} x40
56	or 50	30秒	
72		1分	

72 7分

**(注意1):** 本プロトコールで特定のメーカーの商品名を示しているのは、それらの使用を推奨しているものではなく、本研究所での実施条件を明らかにする目的からである。

**(注意2):** 現在、SARS コロナウイルス検出用として市販されている種々のPCRキットについては、現時点では性能試験または研究用にのみ使用し、診断用には使用してはならない。

( 参考 3 )

## SARS コロナウイルス検出のための ウイルス分離用検体の採取・処理法およびウイルス分離

国立感染症研究所ウイルス第三部第 1 室

### < 原則 >

現時点では、ウイルス分離検査において検体の採取日、個人差等で陰性となることがあるので、陰性の検査結果は SARS コロナウイルス感染を否定するものではないことに注意していただきたい。

- 1 SARS-コロナウイルスは当面、WHO では BSL3 で扱うことが決まっている。また、感染研においても現時点では BSL3 で対応することが決まっている。
- 2 SARS 関連の患者検体の処理は、BSL 2 またはそれ以上のレベルで行わなければならない。
- 3 細胞への検体の接種は、BSL3 で対応しなければならない。従って、必ず安全キャビネット内ですべて処理できるように、また検体の飛散や汚染の拡大が起こらないように工夫する必要がある。

下記に示す方法は通常ウイルス分離検査で行われている方法であり、SARS-コロナウイルスの分離においても基本的には同様の操作で行う。

臨床検体からウイルスの分離率を高めるためには、採取された検体は可能な限り早期に細胞に接種される必要がある。検体採取から細胞に接種するまでは、4 に冷やしておく。

### 細胞の準備：

VeroE6 細胞は SARS コロナウイルスに感受性がある。

96 穴のマイクロプレートや 24 穴のマイクロプレート、細胞培養用カルチャーボトル等にウイルス分離に使用する細胞の単層を作製する。普通 3~4 日後に単層ができるように細胞を調製して細胞をまく。

### 検体の処理と接種：

1. 咽頭スワブ，鼻腔スワブの場合：

a) 輸送培地：

[Eagle's MEM(E-MEM)+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]

\* 輸送培地に含まれるゼラチンはオートクレーブ処理してから使用する必要があるため、オートクレーブ可能な Eagle's MEM (Nissui) などを使用すると簡単に輸送培地を準備できる。

b) 検体を培養細胞へ接種後の維持培地

E-MEM + ペニシリン G 500 U/ml, ストレプトマイシン 500 µg/ml + 2%FBS

\* 咽頭スワブや鼻腔スワブを滅菌された綿棒で採取したら、輸送培地に攪拌する。一般的に呼吸器ウイルスは細胞内に多く存在するので、できるだけ多く細胞成分を擦過して得るようにする。ただし、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に攪拌してもよい。

c) 接種

検体を接種する場合には、細胞を PBS で洗浄してから行う。

スワブが攪拌された輸送培地を 4 で、3,000 回転 15 分間遠心し（混在する細菌を除去するため）、その上清液を細胞に接種するための検体とする。

細胞がマイクロプレートで培養されている場合には、維持培地（抗生物質と 2%FBS 含有 D-MEM）を細胞が培養されているウェルに培養に必要な量の半分（96 ウェルマイクロプレートの場合は 0.1 ml、24 ウェルマイクロプレートの場合は 0.5 ml）を加えておき、等量の検体を接種する。

ボトルやチューブで細胞が培養されている場合には、検体を細胞全体にひろがるくらい加え、1 時間経ってから（検体に含まれていると想定されているウイルスを細胞に吸着させてから）維持培地を適量加えるとよい。また、複数の患者からの検体を接種する際は、異患者間のクロスコンタミネーションを防ぐために、別のプレートに接種するか、やむなく同一プレートを用いる場合は、接種穴の間隔を十分にとる。

2. 気管洗浄液、鼻腔吸引液および喀痰の場合：

生理食塩水や PBS で得られた気管洗浄液や鼻腔洗浄液の場合には、維持培地で 10 倍程度に希釈し、4 で、3,000 回転 15 分間遠心して得られた上清液を

検体とする。

PBS で洗浄した細胞に、この検体を咽頭スワブや鼻腔スワブの場合と同様に接種する。

### 3 . 尿の場合 :

検体である尿を 4 で、3,000 回転 15 分間遠心し、その上清液を接種する。検体を細胞に接種後、37 で 1 時間培養 (吸着反応) する。吸着反応後に PBS で 3 回洗浄し、適当量の維持培地で細胞を培養する。

\* 尿は細胞毒性が比較的強く、吸着反応の時間を 30 分にしたほうがよい場合もある。

### 4 . 便の場合 :

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 , 6,000 回転 5 分間遠心し、その上清を接種する。細胞毒性が比較的強い場合が多いことから、検体接種後、炭酸ガス孵卵器内で 30 60 分の吸着が終わったら、PBS で 3 回以上よく細胞を洗浄することが重要である。

