

鳥インフルエンザウイルス H5/H7 亜型同定
検査マニュアル
(第4版)

(令和8年2月)

本検査マニュアルは、公衆衛生上ヒト感染リスクのある鳥インフルエンザウイルス H5 及び H7 亜型同定検査法について記載したものである（ただし、H7 亜型同定検査法は、2013 年から 2019 年にかけて中国を中心に流行した H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルスを対象とした検査法であり、他系統の H7 亜型鳥インフルエンザウイルスは検出できない場合がある）。なお、季節性インフルエンザウイルスの遺伝子検出検査やウイルス分離については、インフルエンザ検出マニュアル（第 6 版）を参照のこと。

目次

Part I: 高病原性鳥インフルエンザの概要

1 高病原性鳥インフルエンザの概要	----- 4
2 検査の進め方	----- 6
3 ウイルス遺伝子検出検査について	----- 7

Part II: ウイルス検査法

1 インフルエンザウイルス検査のための臨床検体	
1. 1 臨床検体	----- 1 0
2 ウイルス遺伝子検出検査による H5 または H7 亜型鳥インフルエンザウイルスの同定	
2. 1 RNA 抽出	----- 1 1
2. 2 リアルタイム RT-PCR (TaqMan Probe 法) による同定	----- 1 2
2. 3 (参考) Conventional RT-PCR 法による同定	----- 2 1
2. 4 (参考) H9 亜型の同定に関する情報	----- 2 5
3 (参考) 喀痰の取扱いについて	
3. 1 喀痰検体の前処理方法について	----- 2 6
3. 2 RNA 抽出を行う前の DNase 処理について	----- 2 7
本マニュアルに関する問合せ先及び執筆者リスト	----- 3 0

前版からの主な変更点

- ・ リアルタイム RT-PCR 法による H5 亜型同定法において一部プライマー及びプローブの配列を変更した。また、現在流行している高病原性鳥インフルエンザウイルスの NA 亜型は様々であるとともに、前版に記載した N1 亜型同定法（リアルタイム RT-PCR 法及び Conventional RT-PCR 法）は、他系統の N1 亜型遺伝子を検出できない場合があることから、本版では削除した。
- ・ 鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出マニュアル（第 2 版）と統合し、本マニュアルに H7 亜型同定法を追記した。

高病原性鳥インフルエンザの概要

1 高病原性鳥インフルエンザの概要

A 型インフルエンザウイルスは、8 分節のマイナス鎖 RNA をゲノムに持ち、ウイルスの表面蛋白質である赤血球凝集素 (HA) とノイラミニダーゼ (NA) の抗原性の違いにより、それぞれ H1~H19 及び N1~N11 亜型に分類されている。A 型インフルエンザウイルスの自然宿主はカモなどの水禽類であり、その多くは感染しても症状を示さない不顕性感染により自然界に広く分布しており、鳥類からはこれまでに H1~H16、H19 亜型と N1~N9 亜型ウイルスが分離されている。これらの亜型の中で H5 及び H7 亜型ウイルスのみが、家禽 (鶏・アヒル・ウズラ・ダチョウ・七面鳥など) に感染して伝播を繰り返すうちに変異して、家禽に対して高い致死率を示す高病原性鳥インフルエンザウイルス (HPAIV) が出現することがある。その高病原性化には、HA 蛋白の開裂部位への連続した塩基性アミノ酸残基の挿入が重要な役割を果たしていることが知られている。

1997 年に香港で初のヒト感染が確認された H5N1 亜型 HPAIV は、2003 年末から日本を含む東・東南アジア諸国の家禽及び野鳥の間で流行が拡大し、その後、ユーラシア大陸から西に向けて流行地域が拡大し、アフリカ大陸でも流行が確認されるようになった。2021 年以降は北アメリカ大陸で、2023 年以降は南アメリカ大陸、南極大陸で流行が確認され、2025 年 11 月時点での流行地域はオーストラリアを除く全大陸に拡大した。H5N1 亜型 HPAIV は、A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1) を起点とした HA 遺伝子の分子系統解析により 2004 年に clade 0 から 9 に分類され、その中の clade 2 から派生した亜系統の一つである clade 2.3.4.4b を中心に、H5 亜型 HPAIV の鳥類での世界的な広がりが確認されている。また clade 2 から派生した H5N1 亜型 HPAIV を起源に、鳥の中で様々な NA 亜型ウイルスとの同時感染による遺伝子交雑が繰り返され、様々な NA 亜型 (N1, N2, N3, N5, N6, N8 など) の H5 亜型 HPAIV も出現している。

1997 年以降、H5N1 亜型 HPAIV のヒト感染例は、2026 年 1 月までに 25 カ国/地域で約 1,000 例が報告され、そのうち約半数は死亡例であった。これらのヒト感染例の殆どは病鳥との濃厚接触が原因であり、継続的なヒト-ヒト感染例は報告されていない。近年の鳥類における clade 2.3.4.4b の世界的な感染拡大に伴う感染鳥から哺乳動物への感染機会も増え、陸生動物のみならず海生動物での感染例も多数報告されるようになった。2024 年 3 月にはアメリカで、乳牛で初となる H5N1 亜型 HPAIV の感染が確認され、2025 年 12 月までに乳牛での clade 2.3.4.4b 感染はカリフォルニア州を中心に 19 州へ拡大し、感染乳牛からのヒト感染例が 40 例以上報告されている。また、アメリカでの家禽等からのヒト感染例が 25 例以上報告されている。clade 2.3.4.4b 以外では、カンボジアでは 2023 年以降に clade 2.3.2.1c

および clade 2.3.2.1c から派生した clade 2.3.2.1e による 40 例以上のヒト感染例、2024 年にインドからオーストラリアに帰国した旅行者への clade 2.3.2.1a による感染例が報告されている。さらに中国では H5N6 亜型 HPAIV、ロシアでは H5N8 亜型 HPAIV、メキシコでは H5N2 亜型 HPAIV、アメリカでは H5N5 亜型 HPAIV のヒト感染が散発的に確認されるなど、様々な NA 亜型の H5 亜型 HPAIV によるヒト感染例が報告されているが、H5N1 亜型も含め H5Nx 亜型 HPAIV の持続的なヒト-ヒト感染は確認されていない。

H7 亜型鳥インフルエンザウイルスについては、2013 年 3 月に中国から初となる H7N9 亜型低病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例が世界保健機関（WHO）に報告され、2016 年後半には、高病原性に変異した H7N9 亜型 HPAIV のヒト感染も報告されるようになった。2019 年 3 月までに、中国を中心に計 1,568 例のヒト感染例と 616 例（39%）の死亡例が報告されたが、2019 年 3 月を最後に H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例の報告はない。

2 検査の進め方

正しい検査結果を得るためには、検体採取時に環境からの汚染がないように採取し、検体間でクロスコンタミネーションが行わないように適切な対策（手指衛生の徹底、器具の使い回しを避けるなど）を講ずる必要がある。また、一連の検査時における検体へのコンタミネーションにも細心の注意を払う必要がある。さらに、検査を実施する際には実験室でのウイルス曝露に十分に注意をする。H5/H7 亜型鳥インフルエンザウイルス感染が疑われる臨床検体を用いて BSL2 実験室にてウイルス分離を伴わずにウイルス遺伝子検出検査のみを実施する場合も、必要に応じて PPE を強化するなど各検査施設の規則に従う必要がある。

