

## 2. 感染症発生動向調査におけるエンテロウイルス病原体検査に関わる 外部精度調査（EQA）導入の研究

研究分担者	吉田 弘	国立感染症研究所ウイルス第二部主任研究員
研究協力者	伊藤 雅、皆川 洋子	愛知県衛生研究所
	北川 和寛	福島県衛生研究所
	近藤眞規子	神奈川県衛生研究所
	高橋 雅輝	岩手県環境保健研究センター
	中田 恵子	大阪府立公衆衛生研究所
	濱崎 光宏	福岡県保健環境研究所
	峯岸 俊貴	埼玉県衛生研究所
	山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所
	山下 照夫	修文大学

### 研究要旨

手足口病検査を対象とした外部精度管理調査用試料調製の条件検討を行った。起因ウイルスであるエンテロウイルスを感度の高い CODEHOP-snpCR 法で同定する場合、同定結果の信頼性確保にはウイルス感染価と PCR によるウイルスゲノム検出下限値、遺伝子配列解析による同定可能なウイルスゲノム下限値を把握した上で、目的とする検出感度、正確性を設定し、試料調製を行う必要性が認められた。

本法による信頼性の評価は既知の標準 RNA を用いたエンドポイント測定により施設間の比較調査が可能であると考えられる。このため RNA を安定に保管する条件を検討した。自家調整 RNA 及び市販 RNA コントロールを RNA 保管用製品(RNAstable)を用い、安定化させる条件について一定の結果を得たが、施設内変動を減少させる条件をさらに検討する必要がある。

遺伝子検査による同定目的の定性試験には、比較的価格の安い FTA Elute カードに高力価ウイルス、高濃度 RNA を固定することで CODEHOP 法で検出可能な RNA が回収可能であり、外部精度管理調査を目的とした試料輸送に適用可能と考えられる。

### A. 研究目的

感染症発生動向調査事業における5類定点把握疾患のうち主に小児科定点で報告される手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎患者に対する病原体検査では多様な血清型のエンテロウイルスが検出されることが知られている。このうち手足口病は主にエンテロウイルス 71 (EV71)、コクサッキーウイルス A16 (CA16)、CA6 が検出され、特に EV71 感染はまれに重篤な臨床症状を引き起こす場合も知られており、近年では CA6 感染による爪甲脱落症を伴うケースも報告されている。なお一部をのぞき、エンテロウイルス感染症には有効なワクチン、抗ウイルス薬は存在しない。

感染症法上、手足口病は臨床診断による届出を基本とし、病原体検査の必要性は明示されていないものの、上記の理由で起因ウイルスの流行状況を明らかにすることは公衆衛生上意義がある。

従来エンテロウイルス検査は感受性のある培養細胞を用いたウイルス分離と型特異的な抗血清による中和試験で検査が実施されてきた。しかしウイルス分離、抗血清による同定試験は、コス

トは比較的安いものの、技術習得に時間を要し、かつ検査結果を得るのに数週間必要なことから、近年では従来法を併用しつつ、遺伝子検査による病原体検索が普及している。

遺伝子検査によるエンテロウイルスの血清型分類は主要な抗原決定部位を含む VP1 領域の塩基配列を調べ、標準株(参照株)との比較により 75% 以上一致するものを、当該血清型とすることと定義されている。

しかしエンテロウイルスの血清型は 100 種類以上が知られ、各血清型内の VP1 領域も遺伝的に多型なことから、これまで多くの種類のプライマーが提唱され、各検査室で適宜組み合わせられてきた。

USCDC の Nix らは咽頭拭い液など微量に含まれるエンテロウイルスゲノムの VP1 領域を高感度、かつ広範囲な血清型も検出できる CODEHOP (consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primer)-snpCR 法(以下 CODEHOP 法)を開発した。

