



病原体検出マニュアル



病原体検出マニュアルの作成が計画されたのは、感染症法が平成10年に施行された時点である。

法律に基づいて、感染症の報告がなされる場合、報告は一定の基準に依らなければならない。又、感染症の報告は科学的な証拠、則ち、病原体検査、で裏打ちされたものである必要があるが、そうであれば、少なくとも日本の中では基準化したものを使うべきである。このような考え方から、全国の地方衛生研究所等及び国立感染症研究所の中で検査法として適当であると合意された検査法を先ず集大成する事とした。そして、実際にこれを使用し、問題点が出れば検討し、より良いものに改定すると云う方向で作業が始まった。この作業を再開したのがほぼ三年前となる。

色々な経緯もあったが、全国地方衛生研究所及び国立感染症研究所の共同作業として、ここに第一版が出来た事は、日本全国での病原体検出の基準化が緒に付いた事となる。平成15年10月に感染症法の改定があり、新たに、SARS等数種の感染症が対象感染症となったので、必要に応じて、これらの病原体検出マニュアルも作成する必要があるであろう。

本マニュアルを使用し、常に評価し、科学の進歩に見合ったものに維持する事が今後求められる事になると思われる。

国立感染症研究所

所 長 吉 倉 廣

平成15年12月9日

待ちに待っていた病原体検査マニュアルがいよいよ発行される運びとなりました。感染症発生動向調査での病原体サーベイランスの精度を担保する必要性から、この構想が出たのはかなり以前のことと伺っていましたが、様々な阻害因子が存在していたことより、なかなか実現しない状況にありました。しかし、“感染症から国民を守る”との理念の下に地方衛生研究所間及び地方衛生研究所と国立感染症研究所との連携が強化され、この度実現することとなりました。これは、今後の感染症対策を容易にするばかりではなく、この内容に関しても地方衛生研究所全国協議会全会員の協力による実地での検証されたものであることより、感染症対策に係る行政対応における大きな根拠を得たこととなったと考えます。ここに、改めて本マニュアル作成でご苦労されました国立感染症研究所並びに地方衛生研究所全国協議会会員の皆様に感謝申し上げます。

地方衛生研究所全国協議会

会 長 加 藤 一 夫

エボラ出血熱

エボラ出血熱診断マニュアル

平成 13 年 3 月

目次

エボラ出血熱の概説

エボラウイルス感染症の検査に関する注意事項

検査材料の採取・輸送

病原学的検査

1. ウイルス分離法
2. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応法
3. ウイルス抗原検出 ELISA

血清学的検査

1. 間接蛍光抗体法
2. IgG ELISA
3. IgM capture ELISA

エボラウイルス感染症の診断基準

引用文献

緊急時連絡先

エボラ出血熱の概説

エボラ出血熱はフィロウイルス科エボラウイルスによる感染症で、その致死率は50～90%と非常に高い。自然宿主は不明で、ワクチン・治療薬もない。これまでアフリカのガボン、スーダン、コンゴ共和国(旧ザイール)、象牙海岸、ウガンダで流行がみられた。非流行地での発生は、ガボンから南アフリカへ移動した医師の発症(死亡)例がある(1996年)。エボラウイルスは、ヒトへの病原性の強さからレベル4の病原体に分類される。実験室診断には、エボラウイルスの分離、RT-PCRによるゲノムの検出、ELISAによるウイルス抗原の検出、さらに蛍光抗体法あるいはELISAを用いた特異抗体の検出がある。剖検組織や生検皮膚(ホルマリン固定)からもウイルス抗原・ゲノムを検出できる。

診断に当たっては、患者の本感染症の発生地であるガボン、スーダン、コンゴ共和国、象牙海岸、ウガンダまたはその周辺国へ旅行・滞在、あるいは熱帯雨林地域への立ち入りの有無が参考になる。自然宿主からヒトへの感染経路は不明である。ヒトからヒトへの2次感染は血液、体液、排泄物等との直接接触による。アフリカでの大流行においては、注射器、ビニール手袋、マスク等の不足に起因する院内感染が大きな要因であった。

エボラウイルス感染症の検査に関する注意事項

エボラウイルス感染症のウイルス学的検査は、国立感染症研究所(村山分室)ウイルス第1部外来性ウイルス室において可能である。

国立感染症研究所においては、現在のところ感染性のあるエボラウイルスの取り扱いが認められていないので、血清学的診断のための抗原の作製にエボラウイルスを用いることができない。そこで組換え核蛋白を抗原とした診断法を開発し、採用している。また、ウイルス学的検査は「国立感染症研究所病原体等安全管理規定」に基づいて行われる。

検体の採取・輸送

1. 検体:エボラウイルス感染症の診断のための検体には、血清、咽頭ぬぐい液、尿および剖検例での各種臓器が利用できる。急性期エボラ出血熱の実験室診断に

は、ウイルス抗原またはゲノムの検出と特異的 IgM 抗体の検出を試みる。これらの検査には患者血清を採取し検査に供する。また、ウイルス分離用の検体には、血清だけでなく咽頭ぬぐい液、尿も用いられる。ウイルス性出血熱が疑われた患者から採取された血液は、採取翌日まで当研究室に届けることが可能であれば、血清分離することなく冷蔵のまま当研究室に輸送されることが望ましい。しかし、血清分離を行った上でドライアイス詰めにして当研究室に輸送してもかまわない。輸送の際は、検体が包装外部に漏れないよう厳重に処置を施す。血清の保存が必要な場合は、 -80°C で保存する。血清学的診断には、急性期と回復期(発症 2 週間以降)に採取されたペア血清の抗体検査を同時に行う必要がある。剖検例では、皮膚、脾臓、肝臓、腎臓組織がウイルス分離、ウイルス抗原・ゲノムの検出に用いられる。

2. 検体の輸送 : 当研究室に検査を依頼する場合には、郵政省告示第 618 号(平成 9 年 12 月 4 日)に基づき、検体が外部にもれないように包装のうえ、感染性物質であることを明示して輸送する。当研究室に持参する場合は、本所の「感染性材料(病原体等及び診断用のヒトあるいは動物の検体)の輸送に関するマニュアル(持参の場合)」(問い合わせ先: 国立感染症研究所 業務課 TEL: 03-5285-1111)に従う。
3. 検体の情報 : 検体を当研究室に送付するときには、以下の情報を検体とともに、または、前もって連絡する。

氏名, 年齢, 性別, 国籍, 職業, 臨床症状, 検体の採取された日時および発症からの日数, 海外渡航歴, その他

病原学的検査

1. ウイルス分離法:
Vero E6 細胞を用いてウイルス分離検査を行う。

A) 試薬・機材

- ① Vero E6 細胞
- ② CO_2 培養器(37°C)
- ③ D-MEM

- ④ ウシ胎児血清(FBS、56℃30分非働化済のもの)
- ⑤ リン酸緩衝液(PBS (-))
- ⑥ 組織培養用フラスコ(25 cm², できればベンチレーションキャップ付)
- ⑦ 組織培養用ペニシリン・ストレプトマイシン(Gibco-BRL 社)
- ⑧ 遠心管
- ⑨ 抗エボラウイルス抗体(血清)(例えば国立感染症研究所ウイルス第1部で作製した抗エボラ核蛋白ウサギ血清)
- ⑩ 遠心機

B) 検査方法

- ① Vero E6 細胞の単層を、PBS (-)で洗浄する。
- ② 無菌的に採取された血清を 2%ウシ胎児血清含有 D-MEM(維持培地)で 10 倍希釈し、細胞に接種する。雑菌の混入が考えられる検体の場合は、通常使用量の5倍のペニシリン・ストレプトマイシンを加え、3,000回転で20分間遠心した上清を用いる。
- ③ 37℃で1時間吸着させる。
- ④ 被験液を取り除き、維持培地を用いて細胞を培養する。
- ⑤ 毎日細胞変性効果(CPE)出現の有無を確認する。
- ⑥ CPE が認められた場合には、抗エボラウイルス抗体を用いた間接蛍光抗体法でエボラウイルスであるか否かを同定する。CPE が認められない場合には、一部の細胞を盲目継代(blind passage)する。また、残りの細胞は、間接蛍光抗体法によるエボラウイルス抗原の検査、逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応に供する。

2. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応法 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) :

ウイルスゲノムの検出のための RT-PCR には One-step PCR 法を採用している。RT-PCR 法のためのプライマーには表1に記載したプライマーセットをそれぞれ用いる。検体としては、血清や組織が用いられるが、非働化した検体では増幅効率が著しく低下する。

表 1. エボラウイルス感染症の診断に用いられるプライマーセット, プライマーの塩基配列, ターゲット遺伝子と PCR 産物の大きさ.

プライマー名	プライマーの塩基配列(方向)	ターゲット遺伝子 (産物の大きさ)
EBO-GP1	5'-AATGGGCTGAAAATTGCTACAATC (+)	Ebola virus (GP) (580 bp)
EBO-GP2	5'-TTTTTTTAGTTTCCCAGAAGGCCCACT (-)	
FILO-A	5'-ATCGGAATTTTCTTTCTCATT (+)	Filovirus L (419 bp)
FILO-B	5'-ATGTGGTGGGTTATAATAATCACTGACATG (-)	
RES-NP1	5'-GTATTTGGAAGGTCATGGATTC (+)	Ebola (Reston) NP (337 bp)
RES-NP2	5'-CAAGAAATTAGTCCTCATCAATC (-)	
ZAI-NP1	5'-GGACCGCCAAGGTAAAAAATGA (+)	Ebola (Zaire) NP (268 bp)
ZAI-NP2	5'-GCATATTGTTGGAGTTGCTTCTCAGC (-)	

A) 試薬・機材

- ① High PureTM Viral RNA Kit (Roche Diagnostics)
 - ② マイクロ遠心機
 - ③ TitanTM One Tube RT-PCR System (Roche Diagnostics)または Ready-to-Go RT-PCR (Pharmacia Biochemica)
 - ④ DEPC 処理済純水 (ニッポンジーン)
 - ⑤ サーマルサイクラー
 - ⑥ サーマルサイクラー用マイクロチューブ
 - ⑦ 核酸電気泳動用 2%アガロースゲル
 - ⑧ DNA 分子量マーカー (100bp ラダーもしくは 200-600 塩基の間を同定できるもの)
 - ⑨ アガロースゲル電気泳動槽
- 以下のものは検体が組織の場合に必要となる.
- ⑩ RNA BeeTM (TEL-TEST, コスモバイオ社取扱)
 - ⑪ ホモジナイザー (1.5ml のプラスチックチューブとそれにあつたプラスチック製ディスポーザブルペステルが市販されている)
 - ⑫ クロロフォルム
 - ⑬ 2-プロパノール
 - ⑭ 70%エタノール

B) 検査方法

- ① 血清からウイルス RNA を High Pure™ Viral RNA Kit を用いて抽出する. 血清 200μl から 50μl の精製 RNA 液を得ることができる. 検体が組織の場合, RNA を RNA Bee™ にて抽出する. 方法はキットの取り扱い説明書を参照のこと. 必ず正常血清等の陰性コントロールを置く.
- ② Ready-to-Go RT-PCR (Pharmacia Biochemica) を用いる場合, プライマーをそれぞれ 50 pmole/tube, 精製 RNA 5 μl を加え, さらに DEPC 処理済純水を最終量が 50μl となるように加える.
- ③ RT-PCR を以下の条件で実施する.

42°C	30 分	
94°C	5 分	
94°C 30 秒	}	3 サイクル
37°C 30 秒		
72°C 30 秒		
72°C	2 分	
94°C 30 秒	}	32 サイクル
45°C 30 秒		
72°C 30 秒		
72°C	5 分	

- ④ RT-PCR 産物をアガロースゲル(1.5-2.0%)電気泳動して, エチジウムブロマイド染色により増幅された DNA 産物を確認する.

3. ウイルス抗原検出 ELISA:

エボラウイルス感染症においては患者体内でのウイルス量が多く, 一方抗体が産生されないことも多いため, 迅速なウイルス感染の証明にウイルス抗原検出 ELISA を用いることができる. ウイルス抗原検出 ELISA の反応原理は以下になる。

- ① 抗エボラウイルス核蛋白モノクローナル抗体をコートしたプレートで患者材料(血清、組織乳剤)中の核蛋白を捕獲する。
- ② 抗核蛋白ウサギポリクローナル抗体を捕獲された核蛋白と反応させる。

- ③ 反応したウサギ抗体を、酵素標識した抗ウサギ IgG 抗体で検出する(マウスに反応する標識抗体では、プレートにコートしたモノクローナル抗体と反応してしまう)。
- ④ 酵素に対する発色基質を加え、捕獲された核蛋白を発色により検出する(核蛋白量・ウイルス量は発色の程度によって示される)。

A) 試薬・機材

- ① 精製抗エボラウイルス核蛋白モノクローナル抗体(クローン 3-3D、国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にて培養上清もしくはマウス腹水より精製)
- ② ウサギ抗エボラウイルス核蛋白ポリクローナル血清(anti-EBO-NP NIID #4, 国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にて作製)
- ③ ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体(Zymed 社, HRPO-標識 anti-rabbit IgG, affinity purified)
- ④ 陽性コントロール(精製リコンビナントエボラウイルス核蛋白, 国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にてリコンビナントバキュロウイルス感染細胞より調製)
- ⑤ 96 ウェル ELISA プレート(Falcon 社製)
- ⑥ リン酸緩衝液(PBS (-))
- ⑦ 洗浄バッファー(0.05% Tween20-PBS (-))
- ⑧ ブロッキングバッファー(5%スキムミルク-PBS (-))
- ⑨ 不活化バッファー(試料が組織の場合。1%Triton X-100 in PBS (-))
- ⑩ Triton X-100 (試料が血清の場合)
- ⑪ 希釈バッファー(0.5%スキムミルク in PBS (-))
- ⑫ ABTS (2,2'-アジノ-ビス-(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)) 発色基質(Roche Diagnostics, ABTS tablet および Buffer for ABTS)
- ⑬ ホモジナイザー(試料が組織の場合。1.5ml のプラスチックチューブとそれにあったプラスチック製ディスポーザブルペステルが市販されている)
- ⑭ 1.5ml チューブ用マイクロ遠心機(試料が組織の場合)
- ⑮ マイクロプレートリーダー

B) 検査方法

- ① 精製抗エボラウイルス核蛋白モノクローナル抗体(クローン 3-3D)を 1 μ g/ml に PBS (-)で希釈し, 96 穴 ELISA プレート(レーン 1〜6 の各ウェルに 100 μ l ずつ分注する(図 1b). 室温で 2 時間吸着させる(4 $^{\circ}$ C で一夜吸着させてもよい. この場合は, 蒸発を防ぐためプレートをシールする). 図 1b に示したように, 単クローン抗体がコートされたウェル(レーン 1〜6, 単クローン抗体陽性ウェル)とコートされないウェル(レーン 7〜12, 単クローン抗体陰性ウェル)を準備する.
- ② 抗体液を捨て, 200 μ l のブロッキングバッファーを各ウェルに分注する. 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる.
- ③ 検体の準備を行う. 検体が血清の場合には Triton X-100 を最終濃度が 1% になるように加え混和する. 検体が組織の場合, 組織が約 10% になるように不活化バッファーを加えホモジナイズ後 3000 回転 5 分間遠心し上清を検体とする. Triton X-100 を加えることは, ウイルスを不活化するだけでなくウイルス粒子中の核蛋白を粒子外に放出するためにも必須である. 処理した検体は, ブロッキングが終了するまで 4 $^{\circ}$ C で保存する. 使用時に希釈バッファーで 5 倍に薄める(希釈しない状態では, Triton X-100 によりプレートにコートされたモノクローナル抗体が洗い流される). 陽性コントロールは 1 μ g/ml に希釈バッファーで希釈する.
- ④ ブロッキングバッファーを捨て洗浄バッファーで 3 回洗浄し, すべてのウェルに 100 μ l の希釈バッファーを加える. 希釈バッファーで 5 倍に希釈した検体および陽性コントロールそれぞれ 100 μ l を, 単クローン抗体陽性ウェル(レーン 1)と陰性ウェル(レーン 7)それぞれに分注し(最終的に 10 倍希釈になる), それらのウェルから順に 2 倍段階希釈する(10 倍希釈から 320 倍)(図 1b). 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる.
- ⑤ 検体を捨て洗浄バッファーで 3 回洗浄し, 希釈バッファーで 1,000 倍に希釈したウサギ抗エボラウイルス核蛋白血清 100 μ l を各ウェルに分注し, 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる.
- ⑥ ウサギ血清を捨て洗浄バッファーで 3 回洗浄し, 希釈バッファーで 1,000 倍に希釈した HRPO 標識抗ウサギ IgG 抗体 100 μ l を各ウェルに分注し, 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる. この間に発色基質を調製する. 発色基質を完全に溶解するのに 10 分から 15 分要する. 調製した基質は数週間程度なら遮光して 4 $^{\circ}$ C で保存できる.

- ⑦ 標識抗体を捨て洗浄バッファーで 3 回洗浄し, ABTS 発色基質 100 μ l を各ウェルに分注し, 37°C で 30 分反応させる。
- ⑧ 波長 405nm のフィルターを用いて, OD(吸光度)を測定する. 単クローン抗体陽性ウェルの OD から, 対応する陰性ウェルの OD を差し引いた値を捕捉されたエボラウイルスの核蛋白による OD 値と判定する。

血清学的検査

1. 間接蛍光抗体法:

エボラウイルスの核蛋白を恒常的に発現する HeLa 細胞 (HeLa-EBO-NP 細胞) を用いた間接蛍光抗体法がエボラ出血熱患者血清の血清学的診断において有用であることを確認している. 急性期と回復期 (発症 2 週目以降) のペア血清を同時に検査することが重要である. また, 被験血清を非働化 (56°C, 30 分) 処理してから検査に供する.

A) 試薬・機材

- ① エボラウイルス核蛋白発現 HeLa 細胞 (HeLa-EBO-NP 細胞)
- ② D-MEM
- ③ リン酸緩衝液 (PBS (-))
- ④ 細胞消化用トリプシン・EDTA 液 (0.25%トリプシン-0.02%EDTA 加 PBS (-))
- ⑤ 蛍光抗体検査用スライドグラス (14 ウェル, AR Brown 社)
- ⑥ FITC 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体 (Zymed 社)
- ⑦ 10%グリセリン加 PBS (-)
- ⑧ カバーグラス
- ⑨ 蛍光顕微鏡
- ⑩ アセトン

B) 検査方法

- ① HeLa-EBO-NP 細胞を継代して 2 日間培養する。
- ② PBS (-) で洗浄し, トリプシン処理により HeLa-EBO-NP 細胞を回収する. 更に細胞を PBS (-) で洗浄後 3×10^6 cells/ml となるように PBS (-) に浮遊する。
- ③ 蛍光抗体検査用スライドグラスの各ウェルに細胞浮遊液を 10 μ l ずつ分配し, 完

全に乾燥させる。乾燥したら100%アセトン中で5分間固定する。アセトンを蒸発させた後-80℃に保管することができる。

- ④ PBS (-)で20倍から2倍段階希釈した被験血清を各ウェルにのせ、37℃、1時間反応させる。被験血清と同時に抗体陽性コントロール血清を同時に検査する。
- ⑤ PBS (-)でスライドグラスを洗浄し、PBS (-)で70倍希釈されたFITC標識ヒツジ抗ヒトIgG抗体を各ウェルにのせ、37℃ 1時間反応させる。
- ⑥ PBS (-)でスライドグラスを洗浄後、10%グリセリン加PBS (-)を用いて封入する。
- ⑦ 蛍光顕微鏡でFITCシグナルを検鏡する。特徴的な染色パターンが認められれば抗体陽性と判定し、抗体陽性を示した最高希釈倍率の逆数を抗体価とする。

2. IgG-ELISA:

リコンビナントバキュロウイルスで発現、精製したエボラウイルス核蛋白を抗原としたIgG 検出を目的としたELISA (IgG-ELISA, 図2a)が、診断に有用であることが確認されている。急性期と回復期のペア血清を同時に検査することが重要である。

A) 試薬・機材

- ① 精製組み換えエボラ核蛋白 (国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にてリコンビナントバキュロウイルス感染細胞より調製)
- ② ELISA プレート (Falcon 社)
- ③ リン酸緩衝液 (PBS (-))
- ④ 0.05% Tween 20 in PBS (-) (T-PBS)
- ⑤ 5%スキムミルク加 T-PBS (M-T-PBS)
- ⑥ ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Zymed 社, HRPO-標識 anti-rabbit IgG, affinity purified)
- ⑦ ABTS 発色基質 (Roche Diagnostics, ABTS tablet および Buffer for ABTS)
- ⑧ マイクロプレートリーダー

B) 検査方法

- ① 精製組み換えエボラ核蛋白を1μg/mlにPBS (-)で希釈し、ELISA プレートのレーン A～D の各ウェルに100μl加える。レーン E～H の各ウェルにはPBS (-)を100μl加える(図2b)。室温2時間または4℃一晩おく。レーン A～D のウェルを抗原陽性ウェル、レーン E～H のウェルを抗原陰性ウェルとする(図2b)。

- ② 各ウェルに 200 μ l の M-T-PBS を加え, 37°C, 1 時間反応させる.
- ③ 抗原液を捨て T-PBS で 3 回洗浄し, 各ウェルに M-T-PBS を 100 μ l 加える. 次いで M-T-PBS で 25 倍に希釈した被験血清 33 μ l を抗原陽性ウェルのレーン A と陰性ウェルのレーン E にそれぞれ加え(最終的に 100 倍希釈になる), それらのウェルから順次 4 倍段階希釈(100 倍から 6,400 倍)する(図 2b). 37°C, 1 時間反応させる.
- ④ 検体を捨て, T-PBS で 3 回洗浄し, 次いで M-T-PBS で 1,000 倍希釈した HRPO 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体 100 μ l を各ウェルに加える. 37°C, 1 時間反応させる.
- ⑤ 標識抗体を捨て, T-PBS で 3 回洗浄し, 各ウェルに ABTS 発色基質液 100 μ l 加え, 37°C, 30 分反応させる.
- ⑥ 波長 405nm のフィルターを用いて, OD を測定する. 抗原陽性ウェルの OD から, 対応する抗原陰性ウェルの OD を差し引いた値を抗エボラ核蛋白抗体による OD 値とする.

3. IgM-capture ELISA :

エボラウイルスに対する IgM 検出のための IgM-capture ELISA(図 3a)は, IgG-ELISA と同様に精製組み換えエボラ核蛋白を抗原としたものである. 現時点では, この IgM-capture ELISA のエボラ出血熱の診断における有用性は確かめられていないが, IgM-capture ELISA の結果はその他の検査結果とともに総合的に反映させる. 検査毎に, 精製組み換えエボラ核蛋白をサルに免疫して作製した抗エボラ核蛋白 IgM 抗体陽性コントロール血清と陰性コントロール血清を置く.

A) 試薬・機材

- ① 精製組み換えエボラ核蛋白(国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にてリコンビナントバキュロウイルス感染細胞より調製)
- ② ELISA プレート(Falcon 社)
- ③ リン酸緩衝液 (PBS (-))
- ④ 0.5%Tween 20 in PBS (-) (T-PBS)
- ⑤ 5%スキムミルク加 T-PBS (M-T-PBS)
- ⑥ IgM 抗体捕捉用抗ヒト IgM 抗体(ヤギ F(ab')₂ Anti-Human IgM, Biosource International, Inc. Tago Products)
- ⑦ ウサギ抗エボラウイルス核蛋白ポリクローナル血清(anti-EBO-NP, NIID #4, 国

立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にて作製)

- ⑧ ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Zymed 社, HRPO-標識 anti-rabbit IgG, affinity purified)
- ⑨ 陽性コントロール (精製組み換えエボラ核蛋白をサルに免疫して 3 週目に採取された血清)
- ⑩ 陰性コントロール (陽性コントロールと同じサルから免疫前に採取された血清)
- ⑪ ABTS 発色基質 (Roche Diagnostics, ABTS tablet および Buffer for ABTS)
- ⑫ マイクロプレートリーダー

B) 検査方法

- ① 捕捉用抗ヒト IgM 抗体を PBS (-) で $1\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度になるように希釈し, ELISA プレートの各ウェルに $100\mu\text{l}$ 加える. 4°C で一晩置く.
- ② 捕捉用抗体を捨て, T-PBS で 3 回洗浄し, 各ウェルに $200\mu\text{l}$ の M-T-PBS を加える. 37°C で 1 時間反応させる.
- ③ M-T-PBS を捨て, T-PBS で 3 回洗浄し, M-T-PBS $100\mu\text{l}$ を各ウェルに加える. 次いでレーン A とレーン E のウェルに, M-T-PBS で 10 倍希釈した被験血清 $100\mu\text{l}$ を加え (20 倍希釈になる), さらに 20 倍から 160 倍になるようにそれぞれ 2 倍段階希釈する (図 3b). 陽性コントロールおよび陰性コントロールを置く. 37°C 1 時間反応させる.
- ④ 被験血清を捨て, T-PBS で 3 回洗浄後, レーン A~D の各ウェルに M-T-PBS で $1\mu\text{g/ml}$ に調整した精製エボラ核蛋白を $100\mu\text{l}$ 加え, 37°C , 1 時間反応させる. 一方, レーン E~H の各ウェルには M-T-PBS $100\mu\text{l}$ を加える (抗原陰性コントロール).
- ⑤ 抗原液を捨て, T-PBS で 3 回洗浄後, M-T-PBS で 1,000 倍希釈した抗エボラ核蛋白血清 $100\mu\text{l}$ を各ウェルに加え, 37°C 1 時間反応させる.
- ⑥ 抗エボラ血清を捨て, T-PBS で 3 回洗浄後, M-T-PBS で 1,000 倍希釈した HRPO 標識抗ウサギ IgG 抗体 $100\mu\text{l}$ を各ウェルに加え, 37°C , 1 時間反応させる.
- ⑦ 抗ウサギ IgG 抗体を捨て, T-PBS で 3 回洗浄後, 各ウェルに ABTS 発色基質液 $100\mu\text{l}$ 加え, 37°C , 30 分反応させる.
- ⑧ 波長 405nm のフィルターを用いて, OD を測定する. 抗原陽性ウェルの OD 値から, 対応する抗原陰性ウェルの OD 値を差し引いた値を抗エボラ核蛋白 IgM 抗体による OD 値と判定する.

エボラウイルス感染症の診断基準

次のいずれかが満たされた場合、「エボラウイルス感染症」とする。

- 被験検体からエボラウイルスが分離された。
- 被験検体から RT-PCR 法でエボラウイルスゲノムが検出された。
- 被験検体から抗原検出 ELISA 法で、エボラウイルス核蛋白が検出された。
- 間接蛍光抗体法または IgG ELISA で判定された急性期と回復期に採取されたペア血清のエボラウイルスの核蛋白に対する抗体価が、4倍以上の有意に上昇した。

次の場合、「エボラウイルス感染症」を疑う。

- IgM-capture ELISA で、EBO-NP に対する特異的 IgM 抗体が検出された。

引用文献

1. 森川茂. ウイルス性出血熱. 臨床病理 特 108 号, 105-110, 1998.
2. Ksiazek TG, Rollin PE, Williams AJ, Bressler DS, Martin ML, Swanepoel R, Burt FJ, Leman PA, Khan AS, Rowe AK, Mukunu R, Sanchez A, Peters CJ. Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen, and IgG and IgM antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. J Infect. Dis. 179 Suppl 1:S177-87, 1999.
3. Jahring PJ. Filoviruses and Arenaviruses. In Manual of Clinical Microbiology, 6th Edition, edited by Murray PR et al, pp 1068-1081, ASM Press, Washington DC, 1995.
4. Niikura M, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, Miranda ME, Morikawa S. Ebola viral antigen-detection enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody to nucleoprotein. J. Clin. Microbi. (in press).
5. Prehaud C, Hellebrand E, Coudrier D, Volchkov VE, Volchkova VA, Feldmann H, La Guenno B, Bouloy M. Recombinant Ebola virus nucleoprotein and glycoprotein (Gabon 94 strain) provide new tools for the detection of human infections. J. Gen. Virol. 79:2565-2572, 1998.

6. Sanchez A, Ksiazek TG, Rollin PE, Miranda ME, Trappier SG, Khan AS, Peters CJ, Nichol ST. Detection and molecular characterization of Ebola viruses causing disease in human and nonhuman primates. *J Infect. Dis.* 179 Suppl 1:S164-9,1999.
7. Saijo M, Niikura M, Morikawa S, Ksiazek TG, Meyer RF, Peters CJ, Kurane I. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoproteins. *J. Clin. Microbiol.* 39:1-7, 2001.
8. Saijo M, Niikura M, Morikawa S, Kurane I. Immunofluorescence Method for Detection of Ebola Virus Immunoglobulin G, Using HeLa Cells Which Express Recombinant Nucleoprotein. *J. Clin. Microbiol.* 39:776-778, 2001.

緊急時連絡先

国立感染症研究所ウイルス第1部

部長 倉根一郎

TEL: 03-5285-1111 / (home) 03-3221-1733

FAX: 03-5285-1169

e-mail: kurane@nih.go.jp

国立感染症研究所村山分室ウイルス第1部外来性ウイルス室

室長 森川 茂

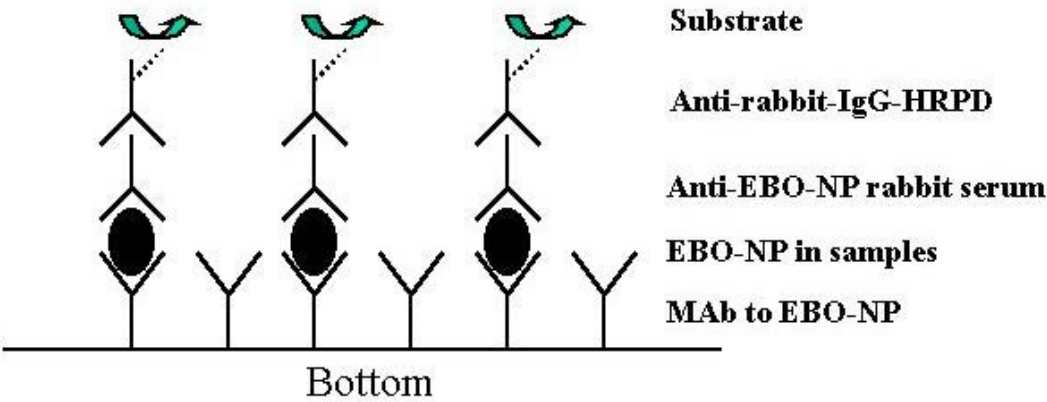
TEL: 042-561-0771(内線 791)/(home) 042-378-2864

FAX: 042-564-4881

e-mail: morikawa@nih.go.jp

図 1. 抗原検出 ELISA の原理(a)と ELISA プレート各ウェルにおける固相化された単クローン抗体の有無、被験血清の希釈倍率および陽性・陰性コントロール抗原の位置(b).

(a)



(b)

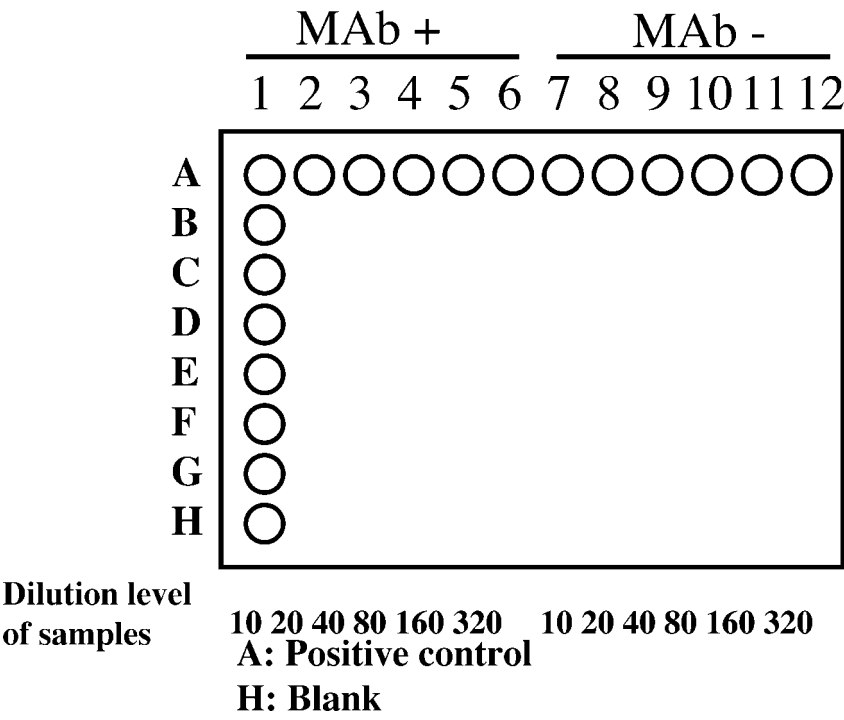


図 2. IgG ELISA の原理 (a) と ELISA プレート の各ウェル における固相化された抗原の 有無, 被験血清の希釈倍率および陽性・陰性コントロール血清の位置の説明 (b).

(a)

(b)

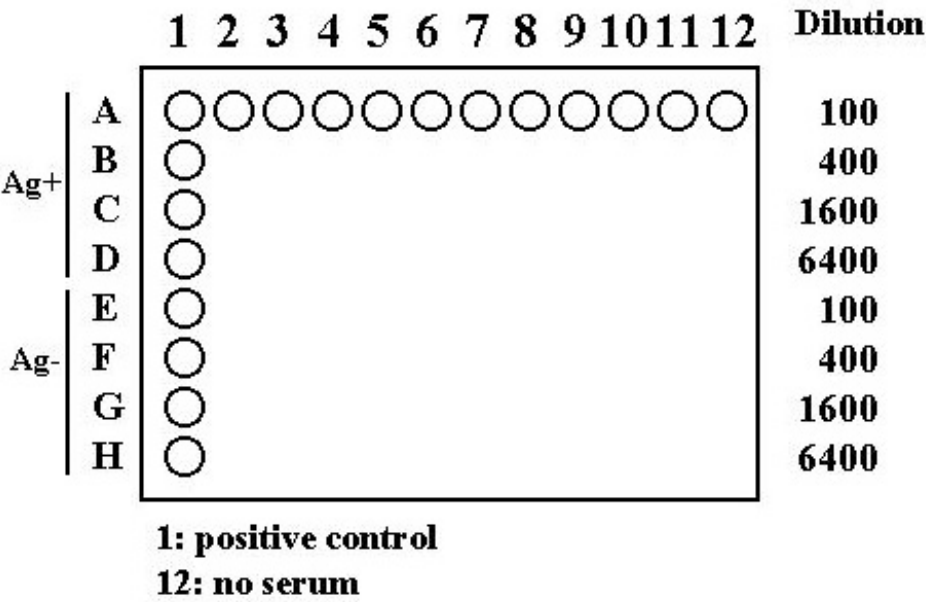
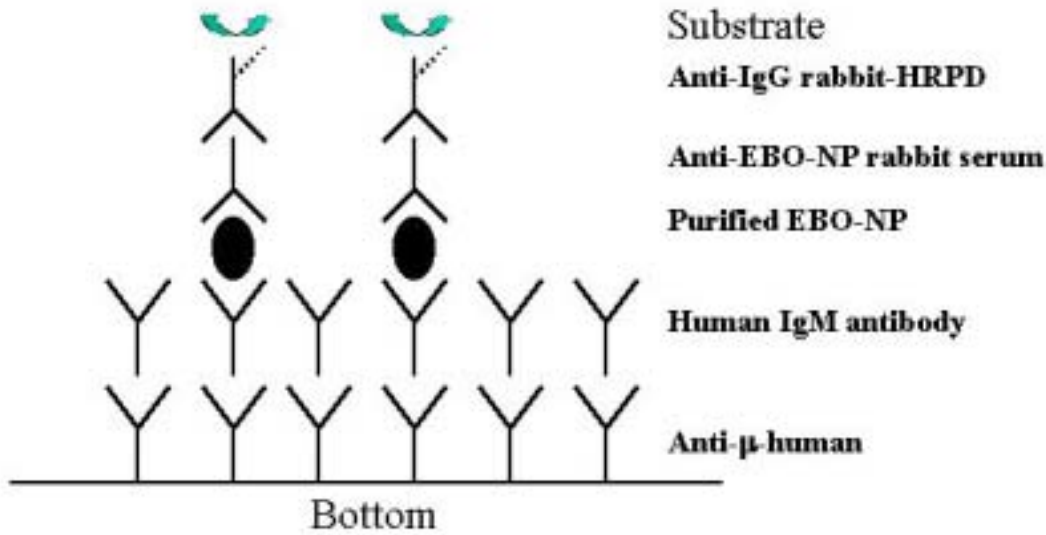
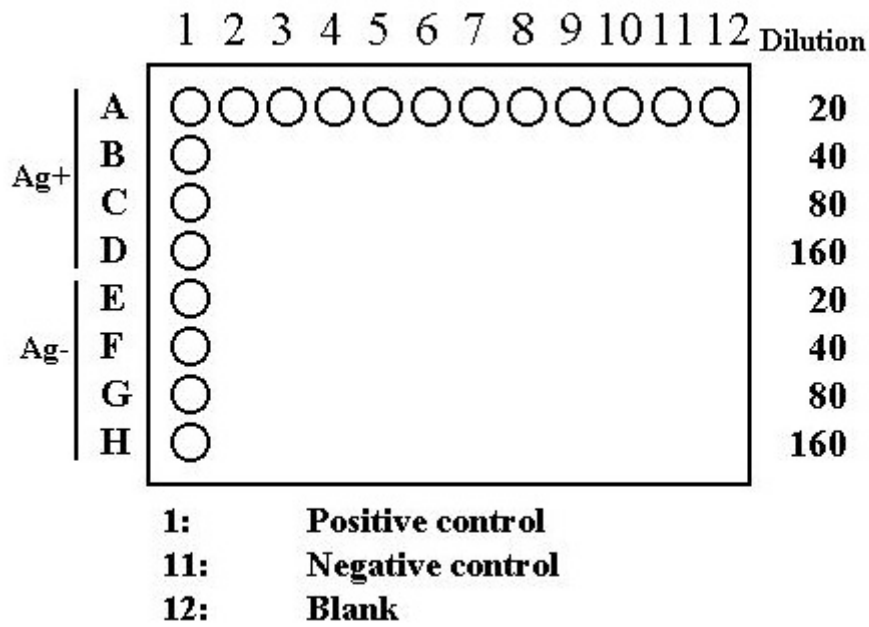


図 3. IgM-capture ELISA の原理(a)と ELISA プレートの各ウェルにおける被験血清の希釈倍率, 加える抗原および陽性・陰性コントロール血清の位置の説明(b).

(a)



(b)



クリミア・コンゴ出血熱

クリミア・コンゴ出血熱診断マニュアル

平成 13 年 3 月

目次

クリミア・コンゴ出血熱の概説

クリミア・コンゴ出血熱ウイルス感染症の検査に関する注意事項

検査材料の採取・輸送

病原学的検査

1. ウイルス分離法
2. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応法
3. ウイルス抗原検出 ELISA

血清学的検査

1. 間接蛍光抗体法
2. IgG ELISA
3. IgM capture ELISA

クリミア・コンゴ出血熱ウイルス感染症の診断基準

引用文献

緊急時連絡先

クリミア・コンゴ出血熱の概説

クリミア・コンゴ出血熱(CCHF)ウイルスは、ブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類され、3分節からなる一本鎖の(-)鎖RNAを遺伝子とするエンベロープウイルスである。多くの野生動物、家畜(ウシ、ヒツジ)が宿主で、ダニ(Hyalomma 属)がベクターおよび宿主として働く。CCHFウイルスは自然界では動物-ダニ間の水平サイクルとダニ-ダニ間の垂直サイクルで維持されている。アフリカ大陸、中近東、東欧、地中海周辺、中央アジア、インド亜大陸、中国西部にわたり分布する。ヒトへの感染経路には、CCHFウイルス保有ダニに咬まれることにより感染する経路と感染動物の組織・血液に接触して感染する経路とがある。ヒトからヒトへの感染は、急性期CCHF患者の血液・体液との接触による。空気感染はしない。潜伏期は2-9日でインフルエンザ様症状にはじまる。数病日から出血傾向が認められる。点状ないし斑状出血、吐血、メレナのほか、多くの症例で黄疸、肝腫大が認められる。発病2週目に死亡するケースが多い。感染者の発症率は20%で、発症例の致死率は15-70%である。CCHFは、1類感染症に指定されていて、CCHFウイルスはレベル4の病原体に分類される。実験室診断には、CCHFウイルスの分離、血清抗体の検出(IgMやIgGを蛍光抗体法あるいはELISA法で検出する)、RT-PCR法、ウイルス抗原の検出(ELISA法等)が行なわれる。診断には、臨床症状の他、患者の渡航歴(アフリカ大陸、中近東、東欧、地中海周辺、中央アジア、インド亜大陸、中国西部等のウイルス常在地域への旅行、滞在、あるいはこれらの地域でのヒツジ、ウシ等との接触、ダニによる咬傷の有無)が参考になる。

クリミア・コンゴ出血熱ウイルス感染症の検査に関する注意事項

クリミア・コンゴ出血熱ウイルス感染症のウイルス学的検査は、国立感染症研究所(村山分室)ウイルス第1部外来性ウイルス室において可能である。

国立感染症研究所においては、現在のところ感染性のあるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの取り扱いが認められていないので、血清学的診断のための抗原の作製にクリミア・コンゴ出血熱ウイルスを用いることができない。そこで組換え核蛋白を抗原とした診断法を開発し、採用している。また、ウイルス学的検査は「国立感染症研究所病原体等安全管理規定」に基づいて行われる。

検体の採取・輸送

1. 検体: クリミア・コンゴ出血熱の診断のための検体には、血清が必要である。急性期のクリミア・コンゴ出血熱の診断には、ウイルス抗原またはゲノムの検出と特異的 IgM 抗体の検出が有用である。そのためには、可能なかぎり発症 1 週間以内に血清を採取し、検査に供されなければならない。発症後 1 週間を過ぎた検体からのウイルス抗原の検出は難しい。ウイルス性出血熱が疑われた患者から採取された血液は、採取翌日までに当研究室に届けることが可能であれば血清分離することなく冷蔵のまま輸送されることが望ましい。また、血清分離を行った上で -80°C で保存し、輸送中に検体が包装外部に漏れないよう厳重に処置を施したうえでドライアイス詰めにして当研究室に輸送しても構わない。剖検例では、脾臓、肝臓組織がウイルス分離やウイルス抗原・ゲノムの検出に用いられる、血清学的診断のためには、急性期と回復期(発症 2 週間以降)に採取されたペア血清の抗体検査を同時に行う必要がある。
2. 検体の輸送 : 当研究室に検査を依頼する場合には、郵政省告示第 618 号(平成 9 年 12 月 4 日)に基づき、検体が外部に漏れないように包装のうえ、感染性物質であることを明示して輸送する。当研究室に持参する場合は、本所の「感染性材料(病原体等及び診断用のヒトあるいは動物の検体)の輸送に関するマニュアル(持参の場合)」(問い合わせ先: 国立感染症研究所 業務課 TEL: 03-5285-1111)に従う。
3. 検体の情報 : 検体を当研究室に送付する場合には、以下の情報を検体とともに、または、前もって連絡する。

氏名、年齢、性別、国籍、職業、臨床症状、検体の採取された日時および発症からの日数、海外渡航歴、ダニに咬まれたか否か、ヒツジなどの家畜との接触歴等、その他

病原学的検査

1. ウイルス分離法: ウイルス分離には乳のみマウス(脳内接種)または Vero E6 細胞を用いる。

1-1. 乳のみマウスを用いたウイルス分離:

生後 1-3 日の乳のみマウスの脳内に, 無菌的に採取された血清 0.02 ml を接種する. 生後 4 日目以降では神経症状を呈さないので不適である. 1 検体につき一腹の乳のみマウス(ほぼ 10 匹)を用いる. 脳内接種後, 神経症状(麻痺症状)の出現を毎日観察する. 神経症状が出現したところで脳組織を採取し, ホルマリン固定したうえで CCHF ウイルス抗原の有無を同定する.

1-2. Vero E6 細胞を用いたウイルス分離:

A) 試薬・機材

- ① Vero E6 細胞
- ② CO₂ 培養器(37℃)
- ③ D-MEM
- ④ ウシ胎児血清(FBS, 56℃30 分非働化済のもの)
- ⑤ リン酸緩衝液(PBS)
- ⑥ 組織培養用フラスコ(25 cm², できればベンチレーションキャップ付)
- ⑦ 組織培養用ペニシリン・ストレプトマイシン(Gibco-BRL 社)
- ⑧ 遠心管
- ⑨ 抗クリミア・コンゴ出血熱ウイルス抗体(血清)(例えば国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室で作製した抗クリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白ウサギ血清)
- ⑩ 遠心機

B) 検査方法

- ① Vero E6 細胞の単層を, PBS で洗浄する.
- ② 無菌的に採取された血清を 2%ウシ胎児血清含有 D-MEM(維持培地)で 10 倍希釈し, 細胞に接種する. 雑菌の混入が考えられる検体の場合は, 通常使用量の 5 倍のペニシリン・ストレプトマイシンを加え, 3000 回転で 20 分間遠心した上清を用いる.
- ③ 37℃, 1 時間吸着させる.
- ④ 被験液を取り除き, 維持培地を用いて細胞を培養する.
- ⑤ 毎日細胞変性効果(CPE)出現の有無を確認する. ただし, クリミア・コンゴ出血

熱ウイルスによる CPE は顕著でないため判定できないことがある。

- ⑥ CPE が認められた場合には、抗クリミア・コンゴ出血熱ウイルス抗体を用いた間接蛍光抗体法でクリミア・コンゴ出血熱ウイルスであるか否かを同定する。CPE が認められない場合には、一部の細胞を盲目継代 (blind passage) する。また、残りの細胞は、間接蛍光抗体法によるクリミア・コンゴ出血熱ウイルス抗原の検査、逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応に供する。

2. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応法 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) :

ウイルスゲノムの検出のための RT-PCR には One-step PCR 法を採用している。RT-PCR 法のためのプライマーには表 1 に記載したプライマーセット (CCHF-F2 と CCHF-R3) を用いる。検体としては、血清や組織が用いられる。

表 1. クリミア・コンゴ出血熱ウイルス感染症の診断に用いられるプライマーセット、プライマーの塩基配列、ターゲット遺伝子と PCR 産物の大きさ。

プライマー名	プライマーの塩基配列(方向)	ターゲット遺伝子 (産物の大きさ)
CCHF-F2	5'-TGGACACCTTCACAACTC-3'	NP (536 bp)
CCHF-R3	5'-GACAAATTCCTGCACCA-3'	
CCHF-F3	5'-GAGTGTGCCTGGGTAGCTC-3'	NP (260 bp)
CCHF-R2	5'-GACATTACAATTCGCCAGG-3'	

A) 試薬・機材

- ① High PureTM Viral RNA Kit (Roche Diagnostics)
- ② マイクロ遠心器
- ③ TitanTM One Tube RT-PCR System (Roche Diagnostics) または Ready-to-Go RT-PCR (Pharmacia Biochemica)
- ④ DEPC 処理済純水 (ニッポンジーン)
- ⑤ サーマルサイクラー
- ⑥ サーマルサイクラー用マイクロチューブ
- ⑦ 核酸電気泳動用 2% アガロースゲル
- ⑧ DNA 分子量マーカー (100bp ラダーもしくは 200-600 塩基の間を同定できるもの)

⑨ アガロースゲル電気泳動槽

以下のものは検体が組織の場合に必要となる.

⑩ RNA Bee™ (TEL-TEST, コスモバイオ社取扱)

⑪ ホモジナイザー (1.5ml のプラスチックチューブとそれにあったプラスチック製デイスポートラブルペステルが市販されている)

⑫ クロロフォルム

⑬ 2-プロパノール

⑭ 70%エタノール

B) 検査方法

① 血清からウイルス RNA を High Pure™ Viral RNA Kit を用いて抽出する. 血清 200μl から 50μl の精製 RNA 液を得ることができる. 検体が組織の場合, RNA を RNA Bee™ にて抽出する. 方法はキットの取り扱い説明書を参照のこと. 必ず正常血清等の陰性コントロールを置く.

② Ready-to-Go RT-PCR (Pharmacia Biochemica)を用いる場合, プライマーをそれぞれ 50 pmole/tube, 精製 RNA 5 μl を加え, さらに DEPC 処理済純水を最終量が 50μl となるように加える.

③ RT-PCR を以下の条件で実施する.

42°C 30 分

94°C 5 分

94°C 30 秒

37°C 30 秒

72°C 30 秒

72°C 2 分

94°C 30 秒

52°C 30 秒

72°C 30 秒

72°C 5 分

5 サイクル

30 サイクル

④ RT-PCR 産物をアガロースゲル(1.5-2.0%)電気泳動して, エチジウムブロマイド染色により増幅された DNA 産物を確認する.

- ⑤ Nested PCR は通常行わないが、行う場合には、RT-PCR 反応液 1 μ l をテンプレートとして、プライマー CCHF-F3 と CCHF-R2 を用いて、High-Fidelity PCR System (Roche Diagnostics) または Ready-to-Go PCR (Pharmacia Biochemica) を使用して行う。その反応条件は、94 $^{\circ}$ C 5 分、30 サイクルの(94 $^{\circ}$ C 30 秒, 52 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 30 秒)および 72 $^{\circ}$ C 5 分である。Nested-PCR は非常に高感度であるが、サンプルのコンタミネーションに関して十分留意する。

3. ウイルス抗原検出 ELISA:

クリミア・コンゴ出血熱ウイルス感染症においては発病数日までは、血液中にウイルスが検出されるため、迅速なウイルス感染の証明に RT-PCR と並んでウイルス抗原検出 ELISA を用いることができる。ウイルス抗原検出 ELISA の反応原理は以下のようになる。

- ① 抗クリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白モノクローナル抗体をコートしたプレートで患者材料(血清, 組織乳剤)中の核蛋白を捕獲する。
- ② 抗核蛋白ウサギポリクローナル抗体を捕獲された核蛋白と反応させる。
- ③ 反応したウサギ抗体を、酵素標識した抗ウサギ IgG 抗体で検出する(マウスに反応する標識抗体では、プレートにコートしたモノクローナル抗体と反応してしまう)。
- ④ 酵素に対する発色基質を加え、捕獲された核蛋白を発色により検出する(核蛋白量・ウイルス量は発色の程度によって示される)。

A) 試薬・機材

- ① 精製抗クリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白モノクローナル抗体(クローン 1B7, 1F1, 国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にて培養上清もしくはマウス腹水より精製)
- ② ウサギ抗クリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白ポリクローナル血清 (NIID-CCHF-NP/#1, 国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にて作製)
- ③ ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Zymed 社, HRPO-標識 anti-rabbit IgG, affinity purified)
- ④ 陽性コントロール(精製リコンビナントクリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白, 国

立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にてリコンビナントバキュロウイルス感染細胞より調製)

- ⑤ 96 ウェル ELISA プレート(Falcon 社製)
- ⑥ リン酸緩衝生理食塩水(PBS)
- ⑦ 洗浄バッファー(0.05% Tween20-PBS)
- ⑧ ブロッキングバッファー(5%スキムミルク-PBS)
- ⑨ 不活化バッファー(試料が組織の場合. 1%TritonX-100 in PBS)
- ⑩ Triton X-100 (試料が血清の場合)
- ⑪ 希釈バッファー(0.5%スキムミルク in PBS)
- ⑫ ABTS 発色基質(Roche Diagnostics, ABTS tablet および Buffer for ABTS)
- ⑬ ホモジナイザー(試料が組織の場合. 1.5ml のプラスチックチューブとそれにあったプラスチック製ディスポーザブルペステルが市販されている)
- ⑭ 1.5ml チューブ用マイクロ遠心機(試料が組織の場合)
- ⑮ マイクロプレートリーダー

B) 検査方法

- ① 精製抗クリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白モノクローナル抗体(クローン 1B7, 1F1)を1 μ g/ml にPBSで希釈し, レーン1〜6の各ウェルに100 μ l ずつ分注する(図 1b). 室温で2時間吸着させる(4℃で一夜吸着させてもよい. この場合は, 蒸発を防ぐためプレートをシールする). 図 1b に示したように, 単クローン抗体がコートされたウェル(レーン 1〜6, 単クローン抗体陽性ウェル)とコートされないウェル(レーン 7〜12, 単クローン抗体陰性ウェル)を準備する.
- ② 抗体液を捨て, 200 μ l のブロッキングバッファーを各ウェルに分注する. 37℃, 1時間反応させる.
- ③ 検体の準備を行う. 検体が血清の場合にはTriton X-100を最終濃度が1%になるように加え混和する. 検体が組織の場合, 組織が約 10%になるように不活化バッファーを加えホモジナイズ後 3000 回転 5 分間遠心し上清を検体とする. Triton X-100 を加えることは, ウイルスを不活化するだけでなくウイルス粒子中の核蛋白を粒子外に放出するためにも必須である. 処理した検体は, ブロッキングが終了するまで4℃で保存する. 使用時に希釈バッファーで5倍に薄める(希釈しない状態では, Triton X-100 によりプレートにコートされたモノクローナル抗体が洗い流される). 陽性コントロールは1 μ g/ml に希釈バッファーで希釈する.

- ④ ブロッキングバッファーを捨て洗浄バッファーで 3 回洗浄し、すべてのウェルに 100 μ l の希釈バッファーを加える。希釈バッファーで5倍に希釈した検体および陽性コントロールそれぞれ 100 μ l を、単クローン抗体陽性ウェル(レーン 1)と陰性ウェル(レーン7)それぞれに分注し(最終的に 10 倍希釈になる)、それらのウェルから順に 2 倍段階希釈する(10 倍希釈から 320 倍)(図 1b)。37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる。
- ⑤ 検体を捨て洗浄バッファーで3回洗浄し、希釈バッファーで1,000 倍に希釈したウサギ抗クリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白血清 100 μ l を各ウェルに分注し、37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる。
- ⑥ ウサギ血清を捨て洗浄バッファーで3回洗浄し、希釈バッファーで1,000 倍に希釈した HRPO 標識抗ウサギ IgG 抗体 100 μ l を各ウェルに分注し、37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる。この間に発色基質を調製する。発色基質を完全に溶解するのに 10 分から 15 分要する。調製した基質は数週間程度なら遮光して 4 $^{\circ}$ C で保存できる。
- ⑦ 標識抗体を捨て洗浄バッファーで 3 回洗浄し、ABTS 発色基質 100 μ l を各ウェルに分注し、37 $^{\circ}$ C 30 分反応させる。
- ⑧ 波長 405nm のフィルターを用いて、OD(吸光度)を測定する。単クローン抗体陽性ウェルの OD から、対応する陰性ウェルの OD を差し引いた値を捕捉されたクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核蛋白による OD 値と判定する。

血清学的検査

1. 間接蛍光抗体法:

クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核蛋白を恒常的に発現する HeLa 細胞 (HeLa-CCHF-NP細胞)を用いた間接蛍光抗体法がクリミア・コンゴ出血熱患者血清の血清学的診断における有用であることを確認している。急性期と回復期(発症 2 週目以降)のペア血清を同時に検査することが重要である。また、被験血清を非働化(56 $^{\circ}$ C, 30 分)処理してから検査に供する。

A) 試薬・機材

- ① HeLa-CCHF-NP 細胞
- ② D-MEM

- ③ リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)
- ④ 細胞消化用トリプシン・EDTA 液 (0.25%トリプシン-0.02%EDTA 加 PBS)
- ⑤ 蛍光抗体検査用スライドグラス (14 ウェル, AR Brown 社)
- ⑥ FITC 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体 (Zymed 社)
- ⑦ 10%グリセリン加 PBS
- ⑧ カバーグラス
- ⑨ 蛍光顕微鏡
- ⑩ アセトン

B) 検査方法

- ① HeLa-CCHF-NP 細胞を継代して 2 日間培養する.
- ② PBS で洗浄し, トリプシン処理により HeLa-CCHF-NP 細胞を回収する. 更に細胞を PBS で洗浄後 3×10^6 cells/ml となるように PBS に浮遊する.
- ③ 蛍光抗体検査用スライドグラスの各ウェルに細胞浮遊液を 10 μ l ずつ分配し, 完全に乾燥させる. 乾燥したら 100%アセトン中で 5 分間固定する. アセトンを蒸発させた後 -80°C に保管することができる.
- ④ PBS で 20 倍から 2 倍段階希釈した被験血清を各ウェルにのせ, 37°C, 1 時間反応させる. 被験血清と同時に抗体陽性コントロール血清を同時に検査する.
- ⑤ PBS でスライドグラスを洗浄し, PBS で 70 倍希釈した FITC 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体を各ウェルにのせ, 37°C, 1 時間反応させる.
- ⑥ PBS でスライドグラスを洗浄後, 10%グリセリン加 PBS を用いて封入する.
- ⑦ 蛍光顕微鏡で特異蛍光を検鏡する. 特徴的な染色像が認められれば抗体陽性と判定し, 抗体陽性を示した最高希釈倍率の逆数を抗体価とする.

2. IgG-ELISA:

リコンビナントバキュロウイルスで発現, 精製したクリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白を抗原に用いた IgG 検出を目的とした ELISA (IgG-ELISA, 図 2a)が, 診断に有用であることが確認されている. 急性期と回復期のペア血清を同時に検査することが重要である.

A) 試薬・機材

- ① 精製組み換えクリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白 (国立感染症研究所ウイル

ス第1部外来性ウイルス室にてリコンビナントバキュロウイルス感染細胞より調製)

- ② ELISA プレート(Falcon 社)
- ③ リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)
- ④ 0.05%Tween 20 –PBS (T-PBS)
- ⑤ 5%スキムミルク加 T-PBS (M-T-PBS)
- ⑥ ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体(Zymed 社, HRPO-標識 anti-rabbit IgG, affinity purified)
- ⑦ ABTS 発色基質(Roche Diagnostics, ABTS tablet および Buffer for ABTS)
- ⑧ マイクロプレートリーダー

B) 検査方法

- ① 精製組み換えクリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白を 1 μ g/ml に PBS で希釈し, ELISA プレートのレーン A～D の各ウェルに 100 μ l 加える. レーン E～H の各ウェルには PBS を 100 μ l 加える(図 2b). 室温 2 時間または 4℃で一晩おく. レーン A～D のウェルを抗原陽性ウェル, レーン E～H のウェルを抗原陰性ウェルとする(図 2b).
- ② 各ウェルに 200 μ l の M-T-PBS を加え, 37℃, 1 時間反応させる.
- ③ 抗原液を捨て T-PBS で 3 回洗浄し, 各ウェルに M-T-PBS を 100 μ l 加える. 次いで M-T-PBS で 25 倍に希釈した被験血清 33 μ l を抗原陽性ウェルのレーン A と陰性ウェルのレーン E にそれぞれ加え(最終的に 100 倍希釈になる), それらのウェルから順次 4 倍段階希釈(100 倍から 6,400 倍)する(図 2b). 37℃, 1 時間反応させる.
- ④ 検体を捨て T-PBS で 3 回洗浄し, ついで各ウェルに M-T-PBS で 1,000 倍希釈した HRPO 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体 100 μ l を各ウェルに加える. 37℃, 1 時間反応させる.
- ⑤ 標識抗体を捨て T-PBS で 3 回洗浄し, 各ウェルに ABTS 発色基質液 100 μ l 加え, 37℃, 30 分反応させる.
- ⑥ 波長 405nm のフィルターを用いて, OD を測定する. 抗原陽性ウェルの OD から, 対応する抗原陰性ウェルの OD を差し引いた値を抗クリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白抗体による OD 値とする.

3. IgM-capture ELISA :

クリミア・コンゴ出血熱ウイルスに対する IgM 検出のための IgM-capture ELISA(図 3a)は, IgG-ELISAと同様に精製組み換えクリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白を抗原としたものである. 現時点では, この IgM-capture ELISA のクリミア・コンゴ出血熱の診断における有用性は確かめられていないが, IgM-capture ELISA の結果はその他の検査結果とともに総合的に反映させる. 検査毎に, 精製組み換えクリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白をサルに免疫して作製した抗クリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白 IgM 抗体陽性コントロール血清と陰性コントロール血清を置く.

A) 試薬・機材

- ① 精製組み換えクリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白(国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にてリコンビナントバキュロウイルス感染細胞より調製)
- ② ELISA プレート(Falcon 社)
- ③ リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)
- ④ 0.05%Tween 20 –PBS (T-PBS)
- ⑤ 5%スキムミルク加 T-PBS (M-T-PBS)
- ⑥ IgM 抗体捕捉用抗ヒト IgM 抗体 (ヤギ F(ab')₂ Anti-Human IgM , Tagoimmunochemicals 社)
- ⑦ ウサギ抗クリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白ポリクローナル血清 (NIID-CCHF-NP/#4, 国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にて作製)
- ⑧ ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体(Zymed 社, HRPO-標識 anti-rabbit IgG, affinity purified)
- ⑨ 陽性コントロール(精製組み換えクリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白をサルに免疫して3週目に採取された血清)
- ⑩ 陰性コントロール(陽性コントロールと同じサルから免疫前に採取された血清)
- ⑪ ABTS 発色基質(Roche Diagnostics, ABTS tablet および Buffer for ABTS)
- ⑫ マイクロプレートリーダー

B) 検査方法

- ① 捕捉用抗ヒト IgM 抗体を PBS で 1 μ g/ml 以上の濃度になるように希釈し, ELISA

プレート各ウェルに 100 μ l 加える。4℃で一晩置く。

- ② 捕捉用抗体を捨て T-PBS で 3 回洗浄し、各ウェルに 200 μ l の M-T-PBS を加える。37℃で 1 時間反応させる。
- ③ M-T-PBS を捨て T-PBS で 3 回洗浄し、M-T-PBS 100 μ l を各ウェルに加える。次いでレーン A とレーン E のウェルに、M-T-PBS で 10 倍希釈した被験血清 100 μ l を加え (20 倍希釈になる)、さらに 20 倍から 160 倍になるようにそれぞれ 2 倍段階希釈する (図 3b)。陽性コントロールおよび陰性コントロールを置く。37℃、1 時間反応させる。
- ④ 被験血清を捨て T-PBS で 3 回洗浄後、レーン A〜D の各ウェルに M-T-PBS で 1 μ g/ml に調整した精製クリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白を 100 μ l 加え 37℃、1 時間反応させる。一方、レーン E〜H の各ウェルには M-T-PBS 100 μ l を加える (抗原陰性コントロール)。
- ⑤ 抗原液を捨て T-PBS で 3 回洗浄後、M-T-PBS で 1,000 倍希釈した抗クリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白血清 100 μ l を各ウェルに加え、37℃、1 時間反応させる。
- ⑥ 抗クリミア・コンゴ出血熱ウイルス血清を捨て T-PBS で 3 回洗浄後、M-T-PBS で 1,000 倍希釈した HRPO 標識抗ウサギ IgG 抗体 100 μ l を各ウェルに加え、37℃、1 時間反応させる。
- ⑦ 抗ウサギ IgG 抗体を捨て T-PBS で 3 回洗浄後、各ウェルに ABTS 発色基質液 100 μ l 加え、37℃30 分反応させる。
- ⑧ 波長 405nm のフィルターを用いて、OD を測定する。抗原陽性ウェルの OD 値から、対応する抗原陰性ウェルの OD 値を差し引いた値を抗クリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白 IgM 抗体による OD 値と判定する。

クリミア・コンゴ出血熱ウイルス感染症の診断基準

次のいずれかが満たされた場合、「クリミア・コンゴ出血熱ウイルス感染症」とする。

- 被験検体からクリミア・コンゴ出血熱ウイルスが分離された。
- 被験検体から RT-PCR 法でクリミア・コンゴ出血熱ウイルスゲノムが検出された。
- 被験検体から抗原検出 ELISA 法で、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白が検出された。
- 間接蛍光抗体法または IgG ELISA で判定された急性期と回復期に採取された

ペア血清の CCHF-NP に対する抗体価が, 4 倍以上の有意に上昇した.

次の場合, 「クリミア・コンゴ出血熱ウイルス感染症」を疑う.

- IgM-capture ELISA で, CCHF-NP に対する特異的 IgM 抗体が検出された.

引用文献

1. 西條政幸. クリミア・コンゴ出血熱. 小児科臨床 51:2499-2501, 1998
2. 西條政幸. クリミア・コンゴ出血熱. 日本医師会雑誌 122: 54-55, 1999
3. Burt FJ, Leman PA, Smith JF, Swanepoel R. The use of a reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of viral nucleic acid in the diagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. J. Virol. Methods. 70:129-137, 1998
4. Khan AS, Maupin GO, Rollin PE, Noor AM, Shurie HH, Shalabi AG, Wasef S, Haddad YM, Sadek R, Ijaz K, Peters CJ, Ksiazek TG. An outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the United Arab Emirates, 1994-1995. Am J Trop Med Hyg 57:519-25, 1997
5. Marriott AC, Polyzoni T, Antoniadis A, Nuttall PA. Detection of human antibodies to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus using expressed viral nucleocapsid protein. J Gen Virol. 75 :2157-61, 1994
6. Saijo M, Niikura M, Morikawa S, Ksiazek TG, Meyer RF, Peters CJ, Kurane I. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoproteins. J Clin. Microbiol. 39:1-7, 2001
7. Saijo M, Niikura M, Morikawa S, Kurane I. Immunofluorescence Method for Detection of Ebola Virus Immunoglobulin G, Using HeLa Cells Which Express Recombinant Nucleoprotein. J. Clin. Microbiol. 39:776-778, 2001

緊急時連絡先

国立感染症研究所(戸山庁舎)ウイルス第1部

部長 倉根一郎

TEL: 03-5285-1111 / (home) 03-3221-1733

FAX: 03-5285-1169

e-mail: kurane@nih.go.jp

国立感染症研究所村山分室ウイルス第1部外来性ウイルス室

室長 森川 茂

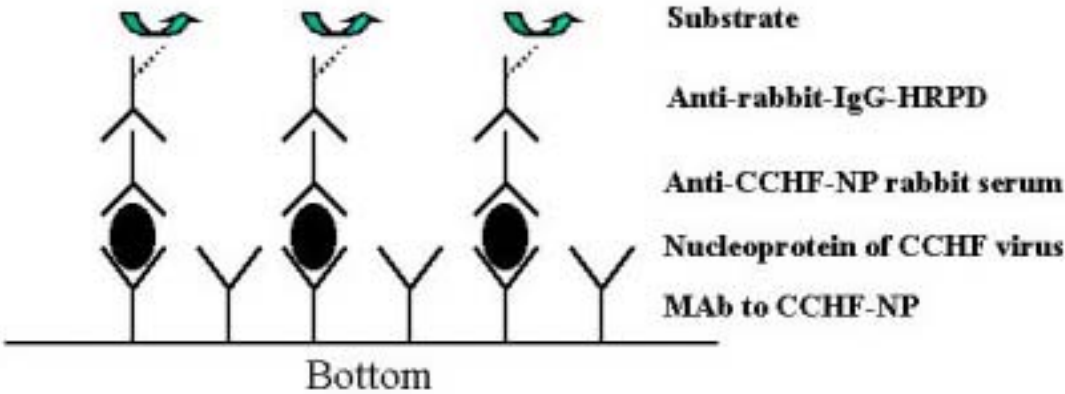
TEL: 042-561-0771(内線 791)

FAX: 042-564-4881

e-mail: morikawa@nih.go.jp

図 1. 抗原検出 ELISA の原理(a)と ELISA プレートの各ウェルにおける固相化された単クローン抗体の有無, 被験血清の希釈倍率および陽性・陰性コントロール抗原の位置の説明(b).

(a)



(b)

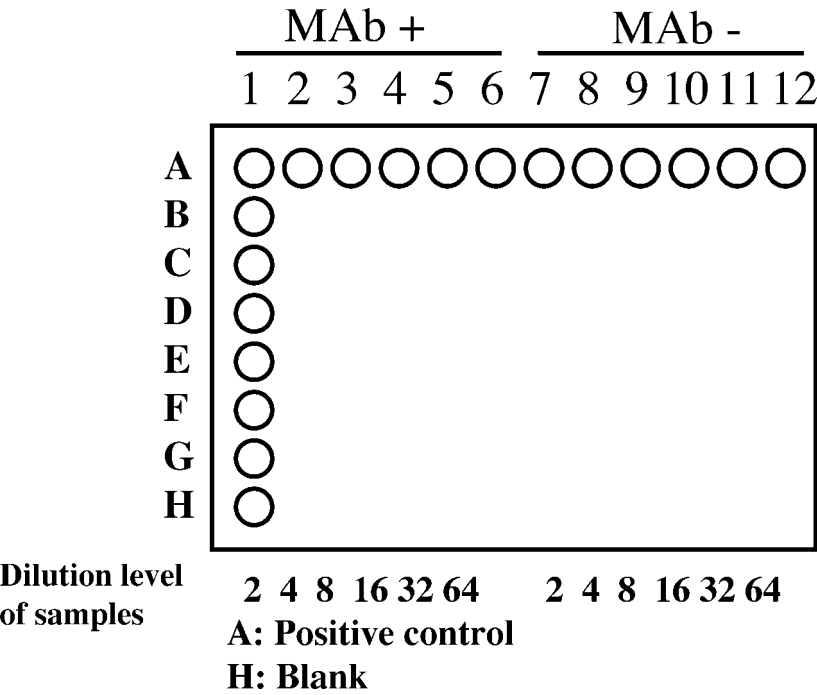
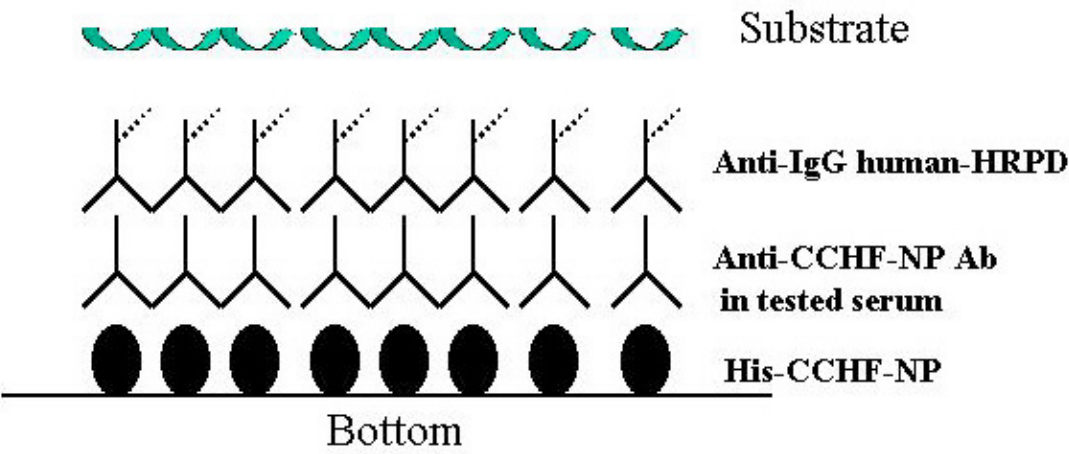


図 2. IgG ELISA の原理 (a) と ELISA プレート の各ウェル における 固相化された 抗原の 有無，被験血清の希釈倍率および陽性・陰性コントロール血清の位置の説明 (b) .

(a)



(b)

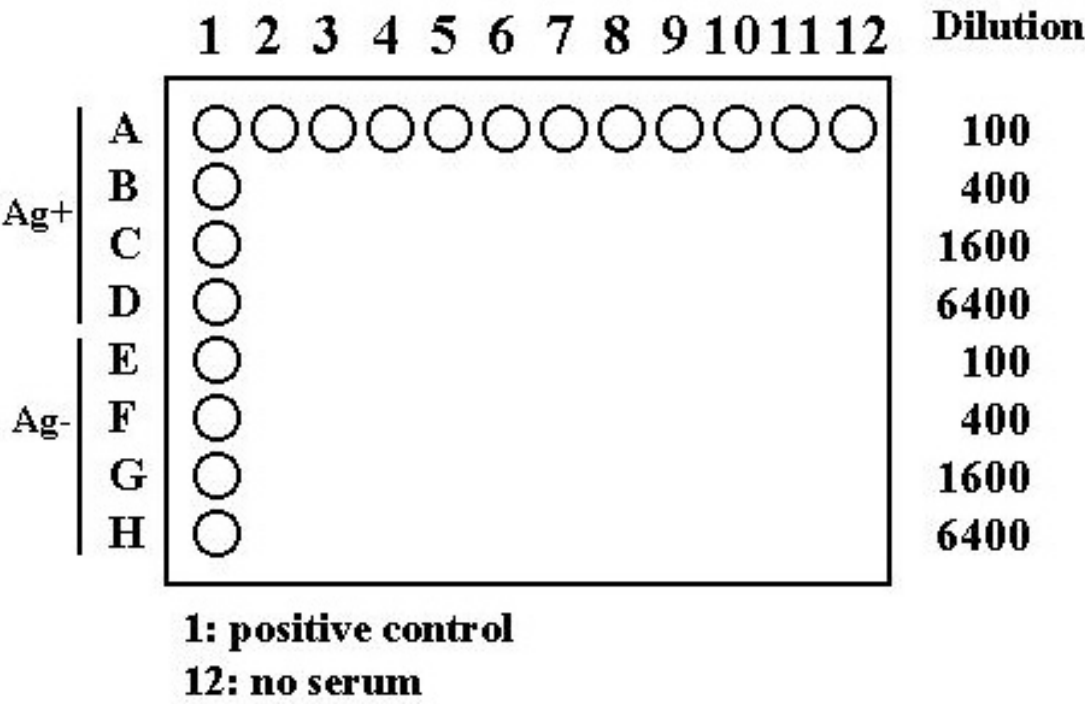
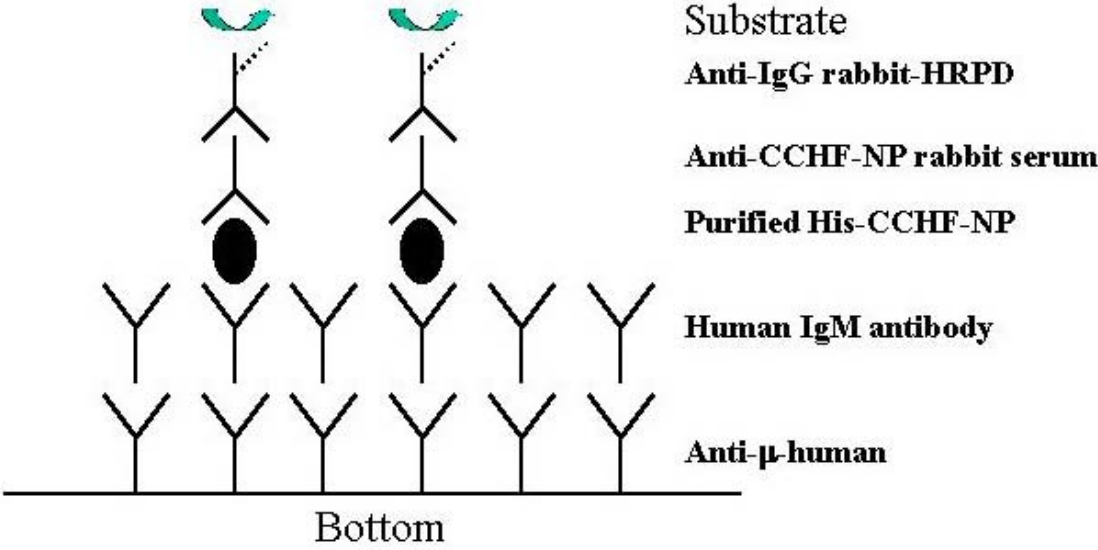
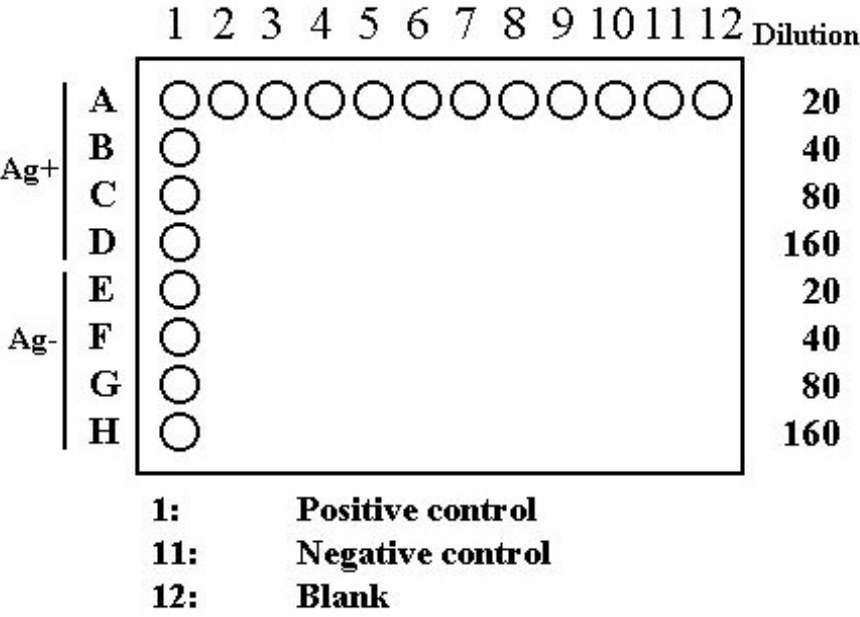


図 3. IgM-capture ELISA の原理(a)と ELISA プレートの各ウェルにおける被験血清の希釈倍率, 加えられる抗原および陽性・陰性コントロール血清の位置の説明(b).

(a)



(b)



ペ ス ト

ペストの病原体検査

ペストの病原体検査・診断マニュアル

目次

- I. ペスト菌によって起こる疾患の概説
- II. 検査材料の採取・輸送
 - 1. 検査材料の採取に関する一般的な注意
 - 2. 検査材料の採取
 - 1) 肺ペストが疑われた場合
 - (A) 喀痰の採取
 - (B) 血液の採取
 - 2) 腺ペストが疑われた場合
 - (A) リンパ節吸引液や膿瘍の採取
 - (B) 血液の採取
 - 3) 敗血症型ペストが疑われた場合
 - (A) 血液の採取
 - 3. 検査材料の包装と輸送
- III. 検査の進め方
 - 1. 検査材料の取り扱いに関する一般的な注意
 - 2. 検査手順
- IV. 検査の判定
 - 1. 疑似
 - 2. 確定
- V. 検査方法
 - 1. 病原体の分離
 - 1) 菌の形態学的検査
 - (A) 塗抹・固定法
 - (B) グラム染色・単染色法
 - 2) 菌の分離および増殖性の特徴
 - (A) 平板培養における特徴
 - (B) 液体培養増殖形態の特徴
 - 2. 抗原検出
 - 1) 蛍光抗体法
 - (A) 蛍光抗体の作製法（直接法）
 - (B) 蛍光抗体による菌のラベル
 - (C) 蛍光顕微鏡判定
 - 2) スライド凝集試験法
 - 3. 抗体検出
 - 1) 血球凝集試験法
 - 2) 定量凝集試験法
 - 3) ELISA 試験法
 - 4) ウェスタンブロット試験法

4. PCR 法を用いた迅速診断

5. 生化学的性状検査

1) 一次確認培養試験

- (A) ブドウ糖、乳糖、白糖発酵試験
- (B) 運動性・インドール・リジン脱炭酸試験
- (C) VP・MR 反応試験
- (D) 尿素分解試験

2) 二次確認培養試験

- (A) 白糖、メリビオース、ラムノース試験
- (B) 市販のキット

3) 毒力因子同定試験

- (A) Fraction 1 同定試験 (*cafI*)
- (B) VW 抗原の同定試験 (*VW*)
- (C) Pesticin 1 同定試験 (*pstI*)
- (D) 色素吸着能をもつ表在抗原の同定 (*pgm*)

4) 鑑別試験

- (A) *Yersinia pestis* と *Yersinia pseudotuberculosis* との鑑別
- (B) *Yersinia pestis* と *Yersinia enterocolitica* との鑑別
- (C) *Yersinia pestis* と *Burkholderia pseudomallei* との鑑別
- (D) *Yersinia pestis* と *Francisella tularensis* との鑑別
- (E) *Yersinia pestis* と *Pasteurella multocida* との鑑別

6. ファージ感受性試験

VI. 参考文献

VII. 付録

1. ペスト菌のマルチプレックス PCR 法
2. ペスト菌の生化学的性状の特徴
3. ペスト菌とペストと誤診される菌との鑑別点
4. ペスト菌の写真

写真 1. ペスト菌のギムザ染色

写真 2. ペスト菌の集落

写真 3. マルチプレックス PCR 法によるペスト菌の検出

写真 4. ウエスタンブロット法によるペストの診断

5. 治療の参考 (抗菌薬)

6. 予防の参考 (抗菌薬・ワクチン : WHO および CDC 提唱)

I. ペスト菌によって起こる疾患の概説

ペストは腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌の *Yersinia pestis* に起因する全身性疾患で病型は感染経路や臨床症状によって腺ペスト、敗血症型ペスト、肺ペストに分けられる。

人ペストの 80～90% を占める腺ペストおよび約 10% を占める敗血症型ペストは、ペスト菌保有ノミを介して（78%）、ペスト感染動物の体液を介して（20%）経皮感染する。腺ペストの臨床症状は特に鼠径部、腋窩、頸部のリンパ節の膿瘍や腫脹（クルミ大もしくはアヒルの卵大）が特徴である。通例 2～7 日の潜伏期の後、40℃前後の突然の発熱に見舞われ、頭痛、悪寒、倦怠感、不快感、食欲不振、嘔吐、筋肉痛、疲労衰弱や精神混濁等の強い全身性の症状が現れる。通例、発症後 3～4 日経過後敗血症を起こし、その後 2～3 日以内に死亡する。敗血症型ペストの臨床症状は局所リンパ腺炎は起こらず、敗血症を主症状とするもので、通例 2～7 日の潜伏期の後、40℃前後の突然の発熱、急激なショック症状や DIC（昏睡および、皮膚のあちこちに出血斑、手足の壊死、紫斑等）が現れ、通例発病後 2～3 日以内に全身が黒色となり死亡する。人ペストの約 2% を占める肺ペストはペスト菌エーロゾルを介して、人から人への急速な伝播が起こる。臨床症状は潜伏期間は通例 1～3 日であるが、最短 12～15 時間という報告例もある。強烈な頭痛、嘔吐、39～41℃の発熱、急激な呼吸困難、鮮紅色の泡立った血痰を伴う重篤な肺炎像を示し、発病後 12 時間～24 時間（発病後 5 時間という例も記載されている）で死亡する。

ペストと誤診される感染症の中で、腺ペストと類似した感染症には連鎖球菌性リンパ節炎、ブドウ球菌性リンパ節炎、伝染性単核球症、猫ひっかき病、リンパ性フィラリア症、発疹チフス、野兎病が、肺ペストと類似した感染症には肺炎双球菌、連鎖球菌、ヘモフィルスインフルエンザ、炭疽菌、トラレミア、レジオネラ、レプトスピラ属菌、ハンターウイルス、インフルエンザウイルスによる重症性市中肺炎が、敗血症型ペストは敗血症症候群、グラム陰性菌敗血症があるので鑑別診断には注意を払う必要がある。

ペストの治療には抗菌薬が大変有効で、日本で認可されている抗菌薬にはスパロフラキシンとストレプトマイシンがある⁷⁾（付録-5. 参照）。

ペストは現在、危険なペスト菌常在地域（アフリカ、特に、南東部の密林地帯、中国の雲南地方・蒙古地方・ヒマラヤ山脈周辺のアジア地域、北米南西部ロッキー山脈周辺、南米北西部アンデス山脈周辺等）の齧歯類、特にネズミ科やリス科の動物間で、ノミを介して常に流行を繰り返している。従って、ペストの流行はノミの繁殖する季節（湿度 60% 以上で温度 20℃ から 26℃）と一致する。人間に対して、感染能力が強いノミはケオピス、セラトフィルス、ノソフィルス等での家住性ネズミに寄生するノミである。その中でもケオピスは貪食で頻繁に吸血し、本来の宿主と異なる人間を好んで吸血するため、人ペスト流行上重要な役割をしている。

日本では 1926 年以降 75 年間、人ペストの発生がなかったり、死亡した野生のネズミからペスト菌が検出されていないため、ペストは根絶されたと考えられている。しかし、安心ばかりしてられない状況、例えば、危険なペスト菌常在地域の開発・文明化に伴い、世界のペスト患者は 1990 年代の始まりから増加し、現在 5000 人以上の患者が発生していること、また日本へのペスト菌常在地域からの資材や食物、ペット等の輸入も増えてきていること、加えて、最近、オウム真理教やアメリカの炭疽事件を始めとする、国際的なバイオテロ犯罪が起こっていること等ペストが日本へ輸入される可能性が全くないとは言い切れない状況が新たに生まれている。

II. 検査材料の採取および輸送¹⁾

1. 検体の採取に関する一般的な注意

検体の採取のために患者に接触するときは、マスク、ゴム手袋、眼鏡および予防衣を必ず着用し、感染防止上の注意を怠ってはならない。ペスト菌は増殖が遅いため、正確な診断をするためには雑菌の増殖をできるだけ最小限にする必要がある。採取した検体を直ちに検査するのが理想的であるが、できない場合は検体をドライアイスや保冷剤を入れて輸送することが大切である^{2,3)}。

2. 検査材料の採取

ペストの臨床症状が現れ、且つ、ペスト流行地への渡航歴やノミによる咬傷がある場合や、バイオテロに襲われた可能性がある場合等、ペストを疑われた場合は、直ちに特定感染症指定医療機関や第1種感染症指定医療機関の感染症病棟に隔離させ、実験室診断のための検査用材料（血液、リンパ節、痰等）を採取後、直ちに、抗菌剤等による治療を開始する（緊急の場合には治療を優先させ、治療前後の抗体価で診断する）。肺ペストが疑われる場合は更に胸部レントゲンも撮る。

1) 肺ペストが疑われた場合

(A) 喀痰の採取

滅菌生理食塩液で口腔および喉をよくすすいで喀出させた痰を直接滅菌シャーレに採取し、肉眼で痰であることを確認後密封する。痰が採取できない場合は咽頭に付着している粘液部を綿棒又はトランスワブで拭い、これを滅菌シャーレに入れて密封する。雑菌が過剰の場合はペスト菌の集落を見逃すおそれがあるので、喀痰の検査にはまず均質化した喀痰の品質管理を行う必要がある。塗抹染色標本の弱拡大で、10 視野以上の鏡検で、1 視野あたり白血球数 10 個以上、扁平上皮細胞 10 個以下のものを検体として採用するのが望ましい。これに合致しないものは喀痰というよりも唾液なので、検体としての意義が少なく、再度の採取を依頼する必要がある。検体はストマッカー又はスプタゾール (Oxoid) で均一化すると良い。

(B) 血液の採取

感染初期は血中への菌の出現は間歇的なので、採血回数が少ないと菌を検出できないことがある。45 分間隔で 3 回採取するのが理想的である。血液は 約 15 ml ずつ採取し、速やかに、菌の検出のため、2.5 ml ずつ血液培養ボトル及び普通ブイヨンボトルに接種し、密封する。更に、血清診断用の検体として、血液 5 ml をセラムチューブに入れ、密封する。

2) 腺ペストが疑われた場合

(A) リンパ節吸引液や膿瘍の採取

腺ペストの初期患者ではリンパ節の化膿や壊死はまれであるので、疼痛のある部位のリンパ節を選ぶ。18～22 ゲージ針付き注射器でまず 1～2 ml の滅菌生理食塩液を、局所麻酔した皮膚を通してリンパ節に注入したのち、強く吸引して採取

した液を滅菌試験管に移す。次に、再度注射器に少量の滅菌生理食塩水を吸引して注射筒内を洗浄し、さきの吸引液に追加し、密封する。

(B) 血液の採取

肺ペストが疑われた場合と同様に行う。

3) 敗血症型ペストが疑われた場合

(A) 血液の採取

肺ペストが疑われた場合と同様に行う。

3. 検査材料の包装と輸送

密封した検体は、吸収紙の入ったビニール袋等に入れ、密封させ、更に二次容器の輸送用パックに入れて、ドライアイスや保冷剤をいれ、それを更にコンテナ（防疫用）を用いて、速やかに検査できる機関（地方衛研等）に直接担当者が届け、検査を依頼する。必ず検体送付用紙および調査票（症状、疑わしき理由、旅行経路、遭遇状況、症状出現の日時、場所など）を添付する。

III. 検査の進め方

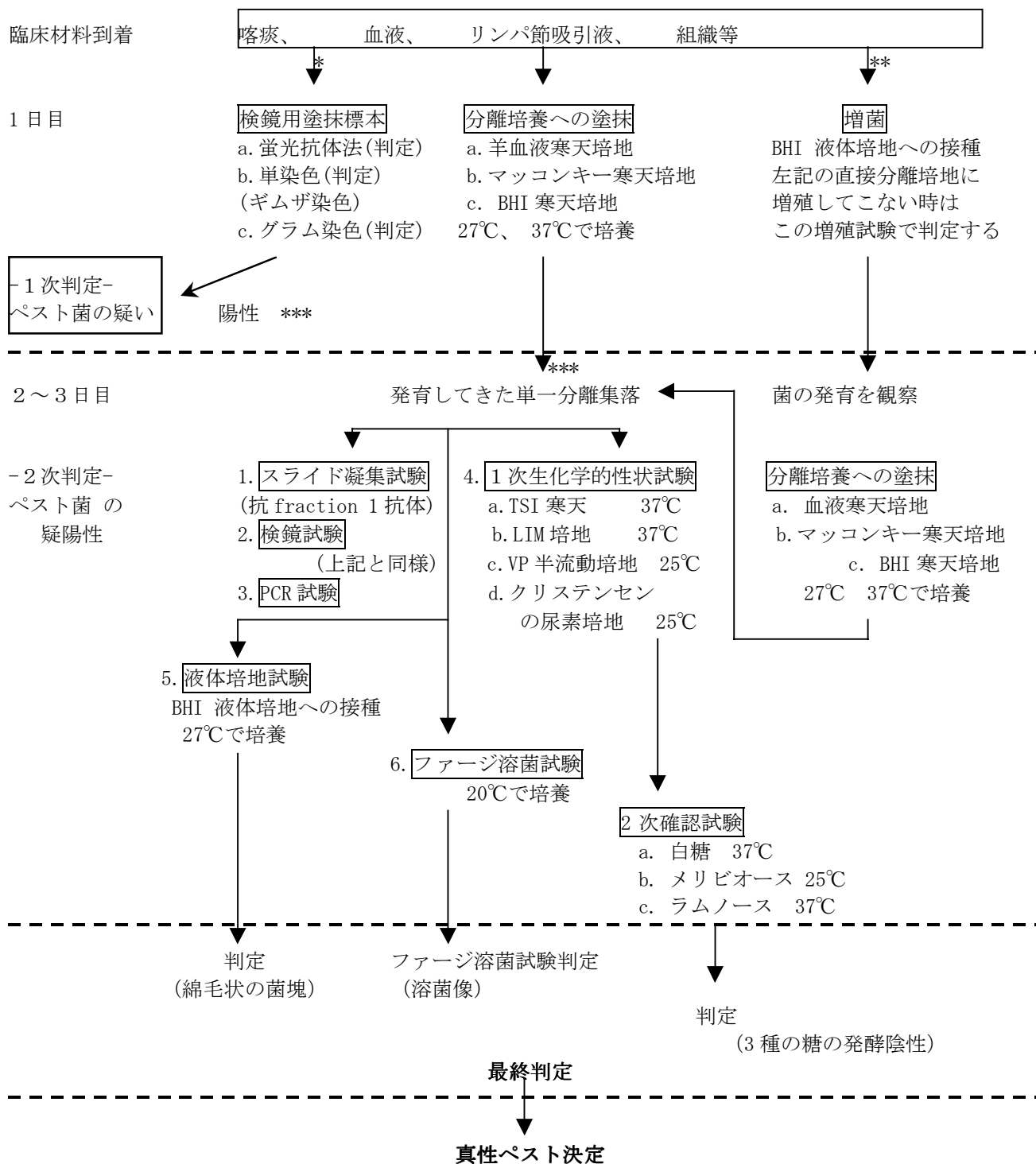
1. 検査材料の取り扱いに関する一般的な注意

臨床検査材料の検査を行う検査室は生物学的安全基準(BSL 2)の条件を満たしていなければならない。分離した菌を増殖させるには BSL3 の施設で行う。検体はセーフティーキャビネット内でマスク、ゴム手袋、予防衣を必ず着用し、感染防止上の注意をはらって操作する。ペスト菌は消毒薬に比較的弱いので、操作中は 75%エタノールを使用する。操作後、使用した器具及び身に付けていたものはできるだけ 121℃で 15 分で高圧滅菌し、高圧滅菌できないものは 1,000ppm 次亜塩素酸ナトリウムや 5%フェノール等の消毒薬に浸けたり、機械等は 75%エタノール噴霧消毒、1,000ppm 次亜塩素酸ナトリウムの拭き消毒をする^{2,3)}。

2. 検査手順

2 次感染を防ぐための適切な防疫対策を講じるために、また隔離された患者の人権を守ると言う観点から出来るだけ早く正確な診断結果を出さなければならない。検査の概略を以下に示したが菌の発育状態によって多少判定日が遅くなる。

図 1. ペスト菌検査のフローチャート



* 臨床材料中に含まれる菌量により、分離培地上で増殖してくる集落の数が異なる。単一の分離菌が得られるように原液材料および希釈した材料を何枚かのプレートに播いておくのが良い。

** 増菌培養は、直接分離培養で菌が分離されない場合の予備であり、患者材料が適切に採取されていればそこからは、一般的には分離培養で菌が発育してくる。27℃で3～5日間増殖の様子を見ながら増菌培養する。

*** 3日目以降に集落が観察された場合はその時点で、検鏡試験、スライド凝集試験、マルチプレックスPCR試験、生化学的性状試験、ファージ溶菌試験、ウエスタンブロット試験等を行い、総合的に真性ペスト判定を行う。もし、10日経過しても集落が観察されない時は検査を打ち切る。

Ⅳ．検査の判定^{1, 2, 3, 4, 5)}

1. 疑似

- 1) ペスト流行地への渡航歴やバイオテロに巻き込まれた可能性がある場合で、臨床的特徴と合致する症状を示し、更に、臨床材料から両端染色性を示すグラム陰性桿菌で、Fraction 1 抗原に対する蛍光抗体に対しても陽性を示す菌が検出された場合。
- 2) ペスト菌に特異的なプライマーを用いた PCR 法で、ペスト菌に特異的なバンドが検出される菌が臨床材料から分離された場合。
- 3) 患者血清中の抗 Fraction 1 抗体価が passive haemagglutination test で 16 倍以上を示した場合（但、前にワクチンを接種したり、ペストに感染したことがない場合）。



1)、2)、3) の内 1 つでも該当する項目がある場合は疑似患者と見なす。

2. 確定

- 1) 臨床材料から分離した菌がペスト菌と同定された時：

- ①顕微鏡所見で明らかな両端染色像を示すグラム陰性桿菌
- ②莢膜抗原に対する抗体や蛍光抗体に陽性
- ③ペスト菌に特異的なプライマーを用いた PCR 法で陽性
- ④ペスト菌特異ファージに対して感受性
- ⑤生化学的性状（ペスト菌の毒力因子の検査も含む）がペスト菌の性状と一致

等から総合的に判断し、ペスト菌 (*Yersinia pestis*) と同定された場合。

- 2) ペア血清を用いての血清診断：

診断用抗原 (Fraction 1) に対する回復期の血清の抗体価が、感染初期の血清の抗体価の 4 倍以上上昇している場合。



1)、2) の内 1 つでも該当すれば確定患者と見なす。

V. 検査方法^{1, 2, 3, 4, 5)}

1. 病原体の分離

1) 菌の形態学的検査

(A) 塗抹・固定法

血液、リンパ節吸引液、喀痰等の各検体や培養菌について3枚以上の塗抹標本を作製する。スライドガラスに検体を薄く均一に塗布し、空气中で自然に乾燥させる。グラム染色用と、ギムザ染色又は wayson 染色用はメタノールで約10分間固定する。蛍光抗体用はアセトンで約10分間固定する。蛍光抗体用のスライドガラスは必ず無蛍光のものを使う。尚、火炎固定法は、メタノール固定法より染色像のコントラストが悪いこと、また必ずしも全部の菌を殺すことができないので、ペスト菌の固定法としては勧められない。

(B) グラム染色・単染色法

a) グラム染色

最初クリスタルバイオレット（ゲンチアナバイオレット）でペプチドグリカンを染めた後、イオジンで色止めし、アセトン・エチルアルコールで脱色する。グラム陰性菌はペプチドグリカン層が薄い、又は全く持たないので、容易に脱色されるので、次にサフラニンを加えるとピンク色に染まる。グラム陽性菌はペプチドグリカン層が厚いので、クリスタルバイオレットが抜けないので紫色に染まる。Quality control としてグラム陰性菌(*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*)やグラム陽性菌(*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*)を置く。

試薬

メタノール

グラム染色キット

材料

滅菌エーゼ

滅菌蒸留水

滅菌チップおよびマイクロピペット

顕微鏡用スライドガラス

染色用ラック

顕微鏡および油浸レンズ

b) 単染色

Wayson 染色液の場合は室温で5～10秒間、Giemza 染色液の場合は約60分間、37℃の孵卵器内で反応させて染色する。染色を終えたすべてのスライドガラスは充分に水洗し、濾紙で軽く押さえ、自然乾燥後、検鏡する。Quality control として両端染色像を示す菌 (*Yersinia* 属, *Pasteurella* 属, *Escherichia coli*) や示さない菌 (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) を置く。

試薬

メタノール

Giemza 染色液：蒸留水（ミリQ）で 100～200 倍に希釈した液

Wayson 染色液

<作製法>

A 液：塩基性フクシン 0.2 g とメチレンブルー 0.75 g に 95% エタノール 20 ml を加え、良く混ぜた後 Watman No. 1 濾紙を使って不溶物を濾した液

B 液 フェノール 5 ml を 95 ml の蒸留緩水で薄めた 5%フェノール液

A 液 B 液を混ぜ、褐色瓶にいれて室温で保存する。

材料

(B) a) と同じ

c) 顕微鏡判定

顕微鏡は油浸系対物レンズを用いて、1000 倍以上で観察する。ペスト菌はグラム陰性の多形形態を示すが、組織内および培養菌等の新鮮な菌では、約 $1.5\mu \times 0.7\mu$ m の両端の丸い楕円形の短桿菌で、単染色法では、ペスト菌は特徴ある明瞭な両端染色菌像（両端部分が濃く、中央部が脱けたように淡く染まる）を示す【V Ⅱ. 付録 - 4. - 1】 写真 1】。但し、両端染色菌像は *Yersinia* spp., *Pasteurella* spp., *Escherichia coli* にも観察されることから、ペスト菌 のみに特異的なものではない。しかし、ペストを疑われる患者から両端染色菌像が認められれば、診断上の大きな手がかりになるため意義はきわめて大きい。又、ペスト患者の場合は血液 1μ l 当たり 1.2 万～2.5 万の白血球（主に成熟型の好中球）が見られるのが特徴的で、時には白血病様反応も示す場合もある。

(C) 蛍光抗体法

a) 蛍光抗体の作製法（直接法）

抗 Fraction 1 抗体から γ -グロブリンを分離し、これに Fluorecein isothiocyanate (FITC) もしくは Alexa Fluor 488 (AF) を結合させた後、セファデックス G25 カラムを通して結合しなかった蛍光色素を除く。次に DEAE セルロースカラムを通して蛍光抗体を集め、使用するまで -20°C で保存しておく。凍結融解は行わないこと。

b) 蛍光抗体による菌のラベリング

アセトンで固定したスライドガラスに蛍光標識抗体をのせ、液が乾かないように密閉箱の中に入れ、 37°C で 60 分反応させる。次に、PBS を満たしたバットに標識スライドガラスを置き、更に 2 分, 6 分, 10 分毎に PBS 液を取り換えて、洗浄する。自然乾燥後、 10μ l のグリセリン緩衝液をスライドガラスの真中に置き、その上にカバーガラスをのせて蛍光顕微鏡で観察する。quality control として、クロス反応を持つ可能性がある *Y. pseudotuberculosis* と negative control 菌の *E. coli* を置く。

試薬

アセトン

抗 Fraction 1 抗体

Fluorecein isothiocyanate (FITC) もしくは Alexa Fluor 488 (AF) kit、10%グリセリン緩衝液 (pH7.5)

材料

(2) a)と同じ但、スライドガラスは無蛍光のもの

c) 蛍光顕微鏡判定

生体内のペスト菌（血液、リンパ腺吸引液、喀痰等）は、蛍光標識した Fraction 1 特異抗体と反応して黄緑蛍光色に見える。培養菌での検査は誤診を避けるため、必ず Fraction 1 の産生量が多い 36～37℃で培養した菌を用いる。27℃以下で培養した菌は Fraction 1 が全く産生されないので、ペスト菌であっても黄緑蛍光色は観察されない。

2) 菌の分離および増殖性の特徴

(A) 平板培養における特徴

a) 培地

Y. pestis の分離には通常ヒツジ血液寒天培地、又は Brain Heart Infusion (BHI) 寒天培地とマッコンキー 寒天培地を用いるが、顕微鏡観察の結果、菌が少ない場合は増菌のために BHI 液体培地も併用する。いずれの培地もペスト菌の至適発育のため pH は 7.2～7.6 にする。

quality control としてグラム陽性菌 (*S. aureus* 等) とグラム陰性菌で両端染色像を示す菌 (*Y. pseudotuberculosis* または *E. coli* 等) を置く。

材料

滅菌エーゼ

ヒツジ血液寒天培地

BHI 寒天培地

マッコンキー 寒天培地 (腸内細菌分離用培地)

b) 培養温度

ペスト菌は 1～45℃ で発育する。発育には 28～30℃位が最適だが、ペスト菌の特徴ある形態学的性質（エンベロープの産生性）を見る場合は 36～37℃が適している。従って、培養温度は 27～28℃と 36～37℃培養を併用する。

c) 集落の特徴

ペスト菌は栄養要求のきびしい菌ではないが、その発育は他の一般的な菌よりも遅く、血液寒天培地でさえも 24 時間培養での集落は透明で針の先ほどの大きさであるため、肉眼での発見は困難であることが多い。発育が明らかに認められるのは 培養後 48 時間以降である。

血液寒天培地

37℃、48 時間培養で、ペスト菌 は大きさ 1～1.5 mm になり、48～72 時間培養すると、灰色ないし灰白色のやや粘稠性を帯びた集落を形成し、個々の集落を実体顕微鏡で 4 倍に拡大して観察すると、やや持ち上がった中心部と辺縁が分葉形で波状のハンマーで潰した銅貨や目玉焼きのように見える【ⅤⅡ. 付録－4.－2】図 2】。集落の粘稠性はエンベロープに関係し、37℃培養の時エンベロープの産生量が一番多いとされている。集落を拾い上げると糸を引くようになるのが特徴である。また溶血は見られない。

マッコンキー寒天培地

Yersinia 属菌は乳糖を発酵しないので、27℃、48 時間培養では大腸菌の半分以下の直径 1～2mm 前後の半透明、灰白色の集落を形成する。*Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* は扁平でスムーズな集落を形成するのに対して、*Y. pestis* は目玉焼きのような集落を形成する。尚、集落形態や分離菌の顕微鏡による形態学的特徴やペストに特異的な抗体を用いたスライド凝集試験からペスト菌を疑う場合は、分離菌に対して PCR 法、液体培養試験、ファージ感受性試験、生化学的性状試験等を行う。

(B) 液体培養増殖形態の特徴

ペスト菌 は初期培養で少し混濁する場合もあるが、24 時間以上培養すると、綿毛様の菌塊として発育し、培地を混濁して発育することはない。綿毛様の菌塊は多くの場合あたかも鍾乳石のように試験管の一方の壁に付着し、試験管を振れば管底に沈殿する。綿毛様の菌塊発育は、時には *Y. pseudotuberculosis* や *Streptococcus pneumoniae* でも見えることもある (*Y. enterocolitica* は必ず濁る)。また、長期に植え継いでいる *Y. pestis* は綿毛様の菌塊発育を示さないこともあるので気をつけなければいけない。液体培地での培養菌の形態は寒天培養菌のそれとはやや異なり、後者よりも長く、かつ幅広く、4～16 個又はそれ以上の細胞が連鎖し、個々に離れて見られることはむしろまれである。長期間 (4 日以上) 培養を続けると、細胞の多形化が見られるとともに、自家融解がおこる。quality control として *Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* を置く。

材料

滅菌エーゼ

BHI 液体培地

2. 抗原検出

1) 蛍光抗体法

(5) 検査方法-1. 病原体の分離-1) 菌の形態学的検査-(C) 蛍光抗体法にすでに記述

2) スライド凝集試験法

ペスト診断用抗体もしくは、抗ペスト菌全血清 (*Y. pseudotuberculosis* が全く凝集しなくなるまで希釈した抗体) を更にペスト菌と抗体が凝集する範囲で適宜に希釈し

てからスライド凝集反応を行う。抗体を希釈する液は 0.425%食塩水（ペスト菌はラフ型なので 0.85%生理食塩水では自然凝集を起こす可能性がある）を使う。尚、同様の理由から抗体の対照として置く液も 0.425%食塩水を用いる。常に対照では凝集しないことを確かめてから行う。

3. 抗体検出

1) 血球凝集試験法⁸⁾

WHO で標準化されている方法（抗原および抗原感作血球の作製方法、血球凝集反応および血球凝集阻止反応のやり方、判定基準等）で試験を行なう。

抗原：

タンニン酸で処理した 2.5%血球浮遊液と 25～50mg/ml の濃度に調整した Fraction 1 抗原を等量混ぜ、室温で 15 分間振盪後 1,500rpm で 3 分間遠心して血球分画を集める。抗原液は血球で換算した場合 0.5%になるように調節する。患者ペア血清を用いた血球凝集反応試験で、4 倍以上凝集価に差があった場合はペストの可能性があるので、更に、血球凝集阻止反応試験を行い決定する。ペア血清が無い場合の判定は WHO の基準に従い、血球凝集価が 16 倍以上の場合は陽性、8 倍の場合は疑陽性とする。

試薬

タンニン酸

材料

羊血液

精製 Fraction 1

生理食塩水

マイクロタイタープレート

プラスチックテープ

マイクロタイターミラー

2) 定量凝集試験法

マイクロタイター上で患者血清を 2 倍段階希釈した後、60℃で 30 分間加熱処理した菌（37℃で 48 時間培養した菌を 1mg/ml になるように調整した懸濁液）を等量加えて、良く混合後 37℃で 2 時間反応させてから一次判定する。冷蔵庫で一夜静置後二次判定して血清の凝集価を決める。

quality control として、positive control に *Y. pestis* を negative control に *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* を置く。

試薬

0.425%食塩水

材料

37℃培養菌

マイクロタイター用 V プレート

3) ELISA 試験法 (9)

WHO で奨励している Cavanaugh, D. D. 等の方法に準じて行う。実際使用するのは ELISAmate キット (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) を用いてメーカーのプロトコルに基づいて行う。患者ペア血清を用いて 4 倍以上凝集価に差があった場合はペストの可能性があるので、更に、ELISA 阻止試験を行って判定する。患者ペア血清がない場合は 32 倍以上を陽性とする。

試薬

ELISAmate キット
Fraction 1 抗原

4) ウェスタンブロット試験法

1000 μg /ml に調整した診断用抗原 (Fraction 1) をウェル当たり 10 μl アプライし SDS-PAGE を行う。更に、PVDF メンブレンに転写後、患者血清を用いてウェスタンブロットを行う。*Y. pestis* のみに検出される 15kDa~18kDa の Fraction 1 のバンドが検出されればペストの可能性が高い【ⅤⅡ. 付録一 4. 一 4) 写真 4】。ペストと疑わしき患者は、直ちに抗菌剤の投与を受けているため、患者の検体からの菌の分離は難しく、又、抗体価が低い場合ペストであっても陽性判定ができない場合があるので、高感度で特異性の高いウェスタンブロット解析は、血清診断のために非常に有効である。

試薬

SDS-PAGE 用試薬一式
ウェスタンブロット用試薬一式 (判定は ECL 試薬を用いる)

材料

SDS-PAGE 用ゲル
SDS-PAGE 用、ウェスタンブロット用装置一式
フィルム
自動現像機

4. PCR 法を用いた迅速診断¹⁰⁾

安全且つ容易なマルチプレックス PCR 法はペストの迅速遺伝子診断法として優れている。プライマーはペスト菌の莢膜抗原遺伝子 (*caf1*)、プラスミノーゲン活性化遺伝子 (*pla*)、侵入性遺伝子 (*inv*) のペスト菌と仮性結核菌に共通で *Y. enterocolitica* には無い領域から 3 種のプライマーを作製した。テンプレートは加熱死菌 (蒸留水に菌を少し濁る程度に懸濁後、100℃で 10 分間沸騰させた菌) を用いた。PCR 条件は熱変性は 94℃で 30 秒、アニーリングは 55℃で 60 秒、伸長反応は 72℃で 90 秒のサイクルで 25 回行い、更に最終延長を 72℃で 10 分行った後冷蔵保存する。検出方法は PCR 産物を TBE 緩衝液を用いて、1.5 % のアガロースゲルで 50V、70 分間電気泳動後、ゲルを 0.5 μg /ml のエチジウムブロマ이드で染色 (20 分) する。更に、蒸留水で 3 回 (15 分くらい) 洗浄して過剰なエチジウムブロマイドを除く。UV で PCR 産物の解析を行うために写真を撮る。ペスト菌の場合は各々 171bp (*caf1*)、295bp (*inv*)、480bp (*pla*) の DNA 増幅バンドが検出され、仮性結核菌の場合は 295bp DNA 増幅バンドが検出される。その他の腸内細菌科の *Salmonella*、*Shigella*、*Escherichia* や腺ペストと類似した症状を持つ *Francisella tularensis* 等からはいずれのバンドも検出されない。

quality control として positive control に *Y. pestis*, negative control に *Y. enterocolitica*, *E. coli* 等を置く【ⅤⅡ. 付録 1. ペストのマルチプレックス PCR 法と, 7】付録 4. ー 3】写真 3】参考。

5. 生化学的性状検査

ペスト菌は前に記したように *Yersinia* 属の仮性結核菌 (*Y. pseudotuberculosis* serovar 0:1b) から進化した菌ではあるが、消化管を経る感染形態をとらなくなってから、腸管生活環境で必要だった遺伝子は不活化され、新たにノミの中で生きていくために必要な遺伝子を獲得したため、ペスト菌の生化学的性状も仮性結核菌とかなり異なる。仮性結核菌は 25℃ で運動性のあること、ウレアーゼ陽性、ラムノースおよびアドニトールを発酵するなどの点でペスト菌と鑑別できる。ペスト菌の主な生化学的性状を(7)付録 2. ペスト菌の生化学的性状の特徴(1)(2)に示した。ペスト菌は発育が遅いため、テストの観察時間を他の菌よりもやや延長する必要がある。ペスト菌の特色は生化学性状が陰性の場合が多い。菌が抗生剤や宿主の防御因子によって痛めつけられた等の場合は菌の発育が遅くなるので、本来、生化学的性状が陽性の菌でも、陰性を示す場合がしばしばあるので、ペスト菌でないのに、ペスト菌と誤って判定する場合があるので気をつけなければならない。

材料

滅菌エーゼ

TSI 培地

LIM 培地

VP・MR 培地

クリステンセン尿素培地

1) 一次確認培養試験

(A) ブドウ糖、乳糖、白糖発酵試験

TSI 培地で 37℃ で 48 時間培養し、判定する。ブドウ糖を発酵し、酸を産生するがガスは産生しない。乳糖、白糖も発酵せず、硫化水素も産生しない。従って、TSI 寒天培地の高層部は黄色で、気泡、亀裂、黒色は認められない。

(B) 運動性・インドール・リジン脱炭酸試験

LIM 培地に穿刺培養し、25℃ と 37℃ で 72 時間培養する。運動性とリジン脱炭酸試験を行った後、Kovac のインドール試薬を加えて判定する。運動性は培地全体に菌の発育が見られる場合は陽性とする。リジン脱炭酸試験は培地の色が対象に比べて明確な紫色を呈した場合は陽性とする。インドールは試薬滴下後、赤色を呈したものを陽性とする。ペスト菌はいずれも陰性である。

(C) VP・MR 反応試験

VP・MR 用培地 2 本に菌を接種後、25℃ で 48 時間培養する。1 本に VP 試薬を加えて良く振り、27℃ で 2 時間置いて赤くなったものは陽性、ペストは陰性である。もう一本に MR 試薬を 5～6 滴加えて振り、赤色になると陽性、ペストは陽性である。

(D) 尿素分解試験

クリステンセンの尿素培地に接種後、25℃で 72 時間培養し、赤変したら陽性とする。ペスト菌は陰性である。

2) 二次確認培養試験

一次確認培養で *Y. pestis* の性状に一致したものは二次確認培養を行う。

(A) 白糖、メリビオース、ラムノース試験

フェノールレッドブイヨンにこれらの糖を加えて 37℃で 48 時間培養後判定する。但し、メリビオース試験は 25℃～28℃で 48 時間培養後判定する。赤色から黄色に変化したものを陽性とする。ペスト菌は全て陰性である。

材料

フェノールレッドブイヨン

白糖

メリビオース

ラムノース

(B) 市販の同定キット

数値同定システムにはペスト菌のプロファイルを含むものがあり、それらを同定に使用することもできるが、指定された菌液濃度では十分な反応が得られず、誤同定されるので注意を要する。もし、それらのシステムを用いるときには、数個の集落を浮遊させた通常よりもやや濃度の高い菌液を接種し、培養を 30～36 時間とする。

3) 毒力因子同定試験¹¹⁾

WHO で推奨している M. J. Sugalla の方法に従って、Fraction 1、VW 抗原、Pesticin 1、および色素吸着能をもつ表在抗原の同定を行う。ペスト患者分離株はほとんど 4 種類の毒力因子が陽性であるが、中程度の病状を示したペスト患者分離株から、1～2 種類の毒力因子欠損株が見つっている。尚、他の *Yersinia* 属の病原性を持つ *pseudotuberculosis*、*enterocolitica* も VW 抗原陽性である。

試薬

(A) Fraction 1 同定試験(*caf1*)

8%Blood agar base

抗 Fraction 1 血清

Chloroform

(B) VW 抗原の同定試験(*vw*)

Magnesium oxalate agar (Blood agar base, Na oxalate, glucose)

(C) Pesticin 1 同定試験(*pst*)

Blood agar base

CaCl₂

Ca-EDTA

Glucose

(D) 色素吸着能をもつ表在抗原の同定 (pgm)

Heart Infusion agar

Galactose

Congo-red stain

材料

(A), (B), (C), (D) の同定試験ともにシャーレ

4) 鑑別試験【ⅤⅡ付録ー2.ー1】並びに2】およびー3.を参考】

(A) *Yersinia pestis* と *Yersinia pseudotuberculosis* との鑑別【ⅤⅡ付録ー2.参考】

Y. pseudotuberculosis は運動性陽性、ウレアーゼ陽性、スレオニン・グリシンの生合成陽性、ラムノース発酵陽性、メリビオース発酵陽性、メチオニン生合成陽性、ロイシン・バリン生合成陽性、グルコース-6-リン酸-デヒドロゲナーゼ陽性、アスパルターゼ陽性、ペスチシン1産生能陰性、murine toxin産生能陰性、クロマトフォアーから色素形成能陰性等が *Y. pestis* と異なる性状である。従って、鑑別は比較的簡単である。

(B) *Yersinia pestis* と *Yersinia enterocolitica* との鑑別【ⅤⅡ.付録ー2.参考】

Y. enterocolitica は運動性陽性、ウレアーゼ陽性、ソルビトール発酵陽性、白糖発酵陽性、オルニチンデカルボキシラーゼ陽性、セロビオース発酵陰性、ペスチシン1産生能陰性、murine toxin産生能陰性、クロマトフォアーから色素形成能陰性等が *Y. pestis* と異なる性状である。従って、鑑別は比較的簡単である。

(C) *Yersinia pestis* と *Burkholderia pseudomallei* との鑑別【ⅤⅡ.付録ー3.参考】

ペストの染色菌に特徴とされている両端染色像は *B. pseudomallei* の特徴でもある。*B. pseudomallei* は運動性陽性、キシロールを分解しない、白糖を分解、オキシダーゼ陽性、TSI 高層で増殖しない、メチルレッド反応陰性、アルギニンジヒドロラーゼ陽性が *Y. pestis* と異なる性状である。

(D) *Yersinia pestis* と *Francisella tularensis* との鑑別

F. tularensis は *Y. pestis* と異なり発育にシスチン又はシステインを必要とし、寒天培地やブイヨンで発育しない等から鑑別は比較的簡単である。

(E) *Yersinia pestis* と *Pasteurella multocida* との鑑別【ⅤⅡ.付録ー3.参考】

P. multocida はマッコンキー寒天培地で48時間では発育せず、硫化水素を産生、メチルレッド反応陰性、メチレンブルー還元、インドール陽性等が *Y. pestis* と異なる性状である。従って鑑別は比較的簡単である。

6. ファージ感受性試験

ファージの感受性試験は特異性の点では少し問題を抱えるが迅速という点では優れている。菌接種寒天培地にファージ液を一滴たらし、20℃で18~24時間培養し、溶菌ゾーン形成を観察する。37℃で培養すると *Y. pseudotuberculosis* や他の腸内細菌科の菌でも溶菌するので気をつけなければならない。

quality control として、positive control に *Y. pestis* を negative control に *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* 等を置く。

材料

ファージ液 (松井株 : Ts-32 株)

滅菌エーゼ又は滅菌楊枝

滅菌チップおよびマイクロピペット

BHI 寒天培地

VI. 参考文献

- 1) Prevention of plague. Centrals for Disease Control and Prevention (CDC) MMWR. 45:RR-14:1-11, 1996.
- 2) Plague manual: epidemiology, distribution and control. World Health Organization (WHO). 1-87, 1999.
- 3) Thomas, V., David, T., Donald, A., et.al.: Plague as biological weapon. JAMA. 283:2281-2290, 2000.
- 4) Thomas B.: Plague and other *Yersinia* Infections. Current topics in infectious disease. Series Editors: William B. Greenough III and Thomas C. Merigan. 1-213, Plenum Press, New York, 1983.
- 5) May, C.: Level A Laboratory procedures for identification of *Yersinia pestis*. Laboratory response network of Centrals for Disease Control and Prevention (CDC) Last revised dec. 13, 2001.
- 6) 春日忠善: 日本のペスト流行史. 科学, 24: 687-700, 1977.
- 7) 戸田忠雄: 戸田新細菌学. 506-517, 南山堂, 昭和 26 年.
- 8) World Health Organization Expert Committee on plague, Fourth Report, W.H.O. Tech. Rep. Ser. 447:23-25, 1970.
- 9) Cavanaugh, D. D., Fortier, M.K., D. M., Robinson, Williams, J. E., and Rust, J.H.: Application of the ELISA technique to problems in the serological diagnosis of plague. Bull. PAHO 13:399-402, 1979.
- 10) Tsukano, H., Itoh, K., Suzuki, S., Watanabe, H.: Detection and Identification of *Yersinia pestis* by Polymerase Chain Reaction (PCR) using multiplex primers. Microbiol. Immun. 40: 773-775, 1996.
- 11) Sugalla, M.J., Beesley, E.D., and Ibizio, J.E.: Practical applications of new laboratory methods for plague investigation. Bull. WHO. 42:993-997. 1970.
- 12) Goto, S., Tsuji, A., Murai, T., Nishida, M., Tsukano, H., and Watanabe, H.: In vitro activity of twenty-three antimicrobials against *Yersinia pestis* strains. J. Infect. chemother. 1: 133-134, 1995.
- 13) Goto, S., Tsuji, A., Murai, S., Tsukano, H., and Watanabe, H.: Therapeutic effect of antimicrobial Drugs against experimental infections due to *Yersinia pestis* in mice. J. Infect. chemother. 4: 1-40, 1998.
- 14) Jefferson T. Demicheli V. and Pratt M.: Vaccines for preventing plague. Cochrane Database System Review. CD000976, 2000.
- 15) Meyer, K.F.: Effectiveness of live or killed plague vaccines in man. Bulletin World Health Organization. 43:653-666, 1970.
- 16) plague vaccine, USP, Physician's Desk Reference
- 17) Russell P., Eley S.M., Hibbs S.E., Manchee R.J., Stagg A.J. and Titball R.W.: A comparison of Plague vaccine, USP and EV76 vaccine induced protection against *Yersinia pestis* in a murine model. 13:1551-1556, 1995.
- 18) Richard W. Titball and Williamson E. Diane: Vaccination against bubonic and pneumonic plague. Vaccine. 16:4175-4184, 2001.

V II. 付録

1. ペスト菌のマルチプレックス PCR 法

a) プライマー

gene	product size (bp)		oligonucleotide (5' to 3')	position	localization	GC content	T _m
<i>caf1</i>	171	S	CAGGAACCACTAGCACATC	221-240	60 Md	52.6	58°C
		A	CCCCACAAGGTTCTCAC	391-374	plasmid	61.1	58°C
<i>Inv</i>	295	S	TAAGGGTACTATCGCGGCGGA	2255-2275	chromosome	57.2	66°C
		A	CGTGAAATTAACCGTCACACT	2549-2529		42.8	60°C
<i>pla</i>	480	S	ATCTTACTTTCCGTGAGAAG	971-990	7 Md	40.0	56°C
		A	CTTGGATGTTGAGCTTCCTA	1450-1431	plasmid	45.0	58°C

b) テンプレートの作製

15 分くらいエアレーションした安全キャビネット内で、0.22 μm のミリポアーフィルターを通し、更に 121°C で 15 分間、高圧滅菌したミリ Q 水を、1.5ml のエッペンドルフチューブに 100 μl ずつ適当な数だけ分注する。更に、デイスポーザブルのエーゼで菌を僅かにかき取り、この滅菌蒸留水に入れ、懸濁する（菌量は少し濁る程度）。安全キャビネット内に置いた Multi Heater にこのエッペンドルフチューブのせ、100°C で 10 分間加熱後、すぐ冷やす。

quality control として negative control に *E. coli*、positive control に *Y. pestis*（3 種のプライマーと反応する）、あるいは *Y. pseudotuberculosis*（*inv* プライマーに反応する）を置く。これらのテンプレートは前もって作製し、-20°C で保存しておいて、検査の都度使用する。検体と同じ場所で、同時には調製しない。

c) PCR 反応混合液の作製

精度管理の面から反応混液はまとめて作製し、小分けして -20°C で保存することが望ましい。以下に標準組成を示した。近年通常の Mg^{++} 濃度の異なる Taq polymerase が市販されており、使用酵素の種類によって組成は若干異なる。また、市販されている Taq polymerase は読み違いの頻度や耐熱性由来、ユニット定義が異なっていたり、バンドの濃淡やエクストラバンドの出現性等異なっているので自分の系で最適な条件を確かめてから使用する。

10 検体当たりの組成	(170 μl)
10 \times PCR 緩衝液	50 μl
25mM MgCl_2	30 μl
2.5mM dNTP 混液	30 μl
5 μM <i>pla</i> -S	10 μl
5 μM <i>pla</i> -A	10 μl
5 μM <i>caf</i> -S	10 μl
5 μM <i>caf</i> -A	10 μl
5 μM <i>inv</i> -S	5 μl
5 μM <i>inv</i> -A	5 μl

滅菌蒸留水 10 μ l
 ※良く混合する。

d) PCR ワーキング溶液の作製（試験毎に作製する）

ワーキング溶液の組成

1 検体当たりの組成例	10 検体分
反応混液	17.0 μ l
Taq ポリメラーゼ	0.2 μ l (0.9unit/reaction)
滅菌蒸留水	30.8 μ l
48.0 μ l	480 μ l

良く混合後、検体名, control 名を書いた 0.2 ml のエッペンドルフチューブに 48 μ l ずつ ワーキング溶液を分注する。最後に各検体のテンプレート を 2 μ l ずつ加えてから蓋をする。

更に、-20℃でストックしておいた negative control (*E. coli*) を、更に positive controls (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*) のテンプレートを順に 2 μ l 加えて直ぐ蓋をする。

e) PCR 条件

熱変成	94℃	30 秒	25 サイクル
アニーリング	55℃	60 秒	
伸長	72℃	90 秒	
最終伸長	72℃	10 分	

f) 電気泳動

1.5%アガロースを使用

charge volume: sample; 8 μ l

【sample 10 μ l + loading buffer (5 x) 2 μ l を混合したもの】

marker; 5 μ l

※泳動条件: 50V, 70 分

g) 染色

0.5 μ g/ml ethidium bromide 溶液で 20 分間染色後、蒸留水で 15 分間洗浄

h) 増幅 DNA 断片の解析

UV ライト上にゲルを置いて、ポラロイドカメラで写真を撮り、解析する。

2. ペスト菌の生化学的性状の特徴

(1) ペスト菌 の生化学的性状

運動性： 22℃	－ (0)	L-アラビノース	＋ (100)
35℃	－ (0)	セロビオース	－ (0)
インドール	－ (0)	乳糖	－ (0)
Voges-Proskauer	－ (0)	麦芽糖	d (80)
クエン酸 (Simmons)	－ (0)	メリビオース	d (20)
硫化水素 (TSI)	－ (0)	ラフィノース	－ (0)
*硝酸塩還元	－ (85)	ラムノース	－ (1)
リジン デカルボキシラーゼ	－ (0)	スクロース	－ (0)
アルギニン ジヒドロラーゼ	－ (0)	トレハロース	＋ (100)
オルニチン デカルボキシラーゼ	－ (0)	D-キシロース	＋ (90)
フェニルアラニン デアミナーゼ	－ (0)	アドニトール	－ (0)
ゼラチナーゼ	－ (0)	D-アラビトール	－ (0)
Dnase	－ (0)	ズルシトール	－ (0)
Tween 80 エステラーゼ	－ (0)	グリセロール	d (50)
マロン酸	－ (0)	イノシトール	－ (0)
β-ガラクトシダーゼ	d (50)	マンニトール	＋ (95)
エスクリン 加水分解	d (50)	ソルビトール	d (50)
炭水化物：			
α-メチル- D-グルコシド	－ (0)		
サリシン	d (70)		
粘液酸	－ (0)		
ブドウ糖 酸	＋ (100)		
ガス	－ (0)		

＋：陽性、－：陰性、d：陽性または陰性、括弧内は % を示す。

※ペスト菌は血清型、ファージ型による型別はなく一種類である。

しかし、亜硝酸の形成能、グリセリン分解能を指標として生物型を分類すれば3つの生物型に分けられる。

<ペストの3生物型>

名称	亜硝酸形成	グリセリン分解能	分布地域
orientalis	＋	－	インド、南西アジア、 南米、北米西部
antiqua	＋	＋	東南アジア、中国東北・北部、 ソ連、アフリカ
mediaevalis	－	＋	トルコ、イラン、カスピ海沿岸

(2) Some Phenotypic Differences between Wild-Type *Yersinia pestis* and Other *Yersinia* Species*

	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
Fraction I (envelope) antigen	+	0	0
Pesticin, coagulase, fibrinolysin	+	0	0
Murine toxin	+	0	0
Pigment formation from chromatophore	+	0	0
Aspartase	0		+
Assimilation of low levels of NH ₃	0		+
Cellobiose fermentation	0	+	0
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	0		+
Isoleucine/valine biosynthesis	0		+
Methionine biosynthesis	0		+
Melibiose fermentation	0	0	+
Ornithine decarboxylase	0	+	0
Rhamnose fermentation	0	0	+
Sucrose fermentation	0	+	0
Sorbitol fermentation	0	+	0
Threonine/glycine biosynthesis	0		+
Urease	0	+	+
Motility at 26°C	0	+	+

* Adapted from R. R. Brubaker⁽¹⁾ in *Microbiology—1979*, with permission of author and publisher.

3. ペスト菌とペストと誤診される菌との鑑別点

	<i>Yersinia Pestis</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
運動性			
22°C, 18h	—	+	
オキシダーゼ	—	+	
インドール	—		+
キシロール	+	—	
白糖	—	+	
アルギニンジヒドロラーゼ	—	+	
H ₂ S	—		+
メチルレッド	+	—	—
メチレンブルー還元	—		+
マッコンキー培地	+		—
TSI 高層培地	+	—	

4. ペスト菌の写真

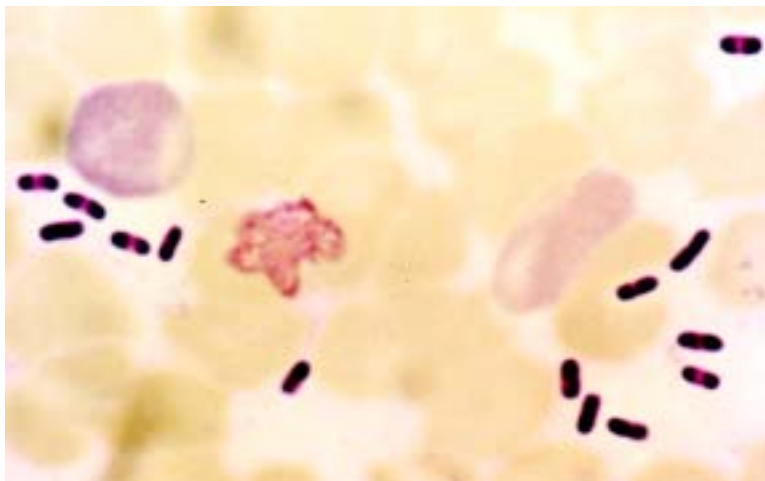


図1. ペスト菌のギムザ染色
ペスト菌のギムザ染色（ペスト菌感染マウスの脾臓スタンプ）
（800 x；安全ピン状の両端染色像が特徴的）

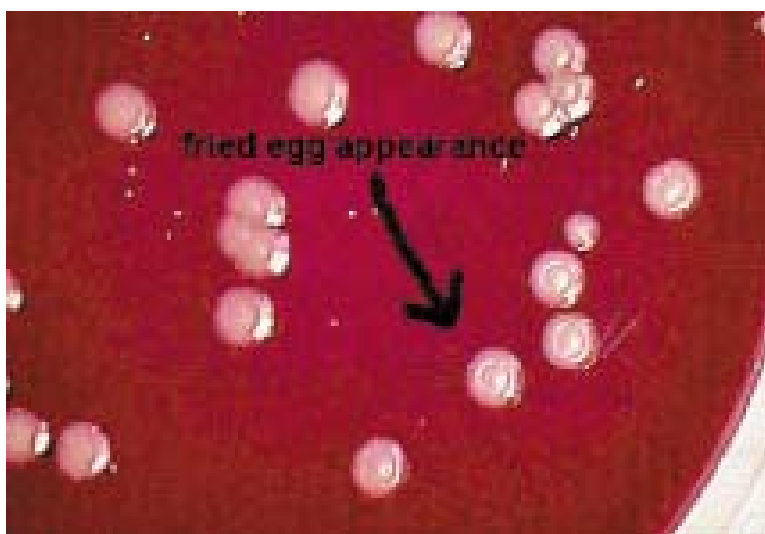


図2. ペスト菌の集落（CDC ホームページ：Plague, Lab & professionals より）
個々の集落はやや持ち上がった中心部と辺縁が分葉形で
波状のハンマーで潰した銅貨のように見える。（4 x）



図3. マルチプレックス PCR 法によるペスト菌の検出

Lanes 1, enteropathogenic *Escherichia coli* 2, *Salmonella typhimurium*;
 3, *Yersinia enterocolitica* 4, *Yersinia pseudotuberculosis*
 5, *Yersinia pestis* M, DNA markers (100-bp ladder)

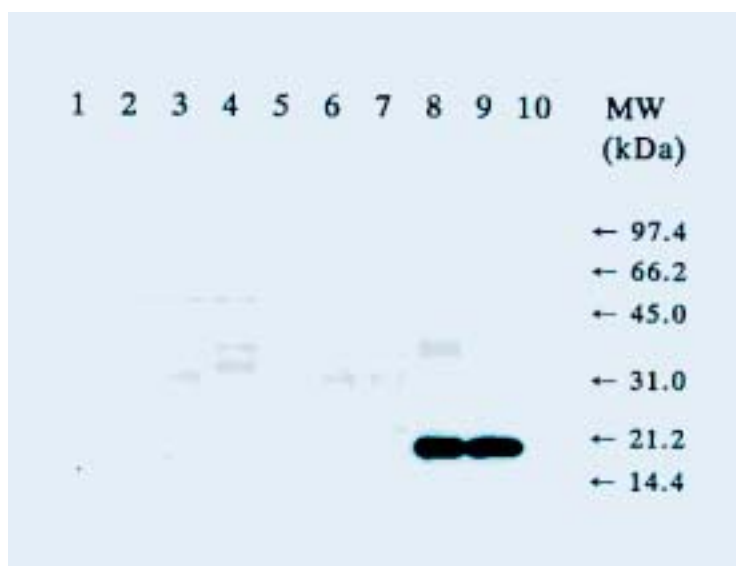


図4. ウェスタンブロット法によるペストの診断

Lanes 1, enteropathogenic *Escherichia coli* 2, *Salmonella typhimurium*;
 3, *Yersinia enterocolitica* 4, *Yersinia pseudotuberculosis*
 5, *Francisella tularensis* 6, *Francisella novicida*,
 7, *Staphylococcus aureus* 8, *Yersinia pestis*
 9, Fraction 1 antigen

5. 治療の参考（抗菌薬）^{1, 2, 3, 12, 13)}

ペストの治療には抗菌薬が非常に良く効くため、早く治療さえすればもう昔のように怖い病気ではない。予後は良好で、後遺症は殆ど残らない。肺ペストの場合は病気の進行が極めて速いので、特に、抗菌薬の早期の投与が必須である。

日本でペストの治療薬として保険が適用されているのはスパルフロキサシンとストレプトマイシンだけである。スパルフロキサシンは、2002年3月にペストの治療にも認定された抗菌薬で、今まで、ペストに対して最も効果があるとされていたストレプトマイシンと同等またはそれ以上に高い効力が見込まれ、副作用も少なく、使い易いのが特徴である。ストレプトマイシンは、副作用があるので過度の投与は避けたほうが良い。新生児、未熟児、乳児、小児に対する安全性は両抗菌薬ともにまだ確立されていない。又、妊婦に対する安全性はスパロフロキサシンは確立されていないが、ストレプトマイシンは治療上の有益性が危険性を上回ると判断されたる場合にだけ投与ができる。

その他に、アメリカのCDC、WHOによって推奨されている抗ペスト薬があるので、次に、それらの薬剤名を記述した。尚、日本人は体格的にも人種的にも欧米人とは異なるため、用量は今日の治療薬（南江堂）を参考にして治療する。治療期間はすべての抗菌薬において10日を超えないことが肝要である。

(A) アミノ配糖体

ストレプトマイシン、ゲンタマイシンは全てのペストに最も効果がある。

(B) テトラサイクリン系

テトラサイクリン、ドキシサイクリンは腺ペスト及び肺ペストの治療にアミノ配糖体と適宜に併用して使用する。

(C) クロラムフェニコール

ペストによる髄膜炎、胸膜炎、内眼球炎等の治療に用いる。腺ペスト又は敗血症型ペストの治療にはアミノ配糖体と適宜に併用して使用する。

(D) ニューキノロン^{12, 13)}

*in vitro*系のマウスモデルではニューキノロン系の抗菌薬は全般的にペストに対して優れた効力を示すが、人の治療に使ったデータの蓄積がないため、FDA等で認可されているニューキノロン薬はない。我々のマウスモデル実験ではその中でも特にレボフロキサシン、スパルフロキサシンが優れているので、副作用（腎障害、耳力障害）の強いアミノグリコシド系よりペストの治療に期待が持てる。

6. 予防の参考（抗菌薬・ワクチン：WHOおよびCDC提唱）

(A) 抗菌薬^{1, 2, 3)}

患者と直接接触した人や肺ペスト患者に接近した人等、ペストに二次感染する可能性の高い人や、流行地への旅行者等のように短期間ペスト菌の暴露を受ける可能性がある人に対して、予防のためにWHO、CDCは抗菌薬（テトラサイクリン、ドキシサイクリン、ST合剤）の予防投与を勧めている。投与量は治療に用いられている用量の1/2～同量を経口投与する。

(B) ワクチン（ホルマリン処理死菌ワクチン）^{14, 15, 16, 17, 18)}

ペストワクチンは腺ペストによる死亡率をある程度低下させるが、肺ペストに対してはほとんど効果が認められない。又、ワクチン投与により免疫を獲得するには数回の投与が必要であり、又、その免疫持続期間は6カ月以内と短い。したがって、ワクチン投与による集団防衛や流行の制御は期待できないと考えるべきである。長期に渡って、ペスト菌常在地域に滞在する人で、ペスト菌に濃厚に暴露される可能性が高い人はワクチンの接種を受けることが勧められている。例えば、ペスト患者に接する医療従事者、ペスト流行を制圧するために派遣された JICA や WHO の専門家等、並びにペスト菌保菌ネズミやノミに曝される危険性のある海外協力隊員や自衛隊員等の野外作業員、又、流行地に赴任したジャーナリスト、商社マン等も対象になる。旅行者などでワクチンを希望する人には、ワクチン投与による副作用についてもよく説明すべきである。

問い合わせ先

国立感染症研究所	細菌第一部	高橋英之	hideyuki@nih.go.jp
		渡邊治雄	haruwata@nih.go.jp

執筆者一覧

塚野尋子	国立感染症研究所	細菌第一部（平成 15 年 3 月退官）
渡邊治雄	国立感染症研究所	細菌第一部
高橋英之	国立感染症研究所	細菌第一部

マールブルグ病

マールブルグ病診断マニュアル

平成 13 年 3 月

目次

マールブルグ病の概説

マールブルグウイルス感染症の検査に関する注意事項

検査材料の採取・輸送

病原学的検査

1. ウイルス分離法
2. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応法
3. ウイルス抗原検出 ELISA

血清学的検査

1. 間接蛍光抗体法
2. IgG ELISA
3. IgM capture ELISA

マールブルグウイルス感染症の診断基準

引用文献

緊急時連絡先

マールブルグ病の概説

マールブルグ病は、マールブルグウイルス(フィロウイルス科)による感染症である。1967年にヨーロッパで、ウガンダから輸入されたアフリカミドリザルの初代腎細胞培養作業に関連したマールブルグウイルス感染症の流行が発生し、患者31名中7名が死亡した。これが初めて確認されたマールブルグ病の流行である。その後マールブルグ病は、アフリカで散発例が報告されるにとどまっていたが、1999年コンゴ共和国(旧ザイール)東部で初めて大規模な流行が報告された。ウイルスは、ヒトへの病原性の強さからクラス4の病原体に分類される。エボラウイルスと同様に宿主は不明であり、また、宿主からヒトへの感染経路も不明である。ヒトからヒトへの感染は血液、体液、排泄物等との直接接触による。実験室診断には、マールブルグウイルスの分離、血清抗体の検出(IgMやIgGを蛍光抗体法あるいはELISA法で検出する)、RT-PCR法、ウイルス抗原の検出(ELISA法等)が行なわれる。診断には、臨床症状の他、患者の渡航歴(アフリカのウガンダ、ケニア、コンゴ共和国等への旅行、滞在、あるいは熱帯雨林等の地域への立ち入りの有無)が参考になる。

マールブルグウイルス検査に関する注意事項

マールブルグウイルス感染症のウイルス学的検査は、国立感染症研究所(村山分室)ウイルス第1部外来性ウイルス室において可能である。

国立感染症研究所においては、現在のところ感染性のあるマールブルグウイルスの取り扱いが認められていないので、血清学的診断のための抗原の作製にマールブルグウイルスを用いることができない。そこで組換え核蛋白を抗原とした診断法を開発し、採用している。また、ウイルス学的検査は「国立感染症研究所病原体等安全管理規定」に基づいて行われる。

検体の採取・輸送

1. 検体: マールブルグウイルス感染症の診断のための検体には、血清が有用であるが、剖検例では肝、脾などの各種臓器が利用できる。急性期マールブルグ病の

実験室診断には、ウイルス抗原またはゲノムの検出と特異的 IgM 抗体の検出を試みる。これらの検査には患者血清を採取し検査に供する。また、ウイルス分離用の検体には、血清だけでなく咽頭ぬぐい液、尿も用いられることがある。ウイルス性出血熱が疑われた患者から採取された血液は、採取翌日までに当研究室に届けることが可能であれば、血清分離することなく冷蔵のまま当研究室に輸送されることが望ましい。しかし、血清分離を行った上でドライアイス詰めにして当研究室に輸送してもかまわない。輸送の際は、検体が包装外部に漏れないよう厳重に処置を施す。血清の保存が必要な場合は、 -80°C で保存する。血清学的診断には、急性期と回復期(発症 2 週間以降)に採取されたペア血清の抗体検査を同時に行う必要がある。剖検例では、脾臓、肝臓、腎臓組織がウイルス分離、ウイルス抗原・ゲノムの検出に用いられる。

2. 検体の輸送 : 当研究室に検査を依頼する場合には、郵政省告示第 618 号(平成 9 年 12 月 4 日)に基づき、検体が外部にもれないように包装のうえ、感染性物質であることを明示して輸送する。当研究室に持参する場合は、本所の「感染性材料(病原体等及び診断用のヒトあるいは動物の検体)の輸送に関するマニュアル(持参の場合)」(問い合わせ先: 国立感染症研究所 業務課 TEL: 03-5285-1111)に従う。
3. 検体の情報 : 検体を当研究室に送付するときには、以下の情報を検体とともに、または、前もって連絡する。

氏名, 年齢, 性別, 国籍, 職業, 臨床症状, 検体の採取された日時および発症からの日数, 海外渡航歴, その他

病原学的検査

1. ウイルス分離法:

Vero E6 細胞を用いてウイルス分離検査を行う。

A) 試薬・機材

- ① Vero E6 細胞
- ② CO_2 培養器(37°C)
- ③ D-MEM

- ④ ウシ胎仔血清(FBS、56℃, 30 分非働化済のもの)
- ⑤ リン酸緩衝液(PBS)
- ⑥ 組織培養用フラスコ(25 cm², ベンチレーションキャップ付)
- ⑦ 組織培養用ペニシリン・ストレプトマイシン(Gibco-BRL 社)
- ⑧ 遠心管
- ⑨ 抗マールブルグウイルス抗体(血清) (例えば国立感染症研究所ウイルス第1部で作製した抗マールブルグ核蛋白ウサギ血清)

B) 検査方法

- ① Vero E6 細胞の単層を, PBS で洗浄する.
- ② 無菌的に採取された血清を 2%ウシ胎児血清含有 D-MEM(維持培地)で 10 倍希釈し, 細胞に接種する. 雑菌の混入が考えられる検体の場合は, 通常使用量の 5 倍のペニシリン・ストレプトマイシンを加え, 3000 回転で 20 分間遠心した上清を用いる.
- ③ 37℃, 1 時間吸着させる.
- ④ 被験液を取り除き, 維持培地を用いて細胞を培養する.
- ⑤ 毎日細胞変性効果(CPE)出現の有無を確認する.
- ⑥ CPE が認められた場合には, 抗マールブルグウイルス抗体を用いた間接蛍光抗体法でマールブルグウイルスであるか否かを同定する. CPE が認められない場合には, 一部の細胞を盲目継代(blind passage)する. また, 残りの細胞は, 間接蛍光抗体法によりマールブルグウイルス抗原の検査, 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応用に供する.

2. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) :

ウイルスゲノムの検出のための RT-PCR には One-step PCR 法を採用している. RT-PCR 法のためのプライマーには表 1 に記載したプライマーセットをそれぞれ用いる. 検体としては, 血清や組織が用いられるが, 非働化した検体では増幅効率が著しく低下する.

表 1. マールブルグウイルス感染症の診断に用いられるプライマーセット、プライマーの塩基配列、ターゲット遺伝子と PCR 産物の大きさ.

プライマー名	プライマーの塩基配列(方向)	ターゲット遺伝子 (産物の大きさ)
mbg1	5' - ACTCTCCAGAAGACAGAAGA (+)	Marburg virus (GP) (521 bp)
mbg2	5' - AGCGATGGGCTTTCAGGACA (-)	
FILO-A	5'-ATCGGAATTTTCTTTCTCATT (+)	Filovirus (L) (419 bp)
FILO-B	5'-ATGTGGTGGGTTATAATAATCACTGACATG (-)	
mbg3	5' - AGCGATGGGCTTTCAGGACA (+)	Marburg virus (GP) (265 bp)
mbg4	5' - CGGTACATTGTTGTGGAGGC (-)	
MBG pol F	5' - ACTTTATAGCCCACCACATTGTGTGA (+)	Marburg virus (L) (220 bp)
MBG pol R	5' - ACTTAGAGTTGTTATACATTGATTATC (-)	
MBG nuc F	5' - GGACCTCCAAAGTAAAAAATGA (+)	Marburg virus (NP) (225 bp)
MBG nuc R	5' - AGTTGTTGATATTGTTCCGCAACATT (-)	

A) 試薬・機材

- ① High Pure™ Viral RNA Kit (Roche Diagnostics)
 - ② マイクロ遠心器
 - ③ Titan™ One Tube RT-PCR System (Roche Diagnostics)または Ready-to-Go RT-PCR (Pharmacia Biochemica)
 - ④ DEPC 処理済純水 (ニッポンジーン)
 - ⑤ サーマルサイクラー
 - ⑥ サーマルサイクラー用マイクロチューブ
 - ⑦ 核酸電気泳動用 2%アガロースゲル
 - ⑧ DNA 分子量マーカー (100bp ラダーもしくは 200-600 塩基の間を同定できるもの)
 - ⑨ アガロースゲル電気泳動槽
- 以下のものは検体が組織の場合に必要となる.
- ⑩ RNA Bee™ (TEL-TEST, コスモバイオ社取扱)
 - ⑪ ホモジナイザー (1.5ml のプラスチックチューブとそれにあつたプラスチック製デイスパーザブルペステルが市販されている)
 - ⑫ クロロフォルム
 - ⑬ 2-プロパノール
 - ⑭ 70%エタノール

B) 検査方法

- ① 血清からウイルス RNA を High Pure™ Viral RNA Kit を用いて抽出する. 血清 200μl から 50μl の精製 RNA 液を得ることができる. 検体が組織の場合, RNA を RNA Bee™ にて抽出する. 方法はキットの取り扱い説明書を参照のこと. 必ず正常血清等の陰性コントロールを置く.
- ② Ready-to-Go RT-PCR (Pharmacia Biochemica)を用いる場合, プライマーをそれぞれ 50 pmole/tube, 精製 RNA 5 μl を加え, さらに DEPC 処理済純水を最終量が 50μl となるように加える.
- ③ RT-PCR を以下の条件で実施する.

42°C	30 分		
94°C	5 分		
94°C	30 秒	}	3 サイクル
37°C	30 秒		
72°C	30 秒		
72°C	2 分		
94°C	30 秒	}	32 サイクル
45°C	30 秒		
72°C	30 秒		
72°C	5 分		

- ④ RT-PCR 産物をアガロースゲル(1.5-2.0%)電気泳動して, エチジウムブロマイド染色により増幅された DNA 産物を確認する.

3. ウイルス抗原検出 ELISA:

マールブルグウイルス感染症においては患者体内でのウイルス量が多く, 一方抗体が産生されないことも多いため, 迅速なウイルス感染の証明にウイルス抗原検出 ELISA を用いることができる. ウイルス抗原検出 ELISA の反応原理は以下のようになる。

- ① 抗マールブルグウイルス核蛋白モノクローナル抗体をコートしたプレートで患者材料(血清、組織乳剤)中の核蛋白を捕獲する。

- ② 抗核蛋白ウサギポリクローナル抗体を捕獲された核蛋白と反応させる。
- ③ 反応したウサギ抗体を、酵素標識した抗ウサギ IgG 抗体で検出する(マウスに反応する標識抗体では、プレートにコートしたモノクローナル抗体と反応してしまう)。
- ④ 酵素に対する発色基質を加え、捕獲された核蛋白を発色により検出する(核蛋白量・ウイルス量は発色の程度によって示される)。

A) 試薬・機材

- ① 精製抗マールブルグウイルス核蛋白モノクローナル抗体(クローン 2A7 および 2H6、国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にて培養上清もしくはマウス腹水より精製)
- ② ウサギ抗マールブルグウイルス核蛋白ポリクローナル血清(NIID-MBG-NP/#4, 国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にて作製)
- ③ ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体(Zymed 社, HRPO-標識 anti-rabbit IgG, affinity purified)
- ④ 陽性コントロール(精製リコンビナントマールブルグウイルス核蛋白, 国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にてリコンビナントバキュロウイルス感染細胞より調製)
- ⑤ 96 ウェル ELISA プレート(Falcon 社製)
- ⑥ リン酸緩衝液(PBS)
- ⑦ 洗浄バッファー(0.05% Tween20-PBS)
- ⑧ ブロッキングバッファー(5%スキムミルク-PBS)
- ⑨ 不活化バッファー(試料が組織の場合。1%TritonX-100 in PBS)
- ⑩ Triton X-100 (試料が血清の場合)
- ⑪ 希釈バッファー(0.5%スキムミルク in PBS)
- ⑫ ABTS (2,2'-アジノ-ビス-(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)) 発色基質 (Roche Diagnostics, ABTS tablet および Buffer for ABTS)
- ⑬ ホモジナイザー(試料が組織の場合。1.5ml のプラスチックチューブとそれにあったプラスチック製ディスポーザブルペステルが市販されている)
- ⑭ 1.5ml チューブ用マイクロ遠心機(試料が組織の場合)
- ⑮ マイクロプレートリーダー

B) 検査方法

- ① 精製抗マールブルグウイルス核蛋白モノクローナル抗体(クローン 2A7 または 2H6)を 1 μ g/ml に PBS で希釈し, レーン 1〜6 の各ウェルに 100 μ l ずつ分注する(図 1b). 室温で 2 時間吸着させる(4 $^{\circ}$ C で一夜吸着させてもよい. この場合は, 蒸発を防ぐためプレートをシールする). 図 1b に示したように, 単クローン抗体がコートされたウェル(レーン 1〜6, 単クローン抗体陽性ウェル)とコートされないウェル(レーン 7〜12, 単クローン抗体陰性ウェル)を準備する.
- ② 抗体液を捨て, 200 μ l のブロッキングバッファーを各ウェルに分注する. 37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる.
- ③ 検体の準備を行う. 検体が血清の場合には Triton X-100 を最終濃度が 1% になるように加え混和する. 検体が組織の場合, 組織が約 10% になるように不活化バッファーを加えホモジナイズ後 3000 回転 5 分間遠心し上清を検体とする. Triton X-100 を加えることは, ウイルスを不活化するだけでなくウイルス粒子中の核蛋白を粒子外に放出するためにも必須である. 処理した検体は, ブロッキングが終了するまで 4 $^{\circ}$ C で保存する. 使用時に希釈バッファーで 5 倍に薄める(希釈しない状態では, Triton X-100 によりプレートにコートされたモノクローナル抗体が洗い流される). 陽性コントロールは 1 μ g/ml に希釈バッファーで希釈する.
- ④ ブロッキングバッファーを捨て洗浄バッファーで 3 回洗浄し, すべてのウェルに 100 μ l の希釈バッファーを加える. 希釈バッファーで 5 倍に希釈した検体および陽性コントロールそれぞれ 100 μ l を, 単クローン抗体陽性ウェル(レーン 1)と陰性ウェル(レーン 7)それぞれに分注し(最終的に 10 倍希釈になる), それらのウェルから順に 2 倍段階希釈する(10 倍希釈から 320 倍)(図 1b). 37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる.
- ⑤ 検体を捨て洗浄バッファーで 3 回洗浄し, 希釈バッファーで 1,000 倍に希釈したウサギ抗マールブルグウイルス核蛋白血清 100 μ l を各ウェルに分注し, 37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる.
- ⑥ ウサギ血清を捨て洗浄バッファーで 3 回洗浄し, 希釈バッファーで 1,000 倍に希釈した HRPO 標識抗ウサギ IgG 抗体 100 μ l を各ウェルに分注し, 37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる. この間に発色基質を調製する. 発色基質を完全に溶解するのに 10 分から 15 分要する. 調製した基質は数週間程度なら遮光して 4 $^{\circ}$ C で保存できる.

- ⑦ 標識抗体を捨て洗浄バッファーで 3 回洗浄し, ABTS 発色基質 100 μ l を各ウェルに分注し, 37°C, 30 分反応させる。
- ⑧ 波長 405nm のフィルターを用いて, OD(吸光度)を測定する. 単クローン抗体陽性ウェルの OD から, 対応する陰性ウェルの OD を差し引いた値を捕捉されたマールブルグウイルスの核蛋白による OD 値と判定する.

血清学的検査

1. 間接蛍光抗体法

マールブルグウイルスの核蛋白を恒常的に発現する HeLa 細胞 (HeLa-MBG-NP 細胞) を用いた間接蛍光抗体法がマールブルグ病患者血清の血清学的診断において有用であることを確認している. 急性期と回復期 (発症 2 週目以降) のペア血清を同時に検査することが重要である. また, 被験血清を非働化 (56°C, 30 分) 処理してから検査に供する.

A) 試薬・機材

- ① HeLa-MBG-NP 細胞
- ② D-MEM
- ③ リン酸緩衝液 (PBS)
- ④ 細胞消化用トリプシン・EDTA 液 (0.25%トリプシン-0.02%EDTA 加 PBS)
- ⑤ 蛍光抗体検査用スライドグラス (14 ウェル, AR Brown 社)
- ⑥ FITC 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体 (Zymed 社)
- ⑦ 10%グリセリン加 PBS
- ⑧ カバーグラス
- ⑨ 蛍光顕微鏡

B) 検査方法

- ① HeLa-MBG-NP 細胞を継代して 2 日間培養する.
- ② PBS で洗浄し, トリプシン処理により HeLa-MBG-NP 細胞を回収する. 更に細胞を PBS で洗浄後 3×10^6 cells/ml となるように PBS に浮遊する。
- ③ 蛍光抗体検査用スライドグラスの各ウェルに細胞浮遊液を 10 μ l ずつ分配し, 完全に乾燥させる. 乾燥したら 100%アセトン中で 5 分間固定する. アセトンを蒸発

させた後、-80℃に保管することができる。

- ④ PBS で 20 倍から 2 倍段階希釈した被験血清を各ウェルにのせ、37℃、1 時間反応させる。被験血清と同時に抗体陽性コントロール血清を同時に検査する。
- ⑤ PBS でスライドグラスを洗浄し、PBS で 70 倍希釈した FITC 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体を各ウェルにのせ、37℃、1 時間反応させる。
- ⑥ PBS でスライドグラスを洗浄後、10%グリセリン加 PBS を用いて封入する。
- ⑦ 蛍光顕微鏡で特異蛍光を検鏡する。特徴的な染色像が認められれば抗体陽性と判定し、抗体陽性を示した最高希釈倍率の逆数を抗体価とする。

2. IgG-ELISA:

リコンビナントバキュロウイルスで発現、精製したマールブルグウイルス核蛋白を抗原とした IgG 検出を目的とした ELISA (IgG-ELISA, 図 2a)が、診断に有用であることが確認されている。急性期と回復期のペア血清を同時に検査することが重要である。

A) 試薬・機材

- ① 精製組み換えマールブルグ核蛋白 (国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にてリコンビナントバキュロウイルス感染細胞より調製)
- ② ELISA プレート (Falcon 社)
- ③ リン酸緩衝液 (PBS)
- ④ 0.05%Tween 20 -PBS (T-PBS)
- ⑤ 5%スキムミルク加 T-PBS (M-T-PBS)
- ⑥ ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Zymed 社, HRPO-標識 anti-rabbit IgG, affinity purified)
- ⑦ ABTS 発色基質 (Roche Diagnostics, ABTS tablet および Buffer for ABTS)
- ⑧ ELISA リーダー

B) 検査方法

- ① 精製組み換えマールブルグ核蛋白を 1μg/ml に PBS で希釈し、ELISA プレートのレーン A～D の各ウェルに 100μl 加える。レーン E～H の各ウェルには PBS を 100μl 加える (図 2b)。室温で 2 時間または 4℃で一晩おく。レーン A～D のウェルを抗原陽性ウェル、レーン E～H のウェルを抗原陰性ウェルとする (図 2b)。

- ② 各ウェルに 200 μ l の M-T-PBS を加え, 37°C, 1 時間反応させる.
- ③ 抗原液を捨て T-PBS で 3 回洗浄し, 各ウェルに M-T-PBS を 100 μ l 加える. 次いで M-T-PBS で 25 倍に希釈した被験血清 33 μ l を抗原陽性ウェルのレーン A と陰性ウェルのレーン E にそれぞれ加え(最終的に 100 倍希釈になる), それらのウェルから順次 4 倍段階希釈(100 倍から 6,400 倍)する(図 2b). 37°C, 1 時間反応させる.
- ④ 検体を捨て T-PBS で 3 回洗浄し, ついで M-T-PBS で 1,000 倍希釈した HRPO 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体 100 μ l を各ウェルに加える. 37°C, 1 時間反応させる.
- ⑤ 標識抗体を捨て T-PBS で 3 回洗浄し, 各ウェルに ABTS 発色基質液 100 μ l 加え, 37°C, 30 分反応させる.
- ⑥ 波長 405nm のフィルターを用いて, OD(吸光度)を測定する. 抗原陽性ウェルの OD から, 対応する抗原陰性ウェルの OD を差し引いた値を抗マールブルグ核蛋白抗体による OD 値とする.

3. IgM-capture ELISA :

マールブルグウイルスに対する IgM 検出のための IgM-capture ELISA(図 3a)は, IgG-ELISA と同様に精製組み換えマールブルグ核蛋白を抗原としたものである. 現時点では, この IgM-capture ELISA のマールブルグ病の診断における有用性は確かめられていないが, IgM-capture ELISA の結果はその他の検査結果とともに総合的に反映させる. 検査毎に, 精製組み換えマールブルグ核蛋白をサルに免疫して作製した抗マールブルグ核蛋白 IgM 抗体陽性コントロール血清と陰性コントロール血清を置く.

A) 試薬・機材

- ① 精製組み換えマールブルグ核蛋白(国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にてリコンビナントバキュロウイルス感染細胞より調製)
- ② ELISA プレート(Falcon 社)
- ③ リン酸緩衝液 (PBS)
- ④ 0.05%Tween 20 -PBS (T-PBS)
- ⑤ 5%スキムミルク加 T-PBS (M-T-PBS)
- ⑥ IgM 抗体捕捉用抗ヒト IgM 抗体(ヤギ F(ab')₂ Anti-Human IgM, Biosource International, Inc. Tago Products)

- ⑦ ウサギ抗マールブルグウイルス核蛋白ポリクローナル血清 (NIID-MBG-NP/#4, 国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にて作製)
- ⑧ ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Zymed 社, HRPO-標識 anti-rabbit IgG, affinity purified)
- ⑨ 陽性コントロール (精製組み換えマールブルグ核蛋白をサルに免疫して 3 週目に採取された血清)
- ⑩ 陰性コントロール (陽性コントロールと同じサルから免疫前に採取された血清)
- ⑪ ABTS 発色基質 (Roche Diagnostics, ABTS tablet および Buffer for ABTS)
- ⑫ マイクロプレートリーダー

B) 検査方法

- ① 捕捉用抗ヒト IgM 抗体を PBS で 1 μ g/ml 以上の濃度になるように希釈し, ELISA プレートの各ウェルに 100 μ l 加える. 4 $^{\circ}$ Cで一晩置く.
- ② 捕捉用抗体を捨て T-PBS で 3 回洗浄し, 各ウェルに 200 μ l の M-T-PBS を加える. 37 $^{\circ}$ Cで 1 時間反応させる.
- ③ M-T-PBS を捨て T-PBS で 3 回洗浄し, M-T-PBS 100 μ l を各ウェルに加える. 次いでレーン A とレーン E のウェルに, M-T-PBS で 10 倍希釈した被験血清 100 μ l を加え (20 倍希釈になる), さらに 20 倍から 160 倍になるようにそれぞれ 2 倍段階希釈する (図 3b). 陽性コントロールおよび陰性コントロールを置く. 37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる.
- ④ 被験血清を捨て T-PBS で 3 回洗浄後, レーン AーD の各ウェルに M-T-PBS で 1 μ g/ml に調整した精製マールブルグ核蛋白を 100 μ l 加える. 一方, レーン EーH の各ウェルには M-T-PBS 100 μ l を加える (抗原陰性コントロール).
- ⑤ 抗原液を捨て T-PBS で 3 回洗浄後, M-T-PBS で 1,000 倍希釈した抗マールブルグ核蛋白血清 100 μ l を各ウェルに加え, 37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる.
- ⑥ 抗マールブルグ血清を捨て T-PBS で 3 回洗浄後, M-T-PBS で 1,000 倍希釈した HRPO 標識抗ウサギ IgG 抗体 100 μ l を各ウェルに加え, 37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる.
- ⑦ 抗ウサギ IgG 抗体を捨て T-PBS で 3 回洗浄後, 各ウェルに ABTS 発色基質液 100 μ l 加え, 37 $^{\circ}$ C 30 分反応させる.
- ⑧ 波長 405nm のフィルターを用いて, OD (吸光度) を測定する. 抗原陽性ウェルの OD 値から, 対応する抗原陰性ウェルの OD 値を差し引いた値を抗マールブルグ核蛋白 IgM 抗体による OD 値と判定する.

マールブルグウイルス感染症の診断基準

次のいずれかが満たされた場合、「マールブルグウイルス感染症」とする。

- 被験検体からマールブルグウイルスが分離された。
- 被験検体から RT-PCR 法でマールブルグウイルスゲノムが検出された。
- 被験検体から抗原検出 ELISA 法で、マールブルグウイルス核蛋白が検出された。
- 間接蛍光抗体法または IgG ELISA で判定された急性期と回復期に採取されたペア血清の MBG-NP に対する抗体価が、4 倍以上の有意に上昇した。

次の場合、「マールブルグウイルス感染症」を疑う。

- IgM-capture ELISA で、MBG-NP に対する特異的 IgM 抗体が検出された。

引用文献

1. 森川茂. ウイルス性出血熱. 臨床病理 特 108 号, 105-110, 1998
2. 森川茂. マールブルグ病. 日本医師会雑誌, 臨時増刊号 122, 60-61, 1999
3. 森川茂, 田代真人. 出血熱ウイルスの診断体制. 臨床と微生物 24:583-586, 1997
4. Jahring PJ. Filoviruses and Arenaviruses. In Manual of Clinical Microbiology, 6th Edition, edited by Murray PR et al, pp 1068-1081, ASM Press, Washington DC, 1995
5. Saijo M, Niikura M, Morikawa S, Ksiazek TG, Meyer RF, Peters CJ, Kurane I. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoproteins. J. Clin. Microbiol. 39:1-7, 2001
6. Saijo M, Niikura M, Morikawa S, Kurane I. Immunofluorescence Method for Detection of Ebola Virus Immunoglobulin G, Using HeLa Cells Which Express Recombinant Nucleoprotein. J. Clin. Microbiol. 39:776-778, 2001

緊急時連絡先

国立感染症研究所ウイルス第 1 部

部長 倉根一郎

TEL: 03-5285-1111 / (home) 03-3221-1733

FAX: 03-5285-1169

e-mail: kurane@nih.go.jp

国立感染症研究所村山分室ウイルス第 1 部外来性ウイルス室

室長 森川 茂

TEL: 042-561-0771 (内線 791) / (home) 042-378-2864

FAX: 042-564-4881

e-mail: morikawa@nih.go.jp

図 1. 抗原検出 ELISA の原理(a)と ELISA プレーートの各ウェルにおける固相化された単クローン抗体の有無, 被験血清の希釈倍率および陽性・陰性コントロール抗原の位置(b).

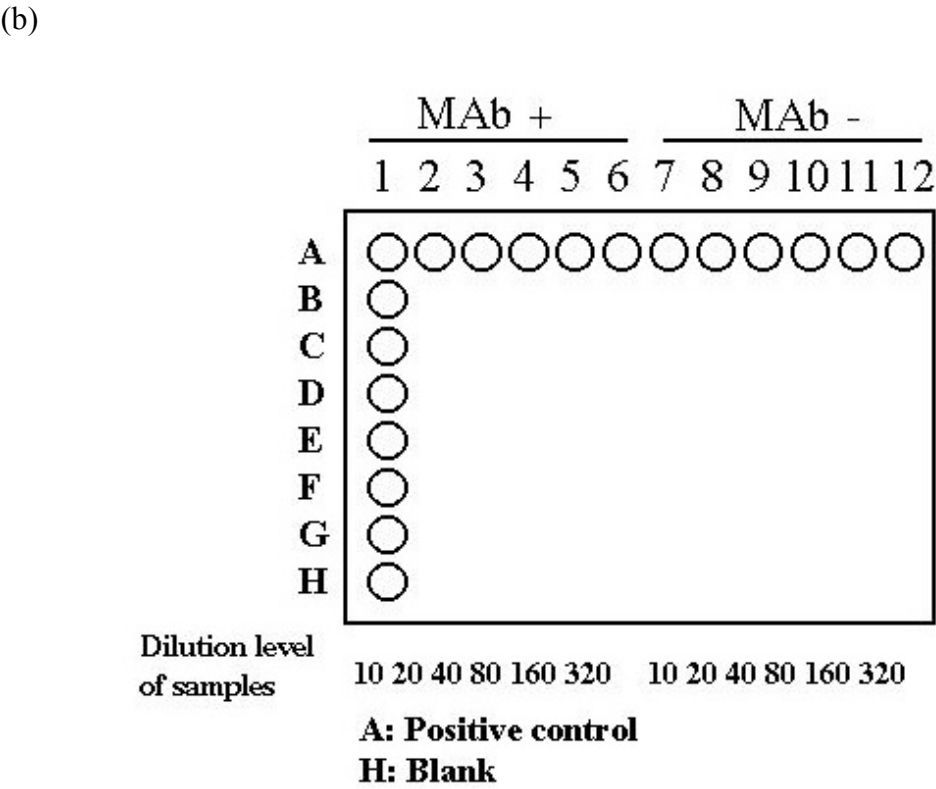
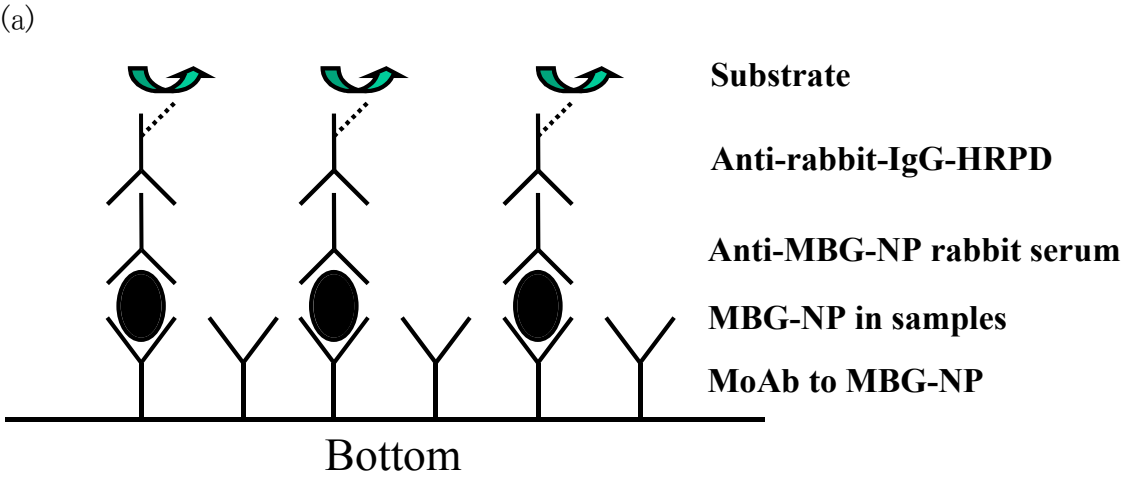
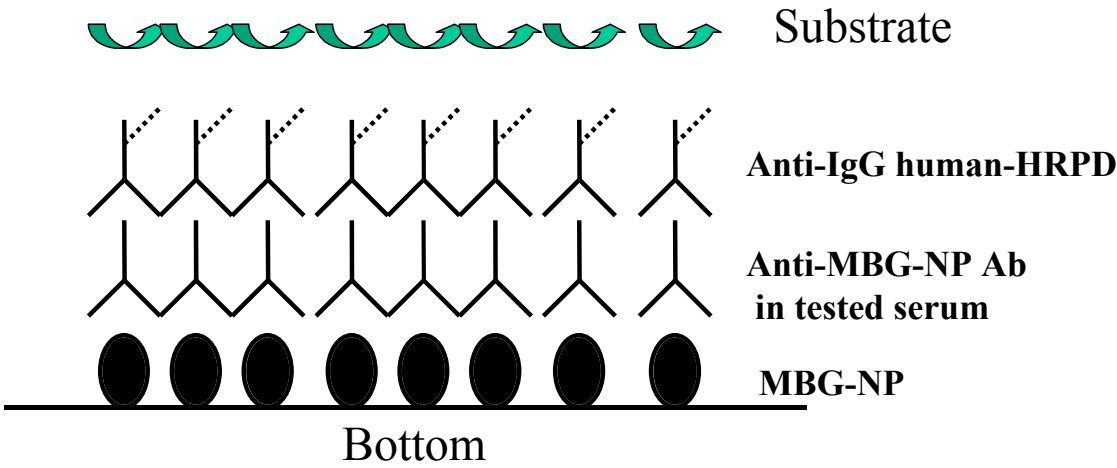


図 2. IgG ELISA の原理 (a) と ELISA プレート の各ウェルにおける固相化された抗原の有無, 被験血清の希釈倍率および陽性・陰性コントロール血清の位置の説明 (b).

(a)



(b)

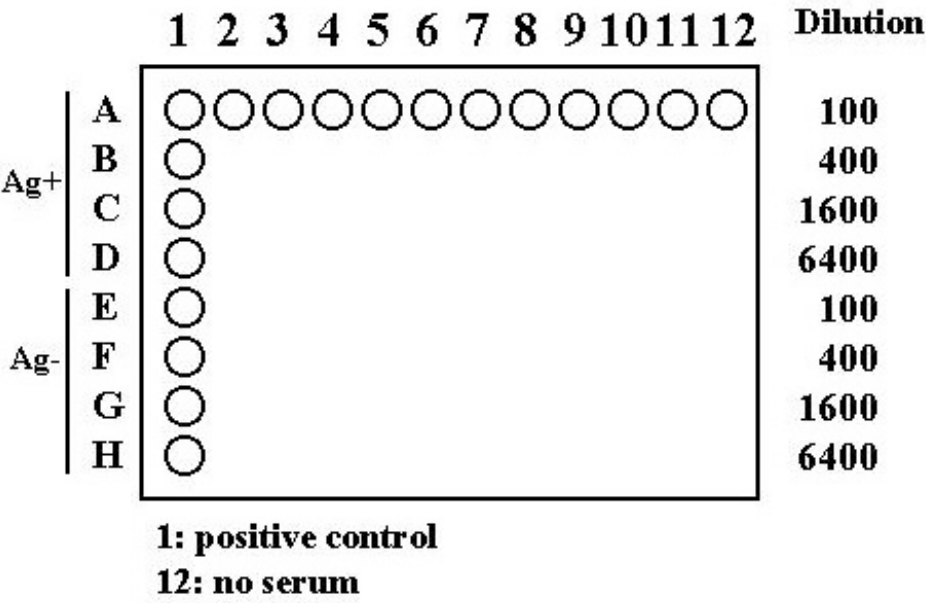
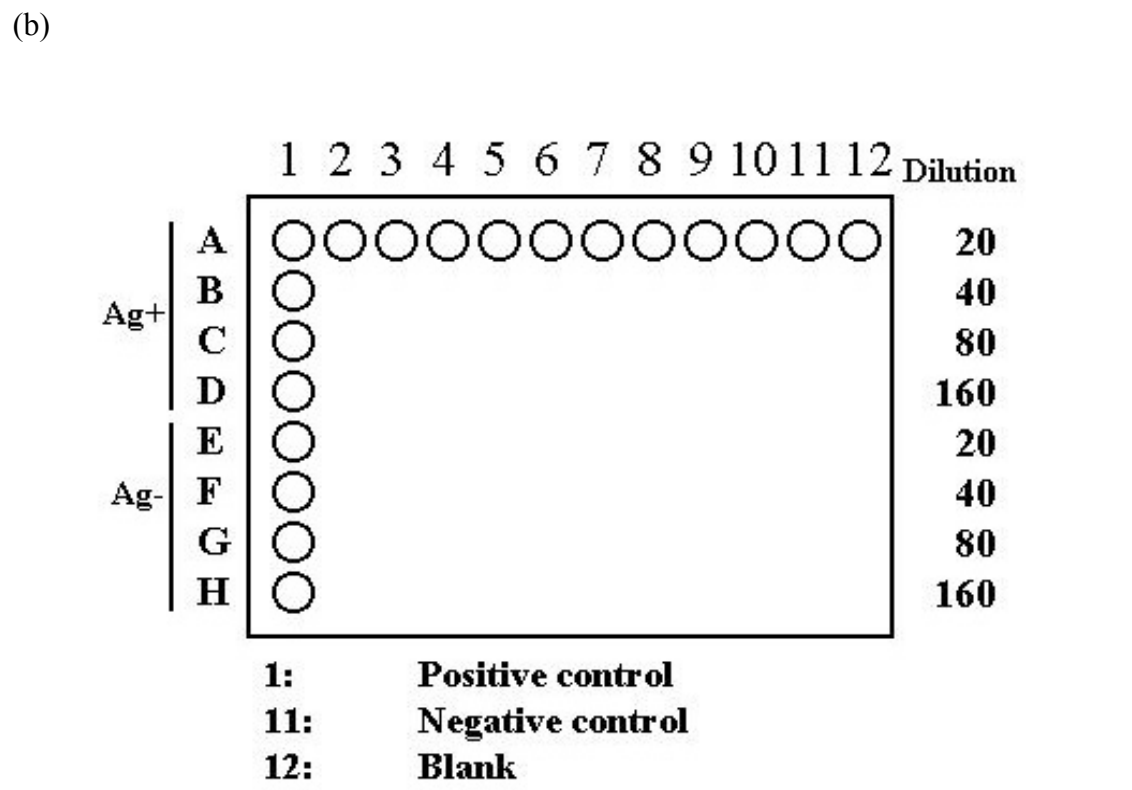
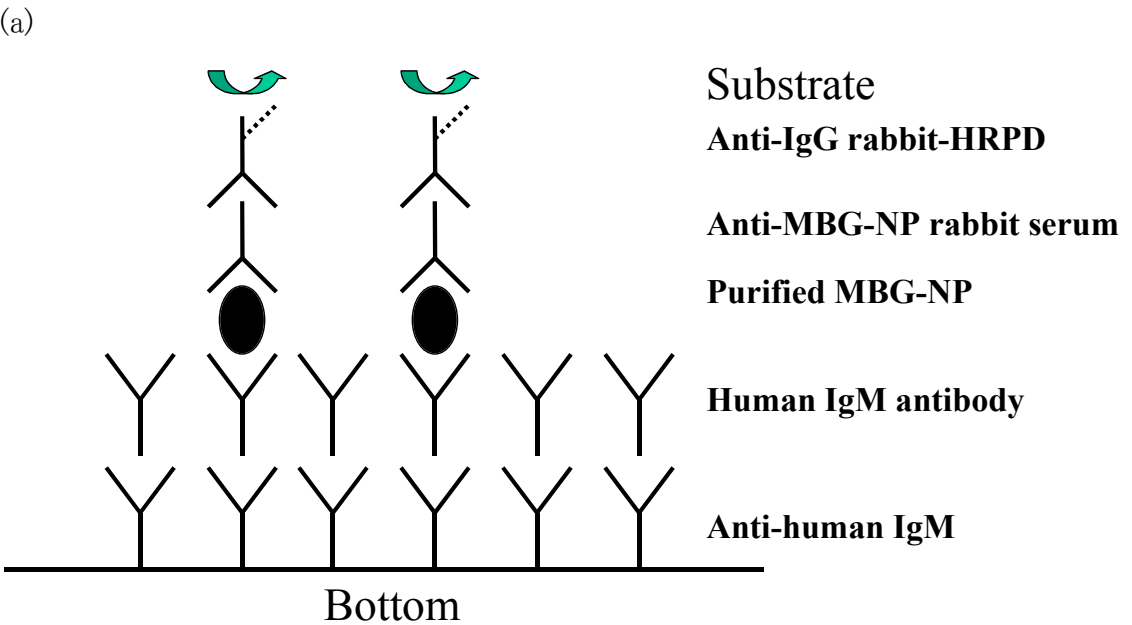


図 3. IgM-capture ELISA の原理(a)と ELISA プレートの各ウェルにおける被験血清の希釈倍率, 加えられる抗原および陽性・陰性コントロール血清の位置の説明(b).



ラ ッ サ 熱

ラッサ熱診断マニュアル

平成 13 年 3 月

目次

ラッサ熱の概説

ラッサウイルス感染症の検査に関する注意事項

検査材料の採取・輸送

病原学的検査

1. ウイルス分離法
2. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応法
3. ウイルス抗原検出 ELISA

血清学的検査

1. 間接蛍光抗体法
2. IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
3. IgM capture ELISA

ラッサウイルス感染症の診断基準

引用文献

緊急時連絡先

ラッサ熱の概説

1969 年にナイジェリアの東北部のラッサ村のある病院で出血熱患者が続出し、この時の検体から出血熱の原因ウイルスが分離されラッサウイルスと命名された。その後、ナイジェリア、リベリア、シエラレオーネ、セネガル、ギニア等のサハラ以南西アフリカでたびたびラッサ出血熱の流行が見られている。1996 年から 1997 年にかけてシエラレオーネで 823 名のラッサ出血熱患者が発生し、その内 153 例が死亡した(致死率 18.6%)。これらの流行地では年間 10-30 万人が感染し、5000 人程が死亡すると推定されている。また、これらの地域からの海外渡航者、帰国者が潜伏期間中に移動することによる流行地以外での患者発生がたびたび報告されている。ラッサウイルスは、アレナウイルス科に属し、2 分節からなる一本鎖の(-)鎖 RNA をゲノムに有するエンベロープウイルスである。アレナウイルス科には、ラッサウイルス以外にも、マチュポウイルス(ボリビア出血熱の病原体)、フニンウイルス(アルゼンチン出血熱の病原体)、サビアウイルス(ブラジル出血熱の病原体)、グアナリトウイルス(ベネズエラ出血熱の病原体)の出血熱ウイルスがあり、いずれもレベル4に分類される。アレナウイルスはいずれも齧歯類を自然宿主とする。ラッサウイルスはマストミス(*Mastomys natalensis*)という野ネズミを宿主とする。ラッサウイルス感染マストミスの排泄物、唾液と接触することによりヒトに感染する。また、ヒトからヒトへの感染は血液・体液との接触による。

実験室診断には ELISA または蛍光抗体法による血清抗体の検出 (IgM 抗体の検出またはペア血清での IgG 抗体の上昇)、血液、尿、咽頭拭い液から Vero 細胞を用いたウイルス分離、血清、組織からの ELISA によるウイルス抗原の検出または RT-PCR 法によるウイルス RNA の検出が行われる。ウイルス分離、RT-PCR 法は発病後 2-15 日で検出可能であるが 16 日以降ではその検出率は低下する。

ラッサウイルス検査に関する注意事項

ラッサウイルス感染症のウイルス学的検査は、国立感染症研究所(村山分室)ウイルス第 1 部外来性ウイルス室において可能である。

国立感染症研究所においては、現在のところ感染性のあるラッサウイルスの取り扱いが認められていないので、血清学的診断のための抗原の作製にラッサウイルスを用いることができない。そこで組換え核蛋白を抗原とした診断法を開発し、採用している。また、ウイルス学的検査は「国立感染症研究所病原体等安全管理規定」に基づいて行われる。

検体の採取・輸送

1. 検体:ラッサウイルス感染症の診断のための検体には、血清が有用である。急性期ラッサ出血熱の診断には、ウイルス抗原またはゲノムの検出と特異的 IgM 抗体の検出が有用である。そのためには、検体はできるだけ急性期に採取されることが望ましい。ウイルス性出血熱が疑われた患者から採取された血液は、採取翌日までに当研究室に届けることが可能であれば血清分離することなく冷蔵のまま当研究室に輸送されることが望ましい。また、血清分離を行った上で-80℃で保存し、輸送中に検体が包装外部に漏れないよう厳重に処置を施したうえでドライアイス詰めにして当研究室に輸送してもかまわない。ウイルス分離用の検体として、血清だけでなく咽頭ぬぐい液、尿も用いられる。また、剖検例の検体では、脾臓、肝臓、腎臓組織がウイルス分離、ウイルス抗原・ゲノムの検出に用いられる。血清学的診断のためには、急性期と回復期(発症 2 週間以降)に採取されたペア血清の抗体検査を同時に行う必要がある。
2. 検体の輸送 :当研究室に検査を依頼する場合には、郵政省告示第 618 号(平成 9 年 12 月 4 日)に基づき、検体が外部にもれないように包装のうえ、感染性物質であることを明示して輸送する。当研究室に持参する場合は、本所の「感染性材料(病原体等及び診断用のヒトあるいは動物の検体)の輸送に関するマニュアル(持参の場合)」(問い合わせ先:国立感染症研究所 業務課 TEL: 03-5285-1111)に従う。
3. 検体の情報 :検体を当研究室に送付するときには、以下の情報を検体とともに、または、前もって連絡する。

氏名, 年齢, 性別, 国籍, 職業, 臨床症状, 検体の採取された日時および発症からの日数, 海外渡航歴(特にアフリカ), その他

病原学的検査

1. ウイルス分離法:
Vero E6 細胞を用いてウイルス分離検査を行う。

A) 試薬・機材

- ① Vero E6 細胞
- ② CO₂培養器(37℃)
- ③ D-MEM
- ④ ウシ胎児血清(FBS, 56℃, 30 分非働化済のもの)
- ⑤ リン酸緩衝液(PBS (-))
- ⑥ 組織培養用フラスコ(25 cm², できればベンチレーションキャップ付)
- ⑦ 組織培養用ペニシリン・ストレプトマイシン(Gibco-BRL 社)
- ⑧ 遠心管
- ⑨ 抗ラッサウイルス抗体(血清)(例えば国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室で作製した抗ラッサウイルス核蛋白ウサギ血清)

B) 検査方法

- ① Vero E6 細胞の単層を, PBS (-)で洗浄する.
- ② 無菌的に採取された血清を 2%ウシ胎児血清含有 D-MEM(維持培地)で 10 倍希釈し, 細胞に接種する. 雑菌の混入が考えられる検体の場合は, 通常使用量の 5 倍のペニシリン・ストレプトマイシンを加え, 3000 回転で 20 分間遠心した上清を用いる.
- ③ 37℃, 1 時間吸着させる.
- ④ 被験液を取り除き, 維持培地を用いて細胞を培養する.
- ⑤ 毎日細胞変性効果(CPE)出現の有無を確認する. ただし, ラッサウイルスによる CPE は顕著でないため判定できないことがある.
- ⑥ CPE が認められた場合には, 抗ラッサウイルス抗体を用いた間接蛍光抗体法でラッサウイルスであるか否かを同定する. CPE が認められない場合には, 一部の細胞を盲目継代(blind passage)する. また, 残りの細胞は, 間接蛍光抗体法によりラッサウイルス抗原の検査, 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応に供する.

2. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) :

ウイルスゲノムの検出のための RT-PCR には One-step PCR 法を採用している. RT-PCR 法のためのプライマーには表 1 に記載したプライマーセットを用いる. 検体

としては、血清や組織が用いられる。

表 1. ラッサウイルス感染症の診断に用いられるプライマーセット、プライマーの塩基配列、ターゲット遺伝子と PCR 産物の大きさ。

プライマー名	プライマーの塩基配列(方向)	ターゲット遺伝子 (産物の大きさ)
36E2	5'- ACCGGGGATCCTAGGCATT -3'	GP (351 bp)
80F2	5' - ATATAATGATGACTGTTGTTCTTTGTGCA -3'	

A) 試薬・機材

- ① High PureTM Viral RNA Kit (Roche Diagnostics)
- ② マイクロ遠心器
- ③ TitanTM One Tube RT-PCR System (Roche Diagnostics)または Ready-to-Go RT-PCR (Pharmacia Biochemica)
- ④ DEPC 処理済純水 (ニッポンジーン)
- ⑤ サーマルサイクラー
- ⑥ サーマルサイクラー用マイクロチューブ
- ⑦ 核酸電気泳動用 2%アガロースゲル
- ⑧ DNA 分子量マーカー (100bp ラダーもしくは 200-600 塩基の間を同定できるもの)
- ⑨ アガロースゲル電気泳動槽

以下のものは検体が組織の場合に必要となる。

- ⑩ RNA BeeTM (TEL-TEST, コスモバイオ社取扱)
- ⑪ ホモジナイザー (1.5ml のプラスチックチューブとそれにあったプラスチック製ディスポーザブルペステルが市販されている)
- ⑫ クロロフォルム
- ⑬ 2-プロパノール
- ⑭ 70%エタノール

B) 検査方法

- ① 血清からウイルス RNA を High PureTM Viral RNA Kit を用いて抽出する。血清

200μl から 50μl の精製 RNA 液を得ることができる. 検体が組織の場合, RNA を RNA BeeTM にて抽出する. 方法はキットの取り扱い説明書を参照のこと. 必ず正常血清等の陰性コントロールを置く.

- ② Ready-to-Go RT-PCR (Pharmacia Biochemica)を用いる場合, プライマーをそれぞれ 50 pmole/tube, 精製 RNA 5 μl を加え, さらに DEPC 処理済純水を最終量が 50μl となるように加える.
- ③ RT-PCR を以下の条件で実施する.

42°C	30 分	
94°C	5 分	
94°C	40 秒	40 サイクル
52°C	45 秒	
72°C	45 秒	
72°C	5 分	

- ④ RT-PCR 産物をアガロースゲル(1.5-2.0%)電気泳動して, エチジウムブロマイド染色により増幅された DNA 産物を確認する.

3. ウイルス抗原検出 ELISA:

ラッサウイルス感染症においては発病数日までは, 血液中にウイルスが検出されるため, 迅速なウイルス感染の証明に RT-PCR と並んでウイルス抗原検出 ELISA を用いることができる. ウイルス抗原検出 ELISA の反応原理は以下のようになる.

- ① 抗ラッサウイルス核蛋白モノクローナル抗体をコートしたプレートで患者材料(血清, 組織乳剤)中の核蛋白を捕獲する.
- ② 抗核蛋白ウサギポリクローナル抗体を捕獲された核蛋白と反応させる.
- ③ 反応したウサギ抗体を, 酵素標識した抗ウサギ IgG 抗体で検出する(マウスに反応する標識抗体では, プレートにコートしたモノクローナル抗体と反応してしまう).
- ④ 酵素に対する発色基質を加え, 捕獲された核蛋白を発色により検出する(核蛋白量・ウイルス量は発色の程度によって示される).

A) 試薬・機材

- ① 精製抗ラッサウイルス核蛋白モノクローナル抗体(クローン 4A5, 国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にて培養上清もしくはマウス腹水より精製)
- ② ウサギ抗ラッサウイルス核蛋白ポリクローナル血清(NIID-Lassa-NP/#1, 国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にて作製)
- ③ ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体(Zymed 社, HRPO-標識 anti-rabbit IgG, affinity purified)
- ④ 陽性コントロール(精製リコンビナントラッサウイルス核蛋白, 国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にてリコンビナントバキュロウイルス感染細胞より調製)
- ⑤ 96 ウェル ELISA プレート(Falcon 社製)
- ⑥ リン酸緩衝液(PBS (-))
- ⑦ 洗浄バッファー(0.05% Tween20-PBS (-))
- ⑧ ブロッキングバッファー(5%スキムミルク-PBS (-))
- ⑨ 不活化バッファー(試料が組織の場合. 1%TritonX-100 in PBS (-))
- ⑩ Triton X-100 (試料が血清の場合)
- ⑪ 希釈バッファー(0.5%スキムミルク in PBS (-))
- ⑫ ABTS (2,2'-アジノ-ビス-(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)) 発色基質(Roche Diagnostics, ABTS tablet および Buffer for ABTS)
- ⑬ ホモジナイザー(試料が組織の場合. 1.5ml のプラスチックチューブとそれにあったプラスチック製ディスポーザブルペステルが市販されている)
- ⑭ 1.5ml チューブ用マイクロ遠心機(試料が組織の場合)
- ⑮ マイクロプレートリーダー

B) 検査方法

- ① 精製抗ラッサウイルス核蛋白モノクローナル抗体(クローン 4A5)を 1 μ g/ml に PBS (-)で希釈し, ELISA プレートのレーン 1〜6 の各ウェルに 100 μ l ずつ分注する(図 1b). 室温で 2 時間吸着させる(4℃で一夜吸着させてもよい. この場合は, 蒸発を防ぐためプレートをシールする). 図 1b に示したように, 単クローン抗体がコートされたウェル(レーン 1〜6, 単クローン抗体陽性ウェル)とコートされないウェル(レーン 7〜12, 単クローン抗体陰性ウェル)を準備する.

- ② 抗体液を捨て、200 μ l のブロッキングバッファーを各ウェルに分注する。37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる。
- ③ 検体の準備を行う。検体が血清の場合には Triton X-100 を最終濃度が 1% になるように加え混和する。検体が組織の場合、組織が約 10% になるように不活化バッファーを加えホモジナイズ後 3,000 回転 5 分間遠心し上清を検体とする。Triton X-100 を加えることは、ウイルスを不活化するだけでなくウイルス粒子中の核蛋白を粒子外に放出するためにも必須である。処理した検体は、ブロッキングが終了するまで 4 $^{\circ}$ C で保存する。使用時に希釈バッファーで 5 倍に薄める（希釈しない状態では、Triton X-100 によりプレートにコートされたモノクローナル抗体が洗い流される）。陽性コントロールは 1 μ g/ml に希釈バッファーで希釈する。
- ④ ブロッキングバッファーを捨て洗浄バッファーで 3 回洗浄し、すべてのウェルに 100 μ l の希釈バッファーを加える。希釈バッファーで 5 倍に希釈した検体および陽性コントロールそれぞれ 100 μ l を、単クローン抗体陽性ウェル（レーン 1）と陰性ウェル（レーン 7）それぞれに分注し（最終的に 10 倍希釈になる）、それらのウェルから順に 2 倍段階希釈する（10 倍希釈から 320 倍）（図 1b）。37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる。
- ⑤ 検体を捨て洗浄バッファーで 3 回洗浄し、希釈バッファーで 1,000 倍に希釈したウサギ抗ラッサウイルス核蛋白血清 100 μ l を各ウェルに分注し、37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる。
- ⑥ ウサギ血清を捨て洗浄バッファーで 3 回洗浄し、希釈バッファーで 1,000 倍に希釈した HRPO 標識抗ウサギ IgG 抗体 100 μ l を各ウェルに分注し、37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる。この間に発色基質を調製する。発色基質を完全に溶解するのに 10 分から 15 分要する。調製した基質は数週間程度なら遮光して 4 $^{\circ}$ C で保存できる。
- ⑦ 標識抗体を捨て洗浄バッファーで 3 回洗浄し、ABTS 発色基質 100 μ l を各ウェルに分注し、37 $^{\circ}$ C 30 分反応させる。
- ⑧ 波長 405nm のフィルターを用いて、OD (吸光度) を測定する。単クローン抗体陽性ウェルの OD から、対応する陰性ウェルの OD を差し引いた値を捕捉されたラッサウイルスの核蛋白による OD 値と判定する。

血清学的検査

1. 間接蛍光抗体法:

ラッサウイルスの核蛋白を恒常的に発現する HeLa 細胞 (HeLa-Lassa-NP 細胞) を用いた間接蛍光抗体法がラッサ熱患者血清の血清学的診断における有用であることを確認している. 急性期と回復期 (発症 2 週目以降) のペア血清を同時に検査することが重要である. また, 被験血清を熱非働化 (56°C 30 分) 処理してから検査に供する.

A) 試薬・機材

- ① HeLa-Lassa-NP 細胞
- ② D-MEM
- ③ リン酸緩衝液 (PBS (-))
- ④ 細胞消化用トリプシン・EDTA 液 (0.25%トリプシン-0.02%EDTA 加 PBS (-))
- ⑤ 蛍光抗体検査用スライドグラス (14 ウェル, AR Brown 社)
- ⑥ FITC 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体 (Zymed 社)
- ⑦ 10%グリセリン加 PBS (-)
- ⑧ カバーグラス
- ⑨ 蛍光顕微鏡

B) 検査方法

- ① HeLa-Lassa-NP 細胞を継代して 2 日間培養する.
- ② PBS (-) で洗浄し, トリプシン処理により HeLa-Lassa-NP 細胞を回収する. 更に細胞を PBS (-) で洗浄後 3,000,000 cells/ml となるように PBS (-) に浮遊する.
- ③ 蛍光抗体検査用スライドグラスの各ウェルに細胞浮遊液を 10 μ l ずつ分配し, 完全に乾燥させる. 乾燥したら 100%アセトン中で 5 分間固定する. アセトンを蒸発させた後 -80°C に保管することができる.
- ④ PBS (-) で 20 倍から 2 倍段階希釈した被験血清を各ウェルにのせ, 37°C, 1 時間反応させる. 被験血清と同時に抗体陽性コントロール血清を同時に検査する.
- ⑤ PBS (-) でスライドグラスを洗浄し, PBS (-) で 70 倍希釈した FITC 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体を各ウェルにのせ, 37°C, 1 時間反応させる.
- ⑥ PBS (-) でスライドグラスを洗浄後, 10%グリセリン加 PBS (-) を用いて封入する.

- ⑦ 蛍光顕微鏡で特異蛍光を検鏡する. 特徴的な染色像が認められれば抗体陽性と判定し, 抗体陽性を示した最高希釈倍率の逆数を抗体価とする.

2. IgG-ELISA:

リコンビナントバキュロウイルスで発現, 精製したラッサウイルス核蛋白を抗原とした IgG 検出を目的とした ELISA (IgG-ELISA, 図 2a)が, 診断に有用であることが確認されている. 急性期と回復期のペア血清を同時に検査することが重要である.

A) 試薬・機材

- ① 精製組み換えラッサウイルス核蛋白 (国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にてリコンビナントバキュロウイルス感染細胞より調製)
- ② ELISA プレート (Falcon 社)
- ③ リン酸緩衝液 (PBS (-))
- ④ 0.05%Tween 20 in PBS (-) (T-PBS)
- ⑤ 5%スキムミルク加 T-PBS (M-T-PBS)
- ⑥ ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Zymed 社, HRPO-標識 anti-rabbit IgG, affinity purified)
- ⑦ ABTS 発色基質 (Roche Diagnostics, ABTS tablet および Buffer for ABTS)
- ⑧ マイクロプレートリーダー

B) 検査方法

- ① 精製組み換えラッサウイルス核蛋白を 1 μ g/ml に PBS (-) で希釈し, ELISA プレートのレーン A~D の各ウェルに 100 μ l 加える. レーン E~H の各ウェルには PBS (-) を 100 μ l 加える (図 2b). 4 $^{\circ}$ C 一晚抗原を吸着させる. レーン A~D のウェルを抗原陽性ウェル, レーン E~H のウェルを抗原陰性ウェルとする (図 2b).
- ② 各ウェルに 200 μ l の M-T-PBS を加え, 37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる.
- ③ 抗原液を捨て T-PBS で 3 回洗浄し, 各ウェルに M-T-PBS を 100 μ l 加える. 次いで M-T-PBS で 25 倍に希釈した被験血清 33 μ l を抗原陽性ウェルのレーン A と陰性ウェルのレーン E にそれぞれ加え (最終的に 100 倍希釈になる), それらのウェルから順次 4 倍段階希釈 (100 倍から 6,400 倍) する (図 2b). 37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる.
- ④ 検体を捨て T-PBS で 3 回洗浄し, ついで各ウェルに M-T-PBS で 1,000 倍希釈

した HRPO 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体 100 μ l を各ウェルに加える。37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる。

- ⑤ 標識抗体を捨て T-PBS で 3 回洗浄し、各ウェルに ABTS 発色基質液 100 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C 30 分反応させる。
- ⑥ 波長 405nm のフィルターを用いて、OD を測定する。抗原陽性ウェルの OD から、対応する抗原陰性ウェルの OD を差し引いた値を抗ラッサウイルス核蛋白抗体による OD 値とする。

3. IgM-capture ELISA :

ラッサウイルスに対する IgM 検出のための IgM-capture ELISA(図 3a)は、IgG-ELISAと同様に精製組み換えラッサウイルス核蛋白を抗原としたものである。現時点では、この IgM-capture ELISA のラッサ熱の診断における有用性は確かめられていないが、IgM-capture ELISA の結果はその他の検査結果とともに総合的に反映させる。検査毎に、精製組み換えラッサウイルス核蛋白をサルに免疫して作製した抗ラッサウイルス核蛋白 IgM 抗体陽性コントロール血清と陰性コントロール血清を置く。

A) 試薬・機材

- ① 精製組み換えラッサウイルス核蛋白(国立感染症研究所ウイルス第1部にてリコンビナントバキュロウイルス感染細胞より調製)
- ② ELISA プレート(Falcon 社)
- ③ リン酸緩衝液 (PBS (-))
- ④ 0.5%Tween 20 -PBS (-) (T-PBS)
- ⑤ 5%スキムミルク加 T-PBS (M-T-PBS)
- ⑥ IgM 抗体捕捉用抗ヒト IgM 抗体(ヤギ F(ab')₂ Anti-Human IgM, Biosource International, Inc. Tago Products)
- ⑦ ウサギ抗ラッサウイルス核蛋白ポリクローナル血清(NIID-LASSA-NP/#1, 国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にて作製)
- ⑧ ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体(Zymed 社, HRPO-標識 anti-rabbit IgG, affinity purified)
- ⑨ 陽性コントロール(精製組み換えラッサウイルス核蛋白をサルに免疫して 3 週目に採取された血清)

- ⑩ 陰性コントロール(陽性コントロールと同じサルから免疫前に採取された血清)
- ⑪ ABTS 発色基質(Roche Diagnostics, ABTS tablet および Buffer for ABTS)
- ⑫ マイクロプレートリーダー

B) 検査方法

- ① 捕捉用抗ヒト IgM 抗体を PBS (-)で 1 μ g/ml 以上の濃度になるように希釈し、ELISA プレートの各ウェルに 100 μ l 加える。4 $^{\circ}$ Cで一晩置く。
- ② 捕捉用抗体を捨て T-PBS で 3 回洗浄し、各ウェルに 200 μ l の M-T-PBS を加える。37 $^{\circ}$ Cで 1 時間反応させる。
- ③ M-T-PBS を捨て T-PBS で 3 回洗浄し、M-T-PBS 100 μ l を各ウェルに加える。次いでレーン A とレーン E のウェルに、M-T-PBS で 10 倍希釈した被験血清 100 μ l を加え(20 倍希釈になる)、さらに 20 倍から 160 倍になるようにそれぞれ 2 倍段階希釈する(図 3b)。陽性コントロールおよび陰性コントロールを置く。37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる。
- ④ 被験血清を捨て T-PBS で 3 回洗浄後、レーン A〜D の各ウェルに M-T-PBS で 1 μ g/ml に調整した精製ラッサウイルス核蛋白を 100 μ l 加える。一方、レーン E〜H の各ウェルには M-T-PBS 100 μ l を加える(抗原陰性コントロール)。
- ⑤ 抗原液を捨て T-PBS で 3 回洗浄後、M-T-PBS で 1,000 倍希釈した抗ラッサウイルス核蛋白血清 100 μ l を各ウェルに加え、37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる。
- ⑥ 抗ラッサウイルス血清を捨て T-PBS で 3 回洗浄後、M-T-PBS で 1,000 倍希釈した HRPO 標識抗ウサギ IgG 抗体 100 μ l を各ウェルに加え、37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる。
- ⑦ 抗ウサギ IgG 抗体を捨て T-PBS で 3 回洗浄後、各ウェルに ABTS 発色基質液 100 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C, 30 分反応させる。
- ⑧ 波長 405nm のフィルターを用いて、OD を測定する。抗原陽性ウェルの OD 値から、対応する抗原陰性ウェルの OD 値を差し引いた値を抗ラッサウイルス核蛋白 IgM 抗体による OD 値と判定する。

ラッサウイルス感染症の診断基準

次のいずれかが満たされた場合、「ラッサウイルス感染症」とする。

- 被験検体からラッサウイルスが分離された。

- 被験検体から RT-PCR 法でラッサウイルスゲノムが検出された.
- 被験検体から抗原検出 ELISA 法で, ラッサウイルス核蛋白が検出された.
- 間接蛍光抗体法または IgG ELISA で判定された急性期と回復期に採取されたペア血清のラッサウイルス核蛋白に対する抗体価が, 4 倍以上の有意に上昇した.

次の場合, 「ラッサウイルス感染症」を疑う.

- IgM-capture ELISA で, ラッサウイルス核蛋白に対する特異的 IgM 抗体が検出された.

引用文献

1. 森川茂. ウイルス性出血熱. 臨床病理 特 108 号, 105-110, 1998
2. 森川茂, 田代真人. 出血熱ウイルスの診断体制. 臨床と微生物 24:583-586, 1997
3. Jahring PJ. Filoviruses and Arenaviruses. In Manual of Clinical Microbiology, 6th Edition, edited by Murray PR et al, pp 1068-1081, ASM Press, Washington DC, 1995
4. Demby AH, Chamberlain J, Brown DWG, Clegg CS. Early diagnosis of Lassa fever by reverse transcription-PCR. J. Clin. Microbiol. 32, 2898-2903, 1994
5. Saijo M, Niikura M, Morikawa S, Ksiazek TG, Meyer RF, Peters CJ, Kurane I. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoproteins. J. Clin. Microbiol. 39:1-7, 2001
6. Saijo M, Niikura M, Morikawa S, Kurane I. Immunofluorescence Method for Detection of Ebola Virus Immunoglobulin G, Using HeLa Cells Which Express Recombinant Nucleoprotein. J. Clin. Microbiol. 39:776-778, 2001

緊急時連絡先

国立感染症研究所(戸山庁舎)ウイルス第1部

部長 倉根一郎

TEL: 03-5285-1111 / (home) 03-3221-1733

FAX: 03-5285-1169

e-mail: kurane@nih.go.jp

国立感染症研究所村山分室ウイルス第1部外来性ウイルス室

室長 森川 茂

TEL: 042-561-0771(内線 791)

FAX: 042-564-4881

e-mail: morikawa@nih.go.jp

図 1. 抗原検出 ELISA の原理(a)と ELISA プレートにおける固相化された単クローン抗体の有無, 被験血清の希釈倍率および陽性・陰性コントロール抗原の位置(b).

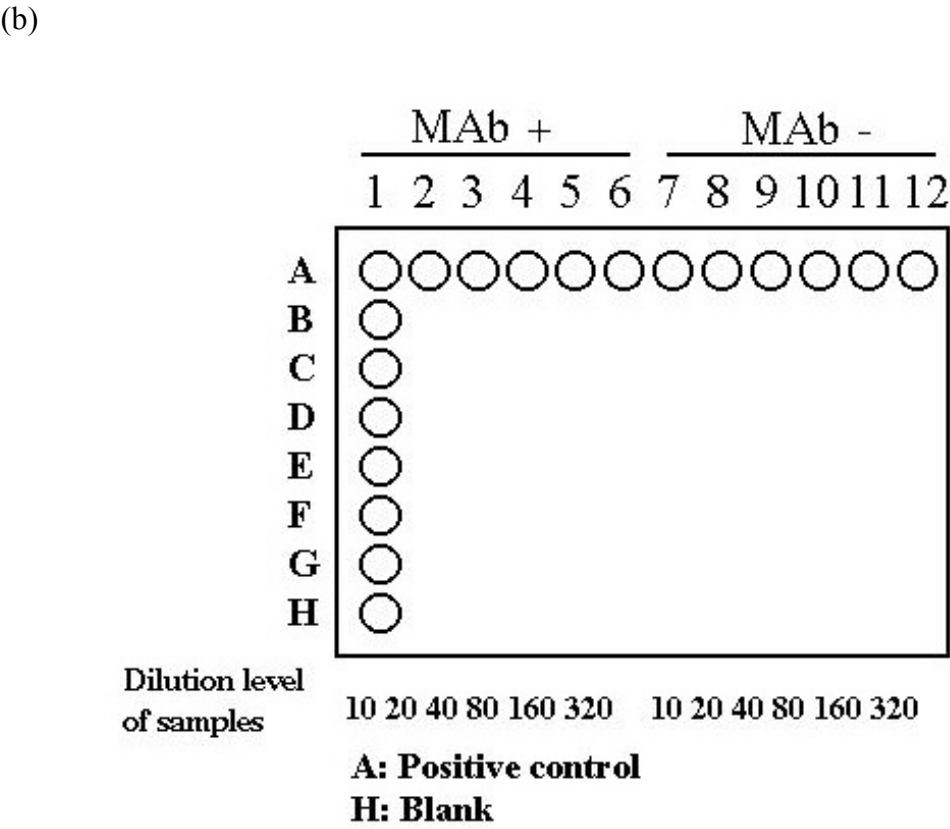
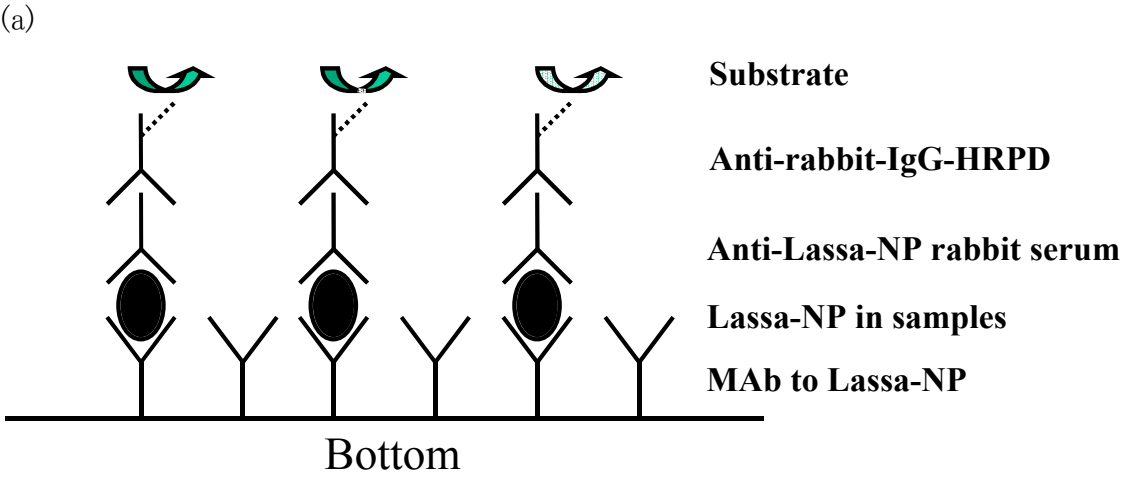
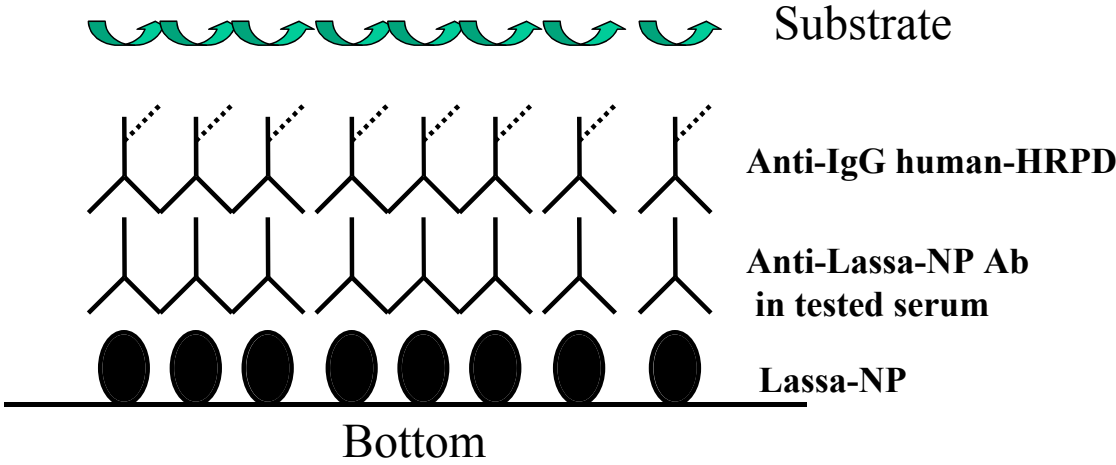


図 2. IgG ELISA の原理 (a) と ELISA プレート の各ウェル における 固相化された 抗原の 有無，被験血清の希釈倍率および陽性・陰性コントロール血清の位置の説明 (b) .

(a)



(b)

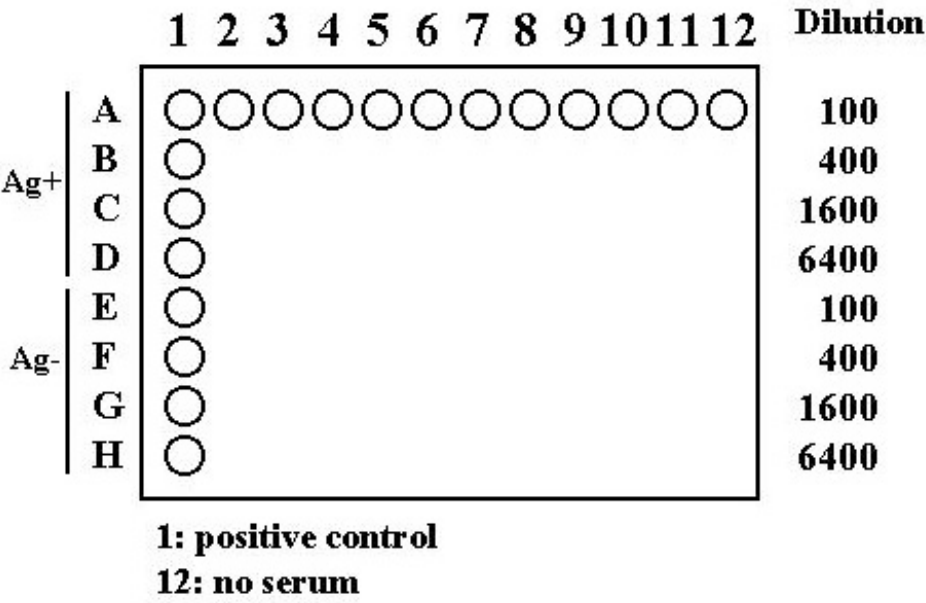
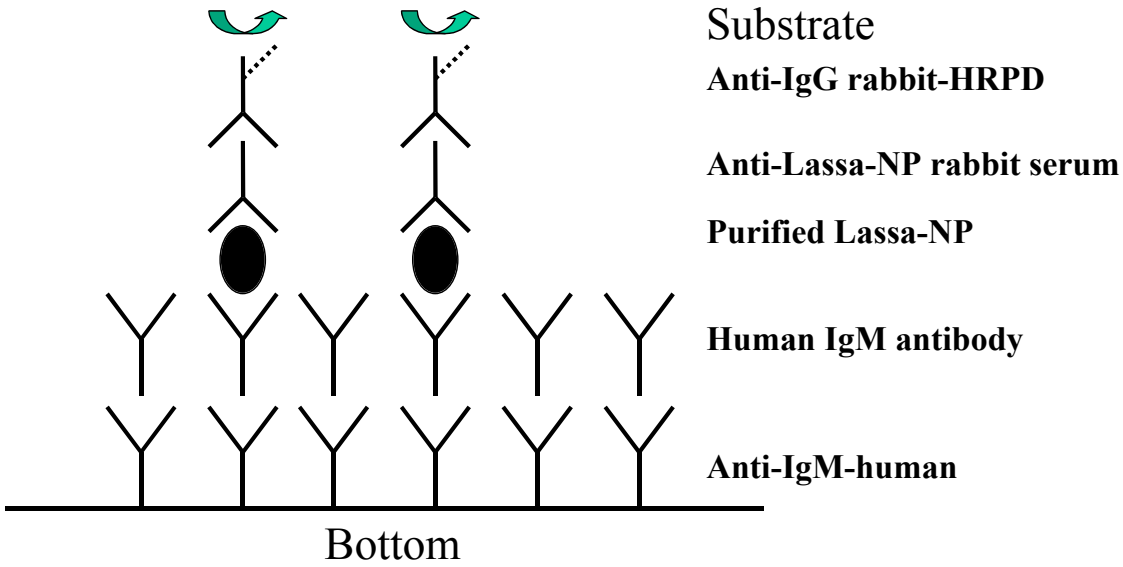
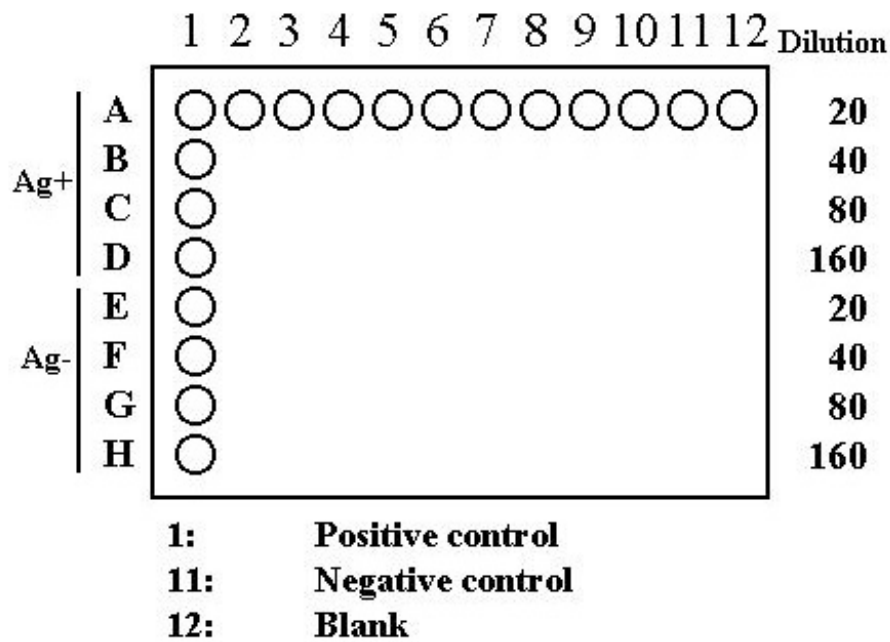


図 3. IgM-capture ELISA の原理(a)と ELISA プレートの各ウェルにおける被験血清の希釈倍率, 加えられる抗原および陽性・陰性コントロール血清の位置の説明(b).

(a)



(b)



ポリオウイルス

目 次

(1) 疾患の概説

ポリオ根絶の状況

(2) 検査に関する一般的注意

検査材料の採取

検査材料の輸送

作業上の注意

検査の進め方

(3) 検査方法

1) ウイルスの分離

2) ウイルスの同定

3) PCR-RFLP 法を用いたポリオウイルスの型内株鑑別

4) 微量中和試験による血清学的検査

(4) 引用文献

(5) 連絡先

(6) 執筆者

(7) 発行所

(1) 疾患の概説

ポリオ(poliomyelitis)は、脊髄性小児麻痺あるいは急性灰白髄炎とも呼ばれる運動麻痺を起こす重篤なウイルス感染症である。起因ウイルスであるポリオウイルスは、小型球形の RNA ウィルスで、分類上ピコルナウイルス科の中のエンテロウイルス属に属している。1-3 型の血清型があり、生ワクチンがポリオの予防に広く用いられている。感染症新法では2類感染症に分類されている。

ポリオウイルスは口から取り込まれると咽頭や小腸で感染が始まる。局所のリンパ組織で増殖して血液中に入り、ウイルスは全身に拡散する。ウイルスが脳血管関門をこえて脳に達した場合、脊髄の前角細胞に運ばれ、そこで増殖する。その結果、神経細胞が破壊され支配領域の運動神経麻痺をおこす。ウイルスが細胞に感染、吸着、侵入するためには、免疫グロブリンスーパーファミリーの一員である宿主細胞のポリオウイルス受容体と結合することが必須である。ポリオウイルス受容体遺伝子がクローニングされ、この受容体がポリオウイルスの増殖の種特異性や組織特異性の決定に重要な関与をしていることが明らかになった。ポリオウイルス感受性となったトランスジェニックマウスが開発され、サルにかわる感染実験動物モデルとしてウイルス伝搬経路の解析や神経毒力の試験に使われている。また、ヒトポリオウイルス受容体を持ったマウス細胞は本稿で述べるように迅速なウイルス診断に欠くことのできない細胞として広く使用されるようになっている。

ポリオウイルスに感染しても大部分が症状のない不顕性感染(90-95%)や感冒様の不全型(4-8%)である。感染がさらに広がっても無菌性髄膜炎や一過性の麻痺(1-2%)で終わる。麻痺型ポリオは感染を受けた人の 0.1-2%くらいとされている。

自然感染の場合、ウイルスの感染を受けてから発症までの潜伏期は普通 7-14 日である。ウイルスの排泄は通常1ヶ月くらいまでである。ポリオの感染は、免疫不全のある患者では長引くことはあるが、一般には急性であってウイルスが持続感染することはない。通常、発熱の最中あるいは解熱期に左右非対称の弛緩性麻痺が出現する。急性期をすぎると6ヶ月くらいまで麻痺の回復はあるがその後は麻痺が固定されて残る。臨床的には野生株によるポリオ麻痺もワクチン由来株によるものも区別は出来ない。ポリオと区別しがたい麻痺症状がエコーウイルス、コクサッキーウイルス、エンテロウイルス71などの非ポリオエンテロウイルスによっておこることがある。またギランバレー症候群もポリオとの鑑別を要するものとして重要である(1)。

ポリオ根絶の状況

我が国では、1961 年よりワクチン接種が始まり、それ以来患者発生は激減した。1981 年以降、野生型ポリオウイルスの感染による麻痺患者の発生はない(2)。1988 年、WHO による全世界レベルでのポリオ撲滅計画が始まった。徹底的な生ワクチン投与により、まずポリオウイルスの野生株を地上から排除しようというものである。WHO ポリオ撲滅戦略の鍵である急性弛緩性麻痺(acute flaccid paralysis ; AFP)の概念をよく理解したうえで、ポリオの鑑別診断を行うことが第一線の医療従事者にとって必要である。1991 年以降アメリカ大陸から(3)、1997 年以降西太平洋地域から(4)ポリオを根絶した戦略は、基本的に AFP をすべてポリオ疑診例として扱い、報告を義務づけ、速やかにウイルス分離のための便検体採取を指導したことである。2000 年現在、野生株が分離されているのはインド、パキスタン、アフリカ中西部の諸国である。ポリオウイルスの分離をもってポリオの最終診断がなされるようになったのは、ポリオ根絶計画と無関係ではない。

野生株の常在しない国でポリオ患者の集団発生をみた場合(5)、原因となったポリオウイルスがワクチン株の変異したものなのか、あるいはどこの地域から侵入してきた野生株なのか調べるが必要不可欠である。ポリオウイルス感染では不顕性感染や不全型感染が多いので、麻痺

を伴わない無菌性髄膜炎や上下気道感染症等でポリオウイルスが分離された場合でも、患者のワクチン歴、海外渡航歴に注意して、常に野生株の侵入の可能性があることに気を留めておく必要がある。実際、我が国でも 1993 年、滋賀県で海外旅行直後のインフルエンザ様患者の咽頭拭い液から輸入野生株が分離されたことがあった(6)。

(2) 検査に関する一般的注意

検査材料の採取

検査をより正確で効果あるものにするために検体は発症後できるだけ早く採取する。ポリオウイルスが分離されるのは麻痺の発現後1ヵ月位までである。検査材料としては糞便が最も効率よくウイルス分離のできる材料として推奨される。咽頭拭い液からも良くウイルスが分離できる。髄液からウイルスが分離できれば、直接病因との関係が明らかになるが、一般にはウイルス分離は困難である。糞便からの検査材料は抗生剤を通常の5倍濃度入れた PBS(+)で 10%乳剤をつくって調整する。その際クロロホルム処理をおこなうと、細菌やカビをとり除くことができる。咽頭拭い液の調整は滅菌綿棒で局所をぬぐい、直に細胞培養液に浸して密栓し、2時間ほど液に溶出させる。それを良く攪拌した後遠心し、その上清が検査材料となる。髄液はそのまま細胞に接種できる。

検査材料の輸送

ウイルス材料の保管・輸送中の凍結、融解の繰り返しはウイルス力価が低下するので避けなければならない。そこで-20℃での保管・輸送が確保できなければ、0-8℃で保管・輸送する。輸送にあたっては冷却が保たれる状態で包装し、被験者の氏名、年齢、ワクチン歴、発病日、検体採取日など必要事項を記入のうえ送付する。

送付先にはあらかじめ検体数、搬入予定などを連絡しておく。麻痺患者から分離されたポリオウイルスや流行予測事業等でワクチン投与後 2 ヶ月以上経過してから分離されたポリオウイルスは被験者の症状を問わず国立感染症研究所ウイルス第二部、腸管感染ウイルス第二室（東京都武蔵村山市学園 4-7-1）に送り、型内株鑑別を依頼すること。

ポリオウイルスは-20℃で長期間保存できる。

作業上の注意

通常の実験室では複数の検体を処理する機会が多いと思われる。他の病原体の混入をさけるためにも、あるいは実験者への感染を防ぐためにも、検体の取り扱いには十分注意を払わなければならない。

- 1) 分離、同定の作業の際はクラス2の安全キャビネットを使用のこと。
- 2) 実験者のポリオウイルスに対する血清抗体価を調べておくこと。抗体陰性者はワクチンの接種をうけること。
- 3) ポリオウイルスの分離、同定に際して感染細胞の保温は 37℃を越えないように注意する。生ワクチンに使われているセービン株は温度感受性であること、また分離中のウイルス変異を極力さけることなどを考慮して、感染研では 35℃で分離同定を行っている。

検査の進め方

検査を進めて問題なのは、ポリオウイルス以外のエンテロウイルスとの区別である。L20B 細胞(7)というヒトポリオウイルスレセプターを発現しているマウスの細胞を使えば、ポリオウイルスだけを選択的に増殖できるのでポリオウイルスの分離、同定は非常に容易になった。同定は 4 種類のプール抗血清パネルを使って中和法(8, 9)で行う。結果の報告に当たってはワクチン接種の有無、時期、海外渡航歴について記載しておくことが必須である。

ポリオウイルスの血清型が同定されたものについては、ワクチン由来株か野生株か型内株鑑別を行う(図1)(10)。これも PCR-RFLP 法(後述)で迅速、かつ正確に行えるようになった。野生株と判明した場合は VP1 領域の塩基配列を決め、分子系統樹をつくって、いままでに分離された野生株との近縁性を調べる。

ポリオ感染症の場合、ウイルス分離を行ったうえでの同定が診断の基本である。血清抗体価

の測定では野生株とワクチン株との区別ができないので血清診断は補助的手段であるが、流行予測事業等の疫学調査では集団の免疫状態に関する貴重な情報を提供している。

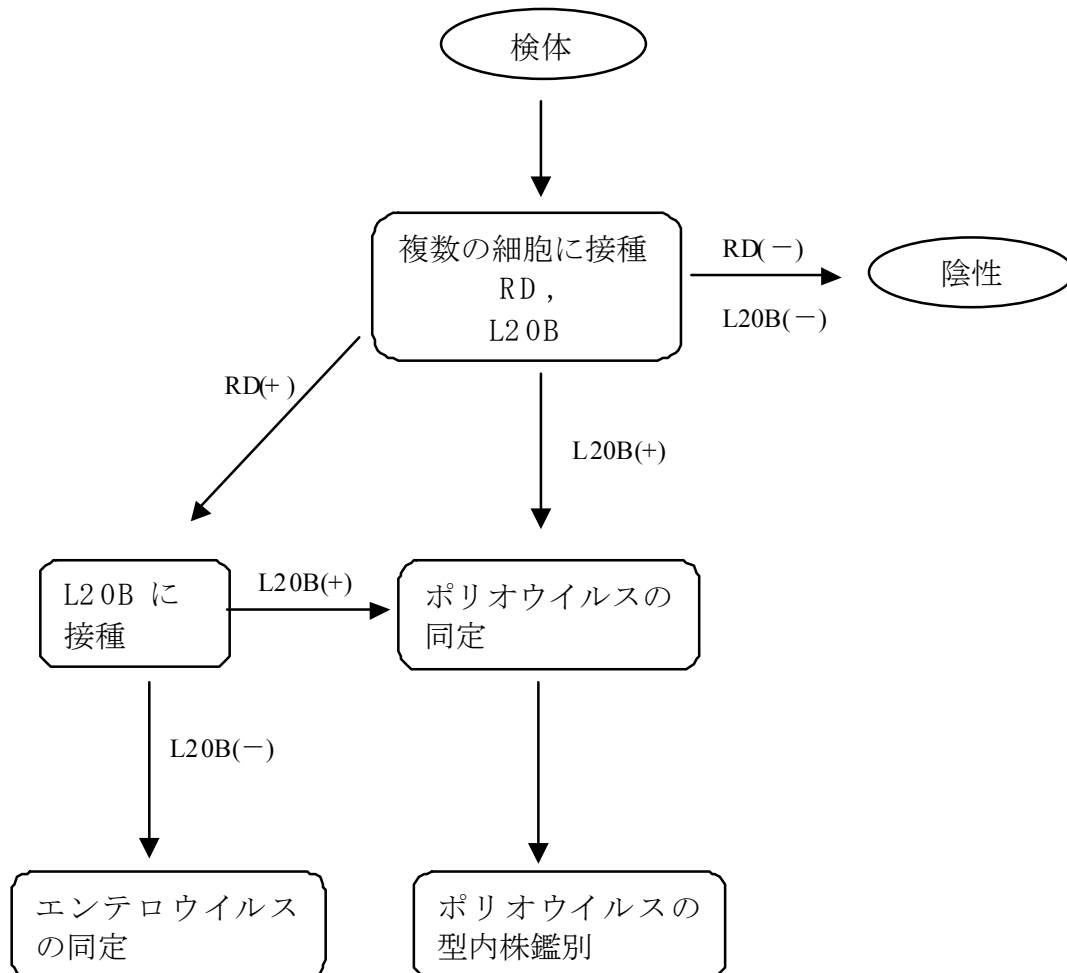


図 1. 検査の進め方と L20B 細胞の使用法

(3)検査方法

1)ウイルスの分離

準備するもの

1. 試薬・細胞

抗生物質を高濃度(ペニシリン 500U/ml,ストレプトマイシン 500 μ /ml)含む PBS(+)、クロロフォルム、細胞増殖培養液(10%FBS 含 MEM)、細胞維持培養液(2%FBS 含 MEM)

RD 細胞、HEp-2 細胞、L20B 細胞 (ポリオウイルスレセプターを発現しているマウスのL細胞)等、ポリオウイルスに感受性のある複数の細胞を使用する。

2. 機材

炭酸ガス培養装置、24 穴細胞培養プレート、マイクロピペット(P1000)、マイクロピペット(P200)、滅菌済み綿付きチップ(～200 μ l)、ストックチューブ(2ml 用)

操作

1. 10%糞便抽出液の作製

- ① 50 ml のポリプロピレン製の遠心管に、糞便1g、抗生物質を含んだ PBS(+) 8.5 ml、クロロホルム 1.5 ml を加える。
- ② 20 分間激しく攪拌の後、3,000 rpm 20 分遠心する。
- ③ 上清を新しいストックチューブにとり、ウイルスの分離に用いる。

2. 接種と観察

- ① 24 穴の培養プレートを使用する。検体相互の混入を避けるため図2のごとく、1 穴ずつ空けて細胞を用意する。

検体 1		検体 2		検体 3	
	検体 4		検体 5		検体 6
検体 7		検体 8		検体 9	
	検体 1 0		検体 1 1		細胞対照

図 2. 分離用プレートの使い方

- ② 単層になった細胞の増殖培養液を捨て、1ml の維持培養液にかえる。
- ③ 1. で用意した糞便抽出液の 100 μ l を細胞に接種する。複数の細胞を使うなら 1 検体あたり 1 穴で良い。
- ④ 35℃で 7 日間観察する。7 日間観察して CPE が現れない時は別の新しい細胞に継代し、更に 7 日間観察する。計 14 日間観察して CPE が現れなければ、ウイルス分離陰性とする。
- ⑤ 完全な CPE が現れたら、培養液を-20℃に保存する(初代ウイルス)。
- ⑥ 初代ウイルスを新しい細胞に接種して、はっきりした CPE が再び現れたら培養液を-20℃に保存する(2 代目ウイルス)。ウイルスの同定には力価の高くなった2代目ウイルスを用いる。

3. 細胞毒性

- ① 接種後 24 時間以内に CPE が現れたら、糞便抽出物による非特異的な細胞毒性である。新しい細胞にその培養液を 100 μ l 接種し観察を続ける。
- ② 初代ウイルスと思われたものでも 2 代目の継代で CPE が現れなければ、糞便抽出物の非特異的变化と考えて良い。計 14 日の観察で分離の結果を判定する。

4. その他

L20B 以外の細胞でウイルスが分離できたら必ず、L20B 細胞に接種しポリオウイルスの有無を調べる必要がある(図1)。L20B 細胞はポリオウイルスだけに感受性のある細胞であり、エンテロウイルスとポリオウイルスが混在する時に非常に便利である。稀に L20B 細胞でアデノウイルスやレオウイルスが分離されるがポリオウイルスと違い力価が低いので容易に区別できる。

2) ウイルスの同定

準備するもの

1. 試薬・細胞

抗ポリオウイルス血清プール(市販)、細胞培養液(前出)、同定に使用する細胞はウイルス分離のものと同じ細胞を使用するのが原則である。細胞浮游液は増殖培養液で調整する。

2. 機材

炭酸ガス培養装置、96 穴細胞培養プレート、マイクロピペット(P1000)、マイクロピペット(P200)、滅菌済み綿付きチップ(～200 μ l、～1000 μ l)、ウイルス希釈用滅菌済み綿付き長チップ(～200 μ l)、ウイルス希釈用試験管(アルミキャップ付き)

操作

基本的にはマイクロプレート上で20単位のプール抗血清と約100TCID₅₀の分離ウイルス希釈検体を、50 μ l ずつ等量混ぜ、2時間中和後、細胞浮游液を100 μ l 加える。作業の迅速化のため、事前の分離ウイルスの力価試験は通常省略する。

① 図3に示した様にマイクロプレートをセットアップする。

		プール抗血清 P1+P2+P3		プール抗血清 P1+P2		プール抗血清 P1+P3		プール抗血清 P2+P3		ウイルス 対照		細胞 対照	
希釈		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
被検ウイルス X	-4	A											
	-5	B											
被検ウイルス Y	-4	C											
	-5	D											
Back titrations:		E											
被検ウイルス X		F											
被検ウイルス Y		G											
		H											
		-4		-5		-6		-7		-8			

図3. マイクロ法によるポリオウイルスの同定

- ② 4 種類の抗血清プールを 50 μ l ずつ、それぞれの穴に加える。
- ③ ウイルス対照の穴に 50 μ l の維持培養液を加える。
- ④ Back titration の穴に 50 μ l の維持培養液を加える。
- ⑤ 細胞対照の穴に 100 μ l の維持培養液を加える。
- ⑥ ウイルス希釈列を 10^{-1} - 10^{-8} までつくる。
- ⑦ 0.9ml の維持培養液を試験管に加える。
- ⑧ 1 本目の試験管に滅菌チップまたはピペットで 100 μ l のウイルス液を加える。
- ⑨ 良く攪拌した後、新しいチップに換えて 100 μ l を 2 番目の試験管に加える。
- ⑩ この操作を繰り返して 10^{-8} までウイルスを希釈する。
- ⑪ 希釈した分離ウイルス 50 μ l を、抗血清を加えてある穴、ウイルス対照の穴、Back titration の穴に加える。
この際、高い希釈のウイルスから加えていけば、チップはウイルス毎に 1 本で済む。
- ⑫ プレートミキサー上で 1 分間震盪する。
- ⑬ 35~37°C で 2 時間保温(中和)する。
- ⑭ 中和の時間に細胞をトリプシン消化し、 $1-2 \times 10^5$ 個/ ml の細胞浮游液をプレート 1 枚につき 10ml 用意する。
- ⑮ 細胞を 100 μ l ずつ中和の終わったプレートの穴に加える。
- ⑯ 35°C の炭酸ガス培養装置で保温する。

判定

- ① 倒立顕微鏡で 7 日間 CPE を観察し、図 4 に示す CPE の出現パターンにより、血清型を判定する。
- ② 原則として攻撃ウイルス量が 32-320TCID₅₀ から外れているときは再検査する。ただし、320 を越えても P1+2+3 のプール血清で CPE が陰性の場合には、再検査の必要はない。

CPEの出現パターン				判定	
プール中の抗体の血清					
P1+P2+P3	P1+P2	P1+P3	P2+P3		
—	—	—	+	1	型
—	—	+	—	2	型
—	+	—	—	3	型
—	—	+	+	1. 2	型混合
—	+	—	+	1. 3	型混合
—	+	+	—	2. 3	型混合
—	+	+	+	1. 2. 3	型混合
+	+	+	+	*非ポリオウイルス	

*: 非ポリオウイルスまたは非ポリオウイルスとポリオウイルスの混合

+: CPE(+), —: CPE(—)

図4. ポリオウイルス血清型の判定

3) PCR-RFLP 法を用いたポリオウイルスの型内株鑑別

分離されたポリオウイルスがワクチン株か野生株かの鑑別の必要性が生じた場合は、VP1を主な標的にしたPCR-RFLP法により行う(11)。3Dポリメラーゼを標的にしたPCR-RFLP法を併用すれば、組換えウイルスを検出することができる(12)。ウイルスRNA抽出の⑥までウイルスの取り扱いにはクラス2の安全キャビネットを使用する。RNAの抽出、およびRT-PCRの方法はいろいろあるが、どの方法でも良い。ここでは我々の使用している方法を簡単に記す。方法の概略を図5に示す。

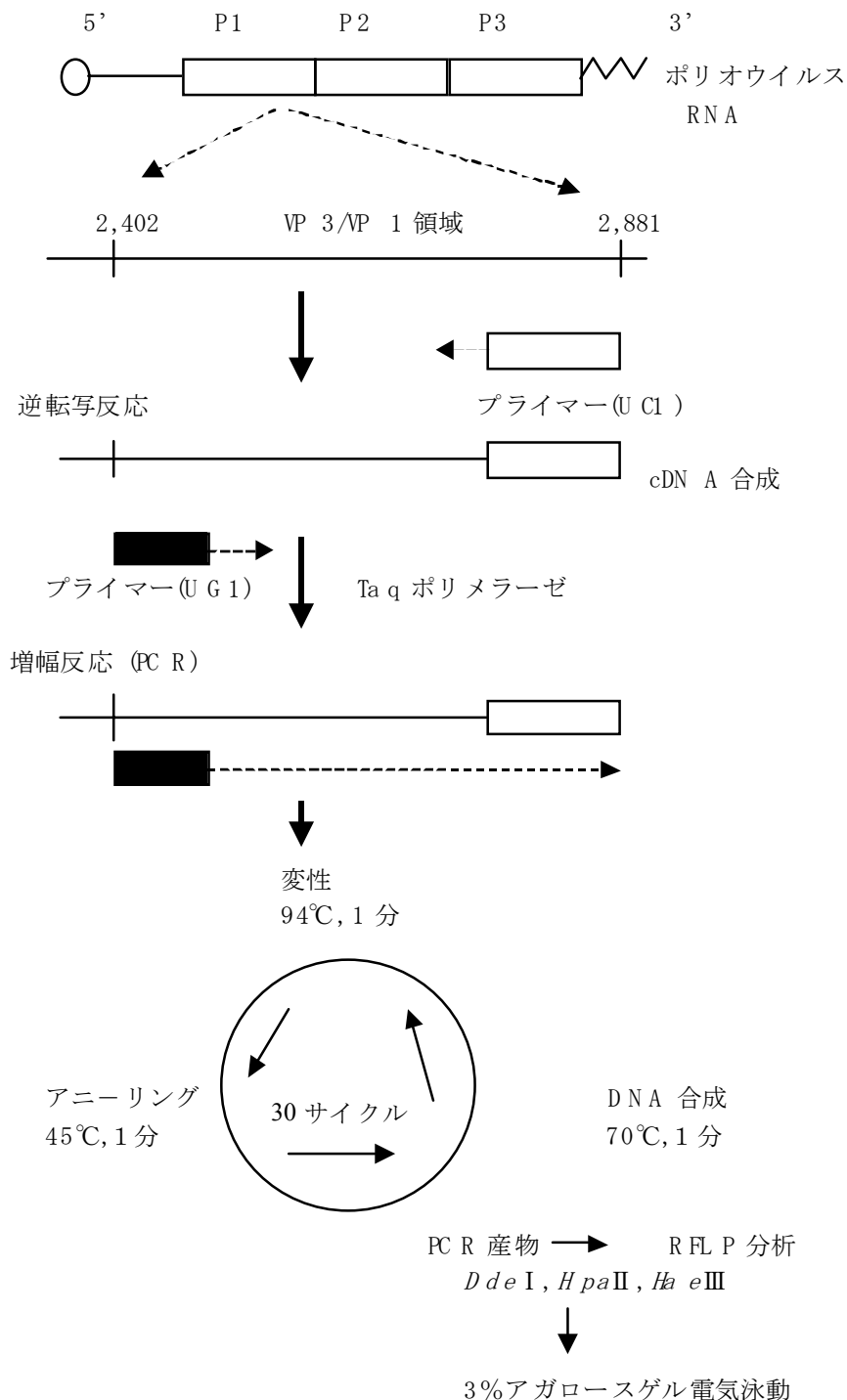


図5. ポリオウイルス RNA の PCR-RFLP 法の概略

準備するもの

1. 器具・試薬

ミューピッド2、紫外線イルミネーター、微量高速遠心器、マイクロチューブ (1.5ml, 0.5ml)、綿付きマイクロチップ(1000 μ l, 200 μ l, 20 μ l)、

Proteinase K(20mg/ml), 10%SDS, フェノール・クロロホルム(1:1)、エタノール、ミネラルオイル、エチジウムブロマイド、プライマー(UG1, UC1)、RT-PCR キット(PERKIN ELMER)、アガロース、泳動用緩衝液試薬、制限酵素(Dde I , Hpa II , HaeIII)

操作

1. ウイルス RNA 抽出 (SDS-PK-Phenol 法)

- ① ウイルス培養液 500 μ l を 4℃ で、12,000rpm, 10 分間遠心。
- ② 上清 400 μ l を採り PK(Proteinase K) 20mg/ml の 4 μ l を含むチューブに入れる。
- ③ 恒温槽で 37℃、15 分間保温。
- ④ 10%SDS 12 μ l を加える(最終濃度 0.3%)。
- ⑤ 再び恒温槽で 37℃、15 分間保温後、さらに 50℃、30 分間保温。
- ⑥ フェノール・クロロホルム(1:1) 混液 400 μ l を加え、3 分間攪拌後 12,000rpm、5 分間遠心。
- ⑦ 上層の水溶性部分を採り、3mM 酢酸ナトリウム 40 μ l と 100%エタノール1ml を入れたチューブに移す。
- ⑧ よく混ぜた後、-20℃で一晩置くか、-80℃で 30～60 分間置く。
- ⑨ 12,000rpm、10 分間遠心。
- ⑩ 上清を捨て、70%エタノール 1ml を加える。
- ⑪ 12,000rpm、5 分間遠心。
- ⑫ 上清を捨て、100%エタノール1ml を加える。
- ⑬ 12,000rpm、5 分間遠心。
- ⑭ 上清を捨てる。
- ⑮ 沈査を 15 分位室温で乾燥後、2.5～5U/ μ l RNase inhibitor を含む 1 mM DTT(dithiothreitol) 16 μ l 中で溶かす。
- ⑯ 使用まで-80℃保存。

2. 逆転写

① マスタープールの作製(1検体当たり)

2.5mM dNTPs	4 μ l
25mM MgCl ₂	2 μ l
10×PCR II	1 μ l
Primer (UC1)(100 μ g/ml)	1 μ l (下流方向)
RTase(50U/ μ l)	0.5 μ l

•UC1 : (2881)-GAATTCCATGTCAAATCTAGA-(2862)

•10×PCR II : 500mM KCl
100mM Tris-HCl
pH 8.3

② 1.5 μ l の RNA 溶液に、マスタープール液 8.5 μ l を加える。陰性対照には蒸留水を 1.5 μ l 入れる。

③ 混合液の保温

20°C、10 分間、42°C、50 分間、99°C、5 分間、5°C、5 分間の順に行う。

3. 増幅

① PCR 用マスタープールの作製(1検体当たり)

2.5mM MgCl ₂	2 μ l
10×PCR II	4 μ l
D.W.	32.5 μ l
Taq-polymerase (5U/ μ l)	0.5 μ l
Primer (UG1)(100 μ g/ml)	1 μ l (上流方向)

UG1 : (2402)-TTTGTGTCAGCGTGTAATGA-(2421)

()内の数字はセービン1型のヌクレオチド番号である。

② 逆転写混合物を含む cDNA に PCR マスタープール 40 μ l を加える。

③ 増幅

94°C	5 分	} 30 サイクル
94°C	1 分	
45°C	1 分	
70°C	1 分	
70°C	10 分	

④ 増幅物 2 μ l を 2-3%アガロースゲル電気泳動(100V 約 30 分間)。

⑤ 1 μ g/ml エチジウムブロマイド溶液で、30 分間アガロースゲルを染色。

4. RFLP 解析

- ① 増幅物 5 μ l を、10U の Dde I、Hpa II あるいは HaeIII のいずれかで消化するため増幅物 5 μ l に酵素を含む次の溶液 5 μ l を加える。TaKaRa の Universal Buffer (H, L, M) を使用した例を示す。

ア) Dde I	1 μ l
10 \times Buffer (H Buffer)	1 μ l
再蒸留水	3 μ l
イ) Hpa II	1 μ l
10 \times Buffer (L Buffer)	1 μ l
再蒸留水	3 μ l
ウ) HaeIII	1 μ l
10 \times Buffer (M Buffer)	1 μ l
再蒸留水	3 μ l

- ② 37°C、90 分間保温。
③ 3%アガロースゲル電気泳動(100V 40 分間)。
④ 1 μ g/ml エチジウムブロマイド溶液で、ゲルを染色。
⑤ 判定(図 6 参照)

分離ウイルスがワクチン由来株であれば図 6 のパターンと同一か非常に良く似たパターンになる。時々、ワクチン由来株の突然変異でバンドの数が 1~2 本違う場合があるが、判断に迷うときは必ず PCR 産物の塩基配列を調べる。

5. 3D ポリラーゼ領域の PCR-RFLP 法の注意点

VP1 を主な標的にした PCR-RFLP 法はポリオウイルスゲノムの 5' 側の一部を、3D ポリラーゼ領域の PCR-RFLP 法は 3' 側の一部の塩基配列を間接的に調べる方法である。

下流のプライマーに UC12 を上流のプライマーに UG7 を使うこと、制限酵素に DdeI (H buffer)、RsaI (L buffer)、HaeIII (M buffer) を使う以外は 1.- 4. に記載された方法と全く同様に RFLP 分析をおこなうことができる。3D の PCR-RFLP 分析に使われるプライマーの塩基配列を示す。

UG7:(6086)-TTTGAAGGGGTGAAGGAACCGAGC-(6108)

UC12:(6516)-TCAATTAGTCTGGATTTCCCTG-(6494)

() 内の数字はセービン1型のヌクレオチド番号である。

増幅される 431 塩基の RFLP プロファイルの模式図を図7に示した。

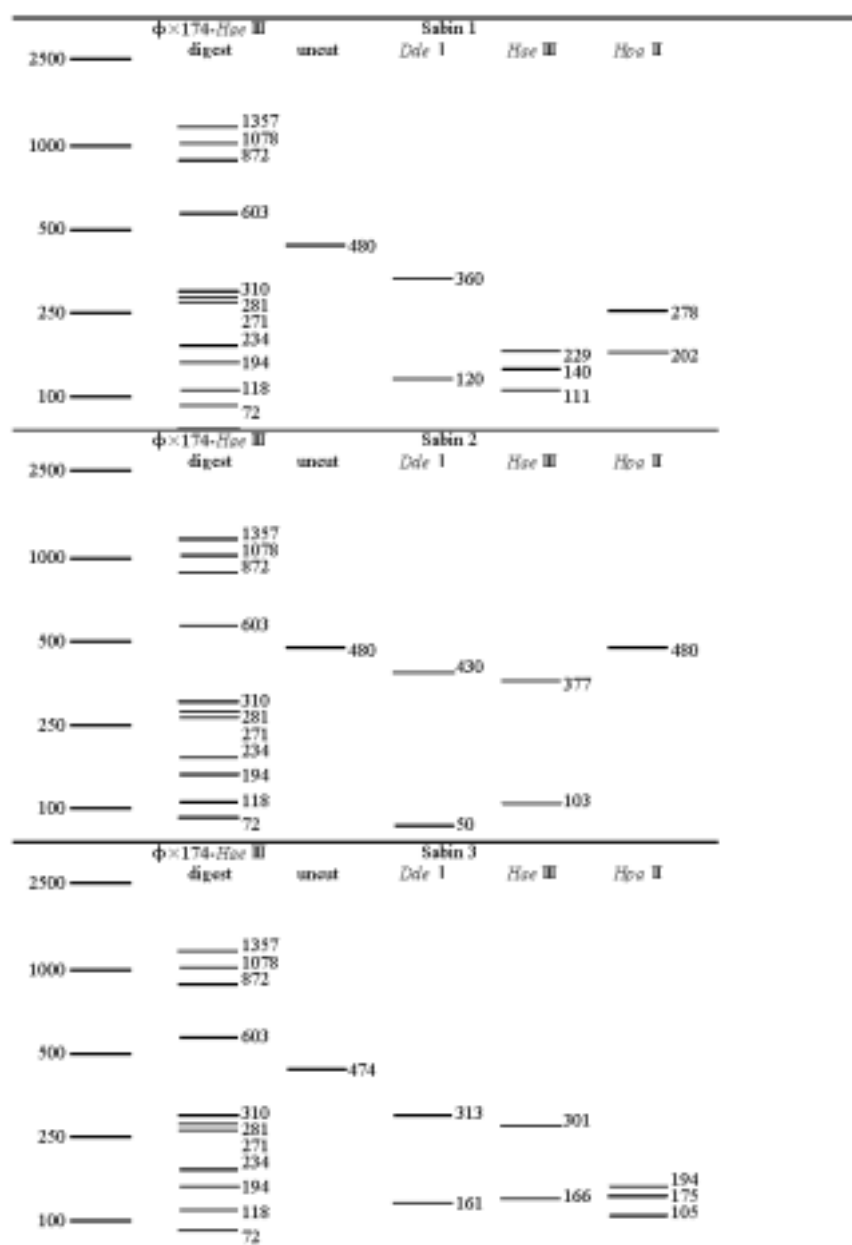


図6. 増幅されたVP1領域(UG1-UC1)の制限酵素による切断パターンの模式図

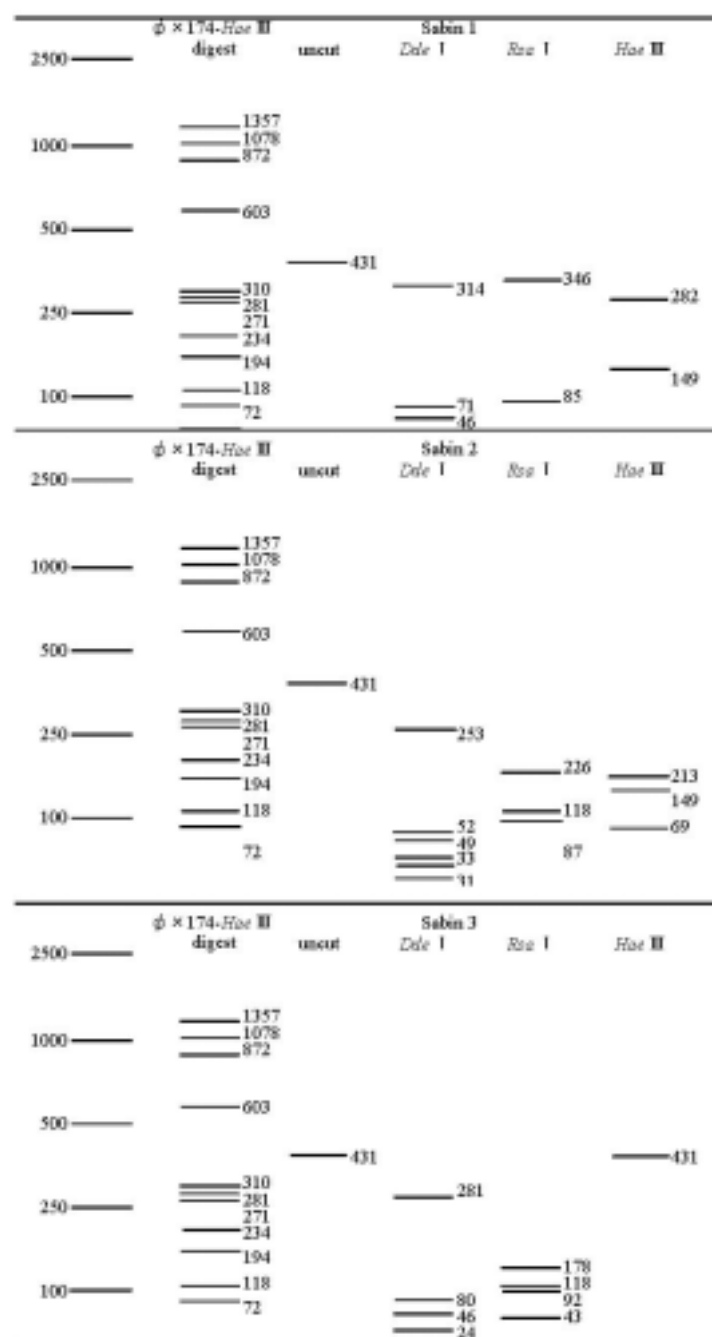


図7. 増幅された3D領域(UG7-UG12)の制限酵素による切断パターンの模式図

4) 微量中和試験による血清学的検査

準備するもの

1. 細胞と培養液

- 細胞は、HeLa, RD, HEp-2 などポリオウイルスに感受性のある継代細胞を使用する。
- 血清希釈には 2%FBS 含 MEM の維持培養液、細胞浮游液の調整には 5%FBS 含 MEM の増殖培養液を使用する。血清はあらかじめポリオウイルスに対する抑制因子がないことを確かめておく必要がある(牛胎児血清が良い)。

2. ウイルス

- ウイルスは 1,2,3 型とも Sabin 生ワクチン株(1 型 LS-C, 2ab, 2 型 P712, Ch, 2ab, 3 型 Leon 12a₁b) を用いる。
- いずれも十分量を作製し、少量ずつ多数分注して-20℃以下に凍結保存し、試験毎に新しいストックウイルスを使用する。
 - ストックウイルスの力価はマイクロプレートを用い、1 希釈に 4 穴以上を使用して、くり返し力価を測定し、TCID₅₀/50 μ l を正確にきめておく。

3. 標準抗血清

< 標準抗血清の使用の意義 >

- 中和試験の結果には、血清又はウイルスの希釈法、中和の温度と時間、使用した細胞や培養液の種類、培養温度などが影響し、得られる結果にはかなりのばらつきが見られることがある。しかし、各中和試験ごとに抗体価のはっきりしている共通の標準抗血清をおけば、得られた標準抗血清の抗体価から中和試験が正しくおこなわれたかどうかの目安を得ることができる。また、その抗体価を被検血清の抗体価と共に測定し、両者の抗体価の比を求めると、そのばらつきは単に倍数で示された抗体価のばらつきよりもはるかに小さくなる。そこで共通の標準抗血清を併用して得られた被検血清の中和試験の成績は同じ尺度で比較することが可能になる。このような比較は国際的な共同作業が行われる場合に具体化されることがある。

< 標準抗血清の取り扱い法 >

- 国内標準血清は感染研ウイルス第Ⅱ部から分与される。各型とも 128 倍のポリオ中和抗体を含んでいる。
- 溶解血清は 4℃に保存する。直ちに使用しない分は、小試験管に分注して-20℃以下に凍結し保存する。
- 凍結血清を溶解して使用する場合は、原則として 1 回限りとし、何回も凍結融解を行わない。
- このようにして溶解された国内標準抗血清は、微量中和反応術式にしたがって被検血清とまったく同様に非働化、希釈、中和、接種をして中和抗体価を定める。
- 対応する Sabin ワクチン株に対して、くり返し測定された各型の国内標準抗血清の平均値が期待値として定められている。

操作

1. 血清希釈

- ① 血清は維持培養液で 1:4 に希釈 (血清 0.1ml に希釈液 0.3ml) し、56℃30 分間非働化する。
- ② マイクロプレートは、図8のようにレイアウトする。

		血清 対照	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	細胞 対照	
試料	1	A	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
試料	2	C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
陽性 対照	E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
力価 測定	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
			0	-1	-2	-3	-4						

図8. 微量中和反応試験のマイクロプレート上におけるレイアウト

- ③ 96 穴マイクロプレートの第 1 列、3-10 列目の各穴に、維持培養液を 50 μ l ずつ、滅菌チップ (以下チップ) で滴下、分注しておく。
- ④ 1 希釈の第 1 列目、2 列目及び 3 列目の穴に 1:4 に希釈した血清の 50 μ l を分注する。
- ⑤ 各型とも血清の 1 希釈につき 2 穴ずつを使用し、チップによる血清の倍数希釈を行う。3 段階希釈ごとにチップを換える。
- ⑥ 8 チャンネルピペッターを用いれば 8 本までなら一度に操作が可能である。使用に際し、液切りに気をつける。
- ⑦ 第 11、12 列目は細胞コントロールとする。

2. 中和

血清希釈が終わったら、100TCID₅₀/50 μ l になるように維持培養液で希釈したウイルス液をチップで血清の希釈列に 50 μ l ずつ加える。

- ① 血清対照列には維持培養液を 50 μ l 加える。また、細胞コントロール列には 100 μ l の維持培養液を加える。
- ② 同時に必ずウイルス対照の力価検定を並行して行い、攻撃ウイルス量が 100TCID₅₀ (許容範囲 32-320TCID₅₀) で行われたことを確認する。このため、中和に用いたウイルスをさらに 10 倍段階希釈し、各希釈毎に維持培養液 50 μ l を分注済みのマイクロプレートの 4 穴を用い、これに希釈したウイルス液を 50 μ l ずつ加える。
- ③ マイクロミキサーで混和後、蓋をかぶせて炭酸ガス培養器に入れ、35-37℃で3時間中和する。

3. 接種

中和を終えたマイクロプレートに別に準備した細胞浮遊液($1-2 \times 10^5$ 個/ml)を 100 μ l ずつ加え 35℃で培養する。

4. 観察

接種後 1 週間、CPE の出現の有無を観察する。

5. 再検査

- ① ウイルス対照の成績が 32-320TCID₅₀/50 μ l からはずれているときは再検査を行う。
- ② 標準国内抗血清の抗体価が期待値の 4 倍以上又は 1/4 倍以下の時にも再検査を行う。

6. 検査結果

抗体価は表 1 のように接種ウイルスを 50%以上中和した血清の最高希釈倍数で表す。

表 1. 中和試験における検査結果判定例

	血 清 希 釈 倍 数								力価
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
例 1	+	+	+	+	+	+	+	+	< 4
	+	+	+	+	+	+	+	+	
例 2	-	-	-	-	+	+	+	+	1:32
	-	-	-	+	+	+	+	+	
例 3	-	-	-	-	+	+	+	+	1:32
	-	-	-	-	+	+	+	+	

(4)引用文献

1. 山本悌司 2000. ポリオ臨床診断マニュアル. 臨床とウイルス, 28:116-128.
2. Shimojo H: 1984. Poliomyelitis control in Japan. Rev Infect Dis 6 (Suppl 2): S427-S430.
3. de Quadros CA, et al: 1997. Eradication of wild poliovirus from the America: Acute flaccid paralysis surveillance, 1988-1995. J Infect Dis 175 (Suppl 1): S37-S42.
4. Hagiwara A, et al: 1999. Genetic analysis of wild polioviruses towards the eradication of poliomyelitis from the western pacific region. Jpn J Infect Dis 52: 146-149.
5. Oostvogel PM, et al: 1994. Poliomyelitis outbreak in an unvaccinated community in the Netherlands, 1992-1993. Lancet 344: 655-670.
6. Yoneyama T, et al: 1995. Characterization of a wild poliovirus type 3 isolated Japan in 1993. Jpn J Med Sci Biol 48: 61-70.
7. Pipkin, PA, et al: 1993. Characterization of L cells expressing the human poliovirus receptor for the specific detection of polioviruses in vitro. J Virol Methods 41: 333-340.
8. 米山徹夫 1999. ポリオウイルス感染症の診断. 日本臨床, 57:331-335.
9. World Health Organization: 1997. Manual for the virological investigation of poliomyelitis. (WHO/EPI/GEN/97.01). Geneva: WHO
10. Harrie GAM, et al: 1995. Comparative study of five methods for intratypic differentiation of polioviruses. J Clin Microbiol 33: 2562-2566.
11. Balanant J, et al: 1991. The natural genomic variability of poliovirus analyzed by a restriction fragment length polymorphism assay. Virology 184: 645-654.
12. Li J, et al: 1996. Genetic basis of the neurovirulence of type 1 polioviruses isolated from vaccine-associated paralytic patients. Arch Virol 141: 1047-1054.

(5)連 絡 先:国立感染症研究所 ウイルス第二部第二室
清水博之

(6)執 筆 者:国立感染症研究所 ウイルス第二部
米山徹夫

(7)発 行 所:国立感染症研究所
発行責任者:ウイルス第二部 宮村達男

コレラ菌

コレラ

目次

(1) コレラの概説

- 1-1) はじめに
- 1-2) ヒトへの病原性
- 1-3) 歴史
- 1-4) わが国でのコレラ症
- 1-5) *V. cholerae* O139について

(2) 検査に関する一般的注意

- 2-1) 検査材料の採取
- 2-2) 検査材料の輸送
- 2-3) 検査の進め方
- 2-4) 検査の判定

(3) 検査方法

- 3-1) 病原体分離
 - 3-1-1) 生化学的性状
 - 3-1-2) 検体別検査法 (a. 糞便、b. 食品、c. 水、汚泥など)
 - 3-1-3) 分離培地上のコレラ菌 (O1) および *V. cholerae* O139の集落性状
 - 3-1-4) 同定の手順
- 3-2) 血清型 (表 6)
- 3-3) 生物方 (表 7)
- 3-4) 毒素産生性試験

3-5) PCR法 (図 2)

3-5-1) 方法

3-5-2) RPLA法とPCR法の毒素産生試験の比較

3-5-3) PCR法利用上の注意

3-6) 疫学マーカー

3-7) 菌株の保存方法

(4) 文献

(1) コレラの概説

1-1) はじめに

コレラは *Vibrio cholerae* O1 および O139 のコレラ毒素（CT）産生株で汚染された水や食物を摂取して発症する。

V. cholerae は O 抗原の違いにより現在 205 種類の血清型（O 群）に分けられている⁹⁾。O1 血清に凝集し、CT を産生する *V. cholerae* O1 を一般に「コレラ菌」と呼んでおり（以下、区別のためにコレラ菌（O1）という）旧伝染病予防法の防疫対象となっていた。O1 血清に凝集しないものは *V. cholerae* non-O1（ナグビブリオ）と呼ばれコレラ菌（O1）のように流行を起こすことは少なく行政上は食中毒菌として扱われる。コレラ菌（O1）はさらに抗原構造の違いにより、稲葉型、彦島型、小川型の 3 つに、また、生物型の違いによりクラシカル型とエルトル型に分けられる。しかし、1992 年にインドで発見された *V. cholerae* O139（ベンガル型コレラ菌）も CT を産生し、コレラ菌（O1）と同様に激しい下痢を引き起こすことから、感染症法では CT 産生性の *V. cholerae* O139 もコレラの病原体に指定し、行政上の防疫対象とした。なお、CT を産生しない *V. cholerae* O1 と *V. cholerae* O139 は、ナグビブリオと同様に食中毒もしくは下痢症原因菌として扱われる。

1-2) ヒトへの病原性

コレラの典型的な症状は、激しい水様性下痢と嘔吐による水分喪失であり、コレラ菌（O1）またはベンガル型コレラ菌に汚染された水や食物を摂取して数時間から 5 日（平均 3 日以内）の潜伏期で発症する。発症は急激で、初めは褐色の水様便、典型例ではさらに米のとぎ汁様になり、下痢便の量は 1 日に 10L を超えることがあり、急激に脱水症状が現れる。年少者あるいは老人での脱水症状は致命的ともなるので注意が必要である。この症状は小腸下部の粘膜上皮細胞に到達した *V. cholerae* が、絨毛に定着・増殖し、CT を中心とする種々

の病原因子を産生することで引き起こされる。感染リスクが高いヒトは何らかの胃疾患があり制酸剤を服用しているヒト、胃酸分泌が少ないあるいは無酸症のヒト、胃の摘出者などである。一方、軽い下痢や軟便程度のヒト、無症状に近いヒトから菌が検出される場合もある。

1-3) 歴史

コレラは熱帯、亜熱帯地方の主要な腸管感染症の一つであり、現在でも非常に多くの患者ならびに死者がみられている。古くからインド東部のガンジス河デルタ地帯の風土病であったコレラは、西欧との通商が盛んになった19世紀初めから世界各地に広まったと考えられており、1817年から1923年までに6回の世界的な流行を繰り返した。第6次までの世界流行の原因菌はクラシカル型コレラ菌であったが、1961年頃からインドネシアのセレベス島（現在のスラワン島）の風土病であったエルトル型コレラ菌による第7次流行が起こり、未だ終息には至らず、むしろ拡大の様相がある。すなわち1991年にこれまでコレラの発生がなかった南米大陸のペルーで大流行が起こり、近隣の中南米諸国にも拡大し、WHOの統計では1990年の世界のコレラ患者数は約7万人であったものが、1991年には約59万人と急増した。現在はアフリカにおける発生が最も多く、2000年の全世界の患者数137,071人、死亡者数4,908人のうちアフリカにおける発生が患者数118,932人（全世界の87%）、死者数4,610人（全世界の94%）であった（表1）。

1992年10月には、インド東南部マドラスで新型コレラ菌による下痢患者が多発し、瞬く間に近隣の都市に拡大して多数が死亡した。1993年にはインド全土に広がり、バングラデシュ、パキスタン、スリランカ、ネパール、中国、タイ、マレーシアでも多数の患者発生があった。このコレラ菌は、このときまでに明らかになっていたコレラ菌の138種類のいずれのO抗原にも属さず、そして最初の分離がベンガル湾沿いであったことから *V.cholerae* O139 Bengal(ベンガル

型コレラ菌）と名付けられ⁷⁾、WHOでは該菌による疾病をコレラと認定した。

1-4) わが国でのコレラ症

過去に大流行をおこした歴史はあるが、近代日本における流行は1977年和歌山県有田市に於けるものが最初である。わが国には存在しないと考えられていた過去の伝染病が、突然に侵入し99名の患者発生をみた事件は、1996年の腸管出血性大腸菌O157事件と同様に社会的パニックを起こした。この流行は東南アジアへ墓参し帰国したツアーの団体によって持ち込まれ、その人達からの二次感染や生活使用水（井戸水）汚染を介して感染が拡大したと考えられている。翌1978年には東京都で結婚披露宴の輸入ロブスターが原因となり、出席者において集団発生（患者49名）を起こしている。これ以来、国内でのコレラ患者発生は主に輸入食品が関連したと思われる発生と海外旅行帰国者においてみられている（表2）。1989年の名古屋市を中心とした集団発生（患者44名）では、マグロの刺身が原因として疑われ、1991年には首都圏で輸入のアオヤギを原因とした集団発生（患者22名）があり、胃切除手術を受けていた老人1名が死亡している。1995年2月以降にはバリ島旅行帰国者にコレラが多発し、海外旅行とコレラの関連を再認識するところとなった。わが国での発生が目立ち始めたのは、人的、物的に海外との交流が盛んになった時期とも一致し、特に近年の海外旅行ブームでは感染の危険が著しく高まっていると考えなければならない。

1995年には、海外旅行の経験がないコレラ患者発生が増加し、1997年にはその傾向が著しく、コレラ菌検出者のうちの35.6%に達した。なおこれらの例では感染源が明らかになっていないことにも注目しなければならない。伝染病においては散発患者の多発は、集団発生の前段階の現象であることはこれまでの種々の経験から明らかで、その予防にはコレラ菌の汚染実態の把握、感染源の解明が緊急の課題である。

1-5) *V.cholerae* O139について

1993年、インドのカルカッタでは、西ベンガル州立伝染病院に入院したコレラ患者からはそれまで優勢に検出されていたコレラ菌（O1）が全く検出されなくなり、検出されるコレラ菌のほとんどは *V.cholerae* O139に置き換わった。1994年になると *V.cholerae* O139の検出頻度は減少し、コレラ菌（O1）が増加したが、1996年後半から1997年前半に再び *V.cholerae* O139の検出が増加した。現在はコレラ菌（O1）が多く検出されており、*V.cholerae* O139の流行は一応の落ち着きをみせているが、再び流行のおそれが残っている以上は注意が必要である。

わが国での *V.cholerae* O139の発生は、1993年4月、埼玉県でインド旅行帰国者（55歳男性）、7月には長野県で研修のため来日したネパール人（28歳男性）から検出され、1994年までに11例の輸入例がみられた。その後1995、1996年には発生がなかったが、1997年9月にネパールからの帰国者（24歳男性）から検出された⁴⁾（表3）。

わが国でみられた *V.cholerae* O139の症状は軽度の下痢から激しい水様下痢までいろいろであるが、流行地ではこれまでのコレラと異なり、成人の患者発生と死者数が多いことが明らかになっている。これはその地域に流行しているコレラ菌（O1）が、しばしば体内に侵入し、感染予防に有効な抗体（感染防御抗体）の産生を惹起しているが、初めて侵入した新型の *V.cholerae* O139に対する抗体保有はみられず多くの成人が感染し、激しい症状を現したものと考えられている。

(2) 検査に関する一般的注意

2-1) 検査材料の採取

検体は原則として排便直後の新鮮糞便であり、採取は抗生物質投与前に行う。吐物は糞便に比べ検査材料としての価値は低い。

2-2) 検査材料の輸送

*V.cholerae*は死滅しやすいので、採取後直ちに検査に供する。しかし、培養までに時間を要する場合にはCary-Blair培地等の輸送培地に入れ、室温で保存する。

2-3) 検査の進め方

図1と表4に従って実施する。

コレラは症状の経過が速く伝染性も強いので、迅速な防疫対策の実施が感染予防に重要であることから、迅速な診断が要求される。

2-4) 検査の判定

感染症法におけるコレラ発生報告のための基準は以下のとおりである。

○診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ、以下の方法によって病原体診断がなされたもの。

（材料）便など

・病原体の検出；コレラ菌（O1）または*V.cholerae* O139を分離・同定し、かつ、毒素産生性あるいはコレラ毒素遺伝子*ctx*の保有が確認された場合。

○疑似症の診断

臨床所見、コレラ流行地への渡航歴、集団発生の状況などにより判断する。

コレラ菌の同定は、1988年（昭和63年）9月28日付、「コレラエンテロトキシン非産生性コレラ菌の取り扱い等について」（健医発第1133号、衛第231号、いずれも厚生省）の通知に従って、国内の初発コレラ菌株の同定は地方衛生研究所において行うことになっている。

(3) 検査方法

3-1) 病原体分離

3-1-1) 生化学的性状

*V.cholerae*はビブリオ科 (*Vibrionaceae*)、ビブリオ属 (*Vibrio*) の1菌種で、GC%は47-49である。

V.cholerae の生化学的性状の特徴

オキシダーゼ	+
運動性	+
ONPG	+
リジン脱炭酸	+
オルニチン脱炭酸	+
アルギニン脱水素	—
インドール	+
ブドウ糖からのガス産生	—
白糖発酵	+
マンニット発酵	+
イノシット発酵	—
無塩ブイヨンでの発育	+

コレラ菌 (O1) および *V.cholerae* O139のほとんど全ての菌株はマンノースを発酵するが、その他のO群では約40%が陽性である。

V.cholerae O139の性状はエルトール型コレラ菌と極めて類似しているが、*Vibrio*属が感受性である *Vibrio static agent*

O/129 (2,4-diamino-6,7-di-iso-propyl pteridine phosphate) (150 μ g)

およびST合剤耐性で、MukerjeeのエルトールフェージVに溶菌されない点が異なる。しかし、最近インドやタイで分離されるコレラ菌 (O1) には *Vibrio static agent* O/129 やST合剤に耐性を示す菌株が増えている。

3-1-2) 検体別検査法

a. 糞便

急性期の患者下痢便では、直接選択分離培地（TCBS寒天培地またはビブリオ寒天培地）に塗抹する。増菌培養法は必ず併用するが、アルカリペプトン水（APW）の時は6時間以内に培地の上層部の1エーゼを選択分離平板に塗抹することが望ましい。Cary-Blairの輸送培地に入れた綿棒材料は、APW、0.5～1mL中で十分に糞便を絞り出し、それを分離培養に供する。

b. 食品

各種の食品は、滅菌容器の中で細切し1gに対し10mLの割合にAPWを加え、そのまま37℃、一夜増菌培養した後（一次増菌）、分離培地（TCBS寒天培地またはビブリオ寒天培地、PMT寒天培地）に塗抹する。その表層部の1mLを他のビブリオの増殖を抑制するため無塩アルカリペプトン水またはMonsurテルライト-胆汁酸-ペプトン水で二次増菌し、同様に分離培養を行う。なお培地量が多い場合には、エアータイプのふ卵器では温度の上昇に時間がかかるので、37℃の温浴中で培養する。

c. 水、汚泥など

濾過が容易なものは0.45 μ m以下のポアサイズのメンブランフィルターで濾過し、濾過膜そのものを増菌培地に入れ培養を行う。濾過が困難な場合には、等量の2倍濃度の増菌培地を直接検体に加え、よく混合して増菌培養を行った後、分離培地（TCBS寒天培地、ビブリオ寒天培地、PMT寒天培地）に塗抹する。この検体の場合も温浴中で培養する。

使 用 培 地		(メーカー名)
分離	TCBS寒天培地	(栄研、日水、Difco、Merck、BBL)
	ビブリオ寒天培地	(日水)
	PMT寒天培地	(日水)
増菌	アルカリペプトン水 (栄研、日水)	

無塩アルカリペプトン水

Monsurテルライト-胆汁酸-ペプトン水

3-1-3) 分離培地上のコレラ菌 (O1) および *V.cholerae* O139 の集落性状

コレラ菌 (O1) や *V.cholerae* O139 は他の O 群の *V.cholerae* と同様に sucrose (白糖) を利用するので TCBS 寒天培地上では 1~2mm 程度の比較的大きい平坦な黄色い集落を、またビブリオ寒天培地上では青みがかった半透明の集落を形成する。TCBS 寒天培地上の集落は粘稠性を帯び、特にビブリオ寒天培地上の菌苔は白金耳でかき取り難く、またスライド凝集テストも行い難い。PMT 寒天培地上では TCBS 寒天培地上の集落よりやや大きいマンノース発酵性の中心部褐色の黄色い集落を形成する。そしてその集落は、TCBS 寒天培地やビブリオ寒天培地上の集落とは異なり粘稠性がなく抗血清に凝集しやすい。

3-1-4) 同定の手順

コレラ菌 (O1) および *V.cholerae* O139 の同定においては、行政上迅速性が要求されるので、分離培地上の疑わしい集落について、コレラ菌混合血清 (またはモノクローナル抗体試薬) および *V.cholerae* O139 抗血清で直接スライド凝集反応を行う。この時には必ず生理食塩水を対照とし、それに自発凝集しないことを確認する。

分離培地上の集落が小さく明瞭な凝集が認められない場合には、残りの菌苔を普通寒天培地平板に塗抹した後、発育した菌を用いて凝集テストを行う。

いずれかの抗血清に強く凝集がみられたならば、この時点でコレラの疑いあり (疑似) として、行政措置をとる。

さらに、凝集反応に用いた集落の残余あるいは TSI 培地の菌苔を用いて、コレラ毒素 (CT) 遺伝子を PCR 法やハイブリダイゼーション法で検査する。CT 遺伝子テストが陽性の場合には、速やかにコレラとしての行政対応を行う。

毒素産生性試験と同時に、該菌を普通寒天、TSI培地、LIM培地、マンニット加フェノールレッド・ブロス(以上すべて1%NaCl加)、NaCl発育試験用培地に培養し、37℃、一夜培養後普通寒天培地からオキシダーゼ試験を行い同定する(確定的同定、表5)。そしてCT産生性を逆受身ラテックス凝集反応法で確認する。

*V.cholerae*と同定する最小限の性状は、オキシダーゼ試験、リジン脱炭酸試験、インドール産生性、ブドウ糖、白糖、マンニットの発酵性、無塩ペプトン水での発育試験、ブドウ糖からのガス非産生性による。

3-2) 血清型 (表6)

*V.cholerae*の抗原にはO(菌体)およびH(鞭毛)抗原があるが、H抗原はすべての菌株に共通であるので、本菌の血清型はO抗原群で表現される。また、*V.cholerae*は同一のR抗原をもち、作製したO血清中にはかなりのR抗体が含まれるので、O型別用抗血清にはR抗体を完全に吸収したものをを用いなければならない。生菌で当該抗血清に凝集しない場合には、加熱菌(100℃、1時間)を用いる。*V.cholerae*O139はO22およびO155と共通抗原があるので、O139の抗血清はこれらとの類属を完全に吸収したものをを用いる⁸⁾。

コレラ菌(O1)のO抗原は3種類の部分抗原(A、B、C)からなり、それらの量的な相違により、小川型(AB(c))、稲葉型(AC)および彦島型(ABC)に分けられるが、彦島型は小川型に統合されることが多い。B因子は小川型の特異因子である。稲葉型菌株は、小川型菌株から解離するがその逆はない。血清反応は診断用血清(*1、*2)の場合、それぞれの型に明らかに凝集がみられたものを陽性と判定する。

小川、稲葉、彦島型の型別には因子血清(モノクローナル感作ラテックス*3)も使用でき、各型は感作ラテックスa、b、cに表6のように凝集する。*V.cholerae* O140(血清群Hakata)や*V.fluvialis*に因子Cを保有するものがあり、因子BあるいはCを有する海水ビブリ

オも知られており診断用血清に凝集する。これらはいずれもコレラ菌（O1）の特異抗原Aを持たないので、因子血清を使用するかぎりコレラ菌（O1）と間違えることはない。

血清の商品名（メーカー名）

*1：コレラ菌診断用血清セット（デンカ生研）

〔セット内容〕混合、稲葉型、小川型

*2：コレラ菌診断用血清 O139 “Bengal”（デンカ生研）

*3：コレラ菌AD（デンカ生研）

〔内容〕感作ラテックスa

感作ラテックスb

感作ラテックスc

対照ラテックス

3-3) 生物型（表7）

コレラ菌（O1）にはクラシカル型とエルトール型の2つの生物型が知られている。コレラ菌（O1）が検出された場合には迅速性が要求されるので、実際にはニワトリ赤血球の凝集性とVP反応で決定することが多い。わが国で検出されるものは大部分エルトール型である。両型の性状には、例外を示すものや弱いものがある。

3-4) 毒素産生試験

このための方法には、被検菌株を毒素産生用培地（L-CAYE）で一晩培養後、その培地上清中のコレラ毒素（CT）を免疫学的に検出する方法（逆受身ラテックス凝集反応法*）と被検菌のCT遺伝子を遺伝学的方法（PCR法あるいはハイブリダイゼーション法）によって証明する2つがある。

免疫学的方法は、どの方法も市販キットが入手できるのでマニュアルに従って実施する。これらの方法は、CTを産生させるために培養が必要で迅速性に欠け、免疫反応による非特異的反応も時には認

められることに注意が必要である（特に non-O1 株ではみられやすい）。また、使用する培地や培養条件によってはCT産生が悪い場合があること、さらに免疫学的に類似の *E.coli* 易熱性毒素（LT）¹⁰⁾ にも反応し、菌株からの試験でない場合には注意が必要である。

市販キット（メーカー）

*：セロトキシLT（栄研）、VET-RPLA（デンカ生研）

遺伝学的方法ではPCR法が簡便、迅速で特異性が高い。方法は後述するが、そこで明らかのようにPCR法ではCT遺伝子が証明されるのであって、その菌株が培養によって毒素を産生するかどうか、生きた菌株が存在するのかは不明である。

3-5) PCR法（図2）

コレラ毒素産生性は染色体上のコレラ毒素構造遺伝子（*ctx*）が関係していることが明らかにされている⁵⁾ ことからPCR法ではこの*ctx*のコレラ菌に特異的なサブユニットA領域の2カ所に、相補的なプライマーを合成して使用する²⁾。

3-5-1) 方法

被検菌（集落あるいは確認培地の菌）を蒸留水に浮遊し、沸騰水中に浮かべて10分間加熱し殺菌と溶菌させ、10,000rpm、5分間遠心し上清をテンプレート（DNAの鋳型）とする。これと2種類のプライマーおよび別に作製したPCR反応濃厚液（表8）を混合し、乾燥防止のためにミネラルオイルを1滴加え（オイルを必要としない方法もある）増幅器にセットする。以下に反応スケール25 μ L の場合の組成を示す。

PCR反応濃厚液	14 μ L
プライマー (S)	0.5 μ L
プライマー (A)	0.5 μ L
テンプレートDNA	10 μ L
計	25 μ L

もし、テンプレートにプライマーがハイブリダイズすれば、DNAポリメラーゼの酵素作用で、テンプレートの塩基配列を鋳型としてプライマーが伸長し、つぎにはその DNA産物も鋳型となりプライマーで挟まれた *ctx* 断片が 2^n 倍 (n =回数) に増幅される³⁾。表8のプライマーを使用した場合の標的DNAサイズは380bpであるが、このDNA断片中には制限酵素; *HinfI* 認識部位を2カ所含むように設計されているので、増幅したDNA断片がCT遺伝子であるかどうか確認をする時は、PCR産物を *HinfI* で切断するとCT遺伝子では183bp、136bp、61bpの3つの小断片になって泳動されるが *ctx* 以外の場合は切断されない。プライマーがテンプレートにアニーリングしないときには伸長が起らない（増幅されない）ので標的DNA断片は確認されない。

増幅産物の制限酵素 *HinfI* 消化

増幅反応液	2.5 μ L
10X <i>HinfI</i> buffer	1 μ L
<i>HinfI</i> (10 units)	0.5 μ L
H ₂ O	6 μ L
計	10 μ L

37℃で1時間以上反応後、5 μ Lをアガロースゲル電気泳動にて確認する（PCR産物の電気泳動時よりもアガロース濃度の高い（3%）ものを使用したほうがバンドの分離が良い）。

なお使用する器具、蒸留水などはすべて清浄なものを用い（かならずしも滅菌は必要でない）、消耗品は原則として使い捨てにする。この時に増幅が正しく行われたことを確認するために、陽性と陰性

の対照菌株の実験を忘れないようにする。*V.cholerae* non-O1 や *V.mimicus* でも *ctx* を保有する株があるので、検体から直接 CT あるいは *ctx* が証明されたからといって、そのままコレラ菌（O1）陽性とすることには問題があるので、集落などから診断用血清で O1 または O139 を確認（推定的同定、図1）したもので実施することが望ましい。

増幅器には色々なメーカーのものがあってそれぞれ加熱、冷却方式が異なるので注意が必要であるが、サンプル内液が図2に記載の温度条件を満たすように設定する。この1 μ L をアガロースを支持体として電気泳動し、1 μ g/mL エチジウムブロマイド液に浸し DNA 断片を染色し、300nm の透過光で判定するが、長時間観察すると DNA 断片が切断され、薄くなってきたり、眼に炎症などの傷害が出るので、ポラロイド写真に撮影して結果の保存と観察を行うようにする。また、エチジウムブロマイドには発癌性があるので、取り扱いには使い捨ての手袋を着用する。

なお、検体の搬入が遅く判定が翌日でもよい場合の温度条件は

94℃、45秒

55℃、2分

72℃、1分

を30回反復する方法を採用している（図2）。この場合はテンプレートを少なくできるし（表8）、増幅された DNA 量も多くなる。電気泳動は DNA サイズマーカー（ λ HindIII digest）を同時に泳動する。PCR 法では判定まで約3時間である。

コレラ毒素検出用プライマーは、表8に記載したもの以外にも報告があるが、市販品では「コレラ毒素検出用 Primer Set : TaKaRa」がある。

3-5-2) RPLA法とPCR法の毒素産生試験の比較

コレラ菌（O1）、*V.cholerae* O139、*V.cholerae* non-O1、non-O139、他の *Vibrio* 科の菌種および下痢起病性細菌、合計501株を用いて行った PCR 法と RPLA 法による結果を参考のために比較した（表9）。

両法が一致したのは陽性と陰性の469株（93.6%）で、32株（6.4%）に不一致がみられた。不一致のうち PCR 法のみ陽性はコレラ菌（O1）

に5株認められたが、別のプローブ法⁶⁾で確認したところ陽性であった。またRPLA法では免疫学的に類似のLT(易熱性毒素、23株)は陽性であったが、non-O1の陽性4株はRPLA法での非特異反応による結果と考えられた。

3-5-3) PCR利用上の注意点

PCR法は理論からも明らかなように、細菌が持っている種々の性質を調べるのではなく、培養しないでその細菌に特異的な遺伝子や病原性決定遺伝子を検出することによって同定するもので、極めて高感度の検査法である。したがって、各試薬のDNA汚染に注意が必要である。

疫学解析には薬剤感受性試験、血清型別、生化学的性状などの検査も必要であり、また分離菌株の分子生物学的方法を用いた比較にも、菌株が必要である。したがって、PCR法は従来の細菌培養検査法に完全にとって変わるものではないことを認識すべきである。

3-6) 疫学マーカー

エルトール型コレラ菌のファージ型別にはMukerjeeの方法があるが、殆どの分離株は4型であり、疫学マーカーとしてあまり有用でない。現在、疫学マーカーとしてはパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による遺伝子解析が一般的に行われており¹⁾、またリボタイピングも利用されている。

3-7) 菌株の保存方法

コレラ菌(O1)や*V.cholerae*O139を含むビブリオの保存には、1%NaCl加酵母エキス・カシトン半流動培地による室温保存が汎用されている。しかし、保存中にプラスミド等は脱落しやすいので、それらの保存を目的とする場合には、凍結保存(高圧滅菌した10%スキムミルクに菌を濃厚に浮遊し、-80℃あるいは液体窒素タンクでの凍結保存)が勧められる。

(4) 文献

- 1) Arakawa,E. et al.: Pulsed-field gel electrophoresis-based molecular comparison of *Vibrio cholerae* O1 isolates from domestic and imported cases of cholera in Japan. J. Clin. Microbiol. 38(1): 424-426, 2000.
- 2) 小林一寛,他 : Polymerase chain reaction 法を用いたコレラ毒素遺伝子の迅速診断. 医学のあゆみ,150:509-510,1989.
- 3) 小林一寛 : Polymerase chain reaction(PCR)法による下痢・食中毒菌の同定. 食品と微生物,9:77-88,1992.
- 4) 国立感染症研究所・厚生省保健医療局結核感染症課 : 病原微生物検出情報 19:97-98,1998.
- 5) Mekalanos,J.J., et al. : Cholera toxin genes: Nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. Nature, 306:551-557, 1983.
- 6) 勢戸和子,他 : コレラ毒素遺伝子のクローニングと遺伝子検出法の開発. 感染症誌,64:1330-1336,1990.
- 7) Shimada,T.et al.: Outbreak of *Vibrio cholerae* non-O1 in India and Bangladesh. Lancet, 341:1347,1993.
- 8) Shimada,T.et al.: Two strains of *Vibrio cholerae* non-O1 possessing somatic (O) antigen factors in common with *V.cholerae* O139 synonym "Bengal". Curr.Microbiol., 29:331-333, 1994.
- 9) 山井志朗,他 : *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139の血清型分布,その毒素産生性および新血清型の追加について. 感染症誌,71:1037-1045, 1997.
- 10) 吉川昌之介,他 : 細菌の病原性, p115-131, 1984. (丸善)

執筆者

国立感染症研究所

荒川英二、田村和満、島田俊雄

大阪府立公衆衛生研究所

小林一寛、田口真澄

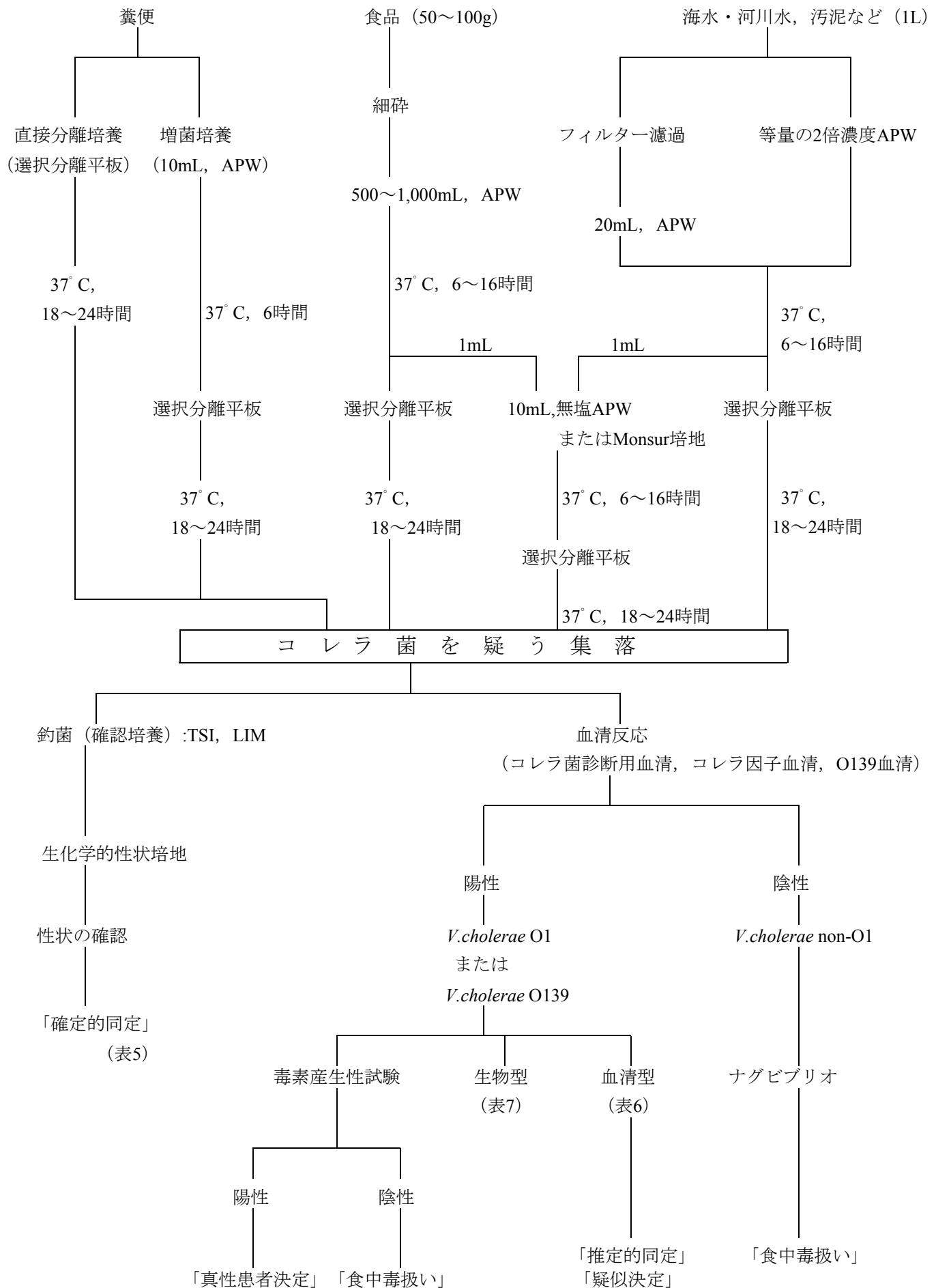


図1 コレラ菌 (O1) , ベンガル型コレラ菌の検査法

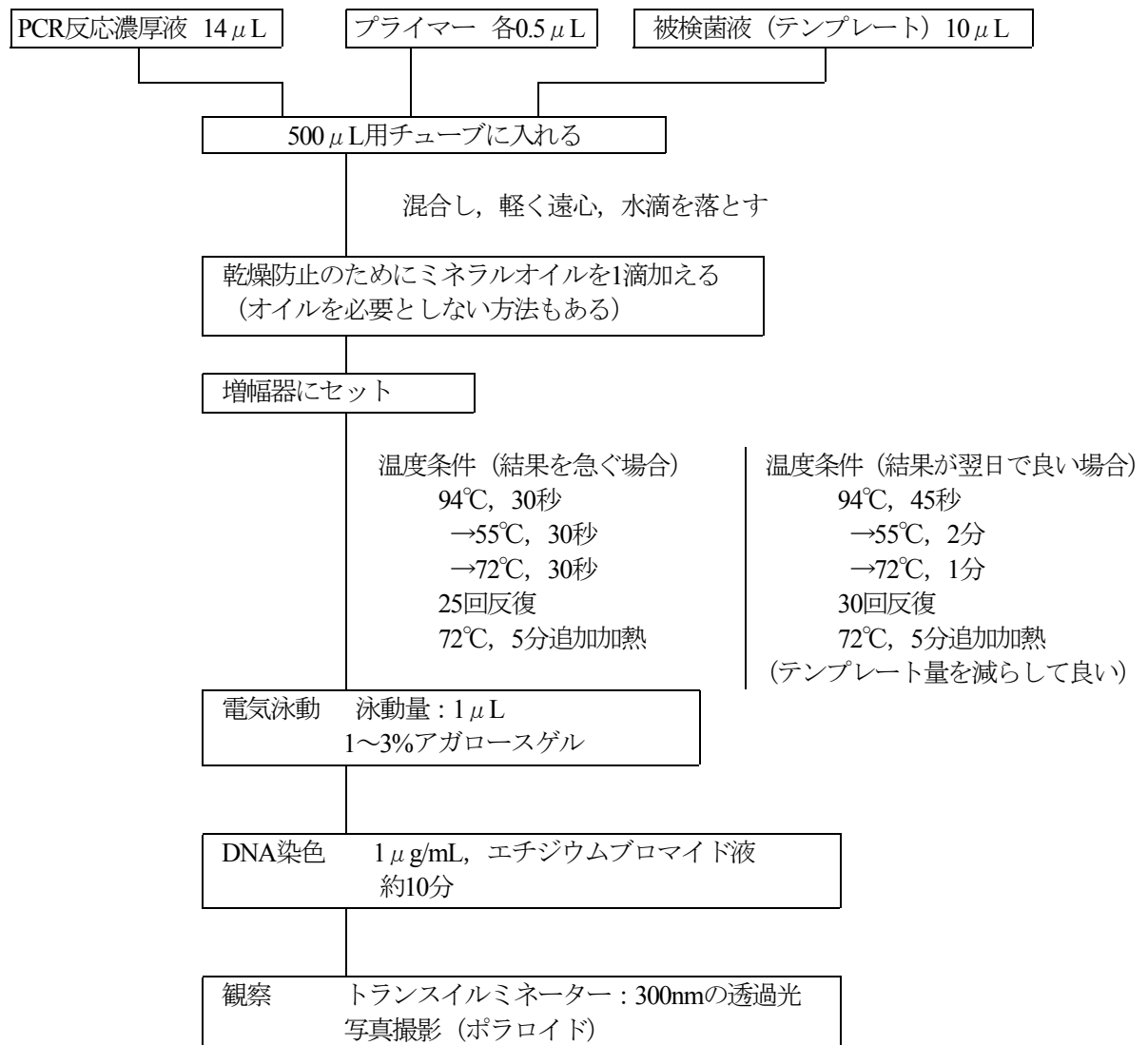


図2 PCR法による毒素産生性試験
(PCR反応濃厚液、プライマー、テンプレートの調整は表8を参照)

表 1 世界のコレラ患者数

(WHO, 1991～2000)

年	患者数	(死亡者数)
1991	594,694	(19,295)
1992	461,783	(8,072)
1993	376,845	(6,781)
1994	384,403	(10,692)
1995	208,755	(5,034)
1996	143,346	(6,689)
1997	147,425	(6,274)
1998	293,121	(10,586)
1999	254,310	(9,175)
2000	137,071	(4,908)

表 2 わが国のコレラ発生状況（厚生労働省）

年	患者数				輸入例の 割合（％）	国内発生の 割合（％）
	真性	保菌	疑似	合計		
1987	34 (29)	3 (1)	1 (1)	38 (31)	81.6	18.4
1988	33 (30)	0	5 (4)	38 (34)	89.5	10.5
1989 ^{a)}	95 (32)	3 (0)	4 (3)	102 (35)	34.3	65.7
1990	73 (62)	1 (0)	6 (6)	80 (68)	85.0	15.0
1991 ^{b)}	90 (65)	3 (1)	9 (5)	102 (71)	69.6	30.4
1992	48 (45)	2 (2)	2 (2)	52 (49)	94.2	5.8
1993	92 (89)	0	13 (12)	105 (101)	96.2	3.8
1994	90 (66)	0	28 (27)	118 (93)	78.8	21.2
1995 ^{c)}	306 (279)	19 (18)	52 (47)	377 (344)	91.2	8.8
1996	40 (29)	0	22 (20)	62 (49)	79.0	21.0
1997	86 (54)	2 (0)	13 (11)	101 (65)	64.4	35.6
1998	56 (53)	2 (2)	15 (13)	73 (68)	93.2	6.8
1999	35 (32)	1 (1)	15 (12)	51 (45)	88.2	11.8
2000	33 (25)	0	19 (16)	52 (41)	78.8	21.2

真性；コレラ菌（O1）が検出され症状のある者。

保菌；コレラ菌（O1）が検出されたが、症状のない者。

疑似；臨床症状によりコレラと診断されたが、コレラ菌が検出されなかった者。

()；輸入例を再掲した。

a)名古屋市某会社関連事件発生

b)首都圏アオヤギコレラ事件発生

c)バリ島旅行帰国者多数

表3 わが国のベンガル型コレラ菌（O139、コレラ毒素産生性）感染例

（文献⁴⁾ より引用改変）

	報告機関	検体採取日	年齢・性	臨床症状	海外渡航歴（国名、期間）
1	埼玉県衛研	1993. 4.21	55歳・男	水様性下痢	インド(4/8-20)
2	長野県衛研	1993. 7.12	28歳・男	水様性下痢、嘔吐、脱水	ネパールからの来訪者
3	栃木県衛研	1993.10.12	22歳・男	泥状便、発熱	タイ、インド(9/24-10/10)
4	青森県衛研	1994. 2.25	52歳・女	水様性下痢	タイ(2/18-22)
5 ^{a)}	大阪空港検疫所	1994. 3.13	20歳・女	水様性下痢	タイ、インドネシア(3/8-13)
6	神奈川県衛研	1994. 3.22	61歳・女	下痢、嘔吐	タイ(3/16-20)
7	山口県衛研	1994. 4.12	42歳・男	水様性下痢	タイ(4/4-9)
8	川崎市衛研	1994. 8. 5	23歳・女	水様性下痢	インド(7/27-8/4)
9	栃木県衛研	1994. 8. 6	64歳・男	下痢、嘔吐	バングラデシュ(7/29-8/4)
10 ^{b)}	東京都衛研	1994.10.11	28歳・男	下痢、頭痛	インド（7日間）
11	成田空港検疫所	1994.10.21	60歳・男	水様性下痢	中国(10/15-19)
12	関西空港検疫所	1997. 9.28	24歳・男	下痢（軟便）、腹痛	ネパール（9/21-28）

a)コレラ菌（O1）と同時検出

b)ソルネ赤痢菌、カンピロバクターと同時検出

表 4 使用培地

検査材料	検査量	前処理	直接分離培養	一次増菌培養	二次増菌培養
糞便	-	-	TCBS,ビブリオ寒天	1%NaCl 加 APW*	(必要なし)
食品	50～100g	細碎		1%NaCl 加 APW	
海水					無塩 APW
井戸水	1L	濾過	(必要なし)	1%NaCl 加 APW	または
河川水					Monsur 培地
汚泥	1L			2倍濃度増菌培地	

*APW：アルカリペプトン水

表 5 生化学的性状

培地		一般的性状	(ベンガル型の性状)
オキシダーゼ		+	
TSI	斜面/高層	+/A ^{a)}	
	ガス産生	—	
LIM	リジン	+	
	インドール	+	
	運動性	+	
マンニット発酵		+	
白糖発酵		+	
O/129	10 μ g	感受性 ^{b)}	(耐性)
発育 ^{c)}	0%NaCl	発育する	
	6%NaCl	発育しない	
	10%NaCl	発育しない	

a)エルトール型では斜面上部が赤変するものが多いが，1995 年分離されたバリ島由来株は黄色(+/A)である。

b)近年、耐性菌が増加している。

c)Nutrient broth(Difco)を使用。

表 6 血清型

血清型	抗原型		診断用血清				モノクローナル抗体試薬		
			混合 (O1)	稲葉 因子	小川 因子	O139	a	b	c
O1	稲葉	AC	+	+	-	-	+	-	+
	彦島	ABC	+	+	+	-	+	+	+
	小川	AB (c)	+	-	+	-	+	+	-
O139			-	-	-	+	-	-	-

小川型菌株は稲葉因子血清に遅れて弱く凝集することがある。

表 7 *V.cholerae* O1 の生物型と *V.cholerae* O139 の性状

血清型	生物型	溶血性 (ヒツジ)	ニワトリ 赤血球 凝集性	ポリミキシン B (50u) 感受性	VP 反応	クラシカル ファージ IV 感受性	エルトール ファージ V 感受性
<i>V.cholerae</i> O1	クラシカル型	—	— ^{a)}	+	— ^{b)}	+	—
<i>V.cholerae</i> O1	エルトール型	+ ^{c)}	+ ^{a)}	—	+	—	+
<i>V.cholerae</i> O139		+ ^{a)}	+	—	+	—	—

a) 例外がある。

b) ときに弱く陽性。

c) 検査方法により陰性の場合がある。

表 8 PCR 反応液の調整

被検菌液（テンプレートを作成）	
集落あるいは確認培地の菌液を蒸留水（生食水ではない）に浮遊し、沸騰水中で 10 分間加熱した遠心上清	
プライマー	
上流(S) : 5'-TCAAACCTATATTGTCTGGTC-3'	
下流(A) : 5'-CGCAAGTATTACTCATCGA-3'	
各濃度を 20 μ mol/L に調整しておく。	
<i>ctx</i> の 380bp の遺伝子領域が増幅される。	
PCR 反応濃厚液（25 μ L 法、10 検体分を作成する場合）	
H ₂ O	91 μ L
10X 反応用バッファー	25 μ L
25 mmol/L MgCl ₂ 液	20 μ L
5.5 単位/ μ L <i>Taq</i> ポリメラーゼ	1.5 μ L
20 mmol/L dNTP 混合液	2.5 μ L
total	140 μ L

表9 コレラ毒素産生性試験の比較

方法		被検菌株数	菌種名				
PCR	RPLA		<i>V.cholerae</i>			<i>V.mimicus</i>	他の細菌 ^{a)}
			O1	O139	non-O1		
+	+	270	188	35	18	29	0
+	−	5	5 ^{b)}	0	0	0	0
−	+	27	0	0	4 ^{c)}	0	23 ^{d)}
−	−	199	54	0	76	41	28
total		501	247	35	98	70	51

a) *V.fluvialis*(8), *Aeromonas* spp.(5), *P.shigelloides*(3),
Salmonella spp.(3), ETEC(25), EHEC(3), EIEC (2) , EPEC(2) を試験した

b) 5株ともプローブ法でも陽性であった。

c) 4株ともプローブ法でも陰性であった。

d) 23株ともLT産生性 *E.coli* であった。

赤 痢 菌

目次

- (1) 赤痢の概説
- (2) 赤痢菌検査に関する一般的注意
 - 1. 検査材料の採取及び輸送
 - 2. 検査の判定及び診断基準
- (3) 検査方法
 - 1. 病原体分離
 - (a) 分離培養
 - (b) 生化学的性状
 - (c) 血清学的性状
 - 2. 病原因子の同定
 - 3. その他
 - (a) 疫学マーカー
 - (a) 消毒・滅菌
 - (b) 薬剤耐性・治療法
- (4) 引用文献
- (5) 検査依頼先
- (6) 執筆者一覧

（１）赤痢の概説

Shigella は細菌性赤痢（shigellosis）の原因菌で、1898 年に志賀潔によって初めて分離された。当時、日本では激しい赤痢の流行が毎年のように発生しており、このとき志賀は患者血清を用いて菌体凝集反応、すなわち Widal 反応を実施し、36 名の赤痢患者のうち 34 名から同一の菌を分離し *Bacillus dysenteriae* と記載した。これが今日でいう志賀赤痢菌（*Shigella dysenteriae* 1）である。実は 1888 年 Chantemesse & Widal によって志賀の分離した菌と同じ菌が分離されていたが、その性状の記載が不十分であったため、志賀が発見者の栄誉を得、*Shigella* と命名された。

現在、*Shigella* は腸内細菌科（*Enterobacteriaceae*）の独立した菌属として分類されているが、*Escherichia coli* との DNA 間の相同性は平均 85%以上と、一般には同一菌種内に含まれるべき値である。したがって、*Shigella* と *E. coli* との鑑別はかなり難しく、後述のように中間的な性状をもつ生物型がみられるほか、*E. coli* のうち腸管侵入性大腸菌（EIEC）は、*Shigella* と同じ病原因子をもち、抗原的にも区別できないものがある。しかしながら、発見以来約 100 年間、細菌性赤痢の原因菌として *E. coli* から区別してきた医学上の重要性と習慣から、*Shigella* として *Escherichia* から独立している。

Shigella には、以下に示す 4 菌種が含まれるが、これらはすべて分類学的には *E. coli* の生物型にすぎない。

- | | |
|-------------------------------|----------|
| ① <i>Shigella dysenteriae</i> | (A 群赤痢菌) |
| ② <i>Shigella flexneri</i> | (B 群赤痢菌) |
| ③ <i>Shigella boydii</i> | (C 群赤痢菌) |
| ④ <i>Shigella sonnei</i> | (D 群赤痢菌) |

Shigella はヒトの病原菌で、まれにサルにも感染するが、野生のサルの間には自然感染はないといわれる。

病変は大腸及び直腸に局限されるが、重症例では回腸末端部にも及ぶ。定型的な病変は、粘膜上皮細胞の急性炎症と潰瘍形成で、これらの病変はある程度原因菌種と関係があり、*S. sonnei* の感染では粘膜上皮の炎症以外に病変が進行することは少ないが、*S. dysenteriae* や *S. flexneri* では潰瘍形成の頻度が高い¹⁾。

Shigella の本質的な病原因子は細胞侵入性で、経口的に摂取された菌が大腸の粘膜上皮細胞に侵入し、増殖、隣接細胞への伝播をくりかえしながら上皮細胞を破壊する。この

一連の過程には、120 (*S. sonnei*) あるいは140 (*S. sonnei* 以外の *Shigella* spp.) メガダルトンの大型プラスミドが関与しており、このプラスミドが脱落した株は病原性を失う。このプラスミドには病原性に関する多数の遺伝子が含まれるが、完全な病原性の発現にはこれらの遺伝子の発現調節に関わる染色体遺伝子の関与も必要である²⁾。

また、O 抗原が病原因子の一つとして重要なことも示されており、*S. sonnei* ではビルレンスプラスミドが脱落すると、病原性を失うと同時に O 特異抗原も失って R 型 (II 相) になる¹⁾。

一方、*Shigella dysenteriae* 1 は特殊な細胞毒、すなわち志賀毒素を産生し、溶血性尿毒症症候群 (HUS) を続発することがある。HUS の発症機序は完全には解明されていないが、特に小児では予後不良である。この他に *S. flexneri* 感染の合併症として、HLA-B27 を有する人に Reiter 症候群と呼ばれる関節炎をきたすことがあるが、Reiter 症候群は *Yersinia enterocolitica* や *Salmonella* など細胞侵入性を示す他の細菌感染症でも見られ、自己免疫反応の一つであると考えられる²⁾。

潜伏期間は1〜5日 (多くは3日以内) で、腹痛、下痢 (粘血便)、発熱、ときに嘔吐などによって急激に発病し、テネスマス (しぶり腹) を伴うのが特徴的な症状である。しかしながらわが国では、*S. sonnei* の分離頻度が高いこと、海外渡航者下痢症では患者が成人であることを反映して、軽症下痢あるいは無症状で経過する例が多く、1985年〜94年の赤痢患者3152人の臨床症状を検討した成績では腹痛70.3%、悪心28.9%、従来臨床診断の根拠とされてきた血便は22.3%にすぎず、いずれの症状も腸炎ビブリオ、カンピロバクター、サルモネラより頻度が低く、発熱も平均37.7℃とカンピロバクター、サルモネラより低いという結果が示されている³⁾。

発症菌量は少なく、1000個以下で発症する。また、50%発症するのに必要な菌数は100〜200という報告²⁾や、ボランティアへの投与実験では10個程度で感染が成立したという報告もある⁴⁾。

細菌性赤痢は世界的に蔓延しているが、特に栄養と衛生状態の悪い発展途上国で多発しており、年間60万人が死亡している⁴⁾。最も多い原因菌は、*S. flexneri* 及び *S. sonnei* で、途上国では *S. flexneri* の分離頻度が高く、衛生環境が改善されるにつれて *S. sonnei* が優勢になる傾向がある。*S. dysenteriae* や *S. boydii* も途上国では稀ではないが、先進国でこれらの菌種が分離されるのは、ほとんど途上国からの帰国者である。

我が国では1960年までは毎年10万人もの患者数であったが、徐々に減少し1975年以降は年間1000名前後が報告されている⁵⁾。しかしその後の20年間に患者数の減少は見られない。これは海外感染例（輸入例）の増加によるもので、1996年は約70%、1997年は約80%が輸入例、特にアジアで感染したと考えられる症例である。ところが1998年はその傾向が逆転し、国内感染例が半数以上を占めた⁶⁾。これは国内集団発生事例が増加したためである。分離菌種は、1983年以降はそれまで主流であった*S. flexneri*にかわって、*S. sonnei*が最も高率に分離されるようになった⁵⁾。

集団発生は、1996年に2件、1997年には1件が報告されたのみであったが、1998年には10件（うち1件はバリ島への団体旅行）が報告され、原因菌種は*S. sonnei*が8件と最も多く、*S. flexneri* 2a、*S. flexneri* 3aがそれぞれ1件ずつであった。1998年5月に長崎市の大学及び付属高校で発生した*S. sonnei*事例は井戸水が感染源と考えられ、患者数は821名にもおよんだ⁶⁾。その他の事例は、保育園や養護・福祉施設、旅館などで発生しているが、原因は解明されていない。

Shigella はわずかな菌数で感染するため、感染者の手指やタオル・器具などを介して感染が広がる。したがって、乳幼児の集まる保育園や養護施設などはハイリスクであり、家庭への二次感染も起こりやすい。

また、汚染された食品や水を介して集団発生を引き起こすことも多い。欧米では、レタスやパセリなどの生野菜やサラダが原因食となることが多く⁷⁾、水系感染も飲料水だけでなく、プールや新しいタイプのウォーター・アミューズメントでの事例が報告されている⁸⁾。日本でも、広域に流通する食品が感染の媒体となったと推測される例が報告されており、1999年12月から翌年2月にかけて福岡県及び長崎県において、輸入タイラギ貝によると考えられる*S. flexneri* 2a患者が発生した。また、2001年11月から12月にかけては、*S. sonnei*に汚染された輸入カキにより日本各地の41自治体で130名以上の患者が発生した。

(2) 赤痢菌検査に関する一般的注意

1. 検査材料の採取及び輸送

検査材料は糞便または腸内容物であることはいうまでもないが、*Shigella* は死滅しやすいので、採取後直ちに検査に供するか、Cary-Blair 培地のような輸送培地に入れ室温で輸送する。患者便の採取にあたっては、抗菌剤投与前に採便し、粘液や血液を含む部分を選んで採取する。

2. 検査の判定及び診断基準⁹⁾

検査の判定については次項を参照のこと。

確定診断

確定診断は糞便培養からの菌検出による。検体は必ず、抗菌薬服用前に採取する。発展途上国からの帰国者、小児や易感染性宿主の下痢、発熱を伴う下痢や血便には本症を疑う。抗菌薬投与終了後 48 時間以上たってから、24 時間以上の間隔で連続 2 回の糞便検査が陰性の場合は、菌陰性とみなす。なお、無症状の病原体保有者（無症状保菌者）は入院の必要はないとされている（感染症法）。

鑑別診断

鑑別すべき疾患にはそのほかの感染性腸炎、薬剤関連性腸炎、炎症性腸疾患、外科的疾患などがある。

(3) 検査方法

1. 病原体分離

Shigella は *Enterobacteriaceae* に属するグラム陰性、通性嫌気性、無芽胞、非運動性の桿菌で、検査の進め方は他の *Enterobacteriaceae* 病原菌と同様である。二次感染を起こしやすいことから、同定は迅速に行う必要がある（図 1）。

(a) 分離培養

分離培地として、選択性の強い SS 寒天や SSB 寒天、選択性の弱い DHL 寒天やマッコンキー寒天、非選択培地である BTB 乳糖寒天があり、SS 寒天培地では発育が抑制される菌株があるため、検査に当っては選択培地と非選択（あるいは弱選択）培地を併用することが望ましい。

分離平板は 37℃で 18～24 時間培養し、*Shigella* は乳糖（及び白糖）非分解のため、表 1 のようなコロニーを形成する。

回復後の排菌者及び健康者の糞便からの菌分離には、本来増菌培養が望ましいが、*Shigella* に対しては効果的な増菌培地はないので、選択性の強い培地に多めの検体を接種するのが通常である。

米国 FDA では、食品の検査にノボビオシン加 *Shigella* broth を用いた嫌気培養を勧めている¹⁰⁾。これは、表 2 に示した組成の *Shigella* broth 225 ml にサンプルを 25 g 加えて懸濁し、必要に応じて pH を 7.0 ± 0.2 に調整し、嫌気ジャーに入れて水浴中で培養する方法で、*S. sonnei* の検出には、ノボビオシンを $0.5 \mu\text{g/ml}$ に加えて 44°C で 20 時間、その他の *Shigella* には、ノボビオシンを $3 \mu\text{g/ml}$ に加え 42°C で増菌培養を行う。

また、霜鳥らは、人為的に *Shigella* で汚染した生ウニを、ノボビオシンを $5 \mu\text{g/ml}$ に加えた *Shigella* broth で 42°C 15~18 時間嫌気培養し、接種菌数 1000 個では 43 株中全株で検出可能であり、24 株は 10 個以下の接種菌数まで検出できたことを報告している¹¹⁾。

前述の 1998 年に国内で発生した *S. sonnei* による大規模集団発生では、井戸水 5~10 リットルをメンブランフィルター ($0.45 \mu\text{m}$) でろ過集菌し、tetracycline (TC) $30 \mu\text{g/ml}$ 加トリプトソイブロスで 35°C 、18~24 時間増菌培養することで、*S. sonnei* を分離できた⁶⁾。

(b) 生化学的性状

分離培地上の疑わしいコロニーを釣菌し、TSI 寒天、LIM 培地などの確認培地に移植して、 37°C 一夜培養する。同時にトリプトソイ寒天斜面培地にも移植し、TSI で乳糖、白糖非分解、LIM でリシン、運動性陰性を示した株 (表 3) は、表 4・表 5 に示すような生化学的性状を調べて同定するとともに、血清型別を実施し推定的同定結果を得る。

原則的には、*S. dysenteriae* はマンニット非発酵菌からなり、他の 3 菌種はマンニット発酵菌で、そのうち *S. sonnei* は乳糖及び白糖を遅れて発酵する。しかし、同一菌種でも血清型や生物型によって異なる性状を示し、例えば、*S. dysenteriae* 1 は β -ガラクトシダーゼが陽性であり、*S. flexneri* 6、*S. boydii* 13、*S. boydii* 14 の一部の生物型はブドウ糖からのガス産生性が陽性である。また、*S. flexneri* 4a と *S. flexneri* 6 にはマンニット陰性の生物型があり、前者では *E. coli* との鑑別性状である酢酸ナトリウム陽性株も多い。血清型による性状の相違については、詳しい成書を参考にすると良い¹²⁾。

S. sonnei と他の 3 菌種の鑑別性状には、オルニチンデカルボキシラーゼ陽性、マンニット陽性、 β -ガラクトシダーゼ陽性などが挙げられ、このうちオルニチン陽性率は 99% 以上であるとされてきた¹²⁾が、1990-97 年に東京都において分離された株のうち、国内例由来株 94 株中 27 株 (28.7%)、輸入例由来株 247 株中 20 株 (8.1%) はオルニチン陰性

であった¹³⁾。また、大阪府における調査でも、輸入例由来株 111 株中 5 株 (4.5%) がオルニチン陰性であり、マンニット陰性株 (10 株)、 β -ガラクトシダーゼ陰性株 (5 株) を合わせ、17 株 (15.3% ; 2 性状が陰性を示した株を 3 株含む) は非典型的な性状を示した¹⁴⁾。

現在では各種市販の腸内細菌用同定キットが普及しており、簡便に同定が行えるが、前述の非典型的性状を示す *S. sonnei* は、キットによっては *Shigella* と同定されない場合があり¹⁴⁾、TSI、LIM によるガス産生性や運動性の有無及び後述の診断用血清による血清型別は必須である。

(c) 血清学的性状

Shigella は鞭毛をもたず、菌体抗原 (O 抗原) のみによって血清型に分けられるが、それらの多くは *E. coli* の O 抗原のいずれかと同一か、又は密接な関係がある。特に組織侵入性大腸菌の O 抗原は、*Shigella* の O 抗原と同一のものがほとんどである。

① *Shigella dysenteriae* : 主抗原によって 1~13 血清型に分けられる。いわゆる志賀赤痢菌は血清型 1 (*S. dysenteriae* 1) をいう。

② *Shigella flexneri* : 6 種類の型抗原 (型特異抗原) によって血清型に、3 組の群抗原 (群共通抗原) によって各血清型を亜型に分ける。群抗原は血清学的に 10 種類以上のものが認められているが、型別上意義のあるものは 3,4、6、7,8 の 3 組で、血清型及び亜型はそれぞれアラビア数字とアルファベットで記載する (表 6)。

型抗原が脱落して群抗原のみになったものを variant X、variant Y と呼び、血清型と同格の扱いを受けることが多い。

③ *Shigella boydii* : 主抗原によって 1~18 血清型に分けられる。

④ *Shigella sonnei* : 一つの血清型しか認められていないが、S-R 変異に類する抗原変異が高頻度にみられ、前者を I 相、後者を II 相とすることがある。しかし、本来『相』という語は *Salmonella* の H 抗原のように、二つの型を可逆的に移行するものに用いられるべきで、*S. sonnei* の I 相から II 相への変異は不可逆であるため適当ではなく、『型、form』とすべきである。S 型の O 抗原は *Plesiomonas shigelloides* O 抗原 17 と同一である。

生化学的性状で *Shigella* と同定した菌株でも、特に *S. dysenteriae* と *S. boydii* の菌株は生菌では赤痢菌診断用抗血清と凝集しないことがある。これは菌体表層部に K 抗原様物質が存在し、O 難凝集性となっているからで、それらの菌株は 100°C30 分あるいは 121°C 15 分加熱すると O 凝集性となる。

- ・新血清型 *Shigella* の検出例

Shigella の血清型分類は、1984 年に国際分類委員会腸内細菌分類小委員会により改定され、上述の血清型分類に基づいた型別法が国際的に広く用いられている。しかし、この改定以降も追加すべき血清型のあることが報告されており（表 7）¹⁵⁾、アメリカでは集団発生事例も起こしている¹⁶⁾。

日本における新血清型 *Shigella* はこれまでに輸入例が 47 例、国内例が 11 例報告されている（表 8）¹⁵⁾。*Shigella* が疑われるが、加熱死菌においても O 凝集性を示さない場合は、新血清型である可能性がある。

2. 病原因子の同定

Shigella の病原性の確認には、以前から培養細胞（HEp-2、HeLa）への侵入テストやモルモットに点眼し角膜・結膜炎を惹起させる Sereny テストが行われてきた。最近では、侵入性プラスミドを DNA プローブや PCR で検出する方法¹⁷⁾も報告されているが、日常の検査で病原因子の確認が必要とされることはなく、組織侵入性大腸菌も同一の病原機序を持つことから、これらの方法では鑑別できない。

- ・ *invE* を標的遺伝子とした PCR 法¹⁷⁾

PCR 法を用いることにより赤痢菌を疑う分離株について迅速な判定が可能な場合もありメリットもあるが、侵入性プラスミド上にコードされる病原遺伝子の有無だけでは赤痢菌とは確定はできない。プライマーは、赤痢回復期血清と反応する抗原蛋白質 (invasion plasmid antigens, Ipa) の発現を正に制御している遺伝子である *invE* を標的遺伝子として設計してある（表 9）。なお、市販されているプライマーでは、*invE*、*ipaH* を標的遺伝子としたもの（宝酒造）が利用できる。

3. その他

(a) 疫学マーカー

集団発生やいわゆる diffuse outbreak の場合、患者同士の関連や感染源の追及に疫学マーカー解析が行われる。このうち *S. sonnei* では、コリシン型別¹⁸⁾が応用されてきたが、最近ではパルスフィールド・ゲル電気泳動法や Random Amplified polymorphic DNA 法による遺伝子解析が用いられる傾向にある¹⁶⁾¹⁹⁾。

(b) 消毒・滅菌

消毒用エタノール、次亜塩素酸ナトリウム、第四級アンモニウム塩などの一般の消毒薬が有効である。患者便には3%クレゾール液を同量混合する。

(c) 薬剤耐性・治療法

1950年代にすでにサルファ剤耐性菌が出現し、年とともに多くの薬剤に対する耐性菌が増加している。東京都の調査によると1980年にはすでに国内例、輸入例とも70%以上の耐性率を示しており、その後も80%前後の高耐性率で推移している⁵⁾。

感染性腸炎研究会が1985~1994年の10年間に分離された約3000株について調べた成績による²⁰⁾と、耐性菌の分離頻度は tetracycline(TC) または streptomycin(SM) で毎年

70~85%、sulfanilamide(SA) は常に 90%を越えており、chloramphenicol(CP) 耐性菌は徐々に減少して1991年以降は30%以下となっている。すなわち、*Shigella* の保有するプラスミドの基本形である TC・CP・SM・SA 4剤耐性は減少する傾向にあり、*S. sonnei* では TC・SM・SA の3剤耐性菌の方が分離頻度が高くなっている。また、trimethoprim(TMP) 耐性菌や、特に *S. flexneri* では ampicillin(ABPC)耐性菌の分離率が高くなっており、これらの耐性は4剤または3剤耐性に伴った形で現れることが多い。一方、norfloxacin(NFLX) 耐性菌の分離頻度は数%にとどまっているが、fosfomycin(FOM) 耐性菌は80%以上と高率であり、多剤耐性化とは無関係に出現している。

治療には、対症療法と抗菌薬療法がある。対症療法では、脱水の程度に応じて経口或いは経静脈的に補液を行ったり、腸内細菌のバランスを整えるために乳酸菌製剤の投与が行われる。WHO は、*Shigella* に限らず細菌性下痢症の治療に ORS(oral rehydration salts) と呼ばれる経口輸液の使用を勧めている。強力な止痢剤（ロペラミドなど）の投与は腸内容物を停滞させ、かえって除菌を遅らせるので使用しない。

抗菌薬の第一選択薬は成人ではニューキノロン系薬、小児では FOM で、いずれも経口で5日間投与する²¹⁾が、耐性菌が出現しているので感受性試験の結果を確認する。

(4) 引用文献

- 1) 坂崎利一：新訂 食水系感染症と細菌性食中毒, 139-152, 2000, 中央法規出版
- 2) Bacterial Pathogenesis : A molecular approach, 169-181, 1994, ASM Press
- 3) 松原義雄：日本の感染性腸炎 II, 51-62, 1996, 菜根出版
- 4) WHO homepage, 1998, <http://www.who.int/vaccines-diseases/diseases/Shigella.shtml>

- 5) 松下 秀ら：モダンメディア, 44:312-320, 1998
- 6) 国立感染症研究所：細菌性赤痢 1996～1998, 病原微生物検出情報, 20:58-59, 1999
- 7) Kapperud G. et al. : J. Clin. Microbiol., 33:609-614, 1995
- 8) MMWR, 49:565-568, 2000
- 9) 感染症の診断・治療のガイドライン. 監修：日本医師会感染症危機管理対策室等.
日本医師会雑誌, 122: 70 - 73, 1999
- 10) FDA, 2001, <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>
- 11) 霜鳥翔一ら：感染症学雑誌, 64:1337-1344, 1990
- 12) 坂崎利一ら：腸内細菌（下）, 225-251, 1992, 近代出版
- 13) 松下 秀ら：感染症学雑誌, 73:414-420, 1999
- 14) 勢戸和子ら：感染症学雑誌, 73:707-708, 1999
- 15) 松下 秀：食品衛生学雑誌, J-221-J-227, 2000
- 16) Rosalie T. et al. : J. Clin. Microbiol., 37:2352-2353, 1999
- 17) 伊藤健一郎ら：日本臨床, 50:368-372, 1992
- 18) 小川正之ら：微生物検査必携, D-14-D-29, 1987, (財)日本公衆衛生協会
- 19) 内村眞佐子ら：感染症学雑誌, 72:615-620, 1998
- 20) 伊豫部志津子：日本の感染性腸炎 II, 39-44, 1996, 菜根出版
- 21) 坂本光男ら：Medical Practice, 16:1777-1780, 1999

（５）検査依頼先

全都道府県の地方衛生研究所等が対象となる。

（６）執筆者一覧

勢戸和子、小林一寛

大阪府立公衆衛生研究所

大友良光

青森県環境保健センター

北條圀生、井出 忍

静岡市衛生試験所

寺嶋 淳、渡辺治雄

国立感染症研究所

図1 *Shigella* の検査手順

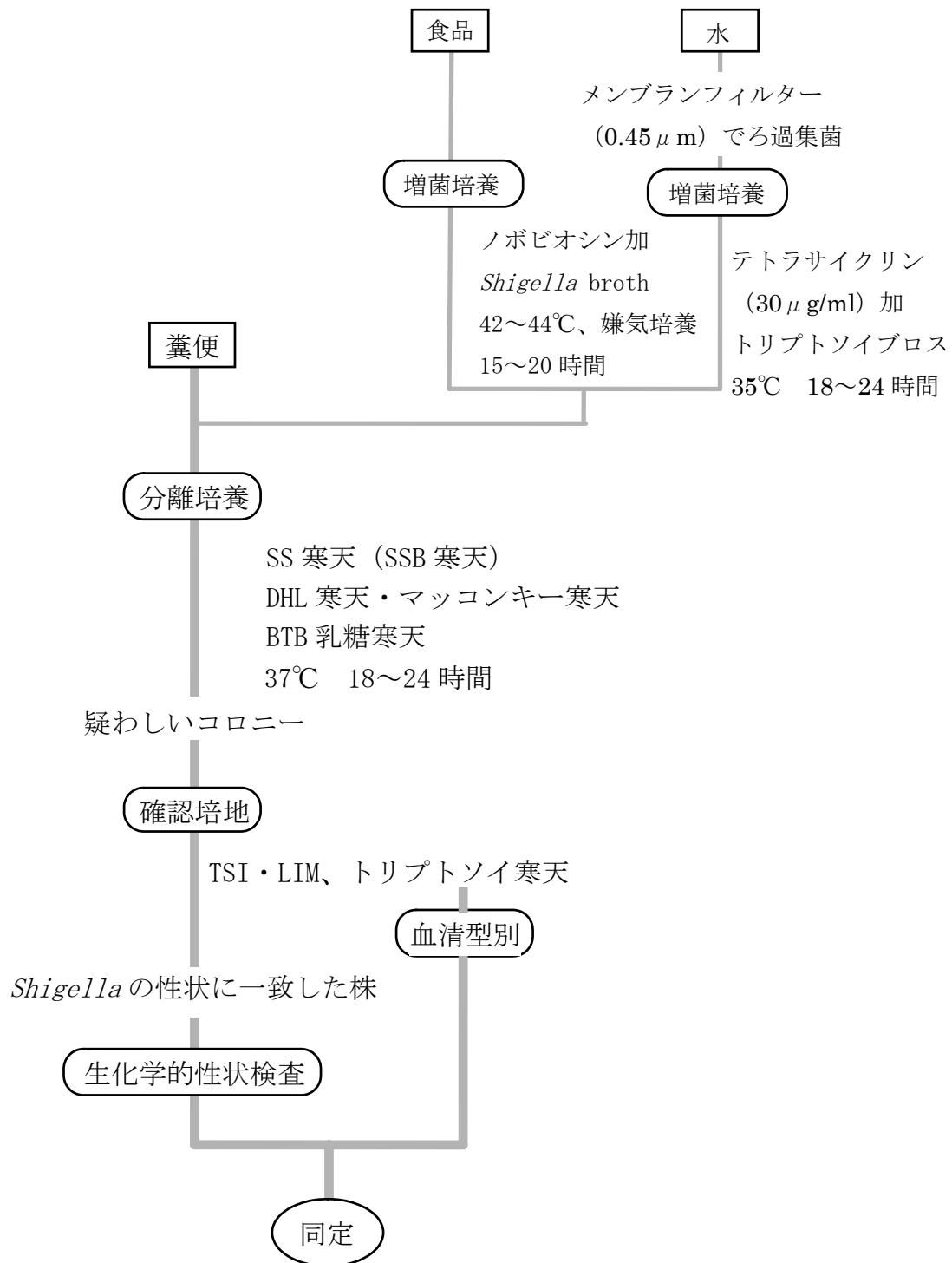


表1 分離培地上のコロニー

分離培地	コロニーの性状
SS 寒天培地	直径 1～2mm の無色半透明コロニー、 <i>S. sonnei</i> ではやや大きく、中心部が淡桃色を帯びることがある。
DHL 寒天培地	無色透明コロニー。SS 寒天培地 よりもやや大きい。
マッコンキー寒天培地	無色半透明コロニー。
BTB 乳糖寒天培地	青色半透明コロニー。

表2 *Shigella* broth の組成

Tryptone	20 g
K_2HPO_4	2 g
KH_2PO_4	2 g
NaCl	5 g
Glucose	1 g
Tween 80	1.5 ml
Distilled water	1 Liter

高圧蒸気滅菌（121℃、15 分）を行う。

表3 確認培地上の *Shigella* 及び類似菌の性状

菌種	TSI				LIM		
	斜面	高層	H ₂ S 産生	ガス産生	リシン	インドール	運動性
<i>Shigella</i> spp.	—	+	—	—	—	d	—
<i>S. Flexneri</i> 6	—	+	—	+	—	d	—
<i>S. boydii</i> 14							
(<i>S. boydii</i> 13)							
EIEC	d	+	—	d	—	+	—
<i>E. coli</i>	+	+	—	+	+	+	+

+ : 90%以上が陽性、— : 90%以上が陰性、d : 菌株によって異なる

表4 *Shigella* spp. の生化学的性状

性 状	反応
インドール	d
メチルレッド	+
Voges-Proskauer	-
クエン酸(Simmons)	-
クエン酸(Christensen)	-
硫化水素(TSI)	-
ウレアーゼ(Christensen)	-
ゼラチナーゼ	-
フェニルアラニンデアミナーゼ	-
リシンデカルボキシラーゼ	-
アルギニンジヒドラーゼ	d
オルニチンデカルボキシラーゼ	d
KCN 培地における発育	-
マロン酸	-
酢酸ナトリウム	d
ブドウ糖からのガス産生	d
糖(酸) : ブドウ糖	+
乳糖	d
白糖	d
マンニット	d
アドニット	-
イノシット	-
サリシン	-
β -ガラクトシダーゼ	d
運動性	-

+ : 90%以上が陽性、- : 90%以上が陰性、d : 菌株によって異なる

表5 *Shigella* spp. の鑑別性状

性 状	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>E. coli</i>
インドール	d	d	d	－	d
β －ガラクトシダーゼ	d	－	d	＋	＋
オルニチンデカルボキシラーゼ	－	－	－	＋	＋
ブドウ糖からのガス産生	－	d	d	－	＋
糖(酸)： マンニット	－	＋	＋	＋	＋
乳糖	－	－	－	(＋)	＋, (＋)
白糖	－	－	－	(＋)	d
ラフィノース	－	d	－	(＋)	d
キシロース	d	d	d	－	＋
ズルシット	d	－	－	－	d
クエン酸(Christensen)	－	－	－	－	d
酢酸ナトリウム	－	d	－	－	＋, (＋)

＋：90%以上が陽性、－：90%以上が陰性、(＋)：遅れて陽性、d：菌株(血清型)によって異なる

表6 *S. flexneri* の簡略抗原構造表

血清型	亜型	型抗原	群抗原
1	1a	I	4
	1b	I	6
2	2a	II	3,4
	2b	II	7,8
3	3a	III	6,7,8
	3b	III	3,4,6
4	4a	IV	3,4
	4b	IV	6
5	5a	V	3,4
	5b	V	7,8
6	-	VI	-
	X variant	-	7,8
	Y variant	-	3,4

表7 新血清型 *Shigella* に関する報告

血清型	報告年	報告者
<i>S. dysenteriae</i>		
I9809-73	1985	Shmilovitz <i>et al</i>
E670/74	1989	Gross <i>et al</i>
E22383	1989	Gross <i>et al</i>
E23507	1989	Gross <i>et al</i>
93-119	1997	松下ら
204/96	1998	松下ら
<i>S. flexneri</i>		
88-893	1992	松下ら
89-141	1992	松下ら
<i>S. boydii</i>		
E16553	1982	Gross <i>et al</i>
E28938	1989	Gross <i>et al</i>

表8 日本における新血清型 *Shigella* の検出状況

血清型	分離年	件数 (うち輸入例)
<i>S. dysenteriae</i>		
I9809-73	1989-1994	3 (3)
E23507	1987	2 (2)
E670/74	1996	1 (1)
93-119	1993-1995	2 (2)
204/96	1996-1999	6 (6)
<i>S. flexneri</i>		
88-893	1986-1998	29 (22)
89-141	1985-1998	10 (7)
<i>S. boydii</i>		
E16553	1985-1999	5 (4)

表 9 赤痢菌病原性診断用 PCR の手順

反応液	sterile distilled water	29 μ l	反応	熱変性	92°C,	0.6 分
	reaction mixture	17 μ l		アニーリング	61°C,	1.4 分
	sample or standard DNA	2 μ l		伸長反応	70°C,	2.2 分
	Taq DNA polymerase	2 μ l (1U)		20-40 サイクル		

invE プライマー:

sense strand 5' - CCTTGATACAAATTTGCCCCCG - 3'

anti-sense strand 5' - GATGGCGAGAAATTATATCCCG - 3'

増幅断片サイズ: 248 bp

ジ フ テ リ ア

ジフテリアの検査・診断マニュアル

目次

- 1 はじめに
- 2 ジフテリアの概説
- 3 ジフテリアの検査
 - (1) 総論
 - 1) 診断・治療に携わる検査・医療従事者の心得
 - 2) 検査材料の採取・輸送・保存
 - 3) ジフテリア菌検査手順の流れ
 - (2) 細菌学的検査法
 - 1) 染色法
 - 2) 分離確認培地
 - 3) ジフテリア毒素原性試験
 - 4) 生化学性状試験
- 4 ジフテリアの診断基準
- 5 参考文献
- 6 ジフテリア検査依頼先または連絡先
- 7 執筆者一覧
- 8 編集・発行

1. はじめに

近年、日本国内ではトキソイドワクチンの接種によりジフテリア患者は激減し、年間数例が散発的に報告されるだけである。したがって、各医療機関ではジフテリア患者に遭遇する機会が少なくなり、適切な診断を早期に行うことが困難となっている。同様に、細菌学や血清学的診断に必要な知識を持った技術者や選択培地が配置されている検査機関が極めて少なくなり、診断の遅れが医療現場での早期治療の障害となることが懸念される。ジフテリアは発展途上国などでは常時蔓延し、呼吸器以外にも皮膚ジフテリアなどがある。1990年代半ばに「旧ロシア連邦」地域から東欧諸国にかけて発生したジフテリアの爆発的な流行は、欧州各地を巻き込んだ国際的な問題となったが、ワクチン接種による防疫が功を奏し、患者の発生は終息した。ジフテリアは国際的に予防対策が必要・可能な疾患として、WHOではExpanded Programme on Immunization (EPI)の対象疾患の1つとしてワクチン接種を奨励している。

2. ジフテリアの概説

ジフテリア菌は患者や無症状保菌者の咳などからの飛沫を介して感染し、潜伏期間は通常1〜10日間で、2〜5日が最も多い。感染後、侵される部位により、鼻ジフテリア (anterior nasal diphtheria)、咽頭・扁桃ジフテリア (pharyngeal and tonsillar diphtheria)、喉頭ジフテリア (laryngeal diphtheria)、皮膚ジフテリア (cutaneous (skin) diphtheria)、眼結膜ジフテリア (ocular diphtheria)、生殖器（陰門）ジフテリア (genital diphtheria) などの病型に分類される。

咽頭、喉頭、鼻腔などに感染、増殖した菌は、産生された毒素の作用により繊維素性壊死性炎の結果、灰白色の偽膜を形成する（毒素非産生菌の感染でも認められた報告有り）。主な症状は咽頭の繊維素性壊死性炎症が一般的にみられ、眼、生殖器、腸管など全ての粘膜組織が感染の対象となりうる。心筋炎、神経炎、血小板減少などを伴い、毒素非産生菌の感染の場合は症状は軽いと言われている。早期に心筋炎を発症すると死亡率が高くなる傾向にあり、運動神経を中心とした神経炎が見られるが、重症化を免れた場合やがて回復する。軟口蓋の麻痺（3週目）や眼筋、手足、横隔膜の麻痺（5週目）、更に、二次性肺炎、横隔膜麻痺による呼吸障害、小児では、中耳炎、呼吸不全が見られる場合もある。感染例の多い咽頭ジフテリアの場合は、厚い偽膜と咽頭粘膜の浮腫により気道を閉塞することもある。熱は通常高くない。

重症例では虚脱、皮膚の蒼白、頻脈、意識障害、昏睡となり6〜10日で死

亡する場合があります、下顎部と前頸部の著しい浮腫とリンパ節腫張を伴い、特徴的な “bullneck”を示す。死亡率は平均で5〜10 %で、5才以下及び40才以上では20 %以上とされている。ジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae*) は、1883年にKlebsにより患部の偽膜で観察され、1884年にLöfflerが培養に成功した。コロニーの形態、糖の分解能および溶血性等の違いにより、gravis, mitis, intermediusの3種類のバイオタイプに分けられているが、バイオタイプと病原性の間に密接な関係はないと現在では考えられている。

ジフテリア菌の病原因子として広く認められているものは、現在のところジフテリア毒素だけである。ジフテリア毒素の遺伝子はバクテリオファージに依存しており、バクテリオファージが溶原化することにより菌は毒素産生性を獲得する。毒素はA-B型の構造を持つADP-リボシルトランスフェラーゼで、標的細胞に侵入しその酵素活性により細胞内のelongation factor 2を修飾して、蛋白合成を阻害して毒性を発揮する。

ジフテリア菌が臨床材料より分離されたら、毒素産生菌か否かを識別することが重要である。菌の毒素産生能と病原性は必ずしも一致しないが、デンマーク、スウェーデンの集団発生時に患者から分離されたジフテリア菌は、DNA解析の結果から特定の型の菌株だけが重症ジフテリアを起こしたことが明らかにされた。1977年に起こった英国の流行はナイジェリアから帰国した毒素産生株保菌者のファージが、毒素非産生株に溶原化して蔓延させたと報告されている。また、牛の常在菌である*C. ulcerans*にジフテリア毒素遺伝子を持ったファージが溶原化して、ヒトが感染した例も報告されている。ジフテリア毒素産生能を持つ菌を保菌する動物と濃厚接触する恐れのある農場関係者や不適当な処理の乳製品については、感染源となる可能性がある。

3. ジフテリアの検査

(1) 総論

1) ジフテリアの診断・治療に携わる検査・医療従事者の心得

- ・ 血中のジフテリア抗毒素価を培養細胞法で測定し、0.1 IU/ml以下の場合は成人用ジフテリアトキソイド又は破傷風の予防を兼ねたジフテリア破傷風混合トキソイドを接種する。抗毒素価の測定は後述の機関に問い合わせる。
- ・ 菌と毒素の取り扱いに注意する。ジフテリア患者又は疑わしい患者由来の検体を検査する場合は、適切な試験・検査の環境で行う。ジフテリア菌はバイオセーフティー上はレベル2である。取り扱いについては国立感染症研究所や日本細菌学会の指針を参考にされたい。近年、ジフテリア菌を取り扱った

海外の施設で実験室感染が起こった事例もある。動物試験における毒素の取り扱いも注意し、試験終了後の動物は消毒、焼却等の処理・管理に注意を要する。

2) 検査材料の採取・輸送・保存

・材料の採取

患者に抗生物質や抗毒素を投与する前に、病変部位（偽膜、咽頭変色部位、潰瘍部位、扁桃陰窩等）から組織を採取又は滅菌綿棒（木の柄や脱脂されていない綿棒の使用は避ける）でぬぐう。本綿棒を材料としてPCRを行う場合は、シリカゲルを入れた滅菌容器に綿棒を保存する。

・材料の輸送

材料を採取した施設以外の機関に検査を依頼する場合は、国立感染症研究所バイオセーフティー規定のマニュアル（国立感染症研究所より分与可能。分与に関しては<http://www.nih.go.jp/niid/Biosafety/toiawase02.html>を参照されたい）に従って、梱包し郵政機関を利用して輸送する。

・材料の保存

バイオセーフティーレベル2の実験施設内で、病変部位の組織は、室温又は4℃に保存する。PCRの検査に用いる綿棒の材料は室温保存する。いずれの材料もすみやかに検査を行う。分離されたジフテリア菌は、羊脱繊維素血液1mlに約 10^8 個浮遊させて-85℃に保存する。

3) ジフテリア菌検査手順の流れ

・検体（咽頭スワブ、偽膜等）について次の検査を行う。

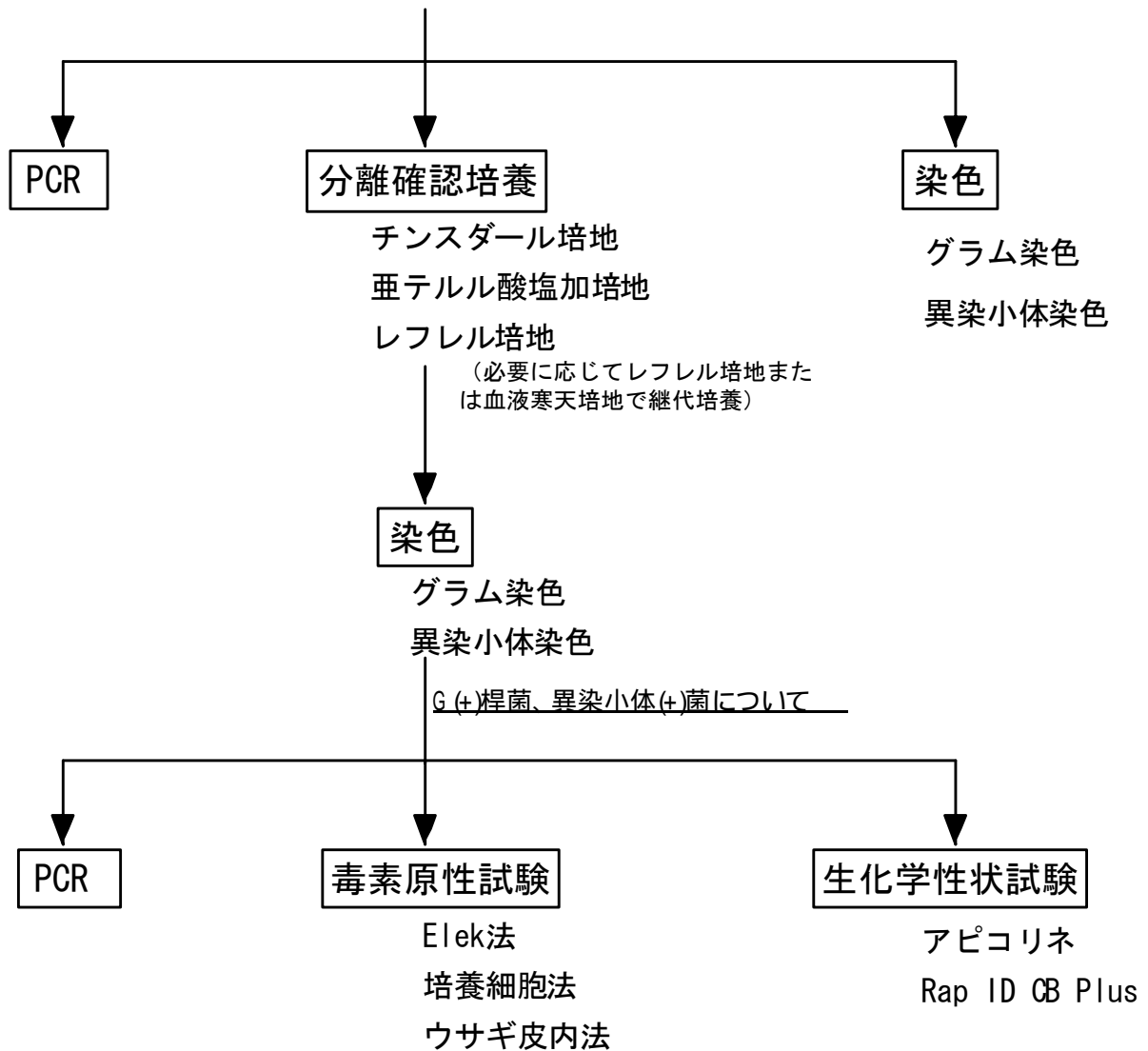
- ① グラム染色を行い、陽性桿菌について、異染小体染色を行う。
- ② 分離培養：チンスダール培地、亜テルル酸塩加培地、レフレル培地
- ③ 咽頭スワブは、そのままPCRができる。

・分離培養のコロニーについて、グラム染色を行い、陽性桿菌について異染小体染色とPCRを行う。

- ・Elek法、培養細胞法、ウサギ法、モルモット法で毒素産生を調べる。
- ・分離された菌株の生化学性状試験を行う（アピコリネ、RapID CB Plus）。

ジフテリア菌検査手順

検体（咽頭スワブ、偽膜等）



(2) 細菌学的検査法

ジフテリアの確定診断には、患者の病変部位からジフテリア菌を分離することが重要である。患者に抗生物質や抗毒素を投与する前に、病変部位の材料（偽膜、咽頭変色部位、潰瘍部位、扁桃陰窩（tonsillar crypt））を直接塗抹しグラム染色、異染小体染色をするとともに、選択培地に塗抹・培養して菌の分離・同定を行う。ジフテリアの偽膜は灰白色の滲出物である。剥離が困難なうえ、無理に剥がすと出血しやすい。また、ジフテリア菌とともにレンサ球菌、ブドウ球菌等との混合感染もあり、注意が必要である。分離培地は、レフレル培地、亜テルル酸塩加血液寒天培地、チンスダール培地を用いる。同定試験は、菌の毒素産生能を試験する寒天内沈降反応法（Elek法）、培養細胞法、ウサギ試験法、モルモット試験法がある。生化学性状試験には、市販品のアピコリネキットやRap ID CB Plusが便利である。また、ジフテリア毒素遺伝子を検出するPCRは迅速性があり、スクリーニングに用いるが、確定診断にはジフテリア菌の検出が必須であり、各試験結果を総合して最終判定を行う。

[検査方法]

1) 染色法[1, 2]

グラム染色（ハッカーの変法）

試薬	①ハッカー液	A液	クリスタル紫	0.3 g
			95 % アルコール	20 ml
	B液		シュウ酸アンモニウム	0.8 g
			蒸留水	80 ml

A液を水で10倍に希釈し、その20 mlと、
B液80 ml とを混合し、翌日濾過して保存する。

②ルゴール液	ヨード	1 g
	ヨウ化カリウム	2 g
	蒸留水	300 ml

ヨードとヨウ化カリウムを乳鉢ですり、少量の水を加えながら完全に溶解させた上で残りの水を加える。

③サフラニン液	原液	サフラニン	2.5 g
		純アルコール	100 ml

定性濾紙で濾過して保存する。

原液を蒸留水で5～10倍希釈して使用する。

* 染色液には、便利な市販品もある。

- 方法 1. 塗抹、乾燥、固定
 2. ハッカー液で30秒～1分間染色、水洗
 3. ルゴール液をかけて1分間媒染、水洗、濾紙で水を吸収
 4. 純アルコールで脱色（30秒～1分間）、水洗
 5. サフラニン液で1分間対比染色、水洗、乾燥、検鏡
- 判定 ジフテリア菌は、グラム陽性（紫～青色）の桿菌（コリネフォーム）として観察される。

異染小体染色（ナイセルの原法）

試薬	①ナイセル液	メチレンブルー	0.1 g
		純アルコール	2 ml
		蒸留水	95 ml
		酢酸	5 ml
	②0.2 % ビスマルクブラウン	ビスマルクブラウン	0.2 g
		純アルコール	10 ml
		蒸留水	90 ml

定性濾紙で濾過してから褐色ビンに保存する。

- 方法 1. 塗抹、乾燥、固定
 2. ナイセル液で30秒間染色、水洗
 3. ビスマルクブラウンで1分間染色
 4. 水洗、乾燥、検鏡

判定 異染小体は青色、菌体は淡黄褐色に染まる。

2) 分離確認培地

チンスダール培地（OXOID社製）

チンスダール培地用粉末	9 g	
蒸留水	200 ml	
加温溶解する。（高圧滅菌は不可）		
サプリメント (SR065A)	15 ml	添加する。
滅菌シャーレに分注し、固める。		

(コロニー) 37℃, 1～2日培養後、テルル酸塩の還元によって
黒色のコロニーが形成される。
コロニー周縁が灰白色になることが多い。

亜テルル酸カリウム加血液寒天培地[3]

2 % 亜テルル酸カリウム水溶液 (濾過滅菌)	16 ml
羊脱繊維素血液	50 ml
ブレイン・ハート・インフュージョン寒天培地	1,000 ml

寒天培地を滅菌後、50℃まで冷却してから亜テルル酸カリウムと血液を加えて平板とする。

亜テルル酸塩により、口腔内常在菌や、その他の雑菌は発育が抑制されるが、ジフテリア菌、ブドウ球菌、ナイセリア、酵母、カンジダはいくぶん抑制されるが、発育する。亜テルル酸塩を還元できる菌は、黒味をもったコロニーが形成されるので、非還元菌との区別に有効である。ジフテリア菌 (下記) と類似したコロニーを形成する菌があるので染色等、鑑別が必要である。

(培養条件) 37℃, 1～3日間, 好気培養
(コロニーの性状)

ジフテリア菌は、24時間培養では直径0.5 mm以下で、2～3日目頃にコロニーの性状がはっきりしてくることが多い。やや扁平で中心部に突起状の小隆起部があり、灰白色の周辺帯を持った灰黒色のコロニーを形成する。亜テルル酸カリウム加血液寒天培地上のコロニー性状から、*gravis*型、*mitis*型、*intermedius*型のバイオタイプに分類できる。以前はバイオタイプと病原性は関連があるといわれていたが、現在では密接な関連はないと考えられている。参考までに、亜テルル酸カリウム加血液寒天培地によるバイオタイプ分類を以下に示す。

ジフテリア菌の3菌型別特徴点

<i>gravis</i> 型:	菌の形態 ; 短型、平等に染まるものが多い。 異染小体は小さく、少ない。 コロニーの硬さ ; 脆い コロニーの性状 ; <i>SR</i> 型、大型、乾燥、粗い、菊花状、 中心から辺縁に向かってシワあり (鋸歯状)、暗灰白色 (中心黒色)
<i>intermedius</i> 型 :	菌の形態 ; 長形、一端が膨隆し、不規則に染まるもの多い

多形態性、異染小体は少ない

コロニーの硬さ；中間

コロニーの性状；sR型、小型、乾燥（中等度）、扁平、
不整斑状、辺縁は正または不正、淡黒褐色

mitis型： 菌の形態； 長形、湾曲し、多形態性、異染小体は最も著明
コロニーの硬さ；軟
コロニーの性状；S型、中等大、浸潤、平滑、円形、斑状
中央部突隆、辺縁は正、黒色（周縁灰白色）

レフレル培地[1, 2]

1 % ブドウ糖ブイヨン 100 ml

ウマ血清 300 ml

上記を混合して中試験管に分注し、血清凝固器内に斜面になるように
入れる。第1日および第2日は70℃，1時間，第3日は80℃，1時間加温す
る。

＊市販品あり。（極東製薬）

（培養条件）

37℃，10～24時間，好気培養

（コロニーの性状）

ジフテリア菌は発育が速く、円形で少し隆起した灰白色半透明の光沢
のある表面のなめらかなコロニーを形成する。菌の形態、染色性を調
べるには、本培地での新鮮発育菌を用いると良い。菌を2～3日培養
後の凝固水（半斜面培地上に溜まる水）は、毒素原性試験に使用でき
る。菌の継代保存用としても使用できる。

3) ジフテリア毒素原性試験

寒天内沈降反応法（Elek法）[4, 5]

基礎培地（蒸留水1リットル中にプロテオースペプトン20g，酵母エキス1g，
塩化ナトリウム2.5g，寒天15g，仔牛血清200ml含有）をシャーレに流し
て固め、直径約5mmの穴を開ける。穴の外周から10mm離れた所に、菌
株を約1μlループ穿刺する。コントロールとしてジフテリア毒素産生
陽性株と陰性株も同様に行う。穴に500 U/mlのジフテリア抗毒素を9
μl入れ、更に蒸留水を入れて穴を満たす。37℃ で培養後、穴と菌穿

刺部位との間を観察する。白色の沈降線が出現すれば、ジフテリア毒素産生株である。陽性株は、培養後1～2日で沈降線が見られる。(ジフテリア抗毒素とジフテリア毒素産生陽性株は国立感染症研究所で分与可能)

培養細胞法

1. VERO細胞を4～5日間培養し、30万個/mlの細胞浮遊液を試験当日に作成する。(ちょうど培養4～5日目が試験日になるよう日程を調整する)
2. 被検菌株、ジフテリア毒素産生陽性株と陰性株をレフレル培地で3～4日間培養し、凝固水を採取して15,000rpm, 5分間遠心する。
3. 菌培養上清を組織培養用マイクロプレート上で、細胞用培養液(例イーグルMEM培地)を用いて、25 μ lの2倍連続希釈系列を2組作成する(12～24wells希釈する。)

希釈系列の1組には、細胞用培養液を125 μ lと、30万個/ml VERO細胞浮遊液(細胞用培養液で浮遊)を50 μ lずつ添加する。もう1組には、約1U/ml以上のジフテリア抗毒素を25 μ l添加して37℃, 30分中和反応後、細胞用培養液100 μ lと30万個/ml VERO細胞浮遊液を50 μ lずつ添加する。(VERO細胞添加量: 1 well 当たり 15,000個)

4. 37℃, 4～5日間、5 % 炭酸ガス培養器で培養する。
5. レフレル凝固水希釈系列で細胞が死亡し、且つジフテリア抗毒素を添加した系列では、その細胞毒性が中和されて細胞増殖が認められた場合、ジフテリア毒素産生株と判定する。

(VERO細胞、ジフテリア毒素産生陽性株、ジフテリア抗毒素は国立感染症研究所で分与可能)

なお、本診断マニュアル(案)には掲載していないが、同様の手法でジフテリア抗毒素価も測定可能である。

ウサギ法

ジフテリア毒素活性をウサギの皮膚の発赤と壊死を指標として検査する方法。

ウサギ(日本白色種、約3.5 kg)の背毛を除去して、約2cm角のマス目を書き、被検菌の培養上清を0.1ml 皮内へ注射する。また、注射前に試験管内で、菌培養上清と約 1 U/ml以上のジフテリア抗毒素を等量混合して、37℃, 30分中和反応させたものも、0.1 ml 皮内へ注

射する。48 時間後に発赤、壊死の有無を観察する。菌培養上清のみを注射した部位に発赤や壊死が生じて、ジフテリア抗毒素で中和後に注射した部位には異常が見られなかった場合、ジフテリア毒素産生株と判定する。

モルモット法

ジフテリア毒素活性をモルモットの皮膚の壊死と致死活性を指標として検査する方法。

被検菌の培養上清4 ml ずつを、2匹のモルモット（ハートレイ系、クリーン、約250g）の側腹部皮内に注射する。ただし、1匹には菌培養上清注射の2時間前に50 U/ml のジフテリア抗毒素を5 ml 腹腔内に注射しておく。ジフテリア毒素産生株であれば、抗毒素注射モルモットは生存するが、他方は2～3日後には死亡する。

PCR [6, 7]

ジフテリア毒素遺伝子を検出する方法。

（方法）QIA amp DNA Blood Mini Kit キアゲン(株)Cat. No. 51104を用いた方法 [7]（キットの説明書と異なる手順なので注意）

1. コロニーから1 μ lループ採取して滅菌精製水1 mlに浮遊させ、5 分間ミキサーにかける。
（咽頭部のスワブを検査する場合）
滅菌綿棒で患者の咽頭部を拭い検査実施までシリカゲル入りチューブ内に室温で保存する。綿棒を、滅菌精製水1 ml中で5 分間ミキサーにかけた後綿棒を取り除く。
2. 15,000 rpm, 5 分間 遠心する。
3. 沈渣にTE Buffer (pH8.0) 180 μ lと100 mg/ml lysozyme 4 μ lを加え、37°C, 1 時間 処理する。
4. AL Buffer 200 μ lとProtease 25 μ lを加えて70°C, 2 時間処理する。
5. 95°C, 30 分間加温後、10,000 rpm, 数秒遠心する。
6. 純エタノール210 μ lを加え、ミキサーに数秒かける。
7. キットのカラムに全量移し、9,500 rpm, 1 分間遠心する。
8. AW 1 Buffer 500 μ l加え、9,500 rpm, 1 分間遠心する。
9. AW 2 Buffer 500 μ l加え、9,500 rpm, 1 分間遠心する。
10. 70°CのAE Buffer 200 μ l加え、9,500rpm, 1 分間遠心する。

11. 滅菌精製水200 μ l加え、 70℃, 5 分間加温する。

12. 9,500 rpm, 1 分間遠心する。

得られたDNAテンプレート5～15 μ lを用いて試薬の説明書に従って反応させる。

(例)

滅菌精製水	x μ l
10×conc PCR Buffer	5 μ l
10mM Deoxynucleotide mix	1 μ l
プライマー 1 (0.1～1.0 μ M)*	5 μ l
プライマー 2 (0.1～1.0 μ M)**	5 μ l
Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0.25 μ l
DNA テンプレート	5～15 μ l
(合計 50 μ l)	

* プライマー1 : ATCCACTTTTAGTGCGAGAACCTTCGTCA

**プライマー2 : GAAAACTTTTCTTCGTACCACGGGACTAA

13. サーマルサイクラーの条件

① 95.0 °C, 2 分

② 95.0 °C, 20 秒

③ 55.0 °C, 30 秒

④ 72.0 °C, 1 分

⑤ 72.0 °C, 10 分

⑥ 4.0 °C, ∞

②③④を35 サイクル行う。

14. 電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、UV トランスイルミネーター上でカメラ撮影し、判定する。

(248 bp の位置のバンドが、ジフテリア毒素遺伝子)

なお、当室では生体からの検査材料ではなく、ホルマリン固定した材料から短いDNA断片によるPCRで毒素遺伝子を確認・検出した経験があるため、論文を紹介する。 Komiya T, et al., Retrospective diagnosis of diphtheria by detection of the *Corynebacterium diphtheriae* tox gene in a formaldehyde-fixed throat swab using PCR and sequencing analysis. J Clin Microbiol. 2000 Jun;38(6):2400-2.

