

病原体検出マニュアル
ヒトオルソニューモウイルス
(RS ウイルス)

令和5年8月改定

第4.0版

目次

Part I: ヒトオルソニューモウイルス (RS ウイルス) 検査法の概要

1 病原体の概要	-----	3
2 検査の留意点	-----	3

Part II: ウイルス検査法

1 RS ウイルス検査のための臨床検体の採取法	-----	5
2 臨床検体の保存と輸送	-----	5
3 臨床検体からの RNA の抽出	-----	5
4 リアルタイム RT-PCR 法による検出		
1. Pan-RSV 検出法	-----	7
2. (参考) Pan-RSV 検出法の two-step リアルタイム PCR 反応での実施	-----	10
3. サブグループ検出法	-----	12
5 シークエンス法によるサブグループの決定方法	-----	15

Part I

ヒトオルソニューモウイルス（RS ウイルス）検査法の概要

1 病原体の概要

ヒトオルソニューモウイルスは *Pneumovirus* 科 *Orthopneumovirus* 属に分類される ssRNA ウイルスであり、RS ウイルス (Respiratory syncytial virus, RSV) とも呼ばれる。世界中に広く分布しており、症状は軽症の感冒様症状から下部気道感染にいたるまで様々で、成人になっても容易に再感染を起こす。特に、生後 8 週から 30 週齢の乳幼児が感染すると最も重症化しやすく、ウイルス性下気道炎（気管支炎・肺炎）で入院する幼児の 70% が RSV 感染によると推定されている。また、老人や骨髄移植などで免疫抑制がなされている患者等でも重症化し、院内感染や家庭内感染の防止が重要とされている。かつて 1960 年代に行われたホルマリン不活化ワクチンの治験では、ワクチン接種群が未接種群に比べ、呼吸器症状が悪化したためワクチン開発が中止された経緯があったが、2023 年 6 月時点で、承認されたワクチンは高齢者向けとして 2 種類あり、いずれもウイルス F タンパク質をターゲットとしたものである。RS ウイルス感染予防薬としては、小児対象のヒト化モノクローナル抗体の Palivizumab と Nirsevimab が商品化されている。

WHO のグローバルサーベイランスでは全年齢層を対象として、重症呼吸器感染症、インフルエンザ様疾患といった症例定義における RS ウイルス感染症の割合の算出が要求されている。国内では五類感染症として、小児科定点（約 3000 定点）でサーベイランスが行われている。定点サーベイランスは、流行動向の把握には有用であるが、検査数の分母がないために WHO の要求するサーベイランスに対応していない。また、日本国内では主に迅速抗原検出キットによる臨床診断が一般的であるが、抗原検出キットの感度と特異度は、他法（PCR 法など）に比し低い。さらに、成人では鼻腔あるいは咽頭ぬぐい液に含まれるウイルス量の不足により、偽陰性の頻度が高くなる可能性もある。よって、抗原検出キットは、全年齢層を対象とするグローバルサーベイランスでは使用が認められていない。現在では、このような背景から、グローバルサーベイランスでは、米国 CDC の開発したリアルタイム RT-PCR 法が採用されている。本マニュアルでは、この米国 CDC 法を中心に RSV 遺伝子検出法について記載する。

2 検査の留意点

臨床検体は、バイオセーフティーレベル (BSL2) 実験施設内の安全キャビネット内で取り扱う。コンタミネーションを防止するため、チューブの蓋を開ける時には遠心し、エアロゾルを発生させないように慎重に開ける。チューブオープナーを用いてもよい。

検査全般において、遺伝子のコンタミネーションと RNase 混入の防止に細心の注意を払う。遺伝子のコンタミネーションを防止するには、試薬調製場所とウイルス RNA などサ

サンプルを扱う場所を物理的に分けることが望ましい。また、試薬などの混合では、タッピングや転倒混和ならびにスピンドウンを原則とし、むやみなピペッティングは避ける。

Part II

ウイルス検査法

1 RS ウイルス検査のための臨床検体の採取法

対象の年齢によって採取検体が異なる。鼻腔あるいは咽頭をぬぐったスワブは、市販のウイルス輸送液等に浸す。スワブについては、可能な限りナイロンのフロックスワブを用いることとし、PCR を阻害する可能性のある綿棒やアルギン酸カルシウムスワブは用いない。