H5N1 及び H7N9 亜型鳥インフルエンザは、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（感染症法）により「二類感染症」に指定され、H5N1 及び H7N9 亜型鳥インフルエンザの症例定義に従い感染が疑われる場合は、鼻腔吸引液、鼻腔拭い液、鼻咽頭拭い液、咽頭拭い液、喀痰、気道吸引液、肺胞洗浄液、結膜拭い液（結膜炎の場合）、剖検材料のいずれかを用いて、実験室診断を実施する必要がある。なお、H5 または H7 亜型を同定した場合は、当該患者を疑似症患者として感染症法に定める届出を直ちに行うとともに、HA 亜型の確定および NA 亜型の同定・確定のために国立健康危機管理研究機構等への検体等送付が必要となる。NA 亜型が確定し、H5N1 または H7N9 亜型鳥インフルエンザと診断された場合は、感染症法で定められた届出を直ちに行う必要がある。

なお、H5 及び H7 亜型鳥インフルエンザウイルスは、上気道側よりも下気道側（喀痰、気道吸引液等）でウイルスの増殖性が高い場合がある事が報告されており、鼻腔拭い液（鼻前庭または鼻甲介における検体採取拭い液）ではウイルスが検出されず、咽頭拭い液や下気道側の検体からウイルスを検出できる場合がある。一方で、季節性インフルエンザウイルスは、鼻咽頭拭い液、鼻腔拭い液、鼻腔吸引液を用いた方が咽頭拭い液を用いるよりもウイルス検出率が高い(ウイルス性肺炎が疑われる場合は除く)。そのため、季節性インフルエンザウイルスと H5 及び H7 亜型鳥インフルエンザウイルスの鑑別診断を行う場合は、鼻咽頭拭い液あるいは鼻腔拭い液といった上気道に近い検体と、咽頭拭い液や喀痰、気道吸引液あるいは肺胞洗浄液などの下気道に近い検体の両方を採取して検査を実施する事により、季節性インフルエンザあるいは H5N1 及び H7N9 亜型鳥インフルエンザの診断精度の向上が期待できる。

また、アメリカにおける乳牛からの H5N1 亜型 HPAIV ヒト感染にて結膜炎（目の充血、痛みや分泌物）を呈している場合は、高頻度に結膜拭い液からウイルスが検出されることが報告されている。さらに 2003 年にオランダで報告された感染した家禽からの H7N7 亜型 HPAIV ヒト感染例では、結膜炎が主症状の一つであることが報告された。一方で中国における H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例では結膜炎を併発したという報告

はないが、H5 亜型あるいは H7N9 亜型以外の H7 亜型鳥インフルエンザウイルスのヒト感染が疑われて結膜炎を呈している場合は、結膜拭い液もこれらウイルスを同定するための有用な検体となりうる。

3 ウイルス遺伝子検出検査について

H5 または H7 亜型鳥インフルエンザウイルス感染の実験室診断は、ウイルス遺伝子検出検査あるいはウイルス分離による病原体の検出・同定によって行われる。2026 年 1 月現在、保険適用されているインフルエンザ検査薬で A 型および B 型インフルエンザウイルスを型判別可能な迅速診断キットや、multiplex nested RT-PCR 法による同時多項目病原体遺伝子検出が可能な FilmArray®呼吸器パネル 2.1 や BioFire® SpotFire® パネルなどの全自動遺伝子解析装置がインフルエンザの診断に利用されているが、H5 または H7 亜型の同定はできないため、現時点ではウイルス遺伝子検出検査によりこれら亜型を同定するのが最も確実な実験室診断法となる。

H5 または H7 亜型の同定は、リアルタイム RT-PCR などのウイルス遺伝子検出検査により M 遺伝子（A 型同定のための Type A 検出系）の検出および H5HA または H7HA 遺伝子の検出（各亜型検出系）により行う。こうしたウイルス遺伝子検出検査で検査が適切に行われたかどうかを確認するため、一回の検査毎に以下の陰性及び陽性コントロール（対照検体）についても同時に検出検査を実施することが望ましい。

- ・ RNA 抽出陰性コントロール：RNA 抽出過程に陰性検体を 1 つ設定
- ・ リアルタイム RT-PCR 陰性コントロール：検出系ごとに滅菌蒸留水などの陰性検体を 1 つ設定
- ・ RNA 抽出陽性コントロール：RNA の抽出過程に陽性検体を置く場合もあるが、実験室汚染（コンタミネーション）による偽陽性のリスクがあるため推奨しない。
- ・ リアルタイム RT-PCR 陽性コントロール：検出系ごとに最低でも一つ陽性検体を設定

これら陽性コントロールはコンタミネーションによる偽陽性を引き起こすリスクがあるため、慎重に取り扱う必要がある。特に臨床検体、抽出したサンプル RNA や反応試薬などが汚染されないように、検査作業の順序、使用する器具、作業スペースなどを十分考慮する必要がある。RNA 抽出陽性コントロールを使用する場合は、Type A 検出系で最小限に検出できるようにあらかじめウイルス濃度を調製した H1N1 あるいは H3N2 亜型の季節性ヒトインフルエンザウイルスを使用するとよい。RNA 抽出陽性コントロールを使用しない場合は、RNA 抽出試薬の精度管理（試薬のロット管理、検査する人の定期的な技能チェック、ロット変更時及び定期的に行う試薬の性能チェックなど）を行う必要がある。また、検体からの RNA 抽出過程の確認のため、検査と同時に内在性コントロール(ハウスキーピング遺伝子など)の確認を行ってもよいが、検体採取時の条件あるいは採取検体の状態によって

は内在性コントロールが検出されないこともあるため、結果の解釈には留意が必要である。

検査の流れと結果の解釈例は、図1の通り。Type A 及び H5 または H7 の両方の検出検査結果が陽性であった場合は、H5 または H7 の陽性例とする。Type A 及び H5 または H7 のいずれの検出検査結果も陰性であった場合は、H5 及び H7 のいずれも陰性例とする。ただし、H5 または H7 亜型鳥インフルエンザウイルスに感染していても、検体採取がウイルスやその遺伝子を排出する適切な時期に行われなかった場合など、検体採取時にリアルタイム RT-PCR の検出限界以下のウイルス量しか採取できなかった場合は、これら遺伝子検出検査が陰性となる場合があるため、検出検査結果の解釈には留意が必要である。Type A の検出検査結果が陽性で H5 または H7 の検出検査結果が陰性であった場合は、他の亜型である可能性も考えられ、季節性の H1pdm09 や H3 亜型同定のための追加検出検査が必要となる。この際、Type A の検査で得られた Cp 値 (Ct 値) が検出限界付近の場合など、ウイルス RNA 濃度が低く同じ RNA 抽出液を用いた再検査では正しい結果が得られない可能性がある場合は、通常の数倍量の検体から RNA を抽出して検査に供するなど、ウイルス RNA を濃縮してから再検査を実施することが望ましい。Type A の検出検査結果が陰性で H5 または H7 の検出検査結果が陽性であった場合においても、陽性と判定された検出検査で得られた Cp 値 (Ct 値) が検出限界付近の場合も、ウイルス RNA を濃縮してから再検出検査を実施することが望ましい。