4) 生化学性状試験

下記の市販品が便利である。

アピコリネキット 日本ビオメリュー（株）
Rap ID CB Plus キット（コリネ型細菌同定用） アムコ（株）

4. ジフテリアの診断基準

臨床的に上述したジフテリアの症状が確認され、且つ、分離された菌が *C. diphtheriae* と同定された場合、又は分離された菌から PCR でジフテリア毒素遺伝子が検出されるか、ウサギ皮内試験法、Elek 法又は培養細胞法でジフテリア毒素が確認された場合は、ジフテリア患者として届け出る必要がある。

5. 参考文献

- [1] 細菌学実習提要
医科学研究所学友会編 丸善 改訂5版
- [2] 微生物検査必携
財団法人日本公衆衛生協会(1966)
- [3] 戸田新細菌学
南山堂 第31版
- [4] Elek, S. D. Br. Med. J. 1: 493-496 (1948)
- [5] Reinhardt, D. J., Lee, A. and Popovic, T. J.
Clin. Microbiol. 36:207-210 (1998)
- [6] Pallen, M. J. J. Clin. Pathol. 44: 1025-1026
(1991)
- [7] Nakao, H. and Popovic, T. J. Clin. Microbiol.
35: 1651-1655 (1997)

6. ジフテリア検査依頼先または連絡先

各機関の後ろに[菌]とあるのは、ジフテリア菌の検査、分離・同定が可能な機関で、[抗体]とあるのは、ジフテリア抗毒素価が測定可能な機関である。なお、このリストは、2002年7月末現在のもので、今後、追加・変更が予想されるために、必要に応じて国立感染症研究所 細菌第二部に照会されたい。

国立感染症研究所 細菌第2部（旧 細菌・血液製剤部）[菌] [抗体]

〒208-0011

東京都武蔵村山市学園4-7-1

TEL 042-561-0771 FAX 042-565-3315

北海道立衛生研究所 [菌] [抗体]

〒060-0819

札幌市北区北19条西12丁目

TEL 011-747-2211 FAX 011-736-9476

秋田県衛生科学研究所 [菌] [抗体]

〒010-0874

秋田県千秋久保田町6番6号

TEL 0188-32-5005 FAX 0188-32-5938

茨城県衛生研究所 [菌] [抗体]

〒310-0852

水戸市笠原町993番2号

TEL 0292-41-6652 FAX 0292-43-9550

東京都健康安全研究センター [菌] [抗体]

〒169-0073

新宿区百人町3丁目24番1号

TEL 03-3363-3231 FAX 03-3368-4060

千葉県衛生研究所 [抗体]

〒260-8715

千葉市中央区仁戸名町666番地2号

TEL 043-266-6723 FAX 043-265-5544

富山県衛生研究所 [抗体]

〒939-0363

射水郡小杉町中太閤山17丁目1番

TEL 0766-56-5506 FAX 0766-56-7326

福井県衛生環境研究センター [菌]

〒910-8551

福井市原目町39番4号

TEL 0776-54-5630 FAX 0776-54-5630

三重県科学技術振興センター [菌]

〒512-1211

四日市市桜町3690-1

TEL 0593-29-3800 FAX 0593-29-3004

大阪府立公衆衛生研究所 [菌]

〒537-0025

大阪市東成区中道1丁目3番69号

TEL 06-6972-1321 FAX 06-6972-2393
兵庫県立衛生研究所 [菌] [抗体]

〒652-0032

神戸市兵庫区荒田町2丁目1番29号

TEL 078-511-6640 FAX 078-531-7080
岡山県環境保健センター [菌] [抗体]

〒701-0298

岡山市内尾739-1

TEL 086-298-2681 FAX 086-298-2088
愛媛県立衛生環境研究所 [菌] [抗体]

〒790-0003

松山市三番町8丁目234番地

TEL 0899-31-8757 FAX 0899-47-1262
福岡県保健環境研究所 [菌] [抗体]

〒818-0135

太宰府市大字向佐野字迎田39番地

TEL 092-921-9940 FAX 092-928-1203
大分県衛生環境研究センター [菌]

〒870-0948

大分市芳河原台2番51号

TEL 0975-69-0802 FAX 0975-69-5150
宮崎県衛生環境研究所 [菌] [抗体]

〒889-2155

宮崎市学園木花台西2丁目3番2号

TEL 0985-58-1410 FAX 0985-58-0930
沖縄県衛生環境研究所 [抗体]

〒901-1202

島尻郡大里村字大里2085番

TEL 098-945-0781 FAX 098-945-9366

7 執筆者一覧

八柳 潤 jyatsu@spica.freemail.ne.jp

秋田県衛生科学研究所 微生物部

〒010-0874 秋田市千秋久保田町6番6号

TEL:0188-32-5005 Fax:0188-32-5938

杉山 明 sugiya00@pref.mie.jp
三重県科学技術振興センター 保健環境研究部 微生物研究グループ
〒512-1211 四日市市桜町3690-1
TEL:0593-29-2923 Fax:0593-29-3004

宮田 義人 miyata@iph.pref.osaka.jp
大阪府立公衆衛生研究所 公衆衛生部
〒537-0025 大阪市東成区中道1丁目3番69号
TEL:06-6972-1321 Fax:06-6972-2393

帆足 喜久雄 kihoashi@eiken.oita-ri.go.jp
大分県衛生環境研究センター
〒870-0948 大分市芳河原台2番51号
TEL:0975-69-0802 Fax:0975-69-5150

高橋 元秀 motohide@nih.go.jp、小宮 貴子 komiya@nih.go.jp
岩城 正昭 miwaki@nih.go.jp、荒川 宜親 yarakawa@nih.go.jp、
国立感染症研究所 細菌第2部（旧 細菌・血液製剤部）細菌製剤第3室
〒208-0011東京都武蔵村山市学園4-7-1
TEL:042-561-0771(ext:544) Fax:042-561-7173 or 565-3315

腸チフス・パラチフス

病原体検査マニュアル

腸チフス・パラチフス

1 腸チフス・パラチフスの概説

1-1 作業上の一般的注意

2 検査材料

2-1 検査材料の採取

2-2 分離培養

3 分離培養

3-1 増菌培養法

3-1-1 使用培地

3-1-2 培養法

3-2 直接分離培養法

3-2-1 使用培地

3-2-2 培養法

4 分離・同定

4-1 集落の観察

4-2 同定

4-2-1 第1次検査

4-2-2 第2次検査

4-2-3 血清型別

5 病原体の輸送方法

6 参考文献

7 執筆者一覧

1. 腸チフス・パラチフスの概説

ここで述べる検査法は主に原発的にチフス症の原因となる数種のサルモネラ、とくに *Salmonella enterica* Typhi（チフス菌）、*Salmonella enterica* Paratyphi A（パラチフスA菌）に限定する。

チフス菌、パラチフスA菌は、ヒトを固有宿主とし原則として動物からは分離されない。これらの菌は、同定のための生化学的鑑別性状が一般のサルモネラから見てかなり異なるため、一般のサルモネラ食中毒の検出方法では見逃される恐れもある。また、チフス菌、パラチフスA菌は「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」における、2類感染症の原因菌であり、临床上重要な菌でもある。さらに、食品衛生調査会（平成11年8月23日開催）は、チフス菌・パラチフスA菌を食中毒事件票の病因物質の種別欄に追加し、食中毒事件としても扱うように提言している。従って、食中毒の際にはチフス菌・パラチフスA菌も考慮し、原因菌の分離を行わなくてはならない。

以下に述べる検査法は基本的には、すでに（財）日本公衆衛生協会出版の「微生物検査必携細菌・真菌検査」がありそれらも参照されたい。

1-1. 作業上の一般的注意

チフス菌、パラチフスA菌はバイオセーフティレベル3に属するため、P3実験施設内での取り扱いが必要である。しかし、患者又は疑わしい患者由来の検査材料を検査するときには、菌種が同定されるまではP2の施設を備えた細菌検査室で行うことができる。

2. 検査材料

2-1. 検査材料の採取

チフス症は、通常10-14日の潜伏期の後に発熱で発症する。第1病期には段階的に体温が上昇し39-40℃に達し、さらに典型的な症例では、三主徴である徐脈、バラ疹、脾腫が出現する。第2病期は極期であり、40℃代の稽留熱（最高38℃以上、日内差1℃以内）、下痢または便秘を呈する。なお、第1病期、第2病期の発熱は4-6日間持続する。第3病期には徐々に解熱する。弛張熱、腸出血をきたす。腸出血に引き続いて2-3%の患者に腸穿孔を起こす。第4病期には、解熱し、回復に向かう。

チフス症の細菌学的検査材料は、病期の第1病期は血液から高率に菌が検出される。第2,3病期では血液培養、便培養ともに菌の検出率はもっとも高い。第4病期では血液中に菌は証明されないが、便中には排菌がみられる。骨髓中にはほとんどの場合全経過を通して菌が証明される。また、菌は尿中にも排泄されるので大便と同様に菌の検出を行う。胆汁にもしばしば菌が証明できるので必要に応じて検査材料とする。回復期に入っても菌はなお数週間ないし数ヶ月にわたって便・尿から排出されることも

あり、時には永久保菌者となる。不顕性感染者を含めて保菌者の検査には便、尿及び胆汁等を検査材料とする。

1) 血液

一般的には患者血液は 2-3ml を正中静脈から無菌的に採取し、後述する液体培地に加えて増菌培養する。市販の血液培養セットが利用できれば、それに直接採血する。また、発病初期には、1 日 4 回までの範囲で頻回行った方が検出率が高い。

2) 胸骨髄液

胸骨穿刺によって採取する。

3) 大便

できるだけ新鮮なものを採取し、その場で培養に供するものがもっともよいが、それができないときは、適当な容器に拇指頭大以上の大きさを採取し 1-2 時間以内に検査に供する。固形便は約 1 g（母指頭大）、液状便の場合は 1ml 採取し、1-2 時間以内に培養検査を行う。大便の輸送を要するとき、または、短時間に検査できないときは、綿棒で採取して Cary-Blair 培地で保存する。

4) 尿

新鮮な中間尿もしくはカテーテルで採尿した尿を 40-50ml 採取し、3000- 4000 rpm、30 分以上遠心した尿沈渣を培養する。

5) 胆汁

早朝空腹時にゾンデで採取する。

6) その他のヒト由来の材料

死体臓器などは無菌的に一片を採取し、ホモジナイザーでよく磨碎して培地に接種する。腸内容は大便に準じて行う。また、チフス症の既往のあるものでは内臓の膿瘍などに菌が存在することがある。

3. 分離培養

チフス菌・パラチフス A 菌の分離方法には増菌培養法と直接培養法があり、患者からの菌検査には両者は原則として併用すべきものであるが、保菌者検索では直接培養法は省略しても差し支えない。

3-1. 増菌培養法

3-1-1. 使用培地

セレナイトーマンニット培地、セレナイトーシスチン培地、血液培養用ブイヨン。前者二つは選択培地で他菌の混入の著しい検査材料、たとえば大便などからの増菌に用いる。ふつうに用いられるブイヨンならどれでもよいが、血液培養用には特にチオグリコレート酸塩培地、コロンビア・ブイヨンが勧められる。もし市販の血液培養用培地が利用できればそれによるのがもっとも良い。セレナイトーシスチン培地、セレナイトーマンニット培地は他のサルモネラ増菌培地よりもチフス症サルモネラをよ

く増殖させるが、大便および尿の遠心沈渣以外の検査材料の増菌培地としては用いられない。

3-1-2. 培養法

1) 血液

市販の血液培養セットを用いるのがもっとも良い。血液にクエン酸ナトリウムが加えられていないときは培地にあらかじめ 0.1%を加えておく。市販の血液培養用ブイヨンにはポリアネトール硫酸ナトリウムあるいはアミロ硫酸ナトリウムが添加されている。これらの物質は抗血液凝固作用、補体不活化作用の他、ある種の抗生物質の作用も不活化するので菌の発育が良好である。

2) 胸骨髄液

少量を血液に準じて培養する。

3) 大便

固形便ならば約 1g（母指頭大）を、液状便ならば 1-2ml をセレナイト培地に入れて、よく混和して 12-18 時間培養する。その後、選択分離培地上に 1 白菌耳を塗布する。Cary-Blair 培地に保存された綿棒材料は生理食塩水又はブイヨン 1ml で良くしぼりだして、その全量を増菌培地に入れ同様に培養する。

4) 尿

遠心沈渣をセレナイト培地に加える。

5) その他の材料

臓器片は血液に準じ、又は腸内容物や膿汁は大便に準じて行う。便は固形便ならば約 1g（母指頭大）を、液状便ならば 1-2ml をセレナイト培地に入れて、よく混和して 12-18 時間培養した後、選択分離培地で培養する。

3-2. 直接分離培養法

3-2-1. 使用培地

亜硫酸ビスマス寒天、S S 寒天、DHL 寒天、血液寒天または普通寒天。各選択分離培地の優劣は一概にいけないがチフス菌に対しては亜硫酸ビスマス寒天培地がもっとも高い検出を示す。しかし、パラチフス A 菌および *S. Sendai* は、この培地では後述するようなサルモネラの特徴的な集落を作らないので大腸菌等として見逃される可能性が非常に大きいため、S S 寒天または DHL 寒天を併用するべきである。

3-2-2. 培養法

1). 血液

血液からの直接分離培養は通常行わない。

2). 大便

白金耳で直接又は約 1g（1ml）を滅菌生食あるいはブイヨン約 10ml に均等に浮遊

させ、その 1- 数白金耳を平板に塗抹する。Cary-Blair 培地で保存された綿材料は生理食塩水またはブイヨン 1ml 中でよくしぼりだし、その 1- 数白金耳を塗抹する。

3) 尿

遠心沈渣 1 白金耳を DHL 寒天に塗抹する。

4) その他の材料

細碎した臓器乳剤を 1- 数白金耳を塗抹培養、腸内容は大便に準じて分離培養を行う。

4. 分離・同定

チフス菌・パラチフス A 菌の分離及び同定は図 1 の手順で行う。

4-1. 集落の観察

各分離培地上ではチフス菌・パラチフス A 菌集落は大腸菌集落と次のようにして区別される。

1) 亜硫酸ビスマス寒天培地

チフス菌は黒色集落を作るが大腸菌および *Proteus* は無色ないし中心部暗色、緑色又は褐色の集落を作る。チフス菌の黒色集落は 2 4 時間後ますます黒色度を増し時には周辺集落の培地まで黒色化し金属光沢のある輪で囲まれる。ただし、多くのパラチフス A 菌、*S. Sendai* のような硫化水素非産生性のサルモネラ集落は大腸菌のそれと鑑別しにくい。本培地の培養時間は 48 時間である。

2) S S 寒天培地

大腸菌（乳糖分解菌）はレンガ色の混濁集落を、またチフス菌・パラチフス A 菌は無色透明の集落を作る。一般のサルモネラ集落は中心部暗色で（硫化水素産生）、それは時間の経過とともに黒色となる。*Citrobacter freundii* もまた黒色集落を作る。

3) DHL 寒天

乳糖および白糖分解菌はレンガ色の混濁集落を作りかつ *Citrobacter freundii* では集落が強く黒色となる。これらに対し、チフス菌の集落はやや小さく無色または中心部のみが黒色で半透明である。パラチフス A 菌は硫化水素非産生のため無色の集落を作る。

4) 分離培養上の注意事項

分離培地とくに選択分離培地はふ卵器内でよく表面を乾燥させて使用する。冷蔵庫に保存した培地を使用するときも、約 1 時間は 37℃で乾燥させる。ただし、選択培地では必要以上の乾燥は菌に対する発育阻止作用を強めることに留意しなくてはなら

ない。自家製の亜硫酸ビスマス寒天培地は抑制が強いため作製当日のものは使用してはならない。

4-2. 同定

分離培地上にチフス菌・パラチフスA菌を疑わせる集落が生じたら、できるだけ多く（5個以上）をとって生化学的同定を行い、チフス菌・パラチフスA菌であることを確認する。被検菌がチフス菌・パラチフスA菌であることの決定は生化学的性状により行う。

4-2-1. 第1次検査

チフス菌・パラチフスA菌の同定には、まず、第1次検査では生化学的性テストとためし凝集テストによって被検菌をスクリーニングする。

1) 生化学的テスト

第1次検査における生化学的テストはT S I 寒天、S I M培地、リシン脱炭酸テスト用培地、V P- MR ブイヨン等の鑑別培地を利用する。T S I 寒天培地、S I M培地およびリシン培地は37℃で18時間、またV P- MR ブイヨンは25-28℃で24時間培養し、成績を観察する（表1, 2）。

2) ためし凝集テスト

生化学性状テストで基本的性状がサルモネラに一致する菌は、混合O血清およびVi血清を用い、T S I 寒天斜面部の菌でためし凝集テストを行う。

3) 判定

生化学性状試験において、基本的な性状がチフス菌・パラチフスA菌のそれに一致し、かつ混合O血清またはVi血清によるためし凝集テストで陽性を示した菌は、チフス菌・パラチフスA菌を疑って直ちに二次検査および血清型別を行う。混合O血清およびVi血清によるためし凝集テストが陽性であっても基本的な生化学性状が一致しないもの（たとえばフェニルアラニンデアミナーゼ陽性、インドール陽性、V Pテスト陽性あるいはT S I 寒天斜面黄色の菌）は第1次テストで陰性としなしチフス症サルモネラとは見なさない。

4-2-2. 第2次検査

第1次検査の結果、チフス菌・パラチフスA菌が疑われた菌株は直ちに第2次検査として菌株の詳しい生化学的性状を調べるとともに、診断用血清を用いて血清型を決定する。チフス菌・パラチフスA菌は他のサルモネラと異なって、すべての細菌検査室で完全に、かつ速やかに同定されなければならない。従って、それらの血清型の決

定に必要な最小限の診断用血清は常に準備しておく必要がある。

1) 生化学テスト

第2次検査でテストすべき生化学的性状およびテストに必要な培地または試薬は次の通りである。

ONPG- ONPGディスク

クエン酸利用性- Simmon's クエン酸寒天

オルニチンデカルボキシラーゼ- オルニチン脱炭酸テスト用培地

アラビノース発酵性- 糖分解用基礎培地+1%アラビノース

キシロース発酵性- 糖分解用基礎培地+1%キシロース

d- 酒石酸発酵性- 変法K- P培地

マロン酸利用性- マロン酸塩培地

これらの培地の代わりに市販の同定キットを使用してもよいが、キットによってはこれらの鑑別テストが組み込まれてないものがあり、判定の結果、同定確率の低いものは追加テストを行わなければならない。表2を参考に鑑別する。

4-2-3. 血清型別

1) 診断用血清

チフス菌・パラチフスA菌の血清型別のためにO9群血清、O2群血清、H-d血清、H-a血清、Vi血清を準備する。これらの診断用血清は市販のものを利用すればよい。

2) O群別検査

T S I 寒天または普通寒天培地斜面の新鮮培養菌を生理食塩水 0.2 - 0.3 ml に濃厚に浮遊させたものを抗原とする。のせガラスをガラス鉛筆で数区画に区分し、その各区画に各血清をそれぞれ一滴ずつおく。次いで、抗原液を各血清滴の上方に一滴ずつおき、かくはん棒で血清と抗原を軽く混合する。のせガラスを約 30 秒間前後に傾斜させ、直ちに肉眼で成績を判定する。30 秒以内に強く凝集したものを陽性とする。新鮮なチフス菌分離菌は Vi 抗原を保有しているので O9 群血清には陰性で Vi 血清のみ凝集することが多い。Vi 血清にのみに凝集し他の O 血清に反応しない場合は、再び菌を生理食塩水に濃厚に浮遊させ、100℃、30 分間加熱後、もう一度前回同様にして凝集試験を行う。初めの Vi 血清による反応が Vi 抗原による特異凝集であれば、加熱菌は Vi 血清に凝集せず、O 9 群血清に強く凝集する。パラチフスA菌は O 2 群血清に凝集する。

3) H抗原の検査

T S I 培地または普通寒天培地の新鮮培養菌の 1 白金耳を、H抗原用ブイヨン（B H I またはトリプトソイブイヨン）約 4ml に接種し、ときどき振りながら 37℃で 6-

8 時間培養後、1.0%ホルマリン加生理食塩水を等量加えて抗原とする。抗原は 37℃のふ卵器に 1 時間おき完全に殺菌してから使用する。H 診断用血清 a, d の 0.05 ml ずつをそれぞれ小試験管にとりこれに抗原液 0.5ml ずつ加える。よく振ってから 50℃の恒温槽に 1 時間、または 37℃のふ卵器に 2 時間おき、どの H 血清に凝集しているかを見る。柔らかい凝集塊の明瞭なものを陽性とする。運動性の弱い菌は H 抗原に乏しく、上記の方法では H 凝集反応が現れないことがある。このような菌でチフス菌・パラチフス A 菌であることが疑われるときはクレギー管を通過させて運動性を強化した培養菌で再度 H 抗原を作製し、H 凝集反応を行う。

4) 血清型の決定

生化学的および血清学的検査の成績（O 抗原と H 抗原の結果）を総合し血清型を決定する。血清型の決定に当たっては最小限記述した範囲の生化学的性状も確認すべきである。チフス菌は O 9 群、H-d、パラチフス A 菌は O 2 群、H-a である。チフス菌の抗原構造は 9, 12 [Vi]: d: -, パラチフス A 菌の抗原構造は 1, 2, 12 : a: - である。

チフス菌の中には H 抗原 d をもたずに j または z₆₆ を持つものがある。近年、輸入事例として国内で分離されるチフス菌中に H 抗原が j または z₆₆ をもつものが分離されることがある。現在 j、z₆₆ 抗原の H 血清は国内では市販されていないので、このような菌は、H 抗原の決定ができない。チフス菌の性状を示し、運動性があるが H 抗原が決定できない場合は j または z₆₆ 抗原をもつ可能性がある。この場合は国立感染症研究所細菌部に相談し H 抗原の決定を依頼する。

5) ファージ型別

わが国では「腸チフス防疫対策実施要綱」（昭和 41 年 11 月、衛発 788 号、「腸チフス対策の推進について」）に基づいて感染経路等の疫学解析と患者の把握のために、日本国内で分離されたチフス菌、パラチフス A 菌は国立感染症研究所細菌第一部に送付することとされている。国立感染症研究所細菌第一部では、送付されたチフス菌・パラチフス A 菌のファージ型別を行い、疫学情報としてファージ型別の結果を整理し各地方衛生研究所、保健所に情報を提供している。

5. 病原体の輸送方法

病原体の輸送方法は、国立感染症研究所・病原体等安全管理規定では、郵政省告示等 760 号（平成 2 年 12 月 28 日号外）に基づき、その輸送方法を推奨している。

6. 参考文献

1. 坂崎利一、田村和満 : チフス性疾患—チフス・パラチフス菌、微生物検査必携 細菌真菌検査 第 2 版、日本公衆衛生協会、120-139、1978

2. 中村明子：チフス菌、パラチフス菌 微生物検査必携 細菌真菌検査 第3版、
日本公衆衛生協会、E2-E19、1987.

7. 執筆者一覧

青森県環境保健センター 大友良光

群馬県衛生環境研究所 赤見正行

静岡市衛生試験所 北條罔生 井出 忍

三重県科学技術振興センター保健環境研究部 岩出義人

奈良県立医科大学細菌学教室 喜多英二

奈良県衛生研究所 今井俊介

大阪府公衆衛生研究所 勢戸和子

長野県公害研究所・堺市衛生研究所・兵庫県立健康環境科学研究センター

国立感染症研究所細菌第一部 廣瀬健二 田村和満

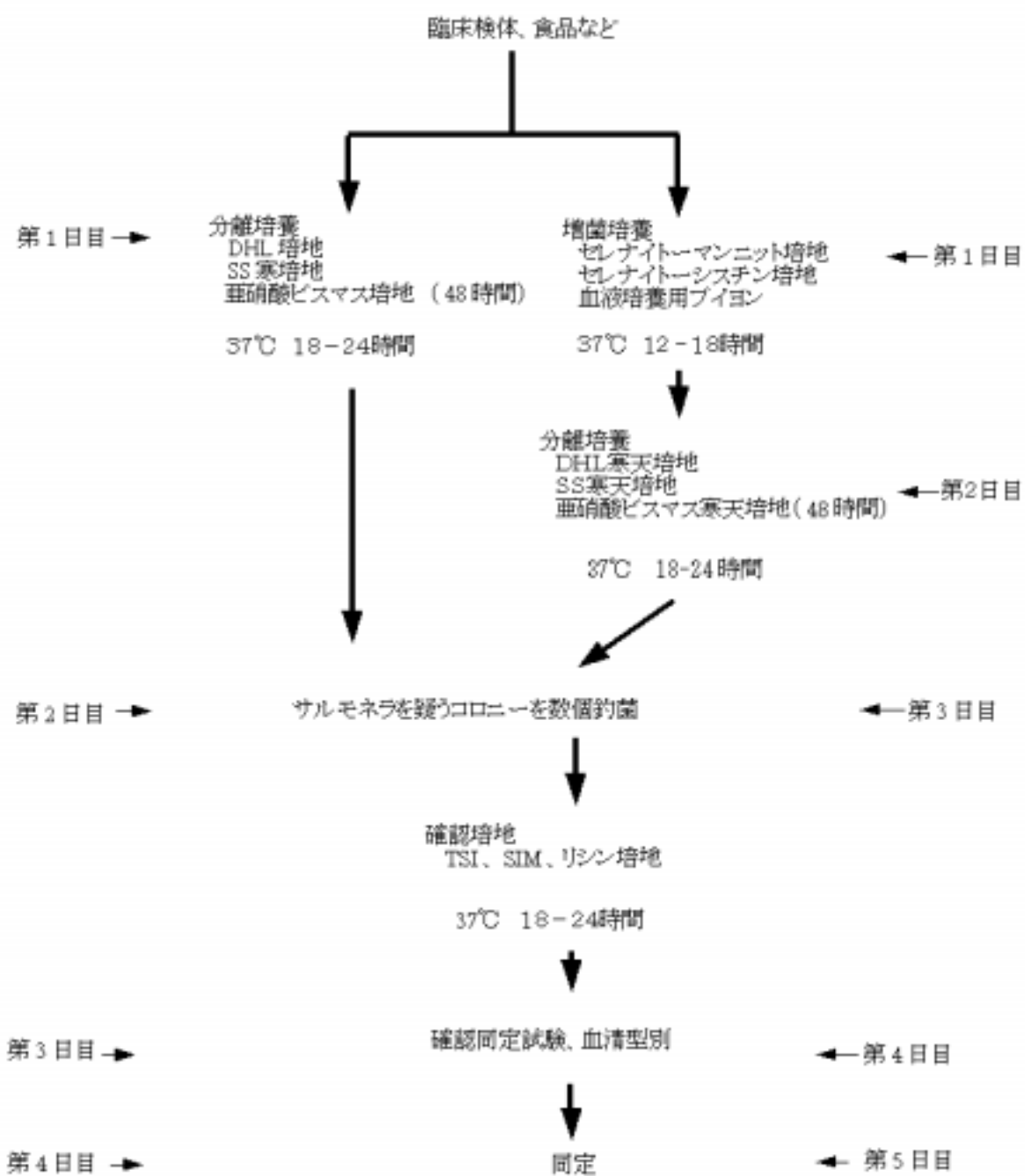


図1 チフス性サルモネラ同定の手順

表 1 *Salmonella* と類似菌の鑑別性状

	TSI					リシン培地	SIM	
	斜面	乳糖	白糖	ガス	硫化水素	リシン	インドール	運動性
<i>S. Typhi</i>	-	-	-	-	+w または -	+	-	+
<i>S. Paratyphi A</i>	-	-	-	+	- または (+w)	-	-	+
他のサルモネラ	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>Citrobacter</i>	A or -	d	d	+	+	-	-	+
<i>Edwardsiella</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Proteus</i>	-	-	d	+	+	-	-	+

A：酸産生、-：90%以上陰性、+：90%以上陽性、d：菌株により異なる

+w:弱い反応、（ ）：まれな反応

表2 S. Typhi、S. Paratyphi A およびその他の*Salmonella* の性状

性状		S. Typhi	S. Paratyphi A	S. Sendai	その他の <i>Salmonella</i>
第一次検査	硫化水素産生	+ ^w または -	- または(+ ^w)	-	+
	ブドウ糖からのガス産生 (TSI)	-	+ または (-)	+	+
	リシンデカルボキシラーゼ	+	- (+)	d	+
	運動性	+	+	+	+
	インドール	-	-	-	-
第二次検査	クエン酸塩(Simmons)	-	-	-	+
	ズルシット	-	+	-	d
	アラビノース	-	+	+	+
	キシロース	+	-	-	+
	マロン酸塩	-	-	-	d
	オルニチンデカルボキシラーゼ	-	+	+	+
	D-酒石酸塩	+	-	-	+
血清型別	ONPG (βガラクトシダーゼ)	-	-	-	d
	O群別 O2	-	+	-	
	O9	+	-	+	
	Vi	+	-	-	
	H型別 Ha	-	+	+	
	Hd	+	-	-	
抗原構造		9,12,[Vi]:d:-	1,2,12:a:-	1,9,12:a:1,5	

+^w:弱い反応、():まれな反応、d:多様な反応

腸管出血性大腸菌

目 次

I. 概説

II. 検査方法

1. 検体の採取と保存
2. 糞便からの検査法
3. 増菌培地
4. 分離培地
5. 分離菌の同定
 - 1) 0157 の同定
 - 2) 0157 以外の同定
6. 血清型別試験
 - 1) 菌体抗原 (O 抗原)
 - 2) 鞭毛抗原 (H 抗原)
7. VT (*stx*) 遺伝子の PCR による検出 法
 - 1) プライマー
 - 2) 反応条件
 - 3) 注意点
8. VT の免疫学的検出法
 - 1) ラテックス逆受け身凝集反応法 (RPLA)
 - 2) イムノクロマト法
9. EHEC 患者の血清学的診断法
抗原液の調製
10. 各種 0157 検出キット
 - 1) ラテックス凝集反応
 - 2) イムノアッセイ

III. 文献

IV. 検査依頼先

V. 執筆者一覧

I. 概説

1982 年米国において、それまで経験されていなかった異常な集団下痢症が 2 回にわたって発生し、その原因菌は大腸菌 (*Escherichia coli*) O157:H7 と同定された^{文献 1)}。その後、この大腸菌がベロ毒素 (Verotoxin, VT) を産生し、従来のどの部類にも属さない特殊な下痢原性大腸菌であることが確認された。このカテゴリーの大腸菌感染症は、しばしば激しい出血性下痢を主徴とする臨床症状を示すために出血性大腸炎 (hemorrhagic colitis, HC) と呼ばれ、その原因大腸菌は腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC) と命名された^{文献 2)}。一方、ベロ細胞に対する細胞毒を産生する大腸菌が存在することは、すでに Konowalchuk ら^{文献 3)}によって 1977 年に発見されていたために、腸管出血性大腸菌を VT 産生性大腸菌 (Vero-toxin producing *E. coli*, VTEC) と呼ぶ人も多く、また VT が *Shigella dysenteriae* 1 の産生する志賀毒素と同じ生物学的活性を持つ^{文献 4)}ことから志賀毒素様毒素 (Shiga-like toxin, SLT) とも呼ばれ、それに因んで菌名を志賀毒素様毒素産生性大腸菌 (Shiga-like toxin-producing *E. coli*, SLTEC) と記載する人もいる。こうした名称上の混乱を避けるため、現在ではそれらの毒素名を志賀毒素 (Shiga toxin, Stx)、この毒素を産生する大腸菌を志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga-toxin producing *E. coli*, STEC) とすることが推奨されている^{文献 5)}。一方、我が国の行政上では菌の名称として腸管出血性大腸菌 (EHEC) が、毒素の名称としては VT が一般的に用いられ、EHEC は「VT を産生する大腸菌」と定義されている。したがってその対象は O157 のみならず、その他の O 血清群に属する VT 産生性の大腸菌も含まれる。

本感染症は平成 11 年 4 月に施行された、「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」では 3 類感染症に分類されている。患者の一部は下痢、HC を経て、溶血性尿毒症症候群や腎機能障害、脳症などの重症合併症を併発する危険があることから、早期の高感度な確定診断が求められている。

Ⅱ. 検査方法

本稿ではヒトの感染事例からの EHEC の分離方法について述べる。食品等からの EHEC の検出については、厚生省生活衛生局が各都道府県にあてた衛食第 195 号、衛乳第 174 号（平成 8 年 7 月 18 日）「病原性大腸菌 O157 に係る食品等の汚染実態調査の実施について」および衛食第 207 号、衛乳第 199 号（平成 9 年 7 月 4 日）「腸管出血性大腸菌 O157 の検査法について」があるので、そちらを参照されたい。

1. 検体の採取と保存

検査材料は糞便または腸内容物で、便性をよく観察し、血便の場合は通常の培養操作と並行して迅速法を実施する方が良い。採取後直ちに検査できない場合は Cary-Blair 培地のような輸送培地に入れ、室温で輸送する。

2. 糞便からの検査法

EHEC O157 がソルビット非（または遅）分解性であることから、EHEC の分離には原則としてソルビットマッコンキー寒天培地（SMAC）を使用するが、その他の腸炎起因菌である可能性も完全に否定できない場合には Desoxycholate-Hydrogen Sulfide-Lactose（DHL）寒天培地等、他の腸内細菌が分離可能な選択分離培地の併用が望ましい。EHEC が疑われるコロニーについては、生化学的性状、血清型別、VT 遺伝子の検出および（または）VT 産生試験を実施して同定する（それらの同定には図 1 のように推定的判断および確定的判断に分かれるが、実際の事例での作業手順はその規模によって異なる）。

3. 増菌培地

EHEC を選択的に増菌する培地として modified *Escherichia coli*（mEC）培地にノボビオシン（NB; 最終濃度 20mg/l）を加えた N-mEC や、トリプトソイブロス（TSB）に 3 種の選択剤（セフェキシム CFIX; 最終濃度 0.05mg/l、亜テルル酸カリウム PT; 同 2.5mg/l、バンコマイシン VCM; 同 40mg/l）を加えた CTV-TSB がある。また、同様な増菌を目的とした市販品の培地には次のようなものがある。

試薬名	製造または販売元
mEC 培地	栄研, ニッスイ, Difco
N-mEC 培地	栄研, 極東, Merck
NB	Difco, Sigma, 他
CTV-TSB 増菌基礎培地	コージンバイオ, Difco, 他
CFIX, PT, VCM	コージンバイオ, アスカ純薬, ベリタス, 他

4. 分離培地

EHEC の選択分離培地は多くの市販品がある（表 1）。これらの選択分離培地は、従来から大腸菌の分離に使用していたマッコンキー寒天培地 (MAC) や DHL を改良したものと、合成基質培地の 2 つに分けられる。一般的には CFIX と PT（併せて CT と略記）をサプリメントとして加えた CT サプリメント加 SMAC (CT-SMAC) が使用されているが、どの選択分離培地を使用するかは現場の実験室の状況で決定すればよい。

なお、O157 以外の O 血清群に属する EHEC のうち、O26 はラムノースを O111 はソルボースを分解しない株が多いため、MAC や DHL にこれらの糖を 1 % となるように加えて分離培地に使用することが出来る^{文献 6, 7)}。

5. 分離菌の同定

1) O157 の同定

多くの EHEC O157:H7 は大腸菌としての一般性状を持つ他、ソルビトールおよび β -グルクロニダーゼが陰性であるのが特徴である（表 2）。それらの性状をもつ大腸菌はさらに VT の産生性もしくは VT 遺伝子の存在を確認し、血清型別を行って O157:H7 または O157:HNM を確認する。

2) O157 以外の同定

一般の性状をもつ大腸菌は VT の産生性または VT 遺伝子を確認し、陽性のものを EHEC とし、さらに血清型別を行う。

6. 血清型別試験

1) 菌体抗原 (O 抗原)

基本的な O 凝集反応は、トリプトソイ寒天培地 (TSA) に発育した菌を生理食塩水 (生食水) に懸濁して 121°C で 15 分加熱後、遠心沈渣を生食水に濃厚に再懸濁した加熱死菌液を作製し、病原大腸菌免疫血清「生研」1 号セット (デンカ生研) を用いてスライド凝集反応を実施する。

O 抗原の検査、特に O157 用のキットとしては、モノクローナル抗体等を用いたものが市販されている。それらのキットについては一括して II. 10 項に列記する。

2) 鞭毛抗原 (H 抗原)

クレイギー管を入れた Sulfide Indole Motility (SIM) 培地で 1~3 回継代して被検株の運動性を強めた後、TSB で 37°C で 6 時間から一夜培養し、等量の 1%ホルマリン加生食水を加えて抗原液とする。病原大腸菌免疫血清「生研」2 号セット (デンカ生研) 2 滴と抗原液約 0.5ml を静かに混合し、50°C の恒温水槽で 1 時間反応させた後判定する。

市販の診断用抗血清に凝集しない菌株は国立感染症研究所・細菌第一部に血清型別の依頼をすることができる。

7. VT (*stx*) 遺伝子の PCR による検出

1) プライマー

VT には免疫学的特性が異なる 2 つのタイプ、VT1 (Stx1) および VT2 (Stx2) が存在し、それぞれにおいて遺伝子 (*VT1* [*stx1*] および *VT2* [*stx2*]) の配列がわずかに異なるバリエーションが多数存在する。両遺伝子の相同性の高い DNA 領域に対してデザインされたプライマーセットがいくつか開発されており、これらについて表 3 にまとめた。

Lin ら^{文献 8)} のデザインしたプライマー (いわゆる、コモンプライマー) セットは *VT2* の複数のバリエーション (*VT2vha* [*stx2ha*], *VT2vhb* [*stx2hb*], *VT2c* [*stx2c*], *VT2d* [*stx2d*], *VT2vp1* [*stx2e*], *VT2vp2* [*stx2ev*], *stx2f*) に対しても有効であること

が報告されている（ただし、*VT1* と *VT2* を区別するためにはそれぞれに特異的な DNA プローブを用いたハイブリダイゼーション操作、または PCR 産物の塩基配列の決定が必要となる）。また、*VT1* と *VT2* を異なるサイズの PCR 産物として得られるようにデザインした 2 組のプライマーからなる小林ら^{文献 9)}、Cebula ら^{文献 10)} のセット（いずれも *VT2* のバリエーションのうち、少なくとも *VT2ha*, *VT2hb*, *VT2c*, *VT2e* が検出可能）も開発されている。また、*VT1* と *VT2* の両方、またはどちらか一方を特異的に増幅可能なプライマーセットがキットとして宝酒造から販売されている。

2) 反応条件

それぞれのプライマーセットにおける反応条件（表 3）の詳細等については各文献および取扱説明書を参照されたい。

PCR に用いる鋳型 DNA は、微量（ピペットマン用チップの先端でつつく）の被検菌を 100 μ l の滅菌水を入れたマイクロチューブに懸濁し、100℃で 5～7 分間加熱後、微量遠心機で 10krpm, 1 分間遠心した上清を数 μ l 用いる。

3) 注意点

継代培養後は *VT* 遺伝子が欠損することも報告されており、検出は出来るだけ早い段階で行うのが望ましい。また、上記の PCR プライマーはいずれも *VT* 遺伝子の一部を増幅するものであり、PCR によって陽性あるいは陰性いずれの結果が出た場合においても、以下、II. 8 項または II. 10 項に示す *VT* の産生性試験を行い、手法の異なる複数の検査結果から総合的に判断するのが望ましい。

8. VT の免疫学的検出法

1) 逆受け身ラテックス凝集反応法（RPLA）

大腸菌と同定された菌株について培養上清や菌体抽出液を試料にし、逆受け身ラテックス凝集反応（RPLA）を利用した VET-RPLA「生研」（デンカ生研）を用いて実施する。免疫学的に *VT* を検出する方法は、RPLA 以外にも ELISA 法や次に述べるイムノクロマト法があるが、ELISA 法は *VT1* と *VT2* の型別ができず、イムノクロマト法は型別できるが感度は RPLA の方が優れている。

2) イムノクロマト法

金コロイド粒子に VT1 あるいは VT2 のモノクローナル抗体（マウス）を感作したものをあらかじめ試料滴下域に乾燥固定しておき、滴下した試料中の VT と金コロイドに感作された VT 抗体との抗原抗体反応物がろ紙上を拡散して判定部に到達し、そこに固定してある抗 VT1 抗体あるいは抗 VT2 抗体に捕捉され、金コロイドの赤いラインがみられたものを陽性と判定するものである。現在 2 種類の市販テストストリップ（ラインジャッジ VT [タウンズ ベリタス]、ベロトキシンテストワコー [和光純薬]）がある。

RPLA と同様に大腸菌と同定された菌株について培養上清や菌体抽出液を試料として用いる。患者糞便を試料とする場合には反応阻害物質などの影響を受ける場合があるため、試料液の調製法について検討しなければならないが、排菌数および毒素産生量の多い急性期の患者糞便が得られる場合は、希釈した糞便液を用いることが可能な場合がある。

本法は VT を迅速、簡便に検出でき、測定装置など不要なことから、特に早期に抗菌剤投薬が必要とされる急性期患者の検査において症状と総合して判定するならば臨床的にも有用な検査法であると考えられる。

9. EHEC 患者の血清学的診断法

本菌感染の診断は糞便からの EHEC 検出が最も確実な方法であるが、初期症状が風邪あるいは単なる急性胃腸炎と類似しているため、抗生物質などの抗菌剤が投与され、すでに原因菌検出が困難となっている場合が多い。このような状況から、本菌に対する抗体を測定し、迅速に診断を行って的確な抗菌剤の投薬により重症化を防ぐことは有意義であると考えられる。しかしながら、本試験に供する患者血清は血中抗体価の上昇が十分に考えられる血清、つまり発症が認められてから 7 日以降の血清でなければ意義のある成績が得られることが少ない。

抗原液の調製

作製抗原は、これまでの EHEC 感染例で検出される血清型のうち最も頻度の高い 4 つの O 血清群、O157, O111, O26, O103 を優先的に用いる。それらの

任意の分離株から S 型菌を選択して培養後、生食水に集菌浮遊し、121℃で 15 分間加熱する。生食水で 3 回遠心洗浄後、再浮遊液を O 抗原液とする。

10. 各種 O157 検出用キット

O157 検出用キットは O 抗原および VT 検出を目的としたものが多数市販されているが、これらのキットは必ずしも十分な評価がなされているとは言えない。従ってここではそれらのキットの紹介にとどめる。

1) ラテックス凝集反応

O157 抗原検出用キットとして次のようなものがある。

ラテックス凝集反応法：

- ・大腸菌 O157 検出キット UNI (UniPath 関東化学)
- ・大腸菌 O-157:H7 テスト (REMEL 日水製薬)
- ・プロレックス「アスカ」大腸菌 O-157 (PRO-LAB アスカ純薬)
- ・Serobact O157 (Medvet グンゼ産業)
- ・E. coli O157-F, O26-F, O111-F「生研」(デンカ生研)

ELISA 法：

- ・ASSURANCE EHEC EIA (BioControl グンゼ産業)
- ・EHEC テック(E. coli O-157) (オルガノンテクニカ チッソまたはアズマックス)

2) イムノアッセイ

EHEC O157 の迅速診断や食品検査のため、糞便や食品の増菌液から直接 O157 あるいは VT を検出するキットとしてつぎのような製品が市販されている。

- ・NOW E. coli O157 (アスカ純薬)
- ・リヴェール O157:H7 (NEOGEN)
- ・VIP Assurance EIA E. coli O157 (BioControl グンゼ)
- ・EHEC TEK (Organon Teknika アズマックス)
- ・TECR E. coli O157 Visual Immunoassay (VIA セティ)
- ・シングルパス E. coli O157:H7 (Merck)
- ・トランジアカード E. coli O157 (Merck)

- E. coli O157 Direct (和光純薬)
- EZ Coli Rapid Detection System (Difco 和光純薬)
- Path -Stik E. coli O157 (セルシス グンゼ)
- ベロトキシンテスト ワコー (和光純薬)
- ラインジャッジ VT (タウンズ)
- RIDA RD Screen Verotoxin (RBP アズマックス)

Ⅲ. 文献

- 1) Riley ら : *N. Engl. J. Med.*, **308**: 681-685, 1983.
- 2) Levine ら : *Epidemiol. Rev.*, **6**: 31-51, 1984.
- 3) Konowalchuk ら : *Infect. Immun.*, **18**: 775-779, 1977.
- 4) O'Brien ら : *Lancet* **i**: 702, 1983.
- 5) Calderwood ら : *ASM News* **62**: 118-119, 1996.
- 6) 平松ら : 感染症誌、**73**: 407-413, 1999.
- 7) 田中ら : 日本臨床微生物学雑誌、**9**:48-50, 1999.
- 8) Lin ら : *Microbiol. Immunol.*, **37**: 543 -548, 1993.
- 9) 小林ら : 日本細菌学雑誌, **45**: 649-652, 1990.
- 10) Cebula ら : *J. Clin. Microbilol.*, **33**: 248-250, 1995.

その他参考となる文献

- 小林一寛 : 下痢患者におけるベロ毒素産生性大腸菌の血清学的診断法について、感染症誌、**70** : 80-86、1996
- 小林一寛 : EHEC 感染症の診断法として血中抗体価の測定とその意義、日本臨床、**55** : 165－169、1997
- 坂崎利一編 : 食水系感染症と細菌性食中毒 (中央法規出版)、266-282、2000.

IV. 検査依頼先

各都道府県の地方衛生研究所を対象とする。

V. 執筆者一覧

大阪府立公衆衛生研究所	微生物課	勢戸和子
		田口真澄
		小林一寛
国立感染症研究所	細菌第一部	伊豫田淳
		田村和満
		泉谷秀昌
		寺嶋 淳
		渡辺治雄

図1 糞便からのEHEC分離の手順

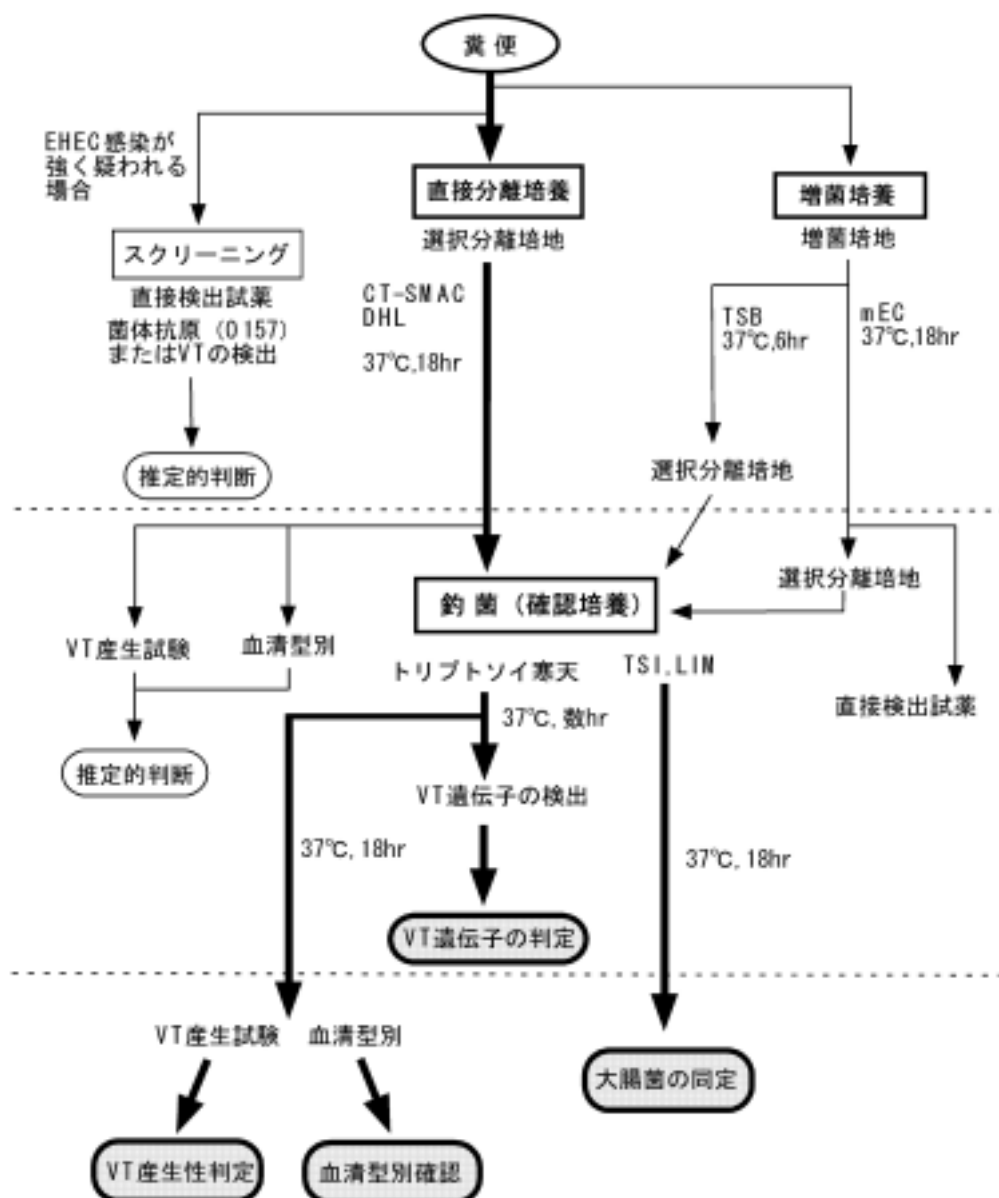


表 1 EHEC 選択分離培地の種類と特徴

培地名	メーカー	鑑別性状
従来品を改良した培地		
ソルビット・マッコンキー寒天培地 (SMAC)	ニッスイ, 栄研, BBL, Difco, MAST, MERCK, Oxoid	ソルビット分解
SIB 寒天培地 (SIB)	極東製薬	ソルビット分解, IPA
DHS 寒天培地「ダイゴ」(DHS)	日本製薬	ソルビット分解, H ₂ S 産生
バクト マッコンキー寒天基礎培地	Difco	添加した糖の分解
DHL 寒天基礎培地「ダイゴ」	日本製薬	添加した糖の分解, H ₂ S 産生
合成基質培地		
フルオロカルト E. coli O157:H7 寒天培地	MERCK	ソルビット分解, β-Glu
フルオロカルト HC 寒天培地	MERCK	ソルビット分解, β-Glu
クロモアガーO157	CHROMagar	β-Gal, β-Glu
レインボーアガー	Biolog	β-Gal, β-Glu
COLI ID 寒天培地	バイオメリュー	β-Gal, β-Glu
BCM O157 寒天培地	栄研, Biosynth	不明

β-Glu : β-グルクロニダーゼ

β-Gal : β-ガラクトシダーゼ

表 2 EHEC と他の大腸菌の鑑別

菌 種	オキシ ターゼ	TSI 寒天				LIM 培地			VP	シモンズの クエン酸塩	ソルビ トール	セロビ オース	MUG
		斜 面	高 層	ガ ス	硫化 水素	リジン	インド ール	運動性					
EHEC													
O157:H7	—	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—*	—	—*
腸管侵入性大腸菌	—	(—)	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—
他の下痢原性 大腸菌および 一般の大腸菌	—	+	+	+	—	+	+	+	—	—	(+)	—	+

(注) 血清型が O157 以外の志賀毒素産生性大腸菌は、一般の大腸菌の性状である。

* 陽性株も一部報告されている。

(+) : 多くは陽性

(—) : 多くは陰性

TSI : Triple Sugar Iron

LIM : Lysine Indole Motility

VP : Voges-Proskauer テスト

MUG : 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide 分解性 (β -グルクロニダーゼ活性) テスト

表 3 VT 検出用 PCR プライマー

プライマー セット	配列 5'-3'	標的 遺伝子	増幅 サイズ(bp)	販売元 または文献
EVT-1&2	未公表	<i>VT1</i>	349	宝酒造
EVS-1&2	未公表	<i>VT2</i>	404	宝酒造
EVC-1&2	未公表	<i>VT1, VT2</i>	171	宝酒造
up/down	up: gaacgaaataatttatatgt down: aaattaccaatgtcagta	<i>VT1, VT2</i>	900	Lin ら ^{文献 8)}
V1/V5	V1: agttaatgtggtggcgaa V5: gactcttccatctgccg	<i>VT1</i>	811	小林ら ^{文献 9)}
V3/V4	V3: ttcggtatcctattcccg V4: tctctgggtcattgtatta	<i>VT2</i>	471	小林ら ^{文献 9)}
LP30/LP31	LP30: cagttaatgtggtggcggaagg LP31: caccagacaatgtaaccgctg	<i>VT1</i>	348	Cebula ら ^{文献 10)}
LP43/LP44	LP43: atcctattccccggaggttacg LP44: gcgtcatcgtatacacaggagc	<i>VT2</i>	584	Cebula ら ^{文献 10)}

反応条件

- EVT-1&2, EVS-1&2, EVC-1&2 (94C, 1min→55C, 1min→72C, 1min)×35cycles
- up/down (94C, 1min→43C, 1.5min→72C, 1.5min)×40cycles
- V1/V5/V3/V4 (94C, 30sec→55C, 30sec→72C, 30sec)×25cycles
- LP30/LP31/LP43/LP44 94C, 5min → (94C, 1.5min→64C, 1.5min→72C, 1.5min)×25cycles → 72C, 5min

ア メ ー バ 赤 痢

目 次

- I. アメーバ赤痢の概説
- II. アメーバ赤痢検査に関する一般的注意事項
- III. 検査材料の採取・輸送及び保管
 - 1. 便
 - 2. 膿瘍液
 - 3. 病変組織・臓器
 - 4. 血清
 - 5. 検査材料の輸送上の注意
- IV. 検査の進め方
 - 1. 検査準備
 - 2. 検査結果の報告
- V. 形態学的（顕微鏡的）診断
 - 1. 直接塗抹法
 - 2. ホルマリンエーテル法
 - 3. 染色法
 - A. ヨード染色法
 - B. コーン染色変法
 - C. その他の染色法
- VI. 病原学的検査
 - 1. 病原体の検出
 - 2. ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR)
 - A. DNA の抽出
 - B. PCR
 - a. 29-kD システインリッチタンパク質遺伝子の PCR
 - b. リボゾーム小サブユニット rRNA 遺伝子の PCR
 - 3. 抗原捕捉法 (antigen capture ELISA)
 - A. E.histolytica II
 - B. Triage Micro Parasite Panel
- VII. 血清学的検査
 - 1. ゲル内沈降反応 (gel diffusion precipitin test)

2. Dot ELISA 法 (enzyme-linked immunosorbent assay)
3. 赤血球凝集試験 (hemagglutination assay)
4. 間接蛍光抗体法 (indirect immunofluorescence assay)
5. プレート ELISA 法

VIII. アメーバ赤痢の診断基準

IX. 感染症法の中でのアメーバ赤痢の取り扱い

X. 赤痢アメーバの検査が可能な機関

XI. 引用文献

I. アメーバ赤痢の概説

アメーバ赤痢は寄生性の原生動物である赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)の感染により引き起こされる。主に熱帯の開発途上国を中心に年間 5000 万人の感染者が存在し、年間の死亡数は約 10 万人と推定される(World Health Organization, 1995)。我が国では浸淫地からの輸入感染例だけでなく、主として男性同性愛者間(例えば(Takeuchi *et al.*, 1989))及び障害者収容施設(例えば(Kaneda *et al.*, 1988))において国内感染例が多く見られる(総説は(Nozaki, 2000)を参照のこと)。赤痢アメーバは通常栄養型(trophozoite)として大腸に寄生する。感染者の 5-10%においてこれら栄養型が大腸上皮細胞を傷害し、赤痢様症状・腸穿孔を起こしたり、門脈を経て転移し、肝臓・肺・脳・皮膚など大腸以外の組織・臓器に膿瘍を形成し、重篤な症状を呈する。また、大腸内で、嚢子(シスト)化し、糞便中に排出され、これを別のヒトが経口摂取することにより、感染が成立する。ヒトの腸管に感染するその他のアメーバには大腸アメーバ、小型アメーバ、ヨードアメーバ、*Entamoeba dispar*などがあるが、このうち *Entamoeba dispar* は形態学的にも系統発生的にも赤痢アメーバと非常に近く、形態学的鑑別は不可能である。治療は通常メトロニダゾールの経口投与により行われるが、シストキャリアに対してはジロキサニドフロエイトが使用されるが、治療効果は低いとされる。前述の *E. dispar* はヒトに病原性を示さないため変異原性をもつメトロニダゾールを投与すべきではなく、下記に詳述する鑑別診断が重要である。

II. アメーバ赤痢の検査に関する一般的注意事項

赤痢アメーバの取り扱いには P2 実験施設で BSL2 の取り扱い基準に従う。したがってアメーバ赤痢患者又は疑わしい患者由来の検査材料並びに赤痢アメーバに汚染した可能性のある検査材料を取り扱う際にはレベル 2 の施設を備えた検査室で行う。なお、アメーバ赤痢の感染集団の一部は男性同性愛者であり HIV、肝炎ウイルス、梅毒の感染が通常の検査集団より高頻度に見られることに特に留意すべきである。

III. 検査材料の採取・輸送及び保管

1. 便

粘血便を伴うような症例の多くでは栄養型が見られる。ただし、赤血球を取

り込み活発に運動する栄養型を検出するためには、糞便が排出された後 1-2 時間以内に鏡検する必要がある。更に以下に述べるようになるべく 37℃ に近い状態で（37℃ を越えてはならない）輸送する必要がある。一度でも凍結・融解した糞便中には栄養型は確認できない。糞便中のシストは 4℃ でも数日間安定して保存できる。更に、シストは下記のホルマリンエーテル法にて 1 年以上の長期保存に耐える。糞便中の原虫の抗原並びに核酸の検出のためには採取された糞便を即時凍結し必要時まで -20℃ 或いは -80℃ の冷凍庫に保存するのが望ましい。この方法では赤痢アメーバ抗原並びに核酸の検出は少なくとも数ヶ月は可能である。

2. 膿瘍液

まず、アメーバ性肝膿瘍は腸アメーバ症を伴わないことが多く、超音波や CT 検査による膿瘍の部位並びに形態で示唆されることが多いことを留意すべきである。肝或いは肺膿瘍内容を超音波ガイド下での穿刺又はドレナージによって採取する。栄養型の証明は上記 1. 便の場合と同様の注意が必要である。光学顕微鏡による原虫の検出率は半分程度であり効率の良い診断法とは言えない。

3. 病変組織・臓器

大腸内視鏡下の生検により得られた組織片は固定せず、生理食塩水に浸したガーゼの上に置き、-20℃ で冷凍保存する (Sanuki *et al.*, 1995)。外科手術の適応例、死亡例に関しては病変部を病理学的検査に供し、原虫を証明する。

4. 血清

血清診断に用いるサンプルは分離後 4℃ 或いは凍結する。

5. 検査材料の輸送上の注意

検査材料の輸送に際しては、万国郵便条約の通常郵便に関する施行規則（平成 12 年 12 月 22 日号外郵政省告示 823 号）第 413 条に規定する容器及び包装を用いた方法によらなければならない。

IV. 検査の進め方

1. 検査準備

検査順序の概略は図 1 のとおりである。大きく分けて 3 つの検査法がある。形態学的（顕微鏡的）検査、病原学的検査、血清学的検査である。前 2 者は糞

便並びに膿瘍液、感染組織検体を対象とし、原虫自体の存在を証明する方法である。一方、後者は感染者の血清を対象とし、感染者の赤痢アメーバ感染に対する免疫応答の結果を間接的に検出するものである。

2. 検査結果の報告

検査結果については「アメーバ赤痢の診断基準（16 頁）」の事項等に基づいて速やかに関係者等に報告する。

V. 形態学的（顕微鏡的）診断

糞便及び膿瘍液などの生鮮材料は迅速に鏡検しなくてはならない。通常粘血便及び膿瘍液は直接塗抹法により観察する。一方、固形便はシストを含むことが多く遠心沈殿法で集卵・集嚢子した後観察する。遠心沈殿法は他の原虫のシスト及び蠕虫の虫卵も集卵されるため汎用性が高い。組織学的染色が行える検査室では下記の染色法を併用しても良い。以下、小林らの論文（小林正規，1994）を改変し、転載する。

1. 直接塗抹法

生理食塩水（0.85% NaCl 水溶液）1 滴をスライドガラス上におき、少量の便を楊枝でとってよく混ぜ、カバーガラスをかけて鏡検する。膿瘍液はそのまま観察する。通常赤血球を貪食し、偽足を伸ばして活発に運動する栄養型が見られる。

2. 遠心沈殿法（変法）^{注1}

- ① 糞便検体を少量（ ≤ 1 g）スピッツ管に取る。
- ② ホルマリン水を 1 ml 加えて竹串で糞便塊を充分ほぐす。
- ③ 全量が 5 ml となるようにホルマリン水を加え、ボルテックスミキサーで充分攪拌する。
- ④ 攪拌後、室温に 20 分間以上放置して固定する。
- ⑤ 再度、よく攪拌してからロートに 4 枚重ねのガーゼを敷き、試料液をろ過する。
- ⑥ ホルマリン水でガーゼ上のろ過残渣を軽く洗浄し、全量で 8 ml のろ液をスピッツ管に回収する。
- ⑦ ろ液に 2 ml の酢酸エチルを加え、密栓をして短時間激しく振盪・混和する。
- ⑧ 速やかに $1,050 \times g$ （通常の卓上遠心機で $2,500 \sim 3,000$ rpm 程度

に相当)、5分間遠心する。

- ⑨ 液層は上から酢酸エチル層、浮遊糞便層、希釈液層、沈渣の4液層に分離する。
- ⑩ 予め浮遊糞便層を竹串等で管壁から離し、上部の3液層を捨て、沈渣を回収する。さらに、スピッツ管内壁の付着物を綿棒で拭き取る。
- ⑪ 得られた沈渣を直接顕微鏡観察(400倍以上の倍率)、又は密度勾配遠心法等の試料に供する。

注1: 本変法では、1) バイオハザードの観点から、生理食塩水での洗浄工程を省略している。また、2) エチルエーテルに替えて、引火性の低い酢酸エチルを用いている。

3. 染色法

A. ヨード染色法

赤痢アメーバのもつグリコーゲンを確認するためにヨード染色法を用いても良い。

・染色液(ヨード・ヨードカリ液)

ヨウ素 1g

ヨウ化カリウム 2g

蒸留水 50ml

ヨウ化カリウムを完全に溶解させた後、ヨウ素を加えて溶かす。蒸留水を100ml とする方法もあるが、染まり具合を見て薄めるほうがよい。暗褐色瓶に密栓して冷暗所に保存し、これを保存液とし使用時に少量滴瓶に移して使用する。ヨウ素は上記の方法によっても完全には溶けず少量の結晶が沈殿する。このヨウ素の結晶が認められる間は使用可能である。しかし少なくとも2-3 ヶ月で作りかえるのがよい。

方法: 生理食塩水を混和した糞便、或いは直接糞便に上記のヨード・ヨードカリ液を1滴加え楊枝又はカバーガラスの角でよくかき混ぜた後、カバーガラスをかけて鏡検する。赤痢アメーバ栄養型と白血球とは粘血便などでは双方見誤りやすいので注意を要する。

B. コーン染色変法

糞便中のアメーバ類の嚢子及び栄養型の固定法は湿潤固定とするのが原則となっている。このため固定が速やかで糞便材料を塗抹したガラス面へ吸着させ

る力の強い Schaudinn 液が従来用いられていた。しかし、昇汞(塩化第二水銀)の廃液処理の問題から、現在はアルコールを主成分とする固定液を用い固定と染色を同時に行うコーン染色法が推奨されるようになってきている。糞便が適度に軟便で原虫数が多数存在する場合はコーン染色液の固定力で問題となることはないが、下痢便では染色中に原虫嚢子や栄養型が塗抹されたガラス面からかなりの数が剥がれ落ちることに留意しなければならない。染色液は以下の通り。

- ・基本液

- 90% エタノール 170ml

- 100% メタノール 160ml

- 酢酸 20ml

- 液状石炭酸 20ml

- 1% リンタングステン酸 12ml

- 蒸留水 618ml (合計 1,000ml)

- ・クロラゾール・ブラック E 溶液

- クロラゾール・ブラック E 粉末 5g

- 基本液 1,000ml

クロラゾール・ブラック E 粉末は乳鉢で磨砕した後、少量の基本液を加えペースト状になるまで磨砕する。更に基本液を加え磨砕し、数分間静置して不溶粉末が沈澱した後に得られた溶液部分を回収する。更に、不溶粉末に基本液を加え磨砕し、静置、溶液部分を回収するという操作を繰り返し、完全にクロラゾール・ブラック E 粉末を溶解させる。4-6 週間室温で色素溶液を熟成させる。

方法

①糞便材料を直接塗抹してもよいが、ここではカバーガラスに塗抹する方法を記す。楊枝でカバーガラスに糞便材料を薄く引き伸ばす(下痢便の場合は糞便が垂れない程度にまで便液を濾紙で吸い取る)。

②固定、染色。カバーガラスの塗抹面を下に向けシャーレに入れた染色液面と平行になるように親指と人差し指で保ち、液面に近づけ静かに指を離し染色液面に浮かせる。糞便材料をカバーガラスによく固定、吸着させるため 2 分程度表面張力により浮かせた後、ピンセットで塗抹面を上向きに修正し染色液中に沈める。そのまま浮かせて染色してもよい。

③染色時間。2-4 時間が染色時間の目安となるが、嚢子と栄養型では染色時

間が異なる。栄養型では過染する傾向があるので、基本液で染色液を希釈したり、或いは染色時間を短縮することで調節する。

④脱色・脱水・透徹。カバーガラスの角を濾紙に接触させ、余分な染色液を吸い取った後、95% エタノールの入ったシャーレに塗抹面を上にして沈める。10-15 秒浸し脱色することで通常分別が完了する。100% エタノールに移し脱水を行う。この時点で鏡検し染色具合を観察する。この操作でも分別ができないものは染色液の濃度或いは染色時間を調節する。分別が良好であれば、100% エタノールの入ったシャーレに 5 分ずつ 2 回通過させ脱水した後、キシレンに 5 分ずつ 2 回、同様に通し封入剤で封入する。

C. その他の染色法

詳細は示さないが 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 又は propidium iodide (PI) での簡便な染色法もある (Kawamoto *et al.*, 1987)。観察には蛍光顕微鏡が必要である。

VI. 病原学的検査

1. 病原体の検出

検便による検査は場合によって 1 回の検査に留めず、連続 3 日間程度の集中検査で検出精度を高めることが推奨される。更に、膿瘍液及び糞便中の栄養型の培養により原虫数を高め、その後上記の形態学的検査、アイソエンザイム解析及び下記のいずれかの方法で赤痢アメーバの存在を確認することも可能であるが、培養、アイソエンザイム解析は一般の検査室では通常不可能である。赤痢アメーバの分離同定及び培養 (Kobayashi and Takeuchi, 1983) を専門としている研究機関 (慶應義塾大学医学部熱帯医学寄生虫学教室、電話 03-3353-1211) に相談されたい。培養は通常 Robinson 培地で行うが、詳細については省略する。

2. ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR)

患者から採取した糞便、膿瘍液又は組織から DNA を分離・抽出し、この DNA を鋳型として、赤痢アメーバ特異的プライマーを用いて PCR を行う。感度は上記の形態学的同定法よりもずっと高く、下記の抗原捕捉法と同等或いはやや良好な感度を得られる。

A. DNA の抽出

a. 最も簡便で再現性の高い方法は市販されている DNA 抽出キットを用いる方法である。キアゲン社 (電話 03-5547-0811 ; techservice@jp.qiagen.com,

www.qiagen.com) の QIAamp DNA stool mini kit (カタログ番号 51504) は良い成績を生む。また、以下の方法でも抽出は可能である。

b. キットを用いない糞便からの DNA 抽出法 (Sanuki *et al.*, 1997)

- ①ホルマリンエーテル法で 1g 見当のサンプルを処理し、900xg で 3 分遠沈回収する。
- ②ペレットに 1ml のリン酸緩衝液(PBS)を入れ、遠沈で 4 回沈渣を洗う。
- ③凍結融解を 3 回繰り返した後、1%Triton X-100 を 200 μ l 加え、90°C で 10 分インキュベートする。
- ④これに 10mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA, 0.5% NaSarcosynate, 0.5mg proteinase K を 200 μ l を加え、60°C で 2 時間インキュベートする。
- ⑤等量のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール(25:24:1)混合液を入れ、攪拌後、遠沈し、上清を 5 μ g グリコーゲンとともにエタノール沈殿する。上清を除いた後適当量の TE でペレットを溶解する。

B. PCR

現在市販されている Taq ポリメラーゼは原則としてどれも使用可能であると思われる。酵素に付属する標準的な緩衝液、標準的 Mg^{2+} イオン (1-2.5mM) 及び dNTP 濃度 (0.1-0.5mM) で推奨される条件で増幅を行えば問題ない。ただし、陽性コントロール (培養された原虫から得られた DNA) 及び陰性コントロール (ヒト或いは大腸菌の DNA など) を必ず併せて使用しなくてはならない。クロスコンタミネーションによる偽陽性を避けるためにすべての試薬を小分けにして保存する、エアロゾルフリーのピペットチップを用いるなどの注意は通常の PCR と同様であることは言うまでもない。様々な種類の赤痢アメーバ特異的プライマーが存在する。29-kD システインリッチタンパク質 (ペルオキシレドキシン) 或いはリボゾーム小サブユニット rRNA 遺伝子を標的とした方法が一般的である。

a. 29-kD システインリッチタンパク質遺伝子の PCR (Tachibana *et al.*, 1991)

使用するプライマーは以下のとおりである。P11/P12 は赤痢アメーバの DNA を特異的に増幅し、P13/P14 は近縁種 *E. dispar* の DNA (いずれも約 100bp) を特異的に増幅する。

P11, 5' GGAGGAGTAGGAAAGTTGAC 3'

P12, 5' TTCTTGCAATTCCTGCTTCGA 3'

P13, 5' AGGAGGAGTAGGAAAATTAGG 3'

P14, 5' TTCTTGAAACTCCTGTTTCTAC 3'

PCR は通常 0.1 µg の精製 DNA を用い、以下の条件で行う。

- (1) denaturation 94°C 30 sec
- (2) annealing 45°C 30 sec
- (3) elongation 72°C 1 min
- (4) 35 cycles

b. リボゾーム小サブユニット rRNA 遺伝子の PCR (Haque *et al.*, 1998)

E1, E2 を一回目の PCR に E3, E4 を 2 回目の PCR に使用して nested PCR を行う。使用するプライマーは以下のとおりである。E1/E2 は赤痢アメーバ、*E. dispar* 両者の DNA を増幅し、2 回目の PCR で EH1/EH2 が赤痢アメーバ DNA を、ED1/ED2 が *E. dispar* の DNA を特異的に増幅する。いずれも約 0.9kbp の断片が得られる。更に *Dra*I と *Sau*96I とで消化すると赤痢アメーバでは 0.5 と 0.35kbp の断片が、*E. dispar* では 0.55、0.2、0.15kbp の断片が確認される。

E1, 5' TTTGTATTAGTACAAA 3'

E2, 5' GTA(A/G)TATTGATATACT 3'

EH1, 5' AATGGCCAATTCATTCAATG 3' (赤痢アメーバ用 E3)

EH2, 5' TTTAGAAACAATGCTTCTCT 3' (赤痢アメーバ用 E4)

ED1, 5' AGTGGCCAATTTATGTAAGT 3' (*E. dispar* 用 E3)

ED2, 5' TTTAGAAACAATGTTTCTTC 3' (*E. dispar* 用 E4)

PCR は通常 0.1 µg の精製 DNA を用い、以下の条件で行う。

- (1) denaturation 94°C 30 sec
- (2) annealing 43°C (first cycle) 62°C (second cycle) 30 sec
- (3) elongation 72°C 1 min
- (4) 35 cycles

以上の方法で糞便 (Haque *et al.*, 1998; Sanuki *et al.*, 1997)、肝膿瘍液 (Tachibana *et al.*, 1992)、生検試料 (Sanuki *et al.*, 1995) からの赤痢アメーバ DNA の検出が可能である。

3. 抗原捕捉法 (antigen capture ELISA)

糞便並びに膿瘍中の赤痢アメーバ抗原を検出するサンドイッチ ELISA 法があり、既にいくつかのキットが販売されている

A. *E. histolytica* II (TECHLAB, Blacksburg, Virginia, USA, 国内代理店 関東化学、03-3279-1751、info@gms.kanto.co.jp)

E. histolytica II のキットはサンドイッチ ELISA (酵素抗体法) の原理に基づ

き、マイクロタイタープレートに固着させた赤痢アメーバ・*E. dispar* の細胞表面レクチン(adhesin 又はガラクトース・N アセチルガラクトサミン阻害レクチン)抗原の共通エпитープに反応する特異的ポリクローナル抗体と、検体中に存在するアメーバの adhesin をまず結合させる。次に赤痢アメーバ adhesin 特異的モノクローナル抗体にペルオキシダーゼ標識したものを反応させ、マイクロプレートリーダーにより吸光度を測定する。結果判定までには約 2.5 時間必要である。

B. Triage Micro Parasite Panel (Biosite Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA.; 国際試薬, 神戸)

Triage Micro Parasite Panel キットは *E. histolytica* II キットと同様に、サンドイッチ ELISA の原理に基づいている。A のキットとの相違点は特異抗体を ELISA 用のマイクロタイタープレートのウェルに固着させるかわりに、ニトロセルロース膜を用いていること。膜に固定されている抗体とアルカリフォスファターゼ(酵素)標識した抗体が同一であること。判定が肉眼に依るため定性的であること。赤痢アメーバと *E. dispar* の共通抗原を認識するため両者の鑑別が不可能であることである。このキットの大きな利点は 1 検体につき 1 つのパネルを使用するため無駄がないことである。また、15-20 分と短時間で結果がでる。更に、膜の特定の位置に抗体を固着させることが可能なため、赤痢アメーバ以外に下痢症の病原体として重要なランブル鞭毛虫やクリプトスポリジウムの特異抗体も同一パネルの膜上に固着させることができ、これらの原虫の抗原を同時に検出でき汎用性が広いなど、利点が多い。更に、同一パネルに抗原と抗体をあらかじめ結合させ、固着した陽性コントロール、及び抗体を作製した同種動物の非免疫血清の陰性コントロールが設けてあり、これらとの反応を同じ反応条件下でチェックすることで使用したキットの信頼性も同時に 1 検体ごとに確認することができる。一方、欠点としては赤痢アメーバと *E. dispar* の区別ができないこと、アメーバのシストとは反応しないことなどがあげられる。

VII. 血清学的検査

血清抗体の検出は、現在或いは過去のある時点での赤痢アメーバによる組織侵入に対するヒトの免疫応答を検出することを目的とする。したがって、すべての血清反応に共通した特徴であるが、しばしば感染の時期を特定化できない。したがって、陽性反応が現在の感染によるものか過去の感染によるものかの厳

密な鑑別は不可能である。また、下記の赤血球凝集試験にみられるように、慢性期のアメーバ赤痢では比較的血清抗体価が高く、検出率が高いのに対して、急性期のアメーバ赤痢においてはいくらかの偽陰性がみられる。したがって、上記の病原学的診断、特に PCR 及び抗原検出法による積極診断を併用することが強く推奨される。なお、血清反応を行う際には陽性コントロール(陽性血清)並びに陰性コントロールの入手が不可欠である。入手先は下記 X を参照されたい。

1. ゲル内沈降反応(gel diffusion precipitin test)

赤痢アメーバ虫体、粗抽出液、或いはその凍結乾燥したものが入手できれば、最も安価で簡便な方法である。アガロースゲルの中で特異的抗原抗体反応をさせ、沈降線を検出する。アガロースゲルは数ヶ月の保存に耐える。沈降線を形成後にゲルを染色し乾燥させた状態で結果を長期保存できる。一般的な方法を示す(荒木国興, 1991)。試料の量等によって様々な変法が可能である。

・Ouchterlony 法

pH8.6 のベロナール(バルビタール)緩衝液に 1% アガロースを加えて水浴上で加熱溶解させてから 7.6×2.6 cm 大のスライドグラス上に 3ml 相当量の寒天板を作る。スクリーニングの段階では、直径 6 mm の血清孔と直径 2 mm の抗原孔を 3 mm 間隔であけ、それぞれに患者の血清と 6 mg/ml タンパク質量の赤痢アメーバ粗抽出抗原を 5μl 入れる。寒天板を湿潤状態の箱に入れ、室温で 12-24 時間、4-6℃ で 24-48 時間静置した後に判定する。また、生理食塩水で 3 日間洗浄した後、濾紙で包んで乾燥しアミドブラック 10B で染色、2%酢酸で脱色、自然乾燥すると沈降線が青く染まり判定が容易になる(荒木国興, 1991)。赤痢アメーバの粗抽出液を更に、フェノール抽出により分けられたタンパク質分画並びに除タンパク質した多糖・核酸分画を用いて Ouchterlony 法を行うことも可能であるが、一般で用いられるのに必要な標準化が行われていない(奥沢英一, 1992)。

2. Dot ELISA 法(enzyme-linked immunosorbent assay)

原理は酵素抗体法(ELISA)に準ずるが、抗原をニトロセルロース膜に固着させる点がマイクロプレートのウェル内で反応させる ELISA と異なる。この方法の利点は、ニトロセルロース膜に固着させた抗原が長期(冷蔵保存; 4-10℃ で約 2 年)にわたり安定して保存できること、また判定は呈色の有無を肉眼的に判定するため、簡便で定性的な抗体のスクリーニングに適していること、などである。

現在、国内では Dot ELISA のキット製品を扱っている業者はみられないが、その最適な反応条件についての詳細はすでに検討・報告されており（天野優子, 1998）、赤痢アメーバの抗原についても、下記（X. 赤痢アメーバの検査が可能な機関）から分与が可能であることから、抗原を入手し自前でアメーバ赤痢診断のための Dot ELISA のシステムを作ることは可能である。以下に一般的な方法を示す（天野優子, 1998 より改変、荒木国興、小林正規、論文未発表）。

方法

i. Dot-ELISA 法ニトロセルロース膜への吸着

寄生虫に感染していない人の 500 倍希釈血清 0.5 μ l 及び赤痢アメーバ粗抗原 1 μ g 量(2mg/ml に調製した抗原液 0.5 μ l) をニトロセルロース膜に吸着させてから 37°C で 30 分間乾燥させる。

ii. 膜のブロッキング

ELISA 法で使用している血清希釈液(BSA/T、下記の「プレート ELISA 法」の項を参照)に 30 分浸してから室温で乾燥しないように蓋付きの容器に入れ使用時まで冷蔵庫内で保管する。1 週間以上の長期保存には乾燥しないようにプラスチックラップに包むか、チャック付きのプラスチック袋に入れて冷凍する。凍結した場合、最低 2-3 年間は使用可能。

iii. 一次反応(患者血清との反応)

パラフィルムを紙と一緒に 40mm \times 25mm 程の大きさに切り、四辺を 5mm 程折り畳んでから紙を取り除き、四隅をつまむようにして箱船のような形にする。このパラフィルムを湿潤箱に入れ、パラフィルムの上に血清希釈液で湿らせてから水切りしたニトロセルロース膜を置く。膜の上に 200 倍に希釈した患者血清を 70 μ l のせた後、湿潤箱の蓋をして 37°C で 40 分間反応させる。

iv. 洗浄

パラフィルムの一部をピンセットでつかみ、スポイト或いは洗浄ビンを用いて洗浄液の入っている容器内で 3 回洗浄する。

v. 二次反応(POD 標識抗ヒト IgG との反応)

水切りをした膜上に血清希釈液で 750 倍に希釈した POD 標識抗ヒト IgG 抗体 (CAPPEL, CodeNo. 55221) を 70 μ l 載せ iii. と同様に 37°C で 40 分間反応させる。

vi. 洗浄

iv. と同様に洗浄する。

vii. 発色

水切り後ニトロセルロース膜を 4-クロロ-1-ナフトール液に 7 分間浸す。枚数が多いときはニトロセルロース膜を容器の底に並べ、発色液を加える方が簡単である。適当な発色がえられたら、発色液を捨て、素早く蒸留水を加え軽く揺すってから反応を停止する。再度蒸留水を加え、4-5 分放置してから取り出し室温で乾燥させて保存する。ある程度の期間は冷蔵庫内で保管できるが、多少脱色するので写真結果を記録しておく方がよい。

・発色液

4-クロロ-1-ナフトール 30mg

エタノール 12ml

リン酸緩衝液 (pH7.4) 63ml

30% 過酸化水素 37.5 μ l

注意 4-クロロ-1-ナフトールをエタノールで完全に溶かしてからリン酸緩衝液を加える。

3. 赤血球凝集試験 (hemagglutination assay)

数年前まで協和薬品工業より赤痢アメーバ HA というキットが発売されていたが、平成 13 年 11 月現在は発売されていない。特異性は優れているものの、急性期の腸並びに肝赤痢アメーバ症において偽陰性が多く (20% (Okuzawa *et al.*, 1993))、緊急の確定診断が不可欠な急性赤痢アメーバ症においてゲル内沈降反応に劣るのが致命的欠陥と考えられる。しかしながら、陽性と判定されれば誤りの可能性は低い。

4. 間接蛍光抗体法 (indirect immunofluorescence assay)

固定した虫体を抗原として患者血清中の IgG と反応させた後、蛍光ラベルした 2 次抗体で反応させ蛍光を観察する方法である。

・アメーバスポット IF (日本ビオメリュー・バイテック)

現在唯一国内で診断用として認可され使用されているキットである。原理は間接蛍光抗体法 (IFA) に基づいている。方法は無蛍光スライドガラスの 10 カ所のサークル内に無菌培養した赤痢アメーバ栄養型を固定・吸着させたものを抗原 (主として膜抗原) とし、これらと段階的に希釈した赤痢アメーバに感染した患者血清を個々のサークル内でまず反応させる。次に蛍光色素で標識した抗免疫グロブリン血清 (2 次抗体) と反応させ、蛍光顕微鏡下で赤痢アメーバ細胞に反応した抗体の蛍光を観察する。これによって、抗赤痢アメーバ抗体を定量的に

検出する。

5. プレート ELISA 法

96 穴プレートに固相化した粗抽出抗原、或いは精製した抗原に対する患者血清中の抗体の反応性を見る検査である。商業レベルの検査キットは存在せず、試薬の調製、検査手技ともに煩雑である。念のため方法を示す。

方法

i. 抗原の吸着

赤痢アメーバ粗抽出抗原液を 2-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように炭酸緩衝液で希釈し、ポリスチレンプレートに 100 μl ずつ入れ、湿潤箱に移して 37°C で 2 時間吸着させる。プレートを洗浄液で 3 回洗浄し、ペーパータオルで水切りした後、蓋をかぶせてからビニール袋に入れ、使用時までフリーザーに保管する。

ii. 一次反応

血清希釈液 (PBS/T) で 1:200 に希釈した血清を 100 μl 加え、湿潤箱に移して 37°C で 40 分間反応させる。反応終了後、洗浄液で 3 回洗浄後、ペーパータオルで水切りする。

iii. 二次反応

POD 標識抗ヒト IgG ウサギ血清 (CAPPEL, CodeNo. 55221) 希釈液で 1:8,000-1:10,000 に希釈し、100 μl ずつ入れ 37°C で 35 分間反応させる。終了後、洗浄液で 3 回洗浄し、ペーパータオルで水切りする。標識抗体は製造者血清の動物種(ウサギ、ヤギ)により反応の強さが異なるので予備実験が必要である。

iv. 基質液を 100 μl ずつ入れ、室温で発色状態を観察する。7 分後に 1.25% フッ化ナトリウムを加えて反応を停止する。波長 414nm で吸光度(OD)を測定する。

ELISA 用試薬

・炭酸緩衝液 (抗原希釈液)

1M 炭酸水素ナトリウム液 43.3ml (4.2g/50ml)

1M 炭酸ナトリウム液 6.7ml (5.3g/50ml)

アジ化ナトリウム 0.2g

蒸留水 950ml

・洗浄液 (PBS/T)

塩化ナトリウム 68g

0.15M リン酸二ナトリウム液 1500ml (21.3g/1000ml)

0.15M リン酸一カリウム液 500ml (10.2g/500ml)

Tween20 5ml

蒸留水 8500ml

- ・血清希釈液 (BSA/T)

BSA (SIGMA, FractionV) 1g

PBS/T 100ml

- ・基質

0.1M リン酸二ナトリウム液 25ml

0.1M クエン酸液 25ml

ABTS 15mg

30% 過酸化水素 5 μ l

VIII. アメーバ赤痢感染の診断基準

言うまでもなく病原体自身或いは病原体由来の DNA、抗原の証明が最も推奨される診断基準となる。赤血球を貪食した栄養型の証明がアメーバ赤痢診断の”Gold standard”と一般に言われるが、便中の白血球、便中の植物・孢子などの誤認も多く見られるため、顕微鏡による証明は一般に考えられているほど確実とは言えない。発展途上国における糞便検査、培養並びにアイソエンザイム解析、PCR、抗原検出の検査成績の比較でも (Haque *et al.*, 1998; Haque *et al.*, 1997)、顕微鏡的にアメーバ赤痢と診断された (すなわち「赤血球を貪食した栄養型が確認された」と報告された) 検体の僅か 40%が、培養などの病原学的診断により真の赤痢アメーバによる感染と確認されるにとどまっていることから、形態学的同定の難しさが理解されよう。アイソエンザイム解析、PCR、抗原検出の検査成績はお互いに良く相関し、特に後の 2 者は 93%もの相関を示す。したがって、一般検査室レベルではどちらを用いても良いと考えられる。価格は再検討の余地があるものの、検査技術の簡便さ、迅速さにおいては抗原検出が優れている。平成 13 年 11 月現在少なくとも抗原検出キット (E. histolytica II) は国内に在庫もあり、一般検査室レベルで最も使いやすいと考えられる。しかしながら、現在は名目上、研究目的のみに使用が制限されていることを指摘しておく必要がある。

一方、病原体自身或いは DNA、抗原の証明が不可能な場合、血清反応により現在の感染を推定することも可能である。この場合、臨床学的診断法（粘血便など理学的所見、画像診断、内視鏡などの所見を含む）と併せて総合的に診断する必要がある、往々にして、メトロニダゾール投与による症状の改善により間接的にアメーバ赤痢と診断される場合もある。血清反応は一般に平易であり、アメーバスポット IF はキットで購入可能である。また、ゲル内沈降反応、Dot ELISA はキットとして購入することができないが、一般検査室でも作製及び長期保存が可能である。しかしながら、前述のとおり、血清反応の陽性反応は現在或いは過去の感染を示すものであるので、除外診断には有効であるが（例えば慢性の腸炎の原因からアメーバ赤痢を除外するなど）、病原学的診断法を併用して積極的な診断を目指す必要がある。

IX. 感染症法の中でのアメーバ赤痢の取り扱い

アメーバ赤痢は第 5 類の感染症に定められており、全数把握のため診断した医師は 7 日以内に保健所に届け出る必要がある。報告のための基準を以下に示す。

診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ以下のいずれかの方法によって病原体診断や血清診断がなされたもの。

1. 病原体の検出

例：

糞便からの赤痢アメーバ栄養体の検出

病原部位（肝膿瘍吸引液、組織切片など）からの本原虫の検出

2. 病原体の遺伝子或いは抗原の検出

例：

赤痢アメーバ特異的 PCR 法による本原虫の核酸の検出

赤痢アメーバ抗原検出法による本原虫虫体成分の検出

3. 病原体に対する抗体の検出

例：

患者血清からの赤痢アメーバに対する特異抗体の検出

X. 赤痢アメーバの検査が可能な機関

1. 慶應義塾大学医学部熱帯医学寄生虫学教室、電話 03-3353-1211
2. 東海大学医学部感染症学部門、電話 0463-93-1121
3. 東京慈恵会医科大学、熱帯医学教室、電話 03-3431-1111
4. 国立感染症研究所、寄生動物部、電話 03-5285-1111

XI. 引用文献

- Haque, R., Ali, I.K., Akther, S. and Petri, W.A., Jr. (1998) Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, 449-452.
- Haque, R., Faruque, A.S., Hahn, P., Lyerly, D.M. and Petri, W.A., Jr. (1997) *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. *Journal of Infectious Diseases*, **175**, 734-736.
- Kaneda, Y., Nagakura, K., Tachibana, H., Tanaka, T. and Sasao, M. (1988) *Entamoeba histolytica* infection in a rehabilitation center for mentally retarded persons in Japan [letter]. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **20**, 687.
- Kawamoto, F., Mizuno, S., Fujioka, H., Kumada, N., Sigiya, E., Takeuchi, T., Kobayashi, S., Iseki, M., Yamada, M., Matsumoto, Y., Tegoshi, T. and Yoshida, Y. (1987) Simple and rapid staining for detection of *Entamoeba* cysts and other protozoans with fluorochromes. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, **40**, 35-46.
- Kobayashi, S. and Takeuchi, T. (1983) Establishment of an axenic strain of *Entamoeba histolytica* from cysts in stool, bypassing bacteria-associated cultivation. *Japanese Journal of Parasitology*, **32**, 475-480.
- Nozaki, T. (2000) Current problems of amebiasis in Japan and recent advances in amebiasis research. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **53**, 229-237.
- Okuzawa, E., Kobayashi, S. and Takeuchi, T. (1993) Evaluation of a commercial kit of indirect haemagglutination test for sero-diagnosis

- of amebiasis. *Japanese Journal of Parasitology*, **42**, 227-233.
- Sanuki, J., Asai, T., Okuzawa, E., Kobayashi, S. and Takeuchi, T. (1997) Identification of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* cysts in stool by polymerase chain reaction. *Parasitology Research*, **83**, 96-98.
- Sanuki, J., Asai, T., Okuzawa, E., Takeuchi, T., Ohnishi, K. and Murata, M. (1995) Detection of *Entamoeba histolytica* DNA from colon-biopsied specimen by PCR. *Clinical Parasitology*, **6**, 114-115.
- Tachibana, H., Kobayashi, S., Okuzawa, E. and Masuda, G. (1992) Detection of pathogenic *Entamoeba histolytica* DNA in liver abscess fluid by polymerase chain reaction. *International Journal for Parasitology*, **22**, 1193-1196.
- Tachibana, H., Kobayashi, S., Takekoshi, M. and Ihara, S. (1991) Distinguishing pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* by polymerase chain reaction letter. *Journal of Infectious Diseases*, **164**, 825-826.
- Takeuchi, T., Okuzawa, E., Nozaki, T., Kobayashi, S., Mizokami, M., Minoshima, N., Yamamoto, M. and Isomura, S. (1989) High seropositivity of Japanese homosexual men for amebic infection letter. *Journal of Infectious Diseases*, **159**, 808.
- World Health Organization. (1995) *The World Health Report 1995: Bridging the Gaps*. Vol.16, pp.377-385, World Health Organization, Geneva.
- 天野優子、渡辺純一、荒木国興 (1998) 寄生虫疾患診断法としての dot-ELISA 法と ELISA 法の比較 肺吸虫症 134 例、マンスン孤虫 35 例についての検討 病態生理、31、48-54
- 奥沢英一、竹内勤 (1992) アメーバ症の血清診断 臨床検査 36、480-485
- 小林正規、関口恒存、竹内勤 (1994) 知っておきたい基本的な原虫検査法 メディアサークル 39、9-19
- 荒木国興 (1991) 寄生虫症の血清学的診断法の発達 in 寄生虫疾患の診断法の開発と症例検討 医薬ジャーナル 140-157

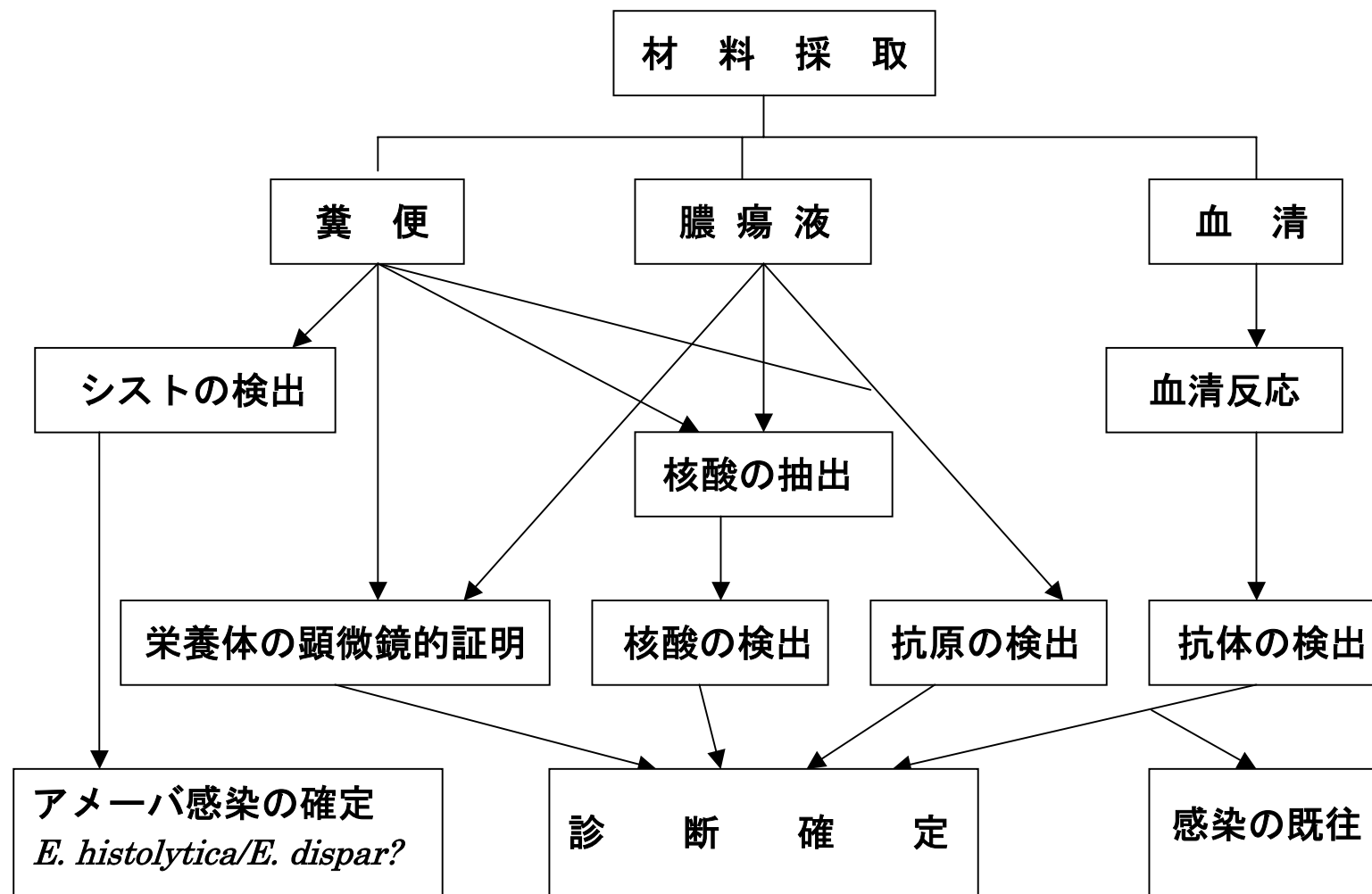


図1 アメーバ症の検査の順序

執 筆 者 一 覧

野崎 智義 : 国立感染症研究所 寄生動物部*
大友 良光 : 青森県環境保健センター 微生物部
赤見 正行 : 群馬県衛生環境研究所 ウィルス課
竹部 久勝 : 奈良県保健環境研究センター ウィルス・細菌担当
栃木県保健環境センター
堺市衛生研究所

*〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1
TEL:03-5285-1111 FAX:03-5285-1173

エキノコックス症

エキノコックス症

目 次

I、エキノコックス症の概説

- 1、エキノコックス症の概念
- 2、エキノコックス症の病態
- 3、エキノコックス症の診断

II、検査の進め方

- 1、エキノコックス症の検査材料
- 2、エキノコックス症の免疫血清学的検査
 - 1, 抗原の調整
 - 2, 酵素抗体法 (ELISA)
 - 3, ウエスタンブロット法 (WB)
- 3、病理組織検査

III、参考文献

IV、検査の問い合わせと依頼先

V、執筆者一覧

I、エキノкокクス症の概説

1、エキノкокクス症の概念

Echinococcus 属条虫の幼虫（包虫）に起因する疾病で、人体各臓器、特に、肝臓、肺臓、腎臓、脳などで包虫が発育し諸症状を引き起す。ヒトは、成虫に感染しているキツネ、イヌなどの糞便内の虫卵を経口摂取することで感染する。エキノкокクス症には、その原因寄生虫種により単包虫症と多包虫症がある。本邦では、多包虫については北海道に於いてその生活環の存在が確認されているが、単包虫については成虫（単包条虫）が終宿主から見出されておらず、国内の特定地域での生活環の存在は確認されていない。

2、エキノкокクス症の病態

単包虫或は、多包虫を原因とするエキノкокクス症は、ともに感染後の潜伏期（約10年以内）がありその期間は無症状で経過することが多い。単包虫症では、孤立性の嚢胞が緩慢に増大することで肝腫大や腹痛を認め周囲の諸臓器を圧迫し、胆道閉塞や胆管炎を併発したり、ときに破裂してアナフィラキシーショックを誘発する。多包虫症では、無数の微細な小嚢胞を形成して周囲組織内に増生し、更には転移病巣を作る。進行すると肝腫大、腹痛、黄疸、肝機能障害などが現れ、閉塞性黄疸、病巣の中心壊死、病巣への細菌感染をきたして重篤となる。末期には腹水や下肢の浮腫が出現する。肝肺癰をきたすと胆汁の喀出、咳嗽が認められ、脳転移をきたすと意識障害、けいれん発作などを呈する。

3、エキノкокクス症の診断

エキノкокクス症の診断は一般に、病巣の画像所見、免疫血清学的検査及び病理組織学的検査により行なわれる。潜伏期でも血清検査でしばしば陽性、腹部超音波検査、CT 検査等で肝の病巣を認めることができる。進行期では血清検査の陽性率も高くなり超音波検査による所見も顕著となる。

また、被検者の流行地での居住歴、キツネ、イヌなどとの接触の有無などは診断の重要な参考となる。

Ⅱ、検査の進め方

1、エキノкокクス症の検査材料

検査の為の生検は、病巣の腹腔内や穿刺創への播種、生着を来すので原則として行なわれない。したがって、検査室診断に関わる材料は特異抗体検出の為の血清であり、病原体そのものを検査する局面は、治療を目的とした病巣の外科的摘出後の病理組織標本についての場合が多い。

2、エキノкокクス症の免疫血清学的検査

抗原は、実験動物（スナネズミ、コットンラット）で継代している多包虫嚢胞から原頭節を分離し、緩衝液で抽出した粗抗原が本邦では一般的に用いられている。多包条虫の汚染地域である北海道においては、粗抗原による酵素抗体法（ELISA）が一次スクリーニングとして用いられ、陽性及び疑陽性の場合はウエスタンブロット法（WB）で確認試験が行なわれている。概略は以下のとおりである。

1、抗原の調整

一般的注意

Echinococcus 属条虫の幼虫（包虫）に感染させた実験動物への感染維持と、感染動物から嚢包及び原頭節を分離する作業はバイオセーフティレベル 2（BSL 2）で実施される必要がある。

調整法

- 1、感染後 2～6 ヶ月のスナネズミ若しくはコットンラットの腹腔から嚢胞を取り出し、中に原頭節が形成されている事を確認した後ハサミで嚢胞を細切する。
- 2、生理食塩水を加え、乳棒と金網（100 メッシュ）ですりつぶしながら原頭節を通過させる。
- 3、生理食塩水を加え沈殿が、原頭節のみになるまでデカンテーションを繰り返す。
- 4、原頭節を滅菌リン酸緩衝食塩液（PBS）で洗浄する。
- 5、分離した原頭節を PBS に入れ、ホモジェナイザーで十分に磨碎する。
- 6、遠心沈殿後上清を分離し蛋白含有量を測定後、使用時まで凍結保存する。

2, 酵素抗体法 (ELISA) (文献 1, 2, 3 参照)

1) 一般的注意

検査は一般実験室 (P 1 レベル) で可能である。

2) 試薬

炭酸緩衝液 (0.05M, pH9.6)

リン酸緩衝食塩液 (PBS)

ブロッキング試薬加 PBS

0.05%Twen20-PBS

酵素標識抗ヒト免疫グロブリン抗体

基質溶液

3) 機材

96 穴平底プラスチックマイクロプレート

マルチチャンネルピペット

ディスペンサー

マイクロプレート自動洗浄装置

マイクロプレート用吸光度計

4) 手法の概略 (一般のマイクロ ELISA の手順に準ずる)

- 1, 抗原原液を 96 穴平底プラスチックマイクロプレートに固相化する。
- 2, 洗浄とブロッキング操作
- 3, 希釈した被検血清と抗原を反応させる。
- 4, 洗浄後、酵素標識抗ヒト免疫グロブリン抗体に反応させる。
- 5, 洗浄後基質液を入れ発色させる。
- 6, マイクロプレート用吸光度計で測定。

注意：エキノコックス症の場合、肝臓などに病変が見出される事によってその感染が疑われるが、免疫血清学的検査を行う際に他の寄生蠕虫症との交叉反応（例えば肝蛭症）を考慮する事が必要な場合がある。この場合はたとえ上記の ELISA で陽性であっても、肝蛭その他の寄生虫抗原を含む DOT-ELISA やゲル内沈降反応により多種類の寄生虫抗原についてスクリーニングする事が必要となる。

3, ウェスタンブロット法 (WB) (文献 1, 2, 4 参照)

1) 一般的注意

検査は一般実験室 (P 1 レベル) で可能である。

2) 試薬

アクリルアミド
ビスアクリルアミド
グリシン
SDS
トリス
酵素標識抗ヒト免疫グロブリン抗体
基質溶液

3) 機材

電源装置
ミニスラブ電気泳動槽
ブロッテイング装置
ブロッテイングフィルター

4) 手法 の概略（一般のウエスタンブロット法の手順に準ずる）

- 1, 抗原の SDS ポリアクリルアミド電気泳動
- 2, ブロッテイングメンブランへの電気泳動による転写
- 3, 転写した膜上での被検血清中の抗体との反応
- 4, ブロッテイングメンブランに結合した抗体の検出

市販キット：本症診断用のウエスタンブロット法キットが市販されている。国内では未承認であるが、フランス LDBIO DIAGNOSTICS 社の ” ECHINOCOCCUS WESTERNBLOT IgG ” がそれである。本キットはマニュアル通りに実施することで多包虫感染か単包虫感染かの区別が可能であるとしている（文献 5 参照）。

3、病理組織検査

検査のための摘出組織は、直ちに固定した後、ヘマトキシリン・エオジン重染色標本と PAS 反応標本とを作製し、組織学的検査をおこなう。包虫嚢胞は、外層の厚い無細胞の角皮層と、内層の薄い増殖部分である胚層より構成されている。角皮層はエオジン好性で PAS 陽性であり、その外側には肉芽組織、壊死組織、線維組織などがみられる。

Ⅲ、参考文献

- 1) Uchino J. & Sato N., 1993. Alveolar Echinococcosis of the Liver. Hokkaido University Medical Library Series. Vol.30, Sapporo: Kokoku Printing Co.
- 2) 北海道立衛生研究所編集・発行、1999, 北海道のエキノコックス
- 3) Woller A., Bidwell D.E. & Bartlett A., 1976. Enzyme immunoassay in diagnostic medicine. Bull. WHO. 53: 55-64
- 4) Towbin H., Staehelin T. & Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 76:4350-4354
- 5) Lianse M., Janin V., Bresson-Hadni S., Vuitton D-A., Houin R., Piarroux R. 2000. Immunodiagnosis of *Echinococcus* infections: Confirmatory Testing and Species Differentiation by a New Commercial Western Blot. J. Clin. Microbiol. 38:3718-3721

Ⅳ、検査の問い合わせと依頼先

北海道立衛生研究所

札幌市北区北 19 条西 12 丁目 Tel: 011-747-2211

国立感染症研究所寄生動物部第二室

東京都新宿区戸山 1 丁目 23-1 Tel: 03-5285-1111 (2734)

Ⅴ、執筆者一覧

川中正憲 (国立感染症研究所寄生動物部第二室)

古屋宏二 (北海道立衛生研究所生物工学室、
現国立感染症研究所寄生動物部第一室)

村田以和夫 (東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科)

急性ウイルス性肝炎

急性ウイルス性肝炎

目 次

- I. 急性ウイルス性肝炎の概説
- II. 検査に関する一般的な注意事項
 - 1. 検査材料の採取、輸送
 - 2. 検査の進め方
 - 3. 検査の判定
- III. 検査の進め方
 - 1. A型肝炎
 - 1. 抗体検査
 - 2. 遺伝子検査
 - 3. A型肝炎のウイルス学的診断基準
 - 2. B型肝炎
 - 1. 血清学的検査
 - 2. 遺伝子検査
 - 3. B型肝炎のウイルス学的診断基準
 - 3. C型肝炎
 - 1. 抗体検査
 - 2. 遺伝子検査
 - 3. C型肝炎のウイルス学的診断基準
 - 4. D型肝炎

1. 抗体検査
2. D型肝炎のウイルス学的診断基準

5. E型肝炎

1. 病原体分離
2. 抗体検査
3. 抗原検査
4. E型肝炎のウイルス学的診断基準

IV. 引用文献

V. 問い合わせ先

VI. 執筆者一覧

I. 急性ウイルス性肝炎の概説

肝炎ウイルスとしては、流行性肝炎型の A 型肝炎ウイルス（HAV）と E 型肝炎ウイルス（HEV）、血清肝炎型の B 型肝炎ウイルス（HBV）、C 型肝炎ウイルス（HCV）、及び HBV をヘルパーとする D 型肝炎ウイルス（HDV）が知られている。この他 1995 年から翌年にかけて G 型ウイルス（GBV-C/HGV）が、更に 1997 年には TT ウイルス（TTV）が肝炎症例より発見されたが、これらのウイルスについては肝炎ウイルスと認知されるまでには至っていない。また、肝炎ウイルス以外に急性肝炎を引き起こすウイルスとしては、Epstein-Barr virus、Cytomegalovirus、Herpes simplex virus などが知られている。

HAV と HEV は主として経口感染であり、ウイルスに汚染された飲料水、食物を介して経口的に侵入し肝へ達する。集団発生は、A 型肝炎では飲料水、食品の汚染、貝類の生食に関連し、E 型肝炎では飲料水の汚染に関連する。一方、HBV、HCV 及び HDV は血液を介して感染する。これらの感染による輸血後肝炎は HBV 抗原、HCV 抗体検出及び核酸増幅法によるスクリーニングにより減少の一途を辿っている。B 型肝炎のキャリア化の主因は母子感染によるが、1986 年以降、B 型肝炎母子感染防止事業が徹底され、新たな母子感染はほとんど見られなくなっている。C 型肝炎では母子感染、性感染例は存在するものの極低率と考えられている。D 型肝炎は HBV の補助が必要であり、麻薬中毒患者などにおける HBV と HDV の同時感染、或いは HBV キャリアに HDV が重複感染することによって発生する。現在、わが国での発生はほぼ皆無である。

臨床症状は、A 型肝炎の場合、突然 38℃ 以上の発熱がおこり 3～4 日持続する。この間に食欲不振、全身倦怠感、悪心嘔吐、右季肋部鈍痛、濃色尿、下痢などが見られ、更に黄疸が認められるようになる。これらの症状は通常 7～10 日間程度で軽減する。E 型肝炎では発熱の程度がやや軽い以外、A 型肝炎と同様の症状を示す。B 型、C 型、D 型肝炎では比較的徐々に食欲不振、全身倦怠感、悪心嘔吐、右季肋部痛、上腹部膨満感などが始まり、濃色尿、引き続き黄疸を認めるようになる。一般的に、C 型肝炎では黄疸などの症状が軽く、D

型肝炎では発症までの日数が比較的短い。

感染予防方法として、A 型、E 型肝炎の場合は手洗い、飲食物の加熱処理が重要である。また、A 型肝炎には HA ワクチン、免疫グロブリンの接種が有効である。B 型肝炎では、母子感染の予防に HBV 陽性の母親からの新生児に対して免疫グロブリンと HB ワクチンの投与が行われる。成人の場合も HB ワクチン投与により、性感染、医療行為からの感染を予防することが可能である。C 型肝炎の特異的な予防法はない。HCV に汚染された器具を介した感染を予防するため、血液付着物による外傷に注意する。D 型肝炎では、麻薬や海外での性感染に注意すべきで、HBV との同時感染の場合 HB ワクチンが有効である。

II. 検査に関する一般的注意

1. 検査材料の採取、輸送

採血の際には PCR を阻害するヘパリンは使用せず、EDTA 存在下で行い血漿を分離する。抗原抗体検査用の検体は 0～4℃または-20℃で運搬、保存する。遺伝子検査を行う場合は凍結して運搬、保存する。HBV-DNA を測定する場合は -20℃で凍結保存し、HAV、HCV、HEV の RNA 測定用検体は-80℃以下に凍結保存することが望ましい。また、凍結融解は繰り返さないよう留意する。

2. 検査の進め方

肝炎ウイルスに関する検査は、P2 実験施設で BSL2 の取り扱い基準に従う。すなわち、肝炎患者又は疑われる患者に由来する検査材料等の取扱いはレベル 2 の設備を備えた検査室において行う。

検査手順は、各肝炎ウイルスに関する「検査方法」の項を参照されたい。

3. 検査の判定

検査結果については、各ウイルスの診断基準に基づいて判定し、速やかに書面で関係者に報告する。

III. 検査の進め方

1. A 型肝炎

A 型肝炎の診断には血中の IgM 型 HAV 抗体を確認すれば良い。IgM 型抗体は発症から約 1 カ月後にピークに達し、3～6 カ月後には陰性となる。重症例ほど IgM 型抗体価は高く、発症 6 カ月以降にも検出される例がある。また、治癒が遷延化する例では IgM 型抗体の持続期間も長い。

IgG 型と IgA 型抗体は A 型肝炎の診断には無用であるが、IgA 型抗体は感染後 1～2 年間、IgG 型抗体は更に長期間持続するので、特殊な血清疫学調査に有用である。一般的な血清疫学調査、 γ -グロブリンやワクチン接種対象者の選択などには、競合抑制 ELISA 法等が用いられる。なお、検出される HAV 抗体はウイルス粒子と結合する防御抗体であり、過去の感染又はワクチン免疫を意味する。

細胞培養によるウイルス分離には長期間が必要なため、診断目的には適さない。発症極く初期の患者糞便中には、ELISA で測定可能な量(1ml 当たり 10^8 粒子以上)の HAV が含まれることもある。ウイルス RNA を検出する RT-PCR 法では、微量の HAV の検出が可能である。発症後 2 週間以内の糞便検体や血液中のウイルス RNA を抽出して、RT-PCR 法で cDNA を増幅してこの遺伝子解析を行えば、感染経路の推定などに役立つ。

1. 抗体検査

検査診断目的には体外診断薬用の市販キットの使用が便利である。簡便な ELISA キットとしては、国内ではマイクロプレート法がデンカ生研、またビーズ法がアボット社から市販されている。特に IgM 測定キットの感度設定は難しい。操作及び判定は各キットの取り扱い説明書に従って行う。

2. 遺伝子検査

RT-PCR 法による HAV の検出感度は理論的には1粒子であるが、RNA 抽出や他の操作でのロスなどにより、実際は 100 粒子の検出が限界となろう。急性期の患者血清が通常の RT-PCR 法による HAV RNA の検出に適している。糞便検体の場合は核酸分解酵素など RT-PCR 反応の阻害物質が大量に存在するので、抗体固相化プレートなどに HAV 粒子を捕捉して行う抗原捕捉 RT-PCR 法を行う必要がある。

2-1. 血清検体を用いる RT-PCR 法

(1) 試薬と器具

Isogen-LS (日本ジーン) 又は TRI 試薬 BD (コスモ・バイオ)

Ethachinmate (日本ジーン)

クロロフォルム

フェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール (PCI)=25:24:1

クロロフォルム・イソアミルアルコール (CI)=24:1

イソプロパノール

エタノール

DEPC-H₂O

逆転写酵素 (M-MLV RTase, 5 X buffer 付き。GIBCO BRL)

Ribonuclease inhibitor (TAKARA)

Taq DNA polymerase (TAKARA, 10X buffer, dNTP 付き)

電気泳動用アガロース

分子量マーカー

マイクロ冷却遠心機

インキュベーター

サーマルサイクラー

電気泳動装置

UV イルミネーター

(2) RNA の抽出

市販の核酸抽出試薬と自家調製したフェノール・クロロホルムを組み合わせる RNA の抽出精製を行う。組み合わせることにより検出感度が上がるようである。

- 1) 蒸留水にて 2 倍に希釈した血清検体 250 μ l を 1.5 ml のチューブに入れ Isogen-LS 又は TRI 試薬 BD を 750 μ l 加え、ボルテックスで攪拌する。
- 2) クロロホルム 200 μ l を加え、激しく 1 分間攪拌する。
- 3) 12,000 rpm 以上で 10 分間 (4℃) 遠心。
- 4) 上清 (700 μ l) を 700 μ l の PCI 入りのチューブにとる。
- 5) 激しく 1 分間攪拌する。
- 6) 12,000 rpm 以上で 10 分間 (4℃) 遠心。
- 7) 上清を 700 μ l の CI 入りのチューブにとり、攪拌する。
- 8) 12,000 rpm で 5 分間 (4℃) 遠心。
- 9) 上清を 2 μ l の Ethachinmate 入りのチューブにとり、等量のイソプロパノールを加える。軽く混ぜて 4℃で 1 時間放置。
- 10) 12,000 rpm 以上で 10 分間 (4℃) 遠心。
- 11) 上清を捨てる。
- 12) ペレットを 1 ml の 75%エタノールで洗浄。
- 13) 12,000 rpm で 5 分間 (4℃) 遠心。
- 14) 上清を捨てペレットを風乾する。

(3) RT-PCR 法

+300 プライマーと-516 プライマーは HAV RNA の 5 非コード領域を増幅する。各種遺伝子型で一致した塩基配列を持つことと、立体構造をとる領域のため、PCR のアニーリング温度は高めに設定してある。感度を増すためには、同じプライマーセットを用いて 2 度目の PCR を行うと良い。+2799 と-3273 のプライマーは VP1/2A 領域を増幅するセットであり、このセットで増幅した cDNA は分子疫学的調査に適する。+2907 と-3162 のセットは+2799 と-3273 での PCR 後の nested PCR 用である。

各種プライマー (20 μ M) :

+300 : GCT GTA GGA GTC TAA ATT GGG GAC (24 mer)

-516 : ACT CAA TGC ATC CAC TGG ATG AG (23 mer)

+2799 : ATT CAG ATT AGA CTG CCT TGG TA (23 mer)

-3273 : CCA AGA AAC CTT CAT TAT TTC ATG (24 mer)

+2907 : GCA AAT TAC AAT CAT TCT GAT GA (23 mer)

-3162: CTT C(CorT)T GAG CAT ACT T(GorT)A (AorG)TC TTT G
(25 mer)

抽出 RNA 試料を 2 単位の Ribonuclease inhibitor, cloned (GIBCO BRL) 入りの 20 μ l の DEPC-H₂O で溶かす。

それぞれ 1 μ l の (-516)および(-3273)primer を加えた反応Aと反応Bのチューブに 10 μ l の RNA 試料を加え、60℃, 10 分加熱し、氷冷する。

各チューブに 10 μ l の 2x RT 液を加える。

2x RT	DW	1.5 μ l
	5x buffer	4.0

0.1 M DTT	2.0
25 mM dNTP	1.0
RNase inhibitor (Takara)	1.0
M-MLV RT	0.5

37℃、1時間反応後、10 μ l を次の PCR 反応液に加える。以下の PCR は MicroAmp tube、Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9600 を使用している。

PCR 反応液 (μ l)

	A(1)	B(1)
10x buffer	10.0	5.0
2.5 mM dNTP	8.0	4.0
DW	69.5	78.5
TaKaRa Taq	0.5	0.5
Primer +	(+301)1.0	(+2799)1.0
Primer -	(-516) 1.0	(-3273) 1.0
RT 液	10.0	10.0
Total volume	100.0	100.0

反応A(1)の条件

Cycle: 1 min at 94℃ for 1 cycle

Cycle: 15 sec at 94℃, 15 sec at 58℃, 30 sec at 72℃ for 40 cycles

Hold: (forever) at 4℃

反応B(1)の条件

Cycle: 1 min at 94 °C for 1 cycle

Cycle: 15 sec at 94 °C, 15 sec at 50 °C, 45 sec at 72 °C for 40 cycles

Hold: (forever) at 4 °C

上記反応液各 1 μ l を次の PCR Mix 20 μ l が入った新しい Micro Amp tube に加える。

	A(2)	B(2)
10x buffer	2.0	2.0

2.5 mM dNTP	1.6	1.6
DW	15.9	15.9
TaKaRa Taq	0.1	0.1
Primer +	(+301) 0.2	(+2907)0.2
Primer -	(-516)0.2	(-3162)0.2
Total volume	20.0	20.0

反応A(2)の条件

Cycle: 1 min at 94 °C for 1 cycle

Cycle: 15 sec at 94 °C, 15 sec at 58 °C, 30 sec at 72 °C for 30 cycles

Hold: (forever) at 4 °C

反応B(2)の条件

Cycle: 1 min at 94 °C for 1 cycle

Cycle: 94 °C, 15 sec → 58 °C, 15 sec → 72 °C, 30 sec (40 サイクル)

Hold: (forever) at 4 °C

アガロースゲル電気泳動

TBE 液で 2% MetaphorXR agarose (TaKaRa)ゲルプレートを作成し、5 μ l の DNA marker (BioMarker EXT, BioVentures)と共に 10 μ l の PCR 反応液を電気泳動する。エチジウムブロマイド染色により、UV イルミネーター下で、反応Aで 257bp、反応 B(1)で 498bp、B(2)で 280bp の各バンドを検出する。

2-2. 抗原捕捉 RT-PCR

糞便検体には RT-PCR 阻害物質が多く含まれるため、抗原を免疫反応により抗体固相化プレートに固定して不純物を除き、RT-PCR を行う。洗浄過程での各ウェルのコンタミが避けられないので、nested PCR は行わないほうがよい。

(1) 試薬と器具

抗 HAV 抗体：患者回復期血清（発症半年から 1 年くらい）又は抗 HAV

単クローン抗体

尿素溶液：7 M urea, 1% SDS, 0.35 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH7.5

96 ウェルマイクロプレート (Nunc immunoplate)

PBS

0.05% Tween 20 加 PBS (PBS-T)

0.5% BSA (Sigma) 及び 0.05% NaN_3 加 PBS (0.5BSA-PBS- NaN_3)

その他 RT-PCR 用の試薬及び器具

(2) 抗 HAV 抗体固相化プレート

- 1) 抗 HAV 抗体を PBS で 1:5000 から 1:10000 に希釈する。
- 2) マイクロプレートの各ウェルに 0.1 ml ずつ加える。
- 3) 4℃で一夜以上置く。
- 4) PBS-T でプレートを 3 回洗浄する。
- 5) 各ウェルあたり 0.25 ml の 0.5BSA-PBS- NaN_3 を加え、プレートをシールする。
- 6) プレートを上下に振って液を全体に行きわたらせた後、4℃で一夜以上置く。

(3) 糞便抽出液の作成

- 1) 15 ml 又は 50 ml の遠心チューブ中の糞便検体に 9 倍量の PBS を加え、10%糞便抽出液を作る。
- 2) 3 回ほど凍結融解を繰り返す。融解のたびに激しく攪拌する。
- 3) 3000 rpm で 30 分遠心する。
- 4) 上清 0.5 ml を 1.5 ml ネジ蓋付のチューブに取り、等量のクロロフォルムで抽出する。
- 5) 12000rpm で 30 分間遠心する。

6) 上清を新しいチューブに移す。

(4) 抗原捕捉から RNA 抽出

- 1) 必要量の抗 HAV プレーットのウェルを PBS-T で 2 回洗う。
- 2) 50 μ l の糞便抽出液を加え、4℃に終夜置く。
- 3) PBS-T で 6 回各ウェルを洗浄する。
- 4) 尿素溶液を 0.1 ml 加え、10 分間室温におく。
- 5) 1 μ l の Ethachinmate と 0.1 ml の TE 液入りの 0.5 ml チューブに液を移す。
- 6) 0.2 ml のフェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコールを加える。
- 7) 激しく攪拌し、4℃、12000rpm で 10 分間遠心する。
- 8) 上清を新しいチューブに移し、6)、7)を繰り返す。
- 9) 上清に 0.2 ml のクロロフォルム・イソアミルアルコールを加え同様に遠心する。
- 10) 1.5 ml チューブに上清をとり、0.1 容量の 3 M 酢酸ナトリウム液と 2.5 容量のエタノールを加え、-70℃に 1 時間置く。
- 11) 75%エタノールで沈殿を洗い、12000rpm で 5 分間遠心する。
- 12) 沈殿を乾燥させる。

(5) RT-PCR

前章の方法に従う。ただし、2 回目の PCR は行わない。PCR 反応は 40 サイクル行う。

3. A 型肝炎のウイルス学的診断基準

次のいずれかに該当すれば「HAV 感染」とする。

- 1) IgM 型抗体検出 ELISA 法で HAV 特異的 IgM 抗体が認められる。
- 2) RT-PCR 法による遺伝子検査でウイルス特異的遺伝子が検出される。

2. B 型肝炎

B 型急性肝炎は、発症初期に HBs 抗原陽性、IgM-HBc 抗体陽性（高力価）の証明により確定診断される。重症、劇症肝炎では HBs 抗原がすでに血中から消失している場合があるので、IgM-HBc 抗体測定は不可欠である。IgM-HBc 抗体は、B 型慢性肝炎の急性増悪時にも検出し得るが、急性肝炎時より抗体価は低値であり鑑別はほぼ可能である。本診断上、最も重要な点は、HBV 持続感染、あるいはキャリアの急性増悪との鑑別である。B 型急性肝炎では、HBs 抗原が経過中に血中から消失し、肝炎は鎮静化し、HBc 抗体、HBs 抗体が陽転化し臨床的には治癒する。しかし肝細胞内には、HBV 遺伝子が残存することが最近明らかとなった。

HBV 感染によりキャリア化した場合には（多くは母児間、幼少児期の HBV 感染）、いずれも HBe 抗原陽性となり、多くは無症候性キャリアとなって経過し、20 代から 30 代にかけて HBe 抗原から HBe 抗体への seroconversion がみられ、肝炎の活動性は低下する。HBV キャリアでは HBc 抗体がほとんどの場合で高力価のまま持続するが、数少ない HBs 抗原消失例では低力価である場合が多い。

HBV 遺伝子は 4 つの open reading frame (ORF)からなり、preS/S 遺伝子は HBs 抗原蛋白をコードし、preC/C 遺伝子は HBc 抗原蛋白と HBe 抗原蛋白をコードし、P 遺伝子は DNA ポリメラーゼをコードし、X 遺伝子は HBx 抗原蛋白をコードしている。HBV マーカーは、それぞれの蛋白に対して、(1) HBs 抗原/抗体、HBc 抗原/抗体、などを測定する血清学的診断と(2) HBV DNA を測定する遺伝子診断に分けられる。主な HBV マーカーは図 1 のごとく推移することが知られており、それぞれのマーカーの意義については表 1 に示した。

図 1. HBV 感染の経過

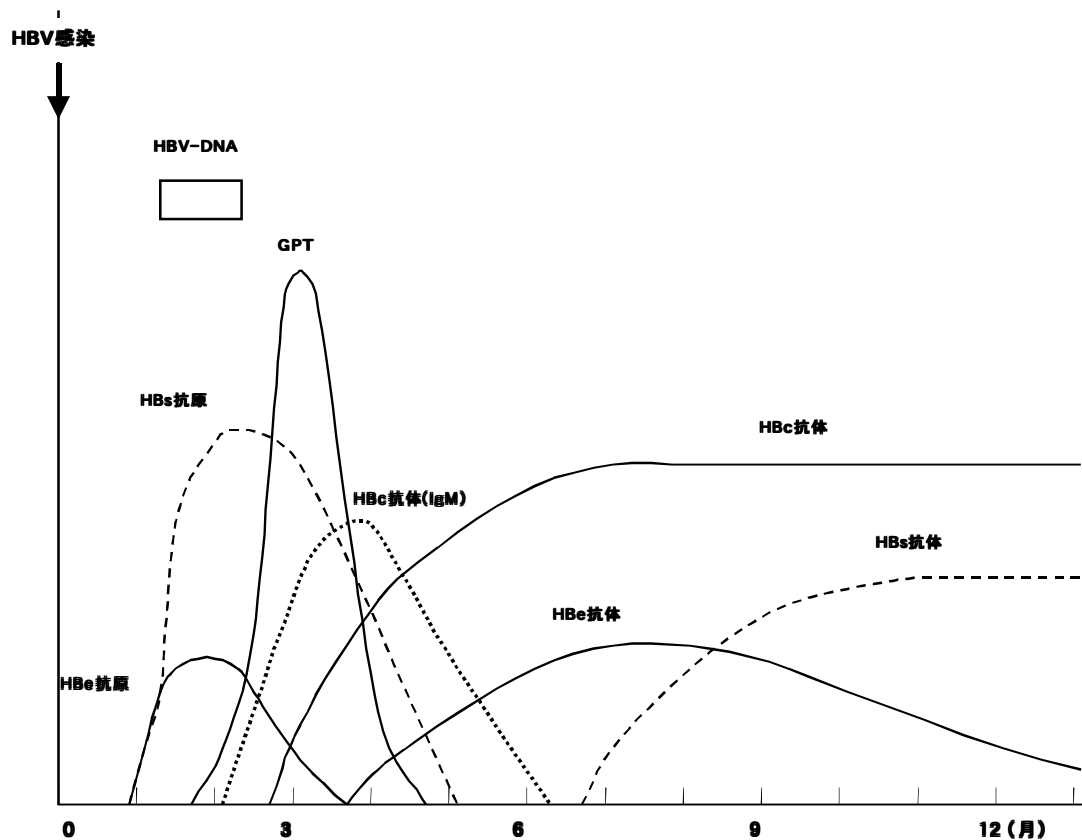


表 1. 血中 HBV マーカーとその意義

-
1. 現在の HBV 感染状態の有無：HBs 抗原
 - a) 急性肝炎：IgM-HBc 抗体
 - b) HBV キャリア：HBc 抗体高力価
 2. HBV 感染既往の有無：HBs 抗体、HBc 抗体
 3. HBV 増殖状態：HBe 抗原、HBe 抗体、HBV DNA
-

1. 血清学的検査

HBV マーカーの免疫血清学的検査法は、凝集法、EIA／RIA／化学発光法、

イムノクロマト法に分類される。それぞれ検出キットが数多く市販されている。血球凝集反応は、受身赤血球凝集反応、逆受身赤血球凝集反応を用いる。これはヒツジ赤血球に抗原或いは抗体を付着させ、被検血清中に抗原ないし抗体が存在すれば、抗原抗体反応を介して血球が凝集する反応を見る方法である。EIA法などに比べ感度は劣るが、倍々希釈により定量的に測定することが可能である。HBs 抗原、HBs 抗体、HBe 抗原、HBe 抗体などの検査に用いられている。

EIA／RIA／化学発光法はビーズ又はマイクロプレートに抗体を付着させ、これに検体中の抗原を吸着させ、洗浄後標識された抗体を加え、サンドイッチ法による抗原抗体反応のシグナルを測定する。これらの方法は高感度であり有用であるが、定量性に問題があり高力価の抗原の定量には適さない。

近年、簡便でかつ迅速な抗原、抗体測定法としてイムノクロマト法が開発されている。原理は抗原抗体反応と毛細管現象を利用したクロマトグラフィを併用した定性反応である。全血を検体として使用でき、特殊な器具を必要としないため、緊急的検査や検査器具などが不足している発展途上国などにおいても非常に有用な検査法である。

HBV 関連の各抗原/抗体の検査法の特徴は以下のとおりである。

1-1. HBs 抗原

1-1-1. 凝集法 (reversed passive hemagglutination; R-PHA 法)

原理：RPHA 試薬と混和した希釈被検血清中に HBs 抗原が存在すると、ヒツジ赤血球表面に吸着している HBs 抗体と免疫反応がおこり、その結果ヒツジ赤血球の凝集が生ずる。

特徴：鋭敏度、特異性に優れ、安価で、検査手技も簡単であり、比較的短時間で大量の検体を処理できる定量法であり、HBs 抗原の最終力価は通常 2^n で表される。

1-1-2. 酵素抗体法 (enzyme-immunoassay; EIA 法)

原理：被検血清中の HBs 抗原と HBs 特異抗体を吸着させた固相(ビーズ)上

の HBs 抗体（一次抗体）とを反応させ、酵素標識 HBs 抗体（二次抗体）でサンドイッチを形成した後に、基質と発色剤を加えて一定時間発色反応を行い、その吸光度を測定する。

特徴：検出感度は鋭敏であり、特異性が高く、測定系が迅速で、安価であるが、高力価の検体においては定量性に欠ける。

1-1-3. ラジオイムノアッセイ法 (radioimmunoassay; RIA 法)

原理：被検血清中の HBs 抗原と HBs 特異抗体を吸着させた固相(ビーズ)上の HBs 抗体（一次抗体）とを反応させ、 ^{125}I 標識 HBs 抗体（二次抗体）でサンドイッチを形成した後に、これを γ -カウンタで測定する。

特徴：検出感度（血球凝集反応の約 10 倍）は著しく鋭敏であり、特異性が高く、信頼性の高い検査法で、低力価の HBs 抗原を検出するのに最も優れているが、測定系に時間を要すること、被検血清を大量に要すること、単価が高く、高力価の HBs 抗原を検出するには適当とは言えない。

1-1-4. 化学発光酵素免疫法 (chemiluminescent enzyme immunoassay; CLEIA 法)

原理：被検血清中の HBs 抗原と固相の抗 HBs 抗体結合フェイライト粒子とを反応させ、酵素標識抗体（アルカリフォスファターゼ標識抗 HBs 抗体）でサンドイッチ複合体を形成した後に、未反応の酵素標識抗体を分離後、化学発光基質(AMPPD)を加えて酵素反応を行う。抗体結合粒子に結合した被検血清中の HBs 抗原は、AMPPD の分解に伴う発光量に反映される。

特徴：高感度で、迅速測定が可能である。

1-2. HBs 抗体

1-2-1. 凝集法 (passive hemagglutination; PHA 法)

原理：PHA 試薬と混和した稀釈被検血清中に HBs 抗体が存在すると、ヒツジ赤血球表面に吸着している HBs 抗原と免疫反応がおこり、その結果ヒツジ赤血球の凝集が生ずる。

特徴：鋭敏度、特異性に優れ、安価で、検査手技も簡単であり、比較的短時間で大量の検体を処理できる定量法である。HBs 抗体価は通常 2ndPHA 価で表される。

1-2-2. EIA 法

原理：被検血清中の HBs 抗体と HBs 抗原を吸着させた固相(ビーズ)上の HBs 抗原を反応させ、酵素標識 HBs 抗原でサンドイッチを形成した後に、基質と発色剤を加えて一定時間発色反応を行い、その吸光度を測定する。

特徴：検出感度は鋭敏であり、特異性が高く、測定系が迅速で、安価であるが、高力価の検体においては定量性に欠ける。

1-2-3. RIA 法

原理：被検血清中の HBs 抗体と精製 HBs 抗原を吸着させた固相(ビーズ)上の HBs 抗原を反応させ、¹²⁵I 標識 HBs 抗原でサンドイッチを形成した後に、これを γ -カウンタで測定する。

特徴：検出感度（血球凝集反応の約 10 倍）は著しく鋭敏であり、特異性が高く、信頼性の高い検査法である。測定系に時間を要し、被検血清を大量に要する。単価が高く、半定量性である。

1-2-4. CLEIA 法

原理：被検血清中の HBs 抗体と固相の HBs 抗原結合フェイライト粒子とを反応させ、酵素標識抗原（アルカリフォスファターゼ標識 HBs 抗原）でサンドイッチ複合体を形成した後に、未反応の酵素標識抗原を分離後、化学発光基質(AMPPD)を加えて酵素反応を行う。抗原結合粒子に

結合した被検血清中の HBs 抗体は、AMPPD の分解に伴う発光量に反映される。

特徴：高感度で、迅速測定が可能である。

1-3. HBc 抗体

EIA 法、RIA 法による HBc 抗体の検出には、競合反応が用いられている。

1-3-1. RIA 法

原理：被検血清中の HBc 抗体が陰性の時は、反応系に加えた一定量の HBc 抗原が固相上の HBc 抗体（一次抗体）と ^{125}I 標識 HBc 抗体（二次抗体）の両者と反応してサンドイッチを形成し、 γ -カウンターで測定される。これに対して、被検血清中の HBc 抗体が存在すると、反応系に加えた一定量の HBc 抗原はこれに反応し、固相上の HBc 抗体、 ^{125}I 標識 HBc 抗体とは反応できないため、 γ -カウンターで測定されない。

特徴：検出感度は著しく鋭敏であり、特異性が高く、信頼性の高い検査法である。測定に時間を要し、被検血清を大量に要する。単価が高く、半定量性である。

1-3-2. EIA 法

原理：二次抗体として酵素標識 HBc 抗体が用いられており、反応の結果を吸光度で測定する。

特徴：検出感度は鋭敏であり、特異性が高く、測定系が迅速で、安価であるが、高力価の検体においては定量性に欠ける。

1-4. IgM 型 HBc 抗体

1-4-1. RIA 法

原理：被検血清中の IgM と固相の抗ヒト IgM 抗体をコートしたビーズを反応させ、HBc 抗原と ^{125}I 標識 HBc 抗体を加えてサンドイッチ法により、特異的に IgM 型 HBc 抗体を検出する。

特徴：RIA 法そのものの特質は、HBs 抗原・抗体の項で述べたのと同様である。

1-5. HBe 抗原

1-5-1. EIA 法

原理：被検血清中の HBe 抗原と HBe 特異抗体を吸着させた固相(ビーズ)上の HBe 抗体（一次抗体）とを反応させ、酵素標識 HBe 抗体（二次抗体）でサンドイッチを形成した後に、基質と発色剤を加えて一定時間発色反応を行い、その吸光度を測定する。

特徴：EIA 法そのものの特質は、HBs 抗原・抗体の項で述べたのと同様である。

1-5-2. RIA 法

原理：被検血清中の HBe 抗原と HBe 特異抗体を吸着させた固相(ビーズ)上の HBe 抗体（一次抗体）とを反応させ、 ^{125}I 標識 HBe 抗体（二次抗体）でサンドイッチを形成した後に、これを γ -カウンタで測定する。

特徴：RIA 法そのものの特質は、HBs 抗原・抗体の項で述べたのと同様である。

1-6. HBe 抗体

EIA 法、RIA 法による HBe 抗体の検出には、競合反応が用いられている。

1-6-1. RIA 法

原理：被検血清中の HBe 抗体が陰性の時は、反応系に加えた一定量の HBe 抗原が固相上の HBe 抗体（一次抗体）と ^{125}I 標識 HBe 抗体（二次抗体）の両者と反応してサンドイッチを形成し、 γ -カウンターで測定される。これに対して、被検血清中の HBe 抗体が存在すると、反応系に加えた一定量の HBe 抗原はこれに反応し、固相上の HBe 抗体、 ^{125}I 標識 HBe 抗体とは反応できないため、 γ -カウンターで測定されない。

1-6-2. EIA 法

原理：二次抗体として酵素標識 HBe 抗体が用いられており、反応の結果を吸光度で測定する。

特徴：EIA 法・RIA 法そのものの特質は、HBs 抗原・抗体の項で述べたのと同様である。

2. 遺伝子検査

HBV DNA は、HBe 抗原や抗体の有無に関わらず、HBV の増殖状態を直接反映しており、定量法としては、分岐 DNA プローブ(bDNA)法、核酸ハイブリダイゼーション(TMA)法、定性的 PCR 法、real-time PCR 法による測定が用いられている。bDNA 法の HBV DNA 量の測定範囲は $0.7\text{Meq}\sim 4500\text{Meq/ml}$ であるのに対して、TMA 法の測定範囲は $5\times 10^3\sim 5\times 10^8\text{copies/ml}$ ($3.7\sim 8.7\text{LGE/ml}$)と約 100 倍検出感度が高い。real-time PCR 法の検出範囲としては、筆者らの検討において $3\times 10^2\sim 10^{10}\text{copies/ml}$ の広範囲で定量が可能であった。したがって、real-time PCR 法は今後、B 型急性肝炎の治癒経過を観察する際の HBV の血中からの減少・排除を知る上で大変有用であると考えられる。

本稿では、各検査法の特徴を紹介し、また定性的 PCR 法と real-time PCR 法のマニュアルを記載する。

2-1. 分岐 DNA プローブ(bDNA)法

原理：HBV DNA をプレートに固定したそれと相補的な塩基配列を持つ合成 DNA で固定する。

分岐 DNA 鎖を有する合成 DNA をシグナルの増幅に用いる。アルカリフォスファターゼで標識した合成 DNA を標識プローブとし、化学発光基質により検出する。検量線を用いて、未知の検体の HBV DNA 量を算出する。

特徴：ターゲット増幅を行わないので、ウイルス核酸の精製が不要で、コンタミネーションが起こりにくく、迅速で大量の検体測定が可能である。高ウイルス量の HBV DNA の定量性に優れているが、低ウイルス量の定量には適さない。

2-2. 核酸ハイブリダイゼーション(TMA)法

原理：2 種類のプライマーおよび基質を用いて、HBV DNA の特異的塩基配列を RNA として増幅する。増幅終了後の検体と化学発光物質で標識した DNA プローブをハイブリダイズさせ、2 本鎖の RNA DNA ハイブリッドを形成させる。

特異活性の異なる 2 種類のプローブを用い 2 種類の標準曲線を作成し、HBV DNA 定量を行う。

特徴：ウイルス核酸の抽出が不要で、コンタミネーションが起こりにくく、高感度で、特異性も高く広範囲の HBV DNA 定量が可能である。

2-3. 定性的 PCR 法

原理：HBV DNA の増幅したい遺伝子領域を挟むようにプライマーの設定を行って、通常、30～40 サイクルの増幅を行う。血清中の HBV DNA 量がきわめて微量である場合には、十分な PCR 産物を得るために、1st PCR のプライマーの位置の内側の配列に、2nd PCR のプライマーを設定しさらに 30～40 サイクルの増幅を行う nested PCR 法を行う。

特徴：nested PCR 法は最も高感度な HBV DNA 測定系であるため、HBs 抗原消失後の B 型急性肝炎や劇症肝炎などで検出されることがあり、低ウイルス量において特に有用であるが、定量性に乏しい。

(1) 試薬と器具

DNA 抽出バッファー

(150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 0.1% SDS)

proteinase K ストック溶液 (100 倍濃度)

滅菌した超純水に 20 mg/ml になるように溶かしたストック溶液を作り小分けして-20℃に保存しておく。

フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール=25：24：1

3 M 酢酸ナトリウム

100% エタノール

70% エタノール

TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA)

10×PCR buffer (with MgCl₂)

dNTPs mix (2.5 mM ストック溶液)

Taq polymerase

分子量マーカー

電気泳動用アガロース

マイクロ冷却遠心器

インキュベーター

サーマルサイクラー

電気泳動装置

UV 照射写真撮影装置

(2) DNA の抽出

- 1) proteinase K ストック溶液を室温で溶解し DNA 抽出バッファーで 100 倍に希釈して DNA 抽出液を調製する。
- 2) 検査血清 50 μ l に対して DNA 抽出液 200 μ l を加えピペティングし（ボルテックスはしない）、37℃で2時間インキュベートする。
- 3) フェノール：クロロフォルム：イソアミルアルコール 250 μ l を加えよく混和する。遠心後、中間層と水層の境界が明確でない場合は水層を別のチューブに移した後、再度フェノール：クロロフォルム：イソアミルアルコール抽出を行う。
- 4) 水層に 20 μ l の 3 M 酢酸ナトリウムと 700 μ l の 100%エタノールを加え遠心操作により DNA を沈殿させる。
- 5) 沈殿を 500 μ l の 70%エタノールでリンスし、風乾燥させた後、10 μ l の TE に溶解する。

(3) PCR

- 1) 上記のように調製した DNA 溶液 1 μ l を用いて PCR を行う。以下は HBV Pre-S1/Pre-S2 領域遺伝子を増幅する反応である。

反応液

2.5mM dNTPs	8.0 μ l	(200 μ M)
20 μ M primer TSB1	2.5	(0.5 μ M)
20 μ M primer TSB2	2.5	(0.5 μ M)
10×PCR buffer	10.0	(1×)
Taq polymerase	0.5	(2.5U)
H ₂ O	76.5	
合計	100 μ l	

TSB1 (nt 2823–2845) : 5' TCA CCA TAT TCT TGG GAA CA 3'

TSB2 (nt 80–61) : 5' TTC CTG AAC TGG AGC CAC CA 3'

94 ℃, 3 min で熱変性を行った後

94 ℃, 45 sec →53 ℃, 1 min →72 ℃, 1.5 min (40 サイクル)

更に 72 ℃, 10 min で伸長反応を行う。

2) PCR 産物 10 μ l を 1.5 %アガロースゲルにて電気泳動する。エチジウムブロマイド染色により、約 480 bp の DNA 断片が検出される。

2-4. real-time PCR 法

原理:検出したいHBV DNAの遺伝子領域の特異的プライマーと2本鎖DNA (dsDNA)に結合する色素である SYBER Green Iを用いた PCR 法である。あらかじめ、濃度既知の HBV DNA 断片が組み込まれたプラスミドと一緒に PCR 反応を行い、増幅されている PCR 産物に結合した SYBER Green I の蛍光強度を測定することにより検量線が算出され、未知の検体の HBV DNA 量を絶対的、相対的に定量する。

特徴:PCR 産物 (HBV DNA 断片) の増幅がリアルタイム、オンラインで同時にモニターが可能である高感度の定量系で、エチジウムブロマイド染色と比較して、感度、特異性が高い。

(1) 試薬と器具

スマイテスト EX&D [ゲノムサイエンス社]

滅菌マイクロチューブ (1.5ml, 0.5ml)

マイクロピペット

滅菌マイクロチップ (綿栓付)

冷却高速遠心分離機 (12,000×g 程度)

恒温器

減圧乾燥器

ボルテックスミキサー

イソプロピルアルコール（特級）
エタノール（特級）
アスピレーター
ddH₂O
Light Cycler-FastStart Taq ポリメラーゼ
Light Cycler-FastStart 反応溶液 SYBR Green I
25mM MgCl₂
Light Cycler キャピラリー
遠心アダプター
カローセル遠心機
Light Cycler
Primer 1, Primer 2

(2) DNA の抽出

被検血清より市販のスマイテスト EX&D を用いて DNA を抽出する方法を述べる。

- 1) 滅菌済み 1.5ml マイクロチューブに酵素溶液(Ⅰ液)を 15 μ l、検体希釈液(Ⅱ液)380 μ l、共沈剤溶液(Ⅳ液)5 μ l を分注する。
- 2) 血清サンプル 100 μ l を混合液が分注された 1)のチューブに加える。
- 3) ボルテックスミキサーで混和後、55℃、30 分間、インキュベートする。
- 4) 上記チューブに、蛋白溶解液(Ⅲ液)250 μ l を加え、混和後、55℃、15 分間、インキュベートする。
- 5) 上記チューブに、イソプロパノール 600 μ l を加え、よく転倒混和した後、氷上で 15 分間以上冷却する。
- 6) 12,000g、4℃、10 分間遠心した後、上清をアスピレーターまたはピペットで除去する。
- 7) 70%エタノール 500 μ l を加え、軽く混和後、12,000g、4℃、3 分間遠心した後、上清をアスピレーターまたはピペットで除去する。この洗

浄操作を再度(計 2 回)行う。

- 8) 得られた白色の沈殿（ペレット）を減圧乾燥で 5～10 分間乾燥させる。
- 9) ddH₂O(DNase/Rnase フリー)に沈殿（ペレット）を再溶解する。

(3) PCR

- 1) 得られた DNA サンプル 1 μ l に付き、1.6 μ l の 25mM MgCl₂ 保存溶液、0.1 μ l の各プライマー (100 μ M)、2 μ l の Light Cycler-FastStart DNA マスター-SYBR Green1、および 15.2 μ l の ddH₂O を氷上で調製する。
- 2). 4℃で冷却しておいた冷却ブロックに同様に冷却しておいた Light Cycler キャピラリーをサンプル数に従ってセットする。
- 3). マスターミックスを 19 μ l ずつ各キャピラリーに分注し、DNA サンプルを 1 μ l 加える。
- 4). ストッパーで各キャピラリーのふたをしてカローセルにセットし、カローセル遠心機で 5 秒間遠心し、反応ミックスをスピンドウンする。
- 5). キャピラリーを Light Cycler のサンプルカローセルにセットし、以下の PCR 条件で PCR 反応を行う。

PCR mixture;

Sample	1 μ l
25mM MgCl ₂	1.6
FastStart DNA マスター-SYBR Green1	2.0
primer 1	0.1
primer 2	0.1
ddH ₂ O	15.2
<hr/>	
total	20 μ l

PCR 条件

95℃	10min.	
95℃	15sec	×40 回
55℃	5sec	
72℃	6sec	
84℃	1sec	

プライマーの配列 (5 →3)

primer 1 : CGC GGG ACG TCC TTT GTC TA

primer 2 : GTT CAC GGT GGT CTC CAT GC

技術的に注意すべき点 : DNA は、物理化学的にはきわめて安定な物質であるが、実験者の唾液や汗に存在している DNase によってさえ容易に分解されてしまうので、取り扱いには十分な注意を要する。また、PCR 法の大きな問題にコンタミネーションがある。PCR 産物が極くわずかであっても測定系に混入すると陰性検体も陽性になってしまうため、PCR 法による検査を行っている実験室では検体調製と PCR 産物の検出を別の部屋で行うなどの工夫が必要である。

3. B型肝炎のウイルス学的診断基準

次のいずれかに該当すれば「HBV 感染」とする。

- 1) HBs 抗原が陽性である。
- 2) IgM-HBc 抗体が高力価陽性（RIA 法 4.0 上、EIA 法 2.0 以上）である。

3. C 型肝炎

C 型肝炎の抗体診断は、血清中 HCV 抗体が陽性であることによってなされる。ただし急性期に検出されるのは 50%以下であり、発症後 3 ヶ月目に 90%、6 ヶ月目にはほぼ 100%陽性となる。そのため確定診断は、RT-PCR 法により HCV RNA を検出することによりなされ、発症初期には 100% 検出される。

急性 HCV 感染により、70~80%の高率でキャリア化する。HCV 抗体が持続陽性化し、HCV RNA 陽性のウイルス血症が持続するため、血清トランスアミナーゼが正常であっても注意深く観察する必要がある。

HCV 遺伝子のゲノム RNA は約 9500 塩基で、9030 塩基以上の一つの大きな open reading frame (ORF)を有し、3010 アミノ酸からなる前駆体蛋白質をコードしている。この前駆体蛋白質から、細胞由来のシグナラーゼとウイルス由来のプロテアーゼによって、ウイルス粒子を形成する構造蛋白のコア蛋白 (C)、エンベロープ蛋白 (E1、E2、p7)とウイルス粒子に含まれない非構造蛋白 (NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B) が産生される。HCV マーカーは、(1) HCV に感染した宿主が産生する HCV 抗体を測定する抗体診断とコア抗原を測定する抗原診断、(2) HCV RNA を測定する核酸診断の 2 系統に分けられる。

1. 抗体検査

1-1. HCV 抗体

C 型肝炎の診断には、まず HCV 抗体を検査する。HCV のコア領域、NS3-4 領域および NS5A 領域の 3 つの領域の遺伝子組換え発現蛋白を抗原エピトープとして用いているので、スクリーニング検査に広く用いられるようになった。A 型、B 型或いは E 型肝炎と異なり、C 型肝炎については未だ IgM 抗体の検出系が確立していない。現在、HCV 感染の診断は主として IgG 抗体の第二世代あるいは第三世代測定系によってなされている。HCV 抗体では、抗体価が低い場合に、既往感染の可能性があるので、RT-PCR 法による HCV RNA の検出が必要である。

1-1-1. 凝集法 (PHA/PA 法)

原理：被検血清中に HCV 抗体が存在すると、動物血球(PHA)あるいはゼラチン粒子(PA)の表面に吸着している HCV の抗原と免疫反応がおこり、その結果、凝集が生ずる。

特徴：簡便で、感度も高く、迅速に半定量が可能で、大量検体のスクリーニングに適している。中等度の HCV 抗体価 ($2^5 \sim 2^{12}$ PHA 価/ $2^5 \sim 2^{11}$ PA 価)を示した場合には、キャリアと感染既往者を区別できないので、RT-PCR 法により HCV RNA の有無を判別することが必要である。

1-1-2. 酵素抗体法 (enzyme-immunoassay; EIA 法)

原理：被検血清中の HCV 抗体と HCV 抗原を吸着させたビーズを反応させ、酵素標識抗ヒト IgG 抗体でサンドイッチを形成した後に、酵素基質液を加えて発色させ吸光度を測定する。

特徴：簡便で、最も普及している HCV 抗体の定性的検査法であるが、低値陽性例ではキャリアか感染既往者か否かの判断を RT-PCR 法により行う。

1-1-3. ラジオイムノアッセイ法 (radioimmunoassay; RIA 法)

原理：被検血清中の HCV 抗体と HCV 抗原を吸着させたビーズを反応させ、 ^{125}I 標識抗ヒト IgG 抗体でサンドイッチを形成した後に、これを γ -カウンタで測定する。

特徴：EIA 法に比し、陽性と陰性の区別が明らかで偽陽性が少なく、定量測定では測定レンジが広くとれる利点があるが、アイソトープ使用による煩雑さや単価が高いなどが欠点である。

1-1-4. マイクロパーティクル EIA 法 : AXSYM

原理：固相化抗原を吸着させる担体として微小粒子 (マイクロパーティクル)を用いることにより固相化抗原量を増やし、サンドイッチ法の第一相

の抗体捕捉量を大幅に増やした。

特徴：抗原・抗体反応の場合に、抗原または抗体のいずれかが過剰である時、抗原と抗体の混合物の中で観察可能な反応が起こらなくなるプロゾーン現象が起こりにくい検出系である。測定レンジの長い測定系（AXSYM）を用いると、この測定系で得られる測定値が 15 未満の場合は HCV 抗体価は 2^5 PHA 価/ 2^4 PA 価未満に相当し、100 以上の場合が 2^{13} PHA 価/ 2^{12} PA 価以上に相当することが、判明している。従って、AXSYM で 15～100 の測定値が得られた場合においてのみ以下に述べる遺伝子検査（RT-PCR）による HCV RNA の検出を行うとよい。

1-1-5. 化学発光酵素免疫測定法(chemiluminescent enzyme immunoassay;CLEIA 法)：Lumipulse

原理：HCV リコンビナント抗原 c25、c33c、NS5 をそれぞれ結合させた抗原結合粒子に検体中の HCV 抗体を反応させる。酵素標識抗体（アルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体）を加えて反応させると、検体中の HCV 抗体を介した 3 者のサンドイッチ複合体が形成される。未反応の酵素標識抗体を分離後、化学発光基質(AMPPD)を加えて酵素反応を行う。抗原結合粒子に結合した検体中の HCV 抗体は、AMPPD の分解に伴う発光量に反映される。

特徴：測定レンジの長い測定系（ルミパルス）を用いると、この測定系で得られる測定値が 10 未満の場合は HCV 抗体価は 2^6 PHA 価/ 2^5 PA 価未満に相当し、50 以上の場合が 2^{13} PHA 価/ 2^{12} PA 価以上に相当することが、判明している。従って、ルミパルスで 10～50 の測定値が得られた場合においてのみ以下に述べる遺伝子検査（RT-PCR）による HCV RNA の検出を行うとよい。

1-2. HCV コア抗原

原理：1) EIA 法、RIA 法、及び CLEIA 法があるが、いずれもサンドイッチ法を用いる。

特徴：コンタミネーションの危険が低く、定量性にも優れている。CLEIA 法では、検体の前処理を強力に行い、HCV のエンベロップ、コア粒子を最小のペプチド単位まで切断して被検血清中に存在する HCV のコア抗体も抗体活性がなくなるまで破壊する、HCV コアペプチドの N 末端と C 末端に反応する 2 種類のモノクローナル抗体を使用する、ことなどによりコアペプチドの抗体決定基まで効率よくつかまえ、検出感度が高くなり、アンプリコア HCV RNA 定量法に近づいてきた。

2. 遺伝子検査

2-1. 定性的測定

HCV RNA 定性法の臨床応用で最も重要な点は、HCV キャリアか否かの最終確認である。HCV 抗体が低力価の場合は既往感染のことが多く、検出感度の高い HCV RNA 定性検査を行う。HCV RNA が陰性であれば、既往感染の可能性が高い。また、急性 C 型肝炎においても HCV 抗体の陽性化には感染後通常 1～3 カ月を要するため（ウインドウ期）、この時期には HCV RNA 定性検査が有用である。

2-1-1. アンプリコア HCV RNA 定性法

原理：被検血清より HCV RNA 抽出を行い、逆転写反応により HCV RNA から cDNA の合成を行う。PCR 法による cDNA の増幅を行い、DNA プローブと増幅 DNA とのハイブリダイゼーションを行う。発色反応を行い吸光度を測定し、増幅 DNA の検出を行う。

特徴：現在最も繁用されている HCV RNA 定性法は、 $10^2 \sim 10^3$ copies/ml と高い感度を有するが、定量性はない。この RT-PCR 法は逆転写反応と PCR 反応を同一のチューブ内で行う方法で、迅速かつ簡便でコンタミネーションの危険が少ない。また、抗ウイルス療法の治療中および治療後のモニタリングとしても臨床的有用性が認められている。

2-1-2. nested RT-PCR 法

原理：被検血清より RNA 抽出を行い、逆転写反応により cDNA の合成を行う。HCV RNA の増幅したい遺伝子領域を挟むようにプライマーの設定を行って、通常、30～40 サイクルの増幅を行う。血清中の HCV RNA 量がきわめて微量である場合には、十分な PCR 産物を得るために、1st PCR のプライマーの位置の内側の配列に、2nd PCR のプライマーを設定しさらに 30～40 サイクルの増幅を行う nested PCR 法を行う。また、プライマーは、各遺伝子型で最も保存性の高い領域である 5 非翻訳領域 (5'-untranslated region; UTR) に設定する。

特徴：nested RT-PCR 法は最も高感度な HCV RNA 測定系であるため、抗ウイルス療法による HCV RNA のモニターや治療の効果判定など低ウイルス量において特に有用であるが、定量性に乏しい。

(1) 試薬と器具

Sepa Gene RV-R (三光純薬)

クロロフォルム (特級)

イソプロパノール (特級)

エタノール (特級)

75% エタノール／25% TE

逆転写酵素 (SUPERScript II, 5X buffer 付き。Invitrogen)

DTT (dithiothreitol. SUPERScript II に附属)

Ribonuclease inhibitor (TAKARA)

Taq DNA polymerase (TAKARA, 10X buffer, dNTP 付き)

ddH₂O

分子量マーカー

電気泳動用アガロース

マイクロ冷却遠心器

インキュベーター

サーマルサイクラー

電気泳動装置

UV 照射写真撮影装置

(2) RNA の抽出

被検血清より市販の Sepa Gene RV-R を用いて HCV RNA を抽出する方法を述べる。

- 1) 滅菌済み 1.5ml マイクロチューブに試薬 1 を 300 μ l 分注する。
- 2) 血清サンプル 100 μ l を 1) にサンプリングし、ボルテックスで攪拌後軽く遠沈する。
- 3) 試薬 2 300 μ l と試薬 3 600 μ l を加え、マイクロチューブのキャップをしっかりと閉めて上下に激しく往復振盪させ、均一な乳化状態になるまで懸濁する。
- 4) -20°C 、5～10 分間冷却する。
- 5) 12,000rpm (11,750 \times g)、 4°C 、15 分間遠心する。
- 6) 別の 1.5ml マイクロチューブに 600 μ l のイソプロピルアルコールを分注する。
- 7) 5) の上層 (水層) を分取し、6) に加えボルテックスで十分攪拌後、 -80°C 8 分間冷却する。
- 8) 12,000rpm (11,750 \times g)、 4°C 、15 分間遠心する。
- 9) 青色ペレットに注意して、アスピレーターまたはピペットで上清を除去する。
- 10) 青色ペレットを壊さないように 70% エタノール約 1 ml を静かに加える。
- 11) 12,000rpm (11,750 \times g)、 4°C 、10 分間遠心する。
- 12) アスピレーターまたはピペットで上清を完全に除去する。
- 13) 上清をピペットマンで丁寧に除き、沈澱を 10 μ l の 1 mM DTT (1/100 容量の RNase inhibitor を含む) に溶かす。

(3) RT-PCR

用いるプライマーを以下に示す。逆転写反応にはランダムプライマーを用いることも可能であるが、本稿では HCV 特異的プライマー（#36AS）を用いる方法を示す。

#32S : 5 CTG TGA GGA ACT ACT GTC TT 3 (nt 45 – 64)

#36AS : 5 AAC ACT ACT CGG CTA GCA GT 3 (nt 265 – 246)

#33S : 5 TTC ACG CAG AAA GCG TCT AG 3 (nt 63 – 82)

#48AS : 5 GTT GAT CCA AGA AAG GAC CC 3 (nt 207 – 188)

1) 逆転写反応

RNA (前述)	5.0 μ l
#36AS (1 μ M)	1.0
2.5 mM dNTP	0.5
DW	4.5

以上をミックスし 65℃、5 分間インキュベートする。氷上に移し、

5x buffer	4.0 μ l
0.1 M DTT	2.0
RNase inhibitor (Takara)	0.5

以上を加え 42℃、2 分間インキュベートする。続いて 1 μ l の SUPERSRIPT II を加え丁寧にピペッティングする。42℃、50 分間で逆転写反応を行った後、70℃、15 分間インキュベートして不活性化する。

2) 1st PCR

cDNA	5.0 μ l
#36AS (10 μ M)	1.0
#32S (10 μ M)	1.0
10x buffer	5.0
2.5 mM dNTP	5.0
DW	32.5
TaKaRa Taq	0.5
<hr/>	
Total volume	50.0

94 °C, 3.5 min で熱変性を行った後

94 °C, 1 min →55 °C, 1.5 min →72 °C, 2 min (35 サイクル)

更に 72 °C, 10 min で伸長反応を行う。

3) 2nd PCR

上記反応液 2 μ l を用いて 2nd PCR を行う。

1st PCR DNA	2.0 μ l
#48AS (10 μ M)	1.0
#33S (10 μ M)	1.0
10x buffer	5.0
2.5 mM dNTP	5.0
DW	35.5
TaKaRa Taq	0.5
<hr/>	
Total volume	50.0

94 °C, 3.5 min で熱変性を行った後

94 °C, 1 min →55 °C, 1.5 min →72 °C, 2 min (35 サイクル)

更に 72 °C, 10 min で伸長反応を行う。

4) アガロースゲル電気泳動

10 μ l の PCR 反応液を電気泳動する。エチジウムブロマイド染色により、2nd PCR で 145 bp のバンドが検出される。また、検体中の HCV 量が多い場合、1st PCR 後のサンプルで 221 bp のバンドが検出されることがある。

技術的に注意すべき点：HCV RNA は実験者の唾液や汗に存在している RNase によってさえ容易に分解されてしまうので、取り扱いには十分な注意を要する。また、血清の凍結融解の繰り返しによっても HCV RNA の検出効率が大きく低下するので、保存は必要なだけ分注しておくのが望ましい。また、PCR 法の大きな問題にコンタミネーションがある。PCR 産物が極くわずかであっても測定系に混入すると陰性検体も陽性になってしまうため、PCR 法による検査を行っている実験室では検体調製と PCR 産物の検出を別の部屋で行うなどの工夫が必要である。

2-2. 定量的測定

HCV 抗体価が高ければ、HCV RNA はほとんど陽性であり、HCV RNA の定量を bDNA プローブ法やアンプリコア定量法(モニター法)で行い、ウイルス血症の程度（増殖状態）を評価する。また、抗ウイルス療法の治療中および治療後のモニタリングや効果判定、経過観察などの臨床的有用性が認められている。

2-2-1. 分岐 DNA プローブ(bDNA)法

原理：被検血清より RNA を抽出した後、マイクロプレートに固相化された相補 DNA プローブとハイブリダイズさせることで HCV RNA を捕らえる。次に分枝鎖標識 DNA プローブと反応させ化学発光の相対強度を測定し、定量化する。

特徴：測定が簡便迅速であり、高ウイルス量での定量性に優れているが、感度が低く $10^{5.5}$ copies/ml 以上ないと検出されない。

2-2-2. アンプリコア HCV RNA 定量法

原理：被検血清より HCV RNA 及び標準 RNA 抽出を行い、逆転写反応により HCV RNA と標準 RNA から cDNA の合成を行う。PCR 法による cDNA の増幅を行い、DNA プローブと増幅 DNA とのハイブリダイゼーションを行う。発色反応を行い吸光度を測定し、定量標準と比較することにより増幅 DNA を定量する。

特徴：現在、保険認可されている HCV RNA 定量系の中で、最も繁用されており、最も高感度で、測定範囲は 0.5～850KIU/ml である。この RT-PCR 法は逆転写反応と PCR 反応を同一のチューブ内で行う方法で、迅速かつ簡便でコンタミネーションの危険が少ない。

2-2-3. real-time PCR 法

原理：検出したい HCV RNA の遺伝子領域の特異的プライマーと 2 本鎖 DNA (dsDNA) に結合する色素である SYBER Green I を用いた PCR 法である。あらかじめ、濃度既知の HCV RNA の cDNA 断片が組み込まれたプラスミドと一緒に PCR 反応を行い、増幅されている PCR 産物に結合した SYBER Green I の蛍光強度を測定することにより検量線が算出され、未知の検体の HCV RNA 量を絶対的、相対的に定量する。

特徴：PCR 産物の増幅がリアルタイム、オンラインで同時にモニターが可能である高感度の定量系で、エチジウムブロマイド染色と比較して、感度、特異性が高い。

3. C 型肝炎のウイルス学的診断基準

次のいずれかに該当すれば「HCV 感染」とする。

- 1) HCV 抗体の高抗体価(2^{13} PHA 価/ 2^{12} PA 価以上)を認める。
- 2) HCV 抗体陰性で、HCV RNA または HCV コア抗原が陽性である。

4. D 型肝炎

HBV との同時感染、重複感染ともに、3～20 週間の潜伏期間を置いて発症する。潜伏期間は HBV の増殖状態に依存するために幅が広く、平均では約 35 日である。いずれの感染でも急激に発症して、重症～劇症肝炎となることが多く、致死率は高い。日本では D 型肝炎の発生は非常に稀で、HBs 抗原陽性者の 1%程度に見られる。

診断に際しては、まず HBs 抗原や HBc 抗体を測定することにより B 型肝炎の診断を行う。HDV が増殖する時期には、HBV の増殖は抑制されるため、HBV 陽性者への重複感染では HBe 抗原が陰性となることが多い。

1. 抗体検査

D 型肝炎の診断には、デルタ抗原、デルタ抗体の免疫血清学的検査法と HDV 遺伝子の検査法があるが、現在、臨床の場で実際に行われているのは血液中の総デルタ抗体の測定である。デルタ抗体は中和抗体ではない。高抗体価であれば現在の感染を、低抗体価であれば過去の感染を表している。

RIA 法及び EIA 法によるデルタ抗体測定用キットが市販されている（ダイナボット社「デルタ抗体 EIA『アボット』」など）。HDV 抗原を固相化したマイクロプレートに血清検体を加え、HDV 抗体があれば抗原と結合する。洗浄後、酵素又は放射能標識した HDV 抗体を加え、未結合抗原を捕捉させ、再度洗浄した後プレート上の酵素又は放射能活性を測定する。検体中に HDV 抗体が多く存在すれば、測定される活性はその分だけ減少する。血清の希釈系列をつくらせて阻止率 50%を示す血清の希釈倍率を求めることにより抗体価を定量化することができる。

2.D 型肝炎のウイルス学的診断基準

RIA 法では抑制率 60%以上、EIA 法では 50%以上抑制された場合に HDV 抗体陽性、即ち D 型肝炎と診断する。

5. E 型肝炎

1. 病原体分離

HEV が増殖可能な培養細胞系はない。

2. 抗体検査

E 型肝炎を発症した時点で、HEV に対する特異的な血中 IgM 抗体が大量に誘導されているので、診断にはこの IgM 抗体の検出が迅速、かつ最も確実な方法である。抗原には ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を欠失させたフラグメントを組換えバキュロウイルスで発現することによって得られる、密度 1.285g/cm^3 、直径 23-24nm の中空粒子が用いられる。

(1) 試薬と器具

- 1) 96 穴平底プレート : IMMULON 2 (Dynatech Laboratories, Inc. USA. catalog# 011-010-3455)、或いは MaxiSorp (Nalge NUNC International, Denmark. Catalog#439454)を用いる。
- 2) コーティング用緩衝液: [Sigma C-3041]で carbonate-bicarbonate 緩衝液 (pH9.6) を調製する。
- 3) PBS-T : 0.05% Tween20 を含む 10mM PBS を調製する。
- 4) 1% SM/PBS-T : 1% skim milk (DIFCO catalog#0032-17-3) を含む PBS-T を調製する。
- 5) 5%SM/PBS : 5% skim milk を含む 10mM PBS を調製する。
- 6) OPD 用緩衝液 : [Sigma P-4809]で 0.05M phosphate-citrate 緩衝液 (pH5.0) を調製する。
- 7) OPD 溶液 : [Sigma P-3804]を OPD 用緩衝液に 0.4 mg/ml となるよう

に溶解する。

8) 30%過酸化水素水

9) 2M 硫酸

(2) 方法

- 1) 中空粒子をコーティング用緩衝液で $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように希釈する。96 穴平底プレートの各ウェルに $100\ \mu\text{l}$ 加え、 4°C に一夜置く。
- 2) 各ウェルの液を除き、 $150\ \mu\text{l}$ の 5%SM/PBS を加える。 37°C に 1 時間、或いは 4°C に一夜置く。
- 3) 各ウェルの液を除き、PBS-T で 6 回洗浄する。
- 4) 患者血清を 1%SM/PBS-T で 1:200 に希釈し、 $100\ \mu\text{l}$ 加える。 37°C に 1 時間置く。
- 5) 各ウェルの液を除き、PBS-T で 6 回洗浄する。
- 6) 各ウェルに HRP-conjugated goat anti-human IgM ([Cappel catalog#55255]) を 1%SM/PBS-T で 1:10,000 に希釈したものを $100\ \mu\text{l}$ 加える。 37°C に 1 時間置く。
- 7) 各ウェルの液を除き、PBS-T で 6 回洗浄する。
- 8) OPD 溶液に 30%過酸化水素水を 0.04% (v/v) 加える (OPD 溶液 12.5 ml に対して 30%過酸化水素水を $5\ \mu\text{l}$ 加える)。各ウェルに $100\ \mu\text{l}$ 加え、室温に 30 分置く。
- 9) 4N 硫酸を各ウェルに $50\ \mu\text{l}$ 加え、反応を停止する。
- 10) 492nm の吸光度を測定する。

(3) 判定

OD 値が 0.2 以上の検体を陽性とする。

3. 抗原検査

(1) 試薬と器具

- 1) 96 穴平底プレート : IMMULON 2 (Dynatech Laboratories, Inc. USA. catalog# 011-010-3455)、或いは MaxiSorp, (Nalge NUNC International, Denmark. Catalog#439454)を用いる。
- 2) コーティング用緩衝液: [Sigma C-3041]で carbonate-bicarbonate 緩衝液 (pH9.6) を調製する。
- 3) PBS-T : 0.05% Tween20 を含む 10mM PBS を調製する。
- 4) 1%SM/PBS-T : 1% skim milk (DIFCO catalog#0032-17-3) を含む PBS-T を調製する。
- 5) 5%SM/PBS : 5% skim milk を含む 10mM PBS を調製する。
- 6) OPD 用緩衝液 : [Sigma P-4809]で 0.05M phosphate-citrate 緩衝液 (pH5.0) を調製する。
- 7) OPD 溶液 : [Sigma P-3804]を OPD 用緩衝液に 0.4mg/ml となるように溶解する。

(2) 方法

- 1) ウサギブレ血清及び組換え中空粒子免疫ウサギ血清をコーティング用緩衝液で 1:10,000 に希釈する。96 穴平底プレートの各ウェルに 100 μ l 加え、4℃ に一夜置く。
- 2) 各ウェルの液を除き、150 μ l の 5%SM/PBS を加える。37℃に 2 時間、或いは 4℃ に一夜置く。
- 3) 各ウェルの液を除き、PBS-T で 6 回洗浄する。
- 4) 10%患者便材料の遠心上清を 1%SM/PBS-T で適当に希釈し、100 μ l 加える。37℃ に 1 時間置く。
- 5) 各ウェルの液を除き、PBS-T で 6 回洗浄する。

- 6) 組換え中空粒子免疫モルモット血清を 1%SM/PBS-T で 1:10,000 に希釈し、100 μ l 加える。37℃ に 1 時間置く。
- 7) 各ウェルの液を除き、PBS-T で 6 回洗浄する。
- 8) 各ウェルに HRP-conjugated rabbit anti-guinea pig IgG ([Cappel catalog#57001])を 1%SM/PBS-T で 1:2,000 に希釈したものを 100 μ l 加える。37℃ に 1 時間置く。
- 9) 各ウェルの液を除き、PBS-T で 6 回洗浄する。
- 10) OPD 溶液に 30%過酸化水素水を 0.04% (v/v) 加える (OPD 溶液 12.5 ml に対して 30%過酸化水素水を 5 μ l 加える)。各ウェルに 100 μ l 加え、室温に 30 分置く。
- 11) 4N 硫酸を各ウェルに 50 μ l 加え、反応を停止する。
- 12) 492nm の吸光度を測定する。

(3) 判定

検体の OD 値が $0.2 \leq$ 、かつ、組換え中空粒子免疫ウサギ血清での OD 値とウサギブレ血清での OD 値の比が $2.0 \leq$ の場合、陽性とする。

4. E 型肝炎のウイルス学的診断基準

次のいずれかに該当すれば「HEV 感染」とする。

- 1) IgM 型抗体検出 ELISA 法で HEV 特異的 IgM 抗体が認められる。
- 2) HEV 抗原検出 ELISA 法で陽性となる。

IV. 引用文献

A型肝炎

1. Robertson H, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, Widell A, Margolis HS, Isomura S, Ito K, Ishizu T, Moritsugu Y, Lemon SM : Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographic regions. *J. Gen. Virol.* 73 : 1365-137, 1992.
2. 山下照夫, 栄賢司, 石原佑弐, 磯村思无, 戸塚敦子, 森次保雄 : A型肝炎ウイルスの家族内感染- 1990 年に愛知県で発生した患者とその家族について. *感染症誌* 66 : 781 - 785, 1992.
3. Jansen RW, Siegl G, Lemon SM : Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2867-71, 1990.

B型肝炎

1. Hendricks DA, Stowe BJ, Hoo BS, Kolberg J, Irvine BD, Neuwald PD, Urdea MS and Perrillo RP: Quantitation of HBV DNA in human serum using a branched DNA (bDNA) signal amplification assay. *Am. J. Clin. Pathol.* 104, 537-546, 1995.
2. Kamisango K, Kamogawa C, Sumi M, Goto S, Hirao A, Gonzales F, Yasuda K and Iino S: Quantitative detection of hepatitis B virus by transcription-mediated amplification and hybridization protection assay. *J. Clin. Microbiol.* 37, 310-314, 1999.
3. Morrison TB, Weis JJ and Wittwer CT : Quantification of low copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24, 954-958, 1998.
4. Nishizono I, Iida S, Suzuki N, Kawada H, Murakami H, Ashihara Y and

Okada M: Rapid and sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay for measuring tumor markers. Clin. Chem. 37, 1639-1644, 1991.

5. 熊田博光：HBs 抗原・HBs 抗体. 日本臨床 53, 241-246, 1995.
6. Lindh, M., Gonzalez, J. E., Norkrans, G., Horal, P.: Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon. J. Virol. Methods 163 - 174. 1998.

C 型肝炎

1. Uyttendaele S, Claeys H, Mertens W, Verhaert H and Vermeylen C: Evaluation of third-generation screening and confirmatory assays for HCV antibodies. Vox Sang 66, 122-129, 1994.
2. 石川和克：抗体測定法. 肝胆膵 43 (5), 669-675, 2001.
3. Ravaggi A, Biasin MR, Infantolino D and Cariani E: Comparison of competitive and non-competitive reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the quantification of hepatitis C virus (HCV) RNA. J. Virol. Methods 65, 123-129, 1997.
4. 八橋 弘、矢野右人：各種 HCV-RNA 定量法. 肝胆膵 43 (5), 683-688, 2001.
5. Urdea MS, Warner BD, Running JA, Stempien M, Clyne J and Horn T: A comparison of non-radioisotopic hybridization assay methods using fluorescent, chemiluminescent and enzyme labeled synthetic oligodeoxyribonucleotide probes. Nucleic Acids Res. 16, 4937-4956, 1988.
6. 吉澤浩司：肝がんの発生予防に資する C 型肝炎検診の効果的な実施に関する研究. 平成 13 年度厚生科学研究費補助金、中間報告書.
7. 小原道法：ウイルス感染の診断および遺伝子型分類. C 型肝炎—HCV 解明から IFN 療法の実際—. メジカルビュー社、pp.68-74, 1994.
8. 石川和克、佐藤俊一：市販 HCV 抗体測定法の開発動向. 日本臨床 53, 203-211,

1995.

9. Garson JA., Preston FE, Makris M, Tuke P, Ring C, Machin SJ, Tedder RS: Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus. *Lancet* 336: 878–879, 1990.
10. Zaaijer H.L., Cuypers HT, Reesink HW, Winkel IN, Gerken G, Lelie PN.: Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet* 341: 722–724, 1993.

D 型肝炎

1. Bonino, F., Smedile, A. Delta agent (type D) hepatitis. *Semin. Liver Dis.* 6: 28 –33. 1986.
2. 岡本 貢、小俣政男 : D 型肝炎、臨床とウイルス増刊、pp. 279 –281. 1995.
3. 井上長三、矢野右人 : デルタ肝炎ウイルス(HDV)マーカー、日本臨床増刊、pp. 356 – 358. 1999.
4. 鵜沼直雄 他 : δ 抗体持続陽性患者の10年間にわたる長期観察. *肝臓* 26: 540. 1985.

E 型肝炎

1. Li T-C, Takeda N, Miyamura T: Oral administration of hepatitis E virus like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *Vaccine* 19: 3476–3484. 2001.
2. Li T-C, Shinzawa H, Ishibashi M, Sata M, Kiso K, Mast EE, Miyamura T, Takeda N: A Empty Virus-like Particle-based Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Antibodies to Hepatitis E Virus. *J. Med. Virol.* 62: 327–333. 2000.
3. Xing L, Kato K, Li T, Takeda N, Miyamura T, Hammer L, Cheng H: Self-assembled recombinant hepatitis E virus particle is a T=1 dual-

domain capsid presenting native virus epitopes. *Virology* 265: 34-45. 1999.

4. Li TC, Yamakawa Y, Suzuki K, Tatsumi M, Razak MA, Uchida T, Takeda N, Miyamura T: Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* 71: 7207-13. 1997.

V. 問い合わせ先

A型肝炎：国立感染症研究所ウイルス第二部第五室（米山 徹夫）

Tel 042-561-0771

Fax 042-561-4729

B型肝炎，C型肝炎，D型肝炎：

国立感染症研究所ウイルス第二部第四室（鈴木 哲朗）

Tel 03-5285-1111

Fax 03-5285-1161

E型肝炎：国立感染症研究所ウイルス第二部第一室（武田 直和）

Tel 042-561-0771

Fax 042-561-4729

VI. 執筆者一覧

戸塚 敦子	前国立感染症研究所ウイルス製剤部
吉澤 浩司	広島大学大学院医歯薬学総合研究科
茶山 一彰	広島大学大学院医歯薬学総合研究科
大石 和佳	広島大学大学院医歯薬学総合研究科
武田 直和	国立感染症研究所ウイルス第二部
李 天成	国立感染症研究所ウイルス第二部
鈴木 哲朗	国立感染症研究所ウイルス第二部

オ ウ ム 病

オウム病検査マニュアル

目 次

I. オウム病の概説

II. 血清抗体測定法

1. 各特異血清抗体測定法について
2. micro-immunofluorescence test : micro-IF 法
 - 1) 使用抗原
 - 2) 抗原の調整・精製
 - 3) 試薬・器具・機器
 - 4) 検査手順
 - 5) 判定法

III. 病原体検出法

1. 検査の進め方
 - 1) 検体採取・輸送・保存方法
 - 2) 検体の調整
2. 分離培養法
 - 1) 培養細胞の維持
 - 2) 検体の輸送・保存に用いる試薬等
 - 3) 分離操作手順・判定法
3. 抗原検出法
 - 1) 直接蛍光抗体法 (DFA) による染色
 - 2) 市販のクラミジア抗原検出キットの応用
4. 遺伝子検出法
 - 1) PCR 法

IV. 引用文献

V. 検査依頼及び連絡先

VI. 執筆者一覧

I. オウム病の概説

オウム病は、オウム病クラミジア (*Chlamydia psittaci* 以下 *C. psittaci*) による人獣共通感染症で、主に感染鳥の排泄物中の *C. psittaci* を吸入したり、ときに口移しの給餌などにより感染する。多くは家庭での愛玩鳥からの感染例で、鳥との関連が疑われた報告例の半数以上がインコ類からと推測されている。家族が同時に感染し発症する家族内発生もしばしば認められ、さらに最近、飼育施設での集団発生も報告されている¹⁾²⁾。本来、鳥類は健康鳥でも 2 割程度は *C. psittaci* を保菌しているとされ、野生鳥も高率に保菌していることが知られている³⁾。

ヒトが感染すると 7～10 日後に突然の発熱で発症する。軽症の気道感染から肺炎などの呼吸器感染症や、髄膜炎、ショック、DIC まで多様な病態を呈する。中等症までの非定型肺炎と原因菌不明の重症肺炎では、必ず鑑別に入れ、問診にてトリとの飼育歴を聞く必要がある。治療が遅れると致死的になることもあり注意すべき疾患である⁴⁾。

オウム病の発生状況については、感染症法施行前は定点報告疾患の「異型肺炎」の中に一括されていたため、その実態は不明であった。感染症法施行後、4 類感染症の全数報告となり 1999 年 (14 週以降) 23 例、2000 年 18 例、2001 年 36 例、2002 年は集団発生の影響もあり 55 例と増加した²⁾。ただし、実態はさらに多いのではないかと推察される。

感染症発生動向調査ではオウム病の報告の基準を、①病原体の検出：痰、血液、剖検例では諸臓器などからの病原体の分離など、②病原体の遺伝子の検出：PCR 法、PCR-RFLP 法など、③病原体に対する抗体の検出：間接蛍光抗体 (IF) 法で抗体価が 4 倍以上 (精製クラミジア粒子あるいは感染細胞を用いた場合は、種の同定ができる) など、としている⁴⁾。患者咽頭材料やトリからの *C. psittaci* 分離は可能であるが、細胞培養を必要とすることや、実験室内感染防止の観点から、実施できる施設は限られている。PCR による遺伝子検出についてもキットなどの開発はなされていない。報告例の診断方法をみると、その大半が補体結合反応 (オウム病 CF) による血清診断でなされており、十分とはいえない。今後はより正確なオウム病の診断と実態把握のため、また特に集団発生が疑われた場合には micro-IF での *C. psittaci* 特異抗体測定や、病原検索などによる確定診断が求められることが想定される。

以上の現状から、本症の診断について地方衛生研究所並びに国立感染症研究所が担うべき役割は大きい。本マニュアルではこれらの現状を踏まえて、国立感染症研究所での施行方法などを紹介しつつ記述した。

Ⅱ. 血清抗体測定法

1. 各特異血清抗体測定法について

オウム病の血清診断では、従来から主としてクラミジア属抗体を検出する補体結合反応(complement fixation :CF 法)が用いられてきた。しかし実際にはクラミジア属共通抗原であるリポ多糖体(LPS)を抗原に用いているので、*C. trachomatis* や *C. pneumoniae* など他のクラミジアの急性感染や感染既往でもしばしば陽性となり、*C. psittaci* 感染を特定することはできない。したがってオウム病の血清診断では、より正確な診断のため、*C. psittaci* 特異抗体の判定が可能な間接蛍光抗体法(IF 法)を用いる必要がある。これらの IF 法にはクラミジア基本小体粒子を用いる micro-immunofluorescence test : micro-IF 法と、感染細胞を用いる microplate immunofluorescence antibody technique:MFA 法がある。MFA 法は各クラミジアに対する抗体価の比較によって感染種の同定がある程度可能で簡便であるが、一般には普及していない。本マニュアルでは、クラミジア種特異性の血清抗体が測定できる標準法の micro-IF 法について紹介する。より詳細な内容は微生物検査必携⁵⁾を参考にしていきたい。

2. micro-immunofluorescence test : micro-IF 法

Wang らによって開発された micro-IF 法は、クラミジア抗体測定の標準法とされる。通常は *C. psittaci* *C. pneumoniae* の 2 種に *C. trachomatis* 血清型グループ 3 抗原を加えた 5 抗原を点置して測定を行う。しかしオウム病の血清診断では、種特異抗体の判定が可能であれば特に問題ないので、抗原を 3 種用いる簡便法で十分である。

1) 使用抗原

簡便法としての 3 種の抗原はたとえば *C. trachomatis* では L2 株 (L2/434/Bu) あるいは D 株などの血清型株で代表させることができ、*C. pneumoniae* では TW-183 株 (TWAR 標準株)、あるいは KKpn-1 株 (本邦臨床分離株) などでも可能で、*C. psittaci* では Califolnia10 株あるいは Budgerigar No. 1 株などを利用する。

- ・ *C. trachomatis* L2 株 (L2/434/Bu) あるいは D 株
- ・ *C. pneumoniae* TW-183 株 (TWAR 標準株) あるいは KKpn-1 株などの国内分離株
- ・ *C. psittaci* Califolnia10 株あるいは Budgerigar No. 1 株

2) 抗原の調整・精製

抗原の調整・精製は実験室内では通常困難なので、Washington Research

Foundation (Seattle, WA, USA) から調整済みのものを購入するか, 国立感染症研究所から分与を受ける. 以下に感染研で行っている抗原の調整・精製法を示す. 分離培養法に準じて, 組織培養用マイクロプレートのウェル内に感染させた各クラミジアを, あらかじめ入れておいたマイクロカバーグラスを染色するか, 細胞を白金耳で掻き取って固定染色して, 封入体の出来具合を観察する. 80%以上の細胞に封入体が形成されていれば十分抗原量が得られる. 培養液を除去し, 感染細胞をラバーポリスマンではがし, PBS (-) を少量加えて回収しチューブに集める. 細胞浮遊液を超音波処理(カップホーン型にて冷水中で 30 秒程度パルス)し, 感染細胞の封入体を破壊する. 超音波処理した細胞浮遊液を 1500rpm, 10 分遠心して, 細胞成分を落とす. (全体の液量が多い場合は上清をチューブに移し, 15,000rpm, 30 分間超遠心し濃縮した上で沈渣に PBS を加えてよくピペッティングし回収するという操作を加えてもよい.) 回収液を 10ml の 30~35% ウログラフィンに重層して 19,000rpm, 40 分間遠心する. 得られた沈渣は 20ml の PBS に浮遊させ 15,000rpm, 30 分間遠心洗浄 2 回した後, 3ml の 0.02%ホルマリン PBS を加え固定し, 浮遊させてこれを抗原液とする. 抗原液の濃度は一部を採って DFA 染色し, EB 数をカウントしておよそ $1 \times 10^8 \sim 9$ /ml となるように調整し, 小分けして 4℃に冷蔵保存する.

*ホルマリン固定するまでは感染性があるので, 必ず安全キャビネット内で操作する.

3) 試薬・器具・機材

①試薬

- ・ 3%孵化鶏卵卵黄囊乳剤 (normal yolk sac:NYS)
- ・ PBS (-)
- ・ FITC 標識抗ヒト IgG, A, M 抗体 (goat)
- ・ リウマチ因子除去剤 (RF-Absorbent: デイドベ어링社)
- ・ Tween20
- ・ 無蛍光グリセリン
- ・ アセトン

②器具・機材

- ・ コニカルチューブ 1.5ml
- ・ 無蛍光ガラススライドあるいはマルチウェル・スライドグラス (15 穴 4mm 径などでアセトン固定に耐えうるもの)
- ・ Dip ペン先 (ピンセットにワッシャーで固定するとよい)
- ・ V 型ディスポマイクロプレート (血清希釈用)

- 100 μ l 可変ピペッター
- 10 μ l 可変ピペッター
- 白金耳
- 湿潤箱
- カバーガラス 24 mm×50 mm
- アセトン固定用のガラス容器
- 洗浄用ビーカーまたはカップ
- 37°C インキュベーター

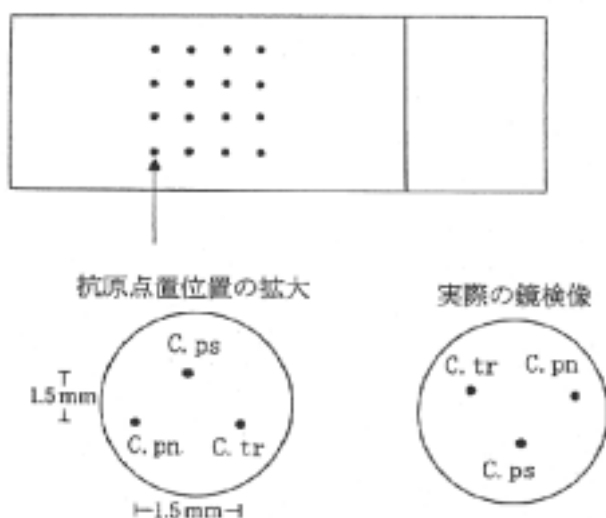
4) 検査手順

① 抗原スライドの作製

- 抗原液（ホルマリン固定済み 3 種 *C. trachomatis* : *C. tr* , *C. pneumoniae* : *C. pn*, *C. psittaci* : *C. ps* ）をそれぞれ Vortex または数秒間超音波をかけ，EB 粒子の均等浮遊液とする．抗原液を使用直前に 3% 孵化鶏卵卵黄囊乳剤（NYS）と約 1 : 1 に混合したものをスライドガラスに点置する．
 - 無蛍光スライドあるいはマルチウエル・スライドガラス（15 穴など）は前もってアセトンで油膜等を洗浄しておくか，軽くバーナーであぶり表面の汚れを除去すると抗原が定着しやすい．
 - ピンセットに固定した Dip ペン先で 1 つの抗原に対して 1 つのペン先を用い，ペン先を軽く抗原液に浸して点置部位のガラス面にそっと触れる程度にして点置していく．左下が *C. pn*，右下が *C. tr*，中央上が *C. ps* などと決めておくとうい．（鏡検では中央下が *C. ps*，左上が *C. tr*，右上が *C. pn* と見える．）各抗原は乾くと白く見える．お互いが接触しないように注意する．
- 点置した抗原が乾燥したら，アセトンにつけて 15 分間室温で固定し，自然乾燥させる．スライドガラスはアルミホイルなどで密封し -70°C に保存する．

図に抗原点置法と観察時の鏡検像を示す．

図 抗原点置法と観察時の鏡検像



②抗体反応

- 被検血清（3種クラミジアの陽性コントロール血清も含めて）をV型ディスポマイクロプレート等にて2倍段階希釈する。ピペッターでまず血清 $10\mu\text{l}$, PBS (-) $150\mu\text{l}$ で16倍希釈を作り、以後その $100\mu\text{l}$ とPBS (-) $100\mu\text{l}$ で2倍段階希釈系列を1024倍まで作る。IgMはリウマチ因子を保有していると偽陽性にでることがあるので、IgM用血清はリウマチ因子除去剤(RF-Absorbent: デイドベアリング社)で前処理して測定する。血清 $10\mu\text{l}$ + 0.1% Tween20-PBS $60\mu\text{l}$ + RF-Absorbent $10\mu\text{l}$ でまず8倍希釈を作り、15分室温で反応させた後、PBSで128倍希釈系列を作る。
- 抗原点置したスライドグラスに被検血清をのせていく。血清は白金耳かピペッターでのせていくとよい。高い希釈列(薄い方)から血清を $1\sim 3\mu\text{l}$ ずつ抗原点置部位にのせていく。
- 血清をのせたスライドグラスは、湿潤箱に入れて 37°C 30分間インキュベートする。
- スライドグラスをPBS (-) の入った容器に浸してゆっくり上下して、血清を洗い落とす。PBS (-) 2回, 蒸留水1回を通し、自然乾燥させる。
- 二次抗体 (FITC 標識抗ヒト IgG, A, M 抗体など) を $1\sim 3\mu\text{l}$ ずつ各抗原点置部位にのせていく。
- 湿潤箱に入れて 37°C 30分間インキュベートする。
- 洗浄し水を切り自然乾燥後、無蛍光グリセリンを各穴にのせていき、カバーグラスをかけて封入する。
- 蛍光顕微鏡で観察する。まず低倍率 (100倍) で抗原点置部位を探し、200~400

倍でクラミジア EB 粒子の蛍光を観察する.

5) 判定法

EB 粒子が一様に特異蛍光を発している場合のみ陽性とする. それぞれの抗原に対して陽性と判定した最高希釈倍数をもって抗体価とする. 蛍光抗体法による判定は観察者の主観に頼るところが大きく, 判定には熟練を要する. したがって常に陽性コントロール血清を加えて検査を行う.

Micro-IF の判定基準

陰性: IgG 16 倍未満

抗体保有 (感染既往): IgG 16~256 倍

急性感染: 単独血清で IgG 512 倍以上あるいは, IgM 16 倍以上

: ペア血清で IgG 4 倍以上の上昇

血清診断では原則としてペア血清での 4 倍以上の上昇を急性感染の確定的な基準とする. できる限り急性期と 3 週間程度の間隔をおいた回復期のペア血清での判定が望ましい. ただし, 診断はあくまでも病原体検出法の結果や臨床像と合わせて総合的に行う必要がある.

Ⅲ. 病原体検出法

1. 検査の進め方

病原体検出法には分離培養, 抗原検出法, 遺伝子検出法などの種々の検出法がある. ヒトからの検体は鼻咽腔・咽頭スワブ, 喀痰, 血液, 剖検組織などが用いられるが, 通常は鼻咽腔・咽頭スワブが主に利用される. 感染源として疑われるトリからは, 生きたままであれば総排泄口スワブや糞便, 死亡個体からは肝臓, 脾臓, 肺, 腸管などが用いられる.

1) 検体採取・輸送・保存方法

材料としてヒト鼻咽腔・咽頭スワブ, トリ総排泄口スワブ, トリ糞便, トリ臓器などを用いる. 採取にはいずれもマスク, 手袋を着用するなどして感染予防に努める.

①ヒト鼻咽腔・咽頭スワブ

滅菌綿棒を鼻咽腔あるいは咽頭後壁にあてて, 回転させて採取する. PCR 用はドライのまま, 分離用は輸送培地入りのプラスチックチューブに入れ, 輸送する. 長期保存する場合は -80°C に凍結保存する.

②トリ総排泄口スワブ

トリを保持固定し, 滅菌綿棒を総排泄口に挿入し, 回転させて採取する. スクリューキャップ付きの容器に移す. 輸送・保存条件は同上.

③トリ糞便

できる限り新鮮な便をディスポのヘラ等で採取し, スクリューキャップ付きのプラスチック容器に移す. 輸送・保存条件は同上.

④トリ臓器

死亡個体は冷蔵で速やかに輸送し, すぐに解剖しない場合は冷凍保存する. 解剖では, 肝臓, 脾臓等の腫脹の有無など肉眼的観察後, 臓器を摘出する. 操作はすべて安全キャビネット内で行いバイオハザードに注意する.

2) 検体の調整

操作については実験室内感染に注意する.

①ヒト鼻咽腔・咽頭スワブ

分離用には, 輸送液とスワブが入っているチューブに十分な Vortex をかけ, スワブをチューブの内壁で絞って抜き取った後, 低速遠心し (1000~1500rpm、5 分程度), 上清を回収する. この回収した上清を分離材料とする. PCR 用には, スワブが入っているチューブに滅菌した PBS 約 2ml を入れ, 十分 Vortex をかけ, 低速遠心し (1000~1500rpm、5 分程度), 上清を回収する. この回収した上清を DNA 抽

出材料とする.

②トリ総排泄口スワブ

鼻咽腔・咽頭スワブと同様に調整する.

③トリ糞便

糞便検体は溶けやすい場合, 滅菌 PBS を加え Vortex をして, 1000~1500rpm 5 分程度低速遠心した後, 上清を回収する. この回収した上清をさらに 15000rpm 30 分程度遠心し, 沈渣を分離または DNA 抽出材料とする. 乾燥糞便で Vortex のみでは解けにくい場合, 10~20% 乳剤を作成した後, 低速遠心後, 同様に処理し, 分離用または DNA 抽出材料とする. 乳剤作成にはホモジナイザー (滅菌済み) を用いるとよい.

④トリ臓器

特に肝臓, 脾臓での陽性率が高いので, これらを小片にして滅菌 PBS を加えて 10~20% 乳剤を作成した後, 低速遠心後, 上記と同様に処理し, 分離用または DNA 抽出材料とする.

2. 分離培養法

分離培養は感染性の有無を確定できる方法であるが, 実施に特別な施設や経験を要すること, またバイオハザードの観点からも習熟した施設以外で行うことは困難である. 施行する場合は P2 レベルにて安全キャビネット内で取り扱う. また大量培養を行う場合は P3 レベルとなる.

培養方法は基本的には他のクラミジアと同様であるが, 使用細胞や培養時間, 遠心吸着の効果の有無などが異なる. 培養時間は, *C. psittaci* は他のクラミジアに比べて短く, 固定あるいは継代するサイクルは 48 時間程度である.

1) 培養細胞の維持

HeLa229 細胞 (子宮頸癌由来) や McCoy 細胞 (マウス Fibroblast) を用いる. 培養細胞がフラスコ底面に隙間なく付着しているものを用意する. 分離培養を成功させるためには良好な状態の培養細胞の継代維持が不可欠である.

①培養継代維持試薬

- ・細胞増殖用培養液 (Eagle' sMEM+FCS10%)
- ・ EDTA トリプシン PBS (-) 液
0.02% EDTA 0.25% trypsin in PBS (-)

②器具・器材

- ・密閉型キャップフラスコ (小) 50ml 組織培養用
- ・ 5ml 綿栓付ディスポピペット
- ・ 中試験管 4 本

- ・試験管立て（斜台：試験管を斜めに立てるように固定したもの）
- ・バーナー
- ・37℃インキュベーター

2) 検体の輸送・保存に用いる試薬等

①輸送保存液：SPG (sucrose phosphate glutamate)

Sucrose	75.0g
KH ₂ PO ₄	0.52g
K ₂ HPO ₄	1.22g
Glutamic acid	0.72g

これを蒸留水に溶解して 1000ml とする. pH を 7.4～7.6 に調整し濾過滅菌後, 抗菌薬を添加し 1ml ずつ滅菌試験管に分注し, これに滅菌ガラスビーズ（直径 0.5mm, 0.5g）を入れたものを臨床の現場に 4℃で常備しておくといよい.

②抗菌薬

検体は通常, 細菌や真菌などでかなり汚染されているため, 抗菌薬を SPG や分離用培養液に加える必要がある. (ただし, クラミジアの増殖を妨げないもの) 組み合わせの一例を示す.

gentamicin (GM)	最終濃度 10 μg/ml
vancomycin (VCM)	最終濃度 100 μg/ml
amphotericin B (AMPH)	最終濃度 2 μg/ml

③クラミジア分離用培養液

細胞増殖用培養液に抗菌薬を加えたものに, クラミジアの増殖を促進するため, 蛋白合成阻害剤シクロヘキシミド (cycloheximide) を最終濃度 1 μg/ml になるように添加する.

④その他の試薬

- ・99%エタノール, あるいはメタノール（以下, 分離同定用の試薬）
- ・PBS (-)
- ・クラミジア属特異性 LPS モノクローナル抗体：クラミジア FA 試薬「生研」（デンカ生研）
- ・*C. trachomatis* 特異モノクローナル抗体：MicroTrak（マイクロトラック, デイドベ어링社）
- ・*C. pneumoniae* 特異モノクローナル抗体：RR-402, IMAGEN など
- ・無蛍光グリセリン

⑤器具・器材

- ・24 穴マルチウエルプレート
- ・マイクロカバーガラス 14 丸（径 14mm）
- ・スライドガラス蛍光顕微鏡用
- ・湿潤箱
- ・Vortex ミキサー
- ・超音波破碎器（安全性のためカップホーン型が望ましい）
- ・低速遠心機
- ・プレート遠心機（プレート用ローター付き）
- ・5%CO₂ インキュベーター
- ・蛍光顕微鏡（落斜型）

3) 分離操作手順・判定法

平底ガラスチューブによる方法と、プラスチックのマルチウエルプレートを使用する方法があるが、ここでは後者を使用した場合の解説をする。

①細胞の用意

24 穴マルチウエルプレートの各穴にマイクロカバーガラスを入れ、 $1.5 \sim 2.0 \times 10^5/\text{ml}$ の濃度に調整した培養細胞浮遊液を 1ml ずつ分注する。5% CO₂ インキュベーター内で 24～48 時間培養し、単層シートを形成させておく。

②検体接種液の用意

前述の如く調整した分離用検体を接種に用いる。

③接種

プレートの各穴の培養液をスポイトで除去し、検体接種液上清を 0.25～0.5ml 接種する。

④遠心吸着

プレート遠心機で 2000 回転(900G)1 時間室温で遠心吸着を行う。引き続き 35℃の CO₂ インキュベーター内で 1 時間静置し追加吸着させる。プレート遠心機が無い場合は、接種液をときどきキルティングしながら 2 時間インキュベーター内で静置吸着させる。

⑤分離用培養液への交換

接種液をスポイトで除去し、抗菌薬とシクロヘキシミドを含む分離用培養液を 1ml 分注する。37℃の CO₂ インキュベーターで 72 時間培養する。

⑥分離株の検出

プレートの各穴の分離用培養液をスポイトで除去し、滅菌ビンへ破棄する。99%エタノールを各穴に約 1ml 分注してマイクロカバーガラスを 10 分間固定する。エタノールを除去後、ピンセットでマイクロカバーガラスを取り出しカップに入った PBS につけて洗浄し、風乾する。モノクローナル抗体（クラミジア

FA) を 1 滴置いて、その上にマイクロカバーグラスを細胞面を下にして伏せて湿潤箱にて 37℃30 分間染色する. マイクロカバーグラスはカップに入った PBS と蒸留水につけて洗浄し風乾後、スライドグラスにのせたグリセリンの上に伏せて（細胞面が下）封入する. 蛍光顕微鏡 UV 励起で封入体を観察する.

⑦分離株の同定

クラミジア属特異性モノクローナル抗体（クラミジア FA）では 3 種すべて染色される. はじめに、これを用いてクラミジアの存在の有無をみて陽性であれば、さらに種特異性のモノクローナル抗体で同定するようにすると無駄が少ない. *C. psittaci* に特異的なモノクローナル抗体はキットとしてはないので、クラミジア FA 陽性, *C. trachomatis* 特異モノクローナル抗体陰性, *C. pneumoniae* 特異モノクローナル抗体陰性のものを *C. psittaci* と同定する. (表 1 参照)

表 1 染色法による分離株の同定

染色法	<i>C. trachomatis</i>	<i>C. psittaci</i>	<i>C. pneumoniae</i>
クラミジア FA	+	+	+
RR-402	—	—	+
Chlamydia-Cel Pn	—	—	+
IMAGEN	—	—	+
MicroTrak	+	—	—
ヨード染色	+	—	—
Giemsa 染色	+	+	+

⑧第 2 代継代以降の培養

初回培養で 48 時間培養したプレートのウェルの培養液を除去し, SPG を 0.5ml 入れる. 感染細胞をラバーポリスマンではがし、その液を回収する. (ラバーポリスマンの代用として細かく切ったシリコンラバー片を滅菌しておいて、ピンセットではさんだラバー片ではがす方法も可能. ただし 1 ウェルはがす毎にバーナーでピンセットは滅菌する.) あとは、初回培養検体接種液の用意をした時と同様、超音波破碎、遠心した上清を接種液とし、その後は初代同様の手順で継代を行う. 陰性の場合でも、3 代までは継代を行って判定する.

3. 抗原検出法

1) 直接蛍光抗体法 (DFA) による染色

クラミジア属特異性のモノクローナル抗体としてクラミジア FA (デンカ生研) が市販されている. 濃厚な感染の場合に感染部位を擦過したスワブで抗原陽性を確認する場合や、分離の確認に封入体を染色する場合は非常に有用である. 手

技としては、スワブにて採取した検体をスライドグラスに塗末し、アセトンで 10 分間固定をする。細胞外に出た EB 粒子はアセトンで固定をしないと、エタノールやメタノール固定では染まりが悪い。風乾した後、クラミジア FA で 30 分間染色して、軽く水洗しグリセリンを滴下後、カバーグラスをかけて蛍光顕微鏡下で観察する。アップルグリーンに染まるクラミジア粒子が観察されれば陽性である。しかし主観が入りやすく、特異的に蛍光を発する抗原を確実に判定するためには、ある程度経験を要し、通常のスクリーニング検査として用いる場合や、多数検体の迅速な検査には適さない。

2) 市販のクラミジア抗原検出キットの応用

ELISA 法を用いたクラミジア属特異性検出キットであるイデアクラミジア PC(協和メデックス)、及び免疫クロマトグラフィーを用いたクリアビュー(関東化学)などの市販キットは、基礎的検討では *C. psittaci* 検出は可能であり、臨床でもオウム病におけるヒト検体からの *C. psittaci* 検出がある程度可能との報告がみられる。ただし我々が市販抗原検出キットを用い、トリの総排泄口スワブ、糞便からの検出を検討した成績では、感度、特異性ともに十分とは言えず、現状の使用法ではトリの検体については推奨しない²⁾。クリアビューでは土壌成分の混入で偽陽性が高率に認められたため、糞便では不适当と考える。

4. 遺伝子検出法

1) PCR 法

感度や特異性に優れている。方法としては DNA 抽出を行い、*C. psittaci* に特異的なプライマーを用いて PCR を行う。DNA 抽出については、抽出キットが市販されているので利用すると良い。PCR は種々のプライマーが報告されているので、その方法に準じて行う⁵⁾⁶⁾。(具体的な方法は後述の参考例を参照) 属特異的なプライマーを用いて PCR を行った後、制限酵素切断によるパターンで確認を行う方法や、nested PCR を用いるものなどがある。なお糞便では、インヒビターによる偽陰性の可能性も高くなることに注意する。参考として感染研で用いている方法を以下に紹介する。

・ DNA 抽出

PUERGENE™DNA 抽出キットを使う場合の手順を述べる。500 μ l 検体を 1500 μ l マイクロチューブに入れ 15,000rpm で 30 分遠心する。上清を抜き、300 μ l Cell Lysis Solution および 3~4 μ l Proteinase K Solution を入れ、十分に Vortex して沈殿を浮遊させる。56℃で一晩インキュベートした後、室温まで冷やす。100 μ l Protein Precipitation Solution を加え、20 秒激しく Vortex し、氷中

に少なくとも 15 分置く. 15, 000rpm で 10~15 分遠心し, 上清を新しい 1500 μ l マイクロチューブに移す. 300 μ l 100% Isopropanol (2-propanol) を加え, 50 回程度転倒混和した後, 室温で 15 分以上インキュベートする. 15, 000rpm で, 5 分間遠心して上清を抜き, 300 μ l 70% Ethanol を入れる. 再び 15, 000rpm, 5 分間遠心し, DNA を失わないように丁寧に上清を完全に抜きとり, 約 10~15 分乾燥させる. 20~50 μ l DNA Hydration Solution を入れ, Vortex し, 65°C で 1 時間インキュベートし PCR 用 DNA とする.

・プライマー

プライマーは, 1st PCR に Yoshida ら⁶⁾の CM1/CM2 を用いている.

プライマー1 : CM1 CAGGACATCTTGTCTGGCTT
CM2 CAAGGATCGCAAGGATCTCC

PCR 反応液 (50 μ l / sample) :

10×PCR Gold Buffer	5 μ l
dNTP Mix (2mM each dNTP)	5 μ l
25mM MgCl ₂ Solution	3 μ l
プライマー CM1 (40pmol/ μ l)	0.5 μ l
プライマー CM2 (40pmol/ μ l)	0.5 μ l
AmpliTaq Gold (5U/ μ l)	0.25 μ l
DW	30.75 μ l
Sample	5 μ l

・結果判定

1.5%Gel を作成し, PCR の産物を 10 μ l/well 点注して 100mV, 25 分間電気泳動する. Gel を Ethidium bromide (1.5mg/L) に入れ, 1 時間染色し判定する. 261bp のバンドを呈したものをクラミジア遺伝子陽性と判定する.

陽性の場合, さらにその PCR 産物を制限酵素で切断し, **表 2** に示すように切断パターンで種の特定制を行う⁶⁾. このプライマーのほかに制限酵素切断を要しないプライマーも報告されており, 利用可能である⁷⁾.

表 2 CM1/2 にて増幅されたクラミジア 3 種の制限酵素切断サイズ

<i>Chlamydia</i> spp.	bp	<i>Alu</i> I (bp)	<i>Pvu</i> II (bp)
<i>C. trachomatis</i> L2	245	90, 89, 66	245
<i>C. psittaci</i> 6BC	259	190, 69	189, 70
<i>C. pneumoniae</i> TW-183	258	199, 59	258

IV. 引用文献

- 1) 福士秀人: *Chlamydia psittaci* 感染症の現状と問題点. クラミジア・ニューモニエ感染症の現状と対策. 千葉峻三、沼崎 啓編, ライフサイエンス・メディカ, 東京, p194-200, 1997.
- 2) 病原微生物検出情報 (IASR) Vol. 23, No. 10, 2002.
- 3) 三宅恭司 他: 鳥類のオウム病に関する研究 (第Ⅲ報)-公園, 寺院等のハト糞便からの *Chlamydia psittaci* の分離-感染症誌. 60:473-477, 1986.
- 4) 岸本寿男: オウム病 感染症の診断・治療ガイドライン, 日本医師会雑誌. 122, 94-95, 1999.
- 5) 厚生省監修: クラミジア, ウイルス・クラミジア, リケッチア検査, 第Ⅲ分冊, 各論 2, 微生物検査必携, 1987.
- 6) Yoshida H, et al.: Differentiation of *Chlamydia* species by combined use of polymerase chain reaction and endonuclease analysis. Microbiol Immunol. 42:411-414, 1998.
- 7) Messmer TD, et al.: Application of a nested, multiplex PCR to psittacosis outbreaks. J Clin Microbiol. 35:2043-2046, 1997.

V. 検査依頼及び連絡先

162-8640

東京都新宿区戸山 1-23-1

国立感染症研究所ウイルス第一部 第五室

岸本寿男

Tel:03-5285-1111(内 2534)

Fax:03-5285-1208

e-mail:kisimoto@nih.go.jp

VI. 執筆者一覧

岸本寿男:国立感染症研究所ウイルス第一部

上野美知:和歌山市衛生研究所微生物学担当

大友良光:青森県環境保健センター微生物部

長 則夫:栃木県保健環境センター

回 歸 熱

回帰熱

目 次

I. 概説

臨床症状

病原体ボレリア

病原体診断

治療・予防

媒介動物

II. ボレリアの分離培養法

作業上の一般的注意

ボレリアの培地製法 (BSK-II 培地)

生体試料からの分離培養

病原体輸送法

血清、髄液、穿刺液の輸送法

病原体保存方法

III. 抗原の検出

IV. 病原体の同定

V. 参考文献

VI. 検査依頼先

VII. 執筆者

I. 概説

回帰熱 (Relapsing fever) は、齧歯類小動物、鳥類等を保菌動物とし、野生のダニ（オルニソドロス属ダニ）やシラミによって媒介される細菌（スピロヘータ）感染症である。アメリカ大陸、アフリカ、中東、欧州の一部で患者の発生が報告されている。本邦では、戦後の混乱期に発生したといわれているが、少なくともここ数十年、患者の報告はなされていない。

【臨床症状】

菌血症による発熱期、及び感染は持続しているものの、菌血症を起こしていない状態（無熱期）を数回繰り返す、いわゆる回帰熱が臨床上見受けられる。致死率は、治療を行わない場合、病原体の種類や健康状態等によっても異なるが、数%-30%といわれている。

〔発熱期〕感染後 5-10 日を経て菌血症による頭痛、筋肉痛、関節痛、羞明、咳などをともなう発熱、悪寒がみられる。またこのとき髄膜炎、点状出血、紫斑、結膜炎、肝臓や脾臓の腫大、黄疸がみられることもある。発熱期が 3-7 日続いた後、一旦解熱し無熱期に移行する。

〔無熱期〕無熱期では血中からは菌は検出されない。この時期、発汗、倦怠感、時に低血圧症や斑点状丘疹をみることもある。抗生剤による治療を行わなかった場合この後 5-7 日後再び発熱期にはいるとされる。

上記症状以外で肝炎、心筋炎、脳出血、脾臓破裂、大葉性肺炎などがみられる場合もある。

【病原体ボレリア】

回帰熱病原体であるボレリアは少なくとも十数種類が確認されている。これらボレリアはいずれもダニ媒介性或いはシラミ媒介性で、ダニ媒介性回帰熱の場合、媒介ダニの分布地域と患者発生地域はほぼ一致する。他のボレリア感染症としてライム病がほぼ全世界的に見い出されるが、病原体の種類は回帰熱ボレリアとは異なる。

【病原体診断】

回帰熱は感染症法での 4 類感染症に含まれ、全数報告が義務づけられている。

〈報告のための基準〉

診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ以下のいずれかの方法によって病原体診断がなされたもの。

1) 病原体の分離

病原体ボレリアの分離培養には BSK-II 培地が用いられ、発熱期の血液から病原体分離が可能である。

2) 病原体の検出

暗視野顕微鏡による鏡検で、発熱期の血中に病原体が観察できる場合がある。

【治療・予防】

回帰熱には抗生剤による治療が有効である。ダニ媒介性回帰熱の場合は、テトラサイクリンが用いられる。シラミ媒介性回帰熱の場合は、テトラサイクリンとエリスロマイシンの併用、若しくはドキシサイクリンが有効とされている。小児の場合はエリスロマイシンが推奨されている。治療に伴ない Jarisch-Herxheimer 反応が見られることもある。

予防には、媒介ダニ、シラミとの接触を避けることが重要である。保菌ダニが生息する地域では、ダニが生息する洞窟、廃屋などにはなるべく近寄らないこと、また特に渡航中、近くで回帰熱発生の情報を得た場合にはシラミ、ダニ刺咬に注意することが重要であろう。

予防を目的としたワクチンは開発されていない。

【媒介動物】

回帰熱ボレリアは、自然環境に生息するダニ若しくはシラミに咬着されることによって媒介、伝播される。

〈オルニソドロス属ダニ〉 アフリカ大陸、アメリカ大陸、欧州や中近東の一部の自然環境中に見いだされる軟ダニで、一般家庭内に生息するダニとは異なる。本邦で見い出される軟ダニの一種、クチビルカズキダニ、サワイカズキダニが形態学的にオルニソドロス属に分類されるが、国内でも限られた地域でしか確認されていない。これら国内で見いだされる軟ダニのボレリア保有の有無及び伝播能力については不明である。吸血時間は1時間以内といわれ、咬着・脱落后に気がつくことが多いであろう。

〈シラミ〉 ヒト寄生性シラミが媒介すると言われているが、詳細については不明である。一般的にシラミはヒトから吸血するので、吸血されたヒトが回帰熱ボレリアを保有していないかぎり次の感染が起こる可能性は極めて低いと考えられる。本邦ではシラミ刺咬症が多発しているが回帰熱は報告されていないことから、輸入例を除き、国内でのシラミ刺咬による回帰熱は今のところ心配ないと考えられている。

II. ボレリアの分離培養法

【作業上の一般的注意】

P2 実験施設。その他特記なし。

【ボレリアの培地製法 (BSK-II 培地)】

回帰熱ボレリア分離には BSK-II 培地を使用する。

1) A 液、B 液を各々調製する。B 液は Autoclave により滅菌できる。

A 液		特記
蒸留水	up to 500 ml (約 440 ml)	Milli-Q レベル
1N NaOH	10 ml	
HEPES	3 g	
Sodium Dihydrogen Citrate	0.35 g	

D-(+)-Glucose	2.5 g	
N-Acetylglucosamine	0.2 g	
Sodium Pyruvate	0.4 g	
Sodium Bicarbonate	1.1 g	溶液後の分解早い*4
X10 CMRL 1066 without glutamine	50 ml	平成 14 年 7 月現在製造中止
TC Yeastolate	1 g	
BSA, Fraction V	25 g	生化学工業(MILES)*1

以上の試薬を記載順に溶解する。BSA が溶解しにくいのでスターラーで攪拌しながら溶解する。1M NaOH で pH 7.5 に調製。上記量で大まかに pH7.5 程度になる。

B 液		特記
Neopeptone	2.5 g	
Gelatin	7 g	
蒸留水	100 ml	Milli-Q

Autoclave 滅菌。滅菌後、ボトルの冷却をまって、使い捨て吸引ろ過装置（0.22 μ m, 500 ml ないし 1000ml 用、CORNING 等）を装着し、必ず付属のプレフィルターを乗せて、A 液をろ過滅菌する*2。

2) 滅菌済ウサギ血清 (Gibco) *1 を 40 ml (final 約 6%) 添加し、よく混合する。培養液総量は約 640 ml となる。なお、ウサギ血清は 56℃で 30 分間、前処理（非働化）しておく。

3) すべて混和後、37℃で Overnight 加温し、無菌を確認すること*3。BSK-H 培地は Gelatin を加えず、autoclave 滅菌を行わない点で BSK-II 培地と異なる。

4) ヒト皮膚組織からの分離培養には、下記抗生剤を加えることを推奨する。添加量は 1XBSK-II 培地 640ml 当たりの量である。純培養時には下記抗生剤添加は特に必要ない。

32 mg/ml Rifampicin (20% DMSO)	1 ml/640ml
12.8 mg/ml Fosfomycin	1 ml/640ml
0.32 mg/ml Amphotericin B	5 ml/640ml

*1:ウサギ血清（出来れば Young rabbit serum が良い）と BSA のロットがボレリア増殖の良否を左右するようである。あくまでも経験上の話ではあるが、Gibco のウサギ血清と Miles の BSA ははずれが少ない傾向がある。

*2:感染研では、A 液を濾紙、ガラスフィルター、0.65 μ m プレフィルターであらかじめプレ濾過後 Sartorius, Nalgen, Corning, IWAKI の 0.22 μ m 滅菌フィルター (PES) で濾過している。

*3:培地の Quality を確認するには、*Borrelia japonica*、或いは *Borrelia miyamotoi* を接種し増菌が見られればよい。培地による増菌傾向は以下の通りである。生化学的試験による Quality check は出来ない。

*4:保存期間は-20℃で 1 ヶ月程度とされている。これは Sodium Bicarbonate が培地中で

分解されてしまうためであると考えられる。Sodium Bicarbonate を用時調製・混和することで保存期間は延長できるかもしれない。

【生体試料からの分離培養】

分離に用いる生体試料には、血液、髄液などが挙げられる。

血液・髄液からの分離培養

発熱期血液を材料とする。髄膜炎（稀に脳炎）患者髄液からは病原体が分離される場合がある。採取された新鮮体液を培地量の 10 分の 1 程度加え、33-37℃で微好気若くは好氣的に培養する。また、培地接種翌日に継代することで培養率が上昇する場合がある。病原体の確認は暗視野顕微鏡を用いて行う。鏡検で病原体が観察されるまで通常 1-8 週間必要である（8-12h/generation）。汚染菌（含む非運動性螺旋状細菌）の除去には、動物接種法、若くはフィルター法を用いる（詳細はライム病診断マニュアル「生体試料からの分離培養」項参照）。動物接種法では接種後の発熱期に血液採取・培養することで回帰熱ボレリアは回収できる。

【病原体輸送法】

分離材料としての生体試料、或いは病原体を BSK-II 培地にいれ室温で送付。輸送方法は他の病原体輸送方法に準拠。

【血清、髄液、穿刺液の輸送法】

滅菌容器にいれ密栓したものを 4℃で輸送。

【病原体保存方法】

10-20%グリセロール添加後、-80℃で保存。

III. 抗原の検出

全血からの PCR 法が報告されている。Alje らは血清分離チューブ (Vacutainer) を用いて回帰熱属ボレリアの一種 *B. crocidurae* を検出する PCR の系を報告した。一方で *B. crocidurae* は赤血球接着能を有することから、上記方法での検出感度は不十分であるとの意見もある。現在、我々はこれら方法の検証作業を進めており、結果が出次第順次マニュアルに記載する予定である。

参考論文：

- 1) Alje, P.V.D. et al. 1999. Tick-borne relapsing fever imported from West Africa: diagnosis by quantitative buffy coat analysis and in vitro culture of *Borrelia crocidurae*. J. Clin. Microbiol. 37: 2027-2030.
- 2) Burman N, Shamaei-Tousi A, Bergstrom S. 1998. The spirochete *Borrelia crocidurae* causes erythrocyte rosetting during relapsing fever. Infect Immun. 66(2): 815-819.

IV. 病原体の同定

形態学的にはスピロヘータに特徴的な螺旋状を示すが、レプトスピラに特徴的な末端部のフック構造は見られない。培養可能になる以前は、細胞長、径、巻数などでトレポネーマ等と分けられていたが、現在では実際的ではない。また回帰熱ボレリアとライムボレリア間での形態による鑑別はまったく不可能である。ボレリア属の同定方法として、単クローン抗体（H9724）との反応性があげられるが、この抗体 H9724 はライム病ボレリアとも交差反応するため、あくまでも回帰熱ボレリアのみの同定のためには用いることができない。したがって、同定には 16S rRNA 遺伝子や鞭毛遺伝子の塩基配列決定など遺伝学的手法をもちいる。詳細はライム病病原体診断マニュアル、「病原体の同定」項参照。

V. 参考文献

- 1) Barbour, A. G. 1984. Isolation and cultivation of lyme disease spirochetes. Yale J. Biol. Med. 57: 521-525.
- 2) Long SS et al ed. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. Churchill Livingstone, 1067-1069.
- 3) Alje, P.V.D. et al. 1999. Tick-borne relapsing fever imported from West Africa: diagnosis by quantitative buffy coat analysis and in vitro culture of *Borrelia crocidurae*. J. Clin. Microbiol. 37: 2027-2030.
- 4) Burman N, Shamaei-Tousi A, Bergstrom S. 1998. The spirochete *Borrelia crocidurae* causes erythrocyte rosetting during relapsing fever. Infect Immun. 66(2): 815-819.
- 5) Fukunaga M, Okada K, Nakao M, Konishi T, Sato Y. 1996. Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease borreliae. Int J Syst Bacteriol. 46(4): 898-905.
- 6) Cutler SJ, Akintunde CO, Moss J, Fukunaga M, Kurtenbach K, Talbert A, Zhang H, Wright DJ, Warrell DA. 1999. Successful in vitro cultivation of *Borrelia duttonii* and its comparison with *Borrelia recurrentis*. Int J Syst Bacteriol. 49 Pt 4:1793-1799.

VI. 謝辞

本マニュアルを作成するにあたり、ご助言・ご助力を賜りました福山大学・福長将仁博士、栃木保健環境センターの諸先生方に深謝致します。

VII. 検査依頼先

分離培養、分離株同定

国立感染症研究所 細菌第一部 川端寛樹

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

電話 03-5285-1111

ファックス 03-5285-1163

E-mail kbata@nih.go.jp

VIII. 執筆者

国立感染症研究所 細菌第一部 川端寛樹、小泉信夫

狂 犬 病
(rabies)

狂 犬 病 (rabies)

目次

- I 狂犬病と狂犬病検査の概説
 - II 狂犬病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・輸送および保管
 - 1 検査材料の採取において注意すべき点
 - (1) ヒトの材料
 - (2) 動物の材料
 - 2 検査材料の輸送において注意すべき点
 - IV 検査の進め方
 - 1 検査順序
 - 2 狂犬病ウイルス感染の診断基準
 - 3 検査結果の報告
 - V 狂犬病ウイルスの検査方法
 - 1 直接蛍光抗体法
 - 2 RT-PCR
 - 3 ウイルス分離法
 - a) マウス脳内接種法
 - b) 培養細胞接種法
 - 4 免疫組織化学
 - VI 引用文献等
 - VII 検査依頼先
 - VIII 執筆者一覧
- 添付 図1 狂犬病ウイルス検査の概要

I. 狂犬病と狂犬病検査の概説

狂犬病ウイルス

狂犬病ウイルス (Rabies virus) は、ウイルス学的にマイナス鎖 1 本鎖 RNA を有し、ラブドウイルス科リッサウイルス属に分類される。ウイルス粒子は「弾丸」様の特徴的な形態を示す。従来、狂犬病ウイルスは血清学的に単一のウイルスと考えられていたが、最近になって免疫学的・分子生物学的解析により、流行地域や流行宿主に固有の変異株 (variants) が多数存在することが明らかにされている。一方、1960 年代後半にアフリカとヨーロッパおよび 1996 年にオーストラリアで臨床的には狂犬病と診断されたヒトおよび動物から狂犬病ウイルスとは異なるリッサウイルス (Lagos bat virus, Mokola virus, Duvenhage virus, European bat virus 1 & 2, Australian bat virus) が分離された。現在、血清疫学および遺伝子解析の成績により狂犬病ウイルスは 1 型、狂犬病類似 (関連) ウイルスは 2 型から 7 型に分類されている。なお、これらのウイルスは全ての温血動物に感染可能である。

狂犬病ウイルス (街上毒、street strain (野生株)) はバイオセーフティーレベル 3 (BSL3) に分類されており、疑似狂犬病が真性狂犬病と診断された時点あるいは分離ウイルスが狂犬病ウイルスと判定された以降のウイルスの取り扱いは P3 施設で行うこととなる。

疫学的背景

狂犬病は代表的な人獣共通感染症 (動物由来感染症) であり、いったん発症するとヒトも動物も致死性的転帰を示す脳脊髄炎である。本症は世界中の多くの国に常在している狂犬病ウイルスによって引き起こされる。日本は現在まで 1956 年のイヌ 6 頭と 1957 年のネコ 1 頭を最後にヒトおよび動物で狂犬病の報告がない。輸入感染症としては海外でイヌの咬傷を受けて帰国後に狂犬病を発症して死亡したヒトの 1 例が 1970 年に報告されている。現在、狂犬病ウイルスの存在しない国はまれである。毎年 3 万から 5 万人が狂犬病で死亡しており、年間 1000-1200 万人が治療的予防接種 (post-exposure prophylaxis (PEP)) を受けている。

世界における地域別の狂犬病感染危険動物種は、アジアのイヌ、ネコ；アフリカのイヌ、マングース、ジャッカルの、ネコ；ヨーロッパのキツネ；北米のコウモリ、アライグマ、スカンク、キツネ、コヨーテ；中南米のイヌ、コウモリ、マングース、コヨーテ、ネコ等である。なお、ワクチン接種者でも狂犬病の動物から咬傷を受けた場合には PEP を速やかに受ける必要がある。また、コウモリの狂犬病が流行している地域でコウモリとの接触を持ったヒトは医師の指示に従って狂犬病ワクチンの接種を速やかに受ける必要がある。流行地への渡航に際しては、渡航先の狂犬病に関する疫学情報を十分に理解した上でワクチン接種を事前に受けておくといいが、渡航先で狂犬病の疑われる動物に咬傷を受けた場合には速やかにワクチン接種を受けるべきである。

臨床

狂犬病はワクチン接種により予防が可能なウイルス感染症であり、また、感染後の適切な治療的予防接種 (PEP) により発症を予防できる。しかしながら発症後の治療法は確立していない。ヒトの狂犬病は主に狂犬病に罹患した動物の咬傷が原因であり、

狂犬病を発症したヒトは間欠的な不安感による精神的動揺を示して半数は咽頭喉頭筋群の痙攣による嚥下障害がおこる（麻痺症状が主体の例もある）。ヒトでは恐水症や恐風症などの症状を示すのが特徴であるが、動物の狂犬病では恐水症は見られない。イヌの狂犬病では性格の変化、視覚的もしくは聴覚的な刺激に対する過敏反応、恐怖心による興奮、飼い主に対する反抗、咬傷部の搔痒、嚥下筋の麻痺による流涎、瞳孔の散大および麻痺症状等が見られる。

狂犬病が疑われる危険動物により咬傷をうけた場合の処置は、WHO（狂犬病治療的予防接種指針、1992 年）の指示に従う。（１）咬傷後直ちに傷口を流水と石鹼で十分に洗浄する。（２）70%エタノールもしくはポピドンヨード液で消毒する。（３）「組織培養不活化狂犬病ワクチン」を初回接種日を 0 日として、0、3、7、14、30 日の 5 回接種する（場合により 90 日に 6 回目の注射をする）。（４）必要に応じてヒト狂犬病免疫グロブリンを咬傷部位周囲に注射する（狂犬病ワクチン接種歴がある場合には免疫グロブリンの注射は行なわない）。

検査

狂犬病を臨床症状から診断することは困難であり、他の神経症状を有する疾患との鑑別は容易でない。また、感染から発症までの潜伏期間が数週間から数年（平均 1 カ月）におよび、この期間内はウイルスを検出することは困難であり血中の抗ウイルス抗体も検出されない。したがって、狂犬病の検査は発症したヒトおよび動物の神経系組織の剖検・生検材料を用いて行うことになる。ヒトが狂犬病の疑いのある動物に咬傷を受けた場合は速やかに PEP（治療的予防接種）の開始を行い、検査によりヒトを咬んだ動物が狂犬病陰性と診断された場合にのみ PEP の継続が中止される。

ヒトと動物の狂犬病診断方法の概要について以下に示す。

<ヒトの狂犬病検査>

生前：現在、狂犬病ウイルスに感染してから発症までの潜伏期間内に生前診断を行うことは不可能である。従って、狂犬病の検査では発症以後にウイルスの抗原、遺伝子および血中の抗ウイルス抗体を検出することになる。しかしながら、PEP を行った患者ではワクチン接種による血清中抗体価の上昇があり血中や脳脊髄液中の抗体検出は診断的価値が低い。通常、ヒトが咬傷等により狂犬病ウイルスの感染が疑われた場合には、加害動物を捕獲してその脳を取り出して狂犬病検査を行ない狂犬病ウイルスの感染を確認することによって開始した PEP の継続判断を行なっている。

「可能な検査方法」

- （１）直接蛍光抗体法によるウイルス抗原検索：項部皮膚生検、気管吸引材料および唾液腺組織、（角膜塗抹標本）。
- （２）RT - PCR 法によるウイルス遺伝子の検出：唾液、脳脊髄液、項部皮膚生検、唾液腺組織。
- （３）ウイルス分離（乳のみマウスおよびマウス神経芽腫細胞への接種）：唾液、脳脊髄液、項部皮膚生検、気管吸引材料および唾液腺組織。
- （４）抗体測定：血液、脳脊髄液。

死後：患者に狂犬病が強く疑われた場合には剖検後に検査が行われる。

「可能な検査方法」

- (1) 直接蛍光抗体法によるウイルス抗原検索：中枢および末梢神経系組織、（唾液腺組織）。
- (2) RT - PCR 法によるウイルス遺伝子の検出：中枢および末梢神経系組織、（唾液腺組織）。
- (3) ウイルス分離（乳のみマウスおよびマウス神経芽腫細胞への接種）：中枢および末梢神経系組織、（唾液腺組織）。
- (4) 免疫組織化学：ホルマリン固定された中枢および末梢神経系組織、（唾液腺組織）。

＜動物の狂犬病検査＞

動物に狂犬病が疑われた場合には、必ず2週間以上の観察を行ない、観察期間内に狂犬病の症状が見られた場合や死亡した場合に速やかに致死処分を行って中枢神経組織について狂犬病検査を行う。狂犬病検査はウイルスの検出率が最も高い脳の脳幹、小脳、海馬についてそれぞれ行う。動物の狂犬病検査は、咬傷やウイルス暴露を受けたヒトへの PEP（治療的予防接種）の判断や他のリスク動物に対する初期対応（対策）を迅速かつ適切に行なうために大変重要である。

「可能な検査方法」

- (1) 直接蛍光抗体法によるウイルス抗原検索：中枢神経組織（脳幹、小脳、海馬、（唾液腺））。
- (2) RT - PCR 法によるウイルス遺伝子の検出：中枢神経組織（脳幹、小脳、海馬、（唾液腺））。
- (3) ウイルス分離（乳のみマウスおよびマウス神経芽腫細胞への接種）：中枢神経組織（脳幹、小脳、海馬、（唾液腺））。

II. 狂犬病ウイルス検査に関する一般的な注意事項

動物の狂犬病検査は、咬傷を受けたヒトへの PEP（治療的予防接種）や他の狂犬病暴露動物に対する対策等を適切かつ迅速に行うための重要な情報源であり検査は慎重に行わなければならない。

「検査担当者」および「材料に直接接する機会を有している者」は PEP（狂犬病ワクチンの暴露前接種）を行い狂犬病ウイルス感染に対する予防を行う。検査作業中の事故等により狂犬病ウイルスの暴露を受けたと考えられる場合には、ワクチン投与を事前に受けていても医師の指示に従いすみやかに PEP を行う。

動物に狂犬病が疑われた場合には速やかに致死処分を行い、中枢神経組織に対する狂犬病検査を行う。脳の摘出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）。

検体の取り扱いに際しては、組織等の飛散に十分注意を払い感染組織（中枢神経系組織、体液、特に唾液）と皮膚及び粘膜との直接的な接触を避ける。

感染が疑われた動物の脳は、脳幹、小脳、海馬の各部位について検査材料を作成してそれぞれ検査を行なう。脳摘出後の操作は安全キャビネット（クラス II）内で行う。

作業中は防護手袋、マスク等の保護器具を必ず使用する。脳摘出後の頭部等の廃棄物は専用の袋に 2 重に密閉してウイルスの不活化処理をおこなう。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。基本的に、狂犬病ウイルスに汚染された可能性のある衣服や用具の表面の清浄化には、一般的な石鹼や家庭用の洗濯用洗剤の使用が勧められる。狂犬病動物の居た部屋の床等の表面の清浄化には、1 %の温湯石けん水や洗剤液、もしくは第 4 級アンモニア塩が有効である。大切なことは、清浄化のための溶液を噴霧する前に、洗剤で表面の有機物を取り除いておくこと。衣類はオートクレーブで清浄化可能であるが、所有者がいとわなければ焼却する。

検査の最終判定結果は「検査結果の報告」に基づいて速やかに関係者等に報告する。狂犬病が強く疑われていたが、検査結果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を行う。

注）動物の狂犬病検査は感染が疑われた個体の脳組織について行う。狂犬病の生前診断は現在不可能であり検査は剖検後の新鮮な脳組織で行う。

「検査手順に関する注意」

- ・ 検査材料を受理した検査室は、「受理した検査材料」と「添付されているデータシート」の内容が同一であることを確認して追加すべき必要事項を記入して直ちに検査を実施する。

「検査担当者に必要な事項」

- ・ 狂犬病ワクチンの暴露前予防接種。
- ・ 病原微生物取り扱いに関する十分な経験と理解。
- ・ 検査器具等の正しい使用。

「検査に必要な施設」

- ・ 外部と十分に隔離された部屋。
- ・ バイオセーフティーキャビネット（クラス II）の使用（バイオセーフティーキャビネット内にはベンチコートを敷いて感染性溶液の飛散等を防ぎ、ウイルスを不活化できる溶液を満たした容器を常にベンチ内に置いて使用済み器具等に付着したウイルスをキャビネット内で不活化可能にしておく）。
- ・ オートクレーブの設置（汚染器具のウイルス不活化）。
- ・ ウイルスは石けん液、エーテル、クロロホルム、アセトン、45-70%エチルアルコール、5-7%ヨード剤、第4級アンモニウム化合物で不活化される。
- ・ 専用着衣（手袋（2重に使用）、着衣、マスク、ゴーグル、履き物等）の使用。

「検査施設に必要な準備事項」

- ・ 緊急時の狂犬病暴露後ワクチン接種（PEP（治療的予防接種））を可能にしておく。
 - （1）連絡網。
 - （2）ワクチン接種を行う医療機関の確保。

III. 検査材料の採取・輸送および保管

狂犬病が疑われたヒトの生検、剖検および狂犬病が疑われた動物の剖検では「II. 狂犬病ウイルス検査に関する一般的な注意事項」を参照して十分な感染防護処置を行ない作業中における検体組織等の飛散や感染組織（中枢神経系組織、体液、特に唾液）と皮膚及び粘膜との直接的な接触を避ける。

狂犬病ウイルスに接する機会の高いリスクグループはあらかじめ狂犬病ワクチンの暴露前接種を行なっておく。狂犬病ウイルスの感染が疑われた動物は死亡もしくは致死処分後速やかに脳を取り出して検査を行なう。殺処分時には頭部に障害を加えないように注意を払う。検査材料の送付は万国郵便法に基づいた方法で行ない、必ず（１）宛先、（２）送り主、（３）データシートに検体の内容と必要事項を明記する。

1 検査材料の採取において注意すべき点

（１）ヒトの材料

ヒトの狂犬病診断では狂犬病常在地での滞在歴や動物による咬傷歴が重要な手がかりとなるため、狂犬病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まず確認する。これらが不明である場合は臨床症状から狂犬病を診断することは困難である。狂犬病が疑われた患者では、皮膚生検（項の毛根部神経組織内の狂犬病ウイルスを検出）や角膜塗抹標本からのウイルス抗原検出、唾液や髄液からのウイルス分離が行なわれる。血中や髄液中の抗狂犬病ウイルス抗体の検査は、発病以降でない抗体が上昇しないため役に立たない。また、ワクチン接種者では抗体による狂犬病ウイルス感染の証明は不可能である。

狂犬病患者の診察、看護、諸検査を行なう医療職員は狂犬病の狂犬病ワクチンの暴露前予防接種を事前に行なうべきであるが、患者が狂犬病と診断された時点で速やかに PEP（治療的予防接種）を開始する。同時に、患者と接触した家族や友人への PEP も行なう。ヒトの狂犬病症状や狂犬病が疑われる患者への対応は引用文献（１）「狂犬病対応ガイドライン 2001」の「付属書 6、7、8」を参照。

生検・剖検組織：頸部毛根域皮膚および皮下組織（注：検査では毛根部周囲神経組織内の狂犬病ウイルスを検出する）、脳材料及び唾液腺は、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する（保管は-80℃で行う）。検査材料をホルマリン固定する場合には必ず検体を 2 分して残りを凍結材料とする。なお、ホルマリン固定にする場合は中性緩衝ホルマリンを使用する（中性緩衝ホルマリンの組成は、「（V）狂犬病ウイルスの検査方法。4. 免疫組織化学」を参照）。検査材料には必ず患者名、組織名、日時を鉛筆で記載する。ホルマリン固定組織およびパラフィン包埋組織は常温で送付可能である。

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 500 µl 注入して蓋をする。（注）各チューブには必ず患者名、組織名、日時を鉛筆で記入して未固定のままポリプロピレン袋に一度いれて-80℃に保管する。

角膜塗抹スライドを作成した場合には、風乾後に冷アセトン固定を 10 分間行ない再度風乾して直接

蛍光抗体法を行う。スライドは「検査材料の輸送」にしたがって冷蔵もしくは冷凍状態で速やかに検査機関に送る。

（２）動物の材料

動物に狂犬病が疑われた場合には、必ず２週間以上の観察を行なう（**註記を参照**）。死亡した個体や観察期間中に狂犬病の症状が見られて致死処分した個体は速やかに解剖を行ない検査に必要な脳組織を取り出す（解剖は死後 24 時間以内に行なう。死亡個体の場合は解剖を行なうまで冷蔵状態で保管する。注：狂犬病検査は、死後の自壊が速い脳の組織で行なうので適切かつ迅速な対応が必要である）。解剖および検査が可能な施設への輸送は冷蔵状態（４℃もしくは氷冷）で行なう。搬送方法についてもその安全性を確認する。致死処分後の動物体もしくは頭部は、外部寄生体をクロロホルム処置により麻酔・殺処理して除去しておく。

解剖施設における脳の摘出は「狂犬病対応ガイドライン 2001」、「Laboratory techniques in rabies.、WHO、第４版」に方法が記載されている（引用文献等（１）と（３）を参照／具体的な方法と写真、図が示されている）。また、各自治体には狂犬病の疑われたイヌの解剖と検査の実際を記載した資料が配付されている（平成 14 年度狂犬病予防等技術研修会で配付された冊子と「CD-ROM タイで麻痺型狂犬病と診断されたイヌの臨床経過（１例）／脳の取り出し方」および平成 14 年度希少感染症診断技術研修会で配付された資料「狂犬病の危機管理対応 ― 地方自治体における対応および検査の実際」）。同様に結核感染症課からは狂犬病に関する通知が出ており上記資料とあわせて参照して頂きたい（引用文献等（１２）～（１５））。

解剖施設において取り出された脳は冷蔵状態（４℃もしくは氷冷）で速やかに輸送して検査を行なう。検査は、頭部より取り出した脳の「脳幹部（視床、橋、延髄）」、「小脳」、「海馬」の各部位について行う。検査部位を切り出した場合には、検体を２分して残りを凍結材料とする（保管は-80℃で行う）。切り出した検査部位（視床、橋、延髄、小脳、海馬）は、スクリューキャップの丈夫なプラスチック管等に入れて密栓後、採材部位を明確に記載して万国郵便法に基づく方法にて-20℃から-80℃で送付が可能である。

（註）狂犬病ウイルスは感染してから発症するまでに平均１ヶ月の潜伏期間があり、感染した動物は症状を全く示さず、潜伏期間中にウイルスを検出することは現在不可能である。また、発症する以前にウイルスに対する抗体の産生も見られない。したがって、感染した疑いのある動物の観察は大変重要である。特に、狂犬病ウイルスに感染したイヌでは発症の 10 日前から唾液中にウイルスの排出が見られると報告されているため、イヌの症状観察はヒトが咬まれた場合のワクチン接種継続（PEP）の重要な判断材料となる。

２ 検査材料の輸送において注意すべき点

- （１）頭部から取り出した新鮮脳は液漏れのしない密閉容器もしくはビニール袋等に入れてしっかりと口を閉ざしてすみやか（解剖及び生検後 4 時間以内）に冷蔵状態（氷上もしくは 4℃）で温度管理を十分に行い直ちに検査室へ輸送する。なお、生検材料および頭部から切り出した検査部位（視床、橋、延髄、小脳、海馬）は冷凍状態での輸送が可能である（輸送に 1 日以上かかる場合）。

- (2) 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」。

体積が 50ml 未満：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。

IV. 検査の進め方

1 検査順序

検査材料を受理した検査室は、「受理した検査材料」と「添付されているデータシート」の内容が同一であることを確認して、必要事項の記入を行い、直ちに検査を実施する。

2 狂犬病ウイルス感染の診断基準

検査結果は、（１）直接蛍光抗体法により検査材料から狂犬病ウイルス特異抗原が検出された場合、（２）RT-PCR 法により検査材料から狂犬病ウイルス特異的遺伝子が検出された場合、（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りウイルスが分離された場合（狂犬病ウイルス特異抗原もしくは特異遺伝子の検出で最終判定をおこなう）に陽性と判定する。

以上３検査のいずれかで狂犬病ウイルスが検出された場合に狂犬病陽性と診断される。

一般的には、最も簡便で確実な検査方法として直接蛍光抗体法が行なわれている（臨床診断、疫学的情報等で狂犬病の疑いが強く示唆された症例で陰性を示した場合には、追検査やウイルス分離の成績を待って最終的な確定を行う）。

3 検査結果の報告

検査結果については「狂犬病ウイルス感染の診断基準」に基づいて速やかに関係者等に報告を行う。

V. 狂犬病ウイルスの検査方法

実験室内の狂犬病検査としては（１）組織の塗抹標本を用いた直接蛍光抗体法によるウイルス抗原検索、（２）組織乳剤を用いた RT - PCR 法によるウイルス特異遺伝子の検出、（３）組織乳剤を乳のみマウス脳内およびマウス神経芽腫細胞に接種して行うウイルス分離法、（４）ホルマリン固定材料による免疫組織化学が可能である。

1 直接蛍光抗体法

ヒトでは主に項部皮膚生検、唾液、脳脊髄液、気管吸引材料、角膜の塗抹標本等を使用して生前診断が行われる。動物の検査では、「脳幹部（視床、橋、延髄）」、「小脳」、「海馬」それぞれについて直接蛍光抗体法を行う。唾液腺の検査は咬傷時のウイルス排泄を知る1つの手掛かりとしてのみ行なわれている。特にウシ、ウマなどの大型の動物ではウイルスの抗原分布に偏りが見られるため検査部位を増やす必要がある。

現在、狂犬病検査に使用する抗体キット「Rabies FITC Conjugate Kit」は、国内で入手可能である（製造元：FDI（フジレビオアメリカ）、販売：（株）ティエフビー／ティエフビーカスタマーズセンター（電話：03-5922-2821））。

<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（Rabies FITC KIT/ CENTOCOR FITC anti-rabies monoclonal globulin, Fujirebio diagnostics, inc. (PBS(-)で50倍に希釈して使用) もしくは BBL anti-rabies globulin/ Fluorescein labeled, Becton Dickinson Microbiology Systems (PBS(-)で100倍に希釈して使用)；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
- * 封入材（50%グリセリン-PBS (-)、pH8.5）
- * ハサミ
- * ピンセット
- * 舌圧子（tongue-depressor）もしくはペーパータオル
- * 無蛍光スライドガラス（8穴、テフロンコーティング：HTC Super cured autoclavable）
- * 塗抹標本固定用染色バット
- * アセトン
- * ベンチコート（検査材料等の飛沫吸収用に作業領域全域に敷く）
- * 湿潤箱（蛍光抗体反応用）
- * 孵卵器（37℃）
- * 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「脳幹部（視床、橋、延髄）」、「小脳」、「海馬」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（スタンプ）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、厚い標本を作成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伸展させるとよい。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キャビネット内で十分に風乾させる（10-30 分、紫外線照射は行なわない）。
- (4) 染色瓶等に十分量の冷アセトン（-20℃）を満たしてこれにスライドを完全に浸して 30 分以上固定する（固定後は十分に風乾を行う）。
- (5) 十分に風乾したスライドに十分量の FITC 標識抗狂犬病抗体を載せて室温で 20 分間反応させる。
- (6) FITC 標識抗体反応後、十分量の PBS（-）で洗浄を行う（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) 染色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狂犬病ウイルス抗原を検索する。顕微鏡観察は通常 200 倍で行ない、抗原量の少ない検体や蛍光の弱い検体は 400 倍で詳細な観察を行う。

2 RT-PCR 法

狂犬病ウイルスの遺伝子検出で行われる RT-PCR は、一般的に実験室で行われている RT-PCR 法と同じである。狂犬病ウイルスの RT-PCR は主として脳組織を検査材料として行なわれるが、ヒトの生前診断においては唾液や髄液、頸部の毛根部皮膚生検材料等を利用して行われている。複数の検体を取り扱う場合には、目的遺伝子の重複汚染に注意を払う。狂犬病ウイルスは、ウイルス RNA の抽出操作を行った時点で感染性を失う。従って、RNA 抽出以降は一般的な実験室内での操作が可能である。

＜必要な試薬、器具、機材（指定品目または同等品を使用）＞

- *O リング付き 2.0ml 遠心チューブ(IWAKI、スクリューキャップマイクロチューブ、No : 2758-020)
- *RNA 抽出液 : TRI-ZOL reagent (GibcoBTL 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 (2 種類) :
 - (1) 10g [5'- CTA CAA TGG ATG CCG AC -3]
 - (2) JW12 [5'- ATG TAA CAC C(C/T)C TAC AAT G -3']JW12 は上記()で示した部位の塩基が C と T の 2 種類の primer を 10pmol/ul 等量混合している。
- *PCR プライマーセット (2 種類) :
 - (1) 1468bp のフラグメントが増幅
 - フォワードプライマー 10g [5'- CTA CAA TGG ATG CCG AC -3']
 - リバースプライマー 304 [5- TT GAC GAA GAT CTT GCT CAT -3]
 - (2) 443bp のフラグメントが増幅
 - 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- CC CAT ATA GCA TCC TAC -3]
- *グローブ

＜検査手順＞

ウイルス RNA の抽出：

- (1) 検査材料 50-100mg 当たり 1ml の TRIZOL 溶液でホモゲナイズを行う。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が、O リング付きスクリューキャップマイクロチューブ (2.0ml) を使用すると操作が容易で安全である。
- (2) ホモゲナイズした溶液を室温 (15-30 °C) 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 を加えてキャップを閉じた後に 15 秒間激しくボルテックスで攪拌を行う。
- (4) 室温 (15-30 °C) で 2-3 分間静置した後に 2-8 °C、12,000 x g で 15 分間の遠心を行う。
- (5) 遠心により分離した液相を新しいチューブに移して使用した 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 (15-30 °C) で 10 分間静置を行う。
- (6) 静置後、2-8 °C、12,000 x g で 10 分間の遠心を行う。
- (7) 遠心後の上清を取り除いた後で、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に 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に 5-10 分間の乾燥を行い 50 μ l の蒸留水 (RNase 不活化処理をした) に溶解して使用直前まで -80°C に保存しておく。

TRIZOL 溶液でホモゲナイズ (フェノール処理) を行うことでウイルスは不活化される。従って、これ以降の操作は安全キャビネット内で行う必要はないが、使用した器具等は十分に滅菌・消毒等の処置を行う。

逆転写反応 (RT 反応) :

- (1) ウイルス RNA 溶液 10 μ l に逆転写用プライマー ((1) 10g もしくは (2) JW12) 1 μ l (10pmol) を加えて 95 $^{\circ}$ C、1 分間の加熱後に氷中で急速冷却を行った後に室温 (15-30 $^{\circ}$ C) とする。
- (2) ウイルス RNA と逆転写用プライマー混合液に順次 4 μ l の 5x 反応用バッファー、4 μ l の 2.5mM dNTP、1 μ l の RNasin (Ribonuclease inhibitor)、1 μ l の AMV RTase を加えて反応液の総量を 20 μ l とする。
- (3) 42 $^{\circ}$ C で 45 分間、95 $^{\circ}$ C で 5 分間の RT を行う。

PCR 反応 :

- (1) RT 反応終了溶液 1 μ l に順次 PCR 用プライマーセット 「(1) 10g と 304」 もしくは 「(2) N1 と N2」 を各々 1 μ l (10pmol)、10x ExTaq Buffer を 5 μ l、dNTP Mixture を 4 μ l、TaKaRa Ex Taq (5 U/ μ l) を 0.25 μ l 加えたのちに総量を蒸留水で 50 μ l として PCR 反応を行う。

PCR 反応は以下の条件で行う。

[プライマーセット 「(1) 10g と 304」]

94 $^{\circ}$ C、1 分
----- 94 $^{\circ}$ C、30 秒
30 回 50 $^{\circ}$ C、30 秒
----- 72 $^{\circ}$ C、90 秒
72 $^{\circ}$ C、7 分

[プライマーセット 「(2) N1 と N2」]

94 $^{\circ}$ C、1 分
----- 94 $^{\circ}$ C、30 秒
30 回 45 $^{\circ}$ C、30 秒
----- 72 $^{\circ}$ C、90 秒
72 $^{\circ}$ C、7 分

増幅遺伝子の確認 :

増幅産物を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の存在を確認する。

- ・プライマーセット 「(1) 10g と 304」 では 1468bp の増幅フラグメントを確認する。
- ・プライマーセット 「(2) N1 と N2」 では 443bp の増幅フラグメントを確認する。

3 ウイルスの分離方法

狂犬病ウイルスの分離は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 日間の観察が必要）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出来る。

a) マウス脳内接種法

マウス接種法による狂犬病ウイルスの分離は脳組織や唾液線の乳剤をマウスの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」により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、性成熟したマウスの使用も可能である。狂犬病ウイルスに対する感受性は雌雄間で差がない。

<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 日令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（破碎する組織の大きさに応じたものを使用）
- *10-50%の非動化済み動物血清（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）
- *麻酔用エーテル
- *ピペット
- *オートピペッター
- *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。接種乳剤中には重量あたり 10%の検査組織が含まれるように調製する。乳剤は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。もし可能であれば遠心（4℃、1600 回転、10 分）を行いその上清を接

種する。細菌汚染を防ぐために乳剤作製に使用する緩衝液にストレプトマイシン（1560IU/ml）とペニシリン（500IU/ml）を加える。

マウスへの接種方法：

マウスへの乳剤接種はエーテル等で麻酔してから行う。親指でマウスの下顎、人さし指で反対側の頭部を抑えてマウスの頭部を固定する。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 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。接種事故によりマウスが死亡しないことを確認して狂犬病発症の観察に移る。もし、接種後短時間（2 日以内）にマウスが死亡した場合は廃棄して別の接種マウスを加えて数をそろえる。

マウスの観察：

狂犬病ウイルスを脳内に接種されたマウスが接種後 5 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、その数、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（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）

ウイルスを接種して 24-48 時間で死亡したマウスは狂犬病ウイルスではなく、ウイルス接種時の外傷による場合や細菌感染もしくは狂犬病ウイルス以外のウイルス感染によるものである。

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 匹のマウスを毎日解剖して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

狂犬病ウイルスの分離は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）を必要としない点がすぐれているが、野外株によっては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（IWAKI、25cm² フラスコ、No : 4100-010）
- * 培養液（E-MEM10 : MEM 培地（SIGMA 社、MEM、No : M-4655）に 10%ウシ胎児血清に抗生物質（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（SIGMA 社、No : F2138）
- * 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）
- * O リング付き 1.5ml 遠心チューブ（IWAKI、スクリューキャップマイクロチューブ、No : 2752-015）
- * ディスポーザブルピペット（1ml、5ml、10ml）
- * ピペットエード
- * CO₂ インキュベーター（5%-CO₂、35℃）
- * スライドグラス（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） O リング付き 1.5ml 遠心チューブに 800μl の E-MEM10 を準備する。
- （2） およそ 50mg の検体を遠心チューブに加えて 20%のホモゲナイズ液とする。
- （3） 遠心（4℃、1600 回転、10 分）を行い破碎した組織を沈殿させる。
- （4） 遠心上清を 1.5ml の培養細胞浮遊液（およそ 2x10⁶ 個の MNA 細胞を 15ml コニカル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℃で 1 時間培養を行う（15 分ごとに攪拌）。
- （6） E-MEM10 をウイルス-培養細胞液に加えて 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（図 3）。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（50ml）フラスコ）で培養を行う。
- （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。

／／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狂犬病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) E-MEM10 を培養細胞液に加えて 5ml に調整する。
- (13) 8 穴のスライドに培養細胞液を滴下して細胞をスライドに固着させる (3 ないし 4 時間、もしくは翌日まで培養)。
- (14) アセトン固定後に 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。
- (15) 判定、もしくはウイルスの回収。

cf. スライドグ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。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。

4 免疫組織化学

生検・剖検組織は中性緩衝ホルマリンで固定することにより感染性が喪失する。固定の後に通常の方法でパラフィンに包埋する。採取された組織材料は採材直後に中性緩衝ホルマリンで固定を行い速やかに検査室に輸送する。なお、40%ホルムアルデヒド（ホルマリン）を水道水で10倍に希釈した溶液は、抗原性が著しく低下するので使用してはならない。

＜必要な試薬、器具、機材（指定品目または同等品を使用）＞

- * 抗狂犬病ウイルス核タンパク ウサギ抗血清
- * ダコ社製 LSAB2 キット（体外診断用医薬品 ダコ社、京都、075-253-3502）なお、このキットを使用してマウス組織での抗原検出は出来ない。
- * 0.25%トリプシン（Trypsin (DIFCO) 1 g を PBS(-) (pH7.2)100 ml に一晩 4℃ にて溶解。遠心上清 20 ml に PBS (-) 60 ml と、CaCl₂ 16 mg を加えて、2 ml ずつ分注し、-20℃ に凍結保存する）。
- * PBS (-)
- * 蒸留水
- * 封入材（水溶性封入剤ーダコ社セルゲル（Code No-0563））
- * 染色バット
- * 染色籠
- * 特級エタノール
- * 特級メタノール
- * 特級キシロール
- * 30%過酸化水素水
- * ピンセット
- * スライドグラス
- * カバーグラス
- * 湿潤箱（免疫組織化学反応用）
- * 恒温槽（37 ℃）
- * 光学顕微鏡

[リリーの緩衝ホルマリンの組成]

NaH ₂ PO ₄ ・2H ₂ O	44 g
Na ₂ HPO ₄ ・12H ₂ O	163.8 g
特級ホルマリン	1 l
蒸留水	全量 10 l となるように蒸留水を加える

＜検査手順（操作は安全キャビネット内（クラス II）で行う）＞

- (1) パラフィン切片を、スライドが完全に浸漬する量の特級キシロールを入れた染色バットに浸漬する。5分間、時折、上下に動かす。バットを換えて、計3回繰り返す、脱パラフィンを行う。
- (2) 100%エタノールを入れた染色バット中に5分間、3回繰り返す。次に 70%エタ

- ノールを入れたバット中に 5 分間浸漬、最後に蒸留水に浸漬して親水化する。
- (3) 0.3%過酸化水素メタノール溶液中に 30 分間、室温で浸漬する。
 - (4) 蒸留水中にスライドを浸漬する。
 - (5) 余分の水分をスライドから取り除き、切片を 0.25%トリプシン溶液でカバーし、37℃30 分間静置する。
 - (6) PBS(-)でトリプシンを洗い流す。
 - (7) 5%-正常ヤギ血清/PBS(-)で切片をカバーし、室温で 20 分間静置する。
 - (8) 過剰の正常ヤギ血清を拭き取り、抗狂犬病ウイルス核タンパク抗体と 4℃ にて 1 晩反応させる（検査のために調整した抗体は 1 週間以内に使用する。使用抗体は 4℃ に保存する）。
 - (9) PBS(-)で抗体を洗い流し、十分量の PBS(-)を入れたバットに浸漬する。5 分間 3 回繰り返す。
 - (10) LSAB キット中の 2 次抗体で 37℃、30 分間反応させる。
 - (11) PBS(-)で抗体を洗い流し、充分量の PBS(-)を入れたバットに浸漬する。5 分間 3 回繰り返す。
 - (12) LSAB キット中の酵素試薬と 37℃、30 分反応させる。
 - (13) PBS(-)で抗体を洗い流し、充分量の PBS(-)を入れたバットに浸漬する。5 分間 3 回繰り返す。
 - (14) 切片を LSAB キット中の過酸化水素水を加えた発色基質でカバーし、光学顕微鏡下で観察する。

必要に応じて、核染色を行う：水溶性封入剤を使用してカバーガラスで封入して鏡顕する。

VI. 引用文献等

狂犬病に関する対応マニュアルおよびウイルスの取扱について

- (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) 国立感染症研究所病原体安全管理規程、平成 11 年 4 月、国立感染症研究所。

検査方法に関する資料

- (3) Meslin, F.-X., Kaplan, M.M. and Koprowski, H., eds. : Laboratory techniques in rabies. 4th ed., WHO Geneva, 1996.
- (4) WHO : 8th Report of the WHO Expert Committee on Rabies, Technical Report Series, No.824, Geneva, 1992.
- (5) Smith, J.S., Rabies Virus, In: Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C. and Tenover, F.C. and Tenover, R.H., eds., 7th ed., Manual of clinical microbiology, AMS press, Washington, D.C., 1099-1106, 2003.
- (6) Trimarchi, C.V. and Briggs, D.J., The diagnosis of rabies, In: Rabies., Guidelines for Medical Professionals, Veterinary Learning systems, a division of MediMedia, USA, 55-66, 1999.
- (7) Black, E.M., Lowings, J.P., Smith, J., Heaton, P.R. and McElhinney, L.M., A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan™ technology. J.Virol.Methods., 105:25-35, 2002.
- (8) Inoue, S., Sato, Y., Hasegawa, H., Noguchi, A., Yamada, A., Kurata, T. and Iwasaki, T. , Cross-reactive antigenicity of nucleoproteins of lyssaviruses recognized by a monospecific anti-rabies virus nucleoprotein antiserum on paraffin sections of formalin-fixed tissues. Pathol.Int., 53:525-533, 2003.

狂犬病の概要に関する資料

- (9) 狂犬病、編集: 山崎修道、井上 栄、大久保一郎、神谷 斎、倉田 毅、小池 麒一郎、竹内 勤、千葉俊三、簗輪眞澄、感染症予防必携、日本公衆衛生協会、88-91、1999.
- (10) Dietzschold, B., Rupprecht, C.E., Fu, Z.F. and Koprowski, H., Chapter 38, Rhabdoviruses, In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., eds., Fields Virology. 3rd ed., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1137-1159, 1996.
- (11) Dodet, B., Meslin, F.-X. and Heseltine, E., eds. : Rabies control in Asia, Proceedings of the Fourth International Symposium organized by the Merieux Foundation, with the co-sponsorship of the World Health Organization, Hanoi, Viet Nam, 5-9 March 2001, John Libbey and Company Ltd., 2001.

狂犬病に関する通知（結核感染症課）

- （１２）平成 13 年 10 月 25 日（結核感染症課事務連絡）「狂犬病対応ガイドライン 2001 の配布について」
- （１３）平成 14 年 9 月 27 日（厚生労働省健康局結核感染症課長通知、健感発第 0927001 号）「我が国に不法に持ち込まれる犬の対策等の徹底について」
- （１４）平成 14 年 11 月 8 日付（結核感染症課事務連絡）「CD ロム（タイで麻痺型狂犬病と診断された犬の臨床経過）の配布について」
- （１５）平成 15 年 1 月 21 日付（結核感染症課事務連絡）「狂犬病に感染する動物の概要」

VII. 検査依頼先

国立感染症研究所・獣医科学部 井上 智

狂犬病の疑われた動物は、「狂犬病対応ガイドライン 2001」の記載に準じて地方自治体で捕獲、隔離、観察等の初期診断をまず行ない、狂犬病の検査が必要な場合には、原則、厚生省結核感染症課（担当：獣医衛生係）を介して検査依頼を行なう。検査可能機関への検体送付は、頭部から脳を取り出した状態もしくは検査部位を採材して採材部位を個別に明記したうえで「III. 検査材料の採取・輸送および保管」を参照して行なう。

VIII 執筆者一覧

井上 智：国立感染症研究所獣医科学部

岩崎 琢磨：長崎大学熱帯医学研究所

飯田 孝：東京都健康安全研究センター

森本金次郎：国立感染症研究所ウイルス 1 部

神山 恒夫：国立感染症研究所獣医科学部

新井 陽子：国立感染症研究所ウイルス 1 部

大友 良光：青森県環境保健センター

赤見 正行：群馬県衛生環境研究所

クリプトスポリジウム症を中心とした 原虫性下痢症

目 次

I 検査法の概要

診断手順一覧

II 形態学的診断法

《クリプトスポリジウム症の診断》

1. 検査材料の採取
2. 濃縮・精製
3. 観察

《ジアルジア症の診断》

1. シストの検査法
2. 栄養型虫体の検査法

《サイクロスポラ症、およびイソスポラ症の診断》

1. 検査の概要と臨床材料
2. オーシストの検査法

付録 顕微鏡の取り扱い

III 遺伝子診断法

1. 原虫検査におけるPCRのポイント
2. 主な試薬と実験器具
3. DNAの抽出と精製
4. 制限酵素処理と電気泳動

《クリプトスポリジウム のPCR》

1. 種の同定を目的としたPCR
2. 遺伝子型別を目的としたPCR
3. 単個のオーシストを用いたPCR

《ジアルジアの遺伝子型別を目的としたPCR》

《サイクロスポラの検出・同定を目的としたPCR》

引用文献

I 検査法の概要

はじめに

原虫類の寄生に起因する主要な消化器疾患としてクリプトスポリジウム症、ジアルジア症、赤痢アメーバ症、サイクロスポラ症およびイソスポラ症等々が知られている。これらのうち、前3疾患は平成11年4月に施行(平成15年11月5日一部改正)された感染症法において、5類感染症の全数把握疾患として病原体サーベイランスの対象疾患に位置付けられている。原虫性下痢症の診断にあたっては検便、すなわち形態学的な検査法が第1選択となる。したがって、多分に経験や習熟度が問題となる領域といえる。ところが(幸いなことではあるが)わが国では原虫性下痢症は比較的稀な疾患で、経験を積むことが難しい分野である。本マニュアルの作成にあたってはこの点を最大限に考慮し、初心者であっても本冊子を参照しながら実務がこなせるよう心がけた。なお、赤痢アメーバ症の診断法については別の企画を予定している。

原虫感染に起因する下痢症は、いずれもさまざまな程度の非血性水様下痢を主症状としており、臨床所見からの区別は困難である。以下のケースでは原虫性下痢症を検討対象とすべきである。

1. 原因細菌やウィルスなどが検出されない下痢症の場合
2. 下痢症、特に海外旅行者の下痢症で、既知の腸管病原体を検出した症例にあってなお説明のできない腹部症状を持続する場合
3. 集団下痢症にあって通常の病原体が検出されない場合
4. 免疫不全宿主にあって長期間持続する原因不明の下痢症の場合

検査の進め方

原虫検査の基本は、主に患者便を検査試料とし、試料中に原虫(オーシスト、シスト、場合によって栄養型虫体)を検出することによる。検査手技としては検査試料をそのまま試料とする直接塗抹法と(オー)シストを濃縮・精製することで検出感度を高める集嚢子法とに分けられる。また、得られた試料を無染色のままで観察する方法(直接観察法)と染色法とにも分けることができる。これらの組み合わせのうちで最も簡便な方法は直接薄層塗抹法で、この方法は少量の糞便材

料を直接スライドグラスに取って生理食塩水など等張液で希釈して顕微鏡観察するものであり、運動性を有する栄養型虫体の観察や多量のシストの検出に有効である。しかしながら、この方法では微量の検査試料しか扱えないことや、食物残渣など夾雑物が多量に含まれる標本から極めて小さな(オー)シストを検出しなくてはならず、十分な検査精度が保証されない難点がある。したがって、原虫性下痢症の診断にあたっては集嚢子法の併用が必須と考える。

集嚢子法には遠心沈殿法と浮遊法の2方法があるが、本マニュアルでは遠心沈殿法を一義的に選択するよう推奨している。その理由は、遠心沈殿法では検査試料の調製段階でホルマリン水を用いた希釈・固定が行われることから、検査担当者への感染事故が回避できる利点があるからである。その他、糞便中の未消化の脂肪分が除去されることにより観察が容易となる利点もある。勿論、浮遊法はそれ自体優れた方法で、検査法として選択することに異論はない。ただし、後述のように高比重液中の(オー)シスト像は通常の顕微鏡像とは著しく異なること、高比重液を洗浄置換してからでないと染色に供することができない等の煩雑さがある。そこで、本マニュアルでは浮遊法を後段の分子生物学的な解析のためのPCRの試料調製など高度な精製が必要な際に選択すべき方法と位置付けるに留めた。ちなみに、現時点におけるPCR/RFLP等は診断というよりもむしろ集団感染における病原体やその感染経路の特定などに用いられるべきレベルにあるものと認識している。

ところで、原虫性下痢症の検査方法は原虫種の如何を問わず基本的に同じ方法が適用される。したがって、本マニュアルではクリプトスポリジウムの検出方法を中心に説明し、他の原虫の検査に関しては特筆すべき点について虫種別に項を立てて説明した。また、各検査機関にあつては顕微鏡の整備状況に格差があるものと推測される。そこで、別表に顕微鏡の整備状況に応じて選択すべき基本的な検査法をまとめておいた。適宜、方法を選択して検査した結果、(オー)シストが検出できなかった場合には陰性と判定してよい。なお、これら原虫類の(オー)シストは糞便中に必ず排出されるとは限らないことから、可能ならば日を置いて3回程度の繰り返し検査が推奨される。また、生物顕微鏡のみの整備状況にある検査機関では、確定診断に際して国立感染症研究所はじめ他の関係機関の協力を要請することも選択肢の1つと考えられよう。

〔別表〕

原虫性下痢症の診断手順

顕微鏡の 整備状況	基本的手順	手 順 の 概 説
蛍光装置 ＋ 微分干渉装置 ＋ 生物顕微鏡	遠 心 沈 殿 法 ＋ 蛍光抗体染色（湿式）	1. 遠心沈殿法で精製濃縮 2. 蛍光抗体法（湿式）で染色 ^{注1} 3. 蛍光顕微鏡下でスクリーニング ^{注2} 4. 微分干渉顕微鏡で確認
蛍光装置 ＋ 生物顕微鏡	遠 心 沈 殿 法 ＋ 蛍 光 抗 体 染 色 ＋ 抗酸染色/ヨード染色	1. 遠心沈殿法で精製濃縮 2. 蛍光抗体法（湿式）で染色 ^{注1} 3. 蛍光顕微鏡下でスクリーニング ^{注2} 4. 別途作製の抗酸染色/ヨード染色標本 で確認
微分干渉装置 ＋ 生物顕微鏡	遠 心 沈 殿 法 ＋ ネガティブ染色 ＋ 抗酸染色/ヨード染色	1. 遠心沈殿法で精製濃縮 2. ネガティブ染色標本でスクリーニング 3. 微分干渉顕微鏡で確認 4. 別途作製の抗酸染色/ヨード染色標本 で確認
生物顕微鏡	遠 心 沈 殿 法 ＋ ネガティブ染色 ＋ 抗酸染色/ヨード染色	1. 遠心沈殿法で精製濃縮 2. ネガティブ染色標本でスクリーニング 3. 別途作製の抗酸染色/ヨード染色標本 で確認

注1 クリプトスポリジウムおよびジアルジアの同時染色用蛍光抗体試薬が市販されている。FITC の特異蛍光は B 励起下で観察。

注2 サイクロスポラおよびイソスポラに対する蛍光抗体試薬は開発されていないが、両原虫のオーシスト壁は自家蛍光を有するので蛍光顕微鏡下でスクリーニングすることができる。自家蛍光は UV 励起下で観察。

検査材料の輸送上の注意

検査材料の輸送に際しては、万国郵便条約の通常郵便に関する施行規則（平成12年12月22日号外郵政省告示823号）第413条に規定する容器及び包装を用いた方法によらなければならない。

II 形態学的診断法

《 クリプトスポリジウム症の診断 》

クリプトスポリジウム症はクリプトスポリジウム属原虫の感染に起因するもので、非血性水様下痢を主症状とする消化器症状を呈する疾患である。その他の症状としては、腹痛、倦怠感、食欲低下、悪心などで、軽い発熱を伴う例もある。下痢は一日数回程度から 20 回以上の激しいものまであり、数日から2～3週間持続する。抗生物質は無効であるが、免疫機能に異常がなければ自然治癒する。一方、エイズを初めとする免疫不全宿主には重症・難治性・再発性・致死性下痢症を発症させる。下痢の程度は軟便・泥状便から水様便までであるが、免疫不全の進行とともに重症化する傾向がある。重症例ではコレラに見られるような大量の水様便や失禁を伴う症例が報告され、直接死因となることが多い。

病原種は *Cryptosporidium parvum* が主であるが、*C. meleagridis* の感染も知られるようになった。免疫不全者では *C. baileyi* や *C. muris* の感染も考えられる。寄生部位は腸管、とくに小腸であるが、AIDS では脾臓、胆道、胆嚢、呼吸器への感染も報告されている。ヒト以外でも多くの哺乳類、特にその幼獣に感染が認められる。

クリプトスポリジウムの診断は検便によりオーシストを検出することによる。急性期の患者便には多数のオーシストが排出されるが、オーシストは 6μm 弱と小さいために通常の顕微鏡観察では見落とされる危険性が高い。したがって、遠心沈殿法(MGL 変法)や浮遊法、密度勾配遠心法(遠心浮遊法)によりオーシストの濃縮・精製を行い、さらに得られた試料を蛍光抗体染色、抗酸染色、ネガティブ染色などで染色して観察に供することが望まれる。最も高い検出感度が期待される方法は蛍光抗体染色で、簡便な染色用キットが市販されている(検査試薬として未承認のため保険適用外である)。

1. 検査材料の採取

患者の便材料を然るべき容器(試験管、蓋付き採便管等で、保存培地の入

っていないもの)に数グラム程度採取する。検査までに時間を要する場合は検体を冷蔵庫保存、さらに長期間の保存が避けられない場合には 10%ホルマリン水で固定するか、後述の集嚢子を行ってから保持するように努める。また、輸送が必要な場合は容器をバイオハザードに対応できるように三重の容器(検体収納容器を含む)に収め、密封後、冷蔵(4℃)で輸送するように指示する。

2. 濃縮・精製

(1) 主な器具および試薬類

- ① 15 ml用 螺子蓋付きポリプロピレン製スピッツ管 (以下、スピッツ管)
- ② ガラス製キャピラリーピペット (以下、ピペット)
- ③ ガーゼ
- ④ 綿棒
- ⑤ 60mmΦ程度のロート
- ⑥ 竹串、または割箸(以下、竹串)
- ⑦ 金属性ループ(直径6 - 7mmのニクロム線のループ)
- ⑧ 10%ホルマリン水溶液(以下、ホルマリン水)
- ⑨ 酢酸エチル(試薬特級)
- ⑩ 高比重液(本文中に記載)
- ⑪ ボルテックスミキサー
- ⑫ 遠心機

(2) 遠心沈殿法(変法)^{注1}

1. 糞便検体を少量(≦1g)スピッツ管に取る。
2. ホルマリン水を1ml加えて竹串で糞便塊を充分ほぐす。
3. 全量が5mlとなるようにホルマリン水を加え、ボルテックスミキサーで充分攪拌する。
4. 攪拌後、室温に20分間以上放置して固定する。
5. 再度、よく攪拌してからロートに4枚重ねのガーゼを敷き、試料液をろ過する。
6. ホルマリン水でガーゼ上のろ過残渣を軽く洗浄し、全量で8mlのろ液をスピッツ管に回収する。

7. ろ液に2mlの酢酸エチルを加え、密栓をして短時間激しく振盪・混和する。
8. 速やかに $1,050 \times g$ （通常の卓上遠心機で $2,500 \sim 3,000 \text{rpm}$ 程度に相当）、5分間遠心する。
9. 液層は上から酢酸エチル層、浮遊糞便層、希釈液層、沈渣の4液層に分離する。
10. 予め浮遊糞便層を竹串等で管壁から離し、上部の3液層を捨て、沈渣を回収する。さらに、スピッツ管内壁の付着物を綿棒で拭き取る。
11. 得られた沈渣を直接顕微鏡観察（400倍以上の倍率）、又は密度勾配遠心法等の試料に供する。

注1: 本変法では、①バイオハザードの観点から、生理食塩水での洗浄工程を省略している。また、②エチルエーテルに替えて、引火性の低い酢酸エチルを用いている。

(3) 密度勾配遠心法（遠心浮遊法）

1. スピッツ管に比重 1.2 のショ糖液^{注1,2}を 4ml程度取り、糞便を溶いた試料液^{注3}を重ねる。
2. $1,050 \times g$ で 10 分間 遠心し、比重の異なった2つの液層の界面付近を新しいスピッツ管に回収する。
3. 充分量の精製水を加えて希釈し、再度、遠心沈殿して沈渣を得る。
4. 沈渣を顕微鏡観察に供する。

注1 ショ糖 500g を精製水 650ml に溶解する。

注2 コロイド PVP 処理シリカーショ糖混合液（比重 1.10）を用いても良い。
液の調整は、精製水 45mlにコロイド PVP 処理シリカ（Percoll またはそれと同等のもの）45mlと2.5Mショ糖液 10ml（8.55gのショ糖を精製水に溶解して全量を 10ml としたもの）を加えて混合する。

注3 便材料に未消化の脂肪分が多量に含まれている場合には、検体をそのままでは浮遊法に供することができない。前処理として遠心沈殿法を行い、得られた沈渣を試料とする。

(4) ショ糖浮遊法

1. 0.5 - 1g の糞便材料^{注1}を比重1.2のショ糖液^{注2}に溶く。
2. 試験管立てに立てた試験管に糞便液を満たす。その際、表面張力を利用して液面を試験管よりも盛り上げる。
3. 20分間程度、室温に静置する。
4. 金属ループかカバーガラスを液最上面に接着して、液表面に浮遊してきたオーシストを回収する。
5. 直接、顕微鏡観察に供する^{注3}か、回収液を十分量の精製水で希釈し、遠沈して沈渣を観察に供する。

注1 下痢便等で未消化の脂肪分が多量に含まれている場合には、前処理として遠心沈殿法を行い、得られた沈渣を試料とする。

注2 用いる高比重液の組成により飽和食塩水浮遊法、硫苦（硫酸マグネシウム）・食塩水浮遊法、ショ糖液浮遊法などの名前で区別される。クリプトスポリジウムの検査では一般に比重1.2のショ糖液が用いられる。

注3 ショ糖液中のオーシストは通常の顕微鏡像と著しく異なる。観察には通常の生物顕微鏡を用いる。

3. 観 察

(1) 器具および試薬類

- ① スライドグラス
- ② カバーガラス
- ③ ネイルエナメル（パラフィン類を溶かして用いても良い）
- ④ 生物顕微鏡（微分干渉装置付きが望まれる）
- ⑤ 蛍光顕微鏡（一般に落射型が便利）
- ⑥ 各種染色液（本文中に記載）
- ⑦ 燐酸緩衝生理食塩水 pH 7.2 (PBS)
- ⑧ 市販の蛍光抗体試薬（検査用試薬として未承認のため、保険適用外）
- ⑨ DAPI 保存液：メタノール 1ml に DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)

2mg を溶解する。密閉容器に入れ、遮光して冷蔵庫に保管する。使用に際して DAPI 保存液 10 μ l を PBS 50ml に加えて混合する。

⑩ 水溶性封入剤

(2) 直接観察

1. 糞便希釈液、又は精製試料^{注1}をスライドガラスに少量取り、カバーガラスをかける。
2. カバーガラスの四隅を封じて^{注2}、微分干渉顕微鏡^{注3}で観察する。通常の生物顕微鏡^{注4}では他の粒子との区別は困難である。

注1 高比重ショ糖液中のオーシストは微分干渉装置での観察には適さない。観察は通常の生物顕微鏡を用いるが通常の像とは著しく異なる。

注2 ネイルエナメル、またはパラフィン類を溶かしてシールする。周囲をシールすることで試料液の流れが止まり、観察が容易となる。

注3 微分干渉顕微鏡は一般の生物顕微鏡に微分干渉装置を組み込んだもので、光源には偏光が用いられる。標本中の光学的厚さの差によって生じる光路差(二次光線の位相の差)をコントラストの差、または色の差に変換して可視化する顕微鏡である。顕微鏡観察に先立って、後述のケーラー照明法に準じた照明の調整が重要である。オーシストの内部構造の観察に適しているが、スクリーニングには適さない。標本作製上の注意点は被検物が重積しないこと、すなわちできるだけ希薄な標本作製すること。水道水等の検査では原虫の確定に用いられている。

注4 被写界深度を調整(コンデンサーの位置や開口絞りの調整)して、最適の像を得ること。

<観察像>

オーシストは類円形(4.5-5.4 × 4.2-5.0 μ m)で、微分干渉顕微鏡像ではオーシスト内に4個のスποロゾイトや残体、その他に大小の顆粒が観察される。

高比重ショ糖液中のオーシストの観察には通常の生物顕微鏡を用いるが、通常の像とは著しく異なる。コンデンサーの位置、開口絞りなどを適正に調整する

と、屈折率の関係でオーシストは薄いピンク～オレンジ色に見える。その際、酵母などは緑色に見えるために識別が可能である。なお、ショ糖液中のオーシストは内部構造の観察には適さない。内部構造の確認や染色標本作成にはショ糖液を精製水に置換する操作が必要となる。

(3) 蛍光抗体染色

本法は免疫反応を利用してオーシスト壁を特異的に染色する方法で、観察には蛍光顕微鏡装置が必要となる。本法は感度が高く、スクリーニング法として優れている。染色方法には間接蛍光抗体染色法と直接蛍光抗体法の2つの方法がある。糞便等の試料では染色工程の少ない直接蛍光抗体法が便利なので、以下に説明する。

< 湿潤試料の直接蛍光抗体染色 (湿式) >

1. 精製材料を小試験管に取り、少量の PBS に希釈・混和する。
2. 必要量 (市販キットにより異なるが、目安として試料の 1/10～20 量) の蛍光抗体試薬原液を添加し、遮光して室温で所定時間 (15-30 分程度) 反応させる。
3. 必要に応じて、染色終了5分前に適当量の DAPI 染色液を加えて反応を続ける。
4. 反応後、PBS で遠心洗浄 ($1,050 \times g$ で 5 分間程度) し、沈渣に水溶性封入剤を滴下する。
5. スライドグラスにとり、カバーグラスを掛けて、周囲をシールして顕微鏡観察に供する。
6. 蛍光顕微鏡^{注1} (B 励起下) で FITC の特異蛍光 (緑色) を示す粒子を観察する。
7. DAPI 染色を行った場合には UV 励起に切り替え、青白色に染まったスポロゾイトの核 (4核) を観察する。

注1 広帯域 (long pass) 接眼フィルターを用いると夾雑物が他の色調を呈し、観察が容易である。

<乾燥標本の直接蛍光抗体染色(乾式)>

1. スライドガラスに糞便材料、または精製試料を薄く塗布して乾燥させる^{注1}。
2. PBS で軽く洗浄した後、スライドガラスを湿箱に移し、試料部分に蛍光抗体試薬を滴下、遮光して室温で所定時間(15-30分程度)反応させる。
3. 必要に応じて染色終了5分前に DAPI 染色液を加え、ピペットで静かに液を攪拌、反応を続ける。
4. 反応後、PBS で丁寧に洗浄、充分水を切ってから封入剤を滴下、カバーガラスをかける。
5. 蛍光顕微鏡 B 励起下で FITC の特異蛍光(緑色)を示す粒子を観察する。
6. DAPI 染色を行った場合には UV 励起に切り替え、青白色に染まったスポロゾイトの核(4核)を観察する。

注1 塗沫標本が剥れないように表面処理を行ったスライドガラスが市販されている。

<観察像>

蛍光抗体染色像では緑色の特異蛍光を示す粒子^{注1}として観察される。オーシストの染色パターンは基本的に辺縁部の蛍光のみで、中心部にはほとんど蛍光は認められない。したがって、全体としてはドーナツ状の染色像となる。

DAPI 染色を行った場合には、UV 励起下でオーシスト中にスポロゾイトの核が4核明瞭に観察される^{注2}。

注1 市販の蛍光抗体試薬は一部の藻類等と交叉反応することが報告されており、環境試料では他の方法による確認が必要である。

注2 新鮮オーシストでは DAPI に染まらない場合がある。

(4) ネガティブ染色

蛍光顕微鏡の設備がない場合の便宜的な方法として考案された方法である。

< 染色液 >

ニューメチレン青	2.5g
シュウ酸カリウム・1水塩	8.0g
精製水	500ml

上記の2薬を精製水に溶解し、ろ過してから試薬瓶に移し、室温で保存する。

< 手順 >

1. スライドグラス上に糞便材料、または精製試料を少量取り、過剰のニューメチレン青染色液を加えて攪拌する^{注1、2}。
2. カバーグラスをかけ四隅をシールしてから100～200倍で観察する。観察には生物顕微鏡を用いる。開口絞り(コンデンサーに付属の絞り)を絞り込み、焦点をわずか上方にずらして観察すると、無色のオーシストは青い背景の中に(白く)浮かんでみえる。
3. オーシストらしい粒子が検出された場合には高倍率で観察する。
4. 陽性と判断された試料については別の方法^{注3}でオーシストの確認を行う。

注1 試料に対して十分量の色素を加えると、過剰分の色素が残ってフィルターの役目をする。細菌等の混入が多いと色素が消費されてフィルター効果を失うことがある。18×18mmのカバーグラスに対して試料の量は10μl以下程度にする。

注2 沈渣の一部を別の試験管に取り、色素液と混和してからスライドグラスに移してもよい。

注3 微分干渉顕微鏡観察、抗酸染色、蛍光抗体染色法など。

< 観察像 >

細菌類、酵母、その他の食物残渣は濃青色に染色されるが、オーシストは染色されない。液中に過剰の色素が残ることで、青色の背景の中に無色のオーシストが浮いて見える。高倍率の観察ではオーシストの内部構造が不均一で、不明瞭ながらスポロゾイト等の内部構造が確認される。酵母や結晶様構造物等が

同じく白く見える場合があるが、経験を積むと内部構造の違いから区別される。

(5) 抗酸染色

クリプトスポリジウムやサイクロスポラのオーシストは抗酸性を示すことから、抗酸染色が用いられてきた。以下に一例として Kinyoun の石炭酸フクシン染色法を紹介するが、抗酸染色法はいろいろ改良されており、各研究室で常用している方法があればその方法を踏襲すべきである。

< 染色液 >

☆ Kinyoun の石炭酸フクシン液

塩基性フクシン	4 g
95% エタノール	20ml
石炭酸	8ml
精製水	100ml

塩基性フクシンをエタノールに溶かし、これに石炭酸と精製水の混合液を加える。十分に攪拌した後、ろ過して褐色試薬瓶に保存する。

☆ Loeffler のアルカリ性メチレン青液

メチレン青	0.3g
95% エタノール	30ml
0.01% 水酸化カリ液	100ml

エタノールにメチレン青を溶かし、水酸化カリ液を加えて試薬瓶に保存する。

< 手順 >

1. スライドグラス上に糞便材料を直接、又は精製試料を薄く塗抹して風乾する。
2. メタノールで1～2分固定し、乾燥する。
3. Kinyounの石炭酸フクシン液を試料塗布面に載せて5分間染色する。
4. 50%エタノールで染色液を剥がすように洗浄する^{注1}。
5. 精製水洗浄後、1%の硫酸水で約2分間、または標本から赤い色素が溶け出なくなるまで脱色する^{注2}。
6. 水洗後、Loeffler のアルカリ性メチレン青染色液で1分間程度、後染色する。

7. 水洗、乾燥後にバルサム等で封入して観察する。

注1 染色液の表面には色素の酸化膜（不溶性）が形成されることがあり、酸化膜が標本上に付着しないように洗い流す。多量に付着した場合には50%エタノール液で漬け洗いする。

注2 目安として、標本に混在している細菌類の赤味がやや残る程度まで脱色すると良い。

<観察像>

オーシストは淡いピンクから赤色、さらに濃赤色に染まる。染色状況は一様ではなく、馬蹄形に染まるものが多い。同時に染まらないオーシストも少なくない。後染色を強めに行うと赤の色調は低下するが、内部が顆粒状に染め出される。結果の判定は他の検査法で得られた結果を合わせて総合的に判断すべきである。ホルマリン処理されたオーシストは抗酸染色性が低下するとの指摘もあるが筆者らは不都合を経験していない。

(6) ヨウ素・ヨウ化カリ染色

クリプトスポリジウムのオーシスト観察用に改良した染色方法を紹介するが、利用可能な顕微鏡が生物顕微鏡に限られている場合の便宜的な染色方法である。スクリーニング法としては推奨できない。染色と熱固定を同時に行うことでオーシスト内部とオーシスト壁の存在を観察することができる。

<ヨウ素・ヨウ化カリ液>

ヨウ素	5g
ヨウ化カリ	10g
精製水	100ml

ヨウ化カリを水に溶かし、攪拌しながらヨウ素を徐々に加えて完全に溶解し、ろ過してから褐色試薬瓶に密閉保存する。（市販の希ヨードチンキで代替できる）

<手順>

1. 精製試料を1.5ml用サンプルチューブ等に取り。
2. 試料量の1/2～1/3量のヨウ素・ヨウ化液を加えて、1～2分間熱湯に湯煎・振盪する。
3. 試料をスライドグラスに取り、カバーグラスをかけ、四隅をシールしてから観察する。

<観察像>

オーシストの内部構造が褐色に染色される。熱処理によって色素が内部にまで浸透する。また、オーシスト壁と内部構造が分離するためにオーシスト壁が明瞭に観察できるようになる。酵母などでは細胞壁の分離は起こらないことから明瞭に区別される。

《 ジアルジア症の診断 》

ジアルジア症(ランブル鞭毛虫症)はジアルジア属原虫の感染に起因する消化器疾患で、病原種は *Giardia lamblia* (*G. duodenalis*、*G. intestinalis* と synonym)である。寄生部位は腸管、特に十二指腸から空腸上部にかけてであるが、胆嚢や胆管粘膜にも寄生範囲が拡大することがある。本症のリスクファクターは発展途上国への渡航である。また、男性同性愛者もリスクグループを形成する可能性がある。本原虫の感染は患者糞便中に排出されるシストを経口摂取することによる。シストを排出する無症状キャリアーが感染源として重要である。臨床的に他の下痢症と区別することは容易でない。

ジアルジア症の診断は糞便中のシスト、または栄養型虫体を検出することによる。シストの観察方法と栄養型虫体の観察方法は異なる。シストは一般に有形便に認められ、下痢便では栄養型虫体が検出される。また、十二指腸ゾンデ採取液中からも栄養型虫体が検出される。

1. シストの検査法

(1) 検査材料の採取

シストの検出を目的とした試料の採取方法はクリプトスポリジウムの検査材料の採取(本文4頁)を参照のこと。

(2) 濃縮・精製

基本的にクリプトスポリジウムの検査法に準じ、遠心沈殿法、密度勾配遠心法(遠心浮遊法)^{注1}、浮遊法^{注1}の各方法が適用できる。一般的には遠心沈殿法による集嚢子が第1選択となる。

注1 ホルマリン等で固定されたシストは浮遊法により回収できない。したがって、遠心沈殿法で得た沈渣を浮遊法の試料とするのは不適當。

(3) 観察

1) 直接塗抹法および蛍光抗体染色法

クリプトスポリジウムの検査法に準じて行う。蛍光抗体試薬は直接法用の試薬が市販されている(検査試薬として未承認のため保険適用外である)。

<観察像>

シストは楕円形(8-12 × 6-8 μ m)で、成熟したシストでは4個の核を持つ。主に泥状便や有形便中に観察される。微分干渉顕微鏡像では核以外にも鞭毛やその他の細胞小器官が観察できる。

蛍光抗体法で染色されたシストは緑色の特異蛍光を示す粒子として観察される。その染色パターンは辺縁部の蛍光が強く、中心部にはほとんど蛍光が認められない。DAPI 染色を行った場合にはシストの成熟度に応じて2ないし4核が観察される。

2) ヨウ素・ヨウ化カリ染色法

利用可能な顕微鏡が生物顕微鏡に限られる場合の便宜法としてヨウ素・ヨウ化カリ染色が用いられている。

<染色液>

13頁(6)ヨウ素・ヨウ化カリ染色 を参照のこと。

<染色手順>

1. 糞便、または精製試料を1.5ml用サンプルチューブ等に取り。
2. 試料量の1/2～1/3量のヨウ素・ヨウ化液を加えて、攪拌する。
3. 試料をスライドグラスに取り、カバーグラスをかけ、周囲をシールしてから観察する。

内部構造が褐色に染色され、核やその他の細胞小器官が観察可能となる。

2. 栄養型虫体の検査法

(1) 検査材料の採取

栄養型虫体の検出を目的とする場合には試料の採取後、速やかに検査を行う必要がある。試料の希釈は生理食塩水等の等張液を用いる。検査までに時間を要す

る場合は検査材料を冷蔵保存すべきであるが、栄養型虫体の運動性が冷蔵状態でどの程度保持されるかは不明である。観察に際して温めて観察する。

<直接塗抹法>

1. 下痢便を生理食塩水で適宜希釈してスライドグラスに取り、カバーグラスをかける。
2. カバーグラスの周囲をシールしてから顕微鏡観察に供する。
3. 観察に際して、37℃程度に暖めると栄養型虫体の運動が活発となり検出し易い。

<十二指腸ゾンデ採取液からの検出方法>

1. 十二指腸ゾンデ採取液をスピッツ管に取り、1,050×g（汎用遠沈機で約2,500rpm）5分程度遠心して沈渣を得る。粘稠性が高い場合にはPBS等で希釈洗浄するとよい。
2. 沈渣をスライドグラスに取り、カバーグラスを掛け、周囲を封じてから顕微鏡観察に供する。

<ギムザ染色>

1. 沈渣をスライドグラス上に薄く塗布し、速やかに風乾する。
2. 充分乾燥させた後に、メタノール固定（2 - 3 分間）する。
3. 薄い液で染色し、風乾後、バルサム等の封入剤で封入し、顕微鏡観察に供する。

<観察像>

栄養型虫体は体長 15 - 17μm、幅 5 - 7μm で左右対称の洋梨型で、運動中の原虫は“木の葉が舞うようにヒラヒラ”とした動きを呈する。固定染色標本では2核、4対の鞭毛、その他の細胞小器官が観察される。猿の面容に似た特徴的な形態を有することから、モンキーフェイスと形容される。

《 サイクロスポラ症、およびイソスポラ症の診断 》

サイクロスポラ症およびイソスポラ症は、*Cyclospora cayetanensis* および *Isospora belli* の感染に起因する消化器疾患である。いずれも臨床的には他の下痢症との区別は容易でない。寄生部位は腸管、特に十二指腸から空腸上部にかけてである。これらの疾患の感染経路については明確ではない。

サイクロスポラ症は、1996 年から続けて米国で中南米産のラズベリーを介した比較的規模の大きな分散型集団感染 (Diffuse Outbreak) が発生したことで有名となった。イソスポラはとくにエイズを初めとする免疫不全宿主に発症するはげしい下痢症の原因微生物として重要である。

いずれの原虫種においても患者の糞便に混じって排出されたオーシストは環境中で一定の発育 (スポロゾイト形成) をして感染性を有するようになる。この点はクリプトスポリジウムやジアルジアとは大きく異なる。

1. 検査の概要と臨床材料

診断は糞便中のオーシストを検出することによる。サイクロスポラのオーシストは直径 8 μ m の球形で、内部には多数の顆粒が観察される。かつてこの原虫は "Cyanobacterium-like body" と呼ばれていたことがあり、形態的に藻類に酷似する。

イソスポラのオーシストは長径 20-33 μ m 短径 10-19 μ m のフットボール型を呈する。新鮮便中に検出されるオーシストは単細胞である。このオーシストは大きいことから見落とすことは稀である。

2. オーシストの検査法

基本的にクリプトスポリジウムの検査法に準じる。

これら2種の原虫に関しては蛍光抗体試薬が開発されていない。しかしながら、オーシスト壁はUV 励起下でいずれもネオン青色の自家蛍光を発することから、蛍光顕微鏡観察による検出が第一選択となる。

なお、サイクロスポラのオーシストは抗酸染色で陽性に染まる。

付 録 顕 微 鏡 の 取 り 扱 い

本試験方法で用いる顕微鏡には、蛍光装置、微分干渉装置、20、40、100 倍の対物レンズが必要である。また、一般に接眼レンズは 10 倍が用いられる。このほか、粒子サイズ測定のために、接眼スケールあるいはその他の計測機器を付属させる。

①蛍光顕微鏡装置

落射型と透過型の 2 種類がある。落射型は不透明な支持体上の標本でも観察が可能である。個々の蛍光色素は特有の励起波長を持った光の照射により励起光とは異なった(それよりも長波長の)蛍光を発する。したがって、染色に用いた蛍光色素にあわせて、励起波長と接眼フィルターを組み合わせる必要がある。

②微分干渉装置

微分干渉装置はポラライザー(偏光板)、2枚の DIC プリズム、アナライザー(偏光板)からなり、それらが一般の生物顕微鏡に組み込まれる。光源として偏光が用いられ、光線が標本を通過する際に標本中の光学的厚さの差によって生じる光路差(二次光線の位相の差)をコントラストの差(あるいは色の差)に変換する装置で、通常は標本の厚さの差が明暗の差として観察される。顕微鏡観察に先立って、ケーラー照明法に準じた顕微鏡の調整が必要である。

〈ケーラー照明法〉

- (1) 未調整の顕微鏡に染色標本をのせて焦点を合わせる。
- (2) 視野絞りを絞り込み、視野に絞りの影を確認する。その際、コンデンサー絞りを適度に絞ると視野絞りの影が見やすくなる。
- (3) コンデンサーを上下して、視野絞りの影が最もシャープに見える位置に固定する。
- (4) 視野絞りの開口部を視野の中心に位置させる(センタリング)。
- (5) 視野絞りを開ける。その際、開口率を 80%程度に設定すると対物レンズのもつ解像力がほぼ完全に引き出される。
- (6) 対物レンズを換えた場合には視野絞りを絞って、絞りの影が明瞭に見えることを確認する。

III 遺伝子診断法

DNA 解析を用いた検査法は、すでに各種の病原体検索に用いられている。PCR 法による特異領域の増幅の有無、増幅領域の長さ、また、RFLP 法との組み合わせによる制限酵素切断部位の多型性等、比較的簡便に原虫の遺伝学的特徴を明らかにすることが可能となっている。原虫類の検査においても同様に、疫学的調査への利用が進んでいる。

ここでは原虫検査における PCR のポイント、特に原虫あるいは検査材料の特性から生ずる問題点について紹介する。なお、PCR の原理や特性に関しては専門書を参考されたい。

1. 原虫検査における PCR のポイント

PCR/RFLP 法などの DNA 解析の利点は、比較的簡便に種間あるいは種内の遺伝学的変異を知ることができることで、これを利用することで汚染源の特定などといった疫学的に重要な情報を得ることが期待できる。

腸管寄生性原虫類への適用に際しての問題点は(オー)シストからの DNA 抽出である。また、糞便材料では目的外の DNA の混入が避けられないことや、PCR 反応の阻害要因も多く含まれていることが問題となる。いずれにせよ、前処理としての試料精製が重要となる。また、反応に際してはテンプレート DNA の濃度範囲を広く取るなど、確実に反応を得るための工夫が必要となる。

現行の DNA 解析法は、検出された原虫を解析対象としてさらに詳細な情報を得ることを目的としているもので、検出を目的とするのには馴染まないと考えている。その他の用途としては、RT-PCR を応用した生死判別法などが開発されている。詳細は文献等を参照されたい。

2. 主な試薬と実験器具

DNA 検査に共通する実験器具と試薬類、および各操作に必要なものに分けて示した。

〔共通するもの〕

0.5ml (又は 0.2ml) PCR チューブ
1.5ml 遠心チューブ
疎水性フィルター付きピペットチップ
微量ピペット (10、200、1000 μ l)
微量高速冷却遠心機
恒温水槽
滅菌精製水 (DW/MiliQ 水など)、
TE バッファー (10mM, Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)

〔DNA 抽出用〕

加熱用ブロックヒーター (1.5ml チューブ対応)
3M 酢酸ナトリウム
TE 飽和フェノール: フェノールを加熱・融解し、等量の TE バッファーを加え、混合し、その後静置して、水層を除く。この操作をもう一度繰り返し、得られたフェノールを TE 飽和フェノールとする。
フェノール/クロロホルム混液
(TE 飽和フェノール: クロロホルム: イソアミルアルコール=25:24:1)
10% SDS
TritonX-100
10mg/ml protenase K
エタノール
ミネラルオイル

〔PCR ならびに DNA 電気泳動用〕

PCR/RFLP 用サーマルサイクラー
電気泳動装置
Taq DNA polymerase キット
抗 Taq 抗体
プライマー/適時オーダー注文
制限酵素/専用バッファー付き
アガロース
TBE バッファー
泳動用サンプルバッファー
DNA サイズマーカー
エチジウムブロマイド溶液 (EtBr)

3. DNAの抽出と精製

原虫類の(オー)シスト壁は硬く壊れにくい。したがって、DNA 抽出においては界面活性剤の存在下で加熱処理が必要である。あるいは、凍結融解も効果的である。抽出後の DNA 精製には市販の各種キットの利用が現実的である。以下に SDS を用いた基本的な抽出法と TritonX-100 を用いた簡便法の2つの方法を示す。

(1)基本的抽出及び精製法(SDS を用いた方法)

SDS(Sodium Dodecyl Sulfate)は基本的な抽出用試薬として各種材料に利用されており、(オー)シスト壁の溶解にも有効である。ただし、SDS はその後のPCR 反応に阻害的なために、充分な除去が必要となる。

<手順>

1. 20 μ l の試料を 160 μ l の TE buffer に浮遊し、さらに 20 μ l の 10%SDS を PCR チューブに入れ、軽く混和する。
2. ミネラルオイル(2 滴)で液面をシールする^{注1}。1.5ml の遠心チューブを用いる時は蓋をロックする。
3. 100℃のヒートブロックあるいは沸騰水中で 15 分間、加熱する^{注2}。
4. 室温にて 5 分間ほど冷却し、3,000rpm 程度で数秒、遠心する。
5. オイルの混入がないように、ピペットで水層部分を取り 1.5ml 遠心チューブに回収する。
6. 10mg/ml プロテナーース K 溶液を全量の 1/20 となるよう加えて軽く混和し、数秒遠心する。
7. 60℃で 1 時間加熱処理する。
8. 室温で5分間冷却する。
9. 400 μ l のフェノール/クロロフォルム混液を加え、チューブを転倒混和する。完全に白濁するまで、穏やかに混和する^{注3}。
10. 12,000 \times g、室温で 5 分間遠心する。
11. 水溶液部分を新しい遠心チューブに 300 μ l 程度回収する^{注4}。
12. 400 μ l のクロロフォルムを加え、全体が混ざるまで遠心チューブを転倒・混和

する^{注5}。

13. 12,000×g、室温で5分間遠心する。
14. 水溶液部分を新しい遠心チューブに回収する。
15. 約 400μl の上清に 40μl の 3M 酢酸ナトリウムと冷 99.5%エタノール 1ml を加え、2～3 分間混和する。
16. 12,000×g、室温で 15～20 分間遠心する。
17. 上清を捨て、冷 70%エタノールを 1ml 加え、2～3 回遠心チューブを転倒・混和する^{注6}。
18. 12,000×g、室温で 5 分間遠心する。
19. 上清を捨て、再び冷 99.5%エタノール 1ml を加え 2～3 回遠心チューブを転倒する。
20. 12,000×g、室温で 5 分間遠心する。
21. 上清を捨て、さらに 3,000rpm 程度で数秒、遠心する。
22. 管底に残ったエタノールを除き沈殿を自然乾燥させる^{注7}。
23. 100μl の TE バッファーを加え、沈殿を溶かす。
24. -20℃で保存する。

注1 オイルを滴下後 3,000rpm程度で数秒遠心し管壁のオイルを落とす。オイルでシールすることで水分の気化を防ぎ、DNA により PCR チューブ内が汚染されることを防ぐ。

注2 加熱時は内圧の上昇で必ずフタは開くので、固定して開かないようにする。

注3 有機溶媒を混ぜると直ちに白濁するが、水層とすぐに分離してしまうので、全体的に白濁が維持されるように遠心チューブを 1 秒毎程度に転倒する。3 分間ほど続ける。

注4 上からゆっくりと吸引・回収し、界面付近の浮遊物を回収しないように注意する。

注5 初めの数秒間強くチューブを振盪する。その後緩やかに 2 分間ほど転倒混和を続ける。

注6 上清はピペットで除去する。チューブの底まで徹底的にエタノールを除

去する必要はない。50 μ l ほど残して 70%エタノールを加える。

注7 沈殿を取らないように気をつけて、エタノールは 10 μ l ほど残しても問題ない。むしろ乾燥しすぎに注意する。

(2) 市販グラスパウダーを用いた方法

エタノール精製した DNA 試料を用いて PCR を行ったが DNA 増幅が見られない、ということがある。これは DNA 試料中にまだ PCR 阻害物質が混入しているためと考えられる。このような場合は、DNA 精製用のグラスパウダーやカラム等で再度精製をする必要がある。ここでは市販のグラスパウダーキットを用いた精製法の一例を示す。

<手順>

1. 1.5ml チューブに 300 μ l の市販キット付属の NaI 溶液、および 5 μ l のグラスパウダーを入れる。
2. 100 μ l のエタノール精製試料を加え、5 分間 (1分毎にチューブを転倒・混和) グラスパウダーを均一となるように混和する。
3. 12,000 \times g、15 秒間遠心する。 ┐
4. 上清を棄て、キット付属の洗浄液を 400 μ l 加える。 | 3回反復
5. チューブを転倒させながら内壁を良く洗う。 |
6. 12,000 \times g、15 秒間遠心する。 ┘
7. 遠心後、上清を棄て、さらに遠心して内壁の溶液を下へ落とし、遠心チューブ底の水分をピペットで完全に除去する。
8. キャップを開けて 5 分間乾燥させる。
9. 30 μ l の滅菌精製水あるいは TE バッファーを加え、グラスパウダーを浮遊させる。
10. 55 $^{\circ}$ C 程度で 5 分間湯煎する。
11. 12,000 \times g、15 秒間遠心する。
12. 上清を回収し、 -20° C に保存する。

(3) TritonX-100 を用いた簡易抽出法

非イオン系の界面活性剤は一般に SDS より穏やかな作用を示し、PCR を阻害しない (TritonX-100 は終濃度 2% まで添加可能)。したがって、抽出後の界面活性剤除去工程を省略することができる利点がある。充分量の精製 (オー) シストが入手可能な場合には便利な方法である。

< 手順 >

1. PCR チューブに精製 (オー) シストを 10% TritonX100 を含む 200 μ l の TE バッファーに浮遊する。
2. ミネラルオイルを 2 滴、滴下する。3,000rpm 程度で数秒、遠心し管壁のオイルを落とし、完全にシールする。
3. 100℃ のヒートブロックあるいは沸騰水中で 15 分間、加熱する。
4. 室温で 5 分間ほど冷却し、3,000rpm 程度で数秒間、遠心する。
5. オイルと管底の沈殿物を取らないように、抽出液を新しい PCR チューブに回収する。
6. 回収液を PCR 用のテンプレートとして用いる。
7. PCR 反応条件等は後述の《クリプトスポリジウムの PCR》を参照。

4. 制限酵素処理と電気泳動

(1) 電気泳動

電気泳動の操作手順は常法に準じて行う。

(2) PCR 産物の制限酵素解析

PCR 産物を 1 度精製してから制限酵素処理をすると酵素処理時間を短縮することができ、結果も良好となる。精製にはカラム法、ガラスパウダー法、その他の方法が適用できる。PCR 産物の収量が少ない時には積極的に濃縮を行うべきである。以下に制限酵素処理の一例を示す。

< 手順 >

1. PCR 産物を電気泳動し、DNA 増幅とその量を確認する。
2. DNA 精製用ガラスパウダーで PCR 産物を精製する。

3. 0.5ml の PCR チューブ内で 17 μ l の DNA 液と 2 μ l の制限酵素用バッファー保存溶液 (10 倍濃度)、そして 1 μ l の制限酵素を加え、2 時間、37℃で保温する。
4. 反応後、常法に従って電気泳動する。

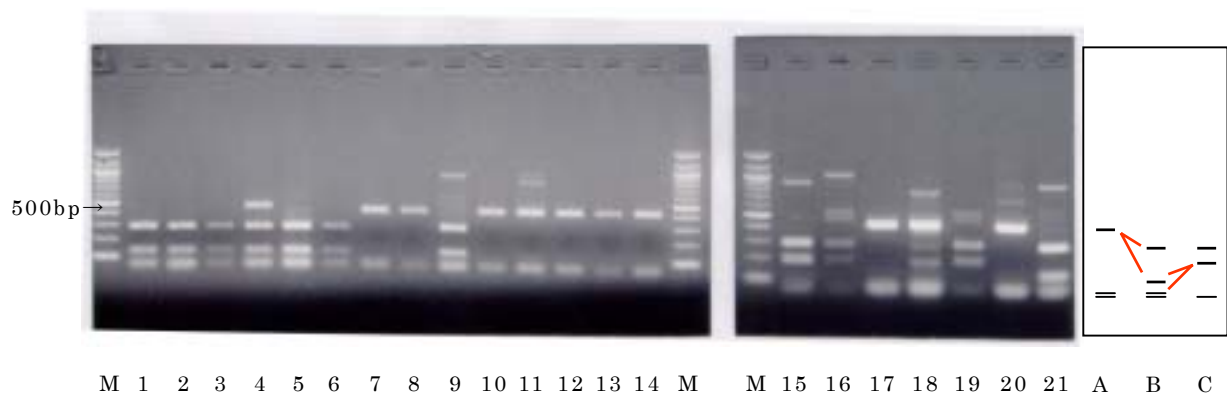


図. 1 PCR/RFLP 解析の例

cry373 および cry44 プライマーによる PCR 産物を *Rsa* I で制限処理した。3 種類の泳動パターンが見られる。パターンの模式図を写真右に示した。レーン 1～6 および 9 はウシ型 (模式図では B)、レーン 7、8、10～14、17、18、20 はヒト型 (同じく A)、レーン 15、16、19 は *meleagridis* 型 (C) であった。レーン 21 は 9 と同じ産物である。レーン M には 100-bp ラダーを使用した。レーン 1～6 はウシより分離された *C. parvum*、レーン 7～20 はヒトより分離された *C. parvum* を用いている。

《 クリプトスポリジウムの PCR 》

精製されたオーシストを用いた場合は、単個のオーシストからでも DNA 増幅は可能である。この場合、マニピュレーション等は技術的な熟練を要する。多量のオーシストを DNA 抽出に用いた場合は、阻害物質の混入を避けるため DNA を希釈して用いた方がよい。また、複数の種類による重複感染など、同一試料中に異なる遺伝集団が混在する可能性もあるので注意が必要である。

ここでは以下の3点について例示する。

1. 種の同定を目的とした PCR/RFLP、
2. *C. parvum* 分離株の遺伝型を調べるための PCR/RFLP、
3. 単一オーシストからの PCR

1. 種の同定を目的としたPCR

Johnson et al, (1995) のプライマー [CPB-DIAGF、CPB-DIAGR] は *C. parvum*、*C. muris*、*C. bailey*、*C. wrairi*、*C. meleagridis* の少なくとも 5 種について 18S リボソーム RNA 遺伝子内の 435bp を増幅する。塩基配列決定により分離株の種の同定ができる。

＜反応液の組成＞

試 薬	容 量
滅菌精製水	13.1μl
10 × Taq 用 buffer	2.5μl
dNTPs	2.0μl
20μM primer	0.5μl × 2
TaqDNA polymerase	0.2μl
Taq Start (抗 Taq 抗体)	0.2μl
50mM MgCl ₂	1.0μl
精製 DNA 溶液	5.0μl
計	25.0μl

DNA ポリメラーゼは、最も汎用されている TaqDNA polymerase を使用しているが、非特異的反応を抑える等の目的から、他種の DNA polymerase を使用する

こともある。また、同じ TaqDNA polymerase でもメーカーにより至適 Mg^{++} 濃度に違いが見られる。酵素については予備実験として至適 Mg^{++} 濃度を調べておいた方がよい。なお、本法では非特異反応を抑える目的で抗-TaqDNA polymerase 抗体を使用したホットスタート法を採用した。TaqDNA polymerase と抗体は予め別の PCR チューブ内で混ぜ、5 分間室温に置き、その後他の試薬とともに混合する。

<プライマー>

CPB-DIAGF : 5' - AAG CTC GTA GTT GGA TTT CTG -3'

CPB-DIAGR : 5' - TAA GGT GCT GAA GGA GTA AGG -3'

<手 順>

- 1) 用意する PCR チューブの本数は試験に要する本数＋陽性、陰性対照各 1 本とし、精製 DNA 溶液を除いた試薬類を全本数分混合し、反応液とする。
- 2) 各々の PCR チューブに 20 μ l の反応液を分注する。
- 3) 陰性対照には滅菌精製水を、陽性対照および試験群の PCR チューブには DNA 試料を各 5 μ l ずつ加える。
- 4) PCR チューブの底を軽くたたいて混合し、軽く遠心する。
- 5) 必要に応じてミネラルオイルを 1 滴落とし、再び軽く遠心する。
- 6) PCR チューブをサーマルサイクラーにセットする。
- 7) 以下の温度プログラムで PCR 反応を行う。

Step 1 :	98 °C	5 分	} Step 2～4 を 40 回反復
Step 2 :	94 °C	30 秒	
Step 3 :	55 °C	30 秒	
Step 4 :	72 °C	1 分	
Step 5 :	72 °C	7 分	

- 8) 2%アガロースで電気泳動する。EtBr で染色、DNA 増幅を確認する。

PCR の一般的な注意点であるが、目的が検出・同定にあるので試料間の相互汚染は必ず避けなければならない。具体的な注意事項として、

- フィルター付きのピペットチップを使用する。
- ゲルへのサンプル添加用に専用のピペッターを用意する。
- 手順の最後に DNA 溶液を取り扱う。
- 同時に複数の PCR チューブの蓋を開けない。
- 試薬類は小分けして保存する。
- 陰性、陽性コントロールをつける。特に、PCR では、DNA 増幅産物そのものがテンプレート DNA として多量に生産されるため、非常に汚染しやすい環境がつくられることに注意する。
- PCR チューブと蓋との隙間や蓋の裏面等に飛散した DNA は、ピペット操作の際に汚染の原因となるので DNA を含む反応液を攪拌したら必ず短時間の遠心 (3,000rpm 程度) を励行する。

<Awad-El-Kariem et al,(1994) のプライマー>

[CRY-RF、CRY-RR2] は *C. parvum*、*C. muris*、*C. bailey* の 3 種類について 18S リボソーム RNA 遺伝子内の 539bp を増幅する。*Mae* I -RFLP により分離株の種の同定ができる。

CRY-RF : 5' - AGT GCT TAA AGC AGG CAA CTG -3'

CRY-RR2: 5' - CTC CAC CAA CTA AGA ACG GCC -3'

温度条件

Step 1 :	94 °C	3 分	}	Step 2~4 を 40 回反復
Step 2 :	94 °C	30 秒		
Step 3 :	53 °C	30 秒		
Step 4 :	72 °C	30 秒		
Step 5 :	72 °C	5 分		

2. 遺伝子型別を目的とした PCR

ヒトや動物由来の *C. parvum* 分離株の遺伝学的解析から、*C. parvum* には大きく分けて動物型とヒト型の2つの遺伝型 (genotype) があると考えられている。現在までヒト型は家畜、その他の動物からは検出されておらず、ヒト集団に特異的な genotype と考えられている。*C. parvum* 分離株の遺伝子型別は、分子疫学的手法として集団感染時の感染源および感染経路の特定に有用な情報を提供するものと期待される。

本法に関しては数種類の遺伝子について報告がされている。使用するプライマーと増幅する DNA 領域および PCR の温度条件等を以下に示す。

< 手順 >

クリプトスポリジウムの種同定を目的とした PCR を参照。

< Carraway et al. (1997) のプライマー >

[CRY-44、CRY-373] は *C. parvum* のポリスレオニン遺伝子内の 518bp を増幅する。*Rsa* I -RFLP により分離株はヒト型、ウシ型、*meleagridis* 型に分けることができる。ページ 26 の図 1 に例を示した。

CRY-44 5' - CTC TTA ATC CAA TCA TTA CAA C-3'

CRY-373 5' - AGC AGC AAG ATA TGA TAC CG-3'

温度条件

Step 1 :	94 °C	3 分
Step 2 :	94 °C	30 秒
Step 3 :	53 °C	1 分
Step 4 :	72 °C	30 秒
Step 5 :	72 °C	5 分

Step 2～4 を 40 回反復

< Spano et al. (1997) のプライマー >

[CRY-15、CRY-9] は *C. parvum* の *Cryptosporidium* outer wall protein (COWP) 遺伝子内 550bpを増幅する。*Rsa* I -RFLP により分離株はヒト型と動物型に分かれる。また、形態学的に *C. parvum* と良く似た *C. wrairi* でも 553bp

の DNA 増幅が認められ、特異的な遺伝型を示す。

CRY-15: 5'-GTA GAT AAT GGA AGA GAT TGT G-3'

CRY-9 : 5'-GGA CTG AAA TAC AGG CAT TAT CTT G-3'

温度条件

Step 1 :	94 °C	3 分]	Step 2～4 を 30 回反復
Step 2 :	94 °C	50 秒		
Step 3 :	55 °C	30 秒		
Step 4 :	72 °C	50 秒		
Step 5 :	72 °C	10 分		

<Spano et al.(1998)のプライマー>

[Cp.E、Cp.Z] は *C. parvum* の Thrombosporidin-Related Adhesive Protein of *Cryptosporidium*-1 (TRAP-C1) 遺伝子内約 1,200bpを増幅する。*Rsa* I -RFLP により分離株はヒト型と動物型に分けることができる。

Cp.E: 5'-GGA TGG GTA TCA GGT AAT AAG AA-3'

Cp.Z: 5'-CAA CTA GCC CAG TTC TGA CTC TCT GG-3'

温度条件

Step 1 :	94 °C	3 分]	Step 2～4 を 35 回反復
Step 2 :	94 °C	50 秒		
Step 3 :	55 °C	30 秒		
Step 4 :	72 °C	60 秒		
Step 5 :	72 °C	10 分		

3. 単個のオーシストを用いた PCR

単個のオーシストの PCR は蛍光抗体で染色された疑わしい粒子の確定、また、複数の種または株による重複感染の可能性を判断するうえで有効な手段である。オーシストの単離は micro-manipulation 法(手製の $\leq 20 \mu\text{m}$ ϕ 程度の先細ピペットを用いて顕微鏡下でオーシストを釣る)、あるいは限界希釈法が用いられる。精製 DNA を用いた PCR と異なる点は、界面活性剤による DNA 抽出と PCR による増幅を同一チューブ内で行うことである。ここでは、Johnson のプライマーを

用いたリボソーム RNA 遺伝子領域を増幅する例を示す。

< 反応液の組成 >

	A 液	B 液
精製水	15.5 μ l	11.0 μ l
10 \times Taq用 buffer	2.5 μ l	2.5 μ l
10% Triton X-100	5.0 μ l	—
dNTPs	—	4.0 μ l
20 μ M primer	—	2.5 μ l $\times 2$
TaqDNA polymerase	—	0.25 μ l
抗 Taq 抗体	—	0.25 μ l
50mM MgCl ₂	—	2.0 μ l
単離オーシスト	2.0 μ l	—
計	25.0 μ l	25.0 μ l

< 手 順 >

1. オーシスト浮遊液 (低濃度に調整) を 60mm 径シャーレに入れる。
2. キャピラリーガラスピペットを加工して micro-manipulation 法によりオーシストを単離・吸引する。
3. 別のシャーレを用意し、その水の中にキャピラリーの内容物を吹き出し、オーシストであることと単個であることを確認する。
4. あらためてオーシストを micro-manipulation により回収し、PCR 用チューブに移す。
5. A 液を入れ、軽く遠心し、ミネラルオイルを1滴加える^{注1}。
6. -80℃と室温の間で凍結融解を 3 回繰り返す。
7. サーマルサイクラー、ヒートブロックなどを用いて 15 分間、100℃の加熱処理をする。
8. 室温で5分間冷却した後、遠心する^{注2}。
9. B 液を加え軽く遠心する。PCR チューブごとにピペットチップは交換する。オイル上に水分が残っていないことを確認する。
10. チューブをサーマルサイクラーにセットする。
11. 以下の温度プログラムで PCR 反応を行う。

Step 1 :	98 °C	5 分		
Step 2 :	94 °C	30 秒	}	Step 2～4 を 40 回 反復
Step 3 :	55 °C	30 秒		
Step 4 :	72 °C	1 分		
Step 5 :	72 °C	7 分		

12. 生成産物を2%アガロースで電気泳動、EtBrで染色し、DNA増幅を確認する。

注1 オイルを重層することで、加熱による気化を防止することができる。25μl の抽出用溶液が少量でも気化して液量が減少すれば、バッファーとしてのイオン濃度が高まり、DNA ポリメラーゼの活性に影響を与える。

注2 オイルでシールされてはいるが、チューブ内は抽出された DNA が充満しており、極めて汚染しやすい状況になっていると考えて取り扱う。加熱されたチューブを冷却し遠心することで DNA との接触を最小限にする。

<単離用マイクロキャピラリーの作り方>

- 1) 市販の 10μl 用のガラス製キャピラリーピペットを用意する。
- 2) 両手の親指と人指し指で両端をつまみ、キャピラリーピペットを回転させながら中央部を幅 2cm くらいにわたって加熱する。
- 3) 自然に折れ曲る程度に柔らかくなったら、炎から離すと同時に両端を 10cm ほど引き伸ばす。この時、引き伸ばされたキャピラリーピペットの先に 120° 程度の角度がつくように両手首を外側に開くように引くとよい。また、キャピラリーピペットを引きちぎることなく、細い管（マイクロキャピラリー）が形成されるようにすることが重要である。
- 4) 引き伸ばされたキャピラリーピペットを中央部付近で切り離す。
- 5) マイクロキャピラリーの先端部分は、角度のついた部分から先端までが 2～3cm となるように調整する。
- 6) 吸引用チューブにマイクロキャピラリーを差込み、水中で空気を噴き出す。微小な気泡が連続して出てくるものを選択し、使用する。

《 ジアルジア の遺伝子型別を目的とした PCR 》

ヒト感染性の *Giardia lamblia* (*G. intestinalis*, *G. duodenalis* と synonym) における DNA タイピングを中心に研究が進められている。蛍光抗体の染色性や形態からは同定しにくい試料の検査、またクリプトスポリジウムと同様に水系感染時の感染源特定を目的とした分子疫学的調査に有効と考えられるが、まだ研究の段階というべきである。

< 手順 >

クリプトスポリジウムの種同定を目的とした PCR (27 頁) を参照。

< Homan et al.(1998) のプライマー >

[GDH1、GDH4] はジアルジアの Glutamate dehydrogenase 遺伝子内 768bp を増幅する。*Dde* I -RFLP により分離株は2つの genotype (Polish type および Belgian type) に分けることができる。

[GDH1、GDH4]

GDH1: 5'-ATC TTC GAG AGG ATG CTT GAG-3'

GDH4: 5'-AGT ACG CGA CGC TGG GAT ACT-3'

温度条件

Step 1 :	94 °C	7 分	}	Step 2~4 を 35 回反復
Step 2 :	94 °C	1 分		
Step 3 :	55 °C	1 分		
Step 4 :	72 °C	1 分		
Step 5 :	72 °C	7 分		

また Homan ら(1998) のプライマー [P1F、P3R] および [B1F、B3R] はそれぞれ Polish type 株および Belgian type 株の Glutamate dehydrogenase 遺伝子内 800bp および 1500bp を増幅する。*Dde* I -RFLP により各 genotype をいくつかの subtype に分けることができる。

[P1F、P3R]

P1f: 5'-CTG CAG GGG CAA GGC GTA GAT-3'

P3R: 5'-CCA CCG TGC CAG TCT TCT GGG-3'

温度条件

Step 1 :	94 °C	7 分]	Step 2～4 を 30 回反復
Step 2 :	94 °C	1 分		
Step 3 :	55 °C	1 分		
Step 4 :	72 °C	2 分		
Step 5 :	72 °C	7 分		

[B1F、B3R]

B1F:5'-CTG CAG TAA CAC TGG CAA G-3'

B3R:5'-CTG CAG AGT TCT CCG CAG CG-3'

温度条件

Step 1 :	94 °C	7 分]	Step 2～4 を 30 回反復
Step 2 :	94 °C	1 分		
Step 3 :	55 °C	1 分		
Step 4 :	72 °C	1 分		
Step 5 :	72 °C	7 分		

《 サイクロスポラの検出・同定を目的とした PCR 》

Cyclospora cayetanensis は 食品由来感染症の病原体として知られる。大きさ 8-10 μ m、ほぼ真球型で自家蛍光をもつ。迅速確定診断には自家蛍光観察と合わせ、PCR による同定が可能となった。

< 手順 >

クリプトスポリジウムの種同定を目的とした PCR(27 頁)を参照。

< Relman et al.(1996) のプライマー >

[F1E、R2B]および[F3E、R4B]は small subunit リボゾーム RNA 遺伝子領域を対象に nested PCR を行う目的で設計されている。[F1E、R2B]は約 600bp を増幅し、[F3E、R4B]はその内側約 300bp を増幅する。オーシストが多数精製された場合は、[F1E、R2B]を用いた PCR で結果が得られる。

[F1E、R2B]

F1E :5'-GGA ATT CCT ACC CAA TGA AAA CAG TTT-3'

R2B :5'-CGG GAT CCA GGA GAA GCC AAG GTA GG-3'

温度条件

Step 1 :	95 °C	3 分	}	Step 2~4 を 30 回反復
Step 2 :	94 °C	1 分		
Step 3 :	50 °C	1 分		
Step 4 :	72 °C	2 分		
Step 5 :	72 °C	7 分		

[F3E、R4B]

F3E: 5'-GGA ATT CCT TCC GCG CTT CGC TGC GT-3'

R4B: 5'-CGG GAT CCC GTC TTC AAA CCC CCT ACT G-3'

温度条件

Step 1 :	95 °C	3 分	}	Step 2~4 を 30 回反復
Step 2 :	94 °C	1 分		
Step 3 :	60 °C	1 分		
Step 4 :	72 °C	2 分		
Step 5 :	72 °C	7 分		

Cryptosporidium、*Giardia* ならびに *Cyclospora* を対象とした主なPCRプライマー

Primer s	Primer sequence		Target DNA		Reference
CPB-DIAGF	5'- AAG CTC GTA GTT GGA TTT CTG	-3'	<i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>C.muris</i> , <i>C.bailey</i> , <i>C.wrairi</i> , <i>C.meleagridis</i>	18SrRNA	Johnson, D.W., et al. (1995)
CPB-DIAGR	5'- TAA GGT GCT GAA GGA GTA AGG	-3'			
CRY-RF	5'- ACT GCT TAA AGC AGG CAA CTG	-3'	<i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>C.muris</i> , <i>C.bailey</i>	18SrRNA	Awad-El-Kariem,F.M.,et al. (1994)
CRY-RR2	5'- CTT CAC CAA CTA AGA ACG CCC	-3'			
CRY 44	5'- CTC TTA ATC CAA TCA TTA CAA	-3'	<i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>C.meleagridis</i>	Polythreonine ORF	Carraway,M., et al. (1997)
CRY 373	5'- AGC AGC AAG ATA TGA TAC CG	-3'			
CRY 9	5'- GGA CTG AAA TAC AGG CAT TAT CTT G	-3'	<i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>C.wrairi</i>	COWP gene	Spano,F., et al. (1997)
CRY 15	5'- GTA GAT AAT GGA AGA GAT TGT G	-3'			
CP.E	5'- GGA TGG GTA TCA GGT AAT AAG AA	-3'	<i>Cryptosporidium parvum</i>	TRAP-C1 gene	Spano,F., et al. (1998)
CP.Z	5'- CAA CTA GCC CAG TTC TGA CTC TCT GG	-3'			
forward	5'- ATG TCT GAA GGT CCA GCT ATT GGT ATT GA	-3'	<i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>C.muris</i> , <i>C.bailey</i> , <i>C.wrairi</i> , <i>C.meleagridis</i> , <i>C.serpentis</i>	hsp70 gene	Sulaiman,I.M., et al. (2000)
reverse	5'- TTA GTC GAC CTC TTC AAC AGT TGG	-3'			
nested fow.	5'- TMT TCA TST GTT GGT GTA TGG AGA AA	-3'			
nested rev.	5'- CAA CAG TTG GAC CAT TAG ATC C	-3'			
GDH1	5'- ATC TTC GAG AGG ATC CTT GAG	-3'	<i>Giardia lamblia</i>	Glutamate dehydrogenase gene	Homan,W.L., et al. (1998)
GDH4	5'- ACT ACG CGA CGC TGG GAT ACT	-3'			
GI B1F	5'- CTG CAG TAA CAC TGG CAA G	-3'			
GI B3R	5'- CTG CAG AGT TCT CCG CAG CG	-3'			
GI P1F	5'- CTG CAG GGG CAA GGC GTA GAT	-3'			
GI P3R	5'- CCA CCG TGC CAG TCT TCT GGG	-3'			
CYCF1E	5'- GGA ATT CCT ACC CAA TGA AAA CAG TTT	-3'	<i>Cyclospora caytanensis</i>	18SsRNA	Relman,D.A., et al. (1996)
CYCF3E	5'- GGA ATT CCT TCC GCC CTT CGC TGC GT	-3'			
CYCR2B	5'- CGG GAT CCA GGA GAA GCC AAG GTA GG	-3'			
CYCR4B	5'- CGG GAT CCC GTC TTC AAA CCC CCT ACT G	-3'			

引用文献

遠藤 卓郎、八木田 健司 1997. クリプトスポリジウムの検査法 『検査と技術』 25(3): 215-220.

