

新型コロナウイルスに関するアドホック委員会からの提言（第1版 2020年3月1日）

新型コロナウイルスの発生が世界的に問題視されており、我が国でも緊急な対応が必要となっています。臨床検査でも遺伝子検査による病原体検出と日常検査の円滑な実施が求められます。新しい病原体であるため、検体の取り扱い並びに輸送・搬送に混乱が生じています。

そのため本委員会は、新型コロナウイルスに関する臨床検査の実態に即した検体の取り扱い及び検査に関して下記のような提言を行います。

I. 新型コロナウイルス検出を目的とした検体の取扱い

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）を参照のこと。

*頻回に更新されているので、HPで最新版かどうか確認する。

【検体採取時の留意点】

➤ **下気道由来検体**・・・患者が挿管されていない場合、喀痰を採取する。人工呼吸器管理下にある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。臨床的に禁忌とならない場合は気管支肺胞洗浄液の採取も検討する。採取した吸引液または喀痰はスクリーキャップ付きプラスチックチューブに入れ確実に蓋をし、利用可能であればパラフィルム**でシールする。

**検査室が保有している場合が多い。実験室でも広く利用されている。

➤ **鼻咽頭ぬぐい液**・・・滅菌綿棒（フロックスワブなど、鼻腔用の細いもの。）を鼻孔から挿入し、上咽頭を十分にぬぐい、綿棒を1-3 mLのウイルス輸送液が入った滅菌スピッツ管に入れ確実に蓋をし、利用可能であればパラフィルムでシールする。ウイルス輸送液が無い場合は滅菌PBSや滅菌生理食塩水などを用いる。滅菌綿棒が長い場合はハサミで先を切断し1-3 mLのPBSを加えて提出する。

【検体採取時ならびに検体取り扱いの注意点】

標準予防策の遵守を徹底する。

擦式アルコール製剤による手指消毒や適切な个人防护具（手袋・サージカルマスク・ガウン・ゴーグルまたはアイシールド）の使用法を改めて確認・徹底する。

ウイルスの分離・培養を伴わない遺伝子検査は、バイオセーフティレベル2（BSL2）の施設において決められた手順に基づき実施する。

検体を取り扱う区域を限定し、作業台や使用した器具など汚染された可能性のある環境・物品は、次亜塩素酸ナトリウムを用いて清拭消毒する。使用済みの検体、使い捨て器具、个人防护具はビニール袋へ入れて感染性廃棄物として廃棄する。

【検体保管】

上気道、下気道検体は採取後、可能な限り速やかに氷上または冷蔵庫（4℃）に保管し、輸送まで48時間以上かかる場合は-80℃以下で凍結保存する。その他の検体は結果判明後、検査機関

に送付する可能性があるので、それまで-80°C以下で凍結保存する。-80°Cの冷凍庫がない場合は通常の冷凍庫（-20°C程度）で保管する。

【同一施設内での検体輸送】

例えば病棟から検査室への輸送の際は、検体は汚染されていない二次容器（ビニール袋やジップロックなど）に収納し提出する。検体の輸送は、気送管の利用を避け、検体の基本的取り扱いが訓練された医療スタッフが担当する。

【他施設への検体輸送】

運送業者を介した施設外輸送は「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」（国立感染症研究所 HP）の記載にあるように病原体輸送カテゴリ-B の条件***にて輸送する。

直接輸送する必要がある場合は、検体が入った一次容器を汚染されていない二次容器（専用でなくてよい。例えば 50mL チューブなど）に入れ、さらに発泡スチロールあるいは段ボールなどの三次容器に入れて陸路で輸送する。

***WHO 感染性物質の輸送規則に関するガイダンスに定められた国際的な基準であり、一般的な運送業社でも認識されているが、事前に業者に確認しておく。

2. RNA の抽出

広く使用されている QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いた方法を示すが、他のウイルス RNA 抽出キットを用いてもよい。

例) MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit (Thermo Cat# A42352)、KingFisher Flex や KingFisher Duo を所有していれば核酸抽出工程を自動化できる。

【操作上の注意】

検体の取り扱いは、バイオセーフティレベル 2 以上の検査室で行う。安全キャビネット内で取り扱い、操作中は个人防护具を着用する。チューブの蓋を開ける前には遠心し、エアロゾルの発生を前提とした操作を行う。

検査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(RNaseZAP や RNase Away など安全キャビネット内やピペットなどを清拭することでRNase の混入を防ぐことができる)。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。ウイルス不活化前の作業までを安全キャビネット内で行う。例えば QIAamp Viral RNA Mini キットの場合は、Buffer AVL を添加した後は安全キャビネット外で作業しても感染の可能性は低いと考えられる。

3. TaqMan プローブを用いた one-step RT-PCR 法

【機材および試薬】

マイクロピペット（10、20、200、1000 μ L）、RNase DNase Free Water、滅菌微量遠心チューブ（1.5 mL）、96 well 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(Real-time PCR 機器に関して機種は問わない)、プライマー、TaqMan プローブ、QuantiTect® Probe RT-PCR Kit(QIAGEN Cat#204443) [AgPath-ID One-step RT-PCR Reagents(Thermo Cat# AM1005)、TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Cat # 4,444,432)のライトサイクラーでの動作は確認済み、ABI 機器での動作報告がある。他試薬でも検出感度 (50 copies/5 μL) の担保ができれば使用可能である。

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(国立感染症研究所 HP より)

N セット

N_Sarbeco_F1 CACATTGGCACCCGCAATC

N_Sarbeco_R1 GAGGAACGAGAAGAGGCTTG

N_Sarbeco_P1 FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BHQ

N2 セット

NIID_2019-nCOV_N_F2 AAATTTTGGGGACCAGGAAC

NIID_2019-nCOV_N_R2 TGGCAGCTGTGTAGGTCAAC

NIID_2019-nCOV_N_P2 FAM-ATGTCGCGCATTGGCATGGA-BHQ

Position は Wuhan seafood market pneumonia virus isolate Wuhan-Hu-1 MN908947.1 由来である。

TAMRA でも動作確認済み。

Ver3 配列とミスマッチがあるが、ウイルス RNA の検出感度に影響がないことを確認済み。

リアルタイム one-step RT-PCR(TaqMan プローブ法)反応

詳細は one-step RT-PCR 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。

【反応系の妥当性の確認】

- 1) 反応系の妥当性の確認は陽性コントロールにて確認を実施する。
- 2) 詳細は国立感染症研究所「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver. 2.7」を参照する。

II. 新型コロナウイルス検出を目的としない検体の取扱い

日頃から、すべての操作は感染性物質暴露のリスクがある。肉眼的に確認できる飛沫飛散、滴下のほか、エアロゾルの発生（容器の蓋を開けるとき、容器からの分取時、攪拌、混注時など）を前提に、日常検査が標準予防策を遵守して行われていることを再認識する。具体的には、手袋・マスクの装着以外に、手袋脱着時のアルコール消毒、汚染と清潔の識別（検体操作前後の電話やドアノブへの接触時など）などに注意する。