日本国内の小児科定点より提出される検体は咽頭拭い液が多く、エンテロウイルスの多様な血

清型を検出する必要がある。そのため地方衛生研究所でも本法を導入している検査室は他の方法の併用を含め 38 箇所であった<sup>1)</sup>。

H28 年 4 月に施行された改正感染症法では 5 類定点把握疾患の病原体検査についても一定の信頼性を担保することが求められている。しかし検査方法は、各地方衛生研究所間で異なるため、検査の質を統一した基準で評価することは困難である。

本研究では、検査体制が異なる現状を踏まえ、エンテロウイルス検査の質の評価手法について、比較的国内外で普及している CODEHOP 法を対象とした外部精度管理調査の導入方法を検討する。

具体的には CODEHOP 法で外部精度管理調査に用いる送付試料の調製条件と評価方法、手足口病検査の信頼性の基準、について検討をしたうえで、試行的に検体送付を行い、外部精度管理調査の実施可能性、そして CODEHOP 法以外の遺伝子検査法への応用可能性について研究を行うものとする。

## B . 研究方法

### 1. ウイルス RNA

1) ウイルス: RD-A 細胞に EV71 BrCr 株を接種し CPE が +4 になった時点で回収した。凍結融解 (1 回) 後、3000rpm で遠心し、上清を回収した。1ml に分注し、-30 度保管した。巻き込み法 (細胞数は  $1.0 \times 10^{-5}/\text{ml}$ ) によるマイクロタイター法で力価を測定した。

2) RNA 抽出: 力価を測定した EV71 BrCr 株を用いて QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit にてウイルス RNA を精製した。

3) 商用 RNA: 市販の RNA コントロールの評価のために VirceII 社の EV71 BrCr 株陽性コントロール RNA を用いた。添付マニュアルに従い 19800GC/uI (50uI) を調製した。

### 2. ウイルス RNA の検出法

1) CODEHOP-snpCR: Nix 等の方法<sup>2)</sup>に基づいた。なお反応系は 1/2 容量 (25uI) とし、RNA は 2.5uI 用いている。電気泳動は 2% アガロースゲルで行い、5uI アプライし、増幅産物をバンドの濃さで +1 から +4 を目視で判定した。なお本法はウイルスゲノムの VP1 から VP3 領域の約 1000bp について逆転写反応を行い、1stPCR で約 760bp、2ndPCR で約 370bp を増幅する検出系である。

2) ウイルスゲノムコピー (以下 GC) 量の測定: ウイルス保管、回収条件を定量的に評価するために、Nijhuis らの方法を若干変更<sup>3)</sup>し、one step RT-qPCR にて 5' 非翻訳領域 155bp の増幅を行った。コントロールプラスミドには人工遺伝子合成サービスを利用した。容量は 25uI とし、RNA は

3uI 使用。反応試薬は Quantitech Multiplex RT-PCR (QIAGEN) を用いた。反応系は 2 穴ずつ用いた。

### 3. ウイルス RNA の保管条件

FTA Elute (Whatman)、RNAstable (Biomatrix) の 2 種類を用いて、異なる濃度の RNA/ウイルスを固定、そして保管温度 (室温、4 度、-30 度) を変え保管した。一定の期間の後、回収したのち、CODEHOP-snpCR で増幅の確認、そして RT-qPCR で GC 量の変動を測定した (図 1)。

#### 1) FTA Elute カードを用いたウイルス、ウイルス RNA 回収試験

FTA Elute カード (サークル径 11mm) に 40uI の希釈したウイルス、ウイルス RNA をしみこませ、3 時間風乾後、専用パウチに入れ保管した。

RNA 回収には 4mm パンチを用いて、2 枚打ち抜き、先行研究で用いた方法で RNA を回収した<sup>4)</sup>。

#### 2) RNAstable を用いたウイルス RNA 回収試験

自家調整ウイルス RNA、あるいは市販 RNA コントロール 10uI を RNAstable にアプライし、一晚キャビネット内で乾燥後、温度、濃度を変え保管した。RNA をリカバーした後 CODEHOP-snpCR で増幅の確認、RT-qPCR で GC 量を測定した。

