

リッサウイルス感染症

— 目次 —

- I. リッサウイルス感染症の概説
- II. リッサウイルス検査に関する一般的な注意事項
- III. 検査材料の採取・輸送
- IV. リッサウイルスの検査方法
 - 1. 直接蛍光抗体法
 - 2. RT-PCR 法
 - 3. ウイルス分離法
 - a) マウス脳内接種法
 - b) 培養細胞を利用したウイルス分離法
- V. 引用文献
- VI. 連絡先

I. リッサウイルス感染症の概説

リッサウイルス感染症はラブドウイルス科リッサウイルス属のウイルスにより引き起こされる感染症である。リッサウイルスに属するウイルスとして狂犬病ウイルスが広く知られているが、ここでは狂犬病以外のリッサウイルスによる感染症と定義する。しかしながら、狂犬病とリッサウイルス感染症を区別せず、狂犬病(rabies)と総称する場合もあるほどで、臨床症状からは狂犬病と区別することは不可能であり、狂犬病検査過程における遺伝子解析により、はじめてリッサウイルス感染症と鑑別される。まずは狂犬病の検査診断に従って作業を進めることとなる。(狂犬病の項を参照)

リッサウイルスは、現在のところその遺伝子解析の結果から、それらの塩基配列の相同性に応じて、7種類の遺伝子型(genotype)に分類されている(図1)。狂犬病ウイルス(Rabies virus)を遺伝子型1型、ラゴスコウモリウイルス(Lagos bat virus)を2型、モコラウイルス(Mokola virus)を3型、ドゥベンヘイジウイルス(Duvenhage virus)を4型、ヨーロッパコウモリリッサウイルス1と2(European bat lyssavirus 1 & 2; EBL1とEBL2)を5型と6型、オーストラリアコウモリリッサウイルス(Australian bat lyssavirus; ABL)を7型としている。これらウイルス間のアミノ酸配列の相同性は78%から93%である。

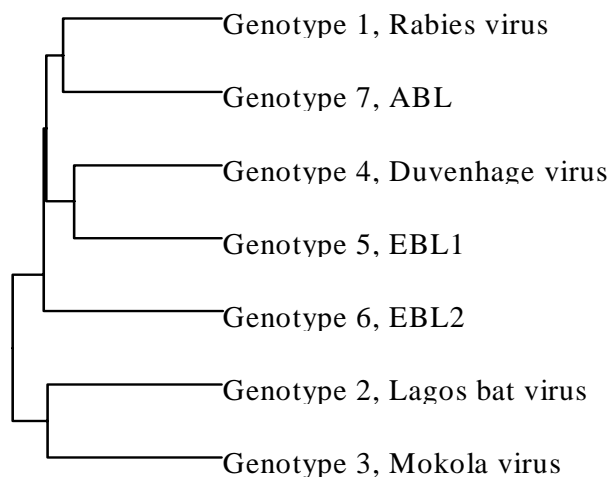


図1. リッサウイルスの遺伝子系統図

狂犬病ウイルス以外のリッサウイルスの自然界における宿主と分布については不明な点が多い。主にヨーロッパ、オーストラリア、アフリカに分布しており、アメリカ大陸での報告例はない。これまでに報告されている事例から、多くはコウモリが自然宿主と考えられており、家畜動物での感染例が多い。ヒト

での感染は10例に満たない。現在のところ、わが国においてはリッサウイルス感染症の発生はみられていないが、近年、英国、オーストラリアにおいてコウモリからの感染発症例が3例報告されている。

臨床症状からリッサウイルス感染症と古典的な狂犬病を鑑別することは不可能である。潜伏期間は狂犬病ウイルスに準じた期間と考えられる。20日～90日が基本的な潜伏期間であるが、咬傷部位や数によって潜伏期間も異なってくる。この期間内はウイルスを検出することは困難である。臨床症状としては、頭痛、発熱、倦怠感、創傷部位の知覚過敏や疼痛の初期症状から始まり、興奮性の亢進、恐水症状、精神攪乱などの中樞神経症状を引き起こす。通常、発症後1～2週間で死亡する。(狂犬病の項を参照)

