

病原体検査マニュアル 高病原性鳥インフルエンザ

（2006年6月改定）

参考資料

（国立感染症研究所作成）

- 1 病原体検査マニュアル 高病原性鳥インフルエンザ
- 2 検査材料の輸送

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	3
2 検査の進め方	5
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の採取法	7
2 ウイルス検査(分離)用検体の輸送と保存	11
3 逆転写 Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による高病原性鳥インフルエンザウイルスの同定	12
4 Real-time RT-PCR (SYBR Green I) 法による高病原性 H5 鳥インフルエンザウイルスの同定	17
5 迅速診断のためのインフルエンザウイルスの検出	20
6 培養細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離	22
7 孵化鶏卵を用いたウイルス分離と増殖	25

Part I

1 高病原性鳥インフルエンザの概要

自然界に存在する A 型インフルエンザウイルスの H1 から H16 までの HA 亜型のウイルスのほとんどは野鳥や水禽類に対して不顕性感染を起こすにすぎず、宿主が症状を示したり、ヒトに感染して健康被害に至る例のほとんどない弱毒型ウイルスである。しかし、このような弱毒型のウイルスのうち H5 および H7 亜型のウイルスが稀にニワトリを主とする家禽群に侵入し、感染と伝播を繰り返すうちに強い伝染性と高い病原性を獲得することがあり、そのような変異によって家禽に高い致死率を示すようになった強毒型ウイルスを高病原性鳥インフルエンザウイルスと呼ぶ。弱毒型 H5, H7 亜型の強毒型への変異には、インフルエンザウイルスの赤血球凝集素蛋白の蛋白分解酵素による開裂活性化部位へ塩基性アミノ酸の連続した配列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。

H5N1 高病原性鳥インフルエンザの流行は、2003 年末から日本を含む東アジア諸国の家禽および野生の水禽などで発生し、2005 年に入ってからはいこれらの地域のみならずユーラシア大陸を西に向けて拡大し、ついには中近東、アフリカ、ヨーロッパ諸国にまで到達している。2006 年現在では 48 ヶ国での流行が確認されている。一方、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスによるヒトへの感染例も徐々に増え続け、現時点で 205 例が確認され、そのうち 113 人が死亡している。感染者の殆どは病鳥との濃厚接触が原因であるが、中には家族内感染と思われるヒト-ヒト感染例も見られている。さらに、ヒト以外の哺乳動物(ネコ、トラ、フェレット)などにも高い致死率で感染することも報告されており、宿主域もこれまでの H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスより広がっていることが分かってきている。現在ヒトから分離される H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスは鳥型のレセプター (SA α 2-3Gal) を嗜好的に認識する鳥型であり、ヒトからヒトへ効率よく伝播する性質をまだ獲得していない。しかし、最近トルコでヒト型のレセプター (SA α 2-6Gal) を認識でき、同時に PB2 ポリメラーゼ蛋白にヒトインフルエンザウイルスに見られるアミノ酸 (627K) 置換を含み、鳥より低体温のヒトの呼吸器で増殖しやすい性質に変わったウイルスがヒトから分離されている。さらに、ヒトのインフルエンザウイルスと H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスとの遺伝子再集合体の出現の可能性もあることから、これら新型インフルエンザウイルスに起因したパンデミックが起こることが強く危惧されている。そのため、WHO は現在の流行状況をパンデミックアラート期フェーズ 3 (ヒトへの新しい亜型のインフルエンザ感染が確認されているが、ヒトからヒトへの感染は基本的に無い) として警戒するよう促している。このような背景から、H5N1 高病原性鳥インフルエンザは第 4 類感染症から新たに「指定感染症」として位置づけられている。

ヒトでの H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染では、潜伏期間は 2~4 日と一般の

インフルエンザより長い傾向が見られている。症状は突然の高熱（通常 $>38^{\circ}\text{C}$ ）と下気道症状を伴うインフルエンザ様疾患を初期症状として呈する。強毒型 H7 亜型ウイルスの感染とは異なり、結膜炎は殆ど見られない。また、患者の一部には感染初期に下痢、嘔吐、腹痛などが見られている。感染早期に出現する下気道症状としては、呼吸窮迫、頻呼吸などが認められ、殆どの患者は原発性ウイルス肺炎を呈していることが知られている。

高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の診断に必要な技術は、一般のインフルエンザの診断と同様、ウイルス分離や RT-PCR 法、リアルタイム RT-PCR 法などのウイルス遺伝子検出法が用いられる。高病原性鳥インフルエンザおよび新型インフルエンザの症例定義に従って要観察例については高病原性鳥インフルエンザ感染の実験室診断を実施する必要がある。高病原性鳥インフルエンザウイルス感染が確定した場合には感染症法に定められる届け出が必要である。

2 検査の進め方

高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の診断は、主にウイルス分離や RT-PCR、リアルタイム RT-PCR 法を利用したウイルス遺伝子の検出など病原体の検出・同定によって行う。現在市販されている迅速診断キットは A 型や B 型などウイルスの型しか判別できないため、別の方法によって亜型を判別する必要がある。従って、現時点ではウイルス遺伝子検出法などでウイルスの亜型を決定するのが最も迅速な実験室診断法であり、実際に多くの実験室で一般に使用されている方法である。

検査を実施する際には実験室での感染に十分に注意をする。ウイルスを増殖させずにウイルス遺伝子検出法などで実験室診断を行う場合は BSL2 実験室で実施してもよいが、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染が強く疑われる臨床材料からウイルス分離を行う際には、感染した場合のヒトに対する病原性の強さから BSL3 実験室で実施する必要がある。

