

病原体検査マニュアル 高病原性鳥インフルエンザ

参考資料

（国立感染症研究所作成）

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

目次

Part I: 高病原性鳥インフルエンザの概要

| | | |
|----------------|-------|---|
| 1 高病原性鳥インフルエンザ | ----- | 3 |
| 2 検査の進め方 | ----- | 5 |

Part II: ウイルス検査法

| | | |
|--|-------|----|
| 1 インフルエンザウイルス検査のための臨床検体の採取法 | ----- | 7 |
| 2 ウイルス検査（分離）用検体の輸送と保存 | ----- | 11 |
| 3 Polymerase Chain Reaction (PCR)法による高病原性鳥インフルエンザウイルスの同定 | ----- | 12 |
| 4 迅速診断のためのインフルエンザウイルスの検出 | ----- | 16 |
| 5 培養細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離 | ----- | 18 |
| 6 孵化鶏卵を用いたウイルス分離と増殖 | ----- | 22 |

Part I

1 高病原性鳥インフルエンザ

自然界に存在する A 型インフルエンザウイルスの H1 から H15 までの HA 亜型のウイルスのほとんどは野鳥や水禽類に対して不顕性感染を起こすにすぎず、宿主が症状を示したり、ヒトに感染して健康被害に至る例のほとんどない弱毒型ウイルスである。しかし、このような弱毒型のウイルスのうち H5 および H7 亜型のウイルスが希にニワトリを主とする家禽群に侵入し、感染と伝播を繰り返すうちに強い伝染性と高い病原性を獲得することがあり、そのような変異によって家禽に高い致死率を示すようになった強毒型ウイルスを高病原性鳥インフルエンザウイルスと呼ぶ。弱毒型 H5, H7 亜型の強毒型への変異には、インフルエンザウイルスの赤血球凝集素蛋白の蛋白分解酵素による開裂活性化部位へ塩基性アミノ酸の連続した配列の挿入が重要な役割を果たしていることが知られている。

家禽における高病原性鳥インフルエンザウイルスは、2004 年に東アジアの広い地域で流行を起こしており、また、国内でも西日本の数カ所で集団発生を起こすなど、ひとたび流行が始まると養鶏業界への経済的打撃は甚大なものとなる。一方、高病原性鳥インフルエンザのヒトへの感染は、1997 年、2003 年に香港で強毒型 H5 亜型ウイルスの感染によってそれぞれ 6 名および 1 名の死亡、2003 年にオランダで強毒型 H7 亜型ウイルスにより 1 名の死亡が報告されている。さらに、2004 年には強毒型 H5N1 亜型ウイルスの感染によってタイ、ベトナムの広い地域にわたって数十名の死亡者が確認されている。

高病原性鳥インフルエンザウイルスによるヒトへの感染は、きわめて希ではあるが、感染確認例中の死亡者の割合が非常に高いこと、トリ型インフルエンザウイルスとヒト型インフルエンザウイルスとの遺伝子再集合によってヒトからヒトへ感染する新型ウイルスが形成され、それによる世界的な大流行（パンデミック）が起こる可能性があることなどから、本ウイルスによるヒトでの感染は、感染症法では「四類感染症」と位置づけられている。

ヒトでの高病原性鳥インフルエンザウイルス感染では、潜伏期間は 2・4 日と考えられ、症状は突然の高熱、咳などの呼吸器症状の他、重篤な肺炎や全身症状を示す。また、強毒型 H7 亜型ウイルスの感染による結膜炎も知られている。

高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の診断に必要な技術は一般のインフルエンザの診断と同様、ウイルス分離や RT-PCR 法によるウイルス遺伝子検出などが用いられる。一般のインフルエンザの診断法によって A 型インフルエンザウイルス感染が確

認められるが、既知のヒト型インフルエンザウイルスである H1, H3 亜型いずれとも同定されずに亜型同定が不能である場合に本疾患を疑う。高病原性トリインフルエンザウイルス感染が確定した場合には感染症法に定められる届け出が必要である。