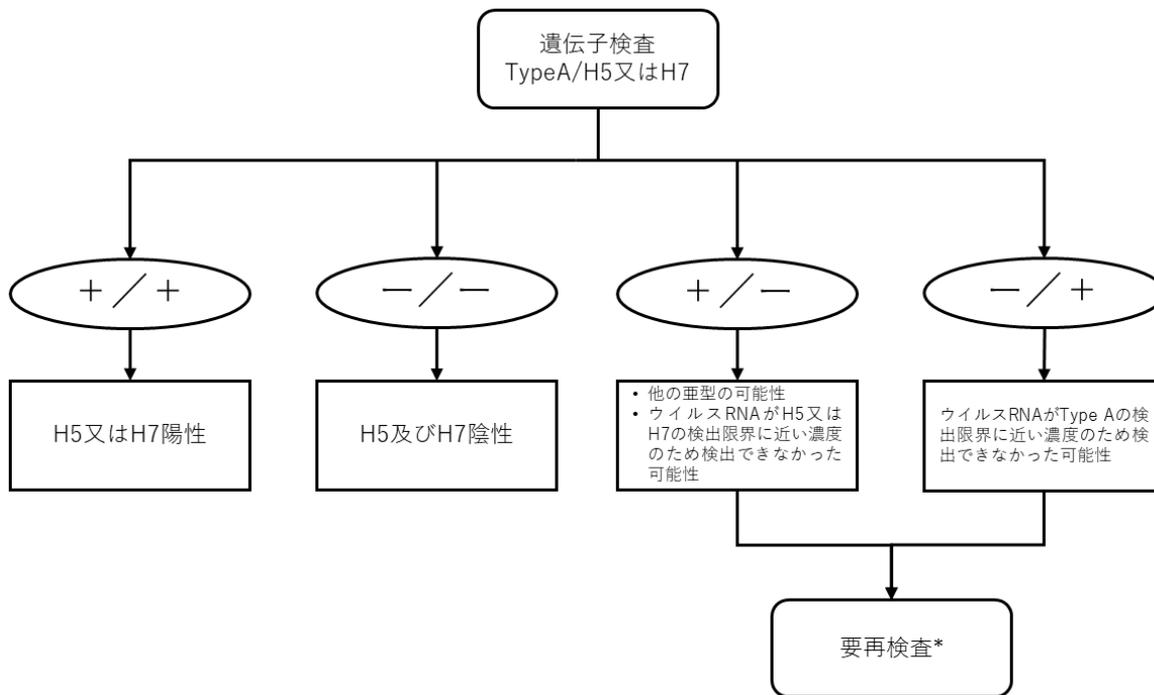
なお、検出検査の結果を判定する際は、偽陰性*や偽陽性**の可能性についても留意する。

*偽陰性：本来陽性となるべきところが陰性となること。その原因には以下のことが考えられる。

- ・ 反応試薬の調製ミス
- ・ 反応試薬やサンプル RNA の分注ミス
- ・ サンプル RNA の抽出過程におけるミス
- ・ ウイルスの変異により検出検査の感度が低くなり検出できなかった
- ・ サンプル RNA に含まれるウイルス遺伝子数が検査の検出限界以下であった

**偽陽性：本来陰性となるべきところが陽性となること。その原因には以下のことが考えられる。

- ・ 陽性コントロール、サンプル RNA、試薬、器具等のコンタミネーション、反応試薬の調製ミス
- ・ 検査の非特異反応



*最初の検査で陽性と判定されたCp値（Ct値）が検出限界付近の場合は、検体中のウイルス濃度が薄い可能性が高い。数倍量の臨床検体から濃縮したRNAを抽出するなど、通常よりも濃度の濃いRNAを用いて再検査を行うことが望ましい。

図1 遺伝子検出検査の流れと検出検査の結果解釈例

1 インフルエンザウイルス検査のための臨床検体

1.1 臨床検体

病原診断におけるウイルス遺伝子検出の成否は、適切な臨床検体をいかに正確に採取できるかに大きく依存している。検査材料には、鼻腔吸引液、鼻腔拭い液*、鼻咽頭拭い液*、咽頭拭い液*、喀痰**、気道吸引液、肺胞洗浄液、結膜拭い液（結膜炎の場合）*、剖検材料のいずれかが用いられる。H5 あるいは H7 亜型鳥インフルエンザウイルスの感染が疑われ、重度な呼吸器症状を示す場合は、特に咽頭拭い液や下気道から採取した検体はウイルス検出のための重要な検査材料となる。一方、季節性インフルエンザウイルスは鼻咽頭拭い液、鼻腔拭い液、鼻腔吸引液から良く検出されるため、H5 あるいは H7 亜型鳥インフルエンザウイルスと季節性インフルエンザウイルスとの鑑別診断を行う際は、咽頭拭い液や喀痰、気道吸引液あるいは肺胞洗浄液など下気道から1種類以上の検体を採取し、さらに鼻咽頭拭い液、鼻腔拭い液あるいは鼻腔吸引液から1種類以上の検体をそれぞれ検査することが望ましい。また、H5 あるいは H7 亜型鳥インフルエンザウイルス感染により結膜炎を呈している場合は、結膜拭い液もこれらウイルスを同定するための有用な検体となりうる。なお、遺伝子検出検査により陽性となった臨床検体は、NA 亜型の同定、全遺伝子分節の解析、ウイルス分離等に用いられるため、一連の検査に必要な検体量（少なくとも 1ml）を確保する必要がある。

*咽頭、鼻咽頭、鼻腔、結膜を拭った綿棒を浸す液には、市販のウイルス輸送用培地（Viral Transport Medium : VTM）や、0.5%ウシ血清アルブミンフラクション V（BSA）、ペニシリン（100-500 U/ml）、ストレプトマイシン（100-500 μ g/ml）、ゲンタマイシン（100 μ g/ml）及びアンフォテリシン B（2 μ g/ml）を添加した細胞培養培地（MEM 培地または 199 培地）または PBS(-)などを用いる。生理食塩水は pH が不安定となるため使用しない。いずれの培地を準備できない場合、空スピッツに採取した綿棒を入れて冷蔵保存することも可能だが、速やかに検査機関に発送し、到着後は速やかに VTM などの添加が必要である。

**喀痰の扱いについては、「3（参考）喀痰の取扱いについて」を参照のこと。

なお、凍結状態での輸送が必要となった場合、ドライアイスが航空輸送において危険物扱いとなり、航空輸送に制限がかかるため、ドライアイスに代わる超低温保冷剤の使用を検討するとよい。