クリプトスポリジウム等原虫疾患に関する情報・資料集. 平成 9 年度 厚生科学研究報告書別冊 (主任研究者 遠藤卓郎)

Carraway, M., S. Tzipori, and G. Widmer. 1997. A new restriction fragment length polymorphism from *Cryptosporidium parvum* identifies genetically heterogeneous parasite populations and genotypic changes following transmission from bovine to human hosts. *Infect. Immun.* 65:3958-3960.

Awad-El-Kariem, F. M., D. C. Warhurst, and V. McDonald. 1994. Detection and species identification of *Cryptosporidium* oocysts using a system based on PCR and endonuclease restriction. *Parasitol.* 109:19-22.

Relman, D. A., T. M. Schmidt, A. Gajadhar, M. Sogin, J. Cross, K. Yoder, O. Sethabutr, and P. Echeverria. 1996. Molecular phylogenetic analysis of *Cyclospora*, the human intestinal pathogen, suggests that it is closely related to *Eimeria* species. *J. Infect. Dis.* 173:440-445.

Homan, W. L., M. Gilsing, H. Bentala, L. Limper, and F. V. Knapen. 1998. Characterization of *Giardia duodenalis* by polymerase-chain-reaction fingerprinting. *Parasitol. Res.* 84:707-714.

Spano, F., L. Putignani, S. Guida, and A. Crisanti. 1998. *Cryptosporidium parvum*: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C1 (Thrombosporidin-Related Adhesive Protein of *Cryptosporidium* -1) gene discriminates between two alleles differentially associated with parasite isolates of animal and human origin. *Exp. Parasitol.* 90:195-198.

Spano, F., L. Putignani, J. McLauchlin, D. P. Casemore, and A. Crisanti. 1997. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C.wrairi* and *C.parvum*, and between *C.parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 150:209-217.

Johnson, D. W., N. J. Pieniazek, D. W. Griffin, L. Misenerand, and J. B. Rose. 1995. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3849-3855.

執筆者一覧

遠藤 卓郎 : 国立感染症研究所寄生動物部*
八木田健司 : 国立感染症研究所寄生動物部
泉山 信司 : 国立感染症研究所寄生動物部
増田 剛太 : 東京都立北療育医療センター
黒木 俊郎 : 神奈川県衛生研究所細菌病理部
大友 良光 : 青森県環境保健センター微生物部
遠藤 守保 : 秋田県衛生科学研究所微生物部
赤見 正行 : 群馬県衛生環境研究所ウイルス課
北條 圀生 : 静岡市衛生試験所衛生検査担当
井出 忍 : 静岡市衛生試験所衛生検査担当
勢戸 和子 : 大阪府立公衆衛生研究所公衆衛生部
肥塚 利江 : 大阪府立公衆衛生研究所公衆衛生部
栃木県保健環境センター
東京都健康安全研究センター

*〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

TEL:03-5285-1111 FAX:03-5285-1173

クロイツフェルド・ヤコブ病(CJD)

クロイツフェルド・ヤコブ病(CJD)

目 次

I. プリオンの概説

1. プリオン病原体検査に関する一般的な注意事項
2. 検体の採取・輸送及び保管
 - 1 検査材料の採取
 - 2 検査材料の輸送
 - 3 検査材料の保存
 - 4 消毒・滅菌法（プリオンの不活化）

II. 検査の進め方

1. 確定診断法
 - 1 ウェスタン・ブロット法による解析
 - 2 免疫組織化学による解析
 - 3 バイオアッセイ法による解析
 - 4 プリオン蛋白遺伝子解析
2. 補足的検査
 - 1 14-3-3 蛋白検査

付記 1) ウシ海綿状脳症確定検査プロトコール（ウェスタン・ブロット法）

III. CJD、vCJD 等の診断基準

IV. 引用文献

V. 検査依頼先

VI. 執筆者一覧

I. プリオンの概説

プリオンは、蛋白性感染粒子(Prion= proteinaceous Infectious particles)のことで核酸は現在のところ証明されていない。プリオンの本体は異常型プリオン蛋白であり、これは正常な神経細胞などで発現している正常型(あるいは細胞型、PrP^c; c=cellular)プリオン蛋白の異常な立体構造をとる構造異性体である。異常型プリオン蛋白は PrP^{sc} と呼ばれる(sc=scrapie, スクレピーに由来)。

ヒトでは染色体の第 20 番目にプリオン蛋白遺伝子がコードされているが、精製した異常 (型) プリオン蛋白質にはプリオン遺伝子は見つからない。

PrP^{sc} は PrP^c から作られるが、その機序は、プリオンダイマー説、核重合説などが考えられているが、いまだ不明である。しかし、構造的には正常型プリオン蛋白の持つ α ヘリックス構造から高度の β シート状構造を形成する。生化学的には難溶性で蛋白分解酵素処理などに抵抗性を示し、また熱や酸などの物理化学的抵抗性を持つ。一連の PrP^{sc} の検出にはこれらの性質を利用している。

異常型プリオン蛋白の異常蓄積によるプリオン病には、ヒトではクールー(Kuru)、クロイツフェルト・ヤコブ病(Creutzfeldt-Jakob disease, CJD), ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群(Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome, GSS), 致死性家族性不眠症(Fatal familial insomnia) などがある。動物には、羊のスクレピー、牛海綿状脳症(Bovine spongiform encephalopathy, BSE)などがある。異常型プリオン蛋白の感染性の性質から、これらを総称して伝達性海綿状脳症(Transmissible spongiform encephalopathy, TSE)とよぶ。

BSE は scrapie の肉骨粉が原因と考えられているし、ミンク伝達性脳症(TME)や動物園のチータなどの TSE は餌として与えられた scrapie の肉が原因と考えられている。ヒトでは変異型 CJD(variant CJD; vCJD)が BSE に起因していると考えられている。

このようにプリオン病は異常型プリオン蛋白と正常プリオン蛋白の連鎖反応として捉えることが出来る。

1. プリオン病原体検査に関する一般的な注意事項

プリオン病原体等の臨床材料の取り扱いまたは剖検材料からの抽出は biosafety level 2 (BSL-2) 内の安全キャビネットで行う。感染防護処置（各々の作業）は BSL-3 相当で行う。マウスの脳内接種による増殖実験では BSL-2 の施設が必要である。

- 未固定材料またはホルマリン固定検体の取扱いは、専用の BSL-2 実験室内で行う。以下、専用とはプリオン病専用を指す。
- ガウン、シールド付きマスク、手袋を着用する。必要に応じてアンチカットグローブを使用する。
- 使用した器具等は 1M NaOH 溶液に 2 時間浸し、水拭きする。
- ガウン等は 134℃ 60 分間のオートクレーブ処理する。
- その他のものは 2 %次亜塩素酸ナトリウムで一晩処理する。

2. 検体の採取・輸送および保管

1 検査材料の採取

プリオン病原体検査に関する一般的な注意事項を参照すること。

2 検査材料の輸送

剖検材料（脳脊髄組織、扁桃、脾臓、髄膜、移植例では角膜）、生検材料（脊髄液等）はスクリューキャップのプラスチック管に入れ密栓し、万国郵便法に基づく方法にて-20～-80℃で送付する。ホルマリン固定組織についても同様に扱い、常温で送付する。ギ酸処理によるプリオン不活化パラフィン包埋組織（パラフィンプロック）については危険性が少なく室温における輸送が可能で通常の輸送方法でよい。

3 検査材料の保存

組織検体はBSL-2内の-80℃の冷蔵庫に耐貫通性のある密閉容器に入れて保管し、施錠、保管管理の記録を行う。3%SDS中で100℃5分間以上煮沸したサンプルに感染性はないので通常のサンプルと同様に保存する。ホルマリン固定後のギ酸処理によるプリオン不活化パラフィン包埋組織も感染性は少なく室温に保管する。

4 消毒・滅菌法（プリオンの不活化）

汚染材料の消毒滅菌法

	薬剤・方法等	温度 (℃)	時間 (分)	対象
a	焼却	—	—	臓器、可燃物等
b	オートクレーブ	134	60	各種機材、機器、臓器、 他
c	3% SDS 浸漬	100	5	各種機材、機器、その他
d	1M NaOH 浸漬	室温	120	各種機材、機器、その他
e	2%次亜塩素酸ナトリウム浸漬	室温	120	各種機材、機器、その他

注1) a, b は、プリオンを完全に消失させ、c, d, e は 10^{-3} 以下のオーダーで不活化させる。可燃物については、a を第一選択とし、不燃物については b を第一選択とし、c が次の適用となる。a, b, c が適さないような高温に耐えないもの及び巨大なものについては、d, e を適用する。

注2) 2M NaOH であれば室温 60 分が可能であるが 2M NaOH は消防法で危険物取扱いの指定を受けていることに注意する。

Ⅱ．検査の進め方

プリオン病検査は基本的にウエスタン・ブロット法による異常型プリオン蛋白の検出と免疫組織化学による異常型プリオン蛋白沈着の確認であり、この二法が現在最も信頼できる確実な検出方法である。その他にバイオアッセイ法、遺伝子解析法があるが、取り扱い安全施設の設置、患者材料を取り扱う必要性によるインフォームドコンセントの確立などクリアしなければならない点が多い。

補足的診断として髄液中の 14-3-3 蛋白、NSE、tau 蛋白などを測定する方法がある。

1．確定診断法

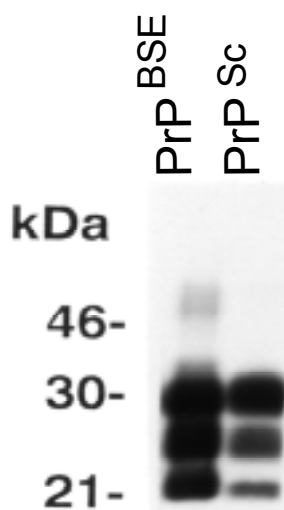
1 ウエスタン・ブロット法による解析

病原体の同定には剖検材料（脳組織、扁桃、脾臓）から免疫組織化学的検査またはウエスタン・ブロット法により異常型プリオン蛋白（プロテアーゼ耐性）を証明する。以下に CJD 剖検例などの脳組織からのプリオン蛋白検出法を示す。後述するウシ海綿状脳症確定検査のためのウエスタン・ブロット法によって CJD の組織を調べることも可能。

[1] プリオン蛋白の抽出

- 1) サンプル 100 mg あたり 600 μ l のバッファー(2% TritonX-100, 0.5% Sarkosyl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, Collagenase 0.5 mg 及び DNase I 40 μ g)を加えチューブ内でホモジェネートし、37℃で 12 時間ローテーションを加える。
- 2) サンプル 100 mg あたり 40 μ g の Protenase K を加え、さらに 2 時間保温する。
- 3) 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)で反応を停止し、4 倍量の cold methanol を加える。 -20℃に 30 分間放置し、15,000 回転、4℃で 20 分間遠心する。
- 4) 得られたペレットを開始組織重量の約 8 倍量の 1X サンプルバッファー [50mM Tris.HCl (pH6.8), 100mM dithiothreitol, 3%SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol]で溶解後、100℃、10 分間加熱する。
- 5) 3% SDS 中で 100℃ 5 分以上加熱すると感染性が失われるため、以後は通常のウエスタン・ブロット法によりプリオン蛋白を検出する。

以下に BSE と CJD から上記の方法により蛋白分解酵素耐性の蛋白を抽出し、プリオンペプチドに対するウサギ抗体によりウエスタン・ブロット法を行った結果を示す。通常、糖鎖の付着個数（1 分子に対し 0, 1, または 2 箇所）により 3 本のバンドを観察する。



BSE 検査など多数検体を処理するための方法としては、蛋白分解酵素を使用して正常プリオン蛋白を消化した後に残った異常型プリオン蛋白を抗プリオン抗体によるサンドイッチ法で検出するエライザ法（Bio-Rad 社）が用いられている。このキットで得られたサンプルをウエスタン・ブロット法によって再検査する場合のプロトコールは後述する。他に感度の高い方法がスクレーピー病原体を対象に報告されている。

2 免疫組織化学による解析

以下に中枢神経組織サンプルからのパラフィンブロック作製と免疫染色法による検査手順を示す。CJD 剖検例から得られたサンプルと異なり、BSE の場合は免疫組織化学的検査による迅速な診断が必要とされ、食肉衛生検査所でホルマリン固定されたウシかんぬき部のサンプルは、十分な固定時間をとることができないが、CJD 剖検例の免疫組織化学的検査について記載し、次に異なる点を中心に BSE サンプルについて記載する。

CJD の免疫組織化学による解析

[1] 包埋

- 1) 検体容器の周囲を 1M NaOH で拭き、安全キャビネット内に 2 時間放置後、水拭きする。
- 2) ホルマリン固定 (15-20%緩衝ホルマリンで最初に固定される) : 通常は 1 —2 週間のホルマリン固定が必要である。
- 3) ホルマリン固定組織の切り出しは安全キャビネット内で、ガウン、手袋、マスク、シールドないしゴーグルを着用する。
ディスポのベンチシートを引き、プラスチックのまな板の上でディスポの刃 (ブレード) で切り出す。切り出す組織の厚さは 3 mm 以内とする。
　　<必要な道具 : ディスポベンチシート、まな板、切り出し用ブレード、ピンセット、ステンレストレイ、番号を記入したプラスチックカセット必要数、ブレード捨て缶、キムタオル[®]、1M NaOH、ギ酸処理用容器>
- 4) プラスチックカセットにいれた固定済み脳組織を、直接 98%ギ酸液にいれ攪拌したのち、室温 1 時間浸漬する。ホルマリンで再固定 (かなりの感染性低下をもたらす)。
- 5) 専用自動包埋機で包埋する。
- 6) パラフィン包埋は専用の機器で、専用のモールド (ディスポプロベースモールド) を使用する。

<後処理>

- 1) ホルマリンは専用の廃液タンクに捨てる。後日、焼却。
- 2) 切り出しに使ったピンセットはステンレストレイにおき、1M NaOH で室温 2 時間浸す。その後水洗。
- 3) ブレードは専用の缶に捨てる。あとで 134℃ 60 分間のオートクレーブ処理し、廃棄。
- 4) まな板は 1M NaOH でぬらしたキムタオルをかぶせて、室温 2 時間、水洗。
- 5) 残った脳組織は固定瓶に戻して保存。不要になったら、134℃ 60 分間のオートクレーブ処理後、廃棄。

[2] 薄切

- 1) BSL-2 実験室内の安全キャビネット内で薄切作業を行う。＜用意するもの：ベンチシート、ミクロトーム、水桶、パラフィン伸展器、加湿器、替え刃捨て缶、スライド硝子、筆、1M NaOH、キムタオル＞
- 2) 手袋、シールド付きマスク、ガウンを着用する。必要時にはアンチカットグローブを使う。
- 3) 安全キャビネット内にベンチシートを敷き、ミクロトーム (Microm 製) を置き、薄切する。専用のパラフィン伸展器および水おけもともに置き、切片をシランコートスライドに載せる。
- 4) ヘパフィルター付き専用掃除機で、切片くずを吸い取る。後で、134℃ 60 分間のオートクレーブ処理。
- 5) ナイフホルダーは 3%SDS で、105℃, 10 分間のオートクレーブ後、水洗、乾燥。その際、1%になるように炭酸ナトリウムを加える。
- 6) 替え刃は専用捨て缶に捨てる（安全キャビネット内に常に置いておく）。
- 7) 薄切切片は 37℃で乾燥させる。

＜後処理＞

すべての切片屑を前述した掃除機で吸い取る。ブレードを消毒する。水には 2% 次亜塩素酸ナトリウムを入れ、一晩処理後、流しに廃棄。

[3] HE 染色（専用の脱パラ・染色用バット系列を用意する）

- 1) 脱パラ、エタノール、水洗。
- 2) カラッチヘマトキシリン染色 室温 10 分。
- 3) 水洗後、0.5%塩酸アルコール 5 秒後、水洗。
- 4) エオジン染色 室温 3 分。
- 5) 分別・脱水・透徹。
- 6) エンテランで封入。

＜封入後の染色スライドは非感染性＞

[4] 免疫組織化学

- 1) 脱パラ、エタノール、水洗。

- 2) 専用のオートクレーブで、3 mM HCl 中で、121℃20 分処理。温度が下がったら出して PBS 洗浄。
- 3) プロティネース K 処理（シグマ、4μg/ml Tris-EDTA、37℃、20-10 分）は固定が十分な場合に限り行う。終了後、PBS 洗浄。
- 4) 内因性ペルオキシダーゼ処理（0.3%過酸化水素水を含むメタノール、室温 30 分）。
- 5) ブロッキング（10%正常ヤギ血清を含む PBS、室温 5 分）。
- 6) 1 次抗体を載せ、4℃、一晚反応させる。
- 7) PBS 洗浄。
- 8) LSAB 液、室温 30 分反応後、PBS 水洗。
- 9) HRP 呈色反応（Dohjin、DAB 40 mg/Tris 200 ml, 100 μl H₂O₂）。
- 10) 蒸留水で洗浄後、ヘマトキシリンで、室温 1 分。
- 11) 蒸留水で洗浄後、脱水、透徹、封入する。

<試薬類：LSAB キット（DAKO K0672 または K0675）あるいはエンビジョンキット（DAKO K002 または K003）、プロティネースK、ブロッキング溶液、一次抗体、ヘマトキシリン>

<後処理>

脱パラ用キシレン、エタノール、蒸留水は別々の専用容器に廃棄。揮発性薬品を含む引火性の高い廃棄物を焼却する場合は処理業者に確認する。専用の染色バット、染色カゴは 1M NaOH で2時間処理後水洗。ヘマトキシリンやエオジン等の染色液はチップに吸わせて廃棄。

[5] BSE 検査用の迅速免疫染色検査

- 1) 検体容器の周囲を 1M NaOH で拭き、安全キャビネット内に2時間放置後、水拭きする。
- 2) 各と畜場においてホルマリン固定開始（15-20%緩衝ホルマリンで最初に固定される）から 18 時間後程度経過したサンプルに対し再固定を（サクラの迅速固定液で 60℃ 40 分間）行う。
- 3) ホルマリン固定組織の切り出しは安全キャビネット内で、前述した服装で行う。

ベンチシートを引き、プラスチックのまな板の上でディスポのブレードで切り出す。切り出し組織の厚さは3 mm以内とする。

＜必要な道具：ディスポベンチシート、まな板、切り出し用ブレード、ピンセット、ステンレストレイ、番号を記入したプラスチックカセット必要数、ブレード捨て缶、キムタオル、1M NaOH、ギ酸処理用容器＞

- 4) プラスチックカセットにいれた固定済み脳組織を、直接 98%ギ酸液に入れ攪拌したのち、室温 1 時間浸漬する。50%エタノールで 5 分間、振とうし再固定する（かなりの感染性低下をもたらす）。
- 5) 専用自動包埋機で包埋する（2.5 時間）。
- 6) パラフィン包埋は専用の機器で、専用のモルド（ディスポプロベースモールド）を使用する。

パラフィン包埋の後処理、薄切とその後処理、HE 染色はよく固定されたサンプルと同様に行う。

[6] 免疫組織化学

- 1) 脱パラ、エタノール、水洗。
- 2) 専用のオートクレーブで 1mM HCl 中で、121℃ 20 分処理。温度が下がったら出して PBS 洗浄。
- 3) 内因性ペルオキシダーゼ処理（3%過酸化水素水を含むメタノール、室温 5 分）。
- 4) ブロッキング（10%正常ヤギ血清を含む PBS、室温 5 分）。
- 5) 1 次抗体を載せ、37℃、60 分間反応させる。
- 6) PBS 洗浄。
- 7) Envision 液(ダコ)、室温 3 0 分反応後、PBS 水洗。
- 8) HRP 呈色反応（Dohjin、DAB 40 mg/Tris 200 ml, 100 µl H₂O₂）。
- 9) 蒸留水で洗浄後、ヘマトキシリンで、室温 1 分。
- 10) 蒸留水で洗浄後、脱水、透徹、封入する。

＜後処理＞はよく固定されたサンプルと同様に行う。

3 バイオアッセイ法による解析

孤発性 CJD 患者の脳組織には多量の異常型プリオンが蓄積しており、マウスへの感染力価(LD₅₀)は 10⁶-10⁹/g に及ぶ。このため、組織（脳）乳剤のマウス脳内接種によるバイオアッセイは孤発性 CJD の最も鋭敏な方法であり、ウエスタン・ブロット法の 100 倍以上の感度を有する。しかし、初代伝播マウスでは潜伏期間が長く（通常 2 年以上）、迅速な検査には適していない。ただし、ヒトプリオン蛋白を過剰発現するトランスジェニックマウスを用いれば 40-50 日で発症させることが可能である。孤発性 CJD では感染したマウスは最終的にすべて死ぬことになる。従って、感染力価 (ID₅₀) と致死量 (LD₅₀) は等しい。

発症の目安となるマウスの異常挙動は 1) 四肢のマヒによる運動失調、2) 尻尾の硬直、3) 尻尾を持って吊り下げた状態での前肢屈曲、及び 4) 仰向け状態からの回復困難などで、これらの症状のうち少なくとも二つが数日以内に観察された時点で発症と見做す。しかし、確定診断には上記のウエスタン・ブロット法あるいは免疫組織化学的方法で異常型プリオン蛋白の存在を確認することが必要である。

1) 脳乳剤の調整

患者の脳組織 1 g を 10 ml の PBS あるいは 0.32 M sucrose でホモジナイズ*し、常温 1000 x g, 10 分間の遠心上清を 10%脳乳剤として使用する。

2) マウスへの接種及び飼育

マウス脳の左半球頭頂部に 30 µl の脳乳剤を接種し（一群、10 匹程度）、専用の P3 施設内で飼育**する。上記の神経症状を経時的に観察する。

*ポリトロン型やポッター型ホモジナイザーを用いる場合には安全キャビネット内で操作し、特に目からの感染を防ぐ意味でゴーグルを装着すること。最近では密閉型の遠心破砕機が使われる。この場合、密閉チューブにビーズを入れて 8 字型の遠心することにより、ホモジナイズが良好かつ安全に行える。

**床敷、汚物、ケージ等は 134℃ 60 分間のオートクレーブで処理する。

4 プリオン蛋白遺伝子検査

血液等から抽出したゲノム DNA をもとに、プリオン遺伝子のシーケンスを決定し遺伝性を調べる。日本人 GSS ではコドン 102、105、145、219 に変異が認められる。フェノール処理後のゲノム DNA には感染性はないので、フェノールを用いた DNA 抽出を行う。プリオン遺伝子は単一エクソン上にオープンリーディングフレームがあるため、ゲノム DNA を以下のプライマーによって増幅し、得られた約 800bp のフラグメントのシーケンスを調べる。増殖させた DNA を直接シーケンスするとポリフォルミズムについての情報を得ることができる。

PrP-F 5'-CAG AGC AGT CAT TAT GGC GA-3'

PrP-R 5'-TTG TTC TGG TTG CTG TAC TC-3'

反応条件は 94°C 30sec, 54°C 30sec, 72°C 1min30sec を 30 サイクル繰り返し、72°C 5min の伸長反応を行う。

得られた DNA サンプルについてはプラスミドへクローニングするよりもダイレクトシーケンスを行う方が、遺伝子多型を同時に調べることができ有利である。102、129、171、219 番のアミノ酸などについて遺伝子変異と遺伝子多型を調べる。この例では、102 番目のプロリンがヘテロになりロイシンに変わっており、遺伝性のプリオン病であることがわかる。

102 (Leu/Pro)



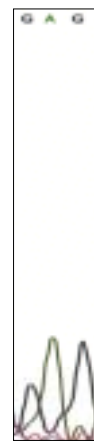
129 (Met/Met)



171 (Asn/Asn)



219 (Glu/Glu)



2. 補足的検査

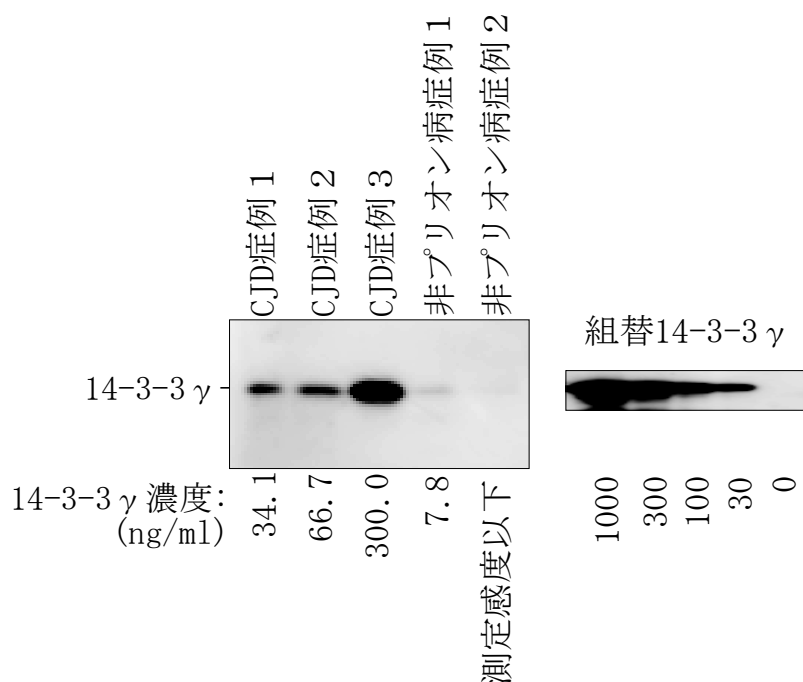
1 脊髄液中の 14-3-3 蛋白の検出

ヒト脳脊髄液中のアイソタイプ特異的な 14-3-3 蛋白の定量法を以下に示す。

他に NSE、tau 蛋白を調べる方法もある。

- 1) 脊髄液を 4℃ 3000g で 5 分間遠心し細胞成分を分離する。
- 2) 上清に 2X サンプルバッファー(1x の 2 倍濃度、付記ウエスタン 1 ウエスタン法の試薬の調整参照)を 1:1 で混合し 100℃、10 分間加熱する。
- 3) 通常ウエスタン・ブロットを行う。既に定量されている組換え 14-3-3 蛋白 (ガンマアイソタイプ及びベータアイソタイプ) の希釈配列をサンプルと同じアクリルアミドゲルで解析しサンプルのバンドと比較し定量する。

以下に脊髄液中の 14-3-3 γ 蛋白の濃度測定した例を示す。ウサギ 14-3-3 γ 特異抗体を用いたウエスタン・ブロット法により蛋白濃度が既知である組換え 14-3-3 γ 蛋白とシグナル強度を比較し、各脊髄液中の 14-3-3 γ 蛋白を定量した。CJD では一般に 15 ng/ml を超える。非プリオン症例においても検出が可能なので判定には定量が必須である。



付記 1) ウシ海綿状脳症確定検査プロトコル（ウエスタン・ブロット法）

平成 13 年 10 月 18 日から食肉の安全性を確保する目的で、ウシ海綿状脳症の全頭検査が全国食肉検査場で ELISA 法を用いて行われている。検査で陽性となった検体についてはウエスタン・ブロット法及び免疫組織化学的検査による確定診断を行う。ウエスタン・ブロット検査については、帯広畜産大学、横浜検疫所、神戸検疫所及び国立感染症研究所が、免疫組織化学的検査については帯広畜産大学及び国立感染症研究所がそれぞれ行っている。

以下に記す確定診断の為のプロトコル（ウエスタン・ブロット法）は、帯広畜産大学が中心となりウシ海綿状脳症の迅速検査のために作成されたものであるが、今後、検査を通しての若干の見直しがあると思われる。

[1] 試薬等

コラゲナーゼ（細胞分散用）	和光	100mg、No. 038-10531
Pefablock	Roche	500mg、No. 1585916
Proteinase K	Roche	100mg、No.745723
N-Laurylsarcosine (Sarkosyl)	Sigma	100g、No. L-5125
Zwittergent 3-14	Calbiochem	5g、No.693017
Sodium dodecyl sulfate(SDS)	Sigma	500g、No. L-4509
2-mercaptoethanol	Sigma	100 ml、No. M-6250
Urea	和光	500g、217-00615
2-Butanol	和光	500 ml、020-11215
Tween-20	和光	500 ml、167-11515
スキムミルク	COOP、明治、雪印など	
Immobilon-PVDF	Millipore	No.IPVH00010
X線フィルム（RX-U）	富士フィルム	六切、No. 03D051
ECL ウェスタンブロットイング 検出試薬	Amasham Pharmacia	No. RPN2209
Anti-rabbit IgG HRP 標識	Amasham Pharmacia	1 ml、NA.9340
Anti-mouse IgG HRP 標識	Amasham Pharmacia	1 ml、NA.9310
o-リング付き 2 ml チューブ	アシスト	No. 72.693S
丸底 2 ml チューブ	アシスト	No. 72.695S

[2] 試薬の調製

- TN buffer: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- Detergent buffer : 4% Zwittergent 3-14, 1% Sarkosyl, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- Butanol-Methanol solution: 2-Butanol:Methanol = 5:1
- Proteinase K: 1mg/ml in 50mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM CaCl₂, aliquoted , stored at -20°C.
- Pefablock: 0.1 M in DDW, aliquoted, stored at -20°C.
- Collagenase: 20mg/ml in DDW, aliquoted, stored at -20°C.
- Sample buffer (X1): 62.5mM Tris-HCl(pH6.8), 5% Glycerol, 3mM EDTA, 5% SDS, 4M Urea, 4% β-mercaptoethanol, 0.04% bromophenol blue. 使用中の少量は室温保存可能。長期の保存は 4 °C (Urea、SDS が析出するが使用時に 50°C程度に加温溶解可) が望ましい。

1M Tris-HCl (pH6.8)	1.25 ml
Glycerol	1 ml
0.5M EDTA (pH8.0)	120 µl
β-mercaptoethanol	800 µl
1% bromophenol blue	400 µl
SDS	1 g
Urea	4.8 g

Up to 20 ml

[3] 脳乳剤の調製 (キアゲン社のミキサーミルを使用した場合)

- 1) 200 mg の脳組織をアシスト 2 ml 丸底チューブに採材。
- 2) 800 µl の TN buffer とタングステンビーズを一粒加える。
- 3) ミキサーミルで 20Hz, 45sec 振盪。
- 4) これを 20%(W/W)脳乳剤とし、O-リング付きチューブに保存する。

脳乳剤の調製はバイオハザード対策の観点からすると、安井機器のマルチビーズショッカーを使用した方がよいかもしれない。

[4] 試料調製

- 1) 20%(W/W)脳乳剤 250 μ l に Detergent buffer 250 μ l を加え Vortex および超音波処理。O-リング付き 2 ml チューブを使用する。
- 2) 12.5 μ l の collagenase を加え Vortex
- 3) 37°C、30 分間消化（必ずウォーターバス中で行う）。
- 4) 20 μ l の 1 mg/ml PK を加え Vortex
- 3) 37°C、30 分間消化（必ずウォーターバス中で行う）。
- 4) 10 μ l の Pefablock を加え Vortex
- 5) 250 μ l の Butanol-Methanol solution を加え Vortex
- 6) 15,000 rpm, 10 min, 20°C遠心。
- 7) 沈殿を軽く乾燥させる。
- 8) 100 μ l の 1X Sample buffer を加えて 100°C、5 min ボイルする。沈殿が溶けにくい場合は、超音波処理を行う。（試料調製が上手く行われていれば、50 μ l の Sample buffer にも溶解できます）。

[5] SDS-PAGE

- ・ Invitrogen 社（旧 Novex 社）のプレキャストゲルを使用する。
- ・ Gel: NuPAGE 12% Bis-Tris Gel, 1.0 mm, 12 well (No. NP0342)
- ・ ゲルローディングチップ（Invitrogen No. LC1001）を使用して 20 μ l（10mg の組織等量）をロードする。
- ・ Buffer: NuPAGE MOPS SDS Running buffer (Invitrogen No. NP0001)。陰極側のバッファーには instruction に指示された量の Antioxidant (Invitrogen No. NP0005) を加える。
- ・ 泳動条件は Invitrogen 社の Instruction に従う（200V、定電圧）。

Positive control は感染マウス脳由来サンプル（100 μ g/10 μ l 組織等量）を原液（4⁰）として、4⁻¹（25 μ g/10 μ l）、4⁻²（6.25 μ g/10 μ l）、4⁻³（1.6 μ g/10 μ l）の 4 階段希釈列を作製

し、 4^0-4^3 のコントロールを 10 μ l/lane ロードする、等の措置をとっておくことにより、WB の感度を評価することが可能となる。

[6] ウェスタン・ブロット法

- ウエットタイプブロッティング装置を使用すること。白金線電極のものを使用する（例：バイオラッド、ミニトランスブロットセル、170-3930 ; IWAKI、マイクロスラブゲル用ブロッティング装置、KS-8451）。
- トランスファーバッファー:Invitrogen 社の instruction に指示されたバッファー（NuPAGE transfer buffer (Invitrogen No. NP0006)、antioxidant (Invitrogen No. NP0005、メタノール）に SDS を 0.01%になるよう加えたもの。
- PVDF 膜 (Immobilon-PVDF) はメタノールに 1 分間浸し活性化する。その後、DDW で洗い、トランスファーバッファーに浸しておく。
- 電気泳動が終了したゲルをトランスファーバッファーに浸す。
- トランスファーバッファーで濡らした濾紙（2 枚）の上に PVDF 膜を置く。その上にゲルを置く。この時ゲルと PVDF 膜の間に気泡が入らないよう注意する。ゲルの上にトランスファーバッファーで濡らした濾紙（2 枚）を重ねる。
- 上記の濾紙-PVDF-ゲル-濾紙のサンドウィッチをブロッティングパッドではさみ、ブロッティング装置にセットする、蛋白質は陰極から陽極へと移動するのでゲルの陽極側に PVDF 膜が位置するようにセットすること。
- a)または b)の条件でブロッティングを行う。
a) 40V 定電圧 4 時間－15 時間。 b) 80－100V 定電圧 1－2 時間。

[7] メンブランの免疫染色

- 1) ブロッキング：5% skim milk in PBST（0.1% Tween 20）。skim milk は必ず加温溶解（80℃程度）すること。
- 2) メンブレンローラー（Advantec、No. EBA-200）上で 1 時間。
- 3) 一次抗体：1% skim milk in PBST で希釈。Affinity purified B-103 は 1:5000、B-103 ウサギ血清は 1:1000－1:2000 で使用すること。
- 4) メンブレンローラー上で 1 時間。
- 5) PBST で 4 分間洗浄。PBST をかえ 5 回繰り返す。

- 6) 二次抗体(Amersham NA9340) : 1% skim milk in PBST で 1:2500 希釈。
- 7) メンブレンローラー上で 45 分。
- 8) PBST で 4 分間洗浄。PBST をかえ 5 回繰り返す。
- 9) ECL ウェスタン・ブロッティング検出試薬で発光。
- 10) X 線フィルムに 2 分間露光し、現像。
- 11) 現像している間に、次の X 線フィルムを露光させる。
- 12) 30 分後に現像 (つまり、2 分、および 30 分露光の x-ray film を作製する)。
- 13) その後必要に応じてオーバーナイトで露光させる。

現像液 : ハイレンドール

停止液 : 3% 酢酸

定着液 : スーパー富士フィックス

追補

Bio-Rad 社の BSE purification kit にて作製された 20% brain homogenate を用いて
確認検査用 WB を行う場合。

- 1) 20% brain homogenate 250 μ l に detergent buffer 250 μ l を加え Vortex および超音波処理 (出力の指定はない)。
- 2) 12.5 μ l の collagenase を加え Vortex
- 3) 37°C、30 分間消化。
- 4) 20 μ l の 1 mg/ml PK を加え Vortex
- 5) 37°C、30 分間消化。
- 6) 10 μ l の Pefablock を加え Vortex
- 7) Kit に含まれている Clarifying solution を 250 μ l 加える。
- 8) Methanol 150 μ l を加える。
7)、8)の処理は 250 μ l の Butanol-Methanol solution を加えることで置き換えられるが、沈殿の量が多くなる傾向がある。
- 9) Vortex
- 10) 15000 rpm, 10 min, 20°C 遠心。

- 11) 沈殿を乾燥させる。
- 12) 100 μ l の 1x sample buffer を加えて 100°C、5 min ボイルする。沈殿が溶けにくい場合は、超音波処理を行い溶解する。

入手可能な市販の抗プリオン抗体を以下に示す。

	抗体名	製造元	検出可能なプリオンの宿主
モノクロナール抗体	6H4	Roche	ヒト、ウシ、ヒツジ、マウス
モノクロナール抗体	3F4	SIGNET	ヒト、ハムスター
ポリクロナール抗体	B103	富士レビオ	ヒト、ウシ、ヒツジ、マウス

Ⅲ. CJD、vCJD 等の診断基準

《クロイツフェルト・ヤコブ病は 4 類感染症全数把握疾患であり、診断した医師は 7 日以内に最寄の保健所に届け出る。報告のための基準は以下のとおりである。》

○孤発性 CJD	
1	進行性痴呆を示し、表 1 に掲げる疾患を除外出来る症例。
2	ミオクロヌス、錐体路又は錐体外路症状、小脳症状又は視覚異常、無動性無言の 4 項目のうち 2 項目以上の症状を示す症例。
3	脳波に周期性同期性放電（PSD）を認める症例。
4	CJD に特徴的な病理所見を呈する症例、又は Western Blot 法や免疫染色法で脳に異常なプリオン蛋白を検出し得た症例
<ul style="list-style-type: none"> ・ 疑い（possible） 上記 1、2 を両方とも満たす症例。 ・ ほぼ確実（probable） 上記 1～3 をすべて満たす症例。 ・ 確実（definite） 上記 4 を満たす症例。 	
○家族性 CJD	
1	進行性痴呆を示し、表 1 に掲げる疾患を除外出来る症例。
2	ミオクロヌス、錐体路又は錐体外路症状、小脳症状又は視覚異常、無動性無言の 4 項目のうち 2 項目以上の症状を示す症例。
3	脳波に周期性同期性放電（PSD）を認める症例。
4	疾患特異的プリオン蛋白遺伝子変異が証明された症例。
5	CJD に特徴的な病理所見を呈する症例、又は Western Blot 法や免疫染色法で脳に異常なプリオン蛋白を検出し得た症例。
<ul style="list-style-type: none"> ・ ほぼ確実（probable） 上記 1～4 をすべて満たす症例。 ・ 確実（definite） 上記 4 及び 5 を両方とも満たす症例。 	
○変異型 CJD	
1	若年発症（平均年齢：20 歳代）で、亜急性進行性痴呆（発病してから無動性無言状態にいたるまでの臨床経過が 6 ヶ月-2 年かかる）を呈し、表 1 に掲げる疾患を除外できる症例。
2	早期に出現する精神症状（不安、抑うつ、行動異常など）、早期より認められる四肢、顔面の錯感覚又は異常感覚、小脳症状、ミオクロヌス、ジストニア又は舞踏運動のいずれか 1 つ以上の症状、痴呆、無動性無言の 6 項目のうち 5 項目以上の症状を示す症例。
3	脳波にて典型的な PSD が見られない症例。
4	医原性感染を疑わせる既往がない症例。
5	プリオン蛋白遺伝子変異が見られない症例。
6	変異型 CJD に特徴的な病理所見（異常なプリオン蛋白からなるアミロイド斑が多数存在し、アミロイド斑の周りを海綿状態が取り囲む、いわゆる florid plaque）を呈する、または、Western Blot 法や免疫染色法で、脳もしくは扁桃に変異型 CJD に特徴的な異常なプリオン蛋白を検出し得た症例。
<ul style="list-style-type: none"> ・ 疑い（possible） 上記 1～5 のすべてを満たす症例。 ・ 確実（definite） 上記 5、6 を満たす症例。 	

表 1 CJD（孤発性、家族性、変異型）と鑑別を要する疾患	
	<ul style="list-style-type: none"> ・ 老年痴呆（アルツハイマー型、脳血管障害型） ・ パーキンソン痴呆症候群 ・ 脊髄小脳変性症 ・ 痴呆を伴う運動ニューロン疾患 ・ 単純ヘルペス、後天性免疫不全症候群などのウイルス性脳炎 ・ 悪性リンパ腫 ・ 梅毒 ・ 代謝性脳症（Adrenoleukodystrophy、ウェルニッケ脳症、甲状腺疾患に伴う脳症、肝性脳症、リピドーシス等） ・ 低酸素脳症 ・ その他の原因による老年期痴呆性疾患

○GSS（ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群）		
	1	進行性小脳症状か痙性対麻痺のいずれか又は両方に、痴呆を合併し、表 2 に掲げる疾患を除外できる症例。
	2	プリオン蛋白遺伝子に疾患特異的な変異が認められる症例。
	3	病理所見で、異常なプリオン蛋白陽性のアミロイド斑が認められる症例。
		<ul style="list-style-type: none"> ・ 疑い（possible） 上記 1 を満たす症例。 ・ ほぼ確実（probable） 上記 1、2 の両方を満たす症例。 ・ 確実（definite） 上記 1～3 のすべてを満たす症例。
	表 2 GSS と鑑別を要する疾患	
	<ul style="list-style-type: none"> ・ 家族性痙性対麻痺 ・ 脊髄小脳変性症 ・ 老年痴呆（アルツハイマー型、脳血管障害型） ・ パーキンソン痴呆症候群 ・ 痴呆を伴う運動ニューロン疾患 ・ 代謝性脳症（Adrenoleukodystrophy、ウェルニッケ脳症、甲状腺疾患に伴う脳症、肝性脳症、リピドーシス等） ・ 低酸素脳症 ・ その他の病因による老年期痴呆性疾患 	

○FFI（致死性家族性不眠症）		
	1	臨床的に頑固な不眠、記憶障害、交感神経興奮状態（高体温、発汗、頻脈など）、ミオクロームスなどを認め、表 3 に掲げる疾患を除外できる症例。
	2	プリオン蛋白遺伝子のコドン 178 変異を有する症例。
	3	病理学的に視床の選択的海綿状変性が認められ、Western Blot 法で脳に異常なプリオン蛋白を検出し得た症例。
	<ul style="list-style-type: none"> ・ほぼ確実（probable） 上記 1、2 の両方を満たす症例。 ・確実（definite） 上記 2、3 の両方を満たす症例。 	
	表 3 FFI と鑑別を要する疾患	
	<ul style="list-style-type: none"> ・視床変性症 ・両側視床部血管障害 ・老年痴呆（アルツハイマー型、脳血管障害型） ・代謝性脳症（Adrenoleukodystrophy、ウェルニッケ脳症、甲状腺疾患に伴う脳症、肝性脳症、リビドーシス等） ・低酸素脳症 ・単純ヘルペス、後天性免疫不全症候群などのウイルス性脳炎 ・悪性リンパ腫 ・梅毒 ・その他の病因による視床症候群 	

《備考》本診断基準による「疑い」は、それぞれの条件に該当する症例である。従って、「いわゆる疑似症」ではないので、留意されたい。

V. 引用文献

プリオン病の臨床とプリオンの取り扱い一般

クロイツフェルト・ヤコブ病診療マニュアル〔改訂版〕平成 13 年度厚生労働科学研究 特定疾患対策研究事業 遅発性ウイルス感染調査研究班 2002 年 太陽美術.
(<http://www.nanbyou.or.jp/> の医療従事者向け情報、疾患群別索引、プリオン病、診療マニュアル)で閲覧可能

ウエスタン・ブロット法

Takahashi H, Takahashi RH, Hasegawa H, Horiuchi M, Shinagawa M, Yokoyama T, Kimura K, Haritani M, Kurata T, Nagashima K. Characterization of antibodies raised against bovine-PrP-peptides. J Neurovirol 5:300-307, 1999.

Nagashima T, Okawa M, Kitamoto T, Takahashi H, Ishihara Y, Ozaki Y, Nagashima K. Wernicke encephalopathy-like symptoms as an early manifestation of Creutzfeldt-Jakob disease in a chronic alcoholic. J. Neurological Sciences, 163:192-198, 1999.

免疫組織化学法

Kitamoto T, Shin RW, Doh-ura K, et al: Abnormal isoform of prion protein accumulation in the synaptic structure of the central nervous system in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. Am.J.Path.140;1285-1294, 1992

免疫組織化学に用いられるプリオン蛋白特異的モノクローナル抗体

Kroth C, Stierli B, Streit P, et al: Prion(PrPSc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. Nature 390; 74-77, 1997

Muramoto T, Tanaka T, Kitamoto N, et al: Analysis of Gerstmann-Straussler syndrome with 102Leu219Lys using monoclonal antibodies that specifically detect human prion protein with 219Glu. Neuroscience Letters; 179-82, 2000

プリオンのエライザ変法

Grathwohl KU, Horiuchi M, Ishiguro N, Shinagawa M. Improvement of PrPSc-detection in mouse spleen early at the preclinical stage of scrapie with collagenase-completed tissue homogenization and Sarkosyl-NaCl extraction of PrPSc. *Arch. Virol.* 141, 1863-1874, 1996.

Grathwohl KU, Horiuchi M, Ishiguro N, Shinagawa M. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of PrP(Sc) in crude tissue extracts from scrapie-affected mice. *J. Virol. Methods* 64, 205-216, 1997.

14-3-3検出法

Kenny K, Brechtel C, Takahashi H, Kurohara K, Anderson P, Gibbs CJ Jr. An enzyme-linked immunosorbent assay to quantify 14-3-3 proteins in the cerebrospinal fluid of suspected Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Ann Neurol.* 48(3):395-398, 2000.

Collins S, Boyd A, Fletcher A, Gonzales M, McLean CA, Byron K, Masters CL. Creutzfeldt-Jakob disease: diagnostic utility of 14-3-3 protein immunodetection in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Neurosci.* 7: 203-208, 2000.

Takahashi H, Iwata T, Kitagawa Y, Takahashi RH, Sato Y, Wakabayashi H, Takashima M, Kido H, Nagashima K, Kenney K, Gibbs CJ, Kurata T. Increased levels of ϵ and γ isoforms of 14-3-3 proteins in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 6:983-985, 1999.

Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ, Lee KH, Harrington MG. The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N. Engl. J. Med.* 335: 924-930, 1996.

VI. 検査依頼先

病理組織解析	国立感染症研究所・感染病理部	佐多徹太郎
ウエスタン・ブロット法	国立感染症研究所・細胞化学部	山河芳夫
14-3-3蛋白測定	国立感染症研究所・感染病理部	高橋秀宗
	国立感染症研究所	電話 03-5285-1111

VII. 執筆者一覧

高橋秀宗：国立感染症研究所・感染病理部

佐多徹太郎：国立感染症研究所・感染病理部

山河芳夫：国立感染症研究所・細胞化学部

田中智之：堺市衛生研究所

大前利市：奈良県保険環境研究センター

今井俊介：奈良県保険環境研究センター

堂浦克美：東北大学大学院医学系研究科・創生応用医学センター

A群溶血レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*)

(劇症型溶血性レンサ球菌感染症起因株を含む)

A群溶血レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*)

検査マニュアル

(劇症型溶血性レンサ球菌感染症起因株を含む)

目 次

はじめに

I. 分離法・同定法

1. 分離法・検体の採取
2. 増菌培養法
3. 分離培養法
4. 培養性状
 - 1 血液寒天平板上の溶血環と集落の形態
 - 2 液体培養所見
5. 同定法
 - 1 レンサ球菌属の確認
 - 2 Lancefieldの血清群別
 - 3 生化学的性状
 - 4 迅速診断法

II. A群溶レン菌の型別法

1. T型別
 - 1 抗原液の作製
 - 2 型別試験
2. M型別
 - 1 沈降反応によるM型別
 - 2 M蛋白質遺伝子 (*emm*) のシーケンスによるM型別
3. 発赤毒素型別

1 ラテックス凝集反応によるSPEの検出

2 *spe*遺伝子のPCR法による検出

III. サンプルの送り方

IV. 病原体の保存法

1. 凍結保存法

2. ゼラチンディスク法

1 ゼラチンディスク保存液

2 機材

3 ディスクの調整法

V. 引用文献

VI. 検査依頼先

VII. 執筆者一覧

A群溶血レンサ球菌

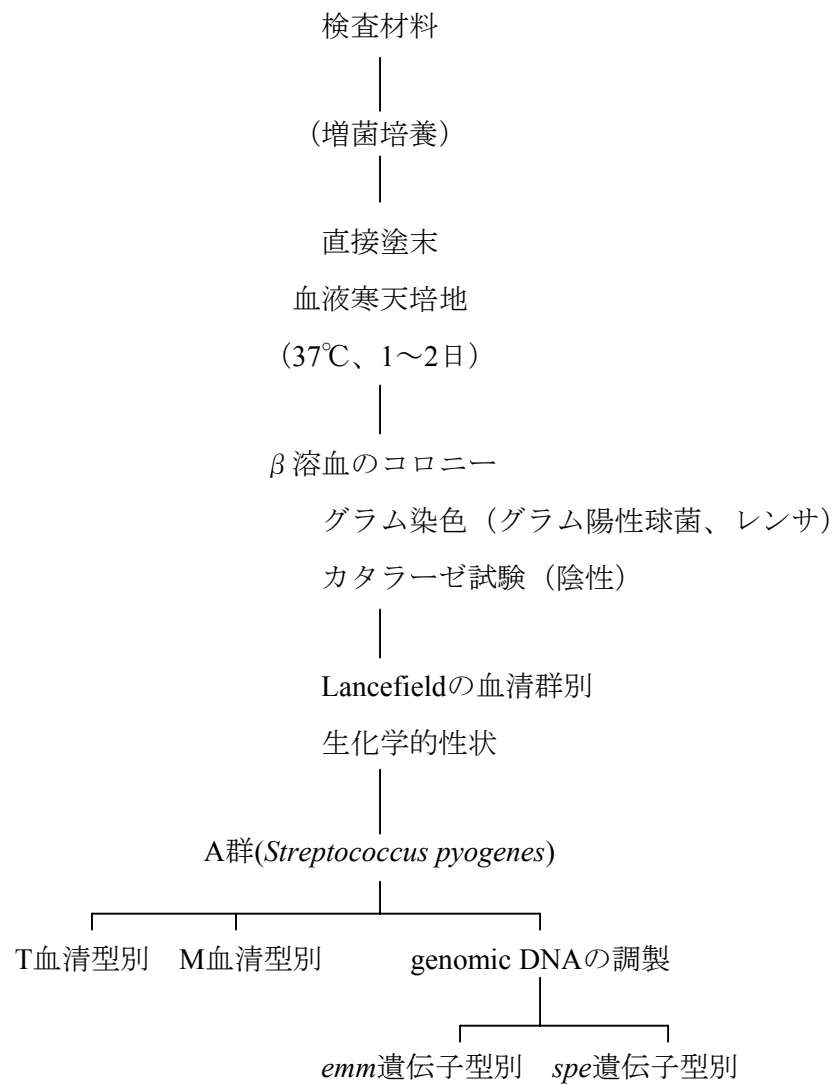
はじめに

A群溶血レンサ球菌（Group A Streptococcus、*Streptococcus pyogenes*、以下A群溶レン菌）は、グラム陽性球菌であり、様々な疾患を引き起こす。A群溶レン菌が関与する感染症は多種多様で、本菌を原因とする代表的な疾患は咽頭炎、扁桃炎、猩紅熱、丹毒、蜂窩織炎、続発症として急性糸球体腎炎やリウマチ熱等であり、手足の筋膜・筋肉等の軟部組織に壊死性の炎症を伴う重篤な症状を呈す劇症型溶血性レンサ球菌感染症も本菌による疾患として注目されている。A群溶レン菌は、健康な人の咽頭、皮膚などにも存在する。

「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（感染症法）」において、A群溶レン菌が引き起こす疾患として、A群溶血性レンサ球菌咽頭炎と劇症型溶血性レンサ球菌感染症が含まれる。これらの疾患は4類感染症に属し、A群溶血性レンサ球菌咽頭炎は小児科定点把握疾患、劇症型溶血性レンサ球菌感染症は全数把握疾患として病原体サーベイランスの対象疾患に位置付けられている。

本菌は、国立感染症研究所病原体安全管理規程のバイオセーフティレベル2に属する病原体である。検体もしくは菌体を扱う場合は、安全キャビネット内で取り扱う。また、検体から本菌の分離・同定までに1～3日、型別にはさらに1～2日必要である。

本稿では、A群溶レン菌の検査法の標準法および菌の解析のための検査法について記載した。劇症型溶血性レンサ球菌起因株も同じレンサ球菌であるので、同じ方法に準じて行う。



1. 分離法・同定法

1. 分離法・検体の採取

検体の採取には綿棒を用いる。綿棒の材質は、菌に対する毒性が少ない化学繊維が望ましく、採取用綿棒を用意する場合は、綿棒をM/15リン酸緩衝液 (pH 7.4) で数秒煮沸し、乾燥後高圧滅菌して用いる¹⁾。また、輸送培地とセットの市販品（チャコール添加アミーズ輸送培地：BBL, CultureSwabTM Transport system Amies Medium：Difco labo., シードスワブ2号、3号：栄研化学）も利用できる。

検体として最も多いのは咽頭拭い液である。扁桃の白色斑点部、腺窩部および咽頭後部を拭って採取する。皮膚の開放創では滲出液を採取する。膿皮症の場合、痂皮をアルコール綿で消毒後はがし、その深部を拭う。このほかに膣分泌物、尿、血液、髄液等が用いられるが、通常の細菌検査に準じる。

2. 増菌培養法

通常、A群溶レン菌は直接培養で分離可能であるが、抗生物質投与後、ブドウ球菌やナイセリア等が多数混在すると思われる検体、疫学調査などで菌数が少ない健康者等の検体では、増菌培養が必要である。

増菌培地には、脱繊維血液を加えるPike培地（Difco）、Q(キノリン)培地（市販品なし）と血液を用いないSEB培地（日水）等がある²⁾。SEB培地には、アジ化ナトリウムおよびクリスタルバイオレットが選択剤として含まれており、グラム陰性桿菌、ブドウ球菌、ナイセリア等の発育を抑制し、選択増菌効果が優れているうえ、検体の保存・輸送および分離株の保存にも使用できる。検体採取後の綿棒、あるいは直接培養に塗抹後の綿棒を2 mlのSEB培地に投入し、37℃、一夜増菌し、分離培養する。

3. 分離培養法

分離培養には、ヒツジまたはウマの脱繊維血液を5%の割合に添加した血液寒

天平板培地を用いる。血液の濃度が3%より低い場合は α 溶血と β 溶血の区別がしにくい場合がある。基礎培地として、Trypticase Soy Agar II (BBL)、ハートインフュージョン寒天（栄研化学）等が適している。また、選択性を持たせた培地としてグラム陰性細菌の発育抑制のためにコリスチンおよびナリジキシム酸を添加したCNA血液寒天培地やアジ化ナトリウムを添加したアザイド血液寒天培地がある。

平板上に塗抹する方法は、綿棒の各方面を平板上の一隅に十分に塗りつけ、白金耳で全面に塗抹する。増菌培養の場合には、一白金耳を培地全面に塗抹する。いずれの場合にも塗抹の最後に白金耳を平板の一カ所に突き刺し³⁾ (Streak-stab culture)、深部集落の溶血環を観察する。深部集落を形成させることによりA群レンサ球菌の酸素に不安定なストレプトリシンOのみを産生する株の形成する溶血環の見落としがなくなる。

4. 培養性状

1. 血液寒天平板上の溶血環と集落の形態

レンサ球菌を鑑別する上で最も重要な性状である溶血性は、 α 、 β 、 α' (α プライム) および γ 溶血に分けられる。A群レンサ球菌の多くは、1日培養で α' 溶血、2日目に β 溶血となるのが特徴である。しかし、基礎培地の種類および脱繊維血液のメーカーの違いなどにより、1日の培養では、 α 溶血を示す場合や、溶血がみられない場合もある。いずれの場合も培養時間を延長することにより鮮明な β 溶血となっていく。溶血環は、C、G群（主に β 溶血）ほど小さくなく輪郭も鮮明でないが、B群レンサ球菌（主に α' 溶血を示すが β 溶血へ移行しない）よりは鮮明である。まれではあるが、A群レンサ球菌にも γ 溶血（非溶血）の株もあるので注意したい。以下に血液寒天平板上での溶血環の鑑別法を述べる。

α 溶血：発育集落の周囲に緑色で、不透明な小さな溶血環を認められる。

血液の緑変がなく退色により褐色に見える場合もある。鏡検すると非溶血の凝集した赤血球が認められる。

β 溶血：発育集落の周囲が完全に透明な溶血環が認められ、透明部を鏡検しても赤血球を認めない。

α' 溶血： β 溶血に比べると、溶血環は小さくなく、透明度や輪郭の鮮明さが劣る。検鏡すると非溶血の血球の凝集が残っているが、血球の緑変は見られない。

γ 溶血：非溶血で全く溶血環を認めない。

集落形態は、多様であるが、最も多く観察されるのは“glossy”型で、直径0.5～1.0 mm位の小型、灰白色、やや不透明、湿潤、正円形を示す。その他には“mucoid”型という露滴状または粘液性様の辺縁のなめらかな集落がある。また、A群レンサ球菌の集落はおおむね堅く、白金線で釣菌すると1個分全てが平板からはがれたり、集落が割れたりする場合がある。以上、典型的なA群レンサ球菌における集落の特徴について述べたが、菌株および培養条件(血球濃度、寒天平板の厚さ等)によってもその性状は多様であり、集落形態のみで群を決定することは困難であるため、群別 (I-5-2) は必ず実施する。

2 液体培養所見

血液寒天平板上の集落を継代するには、ハートインフュージョンブイヨン培地(栄研、Difco)、Todd-Hewitt Broth (Difco、BBL)等の液体培地を用い、37℃、一夜培養する。A群レンサ球菌はほとんど例外なく、雲絮状の沈殿か、顆粒状で管底や壁面に付着するような発育を示し、培養液上部は清澄である。C、G群も同様で、混和しても底部に沈みやすい。B、D群レンサ球菌は培養液が一様に濁って発育し、管底にボタン状の沈殿を示すのが特徴である。

5. 同定法

1 レンサ球菌属の確認

レンサ球菌は、グラム陽性、連鎖状または双球状の配列を形成し、カタラーゼ陰性である。液体培養液からグラム染色およびカタラーゼ試験を行い被検菌がレンサ球菌属であることを確認する。

1) グラム染色標本

グラム陽性および特徴的な菌の配列を観察する。連鎖の長さは、C、G群が長く、次いでA群、B、D群は短い傾向にあり、肺炎球菌は双球菌を形成する。

2) カタラーゼ試験

清浄なスライドグラス上に、培養液1滴を載せ、3%過酸化水素水溶液を加え、気泡形成の有無を確認する。この方法以外に、液体培養液1滴を試験管に取りそれに3%過酸化水素水溶液を滴下する方法や、固形培地上に発育した集落に3%過酸化水素水溶液をふりかけたりする方法もある。陽性対照として、ブドウ球菌を用いるとよい。操作には、ニクロム線等の鉄製品を用いると判定を誤るおそれがあるために用いてはならない。また、赤血球にはカタラーゼ活性が存在するため、血液寒天培地上で本試験を行うことは望ましくない。

2 Lancefieldの血清群別

Lancefieldの血清群別は、Rebecca Lancefieldによって菌体の多糖体抗原の免疫学的差異により証明され⁴⁾、現在では、A群からZ群（I群およびJ群は除く）（W群からZ群は暫定的）まで分類されている⁵⁾。A群溶レン菌を同定していく過程で、このLancefieldの血清群別は、他の β 溶血レンサ球菌と区別できるため重要である。

検査室では、市販品群別用キットを用いる群別が一般的である。市販キットは、簡便な共同凝集反応（ファデバクト ストレプトコッカス キット：ファルマシア）や特異性に優れた感作ラテックス凝集反応（スライデックスストレプトキット：バイオメリュー、セロアイデンストレプトキット：栄研化学、ストレプトLA「生研」：デンカ生研、プロテックス「アスカ」レンサ球菌：アスカ純薬、ストレプテックス：ダイアヤトロン）があり、A、B、C、G群の4種または、D、F群を含む6種類の群別が可能なキットもあり、容易に群別ができる。1987年、SchleiferとKilpper-Balzにより報告されたレンサ球菌の分類⁶⁾では、Lancefield

血清群別でD群抗原を保有する腸球菌を*Enterococcus*属、N群を*Lactococcus*属として新たに独立させている。

3 生化学的性状

生化学的性状の代表的な試験として、ピロリドニルアリルアミダーゼ活性(PYR)、バシトラシン感受性、CAMP試験、馬尿酸分解性などがある。また、API strep 20（バイオメリュール）や短時間で同定可能なAPI Rapid strep 32（バイオメリュール）等のキットも有用である。

1) ピロリドニルアリルアミダーゼ活性 (PYR)

β 溶血をするレンサ球菌のなかで、本酵素活性を有するのは*S. pyogenes* (A群)のみである。市販品（Dry Slide PYR Kit : Difco、ストレップ-A-チェックキット : E.Yラボラトリーズ）は、発色基質（L-ピロリドニル- β -ナフチルアミド）を含有するスティックの濾紙部分に数個の集落を塗布し、発色試薬を滴下して赤色の発色を確認する。腸球菌（D群）も本活性を有するので、 β 溶血を示す株について鑑別が必要となる³⁾。

2) バシトラシン感受性

本薬剤を含有するディスクが市販されており平板上で判定ができる。A群レンサ球菌のほとんどがバシトラシン感受性であるが、 β 溶血を示すC、GおよびL群レンサ球菌の中にも感受性の株がある。

3) CAMP試験⁷⁾

ミューラー・ヒントンスキム寒天培地（Difco）に脱繊維血液（ヒツジ、ウマ）を5%の割合に加えた血液寒天平板をもちいる。被検の培養菌液と β 溶血素産生性のブドウ球菌（ATCC49444）の培養菌液を接触しないよう直角に塗布する。矢印状の透明溶血帯が形成されれば反応陽性とする。 β 溶血素産生性のブドウ球菌に変わって β 溶血素をしみこませたディスク（Beta Lysin Disk : remel）も市販されている。この反応は、*S. agalactiae* (B群)で陽性である。

4) 馬尿酸分解試験（グリシン法）^{1, 2)}

1%馬尿酸ナトリウム水溶液 0.4 mlに血液寒天平板上の菌をかき取り、濃厚菌液を調製して、37℃ 2時間培養しニンヒドリン試薬（アセトン、ブタノール等量混合液にニンヒドリンを3.5%に加える）0.2 mlを加え、37℃、10分間反応させ、濃紫色に発色するとグリシン陽性である。B群レンサ球菌は馬尿酸を分解して安息香酸とグリシンを産生する。

4 迅速診断法

A群溶レン菌の感染症に対しては適切な化学療法剤による治療を早期に行えば、重症化を防ぐとともに続発症の発症を予防することができる。しかし、通常の培養法では検査結果判明までに24～48時間を要するので、初診時には適切な医療の提供ができない場合がある。そこで培養法に変わる迅速診断として、培養によらない簡便迅速な検出方法が開発、実用化されている^{8, 9, 10)}。

検査法の原理は免疫学的手法による抗原検出であり、検査材料から酸または酵素を用いて多糖体抗原を抽出し、特異抗体により検出している。

市販のキットとしては以下のものがあり、測定原理別に分類した。

- ・ 逆受身ラテックス凝集反応

- セロダイレクト‘栄研’ストレプトA（栄研化学）

- AストレプトAD「生研」（デンカ生研）

- ・ 標識抗体法

- イムノクロマトグラフ法

- ストレプトAテストパック・プラス（ダイナボット）

- クイックビューストレップA（Quidal Corporation）

- クリアビューストレップA（ユニパス）

- Liposome Immunoassay法

- Qテストストレップ（BD Biosciences）

これらはいずれも10分以内にA群溶レン菌感染の診断が可能であり、培養との一致率、特異性に優れ、検体あたり $10^4 \sim 10^5$ CFU以上で陽性となる。

II. A群溶レン菌の型別法

A群溶レン菌の菌体表層には、群多糖体のほかにM、RおよびT蛋白等が存在しており(表1)、型別に利用されている。M蛋白は、耐熱性、トリプシン感受性、型特異的であり100以上の型が知られている¹¹⁾。M蛋白は、抗オプソニン作用^{12, 13)}を有し、細胞への接着にも関与しており、病原因子として知られている。分離株のM型別を行うことは病因との関連を知る上で重要であるが、継代による蛋白の脱落が生じることや市販血清がないことから、M型別の実施は困難であり、一部の機関でのみ行われている。近年、M型別を血清学的方法ではなく、M蛋白遺伝子の領域を明らかにし、型別する試みもなされている¹¹⁾。一方、T蛋白は病原性と無関係とされているが、T型別とM型別の菌型は相対すること¹⁴⁾、トリプシン耐性、型特異的、M蛋白に比べ安定性があり、さらに、継代に耐えることから、疫学調査の手段として用いられ、多くの施設で実施されている。R蛋白は、病原性と無関係とされていることや、型も少ないことから利用されることは少ない。

表1 A群溶レン菌の菌体表層蛋白

	M protein	T protein	R protein
boiling (pH 7)	stable	destroyed	stable
boiling (pH 2)	stable, extracted	destroyed	stable, extracted
trypsin	destroyed	stable	R3: destroyed R28: stable
pepsin	destroyed	stable	destroyed
virulence	virulence factor	not relate to	not relate to
	antiphagocytic action	virulence	virulence
protection	antibody confers	antibody not	antibody not
	type specific protection	protective	protective

1. T型別

T蛋白による型別は、Griffith¹⁵⁾が凝集反応を用いて実施したことに始まる。T型別は当初4つの血清型に分類されていたが、その後増加し、また整理されて、

現在は22の血清型が認められている。このうち、5、27、44型および14、49型はcomplexとしてそれぞれ1つにまとめられている。そのため抗血清としては19種類である。T型別試験は、腭エキスを抽出抗原とT型別免疫血清を用いて、スライド凝集反応を行う。操作上の注意点として、被検菌の培養を30℃で培養することにより、自然凝集の少ない抗原が得られる。消化中のpH修正は酸性側に傾かないようにする。T蛋白は、腭エキス消化に対し耐性であるが、長時間消化することにより凝集性は低下する。凝集反応は、弱い場合もあり、反応までの時間は長いが、特異的な反応であれば陽性である²⁾。特異的な反応を示さない場合、および、凝集反応が見られない場合は、「型別不能」として取り扱う。抽出試薬および型別用免疫血清はデンカ生研より市販されている。

1 抗原液の作製

方法 1 :

1. THB 10 mlに菌を接種し、30℃で一夜、静置培養する。
2. 9,800 x g、10分遠心分離する。
3. 沈さにブタ腭臓エキス4滴を加え、次いで0.02%フェノールレッドを1滴加えて十分に混和する。
4. pH補正液を加えてpH 8.0-8.5 (菌液が赤紫色) になるように修正し、37℃、1時間消化する。消化途中でpHの変化が認められる場合はその都度pHを修正、また均一に消化するように時々振り混ぜる。
5. 菌液を1.5 ml容サンプリングチューブに移し、17,000 x g、30秒遠心分離する。
6. 沈さに0.5 ml PBSを加え、ミキサーを使用して均一な浮遊液を作製し、抗原液とする（このとき自然凝集していたら、再度遠心して沈さに0.5 ml PBSを加え、けん濁する）。

方法 2 :

1. 0.1%トリプシン加THB 5 mlに菌を接種し、30℃で一夜、静置培養する。

2. 9,800 x g、10分遠心分離する。
3. 沈さに0.5 ml PBSを加え、ミキサーを使用して均一な浮遊液を作製し、抗原液とする。

2 型別試験

1. 自然凝集がないことを確認後、菌液とT型多価血清を混和し、凝集の有無を確認する。
2. 多価血清の1つに凝集が認められたら、その多価血清を構成するT型単価血清を用いて凝集反応を行い、T抗原の血清型を決定する。

2. M型別

M型別は、Swiftら¹⁷⁾によって毛細管沈降反応法により始められた。その後、多くの血清型が発見され、Johnsonら¹⁴⁾は1993年にM81までの型、約74の血清型があることを報告した。その後も、新しい型が確認され、現在では100以上の型があるとされている¹¹⁾。

M型別は、塩酸抽出抗原¹⁾とM型別抗血清を用いてゲル内沈降反応で行われているが、市販のM型別用抗血清がないので簡単には実施できない。しかし、分離頻度の高い1, 3, 4, 6, 12型の抗血清を準備しておけば、50-60%以上の菌株について型別が可能である^{16, 18)}。

さらに多くのA群菌についてM型を決定するためには、より多くの種類の抗血清を準備しておく必要があるが、上述したように市販のM型別用抗血清がないために非常に困難である。しかし、M蛋白については多くの遺伝子がクローニングされ、その塩基配列はデータベースとして存在する。そのデータベースはCDCにより公開されているので¹¹⁾、菌のM蛋白質をコードする遺伝子(*emm*)のシーケンスを行い、そのデータと比較することにより遺伝学的なM型別は可能である。

1 沈降反応によるM型別

1) 沈降反応用抗原液の抽出

沈降反応用抗原の作製法としては、酸加熱抽出法のほうがオートクレーブ法より明瞭な沈降線が得られるので本検査法では、酸加熱抽出法について記載する。M蛋白質の発現はCO₂存在下で上昇することから、被検菌をCO₂インキュベーター内で培養する。

1. 細胞培養用25cm²フラスコ内のTHB 10 mlに接種し(1菌体につき2本(計20 ml))、37℃で一夜、CO₂インキュベーター内でキャップを少し緩めて静置培養する（このフラスコを用いることでCO₂が培地に行き渡りやすくなる）。
2. 12 ml容アシストチューブに移し、9,800 x g、10分遠心分離する。
3. 上清を捨て、残った上清と菌体をサスペンドし、1.5 ml容ねじつきサンプルリングチューブに移す。
4. 17000 x g、15秒間遠心し、上清を捨てる。
5. 沈さに0.2 M HClを100 μ l加え、ミキサーで混和する。
6. 100℃、10分間煮沸した後、急冷する。
7. 0.02%フェノールレッド1滴を加えた後、0.2 M NaOHで中性付近(ピンク色)にpHを調整する。
8. 17,000 x g、1分遠心する。
9. 遠心エバポレーターを用いて2倍から3倍に濃縮する。
10. 上清を抗原液とする。

2) 寒天ゲル内沈降反応

1. 滅菌蒸留水にアガロースを1%の割合に加え、加熱溶解させる。
2. スライドグラスに厚さ2 mmになるように溶解したアガロースをのせ、凝固させる。（溶解したアガロースを十分冷ます）
3. 鋳型で円形にアガロースをくり抜き、余分なアガロースを吸引により取り除く。
4. 中心のウェルに抗血清、周りのウェルに抗原を注入する。

5. 湿潤箱に収め、4℃で一晩放置する。
6. 沈降線を観察し、型を決定する。

抗血清は、一般に未吸収のものを用いる。未吸収の血清はA群多糖体に対する抗体とM蛋白質に対する抗体の両者を含むが、アガロース内では、M蛋白質より分子量の小さいA群多糖体のほうが移動速度が速い。そのため、A群多糖体による沈降線は抗血清のウェルの近くに現れ、M蛋白質による沈降線は抗血清と抗原の中間に現れるので、区別は可能である。

2 M蛋白質遺伝子(*emm*)のシーケンスによるM型別

シーケンスの方法としては*emm*遺伝子をPCRで増幅後、その増幅産物の塩基配列を決定する手法が簡便である。

M蛋白質はN末よりhypervariable region、variable region、conserved regionに分けられる。PCRに用いるプライマーをデザインする場合、C末のconserved regionはその塩基配列も各型に共通な配列が存在して問題がないが、N末はhypervariable regionで、それぞれの型に特異的な領域であり、各型に共通な配列は存在しないことから、各菌株に共通なプライマーは設定できない。しかし、M蛋白質は菌体外に突出した蛋白質であることから、菌体内で作られたときはそのM蛋白質を菌体外に分泌するためのシグナルペプチドが存在する。このシグナルペプチドはN末からbasic region、hydrophobic region、cleavage regionに分けられ、その中でもbasic regionは各型に共通な配列が存在する¹⁹⁾。したがって、シグナルペプチドのbasic regionおよびconserved regionをコードする領域にプライマーを設定することにより、*emm*遺伝子の増幅が可能となる²⁰⁾。

1) Genomic DNAの抽出

方法 1 :

1. 血液寒天培地上の数コロニーをTE buffer (pH8.0) (10 mM Tris (pH8.0), 1 mM EDTA) 100 μ lに懸濁する。

2. ヒートブロックで95℃、10分間加温する。
3. 15,000 x g、5分間遠心する。
4. 遠心上清をPCRのtemplateとする。

方法 2 :

1. 血液寒天培地上の数コロニーをTris buffer (pH 8.0) 90 μ lにけん濁する。
2. 70℃、10分間ヒートブロックで加温する。
3. mutanolysin (1mg/ml) 10 μ l 添加する。
4. 37℃、1時間加温する。
5. High Pure PCR products purification kit (Roche)を用いてgenomic DNAを抽出する。(方法は以下に示す)
6. Collection tubeにHigh pure spin filter tubeを差し込む。
7. High pure spin filter tubeの中にBinding buffer 500 μ lとmutanolysin処理液100 μ lを加え、ピペットマンでよく攪拌する。
8. 17,000 x g、30秒間遠心する。
9. Collection tube内の溶液を捨て、High pure spin filter tubeを差し込む。
10. Wash Bufferを500 μ l加える。
11. 17,000 x g、30秒間遠心する。
12. Collection tube内の溶液を捨て、High pure spin filter tubeを差し込む。
13. Wash Bufferを200 μ l加える。
14. 17,000 x g、30秒間遠心する。
15. High pure spin filter tubeを1.5 ml容サンプリングチューブに差し込む。
16. 10 mM Tris-HCl (pH8.0)を50 μ l加える。
17. 70℃、10分間加温する。
18. 17,000 x g、30秒間遠心する。
19. サンプリングチューブ内の溶液をPCRのtemplateとする。

2) PCRによる *emm* 遺伝子の増幅

プライマー ; *emm*-1: TAT T(C/G)G CTT AGA AAA TTA A

emm-2: GCA AGT TCT TCA GCT TGT TT

3) PCR反応液

AmpliTaq Gold with PCR Gold Buffer (Applied Biosystems)を用いる例を示す。

滅菌蒸留水	20.0 μ l
10 x PCR Gold buffer	5.0 μ l
25 mM MgCl ₂	5.0 μ l
dNTPs mixture (2.5 mM each)	5.0 μ l
Primer <i>emm</i> -1 (10 pmol / μ l)	7.0 μ l
Primer <i>emm</i> -2 (10 pmol / μ l)	7.0 μ l
AmpliTaq Gold DNA polymerase (5 U / μ l)	0.25 μ l
Template	0.75 μ l

4) 反応条件

Pre : 95°C 10 min.

95°C 30 sec. 52°C 30 sec. 72°C 1 min. 30 cycles

Post : 72°C 7 min.

4°C storage

5) 増幅の確認

PCRサンプルを5 μ lとり、電気泳動にてPCRによりDNAが増幅されているかを確認する。

6) PCR産物の回収

High Pure PCR products purification kit (Roche)を用いる例を示す。

- 1 . Collection tubeにHigh pure spin filter tubeを差し込む。

2. High pure spin filter tubeの中にBinding buffer 500 μ lとPCRサンプル50 μ lを加え、ピペットマンを用いてよく攪拌する。
3. 17,000 x g、30秒間遠心する。
4. Collection tube内の溶液を捨て、High pure spin filter tubeを差し込む。
5. Wash Bufferを500 μ l加える。
6. 17,000 x g、30秒間遠心する。
7. Collection tube内の溶液を捨て、High pure spin filter tubeを差し込む。
8. Wash Bufferを200 μ l加える。
9. 17,000 x g、30秒間遠心する。
10. High pure spin filter tubeを1.5 ml容サンプリングチューブに差し込む。
11. 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)を50 μ l加える。
12. 17,000 x g、30秒間遠心する。
13. サンプリングチューブ内の溶液をシーケンス反応のtemplateとする。

7) シーケンス反応

シーケンス用プライマー

emmseq2 : TAA TCG CTT AGA AAA TTA AAA ACA GG

シーケンス反応試薬

BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems)

を用いてシーケンス反応液を調製する。

PCRに用いたemm-1プライマーでもシーケンスは可能である。

8) 反応条件

Pre : 96°C 30 sec.

96°C 30 sec. 55°C 10 sec. 60°C 4 min. 25 cycles

4°C storage

9) シークエンス

解析には最低90 bpのデータが必要である。

10) シークエンスデータの解析および型別

Center for Disease Control and Prevention (CDC) の *Strep* HOME, *Streptococcus pyogenes* Database (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepindex.html>) より BLAST-*emm*の項を開き、必要事項 (Requestor, Phone, Sample Identifier)、E-mail addressおよびシークエンスデータを送付する。サーチ結果をメールで受け取る。

また、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) BLAST Searchでも解析および型別は可能である。

3. 発赤毒素型別

発赤毒素 (streptococcal pyrogenic exotoxin : SPE、あるいは、erythrogenic toxin : ET、Dick toxin)は、猩紅熱患者から分離されたA群溶レン菌株の培養濾液中に存在する病原因子として1924年Dickにより発見された²¹⁾。主なSPEとしては、SPE-A、SPE-B、SPE-Cがあり、それぞれの遺伝子(*spe*)はクローニングされ、塩基配列が決定されている^{22, 23, 24)}。*speA* は756 bp (分子量: 25.8 kDa)、*speB* は1,197 bp (分子量: 40.3 kDa)、*speC* は708 bp (分子量: 24.4 kDa)である。これらの蛋白質は、それぞれ異なった性状を有することが知られている²⁵⁻²⁸⁾。

1 ラテックス凝集反応によるSPEの検出

五十嵐ら²⁹⁾は、ラテックス凝集反応による簡易・迅速なSPE-A、SPE-B、SPE-C 検出法を確立し、実用化した。試薬の作成方法としては、高純度のこれらの毒素を精製し、それをウサギに免疫して作製した血清から型特異的免疫グロブリンを調製し、最後にラテックス粒子に感作してラテックス凝集反応試薬を作製する。検出は、BHI液体培地で試験菌株を培養後、その上清とラテックス凝集反応試薬を反応させることによって行われる。非常に簡便であり、3時間程度で検出が行われるが、現在試薬は市販されていない。

2 *spe*遺伝子のPCR法による検出

speA、*speB*、*speC*それぞれの遺伝子に特異的なプライマーを準備することにより、PCR法で簡便に遺伝子保有の有無を調べることができる。しかし、*spe*遺伝子の保有の有無とその菌が活性のあるSPEを産生しているかどうかは必ずしも相関しない可能性があるので注意を要する。

1) Genomic DNAの抽出

*emm*型別の項（II-2-2-1）と同様の方法でGenomic DNAを抽出する。

2) PCR法による*spe*遺伝子の増幅

プライマーは*speA*および*speB*については岸下らのデザインしたもの³⁰⁾を、*speC*については稲垣らのデザインしたもの³¹⁾を用いた。プライマーは各遺伝子の特異性を考慮し、さらに、増幅されるDNA断片に大きさの違いを持たせアガロース電気泳動後の泳動位置を観察することによりいずれの遺伝子に由来するものかを容易に判別できるようにデザインされている。*spe*遺伝子検出に用いるプライマーの例を表2に示した。

表2 *spe*遺伝子増幅のためのプライマー

プライマー	オリゴヌクレオチド配列 (5'-3')	増幅されるDNA断片の大きさ(bp)
SPE-A1	GCTCAACAAGACCCCGATCC	
SPE-A2	TGATAGGCTTTGGATACCATCG	393
SPE-B1	GATCAAAACTTTGCTCGTAACG	
SPE-B2	AGGTTTGATGCCTACAACAGC	1113
SPE-C1	GACTCTAAGAAAGACATTTCG	
SPE-C2	AGTCCCTTCATTTGGTGAGTC	540

3) PCR反応液

AmpliTaq Gold with PCR Gold Buffer (Applied Biosystems)を用いる例を示す。

滅菌蒸留水	33.0 μ l
10 x PCR Gold buffer	5.0 μ l

25 mM MgCl ₂	5.0 μ l
dNTPs mixture (2.5 mM each)	4.0 μ l
Primer (10 pmol / μ l)	1.0 μ l
Primer (10 pmol / μ l)	1.0 μ l
AmpliTaq Gold DNA polymerase (5 U / μ l)	0.25 μ l
Template	0.75 μ l

4) 反応条件

Pre : 95°C 10 min.

95°C 30 sec. 52°C 30 sec. 72°C 1 min. 30 cycles

Post : 72°C 7 min.

4°C storage

5) 電気泳動による増幅産物の確認

1%アガロースを用いて電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、確認する。

III. サンプルの送り方

菌株の送付は、検体採取および輸送用の市販品（シードスワブ）、チョコレート斜面培地、ゼラチンディスク（IV-2 参照）等であれば、常温で輸送可能である。

IV. 病原体の保存法

分離菌株を安定した状態で長期間保存することは、調査研究上重要であり、長期保存には凍結乾燥法が最も適した方法であろう。しかし、凍結乾燥法は、日常業務の中では煩雑で、高価な機器が必要となるためこれに代わる保存法を紹介する。

1. 凍結保存法

10%スキムミルク溶液に菌液を濃厚に懸濁、または、Todd-Hewitt Brothにて培養した菌体を遠心により回収し、新しいTodd-Hewitt Broth液で再浮遊後、セラムチューブ等で凍結保存する。凍結融解を行わなければ、数年にわたり保存可能である。

2. ゼラチンディスク法³²⁾

ゼラチンディスク法は凍結乾燥と同様、良好な保存状態が維持でき、輸送にも十分耐えうる。

1 ゼラチンディスク保存液

【A液】

Bacto dextrose 5.0%

Bacto skim milk 3.0%

charcoal activated 0.6%

よく混合して、スクリー試験管に分注し(5 ml)、110℃、10分間滅菌後、密栓して冷蔵庫で保存する。

【B液】

sodium L-ascorbate 5.0%

濾過滅菌後、少量(1 ml)ずつ分注し、密栓、遮光して凍結保存する。

B液の凍結融解は避ける。

【C液】

Bacto gelatin 20.0%

加熱溶解後、スクリー試験管に分注し(5 ml)、121℃、15分間滅菌後、密栓して冷蔵庫で保存する。

2 機材

[デシケーター]

吸引コック付きの真空用デシケーター

[シリカゲル(または五酸化リン)]

五酸化リンは、取り扱いおよび廃液処理が困難なため、現在は代用品としてシリカゲルを用いている。特に死滅しやすい菌以外はシリカゲルで代用できると思われる。

[パラフィン濾紙]

菌液を乾燥させるためパラフィン濾紙を作製する。直径7 cmの濾紙を固形パラフィンでコーティングするのが原法であるが、料理用のオーブンシート（リードクッキングペーパー等）を用いると便利である。オーブンシートをシャーレよりやや小さめにカットし、オートクレーブ滅菌後、乾燥する。使用時に一枚ずつ滅菌シャーレにとり使用する。滅菌シャーレはポリシャーレを使用することもできるが、ゼラチンディスク回収の際、静電気によりシャーレにディスクが張り付くことがある。

[真空ポンプ]

3 ディスクの調整法

菌株の準備：菌株の発育度に応じて1～数枚の非選択培地を用い、適した温度および方法で培養する（長時間培養したものは不適）。

[ディスクの作製]

1. 試薬A液をよく混合し、B液、C液は溶解しておく。
2. A液：B液：C液を1：0.2：1の割合で混合し、滅菌小試験管に分注しておく。
3. 平板に発育した菌体を白金耳でかき集め、試験管壁でよく混合し、均

等な浮遊液とする。粘稠性の強い菌は、特に注意深く混合する。（浮遊したときの菌量は $10^9 \sim 10^{10}$ / ml以上とするが、菌量が多すぎるとゼラチン強度が低下しディスクが壊れやすくなるので注意する。レンサ球菌であれば、血液寒天平板1枚を0.5～1 mlに浮遊させると適当量であると思われる。）

4. 菌体浮遊液を滅菌パスツールピペットで気泡が入らないように滅菌シャーレ中のパラフィン濾紙上に適当な間隔をあけ滴下する。1 mlの浮遊液で約30滴滴下できる。
5. デシケーターの中に入れ、シャーレの蓋の間に滅菌ガラス棒を入れる。また、シャーレを器とし、シリカゲル（または五酸化リン）を数カ所にいれる。
6. デシケーターの蓋を閉じて真空ポンプで減圧する。（減圧しすぎると気泡を生じ、また、弱すぎても乾燥に時間がかかり生菌数も減少するので注意する。）
7. ディスクが平坦になり始めたら減圧を止め、室温に放置する。
8. 翌日には、乾燥したゼラチンディスクができあがる。

ディスクの保存

1. 乾燥したディスクは先の細いピンセットでパラフィン濾紙から剥がす。
2. 滅菌したセラムチューブに入れ、密栓し -20°C 以下の冷凍庫で保存する。また保存と同時に、作製したゼラチンディスク1枚を溶解し、平板に塗抹培養し生菌数が十分であることを確認する。

[ディスクの溶解]

使用するときには、ディスク1枚を取り出し、滅菌した液体培地0.1～0.2 ml程度に浮遊させる。溶解後はそのまま培養せず、平板に塗布後、分離培養を行う。この他、ディスクをそのまま寒天培地に置いて、数分放置し、寒天培地の水分でふやかしてから塗布することも可能である。

V. 引用文献

- 1) Rotta J. and Facklam R. R. 1980. Manual of Microbiological Diagnostic Methods for Streptococcal Infections and Their Sequelae. WHO/BAC/80.1
- 2) 児玉博英、永瀬金一郎、奥山雄介ほか。1987. レンサ球菌. 微生物検査必携 細菌・真菌検査 第3版、F2-F30、金井興美、赤尾頼幸、伊藤雅治ほか編、日本公衆衛生協会、東京。
- 3) Ruoff K. L. 1995. *Streptococcus*. Manual of Clinical Microbiology sixth ed, 299-307, Murray PR *et al.* eds., ASM Press, Washington DC.
- 4) Lancefield R. C. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J. Exp. Med. 57: 571-595.
- 5) Facklam R. R. and Edwards L. R. 1979. A reference laboratory's investigations of proposed M-type strains of *Streptococcus pyogenes*, capsular types of *S. agalactiae*, and new group antigens of streptococci. In: Parker M. T. (ed). Pathogenic Streptococci. Chertsey, Surrey: Reedbooks. 251-253.
- 6) Schleifer K. H. and Kilpper-Balz R. 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of Streptococci, Enterococci, and Lactococci; A Review. Syst. Appl. Microbiol. 10: 1-19.
- 7) Bae B. H. C. and Bottone E. J. 1980. Modified Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP) test for direct identification of hemolytic and nonhemolytic group B streptococci on primary plating. Can. J. Microbiol. 26: 539-542.
- 8) Gerber M. A., Spadaccini L. J., Wright L. L. and Deutsch L. 1984. Latex agglutination tests for rapid identification of group A streptococci directly from throat swabs. J. Pediatr. 105: 702-705.
- 9) Drulak M., Bartholomew W., LaScolea L., Amsterdam D., Gunnensen N., Yong J., Fijalkowski C. and Winston S. 1991. Evaluation of the modified Visuwe II Strep-A enzyme immunoassay for detection of group-A Streptococcus from throat swabs. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 14: 281-285.
- 10) Gerber M. A., Randolph M. F. and DeMeo K. K. 1990. Liposome immunoassay for rapid identification of group A streptococci directly from throat swabs. J. Clin. Microbiol. 28: 1463-1464.
- 11) Centers for Disease Control and Prevention Homepage. *Streptococcus pyogenes* database. <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepindex.html>.
- 12) Horstmann R. D., Sievertsen H. J., Knobloch J. *et al.* 1988. Antiphagocytic activity of

streptococcal M protein: selective binding of complement control protein factor H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 1657-1661.

13) Jacks-Weis J., Kim Y. and Cleary P. P. 1982. Restricted deposition of C3 on M⁺ group A streptococci: correlation with resistance to phagocytosis. J. Immunol. 128: 1897-1902.

14) Johnson D. R. and Kaplan E. L. 1993. A review of the correlation of T-agglutination patterns and M-protein typing and opacity factor production in the identification of group A streptococci. J. Med. Microbiol. 38: 311-315.

15) Griffith F. 1935. The serological classification of *Streptococcus pyogenes*. J. Hyg. 34: 542-584.

16) 中島邦夫、奥山道子。1988. レンサ球菌の分類と関連抗体。皮膚科MOOK 17: 47-56.

17) Swift H. F., Wilson A. T. and Lancefield R. C. 1943. Typing of group A hemolytic streptococci by M precipitin reactions in capillary pipettes. J. Exp. Med. 78: 127-133.

18) 勝川千尋、原田七寛。1991. 大阪府下で分離されたA群溶血レンサ球菌の血清型と薬剤感受性について(1988～1989年)。感染症学雑誌 65: 945-952.

19) Katsukawa C. 1994. Cloning and nucleotide sequence of type 3 M protein gene (*emm3*) consisting of an N-terminal variable portion and C-terminal conserved C repeat regions: relation to other genes of *Streptococcus pyogenes*. Kansenshogaku Zasshi. 68: 698-705.

20) Beall B., Facklam R. Thompson T. 1996. Sequencing *emm*-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. J. Clin. Microbiol. 34: 953-958.

21) Dick G. F. and Dick G. H. 1924. A skin test for susceptibility to scarlet fever. JAMA 82: 265-266.

22) Week C. R. and Ferretti J. J. 1986. Nucleotide sequence of the type A streptococcal exotoxin (erythrogenic toxin) gene from *Streptococcus pyogenes* bacteriophage T12. Infect. Immun. 52: 144-150.

23) Hauser A. R. and Schlievert P. M. 1990. Nucleotide sequence of the streptococcal pyrogenic exotoxin type B gene and relationship between the toxin and the streptococcal proteinase precursor. J. Bacteriol. 172: 4536-4542.

24) Goshorn S. C. and Schlievert. P. M. 1988. Nucleotide sequence of streptococcal pyrogenic exotoxin type C. Infect. Immun. 56: 2518-2520.

25) Kim Y. B. and Watson D. W. 1970. A purified group A streptococcal pyrogenic exotoxin. J. Exp. Med. 131: 611-628.

26) Barsumian E. L., Cunningham C. M., Schlievert P. M. *et al.* 1979. Heterogeneity of group A Streptococcal pyrogenic exotoxin type B. Infect. Immun. 20: 512-518.

27) Schlievert P. M., Bettin K. M. and Watson D. W. 1977. Purification and characterization

of group A streptococcal pyrogenic exotoxin type C. Infect. Immun. 16: 673-679.

28) McMillian R. A., Bloomer T. A., Saeed A. M. *et al.* 1987. Characterization of a fourth streptococcal pyrogenic exotoxin (SPE D). FEMS Microbiol. Lett. 44: 317-322.

29) 五十嵐英夫、柏木義勝、遠藤美代子、奥野ルミ。1994. 劇症型A群レンサ球菌感染症。臨床と微生物 21: 638-647.

30) 岸下雅道、山崎伸二、竹田美文。1992. A群溶連菌の産生する発赤毒素遺伝子のPCRによる型別判定。日本臨床 50: 326-332.

31) 稲垣善重、渡辺治雄。1997. 発赤毒素*spe*遺伝子のPCRによる検出。劇症型A群レンサ球菌感染症ーヒト喰いバクテリアの出現ー、近代出版 193-197.

32) Obara Y., Yamai S., Nikkawa T. *et al.* 1981. Preservation and Transportation of Bacteria by a Simple Gelatin Disk Method. J. Clin. Microbiol. 14: 61-66.

VI. 検査依頼先

衛生微生物技術協議会溶血性レンサ球菌レファレンスシステムセンター窓口

A 群レンサ球菌の T, M 型別試験、および劇症型 A 群レンサ球菌感染症に関する情報についての窓口は以下の機関になっておりますので、お問い合わせをお願いいたします。

センター 国立感染症研究所細菌部 〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1	tel : 03-5285-1111 fax : 03-5285-1163
北海道・東北・新潟ブロック支部センター 福島県衛生研究所 〒960-8163 福島県福島市方木田字水戸内 16-6	tel : 024-546-8047 fax : 024-546-8364
関東・甲信静ブロック支部センター 神奈川県衛生研究所 〒241-0815 神奈川県横浜市旭区中尾 1-1-1	tel : 045-363-1030 fax : 045-363-1037
東海・北陸ブロック支部センター 富山県衛生研究所 〒939-0363 富山県射水郡小杉町中太閤山 17-1	tel : 0766-56-5506 fax : 0766-56-7326
近畿ブロック支部センター 大阪府立公衆衛生研究所 〒537-0025 大阪府大阪市東成町中道 1-3-69	tel : 06-6972-1321 fax : 06-6972-0772
中国・四国ブロック支部センター 山口県環境保健研究センター 〒753-0821 山口県葵 2 丁目 5-67	tel : 083-922-7630 fax : 083-922-7632
九州ブロック支部センター 大分県衛生環境研究センター 〒870-0948 大分県大分市芳河原台 2-51	tel : 097-569-0802 fax : 097-569-5150
東京都立衛生研究所 〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1	tel : 03-3363-3231 fax : 03-3368-4060

VII. 執筆者一覧

池辺忠義：国立感染症研究所細菌第一部

平沢恭子：福島県衛生研究所微生物部

田中大祐：富山県衛生研究所細菌部

鈴木理恵子：神奈川県衛生研究所微生物部

勝川千尋：大阪府公衆衛生研究所感染症部

富田正章：山口県環境保健研究センター生物学部

緒方喜久代：大分県衛生環境研究センター微生物部

遠藤美代子：東京都健康安全研究センター微生物部

エイズ／HIV 感染症

エイズ／HIV 感染症

目 次

(1) はじめに

(2) 検査手順

(3) 血清診断法

A) スクリーニング法

I. HIV 抗体の検出

1. ゼラチン粒子凝集法 (PA)

2. ラテックス凝集法

3. イムノクロマトグラフィー法 (ICA)

4. 酵素免疫測定法 (ELISA)

II. HIV 抗原および抗体の同時検出

1. 酵素免疫測定法 (ELISA)

B) 確認法

1. ウェスタンブロット法 (WB)

2. イムノブロット法

C) その他

I. HIV 抗原の検出 (p24 Ag)

1. 酵素免疫法 (ELISA)

(4) 病原体の検出法

I. ウイルス分離培養 (共培養法)

II. 遺伝子検査

1. PCR によるプロウイルス DNA の検出法

2. HIV-1 RNA 定量法

3. HIV の遺伝子型 (サブタイプ) 判別

4. HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査法

(5) 執筆者一覧

(6) 連絡先

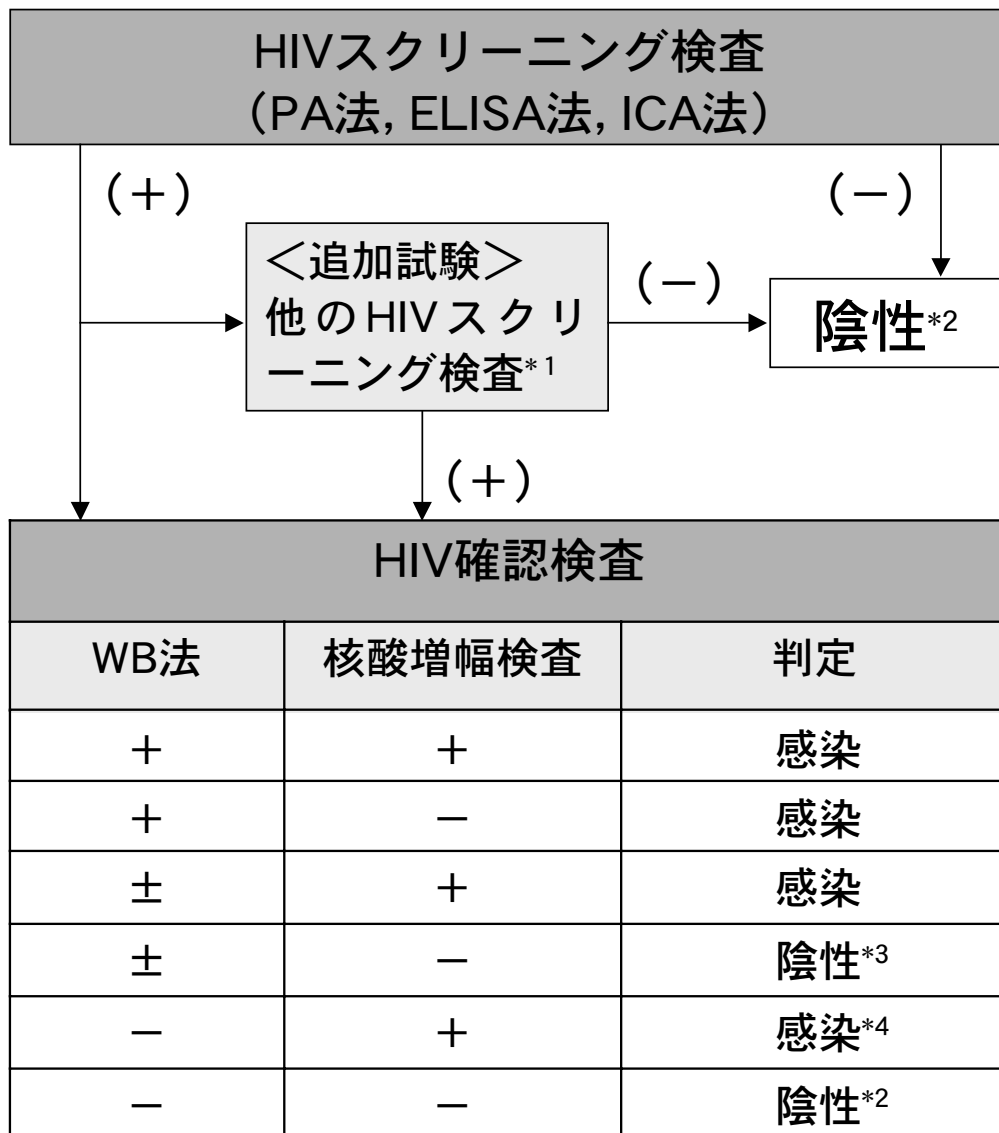
(1)はじめに

後天性免疫不全症候群 (AIDS) は、HIV (Human immunodeficiency virus : ヒト免疫不全ウイルス) の感染によって引き起こされる免疫不全状態を主な病態とする疾患である。本症は 1981 年アメリカで発見され、その病原体ウイルスは 1983 年初めて分離されたが、WHO を中心とする世界的な努力にもかかわらず世界的に急速に拡大している。HIV は、患者および感染者の血液、精液、膣分泌液などの体液の他、組織や臓器にも含まれており、その感染経路は、主として 1) 感染者との性的接触、2) HIV 汚染血液との接触、3) 感染母胎からの母子感染が知られている。通常、HIV に感染してから血液中に HIV 抗体が出現するまで平均 4～8 週間を要する。

本マニュアルでは、血清学的診断法として HIV 抗体および抗原 (p24Ag) の検出、病原体診断法としてウイルス分離培養、プロウイルス DNA の検出、HIV RNA 量の測定および薬剤耐性について詳細に記載した。

(2) 検査手順

HIVスクリーニング検査実施 フローチャート



WB法：ウエスタンブロット法

- *1 一回目のスクリーニング検査と同等以上の感度の検査
- *2 感染のリスクが高く感染初期の可能性が考えられる場合は 数週間後に採血し、再検査を実施する。
- *3 感染の疑いもあるので、数週間後に採血し、再検査を実施する。
- *4 感染初期の可能性が高いので、数週間後に採血し、再検査を実施する。

(3) 血清診断法

A) スクリーニング法

I. HIV 抗体の検出

1. ゼラチン粒子凝集法 (PA)

[ジェネディア HIV-1/2 ミックス PA]

本法は血清または血漿中の抗 HIV-1 抗体および抗 HIV-2 抗体を同時に検出するもので、ゼラチンを粒型化した人工担体 (ゼラチン粒子) に、リコンビナント HIV 抗原 (HIV-1/gp41、HIV-1/p24、HIV-2/gp36) を吸着させた感作粒子が、検体中の抗 HIV-1 抗体または抗 HIV-2 抗体と反応し、凝集することを応用した粒子凝集反応法 (PA 法) である。

1) キットの構成

- A : 溶解溶液 (液状) 10ml または 20ml 1 本
- B : 血清希釈液 (液状) 20ml または 40ml 1 本
- C : 感作粒子 (凍結乾燥) 0.6ml 用 5 本または 1.5ml 用 4 本
使用の 30 分前に所定量の溶解液を加えて室内温度 (15～30℃) にて調整する。
- D : 対照粒子 (凍結乾燥) 1.0ml 用 5 本または 20ml 用 4 本
使用の 30 分前に所定量の溶解液を加えて室内温度 (15～30℃) にて調整する。
- E : 対照用陽性血清 (液状)

2) 操作法

(1) 使用器具

- マイクロプレート U 型
- ダイリ्यूター 25μl 用
- ドロップパー 25μl 用
- ピペット
- スポイト
- トレイミキサー
- 判定用ビューアー

(2) 測定法

<定性法>

- (a) ドロップパーまたはマイクロピペットを用いて、血清希釈用液をマイクロプレートの第 1 穴に 3 滴 (75μl)、第 2 穴、第 3 穴に 1 滴 (25μl) ずつ分注する。
- (b) マイクロピペットを用いて検体 25μl をとり、第 1 穴に入れる。次にダイリ्यूターまたはマイクロピペットを用いて第 1 穴から第 3 穴まで 2 倍希釈を行う。
- (c) 添付のスポイトを用いて対照粒子を第 2 穴に 1 滴 (25μl)、感作粒子を第 3 穴に 1 滴 (25μl) ずつ滴下する。
- (d) トレイミキサーを用いてマイクロプレートの内容物が飛び散らない程度の強さで 30 秒程度混合する。マイクロプレートに蓋をして、室内温度 (15～30℃) にて水平に静置し、2 時間後に判定する。なお、翌日まで静置し判定しても差し支えない。

<定量法>

定性法で陽性または保留と判定された検体については確認の意味も含め定量法を実施する。定量法は検体希釈および感作粒子の滴下を最終穴まで行う。その他の操作は定性法と同様に行う。

3) 対照試験

- (1) 検体ごと対照粒子の反応 (最終希釈倍数 16) が (－) であることを確かめる。
- (2) 検査ごとに血清希釈液と感作粒子および対照粒子の反応が (－) であることを確かめる (メディウム対照)。
- (3) キットごとに対照用陽性血清を検体と同様の測定操作で実施する。対照用陽性血清は、抗体価 128 (最終希釈倍数) になるように調製してある。

4) 測定結果の判定法

(1) 反応像の読み

判定ビューアの上にマイクロプレートを静かに置き、粒子の反応像を観察する。反応像はメディウム対照の像と対比し、以下の表を参照して読む。

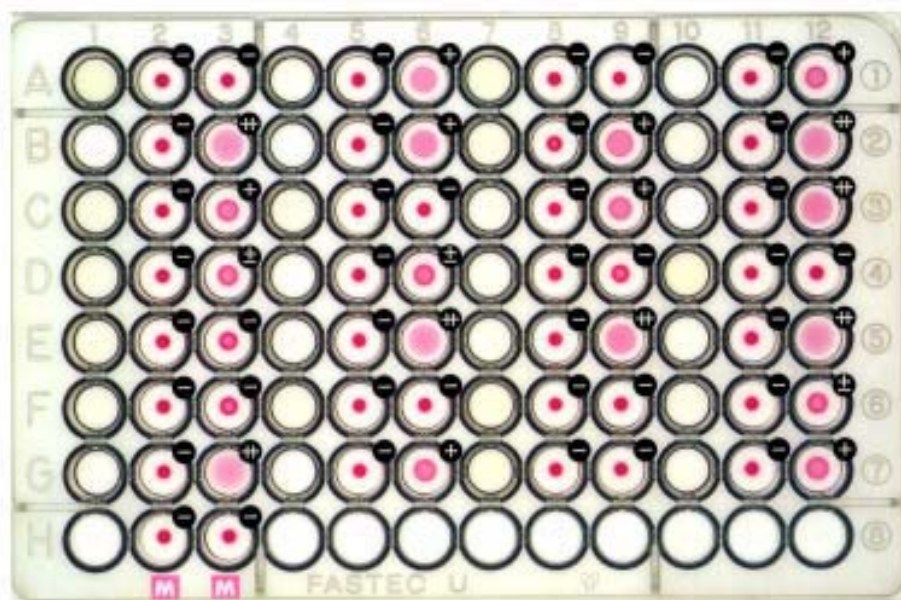
反応像	読み
粒子がボタン上に集まり、外周縁が均等でなめらかな円形を示すもの	－
粒子が小さなリングを形成し、外周縁が均等でなめらかな円形を示すもの	±
粒子リングが明らかに大きく、その外周縁が不均等で荒く周辺に凝集が見られるもの	＋
凝集が均一に起こり、凝集粒子が底全体に膜状に広がっているもの	++

(2) 判定基準

陽性：対照粒子 (最終希釈倍数 16) の反応像の読みが (－) で、感作粒子 (最終希釈倍数 32) の反応像の読みが (＋) 以上を示すものを陽性とする。定量法の場合は凝集像 (＋) を示した最終希釈倍数をもって抗体価とする。

陰性：対照粒子 (最終希釈倍数 16) の反応像の読みにかかわらず、感作粒子 (最終希釈倍数 32) の反応像の読みが (－) を示すものを陰性とする。

保留：対照粒子 (最終希釈倍数 16) の反応像の読みが (－) で、感作粒子 (最終希釈倍数 32) の反応像の読みが (±) を示すものを保留とする。



PA法

5) 吸収操作

対照粒子および感作粒子がともに（±）以上の凝集を示した検体については、次の手順による吸収操作を行った上で再検査する。

- (1) 小試験管（スピッツ管など）に所定量の溶解溶液で調製した対照粒子を 0.35ml 入れる。
- (2) 検体 50 μ l を加えて混合し、室内温度（15~30℃）に 20 分以上放置する。
- (3) 遠心分離（2,000rpm、5 分）し、その上清液〔吸収済み検体（8 倍希釈）〕を粒子が混ざらないように注意深く分取してマイクロプレートの第 2 穴に 50 μ l とる。
- (4) 第 3 穴以降はあらかじめ血清希釈液を 25 μ l ずつ分注しておき、第 2 穴から最終穴までダイリ्यूターまたはマイクロピペットを用いて 2 倍希釈を行う。
- (5) 添付のスポイトを用いて対照粒子を第 2 穴に 1 滴（25 μ l）、感作粒子を第 3 穴以降最終穴まで 1 滴（25 μ l）ずつ滴下する。
- (6) トレイミキサー等を用いてマイクロプレートの内容物が飛び散らない程度の強さで 30 秒程度混合する。マイクロプレートに蓋をして、室内温度（15~30℃）にて水平に静置し、2 時間後に判定する。なお、翌日まで静置し判定しても差し支えない。

2. ラテックス凝集法

[ランリーム HIV-1/2]

本法はラテックス凝集の原理に基づいて抗 HIV 抗体を測定するものである。ラテックス粒子上に感作された HIV 抗原が試料（血清、血漿、および全血など）中の抗体（抗 HIV 抗体）と反応することにより、抗体をなかだちとしてラテックスの凝集が起こる。この凝集は抗体量に応じて起こるため、あらかじめ既知濃度の抗 HIV 抗体を含む試料（HIV-1/2 カットオフコントロール）により設定したカットオフ値から判定を行うことができる。

ラテックス粒子上に HIV-1 *gag* 領域 p24 抗原（リコンビナント抗原、大腸菌由来）、HIV-1 *env* 領域 gp41 および HIV-2 *env* 領域 gp36 ハイブリッド抗原（リコンビナント抗原、大腸菌由来）、HIV-1 *pol* 領域 p31 抗原（リコンビナント抗原、大腸菌由来）および HIV-2 *env* 領域 gp36 抗原（合成ペプチド）を感作しているので抗 HIV-1 抗体および抗 HIV-2 抗体を同時に検出することができる。

1) キットの構成

本キットは以下の (A)、(B) および (D) の 3 種類の試薬より構成されている。

	構成試薬	60 テスト用 (RHI-700A)	120 テスト用 (RHI-710A)
(A)	HIV-1/2 ラテックス試薬	0.8 ml×1 本	1.4 ml×1 本
(B)	HIV-1/2 緩衝液	6.6 ml×1 本	11.7 ml×1 本
(D)	HIV-1/2 カットオフコントロール	1.0 ml×1 本	1.0 ml×1 本
	HIV-1/2 陽性コントロール	1.0 ml×1 本	1.0 ml×1 本
	HIV-1/2 陰性コントロール	1.0 ml×1 本	1.0 ml×1 本

2) 用法・用量（操作法）

(1) 試薬の調製法、安定性

<試薬の調製法>

HIV-1/2 ラテックス試薬、HIV-1/2 緩衝液、HIV-1/2 陰性コントロール、HIV-1/2 カットオフコントロール、HIV-1/2 陽性コントロールをそのまま用いる。

<試薬の安定性>

未開封：2～8℃で保存する場合、製造後から 12 ヶ月安定。

開封後：2～8℃に保存する場合、1 ヶ月安定。

(2) 測定操作方法

免疫凝集測定装置「PAMIA-10、20、30、50、100」（シスメックス株式会社 医療用具許可番号：28BZ0193）における測定を以下に示す。

使用に際しては、必ず測定装置の取扱説明書を読むこと。また、測定装置は使用前に十分調整すること。

<測定の準備>

HIV-1/2 ラテックス試薬および HIV-1/2 緩衝液の蓋を外し、各ボトルをそのまま装置内の定められた位置（試薬ユニット内）にセットする。

<カットオフ値の設定>

- (a) HIV-1/2 陰性コントロールおよび HIV-1/2 カットオフコントロール を泡立たないように静かに攪拌し、サンプルカップに約 200μl 分注する。
- (b) HIV-1/2 陰性コントロールおよび HIV-1/2 カットオフコントロール を装置内の定められた位置にセットする。
- (c) 「HIV」を指定して測定を開始する。

<検体の測定>

- (a) 検体をサンプルカップに各々約 200μl 分注する。
- (b) 検体を装置内の定められた位置にセットする。
- (c) 検体番号を入力する。
- (d) 「HIV」を指定して測定を開始する。

[注 1] 各試薬は、他の測定項目のものと取り違えないように注意し、「HIV」の指定がなされている位置に正しくセットする。

[注 2] 本品に含まれている HIV-1/2 陽性コントロールは、主に検量線作成後、機器・試薬を含めた性能を確認する目的で使用する。

[注 3] カットオフ値の設定においては、設定を実施した同一日内は、再度設定する必要はない。

3) 性能・妨害物質

(1) 性能

(a) 感度試験

抗 HIV 抗体を含まない試料として HIV-1/2 陰性コントロールを、また抗 HIV 抗体を含む試料として HIV-1/2 カットオフコントロールをそれぞれ 10 回測定し、各々の凝集度の平均値と標準偏差値を X0、SD0 および X1、SD1 とするとき、下式を満足することが確認されている。

$$\text{式: } (X0+2SD0) < (X1-2SD1)$$

(b) 特異性試験

HIV-1/2 陽性コントロールを試料として測定するとき、陽性となること。また、HIV-1/2 陰性コントロールを試料として測定するとき、陰性となることが確認されている。

(c) 再現性試験

HIV-1/2 陽性コントロールを 5 回同時に測定するとき、すべて陽性となること。また、HIV-1/2 陰性コントロールを 5 回同時に測定するとき、すべて陰性となることが確認されている。

(d) 最低検出感度

1.0 SU*/ml 以上

*SU:SYSMEX UNIT (社内標準単位) の略である。なお、1SU/ml は HIV-1/2 カットオフコントロールがカットオフ値 1.0 を示すように抗 HIV ウサギ血清を含む校正用基準物質により設定したもの。

(2) 操作上の留意事項

- (a) 検体は、採血後速やかに測定するようにして下さい。
- (b) 検体の保存が必要な場合は、-20℃以下で凍結して保存する。
- (c) 検体の凍結融解を繰り返すと粒子成分が生じ、測定が正常に行われないことがあるので、検体を繰り返し凍結融解することは避ける。

- (d) 検体に気泡が存在すると測定が正常に行われなことがあるので、検体の攪拌や分注時には、気泡が生じないように注意する。検体間のコンタミネーションを防ぐために、検体の分注や希釈においては同じピペットあるいはチップを使用しないこと。
- (e) 測定試料は蒸発の影響を考慮して通常は 200 μ l 分注する。なお、最低分注量については、装置の取扱説明書を参照する。

4) 測定結果の判定方法

(1) 判定方法

HIV-1/2 陰性コントロール、HIV-1/2 カットオフコントロールの凝集度 (T2%) からカットオフ値を設定する。

カットオフ値 = HIV-1/2 カットオフコントロールの凝集度 (T2%)
検体のカットオフインデックス (C.O.I.) の計算方法

$$\text{カットオフインデックス (C.O.I.)} = (S - N) / (C - N)$$

S: 検体の凝集度 (T2%)

N: HIV-1/2 陰性コントロールの凝集度 (T2%)

C: HIV-1/2 カットオフコントロールの凝集度 (T2%)

各検体の凝集度 (T2%) がカットオフ値以上 (C.O.I.=1 以上) のものを陽性、カットオフ値未満 (C.O.I.=1 未満) のものを陰性と判定する。

以上の判定については、免疫凝集測定装置で自動的に計算され判定結果とカットオフ値が表示される。

(2) 判定に関わる注意事項

- (a) 測定結果が陽性を示した検体およびカットオフ値付近の検体については、経時的に検査すると共に他の HIV 関連検査および臨床症状等より総合的に判断すること。
- (b) HIV 感染後、抗体が産生されるまでにはおよそ 3 週間～2 ヶ月かかり、この期間においては抗体が認められないか、もしくは非常に少ないことがある。よって HIV 感染が疑われる場合には、本試薬の判定結果が陰性であっても経時的に検査すると共に他の HIV 関連検査および臨床症状等より総合的に判断すること。
- (c) ラテックス凝集法では、検体により非特異的に凝集を示し偽陽性を生じる場合がある。この偽陽性検体の反応性は C.O.I.でおよそ 1～7 の範囲で存在しており、ちょうど Seroconversion 初期の反応性と重なっているため、(BBI 社製 Seroconversion panel 測定の中で最も低い反応性は、C.O.I.でおよそ 2 付近) 経時的に検査すると共に他の HIV 関連検査および臨床症状等より総合的に判断すること。

3. イムノクロマトグラフィー法 (ICA)

[ダイナスクリーン・HIV-1/2]

本法はサンドイッチイムノアッセイ法を用いたイムノクロマトグラフィー法により、検体（血清、血漿または全血）中の抗 HIV-1 抗体および抗 HIV-2 抗体を検出するものである。

HIV-1/2 抗体検出用シート（以下シートとする）に検体を滴下して 15 分後、シート上に出現する赤色のラインの有無を確認することにより、結果を判定することができる。

また従来の HIV 抗体検査のキットにはない以下の 3 つの特徴を有している。

(1)全血検体を前処理することなく使用できる。

(2)短時間で結果を判定できる。

(3)室温でも保存できる。

1) キットの構成

ダイナスクリーン・HIV-1/2（100 回用）

HIV-1/2 抗体検出用シート 10 テスト/1 シート 10 シート

HIV 抗原：セレンウムコロイド標識 HIV 抗原

*HIV 抗原は HIV-1 の *env* (gp41 または gp120) 領域の合成ペプチドおよびリコンビナント抗原、HIV-2 *env* (gp36) 領域の合成ペプチドおよびリコンビナント抗原を使用。

2) 操作法

(1) 準備器具および試薬

(a) 血漿または血清の場合

チップ式マイクロピペット

(b) 全血の場合

全血展開液 (Chase buffer)

チップ式マイクロピペットまたはキャピラリー (EDTA Capillary tube)

(2) 検体の測定

HIV-1/2 抗体検出用シートの右側から必要テスト数を切り離し、シート上のアルミシールを剥がす。測定は 15～40℃で行う。

(3) 血漿または血清検体の場合

(a) シート下部の検体滴下部位に検体を 50μl ずつ滴下する。

(b) 検体滴下 15 分後 (1 時間以内) に結果を判定する。

(4) 全血検体の場合

(a) シート下部の検体滴下部位に検体を 50μl ずつ滴下する。

(b) 検体滴下 1 分後に同じ部位に全血展開液 1 滴を滴下する。

(c) 検体滴下 15 分後 (1 時間以内) に結果を判定する。

(5) キャピラリーで採血して測定する場合

以下のような皮膚穿刺法を実施して適切な検体採取を行うこと。

(a) 採血部位

指先の側面、足蹠など (耳朶は避けること)

(b) 穿刺部位を加温して、血行を良くする。

(c) 穿刺部位をアルコールで清拭する。

(d) 新しい滅菌済み穿刺器具 (ランセットなど) で、皮膚表面を穿刺する。

(e) 最初の 1 滴は、組織液を含んでいるため避けること。

(f) 血液滴にキャピラリーを当て 2 本目の線まで血液を採取する。

- (g) シート下部の検体滴下部位にキャピラリーの先端をつけ、キャピラリー内の血液を全て吸収させる。
- (h) 全血展開液 1 滴を滴下する。
- (i) 検体滴下 15 分後 (1 時間以内) に結果を判定する。

3) 測定結果の判定

図に示すようにシートの各ストリップ上には、2 つの判定窓がある。

この 2 つの窓を確認し、赤色のラインの有無を確認する。

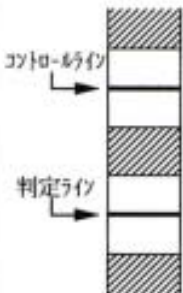



<判定基準>

陽性：ストリップ上部の判定窓に赤色のライン (コントロール) が認められ、かつ、ストリップ下部の判定窓に赤色のライン (判定ライン) が認められた場合は、陽性と判定する。

陰性：ストリップ上部の判定窓に赤色のライン (コントロール) が認められ、かつ、ストリップ下部の判定窓に赤色のライン (判定ライン) が認められない場合は、陰性と判定する。

4) 操作上の留意点

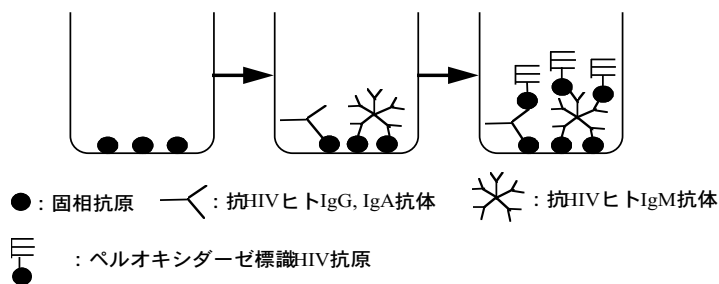
- (1) 検体には、血漿、血清または全血を用いる。抗凝固剤は EDTA を使用する。
- (2) 溶血した検体は使用しないこと。
- (3) 血漿検体または血清検体は、2～8℃に保存して 7 日以内に試験するか、凍結保存すること。検体の凍結融解は繰り返さないこと。
- (4) 全血検体は採血当日に試験することが望ましい。後日試験する場合は、2～8℃に保存して 7 日以内に試験する。凍結保存はしないこと。
- (5) キャピラリーの場合は採血後直ちに試験する。
- (6) 血漿検体または血清検体中に凝集塊や赤血球がある場合は、溶血を避けるために、できるだけ早く取り除くこと。
- (7) 血漿検体または血清検体中に沈殿物のある検体または濁りがある場合は、結果に影響を及ぼす可能性があるため、遠心分離して透明にした後に使用する。
- (8) 不活化処理検体 (補体を失活させた検体) は、測定に影響を与えなかった。
- (9) ビリルビン添加 20mg/dl まで、ヘモグロビン添加 500mg/dl まで、トリグリセライド添加 1,000mg/dl まで測定には影響は見られなかった。

有 効		無 効	
陽 性	陰 性		
			
コントロールラインと判定ラインの両方が認められる	コントロールラインは認められるが、判定ラインが認められない	コントロールラインは認められず、判定ラインだけが認められる	コントロールラインと判定ラインの両方が認められない

4. 酵素免疫測定法 (ELISA)
[ジェンスクリーン HIV1/2]

本法は ELISA (酵素免疫測定法) によるサンドイッチ法により血清または血漿中の抗 HIV-1 抗体および抗 HIV-2 抗体を検出するものである。固相抗原として HIV-1 gp160 (リコンビナント)、p25 (リコンビナント) および HIV-2 gp36 (合成ペプチド) を、標識抗原としてペルオキシダーゼで標識した HIV-1 p25 (リコンビナント)、HIV-1 gp41 (2 種の合成ペプチド) および HIV-2 gp36 (合成ペプチド) を使用している。

マイクロプレートに検体を加えると、固相抗原に検体中の抗 HIV 抗体が結合し、複合体を形成します。さらに標識抗原を加え、その複合体に結合させた後、TMB (テトラメチルベンチジン) の発色を利用した吸光度測定により、検出する。



1) キットの構成

R1	固相マイクロプレート	ポリスチレン	1 枚
R2	洗浄原液	濃縮液	100ml
R3	陰性コントロール	液状	1ml
R4	カットオフコントロール	液状	2.5ml
R5	陽性コントロール	液状	1ml×1 本
R6	検体希釈液	液状	14ml
R7 a	酵素標識抗原	凍結乾燥品	12.5ml 用×1 本
R7 b	標識抗原溶解液	液状	12.5ml×1 本
R8	基質緩衝液	液状	60ml×1 本
R9	発色剤	液状	5ml×1 本
R10	反応停止液	液状	28ml×1 本
	粘着フィルム		4 枚

(注意 1) : R3、R4、R5 には、アジ化ナトリウム 0.1ml が含まれている。
(注意 2) : R2 にはチメロサル 0.001%が含まれている。

2) 用法・用量

(1) 試薬の調整法、安定性

試薬		調製法	調製後の安定期間
R1	固相マイクロプレート	検体数に応じて必要数を取り出し、残りは袋に戻して密封保存。前洗浄は不要。	開封後、2～8℃／4 週間
R2 + 精製水	洗浄液	洗浄原液 (R2) を精製水で 10 倍に希釈。	2～8 ℃／2 週間

R7a+R7b	酵素標識抗原液	酵素標識抗原 (R7a) に標識抗原溶解液 1 バイアル (R7b : 12.5 ml) を加えて溶解 し、酵素標識抗原液を調製。	調製後、2～8 °C / 4 週間
R8+R9	基質発色液	発色剤 (R9) を基質緩衝液 (R8) で 11 倍に希釈し、基質発色液とする。	調製後、18～30°C / 遮光 / 6 時間

(2) 必要な器具・試薬

- (a) 精製水
- (b) マイクロピペット (25, 75, 80, 100μl)
- (c) メスシリンダー (25, 1000 ml)
- (d) 恒温槽 (37±1 °C)
- (e) マイクロプレートウォッシャー
- (f) マイクロプレートリーダー
- (g) 吸水紙
- (h) 廃液処理液／廃液処理容器

(3) 測定操作法

- (a) 洗浄原液 (R2) を精製水で 10 倍に希釈し、洗浄液とする。
- (b) 検体数に応じて、固相マイクロプレートを取り出し、各ウェルに検体希釈液 (R6) を 25μl ずつ分注する。そのあとに検体および各コントロールを下記の順序で 75 μl ずつ加えてよく混合する。検体を加えると、希釈液の色が紫から青に変化する。

ウェル No.	検体希釈液 (R6)	測定検体	検体量	総分注量
A1	25μl	陰性コントロール (R3)	75μl	100μl
B1, C1, D1	25μl	カットオフ値用コントロール (R4)	75μl	100μl
E1	25μl	陽性コントロール (R5)	75μl	100μl
F1, G1, ……	25μl	検体	75μl	100μl

- (c) 粘着フィルムでマイクロプレートをシールして、37±1 °C で 30±5 分間 反応させる。
- (d) 反応が終了する約 15 分前に、酵素標識抗原 (R7a) を標識抗原溶解液 (R7b) で溶解し、酵素標識抗原液を調製する。
- (e) マイクロプレートの粘着フィルムを取り除き、各ウェルの液を吸引除去し、洗浄液にて 3 回洗浄する。1 回の洗浄につき、20～30 秒の浸漬時間をおくようにする。吸水紙の上でマイクロプレートを逆さにしてたたき、ウェル内に残った洗浄液を除く。
- (f)* 各ウェルに調製済みの酵素標識抗原液を 100 μl ずつ加え、粘着フィルムでシールし、18～30 °C で 30±5 分間反応させる。
- (g) マイクロプレートの粘着フィルムを取り除き、各ウェルの液を吸引除去し、洗浄液にて 5 回洗浄する。1 回の洗浄につき、20～30 秒の浸漬時間をおくようにする。吸水紙の上でマイクロプレートを逆さにしてたたき、ウェル内に残った洗浄液を除く。
- (h)* 各ウェルに調製済みの基質発色液を 80 μl ずつ加え、18～30 °C、暗所に静置し、30±5 分間反応させる。
- (i)* 各ウェルに反応停止液 (R10) を 100 μl ずつ加えて反応を停止させる。
- (j) 反応停止後 30 分以内に、各ウェルの吸光度を主波長 450 nm / 副波長 620 nm にて測定する。

3) 測定結果の判定法

(1) カットオフ値による判定法

カットオフ値用コントロールの吸光度を 3 回測定し、その平均値を 10 で割った値をカットオフ値 (C.O.) とし、検体の吸光度を X とし、次のように判定する。

検体の吸光度 : X	判 定
$X < \text{C.O.}$	陰 性
$X \geq \text{C.O.}$	陽 性

(2) カットオフインデックス (C.O.I.) による判定法

検体の吸光度 (X) をカットオフ値 (C.O.) で割り、カットオフインデックス (C.O.I.) を求め次のように判定する。

	判 定
$\text{C.O.I.} < 1$	陰 性
$\text{C.O.I.} \geq 1$	陽 性

[判定に関する注意事項]

- (a) 検体の吸光度がカットオフ値よりもわずかに低い場合 (カットオフの 90%以上 100%未満) には、その検体を二重測定にて再検査する。また、このような場合、感染初期で抗体がまだ血中に出現していない可能性があるので、数週間後に再び検体を採取して再検査する。
- (b) 陽性と判定された場合には、その検体を二重測定にて再検査すること。その結果、2 回とも検体の吸光度がカットオフ値未満の場合には、陰性と判定する。また、どちらか一方の吸光度がカットオフ値以上であった場合には、その検体は最初の判定通り、陽性と判定する。

[測定系の確認]

陰性コントロールの吸光度を A、カットオフ値用コントロールの平均吸光度を B、陽性コントロールの吸光度を C とし、以下の条件を満たしていない場合には再測定する。

- (a) 陰性コントロールの吸光度 (A) がカットオフ値 ($\text{C.O.} = B \div 10$) の 70%未満
$$A < 0.7 \times \text{C.O.}$$
- (b) カットオフ値用コントロールの平均吸光度が 0.8 より大
$$B > 0.8$$
- (c) 陽性コントロールの吸光度 (C) をカットオフ値用コントロールの平均吸光度 (B) で割ったときの値が 1.3 以上
$$C \div B \geq 1.3$$

4) 操作上の留意事項

(1) 検体の採取法

採取した検体は 2~8℃で保存すること。また、採取後 24 時間以内に測定ができない場合は、凍結保存 (-20℃以下) すること。ただし、凍結・融解の繰返しは避けること。

HIV を不活化するためには 56℃、30 分間の処理が有効である。

検体を不活化しても測定結果に影響はない。

(2) 妨害物質、妨害薬剤

検体の微生物汚染、著しい溶血、また高脂肪、自己免疫疾患の検体は、測定値に影響を及

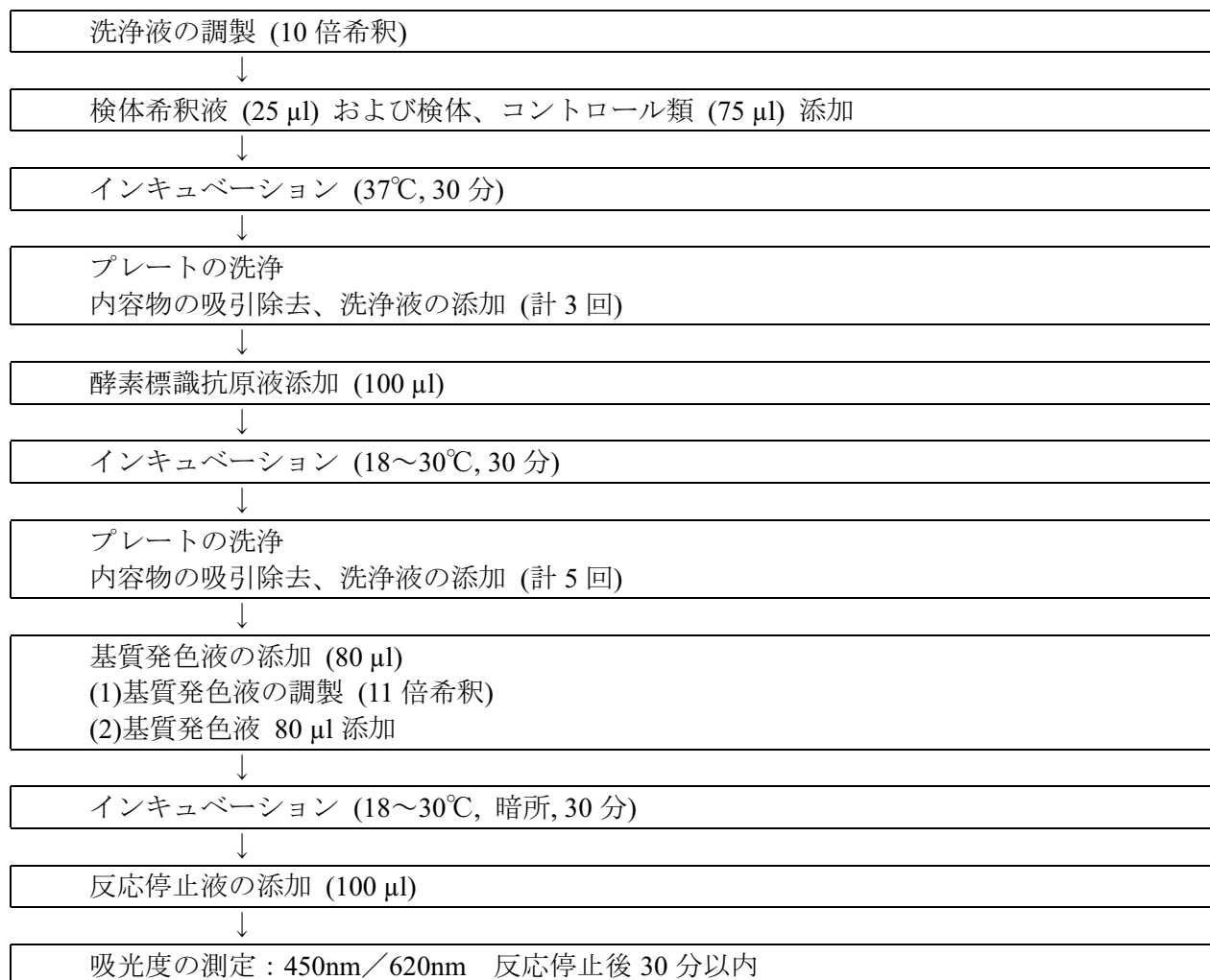
ばす場合がある。

(3) 洗浄操作

本キットの性能を確保するためには、十分な洗浄が必要である。本キットの製造元にて洗浄条件を検討したところ、特に陰性検体における偽陽性を防止するためには 1 回の洗浄につき浸漬時間の設定が必要であることが示された。その時間は 20～30 秒が適当であり、40 秒以上に設定するとかえって陰性検体の吸光度が若干高めになる傾向が認められた。

マイクロプレートを洗浄する際には、測定操作法に記載されたとおり、1 回の洗浄につき、20～30 秒の浸漬時間を設定する、つまりウェルに洗浄液を分注してから吸引するまで 20～30 秒間おくように設定する。

ジェンスクリーン HIV1/2：操作法一覧表



Ⅱ. HIV 抗原および抗体の同時検出

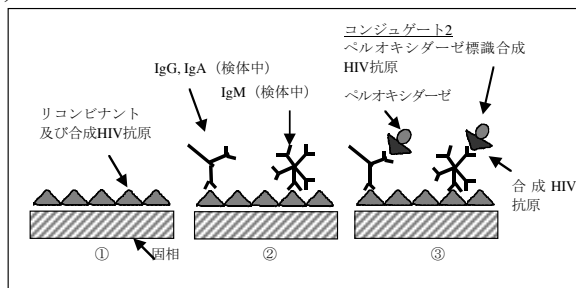
1. 酵素免疫測定法（ELISA）

[ジェンスクリーン[®] HIV Ag-Ab]

本法は、酵素免疫測定法（ELISA）法によるサンドイッチ法により血清又は血漿中の HIV-1/2 抗体および HIV p24 抗原を同時に検出するものであり、以下の抗原・抗体および測定原理により HIV 抗体と HIV 抗原を同時に検出する。

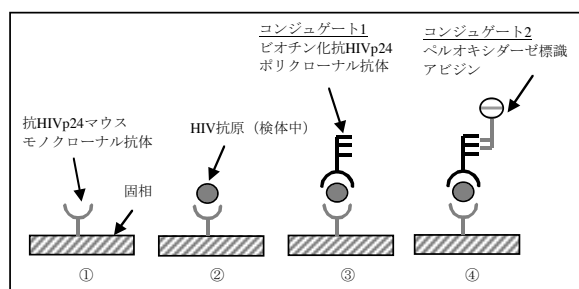
固相抗原・抗体	抗体検出：HIV-1gp160、HIV-1 グループ O gp41、HIV-2 gp36 抗原検出：抗 HIVp24 モノクローナル抗体
コンジュゲート 1	抗原検出：ビオチン化抗 HIVp24 ポリクローナル抗体
コンジュゲート 2	抗体検出：ペルオキシダーゼ標識 HIV 抗原（HIV-1gp41、HIV-1 グループ O、HIV-2gp36） 抗原検出：ペルオキシダーゼ標識アビジン

(1) 抗体測定系



固相抗原に検体中の抗 HIV 抗体が結合し、複合体を形成。さらに、酵素標識抗原（コンジュゲート 2）を加え、その複合体に結合させた後、テトラメチルベンジジンの発色を利用した吸光度測定により検出する。

(2) 抗原測定系



固相抗体およびビオチン化抗 HIVp24 抗体（コンジュゲート 1）に、検体中の HIV 抗原が結合し、複合体を形成。さらに、ペルオキシダーゼ標識アビジン（コンジュゲート 2）を加え、その複合体に結合させた後、テトラメチルベンジジンの発色を利用した吸光度測定により検出する。

1) キットの構成

ラベル	試 薬	性 状	規 格
R1	固相マイクロプレート	ポリスチレン製プレート	1 枚
R2	洗浄原液	濃縮液	100ml×1 本
R3	陰性コントロール	液状	1ml×1 本
R4	カットオフ値用コントロール	液状	2.5ml×1 本
R5	HIV抗原陽性コントロール	液状	1ml×1 本
R6	コンジュゲート 1	液状	10ml×1 本
R7a	コンジュゲート 2	凍結乾燥品	1 本 (12.5ml 用)
R7b	コンジュゲート 2 溶解液	液状	12.5ml×1 本
R8	基質緩衝液	液状	60ml×1 本
R9	発色剤	液状	5ml×1 本
R10	反応停止液	液状	28ml×1 本
粘着フィルム			4 枚

[注意 1] : キットに含まれている試薬は体外診断用にのみ使用。

[注意 2] : R3, R4 には、アジ化ナトリウム 0.1%が含まれている。

[注意 3] : R2 にはチメロサル 0.01%が含まれている。

2) 用法・用量

(1) 試薬の調製法

試 薬	調 製 法	有効期間
R1 固相マイクロプレート	検体数に応じて必要数を取り出し、 残りは袋に戻して密封保存。 前洗浄は不要。	開封後、2～8℃／ 4 週間
R2+精製水 洗浄液	洗浄原液 (R2) を精製水で 10 倍に 希釈。	調製後、2～8℃／ 2 週間
R7a+R7b コンジュゲート 2 溶液	コンジュゲート 2 (R7a) にコンジュ ゲート 2 溶解液 (R7b) 1 バイアルを 加えて 10 分間静置し、溶解。	調製後、2～8℃／ 4 週間
R8+R9 基質発色液	発色剤 (R9) を基質緩衝液 (R8) で 11 倍に希釈。	調製後 18～30℃、 暗所で 6 時間

(2) 必要な器具・試薬

- (a) 精製水
- (b) マイクロピペット (25～100 μ l)
- (c) メスシリンダー (25, 1000 ml)
- (d) 恒温槽 (37 \pm 1℃)
- (e) マイクロプレートウォッシャー
- (f) マイクロプレートリーダー
- (g) 吸水紙
- (h) 廃液処理液／廃液処理容器

(3) 測定操作法

- (a) 洗浄原液 (R2) を精製水で10倍に希釈し、洗浄液とする。
- (b) 検体数に応じて、固相マイクロプレートを取り出し、各ウェルにコンジュゲート1 (R6)

を25 μ lずつ分注する。そのあとに検体及び各コントロールを下記の順序で75 μ lずつ加えてよく混合する。

検体を加えると、コンジュゲート1の色が緑色から青色に変化する。

ウェルNo.	検体希釈液 (R6)	測定検体	検体量	総分注量
A1	25 μ l	陰性コントロール (R3)	75 μ l	100 μ l
B1, C1, D1	25 μ l	カットオフ値用コントロール (R4)	75 μ l	100 μ l
E1	25 μ l	HIV抗原陽性コントロール (R5)	75 μ l	100 μ l
F1, G1, ...	25 μ l	検体 1, 2,	75 μ l	100 μ l

- (c) 粘着フィルムでマイクロプレートをしールして、 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で 60 ± 5 分間静置して反応させる。
- (d) 反応が終了する約15分前までに、コンジュゲート2 (R7a) をコンジュゲート2溶解液 (R7b) で溶解し、コンジュゲート2溶液を調製する。
- (e) マイクロプレートの粘着フィルムを取り除き、各ウェルの液を吸引除去し、約0.370 mlの洗浄液にて3回洗浄する。1回の洗浄につき、30秒の浸漬時間をおくようにする。吸水紙の上でマイクロプレートを逆さにして叩き、ウェル内に残った洗浄液を除く。
- (f) 各ウェルに調製済みのコンジュゲート2溶液を100 μ lずつ加え、粘着フィルムでしールし、 $18 \sim 30^{\circ}\text{C}$ で 30 ± 5 分間反応させる。
- (g) マイクロプレートの粘着フィルムを取り除き、各ウェルの液を吸引除去し、約0.370 mlの洗浄液にて5回洗浄する。1回の洗浄につき、30秒の浸漬時間をおくようにする。吸水紙の上でマイクロプレートを逆さにして叩き、ウェル内に残った洗浄液を除く。
- (h) 各ウェルに調製済みの基質発色液を80 μ lずつ加え、 $18 \sim 30^{\circ}\text{C}$ ・暗所に静置し、 30 ± 5 分間反応させる。
- (i) 各ウェルに反応停止液 (R10) を100 μ lずつ加えて反応を停止させる。
- (j) 反応停止後30分以内に、各ウェルの吸光度を主波長 450nm／副波長 620nmにて測定する。

3) 測定結果の判定法

(1) カットオフ値による判定法

1回の測定につき3個のウェルを使用してカットオフ値用コントロールの吸光度を測定し、その吸光度の平均値を5で割った値をカットオフ値 (C.O.) として次のように判定する。

基 準	判 定
$X < \text{C.O.} (\text{C.O.I.} < 1)$	陰 性
$X \geq \text{C.O.} (\text{C.O.I.} \geq 1)$	陽 性

X：検体の吸光度

C.O.I.：カットオフインデックス ($X \div \text{C.O.}$)

検体の吸光度がカットオフ値未満 (C.O.I.が1未満) の場合は原則として陰性と判定するが、 $\text{C.O.} \times 0.9 \leq X < \text{C.O.}$ (もしくは、 $0.9 \leq \text{C.O.I.} < 1$) に該当する場合は判定保留とし、下記の注意にしたがって、再測定する。

[判定に関する注意事項]

- (a) 本品で陽性又は判定保留の場合には、再測定する。その結果、陽性と判定された場合には、

確認のために他の検査（HIVp24 抗原検査、ウェスタンブロット法、遺伝子検査等）を実施し、また臨床症状を加味して総合的に判断する。再測定にて判定保留となった場合は、感染初期で検出に十分な量の抗原や抗体が血中に出現していない可能性があるので、数週間後に再び検体を採取して検査を行う。

- (b) HIV感染初期では、抗体が産生されなかったり、産生されていても抗体の量が少ない場合がある。また、抗原の発現量・発現時期にも個人差がある。感染が疑われる場合には、本品の判定結果が陰性であっても、経時的に検査し、また他の検査結果、臨床症状等を加味して総合的に判断する。

4) 操作上の留意事項

(1) 検体の取扱い

- (a) 本品による測定は、血清又は血漿を使用する。
- (b) 加熱により非働化した検体は使用しない。
- (c) 採取した検体は2～8℃で保存し、7日以内に使用する。それ以降は-20℃で凍結保存する。凍結・融解を3回以上繰り返さないようにする。
- (d) フィブリン等の凝集塊が著しい検体は、遠心して除去してから使用する。

(2) 妨害物質など

検体の微生物汚染、著しい溶血、高脂肪の血清及び血漿は、測定値に影響がみられる場合がある。

B) 確認法

1. ウエスタンブロット法

[ラブ ブロット 1 (LAV BLOT 1)]

本法は、血清中の HIV-1 抗体の確認用キットである。電気泳動により分画した HIV-1 のウイルス構成蛋白を転写したニトロセルロース膜を使用している。まず、膜上の各構成蛋白 (抗原) と検体中に存在する抗 HIV-1 抗体が反応し、抗原-抗体複合体を形成する。次に酵素標識抗体 (抗ヒト IgG 抗体) を加えて反応させた後、発色剤を加えて発色させることにより検体中の抗体を検出する。

1) 操作法

(1) 試薬の調製

試薬		調 製 法	調製後の安定期間
R1	HIV-1 ウイルス蛋白含有ニトロセルロース膜片	検体数に応じて必要数のニトロセルロース膜を取り出し、残りはパラフィルム等でシールして密封保存する。	2～8℃／ラベルの使用期限まで有効
R2	洗浄液 (原液)	精製水で 5 倍希釈して使用する。1 トレイ (6 枚) につき R2 (30ml) + 精製水 (120ml)	密封保存 2～8℃／1 カ月
R3	陰性コントロール血清	測定法に従って、そのまま使用する。	2～8℃／ラベルの使用期限まで有効
R4	陽性コントロール血清		
R5	酵素標識抗体		
R6	発色剤		

(2) 使用器具、試薬

- (a) 精製水
- (b) マイクロピペット (20ml)
- (c) ピペット (2ml)
- (d) メスシリンダー (100、250、500ml)
- (e) 振とう器
- (f) 使い捨て手袋
- (g) 吸引ポンプ (アスピレーター)
- (h) 次亜塩素酸ナトリウム液
- (i) ピンセット (プラスチック製)
- (j) 吸水紙

(3) 操作手順

- (a) 測定順に検体を並べる。
- (b) 洗浄液 (R2) を精製水で 5 倍に希釈調製する。
- (c) 検体数に応じて必要な枚数のニトロセルロース膜 (R1) をピンセット (プラスチック製) にて取り出す。余分なものはそのままパラフィルム等でシールし、保存可能である。また、添付トレイの代わりに市販トレイを用いることも可能である。
- (d) 調製済の洗浄液 2ml を各トレイに添加し、5 分間、振とう器でニトロセルロース膜を親和する。
- (e) ニトロセルロース膜上での反応 (検体とウイルス蛋白の反応)

- (i) 検体、陽性コントロール血清 (R4)、陰性コントロール血清 (R3) 各 20 μ l をトレイに添加する。
- (ii) 18～22℃、2 時間、振とう器を用いてインキュベーションさせる (4℃による一昼夜反応も可能)。
- (f) ニトロセルロース膜の洗浄
 - (i) トレイの内容物を吸引除去する。
 - (ii) 調製済の洗浄液 2ml を、再度各トレイに添加する。
 - (iii) 18～22℃、5 分間、振とう器で洗浄する。
 - (iv) 内容物を吸引除去し、再度、調製済の洗浄液 2ml を添加する。同様の洗浄操作を合計 3 回実施する。

注意：吸引はアスピレーターを用いること。
トレイの蓋の開閉は内容物が飛散しないように注意すること。振とう器はニトロセルロース膜がゆっくりトレイ内で動くように調整する。

- (g) 酵素標識抗体の反応
 - (i) 酵素標識抗体 (R5) 2ml を、トレイに添加する。
 - (ii) 18～22℃、1 時間、振とう器を用いてインキュベーションさせる。
- (h) ニトロセルロース膜の洗浄
 - (f)と同様の洗浄操作を実施する。
- (i) 発色剤との反応
 - 発色剤 (R6) 2ml を、トレイに添加する。
 - バンドが出現するまで、(18～22℃、約 5 分間) 反応させる。
 - [過染色を防ぐために、バンドの出現を注意深く観察すること。]

注意：3～4 分経過後は、目視で注意深く観察すること。

- (j) 呈色反応の停止
 - 内容物を吸引除去し、精製水 2ml で約 30 秒間洗浄する。同様の洗浄操作を合計 3 回実施する。
- (k) ニトロセルロース膜の乾燥
 - 吸水紙に挟んで水分をとり、自然乾燥させる。
- (l) ニトロセルロース膜を番号順に整理し、コントロールバンドが強く発色していることを確認した後、陽性コントロール血清のバンドと比較し、判定する。

[注意]

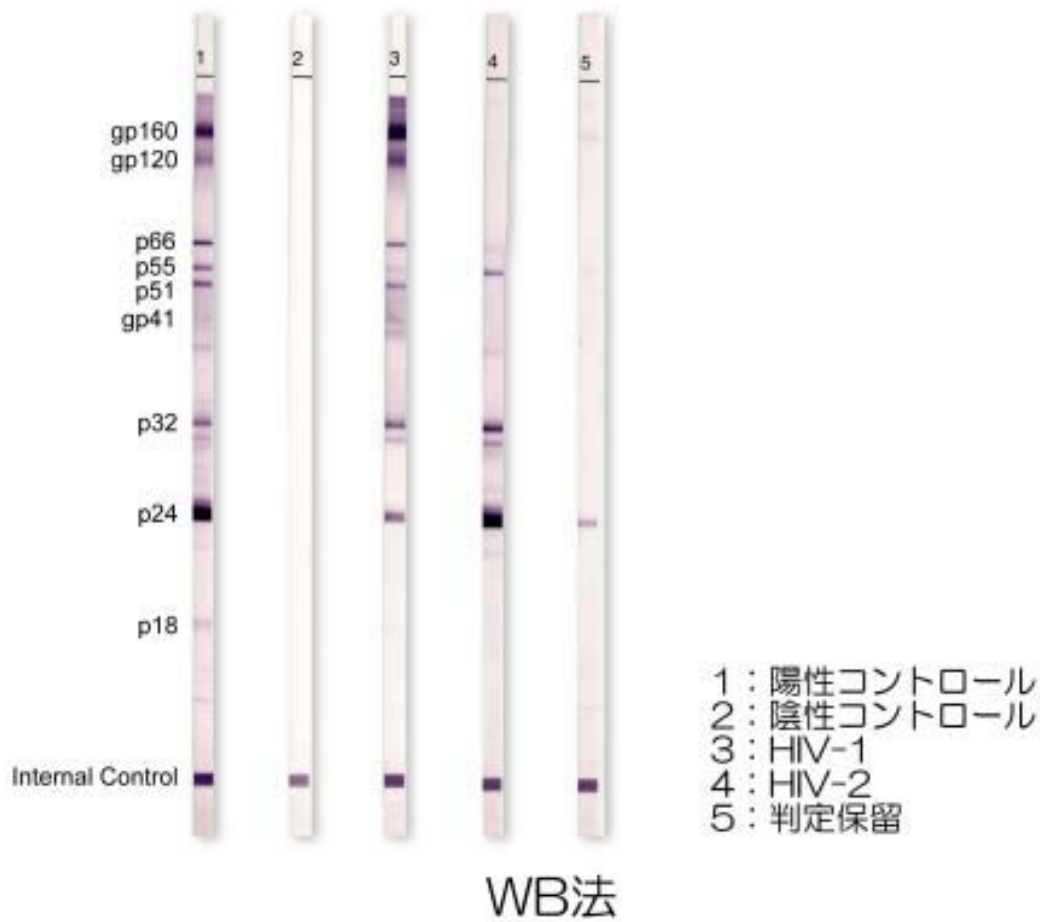
- (i) 陽性コントロール血清は発色バンドの確認のため、必ず毎回使用すること。
- (ii) 検体の保存
 - ・検体の採取は通常の方法で行うこと。
 - ・溶血検体の使用は避けること。
- (iii) 24 時間以内に検査を実施する場合は、2～8℃保存が可能。それ以外の場合は－20℃で保存のこと。ただし、凍結融解の繰り返しは避けること。融解した場合も必要に応じて遠心処理などにより脱フィブリン処理をすること。

2) 測定結果の判定法

HIV-1 抗体が存在した場合はニトロセルロース膜にバンド (青紫色) が出現する。このバンド

の位置は各構成蛋白の分子量により分かれています。ウイルスの各構成蛋白は次表のとおりである。

名称	遺伝子	性質	WB 法バンドの特徴
gp160	<i>env</i>	糖蛋白質 gp 110/120, gp 41 の前駆体	明瞭なバンド
gp110/120	<i>env</i>	膜構成糖蛋白質	幅広いバンド
p68	<i>pol</i>	逆転写酵素	狭い明瞭なバンド
p55	<i>gag</i>	Core (核) 蛋白質の前駆体	ペアーバンド (上)
p52	<i>pol</i>	逆転写酵素	ペアーバンド (下)
gp 41	<i>env</i>	膜貫通糖蛋白質	幅広いバンド
p40	<i>gag</i>	Core (核) 蛋白質の前駆体	明瞭なバンド
p34	<i>pol</i>	エンドヌクレアーゼ	明瞭なバンド
p24/25	<i>gag</i>	Core (核) 蛋白質	明瞭な幅広いバンド
p18	<i>gag</i>	Core (核) 蛋白質	不鮮明なバンド



- [注意]
- (i) バンドを確認する場合は、陽性コントロール血清のバンドや、添付写真を参考にすること。
 - (ii) HIV-1 以外の他のレトロウイルスにより非特異的に所定のバンド以外の位置にバンドが見られることがある。
 - (iii) コントロールバンドが強く発色していることを、常に確認するようにすること。コントロ

ールバンドが発色していない、もしくは発色が薄い場合は、検体あるいは試薬の分注が適切に行われなかった可能性がある。

結果の判定：

〔重要〕陽性コントロール血清の出現バンドとよく比較しながら次の表に従って解釈すること。

判定基準	プロファイル
陽 性	2 本以上の ENV バンド
判定保留	陰性、陽性と判定されない
陰 性	HIV 特異バンドが出現しない

：本法の判定基準は WHO 判定基準に従うものである。

〔注意〕

- (i) 判定保留、陽性の場合に陽性コントロール血清によるコンタミネーションの可能性も考慮する必要がある。
- (ii) HIV-2 感染、Seroconversion 開始前および他のレトロウイルスにより判定保留になることがある。判定保留の場合は少し期間 (2 週間、4 ヶ月、6 ヶ月) をあけて再検査および他の確認検査もあわせて実施し、さらに臨床経過を加味して総合的に判断する。また HIV-2 関連検査も実施するようにする。
- (iii) 本法で陰性の場合でも完全に HIV 感染を否定することはできない。感染初期 (感染後 6～8 週間後) では抗体の出現が見られない場合があるため、他法との併用、または 3 ヶ月後に他法と併用検査を実施すること。

〔以下の点を厳守すること〕

本法で HIV-1 陽性と判断された場合でも、HIV-2 による交差反応を否定することは不可能である。最終的に (1) HIV-1 単独感染、(2) HIV-2 単独感染 (HIV-2 との交差反応)、(3) HIV-1 + HIV-2 重感染の鑑別が必要な場合は、他の方法による試験が必要である。
他の方法：ペプチド法、PCR 法、ウイルスの培養等。

参考：ウエスタンブロット法、およびペプチド法の判定結果の組み合わせとその解釈

スクリーニング検査 (ELISA、PA 等) で HIV-1、HIV-2 のいずれか、もしくは両方が陽性的場合、その確認試験、および鑑別試験を実施する必要がある。

次表は、確認試験として、ウエスタンブロット法、鑑別試験として、ペプチド法を用いて試験した判定結果の組み合わせ、およびその結果の解釈である。

ウエスタンブロット法		ペプチド法		結果の解釈
HIV-1	HIV-2	ペプチド1	ペプチド2	
陰 性	陰 性	—	—	スクリーニング検査の偽陽性
陽性 ～ 保留	保留 ～ 陰性	++	—	HIV-1 陽性 *1 : HIV-1 との交差反応
			*1 ±	
			*1 +	
		+	—	
			*1 ±	
		—	—	HIV 陰性 HIV-1 の Seroconversion の可能性があり、要再検査
保留 ～ 陰性	陽性 ～ 保留	—	++	HIV-2 陽性 *2 : HIV-2 との交差反応
		*2 ±		
		*2 +		
		—	+	
		*2 ±		
		—	—	HIV 陰性 HIV-2 の Seroconversion の可能性があり、要再検査
陽性 ～ 保留	陽性 ～ 保留	++	++	HIV-1 + HIV-2 重感染
		+	+	
		++	—	HIV-1 陽性 *3 : HIV-1 との交差反応
			*3 ±	
			*3 +	
		+	—	
			*3 ±	
		±	—	HIV-1 陽性の疑い
		—	++	HIV-2 陽性 *4 : HIV-2 との交差反応
		*4 ±		
		*4 +		
		—	+	
		*4 ±		
		—	±	HIV-2 陽性の疑い

ラブプロット 1：操作法一覧表

洗浄液の調製	
↓	その他の条件
ニトロセルロース膜の前処理 (1) 調製済の洗浄液 2ml 添加 (2) 5 分間振とう	* 振とう器 / 18～22℃
↓	
検体 (20μl) 添加 (2 時間：振とう)	* 振とう器 / 18～22℃
4℃、1 昼夜反応も可能	
↓	
ニトロセルロース膜の洗浄 (1) 内容物の吸引除去 (2) 調製済の洗浄液 2ml 添加 (3) 5 分間振とう洗浄 (計 3 回)	* 吸引ポンプ * 振とう器 / 18～22℃
↓	
酵素標識抗体 (2ml) の添加 (1 時間：振とう)	* 振とう器 / 18～22℃
↓	
ニトロセルロース膜の洗浄 (1) 内容物の吸引除去 (2) 調製済の洗浄液 2ml 添加 (3) 5 分間振とう洗浄 (計 3 回)	* 吸引ポンプ * 振とう器 / 18～22℃
↓	
発色液の添加 (2ml：18～22℃で約 5 分間) バンドが発色するまで	* 振とう器 / 18～22℃
↓	
呈色反応の停止 (1) 内容物の吸引除去 (2) 精製水 2ml 添加 (3) 30 秒間振とう洗浄 (計 3 回)	* 吸引ポンプ * 振とう器 / 18～22℃
↓	
ニトロセルロース膜を乾燥させ、判定	

2. イムノブロット法

[ペプチラブ 1, 2]

本法は酵素抗体法を原理とし、HIV-1、HIV-2 を代表する 2 種類の合成ペプチドを用いたイムノブロット法である。

	1		2		C	

(スティック上の固定物)

- 1 : HIV-1 特異的合成ペプチド : gp41
 2 : HIV-2 特異的合成ペプチド : gp36
 3 : コントロールバンド : ヒト IgG

ペプチラブ 1, 2 で使用するスティックは、プラスチック片にニトロセルロース膜をコートし、その膜の上に合成ペプチド抗原を固定したものである。

1) キットの構成

No.	試薬	性状	規格	備考
R1	合成ペプチド固定スティック	スティック	10 枚	合成ペプチド(gp36, gp41) およびヒト IgG 固定スティック
R2	洗浄液	液状	100ml×1 本	トリス緩衝液
R3	検体希釈液	液状	40ml×2 本	トリス緩衝液
R4	酵素標識抗体液	液状	2ml×1 本	ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体 (ヤギ)
R5	発色剤	錠剤	4 錠	ジアミノベンジジン 10.0mg / 錠含有
R6	基質液	液状	2ml×1 本	0.6 過酸化水素水含有

付属品	褐色空バイアル	1 本	発色液調製用
	青栓チューブ	10 本	検体および酵素標識抗体反応用
	オレンジ栓チューブ	10 本	発色反応用
	無色栓	10 個	酵素標識抗体添加後使用
	保存用紙	10 枚	試験結果保存用

2) 操作法

(1) 使用器具、試薬

- (a) 精製水
- (b) 振とう器 (または自動洗浄装置 LS12)
- (c) マイクロピペット (30, 150μl)
- (d) ピペット (5, 10ml)
- (e) メスシリンダー (100ml)
- (f) 使い捨て手袋
- (g) 吸引ポンプ (ジェット式)
- (h) ピンセット

(2) 測定手順

(a) 測定計画

測定順に検体を並べる。

(b) 試薬の調製

洗浄液 (R2) を精製水で 10 倍希釈し、調製済みの洗浄液とする。

(c) 検体のインキュベーション

(i) 青栓チューブに検体希釈液 (R3) 3ml を入れる。

(ii) 検体 30 μ l を加えてよく混和する。

(iii) スティック (R1) をチューブに入れ、青栓をしっかり締める。

(iv) 振とう器に乗せて、18～22℃、1 時間振とうさせながら反応させる。

(d) 洗浄

(i) チューブの中のスティックを指で固定し、チューブ内の液を吸引ポンプで除去する。

(ii) 洗浄液をチューブに満たす。

(iii) 栓を締め、転倒混和後、1～2 分間振とうさせる。

(iv) チューブ内の洗浄液を吸引除去する。

(v) 同じ操作を更に 2 回行い、計 3 回行う。

(e) 酵素標識抗体との反応

(i) 同じチューブに検体希釈液 3ml を入れる。

(ii) 酵素標識抗体液 (R4) 150 μ l を入れる。

(iii) 無色の栓を締めて、よく混和させる。

(iv) 振とう器に乗せて、18～22℃、30 分間振とうさせながら反応させる。

(f) 洗浄

(d)と同様の洗浄を行う。

(g) 酵素の発色

オレンジ栓チューブを用いて反応させる。

< 試薬の調製 >

・発色剤調製用バイアルに発色剤 (R5) 1 錠を入れ、洗浄液 30ml で溶解し発色液とする。

・発色液 3ml をオレンジ栓チューブに入れる。

・基質液 (R6) 150 μ l をオレンジ栓チューブに入れる。

・溶液が均一になるように混和する。

(i) 無色栓チューブ内のスティックを取り出し、オレンジ栓チューブに入れる。

(ii) チューブを振とうさせながら約 3 分間反応させる。

(h) 反応の停止

(i) コントロールの発色を確認した後、スティックを取り出し、精製水に浸け反応を停止する。

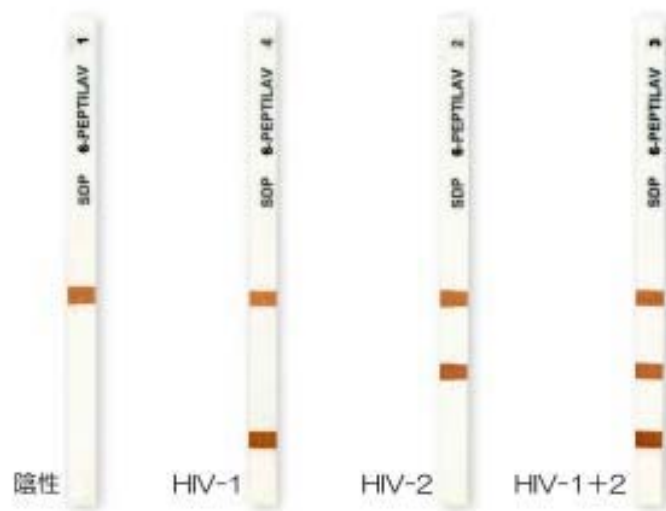
(ii) 精製水から取り出し、風乾させる。

3) 結果の判定、解釈

(1) 実験条件のチェック：コントロールバンドの発色の確認

(a) コントロールバンドの発色の有無を確認する。

(b) コントロールバンドが発色していない場合は、実験条件を再検討して再検査する。



イムノプロット法

(2) 発色バンドの判定：(++, +, ±, -) の判定

	発色強度	判定
コントロールバンドの発色	++	基準
コントロールバンドと同等またはそれ以上の発色の場合	++	強陽性
明瞭なバンドでコントロールバンド以下の発色の場合	+	陽性
明瞭性に欠けたり、発色の幅が狭い場合	±	疑陽性
発色が認められない場合	-	陰性

(3) 結果の解釈：発色強度による判定

(ウエスタンブロット法にて HIV 抗体陽性と判定された検体に関して)

プロファイル	発色強度		判定
	ペプチド 1	ペプチド 2	
発色が認められない	-	-	鑑別不可能 [注]
発色が認められる	++	-	HIV-1 陽性
	++	*1+	HIV-1 陽性
	++	*1±	HIV-1 陽性
	+	-	HIV-1 陽性
	+	*1±	HIV-1 陽性
	±	-	HIV-1 陽性の疑い
	-	++	HIV-2 陽性
	*2+	++	HIV-2 陽性
	*2±	++	HIV-2 陽性
	-	+	HIV-2 陽性
	*2±	+	HIV-2 陽性
	-	±	HIV-2 陽性の疑い
	++	++	HIV-1 と HIV-2 の交差反応 [注]
	+	+	HIV-1 と HIV-2 の交差反応 [注]

*1 : HIV-1 との交差反応

***2 : HIV-2 との交差反応**

〔注〕 交差反応の可能性と他の未知のレトロウイルスによる可能性も存在する。単独感染、または重感染の最終鑑別には、ウイルスの培養、PCR 法による鑑別が必要である。

3. 参考文献

- 1) 吉原なみ子. HIV 感染の検査法. 総合臨床, 42 (3), 594-599, 1993.
- 2) 吉原なみ子. HIV 感染の検査. 総合臨床, 46 (3), 465-469, 1997.
- 3) 岡慎一. HIV-1 感染症. 日本内科学会雑誌, 86 (11), 2103-2107, 1993.
- 4) 北村敬編. HIV 検査. HIV 感染症の診療—医療関係者の手引き, 36-46, 1993.
- 5) 速水正憲、他. HIV-1/2PA コンビネーションタイプによる HIV-1 抗体の検出. 医学と薬学, 31, 943-951, 1994.
- 6) 吉原なみ子. “血清診断” 図説 HIV 感染症. メジカルビュー社, 88-98, 1993.
- 7) 吉原なみ子. HIV 抗体検査法と RNA 定量法. 臨床と微生物, 25(3), 295-299, 1998.

C) その他

I. HIV 抗原の検出 (p24 Ag)

1. 酵素免疫法 (ELISA または EIA)

ELISA による HIV 抗原検査は HIV を検出する方法としては PCR 法に比べて感度が低い。したがって、HIV 感染のスクリーニングには適さないが、特異性が高いため、診断や病態把握の補助検査法として用いられる。しかしながら近年ではウイルス量が直接測定でき病態と良く相関することから、本法が病態把握の補助検査法として用いられることは少ない。主に、研究室等で試験管内で増やした HIV の確認や定量目的で使われている。

HIV 抗原検査には次の 2 つの市販キットがよく用いられる。ダイナボット社の HIV 抗原・EIAII 「アボット」と富士レビオ社の「ルミパルス HIVp24」であり、いずれも HIV の p24 抗原を検出する。前者は ELISA 法で特殊なトレイ洗浄器が、後者は化学発光酵素免疫測定法で専用の機械 (全自動) がそれぞれ必要である。

1. 検査法

HIV 抗原・EIAII 「アボット」 (キット添付のマニュアルより抜粋)

- 1) 検体希釈液剤 20 μ l を反応トレイ (以下トレイ) の各穴に入れる。
- 2) 検体 (血漿または血清) またはコントロール (3 本の陰性コントロール、2 本の陽性コントロール 200 μ l ずつを、マイクロピペットでトレイの各穴に入れる。
- 3) HIV 抗体ビーズ 1 個をトレイの各穴に入れる。
- 4) トレイをシールでおおい、軽くたたいて気泡を除去する。
- 5) 第 1 インキュベーションを行う。
A 法: コマンダーダイナミックインキュベータ (ROTATE モード) で 40 \pm 2 $^{\circ}$ C、1 時間 \pm 5 分
B 法: 水浴で 40 \pm 2 $^{\circ}$ C、3 時間 \pm 5 分
- 6) シールを取り除き、反応液を吸引除去し、総量 12 \sim 18ml の蒸留水または脱イオン水でビーズを洗浄する。
- 7) 余分な液体を吸引除去する。
- 8) HIV 抗体 200 μ l をトレイの各穴に入れる。
- 9) トレイをシールでおおい、軽くたたいて気泡を除去する。
- 10) 第 2 インキュベーションを行う。
A 法: コマンダーダイナミックインキュベータ (STATIC モード) で 40 \pm 2 $^{\circ}$ C、1 時間 \pm 5 分
B 法: 水浴で 40 \pm 2 $^{\circ}$ C、1 時間 \pm 5 分
- 11) シールを取り除き、反応液を吸引除去し、総量 12 \sim 18ml の蒸留水または脱イオン水でビーズを洗浄する。
- 12) 余分な液体を吸引除去する。
- 13) 抗 IgG 抗体—ペルオキシダーゼ 200 μ l をトレイの各穴に入れる。
- 14) トレイをシールでおおい、軽くたたいて気泡を除去する。
- 15) 第 3 インキュベーションを行う。
A 法: コマンダーダイナミックインキュベータ (STATIC モード) で 40 \pm 2 $^{\circ}$ C、1 時間 \pm 5 分
B 法: 水浴で 40 \pm 2 $^{\circ}$ C、1 時間 \pm 5 分
- 16) シールを取り除き、反応液を吸引除去し、総量 12 \sim 18ml の蒸留水または脱イオン水でビーズを洗浄する。
- 17) 余分な液体を吸引除去する。
- 18) ビーズを酵素反応用試験管に移す。
- 19) 調製した基質液 300 μ l をビーズの入った試験管に入れ、さらに 2 本の空の試験管 (基質ブランクとする) に入れる。

- ・連続分注器で基質液を分注する前に、2～3 回プライムして初液を捨てる。
- 20) 試験管にカバーをしてしゃ光し、15～30℃で 30±2 分間、第 4 インキュベーションを行う。
- 21) 1 N 硫酸 1ml をすべての試験管に加えて酵素反応を停止させる。
- 22) 基質ブランクを用いて、波長 492nm でゼロ調整する。
- 23) 波長 492nm で検体およびコントロールの吸光度を測定する。

ルミパルス HIVp24（一部エイズ研究センター独自）

- 1) 電源を入れる。（1 箇所のみで良い）。
リンス液を新鮮なミリ Q に入れ替える。
「ウォームアップを行いますか？」→Yes
「新しい日付で分析を行いますか？」→Yes
 - 2) 試薬の補充
システムステータス画面にして、赤い項目があれば補充する。→【終了】
(終了はすべて F1 キー)
 - 3) ワークシートの作成
【ルーチン】→【検体受付】→【一般検体受付】→【登録】(F2)
この場面で、検体番号がアクティブになっているので 001 のまま確定。
以後、HIV-Ag まで順次確定していく。
その後【一括登録】を押し、測定したい数を入力後確定→【終了】→【終了】

【スタンダード検体受付】→必要に応じて【追加】(F2) →【印刷】(F7) →
範囲を選択→Yes
プリントアウトされた内容を確認→【終了】
(コンピュータにちゃんとサンプルがセットされてるかどうかチェック)
(測定したいだけのサンプル数がちゃんと登録されてるかどうか、etc)
 - 4) サンプルセット
黄色の 10 本ラック：1 番に NC、2 番に PC（標準液 250μl+検体希釈液 50μl）
白の 10 本ラック：1 番から順にサンプルをセット（サンプル 100μl+検体希釈液 200μl）
ラックフィーダレーン 1 に黄色ラックを 2 以降に白ラックをセット。
 - 5) スタート
「分析をスタートしますか？」→Yes
終了すると結果が勝手にプリントアウトされます。
 - 6) 終了操作
【エンド処理】→「エンド処理を行いますか？」→Yes→パラメータ保存→No→
自動電源 ON→No→終了後の自動電源 OFF→Yes
エンド動作開始→Yes
- #### 2. 留意点
- 1) 「アボット」では、抗凝固剤 EDTA は 200mg/ml まで、ヘパリンは 50mg/ml まで、測定系に影響しないと記載されている。
 - 2) 「アボット」の第 1 インキュベーションは、室温オーバーナイトでも充分反応することを確認している。
 - 3) いずれの系でも HIV-2 や SIV、SHIV のコア抗原と交差反応する。
 - 4) 「アボット」の基質液や硫酸を含む溶液を次亜塩素酸で処理すると有毒ガスを発生するので十分留意すること。

3. 参考文献

- 1) Goudsmit J., et al. Expression of human immunodeficiency virus antigen(HIV-Ag) in serum and cerebrospinal fluid during acute and chronic infection. *Lancet*, 2 (8500), 177-180, 1986.
- 2) Gaines H., et al. HIV antigenaemia and virus isolation from plasma during primary HIV infection. *Lancet*, 1 (8545), 1317-1318, 1987.
- 3) Allain JP., et al. Long-term evaluation of HIV antigen and antibodies to p24 and gp41 in patients with hemophilia. Potential clinical importance. *N Engl J Med*, 317 (18), 1114-1121, 1987.
- 4) 酒井敦子、他. 全自動化学発光酵素免疫システムによる HIV コア抗原検出系の評価. *感染症学雑誌*, 73 (3), 205-212, 1999.

(4) 病原体の検出方法

I. ウイルスの分離培養（共培養法）

ウイルス分離培養により、感染性ウイルスの存在およびその生物学的力価（半定量）を知ることができる。

HIV の存在を生物学的に直接確認する方法で、さらに感染性ウイルスを段階希釈法で半定量することにより感染者血中ウイルスの活動性を示す指標として意義がある。市販キットなどにより測定された血漿中ウイルス量が遺伝子工学的ウイルス量を表しているのに対して、血中（細胞および血漿）の感染性ウイルス力価を表している。分離されたウイルスは、さらにウイルス遺伝子生物学的検索が行われるべく凍結保存される。

生物活性を表している点では、遺伝子工学的ウイルス量より優れているが、手技の煩雑さ、時間とお金がかかる点、低感度などのデメリットがある。特に、感度が低いというデメリットから、病態進行の指標あるいは治療効果の指標としての座を遺伝子工学的ウイルス量に譲っている。

1. 材料

1) Growth medium

- ・ 2mM L-グルタミン加 RPMI 1640
- ・ 15%非働化 FCS
- ・ 40units/ml リコンビナント IL-2（塩野義、大阪）
- ・ 50units/ml 抗インターフェロン α 抗体
- ・ 抗生物質：ペニシリン 50U/ml、ストレプトマイシン 50 μ g/ml

2) Stimulation medium

- ・ 2mM L-グルタミン加 RPMI 1640
- ・ 10%非働化 FCS
- ・ PHA：0.01%（PHA-P#3110-56, Difco, Detroit, Michigan）
- ・ 抗生物質：ペニシリン 50U/ml、ストレプトマイシン 50 μ g/ml

3) その他

- ・ Ficoll-Conray（#23010, Immuno-Biol. Lab, 藤岡、群馬）
- ・ PBS(-), RPMI 1640
- ・ 24 穴組織培養プレート
- ・ p24ELISA kit（Dinabot, 港区、東京）
- ・ クエン酸、EDTA または他の凝固剤
- ・ 細胞凍結液：50%FCS, 40%RPMI 1640, 10%DMSO（特級）。よく混和し、0.22 μ m のフィルターを通す。用時調節が望ましい。

2. 方法

1) バフィコートからの PBMC の分離（PHA-blast の作製）

ここで作製する PHA-blast は、ウイルス分離を行うにあたり、患者末梢血との Co-culture に用いる。

健常者由来バフィコートから PBMC を分離し、PHA にて 24 時間刺激する。その後、細胞を回収し、1,200rpm で 5 分間、2 回遠心洗浄する。2 \times 10⁷細胞/1ml 細胞凍結液に小分けし、-135℃で使用時まで凍結保存する。

- (1) バフィコート（赤十字血液センターより供与）を 50ml チューブに移し、PBS にて 2 倍希釈する。

- (2) ピペットでよく攪拌し、50ml 遠心管中の Ficoll-Conray (リンホセパール) 15ml に対し、希釈血液を 30ml を静かに重層する。
- (3) 400g にて、室温 20 分間遠心する。
- (4) リンパ球層を別のチューブにとり PBS で 3~4 倍に薄める。
- (5) 400g にて、室温 10 分間遠心洗浄する。
- (6) さらに 2 回、PBS で遠心洗浄操作をする。
- (7) トリパンブルー染色で生細胞数をカウントし、 $2 \times 10^6/\text{ml}$ になるよう Stimulation medium を加え、 37°C CO_2 インキュベーターで 24 時間培養する。
- (8) 細胞を回収し、細胞凍結液で $2 \times 10^7/\text{ml}$ チューブになるように細胞を凍結し、 -80°C で一晩保存、翌日 -135°C に移す。

2) 患者末梢血からのウイルス分離 (全検体について)

血液検体として抗凝固剤クエン酸ナトリウム ($20\text{U}/\text{ml}$ 以内の濃度) または EDTA を用い、少なくとも 10ml 採血してもらう。血液は室温保存し、24 時間以内にできれば 4 時間ぐらいのうちに処理するのが望ましい。

- (1) 凍結保存している PHA-blast を血液検体数分溶解する。
 37°C ですみやかに溶かし、PBS を用い、400g 室温 5 分間の遠心洗浄操作を 2 回行う。
 得られた細胞ペレットに Growth medium を 10ml 加え、24 穴プレートに $2 \times 10^6/\text{ml}/\text{well}$ で 9 穴分注する。
- (2) 血液検体を 2,000rpm、10 分間遠心し、血漿を分離し、以下のようにアシストチューブに分注して保管する。

1ml \times 2 本

100~200 μl \times 2 本：サイトカインアッセイ用

500 μl \times 1 本：シーケンスあるいは RNA 定量用

30 μl \times 1 本：Western blotting 用

- (3) (2)の残りを PBS にて 2~3 倍希釈し、ピペットでよく攪拌した後、Ficoll-Conray に静かに重層する。
- (4) 400g にて、室温 30 分間遠心する。
- (5) リンパ球層を別のチューブにとり PBS で 3~4 倍に薄める。
- (6) 400g にて、室温 10 分間遠心洗浄する。
- (7) さらに 2 回、PBS で遠心洗浄操作をする。
- (8) トリパンブルー染色で生細胞数をカウントし、 $2 \times 10^6/\text{ml}$ に調整する。
- (9) (1)で準備したプレートの上段 4 穴に(8)で調整した PBMC を 2×10^2 , 2×10^3 , 2×10^4 , 2×10^5 ずつ加える。1 穴はコントロール用とする。
- (10)下段の 4 穴に血漿を 2 μl , 10 μl , 40 μl , 200 μl ずつ加える。
- (11)血漿については 37°C 、5% CO_2 インキュベーターにて 1 時間培養し、上澄 0.5ml を除き、新しい Growth medium を 0.5ml 補給する。
- (12)残りの PBMC は、以下のように保存する。

2×10^6 cells \times 1 (ペレット)：シーケンス解析用 (アシストチューブ)

残り \times 2 (凍結保存液)：保存用 (赤キャップ)

- (13) 37°C 、5% CO_2 インキュベーターにて培養開始。

(14)培養 7 日目に、新たな PHA-blast (2×10^6 /ml Growth medium) を 1ml ずつ全てのウェルに追加する。

(15)培養 2 週間目に上清の一部を回収し、p24 ELISA kit により p24 の存在を検査する。p24 が検出された場合、ウイルス分離されたと判定し上清と細胞を凍結保存する。(細胞は凍結保存液中に保存) p24 が検出されない場合、培養は 4 週間継続し、3、4 週間目に p24 を同様に測定する。

3) 判定 (ウイルス半定量)

2×10^2 、 2×10^3 、 2×10^4 、 2×10^5 全て p24 陽性	→ 2,000 感染性ウイルス/ 10^6 PBMC
2×10^3 、 2×10^4 、 2×10^5 の 3 ポイントで p24 陽性	→ 200 感染性ウイルス/ 10^6 PBMC
2×10^4 、 2×10^5 の 2 ポイントで p24 陽性	→ 20 感染性ウイルス/ 10^6 PBMC
2×10^5 のみ p24 陽性	→ 2 感染性ウイルス/ 10^6 PBMC
いずれも p24 陰性	→ 0 感染性ウイルス/ 10^6 PBMC
2 μ l、10 μ l、40 μ l、200 μ l 全て p24 陽性	→ 500 感染性ウイルス/ml Plasma
10 μ l、40 μ l、200 μ l の 3 ポイントで p24 陽性	→ 100 感染性ウイルス/ml Plasma
40 μ l、200 μ l の 2 ポイントで p24 陽性	→ 25 感染性ウイルス/ml Plasma
200 μ l のみ p24 陽性	→ 5 感染性ウイルス/ml Plasma
いずれも p24 陰性	→ 0 感染性ウイルス/ml Plasma

3. 留意点

- 1) 細胞由来インターフェロンの抗ウイルス作用を防ぐため抗インターフェロン α を添加しているが、文献上不要という報告もある。我々は、ウイルス分離を始めた初期に既に添加しており、その後の実験の一貫性を保つため同剤を継続添加している。
- 2) 抗凝固剤ヘパリンはウイルス分離に阻害的に働くため、ウイルス分離目的には適さない。一方、EDTA 加血漿は共培養によりフィブリン塊様の物質を生成し、ウイルス分離に適さない。この現象は特に 200 μ l の培養ウェル中で顕著である。対策として、同ウェルについては 30 分程の初期培養後、1.5ml チューブを用いて反応細胞のみを遠心分離し、再度培養液にサスペンションする、という方法を近年ではとっている。
- 3) 前項のフィブリン塊様物質は p24 測定の際に偽陽性反応を起こしやすい。目視による細胞カウントはばらつきが出やすい。自動血算器の使用が望ましい。培養 7 日目以降に feeder として添加する PHA-blast は同一検体では全て同じロットのものが望ましい。

4. 参考文献

- 1) Hollinger F.B., et al. Standardization of sensitive human immunodeficiency virus coculture procedures and establishment of a multicenter quality assurance program for the AIDS Clinical Trials Group. The NIH / NIAID / DAIDS / ACTG Virology Laboratories. J Clin Microbiol. 30 (7), 1787-1794, 1992.
- 2) Nakasone, T., et al. Decline in the HIV-1 isolation rate in Japan: A 12 year observation. Microbiol. Immunol. 44 (11), 949-952, 2000.

II. 遺伝子検査

1. PCR によるプロウイルス DNA の検出法

本章では、最も主要な流行株である HIV-1 検出法を主体として述べる。

1) 検査材料

被検者の末梢静脈血（EDTA あるいは ACD 加全血が推奨される。ヘパリンは PCR を阻害するので避ける）から抽出されたリンパ球 DNA を用いる。

2) 必要な試薬・器具類

(1) DNA 抽出キット

全血から DNA を抽出するキットが各メーカーから発売されている。QIAamp Blood Mini Kit (QIAGEN 51104) などが用いられる。

(2) Taq ポリメラーゼ

Ex Taq (宝酒造 RR001A) など。他の耐熱性ポリメラーゼでも構わない。なお Ex Taq など 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性（校正機能）をもつ耐熱 DNA ポリメラーゼは、一般に従来の Taq DNA ポリメラーゼと比べて、高い増幅効率、低いエラー率が得られる。

(3) プライマー

PCR 診断に用いるプライマーは、カートリッジ精製グレード程度のもので十分である。日常 HIV-1 検出に用いているプライマー・セットを図 1 に示す。プライマーは多くの HIV-1 サブタイプ、CRF の検出に対応するように設計されているが、HIV-1 では株間の変異が大きく、プライマーがマッチしない場合にもしばしば遭遇する。したがって、どのプライマーも絶対的なものではない。とくに問題になるのは HIV ゲノムの中でも殊に多様性の高い *env* 領域の増幅であるが、この領域の増幅に良く用いられる他のプライマー・セットを参考のため図 1 の下に掲げる。

(4) 水平型電気泳動装置

Mupid (コスモバイオ) 等のミニゲル電気泳動装置で充分。

(5) 電気泳動用バッファー

TBE、TAE バッファーのいずれでも可。5x (TBE) または 50x (TAE) のストックを作製し、使用時に 再留水を用いて 1x に希釈して使用する。

5x TBE (1 リットル当たり)		50x TAE (1 リットル当たり)	
Tris base	54 g	Tris base	242 g
ホウ酸	27.5 g	酢酸	57.1 ml
0.5M EDTA (pH 8.0)	20 ml	0.5M EDTA (pH 8.0)	100 ml

(6) 2%アガロースゲル

DNA にエチジウムブロマイドがインターカレーションという機構で結合して、DNA 断片の泳動度に影響を与えることから、原理的には泳動後にゲルを染色する方法が推奨されるが、検査という目的では、その影響は無視できる程度のため、あらかじめゲルに 0.5 µg/ml のエチジウムブロマイドを加えて構わない。その方がより簡便でしかも、電気泳動後染色するよりバックグラウンドが低く、バンドをより鮮明に検出できることを経験している。

なお、エチジウムブロマイドは発がん作用があるので、ディスポーザブルの手袋をし

て取り扱う。また廃棄の際は活性炭に吸着させて捨てる。

(7) 6x ローディングバッファー

			最終濃度
100% グリセロール	12	ml	30 %
0.5M EDTA (pH8.0)	0.4	ml	5 mM
10% SDS	2	ml	0.5 %
Bromophenol blue (BPB)	100	mg	0.25 %
Xylene cyanol FF (XC)	100	mg	0.25 %
再留水	25.6	ml	
総量			40 ml

(8) サイズマーカー

100-1,000 bp の範囲に使用できるもの。(φ X174RF DNA/HaeIII 断片等)

3) 血液からの DNA 抽出

各抽出キットに付属のプロトコールに沿って行う。ここでは、QIAamp Blood Mini Kit (QIAGEN) を用いたマイクロ・スケールの簡易抽出法を記す。

このキットは 200 µl の全血から高純度の DNA を抽出できるが、血漿保存やウイルス分離等を同時に行う場合には、 10^7 細胞 (全血約 7-10ml 相当) の白血球画分 (バフィーコート) または末梢血単核細胞 (PBMC) を PBS (-) に懸濁したものを出発材料にすることも可能である (PBMC 調製の方法については前章を参照)。PCR の鋳型として用いる量は、1 反応当たり $1-2 \times 10^5$ 細胞相当分 (全血として約 0.1ml、細胞 DNA として約 1mg に相当する) が目安となる。

- (1) 200 µl の全血を 1.5 ml のチューブにとる。
- (2) 25 µl の QIAGEN Protease 溶液と 200 µl の AL バッファーを加え、15 秒間ボルテックスする。
- (3) 70 °C で 10 分間インキュベートする。
- (4) 210 µl のイソプロパノール (またはエタノール) を加えボルテックスする。
- (5) QIAamp スピнкаラムをコレクションチューブにセットし (4) の混合液をアプライする。
- (6) 遠心 6,000 g (一般的なマイクロチューブ遠心機で 8,000 rpm) 1 分間。
- (7) カラムを新しいコレクションチューブにセットし 500 µl の AW バッファーを加える。
- (8) 遠心 6,000 g 1 分間。
- (9) (7) と (8) の操作をくり返す。
- (10) カラムに残ったエタノールを完全に除くため、さらに 10,000 g (一般的なマイクロチューブ遠心機で 12,000 rpm) 2 分間遠心する。
- (11) カラムを回収用の 1.5 ml のチューブにセットし、あらかじめ 70 °C に温めておいた AE バッファーを 50 µl 加える。
- (12) 遠心 6,000 g 1 分間。溶出した DNA 溶液を PCR に用いる。

4) Nested PCR 法による遺伝子検出

HIV は株間での塩基配列の多様性が高いので、株間で相同性の高い領域を選んでプライマーを作製する必要がある。ここでは、HIV-1 の遺伝子型判別の目的にも合わせ、*gag* 遺伝子の *p17* 領域 [*gag* (*p17*)] とエンベロープ (*env*) 遺伝子の *C2/V3* 領域 [*env* (*C2/V3*)] の 2 領域を用いている (図 1)。

コンタミネーションを防ぐため、すべての試薬調製の操作は専用の無菌ボックスなど清浄な環境で行う。ピペット装置も専用のものを用意し、チップはエアロゾル防止用のフィルターつきのものを用いる。再留水も分子生物学グレードのものを購入した方が望ましい。Nested PCR が正しく行われたかどうかを確認するために、検体に加えて陽性対照および陰性対照を必ず置く。

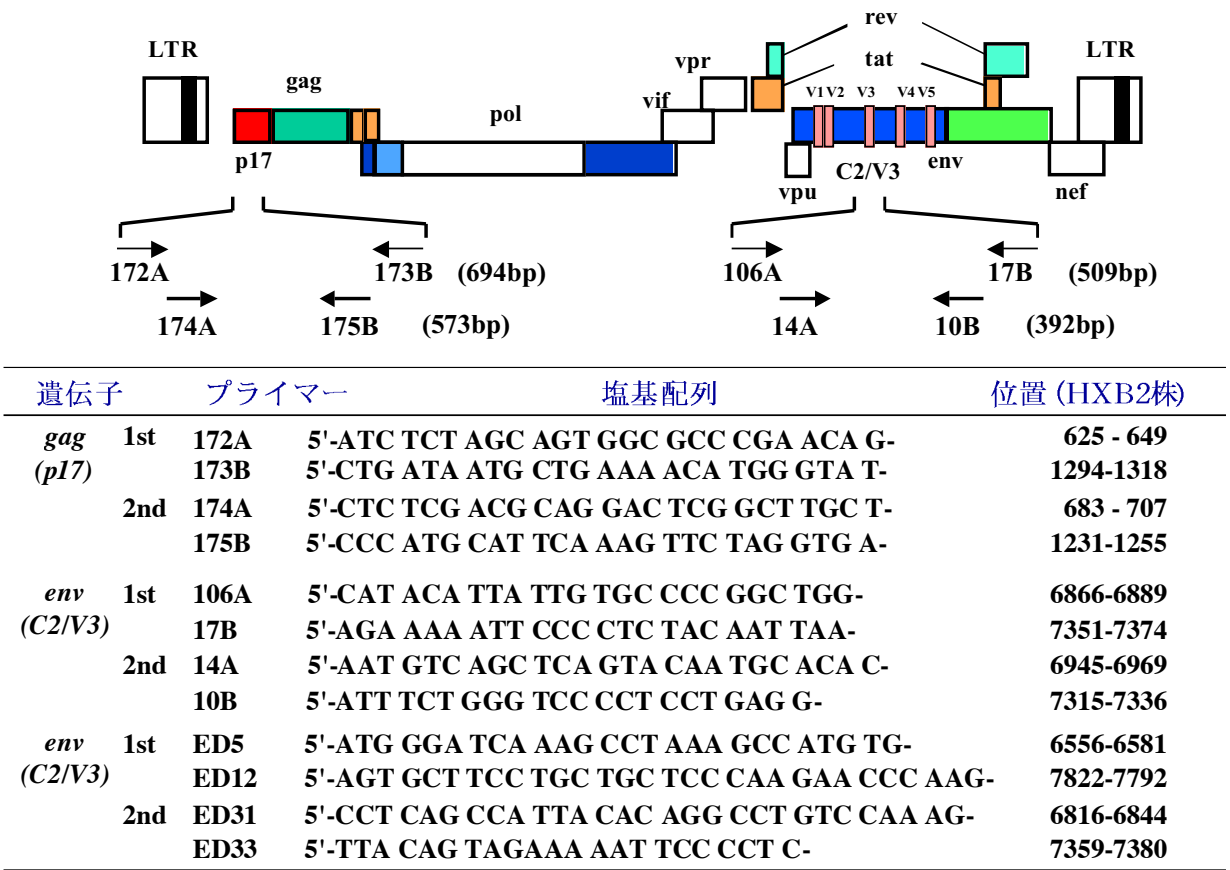


図1. HIV-1 検出のためのプライマー設計

他の病原体とは異なり、著しい多様性を示す HIV では、万全のプライマーは存在しないといってもよいので、問題がある時は複数のプライマーセットで検討すべきである。

(1) 1st PCR

(a) 反応液の調製

使用する DNA ポリメラーゼに添付のプロトコールにしたがって調製する。ここでは EX Taq を用いる場合の反応液の調製法を記す。

再留水	33.5 μ l
10x EX Taq バッファー	5 μ l
2.5 mM dNTP	4 μ l
20 μ M 1st PCR 用センスプライマー	1 μ l
20 μ M 1st PCR 用アンチセンスプライマー	1 μ l
EX Taq	0.5 μ l

ミネラルオイルを重層する。

試薬調製とは別のキャビネットにて、抽出した DNA 溶液 5 μ l を加える。

(b) 反応条件

至適反応条件は用いる DNA ポリメラーゼやサーマルサイクラーによって異なるため、あらかじめ検討した方がよい。ここでは、我々が普段用いている条件を記す。

94 °C 1 min ↙
55 °C 1 min | 30 cycle
72 °C 3 min ↘
72 °C 7 min
4 °C Hold

(2) 2nd PCR

(a) 反応液の調製

再留水	33.5 μ l
10x EX Taq バッファー	5 μ l
2.5 mM dNTP	4 μ l
20 μ M 2nd PCR 用センスプライマー	1 μ l
20 μ M 2nd PCR 用アンチセンスプライマー	1 μ l
EX Taq	0.5 μ l

ミネラルオイルを重層する。

試薬調製とは別のキャビネットにて、1st PCR 産物 5 μ l を加える。

(b) 反応条件

94 °C 1 min ↙
55 °C 1 min | 30 cycle
72 °C 3 min ↘
72 °C 7 min
4 °C Hold

(3) PCR 産物の検出

(a) アガロースゲル電気泳動

PCR 産物 5 μ l と 6x ローディング・バッファー 1 μ l とをパラフィルム上で混合した後、2%アガロースゲルで電気泳動を行う。この際、 ϕ X174 フェージの HaeIII 制限酵素による切断産物をサイズマーカーとして同時に泳動する。泳動時間は、ミューピッドミニゲル電気泳動装置を用いる場合 100 V で 30 分程度。

(b) バンドの検出

トランスイルミネータ上でバンドを確認する（図2）。

5) 判定

- (1) HIV-1 陽性であれば、*gag* (p17), *env* (C2/V3) 領域のPCRで、それぞれ573 bp および392 bp 近辺に（HIVゲノムの著しい多様性のため増幅遺伝子サイズにも多型がある）遺伝子増幅が見られるはずである（図2）。
- (2) またプライマーの不一致や両領域のPCR増幅の感度の差によって、一方しかバンドが見られないこともあるが、偽陽性の可能性が否定できている場合には、陽性と判定してかまわないと考えられる。
- (3) 慎重を期する場合には、さらに別のプライマーセットをテストしてみることや、他領域のPCR結果、別の機会に採取された新たな検体で検討する必要がある。またPCR産物を直接塩基配列を決定することは確証を得るための、もう一つの方法である（次項参照）。
- (4) 被検者のViral load（血漿中のHIV-1量／HIV-1 RNAコピー数）にもよるが、感染者血清あるいは血漿からRNAを抽出して、RT-PCRとNested PCRを組み合わせる遺伝子増幅する方法の方が、PBMCから抽出したプロウイルスDNAを鋳型としてNested PCRを行うより、高感度でまたバックグラウンドが低く遺伝子増幅できる場合が多いことを経験している。ただし、既にHAART療法を受けている患者に関しては、血液中のViral loadが検出限界以下に低下していて、RT-PCRによっては遺伝子増幅できないことが多い。その場合はPBMCからのプロウイルスDNAの検出を行う。

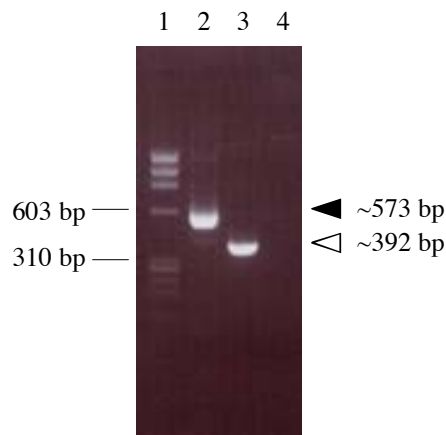


図2. Nested PCRによるHIV-1プロウイルスの検出

2%アガロース電気泳動. 1, ϕ X174/HaeIII断片;
2, *gag*(p17) (◼); 3, *env*(C2/V3)領域のPCR産物 (◻);
4, 陰性対照. 予想されるPCR産物のサイズはpNL432を
鋳型とした場合.

6) 参考文献

- (1) Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press. NY. 1990. [日本語訳「PCR実験マニュアル」H B J 出版局. 東京. 1991].
- (2) 武部 豊, 三谷幸之助, 石川晃一, 前川みどり, 井上栄, 山崎修道. PCR 法を用いた HIV 診断. 遺伝子増幅 PCR 法—基礎と新しい展開— (藤永恵編集). 蛋白質 核酸 酵素臨時増刊 35 (17), 3061-3072. 共立出版. 東京. 1990.
- (3) 武部 豊, 前川みどり. PCR法を用いた HIV 遺伝子解析. PCRとその応用—基礎研究から臨床まで (榊佳之・村松正実・高久史麿編集) 実験医学増刊 8 (9): 174-181 . 羊土社. 東京. 1990.
- (4) 玉造 滋, 林 邦彦, 草川 茂, 武部 豊. ヒト免疫不全ウイルスゲノムの検出と解析に関する最新技術. PCR法最前線 基礎技術から応用まで (関谷剛男, 藤永恵編集). 蛋白質 核酸 酵素 増刊号 41 (5): 686-695 (280-289). 共立出版. 東京. 1996.

2. HIV-1 RNA 定量法

1) 背景

HIV-1 感染者血液中の HIV-1 RNA コピー数の測定は治療薬剤効果の観察、病態把握、病態の進行の予測に有用であることが臨床試験により示唆されており、米国 International AIDS Society が発表した HIV 感染症治療勧告においても HIV RNA 定量が CD4 陽性細胞数および臨床症状と並んで重要とされている。測定方法には AMPLICOR™、NASBA、Brunched DNA 等の方法があるが、現在日本で認可されているものは AMPLICOR™のみである。

2) 検査の概要

AMPLICOR™ は Polymerase chain reaction (PCR) 法による核酸増幅と核酸ハイブリダイゼーション法を応用した HIV-1 RNA 測定キットである。測定プロトコールには感度の異なる 2 つの方法がある。1 つは「標準法」であり、末梢血 1ml 当たり 400-75,000 コピー迄を測定する事ができる。もう 1 つは「高感度法」で、50-10,000 コピー迄の測定が可能である。各々のプロトコールについて以下に記す。

3) 検査プロトコール

<標準法>

(1) 試液の調製

- (a) HIV-1 モニター溶解液に HIV-1 モニター-QS v1.5 を 100μl 添加し、混和する。
- (b) HIV-1 モニターミックス v1.5 に HIV-1 モニターマンガン試液 v1.5 を 100μl 添加し、混和する。

(2) RNA 抽出

- (a) γ 滅菌済み 2.0ml アシストチューブ (1-12 の番号と遠心時外側にする印をつけたもの) に調製済み試液(a)を 600μl ずつ分注する。
- (b) 番号 1 から 9 のチューブには検体 200μl を添加する。番号 10-12 のチューブ (コントロール用) には正常人血漿を 200μl を添加し、混和してから各コントロール 50μl を添加する。
- (c) 試験管ミキサー等を用いて 3-5 秒間混和し、15℃から 25℃で 10 分間インキュベーションする。
- (d) 各チューブに 800μl のイソプロパノールを添加し、良く混和する。
- (e) 印を付けた側を外側にして微量高速遠心機にセットし、12,500-16,000g で 15 分間遠心し、RNA を沈澱させる。
- (f) 先細のスポイト等を用いて、沈澱物を吸引しない様に上清を除去する。
- (g) 70%エタノールを 1ml 添加して 3-5 秒間混和の後、(e)と同様に 5 分間遠心し、RNA を沈澱させる。
- (h) (f)と同じ様に上清を除去する。
- (i) HIV-1 モニター検体希釈液 400μl を添加、10 秒間ボルテックスし、RT-PCR の試料とする。

(3) 逆転写反応による標的 RNA からの DNA の合成

- (a) サーマルサイクラー用 12 連チューブに調製済み試液(b)を 50μl ずつ分注し、抽出した RNA を 50μl ずつ添加する。

- (b) ジーンアンプ PCR システム 9600-R または 2400-R (PE Biosystems 社製) にセットし、以下のプログラムで反応させる。

Hold	50°C	2 min
Hold	60°C	30 min
1~8 Cycle	{	95°C 10sec
		52°C 10 sec
		72°C 10 sec
9~31 Cycle	{	90°C 10 sec
		55°C 10 sec
		72°C 10 sec
Hold		72°C (15min 以内)

- (c) PCR 終了後 15 分以内に変性液を 100μl を添加し、5 回以上ピペッティングによって混和する。

<高感度法>

(1) 試液の調製

- (a) HIV-1 モニター溶解液に HIV-1 モニター-QS v1.5 を 25μl 添加し、混和する。
(b) HIV-1 モニターミックス v1.5 に HIV-1 モニターマンガン試液 v1.5 を 100μl 添加し、混和する。

(2) RNA 抽出

- (a) γ滅菌済み 2.0ml アシストチューブに 1-12 の番号と遠心時外側にする印をつけ、番号 1 から 9 のチューブには 検体 500μl を、番号 10-12 のチューブには正常人血漿を 500 μl を添加する。
(b) 印を付けた側を外側にして微量高速遠心機にセットし、2°C-8°C、23,600g で 60 分間遠心する。
(c) 先細のスポイト等を用いて、沈澱物を吸引しない様に上清を除去する。
(d) 12 本に調製済み試液(a)を 600μl ずつ添加する。
(e) 番号 10-12 のチューブは混和してから各コントロール 12.5μl を添加する。
(f) 試験管ミキサー等を用いて 3-5 秒間混和し、15°C-25°Cで 10 分間インキュベーションする。
(g) 各チューブに 600μl のイソプロパノールを添加し、良く混和する。
(h) 印を付けた側を外側にして、微量高速遠心機にセットし、12,500-16,000g で 15 分間遠心し、RNA を沈澱させる。
(i) (c)と同じ様に上清を除去する。
(j) 70%エタノールを 1ml 添加して 3-5 秒間混和の後、(h)と同様に 5 分間遠心し、RNA を沈澱させる。
(k) (c)と同じ様に上清を除去する
(l) HIV-1 モニター検体希釈液 100μl を添加、10 秒間ボルテックスし、RT-PCR の試料とする。

(3) 逆転写反応による標的 RNA からの DNA の合成

- (a) サーマルサイクラー用 12 連チューブに調製済み試液(b)を 50μl ずつ分注し、抽出した RNA を 50μl ずつ添加する。
(b) ジーンアンプ PCR システム 9600-R または 2400-R (PE Biosystems 社製) にセットし、

以下のプログラムで反応させる。

Hold	60°C 30min
1~8 Cycle	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="font-size: 3em; margin-right: 10px;">{</div> <div> 95°C 10 sec 52°C 10 sec 72°C 10 sec </div> </div>
9~31 Cycle	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="font-size: 3em; margin-right: 10px;">{</div> <div> 90°C 10 sec 55°C 10 sec 72°C 10 sec </div> </div>
Hold	72°C (15 min 以内)

(c) PCR 終了後 15 分以内に変性液を 100 μ l を添加し、5 回以上ピペッティングによって混和する。

4) 検出

- (1) 全てのウェルにハイブリダイゼーション緩衝液 100 μ l を分注する。
- (2) ウェル A に RT-PCR 後、変性液を 100 μ l を添加した増幅 DNA25 μ l を添加し、ピペッティングによって混和する。
- (3) ウェル A から 25 μ l を取り、ウェル B に添加してピペッティングによって混和する。
- (4) 同様の操作を B から C へ、C から D へとウェル F まで行う。
- (5) ウェル F から 25 μ l を取除く。
- (6) ウェル G に RT-PCR 後、変性液 100 μ l を添加した増幅 DNA25 μ l を添加し、ピペッティングによって混和する。
- (7) ウェル G から 25 μ l を取り、ウェル H に添加してピペッティングによって混和する。
- (8) ウェル H から 25 μ l を取除く。

DNA マイクロウェル固相プレート

A- F: HIV RNA 用ウェル

G-H: QS RNA 用ウェル

ウェル	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	希釈倍率
A		25 μ l PCR 産物											X1
B		25 μ l											X5
C		25 μ l											X25
D		25 μ l											X125
E		25 μ l											X625
F		25 μ l 廃棄											X3125
G		25 μ l PCR 産物											X1
H		25 μ l											X5

- (9) 37°C で 60 分間インキュベーションする。
- (10) 洗浄液 400-450 μ l で 30 秒間、4 回洗浄する。
- (11) アビジン-HRP コンジュゲート 100 μ l を全てのウェルに分注する。
- (12) 37°C で 15 分間インキュベーションする。
- (13) (10)と同様に洗浄する。
- (14) 基質液 A12ml と基質液 B3ml を混和し、100 μ l ずつ全てのウェルに分注する。
- (15) 遮光した状態で 10 分間、室温でインキュベーションする。
- (16) 停止液 100 μ l を全てのウェルに分注する。
- (17) 停止液100 μ lを添加して10分以内に、450nm吸光度を測定する。

5) ウイルスコピー数の算出および結果判定

(1) HIV RNA (ウェル A-F) の各希釈系列から吸光度 0.2-2.0 の範囲で最低吸光度を、QS RNA (ウェル G-H) の各希釈系列から吸光度 0.3-2.0 の範囲で最低吸光度を選択する。

(2) 選択した吸光度から 0.07 を差し引いた値 (最適吸光度) とキット添付の各ロット毎の QS RNA の表示濃度 (N) を下記計算式に当てはめ RNA 量を算定する。

(標準法の場合)

$$\text{HIV RNA 量 (コピー/ml)} = N \times \frac{\text{HIV RNA の最適吸光度} \times \text{希釈倍率}}{\text{QS RNA の最適吸光度} \times \text{希釈倍率}} \times 40$$

(高感度法の場合)

$$\text{HIV RNA 量 (コピー/ml)} = N \times \frac{\text{HIV RNA の最適吸光度} \times \text{希釈倍率}}{\text{QS RNA の最適吸光度} \times \text{希釈倍率}} \times 4$$

<HIV RNA 量算出例>

ウェル	希釈倍率	OD ₄₅₀
A	1	4.198
B	5	4.16
C	25	3.841
D	125	2.33
E	625	0.586
F	3125	0.141
G	1	3.106
H	5	0.944

*標準法によってこのようなデータが得られた場合、HIV-1 RNA の OD₄₅₀ 値は 0.586 を、希釈倍率は 625 を選択する。QS RNA の OD₄₅₀ 値は 0.944 を、希釈倍率は 5 を選択する

*添付の各ロット毎の QS RNA の表示濃度 (N) が 81 であったとして計算する

$$\text{HIV RNA の最適吸光度} = (0.586 - 0.07) \times 625 = 322.5$$

$$\text{QS RNA の最適吸光度} = (0.944 - 0.07) \times 5 = 4.37$$

$$\text{HIV RNA 量 (コピー/ml)} = 81 \times \frac{322.5}{4.37} \times 40 = 239,108 \text{ コピー/ml}$$

3. HIVの遺伝子型（サブタイプ）判別

我が国で見いだされる HIV 株のほとんどは HIV-1 グループ M であるので、主にその遺伝子型の判定について述べる。HIV-1 グループ M に属する流行株は、サブタイプ A-D, F-H, J, K の 9 サブタイプと、これらサブタイプ間の遺伝子組換えによって生まれた組換え型流行株（Circulating recombinant forms, CRFs）に分類される。CRF には現在のところ 14 種知られている（図 3）。この他にサブタイプ A/C 間や A/D 間などの組換えウイルスのように少数個体にしか見いだされない孤立型組換えウイルス（Unique recombinant form, URF）が知られている。

(A) サブタイプ分類

(B) 組換え型流行株 (CRF) 分類

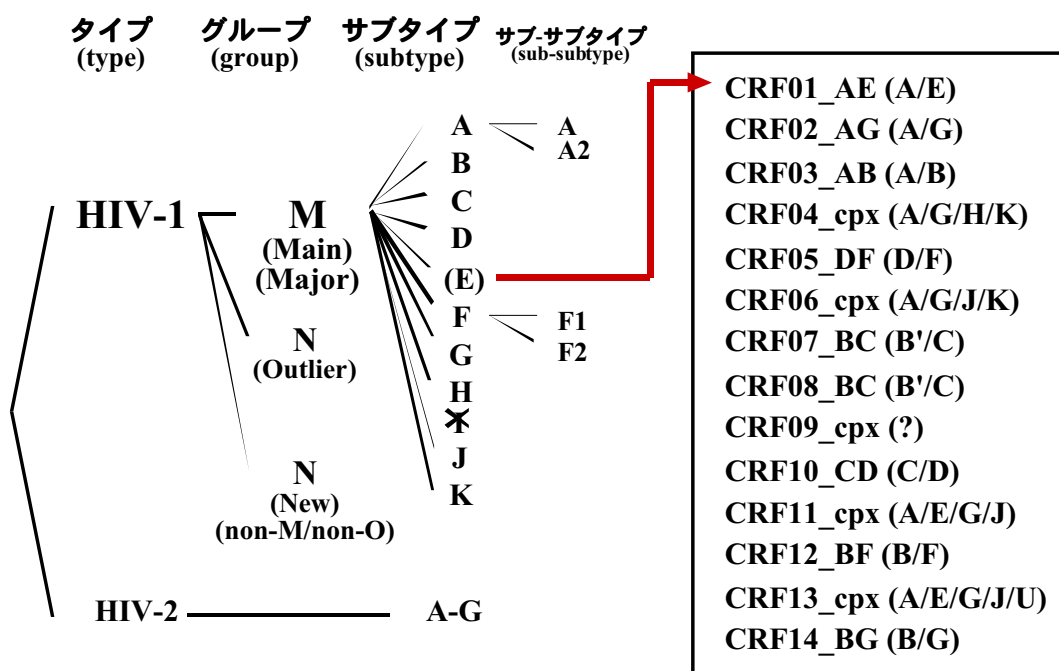


図3. HIVのサブタイプ／組み換え型流行株（CRF）の分類・命名法

旧分類のサブタイプ I は削除。サブタイプ E はサブタイプ A と E の間の組み換えウイルスであることから、正式には今後 CRF01_AE と呼ばれる。

HIV-1 の遺伝子型判別は、塩基配列決定による方法と、検体と各標準株の PCR 産物を変性後、再びアニールした時に生成するヘテロデュプレックスの泳動パターンで遺伝子型判別を行う HMA (Heteroduplex mobility assay) 法（多数検体サブタイプ決定のスクリーニングに用いられる）による場合があるが、ここでは、直接塩基配列決定法による遺伝子型判別法について述べる。手順の概略を図 4 のフローチャートに示す。

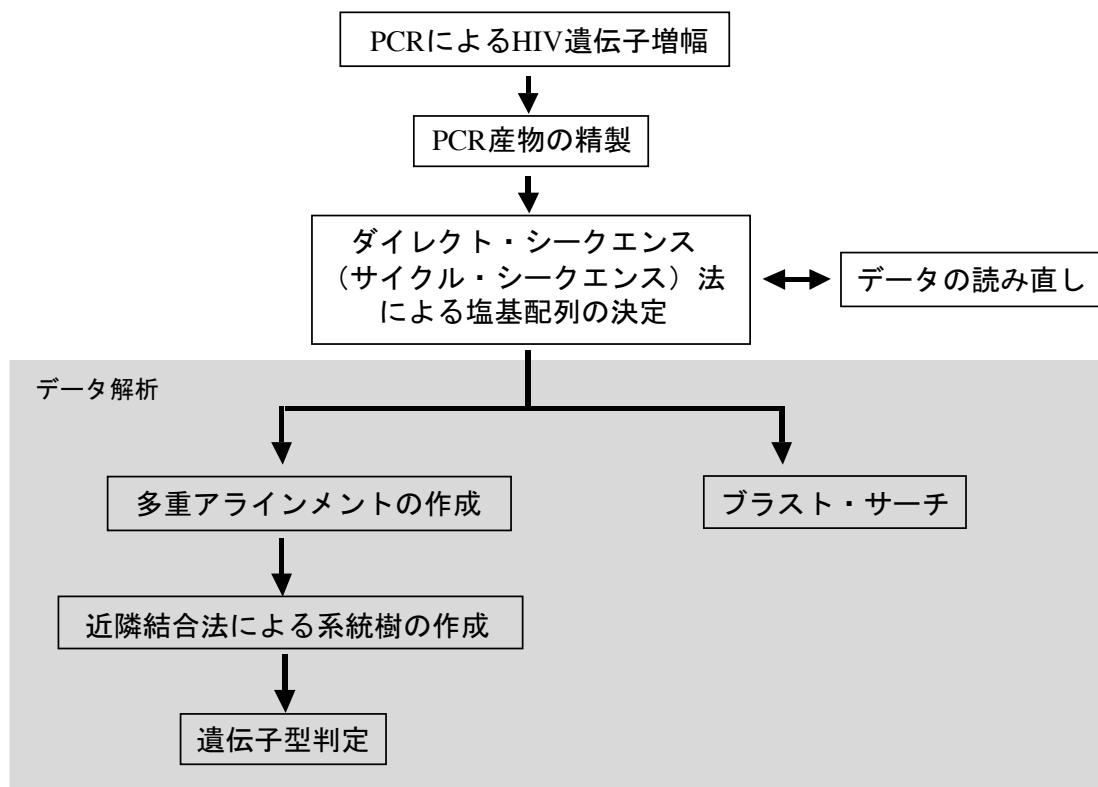


図4. HIV遺伝子型判定のためのフローシート

1) 必要な試薬・器具類

- (1) PCR 産物の精製キット： QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 28014)
- (2) シーケンス反応キット： BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (アプライドバイオシステムズ P/N4307175)
- (3) シーケンス反応産物の精製用ゲルろ過スピンカラム： CentriSep (アプライドバイオシステムズ P/N401762)
- (4) 専用のサンプルバッファー： TSR (Template Suppression Reagent アプライドバイオシステムズ P/N401674)。
- (5) Genetic Analyser Sample Tube (アプライドバイオシステムズ P/N401957)
- (6) チューブセプタ (アプライドバイオシステムズ P/N401956)
キャピラリーを通すための穴があいているがまれに穴があいていないものがある。事故に繋がるので、使用時に必ず確認する。

2) PCR 産物の精製

PCR 反応液から、シーケンス反応の妨げとなる未反応のプライマーや dNTP、Taq ポリメラーゼなどを除去するためのキットが各社から発売されている。限外ろ過膜上に PCR 産物をトラップさせるもの (Microcon-100 (Amicon AM001A)、SUPREC-02 (宝酒造 9073) 等) とシリカ膜やイオン交換樹脂に PCR 産物を吸着させ、再留水 あるいは Tris バッファーで溶出させ

るもの (QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 28014)、Concert Rapid PCR Clean-up System (GIBCO 11458-015) 等) があるが、どちらも使用することができる。ここでは、QIAquick PCR Purification Kit を用いた精製法について記す。

- (1) PCR 産物に 5 倍量の PB バッファーを加え、よく混和する。(ミネラルオイルを除去する必要はない。)
- (2) QIAquick カラムをコレクションチューブにセットし、サンプルをアプライする。
- (3) 遠心 13,000 rpm 1 分間。
- (4) コレクションチューブのろ液を除き、750 μ l の PE バッファーを入れる。
- (5) 遠心 13,000 rpm 1 分間。
- (6) エタノールを完全に除去するため、コレクションチューブのろ液を除いた後さらに 13,000 rpm 1 分間遠心する。
- (7) カラムを回収用のチューブにセットし、50 μ l の EB バッファーを入れる。
- (8) 遠心 13,000 rpm 1 分間。
- (9) ろ液 (精製物) を回収する。

3) 塩基配列決定 (ダイレクトシーケンス法)

分子疫学的研究の目的では、PCR 産物の塩基配列をクローニングすることなく、産物そのものを鋳型としてシーケンス反応を行い、塩基配列を決定する方法 [ダイレクトシーケンス法 (直接塩基配列決定法)] が取られる。

HIV-1 は 準種 (Quasispecies) を形成しているが、ダイレクトシーケンス法では、マイナーな 準種の塩基配列や Taq ポリメラーゼ による塩基取り込みの過誤 (Misincorporation) の影響は平均化され、大多数を占める準種の平均的な塩基配列を知ることができるので、分子疫学研究などの目的には有用で簡便な解析方法である。

現在シーケンス解析は、蛍光 Terminator (Dye-labeled dideoxy NTP) の存在下でシーケンス反応を行い、オートシーケンサーを用いて解析する方法が主流になってきている。

本マニュアルでは BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (アプライドバイオシステムズ P/N4307175) を用いた方法を述べる。また、400 塩基以降の読み取り感度はやや劣るが、より安価で反応時間の短い DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences US81050) も用いることができる。

シーケンスに用いるプライマーは、2nd PCR に用いたものと同じものを用いている。1 種類のプライマーで解析を行った場合、しばしばピークのパターンがあいまいで、塩基配列を決定できない箇所ができるため、できるだけ双方向からオーバーラップをとるようにシーケンスを行った方がよい。

(1) サイクルシーケンス反応

(a) 反応液の調製

ここでは、試薬が高価なため、通常の半量での反応を示しているが、特に支障はない。

再留水	2.5 μ l
精製した PCR 産物	2.5 μ l (20-40 ng 程度)
1.6 μ M シークエンシングプライマー	1 μ l
Terminator Ready Reaction Mix	4 μ l

(b) 反応条件

以下の条件は、Gene Amp PCR System 9600 (PERKIN ELMER) を使った場合のものである。

96 °C 1 min
96 °C 10 sec ▽
50 °C 5 sec | 25 Cycle
60 °C 4 min ▽
4 °C Hold

(2) シークエンス反応後の処理（反応産物の精製）

未反応の 蛍光 Terminator は解析の妨げになるため、除去しておく必要がある。エタノール沈澱によっても除去することができるが、CentriSep（アプライドバイオシステムズ P/N401762）などのゲルろ過スピンカラムを用いる方法がより簡単で確実なため、この方法を用いて精製することを推奨する。

- カラムに 800 μ l の再留水を入れ、よくボルテックスをかけ、室温で 30 分以上膨潤させる。
- 使用直前にもう 1 回ボルテックスをかけ、気泡を完全に除いておく。
- まず上のキャップをはずし、下から気泡が発生していないか確認したら下のストッパーをはずし、コレクションチューブにセットする。
- 液面がゲル表面にくるまで自然落下させ、ろ液を除く。
- 遠心 3,000 rpm 2 分間。ゲルベッドがカラム中央に円柱状になる。以下のステップでこれを壊さないようにする。
- カラムを回収用チューブにセットし、ゲルベッドの中央表面にシークエンス反応液をアプライする。
- ゲルベッドの高い方が外側になるように遠心機にセットし、遠心 3,000 rpm 2 分間。
- 回収したろ液を Vacuum concentrater で乾燥させる。
- 得られたペレットに 25 μ l TSR を加え、ボルテックスして溶解させる。
- サンプルを Genetic Analyser Sample Tube に移しチューブセプタで蓋をする。
- サンプルを 95 °C 2 分間加熱し、加熱後すぐに氷中に置いて急速に冷却し、DNA の変性を完全なものにする。

(3) 反応産物のシークエンス解析

(a) オートシークエンサーを用いた塩基配列の解析

オートシークエンサー（自動塩基配列決定装置）には、電気泳動をゲルで行うタイプとキャピラリーで行うタイプがあるが、ゲルの作製が煩雑であることと、マルチキャピラリータイプが登場し、キャピラリータイプの欠点であった多検体の処理時間が短縮されたこ

とから、キャピラリーを使うタイプが多く使われるようになってきている。ここではキャピラリータイプの ABI PRISM 310 オートシークエンサーを用いた場合の操作方法の概略を述べる。

なおオートシークエンサーは非常に便利である反面、メンテナンスの不備により大きなトラブルに見舞われることもある。使用講習を受けた担当者が責任をもって定期的にメンテナンスを行うことが必要である。

- (i) メモリをクリアするため、コンピュータを再起動する。
- (ii) サンプルトレイにチューブをセットし、オートサンプラーにサンプルトレイをのせる。
- (iii) サンプルシートを作成する。サンプル名を入力し、モビリティファイルとマトリクスファイルを設定する。
- (iv) インジェクションリストを作成する。iii)で作成したサンプルシートを選択し、ランの条件にあったモジュールを選択する。
- (v) ランを開始する。

(b) データの読み直し

自動解析を設定しておけば、オートシークエンサーのランが終了すると同時に解析結果を確認することができる。通常解析が理想的に終了しても、プライマー近傍、およびプライマーから 400 bp 以上離れた領域を中心に、塩基を余分に読んでいたり、ピークが出ているにもかかわらず塩基が読まれていなかったりすることがある。正確なデータを出すためには、解析データを確認する作業は非常に重要である。同時に、同じ領域を異なるプライマーで反応を行い、オーバーラップする部分のシーケンスが一致するかどうかを確認することで、データの信頼度が高まる。

4) ブラスト・サーチ [BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Search]

塩基配列データが得られた場合、そのサブタイプあるいは CRF 帰属を推定するのに、いわゆるブラスト・サーチ (BLAST search) が便利である。ブラスト・サーチはデータベースに登録されている塩基配列を自動検索し、相同性の高い順にリストしてくれるプログラムで、サブタイプ/CRF の迅速判定だけでなく、実験室内でおこりえる PCR に関連する誤り (他のウイルス株やウイルス遺伝子の混入) の有無を検定する方法としても用いられている。得られた HIV 塩基配列がデータベースに登録されている既知の (あるいは自分達自身が登録した) 配列と著しく高い一致率を示すときは、(PCR での他の増幅産物の混入、検体の取り違いなどの) 実験手技上のエラーを疑う必要がある。

HIV に関する研究・検査では、検索対象が 通常の場合、HIV、SIV に限られるので、検索が比較的早いことから、ロスアラモス研究所の HIV sequence database のホームページ (<http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/mainpage.html>) にある HIV-BLAST を用いることが多い。また国内のサイトでは、日本 DNA データバンク (DNA Data Bank of Japan, DDBJ) (<http://www.ddbj.ac.jp/Welcome-j.html>) を使うことができる。パラメータの変更ができたり、検索するデータの範囲を限定したりできるオプションが豊富で、使いやすい。

該当するページにアクセスして、調べたい塩基配列をペーストして検索ボタンを押すだけで検索ができる。なお、ロスアラモス研究所のサイトは塩基配列データを FASTA 形式 (後出) にする必要がある。

5) 系統樹解析

系統樹解析は塩基配列間の近縁関係を定量化し、視覚的に表示するデータ解析技術であり、系統樹解析によって HIV 株の遺伝子型を判別することができる。系統樹の作成法には遺伝距離を使う方法と配列そのものを使う方法がある。前者の代表的なものは近隣結合法であり、後者の代表的なものには最尤法 (Maximum likelihood) や最大節約法 (Maximum parsimony) がある。いずれの方法でもサブタイピングを行うことは可能ではあるが、最尤法や最大節約法は分析に多大な時間を必要とするのに対して、近隣結合法は他の 2 つの方法に比べて計算が早く、解析はパソコンでも充分である。同じデータを用いればどの系統樹作成法を用いても、基本的には同一の樹型になるので、HIV-1 遺伝子型判別の目的では近隣結合法が広く使われる。

なお UPGMA 法はその性格から、系統樹作成に応用する際、進化速度が一定であることが前提となる。しかし HIV-1 に代表されるウイルスでは進化速度が一定という仮定は保証されていない。また同一時期に採取された検体に関しても進化過程が異なると考えられるため、理論上 UPGMA 法を用いることは妥当でないと考えられる。

近隣結合法による系統樹作成ができるプログラムパッケージで最も良く使われているのは Felsenstein の作成した Phylip である。Phylip は近隣結合法だけでなく様々な系統解析法のプログラムが含まれている。ウインドウズ、マッキントッシュ、UNIX のいずれの環境にも対応しており、Phylip のホームページ (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>) からダウンロードが可能である。

Higgins の作成した Clustal は、塩基およびアミノ酸配列の多重アラインメントを行うソフトとして良く使われるが、近隣結合法による系統樹作成も行うことができる。Phylip が、1 つの系統樹を作成しその樹型の信頼性を検討するのに複数のプログラムを使いこなさなければならないのに対し、Clustal は、多重アラインメントから系統樹の作成まで連続的に行うことができるために、分かりやすい。Phylip 同様ウインドウズ、マッキントッシュ、UNIX のいずれの環境にも対応しており、(<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>) からダウンロードが可能である。

ここでは、Clustal の最新バージョン Clustal X ver.1.81 を用いた系統樹解析とそれによる遺伝子型判別の手順の概略を示す (なお以下は、マッキントッシュ使用を前提に記述してあるので、他のオペレーティングシステムの場合とは少々異なる部分があるかもしれないことに留意されたい)。

(1) 多重アラインメント (Multiple alignment) の作成

アラインメントの質が系統樹の樹型に大きく影響するため、アラインメントの作成は非常に重要なステップである。

- (a) HIV の遺伝子型決定の基準となる 標準 (レファレンス) 株の塩基配列のアラインメントは、ロスアラモス研究所の HIV シークエンスデータベース (<http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/mainpage.html>) で公開されているので、これを FASTA 形式でダウンロードし、各サブタイプの標準株のアラインメントを作る。

FASTA 形式とは次のようなフォーマットである。

```
>sampleID (英文字で 10 字以下) (return)
agctaggcctaa...(sequence)....
.....aaaattagcc (return)
>sample2ID (return)
agctgggtctaa.....
.....aagattagtc (return)
```

- (b) 不要な株の名前を選択し、"Edit" メニューの "Clear" コマンドを実行して除く。このとき、系統樹を描く際のアウトグループ (Outgroup) として例えば SIVCPZ_{GAB} は、必ず残しておく。この時 gap のみのカラムができるので "Edit" メニューから "Remove Gap-Only columns" コマンドを実行して除いておく。
- (c) Profile Alignment Mode を用いて、Profile 1 に標準株のアラインメント、Profile 2 に検討したい塩基配列データをロードし、"Do Complete Alignment" コマンドを選択してアラインメントを作製する。
- (d) 画面上でコドンのずれがないかどうかを確認する。もし修正が必要であれば、アラインメントファイルをテキストエディターで開き、修正する。マッキントッシュ版だけであるが、Se-Al (<http://evolve.zoo.ox.ac.uk/software.html> からダウンロード可能) を使えば、簡単に手動でアラインメントを修正できる。

(2) 近隣結合法による系統樹の作成

- (a) 近隣結合法で系統樹を作成するためには、まず多重アラインメントをもとにすべてに組み合わせで塩基置換数を計算し、距離行列 (Distance matrix) を作成する。Clustal X で採用されている Kimura の 2-パラメーター法では、プリン同士 (AG 間)、ピリミジン同士 (CT 間) の置換 (トランジション) は、プリンとピリミジンの間の置換より起こりやすいことから、これらが異なる速度で起こることを考慮して塩基置換数を推定する。距離行列データをもとに近隣なものを順番に繋ぎ合わせていくと、最終的にひとつの樹型が得られる。これが近隣結合法である。
- (b) 近隣結合法で作成された系統樹の樹型の信頼性は、ブートストラップ (Bootstrap) 法で評価する。ブートストラップ法では、長さ n の塩基のアラインメントから n 個の標本を無作為に抽出して、これについて系統樹を推定することを 100 回あるいは 1,000 回くり返した時に特定の樹型が得られる頻度を示すもので、100 % に近い程その樹型の信頼性が高い。
- (c) Clustal X では、Bootstrap N-J Tree コマンドを実行することで、これらのことを 1 度に行うことができる。また、同プログラムに付属している NJ plot というソフトウェアを用いることで、Clustal X で作成された Tree ファイルを読み込んでその結果を直ちに系統樹として表示させることができる。

6) 遺伝子型判別

- (1) 作成された系統樹の一例を図 5 に示す。系統樹をもとに、遺伝子型を判定したい塩基配列が各サブタイプ/CRF の標準株が形成するクラスターとどのような関係があるかを検討する。この例では HIV-1 サブタイプ B', C と CRF01_AE が同定される。なお、サブタイプ B' はサブタイプ B のタイ型ヴァリエント (アジア地域の主に IDU に広く分布している地域ヴァリエントでタイ B 型ウイルスともよばれる) である。
- (2) 系統樹の各分岐点 (ノード、Node) に示した数値がブートストラップ値が樹型の信頼性の指標となる。
- (3) 図 5 に見るように、*gag* (*p17*) と *env* (*C2/V3*) 領域のサブタイプ帰属は、時に一致しない (不一致, Discordance) ことがある (検体 1-6)。このような場合には、組換えウイルスあるいは複数サブタイプのウイルスの共感染が疑われる。このような場合には、より広い領域の塩基配列 (理想的には全塩基配列) を決定して、遺伝子組み換えの有無を検討する。
- (4) また、どのサブタイプ/CRF にも帰属しないように見える場合には、どのカテゴリーにもあてはまらない新しいタイプのウイルス株である可能性もあるが、実際には、系統樹作成の前提となるアラインメントに問題があることが多いので、もとに戻ってアラインメントの妥当性を再検討する。

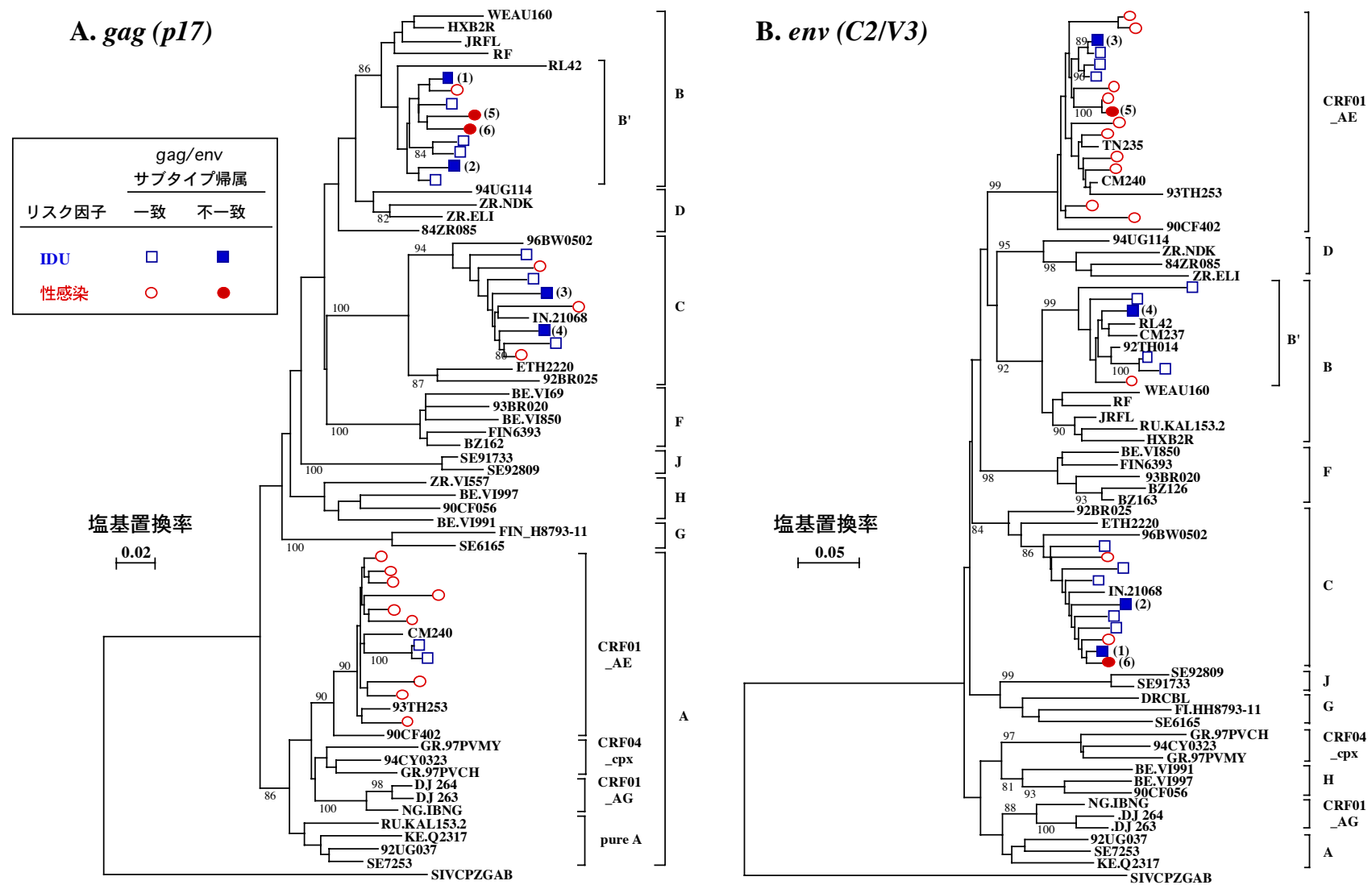


図5. *gag* (p17) および *env* (C2/V3) 領域の系統樹解析の一例（文献 6 を改変）

gag (p17) (A)および *env (C2/V3)* 領域 (B) の塩基配列データに基づく近隣結合法による系統樹解析の一例。□, ■は注射薬物乱用者 (IDU)、○, ●は異性間性接触による感染者。その他は各 HIV-1 サブタイプと CRF の標準 (レファレンス) 株。(1)-(6)の数字は *gag (p17)* および *env (C2/V3)* 領域のサブタイプ帰属が一致しない検体を示す。

7) 参考文献

- (1) Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Gao F, Hahn BH, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Mullins JI, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Rodrigo A, Salminen M, Wolinsky S, Korber B. HIV-1 subtype and recombinant nomenclature proposal. Human Retroviruses and AIDS: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences (ed. Korber, B. et al.) III-1-15, Los Alamos National laboratory, Los Alamos, New Mexico. 1999.
- (2) Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B. HIV-1 nomenclature proposal. Science 288, 55-6, 2000.
- (3) 武部 豊. HIV-1 分類・命名法の新ガイドラインとサブタイプ分類を巡る諸問題. ウイルス50 (2), 123-138. 日本ウイルス学会. 東京. 2000.
- (4) 武部 豊. HIV-1サブタイプの世界分布: 世界流行形成のメカニズム. 日本エイズ学会雑誌 (The Journal of AIDS Research). 3 (3), 140-154. 日本エイズ学会. 東京. (2001).
- (5) 武部 豊. HIVのゲノム多様性: メカニズムとその生物学的意義. ウイルス 51 (2), 123-133. 日本ウイルス学会. 東京. 2001.
- (6) Motomura, K., Kusagawa, S., Kato, K., Lwin, H. H., Tun, K. M., Thwe, M., Oo, K. Y., Kyaw, O., Zaw, M., Nagai, Y., and Takebe, Y. Emergence of new forms of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombinants in Central Myanmar. AIDS Res. Hum. Retroviruses 16, 1831-1843, 2000.

4. HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査法

1) 背景

抗 HIV-1 多剤併用療法は優れた治療効果を示す反面、その成功には様々な障害が立ちふさがっている。低い服薬率（アドヒアランス）、治療薬剤による副作用、そして薬剤耐性ウイルスの出現等いずれも治療の失敗の引き金になる事項である。特に薬剤耐性ウイルスの出現はその後の治療選択に大きな制約を課すことから重要な問題である。

症例が薬剤耐性に陥っているか否かは臨床経過からある程度は判断することが出来る。しかし、より詳細にどの薬剤に対して耐性を獲得し、どの薬剤に対しては感受性が温存され薬効が期待できるかを判断するには特別な検査を実施する必要がある。遺伝子検査はその名が示すようにウイルス遺伝子の配列を調べることにより耐性の有無を調べる検査であり、この検査が成立する前提として各治療薬剤が特異的な点変異を誘導するという事実がある。図1に主要な薬剤とそれに対応する耐性変異の部位と変異のパターンを示す。ここに見るように、薬剤はそれぞれ幾つかの決まった変異を誘導することが知られている。したがって、誘導された変異の有無を調べることにより耐性薬剤の判定が可能となる。

2) 検査の概要

HIV-1 の薬剤耐性検査は患者血漿中の HIV-1 ウイルスより RNA を抽出し、それをテンプレートにして逆転写反応を行い、Antisense DNA を作り出すことから始まる。次に、この DNA 鎖を鋳型にして PCR を行い塩基配列解析が可能な量まで DNA を増幅する。反応後の産物は標識 ddNTP を加えて再度 PCR を行い、反応後の標識産物を自動塩基配列解析装置で解析する。結果はアミノ酸に翻訳後、レファレンス配列と比較し、耐性変異の有無を確認する。

3) 検査プロトコール

(1) 採血

採血時の抗凝固剤は EDTA が望ましい。ヘパリンは PCR 反応を阻害するので避けるべきである。検査には 200-500 μ l の血漿が必要である。採血後は出来るだけ早く細胞成分と血漿成分とを分けるのが望ましい。処理するまでに時間がかかるようであれば、室温で保管する。

(2) 血漿中ウイルスからの RNA 抽出

薬剤耐性遺伝子検査は血液中のウイルス粒子より抽出されたウイルス RNA を用いるのが一般的である。検査に際しては RNA を取り扱う際の一般的な注意事項を守る必要がある。今日 RNA 抽出のためのキットは優れた製品が複数市販されており、基本的にどれを用いても良い。以下代表的な手技について記す。

(a) RNA 吸着カラムを用いた手法（スピンカラム法）

この手法は簡便であり、迅速にきわめて純度の高い RNA を得ることができる。ここでは High Pure Viral RNA Kit (Roche; 1858-882) を用いた方法を説明する。

- (i) 血清または血漿サンプル 0.2ml に対して 0.4ml （2 倍量）の Binding buffer（緑 cap）を加え、ピペティングしてよく混ぜる
- (ii) コレクションチューブにセットしたスピンカラムへ混合したサンプルを添加し、10,000rpm (ca.8000g) で 10～20 秒遠心する（この操作により、ウイルス RNA はス

ピンカラムのフィルターにトラップされる)

- (iii) スピнкаラムを新しいコレクションチューブに移し、Inhibitor removal buffer (黒 cap) を 0.4ml 加え、10,000rpm で 10~20 秒遠心する
 - (iv) スピнкаラムを新しいコレクションチューブに移し、Wash buffer (青 cap) を 0.4ml 加え、10,000rpm で 10~20 秒遠心する
 - (v) スピнкаラムを新しいコレクションチューブに移し、Wash buffer を 0.4ml 加え、10,000rpm で 1 分遠心して Wash buffer をフィルター内より完全に取り除く
 - (vi) スピнкаラムをきれいなチューブに移し、Elution buffer(白 cap)を 100μl 加え、10,000rpm で 1 分遠心してフィルター内にトラップされた RNA を回収する
- (b) 液層分離 (フェノール GTC) 法[TRIZOL-LS; LIFETECH; 10296-010]
- この方法でも純度の高い RNA を回収することが可能である。
- (i) 血清または血漿 0.25ml に 0.75ml (3 倍量) の TRIZOL-LS を加えて、vortex またはピペティングでよく混ぜた後、室温で 5 分放置する
 - (ii) クロロホルムを 0.2ml 加え、しっかりフタを閉めて vortex でよく混ぜ、室温で 2~15 分程度放置する
 - (iii) 15,000rpm, 10 分遠心する
 - (iv) RNA を含んだ無色の上 (水) 層を採取し、新しいチューブに移す
 - (v) 0.1mg の tRNA(tRNA yeast; GIBCO BRL; 16051-039)と 0.5ml のイソプロパノールを加え、-20℃で 1 時間くらい冷やす
 - (vi) 4℃15,000rpm で 10 分間遠心する
 - (vii) 上清を捨て 80%エタノールでペレットを洗浄する
 - (viii) ペレットを風乾し 50μl の Rnase-free water に溶かす
 - (ix) 55~60℃で 10 分加熱する

(3) 治療薬剤の標的であるプロテアーゼと逆転写酵素阻害剤遺伝子の増幅 (RT-PCR から 2nd PCR)

プロテアーゼ全域および逆転写酵素 N 末からおよそ 230 番目のアミノ酸までの領域を増幅する。(図 2)

両遺伝子を 1 断片、もしくはプロテアーゼと逆転写酵素の 2 断片にわけて増幅を行う。感染研では 2 断片に分けて増幅している。各断片の増幅に用いるプライマーは表 1 に記す。

今日多種の RT-PCR 反応キットが販売されており、いずれを用いても問題なく増幅することができる。ここでは AMV one step RNA PCR kit (TAKARA RR024A)を用いた場合を例としてあげる。下記のレシピに従い反応液を準備する。

Water	12.5 μ l
10x AMV RT-PCR buffer	5.0 μ l
25mM MgCl ₂	10.0 μ l (5mM)
10mM dNTPs	5.0 μ l (1mM)
For. primer(100 μ M)*	0.5 μ l (50pmol)
Rev. primer(100 μ M)*	0.5 μ l (50pmol)
RNase Inhibitor(40U/ μ l)	0.5 μ l (20U)
AMV RTase XL(5U/ μ l)	0.5 μ l (2.5U)
AMV-Optimized Taq.(5U/ μ l)	0.5 μ l (2.5U)
Template RNA	15.0 μ l
Total volume	50.0 μ l

反応液の調整はプライマーの非特異的結合を防ぐために 4℃で行う。準備が出来たら PCR を行う。PCR プログラムは以下のとおりである。

逆転写反応	55℃	30 min	
PCR	95℃	5 分	
	95℃	30 sec	} 40 Cycle
	52℃	30 sec	
	72℃	45 sec	
	72℃	7min	

DNA の増幅が不十分であれば引き続き Nested-PCR を行う。

KOD DNA polymerase (TOYOBO KOD-101) を用いた場合について以下に Nested-PCR のレシピを示す。

Water	33.0 μ l
10x KOD buffer(#1)	5.0 μ l
25mM MgCl ₂	2.0 μ l(1mM)
2mM dNTPs	5.0 μ l(0.2mM)
For. primer(100 μ M)	0.4 μ l(40pmol)
Rev. primer(100 μ M)	0.4 μ l(40pmol μ l)
KOD(2.5U/ μ l)	0.4 μ l(1.0U)
RT-PCR product	3.8 μ l
Total volume	50.0 μ l

反応液の調整はプライマーの非特異的結合を防ぐために 4℃で行う。準備が出来たら PCR を行う。PCR プログラムは以下のとおりである。

94℃	5 min	
94℃	30 sec	} 30 Cycles
60℃	30 sec	
74℃	30 sec	
72℃	7 min	

(4) PCR 産物の精製

反応が終了したら反応液中に残っているタンパク、プライマー、未反応 dNTP などを取り除かなければならない。精製キットは多種販売されておりどれを用いても良い。ここでは QIAquick PCR Purification Kit による精製法[QIAGEN cat.no. 28104]を記す。

- (a) PCR 産物に 5 倍量の bufferPB を加えてよく混ぜる。
- (b) スピнкаラムをコレクションチューブ(フタなし 2ml tube)にセットする。
- (c) サンプルをカラムに添加し 14,000rpm で 30 秒遠心する。
- (d) スピнкаラムを新しいコレクションチューブに移し、bufferPE を 0.75ml 加え 14,000rpm で 30 秒遠心する。
- (e) スピнкаラムを新しいコレクションチューブに移し、14,000rpm で 30 秒遠心してエタノールをフィルターから完全に取り除く。
- (f) スピнкаラムを 1.5ml の遠心チューブへ移す。
- (g) 適当量(50~400 μ l)の BufferEB または H₂O あるいは TE を加えて 14,000rpm で 30 秒遠心して DNA を回収する。H₂O を用いる場合は pH に注意する必要がある。

(5) 増幅した PCR 産物の塩基配列解析

自動塩基配列解析装置が普及しつつある今日、アイソトープを用いた解析手法はあまり行われなくなっている。ここでは蛍光色素標識 ddNTP を用いた Dye-terminator 法によるシーケンス反応について記す。蛍光標識 ddNTP 試薬は各種販売されており、同時に解析できる色素の種類が異なるだけで基本的な取り扱いは同じである。ここでは BigDye terminator によるサイクルシーケンス[Applied Biosystems;4303500]を記す。

DW	8.0 μ l
BigDye terminator	4.0 μ l
BigDye dilution buffer	4.0 μ l
Primer(1 μ M)*	2.0 μ l (2pmol)
PCR product	2.0 μ l (30-90ng)
Total volume	20 μ l

*解析プライマーに関しては表 1 を参照

反応は次の条件で行う

96(2') [96(10''), 65(40'')] x30 Cycles

シーケンス反応産物の精製

解析装置にかけるまえに反応後に残った酵素、dNTPs、Labeled-ddNTPs 等を除去する。ゲル濾過、エタノール沈殿、透析などの方法があるが、ゲル濾過が簡便でかつ未反応物の除去率が高い。ここでは Autoseq G-50 スピнкаラム [Pharmacia;27-5340] による精製について記す。

- (a) Vortex でカラム内に充填済みのレジンを懸濁させる。
- (b) 上部のキャップを 1/4 回転くらい回して緩め、下部の流出口を折り取る。
- (c) カラムを 1.5ml チューブにセットして 5,000rpm で 1 分間遠心し、余分な水を除く。
- (d) カラムを新しい 1.5ml チューブに移して、反応済みサンプルをカラムに添加し、5,000rpm で 1 分間遠心してサンプルを溶出する。
- (e) ヒートブロックまたは減圧遠心乾燥機等で乾燥後、専用の Loading buffer*に懸濁する。

*Loading buffer (ポリアクリルアミドゲル用)

(Formamide:25mM EDTA(pH8.0)/Blue dextran(50mg/ml)=5:1)

(ABI 377 等のポリアクリルアミドゲルで泳動する場合と ABI 310 等のキャピラリーでは異なる)

シーケンサーの準備ができればサンプルを添加、泳動する。

データー回収と評価

泳動終了後終了データーを回収し、解析ソフトウェアを用いて、データーの解析を行う。レファレンス配列に対し **Alignment** をかけた後、アミノ酸に翻訳し、レファレンスと異なる部位を検索する。結果を表と照らし合わせて感受性が低下していると予想される薬剤を判定する。

4) 参考文献

- (1) 杉浦 亙. HIV-1 の薬剤耐性検査と臨床的意義. 日本臨床 60, 703-710, 2002.
- (2) Hirsch, M. S., Brun-Vezinet, F., D'Aquila, R. T., Hammer, S. M., Johnson, V. A., Kuritzkes, D. R., Loveday, C., Mellors, J. W., Clotet, B., Conway, B., Demeter, L. M., Vella, S., Jacobsen, D. M., and Richman, D. D. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. JAMA. 283, 2417-2426, 2000.
- (3) Sugiura, W. Effect of introduction of highly active antiretroviral treatment and the changes in patterns of drug-resistant HIV-1 in Japan. J. Infect. Chemother. 7, 127-132, 2001.

図1 抗HIV-1薬剤と誘導される耐性変異のまとめ

(a)ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤

codon No.	41	44	62	65	67	69	70	74	75	77	100	103	106	108	115	116	118	151	181	184	188	190	210	215	219	225	230	236
A.A in wild type	M	E	A	K	D	T	K	L	V	F	L	K	V	V	Y	F	V	Q	Y	M	Y	G	L	T	K	P	M	P
zidovudine(AZT)	L				N		<u>R</u>																W	<u>YF</u>	QE			
didanosine(ddI)	L			R	N		R	<u>V</u>												V			W	YF	Q			
zalcitabine(ddC)	L			<u>R</u>	N	<u>D</u>	R	<u>V</u>												<u>V</u>			W	YF	Q			
stavudine(d4T)	L				N		R		T														W	YF	Q			
lamivudine(3TC)		<u>D</u>															I			<u>V</u>								
abacavire(ABC)	L			<u>R</u>	N		R	<u>V</u>							F					<u>V</u>			W	YF	Q			
multi :151 comlex			V						I	L						Y		M										
multi:69 ins complex			V		N	ins	R																					
multi-nRTI	L				N		R																W	YF	QE			

(b)非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤

codon No.	41	44	62	65	67	69	70	74	75	77	100	103	106	108	115	116	118	151	181	184	188	190	210	215	219	225	230	236
A.A in wild type	M	E	A	K	D	T	K	L	V	F	L	K	V	V	Y	F	V	Q	Y	M	Y	G	L	T	K	P	M	P
nevirapine											I	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>I</u>					<u>CI</u>		<u>C</u>	<u>A</u>						
efavirenz											I	<u>N</u>		I							<u>L</u>	<u>SA</u>				H		
delavirdine												<u>N</u>							<u>C</u>								<u>L</u>	
multi-NNRTI												N									L							
multi-NNRTI											I		A						CI			SA					L	

(c) プロテアーゼ阻害剤

codon No.	10	20	24	30	32	33	36	46	47	48	50	53	54	63	71	73	77	82	84	88	90
A.A in wild type	L	K	L	D	V	L	M	M	I	G	I	F	I	L	A	G	V	V	I	N	L
saquinavir										<u>V</u>			VL		VT	VCS	I	A	V		<u>M</u>
ritonavir	FIRV	MR			I	F	I	IL					VL		VT	S	I	AETS	V		M
indinavir	IRV	MR	I		I		I	<u>IL</u>					V		VT	SA	I	AETS	<u>V</u>		M
nelfinavir	FI			<u>N</u>			I	IL							VT		I	AFTS	V	DS	<u>M</u>
amprenavir	FIRV				I			IL	V		<u>V</u>		LVM			S			<u>V</u>		M
Lopinavir	FIRV	MR	I		I	F		IL	V		V	L	VL	P	VT	S		AFTS	V		M
multi-PI	FIRV							IL					VML					AFTS	V		M

X 一次変異：薬剤投与後最初に出現することが多い変異であり、且つ薬剤感受性に大きく影響を及ぼすもの

X 二次変異：一次変異に続いて出現してくる変異であり、一次変異と組み合わせることにより耐性レベルを上げる。

X in vitroで耐性変異として報告されているが、臨床検体では希な変異

図2 遺伝子増幅範囲と使用プライマー

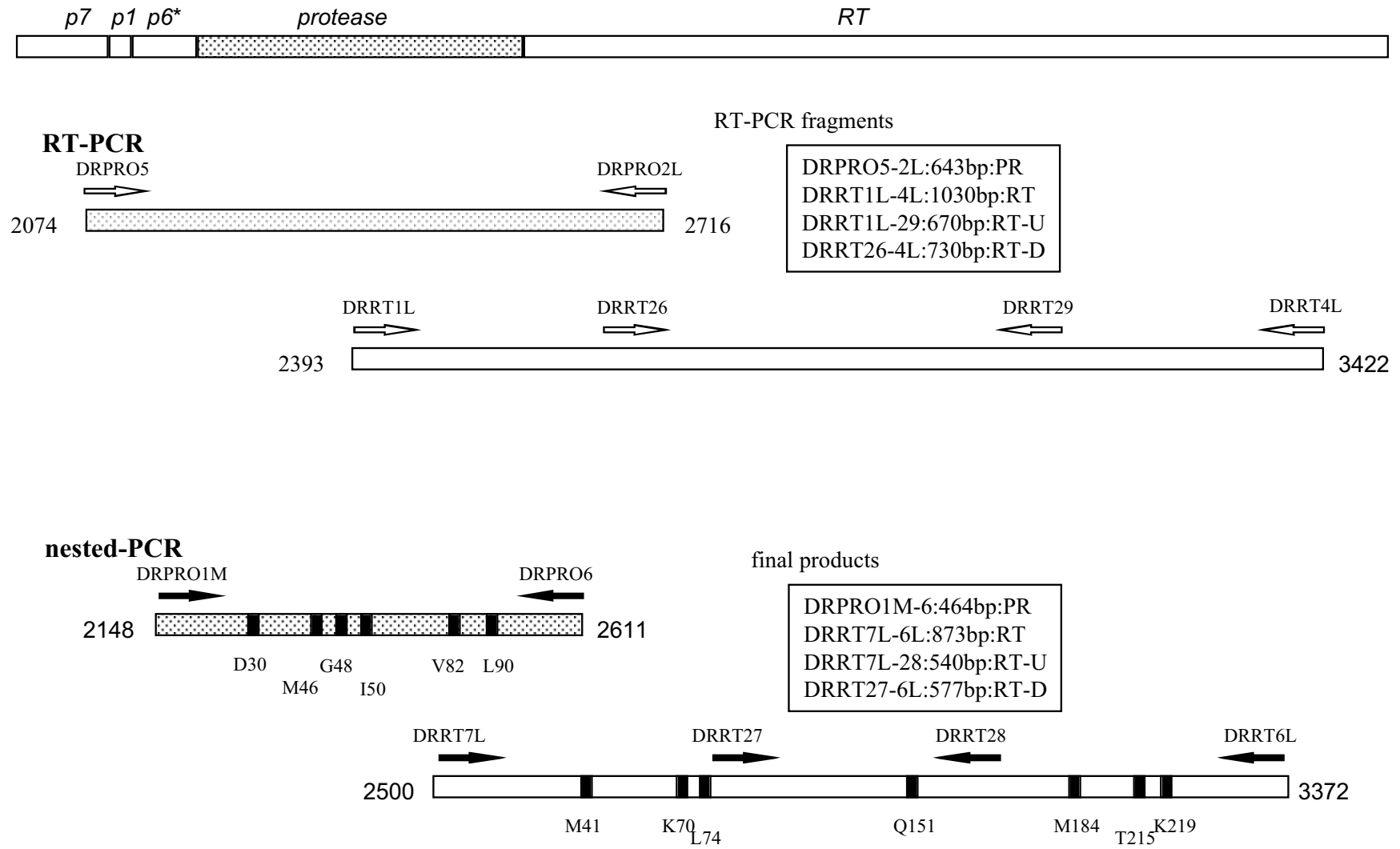


表 1. 使用するプライマー一覧

name	sequence	5' end location	orientation and usage	
DRPRO5	5-AgACAggYTAATTTTTTAgggA	2074	PR/outer	forward
DRPRO2L	5-TATggATTTTCAGgCCCAATTTTTgA	2716	PR/outer	reverse
DRPRO1M	5-AgAgCCAACAgCCCCACCAg	2148	PR/inner	forward
DRPRO6	5-ACTTTTgggCCATCCATTCC	2611	PR/inner	reverse
DRRT1L	5-ATgATAgggggAATTggAggTTT	2388	RT/outer	forward
DRRT4L	5-TACTTCTgTTAgTgCTTTggTTCC	3425	RT/outer	reverse
DRRT7L	5-gACCTACACCTgTCAACATAATTgg	2485	RT/inner	forward
DRRT6L	5-TAATCCCTgCATAAATCTgACTTgC	3372	RT/inner	reverse
DRRT1L	5-ATgATAgggggAATTggAggTTT	2388	RT/outer	forward
DRRT29	5-ggCTCTAAgATTTTTgTC	3058	RT-U/outer	reverse
DRRT7L	5-gACCTACACCTgTCAACATAATTgg	2485	RT/inner	forward
DRRT28	5-TggAATATTgCTggTgATCC	3031	RT-U/inner	reverse
DRRT26	5-CAAAAATTgggCCTgAAAATCC	2692	RT-D/outer	forward
DRRT4L	5-TACTTCTgTTAgTgCTTTggTTCC	3425	RT/outer	reverse
DRRT27	5-AACTCAAgACTTCTgggAAgT	2798	RT-D/inner	forward
DRRT6L	5-TAATCCCTgCATAAATCTgACTTgC	3372	RT/inner	reverse

(5) 執筆者一覧

- | | |
|---------------------------|------------|
| (1) はじめに | 山本直樹 |
| (2) 検査手順 | 吉原なみ子、鈴木寿子 |
| (3) 血清診断法 | |
| A) スクリーニング法 | |
| I. HIV 抗体の検出 | |
| 1. ゼラチン粒子凝集法(PA) | 吉原なみ子、鈴木寿子 |
| 2. ラテックス凝集法 | 吉原なみ子、鈴木寿子 |
| 3. イムノクロマトグラフィー法(ICA) | 吉原なみ子、鈴木寿子 |
| 4. 酵素免疫測定法(ELISA) | 吉原なみ子、鈴木寿子 |
| II. HIV 抗原および抗体の同時検出 | |
| 1. 酵素免疫測定法(ELISA) | 吉原なみ子、鈴木寿子 |
| B) 確認法 | |
| 1. ウエスタンブロット法(WB) | 吉原なみ子、鈴木寿子 |
| 2. イムノブロット法 | 吉原なみ子、鈴木寿子 |
| C) その他 | |
| I. HIV 抗原の検出(p24 Ag) | |
| 1. 酵素免疫法(ELISA) | 仲宗根正 |
| (4) 病原体の検出法 | |
| I. ウイルス分離培養(共培養法) | 本多三男 |
| II. 遺伝子検査 | |
| 1. PCR によるプロウイルス DNA の検出法 | 武部豊、草川茂 |
| 2. HIV-1 RNA 定量法 | 杉浦互 |
| 3. HIV の遺伝子型 (サブタイプ) 判別 | 武部豊、草川茂 |
| 4. HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査法 | 杉浦互 |

(6) 連絡先

山本直樹	国立感染症研究所エイズ研究センター	nyama@nih.go.jp
吉原なみ子	国立感染症研究所エイズ研究センター第二室	namiko@nih.go.jp
鈴木寿子	国立感染症研究所エイズ研究センター第二室	hisakos@nih.go.jp
仲宗根正	国立感染症研究所エイズ研究センター第一研究グループ	nakabone@nih.go.jp
本多三男	国立感染症研究所エイズ研究センター第一研究グループ	mhonda@nih.go.jp
武部豊	国立感染症研究所エイズ研究センター第一室	takebe@nih.go.jp
草川茂	国立感染症研究所エイズ研究センター第一室	kusagawa@nih.go.jp
杉浦互	国立感染症研究所エイズ研究センター第二研究グループ	wsugiura@nih.go.jp

輸入真菌症

輸入真菌症

目 次

・ 概説

- 1 .輸入真菌症 (imported mycosis, imported mycoses) とは
- 2 . 検査に関する一般的事項
 - 1 取り扱い

・ 検査の進め方

1 .*Coccidioides immitis*

1 検査方法

- 1) 同定法
- 2) 抗原検出
- 3) 抗体検出
- 4) DNA、RNAの検出
- 5) その他

2 .*Histoplasma capsulatum*

1 検査方法

- 1) 同定方法
 - a) *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*
 - b) *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*
 - c) *Histoplasma farciminosum*
- 2) 抗原検出
- 3) 抗体検出
- 4) DNA、RNAの検出
- 5) その他

3 .*Paracoccidioides brasiliensis*

1 検査方法

- 1) 同定方法
- 2) 抗原検出
- 3) 抗体検出
- 4) DNA、RNAの検出
- 5) その他

- ・ 真菌培養に使用する培地
- ・ 文献
- ・ 検査依頼先
- ・ 執筆者

概説

1. 輸入真菌症 (imported mycosis, imported mycoses) とは

真菌症の多くは世界のさまざまな地域で見られるが、中には風土病として特定の地域でのみ発生するものがある。このような真菌症の場合、原因となる真菌は流行地域にのみ生息していると考えられる。我が国で見られる真菌症の大部分は、日本国内に生息している真菌によって発生するものであるが、本来我が国には生息していない真菌による真菌症で、海外の特定地域でのみ発生しているものが、何らかの原因により、日本国内で発生することがあり、これを輸入真菌症（原因菌は輸入真菌）という。現時点ではコクシジオイデス症（起因菌 *Coccidioides immitis*）、ヒストプラズマ症（同 *Histoplasma capsulatum*）、パラコクシジオイデス症（同 *Paracoccidioides brasiliensis*）、それに近年発生が確認されたマルネツフェイ型ペニシリウム症（同 *Penicillium marneffeii*）が該当する。また、発生の報告はないものの、流行地域と日本との往来が多く発生の可能性が高いことから、ブラストミセス症（同 *Blastomyces dermatitidis*）もこれに含める場合が多い。実際の症例数では、これまでのところ、大部分がコクシジオイデス症、ヒストプラズマ症、パラコクシジオイデス症の3疾患により占められている。

我が国固有に存在する病原真菌が、殆どの場合、抵抗力の低下したホストに感染する（日和見感染）のに対し、これらの輸入真菌はいずれも感染力が強く、しばしば健常人にも発生して深在性～全身性（deep-seated mycoses, systemic mycoses）を起こす点で、大きく異なっている。いずれも病原性が強く、重篤な真菌症をおこすため、十分な注意が必要である。患者間の感染はないが、起因菌を分離、培養する検査室での感染事故は非常に起こりやすく、欧米でも数多く報告されている。

2. 検査に関する一般的事項

1 取り扱い

国立感染症研究所による病原真菌の危険度分類では、*C. immitis* を始めとして、*P. brasiliensis*、*H. capsulatum*、*B. dermatitidis*、*P. marneffeii* などといった輸入真菌は、いずれもレベル3に分類されており、高い感染性を示す（表1）。いずれも感染力がきわめて強く取り扱いには十分な注意が必要であり、一般の細菌検査室では取り扱うべきではない。真菌の多くは分生子（conidia）を形成し、これを空気中に大量に飛散させるため、これを吸入することによりヒトは容易に真菌に暴露され、感染、発症に至る。したがって、真菌によるバイオハザード対策の要諦は、いかにして分生子の飛散を防ぐかにある。したがって、これらの輸入真菌の可能性が疑われた場合は、専用の容器に入れて厳重に密封し、専門機関に同定を依頼する。輸送中に容器が破損することのないよう、頑丈な容器を用いること、容器の周囲にショックを和らげるパッキングを行なうことなど、安全性には注意が必要である。特に*C. immitis* は取扱中に米国で数多くの臨床検査技師や研究者が感染する事故が起こっており、死亡例も報告されている。なお、*C. immitis* などでは、発育が進むほど取り扱いの危険が増すので、疑いのある菌は丈夫で密封できる円筒形の容器（セラムチューブなど）にいれ、できるだけ早期に専門機関に輸送する必要がある（感染性検体の輸送専用の容器がある）。

一方、一般の感染症とは異なり、患者と直接接する医師や看護師あるいは家族などが患者から直接感染する可能性は極めて少ない。ただし、検体を長期間放置すると菌が発育し分生子を形成して飛散させる可能性がある。また、まれに喀などに菌糸形で排菌される場合もあるので、菌が含まれている可能性のある材料（喀、ドレナージの廃液など）は病室内、病棟内などに放置せず、迅速に処理しておく必要がある。

検査の進め方

1. *Coccidioides immitis*

1 検査方法

病原真菌としては現在地球上で知られている中でもっとも危険とされている。感染すると全身播種を起こし死亡する可能性がある。危険度分類では他の輸入真菌と同様にレベル3とされてはいるものの、レベル3の他の真菌とはその危険性において一線を画す。

本菌は、他の輸入真菌と同様、一般的な培養法ですぐにそれとわかる形態学的特徴があるわけではなく、同定の手がかりとしては、流行地域への渡航歴がきわめて重要である。コクシジオイデス症の流行地は、主にアメリカ合衆国南西部（カリフォルニア、アリゾナ、ニューメキシコ、テキサス、ネバダ、ユタ。特にカリフォルニアとアリゾナが多い）であるが、メキシコなど中南米各地にも酸剤しているため、これらの地域を中心として渡航歴を入念に確認する。渡航歴のはっきりしない検体に関しては、積極的に問い合わせる必要がある。本菌は感染時には球状体となり、培養すると分節型分生子を伴う糸状菌となる二形性真菌である。

1) 同定法

- ・喀 などのスミアでは球状体が確認される場合があるが、変性が強く、確定診断に至るケースは少ない（パパニコロ染色、PAS染色、Grocott染色など）（図1）。
- ・検体（培養）：喀、気管支肺胞洗浄液(BAL)、肺生検標本、経皮的肺穿刺、皮膚病変（潰瘍など）など。
- ・二次培養法：1%デキストロース加BHI寒天培地を用いる。アスペルギルスなどと異なり、cycloheximideによっても発育は阻害されにくく、同定の手がかりとなる。
- ・肉眼的所見（図2）：発育は早く、35℃で2 - 3日で白色～淡褐色のコロニーが旺盛に発育してくる。巨大培養を作製するために、2% dextrose SDAのシャーレにて培養すると、37℃ 7日間で直径約 45 mmとなる（ただし巨大培養の作成は危険性が大きいので、原則として行うべきではない）。27℃より37℃の方が発育が良好である。シャーレはビニールテープでしっかりと閉じ、テープに針で小さな孔を2、3箇所開けておく。以後シャーレのふたを開けるてはならない。また、転倒、強い振動などを与えてはならない（もちろん、輸送は厳禁である）。

コロニーははじめ無毛状であり、一見すると一般細菌のようにも見えるが、次第に綿花状になる。この菌糸を実体顕微鏡下で観察する。この目的にはシャーレではなくスラントを用いるのが好ましいが、どの容器を用いる場合も、密封したまま容器の外側から観察することが必要である。特徴的な分節型分生子（arthroconidia）が確認された場合、本菌の可能性を考える。この分節型分生子は非常に飛散しやすく、このため本菌はバイオハザードの危険が極めて高い真菌となっている。

綿花状の発育が少しでも認められたら、外側から観察する以外の全ての作業は、レベル3対応の施設でクラス B以上のバイオハザードキャビネット内を用い、豊富な経験を有する技術者により行なう。決して不用意に容器を開けたり、スライドカルチャー（slide culture）を試みてはならない。

- ・顕微鏡的所見：解離細胞（disjunctor cells）と交互に形成された矩形～樽形の分節型分生子（ $2.5 - 3 \times 4 - 6 \mu\text{m}$ ）が認められる（図3）。分節型分生子は、他のさまざまな真菌に認められるので、これのみで同定してはならない。菌糸から遊離した分節型分生子には両端に環状の縁飾り（annular frills）が残っている。Converseの改良液体培地で振培養すると、分節型分生子は球状体（spherule）となる。感染組織内でも同様である。球状体は径 $40 \sim 200 \mu\text{m}$ の球形で、中に無数の内生孢子を蓄えている（図4）。

- ・同定の決め手は、古典的には

- 1) 37°C での旺盛な発育、
- 2) 分節型分生子の存在、
- 3) 球状体の確認

である。分節型分生子を形成する真菌は多いが、その中でも本菌の分節型分生子は*Malbranchea*に類似している。*Malbranchea*とは、 27°C で発育が盛んで、 37°C では発育が不良なこと、球状体を形成しないこと、などから鑑別する。球状体の確認としては動物に感染させ in vivo の形態を病理学的に判定するものと特殊な in vitro の環境下で培養する方法とが知られている。前者としてはマウス腹腔内に菌を接種し、その病理組織標本中に球状体を確認する方法がよく用いられるが、実験室全体が陰圧となり排気は滅菌フィルターを介して行なうなどの対策を施した感染実験用の施設が必要である。また、後者の in vitro の方法としては、1) Converseの改良液体培地に分節型分生子と短菌糸の混合液を接種し、 34°C 1週間振培養する方法。

2) Converseの改良液体培地にIonagar No.2を1%の割合で加え、高圧滅菌を行なって固型培地を作製し、これに分節型分生子と短菌糸の混合液を接種

し40℃、20%CO₂、80%空気の条件下で培養する方法とが知られている。
in vivo の方法の方が安全性および球状体形成の確率のいずれの観点からもすぐれている。

一方、近年は、安全性の観点から、培養上清からのexoantigen の検出や、遺伝子を応用した同定法 (hybridization) も行なわれるようになっていく。しかし、いずれの方法でも臨床検体から直接同定 (診断) を行なうわけではなく、まず菌の培養を行ない菌体を得ることが必要となっている。また、これらはいずれも特に本菌を積極的に疑わない限り施行しない検査であるため、本菌の疑いを持つことがまず第一である。このための手がかりとしては、どのような検査機器よりも、流行地域への渡航歴が最も重要であり、いくら強調してもし過ぎることではない。

本菌は輸入真菌の中でも特別に危険性が高く、取り扱いには十分な知識、設備と慎重さが必要である。本菌を疑った場合、迅速に安全な容器に移すとともに、できるだけ早期に専門の機関に依頼すべきである。菌の発育が進むほど、感染の危険が増し、取り扱いが困難となる。

2) 抗原検出

一般化されていない。

3) 抗体検出

主にCF法とID法とが用いられ、病態や目的により使い分けられている。米国数社からキットが販売されているが信頼性に大きなばらつきがあり注意する必要がある。また、千葉大学真菌医学研究センターにて測定をおこなっている。

4) DNA、RNAの検出

一般化されていない。

5) その他

以前、Spherulinなどの皮内テスト液が市販されていたが、現在は製造中止となり、入手困難である。

2. *Histoplasma capsulatum*

1 検査方法

1) 同定方法

本菌も同定の手がかりとしては、流行地域への渡航歴がきわめて重要である。ヒストプラズマ症の流行地は、アメリカ合衆国ミシシッピー川流域南部（インディアナポリス、オハイオなど）、メキシコなどであるが、輸入真菌症としては流行地域が広く、東南アジア（特にタイ）やヨーロッパの一部、アフリカ（ズボアジ型）などにも認められる。渡航歴は入念に確認する必要があるが、これまでの報告では20%あまりの症例に海外渡航歴がなく、流行地域に行っていないとも油断できない。

- ・検体（培養）：喀、気管支肺泡洗浄液(BAL)、肺生検標本など
- ・菌の操作はいずれもバイオハザードキャビネット内で行なう。
- ・本属は*H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii*, *H. farciminosum* の3菌種からなり、いずれもヒストプラズマ症の原因菌となるが、*H. farciminosum* は家畜の真菌症の起因菌とであり、ヒトには感染しないとされる。ヒトのヒストプラズマ症の起因菌は*H. capsulatum* var. *capsulatum* と*H. capsulatum* var. *duboisii* であるが、これらは in vivo の寄生形態でのみ鑑別可能であり、in vitro においては形態学的識別は不可能である。
- ・二次培養法：1%デキストロース加BHI寒天培地を用いる。二形性真菌の一種である。巨大培養を作製するには、*C. immitis* の場合と同様に、シャーレのふたはビニールテープでしっかりと密封し、2-3個所の小さな孔を開けるのみとする。

a) *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*

- ・肉眼所見（図4）：発育は比較的遅くSDAにて27℃で14日後に直径14-29 mmに達するのみである。SDAやPDAでは最初、白色の粒状～綿毛状のコロニーであるが、やがて白色→黄褐色のコロニーを形成する。裏面は黄色あるいは黄味を帯びた色となる。酵母様集落の形成には1%デキストロース加BHIAで37℃にて培養する。
- ・顕微鏡所見（図5）：27℃では分生子柄の先端、あるいは菌糸側壁に大小二種類の分生子が形成される。SDAでは27℃で7日間程度を要する。大分生子（径7-25 μ m）は球状～西洋梨型、単細胞性で、壁が厚く、表面は最初平滑であるが、時間とともに表面に指状の突起が現れる。小分生子（径2-6 μ m）は球状～西洋梨型で単細胞性、無色、表面平滑～棘状。37℃では球

状～卵形の酵母様細胞（径2 - 5 μm ）が形成される。しばしば2個の酵母がペアになっているのが見られる。細胞内寄生菌であり、生体内ではマクロファージに食されるが、その中で増殖しつつ、むしろマクロファージを移動手段としてホスト内に広がっていく（図6）。

b) *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*

本菌によるヒストプラズマ症をズボアジ型（histoplasmosis duboisii）という。菌学的には*H. capsulatum* var. *capsulatum* と同一であり、感染組織内の寄生形態と組織反応の相違により区別される。本菌の感染組織内の酵母細胞は、大型で（直径8-15 μm ）かつ多数の巨細胞（giant cells）が炎症組織内に見られる点が、カプスラツム型との相違点である。

c) *Histoplasma farciminosum*

ファルシミノーズム型ヒストプラズマ症（histoplasmosis farciminosi）の起因菌で、ウマ、ロバなどの家畜のリンパ系を特異的に侵す。ヒトへの感染はないとされてきたが、最近ヒト感染の可能性も指摘されている。

- ・肉眼所見：発育は遅くSDA、27℃にて14日後に直径が8-11mm程度にしか達しない。初期は表面平滑で中心部がやや盛り上がっているが、次第にが形成される。1%デキストロース加BHIAで37℃で培養すると、クリーム状の酵母様集落を形成する。
- ・顕微鏡所見：27℃では通常分生子はほとんど形成されることが無い。1%デキストロース加BHIAで37℃で培養すると、酵母様細胞が形成されるが、これは*H. capsulatum* var. *capsulatum* と識別不能である。

2) 抗原検出

血清、尿、脳脊髄液などを対象として行なわれ、とくに全身播種型では比較的に有用とされる。米国Miravista Diagnostics社にて有償で施行している。我が国では現在行なわれていない。

3) 抗体検出

目標とする抗体の種類によりCF、LA、IDなど、種々の測定法で行なわれており、病態により使い分ける必要がある。米国の数社よりキットが販売されている。また、千葉大学真菌医学研究センターにても測定を行なっている。

4) DNA、RNAの検出
一般化されていない。

5) その他

以前、Histolynなどの皮内テスト液が市販されていたが、現在は製造中止となり、入手困難である。

3 .*Paracoccidioides brasiliensis*

1 検査方法

本菌は、他の輸入真菌と同様、一般的な培養法ですぐにそれとわかる形態学的特徴があるわけではなく、同定の手がかりとしては、流行地域への渡航歴がきわめて重要である。パラコクシジオイデス症の流行地は、中南米各地に広がっているが、とくにブラジル国サンパウロ周辺に多い。また、本症の場合、潜伏期間がきわめて長いことがあり、流行地域から離れて（帰国して）20年以上経過して発症する場合がある。渡航歴は以前にさかのぼって、入念に確認する。

1) 同定方法

- ・検体（培養）：皮膚粘膜病変、リンパ節などからの生検標本、喀 咳、気管支肺胞洗浄液(BAL)、肺生検標本など
- ・菌の操作はいずれもバイオハザードキャビネット内で行なう。
- ・二次培養法：1%デキストロース加BHI寒天培地を用いる。二形性真菌の一種である。*C. immitis* の場合と同様に、巨大培養の作製にはシャーレのふたはビニールテープでしっかりと密封し、2-3個所の小さな孔を開けるのみとする。
- ・肉眼所見（図7）：27℃では発育は遅く、SDAにて4週間で5-19mm程度に過ぎない。SDAあるいはPDAで培養すると、羊毛～綿花状で、次第に褐色を帯びたコロニーとなる。中央に亀裂が生じ、噴火口のようにめくれ上がることが多い。裏面は黄褐色～褐色である。1%デキストロース加BHIAで37℃で培養すると、白色から淡黄色のヒダの多い乾燥した酵母様集落となる。この状態では*B. dermatitidis* の酵母様集落と鑑別不能である。
- ・顕微鏡所見（図8）：27℃では分生子はほとんど形成されない。有隔性の細い菌糸と厚膜孢子（chlamydospores）が認められる。温度を上げると（35℃）厚膜孢子や菌糸壁から直接出芽により酵母様細胞が形成されるようになる。1%デキストロース加BHI寒天培地で37℃で培養すると、短菌糸と酵母様細胞（径4-15μm）が形成される。通常酵母様細胞に変換するのに10-20日程度を要する。この酵母様細胞からは、一つの母細胞が同時に多数の娘細胞を出芽し、船の操舵輪の様に見えるのが特徴である（多極性出芽）（multiple budding）。

2) 抗原検出

行なわれていない。

3) 抗体検出

米国などで一般に用いられているキットは、偽陽性が多く、診断的意義は低い。特異性の向上を図った抗体検出は研究室レベルで行われているが、まだ、一般的ではない。

4) DNA、RNAの検出
一般化されていない。

5) その他

本症は、皮膚、粘膜など体表面に病変が現れる場合が多いこと、慢性で、進行が緩徐であることなどより、生検による病理学的あるいは菌学的診断法により多くが診断可能であり、相対的に血清診断法の必要性は低い。

真菌培養に使用する培地

- ・ サブロー寒天培地 Sabouraud Dextrose Agar (SDA) 培地
市販されているが（生培地とも）、下記のように作成も可能。

グルコース (20-)40g
ペプトン 10g
寒天 (15-) 20 g
蒸留水 1,000 ml
121℃15分オートクレーブ

- ・ 1%デキストロース加BHIA培地 (Brain Heart Infusion Agar 培地)

BHI 培地 (市販) 1,000ml
グルコース 10g
オートクレーブ
二形性真菌の酵母形への変換に有用

- ・ ポテトデキストロース寒天培地 (PDA 培地)

市販品を用いるのが簡便である

文献

1 菌学

- ・ 宮治 誠、西村和子：医真菌学辞典 第2版 協和企画通信.
- ・ 宮治 誠、西村和子、宇野潤：病原真菌 同定法と感受性試験 廣川書店.
- ・ 宮治 誠、亀井克彦：二形性真菌. 臨床と微生物 21(5):532- 537、1994 .
- ・ 宮治誠：輸入真菌症. 検査と技術 25(6):506-511, 1997.
- ・ 宮治誠：輸入真菌症. 臨床検査 42(11):1479, 1998.

2 血清検査

- ・ Kaufman L, Sekhon AS, Moledina M, Jalbert M, Pappagianis D. Comparative evaluation of commercial premier EIA and microimmunodilution and complement fixation tests for *Coccidioides immitis* antibodies. J Clin Microbiol 33(3): 618, 1995.
- ・ Johnson S, Zimmermann C , et al.. Use of a recombinant *Coccidioides immitis* complement fixation antigen-chitinase in conventional serological assays. J Clin Microbiol 34(12): 3160-4, 1996.

- ・ Pappagianis D. Serologic studies in coccidioidomycosis. Semin Respir Infect 16(4): 242-50, 2001.

3 疫学、発生動向

- ・ Fujio J, Nishimura K, Miyaji M : Epidemiology survey of the imported mycoses in Japan. Jpn J Med Mycol 40:103-109, 1999.
- ・ 亀井克彦：輸入真菌症の発生動向調査. 平成12年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）輸入真菌症など真菌症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究 研究報告書 pp.36-44, 2000.
- ・ Kamei K, Sano A, Kikuchi K, Makimura K, Niimi M, Suzuki K, Uehara Y, Okabe N, Nishimura K, Miyaji M : The trend of imported mycoses in Japan J Infect Chemother 9 (1) :16-20, 2003.

検査依頼先

千葉大学真菌医学研究センター（〒260-8673 千葉市中央区亥鼻1－8－1 電話：043-222-7171 内線5911、ファックス 043-226-2491）

執筆者

千葉大学真菌医学研究センター 亀井克彦

電話：043-222-7171 内線5911

電子メール：k.kamei@faculty.chiba-u.jp

図表説明

図 1 : *C. immitis* の巨大集落 (giant colony)。肉眼的な特徴に乏しく、注意が必要である。

図 2 : *C. immitis* の分節型分生子。吸入により容易に感染するため、取り扱いには細心の注意を要する (ラクトフェノールコットンブルー標本)。

図 3 : 感染したホストの肺内にみられる *C. immitis* の球状体。中には内生孢子が充満している。

図 4 : *H. capsulatum* (菌糸形) の分生子。大分生子は突起を持ち特徴的である。

図 5 : *H. capsulatum* の巨大集落 (SDA、27℃、21日間培養)。

図 6 : マクロファージ内で増殖する *H. capsulatum*。 *H. capsulatum* はマクロに食されたあとでも、細胞内で増殖を続けながら広がっていく (x400。Diff Quik染色)。

図 7 : *P. brasiliensis* の巨大集落。中央に亀裂が形成され、噴火口様の形状を呈している (PDA、室温にて2ヶ月培養)。

図 8 : 多極性出芽で増殖する特徴的な酵母形の *P. brasiliensis* (x400、ラクトフェノールコットンブルー標本)

表 1 : 真菌の危険度分類

危険度	該当する真菌
レベル 1	レベル 2 および 3 以外の菌
レベル 2	<i>Aspergillus fumigatus</i> 、 <i>Candida albicans</i> 、 <i>Cladosporium carrionii</i> 、 <i>Cladosporium trichoides</i> (<i>C. bantianum</i>)、 <i>Cryptococcus neoformans</i> 、 <i>Exophiala dermatitidis</i> 、 <i>Fonsecaea pedrosoi</i> 、 <i>Sporothrix schenkii</i>
レベル 3	<i>Blastomyces dermatitidis</i> 、 <i>Coccidioides immitis</i> 、 <i>Histoplasma capsulatum</i> 、 <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> 、 <i>Histoplasma farciminosum</i> 、 <i>Penicillium marneffe</i>

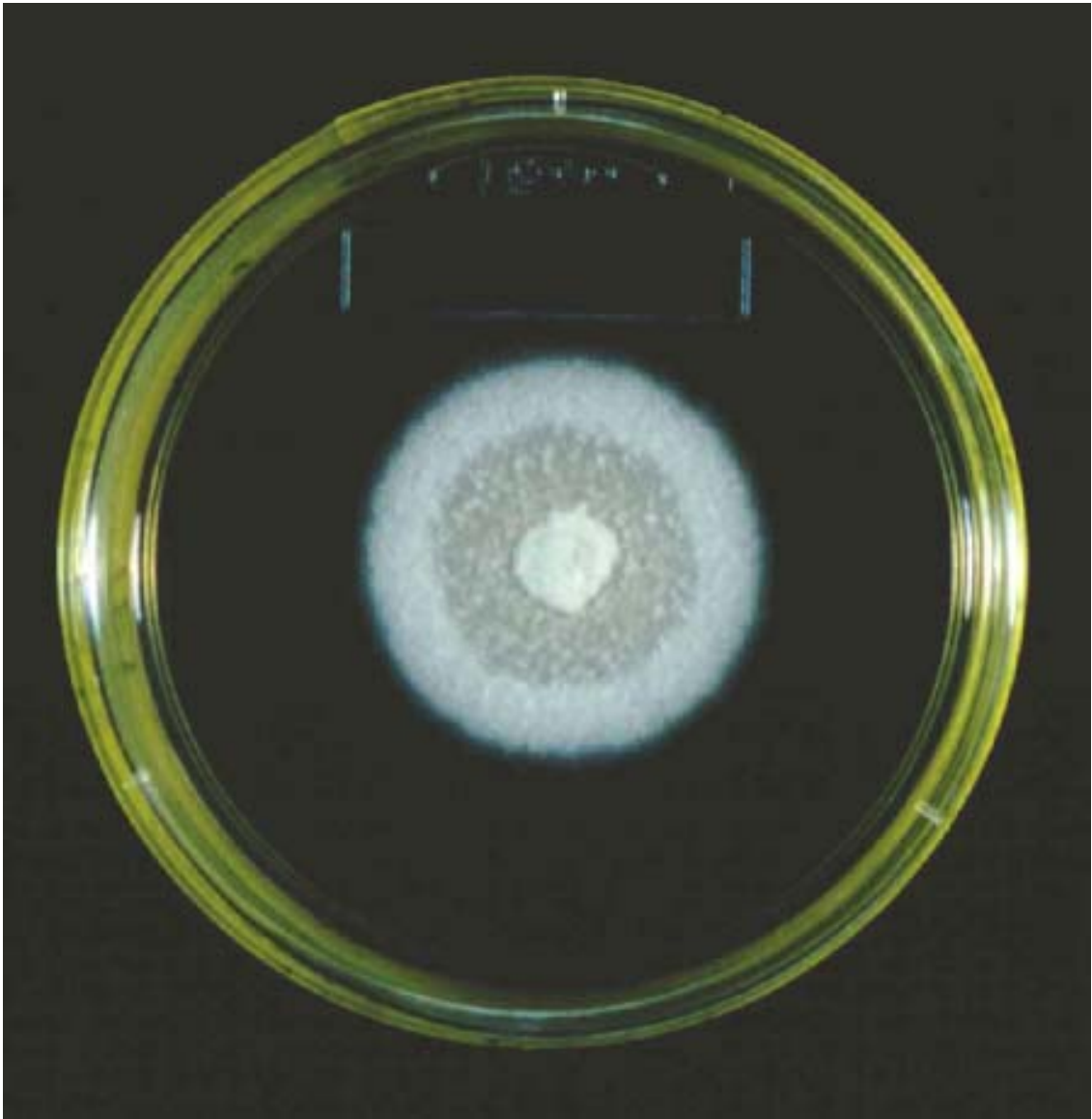


图 1

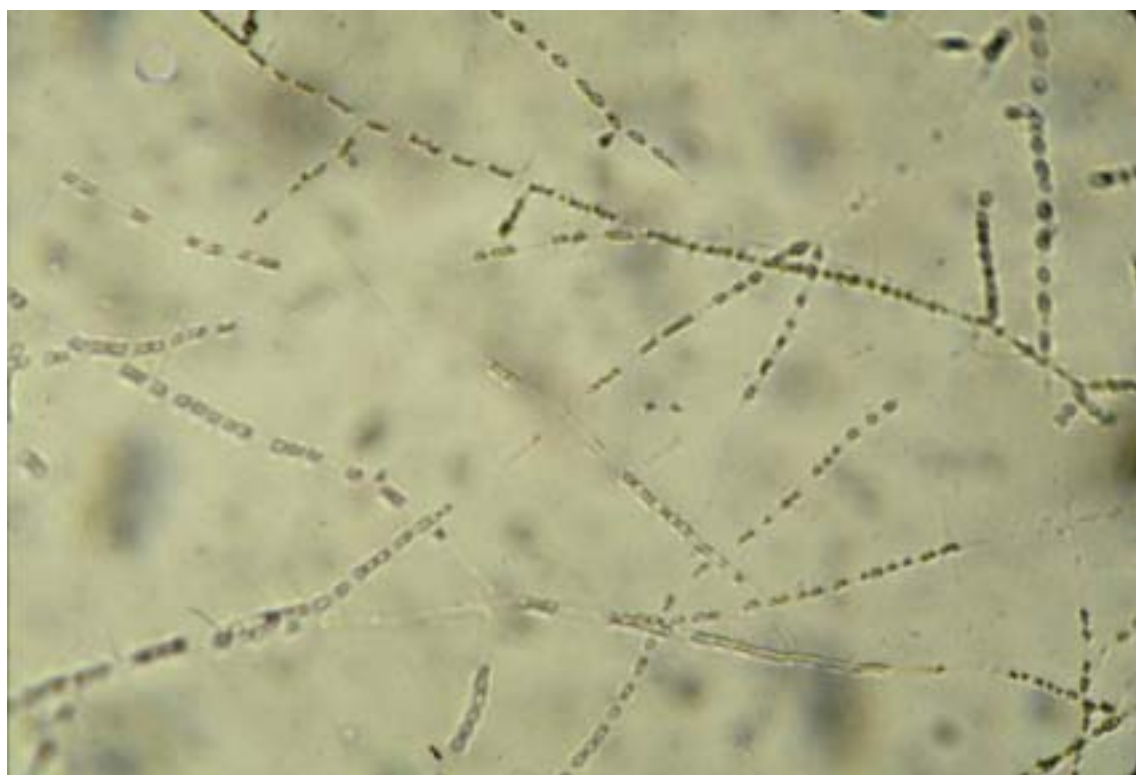


图 2

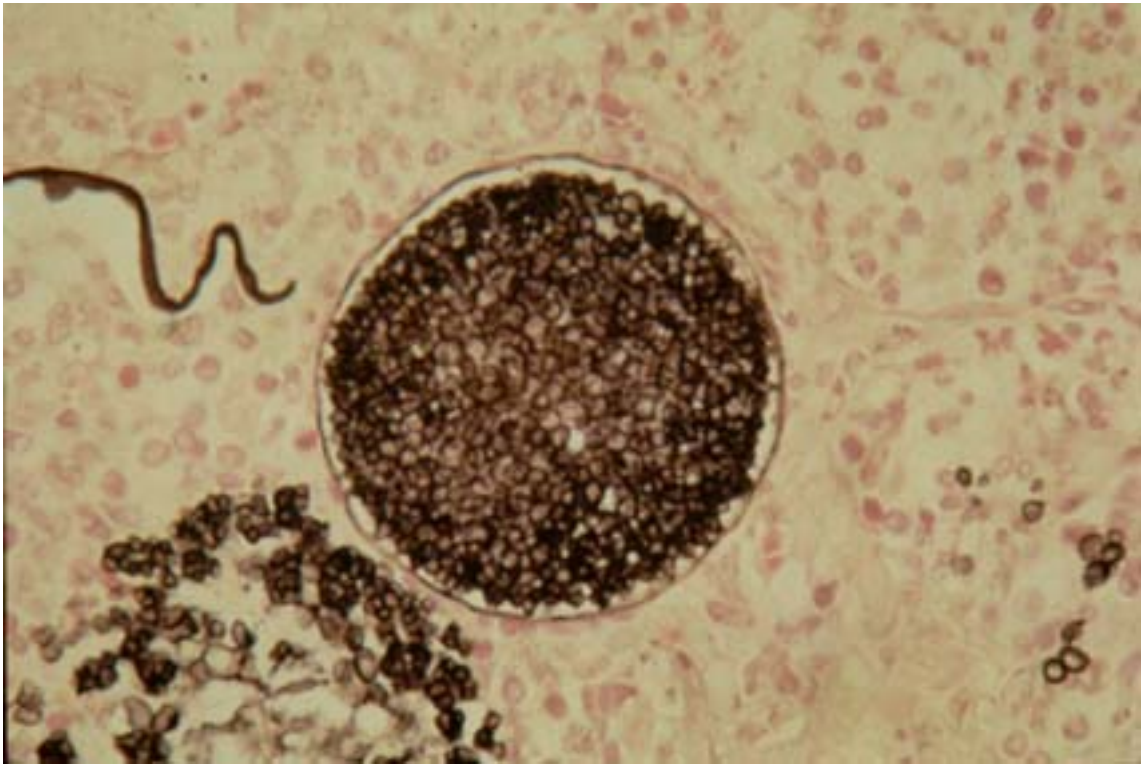


图 3

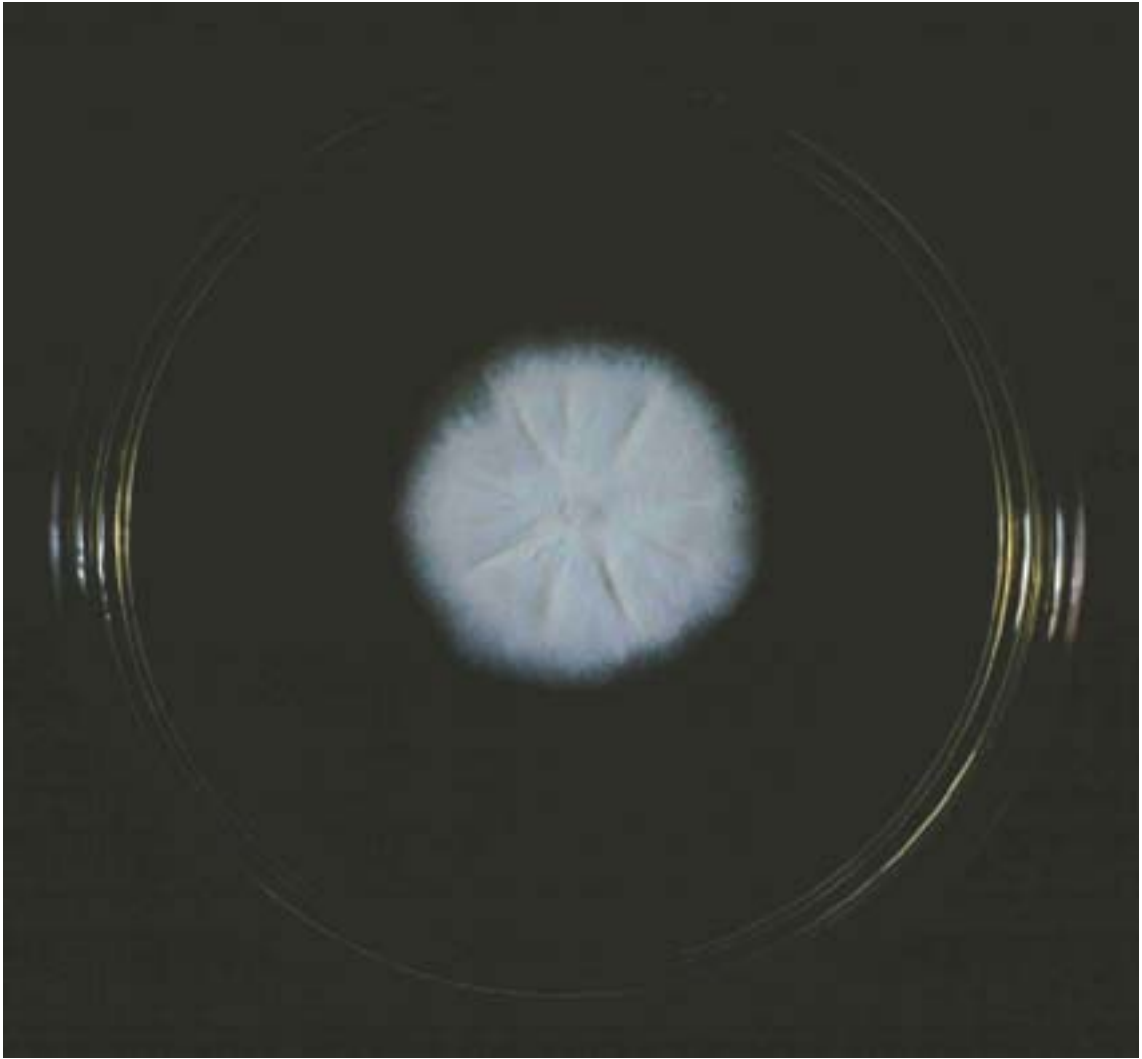


图 4

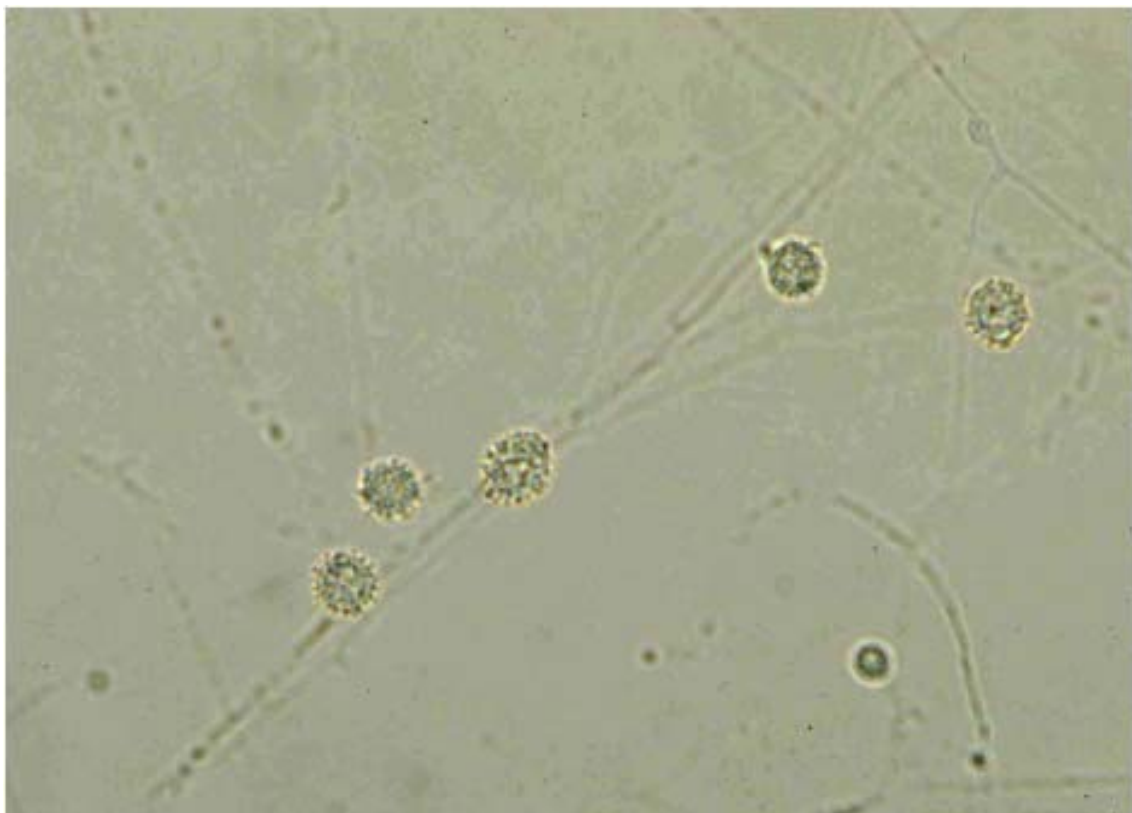


图 5

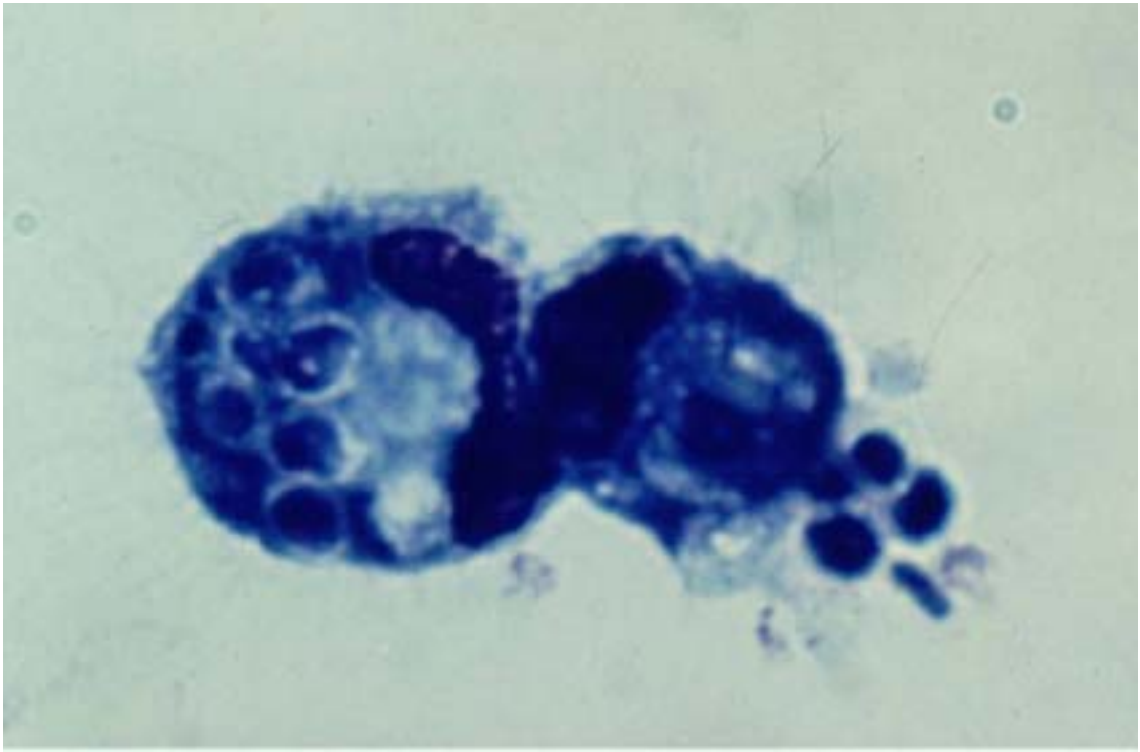


图 6

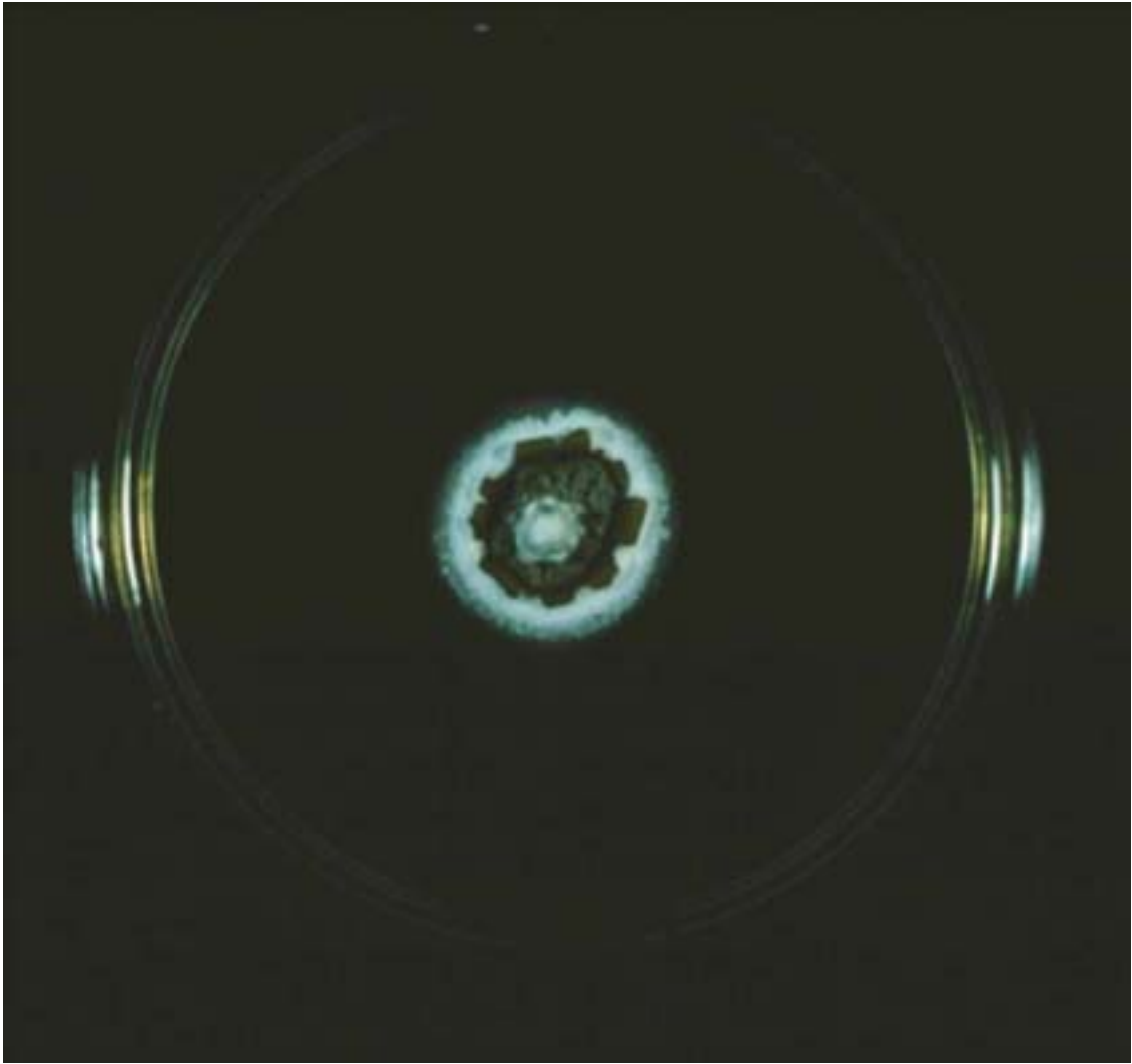


图 7

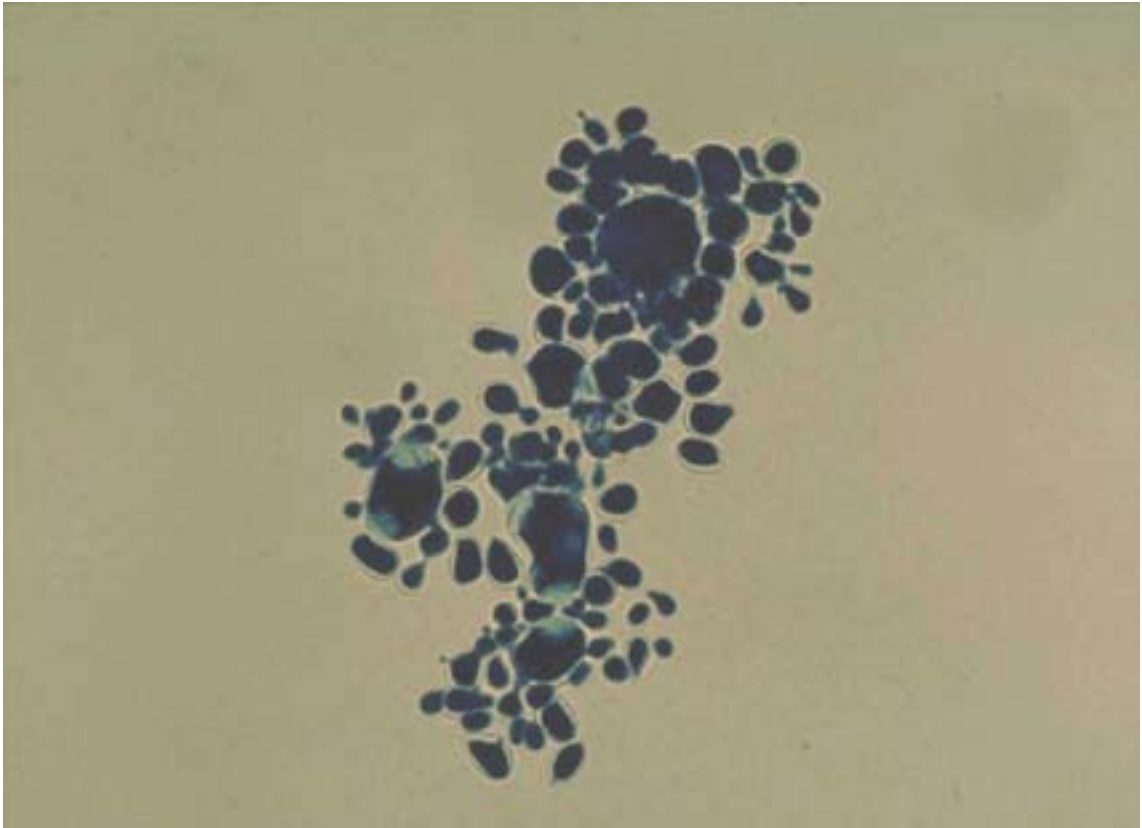


图 8

腎症候性出血熱

(hemorrhagic fever with renal syndrom ; HFRS)

腎症候性出血熱 (hemorrhagic fever with renal syndrom; HFRS) 診断マニュアル

平成 14 年 2 月

目次

HFRS の概説

HFRS 検査に関する注意事項

検体の採取・輸送

病原学的検査

1. ウイルス分離法
2. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

血清学的検査

1. 間接蛍光抗体法

腎症候性出血熱 (HFRS) の診断基準

引用文献

緊急時連絡先

HFRS の概説

腎症候性出血熱 (hemorrhagic fever with renal syndrom; HFRS) は、ハンタウイルスによって引き起こされる高熱, 出血傾向, 腎機能障害等を主徴とする人獣共通感染症である (1). 本ウイルスはハンタウイルス科のハンタウイルスに分類され, 3分節の(-)鎖 RNA をゲノムとして持つ (2, 3). HFRS ウイルスの血清型もしくは遺伝子型はこれまでに 4 型が報告されており, それらの宿主動物と同疾患の症状の重篤度は強く相関する. 重篤度の順にハンタン型(死亡率 5~10%, セスジネズミ (*Apodemus agrarius*)), ドブラバ型 (5~10%, キクビアカネズミ(*Apodemus flavicollis*)とセスジアカネズミ (*Apodemus agrarius*)), ソウル型(1% 程度, ドブネズミ(*Rattus norvegicus*)とクマネズミ (*Rattus rattus*))およびプーマラ型(1% 以下, ヤチネズミ(*Clethrionomys glareolus*))とされている (表 1)(ハンタウイルス肺症候群 (HSP)を引き起こす Sin Nombre Group については別項を参照)(4). 感染げっ歯類は無症状に持続感染し尿や糞便中にウイルスを排出する. 通常, 人はウイルスを含む粉塵を吸い込むことによって経気道感染するが, 人から人への水平感染は報告されていない. 流行地は中国, 韓国, ロシアやヨーロッパ各地であり, 日本国内では 1960 年代に大阪梅田駅周辺でドブネズミが感染源と疑われる流行が発生し(119 症例中 2 例が死亡, 梅田熱として知られる) (5), 1970 年代から 1984 年まで大学や研究機関の実験動物施設で, 実験用ラットを介した流行が散発的に発生した(126 症例中 1 例が死亡) (6). 現在, 我が国ではハンタウイルスのスクリーニング法の確立により, 感染動物を摘発淘汰することにより, 患者の発生はない. しかし近年, 海外の流行地への海外旅行客の増加に伴い, 輸入感染症として監視を強化する必要がある. HFRS の臨床診断に有効な所見として, ①急激な発熱と 3~7 日間の高熱の稽留, その後の解熱, ②タンパク尿(第 6 病日頃がピーク), ③白血球減少(第 3 病日)の後増加(第 6 病日), ④血清 GOT, GPT, LDH, CPK 値の上昇, ⑤点状出血(上口蓋粘膜, 軀幹部)などが挙げられる (7). HFRS 発症時, ウイルスに対する抗体価は通常上昇しているため, 確定診断はウイルスに対する抗体の検出(及びペア血清での抗体価の上昇)により行う. また, ウイルス分離や Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)によるウイルス遺伝子の検出も実験室診断として補助的に行われることがある. 治療法は抗ウイルス剤のリバビリンの有効性が試験的に検討されているが(8), 実際には対症療法による治療が行われている. 予防法としてはネズミの駆除や環境の衛生的整備が重要である. 中国や韓国では不活化ワクチンが製造され実用化されているが我が国では認可されたワクチンはない.

HFRS 検査に関する注意事項

HFRS のウイルス学的検査は、国立感染症研究所(村山分室)ウイルス第 1 部外来性ウイルス室において可能である。本検査は「国立感染症研究所病原体等安全管理規定」に基づいて行われる。

検体の採取・輸送

1. 検体:HFRS の実験室診断のための検体には、血清および剖検例での各種臓器が利用できる。HFRS の病原学的検査にはウイルス分離、ウイルス抗原・ゲノムの検出がある。これらの検査には患者血清を採取し検査に供する。HFRS が疑われた患者から採取された血液は、採取翌日までに当研究室に届けることが可能であれば、血清分離することなく冷蔵のまま当研究室に輸送してもかまわない。しかし、可能であれば、血清分離を行った上で、ドライアイス詰めにして当研究室に輸送することが望ましい。輸送の際は、検体が包装外部に漏れないよう厳重に包装する。血清の保存が必要な場合は、 -80°C で保存する。血清学的な確定診断には、急性期と回復期(発症 2 週間以降)に採取されたペア血清の抗体検査を同時に行う必要がある。剖検例では、腎臓組織等が病原学的検査に用いられる。
2. 検体の輸送 :当研究室に検査を依頼する場合には、郵政省告示第 618 号(平成 9 年 12 月 4 日)に基づき、検体が外部にもれないように包装のうえ、感染性物質であることを明示して輸送する。当研究室に持参する場合は、国立感染症研究所の「感染性材料(病原体等及び診断用のヒトあるいは動物の検体)の輸送に関するマニュアル(持参の場合)」(問い合わせ先:国立感染症研究所 業務課 TEL: 03-5285-1111)に従う。
3. 検体の情報 :検体を当研究室に送付するときには、以下の情報を検体とともに、または、前もって連絡する。

氏名、年齢、性別、国籍、職業、臨床症状、検体の採取された日時および発症からの日数、海外渡航歴、ネズミとの接触の有無、その他

病原学的検査

1. ウイルス分離法:

Vero E6 細胞を用いてウイルス分離検査を行う. 通常ウイルス分離には数週間の培養が必要である.

A) 試薬・機材

- ① Vero E6 細胞
- ② CO₂ 培養器(37℃)
- ③ D-MEM (ダルベッコ変法 MEM)
- ④ ウシ胎児血清(FBS, 56℃30 分非働化済のもの)
- ⑤ リン酸緩衝液(PBS)
- ⑥ 組織培養用フラスコ(25 cm², できればベンチレーションキャップ付)
- ⑦ 組織培養用ペニシリン・ストレプトマイシン(Gibco-BRL 社)
- ⑧ 遠心管
- ⑨ 抗ハンタウイルス抗体(血清)(例えば国立感染症研究所ウイルス第1部で作製した抗ハンタウイルス・ウサギ血清)
- ⑩ 遠心機

B) 検査方法

- ① Vero E6 細胞の単層を, PBS で洗淨する.
- ② 無菌的に採取された患者血清を 2%ウシ胎児血清含有 D-MEM(維持培地)で 10 倍希釈し, 細胞に接種する. 雑菌の混入が考えられる検体の場合は, 通常使用量の 5 倍のペニシリン・ストレプトマイシンを加え, 3,000 回転で 20 分間遠心した上清を用いる.
- ③ 37℃1 時間吸着させる.
- ④ 被験液を取り除き, 維持培地を用いて細胞を培養する.
- ⑤ 一部の細胞を 1〜2 週間, 盲目継代(blind passage)する. また, 残りの細胞は, 間接蛍光抗体法によるハンタウイルス抗原の検査, 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応用に供する.

2. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) :

ウイルスゲノムの検出のための RT-PCR には One-step RT-PCR 法を採用している. RT-PCR 法のためのプライマーには Arther ら (9) によって報告されたハンタウイルス共通の次のプライマーセットを用いる.

GS4 5' - G A I I G I T G T C C A C C A A C A T G - 3'

GS6 5' - A G C T C I G G A T C C A T I T C A T C - 3'

検体としては、血清や組織が用いられるが、非働化した検体では増幅効率が著しく低下する.

A) 試薬・機材

- ① High Pure™ Viral RNA Kit (Roche Diagnostics)
- ② マイクロ遠心機
- ③ Titan™ One Tube RT-PCR System (Roche Diagnostics) または Ready-to-Go RT-PCR (Pharmacia Biochemica)
- ④ DEPC 処理済純水 (ニッポンジーン)
- ⑤ サーマルサイクラー
- ⑥ サーマルサイクラー用マイクロチューブ
- ⑦ 核酸電気泳動用 2% アガロースゲル
- ⑧ DNA 分子量マーカー (100bp ラダーもしくは 200-600 塩基の間を同定できるもの)
- ⑨ アガロースゲル電気泳動槽

以下のものは検体が組織の場合に必要となる.

- ⑩ RNA-Bee™ (TEL-TEST, コスモバイオ社取扱)
- ⑪ ホモジナイザー (1.5ml のプラスチックチューブとそれにあつたプラスチック製ディスク ポーザブルペステルが市販されている)
- ⑫ クロロフォルム
- ⑬ 2-プロパノール
- ⑭ 70% エタノール

B) 検査方法

- ① 血清からウイルス RNA を High Pure™ Viral RNA Kit を用いて抽出する. 血清 200μl から 50μl の精製 RNA 液を得ることができる. 検体が組織の場合, RNA を RNA-Bee™ にて抽出する. 方法はキットの取り扱い説明書を参照のこと. 必ず正

常血清等の陰性コントロールを置く.

- ② Ready-to-Go RT-PCR (Pharmacia Biochemica)を用いる場合, プライマーをそれぞれ 50 pmole/tube, 精製 RNA 5 μ l を加え, さらに DEPC 処理済純水を最終量が 50 μ l となるように加える.
- ③ RT-PCR を以下の条件で実施する.
- | | | |
|------|------|---------|
| 42°C | 30 分 | |
| 94°C | 5 分 | |
| 94°C | 30 秒 | 35 サイクル |
| 50°C | 30 秒 | |
| 72°C | 60 秒 | |
- ④ RT-PCR 産物をアガロースゲル(1.5-2.0%)電気泳動して, エチジウムブロマイド染色により増幅された DNA 産物(283-base pair)を確認する.

血清学的検査

1. 間接蛍光抗体法:

ハンタウイルス感染 Vero E6 細胞を用いた間接蛍光抗体法が HFRS 患者の血清学的診断に有用である. 急性期と回復期(発症 2 週目以降)のペア血清を同時に検査することが望ましい. また, 被験血清を非働化(56°C, 30 分)処理してから検査に供する.

A) 試薬・機材

- ① Vero E6 およびハンタウイルス感染 Vero E6 細胞(通常 Hantaan ウイルスの 76-118 株又は Seoul ウイルスの SR-11 株感染 Vero E6 細胞を用いる)
- ② D-MEM
- ③ リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)
- ④ 細胞消化用トリプシン・EDTA 液 (0.25%トリプシン-0.02%EDTA 加 PBS)
- ⑤ 蛍光抗体検査用スライドグラス (14 ウェル, Air Brown 社)
- ⑥ FITC 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体(Zymed 社)
- ⑦ 10%グリセリン加 PBS
- ⑧ カバーグラス

⑨ 蛍光顕微鏡

⑩ アセトン

B) 検査方法

- ① 細胞をPBSで洗浄し、トリプシン処理により細胞を回収する。更に細胞をPBSで洗浄後、ハンタウイルス感染細胞と非感染細胞 1:1 の割合で混ぜ、 3×10^6 cells/ml となるようにPBSに浮遊する。
- ② 蛍光抗体検査用スライドガラスの各ウェルに細胞浮遊液を10 μ l ずつ分配し、完全に乾燥させる。乾燥したら100%アセトン中で5分間固定する。ここまでの過程は、BSL3実験室の安全キャビネット内で行う。アセトンを蒸発させた後-80℃に保管することができる。
- ③ PBSで20倍から2倍段階希釈した非働化(56℃, 30分間)被験血清を各ウェルにのせ、37℃, 1時間反応させる。被験血清と同時に抗体陽性コントロール血清を同時に検査する。
- ④ PBSでスライドガラスを洗浄し、PBSで70倍希釈されたFITC標識ヒツジ抗ヒトIgG抗体を各ウェルにのせ、37℃ 1時間反応させる。
- ⑤ PBSでスライドガラスを洗浄後、10%グリセリン加PBSを用いて封入する。
- ⑥ 蛍光顕微鏡でFITCシグナルを検鏡する。特徴的な染色パターンが認められれば抗体陽性と判定し、抗体陽性を示した最高希釈倍率の逆数を蛍光抗体法によるハンタウイルス抗体価とする。

腎症候性出血熱 (HFRS) の診断基準

次のいずれかが満たされた場合、「腎症候性出血熱 (HFRS)」とする。

- 被験検体からハンタウイルスが分離された。
- 被験検体からRT-PCR法でハンタウイルスゲノムが検出された。
- 間接蛍光抗体法で判定された急性期と回復期に採取されたペア血清のハンタウイルスに対する抗体価が有意(4倍以上)に上昇した。

引用文献

1. World Health Organization: Hemorrhagic fever with renal syndrome: memorandum from a WHO. Bull WHO 61:269-275,1983.
2. McCormic, J.B., Sasso, D.R., Palmer, E.L., and Kiley, M.D. Morphological identification of the agent of Korean hemorrhagic fever (Hantaan virus) as a member of the Bunyavirus. Lancet 1: 765-768, 1982.
3. Schumaljohn, C.S., Hasty, S.E., Harrison, S.A., and Dalrymple, J.M. Characterization of Hantaan virions, the prototype virus of hemorrhagic fever with renal syndrome. J.Infect. Dis. 148: 1005-1012, 1983.
4. Kruger, D. H., Ulrich, R., and Lundkvist, A.: Hantanvirus infection and their prevention. Microbes and Infection 3: 1129-1144. 2001.
5. Lee, H.W., Lee, P.W., Tamura, M., Tamura, T., and Okuno, Y. Etiological relation between Korean hemorrhagic fever and epidemic hemorrhagic fever in Japan. Biken J. 22: 41-45, 1979.
6. Kawamata, J., Yamamoto, T., Dohmae, K., Miyamoto, H., Takahashi, K., Kurata, T., and Lee, H.W. Control of laboratory acquired hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Japan. Lab. Anim. Sci. 37: 431-436, 1987.
7. 荻和宏明, 水谷哲也, 高島郁夫. 腎症候性出血熱. 最新医学 54: 1425-1431. 1999.
8. Huggins, J.W., Kim, G.R., Brand, O.M., and Mckee, K.T. Ribavirin therapy for Hantaan virus infection in suckling mice, J. Infect. Dis. 153: 489-497, 1986.
9. Arthur, R.R., Lofts, R.S., Gomez, J., Glass, G.W., and Childs, J.E. Grouping of Hantaviruses by small (S) genome segment polymerase chain reaction and amplification of viral RNA from wild-caught rats. Am. J. Trop. Med. Hyg. 47: 210-224, 1992.