自然宿主がコウモリと考えられていることから、鑑別診断にはコウモリとの接触の有無が重要な手がかりとなる。コウモリによる咬傷は非常に小さいため噛まれたとの自覚なく発症する例が多く、十分な注意が必要である。今まで報告されている限りでは、北米のコウモリは遺伝子型1型の狂犬病ウイルス、ヨーロッパおよびオーストラリアのコウモリは狂犬病ウイルス以外のリッサウイルスを保有している。日本国内のコウモリにおけるリッサウイルスの保有は不明である。

II. リッサウイルス検査に関する一般的な注意事項

リッサウイルスを保有する野生のコウモリとの接触が最もありうる感染経路であることから、コウモリとの接触の有無が重要な手がかりとなる。しかしながら、臨床症状からリッサウイルス感染症と古典的な狂犬病を鑑別することは不可能であり、現実的には狂犬病としての検査診断の過程で、遺伝子解析—RT-PCR法により得られたcDNAの塩基配列を解読すること—により、はじめてリッサウイルス感染症と鑑別できるわけである。従って、検査は狂犬病検査と同様の手続き、手順により行わなければならない。(狂犬病の項を参照)

検体の取り扱いに際しては、防護手袋、マスク等の保護器具を必ず着用し、組織等の飛散に十分注意を払い、感染組織(中樞神経系組織、体液、唾液)と皮膚及び粘膜との直接的な接触を避けること。解剖等に使用した道具、部屋等は作業終了後に十分にウイルスの不活化処理を行うこと。ウイルスは石けん水や洗剤液、70%エタノール、紫外線照射、オートクレーブ処理により不活性化される。

狂犬病ワクチンの接種

リッサウイルスの予防を目的としたワクチンや免疫グロブリンは現在のところない。狂犬病ワクチンが全てのリッサウイルスに対して有効に働くとは考えられていないが、検査材料を取り扱う者はあらかじめ狂犬病ワクチンの接種を受けておくことが望ましい。

ヒトがリッサウイルス感染した動物より咬傷を受けた場合には、速やかに暴露後予防接種 (Post-exposure prophylaxis: PEP) を開始し、検査によりヒトを咬んだ動物がリッサウイルス陰性と診断された場合にのみ PEP の継続を中止する。

狂犬病及びリッサウイルス感染症患者の診察、看護、諸検査を行う医療職員は狂犬病ワクチンの暴露前予防接種 (Pre-exposure prophylaxis) を事前に行うべきであるが、患者が狂犬病及びリッサウイルス感染症と診断された時点で速やかに暴露後予防接種 (PEP) を開始する。同時に患者と接触した家族や友人への PEP も行う。

III. 検査材料の採取・輸送

検査材料の採取

狂犬病及びリッサウイルス感染症の疑われる患者を診た場合には海外渡航歴や海外での動物咬傷歴を確認する。これらが不明である場合には臨床症状から狂犬病及びリッサウイルス感染症を診断することは困難である。狂犬病及びリッサウイルス感染症が疑われた患者では、皮膚生検や角膜塗沫標本からのウイルス抗原の検出、唾液や髄液からのウイルス遺伝子の検出を試みることができる。

(1) ヒトの材料

生検・剖検組織：頸部毛根域皮膚および皮下組織、脳組織（海馬、脳幹部、小脳）あるいは唾液腺を 5 mm x10 mm x10 mm 大に切り出して濾紙に張り付けて未固定のままポリプロピレン袋あるいは遠心管に挿入し（保管は -80℃で行う）、検査可能な施設へ搬送する。

