

# ヒトメタニューモウイルス

平成 20 年 7 月

## 目次

1	ヒトメタニューモウイルスの概説	・ ・ ・ ・ ・ 3
2	ヒトメタニューモウイルス検査に関する一般的注意	・ ・ ・ ・ ・ 3
3	病原学的検査	・ ・ ・ ・ ・ 5
4	遺伝子検査	・ ・ ・ ・ ・ 11
5	血清学的検査	・ ・ ・ ・ ・ 25
6	体外診断用医薬品を用いた検査	・ ・ ・ ・ ・ 26

参考文献

検査依頼先

緊急時（実験室内暴露）の応急対応と事故対応基準

執筆者一覧

## 1 ヒトメタニューモウイルスの概説

ヒトメタニューモウイルス (human metapneumovirus: hMPV)は、2001年に発見されたパラミクソウイルス科ニューモウイルス亜科メタニューモウイルス属に属する RNA ウイルスである。ウイルスのゲノムはマイナス一本鎖 RNA、その長さは約 13kb である。hMPV の遺伝子型は、2つの Group (1 および 2)、さらに Group はそれぞれ 2つの subgroup (1a と 1b および 2a と 2b) に系統樹上分類される。

hMPV は、小児を中心とした急性呼吸器感染症の原因ウイルスの 1つであると考えられている。臨床症状は RS ウイルス感染症に類似しており、上気道炎、気管支炎および肺炎などの下気道炎を引き起こす。ウイルス性呼吸器感染症のうち、hMPV が原因と推定されるのは、小児で 5-10%、成人で 2-4% であると考えられる。特に 1-2 歳の感染が多く、大多数では乳幼児期に hMPV の初感染を受けているが、RS ウイルスと同様に再感染を繰り返すことが示唆されている。hMPV の流行時期は 3-6 月の春が中心である。しかし、通年で検出されるという報告もあり、年毎により流行パターンは一定していないと考えられる。また、有効なワクチンは未だ開発されておらず、院内感染等の感染予防策は標準予防策および接触感染予防策が講じられる。

hMPV のウイルス分離は比較的困難であると考えられ、また診断用抗原/抗体キットは市販化されていないことから、現在のところ hMPV の検出には遺伝子検査法が広く用いられている。

## 2 ヒトメタニューモウイルス検査に関する一般的注意

検査に際し、感染性ウイルスの取り扱い、バイオセーフティレベル(BSL)2

施設および安全キャビネット (クラス IIA/IIB)内で適切な操作を行うとともに、使用済みの器具等は高圧蒸気滅菌処理などにより感染性を排除後、実験区域から搬出しなければならない。また、臨床材料を取り扱うため、universal precautionに留意した操作を行うことが重要である。

## 2-1 検査材料の採取・保存

hMPVの実験室内診断は、ウイルス分離・同定、ウイルス特異遺伝子断片の増幅・検出、特異抗体の検出あるいは抗体上昇の確認を行うことが基本となる。このため、鼻腔吸引液 (Nps)、咽頭ぬぐい液 (Ts)、血清など、検査目的に応じた種々の検査材料が用いられる。採取・保存方法はそれぞれの項を参照されたい。

## 2-2 検査材料の輸送

検査材料は採取容器から内容物が漏出しないような適切な包装をした後、温度管理下 (一般に-80°C以下、凍結状態の保持が困難な場合は非凍結状態で4°Cに保持が望ましい)で検査依頼機関へ送付される。

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施行規則 (平成10年厚生労働省令第99号)第31条の36第1項打2号ホおよび第4号の規定に基づき、特定病原体等の運搬に係る容器等に関する基準が定められ、平成19年6月1日から適用されている (<http://mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou17/03.html>)。

検査材料には必要事項 (個体識別等)を明記するとともに、送付リストを添付する。

### 2-3 検査の進め方

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。検査実施までに空白期間が生じる場合は，あらかじめ検査材料を適切に処理した後，温度管理下 (-80°C 以下が望ましい) で保存する。

病原学的検査，遺伝子学的検査および血清学的検査が並行実施され，実験室内診断基準に準拠して診断がなされる。

### 2-4 実験室内診断基準

次のいずれかの結果が得られた場合，hMPV 感染とする。

- hMPV が分離・同定される。
- hMPV 特異遺伝子断片が増幅・解析される。
- 患者対血清 (急性期および回復期) 中の hMPV 特異的 IgG 抗体の陽転あるいは抗体価の有意の上昇 (4 倍以上) が確認される。

## 3 病原学的検査

### 3-1 使用器具

25/75cm<sup>2</sup> プラスチックフラスコ，24/48/96 穴プラスチックプレート，マイクロピペット，ピペット，保存チューブ，メンブレンフィルター，CO<sub>2</sub> インキュベーター，高圧蒸気滅菌器，光学顕微鏡，遠心器，等

### 3-2 必要試薬

Eagle's MEM 培地，細胞剥離用トリプシン (1:250)，EDTA，ウシ胎児血清 (FBS)，ペニシリンGカリウム，硫酸ストレプトマイシン，リン酸緩衝生理食塩水[Mg<sup>2+</sup>，

Ca<sup>2+</sup>不含, PBS(-)], 100 倍濃度ビタミン液 (三光純薬, Cat. No. SS244-0010), 結晶トリプシン (SIGMA, Cat. No. T-8003), 等