緊急時連絡先

国立感染症研究所ウイルス第 1 部

部長 倉根一郎

TEL: 03-5285-1111 / (home) 03-3465-1570

FAX: 03-5285-1169

e-mail: kurane@nih.go.jp

国立感染症研究所村山分室ウイルス第 1 部外来性ウイルス室

室長 森川 茂

TEL: 042-561-0771 (内線 791) / (home) 042-378-2864

FAX: 042-564-4881

e-mail: morikawa@nih.go.jp

髓 膜 炎 菌

髄膜炎菌 *N. meningitidis* 検査マニュアル

(一部 淋菌 *N. gonorrhoeae* を含む)

目次

解説編

概説

I. 疫学情報

1. 世界的疫学状況
 - 1) 血清群別発生状況
 - 2) 地域別発生状況
2. 国内疫学状況

II. 髄膜炎菌性髄膜炎の臨床症状

III. 病原性 *Neisseria* 属菌の特徴

1. *Neisseria* 属菌の特徴
2. 髄膜炎菌の特徴
3. 淋菌の特徴

IV. 作業上の一般的注意

1. 安全管理
2. 髄液の採取
3. 病原性 *Neisseria* の取り扱い
 - 1) 釣菌、培養
 - 2) 鑑別
 - 3) 保存
4. 検査に要する日数

V. 試薬と器材

1. 試薬
 - 1) グラム染色用試薬
 - 2) 抗原検出用試薬
 - 3) 輸送培地
 - (1) Transgrow 培地
 - (2) Trans-Isolate 培地
 - (3) 変法 Stuart 培地
 - 4) 増菌培地
 - 5) 二層培地
 - 6) 分離継代培地
 - (1) チョコレート寒天培地
 - (2) 血液寒天培地
 - (3) Kellogg 寒天培地
 - 7) 選択培地
 - (1) Modified Thayer-Martin 培地
 - (2) New York City 培地
 - 8) 生化学的性状確認培地
 - (1) Cystine Trypticase agar 培地
 - (2) 硝酸塩・亜硝酸塩還元試験用培地
 - (3) 食塩無添加普通寒天培地
 - (4) シュークロース加寒天培地
 - (5) DNA 分解酵素産生性試験用培地

- 9) オキシダーゼ試験用試薬
- 10) カタラーゼ試験用試薬およびスーパーオクソール試験用試薬
- 11) 血清群別用抗血清
- 12) 酵素活性検出試薬
- 13) 分子遺伝学的手法用試薬・
- 14) ペニシリン分解酵素産生性試験用試薬
- 2. 器材・
 - 1) 検体の輸送
 - 2) 培養
 - 3) 菌株の保存

VI. 分離同定

- 1. 推定
 - 1) 髄液の染色
 - 2) 膣・子宮頸管分泌物、尿道分泌物
 - 3) 抗原検出
- 2. 菌の分離
 - 1) 分離の対象となる検体・
 - 2) 髄液からの分離
 - 3) 血液からの分離
 - 4) 髄液、血液以外の検体からの分離
- 3. 鑑別・同定
 - 1) オキシダーゼ試験およびグラム染色
 - 2) カタラーゼ試験およびスーパーオクソール試験
 - 3) 糖からの酸産生性
 - 4) 硝酸塩・亜硝酸塩還元性
 - 5) 各種培地での発育
 - 6) シュークロースからの多糖体産生性
 - 7) DNA 分解酵素産生性
 - 8) 酵素プロファイルによる鑑別・同定
 - 9) ペニシリン分解酵素産生性試験
 - 10) 同定用キットによる鑑別
- 4. 髄液からの PCR 法による検出
- 5. 淋菌の分子遺伝学的手法による検出
- 6. 血清型別
 - 1) 血清群
 - 2) typing および subtyping
- 7. Multilocus enzyme electrophoresis および Multilocus sequence typing
- 8. 栄養要求型

VII. 検体の輸送方法

- 1. 髄液および血液等の送付方法
 - 1) 髄液の輸送方法
 - 2) 血液の輸送方法
 - 3) その他の臨床検体の輸送方法
- 2. 菌株の送付方法
 - 1) 培養菌
 - 2) 保存菌株

VIII. 菌株の保存方法

1. 一時的保存
2. 短期保存
 - 1) 綿棒保存
 - 2) 簡易保存法
3. 長期保存
 - 1) ゼラチン・ディスク法
 - (1) ゼラチン・ディスク法用試薬
 - (2) 必要な器材
 - (3) ディスクの調製法
 - (4) ディスクの溶解
 - (5) 保存期間
 - 3) 凍結保存法
 - 4) 凍結乾燥法

IX. 感染症発生動向調査事業における検査の進め方

1. 検体を受領する場合
2. 菌株を受領する場合

X. 文献

実技編

I. 検査の流れ

II. 検体の採取、検査手技

1. 髄液、皮膚穿刺液、関節腔液
2. 血液
3. 喀痰
4. (鼻) 咽頭粘液
5. 膣・子宮頸管分泌物
6. 尿道分泌物
7. 直腸粘液・

III. 菌の分離、同定・鑑別

1. 分離菌の同定・鑑別作業日程の目安
2. 釣菌
3. グラム染色
4. オキシダーゼ試験
5. カタラーゼ試験、スーパーオクソール試験
6. 糖からの酸産生性
7. 硝酸塩・亜硝酸塩還元性
8. 多糖体産生性試験
9. 各種培地での発育性
10. DNA 分解酵素産生性試験
11. 群別用血清凝集反応

概説

髄膜炎菌はグラム陰性球菌ナisseria科に属する菌として分類される。髄膜炎菌は人にのみ感染し、人の鼻咽頭に定着してくしゃみ等の飛沫感染を介して人から人へ伝播する。化膿性髄膜炎の起炎菌としては髄膜炎菌の他にインフルエンザ菌、肺炎球菌、大腸菌 K-1 株などがあるが、流行性の髄膜炎を起こすのは髄膜炎菌のみであるため、髄膜炎菌性髄膜炎は流行性髄膜炎とも呼ばれる。

I 疫学情報

1. 世界的疫学状況

世界では髄膜炎菌に因る症例は毎年 30 万人に上り、その 10%にあたる 3 万人もの人々が命を落としている²⁾。髄膜炎菌は莢膜多糖体の種類によって少なくとも 13 種類 (A, B, C, D, X, Y, Z, E, W-135, H, I, K, L) の血清群 (Serogroup) に分類されているが、髄膜炎菌性髄膜炎の起炎菌としては A, B, C, Y, W-135 群が認められている。その中でも A, B, C 群の髄膜炎菌が大規模の髄膜炎菌性髄膜炎の起炎菌として比較的多く認められる。

1) 血清群別発生状況

A 群髄膜炎菌による流行は歴史的に見ても髄膜炎ベルト (meningitis belt) と呼ばれる、降雨量が毎年 300mm から 1000mm である赤道北部のアフリカ諸国に最も多く認められる。今までの大規模な流行としては Rwanda (1978)、Sudan、Ethiopia (1988-89)、Kenya、Burundi (1989-92)、Burkina Faso (1996-97)、Nigeria (1996) が挙げられる。アフリカ以外では Finland (1973)、Brazil (1974)、Mongolia (1973)、Nepal (1983) で流行が起こっている。その発生率は先進国では 10 万人あたり 15 人以下と低いが、発展途上国では 1000 人あたり 1 人と異常に高く、2 歳以下の乳幼児に至っては 100 人あたりに 1 人となり、全体的に人口の 1%に相当する人々が罹患していると推測されている。一般的に小規模な髄膜炎菌性髄膜炎の流行に際しては乳幼児が感染の危険率が最も高いが、大規模なものになると乳幼児はもちろん 10-20 代の若年層まで感染する可能性が高くなる。

B 群髄膜炎菌による流行は主として 1970 年代の Norway、Finland 等の北ヨーロッパ諸国で大規模な流行が起こっている。それ以降はヨーロッパや北米といった先進国の地域で小規模な流行が散発的に起こることが多く、罹患率は 10-50 人/10 万人と A 群に比べると低い。

C 群はヨーロッパや南北アメリカ、アフリカの一部で散発的で小規模な発生を引き起こす起炎菌としてよく認められる。その罹患率は B 群同様 A 群のものよりは低いが、1979 年の Burkina Faso の流行では 10 万人あたりの罹患率が 500 人を超え、決して病原性の低い血清群ではない。

2) 地域別発生状況

アフリカでは髄膜炎ベルトで流行性髄膜炎が頻繁に発生するが、そのほとんどが A 群髄膜炎菌に因るものである。小規模な流行は毎年乾期において発生しており、大規模な流行は過去 50 年間においては 8 年から 12 年ごとに周期的に起こっている。1970 年から 1992 年にまでの統計においては、約 80 万人の患者が発生したと推定されている。

ヨーロッパでは 1970 年代に Norway、Finland で B 群髄膜炎菌による髄膜炎菌性髄膜炎が大流行した。1980 年以降においても各地で B 群及び C 群髄膜炎菌による小規模な流行が散発的に起こっている。記憶に新しいところでは 1998 年に英国で大発生した C 群髄膜炎菌性髄膜炎の流行が挙げられるが、その時には 1530 名もの患者が発生し、子供や若い世代を中心に 150 名もの死亡者が出たと報告されている。

1990 年代前半までは、アラブ諸国での発生率は高く、Iraq、Pakistan や Egypt では各国で約 5000 人/年、次いで Iran、Saudi Arabia で約 500 人/年の患者が見られていた。それ以降は WHO が中心となってハイリスクな血清群のワクチンの予防接種を強力に進めているため、髄膜炎菌性髄膜炎の流行は激減してきている。しかし、この地域には世界各国から巡礼に訪れるイスラム教徒がこの地域で感染し、帰国後巡礼者自身、さらにはその近縁者が発症する例が多く認められている。特に 2000 年に入ってから、Mecca から帰国した巡礼者によって伝播されたと推測される髄膜炎菌性髄膜炎の発症例が欧州や米国などで次々と報告され、そのほとんどが W-135 群という、流行性髄膜炎の起炎菌としては比較的稀な血清群であることが

明らかとなっている。

2. 国内疫学状況

国内では髄膜炎菌性髄膜炎の症例は戦前は 4000 例以上あったが、戦後は急速に減少し、現在は年間 10 例ほどが報告されているのみである。日本においては髄膜炎菌は健常者からは 100 人あたり数人程度の割合で単離され、その単離株は B 群、Y 群であることが多く、発症患者からの起炎菌も B 群及び Y 群が多く認められ、稀に C 群や W-135 群も単離される。日本においては感染症新法に基づいて報告される髄膜炎菌性髄膜炎の臨床報告は年間 10 例前後であるが、その適用は髄膜炎発症例に限定されているため、実際の髄膜炎菌による感染例の例数把握は不完全であると考えられている。

II. 髄膜炎菌性髄膜炎菌の臨床症状

髄膜炎菌はヒト以外からは分離されない。感染ルートとしては患者もしくは保菌者から飛沫感染が考えられる。保菌者が必ずしも発病するわけではなく、健常保菌者と発病者の間にどのような相違があるかはまだ解明されていない。

発病する場合には気道粘膜を介してまず血中に侵入し、高熱や皮膚、粘膜における出血斑、関節炎等の症状が呈する菌血症（敗血症）を起こす。さらに頭痛、吐き気、精神症状、発疹、項部硬直などの主症状を呈する髄膜炎に発展する。この時髄液検査では数百～数千に上る多核球優位の細胞増加、糖量減少、蛋白増加がみられる。また、劇症型とよばれる突然発症する急性の髄膜炎菌性髄膜炎もあり、頭痛、高熱、けいれん、意識障害を呈し、DIC（汎発性血管内凝固症候群）を伴いショックに陥って死に至る Waterhouse-Friderichsen 症候群も稀に認められる。

菌血症だけで治癒し、髄膜炎を起こさない場合もあるが、髄膜炎を起こした場合には、治療を施さないとその死亡率はほぼ 100%に達する。抗生物質が有効であるので、早期に適切な治療を施せば治癒する。潜伏期間は 3～4 日とされている。

III. 病原性 *Neisseria* 属菌の特徴

1. *Neisseria*属菌の特徴

Neisseria 属の菌種は、グラム陰性のそら豆状の球菌（*N. elongata* は桿状）であり、非運動性で芽胞は形成しない。オキシダーゼ及びカタラーゼ反応は陽性（*N. elongata* はカタラーゼ反応陰性）である。好気性で、多くは発育に際し CO₂ を要求する。一般に生体外での生物活性は弱く、生存は難しいとされている。温血動物の粘膜に生息し、特に淋菌と髄膜炎菌がヒトに対して病原性を示す。

集落の大きさは 0.5～2mm ほどで、正円、灰白色、半透明で光沢のある集落を呈する。多くは色素を産生しないが、一部の菌種は黄色色素を産生する。

2. 髄膜炎菌の特徴

髄膜炎菌は直径 0.6～0.8 μm で、そら豆状の球菌が相対する双球菌である。集落は 1～2mm で、淋菌に比べるとやや発育がよい。灰白色、半透明、光沢あるやや隆起した正円形の集落を形成する。A群およびC群株の集落はムコイド状になる。集落は粘稠で柔らかい。

髄膜炎菌はヒトの呼吸器系分泌物の飛沫で感染する。感染すると感染者の鼻咽腔に定着して健康保菌者となるか、軽度の鼻咽頭炎や髄膜刺激症状を呈することがある。粘膜から血中に入り菌血症や敗血症、脳脊髄膜炎を起こし、劇症型では皮膚、粘膜に出血斑を伴ってショック症状と播種性血管内凝固症候群（DIC）、多臓器不全によって数時間から1、2日以内に死亡する（Waterhouse-Friedrichsen 症候群）。他に上気道炎、肺炎、関節炎、膣・子宮頸管炎がある。

検査材料には、血液、髄液、鼻咽頭粘液、喀痰、皮膚穿刺液、関節腔液、中耳分泌物などが挙げられ、稀に尿道分泌物、膣・子宮頸管分泌物、直腸粘液から分離されることがある。患者の症状に合わせて検査材料を選択する。

3. 淋菌の特徴

淋菌は直径 0.6～1 μm の腎形またはそら豆状の球菌で、双球菌としてみられる。集落は直径 0.5～1mm くらいで、髄膜炎菌に比べてやや小さい。髄膜炎菌同様、集落は粘稠で柔らかく、18 時間を超えて培養すると自己融解によりさらに粘稠となり、培地からの釣菌が難しくなる。その集落型は T1～T4 型に分けられ、分離当初は T1、T2 型が主で、継代により集落型が T3、T4 に変化する。T1、T2 は小さく、灰白色から白色、光沢があるが不透明な隆起した集落である。T3、T4 は大きく、やや扁平で光沢はないがやや透明感のある集落である。栄養要求型の AHU 型は集落が小さく（0.25mm）、発育が遅い。

淋菌は代表的な性感染症（STD）の原因菌であり、泌尿生殖器感染症、直腸炎、咽頭炎、播種性淋菌感染症（disseminated gonococcal infection; DGI）、骨盤内炎症性疾患、新生児眼炎などの起因菌となる。検査材料として、尿道分泌物、膣・子宮頸管分泌物、直腸粘液、鼻咽頭粘液、気管支吸引液、結膜・中耳分泌物、関節腔液、血液、髄液などが挙げられる。髄膜炎菌同様、患者の症状に合わせて検査材料を選択する。

IV. 作業上の一般的注意

1. 安全管理

髄膜炎菌と淋菌を検査するには、バイオセーフティーレベル 2 の基準を満たした条件で扱い、安全上の管理を十分に行わなければならない。

2. 髄液の採取

多くの場合髄液が検査の対象となるが、必要以上の髄液の採取は患者にとって危険であるため、採取量は最小限にとどめなければならない。この点を考慮して医療機関における検査を優先し、残りの髄液を感染症発生動向調査事業に活用するか、または検体輸送が難しいことを考え合わせて、医療機関あるいは検査機関における分離菌の分与を受けることも一法である。

3. 病原性 *Neisseria* 属菌の取り扱い

病原性 *Neisseria* 属菌は注意深く取り扱わないと分離、培養、鑑別、保存が困難となる。

1) 釣菌、培養

分離・継代には白金線や白金耳の先に見える程度の菌体を採取して培地に接種し、培養する。

病原性 *Neisseria* 属菌は栄養要求性が高く、適した培地を使用しなければならない。

培養するには、5%程度の CO₂ と 70~80%程度の湿度が必要である。寒天平板は厚めに作製し、表面は乾燥しすぎないように注意して、乾燥により表面にシワの寄った平板の使用は避ける。

CO₂ インキュベータ、CO₂ ジャーあるいはロウソク培養により CO₂ 濃度を高め、湿らせたガーゼを置くなどして加湿する。

病原性 *Neisseria* 属菌は自己融解しやすいので、菌株の性状試験、継代あるいは保存には 16~18 時間培養菌を使用する。培養時間が長くなると集落は粘性が高くなり、釣菌や集菌が困難となる。

2) 鑑別

性状試験用培地は病原性 *Neisseria* 属菌に適したものをを用い、大量に菌を接種する。市販のキットを使用する場合には説明書に従う。

3) 保存

菌株の保存は腸内細菌等と比較するとかなり難しく、平板や高層培地で保存することはできないので、適した保存方法を採用しなければならない。

培地上の病原性 *Neisseria* 属菌は死滅しやすいので、冷蔵しても 2 日が保存のめどである。

菌株の安定的な保存は凍結によるが、この場合新鮮培養菌を大量に必要とする。

4. 検査に要する日数

検体の採取から菌の分離までの培養に 1~2 日、継代に 1 日、性状確認による確定に 1 日を要する。したがって菌種を決定するのに 4~7 日、血液の増菌を行えばさらに 1~2 日以上を要する。

V. 試薬と器材

1. 試薬

1) グラム染色用試薬

髄液や膣・子宮頸管分泌物、尿道分泌物あるいは分離菌の染色に Hucker の変法を用いる¹⁾。

2) 抗原検出用試薬

髄液等から髄膜炎菌抗原を検出する方法としてラテックス凝集試験 (bioMerieux、BioRad) の試薬が市販されている。群別を同時に行うことができるが、検出される血清群が A、B、C あるいは Y/W135 に限られてしまう。

膣・子宮頸管分泌物あるいは尿道分泌物から淋菌抗原を検出する方法として、酵素抗体法用キット (Abbott) がある。

3) 輸送培地

(1) Transgrow 培地

後述の Modified Thayer-Martin 培地と同じ処方であるが、寒天を増量して強度を増し、輸送に適した形態の容器に作製され、CO₂が充填された市販品がある。

(2) Trans-Isolate 培地 (T-I 培地)

液状部と固相部からなる、増菌および輸送用培地である²⁾。細菌性髄膜炎の原因である髄膜炎菌、インフルエンザ菌および肺炎球菌等の栄養要求性の高い細菌を髄液から分離する場合に用いることができる。密栓をして 25～37℃で 1～2 週間程度菌は生存する。25℃よりも温度が低いと、菌は死滅しやすい。通気性の栓を使用すれば生存期間は延びるとされているが、乾燥に注意しなければならない。

作製手順

①3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) 20.93g を 1,000ml の精製水に溶解し、NaOH で pH7.2 にして MOPS buffer を作製する。

②固相部の作製は下記の試薬を混合して加熱溶解後、5ml ずつを 20ml 程度の T-I medium 用容器に分注し、軽く栓をして高圧滅菌する。滅菌後、容器内で斜面を作る。

固相部

活性炭	2.0 g
可溶性デンプン	2.5 g
寒天	10.0 g
MOPS buffer	500 ml

③液状部は高圧滅菌後、5ml ずつを斜面のできた容器に分注する。

液状部

トリプトソイブロス (または同等品)	30.0 g
ゼラチン	10.0 g
MOPS buffer	500 ml

T-I medium は密栓して冷蔵すれば 2 年間は保存できる。発育促進剤を加える場合は使用時に添加する。

(3) Stuart 培地 (変法)

咽頭ぬぐい液、膣・子宮頸管分泌物、尿道分泌物等の検体の輸送に用いる。市販の粉末培地等 (Difco、Oxoid、BBL 等) がある。

4) 増菌培地

血液の培養や髄液の予備的培養にトリプトソイブロスやブレインハートインフュージョンブロスを用いる。発育促進剤を加えることもできる。Sodium polyanetholesulfonate (SPS) は病原性 *Neisseria* 属菌の発育に抑制的に働くので、これが添加されている培地は使用を避ける方がよい。

第6章 分離同定 3. 菌の分離の2) 髄液からの分離および3) 血液からの分離の各項を参照のこと。

5) 二層培地

淋菌を血液から検出する場合に用いる。血液培養用液体培地よりも良く発育するとされている。市販品はない。

斜面および液層に1% defined supplement あるいは IsoVitaleX、supplement B、Vitox 等の発育促進剤を加える。

斜面：GC 基礎培地＋発育促進剤

液層：トリプトソイブロス＋発育促進剤

6) 分離継代培地

病原性 *Neisseria* 属菌は栄養要求性が高いので、血液成分、グルコース、補酵素、グルタミン、ビタミン類等が添加された培地を用いなければならない。髄膜炎を対象に細菌の分離を行うには、髄膜炎菌のみならず、インフルエンザ菌、肺炎球菌あるいはその他の病原菌による場合を想定して、広範囲の菌種を検出できるように適切な分離培地を選択する必要がある。

(1) チョコレート寒天培地

髄液等からの分離や増菌培地からの転用培養に用いる。基礎培地は GC 寒天培地やトリプトソイ寒天培地とし、オートクレーブで滅菌後、50℃程度に冷ました後にヘモグロビンを加えるか、ウマあるいはヒツジ脱線維素血液を5%に加えて作製する。インフルエンザ菌の発育を考慮して発育促進剤 (1% defined supplement、IsoVitaleX (BBL)、supplement B (Difco)、Vitox (Oxoid) 等) を添加して平板とする。後述の2% defined supplement はインフルエンザ菌の培養には適さない。また、髄膜炎菌等の培養に適した市販の培地を使用することができる。

(2) 血液寒天培地

髄液等からの分離や髄膜炎菌の血清型別の前培養に用いる。インフルエンザ菌の分離には適さない。トリプトソイ寒天培地、ハート・インフュージョン寒天培地あるいはコロンビア寒天培地等を基礎培地としてウマ、ヒツジあるいはウサギ脱線維素血液を5%に加えて作製する。チョコレート寒天培地同様、市販の培地を使用できる。

(3) Kellogg 寒天培地

Neisseria 属菌の菌株の継代、性状検査の前培養、菌株の保存のための前培養等に用いる。市販の GC 粉末培地を滅菌し、2% defined supplement あるいは IsoVitaleX、supplement B、Vitox 等の発育促進剤を加えて平板とする。

2% Defined supplement

グルコース	20 g
Coccarboxylase	0.001 g
L-グルタミン (L-glutamine)	0.5 g
硝酸鉄 (Ⅲ) 九水和物 (Ferric nitrate)	0.005 g
精製水	100 ml

ろ過滅菌し、必要量ずつ分注して-20℃以下に保存する。
培地 1,000ml に対して 20ml を添加する。

7) 選択培地

(1) Modified Thayer-Martin medium (MTM 培地)

咽頭ぬぐい液、喀痰、膣・子宮頸管分泌物、尿道分泌物等の混在菌の多い検体の培養に用いる。市販の生培地がある (Difco、BBL)。

基礎培地

GC 培地	7.2 g
精製水	100 ml

発育促進剤にグルコースが含まれていなければ最終濃度が 0.25%になるように基礎培地に添加しておく。できた平板が柔らかいようであれば、寒天を 1.2~1.5%になるように加える。

高压滅菌 (121℃、15 分) する。

ヘモグロビン溶液

ヘモグロビン	2 g
精製水	100 ml

ビーカーに精製水 100ml をとり、ヘモグロビン 2g を加えてスターラーまたはミキサーで均一な浮遊液になるまで攪拌する。

均一になったら高压滅菌 (121℃、15 分) する。

基礎培地とヘモグロビン溶液を別々に高压滅菌し、手で触れるくらいの温度 (約 50℃) になったら混合する。さらに発育促進剤 (1% defined supplement、IsoVitaleX 等) と選択剤 (VCNT : vancomycin:3 μ g/ml、colistin:7.5 μ g/ml、nystatin:13.5 μ g/ml および trimethoprim lactate:5 μ g/ml、※各々培地量に対する濃度) を分注直前に加える。VCNT や VCN は市販品がある。

1% Defined supplement

(前ページの 2% Defined supplement より成分が多いことに注意)

L-シスチン (L-cystine)	1.1 g
Guanine HCl	30 mg
Thiamine HCl	3 mg
p-aminobenzoic acid	13 mg
Vitamin B ₁₂	10 mg
Coccarboxylase	100 mg
NAD	0.25 g
アデニン (Adenine)	1.0 g

L-グルタミン (L-glutamine)	10 g
グルコース	100 g
硝酸鉄 (Ⅲ) 九水和物 (Ferric nitrate)	0.2 g
精製水	1,000 ml

ろ過滅菌し、必要量ずつ分注して-20℃以下に保存する。

培地 1,000ml に対して 10ml を添加する。

Neisseria 属菌の分離培地、薬剤感受性測定用培地（髄膜炎菌を除く）等に加える。

(2) New York City 培地

New York City 培地には原法では溶血ウマ血球、ウマ血漿および酵母エキ스가加えられており、選択剤 (vancomycin:2 μ g/ml、colistin:5.5 μ g/ml、amphotericinB:1.2 μ g/ml および trimethoprim lactate:3 μ g/ml、※各々培地量に対する濃度) を添加する。市販品がある (BBL、Oxoid)。

8) 生化学的性状確認培地

(1) Cystine Trypticase agar (CTA) 培地

糖からの酸産生能を調べるために用いる。市販の粉末培地がある (Difco)。

- ① グルコース、マルトース、シュークロース、フルクトースおよびラクトースの 10% 水溶液をろ過滅菌する。
- ② 高压滅菌 (121℃、15 分) 後に約 50℃ になった CTA 培地に、糖の濃度が 1% となるように添加する。
- ③ それぞれの糖が添加された培地を滅菌チューブに 3ml ずつ分注する。
- ④ 使用時まで密栓して冷蔵保存する。
- ⑤ 使用時滅菌キャップに替える。

(2) 硝酸塩・亜硝酸塩還元試験用培地

試験用培地の作製

- ① ハートインフュージョンブロスに硝酸塩還元試験用培地には 0.1% に硝酸カリウムを、亜硝酸塩還元試験用培地には 0.001% に亜硝酸ナトリウムを加える。
- ② チューブに約 3 ml ずつ分注して高压滅菌する。亜硝酸ナトリウムを入れたチューブにはダーラム管を入れておく。
- ③ ウマ血清を 5~10% になるようにそれぞれのチューブに加える。

判定用試薬

試薬 1

スルファニル酸	0.8 g
5N 酢酸	100 ml

試薬 2

<i>N,N</i> -ジメチル-1-ナフチルアミン	0.5 g
または <i>N</i> -(1-ナフチル)エチレンジアミン-2 塩酸塩	
5N 酢酸	100 ml

褐色ビンに入れて、冷蔵する。

(3) 食塩無添加普通寒天培地

発育試験に用いる。

肉エキス	0.3g
ペプトン	0.5g
寒天	1.5g
精製水	100ml

pH6.8 に調整して高圧滅菌後、平板とする。

(4) シュークロース加寒天培地

シュークロースからの多糖体産生能を調べるために用いる。

トリプトソイ寒天培地を高圧滅菌後、ろ過滅菌したシュークロース水溶液を 1% になるように添加し、平板を作製する。従来用いられている 5% シュークロース加培地は菌の発育に抑制的に働く場合があるので、1% シュークロース加トリプトソイ寒天培地の使用が勧められている⁹⁾。多糖体の産生は Lugol 液（グラム染色用ヨード液を 1:4 に希釈した溶液）を滴下する。*N. meningitidis* と *N. polysaccharea* との鑑別に用いる。特に、*N. polysaccharea* の生息部位である咽頭からの分離菌には重要である。

(5) DNA 分解酵素産生性試験用培地

DNase 寒天培地に 2% defined supplement あるいは 5% に血清を加える。*Moraxella (Branhamella) catarrhalis* の鑑別に用いる。

9) オキシダーゼ試験用試薬

1% Tetramethyl-*p*-phenyldiamine・HCl 水溶液を作製し、少量ずつ分注して冷凍保存する。赤変した溶液や一度解凍した溶液は廃棄する。

市販の試薬を使用することもできる。

10) カタラーゼ試験用試薬およびスーパーオクソール試験用試薬

カタラーゼ試験には 3% 過酸化水素水を、スーパーオクソール試験には 30% 過酸化水素水を用いる。

11) 血清群別用抗血清

群別のための血清が市販されている (E・Y Laboratories)。血清凝集反応はスライドグラス上で常法どおりに行う。抗原検出用試薬を代用することもできる。

12) 酵素活性検出用試薬

Neisseria 属菌および近縁の菌種を鑑別するためのキット (Gonocheck II (E・Y Laboratories) 等) が市販されている。髄膜炎菌と淋菌、*N. lactamica* の鑑別に用いる。

13) 分子遺伝学的手法用試薬

髄膜炎菌では、分子遺伝学的手法を用いた診断用試薬は市販されていないが、髄液からの Polymerase chain reaction 法による検出に関する報告がある。

淋菌感染症診断用には液相ハイブリダイゼーション法 (Gen-Probe)、Polymerase chain reaction 法 (Roche)、Ligase chain reaction 法 (Abbott) がある。液相ハイブリダイゼーション法は膣・子宮頸管分泌物と尿道分泌物を対象とする。Polymerase chain reaction 法および Ligase chain reaction 法は検出感度が高く、膣・子宮頸管分泌物と尿道分泌物だけでなく、尿を検査対象とする

ことができる。

1 4) ペニシリン分解酵素産生性試験用試薬

淋菌にはペニシリン分解酵素（ β -ラクタマーゼ）産生能を有する株（Penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* : PPNG）がある。この検出には、ニトロセフィン（Oxoid）や検出用試験紙（BBL、Oxoid、Glaxo）が市販されている。

2. 器材

髄膜炎菌や淋菌の検査で用いる器具・器材は、他の病原菌の検査で用いられるものと同じであるが、それに加えて以下の器材を必ず、あるいは必要に応じて準備する。

1) 検体の輸送

検体の輸送に 5%CO₂ の環境が必要な場合は CO₂ 発生装置付の輸送用バッグ等を用意する。保温や保冷で輸送する場合には、それぞれの条件に応じた輸送用容器を準備する。

2) 培養

髄膜炎菌や淋菌の培養には 5%前後の濃度の CO₂ 環境が必要なため、炭酸ガス培養器、CO₂ ジャー、ロウソク培養用容器等を準備する。発育を促進するために、湿らせたガーゼ等を入れて培養器の内部を高湿度に保つことも必要である。

3) 菌株の保存

菌株の保存に高層培地や斜面培地を用いることはできない。冷凍保存による方法で保存する。

ゼラチン・ディスク法で菌株を保存するには、真空デシケーターと真空ポンプを準備する。凍結乾燥法では、凍結乾燥機が必要となる。

菌株は冷凍庫で -40～-80℃ に保存することが望ましく、-20℃ 前後でも保存できるが、その場合は霜取り機能のない冷凍庫を用いる。

VI. 分離同定

1. 推定

1) 髄液の染色⁴⁾

髄液を 3,000rpm で 20 分遠心し、沈渣の一部をスライドグラス上に取り、自然乾燥する。乾燥後、炎に 2~3 回かざして火炎固定し、Hucker の変法でグラム染色する。ただし髄液量が 1ml 以下であれば遠心せずにそのまま少量を取って染色する。グラム陰性双球菌（そら豆状）が多形核白血球の内外に観察されれば、髄膜炎菌の感染が疑われる。

2) 膣・子宮頸管分泌物、尿道分泌物の染色

膣あるいは子宮頸管の分泌物は滅菌綿棒 2 本で採取する。尿道分泌物は尿道口を滅菌脱脂綿等で清拭してから尿道をマッサージして分泌物を 2 本の滅菌綿棒で採取する。

1 本は培養用とし、もう 1 本の分泌物を清浄なスライドグラスに塗抹する。自然乾燥させた後に軽く火炎固定し、Hucker の変法でグラム染色する。多形核白血球が多く、扁平上皮や他の細菌は少なく、一部の多形核白血球内にグラム陰性の双球菌として認められる（図 1）。

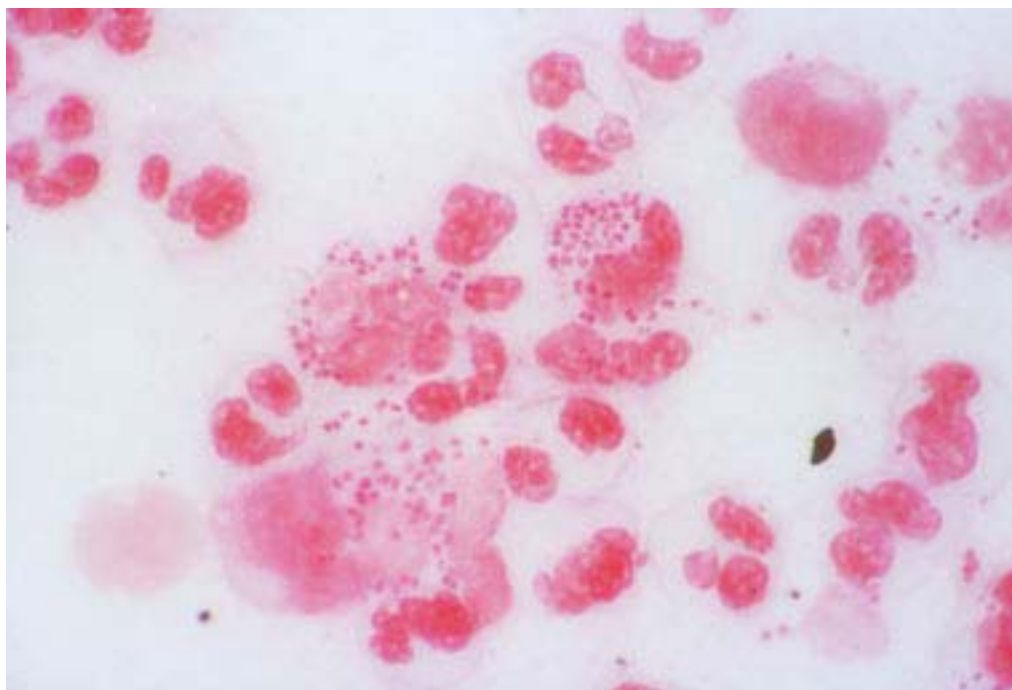


図 1 淋菌症患者の尿道分泌物を観察したもの（神奈川衛生研究所 黒木博士提供）

3) 抗原検出

キットの説明書に従って試験を行う。髄膜炎菌の検出では、通常は髄液を 3,000rpm で 20 分遠心し、上清をラテックス凝集反応に用いる。

2. 菌の分離

1) 分離の対象となる検体

髄膜炎菌感染症では、患者の髄液、血液、皮膚穿刺液、関節腔液、喀痰、鼻咽頭粘液が診断のための検体となる。髄膜炎の症状があれば髄液が検査対象となるが、菌血症を伴うことが多いので血

液も検査する。出血斑や関節炎があれば皮膚穿刺液や関節腔液を検査対象とする。稀に肺炎や上気道炎も見られ、喀痰を検査する。鼻咽頭粘液を採取する場合には滅菌綿棒で鼻咽頭粘液あるいは咽頭後壁から扁桃窩の粘液をぬぐい取る。髄膜炎以外の症状でも血液から検出されることがあるので、採血して培養する。髄膜炎菌感染症の患者の家族、接触者あるいは保菌者は、鼻咽頭粘液から菌の分離を試みる。

特殊な事例として、淋菌のように膣分泌物、子宮頸管分泌物、尿道分泌物あるいは直腸粘液から髄膜炎菌が分離されることがある。

淋菌感染症では、膣分泌物、子宮頸管分泌物、尿道分泌物、直腸粘液等が検査材料となる。尿道分泌物は滅菌綿棒か白金耳で採取する。分泌物が少ないときは滅菌綿棒で前部尿道分泌物を採取する。子宮頸管分泌物は子宮頸管部を圧迫し、浸出した分泌物を採取するか、頸管内に綿棒を挿入して粘液を採取する。直腸粘液は滅菌綿棒を直腸内に 3～5cm 挿入し、肛門輪内側の腋窩から粘液を採取する。播種性淋菌感染症では血液、皮膚膿瘍では膿瘍内容物を検査する。性的接触の状況によっては、咽頭から淋菌が検出されることがあるので、必要に応じて咽頭粘液を採取する。乳児の淋菌性結膜炎では膿、眼結膜分泌物を滅菌綿棒で採取する。

2) 髄液からの分離

髄液を 3,000rpm で 20 分遠心し、滅菌パスツールピペットで 1 滴程度の沈渣をチョコレート寒天培地と血液寒天培地に接種する。ただし髄液量が 1 ml 以下であれば遠心せずにそのまま接種する。

検体を接種した平板を 5～10%CO₂ 環境下（あるいはロウソク培養）、35～37℃で 18～24 時間培養し、集落を観察されれば継代して同定を行う。集落が観察されなければ 3 日目まで培養し、毎日観察する。

可能であれば、予備的に寒天平板による分離と併用して、髄液の一部をトリプトソイブロスあるいはブレインハートインフュージョンブロス（＋発育促進剤）等の液体培地に接種して 35～37℃で培養し、7 日目まで菌の発育を毎日確認する。

髄液は採取直後に培地に接種することが望ましいが、そうでなければ極力 1 時間以内に接種する。その場合、髄液の入ったチューブの栓をゆるめて 5%CO₂ 存在下、35～37℃で保管する。

5%CO₂ の環境が得られなければ密栓して 4～5℃あるいは室温（22℃前後）で保管するのが望ましい。髄液の pH が急激に上昇して髄膜炎菌等の病原菌の生存性に影響を与えるとの報告⁷⁾があるため、決して大気中に（あるいは密栓したまま）30℃以上で放置してはならない。

また 1 時間を過ぎる場合は 4～5℃あるいは室温で保管するが、できるだけ早く培地に接種する。輸送などにより採取後 1 時間以内に寒天培地に接種することができないことが髄液採取当初から分かっている場合は、T-I medium に接種することが勧められている²⁾。この場合、25～37℃に保って輸送する。

髄液以外の、通常は無菌である検体（関節腔液等）は髄液と同様に扱う。

3) 血液からの分離

髄膜炎菌性髄膜炎を含む細菌性髄膜炎では、血液は採取直後に血液培養用液体培地に接種する。接種する血液量は、培地容量に対して 1:5 から 1:10 となるように、5～10ml を 50ml の培地に接種する。幼小児では 1:10～20 程度になるように、1～2ml の血液を 20ml の培地に接種する。

培地は通気性を保ち、3～10%CO₂ 環境下、35～37℃で培養し、7 日後まで毎日観察する。菌の増殖が観察されたら培地の一部を無菌的に血液寒天培地とチョコレート寒天培地に接種する。菌の増殖が観察されなくても 18～24 時間後、48 時間後および 7 日後に血液寒天培地とチョコレート寒天培地に接種して菌の増殖の有無を確認する。

市販の血液培養用キット（Isolator 等）を利用することもできる。

血液から淋菌を検出する場合には、二層培地の使用が推奨される。

4) 髄液、血液以外の検体からの分離

喀痰や鼻咽頭粘液、膣・子宮頸管分泌物、尿道分泌物等のように混在菌の多い検体は、MTM 培地等の選択培地に接種し、5～10%CO₂ 環境下（あるいはロウソク培養）、35～37℃で培養すると、24～48 時間で集落は観察されるが、観察されない場合 3 日目まで培養する。

病原性 *Neisseria* 属菌にはバンコマイシン感受性株があるため、選択培地に発育しない株も検出できるようにチョコレート寒天培地といった非選択培地を併用する。平板は 3 日目まで毎日観察し、集落が見られれば非選択培地に継代する。

3. 鑑別・同定

髄膜炎菌の平板上の集落は、正円形、直径 1～2mm、半透明で、表面平滑で光沢がある（図 2）。



図 2 髄膜炎菌のコロニーを実体顕微鏡で観察した像
（神奈川衛生研究所 黒木博士提供）

淋菌の集落は正円形、直径 0.5～1mm、不透明から半透明で光沢ある隆起した集落である。淋菌のコロニーは継代するにしたがって円すい状の先が尖った小さい状態から先の凹んだ円すい状の大きなコロニーに変化し、その尖り具合の鋭い状態から完全に平たい状態までを順に T1、T2、T3、T4 という表現によりおおまかに分類している。分離直後は T1、T2 が多いが、長時間または継代により T3、T4 となる。推定試験としてオキシダーゼ試験とグラム染色を行い、さらに糖からの酸産生性、硝酸・亜硝酸還元性、食塩無添加普通寒天培地における発育、シュークロースからの多糖体産生性、DNA 分解酵素産生能等の性状を調べる。検査の流れを図 3 に、*Neisseria* 属菌および近縁種の集落の特徴を表 1 に、生化学的性状を表 2 に示した^{8,9)}。

日常的には、平板上の集落の形態、オキシダーゼ試験、グラム染色、糖からの酸産生性および硝酸・亜硝酸還元性でほぼ鑑別することができる。これらの性状と検体採取部位を考慮し、必要に応じて各種培地での発育、シュークロースからの多糖体産生性、酵素プロファイル等を調べる。

Neisseria 属菌の中には髄膜炎菌と同様にグルコースとマルトースから酸を産生する菌種がある。また髄膜炎菌をはじめとする *Neisseria* 属菌には、稀に糖からの酸産生性が非典型的な株があり、鑑別を誤ることがある。鼻咽頭粘液等の雑菌の多い検体からの分離を非選択培地を用いて行った場合は非病原性 *Neisseria* 属菌を拾う可能性があるため、生化学的性状を十分検討した上で鑑別を行うことが重要である。特に *N. meningitidis* と *N. polysaccharea*、*N. gonorrhoeae* とマルトース非分解 *N. meningitidis*、*N. meningitidis* と *N. subflava* の鑑別には注意を要する。

1) オキシダーゼ試験およびグラム染色

分離培地上の疑わしい集落をオキシダーゼ試験用試薬を用いて調べる。新鮮集落に直接試薬を滴下するか、試薬を滴下したろ紙に新鮮菌を塗抹する。陽性であれば数秒で青紫色に発色する。*Neisseria* 属菌はオキシダーゼ陽性である。

Hucker の変法を用いてグラム染色を行い、顕微鏡下でグラム陰性双球菌であることを確認する。

2) カタラーゼ試験およびスーパーオクソール試験

Kellogg 培地で培養した集落に直接、あるいはシャーレに取った菌に試薬をかけて発泡の状態を観察する。発泡があれば陽性、なければ陰性とする。

血液寒天培地にはカタラーゼが含まれているため、試験に用いてはならない。

3) 糖からの酸産生性

試験には 16～18 時間程度培養した平板上の大量の菌体を必要とする。培養時間が長いと自己融解が始まり、掻き取りや CTA 培地中での均一化が難しくなるので、18 時間以内とする。特にチョコレート寒天平板では融解が早い。

Kellogg 培地等の平板 1～2 枚全体に菌を発育させ、1 チューブ当たり 2 白金耳程度の菌体をかき取る。培地表面から 0.5～1cm 程度までに菌を接種し、培地とよく混和して接種部を白濁させた後に管底まで穿刺する（図 4 参照）。35～37℃で 24 時間静置後に CTA 培地の変化を観察する。

グルコース、マルトース、シュークロース、フルクトース、ラクトースを 1%に添加した各 CTA 培地に菌を接種し、培地の上部が黄変したチューブを陽性、赤変したチューブを陰性とする（図 5、6）。

培地に変化のないチューブは接種量が不足しているのでやり直す。また、穿刺部位や培地全体に菌の増殖が認められるチューブは他の菌種による汚染としてやり直す。

4) 硝酸塩・亜硝酸塩還元性

Kellogg 培地等で 16～18 時間培養した菌をそれぞれの培地に多めに（1 白金耳程度）接種し、大気中に 35～37℃で 24～48 時間培養する。

培養後、0.8%スルファニル酸と 0.5% *N,N*-ジメチル-1-ナフチルアミンまたは *N*-(1-ナフチル)エチレンジアミン-2 塩酸塩を等量混ぜ、約 0.5ml ずつ加える。

硝酸カリウムを加えた培地が赤変すれば硝酸塩還元陽性、赤変せず亜鉛末を加えて赤変すれば陰性、赤変しなければ陽性とする。亜硝酸カリウムを加えた培地が赤変すれば亜硝酸塩還元陰性、赤変しなければ陽性と判定する。ダーラム管中のガスの有無を観察する。

5) 各種培地での発育

35～37℃における病原性 *Neisseria* 属菌用選択培地（分離時に選択培地を用いなかった場合）や食塩無添加普通寒天培地、あるいは 22℃におけるチョコレート寒天培地あるいは Kellogg 培地での発育性を調べる。発育試験には新鮮培養菌から $10^6 \sim 10^7$ CFU/ml 程度の菌液を作製し、これを各培地に接種して選択培地では 5～10%CO₂ 環境下、食塩無添加普通寒天培地および 22℃における発育では大気中、35～37℃で 48 時間観察する。

これらの性状は *Neisseria* 属菌の鑑別に補助的に用いられる。

6) シュークロースからの多糖体産生性

試験用培地に菌を濃厚に接種し、大気中に 35～37℃で 24～48 時間培養する。集落に Lugol 液（グラム染色用ヨード液を 1:4 に希釈した溶液）を滴下し、暗赤紫色から濃青色を示した株を陽性とする。淋菌はこの培地で発育しにくい。市販のグラム染色用ヨード液では反応が正しく現れない場合

があるので注意する⁹⁾。*N. meningitidis* と *N. polysaccharea* の鑑別に有用である。

7) DNA 分解酵素産生性

DNA 分解酵素産生性試験用培地に菌を濃厚に接種し、5%CO₂ 環境下、35～37℃で 24 時間培養する。1 N 塩酸を培地全面に注ぎ、集落の周辺が透明となれば陽性とする。

8) 酵素プロファイルによる鑑別・同定

病原性 *Neisseria* 属菌および *M. (B.) catarrhalis* 等の鑑別には、β-ガラクトシダーゼ、ハイドロキシプロリルアミノペプチダーゼおよびγ-グルタミルアミノペプチダーゼの 3 酵素の保有の有無を用いることができる (表 3)。迅速な鑑別や生化学的性状が典型的でない株の鑑別に有用である。

ここで調べる酵素は *Neisseria* 属菌が固有に保有するものではないため、キットの対象とする菌は MTM 培地等の選択培地で発育したオキシダーゼ陽性のグラム陰性双球菌に限られている。したがって、チョコレート寒天培地や血液寒天培地といった非選択培地から分離した菌を鑑別する際には注意しなければならない。

9) 同定用キットによる鑑別

Neisseria 属菌の生化学的性状による菌種同定キットは、日水製薬、バイオメリュー、Becton Dickinson、Dade Behring 等から市販されており、*Neisseria* 属菌とともに *Haemophilus* 属菌やその他近縁の菌種の同定ができる。以下の 2 種類の診断キットが簡易診断には便利である。

日水製薬から市販されている ID テスト・HN-20 ラピッドは *Neisseria* 属菌と *Haemophilus* 属菌の同定キットであり、4 時間で鑑別が可能であり、比較的急を要する検査の場合には便利である。しかし、簡易的であるために最終的な菌の同定はやはり前述の生化学的性状を検査した後の方が確実であると思われる。

また MTM で *Neisseria* 属と推測される菌が分離された場合には Gonocheck-II (コスモバイオ) によって淋菌、髄膜炎菌と他の 2 種の近縁株の簡易同定が可能である。しかし、この簡易診断薬に関しても MTM で培養された菌のみを限定したうえでの同定法であり、事実この診断薬では同定できなかった特殊な髄膜炎菌も臨床分類株として分離されているので確定同定はキットと従来の古典的な解析の両方の結果を合わせて判断するのが妥当であると思われる。

10) ペニシリン分解酵素産生性試験

ニトロセフィン溶液を直接 16～18 時間培養した集落に滴下するか、ろ紙にニトロセフィン溶液を滴下し、これに菌を塗抹して、赤紫色に発色した菌を陽性とする。

試験紙には発色性基質をしみ込ませて乾燥させてあり、滅菌精製水を滴下し、新鮮菌を塗抹して赤紫色に発色すれば陽性とする。

ペニシリンや第一世代セフェム系薬剤が治療に盛んに用いられていた時期には、ペニシリン分解酵素産生性を調べることは非常に重要であった。しかし、現在わが国では淋菌感染症の治療にはこれらの薬剤はほとんど用いられておらず、したがってペニシリン分解酵素を保有していても治療にはほとんど影響を及ぼさなくなった。

4. 髄膜炎菌の髄液からの PCR 法による検出

髄液から髄膜炎菌が分離されなくても、PCR 法による検出が可能である⁵⁾。髄膜炎菌、インフルエンザ菌および *Streptococcus* 属菌を同時に検出するシステムも報告されている⁶⁾。

血清型を決定する抗原とそれに関与する遺伝子も解析されており、近い将来、PCR 法による血清型別が可能となることが期待される。したがって、何らかの理由により髄膜炎菌の分離が不能であった髄液等の検体を疫学的解析のために冷凍保存（－80℃）することが推奨される。髄液の量が少なく染色や培地への接種に全て使用されてしまった場合、髄液が接種された液体培地が残っていれば、これを遠心して PCR 法の材料とすることも可能である。

しかし現状においては PCR 法による検出や血清型別の同定はまだ学術段階であり、実用段階で推奨される方法はまだ確立されておらず、現時点では検査に直接携わる人の判断で PCR 法による検査の実施とその結果を判断することとなる。

5. 淋菌の分子遺伝学的手法による検出

膣・子宮頸管分泌物はそのまま各キットの検査材料とすることができる。尿は遠心して得られる沈渣を検査対象とする。

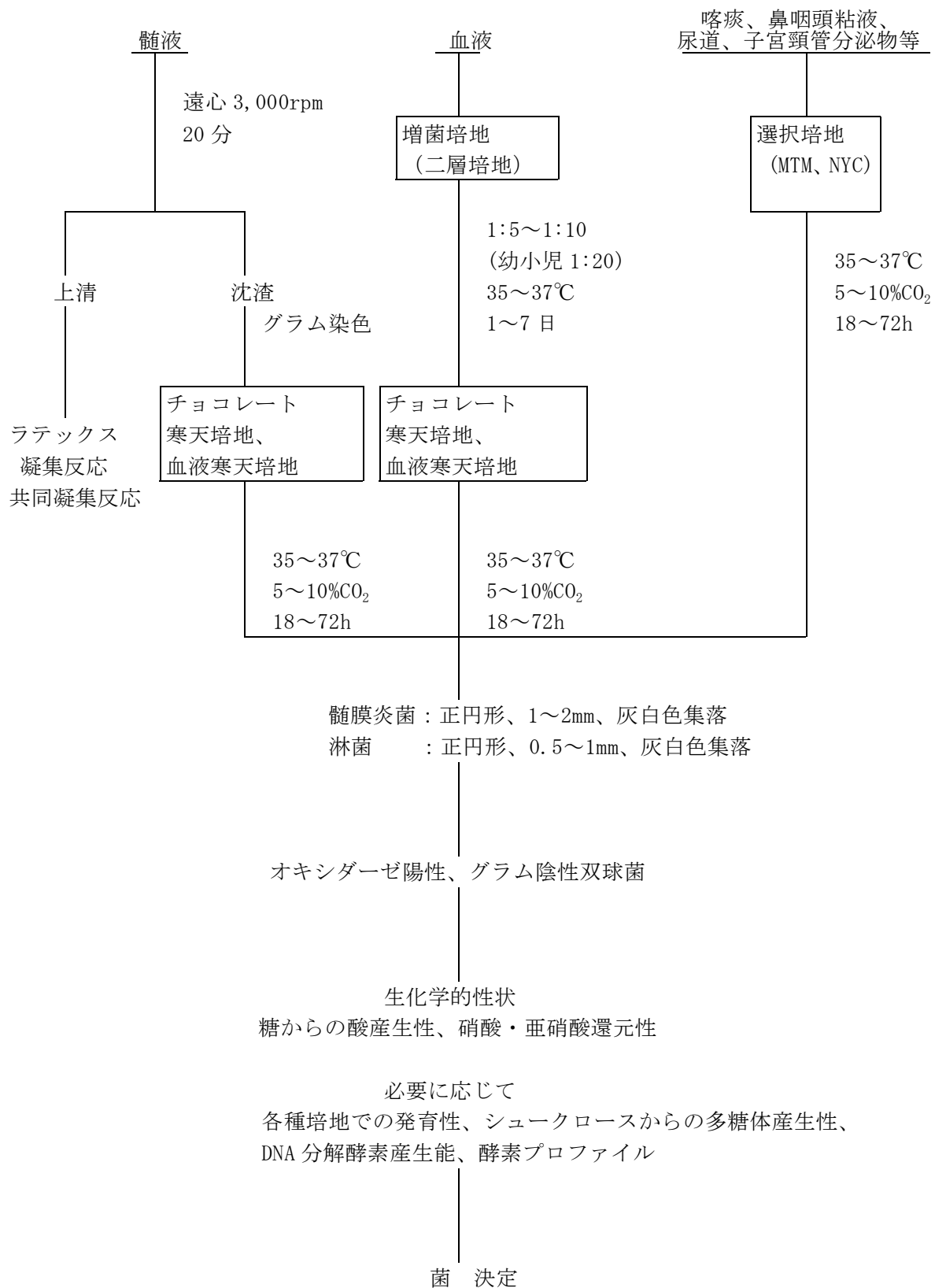


図3 病原性 *Neisseria* 属菌の検査の流れ

表 1 *Neisseria* 属菌および類縁菌の集落の特徴

菌種	集落の特徴
<i>N. gonorrhoeae</i>	直径 0.5～1mm、不透明から半透明の光沢ある隆起した正円形集落。4 タイプ（T1～T4）の集落の変異あり。初代分離では複数のタイプが混在することが多いので注意が必要。T1、T2：分離当初は優勢。小型（0.5mm 程度）、光沢があり、隆起する。T3、T4：大きく（1mm 程度）、やや扁平で T1、T2 ほど光沢はない。
<i>N. meningitidis</i>	直径 1～2mm で淋菌よりも大型。半透明、光沢あるやや隆起した正円形集落。ムコイド状のこともある。
<i>N. lactamica</i>	髄膜炎菌に似るが、やや黄色みを帯びることがあり、湿潤性に欠ける。
<i>N. sicca</i>	髄膜炎菌よりも大型。しわのある、粗造で乾燥した集落。培地に固着。
<i>N. mucosa</i>	髄膜炎菌よりも大型。黄色、透明から不透明の円形集落。しばしば培地に固着。
<i>N. subflava</i>	髄膜炎菌よりも大型。黄色を帯びることあり。ムコイド状。培地に固着。
<i>N. flavescens</i>	髄膜炎菌よりも大型。黄色、不透明な正円形集落。
<i>M. (B.) catarrhalis</i>	髄膜炎菌よりも大型。灰白色、不透明、光沢のある正円形集落。

注：自家調製したチョコレート寒天培地あるいは Kellogg 培地で 35～37℃、18～24 時間程度培養したときの集落の特徴を示した。集落の特徴は既製培地のメーカーや製品により異なる可能性がある。可能な限り対照株を置いて釣菌することが望まれる。

釣菌に際して、白金耳で触れると集落全体が動くような堅い集落、白色で堅い感じの集落、MTM 培地やチョコレート平板上で集落周辺が緑色を帯びている集落および培地に食い込むような扁平な集落は *Neisseria* 属菌ではない。

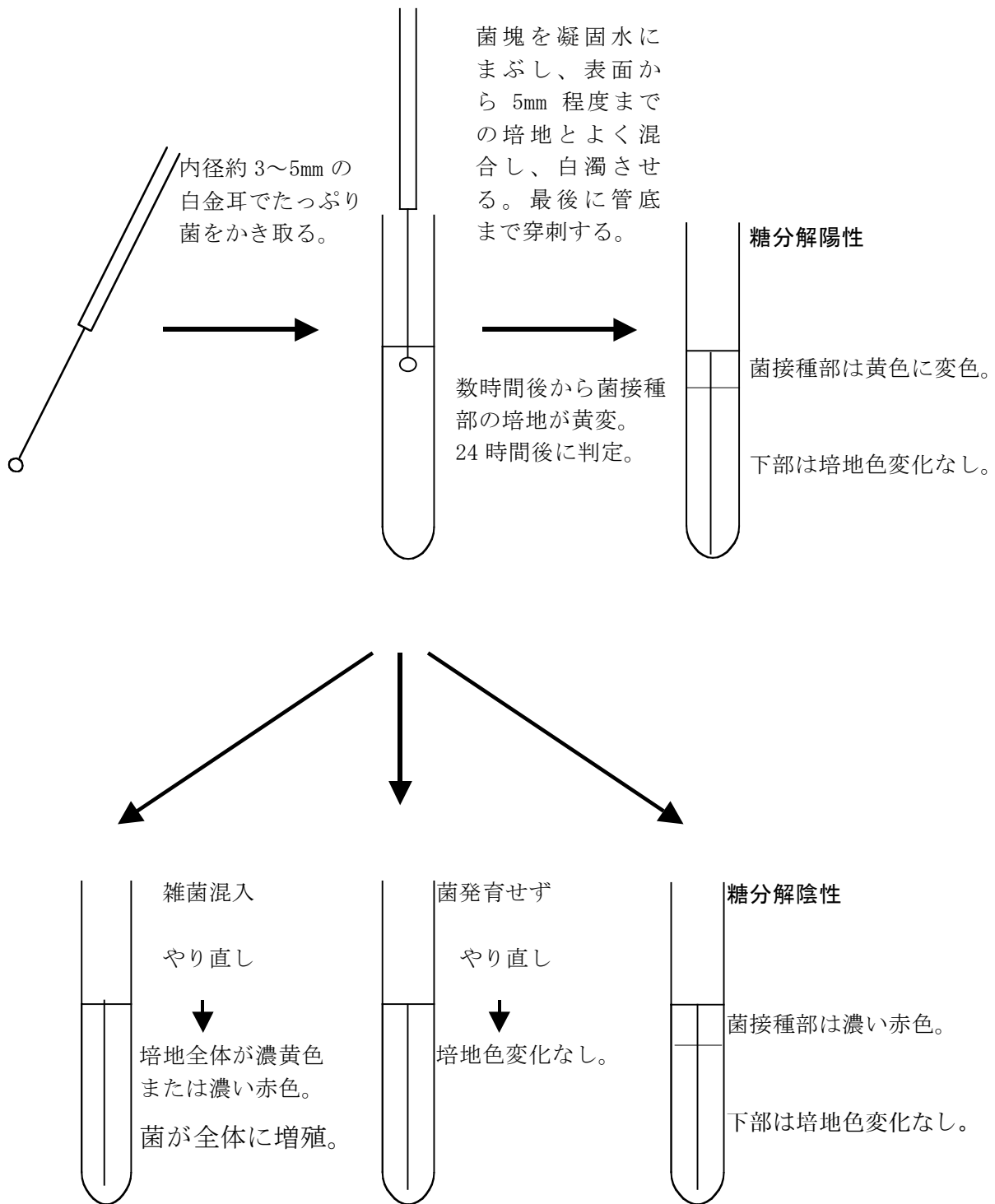


図 4 *Neisseria* 属菌の CTA 培地への接種法と判定

表2 *Neisseria* 属菌および近縁種の生化学的性状

	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>N. meningitidis</i>	<i>N. lactamica</i>	<i>N. polysaccharea</i>	<i>N. cinerea</i>	<i>N. flavescens</i>	<i>N. mucosa</i>	<i>N. subflava</i>	<i>N. sicca</i>	<i>N. elongata</i>	<i>M.(B.) catarrhalis</i>	<i>K. denitrificans</i>	
菌形態	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
オキシダーゼ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
カタラーゼ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—
スーパーオキシド	4+	+4+	+3+	+3+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	—	+4+	—
酸産生性													
グルコース	+	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	+	+
マルトース	—	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—	—
シュークロース	—	—	—	—	—	—	+	v ^a	+	—	—	—	—
フラクトース	—	—	—	—	—	—	+	v ^b	+	—	—	—	—
ラクトース(ONPG)	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
還元性													
硝酸塩	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+	+	+
亜硝酸塩	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ガス産生	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
発育性													
MTM, NYC	+	+	+	v	v	—	—	v	—	—	v	+	+
22℃	—	—	v	v	v	+	+	v	v	+	+	?	?
普通寒天	—	—	+	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+
多糖体産生性	—	—	—	+	—	+	+	v ^c	+	—	—	—	—
DNase	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—
色素	—	—	v	—	— ^d	+	— ^d	+	— ^d	—	—	—	— ^d

S : 球菌。 R : 桿菌。 v : 株により陽性と陰性がある。 MTM : modified Thayer-Martin medium
 NYC : New York City 培地。

a : *N. subflava* biovar *subflava*(-), *N. subflava* biovar *flava*(-), *N. subflava* biovar *perflava*(+)。

b : *N. subflava* biovar *subflava*(-), *N. subflava* biovar *flava*(+), *N. subflava* biovar *perflava*(+)。

c : *N. subflava* biovar *subflava*(-), *N. subflava* biovar *flava*(-), *N. subflava* biovar *perflava*(+)。

d : 色素を産生する株もある。

表3 髄膜炎菌の鑑別に用いる酵素プロファイル

	γ -glutamyl aminopeptidase	Hydroxyprolyl aminopeptidase	β -galactosidase
<i>N. meningitidis</i>	+	/	—
<i>N. gonorrhoeae</i>	—	+	—
<i>N. polysaccharea</i>	—	+	—
<i>N. lactamica</i>	—	/	+
<i>M.(B.) catarrhalis</i>	—	—	—

/ : 鑑別には用いない。

6. 血清型別

1) 血清群

髄膜炎菌の血清群は莢膜多糖体を抗原としている。A、B、C、29E (Z')、H、I、K、L、W135、X、Y、Z がある。海外では A と C が流行株として注目され散発例は B が多いが、B 群株による流行もある。国内の症例ではこれまで B と Y が多数を占めている。

2) typing および subtyping

髄膜炎菌の外膜タンパクを抗原として、モノクローナル抗体による typing および subtyping が行われる。型別はレファレンス機関に依頼する。現在において日本細菌学会より *Neisseria* 属菌リファレンスセンターとして認定されている機関は神奈川県衛生研究所であるが、その他の機関、国立感染症研究所、東京都立衛生研究所でも検査は可能である。

7. Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) および Multilocus sequence typing (MLST)

複数の特定の酵素の、電気泳動による移動度の違いを組み合わせた酵素型 (enzyme type: ET) が髄膜炎菌の疫学マーカーとして利用されている¹⁰⁾。酵素に関連する遺伝子の DNA 配列による型別が sequence type (ST) で、ET と ST はほぼ同等とされており、現在では ST を typing する MLST の解析の方が主流となっている。ST はインターネット上でデータベース化されており^{11, 12)}、日本国内では国立感染症研究所細菌部でその解析が可能となっている。

ST によって世界で大流行を起こし、伝播した髄膜炎菌の由来とルートを推測することが可能である。ST と髄膜炎菌の病原性との直接的な関連性は不明であるが、流行起炎株と ST の関連は疫学的観点から明らかになっている。ST32 (ET5) と分類されるものは 1970 年代の北欧、英国を中心に大流行し、現在においても先進国を中心に小規模の流行を起こす危険菌であると考えられている。また ET: Group III-1 は 1983 年のネパールの大流行から始まり、インド、パキスタン、サウジアラビアを経由して 1989 年にアフリカのナイロビにまで大流行をもたらしたとされている。

8. 栄養要求型

淋菌の株の、アミノ酸、ビタミン類等に対する要求性の違いを利用した型別法である。35 型が知られている。多くは Proto 型、Pro- 型に属する。AHU 型は播種性淋菌感染症 (DGI) から高頻度に分離される。

VII. 検体の輸送方法

髄膜炎菌および淋菌を輸送・保存する条件に関する様々な報告がなされているが、標準的方法は確立されていない。特に髄液等の検体の輸送・保存に関しては、検体の状態や株の性状により適した条件が異なることが予想され、温度条件さえも定まっていない。一般的に検体は室温から 37℃に保つようにされているが、35～37℃では短時間で死滅することもある。低温でも死滅しやすいとされているが、髄液を冷蔵して数日間生存することもあり、また Stuart 培地では 4℃で良好な成績が得られている。これらの状況を踏まえ、最も妥当と思われる方法を記す。

1. 髄液および血液等の輸送方法

1) 髄液の輸送方法

髄液をそのまま冷蔵または室温で搬送することはできるが、検出率が低下する可能性がある。確実に菌を分離するには、医療機関においてチョコレート寒天培地（搬送するまでに数日を要する場合は T-I medium）に接種し、3～5%CO₂ 環境下で 25～37℃に保ちながら輸送する。あるいは寒天平板に接種して培養後で既に集落が観察されれば冷蔵で送付・搬送することが奨められる。5%CO₂ 環境を保つことができるキットも市販されている。

2) 血液の輸送方法

血液は液体培地（あるいは二層培地）に接種し、あるいは Isolator を用いて 22～37℃に保ちながら送付・搬送する。Isolator では、22℃あるいは 34℃で 15 時間静置後も分離率が変わらなかったとの報告がある¹³⁾。培地中に菌の増殖が認められる場合は冷蔵で送付・搬送する。

3) その他の臨床検体の輸送方法

選択培地などの適切な培地に接種し、3～5%CO₂ 環境下で 25～37℃に保ちながら、あるいは培養後で既に集落が観察されれば冷蔵で送付・搬送する。市販の輸送培地（Transgrow 培地等）と輸送用キット（JEMBEC）を使用することもできる。鼻咽頭粘液、膣・子宮頸管分泌物、尿道分泌物は Stuart 培地（変法）等に接種して冷蔵で搬送する。

2. 菌株の送付方法

1) 培養菌

チョコレート寒天培地に接種し、35～37℃で 18 時間程度培養した培養菌を培養直後に発送し、翌日到着するのであれば、冷蔵で送付することができる。24 時間以上培養した菌は死滅する可能性が高いので送付してはならない。

T-I medium に接種して密栓した状態では 25～37℃で 1～2 週間程度生存するので、その間に送付することができる。

綿棒で新鮮培養菌を多くかき取り、スクリューキャップ付滅菌試験管等の滅菌容器に入れておけば菌種や菌株により異なるが室温でも 3～7 日程度、冷蔵では 1 週間、冷凍ではさらに長く生存するので、培養菌の送付に利用できる。綿棒保存法はIV. 菌株の保存方法を参照。

送付中に死滅することもあるので、必ず別に菌株を保存しておく。

2) 保存菌株

後述の綿棒保存、ゼラチン・ディスク法あるいは凍結乾燥法で保存された菌株は冷蔵（3～7 日程度であれば室温も可）で搬送あるいは送付することができる。冷凍で送付するのが理想だが、送付中に温度変化が激しいと菌数は急激に減少するため、むしろ冷蔵の方が安全である。

VIII. 菌株の保存方法

髄膜炎菌や淋菌は長時間培養すると自己融解が始まるため、保存するには 16～18 時間培養菌を用いる。チョコレート寒天培地あるいは血液寒天培地のように血液成分が加えられて栄養分の豊富な培地では自己融解が早いので、培養時間を短くするか、淋菌では Kellogg 培地を使用するほうが扱いが楽である。

1. 一時的保存

寒天平板で培養した 18 時間培養菌は、培養後冷蔵庫で保存すれば 1～2 日は生存する。それ以後の生存性は株により異なるので、3 日以上は保存は避ける。

2. 短期保存

1) 綿棒保存

滅菌綿棒で寒天平板上の 18 時間培養菌を平板からできるだけ多く掻き取り、滅菌スクリーキャップ付チューブ等に入れて－20～－80℃で冷凍保存すると、数カ月生存する。冷蔵保存でも 1 週間程度は生存する。室温では 3～7 日をめどにする。保存容器に滅菌したシリカゲルを入れておくと菌体の乾燥が確実に、菌が死滅しにくい。

綿棒で掻き取る菌体の量が少ないと早期に死滅してしまうので、寒天平板上に画線で菌苔状に培養し、できるだけ多く菌体を掻き取る方が保存は確実である。

2) 簡易保存法³⁾

ゼラチン・ディスク法用溶液（A、B、C 5:1:5 混合液）を滅菌スクリーキャップ付チューブに 0.5ml ずつ分注し、菌苔状の 18 時間培養菌の平板半分程度を浮遊させる。これを－20～－80℃で冷凍保存すると数年間保存することができる。

3. 長期保存

1) ゼラチン・ディスク法³⁾

あらかじめ凍結することなく、菌保存液の水分を真空または減圧下で蒸発させ、ディスク状に乾燥させる方法である。継代培養による性状の変異なしに長期間保存でき利用価値が高く、常時一定の条件のまま菌株が保存できる。*Vibrio* 属菌を除く多くの臨床細菌に応用することができる。

Neisseria 属菌、*Haemophilus* 属菌等の保存が難しい菌株の保存に欠かすことができない方法があるので、ここで詳述する。作製方法等については、*Neisseria* 属菌に限定せず一般的な方法とする。

(1) ゼラチン・ディスク法用試薬

A 液

グルコース	5 g
スキムミルク	3 g
活性炭末	0.6 g
精製水	100 ml

グルコースとスキムミルクを加温溶解し、炭末を加えてよく混合してスクリーキ

キャップ付チューブに適量分注する。110℃、10 分間高压滅菌後、直ちに流水で冷却し、密栓の上冷蔵保存する。通常の 121℃ 15 分間ではスキムミルクと炭末が凝固するので、温度と圧力に注意する。

B 液

L-アスコルビン酸ナトリウム	5 g
精製水	100 ml

ろ過滅菌して少量ずつスクリーキャップ付チューブに分注し、-20℃以下で凍結保存する。

C 液

ゼラチン	20 g
精製水	100 ml

加熱溶解後、スクリーキャップ付チューブに適量ずつ分注し、121℃、15 分間高压滅菌する。密栓して室温保存する。

(2) 必要な器材

①デシケーター

吸引コック付きの真空用デシケーターで、真空ゲージがついていれば使い易い。

②五酸化リン

菌保存液をディスク状に乾燥するために、潮解性を利用する。多量の水があると強く反応するので、取り扱いに注意する。炎症を起こすので、皮膚や粘膜につけないこと。一度に処理する株数が少なければシリカゲルで代用することも可能である。

③クッキングペーパー

従来使用していたパラフィン濾紙の代用として、市販のクッキングペーパー（オーブン料理用）を使用することができる。クッキングペーパーをガラス製シャーレのサイズに切り、オートクレーブで 121℃、15 分滅菌後乾燥する。この 1 枚ずつをガラス製滅菌シャーレに入れる。片面用クッキングペーパーではシャーレに入れる際に、クッキングペーパーの裏表に注意する。

参考までにパラフィン濾紙の作製法は、病理標本用固形パラフィンを溶解し、140～145℃に保つ。これに直径 7cm の円形濾紙を 1 枚ずつ入れて 1 分間程度放置する。ピンセットで 1 枚ずつ取り出し、余分なパラフィンを除き、ガラス製滅菌シャーレ中で固化させる。

④真空ポンプ

20～30mm/Hg 以下の減圧度が得られるものがよい。

(3) ディスクの調製法

①保存菌株の準備

培養は、保存菌に適した平板培地を 1 株あたり 1～数枚を使い、適切な温度と方法で行う。発育阻止剤などの入った選択培地は使用しない。腸内細菌などのように良く発育する菌は、トリプトソイ寒天培地、ハートインフュージョン寒天培地でよいが、栄養要求性が高い菌には血液寒天培地やチョコレート寒天培地等の発育に適した培地を用いる。

平板の枚数は菌の発育度により異なるので、発育が良ければ 1〜2 枚、悪ければ 3〜4 枚あるいはそれ以上必要とする。保存には対数増殖期の新鮮培養菌を用い、長時間培養したものは不適である。

②ディスクの作製

試薬A液はミキサーでよく混合し、B液、C液をそれぞれ液状にしておく。解凍したB液は再凍結せずに残りは捨てる。A液 1 容、B液 1/5 容およびC液 1 容を滅菌試験管に分注し、保存菌を均等に浮遊させる。*Neisseria* 属菌のように粘調性で浮遊させにくい菌ではA液 1 容とB液 1/5 容を滅菌試験管に分注してから保存菌を注意深く均等に浮遊させたのち、C液 1 容を加えてよく混合する。滅菌試験管に分注する量は作製するディスクの枚数による。通常はA液、B液およびC液合わせて 1 ml が適量である。

新鮮培養菌を掻き取り、A B C 混合液に浮遊する。浮遊液の菌濃度はディスク乾燥時に菌数が減少するので、浮遊時に菌量が $10^9 \sim 10^{10}$ CFU/ml 以上得られるように十分に濃厚でなければならない。しかし、必要以上に大量の菌を浮遊させることは、ゼラチン強度の低下を招きディスクがもろく壊れ易くなる。

菌浮遊液を毛細管ピペットで、気泡が入らないようにガラス製滅菌シャーレ中のクッキングペーパー上に適当な間隔で 0.025〜0.03ml ずつ滴下する。1 ml の浮遊液でおよそ 30 滴滴下できる。

ディスクの作製と同時に、掻き取った残りの平板を冷蔵したり、菌種によっては簡易保存法あるいは綿棒保存法により株を保存する。作製したディスクの菌数が少ない場合や雑菌の混入がある場合にこれから株を再び起こす。

③乾燥

デシケーターの中に、シャーレ数枚に入れた十分量（表面積が広いほど乾燥能率がよい）の五酸化リンを置き、浮遊液を滴下したクッキングペーパーの入ったガラス製滅菌シャーレを置く。乾燥しやすくするために滅菌ガラス棒をシャーレの蓋の間に入れ、デシケーターの蓋を閉じて真空ポンプで約 20mmHg (2700 Pa) まで減圧する。4〜5 時間経過すると、五酸化リンは吸湿して表面が潮解し、滴下した菌浮遊液はディスク状に平坦になっている。この時点で一度常圧に戻し、五酸化リンの潮解部を取り除き、必要があればさらに五酸化リンを追加して、今度は強く減圧する。

なお、潮解した五酸化リンは強酸性なので、中和処理を施したのち廃棄する。

④ディスクの保存

乾燥したディスクは、火炎滅菌した先の細いピンセットでクッキングペーパーから剥す。濾紙を軽く湾曲させると自然に剥がれ落ちる。これを滅菌したシリカゲル入りの小瓶（あるいは小容器）に集め、密栓して−20℃以下の冷凍庫で保存する。

また、保存と同時に、菌の生存と雑菌の混入の確認培養のため、1 枚のディスクを溶解し、平板に塗抹して培養する。生菌数が十分あることと雑菌の混入が無いことを確かめる。菌数が不十分であるか、雑菌の混入があれば、ディスクを作り直す。

（4）ディスクの溶解

菌を使用するときは、ディスク 1 枚を取り出し滅菌小試験管に入れる。適当な液体培地を 0.1〜0.2ml 加えて 35〜37℃で約 5 分間ときどき攪拌しながら溶解し、その 1 滴を平板培地に塗抹し培養する。

（5）保存期間

腸内細菌、*Pseudomonas*、*Streptococcus*、*Haemophilus*、*Neisseria*、*Branhamella*、*Bacteroides* 等の限定された菌での保存実験では、いずれの菌も 3 年以上生存し、生菌数の減少も 1 オーダーにすぎなかった。しかし、コレラ菌では乾燥直後には生存していたが、凍結保存 1 週間で死滅した。

標準株や薬剤感受性用対象株、分離株などを $-40\sim-80^{\circ}\text{C}$ で保存することが可能である。淋菌をはじめとする *Neisseria* 属菌、*Streptococcus* で 25 年、*Campylobacter* で 17 年を経過しても比較的良好に保存されている。生化学的性状や集落型、病原性、薬剤感受性などに保存中の変異は全く認められていない。

2) 凍結保存法⁴⁾

凍結保存にはヒツジ、ウマあるいはウサギ脱線維素血液、15～20%グリセリン加 TSB あるいは Greaves 液を用いることができる。保存液を滅菌スクリーキャップ付チューブに 1 ml 分注し、これに菌苔状の 18 時間培養菌の平板 1 枚分を浮遊させ、 $-40\sim-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存する。菌を浮遊させた保存液をドライアイス・エタノールで急激に凍結させると生存性が増す。

3) 凍結乾燥法

通常の凍結乾燥法により菌株を保存する。

ゼラチン・ディスク法のディスクの乾燥を凍結乾燥機のチャンバー内で行うこともできる。この場合高い生存性が得られ、保存菌株の扱いも容易である。

IX. 感染症発生動向調査事業における検査の進め方

病原性 *Neisseria* 属菌は死滅しやすく、輸送や保存が難しい。そのため、感染症発生動向調査事業等において衛生研究所で病原性 *Neisseria* 属菌（淋菌および髄膜炎菌）の検査を行う場合には、調査の目的やその他の状況に応じた検査の進め方を設定しなければならない。

1. 検体を受領する場合

検体採取直後に検査を始めることが理想であり、輸送・保存は最小限にとどめる。輸送・保存が避けられない場合は、①輸送培地の使用を検討する、②分子遺伝子学的手法による検出や抗原検出による検査をおこなう、③医療機関や検査機関において培地に接種し、（可能であれば培養後に）それを輸送する、④検体は受領せずに医療機関や検査機関において菌を分離し、分離菌株を受領する、といった選択肢が挙げられる。特に検体を採取してから検査を始めるまでに1日以上輸送・保存期間がある場合には、十分な検討が必要である。

鼻咽頭粘液、膣・子宮頸管分泌物あるいは尿道分泌物は滅菌綿棒で採取し、Stuart 培地（変法）等に接種して冷蔵で輸送・保存することができるが、検出率の低下は免れない。

髄膜炎菌は髄液を対象にしたラテックス凝集法による試薬がある。また、髄液からの PCR 法による検出が報告されている。淋菌では、膣・子宮頸管分泌物、尿道分泌物あるいは尿を対象にした分子遺伝学的手法および酵素抗体法を用いた検出用キットが市販されている。これらの手法は、検体採取から検査開始までの期間が長いなどの理由により菌の分離が困難な場合に有効である。

検体を培地に接種してから輸送する方法は、検体を衛生研究所に搬送してから検査する場合よりも検出率が高くなる。輸送・保存期間（検体採取から検査開始までの期間）が1～2日までの場合に有効である。髄液を T-I medium に接種する方法では、25～37℃に保てば菌は1～2週間程度生存する。

検体の輸送方法は **V. 検体の輸送方法** を参照。

2. 菌株を受領する場合

菌株の受領は、検体採取から検査開始までの期間が3日以上の場合や確実に菌株を確保する方法として選択する。菌株の輸送・保存方法は **V. 検体の輸送方法** および **VI. 菌株の保存方法** を参照。

菌株を受領する場合、輸送中に死滅することを勘案して、菌株分与元においても菌株を保存しておくように依頼する。

コンタミネーションの可能性があるので、受領した株を継代培養し、純培養であることを確認する。純培養であることを確認後、同定・鑑別を進めながら、菌株を保存する。保存法は **VI. 菌株の保存方法** を参照。

X. 文献

- 1) 細菌学実習提要 東京 丸善.
- 2) G.W. Ajello *et al*: Trans-Isolate medium: a new medium for primary culturing and transport of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. J. Clin. Microbiol. 1984; 20:55-58.
- 3) 浅井良夫、山井志朗：死滅しやすい細菌の保存法 ―ゼラチン・ディスクの作製方法― 日本臨床微生物学雑誌 1996;6:44-48.
- 4) Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. Centers for Disease Control and Prevention.
http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/meningitd_manual.pdf 1998.
- 5) D. A. Caugant, E. A. Hoiby, L. O. Froholm and P. Brandtze: Polymerase chain reaction for case ascertainment of meningococcal meningitis :application to the cerebrospinal fluids collected in the course of the Norwegian meningococcal serogroup B protection trial. Scand. J. Infect. Dis. 1996; 28:149-153.
- 6) P. Radstrom *et al*: Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and Streptococci using a seminested PCR strategy. J. Clin. Microbiol. 1994; 32:2738-2744.
- 7) J. G. Cunniff, S. Whitby-Stevens and M. H. Wilcox: Effect of pH changes in cerebrospinal fluid specimens on bacterial survival and antigen test results. J. Clin. Pathol. 1996;49:249-253.
- 8) 微生物検査必携 細菌真菌検査 第3版 東京 日本公衆衛生協会.
- 9) Identification of *Neisseria* and related species. *Neisseria meningitidis*. Centers for Disease Control and Prevention.
<http://www.cdc.gov/ncidod/dastlr/gcdir/NeIdent/Nmen.html> 1998.
- 10) R. K. Selander *et al*: Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl. Environ. Microbiol. 1986;51:873-884.
- 11) M. C. J. Maiden *et al*: Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. 1998;95:3140-3145.
- 12) Multilocus Sequence Typing. The Wellcome Trust. University of Oxford.
<http://mlst.zoo.ox.ac.uk/default.htm>
- 13) J. S. Cashman, R. Boshard and J. M. Matsen: Viability of organisms held in the Isolator blood culture system for 15 h and their rapid detection by acridine orange staining. J. Clin. Microbiol. 1983;18:709-712.

I. 検査の流れ

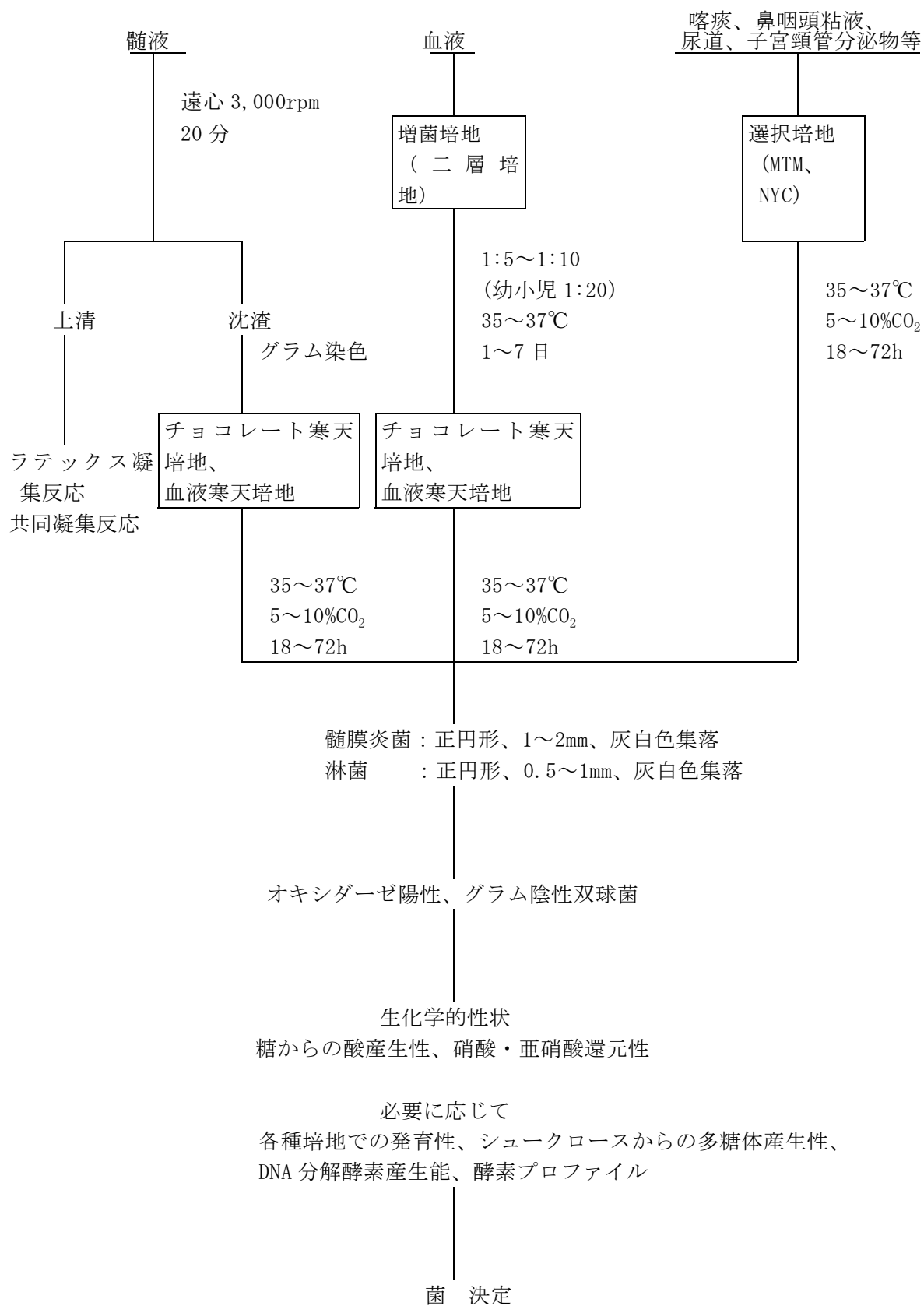


図1 病原性 *Neisseria* 属菌の検査の流れ

II. 検体の採取、検査手技

1. 髄液、皮膚穿刺液、関節腔液

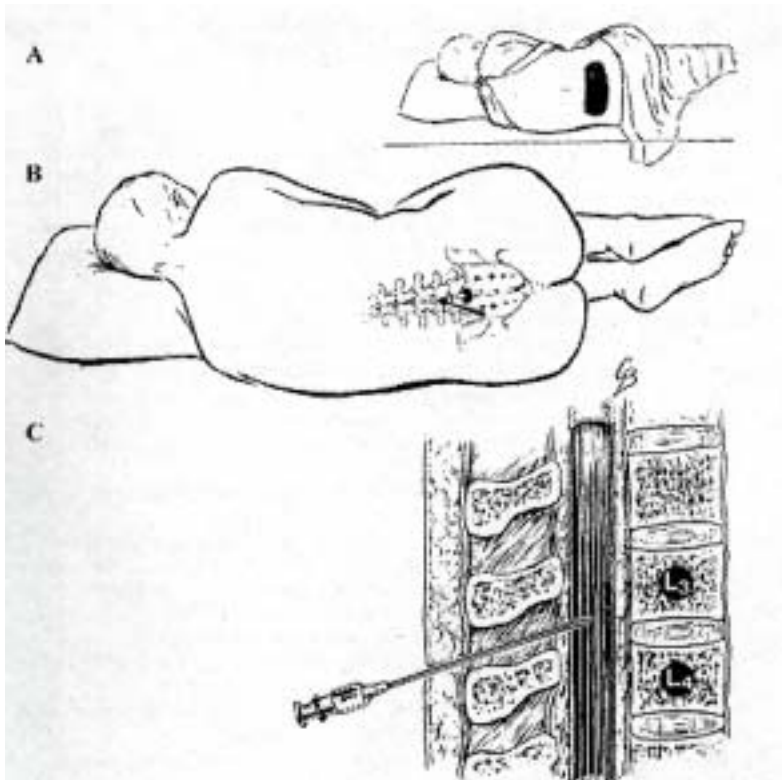
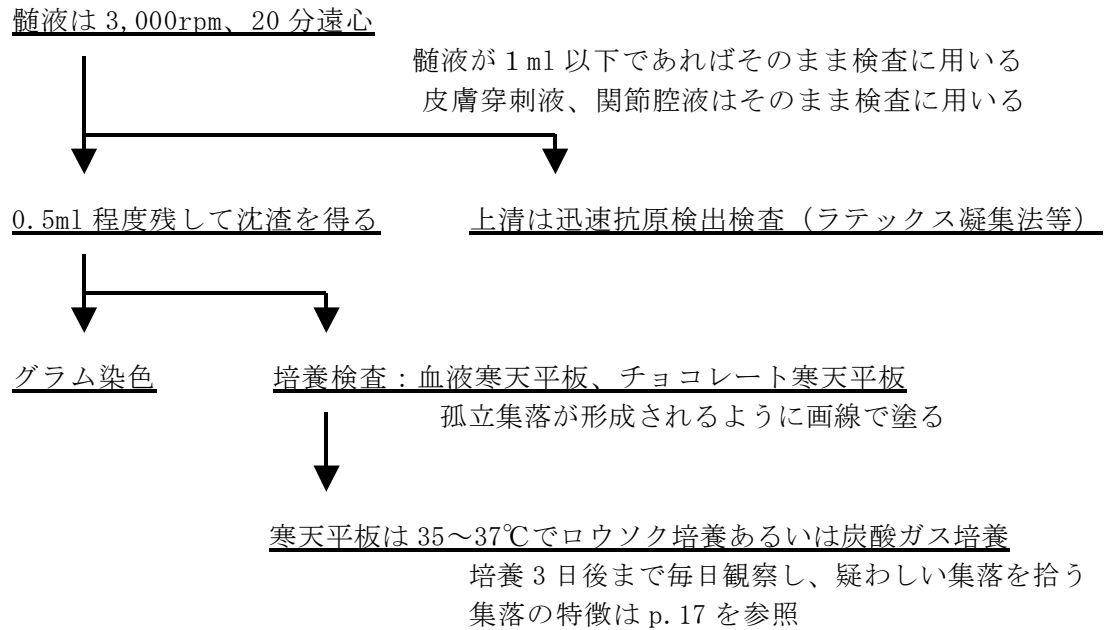


図 2 腰椎穿刺術

A：患者の穿刺を実施する周囲を消毒する。

B：患者の穿刺部位を示す。

C：穿刺針が脊髄腔に達するように注意深く刺す。

出典：Diagnostic Microbiology, Elmer W. et al, J. B. Lippincott, 1992.

2. 血液

採取直後に血液培養用増菌培地に接種



5～10ml を 50ml の培地（1:5 から 1:10）に接種
幼小児：1～2ml を 20ml の培地（1:10～20 程度）に接種
淋菌感染の疑いでは二層培地

35～37℃で培養、7 日後まで毎日観察

培地の通気性を保ち、3～10%CO₂ 環境下に置く

菌の増殖を観察：血液寒天培地

チョコレート寒天培地 } 継代培養

菌の増殖が観察されない：18～24 時間後、48 時間後、7 日後

血液寒天培地

チョコレート寒天培地 } 継代培養

平板上における菌の増殖の有無を確認

3. 喀痰

痰を滅菌シャーレあるいは採痰用の滅菌容器等に喀出



痰（膿様であればその部分）の 1 白金耳を接種



MTM 培地等の選択培地

血液寒天培地、チョコレート培地等の非選択培地
も併用

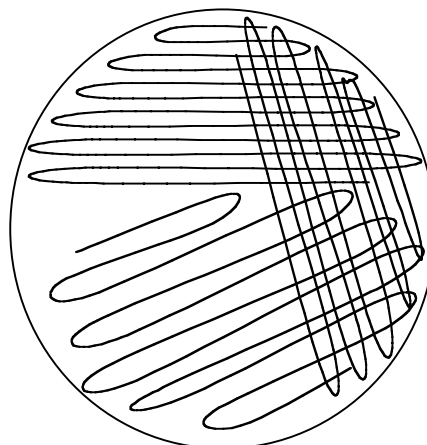
孤立集落が形成されるように画線で塗る

選択培地では濃いめに塗ることができる

35～37℃でロウソク培養あるいは炭酸ガス培養（5～10%）

培養 3 日後まで毎日観察し、疑わしい集落を拾う
集落の特徴は p. 17 を参照

図 3 画線塗抹の 1 例



4. (鼻) 咽頭粘液

滅菌綿棒で鼻咽頭粘液、咽頭後壁から扁桃の表面の粘液をぬぐい取る（下図参照）



採取後直ちに MTM 培地等の選択培地の全面に塗抹



採取直後の培地への接種不可ならば Stuart 培地での
保存・輸送可（冷蔵）

35～37℃でロウソク培養あるいは炭酸ガス培養（5～10%）

培養 3 日後まで毎日観察し、疑わしい集落を拾う
集落の特徴は p. 17 を参照

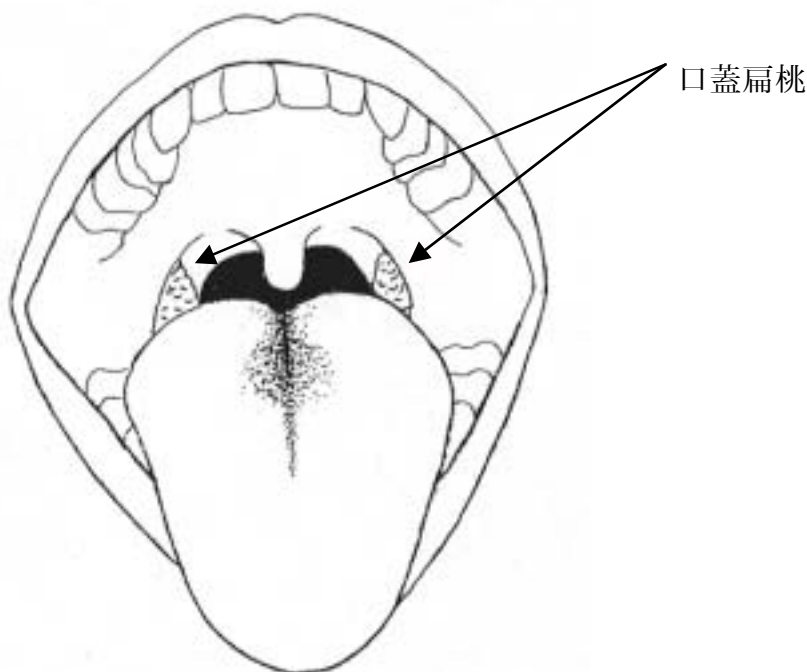


図 4 口腔内の扁桃の部位 左右両側の口蓋扁桃と咽頭後壁の表面を滅菌綿棒でぬぐい取る。

5. 膣・子宮頸管分泌物

滅菌綿棒 2 本で膣、子宮頸管分泌物を採取



1 本をスライドグラスに塗抹



グラム染色

1 本は採取後直ちに MTM 培地等の選択培地の全面に塗抹

採取直後の培地への接種不可ならば
Stuart 培地での保存・輸送可（冷蔵）

35～37℃でロウソク培養あるいは炭酸ガス培養（5～10%）

培養 3 日後まで毎日観察し、疑わしい集落を拾う
集落の特徴は p. 17 を参照

6. 尿道分泌物

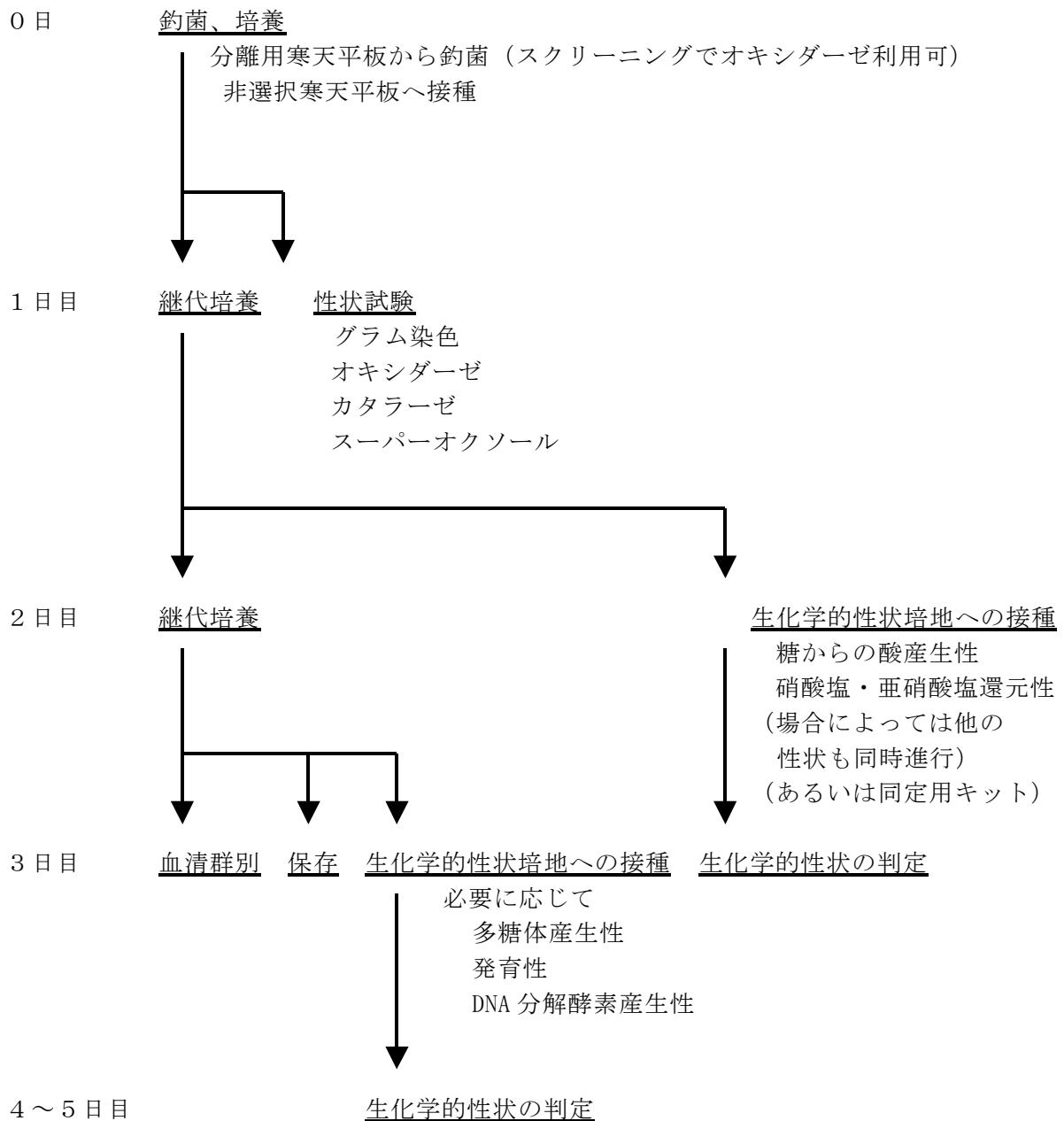
培養3日後まで毎日観察し、疑わしい集落を拾う
集落の特徴は p. 17 を参照

培養 3 日後まで毎日観察し、疑わしい集落を拾う
集落の特徴は p. 17 を参照

III. 菌の分離、同定・鑑別

1. 分離菌の同定・鑑別作業日程の目安

検体を分離用寒天平板に接種してから *Neisseria* 属菌の鑑別が完了するまで、通常 4～7 日を要する。以下に分離用寒天平板からの釣菌に続いて性状試験終了までの作業の流れと日程の目安を示す。



2. 釣菌

18～48 時間培養後、寒天平板上の集落を観察



髄膜炎菌：直径 1～2mm、半透明、

光沢のあるやや隆起した正円形集落

淋菌：直径 0.5～1mm、

T1、T2：0.5mm ほど、不透明、光沢ある隆起した集落

T3、T4：1mm ほど、半透明、光沢少ないやや扁平の集落

小さめの白金耳で多めに釣菌



白金耳の先に菌が見える菌量を拾う

非選択培地（血液寒天培地、Kellogg 培地等）に転培

釣菌すべき集落が判別できない場合は、1% Tetramethyl- ρ -phenyldiamine・HCl 水溶液（オキシダーゼ試験試薬）を集落上に滴下し、オキシダーゼ陽性集落を 30 秒以内に拾う（オキシダーゼ試験によるスクリーニング）。

3. グラム染色

清浄なスライドグラス上に少量の精製水を滴下



新鮮集落から白金耳で菌を取り、精製水に浮遊



自然乾燥後、火炎固定



Hucker の変法でグラム染色



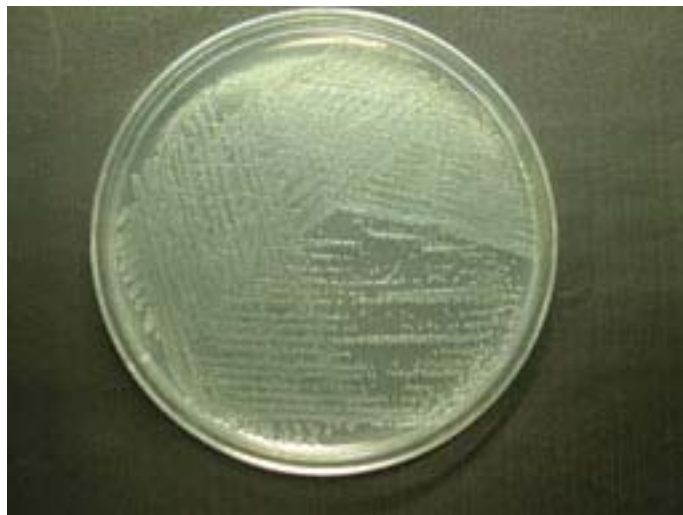
顕微鏡でグラム陰性双球菌であることを確認



MTM

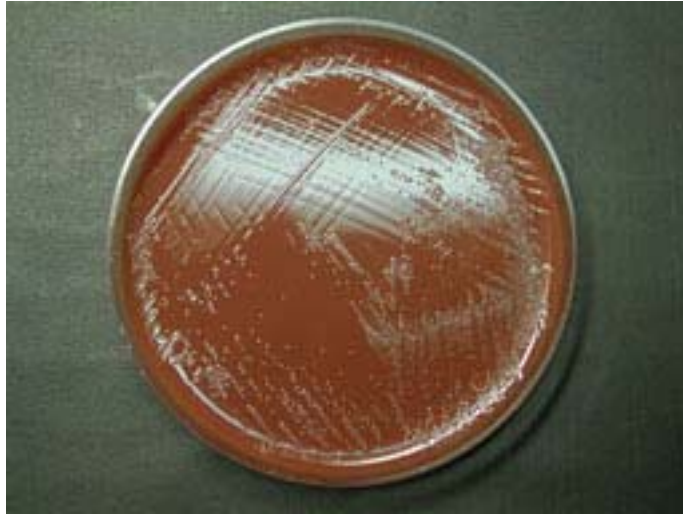


血液寒天培地



Kellogg 培地

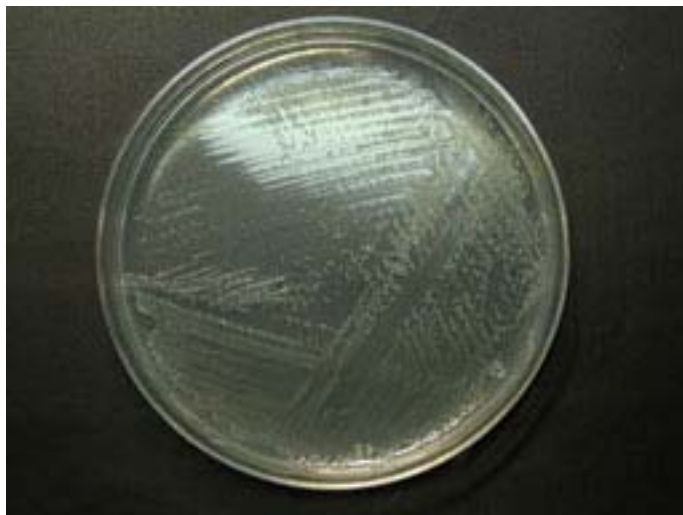
図 5 髄膜炎菌の平板状での様子



MTM



血液寒天培地



Kellogg 寒天培地

図 6 淋菌 (*N. gonorrhoeae*) の平板上の様子

4. オキシダーゼ試験

新鮮集落に 1% Tetramethyl- ρ -phenyldiamine·HCl 水溶液を滴下



数秒後、青紫色に発色

あるいは

1% Tetramethyl- ρ -phenyldiamine·HCl 水溶液をろ紙に滴下



新鮮集落から白金耳で菌を取り、ろ紙に塗抹



数秒後、青紫色に発色

キットや市販試薬の利用可

5. カタラーゼ試験、スーパーオクソール試験

Kellogg 培地で炭酸ガス存在下 35~37℃、16~18 時間培養



新鮮な集落上に あるいは シャーレに 1 白金耳の菌を採り



3%過酸化水素水（カタラーゼ試験）滴下

30%過酸化水素水（スーパーオクソール試験）滴下

判定

発泡すれば陽性

6. 糖からの酸産生性

非選択平板培地（Kellogg 培地等）1～2 枚全面に菌を塗抹



炭酸ガス存在下 35～37℃で、16～18 時間培養



白金耳でかき取り、CTA 培地表面から 0.5～1cm 程度に接種



1 チューブ当たり 2 白金耳程度接種し、接種部を白濁
最後に管底まで穿刺（図 5 参照）

大気中 35～37℃で、18～24 時間培養



判定

培地上部が黄変：陽性 vs 培地上部が赤変：陰性
培地全体が黄変または赤変：雑菌が混入

7. 硝酸塩・亜硝酸塩還元性

非選択培地（Kellogg 培地等）で炭酸ガス存在下 35～37℃、16～18 時間培養



還元性試験用培地に 1 白金耳菌接種



大気中 35～37℃で、24～48 時間静置



試薬 1 と試薬 2 を等量混ぜ、約 0.5ml を培地に滴下



数秒後判定

硝酸塩培地：赤変＝陽性 vs 変化なし



亜鉛末の微量を添加

赤変＝陰性 vs 変化なし＝陽性

亜硝酸塩培地：赤変＝陰性 vs 変化なし＝陽性

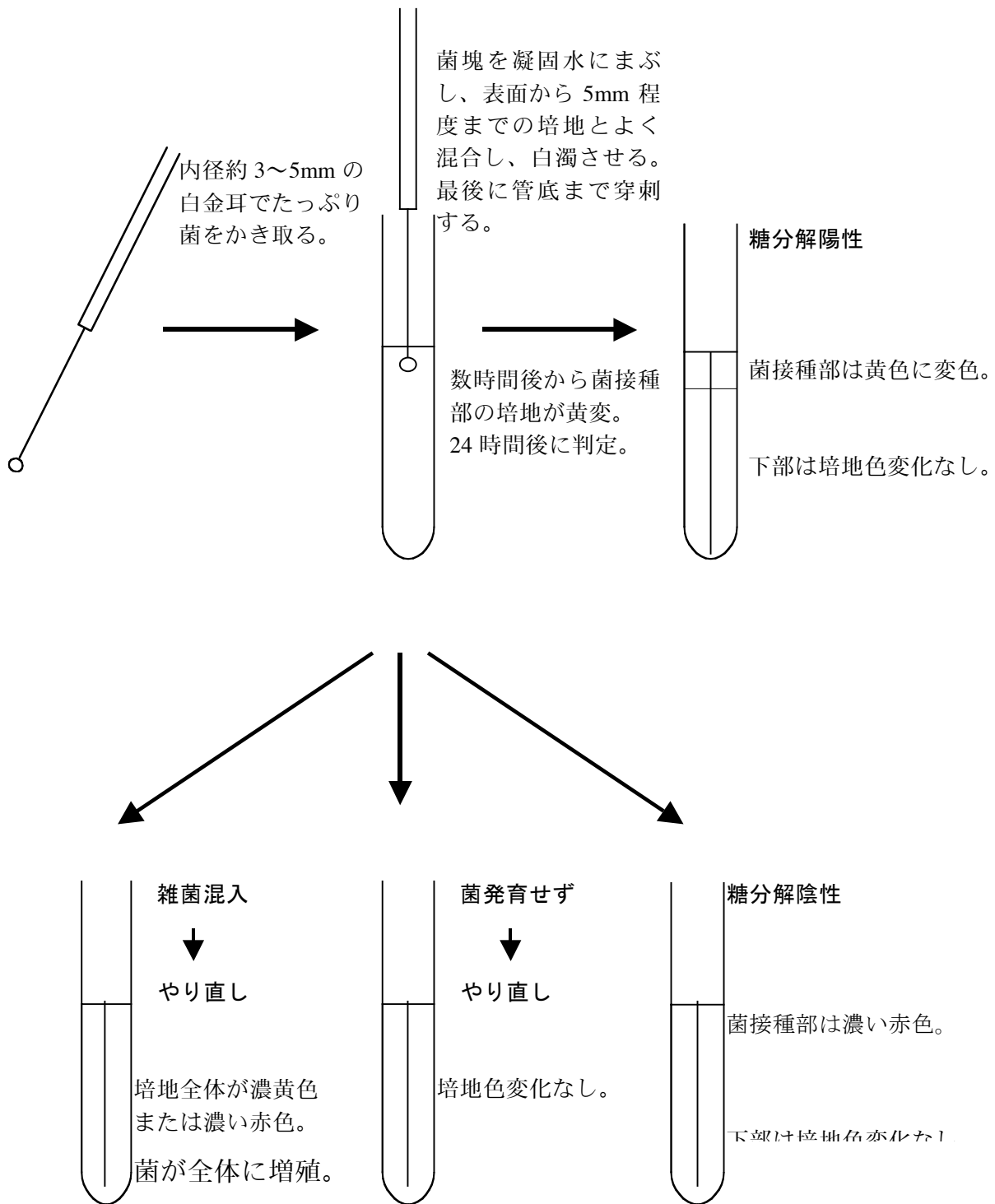


図 7 *Neisseria* 属菌の CTA 培地への接種法と判定

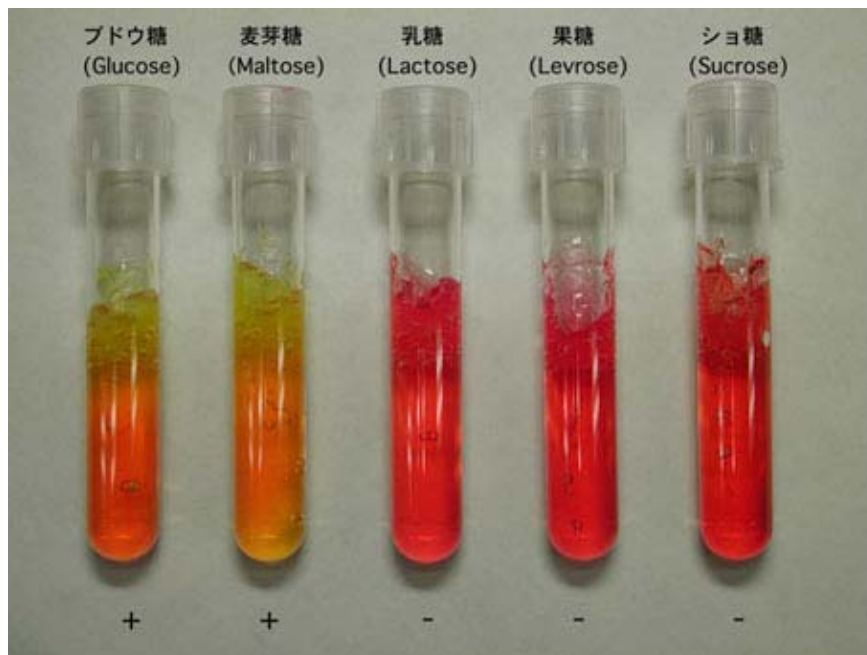


図 8 髄膜炎菌の CTA 培地での糖分解の結果



図 9 淋菌の CTA 培地での糖分解の結果

8. 多糖体産生性試験

非選択培地（Kellogg 培地等）で炭酸ガス存在下 35～37℃、16～18 時間培養



10⁷～⁸CFU/ml 程度の浮遊液作製あるいは白金耳で濃厚に画線接種



1%シュークロース加寒天培地に接種



大気中、35～37℃、48 時間培養



集落に Lugol 液滴下



判定

暗赤紫色から濃青色：陽性

9. 各種培地での発育性

非選択培地（Kellogg 培地等）で炭酸ガス存在下 35～37℃、16～18 時間培養



10⁶～⁷CFU/ml 程度の浮遊液作製



各種寒天培地に接種

MTM 培地あるいは NYC 培地

（MTM 培地や NYC 培地から分離した場合は不要）

Kellogg 培地

食塩無添加培地



MTM 培地あるいは NYC 培地炭酸ガス存在下 35～37℃で、48 時間培養

Kellogg 培地（22℃における発育）及び食塩無添加培地大気中 35～37℃、48 時間培養

10. DNA 分解酵素産生性試験

非選択培地（Kellogg 培地等）で炭酸ガス存在下 35～37℃、16～18 時間培養

↓
DNA 分解酵素産生性試験用培地に濃厚に画線接種

↓
炭酸ガス存在下 35～37℃、24 時間培養

↓
1N 塩酸を培地全体に滴下

↓
判定
集落周辺に透明帯：陽性

11. 群別用血清凝集反応

5%ウマまたはウサギ脱繊維血加 TSA 培地で炭酸ガス存在下 35～37℃、16～18 時間培養

↓
菌を白金耳で取り、1ml 生食に浮遊（McFarland 3~4）

↓
菌浮遊液を 10 分間煮沸

↓
清浄なスライドグラスに抗血清を滴下

↓
抗血清と菌浮遊液を混合、攪拌

↓
凝集を観察

問い合わせ先

国立感染症研究所	細菌第一部	高橋英之	hideyuki@nih.go.jp
		渡邊治雄	haruwata@nih.go.jp

執筆者一覧

高橋英之：国立感染症研究所 細菌第一部

渡邊治雄：国立感染症研究所 細菌第一部

平成 12-14 年度厚生科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業

「髄膜炎菌性髄膜炎の発生動向調査及び検出方法の研究」研究班

遠藤美代子：都立衛生研究所 微生物部

先天性風疹症候群

目次

- 1、先天性風疹症候群 (CRS) の概説
- 2、先天性風疹症候群 (CRS) 診断の基準
- 3、検査に関する一般的注意
 - (1) 実験室、実験者
 - (2) 検査材料の採取
 - (3) 検査材料の輸送
 - (4) 検査の進め方
 - (5) 検査の判定
- 4、検査方法
 - (1) 抗体検出
 - (a) IgM 酵素免疫抗体 (IgM-EIA)
 - (b) 赤血球凝集抑制 (Hemagglutination Inhibition : HI) 抗体
 - (c) IgG 酵素免疫抗体 (IgG-EIA)
 - (2) ウイルスゲノム RNA の検出 (逆転写-nested PCR)
 - (3) ウイルス分離 (組織培養法)
 - (4) 抗原検出 (蛍光抗体法)
- 5、参考文献
- 6、検査依頼先
- 7、執筆者

1、先天性風疹症候群(CRS)の概説

風疹の感染経路は呼吸器であり、感染は全身に及ぶ。潜伏期は約2週間。その症状は、3日程度の発疹（3日はしか）と発熱、時には、耳介後部のリンパ節腫張を伴う。成人の約15%が不顕性感染である。従って、既往および他の発疹性疾患との鑑別は血清診断による。

風疹の検査、診断マニュアルは、別に定められる。

風疹が重要視されるのは、先天性風疹症候群（Congenital Rubella Syndrome : CRS）の存在による。風疹に対する免疫の無い女性が妊娠初期（特に3ヵ月以内）に風疹に感染すると、その児に CRS を発症することがある。眼（白内障、緑内障、網膜症、小眼球）、耳（高度難聴）、心臓（PDA、ASD、VSD、AS）の障害が3大障害であるが、血小板減少、肝脾腫、身体および精神の発達遅滞等を伴うことが多い。

母親が不顕性感染でも、また、稀には再感染でも CRS を発症することがある。発生頻度は、出生前のウイルス遺伝子診断の結果から、母親が顕性感染の場合、胎児感染率は約1/3で、感染胎児が障害を有する率が約1/3である。即ち、顕性感染の母親から約1/10の率で CRS が発生する。再感染による CRS は初感染による CRS の約1/100の頻度である。

1964～65年の沖縄での408名の CRS の大量発生、1966年の本土での風疹の大流行を契機として、風疹ワクチンの開発が始り、1977年から女子中学生に対する予防接種が開始された。それに加えて、1989年から男女幼児に対するMMR（麻疹、おたふくかぜ、風疹）ワクチンの接種が導入された。しかし、このMMRワクチンは、おたふくかぜワクチンによる髄膜炎の発生により中断した。予防接種法改正により1995年からは男女幼児（12～90ヶ月）と2003年9月までの経過措置として男女中学生が接種対象者になった。この接種対象者の変更（対象者数が約4倍増加）により、風疹患者発生数は、1999年より大きく減少しはじめた。それに平行して CRS の発生数も減少して、1桁の前半の数値になっている。

2、先天性風疹症候群(CRS)診断の基準

WHOが出している野外試験版において、簡単に以下のように定義されている。

1) 臨床的確定 CRS

A群の2項目か、A群の1項目とB群の1項目を有するもの。

(A) 白内障およびまたは先天性緑内障、先天性心疾患、難聴、色素性網膜症、

(B) 紫斑病、脾腫、小頭症、精神発達遅滞、髄膜脳炎、骨透亮症、生後2

4 時間以内に発症した黄疸

2) 実験室確定 CRS

臨床的に確定した CRS において、風疹 IgM 抗体が陽性の例。

WHO の基準には入っていないが、ウイルス遺伝子陽性、または、ウイルス分離陽性。

3、検査に関する一般的注意

(1) 実験室、実験者

風疹ウイルスはクラス 2 に分類されているので、P2 実験施設で BSL2 の取り扱い基準に従って行う。被験者由来の検査材料は安全キャビネットの中で取り扱う。

試験者は、予め風疹抗体価の存在を確認し、抗体が無いか低い場合 (HI 抗体価 1:8~1:16) には風疹ワクチンを接種し、抗体の獲得や上昇を確認してから検査に従事するのが望ましい。

(2) 検査材料の採取

検体としては、抗体測定用に血清、ウイルス分離やウイルス遺伝子検出用に咽頭ぬぐい液、末梢血、臍帯血 (出生時)、血清、尿、脳脊髄液、白内障レンズ等を用いる。滅菌容器に採取し、密栓後直ちに -80℃ に凍結保存する。

1) 咽頭ぬぐい液：滅菌綿棒の先端の綿球を保存液 (アール液等) に浸して被験者の咽頭部分をこすり、その綿棒を保存液の試験官の中で攪拌したのち、綿棒を取り出し密栓する。

2) 末梢血および臍帯血 (出生時)：抗凝固剤として EDTA または、クエン酸を用いて採取する。PCR 反応の妨げになるヘパリンを用いてはならない。

3) 尿および脳脊髄液：そのまま保存。

4) 血清：血液採取後、血清を分離してから保存する。抗体測定にも利用するが、ウイルス分離やウイルス遺伝子検出にも使用する可能性があるため、-80℃ に凍結する。

5) 白内障レンズ：白内障の手術の際に、摘出したレンズ。ホモゲナイザーまたは超音波で軽く組織を壊してから用いる。

(3) 検査材料の輸送

ドライアイスによる凍結状態のままで、検査を行う施設に送る。ドライアイスによるウイルスの不活化のおそれがあるので、密閉容器の蓋をビニールテープ等でシールする。送付に当たっては、氏名、年齢、性別、検体の種類、症状、

採取病日等の必要事項を記入し、検査材料と一緒に送付する。送付先には、検体数、搬入予定日時等を予め連絡しておく。

（４） 検査の進め方

WHO による 0～11 ヶ月齢の小児における CRS サーベイランスのフローチャートを引用する（図 1）。

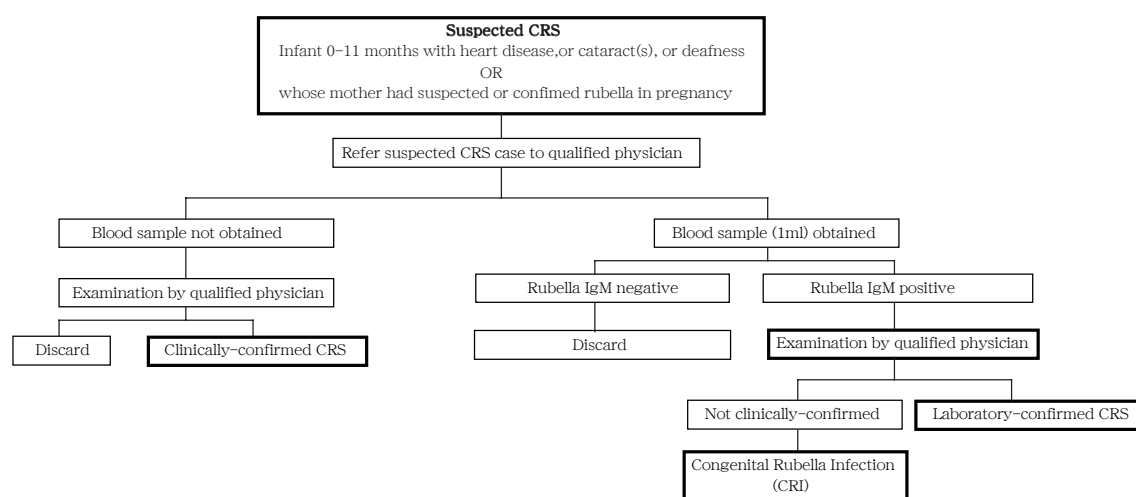


図 1、0～11 ヶ月齢の小児における CRS サーベイランス(WHO)

CRS 患児の診断

CRS 患児の診断は、第一義的には出生後における白内障、難聴、心奇形等の CRS に特徴的な臨床症状に基づく。CRS 患者に対する実験室診断法としては、CRS 患児の血清検査およびウイルスまたはウイルス遺伝子検出がある。

加えて妊娠中に母親が風疹感染を受けたことのウイルス学的な確認が参考になる。

また、妊娠中に出生児が CRS となる可能性を推測するために、出生前に胎児由来試料についてウイルス遺伝子の検出を行うことによって胎児の風疹感染の有無を調べることができる。検体の採取技術や検査可能施設等に制約があり、一般的ではないのでここでは参考として記載する。胎盤絨毛（妊娠 9～11 週頃）、臍帯血（妊娠 18 週以降）、羊水（妊娠 16 週以降）を試料として用いる。母体保護法により妊娠 21 週 6 日までに検査結果を出せるように時間的に余裕のある採取が望ましい。

（５）検査の判定

患児の血清診断としては、１）風疹 IgM 抗体の存在（生後約半年は存在する）、２）高い HI 抗体価または、高い IgG-EIA 値の長期持続（非 CRS 患児の早期減衰に比べてほぼ 1 年以上存在）、３）出生時の総 IgM 量が 20mg/dl 以上（風疹に限らず胎内感染の存在を意味する）、また、抗原診断としては、４）ウイルスゲノム RNA の検出、５）ウイルス分離、の少なくともいずれか 1 つが陽性であれば、患児は胎内での風疹感染陽性と判定する。

補体結合（CF）抗体の測定は、その感度の低さから勧められない。

４、検査方法

（１）抗体検出

（a）IgM 酵素免疫抗体（IgM-EIA）

間接法 EIA キットと IgM 抗体捕捉法による EIA キットとの 2 種類があり、市販されている。何れも、製造所の使用説明書の記載に従って操作し、キットに添付されている血清を標準にして判定する。

＜評価の目安＞

CRS 患児の場合、風疹 IgM 抗体が存在するだけで確定診断になる。生後時間が経った患児の血清の場合、弱陽性より値の低い疑陽性となる事が有りうるが、その場合は、陽性と診断して良い。

（b）赤血球凝集抑制（Hemagglutination Inhibition：HI）抗体

風疹の検査マニュアル（P.4-8）、参照。

＜評価の目安＞

HI 抗体が存在することが必須である。存在しない場合は、臨床症状からは CRS と思われても、実際には CRS では無く風疹以外の原因による。HI 抗体価の減衰は、非 CRS 患児の早期減衰に比べて遅く、ほぼ 1 年以上存在する。

（c）IgG 酵素免疫抗体（IgG-EIA）

間接法 EIA のキットが市販されている。何れも、製造所の使用説明書の記載に従って操作し、キットに添付されている血清を標準にして判定する。

＜評価の目安＞

定性的には、HI 抗体価とほぼ相関する。HI 抗体の場合と同じように、IgG-EIA 抗体が存在することは必須である。存在しない場合は、臨床症状からは CRS と思われても、実際には CRS では無く風疹以外の原因による。IgG-EIA 値の

減衰は、非 CRS 患児の早期減衰に比べて遅く、ほぼ 1 年以上存在する。

（２）ウイルスゲノム RNA の検出（逆転写-nested PCR）

風疹の検査マニュアル（p. 9-12）、参照。

（３）ウイルス分離

風疹の検査マニュアル（p. 12-13）、参照。

（４）抗原検出（蛍光抗体法）

風疹の検査マニュアル（p. 13-14）、参照。

5、参考文献

- 1) Viruses, Rickettsiae, Chlamydiae, and Mycoplasmas (L. M. Clarke, Sec. ed.), in Clinical Microbiology Procedures Handbook (ed. in Chief, H. D. Isenberg): Sec. 8, American Society for Microbiology, Washington DC, 1992.
- 2) Best JM and O'Shea S: Rubella virus. in Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. 7th ed.: EHLennette, DA Lennette, ET Lennette eds., pp583-600, American Public Health Association, Washington DC, 1995.
- 3) 加藤茂孝：風しんワクチン「ワクチンハンドブック」国立予防衛生研究所学友会編、pp170-179、丸善、東京、1996.
- 4) Cutts FT, Best J, Siqueira MM, Engstrom K, Robertson SE : Guidelines for surveillance of congenital rubella syndrome(CRS) and rubella. Field test version, May 1999, WHO.
- 5) Katow S : Rubella virus genome diagnosis during pregnancy and mechanism of congenital rubella. Intervirology, 41, 163-169, 1998.
- 6) 加藤茂孝：日本における先天性風疹症候群：1978-93 年の発生状況。臨床とウイルス 23, 148-154, 1995.
- 7) 加藤茂孝：風疹の胎児診断、川名尚編集「女性と感染症」（新女性医学大系 10）、pp307-314, 1999.
- 8) 加藤茂孝：風疹ウイルス、「臨床 DNA 診断法」古庄敏行、井村裕夫監修、pp978-980、金原出版、東京、1995.
- 9) Katow S, Arai S : Quantitation of rubella virus genome by QPCR and its application to resolution for mechanism of congenital rubella syndrome. In Modern Application of DNA Amplification Techniques-Problems and New Tools. Lassner D, Pustowoit B, Rolfs A eds. pp93-100, Plenum Press , New York, 1997.

6、検査依頼先

都道府県衛生研究所

政令指定都市衛生研究所

国立感染症研究所ウイルス第三部

7、執筆者

加藤茂孝：国立感染症研究所ウイルス第三部

海野幸子：国立感染症研究所ウイルス第三部

加藤宏幸：国立感染症研究所ウイルス第三部

赤見正行：群馬県衛生環境研究所

神戸市環境保健研究所

栃木県保健環境センター

長野県衛生公害研究所

兵庫県立健康環境科学研究所

炭 疽

炭疽検査マニュアル

目次

I. 炭疽検査法の概要

1. 疫学および治療・予防
2. 臨床症状

II. 細菌学的検査

1. 炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) の形態
2. 集落および莢膜の鏡検
 - 1 ポリクローム・メチレンブルー染色
(Polychrome methylene blue stain: M Fadyean's reaction)
 - 2 レビーゲル染色
 - 3 レフレルのメチレンブルー染色
 - 4 ギムザ染色
3. 分離培養法
 - 1 分離培養用培地
 - 2 アスコリー反応
 - 3 パールテスト
 - 4 ヲファージテスト
 - 5 形態及び生化学的性状
 - 6 動物接種

III. 遺伝子診断

1. 鋳型 DNA の調整
 - 1 菌株
 - 2 粉状物
 - 3 食品、組織及び臓器
 - 4 土壌
2. PCR (文献 2 による方法)
 - 1 プライマーオリゴヌクレオチド
 - 2 PCR 反応液
 - 3 反応条件

- 4 電気泳動、核酸染色、バンドの確認
3. PCR（文献4による方法）
 - 1 プライマーオリゴヌクレオチド
 - 2 PCR 反応液
 - 3 反応条件
 - 4 その他

IV. 汚染の除去と消毒

1. 汚染の序個、消毒及び滅菌
2. 検査室における消毒
3. 人体の汚染
4. 建物等の汚染
5. 衣服、道具、器物等の汚染
6. 水の汚染

V. 文献

VI. 執筆者一覧

I. 炭疽検査法の概要

炭疽（anthrax）は *Bacillus anthracis*（炭疽菌）の感染によっておこる急性敗血症性の疾病である。人獣共通感染症として重要であるが、ウシなどの草食獣に比べてヒトは比較的抵抗性が強いといわれる。

1. 疫学および治療・予防

炭疽は地球上に広く存在し、世界の多くの地域で発生がみられる。患者数および動物の炭疽の発生は発展途上国や獣医衛生の立ち後れている国に多く、それぞれ年間およそ 2 万人および 100 万頭に達すると推定されている。一方、先進国でみられる炭疽は動物の組織の処理過程での孤発的発生が多い。ヒトおよび動物の炭疽の自然感染は、偶発的に摂取（あるいは接触）した芽胞が原因であり、炭疽菌が個体から個体へ直接伝播されることはほとんどない。

炭疽菌は土壌などの環境中で芽胞として長期間生残し、動物に感染を繰り返す。芽胞が生体内に侵入すると発芽し、栄養型として体内で急速に増殖し炭疽を発病する。感染した動物の血液、体液、死体などで地表が汚染すると、その土壌は再び感染源となりうる。炭疽菌はこのような感染サイクルを繰り返して炭疽汚染地帯を作る。スペイン中部からギリシャ、トルコを経てパキスタンに及ぶ汚染地域は炭疽ベルトとも呼ばれる。

近年わが国では家畜衛生等の対策が功を奏して動物の炭疽発生は極めて少なくなり、その結果ヒトの炭疽発生も経験されていない。

炭疽菌による暴露が明らかな場合、発症前であれば経口感染や吸入感染であっても抗生物質による暴露後治療が効果的とされる。

発症者には 200 万単位のペニシリン G、またはシプロフロキサシンの静脈内投与が効果的とされる。

後述する旧ソ連の事故では入院患者に対してペニシリンまたは他の抗生物質、免疫グロブリン、コルチコステロイドの投与、および人工呼吸治療が行われた。

ヒト用無細胞ワクチンが実用化されているがわが国では使用されておらず、入手も不可能である。ウシおよびウマの予防には莢膜プラスミドが脱落した無莢膜ワクチン株の生菌ワクチンが用いられている。

家畜からヒトへの伝播の防止は、病獣の同定診断と淘汰が第一である。非流行国における炭疽の発生は流行地域から輸入される羊毛や骨などの動物産品からおこる危険性が高いため、防疫には汚染された家畜成分のサーベイランス、および検疫が有効である。

2. 臨床症状

ヒトの病型は伝播様式によって皮膚炭疽（経皮感染）、腸炭疽（経口感染）、および肺炭疽（吸入感染）の三つに分けられる。

皮膚炭疽（炭疽よう）：炭疽の自然感染の 95%以上が皮膚炭疽である。炭疽菌芽胞は正常の皮膚からはほとんど侵入せず、創傷部から体内に取り込まれる。炭疽菌や芽胞を含んだ動物又はその成分と接触した後 1-10 日して小さな掻痒性、無痛の丘疹が出現し、周囲に発疹と浮腫が出現する。丘疹は崩壊し、潰瘍を形成する場合がある。局所リンパ節の腫脹が著しい。未治療の場合の致死率は 10～20%とされる。

腸炭疽（出血性腸炎）：感染獣の肉を摂食して発症する。症状は悪心、嘔吐、食欲低下、発熱で始まる。2～3 日後激しい腹痛と血液を含んだ下痢がある。この激しい症状のあと、毒血症、ショック、死亡に至ることがある。病変は盲腸に見られ、時に他の大腸部や十二指腸にも見られる。死亡率は 25～50%とされる。

肺炭疽：発生はきわめてまれである。1979 年、旧ソ連の軍施設から飛散した芽胞によって 64 名が肺炭疽のために死亡したとされるが、この事故以前には 30 例のみが知られていた。初期にはインフルエンザ様症状またはウイルス性呼吸器症状（軽度の発熱、消沈、筋肉痛など）を示し、発熱、呼吸困難、咳、頭痛、嘔吐、悪寒、脱力、腹部と胸部の疼痛が見られる。胸部に浸潤像は見られないが、胸水をともなった縦隔の拡張がある。未治療の死亡率は 90%以上に達するとされる。

動物における炭疽は草食獣、特にウシやウマなどに多い。超急性／卒中性感染、急性感染、および亜急性／慢性感染の病型が知られている。症状は眼結膜の充血、可視粘膜の浮腫、呼吸困難などで、感受性の強い動物は急性敗血症や尿毒症による腎障害を呈して死亡する。

II. 細菌学的検査

1. 炭疽菌(*Bacillus anthracis*)の形態

炭疽菌は、1876 年 R. Koch が感染動物から初めて分離に成功し、分離菌を用いて、マウスに接種し急性敗血症を起こすことを証明し病原性を明らかにした。微生物学の歴史上有名な Koch の 3 原則は、この時樹立されたものである。その後、L. Pasteur は *B. anthracis* を 42~43℃ の高温で培養することによって弱毒化し、ワクチンの実用化を成功させた。*B. anthracis* は、ウシ、ウマ、ブタ等家畜、マウス、モルモット等実験動物やヒトを始めとする哺乳動物に感染する。中でもウシ、ウマ、マウス、モルモット等は感受性が強く敗血症を起こす。

2. 集落及び莢膜の鏡検

B. anthracis は、1~1.5_3~8 μm のグラム陽性大桿菌で鞭毛は保有していない。感染動物の体内では単にか短連鎖であるが、培地で人工培養すると並列または絡み合った状態の断節的な長連鎖を呈する。芽胞は、楕円形または卵円形で菌の中央に菌体の幅以内で形成される。一般的に感染動物体内では形成されないが、剖検や出血により菌が空気に触れると形成される。人工培地では、2%NaCl の添加または対数増殖期以降も培養を続けると形成が促進されるが、 Ca^{++} の存在で抑制される。*B. anthracis* の強毒株がウシ、マウス、モルモット等に感染するとその体内では、莢膜を形成する。このほか、ウマやウシなどの血清を 10~20% 添加した普通寒天培地に塗抹し 20~30% CO_2 存在下で 1 夜 (18 時間程度) 培養すると莢膜が形成される。本法で培養した強毒株の *B. anthracis* 集落は S 型で、血清非添加で好気条件下で培養した時の R 型とは容易に区別できる。また、ブレインハートインフュージョン寒天培地で 24 時間程度培養した菌を 1 白金耳分取り 2~3ml のウマ脱線維素血液に接種し、37℃ で 5~18 時間培養後、厚めの塗抹標本を作製しポリクローム・メチレンブルーで染色すると長連鎖した莢膜保有菌が観察される。本法を M'Fadyean's 反応という。

2. 1 ポリクローム・メチレンブルー染色(Polychrome methylene blue stain : M'Fadyean's reaction)

【染色液】

- 1) Methylene blue 0.3g を 95%エタノール 30ml に溶解する。
- 2) 0.01% KOH 溶液を 100ml 作製する。
- 3) 1)の溶液 30ml と 2)の溶液 100ml を混合する。

新たに調製した 3)の溶液は染色性が悪いので、古い染色液でも同時に染色して染色性を比較し、莢膜が染色されることを確認できるまで保存してから使用する。

【染色法】

- 1) スライドグラスに菌を培養した血液を $1.5\mu\text{l}$ 滴下し、カバーグラスで塗抹する。
- 2) 風乾後、無水または 95%エタノール（メタノールでもよい）に 60 秒間浸漬、固定後、再度風乾させる。
- 3) 染色液を塗抹面に満遍なく滴下し、60 秒間放置する。
- 4) 水洗し、濾紙で水分を吸収し、乾燥させる。洗浄水は高圧滅菌または、10,000ppm の次亜塩素酸ナトリウム溶液中に捨てる。
- 5) まず、100 倍で観察し、次いで 1,000 倍で莢膜を観察する。2〜3 個または長連鎖した無芽胞を観察すると莢膜はピンク色、菌体は青色に染色される。使用した濾紙及びスライドグラスは、高圧滅菌または 10,000ppm の次亜塩素酸ナトリウム溶液中に浸漬後捨てる。

2. 2 レビーゲル染色

【染色液】

- 1) ゲンチアナバイオレット 10g と局方ホルマリン 100ml を混和する。
- 2) よく混和し、数時間後に濾過する。

【染色法】

- 1) スライドグラスに培養した菌、血液や感染動物の臓器を塗抹またはスタンプする。
- 2) 完全に風乾したら、固定せず染色液を載せて 20〜30 秒間染色する。
- 3) 水洗し、乾燥後鏡検する。菌体は鮮やかな紫色、莢膜は淡い紫色に染色される。

染色液には、ホルマリンが入っているので殺菌効果が強く安全であるが、洗浄液やスライドグラスは滅菌後捨てる。ヒトや動物が敗血症死後時間が経過すると染色性が悪くなる。

2. 3 レフレルのメチレンブルー染色

【染色液】

- 1) メチレンブルー5g を純アルコール 100ml に溶解したものをメチレンブルー原液とする。
- 2) メチレンブルー原液 30ml に 0.01%水酸化カリウム溶液 100ml を加えて混和する。これをレフレルのアルカリ性メチレンブルー染色液という。

【染色法】

- 1) スライドグラスに培養した菌、血液や感染動物の臓器を塗抹またはスタンプする。
- 2) 完全に風乾したら、火炎固定する。
- 3) 固定後速やかにレフレルのアルカリ性メチレンブルー染色液を載せ数秒間染色する。
- 4) 水洗し、乾燥後鏡検する。菌体は青色、莢膜は淡青色に染色される。本染色法は、染色時間が長くなると菌体と莢膜の区別がつかなくなる。

2. 4 ギムザ染色

【染色液】

- 1) 水 2ml にギムザ染色液を 1～2 滴加えた薄い染色液を作る。

【染色法】

- 1) スライドグラスに培養した菌、血液や感染動物の臓器を塗抹またはスタンプする。
- 2) 完全に風乾したら、ホルマリンガスで固定する。200 または 300ml のビーカーにホルマリンを 10ml 位入れ、そこに 1)で作製したスライドグラスの塗抹面を下向きにして斜めに立て、発生したホルマリンガスが漏れないように上部はアルミ箔で覆って 3～5 分間固定する。
- 3) 固定後 1)の染色液で 2～3 分間染色する。
- 4) 水洗し、乾燥後鏡検する。菌体は濃紫色、莢膜は淡紫色に染色される。本染色法では、白血球や赤血球も紫色に染色されるので血液塗抹標本では菌と血球との比較ができる。

3. 分離培養法

B. anthracis は、普通寒天培地や普通ブイヨンでよく発育する。発育至適温度は 37℃であるが、12～44℃でも発育する。普通寒天培地で好氣的条件下において 37℃、18 時間位の培養により、やや乾燥、隆起した Rough 型の大きな集落を生じる。普通寒天培地では、束状の長連鎖発育をするため集落の周縁はカール(捲毛 : Medusa-head)状、表面は粗造でスリガラス様構造である。

図 2 に示したように血液寒天培地での *B. anthracis* は、37℃、18 時間培養で非溶血性の周辺が鋸歯状の集落を作る。それに対して、*B. subtilis* は、37℃、18 時間培養で集落の表面は乾燥した凸凹状で、溶血性が認められる。このほか、*B. mycoides* の初代分離では、根足状(rhizoid)の集落を作るのですぐ見当がつくが、培地で継代を重ねると *B. anthracis* と区別し難くなる。また、普通寒天培地での *B. anthracis* と *B. cereus* の集落はよく似ているが、*B. cereus* は 2～3 日経過すると運動性のため拡散する性質が強い。強毒株は、R 型であるが環境の変化によって S 型への移行、毒性の低下、莢膜形成能の喪失など種々の変異が認められることがある。*B. anthracis* 分離培養法の手順を図 1 に示す。本菌感染が疑われる敗血症を起こした動物由来新鮮材料は、血液寒天や普通寒天培地への直接塗抹で充分分離できる。しかし、動物由来材料でも死後時間が経過したものや土壌等環境材料では、他の菌が混入している可能性があるので、検体を希釈したり加熱して芽胞のみを選択的に培養する方法がとられる。*B. anthracis* または本菌に汚染された可能性が強い検体の分離培養に当たっては、安全性の面から P-3 実験室内に設置されたクラス II B のバイオセーフティキャビネット内で操作すべきである。さらに術者は、ラテックスディスポーザブル手袋や白衣を着用した方が危険性が軽減できる。

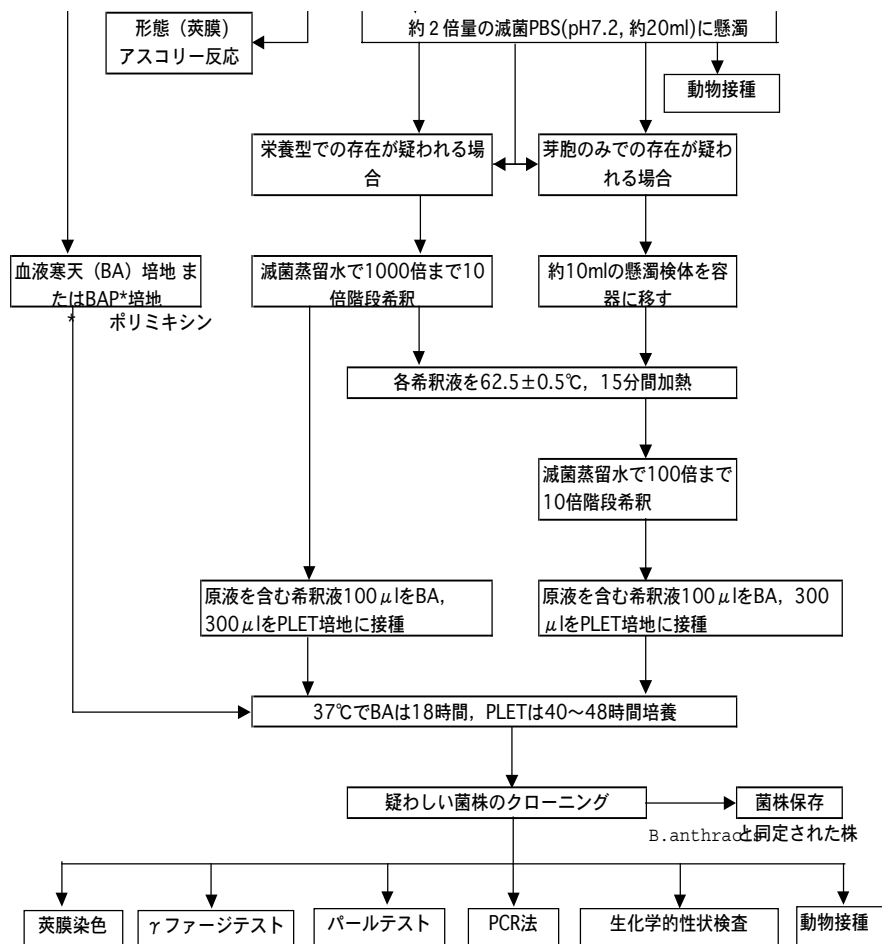


図1. *B. anthracis*の分離・同定手順

3. 1 分離培養用培地

B. anthracis 分離用培地は、普通寒天培地のほか下記に示したような培地を用いる。その培地の組成を以下に示す。

なお *Bacillus* 属の選択分離培地として NGKG 寒天培地（日水）と PBCW 寒天培地（栄研）があるが、これらはどれか一種類を用いればよい。

1) 血液寒天 (BA) 培地			
ハートインフュージョン寒天		40 g	
(ブロスを用いた場合は Bact agar を 1.5% の割合で添加する)			
蒸留水		950 ml	
12℃, 15 分間高圧滅菌 5℃ まで冷却			
馬または綿羊脱線維素血液			
50 ml			
十分攪拌し滅菌シャーレに分注し固める			
2) Polymyxin blood agar 培地 AP			
ハートインフュージョン寒天		40 g	
蒸留水		950 ml	
12℃, 15 分間高圧滅菌 5℃ まで冷却			
馬または綿羊脱線維素血液			
50 ml			
ポリミキシシ		10 万 IU	
十分攪拌し滅菌シャーレに分注し固める			
* 50,000 IU のポリミキシシを作製後 0.4 μl のフィルターで濾過			
2ml ずつ小分けし -20℃ に凍結保存			
3) Polymyxin-lysozyme-EDTA-thallos acetate			
(PLET) agar			
ハートインフュージョン寒天		40 g	
EDTA		0.25-0.3 g	
(or EDTA)		0.32-0.38 g	
酢酸タリウム		0.04 g	
蒸留水		1,000 ml	
12℃, 15 分間高圧滅菌 5℃ まで冷却			
ポリミキシシ			
3 万 IU			
lysozyme*		30 万 IU	
十分に攪拌し, 滅菌シャーレに分注し固める			
* ly を 150,000 IU になるように蒸留水に溶解し, 4 μm の			
フィルターで濾過滅菌後 2ml ずつ小分けして -20℃ に保存			
4) 運動性試験用半流動培地			
ハートインフュージョンブロス		2.5 g	
Bact agar		0.3 g	
蒸留水		100 ml	
2 μl ずつ分注後, 12℃, 15 分間高圧滅菌			

B. anthracis が疑われる集落の微量を高層に固めた運動性試験用半流動培地の上部から 1cm 位の深さまで接種し、20～25℃及び 37℃、48 時間培養し運動性の有無を観察する。*B. cereus* は運動性が陽性で、*B. anthracis* は陰性である。BAP、PLET 培地は、雑菌混入の多いと考えられる検体からの *B. anthracis* の分離に適する。



B. anthracis, 37℃ 18 時間培養

B. subtilis, 37℃ 18 時間培養

図 2. *B. anthracis* 及び *B. subtilis* の血液寒天培地での集落

3. 2 アスコリー反応（血清学的検査）

1) 感染動物の臓器等を細切し、3～5 倍量の生理食塩水を加える。培養した菌でも同様の方法で試験できる。

2) これを沸騰水中で 20 分間程度加熱する。

3) 2,000rpm、5 分間遠心し、上清を 0.45 μ m のミリポアフィルターで濾過する。

4) 濾液を村田試験管または細試験管にとり、その上に炭疽沈殿素血清を静かに重層する。

陽性であれば数分以内に境界面に白濁帯を生じる。本法での白濁は、*B. anthracis* の莢膜の成分であるグルタミン酸ポリペプチドと抗血清との反応による沈降帯である。3)で作製した抗原と生理食塩水、*B. anthracis* 非感染健康血清とを重層させたものを対照として、いずれも陰性であることを確認しておく。

【注意点】

1) 菌量が少なかったり、古くなった材料では陰性となることがある。

2) 重層時に境界面が乱れないようにパスツールピペットで静かに入れる。なお、抗原と炭疽沈殿素血清は、どちらを先に入れてもよい。

3) 炭疽沈殿素血清は、下記で有料入手可能。

独立行政法人農業技術研究機構 動物衛生研究所

〒305-0856 つくば市観音台 3-1-5

TEL : 0298-38-7713, FAX : 0298-38-7880

URL : <http://ss.niah.affrc.go.jp/index.-j.html>

3. 3 パールテスト

1) 最終濃度 0.5 IU/ml、0.05 IU/ml になるようにペニシリンを添加した普通寒天培地を作製する。本培地は、高压滅菌した 9ml の普通寒天培地を 2 組用意し、それぞれに濾過滅菌した 5.0 IU/ml、0.5 IU/ml のペニシリンをそれぞれ 1ml 添加し、静かによく攪拌し滅菌シャーレに分注し固めて作製する。この時、泡を立てないように注意する。なお、対照はペニシリン非添加の普通寒天培地とする。この時作製する各培地は、あまり厚すぎると観察し難いのみならず、鏡検の時フォーカスが合わなくなるので注意すること。

2) 各寒天培地をカバーグラス大に切り、図 3 のように滅菌スライドグラスに載せる。

3) 被検菌を各寒天培地表面に塗抹し、滅菌カバーグラスを無菌的にかける。

4) 菌を接種した寒天培地が乾燥しないように図に示したように脱脂綿に蒸留水等を浸したものをあらかじめ滅菌しておきシャーレの中央に入れる。これを 37℃で 2~4 時間培養する。脱脂綿は、スライドグラスへ触れないようにすること。

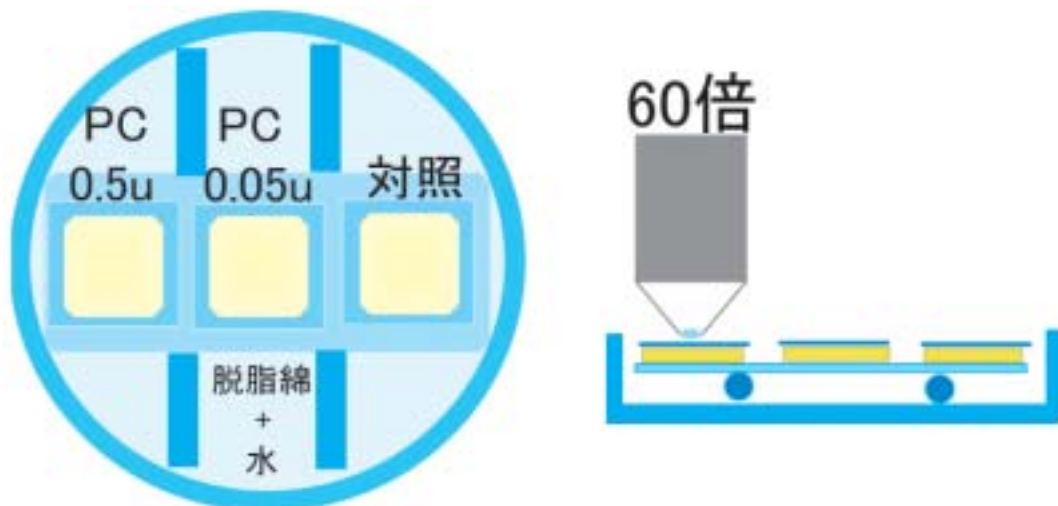


図 3. パールテストの模式図

5) 培養後、400 倍程度で鏡検し、ペニシリンを含む培地で菌が真珠状の膨満した菌、含まない培地で桿菌になっているかを確認する。このテストは、ペニシリンによって菌の細胞壁が脆弱化し、プロトプラスト化と呼ばれる菌体が膨化する現象を応用したものである。このテストはドイツの Jensen と Kleenver によって開発されたものである。

【注意点】

1) 菌がプロトプラスト化し、真珠の珠状になると浸透圧で極めて短時間に破裂する。したがって、30 分間隔で観察するのが望ましい。

2) 本試験を行う際には、必ず陽性対照として *B. anthracis* 弱毒株、陰性対照として *B. subtilis* または *B. cereus* を必ずおく。まれにパールテスト陽性の *B. cereus* があるので、陰性対照とする *B. cereus* は、あらかじめ陰性であることを確かめておくこと。

3) ペニシリン耐性の *B. anthracis* はパールテスト陰性となる。このような株もまれに認められる。

4) 敗血症を起こした動物の血液を直接接種する場合は、赤血球を誤認する可能性があるので 1~2 倍量の滅菌蒸留水を加えて溶血させる。

3. 4 γ フェージテスト

1) 培養菌、臓器乳剤、血液等を普通寒天培地に接種し、直径 3~4cm に広げる。この時、陽性対照として *B. anthracis* 弱毒株、陰性対照として *B. cereus* を必ずおく。

2) γ フェージ液を中央部に 1 滴接種して 37℃で培養する。

3) 3~4 時間培養すると γ フェージ滴下部が溶菌して透明化してくる。

【 γ フェージ液の調製と保存法】

1) 普通、ハートインフュージョン等のブロスに *B. anthracis* Davis 株を接種し、37℃で 2~3

時間培養する。これに γ フェージ 2~3 滴添加し、18 時間培養する。

2) 培養したブロスを遠心後、上清を 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過する。

3) フェージ力価(PFU : plaque forming unit)を測定し、 $10^8 \log$ PFU/ml 以上あることが確認されたものを 0.3~0.5ml ずつに分注し-80℃に凍結保存する。

4) *B. anthracis* Davis 株を普通ブロス等で培養後、McFarland No. 3 程度に調製し普通寒天培地に接種し、これに 10 倍階段希釈したフェージ液を 0.1ml 滴下する。滴下部分に出現したブラック数をカウントし、希釈列の逆数を乗じてフェージ力価とする。

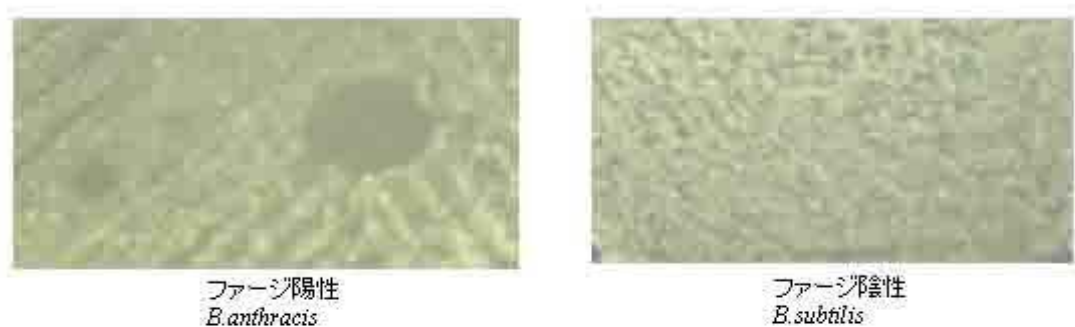


図4. ファージテスト

【注意点】

- 1) 本テストも新鮮検体でないとできない。
- 2) *B. anthracis* Davis 株は、寒天培地では死滅しやすいので保存するためには、凍結か凍結乾燥しておく必要がある。

3. 5 形態及び生化学的性状

B. anthracis、*B. cereus*、*B. megaterium*、*B. subtilis* の主な形態ならびに生化学的性状を表1に示した。*B. anthracis* は、普通寒天や普通ブロスで好氣的条件下でよく発育し、37℃、18時間位の培

養により、やや乾燥、隆起した周縁部がカール状になった Rough 型の大きな集落を生じる。普通ブロスでは、上清が透明で長糸状の沈殿ができて試験管の内壁に厚いリング状の菌苔が付着してくる。運動性用半流動培地では運動性は認められないが、ゼラチン培地に穿刺培養すると穿刺部から外側へ向けて樹枝状の発育をする。なお、非運動性菌は *B. mycoides* のかなりの株でも認められるので注意を要する。一般的に *B. anthracis* の場合、形態及び生化学的性状のみで同定することはほとんどない。したがって、*B. cereus* と *B. anthracis*、非運動性の *B. mycoides* と *B. anthracis* との鑑別はパールテスト、 γ ファージに溶菌性、各種糖分解等を総合して判定すればほとんど間違うことがない。前述の形態及び生化学的性状でも不可能な場合はマウスやモルモット等感受性の強い動物に接種すれば誤ることがない。また、別項で記述されている PCR 法を併用すれば、さらに同定の精度が上がる。

表1. <i>Bacillus anthracis</i> 及び類似 <i>Bacillus</i> spp. の主な性状				
各種性状	<i>B. anthracis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. subtilis</i>
運動性	—	+	+	+
嫌気性発育	+	+	—	—
50℃における発育	—	—	—	+
カタラーゼ	+	+	+	+
VP反応	+	+	—	+
卵黄反応	+	+	—	—
リゾチム	+	+	—	—
10% NaCl 下でのpH5.7	+	d	—	d
炭水化物からの酸産生				
ブドウ糖	+	+	+	+
セロビオース	—	d	+	+
ガラクトース	—	—	d	d
キシロース	—	—	+	d
サリシン	—	+	+	+
ラフィノース	—	—	d	+
マンノース	—	—	d	+
ONPG	—	—	+	+
クエン酸利用能	—	d	+	+
ウレアーゼ	—	d	d	—
カゼイン加水分解	+	+	+	+
デンプン加水分解	+	+	+	+

3. 6 動物接種

通常必要ではないが、動物接種により病原性の確認を行う場合がある。*B. anthracis* は、*Bacillus* spp. の中で唯一ほとんどの哺乳動物に敗血症や菌血症を起こす菌である。本菌に対する感受性が最も高いのはマウスで、次いでモルモットである。これらに対する LD₅₀ は、芽胞の場合皮下接種で 5CFU とされている。皮下接種した場合、芽胞はまもなく発芽し、約 2 時間で浮腫病巣が接種部位に形成される。この時すでに莢膜を形成した菌体が病巣部に認められる。菌は更に増殖すると毛細血管の変性、リンパ管の拡張も認められる。浮腫は、最初に起こった部位から段々外に拡大していくが、菌が存在するのは最初の浮腫層のみで、拡大した浮腫層には存在しない。その後、時間が経過すると菌はリンパ流で局所リンパ節に運ばれ増殖し、血液中に放出され脾臓で捕らえられ暗赤色に腫大する。動物が死亡する直前は血液中にも大量の菌が存在する。また、この時期、血液中には浮腫因子と致死因子という外毒素が証明され、さらにこれらの毒素を宿主細胞に運ぶための防御抗原と呼ばれる蛋白も産生される。

臓器や汚染材料等の乳剤等については、15g 以下のマウスでは 0.1～0.2ml、モルモットでは 0.5～1.0ml を皮下または腹腔内に接種する。分離菌の場合、マウスに対する致死量は 2～4 logCFU である。動物接種を行う場合は、次のことに留意する。

- 1) 接種動物が死んだ場合、*B. anthracis* によるものか否かを前述の方法で確認する。

2) 接種材料を加熱してから接種しても接種動物が死んだ場合は、*Clostridium* sp. を検査する。

3) 接種動物が死んだ場合、そのままにしておくと共食いし、ケージ内面や床敷を汚染するので直ちに検査するとともに実験に用いたケージは完全に滅菌する。

Ⅲ. 遺伝子診断

炭疽の迅速診断法の一つとして、炭疽菌の毒素遺伝子及び莢膜遺伝子を標的とした PCR 法が普及している。迅速に結果を得るために、検体から直接鋳型 DNA を調製して PCR を行う方法が考案されているが、検出感度や PCR 阻害物質の混在など種々の問題がある。確実な結果を得るためには検体の増菌培養を同時に行い、増菌後の試料からも鋳型 DNA を調製して PCR を行う必要がある。PCR 法については迅速スクリーニングとして用い、確定は菌の生化学的性状の確認など培養試験によって行われる。

1. 鋳型 DNA の調製

搬入される検体については菌株、白色粉状物（洗剤、デンプン、スキムミルクなど）、食品、組織及び臓器、土壌などが想定される。

1. 1 菌株

試験には新鮮培養の菌株を用いる。増菌培養については、トリプトソイブイオンに株を接種し、37℃で一夜振とう培養する。培養液を 10 倍希釈し、これをトリプトソイブイオンに接種してさらに 3~4 時間振とう培養する。二次増菌により、芽胞非形成の栄養型細胞を多数得ることができる。培養後、その 100 μ l を TE 緩衝液 900 μ l に接種し、加熱処理（ドライバス、95℃、15 分間、以下加熱処理）する。これを冷却し、その遠心上清 1 μ l を鋳型 DNA として用いる（文献 1）。

寒天培養については、菌株を選択培地（*Bacillus cereus* Selective Agar; OXOID）に画線塗抹し、37℃で 24 時間培養する。炭疽菌を疑う集落を少量の滅菌蒸留水に懸濁し、増菌培養と同様に加熱処理して鋳型 DNA を調製する。

1. 2 粉状物

粉状物に 10 倍容の滅菌リン酸緩衝食塩水（PBS; 1/15 M, pH 7.4）を加えてよく混和し、これを遠心する。上清を捨て、沈渣に少量の TE 緩衝液を加えて加熱し、冷却後、遠心する。その上清を鋳型 DNA として用いる。

検体を 10 倍容のトリプトソイブイオン(Polymyxin B sulfate を 100 units/ml に添加; TSBP) に接種し、37℃で一夜振とう培養する。二次増菌後、その 100 μ l を 900 μ l の TE 緩衝液に接種し、加熱処理する。これを冷却し、その遠心上清を鋳型 DNA として用いる。

1. 3 食品、組織及び臓器

検体を鉗を用いて細切し、これに 5 倍容の抽出液注）を加えてよく混和し、55℃で 1 時間反応させる。この間、緩やかに混和操作を数回繰り返す。反応終了後、フェノール・クロロ

ホルム溶液を等量加えて処理し、これを遠心(12,000rpm, 5 分間)する。上清をマイクロチューブにとり、これに 1/10 量の酢酸ソーダ(3 M, pH 4.0)を加え、次いでイソプロピルアルコールを加えて(抽出液と等量)よく混和した後、遠心する。上清を捨て、沈渣に 500 μ l の 70% エタノールを加えてよく混和し、再度遠心する。上清を捨て、沈渣を遠心エバポレーターにより乾燥させ、これに 50 μ l の滅菌蒸留水を加えて鋳型 DNA とする。

鋳型 DNA の調製については、市販の鋳型 DNA 調製用キットを用いてもよい。また、検体を細切後、10 倍容の TSBP に接種し、37℃で一夜振とう培養を行ってから鋳型 DNA を調製する。

注) 抽出液の組成

TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.8)

NaCl(100mM)

Proteinase K(200mg/ml)

SDS(終末濃度 1%)

1. 4 土壌

土壌から炭疽菌を検出・分離することは、菌数が多い場合を除き極めて困難で、その検出法はまだ確立されていない。

2. PCR(文献 2 による方法)

2. 1 プライマーオリゴヌクレオチド

増幅用プライマーの性状を表 2 に示す。なお、これらについては、細菌遺伝子検出用プライマーとしてキットが販売されている(宝酒造株)。

表 2. 炭疽菌遺伝子の増幅に用いられる PCR-プライマー

名 称	標的遺伝子	塩 基 配 列	増幅DNA長
M011	莢膜遺伝子	5'-gacggattatggtgctaag-3'	591 bp
M012		5'-gcactggcaactggttttg-3'	
PA7	毒素遺伝子	5'-atcaccagaggcaagacaccc-3'	211 bp
PA6		5'-accaatatcaaagaacgacgc-3'	

2. 2 PCR 反応液

以下の組成に従って PCR 反応液を調製する。プライマーは2種類のプライマーを反応液に加えて（マルチプライマー）用いてもよい。

表 3. PCR 反応液の組成

滅菌蒸留水	38.0 μ l
10x緩衝液	5.0 μ l
dNTPs(2.5 mM each)	4.0 μ l
sense Primer(20 pM)	0.5 μ l
anti-sense primer(20 pM)	0.5 μ l
Taq DNA Polymerase(2.5 unit/ μ l)	1.0 μ l
template	1.0 μ l
total	50.0 μ l

2. 3 反応条件

(a) 熱変性 : 95°C、 2 分

(b) 熱変性 : 95°C、 15 秒、 アニーリング : 60°C、 15 秒、 伸長 : 72°C、 30 秒

以上を 35 サイクル

(c) 伸 長 : 72°C、 5 分

2. 4 電気泳動、核酸染色、バンドの確認

増幅反応終了後、常法に従って反応液をアガロースゲルにアプライし、電気泳動を行う。次いでゲルをエチジウムブロマイド水溶液（0.5 μ g/ml）に浸して増幅産物を染色し、これをトランスイルミネーターで観察する。予想されたサイズの増幅断片が確認できたならば、これを撮影して保存する。

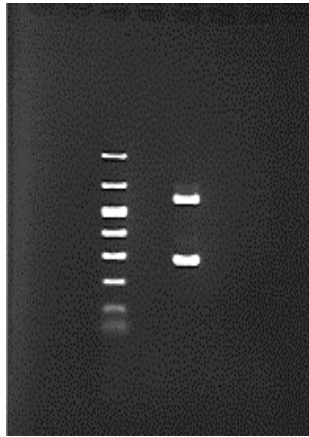


図 5．混合プライマーによる炭疽菌遺伝子の増幅

3．PCR（文献 4 による方法）

3．1 プライマーオリゴヌクレオチド

増幅用プライマーの性状を表 4 に示す。

表 4 炭疽菌遺伝子の増幅に用いられる PCR プライマー

名称	標的遺伝子	塩基配列	増幅DNA長
CAP1234	莢膜遺伝子	5'-ctgagccattaatcgatatg-3'	846 bp
CAP1301		5'-tcccacttacgtaatctgag-3'	
PA5	毒素遺伝子	5'-tcctaacactaacgaagtcg-3'	596 bp
PA8		5'-gaggtagaaggatatacggt-3	

3. 2 PCR 反応液

表 5 に従って反応液を調整する。

表 5 PCR 反応液の組成

滅菌蒸留水	31.5 μ l
10 x 緩衝液 (GibcoのTaqに付属)	5.0 μ l
50 mM MgCl ₂ (GibcoのTaqに付属)	1.5 μ l
dNTPs (2.5 mM each)	4.0 μ l
sense primer (10 pM)	1.0 μ l
anti-sense primer (10 pM)	1.0 μ l
Taq DNA Polymerase (2.5 unit / μ l)	1.0 μ l
template	5.0 μ l
total	50.0 μ l

3. 3 反応条件

- (a) 熱変性 : 92°C 5 分
- (b) 熱変性 : 92°C、30 秒、アニーリング : 50°C、30 秒、伸長 74°C 30 秒。以上を 35 サイクル。
- (c) 伸長 : 74°C 5 分

電気泳動、核酸染色、バンドの確認、その他の注意事項は 2.4 と同様に行う。

4. その他

PCR を実施するときは、試験の結果に与える影響や環境への汚染防止の観点から、特にクロスコンタミネーションが起らないように注意する。そのためには鋳型 DNA の調製、PCR 反応液の調製、増幅反応及び電気泳動などの各作業を異なった場所で行い、必ず滅菌済のフィルター付チップやねじロマイクロチューブなどを使用し、試験終了後は使用した器具等を必ずオートクレーブ処理する。試験には必ず陰性対照（滅菌蒸留水及びセレウス菌由来 DNA）ならびに陽性対照（炭疽菌由来 DNA）を置き、偽陰性及び偽陽性のないことを確認する。また、検出感度や PCR 阻害物質の影響などを考慮すると、増菌培養後の試料から鋳型 DNA を調製する操作も併せて行うことが必要である。PCR 試験は迅速スクリーニングの手段であり、

確定については生化学的性状による培養試験やキット（RPLA 法、デンカ生研(株)）による試験を併行し、総合的に判定する必要がある。

培養試験と同様、鋳型 DNA の調製までの操作はレベル 3 の実験室で行われるべきである。炭疽菌の栄養細胞及び芽胞は、鋳型 DNA 調製時の加熱条件で死滅するので、以後の操作についてはレベル 3 の実験室で行う必要はない。参考までに炭疽菌の熱抵抗性を表 6 (N.F.P.A., 2001)に示す。

表 6．炭疽菌の熱抵抗性

<u>Vegetative cells</u> <u>Moist heat resistance</u> survived 5 but not 5.5 min at 65°C(149F) survived 3.5 but not 4 min at 70°C(158F) survived 2.5 but not 3 min at 75°C(167F) survived 50 but not 60 sec at 80°C(176F) <u>Dry heat resistance</u> destroyed by 2 h(92-100°C)
<u>Spores</u> <u>Moist heat resistance in physiological saline</u> D value at 90°C(194F) for 2.5-7.5 min D value at 95°C(203F) for 1.7-4.2 min <u>Dry heat resistance</u> • Death times of spore suspension on glass: 60 min at 120°C(248F), 9 min at 160°C(320F) 2.5-4 min at 229°C(444F), 1.5-2 min at 288°C(550F) • Death time of 108 spores on aluminum foil(0.2 mm thick): 30 min at 140°C(284F), 8 min at 160°C(320F), 2 min at 180°C(356F)

IV. 汚染の除去と消毒

1. 汚染の除去、消毒および滅菌

炭疽菌芽胞により汚染した身体、器物および環境から芽胞の飛散を最小限に抑える一方、以下に掲げるいずれかの消毒薬または滅菌法を用いることが奨められる。どの方法を用いるかは、対象物の性質（生物材料、器物、建造物の一部、土壌、水など）や、処理後の用途（廃棄、再使用など）によって異なる。汚染物の取り扱いにはガウン等を着用する。汚染した可能性のある衣服（靴、ソックス、ストッキング、および袖や襟が汚染した場合には上着）はできるだけ早く脱衣して缶かバッグに入れ、消毒やオートクレーブ処理を行う。使い捨てガウンは焼却しても良い。

最終消毒終了後、室内あるいは動物舎のような閉鎖空間は十分に換気を行い、消毒剤が人体に悪影響を及ぼさないように注意してから再使用する。

・ 10%ホルムアルデヒド（30%ホルマリン）	1-1.5l/m ² 、2 時間、10℃以上
・ 4%グルタルアルデヒド（pH8.0-8.5）	1-1.5l/m ² 、2 時間、10℃以上
・ 3%過酸化水素水	0.5l/m ² 、2 時間
・ 1%過酢酸	0.5l/m ² 、2 時間
・ 焼却	
・ オートクレーブ処理	121℃20-30 分
・ エチレンオキサイドガス滅菌	

なお、芽胞を効果的に消毒するのはきわめて困難であり、状況によってはこれを完全に実施するのは不可能な場合がある。また、消毒作業の効果を推定することはできないので、確認する場合はスワブを採取して培養によって確かめる。

2. 検査室における消

病院用の殺芽胞剤または 0.5%次亜塩素酸溶液（家庭用漂白剤の 10 倍希釈液、有効塩素濃度 100,000 ppm）を用いて、消毒を行いながら作業を行う。ベンチコートなどの実験台カバーを用いる。

3. 人体の汚染

皮膚の汚染部位は次亜塩素酸溶液（有効塩素濃度 5,000 ppm）に 1 分間浸したあと石鹸を使って十分に水洗いする。皮膚に損傷がある場合は次亜塩素酸溶液は用いず、血液を絞り出してから傷口を十分量の水を用いて洗浄する。目に飛散した場合には、目をこすらず、直ちに大量の水で十分に洗い出す。口腔内の汚染は直ちに口の中のものを吐き出し次亜塩素酸溶

液（有効塩素濃度 2,000ppm）で口腔内を十分にすすぎ、次いで何回か水で口腔内をすすぐ。人体の汚染が考えられた場合には直ちに医師による診察を受け、最低 1 週間は観察下に置く。

4. 建物等の汚染

床等の上に滴下したり飛散したものには直接、または汚染区域を吸湿性物質で覆ってから、次亜塩素酸溶液（有効塩素濃度 10,000ppm）、10%ホルマリン、4%グルタルアルデヒドまたは 1%過酢酸を十分にふりかける。2 時間以上経過してからペーパータオルでふき取り、ペーパータオルは袋に入れて焼却する。

5. 衣服、道具、器物等の汚染

可能な場合には汚染した器物は焼却またはオートクレーブ滅菌を行う。使い捨てにしない器物の場合は、付着している大きなゴミは焼却用袋またはオートクレーブ用袋にそそぎ落としたあと、器物それ自身は 4%ホルムアルデヒド溶液または 2%グルタルアルデヒド溶液に一晩（8 時間以上）浸漬する。

器具、機器類でオートクレーブ滅菌、煮沸滅菌、またはホルマリン等の溶液に浸漬できないものには薫蒸滅菌を考慮する。適切な構造と気密性を保ったチャンバーに汚染物とホルマリン（水で 2~3 倍に希釈）を入れ（約 15ml/m³）煮沸蒸発させたあと常温（ $\geq 18^{\circ}\text{C}$ ）で 12 時間以上放置する。薫蒸処理中のチャンバー内の相対湿度は 90%以上とする。薫蒸処置が終了したときの換気装置は人や動物が移動する場所から離れた位置に備える。

ホルムアルデヒドに代えてエチレンオキサイドガスによる滅菌も可能である。エチレンオキサイドガスの使用は整った設備とその運転経験のある施設に限って行うべきである。

6. 水の汚染

汚染水の滅菌・消毒にはオートクレーブ滅菌、ホルムアルデヒドによる滅菌、塩素剤による滅菌、濾過滅菌などが考えられるが、水の溜まり場所、芽胞の推定濃度、処理する水の量、その水が流れて行く先、および処理後の水の使用目的等の状況を判断して、最もよい解決方法を適用する。

V. 文献

- 1) H. I. Cheun, S. -I. Makino, M. Watarai, T. Shirahata, I. Uchida and K. Takeshi : A simple and sensitive detection system for *Bacillus anthracis* in meat and tissue, J. Appl. Microbiol., 2001, **91**, 421-426.
- 2) S. -I. Makino, H. I. Cheun, M. Watarai, T. Shirahata, I. Uchida and K. Takeshi : Detection of anthrax spores from the air by real-time PCR, Letters in Appl. Microbiol., 2001, **33**, 237-240.
- 3) N.F.P.A. (National Food Processors Association), : ANTHRAX-What is it and addressing inquiries, N.F.P.A. URL. 2001
- 4) World Health Organization: Guidelines for the surveillance and control of anthrax in humans and animals. 1998.

VI. 執筆者一覧

赤見正行 群馬県衛生環境研究所

井出 忍 静岡市衛生試験所

大友良光 青森県環境保健センター

神山恒夫 国立感染症研究所（電話：03-5285-1111、e-mail：kamiyama@nih.go.jp）

杉山 明 三重県衛生研究所

武士甲一 北海道立衛生研究所

北條圀生 静岡市衛生試験所

日 本 脳 炎

日 本 脳 炎

－ 目 次 －

I 概説

II 検査の進め方

- (1) 患者の診断
- (2) 疫学調査
 - 1) 感染源調査
 - 2) 感受性調査

III 検査材料

- (1) ウイルス分離材料及び RT-PCR 材料
 - 1) ヒトのウイルス分離材料
 - 2) コガタアカイエカ等の分離材料
 - 3) ブタ血液の分離材料
- (2) 抗体測定用血清

IV ウイルス分離法

- (1) ウイルス分離材料の前処理
- (2) ウイルス分離法
 - 1) 乳飲みマウス脳内接種法
 - 2) 培養細胞によるウイルス分離法
- (3) RT-PCR 法による遺伝子検出
- (4) 蛍光抗体法(直接蛍光抗体法)

V 血清診断

- (1) 赤血球凝集抑制試験(HI 試験)
 - 1) HI 試験法の概要
 - 2) 被検血清の前処理
 - 3) HI 試験の手順
 - 4) IgM 抗体の証明
 - a. 2-メルカプトエタノール処理法
 - b. 2-ME・ヨードアセトアミド処理法
- (2) 補体結合試験(CF 試験)
- (3) 中和試験(NT 試験)
 - Vero 細胞を用いた中和試験法
 - 1) 材料
 - 2) 細胞継代
 - 3) 細胞プレートの作成
 - 4) 中和試験法
 - 5) プラーク係数と中和抗体価の判定
 - 6) 試薬の組成
 - a. 細胞増殖用培地
 - b. 細胞維持液(ウイルス・血清の希釈液)
 - c. 染色液(メチレンブルー溶液)
- (4) 酵素抗体法(ELISA 法)
 - IgMcapture-ELISA 法
 - 1) 原理
 - 2) 試薬・機材
 - 3) 操作手順

VI 確定診断基準と成績の解釈

日本脳炎ウイルス

I. 概説

日本脳炎ウイルスは、Flaviviridae 科、Flavivirus 属のウイルスであり、コガタアカイエカが媒介する。カ→ブタ（時にトリ）→カのサイクルで、生態環を作っている。ヒトは日本脳炎ウイルス感染の終末宿主であり、ウイルス増殖動物としてのブタの感染状況が、ヒトでの感染状況を左右していると考えられている。現在、日本脳炎の流行地は、東アジア、東南アジア、南アジアからオーストラリアにまで拡大し、年間数万人の日本脳炎患者が発生している。症状は、定型的な脳炎で、1～2日で40℃以上の高熱となる。頭痛、嘔吐、項部硬直、ケルニッヒ徴候などの髄膜刺激症状が現れ、次いで意識混濁、筋強剛、けいれん等の脳症状が現れる。発症後1週間が病気の極期で、このころに死亡例が多く見られ、致死率は約20%である。その後、熱は次第に低下し、症状も軽快するが、生残者の半数に精神障害、運動障害等の後遺症が残る。近年、日本での日本脳炎確認患者は、1965年以前と比べ激減している。患者発生の強力な抑制因子としては、ヒトに対してのワクチン接種による免疫賦与、コガタアカイエカの減少、ブタ飼育環境の変化の3点がその大きな役割を担っていると考えられている。

II. 検査の進め方

(1) 臨床例の診断

一般には、ウイルス分離と血清診断が基本となる。第7病日までの死亡例の脳組織から、ウイルス分離、RT-PCRによる遺伝子の検出が可能である。しかし、発病初期の血液・髄液からのウイルス分離は、稀に成功することがある程度である。臨床症状は、他の類似疾患との鑑別が困難なので、血清学的診断が不可欠である。第7病日以後の患者血清については、HI試験による血清診断が可能となる。原則として急性期（第7病日以内）と回復期（第14病日以降）に採血したペア血清を用い、抗体価の有意な上昇が確認できれば診断が確定する。CF試験でも同様である。また単一血清（回復期）でも、有意なIgM抗体が検出できれば診断可能である。

(2) 疫学調査

疫学調査として、以下の調査が行われており、日本脳炎患者発生を予測する上では参考となる。

1) 感染源調査

ブタの抗体保有状況の調査とくにIgM抗体の証明は、感染時期の特定に欠かせない。この調査から、ウイルスの浸淫状況を知ることが出来る。現在、約30弱の地方衛生研究所に於いて実施されている。日本脳炎ブタ情報は、毎年日本脳炎ウイルスの各都道府県における散布状況を示し、日本脳炎流行予測の指標となっている。

2) 感受性調査

ヒトの日本脳炎に対する抗体保有調査 全国住民の抗体保有調査（抗体保有状況）を、中和試験法により実施している。中和抗体価の測定結果から日本脳炎感受性者数を把握

することにより、日本脳炎患者の発生する危険性が予測可能となる。

Ⅲ. 検査材料

(1) ウイルス分離用材料および RT-PCR 用材料

1) ヒトのウイルス分離用材料

死亡した患者の脳組織の採取は、解剖の場合、白質部を除き、灰白質部のみを集める。アンモン角、視床が採取できればウイルス分離率が高い。解剖が困難な例では、市販の脳穿刺針を用い、鼻孔より挿入して脳底を破壊した後、脳神経組織を採取する。 -80°C に保存する。蛍光抗体測定用には、ドライアイスアセトン中に浸した N-ヘキサン中で迅速凍結した後、 -80°C に密栓して保存する。

2) コガタアカイエカ等の分離用材料

直ちに乳剤にしない場合には、分離するまでそのまま -80°C に保存する。

吸血蚊の場合は、吸血液中に日本脳炎抗体があれば中和されてしまうため、1 日以上飼育して血液を消化させることが望ましいが、トラップ中で 1 日以上放置すると大部分の蚊が死亡する。死亡した蚊の体内ではやはりウイルスが不活化するため、理想的には吸血した蚊とそうでない蚊を分別し、それぞれ、1 日飼育する群、直ちに凍結保存する群に分けることが理想的である。

3) ブタの血液の分離用材料

血液は、血球を遠心分離した後、血清を直ちにウイルス分離に用いる。直ちに出来ない場合は、ドライアイス・アセトンで急速凍結した後 -80°C に保存する。

(2) 抗体測定用血清

ヒトの患者血清は、急性期（発病後 7 日以内）、回復期（発病後 14 日以上）二回以上採血を行い、ペア血清として抗体測定に用いる。HI 試験、CF 試験、IgM 捕捉 ELISA、中和試験等種々の試験に用いることがあるので、凍結融解を繰り返さないため、凍結保存する前に数本のチューブに分注しておくのが望ましい。

Ⅳ. ウイルスの分離法

(1) ウイルス分離材料の前処理

ウイルス分離材料を、乳剤にするために用いる希釈液には、抗生物質を加える。ウイルス分離のために採取した材料は、無菌的でない場合が多いからである。抗生物質としては、カナマイシン $60\text{ }\mu\text{g/ml}$ または、ペニシリン・ストレプトマイシンでは、通常用いる量の 2 倍程度加える。更にウイルスの不活化を防ぐ目的でウシ胎児血清を 5 %加えるとよい。ただし、このウ

シ胎児血清には、使用する前に日本脳炎ウイルスに対する抗体が含まれていないことを、HI 試験、中和試験などで確かめることが重要である。材料が少量の場合は、乳鉢と乳棒またはモーター駆動式ガラスホモジナイザーを用いる。

蚊材料の場合は、1 プール当たり（1 ～100 匹）に希釈液 2～4ml を加えて乳剤とする。乳剤は、10,000rpm にて 30 分間遠心し、その上清を接種材料とする。患者の血液は遠心分離した血清がそのまま接種材料となる。

ヒトの死亡例からの脳組織は、10%乳剤を作製した後、10,000rpm、30 分の遠心上清を接種材料とする。更に 0.45 μ m のフィルター濾過を行い最終接種材料とする。

（2）ウイルスの分離法

1）サックリングマウス脳内接種法

生後 2 ～ 4 日令のサックリングマウス（乳のみマウス）の脳内に、一匹当たり 0.02ml ないし 0.03ml 接種し、10 日間観察する。ウイルス材料 1 検体当たり 1 腹のサックリングマウス（8 ～ 10 匹）を使用する。発症マウスは、頸動脈を切断し放血後に採脳する。採脳した脳は、一部を -80℃ に保存し、残りの脳は、蛍光抗体法、HI 試験等ウイルスの同定のために使用する。

2）培養細胞を用いるウイルス分離法

ヒトスジシマカの培養細胞クローンである C6/36 細胞を用いる。この方法は、サックリングマウスの脳内接種法と同等かそれ以上のウイルス分離能を持っている。

1. 必要な器材

- a. 28℃のインキュベーター（CO₂インキュベーターが望ましい）
- b. 細胞培養液

Eagle's MEM 100ml に 100 倍溶液・非必須アミノ酸 2ml を添加する。これに日本脳炎ウイルスに対する抗体陰性の非働化済みウシ胎児血清を 10ml 添加したものを細胞増殖用培養液とし、2ml 添加したものを細胞維持培養液として用いる。いずれも、適当な抗生物質を規定量加える。

2. C6/36 細胞の培養および分離材料の接種

- ① 1×10^5 cells/ml の細胞浮遊液を作る。
- ② 組織培養用プラスチックプレートに 1 ウェル当たり 1ml を分注し、28℃・5%CO₂ 下で培養する。
- ③ 分離材料を接種する前に、ほぼ単一層を形成するまでに、細胞が増殖していることを確かめる。次いで培養液を除き、分離用材料 0.1ml をウェルの細胞上に接種する。1 検体当たり 2 ウェルを使用する。
- ④ 分離材料を細胞面に浸すように 2 時間、28℃・5%CO₂ 下で静置する。

- ⑤ 2%ウシ胎児血清を含む細胞維持培地を、2ml 加え 28℃で培養する。
- ⑥ 細胞変性 (CPE) の有無を観察する (約 1 週間)。
- ⑦ CPE の観察された時点で培養液の一部は、凍結保存する。残りを HI 試験、中和試験等による同定検査に用いる。

3) 日本脳炎ウイルスの RT-PCR 法による遺伝子検出

日本脳炎ウイルス遺伝子の PCR によく用いられるプライマーは、E 領域に設定されていることが多い。 代表的なものは次のようである。

JE8K-S: 5' ATG GAA CCC CCC TTC 3'

JEER: 5' AGC AGG CAC ATT GGT CGC TA 3'

その産物の大きさは 381bp である。

さらに以下のプライマーを用いれば Nested PCR も可能である。

JE8K inner-S: 5' ATC GTG GTT GGG AGG GGA GA 3'

JEER inner-C: 5' AGC ACA CCT CCT GTG GCT AA 3'

その産物の大きさは、326bp である。

もちろん、preM 領域、NS3 領域で設定したプライマーも使用可能である。

フラビウイルスの場合核酸抽出することなく培養液、血清等から直接 RT-PCR 反応に用いることができる。 PCR 法は、森田らの迅速 RT-PCR 法に準じて、逆転写反応と PCR 反応をワンチューブで行うと便利であり、コンタミネーションの危険性も減る。ただし、感度を高めるためには RNA 抽出キットを用いて RNA を抽出して実施する。

反応条件は、53℃・10 分 (逆転写)、92℃・2 分 (熱変性) の後、92℃・1 分、53℃・1 分、72℃ 1 分を 35 サイクル繰り返し、72℃・5 分間伸長反応を行う。

Nested PCR の反応条件は、92℃ 5 分 (熱変性) の後、92℃・1 分、53℃・1 分、72℃・1 分を 25 サイクル繰り返し、72℃・5 分間伸長反応を行う。

4) 蛍光抗体法 (直接蛍光抗体法)

検査材料は、ウイルス分離と同じでよく、その凍結切片またはスタンプ標本をアセトンで室温 10 分間固定した後、標識抗体を重層する。湿潤箱で、37℃、60 分間または 4℃で一晩反応させ、その後、反応しなかった余分な標識抗体を PBS で充分洗浄した後、乾燥し、緩衝グリセリン液で封入する。蛍光顕微鏡下で、細胞質内に黄緑色の蛍光が見えれば陽性である。

V. 血清診断

血清反応としては、HI 試験、CF 試験、中和試験、IgM 捕捉 ELISA 法がある。

(1) 赤血球凝集抑制試験 (HI 試験)

フラビウウイルスの HA 反応は、pH に依存している。日本脳炎ウイルスは、至適 pH が 6.4～6.8 である。

1) HI 試験法の概要

- ① 被検血清の前処理：アセトン抽出によるインヒビター除去処理、補体の非働化、血球による非特異凝集素吸収処理
- ② 2 倍段階希釈された被検血清と 4HA 単位の抗原を等量混和する。
- ③ 抗原抗体反応は、4℃一晩行う。
- ④ 翌日至適 pH になるように調製された血球希釈液 (VAD) に浮遊したガチョウ赤血球を加え 37℃ 1 時間反応後、血球凝集抑制を示す血清の最高希釈倍数を HI 抗体価と判定する。

材料と方法

HI 用ウイルス抗原：市販品を使用するのが便利である。例えば HI 用ウイルス抗原はデンカ生研から市販している。

ガチョウ血球：市販品を使用するのが便利である。例えばニッポンバイオテストラボラトリーより市販している。

※ガチョウ血球の代わりに、あひる又は生後一日のヒヨコの血球を用いることも可能である。

8%ストックガチョウ血球は、下記の DGV (Dextrose-Gelatin-Veronal) を用いて作製する。これを、使用直前に VAD (Virus Adjusting Diluent) で 24 倍希釈する。

[試薬の調整法]

◎ DGV の作り方：

局方バルビタール	0.58g
ゼラチン	0.6g
局方バルビタールソーダ	0.38g
特級 CaCl_2	0.02g
特級 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.12g
特級 NaCl	8.5g
特級デキシトローース	10.0g

蒸留水で、全量 1,000ml とし、121℃で 10 分間高压滅菌した後、4℃に保存する。

◎ 0.01M PBS (pH 7.4)

1/15M Na_2HPO_4 (9.464g/1000ml).....160.8ml:①

1/15M KH_2PO_4 (9.08g/1000ml)..... 39.2ml:②

①+②+1140 (DW)=1340ml 1340ml

③を下記の割合で混合する。

1000ml (③) +8.5g (NaCl)

◎ 被検血清および抗原希釈液： 卵白アルブミン (EA) または牛血清アルブミン (BSA)
を 0.4%に加えた pH9.0 のホウ酸緩衝液 (BS) を用いる
(ES・BS または BSA・BS)

◎ pH9.0 のホウ酸緩衝液 (BS) の作り方：

1.5M NaCl 80ml

0.5M H_3BO_3 100ml

1.0M NaOH 24ml

蒸留水で全量を 1,000ml とする

血球希釈液 (VAD) の作り方： 等量の pH9.0 の BS を加えたとき、所定の pH になるようなリン酸緩衝液である。表 1 に段階的 pH の緩衝液を示す。

表 1 血球希釈液 (VAD)

pH	6.0	6.2	6.4	6.6	6.8	7.0
1.5M NaCl	100	100	100	100	100	100
0.5M Na_2HPO_4	32	62	112	160	192	240
1.0M NaH_2PO_4	184	169	144	120	104	80

それぞれ蒸留水を加え、1,000ml とする

2) 被検血清の前処理

ア. 被検血清を 0.1ml 小試験管にとる。

イ. これに、約 2ml の冷アセトン (-20℃に保存してあったもの) を加え、ゴム栓をして良く振とうする。5 分間氷浴中にて抽出

ウ. 1,500rpm 5 分間遠心後上清を捨てる。

エ. イ・ウの操作を 2 回繰り返す。

- オ. 沈澱物を試験管内壁に広げ、デシケーターに入れロータリーポンプで陰圧にし、1時間乾燥する。
- カ. 完全に乾燥したら、pH9.0のBSを1.0ml加え、沈澱物を浸し、4℃に一夜置き完全に溶解させる。
- キ. 56℃, 30分非働化する
- ク. 生理食塩水で洗浄したガチョウ血球ペレットを0.05ml各処理血清に加え、4℃15分放置後、3,000rpm5分間遠心を行い、上清を別の試験管に移す。(血球吸収処理)
- ケ. これら、全ての処理を終えた血清は、10倍に希釈されている。

3) HI 試験の手順

基本操作は、一般に行われるHI試験と同じである。

- ア. 抗原の一次定量： 抗原を0.4%EA・BSで2倍段階希釈し、pH6.0～7.0のVADで希釈した血球を加える。37℃1時間後HA価を判定する。HI試験には、至適pHのVADを用いた場合に4単位/25 μ lになるように修正する。

〔注〕2次定量として、希釈調整した抗原のBack titrationを行い、4単位/25 μ lであることを確認する。

- イ. 被検血清の希釈： 前処理済み血清は、0.4%EA・BSで2倍段階希釈を行う。(25 μ l /well)
- ウ. 4単位の抗原を、プレート上の希釈血清液に等量加える (25 μ l /well)。
- エ. 振とう混和後、カバーをして4℃に1晩静置する。
- オ. 8%ガチョウ血球を、至適pHのVADを用いて、24倍に希釈し50 μ l /well加える。
- カ. プレートにカバーをして、37℃で1時間反応させ判定する。

4) IgM 抗体の証明

血清診断では、急性期と回復期のペア血清による抗体上昇により感染を証明するが、患者が早期に死亡した場合等、単一血清しか採取できない場合がある。IgM抗体は、感染病日の早期に出現し、しかも、ウイルス特異性が高く、感染を確実に証明できる唯一の抗体である。フラビウイルスは、日本脳炎ウイルスの他にデングウイルス、ロシア春夏ダニ脳炎など、近縁のウイルスがあり、IgG抗体価だけでは、たとえペア血清で抗体価が上昇していたにしても、日本脳炎であると確定診断をすることが出来ない。IgM抗体は、IgG抗体と比較した場合、フラビウイルス間での特異性に優れた抗体であり、単一血清しか得られない場合でも、IgM抗体が日本脳炎を用いた抗原で証明されれば臨床経過を考慮して確定診断が可能となる。特異的IgM抗体の証明には、下記の方法が用いられる。

a. 2-メルカプトエタノール (2-ME) 処理法

IgM 抗体は、2-ME 等のような SH 試薬により S-S 結合が解離される。同時に抗体との反応性が消失する。そのため 2-ME 処理前と処理後の抗体活性を比較することにより、間接的に IgM 抗体を証明する。すなわち、2-ME 処理後の抗体価が処理前に比べて低ければ、被検血清には IgM 抗体が存在していたことになる。

方法： 血清を PBS で 2 倍に希釈し、0.2M の 2-ME を等量混合する (2-ME は使用時ごとに調製すること)。37℃で 1 時間反応させた後、20 倍量の冷アセトンで 2 回抽出 (血清の前処理で述べた同じ方法) する。沈殿物を乾燥させた後、使用した血清量の 10 倍量の BS (pH9.0) を加え、4℃で 1 夜かけて溶解したものを 10 倍希釈の 2-ME 処理検体とする。対照として 2-ME 処理しないものを置き、処理前に対して処理後の HI 抗体価が、1/8 以上低下が認められたときに IgM 抗体陽性と判定する。

最近では、悪臭のある 2-ME に代わって 0.01M Dithiothreitol (DTT) も用いられている。成績はいずれも同じである。

b. 2-ME・ヨードアセトアミド処理法

0.2M の 2-ME で 4℃、24 時間反応させ、この混合物を透析チューブに入れ、0.02M ヨードアセトアミド加 0.01M PBS 溶液 (処理血清の 100 倍量) 中で、4℃で一晩透析後、アセトン処理する。本法は上記の方法よりもより、精度が高い処理法である。判定しがたい結果の場合は、本法により再検する。

※後述する IgM 捕捉 ELISA 法にて確認することもできる。

[試薬の組成について]

a. 0.2M 2ME (用事調整)

2ME 1.4ml

0.01M PBS . . . 100ml

b. 0.02M ヨードアセトアミド加 0.01M PBS 溶液

ヨードアセトアミド . . . 3.6992g

0.01M PBS . . . 1000ml

(2) 補体結合試験 (CF 試験)

CF 試験に用いる抗原は、HI 試験で用いた抗原が使用できる。方法は、一般の方法とまったく同じであるので省略する。

(3) 中和 (NT) 試験

中和抗体価の測定はウイルス特異性の点から重要である。IgG 抗体のフラビウイルス間の高い交叉性は、蛍光抗体法、CF 法、HI 試験法等で認められるが、IgG 抗体の測定法で特異性があるのは、中和抗体測定法である。中和抗体測定法は、今までニワトリ胎児細胞 (CE) を用いたブラーク減少法が用いられてきた。この方法は、ニワトリ孵化鶏卵 (9 日卵) を使用するため細胞の作製に手間がかかること、また、孵化鶏卵の入手が困難になったことなどから、CE に代わる継代細胞による中和試験法の開発が望まれるようになった。ここでは、CE に代わってアフリカミドリザル腎細胞由来 V e r o 細胞を用いたブラークアッセイについて述べる。

1) 材料

- ① 被検血清：個々の血清を希釈液⑥にて 10 倍に希釈し、56℃、30 分非働化する。
- ② Vero 細胞：ヒューマンサイエンス細胞資源バンク Vero9013 の感受性が高い。
- ③ Eagle's MEM ; たとえば、日水製薬製の Eagle's MEM を用いる場合、高圧滅菌後の培地に L-glutamine を規定量追加する。
- ④ 細胞増殖用培地：10%FBS-Eagle's MEM pH 7.4 [組成－1]。
- ⑤ 重層培地：2%FBS-MEM-1%メチルセルロース培地 pH 7.75 [組成－2]。
- ⑥ 希釈液：2%FBS-MEM pH 7.4 [組成－3]。
- ⑦ 細胞継代用トリプシン液：トリプシン-EDTA [生研] (0.25%トリプシン, 0.014 モル EDTA) を M/100 PBS(-) [pH 7.2] で 2 倍に希釈し (0.125%トリプシン, 0.007 モル EDTA)、5ml ずつ分注し-20℃以下で保存する。
- ⑧ プラーク用プレート：6 穴プレート。
- ⑨ 細胞継代用プラスチックフラスコ：150 cm² Tissue Culture-Flask (plug seal Cap)
- ⑩ 牛胎児血清 (FBS)： 56℃、30 分、非働化して用いる。

※ FBS の lot チェックの際には日本脳炎ウイルスに対する中和抗体価を測定し、抗体陰性の FBS を使用する必要がある。

2) 細胞の継代と維持

- ① 培養液を除き、細胞を PBS(-) で 1 回洗浄する。
- ② トリプシン液を加え、細胞表面を潤した後、トリプシン液を取り除く。
- ③ 37℃で 5 ～ 10 分後、フラスコ表面からの細胞脱落が認められたら細胞増殖用培地で細胞を分散させる。
- ④ 3×10^5 cell / ml の濃度になるように、細胞増殖用培地で細胞数を調製して、150 cm² (75 cm²) プラスチックフラスコに 40ml (20ml) 植え込む。
- ⑤ 37℃で培養し、培養 3 ～ 4 日毎にこの継代を繰り返して細胞を維持する。

3) 細胞プレートの作成

- ① 細胞の継代と同様にトリプシン処理を行い、細胞増殖用培地を用いて細胞数を 2×10^5 cells/ml に調製する。
- ② 6 穴プレートに 2ml/well ずつ分注し、均一な細胞シートになるようにプレートを前後左右によく振とうした後、37℃、5% CO₂ インキュベーター内で静置培養する。
- ③ 培養 1 日後に使用する。80~90% 程度の細胞シートが形成されていれば使用可能である。
* 1×10^5 cell/ml に調整して細胞を植え込み、2 日後に使用することも可能である。

4) 中和試験法

- ① 検査血清を希釈液で 10 倍にうすめ、56℃30 分非働化した後、2 倍階段希釈を行う。
- ② 保存ウイルスを 200PFU/100 μ l になるように希釈し、これを攻撃ウイルスとする（氷浴中）。
- ③ 各希釈血清 400 μ l に攻撃ウイルス 400 μ l を等量加える（氷浴中）。
対照ウイルスは、希釈液 1ml に攻撃ウイルス 1ml を等量加える（氷浴中）。
- ④ 各試験管は、よく振とう混和してから 37℃の恒温水槽内で 90 分間中和反応をさせる。
- ⑤ 中和反応の終わった各試験管は、すみやかに氷浴中に移す。
- ⑥ 細胞プレートの培養上清を完全に除く。その後の細胞面の洗浄は必要としない。
- ⑦ 対照ウイルス、血清・ウイルス混和液のそれぞれを、well あたり 100 μ l を壁面より接種する。
- ⑧ 対照ウイルスは 6~12 ウェル、血清・ウイルス混和液の場合は 3 ウェル~4 ウェルを用いる。
- ⑨ 接種直後に接種液が細胞全面に行き渡るようにプレートを軽く動かす。
- ⑩ ウイルス吸着時間は、37℃、5%CO₂ インキュベーター内で 90 分。その間 15 分毎にプレートを動かして接種液が細胞全面に潤うようにする。
- ⑪ ウイルス吸着反応終了後、接種液を除かずに、1%メチルセルロース加 MEM 重層培地 3ml を各 well に加え、37℃、5%CO₂ 下で 4~6 日間培養する。
- ⑫ 4~6 日間の培養終了後、各 well の重層培地上へ 10%中性緩衝ホルマリン液（ホルマリン原液は 37%であるが、これを 100%に見立て、M/100 PBS(-) [pH 7.2]を用いて 10 倍に希釈したもの）を 1.5ml 加えよく振とうし、培地とホルマリン液を混和後、室温で 1 時間以上放置する。（1 日間放置してもかまわない）。
- ⑬ ホルマリン固定終了後、水道水にて培地・ホルマリン液を洗い落とす。
- ⑭ メチレンブルー染色液を各 well に 1.5ml 加え 1 時間室温に放置する。染色終了後、水道水にて染色液を洗い落とし、ブラック数を算定する。染色したプレートは長期保存が可能である。

5) プラーク計数と中和の判定

判定としては、対照群のプラーク数および対照陽性血清の抗体価が次の条件に適合した場合、検査は適正となる。

- a. ウイルス対照群のプレートの、プラーク数の平均値が 50～150 の間にあり、 χ^2 表から $P > 0.05$ であること。
- b. 血清希釈のそれぞれのプラーク減少率から、Reed-Muench 法により 50%プラーク減少率を求め、その血清希釈倍数を中和抗体価とする。
- c. 患者血清の診断には、急性期血清と回復期血清を用い、回復期血清の中和抗体価が有意に 4 倍以上、上昇していれば感染した可能性がある。

6) 試薬の組成について

- a. 細胞増殖用培地：10%FBS-Eagle's MEM 「組成-1」
5 x 濃度 Eagle's MEM 200 ml
非働化済み FBS 100 ml
7% NaHCO_3 15.7 ml (最終濃度 0.11%)
カナマイシン (60mg/ml) 1 ml
滅菌蒸留水 783.3ml
1, 100ml
- b. 重層培地：2 %FBS-Eagle's MEM -1%メチルセルロース培地・・「組成-2」
A) Eagle's MEM (L-グルタミン不含・高圧滅菌可 日水製薬) 9.4 g
DW 958.5 ml
B) Methyl Cellulose 10g (粉末のみを 1,000ml のボトルに入れ、回転子も入れる)
A)、B)を 121°C, 15 分滅菌した後、A) を B) に加え (まだ熱いうちに) スターラーで回転させる。メチルセルロースの濁りが均一になったら、さらに氷水中にてスターラーを回し、均一に透きとおるまで、回転を続ける。

使用前に次の試薬を加える。

100 x conc. L-glutamine 10 ml
非働化済み FBS 20 ml
7% NaHCO_3 31.5 ml (最終濃度 0.22%)
(この重曹濃度は、通常の細胞増殖培地の 2 倍濃度である)

- c. ウイルス・血清の希釈液

5 倍濃度の Eagle's MEM 100 ml

非働化済み FBS 10 ml
 7% NaHCO₃ 7.6 ml (最終濃度 0.11 %)
 penicillin・streptomycin (1万単位) . . 5 ml
 滅菌蒸留水を加えて 500 ml にする。

d. 30x 濃度のメチレンブルー溶液
 メチレンブルー 2.25 g
 DW 200 ml
 1N NaOH 0.375 ml
 ÷ 200 ml

使用時に DW で 30 倍に希釈して用いる。

(4) 酵素抗体法 (IgM 捕捉 ELISA 法) (検査日数：1 日または 2 日)

従来、日本脳炎の血清診断は HI 試験で行われてきたが、HI 試験ではデングウイルスなど血清学的に交叉反応性を示すウイルスに対する抗体と、日本脳炎ウイルスに対する抗体とを明確に識別できなかった。HI 試験に代わる血清診断法として、ウイルス感染後の体内でいち早く産生される IgM 抗体を検出することで日本脳炎ウイルス感染を診断できる。IgG と比較して血中濃度の低い IgM を検出するために、鋭敏な酵素免疫吸着測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) を応用し、反応系の感度を向上させることができる。

1) 原理

反応原理は以下のようになる。

- (1) 抗ヒト IgM 抗体をコーティングしたプレートで患者血清中の IgM を捕捉する。
- (2) 日本脳炎ウイルス抗原を反応させる。
- (3) ヒト血清中の日脳ウイルスに対する IgM と反応したウイルス抗原を、酵素標識した抗ウイルス抗体 (IgG 抗体) で検出する。(検出用抗体に IgM が含まれていると固相の抗ヒト IgM と反応してしまう。)
- (4) 酵素に対する発色基質を加え、抗体のウイルス抗原との反応を発色により検出する。(抗体の結合量は発色の程度として表現される。)

2) 試薬・機材

この項は操作手順が煩雑なため、操作手順に含めて記す。

3) 操作手順

- (1) 市販の抗ヒト IgM を 500 倍に希釈し、プレートへ分注 (0.1 ml/well) する。

*Coating buffer, pH 9.6

Na ₂ CO ₃	0.4 g
NaHCO ₃	0.73 g
H ₂ O	make up to 250 ml

*Anti-Human IgM (μ chain specific) Goat serum は、アフィニティー精製した市販のポリクローナル抗体を使用する。

例えば、ZYMED 社（コスモバイオ取り扱い）製の抗ヒト IgM は 1 mg の包装なので、500 倍に希釈すると 2 μ g/ml の濃度となって、ELISA 用プレートのタンパク濃度に不足しない。

*プレートは、市販の ELISA 用平底プレートを使用する。

(2) 希釈した抗ヒト IgM を固相表面へコーティングする。

*プレートは、各検体につきウイルス抗原と未感染対照抗原で反応するようにレイアウトする。また、コーティングしないで発色のみ行ってプレートの非特異的反応を検出するためのプレートコントロール用ウェルを割り振る。

*プレートをシールテープやサランラップなどで蒸発防止して、室温に 2 時間以上置く。場合により、このステップを冷蔵庫内で一晩行うことも出来る。

(3) 抗ヒト IgM のコーティングが完了したら、プレートをバッファーで洗浄する。

*洗浄バッファーには 0.05 % Tween 20 を含むリン酸緩衝食塩水（PBS-Tween）を用いる。

*洗浄は原則として、自動洗浄装置を用いて行う。洗浄操作および洗浄後の廃液、等の処置は B S L 2 の基準に基づいて行うこと。

*洗浄は、各ウェルにバッファーを満たして捨てる操作を 3 回以上繰り返す。

*洗浄したプレートはペーパータオルなどで水分を除去する。

(4) プレートのコーティングの間に、被験血清の準備を行う。

*被験血清（1 vol.）と血清用希釈液（100 vol.）とを混合して、101 倍の希釈血清を作る。

*血清の希釈（PBS-Tween）には、フラビウイルスに対する抗体を含まないウシ血清、ブロックエースなど市販のキャリアータンパクを 10 % 程度に添加する。

(5) 抗ヒト IgM をコーティングし洗浄したプレートへ、希釈した被験血清を 0.1 ml ずつ加える。

*V-Ag、N-Ag とともに複数のウェルを使って、結果の信頼性を確保すること。

- (6) プレートを室温に 60 分間置き、反応させる。
- *状況によって、このステップを冷蔵庫内で一晩行うことも可能である。
 - 冷蔵庫内で一晩反応させる場合は、蒸発防止のためプレートをシールすること。
- (7) 被験血清との反応の終了したプレートを洗浄する。
- *被験血清を取り扱う際には手袋を着用すること。
 - *被験血清のふくまれた洗浄バッファーは流しに直接捨てないで、滅菌のできる容器に溜めておき、実験終了後に滅菌してから捨てること。
 - *洗浄は 3 回以上行う。ELISA では洗浄操作が最も重要で、非特異的反応の大半を低減することができる。
- (8) 日本脳炎ウイルス抗原と室温 2 時間以上反応させる。
- *抗原として使用する日本脳炎ウイルスは、中山株（または北京株）と JaGAr 株を蚊由来 C6/36 細胞で増殖させて混合して用いる。
 - *培養したそれぞれの日本脳炎ウイルスの抗原力価を ELISA で測定し、混合する。
このために、2 株に対して同じような反応性を有する抗体（フラビウイルス交差反応性な抗体）を用いて抗原の titer を調整した後、混合する。
 - *未感染の C6/36 細胞培養液を、対照抗原および力価調整用の抗原希釈液として使用する。
- (9) 抗原との反応後、プレートを洗浄する。
- *ウイルス抗原は、滅菌してから捨てること。
- (10) プレートに結合したウイルス抗原を酵素標識した抗ウイルス抗体で検出する。
- *このシステムでは、2 つの日本脳炎ウイルス抗原を混合して反応させているので、すべてのウイルスにおなじような反応性を示す抗体（フラビウイルス特異的な抗体、あるいはデングに感染したヒト血清など）より IgG を精製して使用する。
 - *被検血清中に日本脳炎ウイルス特異的 IgM が含まれていると、固相にコートされた抗ヒト IgM と反応する。
- (11) プレートを室温に 60 分間置き、反応させる。
- (12) プレートを洗浄する。
- (13) 発色基質液を準備する。
- *発色基質は、用いた酵素の種類により選択する。
例として、パーオキシダーゼの検出系について記載する。
 - *発色基質
Ortho-phenylenediamine 2HCl (OPD)・・・10mg のタブレット状の試薬が

市販されている。

*バッファー (pH 5.0)

Citric acid (final 0.1 M)..... 2.34 g
Na Phosphate (final 0.2 M)..... 4.56 g (as $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
 H_2O make up to 500 ml

115 °C、10 分間オートクレーブする。

*組成(使用直前に調製する。)

OPD 10 mg
バッファー 25 ml (プレート 2 枚分)
30 % H_2O_2 0.01 ml

(14) 発色液を加え (0.1 ml/well)、暗所で室温 30 分間反応させる。

(15) 発色を停止する。

*OPD の場合は、2.5 M H_2SO_4 を 0.05 ml/well に加える。

(16) ELISA 用の吸光度計で吸光度を測定する。

*吸光度の波長は、使用した発色基質により決定する。

(OPD の場合は 492 nm で測定する。)

*吸光度の測定は、発色停止後 1 時間以内に行うこと。

以上で測定が完了したので、次に結果の評価を行う。

(17) 得られた吸光度より被験血清の抗体の有無を判定する。

$$\text{Index Value} = \frac{(\text{ウイルス抗原との反応で得られた吸光度値} - \text{プレートの非特異的発色値})}{(\text{未感染抗原で得られた吸光度値} - \text{プレートの非特異的発色値})}$$

とし、>2.00 を IgM 陽性、<2.00 を陰性とする。=2.00 の場合は、再検査または判定保留とし、中和試験で判定する。

VI. 確定診断基準と成績の解釈

1) ウイルスの分離および遺伝子の検出

疑似日本脳炎患者の血清あるいは髄液から、RT-PCR 法で直接ウイルス遺伝子を検出するか、ウイルスを分離した場合は、日本脳炎ウイルス感染が確定する。

2) 抗体検査の解釈

(1) HI 抗体価の上昇で判断する場合：ペア血清（急性期および回復期血清）を検査した時、急性期から回復期にかけて 4 倍以上の抗体価上昇があり、かつ最高値が 1:320 以上を確実、1:160 をほぼ確実、1:40~1:80 を疑わしいとし、中和試験を

実施する。

- (2) CF 抗体価の場合：ペア血清で 4 倍以上の抗体上昇がありかつ最高値 1:16 以上を
確実、1:8 をほぼ確実、1:4 を疑わしいとし、中和試験を実施する。
- (3) 中和抗体価の場合：ペア血清で 4 倍以上の中和抗体価の上昇が認められれば確実
である。
- (4) 特異的 IgM 抗体が検出されれば、単一血清でも確定診断が可能である。

＊以上の診断基準は、現在の日本においては、発病前にデングウイルス・西ナイ
ルウイルス等のフラビウイルス属の流行地への海外渡航歴の無い患者に対する
ものとする。

文 献

- 1) Melnick, J.L.: Classification and nomenclature of viruses. *Progr. Med. Virol.*, 17, 290～294, 1974
- 2) 大谷 明 : 改めて日本脳炎を考える, 感染・炎症・免疫, 15(6), 1～8, 1985
- 3) 五十嵐 章 : ヒトスジシマカ培養細胞クローン C 6 / 3 6 を用いた野外採取コガタアカ
イエカからの日本脳炎ウイルスの分離方法, 熱帯医学, 22, 255～264, 1980
- 4) 五十嵐 章 : デング出血熱について. *Infection Inflammation Immunity*, 22, 1～19, 1992
- 5) Clarke DH, Casals : Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition
with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg*, 7, 561～573, 1958
- 6) 内山圭梧 : 日本脳炎に関する研究 (第一報). *日本伝染病学会雑誌*, 36, 108, 1962
- 7) Bundo K, Igarashi A : Antibody capture ELISA for detection of immunoglobulin M
antibodies in sera from Japanese encephalitis and dengue hemorrhagic fever patients.
J Virol. Methods, 11, 15～22, 1985
- 8) 矢部貞雄、中山幹男、山田堅一郎、北野忠彦、新井陽子、堀本泰介、増田剛太、見籐歩、田
代真人 : 輸入デングウイルス感染症のウイルス学的診断. 70, 1160～1169, 1996
- 9) Morita K, Tanaka M, Igarashi A : Rapid identification of dengue virus serotypes by
using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 29, 2107～2110, 1991
- 10) 木村朝昭、弓指孝博、山崎謙治、小田美光、原 嘉宏、木村明生、中村 央、吉田政弘、峯
川好一 : PCR 法による野外採取蚊からの日本脳炎ウイルスゲノムの検出. *大阪府立公
衛研所報*, 30, 59～64, 1992

執筆者 小野哲朗 大分県衛生環境研究センター
吉田靖子 東京都衛生研究所
平位芳江 川崎市衛生研究所
高崎智彦 国立感染症研究所
倉根一郎 国立感染症研究所

連絡先 〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1
国立感染症研究所ウイルス第一部
高 崎 智 彦
TEL:03-5285-1111 (2526)
Fax:03-5285-1188
e-mail:takasaki@nih.go.jp

乳児ボツリヌス症

乳児ボツリヌス症

目 次

I. ボツリヌス症の概説

1. ボツリヌス症の分類と菌の分布
2. ボツリヌス症の検査に関する一般的な注意事項
3. 検体の採取・輸送及び保管
 1. 検査材料の採取
 2. 検査材料の輸送
 3. 病原体の保管
 4. 毒素の不活化及び消毒方法

II. 検査の進め方

1. 試薬及び診断用抗毒素血清
2. 装置及び器材
3. ボツリヌス毒素の検出方法
4. ボツリヌス菌の分離方法
5. ボツリヌス毒素遺伝子の検出方法

III. ボツリヌス症の診断基準

IV. 引用文献

V. 検査相談先及び連絡先

VI. 執筆者一覧

VII. 編集・発行

I. ボツリヌス症の概説

ボツリヌス症 (botulism) は、芽胞を有する嫌気性グラム陽性桿菌であるボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) が産生するタンパク毒素 (ボツリヌス毒素) の作用によって起こる神経麻痺性疾患である。

ボツリヌス菌はDNA相同性および生物学的性状の違いからⅠ群からⅣ群に分けられているが、産生されるボツリヌス毒素は抗原性の違いによってA型からG型までの7型に分類されている (表1) ^{1, 2)}。したがって、生物学的性状による分類と産生する毒素の型による分類とは一致しない。Ⅰ群菌にはA型菌とタンパク分解性のB型およびF型菌が属し、Ⅱ群にはE型菌とタンパク非分解性のB型およびF型菌が、Ⅲ群菌にはCおよびD型菌が、Ⅳ群菌にはG型菌が属している。Ⅳ群菌は*C. subterminale*や*C. hastiforme*のような白糖非分解性、タンパク分解性のclostridiaと生物学的性状がよく似ており、SuenらはDNA相同性から本菌を*C. argentinense*と呼ぶよう提唱している。また、欧米で発生したボツリヌス症例から、E型毒素と類似した毒素を産生する*C. butyricum*、F型毒素と類似した毒素を産生する*C. baratii*がそれぞれ分離されている。

1. ボツリヌス症の分類と菌の分布

ボツリヌス症はヒトにも動物にも発生し、ヒトの症例に関係するのは主としてA、B及びE型菌で、まれにF型菌による事例も報告されており、ニワトリや野鳥ではC型、家畜ではC及びD型によるボツリヌス症が発生している。

ボツリヌス症は、その発病機序により、①ボツリヌス食中毒 (foodborne botulism: 食餌性、食生ともいう)、②乳児ボツリヌス症 (infant botulism)、③創傷ボツリヌス症 (wound botulism)、及び④子供及び成人の乳児型ボツリヌス症 (child and adult colonization botulism) の4つの型に分類されている ^{3, 4)}。

(1) ボツリヌス食中毒

ボツリヌス食中毒は、食品中でボツリヌス菌が増殖し、産生された毒素を経口的に摂取することによって発症する毒素型食中毒である。1897年、Van Ermengemによって最初の食中毒事例が報告されて以来、米国、カナダ、旧ソビエトなど世界各国での発生事例が報告されるようになった。ボツリヌス中毒に関する世界的な統計資料はないが、これまでに少なくとも世界43カ国における発生が確認されている。

食中毒の場合の潜伏時間は6時間～10日間であるが、一般的には18～36時間である。主な臨床症状は、脱力感、倦怠感、複視、弱視、眼瞼下垂、瞳孔散大、対光反射の遅延・消失、嚥下困難、発声困難、口の渇き、しわがれ声、腹部膨満、腹痛、便秘、歩行困難、握力低下、尿閉、呼吸失調などである。重症例では、呼吸困難により死亡する。そのほか、ボツリヌス毒素による特異症状では

ないが、嘔気、嘔吐、下痢などの胃腸炎症状が伴うことが多い。体温は正常である。

表1 ボツリヌス毒素産生菌の分類と生物学的性状

性 状	I	II	III	IV ¹⁾	<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Clostridium baratii</i>
産生毒素型	A,B,F	B,E,F	C,D	G	(E)	(F)
蛋白分解性	+	—	—	+	—	—
ゼラチンの液化	+	—	+	+	—	—
ブドウ糖分解性	+	+	+	—	+	+
マンノース分解性	—	+	+	—	+	+
白糖分解性	—	+	—	—	+	+
リパーゼ	+	+	+	—	—	—
運動性	+	+	+	+	—	—
トリプシンによる毒素の活性化	—	+	—	+		
芽胞の耐熱性 (温度／D値)	120℃4分 (112℃) (1.23)	80℃6分 (80℃) (0.6-1.25)	100℃15分 (104℃) (0.1-0.9)			
発育至適温度	37～39℃	28～31℃	40～42℃	37℃	30～37℃	30～45℃
発育最低温度	10℃	3.3℃	15℃		10℃	
類似菌 ²⁾	<i>C. sporogenes</i>	+ ²⁾	<i>C. novyi</i>	<i>C. subterminale</i>		

1) Suenら(1988)は、DNA相同性の成績からIV群菌を*C. argentinense*と呼ぶよう提唱している。

2) 存在するが名称が割り当てられていない。

日本では1951年、北海道岩内町で発生した鯊の飯ずしを原因食品としたE型食中毒事例が初めての報告である。その後北海道、東北地方の各県でも確認され、2000年までに116事例が発生している（患者数537名、死者は113名；致死率21.0％）。北海道、東北地方で発生した原因食品は自家製の飯ずし、或いはこれに類似した魚類の発酵食品で、原因毒素型はいずれもE型である。その他の

地域では、1969年、宮崎県での輸入キャビアによるB型事例、1976年、東京都でのA型事例（原因食品不明）、1984年、熊本県産の芥子蓮根によって全国15都府県で患者36名、死者11名をみたA型事例及び同年、栃木県で発生したB型事例（原因食品不明）などが主な発生事例である。滋賀県では自家製のハズズシによって1973年、1989年に各1事例ずつのE型ボツリヌス食中毒が発生している。1985年以降、最近では日本で分布の少ないと思われるA型による事例が多くなってきており、1998年に東京都で発生したイタリア産のグリーンオリーブ（瓶詰）によるB型事例のように、輸入食品の関与にも注目し、輸出国での食品衛生事情にも関心を払っていく必要がある。

なお、患者の発生状況についての詳細情報については、“ボツリヌス症の手引き・資料集” p167-172を参照されたい⁵⁾。

(2) 乳児ボツリヌス症

乳児ボツリヌス症は、生後1才未満の乳児がボツリヌス菌芽胞を経口的に摂取した場合、菌が消化管内で増殖し、産生した毒素の作用により発症する。1976年米国での症例が最初の発生報告となっているが、ボツリヌス症の診断に便の検査を採用した結果、新しい型のボツリヌス症として確認されたものである。生後2週では感染報告例は少なく、母乳（初乳）に含まれる成分がボツリヌス菌の定着・増殖を抑制することが考えられる。また、大半の患者は離乳食を与える前に感染するため、腸内細菌叢の構成細菌とボツリヌス菌が増殖する条件とは関係が深い。感染源としては国内患者の半数がハチミツを摂取した後に発症しているが、野菜ジュース、コーンシロップ等も感染源となりうる。

患者の所見としては便秘状態が数日続き、全身の筋力低下、ほ乳力の低下、泣き声が小さくなる。特に、顔面は無表情となり、頸部筋肉の弛緩により頭部を支えられなくなる。眼瞼下垂、瞳孔散大、対光反射が緩慢になる等、食餌性ボツリヌス症と同様な症状が認められる。また、患者は頑固な便秘のために便からは長期間（1～2ヶ月）、ボツリヌス菌が排泄される例も珍しくない。通常、抗毒素療法は行われないが、患者が死亡する例は少ない。米国では1976年から1996年までに1,442例の症例が報告されており、A型による事例46.5%、B型による事例51.9%で、カリフォルニア州で米国全体の47.2%が発生しているという³⁾。

日本では、1986年に千葉県で発生したA型菌による事例が最初の報告で、これまでに17例の症例が報告されている。毒素型はA型が12例、B型とC型がそれぞれ1例ずつ、毒素型不明3事例である。そのうち、感染源として重要視されている蜂蜜の摂取歴のある症例は11例で、1987年10月、厚生省による「1才未満の乳児には蜂蜜を与えないよう」という指導後にも蜂蜜の摂取歴のある症例が発生している。また、1996年に東京都で発生した症例では、野菜スープが原因食品として推定されている。なお、患者の発生状況についての詳細情報は“ボツリヌス症の手引き・資料集” P173-174を参照されたい⁵⁾。

(3) 創傷ボツリヌス症

ボツリヌス菌が創傷部位を汚染し、増殖して産生されたボツリヌス毒素の作用によって発生するボツリヌス症である。症例の殆どは米国で発生しており、日本では報告例がない。創傷ボツリヌス症はA型菌による事例が多いが、B型菌によっても発生している。

創傷部位は通常深部で、多くの場合複雑骨折を呈しており、4例では手の広範囲な挫傷が認められている。潜伏時間は、外傷の例で4日～21日、平均7日間である³⁾。

同様の感染経路として、1994年以降、米国ではブラックタールヘロインの常用者での発生事例が急激に増加しているという。この場合の感染様式は、使い回しの注射器や注射針がボツリヌス菌によって汚染されていた場合と、薬剤(ヘロイン等)自体にボツリヌス菌が混入し薬剤と共に注射した場合が考えられる。このような事例については日本では現在まで報告されていない。

(4) 子供及び成人の乳児症型ボツリヌス症

成人や子供が乳児と同じ発症機序によって発生するボツリヌス症で、明確な原因食品がなく、創傷ボツリヌス症の証拠もない事例で、1才以上のヒトに腸管定着性の可能性のみが考えられる事例をいう³⁾。日本では本症例についての報告は明らかでない。

(5) ボツリヌス菌の分布

ボツリヌス菌は、元来土壤中に芽胞の状態で分布する細菌である。自然界におけるボツリヌス菌の分布は、ボツリヌス食中毒の原因食品(食物)への汚染源として深く関わっていると指摘されている。したがって、ボツリヌス食中毒の感染源の究明に際しては、環境のボツリヌス菌調査も重要である。

1) 環境におけるボツリヌス菌の分布

ボツリヌス菌は芽胞の状態で世界中の土壤、河川、湖沼、海水、泥などの自然界に広く分布している。このため、農作物、魚介類、動物の肉などのあらゆる食品の原材料がボツリヌス菌芽胞に汚染される可能性がある。環境から分離される菌の毒素型は均一ではなく、地域により特徴があり、その地域で発生する菌型と関係が深い。米国のロッキー山脈西側ではA型菌の検出頻度が高く、ミシシッピ川以東ではB型菌の検出頻度が高い。五大湖ではE型菌が多い。ヨーロッパではB型菌が多く、北欧ではE型菌が多く分離される。ヨーロッパで分離されるB型菌はタンパク非分解性のII群菌が多く、米国のB型菌はタンパク分解性のI群菌が多いのが特徴的である。菌の分布に地域特異性がある理由は明確にされていないが、土壤中の有機物の質と量や湿度と関係があると考えられている。A型菌は中性～アルカリ性の有機物の少ない場所を好み、E型菌は有機物の多い湿地を好む傾向がある。C、D型菌は温度の高い地域に多く分布する。

日本では、E型菌は北海道、東北地方、東京都、滋賀県、石川県、富山県、山口県及び宮崎県で、A型菌は1950年代に九州地域における調査によって分布が認められている。C型菌やD型菌は東京都、石川県、滋賀県、富山県、岐阜県及び宮崎県で分布が確認されているが、北海道、東北地域では確認されていない。

2) 食品におけるボツリヌス菌の分布

耕地などに分布するボツリヌス菌により家畜を通じて食肉が汚染を受ける可能性があり、野菜や果実への汚染も考えられる。また、河川や海におけるボツリヌス菌は、魚介類を汚染する可能性がある。

ボツリヌス菌の食品汚染率は、他の食中毒起因菌の汚染率に比べて極めて低い。わが国では、E型菌汚染の高い北海道、青森、秋田で捕獲された生魚の数%からE型菌が検出されたという報告がある。また、青森県では、淡水魚からA、E、F型菌が、東京都の魚市場に入荷したキスからはE型菌が検出されている。このほか、市販食品では魚練り製品からA及びE型菌、真空包装食品からB型菌、香辛料からA型菌が検出された例がある。食中毒の原因となった食品では、ドイツ産瓶詰めの「キャビア」からB型菌、真空包装食品の「芥子レンコン」からA型菌、イタリア産瓶詰めの「グリーンオリーブ」からB型菌、合成樹脂製袋詰めのレトルト類似食品「ハヤシライスソース」からA型菌が検出されている。米国、英国やカナダの調査では、食肉製品からA、B型菌が、魚肉製品からE型菌が証明されている。

乳児ボツリヌス症の原因として注目された蜂蜜のボツリヌス菌汚染調査成績によると、三田村らは6.6%からE型菌を検出している。また、阪口らが実施したボツリヌス菌汚染調査研究班の成績では512件中27件(5.7%)から、A、B、C、E、Fの各型のボツリヌス菌が検出されている。

なお、文献および各資料等については、“ボツリヌス症の手引き・資料集”を参照されたい⁵⁾。

2. ボツリヌス症の検査に関する一般的な注意事項

ボツリヌス症が疑われる検体には、ボツリヌス毒素やボツリヌス菌が含まれていることを前提として取り扱うことが必要である。ボツリヌス患者由来の試料およびボツリヌス菌汚染が疑われる検査材料の取り扱い、バイオセフティーレベル2の封じ込め施設内で行うことが望ましい。

乳児ボツリヌス症では、患者の腸管内で菌が増殖し毒素が産生されているため、検体（ふん便等）を取り扱う病院又は検査室では2次汚染の防止が必要である。特に治療中の患者の近くに、感染の危険性のある離乳前の乳児を収容している場合、医師や看護婦等が患者から菌を拡散する恐れがある。患者の家庭においては排泄された便と共に菌の汚染が予想される（電気掃除機内のゴミ、ほ乳瓶等）。健康な子供、成人に対する感染拡大の恐れは極めて低い、手術

後あるいは抗生物質を連続的に服用使用している場合は注意が必要である。また、汚染家庭内で食品を調理する場合は、調理された食品の保存を避けると共に、加熱処理、嫌気状態等、他の細菌を防止するための保存方法は、ボツリヌス菌には無効であることを周知徹底する。

3. 検体の採取・輸送及び保管

ボツリヌス症の検査は、①検体中のボツリヌス毒素の証明、②検体中のボツリヌス菌の検出・分離に大別される。

(1)検査材料の採取

ボツリヌス症の検体としては、共通して患者血清、患者ふん便、原因食品の究明のため喫食残品、原料、関係食品のほか、調理場の下水や排水溝内の泥、原料の採取場所の土壌検体など関連材料も検体として採取する。吐物や胃の洗浄液なども状況に応じて検体として採取する。患者が喫食した食品について、複数の食品の数ロットについて1検体から数カ所から採取するほか、調理方法、購入先、保存方法等の情報についても入手する。患者が調理者である場合は、家族や関係者からも情報収集を行う。

乳児ボツリヌス症では、蜂蜜の摂取の有無を確認し、残品や参考品があれば必ず検査を行う。その他、ベビーフード、野菜、ほ乳瓶、ハウスダスト、室内の植木鉢や居住区周辺の土等を採取する。ハウスダストの採取方法として、電気掃除機内のゴミの採取は容易である。

また、創傷ボツリヌス症では創傷部位の浸出液、組織、その拭い液を採取する。創傷ボツリヌス症の患者が麻薬や覚醒剤の常習者であれば、注射跡の確認を行い、使用した注射器等も検体とする。

ボツリヌス症の診断に必要な検体について、その概要を表に示す（表2）。

表2. ボツリヌス症の診断に必要な検体

採取すべき検体	ボツリヌス症の分類別採取検体			
	食餌性	乳 児	創 傷	子供・成人の乳児型
患者血清	○	○	○	○
患者ふん便	○	○	○	○
吐物、胃の洗浄液	○	—	—	—
喫食残品などの関連食品	○	○*	—	○
土壌、その他環境材料**	○	○	○	○
創傷部の浸出液、組織、	—	—	○	—

* 蜂蜜

** ほ乳瓶、ハウスダスト（電気掃除機内のゴミ等）、下水や排水溝内の泥等

患者由来検体の採取量としてはできる限り多い方が望ましいが、以下の量を目安とする。

- 1) 患者血清：10～15ml相当が望ましく、3ml以下であると確定的な結果が得られない可能性がある。また、ボツリヌス抗毒素血清の投与前の血清を採取することが重要である。
- 2) 患者ふん便：25g～50g採取すべきで、ボツリヌス抗毒素血清投与前のふん便が望ましい。しかし、これより少量のふん便でも診断可能で、乳児ボツリヌス症の場合にはエンドウ豆大の量からでも毒素が確認された例がある。もし、患者が便秘のため浣腸しなければならない場合には、少量の液体（滅菌水が望ましい）を用いて回収した液を、そのまま毒性試験に供試する。また、患者が薬物治療されていた場合、ふん便からの菌の培養や毒性試験が阻害される可能性がある。例えば、筋無力症の患者に経口投与された抗コリンエステラーゼ薬は、ふん便抽出液のマウスを用いたボツリヌス毒素試験を阻害することが明らかになっている。
- 3) 推定原因食品等の食品：100g以上を検体として採取する。

（2）検査材料の輸送

ボツリヌス毒素やボツリヌス菌が含まれている可能性のある検体の取り扱いには、毒素や芽胞による周囲の汚染に十分な注意を払う必要がある。検体は採取後、乾燥や高温を避けて、冷蔵しながら速やかに検査室に送付する。また、検体には、病名（症状等）、採取の日時、抗生物質の投与の有無などの情報を添付する。輸送には、検査材料の漏出を防ぐために、密栓のできるスクリュウキャップ付き容器を用いる。検査に供した残りの検体は冷蔵又は凍結して保存するが、凍結融解の繰り返しは毒素活性を低下させるので、注意が必要である。

（3）病原体の保管

ボツリヌス菌の保存は凍結乾燥が理想的であるが、 $-30\sim-80^{\circ}\text{C}$ での凍結保存も可能である。クックドミート培地を用いても、室温で、0.5～1年は保存できる。流動パラフィンやワセリンを液面に重層し、空気の遮断と水分の蒸発を防ぐ方法も併用される。可能であれば室温よりも冷暗所に置く方が望ましい。ボツリヌス菌のような嫌気性菌は、好気性菌と比較して継代保存中に菌を死滅させることが多い。特にボツリヌス菌の中には高い嫌気度を要求する菌株もあるので、十分な注意が必要である。

(4) 毒素の不活化及び消毒方法

1) 毒素不活化液

ボツリヌス毒素はアルカリや酸化剤で速やかに失活するので、0.1M NaOH或いは、0.5% NaOCl液を作製し、毒素の不活化に使用する。

2) ボツリヌス毒素で汚染した場合の処置

毒素をこぼした場所に、推定される毒素量の少なくとも15倍量以上の0.1M NaOH又は0.5%NaOClを注ぎ、ペーパータオル等をかぶせる。数分後にふき取り、ペーパータオル等を滅菌する。更に表面をNaOH又はNaOCl液で丁寧に清掃する。

3) 器具や廃棄物の殺菌消毒

ボツリヌス毒素は、100℃で10分の加熱で失活する。また、ボツリヌス菌は、耐熱性の芽胞を作るので、毒素や菌の付着したものは、121℃で30分間オートクレーブする。この処置によって、すべての毒素を失活させ、ボツリヌス菌芽胞の殺菌を確実にする。また、多量の菌液等を滅菌する場合には、使用するオートクレーブの容量、能力に応じた温度、時間の設定を行うべきである。

I I . 検査の進め方

ボツリヌス症の検査法としては、① 検体中のボツリヌス毒素の証明、② 検体中のボツリヌス菌の検出・分離に大別される(図1、表3)。ボツリヌス症は、患者材料中のボツリヌス毒素の検出が最も重要で、毒素の証明によって検査室でボツリヌス症と確認される。ボツリヌス毒素の検出や確認法として一般的な検査法は、①マウスを用いた毒性試験と、②診断用ボツリヌス抗毒素血清による中和試験であり、約100pgのボツリヌス毒素を検出できる。ボツリヌス症が疑われる場合、ボツリヌス毒素の検索と共に通常ボツリヌス菌の分離を行うが、菌の分離は、しばしば成功しないことがある。

1. 試薬及び診断用抗毒素血清

(1) マウス試験用試薬

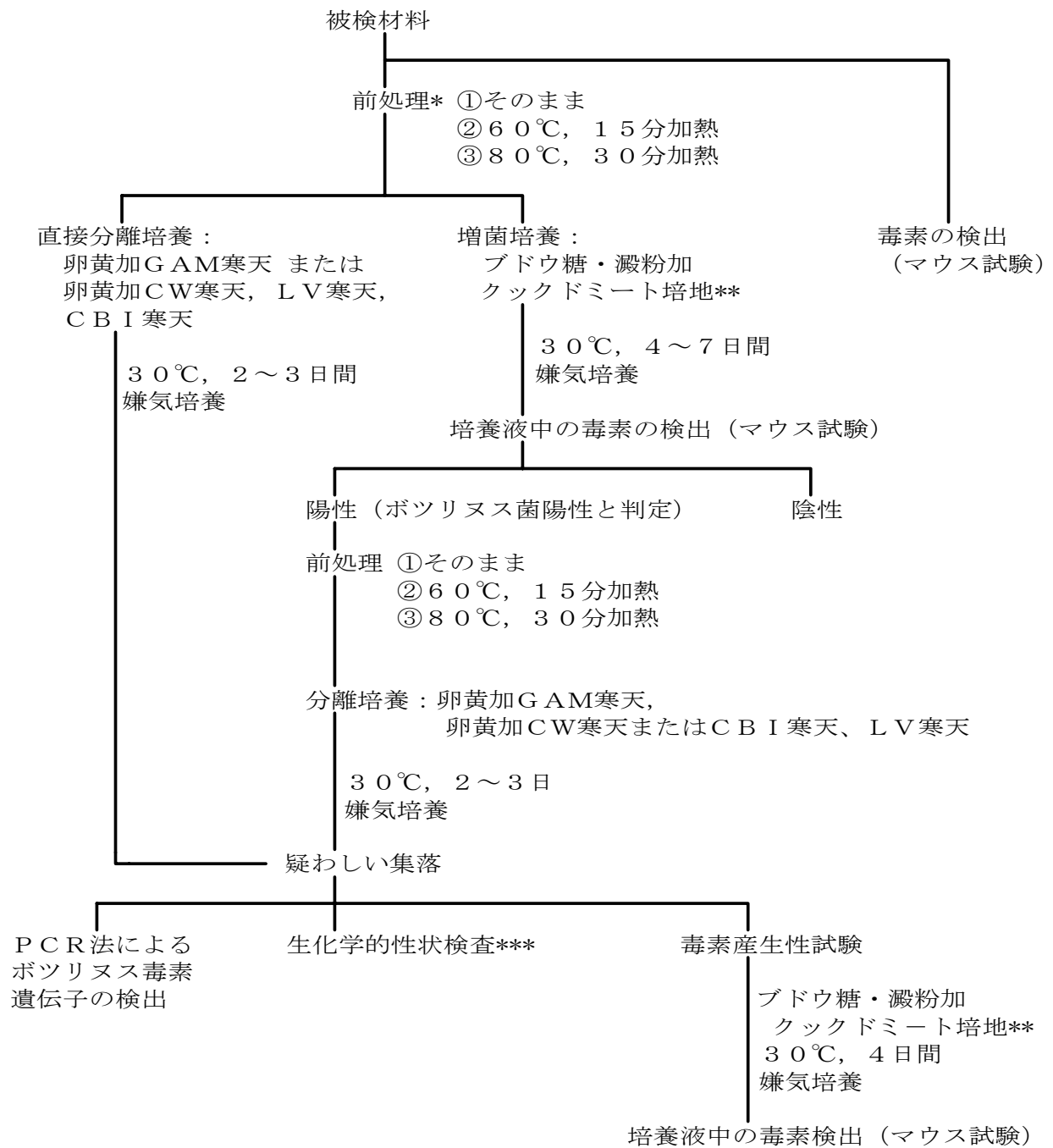
ゼラチン希釈液：リン酸一水素ナトリウム(4g)を精製水(1,000ml)に溶解し、塩酸でpH6.2に調整する。この溶液にゼラチン(2g)を加え、121℃で15分間滅菌する。必要に応じて、300Uのペニシリンや0.5mg/mlのストレプトマイシンを使用する。

ピクリン酸溶液：適当量をエタノールに溶解し、マウスのマーカースに使用する。マウスの頭、頸、背中、尾、左右前足、左右後

足等に標識して識別する。

トリプシン溶液：検体中の毒素の活性化に使用する。トリプシン（活性1:250）は、2%にゼラチン希釈液に溶解し、結晶トリプシンの場合には0.02%に溶解して使用する。

図 1. ボツリヌス症診断のための検査手順



- * 増菌培地に入れてから前処理（加熱）してもよい。
- ** 肝片加肝臓グイヨンを使用する場合もある。
- *** 本菌の同定は、毒素の産生と毒素型の決定が最も重要で、生化学的性状検査は補助的な意味しか持たない。

表 3. ハチミツからのボツリヌス菌検査

-
1. ハチミツを37℃～42℃の孵卵器中で一夜加温処理する（結晶の場合は50℃前後）。
 2. 十分に激しく攪拌して、その20gを秤量する。
 3. 37℃に加温した滅菌蒸留水を100ml加え十分に混和後、10,000rpm30分間遠心分離する。
 4. 沈渣を2mlの生理食塩液に懸濁し、検査原液とする。
 5. 検査には、原液と生理食塩液で10倍、100倍に希釈したものを、各々用いる。
 6. 2本のブドウ糖・澱粉加クックドミート培地、或いは肝片加肝臓グイヨンに、各希釈試料を等量ずつ残りなく接種する。
 7. 試料を接種した培地の1本はそのまま、他の1本は80℃15分加熱処理後、30℃で嫌気培養する。以下、通常のボツリヌス検査と同様に行う。
-

(2) PCR 反応用試薬

TE-0.1% Tween20 : 10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA (pH8.0),
0.1% Tween20 を混合し、121℃, 15分間滅菌する。

プライマー : A～G型ボツリヌス毒素遺伝子検出用プライマーは
宝酒造から市販されている。

(3) 診断用抗毒素血清

ボツリヌス診断用抗毒素血清は、千葉県血清研究所で製造・販売されていたが、2002年9月で廃業が決定しており、今後の入手方法については、国立感染症研究所 細菌第二部に照会されたい。なお、現在市販されている抗毒素は、A、B、F型の抗毒素血清の1 IU（単位）は、約50,000マウスipLD₅₀（腹腔内注射で求める50%致死量）、E型抗毒素血清1 IUは約5,000マウスipLD₅₀のボツリヌス毒素を中和する。

(4) 標準精製ボツリヌス毒素

研究用試薬としてA～F型の市販品（和光純薬）が入手できるため、検体接種後の毒素陽性対照品として同時に用いることを勧める。ただし、1バイアル中の毒素量は型により異なり、マウスに対する致死活性で示されている。

(5) マウス

15～20gのマウス（系統や雌雄は問わない）を使用する。

2. 装置及び器材

(1) 嫌気性培養装置

GasPakシステム (BBL) や嫌気ジャー (BBL, OXOID) を使用し、添付の使用書に従って操作する。また、グローブボックスを使用する場合も、操作方法についてはその使用説明書に従う。

(2) ストマッカー、乳鉢

食品の破碎液や懸濁液を作製する時に使用する。

(3) 遠心分離機

冷却装置付遠心分離機を使用し、適合した遠心管を用いる。

(4) 恒温水槽

機器に添付してある使用書に従って操作する。

(5) 注射器

市販の1ml用注射器を用いる。

(6) アルコール綿

マウスの注射部位を消毒する時に使用する。

3. ボツリヌス毒素の検出方法

毒素の検出には、動物試験がもっとも確実で、毒素に対する感受性も他の *in vitro* 試験法に比べて高い。Ⅰ群菌 (A、B、及びF型のタンパク分解菌群) が産生するボツリヌス毒素は、トリプシン等のタンパク分解酵素によって活性化されないが、Ⅱ群菌 (タンパク非分解性B、E、及びF型の菌群) の産生した毒素は、タンパク分解酵素処理により毒素活性が著しく上昇する (E型毒素は500倍以上)。食品や便中の毒素は、混在菌が産生する酵素により毒素が活性化された状態で存在している可能性があるが、念のためにトリプシン処理後、毒素試験を行う。

(1) 検体の調製

① 血清

患者血液を遠心分離し、血清は希釈せずにそのまま試料原液とする。
トリプシン処理は行わない。

② 糞便、食品

検体 (10 g) と少量 (10~20ml) のゼラチン希釈液を加え、ストマッカーや乳鉢で乳剤化する。その懸濁液に等量の2%トリプシン溶解液 (結晶トリプシンを用いる場合には0.02%) を加え、37℃で30分~1時間反応させる。可能な限り、トリプシン処理しない群も用意し、いずれも3,000rpmで20分

間遠心分離する。その上清をマウス注射の試料原液とする。

③ 培養液

食品や糞便からの培養液を緩やかに攪拌し、2.0mlの培養液を採取し、等量の2%トリプシン液を加え、37℃で30分～1時間反応させる。可能な限り、トリプシンで反応させていない群も用意し、いずれも3,000rpmで20分間遠心分離する。その上清をマウス注射の試料原液とする。

(2) マウス試験

マウス試験には、マウス2匹以上を1群として、次の5群を準備する(表4)。

第1群：試料原液をそのまま0.5mlずつマウス腹腔内に注射する。

第2群：試料原液を100℃、10分間加熱処理し、0.5mlずつをマウス腹腔内に注射する。

第3群：試験管内で試料原液とA型ボツリヌス抗毒素血清(1IU/ml)を等量に混合し、37℃、15～30分間反応させ、0.5mlずつをマウス腹腔内に注射する。

中和反応の方法としては、あらかじめ抗毒素血清をマウスに注射し、その後、試料原液を注射する方法でもよい。

第4群：操作は第3群と同様で、抗毒素血清にはB型を用いる。

第5群：操作は第3群と同様で、抗毒素血清にはE型を用いる。

注射後24時間までは、1、2、4、8、12、18時間目など、できるだけ頻繁に観察する。ボツリヌス毒素陽性の場合にはほとんど24時間以内にマウスは死亡するが、最終4日目まで観察する。

第1群がボツリヌス毒素による特有の症状(腹壁の振動と陥没、後肢麻痺、呼吸困難)を呈して死亡し、第2群が生存し、かつ第3群から第5群の内どれか一つの群が生存した場合、生存群に使用した血清型に相当する毒素の存在が証明される。5つの群のマウスが全部死亡した場合、ボツリヌス毒素以外の耐熱性毒物の存在が示唆される。

しかし、第1群がボツリヌス毒素による特異的症状を呈して死亡し、第2群が生存したにもかかわらず、第3～5群のマウスが全部死亡した場合は、試料の毒素量に対して用いた抗毒素血清の力価が不十分か、A、B或いはE型以外のボツリヌス毒素の存在が示唆される。この場合には、試料原液をさらに希釈して試験するか、他の毒素型(C₁、C₂、D、F型)の抗毒素血清による中和試験を試みる(表4の第6群～第9群)。

なお、1単位のボツリヌス抗毒素が中和できる各型の毒素量は、A型毒素は約90,000マウス腹腔内注射LD₅₀(LD₅₀)、B型毒素は約110,000 LD₅₀、E型毒素は約500,000 LD₅₀及びF型毒素は約13,000 LD₅₀程度である。

表 4. マウスによるボツリヌス毒素試験

下表に従って調製した試料を、各群 2 匹のマウスに、0.5ml ずつ腹腔内注射する。

マウス 群	培養上澄液 (トリプシン処理)	抗毒素血清* (1 IU/ml)	備 考
1 群	0.7ml	—	ゼラチン希釈液 0.7 ml
2 群	0.7ml	—	ゼラチン希釈液 0.7 ml を 100℃10分間加熱処理**
3 群	0.7ml	A 型 0.7ml	
4 群	0.7ml	B 型 0.7ml	
5 群	0.7ml	E 型 0.7ml	
6 群	0.7ml	C1型 0.7ml	
7 群	0.7ml	C2型 0.7ml	
8 群	0.7ml	D 型 0.7ml	
9 群	0.7ml	F 型 0.7ml	

* 抗毒素血清又はゼラチン希釈液を加えた試料を、37℃、15～30分間反応させる。
力価の高い抗毒素血清 (10 IU/ml) を使用する時は、適時添加量を調整する。

** 80℃20分間の加熱処理も可能。

(3) 毒力の定量

ボツリヌス毒素が検出された場合には、検査材料 (1g、1ml) 中の毒力を定量する。この成績は、患者の毒素摂取量、血清やふん便中の毒素量を推定するために有効であり、ヒトの中毒量、致死量を推定するのに貴重な資料となる。

毒力の定量方法は、試料を段階的に希釈して1段階4匹以上のマウスに腹腔内注射する方法、或いは静脈内注射後マウスの死亡時間から毒素量を換算する方法がある。

4. ボツリヌス菌の分離方法

(1) 培地

汚染食品や便からの I 群菌の分離に際しては、培地に D-cycloserine 250 μ g/ml、sulfamethoxazole 76 μ g/ml 及び trimethoprim 4 μ g/ml を添加して夾雑菌の増殖を抑制することも可能である³⁾。

① 増菌培地：ブドウ糖・澱粉加クックドミート培地

ブドウ糖 (0.3%)、可溶性澱粉 (0.2%) を精製水に加熱溶解し、クックドミート培地 (Difco) 1.5g (12 ml の分量／試験管) を入れた試験管 (ねじ口) に 12 ml ずつ分注し、121℃で15分間滅菌する。滅菌後直ちに急冷し、使用する。

増菌培地は、出来る限り使用時に調製するのがよいが、調製後直ちに使用しない場合には、可能であれば嫌気ジャーやグローブボックス中の嫌気環境下で、出来ないときは密栓して冷蔵庫で保管する。そして使用直前に溶存酸素を除去するために、沸騰水中で10分間加熱後、流水中で急冷して使用する。

肝片加肝臓ブイヨン（自家製）も使用できる。

② 分離培地：卵黄加GAM寒天培地、又は卵黄加CW寒天培地

GAM寒天（日水）又は、CW寒天（カナマイシン不含、日水）を精製水に加熱溶解後、滅菌し（GAM寒天は115℃で15分、CW寒天は121℃で15分）、50℃の温浴中に保管する。これに、50%卵黄－滅菌精製水溶解液を10%の割合で加え、泡をたてないように静かに攪拌しながら混合し、シャーレに20mlずつ分注して固める。Ⅲ群菌の分離には、この培地にシステインを0.1%加えるとよい（この場合にはpHの再調整が必要）。

A型、B型、E型菌では、GAM寒天よりCW寒天の方が集落を見易い。しかし、CW寒天は、C型やD型菌には不適であり、C型やD型菌ではGAM寒天を用いなければならない。

また、I群菌の分離には抗菌剤を添加したCBI³⁾培地が有効な場合もある。詳細については、“ボツリヌス症の手引き・資料集” (p148)を参照されたい⁵⁾。

③ LV寒天平板培地 (Lecitho vitellin agar)⁸⁾

滅菌生理的食塩水1,000mlに珪藻土を25g添加して高圧滅菌し、冷却後これに鶏卵4個分の卵黄を添加して十分に攪拌し、1,000rpmで10分間遠心後、上清をそのまま、あるいは無菌的にろ紙 (Whatman[®]、DE81) でろ過して卵黄液 (LV液) とする。次に、LV液100mlを55℃に保温した滅菌ハートインフュージョン寒天培地 (原法では普通寒天培地) 900mlに混合し、70万倍にクリスタルバイオレットを加えて20mlずつシャーレに分注し、十分に乾燥する。LV液は1ヶ月程度であれば冷蔵、それ以上の期間であれば－20℃以下での冷凍保存が可能であるが、冷凍の場合には解凍により卵黄が粒子状になり易いため用事調製が望ましい。

本培地を用いてA、B、C、D、E、F型ボツリヌス菌を30℃で48時間嫌気培養を行った場合、菌が産生するリパーゼにより、集落直下に乳濁帯、集落周辺表面に明瞭な「真珠様」層を形成し、ボツリヌス菌を疑う集落の判定が極めて容易である。ただし、*C. sporogenes*と*C. novyi*、そして、自然界の土壌等が多い無毒のボツリヌスE型菌類似菌 (Boticin Eなどのバクテリオシン産生菌および非産生菌) もリパーゼ産生性であるため、本培地では、ボツリヌス菌と誤判定し易い。ボツリヌス菌と疑われた菌については毒素産生の確認が必要である。

(2) ボツリヌス菌の分離

① 増菌培養

「3 (1) 検体の調製」の項で、遠心分離した沈渣0.5ml～1mlを増菌培地3本の深部にパスツールピペット或いは駒込ピペットで静かに移植し、1本目はその

まま、2本目は60℃で15分、3本目は80℃で30分間加熱後、それぞれ30℃で7日間培養する。加熱処理は、芽胞の発芽を促進すると共に、非芽胞性夾雑菌を除くためである。

培養4日目及び7日目に、培養液中のボツリヌス毒素の有無を調べる（マウス試験）。ボツリヌス毒素が証明されれば、ボツリヌス菌陽性とし、ボツリヌス菌の分離を行う。この際に、80℃で30分間加熱後培養した増菌培地以外の培養液中に毒素が検出されても、沈渣からのボツリヌス毒素の移行が推測されるので、供試材料中にボツリヌス毒素が証明された検体では考慮を要する。

② 分離培養

毒素が証明された培養試験管の深部液を分離培地に画線し、30℃で48時間、GasPak（BBL）システム等により嫌気培養する。芽胞非形成菌の多い場合には、増菌培養液2mlに等量のエタノールを添加し、25℃で1時間の処理法も有用である⁷⁾。ボツリヌス菌は、リパーゼを産生（G型菌は非産生）するため、卵黄添加寒天培地上で卵黄中の脂肪を分解し、培地上のコロニーの周りに限局して乳光を発する。ボツリヌス菌が疑われる集落をなるべく多く釣菌して、ブドウ糖・澱粉加クックドミート培地に接種し、30℃で4日間培養する。次に、培養液から「3(2)」マウス試験」の記載に従ってボツリヌス毒素を検出し、ボツリヌス毒素型が決定されれば、当該毒素型のボツリヌス菌が分離されたことになる。分離株については、生化学的性状についても調べるが、本菌の同定は、毒素産生と毒素型の決定が最も重要で、生化学的性状検査は補助的な意味しか持たない。詳細は、“ボツリヌス症の手引き・資料集”（p17）⁵⁾及び他の専門書を参照されたい。

5. ボツリヌス毒素遺伝子の検出方法

ボツリヌス菌には、サイレント遺伝子（毒素遺伝子が存在するが、毒素産生が確認されない）の存在が知られていること等から、PCR法単独ではボツリヌス毒素産生能の有無を決定できず、最終的にはマウス試験法によって毒素産生性の有無を決定しなければならない。しかし、PCR法は、培養液中の菌の存在や、大量の分離株の毒素産生性をスクリーニングする場合に有効である。以下に、PCR法によるボツリヌス毒素遺伝子の検査法の概略を示す。また、詳細については、“ボツリヌス症の手引き・資料集”（p106）を参照されたい⁵⁾。

（1）テンプレートの作製

- ①疑わしい集落をブドウ糖・澱粉加クックドミート培地に接種し、30℃で一夜培養する。
- ②培養液0.2 mlを1.5 mlのエッペンドルフチューブに採取し、12,000rpm、4℃で10分間遠心する。
- ③ピペットマン等を用いて上清を捨て（毒素が含まれていることがあるので注意を要する）、0.2 mlのTE-0.1% Tween20 を加える。

- ④ 沈渣を試験管ミキサーで均一に懸濁し、100℃で10分間加熱する。この処理によって、毒素が失活すると共に、遺伝子も抽出される。
- ⑤ 12,000rpm、4℃で10分間遠心した上清をPCRに供する。

＊：分離培地上の疑わしい集落を少量のTE-0.1% Tween20 に懸濁してテンプレートを作製する方法もある。この場合は集落のレプリカを作製する。

(2) PCR反応

市販のプライマー等を用い、添付マニュアルに従って行う。

II. ボツリヌス症の診断基準

ボツリヌス食中毒の診断に際して、弛緩性の麻痺を伴う臨床所見と共に「患者の喫食した残りの食品、又は同一ロットの製品から、ボツリヌス毒素又はボツリヌス菌が検出された場合」には、糞便又は血清から毒素が検出されない場合でもボツリヌス食中毒と診断する。また、ボツリヌス症の診断に際して、糞便からボツリヌス毒素が検出されても、ボツリヌス菌は分離されない事例もあることが予想されるため、臨床所見と共に「糞便、血清中或いは創傷部等の患者材料からボツリヌス毒素が検出された場合」や「抗毒素治療が施され顕著な治療効果が認められた場合」にはボツリヌス症として診断することを提唱する。

III. 引用文献

- 1) Cato, E. P., George, W. L. and Finegold, S. M. : Genus *Clostridium* Prazmowski 1880, 23^{AL}, In Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. p.1141-1200, Williams & Wilkins, Baltimore (1986)
- 2) Hatheway, C.L. : *Clostridium botulinum* and other clostridia that produce botulinum neurotoxin. In Hauschild, A.H.W. Dodds, K.L. eds. *Clostridium botulinum* : Ecology and Control in foods. New York, Marcel Dekker Inc. p3-20 (1992)
- 3) Centers for Disease Control and Prevention : Botulism in the United States, 1899-1996. Handbook for epidemiologists, Clinicians, and laboratory workers. p1-25 (1998)
- 4) 阪口玄二：ボツリヌス症－病因、病態、発病機序、診断と治療．病原微生物検出情報、21、51-52 (2000)
- 5) 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部 編集・発行：ボツリヌス症の手引き・資料集、平成13年9月

- 6) Dezfulian, M., McCrosky, L. M., Hatheway, C. L. and Dowell, V. R. : Selective medium for isolation of *Clostridium botulinum* from human feces. J. Clin. Microbiol., **13**, 526-531 (1981)
- 7) Jonston, R. et al : Method to facilitate the isolation of *Clostridium botulinum* type E. Bacteriol., **88**, 1521-1522 (1964)
- 8) Cowan, S. T. and Steel, R. J. : Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge, 119 (1965)

IV. 検査相談先及び連絡先

(地方衛生研究所等)

北海道立衛生研究所 食品微生物部 武士 甲一

〒060-0819 札幌市北区北19条西12丁目 TEL : 011-747-2211

青森県環境保健センター 微生物部 大友 良光

〒030-8566 青森市東造道1丁目1番1号 TEL : 017-736-5411

秋田県衛生科学研究所 微生物部 八柳 潤

〒010-8577 秋田市千秋久保田町6番6号 TEL : 018-832-5005

石川県保健環境センター 微生物部 芹川 俊彦

〒920-1154 金沢市太陽が丘1丁目11番 TEL : 076-229-2011

千葉県衛生研究所 細菌研究室 内村 眞佐子

〒260-8715 千葉市中央区仁戸名町666番2号 TEL : 043-266-6723

東京都健康安全研究センター 微生物部 甲斐 明美

〒169-0073 東京都新宿区百人町3丁目24番1号 TEL : 03-3363-3231

滋賀県立衛生環境センター 微生物担当 林 賢一

〒520-0834 大津市御殿浜13番地45号 TEL : 077-537-3050

兵庫県立健康環境科学研究センター 感染症部 辻 英高

〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29 TEL : 078-511-6640

大阪府立公衆衛生研究所 食品衛生部 食品細菌課 浅尾 努

〒537-0025 大阪市東成区中道1-3-69 TEL : 06-6972-1321 (EXT) 409

広島県保健環境センター 微生物第一部 小川博美

〒734-0007 広島市南区皆実町1丁目6番29号 TEL : 082-255-7131

広島市衛生研究所 生物化学部 石村勝之
〒733-8650 広島市西区商工センター4丁目1番2号 TEL : 082-277-6575

福岡県保健環境研究所 病理細菌課 世良暢之、堀川和美
〒818-0135太宰府市大字向佐野字迎田3番地 TEL : 092-921-9940

(国公立の機関)

国立感染症研究所 細菌第2部 (旧 細菌・血液製剤部) 細菌製剤第3室
高橋元秀
〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1 TEL : 425-61-0771

大阪府立大学大学院 農学生命科学研究科獣医学専攻 獣医感染症研究室
小崎俊司
〒599-8531 大阪府堺市学園町1-1 TEL : 072-254-9504

岡山大学大学院 医歯学総合研究科 病原細菌学 小熊恵二
〒700-8558 岡山県岡山市鹿田町2-5-1 TEL : 086-235-7157

V. 執筆者一覧

武士 甲一	北海道立衛生研究所 食品微生物部
大友 良光	青森県環境保健センター 微生物部
甲斐 明美	東京都健康安全研究センター 微生物部
林 賢一	滋賀県立衛生環境センター 微生物担当
内村 眞佐子	千葉県衛生研究所 細菌研究室
高橋 元秀	国立感染症研究所 細菌第2部
岩城 正昭	国立感染症研究所 細菌第2部

VI. 編集・発行

国立感染症研究所 レファレンス委員会
地方衛生研究所全国協議会

発行年月日 平成15年9月1日

梅 毒

梅毒検査マニュアル

目 次

I. 疾患の概説

1. 疫学
2. 病原体
3. 臨床症状
4. 治療・予防

II. 検査に関する一般的注意

1. 病原診断の概論と結果の解釈

III. 検査方法（抗体検出血清検査法の実際）

○脂質抗原法

- （1） ガラス板法
- （2） RPR カードテスト
- （3） 梅毒凝集法

○Tp 抗原法

- （1） TPHA 法
- （2） FTA-ABS 法
- （3） 酵素免疫測定法
- （4） イムノクロマト法
- （5） ラテックス比濁法

IV. 引用・参考文献

V. 検査依頼先

VI. 執筆者一覧

I. 疾患の概説

1. 疫学

梅毒は世界中に広く分布している疾患である。1943 年にマホニーらがペニシリンによる治療に成功して以来、本薬の汎用によって発生は激減したが、その後、各国で幾度かの再流行が見られている。1960 年代半ばには日本も含め、世界的な再流行が見られた。最近では、日本では 1987 年、米国では 1990 年をピークとする流行が見られたが、その後再び減少している。しかしながら、今後とも楽観はできないものと思われる。

最近の状況については、感染症法の下での感染症発生動向調査によると、1999 年 4～12 月には 735 例、2000 年 1～12 月には 749 例の報告がなされている。

2. 病原体

病原体は梅毒トレポネーマ（学名：*Treponema pallidum sub sp. pallidum*、以下、Tp と言う）で、直径 0.1~0.2 μm 、長さ 6~20 μm の屈曲した 6~14 施転の螺旋状菌である。通常の見視野光学顕微鏡では視認できず、暗視野顕微鏡で観察される。青い色彩を放つことから *pallidum*（英語の pale）の種名が与えられている。現在、試験管内の培養は不可能で、菌の維持その他には、ウサギの睾丸内で培養する以外に現実的方法はない。培養の困難さもあって病原性の機構は殆ど解明されていないが、哺乳類の培養細胞への接着と侵入能が確認されており、病原性との関連が議論されている。1998 年に全ゲノムの DNA 配列が決定、公開され、この接着能を担うと予想される遺伝子群が見つかっている。また、多くの菌で病原因子として働くヘモリジンの遺伝子が 5 コピー発見されたが、実際に病原性に関与する証拠はない。

本菌は低酸素状態でしか長く生存できないため、現実には感染形態、経路は限定される。大部分は、菌を排出している感染者（後述の I 期、II 期の患者）との粘膜の接触を伴う性行為や疑似性行為によるものである。極めてまれには、傷のある手指が多量の排出菌に汚染された物品に接触して伝播されたとする報告もある。輸血による感染は劇的に減少し、近年では殆ど報告がないが、これは保存血中での本菌の生存期間についての研究が行われ、血液のスクリーニングが進んだ結果である。しかし、第一潜伏期感染者では臨床症状はなく、血清反応も陰性であり、新鮮血を用いた緊急輸血などがそれらのドナーから行われる場合には、感染の可能性はある。これら以外に、感染した妊婦の胎盤を通じて胎児に感染する経路があり、先天梅毒（後述）の原因となる。

3. 臨床症状

感染後 3 週間程度の潜伏期（第一潜伏期）を経て、経時的に様々な臨床症状が逐次

出現する。

I 期梅毒；(ー3 週)・[感染部位の病変] 初期硬結(赤色)、硬性下疳、局所リンパ腺症(非常に硬性)。

II 期梅毒；(3ー12 週)[血行性に全身に移行] 梅毒性バラ疹(体肢対称性)、発熱、倦怠感、リンパ腺症、粘膜疹、扁平コンジローマ、梅毒性脱毛、髄膜炎、頭痛など。この時期の皮膚病変は梅毒に極めて特徴的なものであり、確定診断が最も容易である。

前期潜伏梅毒；(1 年以内)、後期潜伏梅毒(1 年以降)；無症状。

潜伏梅毒は時に II 期梅毒症状の再発を起こすが、その殆どが1 年以内であるため、その時期を特に前期潜伏梅毒として区別することが多い。

晩期顕症(III 期)梅毒；

- 1) 心臓血管梅毒；[心血管への移行](10ー30 年、アフリカ人種以外では稀)
大動脈瘤、大動脈弁逆流、冠状動脈口狭窄
- 2) 神経梅毒(変性梅毒)；[中枢神経への移行]
 - A) 無症状期：(ー2 年)脳脊髄液中の白血球数、タンパクレベル上昇を伴う CSF (髄液指標) 異常のみの時期。
 - B) 急性梅毒髄膜炎：(ー2 年)頭痛、錯乱
 - C) 上部神経麻痺：(ー2 年)顔面、聴覚神経麻痺
 - D) 進行麻痺：(5ー7 年、男性の症例が有意に多い)頭痛、めまい、人格障害、血管障害など。
 - E) 脊髄癆：(10ー20 年、男性の症例が有意に多いが、ペニシリン治療の普及で現在では稀)進行性痴呆、疲労感、運動失調、脊髄根部疼痛、無反射症、アーガイル ロバートソン瞳孔(反射性瞳孔硬直)など。

*D)、E) の時期を特に「IV 期梅毒」として区別する研究者も多い。

F) ゴム腫：(ー15 年) ゴム腫、結節性梅毒疹、などの肉芽腫、単球浸潤
先天梅毒；

- 1) 早期先天梅毒(出産後ー2 年)骨軟骨症、貧血、肝脾腫、神経梅毒症状
- 2) 晩期先天梅毒(2 年以降)角膜実質炎、リンパ腺症、肝脾腫、コンジローマ、貧血、ハッチンソン歯、聴覚神経障害(内耳性難聴)、回帰性関節症、神経梅毒症状

4. 治療・予防

基本的にはペニシリン G の大量投与である。日本では、病期によらず 120 万単位を

2～4週間にわたり内服する方法が取られている。米国では筋注が基本であり、神経梅毒の場合には髄液中の濃度を高めるため、さらに5倍量程度のペニシリンを静注、さらに適宜ペニシリン排泄阻害剤を併用している。ペニシリンアレルギーがある場合にはテトラサイクリン、エリスロマイシンを使用するが、これらの薬剤は髄液への移行が悪い。したがって、神経梅毒の場合、ペニシリン脱感作を行ってペニシリンを投与するのが勧められる。妊婦に対しても基本的には同様に行うが、胎児への副作用のためにテトラサイクリンは使用しない。妊婦にペニシリン治療を行った場合、新生児は同時に治療できたと考えてもよいが、アレルギーのためにエリスロマイシンを使用した場合には、本薬は胎盤を通過できないので、新生児は出産後改めて治療する必要がある。かつて使用されたクロラムフェニコールは、副作用として重篤な血液疾患をひき起こす場合があり、現在は使用されていない。現在のところ、本菌に対する薬剤耐性菌の報告はない。

治療効果の判定には、抗カルジオリピン抗体の減少と臨床所見を経時的に追跡する。抗カルジオリピン抗体の完全な陰性化は起こらないか、仮に起こるとしても長期間を要するので、抗体価の絶対値ではなく、減少傾向があるかどうかをみることが重要である。感染症法での取り扱いで、「無症候梅毒」では、「カルジオリピンを抗原とする検査で16倍以上陽性かつ *T. pallidum* を抗原とする検査が陽性のもの」と規定されるのはこのためで、抗カルジオリピン抗体8倍陽性では、治療後の残存抗体と判断する方が妥当である（「無症候梅毒」は、前ページでの分類上は、前期潜伏梅毒、後期潜伏梅毒、および神経梅毒期中の a) 無症状期に対応すると解釈できる）。

予防としては、感染者、特に感染力の強い第Ⅰ期及び第Ⅱ期の感染者との性行為、疑似性行為を避けることが基本である。コンドームの使用は効果が高いが、疫学データからすると、淋菌感染症の場合ほどには完全でないことが示唆されている。

II. 検査に関する一般的注意

1. 病原診断の概論と結果の解釈

確定診断の理想は病原体の分離培養、検出であるが、本疾患では、病原体の分離培養は不可能であり、検出についても、第Ⅰ期と皮膚病変のある第Ⅱ期の場合を除き、かなり困難である。臨床の現場では、臨床症状と血清反応の組み合わせによって診断することが多い。ただし、第Ⅰ期の症状が現れても血清反応の陽性化まで1週間程度の期間があるので、この時期には下疳などの病巣部から病原体検出を積極的に試みる必要があり、実際検出されることも多い。具体的には、病巣部の浸出漿液をパーカーインキで染色して、顕微鏡観察を行う。実際には、この検査は経験のある臨床現場付属施設に限られ、地方衛生研究所が対応することは基本的にないので、ここでは手順を詳述しない。具体的な試技は、「細菌・真菌検査 第3版」（財団法人日本公衆衛生

協会)の第3章に詳しい。

この検査の結果の解釈で注意を要する点は、①トレポネーマ様の菌が観察されても、それが常在の非病原性のトレポネー マ属菌である可能性を否定できない点、及び、②検出されないことを以て、梅毒感染を否定できない点である。前者については、特異性の高い蛍光抗体法を用いることによって、観察された菌が Tp であることを結論付けられる。具体的な試技は、同じく、「細菌・真菌検査 第3版」(財団法人日本公衆衛生協会)の第3章に詳しい。

血清抗体は感染後、初めに脂質であるカルジオリピンに対する抗体価が上昇し、次いで Tp に対する特異的抗体価が上昇する。抗カルジオリピン抗体は感染、治癒に応じて比較的良く上昇、下降するため、治療効果の判定にも利用される。しかし、抗原が特異的なものではないため、梅毒以外の疾患等による生物学的偽陽性反応がある。生物学的偽陽性反応の原因として、一部の予防接種や、免疫疾患等がある。これらの詳細や頻度については、「細菌・真菌検査 第3版」(財団法人日本公衆衛生協会)の第3章中の表1に詳しい。

一方、抗 Tp 抗体は特異性は高いが、治癒後漸減はしても完全な陰性化は困難なため、過去の梅毒感染との区別がつきにくい。そこで、スクリーニングとして抗カルジオリピン抗体を RPR カードテスト、凝集法、ガラス板法で測定し、いずれかで陽性であった場合には(場合により期間をおき)、抗 Tp 抗体を TPHA 法、FTA-ABS 法で測定し、いずれかで陽性の場合に、最終的に血清学的確定診断とするのが現実的方法である。抗カルジオリピン抗体を RPR カードテスト、凝集法、ガラス板法と複数法を行うのは、各法での結果に乖離例が多いためである。

また、抗 Tp 抗体を TPHA 法、FTA-ABS 法の2法で行うのは、TPHA 法が IgM クラスの抗体に対する感度が低いためである(最近では、凝集担体をゼラチンその他の人工担体に替えることでこの問題をかなり解消できることが判ってきたが、必ずしも完全に確立していない)。従って、現実的な対応としては、試技の比較的容易な TPHA 法を先に行い、陽性判定であれば FTA-ABS 法を待たずして抗 Tp 抗体陽性を結論づけられる。TPHA 法が陰性の場合には FTA-ABS 法を行う。

血清検査結果の解釈について、注意を要するのは、抗カルジオリピン抗体が陽性の場合である。抗カルジオリピン抗体が陰性の場合には、抗 Tp 抗体が陽性であっても、治療後の過去の感染と判断できる。

①抗カルジオリピン抗体が陽性で抗 Tp 抗体が陰性の場合

この結果につながるシナリオは2通りある。

a)梅毒以外の疾患等による生物学的偽陽性反応

b)感染初期で、カルジオリピンに対する抗体価が上昇しているが、Tp に対する特

異的抗体価が未だ上昇していない時期の血清検体である。

b)である場合はかなり稀であるが、この場合は、1～2週間後に血清を再採取し、抗Tp抗体の上昇が見られるか確認することで、a)、b)の区別をつけられる。

②抗カルジオリピン抗体が陽性で抗Tp抗体が陽性の場合

この結果につながるシナリオは3通りある。

a)梅毒

b)梅毒治癒後であり、かつ、梅毒以外の疾患等による生物学的偽陽性反応を呈している。

c)梅毒治癒後であり、抗カルジオリピン抗体が未だ陰性化していない。

この3つの可能性の区別は、医師による臨床所見に寄らねばならない。

臨床所見が見られる場合はa)を結論できるが、見られない場合には「臨床症状」の節で記述した、潜伏期等の梅毒か、b)、c)か、の可能性かは区別できない。

臨床所見が見られない場合の取り扱い「感染症法における取り扱い」に掲げられた通り、抗カルジオリピン抗体が16倍以上陽性を以て、「無症候梅毒」として報告することとなる。

なお、各血清検査における検査材料の取り扱い法等の注意点については、次項の各法ごとの段落で述べる

III. 検査方法（抗体検出血清検査法の実際）

○脂質抗原法

（1）ガラス板法

本法は沈降反応または、顕微綿状反応(microflocculation)とよばれる一種の受身凝集反応で、カルジオリピンおよびレシチンで感作されたコレステロール粒子が抗体によって凝集した状態を顕微鏡で観察するものである。

〈機器〉

- ・ 恒温槽
- ・ 広口共栓瓶（20～30ml ほどの大きさ）
- ・ ピペット
- ・ 注射器、22～23G 注射針
- ・ 梅毒血清反应用ガラス板
- ・ 水平回転台（回転直径 5 cm、120 回/分の回転が可能であること）
- ・ 顕微鏡

〈試薬〉

- ・ ガラス板法用抗原（カルジオリピン 0.03%、レシチン 0.18～0.30%、コレステロール 0.9%を含む無水エタノール溶液）
- ・ 生理食塩水

〈実施法〉

- ① 被検血清を 56℃30 分加温して補体を不活性化する。
- ② 抗原浮遊液を作成する。
 1. 生理食塩水 0.4ml を正確にとり、広口共栓瓶の底一面に広げる。
 2. 抗原液 0.5ml を正確にとり、広口共栓瓶を水平に回転させながら、6 秒間で全量を滴下する。瓶をさらに 10 秒間水平に回転して抗原液と生理食塩水をよく混和する。
 3. 生理食塩水 4.1ml を加え、栓をして 10 秒間激しく振る。
- ③ ガラス板のくぼみに不活化血清 50 μ l を広げる。
- ④ 抗原浮遊液を注射筒に吸い上げ、注射針切り口が水平になるように下に向け

て1滴を滴下する。

- ⑤ ただちに水平回転器にかけて 120 回/分、5 分間回転後、倍率 100 倍の顕微鏡で観察する。
- ⑥ 定量法は、生理食塩水で不活性化血清の 2 倍連続希釈系列を作成後、各希釈液について③～⑤を行い、凝集が（1+）を示す希釈倍数をもって抗体価とする。

<判定>

次の基準に従って凝集像を判定し、記録する。

判 定 基 準	表 記	判 定
・ 抗原粒子が平等に分布し、凝集塊がない ・ 少し粗い感じ	0 ?	陰性
・ きわめて小さな凝集塊 ・ 小さな凝集塊 ・ 中くらいの大きさの凝集塊 ・ 大きな凝集塊	1+ 2+ 3+ 4+	陽性

<留意点>

- ① 血清の不活性化は 60~63℃10 分でもよい。4 時間以内に検査できなかった場合、再度不活性化を行うが、2 回目以降は 56℃、10 分でよい。
- ② 試薬の保存は室温で行う。冷蔵保存するとコレステロール結晶が析出する。
- ③ ガラス板は専用のものがあるが、一般的なくぼみのあるガラス反応板でもよい。または、スライドガラスにワセリンやガラス鉛筆で直径 2 cm のサークルを書いて使用してもよい。
- ④ 抗原液の滴下は 1 ml が 60 滴になるようにする。1 滴約 17 μ l である。
- ⑤ 抗原液の調整の良否によって感度が異なるため、細かい均一な抗原液を調整出来るよう習熟する必要がある。
- ⑥ 室温が 15℃以下では反応が鈍くなる。
- ⑦ 濃縮・乾燥により非特異的陽性反応が起こるため、全操作を手早く行う。
- ⑧ 抗体過剰により地帯現象がおきる。凝集塊の大きさがまちまちで、凝集していない抗原粒子も見られる。判定時、抗原粒子が少し粗い（?）場合、他法の結果を参考にするとともに再検査を行う。このとき生理食塩水で 2 倍希釈した血清についても行い、反応が強くなれば地帯現象が生じたことが判る。
- ⑨ 生物学的偽陽性反応の場合がある。陽性となった場合は Tp 抗原法で確認する。

⑩ 陽性度の分かった血清をプールして精度管理血清を自家調整し、検査毎に対照として使用するとよい。特に 1 + の管理血清は抗原液作成の可否の判断に便利である。

⑪ 本法は髄液の検査には適さない。γ-グロブリン量 ($7.7 \pm 1.9 \text{ mg/dl}$) が少なく、抗原過剰で反応が起こらない。また、髄液に梅毒抗体が出現するのは神経梅毒(4 ページ、晩期顕症梅毒の 2) 項参照) に進展してからである。

(2) RPR カードテスト (rapid plasma reagin card test)

本法は、カルジオリピン-レシチン抗原をカーボン粒子に吸着させた抗原液と被検血清 (または血漿) を混合し、カーボン粒子の凝集塊の有無により判定する受身凝集反応である。

<機器>

- ・ 水平回転台 (100rpm の水平回転が可能なもの)
- ・ マイクロピペット ($50 \mu\text{l}$) または試薬キットに付属しているディスペンサーを用いてもよい。付属のディスペンサーは 1 滴が $50 \mu\text{l}$ である。
- ・ 反応カードは試薬に付属している。

<試薬>

RPR 抗原液は、滴下用針、反応カード、血清ディスペンサーなどが付属したキット (「RPR テスト」 化血研」 等) として販売されている。

<実施法>

- ① 被検血清 $50 \mu\text{l}$ を、マイクロピペットまたは試薬付属のディスペンサーを用いて反応カードのサークル内に滴下し、はみ出ないように一杯に広げる。
- ② 滴下用針を装着した抗原液瓶を反応カードに垂直に保持し、抗原液を 1 滴滴下する。1 滴は $1/60 \text{ ml}$ である。
- ③ ただちに水平回転台にのせ、100~120rpm で 8 分間回転させ混和する。
- ④ 回転終了後、ただちに肉眼で凝集の有無・大きさを判定する。
- ⑤ 定量法は生理食塩水で血清の 2 倍連続希釈系列を作成後、各希釈液について上記と同様に実施する。凝集が (1 +) を示す希釈倍数をもって抗体価とする。

〈判定〉

①次の基準に従って凝集像を判定し、記録する。

判 定 基 準	表 記	判 定
・大きな凝集塊 ・中程度の凝集塊 ・小さな凝集塊	+++ ++ +	陽性
・－に比べてわずかに粗い ・全く凝集がない	± －	陰性

〈留意点〉

- ①血清の不活性化は必要ない。
- ②温度の影響を受けるので、抗原液は必ず室温まで戻し、十分混和後滴下する。
- ③濃縮・乾燥をさけるため操作は手早く行い、水平回転中は蓋をする。
- ④ガラス板法と同様に抗体過剰により地帯現象がおきる。地帯現象が特に強い場合、凝集塊が非常に小さく見逃す危険がある。(±)の場合、他法の結果を参考にするとともに再検査する。このとき生理食塩水で2倍希釈した血清についても同時に行うと、反応が強くなれば地帯現象が生じたことが判る。
- ⑤ 生物学的偽陽性反応の場合がある。陽性となった場合は Tp 抗原法で確認する。

(3) 梅毒凝集法

本法は、カルジオリピン-レシチン抗原をカオリン粒子に吸着させた抗原浮遊液を用いた感作粒子凝集法である。粒子は容易に遠心沈殿でき、血清の濁度や溶血に影響されず、判定が容易で鋭敏である。髄液の検査にも適している。

〈機器〉

- ・ビーカー 50ml、100ml
- ・小試験管 (例 φ 1.0 x 7.5cm)、試験管立て
- ・ピペット 1 ml、10ml
- ・恒温槽
- ・遠心機
- ・黒い紙

〈試薬〉

- ・抗原 (カルジオリピン 0.01%、レシチン 0.1%の無水エタノール液)

- ・ カオリン 1 mg/ml 液
- ・ 生理食塩水

〈実施法〉

- ① 被検血清を 56℃30 分加温して不活性化する。髄液は不活性化する必要はない。
- ② 抗原浮遊液を作る。
 1. 凝集反応用抗原液 1 容量、生理食塩水 19 容量、カオリン液 5 容量をそれぞれ別々のビーカーに用意する。
 2. 生理食塩水をビーカーから直接、抗原液が入ったビーカーに素早く入れる。次に素早く全量を生理食塩水が入っていたビーカーに戻す。この操作を 4～5 回行い十分に混和した後、素早く全量をカオリン液のビーカーに入れ、同様に混和する。
 3. 37℃、30 分加温しカオリン粒子にカルジオリピン-レシチン抗原を感作する。
 4. 使用前に生理食塩水で 2 倍希釈して、使用液とする。
- ③ 次の表にしたがって血清を希釈する。髄液は希釈しないで検査する。

試験管番号	本 試 験			対 照	
	1	2	3	陰性血清	生理食塩水
1:5 希釈血清(ml)	1. 5	0. 25	0. 05	1. 0	/
生理食塩水(ml)	/	0. 8	1. 0	/	1. 0
抗原浮遊液(ml)	0. 2	0. 2	0. 2	0. 2	0. 2

- ④ 37℃恒温槽で 30 分間（室温では 60 分間）反応させる。
- ⑤ 2,000 回転 3～4 分遠心し、上清を約 0.5ml 残して吸引除去する。
- ⑥ 回転再浮遊させ、凝集の強さを判定する。
- ⑦ 定量法の希釈は次表に従って行う。

試験管番号	1	2	3	4	5 10
血清	0. 4	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0 1. 0
生理食塩水	1. 6	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0 1. 0
抗原浮遊液	0. 2	0. 2	0. 2	0. 2	0. 2 0. 2
血清希釈倍数	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16 1:512

- ⑧ 髄液で定量法を行う場合は髄液 1 ml が基準となる。つまり試験管 1 に髄液 1ml、試験管 2 に髄液 1 ml と生理食塩水 1 ml を加え、試験管 2 から 2 倍連続希釈する。

<判定>

- ① 陰性血清対照、生理食塩水対照が陰性であることを確かめ、各試験管の凝集の強さを記録する。

判 定 基 準	表 記
凝集塊の大きさが平均 1mm くらいに達しており、中間液は透明	3
3 と 1 の中間の強さ	2
凝集塊はきわめて小さいが、対照に比べると粒子全体が粗いことがわかる	1
ごく一部の粒子が粗いと認められるが、大部分の粒子は細かく浮遊しており、肉眼ではぼんやり濁った状態	?
凝集が全く認められない	0

- ② 次の表に従って本試験の判定を行い、記録する。

凝集の強さ			判定	備 考
試験管番号				
1	2	3		
3	3	3	強陽性 3 +	3 本ともに 陽性
3	3	2		
3	3	1		
3	2	1		

2	3	3		
1	2	3		
3	3	0	中等度陽性 2 +	試験管番号 1, 2 が陽性
3	2	0		
2	2	0		
3	1	0		
2	1	0		
1	?	0	弱陽性 1 +	試験管番号 1 のみ陽性
2	0	0		
1	0	0		
?	0	0	陰性 －	
0	0	0		
?	?	0	異常反応	地帯現象が起きている可能性のある定量法を行う
?	?	?		
0	0	?		
0	?	1		

<留意点>

- ① 対照は検査毎に陽性血清対照、陰性血清対照、生理食塩水対照をおく。陽性血清対照は本試験と同様に実施する。
- ② 乳びや溶血が強い血清の場合、遠心後沈査を残して上清を全量すて、生理食塩水を、約 0.5ml 加えて判定する。
- ③ 反応の見方は試験管を試験管立てに立てたまま黒色の背景に向かって前上方の光にかざす。試験管の先端を指先でつまみ、軽く回して、凝集が舞い上

がってくるときの粒子の様子を観察する。

- ④ 生物学的偽陽性反応の場合がある。陽性となった場合は Tp 抗原法で確認する。

○Tp 抗原法

I. TPHA 法

(Tp hemagglutination test ・TPPA 法 Tp particle agglutination test)

本法は受身赤血球凝集反応で、ホルマリン・タンニン酸処理を施したヒツジやニワトリの赤血球に超音波処理をした Tp の菌体成分を吸着させ、血清中の抗体との反応により生じた凝集像をみるものである。マクロ法とマイクロ法があるが最近ではマイクロ法で行われることが多い。赤血球に替わる担体としてゼラチン粒子、ポリアクロレイン粒子、ポリアミノ酸粒子、高比重複合粒子を用いる試薬(以上 TPPA 法)もある。また、磁性化粒子を用いた MAT 法(Magnetic agglutination test)は、専用の磁気発生装置を用いることにより、反応時間 13 分での検出を可能にした方法であるが、原理は同じである。

<機器>

U 底マイクロプレート、ピペット、トレイミキサー

<試薬>

試薬キットの構成はメーカーにより若干異なるが血清希釈液、Tp 抗原感作血球、対照用未感作血球、対照用陽性血清、吸収試薬、などである。

<実施法>

標準的なマイクロ法の実施法は次のとおりであるが、試薬キットの添付使用説明書に沿って行うこと。

- ① 感作血球および対照用未感作血球をキット付属の溶解液で復元し、室温に 30 分間放置し、血球の状態を安定させる。
- ② 血清希釈液をマイクロプレートの第 1 穴に 100 μ l、第 2 穴から第 4 穴に 25 μ l 入れる。
- ③ 被検血清 25 μ l を第 1 穴にとり、第 1 穴から第 4 穴までピペットまたはダイリューターで 2 倍連続希釈する。
- ④ 陽性血清対照、メディウム対照等を指示通りに置く。

- ⑤ 各検体の希釈第2穴に対照用未感作血球浮遊液を $75\mu\text{l}$ 、第3穴、第4穴に感作血球浮遊液を $75\mu\text{l}$ 加える。陽性血清対照、メディウム対照にも指示通り血球浮遊液を加える。血清の最終希釈倍数は、この方法では第2穴が 1:40、第3穴が 1:80 となる。
- ⑥ トレイミキサーに乗せ十分に混和後、蓋をして室温に静置する。
- ⑦ 2時間後または翌日判定する。
- ⑧ 定量法は、第5穴以降も続けて2倍連続希釈系列を作成し、定性法と同様に血球浮遊液を加える。

〈判定〉

- ① 反応像を観察記録する。

反 応 像	表 記
血球がボタン状に集まり、外縁はなめらかな円形 血球は小さなリング状であるが、リングの外縁はなめらかな円形	—
血球はメディウム対照よりやや大きなリング状で、周辺にわずかに凝集がある。	±
血球リングがメディウム対照より大きく薄い 周辺に多くの凝集がある	+
血球凝集が均一で膜様になっている	++
凝集の一部が中心に向かってスリップしている	+++

- ② 陽性対照血清の反応像が使用説明書に表記された凝集像を呈していること、または抗体価を示していることを確認する。メディウム対照が陰性であることを確認する。
- ③ 定性法は、血清最終希釈 1:80 の反応パターンにより、次表に従い判定する。

反 応 像		判 定
未感作血球	感作血球	
—	—	陰 性
+～+++	—	
+～+++	+～+++	吸収操作を行い 再検査
—	±	判定保留
—	+～+++	陽性

- ④ 定量法の場合(+)を示した最終希釈倍数が抗体価である。

<留意点>

- ① 対照として陽性血清、メディウムを検査毎におく。
- ② マイクロプレートを繰り返し使用する場合は、汚れや埃がついていると反応パターンに影響するので注意する。また、血清希釈をダイリューターで行う場合は、ダイリューターによる回転混和に習熟しておく必要がある。ダイリューターの先端が浮き上がると気泡が入り正しく希釈されない。また、強く押しつけ回転混和するとU底に傷がつく。この場合も反応パターンに影響する。
- ③ 反応中に反応プレートを動かすと反応パターンが崩れる。静置する実験台は振動をさけること。また、遠心機など振動する機器の傍の実験台に静置してはならない。
- ④ 対照用未感作血球は異好抗体の有無を確認している。未感作血球、感作血球ともに凝集がみられた場合、感作血球の反応像が未感作血球の反応像より強くても陽性と判定してはならない。必ず試薬の使用説明書に従って吸収操作を行い、再検査する必要がある。
- ⑤ マクロ法定量の血清希釈は通常は4倍連続希釈であるが2倍連続希釈でもかまわない。

(2) FTA-ABS 法 (fluorescent treponemal antibody absorption test)

FTA 法はTpを用いた蛍光抗体間接法である。スライドグラス上に塗抹・乾燥・固定された梅毒Tpに被検血清（1次抗体）を反応させる。被検血清中に梅毒Tpに対する抗体が存在すれば、Tp抗原に結合する。さらにFITC標識抗ヒトγグロブリン動物抗体（2次抗体）を反応させるとTp抗体に結合する。この操作により蛍光黄緑色に染まったTpを蛍光顕微鏡で観察することが出来る。しかし被検血清中に、ヒトに常在する非病原性トレポネーマにより、トレポネーマ共通抗原に対する抗体がある場合、非特異陽性反応が起こる。この非特異陽性反応を除くために、培養可能な非病原性トレポネーマライター株培養加熱上清により、あらかじめ被検血清中のトレポネーマ共通抗原に対する抗体を吸収後、Tpと反応させることで特異性を高めた改良法がFTA-ABS法（梅毒蛍光抗体吸収法）である。本法は迅速で、鋭敏度、特異性にすぐれており、梅毒の確定検査法として認められている。

<器具>

- ・マイクロ ピペット 50 μ l
- ・ピペット 1 ml

- ・ マップ
- ・ 湿箱
- ・ 噴射洗浄瓶
- ・ 染色バット
- ・ 三角フラスコまたはビーカー 500ml
- ・ シリンダー
- ・ 蛍光顕微鏡

〈試薬〉

Tp 塗抹スライド、FITC 標識 2 次抗体、参考陽性血清、封入剤など必要な試薬類がキット化されて市販されている。使用説明書に従って PBS、参考陽性血清、ラベル抗体の調整をする。

〈実施法〉

試薬キット添付の使用説明書に従って行う。概略は以下のとおりである。

- ① 抗原スライドは室温に戻してから開封する。
- ② 被検血清を吸収液で 5 倍、20 倍希釈する。
- ③ 抗原スライドを湿箱内に並べ、参考強陽性血清、参考弱陽性血清、希釈した被検血清約 $20\mu\text{l}$ をサークルからはみ出さないよう慎重に乗せる。参考血清は希釈しないでそのまま使用する。
- ④ 湿箱に蓋をして 37°C にて 45～60 分間、一次反応させる。
- ⑤ スライドを 1 枚ずつ湿箱から取り、噴射洗浄瓶を用いて PBS をスライドにかけ、素早く血清を除く。このときサークルには直接 PBS を噴きかけないように周辺から流す様にする。PBS を満たした染色バットにスライドを入れ、3 回 PBS を交換しながら洗浄する。
- ⑥ 精製水で軽くゆすいで、水を切る。スライドをマップに並べて十分に乾燥させる。ドライヤーの冷風、扇風機の風を当てると早く乾燥する。
- ⑦ 再び湿箱内にスライドを並べ、10 倍希釈したラベル抗体使用液を約 $20\mu\text{l}$ ずつサークルに乗せる。
- ⑧ 湿箱に蓋をして 37°C にて 45～60 分間、二次反応させる。
- ⑨ ラベル抗体の除去・洗浄・乾燥を⑤・⑥と同様に行う。
- ⑩ カバーガラスに封入剤をつけスライドガラスに重ね封入し、400 倍の蛍光顕微鏡で観察する。

〈判定〉

- ① 蛍光の強さ（読み）を記録する。

蛍 光 の 強 さ	表 記
極めて強い蛍光像がみられる	4 +
強い蛍光像がみられる	3 +
明らかに特異蛍光がみられる	2 +
弱い特異蛍光がみられる	+
特異蛍光はみられないが Tp の存在が認められる	±
特異蛍光も Tp の存在も認められない 暗視野法で Tp が確認できる	—

② 次表に従って判定する。

B V 励起方式による読み		U V 励起方式による読み		判 定
1 : 5	1 : 20	1 : 5	1 : 20	
4 + ~ 3 +	4 + ~ 3 +	4 + ~ 2 +	4 + ~ 2 +	陽性
3 + ~ 2 +	3 + ~ 2 +	2 + ~ 1 +	2 + ~ 1 +	
2 +	1 + ~ ±	1 +	± ~ —	±
1 +	1 + ~ ±	±	± ~ —	陰性
±	± ~ —	—	—	
—	—			

＜留意点＞

- ① FITC ラベル抗体（2次抗体）によって検出される被検血清の抗体分画が決まる。日本凍結乾燥研究所のキット試薬 FTA-ABS テスト-SG-KIT(KW) の FITC 標識抗体は抗ヒト IgG ヤギ抗体である。IgM 抗体を検出する場合は別売りの抗ヒト IgM・FITC 標識抗体(KW)を用いる。
- ② 乾燥は十分に行う。湿っている状態でラベル抗体を乗せると、サークルの外に流れ出る。
- ③ 判定が（±）のときは再検査する。可能ならば採血日が後の血清で再検査することが望ましい。

（３）酵素免疫測定法（ELISA 法 enzyme-linked immunosorbent assay、FEIA 法 fluoroenzyme immunoassay、CLEIA chemiluminescence enzyme immunoassay など）

酵素免疫測定法の試薬は各社から販売されているが、反応系の組み立て方はそれぞれに工夫がある。概略はマイクロプレートのウェルやビーズまたはチューブに Tp 抗原を非共有的に付着させて固相とし、被検血清を反応させる。さらに Tp 抗原に結合した抗体に、標識した 2 次抗体またはサンドイッチ法の場合は標識抗

原を反応させた後、標識に応じた検出法で定性的・定量的情報を得るものである。標識抗体を被検血清とともに固相に加え、競合の原理で測定する試薬キットもある。標識方法は酵素(ELISA)、蛍光色素(FEIA)、化学発光(CLEIA) があるが、これらの方法を行うには、反応最終段階の発色・蛍光・化学発光を測定するためのリーダーが必要になる。全自動測定機専用デザインされた試薬キットもある。ELISA 法は目視でも発色は確認できるが陽性と陰性の境目の判断は難しい。用手法で可能なキットには、プレート法でTp 抗体を競合法により測定するものと、ビーズ法でIgM 抗体を2ステップサンドイッチ法で測定するものなどがあるが、使用に際しては試薬キットの使用説明書に従って測定することが肝要である。

(4) イムノクロマト法 (ICA immunochromatography assay)

原理的には酵素免疫測定法のひとつである。Tp 抗原が固相化されたメンブレンに、被検血清を加えることにより形成される抗原抗体複合物を検出する仕組みが、すべてカセット内にセットされている。抗原にリコンビナント抗原を用いたり、妨害物質の影響を受けにくいよう展開液を組み込んであるものもある。ともに試薬の調整や特別な機器を必要とせず、簡単な操作で15分から30分でTp 抗体の検出が可能である。やはり使用説明書に従い測定すること、特に必ず試料が展開していることをカセットのリファレンス部で確認することが重要である。

(5) ラテックス比濁法 (TPLA 法 Tp latex turbidimetric immuno assay) など

Tp 抗原感作ラテックス粒子と血清または血漿中のTp 抗体の反応による凝集塊を光学的に測定することで試料中のTp 抗体の濃度を求める。市販されているいずれの試薬も生化学用自動分析装置または専用機器を用いる。大量検体が迅速に処理できるが、現段階では各試薬間の相関性については疑義を指摘する声もあり、定量に使用出来るかどうかの臨床的評価は定まっていない。

IV. 引用・参考文献

○細菌・真菌検査 第3版 (1987) : H21- H91

厚生省監修 (財) 日本公衆衛生協会

○免疫血清反応検査 第2版 (1978) : 147-155

厚生省監修 (財) 日本公衆衛生協会

○ Clinical Microbiology Reviews. (1999) 12: 187-209

Syphilis: Review with emphasis on clinical, epidemiologic, and some biologic

features

○ Manual of Clinical Microbiology. (1995) Chapter 52: 636-651

Treponema and other host-associated spirochetes

○東京都感染症マニュアル改訂版（第3刷）（2001） 262-263、東京都衛生局医療福祉部結核感染症課

○「梅毒の臨床と検査法の推移、東京都臨床衛生検査技師会 血清検査研修会記録」（2002）血清反応のあゆみ No. 168. 安木良博

V. 検査依頼先

全地研、（医療現場検査施設、又は外注対応の自治体もあり）

VI. 執筆者一覧

伊瀬郁（東京都立衛生研究所 微生物部細菌第二研究科）

中山周一（感染研 細菌第一部）

大友良光（青森県環境保健センター 微生物部）

竹部久勝（奈良県保健環境研究センター ウイルス・細菌）

赤見正行（群馬県衛生環境研究所 ウイルス課）

北條圀生（静岡市衛生試験所 衛生検査）

井出 忍（静岡市衛生試験所 衛生検査）

破 傷 風
(Tetanus)

病原体検査マニュアル：破傷風 (Tetanus)

目 次

1. 破傷風の概要
2. 破傷風（菌）検査に関する一般的な注意事項
3. 検査材料の採取・輸送・保管
4. 検査の実際
 - [1] 検査材料の前処理
 - [2] 細菌学的検査
 - (1) 破傷風菌の分離
 - (2) 破傷風菌の顕微鏡観察
 - 1) グラム染色
 - 2) 芽胞染色
 - (3) 破傷風毒素の検出：動物接種試験
 - (4) 破傷風毒素遺伝子の検出：PCR 試験
 - [3] 血清学的検査
 - (1) 破傷風毒素の検出
⇒ [2] 細菌学的検査 (3) 破傷風毒素の検出 を参照
 - (2) 破傷風抗体の検出
 - 1) 破傷風抗体簡易測定法：破傷風抗体測定キット「化血研」(KPA 法)
 - 2) 中和（発症防御）抗体測定法：破傷風毒素中和試験
5. 破傷風患者の診断と報告
6. 引用文献
7. 検査依頼先
8. 執筆者一覧

1. 破傷風の概要

破傷風は、破傷風菌 (*Clostridium tetani*) が産生する神経毒素 (破傷風毒素) により、強直性痙攣をひき起こす疾患である。破傷風菌は、芽胞という形で土壌中に広く常在し、事故などで受けた創傷部位から体内に侵入・感染する。感染した芽胞は感染部位が嫌気的条件なら発芽して栄養型菌となり、破傷風毒素を産生する。破傷風の特徴的な症状である強直性痙攣は、破傷風毒素が主な原因であり、潜伏期間 (3〜21 日) の後に感染部位近辺や顎から頸部の筋肉のこわばり、痙攣、開口障害、嚥下困難などの局所性の痙攣から始まり、呼吸困難や後弓反張などの全身性の痙攣に移行する。重篤な患者では呼吸筋の麻痺により窒息死する事がある。破傷風では初期症状 (一般に開口障害) から、全身性痙攣が始まるまでの時間をオンセットタイムといい、オンセットタイムが 48 時間以内である場合、患者の予後は不良である事が多いといわれている。現在、報告されている患者の 95%以上が 30 才以上の成人である。

2. 破傷風 (菌) 検査に関する一般的な注意事項

破傷風菌は偏性嫌気性の芽胞形成菌であり、極めて毒性の強い毒素を産生する。その取扱い、及び検査は、国立感染症研究所や日本細菌学会の指針を参考にバイオセーフティーレベル 2 以上の検査施設で行う。破傷風菌の検査では、下の事項への注意が必要である。

- 1) 破傷風菌は偏性嫌気性菌であるので、検査過程での空気への暴露は極力避ける事が望ましい。
- 2) 検査環境が芽胞で汚染された場合は対処が困難なため、芽胞の取り扱いには十分な注意が必要である。
- 3) 不測の事態に備え、破傷風の検査従事者は自分の血中破傷風抗体価を測定し、抗体価が発症防御に必要な抗体価 (0.01 単位/ml) 未満の場合には、破傷風トキソイドの接種により破傷風に対する免疫を獲得しておく事が望ましい。

3. 検査材料の採取・輸送・保管

採取

破傷風を対象とした検査では、破傷風の疑いのある患者の創傷部位のデブリドーマン（創面切除法）による組織片、洗浄液、膿汁、更に血清などが検査材料となる。検査材料の採取方法は一般的な細菌学的材料の採取方法と同様であり、採取された臨床材料への検査環境中の微生物による汚染を避ける。材料の包装には、材料の組織などの名称、患者の症状や疑いのある疾病、採取された日時、その他の特記事項を記載する。材料の採取時期は患者への抗生物質と抗破傷風ヒト免疫グロブリンの投与前が望ましいが、投与後の場合は投与された抗生物質や抗破傷風ヒト免疫グロブリンの名称、投与量、そして投与日時などを明記する。

輸送

材料の輸送の際は、国立感染症研究所病原体等安全管理規程に従い、梱包し輸送を郵便機関に依頼する。また、輸送中は材料を梱包した容器を保冷状態に維持する事が望ましい。

本規程は、国立感染症研究所より入手可能である。入手についての詳細は、[「http://www.nih.go.jp/niid/Biosafety/toiawase02.html」](http://www.nih.go.jp/niid/Biosafety/toiawase02.html)を参考にされたい。

保存

採取された材料は、直ちに検査されるべきである。しかし、やむを得ない場合は、凍結や乾燥を避け冷蔵庫に保存する。

4. 検査の実際

[1] 検査材料の前処理

患者の創傷部位のデブリドーマンによる組織片、洗浄液、膿汁、更に血清などの臨床材料から、破傷風菌の分離や、破傷風毒素や破傷風抗体の検出などを試みる（表 1.）。

これらの臨床材料は、そのまま若しくは必要に応じて滅菌乳鉢等で粉碎し、

更に滅菌した生理食塩液を添加したものを検体として、検査に使用する。

表1. 各臨床材料における破傷風の検査項目

臨床材料	検査項目		
	菌の分離	毒素活性の検出	抗体の検出
組織片 組織洗浄液 膿汁 など	○	○	×
患者血清	×	○	○
分離菌の培養濾液	×	○	×

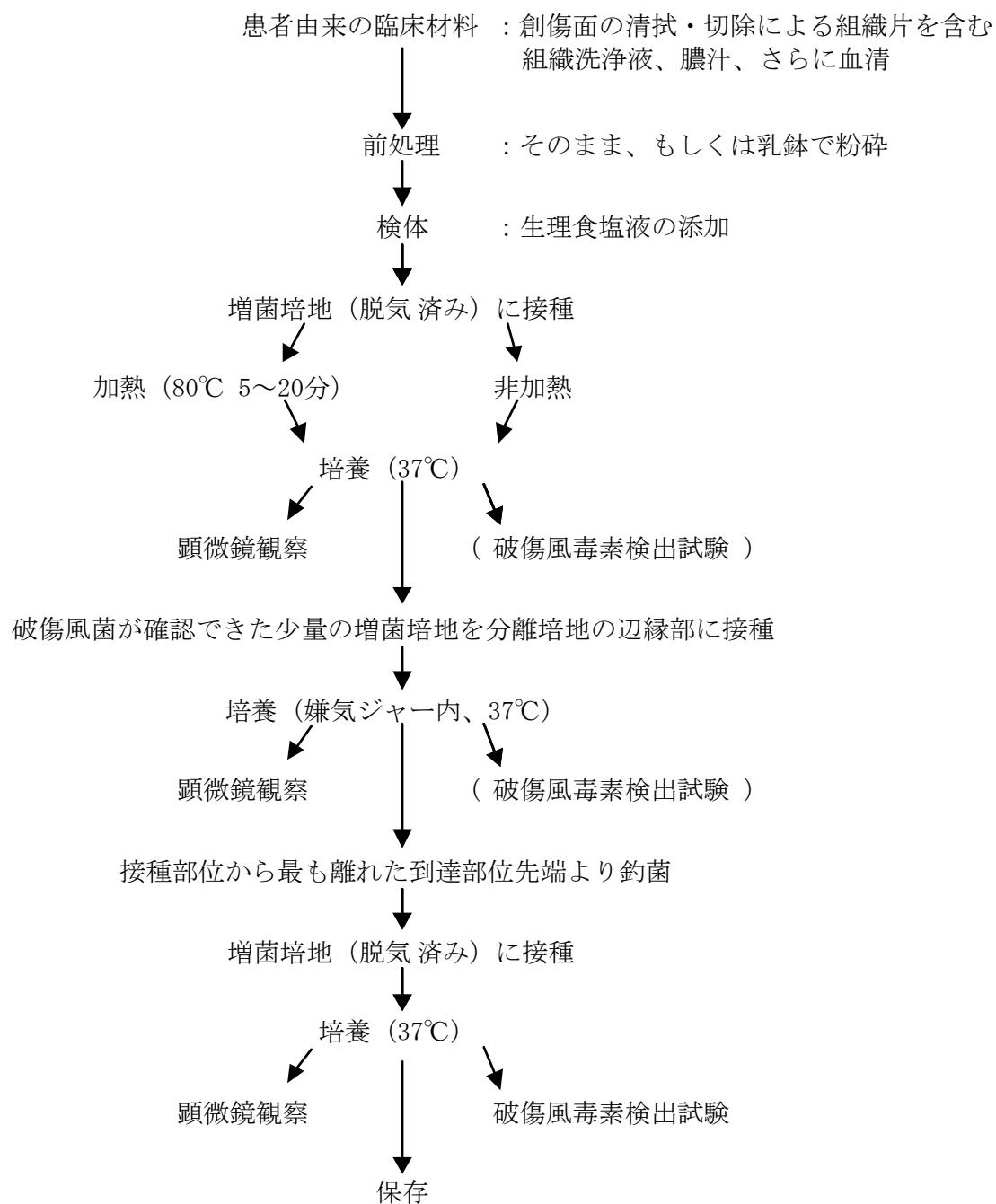
〔 2 〕 細菌学的検査

細菌学的な検査としては、主に破傷風菌の分離・観察や破傷風毒素活性・毒素遺伝子の検出がある。これらの検査はそれぞれ単独で行う事も可能であるが、破傷風菌の分離を行う過程で、菌の観察や毒素の検出を行う方が効率的である（図 1.）。

破傷風患者は、通常破傷風特有な臨床症状（強直性痙攣）により診断されるが、患者の臨床材料から破傷風菌が分離され、更にその菌株より破傷風毒素が検出されれば、破傷風患者の診断は、通常の臨床診断より確実な“病原体診断”として扱われる。

なお、PCR 試験を用いた分離菌株からの毒素遺伝子の検出は補助的な手段と考え、動物接種試験で破傷風毒素活性の検出を行うべきである。

図 1. 細菌学的検査の流れ



増菌培地は、脱気 (100℃ 5分間 加熱後、氷水中で急冷する) することにより、嫌気状態になるので、嫌気ジャーに入れる必要はない。

(1) 破傷風菌の分離

破傷風は主に臨床症状により診断される事が多く、患者の臨床材料から破傷風菌の分離を試みる機会は少ない²⁾。しかし、患者の臨床材料から破傷風菌が分離され、更に破傷風毒素が検出されれば、破傷風の診断がより確実となる。

材料

- 1) 検体 (前処理済みの臨床材料)
- 2) 増菌培地 (使用前に 100℃ 5 分間煮沸後、急冷する事により脱気する)
クックドミート培地 (DIFCO など)
酸化還元電位を下げるために、システイン (最終濃度 0.03%)²⁾や、
グルコース (最終濃度 0.5%) を加える場合もある。
チオグリコール酸培地 (日水製薬 など)
- 3) 分離培地 (寒天濃度 : 1.5%)
変法 GAM 平板寒天培地 (日水製薬 など)
血液寒天培地 (日水製薬 などから市販されているが、自家製でも 可)
- 4) 嫌気環境調節装置
BBL ガスパックや、三菱ガス化学 アネロパックなどがある。

方法

- 1) 2 本の増菌培地 (10 ml/本) に、検体 (0.5~1 g 又は 0.5~1 ml/本) を接種する。
- 2) 1 本の増菌培地を 80℃ 5~20 分間 加温し、もう 1 本の増菌培地は非加熱のまま、37℃、2~4 日間培養する。破傷風菌には、芽胞を形成しにくい菌株も存在し、このような菌株は加熱により容易に死滅するので、非加熱の増菌培地も用意する。増菌培地は脱気して嫌気状態になっているので、嫌気ジャーに入れる必要は無い。
- 3) それぞれの培養液をグラム染色 [4.-[2]-(2)-2)] し、破傷風菌 (太鼓バチ状の桿菌) の存在を確認する。
- 4) 破傷風菌が確認された少量の培養液を分離培地の辺縁の近くに接種し、37℃ 24 時間嫌気ジャー内で嫌気培養する。
- 5) 破傷風菌は一般的に遊走性があるために、分離培地上で嫌気培養すると

接種部位から離れた所まで到達する。その到達部位の先端では純培養に近い状態で破傷風菌を得る事ができる^{1,2)}。しかし、遊走性の低い破傷風菌株も存在するので、注意が必要である。

- 6) 分離された破傷風菌は増菌培地（脱気済み）で4～6日間培養し、その菌液を検体にして、後述の破傷風毒素の検出〔4.-〔2〕-(3)〕を実施する。また、破傷風毒素検出試験を行う前に、分離菌株の破傷風毒素産生能をスクリーニングするために、PCR 試験を用いて破傷風毒素遺伝子の検出〔4.-〔2〕-(4)〕を試みる事もできる。

判定

破傷風毒素の検出〔4.-〔2〕-(3)〕に従い判定し、分離菌株が破傷風毒素を産生する事を確認する。

参考

分離培地の寒天濃度を3%にすると、破傷風菌の遊走性が低くなり、単一のコロニーを形成させる事ができる³⁾。

(2) 破傷風菌の顕微鏡観察

破傷風は少ない菌数で発症すると考えられ、患者の臨床材料を直接塗抹した標本を鏡検した場合、菌を確認できる確率は低いとされている。

芽胞を形成している破傷風菌をグラム染色や芽胞染色後 観察すると、特徴的な太鼓バチ状の桿菌として観察される。しかし、芽胞形成は多くの環境要因に影響を受けるので、芽胞の有無だけで破傷風菌かどうか判定できないため注意が必要である。

1) グラム染色

材料

- 1) 検体（前処理済みの臨床材料）
- 2) グラム染色用染色液
 - a 液：クリスタルバイオレット・シュウ酸アンモニウム混合液

10%クリスタルバイオレット-エタノールと、10%シュウ酸アンモニウム水溶液 を、1 : 9 の割合で混ぜた混合液

b 液：ルゴール液

ヨウ化カリウム 2 g／水 300 ml に、更にヨウ素 1 g を添加した混合液

c 液：100%エタノール

d 液：0.25%サフラニン水溶液

フェイバー・G セット F「ニッスイ」(日水製薬)などの染色キットも市販されている。

3) スライドガラス

4) 顕微鏡

方法

- 1) 検体をスライドガラス上に塗抹する（スライドガラスにガラス鉛筆等で検体塗抹箇所を記す）。
- 2) 検体を乾燥後、ガスバーナー等で火炎固定する。
- 3) 固定された検体を、a 液で 60 秒間染色する。
- 4) 流水でスライドガラスを軽く水洗する。
- 5) b 液で塗抹面を被い、60 秒間染色する。
- 6) c 液で塗抹面を被い、15～30 秒間脱色する。
- 7) 流水でスライドガラスを軽く水洗する。
- 8) d 液で塗抹面を被い、60 秒間染色する。
- 9) 流水でスライドガラスを軽く水洗する。
- 10) スライドガラスの乾燥後、顕微鏡を用いて検体を観察する。

※染色キットを使用する際は、キット添付の使用書に従う。

判定

破傷風菌は培養初期では通常グラム陽性であるが、更に培養を続けると陰性化する傾向がある¹⁾。芽胞を形成している破傷風菌をグラム染色すると、芽胞は染まらないが 菌体は青色に染色される。

2) 芽胞染色：Moeller 法⁴⁾

材料

- 1) 検体（前処理済みの臨床材料）
- 2) a 液：Ziehl 石炭酸フクシン液
フクシン原液と 5%石炭酸水溶液 を 1 : 9 の割合で混ぜた混合液
- 3) エタノール
- 4) b 液：Loeffler メチレンブルー液
メチレンブルー原液と 0.01%水酸化カリウム水溶液を 3 : 10 の割合で混ぜた混合液
- 5) スライドガラス
- 6) 顕微鏡

方法

- 1) 検体をスライドガラス上に塗抹する（スライドガラスにガラス鉛筆等で検体塗抹箇所を記す）。
- 2) 検体を乾燥後、ガスバーナー等で火炎固定する。
- 3) a 液で塗抹面を被い、ガスバーナーで湯気が出るまで 加温する。
- 4) 湯気が出たら 加温をやめ、5 分間放置する。
- 5) 流水でスライドガラスを軽く水洗する。
- 6) 赤色が消失するまで、エタノールで脱色する
- 7) b 液で塗抹面を被い、1 ～ 2 分間染色する。
- 8) 流水でスライドガラスを軽く水洗する。
- 9) スライドガラスの乾燥後、顕微鏡を用いて検体を観察する。

判定

Moeller 法では、菌体は 青色、芽胞は 赤色に染色される。

(3) 破傷風毒素の検出：動物接種試験

患者から分離した破傷風菌の培養濾液から破傷風毒素を検出することができる。また、臨床材料から直接破傷風毒素が検出される事例は多くないが、破傷風患者の血清中に毒素が証明される事もあるので、本試験の実施を推奨する。

材料

- 1) 検体：分離破傷風菌をクックドミート培地で 5 日間前後培養した培養液や、臨床材料（必要に応じ、滅菌乳鉢等で粉碎したり、生理食塩液を添加する）を検体とする。
- 2) ディスポーザブルメンブレンフィルター (0.22 μ m)
- 3) マウス：ddY 系統（安価で入手が容易）、SPF、♀、体重約 16 g、8 匹（2 匹／群）
- 4) 破傷風毒素溶液（感染研より分与可能：1,000 マウス LD₅₀／ml）
- 5) 破傷風抗毒素抗体（感染研より分与可能：1,700 単位／バイアル）
- 6) ディスポーザブル注射筒：1 ml、4 本
- 7) ディスポーザブル注射針：25G × 1 インチ、4 本（1 本／注射筒）
- 8) PBS：滅菌 0.2w/v%ゼラチン加 0.017M リン酸塩緩衝塩化ナトリウム液 (pH7.0) ※、又は滅菌生理的食塩液

※ 0.2w/v%ゼラチン加 0.017M リン酸塩緩衝塩化ナトリウム液 (pH7.0)

無水リン酸一水素ナトリウム 14.45 g

リン酸二水素カリウム 8.83 g

塩化ナトリウム 85.0 g

これらを水に溶かして、10,000 ml (a) とする。

(a) に、0.2 w/v%になるようにゼラチン (20 g) を加えて、加温溶解後、滅菌して用いる。

方法：PBS 又は滅菌生理的食塩液は、予め冷やしておく。また、以下に調製した試料は、注射時まで水中に保持し速やかに注射する。

- 1) 検体を濾過滅菌する（検体が無菌的に採取された場合は必要ない）。
- 2) 破傷風毒素溶液（1,000 マウス LD₅₀／ml）0.1 ml に PBS 又は滅菌生理的食

塩液を 0.9 ml 加え、10 倍希釈する。更に、得られた毒素溶液 0.5 ml に PBS 又は滅菌生理的食塩液 4.5 ml を加えて 10 倍希釈し（最終的に 100 倍希釈した事になる）、10 マウス LD_{50}/ml の毒素溶液を作製する。

- 3) 破傷風抗毒素抗体（1,700 単位／バイアル）を PBS 又は滅菌生理的食塩液 1ml で溶解する。溶解した抗毒素抗体溶液（1,700 単位／ml）0.4 ml に、PBS 又は滅菌生理的食塩液 3.0 ml を加えて 8.5 倍希釈し、200 単位／ml の抗毒素抗体溶液を作製する。
- 4) マウス (A) 毒素検出群：検体濾液（0.2～0.5 ml）を内股部皮下に接種する。
- 5) マウス (B) 毒素中和群：最初に抗毒素抗体溶液（200 単位／ml）を腹腔内に接種（0.5 ml）する。抗毒素抗体溶液を投与した約 30 分後に、更にマウス (A) 群と同様に検体濾液を内股部皮下に接種する。
- 6) マウス (C) 毒素対照群として、毒素溶液（10 マウス LD_{50}/ml ）を内股部皮下に接種（0.5 ml）する。
- 7) マウス (D) 毒素中和対照群として、抗毒素抗体溶液（200 単位／ml）の 0.5 ml を、マウス (B) 群と同様に腹腔内に接種し、抗体溶液投与 30 分後に毒素溶液（10 マウス LD_{50}/ml ）を内股部皮下に接種（0.5 ml）する。
- 8) これらのマウスを 7 日間毎日観察する。

判定

接種した検体濾液中に破傷風毒素が存在する場合は、マウス (A) 群は破傷風毒素特有の局所の強直性麻痺などを起こし、濾液中の毒素量が多い時は死亡する。マウス (B) 群は破傷風抗毒素抗体により破傷風毒素は中和されるために発症せず（破傷風毒素では局所の壊死などは起こらない）、生存する。

毒素対照マウス (C) 群は、破傷風毒素により体躯の屈曲や、接種側の後肢に麻痺が認められ、7 日以内に死亡する。この (C) 群に破傷風の症状が認められない場合、使用された試験毒素に異常があったと考えられ、再度試験する事が望ましい。この群は、必ずしも必須では無いが、観察者が破傷風の症状を見た経験が無い、若しくは少ない場合、この (C) 群を置く事により、発症マウスと無発症マウスを対比しながら観察できるので、試験の際には、この (C) 群を置く事を薦める。

毒素中和対照群 (D) 群では、破傷風抗毒素抗体が破傷風毒素を中和し発症しない事が期待される。もしこのマウスが破傷風様の症状を示した場合、使用され

た破傷風抗毒素抗体に異常がある可能性が考えられ、試験全体をやりなおす事が必要である。

参考

マウス(A)群と(C)群がともに生存した場合、接種濾液中には(破傷風毒素を含め)マウスに対して致死活性を示す物質が存在しないと考えられる。マウス(A)群と(C)群がともに死亡した場合、死亡したマウスの症状が破傷風様の症状の場合には、予め注射した破傷風抗毒素抗体で中和しきれない破傷風毒素が接種濾液中に存在する可能性があり、死亡したマウスの症状が破傷風様の症状でない場合には、マウスに対して致死活性をしめす破傷風毒素以外の物質が存在する可能性がある。

(4) 破傷風毒素遺伝子の検出：PCR 試験

PCR 反応を用いて、分離菌株より破傷風毒素遺伝子を検出する方法を示す。迅速に結果が得られるために、分離菌株の破傷風毒素産生能をスクリーニングに有用である。

詳細は 畠山 薫らの文献(日本獣医師会雑誌、第 53 巻、第 6 号、平成 12 年 6 月号 P405 ～ 408) ⁶⁾を参考にされたい。

材料

- 1) 検体(分離菌株)
- 2) ブレインハートインフュージョン培地(日水製薬 など)
- 3) プライマー(プライマーペア：GAT1 と GAT2、GAT5 と GAT6)
GAT1 (5' - GATGATACGTATGCCAATAACC)
GAT2 (5' - TAAGGCTTCACCTGCTACATTG)
GAT5 (5' - CTACATGGTTTATACGGAATGCAGG)
GAT6 (5' - GATCATTGCAGCTAGTGA CTTGAC)
- 4) PCR 反应用試薬(市販品)
- 5) サーマルサイクラー
- 6) 2%アガロースゲル
- 7) エチジウムブロマイド染色液

8) トランスイルミネーター

方法

- 1) 検体をブレインハートインフュージョン培地で、37℃ 18〜24 時間嫌気培養する。
- 2) 培養菌液 5 μ l を 100℃ 5 分間加熱し、遠心上清をテンプレートにする。
- 3) PCR 反应用試薬の説明書に従い、PCR 反応の準備を行う。
- 4) サーマルサイクラーを用い、95℃・20 秒間、55℃・2 分間を 35 サイクル行う。
- 5) 2%アガロースゲルを用い、PCR 産物を電気泳動する。
- 6) アガロースゲルをエチジウムブロマイド染色液で染色する。
- 7) 染色したアガロースゲル上で、トランスイルミネーターを用いて PCR 産物（バンド）を確認する。

判定

アガロースゲル上で 331 bp (GAT1-GAT2) と 229 bp (GAT5-GAT6) のバンドが観察される。

破傷風患者の病原体診断では 破傷風菌の毒素産生を確認する必要があるので、PCR 試験は補助的な試験と考え、毒素遺伝子の検出だけでなく、更に動物接種試験を行う必要がある。

[3] 血清学的検査

血清学的な検査としては、主に患者血清中の破傷風毒素や破傷風抗体の検出がある。通常、検査に使用できる患者血清の量は少ないので、検査計画を綿密に作製し、効率良く検査を実施する。

(1) 破傷風毒素の検出

⇒ [2] 細菌学的検査 - (3) 破傷風毒素の検出：動物接種試験 を参照

(2) 破傷風抗体の検出

血清学的な検査の一つとして、患者血清中の破傷風抗体価を測定するが、

本マニュアルでは 1) 破傷風抗体簡易測定法（破傷風抗体測定キット「化血研」(KPA 法)）と、2) 中和抗体価測定法（破傷風毒素中和試験）を示す。

迅速に破傷風抗体価を測定できる 1) の KPA 法は、早期診断が重要な破傷風では有用である。2) の破傷風毒素中和試験は破傷風毒素に対する中和（発症防御）抗体価を測定できる唯一の方法である。

1) 破傷風抗体簡易測定法：破傷風抗体測定キット「化血研」(KPA 法)

連絡先：(財) 化学及血清療法研究所 第一製造部 開発室 TEL: 096 - 344 - 1211

諸熊 一則、田嶋 義高

この試験法では、破傷風毒素に対する中和抗体価ではなく、ポリアミノ酸粒子に吸着した破傷風トキシイドと抗体が結合する事により、凝集抗体価を定量する。しかし、この試験で測定された凝集抗体価と中和抗体価の間には、高い相関が確認されているので、破傷風抗体価の簡易測定法として、十分利用可能である。また、実験動物を使用し判定までの長期間が必要な破傷風毒素中和試験に比較して、安価かつ迅速に抗体価を測定できる。

試験方法はキット内添付文書を参照されたい。

2) 中和（発症防御）抗体測定法：破傷風毒素中和試験

破傷風菌が産生する破傷風毒素に対する中和（発症防御）抗体を測定できる唯一の抗体価測定法である。この試験法では実験動物を使用するために、費用と判定までの時間が多く必要である。

材料

- 1) 検体（患者血清）：破傷風抗体簡易測定法〔4.-[3]-(2)-1〕で予め破傷風抗体価（凝集抗体価）を測定し、その値から中和抗体価をある程度予測しておく事が、中和抗体価を確実に測定するためには望ましい。
- 2) 標準破傷風抗毒素 Lot 5（感染研より分与可能、41 単位／バイアル）
- 3) 破傷風試験毒素 Lot5（感染研より分与可能、 4.4×10^6 マウス LD₅₀ ／バイアル）
- 4) 実験動物マウス：ddY 系統（比較的安価で入手が容易であるが、他のマウスでも可）、SPF、♀、4 週齢（約 16g）

検体：5 用量 → 5 群（4 匹／群）

標準抗毒素：5 用量 → 5 群（4 匹／群）

破傷風試験毒素の活性確認：3 用量 → 3 群（3 匹／群）

- 5) ディスポーザブル注射筒：2.5ml 13 本（1 本／用量）
- 6) ディスポーザブル注射針：25 G × 1 インチ 13 本（1 本／注射筒）
- 7) PBS：滅菌済 0.2 w/v%ゼラチン加 0.017 M リン酸塩緩衝塩化ナトリウム液（pH 7.0）〔4.-〔2〕-（3）参照〕、又は滅菌生理的食塩液

方法

- 1) 標準抗毒素（41 単位／バイアル）を、PBS、又は滅菌生理的食塩液 4.1 ml で溶解する。溶解した標準抗毒素抗体溶液（10 単位／ml）を、PBS で 1000 倍に希釈して、0.01 単位／ml の標準抗毒素抗体溶液 3ml を作製する。
- 2) 検体を KPA 法などで測定した抗体価の成績をもとに約 0.01 単位／ml（0.008 ～ 0.012 単位／ml）に PBS で希釈し、検体溶液 3 ml を作製する。
- 3) 破傷風試験毒素（ 4.4×10^6 マウス LD₅₀／バイアル）を、PBS 10 ml で溶解する。溶解した破傷風試験毒素溶液（ 4.4×10^5 マウス LD₅₀／ml）を PBS で 3000 倍に希釈して、破傷風試験毒素溶液 10 ml を作製する。
- 4) 標準抗毒素抗体溶液（0.01 単位／ml）、検体溶液（約 0.01 単位／ml）、PBS、及び破傷風試験毒素溶液（4,000 倍）を用いて、希釈列（表 2.）を調製する。

表 2. 希釈列

試験管番号					
試験管中の抗体量（単位/ml）	0.00781	0.00625	0.005	0.004	0.0032
検体（約 0.01 単位/ml）又は 標準抗毒素（0.01 単位/ml）	0.781	0.625	0.500	0.400	0.320
PBS	0.219	0.375	0.500	0.600	0.680
試験毒素（4000倍）	各 1.000				

(ml)

- 5) 室温で1時間、抗毒素抗体と破傷風毒素の中和反応を行う。37℃30分間でも良い。
 - 6) マウス（4匹／群）の内股部皮下に、各混合液 0.4 ml を接種する。
 - 7) マウスを5日間観察する。
- ※ 使用した破傷風試験毒素溶液（4,000 倍、110 マウス LD₅₀／ml）を 2.0（28 倍）、1.0（14 倍）、0.5（7 倍） マウス LD₅₀／0.5ml になるように希釈する。それぞれの希釈毒素液を、各1群の毒素活性確認用のマウスにそれぞれ 0.5ml ずつ接種する。これらのマウスを5日間観察して、使用された破傷風毒素の活性を確認する。

判定

検体と標準抗毒素の 50%有効量を算出し、標準抗毒素に対する相対価として、検体の抗体価を統計学的解析により算出する（例：図 2）。

図 2 . 結果の計算例

中和抗体価が未知の検体をKPA法を用いて抗体価を測定した結果、検体の抗体価は0.4 単位 / mlであった。そこで、中和抗体価を求めるために、上の試験を実施したところ、下の表の結果が得られた。

その場合の計算を以下に示す。

希釈列		検体 (40倍)		標準抗毒素 (0.01 単位/ml)	
検体 標準抗毒素	PBS	生存 (X / 4 匹)	生存率 (%)	生存 (X / 4 匹)	生存率 (%)
0.781 < -0.107 >	0.219	4	100	4	100
0.625 < -0.204 >	0.375	2	50	4	100
0.500 < -0.301 >	0.500	1	25	3	75
0.400 < -0.398 >	0.600	0	0	1	25
0.320 < -0.495 >	0.680	0	0	0	0

上段 (ml)
< 上段の対数 >

検体と標準抗毒素の50%有効量の算出方法：比例配分で算出する。

検体の50%有効量(a) 0.625 ml

< 対数 > < -0.204 >

標準抗毒素の50%有効量(b) 0.447 ml

< 対数 > < -0.349 >

$$= (-0.398) + \{ (-0.301) - (-0.398) \} \times (50-25) / (75-25)$$

検体の抗体価の算出方法

$$\begin{aligned} \text{体の抗体価 (単位 / ml)} &= \text{標準抗毒素の抗体価} \times (a) / (b) \times \text{検体の希釈倍率} \\ &= 0.01 \times 0.625 / 0.447 \times 40 \\ &= 0.559 \end{aligned}$$

5. 破傷風患者の診断と報告

1999～2000 年に報告があった破傷風患者（157 例）の中で、患者の臨床材料から破傷風菌が分離された病原体診断が行われたのは 1 例であり、他の 156 例は臨床症状から診断された。このように破傷風患者の診断は、強直性痙攣などの

破傷風特有な症状により臨床的に行われる事が多い。破傷風治療の要である抗破傷風ヒト免疫グロブリン療法は、患者の発症初期に実施する事が望ましいので、破傷風の治療には早期診断が重要である。破傷風の診断では感染部位を特定する事は重要であるが必須ではなく、実際に患者の 26%では感染部位が特定されていない。そこで、破傷風の診断では外傷の有無に関わらず、患者に開口障害や嚥下困難などが認められた場合、破傷風を疑い、注意深く診断にあたるべきである。臨床検査により、感染部位からの破傷風菌の分離・同定などの細菌学的診断、更に分離菌株から破傷風毒素の産生が確認されればより確実な診断（病原体診断）が可能となる。

また、患者の破傷風診断を行う際に、抗破傷風ヒト免疫グロブリン投与前の患者血清中の破傷風抗体価を測定し、患者の破傷風に対する免疫状態を推測する事ができる。患者血清中の破傷風抗体価が発症防御レベル（0.01 単位/ml）以上であるなら、当該患者は破傷風でない可能性がある。しかし、ここで注意する必要があるのは、抗破傷風ヒト免疫グロブリンの投与の有無、使用した抗体価の測定方法である。免疫グロブリン投与後の血清では、治療時に投与された免疫グロブリンと過去に接種されたかもしれない破傷風トキソイドワクチンにより誘導された免疫グロブリンを、区別する事はできない。また、抗体価を測定した方法が ELISA 法や凝集法であるなら、必ずしも正確に中和（発症防御）抗体価をあらわしていない可能性がある。更に、（ELISA 法で測定した）発症防御レベル以上の抗体価を保有しているながら、破傷風を発症した例⁶⁾もあるので、患者が十分高い抗体価を保持している場合でも、破傷風を否定してしまうのは危険である。

「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⁷⁾」により、患者を破傷風と診断した医師は、診断日から7日以内に最寄りの保健所長を通して、都道府県知事に届けなければならない。診断時に患者の創傷部位から破傷風菌の分離、更に分離菌株より破傷風毒素の産生が証明されれば、病原体診断である旨を報告する。しかし、患者の臨床症状から診断が行われ、保健所に診断報告を届け出た後であっても、臨床材料から破傷風菌の分離、更には、分離菌株から破傷風毒素が検出された場合、病原体診断となった旨を保健所に報告する事が望ましい。

6. 引用文献

- 1) 微生物検査必携細菌真菌検査 第3版（厚生省 監修），（財）日本公衆衛生協会，1987.
- 2) 赤間清人，大谷 昌：臨床検査のための嫌気性細菌学 第3版，日水製薬，1978.
- 3) 海老沢 功：破傷風，日本医事新報社，1988.
- 4) 戸田細菌学 31 版（天児 和暢、南嶋 洋一 編集），南山堂，1997.
- 5) 畠山 薫，他：小学校で飼育されていた家兎の破傷風. 日本獣医師会雑誌 53（6），p405-408，2000.
- 6) Crone NE and Reder AT: Severe tetanus in immunized patients with high anti-tetanus titers. *Neurology* 42（4），p761-764，1992.
- 7) 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（厚生省保健医療局結核感染症課 監修），中央法規出版，1998.