2 ウイルス遺伝子検出法による H5 または H7 亜型鳥インフルエンザウイルスの同定

2.1 RNA 抽出

2.1.1 器具及び試薬

マイクロ遠心機、マイクロピペット (100、200、1000 μ l)、100%エタノール、滅菌微量遠心チューブ (1.5ml)、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN Cat#52904)

2.1.2 RNA 抽出方法

QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて RNA 抽出を行う場合のプロトコールを下記に示した。なお、注意事項、詳細についてはキットに付属のマニュアルを参照すること。

1) 140 μ l の検体またはウイルス培養液をキャリア RNA 添加済みの Buffer AVL 560 μ l と混合し室温で 10 分間インキュベートする。

↓

2) スピンドアウンした後、100%エタノール 560 μ l を添加し、15 秒間ボルテックスする。再びスピンドアウンして溶液を回収する。

↓

3) 混合液 630 μ l を QIAamp スピンカラムに注入し、キャップを閉めて 6,000 \times g (8,000rpm) で 1 分間遠心する。カラムを新しいコレクションチューブに移す。ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。この作業をもう一度繰り返す。

↓

4) Buffer AW1 500 μ l を添加し、キャップを閉めて 6,000 \times g (8,000rpm) で 1 分間遠心する。カラムを新しいコレクションチューブに移し、ろ液の入ったチューブは捨てる。

↓

5) Buffer AW2 500 μ l を添加し、キャップを閉めてフルスピード 20,000 \times g (14,000rpm) で 3 分間遠心する。

↓

6) カラムを新しいコレクションチューブに移し、フルスピード 20,000 \times g (14,000rpm) で 1 分間遠心する。

↓

7) カラムを新しい 1.5ml チューブに移し、Buffer AVE 60 μ l を添加する。キャップを閉めて室温で 1 分間インキュベートした後、6,000 \times g (8,000rpm) で 1 分間遠心する。

抽出した RNA は速やかに遺伝子検出検査に使用し、保存する場合はできるだけ-70 $^{\circ}$ C以下で保存する。

2.2 リアルタイム RT-PCR (TaqMan Probe 法) による同定

インフルエンザウイルスの各遺伝子分節は一本鎖の RNA であるため、PCR 反応のためにウイルス RNA に相補的な DNA (cDNA) を reverse transcriptase (RT) で合成する必要がある。ここでは RT 反応と PCR 反応をシングルチューブで行う TaqMan Probe 法を用いたリアルタイム One-step RT-PCR により、A 型インフルエンザウイルスの M 遺伝子の検出を同時に行って、H5 または H7 亜型鳥インフルエンザウイルスを同定する方法を示す。反応は 1 チューブ内で連続的に行い、増幅産物をリアルタイムに検出するため、電気泳動が不要であり、判定までの時間短縮も可能となる。また通常は、反応後のチューブを開ける必要がないので、電気泳動などのポスト PCR 操作によるコンタミネーションの可能性がなく、コンタミネーションによる偽判定のリスクを減らすことができる。

2.2.1 機材及び試薬

マイクロ遠心機、マイクロピペット (2、10、20、200、1000 μ l)、RNase-free 滅菌蒸留水^{※1}、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、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、リアルタイム RT-PCR 試薬 (表)、RNase Inhibitor 20U/ μ l (ABI Cat#N808-0119)

表 リアルタイム RT-PCR 試薬各種

PCR 試薬名	メーカー	Cat #
TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG	Thermo Fisher Scientific	A15299、A15300
TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix for qPCR	Thermo Fisher Scientific	4444432、4444434、4444436
THUNDERBIRD Next Probe One-step qRT-PCR 4xMix	TOYOBO	QRX-101
(参考) AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents	Thermo Fisher Scientific	AM1005、4387424、4387391
(参考) QuantiTect Probe RT-PCR Kit	Qiagen	204443、204445

^{※1} RNase-free 滅菌蒸留水はコンタミネーションを防ぐために市販のものを使用するのが望ましい。検査ごとに新品を開封して使用するか、または予め清浄な環境で RNase-free の滅菌チューブなどに分注しておいたものを検査ごとに使用する。

2.2.2 リアルタイム RT-PCR 用プライマー及びプロブについて

(A 型同定用)

Type A M 遺伝子検出用プライマー及びプロブ :

MP-39-67For 5'-CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTATC

MP-183-153Rev 5'-TGACAGRATYGGTCTTGTCTTTAGCCAYTCCA

MP-96-75ProbeAs 5'-(FAM)ATYTCGGCTTTGAGGGGGCCTG(MGB)

PCR 産物の長さ : 146bp

(H5 亜型同定用)

H5 HA 遺伝子検出用プライマー及びプローブ:

H5HA-205-227-For(2010) 5'-CGATCTAAATGGAGTGAAGCCTC

H5HA-326-302-Rev(2010) 5'-CCTTCTCTACTATGTAAGACCATTC

NIID-H5HA-For(2024) 5'-CTGTGATYTAAYGGGGTGAARCC

NIID-H5HA-Rev(2024) 5'-KCTCCACTATGTANGACCATTC

H5-Probe-239-RVa 5'-(FAM)AGCCAYCCAGCTACRCTACA(MGB)

H5-Probe-RVc (2024) 5'-(FAM) AGCCATCCYGCYACACTACA(MGB)

PCR 産物の長さ: 125bp

(H7 亜型同定用)

H7 HA 遺伝子検出用プライマー及びプローブ:

NIID-H7 TMPrimer-F1 5'-TGTGATGAYGAYTGYATGGCCAG

NIID-H7 TMPrimer-R1 5'-ACATGATGCCCGAAGCTAAAC

NIID-H7 Probe1 5'-(FAM) ATCTGTATTCTATTTTGCATTGCYTC(MGB)

PCR 産物の長さ : 156bp

2.2.3 リアルタイム RT-PCR (TaqMan Probe 法) 反応

以下に、感染研で検証した各試薬及びリアルタイム PCR 装置の反応条件を記載した。使用する試薬、リアルタイム PCR 装置等によって、最適な反応条件は異なるので、必ず事前に反応条件の最適化を行い、検出感度などの確認をしておく必要がある。

2.2.3.1 Thermo Fisher Scientific 社の TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG を用いた反応条件

(詳細はキットに添付のマニュアルを参照)

H5検査系

試薬	容量(μl)	最終濃度
4x TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG	5	1×
H5HA-205-227-For(2010) (25 μM)	0.48	0.6μM
NIID-H5HA-For(2024) (25 μM)	0.48	0.6μM
H5HA-326-302-Rev(2010) (25 μM)	0.48	0.6μM
NIID-H5HA-Rev(2024) (25 μM)	0.48	0.6μM
Probe RVa(5μM)	0.32	0.08μM

Probe RVc(5 μ M)	0.32	0.08 μ M
RNase-free water	7.44	
RNA template	5	
Total 容量	20 μ l	

TypeA及びH7検査系

試薬	容量(μ l)	最終濃度
4x TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG	5	1 \times
Forward primer (10 μ M)	1.2	0.6 μ M
Reverse primer (10 μ M)	1.2	0.6 μ M
Probe (5 μ M)	0.4	0.1 μ M
RNase-free water	7.2	
RNA template	5	
Total 容量	20 μ l	