### 4. 倫理面の配慮

個人情報 は取り扱わない。

## C . 研究結果

### 1. ウイルス力価と CODEHOP-snpCR による検出と GC 量の関係

CODEHOP 法による手足口病検査の信頼性評価を目的とした外部精度管理調査用試料は、ウイルス、ウイルス RNA、市販のウイルス RNA コントロールを用いることが想定される。病原体サーベイランスにおける検査の質管理の基準を検討するために、ウイルス感染価と CODEHOP 法による検出可能なウイルス GC 量の関係を調べた。

用いた EV71 (BrCr 株) の力価は RD-A 細胞を用いた場合、マイクロタイター法で  $10^{6.5} \text{CCID}_{50}/50\text{uI}$  であった。ウイルスから RNA を精製後、 $10^{-1}$  から  $10^{-8}$  までの 10 倍希釈列を作製し、2.5uI の RNA を用いて CODEHOP-snpCR による検出、3uI の RNA を用いて RT-qPCR による GC 量を測定した (図 1)。同様に市販の RNA ( $2.0 \times 10^4 \text{GC}/\text{uI}$ ) を希釈し CODEHOP 法で検出し、ウイルス力価と GC 量の関係を比較した。(図 2)

その結果自家調製 vRNA を  $10^{-8}$  まで希釈したとき ( $10^{-1.5} \text{CCID}_{50}/50\text{uI} = 0.03 \text{CCID}_{50}/50\text{uI}$  相当)、CODEHOP 法では検出可能であったが、RT-qPCR では RNA を  $10^{-7}$  希釈 ( $10^{-0.5} \text{CCID}_{50}/50\text{uI} = 0.3 \text{CCID}_{50}/50\text{uI}$  相当) したときでも数コピー検出できた。したがっていずれかの方法で検出すれば理論上、 $1 \text{CCID}_{50}/50\text{uI}$  以下の感染価の時でも、ウイ

ルスゲノムが検出できることになる。

他方市販 RNA コントロールは CODEHOP 法により 70 コピーまで検出可能であったが、RT-qPCR では数コピー/uI まで検出可能であった。

自家調整 RNA、市販 RNA とも、RT-qPCR では数コピーが検出可能だが、CODEHOP 法では検出可能は GC 量が異なる、つまり CODEHOP 法で増幅する領域（約 1000bp）は RT-qPCR の領域（155bp）より長い、つまり増幅可能なフラグメントの含有量は異なっていると考えられた。この現象が RNA 調製時のロット間の差と考えれば、外部精度管理調査用に用いる RNA 調製には CODEHOP 法による検出下限値と対応する GC 量を事前に測定しておく必要があると考えられる。

更に、1 CCID<sub>50</sub> 以下、つまり数～数十コピー数の GC 量は遺伝子検査において検出できても、シーケンス反応による遺伝子配列による同定には困難なことが多い。そのため、精度管理用試料調整時には、CODEHOP 法による検出限界 GC 量と感染価を把握したうえで、目的に応じ適切な量を調製する必要があると考えられる（図 2）。

## 2. FTA Elute カードを用いたウイルス、ウイルス RNA 回収試験

外部精度管理調査用試料送付に FTA Elute カードの適応可能性を検討した。FTA Elute カードにウイルスを固定すると、抽出作業なしに RNA が抽出できることを先行研究（参考文献 4）にて示している。今般精製したウイルス RNA を固定した場合についても比較検討を行った。

施設内変動を観察するため-1 と-2 に希釈したウイルス、ウイルス RNA を各々 40uI を FTA Elute カードに固定し、1 日後（4 度保管）4 名の術者で回収を行った結果を図 3 に示す。

10<sup>-1</sup> 希釈（10<sup>5.5</sup>CCID<sub>50</sub>/50uI）、10<sup>-2</sup> 希釈のウイルスは抽出後何れも比較的安定して検出でき先行研究と同様の数%の回収率であった。次にウイルス RNA の場合、10<sup>-1</sup> 希釈で 4 名とも同様の数%の回収率であったが、10<sup>-2</sup> 希釈では大きなばらつきが見られた（図 2）。