7. 検査依頼先

国立感染症研究所 細菌第2部 第3室

担当者：福田 靖、担当室長：高橋 元秀

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4 - 7 - 1

TEL：042 - 561 - 0771 FAX：042 - 561 - 7173

8. 執筆者一覧

大友 良光 KANKYOSENTA@ags.pref.aomori.jp

青森県環境保健センター 総務室

〒030-8566 青森県青森市東造道 1 丁目 1-1

TEL：017-736-5411 FAX：017-736-5419

長 則夫 cyou01@pref.tochigi.jp

栃木県保健環境センター 微生物部 特別研究員

〒329-1196 栃木県河内郡河内町下岡本 2145-13

TEL: 028-673-9070 FAX: 028-673-9071

赤見 正行 aka-masa@pref.gunma.jp
群馬県衛生環境研究所 ウイルス課
〒371-0052 群馬県前橋市上沖町 3 7 8
TEL : 027-232-4881 FAX : 027-234-8438

遠藤 美代子 endoh@tokyo-eiken.go.jp
東京都健康安全研究センター 微生物部
〒169 - 0073 東京都新宿区百人町 3 - 24 - 1
TEL : 03 - 3363 - 3231 FAX : 03 - 3368 - 4060

北條 罔生 houjou_ar@city.shizuoka.shizuoka.jp
静岡市衛生研究所 衛生検査
〒422-8072 静岡県静岡市小黒 1 丁目 4-7
TEL : 054-285-2131 FAX : 054-283-3119

田中 智之 tanaka-tom@city.sakai.osaka.jp
堺市衛生研究所 所長
〒590-0953 堺市甲斐町東 3-2-8
TEL: 072-238-1848 FAX: 072-227-9991

貫名正文 kih-info-1@mse.biglobe.ne.jp
神戸市環境保健微生物部
〒650-0046 神戸市中央区港島中町 4-6
TEL : 078-302-4321 FAX : 078-302-0894

竹部 久勝 h.takebe@ihe.pref.nara.jp
奈良県保健環境センター ウイルス・細菌担当
〒630-8131 奈良県奈良市大森町 57-6
TEL : 0742-23-6175 FAX : 0742-27-0634

世良 暢之 SERA@star-fihes.pref.fukuoka.jp
福岡県保健環境研究所 保健科学部 ウイルス課
〒818-0135 福岡県太宰府市大字向佐野 39
TEL : 092 - 921 - 9944 FAX : 092 - 928 - 1203

福田 靖 yfukuda@nih.go.jp 岩城 正昭 miwaki@nih.go.jp
高橋 元秀 motohide@nih.go.jp 荒川 宜親 yarakawa@nih.go.jp
国立感染症研究所 細菌第2部
〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4 - 7 - 1
TEL : 042 - 561 - 0771 FAX : 042 - 561 - 7173

藥 劑 耐 性 菌

薬剤耐性菌の検査マニュアル

目 次

- (1) 薬剤耐性菌により起こる感染症
- (2) 検査に関する一般的諸注意
 - a) 検査材料の採取
 - b) 薬剤感受性試験の原則
 - c) 菌株あるいは耐性株の「元株」の保存
- (3) 菌株の輸送方法
- (4) 薬剤耐性菌の検査法の概要と留意点
- (5) 細菌学的検査法
 - 《MRSA》
 - 《PRSP》
 - 《VRE》
 - 増菌培養法、拭き取り検査
 - 《薬剤耐性緑膿菌》
- (6) 薬剤耐性遺伝子検出法
 - a) PCR による遺伝子の増幅
 - b) データベースとの照合
 - 《MRSA》
 - 《PRSP》
 - 《VRE》
 - 《薬剤耐性緑膿菌》
- (7) その他
- (8) 参考文献等
- (9) 参考資料等

荒川宜親	国立感染症研究所	細菌第二部
遠藤美代子	東京都立衛生研究所	微生物部
齋藤紀行	宮城県保健環境センター	微生物部
村瀬 稔	神戸市環境保健研究所	細菌部

(1) 薬剤耐性菌により起こる感染症

感染症法で届け出が求められている薬剤耐性菌による感染症は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)、ペニシリン耐 (低感受)性肺炎球菌(PRSP or PISP)、および薬剤耐性緑膿菌による感染症である。

これらの薬剤耐性菌は、通常、健常者で感染症を引き起こすことは稀であり、多くは術後や癌などの消耗性疾患を基礎疾患に持つ感染防除能力の低下した患者 (immunocompromised host) における「日和見感染症」あるいは、医療施設内で耐性菌が患者間で伝播することによる「院内感染症」「病院感染症」として問題となる。しかし、PRSP や MRSA など近年、初診の外来患者の中耳炎などからもしばしば分離されるようになり「市中感染症」の起因菌としても警戒されている。

(2) 検査に関する一般的諸注意

a) 検査材料の採取

i) 喀痰、咽頭拭い液、尿、便、胆汁、耳漏などの非無菌的臨床材料の場合は、常在菌の増殖等による臨床材料の質の劣化を防ぐため、採取後すみやかに菌の分離・培養に供する。

ii) また、血液、髄液などの無菌的であるべき臨床材料は、採取時の皮膚常在菌の汚染を極力避けるよう、針の刺入部位の消毒に特に注意する必要がある。

iii) 喀痰や尿などの臨床材料の場合、分離される菌が、感染症の起因菌であるか否かを識別するため、塗抹、染色、鏡検により好中球の細菌貪食像を確認する事が望ましい。

b) 薬剤感受性試験の原則

i) 薬剤耐性遺伝子がプラスミドにより媒介されている場合、薬剤の入っていない培地等で継代すると、プラスミドが脱落し、感受性菌化する場合があるため、分離した菌を抗菌薬を含まない培地上 (中) で長期間放置したり何代にもわたって継代してはならない。

ii) 逆に、抗菌薬を含む培地上 (中) で何度も継代する事により、適応現象や、変異が起き、薬剤に対する耐性度が徐々に上昇する現象が発生する事もあり、そのような継代操作は行ってはならない。特に、MRSA やコアグラ

ゼ陰性ブドウ球菌属(CNS)などをグリコペプチド（バンコマイシン、テイコプラニンなど）を含む培地上（中）で繰り返し継代すると1～3 管程度 MIC 値の上昇が起きる事もあり、薬剤感受性を試験する場合は細心の注意が必要である。

c) 菌株あるいは耐性株の「元株」の保存

臨床分離菌株あるいは耐性株の「元株」は、20%グルセロールを含む保存用培地等に懸濁し-80℃に保存確保する。前述した如く、薬剤感受性試験を行う場合は、菌株を分離した後の保管状況等の影響を最大限少なくするため、可能な限り臨床材料より分離された「元株」に近い株を用いる必要がある。そこで、繰り返し薬剤感受性試験を行う必要がある場合や、特異な耐性株を分離した場合には、可能な限りその「元株」に近い株を-80℃に保管して基本ストックとし、以後そこから随時新しい培地に菌を起こし、試験菌とする。

（3）菌株の輸送方法

医療施設から、各都道府県の地方衛生研究所等へ菌株を輸送する際には、基本的には、持参または郵送を推奨する。

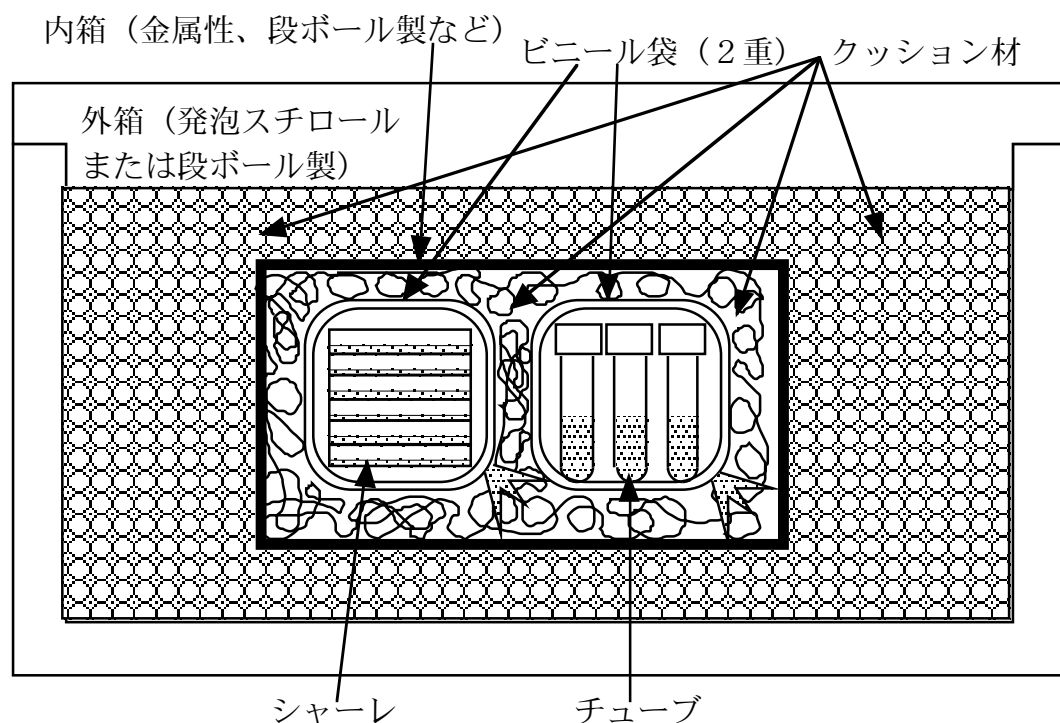
持参の場合は、テープ等で密封した菌接種後の培地を二重のビニール袋に入れ、さらに適当な強度の発泡スチロール製の箱に入れ密閉し持ち運ぶ。

郵送の場合は、菌を接種した移送培地或いは寒天培地の蓋をビニールテープで密閉し、2 重のビニール袋に入れ密封する。それを適当なクッション材で包み、適当な強度の段ボール箱、缶などの内箱に納める。それをさらにクッション材で包み、適当な強度の発泡スチロール或いは段ボール箱等に入れ、密閉し室温または冷蔵（4℃）で郵送する。

内箱には、以下の内容等を記載したラベルを貼付する。

内箱に貼付するラベルの記載例

内容：薬剤耐性緑膿菌 薬剤耐性菌、常在菌、弱病原性、 煮沸または70%エタノール10分処理で死滅 問い合わせ先： _____ _____ _____



（４）薬剤耐性菌の検査法の概要と留意点

MRSA、PRSP、VRE、薬剤耐性緑膿菌の判定は、原則として、日本化学療法学会、あるいは米国臨床検査標準化委員会(NCCLS)の定める薬剤感受性試験法およびその判定基準を参考に行う。

しかし、MRSA や VRE 等のように菌に薬剤耐性を付与する特定の耐性遺伝子が明らかになっている場合は、PCR 法などによりその遺伝子を検出する事により、耐性菌の判定を行う事も可能である。ただし、その場合の経費は MRSA の PCR 検査以外は、健康保険の適応対象外となっており、検査経費は病院負担あるいは患者負担で実施されるため、一般の医療機関では「研究目的」として遺伝子の検査による判定が実施されているのが現状である。

（５）細菌学的検査法

各細菌の分離・同定法については、成書を参照して頂くことにして、ここでは、各々の耐性菌の判定上の留意点等を中心に紹介する。

耐性、感性の判定基準としては、国際的な基準として認知されつつある米国臨床検査室標準化委員会(NCCLS)の定めるブレイクポイントを主として採用した。

なお、薬剤感受性試験用の標準株は NCCLS の指定する ATCC 株を用いると精度管理上好都合である。

《MRSA》

臨床材料を血液寒天培地などに接種し、コロニー形態や溶血性の有無などを参考にし、コアグラゼ産生能のチェックや自動検査装置による、通常分離同定法により黄色ブドウ球菌と同定された菌が分離された場合、日本化学療法学会あるいは NCCLS の定める薬剤感受性試験法により、微量液体希釈法、あるいはディスク拡散法（KB ディスク法）により MRSA か否かの判定を行う。

最近では、MRSA スクリーニング用培地が各社から販売されており、それを用いると簡便な場合も多いが、ややコストがかかるのが難点である。

以下に、市販されている主な MRSA 選択培地の例を示す。

・日本ベクトン・ディッキンソン（株）

1) OPAブドウ球菌寒天培地

ポリミキシン 10 mg/L

オキサシリン 6 mg/L

アズトレオナム 5 mg/L

2) MRSAスクリーニング寒天培地

オキサシリン 6 mg/L

・極東製薬工業（株）

MDRS-II 寒天培地

オキサシリン 4 mg/L

セフチゾキシム 12.5 mg/L

・栄研化学（株）

MRSA分離培地

セフチゾキシム 12.5 mg/L

シノキサシン 10 mg/L

・日水製薬（株）

MSO寒天培地

オキサシリン 6 mg/L

コリスチン 10 mg/L

アンホテリシンB 2 mg/L
アズトレオナム 5 mg/L

・日研生物医学研究所

1) MRSA-1 寒天培地

ポリミキシン 10 mg/L
アズトレオナム 8 mg/L
セフチゾキシム 25 mg/L

薬剤感受性試験用培地としてはミュラーヒントン(MH)培地をベースとし食塩を2% (0.34 mol/L) 添加した陽イオン調整液体培地あるいは寒天培地を用いる。

接種菌量は、McFarland 0.5 濁度標準液を指標に 5×10^5 CFU/mL の生菌数を調製し、所定の菌量を接種する。

培養温度と培養時間は 35℃、24 時間が望ましい。

微量液体希釈法による判定基準は、オキサシリンを用いた場合、その MIC 値が $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ の場合 MRSA と判定する。

ディスク拡散法で判定を行う場合は、MH 寒天培地を用い、好気的環境下で培養し、オキサシリンを $1 \mu\text{g}$ 含有する KB ディスクの周囲の発育阻止円の直径が $\leq 10 \text{ mm}$ の場合、MRSA と判定する。

＜追補＞一昨年、米国において2件 *vanA* 遺伝子を保有するバンコマイシン耐性(VRSA)の臨床分離が報告された。そこで、今回改定された感染症法に VRSA が報告対象（全数）として新たに追加された。VRSA の判定は、NCCLS の定める試験法と判定基準より行うが、具体的には、MH 培地など NCCLS が指定する培地を用いて薬剤感受性試験を実施し、VCM の MIC 値が $32 \mu\text{g/ml}$ あるいはそれ以上と判定された株が分離された場合は、VRSA と判定する。PCR などによる遺伝子の解析を希望する場合は、国立感染症研究所 細菌第二部に御照会下さい。

《PRSP》

臨床材料を血液寒天培地などに接種し、コロニー形態や溶血性の有無などを参考にした定法の分離同定法により肺炎球菌と同定された菌が分離された場合、日本化学療法学会あるいは NCCLS の定める薬剤感受性試験法により、微

量液体希釈法あるいは disk 拡散法により PRSP または PISP の判定を行う。

薬剤感受性試験用培地としてはミューラーヒントン(MH)培地をベースとし溶血ウマ血液 (LHB) を添加した陽イオン調整液体培地を用いる。

接種菌量は、McFarland 0.5 濁度標準液を指標に 5×10^5 CFU/mL の生菌数を調製し、所定の菌量を接種する。

培養温度と培養時間は 35℃、20-24 時間が望ましい。

微量液体希釈法による場合の判定基準は、ペニシリンを用いた際は、MIC が $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ の場合 PRSP と判定される。また、MIC が $0.12 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ の場合は PISP (ペニシリン低感受性菌) と判定される。

ディスク拡散法 (KB ディスク法) による場合は、5%ヒツジ血液添加 MH 寒天培地を用い、5%CO₂ 環境下で、35℃、20-24 時間培養後、 $1 \mu\text{g}$ のオキサシリンを含む KB ディスクの周囲に出現する発育阻止円の直径が $\geq 20 \text{ mm}$ となる場合は、ペニシリン感性肺炎球菌 (PSSP) と判定される。しかし、この方法では発育阻止円の直径が $< 20 \text{ mm}$ の場合、PISP や PRSP の可能性があるものの、薬剤感受性の判定に誤差が生じる恐れがあるため、そのような場合 PISP や PRSP と判定することは行わず、あらためて、微量液体希釈法により MIC を測定し判定する事が望ましい。

《VRE》

臨床材料を血液寒天培地や市販の VRE 選択培地などに接種し、コロニー形態や溶血性の有無などを参考にした定法の分離同定法により腸球菌と同定された菌が分離された場合、日本化学療法学会あるいは NCCLS の定める薬剤感受性試験法により、微量液体希釈法、あるいはディスク拡散法 (KB ディスク法) により VRE の判定を行う。

臨床材料より VRE をスクリーニングする主な培地として以下が市販されている。

・日本ベクトン・ディッキンソン (株)

1) バンコマイシン添加エンテロコッコセル寒天培地

バンコマイシン 8 mg/L

2) バンコマイシンスクリーニング寒天培地

バンコマイシン 6 mg/L

3) エンテロコッカススクリーニング寒天培地 (4 分画)

1. バンコマイシン 6 mg/L

2. ゲンタマイシン 500 mg/L
3. ストレプトマイシン 2000 mg/L
4. 無添加

・ 極東製薬工業（株）

VRE S寒天培地

バンコマイシン 6 mg/L

・ 栄研化学（株）

ESC寒天培地/EC5V6寒天培地（2分画）

バンコマイシン 0.02 g/L

アンホテリシンB 2 mg/L

・ 関東化学（OXOID）

VRE Agar base

バンコマイシン 6 mg/L

・ 日水製薬

VR-EF寒天培地

バンコマイシン 6 mg/L

a. 増菌培養法

また、健常者や VCM を投与されていない患者などの糞便から VRE を検出する場合、試料中の菌数が少ないと通常の方法で検出できない場合が多い。そこで、以下に例を示す「増菌培養法」を試みる事により、分離効率を向上させることが可能である。

＜増菌培養法の例＞

（a）VCM (6 μ g/mL) を含む Enterococcosel broth 培地などを試験管に 2～3 mL 取り、糞便試料を 0.5～1 g 加え振盪した後、37℃で 2 晩以上培養する。

（b）VCM を 12.5 μ g/mL 含む選択平板(Bile esculin azide agar)に 2 晩培養した菌液を 100～200 μ l ほどスポットし、コンラジ棒などで広げた後、さらに 37℃で 2 晩以上培養する。x

（c）黒いコロニーを釣菌し、同種の選択平板上を用いて単集落として分離する。培養条件は 37℃で 2 晩培養する。

（d）*vanB* の中には耐性の低い株もあることから、（a）の菌液を同様に

BHI(VCM 濃度が $6\mu\text{g/mL}$)寒天平板上に広げ 37°C で 1 晩培養する。コロニーが得られた場合、菌種の同定と感受性試験、PCR 解析に用いる。ただし、この選択条件下では、VanC 型 VRE 株や *Pediococcus*、*Leuconostoc* など多数分離されてくるので注意が必要である。

薬剤感受性試験用培地としてはミュラーヒントン(MH)培地をベースとした陽イオン調整液体培地あるいは寒天培地を用いる。

接種菌量は、McFarland 0.5 濁度標準液を指標に 5×10^5 CFU/mL の生菌数を調製し、所定の菌量を接種する。

培養温度と培養時間は 35°C 、好気環境下で 24 時間以上十分に培養する。

微量液体希釈法では、バンコマイシン (VCM) の MIC 値が $\geq 32\mu\text{g/mL}$ の場合 VRE と判定する。(注意:感染症法では、VCM の MIC 値が $\geq 16\mu\text{g/mL}$ の場合、届け出が求められている。)

ディスク拡散法では、VCM を $30\mu\text{g}$ 含有する KB ディスクの周囲の発育阻止円の直径が $\leq 14\text{ mm}$ の時 VRE と判定する。

b. 拭き取り検査法

また、VRE 感染症患者や保菌患者が発見された場合、病院環境の汚染状況を把握する為、拭き取り検査が必要になる場合がある。綿棒を用いた検査の場合、便のように VRE を多く含む材料でも、VRE の検出に失敗する例も多いと報告されている。検出感度を上げる為には、拭き取りに滅菌生食水に浸した $15\times 15\text{ cm}$ 程度のガーゼを用いてより広い範囲を満遍なく拭き取る方法が推奨される。その際、50 ml のファルコンチューブに VCM を $6\mu\text{g/mL}$ 含有した培養液を 10 ~20 ml 入れたものに、拭き取ったガーゼを丸めて入れ、前述した増菌培養を応用する事により、VRE による薄い汚染を効率良く検出する事が可能と考えられる。

《薬剤耐性緑膿菌》

臨床材料からマッコンキー寒天培地や TSI 培地、クリグラー培地などを用いた定法により緑膿菌と同定された菌が分離された場合、日本化学療法学会あるいは NCCLS の定める薬剤感受性試験法により、微量液体希釈法、あるいはディスク拡散法 (KB ディスク法) により判定を行う。

薬剤感受性試験用培地としてはミュラーヒントン(MH)培地をベースとした陽イオン調整液体培地あるいは寒天培地を用いる。

接種菌量は、McFarland 0.5 濁度標準液を指標に 5×10^5 CFU/mL の生菌数を調製し、所定の菌量を接種する。

培養温度と培養時間は 35℃、好気環境下で 16～20 時間とする。

NCCLS による耐性菌の判定基準は、以下の表に示すとおりである。しかし、感染症法により届け出が求められている耐性菌の報告基準とは微妙に異なっており、例えばアミカシンでは、その MIC 値が $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ である低感受性菌についても報告が求められているため、「報告の基準」を十分理解し報告する必要がある。

耐性菌の判定基準(NCCLS)

抗菌薬	耐性(R)の判定基準	
	微量液体希釈法	ディスク拡散法
イミペネム	IPM の MIC, $\geq 16 \mu\text{g/mL}$	IPM の阻止円径 $\leq 13\text{mm}$
アミカシン	AMK の MIC, $\geq 64 \mu\text{g/mL}$	AMK の阻止円径 $\leq 14\text{mm}$
ただし、アミカシンの薬剤感受性試験を実施していない場合は、トブラマイシンなど他のアミノ配糖体の試験結果を参考にすることも可能	TOB で判定する場合 MIC, $\geq 8 \mu\text{g/mL}$	TOB の阻止円径 $\leq 12\text{mm}$
シプロフロキサシン	CPFX の MIC, $\geq 4 \mu\text{g/mL}$	CPFX の阻止円径 $\leq 15\text{mm}$
ただし、シプロフロキサシンの薬剤感受性試験を実施していない場合は、レボフロキサシンなど他のフルオロキノロンの試験結果を参考にすることも可能	LVFX で判定する場合 MIC, $\geq 8 \mu\text{g/mL}$	LVFX の阻止円径 $\leq 13\text{mm}$

(6) 薬剤耐性遺伝子検出法

a) PCR による遺伝子の増幅

以下に、PCR 法による VRE 等の薬剤耐性遺伝子の検出条件の例を以下に示す。試薬の量や混合比、サーマルサイクラーのサイクル条件（温度、時間など）は、検出する遺伝子の塩基配列や PCR キット、機種により微妙に異なるので、各々の添付書類等を参考にされたい。

PCR 反応液の組成の例	サイクル条件の例
--------------	----------

滅菌蒸留水	30 μ L	
10×バッファー	5 μ L	94℃ 2 分
dNTP 溶液	4 μ L	94℃ 1 分 → 55℃ 1 分 —
プライマーF	0.5 μ L	↑ 30 回 ↓
プライマーR	0.5 μ L	72℃ 1.5 分 — — — — —
Taq DNA polymerase	0.25 μ L	72℃ 5 分
DNA テンプレート溶液	10 μ L	4℃ 保存
反応液総量	50 μ L	

b) データベースとの照合

PRSP の PBP_s あるいは緑膿菌の DNA ジャイレースやトポイソメラーゼ IV の遺伝子変異を PCR 増幅とシーケンス解析により確認する場合、得られたシーケンス結果を、データベースと照合し、変異箇所を確認する必要がある。

その場合、三島の国立遺伝学研究所のホームページ<<http://www.nig.ac.jp>>の DDBJ <<http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>> にアクセスし、FASTA <<http://spiral.genes.nig.ac.jp/homology/fasta.shtml>>などの解析プログラムによりオンラインでデータの照合が可能である。

《MRSA》

MRSA のメチシリン耐性の分子機構はペニシリン結合蛋白(PBP_{2'})の産生である。黄色ブドウ球菌がその遺伝子 (*mecA*) を、トランスポゾン様の転位遺伝子により、外来性に取り込む事により、MRSA が発生したと考えられている。

以下に、*mecA* 遺伝子を検出する PCR プライマーセットの例を示す。

PCR 法による MRSA の *mecA* と *spa* 遺伝子 (*spa*: staphylococcal protein A) の検出キットが、湧永製薬 (株) などから市販されている。

また、デンカ生研からスライドラテックスによる PBP_{2'}検出キットも市販されている。

<i>mecA</i>	プライマーF : 5'-TGT CCG TAA CCT GAA TCA GC-3' プライマーR : 5'-GAC AAA CTC CCA CCT ATC GC-3'
-------------	--

《PRSP》

PRSP のペニシリン耐性の分子機構は、ペニシリン結合蛋白(PBP_{1a}, PBP_{2b}, PBP_{2x} など)の変異あるいは獲得である。

以下に、前述した PBP_s の遺伝子の変異箇所をシーケンス解析して確認するための PCR 増幅に利用可能な PCR プライマーセットの例を示す。

<i>pbp1a</i>	プライマーF : 5'-AAA CAA GGT CGG ACT CAA CC-3' プライマーR : 5'-ATA TAC ATT GGT TTA TAG TAA GTT-3'
<i>pbp2x</i>	プライマーF : 5'-CCA GGT TCC ACT ATG AAA GTG-3' プライマーR : 5'-ATC CCA ACG TTA CTT GAG TGT-3'
<i>pbp2b</i>	プライマーF : 5'-CCT ATA TGG TCC AAA CAG CCT-3' プライマーR : 5'-GGT CAA TTC CTG TCG CAG TA-3'

《VRE》

VRE のバンコマイシン耐性の分子機構は、外来性の *van* 遺伝子クラスターの獲得である。リガーゼには、*vanA*、*vanB*、*vanC*、*vanD*、*vanE*、*vanG* などの種類があり、以下に、院内感染対策上識別が必要な主な *van* 遺伝子を確認するための PCR 増幅に利用可能な PCR プライマーセットの例を示す。

<i>vanA</i>	プライマーF : 5'-GGG AAA ACG ACA ATT GC-3' プライマーR : 5'-GTA CAA TGC GGC CGT TA-3'
<i>vanB</i>	プライマーF : 5'-ATG GGA AGC CGA TAG TC-3' プライマーR : 5'-GAT TTC GTT CCT CGA CC-3'
<i>vanC1</i>	プライマーF : 5'-GGT ATC AAG GAA ACC TC-3' プライマーR : 5'-CTT CCG CCA TCA TAG CT-3'
<i>vanC2/C3</i>	プライマーF : 5'-CTC CTA CGA TTC TCT TG-3' プライマーR : 5'-CGA GCA AGA CCT TTA AG-3'
<i>E. faecalis</i> <i>ddl</i>	プライマーF : 5'- TTC ATG GAA ACC ATT AAT ATG CCT-3' プライマーR : 5'- GTT TGT AAA AGA TAT TTG CTC ATG A-3'
<i>E. faecium</i> <i>ddl</i>	プライマーF : 5'- TCG AGC AAT CGT TGA ACA AGG-3' プライマーR : 5'- CGT CCG AAC ATC TTC ATT TCC-3'

注 : *ddl* は、Enterococcus の D-alanine:D-alanine ligase 遺伝子で、菌種毎にシーケンスが微妙に異なるため PCR による菌種の識別に利用可能な場合もあるが、*E. faecalis* と *E. faecium* の同定は、生化学的性状や運動性で判断するのが基本である。Difco より、運動性を判定する Motility Test Medium が発売されており、*E. faecium* と *E. gallinarum* の鑑別に便利である。

感染研よりの VRE の PCR 判定用の陽性参照株の提供は、地方衛生研究所、大学等バイオセーフティー管理が厳格に実施されている施設に対しては可能であるので、細菌第二部（旧細菌・血液製剤部）に相談して下さい。

《薬剤耐性緑膿菌》

◆カルバペネム耐性を付与する分子機構

★外膜蛋白 D2 ポリンの減少★

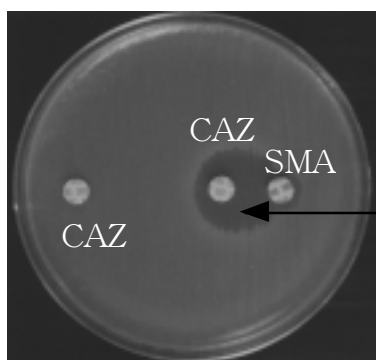
この耐性機構により、イミペネムの MIC が $16\sim 32\mu\text{g/L}$ 程度まで上昇する。臨床分離される緑膿菌の約 2 割程度を占めるイムペネム耐性株がこれに相当すると考えられている。しかし、外膜蛋白 D2 ポリンの減少を遺伝子レベルで検出・定量する方法は技術的に確立されていない。

★メタロ- β -ラクタマーゼの産生★

プラスミド依存性に IMP-1、VIM-2 型メタロ- β -ラクタマーゼなどを産生する場合、第三世代セフェム薬、セファマイシン、カルバペネムなどに広範な耐性を獲得する。特に D2 ポリン蛋白の減少を同時に伴うと、イミペネムなどのカルバペネム系薬に対し高度耐性(MIC, $\geq 128\mu\text{g/mL}$)を獲得する。

i) SMA disk によるメタロ- β -ラクタマーゼ産生株の識別

メタロ- β -ラクタマーゼ産生株か否かを簡便に推定する方法として、阻害剤であるメルカプト化合物を用いる方法が最近開発され、メルカプト



SMAによるメタロ- β -ラクタマーゼの阻害によりCAZに感受性となり発育阻止円が出現する。

CAZ:セフトジジム

SMA:メルカプト酢酸ナトリウム

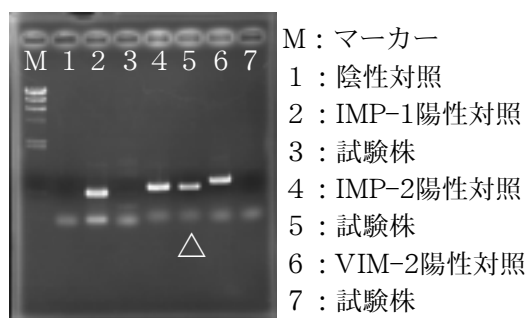
酢酸ナトリウム(SMA)を含む disk が栄研化学株式会社より市販されている。CAZ と SBT/CPZ の MIC 値がともに $\geq 64\mu\text{g/mL}$ となる株は、メタロ- β -ラクタマーゼ産生株である可能性が高い。SMA disk を用いる事により、メタロ- β -ラクタマーゼの種類が何であれ、比較的容易にメタロ- β -ラクタマーゼ産生株を識別する事が可能である(図)。SMA disk 法により陽性になった株についてのみ、以下の PCR 解析を行うと、検査すべき株数を絞り込む事ができ、コストの削減が可能である。

ii) メタロ- β -ラクタマーゼ遺伝子の検出

これまでに緑膿菌から分離されているメタロ- β -ラクタマーゼとして IMP-1 や VIM-2 などがあり、PCR プライマーのセットの例を以下に示す。

IMP-1:	プライマーF : 5'-ACC GCA GCA GAG TCT TTG CC-3' プライマーR : 5'-ACA ACC AGT TTT GCC TTA CC-3'
IMP-2:	プライマーF : 5'-GTT TTA TGT GTA TGC TTC C-3' プライマーR : 5'-AGC CTG TTC CCA TGT AC-3'
VIM-2:	プライマーF : 5'-ATG TTC AAA CTT TTG AGT AAG-3' プライマーR : 5'-CTA CTC AAC GAC TGA GCG-3'

IMP-2 陽性株（レーン 5）の検出例



◆アミカシン耐性を付与する分子機構

アミカシン耐性には、プラスミド性のアミノグリコシドアセチル化酵素 (AAC(6')-Ib)などが関与しており、その遺伝子を検出する PCR プライマーセットの例を以下に示す。

<i>aac(6')-Ib</i>	プライマーF : 5'-TAT GAG TGG CTA AAT CGA-3' プライマーR : 5'-CCC GCT TTC TCG TAG CA-3'
-------------------	---

◆ニューキノロン耐性を付与する分子機構

ニューキノロン耐性には、DNA ジャイレースおよびトポイソメラーゼ IV の多重変異、および細菌の膜に存在する薬剤能動排出ポンプ (MexA-MexB-OprM など) の機能亢進が関与する。しかし、これらを PCR などにより簡便に検出する方法は確立されていない。

ただし、以下に示す PCR プライマーを用いてキノロンやニューキノロン（フルオロキノロン）の標的分子である DNA ジャイレース(GyrA)やトポイソメラーゼ IV(ParC)などの遺伝子のキノロン耐性決定領域（Quinolone Resistance Determining Region: QRDR）を増幅し、その PCR 産物をダイターミネーター法等でシーケンスし、変異箇所を検出し確認する事は可能である。

QRDR 領域増幅用の PCR プライマーセット

<i>gyrA</i>	プライマーF : 5'-AGT CCT ATC TCG ACT ACG CGA T-3' プライマーR : 5'-AGT CGA CGG TTT CCT TTT CCA G-3'
<i>gyrB</i>	プライマーF : 5'-TGC GGT GGA ACA GGA GAT GGG GCA AGT AC-3' プライマーR : 5'-CTG GCG GAA GAA GAA GGT CAA CAG CAG GGT-3'
<i>parC</i>	プライマーF : 5'-CGA GCA GGC CTA TCT GAA CTA T-3' プライマーR : 5'-GAA GGA CTT GGG ATC GTC CGG A-3'
<i>parE</i>	プライマーF : 5'-CGG CGT TCG TCT CGG GCG TGG TGA AGG A-3' プライマーR : 5'-TCG AGG GCG TAG TAG ATG TCC TTG CCG A-3'
注：増幅された DNA 断片をシーケンス解析し、QRDR 領域などの特定の箇所に変異がある事を確認する。	

（７）その他

薬剤耐性菌を分離した場合あるいは感染症を診断した際の届け出の留意点

a) 感染症法による届け出

感染症法では、特定の病原体による感染症を診断した場合、その医師に管轄の保健所に届け出を行う義務が生じ、それを怠ると罰則が科せられる事になる。しかし、病原体が薬剤耐性菌の場合は、患者由来の臨床材料からそれらが分離された際、かならずしも全例が「感染症」とは診断されるわけではなく、「保菌例」、「定着例」と判定される場合も多い。それらの場合は、感染症法に則り報告する義務は発生しない。ただし、未だ国内で稀であるため全数報告菌種に指定されている VRE については、現時点では、感染症の症状を呈していない患者の便や尿などからの分離で「保菌例」、「定着例」と判定される場合でも、届け出の努力が求められているという点で、他の３種類の薬剤耐性菌とは異なっている点に留意する必要がある。

その他、VRE の分離や院内感染の発生が疑われる事例に遭遇した場合は、以下の通知等を根拠にして、所管の地方自治体を通じて厚生労働省の担当部局に情報の提供を行うことが可能となっている。

b) 厚生労働省の「院内感染対策サーベイランス事業」に基づく随時報告

厚生労働省が平成１２年７月より開始した「院内感染対策サーベイランス事業」に、参加施設として登録されている施設は、「定着例」や「保菌例」であっても、「院内感染対策サーベイランス実施マニュアル」の７ページの 2-2-7 の「データの随時提出」を根拠として、厚生労働省医薬局安全対策課に直接、

報告して頂くことが可能。

c). 旧厚生省から発出された諸通知に依拠する報告

1) 旧厚生省健康政策局指導課長および保健医療局エイズ結核感染症課長の連名で平成9年4月23日に各都道府県衛生主管部（局）長宛に発出された（健医感発第51号通知）「バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)に対する院内感染防止対策について」を根拠に「バンコマイシン耐性腸球菌による院内感染症患者の発生が疑われる場合」には、所管の地方自治体に報告していただくことが可能。

2) 平成10年7月31日に旧厚生省医薬安全局安全対策課長名で各都道府県衛生主管部（局）長に発出された（医薬安発第83号通知）「バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）に対する院内感染防止対策の徹底について」を根拠に、「バンコマイシン耐性腸球菌による院内感染症患者の発生が疑われる場合」には、所管の地方自治体に報告をして頂くことが可能。

尚、院内感染症によると思われる感染患者の同時多発や死亡事例が発生した場合には、すみやかに保健所等行政に届け出て頂く必要があります。

（8）参考文献等

全 体

臨床検査 Yearbook 2000－話題の耐性菌とその検査法－臨床病理レビュー
特集 第111号、2000年1月発行、臨床病理刊行会発行、
克誠堂出版株式会社、東京、（雑誌 09362-01, T1109362014416）

PCR プライマー、増幅条件等参考文献

1. MRSA

Geha DJ, Uhl JR, Gustaferrero CA, Persing DH, Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory, J Clin Microbiol. 1994 Jul;32(7):1768-72.

[Song MD, Wachi M, Doi M, Ishino F, Matsushashi M. Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant Staphylococcus aureus by gene fusion. FEBS Lett. 1987 Aug 31;221\(1\):167-71.](#)

2. VRE

Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P, Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR, J Clin Microbiol. 1995 Jan;33(1):24-7.

Kanchana MV, Deneer H, Blondeau J, Cost-effective algorithm for detection and identification of vancomycin-resistant enterococci in surveillance cultures, Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000 May;19(5):366-9.

3. PRSP

Shibasaki Y, Ubukata K, Beta-lactam and macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*, Nippon Rinsho. 2001 Apr;59(4):681-6. Review. Japanese.

Nagai K, Shibasaki Y, Hasegawa K, Davies TA, Jacobs MR, Ubukata K, Appelbaum PC, Evaluation of PCR primers to screen for *Streptococcus pneumoniae* isolates and beta-lactam resistance, and to detect common macrolide resistance determinants, J Antimicrob Chemother. 2001 Dec;48(6):915-8.

4. 薬剤耐性緑膿菌

Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M, Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds, J Clin Microbiol. 2000 Jan;38(1):40-3.

Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, Shimokata K, Kato N, Ohta M, PCR detection of metallo- β -lactamase gene (*bla_{IMP}*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams, J Clin Microbiol. 1996 Dec;34(12):2909-13.

Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A, Sato K, Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance, Antimicrob Agents Chemother. 2001 Aug;45(8):2263-8.

（９）参考資料等

行政に届け出（報告）が必要な薬剤耐性菌による感染症

医療施設内で MRSA や VRE 等の特定の薬剤耐性菌による感染症あるいは院内感染症患者の発生が疑われる場合は、以下のごとく、感染症法あるいは、旧厚生省から発出された、局長、課長通知などにより、行政に届け出あるいは報告が求められている。

a. 感染症法に基づく届け出

感染症法の第４類感染症として、以下の薬剤耐性菌による感染症が指定されており、それらを診断した場合、全数あるいは定点施設の発生事例について、診断した医師は、保健所等の行政に一定期限内に届け出る事が義務付けられている。

1) 全数の届け出：

バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)

（ただし、VanA や VanB 型の VRE が便や尿から分離され「定着例」、
「保菌例」と判断される場合でも、当面、報告が求められている。）

2) 定点機関での届け出：

ii) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)

iii) ペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP & PISP)

iv) 薬剤耐性緑膿菌

b. 旧厚生省の局長、課長通知に基づく報告

VRE 等では保菌者の同時多発など、院内感染症患者の発生が疑われる場合は、旧厚生省の局長、課長通知（前述）により、自治体に報告が可能である。

c. 「院内感染対策サーベイランス事業」に基づく報告

厚生労働省の「院内感染対策サーベイランス事業」に参加している医療施設では、特異な耐性菌を分離した場合や院内感染事例を疑う事例を経験した場合は、そのマニュアルの 2-2-7 の「随時報告」規定に従い、随時、直接厚生労働省安全対策課に報告することが可能である。

感染症法および関連通知にもとづく届け出あるいは報告時の要点

MRSA (定点)	各施設で実施されている日常的な分離・同定検査と薬剤感受性試験結果をもとに、MRSA と判定された黄色ブドウ球菌による感染症と医師が診断した場合。
PRSP (定点)	各施設で実施されている日常的な分離・同定検査と薬剤感受性試験結果をもとに判定を行う。微量液体希釈法では、ペニシリンの MIC 値が、 $0.12 \mu\text{g/mL}$ 以上を示す PISP または PRSP 株による感染症と医師が判断した場合。ただし、disk 拡散法による場合は、オキサシリンの感受性 disk の周囲の発育阻止円が 19 mm 以下の場合は、PISP あるいは PRSP の可能性が高いが、その場合、微量液体希釈法による MIC 値の測定を行い、確認を行う必要がある。
VRE (全数)	<p>バンコマイシンの MIC 値が $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ 以上の VRE および、PCR 法などで VanA、VanB 型と確認された VRE 株では、血液、髄液など無菌的であるべき臨床材料から分離され、感染症と医師が判断した場合。</p> <p>ただし、VRE は国内で未だ稀な耐性菌であるため、院内感染対策上もその動向を保菌者数も含め正確に把握する必要がある。当面、便や尿等から分離された場合で「定着例」「保菌例」と判断される事例でも、診断した医師や各医療機関は、感染症法のみならず、旧厚生省の局長、課長通知（後述）に基づいて、各自治体に報告する事が求められている。</p> <p>しかし、VanC 型の VRE の場合は、血液、髄液などの無菌的であるべき臨床材料から菌が分離され、医師が感染症と診断した場合のみ届け出が求められている。</p>
薬剤耐性緑膿菌 (定点)	<p>「薬剤耐性緑膿菌」の判定に用いる抗菌薬の例として、イミペネム、アミカシン、シプロフロキサシンが挙げられている。しかし、これはこの3種の抗菌薬を特別に指定するものではなく、イミペネムを含むカルバペネム薬、アミカシン、トブラマイシンなどの抗緑膿菌用アミノ配糖体、および、シプロフロキサシン、レボフロキサシンなどのフルオロキノロン薬の3種の系統の抗菌薬に対し「全て耐性」と判定された緑膿菌による感染症が発生した場合は、届け出が必要である。</p> <p>しかし、薬剤耐性緑膿菌の保菌者が同時期に特定の病棟や病室で多発し院内感染症患者の発生が疑われるのみの場合は、感染症法による届け出義務は生じないが、旧厚生省の安全対策課の課長通知に基づいて都道府県、政令指定都市に報告する事が可能である。また、「院内感染対策サーベイランス事業」参加施設では、そのマニュアルの2-2-7に定める「随時報告」として、直接、厚生労働省安全対策課に届け出る事が可能である。</p>

医療機関が VRE 等を分離した場合の届け出（報告）の根拠

	血液や髄液等から菌が分離され、感染症と診断された場合	便や尿等から菌が分離され「定着例」「保菌例」と判断される場合でも、院内感染症患者の発生が疑われる場合
届け出（報告）の根拠	「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」（感染症法）	<p>1）感染症法（VanA, VanB 型 VRE）</p> <p>2）各種通知等</p> <p>a) 「バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)に対する院内感染防止対策について（健医感発第 5 1 号 平成 9 年 4 月 2 3 日）」</p> <p>b) 「バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）に対する院内感染防止対策の徹底について（医薬安発第 8 3 号 平成 1 0 年 7 月 3 1 日）」</p> <p>c) 「セラチアによる院内感染防止対策の徹底等について（医薬安第 8 8 号 平成 1 2 年 7 月 4 日）」</p> <p>d) 「セラチアによる院内感染防止対策の徹底等について（医薬安第 1 2 7 号 平成 1 2 年 1 0 月 2 7 日）」</p> <p>e) 「エンテロバクター菌による院内感染防止対策の徹底等について（医薬安第 1 2 9 号 平成 1 3 年 9 月 4 日）」</p> <p>f) 「セラチアによる院内感染防止対策の再徹底について（医薬安第 0 1 2 1 0 0 1 号 平成 1 4 年 1 月 2 1 日）」</p> <p>3）厚生労働省「院内感染対策サーベイランス事業」の「データの随時提出」</p> <p>厚生労働省「院内感染対策サーベイランス事業」に参加している医療施設は、「院内感染対策サーベイランス実施マニュアル」の 7 ページの 2-2-7「データの随時提出」に基づいて、直接、医薬局安全対策課に報告する事が可能</p>

VRE 等の保菌者、感染者や院内感染症患者の発生が疑われる場合に

医療施設がとるべき対応等： ただし（ ）内は、届け出の根拠となる法、通知等

VRE (感染症法（全数）、VRE に関する諸通知、 「データの随時提出」規定：ただし「院内感染対策サーベイランス事業」参加施設のみ)		
	MRSA、PRSP、薬剤耐性緑膿菌（感染症法：定点）	
	セラチア、エンテロバクター、 緑膿菌、アシネトバクター等の常在性細菌 (関連する諸通知、 「データの随時提出」規定：ただし「院内感染対策サ ーベイランス事業」参加施設のみ)	
保菌者が発見され、 院内感染症患者の発生が 疑われる場合	保菌者の同時多発や 院内感染症患者が 発生した場合	感染症患者の同時多発の 場合、あるいは 死者が出ている場合
保健所等への報告	保健所等へすみやかに届 け出る	保健所等へ直ちに届け出 る
感染の原因、感染経路の 特定と、感染原因の除去	感染の原因、感染経路の 特定と、感染原因の除去	感染の原因、感染経路の 早急な特定と、感染原因 の除去
保菌者の範囲を特定	感染症患者および保菌者 の範囲を特定	感染症患者および保菌者 の範囲を特定
菌の伝播（拡散）防止対 策の実施	菌の伝播（拡散）防止対 策の徹底	菌の伝播（拡散）防止対 策の徹底
保菌者およびその家族へ の状況説明	保菌者、感染症患者およ びその家族への状況説明	保菌者、感染症患者およ びその家族、入院患者等 への状況説明

ハンタウイルス肺症候群

(hantavirus pulmonary syndrome ;HPS)

ハンタウイルス肺症候群 (hantavirus pulmonary syndrom; HPS) 診断マニュアル

平成 14 年 2 月

目次

HPS の概説

HPS 検査に関する注意事項

検体の採取・輸送

病原学的検査

1. ウイルス分離法
2. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

血清学的検査

1. 間接蛍光抗体法

ハンタウイルス肺症候群 (HPS) の診断基準

引用文献

緊急時連絡先

HPS の概説

HPS は、ハンタウイルスによって引き起こされる肺機能障害を主徴とする人獣共通感染症である (1). 本ウイルスはハンタウイルス科のハンタウイルスに分類され、3 分節のネガティブ鎖 RNA をゲノムとして持つ (2). 1993 年、アメリカ合衆国の南西部諸州において呼吸器障害を主徴とする死亡率 50% を越す急性感染症の流行が発生した (3). 本症はハンタウイルス肺症候群 (HPS) と命名され、今日までにアメリカ大陸の各地で散発的な流行が報告されている. HPS の原因ウイルスとして、Sin Nombre virus (宿主 ; シカシロアシマウス, *Peromyscus maniculatus*), New York virus (シカネズミ, *Peromyscus leucopus*), Bayou virus (ライスラット, *Oryzomys palustris*), Black Creek Canal virus (アラゲコットンラット, *Sigmodon hispidus*), Andes virus (ヨルマウス, *Oligoryzomys longicaudatus*) 等数多く報告され、その宿主であるげっ歯類もウイルス種により様々である (表 1) (腎症候性出血熱 (HFRS) を引き起こす Hantaan および Puumala Group については別項を参照) (1). 感染げっ歯類は無症状に持続感染し糞便や唾液中にウイルスを排出する. 通常、人はウイルスを含む粉塵を吸い込むことによって経気道感染する. Andes virus では、1996 年のアルゼンチンでの流行において疫学的および遺伝子学的に人から人への水平感染が報告されている (4). しかし、他のウイルスでは現在のところ水平感染の報告はない. 日本には、HPS の原因ウイルスを保有するげっ歯類は生息しないため HPS の発生は報告されていないが、近年の流行地への海外旅行者の増加に伴い、輸入感染症として監視を強化する必要がある. HPS の診断に有効な臨床症状は、①38.3℃以上の発熱、②呼吸障害、③入院後 1 週間以内の肺内浸出液の貯留や④流行地への渡航歴の有無などである (1, 5). HPS の発症時、ウイルスに対する抗体価が既に上昇しているため、確定診断はウイルスに対する抗体の検出により行う. また、発症時には通常抗体反応が見られるため、ウイルス分離や Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) によるウイルス遺伝子の検出は難しいが、実験室診断として補助的に行うこともある. 治療は対症療法である. 予防法としてはネズミの駆除や環境の衛生的整備が重要である.

HPS 検査に関する注意事項

HPS の日本における発生は報告は無いため、HPS の有効な検査法は確立されていない。しかし、これまで HPS を起こすハンタウイルスの遺伝子解析が文献的に報告されており、国立感染症研究所においてもウイルス分離と逆転写反応ーポリメラーゼ鎖反応法 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT ; RT-PCR) によるウイルス遺伝子の検出は可能である。本ウイルス学的検査は「国立感染症研究所病原体等安全管理規定」に基づいて行われる。

検体の採取・輸送

1. 検体：HPS の原因ウイルスであるハンタウイルス感染症の実験室診断のための検体には、血清および剖検例での各種臓器が利用できる。ハンタウイルスの病原学的検査には、RT-PCR によるゲノムの検出を行う。これらの検査には患者血清を採取し検査に供する。HPS が疑われた患者から採取された血液は、採取翌日までに当研究室に届けることが可能であれば、血清分離することなく冷蔵のまま当研究室に輸送しても構わない。しかし、可能であれば、血清分離を行った上でドライアイス詰めにして当研究室に輸送されることが望ましい。輸送の際は、検体が包装外部に漏れないよう厳重に処置を施す。血清の保存が必要な場合は、 -80°C で保存する。血清学的な確定診断には、急性期と回復期（発症 2 週間以降）に採取されたペア血清の抗体検査を同時に行う必要がある。剖検例では、肺、腎臓組織等がウイルス分離、ゲノムの検出に用いられる。
2. 検体の輸送：当研究室に検査を依頼する場合には、郵政省告示第 618 号（平成 9 年 12 月 4 日）に基づき、検体が外部に漏れないように包装のうえ、感染性物質であることを明示して輸送する。当研究室に持参する場合は、国立感染症研究所の「感染性材料（病原体等及び診断用のヒトあるいは動物の検体）の輸送に関するマニュアル（持参の場合）」（問い合わせ先：国立感染症研究所 業務課 TEL: 03-5285-1111）に従う。
3. 検体の情報：検体を当研究室に送付するときには、以下の情報を検体とともに、または前もって連絡する。

氏名、年齢、性別、国籍、職業、臨床症状、検体の採取された日時およ

び発症からの日数，海外渡航歴，その他

病原学的検査

1. ウイルス分離法：

Vero E6 細胞を用いてウイルス分離検査を行う．

A) 試薬・機材

- ① Vero E6 細胞
- ② CO₂ 培養器(37℃)
- ③ D-MEM（ダルベッコ変法 MEM 培地）
- ④ ウシ胎児血清(FBS, 56℃30 分非働化済のもの)
- ⑤ リン酸緩衝液（PBS）
- ⑥ 組織培養用フラスコ(25 cm², できればベンチレーションキャップ付)
- ⑦ 組織培養用ペニシリン・ストレプトマイシン(Gibco-BRL 社)
- ⑧ 遠心管
- ⑨ 遠心機

B) 検査方法

- ① Vero E6 細胞の単層を， PBS で洗浄する．
- ② 無菌的に採取された血清を 2%ウシ胎児血清含有 D-MEM（維持培地）で 10 倍希釈し，細胞に接種する．雑菌の混入が考えられる検体の場合は，通常使用量の 5 倍のペニシリン・ストレプトマイシンを加え，3,000 回転で 20 分間遠心した上清を用いる．
- ③ 37℃1 時間吸着させる．
- ④ 被験液を取り除き，維持培地を用いて細胞を培養する．
- ⑤ 一部の細胞を 1～2 週間，盲目継代（blind passage）する．また，残りの細胞は，逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応用に供する．

2. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）

ウイルスゲノムの検出のための RT-PCR には One-step PCR 法を採用している。HPS を引き起こす Sin Nombre Group に属するウイルスを検出するための RT-PCR 法は幾つか報告されている (6, 7)。本項では Arthur らのハンタウイルス共通の次のプライマーセットを用いる方法 (8) (本法で使用するプライマーは HFRS 用に設計されたが HPS に対しても使用できるものと考えられる) と Levis らによる Nested RT-PCR 法 (6) について説明する。国立感染症研究所においては Arthur らの方法のプライマーを整備している。しかし、遺伝子配列の多型性から全ての HPS 原因ウイルスを検出できるプライマーは現時点では無い。

A) 試薬・機材

- ① High Pure™ Viral RNA Kit (Roche Diagnostics)
- ② マイクロ遠心機
- ③ Titan™ One Tube RT-PCR System (Roche Diagnostics) または Ready-to-Go RT-PCR (Pharmacia Biochemica)
- ④ DEPC 処理済純水 (ニッポンジーン)
- ⑤ サーマルサイクラー
- ⑥ サーマルサイクラー用マイクロチューブ
- ⑦ 核酸電気泳動用 2% アガロースゲル
- ⑧ DNA 分子量マーカー (100bp ラダーもしくは 200-600 塩基の間を同定できるもの)
- ⑨ アガロースゲル電気泳動槽

以下のものは検体が組織の場合に必要なものとなる。

- ⑩ RNA Bee™ (TEL-TEST, コスモバイオ社取扱)
- ⑪ ホモジナイザー (1.5ml のプラスチックチューブとそれにあったプラスチック製ディスポーザブルペステルが市販されている)
- ⑫ クロロフォルム
- ⑬ 2-プロパノール
- ⑭ 70% エタノール

3. 検査方法

- ① 血清からウイルス RNA を High Pure™ Viral RNA Kit を用いて抽出する。

血清 200 μ l から 50 μ l の精製 RNA 液を得ることができる。検体が組織の場合、RNA を RNA Bee™ にて抽出する。方法はキットの取り扱い説明書を参照のこと。必ず正常血清等の陰性コントロールを置く。

- ② (Arthur らの方法) Ready-to-Go RT-PCR (Pharmacia Biochemica)を用いる場合、下に示すプライマー（ウイルスの核蛋白質に対するプライマー）をそれぞれ 50 pmole/tube, 精製 RNA 5 μ l を加え、さらに DEPC 処理済純水を最終量が 50 μ l となるように加える。

GS4 5'-GAIIGITGTCCACCAACATG-3'

GS6 5'-AGCTCIGGATCCATITCATC-3'

RT-PCR を以下の条件で実施する。

42°C	30 分		
94°C	5 分		
94°C	30 秒	}	35 サイクル
50°C	30 秒		
72°C	60 秒		

(Levis らの方法) Ready-to-Go RT-PCR (Pharmacia Biochemica)を用いる場合、下に示すプライマー（ウイルスの膜蛋白質 G2 に対するプライマー）をそれぞれ 50 pmole/tube, 精製 RNA 5 μ l を加え、さらに DEPC 処理済純水を最終量が 50 μ l となるように加える。

+2765 5'-CTGTATGTGAGTACCAAG-3'

-3348 5'-CTGTCCAGATTTAGTGTTC-3'

1st RT-PCR を以下の条件で実施する。

41°C	60 分		
94°C	40 秒	}	40 サイクル
38°C	45 秒		
72°C	60 秒		

次に 3 μ l の 1st RT-PCR 産物を鋳型として用い、以下のプライマーをそれぞれ 50 pmole/tube を加え、さらに DEPC 処理済純水を最終量が 50 μ l となるように加える。

+2781 5'-AGGTAACACTATATCTGG-3'

-3221 5'-TCAGAAGAGCAGTCAGTGTCATG-3'

2-nd PCR を以下の条件で実施する。

94℃	40 秒	}	35 サイクル
43℃	45 秒		
72℃	60 秒		

(注) Levis らの方法により HPS を起こす ハンタウイルスの遺伝子の増幅をコンピュータ上 (Amplify v1.2, B.E.) でシミュレートした結果, Sin Nombre, Andes, New York virus 等のウイルス種では効率良く増幅するが, Bayou や Black Creek Canal virus 等では効率が低かった. 従って, 検査上一次スクリーニングとして全ての HPS を起こすハンタウイルス遺伝子を増幅するプライマーを検討する必要がある.

- ③ RT-PCR 産物をアガロースゲル(1.5-2.0%)電気泳動して, エチジウムブロマイド染色により増幅された DNA 産物 (283-base pair (Arther らの方法), 441-base pair (Levis らの方法)) を確認する.

血清学的検査

1. 間接蛍光抗体法:

HPS の原因ウイルスである Sin Nombre Group のハンタウイルス (表 1) は現在入手できない状況にある. そこで Sin Nombre Group のウイルスと交叉性の高い Puumala virus (PUUV) (HFRS の原因ウイルスの 1 つ) (表 1) 感染 Vero E6 細胞を用いた間接蛍光抗体法が HPS 患者の血清学的診断に有用であると考えられる. 急性期と回復期 (発症 2 週目以降) のペア血清を同時に検査することが望ましい. また, 被験血清を非働化 (56℃, 30 分) 処理してから検査に供する.

A) 試薬・機材

- ① Vero E6 および PUUV 感染 Vero E6 細胞
- ② D-MEM
- ③ リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)
- ④ 細胞消化用トリプシン・EDTA 液 (0.25%トリプシン-0.02%EDTA 加 PBS)
- ⑤ 蛍光抗体検査用スライドグラス (14 ウエル, Air Brown 社)
- ⑥ FITC 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体 (Zymed 社)

- ⑦ 10%グリセリン加 PBS
- ⑧ カバーガラス
- ⑨ 蛍光顕微鏡

B) 検査方法

- ① 細胞を PBS で洗浄し，トリプシン処理により細胞を回収する．更に細胞を PBS で洗浄後 PUUV 感染細胞と非感染細胞を 1:1 の割合で混ぜ， 3×10^6 cells/ml となるように PBS に浮遊する．
- ② 蛍光抗体検査用スライドガラスの各ウエルに細胞浮遊液を $10\mu\text{l}$ ずつ分配し，完全に乾燥させる．乾燥したら 100%アセトン中で 5 分間固定する．ここまでの過程は，BSL3 実験室の安全キャビネット内で行う．アセトンを蒸発させた後 -80°C に保管することができる．
- ③ PBS で 20 倍から 2 倍段階希釈した非働化（ 56°C ，30 分間）被験血清を各ウエルにのせ， 37°C ，1 時間反応させる．被験血清と同時に抗体陽性コントロール血清を同時に検査する．
- ④ PBS でスライドガラスを洗浄し，PBS で 70 倍希釈された FITC 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体を各ウエルにのせ， 37°C 1 時間反応させる．
- ⑤ PBS でスライドガラスを洗浄後，10%グリセリン加 PBS を用いて封入する．
- ⑥ 蛍光顕微鏡で FITC シグナルを検鏡する．特徴的な染色パターンが認められれば抗体陽性と判定し，抗体陽性を示した最高希釈倍率の逆数を蛍光抗体法によるハンタウイルス抗体価とする．

ハンタウイルス肺症候群 (HPS) の診断基準

次のいずれかが満たされた場合，「ハンタウイルス肺症候群 (HPS)」とする．

- 間接蛍光抗体法で判定された急性期と回復期に採取されたペア血清のハンタウイルスに対する抗体価が有意（4 倍以上）に上昇した．
- 被験検体から Sin Nombre Group のハンタウイルスが分離された．
- 被験検体から RT-PCR 法でハンタウイルスゲノムが検出された．

引用文献

1. Kruger, D. H., Ulrich, R., and Lundkvist, A. Hantavirus infection and their prevention. *Microbes and Infection*, 3: 1129–1144, 2001.
2. Schmaljohn, C.S., and Hooper, J.W. Bunyavirus: The viruses and their replication. *In Fields Virology*, pp1581–1602, 2001.
3. Nichol, S.T., Spiropoulou, C.F., Morzunov, S., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Feldmann, F., Sanchez, A., Zaki, S. Genetic Identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 262: 914–917, 1993.
4. Padula, P.J., Edelstein, A., Miguel, S.D., Lopez, N.M., Rossi, C.M., and Rabinovich, R.D. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak In Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology* 241: 323–330.
5. 菊和宏明, 水谷哲也, 高島郁夫. 腎症候性出血熱. *最新医学* 54: 1425–1431, 1999.
6. Levis, S., Morzunov, S.P., Rowe, J.E., Enria, D., Pini, N., Calderon, G., Sabattini, M., and St. Jeor, S.C. Genetic diversity and epidemiology of Hantaviruses in Argentina. *J. Inf. Dis.* 177: 529–538.
7. Nichol, S.T., Spiropoulou, C.F., Morzunov, S., Rollin, P.I., Ksiazek, T.G., Sanchez, A., Childs, J., Zaki, S., and Peters, C.J. Genetic identification of a Hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 262: 914–917.
8. Arthur, R.R., Lofts, R.S., Gomez, J., Glass, G.W., and Childs, J.E. Grouping of Hantaviruses by small (S) genome segment polymerase chain reaction and amplification of viral RNA from wild-caught rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47: 210–224, 1992.

緊急時連絡先

国立感染症研究所ウイルス第 1 部

部長 倉根一郎

TEL: 03-5285-1111 / (home) 03-3221-1733

FAX: 03-5285-1169

e-mail: kurane@nih.go.jp

国立感染症研究所村山分室ウイルス第 1 部外来性ウイルス室

室長 森川 茂

TEL: 042-561-0771 (内線 791) / (home) 042-378-2864

FAX: 042-564-4881

e-mail: morikawa@nih.go.jp

表 1 . ヒトに病原性を有するハンタウイルスとその宿主げっ歯類

ウイルス		宿主		地理的分布	病気
Groups	Virus	Genus	Species		
Hantaan	Hantaan virus	<i>Apodemus</i>	<i>agrarius</i> (セスジネズミ)	Asia	HFRS
	Dobrava virus		<i>agrarius</i> (セスジアカネズミ)	Europe	HFRS
			<i>flavicollis</i> (キクビアカネズミ)	Europe	HFRS
	Seoul virus	<i>Rattus</i>	<i>rattus</i> (クマネズミ)	Asia	HFRS
			<i>norvegicus</i> (ドブネズミ)	Asia	HFRS
Puumala	Puumala virus	<i>Clethrionomys</i>	<i>glareolus</i> (ヤチネズミ)	Europe, Asia	HFRS
Sin Nombre	Sin Nombre virus	<i>Peromyscus</i>	<i>maniculatus</i> (シカシロアシマウス)	North America	HPS
	New York Virus		<i>leucopus</i> (シカネズミ)	North America	HPS
	Bayou virus	<i>Oryzomys</i>	<i>palustris</i> (ライ斯拉ット)	North America	HPS
	Black Creek Canal Virus		<i>hispidus</i> (アラゲコットンラット)	North America	HPS
		Andes virus	<i>Oligoryzomys</i>	<i>longicaudatus</i> (ヨルマウス)	South America

Bウイルス

B ウイルス検査マニュアル

目 次

I. B ウイルス感染症の概説

II. B ウイルス検査に関する一般的な注意事項

- 1) 検査材料の採取 2) 検査材料の輸送 3) 検査の進め方 4) 検査の判定

III. 検査方法

1) ウイルス分離

2) ウイルスゲノムの検出

3) 病理学的検査

4) 血清学的検査

5) 感染源動物の検査

(1) ウイルス分離

(2) ウイルス遺伝子の検出

(3) 血清学的検査

IV. 診断基準

V. 参考文献

VI. 検査依頼先

VII. 執筆者一覧

I. Bウイルス感染症の概説

Bウイルス感染症の病原体であるBウイルスはヘルペスウイルス科 α ヘルペスウイルス亜科に分類される（表1）。分類学上の正式ウイルス名は *Cercopithecine herpesvirus 1* (CHV-1) であるが、Bウイルス、ヘルペスBウイルス、*Herpesvirus simiae* などと呼ばれる。ウイルスゲノムは2重鎖線状DNAからなる。ウイルス粒子は直径200 nmでエンベロープを有している。ウイルス学的に類似のウイルスを表1に示したが、とくにHSV-1ならびにHSV-2に類似している。

表1 Bウイルスの分類学的位置

- ヘルペスウイルス科 アルファヘルペスウイルス亜科
 - 単純ヘルペスウイルス1型 HSV-1
 - 単純ヘルペスウイルス2型 HSV-2
 - 水痘帯状疱疹ウイルスVZV
 - SA8
 - Bウイルス CHV-1**
 - Herpesvirus papio 2*
 - Spider monkey herpesvirus*
 - Marmoset herpesvirus*

Bウイルスは、ニホンサル、アカゲザル、カニクイザル、ブタオザルなどのマカク属サルを自然宿主とし、サルあるいはサルの排泄物（唾液、その他）との接触により人体に感染する。具体的には咬傷、擦過、あるいは唾液・便等の排泄物、感染サル組織材料により感染する。自然宿主たるマカク属サル感染では重症となりにくく、急性感染後、潜伏性に感染し、ときにウイルスを排出している。本ウイルスによるヒトの感染は非常にまれでこれまで米国において30例程度の報告がされているのみであり、本邦での報告はなく、確定診断法も十分に開発されていないのが現実である。しかしながらヒトでの感染例では中枢神経系への感染が生じやすく、上行性脊髄炎、脳炎を発症し、致死的転帰をきたしやすい。原因不明の脳炎患者では常に本症を考慮し、また、マカク属サルとの接触歴についても検索する必要がある。

本感染症における診断において考慮すべきことは

- 1) 本ウイルスがヒト単純ヘルペスウイルス *herpes simplex virus* (HSV) 1型、2型と抗原性が非常に類似していること。
- 2) HSV-1あるいはHSV-2に感染しているヒトが多く、ヒトの診断では血清抗体による鑑別が困難であること。なお、確実な血清学的識別方法は開発段階にある。
- 3) 本ウイルス感染は感染サルまたはサル由来の組織・分泌物・汚物を介しなければ感染が生じないこと。

以上のことから本ウイルスのヒトへの感染は感染源となるサルまたはその組織等に接触がある場合に限られ、診断をする場合の重要な情報となる。

Ⅱ. Bウイルス検査に関する一般的な注意事項

国立感染症研究所においては「Bウイルス（ヘルペスBウイルス）取り扱い（Bウイルス（ヘルペスBウイルス）感染を疑うサル及び患者検体からのウイルス分離）に関するマニュアル」を平成11年4月に作成し、これを遵守して取り扱っている。本マニュアルには、診断のための少量培養にはP3実験施設でBSL3の取り扱い基準に従い実施すると規定されている。少量培養とは、具体的に1検体につき培養面積25□の培養容器2個に相当する量以内である。また、実験動物を用いてのウイルス分離は原則として行わない。

1) 検査材料の採取

- A) 患部水疱液及び生検可能な組織は、直ちに検査できない場合は-70℃以下で凍結に保存する。これらの材料はウイルス分離またはウイルスゲノム検出の材料となる。病理組織学的検査にはホルマリン固定する。
- B) 血液は血清を分離して抗体検出に用いる。

2) 検査材料の輸送

他の検査室へ輸送が必要な場合は、デングウイルス感染症診断マニュアル（平成12年）第3項に準じて送付する。

3) 検査の進め方

ヒトにおける感染の可能性が発生した場合の実験室診断は以下の試験の実施を行う。A) 患部からのウイルス分離またはウイルスゲノム断片の検出 B) 被験患者血清のBウイルス抗体の検出 C) 接触したあるいは感染源と推定されるサルの特定の検査(血清抗体の検出、口腔ぬぐい液等からのウイルス分離またはウイルスゲノム検出)

4) 検査の判定

実験室検査の結果およびサルとの接触歴、並びにヒトヘルペスウイルス感染の既往等を考慮して総合的に判定する。

Ⅲ. 検査方法

患者材料からのウイルスまたはウイルスゲノムの検出、血清抗体の検出ならびに感染源動物の検査が行われる。

1) ウイルス分離

検査手順

- 検体の処理

患部水疱液やぬぐい液をウシ胎仔非動化血清 (FCS) 20%を含む培地 (Eagle' s modified essential medium) と混合した後、検査試料の雑菌を除くため 3000rpm、20 分間遠心し、その上清を接種材料とする。生検材料については同培地で 10% 乳剤としてその遠心上清を細胞に接種する。採取後直ちに検査を行う場合は 4° C に、行えない場合は -70° C に保存する。

- 対数増殖期にある Vero 細胞を 25 cm² フラスコを準備する。
- 処理検体を接種する。
- 37° C、1 時間炭酸ガス培養器内に保温し、吸着する。
- 細胞維持用培養液を加え、培養器内で培養する。
- 倒立顕微鏡下で毎日細胞変性を観察する。
- 細胞変性が観察された場合は、同定試験を行う。

同定試験は細胞変性の出現した Vero 細胞から DNA を抽出し、これを鋳型として、PCR 法によりウイルスゲノムを増幅し、塩基配列を決定する。詳細は後述のウイルスゲノムの検出による。

< 必要な試薬、器具、機材 (指定品目または同等品を使用) >

- 炭酸ガス培養器 (5% CO₂、37° C)
- ウシ胎仔血清 (FCS) (56° C、30 分間非働化したもの)
- 細胞増殖用培養液 (5% FCS 加 EMEM)
- 細胞維持用培養液 (2% FCS、100 IU / ml アンピシリン 100 μ g / ml ストレプトマイシン、2.5 μ g / ml ファンギゾン加 EMEM)
- 細胞培養用フラスコ
- PBS (-)
- 0.05% トリプシン-0.53m MEDTA 液
- ピペット類
- 倒立顕微鏡

2) ウイルスゲノムの検出(PCR 法)

患部水疱液、生検材料等から DNA を調整し、PCR 法にて B ウイルス DNA 断片を増幅し、塩基配列により確認する。

<必要な試薬、器具、機材（指定品目または同等品を使用）>

- 0.5M EDTA (pH 8.0)
- Proteinase K
- SDS
- フェノール
- クロロフォルム
- エタノール
- 滅菌蒸留水
- ヘルペスウイルス検出用プライマー

《Black & Eberle 1997、参考文献 3》

First PCR

B3(F) 5' -TTCACCGTGGCTGGGACTGG-3'

B4(R) 5' -GYGRTTCTGSAGCTCGCACCA-3'

増幅バンドサイズ
555bp

Second PCR

B9(F) 5' -AGTACGGCSSCTCSTTCCGTTTCTCC-3'

B10(R) 5' -GAGGASGTGGTCTTGATGCGCTCCACG-3'

増幅バンドサイズ
364bp

《Hirano et al. 2000、参考文献 4》

gGA4 5' -CCGCGTACGACTACGAGATCC-3'

gGAS4 5' -GTTCGCGGCCACGATCCA-3'

増幅バンドサイズ
209bp

- PCR キット (TaKaRa La Taq with GC buffer #RR02AG)
- エチジウムブロマイドまたはサイバーゴールド等の染色剤
- アガロース (1.5 %, TAE 緩衝液)
- 電気泳動装置
- UV トランスイルミネーター
- 撮影装置
- その他ピペット、チューブ類

試料調整 (DNA 抽出法)

検体 50 μ l に 0.5M EDTA (pH 8.0) を加えて、終濃度 20 mM にした後、Proteinase K (終濃度 1 mg/ml), SDS (終濃度 0.5%) をそれぞれ加えて、65°C 15 分間、さらに 37°C で 1 昼夜保温する。その後、常法に従い、フェノール、クロロフォルム抽出、エタノール沈澱を行い、70%エタノールで DNA を 2 回洗浄・乾燥後、10 μ l の純水で溶解する。

PCR の反応手順

TaKaRa LA Taq with GC Buffer (宝酒造) を用いて下記の組成で PCR 反応を行う。

First PCR

2 to 4	μl	検体DNA
25	μl	2 x GC buffer I
8	μl	dNTP mixture (2.5 mM each)
1	μl	B3(F) primer (20 pmol/ μl)
1	μl	B4(R) primer (20 pmol/ μl)
0.5	μl	LA Taq (5 units/ μl)

滅菌蒸留水で 50 μl にする。

95°C, 5 min	
95°C, 30 sec	30 cycles
55°C, 30 sec	
72°C, 60 sec	
72°C, 5 min	
4°Cに冷却	

Second PCR

5	μl	First PCR 液
25	μl	2x GC buffer I
8	μl	dNTP mixture (2.5mM each)
1	μl	B9(F) primer (20 pmol/ μl)
1	μl	B10(R) primer (20pmol/ μl)
0.5	μl	LA Taq (5 units/ μl)

滅菌蒸留水で 50 μl にし、上記サイクルで反応させる。

反応液の 5 から 10 μl を 1.5%アガロースゲルで電気泳動し、染色後バンドを確認する。

[濃度の明らかなBウイルス遺伝子を含むプラスミドを陽性対照とし検出限界を確認する。また、被験DNAを含まない陰性対照を必ず同時に実施する。特に Second PCR を実施する際はコンタミネーションに注意が必要である。B3-B4, B9-B10 のプライマーセットではHSV-1, -2 も検出される。gGA4 と gGAS4 を用いる場合は 40 サイクル 1 回でBウイルス特異的に検出される。]

3) 病理学的検査

患部の生検組織、患者が不幸にして死亡した場合剖検組織が解析の対象となる。生検・剖検組織は中性緩衝ホルマリンで確実に固定することにより感染性は喪失する。固定の後に通常の方法でパラフィンに包埋する。採取された組織材料は採材直後に中性緩衝ホルマリンで固定を行い速やかに検査室に輸送する。なお、40%ホルムアルデヒド（ホルマリン）を水道水で10倍に希釈した溶液は、抗原性が著しく低下するので使用してはならない。

免疫組織学的にBウイルスを検出できる抗体は現在、国内で入手できないので、抗HSV抗体を使用して除外診断として解析することになる。しかし、この解釈は現在確定していない。従って、平成14年3月の時点では標本作製、通常の染色標本での光顕的解析の段階までが可能である。HSV感染では核内封入体の形成が特徴的であるが、Bウイルスでは形成されないとする報告もあり、その病理像についても検討の余地が残されている。いずれ、Bウイルス特異的抗体が入手できることが予想されており、貴重な検体を保存することが望まれる。

<必要な試薬、器具、機材（指定品目または同等品を使用）>

- * 蒸留水
- * 封入材
- * 染色液：ヘマトキシリン、エオシン
- * 染色バット
- * 染色籠
- * 特級エタノール
- * 特級メタノール
- * 特級キシロール
- * ピンセット
- * スライドグラス
- * カバーグラス
- * 光学顕微鏡

[リリーの緩衝ホルマリンの組成]

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 44 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 163.8 g

特級ホルマリン 1 l

蒸留水 全量 10 l となるように蒸留水を加える

4) 血清学的検査

人体例において、HSV-1 ならびに HSV-2 抗体陽性者では、血清中の抗 HSV 抗体と B ウイルス特異的抗体を区別する方法は現段階では困難であり、本邦での実施はなされていない。

5) 感染源動物の検査

(1) ウイルス分離

被験患者に接触があったサルの口腔内ぬぐい液、泌尿生殖器ぬぐい液等が検査の対象となる。検査の方法は前述と同様に行う。

(2) ウイルスゲノムの検出

被験患者に接触があったサルの口腔内ぬぐい液、泌尿生殖器ぬぐい液等が検査の対象となる。検査の方法は前述と同様に行う。

(3) 血清学的検査

サルにおける血清抗体の検出においては、HSV-1 や HSV-2 が感染している可能性は低く鑑別の必要性はないと考えられている。使用する抗原として、B ウイルスの大容量培養は BSL4 施設で行わなければならないことから、診断用抗原としては B ウイルスに抗原性が極めて類似した SA8 (Cercopithecine herpesvirus 2) や Herpes papio 2 感染細胞抽出抗原、あるいは抗原性の高いとされる B ウイルス gB や gD 蛋白の組換え発現蛋白を利用する。ここでは、組換え発現 gB, gD 蛋白を用いたドットブロット法《Tanabayashi et al. 2001》を記載する。

ドットブロット法による抗体検出法

<必要な試薬、器具、機材（指定品目または同等品を使用）>

- ・ B ウイルス gB 及び gD 抗原：pBgB713 および pBgDdTM プラスミドを LipofectAmin-Plus 試薬(Gibco)を用いて COS7 細胞にトランスフェクト後、無血清培地(Opti-MEM)で2日間培養して、その培養液の遠心上清を用いる。
- ・ 陰性対照抗原は発現ベクタープラスミドを同様に細胞にトランスフェクトした培養上清を用いる。
- ・ PVDF 膜:Immun-Blot PVDF Membrane (Bio-Rad, #162-0174)をメタノールに1分間、水に5分間浸漬して、余剰の水分を軽く拭取り使用する。抗原液のスポット中乾燥しないようにする。
- ・ ブロッキング液：洗浄液とブロックエース（第一化学）を等量混和
- ・ 洗浄液：0.1%Tween20 加 PBS
- ・ 検体希釈液：洗浄液に10% (v/v) ブロックエースを混和
- ・ 2次抗体：Peroxidase-conjugated goat IgG fraction to Monkey IgG (Cappel #55432)を検体希釈液で1000倍希釈する。
- ・ 発色試薬：HRP Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad, #170-6431)をキット付属マニュアルに従って調製する。
- ・ 振盪器
- ・ ピペット、チューブ類

反応手順

- ・ B ウイルス gB 及び gD 抗原 5 μ l 及び陰性対照抗原を活性化 PVDF 膜にスポットし (1 平方センチメートル内に 3 カ所) 風乾、吸着させる。
- ・ ブロッキング液に室温一昼夜つける。
- ・ 洗浄液で 3 回洗浄
- ・ 抗原膜を 1 平方センチメートルに細断し、24 穴プレートに入れる。
- ・ 血清希釈液 200 μ l に被験血清 10 μ l を加え 20 倍に希釈する。
- ・ 室温で 90 分反応させる。
- ・ 洗浄 (0.75ml、2 分間 2 回、15 分間 1 回、5 分間 1 回)
- ・ 2 次抗体 300 μ l を加えて、室温 60 分間反応させる。
- ・ 洗浄 (同上)
- ・ 発色試薬 500 μ l を加え、室温 30 分間反応させる。
- ・ 吸引除去後、水で 5 分間、2 回洗浄し反応を停止する。
- ・ 膜を風乾して陰性対照抗原のスポットとの濃度の差を確認する。
- ・ 退色する前にスキャナーで画像データを保存する。

IV. 診断基準

本邦において、人体例の B ウイルス感染の確定例は報告されていないため、その判定は慎重に行う。

最も確実なのは患者材料からの B ウイルスの分離である。感染を疑った場合、少量培養系でのウイルス分離を P3 施設を有する検査機関に依頼する。

傍証として、

1. 患者のマカク属サルとの接触歴、
2. サルが抗 B ウイルス抗体陽性であれば、ほぼ確定的となる。

ウイルス分離を行うことができない場合、PCR によるウイルスゲノム検出結果を参考とする。ただし、必ず、偽陽性 (コンタミネーション) の可能性を否定しなければならない。

剖検における組織学的解析は確立していないが、今後の進展により開発されることが予想されるので、ヒトの中枢神経組織ならびに咬傷部位をホルマリン固定したパラフィン組織の採取、保存が望まれる。

V. 参考文献

1. 吉川泰弘, 1999, B ウイルス感染症、エマージングディゼイズ (竹田、五十嵐、小島編) 265-270、近代出版
2. 岩崎琢也、向井鐸三郎、倉田毅 : B ウイルス。小児科臨床 51: 2555-2559, 1998
3. Black, D., and R. Eberle. 1997. Detection and differentiation of primate α -herpes-viruses by PCR. J. Vet. Diagn. Invest. 9:225-231.
4. Hirano, M., S. Nakamura, M. Okada, M. Ueda, and R. Mukai. 2000. Rapid discrimination of monkey B virus from human herpes simplex viruses by PCR in the presence of betamine. J. Clin. Microbiol. 38: 1255-1257.

5. Tanabayashi, K., R. Mukai, and A. Yamada. 2001. Detection of B virus antibody in monkey sera using glycoprotein D expressed in mammalian cells. J. Clin. Microbiol., 39, 3025-3030.
6. Holmes GP, Chapman LE, Stewart JA, et al: Guideline for the prevention and treatment of B-virus infections in exposed person. Clin Infect Dis 20: 421-439, 1995
7. CDC, NIH: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 3rd ed US. Government Printing Office, Washington. 1993 (邦訳: 倉田毅訳: CDC・NIH: 微生物学・医学実験室のバイオセーフティ、医学書院、東京。pp94-95, 1996)

VI. 連絡先

患者検体に関して

国立感染症研究所 感染病理部 (佐多徹太郎)
あるいはウイルス1部 (倉根一郎)
〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1
電話:03-5285-1111 ファックス:03-5285-1150

サル類の検体に関して

国立感染症研究所 獣医科学部 (棚林 清)
〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1
電話:03-5285-1111 ファックス:03-5285-1179

VII. 執筆者一覧

棚林 清: 国立感染症研究所獣医科学部
岩崎琢也: 国立感染症研究所感染病理部(現 長崎大学熱帯医学研究所)

ブルセラ症

ブルセラ症検査マニュアル

目 次

I. ブルセラ症の概説

病原体・疫学・感染源・症状・治療・予防

II. ブルセラ属菌検査に関する一般的な注意事項

1. 作業上の一般的注意
2. 検査上の一般的注意

III. 検体の採取・輸送・保管および滅菌

1. 検査材料の採取・輸送
2. 検査材料および病原体の保存
3. 消毒・滅菌法

IV. 病原体の検出

1. 細菌学的検査
2. 遺伝子の検出

V. 抗体の測定

1. 試験管内凝集反応（血清反応）

VI. 参考文献

VII. 検査依頼先

VIII. 執筆者一覧

I．ブルセラ症の概説

わが国ではヒト、動物のブルセラ症とも最近ではほとんど発生していない。しかし食料や社会・経済面での動物への依存度が強い国や地域ではいまだに多くの患者が発生していて、公衆衛生面のみならず経済的にも重要な感染症の一つである。

病原体：ヒトへの感染が報告されているものとしては、*B. melitensis*（自然宿主：ヤギ、ヒツジ）、*B. abortus*（ウシ）、*B. suis*（ブタ）、*B. canis*（イヌ）、*B. maris*（アザラシ）の5菌種があり、ほかに *B. ovis*（ヒツジ）、*B. neotomae*（齧歯類）がある。公衆衛生的には *B. melitensis* 感染が、家畜衛生的には *B. abortus* によるウシの感染が最も重要である。

疫学：本症のおもな分布域は地中海地域、西アジア、中東、およびアフリカとラテンアメリカの一部等で、これらの地域では患者数は増加傾向にあるとされる。流行地で報告される発生数には大きな幅があるが、動物に対するブルセラ症対策が行われていない地域での報告が多い。動物間でブルセラが流行している地域で人の感染率が低く報告されている場合にはサーベイランスや報告システムの不備である可能性を疑う。なお、多くの国では本症は届出感染症になっているが、診断が不正確なため患者は他の疾患名、あるいは「原因不明熱」として扱われることも多い。そのため、実際の感染者数は公式に発表される患者数の10～25倍存在するものと推定されている。

感染源：ブルセラ属菌は非常に感染しやすく10～100個の菌で感染しうる。汚染した乳や乳製品を加熱殺菌処理が不十分なまま摂取すること、および感染動物（ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ラクダ、水牛、野生反芻獣、また最近ではアザラシ）との直接接触や、死体や流産時の汚物と接触することによって伝播する。動物のブルセラ対策が進んだ国では、海外からの帰国者、危険食品の摂食者、および一部のハイリスク集団（酪農家、獣医師、と畜場従業員、実験室感染）に散発的に認められる。

症状：*B. melitensis* がもっとも重く、ついで *B. suis*、*B. abortus* となる。通常、潜伏期は1～3週間であるが、時に数ヶ月になることもある。症状そのものに特異的なもの

はなく、軽症では単に風邪様の症状を示す。総じて、他の熱性疾患と類似しているが、筋肉・骨格系に及ぼす影響が強く、全身的な疼痛、倦怠感を示す。発熱は主に午後から夕方に認められ、時に 40 度以上となることもあるが、発汗とともに朝には解熱する。このような発熱パターン（間欠熱）が数週間続いた後、症状の好転が 1～2 週間認められるが、再び発熱を繰り返す（波状熱）こともある。病気の期間は、数週間から数ヶ月に及ぶこともある。臨床症状により、急性型、限局型、慢性型に分けられる。

急性型：発熱、悪寒、倦怠感、関節痛などが認められる。脾腫、リンパ節腫脹、肝腫大を認めることもある。発熱は午後から夕方にかけて認められることが多い。

限局型：心内膜炎、肺炎、骨髄炎、脾炎、および精巣炎を認める場合が多い。心内膜炎はブルセラ症による死亡原因の大半を占める。

慢性型：発症後 1 年以上にわたって脱力感や疲労感が続く。

治療：ブルセラ属菌にはテトラサイクリン（2 g/日）の 6 週間連続投与やストレプトマイシン（1 g/日）の 3 週間連続投与が有効である。細胞内寄生であるためリファンピシン（米国：リファンピン）やキノロン剤などの併用も有効である。成人の急性ブルセラ症に対する WHO の推奨治療法は 600-900 mg/日のリファンピシンと 200 mg のドキシサイクリンを 6 週間投与する方法である。髄膜脳炎や心内膜炎等の合併症がある場合にはリファンピシン、テトラサイクリン、およびアミノグリコシド剤を併用する。小児で合併症がない場合にはリファンピシンとコトリモキサゾールの併用が推奨される。

予防：ヒトのブルセラ症の予防は家畜の予防接種、および検査陽性動物の殺処分（Test and Slaughter）などによる感染動物の根絶対策を中心とした獣医学的な対策が有効である。また、乳と乳製品の適切な加熱処理も効果が高い。これらの方法によってヒトのブルセラ症の発生が激減した国や地域が多い。

かつて旧ソ連、中国、およびフランスにおいて弱毒生菌ワクチンやペプチドグリカンワクチンが用いられたが、現在では用いられていない。弱毒変異株を用いたワクチンの開発が行われているとされるが実用化には至っていない。

Ⅱ．ブルセラ属菌検査に関する一般的な注意事項

1．作業上の一般的注意

ブルセラ属菌はすべて、国立感染症研究所バイオセーフティーレベル 3 (BSL3) に分類されている。ブルセラ症の疑われる臨床材料の取り扱いは、まず、BSL2 内の安全キャビネットで行う。ブルセラ属菌が確認もしくは非常に強く疑われた場合、以降の検討はすべて BSL3 実験室内で行う。ブルセラ属菌は実験室内感染がきわめて多い。感染経路は主として皮膚、吸入、眼、口である。

* 疑い検体は BSL2 内の安全キャビネット内で取り扱う。

* ブルセラ属菌が確認もしくは非常に強く疑われた場合、以降の作業はすべて BSL3 実験室で実施する。

* ガウン、マスク、手袋を着用する。

* 使用した器具等は、70%エタノールで消毒する。

* オートクレーブ可能な器具等および汚物は、オートクレーブ (121℃、20 分) 処理をする。

2．検査上の一般的注意

症状に特異的なものがないため、検査室での検査結果が重要となる。一般的な検査所見としては、白血球数は正常またはやや減少し、軽度の貧血が認められ、赤沈は正常またはやや亢進する。その他、細菌学的検査や抗体検査、遺伝子検出などが行われる。

鑑別診断を必要とする疾患として野兔病、伝染性単核症、インフルエンザ、リステリア症、トキソプラズマ症、ウイルス性肝炎、慢性リウマチなどがある。

Ⅲ. 検体の採取・輸送・保管および滅菌

1. 検査材料の採取・輸送

血液培養による診断が有効なので、発熱時の、なるべく抗生物質投与前の血液（血清分離の必要はない）、リンパ節生検材料、骨髄穿刺材料などを採取する。

血液、培養用材料ともに凍結を避けて氷冷して搬送する。

2. 検査材料および病原体の保存

疑い検体は、BSL2 実験室内で保存する。

ブルセラ属菌は、BSL3 実験室内で保存する。

3. 消毒・滅菌法

使用した器具等は、70%エタノールで消毒する。汚物やオートクレーブ可能な器具等は、オートクレーブ（121℃、20 分）処理をする。

IV. 病原体の検出

1. 細菌学的検査

検査材料：検査材料としては発熱時の、なるべく抗生物質投与前の血液（同時に血清を分離し抗体測定に用いる）、リンパ節生検材料、骨髓穿刺材料などの無菌的に採取した組織、体液を対象とする。本菌の増殖は遅いので、菌分離には無菌的に採取された材料が望ましい。また、ブルセラ属菌は血液や骨髓から分離されることが多いが、脾臓、肝臓および膿瘍の生検材料から分離されることもある。

汚染のおそれがある材料の場合には抗生物質を加えた選択培地を用いる。汚染が著しいことが分かっている材料の場合には、滅菌リン酸緩衝食塩水などで乳剤を作成し、1～2 ml をモルモットの筋肉または腹腔内接種用とする。数日以内に死亡した場合はブルセラ属菌によるものではない。2～5 週後、血液或いは脾臓を検体として培養検査を行う。動物の飼育は実験室内感染に注意して行う。

培養：直接平板寒天培養と必要ならば増菌培養を行う。血液などの検査材料を、5% ヒツジ血液寒天培地（SBA）、血清加ブルセラ寒天培地などの平板に塗抹して培養する。一般的生検材料など臓器の場合は、平板に臓器断面を押しつけ、平板全体にスタンプする。ブルセラ菌は淋菌の選択培地である Martin Lewis 培地や Thayer Martin 培地を選択培地としても成長するので、創傷部位や肺などからの菌の分離に利用できる。菌数の少ない菌血症の検索には血清加ブイヨンを用いて増菌培養を行う。培養は原因菌が *B. abortus* である場合を考慮し、炭酸ガス 5～10% 存在下で行う。35℃で最低 21 日間培養し、各週 2 回程度分離培地（SBA、ブルセラ寒天など）に移植する。

判定：ブルセラ属菌は小さい正円形、半球状にやや隆起した表面平滑なコロニーで、発育はやや遅く、3 日以上培養で直径 1.5～2mm になる。疑わしいコロニーについては火炎固定塗末スライドを作りグラム染色を行う。グラム陰性の小球～球桿菌で単在することが多く、長い連鎖は作らず両端濃染性を示さない。その他、一般的な生理学的（運動性等）・生化学的性状（オキシダーゼテスト、カタラーゼテスト等）の検査を実施する。以下にブルセラ属菌の鑑別のための特徴を示す。

ブルセラ属菌と鑑別を要する細菌

試 験	<i>Brucella</i> sp.	<i>Bordetella</i> <i>bronchiseptica</i>	<i>Acineto-</i> <i>bacter</i> sp.	<i>Moraxella</i> <i>phenylpyruvica</i>	<i>Oligella</i> <i>ureolytica</i>	<i>Haemophilus</i> <i>influenzae</i>
抗ブルセラ抗 血清での凝集	+	—	—	—	—	—
オキシダーゼ	+	+	—	+	+	+
運動性	—	+	—	—	+ / —	—
尿素水解	+	+	+ / —	+	+	+ / —
硝酸塩還元	+	+	— / +	+	+	
血液寒天 での発育	+	+	+	+	+	—
グラム染色 形態 染色性	極小の 球桿菌 淡い	短桿菌、 小球桿菌 鮮明	大球桿菌 鮮明	球桿菌 鮮明	極小の 球桿菌	小球桿菌

ブルセラ属菌の鑑別

鑑別試験等	<i>B. abortus</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. suis</i>	<i>B. canis</i>
宿 主	ウシ	ヤギ・ヒツジ	ブタ	イヌ
ヒトへの病原性	中等度	強い	強い	弱い
色素に対する感受性 塩基性フクシン チオニン	耐性 感受性	耐性 耐性	感受性 耐性	感受性 耐性
尿素水解	> 90min	> 90min	< 90min	< 90min
H ₂ S 産生	2～5 days	—	1～6 days	—
CO ₂ 要求性	+ / —	—	—	—

2. 遺伝子の検出

ブルセラ属菌遺伝子の検出には PCR 法を用いる。以下に、PCR 用プライマーの性状を示す。サンプルは、血清もしくは血液、骨髓穿刺材料から、市販の DNA 抽出キット（SepaGene：#SG0025：三光純薬、FlexiGene DNA Kits：#51204：QIAGEN）を用いて精製した DNA、もしくは、分離培養した細菌コロニーから同じくキット（SepaGene：#SG0025：三光純薬）を用いて抽出した DNA を用いる。以下の方法による PCR が血液中のブルセラ属菌の検出に優れているとされる。

ブルセラ属菌遺伝子の増幅に用いられる PCR 用プライマー

Target	Primer	Sequence	Length	GenBank
BCSP31	B4 (S)	5'-Tgg CTC ggT TgC CAA TAT CAA	224 bp	M20404
	B5 (AS)	5'-CgC gCT TgC CTT TCA ggT CTg		
16S-rRNA	F4 (S)	5'-TCg AgC gCC CgC AAg ggT	904 bp	X13695
	R2 (AS)	5'-AAC CAT AgT gTC TCC ACT AA		
OMP2	JPF (S)	5'-gCg CTC Agg CTg CCg ACg CAA	192 bp	U26438
	JPR (AS)	5'-CCC AgC CAT TgC ggT Cgg TA		U26439

BCSP31-PCR のプライマーによって増幅される産物は、*B. abortus* 細胞表面タンパクの 31kDa 抗原をコードする遺伝子の 224bp の領域で、全てのブルセラ属菌に保存されている。16S-rRNA-PCR のプライマーによって増幅される産物もすべてのブルセラ属菌に保存され、増幅長は 904bp である。一方、OMP-PCR のプライマーによって増幅される 192bp の産物は、ブルセラ属菌の外膜タンパクをコードする遺伝子の一部で、これは *B. suis* biovar 2、3、4、*B. ovis*、および *B. canis* には含まれていない。

B. abortus および *B. canis* の陽性コントロール遺伝子は、それぞれの凝集反応用菌液（*B. abortus*：農業技術研究機構、*B. canis*：北里研究所）より SepaGene（三光純薬）を用いてプロトコールに従い分離精製、使用することが可能である。

PCR は、puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (#27-9558-01、Amersham Bioscience) を用いて実施するのが簡便で良い。以下にその反応溶液の調整方法および反応条件を記す。

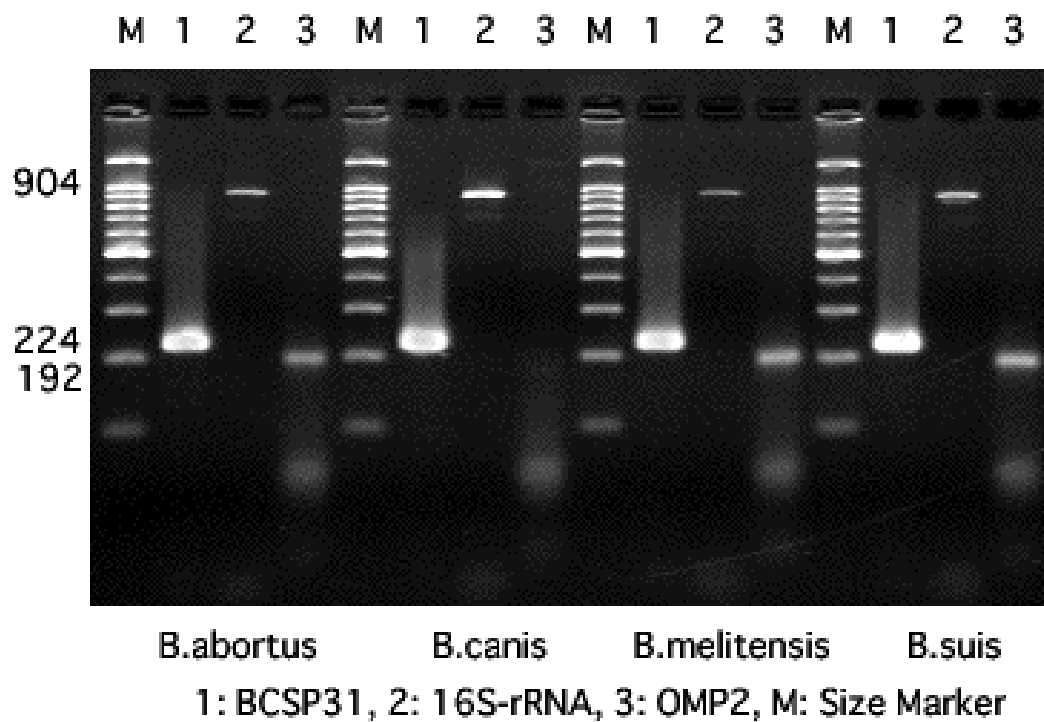
反応溶液の調整

	BCSP31 16S-rRNA	OMP2
PCR beads	1 beads	1 beads
Mg ⁺⁺ solution (25mM)	— (final 1.5mM)	1.5 µl (final 3mM)
DEPC-H ₂ O	18 µl	17 µl
Sense Primer (10µM)	1 µl (final 0.4µM)	0.75 µl (final 0.3µM)
AntiSense Primer (10µM)	1 µl (final 0.4µM)	0.75 µl (final 0.3µM)
Sample	5 µl	5 µl
Total volume	25 µl	25 µl

PCR 反応条件

BCSP31、OMP2			16S-rRNA		
1) 1 サイクル	熱変性	94℃、4 分	1) 1 サイクル	熱変性	95℃、5 分
2) 35 サイクル	熱変成	94℃、1 分	2) 30 サイクル	熱変成	95℃、30 秒
	アニーリング	60℃、1 分		アニーリング	54℃、 1 分 30 秒
	伸長	72℃、1 分		伸長	72℃、 1 分 30 秒
3) 1 サイクル	伸長	72℃、5 分	3) 1 サイクル	伸長	72℃、6 分

次に、*B. abortus* biovar 1 No.125 株、*B. canis* QE13 株、*B. melitensis* biovar 1 No.16M 株、*B. suis* biovar 1 No.1330 株を用いて前述の PCR を行ったときの検出パターンを示す。図のように、*B. abortus*、*B. melitensis*、*B. suis* biovar 1 ではすべての遺伝子が検出



されるが、*B. canis* は OMP2 が検出されない。また、*B. suis* biovar 2, 3, 4 でも OMP2 は検出されない。

V. 抗体の測定

1. 試験管内凝集反応（血清反応）

ブルセラ症は多くの場合慢性経過をたどり、有症状期（風邪様症状など）でもすでに抗体を保有していることが多い。また、検体からの菌の分離・培養は困難で、時間を要する。これらのことから本症の日常的な診断では多くの場合、血清診断が行われ、その意義は大きい。血清反応のうち標準的に行われる試験管内凝集反応は、操作と判定が容易で、市販の家畜用の標準菌液を利用できる。また 2-メルカプトエタノール感受性の IgM 抗体の検出によって病気の早期での診断も可能である。IgG 抗体は、治癒後も 1 年くらい検出できると言われている。発症初期の血清と、その後 2～3 週間後の血清を検査して抗体価の変化を見るとよい。野兔病菌、エルシニア菌、コレラ菌との交差反応に注意する。

S-LPS を持つブルセラ属菌に対する抗体の測定には、*B. abortus* の死菌体を用いた試験管内凝集反応が広く用いられるが、これでは R-LPS を持つ *B. canis* に対する抗体は検出できない。*B. canis* を疑うときは *B. canis* の凝集反应用抗原を用いる。

また、血清は非動化しない。それぞれ凝集反应用菌液添付の使用説明書（次ページ参照）に従って実施する。

必要な器具等

- * 透明なガラス製小試験管（直径 12mm-長さ 75mm、Disposable culture tubes、#9831-1207、IWAKI）
- * 0.5w/v% フェノール加生理食塩水（生理食塩水に 0.5%（w/v）になるよう加温融解したフェノールを加える）（*B. abortus* 用）
- * リン酸緩衝食塩液（pH7.2、46.7g リン酸二ナトリウム・12 水、6.55g リン酸一ナトリウム・2 水、9.0g 塩化ナトリウム、1.0g 窒化ナトリウム、以上を 1,000ml に調整）（*B. canis* 用）
- * 試験管内凝集反应用菌液（*B. abortus*：農業技術研究機構、*B. canis*：北里研究所）
- * 陽性対照血清（ウサギに標準菌液を免疫して調整する）
- * その他、一般的に血清反応に必要とされる器具類

A) *B. abortus*、*B. melitensis*、*B. suis* に対する抗体の検出

1. 菌液 (*B. abortus* : 農業技術研究機構) をよく振り、フェノール加生理食塩水で 10 倍に希釈する。
2. 標準混濁管を調整する。
3. 10 倍希釈血清から出発して 2 段階希釈で 8 段階の希釈系列を用意する (0.5 ml/試験管)。
4. 同様に力価が 160 倍以上の陽性対照血清を希釈する。
5. 抗原菌液 0.5 ml を各試験管に加えてよく攪拌し、37℃で 18～24 時間感作後判定する。
6. 判定は、標準混濁管と対比して凝集の程度を調べ、50%凝集を示す最終血清希釈倍数を読む。
7. 血清の最終希釈倍数 40 倍以上で 50%以上の凝集を示すものを陽性と判定する。

注 : *Yersinia enterocolitica* serotype 09、*Francisella tularensis*、*Vibrio cholera* との交差凝集があり擬陽性を呈することがあるため注意を要する。また、凝集抗体価が高値の検体では血清希釈の低いところで擬陰性を呈することがあるため、常に 320 倍以上も希釈し検査するとよい。

B) *B. canis* に対する抗体の検出

1. 標準混濁管を調整する。
2. 20 倍希釈血清から出発して 2 段階希釈で 8 段階の希釈系列を用意する (0.5 ml/試験管)。
3. 同様に力価が 320 倍以上の陽性対照血清を希釈する。
4. 抗原菌液 0.5 ml を各試験管に加えてよく攪拌し、50℃で 24 時間感作後判定する。
5. 判定は、標準混濁管と対比して凝集の程度を調べ、50%凝集を示す最終血清希釈倍数を読む。
6. 血清の最終希釈倍数 160 倍以上で 50%以上の凝集を示すものを陽性と判定する。

VI. 参考文献

1. Disease information, Brucellosis. [http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/brucellosis_g.htm] CDC. 2002. (総論)
2. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* 3:213-221. 1997. (総論)
3. Shapiro DS and Wong JD. Brucella. p625-631. In: Lennette EH, Balows A et al. (eds), *Manual of clinical microbiology*. 7th ed. ASM Press. 1999. (総論)
4. Multiannual animal disease status, Bovine brucellosis. Caprine and ovine brucellosis (excluding *B. ovis*). [<http://www.oie.int/hs2/report.asp?lang=en>] OIE. 2002. (疫学、家畜)
5. Brucellosis. Global infectious diseases & epidemiology network. GIDEON Informatics, Inc. , 2002. (疫学、ヒト)
6. Baily GG, Krahan JB, Drasar BS and Stoker NG. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.* 95:271-275. 1992. (PCR、BCSP31)
7. Romeo C, Gamazo C, Pardo M and Lopes-Goni I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33:615-617. 1995. (PCR、16S-rRNA)
8. Leal-Klevezas DS, Martinez-Vazquez IO, Lopez-Merino A and Martinez-Soriano JP. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. From blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.* 33:3087-3090. 1995. (PCR、OMP2)

VII. 検査依頼先

国立感染症研究所 獣医科学部 今岡 浩一 Tel: 03-5285-1111 (内 2622)
Fax: 03-5285-1179

VIII. 執筆者一覧

今岡 浩一：国立感染症研究所 獣医科学部
神山 恒夫：国立感染症研究所 獣医科学部
赤見 正行：群馬県衛生環境研究所
大友 良光：青森県環境保健センター

ス フ チ 疹 発

発疹チフス

目 次

I. 発疹チフスの概説

II. 血清診断法

1. 抗原の継代及び増殖に使用する細胞
2. リケッチアの継代及び増殖
3. 間接蛍光抗体法に用いる抗原スライドの作製
4. 間接蛍光抗体法による血清抗体価の測定及び診断の基準

III. 遺伝子増幅法（PCR 法）

1. プライマー
2. PCR 法

IV. 今後の課題

V. 参考文献

I. 発疹チフスの概説

発疹チフス群のリケッチアには、*Rickettsia prowazekii* (*R. prowazekii*), *Rickettsia typhi* (*R. typhi*), *Rickettsia canada* (*R. canada*) 等が知られている。発疹チフス (epidemic typhus) は *R. prowazekii* が原因で起こり、また発疹熱 (endemic typhus or murine typhus) は *R. typhi* に感染し発症するが、この 2 疾病が異なったリケッチアに起因している事実を血清学的に確認したのは 1932 年、Zinsser 及び Castaneda である。

第二次世界大戦以後、発疹チフスは文明社会において忘れ去られた疾病となりつつある。しかしながら、世界的に見ると 1990 年代に入ってからエチオピア、ナイジェリア、アルジェリア、ブルンジ、ルワンダ、ザイール等のアフリカ諸国、ペルー、ロシアでの患者の発生が確認されており、また非衛生的な環境下にある難民キャンプや刑務所内など、特殊な状況下での発生も報告されている。

一方発疹熱患者はアメリカ合衆国、西インド諸島、中央アメリカ諸国、南アメリカ大陸、地中海や黒海沿岸のヨーロッパ・中東諸国、アフリカ大陸、東南アジア諸国、オーストラリアの一部地域など世界中に広く分布しており、地域によっては今なおその発生が大きな問題になっている感染症である。日本でも患者発生は希に認められており、著者も患者を血清学的に確認している。

現在まで判っている *R. prowazekii* の reservoir host はヒトとムササビ（アメリカ合衆国）であるが、主な host は発疹チフスの再発型である Brill-Zinsser 病を発症したヒトである。Vector はコロモジラミ（アタマジラミ及びムササビに寄生するノミやシラミも vector と考えられている）であり、Brill-Zinsser 病を発症したヒトに寄生し、リケッチアを獲得する。

R. typhi の vector はノミ、シラミ、ダニ (mites and ticks) であり、自然界では多くの場合齧歯類が reservoir host となる。通常 rat-ノミ-rat 間での伝播様式をとるが、オポッサム、ヘビ、ネコにも感染が確認されており、host となりえる可能性がある。

節足動物が Brill-Zinsser 病を発症したヒトの血液を摂取した際に獲得する *R. prowazekii* 及び哺乳動物の血液を摂取した際に獲得する *R. typhi* は、ツツガムシ病や紅斑熱群リケッチア症のリケッチアとは異なり、唾液腺には移行せず消化管の上皮内膜や排泄器官で増殖する。このため、これら 2 種類のリケッチアは節足動物が哺乳類を刺咬しても感染は起こらず、感染は節足動物の糞中にあるリケッチアが擦過部位や結膜を通して、あるいは埃として吸飲する事で成立する。

R. typhi は長い間 vector 中で経卵伝播を起こさないとされてきたが、1985 年にネズミノミ中で経卵伝播する事が証明されている。一方、*R. prowazekii* の

場合は、他のリケッチアが vector 中で長期間維持されるのとは異なり、これを獲得したシラミは 3 週間前後で死亡する。

発疹チフス、ツツガムシ病、紅斑熱は共に 4 類感染症に分類されている感染症であるため個別診断を行う必要があるが、臨床的にこれら疾病を区別する事は難しく、発疹熱との区別となるとなお一層難しいと言わざるをえない。それ故、これら疾病を区別するために以下に述べる血清診断法及び PCR 法が重要な診断方法となる。

II. 血清診断法

発疹チフスあるいは発疹熱を血清学的に診断する場合には、紅斑熱群リケッチア症やツツガムシ病の診断と同様、簡便で高感度で特異性も高く、かつ IgM, IgG 抗体を個別に測定可能な間接蛍光抗体法 (indirect immunofluorescence assay) が用いられる。よって、本稿では間接蛍光抗体法及びこれに用いるリケッチア抗原の作製について述べる。尚、発疹チフス群リケッチアは、他のリケッチアと同様病原体取り扱いレベル 3 に分離されており、増殖を伴う病原体の取り扱いは P3 実験室で行う。

1. 抗原の継代及び増殖に使用する細胞

① *Rickettsia prowazekii* (発疹チフス診断用抗原) の継代に使用する細胞

R. prowazekii の増殖及び継代には Vero 細胞を用いる。なお、Vero 細胞の継代についてはリケッチア感染症診断マニュアル (国立感染症研究所 (レファレンス委員会) 地方衛生研究所全国協議会 編集/発行) の紅斑熱群リケッチア症診断マニュアルを参照されたい。

② *Rickettsia typhi* (発疹熱診断用抗原) の継代に使用する細胞

R. typhi の増殖及び継代には BS-C40 細胞を用いる。

- ア) 凍結保存されている BS-C40 細胞懸濁液を融解し、3,000 rpm 10 分間遠心した後上清を捨て、沈渣を細胞増殖用培地 (8% 牛胎児血清を含んだ Eagle's MEM No3, 抗生物質不含, ニススイ) に再浮遊させ、37°C のインキュベーター中で培養を行う。
- イ) 細胞は 4~6 日でフルシートになるので、0.25% トリプシン-0.02% EDTA を用い培養面から剥離させ、2,000rpm で 5~10 分間遠心後、全量の 1/6~1/8 の細胞を増殖用培地に再浮遊させ継代を行う。

- ウ) BS-C40 細胞の保存は、セルバンカー（ダイヤトロン）等で細胞を再浮遊し、 -80°C あるいは液体窒素中で行う。

2. リケッチアの継代及び増殖

① *Rickettsia prowazekii* (Brein 1 株) の継代及び増殖

- ア) 凍結保存されている *R. prowazekii* 感染 Vero 細胞浮遊液を融解し、3,000 ~ 4,000rpm, 10 分間遠心した後、上清を捨て沈渣を細胞維持用培地（1% 牛胎児血清を含んだ Eagle's MEM No3, 抗生物質不含）に再浮遊させる。
- イ) 単層培養した非感染 Vero 細胞の増殖用培地を維持培地に代え、*R. prowazekii* 感染 Vero 細胞懸濁液を接種する。この際、接種する *R. prowazekii* 感染 Vero 細胞数は非感染 Vero 細胞数の $1/3$ から $1/4$ とする。
- ウ) $33\sim 35^{\circ}\text{C}$, 7~10 日間継代培養を行うと、*R. prowazekii* は Vero 細胞に重感染し、細胞変性（CPE）により一部の感染細胞が培養面より剥離する。培養面に残った細胞を、ラバーポリスマンを用いて剥離させ、3,000 ~ 4,000rpm で 10 分間程度遠心し感染細胞を集めた後、新たに単層培養した非感染 Vero 細胞を用意し、これに（イ）と同様の操作により接種することで継代する。

② *Rickettsia typhi* の継代及び増殖

R. typhi の継代及び増殖に用いる細胞は、*R. prowazekii* に用いる Vero 細胞とは異なり BS-C40 細胞を用いる。これ以外の点については *R. prowazekii* の継代及び増殖の項に述べた手順と同一であるため、*R. typhi* の継代及び増殖を行う場合には、*R. prowazekii* の継代及び増殖の項の Vero 細胞を BS-C40 細胞と読み直して行う。

- 注) 接種材料の感染力価が低い場合には、接種後に 3,000 ~ 4,000rpm, 10 分間程度の遠心吸着を行うと増殖効率が上がる場合がある。一方、感染率が極端に低い場合には、増殖を回復させる事が難しいため、凍結保存してあるリケッチア感染細胞を用い、継代をやり直した方が良い。また、リケッチアを継代する場合には、感染細胞の一部をとって間接蛍光抗体法により感染の程度を確認することが望ましい。

なお、後述する間接蛍光抗体法に使用する感染細胞は、リケッチア粒子が細胞内に確認できる状態の感染細胞を用いること。

3. 間接蛍光抗体法に用いる抗原スライドの作製

発疹チフスあるいは発疹熱の血清診断に使用する *R. prowazekii* あるいは *R. typhi* の抗原スライドは、「リケッチア感染症診断マニュアル」中の紅斑熱群リケッチア症診断マニュアルに記載してある抗原スライドの作製の項に準じて作製する。

4. 間接蛍光抗体法による血清抗体価の測定及び診断の基準

R. prowazekii あるいは *R. typhi* に対する患者血清中の抗体価の測定は、「リケッチア感染症診断マニュアル」中の紅斑熱群リケッチア症診断マニュアルに記載してある間接蛍光抗体法及び診断の基準、それぞれの項に準じて実施する。

発疹チフス患者は現在日本には無く、また発疹熱患者も希である。このため、両患者血清抗体の *R. prowazekii* 及び *R. typhi* に対する交差反応性については確認が難しいが、Burundi らの発疹チフス患者の血清を用いたデータでは、*R. prowazekii* 及び *R. typhi* に対しほぼ同程度の抗体価を示すとされており、血清中の抗体価を間接蛍光抗体法で直接測定しても *R. prowazekii* あるいは *R. typhi* のいずれに感染したかを決めるのは難しいと考えられる。このような場合、*R. typhi* を用いて血清中の抗体を吸収した後に間接蛍光抗体法を実施すると、*R. prowazekii* に対する抗体だけが検出でき、*R. typhi* に対する抗体は検出されなくなるとされることから、抗原による吸収操作を行う事により、いずれのリケッチアに感染したか判別が可能と考えられる (1)。

一方、日本の紅斑熱群リケッチア症患者抗体も *R. prowazekii* 及び *R. typhi* と交差反応する。しかし、多くの場合 *R. prowazekii* あるいは *R. typhi* に対する抗体価に比較して *R. japonica* に対する抗体価が高値となることから、紅斑熱群リケッチア症患者を発疹チフス群リケッチア症患者と誤診する事は少ないと考えられる。

いずれにしても、抗体価から感染しているリケッチアの同定が難しいと思われる場合には、後述の PCR 法等を積極的に実施し結論を出す事が必要である。

III 遺伝子増幅法 (PCR 法)

PCR 法に用いる「DNA の抽出法」「抽出材料」等については、「リケッチア感染症診断マニュアル」中の紅斑熱群リケッチア症診断マニュアルに記載してある遺伝子増幅法の項と基本的に同じであるため、紅斑熱群リケッチアを発疹チフス群リケッチアに、*R. japonica* を *R. prowazekii* あるいは *R. typhi* に読み直し、同様に実施する。

1. プライマー

R. prowazekii 及び *R. typhi* をそれぞれ判別するために, citrate synthase や膜タンパク質である 17kDa あるいは 120kDa タンパク質をコードしている遺伝子の DNA fragment をターゲットとしたプライマーの系がいくつか報告されている (2, 3, 4).

なお, 本稿では紅斑熱群リケッチアの 17-kDa タンパク質をコードしている遺伝子を検出するために用いられている R1-R2 プライマーを用いる事で発疹チフス群のリケッチア遺伝子も共通に検出可能であることからこの系と, 発疹チフス群のリケッチアを特異的に検出するために新たに 17-kDa タンパク質をコードしている遺伝子上に設定した下記のプライマーを用いた系について記載する. また, 検出感度を上げるために R1-R2 プライマーを 1st PCR のプライマーとして用い, 2nd PCR で *R. prowazekii* 及び *R. typhi* を判別可能なプライマーを用いた nested PCR を行う事も可能である.

R1 : 5' - TCA ATT CAC AAC TTg CCA TT - 3'

R2 : 5' - TTT ACA AAA TTC TAA AAA CC - 3'

(*R. typhi* 特異的プライマー)

Rty 2F : 5' - gTA TgA ACA AAC AAg ggA CT - 3'

Rty 3R : 5' - TTA CgT AAC CAT gAT TgC CA - 3'

(*R. prowazekii* 特異的プライマー)

Rpro 2F : 5' - ACA AgC TTg TAA Tgg TCA gA - 3'

Rpro 3R : 5' - gCC ATT gCC CAT CAg gTT gA - 3'

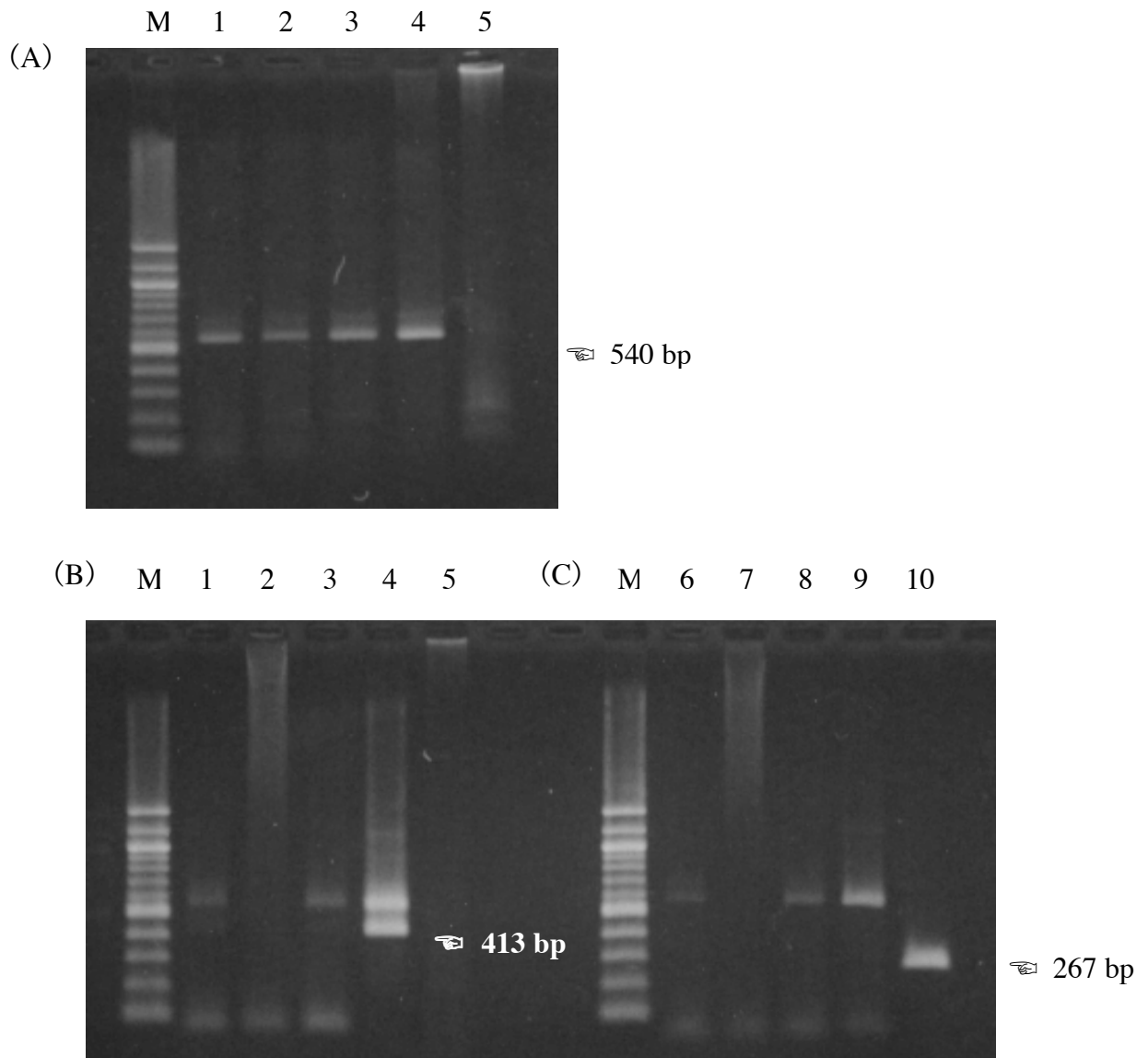
2. PCR 法

PCR 法の反応系における成分組成は, 「リケッチア感染症診断マニュアル」中の紅斑熱群リケッチア症診断マニュアルに記載してあるものと同様である.

1st PCR の反応はそれぞれのプライマーセットを用い以下の系で (2) ~ (4) を 30~35 cycle 行う.

- | | |
|---------|-----|
| 1) 95°C | 2 分 |
| 2) 94°C | 1 分 |
| 3) 56°C | 1 分 |
| 4) 72°C | 1 分 |

2nd PCR あるいは nested PCR を行う場合には、1st PCR の増幅産物の一部を Template DNA として用い、1st PCR と同様の反応条件で実施する。以下に、nested PCR 法を実施した結果を示した。



(A) R1-R2 プライマーの組み合わせによる 1st PCR で紅斑熱群及び発疹チフス群の DNA を増幅。

M : 100 bp ladder marker, 1: *R. rickettsii*, 2: *R. conorii*, 3: *R. japonica* YH 株, 4: *R. prowazekii*, 5: *R. typhi*

(B) Rpro 2F-Rpro 3R で *R. prowazekii* DNA, (C) Rty 2F-Rty 3R で *R. typhi* DNA を増幅

M : 100 bp ladder marker, 1, 6: *R. rickettsii*, 2, 7: *R. conorii*, 3, 8: *R. japonica* YH 株, 4, 9: *R. prowazekii*, 5, 10: *R. typhi*

IV 今後の課題

感染症法の施行により、発疹チフス、日本紅斑熱、ツツガムシ病が4類感染症全数把握対象疾病となり、これらのリケッチア症を判別同定する必要が生じた。幸いにも、今までに日本紅斑熱とツツガムシ病に関しては検査マニュアルができあがり、これを参考にすればいずれの研究室でも同定が可能となっている。しかしながら、発疹チフスの病原体である *R. prowazekii* や発疹熱の病原体である *R. typhi* については、各研究機関に広く普及しているとは言い難い状況にあり、血清検査やPCR法などの検査を難しくしている。

日本では、今のところ発疹チフス患者はいないとされているが、路上生活者の増加と、彼らに寄生しているコロモジラミの増加に伴い、この疾病がこれらのヒトの間に入り込んだ場合のアウトブレイクが懸念される。また、1998年には発疹チフスの流行地であるBurundiで医療活動に従事した看護婦が、スイスに帰国後発病したが、診断が遅れた結果死亡するという悲劇も発生している。日本でも、NGOによる発展途上国へのヒトの派遣や企業活動の一環としての海外派遣社員、旅行者等の増加に伴い、本疾病がいつ何時輸入感染症として入り込むか判らない状況にある。

以上の現状を踏まえ、これら疾病で死亡者が出るような不幸を避けるためにも一時も早い検査の充実が望まれる。

V 参考文献

- 1) D. Raoult, J. B. Ndiokubwayo, H. Tissot-Dupont, V. Roux, B. Faugere, R. Abegbinni, and R. J. Birtles. 1998. Outbreak of epidemic typhus associated trench fever in Burundi.. The LANCET., 352: 353-358.
- 2) D. Raoult, V. Roux, J. B. Ndiokubwayo, G. Bise, D. Baudon, G. Martet, and R. Birtles. 1997. Jail fever (Epidemic typhus) outbreak in Burundi., Emerging Infectious Disease, 3: 357-360.
- 3) M. Carl, C. W. Tibbs, M. E. Dobson, S. Paparello, and G. A. Dasch. 1990. Diagnosis of acute typhus infection using the polymerase chain reaction., 161: 791-793.
- 4) M. Carl, M. E. Dobson, W. M. Ching, and G. A. Dasch. 1990. Characterization of the gene encoding the protective paracrystalline-surface-layer protein of *Rickettsia prowazekii*: Presence of a truncated identical homolog in *Rickettsia typhi*. Proc. Natl. Acad. Soc., 87: 8237-8241.

発疹チフス群リケッチア診断マニュアル

執筆担当 海保郁男

千葉県衛生研究所 ウイルス研究室

編集 / 発行 : 国立感染症研究所（レファレンス委員会）

地方衛生研究所全国協議会

連絡先 : 国立感染症研究所 ウイルス第一部

リケッチア・クラミジア室

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

TEL 03-5285-1111（内線 2563 or 2554）

FAX 03-5285-1208

地方衛生研究所 各執筆者

発行日 : 平成 14 年 7 月 23 日

マ ラ リ ア



目 次

(1) マラリアの概説

(2) マラリア原虫検査に関する一般的な注意事項

1. 検査材料の採取
2. 検査材料の輸送
3. 検査の進め方
4. 検査の判定

(3) 検査方法

1. 病原体検出（血液塗抹標本）

採血の要点

血液薄層塗抹標本の作製手順

血液塗抹標本の染色

ギムザ染色

染色液の調整

染色の手順

ギムザ染色標本による原虫の鑑別

アクリジンオレンジ染色

染色液の調整

染色の手順と染色像

2. 抗原検出

3. DNA 診断法

4. 薬剤感受性試験

(4) 引用文献

（１）マラリアの概説

マラリアはマラリア原虫（*Plasmodium*）の感染に起因するもので、特有の熱発作とそれに続発する貧血、脾腫のほか多彩な病態を呈する疾患である。感染症法においては四類感染症に分類され、患者の全数把握が義務づけられている。人に寄生するマラリア原虫は熱帯熱マラリア原虫(*P. falciparum*)、三日熱マラリア原虫(*P. vivax*)、四日熱マラリア原虫(*P. malariae*)、卵形マラリア原虫 (*P. ovale*) の 4 種が知られており、いずれも夜間吸血性のハマダラカに媒介される。本症は地球総人口の 40% 以上が居住する熱帯、亜熱帯各地に蔓延しており、年間 3 億人以上が罹患し、犠牲者は 200 万人以上に達すると推定されている。特にサハラ以南の熱帯アフリカでの被害が甚大である。我が国におけるマラリアの大部分は輸入症例であるが、輸血（保存血、血小板、交換輸血）、針刺し事故などによる感染も起こり得るので注意を要する。

マラリアの臨床経過は複雑で、赤血球の原虫感染密度、合併症の有無、宿主の栄養や免疫状態などにより著しく影響される。潜伏期は通常 7～40 日で、平均的には熱帯熱マラリアが最も短く四日熱マラリアが最も長く、熱帯熱マラリア以外ではさらに長期化することもある。マラリアの特徴である熱発作は第 5 病日頃から見られるようになり、三日熱と卵形マラリアでは 48 時間、四日熱マラリアでは 72 時間毎の周期性を示す。熱帯熱マラリアでは熱の分利が悪く、不規則な高熱を持続することが多い。熱帯熱マラリアは悪性で治療開始が遅れると死の転帰をとる危険が高く、他のマラリアとの鑑別診断の重要性が指摘されている。

（２）マラリア原虫検査に関する一般的な注意事項

古典的な方法であるが、虫種の鑑別、感染密度の測定、その形態学的な変化などの観察はギムザ液染色標本を用いるのが基本である。

1. 検査材料の採取

患者の血液を検査材料とする。染色標本の観察により、赤血球に寄生したマラリア原虫を検出する方法が基本となる。したがって、採血後は速やかに標本作製を行う必要がある。

2. 検査材料の輸送

形態的検査に供するのであれば、下記の要領でメタノール固定血液薄層塗抹標本を作製してから送付する。なお、原虫種の確認を依頼する場合には自らが原虫を確認した標本、可能であれば、検出場所にマークを付けて送付するとよい。

血中のマラリア抗原検出用、あるいは DNA 診断用の試料であれば血液凝固阻止剤（ヘパリン不可）添加の全血をバイオハザードの規定に準じて 3 重の容器に入れて、冷蔵して輸送する。

検査材料の輸送上の注意

検査材料の輸送に際しては、万国郵便条約の通常郵便に関する施行規則（平成 12 年 12 月 22 日号外郵政省告示 823 号）第 413 条に規定する容器及び包装を用いた方法によらなければならない。

3. 検査の進め方

一般に以下の方法が用いられる。

- 1) 患者末梢血採取
- 2) 血液薄層塗抹標本作製
- 3) ギムザ染色標本
- 4) 検鏡による原虫確認

希薄な感染事例では感染の有無をアクリジンオレンジ染色標本の蛍光顕微鏡観察で行い、次いで上記のギムザ染色標本で虫種の確認を行うと効率的である。

4. 検査の判定

ギムザ染色標本の顕微鏡観察によりマラリア原虫の感染の有無、およびその形態的特徴から熱帯熱マラリア、三日熱マラリア、卵形マラリアおよび四日熱マラリアの 4 種の虫種鑑別を行う。

（3）検査方法

1 病原体検出（血液塗抹標本）

採血の要点

耳朶血、指頭血、静脈血のいずれでもよい。

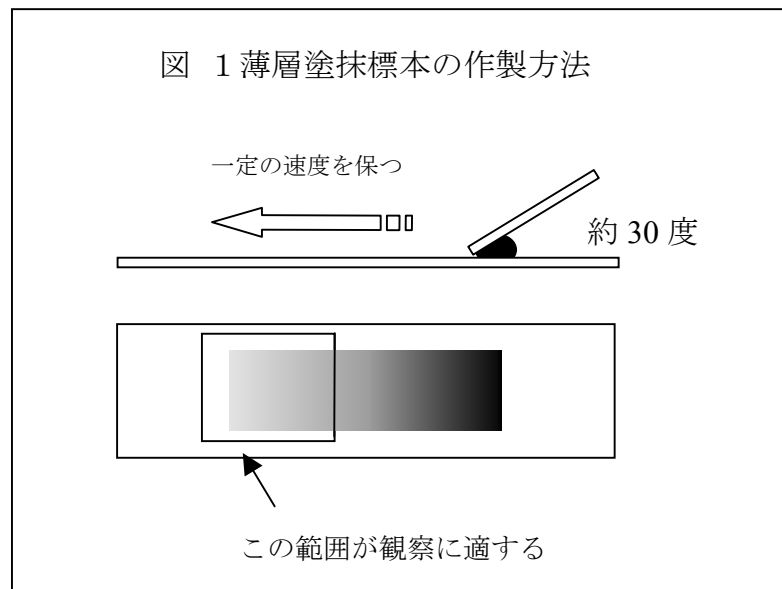
- 1) 採血後は速やかに塗抹標本を作製する必要がある。採血後に血液を

放置するとマラリア原虫が変形し（球形化）、形態的特徴を失う。

- 2) 静脈血を採取する際の血液凝固阻止剤は EDTA を選択することが強く望まれる。ヘパリン系の血液凝固阻止剤用いるとギムザの染色性に影響（メタクロマジー）を与え、良好な染色結果が期待できない。

薄層塗抹標本の作製手順

- 1) 清浄なスライドグラスに患者血液を 1 滴取り、片縁の平らなカバーグラス（血液算定板に用いる厚手のカバーグラスがよい）を用いて、図 1 の要領で血球が重ならず一層となるように塗抹する。標本の厚みはカバーグラスの角度で調整、スライドグラスとの俯角が大きくなると厚く、角度が小さくなるほど薄い塗抹標本となる。
- 2) 速やかに、乾燥させる。
- 3) メタノールで 2 - 5 分間固定する。固定過多は染色性を損なうので注意する。（固定後は、乾燥状態を保つことで長期間の室温保存に耐える。）



参考

血液厚層塗抹標本の作製手順

もっぱら、集団検診などで感染の有無を調査する際に用いられる方法である。標本作製の行程で溶血処理がほどこされることから、原虫の形態観察ができず、熟練者以外では虫種の鑑別・同定には不向きである。

1. 清浄なスライドグラスに患者血液を1滴取り、直径1 - 1.5cmの大きさに円状に広げ、室温で乾燥させる。
2. 37℃の恒温器に30分程度放置し、十分乾燥させる。乾燥が不十分であると、後の行程で標本が剥離する恐れがある。
3. 蒸留水にスライドグラスごと浸し、塗抹血液が白雲状になるまで溶血させる。
4. ふたたび乾燥させ、メタノールで固定する。固定標本は長期保存が可能である。

血液塗抹標本の染色

マラリア原虫の鑑別診断は古典的な方法であるが、ギムザ染色が基本である。本方法で虫種の全鑑別、感染密度の測定、形態学的な変化などの観察が可能である。希薄な感染の場合やスクリーニングにはアクリジンオレンジ染色が有効である。これら2法の有効な組み合わせを用いることで、迅速、確実な検査が可能となる。

ギムザ染色法

染色液の調製

染色液は用時調製とする。10mM リン酸緩衝液 (pH7.2 - 7.4) 1ml に対して市販のギムザ染色原液を1 - 1.5 滴の割合で滴下・混合する。色素の析出を防ぐ目的で、色素液の希釈に際しては強い攪拌を避ける。最も簡便な方法としては水道水のpHを測定し、pH7.2 付近で安定しているようであれば水道水をそのまま用いてもよい。一般に血液像の観察では pH6.4 程度のわずかに酸性の緩衝液を用いるが、原虫の形態観察には pH7.2 - 7.4 に調整した染色液が適当である。なお、本染色液では赤血球が青色を帯びた色調となる。

ギムザ染色の代わりにライト染色を用いてもよい。なお、ライト-ギムザ染色、あるいはメイ・グリュンワルド-ギムザ染色などの二重染色法では細胞質の染色性が向上し、マラリア原虫の顆粒観察に適しているとされる。ライトやメイ・グ

リュンワルドの染色液はメタノール溶液であることから、固定を兼ねている。これらの染色法については関係の専門書等を参照のこと。余談であるが、ギムザ染色はマラリア原虫の染色用に改良された染色法で、その後に、血液像の観察に広く応用されたという経緯がある。

染色の手順

- 1) メタノール固定薄層塗抹標本を水平に保ち、色素液をかける。多数の標本を同時に染色する場合には染色瓶を用いてもよい。
- 2) 染色時間は色素の希釈度によるが、10 - 30 分間とする。染色時間は45 分が最長で、染色時間をそれ以上延長しても色調は変わらない。特に濃染したい場合には、染色液を新調して染め直す。
- 3) 緩衝液で洗浄する。染色液の表面には不溶性の色素の浮きかす（色素の酸化被膜）が形成されているので、標本に付着しないように洗い流す。
- 4) 染色濃度は緩衝液による洗浄時間で調整する。
- 5) 洗浄後は速やかに水を切り、冷風で乾燥する。
- 6) 繰り返し観察をする場合には、バルサム等の封入剤で封じ、カバーガラスをかけて永久標本作製するとよい。
- 7) 顕微鏡観察は一般に油浸の100 倍対物レンズを使用する。マラリア原虫は細胞質が淡青紫色、核が赤紫色に染まる。形態的特徴（下記参照）から4 種類の人マラリア原虫の鑑別が可能である。

ギムザ染色標本による原虫の鑑別

マラリア原虫の鑑別にはいくつかの観察上重要なポイントがあるので以下に概要を示す。詳細は寄生虫関連の教科書等の写真等を参照することを薦める。なお、<http://www.nih.go.jp/niid/para/atlas/japanese/>に写真を公開しているので参照してほしい。

寄生赤血球が非寄生赤血球に比べて膨大するか否かで2グループに大別する。

①寄生赤血球が膨大する・・・三日熱マラリア原虫、または卵形マラリア原虫

①-1 三日熱マラリア原虫では、感染赤血球が非感染赤血球より膨大する。輪状体、栄養体（別名アメーバ様虫体と呼ばれ、多様な形態をとる）、シズント（分裂体）のほか、生殖母体を含め全発育環が出現する。シェフナー 斑点を認める。

①-2 卵形マラリア原虫でも感染赤血球が非感染赤血球より膨大する。後期栄養体が寄生する感染赤血球が卵円形で一端が鋸歯状を呈することが多い。赤血球内容積に占める原虫の割合が少ない印象である。シェフナー 斑点を顕著に認める。

三日熱マラリア原虫と卵形マラリア原虫との鑑別は必ずしも容易ではない。以下、卵形マラリア原虫からみた鑑別点は

- ◇ 核が大きい
- ◇ 栄養体の形態が比較的まとまっておりアメーバ様の変化に乏しい
- ◇ シズゴニーによって形成されるメロゾイトの数は 8-10 個である（赤外型虫体からの再発（relapse）例ではメロゾイト数が倍加することがある）

②寄生赤血球に変化がない・・・熱帯熱マラリア原虫、または四日熱マラリア原虫

②-1 熱帯熱マラリア原虫は、発病直後には輪状体のみが観察され、感染赤血球は非感染赤血球と同大もしくはやや小さく、マウレル斑点を認める。やがてバナナ形の生殖母体が出現する。成熟栄養体やシズントが検出されるのは稀で、重症例である。

②-2 四日熱マラリア原虫では、感染赤血球は非感染赤血球と同大もしくはやや小さく、いずれの斑点も欠くが、ギムザ染色が長引くと斑点が現れることがある。特徴的には栄養体が帯状を呈する。シズントの核数は8から10個で、典型的な菊花様の配列（daisy head form）を呈する。

なお、上述の特徴的な顕微鏡像がすべて単一の標本に認められるとは限らない。また、シェフナー斑点やマウレル斑点は染色の加減で観察できないことがある。

アクリジンオレンジ染色

染色液の調整

アクリジンオレンジ	5.0 mg
グリセリン	2.5 g
10mM リン酸緩衝液 (pH7.0-7.5)	47.5 ml

溶解後、遮光して冷暗所に保存する。

緩衝液の種類や塩濃度には特にこだわらないが、一般に上記の緩衝液を用いる。

染色の手順と染色像

- 1) 薄層塗抹標本にアクリジンオレンジ染色液を適量滴下して、カバーグラスをかけて封じる。
- 2) 蛍光顕微鏡 B 励起 (450-490nm) / 広域帯ブルーフィルター (520nm 以下カット) の組み合わせで観察を行う。総合倍率で 400-1,000 倍が適当。
- 3) 赤血球は染まらないが、細胞外のアクリジンオレンジ液が弱い黄緑色の蛍光を発する赤血球の輪郭が観察できる。マラリア原虫の細胞質は鮮やかな橙色、核は黄色の蛍光を発する。全体像として、暗黄緑色の中に橙色の蛍光を発する、マラリア原虫の検出は容易である。標本中の白血球の核も染色されるので、原虫との鑑別は必要である。

2. 抗原検出

ほとんどのものが研究段階にあり、わが国で検査試薬の承認を得ているものは無い。国外では患者の血液中のマラリア抗原を検出する、OptiMAL[®] (米国 FLOW 社)、NOW[®] ICT Malaria P.f./P.v. (米国 Binax 社) などの検査用試薬が市販されている。

OptiMAL[®] (米国 FLOW 社) : *Plasmodium falciparum* (熱帯熱マラリア原虫) および 4 種のマラリア原虫に共通な乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase) を標的とした検出キットで、熱帯熱マラリア原虫と他の 3 種のマラリア原虫との鑑

別ができる。

方法は、患者の血液を指定の緩衝液に添加・混和後、ろ紙短冊に染み込ませて発色により抗原の有無を確認するものである。ろ紙短冊にはあらかじめ規定の位置に2種類の特異抗体が固相化されており、発色の位置により熱帯熱マラリアとその他のマラリア原虫との鑑別が可能となる。所要時間はおよそ15-20分程度とされている。

NOW[®] ICT Malaria P.f./P.v. (米国 Binax 社)：反応の原理は基本的に上記 OptiMAL[®] と同じであるが、用いられている抗体が異なる。本試薬キットでは、熱帯熱マラリアの HRP-2 (histidine-rich protein 2) に対する特異抗体とマラリアに対する抗体が用いられている。本キットの検査対象は熱帯熱マラリアと三日熱マラリアの2種類のマラリア原虫となっている。

3. DNA 診断法

PCR 法: 4種類の人マラリア原虫に関して、それぞれの遺伝子の特異配列を標的とした PCR 法が提案されている。市販の PCR キットも出ているが、いずれも検査用試薬としては未承認である。現行では、必ずしも迅速、簡便な検査法にまで醸成されていないようである。わが国で開発された DNA 診断法として、マイクロタイタープレートハイブリダイゼーション (MPH) 法がある。試験段階であるが、MPH 法は、上記4種のマラリア原虫、および卵形マラリア原虫遺伝子変異株 (18S rRNA 遺伝子の一部変異型) の 18S rRNA 遺伝子の塩基配列を標的 DNA としている。原理は、マラリア原虫に共通の DNA 塩基配列部分をプライマーとして設定し、片方のプライマーの 5'-末をビオチン標識しておき PCR 反応を行う。得られた PCR 産物を、マラリア原虫種ごとに特有のプローブを固相化してあるマイクロタイターウェル上にハイブリダイズさせる。次いで、アルカリフォスファターゼ標識したストレプトアビジンを PCR 産物に結合させて発色反応により検出する方法である。本法による結果の判定までに要する時間は約6時間であり、検出限界は原虫 13 個/10 μ l (全血) であると報告されている。1991年から2001年1月におよぶ東大医科学研究所を中心とした調

査研究では、輸入マラリア症例の疑いおよび確定患者血液 312 検体を用いて MPH 法を実施して、検出率、特異性共に良好な結果を得ている（表 1）。

表 1 マイクロタイタープレートハイブリダイゼーション法を応用した輸入マラリア症例の診断結果（平成 3 年～平成 13 年 1 月まで）

顕微鏡診断	症例数	DNA 診断陽性数					DNA 診断陰性数
		<i>P.f.</i>	<i>P.v.</i>	<i>P.o.</i>	<i>P.o.-v</i>	<i>P.m.</i>	
熱帯熱マラリア	105	105	0	0	0	0	0
三日熱マラリア	80	0	79	0	0	0	1 注1)
卵形マラリア	19	0	0	14	5	0	0
四日熱マラリア	2	0	0	0	0	2	0
原虫種不明	3	0	1	2	0	0	0
非マラリア	87	0	1 注2)	0	0	0	86
未記入	16	4	0	0	0	0	12

P.f.: 熱帯熱マラリア原虫、*P.v.*:三日熱マラリア原虫、*P.m.*:四日熱マラリア原虫、*P.o.*:卵形マラリア原虫、*P.o.-v*:卵形マラリア原虫 variant（形態学的には卵形マラリア原虫と区別できないが、18S rRNA 遺伝子が一部変異しているもの）、

注1) 検体赤血球中の原虫の形態が、ガメトサイトのみ（104 個／ μ l）であった症例。

注2) 発症前に受診した際に顕微鏡法では原虫を検出できなかった症例で、4 日後に発症し、顕微鏡でマラリア陽転。

（IASR Vol.22: 27-27 より転載； <http://idsc.nih.go.jp/iasr/22/252/dj2521.html>）

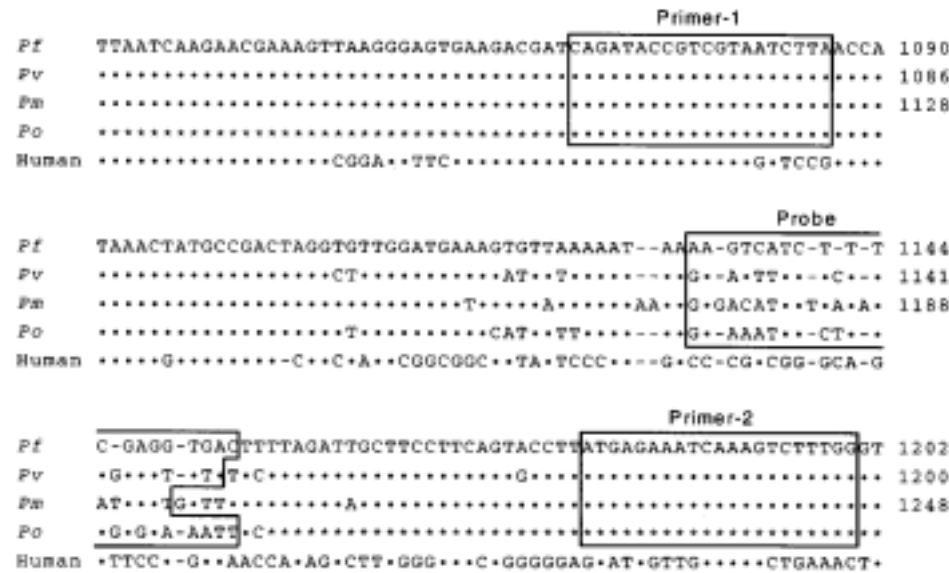


図 2 マラリア原虫の 18S rRNA 遺伝子部分塩基配列。

四角で囲った部分がプライマーおよび分類用プローブに用いた遺伝子領域である。図中の「・・・」は同一の配列を意味し、「★ ★ ★」は未同定の配列を意味する。Pf: 熱帯熱マラリア原虫； Pv: 三日熱マラリア原虫； Pm: 四日熱マラリア原虫； Po: 卵形マラリア原虫。

（J. Clin Microbiol. 33:2342-2346,1995 より転載）

4. 薬剤耐性試験

1960年代にクロロキン耐性熱帯熱マラリア原虫が報告されて以来、薬剤耐性や低感受性原虫は急速にその分布域を拡大している。従って、熱帯熱マラリアに関しては早期診断に加え、適切な薬剤の選定が望まれる。また、薬剤耐性マラリア原虫の疫学情報を得るためにも薬剤耐性試験の実施に期待するところがある。薬剤耐性試験の依頼検査は下記の機関で受け付けている。

- ・ 国立国際医療センター研究所 適正技術開発移転研究部
電話 03-3202-7181（内線 2877）
- ・ 群馬大学医学部寄生虫学教室 電話 027-220-8022
- ・ 都立衛生研究所 微生物部寄生虫研究室 電話 03-3363-3231（内線 3218）

これまで熱帯熱マラリア原虫の *in vitro* 薬剤耐性試験として WHO 推奨のマイクロテスト法¹⁾ と Le Bras らによるセミマイクロテスト法²⁾ が知られている。WHO のマイクロテストは WHO/WPRO, United Nations Avenue, P.O. Box 2932, 1000 Manila, Philippines E-mail: postmaster@who.org.ph から入手できる。この使用に関するマニュアルも出されている³⁾。あらかじめ下記の表に示す抗マラリア剤の用量を塗布した 96 穴平底培養プレートが用意されており、この中で規定に沿った方法で患者検体（感染赤血球）を培養することで薬剤耐性を検証する方法である。WHO の目指すところはマラリア流行地でのフィールドテストに対応することで、そのための簡易なインキュベーターも準備されているようである。

表 2 WHO *in vitro* マイクロプレート キット 薬剤濃度

Well	クロロキン	アモディアキン	キニーネ	メフロキン	
A	0	0	0	0	$\times 10^{-6}$ mol/l/blood
B	0.2	0.05	0.8	0.1	$\times 10^{-6}$ mol/l/blood
C	0.4	0.1	1.6	0.2	$\times 10^{-6}$ mol/l/blood
D	0.8	0.2	3.2	0.4	$\times 10^{-6}$ mol/l/blood
E	1.14	0.4	6.4	0.8	$\times 10^{-6}$ mol/l/blood
F	1.6	0.8	12.8	1.14	$\times 10^{-6}$ mol/l/blood
G	3.2	1.6	25.6	1.6	$\times 10^{-6}$ mol/l/blood
H	6.4	3.2	51.2	3.2	$\times 10^{-6}$ mol/l/blood

*SP = サルファドキシシン/ピリメサミン (80:1) 濃度はサルファドキシシンとしての濃度

(Drug sensitivity tests in malaria parasites⁴⁾ より転載)

わが国では群馬大学医学部寄生虫学教室からマイクロテスト法の改変法が考案され、一部臨床試験に用いられている。この方法では 24 穴プレートを用い、N₂ 90%; CO₂ 5%; O₂ 5% のガス条件を設定したマルチガスインキュベーターで培養を行い、検査精度を高めている。また、本方法では患者血液を 5ml 程度と多く使用することで、発育を確認するための血液標本を複数枚作製できるようにしてある。参考までに、以下に手技を記載した。

実験手技

1) 用意する試薬等

- 抗凝固剤入りの患者血液 約 5mL

血液検体は抗凝固剤として EDTA を用いた全血とする。採血後は検査機関に速やかに搬入する。保存及び検体搬入時は冷蔵とする。経験的には患者の parasitemia が極端に低い場合、マラリア原虫の発育に時間がかかる傾向が見られるようである。実験の成否は採血から試験開始までの時間に影響されるので、準備等、速やかに行う努力が必要となる。

- RPMI1640(-)

RPMI-1640 粉末	10.4 g
NaHCO ₃	2.0 g
HEPES	5.95 g
精製水	950 mL
1N NaOH で pH7.4 に調整	

全量	1,000 mL
----	----------

メンブランフィルターでろ過滅菌して使用。

- RPMI1640(+)

RPMI1640(-) にヒト血清が 10%になるように加え、ゲンタマイシンを最終濃度が 25µg/ml になるように添加したもの

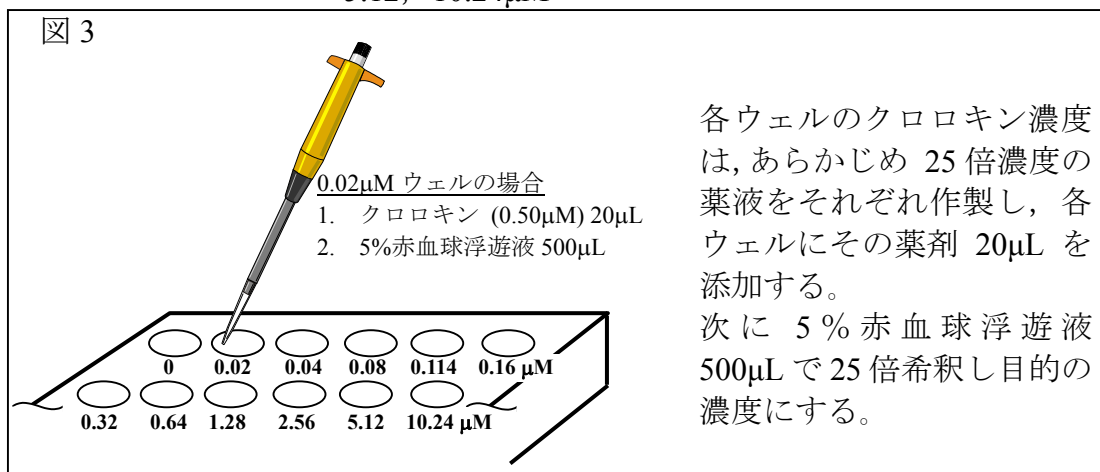
- クロロキン等の薬剤
- 24 穴平底培養プレート（1 薬剤に対して 1 プレートを使用）

2) 操作手順

最も代表的なクロロキンに関する薬剤耐性試験の手順について以下に示す。

1. 24 穴平底培養プレートにクロロキンの最終濃度が以下のようにになるように加える (図 3)

クロロキン濃度 : 0, 0.02, 0.04, 0.08, 0.114, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28, 2.56, 5.12, 10.24 μ M



2. 患者血液を遠沈管に移し、400 \times g (約 1,500rpm) で 5 分間遠心
3. 上澄みを捨て、RPMI (-) を加えて血球とよく混和し、400 \times g (約 1,500rpm) で 5 分間遠心
4. 3 の操作を繰り返し、遠心終了後、上澄みを捨てる
5. 5%赤血球浮遊液になるように RPMI (+) を加える
6. 各ウェルに 5%赤血球浮遊液を添加し、よく混和する
この際、対照として 4 ~ 5 のウェルに 5%赤血球浮遊液を入れておく
7. 培養プレートを窒素 90 %、二酸化炭素 5%、酸素 5%のガス条件に調整した 37 $^{\circ}$ C のマルチガスインキュベーター中で 24~40 時間^{*1}培養する
8. 培養開始 24 時間後から対照として培養しているウェルの上清を捨て、薄層血液塗抹標本を作成し、ギムザ染色法で染色する
9. 染色標本を顕微鏡下で観察し、赤血球内の熱帯熱マラリア原虫が分裂体にまで発育していたら、各クロロキン濃度についても 8 と同様にギムザ染色標本を作成する
10. 染色標本においてクロロキン濃度 0 μ M の熱帯熱マラリア原虫分裂体が 50 個体^{*2}になる赤血球数を計数し、その赤血球数における各クロロキン濃度での熱帯熱マラリア原虫の分裂体数を計数する

11. 横軸にクロロキン濃度、縦軸に分裂体の個数を取り、50%及び100%マラリア原虫発育阻害クロロキン濃度 (IC₅₀ 値、IC₁₀₀ 値) を求める
(IC₅₀ 値が 0.114μM 以上かつ IC₁₀₀ 値が 0.16μM 以上であった場合はクロロキン耐性熱帯熱マラリア原虫と判断する*³, *⁴)

- *1. 熱帯熱マラリア原虫の分裂体への発育時間は、採血から薬剤耐性試験開始までの時間、マラリア原虫の赤血球内寄生率などに影響される⁴⁾。
- *2. 赤血球内寄生率がきわめて低い血液検体では、クロロキン濃度 0μM における分裂が 20 個体程度を基準とする場合もあり得る。
- *3. WHO では熱帯熱マラリア原虫の IC₁₀₀ 値がクロロキン濃度 0.08μM 以下であれば感受性、0.16μM 以上であれば耐性とするとしている。
- *4. クロロキン以外の薬剤に関する WHO の規定はなく、そのため他の薬剤に関してはこれまでの報告事例 (メフロキンの場合 IC₅₀ 値 ≥ 40nM で耐性) 及びクロロキン感受性株である FCR-3 株、SGE-1 株 (共にガンビア由来) 等の IC₅₀ 値と IC₁₀₀ 値を比較し薬剤耐性の度合いを判断する。

(4) 引用文献

- 1) 綿矢有佑、マラリアの DNA 診断法、臨床 DNA 診断法(古庄敏行・他監)、金原出版、1994, 1058-1062.
- 2) 綿矢有佑、木村幹男、マラリアの DNA 診断、医学のあゆみ、191(1), 67-73, 1999.
- 3) Rieckmann KH, Sax LJ, Campbell GH, Mrema JE : Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* -An in vitro microtechnique, *Lancet*, **7**, 22-23, 1978.
- 4) Le Bras J, Deloron P : In vitro study of drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* - Evaluation of a new semi-micro test, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **32**(3), 447-451, 1983.
- 5) *In vitro* Test for susceptibility of *P. falciparum* to chloroquine and mefloquine. Annex 6 (Bruce-Chwatt LJ, Black RH, Canfield CJ, Clyde DF, Peters W, Wernsdorfer WH. Eds) in Chemotherapy of Malaria. Revised second edition. World Health Organization monograph series no. 27, Geneva: World Health Organization. 1986.
- 6) Wernsdorfer WH and Payne D : Drug sensitivity tests in malaria parasites, in

Malaria Vol. 2 – Principles and Practice of Malariology (Werndorfer WH and McGregor M eds.) pp. 1765-1795, 1988. (Churchill Livingstone, London)

- 7) Inaba H, Ohmae H, Kano S, Faarado L, Boaz L, Leafasia J, Suzuki M : Variation of incubation time in an *in vitro* drug susceptibility test of *Plasmodium falciparum* isolates studied in the Solomon Islands, *Parasitology International*, **50**, 9-13, 2001.

執 筆 者 一 覧

遠藤 卓郎 : 国立感染症研究所寄生動物部*
朝日 博子 : 国立感染症研究所寄生動物部
大友 良光 : 青森県環境保健センター微生物部
東京都健康安全研究センター
堺市衛生研究所
富山県衛生研究所細菌部

*〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1
TEL:03-5285-1111 FAX:03-5285-1173

ラ イ ム 病
(ライムボレリア症)

ライム病（ライムボレリア症）

目 次

I. 概説

- 疾患の定義
- 病原体診断
- 臨床的特徴
- 病原体
- ライム病ボレリアと他の病原体の共感染
- 治療・予防
- 媒介マダニ

II. ボレリアの分離培養法

- 作業上の一般的注意
- ボレリアの培地製法（BSK-II 培地, BSK-H 培地）
- 生体試料からの分離培養
- 病原体の同定法
- 病原体輸送法
- 病原体保存方法

III. 実験室診断（血清診断）

- 判定基準
- WB 法
- EIA(ELISA)法
- 血清、髄液、穿刺液の輸送法

IV. 参考文献

V. 謝辞

VI. 検査に関する問い合わせ先

VII. 執筆者

I. 概説

【疾患の定義】

マダニ（*Ixodes* 属）刺咬により媒介されるスピロヘータ（ライム病ボレリア）感染症。北米、欧州、ロシア、本邦を含む極東地域で広くみられ、患者は皮膚症状、神経症状、心臓炎など、多様な症状を示す。本邦では国内感染例、海外感染例ともに見られる。

【病原体診断】

ライム病の診断には、欧米では、流行地での媒介マダニとの接触機会の既往などの疫学的背景、遊走性紅斑やその他ライム病に相応する臨床症状、更に米国疾病予防センター (CDC) が示した血清学的診断基準から総合的に判断することが推奨されている。

〈報告のための基準〉ライム病は感染症法での第 4 類感染症に含まれ、全数報告が義務づけられている。診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ以下のいずれかの方法によって病原体診断や血清学的診断がなされたものが報告対象である。

病原体の検出（例：生体試料からの分離培養など）

病原体に対する抗体の検出

〈病原体の検出〉病原体ボレリアの分離培養には BSK-II 培地若くは BSK-H 培地が用いられている。紅斑部からの皮膚生検ではボレリアが分離可能である。欧米では脳炎患者の髄液からも稀に分離されている。血液からの分離は難しいとされているが、これは菌血症が一過性でありしかも血中の菌濃度が極めて低いことが原因と考えられている。

〈血清診断〉本邦では輸入例、国内例ともにみられるため、それぞれに適した血清診断抗原を選択する必要がある。北米からの輸入例が疑われる場合には、血清診断はコマーシャルラボ経由で米国の臨床検査ラボに依頼することもできる。

【臨床的特徴】

全身性慢性感染を引き起こす。臨床症状は感染の進行過程で 3 stage に分類される。

感染初期 (stage I) マダニ刺咬部を中心とする限局性感染期間。ライム病に特徴的な遊走性紅斑 (Erythema migrans: EM) を呈することが多い。随伴症状として、筋肉痛、関節痛、頭痛、発熱、悪寒、倦怠感などのインフルエンザ様症状を伴うこともある。EM の出現期間は数日から数週間といわれ、形状は環状紅斑又は均一性紅斑が殆どである。その長径は 5cm 以上に及ぶことが多く、まれに数 10cm にまで達することもある。

播種期 (stage II) 体内循環を介して病原体が全身性に拡散する。これにともない、皮膚症状、神経症状、心疾患、眼症状、関節炎、筋肉炎など多彩な症状が見られる。

皮膚症状：EM がマダニ刺咬部以外の離れた皮膚領域で見られる場合もある（二次性 EM）。また良性リンパ球腫 (ear lobe, nipple, scrotum 等) の報告例もある。

神経症状：神経根炎 (Garin-Boujadoux-Bannwarth 症候群)、髄膜炎、顔面神経麻痺 (7 th nerve palsy) 等。

心疾患：心筋心膜炎、及びこれに起因すると考えられる急性の高度（2度或いは3度）房室伝導障害。

眼症状：虹彩炎、角膜炎。

慢性期（stage III） 感染から数ヵ月ないし数年を経て、慢性感染に移行する。患者は播種期の症状に加えて、重度の皮膚症状、関節炎などを示すといわれる。本邦では、慢性期に移行したとみられる症例は現在のところ報告されていない。

症状としては、慢性萎縮性肢端皮膚炎（Acrodermatitis chronica atrophicans）、慢性関節炎、慢性脳脊髄炎などがあげられる。

【病原体】

ライム病病原体であるボレリアは数種類が確認されている。北米では主に *Borrelia burgdorferi* 欧州では *B.burgdorferi* に加えて、*B.garinii*、*B.afzelii* が主な病原体となっている。本邦では *B.garinii*、*B.afzelii* が主な病原体となっていると考えられている。

【ライム病ボレリアと他の病原体の共感染】

原虫（*Babesia* 属）、*Borrelia* 属以外の細菌としてヒト顆粒球エーリキア HGE（現在の *Anaplasma phagocytophila* など）やウイルス（ダニ脳炎ウイルスなど）感染が起こる可能性がある。いずれも *Ixodes* 属ダニ刺咬に起因する。

【治療・予防】

ライム病ボレリアには抗生剤による治療が有効である。マダニ刺咬後の遊走性紅斑にはドキシサイクリン、髄膜炎などの神経症状にはセフトリアキソンが第一選択薬として用いられている。薬剤耐性は今のところ報告されていない。マダニ刺咬による HGE の共感染が疑われる場合にはドキシサイクリン若しくはテトラサイクリンの適用が有効とされている。

ライム病の予防には野山でマダニの刺咬を受けないことがもっとも重要である。マダニの活動期（主に春から初夏、及び秋）に野山へ出かけるときには、1）むやみに藪などに分け入らないこと、2）マダニの衣服への付着が確認できる白っぽい服装をすること、3）衣服の裾は靴下の中にいれ、虫よけをし、マダニを体に近寄らせないことが、肝要であろう。また万一刺咬を受けた場合には、自分でマダニを引き剥がさず病院の皮膚科で切除してもらうことでマダニ口器の残留による感染を予防できる。

【媒介マダニ】

ライム病ボレリアは、野山に生息するマダニ（*Ixodes tick*）に咬着されることによって媒介、伝播される。北米においては主に *I.scapularis*、欧州においては主に *I.ricinus* がライム病ボレリアを伝播するとされている。本邦においてはシュルツェ・マダニ（*I.persulcatus*）の刺咬後、ライム病を発症するケースが殆どである。これらマダニは本州中部以北の山間部に棲息し、北海道では平地でもよく見られる（一般家庭内のダニで感染することはないとされている）。

II. ボレリアの分離培養法

【作業上の一般的注意】

P2 実験施設。その他特記なし。

【ボレリアの培地製法（BSK-II 培地, BSK-H 培地）】

通常は BSK-II 培地を使用する。*B.burgdorferi* 培養時は BSK-H で代用できる。以下 BSK-II 培地作製法を記す。

1) A 液、B 液を各々調製する。B 液はオートクレーブにより滅菌できる。

A 液	特記
蒸留水	up to 500 ml Milli-Q レベル
1N NaOH	10 ml 用時調製
HEPES	3 g
Sodium Dihydrogen Citrate	0.35 g
D-(+)-Glucose	2.5 g
N-Acetylglucosamine	0.2 g
Sodium Pyruvate	0.4 g
Sodium Bicarbonate	1.1 g 溶液後の分解早い*4
CMRL 1066 with glutamine (Sigma)	4.9 g 10XCMRL 溶液は製造中止
TC Yeastolate	1 g
BSA, Fraction V	25 g 生化学工業(MILES)*1

以上の試薬を記載順に溶解する。BSA が溶解しにくいのでスターラーで攪拌しながら溶解する。1M NaOH で pH 7.5 に調製。上記量で大まかに pH7.5 程度になる。

B 液	特記
Neopeptone	2.5 g
Gelatin	7 g
蒸留水	100 ml Milli-Q

オートクレーブ滅菌。滅菌後、ボトルの冷却をまって、使い捨て吸引ろ過装置（0.22 μ m, 500 ml ないし 1000ml 用、CORNING 等）を装着し、必ず付属のプレフィルターを乗せて、A 液をろ過滅菌する*2。

2) 滅菌済ウサギ血清 (Gibco) *1 を 40 ml (final 約 6%) 添加し、よく混合する。培養液総量は約 640 ml となる。なお、ウサギ血清は 56℃で 30 分間、前処理（非働化）しておく。

3) すべて混和後、37℃で Overnight 加温し、無菌を確認すること*3。BSK-H 培地は Gelatin を加えず、オートクレーブ滅菌を行わない点で BSK-II 培地と異なる。

4) ヒト皮膚組織からの分離培養には、下記抗生剤を加えることを推奨する。添加量は

1XBSK-II 培地 640ml 当たりの量である。純培養時には下記抗生剤添加は特に必要ない。

32 mg/ml Rifampicin (20% DMSO)	1 ml/640ml
12.8 mg/ml Fosfomycin	1 ml/640ml
0.32 mg/ml Amphotericin B	5 ml/640ml

*1:ウサギ血清（出来れば Young rabbit serum が良い）と BSA のロットがボレリア増殖の良否を左右するようである。あくまでも経験上の話ではあるが、Gibco のウサギ血清と Miles の BSA ははずれが少ない傾向がある。

*2:感染研では、A 液を濾紙、ガラスフィルター、0.65 μ m プレフィルターであらかじめプレ濾過後 Sartrius, Nalgen, Corning, IWAKI 等の 0.22 μ m 滅菌フィルター(PES)で濾過している。

*3:培地の Quality を確認するには、*Borrelia japonica*、或いは *Borrelia miyamotoi* を接種し増菌が見られればよい。培地による増菌傾向は以下のとおりである。生化学的試験による Quality check は出来ない。

B.burgdorferi \div *B.garinii* \div *B.afzelii* \gg *B.japonica* \geq *B.miyamotoi*

（大抵の場合、*B.burgdorferi* は生育できる）

*4:保存期間は-20℃で 1 ヶ月程度とされている。これは Sodium Bicarbonate が培地中で分解されてしまうためであると考えられる。Sodium Bicarbonate を用事調製・混和することで保存期間は延長できるかもしれない。

【生体試料からの分離培養】

分離に用いる生体試料には、皮膚組織、血液、髄液などが挙げられる。

1) 皮膚からのボレリア分離方法

生検部位の選択は遊走性紅斑においてはマダニ刺咬部（中心部）でも紅斑辺縁部でも培養成功率は変わらない。消毒は通常 10%イソジン液及び 10% ハイポアルコールで行い、局所麻酔は 0.5-1 %キシロカインで浸潤麻酔を行う。その際、出血を防ぐ意味で 10 万倍エピネフリン添加を使用してもよい。皮膚の切除は鋭利なメス(15 番メス)で、長軸約 0.6-1 cm、短軸 0.3-0.5 cm の紡錘形に切開線を加え、表皮、真皮、皮下脂肪組織（少量でよい）の 3 要素を含む様に切除する。ボレリアの培養は、切除した組織の半量で充分可能であり、半量は病理組織検査に使用する。切除後は 5-0 ナイロン糸等で一次的に縫合すればよい。皮膚切除は 3-8 mm のトレパンによるパンチ生検でも充分であり、この後の縫合は一般に必要な。ただし部位によって創の開きが大きいときは、5-0 ナイロンで 1 針或いは 2 針縫合しても良い。切除した組織はすぐ培養ができない場合（輸送が必要な場合など）は、滅菌シャーレ内に、生食で浸した滅菌ガーゼで組織を包んでたたんでおく。これらは無菌的に行い、4℃保存すれば 2-3 日間放置してもボレリア培養は成功することが多い。

2) 血液・髄液からの分離培養

血液を材料とした場合、通常ライム病ボレリアは殆ど分離できない。これは血中に出現する菌数がきわめて少ないためと考えられている。髄膜炎（稀に脳炎）患者髄液からは病

原体が分離される場合がある。採取された新鮮体液を培地量の 10 分の 1 程度加え、33-37℃で微好気若くは好氣的に培養する。また、培地接種翌日に継代することで培養率が上昇する場合がある。病原体の確認は暗視野顕微鏡を用いて行う。鏡検で病原体が観察されるまで通常 1-8 週間必要である (8-12h/generation)。

暗視野顕微鏡観察により培養液中に運動性のある螺旋状細菌が観察できた場合に、病原体の同定を行う (次項参照)。非運動性螺旋状菌の増殖は汚染による可能性が高い。汚染菌除去には動物接種法 (マウス接種法 : C3H/HeN などの純系、又は ddY 等の非近交系マウスに腹腔内若くは皮下接種後、14 日後に耳介、ボウコウなどから分離できる。)、若くはフィルター法 (汚染培地を 0.45 μ m 若くは 0.22 μ m 滅菌フィルターを通過させることで、多くの場合、汚染菌を除去できる。ボレリアもフィルターにトラップされるので、ある程度増菌させた後に行う)。

【病原体の同定法】

暗視野顕微鏡観察により培養液中に運動性のある螺旋状細菌が観察できた場合に、病原体の同定を進める。暗視野顕微鏡による形態観察では、他のスピロヘータ細菌との鑑別には熟練を要する。したがって、この方法は通常の検査室での同定法としては適していない。

病原体の同定には、ライム病ボレリアに特異的な鞭毛遺伝子或いは 16S rRNA 遺伝子の PCR や塩基配列決定、5S-23S rRNA intergenic spacer の PCR などの遺伝学的手法で代用する(図 1)。以下一例として、鞭毛 PCR による病原体の同定作業を示す。

1) ボレリア DNA 検出及び病原体の同定作業

1. 使用 PCR プライマーの一覧を示す。

• BflaPAD 26mer (376→401)

5'-GAT CA(G/A) GC(T/A) CAA (C/T)AT AAC CA(A/T) ATG CA-3'

• BflaPDU 24mer (811←835)

5'-AGA TTC AAG TCT GTT TTG GAA AGC-3'

nest-PCR・sequencing 用プライマー

• BflaPBU 23mer (442→464)

5'-GCT GAA GAG CTT GGA ATG CAA CC-3'

• BflaPCR 24mer (770←793)

5'-TGA TCA GTT ATC ATT CTA ATA GCA-3'

() 内はこれら塩基の mix であることを示す。

2. 分離・増菌させたボレリアを遠心集菌後、0.01% tritonX-100 溶液に懸濁し、100℃10 分加温する。

3. 上記懸濁液(=template)を用い、以下の反応組成液を混和、PCR を行う。

MilliQ 39 μ l

10EX-Taq buffer 5 μ l

2.5mM ea. dNTP mixture	4 μ l
20 μ M BflaPAD	0.5 μ l
20 μ M BflaPDU	0.5 μ l
template	0.5 μ l
EX-Taq (5U/ μ l)	0.5 μ l

本組成では PCR 酵素は宝酒造の EX-Taq を用いている。

4. PCR cycle は以下の通りである。

94°C10sec, 48°C60sec, 72°C90sec (25 cycles) + 72°C10min(post elongation)

5. 反応終了後、PCR 産物を精製する。我々は精製に Roche 社の PCR product purification kit を用いている。

6. 上記プライマーを用い、増幅産物の塩基配列を決定し病原体の同定を行う。この方法では回帰熱ボレリアに加えライム病ボレリアも同定可能である。

このほか、参考事項として血清学・免疫学的同定について述べる。血清学・免疫学的同定には、ボレリア属特異的な鞭毛抗原に対する特異的単クローン抗体 H9724 (回帰熱ボレリアにも反応する)、及びライム病ボレリア表層蛋白質 A(OspA)特異的単クローン抗体 H5332 を使用したウエスタンブロットが行われる。しかし、アメリカ等とは異なり本邦や欧米で分離されているボレリアは OspA が多様性に富むため、H5332 との反応が見られない場合が存在するので注意が必要である。H9724 の反応抗原であるフラジェリン抗原は、ライム病ボレリアの場合、約 40kDa であり、回帰熱ボレリアの 38kDa より若干大きいことが知られている。この他に抗ボレリア抗体が 20 数種類市販されている。これら製品の感度・特異性は感染研では把握していない。

【病原体輸送法】

分離材料としての生体試料、或いは病原体を BSK-II 培地にいれ室温で送付。輸送方法は他の病原体輸送方法に準拠。

【病原体保存方法】

10-20% グリセロール添加後、-80°C で保存。

III. 実験室診断（血清診断）

【判定基準】

米国 CDC が推奨している Two-step 法²⁾に準拠。

第 1 ステップ

Enzyme immunoassay (EIA) 或いは Immunofluorescent assay (IFA)により試験する。

第2ステップ

EIA 或いは IFA で陽性、疑陽性であった検体には Western blot (WB) 法を行い、以下の場合最終的に抗体陽性とする。

i)WB 法で主要表層抗原 C(OspC)、ボレリア膜タンパク質 A (BmpA)、鞭毛抗原のうち少なくとも2つ以上に対して IgM 価が上昇していること。

ii)WB 法で 18kDa 抗原、21kDa 抗原(OspC)、28kDa 抗原、30kDa 抗原、39kDa 抗原 (BmpA)、41kDa 抗原(鞭毛抗原)、45kDa 抗原、58kDa 抗原(not GroEL)、66kDa 抗原、93kDa 抗原のうち少なくとも5つ以上に対して IgG 価が上昇していること。

【WB 法】

使用抗原は、患者の疫学的背景をもとに選択する。通常、国内感染例では *B.garinii* 及び *B.afzelii* を抗原として用いる。検体が少数の場合は EIA をスキップし、WB 法のみで判定可能である。判定の一例を図2に示した。

1) 診断抗原の調製

血清診断用菌体を BSK-II 培地を用いて培養する。長期継代培養により plasmid の脱落が起こるため、C3H/HeN, C3H/HeJ 等の近交系マウス (ddY などの非近交系でも可能) から分離した株を用いること。本邦診断用ボレリア種は *B.garinii* 及び *B.afzelii* である。輸入例が疑われる場合には *B.burgdorferi* を抗原種として用いること。感染症研究所では国内感染が疑われる場合には HP1 株(北海道 *Ixodes persulcatus* 由来)及び P/Gau 株(旧西ドイツ患者髄液由来)を、欧米での感染が疑われる場合には B31 株(*I.scapularis* 由来)あるいは 297 株(米国患者髄液由来)を併用している。培養温度は 34-37℃とし late-log phase まで培養を行うこと。これは OspC を十分発現させるためである。また米国でワクチン接種を受けた患者の血清診断では OspA に対する抗体価が見い出される可能性がある点留意すること。

培養菌株を遠心・集菌・洗浄する。集菌・洗浄には PBS 若しくは 5mM MgCl₂ 添加 PBS を用いる。洗浄液は冷却したものを用いること(4℃～氷中)。遠心条件は大腸菌などと同様の集菌操作で可能である。洗浄は2度以上おこなうこと。

湿菌重量を測定し、最終 100 mg/ml に懸濁する(滅菌水)。-20℃で長期保存可能。凍結融解は避けるために、抗原液は小分けしておいたほうがよい。

100mg/ml 抗原液を 2Xsample buffer と等量混和し、boil する(サンプルの調製方法は通常の western blotting (immunoblotting) と同様で差し支えない)。

2) Western blotting 法

1. 常法に従い SDS-PAGE を行う。分離ゲル濃度は 12.5%、濃縮ゲル濃度は 5%。市販の 10-20%グラジエントゲルでも代用可能。
2. PVDF メンブラン(Bio-Rad など)にゲルから抗原をブロットする。

3. メンブランをブロッキング溶液中で最低 1 時間室温で振盪。すぐに次の操作へ進まない場合は翌日まで 4℃で保存可能。
4. 血清などを上記ブロッキング溶液に 1/100 量加え、1 時間室温で振盪。
5. 洗浄液で 5 分×3 回洗浄。
6. 2 次抗体を含む上記ブロッキング溶液中で 1 時間室温で振盪。
7. 洗浄液で 5 分×3 回洗浄。
8. 至適条件下で発色或いは化学発光させる^{注)}。

ブロッキング溶液:

1% Blocking reagent (ペーリンガーマンハイム)
0.1 M マレイン酸ナトリウム
0.15 M NaCl

洗浄液:

0.3% Tween 20
0.1M マレイン酸ナトリウム
0.15M NaCl

注) 筆者は 2 次抗体にペルオキシダーゼラベル抗体を用い、アマシャム社 ECL キットにて化学発光させ、最終的に X 線フィルム上にて反応抗原検出を行っている。

【EIA(ELISA)法】

1) ELISA 用抗原の調製

1. BSK-II 培地により対数増殖期後期まで培養したボレリアを PBS で 3 回遠心洗浄後、5ml の PBS に再懸濁する。
2. 氷上にて超音波細胞破碎器により 50W を 30 秒 10 回行うことで細胞を破碎。
3. 蛋白質濃度を Bradford 法により測定し、10 μ g/ml に調製して抗原液とする。

2) ELISA 法

1. 抗原液 50 μ l を ELISA 用マイクロプレート (Nunc, immuno plate, Maxisorp F96) の各穴に分注し、4℃で一晩吸着、乾燥。
2. 0.1% 馬血清-PBS 200 μ l を加え、室温下 1 時間 15 分ブロッキング。
3. 0.05% Tween 20-PBS で 3 回洗浄。
4. 抗体希釈液で 200 倍希釈した被検血清 60 μ l を加え、室温下 1 時間反応させた。
5. 0.05% Tween 20-PBS で 3 回洗浄。
6. 1000 倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト抗体 (IgG+IgA+IgM, KPL) 60 μ l を加え、室温下 1 時間反応。
7. 0.05% Tween 20-PBS で 3 回洗浄。
8. 基質溶液 60 μ l を加え、室温下 30~90 分間反応。

9. 405nm における吸光度をマイクロプレートリーダーにより測定し、抗体価を optical density (OD) 値で表す。

3) 陽性判定基準値は健常人血清の平均吸光度+3×標準偏差とし、この値以上の OD 値が得られた検体を陽性と判定する。

ELISA 用試薬一覧

4×0.05% Tween20-PBS (stock solution : オートクレーブ d, 4℃保存)

10×PBS	200ml
Tween20	1g
distiled-water	up to 300ml

抗体希釈液 (用事調製)

4×0.05% Tween20-PBS	100 ml
5% Sodium dextran sulfate solution	1 ml
normal horse serum (NHS)	5 ml

塩濃度をあげることで background を低下させることができる。

50mM citrate-phosphate 溶液 (pH 5.0) (stock solution : オートクレーブ d, 4℃保存)

0.1M Sodium citrate solution	243 ml
0.2M disodium hydrogenphosphate solution	257 ml
distiled-water	up to 1000 ml

基質溶液(Peroxidase substrate solution) (用事調製)

50mM citrate-phosphate buffer (pH 5.0)	10 ml
52mM 2-2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) solution	0.2 ml
35% hydrogen peroxide solution	2 μ l

追記) 筆者は IFA 法による一次スクリーニングを行っていないため、本マニュアルでは記載していない点、ご容赦願いたい。

【血清、髄液、穿刺液の輸送法】

滅菌容器にいれ密栓したものを 4℃以下で輸送。

IV. 参考文献

- 1) Barbour, A. G. 1984. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. Yale J. Biol. Med. 57: 521-525.
- 2) Centers for Disease Control and Prevention and Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors. 1994. Proceeding of the Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme disease. Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, Colo.
- 3) Masuzawa, T., Y. Okada, Y. Yanagihara, and Y. Sato. 1991. Antigenic properties of *Borrelia burgdorferi* isolated from *Ixodes ovatus* and *I. persulcatus* in Hokkaido, Japan. J. Clin. Microbiol. 29: 1568-1573.
- 4) Burman N, Shamaei-Tousi A, Bergstrom S. 1998. The spirochete *Borrelia crocidurae* causes erythrocyte rosetting during relapsing fever. Infect Immun. 66(2): 815-819.
- 5) Fukunaga M, Okada K, Nakao M, Konishi T, Sato Y. 1996. Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease borreliae. Int J Syst Bacteriol. 46(4): 898-905.
- 6) Cutler SJ, Akintu nde CO, Moss J, Fukunaga M, Kurtenbach K, Talbert A, Zhang H, Wright DJ, Warrell DA. 1999. Successful in vitro cultivation of *Borrelia duttonii* and its comparison with *Borrelia recurrentis*. Int J Syst Bacteriol. 49 Pt 4:1793-1799.

V. 謝辞

本マニュアル作成に当たり、ご助言・ご助力を賜りました福山大学・福長将仁博士、旭川医科大学・橋本喜夫博士、静岡県立大学・増沢俊幸博士、栃木県保健環境センター、長野県衛生公害研究所の諸先生方に感謝致します。

VI. 検査に関する問い合わせ先

分離培養、分離株同定、血清診断

国立感染症研究所 細菌第一部 川端寛樹

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

電話 03-5285-1111

ファックス 03-5285-1163

E-mail kbata@nih.go.jp

VII. 執筆者

国立感染症研究所

青森県環境保健センター

群馬県衛生環境研究所

静岡市衛生研究所

細菌第一部

微生物部

ウイルス課

衛生検査担当

川端寛樹、小泉信夫

大友良光

赤見正行

北條罔生、井出忍

本マニュアル記載の試験方法

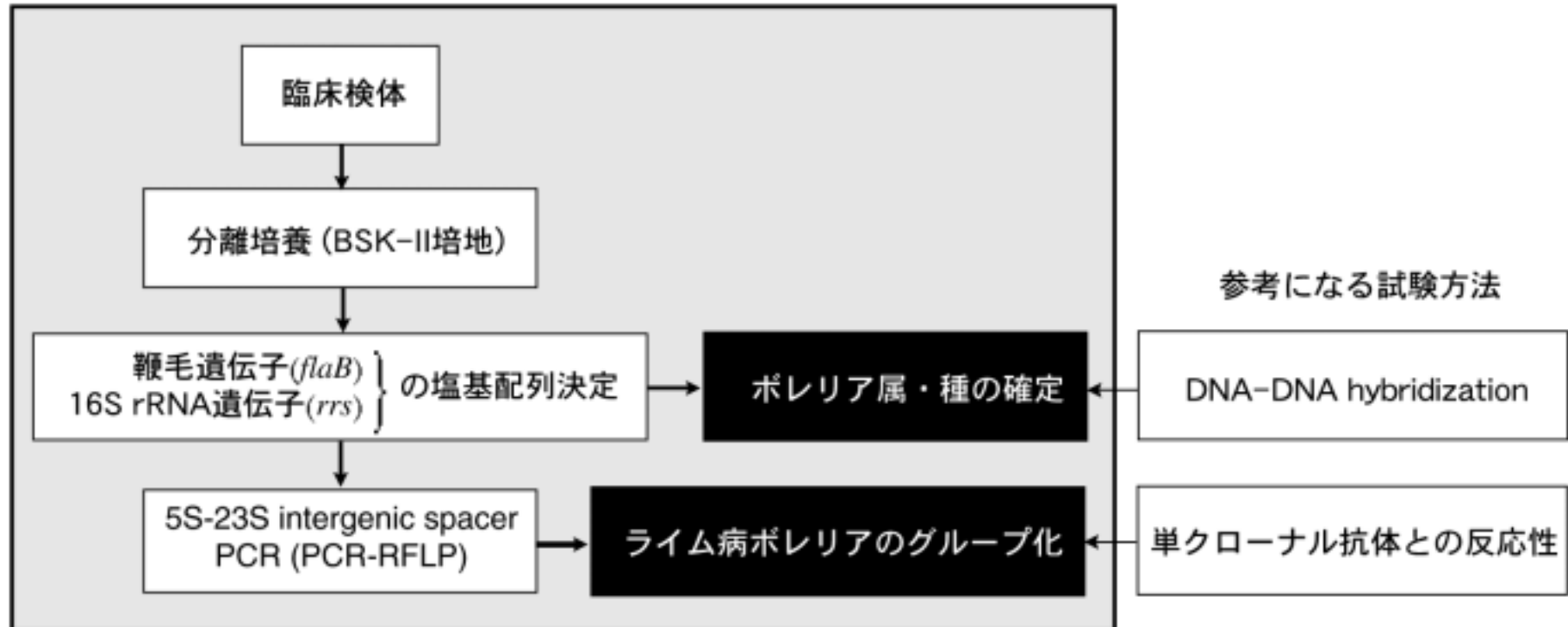


図1. 病原体ポレリア同定の流れ

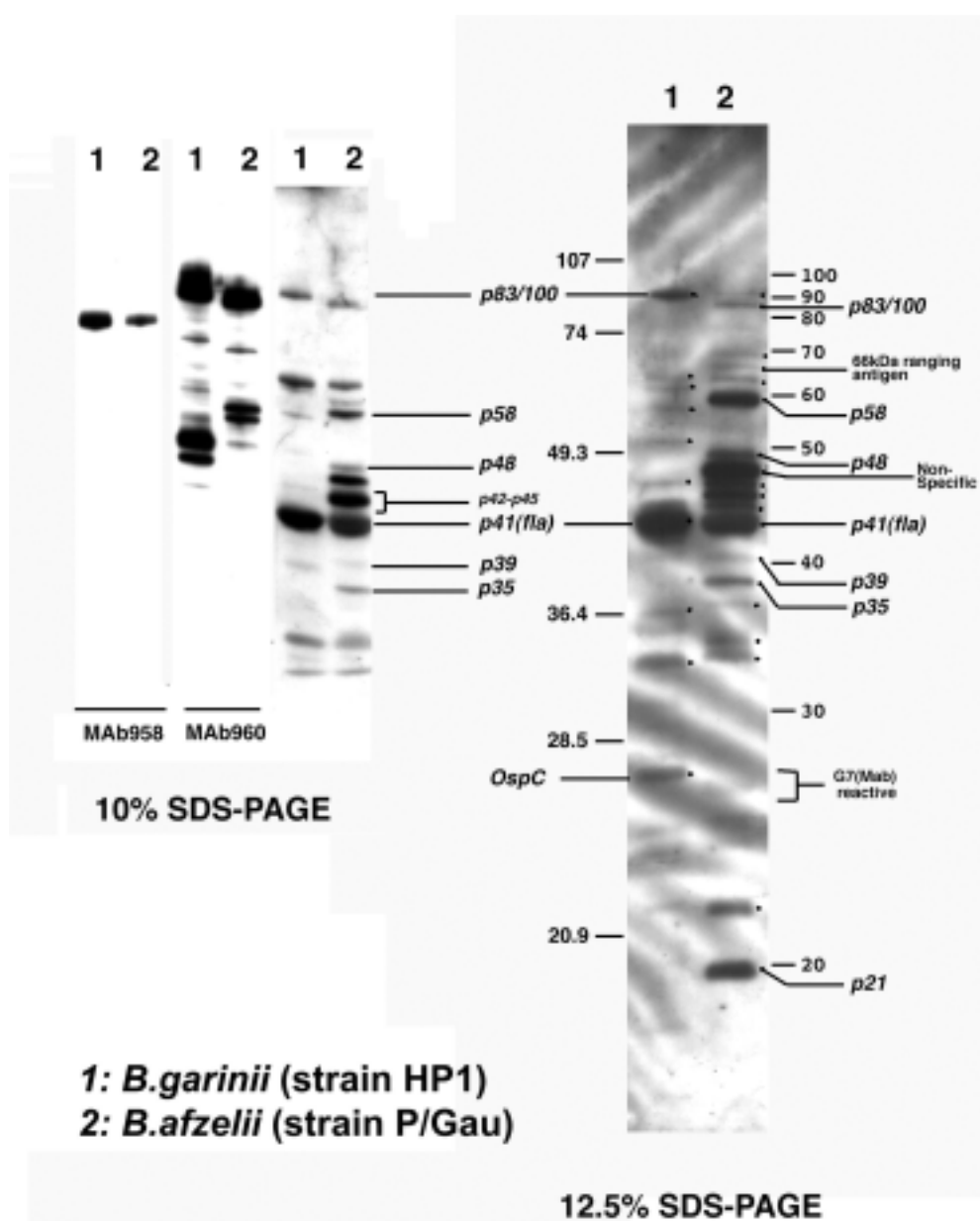


図 2. Western blotting の一例

レジオネラ症

平成 15 年 8 月 29 日改訂

目次

レジオネラ症検査に関する一般的注意

1. 臨床検体
2. 環境検体

検査の進め方および判定

届出の基準

検査方法

1. 分離
 - 1) 分離培養法
 - (1) BCYE α 培地
 - (2) 選択培地（抗菌剤含有の BCYE α 培地）
 - 2) 検体の前処理
 - (1) 酸処理法 acid treatment
 - (2) 熱処理法 heat treatment
 - 3) 確認培養
 - 4) 環境水からのレジオネラの検出法
2. 同定
 - 1) 染色法（蛍光抗体法を含む）
 - (1) ヒメネス染色（Gimenez stain）
 - (2) 蛍光抗体法
 - 2) 馬尿酸加水分解試験
 - 3) 特異抗血清を用いた同定法
 - 4) 核酸を用いた同定法
 - (1) PCR による *L. pneumophila* およびレジオネラ属菌の同定
 - (2) DNA-DNA ハイブリダイゼーション
3. 菌抗原の検出
 - 1) 尿中抗原の検出
4. 遺伝子の検出
 - 1) PCR 法
5. 血清抗体価の測定

- 1) 間接蛍光抗体法
- 2) マイクロプレート凝集反応
- 6. 疫学的解析
 - 1) PFGE 法

引用文献

検査依頼先

執筆者一覧

コメント者一覧

図 1. *Legionella* sp. の分離, 同定手順

図 2. 凝集反応の判定図

表 1 レジオネラ属 49 種の基準株と血清群 (アルファベット順)

表 2 役立つレジオネラ属菌の表現形質

レジオネラ症の概説

レジオネラ症はレジオネラ (*Legionella*) 属菌が原因で起こる感染症の総称で、予後良好なポンティアック熱型と重症例の多い肺炎型(レジオネラ肺炎)の大きくふたつに分類される。

ポンティアック熱型は、5～66 時間の潜伏期後、発熱、悪寒、筋肉痛、関節痛、倦怠感、頭痛など風邪症状を示すが、3～5 日で回復する場合が多い^{1)、2)}。

肺炎型は進行が早いのが特徴で、2～10 日の潜伏期の後、初期には全身倦怠感、頭痛、筋肉痛、などで始まり数日以内に 39℃以上の高熱、乾性咳ときに湿性咳、胸痛、膿性痰、呼吸困難といった呼吸器疾患の症状が現れ、しばしば 48 時間以内に重体となる。また、四肢の振せん、意識混濁などの神経症状が現れることもある³⁾。

レジオネラ属菌は好気性のグラム陰性桿菌で、土壌や河川、湖沼などに生息する環境細菌である。そのような自然水系、あるいは空調設備の冷却塔水、循環式浴槽水、給湯器の水といった人工水系中に生息する細菌捕食性のアメーバやテトラヒメナに寄生、増殖すると考えられている。ヒトがこれらの水から発生したレジオネラ属菌を含むエアロゾルを吸入することにより経気道感染が起こり、ヒト体内ではマクロファージの中で増殖することが知られている。高齢者や新生児、免疫不全患者などがレジオネラ症のリスクグループである。

1976 年の米国フィラデルフィアで開催された在郷軍人 (the Legion) 大会における集団肺炎の起因菌として、レジオネラ属菌の基準種である *Legionella pneumophila* が新科 (*Legionellaceae*) 新属新種として 1979 年に命名されて以来、レジオネラ属菌は現在にいたるまで新種の報告が相次いでおり、2002 年 6 月時点で 49 種 (表 1)、および *Legionella pneumophila* の 3 亜種 (*fraseri*, *pascullei*, *pneumophila*) が知られている。*L. lytica* は今のところアメーバでしか培養できない。なお *Legionella* 属を *Legionella*、*Fluoribacter*、*Tatlockia* の 3 属に分けることが提案されているが、国際細菌命名規約においてまだ正式には認められていない。

レジオネラ属菌の半数足らずの菌種においてヒトへの病原性があると報告されているが、環境から分離、同定されたのちに、ヒトへの病原性が認められたものも多く、ほとんどのレジオネラ属菌に潜在的に病原性があると考えられる。

レジオネラ症検査に関する一般的注意

レジオネラは P2 実験施設で BSL2 の取り扱い基準に従い行う。すなわち、患者または疑わしい患者由来の検査材料などを取り扱う際にはレベル 2 の施設を備えた検査室で行う。本菌は飛沫感染するので、エアロゾル発生のある作業は安全キャビネットの中で行う。

検査材料の採取、輸送および保存

1. 臨床検体

菌を分離培養する場合には、抗菌薬投与前に採取された喀痰、気管支肺胞洗浄液、気管内吸引物、胸水、肺組織などの呼吸器由来の検体が主として用いられるが、心嚢液、髄液、血液なども分離培養のための検体となりうる。臨床検体は滅菌容器に採取し、乾燥を避ける。喀痰などでは常在菌がレジオネラの発育を阻害するので、直ちに塗抹検鏡と培養検査を開始する。

抗体価測定のための血清は発症初期および 2 ～ 3 週間後のペア血清を採取するとよい。陰性の場合には 5 ～ 6 週間後の血清も検査する。尿中抗原検出のための尿は発症初期から採取可能である。

いずれの臨床検体も 0 ～ 4℃ で輸送、保存し、原則として 2 日以上保存する際は -70 ～ -80℃ で凍結保存する。ただし尿中抗原検出のための尿は 2 ～ 8℃ で 2 週間保存でき、それ以上は -20℃ で保存可能である。

2. 環境検体

冷却塔水、浴槽水、給湯水などの検水は滅菌したポリエチレンビンに 500ml 採取する。塩素を含む検水には 25% チオ硫酸ナトリウムを 1/500 量加えて中和する。滅菌ハイポ入採水瓶（栄研器材）を用いると便利である。採水に際して種類、採水部位、日時、型式、水温、pH 値、残留塩素濃度などの記録を必ずつける。

冷却塔では、直接落下水を採取するか、受け皿の中央で水の表層分を採取する。浴槽水は中央部で無菌的に採取する。水道の蛇口、シャワーヘッドなどは滅菌スワブでよく拭いたものを検体とする。

検体は採取後速やかに、クーラーボックスに入れ搬入し、検査は出来るだけ早く（2 時間以内に）始める。残余の検水は 4℃ で保存しておく。

検査の進め方および判定

尿検体からは、可溶性抗原の検出を行い、血清を用いて抗体価の測定を行う。その他の臨床検体からは培養による菌の分離や PCR による DNA の検出が行われる。

感染源として疑われる環境検体からの菌の分離は疫学的に重要で、分離培養あるいは PCR による DNA の検出が行われる。

届出の基準

感染症新法に基づく医師から都道府県知事等への届出のための基準（健医感発第 4 6 号、平成 1 1 年 3 月 3 0 日）は次のようになっている。

○ 診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ、以下のいずれかの方法によって病原体診断や血清学的診断がなされたもの

- ・病原体の検出

例、臨床材料（肺組織、痰、胸水、血液、他の無菌的部位）からの菌の分離、Serogroup 1 の場合は臨床材料（肺組織または気道分泌物）からの菌の検出（直接蛍光抗体染色法）など

- ・病原体の抗原の検出

例、尿中抗原の検出（EIA 法）など

- ・病原体の遺伝子の検出

例、臨床材料からの遺伝子の検出（PCR 法）など

- ・病原体に対する抗体の検出

例、間接蛍光抗体法での特異抗体価の上昇（ペア血清で 4 倍以上の上昇、または単一血清で 256 倍以上）など

検査方法

1. 分離

分離、同定手順を図 1 に示した。臨床材料では抗菌剤の使用の有無、種類を確認しておく。環境水の検査法は厚生省生活衛生局企画課監修の新版レジオネラ症防止指針（発行・財団法人 ビル管理教育センター）が参考になる⁴⁾。レジオネラは発育が遅く、検体からの初代分離には通常 3～6 日を要するので、それまでに他の細菌や真菌が過増殖すると、本菌群の発育が見られなくなる。分離された菌が血液寒天培地で増殖しない場合にレジオネラ様菌という。

1) 分離培養法

レジオネラの培養は従来の一般細菌用培地では不可能で、現在 BCYE α 培地（buffered charcoal-yeast extract agar with 0.1% α -ketoglutarate）が最もすぐれている。発育至適 pH は 6.90 ± 0.05 、培養温度は $35 \sim 36^\circ\text{C}$ 、酸素が十分存在する環境下で初代分離には 3 日以上を要する。2 日以内に形成されたコロニーはレジオネラ以外の細菌と考えられる。2～5%の CO_2 は発育を促進するが、それ以上の濃度は抑制的である。検体には他の菌が混入している可能性があるので抗菌剤入りの選択培地も同時に用いる。特に環境検体の場合、雑菌が多いので非選択培地は実際的にあまり役立たない場合が多く、選択培地を 2 種類使用するほうが良い結果を得る。乾燥すると発育が抑制されるので培養には蓋付きの水切りバットの外側に純水を入れ、内側にプレートを入れて孵卵器に入れるとよい。大小の灰白色湿潤集落が発育していれば、集落数を数え、濃縮倍数または希釈倍数と接種液量から原液 100ml 当たりの菌数を仮算定する（CFU/100ml）。

10 個程度の集落を釣菌し、グラム染色性と L-システイン要求性を確認する。これらの確認の結果に応じて最初の菌数算定値を修正する。慣れればグラム染色性（サフラニン液では染まりが悪く、薄ピンクに染まる）と L-システイン要求性の確認と集落の性状（淡い酸臭があり、灰白色湿潤で、培地から剥がれにくい）などで、レジオネラと他の菌との鑑別がある程度できるようになる。

(1) BCYE α 培地

組成：

①基礎培地

ACES Buffer	10 g
酵母エキス	10 g

水酸化カリウム	2.8 g
α -ケトグルタル酸	1 g
活性炭（ノリット A）	2 g
寒天（Bacto agar）	17 g
純水	980ml

②L-システイン溶液

L-システイン塩酸塩	0.4 g
純水	約 10 ml

③ピロリン酸第二鉄溶液

ピロリン酸第二鉄	0.25g
純水	約 10ml

作り方：基礎培地を 121℃、15 分間高圧滅菌の後、約 50℃に保温し、各々別々にミリポアフィルター（0.22 μ m）で濾過滅菌した L-システインおよびピロリン酸第二鉄溶液を加え、シャーレに 15～18ml ずつ分注し、平板に固める。液体培地は基礎培地から寒天と活性炭を除き、上述の方法で作製する。袋にいれれば 4℃で 2 カ月は保存できる。

(2)選択培地（抗菌剤含有の BCYE α 培地）

組成＜BCYE α 培地を基礎培地とした選択培地、1 リットル当たり＞：

①BMPA α 培地

ポリミキシン B	80,000 U
セファマンドール	4 mg
アニソマイシン	80 mg

②GVPC 培地

ポリミキシン B	80,000 U
バンコマイシン	1 mg
グリシン	3 g
サイクロヘキシミド	80 mg

③MWY 培地

ポリミキシン B	50,000 U
バンコマイシン	1 mg
グリシン	3 g
アニソマイシン	80 mg

ブロムチモールブルー	10 mg
ブロムクレゾールパープル	10 mg

④WYO 培地

ポリミキシシン B	100,000 U
バンコマイシン	5 mg
グリシン	3 g
アンホテリシン B	80 mg

⑤CCVC 培地

セファロチン	4 mg
コリスチン	16 mg
バンコマイシン	0.5 mg
サイクロヘキシミド	80 mg

⑥PAV 培地

ポリミキシシン B	40,000 U
アニソマイシン	80 mg
バンコマイシン	0.5 mg

⑦selective BCYE α 培地

ポリミキシシン B	100,000 U
バンコマイシン	5 mg
サイクロヘキシミド	80 mg

抗生物質含有の選択培地は、多数のものが報告されているが、その主なものを上記に示した。これらを 50℃に冷ました BCYE α 培地に濾過滅菌してから加える。選択培地は使用時に調製し、保存は 4 週間を限度とする。冷却塔からのレジオネラ属菌の分離に WYO 培地⁵⁾ や MWY 培地⁶⁾ がよい成績をあげた。水道水からの検出には MWY や BMPA α よりも GVPC がよいという報告もある⁷⁾。春日らは、MWY 培地にポリキシシン B を 20,000U/ml に増量またはオキシテトラサイクリンを 100 μ g/ml 添加した場合、浴槽や冷却塔水などの環境水の混入雑菌の生育を大きく減少させることを見いだしている⁸⁾。また、糸状菌などの真菌が多く混在していると予測される環境水の場合は MWY 培地にアンホテリシン B を 80 μ g/ml 加える⁹⁾。臨床検体の場合、酵母の増殖がレジオネラ属菌の検出感度を低下させるが、フルコナゾール 80 μ g/ml を追加添加するとよい¹⁰⁾。レジオネラ属菌に対する抗菌物質の影響は菌種ばかりでなく菌株によっても異なり、1 つの選択培地では対応しえない。

レジオネラ属菌用の主要な生培地の入手先は以下のとおりである。

BCYE α 寒天平板（非選択培地）	栄研化学、日研生物医学、日本 BD、関東化学
WYO α 寒天平板（選択培地）	栄研化学
GVPC α 寒天平板（選択培地）	日研生物医学
MWY 寒天平板（選択培地）	関東化学
CCVC 寒天平板（選択培地）	日本 BD
PAC (BMPA α) 寒天平板（選択培地）	日本 BD
PAV 寒天平板（選択培地）	日本 BD
selective BCYE α 寒天平板（選択培地）	極東製薬工業

その他、レジオネラ属菌粉末基礎培地（Difco、Oxoid、日本ビオメリューバイテック）、システインとピロリン酸鉄を含む添加物（Oxoid、日本ビオメリューバイテック）、選択剤（BMPA α 、MWY 用が Oxoid から、GVPC 用が Merck から）が入手できる。Difco からでている粉末培地では、ACES Buffer などの量が少なく水酸化カリウムの量は 1 リットルあたりオートクレーブ前に 1.5g 添加の条件が最適である。選択剤の名前が同じでも成分の量が減少していることがあるので注意が必要である。

2) 検体の前処理

選択培地を用いても発育を抑制できない微生物に対処するため、検体の酸処理または熱処理を行う。酸処理は *Bacillus* の発育抑制効果が得られ、熱処理ではブドウ糖非発酵菌の発育抑制効果が得られる¹¹⁾。環境水では緑膿菌がレジオネラ属菌に発育阻害を示すが、熱処理後に酸処理（この逆はレジオネラ属菌も減少するので不可）を行うと除去できる⁸⁾。

(1) 酸処理法 acid treatment

pH2.2 緩衝液 (0.2 M の塩酸 5.3 ml と 0.2 M の塩化カリウム 25 ml を蒸留水 100 ml に加える。武藤化学、日研生物医学より購入可能) を検体に等量加えてよく混和し、混在すると考えられる菌量により 35℃ 10〜20 分、あるいは 25℃ で 4 分間反応させた後、選択培地に接種する。レジオネラ属菌は酸処理にはかなり強い。緩衝作用の強いクエン酸緩衝液 (0.1M クエン酸二水素カリウム 23.0g/l と 0.1M クエン酸 21.0g/l を混和する、pH2.2) を使用すると緩衝作用が増加して高率にレジオネラ属菌を分離できるという²⁴⁾。

(2) 熱処理法 heat treatment

50℃ で 20 分間加熱する。検体を 60℃、4 分以上処理すると、検出率はきわめて低率となるので注意が必要である。

3) 確認培養

L-システイン不含 BCYE 培地か 5 % ヒツジ血液寒天培地で行う。BCYE α 培地でのみ発育し、他の培地では発育しない菌をレジオネラである可能性のある菌として同定を行う。ヘモグロビンの他に発育促進用に IsoVital X が添加されているチョコレート寒天の生培地は、レジオネラ属菌がわずかに発育し判断を誤ることがあるので使わないほうがよい。また、レジオネラ属菌のうち培地に適合した *L. jordanis*、*L. spiritensis* の株および *L. oakridgensis* は L-システインを添加しなくても増殖する。

4) 環境水からのレジオネラの検出法

採取された検体の菌数を予測出来ないので、濃縮検体と非濃縮検体を並行して検査する。

非濃縮検体は選択培地に未処理のもの 100 μl、加熱または低 pH 処理したものを 100 μl 塗布する。その際、適宜 10 倍希釈で 2〜3 段階希釈し、それぞれ 100 μl 塗布しておくこと菌数の算定がし易い。

菌数が 10^2 CFU/100ml 未満と推定される時には、下記の 3 方法の何れかで濃縮する。

(1) 冷却遠心濃縮法：検体の汚濁が激しい場合にはこの方法が優れている。

滅菌した蓋付きの遠心管に検水 200ml を入れ、バランスを取った後 5,000～7,000rpm、30 分間（たとえば 20°C で）遠心する。静かに上清を除き、1ml（200 倍濃縮）または 2ml（100 倍濃縮）の滅菌蒸留水を加えて管内壁をよく洗い、沈渣を懸濁する。

200 倍濃縮検体は酸処理を行い、100 倍濃縮検体は熱処理を行う。環境検体の場合には熱処理の方が一度に多検体を処理出来て便利である。雑菌汚染がひどいと考えられる検体では、熱処理後酸処理も行うと良い。その後図 1 のような手順を進む。

(2) ろ過濃縮法：混濁の激しい検体ではフィルターが目詰まりする為、上述の冷却遠心濃縮法が推奨される。

検水 500ml を直径 47mm、孔径 $0.45\mu\text{m}$ のポリカーボネートメンブランフィルターで吸引ろ過する。混合エステルフィルターは膜に菌が入り込んで回収率が減るので使用しない¹²⁾。フィルターを剥がし 5ml の滅菌蒸留水にひたし、フィルターがちぎれる程度に強く手で振盪（voltex mixer で 1 分間は回収率が低い）洗浄した液（100 倍濃縮）を遠心法と同じように酸または熱処理を行う。

(3) フィルター貼付法：集落数が多い場合、菌数算定はし難い。

検水 100ml と pH2.2 緩衝液 100ml を混合し、 25°C 、20 分後に、直径 47mm または 90mm、孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで吸引ろ過する。滅菌水 25ml でファンネル内壁を洗い、再度吸引ろ過する。その後フィルターを剥がし培地に貼付し培養する。

酸処理後の濃縮倍数はフィルター貼付法以外では半分になり、熱処理法後の濃縮倍数は変化しない。

前処理が済んだ検体 $100\mu\text{l}$ を数枚の選択培地（少なくとも 2～3 枚）に滅菌コンラージ棒で塗布する。

バイオフィルムの付着した滅菌スワブや浴槽濾過材などの検体は、滅菌生理食塩水中に懸濁するか、たとえば 20KHz、130W、24 秒の条件で密閉式超音波破碎装置により処理して浮遊液とする。スワブは直接抗菌剤入りの BCYE α プレートに塗ってもよい。

2. 同定

培養菌ではグラム陰性桿菌として観察できるが、喀出痰、気管分泌物、肺組織などの臨床材料中ではグラム染色、抗酸菌染色などでは染色されず、Gimenez（ヒメネス）染色（菌は紫色）、Warthin-Starry 染色（菌は黒色）あるいはアクリジンオレンジ染色（菌はオレンジ色）で染め出されるので、グラム染色で細菌が見られない場合は、これらの染色を行う。

レジオネラ属の各菌種間の鑑別・同定に役立つ表現形質は少ない。その中で自発蛍光の有無（ほとんどのレジオネラ属菌は自発蛍光がない）と蛍光色の種類および馬尿酸加水分解試験がやや鑑別に役立つので表 2 にまとめた。現在のところ、これらの性状のみでは種の鑑別は容易ではないので、血清学的方法が簡便である。*L. pneumophila* には 15 の血清群（SG）があり、レジオネラ属全体では 67 血清群となっている。その他分離された菌の同定には、DNA-DNA hybridization、*mip* プライマーによる *L. pneumophila* の同定などがある。

1) 染色法（蛍光抗体法を含む）

レジオネラのみを染色する方法ではないが、喀出痰や胸水などの塗抹標本の染色にはヒメネス染色が行われる。

(1) ヒメネス染色（Gimenez stain）

① 石炭酸フクシン液原液

- | | | |
|----|----------|-------|
| a. | 塩基性フクシン | 1g |
| | 95%エタノール | 10ml |
| b. | フェノール | 1ml |
| | 純水 | 24 ml |
| c. | 純水 | 65 ml |

a, b, c 溶液を混合し、37°C48 時間加温する。室温保存。

② 緩衝液

a. 0.2M リン酸二水素ナトリウム溶液

- | | |
|-------------|-------|
| リン酸二水素ナトリウム | 2.84g |
| 純水 | 100ml |

b. 0.2M リン酸一水素ナトリウム溶液

- | | |
|-------------|-------|
| リン酸一水素ナトリウム | 2.76g |
| 純水 | 100ml |

a 溶液を 3.5ml および b 溶液を 15.5ml 混合し、さらに純水 19.0ml を加えて作製する。

③石炭酸フクシン染色液

石炭酸フクシン原液	1ml
0.1M 緩衝液	9ml

④マラカイトグリーン液

マラカイトグリーン	0.8g
純水	100ml

<方法>

①塗抹、火炎固定

②石炭酸フクシン液で、30 秒間染色

③水洗

④マラカイトグリーンで、6～9 秒染色

⑤水洗

⑥マラカイトグリーンで、6～9 秒染色

⑦水洗

⑧乾燥・鏡検

細菌は赤く染まり、バックグラウンドは青緑色に染色される。細菌が見られたからと言って、レジオネラとは限らない。なおヒメネス染色セットが日研生物医学、および武藤化学から入手できる。

(2)蛍光抗体法

検体中のレジオネラを特異抗体を用いて染色する方法には、抗体に蛍光色素（fluorescent isothiocyanate, FITC：緑色）を直接標識して、菌体を染色する直接抗体法と以下に述べる間接抗体法（IFA）がある。IFA は特異抗体を作製した動物のグロブリンで免疫した他の動物の免疫グロブリンに、あらかじめ蛍光色素を標識しておいて（標識抗体）検体中のレジオネラと特異抗体（一次血清）とが結合しているところに、この標識抗体（二次血清）を作用させて、間接的に菌体を染色する方法である。後者の方法が市販されている標識抗体を用いることができるし、感度¹³⁾や特異性も高いため広く用いられる。

<試薬>

①リン酸緩衝食塩水（PBS, pH7.2）

NaH₂PO₄・2H₂O 9.00g

Na₂HPO₄ · 12H₂O 64.54g

NaCl 160.00g

上記成分を純水で溶解し、全量を 20 L にする。

水酸化ナトリウムまたは塩酸で pH を 7.2 に調整し、冷蔵庫（4℃）で保存。

②グリセロール封入剤（pH9.0）

無蛍光グリセロール（グリセリン） 9 容

0.2M Na₂HPO₄ 1 容 冷蔵庫（4℃）で保存。

<方法：IFA 法>

①材料をスライドガラスに塗抹し、風乾後 10%ホルマリンで 15 分固定し、洗浄後、乾燥する（パラフィン包埋標本は脱パラして乾燥）。

②抗レジオネラ家兎免疫血清を標本面に載せる。

③湿潤箱に入れて、37℃、30 分間反応させる。

④PBS（pH7.2）で静かにオーバーフローさせて、洗浄する。

⑤PBS を入れたバット内に、スライドガラスを入れて、バイブレーターをかけ 5 分間洗浄する。2 回繰り返す。

⑥取り出して、再度蒸留水でオーバーフローして 2 回洗浄する。

⑦検体の周囲の水分を濾紙で拭き取る。

⑧これに、さらに FITC 標識抗家兎ヤギグロブリンを載せる。

⑩③ー⑦までを繰り返す。

⑪グリセリン封入剤で封入する。

⑫蛍光顕微鏡で観察。

鏡検までは遮光して、4℃に保存。特異抗体を使用するので、菌体が観察されれば、レジオネラと同定できる。材料としては、喀出痰、気管吸引物や胸水などが用いられ、肺組織中では、好中球やマクロファージの細胞質中に多く取り込まれている像が観察される。

2) 馬尿酸加水分解試験

試薬：

①ニンヒドリン液

ニンヒドリン 3.5g

アセトン：ブタノール 1：1 100ml

室温暗所に保存。

②馬尿酸液

馬尿酸ナトリウム 1g

純水 100ml

高压滅菌して、0.4ml ずつ分注して-20℃に保存。

方法：BCYE α 培地に 2-3 日培養した菌を 0.5 白金耳とり、ネジ付き試験管（13×100mm）で 0.4ml 馬尿酸溶液に濃厚に接種し、35℃、18〜24 時間培養後、ニンヒドリン液 0.2ml を加え静かに混和し、35℃10 分間反応させる。紫色を呈したら陽性と判定する。

3) 特異抗血清を用いた同定法

L. pneumophila には現在 15 種の血清群がある（表 1）。この他、*L. bozemanii*、*L. longbeachae*、*L. feeleeii*、*L. hackeliae*、*L. quinlivanii*、*L. sainthelensi*、*L. spiritensis*、*L. erythra* に各 2 つの血清群がある¹⁴⁾。現在、このうちの *L. pneumophila* の血清群 1〜6 および *L. bozemanii*（血清群 1 のみ）、*L. gormanii*、*L. dumoffii*、*L. micdadei* の 10 種類がレジオネラ診断用の抗血清（デンカ生研）で同定できる。また、*L. pneumophila* の血清群 7〜15 の抗血清がデンカ生研から地研向けに研究用試薬（特注品）として発売されている。2001 年より販売されている Oxoid レジオネラ・ラテックステスト（関東化学）を用いると *L. pneumophila* 血清群 1、*L. pneumophila* 血清群 2-14、その他ヒト疾患に関連する 7 群（*L. longbeachae* 血清群 1 および 2、*L. bozemanii* 血清群 1 および 2、*L. dumoffii*、*L. gormanii*、*L. jordanis*、*L. micdadei*、*L. anisa*）の 3 種類に鑑別できる。冷却塔水の由来の 60%以上が血清群 1 であるが⁶⁾、温泉や風呂などからは血清群 3、4、5、6 が高率に分離される¹⁵⁾。

<スライド凝集反応>

BCYE α 寒天平板培地で 2〜3 日培養した菌をかきとって生理食塩水に濃厚浮遊液（McFarland No. 7 の 5 倍、約 10¹⁰/ml 以上）を作製する。100℃1 時間あるいは 121℃30 分間加熱し 3000〜3500rpm、15 分間遠心して上清を捨て新しい生理食塩水に懸濁して抗原液とする。スライドグラスをガラス鉛筆で数区画に区切り、抗血清を区画内に一滴、滴下する。さらに抗原液を一滴ずつピペットで滴下し、凝集を観察する。単一の抗血清に凝集が認められた抗血清を、被検菌の菌種あるいは血清群とする。1 分以上たってからの弱い凝集は通常非特異的なものである。ただし、抗原性の弱い株の場合には、3 分から 5 分で凝集が認められることがある（他の特異抗血清には反応しないので非特異的凝集ではない）。

また *L. bozemanii*、*L. dumoffii*、*L. gormanii*、*L. micdadei* は菌種間に血清の交差反応がみられるため、後述する DDH レジオネラを用いた確認同定試験が推奨される。

4) 核酸を用いた同定法

(1) PCR による *L. pneumophila* およびレジオネラ属菌の同定

分離されたコロニーが *L. pneumophila* であるか、また、レジオネラ属菌であるかどうかを PCR を用いて鑑別することができる。

<LEG プライマーと Lmip プライマーを用いた PCR>

型別判定は LEG (genus *Legionella* 16S rRNA gene) と Lmip (*L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator gene) の両プライマーを用いて PCR 法で調べ、両遺伝子を持つものを *L. pneumophila* と、LEG だけ持つものを *Legionella* sp. と推定する。

LEG プライマーは山本らの報告によるものを用いる¹⁶⁾。

LEG 448A 5'-GAGGGTTGATAGGTTAAGAGC-3'

LEG 854B 5'-CGGTCAACTTATCGCGTTTGCT-3'

Lmip プライマーは Mahbubani らの報告によるものを用いる¹⁷⁾。

Lmip L920 5'-GCTACAGACAAGGATAAGTTG-3'

Lmip R1548 5'-GTTTTGTATGACTTTAATTCA-3'

具体的には、上記の BCYE- α 寒天培地のみに発育した純培養菌を 1 μ l のエーゼに取り、50 μ l の純水に懸濁する。100℃で 5 分間加熱し、15,000rpm、5 分遠心し、上清の 2 μ l をテンプレートとする。

LEG を確認するには、PCR 反応液(2 検体分 46 μ l)として、 $\times 10$ reaction buffer 5.0 μ l、dNTP mixture 4.0 μ l、ultra-pure water 35.75 μ l、LEG プライマーF (20 μ M) 0.5 μ l、LEG プライマーR (20 μ M) 0.5 μ l、Taq polymerase (5U/ μ l) 0.25 μ l を加え軽くボルテックスし、200 μ l の PCR 用マイクロチューブに 23 μ l ずつ分注する。

これに各テンプレートを 2 μ l 加えてサーマルサイクラーで PCR を行う。

反応条件として、熱変性 94℃60 秒、アニーリング 61℃60 秒、伸長 72℃60 秒、40 サイクル繰り返す。その後 3%アガロースで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色して、430bp の増幅バンドを検出する。

Lmip の場合も同様な反応液を作り、熱変性 94℃60 秒、アニーリング 50℃60 秒、伸長 72℃60 秒、35 で PCR を行う。650bp のバンドが検出できる。

<EnviroAmp Legionella Kit のプライマー配列を用いた PCR>

①プライマー配列¹⁸⁾

5S rRNA (レジオネラ属特異的) :

Forward primer (5-29) 5'-GGCGACTATAGCGPTTTGGAA-3'

Reverse primer (91-112) 5'-GCGATGACCTACTTTTCPCATGA-3'

mip (*L. pneumophila* 特異的) :

Forward primer (948-965) 5'-GCATTGGTGCCGATTG-3'

Reverse primer (1092-1115) 5'-GRTTTGCCATCAAATCTTTTRTGAA-3'

*P=A/G, R=C/T

②DNA の調製

プレート上のコロニーを爪楊枝の先で軽くつつき、20 μ l の滅菌超純水に懸濁し、100°C で 10 分間加熱し、spin down (10,000 rpm 数秒) した上清を使用する。この操作後には、すぐに③に進む (用時調製)。

③PCR 反応溶液

(最終反応液量 100 μ l)

Forward primer 100pmol/ μ l	1.5 μ l
Reverse primer 100pmol/ μ l	1.5 μ l
×10 Reaction buffer	10 μ l
2.5mM dNTP mixture	8 μ l
chromosomal DNA	1.5 μ l
ultra-pure water	77 μ l
AmpliTaq DNA polymerase	0.5 μ l

④反応条件

(Perkin Elmer Model 2400)

前熱変性	95°C、30 秒
熱変性	95°C、30 秒
アニーリングおよび伸長	63°C、45 秒
熱変性とアニーリングおよび伸長を 30 サイクル	
最終伸長	72°C、7 分

⑤電気泳動

2% アガロースゲルでサンプル 5 μ l を泳動すると、5S rRNA は 108bp のバンド、*mip* は 168bp のバンドとして、それぞれ検出される。5S rRNA と *mip* のプライマーを混合して PCR をすると *mip* のバンドが弱くなるので推奨できない。反応液量を半分にしても問題ない。

(2) DNA-DNA ハイブリダイゼーション

菌種の同定は分類学的には基準株との全 DNA 相同性が 70% 以上あるとき同一菌種と判定される。従来の菌種同定のための DNA-DNA ハイブリダイゼーション法は放射

性同位元素を用いる必要があったが、マイクロプレートとビオチンを用いた方法が考案されている¹⁹⁾。 *L. pneumophila* をはじめ、レジオネラ属 25 菌種の基準株の DNA をマイクロプレートに固定したキットが極東製薬より市販されているので（ DDH レジオネラ' 極東 '）、簡便に DNA-DNA ハイブリダイゼーションによるレジオネラ属菌種同定を行うことができる。分離コロニーを用いて、約 4 時間で判定が可能である。

3. 菌抗原の検出

当初直接蛍光抗体法によって菌の検出が行われてきたが、試薬の入手が難しいこともあり、最近では、直接蛍光抗体法と同程度の感度が得られ、操作も容易な尿中抗原の検出によってかわってきた。

1) 尿中抗原の検出

尿中に排出される熱安定性の可溶性抗原、リポ多糖を検出する。感度約 80%、レジオネラ症としての特異性はほぼ 100%のキットが Binax、Biotest 両社で開発され、それぞれアスカ純薬、ダイヤトロンより入手できる。血清抗体価が上昇していなくても症状の出現後 2〜3 日で陽性になるので早期に診断できる利点がある。また、治療後も長期間陽性であり、1 年以上も陽性であった例もあるという。原理は、マイクロプレートを用いたサンドイッチ ELISA 法で、抗体に結合した HRP (horseradish peroxidase) により発色させる。必要な時間は 2 時間の反応時間と洗浄時間であるので、検体の数にもよるが 4 時間もあれば判定できる。また、15 分で判定可能なイムノクロマトグラフィー法を用いた NOW Legionella (Binax 社) が最近発売された。

Binax 社のキットは *L. pneumophila* SG1 を検出するために作製されているが他の血清群の *L. pneumophila* とも交差反応するのでこれが陽性であっても *L. pneumophila* SG1 による感染と断言はできない。同様に、Biotest 社のキットはすべての血清群の *L. pneumophila* に反応できるよう製品化されたが他の種のレジオネラ属菌とも交差反応する。しかし、すべてのレジオネラ種と反応できるわけではないので、陰性であるからといってすぐにレジオネラ症を否定できず、培養結果や血清学的試験などがその補助となる。

<注意>

- ①尿検体は感染源として取り扱う。
- ②反応停止液は硫酸を含有しているので、もし身体に触れてしまったら大量の水で洗い流すこと。
- ③使用前に全ての試薬を室温にもどして使用する。

<尿の前処理>

- ①限外濾過により尿を濃縮することにより、感度が、1.3 倍から 1.4 倍に上昇して 87〜89% になるという²⁰⁾。たとえば、MILLIPORE 社の Ultrafree-15 Centrifugal Filter Device で、15ml を 1ml まで遠心を行い濃縮する。フィルターは、分画分子量 5000 のものを使用する。

しかし、今のところ確定診断には利用されていない。

②尿検体が大きい粒子を含む場合は、透明な上澄み液を使う。高濃度のリン酸塩、尿酸塩を含む凍結検体は、解凍時に多量の塩を析出することがあるので、37℃に暖めて再び溶解させて用いる。

4. 遺伝子の検出

1) PCR 法

PCR 法は培養法、血清抗体価の測定に比べ、陽性率が高く²¹⁾、きわめて有用な方法であると考えられるが、精度管理の問題などもあり、本症の診断においては現在のところまだ一般的ではない。以下に *L. pneumophila* を検出する方法²²⁾ を述べる。

(1)DNA の調製

1ml の検体に 0.1ml の lysozyme (5mg/ml,和光純薬) を加え、37℃ 1 時間作用させた後、100℃ 5 分間処理で不活化する。さらに 0.1ml の proteinase K (1mg/ml)および 0.1ml の 20%SDS を加え 55℃ 1 時間作用させた後、不活化し、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈澱で精製する。精製した DNA を 50μl の蒸留水に溶解しその 10μl を 1st step の PCR に用いる。2nd step PCR は1μl の 1st step PCR 産物を加えて行う。

(2)プライマー配列

1st step primers:

LmipL920 5'-GCTACAGACAAGGATAAGTTG-3'

LmipR1548 5'-GTTTTGTATGACTTTAATTCA-3'

2nd step primers:

LmipL997 5'-TAATCCGGAAGCAATGGCTA-3'

LmipR1466 5'-GGGCCAATAGGTCCGCCAAC-3'

(3)反応液 (100μl)

100mM Tris-HCl(pH8.3)

1.5mM MgCl₂

200μM dNTP

40μM primers

2.5U AmpliTaq

(4)反応条件 (2 ステップとも)

変性 94℃ 1 分

アニーリング 55℃ 1 分

伸長 72℃ 1 分

30 サイクル

(5) 検出

PCR 産物は 2 % アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色を行い 489bp の DNA 断片を観察する。

5. 血清抗体価の測定

従来、血清抗体価の測定には間接蛍光抗体法が行われてきた。ここでは間接蛍光抗体法と、容易にできるマイクロプレート凝集反応法について述べる。急性期および発症後 2〜3 週間後のペア血清を試験するのがよい。陰性の場合は 5〜6 週後の血清も検査する。

1) 間接蛍光抗体法

本法は早期診断には適さないが、軽症例や検体の採取ができなかったものなどにおける既往的な診断に重要な方法である。抗原にはレジオネラの参考株が用いられ、判定は明らかに蛍光を発する菌が、塗抹菌量の 50% 以上の数で見られる最高希釈濃度で表す。単一血清では 256 倍以上、ペア血清であれば、抗体価 128 倍以上でかつ 4 倍以上の上昇が見られた場合に陽性と判定する。

(1) 試薬

PBS (pH7.2)、グリセリン封入剤は、蛍光抗体法の項を参照。

(2) 抗原液の作製

- ①レジオネラを保存培地から BCYE 寒天培地に展開し、35℃、48 時間培養。
- ②発育した集落を新たな BCYE 寒天培地に濃厚に展開し、さらに 2 日間培養。
- ③この培地表面に 1%ホルマリンを加えた PBS (pH7.2) 溶液、10ml を加え、菌体を滅菌スピッツグラスに移し取り、1 夜冷蔵庫に置く（殺菌のため）。
- ④3,000rpm, 30 分間遠心し、上清を捨て、0.1%ホルマリン PBS (pH7.2) を加え、McFarland No.4〜5 に調整し、これに卵黄（たとえば Egg Yolk Enrichment 50% (Difco) など）を 0.5% になるように加える。
- ⑤この時の菌数は約 10^9 / ml で、400 倍の鏡検で一視野当り、約 500〜600 個の菌が観察されるが、菌数が異なった時は、PBS (pH7.2) 溶液で調整する。
- ⑥アジ化ナトリウムを 0.5% になるように加えて、4℃に保存する。4 か月は安定である。
- ⑦レジオネラ種の中から、頻度の高いものの抗原を幾つか組み合わせて、多価抗原を作製しておくると便利である。

(3) IFA 用抗原スライドグラスの作製

①スライドグラス（たとえば 18 穴黒ベタ、5mmφ、UV 用、松浪社、大阪）を、100% エチルアルコールで脱脂して乾燥させる。

②滅菌したヘマトクリット管に抗原液を取り、各ウエルに一定量ずつ滴下する。自然乾燥させる。

③すべての抗原液を載せ終わったら、アセトン液中で 15 分間固定する。

（4）被検血清の希釈

①U 底マイクロプレートを使用する場合、ドロップパー（25 μ l 用）で、1%BSA を添加した PBS（pH7.2）を最初の一穴目に 3 滴（75 μ l）、2 穴目から 1 滴ずつ入れる。

②一穴目に被検血清を 5 μ l 加える（16 倍希釈）。

③ダイリューター（25 μ l）で 16 倍から 1,024 倍まで希釈を行う。

（5）IFA 染色

①（3）で作製した IFA 用抗原スライドグラス上に、希釈した被検血清を希釈の薄い方からピペットマンを用いて 10 μ l ずつ載せていく。

②湿潤箱に入れて、37℃、40 分間反応させる。

③PBS（pH7.2）で、静かにオーバーフロー洗浄後、PBS を入れたバット内につけて、バイブレーターに 5 分かける。

④純水を入れたバット内でさらに 4 回ゆすぐ。取り出して、水分を切る。

⑤50 倍希釈 FITC 標識抗ヒト免疫グロブリン（IgG、IgM、IgA に反応できると感度が高くなる）を、各ウエルに 10 μ l 注ぐ。

⑥湿潤箱内で、37℃、40 分間反応させる。

⑦PBS で静かに洗浄後、PBS バット内に入れ、バイブレーターに 5 分間かける。

⑧純水で 4 回ゆすぐ。

⑨水分を軽く切ってグリセリン封入剤で封入する。

⑩遮光し、30 分落ちつかせて検鏡。

（6）判定

①蛍光の強度

4+：菌体が輝くように、黄色ー黄緑色に観察される。

3+：明るい黄緑ー緑色に観察される。

2+：緑色に染色された菌体が明らかに観察される。

1+：緑色に染色された菌体が観察されるが、蛍光を発しているようには見えないもの。

－：菌体が見えないか、わずかに少数の菌が観察されるもの。また、抗原液の辺縁部のみが強く染色されていることがあるが、これは判定に考慮しない。

②菌量

被検血清の希釈倍数が高くなるにつれて、蛍光は弱くなるが、すべての菌の蛍光が一樣に低下するとは限らない。はじめの菌数の約 50%のものが 2+以上の強度を示す最高希釈倍数を、被検血清の抗体価とする。

③判定 (①および②より)

ペア血清の場合：急性期と回復期の抗体価の差が 4 倍以上で、かつ回復期血清が 128 \leq の時。シングル血清の場合：256 \leq の時。

④退色

観察時に蛍光の退色が著しい場合には、グリセリンによる封入の替わりに、たとえば FluoroGuard(Bio-Rad 社、10ml)を使用するとよい。

⑤接眼ミクロメーター (1mm100 マスなど) を使用すると、視野区分が明確化され、光っている菌の%が容易に算出できる。

⑥抗体価が既知の陽性参照血清を使用して抗体価を標準化する必要がある。

2) マイクロプレート凝集反応²³⁾

(1) 抗原液の作製

①易熱性抗原による交差反応をさけるため、BCYE 寒天平板培地で 2~3 日間培養した菌をかきとって、生理食塩水に懸濁し 100℃1 時間、あるいは 121℃30 分処理する。

②3000rpm15 分遠心して上清を捨て、もう一度遠心して洗い、抗原希釈液 (防腐剤としてアジ化ナトリウムを 0.1w/v%になるよう添加した PBS) で 8×10^9 /ml に調整する。これで遮光して 2~10℃で 1 年間は使用可能である。

③使用時に、1 検体当たり 75 μ l の抗原液をそれぞれ小試験管に採取し、2 倍量 (1 検体当たり 150 μ l) の抗原希釈液を加えて希釈抗原液とする。

(2) 検体の希釈

①レジオネラ症が疑われる患者の血清を 56℃30 分処理して非働化する。非働化処理をしないと非特異的反応がでる場合がある。

②小試験管に検体希釈液 (1%の BSA あるいは正常ウサギ血清、0.1%のアジ化ナトリウムを含む生理食塩水) 350 μ l を採取し、次に検体 50 μ l を加え、攪拌する (1:8 希釈)。

(3) 操作

11 種の菌抗原を使用する場合を述べる。

①血清 1 検体あたり 96 穴 U 底マイクロプレート 1 枚を横にして、右端の 1 列を残し、11 列すべての穴に検体希釈液を 25 μ l ずつ分注。

②1:8希釈した検体を最下行の穴にダイリ्यूターまたはマイクロピペットで25 μ l入れ、攪拌する。

③1:16希釈した検体を次の穴に25 μ lずつ移し、2倍階段希釈を行う。最上行の穴は検体の希釈は行わず、検体希釈液のみ入れて抗原対照穴とする。

④各希釈抗原液を対応する穴に25 μ lずつ滴下し、マイクロプレートミキサーで攪拌する。

⑤湿潤箱にいれ常温で一晩（16時間以上）静置する。

（4）判定

①明るい平坦な場所に黒紙を敷いた上にマイクロプレートを置いて、または沈降線観察装置を用いて各穴の沈降像を観察する。

②最初に各抗原の抗原対照穴の判定が-であることを確認する。もし+で自己凝集が起こっていればその試薬は使用しない。

③判定は図2に従って行い、+以上を凝集とする。

④各抗原について凝集が観察される血清の最高希釈倍数を凝集価とする（最下段のみ+なら16）。

⑤ペア血清の場合：急性期と回復期の抗体価の差が4倍以上で、かつ回復期血清が128 \square \leq の時、シングル血清の場合：256 \leq の時、レジオネラ症とする。

（5）注意

①使用する試薬は使用時に室温にもどしておく。

②手動のダイリ्यूターとポリスチレンのプレートの組み合わせでは、希釈すると底面に傷がついて判定しにくいので使用しない。

③デンカ生研のニューモフィラ群1B、3、6、ミクダデイ抗原に対してマイコプラズマ肺炎では1:128となることがあるので鑑別に注意する。同様に、ニューモフィラ群1B抗原に対してクラミジア肺炎では1:128となることがあるので鑑別に注意する。1:256以上の力価ならレジオネラ症である。

6. 疫学的解析

現在のところ PFGE（パルスフィールドゲル電気泳動）法が患者およびその周辺環境から分離された菌株の比較を行うのにもっとも有用な分子疫学的手法である。

1) PFGE 法

BCYE α 寒天（Difco）培地上で35 $^{\circ}$ C 3日間培養した菌体を爪楊枝の先でごく少量かきとり、200 μ lの超純水に懸濁し、等量の1% Low Melt Agarose（Bio-Rad）と混

ぜ、plug mold (Bio-Rad) に流し込み氷上で冷却し、アガロースブロックを作製する。アガロースブロックをリゾチーム液 (10mg/ml lysozyme, 0.5M EDTA, pH8.0) 1ml に浸し、37℃で一晩ゆっくり振盪する。液を蛋白質分解酵素液 (1mg/ml proteinase K, 1% N-lauroylsarcosine, 0.5M EDTA, pH8.0) 1ml に換え、50℃で一晩ゆっくり振盪する。アガロースブロックを半分の大きさに切断後、1mM phenylmethane sulphonyl fluoride (PMSF) を含んだ TE バッファー (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) 1ml に浸し、50℃で1時間ゆっくり振盪する。液を新しい 1mM PMSF を含んだ TE バッファーに換え、再び 50℃で1時間ゆっくり振盪する。PMSF は神経毒作用があるので、取り扱いには注意が必要である。代わりに比較的高価だが安全性および安定性の高い Pefabloc SC AEBSF (Roche Diagnostics) を 4mM になるよう TE バッファーに溶かして用いてもよい。液を TE バッファー 1ml に換え、氷上で1時間ゆっくり振盪し、アガロースブロックを洗浄する。液を制限酵素処理のためのバッファー (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, 100 μ g/ml bovine serum albumin) 200 μ l に換え、氷上で1時間ゆっくり振盪し、バッファーの平衡化を行う。液を制限酵素 *Sfi*I (New England Biolabs) 20 units を含む制限酵素バッファー 100 μ l に換え、50℃で一晩ゆっくり振盪する。酵素処理を終えたアガロースブロックは液を 0.5 \times TBE (Tris-borate 45mM, EDTA 1mM) に換え、電気泳動を開始するまで 4℃に置く。

パルスフィールドゲル電気泳動は CHEF DRII (Bio-Rad) を用いて、1% Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad)、0.5 \times TBE、パルスタイム 5 秒から 50 秒、200V、泳動時間 21 時間、バッファーの温度は約 16 °C で行う。電気泳動終了後、ゲルは 0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射装置上でポラロイド 107 フィルムで撮影する。

引用文献

1. 森 正道, 星野啓一, 園田久子, 吉田広海, 藪内英子, 山城祐子, 小出道夫, 斎藤厚, 岸本寿男, 古畑勝則, 相原雅典, 嶋田昌司: *Legionella pneumophila* serogroup 7 による Pontiac fever の集団発生例. I. 臨床所見. 感染症学雑誌, 69:646~653, 1995.
2. Glick, T.H., M. B. Gregg, B. Berman, G. Mallison, W. W. Rhodes, Jr., and I. Kassanoff: Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. Am. J. Epidemiol., 107:149-160, 1978.
3. 斎藤 厚, 下田照文, 長沢正夫, 田中 光, 伊藤直美, 重野芳輝, 山口恵三, 広田正毅, 中富昌夫, 原 耕平: 本邦はじめての Legionnaires' disease (レジオネラ症) の症例と検出菌の細菌学的性状. 感染症学雑誌, 55:124~128, 1981.
4. 厚生省生活衛生局企画課監修: 「新版・レジオネラ症防止指針」(財)ビル管理教育センター, 東京, 1999.
5. 奥田敬一, 池戸正成, 藪内英子: 冷却塔から *Legionella* 属菌を検出するための新選択培地: Wadowsky-Yee-Okuda (WYO) 培地. 感染症学雑誌, 58:1073-1082, 1984.
6. 小出道夫, 神野 勉, 塚原八重子, 前島健治, 斎藤 厚: 近畿地方のクーリングタワー水からの *Legionella* の分離. 感染症学雑誌, 65:1578-1582, 1991.
7. Reinthaler, F. F., J. Sattler, K. Schaffler-Dullnig, B. Weinmayr, and E. Marth: Comparative study of procedures for isolation and cultivation of *Legionella pneumophila* from tap water in hospitals. J. Clin. Microbiol., 31:1213-1216, 1993.
8. 春日 修, 高木紀美子, 谷 佳都, 絹巻明生: 環境水由来レジオネラ属菌の分離方法に関する検討. 感染症学雑誌, 73:25-34, 1999.
9. 春日 修, 三沢 均, 高木紀美子, 谷 佳都, 池戸正成: 環境水由来レジオネラ属菌の選択培地による効率的検出法の検討. 感染症学雑誌, 76:41-50, 2002.
10. Lin A, J. E. Stout, J. D. Rihs, R. M. Vickers, and V. L. Yu: Improved *Legionella* selective media by the addition of fluconazole: results of in vitro testing and clinical evaluation. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 34:173-175, 1999.
11. 小栗豊子, 中村文子, 三澤成毅: 環境水からの *Legionella* 属菌の検出について. 日本臨床微生物学雑誌, 7:21-25, 1997.
12. 黒木俊郎, 佐多 辰, 山井志朗, 八木田健司, 勝部泰次, 遠藤卓郎: 循環式浴槽における自由生活性アメーバと *Legionella* 属菌の生息状況. 感染症学雑誌, 72:1056-1063, 1998.
13. Brown S. L., Bibb W. F., and McKinney R. M: Retrospective examination of lung tissue specimens for the presence of *Legionella* organisms: comparison of an indirect

- fluorescent-antibody system with direct fluorescent-antibody testing. J Clin Microbiol., 19:468-472, 1984.
14. Benson, R. F., and B. S. Fields: Classification of the genus *Legionella*. Semin. Respir. Infect. 13:90-99, 1998.
 15. 藪内英子, 王 笠, 荒川迪夫: 温泉とレジオネラ症. Clin. Infect. Chemother., 1:40-42, 1995.
 16. 山本啓之: PCR 法による *Legionella* 属細菌の検出・同定, 日本臨床, 50 特別号, 394~399, 1992.
 17. Mahbubani, M. H., Bej, A. K., Miller, R., Haff, L., DiCesare, J., and Atlas, R. M. : Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. Molecular and Cellular Probes, 4:175-187, 1990.
 18. Perkin Elmer: Package insert, EnviroAmp Legionella Kits. Perkin Elmer Corporation. 1993.
 19. Ezaki, T., Y. Hashimoto, and E. Yabuuchi.. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. Int. J. Syst. Bacteriol., 39:224-229, 1989.
 20. Dominguez, J. A., N. Gali, P. Pedroso, A. Fargas, E. Padilla, J. M. Manterola, and L. Matas: Comparison of the Binx *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay (EIA) with the Biotest *Legionella* urin antigen EIA for detection of *Legionella* antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples. J. Clin. Microbiol., 36:2718-2722, 1998.
 21. 山口恵三, 舘田一博, 小林隆夫, 松本哲哉, 石井良和, 馬 リン, 磯貝健次, 村上日奈子: レジオネラ肺炎の診断学的・臨床的特徴に関する検討-過去7年間における87症例の解析-. 厚生科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業「レジオネラ感染症の新しい診断技術の開発とその標準化に関する研究」平成11年度研究報告書, 10-15, 2000.
 22. 小出道夫, 斎藤 厚, 比嘉 太, 山城祐子, 伊志嶺朝彦, 普天間光彦, 稲留 潤, 川上和義, 草野展周: Two step polymerase chain reaction 法による *Legionella pneumophila* の検出. 感染症学雑誌, 67:1062-1067, 1993.
 23. 藪内英子, 斎藤 厚, 二木芳人, 田口善夫, 山口恵三, 河野 茂, 本田武司: 抗レジオネラ血清抗体価診断基準値の設定 - マイクロプレート凝集反応 -. 感染症学雑誌. 71:116-124, 1997.

24. 春日 修, 高木紀美子, 三沢 均、小野沢正人、千葉栄次、谷 佳都, 池戸正成: 環境水由来レジオネラ属菌の検出における有機酸緩衝液前処理の検討. 感染症学雑誌, 76:1010-1015, 2002.

検査依頼先

全地研および国立感染研

執筆者一覧

堺市衛生研究所		山内昌弘、田中智之
三重県科学技術振興センター	保健環境研究部	杉山 明、山内昭則
国立感染症研究所	細菌第一部	倉 文明、前川純子

コメント者一覧

大阪府立公衆衛生研究所	公衆衛生部	枝川亜希子
静岡市衛生研究所	衛生検査担当	北條圀生
名古屋市衛生研究所		野村 寛

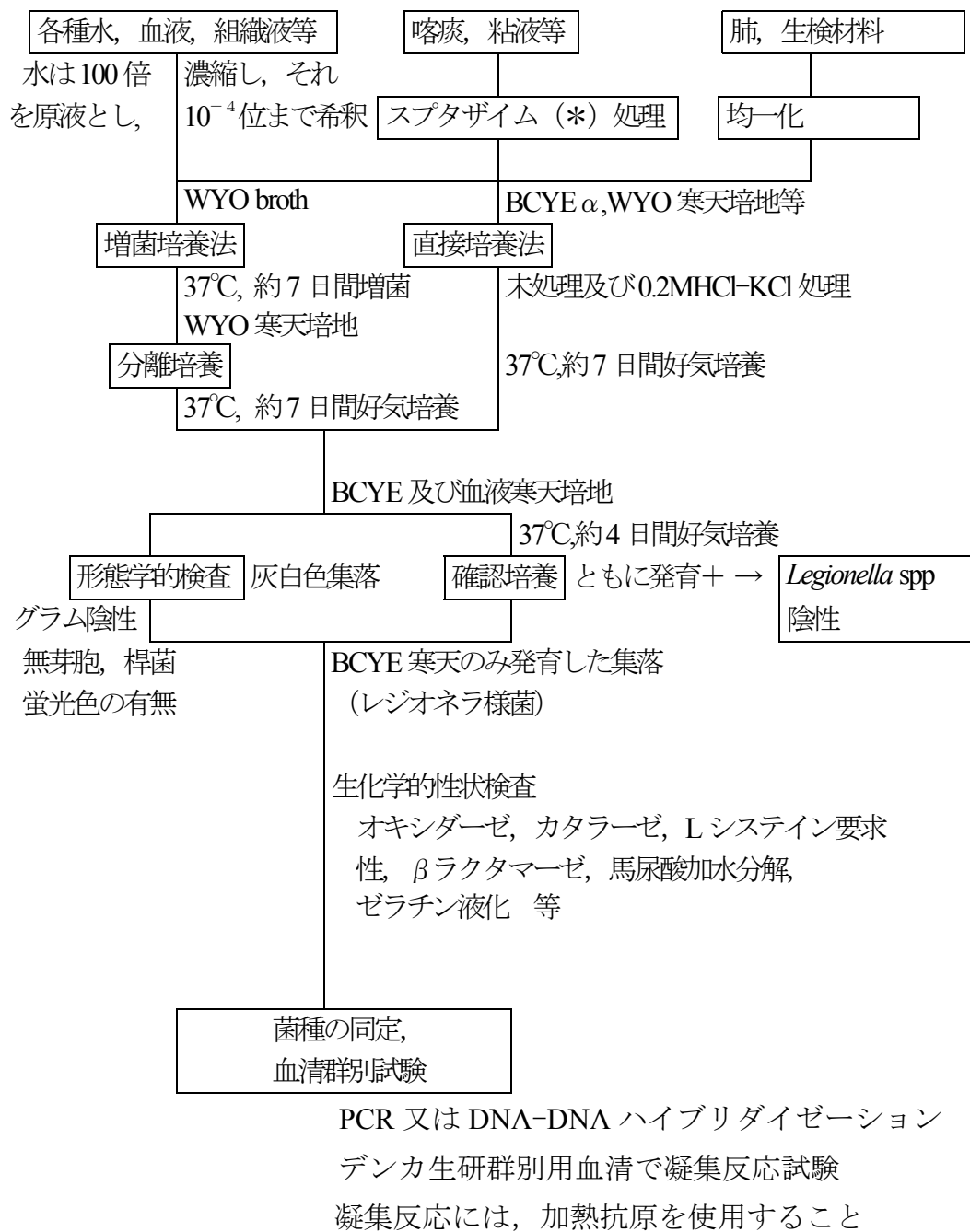


図 1. *Legionella* sp. の分離, 同定手順

* 喀痰溶解酵素 (極東製薬工業): 喀痰と同量あるいは4倍量加え、喀痰を均質化する。

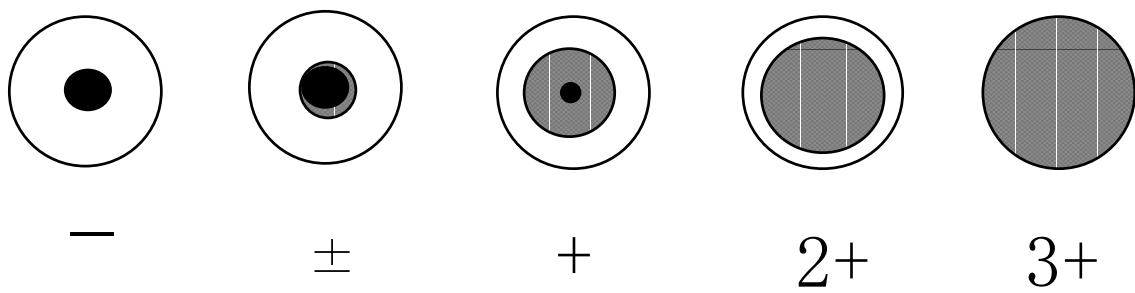


図 2. 凝集反応の判定図

表1 レジオネラ属 49 種の基準株と血清群（アルファベット順）

No	血清群	参考株	ATCC	No	血清群	参考株	ATCC
1	<i>L. adalaidensis</i>	1 1762-AUS-E	49625	42	<i>L. shakespearei</i>	1 214	49655
2	<i>L. anisa</i>	1 WA-316-C3	35292	43	<i>L. spiritensis</i>	1 Mt St Helens 9	35249
3	<i>L. beliardensis</i>	1 Montbeliard A1	700512			2 ML 76	12082 *
4	<i>L. birminghamensis</i>	1 1407-AL-H	43702	44	<i>L. steigerwaltii</i>	1 SC-18-C9	35302
5	<i>L. bozemani</i>	1 WIGA	33217	45	<i>L. taurinensis</i>	1 Turin I no.1	700508 **
		2 Toronto 3	35545	46	<i>L. tucsonensis</i>	1 1087-AZ-H	49180
6	<i>L. brunensis</i>	? 441-1	43878	47	<i>L. wadsworthii</i>	1 81-716	33877
7	<i>L. busanensis</i>	1 K9951	BAA-518	48	<i>L. waltersii</i>	1 2074-AUS-E	51914
8	<i>L. cherrii</i>	1 ORW	35252	49	<i>L. worsleiensis</i>	1 1347	49508
9	<i>L. cincinnatensis</i>	1 72-OH-H	43753	* NTCC.	No., London, England		
10	<i>L. drozanskii</i>	1 LLAP-1	700990	**	<i>L. spiritensis</i>	SG1 と同じ血清群	
11	<i>L. dumoffii</i>	1 NY-23	33279	***	<i>L. quinlivanii</i>	SG2 と同じ血清群	
12	<i>L. erythra</i>	1 SE-32A-C8	35303	****	<i>L. rubrilucens</i>	と同じ血清群	
		2 LC 217	****				
13	<i>L. fairfieldensis</i>	1 1725-AUS-E	49588				
14	<i>L. fallonii</i>	1 LLAP-10	700992				
15	<i>L. feeleii</i>	1 WO-44C-C3	35072				
		2 691-WI-H	35849				
16	<i>L. geestiana</i>	1 1308	49504				
17	<i>L. genomospecies 1</i>	1 2055-AUS-E	51913	***			
18	<i>L. gormanii</i>	1 LS-13	33297				
19	<i>L. gratiana</i>	1 Lyon 8420412	49413				
20	<i>L. gresilensis</i>	1 Greoux 11 D13	700509				
21	<i>L. hackeliae</i>	1 Lansing 2	35250				
		2 798-PA-H	35999				
22	<i>L. israelensis</i>	1 Bercovier 4	43119				
23	<i>L. jamestownensis</i>	1 JA-26-G1-E2	35298				
24	<i>L. jordanis</i>	1 BL-540	33623				
25	<i>L. lansingensis</i>	1 1677-MI-H	49751				
26	<i>L. londiniensis</i>	1 1477	49505				
27	<i>L. longbeachae</i>	1 Long Beach 4	33462				
		2 Tucker 1	33484				
28	<i>L. lytica</i>	1 PCM 2298	-				
29	<i>L. maceachernii</i>	1 PX-1-G2-E2	35300				
30	<i>L. micdadei</i>	1 TATLOCK	33218				
31	<i>L. moravica</i>	1 316-36	43877				
32	<i>L. nautarum</i>	1 1224	49506				
33	<i>L. oakridgensis</i>	1 Oak Ridge 10	33761				
34	<i>L. parisiensis</i>	1 PF-209C-C2	35299				
35	<i>L. pneumophila</i>	1 Philadelphia 1	33152				
		1 Knoxville-1	33153				
		2 Togus-1	33154				
		3 Bloomington-2	33155				
		4 Los Angeles-1	33156				
		5 Dallas 1E	33216				
		6 Chicago 2	33215				
		7 Chicago 8	33823				
		8 Concord 3	35096				
		9 IN-23-G1-C2	35289				
		10 Leiden 1	43283				
		11 797-PA-H	43130				
		12 570-CO-H	43290				
		13 82A3105	43736				
		14 1169-MN-H	43703				
		15 Lansing 3	35251				
36	<i>L. quateirensis</i>	1 1335	49507				
37	<i>L. quinlivanii</i>	1 1442-AUS-E	43830				
		2 LC 870	12434 *				
38	<i>L. rowbothamii</i>	1 LLAP-6	700991				
39	<i>L. rubrilucens</i>	1 WA-270A-C2	35304				
40	<i>L. sainthelensi</i>	1 Mt St Helens 4	35248				
		2 1489-CA-H	49322				
41	<i>L. santacrucis</i>	1 SC-63-C7	35301				

表 2 役立つレジオネラ属菌の表現形質

菌種	自発蛍光	馬尿酸水解
<i>L. anisa</i>	+青白	
<i>L. bozemanii</i>	+青白	
<i>L. cherrii</i>	+青白	
<i>L. dumoffii</i>	+青白	
<i>L. gormanii</i>	+青白	
<i>L. lytica</i>	+青白V	?
<i>L. parisiensis</i>	+青白	
<i>L. rowbothamii</i>	+青白	?
<i>L. steigerwaltii</i>	+青白	
<i>L. tusconensis</i>	+青白	
<i>L. erythra</i>	+赤	
<i>L. rubrilucens</i>	+赤	
<i>L. taurinensis</i>	+赤V	
<i>L. busanensis</i>		+
<i>L. feeleii</i>		V
<i>L. geestiana</i>		+
<i>L. gresilensis</i>		+
<i>L. londiniensis</i>		+
<i>L. pneumophila</i>		+
<i>L. spiritensis</i>		+
<i>L. waltersii</i>		+
<i>L. adelaidensis</i>		
<i>L. beliardensis</i>		
<i>L. birminghamensis</i>		
<i>L. brunensis</i>		
<i>L. cincinnatiensis</i>		
<i>L. drozanskii</i>		?
<i>L. fairfieldensis</i>		
<i>L. fallonii</i>		?
<i>L. genomospecies1</i>		
<i>L. gratiana</i>		
<i>L. hackeliae</i>		
<i>L. israelensis</i>		
<i>L. jamestowni</i>		
<i>L. jordanis</i>		
<i>L. lansingensis</i>		
<i>L. longbeachae</i>		
<i>L. maceachernii</i>		
<i>L. micdadei</i>		
<i>L. moravica</i>		
<i>L. nautarum</i>		
<i>L. oakridgensis</i>		
<i>L. quateirensis</i>		
<i>L. quinlivanii</i>		

365 nm UV

空欄は negative であることを示す。

Vは株により異なることを示す。

菌種	自発蛍光	馬尿酸水解
<i>L. sainthelensi</i>		
<i>L. santicrucis</i>		
<i>L. shakespearei</i>		
<i>L. wadsworthii</i>		
<i>L. worsleiensis</i>		

365 nm UV

ニンヒドリンの紫

空欄は negative であることを示す。

Vは株により異なることを示す。

インフルエンザ

目次

Part I: インフルエンザおよびインフルエンザウイルス検査法の概要

- 1 病原体
- 2 ヒトにおけるインフルエンザの疫学
- 3 臨床症状
- 4 検査の進め方

Part II: ウイルス分離と同定

- 1 インフルエンザウイルス分離のための臨床検体の採取法
- 2 ウイルス分離用検体の輸送と保存
- 3 培養細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離
- 4 孵化鶏卵を用いたウイルス分離と増殖
- 5 赤血球凝集阻止試験 (HI test) によるインフルエンザ分離株の同定
- 6 Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による
インフルエンザウイルスの同定
- 7 迅速診断のためのインフルエンザウイルスの検出

Part III: インフルエンザの血清診断

- 1 HI 試験による血清診断
- 2 ウイルス中和試験による血清学的診断

執筆者リスト

Part I

インフルエンザおよびインフルエンザウイルス検査法の概要

1 病原体

インフルエンザウイルスはオルトミクソウイルス科に属し、ウイルス粒子内部に存在する核蛋白(NP)およびマトリックス(膜蛋白、M1)の抗原性の違いから A、B、C 3つの型に分けられる。ウイルス粒子は直径 80~120 nm のエンベロープをもつ球状、または紐状の形態をしており、内部には 8 本 (C 型ウイルスは 7 本) に分節されたマイナス鎖 RNA が遺伝子として含まれている (図 A)。A 型および B 型ウイルスでは粒子表面には、宿主細胞表面に存在するレセプターに結合する赤血球凝集素 (HA) と、子ウイルスが細胞表面から出芽する際に、レセプターのシアル酸を切断してウイルス粒子を細胞外へ遊離させる働きをするノイラミニダーゼ (NA) の 2 種類の糖蛋白が存在する。一方、C 型ウイルスでは HA とエステラーゼ活性を併せもつ 1 種類の糖蛋白のみが粒子表面に存在する。

A 型ウイルスはヒト以外の動物にも広く分布している人畜共通ウイルスで、粒子表面の糖蛋白の抗原性の違いから、HA は 15 亜型、NA は 9 亜型に分けられ、それら全てはカモなどの水禽の世界に存在している。A 型ウイルスでは十~数十年に一度の頻度でこれら亜型の組み合わせがこれまでの流行株とは大きく異なる新型ウイルスが出現し、インフルエンザの世界的な大流行を引き起こす。このことから、A 型ウイルスについては人畜にわたる広範なサーベイランスが重要である。

2 ヒトにおけるインフルエンザの疫学

毎年冬頃になると世界各地で大なり小なりインフルエンザの流行がみられ、北半球にある温帯地域以北の国々ではおおむね 1-2 月頃が流行のピークとなる。わが国のインフルエンザは、毎年 11 月下旬から 12 月上旬頃に発生が始まり、翌年の 1-3 月頃にその数が増加、4-5 月にかけて減少していくというパターンであるが、夏期に患者が発生しインフルエンザウイルスが分離されることもある。流行の程度とピークの時期はその年によって異なる。

インフルエンザ流行の大きい年には、インフルエンザ死亡数および肺炎死亡数が顕著に増加し、さらには循環器疾患、慢性基礎疾患などを死因とする死亡も増加し、結

果的に全体の死亡数が増加することが明らかになっている（超過死亡）。ことに高齢者がこの影響を受けやすく、先進国などで共通に見られる現象となっている。高齢者の全人口に対する割合が急増している我が国においても、超過死亡は 1998/99 シーズンには 3 万人以上も観測され、超過死亡の 8 割以上は 65 歳以上の高齢者によってもたらされており、社会的な問題となっている。

3 臨床症状

感染から 1-3 日間ほどの潜伏期間の後、発熱・頭痛・全身の倦怠感・筋関節痛などが突然現われ、咳・鼻汁などの上気道炎症状がこれに続き、約 1 週間以内で軽快するのが典型的なインフルエンザで、いわゆる「かぜ」に比べて全身症状が強いのが特徴である。インフルエンザに罹患することによって 2 次的な細菌感染症を起こしやすくなることが知られており、肺炎、気管支炎、小児ではこれらの合併症に加えて中耳炎を起こしやすく、気管支喘息を誘発することもある。

インフルエンザの診断基準はインフルエンザの流行期間中に以下の 4 つの項目全てを満たすものとされている。

-
1. 突然の発症
 2. 38℃を超える発熱
 3. 上気道炎症状
 4. 全身倦怠感等の全身症状
-

なお、非流行期での臨床診断は、他疾患とのより慎重な鑑別が必要である。

4 検査の進め方

インフルエンザの検査にはウイルス学的、遺伝学的および血清学的手法がある。前者 2 つはウイルスの検出と分離・同定が中心であり、病因の診断としては最も信頼がおける検査である。最近では種々の迅速診断キットが市販されており、臨床分離検体中のウイルスの有無が短時間で判断できるようになってきているので、これらキットを併用した検査の進め方が有効である。一方、血清学的手法は抗体価の上昇をもとにした病因の確定診断で、正確な判定を下すためには急性期と回復期のペア血清を採取することが重要である。これら検査法の概要を図 B に示す。

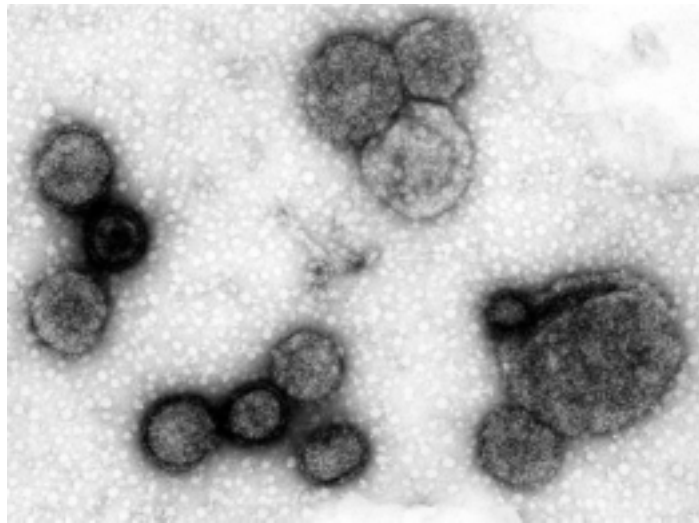
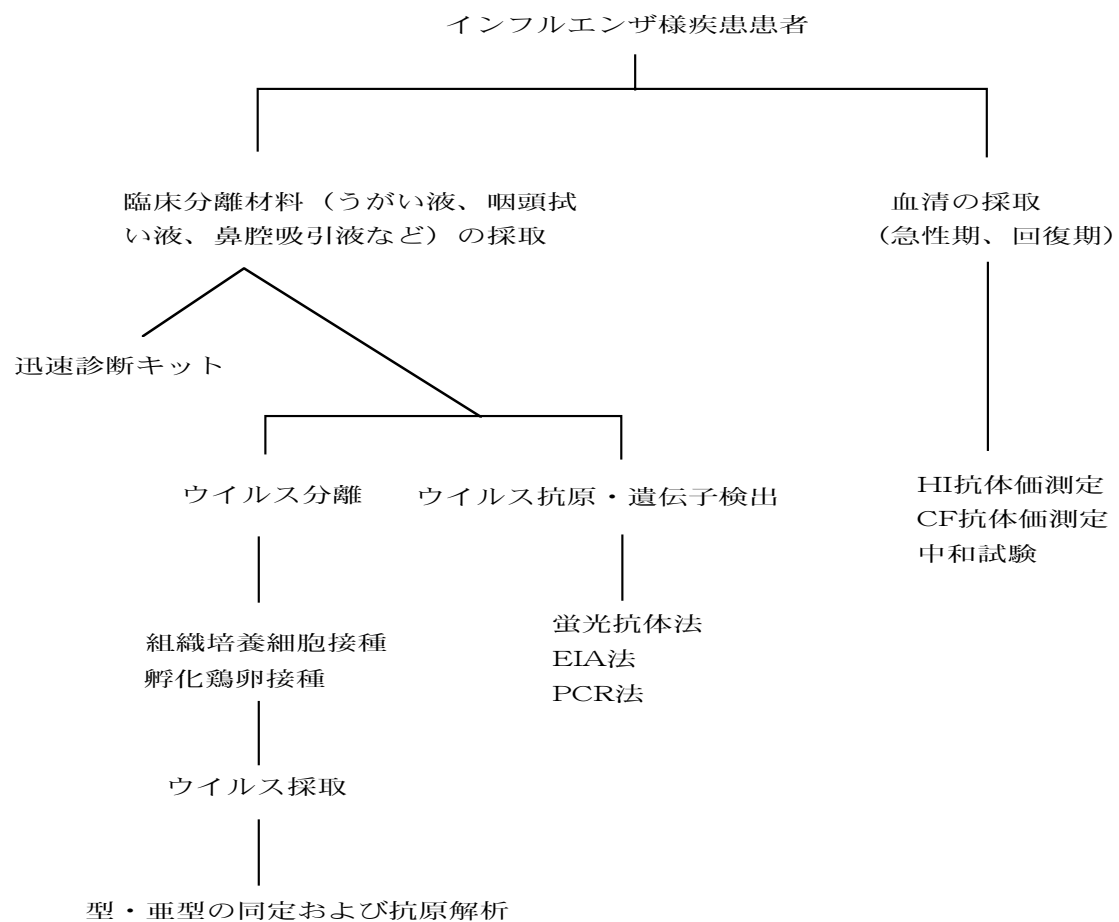


図 A インフルエンザウイルス A/Panama/2007/99 (H3N2)の電子顕微鏡写真



Part II

ウイルス分離と同定

患者から採取した検体からのウイルス分離は、ウイルス感染の病原診断として感度が高く、もっとも信頼できる方法である。また、インフルエンザ予防の要であるワクチンを供給するためには、ウイルスの分離という過程は不可欠である。

一昔前までは、インフルエンザウイルスの分離培養に孵化鶏卵が盛んに用いられていた。しかし、その入手が困難であることやウイルスを孵化鶏卵で増殖させると元の抗原性、感染性が変化することから、今日では、培養細胞を用いるのが普通になった。ところが現行のインフルエンザワクチンは、孵化鶏卵で増やしたウイルスから製造しているため、ワクチン株は孵化鶏卵で分離、継代されたウイルスを使用しなければならない。そのため、孵化鶏卵によるウイルス検出システムを備えた検査室では、培養細胞によるウイルス分離に加え、孵化鶏卵による分離も心がけたい。

1 インフルエンザウイルス分離のための臨床検体の採取法

病原診断のためのウイルス分離あるいは抗原検出の成功の鍵は、いかに上手に的確な臨床材料を得るかにかかっている。

1.1 咽頭ぬぐい (throat swab) 液の採取

急性呼吸器感染症の病原ウイルスを特定するための検体としては、咽頭拭い液がもっとも一般的である。

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 加 PBS(-)、2ml 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、ストレプトマイシンを夫々100-500u/ml、100-500 μ g/ml 添加してある。
- PBS の代わりに、ハンクス液を用いても差し支えない。PH 緩衝液がよいと考えているだけである。故に生理食塩水は不可。
- PBS の代わりに、Beef Broth を用いる場合もある。

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ッとなる。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あるという報告もまれにある。
- 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。生食水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、バルブをつまみ生食水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生食液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。鼻腔内に注入した生食液が戻ってこなかったり、バルブの中に注入され残った生食液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。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。コトン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。

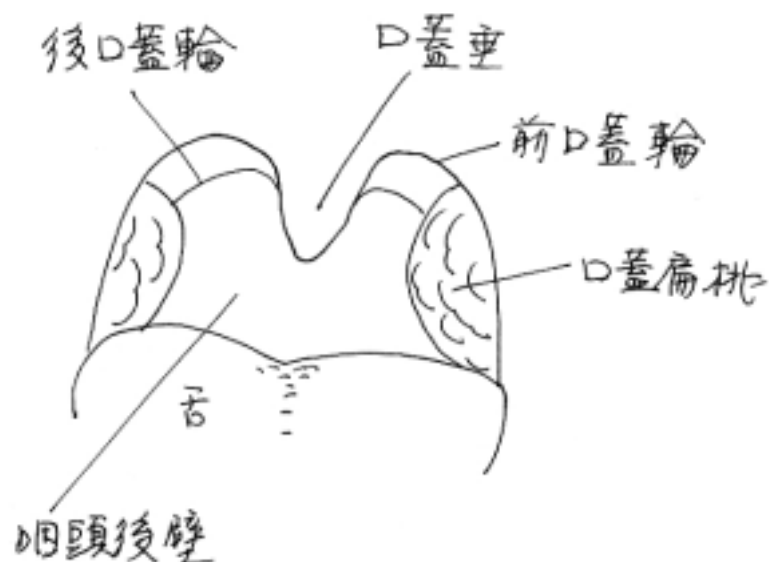


図 1.1 咽頭の説明

1.4 うがい液の採取

できるだけ少量（5～10 ml）の PBS または生食でうがい液を採取する。ショックを避けるために PBS または生食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

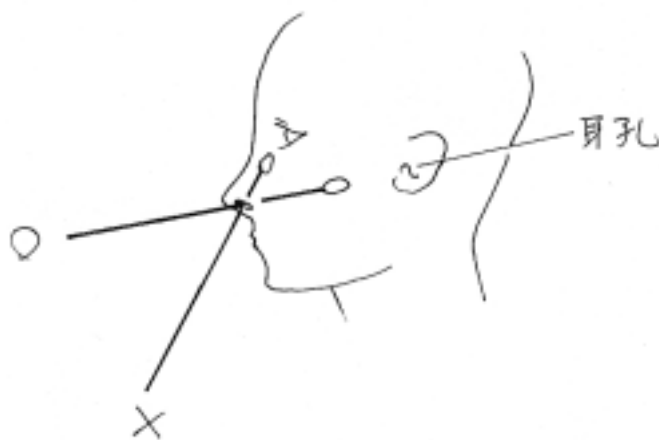


図 1.3 鼻咽頭拭い液採取法



鼻腔洗浄液採取法

2 ウイルス分離用検体の輸送と保存

分離用検体を採取したら水中または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 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、最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。

3.1 継代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（-））

3.2 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

3.3 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 を加えピペティングして細胞を分散させる。

⑤ 細胞分散液 2 ml (およそ 1×10^6 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込み、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込み培養する。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し、トリプシン処理をかけすぎないように注意する。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もあるので、そのような場合には、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。

3.4 インフルエンザウイルスの分離

3.4.1 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

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)

*24 ウェルマルチプレートを使用する場合、使用ウェルの間隔を空けることで交叉汚染を避けることが可能。不可能な場合、1 ml tube の使用が多検体の処理に適する。

3.4.2 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 μ g/ml ストレプトマイシン	5 ml
ファンギゾン	0.5 μ g/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

3.5 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℃のインキュベータ内で行う。
- ⑤ 30～45 分後**、トリプシン (1～10 μ g/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。

(別法) MDCK 細胞浮遊法でのウイルス分離

0.1%BSA および $2.5\mu\text{g/ml}$ アセチルトリプシン加 MEM*で MDCK 細胞数を $1\times 10^6/\text{ml}$ に調整し、その 0.5 ml を 24 ウェルマルチプレートに分注し、同時に検体 0.1ml を接種する。34℃で培養する。

*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浮遊状態を保てる量を用いる。

3.6 判定方法

培地の HA 活性を測定する。方法については「5.1 赤血球凝集 (HA) 試験および赤血球凝集阻止 (HI) 試験の実際」の項を参照。

HA 活性の検索でウイルス分離が特定できない場合には数回継代を繰り返す。継代については moi を考慮すること。

3.7 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。

4 孵化鶏卵を用いたウイルス分離と増殖

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、羊膜腔で有るが、卵に馴化したウイルスの増殖等には尿膜腔が良い。

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

卵令： 8～10日卵を用いる。

4.1 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し、発育状態を確かめ、胎仔側の気室と卵殻膜との境目に、なるべく血管の少ない部分に印（ライン）を付ける（図 4.1）



図 4.1 検卵

2) 検卵した卵を卵台に気室を上になる様に垂直に立てる。

4.2 検体接種

- 1) 卵殻上部気室部を中心に70%アルコールにて消毒する。
- 2) 印より 約1cm上部に鉗等にて、直径約1cm になるように卵殻を取り除き 小窓をあける。
- 3) 卵殻膜を透明にし胎仔の位置を把握する為、高压滅菌したサラダオイルを 約0.1ml 小窓より滴下する。
- 4) 接種材料を注射器に吸い入れ、小窓より確認した胎児の側に、検卵しながら注射

針を刺し入れ、注射針の位置を確認後、羊膜腔内に0.1 ml 接種する（図 4.2）
（羊膜腔内に注射針の先端が入っているのかを確認する方法は、注射針に少量の空気を入れ羊膜腔内に針を刺し入れた際に空気を出す。羊膜腔内に針が入っていない場合には、空気が泡となって上昇して来る事が卵殻膜越しに確認出来る。また羊膜腔内に針が入っている場合には、泡はそこに留まる）

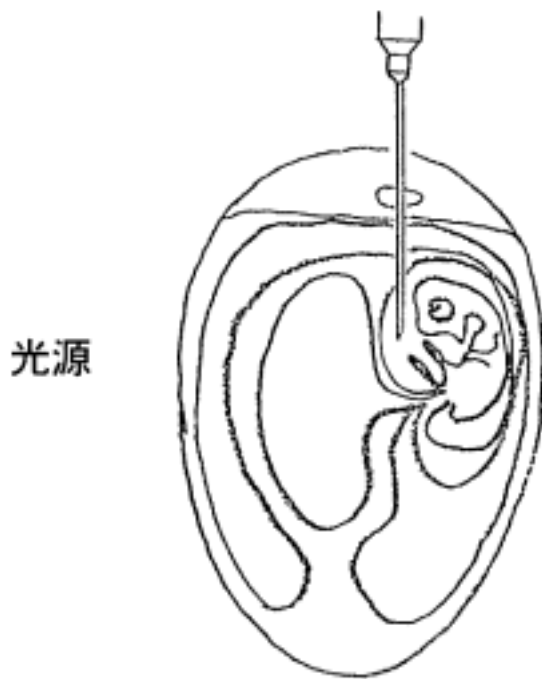


図 4.2 羊膜腔内接種法

5) 羊膜腔内に接種後、卵殻気室部の小窓をセロテープにて塞ぐ。

4.3 培養

気室を上にした状態で静置し、加湿して34℃にて、おおよそ48時間培養する。

（接種24時間で検卵。死亡の場合も念の為継代）

4.4 羊水採液

1) 一夜、4℃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、鉗等にて気室部全体の卵殻を取り除く。

2) 卵殻膜をピンセットにて取り除いた後、採液用の注射器の針にて、漿尿膜を破り、卵を傾け漿尿液を滅菌シャーレ等に捨てる。

（漿尿液についても一部採液する）

- 3) 胎仔を卵の外に出さない様に注意しながら、さらに卵を傾けると、羊膜に包まれた胎仔が羊水とともに露出して来るので、風船状に膨らんだ羊膜腔から羊水を採液する。

なお採液される羊水の量は1 ml 前後である。

4.5 判定

- 1) 通常はHA 活性の測定にて行う事が多い。(HA 価の測定の項参照)
(漿尿液のHA 活性も測定する)
- 2) HA 活性が陰性の場合、さらに採液した羊水を接種材料とし、通常数回接種を繰り返す。

4.6 尿膜腔内接種法

HA 活性が陽性の場合、HI 試験等に供する為、分離ウイルスの増殖を尿膜腔にて行う。

A) 卵令、検卵は羊膜腔内接種法に準じる。

4.6.1 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5 mm 程上部に、千枚通し等にて径1mm 弱の小穴を開ける。
- 3) 接種材料の羊水をPBS(-)(ペニシリン200単位/ml・ストレプトマイシン200 μ g/mlを含む)にて通常10倍~1000倍に希釈し、希釈段階毎に数個づつ接種する。
- 4) 接種量は0.2 ml、接種後小穴を木工ボンド等にて塞ぐ。

4.6.2 培養

羊膜腔内接種法に準じる。

4.6.3 尿液採液

- 1) 一夜4℃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、鋏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。

なお採液される尿液の量は10ml前後位である。

4.6.4 判定

通常はHA活性の測定にて行う事が多い。（HA価の測定の項参照）

HA活性のある物は、HI試験及びPCR法にて同定を行う。（インフルエンザA型・B型ウイルス分離株の同定の項参照）

4.6.5 保存法

数本に分注して－70℃以下に保存する。

5 赤血球凝集阻止試験（HI test）によるインフルエンザ分離株の同定

インフルエンザ様疾患の患者から得られたスワブ等を、発育鶏卵や MDCK 細胞等の培養細胞に接種することによって得られた検体に赤血球凝集活性が認められた場合、インフルエンザウイルスの存在を確認するために同定試験を行う必要がある。培養上清や鶏卵由来の羊水や漿尿液中のインフルエンザウイルスを同定するための方法として、市販のインフルエンザウイルス同定キット（後述）や亜型特異的なモノクローナル抗体、HA の亜型特異的な PCR プライマーを用いた PCR 法（後述）などを利用することが出来る。これらの方法は、インフルエンザウイルスの型別（前者）や、A 型ウイルスの亜型の判別などに有効であり、分離されたウイルスの同定という目的を十分達成することが出来る。

一方、インフルエンザウイルスにおける抗原の連続変異は、ワクチンの有効性に影響を与えることから、インフルエンザウイルスのサーベイランス活動においては、亜型の同定にとどまらず抗原性の変異の程度を知ることも重要な点になっている。標準抗体を用いた HI 試験は、亜型の同定と同時に、抗原性の変異の程度に関する情報がある程度得られる点で診断キットや PCR による同定より優れている。

HI 試験の信頼性は、使用する抗血清に大きく依存している。このため国立感染症研究所では、毎年のインフルエンザシーズンに先駆けて当該シーズンのワクチン株および疫学的に重要であると考えられる株に対する抗血清を作成し、標準抗原とともに要望のある地方衛生研究所に配布している。HI 試験の実施にあたり、血清中に存在する非特異的な血球凝集阻害物質および非特異的血球凝集物質を取り除くための操作が必要であり、試験実施機関における試験の信頼性、再現性を確保するためには、これらの操作が適切に行われる必要がある。さらに試験毎に参照抗原および被検抗原の抗原量が厳密に調整されるとともに、試験結果の判定基準が常に一定していることが、試験の信頼度を高めることになる。したがって、これらの条件が十分保証されている施設においては HI 試験がインフルエンザウイルスの同定に最も適した試験方法であるため WHO による世界的なインフルエンザのサーベイランス活動においてもこの方法が採用されている。

5.1 赤血球凝集（HA）試験および赤血球凝集阻止（HI）試験の実際

5.1.1 インフルエンザウイルス同定キット

国立感染症研究所では、毎年のインフルエンザシーズンに先立ちインフルエンザ同

定キットを希望する地方衛生研究所に配布し、分離株の抗原性に関する情報の還元に協力をお願いしている。

同定キットに含まれるフェレット感染血清は当該シーズンのワクチン株および疫学的に必要であると考えられるウイルスを、各株毎に 10-15 頭のフェレットに感染させ、その感染後血清をプール後凍結乾燥させたものである。コントロール抗原は、フェレット感染血清の作成に用いたものと同じウイルスの感染しょう尿液を不活化したものである。

参考：米国 CDC では、国内のインフルエンザサーベイランスに参加している施設（WHO Collaborating Laboratories）に対して、同定用の抗血清としてワクチン株の精製 HA で複数回免疫した羊免疫血清もしくは発育鶏卵培養したウイルスを静脈内接種した鶏の免疫血清を配布している。この方法は日本での方法に比べ、高力価の同定用血清が大量に安価に作成できるという利点がある。

5.1.2 試薬

血球浮遊液（七面鳥、鶏、人 O 型またはモルモット血球）

使用する赤血球の選択には、臨床分離インフルエンザウイルスの血球凝集性が流行シーズンや継代歴によって変化することを念頭に置く必要がある。細胞で分離された最近の A 型分離株は鶏赤血球に対する感受性が低い傾向があり、一方 B 型分離株は七面鳥血球よりも鶏赤血球に対する感受性が高いものが見受けられる。これらの点を考慮して、国立感染症研究所では近年インフルエンザウイルスの HA, HI 試験には七面鳥血球を用いている。血球選択における注意点としては、同一検体においても異なる血球を用いることによって 4HA を示す抗原量が異なるため、一連の試験は同一種の血球で行う必要がある。また、血球浮遊液の濃度は血球種によって異なり、七面鳥、鶏は 0.5%、人、モルモット血球は 0.75% の濃度で使用する。

滅菌蒸留水

0.01M リン酸緩衝液 (PBS(-)) (pH7.2)

生理食塩水、0.85% NaCl

5.2 血清からの非特異的血球凝集阻止因子の除去

国立感染症研究所から分与する同定用フェレット感染血清からの非特異的血球凝集阻止因子の除去には以下の方法（RDE 法）を用いる*。

1. 凍結乾燥血清を指定量の滅菌蒸留水で溶解する。溶解した血清は-20℃以下の冷凍庫で保存する。
2. RDE(II)「生研」(デンカ生研)に滅菌生理食塩水 20ml を加えて溶解する。
3. 一容の血清に三容の RDE を加える(例 0.3ml 血清+0.9ml RDE)。
4. 37℃のウォーターバスで 18 時間から 20 時間作用させた後、56℃のウォーターバスで 30 分から 1 時間加熱し、RDE を不活化する。
5. 室温に冷却した後、6 容の滅菌生理食塩水を加え、最終希釈を 10 倍とする。
6. HA,HI 試験に用いるものと同種の赤血球の packed cells を、10 倍希釈した血清 10 容に対して 1 容加え、緩やかに攪拌混和する。
7. 室温一時間で、吸収する。途中数回攪拌混和することで血球が沈殿しないようにする。
8. 1200rpm 10 分間遠心し、血清と血球を分離する。
9. 吸収済血清と血球を反応させて、吸収が完全に行われたことを確認する**。
10. 吸収が不完全な場合は、6.からの操作を吸収が完全になるまで繰り返す。

*血清中の非特異的血球凝集阻止因子の性状および特異性は、血清ごとに異なり、また RDE のロットごとに RDE 活性が異なることを考慮する必要がある。このため、全量の抗血清を処理するに先立ち RDE 処理および血球吸収によって、使用する抗血清の非特異反応が完全にのぞけるかどうかを、少量の抗血清を用いて事前に確認すべきである。不完全な RDE 処理や血球吸収による非特異反応は HI 試験の信頼性を著しく低下させる。

血清診断を行う場合には血清および抗原の種類によって、非特異的血球凝集阻止因子の除去方法としていずれの方法が適しているか(RDE 法、トリプシン過ヨウ素酸法(後述)等)を検討する必要がある。

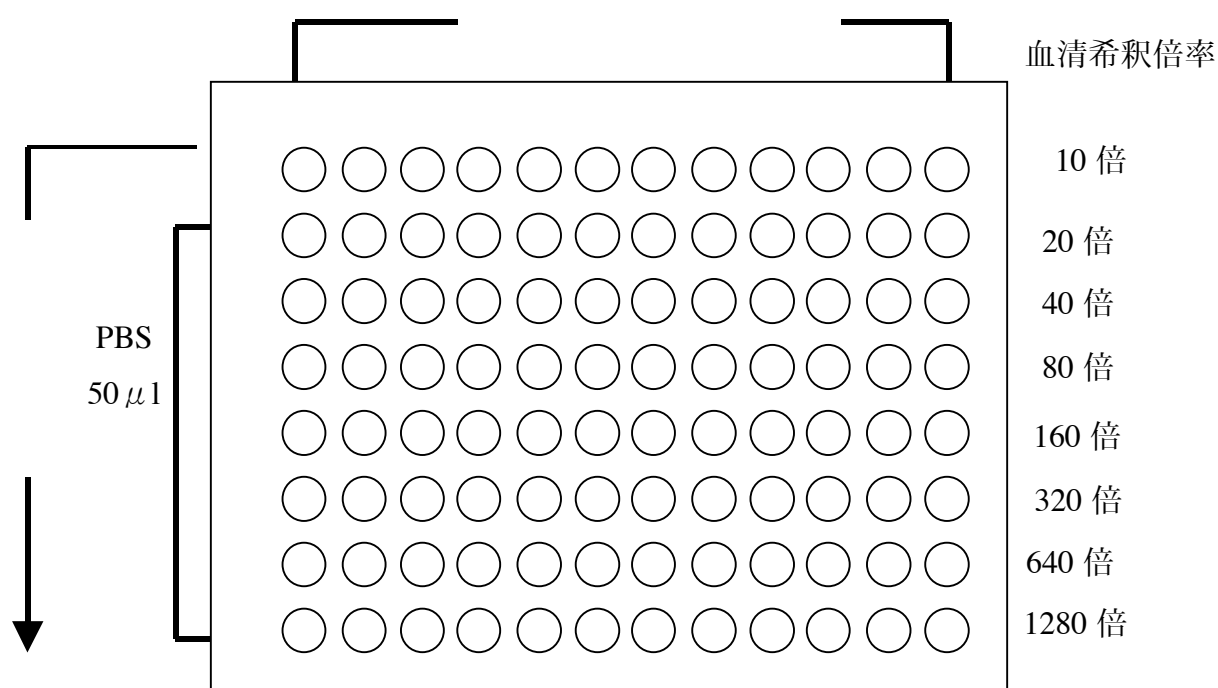
****非特異的血球凝集因子の除去の確認法：**

- 1) マイクロプレートの B 列から H 列まで、PBS (pH7.2(-)) 50 μ l を加える。
- 2) A 列のそれぞれのウェルに 100 μ l の処理済み血清を加える。一列は血球対象として血清の代わりに、100 μ l の PBS(-)を加える。
- 3) A 列から 50 μ l を取り、B 列から H 列まで二倍の階段希釈を行う。
- 4) 全てのウェルに 50 μ l の血球浮遊液を加え、室温で一定時間反応させる。(注：それぞれ血球によって、至適濃度および反応時間が異なる。七面鳥、鶏を用いる場合は 0.5%血球浮遊液とし、45 分間反応させる。人 O 型またはモルモット血球を用いる場合は 0.75%血球浮遊液とし 60 分間反応させる。また、人 O 型またはモルモット血

球を使用する場合、0.1%のアルブミンを添加すると判定が容易となる。)

5) 血清存在下で血球対照と同様に血球が沈殿するかどうかを判定し、非特異的血球凝集因子が除かれたかどうかを調べる。

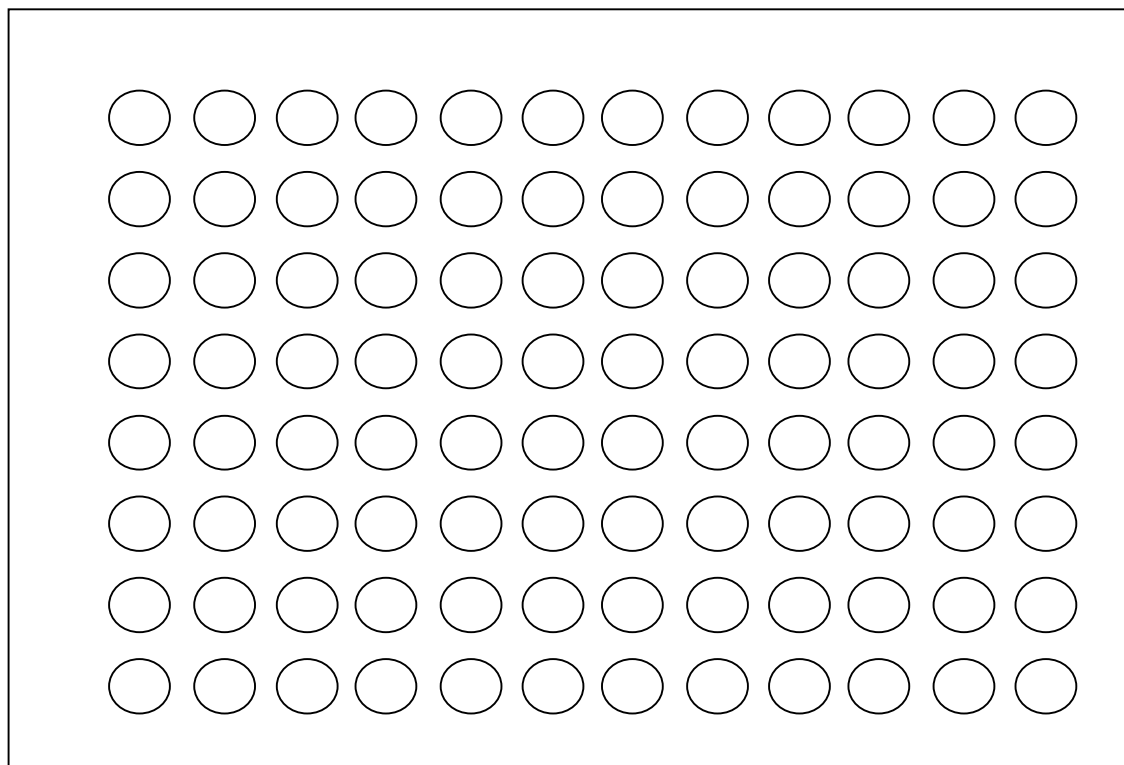
6) さらに、交差反応を示さない亜型の抗原を用いて HI 試験を行い非特異的な血球凝集阻止因子が RDE 処理によって、きちんと除去されたかどうかを調べる。



HA 価の測定： (1 プレート 8 株 1 : 2 から 1 : 4096 まで測定)

1. 50 μ l の PBS を全てのウェルに分注する。
2. ウイルス原液 50 μ l を 1 列目の各ウェルにそれぞれ加える。1 ウェルは血球対照としてウイルスの代わりに、PBS(-)を 50 μ l 加える。
3. 1 列目の各ウェルをよく混和後、50 μ l とり順次 2 倍階段希釈を行う。
4. 全ウェルに 50 μ l の血球浮遊液を加える。
5. 低速で攪拌後、室温で適時反応後、判定。完全凝集を与えるウイルス希釈の最高値の逆数を HA 価とする。

HA 価 2 4 8 16 32 64 128 256 512 1024 2048 4096



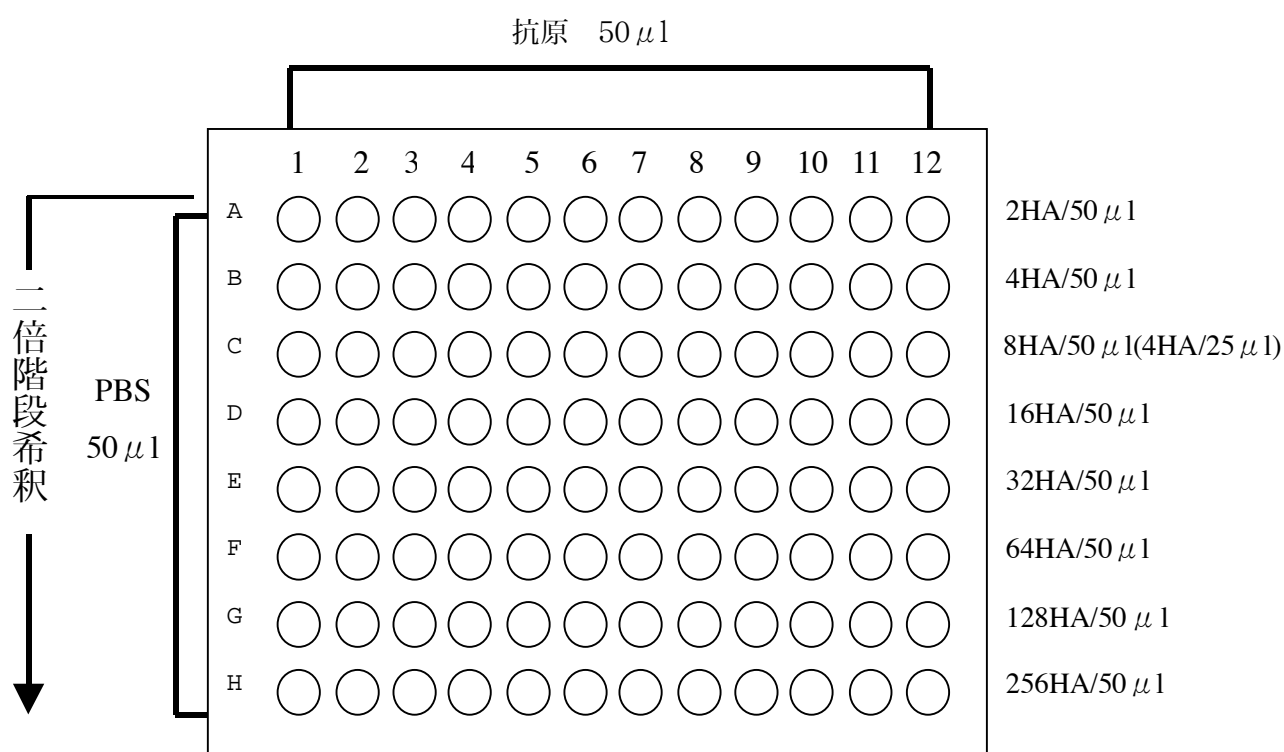
ウイルス (抗原) 50 μ l

5.3 4 HA/25 μ l 抗原液の作成 (1 プレート 12 株)

1. 上で求めた HA 価を 8 で割って、4 HA/25 μ l 抗原液の作成に必要な抗原原液の希釈倍率を求める。すなわち抗原原液の HA 価が 64 の時は、原液を 8 倍希釈したものが計算上、4 HA/25 μ l 抗原液となる。
2. 一回の試験に必要な抗原液の量をもとに PBS(-)で、抗原原液を希釈して 4 HA/25 μ l 抗原液を作製する。
3. 50 μ l の PBS(-)を全てのウェルに分注。
4. A 列にそれぞれ希釈した 4 HA/25 μ l 抗原液 50 μ l を加える。
5. A 列の各ウェルをよく混和後、50 μ l をとり順次 2 倍階段希釈を行う。

6. 50 μ l の血球浮遊液を加える。
7. 低速で攪拌後、室温で一定時間放置後、判定。
8. 3 well 目まで完全凝集を認めれば O.K. だめなら希釈液をもとに再調整後、再度 HA 価を測定する。*

*希釈作成した 4 HA/25 μ l 抗原液は、必ず back titration で力価を確認した後、その日のうちに HI 試験に供する。4℃で一晩以上保存した場合は、HI 試験実施前に HA 価の再確認をすること。



5.4 HI 試験

1. 25 μ l の PBS(-)をウェル 2 から 12 まで分注する。
2. 50 μ l の 1 : 10 希釈抗体をウェル 1 に分注する。
3. ウェル 1 から 25 μ l とり、ウェル 12 まで 2 倍階段希釈する。
4. 各ウェル 25 μ l ずつ 4HA/25 μ l のウイルス抗原を分注する。
5. 低速で攪拌後、室温で 60 分以上放置後、50 μ l の血球浮遊液を加える。
6. 低速で攪拌後、室温で適時放置後、判定。*

*抗体価は、完全に凝集阻止を示す抗体の最高希釈倍率の逆数とする。また、抗体の希釈倍率とは、2 倍階段希釈終了後の抗体の希釈倍率とし、抗原液、血球浮遊液によ

る抗体の希釈は考慮に入れないものとする。血球凝集阻止の判定の際には、プレートを傾け沈降した血球が血球対象と同様にウェル内で流れるものを陽性とする。

5.5 判定

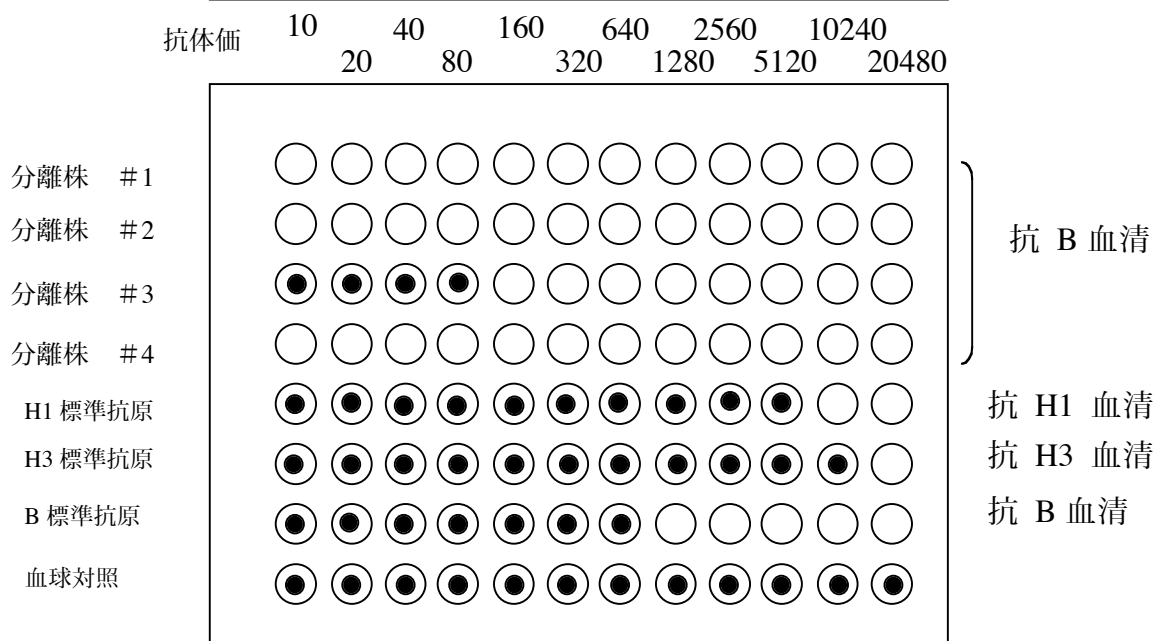
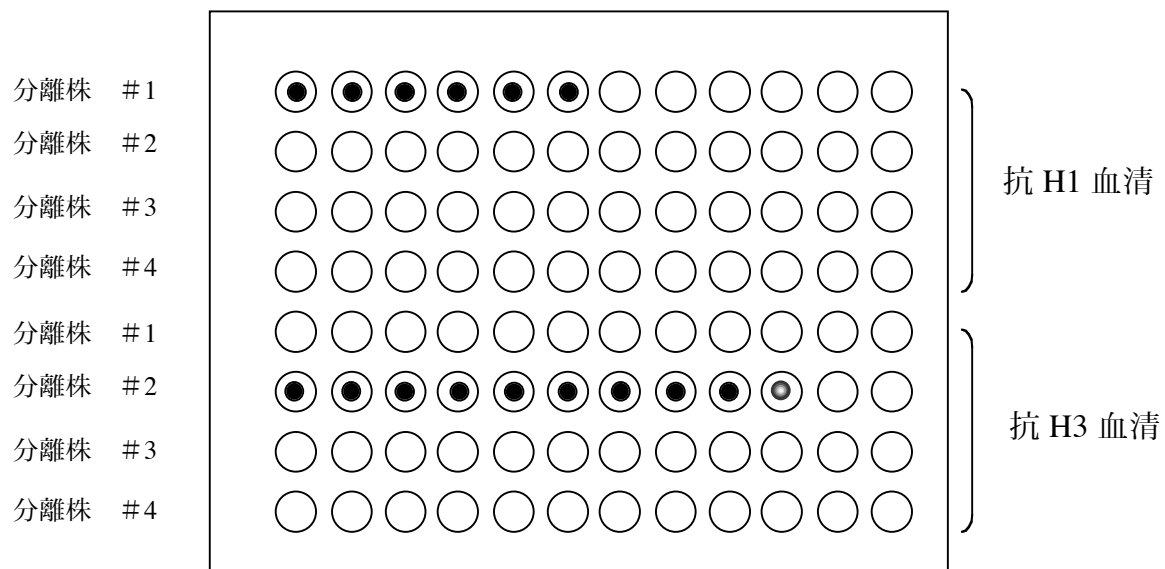
例 （下表・次ページ図参照）

	血清 HI 価			判定
	抗 H1 血清	抗 H3 血清	抗 B 血清	
分離株 #1	320	<10	<10	H1
分離株 #2	<10	2560*	<10	H3
分離株 #3	<10	<10	80	B
分離株 #4	<10	<10	<10	判定不能**
H1 標準抗原	5120	<10	<10	-
H3 標準抗原	<10	10240	<10	-
B 標準抗原	<10	<10	640	-

注意：

*：分離株 #2 の抗 H3 血清に対する 10 ウェルの反応のように不完全な凝集阻止が認められた場合は、完全阻止を示す最終希釈（2560 倍）を抗体価とする。

**：分離株 #4 の様に標準抗血清のいずれとも反応が認められない場合、インフルエンザウイルスではない可能性も考えられるため、インフルエンザ診断キットや PCR 法などによってインフルエンザ A 型、B 型のいずれで（可能であれば亜型まで）あるかを決定する。



抗血清 50 μ l

6 Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による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、より速く、より高い検出感度を得られるために、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つねに考慮しなければならない。今日、インフルエンザの予防にはワクチン接種が推奨され、その作成にはウイルス分離が不可欠である。したがって、インフルエンザにおける PCR 法の利用としては、血清学的手法 (HI 試験) によりウイルスの同定が困難な場合に有効である。

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-PCR (RT-PCR) で合成する必要がある。この章では、ウイルスから RNA を抽出し、ウイルス特異的なプライマーを用いて RT-PCR によるウイルスの同定方法を述べる。尚、本章では A/H1、A/H3 および B 型を同定するために、HA 遺伝子に対するプライマーを用いた RT-PCR 法を紹介するが、型 (A か B 型) を同定するためには M 遺伝子に対するプライマー (1) を用いて行うのも有用である。

6.1 ウイルス RNA の抽出および RT-PCR 反応

材料および試薬

マイクロ遠心器、マイクロピペット (2, 20, 200, 1,000 μ l)、 β -mercaptoethanol、RNase-free 滅菌蒸留水^{*1}、70 % エタノール^{*2}、滅菌微量遠心チューブ (0.2, 0.5, 1.5 ml)、サーマルサイクラー、プライマー、RNAeasyTM Mini Kit (Qiagen, Catalog #74106)、One Step RNA PCR Kit (TaKaRa, Catalog code RR024A)

6.2 分離されたウイルス検体からのウイルス RNA の抽出

ウイルス RNA の抽出方法は Qiagen 社の RNAeasyTM Mini Kit に添付されているマニュアルを参照している。

1. 以下の材料および試薬を混合する。

250 μ l Lysis Buffer RLT

2.5 μ l β -mercaptoethanol

50 μ l 検体あるいは RNase-free の滅菌蒸留水 (陰性コントロールのため)

250 μ l 70 % エタノール

2. 混合物をピンク色のカラムに入れ、10,000 rpm、15 秒間遠心する。
3. カラムをチューブから抜き取り、チューブの底にたまった液体を捨て、カラムを再び元に戻す。
4. 700 μ l の Wash Buffer RW1 をカラムに加え、10,000 rpm、15 秒間遠心する。
5. カラムを新しいチューブに移し、500 μ l の Wash Buffer RPE をカラムに加え、10,000 rpm、15 秒間遠心する。
6. カラムをチューブから抜き取り、チューブの底にたまった液体を捨て、カラムを再び元に戻す。
7. 500 μ l の Wash Buffer RPE をカラムに加え、12,000 rpm、2 分間遠心する。
8. カラムを滅菌 1.5 ml 微量遠心チューブに移し、20 μ l の RNase-free の滅菌蒸留水を加えて、1 分間置く。
9. 10,000 rpm、1 分間遠心する。

-20℃あるいは-80℃に保存することができるが、抽出されたウイルス RNA は、速やかに RT-PCR 反応に使うことが望ましい。

6.3 RT-PCR 反応

RT-PCR 反応は、Takara 社の One Step RNA PCR Kit に添付されているマニュアルを参照している。

Kit に含まれている試薬、型特異的なプライマーおよび抽出したウイルス RNA を以下のように混合し反応させる。

試薬	使用量	最終濃度
10 x One Step RNA PCR Buffer	5 μ l	1 x
25 mM MgCl ₂	10 μ l	5 mM
10 mM dNTPs	5 μ l	1 mM
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	1 μ l	0.8 U/ μ l
AMV RTase XL (5 U/ μ l)	1 μ l	0.1 U/ μ l
AMV-Optimized Taq (5 U/ μ l)	1 μ l	0.1 U/ μ l
sense (+)primer (20 μ M)	1 μ l	0.4 μ M
antisense (-) primer (20 μ M)	1 μ l	0.4 μ M
ウイルス RNA	1-25 μ l	

RNase-free 滅菌蒸留水	0-24 μ l
Total	50 μ l

各ウイルス HA 遺伝子に対するプライマーは以下のとおりである。

A/H1 (PCR 産物は 729 bp)

(+) 5'-AGCAAAAGCAGGGGAAAATAA-3'

(-) 5'-GCTATTTCTGGGGTGAATCT-3'

A/H3 (PCR 産物は 1,143 bp)

(+) 5'-AGCAAAAGCAGGGGATAATTC-3'

(-) 5'-TGCCTGAAACCGTACCAACC-3'

B (PCR 産物は 1,142 bp)

(+) 5'-AGCAGAAGCGTTGCATTTTC-3'

(-) 5'-ACCAGCAATAGCTCCGAAGA-3'

反応条件は以下のとおりである。

- 1) 50 °C 30 min.
- 2) 94 °C 2 min.
- 3) 94 °C 1 min.
- 4) 45 °C 1 min.
- 5) 72 °C 2 min.
- 6) 3.~5.を 30 回繰り返し
- 7) 72 °C 10 min
- 8) 4 °C

6.4 PCR 産物のアガロースゲル電気泳動による確認

材料および試薬

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、エチジウムブロマイド、1xTBE 電気泳動バッファー (0.089M Tris-0.089M boric acid-0.002M EDTA, pH 8.3 \pm 0.3)、ゲルローディングバッファー (30% glycerol, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF)

最終濃度 0.2～0.4 $\mu\text{g/ml}$ のエチジウムブロマイドを含む 1%アガロースゲルを製作し、1xTBE 電気泳動バッファーで 100V、約 30～40 分間電気泳動後、UV ライト上でバンドの有無を確認する（図 1）。PCR の結果、検体 1 は H1 A 型インフルエンザウイルス、検体 2 は H3 A 型インフルエンザウイルス、検体 3 は B 型インフルエンザウイルスと同定できる。検体 4 は同定不能であるが、プライマーの不一致による可能性もあるため、プライマーを再考し再度 PCR をかけることも考慮する。

※1 RNase-free 滅菌蒸留水

超純水を密閉できるガラスびんに入れ、DEPC（diethylpyrocarbonate）を終濃度 0.1%となるように加え、37℃で 2 時間加温する（この間に何回かよく混ぜる）。その後、滅菌と DEPC を飛ばして除くことを兼ねて、121℃、20 分オートクレーブにかける。DEPC は有臭のため、オートクレーブ後、臭いをかいで DEPC が残存していた場合、再度オートクレーブにかける。DEPC の臭いがなくなるまでこの作業を繰り返す。

※2 70 % エタノール

RNase-free 滅菌蒸留水を 3 容と試薬特級エタノール 7 容を混ぜ合わせる。

参考文献

(1) Zhang, W., Evans, D.H. : Detection and identification of human influenza viruses by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 33 : 165-189, 1991

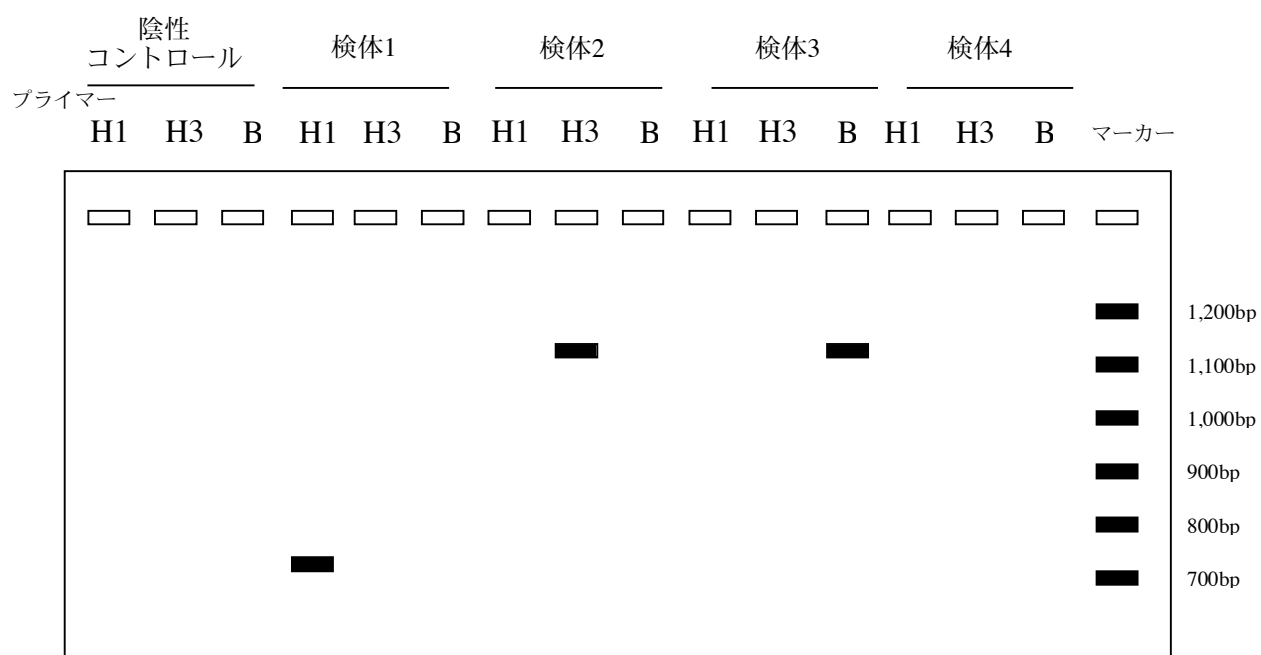


図1 PCR産物のアガロースゲル電気泳動による確認および型の同定

検体1、2および3は、それぞれA/H1、A/H3およびB型インフルエンザウイルスと同定できる。検体4はこの段階では同定不能であるが、プライマーの不一致によりPCR反応が進まなかった可能性があるので、プライマーを再考し再度PCRを行うことが望ましい。

7 迅速診断のためのインフルエンザウイルスの検出

1998 年よりわが国においても A 型インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス剤として Amantadine が認可され使用されている。より最近になってノイラミニダーゼの阻害剤である Zanamivir や Oseltamivir が使用されるようになり、臨床現場での迅速診断の重要性が高くなっている。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。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)
ジーンスタットフルーA&B キット	NA 酵素 活性測定	A 型・B 型	25 分	咽頭拭い液	ZymeTx (ニチレイ)
インフル A・B-クイック「生研」	EIA	A 型・B 型 (鑑別可)	20 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

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。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査検体からウイルスが検出できなかったに過ぎず、必ずしもインフルエンザウイルスによる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。

Part III

インフルエンザの血清診断

インフルエンザウイルス感染の診断は、ウイルス株自体が同定できる利点があるうえに、迅速であるという点でウイルス分離による方法が血清診断よりもすぐれている。一方で、ウイルス分離のための検体の採取が困難であったり、ウイルス分離をする施設がないなどの理由で血清診断が必要な場合がある。このため個人の最近の感染の有無を調べる目的で血清診断が行われているのが現状であろう。このような目的での血清診断の際には急性期の血清と回復期（2～4週間後）のペア血清が必ず必要である。急性期血清は、なるべく発症直後に採取する必要がある。また、たいていの人はインフルエンザウイルスに対する抗体を保有しているために、回復期血清一点での血清診断は、信頼性が低いために避けるべきである。このような条件が保証された上で、急性期血清と回復期血清の抗体価に4倍以上の上昇が認められたとき、ウイルス抗原の検出やウイルス分離が出来なかった場合でも他の臨床所見等と総合してウイルス感染の診断を行うことが出来る。

一方、ウイルス感染診断以外の目的でも、血清学的手法による抗体の検出によってウイルスの流行状況、流行予測の基礎資料となる国民の抗体保有状況、ワクチンの免疫原性の評価などの疫学的、免疫学的な研究に重要な情報を提供する。

1 HI 試験による血清診断

1.1 HI 試験による血清診断上の注意

血清診断の手法として HI 試験を用いる際には、血清の前処理に十分な注意が払われるべきである。インフルエンザ分離株の同定試験の稿でふれたように、血清中には非特異的な血球凝集阻止因子と血球凝集因子という相反する2つの因子が存在する。非特異的な血球凝集阻止は、血清中の成分に含まれるある種の分子がインフルエンザウイルスのレセプターとして赤血球上のウイルスレセプターと競合することによってウイルスの血球への結合を阻害することによって起こる現象である。このような阻害分子として人や動物の血清中の α 、 β 、 γ -阻害物質という三種類の分子種が知られている。これらの阻害分子は、異なるインフルエンザ株に対して異なった作用を示すため、血清種とウイルス株の組み合わせによっては、異なった前処理が必要となる場合がある。

1.2 血清の前処理

人血清の前処理は HA,HI によるインフルエンザの同定試験の稿にある RDE(II) 「生研」(デンカ生研)による非特異的凝集阻止因子の除去と使用する血球による吸収処理で多くの場合対応可能である。動物血清などで、この処理によっても非特異的反応と思われる反応がのぞけない場合の変法の一つとしてトリプシン-過ヨウ素酸法がある。

トリプシン-過ヨウ素酸法

試薬：

トリプシン溶液 200mg のトリプシン(SIGMA type(II), T-7409)を 25ml の 0.1M リン酸緩衝液(pH 8.2)に溶かし、濾過滅菌する。少量に分注し-20℃以下で保存する。保存したトリプシン溶液は半年間使用可能である。

1/90M 過ヨウ素酸(KIO₄)溶液 230mg の KIO₄を PBS(-) pH7.2 に溶かし 100ml とし、濾過滅菌する。1/90M 過ヨウ素酸(KIO₄)溶液は要事調整とし一週間以内で使い切ること。

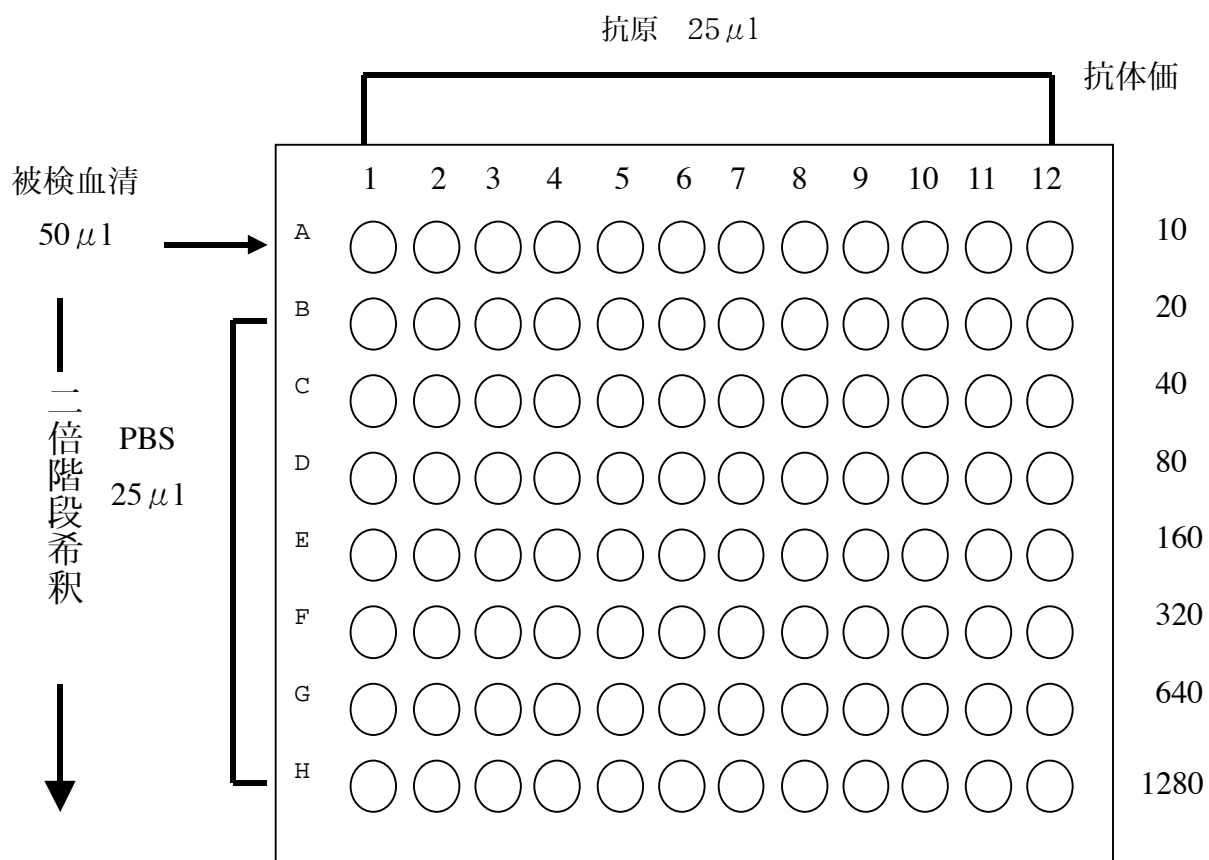
1% Glycerol 生理食塩水 1ml glycerol を 99ml の生理食塩水に加えて、濾過滅菌する。

手順：

1. 1/2 容のトリプシン溶液を 1 容の血清に加える。
2. 56℃30 分ウォーターバス内で非働化する。
3. 室温に冷却後、3 容の 1/90M 過ヨウ素酸(KIO₄)溶液を加え、混合し室温 60 分間放置する。
4. 3 容の 1% Glycerol 生理食塩水を加え、混合し室温 15 分放置する。
5. 2.5 容の 0.85% NaCl を加えて混合する。最終希釈は 1 : 10 となる。
6. RDE(II)処理の場合と同様、HI 試験に使用する血球で吸収処理をする。
7. 非特異的凝集の有無を調べる。

1.3 抗原の HA 価測定および 4 HA/25 μl 抗原液の作成および HI 試験法

赤血球凝集阻止試験(HI test)によるインフルエンザ分離株の同定の稿に準ずる。ただし、血清の階段希釈に関しては感染血清の抗体価は同定用の標準血清に比較して低いと考えられるので、10 倍から 1280 倍まででよい。



2 ウイルス中和試験による血清学的診断

ウイルス中和試験は、ヒトや動物のウイルス特異的な抗体を検出するのに極めて高い感度と特異性を有する。中和試験は、ウイルスと抗体を混合し中和反応するステップとそれを適当な宿主（培養細胞、孵化鶏卵、マウスなどの実験動物）に接種するステップによって構成されている。感染が認められないときには、その検体に中和抗体が存在していることを示している。感染の有無について、培養細胞を宿主として用いた場合、通常ウイルス感染による細胞変性効果(CPE)を指標としているが、それ以外にも様々な方法が開発されている。

中和試験は特定のウイルスに対する感染性を中和する抗体の測定に関して最も正確な方法である。インフルエンザウイルスの場合、中和抗体の主要な標的ウイルス蛋白はヘマグルチニン(HA)であり、中和試験ではウイルス株特異的に抗体を検出することが可能である。さらに、中和試験は感染性のウイルスがあれば行うことができる。そのため酵素抗体法(ELISA)などで必要となる精製されたウイルス蛋白などが利用できるようになる前に迅速に測定システムを立ち上げることができる。これは、新型インフルエンザウイルスの出現時には極めて有効な特性である。実際、1997年に香港でA/H5N1ウイルスが出現した際に、感染者の同定や感染経路の解明などの疫学調査に中和試験が利用されている。一方、中和試験は結果を得るのに時間がかかることや、試験に用いる感染性のウイルスを使用できる施設に制限があるなどの制約がある。

ここでは、MDCK細胞を用いた中和試験の一例について説明する。

2.1 ウイルス中和抗体価の測定方法

ウイルス中和抗体価の測定は大きく「I.ウイルス力価測定」と「II. ウイルス中和試験」の2つの部分に分けることができる。以下にその手順を示す。ここでは24穴プレートを使用しているが、他の96穴プレートなどにも変更可能である。

材料および試薬

1 ウイルス分離用培地

「3.4 インフルエンザウイルスの分離」の項を参照。

添加するトリプシン濃度についてはロット毎に至適濃度を決定しておく。

2 ウイルス希釈液

ウイルス分離用培地を使用する。

3 クリスタルバイオレット染色液

0.1%クリスタルバイオレット

20%メタノール

4 MDCK 細胞

細胞の継代によりウイルス感染に対する感受性が変化することが考えられるので、一定の継代数のものを使用する。

5 24 穴プレート

6 インフルエンザウイルス

発育鶏卵または MDCK 細胞等を用いて増殖させる。方法については「3. 培養細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離」および「4. 孵化鶏卵を用いたウイルス分離と増殖」の項を参照。

7 抗体陽性血清

入手可能な中和抗体陽性の血清を分注して-20℃以下に保存する。

8 抗体陰性血清

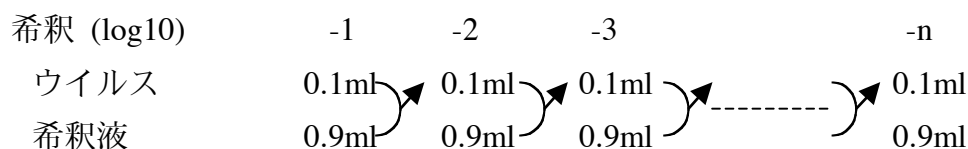
入手可能な中和抗体陰性の血清を分注して-20℃以下に保存する。

2.2 方法

2.2.1 ウイルス力価測定

中和試験に使用するウイルスの感染価を測定する。

1) ウイルスを 10 倍階段希釈する



2) MDCK 細胞を播いた 24 穴プレート*の各穴に 1ml の PBS(-)を加えて洗浄する

3) 通常-5~-8 の各希釈 0.1ml を各穴に接種する(各希釈 6 穴)

4) 34℃で 1 時間放置

5) 分離用培地 0.5ml を各穴に加える

6) 34℃の CO₂ インキュベーターで 2 日間程度**培養する

7) 培養液を除きクリスタルバイオレットで染色する

8) CPE の有無を判定し Reed&Muench の方法で TCID₅₀ を計算する (測定例を参照)

測定例

ウイルス感染価測定記録

実施日：

ウイルス：

ウイルス希釈 (log10)	CPE陽性 ウエル数	CPE陰性 ウエル数	累積陽性 ウエル数	累積陰性 ウエル数	割合	%CPE陽性
0					/	
-1					/	
-2					/	
-3					/	
-4					/	
-5	6	0	12	0	12/12	100
-6	5	1	6	1	6/7	86
-7	1	5	1	6	1/7	14
-8	0	6	0	12	0/12	0

50%の感染を起こす希釈(log₁₀)は-6 と-7 の間にあり、その希釈は

で求められる。測定は 0.1ml を接種して実施しているので、このウイルス原液の感染価は

$$6.5+1.0=7.5 (\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml})$$

になる。

[注意事項]

*前日に 75cm² 組織培養用フラスコに増殖させた MDCK 細胞を 2~3 枚の 24 穴プレートに播く。MDCK 細胞の継代方法は「MDCK 細胞を用いたウイルス分離」の項を参照。

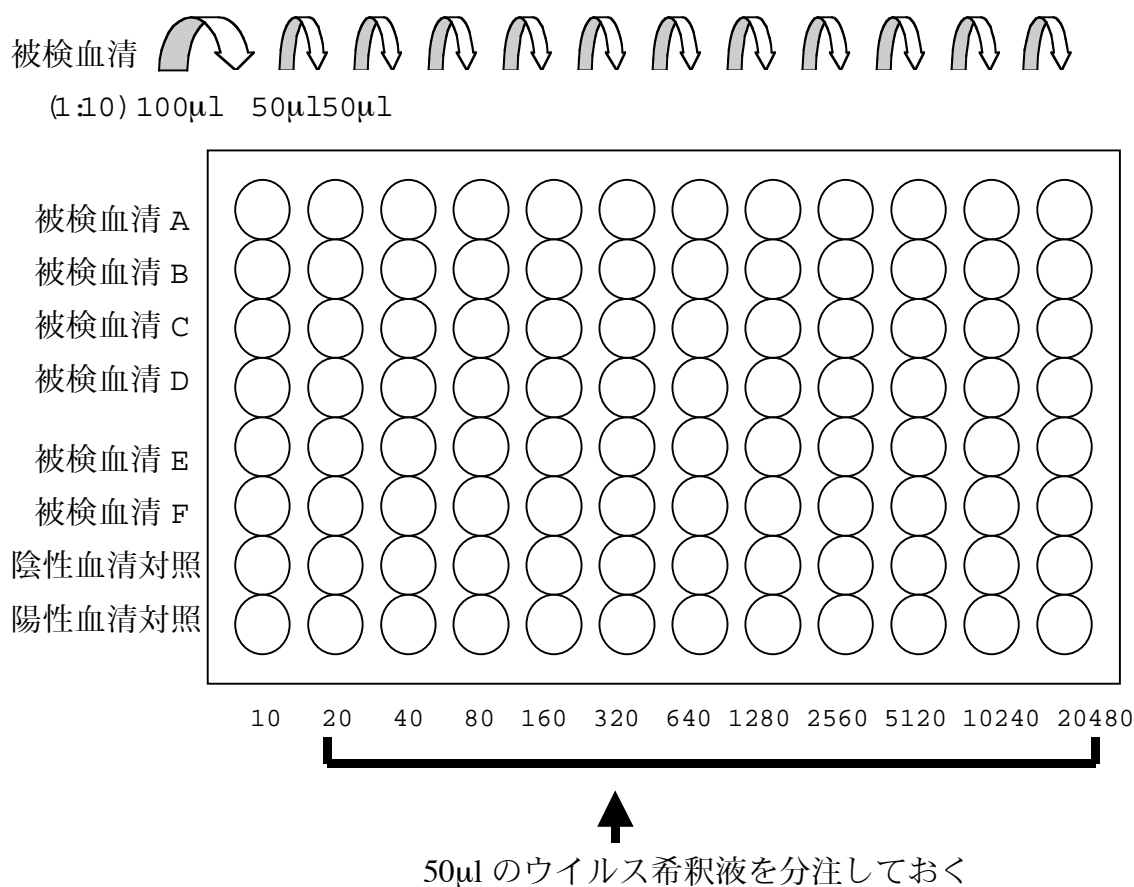
**通常 34℃で2日間程度であるが、使用するウイルス株により異なる。CPE が認めら

れるウイルスの最大希釈のところで CPE が細胞全体に現れるのに必要な期間を設定する。温度についても、鳥由来のウイルスなどは 37℃の方がよく増殖するので必要に応じて設定する。

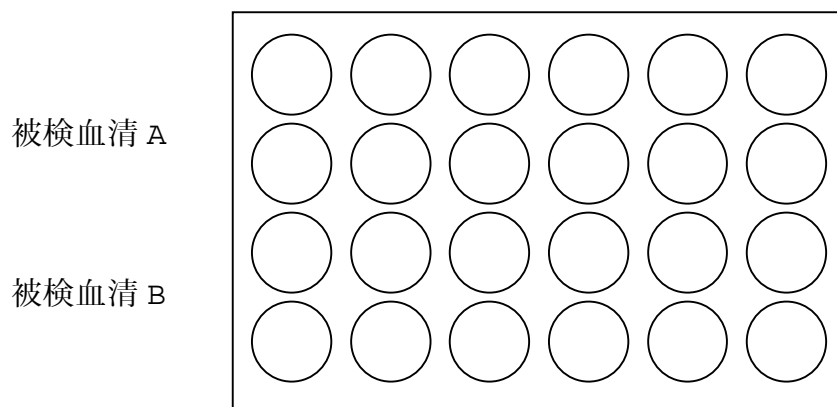
2.2.2 ウイルス中和試験

ウイルス力価を測定したウイルスを使用して被検血清の中和抗体価を測定する

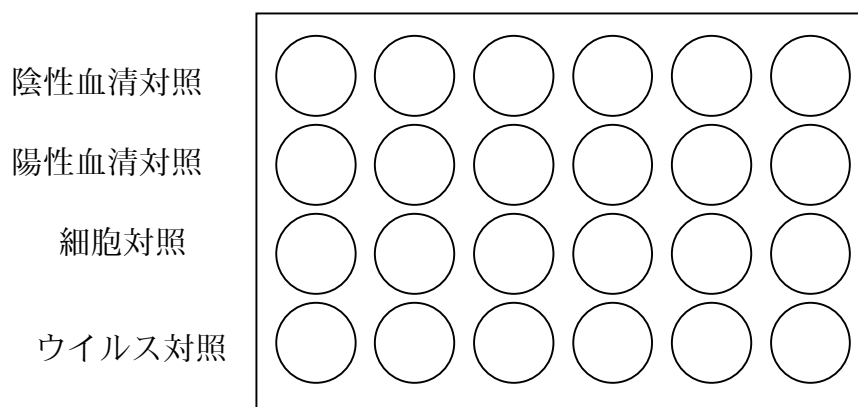
- 1) 被検血清を下図のように 10 倍希釈から 2 倍階段希釈する* (96 穴プレート[フラットボトム]を使用)



- 2) 各穴に 50μl (約 100 TCID₅₀ の感染価になるように希釈しておく) のウイルスを加える
- 3) 37℃で 30 分間保温する
- 4) MDCK 細胞を播いた 24 穴プレート*の各穴に 1ml の PBS(-)を加えて洗浄する
- 5) 被検血清とウイルス混合液 0.1ml を 24 穴プレートの各穴に下図のように接種する

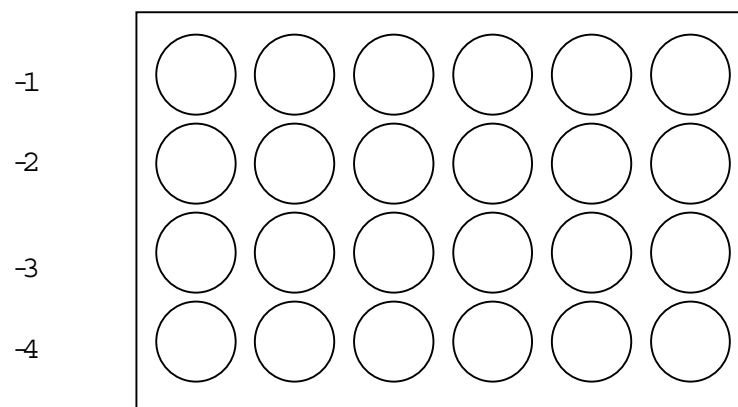


6) 血清の陽性対照および陰性対照とのウイルス混合液も 0.1ml を 24 穴プレートに各穴に下図のように接種する。



7) また細胞対照にはウイルス希釈液を、ウイルス対照には希釈したウイルス液（約 100 TCID₅₀/50μl）とウイルス希釈液を等量混合したものを、それぞれ 0.1ml を各穴に接種する。

8) 中和試験に利用したウイルス液について感染価を確認するために、下図のようにウイルス希釈液を 0.1ml ずつ各穴に接種する（「2.2.1 ウイルス力価測定」の項を参照）



- 9) 34℃で1時間放置
- 10) 0.5ml のウイルス分離用培地を加える
- 11) 34℃のCO₂ インキュベーターで2日間程度培養する
- 12) クリスタルバイオレットで染色する
- 13) ウイルス増殖を完全に抑制する血清の最大希釈倍数の逆数を中和抗体価とする**

- * (1)被検血清はあらかじめ56℃で30分間処理しておく。
- (2)非特異的中和反応を除くためには、血清をあらかじめ3容のRDEを加え反応後、56℃で30分間処理するほうが特異性の高い結果が得られることがある。
- (3)血清の希釈の範囲は予想される力価と目的に応じて選ぶ。

**中和抗体価の判定に際しては、陰性対照血清や陽性対照血清の力価が一定の範囲で測定できていることを確認する。また、ウイルスの感染価についても確認しておく。

執筆者リスト（記載項目順）

小田切孝人	国立感染症研究所ウイルス第3部
進藤奈邦子	国立感染症研究所情報センター
奥野良信	大阪府立公衆衛生研究所 (インフルエンザおよびウイルス検査法の概要、ウイルス分離用検体の輸送と保存)
武内可尚	市立川崎病院 (インフルエンザウイルス分離のための臨床検体の採取法)
今井正樹	国立感染症研究所ウイルス第3部
前田章子	堺市衛生研究所 (培養細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離)
斉藤利憲	国立感染症研究所ウイルス第3部 (孵化鶏卵を用いたウイルス分離と増殖)
西藤岳彦	国立感染症研究所ウイルス第3部 (赤血球凝集阻止試験 (HI test) によるインフルエンザ分離株の同定、HI 試験による血清診断)
渡辺真治	国立感染症研究所ウイルス第3部 (Polymerase Chain Reaction (PCR) 法によるインフルエンザウイルスの同定)
板村繁之	国立感染症研究所ウイルス第3部 (迅速診断のためのインフルエンザウイルスの検出、ウイルス中和試験による血清学的診断)
渡辺寿美	神奈川県衛生研究所 (迅速診断のためのインフルエンザウイルスの検出)

校正協力（順不同）：

名古屋市衛生研究所、後藤則子；群馬県衛生研究所、赤見正行；堺市衛生研究所；栃木県保健環境センター；神奈川県衛生研究所；大阪府立公衆衛生研究所、勢戸和子

アデノウイルス性結膜炎 (流行性角結膜炎、咽頭結膜熱)

目 次

1. はじめに
2. アデノウイルス性結膜炎の臨床（青木 功喜、内尾 英一、横浜市大眼科）
3. アデノウイルス検査の概要（加瀬 哲男、大阪府衛生研）
4. 検体の採取、運搬方法及び滅菌法（稲田 敏樹、感染研）
5. アデノウイルスの分離、培養（栄 賢司、愛知県衛生研）
6. アデノウイルス血清型の同定（中和試験）（池田 義文、広島市衛生研）
7. アデノウイルスの HI 試験（橋戸 円、感染研）
8. モノクロナール抗体を用いた診断キット（アデノクロン、アデノチェック；
内尾 英一、横浜市大眼科）
9. アデノウイルスの DNA 診断（1）（PCR－RFLP 法；伊奈川 和香、横浜市大眼
科、大嶋 彰、三菱化学ビー
シーエル）
（PCR－sequence 法；竹内 聡、横浜市大眼科）
10. アデノウイルスの DNA 診断（2）（PCR 法による型判別；藤本 嗣人、兵庫
県立健康環境科学研究センター；
向山 淳司、感染研）
11. ゲノムタイピング（RFLP 法；清水 英明、川崎市衛生研）
12. アデノウイルスの血清診断（甲木 和子、西村 浩一、熊本県衛生研）

はじめに

感染症新法で規定されるアデノウイルス性結膜炎は、咽頭結膜熱（PCF）と流行性角結膜炎（EKC）である。いずれも4類感染症として、患者サーベイランス上定点観測するものとされている。これらの疾患は生命に危険を及ぼすことは少ないが、頻度が高く、しばしば院内感染などの流行を引き起こすため疫学上重要な疾患である。また、PCFをおこすアデノ7型は乳幼児に重い肺炎を引き起こすこともあり、必ずしも眼疾患に限定されていない。

アデノウイルス感染症の診断は臨床的には難しく、実験室診断が必須である。最近、高感度で、しかもベッドサイドで行える簡便な診断法が開発されてきたが、疫学的な解析に必要なアデノの型別診断法は、ウイルスの分離や中和試験といった方法を施行しなければならない。一方、最近の分子疫学的方法論の進歩により、PCR法や制限酵素切断法を利用して、血清型を同定しようとする試みが盛んになってきた。

本書はアデノウイルス実験室診断の第一線で活躍される研究者の執筆によるものである。他の診断マニュアル同様、技術の進歩に伴い、逐次内容を変更すべきものと考えているが、そのためにも、本書を使用される方々の内容に関する御意見をお寄せ頂ければ幸いです。

アデノウイルス性結膜炎（流行性角結膜炎、咽頭結膜熱）の臨床

厚生省のサーベイランス事業の報告から年間の流行性角結膜炎（EKC、Epidemic kerato conjunctivitis）と咽頭結膜熱（PCF、Pharyngoconjunctival fever）の患者数は100万と推定される。眼感染症の中で院内感染などの原因になる疾患は多くないが、アデノウイルスは夏かぜの原因としてあげられ、この結膜炎も夏に多いのが一般的である。最近では病因検索をかなり迅速に、さらに確実に行う市販 kit も開発され普及してきているので、従来の病名よりもアデノウイルス角結膜炎やアデノウイルス結膜炎の方がもちいられる。

従来 EKC は8型と考えられていたが、最近では19, 4, 37型も同じ症状を呈することが判り、多元的に病因が理解されて来ている。PCF は完全型より不全型が多く、EKC や PCF の clinical entity より etiologic entity が適切であると考えられる。

結膜は瞼結膜、球結膜、円蓋部結膜からなり、結膜上皮細胞と実質層から構成されている。この病原体は結膜に親和性を持っており、5層からなる上皮細胞層の最上層の円柱細胞に接着しその核内で増殖する。すなわちアデノウイルスのファイバーはこの結膜上皮細胞に接着する。結膜に接着するアデノウイルスは、その血清型がB, D, E亜属であり、ファイバーが短いという共通点がある。アデノウイルスの多くの血清型のうちで、結膜炎をおこすのは、3, 4, 7, 8, 11, 19, 37型である。3, 4, 7, 11型はPCFを、4, 8, 19, 37型はEKCを起こす。PCFはプール熱といわれているように、結膜の病巣以外に尿や便がその感染源となる。またEKCは院内感染の原因となり、社会的な話題を提供することもある。

一般に初感染は下瞼結膜で、次いで円蓋部結膜を下から上と移動して、球結膜から角膜と進行する。結膜上皮は新生児では1層であり年齢と共に5層になる。このため乳幼児では実質層に病変がおよび易く、実質からの fibrin の滲出により偽膜を起こしやすい。この時期に細菌の2次感染が起こることがあり、放置されると角膜が穿孔して失明する。成人でも症状が強いと偽膜が発生する。これを放置すると涙点閉鎖、結膜瘢痕などの後遺症を残す。

感染結膜ではリンパ球の浸出が目立ち、このため濾胞が形成される。上瞼結膜は運動性があるため、症状が上結膜におよぶと異物感、流涙などの自覚症状が強くなる。白血球の浸潤は少ないので眼脂は少ない。内、外側の結膜には初期に点状の出血斑が見られるので早期診断の参考になる。1-2週間の潜伏期の後に、急性濾胞性結膜炎が始まり完成するのに1-3週間かかる。この間がもっとも感染力が強い。この時期が過ぎると角膜上皮に炎症が起り、次いで角膜上皮下に点状混濁が起る。このために視力障害を訴える。この症状は治療されないと1ヶ月に及ぶ。結膜炎の発症に必要なウイルス量、有効な消毒薬の in vitro の成績、抗アデノウイルス剤の開発などまだ解明されていない。

アデノウイルス検査の概要

検査の意義

病因となるウイルスを確定するということは、正確には、非常に困難なことである。したがって、臨床症状を示す器官から、ウイルスが検出された場合には、その検出されたウイルスを起因ウイルスとするということが、最も妥当性が高いといえる。特に アデノウイルスでは、麻疹や水痘のようにウイルス特有の症状が必ず存在するわけではない。そのためアデノウイルス感染症においても検査材料は、症状を有している器官から採取するのが普通である。すなわち、上気道炎の場合は咽頭拭い液または鼻腔洗浄液（鼻汁）、角結膜炎では結膜拭い液、下痢症では便材料、血尿では尿ということになる。しかし、ウイルス検査には、病因ウイルスを確定する以外に、精密な同定作業は必要としないが、迅速性が求められることも多い。特に院内感染の防止を目的とした場合には、血清型は同定できなくてもいいし、さらに検査材料も症状を示す器官由来である必要はない。アデノウイルス感染症は、呼吸器感染症でありながら、便中に多数のウイルスが存在することはよく知られている。アデノウイルス7型肺炎では、一番重要なことは、迅速診断であるので、便中のアデノウイルス抗原の検出が役立つことが多い。この場合はウイルスの血清型などはわからないが、とりあえず隔離するというふうに収束し、その後に気道由来検体のウイルス分離など詳細な検査が行われることになる。しかし、アデノウイルス感染症では、肺炎などの重症例に限らず、咽頭炎症状のみを示した症例でも便中にウイルスがよく観察される。そして、上気道由来検体からウイルスが検出されず、便中からのみウイルスが検出された場合は、その病因診断は慎重にならざるを得ない。このような場合は、臨床症状や周囲の状況が判断の助けになるので、検査に際しては背景の情報収集も重要な仕事である。

ウイルス分離による診断

培養細胞を用いたウイルス分離は、ウイルス感染症診断のゴールドスタンダードと考えることに異議はないが、アデノウイルスでは、分離に要する時間がかかりかかる時がある。通常検査においても、CPE が陽性になるまでに4代以上継代しなければならない例が少なからず存在する。この場合、ウイルスが細胞にアダプテーションするのに時間がかかると思うのが普通であるが、可能性としては、常在的（あまり病原性を発揮していない状態）に存在する非常に微量なウイルスが増殖するために時間を要しているとも考えられる。

やはり、この場合も臨床症状や周囲の疫学情報などを併せて判断することが必要になる。また、このことは、DNA 増幅を高頻回に繰り返す PCR についても同様である。特に Nested-PCR のみが陽性になった場合は、かなり慎重な判断が必要となると思われる。

重複感染の問題

血清型の違うアデノウイルスの重感染を正確に捉えたデータは、あまり存在しない。ただ、便中では、エンテリックアデノウイルスとコンベンショナルアデノウイルスの共存が普通にみられるが、下痢症の原因としてはエンテリックアデノウイルスが優先されるだろう。上気道由来検体でも PCR をすると重感染を疑わせる結果が出てくることがある。重感染を証明するには、抗体存在下でウイルス分離するなど非常に手間がかかるので、このような場合は、緊急性、正確性、必要性など考えてケースバイケースによって処理することになる。アデノウイルスとインフルエンザウイルスとの重感染は、通常検査でもよく遭遇する。この問題は、分離用の細胞を複数用いることで、割合容易に解決するが、病因論の解釈としては通説があるわけではない。筆者の経験では、アデノウイルスとインフルエンザウイルスとの重感染は、より高い発熱傾向を示し相乗的であった。しかし、インフルエンザ脳症からアデノウイルスが分離された場合や、7 型肺炎からインフルエンザウイルスが分離された場合などは、残念ながら容易な解釈はできない。

アデノウイルス感染症は、非常に軽微な普通感冒から重症致死性肺炎まで、その病態は非常に広範囲である。そのため日頃から、その緊急性や正確性あるいは疫学事象を常に考えて、検査の目的をしっかりと見定めて、検査に臨むことが大切であると思われる。

検体の採取、運搬および滅菌、消毒法

アデノウイルス性結膜炎の病原診断に用いられる検体は第一に罹患眼のぬぐい液、結膜擦過物である。しかし、アデノウイルスは多くの臓器の細胞に感染、増殖可能であるため、咽頭ぬぐい液、気管洗浄液、糞便、尿なども材料になりうる。検体は採取後、出来るだけ早く分離用細胞に接種ないし、PCR 法などのテストに供するが、遠隔地の検査施設へ搬送ないし、都合により一時貯蔵の必要な場合がある。近距離で短時間で搬送可能な時は、4° C に冷却して搬送出来るが、長時間を要する時は、ドライアイス下で凍結して搬送する。貯蔵は-80° C が理想であるが、-20～ -30° C でも短時間は可能である。運搬（郵送）法は 感染性材料の輸送に関するマニュアルに従う。採取検体は全てオートクレーブ（120° C, 30 分）で滅菌する。ピペット類、ガラス器具は 0.01～0.05% の次亜塩素酸ソーダ液に 30 分～1 時間浸し、水洗する。患者と接触した手指、眼科用器具はイソジン、70%エタノールで拭く。

検体採取法

1. 眼ぬぐい液、結膜擦過液

（1）滅菌綿棒で上および下眼瞼結膜を数回こする。

（2）イーグル MEM 液（ペニシリン 25U/ml、ストレプトマイシン 25 μ g/ml、0.5% 牛血清アルブミン(BSA)を加える）を 2～3ml 入れた滅菌プラスチックチューブに綿棒を浸し、数回内壁をこするようにして抽出する。

2. 咽頭ぬぐい液

（1）滅菌綿棒で数回咽頭をこするように擦過する。

（2）イーグル MEM 液（ペニシリン 250U/ml、ストレプトマイシン 250 μ g/ml、0.5%BSA 加）を 2～3ml 入れた滅菌プラスチックチューブに綿棒を浸し数回内壁をこするようにして抽出する。

3. 糞便

（1）イーグル MEM（ペニシリン 1,000U/ml、ストレプトマイシン 1,000 μ g/ml、0.5%BSA 加）を糞便に加え、乳鉢で 10%乳剤を作製する。

（2）3,000rpm, 15 分遠心、上清を採取、さらに 10,000rpm, 30 分遠心した上清を接種材料とする。

4. 尿

- (1) イーグル MEM (ペニシリン 250U/ml、ストレプトマイシン 250 μ g/ml、0.5%BSA 加) で採取尿を 5-10 倍に希釈する。
- (2) 3,000rpm, 15 分遠心し上清を接種材料とする。

いずれの材料も原液あるいはイーグル MEM で 2-5 倍に希釈したものを接種に用いるが 1 時間程度の吸着時間で細胞毒性が現れれば更に希釈する。24 時間後に培養液の交換を行う (維持培地、1~2%牛胎児血清加イーグル MEM)。

検体の運搬

採取した検体は可及的速やかに培養細胞での分離作業やウイルス抗原や核酸の検出試験に移すべきであるが、諸般の事情で一時保管ないし、遠隔地へ移送が必要な場合がある。アデノウイルスは比較的安定であり、室温で 1~2 日、4° C で数日、-20° C で数年、-70° C では数 10 年にわたり感染価の大きな低下なしで保存可能である。遠隔地の郵送はその所要日数に応じて輸送条件を設定する。このさい感染性材料の郵送、輸送に関する諸規程に従う。即ち、感染性材料は一次容器、二次容器および外側容器 (三次容器) で包装し、ドライアイス等は外側容器の内に入れる。また、外側容器には差し出し人および受け取り人の氏名、住所、電話番号、Fax 番号、内容物の詳細、バイオハザードマークの表示を行う。

滅菌、消毒法

アデノウイルスは種々の物理化学的作用に比較的抵抗性が強い。患者の検査検体やウイルス培養細胞上清などはすべて高圧滅菌を行う (120° C, 30 分~1 時間)。オートクレーブ出来ないもの (ガラスピペットなど) は次亜塩素酸ソーダ (0.1-1%) 溶液に一晩浸漬し、水洗する。蛋白濃度の高い溶液にはより高い濃度が必要である。汚染された手指および患者の分泌物、手術器具、便器の表面は消毒用エタノールやグルタラール (2%)、ポピドンヨード (10%) に浸漬ないし、これらで清拭した後、十分水洗する。

アデノウイルスの分離、培養

1. 器具及び試薬

孵卵器 (33-37° C)、組織培養用チューブ、175cm² 細胞培養用プラスチックボトル (あるいはガラス製 750 ml ルー瓶)、50ml、15ml 遠沈管、0.45 μ m フィルター、Veal Infusion Broth 粉末 (DIFCO 0344-17-6)、牛アルブミン粉末 (SIGMA A-7906)、イーグル MEM、7.5%NaHCO₃、ペニシリン、ストレプトマイシン (PS) 100 倍溶液 (インビトロジェン Cat. No.15140-148 等)、ゲンタマイシン溶液 (10mg/ml) (インビトロジェン Cat. No.15710-064 等)、アンホテリシン B 100 倍溶液 (インビトロジェン Cat. No.15290-018 等)、牛胎児血清(FCS)、2.5%トリプシン溶液 (インビトロジェン Cat. No.15090-046 等)、PBS(Mg、Cl(-))、EDTA-2Na

なお、オートクレイブ可能な粉末イーグル MEM 培地を使用する際には、別途 L-グルタミン 100 倍溶液 (インビトロジェン Cat. No. 25030-149 等)を用意する。

2. 細胞の継代、維持

アデノウイルスの分離同定に用いられている細胞は各々の試験研究機関によって異なるが、一般的には HEp2、FL、HeLa、RD-18S、HEL (ヒト肺 2 倍体細胞) 等の細胞が用いられる。HEp2、FL、HeLa 等の細胞では広範囲のアデノウイルスが分離可能であるが、培養が 1 週間以上になると円形細胞が増え、細胞が培養液中にはがれ落ちたり浮いてきたりして CPE (細胞変性効果) の観察が難しくなる。一方、RD-18S 細胞はアデノウイルスの分離率はやや落ちるが、約 2 週間細胞の維持が出来る。また、HEL 細胞は約 4 週間細胞の維持が出来、アデノウイルスによる CPE も大変観察しやすく、感受性も高いが、ウイルスの収量が少なく、細胞の継代、維持に限りがあるため、常時、大量に使用することが出来ない。使用する細胞は、継代培養によるウイルス感受性の変化を極力抑制するために、凍結保存し、出来るだけ同じ継代数の細胞を使用するのが望ましい。HEL 細胞についても凍結保存すれば比較的容易に同じ継代数の細胞の使用が可能である。

a) 溶液の調整

7.5% NaHCO₃ は、蒸留水に NaHCO₃ を 7.5%の割合で溶解させた後、0.45 μ m フィルターを用いて加圧濾過することによって除菌する。除菌後、炭酸ガスが抜けないようにきつく蓋をして 4° C に保存する。

PS 溶液はおよそ 1 週間に使用する量をチューブあるいはボトルに分注し、凍結保存する。

増殖培地の調整は、500ml のイーグル MEM 培地に PS 溶液を 5ml, FCS を 50ml (終濃度約 10%)、7.5%NaHCO₃ を 5ml 添加する。オートクレーブ可能な粉末イーグル MEM 培地の場合には、更に L-グルタミン溶液を 5ml 添加する。全て加えたら、培地を泡立てないように手で容器全体を軽く撹拌する。

維持培地の調整は、500ml のイーグル MEM 培地に PS 溶液を 5ml, FCS を 10ml、7.5%NaHCO₃ を 10ml 添加する。オートクレーブ可能な粉末イーグル MEM 培地の場合には、更に L-グルタミン溶液を 5ml 添加する。全て加えたら培地を泡立てないように手で同様に撹拌する。

検体処理液 500ml の Veal Infusion Broth に PS 溶液 5ml、ゲンタマイシン溶液 1ml、アンホテリシン B 溶液 5ml および 10%牛アルブミン 2.5ml を加える。(10%牛アルブミンは粉末の牛アルブミンを蒸留水に 10%の割合で溶解し、0.45 μ m フィルターで濾過滅菌しておく)

b)細胞の継代

1)細胞の継代には 125cm² 細胞培養用プラスチックボトル(あるいはガラス製 750ml ルー瓶)を用いる。細胞は毎日顕微鏡にて観察し、コンフルエントになったら出来るだけ早く継代を行うのがよいが、一般的には概ね 1 週間に 1 回程度、曜日を決めて行っている。なお、継代の際には必ず古い代数の細胞を 1 本残しておく。また、新しいボトルも必要量の他に必ず 1 本余分に作成する。

2)継代するボトルは古いメデュウムを捨てた後、10ml の 0.02%EDTA2Na 添加 PBS(EDTA-PBS)で細胞を 2 回洗浄した後、同液を 5ml 加える。ここに 2.5%トリプシン溶液 0.2ml を細胞が増殖している反対側のボトル面に加えた後、ボトルを手でまわして細胞全体をトリプシン溶液でぬらし、室温で(細胞がはがれにくい場合には孵卵室で) 1-5 分静置する。その間時々ボトルを手で軽くゆらしてみても細胞がガラス壁からはがれ始めたら、ボトルの横を手のひらで叩きながら全ての細胞を落とした後、増殖用培地 2ml を加えてトリプシンの働きを止める。

3)細胞が浮遊した液をピペットで 15ml 遠沈管に移し、800rpm, 5 分間遠心する。遠心後

上清を捨て、3-5 ml の増殖培地に浮遊させる。この際、オートピペッターで数回のピペッティングによって固まりを十分にほぐす。

4)新しいボトルに増殖用培地（約 70ml）を入れ、細胞浮遊液約 1 ml(細胞数にして 5×10^6 程度)を加える（HeLa 細胞の場合コンフルエントの状態では細胞数はおよそ 2×10^7 があるので、1 本のボトルから新たに 4 本のボトルが出来る）。ボトルに継代した日付と継代数を記入し、 37°C の孵卵器で培養する。

3. 細胞の凍結保存及び融解

分離に使用する細胞は大量に増やして凍結保存（ $-80^{\circ}\text{C} \sim -196^{\circ}\text{C}$ ）しておき、使用に際して必要量を融解し直接チューブを作製するようにすれば、継代による細胞の変化を抑制することが出来る。また、毎週の細胞継代作業をなくすことが出来るので、ここに細胞の凍結方法を記す。

1)細胞の凍結には、増殖培地にさらに 10% の割合で FCS を追加したもの（例えば 500ml の増殖培地に 50ml の FCS とした割合）に、同様に 10%の割合でジメチルスルフォオキサイド(DMSO)を加えたものを凍結用培地として使用する。また、市販の凍結用培地を使用しても良い。その際の凍結方法は当該培地の説明書による。

2)細胞はコンフルエントになったら出来るだけ早く凍結作業を行う。手順は細胞をはがすところまでは細胞継代と同じ様に行う。ボトル 3-5 本分の浮遊細胞液を 50ml の遠沈管に集め、800 rpm、5 分間遠心する。遠心後上清を捨てて、ボトル 1 本につき 1.5ml の凍結用培地を入れて細胞を浮遊させる。この際に固まりが残らないようオートピペッターで十分にピペッティングする。

3)1.8ml の内蓋式クライオチューブに日付と次代の代数を記入しておく。凍結用培地に浮遊した細胞を 1 チューブあたり 0.5ml ずつ分注する。

4)チューブを発砲スチロールの箱に入れて、 -80°C のフリーザーに一晩入れておく。この際チューブを傾けて出来るだけ液の表面積が多くなるように凍結しておく、融解するときには早くする事が出来る。 -80°C のフリーザーに保存する場合には約半年は問題なく使用できるが、更に長期間保存する場合には -196°C の液体窒素で保存すれば、ほとんど半永久的に使用可能である。また、液体窒素容器なら停電、フリーザー故障等

のアクシデントをさけられる。液体窒素の補充については定期的に補充してくれるサービスがあるのでこれを利用すると良い。

5)-80° C のフリーザーで凍結した細胞チューブは、液体窒素容器保存用のケーンに蓋を下にしてホールドし、すばやく液体窒素容器に入れる。

以上の方法によりおよそ半年から1年分の細胞をストックしておくが、コンタミネーションには充分注意して作業を行う。

6)細胞を取り出すときは、37-45° C 程度のぬるま湯を用意し、容器から取り出したチューブを直ちに浸ける。チューブを取り出す際に凍傷にならないように指先を手袋やタオルなどで保護する。

7)15ml 遠沈管に増殖用培地を 10ml 程度入れ、その中に融解した細胞溶液を加えて、遠沈管を手で振って軽く攪拌する。

8)800rpm、5 分間遠心後上清を捨てて、3-5ml の増殖培地に浮遊させる。

9)細胞浮遊液を適当量 (25-80ml)に希釈して、ウイルス分離用チューブを作製する。ウイルス分離用チューブは 2-3 日でコンフルエントになるようにするが、凍結したときの条件によって細胞の生残数が異なることがあるので、1チューブの凍結細胞をどれくらいに希釈すれば良いかを確認するために、あらかじめ試験的に分離用チューブを作製してみると良い。HEp2, FL, HeLa, RD-18S 等は概ね 60-80ml であるが、HEL は 25-30ml である。

4. アデノウイルスの分離同定法

a) 検体処理

1)糞便約 0.4g (小指頭大)をガラス棒でとり、検体処理液 4ml が入った遠沈管にいれてガラス棒でよく攪拌する。

2)咽頭ぬぐい液、眼ぬぐい液は綿が入っている場合にはガラス棒で綿をついて、ぬぐい液

を遠沈管に確実に移す。

3)冷却遠心器で 4° C, 10,000G, 20 分間遠心し、上清を滅菌した検体保存用プラスチック容器に移す。遠心しても夾雑物がとれない場合は上清を 0.45 μ m フィルターで濾過する。

b) ウイルス分離

1)検体接種時には、検体中の雑菌を抑えるために維持培地に更にゲンタマイシンを 1 ml、アンホテリシン B を 5ml 追加した強化維持培地を使用する。

2)接種用のチューブの増殖培地を捨て、強化維持培地 1ml と交換する。検体は細胞 1 種類あたり 0.1-0.2ml を接種し、接種後は 3-4 日毎に 1.2ml の維持培地を交換し、2 週間細胞変性効果 (CPE)の出現を観察する。途中で雑菌が増殖してきた場合には、元の検体を 0.45 μ m フィルターで濾過した後、最初からやり直す。

3)CPE が出現した検体については 3 回の凍結融解後、(凍結温度、凍結期間は不問)その培養液 0.2ml を新しい細胞に接種して 2 週間 CPE の確認を行う。アデノウイルス以外に糞便からよく分離されるエンテロウイルスは CPE の形態が異なっているので、この段階で区別しておくが良い。

4)アデノウイルスの CPE は通常シートとなった細胞の辺縁部から出現する。CPE を起こした細胞は最初はガラス壁に付着しており、正常細胞より大きくなり、やや丸みを帯びてくる。日数の経過と共に CPE は次第に強くなり、全ての細胞が脱落するが、それ以前に -20° C 以下に凍結した方がウイルスの収量は多い。採取した検体は必ず 3 回凍結融解(同上)を繰り返す。

5. アデノウイルスの同定法

1)CPE が確認された検体は中和試験によるアデノウイルスの同定試験を行う。使用する細胞は原則的には CPE が確認された細胞を使用する。

2)細胞は同定試験をする 1-2 日前に凍結から戻し、必要量のプレートに播いておく。細胞の濃度は分離用チューブ 20 本分がプレート 1 枚である。

3)同定の前に、患者の診断名、CPE の形態、出現までの日数、細胞に対する感受性を参考にして同定に使用する抗血清を選定する。一般的なやり方として、最初はアデノ 1 型から 8 型の抗血清を用いて同定を行い、同定出来なければアデノ 11, 19, 31, 37 等の抗血清で同定を行う。

4)同定に用いる抗血清は、デンカ生研製あるいは感染研から分与の中和用抗血清ならば、10-20 単位に希釈して使用することが出来る。

5)同定する検体はあらかじめウイルス力価を測定するのが原則であるが、アデノウイルスの場合、CPE の出現が遅いこと、ウイルス力価は概ね 100-1000 TCID₅₀/25 μ l である事などから力価測定を省略し、全て 10 倍希釈して同定を行う。

6)希釈したウイルス液をトランスファープレート（ダイナテック社 Cat. No. 001-010-5850）に 25 μ l ずつ分注し、これに各中和用抗血清をそれぞれ 25 μ l ずつ等量混合、37° C で 2 時間反応させる。ウイルスコントロールは抗血清と混合したウイルス液と同じもの、更に 10 倍希釈、100 倍及び 1,000 倍希釈したものを作る。

7)あらかじめ作製しておいた細胞のプレートを新しい維持培地に交換し、反応が終わったトランスファープレートを細胞のプレートに重ねると、各ウェルの検体は細胞プレートに移行する。37° C、5%炭酸ガス孵卵器で培養し、1 週間観察する。

8)型決定はウイルスコントロールに CPE が出現し、かつ抗血清と反応させたウェルのうち 1 つだけが CPE 陰性であった場合のみ判定できる。この場合には CPE が陰性であったウェルに混合したウイルス抗血清の名前が当該ウイルスの血清型である。

9)反応させた全てのウェルに CPE が出現し、かつ 1,000 倍希釈のウイルスコントロールまで CPE が出現した場合にはウイルス力価が高すぎるので、ウイルス液を 10 倍以上希釈して再度中和試験を行う。

10)反応させた全てのウェルに CPE が出現し、かつ 100 倍希釈のウイルスコントロールまで CPE が出現し、1,000 倍希釈のウイルスコントロールが陰性であった場合には、同定試験に使用した抗血清とは異なるウイルスである場合と 2 種類以上のウイルスが混合している場合が考えられる。この場合にはまず、他の抗血清を用いて同定試験を行う。そ

れでもなおかつ全てのウエルに CPE が出現する場合には、ウイルスが混合していることを考えてウイルスのクローニングを 2 回行い（クローニング法あるいは希釈法で）、クローン化サンプルを用いて改めて同定試験を行う。

11)CPE の出現が遅く、しかも反応させたウエルの 2 つ以上が抑制され、かつ等倍のウイルスコントロールのみ CPE が出現した場合には、ウイルス力価が低すぎる事が考えられるのでウイルスの希釈倍率を低くするか、あるいはもう 1 代継代してウイルス力価を高くしてから改めて同定試験を行う。

12)反応させたウエルの 2 つ以上が抑制され、かつ 10 倍のウイルスコントロールまで CPE が出現した場合（アデノ 19 と 37 型ではしばしば起こりうる）には、中和試験では同定できないので、シーケンス等の他の手段を用いて同定する。

アデノウイルス血清型の同定（中和試験）

1. 細胞の準備

- (1) 細胞はウイルスが分離されたものを用い、96 穴培養プレートの各穴に細胞浮遊液を 0.2ml ずつ分注し、37° C 炭酸ガス孵卵器中で静置培養する。
- (2) 単層になる前、すなわち、80-90%まで細胞が増殖し多少隙間がみえる頃(培養 2, 3 日後)に、培養液を捨てて、各穴に 0.15ml ずつの細胞維持液に交換したものを、ウイルス力価の測定と中和試験に用いる。
 - *) HEp2, HeLa などの上皮系株化細胞は培養日数が経過すると細胞が盛り上がり、CPE の観察が難しくなるので、早めに使用する。

2. 同定用ウイルス液の調整

- (1) 分離培養で 75%以上の細胞が CPE (CPE + + +) を示した時に、細胞をピペッティングではがし、遠心管に移す。
- (2) 細胞浮遊液は凍結融解を 4-5 回繰り返す。
- (3) 3,000rpm、30 分間冷却遠心し、その上清を試料とする。
- (4) 細胞維持液で 5-30 倍程度に希釈し、各希釈につき、96 穴マイクロプレートに用意した培養細胞の 4 穴以上を使用し、25 μ l ずつ接種する。
- (5) 翌日から細胞を観察し、3-5 日間で CPE + + + を示す希釈濃度のウイルスを攻撃ウイルスに用いる。
 - *) ウイルス液を 0.45 μ m のメンブレンフィルターで濾過するとウイルス力価は少し低下するが、ブレイクスルーが防げ同定が容易となる。
 - **) アデノウイルスの増殖は遅く、エンテロウイルスのように 10 倍階段希釈で感染価を求めることは困難なことが多い。
 - ***) ウイルス力価が高いと細胞毒性のため細胞が死に同定不能となることがある。
また、ウイルス増殖の遅い株では細胞増殖が勝り、CPE の観察が難しくなる。その時はもう一度継代培養を繰り返す。

3. 中和試験

アデノウイルスの血清型間には中和交差反応があり、全て同じ力価（5 単位）の抗血清を、

また、少なくとも、同じ亜属内の2種類以上の抗血清を用いることが、誤った同定を防ぐために必要である。アデノウイルス 1-7 型、11、19 型、31 型、37 型の中和用抗血清はデンカ生研（株）から（100 単位）販売されているので、ウシ血清を含まない培養液で5 単位に希釈して用いると便利である。

- （1）ワークシートを用いて培養プレートの同定レイアウト（抗血清と攻撃ウイルスの位置を各2穴ずつ）を決める。
- （2）96穴トランスファープレートをプレートホルダーにセットする。
- （3）レイアウトに従い、至適濃度に希釈したウイルス液 25 μ l と5 単位の抗血を各穴に接種する。ウイルス対照の穴には抗血清の代わりに細胞維持液を入れる。
- （4）プレートホルダーのフタをセットし、プレートミキサーで攪拌・混合する。
- （5）中和は 37° C 炭酸ガス孵卵器中で1時間静置し行う。
- （6）中和反応中に細胞培養液を維持液に交換する。
- （7）細胞への接種は、トランスファープレートを真上から静かに降ろし、維持液に浸した後に、気泡を生じさせないように静かに持ち上げる。
- （8）37° C 炭酸ガス孵卵器中で培養し、翌日から毎日2回観察する。
- （9）判定は、接種後、3-5 日目にウイルス対照の CPE が+++以上となった時点で行い、CPE を完全に抑制した抗血清の型をウイルスの血清型とする。

＊）一旦は中和されても遅れて CPE の出現することがあるので、7-10 日目頃まで観察を続ける。

＊ ＊）ウイルス対照の CPE が予定日を過ぎても出現しない、あるいは、複数の抗血清で CPE が抑制された場合は再試験とする。

アデノウイルスの HI（血球凝集抑制）試験

ヒトアデノウイルスはある種の動物の赤血球に対する凝集能を有する。ウイルス抗原が対応する抗体と結合し抗原抗体反応を起こすと赤血球凝集能が抑制される。この反応を利用して、分離株や血清抗体から、感染したアデノウイルスの型を決めることができる。分離株の場合はまず、どの種の動物の赤血球を凝集するかにより亜属を決め、ついで、型別抗血清を用いた血球凝集抑制反応により型を決める。通常 4HA 単位のウイルスに対し、抗血清を段階希釈し、血球凝集が陰性となる最大希釈倍数を HI 抗体価として表す。血清検体中の HI 抗体価を測定する場合は、型別血清の代わりに被検血清を、分離株の代わりに既知の型のウイルスを用いる。

どの型のアデノウイルスがどの種の動物の赤血球を凝集するかについては、表に示す通りである。ヒトアデノウイルスには血清型が 51 種同定されており、生化学的、血清学的基準で 6 つの亜属に分けられているが、この分類は血球凝集性に関してもよく一致する。

亜属	血清型	血球凝集
A 12, 18, 31	ラット（不完全）	
B 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35	アカゲザル	
C 1, 2, 5, 6	ラット（不完全）	
D 8, 9, 37	ラット、マウス、ヒト、モルモット、イヌ	
10, 19, 26, 27, 36, 38, 39	ラット、マウス、ヒト	
13, 43	ラット、マウス、ヒト、アカゲザル	
15, 22, 23, 30, 44-49	ラット、マウス、アカゲザル	
17, 24, 32, 33, 42	ラット、マウス	
20, 25, 28, 29	ラット、アカゲザル	
E 4	ラット（不完全）	
F 40, 41	ラット（非定型）	

(Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 第 9 版より引用)

1. 器具及び試薬

高速冷却遠心機、恒温槽、HI 用 96 穴マイクロプレート、プレートシール、プレートミキサー、連続分注ピペット、マイクロチューブ、動物血液、Alsever（ブドウ糖 2.05g、塩化ナトリウム 0.42g、クエン酸ナトリウム 0.8g を蒸留水 100ml に溶かし、クエン酸で

pH6.1 に合わせる。フィルター滅菌する。)、生理食塩水、希釈液 {0.01MPBS(pH7.2)に gelatin を 0.005%になるように溶かす。}、PBS、アデノウイルス対照株、検査用分離株、型別抗血清。

2. 試薬・検体の調製

赤血球の調製：血液は 2 倍量の Alsever にて保存。使用前に生理食塩水で 3 回洗浄する。希釈液にて赤血球を 0.4%に調製する。

型別抗血清の非働化：56℃恒温槽で 30 分間インキュベートする。

非特異凝集素の吸収：1:4 希釈血清 1ml に対し 50%赤血球 0.1ml を混合し、4℃で 1 時間反応させる。遠心して赤血球を除去する。

HI インヒビターの除去：使用する抗血清に関し、必要があれば 25%カオリン処理を行う。

3. 検査方法

1)最初に HA 抗原価を決める。マイクロプレートの左端に 1:128 希釈ウイルスを 50 μ l ずつ加え、右列へ向かって、25 μ l の PBS を用いて 2 倍段階希釈する。さらに、各穴に PBS25 μ l および 0.4%赤血球 50 μ l を加え、よく混合する。37℃で 1~1.5 時間反応させた後、判定する。血球凝集が起こった最終希釈倍数の逆数を抗原価(HA 価)とし、4HA 価ウイルス希釈液を調整する。

2)マイクロプレートの左端に 1:4 希釈抗血清を 50 μ l ずつ加え、右列へ向かって、25 μ l の希釈液を用いて 2 倍段階希釈する。

3)各穴に 4HA 価に調製した抗原（ウイルス）25 μ l を加える。

4)室温で 1 時間反応させる。

5)各穴に 0.4%赤血球 50 μ l を加え、よく混合する。

6)37℃で 1~1.5 時間反応させる。

7)判定。血球凝集が陰性となる抗血清の最大希釈倍数の逆数をもって HI 抗体価とする。

8)対照として、既知の型のウイルス抗原も同様に測定する。また、用いた抗原の HA 価のバック・タイトレーションと、用いた抗血清の非特異凝集性の確認も行っておく。

4. 文献

Rosen I. A hemagglutination-inhibitor technique for typing adenoviruses. Am J Hyg 1960;71:120-28.