— Applied Biosystems QuantStudio 5 (以下、QS5)、Roche LightCycler 480 システム II (以下、LC480II) または、LightCycler PRO システム (以下、LCPro) を使用する場合

ステップ	サイクル数	温度 (°C)	時間	Ramp Rate ² (°C/sec)	Acquisition Mode ²
UNG反応 ¹	1	25	2分		
逆転写反応	1	50	15分	4.4	None
PCR初期変性	1	95	2分	4.4	None
PCR	45	95	3秒	4.4	None
		60	30秒	2.2	Single
冷却 ²	1	40	30秒	2.2	None

¹ LC480II 及び LCPro を使用する場合には、UNG 反応 (25°C) は設定できないが、PCR 反応への影響はない。

² LC480II または LCPro を使用時の参考値。冷却ステップは必要に応じて行う。

2.2.3.2 Thermo Fisher Scientific 社の TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix for qPCR を用いた反応条件

(詳細はキットに添付のマニュアルを参照)

H5検査系

試薬	容量(μ l)	最終濃度
TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix	5	1 \times
H5HA-205-227-For(2010) (25 μ M)	0.48	0.6 μ M
NIID-H5HA-For(2024) (25 μ M)	0.48	0.6 μ M
H5HA-326-302-Rev(2010) (25 μ M)	0.48	0.6 μ M
NIID-H5HA-Rev(2024) (25 μ M)	0.48	0.6 μ M
Probe RVa (5 μ M)	0.32	0.08 μ M
Probe RVc (5 μ M)	0.32	0.08 μ M

RNase-free water	7.44	
RNA template	5	
Total 容量	20 μ l	

TypeA及びH7検査系

試薬	容量(μ l)	最終濃度
TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix	5	1 \times
Forward primer (10 μ M)	1.2	0.6 μ M
Reverse primer (10 μ M)	1.2	0.6 μ M
Probe (5 μ M)	0.4	0.1 μ M
RNase-free water	7.2	
RNA template	5	
Total 容量	20 μ l	

—QS5、 LC480II または LCPro を使用する場合

ステップ	サイクル数	温度 (°C)	時間	Ramp Rate ¹ (°C/sec)	Acquisition Mode ¹
逆転写反応	1	50	5分	4.4	None
PCR初期変性	1	95	20秒	4.4	None
PCR	45	95	3秒	4.4	None
		60	30秒	2.2	Single
冷却 ¹		40	30秒	2.2	None

¹ LC480II または LCPro を使用時の参考値。冷却ステップは必要に応じて行う。

2.2.3.3 TOYOBO 社の THUNDERBIRD Next Probe One-step qRT-PCR 4xMix を用いた反応条件

(詳細はキットに添付のマニュアルを参照)

H5検査系

試薬	容量(μ l)	最終濃度
THUNDERBIRD Next Probe 4xMix	5	1 \times
50x ROX Reference dye	0.04	1 \times
H5HA-205-227-For(2010) (25 μ M)	0.48	0.6 μ M
NIID-H5HA-For(2024) (25 μ M)	0.48	0.6 μ M
H5HA-326-302-Rev(2010) (25 μ M)	0.48	0.6 μ M
NIID-H5HA-Rev(2024) (25 μ M)	0.48	0.6 μ M
Probe RVa (5 μ M)	0.32	0.08 μ M
Probe RVc (5 μ M)	0.32	0.08 μ M
RNase-free water	7.44	
RNA template	5	
Total 容量	20 μ l*	

TypeA及びH7検査系

試薬	容量(μl)	最終濃度
THUNDERBIRD Next Probe 4xMix	5	1×
50x ROX Reference dye	0.04	
Forward primer (10μM)	1.2	0.6μM
Reverse primer (10μM)	1.2	0.6μM
Probe (5μM)	0.4	0.1μM
RNase-free water	7.2	
RNA template	5	
Total 容量	20μl*	

* 厳密には20.04μlとなる。

—QS5 を使用する場合

ステップ	サイクル数	温度 (°C)	時間
逆転写反応	1	50	10分
PCR初期変性	1	95	1分
PCR	45	95	15秒
		60	45秒

—LC480II または LCPro を使用する場合 (高速サイクル条件が使用可)

ステップ	サイクル数	温度 (°C)	時間	Ramp Rate (°C/sec)	Acquisition Mode
逆転写反応	1	50	10分	4.4	None
PCR初期変性	1	95	30秒	4.4	None
PCR	45	95	5秒	4.4	None
		60	10秒	2.2	Single
冷却		40	30秒	2.2	None

2.2.3.4 (参考) Thermo Fisher Scientific 社の **AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents** を用いた反応条件 (本試薬においてのみ PCR 反応が 3-step になっていること、及び上記した試薬よりも反応時間が長いことに注意が必要。)

H5 検査系

試薬	容量(μl)	最終濃度
2X RT-PCR Buffer	12.5	1×
25X RT-PCR Enzyme Mix	1	1×
RNase inhibitor (20U/μl)	0.1	
H5HA-205-227-For(2010) (25 μM)	0.6	0.6μM
NIID-H5HA-For(2024) (25 μM)	0.6	0.6μM
H5HA-326-302-Rev(2010) (25 μM)	0.6	0.6μM
NIID-H5HA-Rev(2024) (25 μM)	0.6	0.6μM

Probe RVa (5μM)	0.4	0.08μM
Probe RVc (5μM)	0.4	0.08μM
RNase-free water	2.9	
RNA template	5	
Total 容量	25μl	

TypeA 及び H7 検査系

試薬	容量(μl)	最終濃度
2X RT-PCR Buffer	12.5	1×
25X RT-PCR Enzyme Mix	1	
RNase inhibitor (20U/μl)	0.1	
Forward primer (10μM)	1.5	0.6μM
Reverse primer (10μM)	1.5	0.6μM
Probe (5μM)	0.5	0.1μM
RNase-free water	2.9	
RNA template	5	
Total 容量	25μl	

—QS5、 LC480II または LCPro を使用する場合

ステップ	サイクル数	温度 (°C)	時間	Ramp Rate ¹ (°C/sec)	Acquisition Mode ¹
逆転写反応	1	50	10分	4.4	None
PCR初期変性	1	95	10分	4.4	None
PCR	45	95	15秒	4.4	None
		56	30秒	2.2	Single
		72	15秒	4.4	None
冷却 ¹	1	40	30秒	2.2	None

¹ LC480II または LCPro を使用時の参考値。冷却ステップは必要に応じて行う。

2.2.3.5 (参考) Qiagen 社の QuantiTect Probe RT-PCR Kit を用いた反応条件（上記した試薬よりも反応時間が長いことに注意が必要。）

H5 検査系

試薬	容量(μl)	最終濃度
2×QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	12.5	1×
QuantiTect RT Mix	0.25	
RNase inhibitor (20U/μl)	0.1	
H5HA-205-227-For(2010) (25 μM)	0.6	0.6μM
NIID-H5HA-For(2024) (25 μM)	0.6	0.6μM
H5HA-326-302-Rev(2010) (25 μM)	0.6	0.6μM
NIID-H5HA-Rev(2024) (25 μM)	0.6	0.6μM
Probe RVa (5μM)	0.4	0.08μM
Probe RVc (5μM)	0.4	0.08μM