2 検査の進め方

高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の診断は、主にウイルス分離や RT-PCR 法を利用したウイルス遺伝子の検出など病原体の検出・同定によって行う。現在市販されている迅速診断キットは A 型や B 型などウイルスの型しか判別できないため、別の方法によって亜型を判別する必要がある。従って、現時点では RT-PCR 法などでウイルスの亜型を決定するのが最も迅速な実験室診断法であり、実際に多くの実験室で一般に使用されている方法でもある。しかしながら、現在使用している RT-PCR の条件では 100~1000PFU/ml 程度のウイルスが存在しなければ検出することができないことに留意すべきである。従って、適切な検体の保存がなされればウイルス分離が最も感度の良い方法である。

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

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

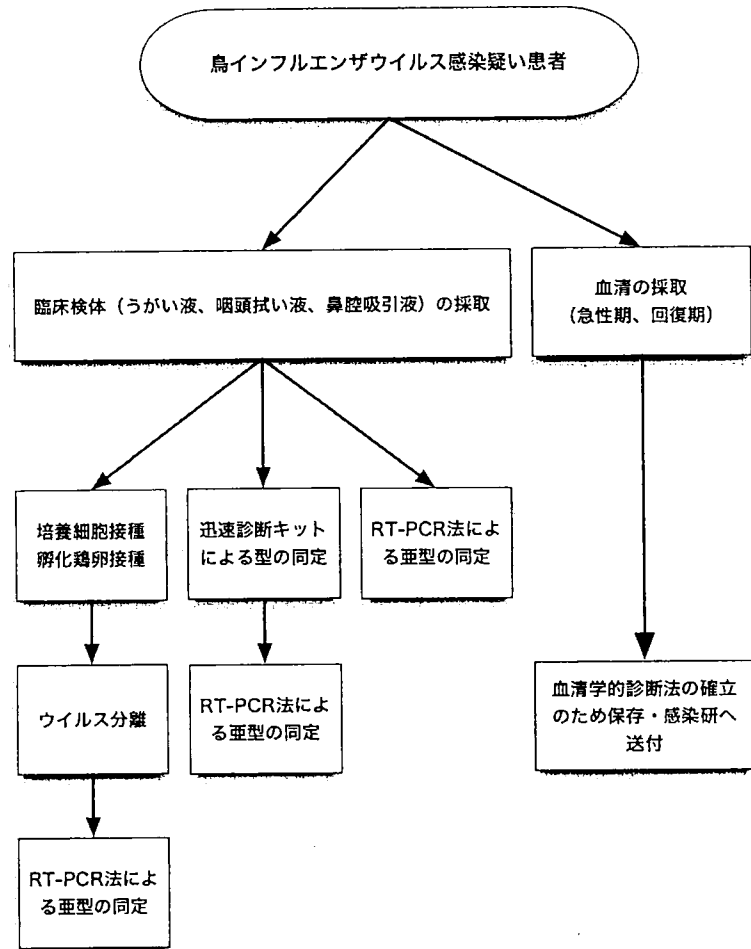


図 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の実験室診断の概要

Part II

ウイルス検査と同定

1 インフルエンザウイルス検査のための臨床検体の採取法

病原診断の成功の鍵は、いかに上手に的確な臨床材料を得るにかかっている。

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 μg/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ぼって、綿棒は捨てる。時に、棒を折り綿棒の先を中短試の液にさし込んだままにする場合もある。

- 綿棒の先端を一度は口蓋垂をはね上げる様にして上咽頭まで拭うのがよい（図 1.1）。
- 咽頭を擦過すると、迷走神経反射でオエツとなる。しばしば嘔吐する。幼児はいやがって口を開けなかったり、手で綿棒を払いのけたりするので、十分のどを拭うことができなくなる。したがって介助者が必要となる。また、最悪の場合、迷走神経反射でストンと心停止することも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ある。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。