1) 乳幼児および低年齢児

中鼻甲介から採取した鼻咽頭ぬぐい液あるいは鼻腔ぬぐい液を用いる。もしくは鼻咽頭吸引液を用いる。

2) 1)を除く小児、青年および成人

鼻咽頭ぬぐい液あるいは鼻腔ぬぐい液を用いる。両方を採取した場合は、2本のスワブを1本の輸送液に浸す。

3) 高齢者

喀痰を用いてもよい。ただし、検査時に別添「喀痰処理法(抜粋)」に記載の検体前処理が必要となる。

2 臨床検体の保存と輸送

検査材料は採取容器から内容物が漏出しないよう適切な包装をした後、非凍結状態(4～8℃)で保存し、冷蔵状態で検査依頼機関へ送付するのが望ましい。しかし、48時間以内に検査が出来ないようであれば、採取後-70℃以下に保存し、凍結状態で検査依頼機関へ送付する。検査材料には必要事項(個体識別等)を明記するとともに、検査材料送付リストを添付する。検査材料を受理した後、直ちに検査が実施されることが望ましいが、出来ない場合は-70℃以下で保存する。

3 臨床検体からのRNAの抽出

本マニュアルにおいては、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。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。

3.1 器具および試薬

マイクロ遠心機、マイクロピペット(200、1000 μl)、ボルテックスミキサー、滅菌微量遠

心チューブ (1.5 ml)、100%エタノール、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Cat.#52904, 52906)

※以下の手順により、予め1サンプル単位で Buffer AVL/Carrier RNA 溶液を作製・保管しておくると便利である。

Buffer AVL 1 本 (31ml) から 1 ml を取り、乾燥 Carrier RNA 1 本 (310 µg) を溶解する。溶解した Carrier RNA を Buffer AVL のボトルに戻し、Buffer AVL/Carrier RNA 混和物を調製する。560 µl ずつチューブに分注し、-20°C に保存する。使用直前に必要本数を取り出し、80°C、5 分以上インキュベートし、沈殿物を確実に溶解する。凍結・融解ならびに 80°C の加温は 1 回限りとする。

3.2 RNA 抽出

1) 140 µl の検体を Carrier RNA 添加済みの Buffer AVL 560 µl と混合し室温で 10 分間インキュベートする。

↓

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

↓

3) 混合液 630 µl を QIAamp スピнкаラムに注入し、キャップを閉めて 6000×g (8000rpm) 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 µl を添加し、キャップを閉めて 6000×g (8000rpm) 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 µl を添加し、キャップを閉めてフルスピード (20000×g、14000rpm) 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 (20000×g、14000rpm) で 1 分間遠心する。

↓

7) カラムを新しい 1.5 ml チューブに移し、Buffer AVE 60 µl 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、6000×g (8000rpm) で 1 分間遠心する。

抽出した RNA は速やかに遺伝子検査に使用し、保存する場合はできるだけ-70°C以下で保

存する。

4 リアルタイム RT-PCR 法による検出

WHO のグローバルサーベイランスで採用されている米国 CDC が開発した pan-RSV 検出法を記載する。また、duplex リアルタイム RT-PCR 法によるサブグループ検出法についても記載する。

4.1 Pan-RSV 検出法

4.1.1 器具および試薬

マイクロ遠心機、マイクロピペット (2、20、200、1000 µl)、RNase-free 滅菌蒸留水^{※1}、滅菌微量遠心チューブ (1.5ml)、96well PCR 反応プレートまたは 8 連 PCR チューブ、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、陽性コントロール用スタンダード RNA、AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents (Thermo Fisher Scientific, Cat#AM1005, 4387424, 4387391)

^{※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 の滅菌チューブ等に分注しておいたものを検査ごとに使用する。

4.1.2 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

Name	Sequence (5' to 3')
Forward primer	GGCAAATATGGAAACATACGTGAA
Reverse primer	TCTTTTCTAGGACATTGTAYTGAACAG
Probe	(FAM)-CTGTGTATGTGGAGCCTTCGTGAAGCT-(BHQ ^{※2})

増幅産物の長さ: 84bp

設計領域: M 遺伝子

参考文献

Fry AM, Chittaganpitch M, Baggett HC, et al. The burden of hospitalized lower respiratory tract infection due to respiratory syncytial virus in rural Thailand. PloS one. 2010;5:e15098.