血清学的にウイルスに対する抗体を検出することによっても感染を診断することは可能である。しかしながら、H5 ウイルス感染では通常実施されている HI 試験では検出感度が低いいためウイルス中和抗体を測定する必要がある。中和抗体を測定するには感染性のウイルスを取扱うため BSL3 実験室が必要であったり、ウイルスの入手などに制約がある。また、H5 ウイルス感染者の多くが早い時期に死亡しているため抗体応答の程度についても不明な点が多く診断法として確立しているとは言い難い。そのため本検査マニュアルでは血清診断については除いている。しかしながら、今後の血清診断法の確立のため感染が疑われる症例からは血清試料も採取・保存しておくことが望まれる。

Part II

ウイルス検査と同定

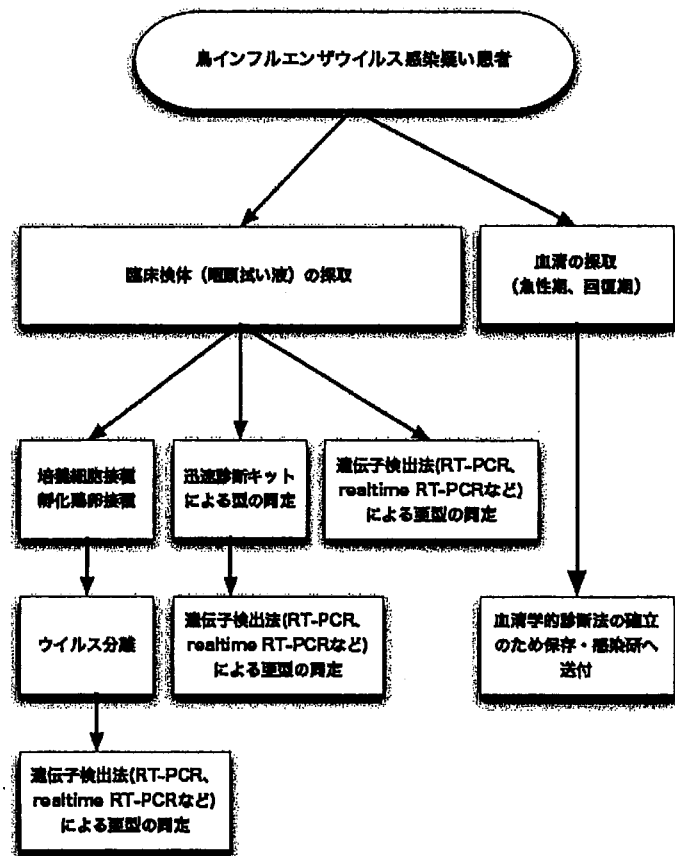


図 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の実験室診断の概要

1 インフルエンザウイルス検査のための臨床検体の採取法

病原診断の成功の鍵は、いかに上手に的確な臨床材料を得るかにかかっている。通常のヒトインフルエンザと異なり、H5N1 高病原性鳥インフルエンザの病原ウイルスを特定するための検体としては、鼻腔から採取した検体より咽頭拭い液の方が検出感度が高いことが分かっている。

1.1 咽頭ぬぐい(throat swab)液の採取

用意するものおよび手技の実際は次の通りである。

イ) 0.5% BSA 添加細胞培養培地 (MEM 培地または 199 倍地) または PBS(-)、1ml 入りの中短試

- BSA に代えてゼラチンを用いることも多い。
- ペニシリン (100-500 U/ml)、ストレプトマイシン (100-500 μg/ml)、ゲンタマイシン (50 μg/ml) およびアンフォテリシン B (250 μg/ml) を添加。
- 生理食塩水は pH が不安定となるために使用不可。

ロ) 綿棒

手で折ることが出来るので、木製が良い。

ハ) 咽頭全体をぐりぐりと綿棒の先端で擦過して、綿の部分をチューブ (中短試) の液体につけ、激しくリンスして (stir & rinse)、管壁で綿の部分をしばって、綿棒は捨てる。時に、棒を折り綿棒の先を中短試の液にさし込んだままにする場合もある。

- 綿棒の先端を一度は口蓋垂をはね上げる様にして上咽頭まで拭うのがよい (図 1.1)。
- 咽頭を擦過すると、迷走神経反射でオエツとなる。しばしば嘔吐する。幼児はいやがって口を開けなかったり、手で綿棒を払いのけたりするので、十分のどを拭うことができなくなる。したがって介助者が必要となる。また、最悪の場合、迷走神経反射でストンと心停止することもまれにあるという報告もある。
- 綿棒の持ち方を注意しないと、相手が動いたりすることで怪我をさせる場合がある。したがって図 1.2 のように、綿棒に逃げ場があるように保持しなければならない。

1.2 鼻腔洗浄液(Nasal wash)の採取

まず相手の頭部を45度ほど後方に傾ける。PBS(-)3～5ml を入れたゴム製のバルブを図 1.3 のように鼻腔にさし込み、バルブをつまみ PBS(-)を鼻腔内に注入する。直ちに手を緩め陰圧の力を利用して鼻腔内の PBS(-)をバルブの中に回収し、ウイルス分離用の検体とする。これには相手の協力とかなりの技術がいる。鼻腔内に注入した PBS(-)が戻ってこなかったり、バルブの中に注入され残った PBS(-)のためにウイルス濃度が薄まってしまう。C. B. Hall は RS ウイルスの分離には、この rubber bulb 法が一番良いとすすめているが、次の方法が best であると考えている。