先行研究で FTA Elute カードはウイルス力価が高いときは回収率に変動が少なく、低いと大きくなる傾向を示している。このように FTA Elute カードは、回収率は約 1/100 程度であり、ウイルス力価が高い場合は比較的安定、今般検討したウイルス RNA 単独の場合でも量が多ければ比較的安定に回収可能であった。

## 3. RNastable を用いたウイルス RNA、商用 RNA コントロールの回収試験

CODEHOP 法は高感度にウイルスゲノム検出可能な方法である。本法を導入する検査室間の信頼性評価する方法のひとつは、同じ濃度の標準 RNA を配布し、各検査室でエンドポイントを測定するこ

とで検出感度の比較が考えられる。この目的には RNA を安定化する必要がある。前述の FTA Elute カードは回収率が低いため、エンドポイント測定目的の RNA 試料送付には向かない。

非感染性で、かつ GC 量が品質管理された多くの種類の商用の PCR 陽性コントロール用 RNA/DNA が入手できる。しかし市販品は高価なため、これを適宜希釈し、回収率が高い方法で保管できれば、EQA への応用は広がるものと考えられる。今般、さらに RNA を安定的に保存する製品、RNastable を用いて保管し、自家調整 RNA を用いて保存した場合を比較した。

1)市販 RNA の RNastable を用いた際の保管温度と回収率

VirceIRNA（100 倍希釈液）10uI を RNastable チューブへアプライし乾燥させた。室温、4 度、-30 度にて 5 日保管後、10uI の DW にて回収し CODEHOP 法、RT-qPCR にて検出した。その結果 CODEHOP 法では 5 日後-30 度保管のみ RNA が検出できた。なお GC 回収率は RNastable 使用前の 1/3 程度に減少していた。また室温、4 度、-30 度とも回収できた GC 量はほぼ同じであり、温度環境が CODEHOP で増幅可能な RNA の安定性に影響したと考えられた（図 4）。このため、155bp を増幅する RT-qPCR の場合は、室温保管でも問題ないと考えられたが、より長い配列を増幅する CODEHOP 用 RNA を RNastable で調製するならば、RNA を安定かつ検出可能な量に再調整して検討する必要があり、今後追試予定である。

2)RNastable で保管した市販 RNA のエンドポイント測定

VirceIRNA（10 倍希釈液：）を-30 度にて 5 日保管後回収し、希釈し CODEHOP 法にて検出したところ、CODEHOP 法で 200 倍希釈（70GC/uI 相当）まで検出可能であった。

以上により RNastable が FTA Elute カードに比べ回収率が安定であることから、高濃度、短期間、冷凍条件なら RNA を安定に保管できることを示し、CODEHOP 法の施設間の検出感度比較調査のために応用可能であることを示す。

3)施設内変動

つぎに施設内変動を調べるため VirceIRNA（10 倍希釈液）を 3 名の術者によりエンドポイントを測定したところ、1 名のみ再現可能であり、RNastable からの回収方法を改善する必要性が認められた。

4)RNastable による自家調整 RNA の保管温度と回収率

高濃度 RNA の安定性を調べるため自家調整ウイルス RNA を用いた実験を行った。ウイルス RNA 10uI を 10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup> に希釈し、室温、4 度、-30 度で保管し、TE（pH8.0）20uI で回収し CODEHOP

法、RT-qPCRにて検出した。

いずれの希釈倍率、温度環境ともウイルス RNA は安定的に検出された。このことは比較的高濃度な RNA の場合、RNAstable で安定して保管できることを示す(図5)。

#### D. 考察

ウイルスゲノムを数コピーまで検出可能な CODEHOP 法を用いた手足口病検査のための外部精度管理調査に用いる RNA の調製条件を検討した。送付用試料はウイルス、ウイルス RNA、商用 RNA コントロールを想定し、送付方法、濃度、温度環境の諸条件を検討した。CODEHOP 法は定性的にウイルスゲノムを検出する方法である。保管条件検討時に RT-qPCR により、GC 量の変化をモニターしつつ、検討を行うこととした。