^{※2} TAMRA でも使用可能

4.1.3 リアルタイム RT-PCR (TaqMan プローブ法) 反応

以下に、使用装置として ABI7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher scientific)ならびに LightCycler (96, 480, 480II) (Roche)を使用した方法を示す。使用装置によって、プライマー・プローブ濃度が異なることに留意する。

他装置を使用する場合は、試薬や測定条件の至適化が必要である。

詳細はキットに添付のマニュアルを参照すること。

試薬	ABI7500 Fast		LightCycler	
	容量 (μl)	終濃度 (nM)	容量 (μl)	終濃度 (nM)
2×RT-PCR Buffer	12.5		12.5	
Forward primer (10 μM)	1.25	500	1.25	500
Reverse primer (10 μM)	0.75	300	0.625	250
Probe (10 μM)	0.375	150	0.125	50
25×RT-PCR Enzyme Mix	1.0		1.0	
Nuclease-free Water	4.125		4.5	
Template RNA	5.0		5.0	
Total volume per reaction	25		25	

※あらかじめプライマー・プローブミックスを作成し、-30℃で保管しておいてもよい。

例) LightCycler 使用時の 20 倍濃度のミックス 100 μl の作製

Forward primer (100 μM)	10 μl
Reverse primer (100 μM)	5 μl
Probe (100 μM)	1 μl
Nuclease-free Water	84 μl

<調製手順>

操作は全て氷上にて行う。

- 1) Template RNA 以外の試薬を必要な数量分調製し、プレートもしくは 8 連チューブのウェルに 20 μl ずつ反応液を分注する。
- 2) 陰性コントロールとして Nuclease-free Water 5 μl をウェルに添加する。
- 3) RNA サンプルを 5 μl ずつウェルに添加する。
- 4) 各濃度の陽性コントロール RNA (段階希釈したものを用いる場合は低濃度から) を 5 μl ずつウェルに添加する。
- 5) キャップまたはプレートシールで封をした後、反応液をスピンドウンする。
- 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>

ABI7500 Fast Real-Time PCR System を使用する場合

(Standard モードで使用)

48°C	10 min	
95°C	5 min	
95°C	15 sec	45 cycles
55°C	1 min (Data collection)	

LightCycler 480 (または 480II、96) を使用する場合

	Analysis Mode	Cycle	Temperature (°C)	Time	Ramp Rate (°C / sec)	Acquisition Mode
RT	None	1	50	600 sec	4.4	None
Denature	None	1	95	600 sec	4.4	None
PCR	Quantification	45	95	15 sec	4.4	None
			58	60 sec	2.2	Single
Cooling	None		40	30 sec	4.4	None

あるいは、以下のインフルエンザ検査と同一の反応条件でもよい。

	Analysis Mode	Cycle	Temperature (°C)	Time	Ramp Rate (°C / sec)	Acquisition Mode
RT	None	1	50	600 sec	4.4	None
Denature	None	1	95	600 sec	4.4	None
PCR	Quantification	45	95	15 sec	4.4	None
			56	30 sec	2.2	Single
			72	15 sec	4.4	None
Cooling	None		40	30 sec	2.2	None

4.1.4 陽性コントロール RNA ならびに結果解釈と判定

陽性コントロールは、 1×10^2 コピー/反応相当の RNA を必ず毎回の反応に使用することとする。10 倍階段希釈したいくつかの陽性コントロールを用いる事で、検査毎に精度管理を行う事ができるため、複数の陽性コントロールを置くことを推奨する。具体的には、検出限界付近の希釈を含む複数の階段希釈した 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 は一回の検査毎に使い捨てにする。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事が望ましい。また、希釈後は直ちに使用するようにする。