### 3-3 培養細胞

hMPV 感受性細胞として, LLC-MK2 細胞, Vero E6 細胞などが用いられる。多用されているのは LLC-MK2 細胞であるが, Vero E6 細胞も有用と考えられる。

#### [LLC-MK2 細胞および Vero E6 細胞の継代培養]

- (1) 細胞増殖用培養液 (GM)を除去する。
- (2) 0.025% EDTA-PBS を用いて細胞表面を洗浄した後, 終濃度 0.1% Trypsin 液を用いて細胞を分散する。
- (3) GM を用いて所定の細胞濃度の細胞浮遊液を調整し, 36-37°C で静置培養する。なお, 継代培養は 4-7 日間隔で行う。
- (4) 細胞の維持には細胞維持培養液 (MM)を用いる。

#### [GM および MM の調製法 (LLC-MK2 細胞, Vero E6 細胞)]

Eagle's MEM を基礎培地として GM は FBS を最終濃度 5-10%, MM は血清を加えずグルコース, ビタミン液およびトリプシンをそれぞれ最終濃度 0.2%, 4% および 2µg/ml となるように加え調製する。GM および MM には雑菌などの増殖を防ぐため抗生物質を所定量添加する。

### 3-4 検体の採取時期

臨床症状 (発熱, 発咳, 鼻漏など) 出現日を第 0 病日とし, 第 3 病日以内に採取された検体が望ましい。

### 3-5 臨床ウイルス分離材料の輸送・保存液

Nps からのウイルス分離増殖が一般的である。Nps あるいは Ts は鼻腔から吸引あるいは咽頭部を滅菌スワブ採取棒で拭い、吸引液あるいはスワブを保存液に浸漬した後、速やかに保存する。綿棒は綿球や軸が天然素材のため、ある種のウイルスの増殖を阻害する場合や遺伝子検査には不適であるなどの理由から他の合成素材の器材を用いたスワブ採取棒に変わりつつある。

分離材料の輸送・保存液には、抗生剤 (ペニシリン 500 IU/ml, ストレプトマイシン 500 $\mu$ g/ml)を含む Eagle's MEM などの塩類緩衝液が用いられる。安定剤としてウシ血清アルブミン (BSA)を終濃度 0.1%添加したものを使用する。なお、市販の輸送・保存液を用いても良い。検体採取後、1 週間以上保存する場合は -80 $^{\circ}$ C 以下、1 週間以内に使用する場合は 4 $^{\circ}$ C に保存し、可能な限り凍結融解は避ける。

### 3-7 ウイルス分離方法

hMPV を分離するためには、感受性のある Vero E6 あるいは LLC-MK2 などの培養細胞を用いて行う。ここでは、96 ウェルマイクロプレートと 48 ウェルプレートを用いてウイルスを分離する方法を示す。操作は全て BSL2 施設の安全キャビネット中で行う。

#### 3-7-1 検査材料の前処理

検体は、咽頭ぬぐい液などにスワブ採取棒が入っている場合は、保存液中でよく攪拌し、スワブ採取棒は廃棄する。検査材料を 3,000rpm, 30 分間、冷却 (4 $^{\circ}$ C) 遠心沈殿した上清を出発材料とする。残余液は再接種等に用いるため凍結保存 (-80 $^{\circ}$ C) する。

### 3-7-2 96 ウェルマイクロプレート法

この方法は多数例の検体を迅速かつ省力的に取り扱う場合、極めて有効な方法であるが、検体相互間のクロスコンタミネーションの発生を回避するため習熟した実験手技が要求される。

- (1) あらかじめ単層培養 (96 穴プラスチックプレート)させた Vero E6 細胞を PBS(-)で 2 回洗浄し、MM100 $\mu$ l を各穴に入れる。
- (2) 被検検体 75 $\mu$ l を 2-4 穴接種し、2, 000rpm, 20 分遠心後、33°C の CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。
- (3) 培養条件がよければ、Vero E6 細胞は約 1 ヶ月間の培養観察が可能であるので、細胞コントロールと比較観察して CPE 出現の有無を確認する。

### 3-7-3 48 ウェルプレート法

- (1) 48 ウェルプレートに単層培養した培養細胞の GM を捨てる。
- (2) 1 ウェルあたり 300 $\mu$ l の MM を分注し、細胞洗浄を二回行う。
- (3) 接種用検体の前処理を行った検体を 1 ウェルあたり 100 $\mu$ l 分注する。33°C, 5%CO<sub>2</sub> で 1 時間インキュベートする。
- (4) 1 ウェルあたり 400 $\mu$ l の MM を分注する。この際、検体が隣のウェルに入ることが無いように注意する。
- (5) 33°C, 5%CO<sub>2</sub> で 1 週間以上観察し、CPE の有無を確認する。

CPE の出現が無い場合は、感染培養液を回収し、新しく作成した培養細胞に上記と同様の手順で接種する。hMPV は、CPE の出現まで 4 代継代以上必要であることもある。



(注 1) hMPV の増殖は非常に遅く、CPE の出現は細胞接種後 10-14 日間以上を要することが多いため、細胞維持が可能な限り長期間観察することが肝要である。

(注 2) VeroE6 細胞では hMPV の外、RS ウイルス、ムンプスウイルス、アデノウイルスおよびエンテロウイルスなどが増殖可能である。これらのウイルスが早期に増殖した場合、hMPV の CPE を観察することは困難となる。