1.3 鼻咽頭分泌液(Nasopharyngeal secretions:NPS)の採取

1.3.1 陰圧吸引法

途中にトラップ容器のついたビニールチューブを鼻腔最奥部にまで挿入し、陰圧で NPS を採取する。鼻咽頭(上咽頭)には耳管も開口しており、なおかつ乳児や低年齢幼児では NPS が潤沢である。通常のインフルエンザウイルスやRSウイルス分離の経験では、咽頭拭い液よりもウイルス量が豊富であるせいか、成功率が高い。

1.3.2 拭い液法

咽頭拭い液採取用の堅い綿棒ではなく、細いフレキシブルな綿棒を用いて図 1.3 のように鼻腔口から耳孔を結ぶ平面を想定し、鼻腔の最下縁に添って挿入する。コトと行き止まりになる最奥部に数秒おいて綿棒を引き抜く。咽頭拭いと異なり、グリグリと擦過するのは控える。綿棒の保持の仕方は先に説明した通りである。

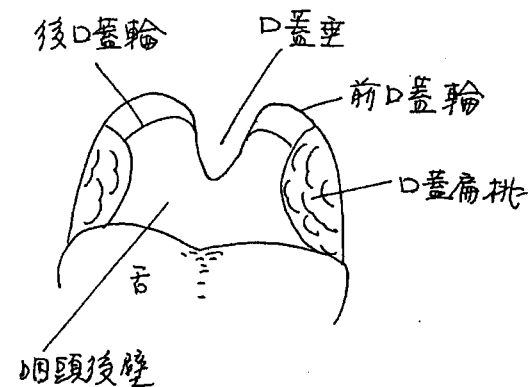


図 1.1 咽頭の説明

1.4 うがい液の採取

できるだけ少量(5～10ml)の PBS(-)でうがい液を採取する。ショックを避けるために PBS(-)には抗生物質は添加しない。

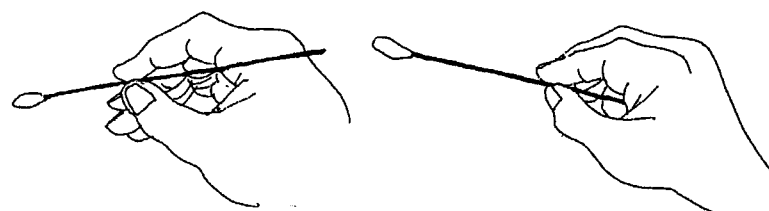


図 1.2 綿棒の正しい持ち方

よくない持ち方

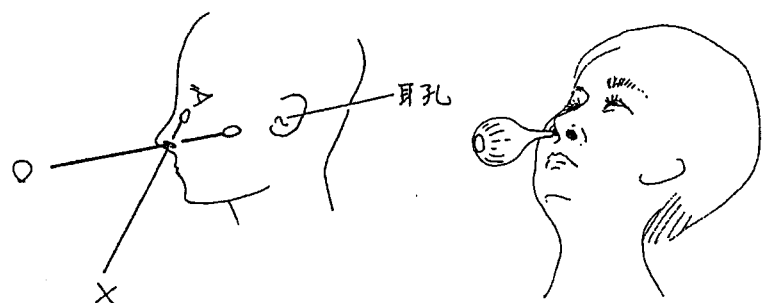


図 1.3 鼻咽頭拭い液採取法

鼻腔洗浄液採取法

2 ウイルス検査(分離)用検体の輸送と保存

検査用検体を採取したら氷中または4℃に保管し、できるだけ速やかにウイルス分離を試みる。ウイルス分離を行なうまでの日数が5日～1週間程度であれば、4℃の状態を維持し、輸送も冷蔵状態で行う。しかし、それ以上の日数を要する場合は、検体を-70℃以下に保存し、輸送も凍結状態で行う。

(注意)ウイルス検査(分離)用検体は可能な限り凍結融解をさける。この操作を繰り返し行くと、ウイルスの感染性が低下して、ウイルス分離が困難になる。

3 Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法による高病原性鳥インフルエンザウイルスの同定

Polymerase Chain Reaction (PCR) 法は、今日では欠くことのできない分子生物学的手法の一つであり、短時間に高い検出感度が得られるために、種々のウイルス遺伝子の検出にも利用されている。しかしながら、その検出感度の高さから、実験室内コンタミネーションの可能性を常に考慮しなければならない。

インフルエンザウイルス遺伝子は一本鎖の 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 で合成する必要がある。この章では、ウイルスからの RNA 抽出方法ならびにウイルスの HA 遺伝子および A 型 M 遺伝子に特異的なプライマーを用いた RT-PCR による鳥インフルエンザウイルスの同定方法を述べる。

3.1 器具および試薬

微量遠心チューブ用遠心器、マイクロピペット (2、20、200、1000 μ l)、RNase-free 滅菌蒸留水、100%エタノール、滅菌微量遠心チューブ (0.2、1.5ml)、サーマルサイクラー、プライマー、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN Cat#51104)、RNase Inhibitor (Applied Biosystems Cat# N808-0119)、QIAGEN One-Step RT-PCR kit (QIAGENCat#210210)。

3.2 臨床検体またはウイルス分離株からの RNA の抽出

(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のこと)

1. 140 μ l の検体またはウイルス液を Buffer AVL 560 μ l と混合し室温で 10 分間インキュベートする。

※ 臨床材料から RNA 抽出を行う場合は BSL2 実験室で実施してもよいが、ウイルス液や高病原性鳥インフルエンザウイルス感染が強く疑われる臨床材料から RNA 抽出を行う際には、BSL3 実験室で実施することが望ましい。Buffer AVL によりウイルスは不活化されるので 2 以降の作業は BSL2 実験室で行ってもよい。