試験成立ならびに判定条件は、使用装置によって異なることに留意する。

ABI7500 Fast Real-Time PCR System を使用する場合

陽性コントロール (1×10² コピー/反応) の Ct 値が 45 以内、かつ陰性コントロールの Ct 値が 45 より大きい時に試験が成立すると見なす。この条件が満たされないときは再試験を行う。その上で、反応時間内に増幅曲線の立ち上がりが認められた場合を「陽性」、認められない場合を「陰性」とする。ただし、必ず増幅曲線の形や曲線の立ち上がりについて陽性コントロールの結果と比較して確認する。なお、本検出系は、スタンダード RNA を用いた検討で、5～50 コピーを検出可能である。

LightCycler 480 (または 480II、96) を使用する場合

陽性コントロールの増幅曲線の立ち上がりが 35 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 35 サイクル以内に見られないときに試験が成立すると見なす。Cp 値 35.0 未満を「陽性」とする。

4.2 (参考) Pan-RSV 検出法の two-step リアルタイム PCR 反応での実施

4.1 で示した Pan-RSV 検出法は、two-step リアルタイム PCR 反応でも実施可能である。ただし、手順が増えることによるコンタミネーションリスクが増大するため推奨しない。

4.2.1 器具および試薬

マイクロ遠心機、マイクロピペット (2、20、200、1000 μl)、RNase-free 滅菌蒸留水^{※3}、滅菌微量遠心チューブ (1.5ml)、96well PCR 反応プレートまたは 8 連 PCR チューブ、8 連ストリップキャップまたはプレートシール、サーマルサイクラー、リアルタイム PCR 装置、プライマー、TaqMan プローブ、陽性コントロール用スタンダード RNA、PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara, Cat#RR037A, RR037B)、FastStart Universal Probe Master (ROX) (Roche, Cat#4913949001, 4913957001, 4914058001)

^{※3} 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 の滅菌チューブ等に分注しておいたものを検査ごとに使用する。

4.2.2 cDNA 合成

詳細はキットに添付のマニュアルを参照すること。必要に応じてスケールアップすることも可能である。

試薬	容量 (μl)
5×PrimeScript Buffer	2.0
Random 6mers (100 μM)	2.0

PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5
RNase Free dH ₂ O	0.5
Template RNA	5
Total volume per reaction	10

<調製手順>

操作は全て氷上にて行う。

- 1) Template RNA 以外の試薬を調製し、プレートもしくは 8 連チューブのウェルに 5 μ l ずつ反応液を分注する。
- 2) 陰性コントロールとして RNase Free dH₂O 5 μ l をウェルに添加する。
- 3) RNA サンプルを 5 μ l ずつウェルに添加する。
- 4) 各濃度の陽性コントロール RNA (段階希釈したものを用いる場合は低濃度から) を 5 μ l ずつウェルに添加する。
- 5) 37°C 15 分、85°C 5 秒の加熱により cDNA 合成と逆転写酵素の不活化を行う。

4.2.3 リアルタイム PCR 反応

以下に、使用装置として ABI7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher scientific)を使用した方法を示す。

他装置を使用する場合は、試薬や測定条件の至適化が必要である。

詳細はキットに添付のマニュアルを参照すること。

試薬	容量 (μ l)	終濃度 (nM)
FastStart Universal Probe Master (ROX)	12.5	
Forward primer (10 μ M)	1.25	500
Reverse primer (10 μ M)	0.75	300
Probe (10 μ M)	0.375	150
RNase-free 滅菌蒸留水	0.125	
cDNA	10	
Total volume per reaction	25	

<調製手順>

操作は全て氷上にて行う。

- 1) cDNA 以外の試薬を調製し、プレートもしくは 8 連チューブのウェルに 15 μ l ずつ反応液を分注する。
- 2) cDNA を 10 μ l ずつウェルに添加する。

- 3) キャップまたはプレートシールで封をした後、反応液を軽くスピンドウンする。
- 4) 反応条件を以下のように設定し、反応を開始する。

<反応条件>

ABI7500 Fast Real-Time PCR System (Standard モード) を使用

95°C	10 min	
95°C	15 sec	45 cycles
55°C	3 min	

4.2.4 陽性コントロール RNA ならびに結果解釈と判定

4.1.4 の ABI7500 Fast Real-Time PCR System を使う場合と同様。なお、two-step リアルタイム PCR 反応でもスタンダード RNA を用いた検討で、5~50 コピーを検出可能である。

