

高病原性鳥インフルエンザ  
診断マニュアル  
(第3版)

(平成24年3月)

## 目次

### Part I: 高病原性鳥インフルエンザの概要

1 高病原性鳥インフルエンザの概要	3
2 検査の進め方	5
3 遺伝子検査の結果解釈について	8

### 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	12
2 ウイルス検査(分離)用検体の輸送と保存	12
3 臨床検体またはウイルス培養液からの RNA の抽出	12
4 ウイルス遺伝子検出法による H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの同定	
1. リアルタイム RT-PCR (TaqMan Probe 法) による同定	13
2. Conventional RT-PCR 法による同定	19
3. (参考) RT-LAMP 法による H5 亜型および H7 亜型の同定	23
5 培養細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離	24
6 孵化鶏卵を用いたインフルエンザウイルスの分離	27
検査依頼先	30
執筆者リスト	30

### 前版からの主な変更点

- リアルタイム RT-PCR 法による H5 亜型同定法において新たなプライマーを追加した。

## Part I

### 高病原性鳥インフルエンザの概要

#### 1 高病原性鳥インフルエンザの概要

自然界に存在する A 型インフルエンザウイルスの H1 から H16 までの HA 亜型のウイルスのほとんどは野生の水禽類に対して不顕性感染を起こすにすぎず、宿主は症状を示すことはほとんどない。しかし、このようなウイルスのうち H5 および H7 亜型の A 型インフルエンザウイルス\*<sup>1</sup> が稀にニワトリを主とする家禽群に侵入し、感染と伝播を繰り返すうちに強い伝染性と高い病原性を獲得することがあり、そのような変異によって家禽に高い致死率を示すようになったウイルスを高病原性鳥インフルエンザウイルス\*<sup>2</sup> と呼ぶ。この変異には、インフルエンザウイルスの赤血球凝集素（ヘマグルチニン、HA）の蛋白質分解酵素による開裂活性化部位への塩基性アミノ酸の連続した配列の挿入が重要な役割を果たしていることが知られている。

H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザの流行は、1996 年の中国南部広東省の家禽農場におけるガチョウへの感染を皮切りとして、1997 年には香港の家禽間で広がり、2003 年末からは日本を含む東アジアや東南アジア諸国の家禽および野生の水禽で確認されている。さらに、2005 年に入ってからはいこれらの地域のみならずユーラシア大陸を西に向けて拡大し、ついには中近東、アフリカ、ヨーロッパ諸国にまで到達して、2011 年 6 月現在で 63 ヶ国・地域での流行が確認されている。H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスは、A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1) を起点とした HA 遺伝子の分子系統解析から、2004 年には clade 0 から clade 9 の 10 種類の clade に分類され、その後も流行が続いて遺伝子変異の蓄積が進み、2005 年に clade 2 は clade 2.1、2.2、2.3、2.4、2.5 に細分化、2008 年にはさらに細分化が進んで、現在は clade 2.1.1、2.1.2、2.1.3、2.2、2.2.1、2.3.1、2.3.2、2.3.3、2.3.4、2.4、2.5 に分類されている(2011 年 9 月現在、clade 1、2.1.3、2.2.1、2.3.2、2.3.4 より派生した clade 1.1、2.1.3.1~2、2.2.1.1、2.3.2.1、2.3.4.1~3 が新たに分類されている)。なお、最新の clade 分類とその推移および分子系統樹については WHO の HP\*<sup>3</sup> で確認する事ができる。

一方、H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染例は、1997 年に香港で初めて確認されて以来、現在も徐々に増え続けており、このウイルスに起因した世界的大流行（パンデミック）の発生が懸念されている。WHO の報告では 2011 年 9 月現在、15 カ国で 565 例が確認され、そのうち 331 人が死亡している。最近の流行状況を見るとカンボジアでは clade 1.1、インドネシアでは clade 2.1.2 および clade 2.1.3.2、エジプトでは clade 2.2.1、バングラデシュでは clade 2.2.2 でヒトへの感染例が報告されている。また香港、韓国、ベトナムなどの東アジアや東南アジア地域では、clade 2.3.2.1 あるいは clade 2.3.4.1 が野鳥や家禽より分離されており、clade 2.3.2.1 と clade 2.3.4.1 のヒト感染例が香港とベトナムでそれぞれ報告されている。日本では、2010 年 10 月から 2011 年 4 月にかけて、全国各地で野鳥や家禽における clade 2.3.2.1 の流行が見られたが、幸いヒトへの感染例は報告されなかった。