↓

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 スピンドアウンカラムに注入し、キャップを閉めて 6000 \times g (8000rpm) で 1 分間遠心する。カラムを新しいチューブに移し、ろ液の入ったチューブは捨てる。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 6000 \times g (8000rpm) で 1 分間遠心する。カラムを新しいチューブに移し、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 (20000 \times g、14000rpm) で 3 分間遠心する。必要に応じてオプションの遠心作業を行う。

↓

6. 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、6000 \times g (8000rpm) で 1 分間遠心する。

抽出したウイルス RNA は速やかに RT-PCR に使用することが望ましい。保存する場合には -80°C または -20°C に保存し、凍結融解の繰り返しは避ける。

3.3 One-Step RT-PCR

鳥インフルエンザウイルス HA 遺伝子および A 型インフルエンザウイルス M 遺伝子の検出

3.3.1 プライマーについて

H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝子検出検査は One Step RT-PCR により、H5-HA および A 型特異的 M 遺伝子の検出を行う。

(A 型同定用)

Type A/M 遺伝子検出用プライマー

Type A/M264R2 5'-ACAAAGCGTCTACGCTGCAG

Type A/M30F 5'-TTCTAACCGAGGTCGAAACG

PCR 産物の長さ: 234bp

(H5 亜型同定用)

H5/248-270F 5'-GTGACGAATTCATCAATGTRCCG

H5/671-647R 5'-CTCTGGTTTAGTGTGATGTYCCAA

PCR 産物の長さ: 424bp

H7 亜型鳥インフルエンザウイルス HA 遺伝子の検出の場合

(H7 亜型同定用) (文献1)

(+)5'-GGGATACAAAATGAAYACTC-3'

(-)5'-CCATABARYYTRGTCTGYTC-3'

PCR産物の長さ：634 bp

3.3.2 One Step RT-PCR 反応

One Step RT-PCR反応は、QIAGEN社のQIAGEN® OneStep RT-PCR kitに添付されているマニュアルを参照している。

キットに含まれる試薬及び各プライマー対を以下のように混合し反応する。

試薬	容量
RNase-free 滅菌蒸留水	9.5µl
5 x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5µl
dNTP 混合液 (containing 10mM of each dNTP)	1µl
sense (+)primer (10µM)	1.5µl
antisense (-) primer (10µM)	1.5µl
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix (5 U/µl)	1µl
RNase Inhibitor (Applied Biosystems 社) (20 U/µl)	0.5µl
RNA 抽出液	5µl
Total	25.0µl/test

<反応条件>

50°C	30min.	
↓		
95°C	15min.	
↓		
94°C	30sec.	} x40 cycles
50°C	30sec.	
72°C	40sec.*	
↓		
72°C	10min.	
4°C	∞	

*) H7 亜型用プライマーを使用の際は、反応時間を 45 sec に設定。

3.3.3 アガロースゲル電気泳動

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(100 bp DNA ladder, Promega 社 Cat#2101)、エチジウムブロマイド、1xTAE 電気泳動バッファー(50X TAE ニッポンジーン社 Cat#313-90035)を希釈して使用、6X Gel loading dye(Promega 社 Cat#G1881)。

3.4 H1 または H3 ウイルス HA 遺伝子を検出しなければならない場合の参考

3.4.1 プライマーについて

H1 HA 遺伝子検出用プライマー

H1HA1-BEGIN 5'-AGCAAAAAGCAGGGGAAAATAA

H1R10 5'-GCTATTTCTGGGGTGAATCT

PCR産物の長さ：729bp

H3 HA 遺伝子検出用プライマー

H3HA1-BEGIN 5'-AGCAAAAAGCAGGGGATAATTC

H3HA1-END 5'-TGCCTGAAACCGTACCAACC

PCR産物の長さ：1143bp

3.4.2 One Step RT-PCR 反応

One Step RT-PCR反応は、QIAGEN社のQIAGEN® OneStep RT-PCR kitに添付されているマニュアルを参照している。

キットに含まれる試薬及び各プライマー対を以下のように混合し反応する。

試薬	容量
RNase-free 滅菌蒸留水	9.5µl
5 x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5µl
dNTP 混合液 (containing 10mM of each dNTP)	1µl
sense (+)primer (10µM)	1.5µl
antisense (-) primer (10µM)	1.5µl
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix (5 U/µl)	1µl
RNase Inhibitor (Applied Biosystems 社)(20 U/µl)	0.5µl

RNA 抽出液	5μl
Total	25.0μl/test
<反応条件>	
50°C 30min.	
↓	
95°C 15min.	
↓	
94°C 30sec.	} x40 cycles
※50°C 30sec.	
72°C 80sec.	
↓	
72°C 10min.	
4°C ∞	

※H3 HA プライマー対を使用の際は反応温度を 56°C に設定する

参考文献

(1) Lee, M.S., Chang, P.C., Shien, J.H., Cheng, M.C., Shieh, H.K.: Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. Journal of Virological Methods 97 (2001) 13-22.