4.3 サブグループ検出法

4.3.1 器具および試薬

マイクロ遠心機、マイクロピペット (2、20、200、1000 µl)、RNase-free 滅菌蒸留水^{※4}、滅菌微量遠心チューブ (1.5ml)、96well PCR 反応プレートまたは 8 連 PCR チューブ、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、陽性コントロール用スタンダード RNA、AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents (Thermo Fisher Scientific, Cat#AM1005, 4387424, 4387391)

^{※4} 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 の滅菌チューブ等に分注しておいたものを検査ごとに使用する。

4.3.2 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

Name	Sequence (5' to 3')
HRSV-F primer	ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGT
HRSV-R primer	TGCACATCATAATTRGGAGTRTCA
HRSV A probe	(FAM)-ACACTCAACAAAGA T CAACTTCTRTCATCCAGCA-リン酸 ↑の T を BHQ-1 修飾する
HRSV B probe	(Texas Red)-ACATTAAATAAGGA T CAGCTGCTGTCATCCAGCA-リン酸 ↑の T を BHQ-2 修飾する

増幅産物の長さ 122bp

設計領域: N 遺伝子

参考文献

Wang L, Piedrab PA, Avadhanula V, et al., Duplex real-time RT-PCR assay for detection and subgroup-specific identification of human respiratory syncytial virus. J Virol Methods. 2019. 271:113676.

4.3.3 リアルタイム RT-PCR (TaqMan プローブ法) 反応

以下に、使用装置として LightCycler (96, 480, 480II) (Roche)ならびに QuantStudio5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher scientific)を使用した方法を示す。

他装置を使用する場合は、試薬や反応条件ならびに測定条件の至適化が必要である。

詳細はキットに添付のマニュアルを参照すること。

試薬	容量 (μl)	終濃度 (nM)
2×RT-PCR Buffer	12.5	
HRSV-F primer (10 μM)	0.5	200
HRSV-R primer (10 μM)	0.5	200
HRSV A probe (10 μM)	0.125	50
HRSV B probe (10 μM)	0.125	50
25×RT-PCR Enzyme Mix	1.0	
Nuclease-free Water	5.25	
Template RNA	5.0	
Total volume per reaction	25	

※あらかじめプライマー・プローブミックスを作成し、-30℃で保管しておいてもよい。

例) 20倍濃度のミックス 100 μl の作製

HRSV-F primer (200 μM)	2 μl
HRSV-R primer (200 μM)	2 μl
HRSV A probe (50 μM)	2 μl
HRSV B probe (50 μM)	2 μl
Nuclease-free Water	92 μl

<調製手順>

操作は全て氷上にて行う。

- 1) Template RNA 以外の試薬を必要な数量分調製し、プレートもしくは8連チューブのウェルに 20 μl ずつ反応液を分注する。
- 2) 陰性コントロールとして Nuclease-free Water 5 μl をウェルに添加する。
- 3) RNA サンプルを 5 μl ずつウェルに添加する。

- 4) 各濃度の陽性コントロール RNA (段階希釈したものを用いる場合は低濃度から) を 5 μ l ずつウェルに添加する。
- 5) キャップまたはプレートシールで封をした後、反応液をスピンドウンする。
- 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) を使用する場合

※インフルエンザ検査と同一の反応条件

	Analysis Mode	Cycle	Temperature (°C)	Time	Ramp Rate (°C / sec)	Acquisition Mode
RT	None	1	50	600 sec	4.4	None
Denature	None	1	95	600 sec	4.4	None
PCR	Quantification	45	95	15 sec	4.4	None
			56	30 sec	2.2	Single
			72	15 sec	4.4	None
Cooling	None		40	30 sec	2.2	None

フィルターは FAM と Texas Red を指定する

QuantStudio5 Real-Time PCR System を使用する場合

50°C	10 min	
95°C	10 min	
95°C	15 sec	
56°C	30 sec (Data collection)	45 cycles
72°C	15 sec	

Target として FAM および Texas-Red (なければ ROX) をセット。Quencher および Passive reference を none とする。