唾液・髄液・血清：検体を外式の蓋付きクライオチューブ 4 本にそれぞれ 500µl 程注入して蓋をし、検査可能な施設へ冷蔵で搬送する。

(2) 動物の材料

狂犬病及びリッサウイルスの感染が疑われた動物は、安楽殺後速やかに頭部を切り離し、検査可能な施設へ冷蔵状態 (4℃) で直ちに搬送する。

脳の摘出を行う場合は周囲と区画された専用の部屋で行う（国立感染症研

究所で規定している BSL2 と同等の環境)。脳の摘出は「Laboratory techniques in rabies. WHO 第 4 版」および「狂犬病対応ガイドライン 2001」に方法が記載されている。感染が疑われた動物の脳は、海馬、脳幹部（視床、橋、延髄）、小脳を採材して各部位についてそれぞれ検査材料を作製して検査を行う。

検査材料の梱包、輸送

- (1) 材料を液漏れのしない密閉容器（1 次容器：ポリプロピレン製のチューブ、ガラスの小ビン等）に入れてしっかり閉ざし、これを別の耐久性ある液漏れのしない密閉容器に入れる。複数の 1 次容器を、その総体積が 50ml を越えない範囲で、1 個の 2 次容器に入れてもよい。1 次容器と 2 次容器との間の上部、底部、側部の空間には、1 次容器が万一壊れたり漏れたりした場合に漏れた液体等を十分吸収可能な吸収材を詰める。次に、2 次容器の各セットを波状繊維板、段ボール紙、木製、または同等の強度を持つ他の材料製の輸送用外装容器に入れる。
- (2) 検査材料は解剖及び生検後、すみやかに冷蔵状態（氷上もしくは 4℃）とし、温度管理を十分に行い、直ちに検査室へ輸送する。輸送にあたっては郵政省告示第 823 号（平成 12 年 12 月 22 日）に基づいた包装を行い、感染性物質であることを明示する。
- (3) 搬送に際しては、データシートに必要事項を記入して検査材料に添付する。検体に関する必要な資料：(1) 提供者名、(2) 採取年月日、(3) 採取地、(4) 動物種と品種、(5) 咬まれたヒトや動物、(6) 検体動物は死亡か安楽殺かの区別、(7) 検体動物のワクチン接種状況、(8) 検体動物は死亡前に捕獲、隔離、観察されたかの区別、(9) 検体動物の生前の挙動、(10) 噛みつき等の暴露事故発生状況、(11) 検査結果の情報提供を受ける「担当官」および「医務担当者」の「名前」、「連絡先」、「住所」、「電話」、「FAX」と「e-mail アドレス」。

IV. リッサウイルスの検査方法

現在のところリッサウイルス特異的な検査方法はなく、狂犬病ウイルス検査に用いられている以下の検査を行い。(2) の遺伝子検査により得た増幅遺伝子の塩基配列の決定により、初めて、リッサウイルスと鑑別できる。

- (1) 直接蛍光抗体法によるウイルス抗原検査
- (2) RT-PCR 法によるウイルス遺伝子の検出

(3) 乳のみマウスおよびマウス神経芽腫細胞への接種によるウイルス分離
狂犬病ウイルスの項も参照すること。

1. 直接蛍光抗体法

リッサウイルス感染症の検査は狂犬病の検査と同じ方法で行う。市販の狂犬病ウイルス抗体は全てのリッサウイルスと反応するが、狂犬病ウイルスとの抗原性の違いの程度により、反応性に違いがある。蛍光陽性の判断には十分な注意が必要である。

抗原の検出は死後の剖検によって得られた脳組織から行う。検査部位は脳の海馬、脳幹部（視床、橋、延髄）、小脳を含む3個所以上について行うことが望ましい。コウモリやマウスなどの小動物では脳全体に対して複数の塗抹標本作製する。角膜塗抹標本、頸部の皮膚などの生検材料からのウイルス抗原の検出も可能である。

<必要な試薬、器具、機材（指定品目または同等品を使用）>

* 検査用抗体：FITC-標識抗体

CENTOCOR FITC anti-rabies monoclonal globulin (PBS(-)で50倍に希釈して使用) [Fujirebio Diagnostics, Inc.]