最初にウイルス感染価と RNA 検出系を検討したところ、1 CCID<sub>50</sub> 以下、すなわち数コピーでも CODEHOP 法、RT-qPCR 法でも検出可能であった。

次に市販 RNA を用いた CODEHOP 法による検出下限値を調べたところ、市販品には自家調製 RNA と同等の数コピーまで検出できたが、CODEHOP 法では 100GC/uI 程度が検出下限値(感染価にして 1 CCID<sub>50</sub> 程度)であり検出範囲の乖離が見られた。これは、RNA 調製時の変動によるものと示唆される。

従って精度管理試験品の再現性、安定性、均一性を担保しておく必要性を示唆する。

他方、病原体サーベイランスでは、血清型の報告を行うにあたり、ダイレクトシーケンスによる塩基配列検索により同定を行う。この場合 CODEHOP 法で増幅したバンドが薄い場合、シーケンサ反応が失敗することが知られており、数十コピー以下の検出下限値を精度管理の対象とするのは現実的ではなく、シーケンス反応が可能な RNA 量、加えて 1CCID<sub>50</sub> 以上の感染価相当の RNA 量を設定した上で、CODEHOP 法によりウイルスゲノムを検出できるかどうか(検出感度)、適切に同定できるか(同定の正確性)、について検討すべきである。

なお塩基配列解析により同定可能な GC 量以下の場合、エンテロウイルス同定不能と報告されるが、疫学的な背景など総合的な評価によりポリオを否定することが感染症法上は重要である。

外部精度管理調査用 RNA 試料配布のため、施設内変動を把握するため FTA Elute カード、RNAstable、の 2 種類を用いて RNA の安定性につき温度、濃度など保管条件を検討した。

FTA Elute カードは先行研究で示したように、高濃度でさえ変動が見られ数%の回収率であるが、ウイルス RNA の場合も同様に数%の回収率であり高濃度なら、RNA 試料輸送用に適用可能と考

えられる。これに対し、RNAstable の回収率は 1/3 以上であることが分かり、qPCR 用の 100bp 程度の短いフラグメントならば室温でも数日安定であったが、CODEHOP 法用には-30 度保管のほうが適切と考えられた。

また RNAstable を用いた市販 RNA の保管条件について、複数の術者により回収を行い、施設内誤差を検討したが、変動が大きく見られ、これは低い濃度による不安定さが要因と考えられる。今後適切な濃度条件を再検討することとする。FTA Elute、RNAstable の操作性、回収率などは図に取りまとめた(図6)。

自家調整 RNA、市販品 RNA の保管条件について数日の輸送期間なら、少なくとも-30 度なら安定な条件が得られたが、施設内変動はさらなる検討(術者による変動と保管期間)が必要である。

CODEHOP 法以外の遺伝子解析による同定法も国内で用いられており、今後 VP1 領域による解析法、VP4 領域の解析法などについて、検出感度と、同定可能な GC 量と感染価の関係を明らかにしたい。

#### E. 結論

1. エンテロウイルス RNA 検出を目的とする外部精度管理調査用試料調製時の条件を検討した。ウイルス感染価と PCR によるウイルスゲノム検出下限値、遺伝子配列解析による同定可能なウイルスゲノム下限値を比較した上で、施設間の比較目的とする検出感度、正確性を設定し RNA 試料調製を行う必要がある。

2. エンテロウイルス検査用に用いられている CODEHOP 法は感度が高い手法であり、本法による検査の信頼性は既知の標準 RNA を用いたエンドポイント測定により施設間の比較調査は可能であると考えられた。様々な疾患の遺伝子検査に応用可能な市販の RNA コントロールを RNAstable を用いて安定化させる条件について一定の結果を得たが、施設内変動を減少させる条件をさらに検討する必要がある。