4.3.4 陽性コントロール RNA ならびに結果解釈と判定

陽性コントロールは、 1×10^2 コピー/反応相当の RNA を必ず毎回の反応に使用することとする。10 倍階段希釈したいくつかの陽性コントロールを用いる事で、検査毎に精度管理を行う事ができるため、複数の陽性コントロールをおくことを推奨する。具体的には、検出限界付近の希釈を含む複数の階段希釈した 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 は一回の検査毎に使い捨てにする。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事が望ましい。また、希釈後は直ちに使用するようにする。

試験成立ならびに判定条件は、使用装置によって異なることに留意する。

LightCycler 480 (または 480II、96) を使用する場合

RSV A、B 共に陽性コントロールの増幅曲線の立ち上がりが 37 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 37 サイクル以内に見られないときに試験が成立するとみなす。サンプルは Cp 値 37.0 未満を陽性とする。

QuantStudio5 Real-Time PCR System を使用する場合

Analysis は全て Auto で実施する。陽性コントロールの Ct 値が RSV A は 37、RSV B は 35 サイクル以内、かつ陰性コントロールの Ct 値が RSV A は 37、RSV B は 35 以上の時に試験が成立すると見なす。サンプルの Ct 値は RSV A は 37 未満、RSV B は 35 未満を陽性とする。

5 シークエンス法によるサブグループの決定方法

米国 CDC の Pan-RSV 検出法は 2 つのサブグループを 1 種類のプライマー・プローブセットで検出することが可能である。従って定まった症例定義の集団を対象とする検査には有用であるが、サブグループの決定はシークエンス解析等によって行う。例として F 遺伝子領域の RT-PCR 増幅産物を用いる方法を示すが、他の方法でも構わない。

5.1 器具および試薬

マイクロ遠心機、マイクロピペット (2、20、200、1000 μ l)、RNase-free 滅菌蒸留水^{※5}、滅菌微量遠心チューブ (1.5ml)、96well PCR 反応プレートまたは 8 連 PCR チューブ、8 連ストリップキャップまたはプレートシール、サーマルサイクラー、電気泳動槽、トランスイルミネーター

SMART MMLV Reverse Transcriptase (Takara, Cat#Z9522N, Z9523N, Z9524N)、Quick Taq HS Dymix (Toyobo Cat#DTM-101)、Random Hexamers (Thermo Fisher Scientific, Cat#N8080127)、Advantage UltraPure PCR Deoxynucleotide Mix (10mM each dNTP) (Takata, Cat#Z9125N)、Recombinant RNase Inhibitor (Takara, Cat#2313A)、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Cat#A9281)、電気泳動用アガロースゲル (1.5~2.0%で使用)、分子量マーカー (Promega, Cat#G2101)、1×TAE 電気泳動バッファー (ニッポンジーン, Cat#313-90035 を希釈して使用)、6×Gel loading dye (Promega, Cat#G1881)、エチジウムブロマイド

^{※5} 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 の滅菌チューブ等に分注しておいたものを検査ごとに使用する。

5.2 PCR 用プライマーについて

Name	Sequence (5' to 3')
HRSVMPFO ₂ primer	AACAGTTTAAACATTACCAAGTGA
HRSVMRW ₂ primer	TCATTGACTTGAGATATTGATGC

増幅産物長:380 bp

参考文献

Fry AM, Chittaganpitch M, Baggett HC, et al. The burden of hospitalized lower respiratory tract infection due to respiratory syncytial virus in rural Thailand. PloS one. 2010;5:e15098

5.3 cDNA 合成

詳細はキットに添付のマニュアルを参照すること。4.2.2 に記載の方法や他の試薬を用いてもよいが、事前に反応条件の最適化を行う。

試薬	容量 (μl)
5×First-Strand Buffer	4.0
Random Hexamers (50 μM)	1.0
dNTP mix (10 mM each)	2.0
DTT (100 mM)	2.0
Recombinant RNase Inhibitor	1.0
SMART MMLV Reverse Transcriptase	1.0
Template RNA	9.0
Total volume per reaction	20

<調製手順>

操作は全て氷上にて行う。

- 1) Template RNA 以外の試薬を調製し、プレートもしくは 8 連チューブのウェルに 11 μl ずつ反応液を分注する。
- 2) RNA サンプルを 9 μl ずつウェルに添加する。
- 3) サーマルサイクラーにて 42°C で 60 分 (50~90 分)、70°C で 15 分の加熱により、cDNA 合成と逆転写酵素の不活化を行う。
- 4) 反応後、30 μl の RNase-free 滅菌蒸留水を加えて希釈し、次の PCR 反応に用いる。