これまでに海外で報告されているヒトへの感染例の殆どは病鳥との濃厚接触が原因であるが、中には家族内感染と思われるヒト-ヒト感染例も見られている。さらに、このウイルスはヒト以外の哺乳動物（ネコ、トラ、フェレットなど）にも高い致死率を示し、宿主域が広いことが分かっている。インフルエンザウイルスはHAが細胞表面にあるウイルス受容体（レセプター）に結合して感染が始まる。鳥インフルエンザウイルスのHAは一般的に鳥型レセプター（シアル酸がガラクトースに $\alpha$  2,3 結合した糖鎖）に結合しやすい性質を持つ。一方、ヒトで流行を繰り返す季節性インフルエンザウイルスのHAは、ヒト型レセプター（シアル酸がガラクトースに $\alpha$  2,6 結合した糖鎖）に結合しやすい性質を持つ。ヒトから分離されたH5N1亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスのほとんどは、鳥由来のウイルスと同様の性質をもっており、鳥型レセプターへの親和性が高くヒト型レセプターへの親和性が低いため、ヒトの呼吸器細胞に効率よく感染することができない。しかし、中近東や東南アジアの患者から分離されたウイルスの一部は、ヒト型レセプターを認識できることが報告されている。さらに中近東で流行しているH5N1ウイルスは、ヒト型レセプターへの認識に加えて、ヒトの細胞で効率よく増殖できる性質を獲得していることが分かっている。現在のH5N1ウイルスは、ヒトからヒトへ効率よく伝播する性質をまだ獲得していないが、今後もヒトへの感染を繰り返すことで、よりヒトに適応したウイルスが出現する可能性がある。一方、ヒトの季節性ウイルスとH5N1亜型ウイルスとの遺伝子分節再集合体がヒトやブタ（新型インフルエンザウイルスの中間宿主と考えられている）の体内で生ずることで、ヒトに適応したH5N1亜型ウイルスが出現する可能性もある。そのため、WHOは現在の流行状況をパンデミックアラート期フェーズ3（ヒトへの新しい亜型のインフルエンザ感染が確認されているが、ヒトからヒトへの感染は基本的に無い状況）に指定し、各国に警戒を促している。

ヒトでの H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス感染では、潜伏期間は概ね 2~8 日と一般のインフルエンザより長い傾向が見られている。初期症状の多くは突然の高熱（通常  $>38^{\circ}\text{C}$ ）と下気道症状を伴うインフルエンザ様疾患を呈する。H7 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染に特徴的な結膜炎症状は殆ど見られない。また、患者の一部には感染初期に下痢、嘔吐、腹痛などが見られる例も報告されている。感染早期に出現する下気道症状としては、呼吸窮迫、頻呼吸などが認められ、殆どの患者はウイルス肺炎を呈していることが知られている。

H5N1 亜型以外にも過去には H7N1, H7N2, H7N3, H7N7 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスや H9N2 亜型、H10N7 亜型鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染例が報告されている。近年の家禽類での H7 亜型高病原性鳥インフルエンザの流行としては、2002 年のチリでの H7N3 亜型の流行、2003 年のオランダでの H7N7 亜型の流行、2004 年のカナダでの H7N3 亜型の流行等が挙げられる。そのうち、2003 年のオランダでの流行では、農場で防疫に従事したヒトを中心に 89 人で感染が認められ、うち 3 人は家族内感染によるヒト-ヒト感染であった事が確認されている。感染者の多くは結膜炎症状を呈するのみであったが、なかにはインフルエンザ様症状を呈した者もいた。また、この事例では獣医師 1 人が急性呼吸窮迫症候群（ARDS）を起こして死亡している。H5N1 亜型以外の鳥インフルエンザウイルス感染で死者が出たのは、この一例だけである。日本でも 2009 年に愛知県で低病原性の H7N6 亜型鳥インフルエンザがうずらで流行したがヒトへの感染は認められていない。

H9N2 亜型鳥インフルエンザウイルスは、アジアや中東の一部地域の家禽間で定着している。1998 年に中国広東省でヒトへの最初の感染が見つかって以来、まれにヒトやブタへの感染が報告されている。このウイルスは、ヒト、ブタいずれに対しても病原性は低くヒトに感染した場合の症状は穏やかであり、これまで感染者は全員回復している。