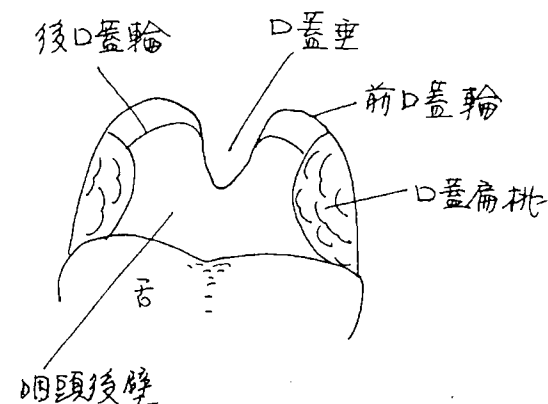


図 1.1 咽頭の説明

1.4 うがい液の採取

できるだけ少量（5・10ml）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。

2 ウイルス検査用検体の輸送と保存

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

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

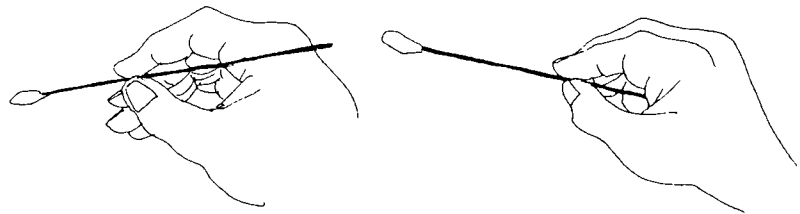


図 1.2 綿棒の正しい持ち方

よくない持ち方

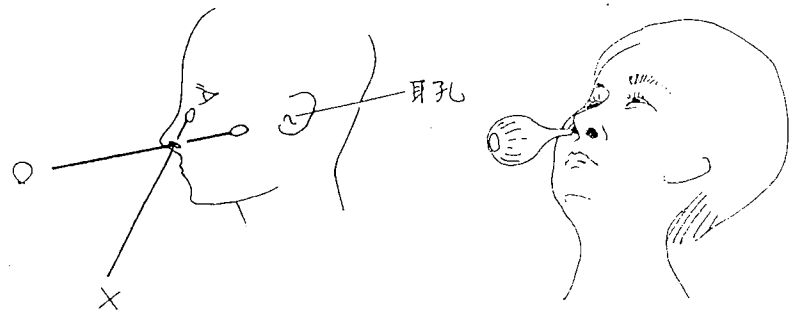


図 1.3 鼻咽頭拭い液採取法

鼻腔洗浄液採取法

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

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、より早く、より高い検出感度が得られるために、種々のウイルス遺伝子の検出にも利用されている。しかしながら、その検出感度の高さから、実験室内コンタミネーションの可能性を常に考慮しなければならない。

インフルエンザウイルス遺伝子は一本鎖の RNA であるため、PCR 反応のためにウイルス RNA に相補的な DNA (cDNA) を reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) で合成する必要がある。この章では、ウイルスからの RNA 抽出方法ならびにウイルスの HA 遺伝子に特異的なプライマーを用いた RT-PCR によるウイルスの同定方法を述べる。

3.1 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, 1000 μ l)、RNase-free 滅菌蒸留水^{*1}、100%エタノール、滅菌微量遠心チューブ (0.2, 1.5ml)、サーマルサイクラー、プライマー、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN Cat#51104)、Super Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen Cat# 18080-044)、RNase Inhibitor (Applied Biosystems Cat# N808-0119)、Takara Ex Taq (Takara Cat#RR001B)

3.2 臨床検体またはウイルス分離株からの RNA の抽出

(注意事項、詳細についてはキットに付属のマニュアルを参照のこと)

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

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

↓

2. スピンドウンした後、100%エタノール 560 μ l を添加し、15 秒間ボルテックスする。再びスピンドウンして溶液を回収する。

↓

3. 混合液 630 μ l を QIAamp スピнкаラムに注入し、キャップを閉めて 6000 \times g (8000rpm) で 1 分間遠心する。カラムを新しいチューブに移し、ろ液の入ったチューブは捨てる。この作業をもう一度繰り返す。

↓

4. Buffer AW1 500 μ l を添加し、キャップを閉めて 6000 \times g (8000rpm) で 1 分間遠心する。カラムを新しいチューブに移し、ろ液の入ったチューブは捨てる。

↓

5. Buffer AW2 500 μ l を添加し、キャップを閉めてフルスピード (20000 \times g, 14000rpm) で 3 分間遠心する。必要に応じてオプションの遠心作業を行う。

↓

6. カラムを新しい 1.5ml チューブに移し、Buffer AVE 60 μ l を添加する。キャップを閉めて室温で 1 分間インキュベートした後、6000 \times g (8000rpm) で 1 分間遠心する。

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

3.3 cDNA の合成

cDNA の合成は、Invitrogen 社の Super Script III Reverse Transcriptase に添付されているマニュアルを参照している。