(注 3) hMPV の CPE は顆粒状となることが多いが、他のパラミクソウイルスと同様に合胞体を形成することもある。前者の場合には、CPE はアデノウイルスのそれに類似しているため鑑別を要するが、アデノウイルスでは他の細胞でも増殖がみられること、増殖速度が速いことで区別できる。合胞体を形成した場合は他の合胞体を形成する RS ウイルス、ムンプスウイルス、パラインフルエンザ 2 型などとの鑑別が重要となる (図 1-8)。

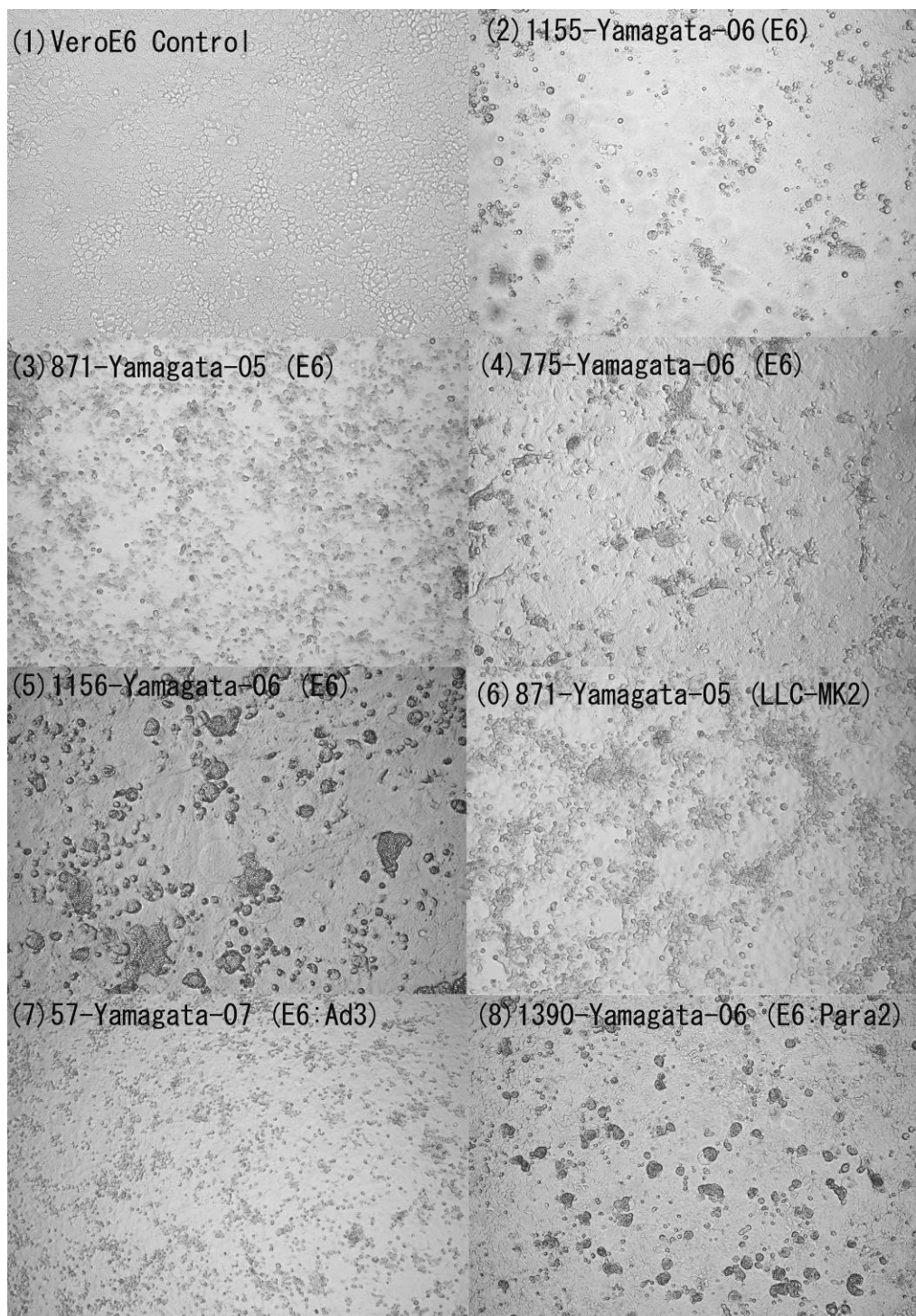


図 ヒトメタニューモウイルス等の細胞変性効果写真 (1)Vero E6 細胞コントロール, (2)(3)Vero E6 細胞におけるヒトメタニューモウイルスの細胞変性効果, (4)(5)Vero E6 細胞におけるヒトメタニューモウイルスの細胞変性効果 (合胞体形成), (6)LLC-MK2 細胞におけるヒトメタニューモウイルスの細胞変性効果, (7) Vero E6 細胞におけるアデノウイルス 3 型の細胞変性効果, (8) Vero E6 細胞におけるパラインフルエンザウイルス 2 型の細胞変性効果 (合胞体形成)

### 3-8 分離株の同定

分離株の同定は、RT-PCR による hMPV の特異的遺伝子増幅・検出および増幅産物の遺伝子解析によって行われていることが多い。「5 遺伝子検査」の項を参照されたい。