4 Real-time RT-PCR (SYBR Green I) 法による高病原性 H5 鳥インフルエンザウイルスの同定

One-Step RT-PCR 法と同じプライマーを使用して、SYBR Green I を用いた Real-time RT-PCR 法により、高病原性 H5 鳥インフルエンザウイルスの同定を行う事もできる。RT-PCR 反応を 1 本の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が可能となる。また、反応チューブを開けないことからポスト PCR 後の実験室内コンタミネーションの可能性も低くなる。

機材および試薬

微量遠心チューブ用遠心機、マイクロピペット (2、20、200、1000 μl)、RNase-free 滅菌蒸留水、リアルタイム PCR 反応チューブ、プライマー、リアルタイム PCR 装置、QuantiTect® SYBR®Green RT-PCR Kit (QIAGEN Cat#204243)

4.1 Real-time RT-PCR (SYBR Green I) 反応

Real-time RT-PCR (SYBR Green I) 反応は、QuantiTect® SYBR®Green RT-PCR Kit に添付されているマニュアルを参照している。

キットに含まれている試薬及び各プライマー対を以下のように混合し反応する。プライマー配列は One-Step RT-PCR 法で示した配列と同じである。

Type A M 遺伝子検出用プライマー :

Type A/M264R2 5' -ACAAAGCGTCTACGCTGCAG
 Type A/M30F 5' -TTCTAACCGAGGTCGAAACG
 PCR 産物の長さ : 234bp

H5 HA 遺伝子検出用プライマー :

H5/248-270F 5' -GTGACGAATTCATCAATGTRCCG
 H5/671-647R 5' -CTCTGGTTTAGTGTGATGTYCCAA
 PCR 産物の長さ : 424bp

試薬	容量	最終濃度
2x QuantiTect SYBR Green		
RT-PCR Master Mix	10 μl	1x

Foward プライマー (10 μM)	1.2 μl	0.6 μM
Reverse プライマー (10 μM)	1.2 μl	0.6 μM
QuantiTect RT Mix	0.2 μl	
RNase free Water	2.4 μl	
RNA template	5 μl	
Total 容量	20 μl	

2種類のリアルタイムPCR装置を用いた反応条件を以下に示す。プライマーダイマーによるノイズを軽減するため、4ステップサイクリング法 (75°C) でデータ収集を行う。なお、他のリアルタイムPCR装置を使用する場合は、条件の最適化を行い、各施設で十分に感度等の検討を行った上で使用する。

(Roche社LightCyclerを使用する場合)

温度上昇率		
50° C	20° C/s	20min.
↓		
95° C	20° C/s	15min.
↓		
94° C	20° C/s	15sec.
50° C	20° C/s	30sec.
72° C	2° C/s	30sec.
75° C	20° C/s	5sec.
↓		
65° C → 90° C Melting curve 融解曲線解析		
95° C	20° C/s	0sec.
65° C	20° C/s	10sec.
90° C	0.2° C/s	2sec. Acquistition Mode : STEP
↓		
40° C	20° C/s	30sec. Cooling

(BioRad社 Chromo-4を使用する場合)

50° C	30min.
↓	
95° C	15min.

↓		
94° C	30sec.	} x40 cycles
50° C	30sec.	
72° C	30sec.	
75° C	15sec.	
↓		
65° C → 90° C (0.2° C) 2sec. hold 融解曲線解析		

融解曲線解析を行うと Type A M遺伝子は 81-83° C、H5 HA 遺伝子は 78-81° C に T_m 値のピークが存在し、プライマーダイマーではそれぞれ、75° C、73.5° C 近辺に T_m 値のピークが存在する事が多い。融解曲線解析は必ず行い、明確に判定できない場合は、電気泳動によるバンドサイズの確認を行う。

5 迅速診断のためのインフルエンザウイルスの検出

現在わが国で市販されている迅速診断のためのインフルエンザウイルス抗原検出用キットの一覧を示す。これらのキットはおもにウイルス核蛋白(NP)を酵素抗体法で検出することによってウイルスの検出を行っている。多くのキットはウイルスの型別しか判定できないので、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の診断には、他の方法でウイルスの亜型を同定する必要がある。これらのキットは臨床現場での迅速診断を主な目的としているが、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染が強く疑われる場合には、診断方法としての有用性は高くはないことから状況によって患者の治療、隔離などを実施するうえで補助的な診断方法として位置づけられる。検出感度については各キットによって異なるがウイルス分離や RT-PCR 法などに比較するとかなり低いことを念頭において診断する必要がある。また、臨床検体からウイルスが検出される期間が限定されていることや、検体採取の手技により検出感度も左右されることから、これらのキットによる陰性結果は検体からウイルスが検出できなかったに過ぎず、感染を否定するものではないことに注意する必要がある。また、非特異反応による偽陽性の結果についても留意する必要がある。

その他、いくつかのキットが市販される予定である。使用方法については、各キットに添付されている使用説明書に従って行う。

製品名	原理	検出対象	所要時間	検体	製造・販売
キャピリア FluA+B	イムノクロマト	A型・B型 (鑑別可)	15分	鼻腔吸引液 鼻腔拭い液 咽頭拭い液	タウンズ (日本ベクトン・ディッキンソン)
ラピッドビューインフルエンザ A/B	イムノクロマト	A型・B型	10分	鼻腔洗浄液 鼻腔拭い液	カイデル (住友製薬)
クイック S-インフル A・B「生研」	フロースルー式免疫測定法	A型・B型 (鑑別可)	15分	鼻腔吸引液 鼻腔拭い液 咽頭拭い液	デンカ生研
ディレクティジェン FluA+B	EIA	A型・B型 (鑑別可)	15分	鼻腔洗浄液 鼻腔吸引液 鼻腔拭い液 咽頭拭い液	BD Biosciences (日本ベクトン・ディッキンソン)
エスプライン インフルエンザ A&B	EIA+イムノクロマト	A型・B型 (鑑別可)	15分	鼻腔吸引液 鼻腔拭い液 咽頭拭い液	富士レビオ
ポクテム インフルエンザ A/B	イムノクロマト法	A型・B型 (鑑別可)	20分	鼻腔吸引液 鼻腔拭い液 咽頭拭い液	シスメックス (三共)
ラピッドテスト Flu II	イムノクロマト法	A型・B型 (鑑別可)	5~15分	鼻腔吸引液 鼻腔拭い液	第一化学薬品