H10N7 亜型鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染は、2004 年にエジプトで 2 例報告されているだけである。

なお、本マニュアルでは、H7 および H9 亜型検出方法に関する論文を参考文献として列挙した。論文に記載された方法を使用するにあたっては、最新の流行株の検出感度に関する情報収集及び関係施設間での情報交換を行うとともに、各施設で反応条件、検出感度や特異性などについて十分な検討を行う必要がある。

\*1.2 家畜伝染病予防法により高病原性鳥インフルエンザおよび低病原性鳥インフルエンザは以下のように規定されている。

高病原性鳥インフルエンザ: 国際獣疫事務局(OIE)が作成した診断基準により高病原性鳥インフルエンザウイルスと判定された A 型インフルエンザウイルスの感染による鶏、あひる、うずら、きじ、だちょう、ほろほろ鳥および七面鳥(以下「家きん」という)の疾病

低病原性鳥インフルエンザ: 家畜伝染病予防法では「H5 又は H7 亜型の A 型インフルエンザウイルス(高病原性鳥インフルエンザウイルスと判定されたものを除く)の感染による家きんの疾病

\*3 Updated unified nomenclature system for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses  
([http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/h5n1\\_nomenclature/en/index.html](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/h5n1_nomenclature/en/index.html))

## 2 検査の進め方

H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の診断は、リアルタイム RT-PCR 法、Conventional RT-PCR 法を利用したウイルス遺伝子の検出や、ウイルス分離など病原体の検出・同定によって行う。2011 年 8 月現在、保険適用されている迅速診断キットは、A 型および B 型インフルエンザウイルスの型判別しか行うことができない。このため A 型インフルエンザウイルスの亜型判別は別の方法によって行う必要があり、現時点ではウイルス遺伝子検出法により亜型を決定するのが最も確実な実験室診断法である。

検査を実施するには実験室での感染に十分に注意をする。ウイルスを増殖させずにウイルス遺伝子検出法などで実験室診断を行う場合は BSL2 実験室で実施してもよいが、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染が強く疑われる臨床材料を検査する際には、必要に応じて PPE を強化する必要がある。

日本では、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)により、H5N1 亜型鳥インフルエンザは 2006 年から「指定感染症」に指定されていたが、2008 年 5 月の法律改正からは「二類感

染症」に指定されている。H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザの症例定義に従って、感染が疑われる患者および臨床的特徴を呈していない無症状病原体保有者に対して、咽頭拭い液、肺胞洗浄液、剖検材料、鼻腔吸引液、鼻腔拭い液などの検査材料を用いて、H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の実験室診断を実施する必要がある。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、ウイルス分離やリアルタイム RT-PCR 法、Conventional RT-PCR 法などのウイルス遺伝子検出法が用いられる(図 1 参照)。なお、H5N1 亜型鳥インフルエンザと診断した場合は感染症法に定められる届け出が必要である。

また、赤血球凝集抑制試験(HI 試験法)や中和抗体測定試験などにより血清学的に抗ウイルス抗体を検出することによっても高病原性鳥インフルエンザウイルス感染を診断することは可能である。しかしながら、これらの試験を行う際には必ず感染性のウイルスを取扱わねばならず、ウイルスや抗体入手などに制約があり、遺伝子検査法に比べると簡便かつ迅速にこれらの試験を行う事は難しい状況であるため、血清診断については本検査マニュアルでは割愛する。なお、感染診断の確定を行う際に、急性期と回復期のペア血清を用いた血清学的診断が必要となる場合があるので、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。