もしくは

BBL anti-rabies globulin/ Fluorescein labeled (PBS(-)で100倍に希釈して使用)
[Becton Dickinson Microbiology Systems]

希釈抗体溶液中には1%エバンスブルー溶液を20μl/ml加える。

* リン酸緩衝液 (PBS(-))

* 蒸留水

* 封入剤 (50%グリセリン/PBS(-))

* ハサミ

* ピンセット

* 舌圧子もしくはペーパータオル

* 無蛍光スライドグラス

* 塗抹標本固定用染色瓶

* アセトン

* 湿潤箱 (蛍光抗体反応用)

* 孵卵器 (37°C)

* 落射型蛍光顕微鏡 (FITC 検出用のフィルターを使用)

<検査手順（操作は安全キャビネット（クラス II）内で行う）>

- (1) 摘出した脳から海馬、脳幹部（視床、橋、延髄）、小脳の組織をそれぞれ 1cm 角大に切り出す。
- (2) 切り出した組織を舌圧子もしくはペーパータオル上に置き、組織に付着している血液（非特異反応の原因となりやすい）をできるだけ取り除く。スライドガラスの上面を組織片に向けて圧片標本の作製を行う。厚い圧片標本は脳組織の自家蛍光や非特異反応などにより蛍光顕微鏡での観察が困難となりやすいため、厚い標本を作製した場合は標本面を下にしてペーパータオル上でスライドを強く圧迫して組織を進展させるとよい。スライド標本は追検査用を含めて各組織について 4 枚から 6 枚作製する。
- (3) 作製した圧片標本を安全キャビネット内で十分に風乾させる。
- (4) 染色瓶等に十分量の冷アセトンを満たして、スライドを完全に浸し、30 分以上固定する。固定後は十分に風乾を行う。
- (5) 風乾したスライドに十分量の FITC 標識抗体を添加し、30-60 分間（37°C）反応させる。
- (6) 抗体反応後、十分量の PBS (-) にて洗浄を行う（10 分間、2 回）。
- (7) PBS (-) 洗浄後、スライドを蒸留水に 2-3 秒浸して塩を除去した後に風乾を行う。
- (8) 操作の終了した圧片標本をグリセリンで封入して蛍光顕微鏡下で FITC 蛍光によるリッサウイルス抗原を検索する。顕微鏡観察：通常 200 倍で観察。抗原量の少ない検体や蛍光の弱い検体では 400 倍で詳細な観察を行う。

2. RT-PCR 法

遺伝子検査の RT-PCR 法により増幅された遺伝子の塩基配列を決定することにより、狂犬病ウイルスを含めたどの遺伝子型のリッサウイルスかを鑑別することができる。病原体遺伝子の検出として、主に脳の剖検によって得られた脳組織および脳乳剤での RT-PCR 法が行われる。唾液、髄液などからも RT-PCR 法で検査可能である。

狂犬病ウイルスを含めたリッサウイルスにおいて相同性の高い N 遺伝子の領域を増幅するプライマーを用いて行うが、遺伝子の塩基配列が異なるため、用いるプライマーや PCR の反応条件には十分な注意を払うことが重要である。