### 3-9 分離株の増殖・保存

分離株の性状解析等の検査・研究には高力価のウイルス浮遊液を用いることが望ましい。

[ウイルス液の調整方法]

- (1) 培養細胞にウイルスを感染させ培養する。
- (2) CPE が培養細胞の約 70-80%以上観察できるようになったら培養液および培養細胞をすべて回収する。
- (3) 回収液はドライアイス-アセトンなどを用いて、ウイルスの失活を抑制しながら急速凍結を行い、凍結保存 (-80°C)する。

(注) hMPV は、感染細胞相に多く存在するため、感染培養液相及び感染細胞相の回収により、より高力価のウイルス液が得られる。

## 4. 遺伝子検査

hMPV の診断には、市販されている試薬がなく、またウイルス分離に時間がかかるため、特異的遺伝子の増幅・検出によって決定することも可能である。hMPV は、F 遺伝子の系統解析により、hMPV の遺伝子型は 1a, 1b, 2a, 2b の 4 つのサブタイプに分類される。現在、hMPV の遺伝子診断には、種々の方法が用いられており、これらの各々について比較検討することは困難であるので、本マニ

ュアルでは、以下の方法について示す。

#### 4-1 RT-PCR 法による hMPV の同定

##### 4-1-1 材料および試薬

共通：滅菌マイクロピペット (20, 200, 1000 $\mu$ l), 滅菌微量遠心チューブ (0.2, 0.5, 1.5ml), マイクロ遠心器, RNase-free 滅菌蒸留水 (SIGMA, Cat. No. W-4502)

RNA 抽出：99%エタノール, High Pure Viral RNA kit (Roche, Cat. No. 1858882)

RT 反応：RNase Inhibitor (Invitrogen, Cat. No.10777-019), Random Primer (Takara, Cat. No.3802), dNTP (Promega, Cat. No. U1240), Reverse Transcriptase (和光純薬, Cat. No. 187-01281), DTT

PCR 反応：Taq Polymerase (Promega, Cat. No. M1865; 10  $\times$  reaction buffer, MgCl<sub>2</sub> 付), dNTP (Promega, Cat. No. U1240), プライマー, サーマルサイクラー

電気泳動：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, 分子量マーカー, ローディングバッファー, 1  $\times$  TBE バッファー (0.089M Tris-0.089boric acid-0.002M EDTA, pH8.3  $\pm$  0.3), エチジウムブロマイド

##### 4-1-2 遺伝子検査のための検体の採取と保存

hMPV の遺伝子診断の検体は、他のウイルス検査検体と同様に、急性期鼻咽頭および気管吸引液などを一般的なウイルス保存・輸送培地 (または生理食塩水) で希釈・保存する。hMPV は RS ウイルスなどと同様に比較的の不活化しやすいと考えられるため、検体は採取後すみやかに検査に供するか、あるいは温度管理

下 (2-2 検査材料の輸送)で保存する必要がある。

#### 4-1-3 ウイルス RNA の抽出

ウイルス RNA の抽出は、それぞれの施設で一般に用いている方法が良いが、ここでは High Pure Viral RNA Kit (Roche)を用いた方法を示す。

- (1) 1.5ml エッペンチューブで、検体 200 $\mu$ l と Binding Buffer (緑キャップ)400 $\mu$ l をよく混和し、スピncラムへ添加する。
- (2) 8, 000  $\times$  g で 1 分遠心する。
- (3) カラムを新しいチューブへ移す。
- (4) Inhibitor Removal Buffer (黒キャップ)500 $\mu$ l を添加し、8, 000  $\times$  g で 1 分遠心、カラムを新しいチューブへ移す。
- (5) Wash Buffer (青キャップ)450 $\mu$ l を添加し、8, 000  $\times$  g で 1 分遠心、カラムを新しいチューブへ移す。
- (6) Wash Buffer (青キャップ)450 $\mu$ l を添加し、8, 000  $\times$  g で 1 分遠心、さらに同条件で 10 秒遠心し、カラムを新しいチューブへ移す。
- (7) Elution Buffer (白キャップ)50 $\mu$ l を添加し、8, 000  $\times$  g で 1 分遠心し、RNA を回収する。
- (8) 抽出 RNA は-80 $^{\circ}$ C での保存が望ましい(-20 $^{\circ}$ C 以下で約 1 年間安定である)。

#### 4-1-4 RT 反応

抽出された RNA は、他の気道ウイルス (RS, ライノ, コロナ, パラインフルエンザ, インフルエンザなど)の検出にも用いることができるので、全量で RT 反応を行い、cDNA を合成し-20 $^{\circ}$ C 以下で保存する。RT 反応は各実験室で行われている方法で差し支えない。

(1) RT-反応液を作成する。

RNase free water	900 $\mu$ l	}	Total 1500 $\mu$ l
0.1M DTT	100 $\mu$ l		
2mM dNTP mix	100 $\mu$ l		
5 × buffer	300 $\mu$ l		
Random Primer*	100 $\mu$ l		

(\*Takara, Cat. No.3802 50nmol 1 本を RNase free water 200 $\mu$ l に溶解)

(2) RT 反応

熱変性*RNA 液	5.0 $\mu$ l	}	(20 $\mu$ l/tube) RT 反応液
RT 反応液	14.0 $\mu$ l		
RNase Inhibitor	0.5 $\mu$ l		
Reverse Transcriptase	0.5 $\mu$ l		