RNA とプライマーを以下のように混合し、65℃ で 5 分間インキュベートする。インキュベート後、氷上に移して 1 分以上置く。

| | |
|--------------------|------------|
| RNA 抽出液 | 11 μ l |
| プライマー (10 μ M) | 1 μ l |
| dNTP (10 mM each) | 1 μ l |
| Total | 13 μ l |

cDNA の合成で用いるプライマーは以下のとおりである。

ゲノム末端共通配列プライマー 5'-AGCAAAAGCAGG-3'

試薬と RNA/プライマー混合液を以下のように混合し、50℃ で 2 時間反応させる。反応後、70℃ で 15 分間インキュベートし、反応を止める。

| | |
|--------------------------------|------------|
| RNA/プライマー混合液 | 13 μ l |
| 5 \times RT Buffer | 4 μ l |
| 0.1MDTT | 1 μ l |
| Super Script III | 1 μ l |
| RNase Inhibitor (40U/ μ l) | 1 μ l |
| Total | 20 μ l |

cDNA はすぐに PCR に用いるか、-20 $^{\circ}$ C で保存する。

3.4 PCR 反応

PCR 反応は、Takara 社の Takara Ex Taq Kit に添付されているマニュアルを参照している。

キットに含まれている試薬、型特異的なプライマーおよび cDNA を以下のように混合し反応させる。

| 試薬 | 使用量 | 最終濃度 |
|-----------------------------------|---------------|----------------|
| cDNA | 5 μ l | |
| 10 x Ex Taq Buffer | 5 μ l | 1 x |
| dNTP (2.5 mM each) | 4 μ l | 0.2 mM |
| Takara Ex Taq (5 U/ μ l) | 0.25 μ l | 0.1 U/ μ l |
| sense (+) primer (10 μ M) | 2 μ l | 0.4 μ M |
| antisense (-) primer (10 μ M) | 2 μ l | 0.4 μ M |
| RNase-free 滅菌蒸留水 | 31.75 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/H5 (PCR 産物は 708 bp)
 (+) 5'-CATACCCAACAATAAAGAGG
 (·) 5'-GTGTTTCATTTTGTAAATGAT

A/H7 (文献 1) (PCR 産物は 634 bp)
 (+) 5'-GGGATACAAAATGAAYACTC-3'
 (·) 5'-CCATABARYYTRGTCTGYTC-3'

反応条件は以下のとおりである。

- 1 94 $^{\circ}$ C 2 min.
- 2 94 $^{\circ}$ C 30sec.
- 3 45 $^{\circ}$ C 30sec.
- 4 72 $^{\circ}$ C 1 min.
- 5 2. 4. を 40 回繰り返す
- 6 72 $^{\circ}$ C 10 min
- 7 4 $^{\circ}$ C

3.5 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 \cdot 0.4 μ g/ml のエチジウムブロマイドを含む 1%アガロースゲルを作成し、1xTBE 電気泳動バッファーで 100V、約 30 \cdot 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。また、必要に応じて塩基配列の決定により確認する。

※1 RNase-free 滅菌蒸留水はコンタミネーションを防ぐために市販のものを使用するのが望ましい。実験ごとに新品を開封して使用するか、または予め清浄な環境で RNase-free の滅菌チューブ等に分注しておいたものを実験ごとに使用する。

参考文献

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

4 迅速診断のためのインフルエンザウイルスの検出

現在わが国で市販されている迅速診断のためのインフルエンザウイルス抗原検出用キットの一覧を示す。これらのキットはおもにウイルス核蛋白(NP)を酵素抗体法で検出することによってウイルスの検出を行っている。多くのキットはウイルスの型別しか判定できないので、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の診断にはその他の方法でウイルスの亜型を同定する必要がある。これらのキットは臨床現場での迅速診断を主な目的としているが、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染が強く疑われる場合には状況によって患者の治療、隔離などを実施するうえで補助的な仮の診断方法として有用かもしれない。

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、必ずしも感染を否定するものではないことに注意する必要がある。また、非特異反応による偽陽性の結果についても留意する必要がある。

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

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

5 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、最近で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。

5.1 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 (-)）

5.2 試薬の調整

| 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 |

5.3 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 1×10⁶ 細胞数/ml に相当）を、増殖用培地 10 ml を加

えた新しい 75 cm² プラスチックフラスコに植え込み、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。