5.4 PCR 反応からサンガーシーケンスまで

詳細はキットに添付のマニュアルを参照すること。他の試薬を用いてもよいが、事前に反応条件の最適化を行う。

試薬	容量 (μl)
2×Quick Taq HS DyeMix	25
HRSVMPFO ₂ primer (50μM)	0.2
HRSVMPRW ₂ primer (50μM)	0.2
Nuclease-free Water	19.6
cDNA 希釈液	5.0
Total volume per reaction	50

<調製手順>

操作は全て氷上にて行う。

- 1) cDNA 希釈液以外の試薬を調製し、プレートもしくは 8 連チューブのウェルに 45 μl ずつ反応液を分注する。
- 2) cDNA 希釈液を 5 μl ずつウェルに添加する。
- 3) サーマルサイクラーにて反応条件を以下のように設定して反応を開始する。

94°C	1 min	
94°C	30 sec	
56°C	30 sec	40 cycles
68°C	1 min	
68°C	5 min	

- 4) PCR 反応終了後、40 μL の増幅産物を用いて 1.5~2.0%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、バンドの有無について確認を行う。
- 5) 380 bp のバンドを切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System で精製を行う。
- 6) PCR 反応に用いたプライマーを用いて、5)の精製物をテンプレートにサイクルシーケンシス反応を行い、サンガーシーケンシスを行う。配列が得られたら Blast 解析等を行い、サブグループを決定する。

(参考文献)

World Health Organization. (2017). WHO strategy to pilot global respiratory syncytial virus surveillance based on the Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS).
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259853/9789241513203-eng.pdf>

PATH, RSV Vaccine and mAb Snapshot, June 2023
<https://www.path.org/resources/rsv-vaccine-and-mab-snapshot/>

Fry AM, Chittaganpitch M, Baggett HC, et al. The burden of hospitalized lower respiratory tract infection due to respiratory syncytial virus in rural Thailand. *PloS one*. 2010;5:e15098.

Wang L, Piedrab PA, Avadhanula V, et al., Duplex real-time RT-PCR assay for detection and subgroup-specific identification of human respiratory syncytial virus. *J Virol Methods*. 2019. 271:113676.

Shrato K, Nao N, Kawase M, and Kageyama T. 2020. An ultra-rapid real-time RT-PCR method for detecting human orthopneumovirus using PCR1100. *Jpn J Infect Dis*. Doi: 10.7883/yoken.JJID.2020.182.

Suwa R, Kume Y, Kawase M, Chishiki M, Ono T, Norito S, Sato K, Okamoto M, Kumaki S, Nagai Y, Hosoya M, Takeda M, Nishimura H, Hashimoto K, and Shirato K. 2022. Practical Validation of United States Centers for Disease Control and Prevention Assays for the Detection of Human Respiratory Syncytial Virus in Pediatric Inpatients in Japan. *Pathogens*. 11(7):754. (<https://doi.org/10.3390/pathogens11070754>)

平成 29～31 年度 AMED 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
「国内ならびにグローバルサーベイランスのための RS ウイルス感染症に関する検査システムの開発研究」代表 竹田 誠

令和 2~4 年度 AMED 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
「インフルエンザ監視・応答システム(GISRS)と連携した国内 RS ウイルスサーベイランスシステムの構築と重症化メカニズムの病態解明」代表 河島 尚志

執筆者

白戸憲也 (国立感染症研究所)

高山郁代（国立感染症研究所）
富田有里子（国立感染症研究所）
小林淳（国立感染症研究所）
松山州徳（国立感染症研究所）
竹田誠（東京大学）
木村博一（群馬パース大学大学院）
安達啓一（愛知県衛生研究所）
塚越博之（群馬県衛生環境研究所）
駒根綾子（川崎市健康安全研究所）
筒井理華（青森県環境保健センター）
高橋雅輝（岩手県環境保健研究センター）
五十嵐映子（福井県衛生環境研究センター）
岡部信彦（川崎市健康安全研究所）