\*70°Cで約 10 分間 denature, 氷水中で 1 分間冷却

30 °C10 分⇒37 °C45 分⇒95 °C5 分⇒4 °C にて反応

#### 4-1-5 PCR 反応

RT 反応の産物 (cDNA)を PCR に用い, 残りは-20 °C 以下で保存する。

(1) PCR反応液を作成する。

10 × buffer (MgCl <sub>2</sub> 不含)	100 $\mu$ l	}	Total 1000 $\mu$ l
25mM MgCl <sub>2</sub>	60 $\mu$ l		
2mM dNTP mix	50 $\mu$ l		
MPVF1f (Forward) primer (50 $\mu$ M)	10 $\mu$ l		
MPVF1r (Reverse) primer (50 $\mu$ M)	10 $\mu$ l		
Distilled Water	770 $\mu$ l		

## (2) PCR反応

cDNA	3.0 $\mu$ l	} (20 $\mu$ l/tube)
PCR反応液	17.0 $\mu$ l	
Ex Taq Polymerase	0.1 $\mu$ l	

### 反応条件

94°C	5分	
94°C	30秒	} × 40cycle
50°C	30秒	
72°C	60秒	
72°C	10分	

### 4-1-6 PCR 産物のアガロースゲル電気泳動による確認

- (1) 1.0%のアガロースゲルを作成する。
- (2) ゲルの穴の中に PCR 産物 10 $\mu$ l とローディングバッファー1.5 $\mu$ l の混和物を入れる。
- (3) 1 × TBE バッファーで 100V, 40-50 分電気泳動する。
- (4) エチジウムブロマイド入り 1 × TBE バッファーで 30-60 分染色し, 水洗する。
- (5) UV ライト上でバンドを確認する。
- (6) ポラロイドカメラなどで電気泳動写真を記録する。