5.4 インフルエンザウイルスの分離

5.4.1 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）

5.4.2 試薬の調整

分離用培地

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

5.5 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 μg/ml) *** を含む分離用培地 5 ml を加え、34℃ で培養する。
- ⑥ 細胞変性効果 (CPE) の出現を毎日顕微鏡下で観察する。
- ⑦ CPE が出現したところで培地を採取する。6 日目あるいは 7 日目になったら、CPE 出現の有無にかかわらず培地を採取する。

** 材料はウイルス吸着後取り除いた方がよい。

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

5.6 判定方法

通常は HA 活性の測定にて行う事が多い (HA 価の測定は、インフルエンザ診断マニュアルを参照)。HA 活性の検索でウイルス分離が特定できない場合には数回継代を繰り返す。継代については moi を考慮すること。HA 活性のある物は、PCR 法にて亜型同定を行う。

5.7 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。

6 孵化鶏卵を用いたウイルス分離と増殖。

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

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

卵令： 8・10日卵を用いる。

6.1 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、胎児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）

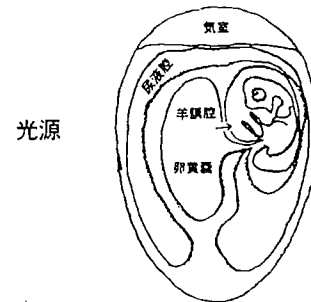


図 検卵

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。

6.2 検体接種

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

4) 接種量は0.1ml、接種後小穴を木工ボンド等にて塞ぐ。

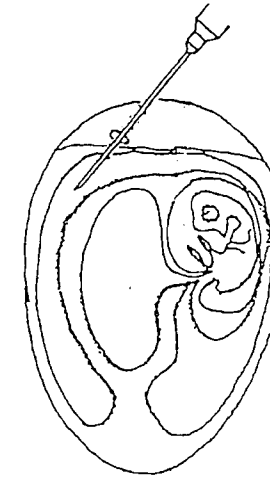


図 尿膜腔内接種法

6.3 培養

気室を上にした状態で静置し、加湿して34℃にて培養する。
(接種24時間位で検卵し、死亡の場合は採液の為に一夜4℃に静置する。)

6.4 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、鉗等にて気室部の卵殻を大きく取り除く。
- 2) 血管、卵嚢を傷つけない様に注意しながら、太めの注射針を付けた注射器にて尿液を採液する。

6.5 判定

通常はHA活性の測定にて行う事が多い（HA価の測定は、インフルエンザ診断マニュアルを参照）。HA活性が陰性の場合、さらに採液した尿液を接種材料とし、通常数回

接種を繰り返す。HA 活性のある物は、PCR 法にて亜型同定を行う。

連絡先

6.6 保存方法

数本に分注し、 -70°C 以下に保存する。

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

検査材料の輸送

I 輸送等に当たっての留意点

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

II 感染性材料の持参輸送に用いる容器

基本型三重包装容器を用いる。容器は次の三層からなるものを用いる。

1 一次容器

感染性材料を入れてラベルを貼った防水性、密封性の主容器である。この容器は破損に備えて、液体全部を吸収するのに十分な量の吸収材によって包まれる。

2 二次容器

一次容器を収納して保護するための二番目の容器で、丈夫で防水性、密封性があるものとする。この中には包んだ一次容器を複数入れてもよい。複数の一次容器の間に入れる緩衝材として、さらに十分な量の吸収材を使わなければならない。