近年では、遺伝子型特異的なプローブ (TaqMan) を用いて各々の遺伝子型を決定可能な技術が開発されている。

< 必要な試薬、器具、機材（指定品目または同等品を使用） >

- * 1.5ml マイクロチューブ
- * 15ml コニカル遠心チューブ
- * RNA 抽出液: TRIZOL (GibcoBRL 社、No: 15596)
- * クロロホルム
- * イソプロパノール
- * 逆転写酵素: RTase (Promega 社、AMV reverse transcriptase, No: M5101)
- * Taq DNA ポリメラーゼ (TaKaRa 社、TaKaRa Ex Taq, No: RR001A)
- * RNase 阻害剤 (Promega 社、Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor, No: N2511)
- * エタノール
- * RNase free 蒸留水
- * エチジウムブロマイド (EtBr)
- * アガロース (Wako 社、Agarose1600, No: 017-09531)
- * DNA サイズマーカー (New England BioLabs, Inc., 1kb DNA Ladder, No: 323-2L)
- * マイクロチューブ用遠心機 (TOMY 社、MX-160)
- * サーマルサイクラー (ASTEC 社、PC707)
- * 電気泳動槽 (コスモバイオ社、ミューピッド2)
- * UV トランスイルミネータ (フナコシ社、CSF-10BF)
- * ポラロイドカメラ (フナコシ社、DS-300)
- * ポラロイドフィルム (Fujifilm 社、FP-3000B)
- * 逆転写用プライマー及び PCR プライマーセット
 フォワードプライマー: N1 5'-TTT GAG ACT GCT CCT TTT G-3'
 リバースプライマー: N2 5'-CCC ATA TAG CAT CCT AC-3'
 443bp を増幅
- * グローブ

<検査手順 (操作は安全キャビネット内 (クラス II) で行う) >

ウイルスRNAの抽出

- (1) 検査材料 50-100mg 当たり 1ml の TRIZOL 溶液を加え溶解させる。検査材料は TRIZOL 溶液の 10% を越えてはならない。材料の容量に応じてチューブを選択する (1.5ml マイクロチューブあるいは 15ml コニカル遠心チューブを使用する)。
- (2) ホモゲナイズした溶液をゆっくり攪拌し、室温で 5 分間静置する。
- (3) 使用した TRIZOL 溶液 1ml に対してクロロホルム 200 μ l を加えた後、15 秒間激しくボルテックスで攪拌を行う。
- (4) 室温で 2-3 分間静置した後、12,000 x g で 15 分間の遠心を行う。
- (5) 遠心により分離した水相を新しいチューブに回収し、使用した TRIZOL 溶液 1ml に対してイソプロパノール 500 μ l を加えて室温で 10 分間静置す

る。

- (6) 静置後、2-8°C、12,000 x g で 10 分間の遠心を行い、RNA を沈殿させる。
- (7) 遠心後の上清を取り除いた後、使用した TRIZOL 溶液 1ml に対して 75% エタノール 1ml を加えてボルテックス後、7,500 x g で 5 分間の遠心を行う。
- (8) 遠心上清を取り除いた後、5-10 分間の乾燥を行い、50µl の蒸留水 (RNase 不活化処理をした) に溶解し、精製 RNA 溶液とする。小分けして、使用直前まで -80°C に保存する。

逆転写反応 (RT反応)

- (1) 精製 RNA 溶液 10µl に逆転写用プライマー、N1 1µl (10pmol) を加えて 95°C、1 分間の加熱後、氷中で急速冷却する。
- (2) 精製 RNA 溶液と逆転写用プライマー混合液に順次 4µl の 5x 反応用バッファー、4 µl の 2.5mM dNTPs Mixture、1µl の RNasin、1 µl の AMV RTase を加えて反応液の総量を 20µl とする。
- (3) 42°C で 45 分間逆転写反応を行い、95°C で 5 分間処理する。

PCR反応

- (1) RT 反応終了溶液 1 µl に PCR 用プライマーセット、N1 と N2 を各々 1 µl (10pmol)、10x ExTaq Buffer を 5µl、dNTPs Mixture を 4µl、TaKaRa Ex Taq (5U/µl) を 0.25µl 加えたのちに総量を蒸留水で 50µl として PCR 反応を行う。

PCR 反応は以下の条件で行う。

	94 °C、1 分
----	94 °C、30 秒
30 回	45 °C、30 秒
----	72 °C、90 秒
	72 °C、7 分

増幅遺伝子の確認

増幅産物を 1% アガロース電気泳動後、EtBr 染色を行い、UV 照射によって目的遺伝子(443bp)の存在を確認する。

プライマーセット「N1 と N2」は狂犬病ウイルス N 遺伝子内でリッサウイルスと相同性の高い部位をプライマーとしてデザインされたものであり、狂犬病ウイルスでは確実に検出できるが、必ずしも全てのリッサウイルスに適用されるとは限らない。