RNase-free water	3.65	
RNA template	5	
Total 容量	25 μ l	

TypeA 及び H7 検査系

試薬	容量(μ l)	最終濃度
2\timesQuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	12.5	1 \times
QuantiTect RT Mix	0.25	
RNase inhibitor (20U/μl)	0.1	
Forward primer (10μM)	1.5	0.6 μ M
Reverse primer (10μM)	1.5	0.6 μ M
Probe (5μM)	0.5	0.1 μ M
RNase-free water	3.65	
RNA template	5	
Total 容量	25 μ l	

—QS5、 LC480II または LCPro を使用する場合

ステップ	サイクル数	温度 (°C)	時間	Ramp Rate ¹ (°C/sec)	Acquisition Mode ¹
逆転写反応	1	50	30分	4.4	None
PCR初期変性	1	95	15分	4.4	None
PCR	45	94	15秒	1.5	None
		56	75秒	1	Single
冷却 ¹	1	40	30秒	4.4	None

¹ LC480II または LCPro を使用時の参考値。冷却ステップは必要に応じて行う。

2.2.4 リアルタイム RT-PCR の結果解釈と判定

TaqMan Probe 法は PCR の伸長反応中に、PCR 増幅領域に結合した TaqMan Probe が Taq polymerase の有する 5'→3'exonuclease 活性により分解されて発する蛍光シグナルの強度を測定することで、リアルタイムに PCR の増幅状態をモニターできる方法である。その蛍光シグナルの強度は増幅反応の進行に伴い指数関数的に増えていき、蛍光シグナルを最初に発するタイミングはサンプル中に存在するターゲットとなる核酸量に依存する。リアルタイム RT-PCR では、蛍光シグナルが立ち上がり閾値を超えた時点の PCR 増幅サイクル数である Ct 値 (Cycle threshold) や増幅曲線の 2 次導関数を求めてそれが最大となるサイクル数である Cp 値 (Crossing point) などが算出される。Ct 値 (Cp 値) を利用することで、検査結果の解析及び判定を行うことが可能である。ターゲットとなる核酸が多い場合は、増幅サイクルの初期 (Ct 値 (Cp 値) は小さい) に蛍光シグナルが検出されるが、少ない場合は、増幅サイクルの終盤 (Ct 値 (Cp 値) は大きい) で検出される。系によっては増幅サイクルの終盤で、非特異反応による TaqMan Probe の分解が起きることがある。蛍光シグナル

の立ち上がりが確認されたといっても、必ずしも特異的にターゲット核酸を検出しているわけではない場合もあるので、検出系の特性を事前に必ず確認する必要がある。また、使用する試薬、リアルタイム PCR 装置等によって、蛍光シグナルの増幅傾向に差がある可能性があることから、事前に必ず検出系の特性を十分に考慮した上で、Ct 値 (Cp 値) の解析方法及び判定基準の設定を行う必要がある。

TaqMan Probe 法による Type A、H5、H7 それぞれの検出限界 Ct 値 (Cp 値) は、H5 または H7 RNA 陽性コントロールを、10 倍段階希釈し、それをテンプレートに用いれば知ることができる。特にリアルタイム RT-PCR では、先述した非特異反応と区別するためにも、検出限界付近を含むいくつかの段階希釈した RNA を陽性コントロールとして用い (例えば 10⁻³ 希釈が検出限界だった場合、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 希釈を常に陽性コントロールに使用する)、検査毎に検出限界付近の Ct 値 (Cp 値) を明確にして、検査毎に精度管理を行うことが望ましい。

リアルタイム RT-PCR では、Ct 値 (Cp 値) の確認により検査結果の解析及び判定を行う。なお、検査結果の判定は、以下の条件が満たされた時のみ有効である。それ以外の場合は、検査中に何らかの事故が発生して検査精度を保つことができなかつたことが推察されるので、ただちにトラブルシューティングを行い、原因を究明した上で再検査を行う。

(1) 各々の検出系で全ての陽性コントロール (検出限界以下の濃度の陽性コントロールは除く) に、蛍光シグナルの立ち上がりがあり、かつそれが予測された Ct 値 (Cp 値) の範囲内であることが確認できる。なお、Type A、H5、H7 の各 Ct 値 (Cp 値) は同じ希釈の陽性コントロールであればほぼ同一である。ただし、Thermo Fisher Scientific 社の TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG または TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix for qPCR を使用した場合、H7 の立ち上がりが他の検出系に比べて遅れる傾向がある。

(2) 全ての陰性コントロールについて、蛍光シグナルの立ち上がりが確認されない。検査結果の解析と判定は、各々の検出系 Ct 値 (Cp 値) を確認して判断する。検体の各々の Ct 値 (Cp 値) が各々の検出限界の陽性コントロールと同じかそれよりも小さな Ct 値 (Cp 値) であった場合は陽性と判定し、Ct 値 (Cp 値) が認められなかった場合は陰性と判定する。ただし、陽性コントロールの検出限界の Ct 値 (Cp 値) は、その検出系本来の検出限界を示すものではないことに留意する。例えば、サンプルの Ct 値が検出限界の陽性コントロール Ct 値 (Cp 値) を上回った (例: RT-PCR 陽性コントロールの Type A の検出限界の Ct 値が 37、検体が 38.5 であったケース) としても、蛍光シグナルの立ち上がりが 40 サイクル以内 (一般的に PCR の増幅効率が良い系では、検出限界の Ct 値 (Cp 値) は 40 前後である場合が多く、本検出法の Type A、H5、H7 検出系にもそれが当てはまる) であれば、本来の検出限界付近でその蛍光シグナルをとらえている可能性がある。また、本検出系では同一の H5 または H7 陽性検体の Type A と H5 または H7 と

の各 Ct 値 (Cp 値) はほぼ同一である (各 Ct 値 (Cp 値) が乖離する場合は、乖離した検出系でターゲット核酸に変異が入っていることが考えられる)。他の検出系での蛍光シグナルの立ち上がりや、Conventional RT-PCR の結果を考慮し、最終的な検査結果を総合的に判断する。

2.2.5 RNA 陽性コントロールの管理・使用について

2.2.5.1 RNA 陽性コントロールの使用 (複数の希釈 RT-PCR 陽性コントロールを使用する場合)

10 倍段階希釈したいいくつかの RNA 陽性コントロールを用いて、それぞれの検出系の検出限界を検査ごとに明確にすることで、検査ごとに精度管理を行うことができる。具体的には、検出限界付近の希釈を含む複数の段階希釈した RNA (例えば 10^{-3} 希釈が検出限界だった場合、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 希釈を使用するなど) を陽性コントロールとして用いるとよい。陽性コントロールは、できるだけ濃い濃度の RNA を一度に使い切る分だけ小分け分注して -70°C 以下で保存管理する。小分け分注した RNA は一回の検査ごとに使い捨てにする。また、希釈した RNA は分解され易いので、希釈液の作製は氷上で行うことが望ましい。また、希釈後は直ちに使用するようにする。