### 4-1-7 PCR 産物の精製とシーケンス

方法は 5-2-7 を参照されたい。

```

871-Yamagata-05  GGGGTCTACGGAAGCTCTGTGATTTACATGGTTCAATTGCCGATCTTTGGTGTTCATAGAT
937-Yamagata-05  GGGGTCTACGGAAGCTCTGTGATTTACATGGTTCAATTGCCGATCTTTGGTGTTCATAGAT
NL/1/99          GGGGTCTACGGAAGCTCTGTGATTTACATGGTTCAATTGCCGATCTTTGGTGTTCATAGAT
1788-Yamagata-05 GGGGTCTACGGAAGCTCCGTGATTTACATGGTCCAGCTGCCGATCTTTGGTGTTCATAGAT
1795-Yamagata-05 GGGGTCTACGGAAGCTCCGTGATTTACATGGTCCAGCTGCCGATCTTTGGTGTTCATAGAT
NL/1/94         GGGGTCTACGGAAGCTCTGTGATTTACATGGTCCAGCTGCCGATCTTTGGTGTTCATAGAT
901-Yamagata-05  GGGGTCTACGGGAGCTCCGTAATTTACATGGTGCAGCTGCCAATCTTTGGCGTTATAGAC
910-Yamagata-05  GGGGTCTACGGGAGCTCCGTAATTTACATGGTGCAGCTGCCAATCTTTGGCGTTATAGAC
NL/17/00        GGGGTCTACGGGAGCTCCGTAATTTACACGGTGCAGCTGCCAATCTTTGGCGTTATAGAC
NL/1/00         GGAGTTTACGGAAGCTCCGTAATTTACATGGTGCAACTGCCAATCTTTGGGGTTATAGAC
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
871-Yamagata-05  ACACCTTGTTGGATAATCAAGGCAGCTCCCTCTTGCTCAGAAAAAACGGGAATTATGCT
937-Yamagata-05  ACACCTTGTTGGATAATCAAGGCAGCTCCCTCTTGCTCAGAAAAAACGGGAATTATGCT
NL/1/99          ACACCTTGTTGGATCATCAAGGCAGCTCCCTCTTGCTCAGAAAAAACGGGAATTATGCT
1788-Yamagata-05 ACACCTTGTTGGATAATCAAGGCAGCTCCCTCTTGTTTCAGAAAAAGATGGAAATTATGCT
1795-Yamagata-05 ACACCTTGTTGGATAATCAAGGCAGCTCCCTCTTGTTTCAGAAAAAGATGGAAATTATGCT
NL/1/94         ACACCTTGTTGGATAATCAAGGCAGCTCCCTCTTGTTTCAGAAAAAGATGGAAATTATGCT
901-Yamagata-05  ACGCCTTGCTGGATAGTAAAAGCAGCCCCTTCTTGTTCCGAAAAAAGGGAAACTATGCT
910-Yamagata-05  ACGCCTTGCTGGATAGTAAAAGCAGCCCCTTCTTGTTCCGAAAAAAGGGAAACTATGCT
NL/17/00        ACGCCTTGCTGGATAGTAAAAGCAGCCCCTTCTTGTTCCGAAAAAAGGGAAACTATGCT
NL/1/00         ACGCCTTGCTGGATAGTAAAAGCAGCCCCTTCTTGTTCCGAAAAAAGGGAAACTATGCT
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

図9 hMPV F 遺伝子アライメント (部分抜粋)



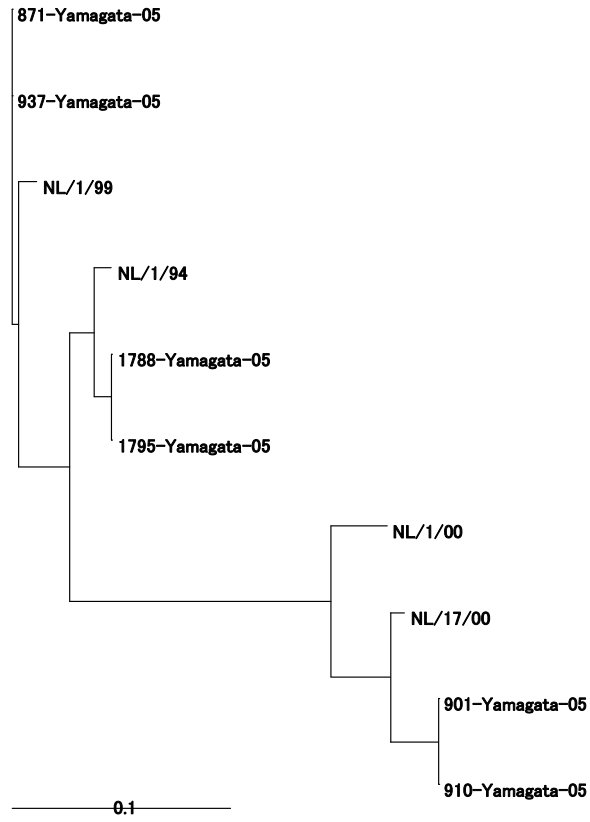


図 10 hMPV F 遺伝子分子系統樹 (N-J 法)

## 4-2 RT-PCR 法による hMPV の同定

### 4-2-1 材料および試薬

共通：滅菌マイクロピペット (10, 20, 200, 1000 $\mu$ l), 滅菌微量遠心チューブ (0.2, 0.5, 1.5ml), マイクロ遠心器, RNase-free 滅菌蒸留水 (ニッポンジーン, Cat. No. 312-90103)

RNA 抽出: 99%エタノール, QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Cat. No.52904)

DNase : DNase I (TaKaRa, Code No. 2215A), 5  $\times$  First strand buffer (Super Script II に添付)

RT 反応 : 5  $\times$  First strand buffer (Super Script II に添付), Ribonuclease Inhibitor (TaKaRa, Cat. No. 2310A), Random primer hexamer (Amersham Pharmacia, Cat. No. 27-2166-01), dNTP mix (TaKaRa, Cat. No. 4030), Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen, Cat. No. 18064-014), 100mM DTT (Super Script II に添付)

PCR 反応 : Perfect shot EX Taq (TaKaRa, RR005A), プライマー, サーマルサイクラー

電気泳動 : 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, 分子量マーカー, ローディングバッファー, 1  $\times$  TAE バッファー, エチジウムブロマイド

PCR 産物の精製 : QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Cat. No. 28104), 99% エタノール

シークエンス : ABI PRISM BigDye Terminator Ver 1.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Cat. No. 4337450), Auto Seq G-50 (Amasham pharmacia biotech, Cat. No. 27-5340-01)

## 4-2-2 RNA 抽出

### QIAamp Viral RNA Mini kit による RNA の抽出

RNA の抽出には多くの方法があり、また抽出キットも多数市販されている。それぞれが良いと判断した方法を用いて良い。ここではノロウイルスの検査でも使用されている QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いる方法を紹介する。

使用前に行う以下の試薬の調整を行う。

培養上清あるいは臨床検体を室温 (15-20°C)に戻す。

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。

Buffer AVL/Carrier RNA をサンプル数にあわせて調整する。

以下の操作は全て室温で行う。