Hierholzer JC. Further subgrouping of the human adenoviruses by differential hemagglutination. J Infect Dis 1973;128:540-50.

モノクローナル抗体を用いた診断キット

1. これまでのアデノウイルス迅速診断キット

これまでもアデノウイルス迅速診断キットはいくつか開発され、臨床応用されたものもある。現在までに用いられたアデノウイルス迅速診断キットを表1に示す。これらの中でアデノレックス R は検出のために濃縮が必要で、小児科での糞便検体に限られている。アデノクロン R と IDEIATM Adenovirus の相違点は前者がアデノウイルス 2 型、後者がアデノウイルス 3 型のモノクローナル抗体を用いている点であり、感度や特異性に差がなかったため、IDEIATM Adenovirus の結膜炎への臨床応用が見送られた経緯がある。酵素抗体法である IDEIATM Adenovirus はインキュベータおよび陽性対照が必須でプレートリーダも場合により必要である。IMAGENTM Adenovirus は蛍光抗体法のため蛍光顕微鏡が必要である。ただし、アデノウイルスの迅速診断キットは血清型別判定を目的としない抗原検査であり、抗原検査法としては唯一健康保険が適応となっている。

2. アデノクロン R の特徴

アデノクロン R は酵素抗体法による診断キットである。吸光度計を用いる場合もあるが、必須ではない。蛍光顕微鏡が必要な IMAGENTM Adenovirus と異なり、臨床の現場で使用することも可能な点で、それまでにない画期的な臨床的な意義のある検査キットであった。そのため健康保険が適応された。ただこのキットは特異性は 100%に近いものの、感度が 60%ほどと低く 1)、反応に 37° C のインキュベータが必須であることなどにより、臨床現場に必ずしも広く普及しなかった。このことは、感染症サーベイランス定点での使用頻度が低いことにも表れている 2)。むしろ、現状では対照を常備し、まとめて検査が行える臨床検査セクションで使用されている。

3. 免疫クロマトグラフィー法による迅速診断法（アデノチェック R）

アデノウイルス検出の迅速診断キットとしてアデノチェック R（SA Scientific, 明治乳業）は免疫クロマトグラフィー法によるもので、アデノクロン R に次いで開発された。キット本体はスライドガラスとほぼ同じ大きさのディスク（2.8×5.5cm）であり（図1）、ウエル部分とウインドウ部分からなっており、その間に濾紙によるペーパーディスク部分

があって両部分をつないでいる。ウエル部分には金コロイド結合抗アデノウイルス 2 ヘキソンマウスモノクローナル抗体がコートされ、ウインドウ部分には抗アデノウイルスポリクローナル抗体と抗マウス免疫グロブリンポリクローナル抗体が別々にコートされている。

4. アデノチェック R の原理と方法

実際の検査手順はきわめて簡便なものであり、それが本キットが広く普及する理由となった。まずキット添付の滅菌綿棒で結膜を擦過し（図 2）、添付のメディウムでウイルス浮遊結膜拭い液とするが、この際に容器内に綿棒を十分擦りつけることにより、ウイルスを十分メディウム内に取り出す必要がある（図 3）。次に、200 μ l の結膜拭い液をウエル部分に滴下する（図 4）。アデノウイルス抗原が存在すると、金コロイド結合モノクローナル抗体とまず結合し、さらに抗アデノウイルスポリクローナル抗体も抗原と結合して紫色の発色の線がウインドウ部分に生ずる。ただし、抗アデノウイルスポリクローナル抗体と結合しなかった過剰の金コロイド結合モノクローナル抗体は抗マウス免疫グロブリンポリクローナル抗体とも複合体を形成するので、結局二本の線が見られることになる。一方、アデノウイルス抗原がない場合は後者の反応のみ生じ、一本の線が見られる（図 1）。反応時間はウイルス量にもよるが、陽性の場合 30 秒から 2 分以内に二本の線が見られることが多い。

5. アデノチェック R の検出能と血清型による反応の違い

アデノクロン R との比較では感度はアデノチェック R の 54.7% に対し、アデノクロン R は 50.5% であり、特異性はそれぞれ、97.1% および 100% で、同等の結果である。血清型別の検出率はアデノチェック R がアデノウイルス 4 型で 100% である以外はアデノウイルス 7, 8, 37 型などの主な結膜炎起炎血清型は 59-67% である（表 2）³⁾。最近増加しているアデノウイルス 7 型の検出率は 20% と低い。病日別にみると PCR 法は 15 病日まで検出できるのに対し、アデノチェック R は 13 病日、アデノクロン R は 11 病日まで検出できる³⁾。このようにアデノチェック R はアデノクロン R に匹敵するかそれ以上の検出能をもち、きわめて短時間に、特別な装置を必要とせずにアデノウイルス結膜炎の診断が可能なキットといえる。アデノチェック R は既にアデノクロン R と同じ健康保険点数が適応され販売されている（実施料 300 点）。製品は室温で保存できる。

6. アデノチェック R の使用上の注意

判定上注意を要するのは、ウイルスが微量の場合、陽性ラインの出現に最長 40 分程度要し、薄い陽性ラインしか得られないこと、コントロールラインも出現しない場合には、拭い液の不足かキットの不良が考えられることなどがある。感度は 57%で特異性は 100%であり 4)、陽性の場合にはアデノウイルス感染と診断できるが、陰性の場合には必ずしもアデノウイルス感染を否定出来ない。血清型陽性率は前述のようにD亜属(8,19 および 37 型)に比較してB亜属(3,7 および 11 型)の陽性率は低く、我が国では、周期的に優勢な血清型が年度ごとに変化していることが陽性率に大きく影響することを念頭に置く必要もある。最長 14 病日までアデノチェック R は検出可能である。本法の陽性率を向上させるためには、1. 発症早期の検体採取、2. ウイルス粒子数を増加させるために結膜を強く擦過する、睑板がしっかりしている上眼瞼結膜の方が望ましい、3. ウイルス粒子の細胞外への取り出しのために、vortex mixer による強い攪拌(図5)やビーズを用いる、などの方法が推奨される。使用後のキットは感染性廃棄物であるので、密封して処理する必要がある(図6)。

7. アデノチェックの限界と今後

小児科領域では咽頭拭い液を用いた場合感度が約 80%あり、眼科領域でアデノチェック R の感度が低いのは、ウイルス量が少ないことによるので、感度向上のために開発段階から関与しているわれわれは製造元とさまざまな方法を検討している。プレートにはさみこまれている濾紙部分の幅を狭くしたものや拭い液に直接浸すことも可能なステックタイプにしたものなどが試作されているが、まだ十分な感度の向上は得られていない 5)。抗体部分以外では、ウイルス粒子の細胞外への取り出しを促進するための extraction buffer の選定と導入が感度上昇に結びつく可能性が高いと考えられ、現在の臨床レベルで利用できる手技的な容易さを維持しつつ、より高い臨床的な有用性を目標にさらに検討が進められている。

8. これからのアデノウイルス結膜炎と診断

眼科医が臨床の場で自らの手でアデノウイルスの病因診断を可能にする迅速診断の導入は、院内感染、地域感染の拡大防止のみならず、現在開発中の新しいアデノウイルス治療薬の使用にあたっても有意義なものがある 6)。感度の向上が今後の重要な課題である。既に、眼科以外の領域でも免疫クロマトグラフィー法によるアデノウイルス診断キットが臨床導

入されてきており、血清型別判定検査、迅速診断キット、抗体測定検査それぞれの目的と限界を十分理解し、その結果を臨床に応用する必要性と可能性は今後ますます高まっていくことが予想される。

文献

- 1) Wiley L, et al : Rapid diagnostic test for ocular adenovirus.
Ophthalmology 95 : 431-433, 1988
- 2) 内尾英一、他 : わが国における眼感染症サーベイランスの実状. 臨眼 51 : 1505-1508, 1997
- 3) Uchio E, et al : Rapid Diagnosis of Adenoviral Conjunctivitis on
Conjunctival Swabs by 10 Minute Immunochromatography. Ophthalmology
104 : 1294-1299, 1997
- 4) Pillay D, et al : A clinico-pathological audit of opportunistic viral
infections in HIV-infected patients. AIDS 7 : 969-974. 1993
- 5) 竹内聡、青木功喜、伊藤典彦ほか : より微量試料で検査できるアデノチェックキットの開発. 新しい眼科 17 : 229-232, 2000
- 6) Gordon YJ, et al : Topical HPMPC inhibits adenovirus type 5 in the New
Zealand rabbit ocular replication model. Invest Ophthalmolo Vis Sci 35 :
4135-4143, 1994

图 1

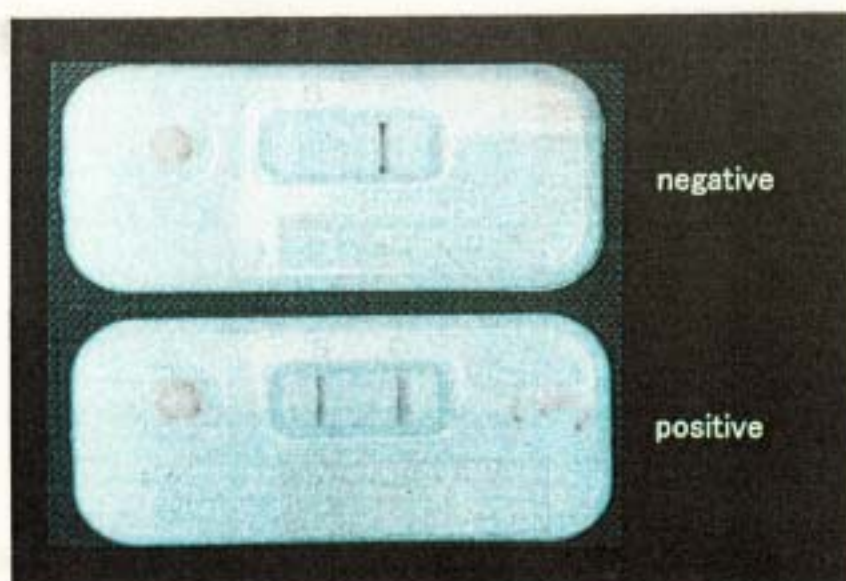


图 2



图 3

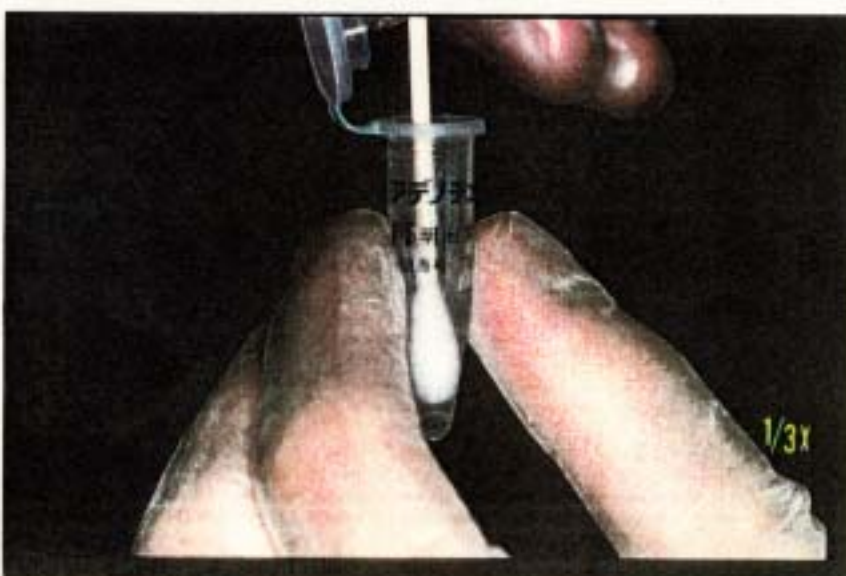


图 4

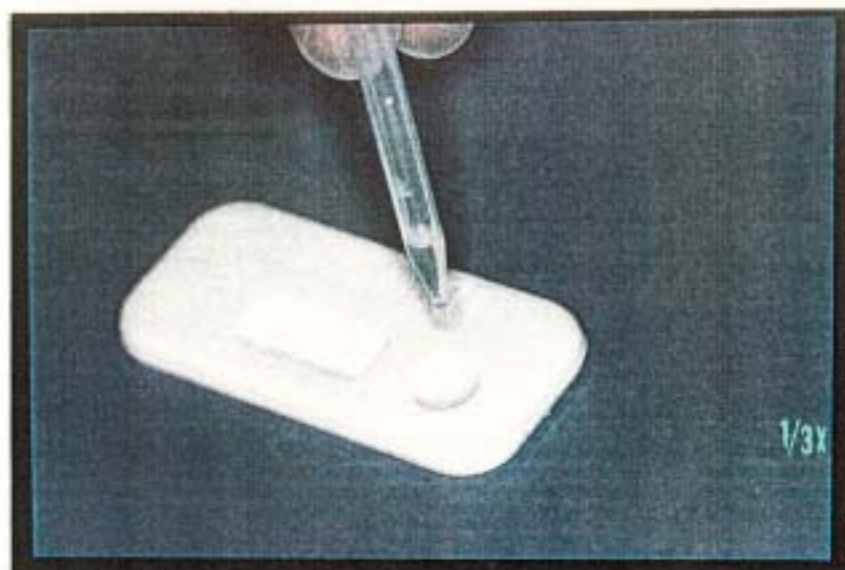


图 5



图 6



図説明

図1. アデノチェック Rの実施例

Ad 陰性検体（上段）には1本線、陽性検体（下段）は2本の線が、多くの場合30秒から2分以内に現れる。

図2. アデノチェック Rの検体採取

キット添付の綿棒で眼瞼結膜を擦過する。キシロカイン点眼麻酔を行うと、疼痛なく十分な検体採取ができる。

図3. アデノチェック R検体のウイルス浮遊液

綿棒をメディウム容器内壁を擦ることにより、ウイルス浮遊液を作成する。

図4. アデノチェック Rディスクへの滴下

ウイルス浮遊液から200 μ l(スポイト4滴)をウエル部分へ滴下する。

図5. Vortex mixer による攪拌

図3の方法に加えて、Vortex mixer による攪拌を行うとアデノウイルス陽性率は約10% 向上する。

図6. アデノチェック Rキットの廃棄法

使用後のアデノチェック Rは感染性をもっているため、添付のパッケージにより密封して各施設指定の方法で廃棄する。

表 1. アデノウイルス迅速診断キットの比較

	測定原理	所要時間	検体前処置	健保適応	感度	特異性	器具
アデノクロン®	酵素抗体法	70 分	不要	適応	中	高	吸光度計
IDEIA™ Adenovirus	酵素抗体法	80 分	不要	なし	中	高	吸光度計
アデノレックス®	ラテックス凝集法	2 分	濃縮要	糞便のみ	高	高	目視
IMAGEN™ Adenovirus	蛍光抗体法	25 分	不要	なし	高	高	蛍光顕微鏡
アデノチェック®	免疫クロマトグラフィー法	10 分	不要	適応	中	高	目視

表 2. 血清型別陽性率の比較

血清型	アデノチェック® (%)	アデノクロン® (%)	PCR
Ad3	8 (31)	7 (27)	26
Ad4	4 (100)	3 (75)	4
Ad7	3 (60)	1 (20)	5
Ad8	20 (67)	20 (67)	30
Ad11	0	0	1
Ad37	17 (59)	17 (59)	29
合計	52 (55)	48 (51)	95 (100)

アデノウイルスの DNA 診断（１）

PCR-RFLP 法

アデノウイルス（Ad）結膜炎の迅速診断法の一つとして、結膜擦過物から抽出された Ad DNA を Nested PCR で検出し、この PCR 産物の制限酵素切断像から Ad の血清型を同定する PCR-restriction fragment length polymorphism(RFLP)法がある。

I．結膜擦過物からの DNA 抽出

Ad 結膜炎が疑われる患者の眼瞼結膜を滅菌綿棒で擦過後 1ml の Tris-EDTA(10mM Tris, pH8.0, 1mM EDTA)の入った 1.5ml マイクロチューブに綿棒を折って入れフタをする。vortex mixer でよく攪拌し、綿棒を除去する。DNA 抽出は以下の方法か DNA 抽出キットが市販されているのでそれに行う。

1．器具および試薬

オートクレーブ済みマイクロチューブ（1.5ml）、マイクロピペット、オートクレーブ済みマイクロチップ（フィルター付き）、高速冷却遠心器、ヒートブロック、パラフィルム R、27G 注射針、スピードバック、Tris EDTA(10mM Tris, pH8.0, 1mM EDTA), lysis buffer(10mM Tris-Cl(pH8.3), 1mM EDTA, 0.5%Tween 20), Proteinase K, フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール（２５：２４：１）、クロロホルム、エタノール（100%, 70%）

2．DNA 抽出

- (1) 検体液全量を 15,000 回転で 30 分間遠心し、沈査に lysis buffer を 490 μ l, proteinase K(15.5mg/ml)を 10 μ l 加える。
- (2) 55° C, 1 時間反応後、95° C に 10 分間かける。
- (3) 15,000 回転、30 分、4° C で遠心分離し、上清を 1.5ml チューブにとる。
- (4) フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール（２５：２４：１）を 500 μ l 加える。
- (5) 1 分間上下攪拌する。
- (6) 12,000 回転、10 分間遠心し、上清を 1.5ml チューブにとる。
- (7) クロロホルムを 500 μ l 加える。

- (8) 1 分間上下撈拌する。
- (9) 12,000 回転、10 分間遠心し、上清を 1.5ml チューブにとる。
- (10) 100%エタノールを 1ml 加え転倒混和する。
- (11) -20°C に一晩、もしくは -80°C に 1 時間置く
- (12) 15,000 回転、30 分、 4°C で遠心分離し、上清を捨てる。
- (13) 70%エタノール (-20°C) を 1ml 加え、転倒混和する
- (14) 15,000 回転、20 分、 4°C で遠心分離し、上清を捨てる
- (15) チューブにパラフィルム R をかぶせ、27G 注射針で穴をあける
- (16) スピードバックで乾燥させる (完全に乾燥させない)
- (17) Tris-EDTA を $50\mu\text{l}$ 加える
- (18) -20°C で保存する

II. PCR-RFLP 法

1. PCR

Ad のヘキソン蛋白をコードする DNA 領域の下流を増幅する Nested PCR を行う。

(1) 器具および試薬

オートクレーブ済みマイクロチューブ (0.5ml)、マイクロピペット、オートクレーブ済みマイクロチップ (フィルター付き)、サーマルサイクラー、電気泳動装置、UV 照射写真撮影装置、PCR 用蒸留水 (DDW)、PCR プライマー、Taq DNA ポリメラーゼ、10 倍 Taq バッファー、25mM MgCl_2 、2.5mM dNTPs、電気泳動用アガロース、分子量マーカー、TAE バッファー、エチジウムブロマイド

(2) PCR 反応液の調整

PCR 用の試薬混合液はあらかじめ (本数分プラスアルファ) 作った後、 4°C に保ちながら 1 本分の量 ($40\mu\text{l}$) を 0.5ml チューブに分注し、最後に抽出 DNA または 1st PCR 産物を $10\mu\text{l}$ ずつ加え最終容量を $50\mu\text{l}$ とする。

1) 1st PCR 反応液 (1 検体分)

DDW	$26.8\mu\text{l}$
50 μM プライマー	
AdTU7	$0.5\mu\text{l}$

AdTU4'	0.5 μ l
10 倍 Taq buffer	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
25mM MgCl ₂	3 μ l
5U/ μ l Taq	0.2 μ l
計	40 μ l

2) Nested PCR 反応液（1 検体分）

DDW	26.8 μ l
50 μ M プライマー	
AdnU-S'	0.5 μ l
AdnU-A	0.5 μ l
10 倍 Taq buffer	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
25mM MgCl ₂	3 μ l
5U/ μ l Taq	0.2 μ l
計	40 μ l

1st PCR プライマー

AdTU7; 5'-gCC ACC TTC TTC CCC ATg gC-3'

AdTU4; 5'-gTA gCg TTg CCg gCC gAg AA-3'

Nested PCR プライマー

AdnU-S'; 5'-TTC CCC ATg gCN CAC AAC AC-3'

AdnU-A; 5'-gCC TCg ATg ACg CCg Cgg Tg-3'

(3) PCR 反応

1st PCR および Nested PCR はともに以下の条件で行う。

94° C	1 分	}	36 回
50° C	1 分		
72° C	2 分		

72° C	7 分	1 回
4° C	保存	

尚 1st PCR, nested PCR とともに陽性コントロール(Ad DNA)および陰性コントロール(DDW 等)を同時に PCR にかける。

(4) 電気泳動

2 %電気泳動用アガロースを 40mM TAE buffer 中で 100V, 約 20 分間泳動し、エチジウムブロマイド染色後 UV 照射撮影を行ってバンドのサイズを確認して診断する。分子量マーカーも同時に泳動する。Ad2 標準株における 1st PCR 産物は 1,004bp, nestedPCR 産物は 956bp である。(血清型により若干のサイズの差は生ずる)(図 1、文献より引用)

2. 制限酵素による PCR 産物の血清型同定法(PCR-RFLP 法)

(1) 器具および試薬

オートクレーブ済みマイクロチューブ (0.5ml)、マイクロピペット、オートクレーブ済みマイクロチップ (フィルター付き)、ヒートブロックまたは恒温槽、電気泳動装置、UV 照射写真撮影装置、蒸留水、制限酵素 (EcoT141, HaeIII, HinfI) と添付の 10 倍制限酵素バッファー、電気泳動用アガロース、分子量マーカー、TAE buffer, エチジウムブロマイド

(2) 制限酵素反応

1) 試薬の調整

DDW	12 μ l
10 倍制限酵素添付 buffer	2 μ l
制限酵素	1 μ l
Nested PCR 産物	5 μ l
計	20 μ l

2) 使用酵素の最適温度で反応させる。

3) 2 %電気泳動用アガロースを 1mM TAE buffer 中で 100V, 約 20 分間泳動し、エチジウムブロマイド染色後、UV 照射撮影を行って制限酵素切断パターンを標準株のもの

と比較して血清型を同定する（図 2、文献より引用）。分子量マーカ―も同時に泳動する。

III. 文献

Saitoh-Inagawa W et al., 1996, J.Clin. Microbiol. 34: 2113-2116

图 1)

a) first PCR

1 2 3 4 5 6 7 8 11 14 19 37 40 41 M



b) nested PCR

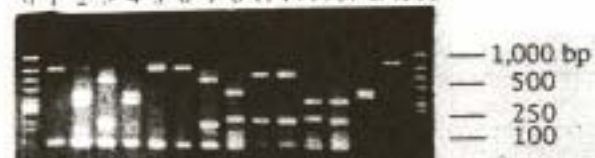
1 2 3 4 5 6 7 8 11 14 19 37 40 41 M



图 2)

a) *Eco*T14I

M 1 2 3 4 5 6 7 8 11 14 19 37 40 41 M



b) *Hae*III

M 1 2 3 4 5 6 7 8 11 14 19 37 40 41 M



c) *Hin*fl

M 1 2 3 4 5 6 7 8 11 14 19 37 40 41 M



アデノウイルスの DNA 診断（１）

PCR-シーケンス法によるアデノウイルスの血清型同定法

PCR-シーケンス法は、アデノウイルスのヘキソン上流側に存在する超可変領域を対象に、PCR法とシーケンス解析法を組み合わせたアデノウイルスの血清型同定法である 1)2)。ヘキソン超可変領域 (hypervariable region;HVR)は血清型特異的な配列を示し、血清型同定に関与している領域のひとつとして注目されている 3)。本法では、シーケンスの相同性を臨床検体と標準株との間で比較することにより、臨床検体の血清型を決定する。アデノウイルスのヘキソン領域のシーケンス解析により、HVR は7つ存在することが知られていたが、より血清型特異的な領域は、HVR4, HVR5, HVR7 の3領域であることがわかって来た 1)。したがって、本法ではこの3領域を対象に相同性を解析し、臨床検体の血清型を決定する。

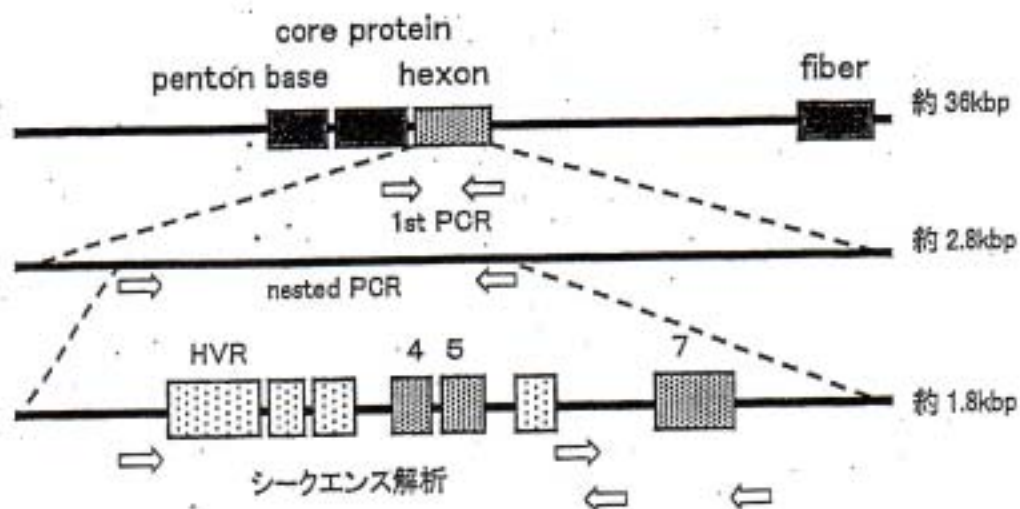


図1 PCR-sequence 法の概要

1. 結膜擦過材料の採取

- 1) アデノウイルス結膜炎患者の下眼瞼結膜を滅菌綿棒で強く擦る。
- 2) 擦過材料を 1.5ml の MEM 溶液に浸し、ウイルスを浮遊させる。

2. ウイルス DNA の抽出

- 1) 先のウイルスを浮遊させた MEM 溶液 1.5ml のうち、0.5ml を本法に使用する。残り 1.0ml は分離培養同定法や再検査のためにディープフリーザー内に保存しておく。
- 2) 0.5ml のウイルス浮遊液を 1.5ml のマイクロチューブにとり、12,000 回転、15 分、4° C にて遠心する。
- 3) 上清を除去し、沈殿物を材料にセパジーン R (三光純薬) を用いてウイルス核酸を抽出する。すなわち、まず、沈殿物に Tris buffer 50 μ l, Guanidine thiocyanate 50 μ l, 蛋白吸着剤を含むクロロホルム 350 μ l と Sodium acetate 200 μ l を加え、攪拌の後、12,000 回転、10 分、15° C にて遠心する。
- 4) 上清のみを新しいマイクロチューブに取り、そこに Acetate buffer 24 μ l, Pellet paint 1 μ l の割合の調整液 25 μ l と 100%エタノール 600 μ l を加え、12,000 回転、15 分、4° C にて遠心する。
- 5) Pellet paint でマークされた沈殿物が認められるはずである。認められないときは再度 12,000 回転にて遠心を繰り返す。沈殿物を浮遊させないように注意しながら上清を除去し、70%エタノール 380 μ l を加え、12,000 回転、1 分、4° C にて遠心する。
- 6) 沈殿物を浮遊させないように注意しながら上清を除去する。
- 7) 風乾あるいは真空ポンプを用いた減圧乾燥を行う。
- 8) DDW 25 μ l にて溶解する。

3. ヘキソン超可変領域の PCR

アデノウイルスの DNA は全長約 36K 塩基対(bp)である。そのうちヘキソンは約 2.8Kbp である。本法では、まず 1stPCR でヘキソン全長を増幅し、次に nested PCR で解析に必要なヘキソン超可変領域、約 1.8Kbp を増幅する (図 1)。

A. 1stPCR

1)プライマー

HX5-1(forward 側); 5'-AAg ATg gCC ACC CCC TCg ATg ATg CCg CAg T-3'

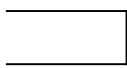
HX3-1(reverse 側); 5'-CAC TTA TgT ggT ggC gTT gCC ggC CgA gAA Cgg-3'

(アデノウイルス 3 型のヘキソン 1-2,829bp の増幅に相当する)

2) 混合液

DDW		12.52 μ l
10 \times LA PCR Taq buffer(Mg2+ plus)		2.0 μ l
dNTPs(各 400 μ M)		3.2 μ l
プライマー(各 100 μ M)	HX5-1	0.04 μ l
	HX3-1	0.04 μ l
LA Taq(1U)		0.2 μ l
Template(2.で作成したもの)		2.0 μ l
計		20.0 μ l

3) PCR 反応

98° C	10 秒		40 回
65° C	6 分		
4° C	保存		

B. nested PCR

1) プライマー

HX5-3(forward 側) ; 5'-CAC ATC gCC ggA CAg gAT gCT TCg gAg TA-3'


HX3-4(reverse 側); 5'-gTg TTg TgA gCC ATg ggg AAg AAg gTg gC-3'

(アデノウイルス 3 型のヘキソン 40-1,847bp の増幅に相当する)

2) 混合液

DDW		12.92 μ l
10 \times Taq buffer(Mg2+ free)		2.0 μ l
MgCl2(1.5mM)		1.2 μ l
dNTPs(各 200 μ M)		1.6 μ l
プライマー (各 100 μ M)	HX5-3	0.04 μ l
	HX3-4	0.04 μ l
Taq(1U)		0.2 μ l
Template(1st PCR 産物)		2.0 μ l
計		20.0 μ l

3) P C R 反 応

94° C	1 分		40 回
60° C	1 分		
72° C	2 分		
4° C	保 存		

4. PCR product の増幅確認

PCRの増幅産物1 μ lを1.5%のアガロースゲルを用いて、Tris-borate buffer(0.089M Tris, 0.089M boric acid, 0.02M EDTA, pH8.0)で100V, 約30分電気泳動し、0.5 μ g/mlのエチデュウムブロマイド染色を行う。1st PCRでは、約2.8kbpの増幅されたバンドを、nested PCRでは約1.8Kbpの増幅されたバンドをそれぞれ紫外線照射下に確認できるはずである。

5. PCR product の精製

- 1) PCR product 約20 μ l(ミネラルオイルを含む)全量を microcon-100R(color code; blue)(Amicon 社製)に移す。さらにそこに DDW 300 μ lを加える。
- 2) microcon-100R を付属の microtube に挿し、tube のフタを閉め、3,000G(6,000回転)、35分、4° C にて遠心する。
- 3) tube を新しいものに交換し、先の microcon-100R に DDW400 μ lを再び加える。
- 4) tube の蓋を閉め、3,000G, 20分、4° C にて遠心する。
- 5) microtube を再び新しいものにし、microcon-100R を逆にして3,000G にて flash する(20秒から30秒程度)。tube には、精製された PCR product が約5 μ lから10 μ l存在する。
- 6) 再び microcon-100R を逆にして元に戻し、microcon-100R に DDW20 μ lを追加する。
- 7) 軽く vortex した後、microcon-100R を逆にして3,000G にてもう一度 flash する。Tube には、合計約30 μ lの精製された DNA が存在する。

6. Cycle sequence

Gene Amp PCR System 9600 用の Micro Amp Reaction tube with Cap(Perkin Elmer #N801-0540)に以下の試薬をそれぞれ加えて、1サンプルあたり合計20 μ lになるよう

にする。1 臨床検体あたり 4 本のプライマーを設定しているので、サンプル数は 4 × 検体数となる。S29 は HVR4, HVR5 のためのフォワード側プライマー、S51 は HVR7 のためのフォワード側プライマー、S52 は HVR4, HVR5 のためのリバーズ側プライマー、S53 は HVR7 のためのリバーズ側プライマーである。

1) プライマー

S29; 5'-gCC AgC ACR TWC TTT gAC AT-3'(アデノウイルス 3 型ヘキソン 289-308bp に相当)

S51; 5'-CCC AAC AgA CCC AAY TAC AT-3'(同 937-956bp)

S52; 5'-CCC ATg TTg CCA gTg CTg TTg TAR TAC A-3'(同 986-1,013bp)

S53; 5'-AAG ggg TTg ACg TTg TCC AT-3'(同 1,555-1,574bp)

W;A/T, Y;C/T, R;A/G

2) 混合液

Terminator Ready Reaction Mix(TRRM)	8.0 μ l
(DNA Sequencing Kit; Applied Biosystems #402079)	
DNA template(5.で精製されたもの)	1.0 μ l
プライマー(各 3.2pmol)	1.0 μ l
(S29, S51, S52, S53 の各 4 本別々に)	
DDW	10.0 μ l
計	20.0 μ l

それぞれの tube をよく vortex して spin down する。

3) PCR 反応 (Gene Amp PCR System 9600)

96° C	10 秒	<div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 100px; display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="width: 50%; height: 50%;"></div> </div>	25 回
50° C	5 秒		
60° C	4 分		
4° C	保存		

7. Centri-Sep Spin Columns による濾過

6. でできた反応物を vortex して spin down したのち、Centri-Sep Spin Columns(Applied Biosystems #401762)を用いて濾過する。Centri-Sep Columns はキット添付書に従って、cycle sequence の間にあらかじめ用意しておく。すなわち、

- 1) 粉末ゲルの入ったチューブに 800 μ l ずつ DDW を加え、vortex して 30 分以上放置する。
- 2) 3,000 回転、2 分、常温にて遠心し、余分な水分を除き、ゲルを作る。
- 3) 6. で出来た反応物をゲルに滴下し、3,000 回転、2 分、常温にて遠心し濾過する。
- 4) 濾過した検体は、真空ポンプを用いた減圧乾燥を行う。ここで遮光してディープフリーザーに入れておけば、検体保存が可能である。

8. ABI Prism 310 への準備

- 1) 7. でドライアップした検体に Template Suppression Reagent(Perkin Elmer # 401762)を 25 μ l ずつ加える。そして 20 分以上よく vortex する。
- 2) spin down してから、全量を ABI Prism 用 tube である Genetic Analyzer 0.5ml Sample Tube(Perkin Elmer #401957)に移し、専用の蓋 Genetic Analyzer Septa for 0.5ml Sample Tube(Perkin Elmer #401956)をする。
- 3) Gene Amp PCR System 9600 を用いて、95° C, 2 分の heat shock をあたえる。終了したらすぐに氷上にサンプルを移動し、保存する。
- 4) サンプルを vortex して spin down する。
- 5) ABI Prism 310 にかけるまで、サンプルは氷上で保存する。

9. ABI Prism 310 によるシーケンス解析

キャピラリーシーケンサーのマニュアルに従ってシーケンス解析を行う。ここで必要な試薬は、310 Genetic Analyzer Buffer(10 \times)(Perkin Elmer # 401884), DNA Sequencing Polymer(Perkin Elmer #401673) の 2 つ、または 310 Genetic Analyzer Buffer with EDTA(10 \times)(Perkin Elmer # 402824), Performance Optimized Polymer 6(Perkin Elmer #402837)の 2 つである。後者の試薬では、前者よりも早くシーケンス解析が可能であり、1 本のシーケンス解析に要する時間は約 40 分である。1 臨床検体あたり 4 本のシーケンス解析が必要になっている。

10. 相同性の解析と血清型の同定

臨床検体の HRV4, HRV5, HRV7 領域におけるシーケンスを、アデノウイルス標準株のシーケンスと比較し、相同性 (%) を計算する。アデノウイルス標準株の HRV4, HRV5, HRV7 領域におけるシーケンスは、すでにデータベースに保存されている。

相同性解析には、DNASIS（日立ソフトエンジニアリング）などの解析ソフトを利用すると便利である。

各アデノウイルス標準株との相同性を計算し、最も相同性が高かった標準株の血清型を、その臨床検体の血清型と判定する。同じ血清型に帰属される臨床検体でも、それぞれ、相同性が異なるのは、各臨床検体の遺伝子型の相違を意味していると考えられる。

1 1. 文献

- 1) Takeuchi S, Itoh N, Uchio E, Aoki K, Ohno S. 1999. Serotyping of adenoviruses on conjunctival scrapings by PCR and sequence analysis. J. Clin. Microbiol. 37; 1839-1845.
- 2) Takeuchi S, Itoh N, Uchio E, Tanaka K, Kitamura N, Kanai H, Isobe K, Aoki K, Ohno S. 1999. Adenovirus strains of subgenus D associated with nosocomial infection as new etiological agents of epidemic keratoconjunctivitis in Japan. J.Clin. Microbiol. 37; 3392-3394.
- 3) Crawford-Miksza L, Schnurr DP. 1996. Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues. J.Virol. 70; 1836-1844.

アデノウイルスの DNA 診断（2）

PCR 法による型判別

アデノウイルス検査用にいくつかの PCR システムが報告されてきたが、それらの方法は

1.アデノウイルス遺伝子の塩基配列に変異が少ない領域にプライマーを設定した型別ができない検出用のもの、

2.血清型または種間で塩基配列の差がある領域を増幅するために遺伝子変異が少ない領域にプライマーを設定し、増幅産物をシーケンシングまたは制限酵素切断解析等で解析して型別や種別を行うもの、

3.特定の型または種の特異的な塩基配列をもとに、アデノウイルスの種あるいは型に特異的なプライマーをデザインし、そのプライマーを使用して目的増幅産物が得られるか否かで型別または種別等を行うものに分類できる。これらのうち2および3による型別をモレキュラータイピング呼ぶと、これが血清型と一致するには、モレキュラータイピングで利用する遺伝子領域の違いが、血清学的な分類と一致していること、その遺伝子領域で血清型内の変異が少ないことの2点が重要である。

ところが、一般的に血清型間の遺伝子配列に大きな差がある領域は、同じ血清型内でも遺伝子配列に変異が起こりやすい領域であることが多い。血清型を決定する塩基配列は徐々に解明されつつあるものの、特定の限定された一つの領域のみで決定されているのではなく、51 種類もの血清型が存在するためモレキュラータイピングは複雑なものとなっている。アデノウイルスのヘキソン（アデノウイルスの正20面体構造の面と稜を構成する蛋白で、血清型を決定する部分を含む）をコードする遺伝子領域には7カ所の変異が多い領域があることが報告されているが、これらの領域は血清型間のみでなく型内でも変異が多いホットスポットであることが同時に報告されている。

一方、ヘキソン蛋白をコードする領域のうち、最初の 400 塩基はアデノウイルスDNAのうちで最も変異が少ない領域とされる。しかし、この領域においても血清型間に塩基配列の違いが見られる。そして、この領域では血清型内での突然変異がほとんど見られない。したがって、この領域は塩基配列の保存性が高い典でモレキュラータイピングに適した領域と言える。以下のマルチプレックスPCR法は、この領域に種特異的プライマーおよび型特異的プライマーを設定したPCRシステムである。

マルチプレックス PCR 法による B 種およびその他の種のアデノウイルス検査法 1)

1. 器具および試薬

サーマルサイクラー、電気泳動装置、UV 照射写真撮影装置、マイクロピペット、同ピペット用チップ、アガロース (Invitrogen, Ultrapure Cat.No.15510), QIAmp Blood Kit(Qiagen), 100bp DNA ラダー (第一化学)、PCR 用精製水、Taq(TaKaRa R001 AM または、R001A など)、PCR 用チューブ、トリス-ほう酸緩衝液 TBE など。プライマーは下記の 6 種類を用いる(GC の区別のため G を小文字で示した)。

Hyogo 1997U	5'-gCC CCA ATg ggC ATA CAT gCA CAT C-3'
HC-A3	5'-gCA CgA AgC gCA gCA TCA gg-3'
HC-7p	5'-TgT CCT CCC ggT CAA Cgg gT-3'
HC-A11	5'-CAA AgA ACg TgC Tgg CCA TAT CC-3'
HexAA 1885	5'-gCC gCA gTg gTC TTA CAT gCA CAT C-3'
HexAA 1913	5'-CAg CAC gCC gCg gAT gTC AAA gT-3'

2. PCR の方法

1) 咽頭拭い液 (または結膜擦過) を 2 ml の抽出液 [ペニシリン 1、000 U/ml, ストレプトマイシン 1 mg/ml を添加した Eagle's MEM (pH 調整済みの維持培地)] に浸し、綿棒ごと 20°C 以下に凍結保存したもの (ウイルス分離用にも使用できる検体) を 3、000 rpm で 10 分間遠心する。上清からウイルス遺伝子を、QIAamp Blood Kit(Qiagen)等で抽出する。

2) 反応液の調整を下記の組成で行う。必要な本数分作って 45 µl ずつ反応チューブに分注して 4°C に保つ。必ずポジティブコントロール (3 型アデノウイルス標準株など; できれば 3、4、7 および 11 型) およびネガティブコントロール (蒸留水) を置くこと。

1 本分余分に作っておくと十分量作れて便利ことが多い。ここでは MgCl₂ 未添加の反応液を使った組成を示す)

DDW	30 µl
Hyogo1997U(50 pmol/ µl)	0.5 µl
HC-A3 (")	0.5 µl
HC-7p(")	0.5 µl

HC-A11(＂)	0.5 μ l
HexAA 1885(＂)	0.5 μ l
HexAA 1913(＂)	0.5 μ l
10 buffer (TaKara)	5 μ l
2.5 mM dNTP mix (TaKara)	4 μ l
25 mM MgCl ₂ (TaKaRa)	3 μ l
total	45 μ l

3) テンプレートを各ティープに 3 μ l ずつ加える。

4) ミネラルオイル（オイルフリーのサイクラーでは不要）を加えて、98° C 20 分間加熱後、4° C に急冷する。5 分冷却後、スピンドウンする。

5) Taq ポリメラーゼ(TaKaRa)1.25U(5U/ μ l を 0.25 μ l)を DDW1.75 μ l に加えて 2 μ l の Taq 希釈液を検体およびコントロールの数分作り、4) のチューブに加えてスピンドウン後、氷冷する。

6) 94° C 7min

94° C	30sec	
64° C	30sec	35 cycles
75° C	30sec	
75° C	5min	

7) 増幅産物 2.5 μ l をゲルローディングバッファー 1 μ l に加え、2%アガロースゲル (Invitrogen, Ultra pure Cat. No. 15510)で 100 V 約 40 分泳動後、エチジウムブロマイド(0.5 μ g/ml)で染色して UV 照射下写真撮影。泳動バッファーには TBE を、サイズマーカーには 100 bp DNALadder（第一化学）を用いる。

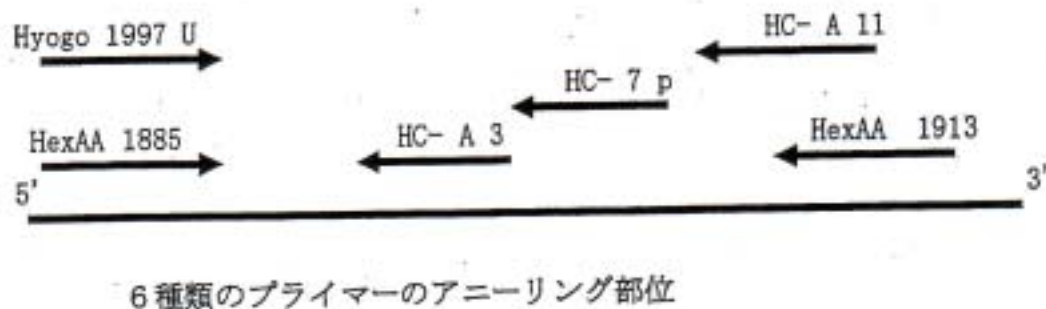
8) 増幅バンドのサイズにより次の 4 種類に区別できる。

3 型	188 bp	7 型	206 bp
その他 B 種	284 bp	B 種以外	301 bp

3. 注意点

本法はアデノウイルス DNA の塩基配列がよく保存されている部分にプライマーを設定し、完全にマッチしたプライマーによる遺伝子増幅が不完全なマッチングの場合よりはるかに効率的であることを利用している。プライマーの競合的な遺伝子増幅を利用するため、6 種類のプライマーを同時に用い、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を持たない Taq ポリメ

ラーゼを用いること。3型、7型の判定はポジティブコントロールと泳動結果を比較して判定する。また、B種アデノウイルス（3型、7型以外）で284bp以外に207bpの薄いバンドが見える場合、ポジティブコントロールの11型の反応産物の泳動結果と比較して判定すること。アガロースは、NuSieve3:1 アガロース(FMC)、ポリアクリルアミドゲルを用いた方が移動度の差は大きい、簡便性の点で Ultra pure アガロースを用いた。



右向き矢印はセンスプライマー、左向き矢印はアンチセンスプライマーを示す。アデノウイルスDNAのヘキソンコード領域、ヘキサソンの21-321baseの間に設定した。

4. B種以外の型判別法 2,3)

結膜炎患者等で 301bp の増幅産物が得られた場合（B種以外と判定された場合）、その検出アデノウイルスがC種、E種、D種のいずれであるかの検討が必要となる。増幅産物のダイレクトシーケンスによって多くのウイルスで型別が可能と思われる 2)。増幅産物の制限酵素切断による種別法が Allard3)らによって報告されていてE種（4型のみから成る）がC種およびD種と SmaI で切断が見られることで区別が可能である。下痢症の病原となる z F種および A 種の 18型も SmaI で切断されるが、検体が眼由来であれば 18型の可能性は極めて低いと思われる。さらにC種とD種は CspI で切断されなければC種、されればD種であることから区別可能とされる。E種は4型のみであるので種別（イコール型別）であるが、D種は32種類の型がウイルス分類国際委員会（ICTV）により認められている。しかし、流行性角結膜炎の病原となるのは主に8型、19型、37型とされ、これら3種類のウイルスも301bpの塩基配列に違いがあることが Allard3)らによって報告されているのでダイレクトシーケンスによって鑑別が可能と推定される。

5. 文献

- 1) Fujimoto T, Chikahira M, Kase T, Morikawa S, Okafuji T, Yokota Y, Nishio O: Single-tube multiplex PCR for rapid and sensitive diagnosis of subgenus B and other subgenera adenoviruses in clinical samples. *Microbiology and Immunology*. 44. 821-826, 2000.
- 2) 岡藤輝夫、岡藤隆夫、岡藤みはる、藤本嗣人、近藤雅嗣、西尾治；スイミングプールを介したと推定されるアデノウイルス4型による咽頭結膜熱の流行。臨床とウイルス。30, 270-274, 2002.
- 3) Allard A, Albinsson B, Wadell G: Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol*. 39, 498-505, 2001.

アデノウイルスの DNA 診断（2）

PCR による型判別

アデノウイルス感染症において分離ウイルスの血清型同定は、疫学的、臨床病理学的に大変重要である。最近では旧来の中和法だけではなく、臨床的に迅速診断性が求められ、遺伝子診断が開発されている。なかでも PCR 法は、従来から分離数が非常に少ない型、増殖が悪く中和反応による同定が困難な型、また、新型ウイルスや変異ウイルスの出現にも対応できることから、検出、同定ともに有用とみられている。

1. アデノウイルス遺伝子核酸検出のための PCR-増幅に利用される遺伝子領域

アデノウイルス遺伝子核酸検出のための PCR-増幅に利用される遺伝子領域はヘキソン、ファイバー、ペントンや E1(a,b), E3 で、前者はウイルス粒子構造蛋白質領域、後者は非構造蛋白質領域にあたる。

1) ヘキソン遺伝子を PCR-増幅領域とする。

ヘキソン遺伝子は全体の約 9 %（約 3,000bp）を占める。全血清型でホモロジーが高い領域を一般的なアデノウイルス検出 PCR 用、およそ 7 カ所の高度変異領域（HVR）のクラスタを利用し、群別、型別用 PCR が行われている。

2) ファイバー遺伝子を PCR-増幅領域とする。

ファイバー遺伝子は群抗原別に（約 950-2,000bp）と塩基数が大きく異なっている。また、ホモローガス（相同性）は低く HVR が細かく組み合わされていて PCR 増幅の塩基数が一定ではないので特異的な型別用 PCR に向いている。

3) E3 遺伝子を PCR-増幅領域とする。

全血清型の E3 遺伝子の塩基配列（約 3,500bp）は明らかでないが、ウイルスに必要な生物学的機能が多い上、約 9 個ある ORF のなかにはホモロジーの低いものがあることから、群別、型別の PCR 増幅ができる。

(全アデノウイルスの塩基配列のホモロジーが高いため群別、型別が特異的にできる PCR-増幅領域は少ない)

(一般的なアデノウイルス遺伝子検出 PCR 法については省略、Table 1-5, Figure 1, 2 参照)

2. PCR 増幅に使われる材料と処理

- 1) 患者の涙汁、鼻汁、唾液、尿、結膜拭い液、擦過液、洗浄液は DNA 抽出したのち PCR を行う。
- 2) 血液、胸水、髄液、喀痰、糞便、吐物、バイオプシー、オートプシー検体のうち固体は液状にして 10%原液または 1%乳剤から抽出後、PCR を行う。

3. PCR 増幅に使う遺伝子核酸を抽出するときの注意

(Hirt の方法 (1972) は、はじめにプロテイナーゼ K (PK) 処理は行わない)

- 1) SDS-phenol 法では、pH7.4 の Tris 飽和フェノールはサンプル 3 に対し 1 (1 ; 3) で乳剤とする。フェノールでの抽出は 2 回以上繰り返す。遺伝子核酸の末端に大きな蛋白質がついているウイルスなので PK 処理前では遠心分離時に中間層だけを残しトリス-EDTA でよく洗浄する。
- 2) 3 M GTC-matrix 法では 6M GTC (グアニジンチオシアネート) は冷凍しておく (室温、冷蔵庫では凝固したまま酸化する) ので使用时解凍する。最後に DDW で遺伝子核酸を matrix から再浮遊するとき 55-60° C (3-5 分) ウォーターバスにおく。中程度の量のサンプルに向く。
- 3) 溶剤-鉄ビーズ法では、混合時マイクロチューブキャップへの鉄ビーズ接着に注意する (magnet でも遠心でもおちない、チューブ種を代えるしかない) 最後に DDW で遺伝子核酸を鉄ビーズから再浮遊するとき 55-60° C (3-5 分) ウォーターバスにおく。材料が少量あるいはよく抽出できなく遺伝子核酸の含量が少ないと思われるサンプルに向く。

4. PCR 増幅法

- 1) DNA 依存性 DNA ポリメラーゼや塩、触媒、4 × dNTP 等を含む反応液が市販されている。
- 2) 両末端用のプライマーと鋳型 DNA だけを用意する。全量 50 μl の反応キットの場合

半量の 25 μ l でも遜色はない

- 3) サイクル増幅時の温度設定のうち未精製の患者サンプルはプレヒートを 100° C 3 分とし、アニーリングはプライマーの GC コンテンツが 50% なら 52° C を標準として上下させる。ミスマッチなど期待されないプロダクツがある時はアニーリング温度を上げエクステンション時間を短くする。
- 4) PCR プロダクツを電気泳動するアガロースベットは精製度の高い製品は 1.5%、低いものは 1.2% とすればトランスイルミネイターによる照射像やポジ写真像がきれいになる。

5. PCR 増幅による結果の評価

- 1) 陽性判定はほぼ単一なバンドができるかできないかで決定し、Nested-PCR は行わない。
- 2) PCR プロダクツは他のアデノウイルス遺伝子診断に使える（クローニング、シーケンシング、RE ポリモルフィズムなど）。

6. 薬品類

1) 核酸抽出キット

(Mag extractor system) Mag extractor-genome-/NPK-101/100 回用 / ¥ 25,000
Magnet stand(8 tube) 別売/¥36,800/Toyobo

2) プライマー

(Purification; OPC または HPLC) 25mer / ¥ 3,000 / 100-150 μ l / 1,000-1,500 回用
Sawady Technology KK; Tel: 03-5914-1200, Fax: 03-5914-1201
Bex KK; Tel: 03-5375-1071, Fax: 03-5375-5636
Espec-oligo KK; Tel: 029-851-8461, Fax: 0120-022-006

3) PCR 用 premix kit

Super Taq premix kit: T-005/50 μ l 用 / 60 回分 / ¥ 9,800
Sawady Technology KK; Tel: 03-5914-1200, Fax: 03-5914-1201

4) agarose

(Seakem ME agarose) 120g / ¥ 31,000
(agarose ME) 50013R / 250g / ¥ 32,000
FMC. co. ltd(Iwai kagaku yakuhin); Tel: 03-3241-0377 Fax: 03-3270-2479

7. 文献

- 1) WanHong Xu and Erdman. D.D, 2001. Type-specific identification of human adenovirus 3. J. Med. Virol. 64: 537-542.
- 2) Adhikary A., Numaga J., Ushijima H, et al. 2001. Rapid detection and typing of oculopathogenic strain of subgenus D adenoviruses by fiber-based PCR and restriction enzyme analysis. Investigative Ophthalmology & Visual Science 42(9): 2010-2015.
- 3) 向山淳司. 1999. アデノウイルス。臨床と微生物。増刊号（診断、治療と遺伝子検査） 26 : 114-125.
- 4) Fujimoto T., Chikahira M., Nishio O., et al. 2000. single-tube multiplex PCR for rapid and sensitive diagnosis of subgenus B and other subgenera adenoviruses in clinical samples. Microbiol. Immunol. 44: 821-826.
- 5) Takeuchi S., Itoh N, Ohno S. et al. 1999. Serotyping of adenoviruses on conjunctival scrapings by PCR and sequence analysis. J. Clin. Microbiol. 37: 1839-1845.

Table 1. ヘキソン遺伝子の遺伝子型決定 PCR 用プライマーセット (wide region)

Ad7-5' (521-541) 5' -AgA CAT TAC TgC AgA CAA CAA-3'

Ad7-3' (1313-1291) 5' -TAT CTT TTT CCC ATg CAg TgT C-3'

Ad7p, Ad7h product =792bp(average)

Ad3-5' (421-444) 5' -CAA ATg ggg ACA ATg CAg TAA C-3'

Ad3-3' (299-1275) 5' -ATT ATg ggg ACA ATg CAg TAA C-3'

Ad3p, 3a product=878bp(average)

Ad11-5' (755-777) 5' -Cgg AgC AgC CAA ATC AgA AAg TC-3'

Ad11-3' (1315-1290) 5' -CCA ATT Agg CgC ATT gTC TCC A-3'

Ad11p-Ad11d product=560bp(average)

Ad34-5' (427-456) 5' -gCA CTg gCC TAg Tgg ACg ACg gCA ATA CT-3'

Ad34-3' (1450-1422)5' -CTT AgC AAg TTC ACT gCT gCC AgT Tgg gTC-3'

Ad34p, a product=1,023bp(average)

Ad35-5' (427-452)5' -CCA ACT gCA gCC gCA ggC AAT-3'

Ad35-3' (843-820)5' -TTT TTC ACT CgA Cgg TTC CgA gTT-3'

Ad35p, a product=416bp(average)

Ad2-5' (404-425)5' -ggA ACA AAC CgA AgA TAg Cgg C-3'

Ad2-3' (1356-1331)5' -CTC CAT TAT CgC CTg AgC CAT TgC CA-3'

Ad2 product=952bp

Ad4-5' (1274-1296)5' -AAg ATg ACA CCA CAg TTA gTA at-3'

aD4-3' (2189-2170)5' -CgT CAg gAg CCg gTC gTT GA-3'

Ad4 product=915bp

Ad12-5' (405-429)5' -gTC AgA TAA CgC TAA CgC TAA gCT TAA TAC-3'

Ad12-3' (1236-1212)5' -gTT gTC ggC AgT CCA gCC ACC TCC T-3'

Ad12 product=831bp

(short region)

Ad7-5' (527-555)5' -TAC TgC AgA CAA gCC CA-3'

Ad7-3' (828-805)5' -ACC TAg AgA CAC TgC ATg ggg AA-3'

Ad7p, h product=301bp(average)

Ad3-5' (529-548)5' -CCA CTA CTg AAg gAg AAg AA-3'

Ad3-3' (833-812)5' -CgC TAA AgC TCC TgC AAC AgC A-3'

Ad3p, a product=304bp(average)

Table 2. アデノ群抗原型特異的 PCR 増幅用プライマーセット

AdA 群 5' (+)(419-443)5' -AAg CCT AAC TTT gCT CAg gCg-3'

AdA 群 3' (-)(1409-1433)5' -ggg AgT gTA TTT CAA gTC gTC Tgg-3'

A group product=950bp

AdB 群 5' (+)(432-452)5' -gCA gTA ACT ACC ACC ACA AAC-3'

AdB 群 3' (-)(1494-1471)5' -AAC ATC Tgg AAg gTA CAA AgC-3'

B group product=995bp

AdC 群 5' (+)(516-538)5' -AAC TCA TgT ATA TgC CCC ggC TC-3'

AdC 群 3' (-)(1533-1513)5' -AgA TAT TTC CAC ATT ggT ggg-3'

C group product=1,000bp

AdD 群 5' (+)(466-487)5' -gTA gCT gCC ATg ggA ggA ACA-3'

AdD 群 3' (-)(1540-1519)5' -TTA gTg ggC AgC gTg ACg TTg-3'

D group product=980bp

AdE 群 5' (+)(1246-1266)5' -ACA gAT gCA ggT TCT gAA AAg-3'

AdE 群 3' (-)(2531-2509)5' -TgA CgC Tgg TAA Cgg CgC TCT T-3'

E group product=1,285bp

AdF 群 5' (+)(417-441)5' -CAA AAC AAA CgT CTg Tgg ACA AgC-3'

AdF 群 3' (-)(1368-1389)5' -AAT gTT gTC Tgg CgT TAt CTT g-3'

F group product=970bp

Table 3. グループ特異的プライマー混合による convenience PCR

cluster 1	cluster 2
3.3pM group A primers *	3.3pM group A primers
3.3pM group B primers	3.3pM group D primers
3.3pM group C primers	3.3pM group E primers
cluster 3	cluster 4
3.3pM group B primers	3.3pM group C primers
3.3pM group E primers	3.3pM group D primers
3.3pM group F primers	3.3pM group F primers

* see table 2

Table 4. プライマー遺伝子の遺伝子型決定 PCR 用プライマーセット

(for group B adenoviruses)

Ad3p, Ad7h	5' (136-156) 5' -TTA AgT CTT TAA ATg TgT TAA T-3' 3' (678-657) 5' -gTA TAg TTC TAC ATT AAT ggA g-3' product size=542bp
Ad11a, Ad14	5' (228-248) 5' -gAC CTT ACA AgA AAA CAT Ag-3' 3' (690-669) 5' -CgC AgA ATC AAA AAA CAg CTC C-3' product size=462bp
Ad16p	5' (372-394) 5' -ACT ATg TTT ATC gCT ggg AgA Tgg-3' 3' (841-819) 5' -Agg gTC TCA gTg gCg TAT gTT A-3' product size=469bp
Ad21, Ad35p	5' (351-370) 5' -gTT AAA ATT TAA CAA Cgg Tg-3' 3' (673-653) 5' -ATC TTA ATT ggA TgT TTg CTg -3' product size=322bp
Ad34a, Ad11p	5' (291-314) 5' -CCA CTA ggA gCC ggA TTg ggA ACg-3' 3' (526-501) 5' -TCA TgA TTT gAC AgT Tgg ATT C-3' product size=235bp

(for group D adenoviruses)

Ad8	5' (482-506) 5' -TTT ATC AAA TAA Tgg Tgg AAA TAT A-3' 3' (69-846) 5' -TgA CAT AAT TgA ATT TTg ATT TCg-3' product size=382bp
Ad9	5' (479-505) 5' -gAA TCA ACA gAT AAT ggC ggA ACg gTA-3' 3' (870-846) 5' -gTT gAC ATA ATT gAA TTT TCA TTT C-3' product size=391bp

Ad15 5' (745-768) 5' -gAT gCA AAC ggA gTT CTT AAA CAg-3'
 3' (1011-990) 5' -ATA gTA ACT gTC AgC TTC TTC A-3'
 product size=266bp

Ad19, 37 5' (264-291) 5' -CTA CTg ATA AAA AAc TTg AgC TTg C-3'
 3' (803-783) 5' -TgT CgA AAC ATT ggA ATT TCC-3'
(for Ad37) 3' (936-916) 5' -TgA CTC CTg gCT gAT CAg gTT-3'
 product size=672bp

Ad28 5' (262-285) 5' -gTT gCA AgT ggA CAA TTg AAT TA-3'
 3' (739-716) 5' -CAT TAg CAT CAA ATA gCA gTg TTA-3'
 product size=477bp

Table 5. E3 遺伝子の遺伝子型決定用プライマーセット

(アデノ B2 サブグループ、11,14,34,35,特異的 PCR プライマー)

16.1KDaE3 protein 5' (147-176)

5' -CCT ACT CAC AAA CAT gAA gCT CAA CgA CTA-3'

19.3KDaE3 glycoprotein 3' (485-454)

5' -T gTT ATT ggC gTT TTT gAT gCg AgT ggT-3'

product size=717bp

(アデノ 7h, 3p, 3b 型特異的 PCR プライマー)

15.3KDa E3 protein 5' (4-35)

5' -ACT gAC CCA ATC gCC ACA TCA TCC ACC gCT gC-3'

Fiber protein 3' (392-362)

5' -gTT ATT TTT gAg TgC AAT AgA ATT ggA AgA g-3'

product size=1,020bp

(アデノ D グループ特異的 PCR プライマー)

12.0KDa E3 protein 5' (219-248)

5' -gAC Cgg ggC ACC ACC TAC ACC gTC TAC-3'

16.0KDa E3 protein 3' (333-303)

5' -AAC TgT ggA AgC AAg gTC CgC TCT ggC ACT g-3'

product size=391bp

(アデノ 8, 9 型特異的 PCR プライマー)

16.1KDa E3 protein 5' (270-300)

5' -ATC CTC TAC AAT CCT TTT gTA gAg ggA ACC T-3'

20.1KDa E3 protein 3' (90-58)

5' -CAT TCC CCA TgA TAC ATT TAA gTT AAT AAT TCC-3'

product size=904bp

(アデノ 15,17,19,37 型特異的プライマー)

20.1KDa E3 protein 5' (754-783)

5' -AAT gTT AgT TTA ACT ggA CCT CCA AAT ggC-3'

34.6KDa E3 protein

3' (28-1)5' -ggT ggg AgA AgT ggg gCg Agg CTg ATT ggC-3'

product size=460bp

(アデノ C グループ特異的 PCR プライマー)

10.3KDa E3 protein 5' (151-179)

5' -g CCT CAT CAC TgT ggT CAT CgC CTT TAT C-3'

14.9Kda E3 protein 3' (350-321)

5' -ggT ggg AgA AgT ggg gCg Agg CTg ATT ggC-3'

product size=621bp

(アデノ 2,5 型特異的 PCR プライマー)

10.3KDa E3 protein 5' (151-179)

5' -g CCT CAT CAC TgT ggT CAT CgC CTT TAT C-3'

15.3KDa E3 protein 3' (338-310)

5' -ggT gCA gAg ATC CTC Agg TCC TTg ACA Ag-3'

product size=857bp

(アデノ B1 サブグループ、3,7,16,21 型特異的 PCR プライマー)

14.9KDa E3 protein 5' (37-66)

5' -CAg gCT ATg CTA CCA gTC ATT TTA ATT CTg-3'

14.9KDa E3 protein 3' (356-330)

5' -TgC TAg Tgg TTg TAT gTg TTg TAg-3'

product size=319bp

Figure 1

A mapping of amino acid cluster of adenovirus hexon gene

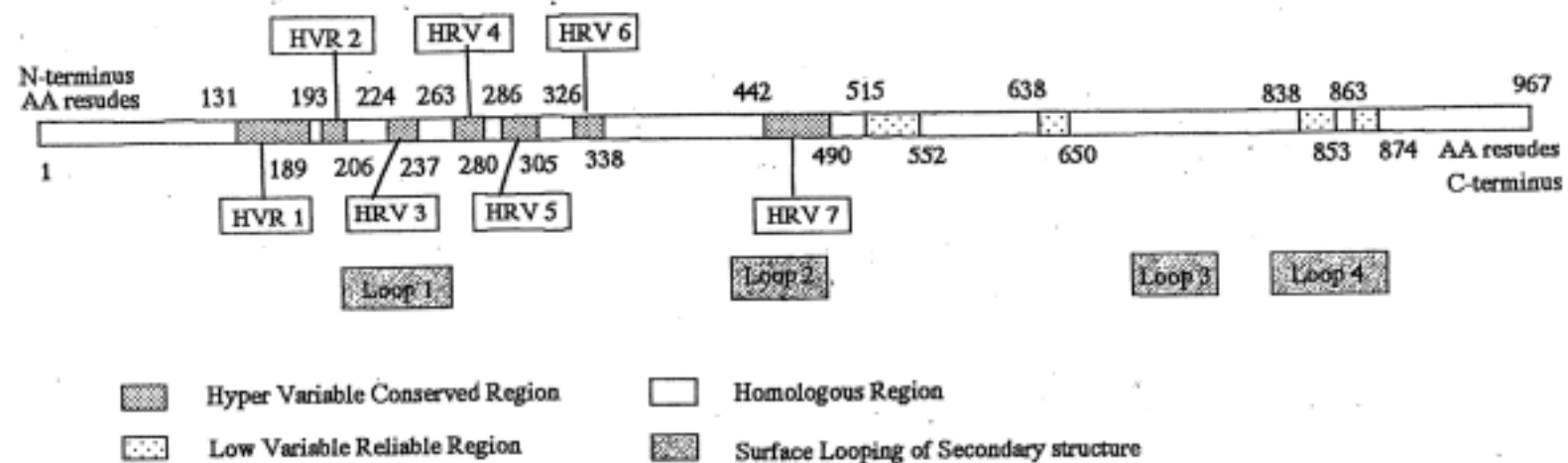
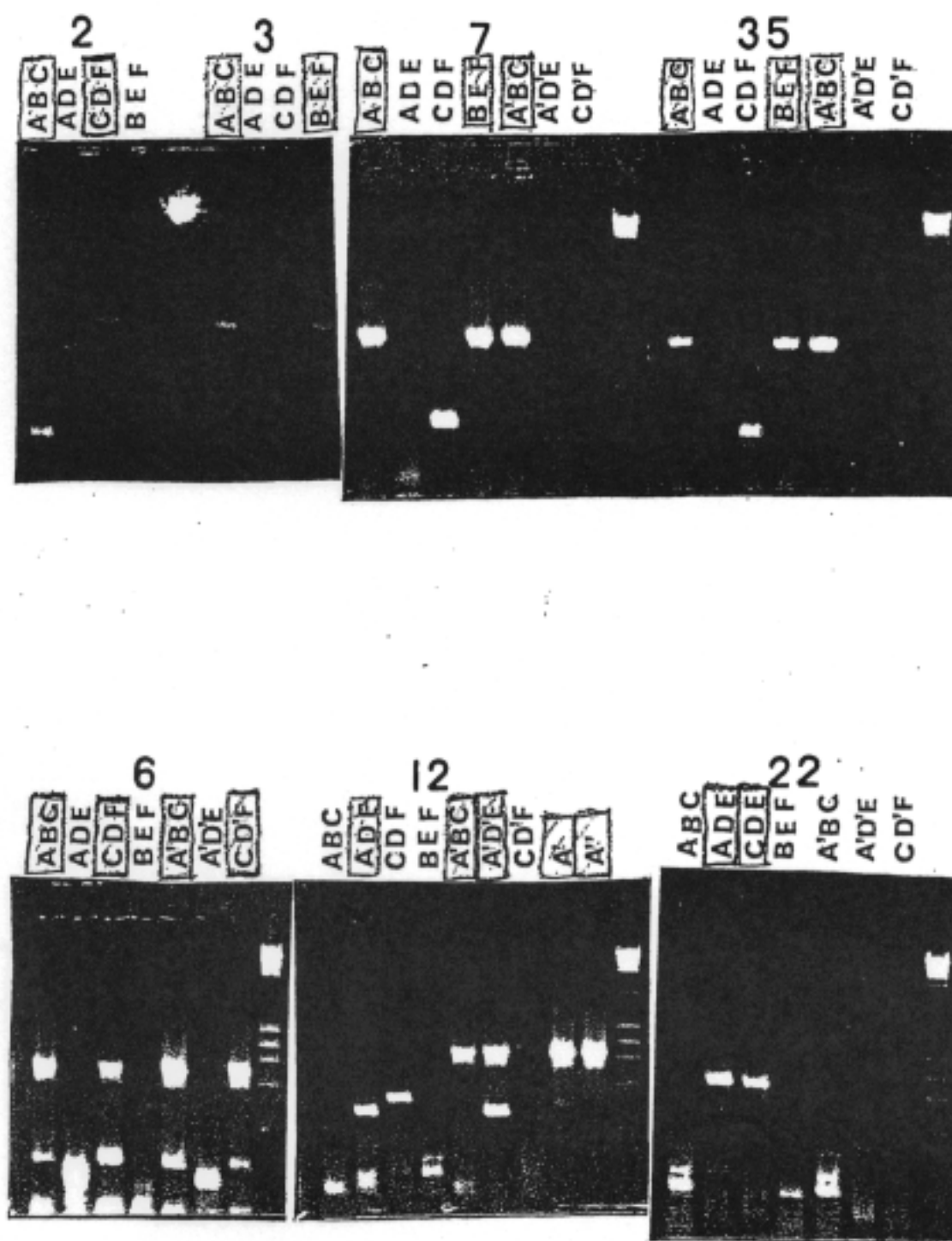


Figure 2

Adサブグループ検出用プライマーセットによるPCRの結果



アデノウイルスのゲノムタイピング

Restriction fragment length polymorphism(RFLP)法によるゲノムタイピングは、細胞培養によって増幅させたアデノウイルスの DNA を抽出し、制限酵素による切断パターンを解析する方法である。

一般的には、感染細胞から DNA を抽出する方法が用いられているが、細胞変性効果 (CPE) の遅い株では DNA の収量が少なく、泳動パターンにスミアが多くなる傾向がある。この場合、超遠心器を用いてアデノウイルス粒子を集めることによって、回収すると DNA が多くなる。

1. 器具と試薬

低速遠心器、超遠心器*1、ボルテックスミキサー、ヒートブロックまたは恒温槽、メスピペット (5,10ml)、マイクロピペット (20, 200, 1,000 μ l)、チップ (20, 200, 1,000 μ l) 25cm² 培養フラスコまたは 60mm ペトリディッシュ、15ml 遠心チューブ、超遠心用チューブ (10ml)*1, 2.0ml チューブ、0.5ml チューブ、電気泳動装置 (ミューピッド)、トランスイルミネイター

- PBS(-) (pH7.4-7.6, 冷やしておく)
- TES バッファー*2 (10mM Tris, 10mM EDTA, 1%SDS) ; 1M Tris(pH8.0) 1mM, 0.5M
EDTA(pH8.0) 2ml, 10%SDS 10ml に超純水を加え 100ml として高圧滅菌する。
- 5 M NaCl バッファー (10mM Tris,10mM EDTA, 5M NaCl) ; 1M Tris(pH8.0) 1ml, 0.5M
EDTA(pH8.0) 2ml, NaCl29.2g に超純水を加え 100ml として高圧滅菌する。
- Proteinase K(20mg/ml)
- PCI*2; 飽和フェノール 25ml, クロロホルム 24ml, イソプロピルアルコール 1ml を混合する。
- CI;クロロホルム 48ml, イソプロピルアルコール 2ml を混合する。
- 70%エタノール
- 滅菌蒸留水
- アガロース

- ・ 10×TAE バッファー
- ・ サイズマーカー
- ・ ローディングバッファー
- ・ エチデュウムブロマイド染色液；TAE バッファー100ml にエチデュウムブロマイド (10mg/ml)を 10 μ l の割合で加える。
- ・ 制限酵素；BamH I, EcoR I, SmaI, Hind III, BstE II 等
- ・ 制限酵素反応バッファー；ほとんどのメーカーで、10 倍濃度のものが各制限酵素に添付されている。
- ・ RNase A(約 10mg/ml)

***1 超遠心法でのみ使用**

- * 2 1 M Tris(pH8.0), 0.5M EDTA(pH8.0), PCI 等の試薬は自分で調整できるが、分子生物用試薬を販売しているメーカー（ライフテックオリエンタル、ニッポンジーン等）で調整済み試薬が販売されているので、時間がないときは使用するとよい。

2. 感染細胞からの DNA 抽出

- 1) アデノウイルスを細胞（HEp-2 等）に接種する。
- 2) 80%以上の細胞に細胞変性効果(CPE)が認められたら、細胞が壊れないように軽くピペッティングしながら剥がしていく。
- 3) 培養液ごと細胞を 15ml の遠心管に入れ、1,000rpm 2 分間遠心する。
- 4) 上清を除去する。（遠心管の底に細胞が沈殿している）
- 5) PBS(-)を 10ml 加え、ピペッティングで細胞を再浮遊させる。
- 6) 2,000rpm, 2 分間遠心する。
- 7) 上清を除去する（細胞は沈殿）
- 8) PBS(-)を 1.5ml 加え、ピペッティングで細胞を再浮遊させる。
- 9) 2.0ml のチューブに移しかえる。
- 10) 2,000rpm 2 分間遠心する。
- 11) 上清を除去する。（細胞は沈殿）
- 12) チューブをボルテックスミキサーで攪拌する。（細胞の塊がなくなるようにする）
- 13) TES バッファーを 800 μ l 入れ、ゆっくり転倒混和する。
- 14) 室温に 15 分置く。
- 15) 5M NaCl を 200 μ l 入れる（終濃度 1 M）
- 16) proteinase K(20mg/ml)を 10 μ l 入れる（1 チューブに 200 μ g/ml）

- 17) ヒートブロックあるいは恒温槽で 50° C 1 時間置く。(時々穏やかに混合する)
- 18) 氷中に 3 時間以上置く (一晩おいて翌日に続きを行っても可)
- 19) 15,000rpm 30 分遠心する。
- 20) 上清を 2.0ml のチューブに移しかえる。(白い沈殿を吸わないように注意)
- 21) PCI を 1.0ml 加え、10 分間転倒混和する。
- 22) 12,000rpm 20 分間遠心する
- 23) 上層を新しい 2.0ml のチューブに移しかえる。(白い沈殿を吸わないように注意)
- 24) PCI を 1.0ml 加え、10 分間転倒混和する
- 25) 12,000rpm 10 分間遠心する
- 26) 上清を 2.0ml のチューブに移しかえる
- 27) イソプロピルアルコールを等量加える
- 28) -80 または -20° C で一晩置く
- 29) 15,000rpm 30 分間遠心する
- 30) 上清を除去する
- 31) 70%エタノールを 1.0ml 加える
- 32) 15,000rpm、20 分間遠心する
- 33) 上清を除去
- 34) 乾燥させる
- 35) TE バッファーあるいは滅菌蒸留水を 50 μ l 入れる
- 36) ヒートブロックあるいは恒温槽で 56° C 10 分間置き DNA を溶解させる
- 37) TAE バッファーを入れた電気泳動装置 (ミューピット) に 1%-2%アガロースをセットする
- 38) 抽出 DNA 3 ~ 5 μ l にローディングバッファー 1 ~ 2 μ l 加え、100V で 30 分間泳動する。アデノウイルスの DNA 全長は約 30Kbp 程度なので、その長さに合ったサイズマーカーも同時に泳動する
- 39) エチジウムブロマイド染色液で 10 分間染色する
- 40) アガロースを 10 分間水洗する
- 41) トランスイルミネーターでアデノウイルスの DNA を確認する
- 42) アガロースを 10 分間水洗する
- 43) トランスイルミネーターでアデノウイルスの DNA を確認する
- 44) RFLP を行うまで、4° C で保存しておく。長期保存の場合は冷凍 (-20° C) する

3. 超遠心法による DNA 抽出

- 1) アデノウイルスを細胞(HEp-2 等)に接種する
- 2) 細胞変性効果 (CPE)が完全に広がるまで培養する
- 3) 培養液ごと細胞を 15ml の遠心管に入れ、3 回凍結融解を繰り返し、細胞を破壊させる。
- 4) 3,000rpm, 20 分間遠心する (細胞成分等は沈殿し、アデノウイルスは上清に残る)
- 5) 上清を超遠心チューブに入れる
- 6) 30,000rpm, 3 時間超遠心する
- 7) 上清を除去する
- 8) 滅菌蒸留水を 50 μ l 入れ、一晚置き、再浮遊させる
- 9) 2.0ml のチューブに移しかえる
- 10) 以後、感染細胞からの DNA 抽出の 1 3) から同様の処理を行う

4. Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP)

- 1) 試薬の調整

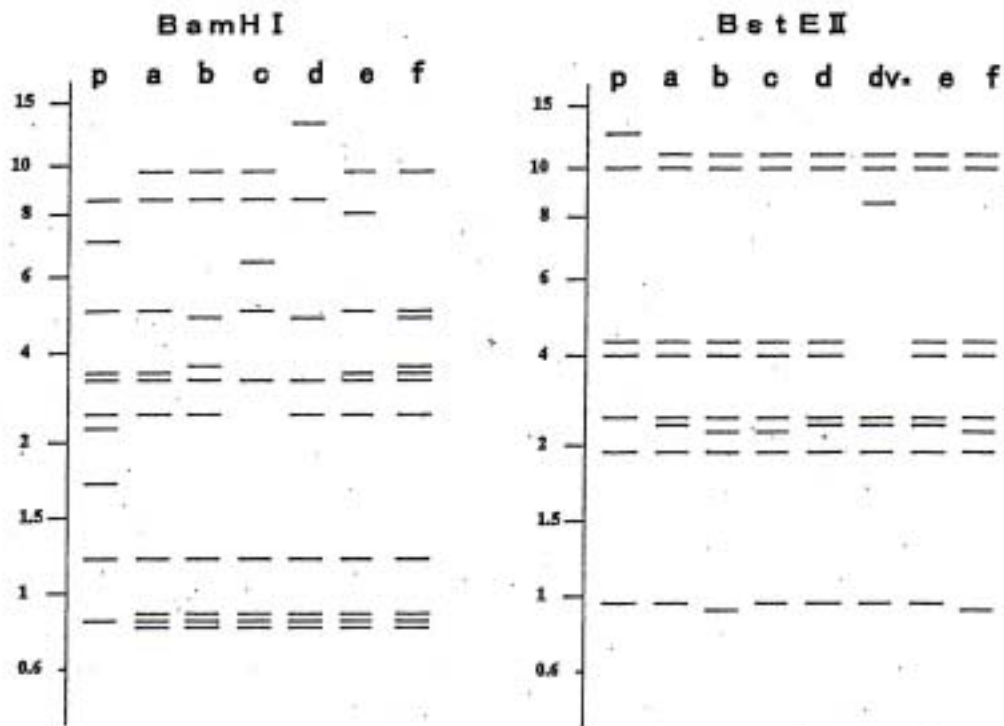
反応バッファー(20 μ l)の場合

10 倍反応バッファー	2.0 μ l
制限酵素	1.0 μ l
RNaseA	0.1 μ l
抽出 DNA	3.0 μ l
滅菌蒸留水	13.9 μ l

上記の組成は一般的な反応条件で、制限酵素 (一本のチューブに 10-20 単位) の活性や抽出 DNA の量によって変動する。制限酵素の活性が低い場合や抽出された DNA の多少によって、それらの量を増減し、最終的に 20 μ l に調整する。

- 2) ヒートブロックあるいは恒温槽で各酵素の添付書に記載されている酵素の至適温度で 3 時間反応させる (一晚反応させて置いても良い)
- 3) TAE バッファーを入れた電気泳動装置 (ミューピッド) に 1-2%アガロースをセットする
- 4) 酵素反応液 5-10 μ l にローディングバッファー1-2 μ l 加え、100 Vで 30 分間泳動する
- 5) エチジウムブロマイド染色液で 10 分間染色する

- 6) アガロースを 10 分間水洗する
- 7) トランスイルミネーターで切断パターンを確認する
- 8) 写真撮影



* 1996 年頃から、日本において流行している Ad7d の変異タイプ

図 制限酵素を用いたアデノウイルス7型のゲノムタイピング (略図)

アデノウイルスの血清診断

血清診断のうち、中和試験は HEp2 または HeLa 細胞等感受性のある細胞を用いて行う。

1. 器具および試薬等

器具： 培養器

炭酸ガス培養器

恒温水槽

マイクロプレート振とう器

分注器

マイクロピペット

8 チャンネルマルチマイクロピペット

機材： 組織培養用プラスチックフラスコ

組織培養用 9 6 穴マイクロプレート（平底）

滅菌済み 9 6 穴 U 底プレート（フタ付き）

マイクロチップ

キャップ付き小試験管

遠心管

滅菌タオルまたは滅菌ペーパータオル

滅菌バット

培地： イーグル MEM (EMEM)

ウシ胎児血清 (FBS)

組織培養用 PBS(-)

トリプシン (1 : 2 5 0)

EDTA-2Na

0.45 μ m メンブランフィルター

2. HEp-2 または HeLa 細胞の継代

アデノウイルスの血清診断には、一般的にウイルス分離に用いられる HEp-2 または HeLa 細胞が用いられる。細胞の増殖には EMEM プラス 10 %FBS を、細胞の維持には EMEM プラス 2 %FBS を用いる。

3. 中和試験

- 1) 単層培養した HEp-2 または HeLa 細胞の古い培地を捨て、PBS(-)を加えて細胞表面を洗浄後その液は捨てる。PBS(-)プラス 0.04%EDTA プラス 0.1%トリプシンを加え、静かに細胞全面に行き渡らせる。
- 2) EDTA プラストリプシンを除いた後、フラスコを静置して細胞がはがれてきたらフラスコをゆすり、少量の増殖培地を加えてピペティングして細胞の塊をなくす。その細胞を遠心管に移す。
- 3) 1,000-1,500rpm、5 分間遠心後上清を捨てる。
- 4) 少量の新しい増殖培地を加えて細胞を再浮遊させる。
- 4) 増殖培地で細胞濃度が $1-2 \times 10^5$ 個/ml* となるように調整し、マイクロプレートに 1 穴あたり 100 μ l 分注器で播種する。炭酸ガス培養器 (5%CO₂, 37° C) に静置して 2 日間培養する。

* 元の単層培養細胞の状態や、中和した血清の接種時間により調整する。

- 6) 細胞をマイクロプレートに播種した翌日、中和反応を行う。まず、キャップ付き小試験管で、被検血清 100 μ l に維持培地 300 μ l を加えて 4 倍に希釈し*、56° C、30 分非動化する。

* 血清が雑菌等で汚染されている可能性があるときは、この時点で 0.45 μ m メンブランフィルターで濾過滅菌する。

- 7) U 底プレートの 2 穴目以降に維持培地を 25 μ l ずつ入れる。6) を 1 穴目に 50 μ l 入れる。8 チャンネルマルチマイクロピペットを用いて 1 穴目から 25 μ l の段階希釈を行う。1 検体につき 2 列を用いる。
- 8) 予め抗原として用いるアデノウイルスの力価を測定しておき、100TCID₅₀/25 μ l のウイルス液を、血清を希釈した U 底プレートの各穴に 25 μ l ずつ加えフタをしてマイクロプレート振とう器で混和する。37° C で 3 時間、さらに 4° C で 1 晩中和する。ウイルス対照として、使用した濃度、10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ 希釈のウイルス液を各 4 穴に入れる。細胞対照として維持培地のみの穴を必ず設ける。
- 9) 播種した細胞が単層になったら、古い培養液を除き*、新しい維持培地を分注器等で

各穴に 100 μ l 入れる。

＊滅菌バットに滅菌タオルまたはペーパータオルを敷き、この上にプレートの古い培地を捨てる。

- 1 0) このマイクロプレートに、8) で中和した検体を、8 チャンネルマルチマイクロピペットを用いて接種する。
- 1 1) 37° C の炭酸ガス培養器で培養し、細胞変性効果(CPE)を 1 週間観察する。
- 1 2) 中和抗体価は、接種ウイルスを 50%以上中和した血清の最高希釈倍数で表す。

注) ウイルスの力価測定

- 1) マイクロプレートに細胞を培養する。
- 2) ウイルスを 10 倍階段希釈する。
- 3) 単層になり、維持培地に交換した細胞に、希釈したウイルスを 25 μ l ずつ、各 4 穴接種する。
- 4) 37° C の炭酸ガス培養器で培養し、細胞変性効果(CPE)を 1 週間観察する。
- 5) 100TCID₅₀/25 μ l は Reed and Munch 法で求める。

4. 文献

- 1) 厚生省保健医療局結核難病感染症課感染症対策室、1986、伝染病流行予測調査検査術式：1-18
- 2) 中園直樹、1987、微生物検査必携、ウイルス・リケッチア検査 第3版 第II分冊：68-80
- 3) 東京大学医科学研究所学友会編、1988、微生物学実習提要：203-205
- 4) 東京大学医科学研究所学友会編、1988、微生物学実習提要：234-237
- 5) 厚生省保健医療局エイズ結核感染症課、国立予防衛生研究所流行予測事業委員会編、1995、伝染病流行予測調査検査術式（一部改定）
- 6) 西村浩一他、2000、病原微生物検出情報、21：26-27

検査依頼先

アデノウイルス検査は、全地研が施行しうるものであるが、特に検査の依頼が必要な場合、下記の本マニュアル執筆者のいずれかの方々へ直接、ご連絡下さい。

青木 功喜

〒060-8638

札幌市北区北 15 条西 7 丁目
北海道大学医学部眼科学教室
Tel: 011-716-1161
011-864-4656
Fax: 011-864-2344

内尾 英一

〒232-0024

横浜市南区浦舟町 4-57
横浜市立大学医学部眼科学教室
Tel: 045-261-5656
Fax: 045-253-8490

加瀬 哲男

〒537-0025

大阪市東成区中道 1-3-69
大阪府立公衆衛生研究所
Tel: 06-6972-1321
Fax: 06-6972-2393

稲田 敏樹

〒162-8640

東京都新宿区戸山 1-23-1
国立感染症研究所
Tel: 03-5285-1111
Fax: 03-5285-1129

栄 賢司

〒462-8576

名古屋市北区辻町字流 7-6
愛知県衛生研究所

Tel: 052-910-5674

Fax: 052-913-3641

池田 義文

〒733-0833

広島市西区商工センター4-1-2

広島市衛生研究所

Tel: 082-277-6575

Fax: 082-277-0410

橋戸 円

〒162-8640

東京都新宿区戸山 1-23-1

国立感染症研究所

Tel: 03-5285-1111

Fax: 03-5285-1129

伊奈川 和香

〒232-0024

横浜市南区浦舟町 4-57

横浜市立大学医学部眼科学教室

Tel: 045-261-5656

Fax: 045-253-8490

大嶋 彰

〒174-8555

東京都板橋区志村 3-30-1

(株) 三菱化学ビーシーエル

Tel: 03-5994-2337

Fax: 03-5994-2949

竹内 聡

〒232-0024

横浜市南区浦舟町 4-57

横浜市立大学医学部眼科学教室

Tel: 045-261-5656

Fax: 045-253-8490

藤本 嗣人

〒652-0032

神戸市兵庫区荒田町 2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所

Tel: 078-511-6640

Fax: 078-531-7080

向山 淳司

〒162-8640

東京都新宿区戸山 1-23-1

国立感染症研究所

Tel: 03-5285-1111

Fax: 03-5285-1129

清水 英明

〒210-0834

川崎市川崎区大島 5-13-10

川崎市衛生研究所

Tel: 044-244-4985

甲木 和子

〒869-0425

熊本県宇土市栗崎町 1240-1

熊本県保健環境科学研究所

Tel: 0964-23-5771

Fax: 0964-23-5260

西村 浩一

〒869-0425

熊本県宇土市栗崎町 1240-1

熊本県保健環境科学研究所

Tel: 0964-23-5771

Fax: 0964-23-5260

突 発 性 発 疹

Human herpesvirus 6 (HHV-6)

および Human herpesvirus 7 (HHV-7)

目次

I. 突発性発疹の概説

1. 疫学
2. 病原体
3. 感染経路
4. 臨床症状
5. HHV-6 および 7 による突発性発疹 (図)
6. 治療・予防

II. HHV-6、HHV-7 の検査に関する注意事項：検体の採取・輸送・保管及び検査の進め方

1. 検査材料の採取
2. 検査材料の輸送
3. 検査の進め方
4. 検査の判定
 - 1) 実験室内診断
 - 2) 感染症法に基づく診断基準
5. 検査模式図

III. 確定診断法

1. 病原体分離および抗原検出
2. 抗体検出
 - 1) 間接蛍光抗体(IFA)法：：HHV-6 variant B 抗原スライドの作成方法
 - 2) 間接蛍光抗体(IFA)法：：HHV-7 抗原スライドの作成方法
 - 3) IgG 抗体価測定方法 (IFA 法)
 - 4) IgM 抗体価測定方法 (IFA 法)
 - 5) 中和(NT)法
3. DNA の検出
 - 1) サンプルの取り扱い
 - ① 血漿
 - ② 血球

- ③ 髄液
- ④ 咽頭ぬぐい液
- ⑤ 母乳
- ⑥ 肝臓、腸などの組織材料

2)PCR

3)Southern blot hybridization (non RI probe)

4)必要な器具・試薬

Ⅳ. 引用文献

Ⅴ. 本マニュアルに関する連絡先

Ⅵ. 執筆者一覧

I. 突発性発疹の概説

1. 疫学

突発性発疹 (exanthem subitum, roseola infantum) は、突然の高熱と解熱前後の発疹を特徴とするウイルス感染症で、生まれて初めての高温であることが多いが、予後は一般に良好である。

感染症発生動向調査によると、報告症例の年齢は 0 歳と 1 歳で 99%を占めており、それ以上の年齢での報告はまれである。特に、生後 6～18 カ月に発症することが多い。季節性はなく、毎週の定点当たり報告数は一定しており、年次による差異もほとんどない。本疾患の原因ウイルスである HHV-6 および 7 の血清疫学調査からは、3 歳までに 95%以上の乳幼児が抗体陽性となることが判明しており、初感染時に 30～60%が突発性発疹を発症すると言われている。不顕性感染は 20～40%と報告されており、発熱のみあるいは発疹のみの報告もある。

このような疫学的特徴から、本疾患は過去感染症発生動向調査のデータ解析の際に基準疾患として利用されてきた。ゴールデンウィークや年末など休日や病院の休業に伴って疾患報告数が変動することはよく知られているが、これを標準化するために、本疾患の発生数がほとんど一定であることを利用して、各疾患の報告数を突発性発疹の報告数で除した値でトレンドを比較しようとした試みがある (平成 6 年感染症サーベイランス事業年報、382-383p)。また、2 歳までにほとんどの小児が本疾患に罹患することから、実際の突発性発疹の発生数を推計し、それと本調査の報告数を比較して定点医療機関での疾患捕捉率を算定し、各疾患の人口 10 万人当たりの罹患率を推定するのに利用されている (病原微生物検出情報、Vol.9、No.4、2p)。

2. 病原体

1910 年に本疾患が記載されて以来長い間病原体は不明であった。HHV-6 は、当初 1986 年に Salahuddin らによってエイズ、リンパ腫、白血病などのリンパ球系疾患患者のリンパ球から発見されたヒトヘルペスウイルスであった。1988 年に、山西らがこのウイルスは突発性発疹の原因ウイルスであることを発見した。その後、突発性発疹の中に一部エンテロウイルスを原因とするものが含まれていること、また HHV-6、エンテロウイルスいずれでもない原因不明の突発性発疹が存在することが明らかとなった。

HHV-7 は、1990 年に Frenkel らが健康成人の CD4 陽性 T リンパ球を活性化することによって発見したヒトヘルペスウイルスである。その後、健康成人の唾液から高率に分離されること、血清疫学的調査により幼小児期に初感染することが報告された。また、年齢別抗体陽性率から感染の時期は HHV-6 より HHV-7の方が少し遅い事が判明している。筆者らは 1994 年に HHV-7 も、その初感染像として突発性発疹を呈することを報告した。また HHV-7 の初感染時には発熱のみや感冒様症状のみという非典型例が認められることも報告した。HHV-7 による突発性発疹は、HHV-7 が HHV-6 より遅く感染することから臨床的には二度目の突発性発疹として経験されることが多い。HHV-6 あるいは 7 による突発性発疹を臨床症状のみで区別することは困難で、ウイルス学的な検索が必要である。

HHV-6、7 の両者とも、ヘルペスウイルス科 β ヘルペスウイルス亜科に属し、HHV-6 は全長約 161kbp、HHV-7 は約 145kbp であり、いずれも直径 160~200nm のエンベロープをかぶったウイルスである。エンベロープの内側にはテグメント(tegment)を有し、その内側に正 20 面体のヌクレオカプシドをもつ 2 本鎖 DNA ウイルスである。いずれのウイルスも T リンパ球に親和性があり、CD4 陽性 T リンパ球でよく増殖する。 β ヘルペスウイルス亜科に属する HHV-6,7 およびサイトメガロウイルス(CMV)に共通の一部の遺伝子の塩基配列について解析した研究では HHV-7 は CMV よりも HHV-6 に近い β ヘルペスウイルスであると報告されている。HHV-6 はモノクローナル抗体に対する反応性、血清疫学、DNA 制限酵素切断パターン、DNA シークエンス、培養細胞での増殖性、病原性の差によって variant A と B に分類されており突発性発疹を起こすのは variant B である。一方 variant A では具体的な疾患の関連性は知られていない。HHV-6,7 とともに初感染以降は潜伏感染状態となり、HHV-6 は唾液腺、リンパ節、神経系などに存続しマクロファージ、アストログリア細胞などで持続・潜伏感染を続け、HHV-7 は CD4 陽性 T 細胞に潜伏し、唾液腺の上皮細胞に持続感染して断続的に唾液中に排泄される。HHV-7 の方が唾液中に排泄される量が多く、容易にウイルスも分離されるが、HHV-6 は唾液から DNA は検出されるものの、ウイルス分離は困難である。

3. 感染経路

現在のところ、唾液中に排泄されたウイルスが経口的、あるいは経気道的に感染すると考えられているが、なぜ排泄量が多い HHV-7 の方が HHV-6 より後に感染するのかなど、不明な点も多い。母体からの移行抗体が HHV-7 の方が長く残ることがその原因の 1 つと考えられている。子宮頸管粘液からウイルス DNA が検出されるという報告もあり、周産期における感染も感染経路の一つである可能性がある。一方、母乳については感染経路として否定的である。初感染後の潜伏期間は、1950 年 Kempe らの報告により約 10 日と推定されている。

4. 臨床症状

突発性発疹の臨床症状は 38℃以上の発熱が 3 日間ほど続いた後、解熱とともに淡紅色～鮮紅色の斑丘疹が体幹を中心に顔面、四肢に数日間出現する。

写真 1：解熱後に出現した発疹（頁 7）

写真 2：躯幹を中心に出現した淡紅色の紅斑（頁 7）

随伴症状としては、下痢、眼瞼浮腫、大泉門膨隆、リンパ節腫脹などがあげられるが、多くは発熱と発疹のみで経過する。診断については、特徴的な臨床経過、発疹出現によりなされることがほとんどであり、困難ではない。永山斑（病初期口蓋垂の根元の両側に認められる粟粒大の紅色隆起）を見つけることにより、有熱期間中に診断が予測できることもある。

発熱初期に熱性痙攣を合併することがあるが、一般に予後は良好である。まれに脳炎、脳症、劇症肝炎、血小板減少性紫斑病など重篤な合併症をおこすことがある。

5. HHV-6 および 7 による突発性発疹

図 1（頁 8）



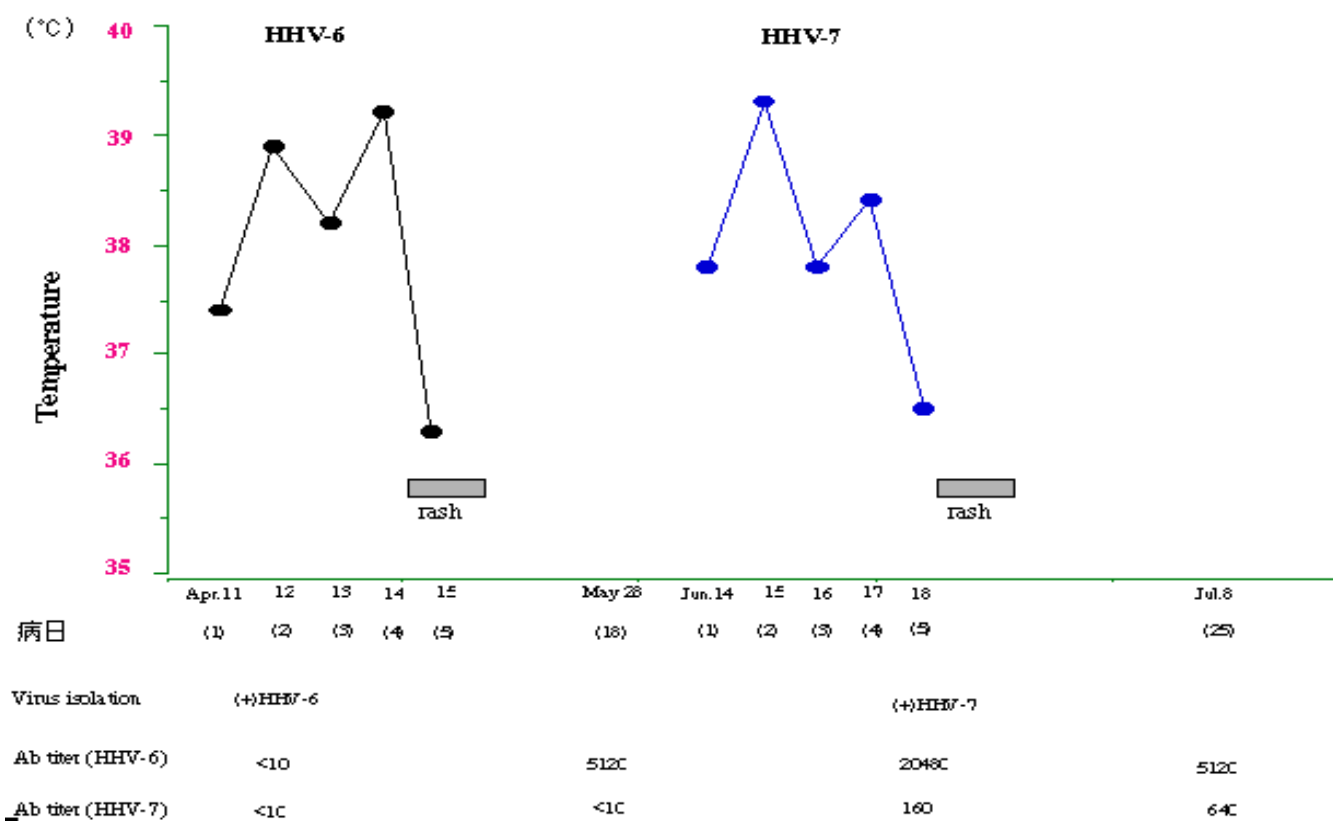
写真 1.



写真 2.

HHV-6による突発性発疹

HHV-7による突発性発疹



6. 治療・予防

通常は予後良好のため、対症療法にて経過観察するのみであり、特に予防が問題となることもない。

In vitro において、ガンシクロビルおよびホスカルネットにより HHV-6 の増殖が高率に阻害されたとする報告がある。アシクロビルに関しては、高濃度の時にのみ同様の効果が認められている。突発性発疹は従来予後良好な疾患であり、実際抗ウイルス療法を考慮しなければならない症例に遭遇することは稀であるが、重篤な合併症を呈した場合、あるいは移植患者や AIDS 患者のように免疫抑制状態にある患者では、抗ウイルス剤の使用も検討する価値があると思われる。

Ⅱ. HHV-6、HHV-7 の検査に関する一般的注意事項：検体の採取・輸送・保管及び検査の進め方

突発性発疹の診断は通常臨床症状のみで行われることがほとんどであり、重症合併症などをきたした場合にウイルス学的な診断を求められることが多い。

病原体診断には、①末梢血単核球からのウイルス分離、②急性期のウイルス特異的 IgM 抗体の存在、③急性期と回復期のペア血清で抗体陽転あるいは抗体価 4 倍以上の有意上昇を証明することが一般的に用いられる。

最近では末梢血中のウイルス DNA 定量によってもその病態がかなり把握できるが、必ず一定量の template から一定量以上のウイルス DNA が証明されなければ病的意義は少ない。あるいは通常ウイルスが存在しない部位（血漿、髄液など）からの DNA 検出が求められる。

単核球から PCR 法で HHV-6 DNA を検出する場合は、 10^5 個中 100 コピー以上のウイルス DNA が検出されないと、病的意義はほとんどない。突発性発疹の急性期では単核球 10^5 個中に通常 100～1,000 コピー以上検出される。発熱期では 1,000 コピー以上検出される場合が多い。HHV-7 に関しては健康成人の末梢血単核球から分離されたウイルスであり、単核球から DNA が検出されても病的意義はない。同様に、HHV-7 が唾液あるいは咽頭ぬぐい液から分離されたり DNA が検出されても病的意義はなく、そのヒトが既感染であることを証明するのみである。一方、血漿（必ず遠心して細胞成分を含まない血漿を用いること）20 μ l 中に HHV-6 あるいは HHV-7 DNA が検出された場合は初感染か再活性化のいずれかの状態であると考えられる。

HHV-6、7 感染症の診断には、上記のように血液からのウイルス分離、PCR 法による血漿中ウイルス DNA の検出、血清抗体価診断などがあるが、現在のところいずれも健康保険適応はない。

1. 検査材料の採取

ウイルス分離で HHV-6,7 感染症を診断するためには、急性期の末梢血を EDTA-2Na、クエン酸ナトリウムあるいはヘパリン(DNA 検出には用いないこと)入りの容器に無菌的に凝固しないように採取する。採血量は白血球数が正常の場合全血 2ml あればウイルス分離、DNA 検出、抗体価測定すべて可能である。ここから単核球を分離し、(3) 検査方法 1. 病原体分離 に従ってウイルス分離を行う。すみやかに培養を始めた方が分離率は高いが、すぐに単核球成分

を分離する時間がない場合は 20℃前後で保存し 1、2 日以内に培養を開始する。

DNA 検出で HHV-6,7 感染症を診断するためには、PCR 法によって細胞成分が含まれていない血漿からのウイルス DNA の証明が必要である。ウイルス分離用に採血された血液から血漿成分を分離し DNA を抽出する。血球成分も採血後すみやかに DNA を抽出するのがベストであるが、時間がない場合は全血を 4℃で保存し 3 日以内に処理する。この場合はウイルス分離には用いず DNA 検出のみに用いる。

単核球から DNA を検出する場合は一定の細胞数にあわせて pellet で-80℃に保存するかあるいはすぐに K buffer(50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH8.3, 3mM MgCl₂, 0.45% NP40, 0.45% Tween 20, 100μg/ml proteinase K)で 56℃ 3 時間あるいは 65℃ over night で処理後-20℃に検査時まで保存する。PCR の際は通常 template として $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 個あるいは 0.5~1μg DNA を使用するためそれに応じて保存しておくことと便利である。抗凝固剤については、ヘパリンは PCR を阻害するため EDTA 加血を使用する方がよい。通常病院には血算検査用に EDTA 加採血管が常備されているためそれに採血し送付してもらうことが多い。

ウイルス分離や PCR を施行せず抗体価のみの検査の場合は、採血後血清を遠心分離し、検査まで-20℃に凍結保存する。急性期、回復期共に血漿でも検査可能である。

2. 検査材料の輸送

ウイルス分離用の抗凝固剤を入れた全血は室温で輸送する。ただし、猛暑の時期は時に輸送車が 40℃を超えることがあり、その場合は 20℃前後で輸送するよう注意を要する。時に凍結されていたり、氷につめて送られてくることがあるがこの場合ウイルス分離に用いることは不可能である。また、採血は無菌的に行ってもらようよう依頼し、採血後はできるだけすみやかに培養を始める。少なくとも 3 日以内に培養を始めなければならない。その他、咽頭ぬぐい液や、脳脊髄液などは、検体採取後速やかに 4℃で検査施設に輸送をしてもらう。もしそれが困難な場合は一旦その医療施設で-80℃に保存してもらい送付可能な日にドライアイスと共に送付してもらう。4℃で送付された場合はすぐに DNA を抽出するかあるいは少量ずつ分注し-80℃に保存する。

3. 検査の進め方

通常急性期の血液検体が送られてくるが一部ウイルス分離、一部 DNA 検出、一部抗体価測定用に使用する。臨床の現場には回復期の血液検体を採取してもらうよう依頼する。

4. 検査の判定

1) 実験室内診断：突発性発疹は臨床診断のため、ここでは HHV-6,7 感染症の診断方法を記載する。①急性期末梢血単核球からウイルスが分離されること。②急性期と回復期で抗体陽転あるいは4倍以上の有意上昇を確認する（この場合は必ず HHV-6 と 7 を同時に測定する）こと。③急性期にウイルス特異的 IgM 抗体の存在を証明すること。④急性期の血漿（細胞成分を混じない）から PCR 法でウイルス DNA を証明すること。これらの結果の一部またはすべてを組み合わせ総合的に判断する。急性期の末梢血単核球を PCR の template に用いる場合は必ず定量 PCR が必要である。HHV-7 は末梢血単核球の結果を診断に用いてはならない。HHV-6,7 共に原因ウイルスではなかった場合はエンテロウイルスの検討を実施する。エンテロウイルスのウイルス分離には便検体が必須である。エンテロウイルスのマニュアル参照。

2) 感染症法に基づく診断基準：突発性発疹は4類感染症定点報告疾患であり、全国約 3,000 の小児科定点より毎週年齢階級別発生数が報告されている。報告の基準は以下の通りである。

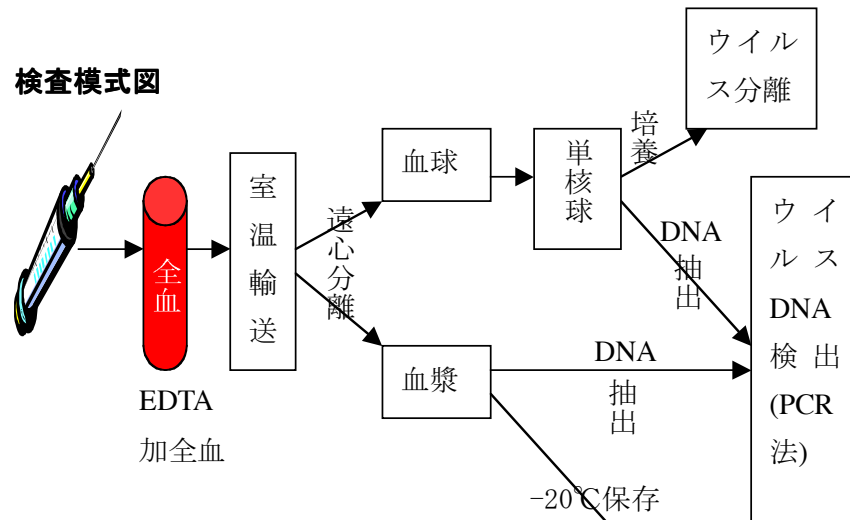
○診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ以下の2つの基準のすべてを満たすもの

1. 突然に発熱（38℃以上）し、2～4日間持続
2. 解熱に前後して体幹部、四肢、顔面の発疹が出現

○上記の基準は必ずしも満たさないが、診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ、病原体診断や血清学的診断によって当該疾患と診断されたもの。

5. 検査模式図

白血球数が正常ならば 2ml 採血。



抗体価測定のみならば 1ml を遠心分離。



Ⅲ. 確定診断法

1. 病原体分離および抗原検出

ウイルス分離は、通常患児の末梢血単核球を検体とし、末梢血単核球単独あるいは臍帯血単核球との共培養により、IL-2、PHA などリンパ球を活性化する試薬を培養液に加えて培養する。一般的には、臍帯血単核球との混合培養の方がウイルス分離の効率は高いが、患児末梢血単核球の単独培養でもウイルスは分離可能である。細胞変性効果(cytopathic effect: CPE)が出現したところで抗HHV-6 あるいは 7 単クローン抗体を用いて染色し、ウイルスの判別を行う。臍帯血単核球を用いることによって継代可能である。また、HHV-6 variant B は MT-4 細胞、HHV-7 は SUP-T1 細胞により継代可能である。

HHV-6 に特徴的な CPE は、風船状でやや透明な大型細胞である。一方 HHV-7 の CPE は HHV-6 より小型の円形細胞である。突発性発疹急性期の血液の場合は 7～10 日前後で CPE が出現する。CPE が出現しない場合でも 2 週間前後で培養細胞を一部採取し、単クローン抗体を用いて染色し、染色陽性の場合、臍帯血単核球で継代する事によって高率に CPE の出現が認められる。染色陰性の場合でも、臍帯血単核球を用いて継代し、さらに 2 週間観察を続ける。この時点でも染色陰性の場合にはウイルス分離陰性と判定している。

培養液は 3～4 日に一度培養容器の 1/3 程度の培養液を上から取って捨て、新しい培養液を加える方法で行っている。突発性発疹の発熱期に検査が行われればほぼ 100%分離可能であるが、発疹期に至ると分離率は 40%程度に下降し、発疹が消失すると分離されることはほとんどない。発熱期に突発性発疹を疑えば分離は比較的容易である。しかし、発熱のみの時期に突発性発疹を確信できない場合もあり、発疹期での採血が多い。発疹期でもなるべく早い時期の採血が望ましい。

突発性発疹以外にも臓器移植患者やエイズ患者を含む免疫抑制状態下にある患者の末梢血単核球からも HHV-6 あるいは 7 が再活性化時に分離可能である。既感染者の唾液から HHV-7 は高率に分離されるが、HHV-6 は一般的に唾液からのウイルス分離は困難である。このことから 唾液からの HHV-7 の分離に病的意義はない。

～方法～

1. 全血を室温 1,500rpm で 10 分遠心し血漿成分と血球成分を分離する。

2. 血球成分を 3 倍量の PBS(-)で suspend し、Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech AB)上にゆっくり重層し、遠心機を slow accel および brake off にして室温 2,000rpm で 15 分遠心する。
3. 単核球の成分を採取し、PBS(-)10ml に suspend し、室温 1,500rpm で 10 分遠心する。
4. 上清を除去し、pellet (単核球) を RPMI1640, 10%FBS, PHA(5 μ g/ml), IL-2(0.1unit)で培養開始。約 10⁶個/ml 培養液 を目安にする。
5. 培養液は 3~4 日に一度培養容器の 1/3 程度の培養液を上から取って捨て、新しい培養液を加える。
6. 上記に示した HHV-6 あるいは 7 に特異的な CPE を観察する。(HHV-6 は風船状でやや透明な大型細胞。HHV-7 は 6 より小型の円形細胞。)
7. 突発性発疹の急性期なら 7~10 日で CPE が出現する。
8. CPE の有無にかかわらず約 2 週間で培養細胞の一部を採取し、冷アセトン (-20℃) で 15 分間固定。
9. 抗 HHV-6 あるいは 7 単クローン抗体を用いて蛍光抗体法により抗原の有無を検索する。
10. 染色陽性の場合は、臍帯血単核球で継代する事によって高率に CPE の出現が認められる。この際、培養液は IL-2, PHA 共に含まない RPMI1640 with 10%FBS に変えた方が早く CPE が出現する。
11. 染色陰性の場合でも、臍帯血単核球を用いて継代し、更に 2 週間観察を続ける。
12. 培養開始 4 週間後にウイルス特異的単クローン抗体を用いて再度染色し染色陰性の場合はウイルス分離陰性と判定。

注 1) 臍帯血単核球が利用できる場合は最初から共培養した方がウイルス分離の効率はよいが臍帯血を手に入れることは困難な場合が多い。

注 2) CPE が確認されなくても、臍帯血単核球で盲継代することにより分離されることもある。

2. 抗体検出

抗体価の測定は、体内でのウイルスの動態を見るためには不可欠な検査方法である。まず間接蛍光抗体 (IFA) 法により抗体価を測定し、必要に応じて中和

法を併用している。IFA 法の方が簡便で迅速に結果が得られる点で勝っているが、特異性という点においては中和法の方が勝っている。

IFA 法に用いる 24 穴抗原スポットスライドはあらかじめ大量に作成し、シリカゲル入り容器に入れ、密閉して-20℃ に保存しておく。スライドガラスを 1 枚ずつハイブリバッグ等に入れシーラーで封じて-20℃に保存する方法もある。

IgM 抗体価を測定する場合は、あらかじめ Protein G sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB)で血清を処理し、IgG を吸着除去した血清を使用しなければならない。2 次抗体として FITC(fluorescein isothiocyanate)ラベルウサギ由来抗ヒト IgM 抗体(Dako, Denmark)を用いることによって測定する。しかし、IgM 抗体検出可能期間は限定されており、初感染の場合は感染後 5～20 日前後での検体が必要である。

診断は急性期のウイルス特異的 IgM 抗体の存在あるいは急性期と回復期のペア血清でウイルス特異的 IgG 抗体の陽転あるいは 4 倍以上の有意上昇を検出する。採血後血清を遠心分離し、検査まで-20℃に凍結保存する。急性期、回復期共に血漿でも検査可能である。

急性期は少なくとも発症後 1 週間以内、回復期は少なくとも発症後 10 日以上経過してからの検体でないと診断を誤る場合がある。また、抗体価測定の場合 HHV-6 既感染のヒトに HHV-7 が感染した場合 HHV-6 も同時に体内で再活性化しているため HHV-6 の抗体価も有意上昇を示す。必ず抗体価の測定は両者を同時に行わなければ病態の把握を誤る。

～方法～

1) 間接蛍光抗体 (IFA) 法 : HHV-6 variant B 抗原スライドの作成方法

1. 臍帯血単核球を分離し、RPMI1640, 10%FBS, PHA(5μg/ml)を約 10^6 個/1ml 培養液を目安に約 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個をフィルタートップフラスコで 3 日間 CO₂incubater 内で培養する。
2. 培養した臍帯血単核球を PBS(-)10ml で 1 回洗浄する (室温 1,500rpm で 10 分遠心)。
3. 上清を除去しこの中に HHV-6 variant B (HST 株)を入れ suspend した後全量をアシストチューブに入れかえる。
4. アシストチューブを 37℃* 2,500rpm で 45 分遠心する。(*我々は 37℃で遠心しているが、室温での検討を実施していないため比較検討のデータ

はない。)

5. 遠心した細胞を RPMI1640, 10%FBS で培養する。
6. CPE が出てきたら抗 HHV-6 単クローン抗体で染色し確認する。
7. 染色陽性が確認できたら臍帯血単核球に感染させた時と同様の方法（遠心法）で MT-4 細胞に感染させる。
8. 感染細胞が約 60～70%程度になったところで細胞を PBS(-)で洗浄し、1μl ずつ 24 穴スポットスライドにのせる。
9. 十分に風乾させた後、冷アセトン（-20℃）で 15 分間固定する。
10. 24 穴抗原スポットスライドはあらかじめ大量に作成し、シリカゲル入り容器にスライドガラス保存容器を入れその中に抗原プレートを入れ、密閉して-20℃ に保存。
11. あるいは、スライドガラスをハイブリバッグ等に入れ熱シーラーで 1 枚ずつ封じて、-20℃に保存する。

注 1) 感染細胞が 100%になると判定がむしろ困難になる。

注 2) 感染 MT-4 細胞 100%に非感染 MT-4 細胞を混じる方法でもよい。

注 3) 細胞の密度に気をつける。少なすぎても多すぎても判定が困難になるため単層一面になるくらいがベストである。

2) 間接蛍光抗体 (IFA) 法 : HHV-7 抗原スライドの作成方法

1. HHV-7(7-KHR 株)は HHV-6 と同様に遠心法で SUP-T1 細胞に感染させる。
2. 同じく感染細胞が約 60～70%程度になったところで細胞を 1μl ずつ 24 穴スポットスライドにのせる。
3. 十分に風乾後冷アセトン（-20℃）で 15 分間固定し、抗原プレートとする。

注 4) 感染 SUP-T1 細胞 100%に非感染 SUP-T1 細胞を混じる方法でもよい。

4. 24 穴抗原スポットスライドはあらかじめ大量に作成し、シリカゲル入り容器にスライドガラス保存容器を入れその中に抗原プレートを入れ、密閉して-20℃ に保存。あるいは、スライドガラスをハイブリバッグ等に

入れ熱シーラーで1枚ずつ封じて、-20℃に保存する。

3) IgG 抗体価測定方法 (IFA 法)

1. 2%BSA+0.02%NaN₃ 入り PBS(-)で 2 倍段階希釈した患者血清を 12μl ずつ抗原スポットスライド上にのせる。(患者血清 10 倍希釈から始める。)
2. 37℃で 1 時間モイスチャーチャンバーにて反応させる。
3. スライドガラスを PBS(-)で 15 分間洗浄する。途中で一度 PBS(-)を新しいものに交換する。
4. スライドガラスをドライヤーの冷風で十分に乾燥させる。
5. 同じスポットに FITC ラベルウサギ由来抗ヒト IgG 抗体(DAKO, Denmark) 12μl を 2 次抗体としてのせ遮光の上 37℃1 時間モイスチャーチャンバーで反応させる。
6. スライドガラスを PBS(-)で 15 分間洗浄し乾燥させる。1 次抗体の時と同様、洗浄途中で一度新しい PBS(-)に交換する。
7. 無蛍光グリセリン液をスライドガラス上に 2, 3 滴滴下し、空気が入らないようにカバーガラスをかけて蛍光顕微鏡で鏡検する。
8. 蛍光の認められる最大希釈倍数を持って抗体価とする。

注 1) IgG 抗体価に関しては必ず抗体価既知の血清をコントロールとして同時に検査し、結果を補正する。結果が 1 管以内に収まらない場合は再検査する。

4) IgM 抗体価測定方法 (IFA 法)

1. 1.5ml の tube に 30μg の Protein G sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB)を良く懸濁させてから入れ、5,000rpm で 30 秒遠心。
2. 上清が残らないように吸引し捨てる。
3. そこに患者血清 10μl と diluent (PBS(-)+0.1% BSA, 0.02%NaN₃, 0.02% Tween 20) 40μl を混ぜ合わせた計 50μl を入れ良く攪拌したのち、4℃で 1 時間振とう攪拌する。
4. 遠心後上清をサンプルとして使用する (この段階で 5 倍希釈)。
5. IgG 抗体価測定方法と同様に 2 倍段階希釈し 12μl ずつ抗原スポットスライド上にのせ、37℃で 1 時間モイスチャーチャンバーにて反応させる。

6. スライドガラスを PBS(-)で 15 分間洗浄する。途中で一度 PBS(-)を新しいものに交換する。
7. スライドガラスをドライヤーの冷風で十分に乾燥させる。
8. 同じスポットに FITC ラベルウサギ由来抗ヒト IgM 抗体(DAKO, Denmark) 12 μ l を 2 次抗体としてのせ遮光の上 37℃1 時間モイスチャーチャンバーで反応させる。
9. スライドガラスを PBS(-)で 15 分間洗浄し乾燥させる。
10. 1 次抗体の時と同様、洗浄途中で一度新しい PBS(-)に交換する。
11. 無蛍光グリセリン液をスライドガラス上に 2, 3 滴滴下し、空気が入らないようにカバーガラスをかけて蛍光顕微鏡で鏡検する。
12. 蛍光の認められる最大希釈倍数を持って抗体価とする。

5) 中和(NT)法

1. 2 倍段階希釈した血清を等量の HHV-6 あるいは 7 感染細胞（約 200TCID₅₀）と混合する。
2. 37℃で 1 時間 CO₂ インキュベーターにて反応させる。
3. 2×10⁵ 個の臍帯血単核球を加えて、5 日間 RPMI1640, 10%FBS で CO₂ インキュベーターにて培養する。
4. 細胞を冷アセトン(-20℃)で固定する。
5. HHV-6 あるいは 7 特異的単クローン抗体を 1 次抗体とし、2 次抗体に FITC ラベルヤギ由来抗マウス IgG 抗体を用いて上記の間接蛍光抗体法と同様の方法で染色する。
6. ウイルスが中和された最大希釈倍数を持って抗体価とする。

3. DNA の検出

PCR 法によるウイルス DNA の検出は両ウイルスともに初感染後に潜伏感染することから、陽性結果の解釈には注意が必要である。また、迅速にかつ簡便に臨床材料からウイルス DNA を検出する最も有用な方法であるが、感度が優れているが故に、常にコンタミネーションには注意しなければならない。特に、HHV-6、7 は普遍的に存在するウイルスであるために、PCR 用の材料、試薬類を取り扱うときは必ずマスクを着用し、唾液からのコンタミネーションを防ぐ。また、PCR 用の器具材料はすべてディスポーザブルのものを使い、PCR 用の材

料の取り扱いと、PCR 後の検体を扱う場所は別々にする。

次に末梢血単核球を材料として PCR を行うときは **template** に赤血球が混じらないようにすることも重要である。細胞を遠心後沈渣が少しでも赤い場合は必ず溶血操作を行う。その他、唾液・咽頭ぬぐい液や、脳脊髄液などは、凍結融解を繰り返すと偽陰性となることがあるため検査を行う直前に融解する。

潜伏感染部位は単球/マクロファージ、唾液腺などが考えられているため、血液細胞や唾液・咽頭ぬぐい液から DNA が検出されても病的意義は低い。HHV-6 あるいは 7 を当該疾患の原因ウイルスとして考える場合は、細胞中ではなく血漿中にウイルス DNA が検出されるか、当該臓器からウイルスが検出される必要がある。また、血液細胞中から検査する場合、病的意義を論じるためには必ず定量することが必要である。検査に関する一般的注意にも述べたが、HHV-6 の場合、単核球から DNA を検出する場合は単核球 10^5 個相当(約 $1\mu\text{g}$ DNA)中 100 個以上のウイルス DNA が検出されないと病的意義はない。少なくとも 1st PCR で検出されなければならない。通常突発性発疹の急性期では 10^5 個の単核球を **template** として PCR を行うと DNA は通常 100~1,000copy 以上検出される。回復期ではウイルス量は減少し、同量の単核球中に約 10~100copy のウイルスが検出され、その後数年間検出可能である。HHV-7 に関しては元々健康成人の末梢血単核球から初めて分離されたウイルスであり、単核球から DNA が検出されても全く病的意義はない。

～方法～

1) サンプルの取り扱い

①血漿

1. 血漿 200 μl から市販の DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出する。
2. 1/10 量を **template** DNA として PCR を行った場合、突発性発疹の急性期ならば確実に陽性となる。
3. 初感染時の急性期のみならず免疫抑制状態下などで再活性化した場合でも、血漿から HHV-6 あるいは 7 の DNA が検出可能である。

②血球

1. ウイルス分離の時と同様、末梢血単核球を分離する。
2. 遠心して **pellet** が少しでも赤い場合は(赤血球が混じている場合は)、溶血 buffer (155mM NH_4Cl -1mM EDTA 10ml を加え 4℃数分間処理後

1,500rpm, 10 分遠心あるいは 0.2%NaCl 5ml で suspend 後すぐに 1.6% NaCl 5ml を加え 1,500rpm, 10 分遠心) で必ず溶血してから PBS 1ml に suspend し template とする。

3. 細胞数を Burkert-Turk 血球計算盤で数える。
4. 1,500rpm 10 分間遠心後、pellet に K buffer(50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH8.3, 3mM MgCl₂, 0.45% NP40, 0.45% Tween 20, 100μg/ml proteinase K)を 10⁴個/1μl になるように加え、56℃で 3 時間あるいは 65℃で overnight 処理する。
5. 10μl を template DNA としている。あるいは直接市販の DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出し、1μg DNA を template として PCR を行う。
6. 必要に応じて、多形核白血球を採取したり、細胞表面マーカーに応じて細胞を選別して採取する。目的に応じた細胞を集め細胞数を数えて 10⁴個/1μl になるように K buffer を入れ、うち 10μl を template DNA としている。

注 1) 2) PCR に示した系で PCR を行うと突発性発疹の急性期ならば 1st PCR で band が検出される (copy 数は 100copy 以上)。

注 2) HHV-7 は血球から検出されても病的意義はない。

③髄液

1. 市販の DNA 抽出キットを用いて髄液 400μl から DNA を抽出する。
2. 1/10 量を template DNA として PCR を行う。

④咽頭ぬぐい液

1. 咽頭を十分にぬぐった綿棒を医療機関で 1.5ml の生理食塩水 (これならば常に医療現場に置いてあるため) につけ保冷して送付してもらう。
2. 綿棒をよく生理食塩水の中で suspend する (ここで綿花がほぐれてくるような柔らかさのものが良い。)
3. suspend した液を 1.5ml の tube に入れ替え、4℃ 12,000rpm で 10 分間遠心。
4. 沈渣から DNA を抽出する方法もあるが、沈渣に 100μl の生理食塩水を残して上清を捨て、よく攪拌した後 10μl を採取し、98℃10 分

間処理のみでも PCR の template として用いることができる。

注 1) 綿棒はウイルス培養用を用いる。細菌培養用のコーティングされたものや硬い素材のものは適さない。

⑤母乳

1. 母乳を 2,000rpm で 10 分間遠心し、細胞と乳清にわけける。
2. 乳清は血漿と同様に 200 μ l から DNA を抽出し、1/10 量を template DNA とする。
3. 母乳細胞は PBS(-)で 1 回洗浄し、3ml の PBS(-)に混合する。
4. 血球と同様に Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech AB)を用いた比重遠心法で分離し、血球と同様の処理を行う。

⑥肝臓、腸などの組織材料

1. 組織から市販のキットを用いて DNA を抽出し 0.5~1 μ g DNA を template として PCR を行う。

2) PCR

1. template DNA を PCR 用の tube に採取し、98℃10 分処理の後、すぐ氷上に置く。
2. 温度が下がったら必ず spin down する。
注) これをしないとコンタミネーションの原因となる。
3. 反応液を作成し、template DNA を入れた tube に入れる。(ただし、ここでの量は系の総量に応じて変わる。)

反応液 (量は表 2)

10×buffer (100mM Tris-HCl (pH8.3), 500mM KCl, 15mM MgCl ₂)
dNTPs (各 25mM) (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) mixture
primers (forward と reverse) (表 1)
Taq DNA polymerase
DW

表 1

No.	1	2	3	4	5
Virus	HHV-6A & 6B	HHV-7	HHV-6A	HHV-6B	HHV-7
F1	6A	7F3	HHV-F		

F2	6B	7F4	6A-F2	6B-F2	7-F2
R2	6E	7R4	HHV-R		
R1	6C	7R3	HHV-R		

F1/R1; forward and reverse primer pair for 1st PCR

F2/R2; forward and reverse primer pair for 2nd PCR

primer と probe のシーケンスは表 3

表 2

HHV-6(表 1 No.1) :

10×buffer	4.5μl
dNTPs (各 25mM) (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) mix	0.4μl
primers (各 20μM)	各 2.5μl
Taq DNA polymerase	0.25μl(1.25units)
DW	up to 40μl(1st), 45μl(2nd)

HHV-7(表 1 No.2) :

10×buffer	5 μl
dNTPs (各 25mM) (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) mix	0.4 μl
primers(各 20μM)	各 1μl
Taq DNA polymerase	0.25μl(1.25units)
DW	up to 40μl(1st), 45μl(2nd)

HHV-6A, 6B, 7(表 1 No.3, 4, 5) :

10×buffer	5 μl
dNTPs (各 25mM) (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) mix	0.4 μl
primers(各 20μM)	各 1 μl
Taq DNA polymerase	0.25μl(1.25units)
DW	up to 45μl(1st), 48μl(2nd)

注)表 1 No.1 のセットを用いると band の大きさで variant A か variant B かの判別が可能である。この領域の variant A には deletion が存在するため band の大きさが variant B に比較して短い。

4. tapping で軽く混合し、4℃で spin down し、必要ならばミネラルオイルを重層する。以下の条件で PCR を行う。

表 3

No.	Virus	標的遺伝子	用途*	配列 (5' → 3')	増幅産物長 1st PCR(bp)	増幅産物長 2nd PCR(bp)
1	HHV-6	immediate early	6A	TTC TCC AGA TGT GCC AGG GAA ATC C	variant A:325 variant B:553	variant A:195 variant B:423
			6C	CAT CAT TGT TAT CGC TTT CAC TCT C		
			6B	AGT GAC AGA TCT GGG CGG CCC TAA TAA CTT		
			6E	AGG TGC TGA GTG ATC AGT TTC ATA ACC AAA		
			6A-DP	GAA CTC CAT CAG CGG CCT CCA G		
			6B-DP	TAA ATC CAT TAC TGG CCT TGA A		
2	HHV-7	major capsid protein	7F3	AGT TCC AGC ACT GCA ATC G	408	264
			7R3	CAC AAA AGC GTC GCT ATC AA		
			7F4	CGC ATA CAC CAA CCC TAC TG		
			7R4	GAC TCA TTA TGG GGA TCG AC		
			7-DP	CAT TAC TCC AGT GAC TTC CGA TAT TAA TTT		
3	HHV-6A	major capsid protein	HHV-F	ATA ATT GGC AAT GAA CAC CGT T	762	579
			HHV-R	GAT CCT TTT TGA GAT GCC CAA GG		
			6A-F2	GTG CCT ATT ATA CAG TTC CAG A		
			HHV-R	GAT CCT TTT TGA GAT GCC CAA GG		
			6A-CP	CCC CCG GTT AGG ACA AAC TTA A		
			6A-DP	AAA TCG CCC CAC ACC CAA GAG		
4	HHV-6B	major capsid protein	HHV-F	ATA ATT GGC AAT GAA CAC CGT T	762	214
			HHV-R	GAT CCT TTT TGA GAT GCC CAA GG		
			6B-F2	GTC AAC AAG CTA TCT GCG AAG TCG		
			HHV-R	GAT CCT TTT TGA GAT GCC CAA GG		
			6B-CP	CTC CGG TCA CGA CAA TAT AC		
			6B-DP	AAA TTG CCC CAT AAC CCC AGA G		
5	HHV-7	major capsid protein	HHV-F	ATA ATT GGC AAT GAA CAC CGT T	762	350
			HHV-R	GAT CCT TTT TGA GAT GCC CAA GG		
			7-F2	TAC ACC AAC CCT ACT GTA AAT AGT		
			HHV-R	GAT CCT TTT TGA GAT GCC CAA GG		
			7-CP	CTT TCG GTA AGA TAA ATA AGC AAT CAC AAT		
			7-DP	CAT TAC TCC AGT GAC TTC CGA TAT TAA TTT		

HHV-6(表 1 No.1);

denaturation step	94°C 1 分	10 サイクル
annealing step	62°C 2 分	
extension step	72°C 3 分	
denaturation step	94°C 1 分	10 サイクル
annealing step	62°C 2 分	
extension step	72°C 4 分	
denaturation step	94°C 1 分	10 サイクル
annealing step	62°C 2 分	
extension step	72°C 5 分	

HHV-7(表 1 No.2);

denaturation step	94°C 1 分	30 サイクル
annealing step	55°C 1 分	
extension step	72°C 1 分	
extension step	72°C 10 分	1 サイクル

HHV-6A, 6B, 7(表 1 No.3, 4, 5);

denaturation step	94°C 1 分	30 サイクル
annealing step	55°C 2 分	
extension step	75°C 1.5 分	

1. 2nd PCR を行う場合は、反応液(10×buffer(100mM Tris-HCl(pH8.3), 500mM KCl, 15mM MgCl₂), dNTPs(dATP, dTTP, dCTP, dGTP) mixture、primers、Taq DNA polymerase、DW (up to 45μl (No.1,2)あるいは 48μl(No.3,4,5))を作成し、そこに 1st PCR 産物を 5 μl(No.1,2)あるいは 2μl(No.3,4,5)入れ、single PCR と同じ温度条件で PCR を行う。
2. Single PCR 産物をとる時は必ず一回 spin down してから tube の蓋を開ける。
3. 2nd PCR 産物 5 μl を 1 μl の 6×loading dye (下記) とともに 2%アガロースゲル (下記) で電気泳動する。

6×loading buffer

0.25% bromophenol blue	in water 室温保存
0.25% xylene cyanol	
15% Ficoll	

注) water で BPB と XC を別々にとかしてから混合する。その後に Ficoll を入れる。

アガロースゲル

アガロース	10g	オートクレーブで溶解する。
TBE	500ml	
エチジウムブロマイド(10mg/ml)	50μl	

注) エチジウムブロマイドはゲルが人肌になってから入れる。

4. UV 照射で band の位置を確認する。

5. band が確認された場合は、1st PCR 産物も同様に電気泳動する。

3) Southern blot hybridization (non RI probe)

1. ゲルを 0.4M の NaOH でナイロンメンブレン(Hybond N+, Amersham) に最低 4 時間アルカリブロットニングする。
2. ゲル穴の位置に鉛筆で印を付け、メンブレンを 4×SSC(0.6M NaCl, 0.06M sodium citrate) 中に約 15 分間入れアルカリ液を取り除いた上で乾燥させる。

注) この状態でサザンブロットハイブリダイゼーションを行うまでしばらく室温で保管できる。

3. ハイブリバッグにプレハイブリダイゼーションバッファー (下記) をメンブレンの面積約 10cm² に対して 1ml 入れ、熱シーラーでシールした後、50℃で 15 分振とうする。

プレハイブリダイゼーションバッファー

SCC	5×
BSA fraction-V	0.5%
ポリビニルピロリドン	0.5%

SDS	1%
-----	----

4. メンブレンの面積約 10cm² に対して 1ml のハイブリダイゼーションバッファー(下記)に ALP ラベルしたインナープローブ (100ng/ml シークエンスは後述) を入れて混合する。

ハイブリダイゼーションバッファー (プレハイブリダイゼーションバッファーに以下の試薬を加える。)

MgCl ₂	10mM
ZnCl ₂	1mM
NaH ₃	0.1%

5. プレハイブリダイゼーションバッファーを捨て、プローブを入れたハイブリダイゼーションバッファーを入れ、気泡が入らないように熱シーラーでシールした後、50℃で 15 分振とうする。
6. メンブレンを洗浄液 1 (下記) に入れ、50℃で 10 分間ゆっくり振とうしながら洗浄する。

洗浄液 1

2×SCC
1%SDS

7. 洗浄液 2 (下記) にメンブレンをうつし、室温で 10 分間ゆっくり振とうしながら洗浄する。

洗浄液 2

1×SCC
0.5% Triton-X

8. 洗浄液 2 を捨て、再びメンブレンをハイブリバッグに入れ発色液(下記)を入れ熱シーラーでシールした後、遮光して室温で 30 分反応させる。

発色液

Tris-HCl	0.3M	pH 9.8
NaCl	0.1M	
MgCl ₂	50mM	
NBT (nitroblue tetrazolium : 70% ジメチルホルムアミドで溶解)	0.33mg/ml	
BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate : 100% ジメチルホルムアミドで溶解)	0.17mg/ml	

9.30 分で発色液を捨てメンブレンを H₂O で洗浄する。

4) 必要な器具・試薬（試薬の型番等は各自でお調べ下さい。）

試薬：

- 1) Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech AB)
- 2) PBS(-)
- 3) 0.4%トリパンブルー液 (GIBCO Invitrogen Corporation)
- 4) RPMI 1640 (ニッスイ)
- 5) 7.5% Sodium Bicarbonate solution (大日本製薬)
- 6) FBS(fetal bovine serum) (SANKO JUNYAKU CO., LTD., TOKYO)
- 7) IL-2 (GIBCO BRL)
- 8) PHA-M (Boehringer Mannheim Biochemica)
- 9) アセトン(Wako)
- 10) 抗 HHV-6 および 7 単クローン抗体(OHV-1:文献 11、KR-4)
- 11) FITC(fluorescein isothiocyanate)ラベルヤギ由来抗マウス IgG 抗体 (TAGO)
- 12) 無蛍光グリセリン液 (Molecular Probes, Inc.)
- 13) シリカゲル(Wako)
- 14) Protein G sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB)
- 15) FITC ラベルウサギ由来抗ヒト IgM 抗体(Dako, TAGO)
- 16) FITC ラベルウサギ由来抗ヒト IgG 抗体(Dako, TAGO)

- 1 7) BSA (Bovine serum albumin fraction-V) (Sigma)
- 1 8) Tween 20 (WAKO)
- 1 9) 血漿からおよび組織材料からの DNA 抽出キット
(Wako, Quiagen)
- 2 0) 精製水
- 2 1) 溶血 buffer(155mM NH_4Cl -1mM EDTA あるいは 0.2%
NaCl と 1.6%NaCl)
- 2 2) K buffer(50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH8.3, 3mM MgCl_2 ,
0.45% NP40, 0.45% Tween 20, 100mg/ml proteinase K)
- 2 3) 生理食塩水
- 2 4) PCR 用 10×buffer (100mM Tris-HCl(pH8.3), 500mM KCl,
15mM MgCl_2) (TAKARA)
- 2 5) dNTPs(各 25mM) (各 dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (TOYOBO)
- 2 6) PCR 用 primers (表 1、表 3)
- 2 7) Taq DNA polymerase (TAKARA)
- 2 8) ミネラルオイル(Sigma)
- 2 9) loading dye (6×buffer: 0.25% bromophenol blue, 0.25%
xylene cyanol, 15% Ficoll in water; water で BPB と XC を
別々にとかしてから混合する。その後に Ficoll を入れる。
室温保存)
- 3 0) アガロース(「LO3」 TAKARA)
- 3 1) エチジウムブロマイド(10mg/ml) (ニッポンジーン)
- 3 2) 0.4M NaOH
- 3 3) 4×SSC(0.6M NaCl, 0.06M sodium citrate)
- 3 4) プレハイブリダイゼーションバッファー (5×SSC, 0.5%
BSA fraction-V, 0.5%ポリビニルピロリドン、1% SDS)
- 3 5) ハイブリダイゼーションバッファー(プレハイブリダイ
ゼーションバッファー+10mM MgCl_2 , 1mM ZnCl_2 , 0.1%
 NaH_3)
- 3 6) ALP ラベルしたインナープローブ (100ng/ml シークエ
ンスは表 3)
- 3 7) 洗浄液 1 (2×SCC, 1%SDS)

3 8) 洗浄液 2 (1×SCC、0.5% Triton-X)

3 9) 発色液(0.3M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 50mM MgCl₂)

【pH9.8】

4 0) NBT (nitroblue tetrazolium : 70% ジメチルホルムアミド
で溶解) (Promega)

4 1) BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate : 100% ジメ
チルホルムアミドで溶解) (Promega)

細胞 :

1) 臍帯血単核球

2) MT-4 細胞

3) SUP-T1 細胞

virus :

1) HHV-6 variant B(HST 株)

2) HHV-7(7-KHR 株)

器具、設備 :

1) P2 実験室

2) クリーンベンチ (HITACHI, SHOWA, SANYO)

3) オートクレーブ (TOMY)

4) 遠心機 (slow accel ,brake off, 37℃が使用可能な機械 ; 15ml、
50ml およびアシストチューブ(SARSTEDT) (感染、継代
用) 遠心用) (TOMY)

5) 卓上冷却遠心機 (swing rotor ; 1.5ml の tube 遠心用)
(SAKUMA)

6) 吸引器、吸引瓶

7) 37℃ CO₂ インキュベーター(TABAI ESPEC CORP.)

8) 倒立顕微鏡 (OLYMPUS)

9) 蛍光顕微鏡(OLYMPUS)

1 0) thermal cycler (Applied Biosystems)

1 1) shaker (室温用および恒温装置付き) (レノバサイエン
ス株)

1 2) shaker 付き water bath (TAITEC, YAMATO)

1 3) ドライヤー

1 4) -20℃冷凍庫、-80℃冷凍庫(SANYO)

1 5) ポリシーラー (富士インパルス)

1 6) 15ml, 50ml(Corning), 1.5ml(Treff), 0.5ml(Robbins), アシ

スト tube (SARSTEDT)

- 1 7) ピペット (パスツール、2ml, 5ml, 10ml, 20ml) (PCR 用はプラスチックのディスポーザブルを使用)
- 1 8) ピペッターあるいはゴム球
- 1 9) **Burker-Turk** 血球計算盤 (Erma 販売)
- 2 0) 細胞カウンター
- 2 1) **Burker-Turk** 血球計算盤用カバーガラス(0.4mm)
- 2 2) 25cm²、75cm² フラスコ(FALCON)
- 2 3) 96 穴平底滅菌プレート, 96 穴 U 底プレート(NUNC)
- 2 4) ピペットマン(P-2, P-20, P-200, P-1000)
- 2 5) 2 4 穴スポットスライド(24 WELL 4MM HTCSUPER CURED(R) AUTOCLAVABLE BLUE) (CEL-LINE/ERIE SCIENTIFIC CO.)
- 2 6) スポットスライド用無蛍光カバーガラス(MATSUNAMI 24×60mm)
- 2 7) スライドガラスホルダー
- 2 8) ガラスつぼ (アセトン用および PBS 用)
- 2 9) モイスチャーチャンバー
- 3 0) スライド保存箱
- 3 1) プラスチックタッパー
- 3 2) ハイブリバッグ(コスモバイオ)
- 3 3) マスク、手袋(SAFESKIN Corporation)
- 3 4) 吸光度計
- 3 5) UV 照射撮影装置(ULTRA LUM Inc.)
- 3 6) voltex mixer(Scientific Industries, Inc.)
- 3 7) ウイルス培養用綿棒
- 3 8) 電気泳動装置(Mupid)
- 3 9) ゲル板、コーム
- 4 0) ブロッキング台
- 4 1) ベノジェクト II 真空採血管 EDTA-2Na 入り
- 4 2) スターラー (アサヒ理化製作所)
- 4 3) 血清保存用チューブ (住友ベークライト株)

IV. 引用文献

1. Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 31; 234(4776): 596-601, 1986
1. Frenkel N, Schirmer EC, Wyatt LS, et al. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*. 87: 748-752, 1990
2. Yamanishi K, Okuno T, Shiraki, et al. Identification of human herpesvirus 6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* i: 1065-7, 1988
3. Tanaka K, Kondo T, Torigoe S, et al. Human herpesvirus 7: Another causal agent for roseola (exanthem subitum). *J pediatr*. 125: 1-5, 1994
4. Yamamoto T, Mukai T, Kondo K, Yamanishi K. Variation of DNA sequence in immediate-early gene of human herpesvirus 6 and variant identification by PCR. *J Clin Microbiol*. 32:473-6, 1994
5. Miyoshi H, Tanaka-Taya K, Hara J, et al. Inverse relationship between human herpesvirus-6 and -7 detection after allogeneic and autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 27:1065-70, 2001
6. Ozaki Y, Tajiri H, Tanaka-Taya K, Mushiake S, Kimoto A, Yamanishi K, Okada S. Frequent detection of the human herpesvirus 6-specific genomes in the livers of children with various liver diseases. *J Clin Microbiol*. 39:2173-7, 2001
7. Tanaka-Taya K, Kondo T, Nakagawa N, et al. Reactivation of human herpesvirus 6 by infection of human herpesvirus 7. *J Med Virol*. 60:284-9, 2000
8. Fujisaki H, Tanaka-Taya K, Tanabe H, Hara T, Miyoshi H, Okada S, Yamanishi K. Detection of human herpesvirus 7 (HHV-7) DNA in breast milk by polymerase chain reaction and prevalence of HHV-7 antibody in breast-fed and bottle-fed children. *J Med Virol*. 56:275-9, 1998
9. Tanaka-Taya K, Kondo T, Mukai T, et al. Seroepidemiological study of human herpesvirus-6 and -7 in children of different ages and detection of these two viruses in throat swabs by polymerase chain reaction. *J Med Virol*. 48: 88-94, 1996
10. Okuno T, Shao H, Asada H, Shiraki K, Takahashi M, Yamanishi K. Analysis of human herpesvirus 6 glycoproteins recognized by monoclonal antibody OHV1. *J*

Gen Virol. 73: 443-7, 1992

11. Torigoe S, Kumamoto T, Koide W, et al. Clinical manifestations associated with human herpesvirus 7 infection. Arch Dis Child. 72: 518-519, 1995
12. Kondo K, Nagafuji H, Hata A, et al. Association of human herpesvirus 6 infection of the central nervous system with recurrence of febrile convulsions. J Infect Dis. 167: 1197-1200, 1993

V. 本マニュアルに関する連絡先

国立感染症研究所 感染症情報センター 多屋 馨子
〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1
Tel : 03-5285-1111(内線 2536)
FAX : 03-5285-1129
e-mail : ktaya@nih.go.jp

VI. 執筆者一覧

国立感染症研究所 感染症情報センター	多屋 馨子
国立感染症研究所 感染病理部	佐多徹太郎
神戸市環境保健研究所	林 皓三郎

百 日 咳
(*Bordetella pertussis*)

平成 15 年 8 月

目 次

（１）百日咳感染症の概要

（２）検査に関する一般的注意

１．検査材料の採取

２．検査材料の輸送

３．検査の進め方

４．検査の判定

（３）検査方法

１．百日咳菌の分離、同定および保存

２．蛍光抗体法による百日咳菌検出

３．抗百日咳菌抗体の検出

４．PCR による百日咳菌 DNA の検出

５．パルスフィールド電気泳動法による遺伝子型別

（４）引用文献

（５）検査依頼先

（６）執筆者一覧

（１）百日咳感染症の概要

百日咳は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の感染によって引き起こされる急性呼吸器感染症であり、主にワクチン未接種の乳幼児が感染する。本感染症は母親からの移行抗体が期待できないため乳児期早期から罹患する。１歳以下の乳児、特に生後６カ月以下では死に至る危険性が高い。百日咳は特有の発作性咳嗽を主徴とし、主病変は気管支上皮の炎症と間質性肺炎である。百日咳菌の感染力は極めて強く、患者の上気道分泌物の飛沫や直接接触により経気道的に伝播される。初期段階として菌はまず上部気道に感染し、次いで気管支および小気管支の粘膜上皮細胞または繊毛間で増殖する。感染は呼吸器系に局限し、他組織への感染はないとされている。

本疾病対策にはワクチン接種による予防が最も効果的であり、現在、我が国では百日咳毒素および繊維状赤血球凝集素を主要抗原とする精製百日咳ワクチン (acellular vaccine) が接種されている。我が国の百日咳届出患者数は 1949 年のワクチン接種開始以来、急激に減少している。1950 年には 122,769 例の患者届出数があったが、1996 年には 183 例にまで減少している。しかし、百日咳感染症は確定診断できない例が多く、1996 年に全国約 3,000 の小児科定点から「百日咳様疾患」として報告された患者数は 5,697 例と依然高い数値を示している。1999 年 4 月施行の感染症新法の下では百日咳様疾患は百日咳疾患扱いとなり、2000 年に小児科定点から報告された患者数は約 3,800 例であった。なお、この報告患者数のうち真性の百日咳患者数は不明である。

百日咳の診断には咳嗽と白血球数増多といった臨床症状が主にとられているが、確定診断を行う上で最も重要な検査は菌分離であることは言うまでもない。また蛍光抗体法や PCR といった百日咳菌抗原・遺伝子の検索も研究室レベルでは行われているが、まだ一般的ではない。そこで本稿では菌分離の手技を中心に解説を行うとともに、今後、検査法として普及することが考えられる蛍光抗体法・PCR 法についても解説を行う。

（２）検査に関する一般的注意

１．検査材料の採取

菌分離のための検体採取方法として、１）咳嗽平板法、２）鼻咽頭分泌物培養法、３）喀痰培養法の３法が用いられる。咳嗽平板法は患者の咳嗽時に平板培地を口から 10～15 cm くらいの距離で暴露させたものを培養する。本法は分離菌数は少ないが純培養に近い菌分離ができることもある。喀痰培養法は患者から喀出された痰を培養する方法で、鼻咽頭分泌物の培養と同様に混在菌が多く培養される欠点がある。咳嗽平板法および喀痰培養法ともに百日咳菌用培地を常時準備しておく必要があるため、検査材料には鼻咽頭分泌物が一般的に用いられる傾向がある。

鼻咽頭分泌の採取はまず患者の頭を動かさないようによく押さえ、その後、綿棒を患者の鼻腔に静かに挿入して粘液を採取する。菌培養等で再検査する必要性を考え、綿棒２本分の検体を採取することが望ましい。検体を保存する場合、翌日に菌培養を行うのであればそのまま 4℃ に保存する。また、長期（１～２週間程度）に保存するのであれば -80℃ に保存する。なお、検体採取に市販の検体保存輸送用シードスワブを使用することができるが、PCR や蛍光抗体法による検査を同時に行うのであれば通常の滅菌綿棒で採取することが必要である。なお咳嗽平板法および喀痰培養法の詳細については成書（１）があるので、そちらを参照して頂きたい。

２．検査材料の輸送

検査材料（鼻咽頭分泌物など）の他施設への輸送は、短期間（１日以内）であれば冷蔵で行うことも可能である。しかし、輸送に数日を要する場合は冷凍で輸送することが必須である。可能ならばドライアイスの存在下で輸送する。なお、検体にはバイオセーフティレベル 2 の百日咳菌が存在すると考え、輸送は各施設で決められた方法に準拠して行う。分離菌株の他施設への輸送は、菌株を新しい培地に塗布し、２～３日後、生育が確認できたものを常温にて移送する。冷蔵での移送は生菌率が低下するので避けたほうが良い。なお、夏期など輸送中の温度上昇が懸念されるときは、菌株の凍結保存サンプルを冷凍状態で輸送することを勧める。

3. 検査の進め方

検体（鼻咽頭分泌物）を採取したら直ちに菌培養を行うことが望ましい。しかし、分離用培地の準備が出来ていないため直ちに培養が出来ない場合、検体を -80℃で保存する。検査は最初に菌培養を行い、続いて残ったサンプルを用いて PCR による菌抗原遺伝子の検索、または蛍光抗体法による菌体の検索を行う。なお図 1 に検査手順を示した。

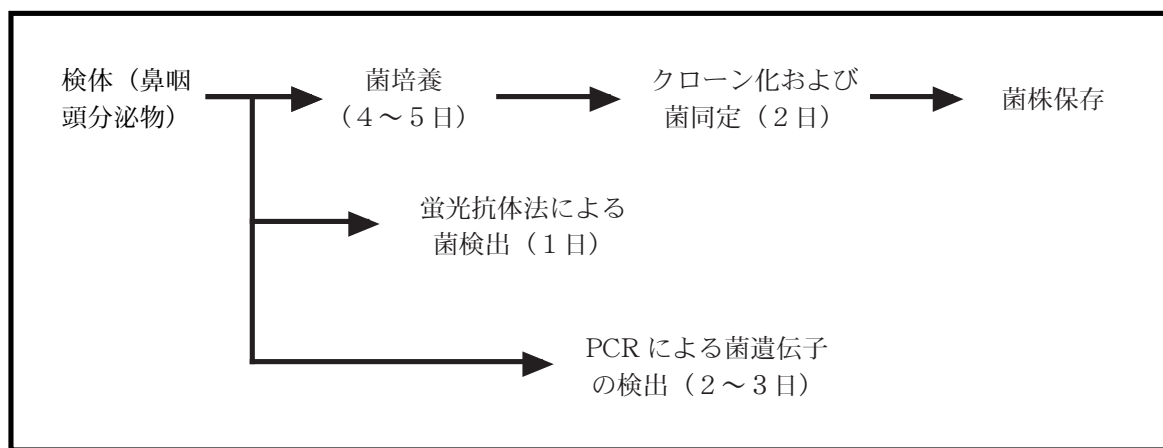


図1 百日咳検査手順（ ）の日数は各検査に必要な日数を示した

培養による百日咳菌検出率は第1病週にはほぼ100%であるが、病週を追うごとにその検出率は低下する。第6病週の検出率は20%にまで低下し、第8病週を過ぎると菌を検出することはできない。また抗生物質を投与した場合、投与3～4日後の菌分離成績はほとんど陰性となる。そのため、死菌の状態でも菌検出が行える蛍光抗体法または菌遺伝子を検出するPCR法を平行して進めることが重要となる。

4. 検査の判定

百日咳は4類感染症定点把握疾患であり、診断基準は臨床症状および細菌学的、血清学的診断により行われている。臨床的診断は1) 2週間以上持続する咳、2) スタッカートやレプリーゼを伴う咳嗽発作または新生児や乳児で他に明らかな原因がない咳嗽後の嘔吐や無呼吸発作の2点を満たすものとなっている。また細菌学的には菌分離、血清学的には百日咳菌抗体の有意な上昇となっている。蛍光抗体法に

よる菌検出および PCR による百日咳菌遺伝子の検出は患者に百日咳菌の抗原または遺伝子が存在することを示すが、未だ研究室レベルで行われているに過ぎず、確定診断の基準とはなっていない。

(3) 検査方法

1. 百日咳菌の分離、同定および保存

百日咳菌の分離には Bordet-Gengou 寒天培地 (BG 培地) またはサイクロデキストリン加固形培地 (CSM 寒天培地) が一般的に用いられている。いずれの培地も雑菌の増殖を抑制するために抗生物質 (セファレキシン) を添加する。なお CSM 寒天培地は長期保存 (6 ヶ月) が可能であり、ボルデテラ CD (CSM) 寒天培地 (+ 5 $\mu\text{g/ml}$ セファレキシン) として日研生物医学研究所から市販されている。なお、ここでは BG 培地を使用して鼻咽頭分泌物から百日咳菌を分離する方法について解説する。

菌分離法

- ① 検体 (鼻咽頭分泌物を拭った綿棒) を 0.3~0.5 ml のカザミノ酸溶液に懸濁する。
- ② 25~50 μl の検体懸濁液を 20 $\mu\text{g/ml}$ セファレキシンを含んだ BG 培地の隅に塗布し、白金耳を用いて培地全面に広げる (図 2)。

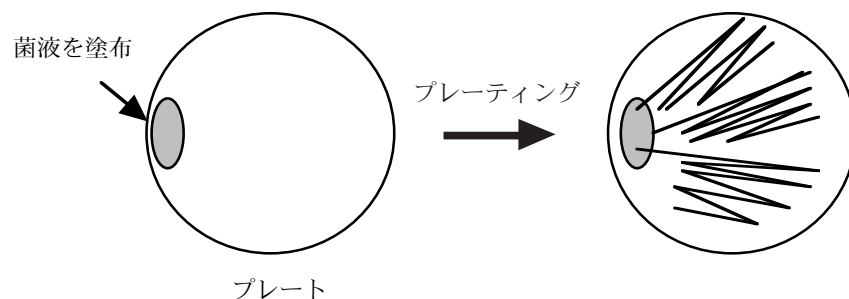


図2 検体のプレーティング法

菌液をプレートの隅に塗布し、その後、白金耳を用いて塗り広げる。この際、菌液からそれぞれ3本引くようにする。

- ③ 36℃のインキュベーターで4～5日間培養する。なお、培養中の乾燥を防ぐため、プレートに適当な容器に入れる。また、培養期間中は毎日観察を行い、培養状態を把握しておく。
- ④ 百日咳菌は培養4～5日後で直径約1 mm以下の小さな集落を形成する。真珠または水銀様の光沢のある集落を選択し、菌同定のため再度新しい培地に植え継ぐ。
- ⑤ 被菌株の菌同定を行い、百日咳菌であることが確認されたら菌株保存を行う。

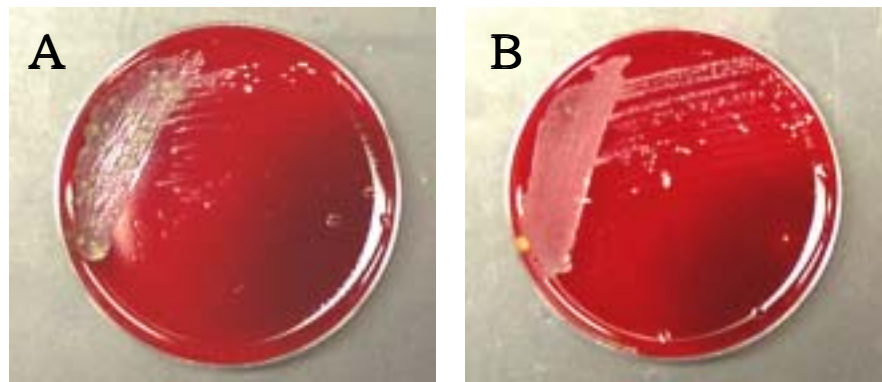


図3 百日咳患者組織からの百日咳菌の分離例

A) 気管支組織洗浄液、 B) 右肺実質組織洗浄液

気管支組織洗浄液には百日咳菌の他に多数の雑菌の生育が認められる。
一方、肺組織洗浄液ではほぼ純培養で百日咳菌の生育が認められる。

試薬

- カザミノ酸溶液： 1% カザミノ酸 (Difco)、0.6% NaCl, pH 7.1 オートクレーブを用いて滅菌する。
- Bordet-Gengou 培地： 蒸留水 250 ml に 9 g の Bacto-Bordet Gengou agar base dehydrated (Difco) と 3 g のグリセロールを加え、オートクレーブ (121℃、15 min) により滅菌する。滅菌後、50℃にまで冷却し、50 ml の馬脱繊維血（日本バイオテスト）と 1.2 ml の 5 mg/ml のセファレキシン（ろ過滅菌）を添加する。添加後、シャーレ 1 枚あたり 15～17 ml を分注する。作製した培地は 37℃のインキュベーターに一晩置き、無菌性を確認する。無菌性を確認したら、乾燥しないように適当な容器に入れ、4℃に保存する。

注意点

- 鼻咽頭分泌物には雑菌が多く存在し、百日咳菌の存在割合はかなり少ない。通常のプレーティング法では成長の早い雑菌により百日咳菌の生育が阻害されてしまう。そのため分離率を上げるために図2に示したプレーティング法を勧める。
- 百日咳菌は肉眼で認められる集落を形成するのに、少なくとも4日以上培養を必要とする。そのため、培養4日以前に発育した菌は百日咳菌ではないと考えて間違いはない。培養6日目になっても百日咳菌様集落が見つからない場合は菌培養は陰性とする。
- BG 培地は作製後、4℃に保存し、約1ヶ月以内に使用する。

同定法

百日咳菌の同定は抗百日咳菌血清を用いたスライド凝集反応または百日咳毒素遺伝子を標的にした PCR 法により行う。スライド凝集反応は簡便な方法であり、約1時間で結果を得る利点を有しているが、百日咳臨床分離株のなかには凝集し難い菌株があり判定には注意を要する。PCR による菌同定は分析に1～2日を要するという欠点があるが、菌同定に確実な結果を得ることができる。そのため我々の研究室では主に PCR 法による同定を行っている。

スライド凝集反応

- ① 培養増菌した被菌株を白金耳でかき取り、生理食塩水に均等に浮遊させる。菌液濃度は $2 \sim 5 \times 10^{10}$ cells/ml ($\approx 1 \sim 2A_{600}$) が適当である。
- ② 百日せき I 相菌免疫血清（デンカ生研）と菌液をそれぞれ1滴スライドグラス上で混和する。
- ③ 対照には抗血清の代わりに生理食塩水を用い、対照では凝集しないことを確認する。
- ④ 判定は1～2分以内に明瞭な凝集塊が認められたものを陽性とする。なお対照で自然凝集が認められたときは判定保留とし、集落の選別を再度行い、再試験とする。

注意点

- 百日咳菌免疫血清は Difco から市販されている（Bacto-Bordetella pertussis antiserum, 2309-50-3, Difco）。なおパラ百日咳菌免疫血清（Bacto-Bordetella parapertussis antiserum, 2310-50-0, Difco）も同社から購入可能である。

PCR による同定

百日咳菌の PCR による同定は百日咳毒素遺伝子のプロモーター領域または下流の非翻訳領域を標的にして行う。図 4 に示したように、百日咳菌のプロモーター領域の塩基配列はパラ百日咳菌とは異なり、この配列に対する PTp1/PTp2 プライマーは百日咳菌に特異的である（2, 3）。被菌株が百日咳菌の場合、191 bp の PCR 産物が得られるが、パラ百日咳菌および他菌では得られない。一方、百日咳菌の毒素遺伝子下流の非翻訳領域はパラ百日咳菌と良く似ているが、制限酵素部位 (*EcoRI*) の存在に違いがある。Aoya-1/Aoya-2 プライマーを用いた場合、被菌株が百日咳菌、パラ百日咳菌に関わらず 473 bp の PCR 産物が得られる（4）。この両菌を区別するためには PCR 産物を制限酵素 *EcoRI* により切断し、切断の有無によって両菌の区別を行う。被菌株が百日咳菌の場合、PCR 産物は 233 bp と 240 bp に切断され、電気泳動分析では見かけ上、一本のバンドとして検出される。一方、被菌株がパラ百日咳菌の場合、PCR 産物は切断されず、473 bp のままである。

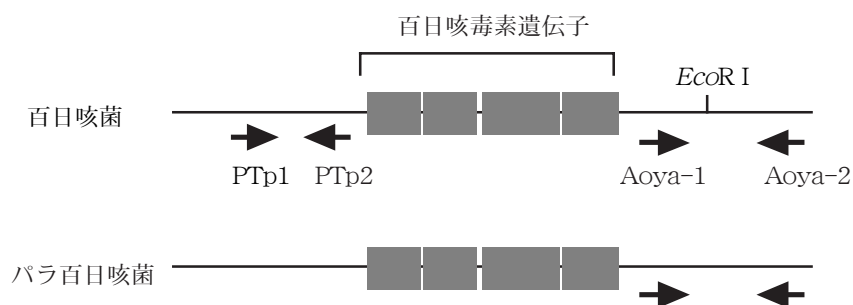


図 4 百日咳菌遺伝子検出のためのプライマーデザイン

PTp1/PTp2 プライマーは百日咳菌毒素遺伝子のプロモーター領域を増幅し、百日咳菌に特異的である。一方、Aoya-1/Aoya-2 プライマーは毒素遺伝子の下流を増幅し、百日咳菌およびパラ百日咳菌の両菌に特異的である。なお、パラ百日咳菌には *EcoRI* 認識部位が無いいため、PCR 産物を *EcoRI* により切断することにより両菌を区別することが出来る。

プライマーの選択は被菌株がパラ百日咳菌の可能性があるときは Aoya-1/Aoya-2 プライマーを、その可能性が無いときは PTP1/PTP2 プライマーを使用するというように、状況によって使い分けるとよい。なおプライマーによる検出感度に差は認められない。

PTP1/PTP2 プライマーを用いた PCR 分析

- ① 被菌株を蒸留水に懸濁し、沸騰水中で5分間煮沸する。煮沸後、遠心操作により上清を得る。なお菌液濃度は 1×10^{10} cells/ml ($\approx 0.5 A_{600}$) あれば十分である。
- ② PCR は以下の反応組成で 94°C 30 sec、66°C 1 min、72°C 30 sec を 30 サイクル行う。

プライマー配列

PTP1: 5'-CCAACGCGCATGCGTGCAGATTCGTC-3'

PTP2: 5'-CCCTCTGCGTTTTGATGGTGCCTATTTTA-3'

反応組成

10×PCR buffer	5	μl
菌抽出液	1	μl
50 pmol/μl PTP1	2	μl
50 pmol/μl PTP2	2	μl
2.5mM dNTPs	4	μl
Taq (Takara, R001)	0.25	μl
DW	35.8	μl
		<hr/>
		50.0 μl

- ③ PCR 反応後、反応液 2~5 μl を 3%アガロースゲル電気泳動分析に供試する。泳動後、0.5 μg/ml のエチジウムブロマイド溶液で染色し、トランスイルミネーターを用いてバンドを検出する。
- ④ 被菌株に 191 bp のバンドが認められたときは百日咳菌と判定する。なお、陰性コントロールに同サイズのバンドが認められたときは、判定保留とし、再度 PCR 反応からやり直す。

Aoya-1/Aoya-2 プライマーを用いた PCR 分析

- ① 被菌株を蒸留水に懸濁し、沸騰水中で5分間煮沸する。煮沸後、遠心操作により上清を得る。なお、菌液濃度は 1×10^{10} cell/ml ($\approx 0.5 A_{600}$) あれば十分である。
- ② PCR は以下の反応組成で 95°C 15 sec、55°C 30 sec、72°C 1 min を 30 サイクル行う。

プライマー配列

Aoya-1: 5'-GCGTACAGGGGATCGCCTTCGAAA-3'

Aoya-2: 5'-TTCGAGCAGGGTCAGCGTCCGGGAGTAT-3'

反応組成

10×PCR buffer	5	μl
菌抽出液	1	μl
50 pmol/μl Aoya-1	2	μl
50 pmol/μl Aoya-2	2	μl
2.5mM dNTPs	4	μl
Taq (Takara, R001)	0.25	μl
DW	35.8	μl
		<hr/>
		50.0 μl

- ③ PCR 反応終了後、反応液 3 μl を以下の条件で 30 min、37°C 処理する。

PCR product	3	μl
10×H buffer	0.6	μl
10 U/μl <i>Eco</i> RI	0.4	μl
DW	2	μl
		<hr/>
		6.0 μl

- ④ *Eco*RI 処理前 (3 μl) および *Eco*RI 処理後 (全量 6 μl) の PCR 産物を 3% アガロースゲル分析に供試する。泳動後、0.5 μg/ml のエチジウムブロマイド溶液で染色し、トランスイルミネーターを用いてバンドを検出する。
- ⑤ 制限酵素無処理で 473 bp のバンドが認められ、かつ制限酵素 (*Eco*RI) 処理でこ

のバンドが約 240 bp に切断された場合、被菌株は百日咳菌である。一方、制限酵素により 473 bp のバンドが切断されなかった場合、被菌株はパラ百日咳菌である。なお、陰性コントロールに 473 bp のバンドが認められた場合、外部から百日咳菌 DNA が混入している可能性がある。そのため、再度 PCR 反応からやり直す。

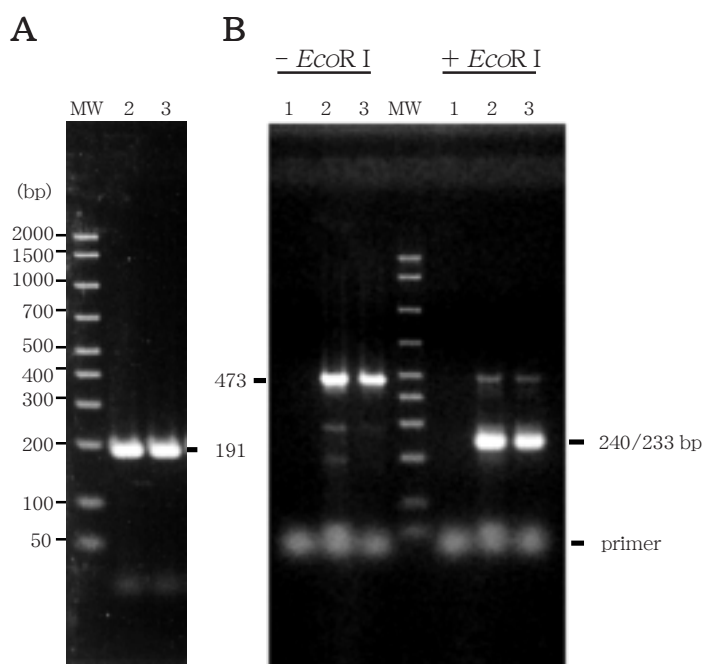


図5 PCR 法による百日咳菌同定例 A) PTp1/PTp2 プライマーを用いた PCR B) Aoya-1/Aoya-2 プライマーを用いた PCR
Lane 1: 陰性コントロール、Lane 2: 陽性コントロール（精製百日咳菌 DNA, 10 ng）、Lane 3: 百日咳臨床分離株

注意点

- PCR を行う際は必ず陽性コントロールと陰性コントロールをおく。陰性コントロールは菌体抽出液の代わりに蒸留水を用い、陽性コントロールには精製した百日咳菌 DNA (10 ng) を使用する。陽性コントロール（百日咳菌 東浜株から精製した DNA）は国立感染症研究所から分与可能である。

百日咳菌の保存法

菌株の短期保存は百日咳菌用培地（Bordet-Gengou 培地、ボルデテラ CD (CSM) 寒天培地）にやや多めの菌量を接種し、36℃約 1 日間培養後、乾燥を避けて冷蔵庫等の冷暗所に静置することにより行う。斜面培地を用いた場合、2～3 ヶ月は保存可能であるが、平板培地ではその保存可能期間は短くなる。培養継代数が多くなると菌株の相変異が起こるので、長期保存にはゼラチンディスクまたは凍結による保存を勧める。ここではスキムミルクを用いた凍結保存法について解説する。

凍結保存法

- ① 百日咳菌用培地（Bordet-Gengou 培地等）の全面に分離菌株を接種し、約 1～2 日間培養する。なお抗生物質（セファレキシン）を含まない BG 培地を使用することが望ましい。
- ② 培地 1 枚分の菌体を滅菌綿棒で回収し、2～3 ml の滅菌 10%スキムミルク溶液に懸濁する。
- ③ 懸濁液をセラムチューブ等に 0.2 ml ずつ分注し、フリーザー（-80℃）に保存する。

試薬

- 10%スキムミルク溶液：蒸留水 100 ml に 10 g のスキムミルク (Difco)を溶解し、超音波処理により均一に分散する。希水酸化ナトリウム溶液を用いて pH 7.4 に調整後、オートクレーブを用いて滅菌する。保存は 4℃で行う。なお、超音波処理は必ず行う必要がある。超音波処理を行わなかった場合、オートクレーブ処理によりスキムミルクの沈殿物が多量に発生し、使用することができない。

2. 蛍光抗体法による百日咳菌検出

蛍光抗体法は菌体に対する蛍光ラベル抗体を用いて菌を直接検出する方法である。本法は死菌でも検出することができる利点を有している。検出用抗体には蛍光物質

(FITC) がラベルされた抗百日咳菌抗体を使用し、検体（鼻咽頭分泌物など）に存在する百日咳菌を検出する。検出感度は検体の状態にもよるが、PCR 法と同等と考えて良く、PCR 法で百日咳菌が検出されない場合、蛍光抗体法により検出することは極めて難しい。ここでは市販されている FITC ラベル抗百日咳菌抗体（Bacto-FA Bordetella pertussis, Difco）を用いた検出法について解説する。

Bacto-FA Bordetella pertussis (Difco) を用いた蛍光抗体法

- ① 菌分離で残った検体懸濁液（5～10 μ l）をスライドガラスに塗布し、乾燥させる。
- ② スライドガラスを 95%エタノール溶液に 1 分間浸漬し、その後、風乾する。
- ③ 検体懸濁液を塗布した位置が分かるように、スライドガラスの裏面にマジックペンで印を付ける。
- ④ FITC ラベル百日咳菌抗体を 1% BSA を含む PBS で 40 倍に希釈する。希釈した抗体溶液を検体懸濁液を塗布した位置に一滴（25 μ l）落とす。スライドガラスを密閉した容器に入れ、0.5～1 時間、室温に静置する。なお、乾燥を防ぐため容器に蒸留水で湿らせたキムワイプを入れる。
- ⑤ 抗体溶液をキムワイプで吸い取る。スライドガラスを PBS 溶液中に 5 分間浸漬し、未反応の抗体を除去する。なお、この洗浄操作を計 3 回繰り返す。
- ⑥ 蒸留水に 1 分間浸漬し、その後、風乾する。
- ⑦ 蛍光退色防止剤を含んだマウント溶液を用いて封入する。
- ⑧ 検鏡は蛍光顕微鏡を用いて行う。対物レンズは 100 倍を使用する。
- ⑨ 蛍光像が得られた場合、判定は陽性とする。蛍光像が得られなかった場合、判定は陰性とはせず、判定保留とする。判定保留とする理由は検体に存在する菌量が少ないため蛍光像が得られなかったものと解釈し、培養およびその他の方法で菌検出を試みる。

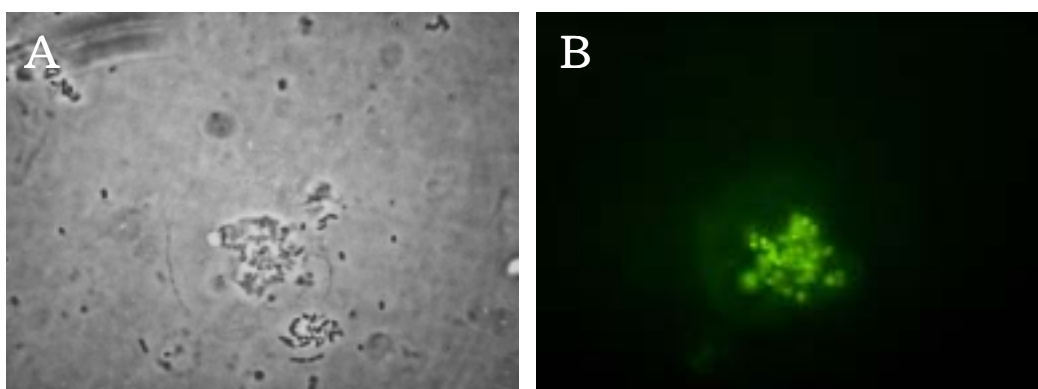


図6 蛍光抗体法による百日咳菌の検出例 A) 位相差による検鏡像、B) 蛍光による検鏡像 百日咳患者の気管支組織洗浄液中に含まれる百日咳菌を蛍光抗体法により検出した。

試薬

- FITC ラベル抗百日咳菌抗体： Bacto-FA Bordetella pertussis (2359-56-6, Difco)
- FITC ラベル抗パラ百日咳菌抗体： Bacto-FA Bordetella parapertussis (2378-56-3, Difco)
- 蛍光退色防止剤： SlowFade Light Antifade kit (S-7461, Molecular Probes)

注意点

- 他の免疫組織化学的解析同様、本法には必ず陰性コントロールが必要である。陰性コントロールには FITC ラベル抗パラ百日咳菌抗体を用いることができる。
- 蛍光退色防止剤は必ず使用する。使用しない場合、検鏡中に蛍光退色が急激に進み、蛍光像が得られなくなる。また、抗体を処理した後は、検体に強い光を当てないように注意する。

3. 抗百日咳菌抗体の検出

患者血清中の抗百日咳菌抗体の測定は百日咳の血清学的診断に重要である。百日咳の血清学的診断には 1) 菌凝集素価、2) 百日咳菌の百日咳毒素 (PT) および繊維状赤血球凝集素 (FHA) に対する抗体価を測定する方法が用いられている。菌凝集反応は患者血清と不活化百日咳菌を反応させ、その凝集の有無によって判定する。

凝集用の百日咳菌は体外診断薬としてデンカ生研から市販されており、2種類の百日咳菌株（東浜株、山口株）が購入可能である。また、百日咳菌抗原に対する抗体価測定キットも体外診断薬として購入可能である（百日咳菌抗体価測定試薬「タケダ」）。本キットは酵素免疫測定法に基づき、抗原（PT、FHA）が固相化されたビーズを用いて患者血清中の抗 PT 抗体価および抗 FHA 抗体価を測定する。

本診断薬を用いて確実な診断を下すためには、測定にペア血清を用いることが必要である。患者から異なった時期に採血した血清を用い、凝集素価または抗体価が有為に上昇していることを確認する。凝集素価を用いた診断ではペア血清で4倍以上の抗体価上昇があるか、シングル血清で40倍以上であれば診断価値が高いとされている。一方、PT および FHA に対する抗体価測定法では、ワクチン接種歴のある乳幼児血清を用いた場合、その判定に注意を要する。抗体価測定法では測定した抗体価がワクチン接種による抗体価上昇なのか、感染により上昇した抗体価なのかを区別することはできない。そのため、抗体価測定法を用いた際は、患者のワクチン歴を十分把握する必要がある。なお測定方法についてはそれぞれの診断薬に詳しい説明書が添付されているので、それを参照して頂きたい。

4. PCR による百日咳菌 DNA の検出

検体に含まれる百日咳菌 DNA の検出は PCR による百日咳菌同定法と同様に行う。PCR による菌検出感度は菌培養法と同程度もしくはやや劣るものと報告されている。しかし、培養法に比較して短時間（<1 日）で判定できる利点を有している。ただし、鼻咽頭分泌物などには微量の血液をはじめ未知の PCR 反応阻害物質の存在が予想されるため、あらかじめ検体から DNA を精製する必要がある。DNA 調製法にはさまざまな方法があるが、市販の DNA 抽出キットを用いると便利である。検体から DNA を精製した後は、百日咳菌の同定法で述べた方法に準じて PCR 反応を行う。ここでは市販の DNA 抽出キット（ISOPLANT、ニッポンジーン）を用いて検体から DNA を抽出する方法について解説を行う。

ISOPLANT キットを用いた DNA 抽出法

- ① 菌分離で残った検体懸濁液（100～200 μ l）を 1.5 ml チューブに移し、遠心操作（12,000 rpm, 10 min）により沈澱物を回収する。
- ② 沈澱物に 300 μ l の溶液Ⅰを添加し、ボルテックスにより分散させる。
- ③ 分散させた後、150 μ l の溶液Ⅱを添加し、攪拌する。攪拌後、50℃、15 分の処理を行う。
- ④ 150 μ l の溶液Ⅲを添加し、攪拌後、氷上に 15 分間静置する。
- ⑤ 遠心操作（12,000 rpm, 15 min, 4℃）により水相画分を回収する。回収量に対し 2～2.5 倍量のエタノールを添加し、攪拌する。生成した沈澱物（DNA）を遠心操作（12,000 rpm, 30 min, 4℃）により回収する。
- ⑥ 沈澱物に -20℃に冷却した 500 μ l の 70%エタノールを加え、再度遠心操作（12,000 rpm, 5 min）を行う。遠心後、エタノールを除き、乾燥させる。
- ⑦ 乾燥した沈澱物を 20 μ l の TE-8 に溶解する。不溶性物質が認められた場合、遠心操作により除去する。なお、DNA サンプルを直ちに使用しない場合は -20℃に保存する。
- ⑧ 2～5 μ l の DNA サンプルを用いて PCR を行う。なお PCR および判定は百日咳菌の同定法で述べた方法に準じて行う。

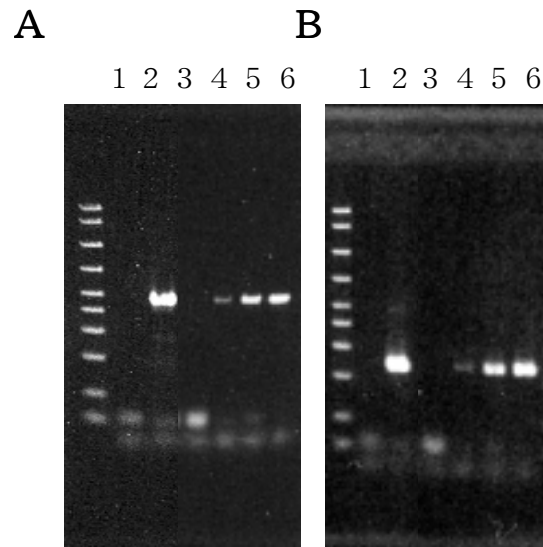


図7 百日咳患者の組織サンプルからの菌遺伝子検出例

A) プライマー(Aoya-1/Aoya-2)を用いた PCR 結果、B) A の PCR 産物を制限酵素 *EcoRI* を用いて切断した結果 Lane 1. 陰性コントロール、Lane 2. 陽性コントロール、Lane 3. 鼻咽頭分泌物、Lane 4. 咽頭組織、Lane 5. 気管支組織、Lane 6. 肺実質組織 結果は患者の咽頭、気管支および肺組織に百日咳菌遺伝子が存在することを示している

試薬

- DNA 抽出キット：ISOPLANT (No. 314-02731、ニッポンジーン)
- TE-8：10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

注意点

- PCR による菌同定法と同じく、陰性コントロールおよび陽性コントロールを必ずおく。
- PCR 法による菌検出感度は培養法と同程度かそれ以下である。本条件での検出限界は百日咳菌 DNA で 10 pg 程度であり、これは菌数でおよそ 2,000 cells に相当する。100 μ l の検体懸濁液を出発材料とした場合、本法で検出するためには 2×10^5 cells/ml 以上の菌数が必要となる。そのため PCR による検出が陰性となっても、直ちに百日咳菌の存在を否定することはできない。

5. パルスフィールド電気泳動法による遺伝子型別

パルスフィールド電気泳動法（PFGE）は電場の方向を変化させることにより、通常の電気泳動法では分離できなかった巨大 DNA 断片をその長さに従って分離することができる。細菌学の分野では院内感染や食中毒の原因菌の特定・比較に加え、分子疫学的調査に頻用されている。百日咳菌の遺伝子型解析には挿入配列（IS1002）を用いた RFLP あるいは PFGE を用いることができるが、近年では PFGE による解析が主流となっている。臨床より分離される百日咳菌はそれぞれ多様な遺伝子型を有することが知られており、PFGE 解析は家族内感染や院内感染の解析に有効である。ここでは制限酵素 *Xba*I を用いた PFGE 法（5）について解説を行う。

プラグ調製

- ① -80℃に保存していた菌株を百日咳菌用平板培地（Bordet-Gengou 培地等）の隅に塗布し、36℃で2～3日間培養を行う。
- ② 菌の生育が認められたらプレート全面に塗り広げ、さらに1日間培養を行う。
- ③ 菌体を滅菌綿棒で回収し、TE-8 に懸濁する。菌濃度は $\approx 0.5A_{650}$ に調整する。
- ④ 0.5 ml の菌液に等量の 1%低融点アガロース溶液（50℃）を加え、攪拌後、プラグモールドに分注する。プラグモールドを氷上に20分間置き、アガロースを固化させる。なお、1検体当り2個のプラグを作製する。
- ⑤ 14 ml ラウンドチューブ（ファルコン、2059）にプラグを移し、1 ml のプロテアーゼ溶液を入れる。55℃で一晩、穏やかに振盪する。
- ⑥ プロテアーゼ溶液を捨て、10 ml の TE-8 でプラグを洗浄する。洗浄後、5 ml の TE-8 および 50 μ l の 40 mg/ml PMSF を加え、55℃で穏やかに振盪する。
- ⑦ 1 時間後、氷中に移し冷却する。冷却後、溶液を捨て、10 ml の TE-8 で再度洗浄する。洗浄後、2.5 ml の 0.5 M EDTA (pH 8.0) を加え、4℃に保存する。

制限酵素処理

- ① プラグを 1/3 に切断し、切断したプラグ片を 10 ml の TE-8 が入ったラウンドチュ

ープに移す。室温で 1 時間以上穏やかに振盪し、プラグ中の EDTA を除く。なおプラグを切断する際は、サランラップを敷き、その上で顕微鏡用のカバーガラスを用いて切断すると良い。

② 1.5 ml チューブに 1 ml の制限酵素用緩衝液を入れ、プラグ片をその中に移す。1 時間程度穏やかに振盪し、プラグを制限酵素用緩衝液に平衡化する。

③ 制限酵素用緩衝液を除き、200 μ l の制限酵素 *Xba*I 溶液を加える。37℃で一晩穏やかに振盪する。

④ 制限酵素溶液を除き、1 ml の 0.5×TBE を加える。泳動するまで 4℃で保存する。なお泳動は当日中に行う必要がある。

電気泳動

電気泳動は使用するパルスフィールド電気泳動装置の取り扱い説明書に従って行う。ここでは CHEF-DR II (Bio-Rad) を用いてパルスフィールド電気泳動を行う方法について解説する。

① 0.5×TBE 溶液を用いて 1%アガロースゲルを作製する。アガロースは PFGE 用に市販されているものを使用する。SeaKem GTG agarose (BioWhittaker Molecular Applications) などが適している。

② 制限酵素処理を行ったプラグ片をサンプル溝に挿入する。サンプル溝はあらかじめ 0.5×TBE を満たし、プラグを壊さないように注意して挿入する。プラグを挿入した後、キムワイプで 0.5×TBE を除き、1%低融点アガロース (50℃) でシールする。市販の分子量マーカーもサンプル溝に挿入し、シールする。

③ 約 2 L の 0.5×TBE を泳動槽に入れ、アガロースゲルをセットする。泳動バッファを 16℃に冷却し、循環させる。泳動は下記条件で行う。

A) ブロック 1: イニシャルスイッチタイム 4 秒、ファイナルスイッチタイム 8 秒、12 時間、6 V/cm

B) ブロック 2: イニシャルスイッチタイム 8 秒、ファイナルスイッチタイム 50 秒、10 時間、6 V/cm

④ 泳動後、0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイド溶液で 1 時間染色する。染色後、蒸留

水で1時間洗浄し、トランスイルミネーターを用いてバンドを検出する。

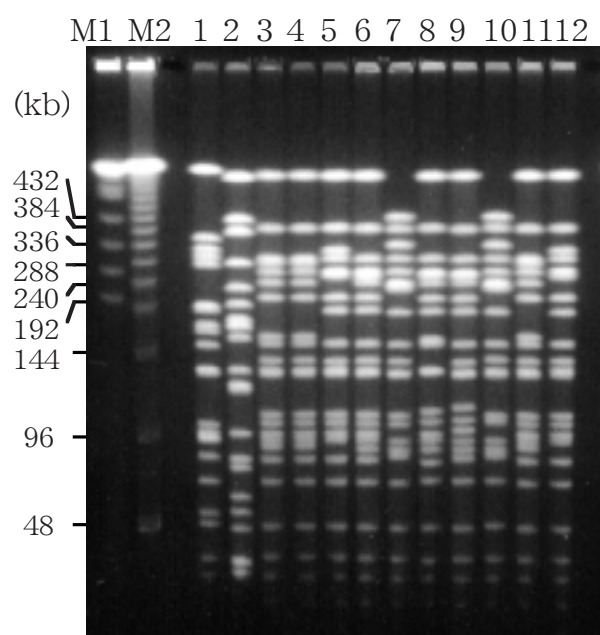


図8 百日咳臨床分離株の PFGE 解析例 M1: *S. cerevisiae* marker, M2: Lambda marker, Lane 1: 百日咳菌 (18323 株), Lane 2: 百日咳菌 (東浜株、ワクチン株), Lane 3~12: 日本で分離された百日咳臨床分離株

試薬および器具

- TE-8 : 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0
- プラグモールド : ディスポーザブルプラグモールド (No. 170-3713, Bio-Rad)
- 20 x TBE: 1 M Tris, 20 mM Na₃EDTA, 0.97 M ホウ酸, pH 8.2
- プロテアーゼ溶液 : 0.5 M EDTA (pH 8.0) に Proteinase K を終濃度 0.5 mg/ml、Na-sarkosyl を 1% (w/v)になるように溶解する。
- 1%低融点アガロース溶液 : 低融点アガロース (SeaPlaque agarose, BioWhittaker Molecular Applications) を 0.5×TBE に終濃度 1%(w/v)となるように溶解する。
- 40 mg/ml PMSF : 0.4 g の PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) を 10 ml のイソプロパノールに溶解する。4℃保存。使用時は 55℃に加熱し、生成した結晶物を溶かす。
- 10×制限酵素用緩衝液 (10×M buffer) : 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM MgCl₂,

10 mM DTT, 500 mM NaCl, -20℃で保存する。使用時に蒸留水で 10 倍に希釈する。

- *Xba*I 溶液：下記溶液をプラグ片 1 個当たり、200 μ l 調製する。

10×制限酵素用緩衝液 (10×M buffer)	20	μ l
0.1% BSA	20	μ l
DW	158	μ l
15 U/ μ l <i>Xba</i> I (Takara)	1.5	μ l
<hr/>		
	200	μ l

- 分子量マーカー： CHEF DNA size standard, Lambda ladder (No. 170-3635, Bio-Rad)

注意点

- パルスフィールド電気泳動に用いる菌は対数増殖期のものを使用する。上記条件下で培養した菌ならば問題はない。
- 百日咳菌の溶菌はプロテアーゼ K のみで行うことができる。他菌のようにリゾチーム処理を必要としない。
- 作製したプラグは 0.5 M EDTA 溶液中で長期保存が可能である。
- 百日咳菌の遺伝子型解析には制限酵素 *Xba*I を用いる。制限酵素 *Spe*I, *Dra*I も使用することもできるが、世界的には *Xba*I を用いることが標準となっている。
- パルスフィールド電気泳動分析では DNA の移動速度は泳動温度に大きく影響される。温度が高いと移動速度が速くなり、低いと遅くなる。そのため、再現性のある結果を得るためには、泳動槽の温度管理に十分注意する。
- パルスフィールド電気泳動像をもとに系統樹解析を行うことができる。我々の研究室では Diversity Database ソフトウェア（ver. 1, PDI, Inc.）を用いて系統樹解析を行っている。

(4) 引用文献

1. 厚生省監修「微生物検査必携：細菌・真菌検査第3版」、F 各論 3: 4. 百日咳菌（佐藤勇治）、財団法人日本公衆衛生協会、1987
2. Houard S, Hackel C, Herzog A, Bollen A. Specific identification of *Bordetella pertussis* by the polymerase chain reaction. Res Microbiol. 140:477-87, 1989
3. 前側恒男、竹内富美恵、馬曉航、飯田英侃. Polymerase Chain Reaction 法を用いた百日咳 DNA 検出法、福井県衛生研究所年報 31:81-82, 1992
4. 青山辰夫、竹内可尚、村瀬雄二、岩田崇、東智英子、今泉厚. PCR 法による百日咳菌、パラ百日咳菌 DNA 検出法開発の試み、第 38 回毒素シンポジウム講演要旨 P54-56, 1991
5. Mooi FR, Hallander H, Wirsing von Konig CH, Hoet B, Guiso N. Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 19:174-81, 2000

(5) 検査依頼先

国立感染症研究所 細菌第2部 第5室 （蒲地、落合、山本、堀内）

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1 TEL: 042-561-0771 内線 560

(6) 執筆者一覧

蒲地 一成 国立感染症研究所 細菌第二部 (e-mail:kamachi@nih.go.jp)

近田 俊文 国立感染症研究所 細菌第二部 (konda@nih.go.jp)

落合 雅樹 国立感染症研究所 細菌第二部 (masakio@nih.go.jp)

山本 明彦 国立感染症研究所 細菌第二部 (yama-aki@nih.go.jp)

堀内 善信 国立感染症研究所 細菌第二部 (horiuchi@nih.go.jp)

荒川 宜親 国立感染症研究所 細菌第二部 (yarakawa@nih.go.jp)

大友 良光	青森県環境保健センター
竹部 久勝	奈良県保健環境センター
赤見 正行	群馬県衛生環境研究所

風 疹

平成 14 年 3 月

目次

- 1、風疹の概説
- 2、検査に関する一般的注意
 - (1) 実験室、実験者
 - (2) 検査材料の採取
 - (3) 検査材料の輸送
 - (4) 検査の進め方
 - (5) 検査の判定
- 3、検査方法
 - (1) 抗体検出
 - (a) 赤血球凝集抑制 (Hemagglutination Inhibition : HI)抗体
 - (b) IgM 酵素免疫抗体 (IgM-EIA)
 - (c) IgG 酵素免疫抗体 (IgG-EIA)
 - (2) ウイルスゲノム RNA の検出 (逆転写-nested PCR)
 - (3) ウイルス分離 (組織培養法)
 - (4) 抗原検出 (蛍光抗体法)
- 4、引用文献
- 5、検査依頼先
- 6、執筆者一覧

1、風疹の概説

風疹の感染経路は呼吸器であり、感染は全身に及ぶ。潜伏期は約2週間。その症状は、3日程度の発疹（3日はしか）と発熱、時には、耳介後部のリンパ節腫張を伴う。稀に、血小板減少性紫斑病、風疹後脳炎、一過性の肝炎、更に稀には、進行性風疹全脳炎（PRP）が知られているが、一般的には予後良好である。小児の30～50%が、また、成人の約15%が不顕性感染である。従って、既往および他の発疹性疾患との鑑別は血清診断による。

風疹が臨床ウイルス学的に重要なのは、小児感染症としてではなくて先天性風疹症候群（Congenital Rubella Syndrome：CRS）の存在による。風疹に対する免疫の無い女性が妊娠初期（特に3ヵ月以内）に風疹に感染すると、その児にCRSを発症することがある。眼（白内障、緑内障、網膜症、小眼球）、耳（高度難聴）、心臓（PDA、ASD、VSD、AS）の障害が3大障害であるが、血小板減少、肝脾腫、身体および精神の発達遅滞等を伴うことが多い。母親が不顕性感染でも、また、稀には、再感染でも発症することがある。

CRSの検査、診断マニュアルは、別に定められる。

1964～65年の沖縄での408名のCRSの大量発生、1966年の本土での風疹の大流行を契機として、風疹ワクチンの開発が始り、1977年から女子中学生に対する予防接種が開始された。それに加えて、1989年から男女幼児に対するMMR（麻疹、おたふくかぜ、風疹）ワクチンの接種が導入された。しかし、このMMRワクチンは、おたふくかぜワクチンによる髄膜炎の発生により中断した。予防接種法改正により1995年からは男女幼児（12～90ヶ月）と2003年9月までの経過措置として男女中学生が接種対象者になった。この接種対象者の変更（対象者数が約4倍増加）により、風疹患者発生数は、1999年より大きく減少しはじめた。それに平行してCRSの発生数も減少して、1桁の前半の数値になっている。

2、検査に関する一般的注意

（1）実験室、実験者

風疹ウイルスはクラス2に分類されているので、P2実験施設でBSL2の取り扱い基準に従って行う。被験者由来の検査材料は安全キャビネットの中で取り扱う。

試験者は、予め風疹抗体価の存在を確認し、抗体が無いか低い場合（HI抗体価1:8～1:16）には風疹ワクチンを接種し、抗体の獲得や上昇を確認してから検査に従事することが望ましい。

（２）検査材料の採取

検体としては、抗体測定用に血清、ウイルス分離やウイルス遺伝子検出用に咽頭ぬぐい液、末梢血、血清、尿、脳脊髄液等を用いる。滅菌容器に採取し、密栓後直ちに-80℃に凍結保存する。

１）咽頭ぬぐい液：滅菌綿棒の先端の綿球を保存液（アール液等）に浸して被験者の咽頭部分をこすり、その綿棒を保存液の試験管の中で攪拌したのち、綿棒を取り出し密栓する。

２）末梢血：抗凝固剤として EDTA または、クエン酸を用いて採取する。PCR 反応の妨げになるヘパリンを用いてはならない。

３）尿および脳脊髄液：そのまま保存。

４）血清：血液採取後、分離してから保存する。抗体測定にも利用するが、ウイルス分離やウイルス遺伝子検出にも使用する可能性があるので、-80℃に凍結する。

（３）検査材料の輸送

ドライアイスによる凍結状態のままで、検査を行う施設に送る。ドライアイスによるウイルスの不活化のおそれがあるので、密閉容器の蓋をビニールテープ等でシールする。送付に当っては、氏名、年齢、性別、検体の種類、症状、採取病日等の必要事項を記入し、検査材料と一緒に送付する。送付先には、検体数、搬入予定日時等を予め連絡しておく。

（４）検査の進め方

風疹の感染診断は、第一義的には特異的な発疹、リンパ節腫脹等の臨床症状によるが、実験室診断としては、血清診断による。これは、麻疹等の他の発疹性疾患との鑑別の必要性や不顕性感染があるためである。ウイルス分離、または、ウイルス遺伝子検出は、診断よりも分離や検出を目的とすることが多く、分離や検出可能時期（発疹をはさんで約 1 週間）が限られているので、診断法としては余り一般的では無い。

（５）検査の判定

血清診断としては、IgM 抗体の存在（IgM-EIA 強陽性）、高い HI 抗体価（通常、感染直後で 1:256 以上）、高い IgG-EIA 値、また抗原診断としては、ウイルスゲノム RNA の検出、ウイルス分離、抗原検出の何れかが陽性であれば、風疹感染陽性と判定する。補体結合（CF）抗体の測定は、その感度の低さから勧められない。顕性感染の場合、発疹が出現してから遅くとも 4 日後には HI 抗体、

および IgM 抗体の上昇が見られる。逆に、発疹出現直後(0～3 日) の血清では、場合によっては陰性と出ることがあるので、血清の採取時期には注意を要する。また、ウイルスゲノム、ウイルスや抗原検出可能期間は、発疹出現を挟んで 1 週間位である。

血清が 2 回以上採取されている場合には、HI 抗体価の 4 倍以上の上昇や、IgG-EIA 値の明らかな上昇も陽性の判断根拠になる。この場合、採取時期の異なる同一患者の血清は、同時に測定するのが原則である。

3、検査方法

(1) 抗体検出

(a) 赤血球凝集抑制 (Hemagglutination Inhibition : HI) 抗体

<試薬類>

調整した試薬類は細菌の感染を防ぐため、高圧滅菌し無菌的に取り扱う。

1) カオリン処理用

a) PBS (ー) (Dulbecco の PBS) pH7.2～7.4。

NaCl 8.0g、KCl 0.2g、Na₂HPO₄ 1.15g、KH₂PO₄ 0.2g を蒸留水に溶解し、全量を 1,000ml とする。

b) 25%カオリン懸濁液

カオリン (Fisher または Aldrich 製) 25g に PBS (ー) 100ml を加えて作る。カオリンは PBS (ー) で 3 回洗う。上清の pH が 7 以上であることを確認したら、液面の高さを攪拌前につけた印に合わせる。市販の 25%カオリン懸濁液もある。

2) 赤血球用

a) DGV (Dextrose-Gelatin-Veronal)

NaCl 8.5g、ベロナール 0.575g、ベロナール-Na 0.375g、CaCl₂ 0.02g、MgSO₄・7H₂O 0.12g、ゼラチン 0.6g、ブドウ糖 10g を蒸留水に溶解し、全量を 1,000ml とする。

b) 赤血球浮遊液

ガチョウ赤血球は市販されている。それを DGV で 3 回洗ったあと、DGV で 8%浮遊液を作り、4℃に保存する。採血後約 3～4 週間保存使用できる。HI 試験では、後述の希釈液で 0.25%浮遊液を作り使用する。正確な 0.25%浮遊液は、シアンメトヘモグロビン標準液および比色計を用いて調整する。

3) 希釈液

a) PBS pH6.8

NaCl 9.0g、Na₂HPO₄ 0.67g、KH₂PO₄ 0.72g、NaN₃ 1.0g を蒸留水に溶解し、全量を 1,000ml とする。

b) カルシウムマグネシウム液

CaCl₂ 4.0g、MgCl₂ · 6H₂O 4.0g を蒸留水に溶解し 100ml とする。

c) 1%ゼラチン

ゼラチン 1.0g に蒸留水 100ml を加え 115℃ 10 分高压滅菌する。1ml ずつ分注し、4℃保存。使用時温浴でとくす。

d) 抗原および血清希釈液

PBS pH6.8 200ml に BSA（ウシ血清アルブミン）0.2g、1%ゼラチン 1.0ml を加えたものを用いる。

e) 赤血球浮遊液

上記 d) の希釈液 200ml に、b) のカルシウムマグネシウム液 2ml を加えたものを用いる。

<血清処理>

血清中には HA 反応を抑制する非特異的インヒビターがあるので、あらかじめこれをカオリン処理によって除く。また赤血球に対する自然凝集素は、大量の赤血球で吸収する。非働化された血清では、インヒビターが除けない場合もあるので、非働化した血清は用いない。抗体陽性と陰性の参考血清も同時に処理する。血清処理はマイクロプレートまたは試験管で行う。

1) マイクロプレート法

- i) 平底マイクロプレート（Falcon Micro Testplate など）の穴を 1 つおきに使う。被検血清各 25 μl をマイクロピペットで穴に入れる（図 1）。
- ii) 25%カオリン 0.1ml ずつを血清の入っている穴にいれる。カオリンが不均一にならないように、時々カオリンを再浮遊させ、素早く分注する。
- iii) プレート上面の水分を拭き取ってから、シールする。
- iv) プレートを手で激しく振る。室温に 20 分間放置する。次の遠心をする前にもう一度振る。
- v) プレートをプレート用遠心機で 1,500rpm、3 分間遠心する。
- vi) 遠心後はプレートを水平に保持しシール穴側内面を濡らさないようにする。シールをはがす。
- vii) 各穴に DGV に保存した 8%赤血球浮遊液 50 μl および PBS（－）25 μl を加える。
- viii) 再びシールし、プレートを軽く振って赤血球をよく混和させる。
- ix) プレートを 4℃に 1 時間～1 夜おく。この間 2 回、プレートを振って赤血球を再浮遊させる。
- x) プレートを遠心してから、シールをはがす。この上清が処理済み 1:8 希釈血

清である。

xi) 各穴の上清を $50\mu\text{l}$ ずつ 2 回、マイクロピペットで HI 試験用のプレートに移す。

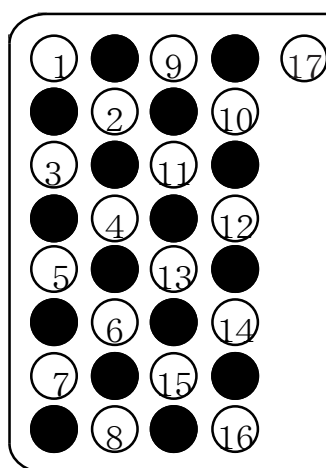


図 1 マイクロプレートでの血清のカオリン処理
平底マイクロプレートの穴を 1 つおきに使う。

2) 試験管法

i) 血清 0.2ml を小試験管にとる。

ii) PBS (－) 0.6ml

iii) 25%カオリン 0.8ml を加え、ゴム栓をして激しく振る。室温 20 分間放置、その間に 2～3 回震盪する。

iv) $2,000\text{rpm}$ 20 分遠心後、上清を別の試験管に静かに移す。ピペットを使う必要はない。

v) 50%ガチョウ赤血球浮遊液(DGV) 0.05ml を加え、氷浴に 1 時間おく、または 4°C 、1 夜放置する。この間、時々試験管を振って血球を混和させる。

vi) $2,000\text{rpm}$ 20 分 4°C で遠心後、上清を別の試験管に静かに移す。これを 1:8 希釈血清とする。

<赤血球凝集素 (Hemagglutinin、HA) の定量>

HI 試験を行う前に、用いるべき HA の力価を測定しなくてはならない。HA は凍結乾燥されたものが市販されている。

1) 溶解した HA 原液を 1:2 に希釈し、その $50\mu\text{l}$ を U 底マイクロプレート (グラインナー#650101、ダイナテック#001-010-2205 等) の穴 No.1 にとる。同じものを 2 列作って、HA の希釈を 2 列同時に行うようにする。また必要に応じて原液を 1:3 に希釈したものも 2 列同時に希釈する。

- 2) 希釈液 25 μ l ずつを穴 No.2~8 に入れる。
- 3) 25 μ l 用ダイリューターで 2 倍段階希釈を行う。
- 4) 希釈液のみ 25 μ l ずつを全部の穴に加える。
- 5) 0.25% 赤血球浮遊液 50 μ l ずつを全部の穴に加える。
- 6) プレートをすぐマイクロミキサーにのせ、赤血球をよく混和させる (5 秒ずつ 3 回)。

(注) 血球の混和が十分でないと、不完全凝集が続き HA 終末点が不明瞭になったり、HA 価が低くでることがある。

- 7) プレートを冷蔵庫 (4~10℃) に 1 時間おく。
- 8) 室温に出して 5~10 分して結果を判定する。完全または部分凝集した終末の希釈倍数を、その HA 原液の HA 価とする。この値を T とすると、HA 原液を T/4 倍に希釈した液を、つぎの HI 試験での抗原とする。たとえば HA 価が 32 の場合には、原液を 1:8 希釈したものを HI 試験に使う。

<HI 本試験>

U 底マイクロプレートの穴を図 2 のように振り分ける。

		HI試験									血清対照
血清	S1	1:8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	8
		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
HA in 抗原	S _n	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		○	○	○	○	○	○				
		○	○	○	○	○	○				
		○	○	○	○	○	○				
		1:1	2	4	8	16	対照				
		HA in 二次定量									

- 1) 処理済み血清を<HI 試験>の 1:8 希釈の穴に 50 μ l、<血清対照>の 1:8 の穴に 25 μ l とる。他の穴には希釈液を 25 μ l ずつ入れる。
- 2) 25 μ l ダイリューターで 2 倍段階希釈を行う。
- 3) <HI 試験>の穴に 4 単位の HA 抗原 25 μ l ずつを、<血清対照>の穴に希釈液のみ 25 μ l ずつを加える。マイクロミキサーで混和後、室温に 1 時間放置す

る。

4) HA 抗原の二次定量を行う。＜HA 二次定量＞の 1:1 希釈の穴に、＜HI 試験＞の穴に加えたのと同じ抗原を $50\mu\text{l}$ 入れる。あとは、先に述べた HA 試験の要領で行う。

5) 0.25%赤血球浮遊液 $50\mu\text{l}$ ずつをすべての穴に加え、十分に混和する。一枚のプレートに血球を加え終わるたびに血球浮遊液も混和する。

6) 冷蔵庫に 1 時間おく。

7) HA を完全阻止した最終の希釈倍数を、その血清の HI 抗体価として判定する。＜血清対照＞をみて、自然凝集素が吸収されているかどうか分かる。抗体陽性と陰性の参考血清の HI 価が正しくでているかどうかをみる。＜HA 二次定量＞で、HA 価が 4 であることを確かめる。

8) HI 価が 1:512 以上になった場合は、処理済み血清 (1:8) を、あらかじめ 1:8(血清原液から計算すると 1:64)に希釈して、そこから再段階希釈を行って、最終 HI 価を求める。

＜一般的な注意＞

マイクロプレート測定法において、HI 抗体価に変動を与える要因としては、液量が最も大きいと思われる。ドロップパーで滴下する希釈量と、希釈に用いるダイリューターの容量が正確に $25\mu\text{l}$ であるかどうかには注意する必要がある。また、滴下や希釈を行う所へ、直接風が当たって液が蒸発し、液量の低下を起こさせないように注意する。

＜評価の目安＞

顕性感染の場合、発疹が出現してから遅くとも 4 日後には HI 抗体の上昇が見られる。発疹出現後 1～2 週で最高価 (1:256～1:8192)に達する。7 ヶ月から 3 年後位までは、128 程度の価で安定する。512 の価が発疹出現後 7 ヶ月以上持続していた例は無い。従って、512 以上の価の場合は、初感染後 7 ヶ月以内か、再感染によるブースターである。近年の HI 抗体高値は不顕性再感染によるものが多い。

(b) IgM 酵素免疫抗体 (IgM-EIA)

間接法 EIA キット (デイドベーリング:エンザイグノスト B 風疹/IgM) と IgM 抗体捕捉法 (デンカ生研:ルベラ IgM(II)-EIA「生研」等) による EIA キットとの 2 種類があり、市販されている。何れも、製造所の使用説明書の記載に従って操作し、キットに添付されている血清を標準にして判定する。

＜評価の目安＞

IgM 抗体捕捉法によるキット (デンカ生研製) の場合、おおよそ指数 5 以上が感染後約 50 日以内と考えられる。約 6 ヶ月で陽性率は半減するが、弱陽性値

で約1年位は検出される。再感染でも症例の約50%にIgM抗体が検出されるので、IgM抗体の有無だけでは、初感染との判別は困難である。一般に再感染例では、持続期間が短く値も低い。

(c) IgG 酵素免疫抗体 (IgG-EIA)

間接法 EIA のキット (デンカ生研等) が市販されている。何れも、製造所の使用説明書の記載に従って操作し、キットに添付されている血清を標準にして判定する。

<評価の目安>

定性的には、HI 抗体価とほぼ相関する。陰性と陽性の間の境界は、HI 法の場合とは完全には一致せず、キット毎で異なる。境界値に近いような極めて低い陽性値の場合、実質的に陰性とみなして対応する (ワクチン接種をする等) 方が安全である。

(2) ウイルスゲノム RNA の検出 (逆転写-nested PCR)

検体から RNA を抽出して、風疹ウイルス E1 遺伝子 (赤血球凝集活性を持つ E1 蛋白をコードしている) の1部(Site3)を逆転写し、nested PCR で増幅して、最終的に 283 塩基長の DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で検出する方法である (図3)。最近では逆転写と 1st PCR の反応を連続して行うキット (QIAGEN) が市販されている。サンプルの汚染による擬陽性の危険性を軽減できる可能性がある (この実験条件を別法として添付)。PCR での Taq polymerase は市販されている多くの酵素が使用に適するが、その際は推奨されている反応条件に従う。Primer は以下の A~D の組み合わせを用いたが、別法の OneStep PCR kit では E1P5~8 を用いた方法を記載した。両方法の検出感度はウイルスでは、0.6PFU 感染価を超える。しかし、今のところ両者の感度を直接比較したデータはない。

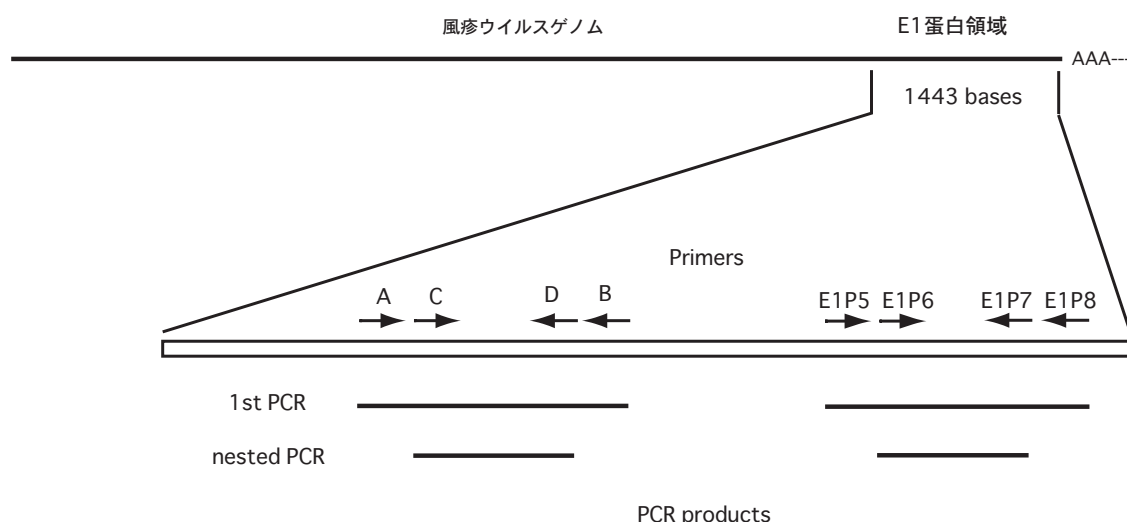


図 3、ウイルスゲノムの増幅部位

1) 試薬

ISOGEN-LS (ニッポンジーン #311-02621) RNA 抽出用

dNTP mixture

RNase inhibitor, RNasin (Promega #N2511)

Reverse transcriptase (RTase), Superscript RT (Invitrogen #18080-044)

Taq DNA polymerase (buffer 中に Mg が含まれるものでも可)

Primer A,B,C,D(4 種類) 委託合成

Agarose (Seakem GTC)

TAE buffer

Etidium Bromide

2) 機器

Thermal cycler

Mupid Minigel 泳動槽 (Advance)

Transilluminator

泳動写真撮影装置

3) RNA の抽出

Acid-Guanidium thiocyanate-Phenol-Chloroform(AGPC 法)か市販の ISOGEN で検体中の RNA を抽出する。RNA は $20\mu\text{l}$ の滅菌水に溶解し、直ちに逆転写反応を行うか、 -80°C に保存する。

4) 逆転写

風疹ウイルスゲノムは 1 本鎖でプラス鎖であるが、検体中に複製過程のマイナス鎖を含むことも考慮して、primer はプラス鎖(primer-A)、マイナス鎖(primer-B)両方からの逆転写が出来るように 2 種類含む。

37°C 、60 分。反応液量 $20\mu\text{l}$ 。

5x RT buffer (BRL)	$4\mu\text{l}$
0.1M DTT	$2\mu\text{l}$
10mM dNTP mixture	$1\mu\text{l}$
Primer-A ($0.33\mu\text{g}$, $0.5\mu\text{M}$ 相当)	$1\mu\text{l}$
Primer-B ($0.33\mu\text{g}$, $0.5\mu\text{M}$ 相当)	$1\mu\text{l}$
RNase inhibitor (40 unit)	$1\mu\text{l}$

RTase, Superscript RT (BRL)(200unit)	0.5 μ l
RNA	5 μ l
H ₂ O	4.5 μ l

5) PCR (First) 反応液量 30 μ l

10xPCR buffer (Mg-free)	3 μ l
Mg ⁺⁺ (25mM)	1.8 μ l
10mM dNTP mixture	0.6 μ l
Primer-A (0.33 μ g, 0.5 μ M 相当)	0.6 μ l
Primer-B (0.33 μ g, 0.5 μ M 相当)	0.6 μ l
Taq DNA polymerase	0.2 μ l (final 1 unit)
cDNA	5 μ l
H ₂ O	18.2 μ l

(94°C 1min, 55°C 2min, 72°C 1.5min) x 30cycle.

30cycle 目のみ 72°C 5min.

OneStep RT-PCR kit を用いた別法（上記 4）～5)の代替方法）

QIAGEN 社の OneStep RT-PCR kit (#210210)を half scale (25 μ l) で用いている。

5x reaction buffer (QIAGEN)	5 μ l
25x dNTP mixture (QIAGEN)	1 μ l
Primer E1E5 (1.0 μ g/ μ l)	0.5 μ l
Primer E1P8 (1.0 μ g/ μ l)	0.5 μ l
placenta RNase inhibitor (40u/ μ l)	0.125 μ l
Enzyme mixture (QIAGEN)	1 μ l
cDNA	5 μ l
H ₂ O	11.875 μ l
Total volume	25 μ l

50°C 30 min（逆転写反応）、94°C 15min（不活化）の後、PCR 反応（94°C 45sec, 60°C 45sec, 72°C 45sec を 30 cycles 及び 72°C 10min）を行う。

6) PCR (nested) 反応液量 30 μ l

10xPCR buffer (Mg-free)	3 μ l
Mg ⁺⁺ (25mM)	1.8 μ l
10mM dNTP mixture	0.6 μ l
Primer-C (0.33 μ g, 0.5 μ M 相当)	0.6 μ l
Primer-D (0.33 μ g, 0.5 μ M 相当)	0.6 μ l
Taq DNA polymerase	0.2 μ l (final 1 unit)

First PCR product	5 μ l
H ₂ O	18.2 μ l

94°C 1min, 55°C 2min, 72°C 1.5min x 30cycle.
30cycle 目のみ 72°C 5min.

7) Primer sequences とウイルスゲノム全長の中での位置

Primer-A : GGCCTCTTACTTCAACCCTG(nt No. 8553-8572)

Primer-B : CCGAGGCCCCACCGGGACTG(complementary to nt No.8902-8921)

Primer-C : GCGGCAGCTACTACAAGCAG(nt No.8573-8592)

Primer-D: TCGGGCGGGACCTGGACCTC(complementary to nt No.8836-8855)

Primer-E1P5 : GCCATGCTACCGTTCGAAATGCC(nt No.9147-9168)

Primer-E1P6 : GGCTGAAGTTCAAGACAGTTCGC(complementary to nt No.9225-9247)

Primer-E1P7 : GCAGCCCCACTCCGCCCAGGTC(nt No.9588-9568)

Primer-E1P8 : GCACAGCAAGCGAGTAAGCCAG(complementary to nt No.9660-9639)

8) 電気泳動

アガロースゲル 1 %、TAE buffer 使用。Mupid ミニゲル泳動槽等で泳動する。
Etidium Bromide 染色後、トランスイルミネイターで蛍光検出する。283 塩基長の DNA 断片が目的のバンドである。

(3) ウイルス分離 (組織培養法)

ウイルス分離およびその同定には 3 ~ 4 週間を要する。風疹ウイルスの増殖は抗真菌剤のファンギゾンによって抑制されるので、ウイルス分離のための培養液には加えない方がよい。

<試薬等>

RK13 細胞、培養液 (Eagle's MEM)、牛血清 (CS)、0.1% トリプシン・EDTA 液、抗生物質 (ペニシリン、ストレプトマイシン)

<機材>

12.5 cm² プラスチック培養瓶、6 穴プラスチックプレート、炭酸ガス培養器。

<分離>

1) 8% CS を添加した Eagle's MEM に浮遊させた RK13 細胞 (3x10⁵ cells/ml) をプラスチック瓶 (12.5 cm²) に 1 本当り 4 ml 蒔き、37°C で 2 日培養する。

2) 0.2ml のサンプルを接種する。室温で 1 時間吸着したのち、接種材料を除かずに 2% CS を含む培養液を加えて 37°C の炭酸ガス培養器で培養する。翌日に細

胞変性効果（CPE）が見られた場合はサンプルの非特異的な毒性によると考えられるので、新しい培養液に交換する。接種後 4 日目に液交換して 1 週間培養を続ける。通常この段階ではウイルスによる CPE は見られない。

3) 感染細胞を培養液とともに凍結融解し、その一部を再び新しい細胞に接種し、培養する。通常この継代培養を 3 回繰り返すが、ウイルスによる CPE が見られるようになれば回数を減らすことができる。培養終了後細胞を凍結融解し、その 3,000rpm、20 分の遠心上清を分離試料とする。一般に風疹ウイルスの CPE は弱いので、CPE 観察のみによるウイルス分離の判定は難しい。

4) 接種細胞を複数用意して、その内の 1 本の細胞に約 800PFU/4ml の VSV を感染させて培養を続け、VSV の CPE が出現するかどうか、すなわち VSV の増殖が分離ウイルスによって干渉されるか否かを調べることで、ウイルスの存在を間接的に調べることができる。

<同定>

風疹ウイルスの同定試験には、所要時間の短い順からウイルスゲノム検出法（RT-PCR）、蛍光抗体法、抗血清による中和法などがある。

1) ウイルス遺伝子検出は、3 (2) に、蛍光抗体法は 3 (4) に記載されている。

2) 抗血清による中和法

ウイルス分離の 4) と同じ方法を用いる。分離ウイルス培養液の感染価が特異風疹抗体によって中和されるか否かを VSV に対する干渉によって測定し、ウイルスの同定を行う。中和は 10 倍段階希釈した分離ウイルスを含む検体を一定量の抗風疹血清と混合し（抗血清の抗体価によるが、通常抗血清は混合液中で 20 倍希釈にする）、また、非中和の対照には正常血清を抗血清と同濃度に加えて 37℃ 60 分、4℃ 1 夜静置する。非中和ウイルスと中和ウイルスの感染価の比（中和指数）が $10^{0.7}$ 以上であれば、風疹ウイルスと同定する。分離された風疹ウイルスがプラークを形成するならば、干渉法によらず直接プラークの感染価測定で中和指数を測る方が、より正確である。

(4) 抗原検出(蛍光抗体法)

<試薬等>

RK13 細胞、培養液（Eagle's MEM）、牛血清、0.1% トリプシン・EDTA 液、抗生物質（ペニシリン、ストレプトマイシン）、抗風疹ウイルス抗血清、FITC-標識 2 次抗血清。

<機材>

チェンバースライド（8 チェンバー）、炭酸ガス培養器。

<操作>

- 1) RK13 細胞をチェンバースライド（ガラス製）で培養し、検体 25 μ l を接種し 37℃、1 時間放置後、培養液を 0.4ml/チェンバー加えて 37℃の炭酸ガス培養器内で培養する。
- 2) 感染後 CPE が現れたら（約 3～4 日）チェンバーを取り外し、細胞を冷 PBS で洗浄した後、アセトンに 15 分間浸し固定する。
- 3) 固定した細胞に 1 次抗体として抗風疹ウイルス抗体（非特異反応を避けるために、あらかじめ RK13 細胞で吸収した風疹免疫ウサギ血清（抗体価によるが 1:60 希釈）や精製単クローン抗体（1～2 μ g/20 μ l）を用いる）を 1 区画当たり 20 μ l のせて、保湿箱に入れ、37℃、1 時間処理する。
- 4) PBS で 5～6 回洗浄後水分を除き、FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体（濃度にもよるが、1:300 希釈）を 20 μ l をのせて、保湿箱にいれ、37℃、1 時間静置する。
- 5) PBS で 5～6 回洗い、封入剤をのせてカバーガラスを置き、蛍光顕微鏡で観察する。同様に処理した非感染細胞を対照とし、風疹ウイルスに特異的な蛍光が検出される場合を分離陽性と判定する。

4、引用文献

- 1) Viruses, Rickettsiae, Chlamydiae, and Mycoplasmas (L. M. Clarke, Sec. ed.), in Clinical Microbiology Procedures Handbook (ed. in Chief, H. D. Isenberg): Sec. 8, American Society for Microbiology, Washington DC, 1992.
- 2) Best JM and O'Shea S: Rubella virus. in Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. 7th ed.: EHLennette, DA Lennette, ET Lennette eds., pp583-600, American Public Health Association, Washington DC, 1995.
- 3) 加藤茂孝：風しんワクチン「ワクチンハンドブック」国立予防衛生研究所学友会編、pp170-179、丸善、東京、1996.
- 4) 加藤茂孝：風疹 HI 抗体価測定の方法。臨床とウイルス、19(2), 127-130, 1991.
- 5) 加藤茂孝：血清処理用カオリンの酸処理は必要条件ではない。臨床とウイルス、22(2), S75, 1994
- 6) Inouye, S. : Micro-modification of kaolin treatment of serum for the rubella hemagglutination-inhibition test. J. Med. Microbiol, 9, 501-502, 1976.
- 7) 加藤茂孝、干場勉：風疹 IgM はいつまで検出されるか：市販キットの性能比較と特異性の検討、臨床とウイルス、23 (1), 36-43, 1995.
- 8) 加藤茂孝：風疹ウイルス、「臨床 DNA 診断法」古庄敏行、井村裕夫監修、pp978-980、金原出版、東京、1995.
- 9) Katow S, Arai S : Quantitation of rubella virus genome by QPCR and its application to resolution for mechanism of congenital rubella syndrome. In Modern Application of

DNA Amplification Techniques-Problems and New Tools. Lassner D, Pustowoit B, Rolfs A eds. pp93-100, Plenum Press , New York, 1997.

10) Umino Y, Tashiro M : Inhibition of rubella virus growth by Fungizone. Vaccine 19, 1369-1372, 2001.

11) Umino Y : Improved potency assay of rubella vaccine: parameters for plaque formation. Journal of Virological Methods 51, 317-328, 1995.

12) 国立予防衛生研究所学友会編：「ウイルス実験学総論、改訂 2 版」丸善、東京、1973.

5、検査依頼先

都道府県衛生研究所

政令指定都市衛生研究所

国立感染症研究所ウイルス第三部

6、執筆者

加藤茂孝：国立感染症研究所ウイルス第三部

海野幸子：国立感染症研究所ウイルス第三部

加藤宏幸：国立感染症研究所ウイルス第三部

村上 司：大阪市立環境科学研究所

杉田隆博：大阪市立環境科学研究所

大友良光：青森県環境保健センター

長野県衛生公害研究所

栃木県保健環境センター

水痘・帯状疱疹ウイルス

目次

- [1] 水痘・帯状疱疹ウイルス感染症の概説
- [2] 検査に関する一般的注意
 - 1. 検査材料の採取
 - 2. 検査材料の輸送
 - 3. 検査の進め方
- [3] 検査方法
 - 1. ウイルスの分離
 - (1) ウイルス分離法
 - (2) ウイルス感染価測定法
 - 2. 抗原検出
 - (1) 免疫蛍光法
 - 3. 抗体検出
 - (1) 酵素抗体法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)
 - (2) 中和試験法
 - 4. ウイルス遺伝子の検出
 - (1) ポリメラーゼ連鎖反応法 (Polymerase chain reaction, PCR)
 - 5. PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 法
 - (1) 分離株の識別
 - (2) ワクチン株の同定
- [4] 判定基準
- [5] 引用文献
- [6] 検査依頼先
- [7] 執筆者一覧
- [8] 図表

[1] 水痘・帯状疱疹ウイルス感染症の概説

水痘・帯状疱疹ウイルス（varicella-zoster virus、VZV）は α ヘルペスウイルスに属する DNA ウイルスである。VZV はヒトに水痘と帯状疱疹を引き起こす。水痘は VZV の初感染による発疹性の疾患である。VZV に感染後 2-3 週間の潜伏期の後に、発疹が体幹部や頭部に出現し、やがて全身に広がる。発疹は水疱化し約 1 週間で痂皮が形成される。水痘治癒後も VZV は脊髄後根神経節や三叉神経節に潜伏感染し、後年宿主の免疫が低下した場合に再活性化すると帯状疱疹を発症する。

水痘は通常小児期に罹患する疾患であるが、近年成人したのち罹患する人もまれではなくなった。成人の水痘はしばしば合併症もみられ重症化する傾向がある。水痘は免疫不全ないし免疫抑制状態にある人が罹患すると重症化する。また、肺炎、脳炎、肝炎などを合併することがある。妊娠末期に妊婦が VZV に感染すると胎児が胎内で VZV 感染を受けて、出生前後に水痘を発症することがある。特に、妊婦が出産 4 日前から出産 2 日後の周産期に水痘を発症した場合には、新生児に移行抗体がないため、新生児水痘は重症化する。

基礎疾患のない小児では、水痘は一般的に予後の良好な疾患である。しかし皮膚疾患がある患者や、基礎疾患の治療のため免疫抑制状態にある患者では、重症化する可能性が高いので早期に抗ウイルス薬による治療を行う必要がある。

水痘も帯状疱疹も特徴的な臨床像を呈するので、実験室診断が必要となることはあまりない。しかし時には発疹の性状が他の水疱性疾患と判別しにくい場合や、帯状の水疱群が VZV によるのか単純ヘルペスウイルス（HSV）によるのか紛らわしいことがある。このような場合には、血清学的検査またはウイルス学的検査によって原因ウイルスを早く確定し、早期に治療方針を決定することが必要になる。また合併症を併発している場合にもより早期の診断が要求される。

VZV 感染の予防のために弱毒水痘生ワクチン（岡株）が日本で開発され、国内、国外で広く使用されている。本ワクチン接種後の副反応はまれであるが、ワクチン接種後に軽症の水痘に罹患する例もある。これらの原因が VZV 野生株かワクチン株かを明らかにするためには、分子疫学的解析が必要となる。

[2] 検査に関する一般的注意

VZV は病原体のバイオセーフティレベル分類でレベル 2 に属するので、ウイルスの取り扱いには BSL2 の安全設備を備えた実験室内で行う。

1. 検査材料の採取

- (1) VZV の分離は、水疱内容液、咽頭ぬぐい液、末梢血リンパ球、髄液などの検体から行う。水疱液からは高率に分離できるが、その他の検体からの分離率は低い。水疱液からのウイルス分離は、1 ml の注射器で水疱液を無菌的に採取し、0.5ml の希釈液（10%ウシ胎児血清、5%ショ糖、100 μ g/ml のカナマイシンを含む PBS）が入ったチューブに注射器の内容を移し入れる。直ちに組織培養に接種しない場合は -80°C に保存しておく。
- (2) ウイルス分離結果が陰性でも、検査材料の一部を用いて PCR を行うと陽性となることがある。PCR を行うときは、水疱内容液、髄液は遠心した沈渣を材料とする（p.11）。
血液の場合は 2ml 程度を EDTA 採血し、リンパ球を分離して検体とする。痂皮は剥離したもの数 mg をマイクロチューブに入れて室温で輸送する。
- (3) 免疫蛍光試験は、水疱内容の感染細胞を 1ml の注射器または綿棒を用いて十分量採取する。直ちに塗抹標本を作り固定する。
- (4) 血清学的検査のための血清は、発病後 5 日以内の急性期と 2 週以後の回復期にペアで採血することが望ましい。血清を分離して検査まで -20°C に保管する。

2. 検査材料の輸送

- (1) ウイルス分離用、PCR 用の検体は二次容器に入れて -80°C に保管する。
検体を輸送する際は、郵政省告示第 618 号（平成 9 年 12 月 4 日）に基づいて行う。検体が入ったプラスチックチューブを、吸収性の材料を詰めた二次容器（金属缶またはプラスチック筒）に入れる。これをドライアイスの入った外部容器（発泡スチロール箱 など）に入れ感染性物質であることを表示して輸送する。
- (2) 血液は採血後速やかに保冷剤入りの容器に入れて検査室に運び、当日のうちに前処理を行う。血清反応用の血清は -20°C に保管し、ドライアイス凍結で輸送する。

3. 検査の進め方

図 1 のように検査を進める。目的によって適切な方法を選択して検査する。
抗体の検出法（文献 1）は ELISA と中和試験のみ記載した。

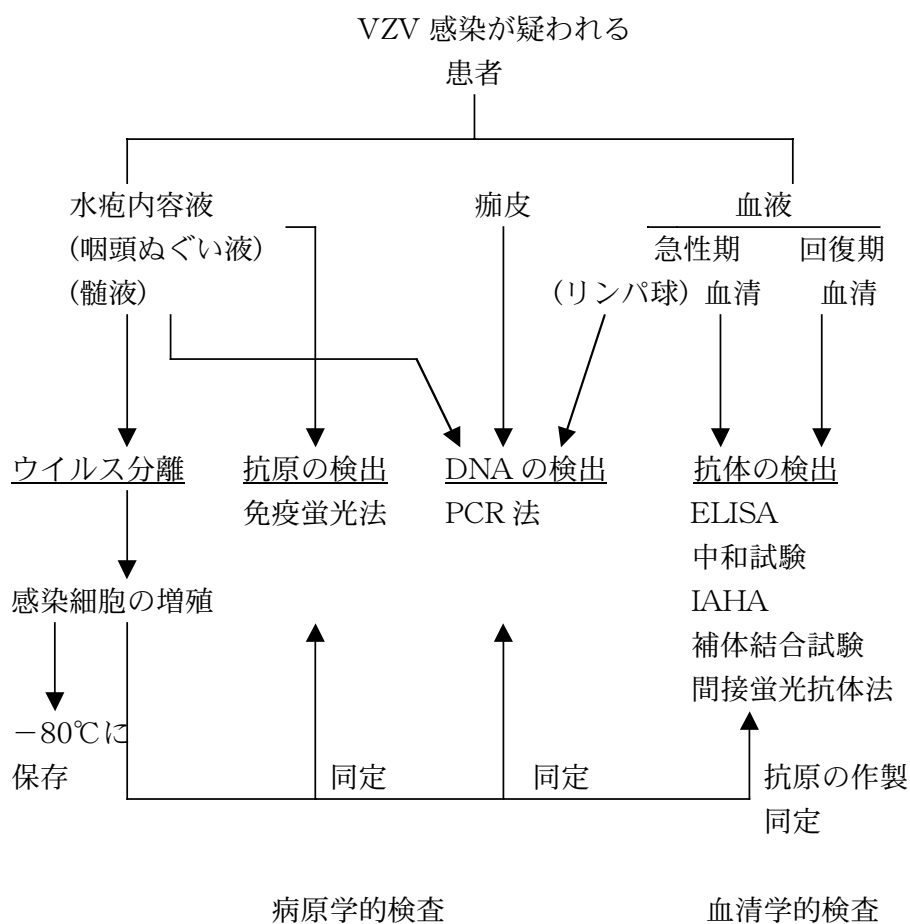


図 1 水痘・带状疱疹ウイルスの検査の進め方

注；（ ）内の材料は検出率が低い

〔3〕 検査方法

1. ウイルスの分離

(1) ウイルス分離法

VZV の分離は、水疱内容液、咽頭ぬぐい液、末梢血リンパ球、髄液などの検体から行う。水疱液からは高率に分離できるが、その他の検体からの分離率は低い。材料をヒト二倍体細胞（HEL 細胞または MRC5 細胞）に接種し、特徴的な細胞変性効果（cytopathic effect, CPE）の出現で判定する。感染細胞から PCR 法により VZV 特異的 DNA を検出するか、抗 VZV モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法で同定する。

1) 試薬・機材

- ・ 5%CO₂ 培養器 (37℃)
- ・ 培養用プラスチックフラスコ(25 cm²)
- ・ Eagle's MEM (pH7.2)
- ・ ウシ胎児血清 (FBS、56℃30 分間非働化したもの)
- ・ 0.25%トリプシン溶液
- ・ 細胞凍結保存液(市販のもの、または 10%FBS、10%DMSO 含有 MEM)

2) 培養液の調整

Eagle's MEM に L-グルタミンと炭酸水素ナトリウムを指示どおりに加え pH を 7.2 前後に調整する。FBS を細胞増殖用培養液には 10%、細胞維持用培養液には 2% になるように加える。

3) 方法

- ① HEL 細胞または MRC5 細胞を、1 日後に単層培養が形成されるように細胞数を調整し、増殖用培養液を入れた培養用プラスチックフラスコに入れて 37℃の培養器で培養する。
- ② 1 日後フラスコの培養液を除去し、0.2 ～ 0.5ml の検体を維持培養液で 2 倍に希釈して接種する。
- ③ 培養器内で 1 時間吸着させる。

- ④ 維持培養液を加えて 37℃ の 5%CO₂ 培養器内で培養しながら、細胞変性効果 (CPE) を観察する。
- ⑤ CPE は 3 日から 7 日位で出現する。感染細胞の円形化、膨大化などがみられる (文献 1)。CPE が出現しない場合でも 7 日目毎に新しい維持培養液に換えて、さらに 2 週間観察を続ける。
- ⑥ CPE が拡大したら、感染細胞をトリプシン処理してフラスコから剥がし、一部を細胞凍結保存液に浮遊させて -80℃ に保存する。
- ⑦ 残りの感染細胞は PCR-RFLP 法 (p.13) または免疫蛍光染色により同定する。免疫蛍光染色による場合は、トリプシンで分散した感染細胞を 10%FBS 含有 MEM に浮遊させマルチウェルスライドガラスのウェル内に滴下する。37℃ の 5%CO₂ 培養器内に 2 時間位静置して細胞がスライドガラス面に付着したら、アセトン固定し染色をする (p.7)。

4) ウイルスの継代

VZV は細胞から細胞へと感染し、培養液上清に感染性ウイルスはほとんど認められない。通常は感染細胞の状態で継代をする。感染細胞をトリプシンで分散し、正常培養細胞へ感染させて継代する。

(2) ウイルス感染価測定法

中和試験の抗原 (p.9) などに用いる細胞遊離ウイルスの感染価は次のように測定する。

- 1) HEL 細胞または MRC5 細胞を 6 well (35mm 径) の組織培養用プレートに分注する (4×10^5 cells/well)。
- 2) 37℃ の 5%CO₂ 培養器内で 1 日培養する。
- 3) 細胞を単層培養したプレートから培養液を除去し、10 倍階段希釈をしたウイルス液を 100 μ l ずつ接種する。
- 4) 37℃ の 5%CO₂ 培養器内で 90 分間吸着させる。
- 5) 1%メチルセルロース、2% FBS 含有 Eagle's MEM を加える (2ml/well)。
- 6) 37℃ の 5%CO₂ 培養器内で 6 日間培養する。
- 7) 6 日目に培養液を除去し、細胞を染色液 (1%ホルマリン、0.1%メチレンブルー水溶液) で固定、染色する (2ml/well)。
- 8) 約 2 時間染色した後水洗し、低倍率顕微鏡下でフォーカスを計数して感染価を算定する (文献 2)。

2. 抗原検出

(1) 免疫蛍光法

水疱内のウイルス感染細胞を検体として、直接蛍光抗体法で VZV 抗原を検出する。FITC 標識抗 VZV モノクローナル抗体が市販されている（デンカ生研など）。信頼できる判定をするには、十分量の細胞数（100 位、文献 3）を採取することが重要である。

1) 試薬・機材

- ・マルチウェルスライドグラス
- ・アセトン
- ・FITC 標識抗 VZV モノクローナル抗体
- ・PBS(-)
- ・封入液（無蛍光グリセリン 9 : PBS(-)1）
- ・落射型蛍光顕微鏡

2) 方法

- ① 水疱液の内容を 1ml の注射器で採取し、マルチウェルスライドグラスに塗抹する。または水疱を覆っている上皮を剥がし、PBS で湿らせた滅菌綿棒で病巣基底部分を拭って水疱内の剥離感染細胞をスライドグラスのウェル内に塗抹する。
- ② 冷風で十分に乾燥させる。
- ③ 冷アセトンに 10 分間浸して固定する。
- ④ FITC 標識抗 VZV モノクローナル抗体液 30 μ l を検体を塗抹したウェル上にのせる。
- ⑤ スライドグラスを湿潤箱に入れ 37℃ で 20 分間反応させる。乾燥させないように注意する。
- ⑥ 洗浄瓶またはシャーレ中で PBS に 2 回、DW₂ に 1 回、静かに浸して検体がはがれないよう注意しながら洗う。
- ⑦ 冷風で乾燥後、封入液を滴下してカバースリップをのせ蛍光顕微鏡で観察する。
- ⑧ VZV 感染細胞は緑色の特異蛍光を発する（文献 1）。偽陽性反応に注意して判定をする。対照として FITC 標識抗 HSV モノクローナル抗体による染色を行うことが望ましい。同時に、VZV 感染培養細胞、HSV-1, -2 感染培養細胞、非感染培養細胞を加える。

3. 抗体検出

(1) 酵素抗体法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

VZV 抗原は部分精製抗原 (文献 4、市販品もある)、または精製糖蛋白抗原 (文献 5) を用いる。ウイルスを感染させない細胞から作製した対照抗原を同時に準備する。精製糖蛋白抗原は特異性も感度も高い。また VZV IgG-ELISA 抗体、IgM-ELISA 抗体を測定するためのキットが市販されている (デンカ生研、デイドベーリング社など)。

1) 試薬・機材

- ・ ELISA 用プレート
- ・ Coating buffer (炭酸—炭酸水素緩衝液, pH9.6)

Na ₂ CO ₃	1.59g
NaHCO ₃	2.93g
H ₂ O を加えて 1,000ml にする	
- ・ 洗浄バッファー (0.05%Tween-20 含有 PBS)
- ・ 抗原
- ・ 希釈緩衝液 (1%BSA, 0.05%Tween-20 含有 PBS)
- ・ 標準抗体
- ・ 酵素標識抗体 (HRP 標識抗ヒト IgG 抗体または IgM 抗体)
- ・ 基質溶液 (TMB 液、TMB は錠剤が市販されている)

TMB	1 mg/1 錠(シグマ)
0.05M クエン酸リン酸緩衝液, pH5.0	10ml
30% H ₂ O ₂	2 μ l
- ・ 酵素反応停止液 (1N 硫酸液)
- ・ プレートウォッシャー
- ・ マイクロプレートリーダー

2) 検査方法

- ① Coating buffer で至適濃度に希釈した抗原をプレートに分注する (100 μ l/well)。

検体の各血清希釈につきウイルス抗原と非感染対照抗原を 2 well ずつ用意する。陽性血清対照、陰性血清対照および試薬のブランク

を設定する。

- ② プレートカバーをして 4℃に一夜おく(37℃2 時間でも可)。
- ③ プレートを洗浄バッファーで 3~4 回洗浄する。
- ④ 希釈緩衝液で 100 倍に希釈 (IgM 抗体を測定する場合は 50 倍に希釈)
した被検血清を 100 μ l ずつ入れる。同じプレートに至適濃度に希釈した陽性対照血清と 100 倍に希釈した陰性対照血清を 100 μ l ずつ入れる。
ブランクには希釈緩衝液を 100 μ l 入れる。
- ⑤ プレートカバーをして 37℃に 60 分間おく。
- ⑥ 洗浄バッファーで 3~4 回洗浄する。
- ⑦ HRP を標識した抗ヒト IgG 抗体 (IgM 抗体を測定する場合は抗ヒト IgM 抗体)を 100 μ l ずつ入れる。
- ⑧ プレートカバーをして 37℃に 60 分間おく。
- ⑨ 洗浄バッファーで 3~4 回洗浄する。
- ⑩ TMB 基質液を 100 μ l ずつ入れる。
- ⑪ 遮光して室温に 30 分間おく。
- ⑫ 反応停止液を 100 μ l ずつ加える。
- ⑬ 吸光度を測定する(450nm)。

3) 結果の判定

ウイルス抗原の吸光度から非感染対照抗原の吸光度を引いた値が 0.2 以上を示した検体を陽性と判定し、0.1 以下の検体を陰性と判定する。0.1~0.2 の間は境界値として再検査をする。急性期血清がすでに VZV IgG 抗体陽性の場合は、ペア血清で IgG 抗体が上昇しても、HSV 感染に対する交差反応の可能性があるので、同時に HSV に対する抗体も測定することが望ましい。VZV 特異 IgM 抗体の上昇が認められれば、最近の VZV 感染と判定できる。

(2) 中和試験法

1) 中和試験用抗原の作製 (文献 6)

- ① 75 cm²の培養用プラスチックフラスコに HEL 細胞または MRC5 細胞を培養する。
- ② 1~2 日後単層培養が形成された細胞に、予め用意した VZV 感染細胞を、感染細胞対正常細胞の比が 1:10 になるような濃度で接種する。

- ③ 37℃の 5%CO₂ 培養器内で 2 日間培養し、70~90%の細胞が CPE を示したとき、細胞を PBS(-)で 2 回洗浄し、ラバーポリスマンで回収する。
- ④ フラスコ 1 本あたりの感染細胞を 3 ml のウイルス希釈液 (10%ウシ胎児血清、5%ショ糖、100 μg/ml カナマイシンを含む PBS(-))に浮遊させ 60 秒間超音波処理をする。
- ⑤ 3,000rpm (1,300G) で 30 分間遠心し(4℃)、上清を採取して抗原とする。少量ずつチューブに分注し-80℃に保存しておく。
- ⑥ 抗原の一部を希釈してウイルス感染価を測定しておく(p. 6)。

2) 中和試験

- ① 4 倍に希釈した被検血清を 56℃で 30 分間非働化する。
- ② 被検血清を希釈液で 4 倍階段希釈する。
- ③ 200 μl 中に 400PFU を含むウイルス液と希釈被検血清を等量混合し、37℃60 分間中和反応を行う。ウイルス対照として血清の代わりに希釈液を用いて同様に処理する。
- ④ 6 well の組織培養用プレートに単層培養した細胞上に、中和反応を終えた血清ウイルス混合液を 100 μl ずつ接種し、37℃の 5%CO₂ 培養器内で 90 分間ウイルスを吸着させる。
- ⑤ 1%メチルセルロース、2%FBS 含有 Eagle's MEM を加え (2ml/well) 37℃の 5%CO₂ 培養器内で 6 日間培養する。
- ⑥ 6 日目に培養液を除去し、1%ホルマリン、0.1%メチレンブルー水溶液で固定、染色する。
- ⑦ 低倍率顕微鏡下でフォーカスを計数し、平均フォーカス数がウイルス対照に比べて 50%以上の減少を示す最高の血清希釈倍数で表す。

4. ウイルス遺伝子の検出

(1) ポリメラーゼ連鎖反応法 (Polymerase chain reaction, PCR)

1) 試薬・機材

- ・ InstaGene Matrix (日本バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社)
- ・ Taq polymerase (TaKaRa Taq)
- ・ 10×PCR Buffer (TaKaRa Taq に添付)
- ・ dNTP (2.5mM each, TaKaRa Taq に添付)

- ・プライマー対
- ・エチジウムブロマイド溶液（TAE Buffer 200ml に 10mg/ml のエチジウムブロマイドを 10 μ l 入れる）
- ・NuSieve 3:1 アガロース
- ・DNA サイズマーカー（100bp ラダー、TaKaRa など）
- ・5×Loading Buffer

25% Glycerol

25mM EDTA

0.025% Bromophenol Blue

0.025% Xylene Cyanol

- ・電気泳動 Buffer（市販の 10×TAE Buffer を希釈して用いる）
- ・ミニゲル電気泳動装置
- ・PCR 装置（Perkin Elmer 社、他）
- ・UV トランスイルミネーター
- ・ポラロイドフィルム

2) DNA の抽出

ウイルス DNA の抽出はフェノール/クロロフォルムを用いる方法と、市販の DNA 抽出キットを用いる方法等がある。ここでは市販の InstaGene Matrix を使用する方法を述べる。添付マニュアルを少し変更した。

- ① VZV 感染が疑われる患者の水疱内容液 0.5ml（髄液の場合は 1ml）をマイクロチューブに入れ 12,000rpm で 5 分間遠心する。
痂皮の場合は 1~2mg を使用する。
感染培養細胞は、20 μ l あたりの細胞数が 100 以上になるように調製する。
血液の場合は、EDTA 採血をした血液 2ml を PBS で 2 倍に希釈し、Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech) 3ml に積層して 30 分間遠心する (400×g)。リンパ球層をとり PBS で 2 回洗った後 DNA 抽出をする。
- ② 上清を除去し、沈渣を 20 μ l の PBS(−)で再懸濁させる。
- ③ 新しいマイクロチューブに InstaGene Matrix 200 μ l を入れ、再懸濁液の全量を加える。
- ④ 56℃に 20 分間(痂皮検体は 60 分間位)おく。
- ⑤ ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌後、100℃に 8 分間おく。

- ⑥ ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌後、12,000rpm で 2 分間遠心する。
- ⑦ 上清をとり 20 μ l (痂皮検体は 2 μ l) をテンプレートとして PCR に使用する。残りの上清は -20°C に保存する。

3) プライマーの設定

プライマーは表 1 に示した。検査の目的に合ったプライマー対を選ぶ。検体が VZV であることを同定する目的なら ORF38-PCR でよい。これで DNA が検出されなければ ORF38-nested PCR を行う。分離株を識別する手段としては R2 プライマーを用いる。水痘ワクチン岡株の同定には ORF62-PCR を行う。

4) ORF38-PCR

- ① PCR 用チューブに、以下の各試薬を加え、全量を 50 μ l とする。
プライマーは表 1 に示した (HVZV1、HVZV2)。

PCR Mixture

10×PCR Buffer	5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μ l
プライマー1 (25 μ M)	1 μ l
プライマー2 (25 μ M)	1 μ l
TaKaRa Taq (5 U/ μ l)	0.3 μ l
DW ₂	18.7 μ l
テンプレート DNA	20 μ l

- ② チューブを軽く遠心し、液体をチューブの底部に集める。
- ③ Thermal Cycler で以下の温度条件で PCR を行う。

94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分	}	1 回
94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分 (Denaturation)		
55 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分 (Annealing)		35 回
72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分 (Extension)		
72 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分 (Complete Extension)		1 回
4 $^{\circ}\text{C}$ hold		

- ④ 反応産生物の一部（2~5 μ l）に 1/4 量の 5×Loading Buffer を加え、3%NuSieve3:1 アガロースゲルで電気泳動を行う。
- ⑤ エチジウムブロマイド溶液中で約 20 分間染色後、蒸留水中に数分間浸す。
- ⑥ トランスイルミネーター上で UV 照射し写真撮影をする。
- ⑦ 642bp の DNA 断片の増幅が認められた場合、VZV 陽性と判定する。
VZV 特異的 DNA 断片であることを確認するためには、増幅産物を *Pst*I による RFLP 分析または nested PCR を行う（図 2）。
DNA の増幅が認められなかった場合は、1st PCR 産物の一部をテンプレートとして nested PCR を行う。

5) ORF38-nested PCR

- ① PCR 用チューブに、PCR Mixture を作り全量を 50 μ l とする。
プライマーは Table1 に示したもの（VZ38in1、VZ38in2）を使う。
テンプレート DNA として 1st PCR 産物の 2~5 μ l を用いる以外は ORF38-PCR と同じである。
- ② PCR の温度条件は 1st PCR と同じ設定で行う。
- ③ PCR 産物の電気泳動と染色は 1st PCR と同様に行う。
- ④ UV 照射で写真撮影をして、498bp の DNA 断片の増幅が認められれば VZV であることが確定できる（図 2）。

5. PCR-RFLP（Restriction fragment length polymorphism）法

VZV の感染経路を追求したり、水痘ワクチン株と野生株の異同の判定をする必要がある場合には、VZV のゲノム型を調べる。

(1) 分離株の識別

分離株を識別するマーカーには、標準株（Dumas 株）と比較して制限酵素切断部位の獲得(+)または欠如(-)により区別する方法と、ゲノム DNA の反復配列を含む領域の長さが分離株により異なることを利用する方法とがある。前者の変異部位には ORF38 の *Pst*I 切断点、ORF13 の *Ban*III 切断点などがある(文献 8)。後者では、R2、R4、R5 反復配列部の反復回数を調べる方法がある。ここでは *Pst*I 切断点の有無を調べる方法と、R2 領域を増幅する方法（文献 9）を述べる。

1) ORF38-PCR 産物の *Pst*I による RFLP

VZV ORF38-PCR または nested PCR で増幅された DNA 断片には、*Pst*I 制限酵素切断点変異領域が含まれているので、増幅産物を RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 解析することにより VZV 分離株を 2 群に分別できる。水痘生ワクチン岡株は *Pst*I 切断点(−)の少数群に属する。多くの分離株が切断点(+)であり、この切断像を比較することでワクチン株との識別ができることが多い (図 2)。

- ① チューブに下記の Digestion Mixture を作る。DNA は ORF38-PCR 産物、または ORF38-nested PCR 産物のどちらでもよい。

Digestion Mixture

10×digestion buffer	1 μ l
DW ₂	7 μ l
<i>Pst</i> I (10u/ μ l)	1 μ l
DNA	1~2 μ l

- ② 37℃で 2 時間消化する。
- ③ 2 倍量の冷エタノールを加えて DNA を沈澱させる。
- ④ 15,000rpm で 10 分間遠心し上清を除去する。
- ⑤ 沈渣を吸引デシケーター内で乾燥させる。
- ⑥ TE Buffer 5 μ l と 1/4 量の 5×Loading Buffer を加えて溶解し、3%NuSieve3:1 アガロースゲルで電気泳動をする。
- ⑦ エチジウムブロマイド液中で約 20 分間染色をし、蒸留水中で数分間脱色をする。
- ⑧ トランスイルミネーター上で UV 照射し写真撮影をする。
- ⑨ 消化をしない対照と同じ単一のバンドの泳動像なら切断点(−)で、2 本の断片に分かれていれば切断点(+)である。

2) R2 反復配列部の PCR

R2 反復配列 (ORF14) では、42bp の単位が分離株によって 4~12 回位繰り返されている。表 1 に記したプライマーを使用して PCR を行う。R2-PCR で増幅された産物のサイズを、42bp×n+147 により確認して R2 反復数を算出する (図 3)。

- ① PCR 用チューブに下記の PCR Mixture(全量 50 μ l)を作る。プライマーは表 1 に示した (R2F、R2R)。

PCR Mixture

2×GC Buffer II	25 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	8 μ l
プライマー1 (25 μ M)	1 μ l
プライマー2 (25 μ M)	1 μ l
Takara LA Taq (5u/ μ l)	0.5 μ l
DW ₂	4.5 μ l
テンプレート DNA	10 μ l

- ②チューブを軽く遠心し、液体をチューブの底部に集める。
③Thermal Cycler で以下の温度条件で PCR を行う。

94℃、1 分	1 回
94℃、30 秒 (Denaturation)	30 回
60℃、30 秒 (Annealing)	
72℃、90 秒 (Extension)	
72℃、10 分 (Complete Extension)	1 回
4℃ hold	

- ④ 反応産物の一部 (5~10 μ l) に 1/4 量の 5×Loading Buffer を加え、3%NuSieve3:1 アガロースゲルで電気泳動を行う。
⑤ エチジウムブロマイド溶液中で約 20 分間染色後、蒸留水中に数分間浸す。
⑥ トランスイルミネーター上で UV 照射し写真撮影をする。
⑦ バンドのサイズを確認して R2 の反復回数を算出する。

(2) ワクチン株の同定

ORF38-PCR 産物の *Pst*I 切断点が(－)の場合には、ORF62-PCR を行って *Sma*I 切断点を調べる。増幅産物を *Sma*I で切断すると、岡親株と他の野生分離株の切断点は 2 か所で、岡ワクチン株のみ 3 か所の切断点があるので確実に識別ができる。対照としてワクチン株を同時に増幅し、切断像を比較する(図 3)。

1) ORF62-PCR と PCR 産物の *Sma*I による RFLP

- ① PCR 用チューブに下記の PCR Mixture(全量 50 μ l)を作る。プライマーは表 1 に示した (PKVL6U、PKVL1L)。

PCR Mixture

10×Buffer	5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	6 μ l
プライマー1 (25 μ M)	1 μ l
プライマー2 (25 μ M)	1 μ l
Takara EX Taq (5u/ μ l)	0.5 μ l
DW ₂	26.5 μ l
テンプレート DNA	10 μ l

- ②チューブを軽く遠心し、液体をチューブの底部に集める。
③Thermal Cycler で以下の温度条件で PCR を行う。

94℃、1 分	}	1 回
94℃、1 分 (Denaturation)		
72℃、1 分 (Annealing & Extension)		30 回
72℃、3 分 (Complete Extension)		1 回
4℃ hold		

- ④ 反応産物の一部 (2~5 μ l) に 1/4 量の 5×Loading Buffer を加え、4%NuSieve3:1 アガロースゲルで電気泳動を行う。
⑤ エチジウムブロマイド溶液中で約 20 分間染色後、蒸留水中に数分間浸す。
⑥ トランスイルミネーター上で UV 照射し写真撮影をする。
⑦ 268bp の DNA 断片の増幅を確認する。
⑧ PCR 増幅産物の 2~5 μ l をとり、前記 (p.14)と同様に *Sma*I による Digestion Mixture を作る。
⑨ 30℃(添付書に従う)で 2 時間消化する。
⑩ 前記と同様に、エタノール沈澱、乾燥の後、4%NuSieve3:1 アガロースゲルで電気泳動をする。
⑪ 染色後写真撮影をし、岡ワクチン株の切断像と比較して判定する。
岡ワクチン株 DNA は 4 本の断片を、他の野生株は 3 本の断片を生じる。

[4] 判定基準

次のいずれかにあてはまれば、VZV 感染とする。

1. VZV が分離される。
2. PCR 法により VZV 遺伝子が検出される。
3. 水疱内容液から抗 VZV モノクローナル抗体による免疫蛍光法で VZV 抗原が証明される。
4. 血清中に VZV 特異的 IgM 抗体が検出される。(ただし急性期と回復期のペア血清で IgM 抗体の有意な上昇を確認することが望ましい)
5. 急性期と回復期のペア血清で、IgG 抗体の 4 倍以上の上昇が認められる。ただしこの場合には HSV 感染である可能性もあるので、注意して鑑別診断をする。

[5] 引用文献

1. 本藤 良、高山道子：水痘・带状疱疹ウイルス. 微生物検査必携；ウイルス・クラミジア・リケッチア検査, 第3版 日本公衆衛生協会：38-56. 1987.
2. Takayama,M., and Oya,A. : A single serum dilution method for the quantitation of neutralizing antibodies to varicella-zoster virus. *Biken J.* 24:109-118,1981.
3. Dahl,H., Marcoccia,J., and Linde,A. : Antigen detection: the method of choice in comparison with virus isolation and serology for laboratory diagnosis of herpes zoster in human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Clin. Microbiol.* 35: 347-349. 1997.
4. Takayama,M. : Reactivity of varicella-zoster virus subunit antigens in enzyme-linked immunosorbent assay to sera from varicella, zoster, and herpes simplex virus infections. *Med. Microbiol. Immunol.* 183: 1-11. 1994.
5. Wasmuth E.H, and Miller,W.J. : Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for antibody to varicella-zoster virus using purified VZV glycoprotein antigen. *J Med Virol.* 32:189-193. 1990.
6. 高山道子、大谷 明：水痘ウイルス中和試験用抗原調整方法と中和試験への影響. *臨床検査* 26: 1525-1528. 1982.
7. 本藤 良、井上 栄、大沢 忍、伊東佑英：水痘・带状疱疹ウイルスーPCR法によるDNA診断と分子疫学的解析ー. *蛋白質 核酸 酵素.* 35: 3034-3040. 1990.
8. Takayama,M., Takayama,N., Inoue,N., and Kameoka,Y. : Application of long PCR method to identification of variations in nucleotide sequences among varicella-zoster virus isolates. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2869-2874. 1996.
9. 高山道子、高山直秀：水痘および带状疱疹患者由来臨床検体からの水痘・带状疱疹ウイルス長鎖DNAの増幅. *感染症誌.* 76 (5): 347-354. 2002.
10. Loparev,V.N., Argaw,T., Krause,P.R., Takayama,M.,and Schmid,D.S. : Improved identification and differentiation of varicella-zoster virus (VZV) wild-type strains and attenuated varicella vaccine strain using a VZV open reading frame 62-based PCR. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3156-3160, 2000.

[6] 検査依頼先

全地研が対象となる。

[7] 執筆者一覧

高山道子

国立感染症研究所ウイルス第一部

勢戸祥介

大阪市立環境科学研究所微生物保健課

[8] 図表

表 1. VZV PCR primers

Region	Primer	Primer sequence (5' to 3')	Size of product	References
ORF38	HVZV1	TTC AGC CAA CGT GCC AAT AAA	642bp	(7)
	HVZV2	GAC GCG CTT AAC GGA AGT AAC		
ORF38	VZ38in1	CTT GAT CCG TGT CAT CAT CAC	498bp	
	VZ38in2	CTG ATG TGG TTA CGG AAG ACG		
ORF14	R2F	ATG GAT TGT ATT CCG CCG TGA ACG C	42bp×n+147	(9)
	R2R	CTG AAT CTC AAC CCA CAC CCG TAA G		
ORF62	PKVL6U	TTC CCA CCG CGG CAC AAA CA	268bp	(10)
	PKVL1L	GGT TGC TGG TGT TGG ACG CG		

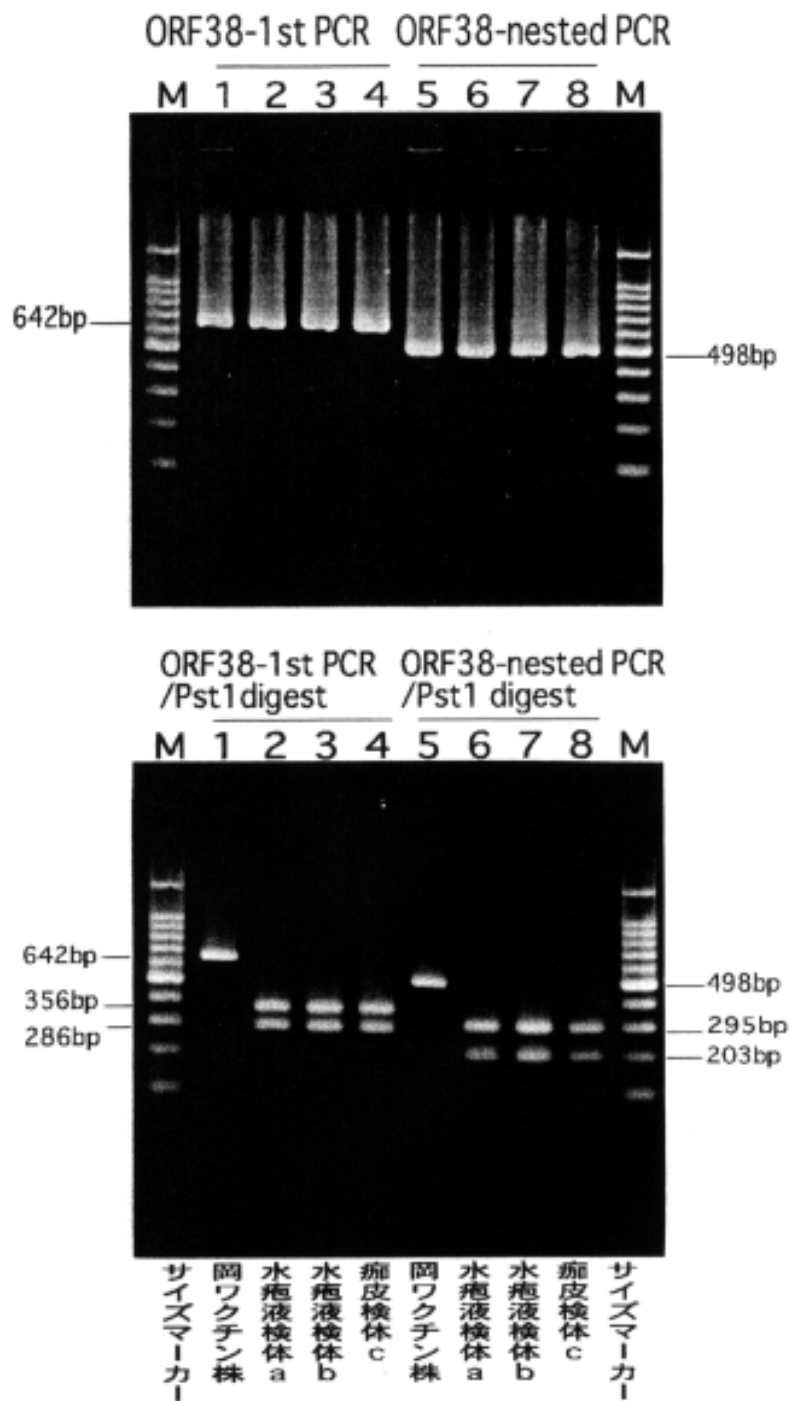


図2. ORF38-PCRによるVZV DNAの検出とPst1によるRFLP解析

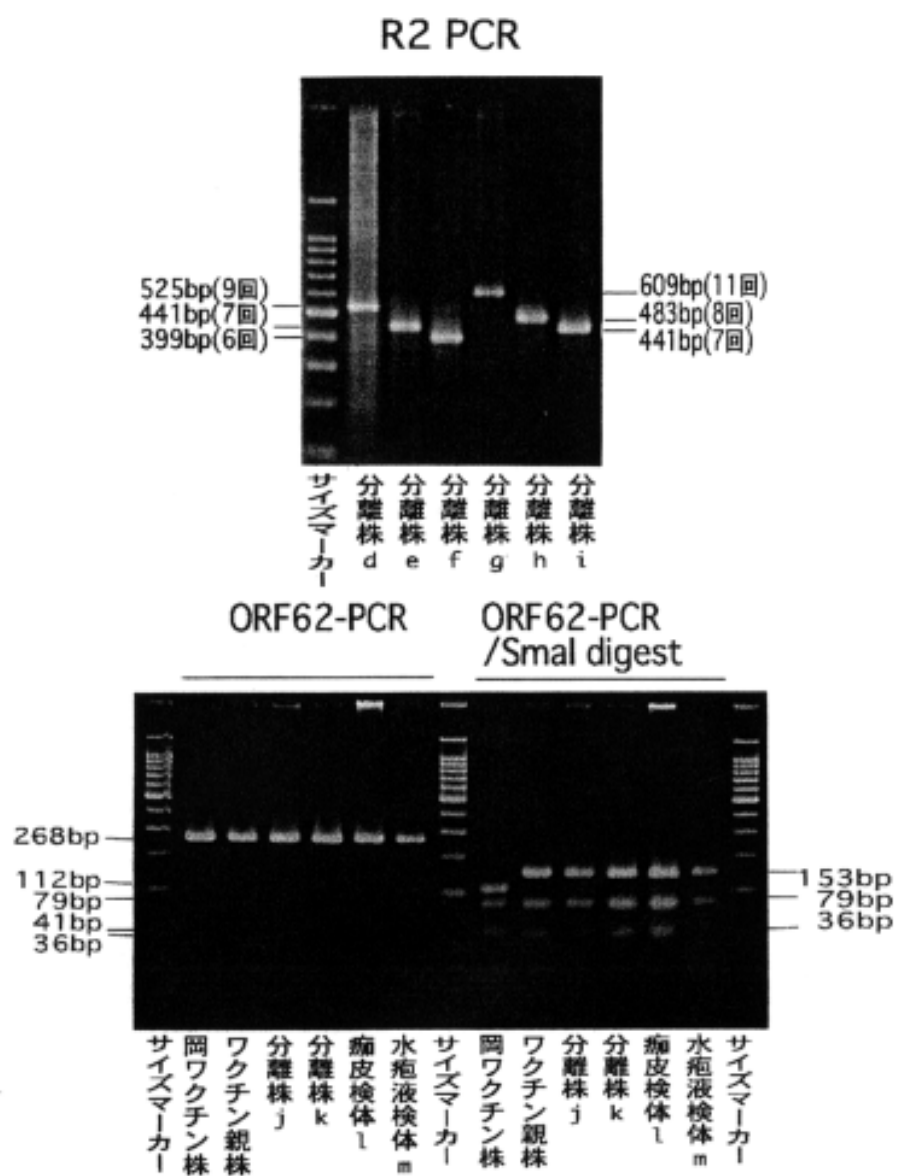


図3. R2反復配列部のPCRとORF62-PCR産物のSmaIによるRFLP解析

ヘルパンギーナ

目 次

(1) 疾患の概説

(2) 検査に関する一般的注意

検査材料の採取

検査材料の輸送

作業上の注意

検査の進め方

検査の判定

(3) 検査方法

1) 細胞培養によるウイルス分離

2) 中和法によるウイルス同定 (細胞培養)

3) 乳のみマウスによるウイルス分離

4) 中和法によるウイルス同定 (乳のみマウス)

5) 補体結合反応によるウイルス同定

6) 中和抗体価の測定

7) RT-PCR による遺伝子検出と塩基配列の解析

(4) 引用文献

(5) 検査依頼先

(6) 執筆者

(1) 疾患の概説

ヘルパンギーナ(herpangina)は、発熱と口腔粘膜にあらわれる小水疱性発疹を特徴とするエンテロウイルス感染症で、日本では毎年夏季を中心に流行する疾患であるが、秋～冬季にも発生が認められる。病原微生物検出情報によると、日本のヘルパンギーナ患者から多く分離されているエンテロウイルスは、順にコクサッキーA4 (CA4)、CA10、CA6、CA2、CA5 で、ウイルス分離率では、この 5 種類のウイルスが全体の約 80%をしめている。流行する血清型は、通常年ごとに異なる。ヘルパンギーナは、発疹・発熱を主徴とし、一般的に予後は良好であるが、まれに無菌性髄膜炎、急性心筋炎等の合併症を伴うことがある。他のエンテロウイルス感染症と同様に、主要な感染経路は経口飛沫感染であり、患者の年齢は 4 才以下が多い。ワクチン、抗ウイルス剤等、ヘルパンギーナに対する積極的な予防治療法は、いまのところ存在しない。現在の感染症法では、ヘルパンギーナは 4 類感染症定点把握疾患に分類されており、全国の小児科定点より毎週患者数が報告されている。

(2) 検査に関する一般的注意

検査材料の採取

ウイルス分離のための検体として、糞便、口腔・咽頭拭い液、水疱内容物等が挙げられる。口腔・咽頭拭い液を採取した滅菌綿棒は、乾燥を避けるため、Veal Infusion Broth、細胞培養用培地等適切な保存液中に入れておく。臨床検体から直接ウイルス遺伝子検査を行う場合の検体採取は、ウイルス分離用の検体採取に準じて行う。検査をより正確で効果あるものにするために検体は発症後できるだけ早く採取し、速やかに検査に供する。すぐに検査に供しない場合は、凍結保存する。血清学的検査のためには、発症後早期に採取した急性期血清と発症後 2 週間以上経過した回復期の血清を採取する。

検査材料の輸送

ウイルス材料の保管・輸送中の凍結、融解の繰り返しはウイルス力価が低下するので避けなければならない。 -20°C での保管・輸送が確保できなければ、 $0\sim 8^{\circ}\text{C}$ で保管・輸送する。輸送にあたっては冷却が保たれる状態で包装し、検体番号、発病日、検体採取日等、必要事項を明記したうえ送付する。送付先にはあらかじめ検体数、搬入予定などを連絡しておく。

作業上の注意

糞便、口腔・咽頭拭い液、血液等臨床検体の取り扱いは、バイオセーフティーに十分留意した上で行う。検体の処理、ウイルス分離及び同定の作業には、クラス 2 の安全キャビネットを使用する。ポリオワクチン未接種者、ポリオ中和抗体陰性者は、ワクチン接種を受けておく。

検査の進め方

エンテロウイルス感染症の確定診断は、基本的には、糞便、口腔・咽頭拭い液等適切な臨床検体からのウイルス分離同定により行う。しかし、ヘルパンギーナの主要な起因ウイルスであるコクサッキーA 群ウイルスの細胞培養によるウイルス分離率は、おおむね低い。ウイルス分離率を上げるため、乳のみマウスを用いたウイルス分離が行なわれる。細胞培養により分離されたエンテロウイルスは、コクサッキーA ウイルス特異的中和抗血清により同定される。乳のみマウスにより分離されたウイルスは、乳のみマウスを用いた中和法、補体結合法(CF 法)等により同定されるが、検査の迅速化・簡便化のため、RT-PCR によるエンテロウイルス遺伝子の検出・解析も行なわれている。しかし今のところ、エンテロウイルス遺伝子検査は標準化されておらず、検査の目的により、適切な方法を使い分ける必要がある。

ウイルス分離が出来なかった場合、発症期にウイルス分離用の適切な検体が得られなかった場合、エンテロウイルス感染の間接的な証明として血清学的診断法が行なわれる。通常、急性期と回復期の血清を比較して 4 倍以上の抗体価の上昇があれば、ウイルス感染の証明とされるが、エンテロウイルス感染には不顕性感染も多いので、検査結果の解釈には注意が必要である。

検査の判定

臨床検体から、とくに口腔・咽頭拭い液、水疱内容物からウイルスが分離された場合は起因ウイルスである可能性が高い。ウイルス分離を行うことが出来ない場合、あるいはウイルスが分離されなかった場合は、ウイルス感染の間接的な証明として血清学的診断法を用いることが出来る。また、分離が困難なエンテロウイルスの同定には、RT-PCR 等ウイルス遺伝子検査が有用な場合もある。エンテロウイルスはしばしば不顕性感染を起こすので、臨床経過や疫学的情報を総合的に判断して、ウイルス実験室診断結果の意義を慎重に解釈するべきである。

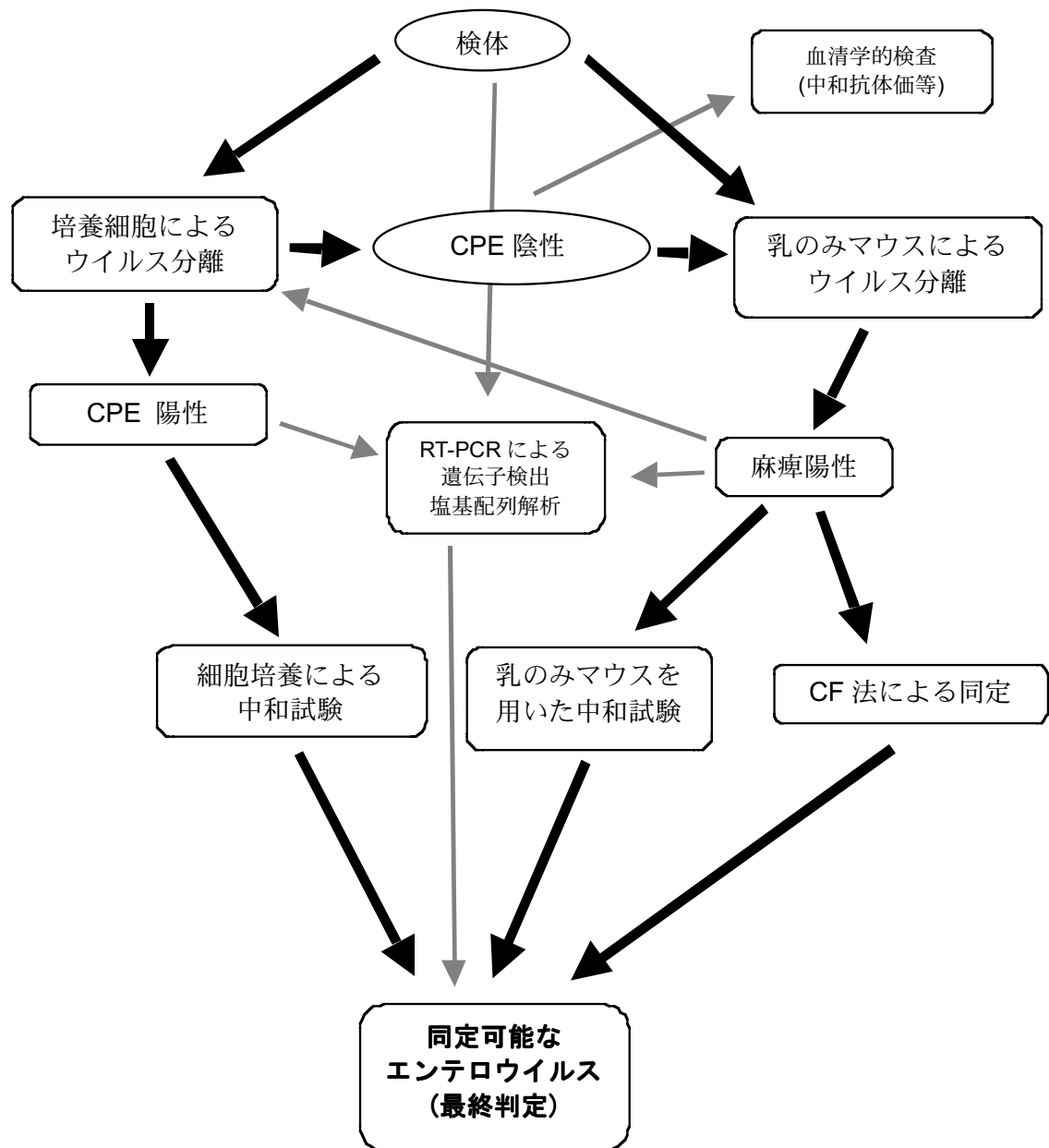


図 1. 検査の進め方 (ヘルパンギーナ)



通常行なわれる実験室検査



補助的に用いられる実験室検査

(3) 検査方法

1. 細胞培養によるウイルス分離

ヘルパンギーナの主要な起因ウイルスは、コクサッキーA 群ウイルスであり、ウイルス分離培養には RD-18S 細胞等が用いられるものの、乳のみマウスと比較すると分離率はかなり低くなる。また、コクサッキーB 群ウイルスやアデノウイルスによる場合も考えられるので HeLa 細胞と Vero 細胞などを併用する事が望ましい。細胞は、継代培養によるウイルス感受性の変化を極力抑制するために、凍結保存し、出来るだけ同じ継代数の細胞を使用するのが望ましい。通常、ウイルス分離には 1 週間以上を必要とし中和のための感染価を得るためには継代培養が必要となる。細胞培養に用いる器具・試薬等は、実験室及び使用する細胞により多少異なるが、以下によく用いられる試薬及び代表的な細胞培養用培地の調整法について述べる。

1. 試薬

Veal Infusion Broth 粉末 (DIFCO 0344-17-6)、牛アルブミン粉末(SIGMA A-7906)、イーグル MEM、7.5%NaHCO₃、ペニシリン・ストレプトマイシン(PS)100 倍溶液(インビトロジェン Cat.No.15140-148 等)、ゲンタマイシン溶液(10mg/ml) (インビトロジェン Cat.No.15710-064 等)、アンホテリシン B 100 倍溶液 (インビトロジェン Cat.No.15290-018 等)、牛胎児血清(FCS)、2.5%トリプシン溶液 (インビトロジェン Cat.No.15090-046 等)、PBS(Mg,Cl(-))、EDTA-2Na。なお、オートクレーブ可能な粉末イーグル MEM 培地を使用する際には、別途 L-グルタミン 100 倍溶液 (インビトロジェン Cat.No.25030-149 等)を用意する。

2. 溶液の調整

7.5% NaHCO₃は、蒸留水に NaHCO₃ を 7.5%の割合で溶解させた後、0.45 μ m フィルターを用いて加圧濾過することによって除菌する。除菌後、炭酸ガスが抜けないようにきつく蓋をして 4℃に保存する。

PS 溶液はおおよそ 1 週間に使用する量をチューブ或いはボトルに分注し、凍結保存する。

増殖培地の調整は、500ml のイーグル MEM 培地に PS 溶液を 5ml、FCS を 50 ml

(終濃度約 10%)、7.5%NaHCO₃ を 5ml 添加する。オートクレーブ可能な粉末イーグル MEM 培地の場合には、更に L-グルタミン溶液を 5ml 添加する。全て加えたら、培地を泡立てないように手で容器全体を軽く攪拌する。

維持培地の調整は、500ml のイーグル MEM 培地に PS 溶液を 5ml、FCS を 10ml (終濃度約 2%)、7.5%NaHCO₃ を 10ml 添加する。オートクレーブ可能な粉末イーグル MEM 培地の場合には、更に L-グルタミン溶液を 5ml 添加する。全て加えたら培地を泡立てないように手で同様に攪拌する。

検体処理液 500ml のオートクレーブ済 Veal Infusion Broth に PS 溶液 5ml、ゲンタマイシン溶液 1ml、アンホテリシン B 溶液 5ml 及び 10%牛アルブミン 2.5ml を加える。(10%牛アルブミンは粉末の牛アルブミンを蒸留水に 10%の割合で溶解し、0.45 μ m フィルターで濾過滅菌しておく)。

3. 機器・機材

炭酸ガス培養器 (33~37℃)、24 穴プラスチックトレイ (或いは細胞培養用チューブ)、175cm²細胞培養用プラスチックボトル (或いはガラス製 750ml ルー一瓶)、50ml、15ml 遠沈管、マイクロピペット (P1000)、マイクロピペット (P200)、滅菌済み綿付きチップ (200 μ l)、ストックチューブ (2ml 用) 等

操作

1. 検体の前処理

- ① 口腔・咽頭拭い液は、綿が入っている場合にはガラス棒で綿をついて、拭い液を遠心管に確実に移す。冷却遠心機で 4℃、10,000G、20 分間遠心し、上清を滅菌した検体保存用プラスチック容器に移す。遠心しても夾雑物がとれない場合は上清を 0.45 μ m フィルターで濾過する。
- ② 糞便検体は小指頭大をガラス棒でとり、検体処理液 4ml が入った遠心管に入れてガラス棒でよく攪拌する。通常 10~20%の糞便乳剤とする。冷却遠心機で 4℃、10,000G、20 分間遠心し、上清を滅菌した検体保存用プラスチック容器に移す。遠心しても夾雑物がとれない場合は上清をフィルターで濾過する。細菌の混入或いは細胞毒性がみとめられる場合は、クロロホルム処理も有効である。

2. 接種と観察

- ① 24 穴の培養プレート或いは組織培養用ガラスチューブを使用する。24 穴の培養プレートを用いる場合は、とくに検体間のクロスコンタミネーションに留意

する。検体接種時には、検体中の雑菌を抑えるために維持培地 500ml に更にゲンタマイシンを 1ml、アンホテリシン B を 5ml 追加した強化維持培地を使用する。接種用のチューブの増殖培地を捨て、強化維持培地 1ml と交換する。

- ② 検体 100 μ l を細胞に接種する。
- ③ 接種後は 3～4 日毎に維持培地を交換し、35～37℃で 2 週間細胞変性効果 (CPE) の出現を観察する。
- ④ CPE が出現した細胞については 3 回の凍結融解後、その培養液 100 μ l を新しい細胞に接種して 2 週間 CPE の確認を行う。採取した検体は必ず 3 回凍結融解 (同上) を繰り返す。
- ⑤ 接種後 24 時間以内に CPE が現われたら、検体中の成分による非特異的細胞毒性の可能性が高い。その場合、新しい細胞にその培養液を 100 μ l 接種し観察を続ける。または、検体接種時に接種液により 1 時間吸着を行い細胞を洗浄し維持培養液を加えることにより細胞毒性の影響を低下させることが出来る。
- ⑥ 途中で雑菌が増殖してきた場合には、元の検体を 0.45 μ m フィルターでろ過した後、再度分離操作を行なう。

2. 中和法によるウイルス同定（細胞培養）

培養細胞によるウイルス分離後、中和試験によるウイルスの同定検査を行う。使用する細胞は原則的には CPE が確認された細胞を使用する。ヘルパンギーナの主要な起因ウイルスであるコクサッキーA ウイルスに対する抗血清は、通常のエンテロウイルス同定用プール血清には含まれていないので、それぞれに対する単味抗血清を用意する。同定に用いる抗血清は、主としてコクサッキーA ウイルスの 1～6 型、8、10 及び 22 型を 20 単位に希釈して使用する。同定する検体はあらかじめウイルス力価を測定し概ね 100 TCID₅₀/well である事を確認し同定を行う。同定がうまくいかない場合クロロホルムで処理した検体を用いるとうまくいく場合もある。中和法は、トランスファープレートを用いる方法、細胞懸濁液を後から加えるまきこみ法、いずれの方法で行っても構わない。

1. 試薬・細胞

コクサッキーA ウイルスの 1～6 型、8、10 及び 22 型に対する抗血清。血清およびウイルス希釈には維持培地、細胞浮游液の調整には増殖培地を使用する。同定に使用する細胞はウイルスが分離された細胞を使用するのが原則である。

2. 機材

炭酸ガス培養装置、96 穴細胞培養プレート、マイクロピペット (P1000)、マイクロピペット (P200)、滅菌済み綿付きチップ (200 μ l、1000 μ l)、ウイルス希釈用滅菌済み綿付き長チップ (200 μ l)、ウイルス希釈用試験管（アルミキャップ付き）

操作

1. トランスファープレートを用いる方法

- ① 細胞は同定試験をする 1-2 日前に凍結から戻し、必要量を組織培養用プレートに播いておく。
- ② 希釈したウイルス液をトランスファープレート（ダイナテック社 Cat.No001-010-5850）に 25 μ l ずつ分注し、これに各中和用抗血清をそれぞれ 25 μ l ずつ等量混合、ウイルスコントロールは抗血清と混合したウイルス液と同じもの、

更に 10 倍、100 倍及び 1,000 倍希釈したものを作る。

- ③ マイクロプレート用ミキサーで混和後、37℃で 2 時間反応させる。
- ④ あらかじめ作製しておいた細胞のプレートを新しい維持培地に交換し、反応が終ったトランスファープレートを細胞のプレートに重ね、各ウェルの検体を細胞プレートに移行する。
- ⑤ 37℃、5%炭酸ガス培養器で培養し、1 週間観察する。

2. まきこみ法

- ① 抗血清を 50 μ l/well 加える。
- ② 希釈した分離ウイルス(100 TCID₅₀/50 μ l) 50 μ l を入れ、マイクロプレート用ミキサーで混和する。
- ③ 35～37℃で 2 時間反応する。
- ④ 中和の時間に細胞をトリプシン消化し、1～2 $\times 10^5$ 個/ ml の細胞浮游液をプレート 1 枚につき 10ml 用意する。
- ⑤ 細胞を 100 μ l ずつ中和反応の終ったプレートに加える。
- ⑥ 35～37℃の炭酸ガス培養器に入れ、7 日間 CPE を観察する。

3. 判定

- ① 倒立顕微鏡で 7 日間 CPE を観察し、CPE の出現パターンにより、血清型を判定する。
- ② 血清型決定はウイルスコントロールに CPE が出現し、かつ抗血清と反応させたウェルのうち 1 つだけが CPE 陰性であった場合のみ判定できる。
- ③ 反応させた全てのウェルに CPE が出現し、かつ 1,000 倍希釈のウイルスコントロールまで CPE が出現した場合にはウイルス力価が高すぎるので、ウイルス液を 10 倍以上希釈して再度中和試験を行う。
- ④ 反応させた全てのウェルに CPE が出現し、かつ 100 倍希釈のウイルスコントロールまで CPE が出現し、1,000 倍希釈のウイルスコントロールが陰性であった場合には、同定試験に使用した抗血清とは異なるウイルスである場合または 2 種類以上のウイルスが混合している場合が考えられる。この場合にはまず、他の抗血清を用いて同定試験を行う。それでもなお全てのウェルに CPE

が出現する場合には、ウイルスが混合していることを考えてウイルスのクローニングを2回行う、クローン化サンプルを用いて改めて同定試験を行う。

- ⑤ CPE の出現が遅く、しかも反応させたウェルの2つ以上が抑制され、かつ等倍のウイルスコントロールのみ CPE が出現した場合には、ウイルス力価が低すぎる事が考えられるのでウイルスの希釈倍率を低くするか、或いはもう1代継代してウイルス力価を高くしてから改めて同定試験を行う。
- ⑥ break through（標準株抗血清で中和されにくい“プライム”変異株や凝集塊のあるウイルスでは不完全な中和反応が起こり、一見中和されているように見えるが、日数がたつと CPE が出現する現象）が起きる場合は、ウイルスを HCFC-141b（ダイキン工業）或いはクロロホルムで処理するか、孔径 $0.45\mu\text{m}$ の非ニトロセルロースフィルターでろ過すると中和がうまく行く場合がある。
- ⑦ 反応させたウェルの全てに CPE が出現し、かつ 10 倍のウイルスコントロールで CPE が出現しない場合には、中和試験では同定できないので、遺伝子解析等の他の手段を用いて同定する。

3. 乳のみマウスによるウイルス分離

ヘルパンギーナの主要な起因ウイルスであるコクサッキーA ウイルスは、細胞培養によるウイルス分離率が低い場合が多く、ウイルス分離率を上げるため乳のみマウスによるウイルス分離法が用いられている。出産直前の妊娠マウスを入手し、臨床検体を生後 48～78 時間のマウスに接種し、麻痺の出現によりウイルス分離を確認する。マウスの系統による感受性の違いはない。

1. 器具及び試薬

飼育箱、ホモジナイザー、クロロホルム、PBS(-)、ショ糖、ツベルクリン用注射器。

操作

- ① 接種検体の $25\mu\text{l}$ を乳のみマウスの皮下に注射する。マウスを扱う時は必ずゴム手袋を着用し、親マウスを別の場所に移動させる。子マウスのは数は 10 匹前後であるので 1 検体あたり 2 匹を使用し、必ず未接種の個体を 1 腹に複数設ける。
- ② 接種したマウスはガスバーナーで熱したピンセットで尾、耳、四肢の先端を焼いてマークする。
- ③ 注射後毎日親マウスを別の場所に移動させ子マウスの麻痺の有無を観察する。麻痺の有無がはっきりしない時は胃の白い部分の大小を参考にする。
- ④ 元気がなくなり乳を飲まなくなると間もなく麻痺が出現するので、アルコール消毒した後頭部切断による放血をおこない、内臓を除去し四肢及び皮膚を剥ぎとり凍結保存する。
- ⑤ 保存された胴体を PBS(-)にて 20%乳剤にする。10,000g、20 分間遠心分離した上清に等量のクロロホルムを加え、1,300g（中心からの距離 13cm の遠心機なら 3,000 rpm）10 分間遠心し、上清に等量の 50%ショ糖液を加え -70°C で保存する。

4. 中和法によるウイルス同定（乳のみマウス）

分離ウイルスが細胞培養で増殖しない場合、コクサッキーA 群ウイルスに対する中和抗血清を用いて中和反応を行う、乳のみマウスに接種することにより同定を行う。これらの手技には大量の乳のみマウスを用いる必要がある。それを避けるために保存マウス乳剤を RD-18S 細胞に接種すればかなりの確率で CPE が観察できるので、中和反応を細胞培養で行うことが可能である。CPE が観察されない場合には乳のみマウスを用いて中和を行うが、CF 法による同定及び RT-PCR によるエンテロウイルス遺伝子の検出・塩基配列の解析によるウイルス同定も可能である（後述）。中和法に用いる抗血清は、主としてコクサッキーA 群ウイルスの 1～6 型、8、10 及び 22 型を（1 型及び 22 型は、我が国ではまれであるので、日常検査から除いても良い）20 単位に希釈して使用する。

操作

- ① 同定する検体はあらかじめウイルス力価を測定し、おおむね 100ID₅₀/tube であることを確認する。
- ② 希釈したウイルス液を反応管に 25 μ l/tube 分注し、これに各中和用抗血清をそれぞれ 25 μ l/tube 等量混合、37℃で2時間反応させる。
- ③ ウイルスコントロールは抗血清と混合したウイルス液と同じもの、更に 10 倍、100 倍及び 1,000 倍希釈したものを作る。
- ④ 反応液を 20 μ l ずつ 2 匹の乳のみマウスの皮下に接種し、1 週間観察する。
- ⑤ 血清型決定はウイルスコントロールに麻痺が出現し、かつ抗血清と反応させたマウスのうち 1 つだけが麻痺を起こさない場合のみ判定できる。
- ⑥ 接種したマウス全てに麻痺が出現し、かつ 1,000 倍希釈のウイルスコントロールまで麻痺が出現した場合にはウイルス力価が高すぎるので、ウイルス液を 10 倍以上希釈して再度中和試験を行う。
- ⑦ ウイルス力価が正しく接種マウス全てが麻痺を発症した場合には、同定試験に使用した抗血清とは異なるウイルスである場合と 2 種類以上のウイルスが混合している場合が考えられる。この場合にはまず、他の抗血清を用いて同定試験を行うが、細胞培養の結果が参考になる。
- ⑧ それでも決定できない場合には、ウイルスが混合していることを考えてウイル

スのクローニングを 2 回行う、クローン化したサンプルを用いて改めて同定試験を行う。

- ⑨ ウイルス力価が低すぎる場合はもう 1 代継代してウイルス力価を高くしてから改めて同定試験を行う。

5. 補体結合反応（CF 法）によるウイルス同定

乳のみマウスを用いた中和試験は、多数のマウスを使用するため、多くの手間及び労力を要する。CF 法は、乳のみマウスによる中和の代替法として用いられている同定法であり、同定用免疫腹水パネルを用いることにより多くのコクサッキーA 群ウイルスが同定可能である。

1. 器具

マイクロプレート (U 型、リジットタイプ)、ダイリ्यूター (25 μ l 用又はマルチチャンネルピペット)、ドロップパー (25 μ l 用、50 μ l 用)、プレートシール用フィルム、マイクロプレート用ミキサー、マイクロプレート用遠心機、恒温槽

2. 試薬

1) 保存液

- (1) 1M MgCl_2 : $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20.3g を精製水に加えて 100ml とする。密栓して室温保存。
- (2) 0.3M CaCl_2 : $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4.4g を精製水に加えて 100ml とする。密栓して室温保存。
- (3) 5 倍 VBS : NaCl 8.5g、バルビタール 5.75g、バルビタールナトリウム 3.75g、窒化ナトリウム 2.0g、1M MgCl_2 5.0ml、0.3M CaCl_2 5.0ml に精製水を加え 2,000ml とする。
- (4) 1%ゼラチン : ゼラチン 1.0g に精製水 100ml を加え、115°C10 分高压蒸気滅菌し、小試験管に分注して 4°Cで保存。

2) F 用希釈液

5 倍 VBS 40ml、1%ゼラチン 2.0ml に精製水 160ml を加える。

3) ヒツジ赤血球

4) モルモット補体

5) 正常マウス抗原

6) 同定用免疫腹水

*CF-KIT（デンカ生研、420015）を用いると便利である。キット中には、CF 用希釈液、感作ヒツジ赤血球、モルモット補体が付属されており、特別に試薬を調整する必要がない。

3. CF キットを使う際の準備

1) 補体 (5CH₅₀/50 μ l)

あらかじめ冷蔵しておいた希釈液をモルモット補体に所定の量（瓶に表示）を加えて溶解する。すぐに使用しないときは冷蔵庫に保存する。

（時間が経つと補体力価が低下するため、溶解後 1、2 日で使用するようになる。）

2) 0.85%感作赤血球浮遊液

8.5%感作ヒツジ赤血球を良く振り均等にした後、希釈液で 10 倍量とし、0.85%感作赤血球浮遊液を調整し、冷蔵庫で保存する。（時間が経つと溶血するので、希釈後 1、2 日で使用するようになる。）

操作

		抗原希釈												
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512				
免疫腹水		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A CA2											免疫腹水コントロール	正常マウス抗原		4
B CA3														3
C CA4														2
D CA5														1
E CA6														0
F CA8														
G CA10														
H 補体対照														
		5CH ₅₀	3.75CH ₅₀	2.5CH ₅₀	1.25CH ₅₀	5CH ₅₀	3.75CH ₅₀	2.5CH ₅₀	1.25CH ₅₀	5CH ₅₀	3.75CH ₅₀	2.5CH ₅₀	1.25CH ₅₀	
		抗原				正常マウス抗原				希釈液				

図 2. プレートレイアウトの例

- ① マイクロプレートに希釈液（VBS）を A-1～G-10 及び H-9～H-12 にドロップパーで 25 μ l 入れる。
- ② 抗原（分離株）を第 1 列（図 2 では A-1～G1）及び抗原補体対照（図 2 では H-1～H-4）に 25 μ l ずつマイクロピペットで加え、A～G についてはダイリ्यूターもしくはマルチチャンネルピペットで 2 倍段階希釈する（1:2～1:512）。
- ③ 正常マウス抗原を 11 列（図 2 では、A～G まで）及び正常マウス抗原補体対照（図 2 では、H-5～H-8）に 25 μ l ずつ入れる。

- ④ CF 用抗血清又は同定用免疫腹水を 4 単位になるように VBS で希釈し、対応する穴（図 2 では、A～G 行のそれぞれ 1 列～11 列まで）に $25\mu\text{l}$ 入れる。通常、ヘルパンギーナの同定の際は、コクサッキー A 2、3、4、5、6、8、10 型の免疫腹水を用いる。
- ⑤ 氷冷した希釈補体 ($5\text{CH}_{50}/50\mu\text{l}$) $50\mu\text{l}$ をドロップパーで対応する穴（図 2 では、A-1～G-11）に入れる。
- ⑥ 同時に補体対照を置く（図 2 では、H-1～H-12）。表 1 で示した希釈液及び補体を入れる。
- ⑦ プレートミキサーで攪拌後、 4°C で 1 晩置く。ここで、溶血度標準作成のための 1:2 希釈感作赤血球を $600\mu\text{l}$ 調整する。そのうち $300\mu\text{l}$ を 1.5ml の滅菌したチューブに移し、 -20°C で 1 晩置き、完全に溶血させる。

表 1 補体対照群における希釈補体の加え方

	5CH_{50}	3.75CH_{50}	2.5CH_{50}	1.25CH_{50}
希釈液 (μl)	25		25	50
$5\text{CH}_{50}/50\mu\text{l}$ (μl)	50			
$2.5\text{CH}_{50}/50\mu\text{l}^*$ (μl)		75	50	25
* $2.5\text{CH}_{50}/50\mu\text{l}$ は $5\text{CH}_{50}/50\mu\text{l}$ を 2 倍希釈して得る。				

- ⑧ 0.85%感作赤血球 $50\mu\text{l}$ をドロップパーで対応する穴に入れる。
- ⑨ 溶血度標準を表 2 に従って調整する（12 列）。
- ⑩ プレートをシールし、よく振ってから 37°C の恒温槽に沈め、60 分間置く。

表 2 溶血度標準の作り方

	溶血度 (%)				
	0	25	50	75	100
判定	4	3	2	1	0
0.85%希釈感作赤血球（溶血） (μl)		25	50	75	100
0.85%希釈感作赤血球（不溶血） (μl)	100	75	50	25	
希釈液 (μl)	50	50	50	50	50

- ⑪ プレートをプレート遠心機で低速遠心 ($1,000\text{rpm} \times 3$ 分) した後、判定する。判定は、溶血度標準を参考に完全溶血 0 から全く溶血が見られない 4 までの 5 段階に分け、3 と 4 を陽性とする。抗原に抗補体作用が無いこと（完全溶血）、免疫腹水、正常マウス抗原が完全溶血していること及び表 3 を参考に

補体二次定量結果が適正であることを確認する。

表3 補体対照群における溶血度の許容範囲

	5CH ₅₀	3.75CH ₅₀	2.5CH ₅₀	1.25CH ₅₀
抗原対照	0	0	1～2	2～3
正常マウス抗原対照	0	0	1～2	2～3
希釈液対照	0	0	1～2	2～3

6. 中和抗体価の測定

エンテロウイルス感染症の間接的診断法として、血清(髄液)中の抗エンテロウイルス抗体の測定が行われている。通常、急性期と回復期の血清を比較して 4 倍の抗体価の上昇があれば、ウイルス感染の証明とされるが、エンテロウイルス感染には不顕性感染も多いので、検査結果の評価には注意が必要である。エンテロウイルスの血清学的診断に最もよく利用されるのは中和法であり、マイクロプレートを用いた微量法により血清中の中和抗体価を測定する。中和試験に使用するウイルスは標準株を用いるが、適切な臨床分離株を併用するとより正確な抗体価が測定できる場合がある。

1. 試薬・細胞

RD-18S など使用するウイルスに感受性のある細胞を使用する。血清希釈には維持培養液、細胞浮游液の調整には増殖培養液を使用する。抗体価測定に使用するウイルス株は、基本的には標準株を用いるが、分離株を併用する場合もある。あらかじめストックウイルスの感染価(TCID₅₀/50 μ l)を測定しておく。

2. 機材

炭酸ガス培養装置、96 穴細胞培養プレート、マイクロピペット(P1000)、マイクロピペット(P200)、滅菌済み綿付きチップ(200 μ l、1000 μ l)、ウイルス希釈用滅菌済み綿付き長チップ(200 μ l)、ウイルス希釈用試験管(アルミキャップ付き)

操作

1. 血清希釈

- ① 血清は維持培養液で 1:4 に希釈（血清 0.1ml に希釈液 0.3ml）し、56℃30 分 間非働化する。

		血清 対照	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	細胞 対照	
試料 1	A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
試料 2	C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
試料 3	E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
力価 測定	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
			-0	-1	-2	-3	-4						

図3. 中和抗体測定試験のマイクロプレート上におけるレイアウト

- ② 96 穴マイクロプレートの第 1 列、3～10 列目の各穴に、維持培養液を 50 μ l ずつ、滅菌チップ（以下チップ）で滴下、分注しておく（図 3）。
- ③ 1 希釈の第 1 列目、2 列目及び 3 列目の穴に 1:4 に希釈した血清の 50 μ l を分注する。
- ④ 各型とも血清の 1 希釈につき 2 穴ずつを使用し、チップによる血清の倍数希釈を行う。3 段階希釈ごとにチップを換える。

2. 中和

- ① 細胞コントロール列には 100 μ l/well の維持培養液を加える。
- ② 100 TCID₅₀/50 μ l のウイルス液を細胞コントロール列および Back-titration 以外の well に加える。
- ③ Back-titration を並行して行い、攻撃ウイルス量が 100 TCID₅₀（許容範囲 32～320 TCID₅₀/50 μ l）で行われたことを確認する。
- ④ マイクロミキサーで混和後、蓋をかぶせて炭酸ガス培養器に入れ、35～37℃で3時間中和する。
- ⑤ 中和を終えたマイクロプレートに、別に準備した細胞浮遊液（1～2×10⁵ 個/ml）を 100 μ l ずつ加え 35～37℃で培養する。
- ⑥ 接種後1週間、CPE の出現の有無を観察する。

3. 判定

- ① Back-titration の成績が 32～320 TCID₅₀/50 μ l からはずれているときは再検査を行う。表 4 に示したように、抗体価は接種ウイルスを CPE の出現を抑制した血清の最高希釈倍数で示す。

表 4 中和抗体価の判定例

	血清希釈倍率								中和 抗体価
	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	
試料 1	+	+	+	+	+	+	+	+	< 4
	+	+	+	+	+	+	+	+	
試料 2	-	-	-	-	+	+	+	+	32
	-	-	-	+	+	+	+	+	
試料 3	-	-	-	-	+	+	+	+	32
	-	-	-	-	+	+	+	+	

7. RT-PCR による遺伝子検出と塩基配列の解析

ヘルパンギーナの主要な起因ウイルスであるコクサッキーA 群ウイルスは、細胞培養による分離率が低いことが多く、乳のみマウスがウイルス分離に利用されている。このため、ウイルス分離同定に多くの時間及び労力がかかる場合が多い。近年、エンテロウイルス同定のため、汎エンテロプライマーを用いて、RT-PCR 法によりウイルスゲノムを増幅、塩基配列を決定し相同性検索 (BLAST、FASTA など) によりウイルスを同定する方法が報告されている。エンテロウイルスの遺伝子解析による同定は、解析方法及び解析領域は標準化されていないが、VP1 部分領域、VP4-VP2 部分領域を用いた解析結果が、主に報告されている (図 4)。ここでは、VP4-VP2 部分を増幅する汎エンテロプライマー (EVP4、OL68-1) を用いたエンテロウイルス遺伝子検出と塩基配列解析について述べる。

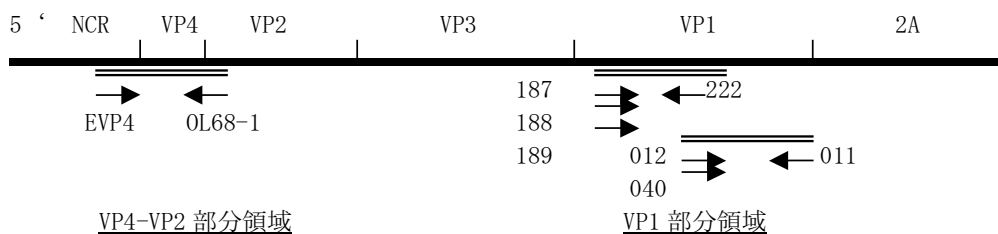


図4 エンテロウイルス RT-PCR に用いられるプライマーと増幅部位

1. 試薬と実験器具

共通するもの

0.5ml または 0.2ml PCR 用チューブ、1.5ml チューブ、フィルター付きピペットチップ (1000、200、20 μ l)、マイクロピペット、滅菌精製水 (DW/Milli-Q 水など)、微量高速冷却遠心機、恒温水槽或いはブロックヒーター、ミキサー

RNA 抽出用試薬・器具

RNA 抽出法は従来の SDS フェノール抽出法のほか、市販のキット各種 (キアゲン: QIAamp Viral RNA Mini kit、ロシュ: High Pure Viral RNA kit など) が利用可能である。

RT-PCR、及び電気泳動用試薬・器具

各種 RT-PCR キット、sense, antisense プライマー、サーマルサイクラー、電気泳動装置、アガロース、TBE バッファー、DNA サイズマーカー、エチジウムブロマイド溶液

直接塩基配列解析 (DyeDeoxy terminator 法による) 試薬・器具

プライマー (3.2pmol/ μ l、シーケンス用センス及びアンチセンス)、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (ABI)、Centri-sep スピンカラム (ABI401762)

操作

1) ウイルス

培養細胞に検体を接種後、CPE が 80-100% 現われたものをハーベストする。凍結融解後遠心 (12000rpm、約 5 分) し、上清をウイルス浮遊液とする。

2) RNA 抽出

SDS-フェノール抽出法あるいは市販 RNA 抽出キットを用いてウイルス RNA を抽出する。

3) RT-PCR

Access RT-PCR system (Promega: cat A1250) を用いた場合。

① 下記の反応組成に基づきマスタープールを作成。

反応組成 (1 検体当たり)

AMV/Tfl buffer	10 μ l
10mM dNTP	1 μ l
EVP4 (sense:10pmol/ μ l)	2 μ l
OL68-1 (antisense:10pmol/ μ l)	2 μ l
25mM MgSO ₄	2 μ l
AMV reversetranscriptase (5U/ μ l)	1 μ l
Tfl DNA polymerase (5U/ μ l)	1 μ l
DW	28 μ l

②抽出した RNA 溶液 $3\mu\text{l}$ とマスタープール $47\mu\text{l}$ を PCR 用チューブ (0.2 或いは 0.5ml) に加え混合 (最終容量 $50\mu\text{l}$)。

③下記の条件にて RT-PCR 反応を行う。

反応条件 (one tube RT-PCR)

48°C	45 min		
94°C	2 min		
94°C	10 sec	x 35 cycle	
50°C	10 sec		
65°C	1 min		
65°C	5 min		
4°C	∞		

④反応終了後 PCR 産物を電気泳動で確認する。

4) プライマー

sense EVP4(20bp) CTA CTT TGG GTG TCC GTG TT
antisense OL68-1(20bp) GGT AAY TTC CAC CAC CAN CC
Y=C+T, N=A+C+G+T

5) PCR 産物の塩基配列解析

① PCR 産物の精製

PCR 産物が電気泳動にて確認できたなら、PCR 産物の精製を行う。目的とするサイズの単一のバンド (約 650bp) が認められた場合は市販の PCR 産物精製キット (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN など) を用いると簡便である。バンドが複数見られた場合はゲルから目的とするバンドを切り出し精製する (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Cat. 28704 など)。手技については各種キット付属マニュアルを参照のこと。精製した PCR 産物の濃度は分光光度計による測定、或いは電気泳動を行い、既知濃度の DNA サイズマーカーと比較しておおよそその濃度を予測する。

② DyeDeoxy terminator 法による PCR 産物の蛍光ラベル (ABI 310 を用いた場合)

反応組成 (1 検体あたり)

BigDye	8 μl
Primer(3.2pmol/ μl)	1 μl
DW	9 μl
Template (30-90ng)	2 μl

反応条件 (ABI GeneAmp 9700, 9600, 2400 の場合)

96°C	1 min	x 25 cycle
96°C	10 sec	
50°C	5 sec	
60°C	4 min	
4°C	∞	

③ 蛍光ラベル産物の精製

エタノール沈殿法のほか CentriSep など市販の精製キットを用いると簡便である。市販キットを用いる場合は各マニュアルを参考のこと。

エタノール沈殿法

- i) 反応終了後 70%エタノール 74 μ l をチューブに加える。
- ii) 4°Cにて 30min 放置
- iii) 14000rpm、室温にて遠心分離
- iv) エタノールを捨て沈渣を自然乾燥

④ シーケンサーへのアプライ (ABI シーケンサーの場合)

乾燥した沈渣を用いるシーケンサーに基づいた loading buffer (ABI310 の場合 TSR、ABI373、377 の場合ブルーデキストラナーホルムアミド溶液 1 : 5) に溶解してシーケンサーへアプライする。

6) 塩基配列の解析

得られた塩基配列は NCBI/GeneBank などに登録されている塩基配列データベースと比較する。データベースと比較するにあたり各種プログラムが存在する。相同性検索はメール或いは直接 WWW を介し国立遺伝学研究所の DDBJ サーバーなどによる BLAST などのプログラムを用いて検索を行う。利用方法については下記のサイトを参照にされたい。商用データベース (Genetyx CD など) によることも可能である。他の分離株と比較して系統関係を解析するには商用ソフト (Genetyx Win/Mac など)、フリーのソフト (phylip, MEGA など)、或いは www 上のサービス (DDBJ ClustalW など) を利用する。

サイト例 <http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>

(4) 引用文献

- 1) 浦野 隆、エンテロウイルス感染症、臨床とウイルス、23: 141-155, 1995.
- 2) 萩原昭夫、ポリオ、エンテロウイルス感染症、手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎、臨床とウイルス、23: 156-163, 1995.
- 3) 清水博之、非ポリオウイルス感染症の実験室診断、日本臨床、57: 336-339, 1999.
- 4) 検査法のマニュアル化に関する委員会、コクサッキーA 群ウイルスの同定検査法、1-9, 1984.
- 5) Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. J. Virol. 73: 1941-1948, 1999.
- 6) Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. J.Clin.Microbiol. 37: 1288-1293, 1999.
- 7) Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. J.Clin. Microbiol. 38: 1170-1174, 2000.
- 8) Li・Graur 著（舘野義男・山崎由紀子訳）『分子の進化』（1994 年，廣川書店）
- 9) 根井正利著（五條堀孝・斎藤成也訳）『分子進化遺伝学』（1990 年，培風館）
- 10) Phylip, MEGA など分子系統解析ソフトを集めたリンク集
<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>

(5) 検査依頼先

エンテロウイルスの分離同定については、全ての地方衛生研究所で対応可能である。エンテロウイルス単味抗血清、エンテロウイルス標準株及び CF 試験用免疫腹水パネルの分与については、国立感染症研究所ウイルス第二部に相談のこと。

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4 - 7 - 1

国立感染症研究所ウイルス第二部

清水博之

TEL: 042-561-0771、FAX: 042-561-4729、E-mail: hshimizu@nih.go.jp

(6) 執筆者

清水博之、米山徹夫、吉田 弘 (国立感染症研究所ウイルス第二部)

山下照夫 (愛知県衛生研究所)

濱碕光宏 (福岡県保健環境研究所)

手 足 口 病

目 次

(1) 疾患の概説

(2) 検査に関する一般的注意

検査材料の採取

検査材料の輸送

作業上の注意

検査の進め方

検査の判定

(3) 検査方法

1) 細胞培養によるウイルス分離

2) 中和法によるウイルス同定

3) 中和抗体価の測定

4) RT-PCR による遺伝子検出と塩基配列の解析

(4) 引用文献

(5) 検査依頼先

(6) 執筆者

(1) 疾患の概説

手足口病(hand, foot and mouth disease)は、口唇粘膜および四肢末端にあらわれる水疱性丘疹を特徴とするエンテロウイルス感染症で、日本では毎年夏季を中心に流行する疾患であるが、秋～冬季にも発生が認められる。病原微生物検出情報によると、日本の手足口病患者から多く分離されているエンテロウイルスは、順にコクサッキーA16 (CA16), エンテロウイルス 71(EV71), コクサッキーA10(CA10)で、ウイルス分離率では、この 3 種類のウイルスが全体の約 90%をしめている。流行する血清型および流行の程度は年ごとに異なるが、ときとして大規模な手足口病の流行が認められる。手足口病は、水疱疹・発熱を主徴とし、無菌性髄膜炎等の症状を伴うことがあるが、一般に予後は良好である。しかし、EV71 による手足口病流行時には、中枢神経合併症の発生頻度が高いとされている。近年、大規模な手足口病流行時に、重篤な中枢神経合併症を伴う重症例が多発したことが、マレーシア、台湾等の東アジア地域で報告されており問題視されている。日本でも散発例ではあるが EV71 感染によると考えられる重症例が認められており、とくに EV71 による手足口病流行時には中枢神経合併症の発生動向の監視が必要とされる。他のエンテロウイルス感染症と同様に、主要な感染経路は経口飛沫感染であり、一般的な潜伏期間は 4～6 日程度とされている。ワクチン、抗ウイルス剤等、手足口病に対する積極的な予防治療法は、いまのところ存在しない。現在の感染症法では、手足口病は 4 類感染症定点把握疾患に分類されており、全国の小児科定点より毎週患者数が報告されている。

（２）検査に関する一般的注意

検査材料の採取

ウイルス分離のための検体として、糞便、口腔・咽頭拭い液、水疱内容物等が挙げられる。髄膜炎をともなう手足口病の確定診断のためには髄液からのウイルス分離は診断的価値が高いが、髄液からのウイルス分離率は一般には低く、糞便、口腔・咽頭拭い液などの、髄液以外の検体を採取しておくことが肝要である。口腔・咽頭拭い液を採取した滅菌綿棒は、乾燥を避けるため、**Veal Infusion Broth**、細胞培養用培地等適切な保存液中に入れておく。臨床検体から直接ウイルス遺伝子検査を行う場合の検体採取は、ウイルス分離用の検体採取に準じて行う。検査をより正確で効果あるものにするために検体は発症後できるだけ早く採取し検査に供する。すぐに検査に供しない場合は、凍結保存する。血清学的検査のためには、発症後早期に採取した急性期血清と発症後２週間以上経過した回復期の血清を採取する。

検査材料の輸送

ウイルス材料の保管・輸送中の凍結、融解の繰り返しはウイルス力価が低下するので避けなければならない。 -20°C での保管・輸送が確保できなければ、 $0\sim 8^{\circ}\text{C}$ で保管・輸送する。輸送にあたっては冷却が保たれる状態で包装し、検体番号、発病日、検体採取日等、必要事項を明記したうえ送付する。送付先にはあらかじめ検体数、搬入予定などを連絡しておく。

作業上の注意

糞便、血液、髄液等臨床検体の取り扱い、バイオセーフティーに十分留意した上で行う。検体の処理、ウイルス分離および同定の作業には、クラス２の安全キャビネットを使用する。ポリオワクチン未接種者、ポリオ中和抗体陰性者は、ワクチン接種を受けておくこと。

検査の進め方

エンテロウイルス感染症の確定診断は、基本的には、糞便、口腔・咽頭拭い液等適切な臨床検体からのウイルス分離同定により行う。手足口病の主要な起因ウイルスである EV71 および CA16 の場合、一般的には細胞培養によるウイルス分離が可能である。手足口病の場合、ウイルスにより培養細胞に対する感受性は異なり、ウイルス分離に時間のかかる場合も多い。ウイルス分離に用いられる培養細胞の種類は実験室により異なるが、実際に使用されている培養細胞は、RD-18S, RD-A, Vero, HEL 等であり、このうち数種類を組み合わせると、ウイルス分離の確率を上げることが可能となる。ウイルス分離後は、エンテロウイルス血清型特異的中和抗血清を用いた中和法により血清型を同定する。EV71 および多くのコクサッキーAウイルスに対する抗血清は、一般のエンテロウイルス同定用プール血清には含まれていないので、CA16, EV71, CA10 等に対する単味抗血清による同定を試みる。エンテロウイルスは伝播の過程でしだいに抗原性が変化し、既存の抗血清で中和されにくい難中和株が出現する。この場合、難中和株に対する抗血清をあらたに調整し標準株に対する交叉中和活性を確認すると同定可能になる場合がある。

中和法による同定を補助する方法として、また検査の迅速化のため、ウイルス遺伝子検査も最近多くの実験室で利用されるようになってきている。今のところ、エンテロウイルス遺伝子検査は標準化されておらず、検査の目的により、適切な方法を使い分ける必要がある。ウイルス分離が出来なかった場合、発症期にウイルス分離用の適切な検体が得られなかった場合、エンテロウイルス感染の間接的な証明として血清学的診断法が行なわれる。通常、急性期と回復期の血清を比較して 4 倍以上の抗体価の上昇があれば、ウイルス感染の証明とされるが、エンテロウイルス感染には不顕性感染も多いので、検査結果の評価には注意が必要である。