3. 高い力価のウイルス、高濃度の RNA を用いた回収試験なら、比較的価格の安い FTA Elute カードを用いた CODEHOP 法で十分検出可能であり、試料輸送に適用可能と考えられる。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載

#### G. 研究発表

1) 論文発表

1. 板持雅恵, 滝澤剛則, 伊東愛梨, 三浦美穂, 伊藤雅, 小澤広規, 北川和寛, 葛口剛, 後藤明子, 島あかり, 下野尚悦, 高橋雅輝, 筒井理華, 中田恵子, 中野守, 西澤佳奈子, 濱崎光

- 宏, 吉富秀亮, 堀田千恵美, 松岡保博, 三好龍也, 吉田弘: 平成27年度ポリオ環境水サーベイランス(感染症流行予測調査事業および調査研究)にて検出されたエンテロウイルスについて 病原体検出情報 37(10):208-209,2016.
- 2.Tao Z., Wang Z., Lin Z., Wang S., Wang H., Yoshida H., Xu A., Song Y. One-year Survey of human enteroviruses from sewage and the factors affecting virus adsorption to the suspended solids. Sci. Rep. 6, 31474,2016.
- 3.濱崎光宏, 吉田弘:エンテロウイルスのウイルス学的検査診断 小児科 57, 949-956, 2016.

## 2) 学会発表

- 1.吉田弘:環境水ウイルスサーベイランスとは。第 57 回日本臨床ウイルス学会ランチョンセミナー(2016.6.19 郡山市)
- 2.吉田弘:感染症法改正にかかわる病原体サーベイランスと信頼性確保について。平成 28 年度地域保健総合推進事業 地全協九州支部地域専門家会議(2016.10.20-21 佐賀市)

## H . 知的所有権の出願・登録状況

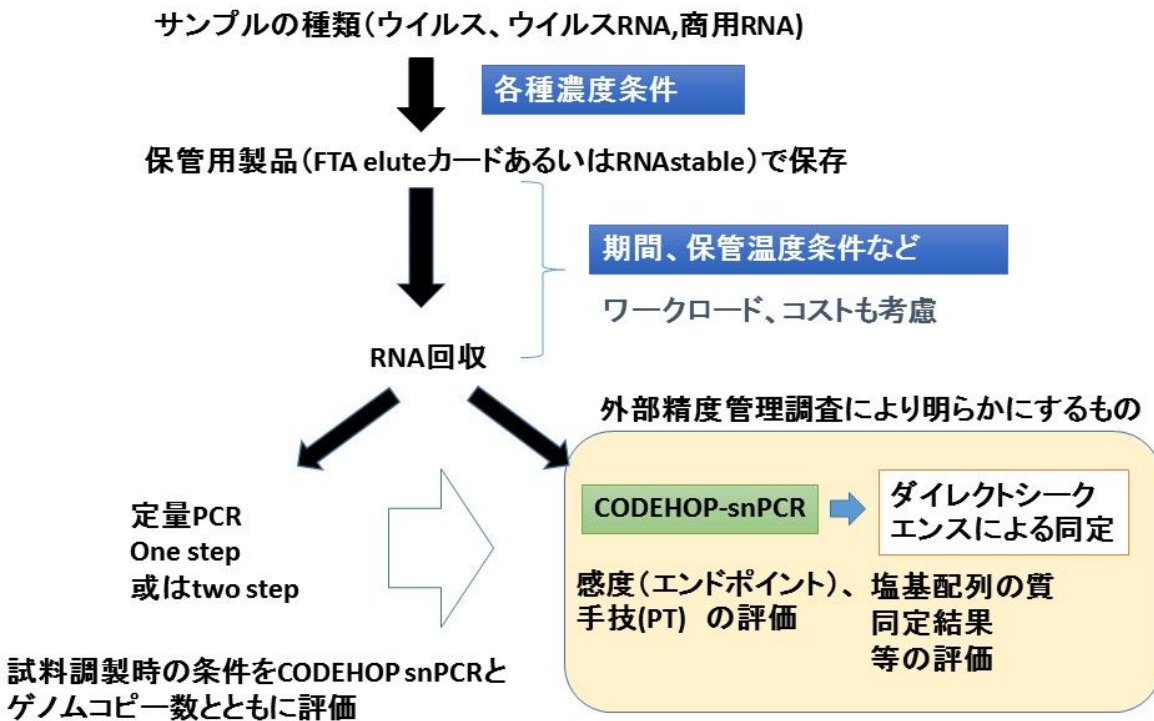
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 参考文献