2.2.5.2 RNA 陽性コントロールの使用 (RT-PCR 陽性コントロールを 1 点のみ使用する場合)

検体数や機器の事情で、RT-PCR 陽性コントロールを 1 点のみしかおけない場合は、10 倍段階希釈したいいくつかの RNA 陽性コントロールを使用して、最初に各検出系の検出限界を求め、求めた検出限界よりも 1~2 order 濃い希釈 RNA を RT-PCR 陽性コントロールとして使用する (例えば 10^{-3} 希釈が検出限界であった場合、 10^{-1} あるいは 10^{-2} 希釈を RT-PCR 陽性コントロールとして用いる)。この場合、検出限界が明確ではなくなるので、例えば陽性コントロールよりも Ct 値が高い検体がある場合など、非特異反応と区別する必要がある時は 2.2.5.1 の陽性コントロールを使用して再検査を行うことが望ましい。陽性コントロールは、一度に使い切る分だけ小分け分注して -70°C 以下で保存管理する。小分け分注した RNA は一回の検査ごとに使い捨てにする。また、希釈した RNA は分解され易いので、融解後は直ちに使用するようにする。

2.3 (参考) Conventional RT-PCR 法による同定

インフルエンザウイルスの各遺伝子分節は一本鎖の RNA であるため、PCR 反応のためにウイルス RNA に相補的な DNA (cDNA) を reverse transcriptase (RT) で合成する必要がある。ここでは、RT 反応と PCR 反応をシングルチューブで行う One-Step RT-PCR と電気泳動により、A 型インフルエンザウイルスの M 遺伝子の検出を同時に行って、H5 または H7 亜型鳥インフルエンザウイルスを同定する方法を示す (ただし、H7 亜型同定検査法は、2013 年から 2019 年にかけて中国を中心に流行した H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルスを対象とした検査法であり、他系統の H7 亜型鳥インフルエンザウイルスは検出できない場合がある)。HA 遺伝子は遺伝子配列が多様性に富んでいるため、本マニュアルに記載された方法を用いたとしても、流行株とプライマー配列との間に相違がある場合などは、流行株を確実に検出できるかどうか分からない。従って、本方法を使用するにあたっては、流行株が検出できるかどうかなど情報収集を行うとともに、各施設では反応条件、検出感度や特異性などについて十分な検討を行う必要がある。

なお、PCR 法はその検出感度の高さから、特に電気泳動などのポスト PCR 操作については、コンタミネーションの大きな元凶となりうるので、動線も考慮した PCR に適切なラボデザインを行い、検査する人は作業フローをしっかりと確認し、コンタミネーションによる偽判定をしないように細心の注意を払う必要がある。

2.3.1 機材及び試薬

マイクロ遠心機、マイクロピペット (2、10、20、200、1000 μ l)、RNase-free 滅菌蒸留水^{※1}、滅菌微量遠心チューブ (1.5ml)、96well PCR 反応プレート、8 連ストリップキャップもしくはプレートシール、サーマルサイクラー、プライマー、QIAGEN OneStep RT-PCR kit (QIAGEN Cat#210210)、RNase Inhibitor (Applied Biosystems Cat# N808-0119)

^{※1} RNase-free 滅菌蒸留水はコンタミネーションを防ぐために市販のものを使用するのが望ましい。検査ごとに新品を開封して使用するか、または予め清浄な環境で RNase-free の滅菌チューブなどに分注しておいたものを検査ごとに使用する。

2.3.2 プライマーについて

(A 型同定用)

Type A/M 遺伝子検出用プライマー：

Type A/M30F2/08 5'- ATGAGYCTTYTAACCGAGGTCGAAACG

Type A/M264R3/08 5'- TGGACAAANCGTCTACGCTGCAG

PCR 産物の長さ： 244bp

(H5 亜型同定用)

H5 HA 遺伝子検出用プライマー :

H5/ 248-270F 5'- GTGACGAATTCATCAATGTRCCG

H5/ 671-647R 5'- CTCTGGTTTAGTGTTGATGTYCCAA

PCR 産物の長さ : 424bp

(H7 亜型同定用)

H7 HA 遺伝子 (ユーラシア系統) 検出用プライマー :

NIID-H7 ConvPCR Primer-F1 5'- CAATGGAGAAYCAGCAYACAATTGAT

NIID-H7 ConvPCR Primer-R1 5'- ACATGATGCCCCGAAGCTAAAC

PCR 産物の長さ : 284bp

2.3.3 One Step RT-PCR 反応

QIAGEN 社の OneStep 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。

試薬	容量
RNase-free 滅菌蒸留水	9.5µl
5×QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5.0µl
dNTP 混合液 (containing 10 mM of each dNTP)	1.0µl
sense (+) primer (10µM)	1.5µl
antisense (-) primer (10µM)	1.5µl
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix (5 U/µl)	1.0µl
RNase Inhibitor (20U/µl)	0.5µl
RNA template	5.0µl
Total	25.0µl/test

<反応条件>

使用するサーマルサイクラー、試薬、反応容器などによって最適な反応条件は異なるので、必ず事前に反応条件の最適化を行い、検出感度などの確認を行っておく必要がある。以下は、試薬に QIAGEN 社 OneStep RT-PCR kit、サーマルサイクラーに Applied Biosystems 社 GeneAmp® PCR System 9700 を使用する場合の反応条件である。

(H5、H7、Type A 同定用)

50°C 30min.

↓

95°C 15min.

↓

94°C 30sec.

50°C 30sec.

72°C 40sec.

} ×45 cycles

↓

72°C 10min.

↓

4°C

2.3.4 PCR 産物のアガロースゲル電気泳動による確認

2.3.4.1 機材及び試薬 (感染研での使用例)

電気泳動装置、UV 照射写真撮影装置、電気泳動用アガロース (1.5~2.0%で使用)、分子量マーカー (100 bp DNA ladder, Promega 社 Cat#2101)、エチジウムブロマイド、1×TAE 電気泳動バッファー (50×TAE ニッポンジーン社 Cat#313-90035 を希釈して使用)、6×Gel loading dye (Promega 社 Cat#G1881)

2.3.4.2 電気泳動

One Step RT-PCR にて増幅後、6×Gel loading dye 2μl と PCR 増幅液 10 μl をよく混合 (ピペティング) し、1.5%から 2.0%に調製したアガロース (以下、「ゲル」とする。) のウェルに混合液を 10 μl 入れる。他のウェルに分子量マーカーを入れる。

↓

電気泳動装置で 100V、30~40 分間、-から+へ電気泳動する。

↓

泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド染色液に入れ、15~30 分間染色する。染色後、ゲルを 5~10 分間水洗し、UV 照射装置にセットし、260~300nm の UV を照射して写真撮影する。

2.3.4.3 Conventional RT-PCR の結果解析と判定

各々の RT-PCR 産物の有無とバンドサイズ (Type A : 234bp、H5 : 424bp、H7 : 284bp) の確認により検査結果の解析及び判定を行う。なお、検査結果の判定は以下の 2 つの条件が