リッサウイルスの各遺伝子型の塩基配列を基にしてデザインされた以下のプライマーセットを用いると、より確実である。

逆転写用プライマーとフォワードプライマーとして

JW12 5'-ATG TAA CAC C(C/T)C TAC AAT TG-3'

リバースプライマーとして各遺伝子型の以下のプライマーミクスチャーを使用する。

JW6 (DPL) 5'-CAA TTC GCA CAC ATT TTG TG-3'

JW6 (E) 5'-CAG TTG GCA CAC ATC TTG TG-3'

JW6 (M) 5'-CAG TTA GCG CAC ATC TTA TG-3'

606bp の増幅をみる。この場合殆どのリッサウイルスにおいて検出される。

2nd PCR として、上記の JW12 と以下のプライマーミクスチャーを用いて heminested PCR を行うとさらに確実となる。

JW10 (DLE2) 5'-GTC ATC AAA GTG TG(A/G) TGC TC-3'

JW10 (ME1) 5'-GTC ATC AAT GTG TG(A/G) TGT TC-3'

JW10 (P) 5'-GTC ATT AGA GTA TGG TGT TC-3'

582 bp が増幅される。

増幅遺伝子の塩基配列決定

用いるプライマーの違いだけで、狂犬病ウイルスとリッサウイルスと別けることは難しく、狂犬病ウイルスを除くリッサウイルスが特異的に検出可能な PCR プライマーは TaqMan プロブを用いた方法以外では報告されていない。現在のところ、リッサウイルス感染症の最終的な決定は増幅遺伝子の塩基配列を決定することによりなされる。

3. ウイルス分離法

リッサウイルスの分離は狂犬病ウイルスと同様、乳のみマウスを利用したマウス脳内接種法とマウス神経芽腫細胞 (MNA 細胞) を利用したウイルス分離法で行うことが可能である。マウス接種法は簡便で検出感度の優れた方法ではあるが検査に長い日数 (一般に 21-28 日間の観察) を必要とする。一方、培養細胞を利用したウイルス分離法は簡便、短期間でウイルス分離ができる可能性があるが、全ての遺伝子型のリッサウイルスが MNA 細胞で容易に増殖可能であるかは不明である。

a) マウス脳内接種法

マウス接種法によるリッサウイルスの分離は患者、感染動物の脳組織や唾液腺の乳剤をマウス脳内に直接接種して行う。なお、ウイルス分離の最終確認は前述の「直接蛍光抗体法」によるウイルス抗原の検出で行う。生後 3 日以内のマウスが最も感受性が高いが、成熟したマウスの使用も可能である。

<必要な器具等（指定品目または同等品を使用）>

- * マウス：1 から 3 日齢の乳のみマウスを使用（Swiss albino、BALB/c、ICR 等の白色マウスを使用する）
- * マウスケージ
- * 給餌及び給水器
- * 麻酔瓶
- * ハサミ
- * ナイフ
- * ピンセット
- * 舌圧子
- * 針と注射器（ツベルクリン用、25 μ l 容量、2 段針もしくは 1.0ml ディスポ注射器、27-26 ゲージ針）
- * ホモゲナイザー（破砕する組織の大きさに応じたものを使用）
- * 希釈液：10-50%の非働化済み動物血清（ウマ、ウサギもしくはハムスター）を含む生理食塩水もしくは PBS(-)等の緩衝液（組織をホモゲナイズするのに使用）。ストレプトマイシン(500 μ g/ml)とペニシリン(500 IU/ml)を加える。
- * 麻酔用エーテル
- * ピペット
- * 試験管もしくはコニカルチューブ（乳剤の希釈及び分注）