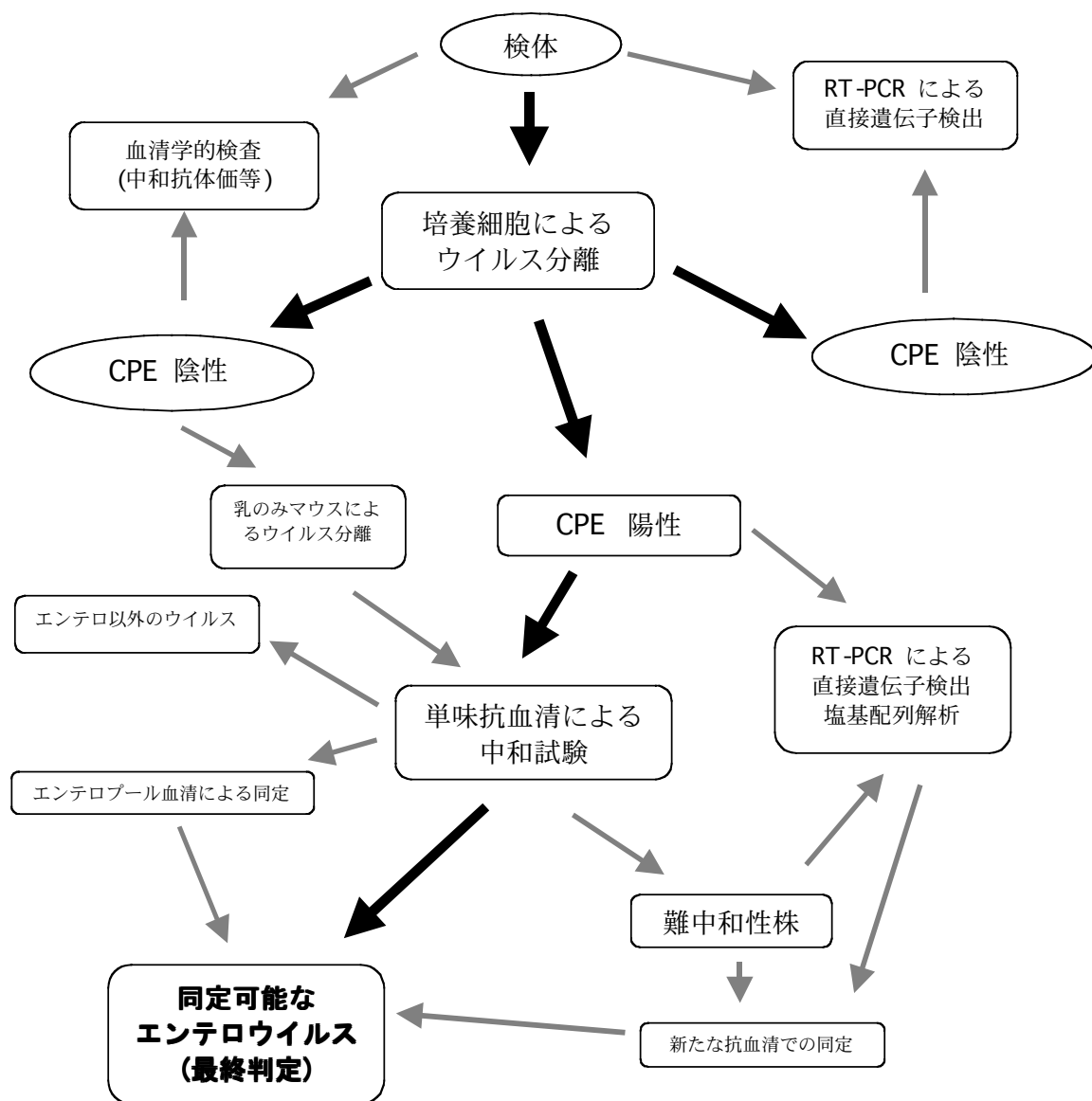


図 1. 検査の進め方（手足口病）



通常行なわれる実験室検査



補助的に用いられる実験室検査

検査の判定

臨床検体から、とくに口腔・咽頭内拭い液、水疱内容物、髄液等からウイルスが分離された場合は起因ウイルスである可能性が高い。ウイルス分離を行うことが出来ない場合、あるいはウイルスが分離されなかった場合は、ウイルス感染の間接的な証明として血清学的診断法を用いることが出来る。また、分離が困難なエンテロウイルスの同定には、RT-PCR 等ウイルス遺伝子検査が有用な場合もある。エンテロウイルスはしばしば不顕性感染を起こすので、臨床経過や疫学的情報を総合的に判断して、ウイルス実験室診断結果の意義を慎重に解釈するべきである。

(3) 検査方法

1. 細胞培養によるウイルス分離

手足口病の主要な病原ウイルスは、CA16, EV71 および CA10 である。これらのエンテロウイルス分離に用いられている細胞は各々の試験研究機関によって異なるが、一般的には RD-18S、HEL (ヒト肺 2 倍体細胞)、Vero 等の細胞が用いられる。通常、ウイルス分離には 1 週間以上を必要とし、中和のための感染価を得るためには継代培養が必要となる。使用する細胞は、継代培養によるウイルス感受性の変化を極力抑制するために、凍結保存し、出来るだけ同じ継代数の細胞を使用するのが望ましい。HEL 細胞についても凍結保存すれば比較的容易に同じ継代数の細胞の使用が可能である。細胞培養に用いる器具・試薬等も、実験室および使用する細胞により多少異なるが、以下によく用いられる試薬および代表的な細胞培養用培地の調整法について述べる。

1. 試薬

Veal Infusion Broth 粉末 (DIFCO 0344-17-6)、牛アルブミン粉末 (SIGMA A-7906)、イーグル MEM、7.5%NaHCO₃、ペニシリン・ストレプトマイシン(PS)100 倍溶液 (インビトロジェン Cat.No.15140-148 等)、ゲンタマイシン溶液(10mg/ml) (インビトロジェン Cat.No.15710-064 等)、アンホテリシン B 100 倍溶液 (インビトロジェン Cat.No.15290-018 等)、牛胎児血清(FCS)、2.5%トリプシン溶液 (インビトロジェン Cat.No.15090-046 等)、PBS(Mg,Ca (-)), EDTA-2Na。なお、オートクレイブ可能な粉末イーグル MEM 培地を使用する際には、別途 L-グルタミン 100 倍溶液 (インビトロジェン Cat.No.25030-149 等) を用意する。

2. 溶液の調整

7.5% NaHCO₃ は、蒸留水に NaHCO₃ を 7.5%の割合で溶解させた後、0.45 μm フィルターを用いて加圧濾過することによって除菌する。除菌後、炭酸ガスが抜けないようにきつく蓋をして 4℃に保存する。

PS 溶液 はおよそ 1 週間に使用する量をチューブあるいはボトルに分注し、凍結保存する。

増殖培地 の調整は、500ml のイーグル MEM 培地に PS 溶液を 5ml、FCS を 50 ml (終

濃度約 10%)、7.5%NaHCO₃を 5ml 添加する。オートクレイブ可能な粉末イーグル MEM 培地の場合には、更に L-グルタミン溶液を 5ml 添加する。全て加えたら、培地を泡立てないように手で容器全体を軽く攪拌する。

維持培地の調整は、500ml のイーグル MEM 培地に PS 溶液を 5ml、FCS を 10ml、7.5%NaHCO₃を 10ml 添加する。オートクレイブ可能な粉末イーグル MEM 培地の場合には、更に L-グルタミン溶液を 5ml 添加する。全て加えたら培地を泡立てないように手で同様に攪拌する。

検体処理液 500ml のオートクレーブ済 Veal Infusion Broth に PS 溶液 5ml、ゲンタマイシン溶液 1ml、アンホテリシン B 溶液 5ml および 10%牛アルブミン 2.5ml を加える。
(10%牛アルブミンは粉末の牛アルブミンを蒸留水に 10%の割合で溶解し、0.45 μ m フィルターで濾過滅菌しておく)。

2. 機器・機材

炭酸ガス培養器 (33~37℃)、24 穴プラスチックトレイ (あるいは細胞培養用チューブ)、175cm²細胞培養用プラスチックボトル(あるいはガラス製 750ml ルー瓶)、50ml、15ml 遠沈管、マイクロピペット (P1000)、マイクロピペット (P200)、滅菌済み綿付きチップ (200 μ l)、ストックチューブ (2ml 用)、等

操作

1. 検体の前処理

- ① 口腔・咽頭ぬぐい液は綿が入っている場合にはガラス棒で綿をついて、ぬぐい液を遠心管に確実に移す。冷却遠心機で 4℃、10,000G、20 分間遠心し、上清を滅菌した検体保存用プラスチック容器に移す。遠心しても夾雑物がとれない場合は上清を 0.45 μ m フィルターで濾過する。
- ② 糞便検体は小指頭大をガラス棒でとり、検体処理液 4ml が入った遠心管に入れてガラス棒でよく攪拌する。通常 10~20%の糞便乳剤とする。冷却遠心機で 4℃、10,000G、20 分間遠心し、上清を滅菌した検体保存用プラスチック容器に移す。遠心しても夾雑物がとれない場合は上清をフィルターで濾過する。細菌の混入あるいは細胞毒性がみとめられる場合は、クロロホルム処理も有効である。

2. 接種と観察

- ① 24 穴の培養プレートあるいは組織培養用ガラスチューブを使用する。24 穴の

培養プレートを用いる場合は、とくに検体間のクロスコンタミネーションに留意する。検体接種時には、検体中の雑菌を抑えるために維持培地 500ml に更にゲンタマイシンを 1ml、アンホテリシン B を 5ml 追加した強化維持培地を使用する。接種用のチューブの増殖培地を捨て、強化維持培地 1ml と交換する。

- ② 検体 100 μ l を細胞に接種する。
- ③ 接種後は 3～4 日毎に維持培地を交換し、35～37℃で 2 週間細胞変性効果 (CPE) の出現を観察する。
- ④ CPE が出現した検体については 3 回の凍結融解後、その培養液 100 μ l を新しい細胞に接種して 2 週間 CPE の確認を行う。採取した検体は必ず 3 回凍結融解 (同上) を繰り返す。
- ⑤ 接種後 24 時間以内に CPE が現われたら、検体中の成分による非特異的細胞毒性の可能性が高い。新しい細胞にその培養液を 100 μ l 接種し観察を続ける。
または、検体接種時に接種液により 1 時間吸着を行った後、細胞を洗浄し維持培養液を加えることにより細胞毒性の影響を低下させることが出来る。
- ⑥ 途中で雑菌が増殖してきた場合には、元の検体を 0.45 μ m フィルターで濾過した後、最初からやり直す。

2. 中和法によるウイルス同定

培養細胞によるウイルス分離後、中和試験によるウイルスの同定検査を行う。使用する細胞は原則的には CPE が確認された細胞を使用する。手足口病の主要な起因ウイルスである CA16, EV71, CA10 に対する抗血清は、通常のエンテロウイルス同定用プール血清には含まれていないので、それぞれに対する単味抗血清を用意する。同定に用いる抗血清は、20 単位に希釈して使用する事が出来るが、100 単位を必要とする場合もある。同定する検体はあらかじめウイルス力価を測定し、概ね 100TCID₅₀/well である事を確認し同定を行う。同定がうまくゆかない場合クロロホルムで処理した検体を用いるとうまくゆく場合もある。中和法は、トランスファープレートを用いる方法、細胞懸濁液を後から加えるまきこみ法、いずれの方法で行っても構わない。

1. 試薬・細胞

CA16, EV71, CA10 に対する抗血清。血清およびウイルス希釈には維持培地、細胞浮游液の調整には増殖培地を使用する。同定に使用する細胞はウイルス分離のものと同一細胞を使用するのが原則である

2. 機材

炭酸ガス培養器、96 穴細胞培養プレート、マイクロピペット (P1000)、マイクロピペット (P200)、滅菌済み綿付きチップ (200 μ l、1000 μ l)、ウイルス希釈用滅菌済み綿付き長チップ (200 μ l)、ウイルス希釈用試験管 (アルミキャップ付き)

操作

1. トランスファープレートを用いる方法

- ① 細胞は同定試験をする 1-2 日前に凍結から戻し、必要量を組織培養用プレートに播いておく。
- ② 希釈したウイルス液をトランスファープレート (ダイナテック社 Cat.No001-010-5850) に 25 μ l ずつ分注し、これに各中和用抗血清をそれぞれ 25 μ l ずつ等量混合、ウイルスコントロールは抗血清と混合したウイルス液と同じもの、更に 10 倍、100 倍及び 1,000 倍希釈したものを作る。

- ③ マイクロプレート用ミキサーで混和後、37℃で2時間反応させる。
- ④ あらかじめ作製しておいた細胞のプレートを新しい維持培地に交換し、反応が終わったトランスファープレートを細胞のプレートに重ね各ウェルの検体を細胞プレートに移行する。
- ⑤ 37℃、5%炭酸ガス培養器で培養し、1週間観察する。

2. まきこみ法

- ① 抗血清を 50 μ l/well 加える。
- ② 希釈した分離ウイルス (100 TCID₅₀/50 μ l) 50 μ l を入れ、マイクロプレート用ミキサーで混和する。
- ③ 35～37℃で2時間反応する。
- ④ 中和の時間に細胞をトリプシン消化し、1～2 $\times 10^5$ 個/ ml の細胞浮游液をプレート1枚につき 10ml 用意する。
- ⑤ 細胞を 100 μ l ずつ中和反応の終わったプレートに加える。
- ⑥ 35～37℃の炭酸ガス培養器に入れ、7日間CPEを観察する。

判定

- ① 倒立顕微鏡で7日間CPEを観察し、CPEの出現パターンにより、血清型を判定する。
- ② 血清型決定はウイルスコントロールにCPEが出現し、かつ抗血清と反応させたウェルのうち1つだけがCPE陰性であった場合のみ判定できる。
- ③ 反応させた全てのウェルにCPEが出現し、かつ1,000倍希釈のウイルスコントロールまでCPEが出現した場合にはウイルス力価が高すぎるので、ウイルス液を10倍以上希釈して再度中和試験を行う。
- ④ 反応させた全てのウェルにCPEが出現し、かつ100倍希釈のウイルスコントロールまでCPEが出現し、1,000倍希釈のウイルスコントロールが陰性であった場合には、同定試験に使用した抗血清とは異なるウイルスである場合と2種類以上のウイルスが混合している場合が考えられる。この場合にはまず、他の抗血清を用いて同定試験を行う。それでもなおかつ全てのウェルにCPEが出現する場合には、ウイルスが混合していることを考えてウイルスのクローニングを2回行い、クローン化サンプルを用いて改めて同定試験を行う。

- ⑤ CPE の出現が遅く、しかも反応させたウェルの2つ以上が抑制され、かつ等倍のウイルスコントロールのみ CPE が出現した場合には、ウイルス力価が低すぎることを考えられるのでウイルスの希釈倍率を低くするか、あるいはもう1代継代してウイルス力価を高くしてから改めて同定試験を行う。
- ⑥ break through (標準株抗血清で中和されにくい“プライム”変異株や凝集塊のあるウイルスでは不完全な中和反応が起こり、一見中和されているようにみえるが、日数がたつと CPE が出現する現象) が起きる場合は、ウイルスを HCFC-141b (ダイキン工業) あるいはクロロホルムで処理するか、口径 $0.45\mu\text{m}$ の非硝酸セルロースフィルターでろ過すると中和がうまく行く場合がある。
- ⑦ 反応させたウェルの全てに CPE が出現し、かつ 10 倍のウイルスコントロールで CPE が出現しない場合には、中和試験では同定できないので、塩基配列の解析等他の手段を用いて同定する。

3. 中和抗体価の測定

エンテロウイルス感染症の間接的診断法として、血清(髄液)中の抗エンテロウイルス抗体の測定が行なわれている。通常、急性期と回復期の血清を比較して 4 倍の抗体価の上昇があれば、ウイルス感染の証明とされるが、エンテロウイルス感染には不顕性感染も多いので、検査結果の評価には注意が必要である。エンテロウイルスの血清学的診断に最もよく利用されるのは中和法であり、マイクロプレートを用いた微量法により血清中の中和抗体価を測定する。中和試験に使用するウイルスは標準株を用いるが、適切な臨床分離株を併用すると、より正確な抗体価が測定できる場合がある。

1. 試薬・細胞

RD-18S, Vero など使用するウイルスに感受性のある細胞を使用する。血清希釈には維持培養液, 細胞浮游液の調整には増殖培養液を使用する。抗体価測定に使用するウイルス株は、基本的には標準株を用いるが、分離株を併用する場合もある。あらかじめストックウイルスの感染価(TCID₅₀/50 μ l)を測定しておく。

2. 機材

炭酸ガス培養器、96 穴細胞培養プレート、マイクロピペット(P1000)、マイクロピペット(P200)、滅菌済み綿付きチップ(200 μ l、1000 μ l)、ウイルス希釈用滅菌済み綿付き長チップ(200 μ l)、ウイルス希釈用試験管(アルミキャップ付き)

操作

1. 血清希釈

- ① 血清は維持培養液で 1:4 に希釈（血清 0.1ml に希釈液 0.3ml）し、56℃30 分間非働化する。

		血清 対照	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	細胞 対照	
試料 1	A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
試料 2	C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
試料 3	E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
力価 測定	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
			-0	-1	-2	-3	-4						

図2. 中和抗体測定試験のマイクロプレート上におけるレイアウト

- ② 96 穴マイクロプレートの第 1 列、3～10 列目の各穴に、維持培養液を 50 μ l ずつ、滅菌チップ（以下チップ）で滴下、分注しておく。
- ③ 1 希釈の第 1 列目、2 列目及び 3 列目の穴に 1:4 に希釈した血清の 50 μ l を分注する。
- ④ 各型とも血清の 1 希釈につき 2 穴ずつを使用し、チップによる血清の倍数希釈を行う。3 段階希釈ごとにチップを換える。

2. 中和

- ① 細胞コントロール列には 100 μ l/well の維持培養液を加える。
- ② 100 TCID₅₀/50 μ l のウイルス液を細胞コントロール列および Back-titration 以外の well に加える。
- ③ Back-titration を並行して行い、攻撃ウイルス量が 100 TCID₅₀（許容範囲 32～320 TCID₅₀/50 μ l）で行われたことを確認する。
- ④ マイクロミキサーで混和後、蓋をかぶせて炭酸ガス培養器に入れ、35～37℃で3時間中和する。
- ⑤ 中和を終えたマイクロプレートに別に準備した細胞浮遊液（1～2×10⁵ 個/ml）を 100 μ l ずつ加え 35～37℃で培養する。
- ⑥ 接種後1週間、CPE の出現の有無を観察する。

3. 判定

- ① ウイルス対照の成績が 32～320 TCID₅₀/50 μ l からはずれているときは再検査を行う。表 2 に示したように、抗体価は接種ウイルスの CPE 出現を抑制した血清の最高希釈倍数で示す。

表 2 中和抗体価の判定例

	血清希釈倍率								中和 抗体価
	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	
試料 1	+	+	+	+	+	+	+	+	< 4
	+	+	+	+	+	+	+	+	
試料 2	-	-	-	-	+	+	+	+	32
	-	-	-	+	+	+	+	+	
試料 3	-	-	-	-	+	+	+	+	32
	-	-	-	-	+	+	+	+	

4. RT-PCR による遺伝子検出と塩基配列の解析

手足口病の主要な起因ウイルスである CA16, EV71 は、一般的に細胞培養による分離同定が可能であるが、ウイルス増殖が遅く、試験に時間がかかる場合が多い。また、中和抗血清に対する難中和株が存在するため、適切な抗血清が得られない場合、中和法による同定が難しい場合がある。そのため汎エンテロプライマーを用いて、RT-PCR 法によりウイルスゲノムを増幅、塩基配列を決定し、相同性検索 (BLAST、FASTA など) によりウイルスを同定する方法が近年報告されている。解析方法および解析領域はいまのところ標準化されていないが、VP1 部分領域、VP4-VP2 部分領域を用いた解析結果が、おもに報告されている (図 2)。いずれの領域を用いた解析でも、適切な解析方法を用いた場合、多くの分離株で、血清型とよく対応した遺伝子型別が出来るとされている。ここでは、VP4-VP2 部分を増幅する汎エンテロプライマー (EVP4, OL68-1) を用いたエンテロウイルス遺伝子検出と塩基配列解析について述べる。

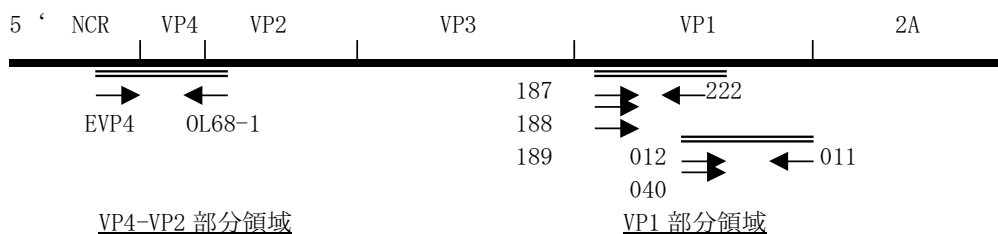


図 2 エンテロウイルス RT-PCR に用いられるプライマーと増幅部位

1. 試薬と実験器具

共通するもの

0.5ml または 0.2ml PCR 用チューブ, 1.5ml チューブ, フィルター付きピペットチップ (1000, 200, 20 μ l)、マイクロピペット、滅菌精製水 (DW/Milli-Q 水など)、微量高速冷却遠心器、恒温水槽或いはブロックヒーター、ミキサー

RNA 抽出用試薬・器具

RNA 抽出法は従来の SDS フェノール抽出法のほか、市販のキット各種 (キアゲン:

QIAamp Viral RNA Mini kit、ロシュ：High Pure Viral RNA kit など）が利用可能である。

RT-PCR、及び電気泳動用試薬・器具

各種 RT-PCR キット、sense, antisense プライマー、サーマルサイクラー、電気泳動装置、アガロース、TBE バッファー、DNA サイズマーカー、エチジウムブロマイド溶液

直接塩基配列解析（DyeDeoxy terminator 法による）試薬・器具

プライマー（3.2pmol/ μ l、シーケンス用センス及びアンチセンス）、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（ABI）、Centri-sep スピンカラム（ABI401762）

操作

1) ウイルス

培養細胞に検体を接種後 CPE が 80-100%現われたものをハーベストする。凍結融解後遠心（12,000rpm、約 5 分）し、上清をウイルス浮遊液とする。

2) RNA 抽出

SDS-フェノール抽出法あるいは市販 RNA 抽出キットを用いてウイルス RNA を抽出する。

3) RT-PCR

Access RT-PCR system(Promega: cat A1250)を用いた場合。

①下記の反応組成に基づきマスタープールを作成。

反応組成（1 検体当たり）

AMV/Tfl buffer	10 μ l
10mM dNTP	1 μ l
EVP4 (sense:10pmol/ μ l)	2 μ l
OL68-1 (antisense:10pmol/ μ l)	2 μ l
25mM MgSO ₄	2 μ l
AMV reversetranscriptase (5U/ μ l)	1 μ l
Tfl DNA polymerase (5U/ μ l)	1 μ l
DW	28 μ l

②抽出した RNA 溶液 $3\mu\text{l}$ とマスタープール $47\mu\text{l}$ を PCR 用チューブ (0.2 或いは 0.5ml) に加え混合 (最終容量 $50\mu\text{l}$)。

③下記の条件にて RT-PCR 反応を行う。

反応条件 (one tube RT-PCR)

48°C	45 min	
94°C	2 min	
94°C	10 sec	x 35 cycle
50°C	10 sec	
65°C	1 min	
65°C	5 min	
4°C	∞	

④反応終了後 PCR 産物 (約 650bp) を電気泳動で確認する。

4) プライマー

sense EVP4 (20bp) CTA CTT TGG GTG TCC GTG TT
antisense OL68-1 (20bp) GGT AAY TTC CAC CAC CAN CC
Y=C, T, N=A, C, G, T

5) PCR 産物の塩基配列解析

① PCR 産物の精製

PCR 産物が電気泳動にて確認できたなら、PCR 産物の精製を行う。目的とするサイズの単一のバンド (約 650bp) が認められた場合は市販の PCR 産物精製キット (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN など) を用いると簡便である。バンドが複数見られた場合はゲルから目的とするバンドを切り出し精製する (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Cat. 28704 など)。手技については各種キット付属マニュアルを参照のこと。精製した PCR 産物の濃度は分光光度計による測定、或いは電気泳動を行い既知濃度の DNA サイズマーカーと比較しておおよその濃度を予測する。

② DyeDeoxy terminator 法による PCR 産物の蛍光ラベル (ABI 310 を用いた場合)

反応組成 (1 検体あたり)

BigDye	8 μl
Primer (3.2pmol/ μl)	1 μl
DW	9 μl
Template (30-90ng)	2 μl

反応条件 (ABI GeneAmp 9700, 9600, 2400 の場合)

96°C	1 min		
96°C	10 sec	}	x 25 cycle
50°C	5 sec		
60°C	4 min		
4°C	∞		

③ 蛍光ラベル産物の精製

エタノール沈殿法のほかCentriSep など市販の精製キットを用いると簡便である。
市販キットを用いる場合は各マニュアルを参考のこと。

エタノール沈殿法

i) 反応終了後 70%エタノール 74 μ l をチューブに加える。

ii) 4°Cにて 30min 放置

iii) 14,000rpm、20 分間室温にて遠心分離

iv) エタノールを捨て沈渣を自然乾燥

④シーケンサーへのアプライ (ABI シーケンサーの場合)

乾燥した沈渣を用いるシーケンサーに基づいた loading buffer (ABI310 の場合 TSR、ABI373、377 の場合ブルーデキストラナーホルムアミド溶液 1 : 5) に溶解してシーケンサーへアプライする。

6) 塩基配列の解析

得られた塩基配列は NCBI/GeneBank などに登録されている塩基配列データベースと比較する。データベースと比較するにあたり各種プログラムが存在する。相同性検索はメール或いは直接 WWW を介し国立遺伝学研究所の DDBJ サーバーなどによる BLAST などのプログラムを用いて検索を行う。利用方法については下記のサイトを参照にされたい。商用データベース (Genetyx CD など) によることも可能である。他の分離株と比較して系統関係を解析するには商用ソフト (Genetyx Win/Mac など)、フリーのソフト (phylip, MEGA など)、あるいは www 上のサービス (DDBJ ClustalW など) を利用する。

サイト例 <http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>

(4) 引用文献

- 1) 浦野 隆、エンテロウイルス感染症、臨床とウイルス、23: 141-155, 1995.
- 2) 萩原昭夫、ポリオ、エンテロウイルス感染症、手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎、臨床とウイルス、23: 156-163, 1995.
- 3) 清水博之、非ポリオウイルス感染症の実験室診断、日本臨床、57: 336-339, 1999.
- 4) Shimizu H, Utama A, Yoshii K, *et al.* Enterovirus 71 from fatal and nonfatal cases of hand, foot and mouth disease epidemics in Malaysia, Japan and Taiwan in 1997-1998. *Jpn. J. Infect. Dis.* 52: 12-15, 1999.
- 5) Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J. Virol.* 73: 1941-1948, 1999.
- 6) Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1288-1293, 1999.
- 7) Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1170-1174, 2000.
- 8) Li ・Gaur 著（舘野義男・山崎由紀子訳）『分子の進化』（1994 年，廣川書店）
- 9) 根井正利著（五條堀孝・斎藤成也訳）『分子進化遺伝学』（1990 年，培風館）
- 10) Phylip、MEGA など分子系統解析ソフトを集めたリンク集
<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>

(5) 検査依頼先

エンテロウイルスの分離同定については、全ての地方衛生研究所で対応可能である。エンテロウイルス単味抗血清およびエンテロウイルス標準株の分与については、国立感染症研究所ウイルス第二部に相談のこと。

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4 - 7 - 1

国立感染症研究所ウイルス第二部

清水博之

TEL:042-561-0771, FAX:042-561-4729, E-mail:hshimizu@nih.go.jp

(6) 執筆者

清水博之、米山徹夫、吉田 弘 (国立感染症研究所ウイルス第二部)

山下照夫 (愛知県衛生研究所)

麻疹

平成14年3月

目 次

1. 麻疹の概説
2. 麻疹ウイルス検査に関する一般的注意
 - 2-1 検査材料の採取・保存
 - 2-2 検査材料の輸送
 - 2-3 検査の進め方
 - 2-4 実験室内診断基準
3. 病原学的検査
 - 3-1 使用器具
 - 3-2 必要試薬
 - 3-3 培養細胞
 - 3-4 臨床ウイルス分離用材料
 - 3-5 検体の採取時期
 - 3-6 検体の輸送・保存液
 - 3-7 ウイルス分離方法
 - 3-8 分離ウイルスの同定
 - 3-9 分離ウイルス株の増殖・保存
 - 3-10 分離ウイルス株の命名法
4. 遺伝子学的検査
 - 4-1 RT-PCR 法および PCR-RFLP 法
 - 4-2 NP 遺伝子相同解析および分子系統樹解析
5. 血清学的検査
 - 5-1 赤血球凝集抑制試験法
 - 5-2 ゼラチン粒子凝集法
 - 5-3 IgG 抗体検出酵素抗体測定法
 - 5-4 定量的 IgG 抗体測定法
 - 5-5 IgM 抗体検出酵素抗体測定法
 - 5-6 中和試験法
6. 引用文献
7. 主な略語一覧
8. 検査依頼先
9. 執筆者一覧
10. 図表 1, 2, 3, 4 および 5

1. 麻疹の概説

麻疹は高熱と発疹を主徴とした小児の重要なウイルス感染症で、伝染力が強く、罹患中に一時的に強い免疫抑制が起こることから、重篤な合併症を伴い、死亡することもこれまで稀ではなかった。現在でも、全世界では発展途上国を中心に年間約 100 万人が麻疹のため死亡していると推定され、WHO の予防接種拡大計画（EPI）戦略が推進されている。

我が国では有効なワクチンが実用化され、予防接種法のもとに多くの小児にワクチン接種がなされはじめた 1978 年以降、麻疹患者発生報告数は減少してきたが、麻疹流行阻止までには至らず、毎年小規模、散発的な発生が報告されている。また、成人麻疹が漸増傾向であることも近年の特徴である。

原因ウイルスはパラミクソウイルス科モルビリウイルス属に属する麻疹ウイルス（MV）で、1 本鎖マイナス鎖の RNA ウイルスである。ウイルスは 1954 年 Enders によって麻疹患者血液からヒト初代腎臓培養細胞を用いて初めて分離された。その後、ウイルス分離には Vero（アフリカミドリザル腎由来）細胞が多用され多くの知見が蓄積されてきた。なお、最初に分離されたウイルス株は Edmonston 株と呼ばれ、この株を原株に多くの生ワクチンが実用化されている。

1990 年に EB ウイルスでトランスフォームしたマーモセット由来 B 細胞株の B95-8 およびそのサブクローン B95a 細胞が MV 高度感受性であることが明らかにされ、現在世界中でウイルス分離に B95a 細胞が多用されている。

多くの臨床ウイルス株の諸性状がより詳細に解明可能になった結果、流行ウイルス株の遺伝子型は多型で、流行年代あるいは地域別にそれぞれ特性があること、野外ウイルスに対する細胞レセプターはリンパ球の活性化に関与する膜蛋白 SLAM（CD150）であることなど、さらに多くの知見が得られつつある。

2. 麻疹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扱いは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は重要である。

ウイルス取り扱い者はあらかじめ MV に対して免疫を保持していることを確認すること、また、免疫未獲得者は予防接種を受け、免疫を獲得したことを確認した後、ウイルスを取り扱うことが望ましい。

2-1 検査材料の採取・保存

麻疹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・検出および特異抗体の検出・上昇確認を行うことが基本となる。このため，血液，咽頭ぬぐい液など，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適切な包装をした後，温度管理下（一般に -40°C 以下，全血液の場合は $4-6^{\circ}\text{C}$ が望ましい）で検査依頼機関へ直接搬送あるいは郵送する。

郵送等の場合は郵政省告示第 760 号（平成 2 年 12 月 28 日号外）に準拠し，包装および内容は感染性物質であることを明示して輸送する（参照；デングウイルス感染症マニュアル図 1）。

検査材料には必要事項（個体識別等）を明記するとともに，検査材料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（一般に -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併行実施され，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

つぎのいずれかの結果が得られた場合，MV 感染とする。

- MV が分離・同定される。
- MV 特異遺伝子断片が増幅・検出される。
- 患者ペア血清（急性期および回復期）中の MV 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。
- MV 特異的 IgM 抗体が検出される。

3 病原学的検査

病原体（ウイルス）分離は正常培養細胞にウイルスを感染させ、MV 増殖を確認しなければならないことから結果が判明するまでに期間を要する。また、感染性のウイルスを取り扱うため、各操作段階でバイオセーフティー対策が要求される。一般にウイルス分離増殖は最も確実な検査・診断法である。

3-1 使用器具

25cm² プラスチックフラスコ（メンブレンフィルター付が望ましい）
24 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
スライドグラス、カバーグラス
メンブレンフィルター
CO₂ インキュベーター
高圧蒸気滅菌器
光学顕微鏡
蛍光顕微鏡
遠心器
ミキサー
超音波発生器

3-2 必要試薬

RPMI1640 培地
Eagle's MEM 培地
Earle's 培地
ウシ胎児血清（FCS）
アセトン
メチルアルコール
ペニシリン G カリウム
硫酸ストレプトマイシン
トリプシン（1:250）
EDTA
ACD 液
Dulbecco's リン酸緩衝生理食塩液（pH7.2 ; PBS⁻）

3-3 培養細胞

MV 感受性細胞として、B95a 細胞（マーマセット B 細胞由来）、Vero 細胞（サル腎由来株化）、ヒト臍帯血単核球細胞（CBMC）、WI-38 細胞（ヒト胎児肺由来 2 倍体）および Raji 細胞（ヒト B 細胞由来）などが用いられる。このうち、B95a 細胞および Vero 細胞がこれまで多用されている。また、高度感受性細胞として新たに Vero/SLAM 細胞が樹立されている。

3-3-1 B95a 細胞の継代培養

- 適量の増殖用培養液（GM）を細胞面に強くピペッティングをくり返し、細胞を分散・浮遊させる。
- 所定の量の GM を加え、37℃で 4～5 日間隔で継代培養する。
- 細胞の維持には維持用培養液（MM）を用いる。
- 培養液中に微量の EBV が産生されているため、取扱いに注意すること。

[増殖用培養液 (GM) および維持用培養液 (MM) の調製法]

RPMI1640 培地を用いて調製する。RPMI1640 培地には液体培地、粉末培地（ろ過滅菌／高圧蒸気滅菌）があるが、いずれの製品を用いてもよい。

GM は FCS を最終濃度 8～10%，MM は FCS を最終濃度 4～5% および抗生物質を加え、調製する。

3-3-2 Vero 細胞の継代培養

- EDTA-Trypsin 液を用いて細胞を分散する。
- GM を用いて $1\sim 2\times 10^5/\text{ml}$ の細胞濃度に調整した細胞浮遊液を作成し、37℃，7 日間隔で継代培養する。
- 細胞の維持には MM を用いる。

[GM および MM の調製法]

Eagle's MEM 培地を用いて調製する。GM は FCS を最終濃度 10%，MM は FCS を最終濃度 5% および抗生物質を加え、調製する。その他、GM および MM 増殖／維持因子として脳エッセンシャルメディウム、TPB、Yeast、Dextrose 等を添加する場合もある。

3-4 臨床ウイルス分離用材料

咽頭拭い液，末梢血液（凝固防止），鼻腔拭い液，髄液，尿沈渣細胞，脳組織などが用いられる。

咽頭拭い液，末梢血液からのウイルス分離増殖が一般的である。

咽頭拭い液あるいは鼻腔拭い液は咽頭部，鼻腔を滅菌綿棒で拭い，綿球を保存液に浸漬す

る。採取後 24～48 時間以内に分離用の細胞に接種可能であれば 4℃で保存する。それ以外の場合には、－70℃以下での保存が望ましい。

末梢血血液はクエン酸ナトリウム(ACD)加凝固防止血液が望ましい。ヘパリン加凝固防止血液はウイルス分離増殖には適しているが、遺伝子検査においてヘパリンの存在が遺伝子増幅阻害要因となる場合がある。末梢血単核球細胞 (PBMC) を分画し、供試する場合もある。血液は室温もしくは 4～8℃で保存する。

尿検体は、4℃で保存し、48 時間以内に分離用の細胞に接種する。(遠心操作の前に、尿検体は凍結してはいけない。)

[凝固防止血液からの末梢血単核球細胞の分画]

- ACD 液を用いて無菌的に採取された凝固防止血液に等量の PBS を混和する。
- あらかじめ Ficoll-paque (比重 1.077) を分注した遠心沈澱チューブに 2 倍希釈した血液を静かに重層する。
- 1,300g, 20 分間, 遠心沈澱する。
- PBMC は中間の液相にバンド状に分画される。
- PBMC を採取した後、PBS で 3 回洗浄する。
- 沈渣細胞を凍結保存用液 (10%DMSO 加 FCS) で所定の濃度に調整し、－80℃に凍結保存する。

3-5 検体の採取時期

発疹出現日を第 0 病日とし、第 5 病日以内に採取された検体が望ましい。

3-6 検体の輸送・保存液

抗生物質 (ペニシリン 500IU/ml, ストレプトマイシン 500 μ g/ml) を含む Earle's 液, PBS などが用いられる。安定剤としてウシ血清アルブミン (BSA), ゼラチン, ラクトアルブミン水解物などを添加する場合もある。

3-7 ウイルス分離方法

3-7-1 B95a 細胞を用いた末梢血液材料および咽頭拭い液からのウイルス分離方法

- MM5ml に被検材料 100 μ l を混和 (50 倍希釈) する。
- あらかじめ単層培養 (25cm² プラスチックフラスコ, メンブレンフィルター付) した B95a 細胞に全量を接種し, 37℃で, 静置培養する。プラスチックフラスコの代わりに 24 穴プラスチックプレートを用いてもよい。この場合, ウイルス接種穴数は 4 穴以上が望ましい。
- 16～18 時間後, 接種液を吸引し MM で細胞表面を洗浄した後, 新鮮 MM5ml を加え

て接種 7 日後まで培養を継続する。この間、MM の半量を適宜交換する。

- ウイルス増殖の有無は合胞体形成を主徴とする細胞変性効果（CPE）の出現を指標として確認する。
- 培養 7 日後、CPE を認めない場合は漸次、1 回継代培養を行った後、ウイルス増殖の有無を確認する。
- ウイルス増殖が確認された場合は、限界希釈法等による株のクローニングを行い、同定を試みる。

3-7-2 Vero 細胞を用いた咽頭拭い液材料からのウイルス分離方法

野外麻疹ウイルスの分離には、前項の B95a 細胞もしくは野外麻疹ウイルスに対する細胞レセプターである SLAM を発現させた Vero/SLAM 細胞が適している。

- 凍結融解したウイルス保存液を 3,000rpm., 15 分間遠心沈澱した上清を出発材料とする。
- 被検材料の 10 倍階段希釈 ($10^0 \sim 10^{-1}$) を作製する。
- あらかじめ単層培養（24 穴プラスチックプレート）した Vero 細胞に 1 穴あたり被検検体 100 μ l を 4 穴接種し、37°C, 1 時間静置する。
- 新鮮 MM を 0.9ml 加え、37°C で、7 日間静置培養する。（ローラーチューブを用いた回転培養を行うと、CPE の出現期間の短縮および CPE 易観察性が図られる場合がある。）
- 培養 7 日後 CPE を認めない場合は漸次、2 回継代培養を行った後、ウイルス増殖の有無を確認する。
- ウイルス増殖が確認された場合は、限界希釈法等による株のクローニングを行い、同定を試みる。

3-7-3 Vero 細胞を用いた亜急性硬化性全脳炎ウイルスの分離

亜急性硬化性全脳炎（SSPE）ウイルスは細胞結合性が強く、このため通常とは異なる混合培養法によってのみ分離可能である。

- 被検材料（脳組織小片）を細切（1mm 前後）して、Vero 細胞と混合培養する。
- CPE 陰性の場合は漸次、継代培養を繰り返す。B95a 細胞を用いても分離可能である。

3-7-4 培養過程中的細菌等の混入

臨床材料には種々の細菌等の混入があり、これらの増殖を抑制するため、ウイルス分離に供する輸送・保存液には高力価の抗生物質を含んでいる。しかし、薬剤耐性菌等の混入によりウイルス分離培養が不能となる場合がある。

なお、抗真菌剤（アンホテリシン B など）は単核球細胞等に対して細胞毒性を強く発現する場合や薬剤によっては僅かながらウイルス増殖を抑制する場合があるので、使用に

際しては注意が必要である。

[細菌等の除去方法]

- 培養中に細菌、真菌などの混入が観察される場合は、ただちに培養を中止し、培養液を回収する。
- 回収した培養液を凍結融解あるいは超音波処理する。
- 3,000rpm, 20 分間遠心沈澱した上清をフィルター (0.22 μ m) を過処理する。
- 処理試料を再出発試料としてウイルス分離増殖を継続する。

3-8 分離ウイルスの同定

一般に分離ウイルス株の同定は血清学的手法により行う。同定に用いるウイルスは限界希釈法等によりクローニングを行った後、増殖・保存されたウイルス液を使用することが望ましい。

その他、生物学的性状 (HA 活性の欠損の有無, プラークサイズの大小), ウイルス構成 H 蛋白の分子量の推定, N 蛋白領域を認識する遺伝子の系統樹解析, H 蛋白領域を認識する遺伝子の塩基置換などを精査検討することにより株の由来同定が可能である。

3-8-1 中和試験

いずれかの方法による中和試験が実施される。

[血清希釈法による中和試験]

- 2 倍階段希釈した標準抗麻疹血清 50 μ l に等量の 100TCID₅₀ に調整した未同定ウイルス液を加え, 37°C, 60 分間あるいは 4°C, 16-18 時間反応させる。
- 標準 MV 株 (2002 現在豊島株が使用されている。) の系を同様に作製, 反応させる。
- あらかじめ単層形成 (24 穴プラスチックプレート) させた培養細胞に 1 希釈あたり 2 穴接種し, 37°C, 60 分間静置後, MM0.9ml を加え, 培養を継続する。
- 攻撃ウイルス量がいずれも所定量であったことを確認のうえ, 未同定ウイルス株および標準ウイルス株に対するそれぞれの中和価が近似である場合, 分離ウイルス株は MV と同定される。

[ウイルス希釈法による中和試験]

- 未同定ウイルス液および標準 MV 液の 10 倍階段希釈列を作製する。
- あらかじめ適切な濃度 (5-10 倍) に希釈した標準抗麻疹血清 50 μ l に等量のそれぞれのウイルス階段希釈液を加え, 37°C, 60 分間あるいは 4°C, 16-18 時間反応させる。

- ウイルス対照は標準抗麻疹血清のかわりに陰性血清（あるいは MM）を用いて同様の系を作製する。
- あらかじめ単層形成（24 穴プラスチックプレート）させた培養細胞に 1 希釈あたり 4 穴接種し、37℃、60 分間静置後、MM0.9ml を加え、培養を継続する。
- それぞれの系の終末ウイルス感染価を求める。ウイルス対照の示す感染価(対数表示)から未同定ウイルス液の感染価(対数表示)を減じた値（中和指数）が 0.5 以上を示す場合、分離ウイルス株は MV と同定される。なお、標準ウイルス株に対する値が同様の結果であることを確認する。

3-8-2 感染細胞を用いた間接蛍光抗体法

- 感染培養細胞（回収後、PBS で 1 回洗浄してもよい）をスライドグラスに塗抹する。
- 安全キャビネット内で風乾後、冷アセトンで固定（5 分間）する。
- 8 単位に調整した抗麻疹モノクローナルマウス血清を重層し、加湿箱内に静置し、37℃、30 分間反応させる。
- PBS で 3 回洗浄する。
- 8 単位に調整した FITC 標識抗マウス IgG 血清を重層し、加湿箱内に静置し、37℃、30 分間反応させる。なお、抗麻疹モノクローナルマウス血清の代わりに抗麻疹ポリクロナルモルモット／ウサギ血清を用いてもよい。
- PBS で 3 回洗浄後、グリセリン加 PBS で封入する。
- 蛍光顕微鏡下で特異蛍光抗原の有無を観察する。
- 陽性対照として MV 標準株感染細胞および陰性対照として正常培養細胞を同様に処理し、観察する。

3-9 分離ウイルス株の増殖・保存

分離ウイルス株の性状解析等の検査・研究に使用するウイルス液は、高力価の感染価を有すること、熱不活化ウイルスや欠損干渉（DI）粒子等の含有が最小限であることが望ましい。

〔ウイルス液の調製方法〕

- 培養細胞にウイルスを感染させ培養する。
- CPE が培養細胞の約 80%に観察される時期に新鮮な培養液に全量、交換する。
- 6－8 時間、培養を継続した後、培養液を回収する。
- 凍結融解あるいは超音波処理を行った後、3,000rpm.、10 分間遠心沈澱した上清をウイルス液として使用するまで保存（-80℃）する。
- 保存ウイルス液は、株／ロットごとにあらかじめ感染価を測定する。感染価は、50% 終末値を Reed & Muench 法または Behrens-Karber 法で算出し、TCID₅₀/ml で表示する。

3-10 分離ウイルス株の命名法

WHO “Standardization of the Nomenclature for Genetic Characteristics of Wild-type Measles Viruses”において、分子疫学的解析から野外 MV 分離ウイルスの命名が次のとおり提案された。

- 臨床材料から細胞培養によりウイルス株が得られた場合は、
Mvi / City. Country / Weeks-Year / Strain number [Genotype]
- 臨床材料の RNA からウイルス遺伝子が検出された場合は、
Mvs / City. Country / Weeks-Year / Strain number [Genotype]
 - City : 分離された市名あるいは県名
 - Country : 分離された国名
 - Weeks : 臨床材料が採取された週（1 年を 52 週として表記）
 - Year : 分離された年
 - Strain number : 分離された場所および週が同一の場合の整理番号
 - Genotype : 遺伝子型
- 特殊な臨床材料からウイルスが分離された場合は、Genotype の後に、略号を附す。
(MIBE) : measles inclusion body encephalitis
(SSPE) : subacute sclerosing panencephalitis

4 遺伝子学的検査（特異遺伝子の増幅／解析）

現在、MV の遺伝子解析には、主に逆転写 PCR 法（RT-PCR）による HA 遺伝子増幅による検出、HA 遺伝子 PCR-RFLP（Restricting fragment length polymorphism）、さらに HA あるいは NP 遺伝子相同解析および分子系統樹解析が行われている。ここでは、HA 遺伝子の RT-PCR、PCR-RFLP およびダイレクトシーケンス法による NP 遺伝子の相同解析ならびに近隣結合法による分子系統樹解析について概略を述べる。

4-1 RT-PCR 法および PCR-RFLP 法

4-1-1 材料

材料は咽頭拭い液、PBMCs、髄液あるいは MV 分離株を用いる。

4-1-2 主な試薬・機器

- ウイルス RNA 抽出キット（例： QIA amp Viral RNA Mini Kit ; キアゲン社）

- DNA 精製キット（例：QIA quick PCR Purification Kit；キアゲン社）
- 逆転写酵素（AMV 由来；宝酒造社）
- TaqDNA Polymerase および dNTP mixture（宝酒造社）
- RNase inhibitor（ヒト胎盤由来；宝酒造社）
- HA 遺伝子増幅用プライマー（MHL1,2 および MHR1,2）
MHL1 : 5'-AAC GGA TGA TCC AGT GAT AG-3'
MHL2 : 5'-TAC CTC TCA TCT CAC AGA GG-3'
MHR1 : 5'-TTG AAT CTC GGT ATC CAC TC-3'
MHR2 : 5'-CAC CTA AGG CTA GGT TCT TC-3'
- アガロース（アガロース X；ニッポンジーン社）
- 分子マーカー（例： ϕ 174/*HincII* digest；ニッポンジーン社）
- 制限酵素（*Sau3AI*；クラボウ社）
- 電気泳動装置（例：ミューピッド；コスモバイオ社製）
- 1.5ml エッペンドルフチューブ用高速冷却遠心機
- 1.5ml エッペンドルフチューブ用卓上高速遠心機（例：チビタン；ミリポア社）
- UV トランスイルミネーターおよびゲル電気泳動写真撮影装置
- 遺伝子増幅装置（例：ABI9600；アプライドバイオシステム社）

4-1-3 ウイルス RNA 抽出（所要時間：約 1.5 時間）

ウイルス RNA (vRNA) の抽出は、キット添付文書に準じて行う。

4-1-4 HA 遺伝子 RT-PCR 法および PCR-RFLP 法（所要時間：約 2 日）

まず、前項（4-1-3）で抽出した vRNA 溶液 5 μ l, プライマー(20pmols), dNTP mixture(1 mM), RNase inhibitor(20units), AMV 由来逆転写酵素(5 units), x10 reaction buffer(2 μ l)に超純水を添加して総量 20 μ l にした後, 42°C 30 分, 95°C 5 分のインキュベーションにより cDNA 合成と逆転写酵素の不活化を行う。RT 反応を行ったチューブに 1st PCR-Mix を 80 μ l 添加して 1st PCR を行う。1st PCR は, 94°C 2 分を 1 サイクル, 94°C 2 分, アニーリング 53°C 3 分, 72°C 2 分 30 秒を 30 サイクル, 伸長反応 72°C 7 分を 1 サイクル行う。Nested PCR は, 1st PCR 産物 5 μ l を鋳型とし, 総量 50 μ l でアニーリング温度を 55°C に変更する以外は 1st PCR と同じ条件で行う。プライマーは, RT と 1st PCR には MHL1:5'-AAC GGA TGA TCC AGT GAT AG-3', MHR1:5'-TTG AAT CTC GGT ATC CAC TC-3', Nested PCR には, MHL2:5'-TAC CTC TCA TCT CAC AGA GG-3' と MHR2:5'-CAC CTA AGG CTA GGT TCT TC-3'を用いる。Nested PCR 産物 20 μ l に *Sau3AI*(10units), 緩衝液および超純水を添加し, 総量 50 μ l で 37°C 12 時間インキュベーションする。消化産物 5 μ l を 3 %アガロースゲルにアプライ後, 約 40 分間電気泳動 (100V) を行う。泳動したゲルをエチジウムブロマイド染色後, UV 照射下で DNA 切断パターンを確認する。PCR-RFLP の結果を図 1 に示す。

理論上、HA 遺伝子の Nested PCR 産物(349bp)を *Sau3AI* で処理すると Edmonston 株を由来とするワクチン株は、198bp, 95bp, 56bp の3つの断片に切断される。1980 年以降、世界的に分離されている contemporary strain は、254bp と 95bp の2つの断片に切断される。HA 遺伝子解析位置および上述の手順を図2, 3に示す。各々の反応系における試薬量・濃度などは以下のとおりである。

作成 1 (RT-Mix)

vRNA	5 μ l
x10 reaction buffer	2 μ l
dNTP mixture (20mM)	1 μ l
AMV Reverse transcriptase (5u/ μ l)	1 μ l
RNase inhibitor (20u/ μ l)	1 μ l
Primer(MHL1 および MHR1) (20 μ M)	各 1 μ l
H ₂ O	8 μ l
計	20 μ l

作成 2 (1st PCR-Mix)

Taq DNA polymerase (2.5u/ μ l)	1 μ l
Primer(MHL1 および MHR1) (20 μ M)	各 2 μ l
H ₂ O	75 μ l
計	80 μ l

注：80 μ l の作成 2 を RT が終了した作成 1 のチューブに添加して 1st PCR を行う。

作成 3 (Nested PCR-Mix)

1st PCR product	5 μ l
x10 reaction buffer	5 μ l
dNTP mixture (20mM)	2.5 μ l
Taq DNA polymerase (2.5u/ μ l)	1 μ l
Primer(MHL2 および MHR2) (20 μ M)	各 2 μ l
H ₂ O	32.5 μ l
計	50 μ l

作成 4 (PCR-RFLP)

Nested-PCR 産物	20 μ l
<i>Sau3AI</i>	2 μ l (5u/ μ l)
x10 reaction buffer	5 μ l
H ₂ O	23 μ l
計	50 μ l

4-2 NP 遺伝子相同解析および分子系統樹解析

4-2-1 主な試薬・機器（4-1-2 と重複しないもの）

- DNA 精製キット 1（例：QIA quick PCR Purification Kit；キアゲン社製）
- DNA 精製キット 2（例：genCLEAN；Genetix 社製）
- シークエンス用 DNA 蛍光標識キット
（例：Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit）
- ゲル切り出しチップ（例：フナゲルチップ II；フナコシ社）
- NP 遺伝子増幅用プライマー（pMvGTf1,2 および pMvGTr1,2）
- DNA シークエンサー（例：ABI310；Applied Biosystem 社製）

4-2-2 ウイルス RNA 抽出（所要時間：約 1 時間）

前項(4-1-3)と同様に抽出した vRNA を用いる。

4-2-3 NP 遺伝子 RT-PCR 法およびダイレクトシークエンス法（所要時間：2－3 日）

RT および 1st PCR はプライマー(10pmols), 94℃ 2 分, 53℃ 3 分, 72℃ 2 分 30 秒を 35 サイクル, Nested PCR は, 1st PCR 産物 5 μl を鋳型として HA 遺伝子の PCR と同様に行う。プライマーは RT と 1st PCR は, pMvGTf1:5'-CGA TCT TAC TTT GAT CCA GC-3', pMvGTr1:5'-TTA TAA CAA TGA TGG AGG-3'を用いる。Nested PCR とシークエンスのプライマーは, pMvGTf2:5'-AGA TTA GGG CAA GAG ATG GT-3', pMvGTr2:5'-GAG GGT AGG CGG ATG TTG TT-3'を用いる。PCR 産物は, 3 %アガロースゲル電気泳動・エチジウムブロマイド染色後, UV 照射下で目的とするバンド(1 st, 574bp, Nested, 533bp)をゲル切り出しチップを用いて採取する。DNA 精製キット 1 を用いて採取したゲルから目的とする DNA を精製する。塩基配列の決定は, Nested-PCR 産物を鋳型として市販のシークエンス用 DNA 蛍光標識キットを用い, 10pmols プライマー, PCR 条件 96℃10 秒, 55℃ 5 秒, 60℃ 4 分, 25 サイクル行い, シークエンス試料を作成する。さらに, この試料を DNA 精製キット 2 によって精製, 緩衝液 (TSR) に溶解後, ダイレクトシークエンス法により NP 遺伝子配列を決定する。相同解析は配列が決定された NP 遺伝子の 493 塩基(position;1214-1706)について行い, さらに遺伝子位置 1302～1686(385 塩基)を近隣結合法(Neighbor-joining 法)によって分子系統樹解析を行うとよい。分子系統樹作成には目的にあったソフトウェア (TREEVIEW など) を使用するとよい。今までのところ, 最近本邦で分離された株は NP 遺伝子解析ではクラスター D 3 あるいは D5 に分類されることが多い。NP 遺伝子解析位置を図 2, 解析によって得られた典型的な NP 遺伝子相同解析例と分子系統樹を図 4, 5 に示す。なお, 分離株あるいは PCR 産物の相同解析・分子系統樹解析が実施困難な場合は, 国立感染症研究所に解析依頼が可能である。また, 各々の反応系における試薬量・

濃度などは以下のとおりである。

作成 1 (RT-Mix)

vRNA	5	μ l
x10 reaction buffer	2	μ l
dNTP mixture (20mM)	1	μ l
AMV Reverse transcriptase (5u/ μ l)	1	μ l
RNase inhibitor (20u/ μ l)	1	μ l
Primer(pMvGTf1 および pMvGTr1) (10 μ M)	各 1	μ l
H ₂ O	8	μ l
計	20	μ l

作成 2 (1st PCR-Mix)

Taq DNA polymerase (2.5u/ μ l)	1	μ l
Primer(pMvGTf1 および pMvGTr1) (20 μ M)	各 1	μ l
H ₂ O	77	μ l
計	80	μ l

注：80 μ l の作成 2 を RT が終了した作成 1 のチューブに添加して 1st PCR を行う。

作成 3 (Nested PCR-Mix)

1st PCR product	5	μ l
x10 reaction buffer	5	μ l
dNTP mixture (20mM)	2.5	μ l
Taq DNA polymerase (2.5u/ μ l)	1	μ l
Primer(pMvGTf2 および pMvGTr2) (20 μ M)	各 1	μ l
H ₂ O	34.5	μ l
計	50	μ l

作成 4 (記載キットにおける PCR-Mix)

Premix	4	μ l
スピンカラム精製 DNA 試料	1	μ l
Primer(pMvGTf2 および pMvGTr2) (20 μ M)	各 0.5	μ l
H ₂ O	4	μ l
計	10	μ l

5 血清学的検査

抗体検出は赤血球凝集抑制 (HI) 試験法, ゼラチン粒子凝集 (GPA) 法, 受身凝集法(PHA)、酵素抗体測定法 (EIA), 中和試験 (NT) 法などが応用され抗体測定が行われている。抗体測定を行うことにより血清学的診断や, 個人/集団の免疫状況を把握することができ, ワクチンの効果判定, 追跡調査, 血清疫学調査が可能となる。また, 未同定臨床ウイルス株の血清学的な同定法として, NT 試験法や間接蛍光抗体法などが応用される。

なお, 使用済みの器具等は適切な処理を行い感染性因子を排除した後, 実験区域から搬出しなければならない。

5-1 赤血球凝集抑制試験法

特別な施設, 設備を必要とせず, 感染性ウイルスによる汚染/感染防止に配慮する必要がないため BSL1 に準拠した施設, 操作でよいことなどから, これまで血清疫学的調査, 血清診断等に最も応用された試験法である。

近年の臨床ウイルス株では赤血球凝集 (HA) 活性が欠損していること, 試験に必要なミドリザル赤血球が入手困難な場合が多いことなどの理由から他の測定法に移行するものと思われる。

5-1-1 使用器具

- マイクロプレート (96 穴, U 型)
- マイクロピペット
- ドロップパー
- トレイミキサー
- 判定用ビューアー

5-1-2 必要試薬

- 希釈液(BSA,ゼラチン添加 1 /15MPBS)
- 25%カオリン (pH7.2)
- 0.5%ミドリザル赤血球浮遊液
- HA 抗原
- HI 抗血清
- PBS 飽和エーテル液
- 0. 5% Tween80－1/15M PBS 溶液

〔試薬の調製法〕

1/15M PBS

NaCl	4.0 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	17.18 g
KH ₂ PO ₄	2.53 g

純水に溶解し、1,000ml (pH7.2) とし、高圧蒸気滅菌する。

5%BSA 液

BSA (Fraction V)	5.0 g
------------------	-------

1/15M PBS 100ml に溶解し、フィルターろ過滅菌する。

1 %ゼラチン液

ゼラチン	1.0 g
------	-------

純水 100ml に溶解し、115℃, 10 分間高圧蒸気滅菌する。

希釈液

5% BSA 液	4.0 ml
1% ゼラチン液	2.0 ml

1/15M PBS で最終 200ml とする。

25%カオリン (pH7.2) 浮遊液

カオリン	25 g
1/15M PBS	100 ml

ミドリザル赤血球浮遊液

PBS を用いて 3 回洗浄 (2,500rpm., 15 分間) した沈渣赤血球と等量の希釈液を加え、50% 赤血球浮遊液を調製する。

HA および HI 試験には 0.5% 赤血球浮遊液を用いる。

0.5% Tween-PBS 液

PBS 飽和エーテル液

エーテルに PBS を加えて、よく攪拌し、静置する。両層が分離したらエーテル層を分取する。

HA 抗原

MV 感染培養液上清を出発試料として、5% Tween 溶液で 4℃, 30 分処理後、PBS 飽和エーテルで Tween を除去。エーテルをとばしたものを HA 抗原とする。

HI 試験には 4 単位の抗原量を用いる。なお、近年の臨床ウイルス株では HA 活性が欠損しているため、株の選択には注意が必要である。

体外診断用医薬品「麻疹ウイルス HI 試薬「生研」」(デンカ生研社) が市販されている。この麻疹 HA 抗原は豊島株 (A 型) 由来である。その他の市販品として、1/15MPBS, 25% カオリン浮遊液および希釈液「麻疹 HI 試験用試薬「生研」別売」がある。

5-1-3 被検血清の前処理

検体中には MV 赤血球凝集素に対する非特異的赤血球凝集抑制物質およびミドリザル赤血球に対する赤血球自然凝集素が存在するため、HI 試験に先立ち処理が必要である。

[非特異的赤血球凝集抑制物質および赤血球自然凝集素の除去法]

- 被検血清、陽性対照血清および陰性対照血清それぞれ $100\mu\text{l}$ に 25%カオリン $400\mu\text{l}$ と 1/15M PBS $300\mu\text{l}$ を加え、振とう混和しながら 22°C 、20 分間放置する。
- 2,500rpm., 10 分間遠心沈澱後、上清を分離する。
- 50%赤血球浮遊液を $100\mu\text{l}$ 加え、振とう混和しながら 22°C 、60 分間放置する。
- 2,500rpm., 10 分間遠心沈澱後、上清を 8 倍処理血清とする。

5-1-4 赤血球凝集試験

HI 試験に用いる HA 抗原量を 4HA 単位/ $25\mu\text{l}$ に調整するため、あらかじめ抗原量を測定する。

[HA 試験法の術式]

- 希釈液 $25\mu\text{l}$ を第 2 穴から第 12 穴まで加える。
- HA 抗原 $25\mu\text{l}$ を第 1 穴および第 2 穴に加え、第 2 穴から第 11 穴まで 2 倍階段希釈を行う。
- 希釈液 $25\mu\text{l}$ を第 1 穴から第 12 穴まで加える。
- 0.5%赤血球浮遊液 $50\mu\text{l}$ を第 1 穴から第 12 穴まで加える。
- プレートを充分、振とう混和後、 37°C 、120 分間(90 分でも可)静置する。
- 判定。

5-1-5 赤血球凝集抑制試験

前処理をした被検血清中の HI 抗体を測定する。

[HI 試験の術式]

- 希釈液 $25\mu\text{l}$ を第 2 穴から第 12 穴まで加える。
- カオリンおよび血球処理をした血清検体 $25\mu\text{l}$ を第 1 穴、第 2 穴および第 12 穴にそれぞれ加え、第 2 穴から第 11 穴まで 2 倍階段希釈を行う。
- 対照用陽性血清および陰性血清も同様に 2 倍階段希釈列および血清対照を作製する。
- 4 単位に調整した HA 抗原液 $25\mu\text{l}$ を第 1 穴から第 11 穴まで加える。
- プレートを充分、振とう混和後、室温、60 分間静置する。
- 0.5%赤血球浮遊液 $50\mu\text{l}$ を第 1 穴から第 12 穴まで加える。
- プレートを充分、振とう混和後、 37°C 、120 分間(90 分でも可)静置する。

- 判定。

5-1-6 使用抗原量の二次検定

HI 試験に用いた HA 抗原量が適正量であることを確認する。

使用抗原量が 4HA 単位/25 μ l と異なった場合は、抗原量を再調整し、HI 試験を行うことが望ましい。

[二次検定の術式]

- 希釈液 25 μ l を第 2 穴から第 6 穴まで加える。
- HI 試験に用いた HA 抗原液 25 μ l を第 1 穴および第 2 穴にそれぞれ加え、第 2 穴から第 5 穴まで 2 倍階段希釈を行う。
- 希釈液 25 μ l を第 1 穴から第 6 穴まで加える。
- プレートを充分、振とう混和後、室温、60 分間静置する。
- 0.5% 赤血球浮遊液 50 μ l を第 1 穴から第 6 穴まで加える。
- プレートを充分、振とう混和後、37℃、120 分間(90 分でも可)静置する。
- 判定。

5-1-7 判定

HA を抑制した最高血清希釈倍数を HI 抗体価とする。

なお、試験が成立するためには、使用した HA 抗原量が 4HA 単位であること、陽性対照血清/陰性対照血清がそれぞれ所定の HI 抗体価を示すこと、被検血清対照（第 12 穴）の凝集像が陰性であること、などの要件が必要である。

5-2 ゼラチン粒子凝集法

ゼラチン粒子を人工担体として、精製 MV 由来抗原を吸着させた粒子凝集試験である。操作が容易であり、BSL1 に準拠した環境で実施可能なことから、多用されている。

現在、粒子に吸着されている抗原は豊島株（A 型）由来であるため、他の遺伝子型に属するウイルス株に対する抗体価と僅かな差が生じていることが推察されている。

5-2-1 使用器具

マイクロプレート（96 穴，U 型）

マイクロピペット

ドロPPER

トレイミキサー

判定用ビューアー

5-2-2 試薬

体外診断用医薬品「セロディアー麻疹」（富士レビオ社）として市販されている。

5-2-3 キットの構成および調製法

溶解用液（液状）：感作粒子および未感作粒子の調製にこのまま用いる。

血清希釈用液（液状）：検体の希釈にこのまま用いる。

感作粒子（凍結乾燥）：使用の 30 分前に溶解用液を所定量加え、室内温度（15－30℃）で溶解する。調製時、MV 抗原感作ゼラチン粒子 1%を含む。

未感作粒子（凍結乾燥）：使用の 30 分前に溶解用液を所定量加え、室内温度（15－30℃）で溶解する。調製時、タンニン酸処理ゼラチン粒子 1%を含む。

対照用陽性血清（液状）：ヒト免疫グロブリンを含み、抗体価は 128 倍（最終希釈倍数）となるように調製されたもの。

5-2-4 測定法

- 血清希釈用液 25 μ l を第 1 穴から第 12 穴まで加える。
- 検体 25 μ l を第 1 穴（血清希釈倍数：2¹）に加え、第 12 穴（血清希釈倍数：2¹²）まで 2 倍階段希釈を行う。
- 対照用陽性血清 25 μ l を第 1 穴に加え、第 12 穴まで 2 倍階段希釈を行う。
- 未感作粒子 25 μ l を検体および対照用陽性血清希釈列の第 2 穴にそれぞれ加える。
- 感作粒子 25 μ l を検体および対照用陽性血清希釈列の第 3 穴（最終血清希釈倍数：2⁴）から第 12 穴（最終血清希釈倍数：2¹³）まで加える。
- プレートを充分、振とう混和後、室内温度に 120 分間静置する。
- 判定。

5-2-5 判定基準

陽性：未感作粒子（最終希釈倍数 2³ 倍）の反応像の読みが（－）で、感作粒子（最終希釈倍数 2⁴ 倍）の反応像の読みが（＋）以上を示すものを陽性とし、反応像の読みが（＋）を示した最終希釈倍数を抗体価とする。

陰性：未感作粒子の反応像の読みにかかわらず、感作粒子（最終希釈倍数 2⁴ 倍）の反応像の読みが（－）を示すものを陰性とする。

保留：未感作粒子（最終希釈倍数 2^3 倍）の反応像の読みが（－）で、感作粒子（最終希釈倍数 2^4 倍）の反応像の読みが（±）を示すものを保留とする。

なお、試験成立には、検体の未感作粒子（最終希釈倍数 2^3 倍）の反応が（－）であること、別に用意した血清希釈用液と感作粒子および未感作粒子の反応が（－）であること、対照用陽性血清が示された抗体価を示すこと、などの要件を満たすことが必要である。

5-2-6 非特異的反応

まれにゼラチン粒子に対する凝集因子を含む検体が認められる。未感作粒子および感作粒子が共に（±）以上の凝集像を示した検体は、ゼラチン粒子吸収操作を行った後、再試験する。

〔粒子吸収操作法〕

- 所定量の溶解液で調製した未感作粒子 $150\mu\text{l}$ に検体 $50\mu\text{l}$ を加えて室内温度（15－30℃）に 20 分以上放置する。
- 遠心沈澱（2,000rpm, 5 分間）した上清 2^2 倍処理血清として供試する。

5-3 IgG 抗体検出酵素抗体測定法

ウイルス感染細胞および正常細胞培養液を出発試料としてそれぞれ精製・濃縮したウイルスおよび正常抗原をマイクロプレートに固相した系を用いて、酵素・基質反応による発色量を定量し、抗体を測定する方法である。

発色量の測定に特殊な機器（イムノリーダー）が必要であるが、BSL1 に準拠した環境で実施可能なこと、迅速性に優れていること、PC による自動解析が応用されているなどの理由から多用されている。各社から体外診断用医薬品キットが市販されている。

体外診断用医薬品『麻疹 IgG(II)- EIA 「生研」』（デンカ生研社）を例に記述する。

5-3-1 使用器具

ピペット

メスシリンダー

フラスコ

マイクロプレート（検体希釈用）

マイクロピペット

マイクロプレートミキサー

マイクロプレート自動洗浄装置

マイクロプレートリーダー（マイクロプレート用比色計）

5-3-2 キットの構成

ウイルス抗原固相プレート

精製 MV 抗原およびウシ血清アルブミンを至適濃度に調製して固相化されたプレート。

対照抗原固相プレート

KB 細胞成分およびウシ血清アルブミンを至適濃度に調製して固相化されたプレート。

緩衝液

塩化ナトリウム 0.85W/V%, ウシ血清アルブミン 0.5 W/V%および Tween20 0.05V/V% を含むリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液で、検体および酵素標識抗体の希釈に用いる。

陰性コントロール

MVIgG 型抗体陰性ヒト血清を使用希釈倍数に希釈したもので、アジ化ナトリウム 0.1W/V%が含まれる。

弱陽性コントロール

MVIgG 型抗体弱陽性ヒト血清を使用希釈倍数に希釈したもので、アジ化ナトリウム 0.1W/V%が含まれる。

強陽性コントロール

MVIgG 型抗体強陽性ヒト血清を使用希釈倍数に希釈したもので、アジ化ナトリウム 0.1W/V%が含まれる。

酵素標識抗体

ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体 (20 μ g/ml ; ヤギ) を含むリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液で、緩衝液で 20 倍に希釈して使用する。

基質液

3,3', 5,5'- テトラメチルベンチジン (0.3mg/ml), 過酸化水素 0.0075V/V%を含む液で、そのまま使用する。

洗浄原液

塩化ナトリウム 8.5W/V%, Tween 20 0.5V/V%を含むリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液で、精製水で 10 倍に希釈して使用する。

反応停止液

0.6N 硫酸液。

プレート用ホルダー

5-3-3 検体の調整

EIA による抗体検出感度，非特異反応による偽陽性反応出現頻度等を考慮し，あらかじめ検体を至適の濃度に希釈する。

- 試験管に緩衝液を 2ml 分注する。
- 検体を 10 μ l 加え，200 倍希釈検体とする。

5-3-4 測定法

- ウイルス抗原固相プレートおよび対照抗原固相プレートを交互にホルダーにはめ込む。
- ウイルス抗原固相プレートおよび対照抗原固相プレートの各穴に陰性コントロール，弱陽性コントロール，強陽性コントロールおよび希釈検体をそれぞれ 100 μ l ずつ加える。この時，ブランク調整用穴は何も加えず，弱陽性コントロールは 2 穴（二重測定）とする。各試料は一定の順序および時間間隔で加える。
- マイクロプレート用ミキサーで数秒間振とう後，室温（15－20℃）に 60 分間静置する。
- マイクロプレート自動洗浄装置を用いて，反応液を吸引除去し，洗浄液 200 μ l で各穴を洗浄する。
用手法で行う場合は，一定の順序，時間間隔を守ることが望ましい。
- 洗浄操作を更に 2 回行った後，洗浄液を完全に取り除く。
- 各穴に酵素標識抗体液 100 μ l を一定の順序，時間間隔で加える。
- マイクロプレート用ミキサーで数秒間振とう後，室温（15－20℃）に 60 分間静置する。この時，ブランク調整用穴には酵素標識抗体液を加えない。
- マイクロプレート自動洗浄装置を用いて，反応液を吸引除去し，洗浄液 200 μ l で各穴を洗浄する。
- 洗浄操作を更に 4 回行った後，洗浄液を完全に取り除く。
- 全穴に基質液 100 μ l を一定の順序，時間間隔で加える。
- マイクロプレート用ミキサーで数秒間振とう後，遮光し，室温（15－20℃）に 30 分間静置する。このときブランク調整用穴にも基質液を加える。
- 全穴に反応停止液 100 μ l を一定の順序，時間間隔で加える。このときブランク調整用穴にも反応停止液を加える。
- 反応停止後 30 分以内に各穴の吸光度を測定（測定波長 450/630nm）する。

5-3-5 判定

各コントロールと検体のウイルス抗原固相プレートの吸光度から対照抗原固相プレートの吸光度を減じた値をそれぞれの吸光度値とし、つぎの基準により判定する。なお、弱陽性コントロールの吸光度値は2穴の吸光度値の平均値とする。

IgG 抗体陽性： (検体の吸光度値) / (弱陽性コントロールの吸光度値) ≥ 1.0

IgG 抗体陰性： (検体の吸光度値) / (弱陽性コントロールの吸光度値) < 0.5

判定保留： $0.5 \leq$ (検体の吸光度値) / (弱陽性コントロールの吸光度値) < 1.0

5-4 定量的 IgG 抗体測定法

別売の〔コントロール麻疹 IgG(II)「生研」〕をコントロール血清として用いると IgG 抗体の定量的測定ができる。

操作法は定性測定法で用いた3種のコントロール血清に代えて、6種のコントロール血清を用いるほかは、定性測定法の操作と同様である。

5-4-1 判定

各コントロール麻疹 IgG(II)と検体のウイルス抗原固相プレートの吸光度から、対照抗原固相プレートの吸光度を減じた値をそれぞれの吸光度値とする。各コントロール麻疹 IgG(II)の抗体価（EIA 価）を横軸、それぞれの吸光度値を縦軸に標準検量線を作成する。検量線を参考にして、検体の吸光度値に対応する抗体価（EIA 価）求め、つぎの基準により判定する。なお、この場合の抗体価（EIA 価）は検体中の抗体量を陽性反応検出限界まで希釈したときの希釈倍数の $1/100$ をもって表した値である。

また、抗体価（EIA 価）が 128 倍以上を示す検体では緩衝液を用いて適切な倍数に希釈した後、再度測定することが望ましい。

IgG 抗体陽性： 抗体価（EIA 価） ≥ 4

IgG 抗体陰性： 抗体価（EIA 価） < 2

判定保留： $2 \leq$ 抗体価（EIA 価） < 4

5-5 IgM 抗体検出 酵素抗体測定法

精製・濃縮した抗ヒト IgM 抗体をマイクロプレートに固相した系による捕捉 EIA 法で、IgM 抗体を定性的に特異的かつ高感度に測定できる。酵素・基質反応による発色、発色量の測定に特殊な機器等、実験環境等は前項（4-3）と同様である。各社から体外診断用医薬品キットが市販されている。

『麻疹 IgM(II)- EIA「生研」』（デンカ生研社）を例に記述する。

5-5-1 使用器具 : 前項 4-3-1 に準ずる。

5-5-2 キットの構成

抗ヒト IgM 抗体固相プレート

抗ヒト IgM モノクローナル抗体（マウス）をマイクロプレートに固相化したもの。

ウイルス抗原

精製 MV 抗原およびウシ血清アルブミンを至適濃度に調製して凍結乾燥したもの。

対照抗原

KB 細胞成分およびウシ血清アルブミンを至適濃度に調製して凍結乾燥したもの。

緩衝液

塩化ナトリウム 0.85W/V%，ウシ血清アルブミン 0.5 W/V%および Tween20 0.05V/V%を含むリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液で、検体および酵素標識抗体の希釈に用いる。

陰性コントロール

MVlgM 型抗体陰性ヒト血清を使用希釈倍数に希釈したもので、アジ化ナトリウム 0.1W/V%が含まれる。

弱陽性コントロール

MVlgM 型抗体弱陽性ヒト血清を使用希釈倍数に希釈したもので、アジ化ナトリウム 0.1W/V%が含まれる。

強陽性コントロール

MVlgM 型抗体強陽性ヒト血清を使用希釈倍数に希釈したもので、アジ化ナトリウム 0.1W/V%が含まれる。

酵素標識抗体

ペルオキシダーゼ標識抗麻疹ウイルスモノクローナル抗体（マウス）（20 μ g/ml）を含むトリス塩酸緩衝塩化ナトリウム液で、緩衝液で 20 倍に希釈して使用する。

基質液

3,3', 5,5'- テトラメチルベンチジン (0.3mg/ml)，過酸化水素 0.0075V/V%を含む液で、そのまま使用する。

洗浄原液

塩化ナトリウム 8.5W/V%, Tween 20 0.5V/V%を含むリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液で、精製水で 10 倍に希釈して使用する。

反応停止液

0.6N 硫酸液。

プレート用ホルダー

5-5-3 検体の調整

EIA による抗体検出感度、非特異反応による偽陽性反応出現頻度等を考慮し、あらかじめ検体を至適の濃度に希釈する。

- 試験管に緩衝液を 2ml 分注する。
- 検体を 10 μ l 加え、200 倍希釈検体とする。

5-5-4 測定法

- 抗ヒト IgM 抗体固相プレートをホルダーにはめ込み、シールをはがした後、保存液をすてる。ブランク、各検体、陰性コントロール及び強陽性コントロールは各 2 穴ずつ、弱陽性コントロールは 4 穴（二重測定）を用意する。
- 抗ヒト IgM 抗体固相プレートに各コントロールと希釈検体をそれぞれ 100 μ l ずつ一定の順序および時間間隔で加える。この時、ブランク調整用穴には何も加えない。
- マイクロプレート用ミキサーで数秒間振とう後、室温（15–20℃）に 60 分間静置する。
- マイクロプレート自動洗浄装置を用いて、反応液を吸引除去し、洗浄液 200 μ l で各穴を洗浄する。用手法で行う場合は、一定の順序、時間間隔を守ることが望ましい。
- 洗浄操作を更に 2 回行った後、洗浄液を完全に取り除く。
- 各検体、陰性コントロール及び強陽性コントロールの 2 穴のうち、1 穴にウイルス抗原液を 100 μ l、残りの 1 穴に対照抗原液を 100 μ l、また、弱陽性コントロールの 4 穴のうち、2 穴にウイルス抗原液を 100 μ l、残りの 2 穴に対照抗原液を 100 μ l ずつ一定の順序、時間間隔で加える。
- マイクロプレート用ミキサーで数秒間振とう後、室温（15–20℃）に 60 分間静置する。この時、ブランク調整用穴には抗原液を加えない。
- マイクロプレート自動洗浄装置を用いて、反応液を吸引除去し、洗浄液 200 μ l で各穴を洗浄する。

- 洗浄操作を更に2回行った後、洗浄液を完全に取り除く。
- 各穴に酵素標識抗体液 100 μ l を一定の順序および時間間隔で加える。この時、ブランク調整用穴には酵素標識抗体液を加えない。
- マイクロプレート用ミキサーで数秒間振とう後、室温（15－20℃）に 60 分間静置する。
- マイクロプレート自動洗浄装置を用いて、反応液を吸引除去し、洗浄液 200 μ l で各穴を洗浄する。
- 洗浄操作を更に4回行った後、洗浄液を完全に取り除く。
- 全穴に基質液 100 μ l を一定の順序、時間間隔で加える。この時、ブランク調整用穴にも基質液を加える。
- マイクロプレート用ミキサーで数秒間振とう後、遮光し、室温（15－20℃）に 30 分間静置する。
- 全穴に反応停止液 100 μ l を一定の順序、時間間隔で加える。この時、ブランク調整用穴にも反応停止液を加える。
- 反応停止後 30 分以内にブランク調整用穴を対照として各穴の吸光度を測定（測定波長 450/630nm）する。

5-5-5 判定

各コントロールと検体のウイルス抗原の吸光度から対照抗原の吸光度を減じた値をそれぞれの吸光度値とし、つぎの基準により判定する。なお、弱陽性コントロールの吸光度値は2穴の吸光度値の平均値とする。

IgM 抗体陽性： $\text{（検体の吸光度値）} / \text{（弱陽性コントロールの吸光度値）} > 1.2$

IgM 抗体陰性： $\text{（検体の吸光度値）} / \text{（弱陽性コントロールの吸光度値）} < 0.8$

判定保留： $0.8 \leq \text{（検体の吸光度値）} / \text{（弱陽性コントロールの吸光度値）} \leq 1.2$

5-6 中和試験法

感染防御能を強く反映する抗体測定法であり、近年の臨床ウイルス株に対する抗体測定が可能であることから、重要な試験法である。また、分離ウイルス株の血清学的な同定を行う際に応用される。

感染性ウイルスを取り扱うことから BSL 2 の施設環境が必要であるため、一部の施設でのみ応用されている試験法である。

5-6-1 使用器具

滅菌済みマイクロプレート（96 穴、フラット型）

マイクロピペット
ドロPPER
トレイミキサー
光学顕微鏡
インキュベータ
高圧蒸気滅菌器

5-6-2 試薬 : 培養細胞, 試薬等は病原体検査の項を参照のこと。

5-6-3 B95a 細胞を感染標的細胞とした同時接種法の術式

- 維持培養液 (MM) 25 μ l を第 1 穴から第 12 穴まで加える。
- 検体 25 μ l を第 1 穴に加え, 第 1 穴から第 12 穴まで 2 倍階段希釈を行う。1 検体について 2 列の希釈列を作成する。
- 対照用陽性血清および陰性血清も同様に 2 倍階段希釈列を作成する。
- ウイルス液 (100TCID₅₀/25 μ l に調整) 25 μ l を第 1 穴から第 12 穴まで加える。
- キャビネット内でプレートを充分, 振とう混和後, 37°C, 90 分間静置する。
- 細胞浮遊液 (GM で 2×10^6 個/ml に調整) 50 μ l を第 1 穴から第 12 穴まで加える。
- 37°C で 1 日間, 静置培養する。
- 新鮮な GM50 μ l を全穴に加え, 37°C で培養を継続する。
- 使用ウイルス量の二次検定が至適の値を示した時点で, 検体, 陽性血清および陰性血清の抗体価を判定する。

5-6-4 使用ウイルス量の二次検定

- 使用ウイルスの 10 倍階段希釈列 ($10^0 - 10^{-4}$) を作成する。
- 中和反応と同様に 37°C, 90 分間静置する。
- 中和反応に用いた細胞浮遊液 (GM で 2×10^6 個/ml に調整) 50 μ l を第 1 穴から第 6 穴まで加える。
- 維持培養液 (MM) 25 μ l を第 1 穴から第 6 穴まで加える。
- 各ウイルス希釈列の 25 μ l を細胞に接種する。接種穴数は各ウイルス希釈あたり 4 穴とする。細胞対照 (第 6 穴) にはウイルス液の代わりに MM25 μ l を接種する。
- 37°C で 1 日間, 静置培養する。
- 新鮮な GM50 μ l を全穴に加え, 37°C で培養を継続する。
- 判定。攻撃ウイルス感染価が 100TCID₅₀/25 μ l となった日を判定日数とする。

5-6-5 判定

5-6-4 における攻撃ウイルス判定日において、少なくとも 1 穴の CPE の発現を完全に抑制した最高血清希釈倍数を中和抗体価とする。

なお、試験が成立するためには、使用した攻撃ウイルス量が 100 (75~125) TCID₅₀/25 μ l であること、陽性対照血清、陰性対照血清がそれぞれ所定の中和抗体価を示すこと、細胞対照が正常に増殖していること、検体希釈列に雑菌等の混入がなく、培養細胞が正常に増殖していること、などの要件が成立しなければならない。

6. 引用文献

1. Okada, H., Kobune, F., Sato, T. A., Kohama, T., Takeuchi, Y., Abe, T., Takayama, N., Tsuchiya, T. Tashiro, M. (2000) Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch. Virol.* 145, 905- 920
2. 木村博一, 大月邦夫, 疋田博之, 森川昭廣, 竹田誠, 小船富美夫 (1999) : 群馬県で1998年に起こった麻疹流行の解析, 日本医事新報, 3936 : 45-49
3. Kobune, F., Sakata, H., Sugiura, A. (1990) Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. *J. Virol.* 64, 700-705
4. 水谷智代 (1981) Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA 法) による IgG・IgM 分離麻疹抗体測定法の研究. 臨床とウイルス, 9, 93-97
5. 野田雅博, 小船富美夫, 井上 栄, 堺 春美 (2000) 麻疹ワクチン接種後の抗体持続および野外ウイルス株の変異が予防接種による獲得抗体に及ぼす影響. 臨床とウイルス, 28, 23-30
6. Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K. Yanagi, Y. (2000) SLAM(CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406, 893-897
7. Saito, H., Nakagomi, O. and Morita, M.: (1995) Molecular identification of two distinct hemagglutinin types of measles virus by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), *Mol. Cell. Probes*, 9: 1-8
8. Sato, T. A., Miyamura K., Sakae, K., Kobune, F., Inouye, S., Fujino, R., Yamazaki, S.(1997) Development of a gelatin particle agglutination reagent for measles antibody assay. *Arch. Virol.* 142, 1971- 1977
9. Takeda, M., Sakaguchi, T., Li, Y., Kobune, F., Kato, A. and Nagai, Y. (1999) The genome nucleotide sequence of a contemporary wild strain of measles virus and its comparison with the classical Edmonston strain genome, *Virology*, 256: 340-350
10. 坂田宏子(1987) 赤血球凝集阻止試験、臨床とウイルス、15(増刊号), 14-18

7. 主な略語一覧

ACD	クエン酸ナトリウム液
BSA	ウシ血清アルブミン
BSL	バイオセーフティーレベル
CBMC	臍帯血単核球細胞
CPE	細胞変性効果
EIA	酵素抗体法
FCS	ウシ胎児血清
GM	増殖用培養液
GPA	ゼラチン粒子凝集
HA	赤血球凝集
HI	赤血球凝集抑制
MM	維持用培養液
MV	麻疹ウイルス
NT	中和試験
PBMC	末梢血単核球細胞
PBS	リン酸緩衝生理食塩液
SSPE	亜急性硬化性全脳炎
TCID ₅₀	50%組織培養感染量
Ts	咽頭ぬぐい液
V-RNA	ウイルス RNA

8. 検査依頼先 : 国立感染症研究所ウイルス第三部第三室
〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1
Tel: 042-561-0771 Fax: 042-561-1960

全国各都道府県／政令市衛生研究所

9. 執筆者（五十音順）： 赤見正行 群馬県衛生環境研究所
伊藤正恵 大阪府立公衆衛生研究所
木村博一 群馬県衛生環境研究所
勢戸和子 大阪府立公衆衛生研究所
◎田代真人 国立感染症研究所
野田雅博 広島県保健環境センター
(◎編集責任者)

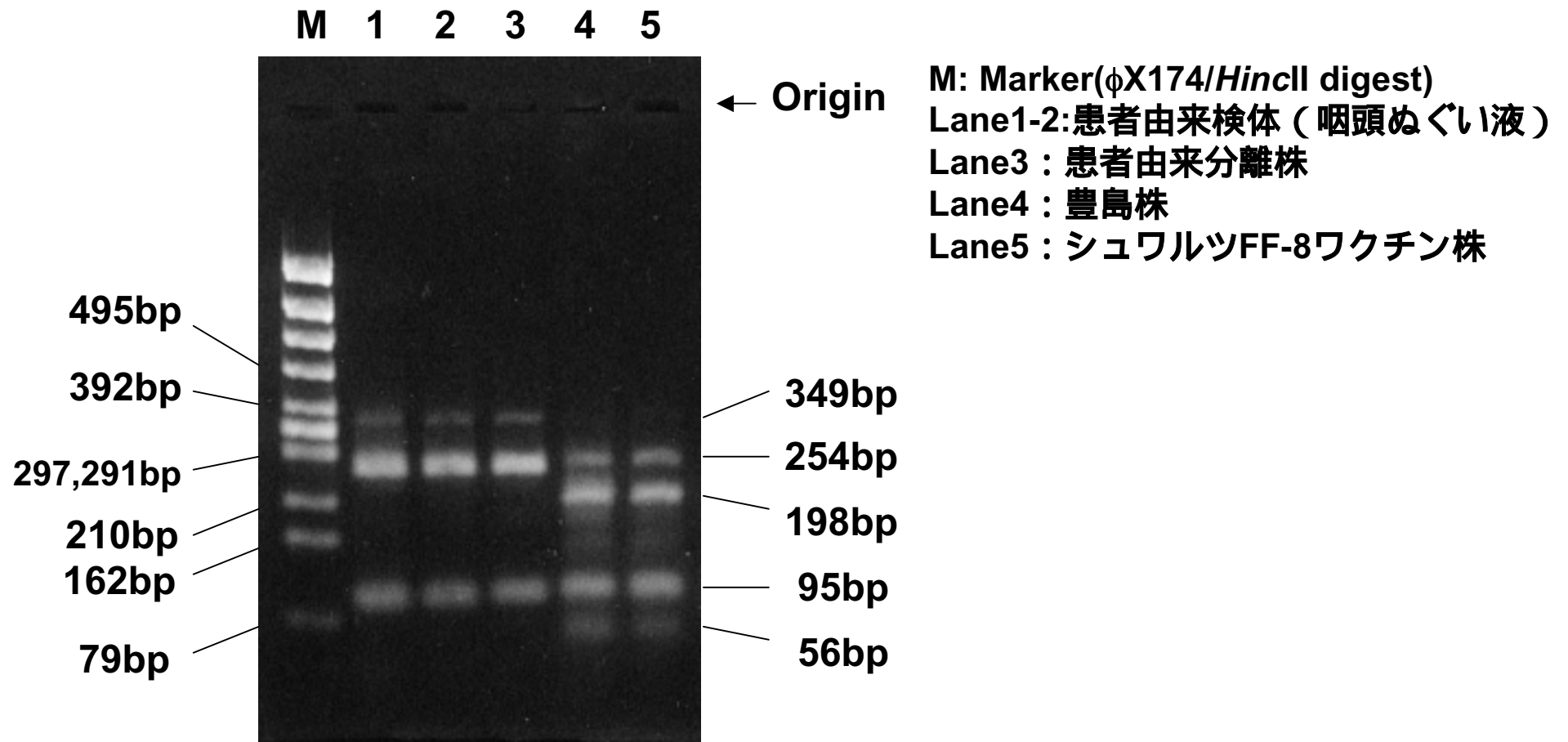


図 1 麻疹ウイルスPCR-RFLP結果 (制限酵素*Sau3AI*)

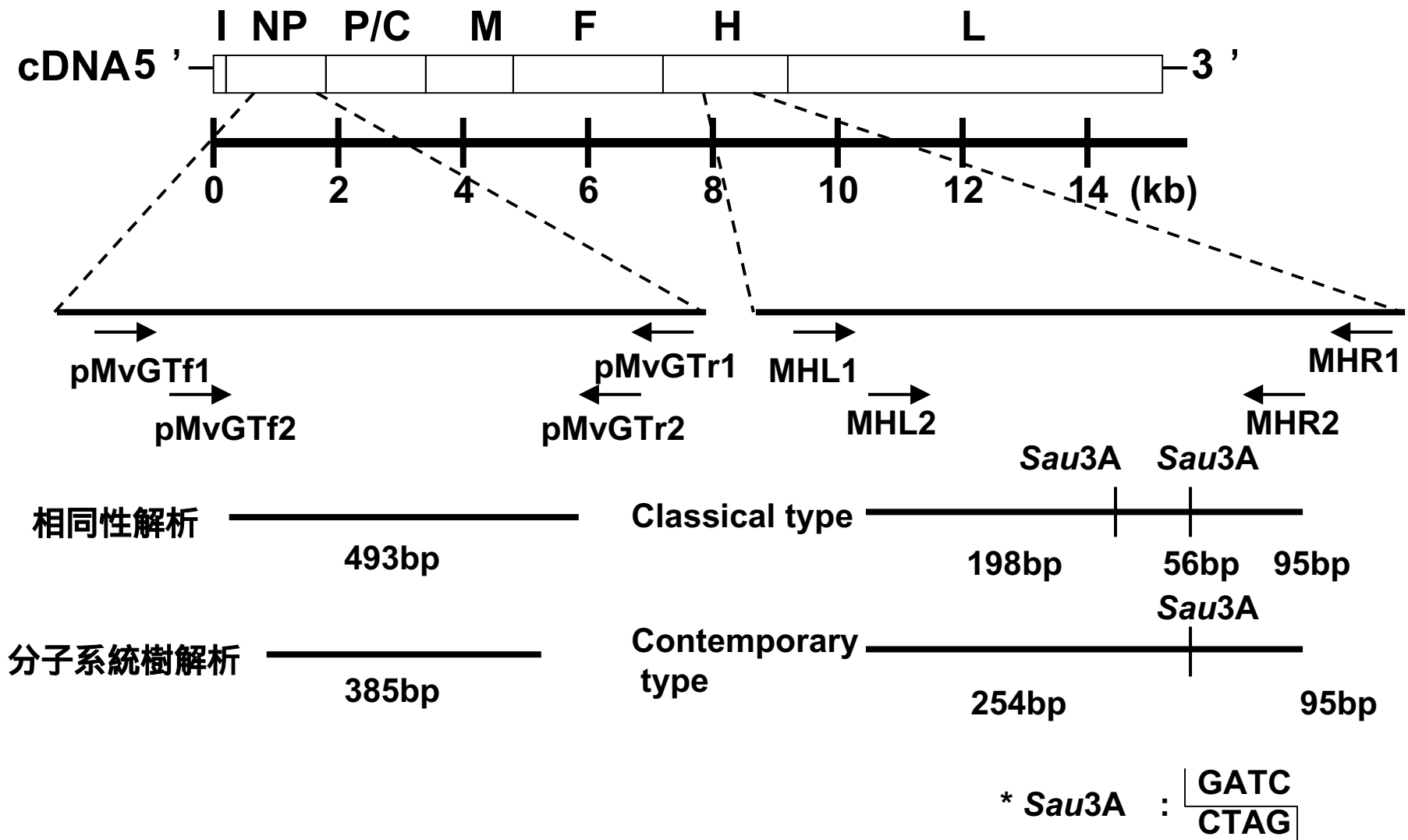


図2 麻疹ウイルス遺伝子解析位置 (cDNA)

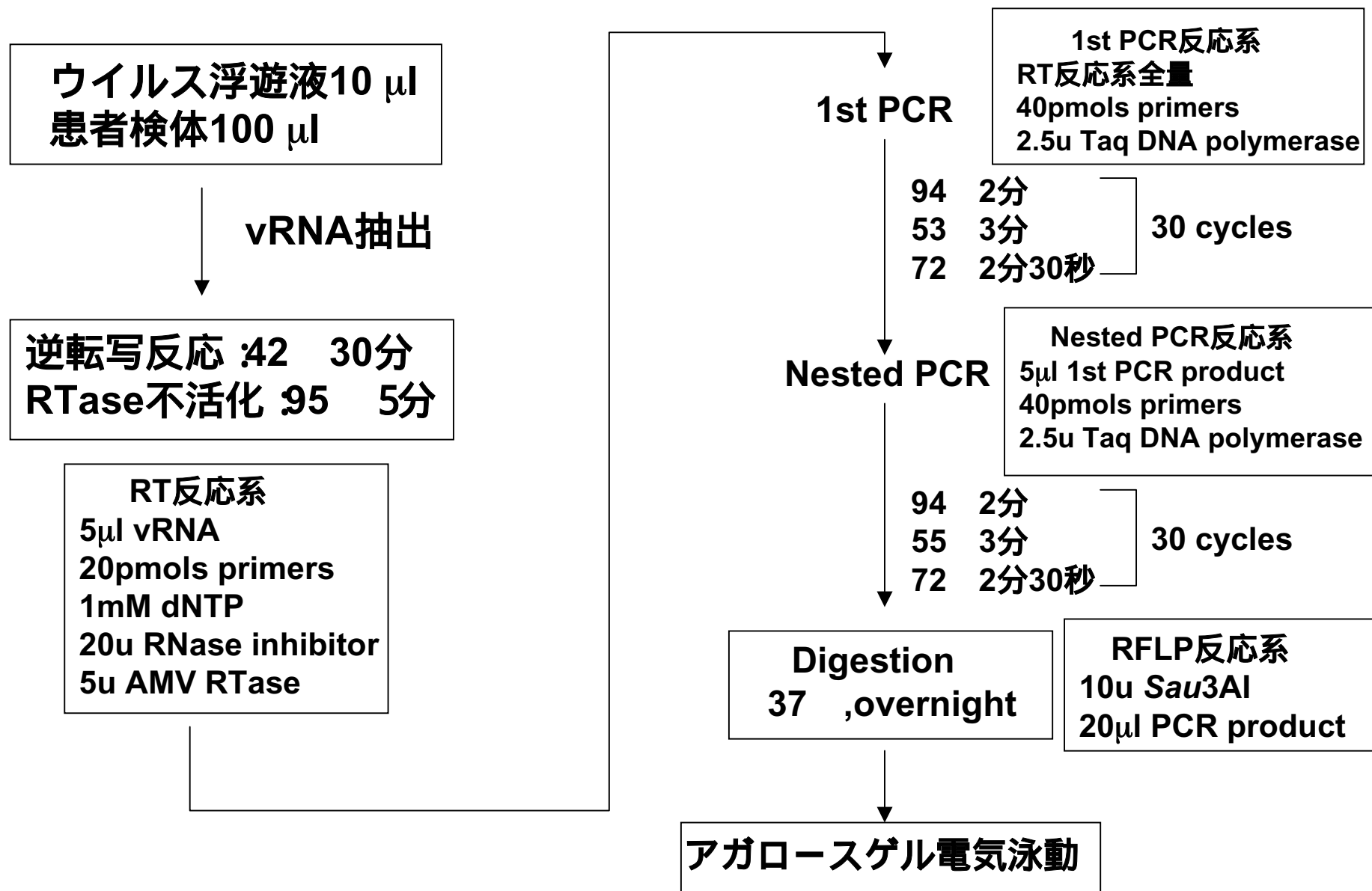


図3 RT-PCRおよびRFLPによるHA遺伝子解析手順

Position:

1214

GAGGAGGTCAGCTGGGAAGGTCAGTTCCACATTGGCATCTGAACTCGGTATCACTGCCGAG
GATGCGAGGCTTGTTCAGAGATTGC AATGCATACTACTGAGGACAGGATCAGTAGAGCGG
TCGGACCCAGACAAGCCCAAGTGTCATTTCTACAC GGTGATCAAAGTGAGAATGAGCTCCC
AGGATTGGGGGGCAAGGAAGAT TAGGAGGGTCAAACAGAGTCGGGGGAGAAGCCAGGGAGA
GCTACAGAGAGACCGGGTCCAGCAGAGCAAGTGATGAGAGAGCTGCCCATCTTCCAACCA
GCACACCCCTAGACATTGACACTGCATCGGAGTCAGGCCAAGATCCGCAGGACAGTCGAA
GGTCAGCTGACGCCCTGCTCAGGCTGCAAGCCATGGCAGGAATCTTGGAGGAACAAGGCT
CAGACACGGAC ACCCCTAGGGTGTACAAT GACAGTGATCTTCTAGACTAG GTGCGAGAGG
CCGAGGACCATAAC

1706

相同性解析 :493bp (position :1214-1706)

分子系統樹 :385bp (position :1301-1685)

アンダーラインは株間で塩基の置換のみられた部位

図 4 NP遺伝子相同解析例(MVi/Gunma.JPN/17 98/10-121[D5] 株)

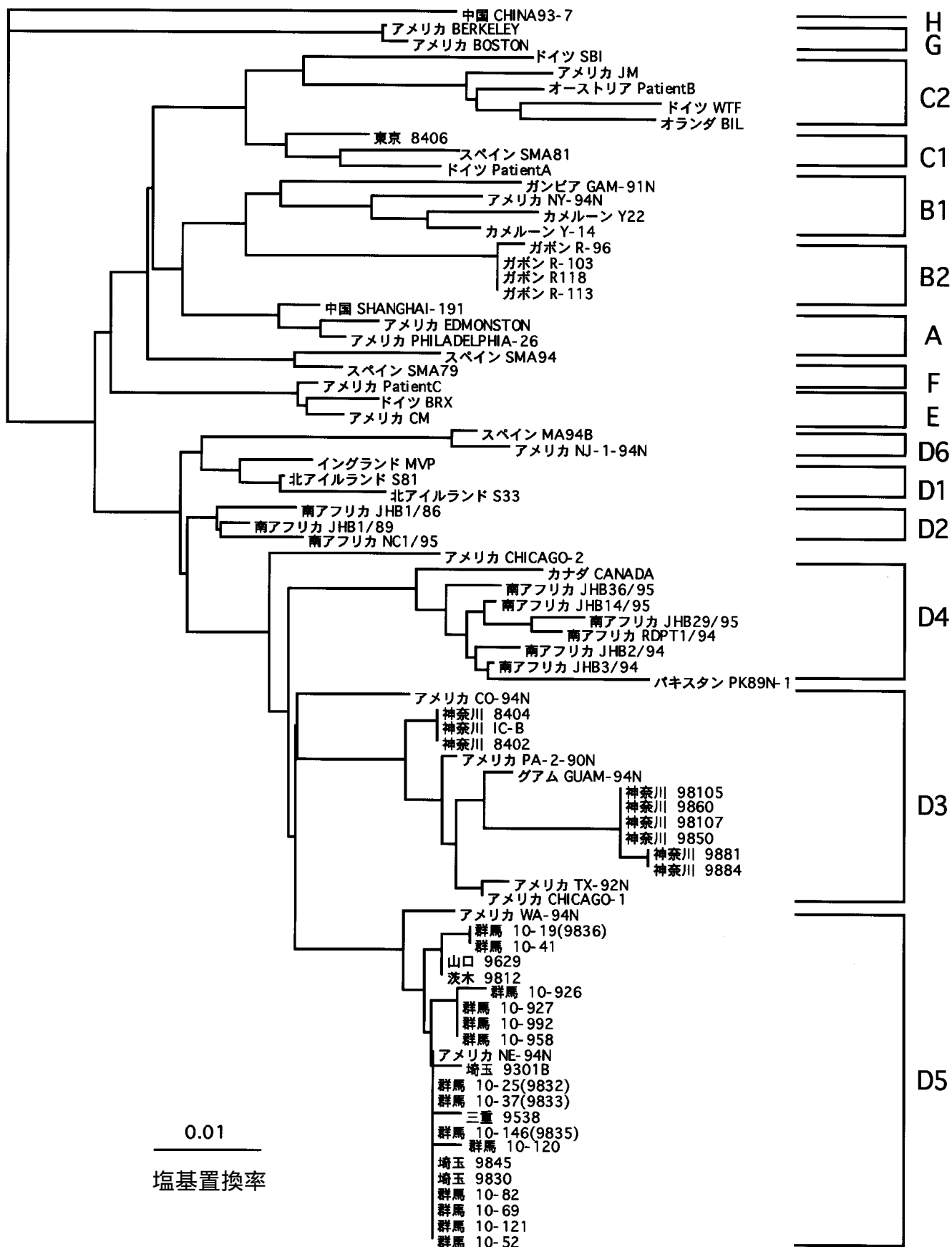


図5 麻疹ウイルス分子系統樹（地域流行解析例, 近隣結合法）

編集／発行： 国立感染症研究所
地方衛生研究所全国協議会
編集責任者： 田代真人（国立感染症研究所ウイルス第3部）
連絡先： 国立感染症研究所ウイルス第三部
〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1
Tel: 042-561-0771
Fax: 042-565-3315
発行日： 平成 14 年 月
印刷所：

伝染性紅斑病原体

伝染性紅斑病原体検査マニュアル

伝染性紅斑（パルボウイルス B19 感染症：B19 感染症）病原体検査マニュアル

目次

I. 伝染性紅斑の概説

1. 疫学
2. 病原体
3. 感染経路
4. 臨床症状
5. 治療、予防
6. 感染症法、学校保健法における取り扱い
7. その他の B19 感染症
8. 血漿分画製剤と B19 感染リスク

II. 検査に関する一般的注意

1. 一般的注意
2. 検査材料の採取、輸送、保管

III. 検査方法

IV. 引用文献

V. 連絡先

VI. 執筆者一覧

I. 伝染性紅斑の概説疾患の概説^{1) -3)}

伝染性紅斑 (erythema infectiosum : 以下 EI) は第 5 病 (the fifth disease) ともよばれ、頬に出現する蝶翼状の紅斑を特徴とし、小児に多くみられる流行性発疹性疾患である。両頬がリンゴのように赤くなることから、「リンゴ (ほっぺ) 病」と呼ばれることもある。英語圏では slapped cheek disease などと呼ばれることがある。本症の病因は長く不明であったが、パルボウイルス B19 (parvovirus B19 : 以下 B19) であることが Anderson らによって明らかにされた^{4) 5)}。病因が明らかになるのに伴って、本症の周辺には多くの非定型例や不顕性感染例があること、多彩な臨床像があることなども明らかになった。

1. 疫学

EI については、オーストラリアの Tachmer による異型の風疹としての報告(1889 年)が初めての記載といわれているが、Boysen らは 1799 年英国の皮膚科医 William の記載が第 1 例であると述べている(1944 年)。また独立疾患であることを示唆したのは Escherich(1898 年)、Erythema Infectiosum と命名したのは Stricker(1899 年)であるとされている。

我が国では大多和・三浦により最初の報告がなされて以来(1912 年)約 10 年の周期で小流行が散見されていたが、よく知られている名称の割には比較的稀な疾患であった。1970 年代後半に再び小流行がみられ、1987 年前後、1992 年前後に全国的な規模での流行があった。感染症発生動向調査によると、ほぼ 5 年ごとの流行周期で発生数の増加がみられ、2001 年は過去 10 年間と比較すると 1992 年に次ぐ大きな発生となっている。年によって若干のパターンの違いはあるものの、年始から 7 月上旬頃にかけて症例数が増加し、9 月頃症例が最も少なくなる季節性を示す。流行が小さい年には、はっきりした季節性がみられないこともある。患者の年齢分布は 5~9 歳での発生がもっとも多く、ついで 1~4 歳が多い。成人における発生状況は、感染症発生動向調査の対象外であるため詳細は不明であるが、臨床の場ではしばしば成人例に出会うことはあり、看護学生・看護師などの病院内感染による成人集団発生事例も報告されている。

2. 病原体

原因ウイルスはパルボウイルス科パルボウイルス亜科エリスロウイルス属に属するパルボウイルス B19 (human parvovirus B19 : 以下 B19) で、約 25nm の小径球状で単鎖 DNA を遺伝子として持つ。ウイルスのレセプターは赤血球膜表面にある P 抗原であり、P 抗原保有細胞、とくに赤芽球前駆細胞に感染し、増殖する。この P 抗原は赤血球系細胞だけではなく、巨核球、血管内皮細胞、胎児の肝・心筋細胞、腎、胎盤など多くの細胞に存在して

いることが報告されているが、これらの細胞の多くでは B19 は増殖しない。

3. 感染経路

EI としてもっとも中心となる感染経路は、発疹が出現する前の患者の気道分泌物との接触である。頬に EI の発疹が出現する 7～10 日くらい前に、感染者には微熱やかぜ様の症状などの前駆症状が見られることが多いが、この時期にウイルス血症をおこしており、ウイルスの排泄量がもっとも多くなる。発疹が現れたときにはウイルス血症はすでに終息しており、ウイルスの排泄はほとんどなく、感染力はほぼ消失している。血液感染および母胎内における母児垂直感染もある。

4. 臨床症状

10～20 日の潜伏期間の後、頬に境界の鮮明な紅い発疹（蝶翼状－リンゴの頬）が現れ（写真 1）、これに 1～2 日遅れて四肢伸側を中心とした続いて手・足に網目状・レース状・環状などと表現される発疹がみられる（写真 2）。胸腹背部にもこの発疹が出現することがある。発疹部ごとに顔面に火照り感や搔痒感を訴えることはあるが、発熱などの全身症状を伴うことは少ない。これらの発疹は 1 週間前後で消失するが、中には長引いたり、温度変化・日光照射・機械的刺激などで、一度消えた発疹が短期間のうちに再び出現することがある。年長者の方が症状が強く出現する傾向にあり、成人例では関節痛やこわばり感をしばしば訴える。なお感染経路の項で述べたように、頬に発疹が出現する 7～10 日くらい前に、微熱やかぜ様の症状などの前駆症状が見られることが多く、この時期にウイルス血症をおこしている。発疹出現のメカニズムは不明である。

予後はおおむね良好であるが、溶血性貧血患者が B19 感染を受けると重症の貧血発作（aplastic crisis）を生ずることがあり、注意が必要である。その他にも関節炎・関節リウマチ、血小板減少症、顆粒球減少症、血球貪食症候群（VAHS/HPS）、免疫異常者における持続感染などの存在も知られるようになってきた。B19 感染症で注意すべきものの一つとして、妊婦感染による胎児の異常（胎児水腫）および流産がある。

EI と風疹の流行時期は重なることが少なくなく、典型的な EI では臨床診断を誤ることはないが、非典型例では風疹との鑑別が困難である。英国において行われた血清調査では、風疹と診断された患者の半数が B19 感染であったことが述べられている。成人では典型的な発疹を伴う頻度が低く、風疹と診断されている例が小児より多いと推察される。

不顕性感染については、欧米の教科書では約 25% 程度が不顕性感染であるとされているが、白人はともかく黒人などでは発疹が確認されることはむづかしく、そのほとんどが不顕性感染としてみなされるであろうことが述べられている。わが国での不顕性感染率につ

いては明らかではないが、抗体調査と感染症サーベイランスの結果から、1 回の EI の全国的流行の際に 40 才未満の人口の約 10% が B19 感染を受け、その約 1/10 が EI 患者として把握されたことが述べられている。

5. 治療、予防

特異的な治療法はなく、対症療法のみである。免疫不全者における持続感染、溶血性貧血患者などではγ-グロブリン製剤の投与が有効なことがある。すでに述べたとおり、紅斑の時期にはほとんど感染力がないので、2 次感染予防の必要はない。ウイルス排泄期には特徴的な症状を示さないで、実質的な 2 次感染予防策はない。したがって、感染予防を目的として隔離あるいは登園、登校停止を行う必要はない。

現在のところワクチンはない。

6. 感染症法、学校保健法における取り扱い

EI は感染症法 4 類定点把握疾患であり、その報告は全国約 3,000 カ所の小児科定点より週毎に届けられる。報告のための基準は以下の通りであり、病原診断は求められていない。

○診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ、以下の 2 つの基準を満たすもの。

- 1) 左右の頬部の紅斑の出現
- 2) 四肢の網目状の紅斑の出現

○上記の基準は必ずしも満たさないが、診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ、病原体診断や血清学的診断によって当該疾患と判断されたもの。

学校保健法においては、EI は学校において予防すべき伝染病の中には明確に規定はされておらず、一律に「学校長の判断によって出席停止の扱いをするもの」とはならない。したがって、欠席者が多くなり授業などに支障をきたしそうな場合、流行の大きさあるいは合併症の発生などから保護者の間で不安が多い場合など、「学校長が学校医と相談をして第 3 種学校伝染病としての扱いをすることがあり得る病気」と解釈される。通常の学校などでの対応のめやすとしては、発疹が現れたときには感染力はほとんどなくなっているもので、発疹のみで全身状態の良いものについては登校が可能である。ただし急性期には、症状の変化に注意をしておく必要がある。

7. その他の B19 感染症¹⁾

関節炎／関節リウマチ：小児の B19 感染の大多数は、軽い症状で短時日のうちに終わる。しかし成人ことに女性の場合には、対照的な両側の関節に炎症症状を伴う関節痛が 1－3 週間にわたり持続することがしばしば見られる。また B19 感染後にアメリカリウマチ協会の診断基準を満たすような関節炎が見られたとの報告もあるが、これらが慢性の経過をたどったとの記録は今のところ見られていない。

一過性の aplastic crisis：鎌状貧血症患者、遺伝性球状赤血球症、pyruvate kinase 欠損症、タラセミアなどの先天性溶血性貧血患者にみられる aplastic crisis の原因ウイルスとして、B-19 は重要な位置を占めている。

血小板減少症／顆粒球減少症：B19 感染に伴って、ITP (idiopathic thrombocytopenic purpura, Henoch-Shonlein purpura 好中球減少症、反復性無顆粒球症を併発したとの報告が散見されるが、両者の因果関係を確認した報告はこれまでのところない。

血球貪食症候群 (VAHS/HPS)：VAHS/HPS の病態は、種々のウイルス感染のみならず、何らかの基礎疾患（ことに免疫学的異常疾患）がある患者における細菌・リケッチア・真菌など多くの微生物感染に伴って出現し得ることが知られている。B19 感染に伴って VAHS/IPH の病態が出現し得るとの報告も散見される。

胎児感染（胎児水腫）：EI 流行期に胎児水腫のために流産した胎児組織について B19 の検索を行ったところ B19 DNA が確認され、胎児水腫の一つの原因として B19 感染の可能性のあることが示唆され、その後の症例の蓄積から両者の関係は確実なものとなった。これらの報告の多くは、妊娠前半期の方がより危険であり、胎児死亡は感染から 4-6 週後に生ずることが述べられているが、妊娠後半期でも胎児感染は生じており、安全時期について特定することはできない。しかし一方では妊婦の B19 感染が即胎児の異常に結びつくものではなく EI を発症した妊婦から出生し B19 感染が確認された新生児でも、正常な妊娠および分娩経過と出生児の正常な発育が確認されているものが多い。したがって妊婦の風疹感染におけるほどの対策（人流産など）の必要性はなく、超音波断層検査等で胎児の状態をよく把握することがまず重要である。B19 感染による胎児水腫は、母体に感染したウイルスが経胎盤性に胎児に感染し、さらに胎児の赤芽球系で増殖するために、先に述べた aplastic crisis と同様に造血が旺盛で赤血球寿命が短い胎児より高度貧血をきたすと考えられている。

なお胎児感染による催奇形性を含むその他の異常については、一般的にはその可能性は少なく、妊婦の風疹感染時における妊娠の中絶などをすぐに考慮する必要はないと考えられるが、B19 感染に伴う胎児水腫以外の胎児異常の報告は決してゼロではないので、感染妊婦に対する十分な注意と説明が必要である。

免疫異常者における持続感染：先天性・後天性 (AIDS・移植患者・免疫抑制剤使用患者な

ど)を問わず、免疫機能が低下している者における B19 感染では、ウイルスの持続感染をきたし慢性的な骨髓機能低下状態になることが知られてきている。出現する症状として最も多いものは、pure red cell anemia である。

その他稀なものまで含めると、B19 感染の臨床症状は極めて多彩である。

8. 血漿分画製剤と B19 感染リスク

各種血漿分画製剤中に B19DNA が PCR 法で検出されたとする成績が企業より報告されている(厚生省薬務局発医薬品副作用情報 No. 141)。B19 は他のウイルスに比べて加熱やフィルターなどによる不活化・除去が容易でないため、製剤中への混入の可能性を否定し得ない。また、B19 感染症が一般的には予後良好であるものの、一部の患者に感染した場合には重篤な症状を招くことがある。したがって血漿分画製剤の使用上の注意事項を変更し、ことに妊婦、溶血性・失血性患者、免疫不全患者、免疫抑制状態の患者に対する使用にあたって注意が喚起されている。免疫グロブリン製剤については、製剤中の抗体によって感染性が失われている可能性も考えられるが、そのことを示す十分な根拠がないため、他の製剤と同様に使用上の注意事項が記載されている。

II. 検査に関する一般的注意

1. 一般的注意

EI に関する感染症法に基づく届け出のための診断基準は、上述(1)~6を参照されたい。その中では病原診断は求められておらず、したがって病原診断に関する診断基準はない。実際に臨床現場でも多くは臨床的観察によって診断が行われている。血清中の抗 B19 ウイルス抗体(IgM, IgG)測定することによって B19 感染診断が行われることがあるが、現在妊婦での IgM 抗体の測定のみが健康保険での適応となっている。抗体測定用キットは市販されている。

赤芽球系培養細胞を用いて血液検体からのウイルス分離が可能であるが、臨床検査にはそぐわない。

ここでは市販のキットで測定が可能である血清抗体検査についての説明は省略し、特殊検査としてウイルス遺伝子検出法を解説する。この検査は P2 実験施設で BSL2 の取り扱い基準に従って行う。特に検体に大量のウイルス粒子が存在し実験室内感染の危険性がある事を考慮して行なう。また、高感度の検出法を使用する際は、検体間の汚染に注意する。

なお遺伝子検査法の診断的意義は、臨床症状、抗体検索成績などとの関連で総合的に考えるべきである。

2. 検査材料の採取、輸送および保管

型どおりに採取した血液は、全血ないし血清として 1.5 ml のポリエチレンチューブに 500 μ l ずつ分注し凍結保存する。輸送にあたっては、検体はドライアイス存在下で凍結状態で輸送する。

III. 検査方法

ウイルス遺伝子検出

B19 の遺伝子は約 5,500 塩基の一本鎖線状 DNA で、感染細胞ではプラス鎖およびマイナス鎖を持つウイルス粒子が均等に形成される。ほぼ全長の遺伝子が世界の異なる場所でクローニングされていて、各々の全塩基配列がデータベースに登録されている。B19 の同定はこの情報を基に行なう。

A. 血液検体からの DNA 抽出

検体の入ったポリエチレンチューブにプロテナー K 溶液を直接加え加温処理する。その後、フェノール、クロロホルム処理による除蛋白を行い、エタノール沈澱により DNA を回収する。得られた DNA は当初の 1/2 量の滅菌蒸留水に溶解して 4℃で保存する。この抽出過程で B19 の二本鎖 DNA も形成される。

B. ポリメラーゼ・チェインリアクション DNA 増幅法 (polymerase chain reaction DNA amplification : PCR 法)

PCR 法は、少量の検体 DNA (1 - 10 μ l) を使用して行う、高感度な B19 検出法である。ウイルス遺伝子の種々の部位を対象としたプライマーが開発されているが、各々検出感度が異なるとされている。表-1 に報告されている 3 種の PCR 法を示した。対象遺伝子部位、増幅巾、増幅条件等かなりの違いがある。原法に忠実に使用する事が肝要である。

増幅した DNA が B19 であるかは、増幅 DNA の一部を直接ニトロセルロース膜に、あるいはアガロース電気泳動後ニトロセルロース膜に転写して、標識したプローブとハブリダイゼーションを行ない判定する。その際アイソトープ標識したプローブを使用すると、1 - 10 μ g の DNA を検出できる。これは 10 - 100 個のウイルス遺伝子に相当する。また、非アイソトープ標識プローブでは 1 - 10 pg の DNA を検出できる。しかし、ハブリダイゼーションでは擬陽性反応があり判定は必ずしも容易でない。増幅 DNA の塩基配列を直接解析しデータベース上の B19 の配列と比較して同定するのが最も正確な方法である。

PCR 法により検体中の B19 の有無が判明するが、これはあくまで B19 遺伝子の一部に関

する事、またウイルス量は不明である事を銘記すべきである。

C. ドットブロットハイブリダイゼーションとサザンブロットハイブリダイゼーション法
(**dot blot hybridization: DBH 法, Southern blot hybridization: SBH 法**)

血液中の B19 DNA を増幅せずに検出する方法として DBH, SBH 法がある。

検体 DNA (1 - 500 μ l) を直接ニトロセルロース膜に、あるいは制限酵素処理してアガロース電気泳動後ニトロセルロース膜に転写して、標識した B19 全長遺伝子クローン DNA プローブとハイブリダイゼーションを行ない判定する方法である。その際、アイソトープ標識プローブを使用すると、0.5 pg の B19 DNA を検出できる。これは 10,000 個のウイルス遺伝子に相当する。検出感度は PCR 法の千分の一以下に過ぎないが、感染の最盛期には 1 μ l の血液に 10^5 から 10^9 個のウイルスが存在するため、容易にウイルスが検出され、コピー数を知り得る場合がある。また、SBH 法では制限酵素切断パターンの違いからウイルス株間の差異を知る事も出来る。しかし、B19 クローンを要し、アイソトープ施設が不可欠であることから、詳細は参考文献に譲る。

IV. 引用文献

疾患の概説

1. 岡部信彦：伝染性紅斑－最近の問題点－ 小児科診療 60(11):1846-1854, 1997.
2. 特集「伝染性紅斑」病原微生物検出情報(IASR) 19(3):50-51, 1998.
3. 感染症週報(IDWR) 感染症の話 -伝染性紅斑- <http://idsc.nih.go.jp/index-j.html>
4. Anderson, M. J., Jones, S. E., Fisher-Hoch, S. P., Lewis, E., Hall, S. M., Barnett, C. L. R., Cohen, B. J., Mortimer, P. P. & Pereira, M. S.: Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum? Lancet 1983, 1:1 378.
5. Okabe, N., Kobayashi, S., Tatsuzawa, O. & Mortimer, P. P.: Detection of antibodies to human parvovirus in erythema infectiosum (fifth disease). Arch. Dis. Child. 1984, 59:1016.

病原診断

1. Salimans M. M. M., Holsappel S., van de Rijke F. M., Jiwa, A. K., Raap, A. K., and H. T. Weiland. Rapid detection of human parvovirus B19 DNA by dot-hybridization and the polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods 1989, 23: 19-28.
2. Clewley J. P. Polymerase chain reaction assay of parvovirus B19 DNA in clinical specimens. Journal of Clinical Microbiology 1989, 27: 2647-2651.
3. Koch, W. C., and S. P. Adler. Detection of human parvovirus B19 DNA by using the polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology 1990, 28: 65-69.
4. 倉田毅、岩崎琢也、佐多徹太郎、松倉俊彦. パルボウイルス, ウイルス感染症の臨床と病理、医学書院 1991, 97-101.
5. 松倉俊彦. サザンブロットハイブリダイゼーション法, 臨床 DNA 診断法、金原出版、1995, 926-931.

V. 連絡先

国立感染症研究所感染症情報センター 岡部信彦

VI. 執筆者一覧

国立感染症研究所感染症情報センター 岡部信彦
ウイルス 2 部 松倉俊彦

大阪府立公衆衛生研究所公衆衛生部微生物課 勢戸和子

静岡市衛生試験所衛生検査担当 北條罔生

井出 忍

長野県公害衛生研究所

栃木県保健環境センター

群馬県衛生環境研究所ウイルス課 赤貝正行

東京都立衛生研究所事務部庶務課

神奈川県衛生研究所企画指導室



写真 1、頬に現れた蝶翼状の発疹（リンゴの頬）



写真 2、上腕に現れたレース状の発疹

表-1 B19検索用のPCR法

PCR法	プライマー名	塩基配列(5' -3')	増幅DNAの遺伝子上の 位置と長さ	増幅条件*	文献
1	B19-1 B19-2 (プローブ)	CAAAAGCATGTGGAGTGAGG CCTTATAATGGTGCTCTGGG (AAACTGTCTGGAAAATGTA CAAGTTACAGTTAGCACTA)	VP1, 104 bp	95℃1分, 65℃3分 (32回)	1
2	A-1 A-2 (プローブ)	TGTGGTAAGAAAAATAC TCATTAAATGGAAAGTTT (ATGGGCCGCCAAGTACAGG)	NS1, 133 bp	91℃1分, 50℃1分, 67℃3分 (35回)	2
3	K-1 K-2 (プローブ)	ATAAATCCATATACTCATT CTAAAGTATCCTGACCTTG (CTAACTCTGTAACCTTGAC)	VP1, 699 bp	94℃ 2 分, 37℃2分, 72℃3分 (35回)	3

*denaturation,annealing,chain elongation (cycles)

ムンプスウイルス

ムンプスウイルス病原体検査マニュアル

[目 次]

流行性耳下腺炎（ムンプス）の概要

おたふくかぜワクチンの概要

検査に関する一般的な注意事項

1. ムンプスウイルスのウイルス分離培養
2. 血清学的検査
3. 遺伝子解析
4. 検査材料の輸送

病原学的検査

1. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応法（Reverse transcriptase-polymerase chain reaction: RT-PCR）
2. SH 遺伝子領域の塩基配列の決定
3. SSCP 法による株の遺伝子型別
4. ウイルス分離
5. ウイルス感染値の測定法⁹⁾
6. アビジン・ビオジン酵素抗体法（ABC 法）による抗原検出

血清学的検査

1. IgM 検出 ELISA
2. IgG 検出 ELISA
3. 中和抗体の測定
4. 補体添加中和試験
5. 赤血球凝集阻止(HI)試験

ムンプスウイルス感染症の診断基準

参考文献

流行性耳下腺炎（ムンプス）の概要

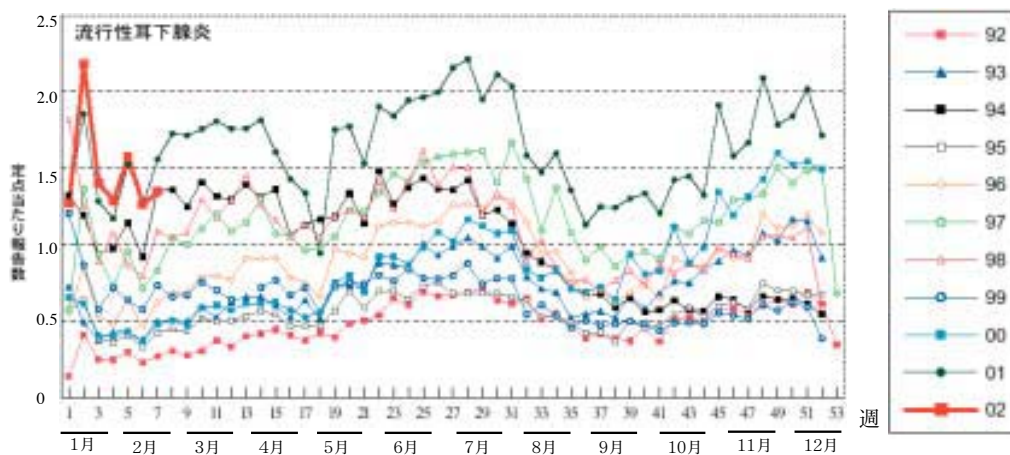
流行時期：以前は初冬から春にかけてであったが、現在ではあまり大きな季節性はない。

原因：ムンプスウイルスの直接接触または飛沫により感染する。性差はない。感染しても 30～40%が無症状の不顕性感染で経過する。しかし、不顕性であってもウイルスを排出しているため、伝染力はある。

好発年齢：85%は 15 歳以下である。

潜伏期間：16～24 日でピークは 17～18 日である。

症状：耳下腺の腫脹をもって発症する。多少の痛み、発熱や全身倦怠感、食欲不振、頭痛なども伴う。腫脹は下顎骨の後縁と耳たぶ下部の間にみられ、前下方へ広がる。腫れるスピードはきわめて早く、数時間で最高に達することもあるが、通常は 1～3 日でピークに達し、3～7 日で消退する。一侧の腫脹が他側に比べ 1～2 日先行することが多いが、一侧のみの場合も 25%ある。酸っぱい食べ物で痛みが強調される。大多数の患者では耳下腺のみが侵されるが、全体の 10～15%の患者では顎下腺も侵される。疼痛は耳下腺よりも少ないが、腫脹の消退は耳下腺の場合より遅い。舌下腺腫脹は少ない¹⁾。



合併症：

- (1) 無菌性髄膜炎：全患者の 65%以上に髄液の細胞数増多が認められるが、無症状のことが多い。髄膜炎の症状を示すのは 10%程度である。耳下腺腫脹の数日後に発熱、頭痛、嘔吐などの髄膜刺激症状が出現するが、完治する。男児は女児の 3-5 倍多い。

- (2) 睾丸炎：思春期以降の成人男性では 20～30%前後の頻度で見られる。睾丸炎の発症は耳下腺腫脹 8 日以内のことが多い。睾丸の腫大と激痛を訴え、体温上昇、頭痛、悪心、下腹部痛を伴う。殆どは片側だけであるが、30-40%に睾丸の萎縮が見られる。機能障害は 10 数%に認められるが、絶対的不妊は稀である。
- (3) 卵巣炎：成人女性では 7 %に認められる。ほとんどの例で不妊症とはならない。
- (4) 腭炎：重篤な腭炎は稀であるが、軽症のものはしばしばみられ、胃痛、発熱、嘔吐、ショックなども出現する。夜間、激しい腹痛で来院して流行性耳下腺炎とわかることも多い。
- (5) 難聴：神経性のため、難治性である。多くは一側性で日常生活に支障がないことが多い。発生頻度は 1 : 20,000。
- (6) 脳炎、脊髄炎：発生頻度は 1 : 5,000。耳下腺腫脹時と、その 7～10 日後に発症する二型がある。
- (7) その他：まれに心筋炎、腎炎、関節炎、血小板減少性紫斑病、甲状腺炎などの合併が知られている。

区別すべき他の病気

- (1) 反復性耳下腺炎：自然消失するが、不定期的に反復する耳下腺炎で、通常片側の耳下腺全体のびまん性腫脹（全体に腫れる）が数日～数週間続く。主たる原因は唾液管末端拡張症である。成人にもみられるが、主に 10 歳以下に発症し、5～6 歳にピークがある。原因の炎症は口腔内常在菌が疲労その他で体力が低下した際に逆行性に感染して起こる。20 歳以上の女性では、シェーグレン症候群をまず否定する。またコクサッキー、パラインフルエンザ 3 型、EB ウイルス(伝染性単核症)などのウイルス感染で耳下腺腫脹が見られることがある。この場合、耳下腺腫脹は比較的短期間（数日）で消退することが多い¹⁾。
- (2) 頸部リンパ節炎
- (3) 急性化膿性耳下腺炎
- (4) 唾石症

治 療：原因療法はなく、もっぱら対症療法のみを行う。ベッド上安静は患者のニーズいかんによる。咬筋の運動で耳下腺の疼痛が増強するので、咀嚼しやすい食事とする。冷湿布は患者が好めば行う。発熱等に対する鎮痛解熱剤の投与、髄膜炎合併例に対しては、安静に努め、脱水などがみられる症

例では輸液の適応となる。

予 防：効果的に予防するには弱毒生ワクチン（おたふくかぜワクチン）を接種するのが唯一の方法である。免疫ができるまでに4週間を要する。有効率は94%以上とされており、1才以上であれば接種可能。現在は、任意接種であるが、集団生活以前に接種することが望ましい。

保育所等

の 管 理：耳下腺腫脹の3日前から5～7日後まで感染力があるため休園、休校することが望ましい。学校伝染病の中ではみずぼうそうと並んで一番欠席の多い病気である。しかし、耳下腺腫脹以前の無症状期から感染力があること、不顕性感染が多いことから集団発生を防止することは困難である。

おたふくかぜワクチンの概要

ワクチン：ワクチンは、流行性耳下腺炎を予防する唯一の方法である。現在、国内で入手可能なワクチンは、武田薬品工業(トリイ株)、北里研究所(ホシノ株)、化学及び血清療法研究所(ミヤハラ株)の3種類である。いずれも発育鶏卵を用いて製造されている。

接種上の

注 意 点：おたふくかぜ流行中の接種は差し支えない。

副 反 応：軽度のものとして、接種後2週間前後に軽度の耳下腺腫脹と微熱が数%にみられることがある。一側性の場合が多く両側性でも程度は軽く一過性で消退する。重要なものとして、無菌性髄膜炎があり1/1,000以下の頻度(1/4,415～1/17,749)でみられる。その場合は入院加療を行う。また、北里研究所製の製造ロット4以前のワクチンにはゼラチンが安定剤として含まれているので、ゼラチンアレルギーのある小児には注意が必要である。

補 足：1989年4月から、欧米に習ってMMR（新三種混合、おたふくかぜ(mumps)、麻疹(measles)、風疹(rubella)）ワクチンという形で定期接種に組み入れられたが、ムンプスワクチンに起因する無菌性髄膜炎を起こす例が少なかつたため、1993年にMMRワクチンは中止された。その後、翌平成6年10月の予防接種法改正を経て、年中いつでも予防接種が受けられるようになり、現在は、おたふくかぜワクチン単味で任意接種という形で行われている。

無 菌 性

髄 膜 炎：無菌性髄膜炎は、厳密な意味での診断名ではなく、通常の塗抹染色標本

および一般細菌培養にて病原体がみつからないものの臨床診断名として用いられている。とは言え、臨床的にはウイルス性髄膜炎のことを念頭に置かれていることが多い。無菌性髄膜炎は、多種多様な病原体が関与しているので、一定の疫学パターンをとらない。しかしながら、全体の約 85% がエンテロウイルスによるものであるために、基本的な流行パターンはこのウイルス属の状況を反映する。すなわち初夏から上昇し始め、夏から秋にかけて流行が見られる。罹患年齢は、幼児及び学童期が中心である。また、抗体保有状況により種々のタイプのエンテロウイルスが周期的に流行することが報告されている。

検査に関する一般的な注意事項

1. ムンプスウイルスのウイルス分離培養

ウイルス分離は本疾患の最も直接的な診断方法である。

実施施設：ワクチン株以外のムンプスウイルスは P2 レベルの取り扱い基準に従う必要があり、患者あるいは感染が疑われる患者由来の検査材料を取り扱う際には BSL2 の施設を備えた検査室で行う。

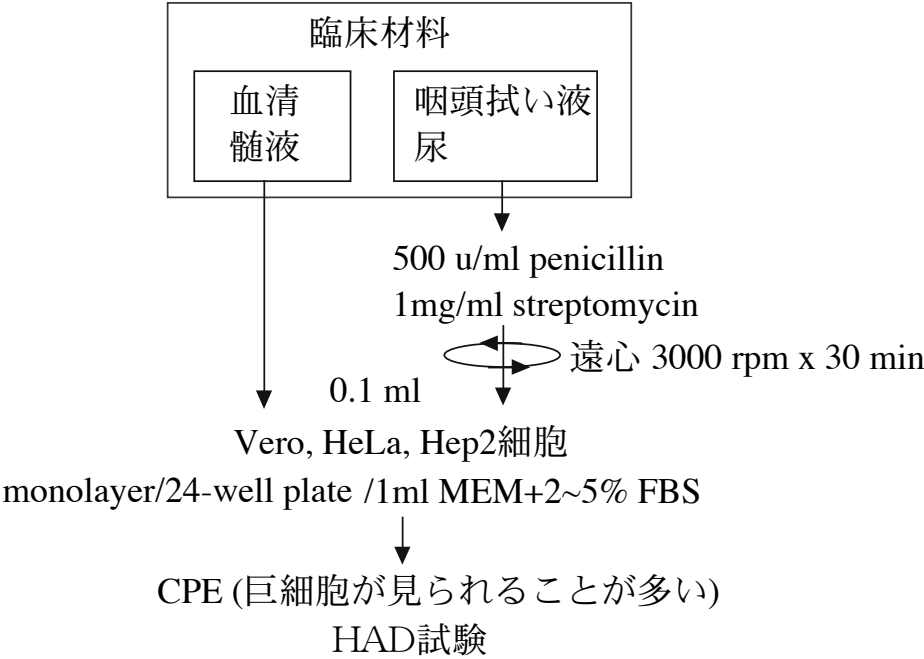
検査材料の採取²⁾：

- (1) 咽頭ぬぐい液： 咽頭ぬぐい液を採取する場合は、発病後 7～9 日以内に綿棒等で採取する。採取した綿棒は直ちに氷冷した培地(0.5%ゼラチン及び抗生物質を含む)に浸す。ぬぐい液を遠心分離にかけ、その上清を検査材料とする。すぐにウイルス分離に使用しない場合には-80℃の冷凍庫あるいは液体窒素中に保存する。
- (2) 髄液： 髄液を採取する場合には発症後 5～7 日以内に無菌的に採取する。保存方法は咽頭ぬぐい液と同様である
- (3) 尿： 発症後 14 日くらいまで尿中にはウイルスの排泄が認められうる。採取した尿に抗生物質を添加し、遠心分離にかけ、その上清を検査材料とする。保存方法は咽頭ぬぐい液と同様である。
- (4) 血液： 血液を採取する場合には発症後 1～2 日以内に行う。それ以降の試料からのウイルス分離はむずかしい。血清分離を行い、検査材料とする。保存方法は咽頭ぬぐい液と同様である。

ウイルス分離培養： Vero(HeLa, Hep2 等)細胞は培養液中にトリプシン無添加状態でムンプスウイルスに感受性を示す。ウイルス感染による細胞変性効果(CPE)

は、ウイルス株毎に明瞭さが異なるため、感染の確認はモルモット赤血球を用い、細胞の赤血球吸着(HAD)能を確かめるのがよい。

ウイルス分離法



培養液を除いた細胞をPBSで洗い、0.4%モルモット赤血球を重層する。4℃で30-60分静置させ、再びPBSで数回洗浄後に細胞を観察する。

分離ウイルスの同定試験

診断方法	機材	手技	感度
補体結合(CF)試験	補体(市販) 感作血球	やや煩雑	低い
赤血球吸着阻止 (HADI)試験	培養細胞 モルモット赤血球	容易	高い
ウイルス中和試験	ムンプスウイルス 培養細胞(Vero等)	煩雑	高い
蛍光抗体(FA)法	特異抗体	容易	高い

2. 血清学的検査

血清学的に検査を行うことも可能である。種々の方法がありそれぞれ長所短所を持つ。補体結合反応は、陰性陽性の判断の容易さから、かつては利用されたことがあったが、感度が低く煩雑なため現在はあまり行われていない。HI 試験も陰性陽性の判断が容易であるが、モルモット赤血球を必要とし、非特異的反応も見られることからあまり行われなくなっている。ウイルス中和試験は、感度、特異性ともに最も優れた方法である。しかし、細胞培養を必要とし、煩雑で時間を必要とすることから、大量に検査する場所では使われていない。ELISA 法は陰性陽性を決めるカットオフ値の設定にむずかしさのあるものの、その容易さから近年は汎用されている。急性期の IgM 抗体を検出するか、ペア血清で IgG 抗体価の有意な上昇をもって診断される。しかし再感染時にも IgM 抗体が検出されることがあり、初感染と再感染の鑑別には IgG 抗体の avidity(結合強度)の測定が有用と報告されている²⁾。

実験室内血清学的診断法の特徴

診断方法	機材	手技	感度
補体結合(CF)試験	補体(市販) 感作血球	やや煩雑	低い
赤血球凝集阻止(HI)試験	96 well plate モルモット赤血球	容易	やや低い
ウイルス中和(NT)試験	ムンプスウイルス 培養細胞(Vero)	煩雑	高い
ELISA試験	市販品	容易	高い

3. 遺伝子解析

RT-PCR にてウイルス遺伝子を検出できる。これによりワクチン株と野生株との鑑別も可能である。検出感度、特異性共に高く、再現性がよいという利点を持つ。むしろ検査室内の DNA の汚染に気をつける必要があり、適切な陰性対照の設定が必要である。

4. 検査材料の輸送

検査材料は漏れないように容器に入れ、区別できるような記号等を付す。また、別の場所へ移す場合の安全輸送の原則は、航空輸送や国際輸送の場合と

同じである。ふつうの輸送条件下で、輸送物が包装容器から出る可能性があ
ってはならない。

三重包装

- (1) 一次容器： 感染性材料を入れてラベルを付した防水性、密閉性の主容器。この容器の破損に備えて、液体全部を吸収するのに十分な量の吸収剤に包む。
- (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。丈夫で防水性、密封性があるもの。この中に、吸収剤に包んだ一次容器をいくつか入れてもかまわない。検体データや、送り主と受取り人を特定するような情報を二次容器の外側に貼付ける。
- (3) 外側容器： 輸送中に物理的な損傷や水などの外部からの影響を二次容器とその中身を守るために、外側容器の中に二次容器を収める。

病原学的検査

病原学的検査には、RT-PCR 法によるウイルス遺伝子の検出とウイルスそのものを分離する方法がある。前者は迅速で PCR 産物の塩基配列を解析することによりウイルスの遺伝子型別に分けることが可能である。後者のウイルス分離は最も確実な検査・診断法である。

1. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応法 (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction: RT-PCR)

(検査時間：6 時間)

ムンプスウイルスはパラミクソウイルス科に属し、マイナス鎖の RNA をゲノムとして持つ。そのため、まず逆転写反応によりウイルス RNA から cDNA を合成する必要があり、次にポリメラーゼ連鎖反応により cDNA 断片を増幅させる。増幅するターゲットとしては SH 遺伝子領域が適している。

(1) 試薬・器材

ウイルス RNA 分離キット (Roche Diagnostics、High Pure Viral RNA Kit:1 858 882)

RT-PCR キット (宝酒造、One step RNA PCR Kit:RR024A)

微量高速遠心機 (トミー精工等)

サーマルサイクラー (ABI 9700 等)

アガロースゲル泳動装置 (コスモバイオ、ミューピッド 2 等)

UV トランスイルミネーターと撮影装置

ボルテックスミキサー

合成プライマー

電気泳動用色素混合液

(2) RNA の抽出

(所要時間：30 分)

ウイルス分離に用いた培養上清からスタートすると確実であるが、ウイルスの含有量が高い場合には髄液や咽頭ぬぐい液等の患者材料も用いることができる。ウイルスから核酸を精製するキットは各種市販されているが、1 例として Roche Diagnostics 社のキットを用いた方法を以下に示す。

1. 検体 200 μ l に 400 μ l の Binding buffer と 4 μ l の poly A 溶液をキャリアーとして加える（このステップでウイルスが可溶化される）。
2. ピペッティングあるいはボルテックスミキサーで混合する。
3. キットに添付の Filter unit を Collection tube に差し込む。
4. サンプルを Filter unit に入れる。
5. 微量遠心機にて 10,000 回転で 15 秒間遠心する（ウイルス RNA は Filter に結合する）。
6. Filter unit を新しい Collection tube に移す。
7. 450 μ l の Wash buffer を Filter unit に入れる。
8. 微量遠心機にて 10,000 回転で 15 秒間遠心する。
9. Filter unit を新しい Collection tube に移す。
10. 450 μ l の Wash buffer を Filter unit に入れる。
11. 微量遠心機にて 10,000 回転で 15 秒間遠心する。
12. 微量遠心機にて 15,000 回転で 10 秒間遠心する。
13. Filter unit を 1.5ml チューブに移す。
14. 50 μ l の Elution buffer を入れる。
15. 微量遠心機にて 10,000 回転で 1 分間遠心する。
16. 溶出した RNA は -80°C で保存する。

(3) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR 法)

(検査時間：3～4 時間)

RNA から cDNA を合成し、続けて cDNA 断片を PCR で増幅するキットが各種市販されている。1 例として一本のチューブで RT-PCR 反応ができて便利な宝

酒造の One step RNA PCR Kit キットを用いた方法を以下に示す。

1. One step RNA PCR Kit (宝酒造) の試薬と RNA を以下の様に混合する。

5 μ l 10x One step RNA PCR buffer*

10 μ l 25mM MgCl₂*

5 μ l 10mM dNTP*

1 μ l RNase inhibitor*

1 μ l RTase XL*

1 μ l AMV-optimized Taq*

1 μ l SH-*F* primer (20 pmol/ μ l)

1 μ l SH-*R* primer (20 pmol/ μ l)

5 μ l RNA

20 μ l H₂O*

*キット添付品

合成プライマーの塩基配列

SH-*F* primer: 5'-TCAAGTAGTGTCGATGATCTC-3'

SH-*R* primer: 5'-AGGTGGCATTGTCTGACATTG-3'

2. サーマルサイクラーにセットして以下のサイクルで反応させる。チューブは機械の温度が 50℃になってからセットする。

50°C x 30 min.

94°C x 2 min.

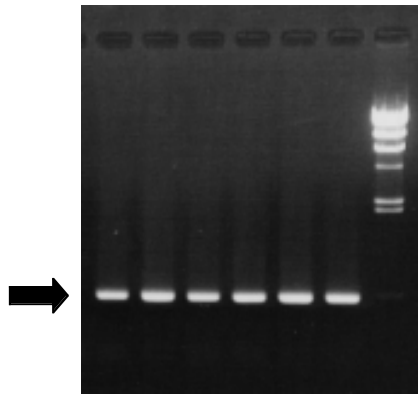
94°C x 30 sec.

55°C x 30 sec.

72°C x 1 min.

} 30 cycles

3. 反応生成物から 2.5 μ l を取り、2x の電気泳動用色素混合物(Dye Mix) 2.5 μ l と混ぜ、1%のアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロマイド染色により増幅された 549bp の DNA 断片 (矢印) のバンドを確認する。



2. SH 遺伝子領域の塩基配列の決定

(検査時間：1 日)

SH 遺伝子はサイズが小さく、また変異が蓄積しやすいので、塩基配列から遺伝子型(genotype)を決定するのに好んで用いられている。得られた PCR 産物をスピニングカラムで精製し、シーケンス反応後に ABI シーケンサーにかけることにより塩基配列を決定することが可能である。用いるシーケンサーの機種によってシーケンシング反応が異なるので、機種に合わせた反応を行う必要がある。

1 例として UltraClean PCR Clean-up Kit と ABI BigDye™ Ver.3 premix を用いた方法を示す。

(1) 試薬・器材

UltraClean PCR Clean-up Kit (MO BIO Laboratories:12500-10、フナコシ取り扱い)

BigDye™ Ver.3 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (ABI:4390242)

Centri-Sep (Princeton Separations: CS-901、ABI 取扱い)

DNA シーケンサー (ABI310 等)

(2) PCR 産物の精製

1. サンプルに 250μl の SpinBind 溶液（5 倍量）を加える。
2. ピペティングあるいはボルテックスミキサーでよく混合する。
3. 混合液を Spin Filter Unit に移す。
4. 微量遠心機にて 13,000 回転で 10～30 秒間遠心する。
5. 溶出液を捨てる（DNA は Filter Unit に吸着している）。
6. Spin Filter Unit をもとのチューブに戻す。
7. 300μl の SpinClean buffer を Spin Filter Unit に入れる。
8. 微量遠心機にて 13,000 回転で 10～30 秒間遠心する。

9. 溶出液を捨てる。
10. Spin Filter Unit をもとのチューブに戻す。
11. 微量遠心機にて 13,000 回転で 30～60 秒間遠心する。
12. Spin Filter Unit を Collection tube に移す。
13. 50 μ l の溶出液を Spin Filter Unit に加える。
14. 微量遠心機にて 13,000 回転で 30～60 秒間遠心し、Collection tube に PCR 産物を回収する。

(3) シーケンシング反応。

1. 以下の溶液を混合する。プライマーは PCR の反応に用いたプライマーが使える。また、精製 PCR 産物の量はおよそその見当で構わない。

0.5 μ l	SH-F primer (20pmo/ μ l)あるいは SH-R primer (20pmol/ μ l)
1 μ l	精製 PCR 産物 (5～20ng)
8 μ l	BigDye™ Ver.3 premix
10.5 μ l	H ₂ O

2. サーマルサイクラーにセットして以下のサイクルで反応させる。50℃を越えてからチューブをセットする。

96°C x 1 min.	
96°C x 10 sec.	} 25 cycles
50°C x 5 sec.	
60°C x 4 min.	

3. PCR の反応中に Centri-Sep スピнкаラムのレジンに 0.8ml の脱イオン水を加え 2 時間以上膨潤させておく。
4. カラムの上のフタ、次に下のフタを取る。
5. 添付のチューブにカラムを入れ、微量遠心機で数秒間遠心する。
6. 溶出液を捨てる。
7. カラムを同じチューブに戻し、微量遠心機にて 3,000 回転で 2 分間遠心する。
8. PCR の反応が終了した反応液をチューブから全量取り、レジンを崩さないように注意深く滴下する。
9. 微量遠心機にて 3,000 回転で 2 分間遠心し、溶出液を取る。
10. 溶出液の一部を ABI310 キャピラリーシーケンサー用のチューブに入れる。

11. セプタ（フタ）をして ABI310 キャピラリーシーケンサーにかける。

(4) シークエンス結果の解析

1. 「AAGAATGAAT」で始まり、「AAAGAAAAAA」で終わる 316 塩基を解析対象とする。国内で販売されたワクチン株の配列は以下の通りである。

2. 武田薬品工業トリイ株の SH 遺伝子の塩基配列

10	20	30	40	50	60
AAGAATGAAT	CCCCTAGGGT	CGTAACGTCT	CGTGACCCCTG	CCGTTGCACT	ATGCCGGCGA
TTCTTACTTA	GGGGATCCCA	GCATTGCAGA	GCACTGGGAC	GGCAACGTGA	TACGGCCGCT
70	80	90	100	110	120
TCCAACCTCC	CTTATACCCA	ACATTTCTAT	TGCTAATTCT	TCTCTCTCTG	ATCATAACTT
AGGTTGGAGG	GAATATGGGT	TGTAAAGATA	ACGATTAAGA	AGAGAGAGAC	TAGTATTGAA
130	140	150	160	170	180
TGTATGTCTG	GATTATATCA	ACCATCACTT	ACAAGACTGC	GGTGGACAT	GCATCACTGT
ACATACAGAC	CTAATATAGT	TGGTAGTGAA	TGTTCTGACG	CCACGCTGTA	CGTAGTGACA
190	200	210	220	230	240
ACCAGAGATC	CTTCTCTCGC	TGGAGTTTCG	ATCACTCACT	CTAGAAAGAT	CTCCAGTTGG
TGGTCTCTAG	GAAGAGAGCG	ACCTCAAAGC	TAGTGAGTGA	GATCTTTCTA	GAGGTCAACC
250	260	270	280	290	300
GACAAGTCCC	AATCCATCAT	GCGAGAACAA	GCTGCATTTA	AATGATGCCG	TTCAATCATG
CTGTTTCAGG	TTAGGTAGTA	CGCTCTTGTT	CGACGTAAAT	TTACTACGGC	AAGTTAGTAC
310	320				
AGACATAAAG	AAAAAA				
TCTGTATTTT	TTTTTT				

3. 北里研究所ホシノ株の SH 遺伝子の塩基配列

10	20	30	40	50	60
AAGAATGAAT	ATCCTGGGGT	CGTAACGTCT	CGTGACCCCTG	CCGTTGCACT	ATGCCGGCGA
TTCTTACTTA	TAGGACCCCA	GCATTGCAGA	GCACTGGGAC	GGCAACGTGA	TACGGCCGCT
70	80	90	100	110	120
TCCAACCTCC	CTTATACCCA	ACATTTCTAT	TGCTAATTCT	TCTCTCTCTG	ATCATAACTT
AGGTTGGAGG	GAATATGGGT	TGTAAAGATA	ACGATTAAGA	AGAGAGAGAC	TAGTATTGAA
130	140	150	160	170	180
TGTATGTCTG	GATTATATCA	ACCATCACTT	ACAAGACTGC	GGTGGACAT	GCAGCACTGT
ACATACAGAC	CTAATATAGT	TGGTAGTGAA	TGTTCTGACG	CCACGCTGTA	CGTCGTGACA
190	200	210	220	230	240
ACCAGAGATC	CTTCTTTTCG	TGGAGTTTCG	ATCACTCACT	CTAGAAAGAT	CTCCAATTGG
TGGTCTCTAG	GAAGAAAGCG	ACCTCAAAGC	TAGTGAGTGA	GATCTTTCTA	GAGGTAAACC
250	260	270	280	290	300
GACAAGTCCC	AATCCATCAT	TCGAGAACAA	GCTGCATTTA	AATGATGCCG	TTCAATCATG
CTGTTTCAGG	TTAGGTAGTA	AGCTCTTGTT	CGACGTAAAT	TTACTACGGC	AAGTTAGTAC
310	320				
AGACATAAAG	AAAAAA				
TCTGTATTTT	TTTTTT				

4. 化血研ミヤハラ株の SH 遺伝子の塩基配列

10	20	30	40	50	60
AAGAATGAAT	ATCCTGGGGT	CGTAACGTCT	CGTGACCCCTG	CCGTTGCACT	ATGCCGGCGA
TTCTTACTTA	TAGGACCCCA	GCATTGCAGA	GCACTGGGAC	GGCAACGTGA	TACGGCCGCT

70	80	90	100	110	120
TCCAACCTCC	CTTATACCCA	ACATTTCTAT	TGCTAATTCT	TCTCTCTCTG	ATCATAACTT
AGGTTGGAGG	GAATATGGGT	TGTAAAGATA	ACGATTAAGA	AGAGAGAGAC	TAGTATTGAA
130	140	150	160	170	180
TGTATGTCTG	GATTATATCA	ACCATCACTT	ACAAGACTGC	GGTGCGACAT	GCAGCACTGC
ACATACAGAC	CTAATATAGT	TGGTAGTGAA	TGTTCTGACG	CCACGCTGTA	CGTCGTGACG
190	200	210	220	230	240
ACCAGAGATC	CTTCTCTCGC	TGGAGTCTCG	ATCACTCACT	CTAGAAAGAT	CTCCAGTTGG
TGGTCTCTAG	GAAGAGAGCG	ACCTCAGAGC	TAGTGAGTGA	GATCTTTCTA	GAGGTCAACC
250	260	270	280	290	300
GACAAGTCCC	AATCCATCAT	TCGAGAACAA	GCCGCATTTA	AATGATGCCG	TTCAATCATG
CTGTTTCAGGG	TTAGGTAGTA	AGCTCTTGTT	CGGCGTAAAT	TTACTACGGC	AAGTTAGTAC
310	320				
AGACATAAAG	AAAAAA				
TCTGTATTTT	TTTTTT				

5. 阪大微研ウラベ Am 9 株の SH 遺伝子の塩基配列

10	20	30	40	50	60
AAGAATGAAT	CTCCTGGGGT	CGTAACGTCT	CGTGACCCCTG	CCGTTGCACT	ATGCCGGCGA
TTCTTACTTA	GAGGACCCCA	GCATTGCAGA	GCACTGGGAC	GGCAACGTGA	TACGGCCGCT
70	80	90	100	110	120
TCCAACCTCC	CTTATACCCA	ACATTTCTAT	TGCTAATTCT	TCTCTCTCTG	ATCGTAACTT
AGGTTGGAGG	GAATATGGGT	TGTAAAGATA	ACGATTAAGA	AGAGAGAGAC	TAGCATTGAA
130	140	150	160	170	180
TGTATGTCTG	GATTATATCA	ACCATCACTT	ACAAGACTGT	GGTGCGACAT	GCAGCACTGT
ACATACAGAC	CTAATATAGT	TGGTAGTGAA	TGTTCTGACA	CCACGCTGTA	CGTCGTGACA
190	200	210	220	230	240
ACCAGAGATC	CTTCTTTTCG	TGGAGTTTTC	ATCACTCACT	CTAGAAAGAT	CTCCAGCTGG
TGGTCTCTAG	GAAGAAAGCG	ACCTCAAAAC	TAGTGAGTGA	GATCTTTCTA	GAGGTGACCC
250	260	270	280	290	300
GACAAGTCCC	AATCCATCAT	GCGAGAACAA	GCTGCATCCA	AATGATGCCG	TTCAATCATG
CTGTTTCAGGG	TTAGGTAGTA	CGCTCTTGTT	CGACGTAGGT	TTACTACGGC	AAGTTAGTAC
310	320				
AGACATAAAG	AAAAAA				
TCTGTATTTT	TTTTTT				

6. 千葉血清 NK-M46 株の SH 遺伝子の塩基配列

10	20	30	40	50	60
AAGAATGAAT	CTCCTGGGGT	CGTAACGTCT	CGTGACCCCTG	CCGTTGCACT	ATGCCGGCAA
TTCTTACTTA	GAGGACCCCA	GCATTGCAGA	GCACTGGGAC	GGCAACGTGA	TACGGCCGTT
70	80	90	100	110	120
TCCAACCTCC	CTTATACCCA	ACATTTCTAT	TGCTAATTCT	TCTCTCTCTG	ATCATAACTT
AGGTTGGAGG	GAATATGGGT	TGTAAAGATA	ACGATTAAGA	AGAGAGAGAC	TAGTATTGAA
130	140	150	160	170	180
TGTATGCCTG	GATTATATCA	ACCATCACTT	ACAAGACTGC	GGTGCGACAT	GCAGCACTGT
ACATACGGAC	CTAATATAGT	TGGTAGTGAA	TGTTCTGACG	CCACGCTGTA	CGTCGTGACA
190	200	210	220	230	240
ACCAGAGATC	CTTCTTTTCG	TGGAGTTTCG	ATCACTCACT	CTAGAAAGAT	CTCCAGTTGG
TGGTCTCTAG	GAAGAAAGCG	ACCTCAAAGC	TAGTGAGTGA	GATCTTTCTA	GAGGTCAACC
250	260	270	280	290	300
GACAAGTCCC	AATCCATCAT	GCGAGAACAA	GCTGCATTTA	AATGATGCCG	TTCAATCATG
CTGTTTCAGGG	TTAGGTAGTA	CGCTCTTGTT	CGACGTAAAT	TTACTACGGC	AAGTTAGTAC

310 320

- 個/316塩基となる。

[illegible]

8. 海外で主流を占めるメルク社ジェルリン(Jerryl-Lynn)株の SH 遺伝子塩基配列は以下の通りであり、国内のワクチン株の代表としてトリイ株と比較すると 37 個/316 塩基の違いになる。同じワクチン株とは言っても SH 遺伝子の塩基の違いは大きい。この様な塩基の違いを基にムンプスウイルスの遺伝子型を決定でき、現在は A~J までの 11 タイプが提唱されている。しかし、いくつ塩基が異なると新しい遺伝子型とするかという国際的基準はなく、研究者の判断に委ねられている。

```

      10      20      30      40      50      60
AAGAATGAAT CTCCTAGGGT CGTAACGTCT CGTGACCCCTG CCGTCGCACT ATGCCGGCAA
TTCTTACTTA GAGGATCCCA GCATTGCAGA GCACTGGGAC GGCAGCGTGA TACGGCCGTT

      70      80      90     100     110     120
TCCAACCTCC CTTATACCTA ACATTTCTAG TGCTAATCCT TCTCTATCTC ATCATAACCC
AGGTTGGAGG GAATATGGAT TGTAAGATC ACGATTAGGA AGAGATAGAG TAGTATTGGG

      130     140     150     160     170     180
TGTATGTCIG GACTATATTG ACTATTAACT ATAAGACGGC GGTGCGATAT GCAGCACTGT
ACATACAGAC CTGATATAAC TGATAATTGA TATTCTGCCG CCACGCTATA CGTCGTGACA

      190     200     210     220     230     240
ACCCGCGATC CTTCTCTCGC TGGGGTTTIG ATCACTCACT CTAGAAAGAT CCCCAATTAG
TGGGCGCTAG GAAGAGAGCG ACCCCAAAAC TAGTGAGTGA GATCTTTCTA GGGGTTAATC

      250     260     270     280     290     300
GACAAGTCCC GATCCGTCAC GCTAGAACAA GCTGCATTCA AATGAAGCTG TGCTACCATG
CTGTTCCAGG CTAGGCAGTG CGATCTTGTT CGACGTAAGT TTACTTCGAC ACGATGGTAC

      310     320
AGACATAAAG AAAAAA
TCTGTATTTC TTTTTT

```

```

AAGAATGAATCCCTAGGGTCGTAACGTCTCGTGACCCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCGA 60
AAGAATGAATCTCCTAGGGTCGTAACGTCTCGTGACCCCTGCCGTCGCACTATGCCGGCAA 60
*****
TCCAACCTCCCTTATACCCAACATTTCTATTGCTAATTCCTTCTCTCTCTGATCATAACTT 120
TCCAACCTCCCTTATACCTAACATTTCTAGTGTAACTCTTCTCTCTCTCATCATAAACC 120
*****
TGTATGTCCTGGATTATATCAACATCACTTACAAGACTGCGGTGCGACATGCATCACTGT 180
TGTATGTCCTGGACTATATTGACTATTAACTATAAGACGCGGTGCGATATGCAGCACTGT 180
*****
ACCAGAGATCCTTCTCTCGCTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGAAAGATCTCCAGTTGG 240
ACCCGCGATCCTTCTCTCGCTGGGTTTGTATCACTCACTCTAGAAAGATCCCAATTAG 240
*** * *****
GACAAGTCCCAATCCATCATGCGAGAACAAGCTGCATTTAATATGATGCCGTTCAATCATG 300
GACAAGTCCCATCCGTCACGCTAGAACAAGCTGCATTCAAATGAAGCTGTGCTACCATG 300
*****
AGACATAAAGAAAAAA 316
AGACATAAAGAAAAAA 316
*****

```

9. 一例として 2000 年に神奈川県下でムンプスウイルス野外株感染患者より分離されたウイルスの SH 遺伝子塩基配列の神奈川県衛生研究所実施例を示す。同じくワクチン株の代表としてトリイ株との違いを比較すると、実に 21 塩基/316 塩基の違いが認められる。現在、日本国内では、ワクチン株と大きく異なる遺伝子型をもつこのようなウイルスが分離されることは、まれではなく、むしろ一般化しつつある。

```

      10      20      30      40      50      60
AAGAATGAAT CTCCTGGGGT CGTAACGTCT CGTGACCCCTG CCGTTGCACT ATGCCGGCAA
TTCTTACTTA GAGGACCCCA GCATTGCAGA GCACTGGGAC GGCAACGTGA TACGGCCGTT

      70      80      90     100     110     120
TCAAACCTCC CTTACACCTA ACATTTCTAT TGCTAATTCT TCTATATCTG ATCATAACTT
AGTTTGGAGG GAATGTGGAT TGTAAGATA ACGATTGAAG AGATATAGAC TAGTATTGAA

```



```

      130      140      150      160      170      180
TTTATGTC TG GATTACATCA ACCATCACTT ATAAGGCTGC GGTGCGACAT GCAACACTGT
AAATACAGAC CTAATGTAGT TGGTAGTGAA TATTCCGACG CCACGCTGTA CGTGTGTACA

      190      200      210      220      230      240
ACCAGAGATC CTTCTTTTCG TGGAGTTTCG ATCACCCACT CTAGAAAGAT CTCCAGTTAG
TGGTCTCTAG GAAGAAAGCG ACCTCAAAGC TAGTGGGTGA GATCTTTCTA GAGGTCAATC

      250      260      270      280      290      300
GACAAGTCTC AATCCTTCAT GCGAGAATAA GTTGCAATTA AATGATACCG TTCAATCATG
CTGTTTCAGAG TTAGGAAGTA CGCTCTTATT CAACGTAAAT TTACTATGGC AAGTTAGTAC

      310      320
AGACATAAAG AAAAAA
TCGTATTTC TTTTTT

```

```

AAGAATGAATCCCCTAGGGTCGTAACGTCCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCGA 60
AAGAATGAATCTCCTCGGGTCGTAACGTCCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCGA 60
***** *** *****
TCCAACCTCCCTTATACCCAACATTTCTATTGCTAATTCTTCTCTCTGATCATAACTT 120
TCAACCTCCCTTACCTAACATTTCTATTGCTAATTCTTCTATCTGATCATAACTT 120
** ***** * *****
TGTATGTCCTGGATTATATCAACCATCACTTACAAGACTGCGGTGCGACATGCATCACTGT 180
TTTATGTCCTGGATTACATCAACCATCACTTATAAGCTGCGGTGCGACATGCATCACTGT 180
* ***** *** *****
ACCAGAGATCCTTCTCTCGCTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGAAAGATCTCCAGTTGG 240
ACCAGAGATCCTTCTTTCGCTGGAGTTTCGATCACCACTCTAGAAAGATCTCCAGTTAG 240
***** *****
GACAAGTCCCAATCCATCATGCGAGAACAGCTGCATTAAATGATGCCGTTCAATCATG 300
GACAAGTCTCAATCTTCATGCGAGAAAGTTGCATTAAATGATACCGTTCAATCATG 300
***** *****
AGACATAAAGAAAAAA 316
AGACATAAAGAAAAAA 316
*****

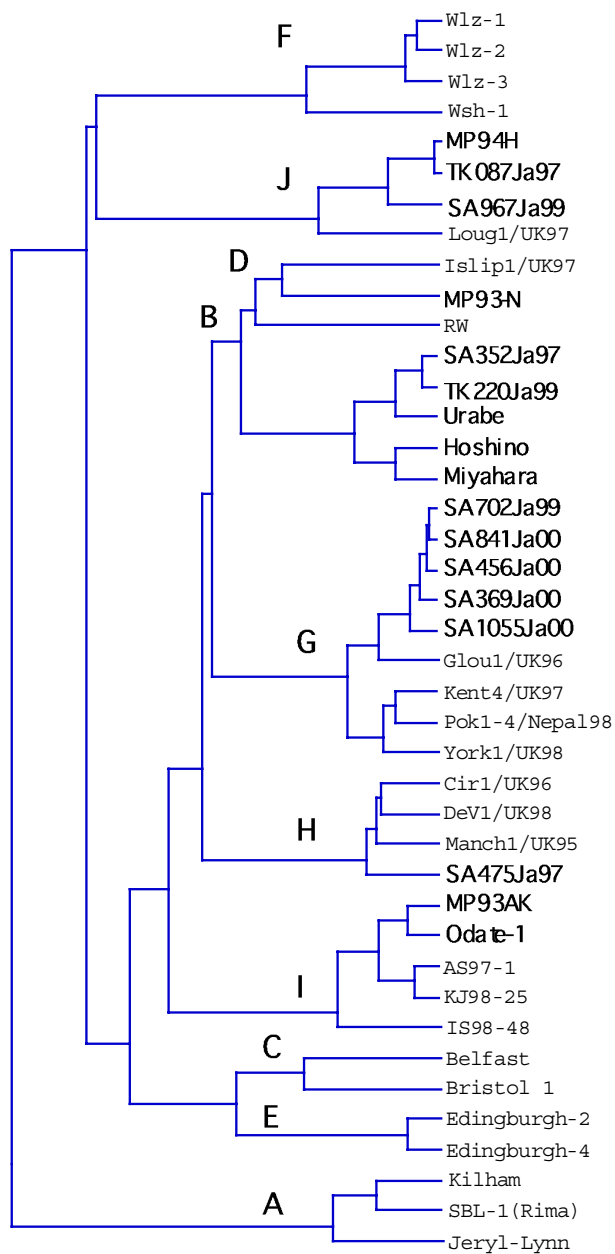
```

10. 得られた SH の遺伝子配列をもとに、塩基の違いの数だけでなく、その位置を考慮して、グループ化を行うことができる。グループ化は UPGMA あるいは NJ 法と言われる数学的手法により、系統樹を作成して行われるのが普通である。これまで多くのムンプスウイルス株の SH 遺伝子の塩基配列が決定されている^{3),4),5)}。そのほとんどは、DDBJ/EMBL/GenBank に登録されている。米国 National Center for Biotechnology (NCBI) のホームページ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> で Nucleotide を選択し、mumps virus AND SH をキーワードに検索すると、これまでに登録された 200 以上の SH 遺伝子の塩基配列を検索することができる。系統樹を作成する遺伝子解析ソフトウェアは各種市販されているが、一例として GENETYX (ソフトウェア開発、東京) を使い UPGMA 法で解析した結果を以下に示す。A から J は遺伝子型を示しているが⁵⁾、前に述べたように分類の基準は各研究者の判断に委ねられているのが現状である。また、太字で書いてある株は日本で分離された株であることを示している。これまで、日本で流行しているのは遺伝子型 B に属するウイルスのみと考えられていたが、最近の研究によると種々の遺伝子型のムンプスウイルス株が流行していることが明らかになってきた。なぜ海外分離株に属するムンプスウイルスが国内で多数分離されるのか？ム

ンプスウイルスの流行様式に興味がもたれる。ムンプスウイルス株の違いにより病原性に差があるのか？ワクチンによる防御効果に差があるのか？
については何もわかっておらず、今後の課題である。

[GENETYX-MAC: Evolutionary Tree]

Method: UPGMA



3. SSCP 法による株の遺伝子型別

(検査時間：2 日間)

遺伝子塩基配列の決定は、以前のように放射性同位元素を利用せずとも PCR を利用して簡便にできるようになり、しかも情報量が豊富なことから、株の型別に頻繁に用いられる。しかしながら、用いる機器及び試薬が高価なことから必ずしもすべての施設で常に利用されているわけではない。塩基配列の決定操作をせずして、遺伝子の配列の違いを知る方法として、RFLP(restriction enzyme fragment length polymorphism；制限酵素切断像多形)と SSCP(single strand conformation polymorphism；一本鎖核酸構造多形)の二つの方法が挙げられる。前者は制限酵素切断点の有無とその位置により型別する方法であり、後者は二本鎖の DNA をそれぞれの一本鎖 DNA に分けた後、再びもとの二本鎖に戻す操作を行うと相補的なもう一方の DNA 鎖と結合するよりも自らの鎖内の相補的な部分と結合し易く、このようにして形成される部分的二本鎖 DNA の構造はその DNA の塩基配列により変化することを利用した方法である。遺伝子の差異を明らかにするだけの目的ならば SSCP 法が簡単ですぐれている⁹⁾。

SSCP 法の解析は電気泳動的に行う。すなわちポリアクリルアミドゲルあるいはアガロースゲルを支持体として電気泳動を行うと、同じ長さの核酸でも二本鎖の方が一本鎖よりも早く流れる性質を持つ。したがって、自鎖内で部分的二本鎖を形成した一本鎖 DNA は、完全な一本鎖よりも電気泳動の移動度が早く、完全な二本鎖よりも遅い。この移動度の違いにより同じ配列を持つ DNA か否かを知ることことができる。

(1) 試薬・器材

RT-PCR キット (宝酒造、One step RNA PCR Kit:RR024A)

サーマルサイクラー(ABI 9700 等)

電気泳動槽(インビトロジェン XCell SureLock Mini-Cell 等)

6% TBE プレメイドゲル(インビトロジェン:EC62652 等)

TBE ランニングバッファー(インビトロジェン:LC6675 等)

銀染色キット(インビトロジェン:LC6070 等)

(2) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

(検査時間：3～4 時間)

前述「逆転写及びポリメラーゼ連鎖反応」に従って抽出した RNA から cDNA を増幅する。但し用いるプライマーは以下に示すムンプスウイルスの P 遺伝子部分に対応するものを用いる^{7),8)}。

合成プライマーの塩基配列

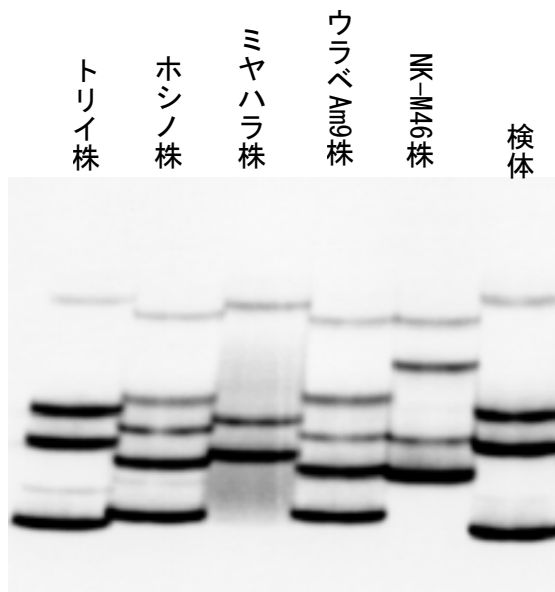
P-F primer: 5'-CTCATTGGCAATCCAGAGCA-3'

P-R primer: 5'-ATGAACCTGTTGGTTGGATA-3'

(3) SSCP 用電気泳動

1. 1μl の PCR 産物に 4 μl のホルムアミド/キシレンシアノール色素混合液を加える
2. 94 度で 2 分間加熱する。
3. アイスバスに移して急冷する。
4. サンプルを電気泳動にかける。
5. 100V で 1 時間泳動する。
6. ゲルを直接手で触れないように、注意深く取り外す。
7. 銀染色を行う。

(4) SSCP 像による判定



SSCP を判定するには必ず、比較する対照が必要である。左に示したように、たとえば未知の検体がどのワクチン株ウイルスかを知りたい場合には、それぞれのワクチン株由来の PCR 産物についても同時に SSCP 解析を行い、同じパターンを示すものを探せばよい。この検体の場合にはトリイ株であると判定できる。

このようなワクチン株対照 cDNA は、問い合わせに応じて感染症研究所から分与可能である。

4. ウイルス分離

(検査時間：1 週間～3 週間)

流行時の典型的流行性耳下腺炎の場合には診断が比較的容易であり、また感度のよい血清学的検査による診断も有効であるので、必ずしもウイルスを分離する必要はない。しかし、ワクチン接種後の無菌性髄膜炎とワクチンウイルスの

因果関係を証明する際等にはウイルス分離が望まれる。1 週間の培養でウイルスが分離できない場合は、3 代継代を行う。

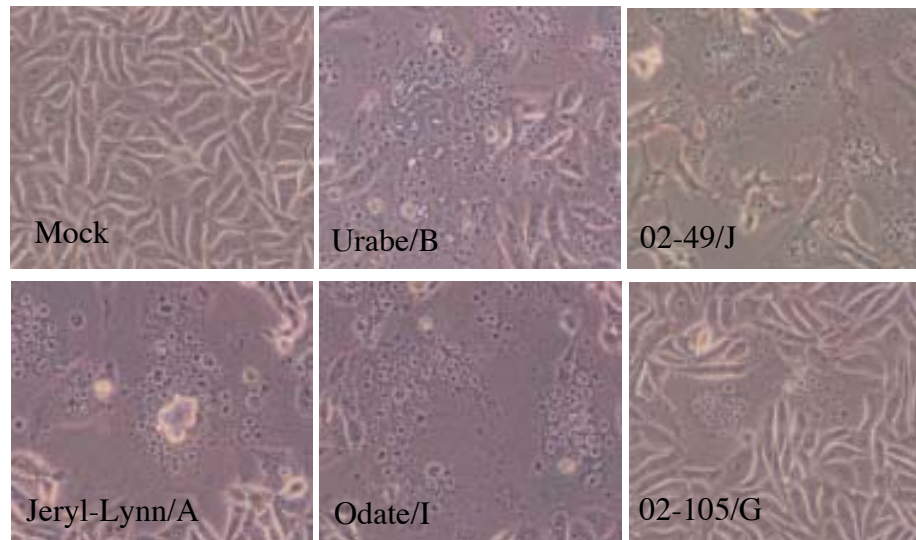
(1) 試薬・器材

一般の細胞培養に用いる試薬 (Eagle MEM、2% fetal bovine serum、ペニシリン・ストレプトマイシン、0.05% Trypsin-0.02% EDTA、PBS(-))
モルモット赤血球 (日本バイオテスト)
抗ムンプスウイルス抗体 (自家製あるいはデンカ生研)
アセトン
抗ウサギ (またはマウス) IgG-FITC conjugate
一般の細胞培養に用いる機材 (クリーンベンチ、CO₂ インキュベーター、低速遠心機)
無蛍光スライドグラス
蛍光顕微鏡。

(2) ウイルス分離の方法

1. 24 穴のプラスチックプレートに 2×10^5 /穴の割合で Vero 細胞をまく。
2. 2～3 日後、上清を除き検体を 0.1 ml/穴ずつ 4 穴 に接種する。複数の検体を扱うときは、検体相互のコンタミネーションを防ぐために、検体と検体の間を一行空けるか別のプレートを用いる。
3. 37℃で1時間吸着後、上清を除き 2% fetal bovine serum、ペニシリン・ストレプトマイシンを含んだ Eagle MEM を 1 ml 加え、37℃に設定した CO₂ インキュベーターで7日間培養する。
4. ムンプスウイルスは明瞭な細胞変性(下図参照)を示さない場合があるので HAD (血球吸着) 試験を行う。培養上清を 0.5 ml ずつ保存した後、HAD 試験を行う。HAD 試験には 0.4%モルモット赤血球を用意する。この時使用する希釈液は Eagle MEM のように Ca イオン、Mg イオンを含むものが良く、PBS(-)は不適當である。また採血後時間が経った赤血球を用いると非特異的な吸着が見られるので注意を要する。培養液を除き、モルモット赤血球液 0.5ml を加え、4℃で 30 分放置する。希釈液で4～5回洗浄してから検鏡する。なお温度は結果に影響するので、25℃以下であることが望ましい。37℃になるとウイルスの HN タンパク質のニューラミニダーゼ活性により吸着していた赤血球も遊離してくる。
5. HAD(+)のものは次のウイルス同定試験に進む。HAD(-)の場合は保存しておいた培養7日目の培養上清を同様のプロトコールで Vero 細胞に接種し、

2 代目、3 代目の継代を行う。3 代目の結果をもって判定とする。



Vero 細胞に各 Genotype のムンプスウイルスを感染させて現れた細胞変性像

Mock: 非感染 Vero 細胞、Urabe/B: B genotype に属する占部ワクチン株感染像、02-49/J: J genotype に属する 2002 年度野外分離株感染像、Jeryl-Lynn/A: A genotype に属する Jeryl-Lynn ワクチン株感染像、Odate/I: I genotype に属する大館株感染像、02-105/G: G genotype に属する 2002 年度野外分離株感染像

(3) ウイルス同定試験

ムンプスウイルスの同定試験としては PCR による遺伝的診断、抗血清を使用して中和指数を出す方法、蛍光抗体法によるものなどある。ここでは簡便で実用的な蛍光抗体法を紹介する。

1. 前記のウイルス分離で HAD(+)となった穴の細胞と対照の非感染細胞を 0.5ml の 0.05% Trypsin-0.02%EDTA で消化する。
2. 細胞がバラバラになったところで更に 1ml の 2% fetal bovine serum、ペニシリン・ストレプトマイシンを含んだ Eagle MEM を加え、全量 1.5ml の細胞懸濁液を遠心チューブに回収し、1,500rpm で 5 分遠心する。
3. 上清を除き沈殿に 1ml の 2% fetal bovine serum、ペニシリン・ストレプトマイシンを含んだ Eagle MEM を加え、細胞数を計算し、 1×10^5 cell/ml に合わせる。
4. 例えばエアブラウン社の HTC スライドグラス(12 穴)に $20 \mu\text{l}$ /穴ずつ 6 穴

に加える。急ぐときは約 10 分放置した後、キャピラリーで慎重に液の部分を除き、細胞が穴に残っているのを顕微鏡で確かめた後 2～3 分間乾燥し、 -20°C に保存しておいた冷アセトンに $20\mu\text{l}$ のせる。アセトンはすぐに蒸発するので、また $20\mu\text{l}$ ずつ補いながら 10 分放置する。なお急がない場合スライドガラスを 3～4 時間 CO_2 インキュベーターに置くと細胞がガラスに接着してくるのできれいな標本が出来る。

5. アセトン固定の後、一次抗体として抗ムンプスウサギ（又はマウス）血清を $20\mu\text{l}/\text{穴}$ と正常ウサギ（又はマウス）血清を $20\mu\text{l}/\text{穴}$ にのせて乾燥しないよう湿度を保つ工夫をした箱に入れ 37°C 1 時間放置する。
6. PBS(-) で 5～6 回洗浄後水分を除き、抗ウサギ（又はマウス）IgG-FITC conjugate（濃度にもよるが 1:100 希釈）を全ての穴に $20\mu\text{l}/\text{穴}$ にのせ湿った箱に入れ 37°C 1 時間放置する。
7. PBS(-) で 5～6 回洗い、マウント剤をのせカバーガラスを置き、蛍光顕微鏡で観察する。

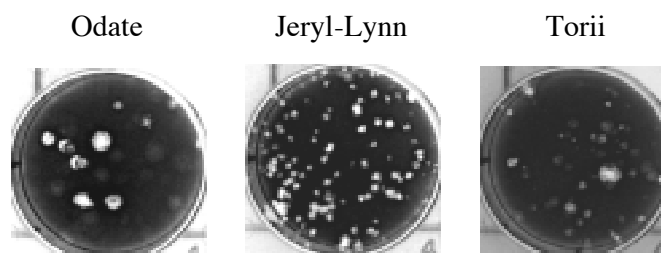
5. ウイルス感染値の測定法⁹⁾

(1) 試薬・器材

ルー瓶
メスシリンダー (100ml)
血球計算盤
6 穴プラスチックプレート
EagleMEM
2x EagleMEM
tryptose phosphate broth (TPB)
牛胎児血清 (FBS)
牛血清 (CS)
ペニシリン・ストレプトマイシン
抗真菌剤 (Fungizone)
アガロース
対照ウイルス液
ニュートラルレッド
0.05%トリプシン- 0.02% EDTA

(2) 操作手順

1. 継代3～4日の Vero 細胞の培養液を除き、4ml のトリプシン・EDTA 液で細胞を洗う。
2. 除液後 4ml の新しいトリプシン・EDTA 液を加えて約1分間置き、細胞が白濁してきたら除液し、37℃に置く。
3. 細胞がばらばらになってきたら増殖培地 (Eagle MEM、10%TPB、5%FBS、ペニシリン・ストレプトマイシン、Fungizone) を 10ml 加え、駒込ピペットで攪拌し、細胞数を数える。2~3x10⁵cells/ml の細胞懸濁液を作製し、1 穴に 3ml ずつ細胞をまき必要な数だけプレートを用意する。通常 175cm² のフラスコ一個より 6 穴プレートを 4 枚作製することができる。
4. 細胞が密な単層状態になるまで 37℃で培養する。
5. 小試験管を用意し、10 倍階段希釈を作るため、ウイルス希釈液 (Eagle MEM、2%CS、ペニシリン・ストレプトマイシン) を 2.7ml ずつ入れる。
6. サンプル 0.3ml を 2.7ml の希釈液の入った試験管に入れ、10⁻¹ とする。以降同様に段階的に希釈する。
7. 希釈列ができれば、6 穴プレートの培養液を除き、段階的に希釈したサンプルを 0.1ml/穴の割合で3つの穴に入れる。
8. 37℃で1時間吸着させる。その間細胞が乾かないように15分おきにプレートを傾ける。
9. 1%アガロース溶液 (蒸留水に1%になるようアガロースを加え、121℃、15分間オートクレーブしたもの) と 2x 培地 (2x Eagle MEM、4%CS、2x ペニシリン・ストレプトマイシン、2x Fungizone)をウイルスの吸着が終わる5分前ぐらいから 45℃の恒温槽に保温しておく。
10. 吸着が終わったら 1%アガロース液と 2x 培地を等量混合して 3ml/穴ずつ重層する。接種液を除く必要はない。
11. アガロースが固まったら 37℃で培養する。
12. 7 日後に 1%アガロース液と 0.09%ニュートラルレッド液を上記同様作製して混合し、3ml/穴ずつ重層する。
13. 翌日、ライトボックスの上でプラーク(図参照)を数え、Plaque Forming Unit (PFU)を算出する。



6. アビジン・ビオジン酵素抗体法（ABC 法）による抗原検出

（検査時間：1 日）

ムンプスウイルスの株によっては細胞に明瞭な細胞変性を起こさず、形成されたプラークが半透明で見にくいことがある。また複数種のウイルスが混在する中でムンプスウイルスのプラークだけを計測したい場合¹⁰⁾もある。酵素抗体法による特異抗原の染色はこのような場合でもプラークを正確に計測することができる。

(1) 試薬・器材

VECTASTAIN Elite ABC（ペルオキシダーゼ）キット（Vector Laboratories: PK-6100、フナコシ取扱い）

抗ムンプスウサギ抗血清（自家製）

ビオチン化抗ウサギ IgG（Vector Laboratories: BA-1000、フナコシ取扱い）

1%塩化コバルト

1%硫酸ニッケルアンモニウム

5mg/ml 3,3' Diaminobenzidine (DAB) (SIGMA: No. D-5637)

1%グルタルアルデヒド（Fisher）

(2) 作業手順

上記の 3. ウイルス感染値の測定法を用いてプラークを形成させる。ABC 法による染色のみを行う場合には、ニュートラルレッド染色を省いても構わない。

1. 1%のグルタルアルデヒドを 1 穴あたり 3ml 入れ、室温で 2 時間固定する。
2. グルタルアルデヒドと重層したアガロースを除き、PBS(-)で 2 回から 4 回細胞を洗う。
3. 99.5%のエタノールで脱水し、風乾する。
4. 直ちに用いない場合には、プレートを-20℃で保存できる。
5. PBS(-)を加えて吸水させる。
6. 1:500 になるように 10%CS-PBS(-) で希釈した抗ムンプスウサギ抗血清を 1 穴あたり 0.4ml 加え、室温で 40 分間置く。
7. PBS(-)で 2 回から 4 回洗浄する。
8. 1:300 になるように 1%BSA-PBS(-)で希釈したビオチン化抗ウサギ血清を 0.4ml/穴で加え、室温で 40 分間置く
9. PBS(-)で 2 回から 4 回洗浄する。
10. VECTASTAIN ABC Kit Complex を以下のように調製する。

- PBS(-) 5ml
A solution 2 滴
B solution 2 滴
11. 0.2ml/穴 加え、室温で 40 分間置く。
 12. PBS(-)で 2 回から 4 回洗浄する。
 13. 基質を以下のように調製し、東洋濾紙 No.1 でろ過する。
5mg/ml DAB 2ml
PBS(-) 19ml
1% 塩化コバルト 0.6ml
1% 硫酸ニッケルアンモニウム 0.6ml
過酸化水素水(H₂O₂) 13μl
 14. 1ml/穴 加え室温で 1 時間置く。
 15. PBS(-)で 2 回から 4 回洗浄する。
 16. 99.5%のエタノールで脱水し、風乾する。
 17. 染色されたプラークを数える。

血清学的検査

血清診断には赤血球凝集抑制試験(HI)、補体結合試験(CF)、ウイルス中和試験(NT)、補体添加中和試験(CNT)、酵素抗体法(ELISA)などが用いられる。近年開発された ELISA はその感度、迅速性、簡便さなどから急速にウイルスの血清診断に用いられるようになってきている^{11),12)}。

1. IgM 検出 ELISA

(検査時間：6 時間)

ELISA を用いると、感染初期に現れる IgM 抗体を簡便に測定することができるので、ムンプスウイルス感染の早期診断が可能である。IgM ELISA 測定キットも市販されている。ここではデンカ生研のキット(ムンプス IgM(II)-EIA「生研」)を用いた方法について簡単に説明する。詳細はキットに添付の説明書を参照されたい。

(1) 操作手順

1. 検体数に応じて小試験管を用意し、緩衝液を 2ml ずつ分注する。
2. 検体 10μl ずつ加え十分に攪拌し、前希釈検体とする。

3. ブランク、各検体、陰性対照及び強陽性対照は各 2 穴ずつ、弱陽性対照は 4 穴使用する。
4. 抗ヒト IgM 抗体固相プレートに各対照と前希釈検体を 100 μ l ずつ一定順序、一定時間間隔で加える。ただし、ブランクの穴には何も加えない。
5. マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、アルミ箔等で覆い、室温(15～20℃)に 1 時間静置する。
6. 穴の反応液を同一順序、同一時間間隔で吸引除去する。
7. 各穴に洗浄液を約 200 μ l 加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、再び液を吸引除去する。
8. この操作を 2 回繰り返す。残りの液は清潔なペーパータオル上でプレートを逆さにして叩き、穴から洗浄液を完全に取り除く。
9. 各検体、陰性対照および強陽性対照の 2 穴のうち、1 穴にウイルス抗原液を 100 μ l、残りの 1 穴に対照抗原液を 100 μ l、また、弱陽性対照の 4 穴のうち、2 穴にウイルス抗原液を 100 μ l ずつ、残りの 2 穴に対照抗原液を 100 μ l ずつ一定時間間隔で加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、アルミ箔等で覆い、室温に 1 時間静置する。ただし、ブランクの穴には抗原液を加えない。
10. 各穴の反応液を同一順序、同一時間間隔で吸引除去する。
11. 各穴に洗浄液を約 200 μ l 加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、再び液を吸引除去する。
12. この操作を 2 回繰り返す。残りの液は清潔なペーパータオル上でプレートを逆さにして叩き、穴から洗浄液を完全に取り除く。
13. 各穴に酵素標識抗体液 100 μ l を同一順序、同一時間間隔で加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、アルミ箔等で覆い、室温に 1 時間静置する。ただし、ブランクの穴には酵素標識抗体液を加えない。
14. 各穴の反応液を同一順序、同一時間間隔で吸引除去する。
15. 各穴に洗浄液を約 200 μ l 加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、再び液を吸引除去する。
16. この操作を 4 回繰り返す。残りの液は清潔なペーパータオル上でプレートを逆さにして叩き、穴から洗浄液を完全に取り除く。
17. 各穴に基質液 100 μ l を同一順序、同一時間間隔で加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、遮光して室温に 30 分間静置する。このときブランクの穴にも基質液を加える。
18. 各穴に反応停止液 100 μ l を同一順序、同一時間間隔で加える。
19. 30 分以内にブランクの穴を対照としてオートリーダー（波長 450nm/630nm）

で測定する。

2. IgG 検出 ELISA

(検査時間：6時間)

基本的には、プレートに吸着させた抗原に希釈した被験血清を反応させ、酵素標識した抗 IgG 抗体を加え呈色反応を行うものである。ELISA と CNT との間には高い相関が認められるので、ワクチンの効果判定に用い得るものと思われる。IgG ELISA 測定キットも市販されている。ここではデンカ生研のキット(ムンプス IgG(II)-EIA [生研])を用いた方法について簡単に説明する。詳細はキットに添付の説明書を参照されたい。

(1) 操作手順

1. 検体数に応じて小試験管を用意し、緩衝液を 2ml ずつ分注する。
2. 検体 10 μ l ずつ加え十分に攪拌し、前希釈検体とする。
3. ウイルス抗原固相プレートおよび対照抗原固相プレートに各対照と前希釈検体を 100 μ l ずつ一定順序、一定時間間隔で加える。ただし、ブランクの穴には何も加えない。
4. マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、アルミ箔等で覆い、室温(15-20℃)に 1 時間静置する。
5. 各穴の反応液を同一順序、同一時間間隔で吸引除去する。
6. 各穴に洗浄液を約 200 μ l 加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、再び液を吸引除去する。
7. この操作を 2 回繰り返す。残りの液は清潔なペーパータオル上でプレートを逆さにして叩き、穴から洗浄液を完全に取り除く。
8. 各穴に酵素標識抗体液 100 μ l を同一順序、同一時間間隔で加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、アルミ箔等で覆い、室温に 1 時間静置する。
9. 各穴に洗浄液を約 200 μ l 加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、再び液を吸引除去する。
10. この操作を 4 回繰り返す。残りの液は清潔なペーパータオル上でプレートを逆さにして叩き、穴から洗浄液を完全に取り除く。
11. 各穴に基質液 100 μ l を同一順序、同一時間間隔で加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、遮光して室温に 30 分間静置する。
12. 各穴に反応停止液 100 μ l を同一順序、同一時間間隔で加える。
13. 30 分以内にブランクの穴を対照としてオートリーダー（波長 450nm/630nm）

で測定する。

3. 中和抗体の測定

(検査日数：7～10 日)

(1) 試薬・器材

Vero 細胞

2x Eagle MEM 培地 (ペニシリン・ストレプトマイシン含む)

牛血清 (56℃、30 分非働化)

PBS

0.5%ニュートラルレッド(粉末を水に溶解)

1%アガロース(Seachem agarose ME; 熱して水に溶解)

2%グルタルアルデヒド (50%溶液を PBS に希釈)

6 穴プラスチックプレート

CO₂ 培養器

(2) 中和抗体価測定の手順

1. 被検血清を 56℃、30 分非働化する。
2. 被検血清を希釈液(Eagle MEM 培地)で 10 倍に希釈し、その後 4 倍階段希釈する。
3. 100pfu/100μl になるように希釈したムンプスウイルスと、希釈被検血清を等量混合し、37℃、30 分間中和反応を行う。一方、ウイルス対照としては、血清の代わりに希釈液と等量混合し、同様に処理する。
4. 中和反応を終えた検体を、6 穴プラスチックプレートに単層培養した細胞上に 200μl ずつ接種し、37℃、5 %CO₂ 培養器内で 60 分間ウイルス吸着をおこなう。
5. 高圧滅菌機にかけて溶かした 1%アガロースと 2x Eagle MEM を等量混合し、0.5%アガロース/MEM 溶液を作成し、それを 45℃に加温する。
6. ウイルス吸着終了後、0.5%アガロース/MEM 溶液を 3 ml/穴の割合で加える。
7. そのまま、アガロースが固まるまで静置し、固まったら CO₂ 培養器内で 7~10 日間培養する。
8. 高圧滅菌機にかけて溶かした 1%アガロースと 0.5%ニュートラルレッドを加え最終濃度 0.1~0.05%とした 2x Eagle MEM を等量混合し、ニュートラルレッド/0.5%アガロース/MEM 溶液を作成する。できたものを 45℃に加温する。3 ml/穴の割合で加え、固化した後、一晚培養を続ける。

9. 結果を保存したい場合には、2%グルタルアルデヒドを 3 ml/穴の割合で加え、2 時間固定操作を行い、その後、アガロースをはがして水洗、乾燥して保存する。保存しない場合には、そのまま以降に進む。
10. 50% plaque reduction を計算し、中和抗体価を計算する。

4. 補体添加中和試験

(検査日数：1 日)

イムノグロブリン(Ig)の中で IgM 及び IgG の一部(IgG3>IgG1>IgG2 の順)に補体結合能力がある。ウイルス中和活性を持つ Ig の場合、これら補体結合能を有する Ig クラスにおいては、補体によりその中和能力が増強されることが知られている。そのため、補体を添加した中和反応試験の方が、実際のウイルスに対する抵抗力を反映する¹¹⁾。

(1) 試薬・器材

基本的には中和試験と同様であるが、それに加えて以下のものが必要である。
乾燥モルモット補体 (デンカ生研:500-101)

(2) 補体添加中和抗体価測定の手順

1. 被検血清を 56℃、30 分非働化する。
2. 希釈液に乾燥補体を 100 単位/100μl になるように添加する。
3. 被検血清を希釈液(Eagle MEM 培地)で 10 倍に希釈し、その後 4 倍階段希釈する。
4. 100pfu/100μl になるように希釈したムンプスウイルスと補体を含む希釈被検血清を等量混合し、37℃、30 分間中和反応を行う。一方、ウイルス対照としては、血清の代わりに希釈液と等量混合し、同様に処理する。
5. 中和反応を終えた検体を、6 穴プラスチックプレートに単層培養した細胞上に 200μl ずつ接種し、37℃、5 %CO₂ 培養器内で 60 分間ウイルス吸着をおこなう。
6. 高圧滅菌機にかけて溶かした 1%アガロースと 2x Eagle MEM を等量混合し、0.5%アガロース/MEM 溶液を作成し、それを 45℃に加温する。
7. ウイルス吸着終了後、0.5%アガロース/MEM 溶液を 3 ml/穴の割合で加える。
8. そのまま、アガロースが固まるまで静置し、固まったら CO₂ 培養器内で 7~10 日間培養する。
9. 高圧滅菌機にかけて溶かした 1%アガロースとニュートラルレッドを加えた 2x Eagle MEM を等量混合し、ニュートラルレッド/0.5%アガロース/MEM 溶

液を作成する。できたものを 45℃に加温する。3 ml/穴の割合で加え、固化した後、一晚培養を続ける。

10. 結果を保存したい場合には、2%グルタルアルデヒドを 3 ml/穴の割合で加え、2 時間固定操作を行い、その後、アガロースをはがして水洗、乾燥して保存する。保存しない場合には、そのまま以降に進む。
11. 50% plaque reduction を計算し、中和抗体価を計算する。

5. 赤血球凝集阻止(HI)試験

(検査日数：2 日)

ムンプスウイルスの HA 反応は、特に冷やさなくても室温で可能である。しかし、ウイルスのノイラミニダーゼ活性により室温では凝集像が時間の経過とともに非凝集像へと変化してしまうため、凝集像を一時的に保管したい場合には冷やしておく必要がある。また、先に述べたように他のパラインフルエンザウイルスとの間に交差性があるので注意を要する

(1) 試薬・器材

96 穴丸底プレート

PBS

モルモット赤血球(日本バイオテスト)

Receptor Destroying Enzyme (RDE ; デンカ生研:340016)

遠心機

(2) 赤血球凝集阻止(HI)試験の手順

1. 市販の RDE を添付書類に従って溶解する。
2. 被検血清 1 容に対して、3 容の溶解 RDE を加え、37℃で一晩処理する。
3. RDE 添加被検血清を 56℃ 1 時間加熱し、RDE を不活化させる。
4. モルモット赤血球を必要量とり低速遠心にかけ、上清を捨てる。捨てた分量と同じだけの PBS を加え、穏やかに赤血球を懸濁する。この操作を 3 回続ける。
5. 最終懸濁液の一部を取り、0.4% (V/V)を作る。
6. 96 穴の丸底プレート内を使って被検血清を希釈液で 2 倍階段希釈液 (50μl/穴)を作成する。
7. 対照としては、血清の代わりに希釈液を用いる。
8. あらかじめ 4HA 単位になるように調整したムンプスウイルス抗原を 50μl/穴で加える。

9. 0.4% モルモット赤血球を各穴に 100μl/穴で加え、よく攪拌する。
10. しばらく静置し、陰性対照の血球が完全に沈降したところで、判定する。

ムンプスウイルス感染症の診断基準

次のいずれかにあてはまれば「ムンプスウイルス」とする。

1. ムンプスウイルスが分離される。
2. RT-PCR による遺伝子検査で、ウイルス特異的な遺伝子断片が検出される。
3. IgM 検出 ELISA でムンプスウイルス特異的 IgM 抗体が認められる。
4. 患者に耳下腺腫脹等のおたふくかぜの典型例が認められ、かつ患者周囲でおたふくかぜの流行がある。
5. HI 抗体あるいはムンプスウイルス特異的 IgG 検出 ELISA 抗体価が急性期と回復期の血清の間で、明らかな上昇が認められる。

参考文献

1. 千葉峻三 1999. 流行性耳下腺炎「感染症の診断・治療ガイドライン」日本医師会雑誌 臨時増刊 122(10):220-224.
2. 厚生省監修微生物検査必携ウイルス・クラミジア・リケッチア検査 1987 年（第3版）、金井興美、山崎修道編、財団法人日本公衆衛生協会、p115-123.
3. 臨床ウイルス学手技編、1978. 甲野礼作、石田名香雄、沼崎義夫編、講談社、p11-44.
4. Kashiwagi, Y., T. Takami, T. Mori, and T. Nakayama 1999. Sequence analysis of F, SH, and HN genes among mumps virus strains in Japan. Arch. Virol 144:593-599.
5. Kim S. H., K-J. Song, Y. K. Shin, J. H. Kim, S. M. Choi, K. S. Park, L. J. Baek, Y. J. Lee and J-W. Song 2000. Phylogenetic analysis of small hydrophobic (SH) gene of Mumps virus in Korea: Identification of a new genotype. Microbiol. Immunol. 44(3): 173-177.
6. Uchida K., M. Shinohara, S. Shimada, Y. Segawa, and Y. Hoshino 2001. Characterization of Mumps virus isolated in Saitama prefecture, Japan, by sequencing analysis of SH gene. Microbiol Immunol. 45(12):851-855.
7. Katayama, K. A. Oya, K. Tanabayashi, K. Okazaki, M. Hishiyama, S. Yamazaki, A. Yamada 1993. Differentiation of mumps vaccine strains from wild viruses by single-strand conformational polymorphism on the P gene. Vaccine 11:621-623.
8. Yamada, A., K. Takeuchi, K. Tanabayashi, M. Hishiyama, and A. Sugiura. 1989.

Sequence variation of the P gene among mumps virus strains. *Virology* 172:374-376.

9. Yamada, A., K. Takeuchi, K. Tanabayashi, M. Hishiyama, Y. Takahashi, and A. Sugiura. 1990. Differentiation of the mumps vaccine strains from the wild viruses by the nucleotide sequences of the P gene. *Vaccine* 8:553-557.
10. Fukuda, A., M. Hishiyama, Y. Umino, and A. Sugiura. 1987. Immunocytochemical focus assay for potency determination of measles-mumps-rubella trivalent vaccine. *J. Virol. Methods* 15: 279-284.
11. 菱山美智子、伊藤康彦、山田章雄、鶴留雅人、杉浦昭 1984. ムンプスウイルスの補体添加中和試験に関する研究 *臨床とウイルス* 12(1):74-80.
12. 坂田宏子、山田章雄、菱山美智子、杉浦昭 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)によるムンプス抗体測定 *臨床とウイルス* 12 (1):81-86.

平成 14 年 7 月 初版

加藤 篤（国立感染症研究所 ウイルス第 3 部第 4 室）＊

竹内 薫（筑波大学医学系）

唐牛良明（京都府衛生公害研究所）

青森県環境保険センター他

平成 15 年 8 月 加筆、修正

加藤 篤（国立感染症研究所 ウイルス第 3 部第 4 室）＊

長崎県衛生公害研究所

群馬県衛生環境研究所

栃木県保険環境センター

*かとうあつし;208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1、TEL:042-561-0771(代表)、Fax : 042-567-5631、E-mail : akato@nih.go.jp

急性出血性結膜炎

目 次

(1) 疾患の概説

(2) 検査に関する一般的注意

- 1) 検査材料の採取
- 2) 検査材料の輸送
- 3) 作業上の注意
- 4) 検査の進め方

(3) 検査方法

- 1) AHC ウイルスの分離
- 2) AHC ウイルスの同定
- 3) 中和試験による血清学的検査
- 4) AHC ウイルスの RT-PCR 及び塩基配列の解析

(4) 引用文献

(5) 連絡先

(6) 執筆者

(1) 疾患の概説

急性出血性結膜炎（Acute hemorrhagic conjunctivitis、AHC）は主としてエンテロウイルス 70（EV70）とコクサッキーウイルス A24 変異株（CA24v）という二つのエンテロウイルスによって引き起こされる激しい出血症状を伴う結膜炎である。両ウイルスともヒトからヒトへ直接接触伝播する。EV70 は 1971 年に日本のウイルス研究者によって発見されたウイルスで、北海道で分離された株が標準株になっている。CA24v は EV70 とほぼ同時期の 1970 年に東南アジアで流行していた AHC 患者から分離されたウイルスである。なぜ同じ病原性を持ったエンテロウイルスが時期を同じくしてヒト社会に出現したのかは今もって謎である。AHC 患者からは EV70 や CA24v 以外のエンテロウイルス、例えばポリオウイルスなどが分離されることもある。

EV70 と CA24v はともにエンテロウイルスの仲間で、電子顕微鏡でみると直径約 30nm の小型の球形粒子として観察される。その遺伝子である 1 本鎖 RNA を構成する約 7,500 の塩基配列は両ウイルスで明らかになっている。大部分のエンテロウイルスは消化管に感染するのが普通であるが、両ウイルスとも結膜が専らの感染部位であり、消化管で増殖したという報告はない。この性状は培養細胞における EV70 の至適温度が 33～34℃であり、39℃では全く増殖できないことと関連するらしい。EV70 は眼に病原性を有すること、潜伏期が極めて短く感染後わずか 36 時間で発症することが偶発的な実験室感染の結果明らかになったが、なぜ結膜下に激しい出血を引き起こすのか、そのメカニズムはいまだに明らかにされていない。

ワクチン、抗ウイルス剤等、急性出血性結膜炎に対する積極的な予防治療法は、いまのところ存在しない。現在の感染症法では、急性出血性結膜炎は 4 類感染症定点把握疾患（眼科定点）に分類されている。

(2) 検査に関する一般的注意

1) 検査材料の採取

ウイルス分離のための検体として、結膜ぬぐい液（結膜擦過物、眼脂）が一般的である。結膜ぬぐい液を採取した滅菌綿棒は、ビールインフュージョンブロス、細胞培養用培地等、適切な保存液中でよく撹拌した後、管内壁に押し付けて絞り、捨てる。臨床検体から直接ウイルス遺伝子検査を行なう場合の検体採取は、ウイルス分離用の検体採取に準じて行なう。検査をより正確で効果あるものにするために検体は発症後できるだけ早い時期に採取し、速やかに検査に供する。すぐに検査に供しない場合は凍結保存する。血清学的検査のためには、発症後早期に採取した急性期血清と発症後 2 週間以上経過した回復期の血清を採取する。

2) 検査材料の輸送

ウイルス材料の保管・輸送中の凍結、融解の繰り返しはウイルス力価が低下するので

避けなければならない。 -20°C での保管・輸送が確保できなければ、 $0\sim 8^{\circ}\text{C}$ で保管・輸送する。輸送にあたっては冷却が保たれる状態で包装し、検体番号、発病日、検体採取日等、必要事項を明記したうえ送付する。送付先にはあらかじめ検体数、搬入予定などを連絡しておく。

3) 作業上の注意

臨床検体の取り扱い、バイオセーフティーに十分留意した上で行なう。検体の処理、ウイルス分離および同定の作業には、クラス2の安全キャビネットを使用する。

4) 検査の進め方

急性出血性結膜炎の確定診断は結膜ぬぐい液（結膜擦過物、眼脂）からのウイルス分離によって行う（図1）。出現当初のEV70は初代サル腎臓細胞、ヒト胎児腎臓細胞（HEK）、HeLa細胞などで比較的容易に分離され、型特異抗体による中和試験で同定された。しかしながら、近年は培養細胞による分離が極めて困難になっており、わが国では20年近く分離の報告がない。理由は不明である。したがって、EV70の場合は結膜ぬぐい液（結膜擦過物、眼脂）から直接RNAを抽出後、RT-PCRで遺伝子を増幅し、その塩基配列を分子系統解析することによって行われている。一方、CA24vでは分離は現在も比較的容易で、通常50%以上が分離陽性となる。型特異抗血清による中和試験で同定する。また、CA24vも近年はエンテロウイルスに共通なプライマーで遺伝子を増幅して、直接塩基配列を決定し、分子系統解析から同定されている。

ウイルス分離を行なうことが出来ない場合、あるいはウイルスが分離されなかった場合は、ウイルス感染の間接的な証明として血清学的診断法を用いることが出来る。しかしながら、両ウイルスともペア血清の抗体上昇は低い場合が多く、かつ抗体レベルの持続も短い。

(3) 検査方法

1) AHC ウイルスの分離

1. 試薬

Eagle's MEM（オートクレーブ可能、ニッスイ等）、7.5%NaHCO₃、ペニシリン・ストレプトマイシン(PS)溶液、牛胎児血清(FCS)、PBS(+）、L-グルタミン溶液（200 mM）

増殖培地

500 mL の Eagle's MEM 培地に PS 溶液（終濃度ペニシリン 100 unit/mL、ストレプトマイシン 100 μg/mL）、FCS（終濃度 10%）、7.5%NaHCO₃ を 7.5 mL、L-グルタミン溶液を 5 mL 添加する。

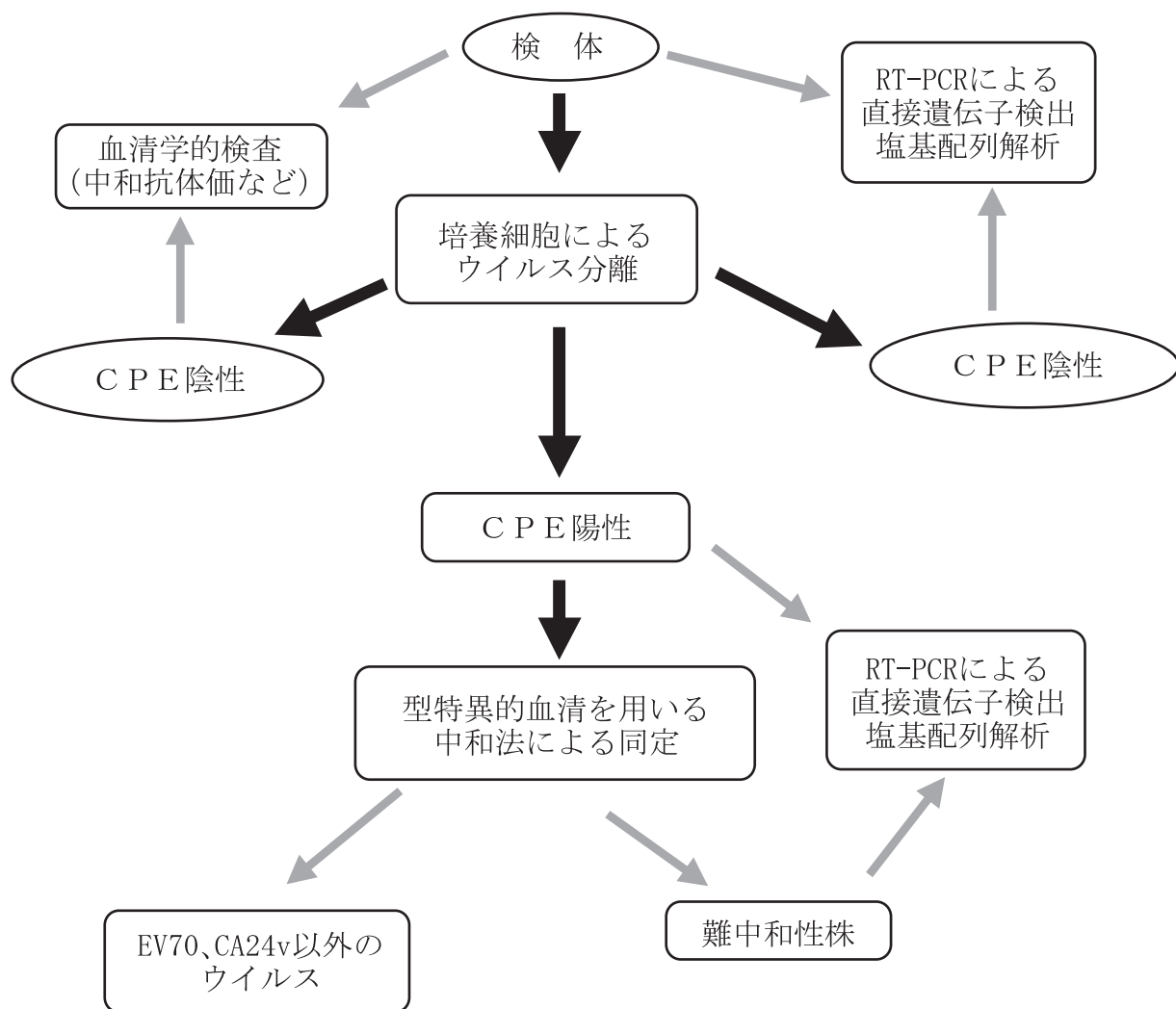
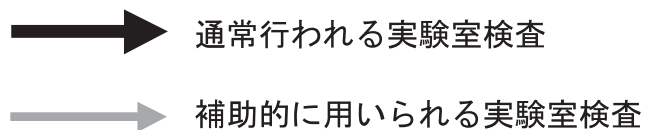


図1 検査の進め方



維持培地

500 mL の Eagle's MEM 培地に PS 溶液 (終濃度ペニシリン 100 unit/mL、ストレプトマイシン 100 µg/mL)、FCS (終濃度 2%)、7.5%NaHCO₃ を 12.5 mL、L-グルタミン溶液を 5 mL 添加する。

検体処理液

PBS(+)に、PS 溶液 (終濃度ペニシリン 500 unit/mL、ストレプトマイシン 500 µg/mL)を添加する。

2. 機器・機材

炭酸ガス培養器 (33℃および 37℃)、24 穴プラスチックトレイ (あるいは組織培養用チューブ)、175 cm²細胞培養用プラスチックボトル (あるいはガラス製 750 mL ルー瓶)、遠沈管 (50 mL、15 mL)、マイクロピペット(P1000)、マイクロピペット(P200)、滅菌済み綿付きチップ (200 µL、1000 µL)、ストックチューブ(2 mL 用)、等

3. 細胞

ヒト胎児腎臓 (HEK) 細胞、HeLa 細胞、RD 細胞などを用いる。

操作

1. 検体の前処理

結膜ぬぐい液 (結膜擦過物、眼脂) は、10,000 rpm、20 分 (4℃) 遠心分離し、上清を接種する。細菌の混入が認められる場合は、0.22 µm のフィルターで処理する。

2. 接種と観察

- (1)24 穴の培養プレートあるいは組織培養用ガラスチューブを使用する。24 穴の培養プレートを用いる場合は、特に検体間のクロスコンタミネーションに留意する。
- (2)単層になった細胞の増殖培養液を捨て、維持培養液に換える。
- (3)検体 100~300 µL を細胞に接種する。
- (4)EV70 が疑われる場合は 33℃、CA24v が疑われる場合は 37℃で 7~10 日間観察する。
CPE が現われない時は、そのまま凍結融解を 3 回行い、遠心上清を新しい細胞に接種して、更に 7~10 日間観察する。CPE が出現しない場合、陰性とする。
- (5)完全な CPE が現われたら、培養液を -20℃に保存する (初代ウイルス)。
- (6)初代ウイルスを新しい細胞に接種して、はっきりした CPE が再び現われたら培養液を -20℃に保存する (2 代目ウイルス)。ウイルスの同定には力価の高くなった 2 代目ウイルスを用いる。
- (7)接種後 24 時間以内に CPE が現われたら、検体中の成分による非特異的細胞毒性の可能性が高い。新しい細胞にその培養液を 100 µL 接種し観察を続ける。または、検体接種時に接種液により 1 時間吸着を行った後、細胞を洗浄し維持培養液を加えることにより細胞毒性の影響を低下させることが出来る。

2) AHC ウイルスの同定

マイクロプレートを用いた中和試験により行なわれることが多く、トランスファープレートを用いる方法、細胞懸濁液を後から加えるまきこみ式、いずれの方法で行っても構わない。型特異的血清は、国立感染症研究所から分与可能である。

1. 試薬・細胞

同定に使用する細胞はウイルス分離のものと同じ細胞を使用するのが原則である。血清希釈には維持培養液、細胞浮游液の調製には増殖培養液を使用する。

2. 機器・機材

炭酸ガス培養器、96 穴細胞培養プレート、マイクロピペット(P1000)、マイクロピペット(P200)、滅菌済み綿付きチップ (200 μ L、1000 μ L)、ウイルス希釈用滅菌済み綿付き長チップ (200 μ L)、ウイルス希釈用試験管 (アルミキャップ付き) 等

操作

1. トランスファープレートを用いる方法

- (1)96 穴トランスファープレートに 20 単位の血清 25 μ L と 100 TCID₅₀/25 μ L に希釈したウイルス液 25 μ L を入れ、マイクロプレート用ミキサーで混和する。
- (2)35～37℃の炭酸ガス培養器中で 1～2 時間反応させる。
- (3)あらかじめ 96 穴平底プレートに培養した細胞の培養液を捨て、細胞維持培地 100 μ L /well を加える。
- (4)トランスファープレートを細胞培養プレートに重ねてウイルスを接種する。
- (5)EV70 の場合は 33℃、CA24v では 37℃の炭酸ガス培養器に入れ、7 日間 CPE を観察する。

2. まきこみ法

- (1)20 単位の抗血清 50 μ L を well に加える。
- (2)希釈した分離ウイルス(100 TCID₅₀/50 μ L)を 50 μ L 入れ、マイクロプレート用ミキサーで混和する。
- (3)35～37℃で 2 時間反応させる。
- (4)中和の間に細胞をトリプシン消化し、1～2 $\times 10^5$ 個/mL の細胞浮游液をプレート 1 枚につき 10 mL 用意する。
- (5)細胞を 100 μ L ずつ中和反応の終わったプレートに加える。
- (6)EV70 の場合は 33℃、CA24v では 37℃の炭酸ガス培養器に入れ、7 日間 CPE を観察する。

判定

- (1)倒立顕微鏡で 7 日間 CPE を観察し、CPE の出現で判定する。
- (2)原則として攻撃ウイルス量が 32～320 TCID₅₀/well から外れているときは再検査する。
- (3)break through (標準株抗血清で中和されにくい"ブライム"変異株や凝集塊のあるウイ

ルスでは不完全な中和反応が起こり、一見中和されているように見えるが、日数が経つと CPE が出現する現象) が起きる場合は、ウイルスを HCFC-141b (ダイキン工業) あるいはクロロホルムで処理するか、口径 0.45 μm の非ニトロセルロースフィルターでろ過すると中和がうまく行く場合がある。

3) 中和試験による血清学的検査

1. 試薬・細胞

HEK、HeLa、RD などウイルスに感受性のある細胞を使用する。血清希釈には維持培養液、細胞浮遊液の調製には増殖培養液を使用する。抗体価測定に使用するウイルス株は、基本的には標準株を用いるが、分離株を併用する場合もある。あらかじめ攻撃ウイルスの感染価(TCID₅₀/50 μL)を測定しておく。

2. 機器・機材

炭酸ガス培養器、96 穴細胞培養プレート、マイクロピペット(P1000)、マイクロピペット(P200)、滅菌済み綿付きチップ (200 μL 、1000 μL)、ウイルス希釈用滅菌済み綿付き長チップ (200 μL)、ウイルス希釈用試験管 (アルミキャップ付き) 等

操作

1. 血清希釈 (図 2)

- (1)血清は維持培養液で 1:4 に希釈 (血清 0.1 mL に希釈液 0.3 mL) し、56°C30 分間非働化する。
- (2)96 穴マイクロプレートの第 1 列、3~10 列目の各穴に、維持培養液を 50 μL ずつ、滅菌チップ (以下チップ) で滴下、分注しておく。
- (3)第 1 列目の血清対照には、20 ユニットの型特異的血清を 50 μL を分注する。2 列目及び 3 列目の穴には 1:4 に希釈した血清を 50 μL 分注する。
- (4)各血清検体につき 2 穴ずつを使用し、3 列目から 2 倍階段希釈を行う。3 希釈ごとにチップを換える。

2. 中和

- (1)細胞対照列には 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ の維持培養液を加える。
- (2)Back-titration を並行して行い、攻撃ウイルス量が 100 TCID₅₀ (許容範囲 32~320 TCID₅₀) /well で行われたことを確認する。
- (3)マイクロミキサーで混和後、蓋をかぶせて炭酸ガス培養器に入れ、35~37°C で 3 時間中和する。
- (4)中和を終えたマイクロプレートに別に準備した細胞浮遊液($1\sim2\times10^5$ 個/mL)を 100 μL ずつ加え、EV70 の場合は 33°C、CA24v の場合は 37°C で培養する。
- (5)接種後 1 週間、CPE の出現の有無を観察する。

3. 判定

ウイルス対照の成績が 32～320 TCID₅₀/50 μL から外れているときは再検査を行う。表 1 に示したように、抗体価は接種ウイルスの CPE の発現を抑制した血清の最高希釈倍数で示す。通常、急性期と回復期の血清を比較して 4～8 倍の抗体価の上昇があれば、ウイルス感染の証明とされる。

		血清 対照		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	細胞 対照	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
試料 1	A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
試料 2	C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
試料 3	E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
力価 測定	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
			-0	-1		-2		-3		-4				

図2. 中和抗体測定試験のマイクロプレート上におけるレイアウト

表 1 中和抗体価の判定例

	血清希釈倍率								中和 抗体価
	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	
試料 1	+	+	+	+	+	+	+	+	< 4
	+	+	+	+	+	+	+	+	
試料 2	-	-	-	-	+	+	+	+	32
	-	-	-	+	+	+	+	+	
試料 3	-	-	-	-	+	+	+	+	32
	-	-	-	-	+	+	+	+	

4) AHC ウイルスの RT-PCR 及び塩基配列の解析

エンテロウイルス共通プライマ-を用いて RT-PCR 法でウイルスゲノムを増幅後、塩基配列を決定し系統解析によってウイルスを同定する。ここでは VP4 領域を用いた解析法を示す（図 3）。

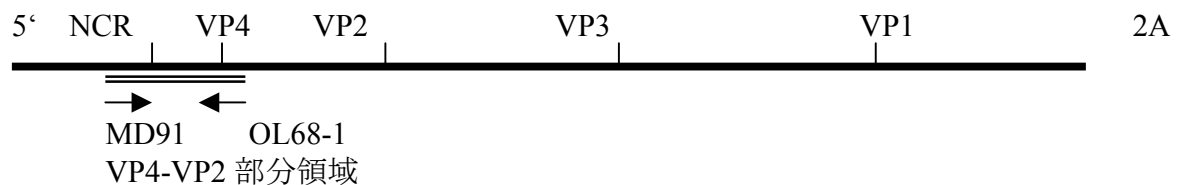


図 3 AHC ウイルス RT-PCR に用いられるプライマーと増幅部位

1. 試薬と実験器具

1.5 mL チューブ、フィルター付きピペットチップ（1000, 200, 20 μ L）、マイクロピペット、滅菌精製水、微量高速冷却遠心機、恒温水槽あるいはブロックヒーター、ミキサー。

RNA 抽出には従来の SDS フェノール抽出法のほか、市販の各種キット（キアゲン：QIAamp Viral RNA Mini kit、ロシュ：High Pure Viral RNA kit、ゲノムサイエンス研究所：スマイテスト R キットなど）が便利である。

RT-PCR、及び電気泳動には各種 RT-PCR キット、0.5 mL または 0.2 mL PCR 用チューブ、センスプライマ-、アンチセンスプライマ-、サーマルサイクラー、電気泳動装置、アガロース、TBE バッファー、DNA サイズマーカー、エチジウムブロマイド溶液が必要になる。

操作

1) RNA の調製

結膜ぬぐい液（結膜擦過物、眼脂）を直接用いる。または、検体を接種後 CPE が 80～100%現われたものを採取し、凍結融解後遠心（10,000 x g、10 分）した上清を用いる。100 μ L のサンプルから SDS-フェノール抽出法あるいは市販 RNA 抽出キットを用いてウイルス RNA を抽出し、以下の組成の溶液に溶解する。

RNasin (40 U/ μ L)	1.0 μ L
OL68-1(100 μ M)	0.5 μ L
DDW	8.5 μ L
	<hr/>
	10.0 μ L

2)cDNA 合成

RNA 溶液 10 μ L を 100℃で 15 秒加熱し、氷水で急冷する。以下の組成の反応液を 10 μ L 加え、37℃で 1 時間反応させる。

10 x Taq buffer*	2.0 μ L
M-MLV reverse transcriptase(200 U/ μ L)	1.0 μ L
25 mM dNTPs	2.0 μ L
RNasin (40 U/ μ L)	1.0 μ L
DDW	4.0 μ L
	<hr/>
	10.0 μ L

3) PCR

1st PCR

cDNA 溶液 5 μ L に以下の組成の反応液を 45 μ L 加える。

10 x Taq buffer*	4.5 μ L
MD91(100 μ M)	0.125 μ L
Taq DNA polymerase(5 U/ μ L)	0.5 μ L
DDW	39.875 μ L
	<hr/>
	45.0 μ L

* Taq DNA polymerase (Roche Diagnostic Systems)に 10 x buffer として、添付されてくる。

サーマルサイクラーで以下の反応を行う。

94℃	5 分		
95℃	30 秒	┌	
55℃	30 秒	├	40 サイクル
72℃	1 分	└	
72℃	7 分		
4℃	∞		

反応後、5 μ L を 3%アガロースゲル電気泳動する。約 750 bp の位置に検出されたバンドを陽性とする。バンドの認められなかった場合、以下の通り Semi-nested PCR を行う。

Semi-nested PCR

1st PCR 反応液 5 μ L に以下の組成の反応液を 45 μ L 加える。

10 x Taq buffer	4.5 μ L
25 mM dNTPs	0.5 μ L
EVP4 (100 μ M)	0.25 μ L
OL68-1 (100 μ M)	0.25 μ L
Taq DNA polymerase (5 U/ μ L)	0.5 μ L
DDW	39.0 μ L
	45.0 μ L

サーマルサイクラーで以下の反応を行う。

94°C	5 分		
95°C	30 秒	}	40 サイクル
55°C	30 秒		
72°C	1 分		
72°C	7 分		
4°C	∞		

反応後、5 μ L を 3%アガロースゲル電気泳動する。約 650 bp の位置に検出されたバンドを陽性とする。

4)プライマー

MD91 : 5'-CCT CCG GCC CCT GAA TGC GGC TAA T-3' (25mer)
 OL68-1 : 5'-GGT AAY TTC CAC CAC CAN CC-3' (20mer)(Y=C+T, N=A+C+G+T)
 EVP4 : 5'-CTACTTTGGGTGTCCGTGTT-3' (20mer)

5)PCR 産物の塩基配列解析

PCR 産物が電気泳動で確認できたら、目的とする 750bp、あるいは 650bp のバンドを切り出して精製する。市販の PCR 産物精製キット(QIAquick Gel Extraction Kit、QIAGEN、Cat.28704 など)を用いると簡便である。シーケンサーのマニュアルに従って塩基配列を解読する。

6) 塩基配列の解析

得られた塩基配列はNCBI/GeneBankなどに登録されている塩基配列データベースと比較する。データベースと比較するにあたり、各種プログラムが存在する。相同性検索はメール、あるいは直接 WWW を介し国立遺伝学研究所の DDBJ サーバーなどにアクセス

し、BLASTなどのプログラムを用いて検索を行う。利用方法については下記のサイトを参照にされたい。

商用データベース（Genetyx CD など）によることも可能である。他の分離株と比較して系統関係を解析するには商用ソフト（Genetyx Win/Mac など）、フリーのソフト（phylip、MEGA など）、あるいはwww上のサービス（DDBJ ClustalW など）を利用する。

サイト例 <http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>

(4) 引用文献

- 1) Ishiko H., Shimada Y., Yonaha M., Hashimoto O., Hayashi A., Sakae K., Takeda N. Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification using the VP4 sequence. *J. Infect. Dis.* 185:744-754, 2002
- 2) Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J. Virol.* 73 : 1941-1948, 1999
- 3) Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J. Clin. Microbiol.* 37 : 1288-1293, 1999
- 4) Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA. 5) Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 38 : 1170-1174, 2000
- 6) Li ・ Graur 著（舘野義男・山崎由紀子訳）『分子の進化』（1994年、廣川書店）
根井正利著（五條堀孝・斎藤成也訳）『分子進化遺伝学』（1990年、培風館）
- 7) Phylip、MEGA など分子系統解析ソフトを集めたリンク集
<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>

(5) 連絡先

EV70 と CA24v の分離同定は、他のエンテロウイルス同様、地方衛生研究所で対応可能と思われる。EV70 および CA24v 標準株、それらの抗血清の分与は、下記、国立感染症研究所ウイルス第二部に連絡するとよい。

武田 直和

国立感染症研究所ウイルス第二部第一室

〒208-0011 東京都武蔵村山学園 4-7-1

電話 042-561-0771 内線 357 ファックス 042-565-3315

電子メール ntakeda@nih.go.jp

(6) 執筆者

武田 直和 (国立感染症研究所ウイルス第二部)
甲木 和子 (熊本県保健環境科学研究所)
清水 博之 (国立感染症研究所ウイルス第二部)

クラミジア感染症

平成15年

目次

はじめに

性器クラミジア感染症検査マニュアル

肺炎クラミジア感染症検査マニュアル

はじめに

クラミジアによってひき起こされる疾患は、内科、小児科、産婦人科、泌尿器科など各科領域での感染症として広がり多彩な臨床像を持つ。しかも特徴的な症状に乏しいことが多いことから、確定診断には実験室手技が重要である。1999年に「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」いわゆる「感染症法」が施行され、2003年に改正された。その中でオウム病は全数把握の4類感染症に指定され、性器クラミジア感染症とクラミジア肺炎(オウム病を除く)が定点報告の5類感染症となった。本マニュアルでは、これらクラミジア感染症の実験室検査について、主に地方衛生研究所や国立感染症研究所等で行なわれる血清診断法と、病原体検出法として分離培養法、抗原検出法、遺伝子診断法などについて紹介する。今後、さらに実用的なものにするため、不十分な点やリニューアルすべき点をご指摘いただき、適宜バージョンアップしていく予定である。

分類について

最近、クラミジアの分類の改変があったのではじめに触れておきたい。クラミジアの分類については1989年以前は1目1科1属とされ、*C. trachomatis*、と

*C. psittaci*の2種に分類されていたが、1989年に*C. pneumoniae*が、また1992年に*C. pecorum*が追加され4種となった¹⁾²⁾。その後、1999年にはEverettら³⁾によって新たな提案がなされた。この新分類は16Sおよび23SリボゾームRNA遺伝子解析、さらに染色体DNAの相同性に基づいて分類されたもので、1科が4科に増え、従来の属はChlamydiaceae科として*Chlamydia*と*Chlamydophila*の2つの属に分けられた。*C. trachomatis*は従来どおり*Chlamydia*に留まるが、一方*C. pneumoniae*は従来の*C. psittaci*、*C. pecorum*に新たに加わった3種と共に*Chlamydophila*属に含まれることになった。

ただし、この新分類には多数のクラミジア研究者が異論を唱え、現時点でも議論が継続中でやや混乱しており、いまだに定着したとは言えない⁴⁾⁵⁾。今後のゲノム情報で更なる再編もあり得るため、もうしばらく動向を見守る必要がある。本マニュアルでは便宜上、従来の分類による表記を用いた。図に従来の分類とEverettらの分類の対比を示す⁶⁾。

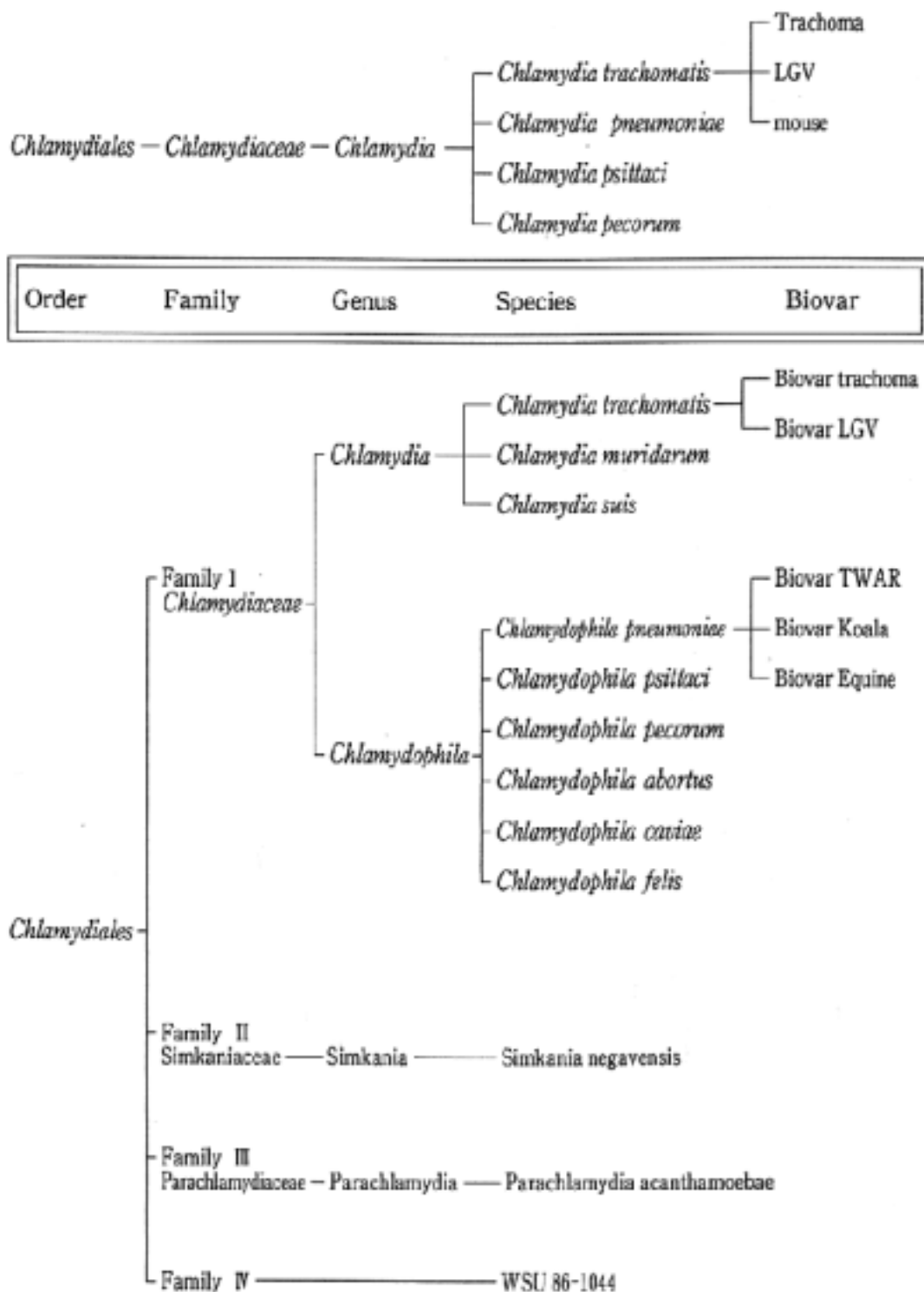


図 クラミジア分類の対比(上:従来の分類¹⁾²⁾, 下:Everett ら³⁾による新分類)
(Everett らの分類は, 原著をもとにした松本⁶⁾による再編成)

引用文献

- 1) Grayston, J.T. et.al. : *Chlamydia pneumoniae*. sp. nov. for *Chlamydia* sp. strain TWAR. Int. J Syst Bacteriol. 39 : 88-99, 1989.
- 2) Fukushi, H. and Hirai, K. : Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. Int. J Syst Bacteriol. 42 : 306-308, 1992
- 3) Everett, K.D. : Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species and standards for the identification of organisms. Int J Syst Bacteriol. 49 : 415-40, 1999
- 4) Schachter, J. et.al. : Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet. Int. J Syst Bacteriol. 51 : 249, 2001.
- 5) Everett, K.D. and Anderson, A.A : Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet-reply. Int. J Syst Bacteriol. 51 : 251-253, 2001.
- 6) 松本 明: クラミジア学入門, 大学教育出版, 岡山, 2000.

性器クラミジア感染症検査マニュアル

目 次

I. 性器クラミジア感染症の概説

II. 血清抗体測定法

1. 各特異血清抗体とその意義について
 - 1) 属特異抗体
 - 2) 種特異抗体
 - 3) 血清型特異抗体
2. micro-immunofluorescence test : micro-IF 法
 - 1) 使用抗原
 - 2) 抗原の調整・精製
 - 3) 試薬・器具・機材
 - 4) 検査手順
 - 5) 判定法

III. 病原体検出法

1. 検査の進め方
 - 1) 材料と採取法
 - 2) 検体の輸送・保存法
2. 分離培養法
 - 1) 培養細胞の維持
 - 2) 検体の輸送・保存用試薬
 - 3) 分離操作手順・判定法
3. 抗原検出法
 - 1) 直接蛍光抗体法 (DFA) による染色
 - 2) 市販のクラミジア抗原検出キットの使用
4. 遺伝子検出法
 - 1) PCR 法 (AMPLICOR C. trachomatis, ロシュ)
 - 2) LCR 法 (クラミジア ダイナジーン, ダイナボット)
 - 3) DNA プローブ法 (DNA プローブ「中外」クラミジア, 中外)
 - 4) PCR 法 (検査室内)
 - 5) 株の血清型別検査 (PCR-RFLP)

IV. 引用文献

V. 検査依頼及び連絡先

VI. 執筆者一覧

I. 性器クラミジア感染症の概説

性器クラミジア感染症の原因菌である *Chlamydia trachomatis*（以下 *C. trachomatis*）は、古くからトラコーマの病原体として知られてきた。トラコーマは一部の発展途上国ではいまだに頻度の高い疾患であるが、わが国をはじめ衛生状態の良い先進国では見られない。

一方、*C. trachomatis* は近年、世界的にも最も頻度の高い性感染症の病原体として知られ、わが国でもその蔓延が社会的な問題となっている¹⁾。性器クラミジア感染症は 2003 年改正の感染症法では 5 類感染症の定点報告疾患であり、その動向調査によると、最も頻度の高い性感染症であり、しかも近年増加傾向を認めている。健康な 20 代の妊婦検診で、5～6%の抗原陽性率であったとの報告があり、男性もほぼ同様の陽性率である。通常、比較的症状が軽微であり、また無自覚である場合も少なくないことなどから、受診に至らず治療を受けない患者が多いことも対応を困難にしている。

女性では子宮頸管炎や子宮付属器炎、肝周囲炎、さらに卵管への感染による癒着や通過障害で卵管妊娠や不妊を来す。また子宮頸管炎の母体からは分娩時、母子感染を起こし、児に封入体結膜炎や新生児肺炎が高率に発症する。男性では尿道炎、精巣上体炎などを引き起こす。また口腔性交による咽頭感染の頻度も高く、成人で咽頭炎や結膜炎の症例が報告されている。

性病性リンパ肉芽腫症（鼠径リンパ肉芽腫症、第四性病）は生物型 LGV のクラミジアによる感染症で、鼠径リンパ節の腫脹、化膿を起こし、放置すれば陰部の象皮病などを起こす。現在本邦での発症はまず見られないが、輸入感染症としてはまれに発生しうる。

C. trachomatis による泌尿生殖器疾患の診断については、近年多くの市販キットが開発され、臨床の場で日常的に使用されているので、これらの詳細な解説は他書にゆずり、地方衛生研究所や研究施設等で行なわれる血清診断法と、病原体検出法として分離培養法、抗原検出法、遺伝子診断法について紹介する。

今後、本マニュアルをさらに実用的なものにするため、ご批判いただき、不十分な点は適宜バージョンアップしていきたいと考えている。

Ⅱ. 血清抗体測定法

1. 各特異血清抗体とその意義について

クラミジアに対する血清抗体には属, 種, 血清型特異的なものがある. また, *C. trachomatis* 抗体測定 of 診断的意義は対象疾患や目的・状況により異なる.

1) 属特異抗体

属特異的な抗原であるリポ多糖体 (LPS) を抗原とした抗 *C. trachomatis* 抗体測定 ELISA キットが市販されていたが, 現在は国内での販売はされていない.

従来からオウム病 of 血清診断に用いられてきた補体結合反応 (complement fixation :CF 法) は, クラミジア属共通抗原であるリポ多糖体 (LPS) を主抗原に用いているので, *C. trachomatis* 感染症でも陽性となりうるが, 感度も低く *C. trachomatis* 特異抗体を特定することはできないため用いられない.

2) 種特異抗体

C. trachomatis については, 種特異部分 of タンパク質を抗原とする ELISA 法がありキット化されている. *C. trachomatis* の外膜複合蛋白 (COMC) を抗原とするヒタザイムクラミジア (日立化成)²⁾, また *C. trachomatis* に特異的な構造部分をペプチド合成したものを抗原とするペプチドクラミジア (明治乳業) などが保険適用で臨床使用されている.

また各クラミジア種の EB 粒子や感染細胞内封入体を抗原とする間接蛍光抗体法 (micro-immunofluorescence test :micro-IF 法³⁾, micro-immunofluorescence antibody technique :MFA 法⁴⁾) もある. micro-IF 法は種特異抗体に加えてさらに血清型抗体も測定できる. MFA 法は各抗原に対する抗体価の差により種を特定し得る. これらの間接蛍光抗体法は本邦で使用可能なキットはなく, 特定の施設で実験室内検査として行われている.

3) 血清型特異抗体

C. trachomatis には 18 血清型 (亜型を含む) があるが, 各血清型特異抗原は主要外膜タンパク質の一部にあり, それを認識する抗体である. これらの血清型については, しばしば伝播経路や感染部位によって異なるため, 地域性や流行状況の違いなどがより明らかになり, 疫学的にまた臨床的にも意義のある成績が得られることがある. 患者血清でもそれぞれの血清型抗原あるいは B complex (B+E+D), C complex (C+J+H+I), Intermediate group (G+F+K) の 3 つのグループに分けて調整しプールした抗原に対する反応性の差から感染 *C. trachomatis* の血清型, あるいは血清グループを推定できる. 測定は各血清型

抗原やグループ抗原を点置したスライドを用い, micro-IF 法で行う⁵⁾. ただし交差反応がある程度あるため, 判定に熟練を要する. 最近では PCR によって血清型別が可能になったため, 煩雑な血清学的手法からの血清型別はほとんど行われなくなったが, 株や遺伝子が得られない場合の血清型別判定法としての意義は残されている. 各抗原やグループ抗原は Washington Research Foundation (Seattle, WA, USA) から購入するか, 国立感染症研究所から分与を受ける.

2. micro-immunofluorescence test : micro-IF 法

Wang ら³⁾によって開発された micro-IF 法は, クラミジア抗体測定の方法とされる. 通常は上記の *C. trachomatis* 血清型グループ 3 抗原に他の 2 種のクラミジア抗原を加えた 5 抗原を点置して測定を行う. ただ実際には判定が容易でないことや, 抗原が手に入りにくいこと, また通常の臨床では種特異抗体の判定が可能であれば血清型までは検査しなくても特に問題ないこともあり, *C. trachomatis* については比較的どの血清型の感染でもよく反応する L₂ 株 (L₂/434/Bu) あるいは D 株などで代表させ, 3 抗原の点置で簡略化した方法を用いることが多い. この簡略法について述べる.

1) 使用抗原

簡便法としての 3 種の抗原はたとえば *C. trachomatis* では L₂ 株 (L₂/434/Bu) あるいは D 株などの血清型株で代表させることができ, *C. pneumoniae* では TW-183 株 (TWAR 標準株), あるいは KKpn-1 株 (本邦臨床分離株) などでも可能で, *C. psittaci* では Califolnia10 株あるいは Budgerigar No. 1 株などを利用する.

- ・ *C. trachomatis* L₂ 株 (L₂/434/Bu) あるいは D 株
- ・ *C. pneumoniae* TW-183 株 (TWAR 標準株) あるいは KKpn-1 株などの国内分離株
- ・ *C. psittaci* Califolnia10 株あるいは Budgerigar No. 1 株

2) 抗原の調整・精製

抗原の調整・精製は実験室内では通常困難なので Washington Research Foundation (Seattle, WA, USA) から調整済みのものを購入するか, 国立感染症研究所から分与を受ける. 以下に感染研で行っている抗原の調整・精製法を示す.

まず分離培養法に準じて, 組織培養用マイクロプレートのウェル内に感染させた各クラミジアを, あらかじめ入れておいたマイクロカバーガラスを染色するか, 細胞を白金耳で掻き取って固定染色して, 封入体の出来具合を観察する. 80%以上の細胞に封入体が形成されていれば十分抗原量が得られる. 培養液

を除去し、感染細胞をラバーポリスマンではがし、PBS (-) を少量加えて回収しチューブに集める。細胞浮遊液を超音波処理(カップホーン型にて冷水中で30秒程度パルス)し、感染細胞の封入体を破壊する。超音波処理した細胞浮遊液を1500rpm, 10分遠心して、細胞成分を落とす。(全体の液量が多い場合は上清をチューブに移し、15,000rpm, 30分間超遠心し濃縮した上で沈渣にPBSを加えてよくピペッティングし回収するという操作を加えてもよい。)回収液を10mlの30~35%ウログラフィンに重層して19,000rpm, 40分間遠心する。得られた沈渣は20mlのPBSに浮遊させ15,000rpm, 30分間遠心洗浄2回した後、3mlの0.02%ホルマリンPBSを加え固定し、浮遊させてこれを抗原液とする。抗原液の濃度は一部を採ってDFA染色し、EB数をカウントしておよそ $1 \times 10^8 \sim 9$ /mlとなるように調整し、小分けして4℃に冷蔵保存する。

*ホルマリン固定するまでは感染性があるので、必ず安全キャビネット内で操作する。

3) 試薬・器具・機材

①試薬

- ・3%孵化鶏卵卵黄囊乳剤 (normal yolk sac:NYS)
- ・PBS (-)
- ・FITC 標識抗ヒト IgG, A, M 抗体 (goat)
- ・リウマチ因子除去剤 (RF-Absorbent: デイ ドベーリング社)
- ・Tween20
- ・無蛍光グリセリン
- ・アセトン

②器具・機材

- ・コニカルチューブ 1.5ml
- ・無蛍光ガラススライドあるいはマルチウエル・スライドグラス (15 穴 4mm 径などでアセトン固定に耐えうるもの)
- ・Dip ペン先 (ピンセットにワッシャーで固定するとよい)
- ・V 型ディスポマイクロプレート (血清希釈用)
- ・100 μ l 可変ピペッター
- ・10 μ l 可変ピペッター
- ・白金耳
- ・湿潤箱
- ・カバーガラス 24 mm \times 50 mm
- ・アセトン固定用のガラス容器

- ・洗浄用ビーカーまたはカップ
- ・37℃インキュベーター

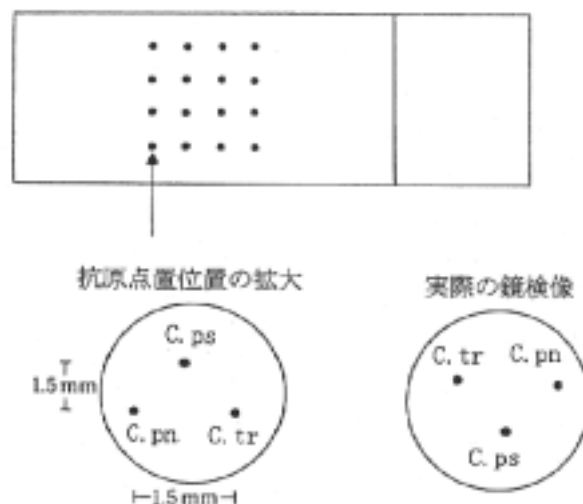
4) 検査手順

①抗原スライドの作製

- ・抗原液（ホルマリン固定済み3種 *C. trachomatis* :C. tr , *C. pneumoniae* : C. pn, *C. psittaci* :C. ps ）をそれぞれ Vortex または数秒間超音波をかけ、EB 粒子の均等浮遊液とする. 抗原液を使用直前に 3% 孵化鶏卵卵黄囊乳剤（NYS）と約 1 : 1 に混合したものをスライドグラスに点置する.
- ・無蛍光スライドあるいはマルチウエル・スライドグラス（15 穴など）は前もってアセトンで油膜等を洗浄しておくか, 軽くバーナーであぶり表面の汚れを除去すると抗原が定着しやすい.
- ・ピンセットに固定した Dip ペン先で1つの抗原に対して1つのペン先を用い, ペン先を軽く抗原液に浸して点置部位のガラス面にそっと触れる程度にして点置していく. 左下が C. pn, 右下が C. tr, 中央上が C. ps などと決めておくとうい.（鏡検では中央下が C. ps, 左上が C. tr, 右上が C. pn と見える.）各抗原は乾くと白く見える. お互いが接触しないように注意する.
- ・点置した抗原が乾燥したら, アセトンにつけて 15 分間室温で固定し, 自然乾燥させる. スライドグラスはアルミホイルなどで密封し-70℃に保存する. より詳細な内容は微生物検査必携⁵⁾を参考にしていきたい.

図に抗原点置法と観察時の鏡検像を示す.

図 抗原点置法と観察時の鏡検像



②抗体反応

- ・被検血清（3種クラミジアの陽性コントロール血清も含めて）をV型ディスポマイクロプレート等にて2倍段階希釈する。ピペッターでまず血清 $10\mu\text{l}$ 、PBS（-） $150\mu\text{l}$ で16倍希釈を作り、以後その $100\mu\text{l}$ とPBS（-） $100\mu\text{l}$ で2倍段階希釈系列を1024倍まで作る。IgMはリウマチ因子を保有していると偽陽性になることがあるので、IgM用血清はリウマチ因子除去剤（RF-Absorbent：デイドベアリング社）で前処理して測定する。血清 $10\mu\text{l}$ + 0.1% Tween20-PBS $60\mu\text{l}$ + RF-Absorbent $10\mu\text{l}$ でまず8倍希釈を作り、15分室温で反応させた後、PBSで128倍希釈系列を作る。
- ・抗原点置したスライドグラスに被検血清をのせていく。血清は白金耳かピペッターでのせていくとよい。高い希釈列（薄い方）の方から血清を $1\sim 3\mu\text{l}$ ずつ抗原点置部位にのせていく。
- ・血清をのせたスライドグラスは、湿潤箱に入れて 37°C 30分間インキュベートする。
- ・スライドグラスをPBS（-）の入った容器に浸してゆっくり上下して、血清を洗い落とす。PBS（-）2回、蒸留水1回を通し、自然乾燥させる。
- ・二次抗体（FITC標識抗ヒトIgG, A, M抗体など）を $1\sim 3\mu\text{l}$ ずつ各抗原点置部位にのせていく。
- ・湿潤箱に入れて 37°C 30分間インキュベートする。
- ・洗浄し水を切り自然乾燥後、無蛍光グリセリンを各穴にのせていき、カバーグラスをかけて封入する。
- ・蛍光顕微鏡で観察する。まず低倍率（100倍）で抗原点置部位を探し、200～400倍でクラミジアEB粒子の蛍光を観察する。

5) 判定法

EB粒子が一様に特異蛍光を発している場合のみ陽性とする。それぞれの抗原に対して陽性と判定した最高希釈倍数をもって抗体価とする。蛍光抗体法による判定は観察者の主観に頼るところが大きく、判定には熟練を要する。したがって常に陽性コントロール血清を加えて検査を行う。

Micro-IFの判定基準

陰性：IgG 16倍未満

抗体保有（感染既往）：IgG 16～256倍

急性感染：単独血清でIgG 512倍以上あるいは、IgM 16倍以上

：ペア血清でIgG 4倍以上の上昇

血清診断では原則としてペア血清での 4 倍以上の上昇を急性感染の確定的な基準とする。できる限り急性期と 3 週間程度の間隔をおいた回復期のペア血清での判定が望ましい。IgA については、活動性を表す指標になるとの指摘もなされたが、コンセンサスは得られていない。また micro-IF では IgA が検出しにくいこともあり、通常判定基準には含まれないが、参考になる場合もある。

6) 血清診断の限界と留意点

性器クラミジア感染症では、急性感染時でも症状が軽微なことが多いため、初感染で特異的に上昇する IgM をタイミングよく捉えることは実際には難しい。新生児肺炎などでは IgM の有用性は高い。また慢性感染の時期には、高抗体価を示してもペア血清で抗体価の動きを捉えることは容易ではない。さらに治療後も長期間高値を維持するため治癒判定にも用いることはできない。これらはクラミジア感染症における血清診断の限界ともいえる。その一方で女性の付属器における慢性潜伏感染の状況を把握するには抗原検査では困難なことがあり、その場合は抗体価測定が有用である。これらのことに留意して診断は病原体検出法の結果や臨床像と合わせて総合的に行うことが望ましい。

Ⅲ. 病原体検出法

1. 検査の進め方

1) 材料と採取法

女性では子宮頸管スワブを用いる。まず頸管粘液をぬぐって除去した後、子宮頸管を滅菌綿棒で回転させながら擦過する。擦過後の綿棒はそれぞれの検出法に適した処理を行う。男性では尿道に滅菌綿棒を挿入し擦過する。最近の抗原検出キットや遺伝子検出キットでは高感度のため、初尿検体でも十分利用できるようになった。朝の初尿が適している。咽頭感染を疑う場合は、咽頭スワブを採取する。新生児肺炎では鼻咽腔スワブ、封入体結膜炎では眼結膜のスワブなどを採取する。

2) 材料の保存と輸送

擦過後の綿棒は、抗原検出用はキット専用液の入った試験管に入れ、指示どおりに処理する。PCR 用は綿棒をそのまま滅菌試験管に折って落とし込んで密栓をし、4℃で輸送し、-70℃で凍結保存する。分離用は輸送用保存液 SPG 入りの滅菌試験管に折って落とし込み密栓をする。24 時間以内に培養細胞に接種可能な場合は使用まで 4℃に保存しておく。できない場合は-70℃で凍結保存する。尿は 4℃に保存しておき、早めに遠心処理をするか、それができない場合は-70℃で凍結保存する。

2. 分離培養法

基本的には他のクラミジアと同様であるが、使用細胞や培養時間、遠心吸着の効果の有無などが異なる。取り扱いには P2 で安全キャビネット内で行う。

1) 培養細胞の維持

HeLa229 細胞（子宮頸癌由来）を用いる。培養細胞がフラスコ底面に隙間なく付着しているものを用意する。分離培養を成功させるためには良好な状態の培養細胞の継代維持が不可欠である。

①培養継代維持試薬

- ・細胞増殖用培養液（Eagle's MEM+FCS10%）
- ・EDTA トリプシン PBS（-）液
0.02%EDTA 0.25% trypsin in PBS（-）

②器具・器材

- ・密閉型キャップフラスコ（小）50ml 組織培養用
- ・5ml 綿栓付ディスポピペット

- ・ 中試験管 4 本
- ・ 試験管立て（斜台：試験管を斜めに立てるように固定したもの）
 - ・ バーナー
 - ・ 37℃インキュベーター

③操作手順

通常の細胞培養の手順に沿って培養フラスコにて細胞を継代維持しておく。

2) 検体の輸送・保存用試薬

①輸送保存液：SPG (sucrose phosphate glutamate)

Sucrose	75.0g
KH ₂ PO ₄	0.52g
K ₂ HPO ₄	1.22g
Glutamic acid	0.72g

これを蒸留水に溶解して 1000ml とする. pH を 7.4～7.6 に調整し濾過滅菌後, 抗菌薬を添加し 1ml ずつ滅菌試験管に分注し, これに滅菌ガラスビーズ（直径 0.5mm, 0.5g）を入れたものを臨床の現場に 4℃で常備しておくといよい.

②抗菌薬

検体は通常, 細菌や真菌などでかなり汚染されているため, 抗菌薬を SPG や分離用培養液に加える必要がある. (ただし, クラミジアの増殖を妨げないもの) 組み合わせの一例を示す.

gentamicin (GM)	最終濃度 10 μ g/ml
vancomycin (VCM)	最終濃度 100 μ g/ml
amphotericin B (AMPH)	最終濃度 2 μ g/ml

③クラミジア分離用培養液

細胞増殖用培養液に抗菌薬を加えたものに, クラミジアの増殖を促進するため, 蛋白合成阻害剤シクロヘキシミド (cycloheximide) を最終濃度 1 μ g/ml になるように添加する.

④その他の試薬

- ・ 99%エタノール, あるいはメタノール（以下, 分離同定用の試薬）
- ・ PBS (–)
- ・ クラミジア属特異性 LPS モノクローナル抗体：クラミジア FA 試薬「生研(デシカ生研)」
- ・ *C. trachomatis* 特異モノクローナル抗体：MicroTrak(マイクロトラック, デイドベアリング社)

- ・ *C. pneumoniae* 特異モノクローナル抗体:RR-402, IMAGEN など
- ・ 無蛍光グリセリン

⑤器具・器材

- ・ 24 穴マルチウエルプレート
- ・ マイクロカバーガラス 14 丸 (径 14mm)
- ・ スライドガラス蛍光顕微鏡用
- ・ 湿潤箱
- ・ Vortex ミキサー
- ・ 超音波破砕器 (安全性のためカップホーン型が望ましい)
- ・ 低速遠心機
- ・ プレート遠心機 (プレート用ローター付き)
- ・ 5%CO₂ インキュベーター
- ・ 蛍光顕微鏡 (落斜型)

3)分離操作手順・判定法

平底ガラスチューブによる方法と,プラスチックのマルチウエルプレートを使用する方法があるが,ここでは後者を使用した場合の解説をする.

①細胞の用意

24 穴マルチウエルプレートの各穴にマイクロカバーガラスを入れ, 1.5~2.0 ×10⁵/ml の濃度に調整した培養細胞浮遊液を 1ml ずつ分注する. 5% CO₂ インキュベーター内で 24~48 時間培養し, 単層シートを形成させておく.

②検体接種液の用意

前述の如く調整した分離用検体を接種に用いる.

③接種

プレートの各穴の培養液をスポイトで除去し, 検体接種液上清を 0.25~0.5ml 接種する.

④遠心吸着

プレート遠心機で 2000rpm(900G) 1 時間室温で遠心吸着を行う. 引き続き 35℃ の CO₂ インキュベーター内で 1 時間静置し, 追加吸着させる. プレート遠心機が無い場合は, 接種液をときどきキルティングしながら 2 時間静置吸着させる.

⑤分離用培養液への交換

接種液をスポイトで除去し, 抗菌薬とシクロヘキシミドを含む分離用培養液を 1ml 分注する. 37℃ の CO₂ インキュベーターで 72 時間培養する.

⑥分離株の検出

C. trachomatis の封入体は増殖し大きくなると宿主細胞の核を圧迫して, 実体顕微鏡下でも細胞内にバルーン上に見え, 中で粒子が活発に動く様子が観察で

きる. 他種の封入体は実体顕微鏡下では判別し難い. 分離の確認法は, プレーートの各穴の分離用培養液をスポイトで除去し, 滅菌ビンへ破棄する. 99%エタノールを各穴に約 1ml 分注してマイクロカバーグラスを 10 分間固定する. エタノールを除去後, ピンセットでマイクロカバーグラスを取り出しカップに入った PBS につけて洗浄し, 風乾する. モノクローナル抗体 (クラミジア FA, MicroTrak 等) を 1 滴置いて, その上にマイクロカバーグラス (細胞面が下) を伏せて湿潤箱にて 37°C30 分間染色する. マイクロカバーグラスはカップに入った PBS, 蒸留水につけて洗浄し風乾後, スライドグラスにのせたグリセリンの上に細胞面を下にして伏せて蛍光顕微鏡で観察する.

⑦分離株の同定

クラミジア属特異性モノクローナル抗体 (クラミジア FA) では 3 種すべて染色される. はじめに, これを用いてクラミジアの存在の有無をみて陽性であれば, さらに種特異性のモノクローナル抗体で同定するようにすると無駄が少ない. MicroTrak が陽性であれば *C. trachomatis* と同定できる. (表 1 参照) 最近, グリコーゲン顆粒を持たない *C. trachomatis* 株が報告されているので, MicroTrak 陽性でヨード染色陰性の株もまれに存在することに留意する⁶⁾.

表 1 染色法による分離株の同定

染色法	<i>C. trachomatis</i>	<i>C. psittaci</i>	<i>C. pneumoniae</i>
クラミジア FA	+	+	+
RR-402	—	—	+
Chlamydia-Cel Pn	—	—	+
IMAGEN	—	—	+
MicroTrak	+	—	—
ヨード染色	+	—	—
Giemsa 染色	+	+	+

⑧第 2 代継代以降の培養

初回培養で 72 時間培養したプレートの上のウェルの培養液を除去し, SPG を 0.5ml 入れる. 感染細胞をラバーポリスマンではがし, その液を回収する. (ラバーポリスマンの代用として細かく切ったシリコンラバー片を滅菌しておいて, ピンセットではさんだラバー片ではがす方法も可能. ただし 1 ウェルはがす毎にバーナーでピンセットは滅菌する.) あとは, 初回培養検体接種液の用意をした時と同様に超音波破碎し, 遠心した上清を接種液とし, その後は初代同様の手順で継代を行う. 陰性の場合でも 3 代までは継代を行って判定する. *C. trachomatis* を継代するサイクルは 72 時間程度である.

3. 抗原検出法

抗原検出法はクラミジア属特異的又は *C. trachomatis* 種特異的抗原を検出する方法で、すでに多数の市販の検査キットがある。したがって個々のキットの使用法についてはここでは簡単に述べるにとどめる。これらの中には簡便に臨床の現場で行うことが可能なものもあり、有用性は高い。しかし他のクラミジア種との交差反応や、一般菌の大量の混入などでの偽陽性の問題もあり、特異性や感度においては遺伝子検査法には及ばない。

1) 直接蛍光抗体法 (DFA) による染色

FITC を標識したクラミジア属特異性のモノクローナル抗体としてクラミジア FA (デンカ生研) が市販されているが、*C. trachomatis* の抗原検出を目的に使用する場合感度はあまり高くない。*C. trachomatis* の種特異的なモノクローナル抗体としては MicroTrak (マイクロトラック, デイドベ어링社) があり、感度が優れている。手技としては、スワブにて採取した検体をスライドグラスに塗末し、アセトンで 10 分固定をする。細胞外に出た EB 粒子はアセトンで固定をしないと、エタノールやメタノール固定では染まりが悪い。風乾した後、FITC 標識モノクローナル抗体で 15~30 分染色して、軽く水洗しグリセリンを滴下後、カバーグラスをかけて蛍光顕微鏡下で観察する。アップルグリーンに染まるクラミジア粒子が 1 視野に 5 個以上観察されれば陽性である。しかし主観が入りやすいため、特異的に蛍光を発する抗原を確実に判定するためには、ある程度経験を要する。そのため通常のスクリーニング検査として用いる場合や、多数検体の迅速な検査にはあまり適さない。

2) 市販のクラミジア抗原検出キットの応用

ELISA 法を用いたイデイアクラミジア PC (協和メデックス)²⁾、及び免疫クロマトグラフィーを用いたクリアビュー (関東化学) などの市販キットで検出可能である。いずれも属特異的な抗原をターゲットとしている。感度はイデイアクラミジア PC で 10^2 EB 個程度、クリアビューで 10^3 EB 個程度とされる。スクリーニングとして利用する意義はあるが、種の鑑別が必要な場合は、さらに他の方法を併用する。

4. 遺伝子検出法

すでに高感度、特異的かつ客観性に優れた PCR や LCR キットはすでに国内でも普及している。いずれも *C. trachomatis* 菌体が普遍的に保有する 7.5Kbp プラスミド (1 菌体当り 10~20 コピー) を標的とするため、感度が高く、実験室内で

の感度では EB 2 個を検出できるとされる. しかし実際の検体では検査材料に混在するリン酸, 2 価鉄イオン, 血液などの阻害物質による偽陰性反応があることや, コンタミネーションに注意する. また高感度であるため治癒判定には利用が困難な場合もある. また最近これらの遺伝子検出法がターゲットとしている cryptic plasmid DNA が欠損した *C. trachomatis* 株が報告されている⁶⁾. この株の感染ではこれらの遺伝子検査キットでは捕捉できない. プラスミド欠損株の実際の臨床での頻度については今後の疫学動向を見守る必要がある. 現在普及している遺伝子診断法の概略を述べる. このほかにも現在申請中の遺伝子検出キットが幾つかあり, さらに感度や迅速性に優れたものも今後利用可能になるものと思われる.

1) PCR 法 (AMPLICOR *C. trachomatis*, ロシュ)

原理は初尿または専用綿棒擦過検体中に存在する *C. trachomatis* に特異的な cryptic plasmid DNA の塩基配列部分 (207bp) を, 2 つのプライマーと Taq ポリメラーゼによる PCR 法によって増幅し, その PCR 産物の存在を DNA プローブ法を介して発色させ吸光度で測定する. 特異性は優れ, 感度も 2~4EB/アッセイで, 実際の臨床検体では約 80EB/綿棒, 20EB/ml 尿と非常に高い. 測定時間は 3~5 時間である.

2) LCR (ligase chain reaction) 法 (クラミジア ダイナジーン, ダイナボット)

原理は PCR と類似しており, 初尿または擦過検体中の cryptic plasmid DNA の特異的な塩基配列部分 (48bp) を 4 つのプローブとリガーゼを用いた LCR 法によって増幅し, 酵素免疫法によって蛍光量で判定する. 臨床的には感度, 特異性ともに PCR とほぼ同等. 淋菌との同時検出が可能である, 測定時間は 2~3 時間である.

3) DNA プローブ法 (DNA プローブ「中外」クラミジア, 中外)

原理は菌体内のリボゾーム RNA の *C. trachomatis* に特異的な塩基配列部分 (約 20bp) の存在を確認する方法である. 綿棒擦過検体中に存在する *C. trachomatis* の標的塩基配列部分に相補的な DNA プローブを結合させ, その結合体 (ハイブリッド) の存在をプローブに標識されたアクリニジウムエステルを発光させることによって発光強度で判定する. 測定時間は約 2 時間である. 淋菌との同時検出が可能である. 感度は抗原検出法とほぼ同等であり遺伝子検出法としては低い. また初尿検体では混入物質により偽陽性反応がみられる可能性があるため使用できない.

4) PCR 法 (検査室内)

コマーシャルキットを使用しないで行う PCR 法では, 属特異的なプライマーを用いて PCR を行った後, 制限酵素切断によるパターンで種の確認をする方法や, 種々の *C. trachomatis* 特異的なプライマーが報告されているので, プライマーを作成して行うこともできる. DNA 抽出については, 抽出キットが市販されているので利用できる. 参考として感染研で用いている方法を以下に紹介する.

・ DNA 抽出

PUERGENE™DNA 抽出キットを使う場合の手順を述べる. 500 μ l 検体を 1500 μ l マイクロチューブに入れ 15,000rpm で 30 分遠心する. 上清を抜き, 300 μ l Cell Lysis Solution および 3~4 μ l Proteinase K Solution を入れ, 十分に Vortex して沈殿を浮遊させる. 56°C で一晩インキュベートした後, 室温まで冷やす. 100 μ l Protein Precipitation Solution を加え, 20 秒強く Vortex し, 氷中に少なくとも 15 分置く. 15,000rpm で 10~15 分遠心し, 上清を新しい 1500 μ l マイクロチューブに移す. 300 μ l 100% Isopropanol (2-propanol) を加え, 50 回程度転倒混和した後, 室温で 15 分以上インキュベートする. 15,000rpm で, 5 分間遠心して上清を抜き, 300 μ l 70% Ethanol を入れる. 再び 15,000rpm, 5 分間遠心し, DNA を失わないように丁寧に上清を完全に抜きとり, 約 10~15 分乾燥させる. 20~50 μ l DNA Hydration Solution を入れ, Vortex し, 65°C で 1 時間インキュベートし PCR 用 DNA とする.

・ プライマー等

プライマーは, 1st PCR に Yoshida ら⁷⁾の CM1/CM2 を用いている.

プライマー-1 : CM1 CAGGACATCTTGTCTGGCTT
CM2 CAAGGATCGCAAGGATCTCC

PCR 反応液 (50 μ l / sample) :

10×PCR Gold Buffer	5 μ l
dNTP Mix (2mM each dNTP)	5 μ l
25mM MgCl ₂ Solution	3 μ l
プライマー CM1 (40pmol/ μ l)	0.5 μ l
プライマー CM2 (40pmol/ μ l)	0.5 μ l
AmpliTaq Gold (5U/ μ l)	0.25 μ l
DW	30.75 μ l
Sample	5 μ l

・結果判定

1.5%Gel を作成し, PCR の産物を 10 μ l/well 点注して 100mV, 25 分間電気泳動する. Gel を Ethidium bromide (1.5mg/L) に入れ, 1 時間染色し判定する. 261bp のバンドを呈したものをクラミジア遺伝子陽性と判定する. 陽性の場合, さらにその PCR 産物を制限酵素で切断し, 表 2 に示すように切断パターンで種の特定制を行う⁷⁾.

表 2 CM1/2 にて増幅されたクラミジア 3 種の制限酵素切断サイズ

<i>Chlamydia</i> spp.	bp	<i>Alu</i> I (bp)	<i>Pvu</i> II (bp)
<i>C. trachomatis</i> L ₂	245	90, 89, 66	245
<i>C. psittaci</i> 6BC	259	190, 69	189, 70
<i>C. pneumoniae</i> TW-183	258	199, 59	258

5) 株の血清型別検査 (PCR-RFLP)

C. trachomatis の血清型は, 地域性や感染部位によって異なることがあることが知られており, 伝播経路や流行状況の違いなどを明らかにする上で疫学的にまた臨床的にも検討の意義がある. 従来は分離株を継代増殖させた後マウスで免疫血清を製作し, micro-IF 法で各血清型標準抗原に当て, 最も強く反応した抗原の血清型を分離株の血清型として同定する方法が行われていた. その後 Wang らにより開発されたモノクローナル抗体 (Washington Research Foundation, Seattle, WA, USA) を用いて直接型別する方法が行われていたが, 現在モノクローナル抗体の供給が不可能になっている. 吉田ら⁸⁾は *C. trachomatis* の 15 血清型に対応する型別を *C. trachomatis* 外膜主要タンパク質 (MOMP) 血清型特異部分をコードする遺伝子の PCR-RFLP (restriction fragment polymorphism) を行う方法で可能であることを報告している. 我々もこの方法に準じて検討しているので簡単に紹介する.

・鋳型 DNA の調整

すでに分離株が得られている場合はクラミジア DNA の抽出は, クラミジアの基本小体粗精製液あるいは感染細胞浮遊液 (100 μ l) を Proteinase K 処理した後, 常法に従いフェノール・クロロホルム抽出, エタノール沈殿を行う. 得られた DNA は 50 μ l の TE buffer (10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA) に溶解し, 鋳型 DNA とする. あるいはクラミジアの増殖を行わなくても, 臨床材料から直接 PCR で得られ

た産物からも型別が可能である.

・プライマー

1stPCR プライマー

CTM1 5'-TTGCGATCCTTGCACCACTT-3'

CTM8 5'-GCTCGAGACCATTTAAGTCC-3'

これで増幅される DNA は約 750bp である.

NestedPCR 用プライマー

CTM4 5'-GGTGACTTTGTTTTCGACCG-3'

CTM7 5'-CTCCAATGTAGGGAGTGAAC-3'

これで増幅される DNA は約 680bp である.

・PCR の条件と PCR 産物の検出

1stPCR は, 鋳型 DNA 10 μ l を 10mM Tris-HCL (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% geratin, 各 250 μ M の dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 1.25U の *Taq* polymerase (以上 TaKaRa), 0.5 μ M のプライマー CTM1, CTM8 を含む反応溶液に加え全量 50 μ l とし, PCR を行う. Nested PCR は, プライマー CTM4, CTM7 を用い最初の PCR 産物 1 μ l を鋳型にして行う.

PCR の反応条件は, 94°C 3 分の熱変性の後, 94°C 20 秒, 55°C 20 秒, 72°C 30 秒を 35 サイクル行う. nested PCR では 25 サイクルとする.

PCR 産物および制限酵素消化物の検出は, おおのの反応液 10 μ l を 4% アガロースゲル (NuSieve 3:1 Agarose, TaKaRa) に供し電気泳動後, エチジウムブロマイド染色・UV 照射により DNA 断片を観察する. DNA 分子量マーカーは ϕ × 174 の *Hinc* II 消化物 (TaKaRa) を使用.

・制限酵素による PCR 産物の消化

PCR 産物 10 μ l を制限酵素 *Alu* I, *Eco*RV, *Hind* III, *Taq* I, *Hha* I (TaKaRa あるいは TOYOBO) を用いて消化する. PCR 産物の制限酵素 *Alu* I 消化物の電気泳動パターンから Ba, C, E, F, G, J, L₁, L₂ と 3 つのグループ (A/K, B/D, H/I/L₃) の 11 型に識別できる. 制限酵素 *Alu* I の切断パターンで識別できなかった血清型 A, K, H, I, L₃ については, 制限酵素 *Eco*RV, *Hind* III, *Taq* I, *Hha* I の切断により識別できる. *C. trachomatis* 臨床分離株についての検討でも micro-IF による血清型と PCR-RFLP による型別はほぼ一致することが確認されている.

IV. 引用文献

- 1) 熊本悦明 他: 日本における性感染症 (STD) 流行の実態調査-2000 年度の STD センチネルサーベイランス報告-日本性感染症誌. 12:32-67, 2001.
- 2) 小島弘敬: 臨床検体についてのクラミジア迅速検査法の有用性-IDEIA クラミジアとクラミジアザイムとの比較を中心として-新しいクラミジア抗原検査法 その基礎的臨床的検討. Prog Med. 10:53-60, 1991.
- 3) Wang SP, et al.: Immunotyping of *Chlamydia trachomatis* with monoclonal antibodies. J Infect Dis. 152:791-800, 1985.
- 4) 別所徹子, 松本 明: *Chlamydia psittaci* の封入体を抗原とした簡単な抗体価測定法 -microplate immunofluorescence technique-. 医学のあゆみ. 128:571-572, 1984.
- 5) 厚生省監修: クラミジア, ウイルス・クラミジア, リケッチア検査, 第Ⅲ分冊, 各論 2, 微生物検査必携, 125-162, 1987.
- 6) 松本 明: クラミジア学入門. 大学教育出版, 2002.
- 7) Yoshida H, et al.: Differentiation of *Chlamydia* species by combined use of polymerase chain reaction and endonuclease analysis. Microbiol Immunol. 42:411-414, 1998.
- 8) 吉田 洋 他: PCR 法による *Chlamydia trachomatis* の型別と血清型について. 日本性感染症誌. 6:40-45, 1995.

V. 検査依頼及び連絡先

162-8640

東京都新宿区戸山 1-23-1

国立感染症研究所ウイルス第一部 第五室

岸本寿男

Tel:03-5285-1111(内 2534)

Fax:03-5285-1208

e-mail:kisimoto@nih.go.jp

VI. 執筆者一覧

岸本寿男:国立感染症研究所ウイルス第一部

岩上泰雄:堺市衛生研究所

大友良光:青森県環境保健センター微生物部

竹部久勝:奈良県保健環境研究センター

長 則夫:栃木県保健環境センター

肺炎クラミジア感染症検査マニュアル

目 次

I. 肺炎クラミジア感染症の概説

II. 血清抗体測定法

1. 各特異血清抗体とその意義

- 1) 属特異抗体
- 2) 種特異抗体
- 3) 抗体価の臨床的意義と推移パターン

2. micro-immunofluorescence test : micro-IF 法

- 1) 使用抗原
- 2) 抗原の調整・精製
- 3) 試薬・器具・機材
- 4) 検査手順
- 5) 判定法

III. 病原体検出法

1. 検査の進め方

- 1) 検体採取・輸送・保存方法
- 2) 検体の調整

2. 分離培養法

- 1) 培養細胞の維持
- 2) 検体の輸送・保存に用いる試薬等
- 3) 分離操作手順・判定法

3. 抗原検出法

- 1) 直接蛍光抗体法 (DFA) による染色
- 2) 市販のクラミジア抗原検出キットの応用

4. 遺伝子検出法

- 1) PCR 法

IV. 引用文献

V. 検査依頼及び連絡先

VI. 執筆者一覧

おわりに

I. 肺炎クラミジア感染症の概説

肺炎クラミジア (*Chlamydia pneumoniae* 以下 *C. pneumoniae*) は, 1989 年に新種のクラミジアとして認知された新興病原体である. ヒトを宿主として飛沫感染し, 感染から症状発現までの潜伏期間は 3~4 週間で, 接触が密接な者の間で小規模に緩徐に広がる. 感染既往を示す抗体保有率は小児期に急増し, 成人で 5~6 割と高い. 市中肺炎の約 1 割に関与することが知られている¹⁾²⁾.

1999 年施行の感染症法では, クラミジア肺炎 (オウム病を除く) として 4 類感染症の定点報告疾患に指定され, 2003 年の改正感染症法では 5 類感染症の定点報告疾患となった. 本来, クラミジア肺炎とは, クラミジアによる肺炎という意味であり, 3 種のクラミジアが含まれる. したがってクラミジア肺炎 (オウム病を除く) には *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* の 2 種による肺炎が含まれる. *C. trachomatis* 肺炎は母子感染例の新生児・乳児肺炎であるため生後 3 ヶ月程度までの肺炎例に多い. しかし, 実際には 2 種の鑑別が感染症発生動向調査に反映されていないため実態の把握はできていない. 1 歳以降では *C. trachomatis* 肺炎はまずまれであるのでほとんどは *C. pneumoniae* によるものと考えてよい. 1999 年以降の感染症発生動向調査による全国の約 500 定点からの年間報告数は約 100~200 例で推移している.

疾患としては急性上気道炎, 急性副鼻腔炎, 急性気管支炎, また慢性閉塞性肺疾患 (COPD) を主とする慢性呼吸器疾患の感染増悪, 及び肺炎である. 発症年齢がマイコプラズマ肺炎と異なり, 小児のみならず, 高齢者にも多い. 小児においては比較的軽症の症例が多いが, 高齢者や基礎疾患を持つ例では重症例も見られる. 時に集団発生があり, 本邦でも家族内感染や幼稚園, 小中学校, 高齢者施設などにおける集団発生が報告されている.

また最近では呼吸器感染症以外の疾患として, 慢性疾患との関連が注目されており, 冠動脈疾患や喘息などとの関連を指摘する報告が多数みられる³⁾. 特に *C. pneumoniae* が血管などに慢性感染も起こしうることが明らかとなったことから, 動脈硬化性疾患に関わる疑いが濃い, 不明な点も多く今後の研究課題である.

感染症発生動向調査ではクラミジア肺炎 (オウム病を除く) の報告の基準として, ①病原体の検出: 痰, 血液, 剖検例では諸臓器などからの病原体の分離など, ②病原体の遺伝子の検出: PCR 法, PCR-RFLP 法など, ③病原体に対する抗体の検出: 間接蛍光抗体 (IF) 法で抗体価が 4 倍以上 (精製クラミジア粒子あるいは感染細胞を用いた場合は, 種の同定ができる) など, としている⁴⁾. 患者咽頭材料からの分離は可能であるが, 細胞培養を必要とすることから実施できる施設は限られている. PCR による遺伝子検出についてもキットの開発はなされてい

い.

以上の現状から, 特異抗体測定や, 病原検索などによる確定診断が求められることが想定され, 本症の診断について地方衛生研究所並びに国立感染症研究所が担うべき役割は大きい. 本マニュアルはこれらの現状を踏まえて, 国立感染症研究所で施行している検査法などを紹介しつつ記述した.

Ⅱ. 血清抗体測定法

1. 各特異血清抗体とその意義

C. pneumoniae に対して用いられる血清抗体測定法には属, 種特異的なものがある.

1) 属特異抗体

従来からオウム病の血清診断に用いられてきた補体結合反応 (complement fixation :CF 法) は, クラミジア属共通抗原であるリポ多糖体 (LPS) を主抗原に用いているので, *C. pneumoniae* の急性感染や感染既往でもしばしば陽性となり, クラミジア感染症のスクリーニングとしてある程度利用できるとされるが, *C. pneumoniae* 特異抗体を特定することはできない. 感度も低く, 特に *C. pneumoniae* 再感染時には陽性になりにくい. また他にも *C. trachomatis* の LPS を主抗原としたクラミジア属抗体測定 ELISA キットが市販されていたが, 現在は国内での販売はされていない.

2) 種特異抗体

・ 間接蛍光抗体法

間接蛍光抗体法では, *C. pneumoniae* 抗体を特異的に検出できる測定法としては, Wang⁵⁾ によって開発された micro immuofluorescence test (micro-IF 法) がある. 単離したクラミジアの基本小体 (Elementary body:EB) を抗原とした間接蛍光抗体法で種特異性が高くクラミジア抗体測定法の標準法とされる. また感染細胞内封入体を抗原とする micro immunofluorescence antibody technique (MFA 法) がある⁶⁾. MFA 法は封入体を抗原とするため, 属特異抗原も含むが, 各クラミジア抗原に対する抗体価の差により種を特定し得るもので, 比較的簡便であるが, 一般には普及していない. これらの間接蛍光抗体法はキットとして本邦で利用可能なものはなく, 特定の施設で実験室内検査として行われている.

・ ELISA 法 (ヒタザイム C. ニューモニエ)

ELISA 法による種特異的抗体測定法としては, 本邦で開発された *C. pneumoniae* の外膜複合体 (chlamydial outer membrane complex :COMC) を抗原としたキット (ヒタザイム C. ニューモニエ 以下ヒタザイム CPN: 日立化成工業) が, 保険適応での臨床応用が認可され一般に利用されている⁷⁾. 医療機関内の検査室でキットを購入して測定することも可能であるが, 外注する場合がほとんどである. 現在 IgG, IgA についての測定が可能で, IgM についても臨床適用が望まれている. ヒタザイム CPN は種特異性は高く *C. trachomatis* 感染では交差反応は低いものの, オ

ウム病患者血清ではある程度交差性を認めており, 臨床像からオウム病の可能性を疑う場合には micro-IF などを確認することが望ましい. ヒタザイム CPN の診断基準としては以下の基準が推奨されている.

ヒタザイム CPN の診断基準案

- ・陰性: IgG-ID 1.0 未満
- ・抗体保有(感染既往): IgG-ID 1.0 以上
- ・急性感染確定: ペア血清で IgG-ID 1.35 以上上昇, あるいは IgA-ID 1.0 以上上昇, またはシングルかペアのいずれかが IgM-ID 1.6 以上(小児は 1.0 以上)
- ・急性感染の疑い: IgG-ID 3.0 以上あるいは IgA-ID 3.0 以上
(ID は吸光度から換算したインデックス)

3) 抗体価の臨床的意義と推移パターン

C. pneumoniae 感染症の血清診断において留意すべき点として, 抗体の推移パターンがある. *C. pneumoniae* の初感染例では, 典型パターンとしては感染後まず IgM が 3 週以降に上昇し, 次いで IgG, IgA がさらに 2~3 週遅れて上昇する. IgM は通常約数ヶ月で消退するが, IgG, IgA は一旦上昇しピークをむかえた後, 数ヶ月から年余に渡って漸減する. IgA は IgG に比べて早期に低下する傾向がある. 一方, 再感染例では既に IgG は低値から中等度の抗体価を示しており, ときに IgA も保有している. その状況で再感染をした場合 IgG, IgA は 2~3 週で比較的急激に上昇する. また IgM は上昇しないか, 上昇した場合でも低値であるとされる. もともと一般成人において *C. pneumoniae* IgG 抗体は感染既往として約 60% の人が保有しており, クラミジア感染症では抗体を持っていたとしても感染防御できず何度でも感染し得る. SLE などの自己免疫疾患や関節リウマチの場合, IgM が偽陽性にでることがあるので IgM 用血清はリウマチ因子除去剤(RF-Absorbent: デイドベアリング社など)で前処理して測定する.

以上のように抗体が上昇し高値になるまでの期間が比較的に長いため, 発症時には陰性のことがしばしばあり, 適切な間隔を置いた回復期のペア血清での検討が望ましい. また有効抗菌剤の早期治療によって抗体上昇が妨げられることもあるため, 抗体検査のみでは診断不可能なこともある. これらの血清診断の限界を補うため常に可能な限り分離, 抗原, 遺伝子などの病原体検出を試み, 臨床経過を含めて総合的に診断することが重要である.

2. micro-immunofluorescence test : micro-IF 法

Wang⁵⁾によって開発された micro-IF 法は, クラミジア抗体測定の標準法とされる. 通常は *C. psittaci* *C. pneumoniae* の 2 種に *C. trachomatis* 血清型グループ 3 抗原を加えた 5 抗原を点置して測定を行う. しかしオウム病の血清診断では, 種

特異抗体の判定が可能であれば特に問題ないので、抗原を3種用いる簡便法で十分である。

1) 使用抗原

簡便法としての3種の抗原はたとえば *C. trachomatis* では L₂ 株 (L₂/434/Bu) あるいは D 株などの血清型株で代表させることができ、*C. pneumoniae* では TW-183 株 (TWAR 標準株)、あるいは KKpn-1 株 (本邦臨床分離株) などでも可能で、*C. psittaci* では Califolnia10 株あるいは Budgerigar No. 1 株などを利用する。

- ・ *C. trachomatis* L₂ 株 (L₂/434/Bu) あるいは D 株
- ・ *C. pneumoniae* TW-183 株 (TWAR 標準株) あるいは KKpn-1 株などの国内分離株
- ・ *C. psittaci* Califolnia10 株あるいは Budgerigar No. 1 株

2) 抗原の調整・精製

抗原の調整・精製は実験室内では通常困難なので、Washington Research Foundation (Seattle, WA, USA) から調整済みのものを購入するか、国立感染症研究所から分与を受ける。以下に感染研で行っている抗原の調整・精製法を示す。分離培養法に準じて、組織培養用マイクロプレートのウェル内に感染させた各クラミジアを、あらかじめ入れておいたマイクロカバーグラスを染色するか、細胞を白金耳で掻き取って固定染色して、封入体の出来具合を観察する。80%以上の細胞に封入体が形成されていれば十分抗原量が得られる。培養液を除去し、感染細胞をラバーポリスマンではがし、PBS (-) を少量加えて回収しチューブに集める。細胞浮遊液を超音波処理(カップホーン型にて冷水中で 30 秒程度パルス)し、感染細胞の封入体を破壊する。超音波処理した細胞浮遊液を 2500rpm, 10 分遠心して、細胞成分を落とす。(全体の液量が多い場合は上清をチューブに移し、15,000rpm, 30 分間超遠心し濃縮した上で沈渣に PBS を加えてよくピペッティングし回収するという操作を加えてもよい。)回収液を 10ml の 30~35% ウログラフィンに重層して 19,000rpm, 40 分間遠心する。得られた沈渣は 20ml の PBS に浮遊させ 15,000rpm, 30 分間遠心洗浄 2 回した後、3ml の 0.02%ホルマリン PBS を加え固定し、浮遊させてこれを抗原液とする。抗原液の濃度は一部を採って DFA 染色し、EB 数をカウントしておよそ $1 \times 10^8 \sim 9$ /ml となるように調整し、小分けして 4℃に冷蔵保存する。

*ホルマリン固定するまでは感染性があるので、必ず安全キャビネット内で操作する。

3) 試薬・器具・機材

①試薬

- ・ 3%孵化鶏卵卵黄囊乳剤 (normal yolk sac:NYS)
- ・ PBS (-)
- ・ FITC 標識抗ヒト IgG, A, M 抗体 (goat)
- ・ リウマチ因子除去剤 (RF-Absorbent: デイ ドベーリング社)
- ・ Tween20
- ・ 無蛍光グリセリン
- ・ アセトン

②器具・機材

- ・ コニカルチューブ 1.5ml
- ・ 無蛍光ガラススライドあるいはマルチウエル・スライドグラス (15 穴 4mm 径などでアセトン固定に耐えるもの)
- ・ Dip ペン先 (ピンセットにワッシャーで固定するとよい)
- ・ V 型ディスポマイクロプレート (血清希釈用)
- ・ 100 μ l 可変ピペッター
- ・ 10 μ l 可変ピペッター
- ・ 白金耳
- ・ 湿潤箱
- ・ カバーグラス 24 mm \times 50 mm
- ・ アセトン固定用のガラス容器
- ・ 洗浄用ビーカーまたはカップ
- ・ 37°C インキュベーター

4) 検査手順

①抗原スライドの作製

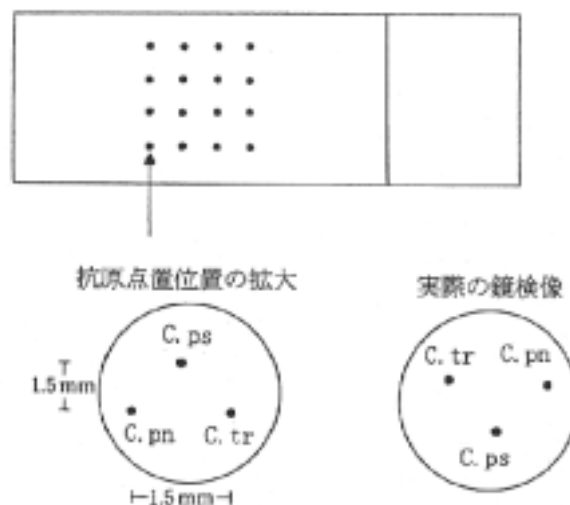
- ・ 抗原液 (ホルマリン固定済み 3 種 *C. trachomatis* : C. tr , *C. pneumoniae* : C. pn, *C. psittaci* : C. ps) をそれぞれ Vortex または数秒間超音波をかけ, EB 粒子の均等浮遊液とする. 抗原液を使用直前に 3% 孵化鶏卵卵黄囊乳剤 (NYS) と約 1 : 1 に混合したものをスライドグラスに点置する.
- ・ 無蛍光スライドあるいはマルチウエル・スライドグラス (15 穴など) は前もってアセトンで油膜等を洗浄しておくか, 軽くバーナーであぶり表面の汚れを除去すると抗原が定着しやすい.
- ・ ピンセットに固定した Dip ペン先で 1 つの抗原に対して 1 つのペン先を用いペン先を軽く抗原液に浸して点置部位のガラス面にそっと触れる程度にして点置していく. 左下が C. pn, 右下が C. tr, 中央上が C. ps などと決めておく

よい。(鏡検では中央下が C. ps, 左上が C. tr, 右上が C. pn と見える。) 各抗原は乾くと白く見える。お互いが接触しないように注意する。

点置した抗原が乾燥したら, アセトンにつけて 15 分間室温で固定し, 自然乾燥させる。スライドガラスはアルミホイルなどで密封し-70℃に保存する。

図に抗原点置法と観察時の鏡検像を示す。

図 抗原点置法と観察時の鏡検像



②抗体反応

- 被検血清 (3 種クラミジアの陽性コントロール血清も含めて) を V 型ディスプレイマイクロプレート等にて 2 倍段階希釈する。ピペッターでまず血清 $10\mu\text{l}$, PBS (-) $150\mu\text{l}$ で 16 倍希釈を作り, 以後その $100\mu\text{l}$ と PBS (-) $100\mu\text{l}$ で 2 倍段階希釈系列を 1024 倍まで作る。IgM はリウマチ因子を保有していると偽陽性になることがあるので, IgM 用血清はリウマチ因子除去剤 (RF-Absorbent: デイドベアリング社) で前処理して測定する。血清 $10\mu\text{l}$ + 0.1% Tween20-PBS $60\mu\text{l}$ + RF-Absorbent $10\mu\text{l}$ でまず 8 倍希釈を作り, 15 分室温で反応させた後, PBS で 128 倍希釈系列を作る。
- 抗原点置したスライドガラスに被検血清をのせていく。血清は白金耳かピペッターでのせていくとよい。高い希釈列 (薄い方) から血清を $1\sim 3\mu\text{l}$ ずつ抗原点置部位にのせていく。
- 血清をのせたスライドガラスは, 湿潤箱に入れて 37°C 30 分間インキュベートする。
- スライドガラスを PBS (-) の入った容器に浸してゆっくり上下して, 血清を洗い落とす。PBS (-) 2 回, 蒸留水 1 回を通し, 自然乾燥させる。

- ・二次抗体（FITC 標識抗ヒト IgG, A, M 抗体など）を $1\sim 3\mu\text{l}$ ずつ各抗原点置部位にのせていく.
- ・湿潤箱に入れて 37°C 30 分間インキュベートする.
- ・洗浄し水を切り自然乾燥後，無蛍光グリセリンを各穴にのせていき，カバーガラスをかけて封入する.
- ・蛍光顕微鏡で観察する. まず低倍率（100 倍）で抗原点置部位を探し，200～400 倍でクラミジア EB 粒子の蛍光を観察する.

5) 判定法

EB 粒子が一様に特異蛍光を発している場合のみ陽性とする. それぞれの抗原に対して陽性と判定した最高希釈倍数をもって抗体価とする. 蛍光抗体法による判定は観察者の主観に頼るところが大きく，判定には熟練を要する. したがって常に陽性コントロール血清を加えて検査を行う.

Micro-IF の判定基準

陰性: IgG 16 倍未満

抗体保有 (感染既往): IgG 16～256 倍

急性感染: 単独血清で IgG 512 倍以上あるいは, IgM 16 倍以上

: ペア血清で IgG 4 倍以上の上昇

血清診断では原則としてペア血清での 4 倍以上の上昇を急性感染の確定的な基準とする. できる限り急性期と 3 週間程度の間隔をおいた回復期のペア血清での判定が望ましい. ただし, 診断はあくまでも病原体検出法の結果や臨床像と合わせて総合的に行う必要がある.

Ⅲ. 病原体検出法

1. 検査の進め方

病原体検出法には分離培養, 抗原検出法, 遺伝子検出法などの種々の検出法がある. 検体は鼻咽腔・咽頭スワブ, 喀痰, 肺胞洗浄液, 剖検組織などが用いられるが, 通常は鼻咽腔・咽頭スワブが主に利用される.

1) 検体採取・輸送・保存方法

材料として鼻咽腔・咽頭スワブを用いる. 採取にはいずれもマスク, 手袋を着用するなどして感染予防に努める. 滅菌綿棒を鼻咽腔あるいは咽頭後壁にあてて, 回転させて採取する. PCR 用はドライのまま, 分離用は輸送培地入りのプラスチックチューブに入れて4℃で輸送する. 1日以内に分離培養する場合は4℃で保存しておくが, 長期保存する場合は-80℃に凍結保存する. 直接-80℃に急速冷凍するより4℃においてゆっくりと冷凍する方が分離率が良いとされる.

2) 検体の調整

操作については実験室内感染に注意する. 分離用には, 輸送液とスワブが入っているチューブに十分な Vortex をかけ, チューブの内壁でスワブを絞って抜き取った後, 低速遠心し (1000~1500rpm、5 分程度) 上清を回収する. この回収した上清を分離材料とする. PCR 用には, スワブが入っているチューブに滅菌した PBS 約 2ml を入れ, 十分 Vortex をかけ, 低速遠心し (1000~1500rpm、5 分程度) 上清を回収する. この回収した上清を DNA 抽出材料とする.

2. 分離培養法

分離培養は感染性の有無を確定できる方法であるが, 実施に特別な施設や経験を要することから習熟した施設以外で行うことは困難である. 施行する場合は P2 レベルにて安全キャビネット内で取り扱う. 培養方法は基本的には他のクラミジアと同様であるが, 使用細胞や培養時間, 遠心吸着の効果の有無などが異なる. 培養時間は, *C. pneumoniae* は他のクラミジアに比べて長く, 固定あるいは継代するサイクルは 72 時間程度である.

1) 培養細胞の維持

HEp-2 細胞 (咽頭癌由来), HL 細胞, HeLa229 細胞などが用いられるが, ここでは HEp-2 細胞を使用した方法について述べる. 培養細胞がフラスコ底面に隙間なく付着しているものを用意する. 分離培養を成功させるためには良好な状態

の培養細胞の継代維持が不可欠である.

①培養継代維持試薬

- ・細胞増殖用培養液 (Eagle's MEM+FCS10%)
- ・EDTA トリプシン PBS (-) 液
0.02%EDTA 0.25% trypsin in PBS (-)

②器具・機材

- ・密閉型キャップフラスコ (小) 50ml 組織培養用
- ・5ml 綿栓付ディスポピペット
- ・中試験管 4 本
- ・試験管立て (斜台:試験管を斜めに立てるように固定したもの)
- ・バーナー
- ・37°Cインキュベーター

2) 検体の輸送・保存に用いる試薬等

①輸送保存液: SPG (sucrose phosphate glutamate)

Sucrose	75.0g
KH ₂ PO ₄	0.52g
K ₂ HPO ₄	1.22g
Glutamic acid	0.72g

これを蒸留水に溶解して 1000ml とする. pH を 7.4~7.6 に調整し濾過滅菌後, 抗菌薬を添加し 1ml ずつ滅菌試験管に分注し, これに滅菌ガラスビーズ (直径 0.5mm, 0.5g) を入れたものを臨床の現場に 4°Cで常備しておくといよい.

他に最近 SPG を利用しない方法も一部では用いられている. Iscove's Modified Dulbecco's Medium+10%FCS+抗菌薬を輸送保存液として, 分離培養時には同液にシクロヘキシミドを加えたもので, 従来法と比較しても分離率は良好とされる.

②抗菌薬

臨床検体は通常, 細菌や真菌などでかなり汚染されているため, 抗菌薬を SPG や分離用培養液に加える必要がある. (ただし, クラミジアの増殖を妨げないもの) 抗菌薬の組み合わせの一例を示す.

gentamicin (GM)	最終濃度 10 μ g/ml
vancomycin (VCM)	最終濃度 100 μ g/ml
amphotericin B (AMPH)	最終濃度 2 μ g/ml

③クラミジア分離用培養液

細胞増殖用培養液に抗菌薬を加えたものに、クラミジアの増殖を促進するため、蛋白合成阻害剤シクロヘキシミド (cycloheximide) を最終濃度 $1\mu\text{g/ml}$ になるように添加する。

④その他の試薬

- ・ 99%エタノール, あるいはメタノール (以下, 分離同定用の試薬)
- ・ PBS (-)
- ・ クラミジア属特異性 LPS モノクローナル抗体: クラミジア FA 試薬「生研」(デンカ生研)
- ・ *C. trachomatis* 特異モノクローナル抗体: MicroTrak(マイクロトラック, デイドベーリング社)
- ・ *C. pneumoniae* 特異モノクローナル抗体: RR-402, IMAGEN など
- ・ 無蛍光グリセリン

⑤器具・機材

- ・ 24 穴マルチウエルプレート
- ・ マイクロカバーガラス 14 丸 (径 14mm)
- ・ スライドグラス蛍光顕微鏡用
- ・ 湿潤箱
- ・ Vortex ミキサー
- ・ 超音波破砕器 (安全性のためカップホーン型が望ましい)
- ・ 低速遠心機
- ・ プレート遠心機 (プレート用ローター付き)
- ・ 5%CO₂ インキュベーター
- ・ 蛍光顕微鏡 (落斜型)

3) 分離操作手順・判定法

平底ガラスチューブによる方法と、プラスチックのマルチウエルプレートを使用する方法があるが、ここでは後者を使用した場合の解説をする。

①細胞の用意

24 穴マルチウエルプレートの各穴にマイクロカバーガラスを入れ、 $1.5\sim 2.0\times 10^5/\text{ml}$ の濃度に調整した培養細胞浮遊液を 1ml ずつ分注する。5% CO₂ インキュベーター内で 24~48 時間培養し、単層シートを形成させておく。

②検体接種液の用意

前述の如く調整した分離用検体を接種に用いる。

③接種

プレートの各穴の培養液をスポイトで除去し、検体接種液上清を 0.25~0.5ml

接種する.

④遠心吸着

プレート遠心機で 2000rpm(900G)1 時間室温で遠心吸着を行う.引き続き 35℃の CO₂ インキュベーター内で 1 時間静置し追加吸着させる.プレート遠心機が無い場合は,接種液をときどきキルティングしながら 2 時間インキュベーター内で静置吸着させる.

⑤分離用培養液への交換

接種液をスポイドで除去し,抗菌薬とシクロヘキシミドを含む分離用培養液を 1ml 分注する.35℃の CO₂ インキュベーターで 72 時間培養する.*C. pneumoniae* は他のクラミジアの培養温度 37℃より 35℃の方がより増殖しやすい.

⑥分離株の検出

プレートの各穴の分離用培養液をスポイトで除去し,滅菌ビンへ破棄する.99%エタノールを各穴に約 1ml 分注してマイクロカバーグラスを 10 分間固定する.エタノールを除去後,ピンセットでマイクロカバーグラスを取り出しカップに入った PBS につけて洗浄し,風乾する.モノクローナル抗体(クラミジア FA)を 1 滴置いて,その上にマイクロカバーグラスを細胞面を下にして伏せて湿潤箱にて 37℃30 分間染色する.マイクロカバーグラスはカップに入った PBS と蒸留水につけて洗浄し風乾後,スライドグラスにのせたグリセリンの上に伏せて(細胞面が下)封入する.蛍光顕微鏡 UV 励起で封入体を観察する.

⑦分離株の同定

クラミジア属特異性モノクローナル抗体(クラミジア FA)では 3 種すべて染色される.はじめに,これを用いてクラミジアの存在の有無をみて陽性であれば,さらに種特異性のモノクローナル抗体で同定するようにすると無駄が少ない.クラミジア FA 陽性,*C. pneumoniae* 特異モノクローナル抗体(RR-402, Chlamydia-Cel Pn, IMAGEN)陽性,*C. trachomatis* 特異モノクローナル抗体陰性のものを *C. pneumoniae* とする.(表 1 参照)

表 1 染色法による分離株の同定

染色法	<i>C. trachomatis</i>	<i>C. psittaci</i>	<i>C. pneumoniae</i>
クラミジア FA	+	+	+
RR-402	—	—	+
Chlamydia-Cel Pn	—	—	+
IMAGEN	—	—	+
MicroTrak	+	—	—
ヨード染色	+	—	—
Giemsa 染色	+	+	+

⑧第2代継代以降の培養

初回培養で72時間培養したプレートのウェルの培養液を除去し,SPGを0.5ml入れる.感染細胞をラバーポリスマンではがし,その液を回収する.(ラバーポリスマンの代用として細かく切ったシリコンラバー片を滅菌しておいて,ピンセットではさんだラバー片ではがす方法も可能.ただし1ウェルはがす毎にバーナーでピンセットは滅菌する.)あとは,初回培養検体接種液の用意をした時と同様,超音波破碎,遠心した上清を接種液とし,その後は初代同様の手順で継代を行う.陰性の場合でも,3代までは継代を行って判定する.

3. 抗原検出法

1) 直接蛍光抗体法(DFA)による染色

クラミジア属特異性のモノクローナル抗体としてクラミジア FA(デンカ生研)が市販されている.濃厚な感染の場合に感染部位を擦過したスワブで抗原陽性を確認する場合や,分離の確認に封入体を染色する場合は非常に有用である.手技としては,スワブにて採取した検体をスライドグラスに塗末し,アセトンで10分間固定をする.細胞外に出たEB粒子はアセトンで固定をしないと,エタノールやメタノール固定では染まりが悪い.風乾した後,クラミジア FAで30分間染色して,軽く水洗しグリセリンを滴下後,カバーグラスをかけて蛍光顕微鏡下で観察する.アップルグリーンに染まるクラミジア粒子が観察されれば陽性である.しかし主観が入りやすく,特異的に蛍光を発する抗原を確実に判定するためには,ある程度経験を要し,通常のスクリーニング検査として用いる場合や,多数検体の迅速な検査には適さない.

2) 市販のクラミジア抗原検出キットの応用

クラミジア属特異性抗原検出キットを *C. pneumoniae* 検出のためスクリーニングとして応用することはある程度可能である.ELISA法を用いたイディアクラミジア PC(協和メデックス)は *C. pneumoniae* の検出感度は 10^2 EBs/Assay 程度とされ,利用可能である.

免疫クロマトグラフィーを用いたクリアビュー(関東化学)などの市販キットでも *C. pneumoniae* 検出はある程度可能であるが,感度は 10^3 EBs/Assay とイディアクラミジア PC よりさらに低い.いずれも種の特定はできない.

4. 遺伝子検出法

1) PCR 法

感度や特異性に優れている.方法としてはDNA抽出を行い, *C. pneumoniae* に特

異的なプライマーを用いてPCRを行う。DNA抽出については、抽出キットが市販されているので利用すると良い。PCR は種々のプライマーが報告されているので、その方法に準じて行う⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾。属特異的なプライマーを用いてPCRを行った後、制限酵素切断によるパターンで確認を行う方法や、nested PCRを用いるものなどがある(オウム病検査マニュアル、性器クラミジア感染症検査マニュアルを参照)¹³⁾。参考として感染研で用いている方法を以下に紹介する。

・ DNA 抽出

PUERGENE™ DNA 抽出キットを使う場合の手順を述べる。500 μ l 検体を 1500 μ l マイクロチューブに入れ 15,000rpm で 30 分遠心する。上清を抜き、300 μ l Cell Lysis Solution および 3~4 μ l Proteinase K Solution を入れ、十分に Vortex して沈殿を浮遊させる。56℃で一晩インキュベートした後、室温まで冷やす。100 μ l Protein Precipitation Solution を加え、20 秒激しく Vortex し、氷中に少なくとも 15 分置く。15,000rpm で 10~15 分遠心し、上清を新しい 1500 μ l マイクロチューブに移す。300 μ l 100% Isopropanol (2-propanol) を加え、50 回程度転倒混和した後、室温で 15 分以上インキュベートする。15,000rpm で、5 分間遠心して上清を抜き、300 μ l 70% Ethanol を入れる。再び 15,000rpm、5 分間遠心し、DNA を失わないように丁寧に上清を完全に抜きとり、約 10~15 分乾燥させる。20~50 μ l DNA Hydration Solution を入れ、Vortex し、65℃で 1 時間インキュベートし PCR 用 DNA とする。

・ プライマーと PCR 条件

Kubota¹²⁾の報告した 53kDa 抗原遺伝子を標的としたプライマーを 1st PCR に用い、Izutsu(未発表)のプライマーで nested PCR を付加したものを用いている。それぞれエタノール沈殿し風乾したものを 100 μ l のバッファー(10mM Tris-Cl pH8.5 など)に溶解して使用。このときのプライマー濃度は 100 μ M となる。

1st : 53-1	5'-ATGATCGCGTTTCTGTTGCCA
53-2	5'-GAGCGACGTTTTGTTGCATCTC
Nested : 53-3	5'-TGTCCAAGCGGTGAAACAAG
53-4	5'-CAACCGTGACCCATTTACTG

PCR の条件は、Perkin-Elmer の Taq-Gold を用い、20 μ l のスケールで以下のように行っている。

	1stPCR	nested PCR
精製水	12.8 μ l	14.5 μ l
×10 バッファー	2.0	2.0
dNTP (2mM)	0.8	1.0
MgCL ² (25mM)	2.0	1.6
プライマー	53-1 0.1 53-2 0.1	53-3 0.1 53-4 0.1
Taq-Gold	0.2	0.2
サンプル	2.0	0.5 (1st PCR 産物)

温度サイクルは下記の条件で行っている.

Preheat	95°C	9 分 30 秒
Melt	94°C	30 秒
Anneal	55°C	30 秒
Extend	72°C	1 分 (40 サイクル)
Final	72°C	5 分
	4°C	∞

増幅産物を電気泳動したゲルをエチジウムブロマイド染色し, UV 照射下で写真撮影し, *C. pneumoniae* に特異的なバンドの有無を確認する. DNA サイズは 53-1/53-2 では 499bp, 53-3/53-4 では 239bp である.

おわりに

C. pneumoniae 感染症の診断については, 診断基準や検査法の標準化の提唱はされているものの, 実際には世界的にも施設間のばらつきは大きい. 新たに簡便で正確に診断できる検査法の開発が望まれるが, 一般化されるまでにはかなり時間がかかるであろう. 当面は本マニュアル記載したような実験室内の検査法の重要性は維持されるものと思われる.

IV. 引用文献

- 1) Grayston JT, et al. : *Chlamydia pneumoniae*. sp. nov. for *Chlamydia* sp. strain TWAR. Int J Syst Bacteriol. 39 : 88-99, 1989.
- 2) Grayston JT, et al. : A new respiratory tract pathogen: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. J Infect Dis. 161:618, 1990.
- 3) Kuo CC, et al. : Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries. J Infect Dis. 167:841, 1993.
- 4) 岸本寿男: クラミジア肺炎(オウム病を除く) 感染症の診断・治療ガイドライン, 日本医師会雑誌, 122, 244-245, 1999.
- 5) Wang SP, et al. : Immunotyping of *Chlamydia trachomatis* with monoclonal antibodies. J Infect Dis. , 152:791-800, 1985.
- 6) 別所徹子, 松本 明: *Chlamydia psittaci* の封入体を抗原とした簡単な抗体価測定法 microplate immunofluorescence technique. 医学のあゆみ. 128:571-572, 1984.
- 7) 岸本寿男 他: ELISA 法による抗 *Chlamydia pneumoniae* 特異抗体の測定 3. 血清学的診断基準の設定. 感染症誌. 73:457-466, 1999.
- 8) 厚生省監修: クラミジア, ウイルス・クラミジア, リケッチア検査, 第Ⅲ分冊, 各論 2, 微生物検査必携. 125-162, 1987.
- 9) Campbell LA, et al. : Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 30:434-439, 1992.
- 10) Gaydos CA, et al. : Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction-enzyme immunoassay in an immunocompromised population. Clin Infect Dis. 17:718-723, 1993.
- 11) Tong CY, et al. : Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci* in sputum samples by PCR. J Clin Pathol. 46:313-317, 1993.
- 12) Kubota Y. : A new primer pair for detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction. Microbiol Immunol. 40:27-32, 1996.
- 13) Yoshida H, et al. : Differentiation of *Chlamydia* species by combined use of polymerase chain reaction and endonuclease analysis. Microbiol Immunol. 42:411-414, 1998.