満たされた時のみ有効である。それ以外の場合は、検査中に何らかの事故が発生して検査精度を保つことができなかつたことが推察されるので、ただちにトラブルシューティングを行い、原因を究明した上で再検査を行う。

(1) 全ての陽性コントロールについて、各々予測されるバンドサイズの RT-PCR 産物が存在することが確認できる

(2) 全ての陰性コントロールについて、各々予測されるバンドサイズの RT-PCR 産物が存在しないことが確認できる

なお、検査結果の解析と判定は、各々の RT-PCR 産物が各々の陽性コントロールと同一のバンドサイズであった場合を陽性と判定し、各々の RT-PCR 産物が各々の陰性コントロールと同一結果が得られた場合を陰性と判定する。最終的な検体の検査結果は、Part I 「2 検査の進め方」を参考にして総合的に判断する。また、RT-PCR 陽性コントロールの管理・使用方法については **2.2.5** を参照する。

2.4 (参考) H9 亜型の同定に関する情報

その他の亜型によるヒト感染事例として知られる H9 亜型のリアルタイム RT-PCR と Conventional RT-PCR 法が記載された論文を以下に記載した。ただし、HA 遺伝子は遺伝子配列が多様性に富んでいるため、論文に記載された方法を用いたとしても、流行株とプライマーもしくはプローブ配列との間に相違がある場合などは、流行株を確実に検出できるかどうか分からない。従って、論文に記載された方法を使用するにあたっては、流行株が検出できるかどうかなど情報収集を行うとともに、各施設において反応条件、検出感度や特異性などについて十分な検討を行う必要がある。

H9 亜型同定用リアルタイム RT-PCR 法が記載された論文

- S. Saito, I. Takayama, M. Nakauchi, S. Nagata, K. Oba, T. Odagiri, T. Kageyama. (2019). Development and evaluation of a new real-time RT-PCR assay for detecting the latest H9N2 influenza viruses capable of causing human infection. *Microbiol Immunol.* 2019 Jan;63(1):21-31.

H9 亜型同定用 conventional RT-PCR 法が記載された論文

- Vincent C.C. Cheng , Jasper F.W. Chan, X. Wen, W.L. Wu , T.L. Que, H. Chen, K.H. Chan, and K.Y. Yuen. (2011) Infection of immunocompromised patients by avian H9N2 influenza A virus. *J Infect* 62: 394–399.

3 (参考)喀痰の取扱いについて

喀痰の粘性が非常に高く、ピペット操作でそのまま検体を取り扱って検査を行うことが困難な場合がある。そのような場合の喀痰の取扱いについては、インフルエンザウイルス遺伝子検査及びウイルス分離のための喀痰検体の前処理（第1版）（平成25年10月）及び「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）で示した方法により検体を取り扱おうとよい。以下にその方法を抜粋する。なお、ウイルス分離を目的とする場合、スプタザイムなどの酵素作用のある喀痰溶解剤を用いるとウイルス分離効率が悪くなることがあるため、その使用には留意が必要である。

3.1 喀痰検体の前処理方法について

ジチオトレイトール（dithiothreitol, 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。なお、PBS(-)では懸濁液の作製が困難であることが多いため、できる限り DTT による溶解を行うことを推奨する。

^{*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・ハサミなど（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。

3.1.1 喀痰処理に必要な器具及び試薬

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 (-)（細胞培養グレード）、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

3.1.2 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 3.1.3 もしくは 3.1.4 の方法で前処理を行う。ウイルス輸送培地などに採取された喀痰検体は PBS(-)をウイルス輸送培地などに読み替えて、下記 3.3.2 の方法において前処理を行う（図2を参照）。

3.1.3 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及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など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) DNase 処理後に RNA 抽出を行う。

*²10%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年程度保存することも可能である。凍結融解は避ける。

3.1.4 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及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など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1.5mlもしくは2ml滅菌微量遠心チューブに移す。
- 3) 20,000 x g、30分間、4℃で遠心する。
- 4) 懸濁液の上清を用いて RNA 抽出を行う。

3.2 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 を加えることで溶解する。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ことがあるため、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。

3.2.1 DNase 処理に必要な器具及び試薬

マイクロピペット(10、200、1000µl)、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)

3.2.2 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 550µl を用いて溶解する(溶解後の DNase 濃度は 2.7 units/µl 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 及び 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。

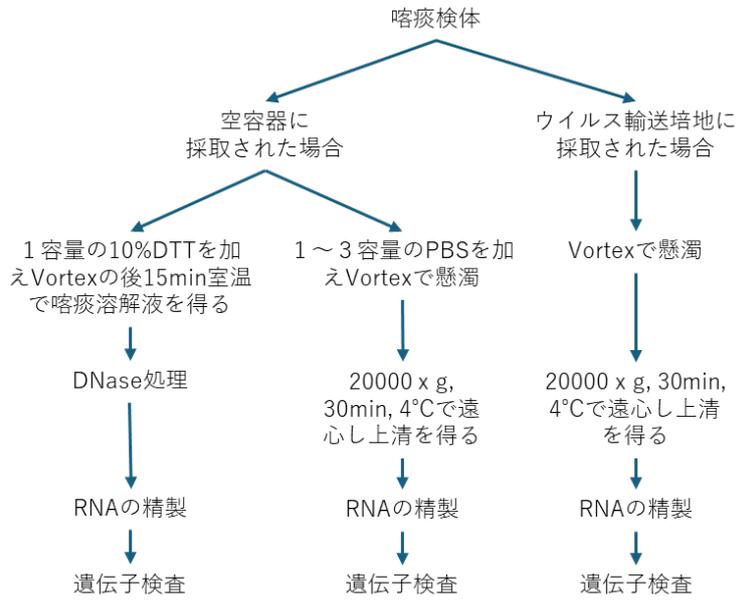


図2 喀痰検体前処理方法フローチャート

本マニュアルに関する問合せ先

国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

TEL: 042-561-0771

お問い合わせの際は、同上に御連絡いただき、検体送付、遺伝子検出検査法、陽性コントロールの配布については検査診断技術研究部、ウイルス分離についてはインフルエンザ研究センターにそれぞれおつなぎください。

執筆者リスト

国立感染症研究所 検査診断技術研究部

荒木久美子

上野みなみ

久場由真仁

Doan Hai Yen

百瀬文隆

竹前喜洋

影山努

地方衛生研究所 (所属機関)

三津橋和也(北海道立衛生研究所)

高橋知子(岩手県環境保健研究センター)

三宅啓文(東京都健康安全研究センター)

黒木絢士郎(東京都健康安全研究センター)

清水耕平(横浜市衛生研究所)

小澤広規(横浜市衛生研究所)

安井善宏(愛知県衛生研究所)

城座美夏(石川県保健環境センター)

森 愛(神戸市健康科学研究所)

三好龍也(堺市衛生研究所)

河瀬曜(愛媛県立衛生環境研究所)

金藤有里(福岡県保健環境研究所)

眞榮城徳之(沖縄県衛生環境研究所)

多和田早紀(沖縄県衛生環境研究所)