*) 製品に関する最新の情報は、各メーカーの HP を参照ください。

6 培養細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離

培養細胞によるインフルエンザウイルスの分離培養には、当初サル腎細胞やヒト胎児細胞などが用いられていたが、最近は分離率が高いこと、また容易に入手できるという手軽さとコストの面からもほとんど MDCK 細胞が用いられている。

6.1 細胞培養器具および試薬

MDCK細胞の単層培養(組織培養用 75 cm² プラスチックフラスコ)

組織培養用 プラスチックフラスコ(75 cm²、25 cm²)

MEM 培地 (GIBCO BRL Cat. #11095-080)

ウシ胎仔血清 (FCS)

ペニシリン/ストレプトマイシン (GIBCO BRL Cat. #15140-122)

0.05%トリプシン/0.53 mM EDTA (GIBCO BRL Cat.#25300-054)

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-))

6.2 試薬の調整

増殖用培地

試薬	最終濃度	使用量
MEM	-	500 ml
FCS	10%	50 ml
ペニシリン/ストレプトマイシン	100 単位/ml ペニシリン 100 μg/ml ストレプトマイシン	5 ml

6.3 培養細胞継代法

- ① 単層を形成した細胞の培地を吸引する。
- ② PBS (-)を器壁に沿って静かに加え、細胞表面を洗浄する。この操作をもう一度繰り返す。
- ③ トリプシン/EDTA 溶液 5 ml を加え、室温に放置する。顕微鏡下で観察して一部の細胞が円形化したら、トリプシン/EDTA 溶液の大部分を吸引し、37℃に保温*する。
- ④ 顕微鏡下で細胞が剥がれているのを確認した後、増殖用培地 10 ml を加えピペッティングして細胞を分散させる。
- ⑤ 細胞分散液 2 ml(おおよそ 1×10⁶ 細胞数/mlに相当)を、増殖用培地 10 mlを加えた新しい 75 cm² プラスチックフラスコに植え継ぎ、37℃で培養する。3-4日で単層の細胞シート

を形成する。25 cm² プラスチックフラスコの場合は、この細胞分散液 1 mlを、増殖用培地 5 ml を加えた新しいフラスコに植え継ぎ培養する。2-3日で単層の細胞シートを形成する。

*細胞によっては数分後にはもうほとんど円形化しているような場合もあるので、処理時間に注意する。また、15 分近く経過してもほとんどの細胞の形態に変化のない場合には、新しいトリプシン/EDTA 溶液を加えて細胞を洗い、再び 37℃に保温する。

6.4 インフルエンザウイルスの分離

6.4.1 器具および試薬

MDCK細胞の単層培養(組織培養用 25 cm²プラスチックフラスコ*)

MEM アール液体培地 (10×) (SIGMA Cat.#M0275)

重炭酸ナトリウム溶液、7.5% (w/v) (GIBCO BRL Cat. #25080-094)

ペニシリン/ストレプトマイシン (GIBCO BRL Cat.#15140-122)

ファンギゾン (GIBCO BRL Cat. #15290-018)

ウシ血清アルブミンフラクション V 溶液 (35%) (BSA, SIGMA Cat.#A8918)

L-グルタミン-20 mM (×100)、液体 (GIBCO BRL Cat. #25030-081)

MEM ビタミン溶液(×100)、液体 (GIBCO BRL Cat. #11120-052)

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-))

アセチルトリプシン (SIGMA Cat. #T6763)

6.4.2 試薬の調整

分離用培地*

試薬	最終濃度	使用量
MEM	-	50 ml
重炭酸ナトリウム溶液	-	14 ml
ペニシリン/ストレプトマイシン	100 単位/ml ペニシリン 100 μg/ml ストレプトマイシン	5 ml
ファンギゾン	0.5 μg/ml	1 ml
BSA	0.4%	5.7 ml
ビタミン溶液	-	15 ml
L-グルタミン	-	5 ml
脱イオン蒸留水	-	404 ml

*)別法として Opti-MEM I (GIBCO Cat#31985-070)の使用も有用である。

6.5 ウイルス分離方法

- ① 単層を形成した細胞の培地を吸引する。
- ② PBS (-)を器壁に沿って静かに加え、細胞表面を洗浄する。この操作を もう一度繰り返す。
- ③ 分離用培地で洗浄し、接種材料 0.2 mlを接種し、細胞全体に広げる。25 cm²フラスコでは接種材料は多量でもよい。
- ④ 10 分おきに容器をゆすって、ウイルスを吸着させる。ウイルスの吸着は 34℃のインキュベーター内で行う。
- ⑤ 30-45 分後**、トリプシン(1-10 μg/ml)***を含む分離用培地 5 mlを加え、34℃で培養する。
- ⑥ 細胞変性効果(CPE)の出現を毎日顕微鏡下で観察する。
- ⑦ CPE が出現したところで培地を採取する。6 日目あるいは 7 日目になったら、CPE 出現の有無にかかわらず培地を採取する。

**材料はウイルス吸着後取り除いた方がよい。

***トリプシン濃度は細胞やトリプシンのロットによって異なるので、予め試験を行い細胞が 1 週間程度維持できる最大量を用いる。

6.6 判定方法

通常は HA 活性の測定にて行う事が多い(HA 価の測定は、インフルエンザ診断マニュアルを参照)。HA 活性の検索でウイルス分離が特定できない場合には、盲継代をして 1 週間観察し CPE や HA 活性がない場合は陰性とする。継代の際は moi を考慮すること。HA 活性のある物は、PCR 法にて亜型同定を行う。