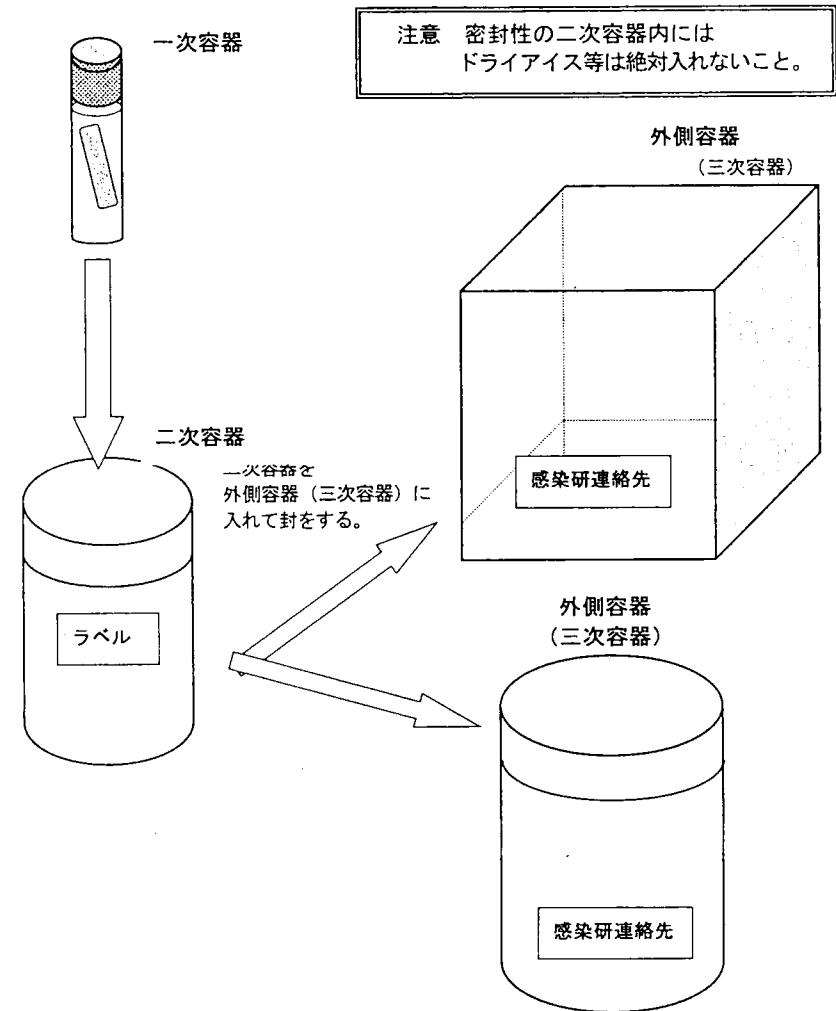
3 外側容器（三次容器）

輸送中に物理的な損傷や水などの外部影響から二次容器とその中身を守るためのものであり、外側容器（三次容器）の中に二次容器を収める。

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

(図 1) 感染性材料の輸送法（持参の場合）

図 1 感染性材料の輸送法（持参の場合）
感染性材料は三層に包装する。



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

III 感染性材料の持参輸送に用いる容器の表示（ラベル）

1 一次容器

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

2 二次容器（図 3）

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

2 外側容器（三次容器）（図 4）

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

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

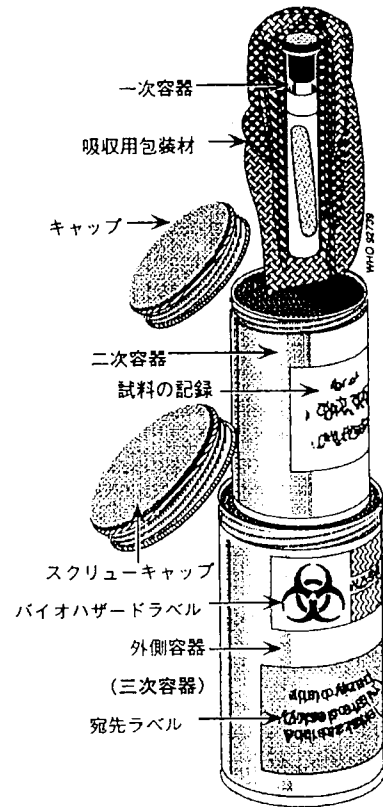


図3 二次容器の例

二次容器には次の表示を行う。

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

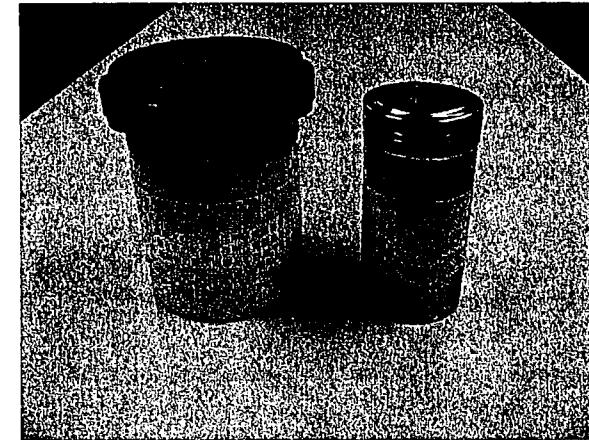


図4 外側容器（三次容器）の例

外側容器（三次容器）には次の表示を行う。

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