<検査手順（操作は隔離された専用の感染実験動物区で行う）>

感染乳剤の作製

感染乳剤は無菌的に作製する。検査組織に希釈液を加え、ホモゲナイザーにより組織を破砕する。乳剤は最終的に 10%(w/v)に調整する。接種前に少なくとも 30 分以上静置して、その上清を接種に使用する。あるいは、4 $^{\circ}$ C、10 分間、1600 回転の遠心を行い、その上清を接種に使用する。

マウスへの接種方法

乳のみマウスをケージから取り出し、親指と人さし指でマウス頭部を抑えて頭部を固定する。一方の手で注射器をもちながら針をマウスの右目と右耳の中間点の頭頂部から脳内に 0.1-0.2cm 刺して 20-30 μ l を注入する。接種の終わったマウスは速やかにマウスケージに移して次の接種を始める。接種後短時間（3 日以内）にマウスが死亡した場合は接種傷害による死亡として廃棄する。

成熟したマウスへの乳剤接種はエーテルで麻酔してから行う。

マウスの観察

リッサウイルスを脳内に接種されたマウスが接種後4日以内に病的症状を示すことはまれではあるが、接種1日目から毎日観察を行うことが望まれる。

接種マウスは、病状、死亡について21日間継続して観察と記録を行う。

<記録すべきマウスの症状>

- * 体毛の逆立
- * 振戦（震え）（尾をピンセットでつまみ上げて空中で観察）
- * 後肢の協調運動の欠落（テーブルに置いて歩かせて観察）
- * 麻痺
- * 衰弱（瀕死状態）

ウイルス接種5日目以降から、診断目的のために1ないし2匹のマウスを適時安楽殺して、採脳後、直接蛍光抗体法によるウイルス検出を行う。

b) 培養細胞を利用したウイルス分離法

マウス神経芽腫細胞（MNA細胞）によって行う。本培養法はマウスによる検査系の欠点である長い検査日数（一般に21-28日間の観察が必要）を必要としないが、リッサウイルスの種類によっては増殖が遅く、抗原の検出が難しい場合がある。

<必要な試薬と機材（指定品目または同等品を使用）>

- * 組織培養フラスコ（25cm²フラスコ）
- * 培養液：Eagle-MEM（SIGMA社）に10%ウシ胎児血清、抗生物質（100U/ml-Penicillin, 100µg/ml-Streptomycin）、抗カビ剤（0.25µg/ml、アンホテリシンなど）を加える。
- * ウシ胎児血清
- * 抗生物質（GIBCO社、Penicillin-Streptomycin, No: 1570-063）
- * 抗カビ剤（WAKO社、Amphotericin B, No: 015-13361）
- * トリプシン（Cellgro社、0.05%-Trypsin/EDTA, No: 25-052-C1）
- * メンブランフィルター（Millipore社、Millex-G5, No: 15070-063）
- * 1.5ml遠心チューブ
- * ディスポザブルピペット（1ml、5ml、10ml）
- * ピペットエード
- * CO₂インキュベーター（5%-CO₂、35°C）
- * スライドガラス（8穴、テフロンコーティング: HTC Super cured autoclavable）

<検査手順（操作は安全キャビネット（クラスII）内で行う）>

- (1) 1.5ml 遠心チューブにおよそ 200mg の検体を加える。
- (2) 800 μ l の培養液を遠心チューブに加えて、ホモゲナイズし、最終的に 1ml とする (20%懸濁液)。
- (3) 遠心 (4°C、1600 回転、10 分) を行い、破碎した組織の残渣を沈殿させる。
- (4) 遠心上清を 1.5mlの培養細胞浮遊液 (およそ 2×10^6 個のMNA細胞を 15ml コニカル遠心チューブに浮遊したもの) に加える。
- (5) ウイルスと培養細胞の混和液を 37°C で 1 時間培養を行う (15 分ごとに攪拌)。
- (6) ウイルス-培養細胞液に培養液を加えて 5ml に調整する。
- (7) ウイルス-培養細胞液を 8 穴のスライドに 1-2 滴滴下 (5mlピペット使用) してスライド上で培養を行う。残りのウイルス-培養細胞液 (およそ半量) は培養フラスコ (25cm²フラスコ) で培養を行う。
cf. スライドガラスによる感染細胞の培養はシャーレ等の容器内で行い、ウイルス液の外部への飛散を防ぐ措置をとること。使用したシャーレ等の容器内には湿らせたペーパータオル等を敷いてスライド上の培養液の蒸発・乾燥を防ぐ。
- (8) 48 時間後に 8 穴スライドを PBS(-)で軽く洗いアセトン固定を行う。
- (9) FITC 標識-抗狂犬病ウイルス抗体を用いて培養細胞内のウイルス抗原を確認する。(直接蛍光抗体法の手順に従う。)