- (1) 1.5ml チューブに Buffer AVL/Carrier RNA 560 $\mu$ l を入れる。
- (2) 検体 140 $\mu$ l と Buffer を充分混合するため 15 秒間ボルテックスミキサーにて振盪混和後、室温 (15-25°C)に 10 分間静置する。チューブをスピンドウンする。
- (3) エタノール (96-100%) 560 $\mu$ l をチューブに加え、ボルテックスミキサーにて振盪混和後、チューブをスピンドウンする。液が混濁した時には再度 9,000  $\times$  g (10,000rpm)で 5 分間遠心する。
- (4) (3)の液 630 $\mu$ l を QIAamp スピнкаラム (キットに添付)に注入し、蓋を閉め、6,000  $\times$  g (8,000 rpm)で 1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のチューブに移し、残りの (3)の液 630 $\mu$ l を入れ、同様に遠心し、全ての液が無くなるまで行う。

- (5) QIAamp スピнкаラムを開け、Buffer AW1 を 500 $\mu$ l 入れる。
- (6) 蓋を閉め、6, 000  $\times$  g (8, 000 rpm) で 1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。
- (7) QIAamp スピнкаラムに Buffer AW2 を 500 $\mu$ l 加え、20, 000  $\times$  g (14, 000 rpm) で 3 分間遠心する。
- (8) QIAamp スピнкаラムを新しい蓋つき 1.5ml 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 60 $\mu$ l を加え、蓋を閉めて 1 分間置いた後、6, 000  $\times$  g (8, 000 rpm) で 1 分間遠心する。
- (9) このろ液が抽出 RNA であり、抽出 RNA は -80 $^{\circ}$ C での保存が望ましいが、-20 $^{\circ}$ C 以下で 1 年間は安定である。

#### 4-2-3 DNase 処理

臨床検体中には様々な DNA が含まれており、しばしば PCR で非特異バンドが出現する可能性があるため、それらを抑制するため、DNase 処理を行うことが望ましい。

- (1) 表 1 に示したように DNase 処理混合液の調製を行う。

表 1 DNase 処理混合液

試薬	15 $\mu$ l 系	30 $\mu$ l 系
抽出 RNA	12.0 $\mu$ l	24.0 $\mu$ l
5 $\times$ First-Strand Buffer <sup>※</sup>	1.5 $\mu$ l	3.0 $\mu$ l
Distilled water	0.5 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l
DNase I (1U/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l	2.0 $\mu$ l

※使用する逆転写酵素緩衝液を用いる。

- (2) 混合液調製後, 37°C に 30 分間置く。
- (3) 次いで 75°C に 5 分間置く。
- (4) 直ちに 4°C (または on ice) に置く。

#### 4-2-4 RT 反応

Super Script II RT (Invitrogen) を用いた方法を示す。

- (1) 下表の RT 反応調整液を作製する。

試薬	15μl 系	30μl 系	50μl 系
DNase 処理 RNA	7.5μl	15.0μl	30.0μl
5 × First strand Buffer	2.25μl	4.5μl	7.0μl
10mM dNTPs	0.75μl	1.5μl	2.5μl
Random Primer (1.0μg) <sup>*</sup>	0.375μl	0.75μl	1.25μl
Ribonuclease Inhibitor (33U/μl)	0.5μl	1.0μl	1.67μl
100mM DTT	0.75μl	1.5μl	2.5μl
Super Script II RT (200U/μl)	0.75μl	1.5μl	2.5μl
Distilled water	2.125μl	4.25μl	2.58μl

※PCR に使用するプライマーを用いても良い。

- (2) 反応は 42°C で 30 分から 2 時間行う (通常 1 時間)。
- (3) 次いで 99°C で 5 分間加熱する。
- (4) 直ちに 4°C (または on ice) する。

#### 4-2-5 PCR 反応

RT 反応の産物 (cDNA) を PCR に用い, 残りは -20°C 以下で保存する。

ここでは, Peret らが報告した hMPV の F タンパクをコードする領域の一部 450bp に対して PCR を行い (1<sup>st</sup> PCR), さらに Nested PCR (357bp) を行う方法を示す。

### 1st PCR

PCR プライマー hMPV-1f (21mer); 5'-CTT TGG ACT TAA TGA CAG ATG-3'

hMPV-1r (20mer); 5'-GTC TTC CTG TGC TAA CTT TG-3'

#### 反応液

試薬	50 $\mu$ l系
hMPV-1f (10 $\mu$ M)	3.0 $\mu$ l
hMPV-1r (10 $\mu$ M)	3.0 $\mu$ l
Distilled water	14.0 $\mu$ l
cDNA	5.0 $\mu$ l
Perfect shot Ex Taq	25.0 $\mu$ l

#### 反応条件

94°C 2分

94°C	60秒	×35cycle
54°C	60秒	
72°C	60秒	

72°C 7分

### Nested PCR

PCRプライマー hMPV-2f (20mer); 5'-CAT GCC GAC CTC TGC AGG AC-3'

hMPV-2r (20mer); 5'-ATG TTG CAY TCY YTT GAT TG-3'

#### 反応液

試薬	50 $\mu$ l系
hMPV-2f (10 $\mu$ M)	3.0 $\mu$ l
hMPV-2r (10 $\mu$ M)	3.0 $\mu$ l
Distilled water	17.0 $\mu$ l
cDNA	2.0 $\mu$ l
Perfect shot Ex Taq	25.0 $\mu$ l

#### 反応条件

94°C	60秒	× 40cycle
55°C	60秒	
72°C	60秒	

#### 4-2-6 PCR産物のアガロースゲル電気泳動による確認

- (1) 1.0%アガロースゲルを作成する。
- (2) アガロースゲルのウェルにPCR産物5 $\mu$ lを入れる。
- (3) 1 × TAEバッファで100V, 40-50分電気泳動する。
- (4) エチジウムブロマイド溶液 (終濃度100ng/ml)で10分染色する。
- (5) UVライト上でバンドを確認する。
- (6) ポラロイドカメラなどで記録する。

#### 4-2-7 PCR産物の精製とシーケンス

- (1) 電気泳動の結果に基づいてPCR産物をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)などにより精製する。