6.7 保存方法

ウイルス液は 3,000 rpm、10 分遠心し、細胞の破片を除いた後分注し-70℃以下に保存する。

7 孵化鶏卵を用いたウイルス分離と増殖

高病原性鳥インフルエンザウイルスを、卵で分離する為の至適接種部位は、尿膜腔である。

尿膜腔内接種法にて咽頭拭い液等の接種材料より、高病原性鳥インフルエンザウイルスの分離を行う。

卵令：10-11 日卵を用いる。

7.1 検卵

- 1) 暗室等にて孵化鶏卵に強い光源を当て、光源の反対側より孵化鶏卵の内部を観察する。發育状態を確かめ、胎児側の気室と卵殻膜との境目のなるべく血管の少ない部分に印(ライン)を付ける(図 7.1)。

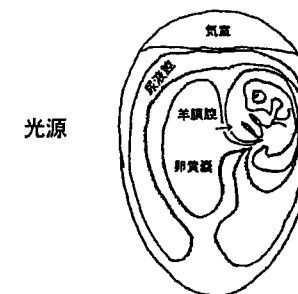


図 7.1 検卵

- 2) 検卵した卵を卵台に気室を上にして垂直に立てる。

7.2 検体接種

- 1) 検卵が済んだ孵化鶏卵を、卵台に気室を上になる様に垂直に立て、卵殻上部気室部の印(ライン)を中心に70%アルコールにて消毒する。
- 2) 印(ライン)より5mm程上部に、千枚通し等にて径1mm弱の小穴を開ける。
- 3) 接種材料を注射器に吸い入れ、数個に接種する(図 7.2)。
- 4) 接種量は0.1ml、接種後小穴を木工ボンド等にて塞ぐ。

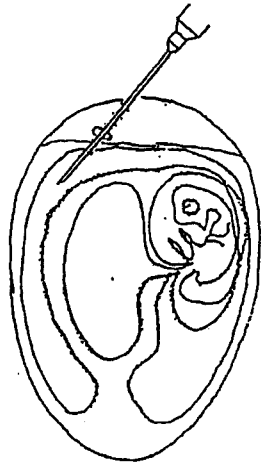


図 7.2 尿膜腔内接種法

7.6 保存方法

数本に分注し、 -70°C 以下に保存する。

7.3 培養

気室を上にした状態で静置し、加湿して 34°C にて培養する。

(接種24時間位で検卵し、死亡している場合は採液の為に一夜 4°C に静置する)

7.4 尿液採液

- 1) 一夜 4°C に静置した培養卵の卵殻上部気室部を中心に、70%アルコールにて噴霧消毒後、鉗等にて気室部の卵殻を大きく取り除く。
- 2) 血管、卵嚢を傷つけない様に注意しながら、太めの注射針を付けた注射器にて尿液を採液する。

7.5 判定

通常はHA活性の測定にて行う事が多い(HA価の測定は、インフルエンザ診断マニュアルを参照)。HA活性が陰性の場合、さらに採液した尿液を接種材料とし、通常1回は盲継代接種を繰り返す。HA活性のある物は、PCR法にて亜型同定を行う。

連絡先

国立感染症研究所ウイルス第3部
第1室（インフルエンザウイルス室）
〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1
TEL 042-561-0771(内)709
FAX 042-561-0812

検査材料の輸送

- I 輸送等に当たっての留意点
- 検査材料を国立感染症研究所に輸送するに当たっては、必ず事前に国立感染症研究所情報センターに問い合わせ、ID 番号を受ける。その後ウイルス 3 部第 1 室に連絡し、到着日、輸送手段などについて、確認する。

- II 感染性材料の持参輸送に用いる容器
- 基本型三重包装容器を用いる。容器は次の三層からなるものを用いる。

- 1 一次容器
- 感染性材料を入れてラベルを貼った防水性、密封性の主容器である。この容器は破損に備えて、液体全部を吸収するのに十分な量の吸収材によって包まれる。
- 2 二次容器
- 一次容器を収納して保護するための二番目の容器で、丈夫で防水性、密封性があるものとする。この中には包んだ一次容器を複数入れてもよい。複数の一次容器の間に入れる緩衝材として、さらに十分な量の吸収材を使わなければならない。
- 3 外側容器（三次容器）
- 輸送中に物理的な損傷や水などの外部影響から二次容器とその中身を守るためのものであり、外側容器（三次容器）の中に二次容器を収める。

検体データ様式、書面、その他検体を識別又は説明するための情報、及び送り主と受取人を特定する情報を二次容器の外側に貼りつけるものとする。

(図 1) 感染性材料の輸送法（持参の場合）

(図 2) (参考) WHO, Laboratory Biosafety Manual 2nd edition に示されている、郵送のための包装法。

- III 感染性材料の持参輸送に用いる容器の表示（ラベル）

- 1 一次容器
- (1) あらかじめ、症例を報告し、与えられた患者 ID を元に、以下の手順で検体 ID をラベルする。症例 ID は、都道府県番号＋患者イニシャル＋感染研にて受付順のシリアルナンバー（001 より始まる）＋診断カテゴリ（S：Suspected；P：Probable；D：Discarded とし、これはカテゴリが変わった場合には、SP（S から P）、SD（S から D）のように連続して付記する）とし、検体 ID は、症例 ID に引き続く、_（アンダーバー）＋検体種別（UR 上気道；LR 下気道；B 血液；U 尿；F 便；T：組織）＋検体採取日時（患者から採取した日付で、例えば 4 月 4 日午後 3 時 5 分であれば、0304041505 とする）＋（同時に数検体とった場合には順に 1、2 と括弧内に入れる）ものとする。CPE 陽性培養上清の場合には、検体種別の前に Y を入れる。