V. 検査依頼及び連絡先

162-8640

東京都新宿区戸山 1-23-1

国立感染症研究所ウイルス第一部 第五室

岸本寿男

Tel:03-5285-1111(内 2534)

Fax:03-5285-1208

e-mail:kisimoto@nih.go.jp

VI. 執筆者一覧

岸本寿男:国立感染症研究所ウイルス第一部

性器ヘルペスウイルス感染症

性器ヘルペスウイルス感染症

目 次

- (1) 単純ヘルペスウイルスによって起こる疾患の概説
- (2) 検査に関する一般的注意
- (3) 検査方法
 - a) ウイルス分離
 - b) 抗原検出
 - c) 抗体検出（割愛）
 - d) PCR 法による HSV DNA の検出
- (4) 引用文献
- (5) 検査依頼先
- (6) 執筆者一覧

(1) 単純ヘルペスウイルスによって起こる疾患の概説

A. はじめに

性器ヘルペスは単純ヘルペスウイルスによる感染症で、4類感染症（定点把握の対象疾患）に分類されている。性器感染症例として男性では淋菌、クラミジアについて3位、女性ではクラミジアについて2位を占めている。単純ヘルペスウイルスには1型と2型の2種類が知られ、感染症法に取り上げられている疾患のうち、急性脳炎や無菌性髄膜炎にも関与している。

B. 関連疾患

単純ヘルペスウイルスは皮膚粘膜病変として、口唇ヘルペスや性器ヘルペスを起こし、眼の角結膜炎、虹彩炎、急性網膜壊死、脳炎、新生児全身感染の原因としても知られている。皮膚粘膜病変では基本的に、上半身は1型が、下半身は2型が多くみられる。しかし、角膜ヘルペスや脳炎では1型、性器ヘルペスや新生児全身感染例では両型が検出される。最近、Mollaret 髄膜炎や急性網膜壊死が2型によるという報告がある。Mollaret 髄膜炎は比較的若い女性に多くみられ、軽度の再発性髄膜炎で性器ヘルペスがなくても起こる。髄液にはリンパ球系細胞が軽度(200/ μ l 程度)に増加し、大型の血管内皮系ないしは単球系細胞(Mollaret)がみつかる。一方、性器ヘルペスは初感染では1型が、再発例の多くは2型である。接触感染によるので性感染症(STD)と考えられ、さらに女性性器ヘルペスは新生児ヘルペスの原因となる。

C. 血清型別の意義

皮膚粘膜病変の初期は水痘帯状疱疹ウイルス(Varicella-zoster virus; VZV)の初期病変と区別しがたいことがある。また皮膚の同じ領域に1型と2型のウイルスが検出されることもある。陰部潰瘍では2型病変であれば再発性であることが多い。また脳炎は1型がほとんどであるが、前述した髄膜炎や髄膜脳炎では2型が多い。したがって、ウイルスの検出だけでなく、その型を知ることにより感染様式や臨床的特徴を把握することができる。

D. 性器ヘルペスウイルス感染症

性器ヘルペスウイルスの初感染例では、性的接触があってから2－10日の潜伏期を経て、男性では包皮、亀頭、陰茎に、搔痒感と違和感といった前駆症状について、比較的突然に数個から無数の水疱が出現し、疼痛を伴う。第3－5病日には水疱が破れて浅い潰瘍となり、第7病日にはもっとも重症化する。女性では前駆症状のあと外陰部に浅い潰瘍が対称性に出現し、疼痛のために排尿困難、歩行困難となることもある。周囲のリンパ節腫脹と圧痛、発熱、下肢の疼痛を伴う。約2－4週で自然治癒するが、抗HSV剤を投与すると7－10日で治癒する。再発性病変では2型が多く、自覚症状が軽く治癒までの期間が短い、再発を繰り返すことは患者にとって大きなストレスとなる。性器ヘルペスウイルス感染症の多くは2型ウイルスの感染であるが、オーラルセックスによる口唇と外性器間の接触感染による1型感染例もある。

E. ウイルスおよびゲノム

単純ヘルペスウイルス(HSV)は血清型として1型と2型に分類されている。最近、ヒトヘルペスウイルス(HHV)には8種が知られ、HSV-1がHHV-1、HSV-2がHHV-2

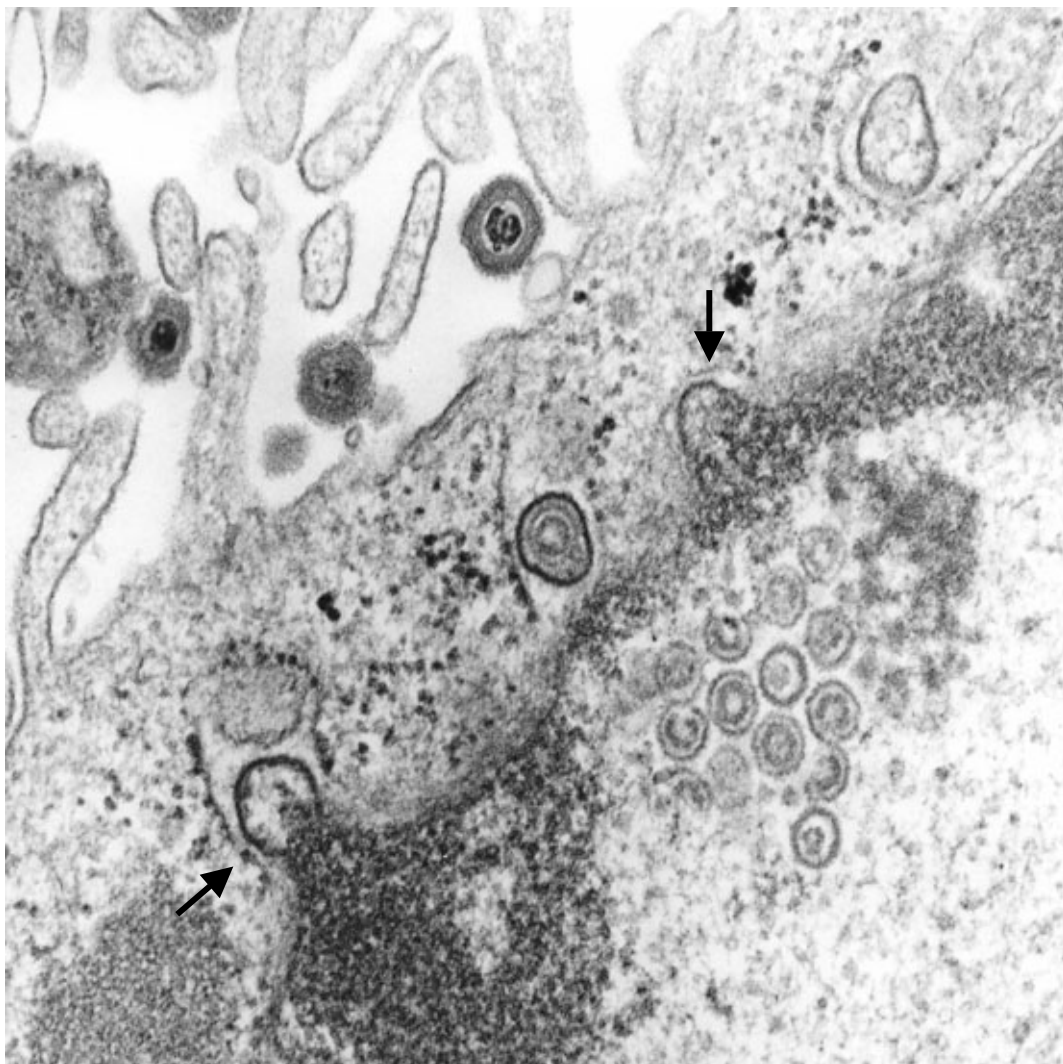
という。ゲノムサイズは 152Kb と大きく、1 型と 2 型は塩基配列上、70%以上の相同性がある。ウイルス粒子は直径 100 nm 前後のカプシドが感染細胞の核内にみられ、核膜で出芽し被膜（エンベロープ）をもった径 200 nm 前後の粒子が細胞質内と外部にみられる（写真 1）。ウイルス粒子像はヒトヘルペス群ウイルスにほぼ共通であるが、付随した構造物の存在や粒子形態像が電顕的に型別に役立つことがある。HSV は水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)とともに α ヘルペスウイルスに属し、その感染動態には類似するところがある。接触等の初感染で皮膚粘膜病変を起こし、その後知覚神経節に潜伏感染し、ヒト宿主の状態が変化（免疫低下やストレスなど）することによって再活性化するという特徴をもつ。ウイルスの宿主域は VZV よりも広く、全身感染を起こした場合は種々の細胞に感染する。

F. 診断

性器ヘルペスウイルス感染症の臨床診断は、初期病変以外は困難ではない。単発や数個の病変をみる初期では診断に迷うこともある。その場合、血清診断よりは病原診断のほうが有益である。病原診断にはウイルス分離、特異抗原の検出、PCR 法がある。血清型別が容易に行え、ウイルス分離ができれば抗ウイルス剤に対する感受性検査も可能となる。わが国では少なくとも 60%以上のヒトが感染しているので、血清診断は臨床的価値は低く、実際、役立たないことが多い。しかし血清検体として採取しておくことも必要である。

G. 検査

一般的に、ウイルス感染診断には血清抗体の検討、ウイルス分離、ウイルス抗原および核酸の検出が使われている。血清抗体価は 2 週間程度の間隔をおいたペア血清で診断するため、時間を要し、ウイルス感染宿主の生体反応をみるという点で間接的診断である。ウイルス分離はコッホの原則にのっとり基本的なものであり、種々の有用性があるが、2－7 日間を要し、初期病変やより後期病変では感度が悪い。迅速診断という観点ではウイルス抗原の検出や核酸の検出は有用性が高い。しかし核酸の検出は、contamination に由来する偽陽性ないし手技上の偽陰性の問題や、感染性病原体でなく単に核酸を検出しているだけなので、陽性の場合でも病因的意義に関して問題が多い。ウイルスが盛んに増殖しているような皮膚粘膜病変の診断には、ウイルス抗原の検出やウイルス分離が適当であるが、病変に対し間接的な検体である髄液や量の限られる前房水や硝子体等の検体では、ウイルス核酸を PCR 法で検出するのが实际的で有用である。



(写真1. HSV-1 感染 Vero 細胞の電顕写真)

右下が細胞の核で、左上が細胞質と細胞外になる。核内には直径 100 nm のヌクレオカプシドが集簇してみられ、細胞質内にはウイルス被膜をかぶった粒子が、そして細胞外には成熟したヘルペス型ウイルス粒子（直径 200 nm）が認められる。ウイルスが核膜で出芽するのがみられる（矢印）。

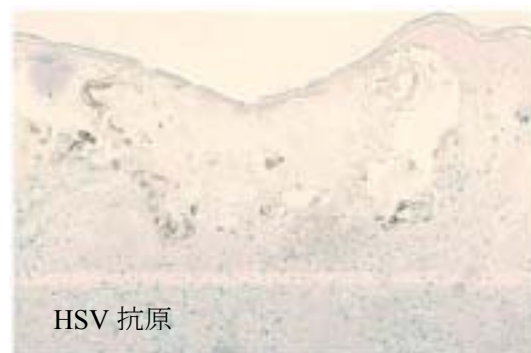
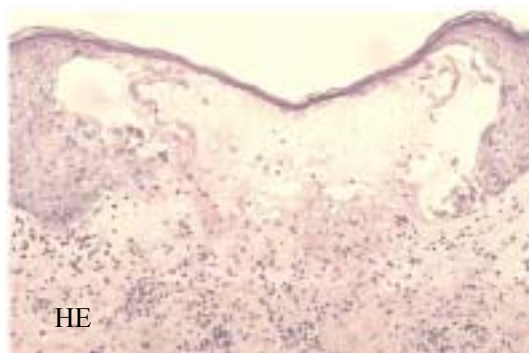
（２）検査に関する一般的注意

１）検査材料の採取

病変部から直接組織、感染細胞、ウイルスを採取し検査に供するため、無菌的に採取することが望ましい。ただし患部を採取直前にエタノール消毒するとウイルスが不活化され分離することが出来なくなることがある。ウイルスは細胞膜由来の被膜をもつからである。

表皮では角化層があるため水疱が形成される。水疱病変の場合、感染細胞は水疱蓋と水疱底ないし水疱を取り囲む扁平上皮細胞（表皮細胞）に存在し（写真２）、ウイルス粒子は水疱液内に存在するので、1)水疱蓋と 2)水疱内容液および 3)水疱蓋を取った後の病変部を滅菌生食水で浸した綿棒等で擦過して感染細胞を採取し、1 ml 以下の少量の滅菌生食水等に浸す。表皮では水疱が破れたあとのびらん、潰瘍では病変部、特に辺縁部を擦過する。一部はスライドガラスに細胞塗抹標本を作製し、アセトンで 10 分間固定し、ウイルス抗原の検出に用いる。直ちに検討しない場合は-20℃ ないし -80℃ で凍結保存する。ウイルス核酸の抽出にはそのまま直ちに凍結保存するか、細胞組織を可溶化するための液に入れる。もちろんウイルス分離用の検体からでも可能である。体腔液（髄液など）はそのまま凍結保存するか、量が多い場合は、遠心して細胞成分やウイルス粒子を集める。

生検ないし剖検組織は、通常の pH7.4 前後の 10%緩衝ホルマリンで固定し（一週間以内が望ましい）、パラフィン包埋する。形態学的診断とともに、免疫組織化学や *in situ* hybridization 法でウイルス抗原やウイルスゲノムを検出することができる。最近では病理切片でも免疫組織化学的に型別が可能である。また良好に処理されたものであれば、パラフィン切片から PCR を行うことが可能である。



（写真２）HSV 皮膚水疱の組織所見。左は HE 染色標本で表皮内水疱が形成されている。真皮上層に炎症性細胞浸潤がある。右は免疫組織化学染色標本で、HSV 抗原は表皮細胞内にのみ存在する。ウイルス抗原存在部はウイルス検出材料となる。

２）検査材料の輸送

単純ヘルペスウイルスはバイオセーフティレベル 2 の病原体で、通常の臨床検体の取り扱いと同じである。病変部から採取した擦過標本は少量の滅菌生食ないし PBS に浸したまま滅菌チューブにいれ、低温で搬送する。スメアも同様である。WHO では 3 重包装が推奨され、わが国の郵便（ゆうパック）でも同じである。直ちに検査しない場合は-20℃ ないし -80℃ で凍結保存するが、後者が望ましい。

3) 検査の進め方（図1）

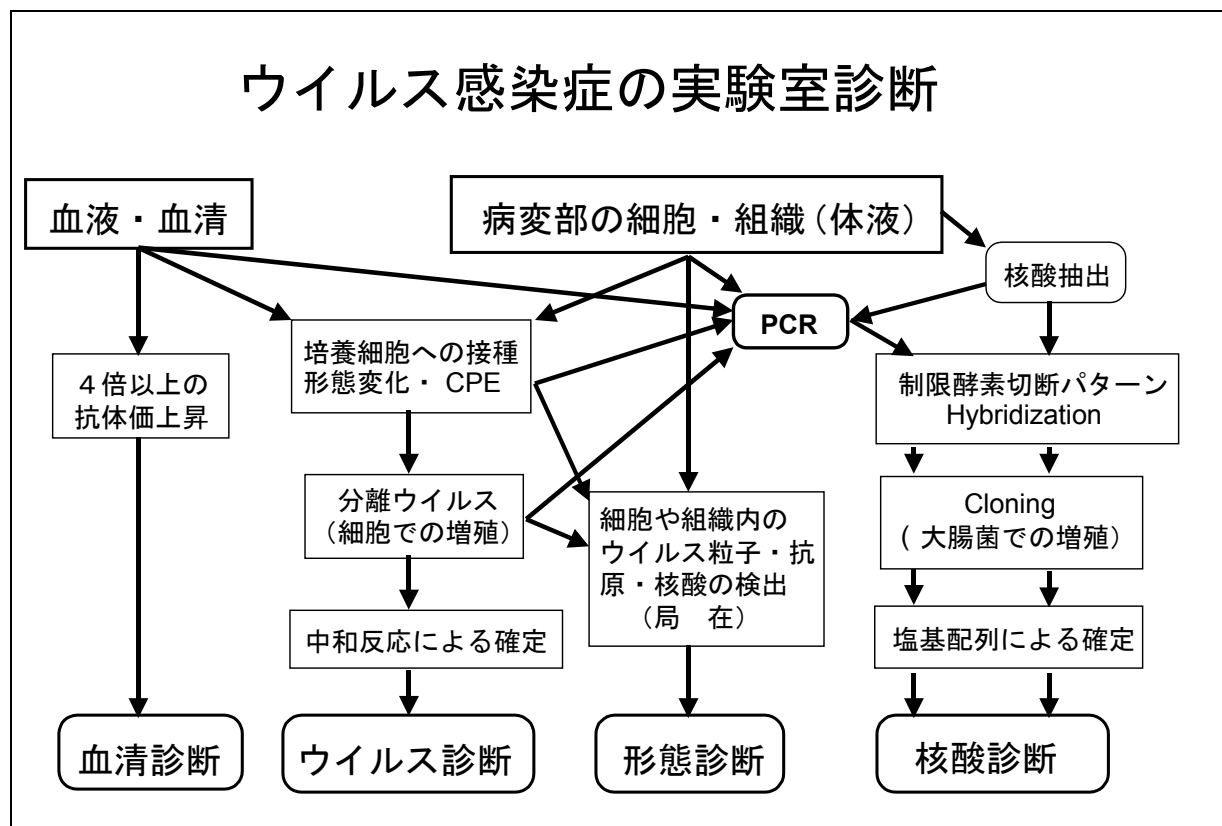
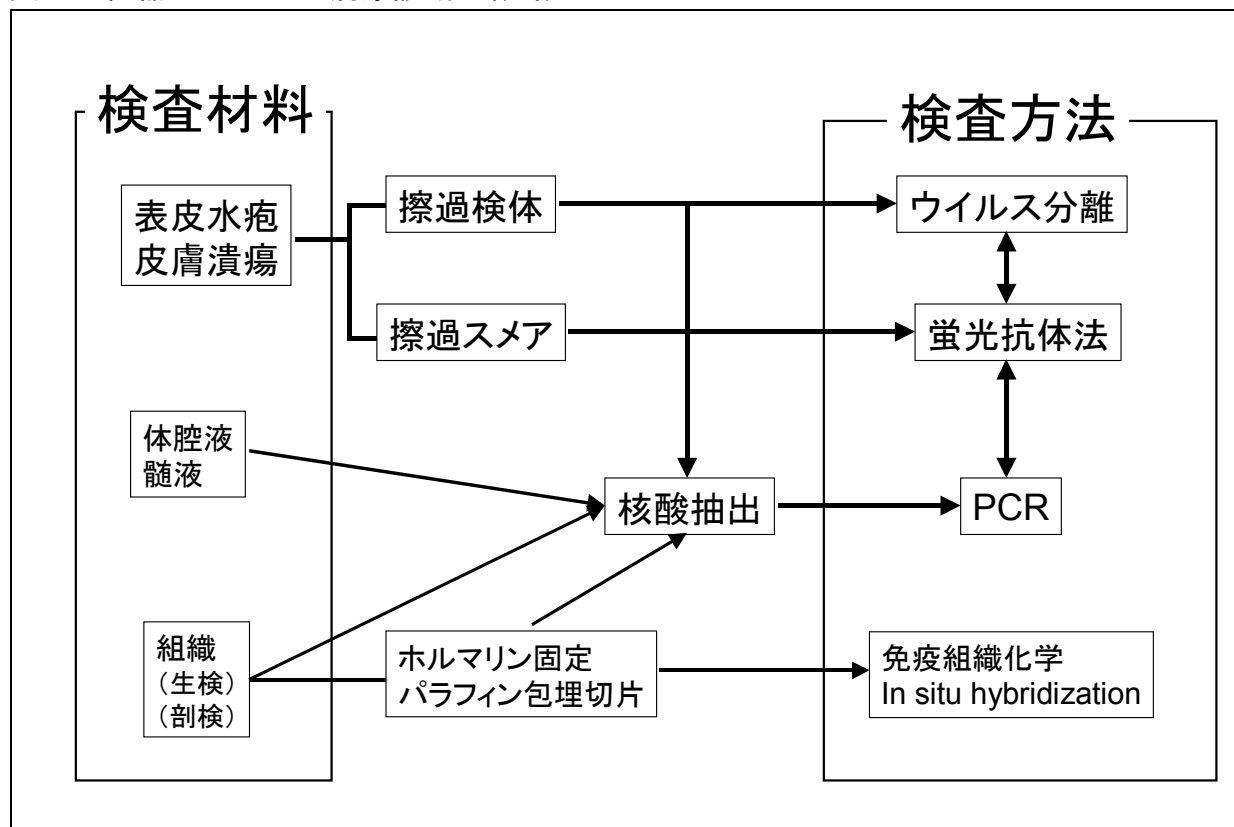


図2 性器ヘルペスの病原診断の概略



4) 検査の判定（感染症法にもとづく診断基準）

性器ヘルペスウイルス感染症の報告基準は臨床診断が中心で、性器や臀部にヘルペス特有な有痛性の単発ないし多発する小さい水疱あるいは浅い潰瘍性病変を認め、かつ病変部の HSV 抗原が陽性のもので、血清抗体のみ陽性のものは除外する。

表 1 単純ヘルペスウイルス患者検体の採取法および検索法

患者検体	検体成分	検索法	保存法
血液	血清	補体結合反応(CF)抗体、ELISA、中和抗体	-20℃
	血球	通常は必要なし	
皮膚粘膜	水疱内容	ウイルス分離	-80℃
	水疱蓋、水疱底	細胞スメアでのウイルス抗原検査	アセトン固定後 4 ~ -20℃
		ウイルス核酸の PCR による検出	-20 ~ -80℃
体腔液		ウイルス分離	-80℃
		ウイルス核酸の PCR による検出	-20 ~ -80℃
組織	感染細胞	核内封入体(Full 型、Cowdry A 型)免疫組織化学 In situ hybridization ウイルス核酸の PCR による検出	ホルマリン固定パラフィン包埋

（3）検査方法

（ア）病原体分離（分離法、形態、染色、血清型等）

病変からウイルスを分離同定することは感染症診断の基本であり、分子生物学的手法が盛んになってきた昨今も決してその重要性は失われていない。というのは、病変が感染性病原体によることが証明できること、および血清型別を含め、抗ウイルス剤への感受性など病原体の性状をさらに詳しく調べられるからである。水痘帯状疱疹ウイルスはヒト細胞にしか感染しないが、単純ヘルペスウイルスは宿主域が広くマウス等の動物にも感染しうる。また VZV はおもに感染細胞内に存在し、HSV は cell free ウイルスとして細胞外の体液等にも存在する。ウイルスの細胞内一段増殖は HSV では 8 時間と早く、病変部から採取した検体を培養細胞に接種すると、多くは翌日に細胞変性効果(cytopathic effect; CPE)が出現し、ウイルスを分離することができる。HSV の分離には Vero 細胞を、VZV には HEL 細胞を使うのが原則である。後者の場合、検体内のウイルス量にもよるが、最低 1-3 回の盲継代が必要であるが、HSV の場合は通常必要がない。ウイルス同定と型別は市販のモノクローナル抗体で行うのが一般的となっている。

ウイルス分離（図3）

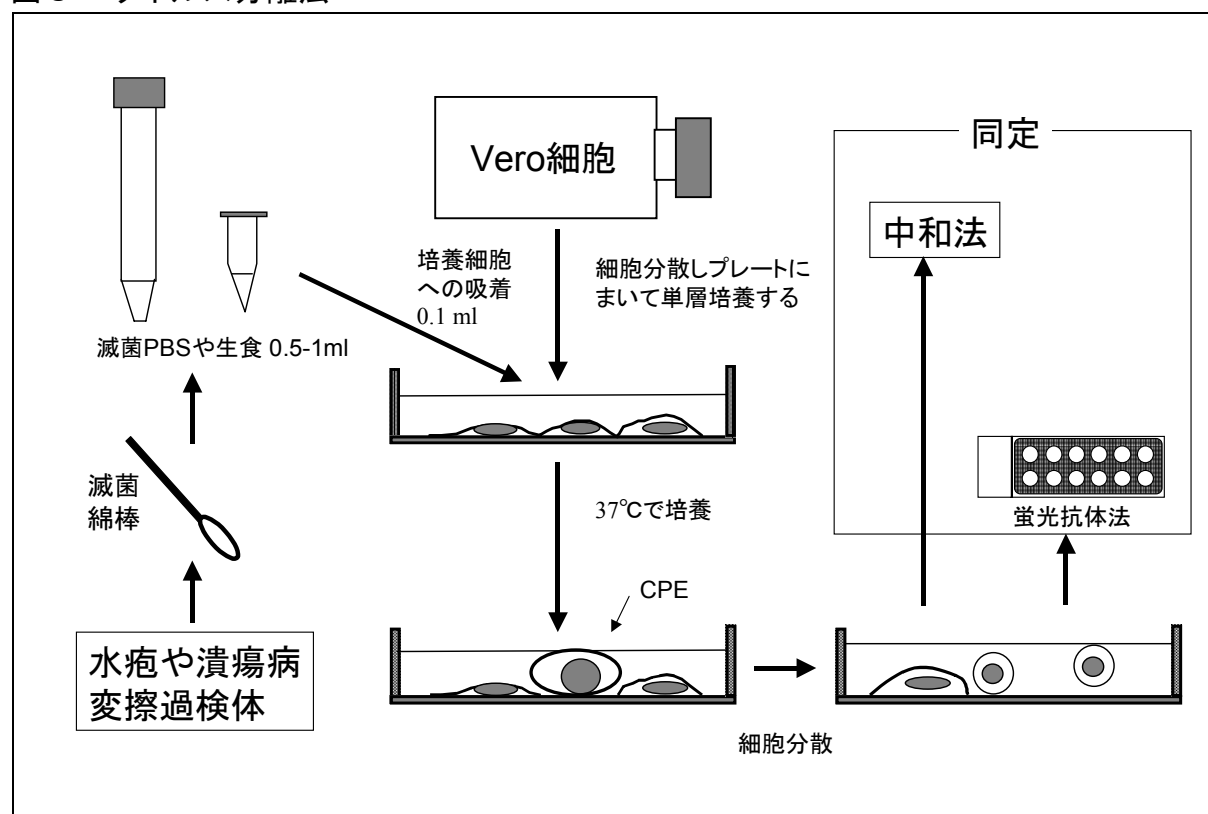
<必要な器具、試薬>

- ・ 感受性細胞：Vero 細胞が一般的だが、ほかに GMK、RK13 ないし PRK(ウサギ腎初代細胞)などが使われる。
- ・ 培地：Eagle MEM が基本だが、細胞によって適切なものを使用する。増殖培地は 10% FCS、維持培地は 2% FCS とし、ほか抗生物質、必要ならファンギゾンを加える。
- ・ 他試薬：細胞分散用トリプシン、PBS、EDTA
- ・ 培養器具：細胞増殖用には 25-75cm² の T フラスコ、分離用には 6-24 well plate。
- ・ 他の器具：スライドガラス（スポットスライド）

<方法>

1. 検体の前処理：単純ヘルペスウイルスは cell-free になるので、検体が細菌や真菌に感染している可能性がある場合には、事前に増殖培地あるいは 0.1%PVP（ポリビニールピロリドン）液で前処理した 0.45 μm のフィルターを通す。擦過検体の場合はそのまま使用することが多い。組織検体の場合は 10%乳剤を適当量のケイ砂と維持培地で作製する。
2. 培養細胞への接種：6-24 well plate に培養した細胞を PBS で 1 回洗浄する。つぎに単層培養細胞の表面積によるが、通常 100 μl 程度の検体を接種する。検体液を培養細胞に良くなじませてから（テイルテイング）、37°C 1-2 時間吸着させる。維持培養液を加えて 37°C の CO2 フラン器で培養する。
3. 観察：翌日から 1 週間以内に細胞が類円形化する細胞変性効果(CPE)が出現するので、毎日観察する。ウイルス量が多い場合は翌日広範な CPE が出現するが、少ない場合は 5-7 日程度かかる。CPE がみられないときや CPE の数が少ないときは、1 週間後に 1:1 で盲継代する。細胞の増殖程度によっては細胞数を減らすこともある。
4. 同定：ある程度の数の CPE が観察されたら、培養細胞表面を PBS で洗浄したのち、トリプシンで細胞分散し、1 ml 程度の維持培地を加えて凍結融解を 3-5 回行い遠心する。上清を分注後保存し、中和法による同定を行う。最近では、モノクローナル抗体による抗原の検出による同定が一般的である。そのためには、培養細胞をトリプシンで分散した後、PBS で一回遠心洗浄後、一部をスライドガラスやスポットスライドに細胞を塗沫し、乾燥後、アセトンで 10 分間固定する(図4)。CPE の出現した培養細胞は PCR 法によるゲノムの検出にも使えるので、分散した細胞は目的に応じて分注保存する。

図3 ウイルス分離法



(イ)抗原検出

病変部擦過標本ないし分離陽性細胞スメア中の単純ヘルペスウイルスを抗原として検出し、同定する。市販されている FITC 等の蛍光標識したモノクローナル抗体を用いる。通常はウイルス被膜を構成する糖タンパク(gD や gG 等)に対する抗体なので、細胞質内に陽性所見が得られるが、ウイルスの NP タンパクの場合は感染細胞の核内に陽性所見が認められる。事前に陽性対照標本や非感染細胞で確認しておく。FITC の蛍光色素は通常の蛍光顕微鏡ではアップルグリーンになるので、全体が淡い緑色を示す場合は非特異所見であり、また蛍光が細胞に一致していることが重要な判定基準となる。判定には形態診断の経験が役に経つ。1%エバンスブルー/H₂O を 1 ml の抗体液に 50 μ l の割合で抗体液に加えておくと細胞の核が赤色になり判定しやすくなる。

蛍光抗体法

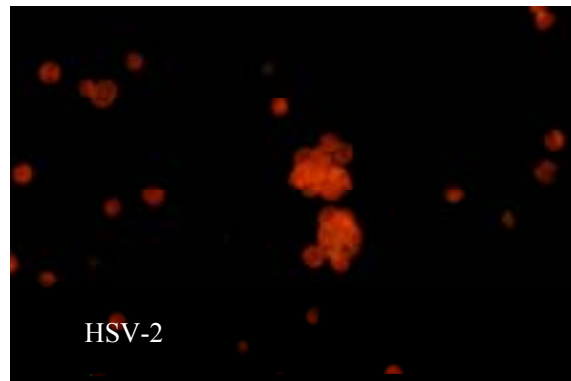
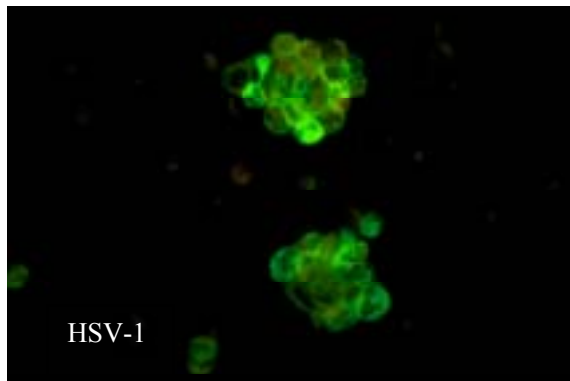
<必要な器具、試薬>

- ・ 単純ヘルペスウイルス 1 型および 2 型に対するモノクローナル抗体 (FITC 等でラベルされたものが使いやすい)
- ・ 固定用アセトン、洗浄用 PBS、封入用緩衝グリセリン (0.5M 炭酸重炭酸緩衝液ないし PBS)
- ・ スライドガラス (4 穴のスポットスライドが使いやすい)、反応用湿潤箱、染色バ

ットと染色カゴ

<方法>

1. 細胞スメア（塗沫標本）の固定：標本は十分に乾燥させ、アセトンで 10 分間固定する。アセトン固定により感染性を消失させ、また感染細胞の細胞膜を抗体が通過しやすくなる。アセトン固定後はすぐにアセトンが消失し乾燥するので、そのまま抗原抗体反応を行うか、あるいは 25 枚入りプラスチックスライドボックスにいれ、箱をビニールテープで密閉したのち、-20℃ で凍結保存する。この凍結保存スメア標本は 10 年以上使用に耐えるので、陽性ないし陰性対照としても使うことができる。
2. 抗体の反応：通常は 4 種類の細胞を用意する。つまり単純ヘルペスウイルス 1 型、2 型、水痘帯状疱疹の抗体、そして PBS を反応させるからである。この方法により血清型別のみならず、初期病変では判別しがたい水痘帯状疱疹との鑑別が可能となる。PBS は抗体反応の陰性対照として使う。もし陽性対照が用意されていれば、スポットスライド上、同じパターンで抗体をかけるといい。4 種類の検体細胞が用意できないときは、パップペン等で 4 箇所に分けるとよい。抗体液は適宜 PBS で希釈し 30-50μl 程度を使用する。スライドガラスを湿潤箱にいれ、37℃ で 45 分から 1 時間反応させる。直接法の場合は、PBS で 3 回洗浄したのち、緩衝グリセリンで封入するが、間接法ではつぎに FITC 標識抗マウス IgG 抗体等の二次抗体を同様に反応させ、洗浄してから封入する。
3. 蛍光顕微鏡による観察：細胞の核あるいは細胞質に一致したアップルグリーンの蛍光を陽性とする。証拠となる写真を撮影しておく。



(写真 3)

型特異的モノクローナル抗体による HSV の検出と型同定。ウイルス分離培養細胞スメア標本では、1 型特異的なモノクローナル抗体で陽性だが、2 型特異的モノクローナル抗体では陰性。抗体はウイルスの糖タンパクに対するもので、ウイルス抗原は細胞質に陽性である。抗体にはエバンスブルーを加えてあるため、細胞の核が赤色に染まる。もちろん水痘帯状疱疹ウイルス抗体や PBS では陰性である。

図4 ウイルス分離同定用抗原スライドの作製法

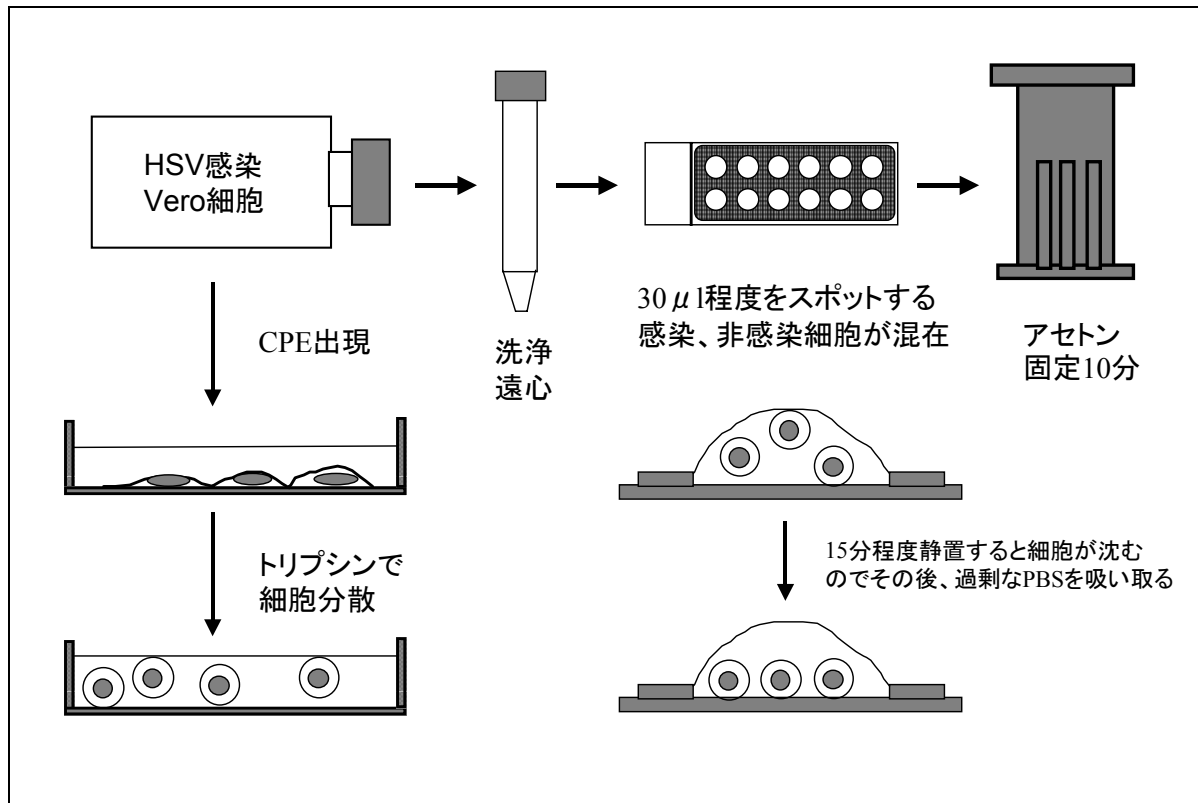
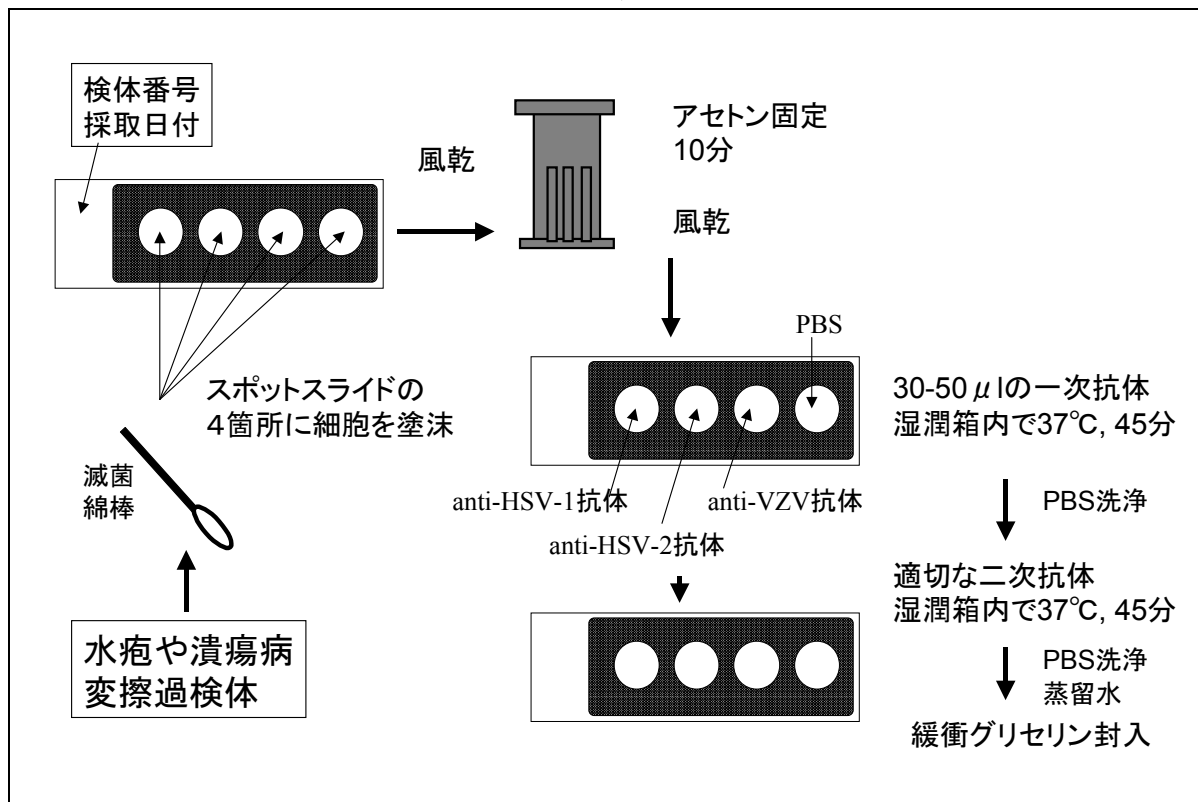


図5 ウイルス抗原検出用擦過スミアの作製法



(ウ) 抗体検出

CF 法、中和抗体法、ELISA 法があるが、実際は診断上、役に立たないことが多いので割愛する。成書を参照されたい。なお、血清型別には IgG を標的とした ELISA 法が有用である。

(エ) PCR 法による HSV DNA の検出

(1) DNA 抽出法

通常は、Lysing buffer と proteinase K で検体を可溶化し、Phenol / Choroform / isoamylalcohol で除蛋白を行い、エタノール沈殿により DNA を抽出後、PCR 反応に用いる。蛋白等の PCR 反応阻害物質の除去が必要である。検体量が多い場合は上記の一般的 DNA 抽出法で十分目的を達するが、髄液や眼液など少量検体の場合は、5-10 分間の boiling のみでも増幅が可能であるが、その検出効率は良いとはいえない。最近では市販の DNA 抽出キットを使うことにより、PCR 反応に最も適した DNA を抽出できるようになってきた。予算が許せば、これら市販キットを使うことが望ましい。DNA 抽出や反応液準備の際の carry-over などによる contamination に注意が必要であることはいうまでもない。

(2) PCR 法

現在までに多くのプライマー配列が報告されている。HSV の塩基配列のうち、糖蛋白 gB, gC, gG, gD や、DNA polymerase, DNA-binding protein をコードする領域を PCR 反応の target にすることが多い。これらはウイルス構成蛋白であるため、塩基配列の変化が少ないという理由による。発表されているプライマーには HSV-1 と-2 の両者をともに増幅するもの、型特異的に増幅する 2 種があり、型別には制限酵素切断パターンやプローブによる Southern hybridization、ELISA 法を応用したものさらに塩基配列の決定で行うものなどがある。型共通プライマーで増幅し、制限酵素切断パターンで型別をするのがもっとも簡便で一般的である（表 2）。まれに制限酵素切断パターンが異なることがあるので 3 種以上の制限酵素を用いることが望ましいが、そのようなプライマーは現在までに報告はない。従来、ウイルスの同定や型別は中和抗体により行われてきたが、PCR 法による検出では単に予想されるサイズのバンドの検出のみならず、本来その塩基配列の特異性により同定や型別が行われるべきである。

抗ウイルス剤が治療に用いられるようになり、脳炎やぶどう膜炎等では感染ウイルス量を PCR 法で調べるが行われている。病気のモニタリングに効果的である。一般的には標準塩基配列を同じ条件で増幅し標準曲線を求めてから定量するものや競合 PCR 法が使われる。しかしその測定誤差が小さくないことから、最近では real time PCR 法などにより、増幅特異配列の蛍光強度で定量するものが報告されている。今後 HSV-1 と-2 の型別とともにウイルス量の定量が行われて、診断だけでなく病変の評価や予後判定に使われていくと考えられる。また、検討対象の病原体として、HSV だけでなくほかのウイルスないし病原体が原因となる場合も少なくなく、少なくとも VZV は同時に検討したい。最近、Multiplex PCR として多種のウイルス等の病原体を同時ないし数本に分けて検出する方法が報告されている。

PCR 法

通常の PCR 法と同様に行う。

<必要な試薬、器具>

- DNA 抽出キットあるいは水（緩衝液）飽和フェノール、クロロフォルム、イソアミルアルコール、70%エタノール、100%エタノール、プロテナーズ K、
- プライマー、PCR キットあるいは Taq DNA ポリメラーゼ、緩衝液、dNTPs
- DNA ラダーマーカー、アガロース、泳動バッファー、サンプルバッファー、エチジウムブロマイド
- 微量冷却高速遠心機、分光光度計、サーマルサイクラー、電気泳動装置、写真撮影装置、マイクロピペット、フィルター付きチップ、1.5 ml エッペンドルフ型チューブ、0.2 ml PCR チューブ

<方法>

1. DNA の抽出：検体の種類によって抽出法が異なる。基本的には lysing buffer と Proteinase K で 37-55°C, 1-16 時間で可溶化し、検体と等量の phenol を加え 7 分混合 1 回、つぎに Phenol / Chloroform -isoamylalcohol (24:1)を(1:1) 1 回 3 分、そして Chloroform-isoamylalcohol (24:1) 1 回 3 分の処理を行う。よく混合したのち遠心し、常に上部の水相をとって次の液を加え、良く混合したのち、遠心して水相を分離する。この方法にもいろいろな種類があるが、白濁した中間層を 1 回目は取り、2 回目はとらない、3 回目は絶対にとらないことが大事である。中間層には蛋白や脂質が存在するからである。つぎに 1.5 倍量の 100%ethanol を加え混合したのち、-80°C に 30 分放置、12,000rpm で 30 分遠心する。上清をすべて吸い取り、70%ethanol で白いペレットを洗浄し、乾燥させる。適量のオートクレーブした水で溶かす。液状検体の場合は、感度は低下するが、可溶化せずに boiling のみでも検出できる。細胞や組織の場合は、通常は上記の方法で行う。市販の抽出キットは簡便でよいので、キットに添付された方法に従って操作を行う。

<可溶化バッファー ; lysing buffer, PK buffer>

PK buffer; 25mM Tris pH7.5, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 0.5% SDS

[5xPK buffer]

2M Tris pH7.5	3.25
5M NaCl	5
0.25M EDTA, pH8.0	10
10% SDS	12.5
DDW	19.25 / 計 50 ml

[Proteinase K (Behringer)]

10 mg/ml of DDW
dissolve & divide & store at -80°C

2. DNA 量の定量：一部をとり、分光光度計で OD260 と OD280 の吸光度を測り、OD260 の吸光度から DNA 量を計算する。OD260/280 比は 1.8 になる。
3. PCR mixture の作製：最近では PCR キット付属のバッファーを使う。
 - 5x PCR buffer (ex. 50mM KCl, 10mM Tris HCl(pH 8.4), 1.5mM MgCl)
 - 200 µM each dNTP
 - 1 µM each primer
 - Taq polymerase 1-4 U

- 26–100 µl の反応液となるように準備する。検体数分を作り、PCR チューブに分注する。この作業は特定の専門場所（部屋あるいはキャビネット）で行う。
4. サンプル DNA：サンプル DNA はおよそ 100 - 500 µg を使う。3 で使った場所と異なる場所でサンプル DNA を PCR チューブにいれる。
 5. サーマルサイクラー：どんな機種でも構わないが、増幅設定条件が守れることが大事。
 6. 電気泳動：増幅 DNA を 2-10 µl とり、色素入りのサンプルバッファーで混合したのち、アガロースないしポリアクリルアミドゲルで 1 時間泳動する。100bp DNA マーカーを必ず同時に泳動する。
 7. UV 照射により写真撮影する。
 8. 型別を行う場合は増幅サンプルを適量とり、制限酵素とバッファーを加えて 37°C, 1 時間以上反応させ、同様に電気泳動する。その際に未切断増幅検体も同じゲルで電気泳動する。

表 2 単純ヘルペスウイルスの PCR 法のプライマー

1. 型共通プライマー(gB 領域)

Lakeman et al. J Infect Dis 1995, 171:857

F	GCATCGTCGAGGAGGTGGAC
R	TTGAAGCGGTCGGCGGCGTA
Probe	GGCGACTTTGTGTACATGTCCCCGTTTTACGGCTACCGG

増幅条件：95°C 45s, 62°C 45s, 72°C 45s (3 s extension), 40 cycles

増幅 DNA 断片のサイズ：148 bp

検出感度：25-18,000 copy/µl

型別法：BsrI: HSV-1(84, 64 bp), HSV-2(non-cut)

HhaI: HSV-1(128, 20 bp), HSV-2(126, 22 bp)

2. 型共通プライマー(polymerase 領域)

Kimura H et al. J Infect Dis 1991, 164:289-293

Ando Y et al. J Med Virol 1993, 41: 170-173

PR-1	F	CAGTACGGCCCCGAGTTCGTGACCGGG
PR-2:	R	GGCGTAGTAGGCGGGGATGTCGCG
	Probe	ATGGTGAACATCGACATGTACGG

増殖条件：96°C 1 min, 67°C 2 min, 72°C 3 min, 35 cycles

増幅 DNA 断片のサイズ：330 bp

検出感度：10²-10⁵ copy/ml, 0.3 pfu

型別法：Bg/II: HSV-1(77, 253 bp)、XhoI: HSV-2(89, 241 bp)

(4) 引用文献

1. 日本医師会編 感染症の診断・治療ガイドライン。医学書院、1999 年。
2. 川名 尚、倉田 毅、佐多徹太郎ほか：FITC 標識モノクローナル抗体（MicroTrak Herpes）による単純ヘルペス感染症の診断。感染症誌 1;1030-1037,1987.
3. 佐多徹太郎ほか。ウイルス感染症の臨床と病理。青山友三、南谷幹夫、倉田 毅編。医学書院 1991 年。
4. DNA 診断法。金原出版。
5. Read SJ, Kurtz JB: Laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system by using a single multiplex PCR secreting assay. J Clin Microbiol 1999, 37: 1352-1355.
6. Kimura H, Futamura M, Kito H, et al.: Detection of viral DNA in neonatal herpes simplex virus infection: Frequent and prolonged presence in serum and cerebrospinal fluid. J Infect Dis 1991, 164:289-293.
7. Ando Y, Kimura H, Miwata H, et al.: Quantitative analysis of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid of children with herpes simplex encephalitis. J Med Virol 1993, 41: 170-173.
8. Domingues RB, Lakeman FD, Mayo MS, et al.: Application of competitive PCR to cerebrospinal fluid samples from patients with herpes simplex encephalitis. J Clin Microbiol 1998, 36: 2229-2234.
9. 林浩三郎：検査総論。ヒトヘルペスウイルス。「眼感染症クリニック」臼井正彦、大橋裕一、田川義雄、秦野寛、林浩三郎編、医学書院、2000 年。

(5) 検査依頼先

全地研が対象

(6) 執筆者一覧（コメントをもらったヒトも含める）

佐多徹太郎（感染研感染病理部）tsata@nih.go.jp TEL:03-5285-1111

林皓三郎（神戸市環境保健研究所）

倉田 毅（感染研副所長）

大分県衛生環境研究センター

群馬県衛生環境研究所

富山県衛生環境研究所

勢戸和子、小田美光（大阪府立公衆衛生研究所）

長野県衛生公害研究所

平位芳江（川崎市衛生研究所）

栃木県保健環境センター

尖形コンジローム

尖 形 コ ン ジ ロ ー ム

目 次

I. 尖形コンジロームの概説

1. ヒトパピローマウイルス検査に関する一般的注意事項
2. 検査材料の採取、輸送および保管
 - 1 検査材料の採取
 - 2 検査材料の輸送

II. 検査の進め方

病原学的検査

1. 生検体組織からDNAの抽出方法
- 2－1. ポリメラーゼ・チェインリアクションDNA増幅法による解析
(Polymerase chain reaction DNA amplification, PCR)
- 2－2. サザンブロットハイブリダイゼーション法による解析
(Southern blot hybridization)
3. 組織内ハイブリダイゼーション法による解析
(in situ hybridization)

III. 尖形コンジロームの診断基準

IV. 引用文献

V. 検査の相談窓口

VI. 執筆者一覧

I. 尖形コンジロームの概説

尖形コンジロームは、ヒトパピローマウイルス（ヒト乳頭腫ウイルス、HPV）の感染により、性器周辺に生じるイボ状腫瘍病変で、臨床視診により診断される。確定診断は病理組織検査による。感染症発生動向調査のために、性感染症としてSTD定点から報告される事になっている。医師の報告のための基準では、「男女ともに、性器及びその周辺に淡紅色又は褐色調の乳頭状、又は鶏冠状の特徴的病変を認めるもの」となっており、病原体検査は要求されていない。また、「検討結果が予防対策に影響しないと考えられるため」と言うことで、病原体サーベイランス対象疾患とはなっていない（1）。そのため、尖形コンジロームの検査依頼が地方衛生研究所に来ることはほとんどないと考えられるが、ヒトのウイルス性良性、悪性腫瘍の貴重なモデルであり、ヒトパピローマウイルスの検査法は不可欠である。

尖形コンジロームの原因となるのは主にHPV6型とHPV11型であり、ときに悪性型のHPV16型や皮膚型のHPV1,2型等の単独ないし混合感染が見られることもある。

尖形コンジローム自体は、良性腫瘍であり自然治癒もあるが、感染するHPVによっては、時に悪性化（癌化）する事もあるので注意を要する。

治療法として、電気焼灼や液体窒素凍結もあるが、病原体検査のためには外科的切除組織が必要となる。

1. HPV検査に関する一般的注意事項

HPV検査はP2 実験施設でBSL2の取り扱い基準に従い行う。

ヒトパピローマウイルスは培養することが出来ない。ウイルス学的検査は、尖形コンジロームの組織よりDNAを抽出し、その中にHPV-DNAがあるかどうか、あるとすればどの型かを検査する。そのほかに組織標本を用いてのin situ hybridization を行う。従って、手術的に摘出した組織は速やかに凍結保存や組織固定をする必要がある。

また、多様なHPV型はヒトの存在するあらゆる環境に遍在する。従って、高感度な検出法を使用する場合は検体へのHPV汚染に特に注意する。

2. 検査材料の採取、輸送および保管

1. 検査材料の採取

組織検体は二分割して一部をホルマリン固定し、残りの一部をそのまま1.5mlのポリエチレンチューブに入れ-80℃で保存する。前者を通常の病理組織検査に用い、後者をHPV検査に使用する。

2. 検査材料の輸送

検体はドライアイス存在下で凍結状態で輸送する。また、可能であれば、未染のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を数枚室温で送付する。

I I. 検査の進め方

検査順序

1. 生検体組織からDNAの抽出
2. 種々のHPV検出法によるHPV型の同定
3. パラフィン切片を用いたHPV DNAの組織内局在の検索

(なお、各検査に必要な試薬、器材の入手先等詳細については、分子生物学の参考書を参照してください。)

病原学的検査

HPVは通常のウイルスと異なり、血清型ではなく遺伝子型として分類されている。即ち、約8,000塩基対の二本鎖環状DNA遺伝子の一部「L1遺伝子」の塩基配列の相同性により86種の遺伝子型に分類されている(2002年2月現在)。また、ほとんどのHPV型の全長遺伝子が解析されていて、データベースに登録されている。HPV型同定にはこの情報が必須である。

1. 生検体組織からDNAの抽出

組織検体の細切は行わず、検体の入ったポリエチレンチューブにプロテナーS溶液を直接加え加温処理する。組織が溶解した後、フェノール、クロロホルム処理による除蛋白を行い、エタノール沈澱によりDNAを回収する。得られたDNAは滅菌蒸留水で約1 µg/ µlに調整し4℃で保存する(2)。

2-1.ポリメラーゼ・チェーンリアクションDNA増幅法(polymerase chain reaction DNA amplification : PCR法)

少量の検体DNA(10-100 ng) を使用して行える、高感度なHPV検出法である。多様なHPV型を同時に検出する為、種々のPCR法が開発されているが(3～5)、各々HPV型特異の検

出感度を示す(6, 7)。したがって、複数のPCR法での検索が望まれる。

表-1 に性器関連HPV型のL1領域を増幅する代表的な3種のPCR法を示した。増幅巾は140-450 bpとかなりの違いがあり、増幅条件も異なる。原法に忠実に乗っ取った使用が肝要である。また、これらの方法で増幅が認められない場合は皮膚関連HPV型を対象としたPCR法での検索が必要となる(8)。

表—1 性器関連HPV型検索用のPCR法

PCR名	プライマー	塩基配列(5' -3') *	増幅DNAの長さ	増幅条件** (文献)
MY	MY11	GCMCAGGWCATAAAYAATGG	約450 bp	95℃1分, 55℃1分, 72℃2分 (40回) (2)
	MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC		
LC	L1C1	CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTTT	約250 bp	95℃1.5分, 48℃1.5分, 70℃2分 (40回) (3)
	L1C2	TACCCTAAATACTCTGTATTG		
	L1C2m	TACCCTAAATACCCTATATTG		
GP	GP5+	TTTGTACTGTGGTAGATACTAC	約140 bp	94℃1分, 40℃2分, 72℃1.5分 (40回) (4)
	GP6+	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC		

*M=A+C, R=A+G, W=A+T, Y=C+T

**denaturation, annealing, chain elongation (cycles)

HPV型判定：増幅されたDNAのHPV型の判定は、従来、主に型特異ハイブリダイゼーションや型特異制限酵素切断パターンにより行われてきた。しかし、80種にのぼるHPV型を区別するには何れの方法も正確でなくまた実用にそぐわない。最も簡便かつ正確な方法は増幅

DNAの塩基配列を調べ、登録されている全てのHPV型と比べて型判定を行うものである。その際、検体に存在する複数のHPV型が同時に増幅され塩基配列が解読出来ないことがある。その場合は増幅DNAをクローニングして数個のクローンの塩基配列を調べることにより複数のHPV型を同定出来る。

こうして検体中のHPV型が同定されるが、PCR法はあくまでHPV遺伝子の一部の存在を知る方法である事を銘記すべきである。

2-2. サザンブロットハイブリダイゼーション法 (Southern blot hybridization: SBH法)

検体DNA (0.5 - 5 μ g) を制限酵素処理しアガロースゲル電気泳動後、ニトロセルロース膜にトランスファーして、標識したクローンHPVDNAとハイブリダイゼーションを行ってHPV型を同定する方法である。

HPV型の判定と同時に検体に存在するHPV遺伝子の長さ、コピー数も知ることが出来るので病因HPV型を知る最も信頼出来る方法である。しかし、アイソトープを要することからここでは触れず、参考文献を示すにとどめる(9)。

3. 組織内ハイブリダイゼーション法 (in situ hybridization: ISH法)

ホルマリン固定パラフィン包埋組織の切片上で標識クローンHPVDNAとハイブリダイゼーションを行い、組織内のHPVDNAの局在を調べる方法である。

病理組織学的技法を要する為、通常の検査にそぐわない。しかし、特に、PCR法で複数のHPV型が検出された場合はこれら全てのHPV型を用いたISH法の検索によって、病因HPV型を特定できる。その為には対象HPV型の全クローンが必要である。ISH法の詳細は文献10を参照。

ⅢⅢⅢ．尖形コンジロームの診断基準

感染症新法に基づく医師からの届出報告のための基準

診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ、以下の基準を満たすもの。

- ・ 男女ともに、性器及びその周辺に淡紅色または褐色調の乳頭状、または鶏冠状の特徴的病変を認めるもの。

I V. 引用文献

1. 感染症新法による感染症発生動向調査（サーベイランス）事業の概要.
病原微生物検出情報 20(4), 9-12, 1999.
2. Matsukura, T., and M., Sugase.: Relationships between 80 human papillomavirus genotypes and different grades of cervical intraepithelial neoplasia: Association and causality. Virology, 283, 139-147, 2001.
3. Manos, M.M., Ting, D.K., Wright, A.J., Lewis, T.R., Broker, T.R., and S.M. Wolinsky.: The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. Cancer Cells 7, 209-214, 1989.
4. Yoshikawa, H., Kawana, T., Kitagawa, K., Mizuno, M., Yoshikura, H., and A. Iwamoto. : Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. Jpn. J. Cancer Res. 82, 524-531, 1991.
5. De Roda Husman, A.-M., Walboomers, J.M.M., van den Brule, A.J.C., Meijer, C.J.L.M., and P.J.F. Snijders.: The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. J. Gen. Virol. 76, 1057-1062, 1995.
6. Husnjak, K., Grce, M., Magdic, L., and K. Pavelic.: Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. J. Virol. Methods 88, 125-134, 2000.
7. Qu, W., Jiang, G., Cruz, Y., Chang, C.J., Ho, G.Y.F., Klein, R.S., and R.D. Burk.: PCR detection of human papillomavirus: Comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. J. Clin. Microbiol. 35, 1304-1310, 1997.
8. Forslund, O., Antonsson, A., Nordin, P., stenquist, B., and B.G. Hansson.: A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. J. Gen. Virol. 80, 2437-2443, 1999.
9. 松倉俊彦.: サザンブロットハイブリダイゼーション法 臨床DNA診断法、金原出版、926-931, 1995.
10. 岩崎琢也、佐多徹太郎、倉田毅,: in situハイブリダイゼーション法 臨床DNA診断法、金原出版、932-937, 1995.

V. 検査に関する相談窓口

岡山県環境保健センター

小倉 肇

FAX 086-298-2088

e-mail hajime_ogura@pref.okayama.jp

VI. 執筆者一覧

小倉 肇：岡山県環境保健センター

松倉俊彦：国立感染症研究所ウイルス第二部

淋 菌

Neisseria gonorrhoeae

淋菌 *Neisseria gonorrhoeae*

検査マニュアル

目 次

- 1. 淋菌感染症の概説
 - 2. 淋菌感染検査マニュアル
 - 2－1. 直接塗抹検鏡法
 - 2－2. 分離培養法
 - 1) 使用培地
 - 2) 培養法
 - 3) 集落形態・
 - 2－3. 同定法
 - 3. 簡易同定キット
 - 4. 迅速同定キット
 - 5. その他の診断法
 - 6. 薬剤感受性試験
- 図 検査の進め方
- 著者

1. 淋菌感染症の概説

淋病（gonorrhea）は、ヒトを唯一の宿主とする *Neisseria gonorrhoeae* による性感染症（sex-transmitted diseases）であり、動物からは *N. gonorrhoeae* は分離されない。本菌の感染は泌尿生殖器や咽頭に留まらず、血行性に播種し、関節炎・肝炎・心内膜炎・髄膜炎等を起こし、いわゆる血行性淋菌播種（disseminated gonococcal infection: DGI）を呈し得る。DGI は特有の皮疹を伴い、不明熱の原因にもなっている。通常 DGI は、発熱・皮疹・関節炎の3主症状を伴う2次性病変であり、女性では月経開始から7日以内にこのような2次性病変が出現することが多い。皮疹の好発部位は、四肢遠位の関節周囲及び軀幹で、一つの皮疹は4～5日で治癒するが、新生が続くため新旧の皮疹が混在することも特徴となる。関節炎は、膝・足・手・肘及び指趾の関節に発症し、多くは複数の部位が標的になる。淋菌性髄膜炎は尿路生殖器の感染病変が明らかな例が多く、髄膜炎菌性髄膜炎との鑑別が重要である。

淋病は、1999年4月より施行された新しい感染症予防法のもとで、他のSTDと共に四類感染症に分類されている。また、*N. gonorrhoeae* の危険度レベルはレベル2に規定されており、取り扱いにはP2実験室で行う。

2. 淋菌感染検査マニュアル

淋菌が検出される材料としては、急性尿道炎の膿尿、および分泌液、慢性患者では前立腺分泌物、前立腺マッサージ後の排泄尿、膣分泌物などで、DGIの疑いでは血液（特に皮疹からの採取）、膝関節液、咽頭粘液、直腸粘液からも分離検出されることもあり、本菌の感染を念頭に置いて検査を進める。また検出率は検体採取から分離培養までの保存法によって左右されるため、出来るだけ速やかに分離培養を実施することと、保存する場合には専用の採取用スワブ〔輸送培地：チャコール加Amies培地およびStuart培地を基礎としたトラレスワブ（アスカ社）、カルチュレットEZ（BD社）、シードチューブ3号（栄研）〕を用い室温で保存し、5～12時間以内に培地に接種する。24時間保存では4℃保存が望ましい。

2-1. 直接塗抹検鏡法

感染局所の分泌物または初尿沈渣標本では、多数の好中球炎症反応と共に好中球細胞質内に貪食されたグラム陰性の双球菌が認められた場合、本菌の感染を強く推定できる。ただし子宮頸管炎などの頸管粘液および膣分泌物では雑菌が多くグラム染色所見だけでは診断は困難である。しかし、DGI症例での皮疹穿刺で得た血液成分のグラム染色所見は、極めて診断的価値が高い。

なお、グラム染色の後染色にパイフェル液を使用することを推奨する。またレフレルのメチレンブルー単染色法でも容易に診断できるが、尿道炎のうちの非淋菌性、非クラミジア性のものは全体の約1/3を占め、その中の表皮ブドウ球菌性の場合には、診断を間違える可能性があり、可能な限りグラム染色を行う。

2-2. 分離培養法

1) 使用培地

淋菌は他の一般細菌と比較して抵抗力が弱く、かつ増殖力も弱いいため、検体採取後直ちに分離培養を行う。分離培地には非選択培地としてチョコレート寒天培地〔ヘモグロビン、アイソバイタルエックス（BD社、オキシイド）添加〕、ゴノコッカス寒天培地（GC）、選択培地として変法サイアー・マーチ

ン寒天培地（MTM）、ニューヨークシティー寒天培地（NYC）などがあるが *N. gonorrhoeae*（淋菌）の一部には選択培地で発育抑制される菌種があるので、必ずチョコレート寒天培地を併用する。MTM培地は、選択剤としてバンコマイシン、コリスチン、ナイスタチンさらにトリメトプリムを添加、*Proteus* のスウォーミング（遊走）を抑制し臨床材料からの検出を有意に向上させることが出来る。淋菌は取り扱いが難しく採取から培養実施まで注意して取り扱うこと。

2）培養法

培養法にはロウソク培養、炭酸ガス培養器、ガスパックジャー・システムがあるが、通常は炭酸ガス培養器を使用されており、培養条件は5～10%の炭酸ガス環境下で35～36℃、24～48時間培養を行う。施設によってコンパクトなガスパックジャー・システムが便利である。ロウソク培養法は他法に比べ発育支持力が落ちる。至適培養温度は35～36℃で、37.5℃以上になると淋菌の増殖は抑制されるため注意する。

3）集落形態

非選択培地および選択培地での本菌24時間培養集落形態は両者共にピン・ホール状の微小集落で半透明状の光沢のある集落を形成する。48時間培養では1.0 mm～1.5 mm程度の正円、灰白色、半透明、湿潤で光沢のある集落を形成する。MTM寒天培地上の集落は自家製チョコレート寒天培地（加熱血液）と比較して集落が大きい。また初代分離培養菌では大小不同のある集落を認めることがある。集落の性状分析には、GC基礎培地に専用添加剤を加えた型別培地が用いられる。本培地上では、性周期前半に得た女性生殖器分泌液からの分離菌は主として不透明集落を、性周期後半の分泌液及び男性の尿道材料からの分離菌は主として透明集落を形成する。さらに男女とも咽頭粘液及び血液からの分離菌は、透明集落を形成する。

2－3．同定法

分離培養後18～24時間後に必ず観察する。単独集落の形成を認めたら、グラム染色およびオキシダーゼ試験陽性を確認後チョコレート寒天培地に純培養する。培養時間が長くなると集落が変化し、ときに死滅する場合がある。

分離増菌された淋菌の同定は主に生化学的性状により行われ、グラム陰性双球菌、MTM培地発育およびオキシダーゼ反応陽性を確認した後、糖分解試験により行う。淋菌はグルコースのみ分解することで他のナイセリアと鑑別が可能である（表）。

オキシダーゼ反応試験は新鮮な1.0% dimethyl-p-phenylenediamine hydrochloride 水溶液（tetramethyl 誘導体でも良い）を少量疑わしい集落に滴下、陽性菌では数分以内に桃色を呈し、さらに時間がたつと黒色となる。集落が黒色になると菌が死滅するので類似集落または桃色のうちに釣菌、純培養を行う。

糖分解試験は Cystine Trypticase 半流動培地（CTA 培地：BBL、日水）に各糖類を0.5～1.0%になるよう無菌的に添加、これに被検菌を多めに穿刺接種、判定は大気中で35℃、24～48時間後に行う。淋菌はブドウ糖のみを酸化的分解し、酸の産生により培地表面から下方に約1 cm位まで黄変する。培地全体に黄変する場合は汚染を疑い、純培養の確認を行う。

3. 簡易同定キット

① BBL CRYSTAL N/H 同定キット (BD) :

Neisseria sp.、*Branhamella* sp.、*Haemophilus* sp.、*Gardnerella* sp.、*Actinobacillus* sp. などの同定が可能で、新鮮培養菌の McFarland No.3 に調整した菌液をキットに接種、37℃、24～48時間培養後、判定する。菌種名の同定は各性状を数値化されコンピューター・コード番号で検索が出来る。

② ID テスト・HN-20 ラピッド (日水) :

Neisseria、*Haemophilus* などの菌種を McFarland No.4 に調整した菌液を使用し、35～37℃ 4～4.5時間培養後、試薬を添加し、性状判定コード番号により菌種を同定する。

4. 迅速同定キット

・ゴノチェッカーⅡキット (コスモバイオ)

本キットは、病原性ナイセリア属の有する酵素活性パターン之差を発色性基質の色の違いとして発現させることにより、菌種の鑑別を行う。*N. gonorrhoeae* のほか *N. meningitidis*、*B. catarrhalis* の同定が可能で、グラム陰性球菌、オキシダーゼ陽性、MTMに発育が確認された純培養菌を使用する。

5. その他の診断法

免疫学的手法として、淋菌抗原検出 EIA 法、遺伝子診断法として DNA プローブ法等があったが、現在では遺伝子検査の PCR 法 (Polymerase Chain Reaction)、LCR 法 (Ligase Chain Reaction) の2法が診断に用いられている。PCR 診断キットにはアンプリコア STD-1 ナイセリアゴノレア (日本ロッシュ)、LCR 診断キットにはゴノレア・ダイナジーン (ダイナボット社) があり、検出感度は共に 10 cfu/ml と高感度である。DNA プローブ法は DNA ハイブリダイゼーションを利用して DNA を同定する検査法である。PCR は淋菌の 16sRNA 遺伝子、LCR 法は *Opa* 遺伝子 (protein II のコード遺伝子) をターゲットにしている。前者は5時間30分、後者は3時間で診断できる。両方法とも感度および特異度に差は認められない。β-ラクタマーゼの検出には、ニトロセフィン法が用いられる。

6. 薬剤感受性試験

E テスト (アスカ社)、またはディスク法 (栄研、BD 社) を用いるのが簡便である。E テストでは、MIC の測定も可能である。

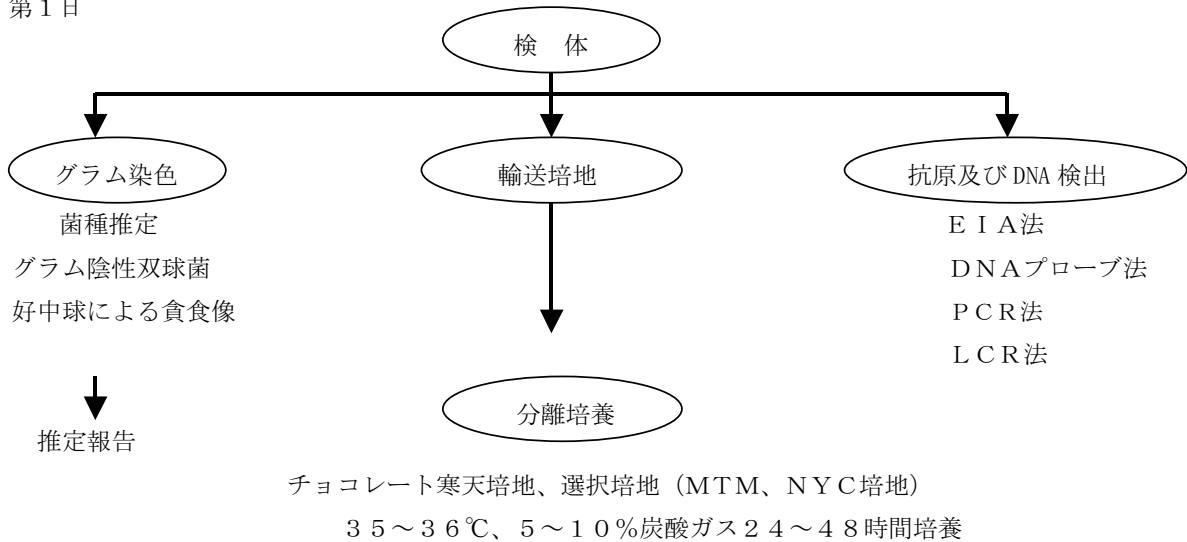
表 *N. gonorrhoeae* と類似菌の鑑別性状

性状	オキシダーゼ	カタラーゼ	グルコース	サッカロース	ラクトース	マルトース	硝酸塩還元	MTM 発育
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	+	+	—	—	—	—	+
<i>N. meningitidis</i>	+	+	+	—	—	+	—	+
<i>N. lactamica</i>	+	+	+	—	+	+	—	+
<i>N. mucosa</i>	+	+	+	+	—	+	+	—
<i>N. elongata</i>	d	+	d	—	—	—	—	—

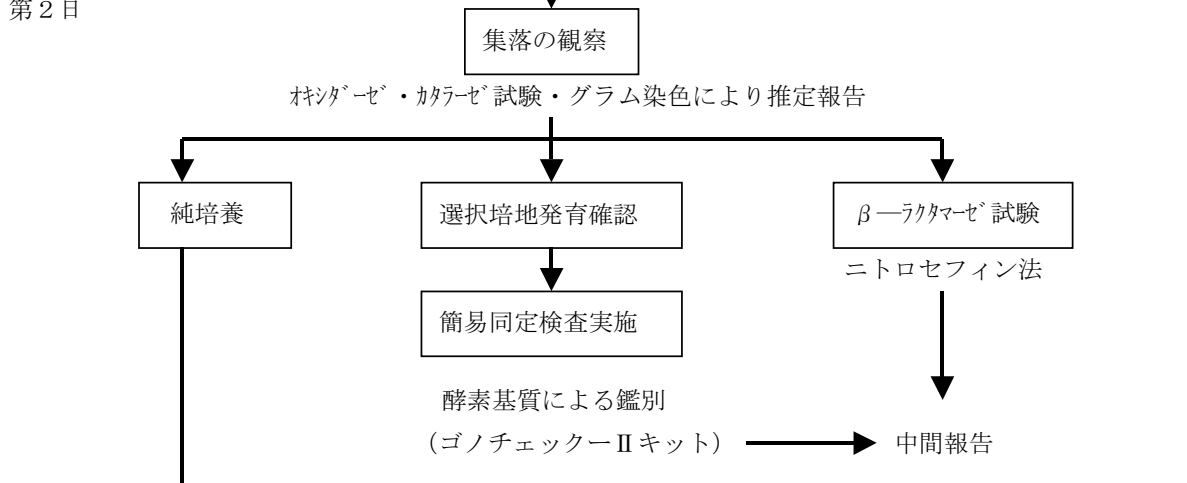
+: 菌株中 85～100%陽性、d: 菌株中 16～84%陽性、—: 菌株中 0～15%陽性

図 検査の進め方

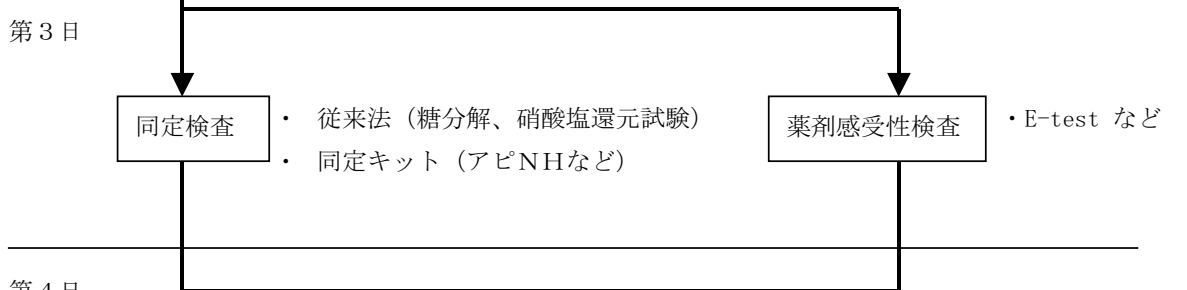
第1日



第2日



第3日



第4日

最終報告

著者

喜多英二：奈良県立医科大学細菌学教授

増谷嵩之：奈良県立医科大学付属病院・中央臨床検査部技師長

今井俊介：奈良県保健環境研究センター所長 imai14@ihe.pref.nara.jp 電話 0742-23-6175

髄膜炎菌 *N. meningitidis* 検査マニュアル（一部 淋菌 *N. gonorrhoeae* を含む）も参照してください。

国立感染症研究所 担当者

芳賀伸治：細菌第一部 第五室長

志牟田健：細菌第一部 第五室（淋菌担当）

急性脑炎

急性脳炎（日本脳炎をのぞく）

目 次

I. 概説

1. 脳炎をおこすウイルス
2. 稀に脳炎をおこすウイルス
3. 感染後脳炎をおこすウイルス

II. 検査の進め方

1. ウイルス分離法
 - i) 検体の採取・保存について
 - ii) 乳のみマウス脳内接種法・
 - iii) 培養細胞による方法・

I. 概説

本質的に、この項目に対してマニュアルを作ることは、極めてむずかしい。個々の症例に応じて、疑われる病因をスクリーニングする以外にない。細菌性の脳炎に関しては、各項を参照されたい。ここでは、日本脳炎をのぞくウイルス性脳炎について述べる。

急性脳炎の臨床像は、一般炎症所見とともに意識障害、痙攣、大脳局在症状、髄膜刺激症状などで特徴づけられる。血清・髄液で抗体上昇を見る。髄液中では細胞増加や IgM・IgG 蛋白が増加する。神経病理的には炎症所見が著明であるが、脱髄・海綿状変性は見ない。

1. 脳炎をおこすウイルスは以下の如くである。

- 1) 単純ヘルペス脳炎（成書参照）
- 2) サイトメガロウイルス（成書参照）
- 3) その他の急性脳炎を起こすウイルス

＜トガウイルス科＞

- ① 東部ウマ脳炎ウイルス
- ② 西部ウマ脳炎ウイルス
- ③ ベネズエラ脳炎ウイルス

＜フラビウイルス科＞

- ④ ウエストナイルウイルス
- ⑤ セントルイス脳炎ウイルス
- ⑥ マレーバレー脳炎ウイルス
- ⑦ ダニ媒介性脳炎ウイルス

＜ブニヤウイルス科＞

- ⑧ カリフォルニア脳炎ウイルス

＜アデノウイルス科＞

- ⑨ アデノウイルス

2. 稀に脳炎を起こすウイルス

＜エンテロウイルス科＞

- ① ポリオウイルス
- ② コクサッキーウイルス
- ③ エコーウイルス

＜ミキソウイルス科＞

- ④ インフルエンザウイルス

＜パラミキソウイルス科＞

- ⑤ 麻疹ウイルス

⑥ ムンプスウイルス

3. 感染後脳炎を起こすウイルス

- ① 風疹ウイルス
- ② インフルエンザウイルス
- ③ 麻疹ウイルス
- ④ ムンプスウイルス
- ⑤ 水痘ウイルス

II. 検査の進め方

上記の脳炎の原因となるウイルスの中で、日本に常在しないウイルスの診断は、血清学的には極めて難しい。従って、ウイルス分離、ウイルス遺伝子の検出といった病原体診断が重要となる。下記の原則はその大前提である。

コッホの仮説

- i) その微生物は、問題の感染症の患者の病変部に見出されなければならない。
- ii) その微生物は、病変部から分離され純粋培養されなければならない。
- iii) 分離した純粋培養菌を感受性のある動物に接種すると、同様の感染症を起こさなければならない。さらに、この動物から、再び同一の細菌が分離されなければならない。

この条件は、レトロウイルス等の出現により、必ずしも全てが満足されない場合もあることが、最近では明らかであるが、原因不明の感染症の診断には依然として重要である。急性脳炎の場合、病変部というのは脳脊髄液（CSF）とする。患者が死亡すれば、脳実質を病変部としてウイルス分離材料に用いる。

1. ウイルス分離法

i) 検体の採取・保存について

ウイルス分離用の検体はドライアイスで輸送し、-80℃以下で保存する。検体は小分けして保存し、出来るだけ凍結・融解を繰り返さない。

ii) サックリングマウス（乳のみマウス）脳内接種法

生後2～4日令のサックリングマウス（乳のみマウス）の脳内に、一匹当たり 0.02ml ないし 0.03ml 接種し、10日間観察する。ウイルス材料1検体当たり1腹のサックリングマウス（8～10匹）を使用する。発症マウスは、放血後に採脳する。採脳した脳は、一部を-80℃に保存し、残りの脳は、蛍光抗体法、HI試験等ウイルスの同定のために

使用する。

iii) 培養細胞による方法：ウイルス分離に用いられる細胞

＜フラビウイルス・トガウイルスによく用いられる細胞＞

Vero 細胞、**C6/36** 細胞、**BHK** 細胞。

＜エンテロウイルスによく用いられる細胞＞

Vero 細胞・**GMK** 細胞・**MA104** 細胞などサル腎臓由来の細胞、**RD18** 細胞、**RD18S** 細胞（クローニングしてコクサッキーA 群に感受性がある。）**HEp-2** 細胞、**HeLa** 細胞、**HEL** 細胞、**FL** 細胞

＜ヘルペスウイルス＞

Vero 細胞、**HEp2** 細胞、**HEL** 細胞

＜ロタウイルス＞

MA104 細胞、**CaCo II** 細胞

＜インフルエンザウイルス＞

MDCK 細胞、**CaCo II** 細胞などを用いる。

＜麻疹ウイルス＞

B95a 細胞

その他、詳しくは「ウイルス図鑑」（保坂康弘、川瀬茂実、松井千秋 編）講談社、1947 年：ウイルスの培養細胞一覧 P696-701 参照

（国立感染症研究所ウイルス第一部 高 崎 智 彦）

細菌性髄膜炎

(*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*)

細菌性髄膜炎検査マニュアル
(*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*)

- I. 定義
- II. 疫学
- III. 検査に関する一般的注意
 - 1. 検査材料の採取
 - 2. 検査材料の輸送
 - 3. 検査の進め方
 - 4. 検査の判定
- IV. 検査方法
 - 1. 抗原検出
 - 2. 病原体分離
 - 3. 起炎菌
 - 1 *S. pneumoniae*
 - a) コロニー形態
 - b) 同定
 - c) 感受性試験
 - d) 血清型別
 - e) 尿中抗原検出
 - f) ワクチン
 - g) 菌株の輸送
 - 2 *S. agalactiae*
 - a) コロニー形態
 - b) 同定
 - c) 血清型別
 - d) ワクチン
 - e) 感染予防
 - d) 抗生剤による感染予防
 - 3 その他の菌
- V. 文献
- VI. 検査依頼先
- VII. 意見
- VIII. 執筆者 他

I. 定義

髄液中の白血球数増加を伴う髄膜の炎症、その原因が細菌によるものであることが確定したものの。

(平成 11 年 3 月 30 日 健医感発第 46 号 厚生省保健医療局結核感染症課長通知では、「種々の細菌感染による髄膜の感染症」が定義であると記載されている)

II. 疫学

感染症法に基づくサーベイランス(1999 年 4 月－2001 年 12 月)では *Haemophilus influenzae* 143 例, *S. pneumoniae* 90 例, group B *Streptococcus* 22 例, *Escherichia coli* 14 例が報告されている (1) (この文献にはその他の細菌に関しては「1 桁台」としか記載されていない)。また、小児化膿性髄膜炎に関するデータは、伝染病予防法、感染症法によるサーベイとは独立して 1966 年以降継続的に報告がなされている (2-8)。文献 8 (1997 年 7 月－2000 年 6 月)で *H. influenzae* 204 例, *S. pneumoniae* 87 例, group B *Streptococcus* 25 例, *E. coli* 124 例, *Listeria*, *Neisseria meningitidis* が報告されていて、年間小児科入院数 1000 例あたりの化膿性髄膜炎症例数は 1.1 から 1.7 と記載されている。

III. 検査に関する一般的注意

1. 検査材料の採取
髄液を採取する(9)。
採取手法に関する記載はこのマニュアルの対象ではない。
2. 検査材料の輸送
室温 (冷蔵しないこと)、採取後、できる限り迅速に検査を開始する。
3. 検査の進め方
細胞数の計測 (9)、(可能であれば) 遠沈後グラム染色、墨汁染色、抗酸染色、抗原検出、培養
4. 検査の判定
上記通知では以下の A または B を満たすとき報告義務があるとしている。

A. 診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ、以下の 2 つの基準を全て満たすもの

1. 以下の臨床症状を呈するもの
 - ・発熱、頭痛、嘔吐を主な特徴とする
 - ・項部硬直、Kernig 徴候、Brudzinski 徴候などの髄膜刺激症状 (いずれも新生児や乳児などでは臨床症状が明らかではないことが多い)
2. 以下の検査所見を有すること
 - ・髄液細胞数の増加 (多核球優位であることが多い)
 - ・髄液蛋白量の増加

B. 上記の基準は必ずしも満たさないが、診断した医師の判断により、症状

や所見から当該疾患が疑われ、かつ、病原体診断や血清学的診断によって当該疾患と診断されたもの

IV. 検査方法

1. 抗原検出

髄液からの抗原検出を目的とした市販キットが存在する。検出できる対象を示す。

Slidex méningite-Kit 5 (bioMérieux)

S. pneumoniae

H. influenzae type b

N. meningitidis group A

N. meningitidis group B/*E. coli* K1

N. meningitidis group C

Strepto B-Kit (bioMérieux)

S. agalactiae

PASTOREX MENINGITIS (Bio-Rad)

S. pneumoniae

H. influenzae type b

N. meningitidis group A

N. meningitidis group B/*E. coli* K1

N. meningitidis group C

N. meningitidis groups Y/W135

S. agalactiae

Slidex méningite-Kit 5 の *S. pneumoniae* ラテックスでは *S. pneumoniae* による髄膜炎 6 例中 5 例陽性、陰性例は 18 例全て陰性で positive predictive value 100%、negative predictive value 95%、*H. influenzae* ラテックスでは *H. influenzae* type b による髄膜炎 10 例中 9 例陽性、陰性例は 12 例全て陰性で、positive predictive value 100%、negative predictive value 92%、Strepto B-Kit では *S. agalactiae* による髄膜炎 3 例中 3 例陽性で、感度 100%であったことが報告されている (10)。

PASTOREX MENINGITIS に関しては、販売元（和光純薬）によると、2002 年 7 月時点で海外、国内ともに、このキットの感度、特異性のデータを示した文献は存在しないとのことである。

2. 病原体分離

培地

5%ヒツジ血液寒天培地 (SBA)、チョコレート寒天培地、嫌気培養用培地 (アネロコロンビアウサギ血液寒天培地)、真菌用培地 (サブロー培地 など、選択剤の入っていないもの)、抗酸菌用培地 (7H9 液体培地[もしくはこれを基礎培地としたもの]、固形培地 [小川培地、工藤培地] のいずれかもしくは双方)、増菌用に GAM 半流動培地も使われる。

培養

SBA、チョコレート寒天培地は 35 °C ないし 37 °C で 5% CO₂ 培養を行う。真菌は 25-30 °C。

3. 起炎菌

起炎菌となる細菌は多岐にわたるため、以下、主要な菌に関して記述する。

H. influenzae, *Listeria* に関しては他の執筆者によるマニュアル参照

1 *S. pneumoniae* (カタラーゼ陰性グラム陽性球菌)

a) コロニー形態

血液寒天培地、チョコレート寒天培地に生育する。α溶血。
自己融解により、中央が陥没したコロニー (Fig. 1a)、
もしくはムコイドコロニー (Fig. 1b) を生じる。

b) 同定

i) 胆汁酸溶解試験 (プレート法)

2%デオキシコール酸ナトリウムを一滴 SBA 上の *S. pneumoniae* が疑われるコロニー上に滴下する。35 °C 30 分間インキュベーション後(通常数分後)に、*S. pneumoniae* のコロニーは融解する (コロニーが見えなくなる)。

ii) 胆汁酸溶解試験 (試験管法)

1ml の生理食塩水に菌を高濃度にサスペンドする。(McFarland 2 以上)。菌液を 0.5 ml ずつに分注し、片方に 0.5 ml の 10%デオキシコール酸ナトリウムを、もう片方には 0.5 ml の生食を入れる。*S. pneumoniae* であれば、37 °C インキュベーションにて 3 時間以内に菌体の溶解が見られる。

iii) オプトヒン感受性試験

SBA に純粋培養し、オプトヒンディスク (BBL か栄研化学 [11]) を置く、好気 35 °C 一晚培養(CO₂ 培養では阻止円が小さくなる)。*S. pneumoniae* はオプトヒンディスクの周辺に阻止円をつくる (14 mm 以上。*S. pneumoniae* 以外のα-streptococcus のなかにも塗抹

量が少ない場合、小さな阻止円を作るものがある [11])。まれにオプトヒン耐性の *S. pneumoniae* が検出される。胆汁酸溶解試験とオプトヒン感受性試験結果が一致しないときは、前者の結果による判定を優先する。

iv) ラテックスや黄色ブドウ球菌凝集による同定

Slidex pneumo-Kit (bioMérieux) (S 型菌に対する感度 100% , 特異性 96% [11]), Phadebact Pneumococcus Test (Boule) (感度 99.3% [408/411], 特異性 94.1% [96/102])がある。

v) PCR

胆汁酸溶解性の原因となる溶解酵素の遺伝子 *lytA* を増幅することにより、*S. pneumoniae* の同定を行うことができる (*S. pneumoniae* は陽性)。後述 (c, vi) のキットに、*lytA* 増幅のためのプライマーが含まれている。

c) 感受性測定

「ペニシリン耐性肺炎球菌」のマニュアルにも感受性測定法の記載がある。平板法、微量液体希釈法、ディスク法、Etest、automated 法がある。製品を用いる測定法は製造者によって示されている。これを守ることが重要である。NCCLS は、ペニシリンの MIC が 2 µg/ml 以上のものを PRSP (penicillin-resistant *S. pneumoniae*)、0.125-1.0 µg/ml のものを PISP (penicillin-intermediate *S. pneumoniae*)、0.063 µg/ml 以下のものを PSSP (penicillin-sensitive *S. pneumoniae*)としている。

i) 平板法

Mueller Hinton Agar 培地にウマ溶血血液を 5%混合し、規定の薬剤を含む培地を作成する。煩雑。

ii) 微量液体希釈法

フローズンプレート、ドライプレートが製品として販売されている (栄研化学)。

iii) KB ディスク法

1 µg のオキサシリンを含む KB ディスクを使用し、規定の条件で培養を行うことにより、発育阻止円の直径が 20 mm 以上となった場合は、ペニシリン感受性との判別ができるとされている。しかし、発育阻止円の直径がこれより小さくてもペニシリン低感受性、もしくはペニシリン耐性と判定することはできない。この場合、感受性を判定するには MIC を測定しなければならない。

iv) Etest

培地内の薬剤濃度が連続的に変化するように工夫されたストリッ

プを平板に置くことにより、MIC の測定が可能である。Mueller Hinton Agar+5%ヒツジ赤血球、5% CO₂、35 °C、20-24 時間培養の条件が規定されている。

v) Automated 法

VITEK (bioMérieux) では新しいバージョンを用いることにより、測定が可能になった。very major error は出ないとされている。

vi) PCR 法

感受性を測定するのではなく、ペニシリン耐性をもたらししている細胞壁合成酵素の遺伝子を増幅し、その変異を見ることにより、耐性度の推定をするキットが販売されている（ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) 遺伝子検出試薬 [湧永製薬]）。

d) 血清型別

呼吸器由来、髄液由来の *S. pneumoniae* の血清型別は、感染症法に基づくサーベイランスとは独立に、すでに大きな規模で行われている (1, 12)。 *S. pneumoniae* には今までに、90 以上の型が報告されている (Table1)。膨潤法 (Quellung 法) による型別、群別が標準法である (Statens Seruminstitut から血清を直接購入可能 [Type/Group 血清各 1 ml x 46 本、および Pneumotest-kit])。また、菌凝集による型別、群別用血清も市販されている (肺炎球菌莢膜型別用免疫血清 [デンカ生研]、筆者の使用経験はない)。ここでは、Quellung 法による型別、群別法を記載する。

新鮮コロニーを McFarland 1 程度の濁度になるようにリン酸バッファー (pH7.4) でサスペンドする。スライドグラスに菌液を少量 (1–2 µl) スポットする。ここで、乾燥後火炎固定してもよいが、膨潤化が見づらくなることがある。血清とメチレンブルー溶液を少量 (各 1–2 µl) 滴下し、カバーグラスをかける。1000 倍 (油浸) で鏡検し莢膜が膨潤して見える血清の型をその菌の型とする (Fig. 2a)。 Fig. 2b には膨潤陰性の結果を示す。

23 価多糖ワクチンに含まれる血清型の型別、群別は Pneumotest-Kit によって行うことができる。これは、多価血清との反応性を調べ、その多価血清の組み合わせにより型別、群別の判定を行うためのキットである。用いる手法は Type/Group 血清もちいるときと同じである。各多価血清に含まれる Type/Group 血清を Table 2 に示す。

Table 1 *S. pneumoniae* の血清型 (Danish)

Type	Group	Type	Group
<u>1</u>			24 (24F, 24A, 24B)
<u>2</u>			25 (25F, 25A)
<u>3</u>		27	
<u>4</u>			28 (28F, 28A)
<u>5</u>		29	
	6 (6A, <u>6B</u>)	31	
	7 (<u>7F</u> , 7A, 7B, 7C)		32 (32F, 32A)
<u>8</u>			33 (<u>33F</u> , 33A, 33B, 33C, 33D)
	9 (9A, 9L, <u>9N</u> , <u>9V</u>)	34	
	10(10F, <u>10A</u> , 10B, 10C)		35 (35F, 35A, 35 B, 35C)
	11 (11F, <u>11A</u> , 11B, 11C, 11D)	36	
	12 (<u>12F</u> , 12A, 12B)	37	
13		38	
<u>14</u>		39	
	15 (15F, 15A, <u>15B</u> , 15C)	40	
	16 (16F, 16A)		41 (41F, 41A)
	17 (<u>17F</u> , 17A)	42	
	18 (18F, 18A, 18B, <u>18C</u>)	43	
	19 (<u>19F</u> , <u>19A</u> , 19B, 19C)	44	
<u>20</u>		45	
21		46	
	22 (<u>22F</u> , 22A)		47 (47F, 47A)
	23 (<u>23F</u> , 23A, 23B)		48

下線は 23 価多糖ワクチンに含まれる血清型

Table 2 Pneumotest-kit に含まれる血清

Pool serum	SGTs ^a in pool					Non-vaccine SGTs ^a
	P	Q	R	S	T	
A	1	18	4	5	2	
B	19	6	3	8		
C	7				20	24, 31, and 40
D			9		11	16, 36, and 37
E			12	10	33	21 and 39
F				17	22	27, 32, and 41
H	14	23		15		13 and 28

a, Serotypes and serogroups

e) 尿中抗原検出

S. pneumoniae による呼吸器感染の診断用に尿中抗原検出キットが開発されている (Binax NOW *Streptococcus pneumoniae*, 日本未認可)。小児では *S. pneumoniae* がコロナイズしている例で高率に偽陽性が出るのが報告されているが (13, 14)、成人では偽陽性は見られないとされている (15)。髄膜炎症例でどれくらいの感受性、特異性が得られるかは不明である。

f) ワクチン

23 価の多糖ワクチンが認可されている。しかし、本邦では、このワクチン接種によって、見かけ上の抗体価が上昇したという報告は存在するが (16)、このワクチンの呼吸器感染防御効果、敗血症と髄膜炎防御効果に関するデータはない。また、このワクチンの主成分は多糖であるため、T 細胞非依存性の抗体産生を惹起する。したがって T 細胞のメモリー効果はない。ショックを起こすことがあるため、再接種は不可である。厚生労働省は、本邦でのこのワクチンによる副作用率を明らかにしていない。髄膜炎の罹患率が高く、罹患後の後遺症が特に問題となる小児に対してはこのワクチンは無効である。海外では 7 価または 9 価の conjugate ワクチンがすでに使われているが、価数を増やすことが困難であり、開発上の問題点となっている。

g) 菌株の輸送

チョコレート高層培地を用意している。必要があるときは請求してください (VI. 参照)。

2 *S. agalactiae* (カタラーゼ陰性グラム陽性球菌)

a) コロニー形態

比較的大きな扁平なコロニー、弱いβ溶血 (α')、もしくは溶血が見られない。

b) 同定

i) Lancefield 血清群別

人から分離される *Streptococcus* の中で、現在、唯一、ひとつの Lancefield 血清群に対してひとつの菌種 (*S. agalactiae*) が対応している種であるため、Lancefield 群別により、同定が可能である。Lancefield 血清群別用にラテックスキットが市販されている (ストレプト LA [デンカ生研], セロディアンストレプトキット [栄研化学], Phadebact *Streptococcus* Test [Boule], Slidex Strepto-Kit [bioMérieux], Streptex [Murex Biotech])。後 2 者には F 群群別用

の試薬も含まれている。

ii) CAMP test

S. agalactiae が産生する CAMP factor と *Staphylococcus aureus* が産生する β -hemolysin の作用により、ヒツジ赤血球が強溶血することを利用し、*S. agalactiae* の同定に用いられてきた検査法である (Fig. 3)。従来 CAMP factor は *S. agalactiae* に特異的とされてきたが、A 群レンサ球菌も CAMP factor を産生することが示され (17)、また、G 群レンサ球菌も溶血帯を示すことから (Fig. 3)、この試験の *S. agalactiae* 同定法としての意義は低くなった。

iii) 生化学的性状

api 20 Strep (bioMérieux)などのキットを用いると、生化学的性状を知るのに便利である。*S. agalactiae* は馬尿酸水解陽性、PYR 試験陰性。

c) 血清型別

多糖体抗原として、Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII、蛋白抗原として c, R, X がある。デンカ生研から出ている「B 群溶血レンサ球菌型別用免疫血清」には、Ia, Ib, II, III, IV, V に対する血清が含まれている。別に、VI, VII, VIII に対する血清も同社から市販されている。試験方法は製品添付のマニュアル参照。

d) ワクチン

ワクチンは母体に投与するものを含め、2002 年 7 月時点で認可されているものはない。

e) 抗生剤による感染予防

文献 8 によると、*S. agalactiae* による髄膜炎 25 例中、23 例は 4 ヶ月以下の小児に発症している。とくに、新生児での発症が半数を占める。*S. agalactiae* は膣、外陰部から 20%以上の頻度で分離される。これらの菌が出産時に垂直感染を起こし、新生児に感染を起こす。米国では抗生剤による出産時の感染予防ガイドラインが存在する (18, 19)。文献 18 には妊婦の膣と直腸の両方からスワブをとり、選択剤を含む液体培養によって *S. agalactiae* の有無を見る必要があると述べられているが、本邦でこれを行っている医療機関は少ないであろう。

3 その他の菌

E. coli

培養、同定、感受性は他のマニュアル参照

N. meningitidis

髄膜炎菌感染症のマニュアルを参照

(*Cryptococcus*)

真菌である。上記通達によると、感染症法の対象ではないと考えられる。

(*Mycobacterium tuberculosis*)

細菌であるが、結核予防法の対象であり、感染症法の対象ではない。染色、培養、同定、感受性試験に関して、文献 20 参照

V. 文献

1. 病原微生物検出情報 23:31-32, 2001.
2. 小林裕ほか、Jpn. J. Antibiotics 22:795-805, 1979.
3. 藤井良知ほか、感染症学雑誌 60:592-601, 1986.
4. 藤井良知ほか、感染症学雑誌 61:849-857, 1987.
5. 藤井良知ほか、Jpn. J. Antibiotics 40:284-294, 1987.
6. 藤井良知ほか、Jpn. J. Antibiotics 40:812-822, 1987.
7. 小林裕ほか、感染症学雑誌 71:1017-1024, 1997.
8. 砂川慶介ほか、感染症学雑誌 75:931-939, 2001.
9. 穿刺・髄液検査 第3章 II 235-259. 臨床検査法提要 第31版、金原出版
10. 中村明ほか、感染症学雑誌 73:901-908, 1999.
11. 小栗豊子、小野米子、臨床と微生物 22:145-151, 1995.
12. 生方公子、ペニシリン耐性肺炎球菌 513-545, 第2版、協和企画通信
13. Dowell SF et al. Clin. Infect. Dis. 32:824-825, 2001.
14. Adegbola RA et al. Pediatr. Infect. Dis. 20:718-719, 2001.
15. Murdoch DR et al. J. Clin. Microb. 39:3495-3498, 2001.
16. 福見秀雄ほか、感染症学雑誌 58:495-511, 1984.
17. Gase K et al. Infect. Immun. 67:4725-4731, 1999.
18. American College of Obstetrics and Gynecology. ACOG Technical Bulletin 170:1-5, 1992.
19. Committee on Infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn. Pediatrics 90:775-778, 1992.
20. 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会、新結核菌検査指針、財団法人 結核予防会、2000.

VI. 検査依頼先

S. pneumoniae, S. agalactiae

国立感染症研究所 細菌第一部 和田昭仁、常 彬

TEL: 03-5285-1111 Ex.2225, 2228

FAX: 03-5285-1163

Email: awada@nih.go.jp, b-chang@nih.go.jp

N. meningitidis

国立感染症研究所 細菌第一部 高橋英之

TEL: 03-5285-1111 Ex.2224

FAX: 03-5285-1163

Email: hideyuki@nih.go.jp

VII. 意見

上記通知(I.参照)では、細菌性髄膜炎と無菌性髄膜炎を区別するために報告基準を定めているように思われる。しかし、この基準の A に基づき診断した場合、感染症法の対象ではない結核性髄膜炎および *Cryptococcus* 髄膜炎が細菌性髄膜炎症例として含まれる可能性がある。医療の現場で確定診断がつかないことはままあるが、法律に伴う通知にこのようなあいまいな部分が含まれることは不適切である。

対象を「化膿性髄膜炎」ではなく、「細菌性髄膜炎」としたために *Cryptococcus* 髄膜炎の診断が確定した症例をを対象からはずしてしまうことになった。どうして、*Cryptococcus* 髄膜炎を対象からはずしたのか、4 類感染症の選定をするときの過程を知りたいと思う。

VIII. 執筆者 他

執筆者

和田昭仁

国立感染症研究所 細菌第一部

コメント提供者(順不同)

氏名不詳

栃木県保健環境センター

竹部久勝

奈良県保健環境研究センター

北條圀生

井出忍

静岡市衛生試験所

勢戸和子

大阪府立公衆衛生研究所

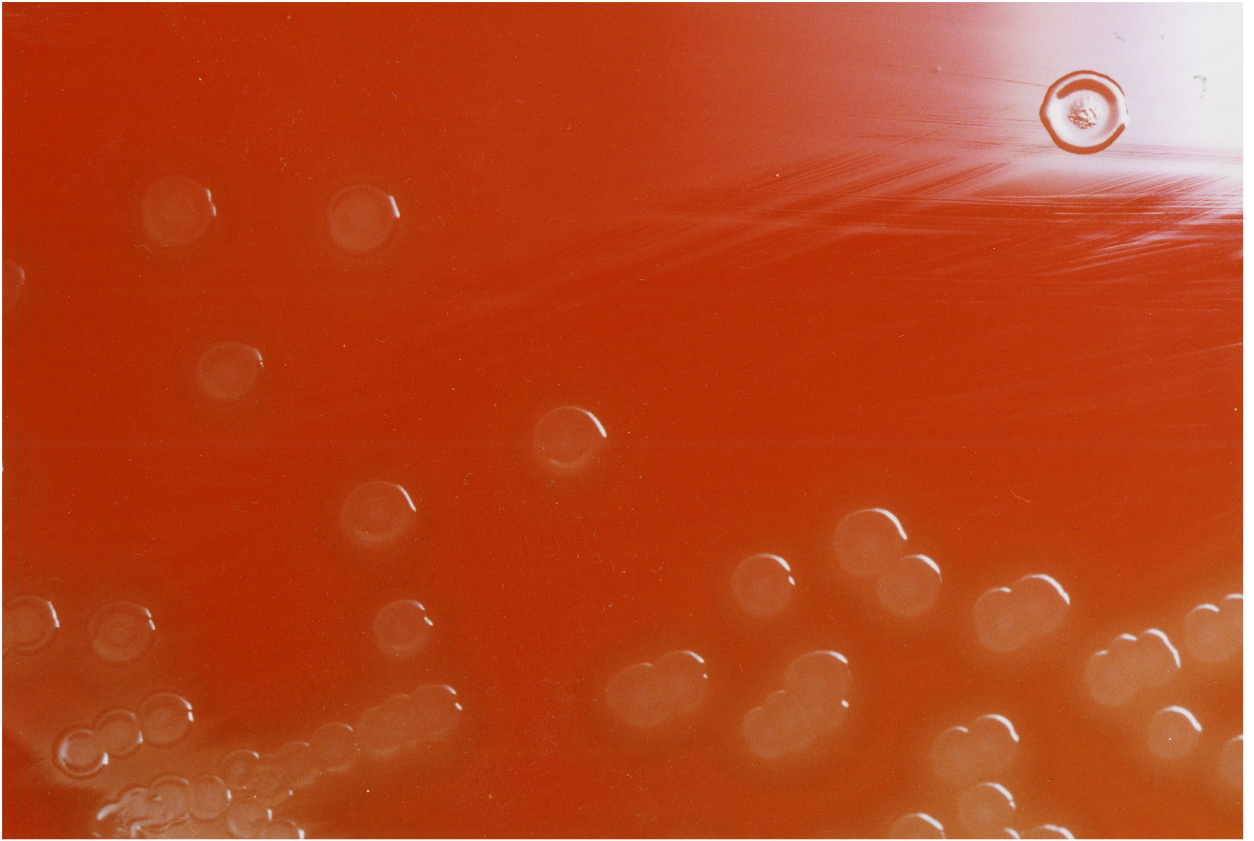
大友良光

青森県環境保健センター

赤見正行

群馬県衛生環境研究所

Fig. 1
a



b

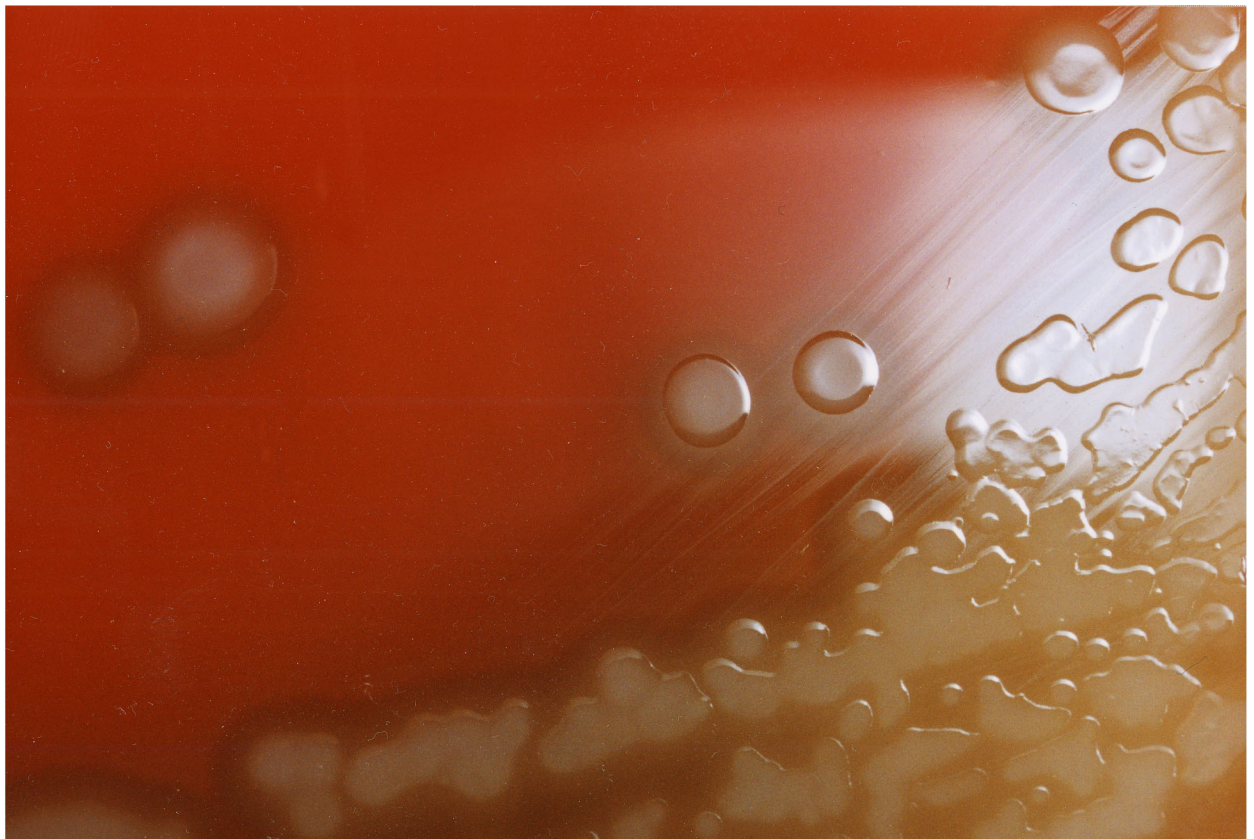
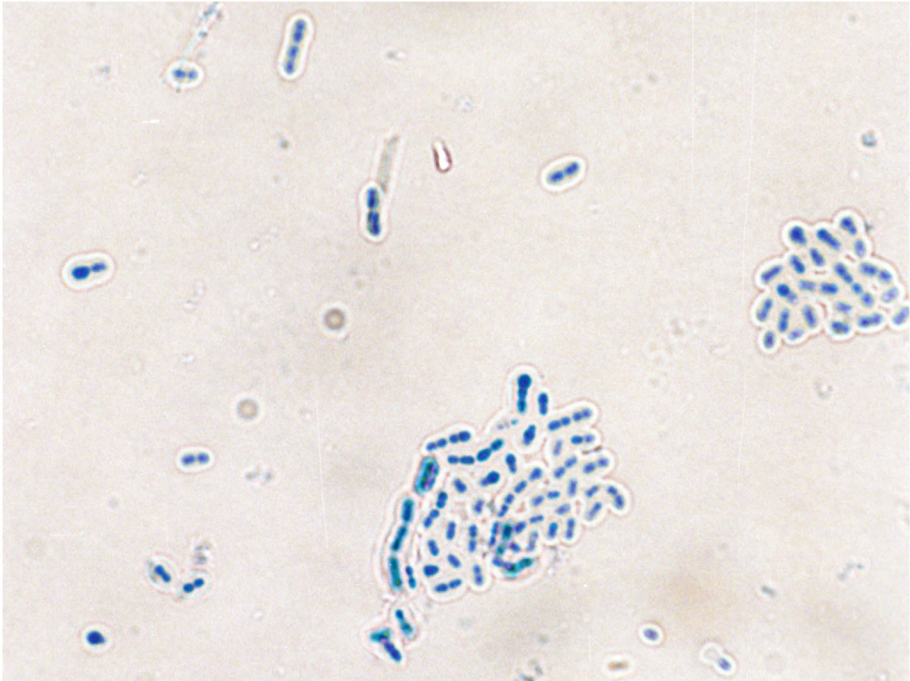


Fig. 2

a



b

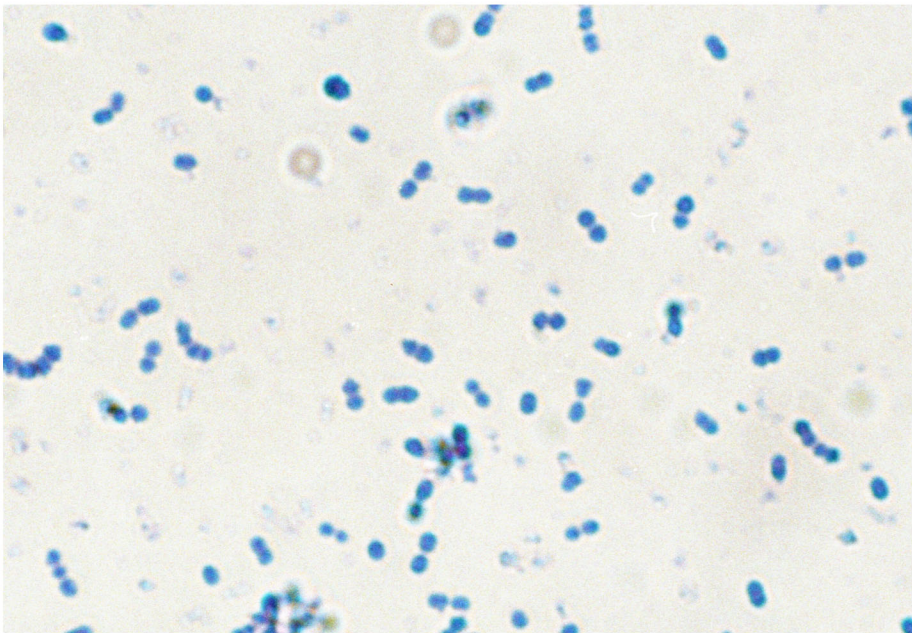


Fig. 3

Staphylococcus aureus

β -hemolysin

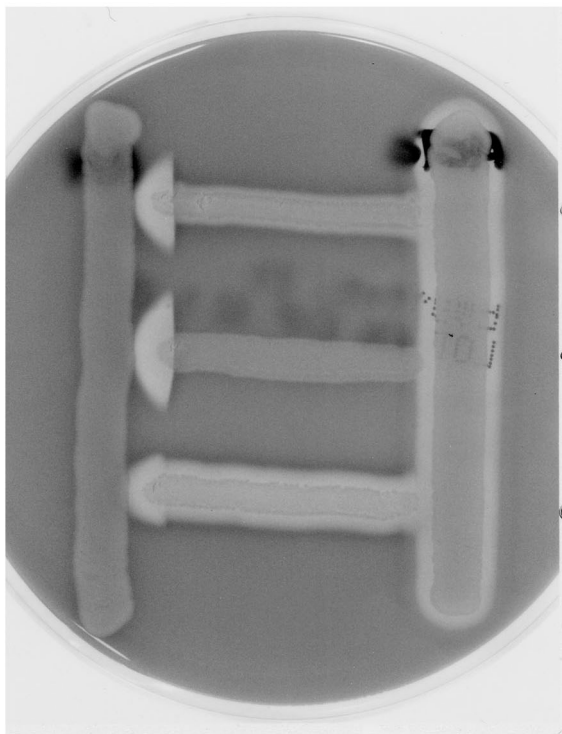
+

-

GAS

GBS

GBS



マイコプラズマ肺炎
(*Mycoplasma pneumoniae*)

平成 15 年 8 月

目次

1. *Mycoplasma pneumoniae* によって起こる疾患
2. 検査に関する一般的な注意
 - 1) 検査材料の採取
 - 2) 検査材料の輸送
 - 3) 検査の進め方
 - 4) 検査の判定
3. 検査方法
 - 1) 培養法 (*M. pneumoniae* の分離法)
 - 2) 抗体検査法
 - 3) 抗原検査法
 - 4) DNA 検査法
4. その他
 - 参考情報 1 : *M. pneumoniae* の遺伝子型別
 - 参考情報 2 : 薬剤耐性菌
5. 文献
6. 執筆者

1. *Mycoplasma pneumoniae* によって起こる疾患

M. pneumoniae は *Mollicutes* 綱 *mycoplasma* 属の細菌であり、分類学的にはグラム陽性菌に近縁である。G+C 含量は 40%で、細胞壁を全くもたず、細長い形態をしている。増殖にはコレステロールをはじめ多くの栄養素を要求する。

M. pneumoniae によって起こる疾患は、主に、気管支炎と肺炎である。原発性異型肺炎の 30–40% がマイコプラズマ肺炎であり、クラミジア肺炎とともに高い割合を占めている。若年齢層に多く発生する疾患であるが、すべての年齢層にみられる。一年中発生がみられるが、秋冬期に多い傾向があり、家族内や学校での集団発生がしばしば起こる。潜伏期間は 1～3 週間程度である。マイコプラズマ肺炎は、以前は 4 年ごとに周期的な流行が見られたため”オリンピック肺炎”と呼ばれたこともあったが、現在は、周期的な流行は見られなくなっている。症状はかぜに似た感冒様症状を呈し、発熱、長く続く咳が特徴である。胸部 X 線検査では、すりガラス様の淡い陰影が認められる。マイコプラズマ肺炎は他の細菌性肺炎に比べて臨床症状は比較的軽いが、様々な合併症があり、まれに重篤な症状に陥ることがある。合併症としては発疹、溶血性貧血、関節炎、中耳炎、髄膜炎、末梢神経障害、心外膜炎、収縮性心膜炎などがあり、中枢神経系合併症を併発した場合は重症となることもある。また、回復期以降にアレルギー性紫斑病や血小板減少性紫斑病なども見られることがある。

肺炎症状回復後も、*M. pneumoniae* は気管内に数ヶ月間、また、低ガンマグロブリン血症の患者では数年間留まる例も報告されている。*M. pneumoniae* 感染はまた、ギラン・バレー症候群やスティーブンス・ジョンソン症候群を引き起こす要因になる場合があるとされている。

M. pneumoniae がヒトに肺炎を起こす仕組みは、完全には明らかにされていないが、*M. pneumoniae* が気道粘膜に接着して増殖し、細胞に傷害を与えることと、菌体成分によって免疫細胞が刺激を受け、炎症反応を引き起こすことが主な原因だと考えられている。

2. 検査に関する一般的注意

M. pneumoniae は、P2 レベルの病原体であり、菌の取り扱いは基本的に P2 実験室において安全キャビネット内で行う。患者検体、汚染した器材、培養液等は、使用後、オートクレーブあるいは消毒液で滅菌、消毒処理し、しかるべき廃棄を行う。

1) 検査材料の採取

M. pneumoniae 感染症の診断に使われる臨床材料は、主として、咽頭スワブと血清（血液）である。しかし、合併症の症状がある場合などは胸水、髄液、細胞組織などを検査する場合もある。

咽頭スワブの採取は、以下の点に留意するよう、医師に依頼する。

1、滅菌綿棒で咽頭の後壁を強くこすり取るようにする。 *M. pneumoniae* は咽頭の粘膜細胞に付着しているので、粘膜細胞がたくさん綿棒でこすりとられるようにする。

2、咽頭スワブは、あらかじめ医師に渡しておいた分離用培地に直ちに入れ、37℃で培養を開始する。または、培地に入れドライアイスで冷凍した状態で検査機関へ速やかに輸送する。医療機関で一時保管する場合も、培地に入れて、できるだけ－80℃に保管する。（基本は－80℃だが、短期間であれば、－20℃でも保存は可能。）

その他、抗体検査のために用いられる血清を除き、*M. pneumoniae* の分離培養を目的とする全ての臨床材料は、一般に以下の点に留意しなくてはならない。

M. pneumoniae をはじめとするマイコプラズマ種は、一般に乾燥に弱いので検体が乾かないようにする。マイコプラズマは、冷蔵にも弱いため 4℃に保存してはいけない。
－80℃での冷凍保存でのみ、長期保管が可能であり、
－20℃の保存では生菌数が徐々に低下する。

2) 検査材料の輸送

臨床材料を輸送する場合は、咽頭スワブであれば輸送培地に入れ、胸水、細胞組織、髄液はそのまま、ドライアイスにて冷凍して輸送する。検査機関到着後は、必ず −80℃フリーザーに保管するとともに、速やかに検査を開始する。

M. pneumoniae は、短時間であっても冷蔵保管（4℃）には弱い（他の一般細菌と大きく異なる）ので菌分離を目的とする検体は冷蔵庫に入れないように注意する。短時間であれば、冷蔵するよりも、室温の方が、菌が死滅しにくい。

輸送培地の組成

（100 ml あたりの組成）

PPLO Broth w/o CV (Difco 255420, Becton Dickinson

Microbiology Systems, MD, U.S.A) 21 g

グリセロール 5 g

高压蒸気滅菌後、無菌的に凍結保存用のチューブに約 3 ml ずつ分注しておく。

輸送培地として、後述の培地（Hayflick 変法液体培地）を使用してもよい。

3) 検査の進め方

咽頭スワブ については、培養法か PCR 法、あるいはこの両方を試す。

血清（血液） については抗体検査法を行う。

（PA 法は必ず行い、他の抗体検査法は補助的に行う。PA 法にはセロディア-MYCO II（富士レビオ（株）などのキットが利用できる。）

胸水、髄液、細胞組織などの検体は、培養法と PCR 法の両方を試

す。補助的手段として抗原検査法がある。

培養法と PCR 法の両方を同時に行う場合は検体を分割し、一方を培養に供し、もう一方から PCR 用の鋳型 DNA 調製を行う。

4) 検査の判定

次のような検査結果の場合、マイコプラズマ肺炎と確定診断される。

臨床的に肺炎症状を呈し、胸部 X 線像に特有の陰影がみられる症例で、

- 1、 培養法により、*M. pneumoniae* が分離同定されたとき。
- 2、 抗体検査法の受身凝集反応（PA）によって、ペア血清で 4 倍以上の抗体価上昇、単一血清では、320 倍以上の抗体価が見られた場合。または、補体結合反応（CF）、によってペア血清で 4 倍以上の抗体価上昇、単一血清では、64 倍以上の抗体価がみられた場合。
- 3、 PCR 法で *M. pneumoniae* の DNA が検出された場合。

上記の確定診断判定をより確実にするため、後述する他の検査法も補助的手段として利用できる。

また、*M. pneumoniae* に感染していても症状が軽く肺炎に至らない例もあるので、胸部 X 線像の陰影が無くとも、抗体価上昇あるいは *M. pneumoniae* の存在を認めた場合は、*M. pneumoniae* 感染による気道炎と診断できる。

《補足》

抗体検査によって *M. pneumoniae* による感染症と考えられるが、肺炎以外の病状を呈するような症例の場合も、分離培養や PCR 検査を行ってみるのがよい。このような症例から *M. pneumoniae* 分離・検出された報告はこれまで少ないが、*M. pneumoniae* の病原性を考察する上で重要である。このような症例と考えられる髄膜炎

からの脳脊髄液や、関節炎からの関節腔内滲出液などの材料が得られた場合は、検査を試してみる価値がある。発疹部位から *M. pneumoniae* が分離された報告もある。しかし、*M. pneumoniae* 感染症の合併症としてのギランバレー症候群などの場合、*M. pneumoniae* が末梢神経に感染するのではなく、神経組織と *M. pneumoniae* 菌体成分の抗原類似性により、抗 *M. pneumoniae* 抗体が自己免疫的にヒトの神経組織を損傷させているという説もある。このような症例では、*M. pneumoniae* の検出は困難と思われる。

3. 検査方法

1) 培養法 (*M. pneumoniae* の分離法)

M. pneumoniae の分離培養は、もっとも確実な確定診断法となる。*M. pneumoniae* の分離が期待できる臨床材料については、できるだけ培養法を実施すべきである。しかし、*M. pneumoniae* の培養には時間がかかるため、早期診断法にはならないという欠点はある。

基本培地の調製法

Hayflick 変法培地、(PPLO 液体培地)

(1 リットルあたりの組成)

PPLO Broth w/o CV (Difco 255420, Becton Dickinson

Microbiology Systems, MD, U.S.A)	21 g
ブドウ糖	5 g (0.5%)
フェノールレッド	20 mg (0.002%)
蒸留水	750 ml

上記を高圧蒸気滅菌し、約 50℃以下に冷えたら、無菌的に以下のものを加える。

ウマ血清 (55 °Cで 30 分間加熱済)	150 ml (15 %)
25 % 新鮮酵母エキス	100 ml (10 %)
ペニシリン G	100 万単位

培地の添加物について

25 % 新鮮酵母エキスの作製法

研究室で継代された *M. pneumoniae* は、新鮮酵母エキスの代わりに、市販の酵母エキス粉末を使用しても増殖する。しかし、臨床検体から *M. pneumoniae* を新規に分離する場合、市販の酵母エキス粉末を使用した培地では増殖が悪く、分離率が低下する。このため、煩雑ではあるが、新鮮酵母エキスを調製する必要がある。

用意するもの

滅菌済フラスコ 2 リットル容量 1 個

3 リットルフラスコに 1.5 リットル蒸留水を入れ滅菌し

たもの 1 個

ニッテンドライイースト 500 g 1 缶

(日本甜菜糖株式会社、Nippon Beet Sugar MFG. Co. Ltd)

鍋 + コンロ

1-3N NaOH 溶液

滅菌済遠心チューブ (8000 x g に耐えるもの)

高速遠心機 (8000 x g 回転可能な機種)

保存用滅菌済容器 (細胞培養用 25 cm² フラスコや、50ml チューブ等)

鍋に湯を沸騰させ、1.5 リットル蒸留水入りフラスコを湯煎し、充分に加熱する。ニッテンドライイースト 500 g を 1.5 リットル蒸留水に攪拌しながら加える。加熱しながら約 20 分間、熱水抽出を行う。この間、3、4 分毎にフラスコを持ち上げ強く攪拌する。次にフラスコごと水で急冷する。これ以後の操作は、無菌的に行うようにする。抽出液を滅菌した遠心チューブに分注し、4℃にて、8000-10000 xg で 20 分間遠心する。上清を、再度、新しい遠心チューブに入れ、同じ条件で遠心する。その上清を滅菌済みのフラスコに集める、NaOH 溶液で pH を 7.6 に調整する。保存容器に小分けし、-20℃で凍結保存する。解凍後は使いきり凍結融解は繰り返さないようにする。

このプロトコールでは、濾過滅菌を行わない手法を紹介したが、最

後の段階で、濾過滅菌を行う方法もある。ろ過滅菌を行う場合は、目詰まりを防ぐため、孔径の大きなフィルターで前ろ過した上で 0.45 μm フィルターでろ過する。

馬血清

マイコプラズマは増殖にコレステロールを要求する。このため、コレステロール供給源として、動物血清を培地に添加する必要がある。一般にウマ血清が用いられているが、ウマ血清中には *M. pneumoniae* の発育阻害因子が含まれており、これを不活化するために、55℃で30分間、加熱処理したものを使用する。*M. pneumoniae* の発育阻害活性は馬血清のロットごとにばらつきが見られる。

《参考》 馬血清のロットによる *M. pneumoniae* 発育阻害活性のばらつき

ウマ血清ロット	非加熱ウマ血清	加熱処理ウマ血清
1	0.046*	1.212*
2	0.649	1.818
3	0.063	1.047
4	0.007	1.458
5	0.401	1.069
6	0.519	1.285
7	0.744	1.242
8	0.108	1.372
9	2.043	6.112

各ロットの馬血清を 10% 添加した PPLO 培地に *M. pneumoniae* FH 株を接種し、培養 24 時間後の生菌数 (CFU) を計測した。*値は、接種時の生菌数に対する培養 24 時間後の生菌数の比で示した。ロット 9 のように *M. pneumoniae* がよく増殖するロットもある。

***M. pneumoniae* 選択培地**

メチレンブルー含有 PPLO 二層培地

臨床検体からの *M. pneumoniae* の分離には、メチレンブルーを添加した選択培地を用いる。上記の Hayflick 変法培地に、終濃度 0.001% のメチレンブルーを加えて調製する。メチレンブルーはヒト口腔内に常在する *M. pneumoniae* 以外のマイコプラズマの増殖を抑制するはたらきがある。

さらに、栓のできる小試験管に、PPLO 寒天培地 1 ml を入れて固めた後、メチレンブルー含有培地を 2 ml を重層して二層培地とすると液層と寒天層の境界の酸化還元電位が *M. pneumoniae* の増殖に適し、分離率が向上するとされている。この二層培地の使用有効期間は、作製後、冷蔵保存で2週間程度である。

メチレンブルーを添加すると、Hayflick 変法培地は茶色がかった色になる。これに *M. pneumoniae* が増殖すると緑黄色になる。

検体の培養と観察

咽頭拭い綿棒絞り液 0.2 ml を二層培地に、0.1 ml を PPLO 寒天平板培地に接種する。（平板培地に接種するとき、マイコプラズマは細胞壁をもたず他の細菌に比べて物理的に弱いので、コンラージ棒などで強い力を加えないようにする。できるだけ接種液を寒天培地に自然吸収させるようにする）。二層培地は、37℃ で好気培養する。寒天培地は 5% 炭酸ガスインキュベータで培養する。5% 炭酸ガスインキュベータがない場合は、寒天表面の乾燥を防ぐためビニール袋に入れて 37℃ で好気培養する。ビニール袋内に、精製水でしめらせたペーパータオルを2、3枚入れておくとともに乾燥を防ぐ効果がある。二層培地に *M. pneumoniae* が増殖すると液層が緑黄色に変化する。検体中の菌数が少なかったり、培地の性能がよくない場合には、増殖に1ヶ月程度を要することもある。変色した培地液体層の一部を後述する方法で－80℃に凍結保存する。

短期間内（1－3 日間）に培地の変色が見られたり、液層に濁りが生じた場合は、マイコプラズマ以外の咽頭内細菌の増殖が考えられる。このような場合、*M. pneumoniae* 増殖の判定は不可能となる。雑菌の

増殖はかなりの頻度（3－10％）で起こる。

培地が変色しただけでは *M. pneumoniae* が増殖したのか明らかではないので、さらに、PPLO 寒天培地に接種してコロニーを形成させてみる必要がある。変色した培地液層を Hayflick 変法培地で 10^{-3} ～ 10^{-6} に段階希釈し、その 10 μ l を 4～6 分割した PPLO 寒天平板シャーレにそれぞれスポット接種し培養する。

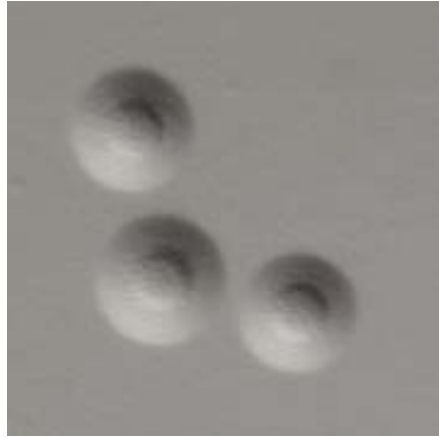
PPLO 寒天培地に接種した検体は、培養開始 5 日後頃から観察を開始する。マイコプラズマのコロニーは微小（0.1mm 程度）なので、観察には 10～40 倍率の実体顕微鏡が必要である。平板を裏側から観察し、マイコプラズマに特徴的な目玉焼き状コロニーを探す。マイコプラズマのコロニーが目玉焼き状になるのは、コロニーの中央部が寒天層に入り込んでいるためであり、コロニーが小さいうちは、この目玉はあまり目立たない。*M. pneumoniae* の場合は、寒天培地表面の状態にもよるが、他のマイコプラズマ種のコロニーのような目玉が比較的目立たない。

形態の観察だけで、マイコプラズマのコロニーであるか確信を持ってない場合は、Dienes の染色液でコロニーを染色して観察する。

Dienes の染色液

メチレンブルー	2.5 g
アズール II	1.25 g
マルトース	10 g
炭酸ナトリウム	0.25 g
安息香酸	0.25 g
精製水	100 ml

上記染色液をコロニーの生じた平板にかけ、数分後に観察する。マイコプラズマのコロニーは、青色に染まる。ヘモフィルス属以外の細菌のコロニーは染まらない。



マイコプラズマの目玉焼き
状コロニー

多種のコロニーが混在しており、平板上のコロニーを純化する必要がある場合は、染色液を加えていないシャーレから先の細いピペット、注射針、滅菌済みつまようじなどでコロニーをひろう。マイコプラズマのコロニーは寒天にくい込んでいるので寒天ごと切り出すようにして取る。切り出したコロニーは2-3mlの液体培地に接種して培養する。菌が増殖した培養液は25ゲージの注射針に数回通す。さらに、0.45mmのメンブランフィルターを通過させ、適当に段階希釈した後、PPLO寒天培地にまいてコロニーを形成させる。そこから再びコロニーを拾い、純化されるまで同じ操作を繰り返す。（この方法はフィルタークローニング法と呼ばれている。）

***M. pneumoniae* 同定法**

検出されたマイコプラズマが *M. pneumoniae* であるかを同定するには、以下のような点について確認を行う。

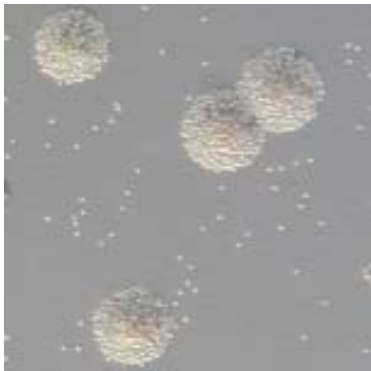
・コロニーへの赤血球付着試験

M. pneumoniae のコロニーには赤血球が吸着する。咽頭から分離される他のマイコプラズマ種のコロニーには、この性質はない。（*M. genitalium* のコロニーも赤血球付着能をもつが、咽頭から分離されることはまれである。*M. genitalium* は非淋菌性尿道炎の原因菌として、おもに泌尿、生殖器から分離される。）

赤血球付着試験の方法

ヒツジ保存血を PBS で 100 倍に希釈する。これをマイ

コプラズマのコロニーが形成されているシャーレに、約 7 ml 加え、37℃で30分～1時間静置する。希釈血液を捨てた後、シャーレに残っている血液を PBS で2、3回洗い流す。実体顕微鏡でコロニーに赤血球が付着しているかを観察する。



赤血球が付着した *M. pneumoniae* のコロニー（小さな点に見えるのが赤血球。）

- ・ *M. pneumoniae* に対して特異的な PCR 法¹⁾を確認する。
後述の PCR 法を使用する。
- ・ 抗 *M. pneumoniae* 血清を用いた代謝阻害試験（Metabolic inhibition test）などで確認する。
- ・ ブドウ糖代謝性でアルギニン非代謝性であることを調べる。

《補足》ヒトから分離される *M. pneumoniae* 以外のマイコプラズマ

ヒト咽頭スワブからは、*M. pneumoniae* 以外に以下のマイコプラズマ種が、分離されることがある。

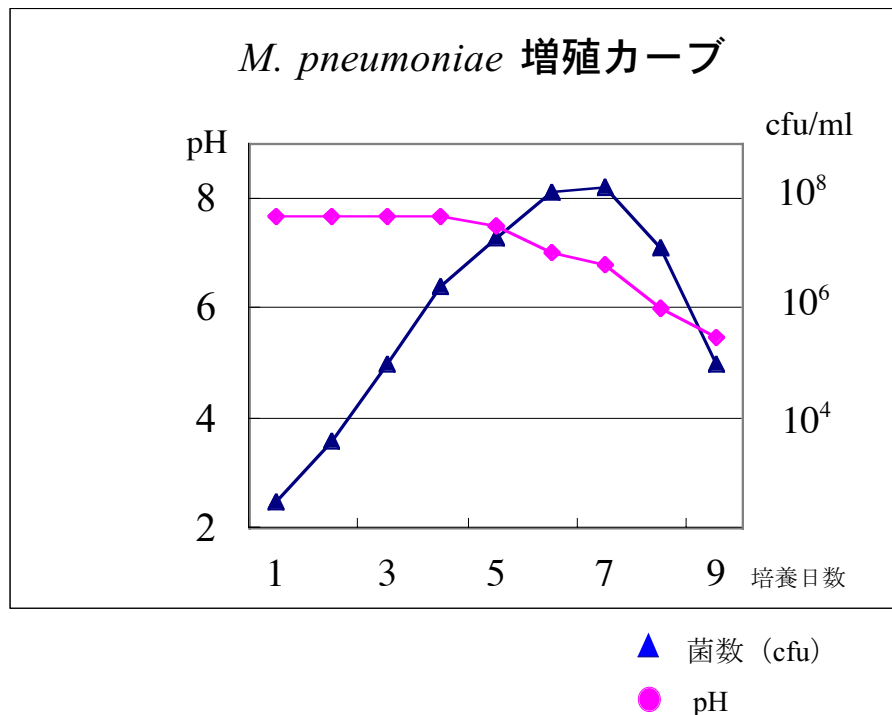
	主な常在または 感染部位	ブドウ糖・ アルギニン分解能
* <i>M. orale</i>	口腔	アルギニン
* <i>M. salivarium</i>	口腔	アルギニン
* <i>M. fermentans</i>		両方
* <i>M. hominis</i>	泌尿器	アルギニン
<i>M. genitalium</i>	泌尿器	ブドウ糖
<i>M. penetrans</i>	気道・泌尿器	ブドウ糖
<i>Acholeplasma laidlawii</i>		ブドウ糖

メチレンブルーを培地に添加することにより、少なくとも*印をつけ

たマイコプラズマの増殖はある程度抑制される。しかし、メチレンブルー 0.001%濃度では、*M. hominis* を抑制できないことがある。Kravbill, W. H. et al. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 118: 965-970 1965

M. pneumoniae 菌株の保存法

マイコプラズマは、対数増殖期の後の定常期が短く、減数期に入り急激に死滅する。したがって培地の色調を観察し、黄色味が強くなる前、遅くとも、黄色味が強くなった日のうちに保存する。参考として、*M. pneumoniae* 増殖と培地 pH 変化の関連図を示す。



培養が長すぎたものは、保存には適さないもので、そのような場合は、植え継いで再培養した方が良い。*M. pneumoniae* は、液体培地中にも浮遊して存在するが、培養容器内の壁や底に多く付着している。継代するときには培養容器の壁面や底をピペットの先などでこすり取るようにする（培地に浮遊している菌ばかり継代を続けると、細胞付着能を失った変異株が保存菌株ストック中に蓄

積することがある。臨床分離株が有する細胞付着能性の性質を保持するためにも注意する。)

液体培地で培養したマイコプラズマを、そのまま細胞凍結用のチューブに移し替え、 -80°C に保存しても、数年間は生存する。より長期的保存には、グリセロール、ジメチルスルホキシド(DMSO)などを添加して保存する。下に示すような2倍保存液と、培養液を1:1に混合し、細胞凍結用のチューブに分注して、 -80°C フリーザーあるいは液体窒素中に保存する。

2倍保存液

PPLO broth w/o CV	培養の2倍濃度で作成
グリセロール	10%
高圧蒸気滅菌後、室温保存可。	

凍結乾燥の際の保護剤としては、12% スクロース、10% 脱脂乳などが推奨されている。凍結乾燥菌は、 4°C 以下の保存が望ましい。数年間の保存が可能である。

解凍方法は、 30°C 前後で解凍し（数本であれば、手で握っていてもよい）、ただちに継代用培地に接種する。

《補足》 *M. pneumoniae* の大量培養調製

後述する血清診断等の抗原を調製するため、*M. pneumoniae* の大量培養を行う場合がある。大量培養は以下のようにして行う。

(1) ヘイフリック変法液体培地約 3ml に、保存菌液 0.3ml を加え培養する。1ml のストックからであれば3本つくれる。数日後、培地の色調が黄色に変化したら、ただちに大容量の継代培養を行う。

(2) 前もってヘイフリック変法液体培地、約 300ml を作成し、 75 cm^2 の細胞培養用のプラスチック製フラスコに 100ml ずつ、3本に培地を入れて用意しておく。(1) で黄変した培養試験管のガラス内面をピペットでこすり、付着している *M. pneumoniae* を液体

中に落とした後、培養液 3ml を 100ml の培地へ加える。フラスコの口を閉め、横に寝かせて数日培養する。

(3) 色調が黄色に変化したら、フラスコの底に曇りガラスの様にこびりついている *M. pneumoniae* を、スクレーパーでこすり取った後、培養液ごと遠心チューブへ移して遠心する。10,000 x g にて 25 分、4℃にて遠心し（抗原調製を目的とする場合は、マイコプラズマが生きている必要はないので、むしろ、死滅した菌体から放出された蛋白分解酵素等の働きを抑える為に冷却する）、上清をすてる。ペレットを滅菌 PBS によく懸濁し再遠心する。この洗浄操作を 3 回繰り返し、最後にペレットを適量の PBS に懸濁し、抗原材料として用いる。

2) 抗体検査法

現在、マイコプラズマ肺炎の確定診断の多くが、抗体検査法によって行われている。*M. pneumoniae* の抗体検査には、おもに以下の方法があげられる。

受身凝集反応 (PA)
補体結合反応 (CF)
ELISA 法 (EIA)
間接蛍光抗体法 (IFA)
寒冷凝集反応
代謝阻止抗体 (MI)
ウェスタンブロット法

この中で臨床確定診断に広く用いられているのは、受身凝集反応 (PA) と 補体結合反応 (CF) である。抗体検査法も、患者の抗体価が上昇していることが前提なので、早期診断にはなりにくい。しかし、IgM 抗体を検出すれば、ある程度の早期診断も可能である。

受身凝集反応 (PA)

M. pneumoniae 抗原を粒子表面に結合させておき、そこに血清を加えて粒子の凝集を見ることで判定を行う。粒子に赤血球を用いるとき、この方法は間接赤血球凝集反応 (IHA) とよばれる。抗原の吸着を促進するためにタンニン酸やホルマリン、塩化クロムなどで処理をした赤血球の表面に抗原を吸着させて行う。しかし、赤血球を用いた凝集反応では非特異的な凝集が起こることがある。このため、現在では凝集体としてラテックス粒子、ゼラチン粒子などがよく用いられる。また、無機化合物の高比重粒子を凝集体に利用した HDPa 法 (High Density Composite particle Agglutination) もある。赤血球を用いた方法では主に IgM 抗体が測定されるため、感染後一週間程度で抗体価が上昇し始める。ピークは 2-6 週間だが、その後急激に低下する。海外で市販されているキットでは IgM と IgG を同時に、または別々に検出する物もある (海外のキットについては文献 (4) を参照)。

市販品として富士レビオ (株) からセロディア-MYCO II が出ている。色素で着色したゼラチン粒子を使用したキットであり、判定までの時間は 3 時間。血清の不活化は必要である。

補体結合反応 (CF)

感作赤血球に補体が結合すると溶血が起こるが、抗原と抗体が結合したものが存在すると、そこに補体が結合して消費されるために溶血が起こらなくなる。CF 法では、抗原抗体結合物に結合する補体の消費量を指標として判定を行う。ペア血清で 4 倍以上の上昇を陽性とするが、単一血清で判定するには 64 倍以上の抗体価が必要である。反応抗原は膜糖脂質とされ、血清中の IgG クラスの抗体を測定する。抗体価が上昇するまで発症後 2 週間以上を要するため、本法での早期診断は困難である。

通常、Kolmer 法に従い、マイクロタイタープレートを用いる。

- 1) 抗原の作製：培養法に従い培養したマイコプラズマを 10,000 x g

にて 25 分間、遠心した沈殿を培養量の 1/20 の PBS で懸濁し、超音波処理したものを抗原とする。ただし、このまま用いると抗補体作用を示すので、加熱処理、フェノール処理等を行う。抗原価は 64－128 倍くらいとなる。抗原値は、あらかじめ陽性血清との box titration により決めておく。

1a) 加熱処理法；1/20 濃縮液を 1、2ml 分注し凍結保存する。使用前に 100℃、10 分間加熱し抗原とする。

1b) フェノール処理法；培養 7－9 日目にフェノールを 0.5%になるように加える。4 日間置いた後、56℃で 30 分加熱する。遠心した沈殿を培養量の 1/20 量の GVB（ゼラチンベロナル緩衝液）に懸濁して抗原とする。

1c) box titration ；陽性血清を倍数希釈する。抗原液を倍数希釈し血球を感作する。それぞれの血清と感作血球とを反応させ、凝集を示す最大血清希釈に加えた、血球の感作に用いた抗原の最大希釈度を至適濃度とする。

2) 操作法：血清は非働化しておく。プレートに GVB を一滴ずつ置き、対象として GVB のみのウェルをおく。血清を倍数希釈する。4 単位の抗原を 1 滴ずつ加える。次に 2 単位*の補体を 1 滴ずつ加え、混和した後 4℃で 1 晩おく、プレートを 37℃に温めておいた後、3 単位**の溶血素で感作した血球を 1 滴ずつ加える。混和して 37℃に 30 分おいてから判定する。溶血を阻止する血清最高希釈倍数を補体結合抗体価とする。

* 補体一単位；最小溶血量。感作血球に希釈した補体を加えていき、溶血する最大希釈倍率の濃度の含まれる補体量

** 溶血素一単位；ヒツジ赤血球浮遊液をウサギに注射して作る、希釈した溶血素を補体に加え完全溶血を示した最小の溶血素の濃度

3) 判定：単一血清で 64 倍以上の値を示したときには陽性とする。

市販試薬として、以下の試薬が入手可能である。

「肺炎マイコプラズマ CD 試薬－生研」として「CF 抗原」、「CF 抗血清 (x 32 倍の陽性血清)」ならびに「正常抗原」デンカ生研。

ELISA 法 (EIA)

ELISA 法の利点は、高感度、特異的であること、さまざまな測定対象やコンディションに対応でき、汎用性があること、定量的な結果が得られることである。抗体のクラスを区別して測定できる利点もある。マイコプラズマ肺炎の抗体検査に応用する場合は、通常 *M. pneumoniae* の菌体成分（未精製又は精製成分）を抗原として ELISA を行うことになる。菌体の超音波破碎液を未精製で抗原に用いると患者以外の人の血清でもかなりの反応が起こり、バックグラウンドが高くなる。この場合、抗 *M. pneumoniae* 抗血清を用いてサンドイッチ ELISA を行えばバックグラウンドを低く抑えることができる。精製抗原を使用する場合は、P1 細胞付着タンパク質などがあげられる。また、合成ペプチドや、遺伝子組換えによって生産した *M. pneumoniae* のタンパク質を抗原として使用することもできる。

一般的な ELISA 操作は、はじめに抗原を固相（96 穴マイクロタイタープレートのウェルなど）に固定する。次に患者の血清を固相化抗原上でインキュベートし、抗原に血清中の抗体を結合させる。さらに、抗原に結合した抗体に酵素標識抗体を結合させ、そこに酵素の基質を加えて反応による発色などを測定するものである。ELISA 法に基づく診断キットが海外で販売されている（文献 4 参照）。また最近、ELISA 法の原理を利用して、迅速に臨床検査を行うカード型の製品も市販されている。これはメンブラン上に抗原をセットして迅速に抗体検査を行うものである。日本でも入手できる（Meridian Diagnostics, Immuno Card Mycoplasma Tes, イムノカード マイコプラズマ抗体 (TFB)）。このキットは IgM だけを検出するものだが、他の IgG を検出する血清学的方法より早期に診断結果を得られる利点がある。

間接蛍光抗体法 (IFA)

固定した *M. pneumoniae* の抗原に、患者の血清を反応させて、血清中に *M. pneumoniae* に対する抗体が存在するかを調べる方法である。通常、培地に沈めたカバーガラス上に *M. pneumoniae* を増殖させ、メタノール酢酸などで固定し、患者血清と反応させる。反応後カバーガラスを洗浄し、*M. pneumoniae* 抗原に結合してカバーガラス上に残っている抗体を、蛍光標識した抗ヒト Ig 抗体で検出する。観察には蛍光顕微鏡を用いる。操作がやや煩雑で、蛍光像の観察と解釈に習熟を要するが、*M. pneumoniae* 抗体の存在を直接検出する有効な方法である。

寒冷凝集反応

寒冷凝集反応とは、低温（4℃）で O 型、Rh(-) の赤血球が凝集する反応で、赤血球の I 抗原に対する IgM 抗体によって起こる。マイコプラズマ肺炎ではこの抗体の上昇が見られるため、寒冷凝集反応が診断法となりうる。通常、マイコプラズマ肺炎発症後 1～2 週間で寒冷凝集反応がみられるが、陽性になるのは、マイコプラズマ肺炎の約 30～40%であるとされる。寒冷凝集反応は、他の細菌やウイルス感染症、自己免疫疾患、血液の疾患によっても見られ、マイコプラズマ肺炎に特異的ではない。現在はマイコプラズマ肺炎の検査法としてあまり使用されない。

代謝阻止抗体 (MI)

M. pneumoniae 感染患者の血清中には、*M. pneumoniae* の増殖を阻止する抗体が産生されている。患者の血清によって、*M. pneumoniae* の増殖に阻害が見られれば、*M. pneumoniae* の感染が疑われる。

ウェスタンブロット法

M. pneumoniae のタンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、PVDF 膜やニトロセルロース膜に転写する。

これに患者の血清を反応させ、*M. pneumoniae* のタンパク質に結合した患者の抗体を、標識抗体で検出する。この方法の利点は、*M. pneumoniae* のどのタンパク質抗原に対して患者の抗体が上昇しているのかを調べられることである。マイコプラズマ肺炎患者の血清の状態を知るための、より研究的な方法であるといえる。通常マイコプラズマ肺炎患者で産生が見られる抗体は、*M. pneumoniae* の膜に存在する P1、B(P90)、C(P40)、P30 タンパク質、あるいは DnaK、DnaJ、HMW3、など量が多く抗原性の強いタンパク質に対するものである。

3) 抗原検査法

抗原検査法の利点は、培養法や抗体検査では不可能な早期診断が行えることである。マイコプラズマ肺炎にはβ-ラクタム剤は無効であるので、適切な治療薬を選択して発病初期に治療を行うためにも、早期診断が望まれる。しかし、*M. pneumoniae* の抗原検査はこれまでいくつか方法が報告されているが、特異性と感度が十分ではなく有効な方法はいまだに広く普及していない。比較的に利用されている方法は、直接蛍光抗体法（DFA）で、蛍光標識した抗 *M. pneumoniae* モノクローナル抗体を用いて、マイコプラズマ肺炎患者の咽頭ぬぐい液中に存在する *M. pneumoniae* を検出するものである。蛍光顕微鏡での観察や判定に多少の習熟を要するが、早期診断法として有用であるとの報告もある（5）。

また、最近海外で、イムノクロマト法などにもとづいた *M. pneumoniae* 簡易抗原検査キットが市販されている。しかし、日本ではまだ市販されておらず有用性は不明である。

現状でマイコプラズマ肺炎の早期診断を意図する場合、PCR 法を用いるのが信頼性が高い。

4) DNA 検査法

PCR 法

PCR 法は比較的簡便に行うことができ、検出感度も培養法よ

りも高い。PCR による *M. pneumoniae* DNA の検出は、現在、マイコプラズマ肺炎の早期診断法として最も有効な方法であると考えられる。しかし、PCR 法はしばしば擬陽性による誤判定も起こすので注意を要する。

PCR 法は、すでに多くの方法が報告されているが、おもに、*M. pneumoniae* の 16S rRNA 遺伝子や、P1 付着タンパク質の遺伝子配列を検出ターゲットとしてデザインされている。臨床材料から直接検出を行う場合は、検出感度を上げるため nested PCR が用いられる。ここでは、nested PCR による検出法の例を示す。

PCR 法の実験操作

■ 鋳型 DNA の調製

検体のからの DNA の調製は、*M. pneumoniae* DNA の分解を防ぐためにも、採取後できるだけ速やかに行うのが好ましい。方法は、一般的な DNA 抽出操作を行えばよいが、次のような簡便な方法でもよい。

1. 咽頭スワブや体液中から鋳型 DNA の調製

1～2 ml の咽頭拭い液や、体液（髄液、組織液など）を卓上遠心機で遠心し（15000 x g、10 分間）、上清をのぞく。

沈渣に 0.1% Triton-X100 を含む TE buffer（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0）を 50 μ l 加え、懸濁する*。

95℃ で 5 分間加熱した後、鋳型 DNA として使用する。

*さらに、プロテイナーゼ K を終濃度 1 μ g/ml になるように加え、55℃で 15 分間処理すると DNA の収率が上がる場合があるが、プロテイナーゼ K を使用した場合は、フェノール抽出、エタノール沈殿でプロテイナーゼ K を失活、除去する必要がある。

体液からの DNA の抽出は、QIAGEN 社の QIAmp DNA Mini Kit などのようなキットでも簡便に行うことができる。

2. 細胞組織からの鋳型 DNA の抽出

患者の細胞組織などから PCR で *M. pneumoniae* の検出を試みることもある。この場合も、検体の処理法は細胞組織から DNA 抽出するため方法であればどのような方法を用いてもかまわないが、QIAGEN 社製の QIAmp DNA Mini Kit を使用すれば簡便に行うことができる。

■ PCR 反応

使用するプライマー

すでに多くのプライマー配列が報告されているが、一例として *M. pneumoniae* の 16S rRNA 遺伝子を検出するものと、P1 遺伝子を検出するプライマー配列をあげる。これらのプライマーを使用して nested PCR 法を行えば、かなり高感度、特異的に *M. pneumoniae* を検出することができる。

16S rRNA 遺伝子を検出するプライマー

1st PCR 用プライマー

MPN/1F: 5'-AGA GTT TGA CTG TAC CAT-3'

MPN/1R: 5'-GCT CAC TTT TAC AAG CTG GCG-3'

2nd PCR 用プライマー

MPN/2F: 5'-CTC GGT AGT GAA GTT AAC AC-3'

MPN/2R: 5'-GCA TTA GCA GTC TCG CTA G-3'

このプライマーを使用した場合、1st PCR では 782 bp、2nd PCR では 301 bp の PCR 産物が生成する

P1 遺伝子を検出するプライマー

1st PCR 用プライマー

ADH 2F: 5'-GGC AGT GGC AGT CAA CAA ACC ACG

~~ADH~~2R: 5'-GAA CTT AGC GCC AGC AAC TGC CAT-3'

2nd PCR 用プライマー

ADH/3F: 5'-GAA CCG AAG CGG CTT TGA CCG CAT -3

ADH/3R: 5'-GTT GAC CAT GCC TGA GAA CAG TAA -3'

このプライマーを使用した場合、1st PCR では 1451 bp、2nd PCR では 1324 bp の PCR 産物が生成する。

PCR 反応液組成 (1st, 2nd PCR 共通)

鋳型 DNA (10ng ~ 1 μ g)	5 μ l
dNTP 溶液 (各1.25 mM)	16 μ l
プライマー F (10 pmol/ μ l)	2 μ l
プライマー R (10 pmol/ μ l)	2 μ l
Taq DNA ポリメラーゼ (1 U/ μ l)	2 μ l
MgCl ₂ (25 mmol/l)	8 μ l
10倍緩衝液*	10 μ l
滅菌精製水	55 μ l
<hr/>	
100 μ l	

*10倍緩衝液は市販の PCR 酵素製品に付属のものを利用。

上記反応液を混合して PCR 反応を下の条件で行う（現在、あらかじめ混合された PCR 用の酵素試薬（Premix Taq EX, 宝酒造 など）が市販されており、このような試薬を用いれば、反応液に鋳型 DNA とプライマーを加えるだけなので簡便で再現性も良い。）。

PCR 反応を行う場合には必ず、陰性対照と陽性対照を置かなくてはならない。 陽性対照用には、あらかじめ、*M. pneumoniae* の菌体又は DNA を希釈して、PCR がぎりぎりに陽性になるようなサンプルを調製しておく。これを小分け、冷凍保存しておき、検査時に使用する。

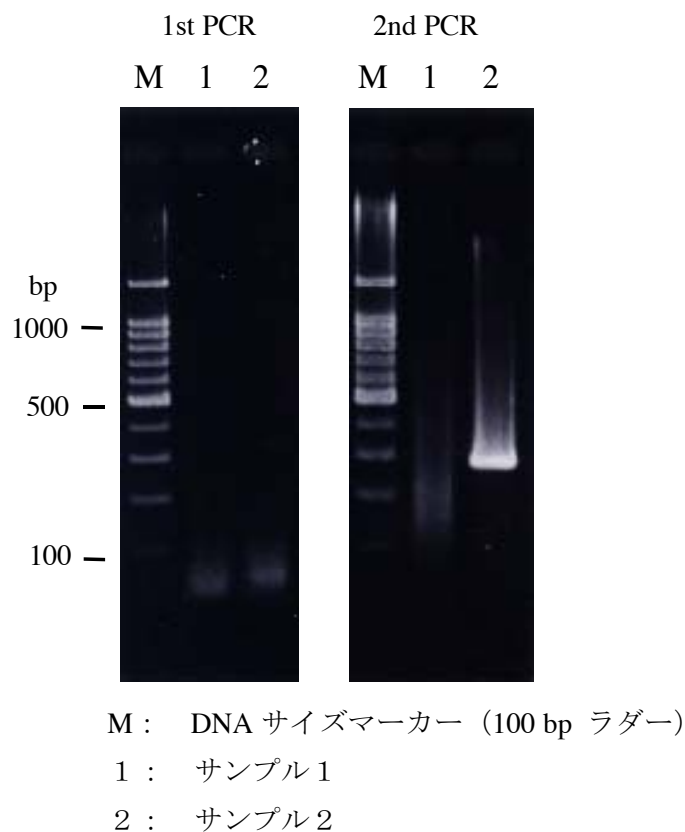
(1st, 2nd PCR 共通)

94°C	1 分	}	35 サイクル
94°C	1 分		
55°C	1 分		
72°C	1 分		
72°C	5 分		

1st PCR が終了したら、アガロースゲル電気泳動によって DNA の増幅が起こっているかを確認する。特異的な増幅が起こっていたら陽性と判断し、増幅が起こっていない場合は、1st PCR の反応液 5～10 μ l を鋳型として、2nd PCR 反応を行う。

■アガロースゲル電気泳動による分析と判定

PCR 終了後、反応液 5～10 μ l を 2 % アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド溶液 (0.5 μ g/ml) で染色した後、UV トランスイルミネーターを使用して観察する。PCR によって特異的な DNA の増幅がおこっていれば陽性と判定する。増幅が見られない場合や、不明瞭なスメアになっている場合は陰性（検出限界以下）と判定する。下の写真は、16S rRNA 遺伝子を検出するプライマーを使用した例である。



サンプル 1、2 とも、1st PCR では増幅がおきていないが、2nd PCR ではサンプル 2 で特異的な増幅（約 300 bp）がおこっており、陽性。サンプル 1 は不明瞭なスメアで陰性（検出限界以下）。

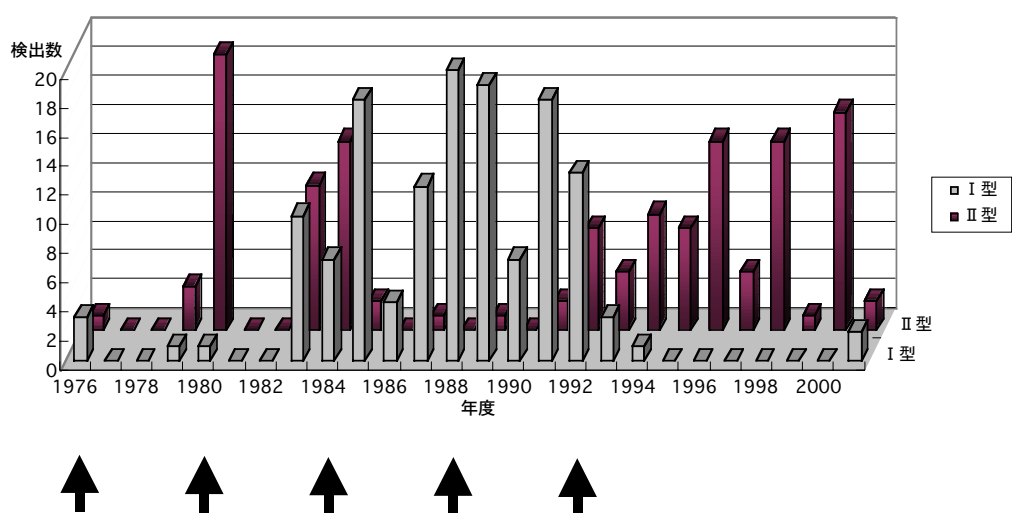
DNA プローブ法

DNA ハイブリダイゼーションを利用した DNA プローブ法が、*M. pneumoniae* 検査法として 1980 年代に開発されている。これは、おもに 16S rRNA 遺伝子を対象にして検出、検査を行う方法だが、感度、特異性とも PCR 法には及ばず、現在はほとんど使用されない。

4. その他

参考情報 1 : *M. pneumoniae* の遺伝子型別

M. pneumoniae にはⅠ型菌とⅡ型菌の 2 つの型があることが明らかになっている。Ⅰ型菌とⅡ型菌は付着タンパク質 P1 と、その他いくつかの遺伝子に塩基配列の違いが見られ、これを調べることによって区別することができる (6、7)。Ⅰ型菌とⅡ型菌の病原性の違いや流行との関連はよくわかっていないが、疫学調査を行うと下図のようにⅠ型菌とⅡ型菌は、数年から 10 年程度の間隔で出現を繰り返している。下図の下の矢印は、過去に日本で大きなマイコプラズマ肺炎の流行が見られた年である。



検査によって *M. pneumoniae* が分離できた場合、分離菌の型別を行えば、各地域のⅠ型とⅡ型菌の出現の動向を把握でき、疫学的にも興味深いと思われる。

型別は比較的簡単に行えるので、以下に、*M. pneumoniae* の遺伝子型別法を記す。

M. pneumoniae の遺伝子型別法

M. pneumoniae の遺伝子型別は PCR-RFLP 法によって行う。*M. pneumoniae* の P1 タンパク質遺伝子には、I 型菌と II 型菌で塩基配列が異なる場所が 2 カ所存在する (RepMP2/3 領域と RepMP4 領域)。この部分を PCR で増幅し塩基配列の違いを制限酵素の切断パターンで区別する。

プライマー ADH1 と ADH2 は、P1 遺伝子の RepMP4 領域を増幅するのに用い、ADH3 と ADH4 は RepMP2/3 領域を増幅するのに用いる。どちらの部位で型別を行っても同じ結果が得られる。

使用プライマー (RepMP4 領域用)

ADH1 : CTGCCTTGTCCAAGTCCACT

ADH2 : AACCTTGTCGGGAAGAGCTG

使用プライマー (RepMP2/3 領域用)

ADH3 : CGAGTTTGCTGCTAACGAGT

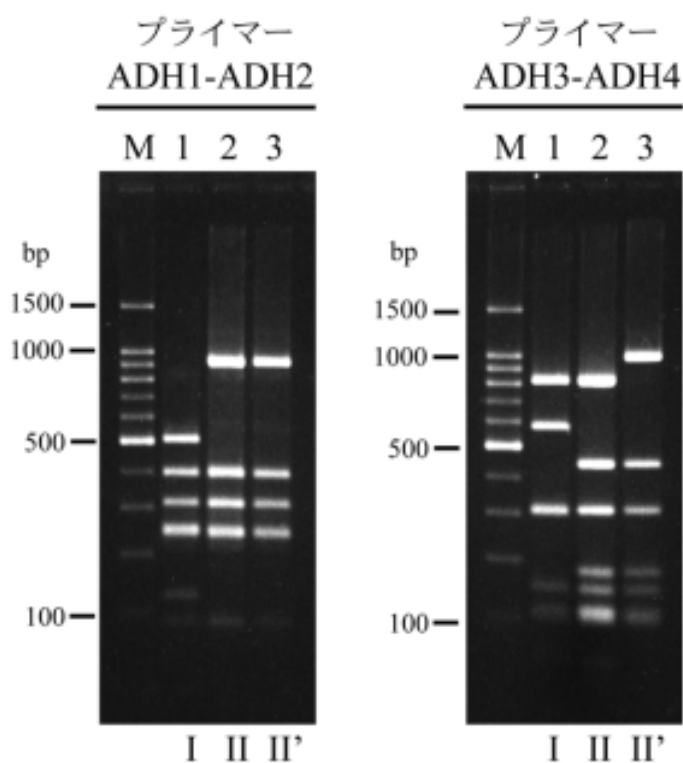
ADH4 : CTTGACTGATACCTGTGCGG

PCR 反応条件

94℃	1 分	}	30 サイクル
94℃	1 分		
55℃	1 分		
72℃	2.5 分		
72℃	10 分		

M. pneumoniae 分離株の DNA を鋳型として上記の条件で PCR を行くと、いずれの場合も約 2.5 kb の PCR 産物が得られる。

この PCR 産物を制限酵素 *Hae*III で処理した後、2 % アガロースゲル電気泳動で分析し、泳動パターンを比較して型別を行う。



M : サイズマーカー (100 bp ラダー)

1 : I 型菌

2 : II 型菌

3 : II' 型菌

上記は、レーン 1 が I 型菌、レーン 2 が II 型菌の分析結果である。まれに、レーン 3 のように、I 型菌、II 型菌とは RFLP パターンが異なる株 (ADH3-ADH4 プライマー使用時) が見つかることがある (II' 型)。今後、さらに RFLP パターンが異なる *M. pneumoniae* の新型株が発見される可能性も考えられるので、このような株が発見された場合は、下記にもご連絡をいただければと思います。

〒208-0011 武蔵村山市学園 4-7-1

国立感染症研究所 細菌第二部 第二室

担当 (見理)

TEL: 042-561-0771, E-mail: kenri@nih.go.jp

《付表》 *M. pneumoniae* の P1 遺伝子にもとづいた型別
 (PCR 産物の *Hae*III 処理で、以下のサイズの断片が生じる。)

プライマー ADH1-ADH2			プライマー ADH3-ADH4		
I 型	II 型	II' 型	I 型	II 型	II' 型
510	939	939	824	824	989
396	396	396	579	440	440
316	313	313	313	313	313
253	240	240	305	183	183
250	237	237	153	153	153
240	91	91	104	119	119
130	17	17	55	119	112
91			31	112	104
31			10	104	39
17			8	55	31
				39	10
				31	8
				10	
				8	

単位 bp

参考情報 2： 薬剤耐性菌と感受性試験

M. pneumoniae 感染症には β -ラクタム剤以外の抗生物質治療が有効で、通常はエリスロマイシン、ジョサマイシン等のマクロライド系あるいはテトラサイクリン、ミノサイクリン等のテトラサイクリン系抗生物質が使用される。つい最近まで、これらの薬剤に対する *M. pneumoniae* の耐性化は問題にはなっていなかったが、2000 年秋の札幌市、2001 年秋の高知県における *M. pneumoniae* 感染症の流行において、一部の患者からマクロライドおよび類似抗生物質に高度の交差耐性を示す *M. pneumoniae* が分離された。これら耐性を獲得した菌は、通常 23S rRNA 遺伝子に点変異がおきており、変異がおきている部位によって各種薬剤に対する感受性も少しずつ異なっている (8)。今後、このような耐性菌の出現が拡大する危険性も考えられ、耐性 *M. pneumoniae* 株の動向に注意する必要がある。従って、分離株についての薬剤感受性を調べることは重要である。

M. pneumoniae の薬剤感受性試験には定まったものがなく、その確立および標準化が急務と思われるが、以下に神奈川県衛生研究所で現在実施している微量液体培地希釈法（マイクロプレート法）による感受性試験法について記述する。

1. 培地

培養法の項に記した、Hayflick 変法培地 を使用する。

2. 菌液の調製

液体培地で十分に増殖させた *M. pneumoniae* の新鮮培養液を、新たな液体培地を用いて希釈し、 $10^4 \sim 10^5$ CFU / ml としたものを使用する。

3. 感受性試験

- ① 液体培地で 2 ないしは 4 倍階段希釈した薬剤希釈液 $100 \mu\text{l}$ を 96 穴マイクロプレート(滅菌済)に分注する。(薬剤によ

って MIC が異なるので、あらかじめ感受性菌を用いて予備試験を行い、測定すべき薬剤希釈濃度の範囲を決めておく。)

- ② *M. pneumoniae* 希釈液 100 μ l をマイクロプレートの各ウェルに分注する.
- ③ 対照として、薬剤を含まない培地 200 μ l (培地対照) および薬剤を含まない培地 100 μ l に *M. pneumoniae* 希釈液 100 μ l を分注した (*M. pneumoniae* 対照) 二つのウェルを用意する.
- ④ マイクロプレートをミキサーで十分混釈し、乾燥を防ぐために湿潤箱に入れ、37℃ で好気培養する.

⑤ マイクロプレートを毎日 2 回 (朝と晩) 観察し、*M. pneumoniae* 対照ウェルが完全に黄変した時に、培地対照ウェルと変わらない色調 (橙色) を呈するウェルの薬剤濃度を最小発育阻止濃度 (MIC; μ g / ml) とする.

感受性試験実施上の注意事項

- ① 培地 pH は MIC 値に影響を与える. pH7.2~8.2 の範囲で、エリスロマイシンの MIC 値は酸性側で高く、反対に、テトラサイクリンはアルカリ側で高い. 感受性用培地の最適 pH については今後の検討課題であるが、少なくとも感受性試験を実施する際には常に一定にしておく必要がある.
- ② 菌数も MIC 値に影響するが、 $10^4 \sim 10^5$ CFU / ml であればバラツキは小さい.
- ③ MIC の判定において、*M. pneumoniae* 対照ウェルが完全に黄変した時に判定する MIC をイニシャル MIC、その後数日間培養し、*M. pneumoniae* の増殖が停止した時に判定するものをファイナル MIC とする場合もある. しかし、エリスロマイシンやテトラサイクリンのように静菌的に作用する抗生物質では判定後における培養で MIC が変動し、ファイナル MIC の判定に戸惑うことがある. 従って、神奈川衛研ではイニシャル MIC を MIC

として記録している.

- ④ *M. pneumoniae* の薬剤感受性試験にはここで記載した微量液体培地希釈法以外に、寒天培地希釈法も利用されているが、神奈川衛研では感受性用培地の調整や感受性試験の操作が容易であること等から、上記方法を採用している. 両者において測定された MIC には大差はないとする報告もあるが、今後、感受性試験法の標準化を進める上で検討すべき課題と考えられる.

5. 文献

1. 尾形学監修、興水馨、清水高正、山本孝史編集、マイコプラズマとその実験法、1988、近代出版
2. 佐々木正吾編、マイコプラズマ図説、1980、東海大学出版会
3. 佐々木正吾、尾形学、中村昌弘編、マイコプラズマ、1974、講談社サイエンティフィック
4. Waites, K. B., Bébéar, C. M., Robertson, J. A., Talkington, D. F. and Kenny, G. E. : Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections in Cumitech-Cumulative techniques and procedures in clinical microbiology, edited by Nolte, F. S. 2001, ASM press, Washington, DC, U.S.A.
5. 田澤節子、岩澤篤郎、中村良子 : Mycoplasma, 臨床と微生物, 2001, 27 650-653
6. Kenri T, Taniguchi R, Sasaki Y *et al.* : Identification of a new variable sequence in the P1 cytoadhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae*: evidence for the generation of antigenic variation by DNA recombination between repetitive sequences. *Infect Immun* **67** : 4557-4562, 1999.
7. Dorigo-Zetsma JW, Wilbrink B, Dankert J *et al.* : *Mycoplasma pneumoniae* P1 Type 1- and Type 2-Specific Sequences within the P1 Cytoadhesin Gene of Individual Strains. *Infect Immun* **69** : 5612-5618, 2001.
8. Okazaki N, Narita M, Yamada S, Izumikawa K, Umetsu M, Kenri T, Sasaki Y, Arakawa Y, Sasaki T.: Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin in vitro. *Microbiol Immunol* **45** : 617-620, 2001

6. 執筆者

国立感染症研究所 細菌第二部 第二室

見 理 剛

佐々木 裕子

新 谷 三 春

堀 野 敦 子

佐々木 次雄

神奈川県衛生研究所 細菌病理部

岡 崎 則 男

国立感染症研究所 細菌第二部

荒 川 宜 親

問い合わせ先

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

国立感染症研究所 細菌第二部 第二室

TEL: 042-561-0771, FAX: 042-565-3315

E-mail: kenri@nih.go.jp または
sasaki@nih.go.jp

無 菌 性 髓 膜 炎

目 次

(1) 疾患の概説

(2) 検査に関する一般的注意

検査材料の採取

検査材料の輸送

作業上の注意

検査の進め方

(3) 検査方法

1) 細胞培養によるウイルス分離

2) 中和法によるウイルスの同定

3) 中和抗体価の測定

4) RT-PCR による遺伝子検出と塩基配列の解析

(4) 引用文献

(5) 連絡先

(6) 執筆者

(1) 疾患の概説

無菌性髄膜炎(aseptic meningitis)は他のエンテロウイルス感染症と同様、日本では毎年夏季を中心に流行する疾患であるが、秋～冬季にも発生が認められる。無菌性髄膜炎は、細菌性髄膜炎以外の髄膜炎の総称なので、ムンプスウイルス、単純ヘルペスウイルス等、他のウイルス感染に起因する髄膜炎も含まれるが、その多くは、エコーウイルス、コクサッキーBウイルス等のエンテロウイルスを起因ウイルスとしている。病原微生物検出情報によると、日本の無菌性髄膜炎患者から比較的多く分離されているエンテロウイルスは、エコーウイルス 6, 7, 9, 11, 16, 18, 24, 25, 30、コクサッキーウイルス A9, コクサッキーウイルス B1～5、エンテロウイルス 71 等であり、エコーウイルス 30 (E30), E9, コクサッキーウイルス B5 (CB5), E7, E6 の順に分離ウイルス数が多い。流行するエンテロウイルス血清型および流行の程度は、通常、年ごとに異なる。エンテロウイルスによる無菌性髄膜炎の症状は、発熱を主徴とし、頭痛、悪心・嘔吐等を伴う場合があるが、一般に予後は良好である。罹患年齢は幼児及び学童期が中心である。他のエンテロウイルス感染症と同様に、主要な感染経路は糞口感染であり、一般的な潜伏期間は 4～6 日程度とされている。ワクチン、抗ウイルス剤等、無菌性髄膜炎に対する積極的な予防治療法は、いまのところ存在しない。現在の感染症法では、無菌性髄膜炎は 4 類感染症定点把握疾患に分類されている。

(2) 検査に関する一般的注意

検査材料の採取

ウイルス分離のための検体として、糞便、髄液、口腔・咽頭拭い液等があげられる。無菌性髄膜炎の確定診断のためには髄液からのウイルス分離は診断的価値が高いが、エンテロウイルスの血清型により髄液からのウイルス分離率には大きな差がある。口腔・咽頭拭い液を採取した滅菌綿棒は、乾燥を避けるため、Veal Infusion Broth、細胞培養用培地等適切な保存液中に入れておく。臨床検体から直接ウイルス遺伝子検査を行なう場合の検体採取は、ウイルス分離用の検体採取に準じて行なう。検査をより正確で効果あるものにするために検体は発症後できるだけ早い時期に採取し、速やかに検査に供する。すぐに検査しない場合は凍結保存する。血清学的検査のためには、発症後早期に採取した急性期血清と発症後 2 週間以上経過した回復期の血清を採取する。

検査材料の輸送

ウイルス材料の保管・輸送中の凍結、融解の繰り返しはウイルス力価が低下するので避けなければならない。-20℃での保管・輸送が確保できなければ、0～8℃で保管・輸送する。輸送にあたっては冷却が保たれる状態で包装し、検体番号、発病日、検体採取日等、必要事項を明記したうえ送付する。送付先にはあらかじめ検体数、搬入予定などを連絡しておく。

作業上の注意

糞便、髄液、血液等、臨床検体の取り扱いは、バイオセーフティーに十分留意した上で行なう。検体の処理、ウイルス分離および同定の作業には、クラス 2 の安全キャビネットを使用する。ポリオワクチン未接種者、ポリオ中和抗体陰性者は、ワクチン接種を受けておく。

検査の進め方

エンテロウイルス感染症の確定診断は、基本的には、適切な臨床検体からのウイルス分離同定により行なう。適切な臨床検体が得られなかった場合あるいはウイルス分離が出来なかった場合は、血清学的方法や臨床検体からの直接的遺伝子検出等の検査により、実験室診断が可能になる場合がある。このマニュアルではおもにウイルス分離および中和抗血清を用いたエンテロウイルスの同定について解説し、血清学的検査とウイルス遺伝子検査についても簡単に述べる。

無菌性髄膜炎の場合、多くの血清型のエンテロウイルスが起因ウイルスとなっており、ウイルスにより培養細胞に対する感受性は大きく異なる。このため、ウイルス分離に用いられる培養細胞の種類も、実験室により、またその時期流行しているウイルスにより異なる。実際にエンテロウイルス分離に汎用されている培養細胞は、RD-18S, RD, Vero, HeLa, HEp-2, FL, CaCo-2 等であり、このうち 3~4 種類を組み合わせると、多くのエンテロウイルスを分離することが可能となる。また、L20B, L-hCAR 等特異的ウイルスレセプター発現細胞を用いると、ウイルス同定を簡略化することが可能となる。

エンテロウイルス血清型特異的中和抗血清を用いた中和法は、エンテロウイルスの同定の基本であり、適切な抗血清を使用すれば信頼性が高い。エンテロウイルスには多数の血清型が存在するので、はじめは何種類かの抗血清を組み合わせたプール血清を用いて血清型を同定する場合が多い。プール血清は、市販のものおよび公的機関で作製されたものが入手可能である。エンテロウイルスは伝播の過程で次第に抗原性が変化し、既存の抗血清で中和されにくい難中和株が出現する。この場合、難中和株に対する抗血清をあらたに調整し標準株に対する交叉中和活性を確認すると同定可能になる場合がある。

中和法による同定を補助する方法として、また検査の迅速化のため、ウイルス遺伝子検査も最近多くの実験室で利用されるようになってきている。今のところ、エンテロウイルス遺伝子検査は標準化されておらず、検査の目的により、適切な方法を使い分ける必要がある。ウイルス分離が出来なかった場合、発症期にウイルス分離用の適切な検体が得られなかった場合、エンテロウイルス感染の間接的な証明として血清学的診断法が行なわれる。通常、急性期と回復期の血清を比較して 4 倍以上の抗体価の上昇があれば、ウイルス感染の証明とされるが、エンテロウイルス感染には不顕性感染も多いので、検査結果の評価には注意が必要である。

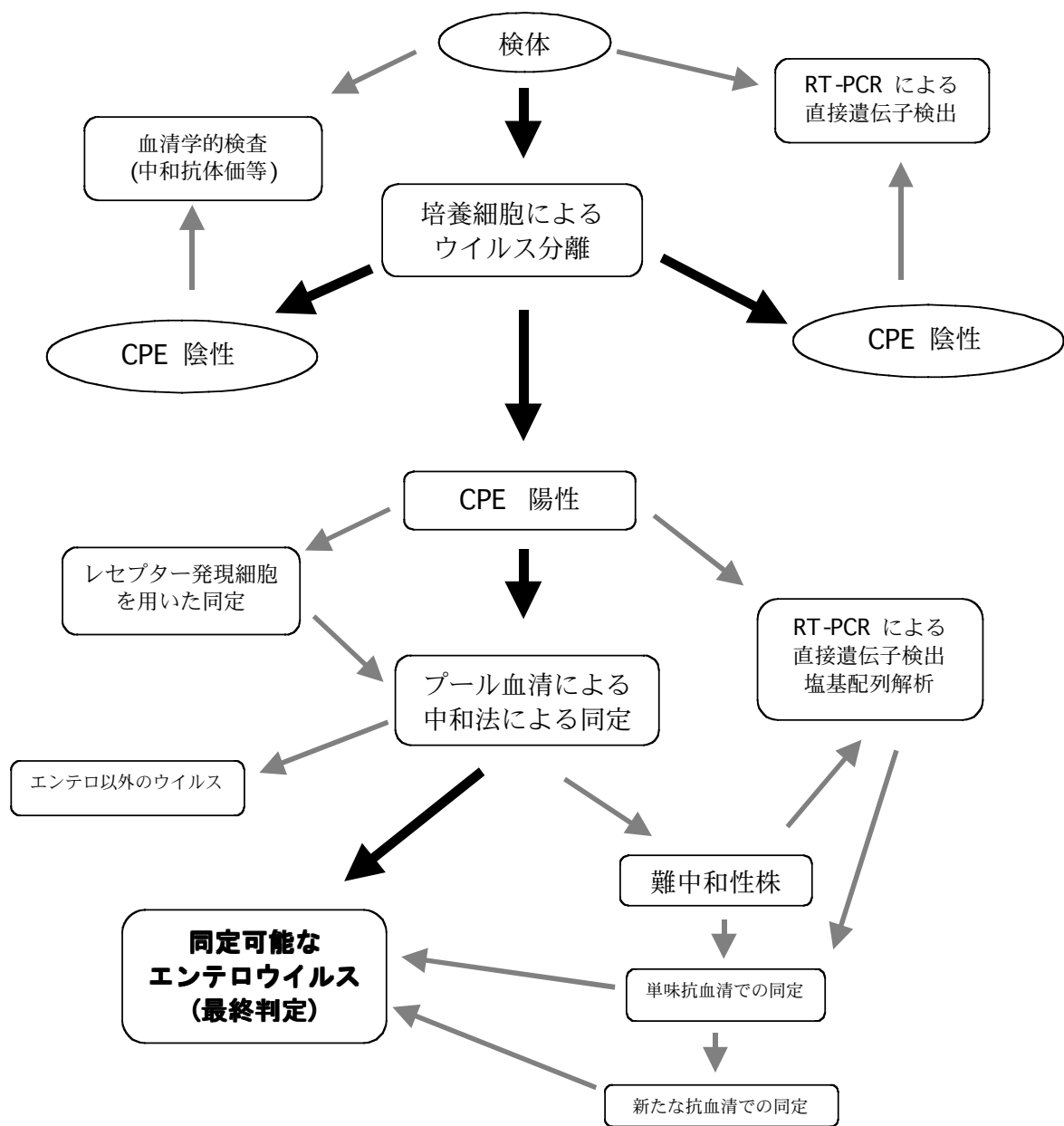




図 1. 検査の進め方（無菌性髄膜炎）

-  通常行なわれる実験室検査
 補助的に用いられる実験室検査

検査の判定

臨床検体からエンテロウイルスが分離された場合、特に、髄液からウイルスが分離された場合は起因ウイルスである可能性が高い。ウイルス分離を行なうことが出来ない場合、あるいはウイルスが分離されなかった場合は、ウイルス感染の間接的な証明として血清学的診断法を用いることが出来る。また、分離が困難なエンテロウイルスの同定には、RT-PCR 等ウイルス遺伝子検査が有用な場合もある。エンテロウイルスはしばしば不顕性感染を起こすので、臨床経過や疫学的情報を総合的に判断して、ウイルス実験室診断結果の意義を慎重に解釈するべきである。

(3) 検査方法

1. 細胞培養によるウイルス分離

エンテロウイルス分離に用いられる培養細胞の種類は、実験室により異なる。実際のウイルス分離に汎用されている培養細胞は、RD-18S, RD-A, Vero, HeLa, HEp-2, FL, Caco-2 等であり、このうち 3~4 種類を組み合わせると、多くのエンテロウイルスを分離することが可能となる。細胞培養に用いる器具・試薬等も、実験室および使用する細胞により多少異なるが、以下によく用いられる試薬および代表的な細胞培養用培地の調整法について述べる。

1. 試薬

クロロホルム、Eagle's MEM(オートクレーブ可能、ニッスイ等)、7.5%NaHCO₃、ペニシリン・ストレプトマイシン(PS)溶液、牛胎児血清(FCS)、PBS(+), L-グルタミン溶液 (200mM)

増殖培地

500ml の Eagle's MEM 培地に PS 溶液 (終濃度ペニシリン 100unit/ml、ストレプトマイシン 100 μ g/ml)、FCS (終濃度 10%)、7.5%NaHCO₃ を 7.5 ml、L-グルタミン溶液を 5ml 添加する。

維持培地

500ml の Eagle's MEM 培地に PS 溶液 (終濃度ペニシリン 100unit/ml、ストレプトマイシン 100 μ g/ml)、FCS (終濃度 2%)、7.5%NaHCO₃ を 12.5 ml、L-グルタミン溶液を 5ml 添加する。

糞便検体処理液

PBS(+)に、PS 溶液 (終濃度ペニシリン 500unit/ml、ストレプトマイシン 500 μ g/ml)を添加する。

2. 機器・機材

炭酸ガス培養器 (33~37°C)、24 穴プラスチックトレイ (あるいは細胞培養用チューブ)、175cm²細胞培養用プラスチックボトル (あるいはガラス製 750ml ルー瓶)、50ml、15ml 遠沈管、マイクロピペット (P1000)、マイクロピペット (P200)、滅菌済み綿付きチップ (200 μ l)、ストックチューブ(2ml 用)等

操作

1. 検体の前処理

- ① 糞便検体は、50 ml のポリプロピレン製の遠心管に、糞便約 1 g、抗生物質を含んだ PBS (+) 8.5 ml、クロロホルム 1.5 ml を加える。20 分間激しく攪拌の後、3,000 rpm 20 分遠心する。上清を新しいストックチューブにとり接種液とする。
- ② 髄液検体は、通常そのままウイルス分離に使用可能である。咽頭・発疹等の拭い液は、保存液中の綿棒をよく攪拌した後、10,000rpm、20 分 (4℃) 遠心分離し上清を接種する。細菌の混入が認められる場合は、フィルター処理も有効である。

2. 接種と観察

- ① 24 穴の培養プレートあるいは組織培養用ガラスチューブを使用する。24 穴の培養プレートを用いる場合は、とくに検体間のクロスコンタミネーションに留意する。
- ② 単層になった細胞の増殖培養液を捨て、維持培養液にかえる。
- ③ 検体 100~300 μ l を細胞に接種する。
- ④ 35~37℃で炭酸ガス培養器にて培養し 7~10 日間観察する。観察して CPE が現れない時は、細胞を凍結融解し別の新しい細胞に継代し、更に 7~10 日間観察し CPE が出現しない場合、陰性とする。
- ⑤ 完全な CPE が現われたら、培養液を-20℃に保存する（初代ウイルス）。
- ⑥ 初代ウイルスを新しい細胞に接種して、はっきりした CPE が再び現れたら培養液を-20℃に保存する（2 代目ウイルス）。ウイルスの同定には力価の高くなった 2 代目ウイルスを用いる。
- ⑦ 接種後 24 時間以内に CPE が現われたら、検体中の成分による非特異的細胞毒性の可能性が高い。新しい細胞にその培養液を 100 μ l 接種し観察を続ける。または、検体接種時に接種液により 1 時間吸着を行なった後、細胞を洗浄し維持培養液を加えることにより細胞毒性の影響を低下させることが出来る。

2. 中和法によるウイルス同定

培養細胞によるウイルス分離後、抗エンテロウイルスプール血清を用いた中和法により、ウイルスの同定を行なう。現在中和法は、マイクロプレートを用いた微量法により行なわれることが多い。中和法は、トランスファープレートを用いる方法、細胞懸濁液を後から加えるまきこみ式、いずれの方法で行なっても構わない。エンテロウイルスの同定には、シュミット式、メルニック式、RIVM プール等のプール血清が使われてきたが、現在、市販のプール抗血清として、単味抗血清を 2～4 種類混合したエンテロウイルス中和用混合血清（デンカ生研：Polio 1～3, コクサッキー B1～6, エコー1, 3～7, 9, 11, 12, 14, 16～19, 21, 22, 24, 25, 30, コクサッキー A9）が入手可能である。また、地方衛生研究所と国立感染症研究所で作製したエコーウイルス同定用プール血清 (EP-95、表 1) は、支部センターあるいは国立感染症研究所を介して分与可能である。

プール血清で同定されなかったウイルスは、他のプール血清あるいは単味血清を用いて再度中和試験を行なう。難中和性分離株の場合でもプール血清による中和試験の際の CPE の出方を観察していると血清型の見当がつけられる場合もあるので、再度単味血清（標準株および分離株）で中和試験を試みる。

表 1 EP-95 によるエンテロウイルスの同定

EP-95 プール 血清	血清型 (Echo)														
	3	4	5	6	7	9	11	14	16	17	18	22	24	25	30
EP1	○	○	○	○	○										
EP2	○					○	○	○	○						
EP3		○				○				○	○	○			
EP4			○				○			○			○	○	
EP5				○				○			○		○		○
EP6					○				○			○		○	○

○：CPE 陰性

1. 試薬・細胞

同定に使用する細胞はウイルス分離のものと同じ細胞を使用するのが原則である。
血清希釈には維持培養液、細胞浮游液の調整には増殖培養液を使用する。

2. 機材

炭酸ガス培養器、96 穴細胞培養プレート、マイクロピペット (P1000)、マイクロピペット (P200)、滅菌済み綿付きチップ (200 μ l、1000 μ l)、ウイルス希釈用滅菌済み綿付き長チップ (200 μ l)、ウイルス希釈用試験管 (アルミキャップ付き)

操作

1. トランスファープレートを用いる方法

- ① 96 穴トランスファープレートに 20 単位のプール血清または中和用混合血清 25 μ l と 100 TCID₅₀/25 μ l に希釈したウイルス液 25 μ l を入れ、マイクロプレート用ミキサーで混和する。
- ② 35～37℃の炭酸ガス培養器中で 2 時間反応させる。
- ③ あらかじめ 96 穴平底プレートに培養した細胞の培養液を捨て、細胞維持培地 100 μ l/well を加える。
- ④ トランスファープレートを細胞培養プレートに重ねてウイルスを接種する。
- ⑤ 35～37℃の炭酸ガス培養器に入れ、7 日間 CPE を観察する。

2. まきこみ法

- ① 抗血清プールを 50 μ l/well 加える。
- ② 希釈した分離ウイルス (100 TCID₅₀/50 μ l) 50 μ l を入れ、マイクロプレート用ミキサーで混和する。
- ③ 35～37℃で 2 時間反応する。
- ④ 中和の時間に細胞をトリプシン消化し、1～2 $\times 10^5$ 個/ ml の細胞浮游液をプレート 1 枚につき 10ml 用意する。
- ⑤ 細胞を 100 μ l ずつ中和反応の終わったプレートに加える。
- ⑥ 35～37℃の炭酸ガス培養器に入れ、7 日間 CPE を観察する。

判定

- ① 倒立顕微鏡で 7 日間 CPE を観察し、CPE の出現パターンにより、血清型を判定する。
- ② 原則として攻撃ウイルス量が $32 \sim 320 \text{ TCID}_{50}/\text{well}$ から外れているときは再検査する。
- ③ break through (標準株抗血清で中和されにくい“プライム”変異株や凝集塊のあるウイルスでは不完全な中和反応が起こり、一見中和されているように見えるが、日数がたつと CPE が出現する現象) が起きる場合は、ウイルスを HCFC-141b (ダイキン工業) あるいはクロロホルムで処理するか、口径 $0.45 \mu\text{m}$ の非ニトロセルロースフィルターでろ過すると中和がうまく行く場合がある。

3. 中和抗体価の測定

エンテロウイルス感染症の間接的診断法として、血清(髄液)中の抗エンテロウイルス抗体の測定が行なわれている。通常、急性期と回復期の血清を比較して 4~8 倍の抗体価の上昇があれば、ウイルス感染の証明とされるが、エンテロウイルス感染には不顕性感染も多いので、検査結果の評価には注意が必要である。エンテロウイルスの血清学的診断に最もよく利用されるのは中和法であり、マイクロプレートを用いた微量法により血清中の中和抗体価を測定する。中和試験に使用するウイルスは標準株を用いるが、適切な臨床分離株を併用すると、より正確な抗体価が測定できる場合がある。

1. 試薬・細胞

HeLa, RD, HEp-2 など使用するウイルスに感受性のある細胞を使用する。血清希釈には維持培養液, 細胞浮游液の調整には増殖培養液を使用する。抗体価測定に使用するウイルス株は、基本的には標準株を用いるが、分離株を併用する場合もある。あらかじめストックウイルスの感染価(TCID₅₀/50 μ l)を測定しておく。

2. 機材

炭酸ガス培養器、96 穴細胞培養プレート、マイクロピペット(P1000)、マイクロピペット(P200)、滅菌済み綿付きチップ(200 μ l、1000 μ l)、ウイルス希釈用滅菌済み綿付き長チップ(200 μ l)、ウイルス希釈用試験管(アルミキャップ付き)

操作

1. 血清希釈

- ① 血清は維持培養液で 1:4 に希釈（血清 0.1ml に希釈液 0.3ml）し、56℃30 分間非働化する。

		血清 対照	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	細胞 対照	
試料 1	A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
試料 2	C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
試料 3	E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
力価 測定	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
			-0	-1	-2	-3	-4						

図2. 中和抗体測定試験のマイクロプレート上におけるレイアウト

- ② 96 穴マイクロプレートの第 1 列、3～10 列目の各穴に、維持培養液を 50 μ l ずつ、滅菌チップ（以下チップ）で滴下、分注しておく（図 2）。
- ③ 1 希釈の第 1 列目、2 列目及び 3 列目の穴に 1:4 に希釈した血清の 50 μ l を分注する。
- ④ 各型とも血清の 1 希釈につき 2 穴ずつを使用し、チップによる血清の倍数希釈を行う。3 段階希釈ごとにチップを換える。

2. 中和

- ① 細胞コントロール列には 100 μ l/well の維持培養液を加える。
- ② 100 TCID₅₀/50 μ l のウイルス液を細胞コントロール列および Back-titration 以外の well に加える。
- ③ Back-titration を並行して行い、攻撃ウイルス量が 100 TCID₅₀（許容範囲 32～320 TCID₅₀/50 μ l）で行われたことを確認する。
- ④ マイクロミキサーで混和後、蓋をかぶせて炭酸ガス培養器に入れ、35～37℃で3時間中和する。
- ⑤ 中和を終えたマイクロプレートに別に準備した細胞浮遊液（1～2×10⁵ 個/ml）を 100 μ l ずつ加え 35～37℃で培養する。
- ⑥ 接種後1週間、CPE の出現の有無を観察する。

3. 判定

- ① ウイルス対照の成績が 32～320 TCID₅₀/50 μ l からはずれているときは再検査を行う。表 2 に示したように、抗体価は接種ウイルスを CPE の発現を抑制した血清の最高希釈倍数で示す。

表 2 中和抗体価の判定例

	血清希釈倍率								中和 抗体価
	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	
試料 1	+	+	+	+	+	+	+	+	< 4
	+	+	+	+	+	+	+	+	
試料 2	-	-	-	-	+	+	+	+	32
	-	-	-	+	+	+	+	+	
試料 3	-	-	-	-	+	+	+	+	32
	-	-	-	-	+	+	+	+	

4. RT-PCR による遺伝子検出と塩基配列の解析

エンテロウイルス同定は基本的には、ウイルス分離および中和抗血清を用いた中和法により行なわれるが、エンテロウイルスの血清型は数多く存在し、難中和性の分離株も存在することから抗血清を用いた従来の分離同定法では、多大な労力および検査時間が必要とされる。そのため汎エンテロプライマーを用いて、RT-PCR 法によりウイルスゲノムを増幅、塩基配列を決定し相同性検索 (BLAST、FASTA など) によりウイルスを同定する方法が近年多数報告されている。解析方法および解析領域はいまのところ標準化されていないが、VP1 部分領域、VP4-VP2 部分領域を用いた解析結果が、おもに報告されている (図 3)。いずれの領域を用いた解析でも、適切な解析方法を用いた場合、多くのエンテロウイルス標準株・分離株で、血清型とよく対応した遺伝子型別が出来るとされている。

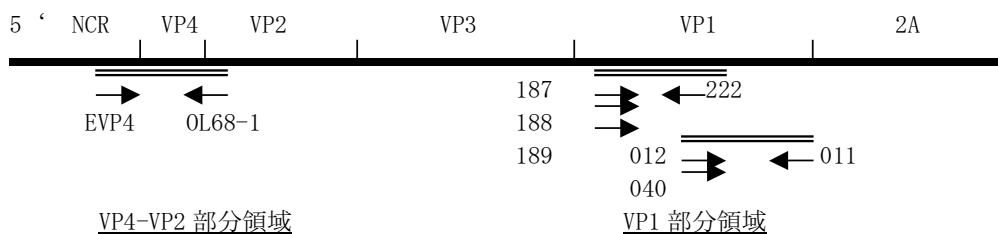


図 3 エンテロウイルス RT-PCR に用いられるプライマーと増幅部位

1. 試薬と実験器具

共通するもの

0.5ml または 0.2ml PCR 用チューブ、1.5ml チューブ、フィルター付きピペットチップ (1000, 200, 20 μ l)、マイクロピペット、滅菌精製水 (DW/Milli-Q 水など)、微量高速冷却遠心器、恒温水槽或いはブロックヒーター、ミキサー

RNA 抽出用

RNA 抽出法は従来の SDS フェノール抽出法のほか、市販のキット各種 (キアゲン: QIAamp Viral RNA Mini kit、ロシュ: High Pure Viral RNA kit など) が利用可能である。

[SDS フェノール抽出法の場合]

Proteinase K (20mg/ml)、10% SDS、3M 酢酸ナトリウム、1mM DTT、RNase inhibitor、TE saturated phenol、クロロホルム、エタノール

[QIAamp Viral RNA Mini kit (cat 52904) の場合]

キットのほかにエタノールが必要

RT-PCR、及び電気泳動用

各種 RT-PCR キット、sense, antisense プライマー、サーマルサイクラー、電気泳動装置、アガロース、TBE バッファー、DNA サイズマーカー、エチジウムブロマイド溶液

直接塩基配列決定 (DyeDeoxy terminator 法による)

プライマー (3.2pmol/ μ l、シーケンス用センス及びアンチセンス)、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (ABI)、Centri-sep スピンカラム (ABI401762)

操作

1. VP1 領域の解析法 (Obreste et al., CDC, USA の方法を改変)

1) ウイルス

培養細胞に検体を接種後 CPE が 80-100% 現われたものをハーベストする。凍結融解後遠心 (12,000rpm、約 5 分) し、上清をウイルス浮遊液とする。

2) RNA 抽出

SDS-フェノール抽出法あるいは市販 RNA 抽出キットを用いてウイルス RNA を抽出する。

[フェノールクロロホルム抽出法]

- ① Proteinase K (20mg/ml) 4 μ l とウイルス浮遊液 400 μ l を混和。37°C、15 分間反応させる。
- ② 10% SDS 12 μ l を①に加える。
- ③ 37°C 15min 加熱し更に 50°C 30 分間反応させる。
- ④ フェノールクロロホルム混合液 (1:1) 400 μ l を加え、3 分間攪拌後 12,000rpm にて 5 分間遠心する。
- ⑤ 上層の水溶性部分を取り、3M 酢酸ナトリウム 40 μ l とエタノール 1ml と混和する。

- ⑥ -20℃で1晩放置。或いは-80℃で30-60分間放置。
- ⑦ 12,000rpm 10分間遠心。
- ⑧ 上清を捨て70%エタノールを1ml加える。
- ⑨ 12,000rpm 5分間遠心。
- ⑩ 上清を捨て、99.5%エタノールを1ml加える
- ⑪ 12,000rpm 5分間遠心。
- ⑫ 上清を捨て管底に残った沈渣を自然乾燥する。
- ⑬ RNase inhibitor (2.5-5 U/ μ l) 含む 1 mM DTT 16 μ l を加え沈渣を溶解する。
- ⑭ -80℃にて保存。

[抽出キットを用いる場合：QIAamp Viral RNA Mini kit (cat 52904)]

添付しているマニュアルを参照のこと。最終的なRNA溶液は60 μ lとなる。

3) RT-PCR (one tube RT-PCR)

Access RT-PCR system (Promega: cat A1250) を用いた場合。

- ① 下記の反応組成に基づきマスタープールを作成。

反応組成 (1検体当たり)

AMV/Tfl buffer	10 μ l
10mM dNTP	1 μ l
sense-primer (10pmol/ μ l)	
187	2 μ l
188	2 μ l
189	2 μ l
antisense-primer (10pmol/ μ l)	4 μ l
25mM MgSO ₄	2 μ l
AMV reversetranscriptase (5U/ μ l)	1 μ l
Tfl DNA polymerase (5U/ μ l)	1 μ l
DW	22 μ l

- ② 抽出した RNA 溶液 3 μ l とマスタープール 47 μ l を PCR 用チューブ (0.2 或いは 0.5ml) に加え混合 (最終容量 50 μ l)。

- ③ 下記の条件にて RT-PCR 反応を行う。

反応条件

48°C	45 min		
94°C	2 min		
94°C	10 sec	x 35 cycle	
50°C	10 sec		
65°C	1 min		
65 °C	5 min		
4°C	∞		

④反応終了後 PCR 産物を電気泳動で確認する。

注 1) フェノールクロロホルム法で RNA 抽出を行った場合サンプル量は 0.5-1.5 μ l にする。併せて DW 量を変更する。

注 2) RT-PCR 反応に 0.5ml チューブを使うときはミネラルオイル (1 滴 : 約 50 μ l) を反応液に重層する。

4) プライマー

187 ACI GCI GYI GAR ACI GGN CA (2612-2631; position はポリオ 1 型 Mahoney 株を基準)

188 ACI GCI GTI GAR ACI GGN G (2612-2630)

189 CAR GCI GCI GAR ACI GGN GC (2612-2631)

222 CIC CIG GIG GIA YRW ACA T (2969-2951)

012 ATG TAY GTI CCI CCI GGI GG (2951-2970)

040 ATG TAY RTI CCI MCI GGI GC (2951-2970)

011 GCI CCI GAY TGI TGI CCR AA (3408-3389)

M:A/C; N:A/C/G/T; R:A/G; W:A/T; Y:C/T. I=deoxyinosine

5) PCR 産物の塩基配列解析

① PCR 産物の精製

PCR 産物が電気泳動にて確認できたなら、PCR 産物の精製を行う。目的とするサイズの単一のバンド(187/188/189 vs 222 の場合、約 340bp)が認められた場合は市販の PCR 産物精製キット (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN など) を用いると簡便である。バンドが複数見られた場合はゲルから目的とするバンドを切り出し精製する。(QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Cat. 28704 など)。手技については各種キット付属マニュアルを参照のこと。精製した PCR 産物の濃度は分光光度計による測定、或いは電気泳動を行い既知濃度の DNA サイズマーカーと比較しておおよその濃度を予測する。

② DyeDeoxy terminator 法による PCR 産物の蛍光ラベル (ABI 310 を用いた場合)。

RT-PCR 反応はセンス側で 2-3 種類用いるため、各プライマーで蛍光ラベルし、シーケンスを行って最も適切なものを選択すること。

反応組成 (1 検体あたり)

BigDye	8 μ l
Primer(3.2pmol)	1 μ l
DW	9 μ l
Template (30-90ng)	2 μ l

反応条件 (ABI GeneAmp 9700, 9600, 2400 の場合)

96°C	1 min		
96°C	10 sec	x 25 cycle	
50°C	5 sec		
60°C	4 min		
4°C	∞		

③ 蛍光ラベル産物の精製

エタノール沈殿法のほか CentriSep など市販の精製キットを用いると簡便である。
市販キットを用いる場合は各マニュアルを参考のこと。

エタノール沈殿法

- 反応終了後 70%エタノール 74 μ l をチューブに加える。
- 4 °C にて 30min 放置する。
- 14,000rpm、室温にて遠心分離を行う。
- エタノールを捨て沈渣を自然乾燥する。

④ シーケンサーへのアプライ (ABI シーケンサーの場合)

乾燥した沈渣を用いるシーケンサーに基づいた loading buffer (ABI310 の場合 TSR、ABI373、377 の場合ブルーデキストラナーホルムアミド溶液 1 : 5) に溶解してシーケンサーへアプライする。

6) 塩基配列の解析

得られた塩基配列は NCBI/GeneBank などに登録されている塩基配列データベースと比較する。データベースと比較するにあたり各種プログラムが存在する。相同性検索はメール或いは直接 WWW を介し国立遺伝学研究所の DDBJ サーバーなどによる BLAST などのプログラムを用いて検索を行う。利用方法については下記のサイトを参照にされたい。商用データベース (Genetyx CD など) によることも可能である。他の分離株と比較して系統関係を解析するには商用ソフト (Genetyx Win/Mac など)、フリーのソフト (phylip, MEGA など)、あるいは www 上のサービス (DDBJ ClustalW など) を利用する。

サイト例 <http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>

2. VP4-VP2 領域の解析法

1) ウイルス

2) RNA 抽出

(ともに 1. VP1 領域の解析と同じ)

3) RT-PCR

Access RT-PCR system(Promega: cat A1250)を用いた場合。

①下記の反応組成に基づきマスタープールを作成。

反応組成 (1 検体当たり)

AMV/Tfl buffer	10 μ l
10mM dNTP	1 μ l
EVP4 (sense:10pmol/ μ l)	2 μ l
OL68-1 (antisense:10pmol/ μ l)	2 μ l
25mM MgSO ₄	2 μ l
AMV reversetranscriptase (5U/ μ l)	1 μ l
Tfl DNA polymerase (5U/ μ l)	1 μ l
DW	28 μ l

②抽出した RNA 溶液 3 μ l とマスタープール 47 μ l を PCR 用チューブ (0.2 或いは 0.5ml) に加え混合 (最終容量 50 μ l)。

③下記の条件にて RT-PCR 反応を行う。

反応条件 (one tube RT-PCR)

48°C	45 min		
94°C	2 min		
94°C	10 sec	x 35 cycle	
50°C	10 sec		
65°C	1 min		
65 °C	5 min		
4°C	∞		

④反応終了後 PCR 産物を電気泳動で確認する。

4) プライマー

sense EVP4(20bp) CTA CTT TGG GTG TCC GTG TT

antisense OL68-1(20bp) GGT AAY TTC CAC CAC CAN CC

Y=C, T, N=A, C, G, T

5) PCR 産物の塩基配列解析

④ P C R 産物の精製

(ともに 1. VP1 領域の解析と同じ、約 650bp の PCR 産物を精製する)

⑤ DyeDeoxy terminator 法による PCR 産物のラベル。

反応組成

BigDye	8 μ l
Primer (EVP4、或いは OL68-1 : 3.2pmol)	1 μ l
DW	9 μ l
Template (30-90ng)	2 μ l

反応条件

(1 . VP1 領域の解析と同じ)

⑥ 蛍光ラベル産物の精製

(1 . VP1 領域の解析と同じ)

6) 塩基配列の解析

(1. VP1 領域の解析と同じ)

(4) 引用文献

- 1) 浦野 隆、エンテロウイルス感染症、臨床とウイルス、23 : 141 - 155、1995
- 2) 萩原昭夫、ポリオ、エンテロウイルス感染症、手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎、臨床とウイルス、23 : 156 - 163、1995
- 3) 清水博之、非ポリオウイルス感染症の実験室診断、日本臨床、57 : 336 - 339, 1999
- 4) 米山徹夫、ポリオウイルス感染症の診断、日本臨床、57 : 331 - 335, 1999
- 5) Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. J. Virol. 73 : 1941-1948, 1999
- 6) Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. J. Clin. Microbiol. 37 : 1288-1293, 1999
- 7) Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. J. Clin. Microbiol. 38 : 1170-1174, 2000
- 8) Li ・Gaur 著（舘野義男・山崎由紀子訳）『分子の進化』（1994 年，廣川書店）
- 9) 根井正利著（五條堀孝・斎藤成也訳）『分子進化遺伝学』（1990 年，培風館）
- 10) Phylip、MEGA など分子系統解析ソフトを集めたリンク集
<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>

(5) 検査依頼先

エンテロウイルスの分離同定については、全ての地方衛生研究所で対応可能である。ポリオウイルスが分離された場合の型内鑑別(ワクチン株か否かの判別)については、国立感染症研究所ウイルス第二部が対応する。エンテロウイルス抗血清プール(EP-95)の分与は、地方衛生研究所の各支部センターおよび国立感染症研究所ウイルス第二部が担当する。エンテロウイルス単味抗血清およびエンテロウイルス標準株の分与については、国立感染症研究所ウイルス第二部に要相談のこと。

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4 - 7 - 1

国立感染症研究所ウイルス第二部

清水博之

TEL : 042-561-0771, FAX : 042-561-4729, E-mail :

hshimizu@nih.go.jp

(6) 執筆者

清水博之、米山徹夫、吉田 弘 (国立感染症研究所ウイルス第二部)

山崎謙治、奥野良信 (大阪府公衆衛生研究所)

山下照夫 (愛知県衛生研究所)

ブドウ球菌食中毒

ブドウ球菌食中毒

目 次

I. ブドウ球菌食中毒の概説

1. ブドウ球菌食中毒の検査に関する一般的な注意事項
2. 検査材料の採取・輸送および保管
 - 1 検査材料の採取
 - 2 検査材料の輸送
 - 3 検査材料の保管

II. 検査の進め方

1. 黄色ブドウ球菌の分離
2. エンテロトキシンの証明

参考1 乳製品中のブドウ球菌エンテロトキシン検査法

参考2 乳等からのエンテロトキシン検査方法（TCA濃縮法）

III. 執筆者一覧

I. ブドウ球菌食中毒の概説

ブドウ球菌食中毒は代表的な毒素型食中毒で、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の増殖に伴って食品中に産生されたエンテロトキシンを摂取する事により発症する。黄色ブドウ球菌は、ヒトをはじめとする各種動物に広く分布し、主に化膿性疾患の原因菌である。環境抵抗性も強いことから、あらゆる食品が本菌の汚染を受ける可能性が高い。食中毒事例の原因食品はにぎりめしが最も多く、ついで弁当類、菓子類などである。本菌食中毒は通常喫食後 1～5 時間で発症し、原因となるエンテロトキシンの性質から、吐き気、嘔吐を主徴とする。1970 年代までは、我が国における最も主要な細菌性食中毒であったブドウ球菌食中毒の発生数は、その後年次的に減数し、1990 年代後半には、事件数・患者数とも全細菌性食中毒に占める割合は数%と大変低く安定していた。他の細菌性食中毒の発生数があまり変化していない中で、ブドウ球菌食中毒の目立った減少は、食品製造者、食品販売者、食品衛生関係者などの努力に因るもので、特に、食品取り扱い時の手袋着用の徹底と調理後の温度管理が良好に機能した結果と考えられている。一方、2000 年 6～7 月に大阪を中心に発生した乳製品を原因とする大規模なブドウ球菌食中毒事件（雪印事件）の発生は、社会的影響は甚大で、本菌が依然として食品衛生上重要な食中毒起因細菌であることを示した。

1. ブドウ球菌食中毒の検査に関する一般的な注意事項

黄色ブドウ球菌はP 2 実験施設で(Biosafety level 2) B S L 2 の取り扱い基準に従い行う。すなわち、患者又は疑わしい患者由来の検査材料、食中毒が疑われる食品等を取り扱う際には、レベル2 の施設を備えた検査室で行う。

2. 検査材料の採取、輸送及び保管

ブドウ球菌食中毒が疑われる検体には、ブドウ球菌エンテロトキシンや黄色ブドウ球菌が含まれていることを前提として取り扱うことが必要である。検体の取り扱いは、以下のように行う。

1 検査材料の採取

ブドウ球菌食中毒の検体としては、推定原因食品、患者の嘔吐物及び糞便、更に推定食品を調理した器具、施設や調理者の手指、鼻前庭等のスワブが対象となる。

2 検査材料の輸送

ブドウ球菌やエンテロトキシンが含まれている可能性のある検体の取り扱いには、周囲への汚染に留意し、十分な注意を払う必要がある。検体は他の食中毒検体と同様に採取後、乾燥や高温を避け、冷蔵しながら速やかに検査室へ搬送する。検体は、漏れることのないように包装のうえ、識別できるように記号等を付ける。他の場所へ検査を依頼する等、輸送が必要な場合は、郵政省告示第618号（平成9年12月4日）に基づいた包装を行った上、感染性物質であることを明示して輸送する。

3 検査材料の保管

速やかに検査することが重要であるが、輸送等で保管の必要のある場合は、冷蔵又は凍結して保存する。ブドウ球菌は、 -20°C の凍結における生存性は比較的良好である。

Ⅱ．検査の進め方

ブドウ球菌食中毒の検査法は、①検体中の毒素産生性黄色ブドウ球菌の分離培養②検体中のエンテロトキシンの証明に大別される。

食中毒患者の検体や推定原因食品からのブドウ球菌の検出は選択平板培地へ接種する直接分離培養で行う。ヒトが発症するのに必要な菌数は、食品中に 10^6 個/g 以上と推定されているので、検体から菌の分離は比較的容易である。直接分離培養する場合は、検体中の生菌数が推定可能な定量培養を行う。その他の検体では、増菌培養の併用が必要となることがある。典型的なブドウ球菌食中毒事例では、検体から多数のエンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌が分離される。一方、原因食品が加熱処理等で、生菌の分離が困難な場合は、②のエンテロトキシンの検出を試みる必要がある。

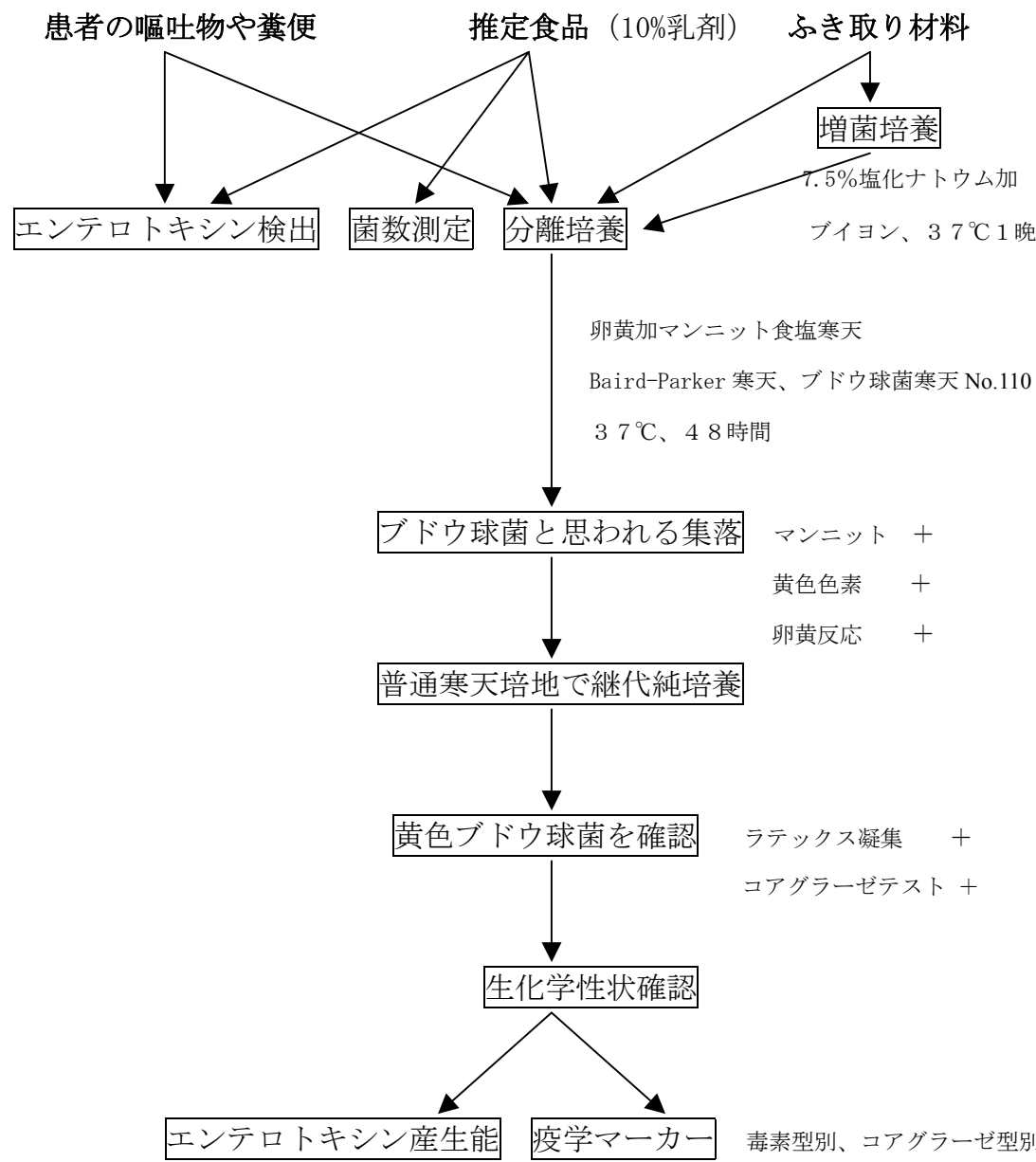
1. 黄色ブドウ球菌の分離

ブドウ球菌食中毒は潜伏期が短いので推定原因食品が確保される事が多い。通常、患者は食品と共にエンテロトキシン及び多数の生菌を摂取する事になるので、推定原因食品及び患者材料（吐物、下痢便）から多数のブドウ球菌が検出される。検体の原液及びその 10 倍階段希釈液 0.1ml を卵黄加マンニット食塩寒天培地又は Baird-Parker 寒天培地に滴下し、コンラージ棒で全面塗布する。選択分離培地としては、ブドウ球菌寒天 No. 110、マンニット食塩寒天、卵黄加マンニット食塩寒天、Baird-Parker 寒天等が用いられる。食品中の黄色ブドウ球菌の定量培養には、食塩を選択剤としない Baird-Parker 寒天培地が好まれる傾向がある。37℃ 48 時間培養し、疑わしいコロニーを普通寒天培地に継代する。卵黄加マンニット食塩寒天では、黄色ブドウ球菌は、1.5mm 程度の黄色集落を形成し、周囲に卵黄反応による不透明な環を形成する。黄色ブドウ球菌以外にもその他のブドウ球菌や一部のグラム陽性菌や腸炎ビブリオ等も増殖する。Baird-Parker 寒天では、黄色ブドウ球菌は 1.2mm 程度の灰色から黒色の集落を形成する。その他の菌は、増殖が抑制され、白っぽい集落を形成するので鑑別できる。食品中の黄色ブドウ球菌の定量培養に適する。

純培養を確認した後、ラテックス凝集反応やコアグラゼテストにより黄色ブドウ球菌であることを確認する。ラテックス凝集反応は、黄色ブドウ球菌と他のコアグラゼ陽性ブドウ球菌との鑑別に効果がある。更に、エンテロトキ

シン産生性、エンテロトキシン型別、コアグララーゼ型別などを行う事により、原因食品由来株と患者分離株の検討が出来る。推定原因食品及び患者材料（吐物、下痢便）から高率かつ多数のブドウ球菌が検出され、コアグララーゼ型、ファージ型や毒素型等が一致することが本食中毒判定の重要な基準となる。（図1 参照）。

図1 食中毒検査材料からの黄色ブドウ球菌の分離—同定手順



2. エンテロトキシンの証明

ブドウ球菌食中毒は、食品中で増殖した黄色ブドウ球菌が耐熱性のエンテロトキシンを産生し、この毒素を食品と共に摂取することにより発症する。黄色ブドウ球菌以外では *S. intermedius* や *S. hyicus* のごく一部の菌株もエンテロトキシンを産生することが知られているが、実際の食中毒の原因となった事件はない。ブドウ球菌エンテロトキシンは耐熱性であるのでブドウ球菌が死滅する条件下でもその活性が保たれ食中毒を発症することがある。この場合、疑われる食品や患者材料から生菌の分離が出来ない。稀な例ではあるが、こうした食中毒事例は報告されている。戦後最大の患者数となった雪印事件は、この例である。したがって、推定原因食品からのエンテロトキシン検出は重要である。エンテロトキシンの検出は、簡易・迅速診断試薬或いはキットが市販されているので、通常これを利用することになる。現在入手可能な検出キット類は、にぎりめしや弁当などを原因とするこれまでの食中毒事件では、直接食品からの検出が可能であったが、雪印事件の原因食品から検出するには感度が不十分で、検体をその種類により適当な方法で処理し、エンテロトキシンを濃縮する必要があった。十分な毒素の産生が見られたと思われる通常の食中毒事例の推定食品からのエンテロトキシン抽出は、食品 10 g に対し生理食塩水 90 ml を加え、ストマッカー等でよく混ぜ、遠心分離により上清を回収し、濾過したものを市販のキットにかける。一方、雪印事件の牛乳の様に直接エンテロトキシンを検出するには濃度が低すぎるが、摂取する食品の量が多いため摂取総量としては、発症に至る例がある。このような場合のエンテロトキシン検出法については、本マニュアルの最後に、参考 1 “乳製品中のブドウ球菌エンテロトキシン検査法” 及び参考 2 “乳等からのエンテロトキシン検査方法（TCA 濃縮法）” として、具体的な手法を詳しく説明してあるので、参考にしていきたい。

参考 1

乳製品中のブドウ球菌エンテロトキシン検査法

大阪府立公衆衛生研究所 浅尾 努
大阪市立環境科学研究所 小笠原 準

エンテロトキシン取り扱いの注意点

1. 遠心チューブ等是有機溶剤耐性でタンパクの吸着が少ないポリプロピレン製のものを使用する。低濃度の毒素はガラス製やポリスチレン製のチューブに吸着する。
2. 陽性コントロールとして使用する精製毒素溶液は、なるべく高濃度で小分けしてスクリュウキャップチューブで凍結保存する。
3. 毒素の容器への吸着を防ぐ目的で、希釈液には0.5%程度のBSAを添加する。SET-RPLA（デンカ生研）添付の希釈液でもよい。日常検査に使用する毒素は冷蔵保存し、凍結融解の繰り返しを避ける。
4. 毒素が付着した可能性のある器具は 1～2%次亜塩素酸ナトリウム溶液に 1 時間以上浸漬して毒素を不活化するか、121℃で 20 分以上高圧滅菌する。

エンテロトキシン検査に使用する試薬と器具機材

1. 緩衝液の作製（参考）

0.01 M リン酸緩衝液、pH 6.0 （50 倍濃縮液）

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (MW 358.14)11.65 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MW 156.01) 72.95 g

蒸留水で 1,000 ml にメスアップする

0.1 M リン酸緩衝液、pH 7.5-0.2 M NaCl

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (MW 358.14) 15.042 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MW 156.01) 1.248 g

NaCl 5.844 g

蒸留水で 500 ml にメスアップする

2. イオン交換樹脂

- 1) 500 ml の 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に CM-Sephadex C-50 （膨潤

率 20-40 ml/g dry) 又は SP-Sephadex C-50 (膨潤率 20-40 ml/g dry) を 5 g の割合で加える。

- 2) 室温で数時間以上放置して十分に膨潤させる。
- 3) 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) を 3 回交換し、同時に沈降スピードの遅い微粒子をデカント或いはアスピレータで吸引除去する。
- 4) 水分を可能な限り除去し、冷蔵庫で保存する。

3. 入手可能なエンテロトキシン検出キット

- 1) SET-RPLA (デンカ生研) : A 型毒素の検出感度は 0.3~0.5 ng/ml である (私達の結果)。
- 2) VIDAS Staph Enterotoxin (bioMerieux、代理店日本ビオメリュー) : A 型毒素の検出感度が最も高く、検出限界は約 0.25 ng/ml 或いはそれ以下である (私達の結果)。
- 3) Transia Plate (Diffchamb、代理店メルクジャパン)
- 4) TECRA SET (R-Biopharm、代理店セティ カンパニー リミテッド)
- 5) RIDASCREEN (R-Biopharm、代理店セティ カンパニー リミテッド)

*上記のキットのうち、エンテロトキシンの型別ができるのは、SET-RPLA と RIDASCREEN のみである。前者は E 型が同定できないし、後者は特に高価であるのが欠点である。RPLA は半定量できるが他の市販キットは定量性を保証していない。しかし TSANSIAPLATE や VIDAS Staph Enterotoxin でも定量は可能である。

4. その他の試薬と器具

試薬

2M HCl、2M NaOH、クロロホルム

器具

透析チューブ、スターラー、グラスフィルター、アスピレータと吸引ビン、パスツールピペット、10 ml ピペット、PD-10 カラム、PD-10 エンブティカラム (使用済み PD-10 カラを再使用してもよい)

機材

冷却遠心器、スターラー、ハンデイトイプ pH メータ、ロータリーエバポレータ

種々のエンテロトキシン濃縮法

通常の食中毒では、食品中に数 10 ng/g 以上のエンテロトキシンが検出できるので濃縮する必要がない事例が殆どである。臨床症状等からブドウ球菌食中毒が疑えるにも拘わらずエンテロトキシンが検出できない場合、エンテロトキシンを濃縮する方法として以下の方法が考えられる。この場合濃縮前に食品を後述するような方法で前処理する必要がある。

1. 30%ポリエチレングリコールによる透析濃縮

ヨーロッパや米国で広く利用されているが、濃縮には1日間位は要する。

2. 凍結乾燥

エンテロトキシンは脱水にも安定なので可能ではあるが、設備と時間を要する。

3. 簡易型限外濾過（遠心式）

ULTRAFREE (MILLIPORE) や VIVASPIN (VIVASCIENCE) はエンテロトキシンの濃縮と同時にバッファ交換が可能である。膜への吸着がなく、エンテロトキシンの検査には有用な器材の一つである。

4. イオン交換樹脂

Amberlite CG 50、CM-Sephadex、QAE-Sephadex、DEAE-cellulose、SP-Sephadex 等が毒素の精製に使用されているが、検査法としてはあまり利用されていない。

5. トリクロロ酢酸（TCA）沈殿法

古くは毒素精製に使用されたが、活性が失活するために毒素の精製の目的としては現在使われていない。最近カマンベールチーズ中の毒素濃縮法に有用であるとの報告がある。試料に最終濃度約 5%の割合に TCA を氷冷下で加える。

6. ロータリーエバポレータ

毒素の耐熱性を利用したもので、エンテロトキシン以外の易熱性タンパクを変性させる効果もあると考えられる。

ロータリーエバポレータによるエンテロトキシンの濃縮

（牛乳、加工乳、脱脂粉乳で可能）

脱脂粉乳の溶解：脱脂粉乳は 10%の割合で滅菌蒸留水に溶解する（スターラーで攪拌）。可能であれば 4℃で一夜保存後に以下の方法を実施する。

1. 酸処理とクロロホルム処理

- 1) 試料 10 ～15 ml に 2M 塩酸を加え、pH 3.8 に調整する。
少しづつ加えると完全に凝固しない場合がある（失敗の可能性が高い）。
予め加える 2M 塩酸量を検討し、一気に塩酸を加え、直ちに攪拌するのがよい。
- 2) 攪拌後、室温に 10 分間放置。
- 3) 生じた白色の凝集塊を 4℃、3,000 回転で 20 分間遠心する。
透明な上清が得られる。そうでないものは再試験する。
- 4) 上清に 2M 水酸化ナトリウムを加えて pH を 6.8（中性）にする。
白濁する。
- 5) 等量のクロロホルムを加えて振とうする（約 20 秒）。
- 6) 4℃で 3,000 回転 20 分間遠心する。上清が混濁したものは再試験する。

2. ゲル濾過による塩類等の低分子物質の除去

PD-10 カラム（アマシャム バイオサイエンス）を使用する。
カラムは洗浄すれば再使用可能であるが、流速が低下したものは捨てる
ほうが効率がよい。

3. 濃縮

- 1) ロータリーエバポレータ（約 50℃）で蒸発乾固する（真空度 10 mmHg）。
突沸させないように気を付ける。約 15 分間で終了する。
- 2) ラテックスキット添付希釈液 0.5 ml で溶解する（20 倍濃縮）。
原液から測定するためにこの希釈液を使用する。

4. ラテックス凝集反応（SET-RPLA）

エンテロトキシン A を 0.05 ng/ml の濃度に添加した時の回収率は約 50%
である。他のキットでも測定が可能であるが、その場合はキット添付の
希釈液で溶解する。

バッチ法によるエンテロトキシン高度濃縮法 （牛乳の場合）

3.5 牛乳、エンテロトキシン A を 0.05 ng/ml の濃度に添加

1. 牛乳 100 ml を遠心管に採取。2M 塩酸を加えて pH を 4.0 に調整する。室温
で 30 分間静置。
2. 7,000 回転、20 分間、4℃で遠心する。

3. 上清に 2M 水酸化ナトリウムを加えて pH を 6.8 に調整する。
 4. 10%の割合にクロロホルムを加え振とうする（約 20 秒）。
 5. 3,000 回転、20 分間、4℃で遠心する。中間層を吸わないように水層をピペットで採取し、ワットマン 5A 濾紙で濾過する。
 6. 水層を透析チューブに入れ、流水中で一夜透析する。
 7. 透析処理した水層の pH を 2M 塩酸で 6.0 に調整する。
 8. 0.01 M リン酸緩衝液（pH 6.0）で平衡化した CM-Sephadex C-50 を水層に 4 ml（ベッドボリューム）加え、スターラーで 30 分間、間欠的に低速で攪拌する。
 9. バッチした CM-Sephadex C-50 をガラスフィルターに移し Sephadex を回収する。100 ml の 0.01 M リン酸緩衝液（pH 6.0）で 3 回に洗浄する。最後はアスピレータで吸引して水分を可能な限り除く。
 10. 4 ml の 0.2 M NaCl 加 0.1M リン酸緩衝液（pH 7.5）で 3 回溶出する。
 11. 限外ろ過（ULTRAFREE-15、MILLIPORE）で溶出液を 0.5 ml まで濃縮する。
 12. SET-RPLA によりエンテロトキシンの型別と定量。VIDAS で定量して回収率を測定。
- *牛乳、加工乳、脱脂粉乳では回収率は約 70%である。後述するように、前処理を工夫すれば、ほとんどの乳製品で使用可能と考えられる。

簡易型バッチ法による多検体処理

必要な器具、試薬等

1. 器具器材
 - 1) 冷却遠心器（3,000 回転）
（可能であれば 96 穴マイクロタイタートレイ遠心用アダプター）
 - 2) ブレンダー
 - 3) ロータリーミキサー（タイテック等）：バッチ用
 - 4) 吸引装置：カラム洗浄後の水分除去用
 - 5) プレートミキサー：マイクロタイタートレイの攪拌用
 - 6) ハンディタイプ pH メータ
 - 7) マイクロタイタートレイ
 - 8) ポリプロピレン製遠心チューブ（50 ml と 15 ml）
 - 9) エッペンドルフチューブ（1.5 ml）

- 10) PD-10 カラム (アマシャム バイオサイエンス)
- 11) PD-10 エンプティカラム (アマシャム バイオサイエンス)
- 12) カラム立て (試験管立てを利用して作成)
- 13) PD-10 カラム用リザーバ

SeP-PaK Reservoir 或いは VARIAN BOND ELUTE RESERVOIR
を工夫して取り付ける。

- 14) ピペットマン
- 15) パスツールピペット
- 16) ディスポーザブル注射筒：カラムの溶出用
- 17) 噴射ビン：洗浄バッファ用

2. 試薬

- 1) CM-Sephadex C-50 或いは SP-Sephadex C-50 (アマシャム バイオサイエンス)
- 2) クロロホルム
- 3) 2M 塩酸、2M 水酸化ナトリウム
- 4) 洗浄液：0.01M リン酸緩衝液 (pH 6.0)
大量に使用するので 50 倍濃縮液を作製し、適時希釈するのが便利である。
- 5) 溶出液：0.2 M 食塩加 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.5)
- 6) SET-RPLA (デンカ生研)：毒素検出用逆受け身ラテックス凝集反応試薬

3. CM-Sephadex C-50 の膨潤

- 1) 0.01M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に CM-Sephadex C-50 (膨潤率 20~45 ml/g dry) を加え混合後、沈降スピードの遅い微粒子をデカント或いはアスピレータで吸引除去する。
- 2) 室温で数時間以上放置して十分に膨潤させ、水分を可能な限り除く。
- 3) 冷蔵庫で保存する。

簡易型バッチ法の基本操作手順

1. 酸処理 (カゼインの除去)
 - 1) 2M 塩酸で pH を 4.5 に調整する。一気に加え激しく混合する。
 - 2) 室温に 10 分間放置する。
 - 3) 遠心 (3,000 回転、20 分、4℃)
2. 中和 (中性で不溶性物質の除去)

2M 水酸化ナトリウムを加えて pH を 6.8 に調整する。

3. クロロホルム処理（脂質の除去とタンパク変性）
 - 1) 上清に等量のクロロホルムを加えて 20 秒間激しく混合する。
 - 2) 遠心（3,000 回転、20 分、4℃）
 - 3) 上清を採取する。
4. ゲル濾過による試料のバッファ交換（イオン強度の低下、pH の調整）
 - 1) PD-10 カラムを 25ml の 0.01 M リン酸緩衝液（pH 6.0）で平衡化する。
*リザーバを使用すると容易である。
 - 2) 試料 2.5 ml を load した後、3.5 ml の上記緩衝液で溶出する。
 - 3) 上記の操作を 3 回繰り返す（計 10.5 ml の濾液が得られる）。
5. バッチ（イオン交換樹脂と毒素の吸着）
 - 1) 0.01 M リン酸緩衝液（pH 6.0）で膨潤した CM-Sephadex C-50 を 0.5 ml 加える（ピペットチップの先端を切断して使用）。
 - 2) ロータリーミキサーで緩やかに攪拌（30 分）
6. 洗浄（非吸着物質の除去）

0.01 M リン酸緩衝液 pH 6.0（噴射ビン入）約 10 ml をカラムに流し込み
2回 洗浄する。洗浄液は可能な限りアスピレータで除去するのが重要である。
7. 溶出（イオン強度及び pH を上げ毒素を遊離させる）
 - 1) 0.2 M 食塩加 0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.5）を 0.5 ml 加える。
 - 2) 室温に 10 分間放置する（時々軽く混和）。
 - 3) カラムの内径に合うディスポーザブルの注射筒（5 ml）を装着する。
 - 4) 圧をかけて溶出液を 1.5 ml エッペンドルフチューブに採取する。
8. SET-RPLA（デンカ生研）による毒素の型別と濃度の測定
 - 1) 取り扱い説明書では試料の希釈率は 25 μ l となっているが、50 μ l 或いは 100 μ l では、それぞれ検出感度は 2 倍、4 倍に上昇する（デンカ生研の情報、私達も確認した）。
 - 2) U 型のマイクロタイタープレートは V 型よりも 1 管高くでる。
 - 3) プレートを 30 分間ミキサーで攪拌、1,500 回転で 15 分間遠心、斜めにすれば凝集の有無が直ちに判定可能である（デンカ生研の情報）。

*エンブティカラムには使用済み PD-10 カラムを蒸留水で洗浄すればよい。
*操作が簡単で多検体処理に都合がよく、所用時間は 3～4 時間である。

検体の前処理法

1. 牛乳、乳飲料：そのまま使用
脱脂粉乳：10%乳剤にする（スターラー等で溶解）。
チーズ：等量の蒸留水を加えてブレンダーで処理する。
粘稠性のある乳飲料：蒸留水で 1.5 倍位に希釈する。

酸処理ー中和ークロロホルム処理ーゲル濾過

*必要に応じて濾紙（5A）で濾過する。

2. アイスクリーム類：等量の蒸留水を加えて良く混合する。
バター：等量の蒸留水を加えて約 50℃で加温溶解する。

クロロホルム処理ー酸処理ーゲル濾過

*必要に応じて濾紙（5A）で濾過する。

3. pH が低い乳製品（酸処理の必要はない）
固形ヨーグルト：蒸留水を加えて良く混合する。
発酵乳；蒸留水で 1.5 倍位に希釈する。

遠心ー中和ークロロホルム処理ーゲル濾過

*必要に応じて濾紙（5A）で濾過する。

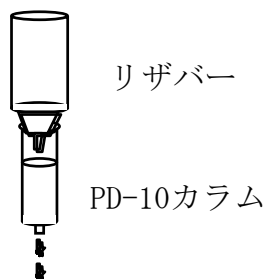
4. クリーム類（植物性、動物性）
10%脱脂粉乳を 1/3 量ー等量加えて 2. と同様の前処理をする。
（更に検討の余地あり）

エンテロトキシン検査上の問題点

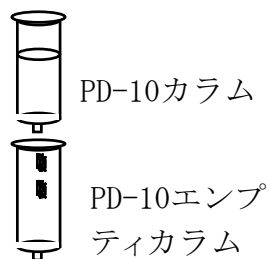
1. 国際標準の毒素がないので、トキシンテクノロジー社（米国）の毒素を使用せざるを得ない。AーE と H 型が入手可能（代理店コスモバイオ）。
100 μ g で 47,000ー73,000 円と高価である。
2. 地方衛生研究所の検査では毒素量と型別が要求される。特に毒素が単一でない場合の定量は困難である。日本で入手可能で、型別と定量或いは半定量できるキットは RIDASCREEN か SET-RPLA である。VIDAS や Transia Plate は単一の毒素であれば定量できるが型別はできない。2 種類以上の毒素が混在すると、型別も定量もできない。
3. 各キットの検出限界は毒素型により異なる。キットのロット差にも注意が必要である。

4. 検出限界付近で毒素陽性と判定するのは危険である。バッチ法で高度に濃縮（例えば 100 倍濃縮）し、希釈しても陽性になることを確認するのが安全である。
5. 如何なる前処理法を採用しても、いずれの検出キットを使用しても、免疫学的検出法には false negative や false positive 反応が起こり得ることを念頭におく必要がある。食品中のプロテイン A、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ等が凝集反応或いは酵素反応を妨害する。これらはウサギ血清での処理（IgG との結合）或いは加熱処理で防止できると思われる。しかし、未知の妨害物質があるのは当然予想される。経験のない食品の検査では、1) 一定量の毒素を添加した試料で回収試験を行う。2) 複数の検査オプションを用意しておく。3) 異なる検出キットの併用（例えば RPLA と ELISA）等により、非特異反応による検査ミスを防止するのが重要と考えられる。

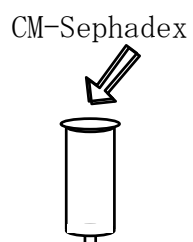
1. PD-10カラム
のバッファ交換



2. 試料のバッファ交換

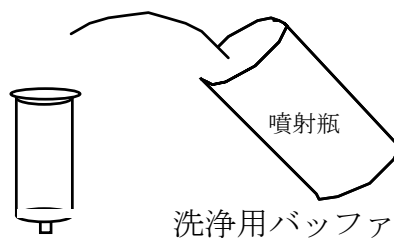


3. バッチ



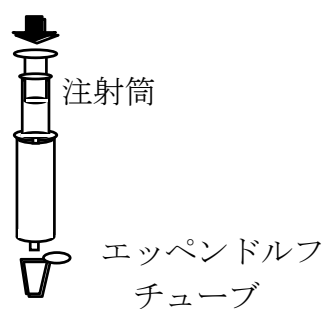
30分間攪拌する

4. 洗浄2回



5. 溶出バッファを加え、10分間放置

6. 溶出



7. SEの検出

SET-RPLA
ELISA

簡易型バッチ法の概略図

参考 2

乳等からのエンテロトキシン検査方法（TCA 濃縮法）

迅速かつ安価な、更に簡易で毒素回収の良いブドウ球菌エンテロトキシン（SE）検出法として、トリクロロ酢酸（TCA）による抽出・濃縮方法とVIDAS法、RIDA法、TP法、及びRPLA法を用いた検出方法を示す。

1 試料の調製

牛乳等50mlを秤量し、試料とする。脱脂粉乳の場合は、10% W/V（例 10g/100ml）になるように滅菌蒸留水に溶解し、4℃で一夜保存したものを試料とする。

2 抽出方法

試料50mlを2M HClでpH3.8に調整し、10分間室温放置後、遠心分離（3000rpm、20分、4℃）を行う。試料に2M HClを加える場合、少しずつ加えると十分タンパク質凝固がみられないことがあるので、HClを一気に加えた後、すぐに攪拌する。HCl添加量については、あらかじめその量を検討しておく必要がある。

その上清を2M NaOHでpH6.8に調整後、クロロホルムを10%量になるよう添加し、激しく混和後、遠心分離（3000rpm、20分、4℃）を行う。上清に30%TCA溶液を20%量になるように添加（最終TCA濃度は5%となる）し、10回転倒混和する。氷中で30分間放置後、遠心（3000rpm、20分、4℃）し、上清を除去した後、3000rpm、4℃で1分間遠心し、管壁に付着しているTCA溶液を十分に除去する。沈さに100mM Tris-HCl（pH8.0）を少量（0.5～0.8 ml）添加して溶解した後、2M NaOHでpH7～8に調整し、最終溶液量が2mlになるように100mM Tris-HClを加える。これをSE抽出・濃縮液としてSEの検査試料とする。

遠心チューブ等はポリプロピレン製を使用すること。（ポリスチレン製のチューブは毒素を吸着する可能性がある。）

3 エンテロトキシン（SE）測定キット

- （1）VIDAS Staph Enterotoxin（bioMerieux社）：以下VIDASと略す。
- （2）Transia Plate Staphylococcal Enterotoxins（MERCK社）：以下TPと略す。

Catalog No. : ST0796

- (3) RIDASCREEN SET A, B, C, D, E (Biopharm社) : 以下RIDAと略す。Art. No. : R4101上記3種の測定キットはS E定性キットであり、定量的に用いる場合はロット毎及び測定毎に標準曲線を作成する必要がある。
- (4) ブドウ球菌エンテロトキシン検出用キットSET-RPLA (デンカ生研(株)) : 以下RPLAと略す。

○ キットの測定原理及び検出限界

表 キットの測定原理及びキットに示された検出限界

キット名	測定原理	最小検出量	型別の可否
VIDAS	サンドイッチ法のELFA	0.25ng/ml	否
TP	サンドイッチ法のELISA	0.25ng/ml	否
RIDA	サンドイッチ法のELISA	0.2～0.7ng/ml	可
RPLA	逆受身ラテックス凝集反応	1～2ng/ml	可

4 標準S E : トキシンテクノロジー社 (Toxin Technology社) から毒素標準品 (表示の濃度より高めになっている) が市販されており、デンカ生研 (株) のキット付属の標準S E と整合して一定濃度を作製して用いると定量の精度が向上する。

5 キットの操作方法

(1) VIDAS

ミニバイダスにスパー及びストリップをセットし、検体500 μ l をストリップのサンプル用ウェルに注入後、ミニバイダスユーザーズマニュアルの指示に従い、測定を開始する。

(2) TP

- ① 必要数のストリップ (*) をセットし、陰性コントロール2ウェル、陽性コントロール1ウェルを設定する。1 サンプルに対し2ウェルを設定する。
- ② バイアル1の陰性コントロールと、バイアル2の陽性コントロールを100 μ l ずつ添加する。各サンプルを各ウェルに100 μ l ずつ添加し、プレートに蓋をする。

- ③ 室温で約30分間振とう培養する。この間に洗浄液を調整する。
- ④ プレートをしっかり持ち、手首を軽く打ってプレートの中味を振り出す。各ウェルをよく洗浄する。

洗浄方法：洗浄液は5～10秒ウェルの中に入れておき、その後プレートをひっくり返し、ペーパータオル上に数回たたきつけて洗浄液を取り除く。この作業を9回繰り返す。

- ⑤ バイアル4の複合物100 μ lを各ウェルに添加する。ピペットの先端がウェルに接触しないよう注意する。
- ⑥ 室温で約30分間振とう反応させる。反応が終了する直前に、基質・色素混合液の必要量を調整する。
- ⑦ プレートをしっかり持ち、手首を軽く打ってプレートの中味を振り出す。各ウェルをよく洗浄する。④の洗浄方法参照
- ⑧ 基質・色素混合液100 μ lをピペットで各ウェルに添加し混合して蓋を閉める。
- ⑨ 室温で約30分間振とう反応させる。
- ⑩ バイアル7の反応停止液50 μ lを各ウェルに添加し、ウェルの中味を完全に混和して色の変化を確認する。
- ⑪ 空気をブランクとして、450nmの吸光度を測定する。

ストリップには番号を記載しておくといい。ペーパータオル上で洗浄液を取り除く際にストリップがフレームから外れ、思わぬ混乱を生じる恐れがある。

(3) RIDA

- ① 1試料あたり1つのマイクロタイターストリップをフレームに入れる。
- ② 100 μ lの試料をA～E（毒素型に対応）及びF、G（陰性コントロール用）のウェルに、100 μ lの陽性コントロールをHのウェルに加える。
- ③ 室温で1時間反応させる。
- ④ ウェル中の液体を捨て、マイクロタイターストリップをフレームにいられたまま吸水紙に良くたたきつけ(3回以上)、ウェルの液体を十分に取り除く。
- ⑤ すべてのウェルに250 μ lの希釈した洗浄液を入れ、ステップ④と同様にして洗浄液を取り除く。この操作を3回以上繰り返す。
- ⑥ 100 μ lの酵素複合体を各ウェルに加えて、室温で1時間反応させる。

- ⑦ ウェル中の液体を捨て、マイクロタイターストリップをフレームにいられたまま吸水紙によくたたきつけ(3回以上)、ウェルの液体を十分に取り除く。
- ⑧ すべてのウェルに250 μ lの希釈した洗浄液を入れ、ステップ④と同様にして洗浄液を取り除く。この操作を3回以上繰り返す。
- ⑨ 各ウェルに50 μ lの基質液と50 μ lの色素原液を加える。よく混合し、室温で30分間反応させる(暗所)。
- ⑩ 各ウェルに100 μ lの反応停止液を加え、よく混合し、空気をブランクとして450nmの吸光度を測定する。

(4) RPLA

- ① マイクロプレートに、最前列の穴を除き各系列の穴に希釈液100 μ lずつを滴下する。
- ② 前列と2穴目に各サンプル100 μ lを2系列ずつ滴下する。
- ③ 2穴目から最後穴を除いて2倍段階希釈する。
- ④ 感作ラテックス抗A 25 μ l及び対象エンテロトキシンA 25 μ lを、それぞれの系列に滴下する。
- ⑤ マイクロプレート用ミキサーで十分振盪する。
- ⑥ マイクロプレートを室温に18～20時間静置後、判定する。
- ⑦ 通常の判定方法及び角度を70度に傾けた判定方法(RMAT法)で判定する。

5 測定結果の読み取り方

(1) VIDAS

結果のTest Value(TV)値が、0.13より低い場合は検出限界以下であり、0.13以上の場合は陽性とする。

(2) TP

- ・陽性コントロールの吸光度は0.5と等しいか或いはそれ以上である必要がある。
- ・陰性コントロールの吸光度は0.3と等しいか或いはそれ以下である必要がある。
- ・しきい値は陰性コントロールの平均値に0.2をプラスした値を用いる。

- ・吸光度値が（しきい値-0.05）より低いサンプルは陰性、吸光度値がしきい値より高いか等しいときは陽性とする。
- ・吸光度が（しきい値-0.05）としきい値の間にある場合は、疑陽性とする。

（3）RIDA

- ・ウェルF、Gの陰性コントロールの吸光度値の平均を求める。平均値に0.15を加えた値をしきい値とする。
- ・陰性コントロールの吸光度値は0.3以下、陽性コントロールの吸光度値は0.5以上であることを確認する。
- ・吸光度値がしきい値未満の試料は陰性、吸光度値がしきい値以上のときは陽性とする。

（4）RPLA

- ・通常判定：ラテックス凝集像の判定は、判定像の基準に従って行う。
- ・角度を70度に傾けた場合の判定方法（RMAT法）：ラテックス粒子の流下がウェルの下側まで観察されるものを陰性、ラテックス粒子がウェルの中央部に沈降し、ボタン状に観察されるもの及び僅かにラテックス粒子の流下が観察されるものを陽性とする。

6 標準曲線

（1）毒素溶液の調整

キット付属buffer又はS Eを含んでいないことが確認されている試料から上記2の抽出方法を用いて調整した濃縮液に、標準S Eを添加して0.125、0.25、0.5、1ng/mlの毒素溶液を作成する。毒素溶液の希釈はbuffer又は濃縮液で行う。

（2）測定方法

各施設で使用可能な検査キットを用いて、各毒素濃度溶液を測定する。

VIDAS及びRIDAは1点測定し、TP及びRPLAは2点測定する。

（3）標準曲線の作成

測定値からbuffer又は濃縮液の近似曲線を作成する。

RPLA法については、1ng/ml毒素液を2倍段階希釈したときの最高希釈倍率を求める。

7 注意事項

(1) TCA法による検出限界について

TCA法における食品中毒素の検出濃度は0.025ng/mlであり、キットに示されたものより10倍感度が高くなっている。回収率は濃縮液標準曲線から求めると52～69%と推定されている。

(2) 遠心チューブについて

遠心チューブ等の器材はポリプロピレン製を使用する。毒素、特に精製毒素はポリスチレン製のチューブに吸着する可能性がある。

Ⅲ. 執筆者一覧

山本茂貴：国立医薬品食品衛生研究所

五十君静信：国立医薬品食品衛生研究所

浅尾努：大阪府立公衆衛生研究所

小笠原準：大阪市立環境科学研究所

ヒトポリオーマウイルス感染症

目 次

I. ヒトポリオーマウイルス感染症の概説

1. BKV、JCV 検査に関する一般的な注意事項

1. 検査材料の採取
2. 検査材料の輸送と保管
3. 検査の進め方

II. 検査の進め方

1. 検体の採取
2. ウイルス分離
3. 赤血球凝集試験 (Hemagglutination: HA 試験)
4. 赤血球凝集阻止試験 (Hemagglutination Inhibition: HI 試験)
5. 間接蛍光抗体法によるウイルス抗原検出
6. PCR 診断

III. BKV、JCV 感染のウイルス学的診断基準

IV. 引用文献

V. 問い合わせ先

VI. 執筆者一覧

1. ヒトポリオーマウイルス感染症の概説

ポリオーマウイルス *Polyomavirus* はポリオーマウイルス科 *Polyomaviridae* に属し、サルを自然宿主とする SV40、マウスを自然宿主とする Murine polyomavirus がよく知られている。ヒトには BK ウイルス (BKV) と JC ウイルス (JCV) が感染する⁽¹⁾。これらのウイルスは直径約 45nm の正二十面体の粒子で粒子中には環状 2 重鎖 DNA を含み、エンベロープは存在しない。いずれもハムスターなどある種の動物に接種すると腫瘍が形成されることから DNA 型腫瘍ウイルスに属する。BKV、JCV とともに小児期に感染を受けており、成人の 70% 以上が抗体を保有している。BKV は世界中に広く蔓延しており、多くの場合尿路系に感染している。BKV 感染の大部分は無症候性に感染しているが、腎移植患者で免疫抑制療法を受けるとウイルスが再活性化されて尿中に排泄される。BKV は出血性膀胱炎 hemorrhagic cystitis 発症との関連性が示唆されている。一方、JCV も広く蔓延しているが、疾患との関連性はヒト中枢神経系の脱髄疾患である進行性多巣性白質脳症 (PML: progressive multifocal leukoencephalopathy) 以外はよくわかっていない。ウイルスが髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイトに感染し、直接細胞を破壊することで二次的に脱髄を引き起こす。PML は免疫機能低下をきたす基礎疾患の上に発症する極めて稀な疾患であるが、近年、エイズの流行に伴い世界中で症例数が増加している。また、日本国内でも臓器移植が積極的に行われるようになり、移植後、免疫抑制療法を受けることで免疫機能が低下し、それに伴って BKV、JCV が再活性化し重篤な病状に至ることが注目されてきている。臓器移植を受ける患者については特に BKV、JCV 感染の検査、診断を行う必要がある。

1. BKV、JCV 検査に関する一般的な注意事項

BKV、JCV 検査は P2 実験施設で BSL2 の取り扱い基準に従い行う。これらのウイルスは安定でエーテルやエタノールに耐性を示し、加熱や紫外線以外では不活化しにくいので実験室内の汚染には十分注意する必要がある。

1. 検査材料の採取

BKV、JCV 検査は血清抗体価は健常人もほとんどが抗体陽性であるため診断価値は少ない。検査材料は一般的には髄液や尿を用いる。BKV は出血性の尿路感染症の患者の尿を、JCV は痴呆や意識障害などの精神症状、麻痺、歩行障害などの神経障害を示す患者から髄液を採取する。JCV の場合は PML の確定診断価値が高いのは脳生検であるので、この実施が可能であれば脳組織の採取を行う。

2. 検査材料の輸送と保管

髄液や尿の検体は 0～4℃ に保ち、密閉して輸送する。脳組織はドライアイス存在下で輸送する。検体は -80℃ で保管する。

3. 検査の進め方

検体を受理したら直ちに検査を行う。ウイルス検査には培養細胞（Vero、MRC-5、COS-7）を用いたウイルス分離と PCR 法によるウイルス核酸の検出の 2 つがある。BKV、JCV は培養細胞内での増殖が遅いので分離するのに長期間を要することからウイルス分離培養と並行して PCR 法による検査も行う。ウイルスが分離できたら抗体を用いた間接蛍光抗体法（IFA）と赤血球凝集抑制試験（HI）で同定を行う。

II. 検査の進め方

1. 検体の採取

BKV は免疫抑制療法を受けている患者や出血性の尿路感染症の患者の尿を、JCV は痴呆や意識障害などの精神症状や麻痺や歩行障害などの神経障害を示す患者からの髄液を採取する。ウイルス分離用に採取した検体は無菌的でないことが多いため、細菌の増殖が問題となる。それを防ぐため、カナマイシン 60 $\mu\text{g/ml}$ またはペニシリン・ストレプトマイシンでは通常細胞培養に用いる量の 2 倍程度を希釈液に添加する。検体を 3,000rpm、30 分間遠心した上清を細胞維持培養液で 10 倍希釈したものを準備する。ヒトの脳組織は 10%乳剤を作製し、10,000 rpm、30 分間の遠心後、上清を回収し、さらに 0.45 μm フィルターで濾過を行い接種材料とする。

2. ウイルス分離

BKV のウイルス分離はアフリカミドリザル腎由来細胞である Vero 細胞あるいはヒト胎児肺由来 MRC-5 細胞を用いて行う。JCV は以前は初代ヒト胎児グリア細胞で分離していたが、現在では細胞の入手が困難なため、アフリカミドリザル腎由来細胞で SV40 の T 抗原を発現する COS-7 細胞を用いて分離を行う。

(1) 試薬と器具

Eagle's MEM

ウシ胎児血清 (FCS: 56℃, 30 分間非働化したもの)

PBS (−)

組織培養用プレート (24 well)

0.45 μ m フィルター

炭酸ガス培養器

遠心機

(2) 培地の調製

Eagle's MEM にウシ胎児血清を 10%になるように添加したものを細胞増殖用培養液とし、2 %になるように添加したものを細胞維持培養液として用いる。

(3) 方法

- 1) Vero 細胞、MRC-5 細胞および COS-7 細胞を細胞増殖用培養液を用いて 24 well プレートにて培養する。
- 2) 細胞が 50~70%confluent の状態になった時点で、プレートの培養液を除き検体を各 well あたり 100 μ l 接種して 37℃、1 時間培養器内に静置する。
- 3) 1 時間後、細胞維持培養液を 0.5ml 加えて培養器内で培養を続ける。細胞変性効果 (CPE) の観察は毎日行い、細胞維持培養液は 1 週間ごとに交換する。CPE はわかりにくくウイルスの増殖も遅いので 1 ヶ月までウイルス分離培養を続ける。
- 4) BKV は 50%の細胞が壁面から脱落した時点で 3,000 rpm、20 分間遠心して上清を回収しウイルス液とする。JCV は培養液中には放出されず、細胞に associate して存在するので、感染細胞を回収して 3 回の凍結融

解を繰り返すことで細胞を破壊する。細胞破碎液は 3,000 rpm、20 分間遠心して上清を回収し、ウイルス液とする。

3. 赤血球凝集試験 (Hemagglutination: HA 試験)⁽²⁾

BKV、JCV の完全粒子および中空粒子はヒト O 型赤血球やモルモットの赤血球を凝集する。この性質を利用して赤血球凝集試験によりウイルスの定量を行う。

(1) 試薬と器具

ノイラミニダーゼ (Type V, Sigma 社)

0.2% BSA 含有 PBS (pH 7.15)

PBS (pH 7.15)

V 字型 96 穴マイクロプレート (Costar 社, Cat No. 2897)

遠心機

インキュベーター

PBS pH 7.15 は $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.02g, KH_2PO_4 0.7g, NaCl 6.8g を蒸留水に溶解し、HCl または NaOH で pH 7.15 に調製した後、蒸留水を加えて 1 リットルに調製する。

(2) 方法

- 1) 回収したウイルス液にノイラミニダーゼを 0.05 mg/ml の濃度になるように添加し、37℃で一昼夜インキュベートする。
- 2) 翌日 56℃で 30 分間熱処理して酵素を不活化させた後、HA 試験用のサンプルとする。
- 3) 0.2% BSA 含有 PBS (pH 7.15) 50 μl を V 字型 96 穴マイクロプレートの全穴に分注する。

- 4) マイクロプレートの第1穴目にウイルス液を 50 μ l 加え 2 倍階段希釈する。
- 5) よく混和した後、37℃で1時間インキュベートする。
- 6) 1,200 rpm、10 分間 3 回 PBS (pH 7.15) で洗浄したヒトもしくはモルモットの赤血球を 0.2% BSA 含有 PBS (pH 7.15) で 0.5% に調製した懸濁液 50 μ l を V 字型 96 穴マイクロプレートの全穴に分注しよく混和した後、4℃で3時間反応させる。
- 7) HA 価は赤血球を完全に凝集する最大希釈の逆数とする。

4. 赤血球凝集阻止試験 (Hemagglutination Inhibition: HI 試験)⁽³⁾

HA が認められた場合、特異抗体を用いて HI 試験を行いウイルスを同定する。

(1) 試薬と器具

抗 JC/BK virus 単クローン抗体 (コスモバイオ社、Cat No. CLA375)

0.2% BSA 含有 PBS (pH 7.15)

PBS (pH 7.15)

V 字型 96 穴マイクロプレート

遠心機

インキュベーター

(2) 方法

- 1) 0.2% BSA 含有 PBS (pH 7.15) 25 μ l を V 字型 96 穴マイクロプレートの全穴に分注する。
- 2) マイクロプレートの第1穴目に抗 JC/BK virus 単クローン抗体 25 μ l 加え 2 倍階段希釈する。
- 3) 8 HA units に相当するウイルス液をよく混和した後、25 μ l ずつ全穴

に加えよく混和し、37℃で1時間インキュベートする。

- 4) 1,200 rpm、10 分間3回 PBS (pH 7.15)で洗浄したヒトもしくはモルモットの赤血球を 0.2% BSA 含有 PBS (pH 7.15)で 0.5%に調製した懸濁液 50 μ l を V 字型 96 穴マイクロプレートの各 well に分注しよく混和後、4℃で3時間反応させる。
- 5) HI 価は赤血球凝集を完全に抑制する最大希釈の逆数とする。

5. 間接蛍光抗体法によるウイルス抗原検出

(1) 試薬と器具

抗 JC/BK virus 単クローン抗体

FITC-conjugated, goat, anti-mouse IgG 抗体 (Sigma 社, Cat No. F4018)

1.0% BSA 含有 PBS (pH 7.4)

PBS (pH 7.4)

グリセリン

冷アセトン

穴あきスライドガラス

遠心機

インキュベーター

蛍光顕微鏡

(2) 方法

- 1) 検体を感染させ CPE が観察された細胞の一部を回収し、PBS で2回の遠心操作 (1,000 rpm, 5 分間) にて洗浄する。陽性コントロールとして JCI 細胞を用いる⁽³⁾。
- 2) 感染細胞を 0.5 ml の PBS に懸濁させ、スライドガラスに 50 μ l ずつス

ポットする。

- 3) 風乾した後、冷アセトンにて-20℃で 10 分間固定する。
- 4) 固定後風乾し、1.0% BSA 含有 PBS で 20 倍希釈した抗 JC/BK virus 単クローン抗体を 50 μ l 滴下し 37℃で 30 分間反応させる。
- 5) PBS で 5 分間 3 回洗浄後、風乾し 1.0% BSA 含有 PBS で 64 倍希釈した FITC-conjugated, goat, anti-mouse IgG 抗体を 50 μ l 滴下し 37℃で 30 分間反応させる。
- 6) PBS で 5 分間 3 回洗浄後、風乾し 10%グリセリン含有 PBS で封入し鏡検する。

6. PCR 診断

BKV、JCV は培養細胞内での増殖が遅いため分離に長期間を要することから PCR 法による迅速診断が有用である。増幅された DNA 断片を制限酵素で消化することにより BKV と JCV を区別することが可能である。また、ウイルス分離の途中で感染細胞より DNA を抽出して PCR を行うことでウイルス分離と併用して遺伝子診断することも可能である。

(1) 試薬と器具

細胞溶解液：0.8% SDS-10mM Tris-HCl (pH 7.5)-14mM EDTA

組織抽出液：10mM Tris-HCl (pH 7.8)-10mM EDTA-proteinase K 50 μ g/ml -1.0% ラウリル酸ナトリウム

PBS (-)

5M NaCl

proteinase K

フェノール・クロロフォルム

エタノール

液体窒素

PCR primer
10×PCR buffer (Takara)
dNTPs (Takara)
Taq polymerase (Takara)
分子量マーカー
電気泳動用アガロース
スクレーパー
マイクロ冷却遠心機
分光光度計
ホモジナイザー
インキュベーター
サーマルサイクラー
電気泳動装置
UV 照射写真撮影装置

(2) 検体の前処理

- 1) 髄液は 90 °C で 10 分間処理する。尿 (10~50ml) を 1,500×g で 15 分間遠心し、pellet を 50 μ l の PCR buffer (Takara) に懸濁し 10 分間煮沸する。
- 2) Hirt 法による感染細胞からのウイルス DNA の抽出⁽⁴⁾
 - a. 感染細胞を PBS で 2 回洗浄後、スクレーパーでかき取って回収する。
 - b. 遠心後 (1,000 rpm, 5 分間)、細胞溶解液を 2 ml 加え、10 分間室温にて静置する。
 - c. 5M NaCl を最終濃度 1M になるよう (1/4 量) 加え、10 回上下させて混和し、一昼夜 4 °C に静置する。
 - d. 4 °C で 15,000 rpm, 30 分間 遠心後、上清を回収する。
 - e. proteinase K を最終濃度 200 μ g/ml になるよう添加し、37 °C, 1 時

間インキュベートする。

- f. フェノール・クロロフォルム抽出後、エタノール沈澱にて DNA を回収し分光光度計にて濃度を測定する。

3) 脳組織からのウイルス DNA の抽出 ⁽⁵⁾

- a. 脳組織を液体窒素中で破碎後、組織抽出液でホモジナイズし、56℃、1 時間インキュベートする。
- b. フェノール・クロロフォルム抽出後、エタノール沈澱にて DNA を回収し分光光度計にて濃度を測定する。

(3) PCR

- 1) 髄液は 20 μ l、尿は 10 μ l を用いて PCR を行う。JCV、BKV の初期遺伝子を増幅する反応である。詳しくは Arthur らの文献 ⁽⁶⁾ を参照されたい。

反応液

2.5mM dNTPs (Takara)	8.0 μ l	(200 μ M)
20 μ M primer PEP-1	2.5	(0.5 μ M)
20 μ M primer PEP-2	2.5	(0.5 μ M)
10×PCR buffer (Takara)	10.0	(1×)
Taq polymerase (Takara)	0.5	(2.5U)
H ₂ O	適量	
合計	100 μ l	

PEP-1: 5' AGTCTTTAGGGTCTTCTTCTACC 3'

PEP-2: 5' GGTGCCAACCTATGGAACAG 3'

94 °C, 1.5 min → 55 °C, 1.5 min → 72 °C, 2 min (40 サイクル)

- 2) PCR 産物 10 μ l を 4%アガロースゲルにて電気泳動する。エチジウムブロマイド染色により、JCV では 173bp, BKV は 176bp の DNA 断片が検出される。
- 3) JCV と BKV の PCR 産物を制限酵素 BamHI で消化することにより区別できる。JCV の場合、120bp と 53bp の 2 断片が得られるのに対し、BKV では 176bp の 1 断片である。

III. BKV、JCV 感染のウイルス学的診断基準

次のいずれかに該当すれば「BKV、JCV 感染」とする。

- 1) PCR 法による遺伝子検査でウイルス特異的遺伝子が検出される。
- 2) ウイルスが分離され、特異抗体を用いた検査でウイルス抗原が検出される。

IV. 引用文献

- (1) Family *Polyomaviridae*. van Regenmortel M.H.V. *et al.*, (Ed.), Virus Taxonomy, pp. 241–246, 2000.
- (2) Padgett, BL., Walker, DL.: Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.* 127, 467–470, 1973.
- (3) Nukuzuma, S., Yogo, Y., Guo, J., Nukuzuma, C., Itoh, S., Shinohara, T. and Nagashima, K.: Establishment and characterization of a carrier cell culture producing high titres of polyoma JC virus. *J. Med. Virol.* 47, 370–377, 1995.
- (4) Hirt, B.: Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* 26, 365–369, 1967.
- (5) Takahashi, H., Yogo, Y., Furuta, Y., Takada, A., Irie, T., Kasai, M., Sano, K., Fujioka, Y. and Nagashima, K.: Molecular characterization of a JC virus (Sap-1) clone derived from a cerebellar form of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Acta. Neuropathol.* 83, 105–112, 1992.
- (6) Arthur, RR., Dagostin, S. and Shah, KV.: Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 1174–1179, 1989.

V. 問い合わせ先

国立感染症研究所ウイルス第二部第三室（勝二 郁夫）

Tel 03-5285-1111

Fax 03-5285-1161

VI. 執筆者一覧

奴久妻 聡一 神戸市環境保健研究所寄生体部

鈴木 哲朗 国立感染症研究所ウイルス第二部

ハ ン セ ン 病
(leprosy, Hansen's disease)

ハンセン病 (leprosy, Hansen's disease)

目次

- I. ハンセン病の概説
- II. 検査項目と検査の進め方
- III. らい菌検査に関する一般的な注意事項
- IV. 検査材料の採取・輸送および保管
 - 1. 検査材料の採取
 - 2. 検査材料の輸送
- V. らい菌特異的遺伝子増幅検査
 - 1. 菌ゲノム DNA の抽出
 - 2. PCR の実際
 - 3. アガロースゲル電気泳動
- VI. ハンセン病の診断基準
- VII. 診断に際しての注意事項
- VIII. 参考文献
- IX. 診断および検査に関する問い合わせ先
- X. 執筆者一覧

I. ハンセン病の概説

ハンセン病(leprosy, Hansen's disease)はおもに皮膚と末梢神経が侵される慢性感染症である。病原体であるらい菌(*Mycobacterium leprae*)は 1873 年にノルウェーの医師 G.H.A. Hansen によって発見された。らい菌は人工培地での培養が不可能で、世代時間が非常に長い(12-14 日)など、他の抗酸菌には見られない特徴を持つ。したがって検査に際しては、他の細菌感染症ではほぼ必須の、患者検体からの菌の分離培養は不可能である。感染経路は肺結核と同様の飛沫による経気道感染であるが、菌に曝露された大多数の例では宿主の免疫機構によって菌は駆逐され、発症には至らない。免疫能が未完成な幼少児期に、長期に亘る濃密な菌への曝露(患者との同居など)があった例では発症の可能性がある。しかし、発症する例でも感染成立から発病までの期間は非常に長く、潜伏期は数年から数十年にもおよぶ。

ハンセン病の皮膚症状は、宿主のらい菌に対する免疫応答に大きく左右され、非常に多彩である。菌への細胞性免疫応答が優位な個体では、限局性の白斑や紅斑、環状の斑が見られ、少菌型(PB leprosy)に分類される。反対に菌への液性免疫応答が優位な個体では、多数の、あるいはび慢性の紅斑や結節が典型的で、多菌型(MB leprosy)に分類される。また、末梢神経に対するらい菌の親和性は非常に高く、皮疹領域の神経症状(触・痛・温・冷覚の低下)はほぼ必発である。治療は複数の抗生物質を内服するが、WHO が病型に応じたプロトコルを定めており、早期に発見して適切な治療を受ければ後遺症を残さずに完治する。

わが国での新患発生数は、有効な化学療法剤の普及、経済発展による衛生状態の改善に伴って、戦後急速に減少してきた。しかし海外では熱帯・亜熱帯の発展途上国を中心に局地的な流行が続き、インド、ブラジル、ミャンマー、マダガスカル、ネパール、モザンビークなどの諸国が流行地として知られている。現在日本での新患発生は年間十数例とごく少数であるが、その約半数を流行地から来日した外国人が占める。したがって流行地の出身者、またはハンセン病の家族歴を持つ者で、知覚異常を伴う皮疹を示す例では本症の可能性を念頭に置いて検査・診断を進め、適切な治療に結びつけねばならない。

Ⅱ. 検査項目と検査の進め方

ハンセン病の診断に当たっては、

- 1) 皮膚科学的所見…知覚（触覚・痛覚・温冷覚）障害を伴う皮疹
- 2) 神経学的所見…末梢神経の肥厚とその支配領域の知覚運動障害
- 3) らい菌の検査…皮膚スミアテストや病理組織、PCR などであらい菌を検出
- 4) 病理組織学的所見…病変部の病理組織像

を総合的に検討することが特に重要である。すなわち、一つの所見にのみ重きをおいて他を軽視することは厳に慎まねばならない。

臨床的な所見の取り方、および皮膚スミアテスト、病理組織標本の見方については他書に譲り、ここでは患者検体かららい菌を検出する方法を述べる。らい菌は人工培地における培養が不可能なため、通常の細菌感染症の診断で重視される、患者検体から菌を培養し、分離・同定するという細菌学的手法を取ることができない。そこで、遺伝子増幅法（polymerase chain reaction: PCR）によるらい菌 DNA の検出という分子生物学的な手法に頼ることになる。

Ⅲ. らい菌検査に関する一般的な注意事項

らい菌の検査は P2 実験施設で BSL2 の病原体取り扱い基準に従って行う。すなわち、患者または疑わしい患者由来の検査材料などを取り扱う際にはレベル 2 の施設を備えた検査室を利用する。

Ⅳ. 検査材料の採取・輸送および保管

検体採取から検査に至る流れを図 1 に示す。皮膚または神経の生検材料を得ることが検査への第一歩である。皮疹のある症例では、皮疹部の生検材料を検体とするのが最もよい。らい菌は皮膚・神経に親和性が高く、皮膚は神経より

容易に生検が出来るからである。ただし皮疹のない場合や生検が困難な例では血液や組織液を検体とする場合もある。生検材料は病理組織学的検索のためにホルマリン固定するものと、PCR のために生の状態で凍結するものに分ける。パラフィンブロックから DNA を抽出して PCR を行うことも可能だが、パラフィンには PCR 阻害物質が含まれているので感度が低下する懸念がある。なお、感度や特異性に問題があるので必須ではないが、診断の参考として血清中の抗 PGL-I 抗体（らい菌細胞壁成分に対する抗体）を測定することもある。

1. 検査材料の採取

1) 生検材料

皮膚または神経を生検したら、半分を病理組織学的検索のためにホルマリン固定し、半分を PCR のために生の状態で（生食水や PBS などを用いずにそのままマイクロチューブに入れる）-20℃で凍結する。輸送にあたってはドライアイスを含めた容器を使うのが望ましいが、短時間（一昼夜程度）であれば保冷剤を使った 4℃の輸送も可能である。速やかに検査機関に送付する。

2) 血液

PCR 用の検体は DNA 合成酵素を阻害するヘパリンを抗凝固剤として使ってはいけない。約 2 ml を EDTA 管により採血し、4℃で保管・輸送する。抗 PGL-I 抗体を測定する場合は血清を採取し、-20℃で凍結する。輸送にあたってはドライアイスを含めた容器を使うのが望ましいが、短時間（一昼夜程度）であれば保冷剤を使った 4℃の輸送も可能であるが、凍結・融解を繰り返すことは避ける。

2. 検査材料の輸送

検査材料（検体）は漏れのないように包装の上、区別できるように記号等を付して発泡スチロール箱に収める。また、検査機関に郵送する場合は郵政省告

示第 760 号（平成 2 年 1 2 月 2 8 日号外）に基づき、図 2 のように包装のうえで感染性物質であることを明示して輸送する。なお現在わが国で、市中医療機関からの検査依頼（らい菌特異的遺伝子増幅検査、抗 PGL-I 抗体など）を受け付けているのは国立感染症研究所ハンセン病研究センターのみである。依頼にあたっては行政検査の要領に従う必要があるので、詳細は同センターあてに問い合わせを頂きたい。

国立感染症研究所ハンセン病研究センター
〒189-0002 東京都東村山市青葉町 4-2-1
TEL: 042-391-8211
FAX: 042-394-9092

V. らい菌特異的遺伝子増幅検査

患者検体（皮膚・神経の生検材料、血液、組織液など）から菌由来 DNA を抽出し、それを鋳型としてらい菌特異的な遺伝子配列を PCR で増幅するものである。増幅された DNA（PCR 産物）はアガロースゲル電気泳動により、予想されるサイズの DNA 断片が増幅されたかどうかを確認する。増幅された場合は PCR 産物の塩基配列を解析するか、またはサザンブロッティングで特異的プローブとのハイブリダイゼーションを行って、PCR 産物がらい菌由来の標的 DNA であることを確認するのが最も確実かつ理想的な検査法である。しかし費用と労力を勘案すれば、特異性が高いプライマーを用いて予想されたサイズの DNA 断片が増幅された場合は、それをもって陽性と判断するのが現実的である。ハンセン病研究センターでも特別な場合の他は、アガロースゲル電気泳動の結果をもって菌の有無を判定している。

1. 菌ゲノム DNA の抽出

検体の種類によって DNA 抽出の手技は異なる。ここでは新鮮生検材料（皮膚または神経）、血液、固定済み試料（パラフィン包埋組織・凍結切片）のそれぞれについて、抽出法を述べる。なお、使用器具・容器のうちディスポーザルでないものについては、ヌクレアーゼの混入による DNA の分解（偽陰性）、菌由来 DNA の残存・混入（偽陽性）を防ぐため、細心の注意が必要である。器具・容器は洗浄の後、過酸化水素系消毒剤で十分に拭き、紫外線照射を行ったのち、オートクレーブ・乾熱滅菌を行う。

1) 新鮮生検材料（皮膚または神経）

● 試薬および機材

- homogenization buffer (0.05% Tween 80/PBS, pH7.4)
- lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 2% (w/v) SDS, 0.5 mg/ml Proteinase K)
- GENECLEAN® kit (Q BIOgene)
- 乳棒、乳鉢
- ピンセット、メス、ハサミ

- ・ マイクロチューブ遠心機
- ・ フリーザー
- ・ ヒートブロック
- ・ 恒温振盪培養槽または孵卵器と振盪装置
- ・ ボルテックスミキサー

● DNA の抽出法

- ・ 生検材料を乳鉢の中でメス、ハサミを用いて細かく切り刻む。
- ・ 適量（検体の量により 500-1000 μ l）の homogenization buffer を加えて、乳棒で十分にすりつぶす。
- ・ すりつぶしたものをマイクロチューブに移し、800 rpm, 5 分で遠心。
- ・ 上清を別のチューブに移し、14000 rpm, 5 分で遠心。
- ・ 上清を捨て、沈殿物を 100 μ l の lysis buffer に再浮遊させる。
- ・ 37℃で一晩（約 15 時間）振盪し、2 回以上の凍結融解を行う。
- ・ 融解した抽出液 100 μ l に対して、300 μ l の沃化ナトリウム液（GENECLEAN® kit）を加えて攪拌し、glass milk（GENECLEAN® kit）10 μ l を加える。
- ・ チューブを 30 分程度室温で振盪のち、14000 rpm, 1 分で遠心する。上清を捨てたのち沈殿した glass milk を 1X New Wash（GENECLEAN® kit）で再浮遊する。
- ・ これを 14000 rpm, 1 分で遠心し、上清を捨てて沈殿を再浮遊させて洗う。この洗浄操作を 3 回繰り返す。
- ・ 洗い終わったら上清を捨て、チューブを 60℃に加熱したヒートブロックに 30 分程度放置して沈殿中に含まれるエタノールを蒸発させる。
- ・ 15 μ l 程度の純水を加えて十分に攪拌し、沈殿を溶解したら 14000 rpm, 1 分で遠心し、上清（抽出された DNA を含む）を回収する。これを PCR の鋳型として用いる。

2) EDTA 加全血

● 試薬および機材

- 2X lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 4% (w/v) SDS, 1 mg/ml Proteinase K)
- Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (25:24:1) ; PCI
- 3M Sodium acetate
- Isopropanol
- 70% ethanol
- マイクロチューブ遠心機
- フリーザー
- ヒートブロック
- 恒温振盪培養槽または孵卵器と振盪装置
- ボルテックスミキサー

● DNA の抽出法

- 全血 1ml を等量の 2X lysis buffer と混和し、37℃で一晩（約 15 時間）振盪、その後 2 回以上の凍結融解を行う。
- 上記処理を終えた検体を 400 μ l ずつマイクロチューブに分注し、等量 (400 μ l) の PCI を加えて十分にボルテックスミキサーで攪拌し、均一な懸濁液とする。
- 14000 rpm, 30 秒で遠心し、水層をピペットで吸い取って別のチューブに移す。
- この処理を中間層がなくなるまで続けて、除タンパクを完全に行う。
- 次にフェノールで抽出した DNA 水溶液の約 1/10 量の 3M Sodium acetate を入れて攪拌、更に DNA 水溶液と等量の Isopropanol を入れる。
- 再度攪拌したのちに -20℃で 30 分程度放置したのち、14000 rpm, 20 分で遠心して DNA を沈殿させる。
- 上清を捨てたのち、70% ethanol を 1 ml 入れて 14000 rpm, 2 分で遠心する。上清を捨てて、チューブを 60℃に加熱したヒートブロックに 30 分程度放置してエタノールを蒸発させる。
- 15 μ l 程度の純水を加えて沈殿を溶解し、PCR の鋳型として用いる。

3) パラフィンプロック包埋組織および凍結切片

- 試薬および機材
 - ・ DEXPAT (宝酒造)
 - ・ マイクロチューブ遠心機
 - ・ ヒートブロック
 - ・ ミクロトーム

- DNA の抽出法
 - ・ パラフィン包埋組織を 5 μm の厚さに切断し、切片 1~3 枚をマイクロチューブに入れる。このようにして 2~3 本の切片入りマイクロチューブを用意する。
 - ・ DEXPAT ボトルを十分に混和して試薬を均一に懸濁する。試料の入った各チューブに 500 μl を加える。
 - ・ チューブの蓋をして、100℃に加熱したヒートブロックに 10 分間放置する。
 - ・ 加熱後は直ちにマイクロチューブを 12000 rpm、4℃で 10 分間遠心する。
 - ・ 水層を回収して、PCR の鋳型として用いる。

2. PCR の実際

らい菌 DNA を検出するための PCR として数種類の系が報告されている。
ここでは、国立感染症研究所ハンセン病研究センターで日常の検査で使用している 2 種類の系について述べる。

- 試薬および機材

- Expand High Fidelity PCR system (Roche)
- プライマー（塩基配列は表 1 を参照）
- dNTP mix
- 遺伝子増幅装置（サーマルサイクラー）

- 1) Plikaytis らの方法

この方法は、*M.lepre* の *groEL* 遺伝子の一部(347 bp)を標的領域とする nested PCR 法である。2 段階の反応を行うため、時間と労力を要するが、感度が非常に高いことが特徴である。理論的には 3 fg（菌一個に含まれる DNA 量）があれば、検出可能とされる。

- 反応液組成

- Expand High Fidelity PCR system (polymerase) 2 u
- 10 mM dNTP mix 1 μ l
- forward primer 0.01 μ M
- reverse primer 0.01 μ M
- template DNA 1- 5 μ l
- 10X expand HF buffer 5 μ l
- dH₂O up to 50 μ l

- 温度条件

- Denaturation 94 °C 1 min 30 sec
 - Annealing 65 °C 1 min 30 sec
 - Extension 72 °C 1 min 30 sec
- Total 25 cycles

注) 1 回目の PCR では L1 と L2 をプライマーとして使用、PCR 産物のサイズは 578 bp である。2 回目の PCR は 1 回目の PCR 産物 5 μ l を鋳型に、L3 と L4 をプライマーとして反応させる。両方の PCR の温度条件は同一である。

2) Sugita らの方法

この方法は、*M.lepre* の 70 KD heat shock protein の一部(157 bp)を標的領域とするものである。一回の反応で結果が得られ、感度も高い。但し一部の非結核性抗酸菌で陽性を示す例があるため、非結核性抗酸菌症が否定できない症例では Plikaytis らの方法で合わせて検査する必要がある。

● 反応液組成

- Expand High Fidelity PCR system (polymerase) 2 u
- 10 mM dNTP mix 1 μ l
- forward primer 0.01 μ M
- reverse primer 0.01 μ M
- template DNA 1- 5 μ l
- 10X expand HF buffer 5 μ l
- dH₂O up to 50 μ l

● 温度条件

- Denaturation 94 °C 1 min
 - Annealing 58 °C 1 min 30 sec
 - Extension 72 °C 1 min 30 sec
- Total 40 cycles

3. アガロースゲル電気泳動

- 試薬および機材
 - size marker (100 bp DNA ladder)
 - ethidium bromide
 - NuSieve GTG (3:1) Agarose (BMA)
 - 電気泳動装置
 - UV transilluminator

2 %程度のアガロースゲルを作製し、10 μ l の PCR 産物を電気泳動する。
エチジウムブロマイド染色により増幅断片の有無を確認する。特に、Sugita らの方法では、PCR 産物が 157 bp と小さいので、プライマーダイマーとの分離が十分になされるように、ゲル濃度、泳動条件に留意する。予想されるサイズの PCR 産物が認められれば陽性、認められなければ陰性と判断する。

VI. ハンセン病の診断基準 (平成9年 厚生省)

ハンセン病は以下の所見から診断される。

- 1) 知覚（触覚・痛覚・温冷覚）の障害を伴った皮疹を認める。
- 2) 末梢神経幹の肥厚：神経幹支配領域に知覚または運動障害を認める。
- 3) らい菌の検出：病巣から菌体を認める。

上記3項目のうち、1項でも認められれば、ハンセン病を疑う。可能ならば、

- 4) 皮疹の生検を行い、病理組織検査をして、1、2の臨床症状と3、4の検査所見をくみあわせて総合的に診断する。

VII. 診断に際しての注意事項

以上のように、ハンセン病の場合には診断の決め手となる、特に重視すべき所見というものは存在しない。また、菌を人工培地で培養することができず、診断的価値のある血清マーカーもないことから、検査室で施行できる診断のための検査はPCRと病理検査のみである。

ハンセン病は皮膚スミア検査で菌を検出できる多菌型（Ridley-Jopling 分類で LL, BL, BB, 一部の BT）と、菌を検出できない少菌型（I, TT, 一部の BT）に分類される。そこで少菌型の症例では、PCR が診断に威力を発揮することが期待されるが、それでも菌を検出できない症例もある。その場合も、PCR で菌が検出できないからといって、即座にハンセン病を否定することは出来ない。臨床的な所見をあわせて総合的に診断を下すことが求められる。逆に、多菌型の症例では治療が奏功して菌が死滅していても、皮疹部の PCR で菌が検出されることもある。これは死菌のゲノム DNA が増幅された結果であると考えられ、PCR は病勢・治療効果の判定に利用することは不適切であることを知る必要がある。

また、すべての検査において他の抗酸菌の混入に注意する必要がある。検体の採取時、パラフィンプロックの薄切時、染色や DNA 抽出の過程など種々の処理において、他の抗酸菌が混入しないように細心の注意が要求される。皮疹から僅少の抗酸菌が検出された場合には、らい菌以外の抗酸菌と培養（小川培地を用い 25℃、37℃で培養）などで鑑別する。しかし、臨床的には皮疹部の知

覚の異常や末梢神経の肥厚を同時に確認できればらい菌と判定してよい。

VIII. 参考文献

ハンセン病の診断・治療について

- 1) 石井則久 ほか：ハンセン病の外来診療，メジカルセンス,1997.
- 2) 石井則久：ハンセン病,皮膚科診療プラクティス 1 皮膚感染症治療戦略，文光堂, 1998.

ハンセン病の PCR について

- 3) 杉田泰之：日本ハンセン病学会雑誌 70: 3-13, 2001.
- 4) Plikaytis et al. J. Clin. Microbiol. 28: 1913-1917, 1990.
- 5) Sugita et al. Eur. J. Dermatol. 6:423-426, 1996.
- 6) Donoghue et al. J. Med. Microbiol. 50:177-182, 2001.

ハンセン病の全般を知る

- 7) Visschedijk et al. Trop. Med. Int. Health 5: 388-399, 2000.
- 8) Jacobson et al. The Lancet 353: 655-660, 1999.
- 9) Sasaki et al. Microbiol. Immunol. 45: 729-736, 2001.

他の抗酸菌感染症との鑑別について

- 10) 中嶋 弘 監修：皮膚抗酸菌症—その臨床と本邦報告例,メジカルセンス, 1998.
- 11) 齋藤 肇 ほか監修：抗酸菌検査法,医歯薬出版, 1997.

Ⅸ. 診断および検査に関する問い合わせ先

国立感染症研究所ハンセン病研究センター

〒189-0002 東京都東村山市青葉町 4-2-1

TEL: 042-391-8211

FAX: 042-394-9092

X. 執筆者一覧

佐々木 津：国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部

石井則久：国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部

大友良光：青森県環境保険センター微生物部

結核菌・非結核性抗酸菌

結核菌・非結核性抗酸菌

目 次

I. 結核・抗酸菌の概説

1. はじめに
2. 病原性
3. 抗酸菌検査材料
4. 検査材料の輸送
5. 臨床検体の取り扱いの注意点
6. 消毒、滅菌、薬剤耐性、治療法

II. 検査の進め方

1. 分離同定法

(1) 喀痰の前処理

- (ア) NALC-NaOH 処理法、(イ) CC-6 “ニチビー” 処理法、
- (ウ) アシッドプラス法

(2) 塗抹検査

- (ア) 蛍光法、(イ) チール・ネールゼン法

(3) 培養検査

- (ア) 固形培地（小川培地）による培養法
- (イ) 液体培地による方法
 - (a) MGIT、(b) KRD 培地、(c) MB-REDOX、(d) マイコアシッド

(4) 同定検査

- (ア) 生化学的検査法 抗酸菌簡易同定キット法
- (イ) 免疫クロマトグラフィー法 キャピリア TB 法
- (ウ) 遺伝子検査法 (a) アキュプローブ法、(b) DDH 法

(5) 核酸増幅検査法

- (ア) アンプリコアマイコバクテリウム法、(イ) MTD 法、
- (ウ) LCR 法

2. 薬剤感受性検査

- III. 引用文献
- IV. 問い合わせ先
- V. 執筆者一覧

I. 結核・抗酸菌の概説

1. はじめに

結核は 21 世紀の現在においても単一感染症としての死亡者は少なくなく、依然として、最大の驚異となっている感染症である。戦後、先進諸国では死亡率、罹患率ともに経時的な減少を示してきたが、日本国内では 1980 年頃から減少が鈍化し、罹患率は 1997 年に、死亡率は 1999 年に増加に転じた。また、院内感染や集団発生などのマスコミ報道も散見されている。そのために、厚生省は 1999 年に「結核緊急事態宣言」を発表し、結核対策強化を唱えた。このように、結核は、決して過去の病気ではないと言える。

結核は、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) による感染症である。非結核性抗酸菌症は、非結核性抗酸菌による感染症で、分離培養法は、結核菌の場合と同じであるが、抗酸菌同定検査により同定された菌種名が、病名としてつけられる。

わが国の抗酸菌検査は、結核がまだ国民病と言われていた時代の 1950 年に、厚生省監修「結核菌検査指針」の第 1 版が刊行された。その後、技術の進歩と検査業務の増加に応じ 1979 年の第 7 版（改訂版）が刊行され、結核の急激な減少に大いに貢献してきた。しかし、その後、約 20 年間改訂されていなかったことと、最近のめざましい検査技術の進歩を鑑みて、新しい検査方法を組み入れた検査指針が望まれるようになった。そのため 2000 年には、結核病学会より「新結核菌検査指針」が刊行され、それに基づいた抗酸菌検査が、病院の臨床検査室や臨床検査センターなどで日常的に行われている。結核菌は、国立感染症研究所の病原体等安全管理規程では、危険度 3 に分類されている。そのため、P3 施設を持つ地方衛生研究所などでは、問題はないが、抗酸菌検査依頼が稀な施設や、設備等により自施設での検査が難しい場合には、臨床検査センター等に依頼することが望ましい。本マニュアルでは、現在臨床検査の現場で行われている検査法の概略を紹介する。

2. 病原性

喀痰の塗抹陽性の肺結核患者が主な感染源と考えられる。伝播様式は患者の咳やクシャミからの飛沫核感染である。結核の感染を受けた早期は、通常臨床的には無症候性に経過するが、稀には感染後 1～2 ヶ月に発熱や軽度の咳などの症状を示す。その後は一部の患者で石灰化巣を残すが、多くは病巣に痕跡を残さずに治癒する。乳幼児では、血行性に菌が運ばれて深刻な症状を呈する事もある（粟粒結核、結核性髄膜炎など）。何らかの要因で結核に対する特異免疫が低下すると、結核菌が再び増殖を開始し、臓器に

病巣を形成し、慢性炎症を呈する場合が多い。肺結核の症状は、発病初期には咳、痰、発熱など一般の気道感染症と同症状を示す。しかし、遷延すると全身倦怠や胸痛、食欲低下などを伴い、肺の組織破壊が進行すれば体重減少、呼吸困難などを示すに至る。

非結核性抗酸菌症は、非結核性抗酸菌が原因で発症するが、一般に感染性は弱い。頻度は排菌陽性の肺結核患者の約 1/5（人口 10 万人あたり 2.5 から 3.0 人）程度である。*M. avium* complex (MAC) 症によるものが 80 %を越え、残りの大多数は、*M. kansasii* 症である。非結核性抗酸菌は水・土壌などの自然環境に生息する菌なので、正常健康者でも、喀痰などに菌が検出される場合がある。画像検査で矛盾しない所見を呈し、同一菌種の排菌が繰り返し証明されるという国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班による診断基準（文献 7）に照らし合せ、非結核性抗酸菌症名が付けられる。また、結核のようにヒトからヒトへの飛沫核感染はない。非結核性抗酸菌症の大多数は肺病変である。一般に症状は軽度で、咳、痰などの気道症状の他に時に喀血（血痰）をみる程度である。比較的ゆっくり進行するものが多いが、まれに短期間で致死的になることがある。

3. 抗酸菌検査材料

喀痰、咽頭粘液、気管支粘液、胃内容物、大便、髄液、胸水、腹水、尿、膿、膿瘍壁および肉芽、臓器などが検査材料となる。不適当な材料や、不十分な方法で取り扱われた材料を用いて検査が行われた場合には、検出成績の低下や誤った結論を導くことがある。適切に採取された検体は、可能なかぎり早く検査室で検査することが望ましい。室温に長時間放置すると雑菌や真菌が増殖し、分離培養時に培地の汚染をおこすので、やむなく保存する場合は一日以内なら 4℃に保存する。検体の凍結は、培養陽性率が低下するので避けることが望ましい。しかし、他施設に依頼する等の理由により 2 日以上検査を実施できない場合には、直ちに -20℃で凍結する。一度凍結した材料は、溶解後、直ちに検査を実施する。

分離培養後、抗酸菌が分離された場合は、同定試験と薬剤感受性試験を行う。いずれの試験も対数増殖期の新鮮な菌を用いなければならない。しかし、分離培養以後の検査が直ちにできない場合や、他施設から輸送されてきた場合には継代培養を行う。

4. 検査材料の輸送

検査を 1 日以内に実施する患者材料は、材料採集後直ちに 0 から 4℃のクーラーボックス等に入れ、フタをした後シールする。

分離菌は、郵便規則第 8 条に則り、瓶または、缶に入れ、これを内容品が漏出しな

いよう密封したうえ、外部の圧力に耐える堅固な箱におさめ、箱には、万一容器が破損しても完全に漏出物を吸収するように、綿その他の柔軟な物を詰めることと、容器表面に品名及び危険物の文字を朱記し、バイオハザードマークを貼り、完全にシールしたのち輸送する。

ヒトに対する起病性別にみた抗酸菌

群 別	菌 群	ヒトに対する起病性			
		+		-	
		一般的	まれ		
遅発育菌	結核菌群	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> *	<i>M. africanum</i> <i>M. microti</i> <i>M. canetti</i>		
	非結核性	<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i>	<i>M. simiae</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. intermedium</i>		
			<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. interjectum</i> <i>M. lentiflavum</i> <i>M. bohemicum</i>	<i>M. farcinogenes</i> <i>M. hiberniae</i> <i>M. cooki</i>	
	結核性	<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. xenopi</i> * <i>M. malmoense</i> * <i>M. haemophilum</i> * <i>M. ulcerans</i> *	<i>M. shimoidei</i> <i>M. shinshuense</i> <i>M. celatum</i> <i>M. genavense</i> <i>M. conspicuum</i> <i>M. branderi</i> <i>M. heidelbergense</i> <i>M. triplex</i> <i>M. gastri</i> <i>M. terrae</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. triviale</i>	<i>M. paratuberculosis</i> <i>M. lepraemurium</i>	
迅速発育菌	抗酸菌	<i>M. fortuitum</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i>	<i>M. peregrinum</i> <i>M. mucogenicum</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. thermoresistibile</i> <i>M. flavescens</i> <i>M. neoaurum</i>	<i>M. phlei</i> <i>M. diernhoferi</i> <i>M. parafortuitum</i> <i>M. gadium</i> <i>M. senegalense</i> <i>M. aichiense</i> <i>M. obuense</i> <i>M. sphagni</i> <i>M. porcinum</i> <i>M. pulveris</i> <i>M. agri</i> <i>M. confluentis</i> <i>M. madagascariense</i> <i>M. chlorophenolicum</i> <i>M. hassiacum</i>	<i>M. vaccae</i> <i>M. aurum</i> <i>M. duvalii</i> <i>M. gilvum</i> <i>M. komossense</i> <i>M. chitae</i> <i>M. chubuense</i> <i>M. rhodesiae</i> <i>M. tokaiense</i> <i>M. fallax</i> <i>M. austroafricanum</i> <i>M. poriferae</i> <i>M. brumae</i> <i>M. alvei</i> <i>M. holderi</i>
	酸菌				

(太字) わが国で今まで感染症が報告されたことのある抗酸菌。 (斎藤 肇 改変, 1999)
* ある特定の国・地域でまれならずみられる。 *M. leprae* は培養できないとされている。

(新 結核菌検査指針 2000 より)

5. 臨床検体の取り扱いの注意点

臨床検体の取扱いは、バイオセーフティーを考慮し、検査を進めなければならない。バイオセーフティーに関しては、文献（8，9）を参考にし、バイオセーフティーレベルに適合した菌の取り扱い設備の充実に努めることが必要である。抗酸菌検査は、レベル2以上の実験室で実施することが望ましい。特に、ピペッティングやミキシングなどのエアロゾルを発生する操作は、クラス II の安全キャビネット内で行うべきである。また、遠心操作もバイオセーフティー機能を持った遠心器で行うことが必要である。前処理後、分離培養を行うが、結核菌が分離される可能性が高い場合は、レベル3実験室で行うことが望ましい。

6. 消毒、滅菌、薬剤耐性、治療法

(1) 消毒

70%アルコール、ポビドンヨード原液、2～3%クレゾール石鹼液、0.5%クロルヘキシジンアルコール、2%グルタルアルデヒド、3～5%フェノール、0.2～0.5%塩酸アルキルジアミノエチルグリシンなどが効果的である。

(2) 滅菌

検査材料、器具、作業着などは高圧蒸気滅菌する。実験室を菌液などで汚染した場合は5%フェノールを噴霧し拭き取った後、再度噴霧し消毒する。

(3) 薬剤耐性

国内で未治療患者においては、上記の抗結核薬のいずれかに対する耐性化率は約10%で、多剤耐性菌は1%以下であるため、早期に適切な治療を行えばほぼ100%の菌陰性化がえられる。一方、既治療再排菌あるいは持続排菌患者では、欧米に比べて多剤耐性菌は少ないが、それぞれの薬剤に対する耐性化獲得率は約40%で、治療が困難の場合もある。

(4) 治療法

抗結核薬による化学療法は感受性を有する薬剤を組み合わせるという大原則の下に、イソニアジド（INH）とリファンピシン（RFP）を中心に、ピラジナミド（PZA）、エタンブトール（EB）又は、ストレプトマイシン（SM）を選択する。

II. 検査の進め方

世界保健機関（WHO）は、1991 年に結核対策の一つとして、臨床材料から菌の分離、同定、薬剤感受性試験までの結核菌検査をすべて 1 か月以内に終了するように、迅速検査法の開発が重要であることを指摘した。また、米国疾病管理予防センター（Centers for Disease Control and Prevention ; CDC）も 1994 年に同様に、臨床検査部門の結核菌検査への迅速な対応と、報告の必要性を推奨した。そのため、結核菌の迅速診断技術の開発が精力的に行われ、めざましい発展を遂げた。キット化され、一般の臨床検査室においても使用可能となった検査法もある。

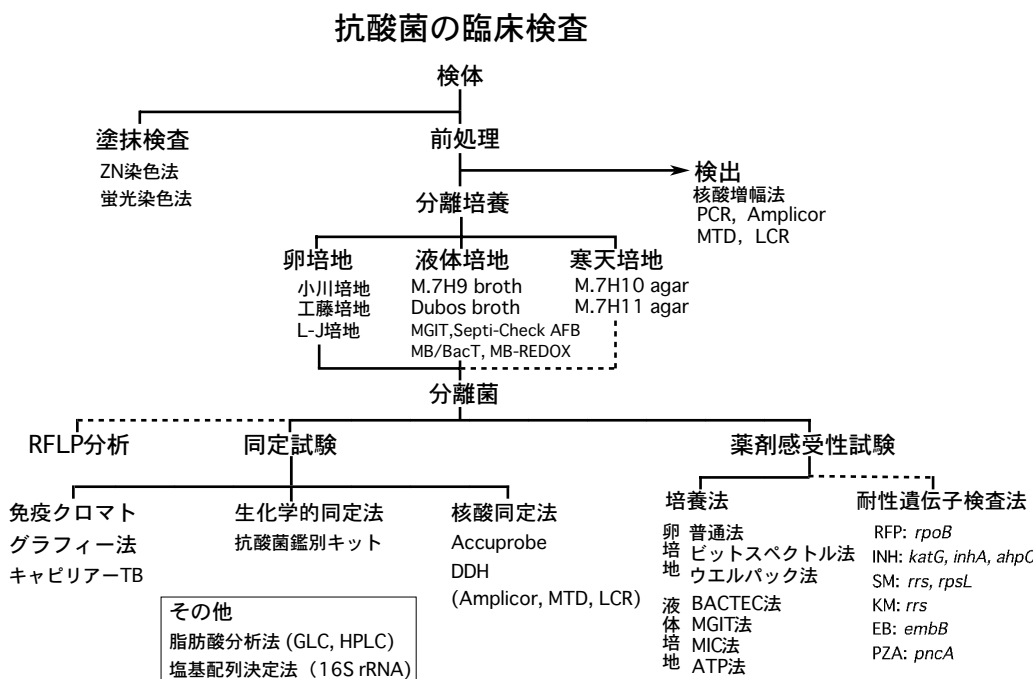
塗抹検査については、24 時間以内に鏡検結果判定が可能であるため、確実に実行することが求められている。培養検査については、小川培地だけを使用した検査では、結核菌の検出までに早くも 2 週間、平均すると 22 日必要である。抗酸菌の分離培養時間を短縮するために、液体培地の開発が進められ、MGIT（日本ベクトン・ディッキンソン）、MB/Bact（日水製薬）、KRD 培地（日本 BCG）、マイコアシッド（極東製薬工業）、MB-REDOX（日水製薬）などのキットが市販されている。液体培地で結核菌が陽性と判定される日数は、早ければ 7 日、平均 13 日程度である。現在は、液体培地と固形培地の併用が推奨されている。

同定検査においても、小川培地上のコロニーを用いて生化学的同定検査法を実施する場合、同定結果が出るまでに、さらに 2～3 週間の日数を必要とする。たとえばナイアシンテストでは、「中等大集落 50 個以上、あるいは培地の 1/3 以上を覆う程度に発育した 4 週間培養菌を使用する」ことになっている。液体培地を利用することにより、同定までの期間を大幅に短縮することができる。

DNA プローブ法である「アキュプローブ」（極東製薬工業）では、液体培地で培養陽性と判定された培養液をそのまま利用でき、約 3 時間で結核菌と *M. avium complex* を同定できる。また、DNA-DNA ハイブリダイゼーション法である「DDH マイコバクテリア」（極東製薬工業）を用いれば、小川培地培養菌を用いても、4 時間で 18 菌種の抗酸菌が同定できる。免疫クロマトグラフィー法を利用した「キャピリア TB」（日本ベクトン・ディッキンソン）では、特別な機械を必要とせず 15 分で、結核菌の証明が可能である。

喀痰を材料にした場合の抗酸菌検査の流れを図に示した。検体が検査室に提出されると、塗抹検査と前処理した後、卵培地、液体培地、寒天培地を用いて分離培養を行う。分離菌が得られた場合には、同定試験と薬剤感受性試験を行う。結核菌を迅速に検出す

るためには、前処理した検体から直接核酸増幅検査法を行うが、この場合は、核酸増幅検査法の結果の再確認と、薬剤感受性試験検査や RFLP 分析等に供する菌株の確保、更に、非結核性抗酸菌の検出のために、培養検査も併行して行わなければならない。



1. 分離同定法

本マニュアルでは、喀痰からの結核菌の分離同定法を述べるが、検査材料には、項目3に示したように喀痰以外に多種の材料がある。必要に応じて他の専門書を参照されたい。

(1) 喀痰の前処理

喀痰の前処理は、NaOH などを用いて均質化をおこない、抗酸菌以外の細菌や真菌を殺菌し、抗酸菌のみを選択的に培養することを目的に行う。前処理方法には、アルカリ処理法と酸処理法がある。主にNaOHを含むアルカリ処理法が用いられるが、*Pseudomonas* 汚染が疑われる喀痰や、*M. chelonae* 感染が疑われる場合には、酸処理法を用いる。市販品としては、スプータメントゾル、ビットゾル（極東製薬工業）、チェックスクリア（日本 BCG）がある。これらの市販品は、いずれもアルカリ法である。喀痰 1 容に対し 2～3 倍量の処理液を加え、vortex して均質化、15～30 分間放置後、その 0.1ml を 2% 小川培地に接種する方法である。しかし、これらの市販品で処理した検体は、中和する

かあるいは、リン酸緩衝液 (pH6.8) にて希釈・集菌操作をしないと、液体培地に直接接種することはできない。本マニュアルでは、アルカリ処理法として、液体培地による分離培養の供試検体を得るために、N-アセチル-L-システイン (NALC) -NaOH 処理法、CC-6 “ニチビー” (日本 BCG) 処理法を、酸処理法として、アシッドプラス (極東製薬工業) 法を記載する。

(ア) NALC-NaOH 処理法

- 1 喀痰を滅菌ポリプロピレンスクリューキャップ付き 50ml 遠心管へ移す。
- 2 倍量の NALC-NaOH 液*を加える (粘性喀痰にはさらに倍量まで加える)。
- 3 キャップを固く締め、Vortex mixer で 5~20 秒間激しく攪拌後、容器を転倒させキャップや容器の内面を NALC-NaOH 溶液に曝す。
- 4 室温で 15 分間放置する。この間、ときどき軽く手振りをする。
- 5 1/15 M リン酸緩衝液 (pH6.8) をトップリングまで加えて希釈、キャップを固く締めて数回転倒混和する。
- 6 冷却遠心機で $3000 \times g$ 、20 分間遠心する。
- 7 十分注意をして上清を捨て、沈渣を 1/15M リン酸緩衝液 (1ml) に浮遊させる。
- 8 集菌試料 (塗抹検査、培養検査、同定検査に使用) を得る。

*NALC-NaOH 液 : 2%NaOH・1.45%クエン酸ナトリウム混合液 100ml に、使用直前に NALC 粉末を 0.5g の割合に加えて調整する。

(イ) CC-6 “ニチビー” 処理法

- 1 喀痰に 2~3 倍量の CC-6 液を加える。
- 2 Vortex mixer で攪拌後、室温で 15 分間放置する。
- 3 リン酸緩衝液 (pH6.8) を 5 倍量以上加える。
- 4 冷却遠心機で $3000 \times g$ 、20 分間遠心する。
- 5 十分注意をして上清を捨て、沈渣をリン酸緩衝液 (0.5ml) に浮遊させる。
- 6 集菌試料 (塗抹検査、培養検査、同定検査に使用) を得る。

(ウ) アシッドプラス法

- 1 上記 NALC-NaOH 法で、 $3000 \times g$ 、20 分間遠心後、上清を捨てた沈渣に酸性喀痰前処理液「アシッドプラス」を 1~2 倍量加え混和する。

2 室温で20分間静置後、接種液とする。

(2) 塗抹検査

前処理後の集菌試料を用いるのが好ましいが、喀痰から直接塗抹標本を作ること
もできる。検体数が多いときは蛍光法でスクリーニングし、陽性の場合チール・ネ
ールゼン法で確認する。また、分離菌が得られた場合もチール・ネールゼン法にて、
抗酸菌であることを必ず確認する。蛍光法、チール・ネールゼン法に用いられる試
薬類は、調整された市販品が存在する。市販品を使用する場合は、その製品の使用
説明書に従い作業されたい。

(ア) 蛍光法

(a) 染色液

- ①ロダミンB液：ロダミンB 0.1g を蒸留水 100ml に溶かす。
- ②石炭酸オーラミンO液：オーラミンO 0.1g を 95ml の蒸留水に溶かし、これ
に石炭酸 5ml を加え、混和する。
- ③3%塩酸アルコール（脱色液）：95%エタノール 97 ml に濃塩酸 3ml を加え、混和
する。
- ④メチレンブルー原液（保存液）：メチレンブルー粉末 5g を 95%エタノール 100ml
に溶かし、密栓して保存する。
- ⑤レフレルのメチレンブルー液（後染色液）：メチレンブルー原液 30ml を 0.01%
水酸化カリウム水溶液 100ml と混和する。

(b) 染色方法

- 1 固定標本にロダミンB液を注ぎ、1分間室温放置。
- 2 染色液を捨て、石炭酸オーラミンO液を注ぎ、10分間染色。
- 3 水洗。
- 4 3%塩酸アルコールで十分脱色。
- 5 水洗。
- 6 10倍希釈したレフレルのメチレンブルー液で30秒間後染色。
- 7 水洗後、乾燥。
- 8 蛍光顕微鏡で検鏡。

(c) 染色所見

抗酸菌は、黄橙～赤橙色の蛍光を発する桿菌として認められる（用いるフィル

ターにより異なる場合があるので注意)。

(イ) チール・ネールゼン法

(a) 染色液

- ① フクシン原液：塩基性フクシン 3g を 95%エタノール 100ml に溶かし、密栓して保存する。
- ② 5%石炭酸水溶液：蒸留水 95ml に加温して溶解した石炭酸 5 ml を加えて混和する。
- ③ 3%塩酸アルコール：95%エタノール 97 ml に濃塩酸 3ml を加えて混和する。
- ④ メチレンブルー原液（保存液）：メチレンブルー粉末 5g を 95%エタノール 100ml に溶かし、密栓して保存する。
- ⑤ レフレルのメチレンブルー液（後染色液）：メチレンブルー原液 30ml を 0.01%水酸カリウム水溶液 100ml と混和する。

(b) 染色方法

- 1 固定標本に石炭酸フクシン液を十分に加える。
- 2 ガスバーナーの炎でわずかに湯気がでる程度に標本の裏面から加温し、5～10 分間放置。
- 3 石炭酸フクシン液を捨て軽く水洗後、3%塩酸アルコールを注ぎ、軽く動かしながら、色がでなくなるまで脱色。
- 4 3%塩酸アルコールを捨て、水洗。
- 5 10 倍希釈したレフレルのメチレンブルー液で 10～20 秒間後染色。
- 6 レフレルのメチレンブルー液をすて水洗。
- 7 乾燥後、油浸で 1000 倍拡大にて検鏡。

(c) 染色所見

抗酸菌は、赤色、その他の細菌および細胞は青色に染まる。

鏡検結果の記載法

記載法	チール・ネールゼン法 (1,000 倍)	蛍光法 (200 倍)	備考 (相当するガ フキー号数)
陰性 (-)	0/300 視野	0/30 視野	G0
少数 (±) (+)	1～2/300 視野	1～2/30 視野	G1
	1～9/100 視野	2～20/10 視野	G2
中等数 (++)	≥10/100 視野	≥20/10 視野	G5
多数 (+++)	≥10/1 視野	≥100/1 視野	G9

(3) 培養検査

分離培養法は、検体から抗酸菌を分離し、菌種の同定や薬剤感受性試験、RFLP 分析などの供試菌を得るために行う。固形培地と液体培地を併用することが望ましい。

固形培地には、卵培地（小川培地、レーベンシュタインジェンセン培地）と寒天培地（ミドルブルック 7H10、ミドルブルック 7H11）がある。わが国では、主に小川培地が用いられている。培地組成成分中のリン酸二水素カリウムの量により、1%小川培地、2%小川培地（工藤 PD 培地）、3%小川培地がある。前処理法により用いる小川培地は異なる。本マニュアルでは、NALC-NaOH 法を推奨するので 2%小川培地を用いる。小川培地は、培地凝固器があれば自家製もできるが、市販品（極東製薬工業、日本 BCG、日水製薬、栄研化学）がある。また、小川培地に酸化還元色素を添加し、観察しやすくしたビット培地（極東製薬工業）も市販されている。液体培地は、ミドルブルック 7H9 液体培地（DIFCO, BBL）、デュボス液体培地(DIFCO)、キルヒナー液体培地を使う。分離用液体培地には、雑菌汚染防止用の抗菌剤が添加されキット化された市販品の利用を勧める。市販品には、Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) (BBL)、セプティチェック AFB(BBL)、KRD 培地（日本 BCG）、MB-REDOX（日水製薬）、マイコアシッド（極東製薬工業）、BacT/ALERT 3D（日水製薬）、がある。これらの製品のうち、MGIT960 抗酸菌システムと BacT/ALERT 3D は自動測定装置がなければ使用できないので本マニュアルでは、省略した。

(ア) 固形培地（小川培地）による培養法

培地上に出現したコロニーを目視判定する方法である。

- 1 NALC-NaOH 処理後の集菌試料 0.1ml を 2%小川培地に接種し、37℃で培養する。
- 2 培養 3～5 日に一回、4 週までは週二回、以後 8 週まで週一回観察し、4 週後に中間判定、8 週後に最終判定する。
- 3 必ずコロニーを抗酸性（チール・ネールゼン法）染色し、抗酸菌であることを確認する。

(イ) 液体培地による方法

(a)MGIT による方法

MGIT は、丸底試験管底部に蛍光性の酸素センサー物質（Tris 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline ruthenium chloride pentahydrate）がシリコン中に包埋されている。前処理済み検体接種時は、培地中の大量の溶存酸素により、蛍光は抑制されて

いる。しかし、菌の増殖にともない溶存酸素量が低下してくると紫外線（365nm）の照射により蛍光が観察され、菌の検出が可能になる。

1 MGIT 完全培地の作成

MGIT™Mycobacteria Growth Indicator Tube（4ml）（BBL）に MGIT™OADC（BBL）0.5ml と MGIT™PANTA™（BBL）水溶液（凍結乾燥粉末バイアルに滅菌蒸留水 3ml を加え、溶解）0.1ml を加える。

2 NALC-NaOH 処理した喀痰 0.5ml を MGIT 完全培地に接種し、試験管のキャップ をきつく締め、37℃で培養する。

3 接種後 2 日目から観察し、陰性の場合は 8 週間まで観察する。判定は UV ランプ（365nm）を試験管に照射し、管底と液面にオレンジ色の蛍光が見られるものを陽性、見られないものを陰性とする。

4 陽性の場合は必ずチール・ネルゼン法により染色し、抗酸菌であることを確認する。

(b) KRD 培地 “ニチビー”（日本 BCG）による方法

ミドルブルック 7H9 液体培地にインジケーターとして酸化還元色素（2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride（略号：STC）と吸着剤を加えた KRD 培地に、前処理済み検体を接種すると、菌の増殖と共に STC が菌体内に取り込まれ、菌体内の還元酵素によりその STC は還元され赤い色素に変化する。これにより、増殖した菌は赤色に染まるため、目視により菌の検出ができる。

1 NALC-NaOH 処理、または CC-6 液 “ニチビー” 処理した喀痰 0.3ml を KRD 培地 “ニチビー”（4ml）に接種し、37℃で培養する。

2 接種後 3～5 日目に雑菌あるいは、迅速発育菌の観察をする。7 日目から、2～3 日おきに観察する。8 週目まで観察する。

3 観察は目視で行なう。陽性の場合、培地が赤色を示すか、白い吸着剤上の赤い点集落が観察される。

4 陽性の場合、必ずチール・ネルゼン染色にて抗酸菌であることを確認する。

(c) MB-REDOX による方法

変法キルヒナー液体培地を基礎培地とするが、4 種類の抗菌補助剤（PACT）と酸化還元インジケーター（3-L-p-indophenyl-2-p-nitrophenyl-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride）が含まれている。NALC-NaOH 処理した喀痰 0.2ml を MB-REDOX

培地（4ml）に接種し、37℃で培養する。以後の観察・判定方法は KRD 培地法と同じである。

(d) マイコアシッド（極東製薬工業）による方法

2%ビット培地（STC 含有小川培地）と変法ミドルブルック 7H9 液体培地を組み合わせた抗酸菌選択培地である。赤色に染まったコロニーを目視判定する。

- 1 「マイコアシッド」キットに添付の複合抗菌剤を、アダプターを使用して無菌的に M7H9-B ボトルに溶かし入れる。
- 2 調整した M7H9-B をビット培地に 3 mL 添加する。
- 3 「アシッドプラス」で前処理した接種液を 0.1 mL 接種する。
- 4 観察は目視で行なう。陽性の場合、コロニーが赤紫色を示す。
- 5 陽性の場合、必ずチール・ネルゼン染色にて抗酸菌であることを確認する。

(4) 同定検査

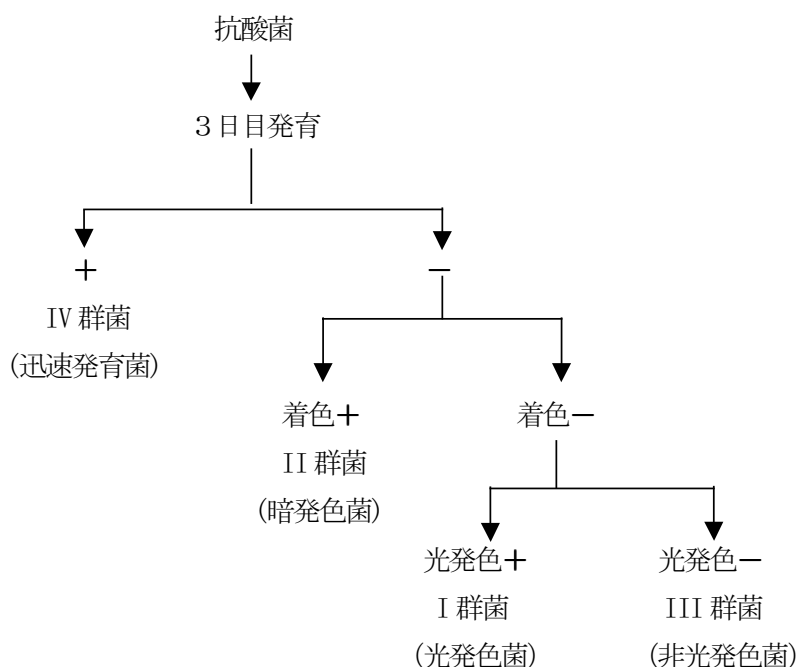
生化学的試験法、免疫クロマトグラフィー法、核酸同定法、塩基配列決定法、脂肪酸分析法等がある。培養法ではナイアシン試験は長年用いられているが、4 週間以上の培養菌を用いなければならないなどの問題点があり、他の方法でも判定まで 3~4 週間を要するなど、培養法は明らかに迅速性に劣っている。遺伝子検査法は正確性と迅速性の両者において培養法より優れているが、コンタミネーションによる偽陽性・偽陰性の問題があり、過信は禁物である。また、コストの問題も大きな問題であり、両者の効率的な組み合わせが必要である。塩基配列決定法（DNA シークエンス法）と抗酸菌細胞壁の脂肪酸分析法（ガス・液体クロマトグラフィー；GLC、高速液体クロマトグラフィー；HPLC）は、共に有用な同定法であるが、機器が高価であるうえに、データーの解析が複雑なため、一般的ではないので、本マニュアルでは省略した。

(ア) 生化学的検査法

結核菌を同定するためには、従来から行われているナイアシン試験と硝酸塩還元試験が重要である。結核菌、*M. avium* および *M. intracellulare* 以外の抗酸菌の同定には、18種類の抗酸菌を一度に同定できるDDHマイコバクテリウム（極東製薬工業）を用いることが可能であるが、DDH法で判定するのに十分な菌量を得るには、3~4週間、

菌種によっては8週間もの培養が必要である。従って、まず生化学同定法を実施することを薦める。特に迅速発育菌（Runyon IV 群菌）の同定や着色菌の同定には有用である。現在、生化学的性状に基づく抗酸菌簡易同定キットは、極東製薬工業から発売されている「極東抗酸菌鑑別セット」のみが存在するため、このキットを用いた同定法について記述する。ただし、あくまでも簡易同定であって、菌株によっては性状にばらつきがあるので、DDH法での結果と合わせて結論する必要がある。

抗酸菌 Runyon 群別



(ナイアシン試験)

結核菌の多くはナイアシンを産生するので、結核菌と同定するためのキーポイント試験の一つとして古くから用いられてきた試験である。試験管法もあるが、試験紙法の方が安全であり簡便なので、試験紙法について記載する。

- 1 小川培地上に生育したコロニーに沸騰水 1.5ml を加え、培地全面が覆われるよ

うに試験管を傾け、5 分間静置し、ナイアシンを抽出する。

- 2 抽出液をスクリーキャップ付小試験管に移し、ナイアシン試験紙（極東製薬）を入れ、密栓する。試験管を立てたまま静置し、試験紙に抽出液を吸水させ、15 分間反応させる。
- 3 陽性コントロールと同程度の着色（黄色）のものを陽性と判定する。

（注意）ナイアシン試験は、結核菌検出に重要であるが、ナイアシン試験陰性の結核菌も存在するので、抗酸菌簡易同定キット全ての判定結果の表に照らし合せ総合的に判定する。

抗酸菌簡易同定キット「極東抗酸菌鑑別セット」（極東製薬工業）を用いた同定法

（接種菌液の調整）

- 1 固形培地に発育したコロニー 1 白金耳をマイコビーズ（極東）に接種し、2～3 日 37℃で培養し McFarland No. 1 の菌液を調整する。
- 2 菌液を 10 倍に希釈し接種菌液とする。

（注意）接種菌は発育旺盛な新鮮な菌株を使用する。古い菌株では、継代培養して使用すること。

（発育速度試験）

- 1 接種菌液を 1%小川培地に 0.1ml を接種し、37℃で培養する。
- 2 3 日目で培地全面に発育を確認すれば迅速発育菌（IV 群菌）と判定する。

（暗発色発育試験）

菌液 0.1ml を接種した 1%小川培地をアルミホイルで遮光し 37℃で培養する。7～14 日目観察で黄色、または褐色の発色菌の発育を確認すれば暗発色菌（II 群菌）と判定する。

（光発色発育試験）

- 1 菌液 0.1ml を接種した 1%小川培地をアルミホイルで遮光し 7～14 日間 37℃で培養する。
- 2 乳白色の菌発育を観察した後、遮光をはずし 60Wの電球か 20W蛍光灯で 30 cm の

距離から1時間照射し、再び37℃で1昼夜培養し色調の変化を観察する。

- 3 黄色または褐色にコロニーの色調が変化すれば、光発色菌（I 群菌）と判定する。
- 4 乳白色のままで色調の変化がなければ、非光発色菌（III 群菌）と判定する。

（硝酸塩還元試験）

- 1 固形培地に発育した菌苔1白金耳を硝酸塩還元試験液体培地に、管壁ですりつぶしながら接種する。
- 2 37℃で培養24時間後に、硝酸還元発色液Aを2滴、硝酸還元発色液Bを10滴滴下し攪拌する。5分後試液が黄色を呈しているものを陽性と判定し、ほとんど変化のないものを陰性とする。

（ピクリン酸培地発育試験）

ピクリン酸培地に菌液を0.1ml接種し、37℃で培養後、2週間目に観察し、菌が生え、更に、培地が赤褐色となっているものを陽性とし、培地の色が元の黄色のままのものを陰性とする。

（ツイーン80水解試験）

- 1 固形培地に発育した菌体1白金耳をツイーン80水解試験液体培地に、管壁ですりつぶしながら接種する。37℃で培養する。
- 2 5日目に観察する。琥珀色の試液が赤みを帯びれば陽性、変化のないものを陰性とする。

（PNB培地、EB培地、HA培地発育試験）

- 1 菌液0.1mlを接種し、37℃で培養する。
- 2 2週目に観察する。コントロール培地と同程度の発育が認められるものを陽性、全く発育が認められないか、わずかに発育しているものを陰性とする。

（PAS培地分解試験）

- 1 菌液0.1mlを接種し37℃で培養する。
- 2 7日目に観察し、発育菌が培地を黒変したものを陽性とし、菌の発育が認められないもの、発育していても培地が黒変しないものを陰性とする。

抗酸菌性状表

Runyonの分類	菌名	発育速度 3日試験	集落性状 S or R	N・T ペーパー	発色		P N B 培地	E B 培地	ビクリン 酸培地	P A S 培地 黒変	H A 培地	ツ イーン 80 水解	硝 酸還元 試験
					暗 発色 試験	光 発色 試験							
結核 菌群	<i>M. tuberculosis</i> *	—	R	+	—	—	—	±	—	—	—	—	+
	<i>M. bovis</i> *	—	S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I 群	<i>M. kansasii</i> *	—	R	—	—	黄	±	±	—	—	—	+	+
	<i>M. marinum</i> *	—	S	±	—	黄	+	±	—	—	±	±	—
	<i>M. simiae</i> *	—	S	+	—	黄	+	+	+	—	+	—	—
II 群	<i>M. scrofulaceum</i> *	—	S	—	橙	橙	+	+	—	—	+	—	—
	<i>M. szulgai</i> *	—	R	—	橙	橙	+	—	—	—	±	±	+
	<i>M. gordonae</i>	—	S	—	橙	橙	+	—	—	—	±	+	—
III 群	<i>M. avium</i> complex *	—	S	—	—	—	+	+	—	—	+	—	—
	<i>M. xenopi</i> *	—	S	—	-黄	-黄	+	+	—	—	—	—	—
	<i>M. gastri</i>	—	S	—	—	—	+	—	—	—	—	+	—
	<i>M. nonchromogenicum</i> complex	—	S _R	—	—	—	+	—	—	—	+	+	±
IV 群	<i>M. fortuitum</i> *	+	RS	—	—	—	+	+	+	±	+	—	+
	<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i> *	+	RS	—	—	—	+	+	—	+	+	—	—
	<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i> *	+	RS	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—
	<i>M. parafortuitum</i> complex	+		—			+	+	+	—	—		
	Other Group IV	+					+	+	+	—	—		

太字記号：重要な判定ポイント。

*：ヒトに対し起病性のある菌

M. avium complex (*M. avium*, *M. intracellulare*), *M. nonchromogenicum* complex (*M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*), *M. parafortuitum* complex (*M. parafortuitum*, *M. aurum*, *M. neoaurum*)

抗酸菌鑑別セット（極東製薬工業パンフレットより）

(イ) 免疫クロマトグラフィー法

免疫クロマトグラフィー法を利用した「キャピリア TB」（日本ベクトン・ディッキンソン）では、特別な機械を必要とせず15分で、結核菌の証明が可能である。

キャピリア TB 法

(測定原理)

結核菌群が特異的に産生する MPB64 を測定対象とする免疫クロマトグラフィー法を採用。MPB64 (Mycobacterial protein fraction from BCG of Rm 0.64 in electrophoresis) は、結核菌群の培養において菌体外に分泌されるたんぱく質である。

テストプレートの試料滴下部に試料を滴下すると金コロイド標識抗 MPB64 抗体 A が溶解し、試料中の MPB64 と免疫複合体を形成する。この免疫複合体は展開部を毛細管現象により移動し、判定部に固定化された抗 MPB64 抗体 B に捕捉され、判定部に金コロイドによる赤紫色のラインを形成する。このキットは、この赤紫色のラインを目視で確認し、試料中の MPB64 の存在の有無を判定する。

(試料の調整方法)

a 固形培地を用いた場合

- 1 37°Cで2～4週間、培地上の菌集落の発育が確認できるまで培養を行う。
- 2 チューブに抽出用緩衝液0.2mlを分注する。
- 3 培地から菌体1μlをエーゼで採取する。
- 4 菌をチューブ内の緩衝液に懸濁する。
- 5 チューブのふたをして、Vortex mixerで十分に懸濁した菌液を試料とする。

b 液体培地を用いた場合

37°Cで1～3週間培養し、陽性を示した培養液をそのまま試料とする。

(操作方法)

- 1 テストプレートの試料滴下部に、試料100μlを滴下する。
- 2 15分後にテストプレートの判定部を観察し、次のように判定する。
- 3 判定方法
陽性：判定部 (T)および判定部 (C)の両方に赤紫色のラインが認められたとき。
陰性：判定部 (T)に赤紫色のラインが認められず、判定部 (C)にのみ赤紫色のラインが認められたとき。

(ウ) 遺伝子検査法

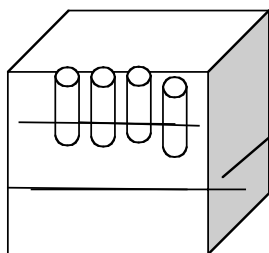
(a) アキュプローブ法

核酸の液相ハイブリダイゼーションに基づく迅速同定法で、結核菌群及び *M. avium* complex (*M. avium* と *M. intracellulare*) の同定が可能である。

液体培地 (MGIT、KRD、マイコアシッド等) で陽性を示した培養液 100 μ l、又は固形培地 (1%小川培地、PD 培地等) に発育した菌塊 1/2 白金耳を使用する。

(検体の調整)

- 1 溶菌チューブに試薬1 100 μ l を溶菌チューブにいれ、固形培地から菌塊 1/2 エーゼを採取する。又は、液体培地から 100 μ l (液体培地の場合試薬は入れなくても良い) を使用する。
- 2 試薬2 100 μ l (加温して沈殿物を溶かしてから使用する)。
- 3 溶菌チューブのキャップをきっちり締め、vortex 10 秒間行う。

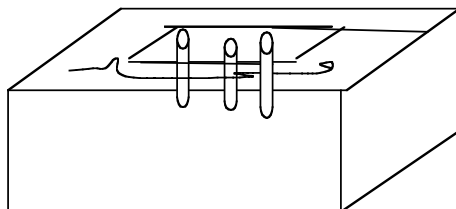


超音波洗浄器に溶菌チューブを差し込み
(キャップは水面から出るようにする)、
60~70℃で15分間超音波をかける
(20分間を越えないように)。

- 4 95 \pm 5℃の温浴で10分間保持する (菌を不活化する)。

(ハイブリダイゼーション)

- 5 溶菌チューブから上清を100 μ l をプローブチューブ TB あるいは、MAC に入れる。
- 6 vortex 10 秒間行う。
- 7 フロートトラックにプローブチューブを差し込み 60 \pm 1℃のウォーターバスにてハイブリダイゼーション15分間 (20分間を越えないように)。



(加水分解)

- 8 プローブチューブのキャップをはずし、試薬 3 を 300 μ l 入れる。
- 9 vortex 10 数秒間する。
- 10 フロートラックにプローブチューブを差し込み、5 分間インキュベート（6 分間を超えることのないように）する。
- 11 常温で 5 分間放冷する。1 時間以内にリーダーで測定する。

(検出)

- 12 リーダーは、測定の 20 分前にスイッチを入れ、洗浄操作を行い、正常に液が出ることを確認した後、リーダー I 及びリーダー 50 はプロトコール 4 を、アキュリーダーはプロトコール 25 を入力する。
- 13 プローブチューブをペーパータオルで拭き、測光部に入れ測定する。

(測定結果の判定方法)

- 14 本キットのカットオフ値は、リーダー I、リーダー 50 では、30,000RLU、アキュリーダーでは 900 PLU 以上の値を示せば、陽性と判定する。(RLU:Relative Light Unit、PLU:Photometric Light Unit)

(注意) このアキュプローブ MAC では *M. avium* と *M. intracellulare* を区別することはできない。

(b) DDH マイコバクテリア極東（極東製薬）

菌の染色体 DNA を用いての DNA-DNA ハイブリダイゼーションに基づいた迅速同定法で、被検菌の 1 本鎖 DNA と抗酸菌 18 種類の 1 本鎖 DNA との DNA-DNA ハイブリダイゼーションにより菌種を同定する。

(測定原理)

被検菌株から抽出した DNA をビオチンで標識し、1 本鎖 DNA とした後、あらかじめ抗酸菌 18 菌種の基準株より抽出精製した 1 本鎖 DNA をそれぞれ固定してあるマイクロプレートの各ウェル内でハイブリダイゼーションを行う。各ウェル内で形成されたハイブリッド DNA の比率をビオチン-アビジン反応を用いて測定することによって比較し、被検菌 DNA と最も反応したウェルの菌種を被検菌の菌種と同定する。

マイコバクテリア属菌同定用プレート

① <i>Escherichia coli</i>	⑨ <i>M. avium</i>	⑰ <i>M. chelonae</i>
② TB complex*	⑩ <i>M. intracellulare</i>	⑱ <i>M. abscessus</i>
③ <i>M. kansasii</i>	⑪ <i>M. gastri</i>	⑲ <i>M. peregrinum</i>
④ <i>M. marinum</i>	⑫ <i>M. xenopi</i>	○
⑤ <i>M. simiae</i>	⑬ <i>M. nondhromogenicum</i>	○
⑥ <i>M. scrofulaceum</i>	⑭ <i>M. terrae</i>	○
⑦ <i>M. gordonae</i>	⑮ <i>M. triviale</i>	○
⑧ <i>M. szulgai</i>	⑯ <i>M. fortuitum</i>	○

TB complex * (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*)
が反応する。

(操作手順)

- 1 ガラスビーズが入った DNA 抽出用試験管に被検菌を 1/2～1 白金耳量とり、チューブミキサーで 60 秒以上激しく震盪し菌体を十分に破碎する。
- 2 キャップをゆるめ、注射器で DNA 抽出試薬 (A-1) を 2ml 入れ、チューブミキサーで 60 秒以上混合した後、転倒混和する。
*DNA 抽出試薬は 2 層に分離しているので、使用直前によく振り、白濁した状態で使用する。
- 3 3000rpm、5 分間遠心する。
- 4 上清 500μl を付属のスピッツチューブに移す。
* 中間の蛋白層がピペットに混入した場合は液を戻し、遠心操作からやり直す。
- 5 エタノール (A-2) を 1ml 加え軽く混合する。(DNA 精製)
- 6 3000rpm、15 分間遠心する。
- 7 静かにエタノールを捨て、-20℃で保存した 70%エタノールでリンスする。
- 8 静かにエタノールを捨て、チューブを逆さまにして水分を切る。

(DNA 標識と 1 本鎖化)

- 9 DNA 標識試薬 (フォトビオチン、A-3) を 100μl 入れ、20 秒間チューブミキサーで混合する。
- 10 300～500Wの水銀灯下 (約 15 センチ) で 10 分間照射する。
- 11 DNA 変性試薬-1 (A-4) を 50μl 入れ、10 秒間混合する。
- 12 DNA 変性試薬-2 (A-5) を 50μl 入れ、10 秒間混合する。

(ハイブリダイゼーション)

- 1 3 チューブにハイブリダイゼーション液 (A-6) を 3ml 入れ、静かに混合し、DNA 固定マイクロプレート (A-7) のウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ分注する。
- 1 4 プレートの表面にプレート用シールを貼り、 55°C 2 時間静置する。

(検出)

- 1 5 シールをはがし、ウェルの液を捨て、プレート洗浄液 (20 倍希釈) を用いプレートウォシャーで 3 回洗浄する。
- 1 6 十分に水切りした後、調整した発色酵素液 $100\mu\text{l}$ を各ウェルに分注する。
* 発色酵素 (B-2) は使用直前に発色光素用希釈液 (B-1) 1 本に対して $10\mu\text{l}$ を混合して使用する。
- 1 7 37°C 10 分間インキュベートする。
- 1 8 再び、プレート洗浄液で 3 回洗浄する。
- 1 9 十分に水を切った後、調整した発色基質液 $100\mu\text{l}$ を各ウェルに分注する。
* 発色基質-a (C-2)、発色基質-b (C-3) は、使用直前に発色基質希釈液 (C-1) 1 本に対し、それぞれ $60\mu\text{l}$ ずつ混合して使用する。
- 2 0 室温で放置し、 630nm における吸光度を測定する。青色の発色を確認する。

(判定)

- 2 1 肉眼的に明らかにひとつのウェルに強い発色が認められる場合は、そのウェルの菌種と同定する。
- 2 2 (吸光度の測定による判定)
もっとも強く発色したウェルの吸光度が、対照ウェル (① *Escherichia coli* が固定されている) の吸光度の 1.9 倍以上であり、第 2 番目に強く発色したウェルの吸光度の相対類似度が 70% 以下であること。

相対類似度は以下の式により計算する。

$$\text{相対類似度 (\%)} = \frac{\text{第 2 位の吸光度} - \text{対象ウェルの吸光度}}{\text{第 1 位の吸光度} - \text{対象ウェルの吸光度}} \times 100$$

(5) 核酸増幅検査法

結核菌を分離培養せずに試料中のある特定の DNA 又は RNA を増幅することで結核菌の検出を行う。(ア) Polymerase chain reaction (PCR)法による DNA 増幅ではアンプリコアTM マイコバクテリウム (日本ロッシュ)、(イ) Transcription mediated amplification (TMA)法による RNA 増幅では Gene-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (MTD) (富士レビオ) が広く用いられている。また、(ウ) Ligase chain reaction (LCR)法による DNA 増幅では LCX、M. ツベルクローシス・ダイナジーン (ダイナボット) も市販されている。

(ア) アンプリコアTM マイコバクテリウム法

ロッシュ社の抗酸菌検出キットで、抗酸菌に共通の 16S rRNA 遺伝子の一部を標的にし、ビオチン化したプライマーを用いて PCR で増幅し、増幅産物を、結核菌群、*M. avium*、*M. intracellulare* の特異プローブとの間でハイブリダイゼーションを行わせ、ビオチン-アビジン酵素発色測定により同定する。同定に要する時間は 5~6 時間で、感度、特異性ともに高い。自動化されたものは、コバスアンプリコアという製品名で市販されている。基本操作は以下のとおりである。

- 1 前処理後の検体 100 μ l に sputum wash solution 500 μ l を加えて混和する。
- 2 15000rpm、10 分間遠心する。
- 3 上清を除去し、sputum lysis reagent 100 μ l を加えて混和する。
- 4 60°C、45 分間静置し、溶菌させる。
- 5 sputum neutralization reagent 100 μ l を加えて混和し、中和する (DNA 溶液)。
- 6 アンプリミックス 50 μ l と DNA 溶液 50 μ l を混合し、PCR を行う。
- 7 PCR 後変性溶液 100 μ l を加え、室温で 10 分間放置する (1 本鎖 DNA 形成)。
- 8 DNA プローブ固相マイクロプレートの各ウェルにハイブリダイゼーションバッファー 100 μ l と PCR 溶液 25 μ l (1 本鎖 DNA) を加え、混和後、37°C、90 分間放置する。

- 9 各ウェルを $400\mu\text{l}$ の洗浄液で 5 回洗浄後、酵素標識アビジン溶液 $100\mu\text{l}$ を加え、 37°C 、15 分間放置する。
- 10 9 の操作を 5 回繰り返し、酵素反応液 $100\mu\text{l}$ を加え、室温暗所で 10 分間放置する。
- 11 各ウェルに酵素反応停止液 $100\mu\text{l}$ を加え、1 時間以内に ELISA リーダーで波長 450nm での吸光度を測定する。

(イ) MTD 法

結核菌の 16S rRNA を標的とした特異プライマーと逆転写酵素の作用により rRNA から cDNA を合成、RNA 合成のための鋳型となる二本鎖 DNA を作成させ RNA ポリメラーゼの作用により RNA を合成する。増幅された RNA をアクリジニウムエステルにて標識した結核菌特異プローブとハイブリダイゼーションを行わせ、Hybridization protection assay (HPA) 法にてルミノメーターにより化学発光量 (relative light unit; RLU) を測定し判定する。この方法は結核菌群しか同定できない。同定に要する時間は 4~5 時間で、感度、特異性ともに良好である。基本操作の概略は以下のとおりである。

- 1 前処理後の検体 $200\mu\text{l}$ と検体希釈液 $20\mu\text{l}$ を加えて、15 分間超音波処理により溶菌する。
- 2 増菌用試験管に増幅試薬 $50\mu\text{l}$ を分注後、 $200\mu\text{l}$ のオイルで重層、溶菌済み検体 $25\mu\text{l}$ をオイルの下層に加え、 $95\pm 5^{\circ}\text{C}$ で 15 分間加温する。
- 3 各試験管を $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ の湯浴にうつし、5 分間保持、増幅酵素液 $25\mu\text{l}$ を加えて混和後、 $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 30 分間加温する。
- 4 プローブ液 $100\mu\text{l}$ を加えて混和し、 $60\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 15 分間加温する
- 5 加水分解液 $300\mu\text{l}$ 添加、混和後、 $60\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 15 分間加温する。
- 6 室温 10 分間冷却後、ルミノメーターにて相対光量 (RLU) を測定する。
- 7 判定：30,000RLU 以上を陽性とする。

(ウ) LCR(LCX)法

結核菌群特異的な Protein antigen b (*Pab*) をコードしている遺伝子を標的として、この標的部位に相補的な 20~30 mer の 4 種類のオリゴヌクレオチドと耐熱性リガーゼの存在下で増幅反応を行う。特異的に増幅された産物を 2

種類のハプテンに挟まれるように標識し、これらの標識物質に対する抗体を介して、マイクロパーティクル酵素免疫法により蛍光発光量を測定する方法で、半自動化されている。アンプリコアや MTD と遜色ない感度、特異性をもっている。特殊装置が必要なので、手順は省略する。

2. 薬剤感受性検査

抗酸菌症患者の治療のために、分離された抗酸菌に対し、薬剤感受性試験を行う。リファンピシン（RFP）、イソニコチン酸ヒドラジッド（INH）、エタンブトール（EB）、ストレプトマイシン（SM）、カナマイシン（KM）などの抗結核薬を含有させた、市販製品があるので、製品のマニュアルに従って検査を行う。

III. 引用文献

- (1) 感染症予防必携、山崎修道他編、日本公衆衛生協会、東京、1999
- (2) 結核病学 I 基礎・臨床編、岩井和郎編、結核予防会、東京、1995
- (3) 新結核菌検査指針 2000、阿部千代治監修、日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編、結核予防会、東京、2000
- (4) 抗酸菌検査法-遺伝子技術による迅速診断-、斎藤 肇、阿部千代治監修、臨床抗酸菌研究会編、医歯薬出版、東京、1997
- (5) 医療従事者のための結核の基礎知識、四元秀毅、佐藤紘二、医学書院、2001
- (6) 室橋豊穂, 工藤祐是、伊藤忠雄他 : 分離培養法.「結核菌検査指針」, 厚生省監修, 日本公衆衛生協会. 1979
- (7) 非定型抗酸菌症(肺感染症)の診断基準、日本結核病学会国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班、結核 60 : 51、1985
- (8) 国立感染症研究所病原体等安全管理規定、国立感染症研究所、2003
- (9) 病原細菌に関するバイオセーフティー指針、日本細菌学会、2001

IV. 問い合わせ先

山崎 利雄 国立感染症研究所 ハンセン病研究センター 病原微生物部

連絡先：国立感染症研究所 ハンセン病研究センター 病原微生物部

TEL：042-391-8059、FAX：042-391-8212、 e-mail：toshiyam@nih.go.jp

V. 執筆者一覧

山崎 利雄：国立感染症研究所 ハンセン病研究センター 病原微生物部

牧野 正彦：国立感染症研究所 ハンセン病研究センター 病原微生物部

長谷 篤：大阪市立環境科学研究所 微生物保健課

園部 俊明：神戸市環境保健研究所 細菌部

岩本 朋忠：神戸市環境保健研究所 細菌部

赤見 正行：群馬県衛生環境研究所 ウイルス課

大友 良光：青森県環境保険センター 微生物部

レプトスピラ病

レプトスピラ病

目 次

- I. レプトスピラの病概説
- II. 検査に関する一般的注意
 - 1. 検査材料の採取および輸送
 - 2. 検査の判定
- III. 検査方法
 - 1. 顕微鏡法
 - 2. 病原体分離
 - 1 血清型の決定
 - 2 *flaB* 遺伝子の塩基配列による分類
 - 3. 血清診断法
 - 1 顕微鏡下凝集試験
 - 2 その他の血清診断法
 - 4. DNA の検出
- IV. 引用文献
- V. 検査依頼先
- VI. 執筆者一覧

I. レプトスピラ病の概説

レプトスピラ病は、病原性レプトスピラ(*Leptospira interrogans* など)の感染に起因する人畜共通感染症である¹⁾。げっ歯類をはじめ多くの野生動物や家畜、ペットがレプトスピラの保菌動物となり得る。病原性レプトスピラは保菌動物の腎臓に保菌され、ある一定期間その尿中に排菌される。ヒトは、この保菌動物の尿で汚染された水や土壌、あるいは尿との直接的な接触によって、経皮的に感染する。また、汚染された水や食物の飲食による経口感染の報告もある。

レプトスピラは、DNA ハイブリダイゼーション法に基づき 12 遺伝種(*Truneria* の分類によっては 13 種)とまだ分類が確定していないいくつかの遺伝群に分類され、さらに凝集素吸収試験に基づいた免疫学的性状により 250 以上の血清型に分類されている(表 1)。

レプトスピラ病は、急性熱性疾患であり、感冒様症状のみで軽快する軽症型から、黄疸、出血、腎障害を伴う重症型まで多彩な症状を示す¹⁾。レプトスピラの潜伏期は、多くの場合は 5-14 日である。その後 38-40℃の発熱を呈し、悪寒、頭痛、筋痛、腹痛、結膜充血、また頻度はさほど高くはないが皮疹を伴う初期症状を持って発病する。

我が国においてレプトスピラ病は、1960 年代中頃までは毎年 100 人以上の死亡者数が報告されていたが、水田の乾田化や農作業の機械化に伴う衛生環境の向上などにより死亡者数は近年著しく減少した。しかしながら、現在でも散発的な発生は全国的に認められており、特に沖縄県では散発、集発事例が報告されている。

一方レプトスピラ病は、全世界的に流行の見られる感染症であり、特に東南アジアや中南米などの亜熱帯、熱帯地域では深刻な問題となっている。近年、海外渡航者が年々増加していることも相まって、海外で感染し、帰国後発症する輸入感染例も報告されている²⁾。また、家畜やペットの輸入によりレプトスピラが海外より持ち込まれることも予想され、輸入感染症としてのレプトスピラ病にも今後注目していく必要がある。

表 1. *Leptospira* の遺伝種

遺伝種	病原性	日本で見られる血清型
<i>L. alexanderi</i>	+	
<i>L. biflexa</i>	—	
<i>L. borgpetersenii</i>	+	javanica, poi
<i>L. fainei</i>	+	
<i>L. inadai</i>	+	
<i>L. interrogans</i>	+	australis, autumnalis, bataviae, canicola, copenhageni, hebdomadis, icterohaemorrhagiae, kremastos, pomona, pyrogenes, rachmati
<i>L. kirschneri</i>	+	grippotyphosa
<i>L. meyeri</i>	±	
<i>L. noguchi</i>	+	
<i>L. santarosai</i>	+	
<i>L. weilii</i>	+	
<i>L. wolbachii</i>	—	

Ⅱ．検査に関する一般的注意

1．検査材料の採取および輸送

病原体の分離には，抗生剤投与以前の発熱期の血液，髄液あるいは尿が用いられ，検体は採取後速やかに培地に入れるのが基本である．検体を接種した培地は，常温で検査可能な機関に送付する．しかしながら，レプトスピラ用の培地は病院に常備されていないことが多く，その場合は，PBS あるいは血液培養用の培地に血液を採取し（血液量は培地の 1/10 程度），常温で検査可能な機関に速やかに送付する．

レプトスピラはヒト尿中での生存時間が短いため，検体採取後速やかに弱アルカリ性(pH 7.0-7.4)とするか，遠心分離で菌を沈澱させ，PBS に懸濁後培地に接種する．

血清診断は，ペア血清を用いて行われる．血清は発症直後と，発症後 10 日から 2 週間程度のものを使用する．

PCR によるレプトスピラ DNA の検出は，抗生剤投与以前の発熱期の血液を用いて行われる．血液は抗凝固剤にクエン酸を用いて採取する．

血清は凍結して，また PCR 用の検体は 4℃に保存して速やかに検査機関に送付する．

2．検査の判定

レプトスピラの確定診断は，病原体の分離または，ペア血清を用いた顕微鏡下凝集試験で行われる．

Ⅲ. 検査方法

1. 顕微鏡法

感染初期には，暗視野顕微鏡（倍率 100 倍）によって血液や尿から直接レプトスピラが観察される場合があり，早期診断に有用である．しかしながら，感度が低く，暗視野顕微鏡 1 視野にレプトスピラ 1 細胞を観察するためには， $1 \times 10^4/\text{ml}$ 以上のレプトスピラが必要である．また，ひも状になったフィブリンやタンパク質をレプトスピラと見誤ることがあり，習熟を要する．

暗視野顕微鏡観察の感度をあげるために，蛍光抗体法や免疫染色法，銀染色法などが用いられることがある^{1,3)}．しかしながら，現在日本で行っているところはなく，確立されたプロトコールは存在しない．

顕微鏡法はその結果にかかわらず，菌の分離，血清診断法によって追試する必要がある．

2. 病原体分離

病原体の分離には，抗生剤投与以前の発熱期の血液，髄液あるいは尿が用いられる．血液からの分離は，血液 1, 2 滴を 5-10 ml のコルトフ培地に接種する．コルトフ培地の組成は以下の通りである．

表 2. コルトフ培地の組成

1. $10 \times$ コルトフ基礎培地

ペプトン (Peptone 140; amresco)	8 g
NaCl	14 g
NaHCO ₃	0.2 g
KCl	0.4 g
CaCl ₂	0.4 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g
Na ₂ HPO ₄	8.8 g
蒸留水	1,000 ml に調整

オートクレーブで 121°C，20 分間滅菌した後に使用する．

2. ウサギ血清

Gibco BRL, ベリタスなどから入手可能．必ずロットチェックを行うこと．56°C で 30 分間非働化を行った後に使用すること．

3. コルトフ培地¹⁾

10×コルトフ基礎培地	100 ml
滅菌非働化ウサギ血清 ²⁾	100 ml
滅菌蒸留水	800 ml

¹⁾ 無菌的に加えること。

²⁾ 市販の滅菌ウサギ血清を使う場合は、そのまま無菌的に加える。自家製のウサギ血清を用意した場合は、フィルター滅菌を行った後に無菌的に加えること。

他の細菌の混入を避けるために 100 μ g/ml の 5-フルオロウラシルを加える場合もある。またコルトフ培地は、デンカ生研より市販されており、入手可能である。髄液の場合は、0.5 ml を 5-10 ml のコルトフ培地に接種する。尿からの分離の場合は、レプトスピラはヒト尿中での生存時間が短いため、上述の方法にてコルトフ培地に接種する。培養は 28-30℃で行い、1 週間ごとに新鮮な培地に植え継ぐことで、分離率は上昇する場合がある。観察は暗視野顕微鏡下で行う。培養は 3 ヶ月まで行う。

レプトスピラは暗視野顕微鏡下で、ひも状螺旋型の回転運動をする菌体が観察される。培養液にレプトスピラと思われる螺旋型のスピロヘータが観察された場合は、以下の方法でレプトスピラであることを証明する。

1 血清型の決定

血清型の決定のためには、凝集素吸収試験によって行われる。これには定められた方法¹⁾があり、このために必要なレプトスピラの代表的なリファレンス株及びその抗血清は、国立感染症研究所細菌部、静岡県立大学薬学部、宮城県保健環境センターおよび沖縄県衛生環境研究所にある。現在のところ、いずれかの機関に依頼して行う。

2 *flaB* 遺伝子の塩基配列による分類

レプトスピラの鞭毛遺伝子の一つ *flaB* を PCR によって増幅し、その増幅産物の塩基配列を決定することで、レプトスピラの同定が可能である。

[1] レプトスピラからの DNA の抽出

分離培養できたレプトスピラからの DNA の抽出は、High Pure™ PCR Template preparation kit (Roche)を用いて行う。

手順	操作	必要量	温度, <i>g</i> , 時間
1	レプトスピラ培養液. 遠心分離.	100 µl	4°C, 13,000× <i>g</i> , 10分
2	上清を捨て、沈澱をPBSに懸濁する.	200 µl	
3	リゾチーム溶液を加えて、加温する.	5 µl	37°C, 15分
4	Binding bufferを加える. プロティナーゼKを加えて加温する.	200 µl 40 µl	72°C, 10分
5	2-プロパノールを加えて良く混合する.	100 µl	
6	混合液をHigh Pureフィルターチューブに添加する. 遠心分離.		室温, 4,500× <i>g</i> , 1分
7	フィルターチューブを新しいコレクションチューブに装着する. Inhibitor removal bufferをフィルターチューブに添加する. 遠心分離.	500 µl	室温, 4,500× <i>g</i> , 1分
8	フィルターチューブを新しいコレクションチューブに装着する. Wash bufferをフィルターチューブに添加する. 遠心分離.	500 µl	室温, 4,500× <i>g</i> , 1分
9	フィルターチューブを新しいコレクションチューブに装着する. Wash bufferをフィルターチューブに添加する. 遠心分離.	500 µl	室温, 4,500× <i>g</i> , 1分
10	コレクションチューブのwash bufferを捨て、フィルターチューブを再度装着する. 遠心分離 (完全にバッファーを除去する).		4°C, 13,000× <i>g</i> , 1分
11	フィルターチューブを新しい1.5 mlチューブに装着する.		
12	あらかじめ70°Cに加温したElution bufferを加える. 遠心分離.	50 µl	室温, 4,500× <i>g</i> , 1分
13	溶出液をPCRに用いる.		

[2] PCR

1) プライマー

ターゲット遺伝子	プライマー	配列 (5' – 3')
<i>flaB</i> (790 bp)	L- <i>flaB</i> F1	5'- CTC ACC GTT CTC TAA AGT TCA AC -3' (23 mer)
	L- <i>flaB</i> R1	5'- TGA ATT CGG TTT CAT ATT TGC C -3' (22 mer)

2) 反応液の組成

DNA 溶液	2 μ l
10×PCR バッファー (+MgCl ₂)	2 μ l
dNTP 混合液 (各 2 mM)	1.6 μ l
20 μ M F1 プライマー	0.2 μ l
20 μ M R1 プライマー	0.2 μ l
<i>Taq</i> ポリメラーゼ	0.1 μ l
滅菌蒸留水	13.9 μ l

3) PCR 条件

熱処理	94°C	25 秒	30 サイクル
熱変性	94°C	20 秒	
アニーリング	50°C	30 秒	
伸長	72°C	60 秒	
最終伸長	72°C	7 分	

[3] 増幅の確認

PCR サンプルを 5 μ l とり，電気泳動にて PCR により DNA が増幅されているかを確認する．

[4] PCR 産物の回収

High Pure™ PCR product purification kit (Roche)を用いて PCR 産物を回収する．

手順	操作	必要量	温度, <i>g</i> , 時間
1	PCR産物	20 μ l	室温, 4,500× <i>g</i> , 1分
2	Binding bufferを加え，良く混合する．	500 μ l	
3	混合液をHigh Pureフィルターチューブに添加する． 遠心分離．	200 μ l	
4	コレクションチューブのBinding bufferを捨て，フィルターチューブを再度装着する． Wash bufferをフィルターチューブに添加する． 遠心分離．	500 μ l	室温, 4,500× <i>g</i> , 1分

5	コレクションチューブのwash bufferを捨て、フィルターチューブを再度装着する。 Wash bufferをフィルターチューブに添加する。 遠心分離。	200 μ l	室温, 4,500 $\times g$, 1分
6	コレクションチューブのwash bufferを捨て、フィルターチューブを再度装着する。 遠心分離（完全にバッファーを除去する）。		4 $^{\circ}$ C, 13,000 $\times g$, 1分
7	フィルターチューブを新しい1.5 mlチューブに装着する。 滅菌蒸留水を加える。 遠心分離。	50 μ l	室温, 4,500 $\times g$, 1分
8	溶出液をシーケンスに用いる。		

[5] シーケンス反応

プライマーは PCR の時と同じプライマーを用いて、両方向からシーケンスを行う。

シーケンス反応試薬には、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 を用いて、シーケンス反応液を調製する。

1) 反応条件

熱処理	96 $^{\circ}$ C	25 秒] 25 サイクル
熱変性	96 $^{\circ}$ C	10 秒	
アニーリング	50 $^{\circ}$ C	5 秒	
伸長	60 $^{\circ}$ C	4 分	

[6] シーケンスデータの解析

National Center for Biotechnology Information
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) BLAST Search にて解析が可能である。

3. 血清診断法

1 顕微鏡下凝集試験 (Microscopic Agglutination Test: MAT)

確定診断のためには、ペア血清を用いた MAT が必要である。MAT は、血清とレプトスピラ生菌を混合し、37 $^{\circ}$ Cで3時間静置後、菌の凝集を暗視野顕微鏡下で観察する方法である。以下にポイントを示す。

[1] 血清

発症直後の血清と，発症後 10 日から 2 週間程度のペア血清を用いる．

[2] レプトスピラ供試菌

継代培養しているものを新しい培地に 1/10 程度植え継ぎ，5-7 日 28-30℃ で培養したもの(1-2×10⁸ 細胞/ml)を用いる．MAT は特異性が高く，血清型（血清群）特異的な抗体を検出する方法である．病原性レプトスピラには現在 230 以上の血清型が存在し，そのうち表 2 の血清型が日本では報告されている．したがって，MAT に用いる菌株は，少なくとも表 2 の血清型は使わなければならない．またレプトスピラ属特異的な抗体を検出するキットが，日本ではいくつか入手可能である（下記参照）．

表 3. 日本におけるレプトスピラ病起因菌の血清型とその分布 ¹⁾

血清型	分布
australis	本州，四国，九州，沖縄
autumnalis	全国
bataviae	本州 ²⁾
canicola	全国
copenhageni	本州，四国，九州，（北海道） ³⁾
grippytyphosa	沖縄
hebdomadis	全国
icterohaemorrhagiae	全国 ³⁾
javanica	北海道，沖縄
kremastos	本州，沖縄 ⁴⁾
poi	北海道
pomona	沖縄 ⁵⁾
pyrogenes	沖縄
rachmati	沖縄

1) ここに挙げた血清型以外にも，未同定の血清型のレプトスピラが存在する．

2) 群馬県の患者から分離．

3) 北海道では菌未分離．

4) 中国地方の牛から分離．沖縄県では患者血清中に抗体価を検出．

5) 患者血清中に抗体価を検出．

[3] 方法

1) 被検血清を PBS で 5 倍に希釈する．

2) 96 穴マイクロプレートの第 2 穴から最終穴まで PBS を 25 μ l ずつ入れる．

- 3) 5 倍希釈した血清 50 μ l を第 1 穴に入れる.
- 4) 第 1 穴から血清 25 μ l を分取し, 第 2 穴から順に 2 階段希釈していく. 最終穴には血清を加えずにコントロールとする.
- 5) レプトスピラ培養液 25 μ l を全穴に入れる.
- 6) プレートミキサーで混合する.
- 7) 37°C, 3 時間反応後, 各穴の上清 5 μ l をスライドガラスに分取し, 暗視野顕微鏡下 (倍率 100 倍) で観察する. コントロールと比較して, 凝集していないフリーの菌数が 50%以下になっている場合を陽性とする.

[4]判定

ペア血清を用いて 4 倍以上の抗体価の上昇が認められた場合を陽性とする. 単一血清の場合は, 40 倍を陽性とするが, 感染初期では抗体価が十分に上昇していない場合があること, また既往の感染とを区別することができないことから, ペア血清を用いて行うことが重要である.

2 その他の血清診断法

確定診断には MAT による試験が必要であるが, 生菌が必要なこと, 特異性が高いために試験に用いた血清型以外による感染は検出できない可能性があること, またペア血清を用いるために結果が出るまでの時間がかかることから, 早期診断を目的としたレプトスピラ属特異的抗体検出のための血清診断法が開発されている. 現在日本では, ラテックス凝集法, マイクロカプセル凝集法(MCAT), IgM-ELISA 法, Dipsticks 法などのキットが入手可能である. しかしながら, これらのキットでは感染血清型を同定することはできない.

3. DNA の検出

PCR による血液からのレプトスピラ DNA の検出が可能である⁴⁾. 血液は, 抗凝固剤としてクエン酸を用いて採取する. また Vacutainer (ベクトンディッキンソン) などの buffy coat separator を用いてプラズマ画分を分離することで, PCR の感度が上昇することも報告されている.

[1] 血液からの DNA の抽出

血液からの DNA の抽出は, High Pure™ PCR Template preparation kit (Roche)を用いて行う.

手順	操作	必要量	温度, <i>g</i> , 時間
1	全血 (+クエン酸). 遠心分離.	2 ml	4°C, 82× <i>g</i> , 5分
2	上清を新しいチューブに分取する. 遠心分離.		4°C, 13,000× <i>g</i> , 10分
3	上清を捨て, 沈澱をPBSに懸濁する.	200 µl	
4	リゾチーム溶液を加えて, 加温する.	5 µl	37°C, 15分
5	Binding bufferを加える. プロティナーゼKを加えて加温する.	200 µl 40 µl	72°C, 10分
6	2-プロパノールを加えて良く混合する.	100 µl	
7	混合液をHigh Pureフィルターチューブに添加する. 遠心分離.		室温, 4,500× <i>g</i> , 1分
8	フィルターチューブを新しいコレクションチューブに装着する. Inhibitor removal bufferをフィルターチューブに添加する. 遠心分離.	500 µl	室温, 4,500× <i>g</i> , 1分
9	フィルターチューブを新しいコレクションチューブに装着する. Wash bufferをフィルターチューブに添加する. 遠心分離.	500 µl	室温, 4,500× <i>g</i> , 1分
10	フィルターチューブを新しいコレクションチューブに装着する. Wash bufferをフィルターチューブに添加する. 遠心分離.	500 µl	室温, 4,500× <i>g</i> , 1分
11	コレクションチューブのwash bufferを捨て, フィルターチューブに再度装着する. 遠心分離 (完全にバッファーを除去する).		4°C, 13,000× <i>g</i> , 1分
12	フィルターチューブを新しい1.5 mlチューブに装着する.		
13	あらかじめ70°Cに加温したElution bufferを加える. 遠心分離.	100 µl	室温, 4,500 x <i>g</i> , 1分
14	99.5%エタノールを溶出液に加える. 3M酢酸ナトリウム溶液を溶出液に加える. よく混合する. 遠心分離.	250 µl 10 µl	-20°C, 30分 4°C, 13,000× <i>g</i> , 20分
15	70%エタノールを加える. 遠心分離.	1 ml	4°C, 13,000× <i>g</i> , 5分
16	沈澱を乾燥させて滅菌ミリQに溶解する.	10 µl	

Vacutainer を用いてプラズマ画分を分離した場合は、新しいチューブに分取して手順 2 の遠心分離から行うこと。

[2] PCR

1) プライマー

ターゲット遺伝子	プライマー	配列 (5' - 3')
<i>flaB</i> (790 bp)	L- <i>flaB</i> F1	5'- CTC ACC GTT CTC TAA AGT TCA AC -3' (23 mer)
	L- <i>flaB</i> R1	5'- TGA ATT CGG TTT CAT ATT TGC C -3' (22 mer)
<i>rrs</i> (340 bp)	Lept 16S F1	5'- GTT TGA TCC TGG CTC AGA ACT A -3' (22 mer)
	Lept 16S R1	5'- TTC TTA ACT GCT GCC TCC CGT -3' (21 mer)

2) 反応液の組成

DNA 溶液	1 μ l
10×PCR バッファー (+MgCl ₂)	2 μ l
dNTP 混合液 (各 2 mM)	1.6 μ l
0.8 mM F1 プライマー	0.5 μ l
0.8 mM R1 プライマー	0.5 μ l
<i>Taq</i> ポリメラーゼ	0.5 μ l
滅菌蒸留水	13.9 μ l

3) PCR 条件

熱処理	94°C	25 秒] 30 サイクル
熱変性	94°C	20 秒	
アニーリング	50°C	30 秒	
伸長	72°C	60 秒	
最終伸長	72°C	7 分	

[3] 増幅の確認

PCR サンプルを 5 μ l とり、電気泳動にて PCR により DNA が増幅されているかを確認する。

IV. 引用文献

- 1) Faine S et al.: “*Leptospira* and Leptospirosis” 2nd ed. MediSci, Melbourne; 1999.
- 2) .坂本光男, 相楽裕子, 小泉信夫, 渡辺治雄.: レーシア, ボルネオ島で感染したレプトスピラ症の1例. 感染症学雑誌 2001; 75: 1057-1061.
- 3) 梁川良.: レプトスピラ. 厚生省監修 微生物検査必携 細菌・真菌検査 第3版 I-40-I51. 財団法人 日本公衆衛生協会 ; 1995.
- 4) Kawabata H et al.: *flaB*-polymerase chain reaction (*flaB*-PCR) and its restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis are an efficient tool for detection and identification of *Leptospira* spp.. Microbiol. Immunol. 2001; 45: 491-6.

V. 検査依頼先

国立感染症研究所 細菌第一部

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

TEL 03-5285-1111 内線 2224

FAX 03-5285-1163

FAX 054-264-5715

静岡県立大学 薬学部 微生物学教室

〒422-8526 静岡県静岡市谷田 52-1

TEL 054-264-5710

FAX 054-264-5715

沖縄県衛生環境研究所 微生物室

〒901-1202 沖縄県大里村字大里 2085

TEL 098-945-0785

FAX 098-945-9366

宮城県保健環境センター 微生物部

〒983-0836 宮城県仙台市宮城野区幸町 4-7-2

TEL 022-257-7228

FAX 022-256-3362

VI. 執筆者一覧

国立感染症研究所 細菌第一部 小泉信夫, 川端寛樹

静岡県立大学 薬学部 微生物学教室 増澤俊幸

沖縄県衛生環境研究所 微生物室 中村正治, 平良勝也

宮城県保健環境センター 微生物部 秋山和夫, 沖村容子