1. H25年度厚生労働科学研究「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」(宮崎班)分担報告書
2. Nix.WA. et.al: J Clin Microbiol 44(8): 2698-6704 .2006.
3. Nijhuis.M. et.al: J Clin Microbiol 40: 3666-3670 .2002.
4. Li,Y., et.al.:J Virol Methods 186:62-67,2012.

図1

配布試料の調製条件



CODEHOP snPCR検出とシーケンス可能なコピー数の関係

図2

ウイルスカ価と検出系について

ウイルス希釈	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	
Virus titer (-logCCID50 /50ul)	6.5	(5.5)相当	(4.5)	(3.5)	(2.5)	(1.5)	(0.5)	(-0.5)	(-1.5)
vRNA (GC/ul)	ND	ND	6.8E+05	6.4E+04	5.6E+03	6.4E+02	6.0E+01	6.8E+00	不検出
CODEHOP-snpPCR	ND	ND	++++	++++	++++	++++	+++	++	+
Vircell RNA希釈液(理論値2.0E+04)					10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
					ND	1.4E+02 (7.0E+01)	(3.5E+01)	4.4E+00	1.5E+00
CODEHOP-snpPCR					++++	+++	+++	+/-	-

シーケンス反応の下限10<sup>2</sup>~10<sup>3</sup> GC/ul

CODEHOP-snpPCRの検出限界

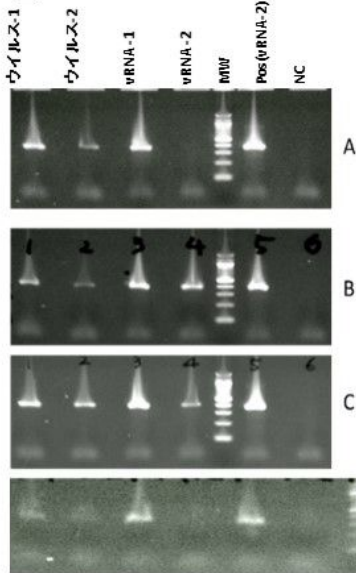
CODEHOPなら数千以上のGCが検出できることを目安としてはどうか

ウイルスゲノムは検出できてもシーケンスは不可→遺伝子による同定は不可(エンテロNTとして報告)

エンテロNTは感染価を含めポリオ否定が重要(個票を含め総合的な判断が必要)



図3



FTAelute 回収結果(4人で実施)

FTAeluteカードから回収したRNAのCODEHOP PCRの結果 (固定1日後、4度保管の条件)

	Virus (6.5CCID50)		vRNA		Pos vRNA	NC
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	
A	++++	++	++++	-	++++	-
B	++++	++	++++	++++	++++	-
C	++++	++++	++++	++	++++	-
D	++++	++	++++	-	++++	-

ウイルスの方が比較的安定。-2のvRNAを回収時、不安定

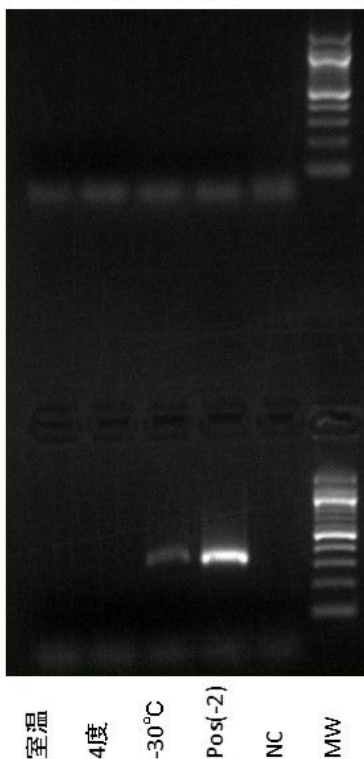
回収したウイルス、ウイルスゲノムのコピー数(GC/ul)