### 5 . 組織の場合 (参考):

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懸濁液を作る。4 で 3,000 回転 15 分間遠心し、その上清液を接種する。

吸着時間の後、適当量の維持培地で細胞を培養する。

\* 細胞毒性が出ることもあるので、吸着反応後に検体を除去する方がよい場合もある。

### 6 . 血清の場合 (参考):

維持培地で血清を 1 : 10 に希釈する。

4 で、3000 回転 15 分間遠心し、その上清を接種する。

吸着時間の後、適当量の維持培地で細胞を培養する。

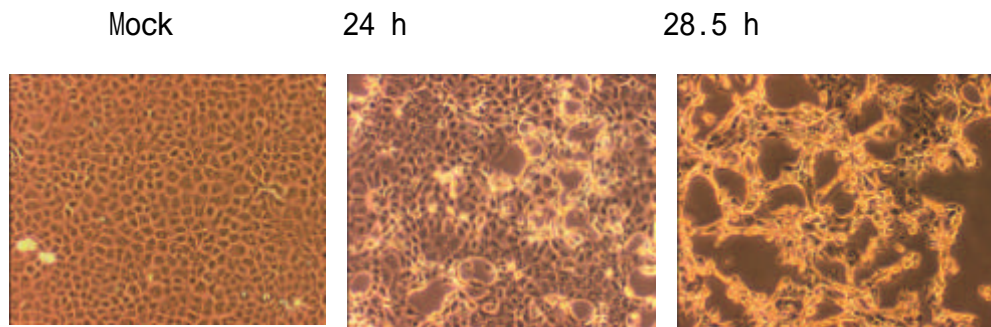
### 細胞培養および細胞変性効果 (cytopathic effect, CPE) の観察 :

検体接種後の細胞の培養は 35 37 が適当と思われる。ちなみに感染研では、37 で培養している。

検体接種後には、毎日 CPE の出現の有無、細胞の性状を観察する。さらに、SARS 関連のコロナウイルスの CPE の出現は接種検体にもよるが比較的早い（3 6 日目）と報告されている。必ず非接種細胞を対照として置く。

（参考）

- 1 現在、感染研では 24 穴プレートに検体を接種し、1 週間後に新しい維持培地を 0.5 ml 追加して、合計 2 週間 CPE を観察している。
- 2 臨床検体の種類によっては、接種後に細胞毒性による細胞の変化が起こることがあるので、CPE と混同しないように注意する。また、細胞毒性による細胞の変化が疑われる際は、新しい維持培地に交換することによって細胞が正常に戻ることがある。
- 3 海外での SARS コロナウイルス分離成功例によれば、検体接種後 3 6 日目頃には細胞の円形化、一部脱落などの CPE が観察され、その上清を新しい細胞に継代すると比較的速やかに（24 48 時間）CPE が出現し、48 時間ごろまでには大部分の細胞が剥がれ落ちるといった観察結果が報告されている。
- 4 VeroE6 細胞に SARS-Corona ウイルス（moi of >1.0）を感染させた時の CPE の形態。CPE が出現し始めると、その進行は比較的早い。



（参考文献；The New England Journal of Medicine, April 10, 2003;  
[www.nejm.org](http://www.nejm.org)）

#### 分離ウイルスの同定：

VeroE6 細胞によるウイルス分離では、SARS コロナウイルスだけでなく単純ヘルペスウイルス、エンテロウイルス、パラインフルエンザウイルス、RSウイルス、レオウイルス 1,2,3、等の種々のウイルスが分離される可能性がある。このため、CPE が出現してもコロナウイルスか否かを同定する必要がある。

現時点では、SARS コロナウイルス同定用の抗血清が無いため、基本的に

は RT-PCR 法により同定検査を行う。CPE 陽性の培養上清を変性剤含有バッファー（RLT buffer）で処理するまでは、BSL3 で行う。それ以降の RNA 抽出操作は BSL2 で行ってもよい。

RT-PCR 法による新型コロナウイルスの同定については、WHO web サイト（<http://www.who.int/csr/sars/primers/en/>）や参考文献（The New England Journal of Medicine, April 10, 2003; [www.nejm.org](http://www.nejm.org)）に掲載されている。また、現時点で感染研で採用しているプライマーや PCR の条件については、感染研情報センターHP に掲載している。しかし、現時点では、検出感度の高い至適プライマーや PCR 条件の開発が進行中であることから、偽陰性による見落とし例の問題点が指摘されている。従って、新規のプライマーや PCR の条件等の情報は暫時更新されるので、情報センターHP を時々チェックしていただきたい。

CPE 陽性の培養上清は、分離ウイルスの同定確認試験のために、もとの臨床検体および地衛研で行った他の病原体除外試験の成績とともに、感染研に送付する。

CPE 陽性が出た場合の最終判定は感染研での確認試験と合わせて行う。

サンプル送付先：

国立感染症研究所ウイルス第三部第 1 室 小田切孝人

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

TEL042-561-0771、FAX042-561-0812