前述 (9) でウイルス抗原の確認が困難な場合や、検査成績が陰性でも臨床所見や疫学的情報からリッサウイルスの感染が強く疑われている場合には以下に進む。

- (10) (7) でウイルス-培養細胞液を播種した培養フラスコの培地を新鮮な培地と交換してさらに 3 日から 4 日間培養を継続する。
- (11) 継続培養が終了したら、トリプシン処理を行って培養細胞を培養フラスコからはがす。
- (12) はがれた細胞に培養細胞液を加えて 5ml に調整する。(7)、(8)、(9) の操作を繰り返し行うことにより、ウイルスの回収が可能となる場合もある。

検査の最終判定

陽性の確認は複数の検査官で行い、検査が陽性となった場合速やかに関係者等に報告を行う。リッサウイルス感染症が強く疑われたが陰性の場合や、検査成績が不明瞭で疑問のある場合には必ず追検査や異なる検査による確定を行う。

V. 引用文献

- 1) 狂犬病対応ガイドライン 2001 厚生労働省健康局結核感染症課
2001年10月18日 第1版第1刷
- 2) Murphy, F. A., Bauer, S. P., Harrison, A. K., Winn W. C. Jr.: Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses. *Viral infection and transit from inoculation site to the central nervous system. Lab. Invest.* 28: 361-376, 1973.
- 3) WHO Expert Committee on Rabies 8th Report, Technical Report Series, No.824, Geneva, 1992.
- 4) Bourhy, H., Kissi, B., Tordo, N.: Molecular diversity of the lyssavirus genus. *Virology* 194: 70-81, 1993.
- 5) Charlton, K. M.: The pathogenesis of rabies and other lyssaviral infections: Recent studies. In *Lyssaviruses, Current Topics in Microbiology and Immunology*, 187 (Rupprecht, C.E., Dietzschold, B., Koprowski, H. eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 95-119, 1994.
- 6) Dietzschold, B., Rupprecht, C.E., Fu, Z.F. and Koprowski, H.: Chapter 38, Rhabdoviruses, In *Fields Virology 3rd Ed*, (Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., eds.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 1137-1159, 1996.
- 7) Meslin, F.-X., Kaplan, M.M., Koprowski, H., eds.: *Laboratory techniques in rabies.* 4th ed., WHO Geneva, 1996.
- 8) Smith, J. S.: New aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis, and prevention of the disease in the United States. *Clin. Micro. Rev.* 9: 166-176, 1996.
- 9) Black, E. M., Lowings, J. P., Smith, J., Heaton, P. R., McElhinney, L. M.: A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using Taq ManTM technology. *J. Virol. Methods* 105: 25-35, 2002.

10) Childs J.E.: Epidemiology In: Rabies (Jackson AC, Wunner WH eds.), Academic Press, San Diego, pp. 113-162, 2002.

11) Warrell MJ, Warrell DA: Rabies and other lyssavirus diseases. Lancet 363: 959-969, 2004.

VI. 連絡先

国立感染症研究所 ウイルス第一部 森本金次郎

国立感染症研究所 獣医科学部 井上 智

国立感染症研究所 ウイルス第一部 中道一生

国立感染症研究所 ウイルス第一部 伊藤（高山）睦代