- (2) 精製PCR産物を鋳型としたシーケンスPCRを行う。

## 反応液

試薬	10 $\mu$ l系
Primer (3.2pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
5 $\times$ PCR Buffer	2 $\mu$ l
Distilled water	4 $\mu$ l
Cycle Sequencing Mix	2 $\mu$ l
Template (3-10ng)	1 $\mu$ l

## 反応条件

96°C	10秒	× 25cycle
50°C	5秒	
60°C	4分	

反応後、Auto Seq G-50 (Amasham pharmacia biotech)などを用いて未反応ダイターミネーターを除去する。この試料をDNAシーケンサーにより解析し、ウイルス遺伝子の塩基配列を決定する。

### 4-2-8 解析

シーケンスデータのアライメントを行う。アライメントは市販のソフトウェア (例:Genetyx)あるいは Clustal W を用いるのが一般的である。Clustal W はインターネット上 (URL: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/clustalw-j.html>)に公開されている。Clustal Wにより、アライメントを行ったシーケンスを基に分子系統樹を作成する。一般に、ウイルス遺伝子の分子系統樹作成には近隣結合法 (N-J法)を用いることが多い。なお、系統樹作成にあたっては、本マニュアルの他の項目 (例:麻疹ウイルス)なども参照されたい。系統樹を基に検出されたウイルス



のクラスター分類などを行うことが可能である。

## 5. 血清学的検査

hMPV 感染細胞および非感染細胞を蛍光抗体用スライドグラスに塗抹し、アセトン固定した上で抗原とする。感染細胞のウイルス抗原に反応する抗体が被検血清中にあるか否かを調べることにより、hMPV に対する特異的抗体を検出する方法である。この方法は検査用抗原を準備しておけば比較的簡単に抗体測定が可能である。

蛍光抗体法にて測定する研究検査が三菱化学 BCL ([http://www.medience.co.jp/research/06\\_32.html](http://www.medience.co.jp/research/06_32.html))でも入手可能である。

### 5-1 試薬・機材

Vero E6 細胞, 蛍光抗体検査用スライドグラス (AR Brown, Cat. No. MS 311 BL), PBS, FITC 標識抗ヒト IgG 抗体 (Cappel Research Reagents, Cat. No. 56988)

### 5-2 検査法

- (1) 単層培養した Vero E6 細胞に hMPV を感染させる。
- (2) 培養細胞に CPE が観察できるようになったら PBS で細胞を洗浄し、トリプシン処理により細胞を回収する。細胞を更に 1 回 PBS で洗浄後、約  $3 \times 10^6$  cells/ml となるように PBS に浮遊する。非感染細胞を同様に処理し、感染細胞および非感染細胞を等量混和する。
- (3) 蛍光抗体用スライドグラスの各ウェルに細胞浮遊液を 10 $\mu$ l ずつ滴下塗抹し、完全に乾燥させる。乾燥後 100%アセトンで 5 分間固定後アセトンを蒸発させ、ウイルスを完全に不活化させる目的で UV を 1 時間以上照射する。

- (4) 被検血清を PBS で 20 倍から 2 倍段階希釈し, その 10-30 $\mu$ l を各ウェルにのせ, 37°C で 1 時間反応させる。被検血清とともに抗体陽性, 陰性コントロール血清も同時に反応させる。
- (5) PBS でスライドグラスを洗浄し, PBS であらかじめ 8 単位に調整された FITC 標識ヒト IgG 抗体 (50-100 倍に希釈)を各ウェルに重層し, 37°C で 1 時間反応させる。
- (6) PBS でスライドを洗浄後, 10%グリセリン入り PBS で封入する。
- (7) 蛍光顕微鏡で特異蛍光を検鏡する。特異的な染色像が認められた場合に抗体陽性と判定し, 抗体陽性を示した最高希釈倍数を抗体価とする。

## 6. 体外診断用医薬品を用いた検査

現在のところ, 体外診断用医薬品は市販されていない。

## 参考文献

1. Van den Hoogen B.G., de Jong J.C., Groen J., Kuiken T., de Groot R., Fouchier R.A.M., and Osterhaus A.D.M.E. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat. Med.* 2001;7(6):719-724.
2. Van den Hoogen B.G., Herfst S., Sprong L., Cane P.A., Forleo-Neto E., de Swart R.L., Osterhaus A.D., Fouchier R.A., Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(4):658-66.
3. Abiko C., Mizuta K., Itagaki T., Katsushima N., Ito S., Matsuzaki Y., Okamoto M., Nishimura H., Aoki Y., Murata T., Hoshina H., Hongo S., and Ootani K., Outbreak of human metapneumovirus detected by use of the Vero E6 cell line in isolates

4. 菊田英明, ヒト・メタニューモウイルス感染症 モダンメディア 2005; 51(9): 217-222.
5. Peret T.C., Boivin G., Li Y., Couillard M., Humphrey C., Osterhaus A.D., Erdman D.D., Anderson L.J., Characterization of human metapneumovirus isolated from patients in North America. J Infect Dis. 2002; 185(11): 1660-1663.
6. 高尾信一, 下藺広行, 柏弘, 松原啓太, 坂野堯, 池田政憲, 岡本尚子, 吉田弘, 島津幸枝, 福田伸治, 本邦において初めて流行が確認された小児の human metapneumovirus 感染症の臨床的, 疫学的解析 感染症学雑誌 2004; 78(2): 129-137.

#### 検査依頼先

- ・ 全国都道府県/政令市衛生研究所
- ・ 国立感染症研究所ウイルス第3部  
〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1  
Tel:042-561-0771  
Fax:042-565-3315

#### 緊急時 (実験室内暴露)の応急対応と事故対応基準

病原体検出マニュアル「RS ウイルス」の項に準じる。

## 執筆者一覧

水田克巳（山形県衛生研究所）

青木洋子（山形県衛生研究所）

須藤亜寿佳（山形県衛生研究所）

加藤政彦（群馬県衛生環境研究所）

塚越博之（群馬県衛生環境研究所）

木村博一（国立感染症研究所感染症情報センター）

野田雅博（国立感染症研究所ウイルス第3部）

監修

田代真人（国立感染症研究所ウイルス第3部）