コントロール のGC/ul	Virus		vRNA			
			Recovery (%)		Recovery (%)	
	-1	-2	-1	-2	-2	
	1.3E+04	6.7E+02	4.0E+02	0.0	undetect	NA
	8.7E+03	7.7E+02	6.3E+04	2.7	6.3E+03	3.5
	7.0E+03	1.1E+03	4.0E+04	1.7	1.1E+03	0.6
	8.7E+03	9.3E+02	1.2E+05	5.3	undetect	NA

\*CODEHOPによる検出では強いバンド

図4

RNA stableを用いたRNA安定性の確認



Vircell RNA(10<sup>-2</sup>) 乾燥固定。CODEHOP snPCRと RT-qPCRはone step

1st	室温	4°C	-30°C	Pos(-2) 0day
GC/3ul	2.0E+2	1.9E+1	1.9E+2	6.6E+2(CT=32.2)
CODEHOP (2.5ul)	-	-	+	++++

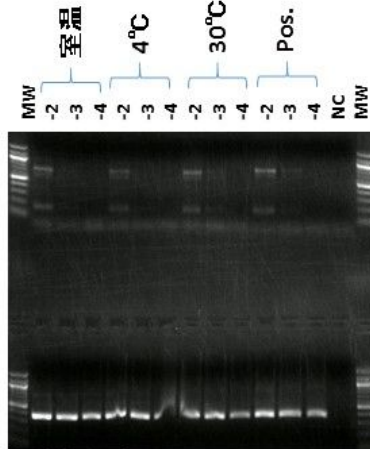
-30°CだとCODEHOPで検出可能。しかし弱い  
他方、5日後保管温度と関係なくGC量はほぼ同じ  
RNAstable使用により、GC量は約1/3に減少

FTA eluteの回収率は数%なので、RNA量を検討すれば  
PT用試料/標準品送付(濃くすれば)に凍結状態なら使  
える可能性あり

5日経過

12日後は不検出 (data not shown)

図5 RNAstable使用



RNAstableを用いたウイルスRNA回収試験

1st ウイルスRNAを-2から-4まで10倍希釈  
RNAstableに10ulアプライ  
4°C、overnightで乾燥  
翌日、室温、4°C、-30°Cにて保管  
6日後 20ul TE(8.0)にてリカバー

2nd

希釈したウイルスRNAと保管温度の関係(GC/ul)

Virus dilution(x10)	control			RNA stable (6days)		
	vRNA	Ct	1/2vRNA	RT	4°C	-30°C
-2	3.0E+05	21.0	1.5E+05	1.4E+05	1.5E+05	1.3E+05
-3	1.6E+04	25.3	0.8E+04	1.4E+04	1.5E+04	1.3E+04
-4	2.8E+03	27.7	1.4E+03	1.3E+03	1.4E+03	1.4E+03

10ulアプライし、20ulでリカバーするといずれの温度環境下でも6日後は、非常に安定していた(CODEHOPの結果、コピー数とも)

GC量が $10^3$ 以上なら安定する模様

図6

検体保管・輸送に用いる各種製品の評価のサマリー

	RNA固定	RNA回収	回収率	価格	温度安定性
FTA elute card (40ul)	容易 3hrs	容易 (数十分)	ばらつく (高濃度に すること)	450円(40ulx4サークル:1サークル)	数日なら室温OK
FTA カード (125ul)	容易 1hrs	抽出キット 要。煩雑	Not done	555円/枚(125ulx1サークル)	Not done
RNAstable (10-20ul)	容易 Over night	容易(15 分)	安定	1560円(チューブ)	vRNAで室温で1週間安定を確認。 市販RNAは追加調査をさらに実施予定