- 2 二次容器（図 3）
- 受取人の名称、住所、電話番号、Fax 番号
 - 送り主の名称、住所、電話番号、Fax 番号
 - 包装物の数、内容品の詳細、重量等

- 2 外側容器（三次容器）（図 4）
- 国際感染性物質ラベル（バイオハザードマーク）
 - 国立感染症研究所連絡先

検体材料の輸送

図1 感染性材料の輸送法（持参の場合）
感染性材料は三層に包装する。

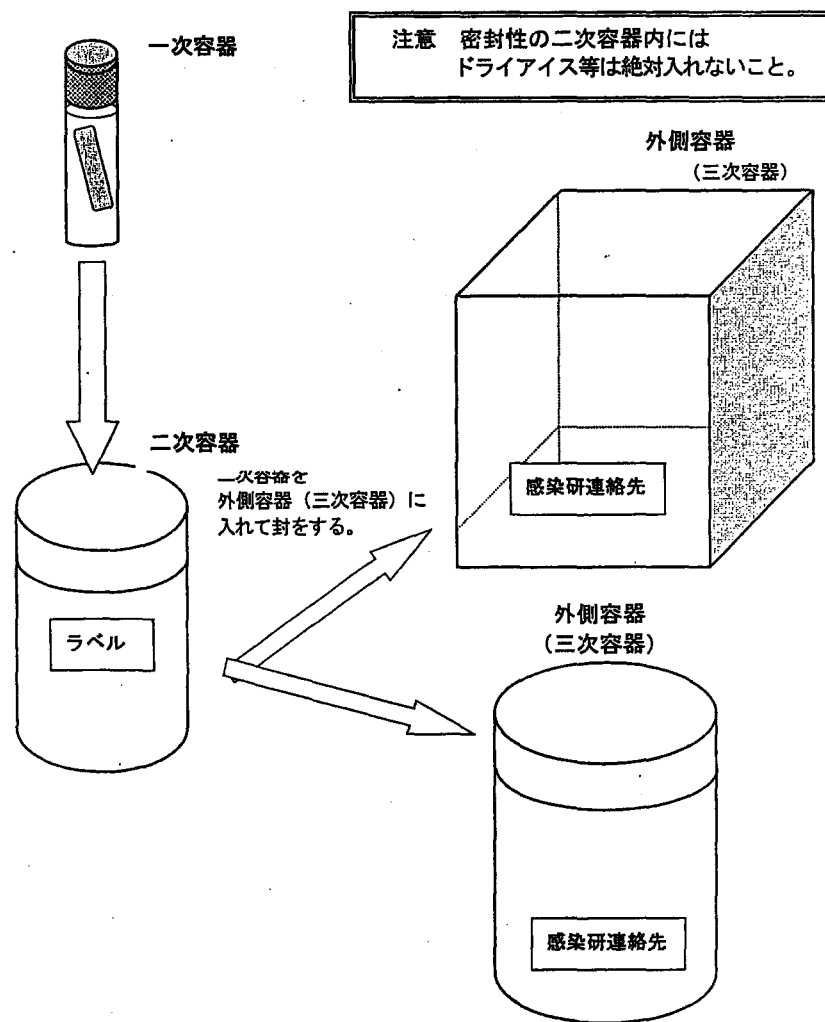


図2 （参考）WHO, Laboratory Biosafety Manual 2nd edition に示されている、郵送の
ための包装法

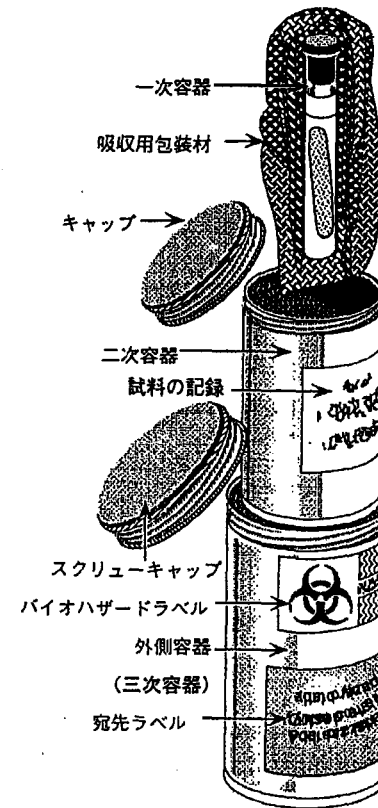


図3 二次容器の例

二次容器には次の表示を行う。

- (1) 受取人の名称、住所、電話番号、Fax 番号
- (2) 送り主の名称、住所、電話番号、Fax 番号
- (3) 包装物の数、内容品の詳細、重量等

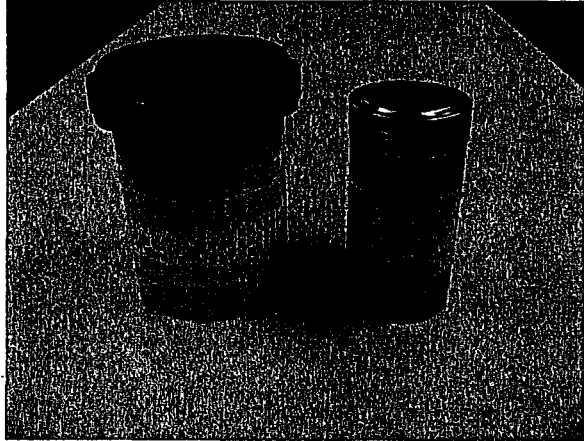


図4 外側容器（三次容器）の例

外側容器（三次容器）には次の表示を行う。

- (1) 国際感染性物質ラベル（バイオハザードマーク）
- (2) 国立感染症研究所連絡先