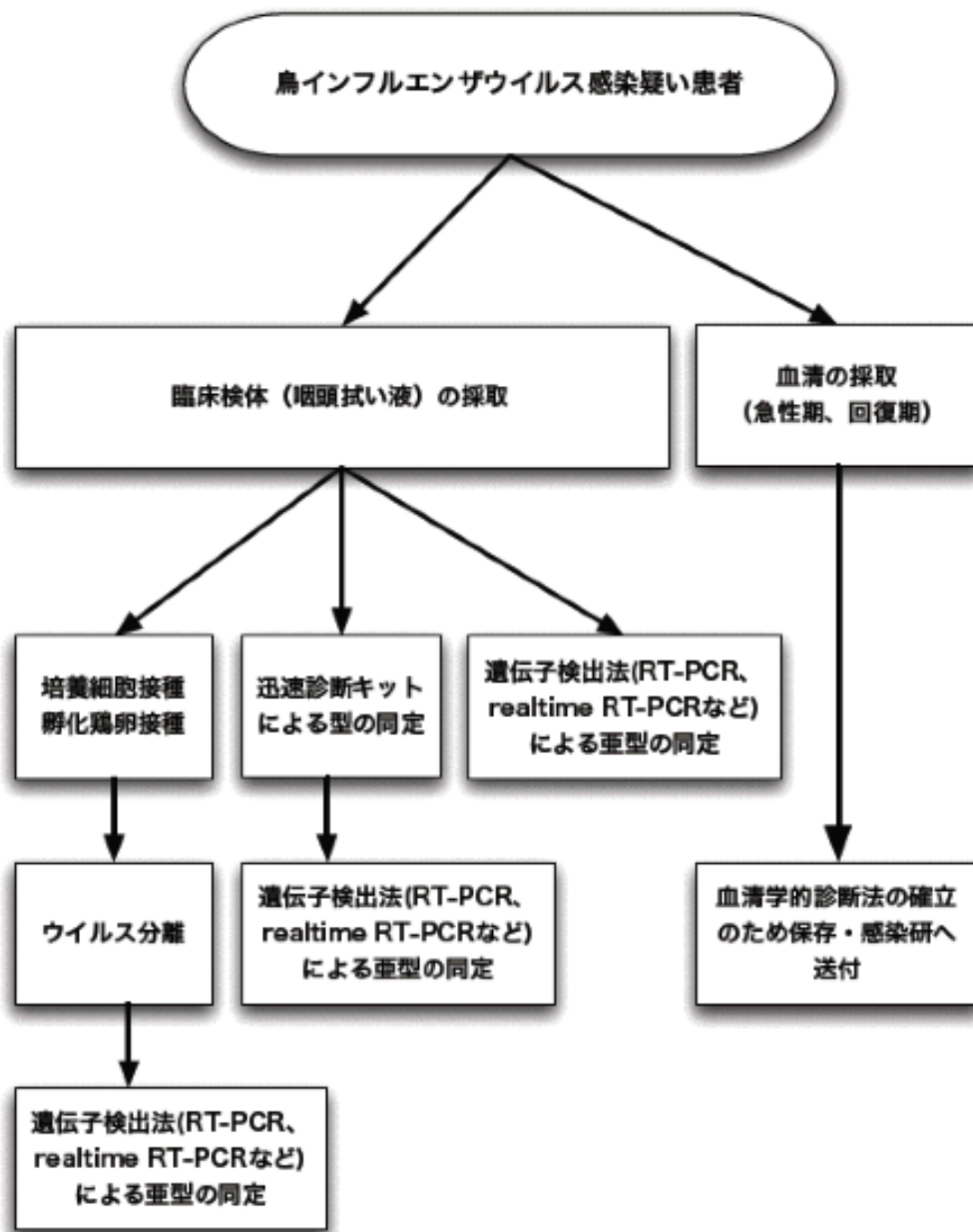


図1 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の実験室診断の概要

### 3 遺伝子検査の結果解釈について

遺伝子検査による H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染診断は、リアルタイム RT-PCR または Conventional RT-PCR により、H5 HA 遺伝子、N1 NA 遺伝子および A 型インフルエンザウイルスの M 遺伝子の検出により実施される。こうした遺伝子検査では一回の検査のたびに、検査が適切に行われたかどうかを確認するために、適切な陰性および陽性コントロール(対照検体)も共に検査する必要がある。これには以下のものが含まれる。

- RNA の抽出過程に陰性検体を1つおく(RNA 抽出陰性コントロール)
- RT-PCR の過程でそれぞれの検出系ごとに滅菌蒸留水の検体を1つおく(RT-PCR 陰性コントロール)
- RNA の抽出過程に陽性検体を1つおく(RNA 抽出陽性コントロール)事が望ましいが、実験室汚染(コンタミネーション)による偽陽性を招く危険性があることから、**推奨はしない**。
- RT-PCR の過程でそれぞれの検出系ごとに陽性検体を最低でも1つはおく(RT-PCR 陽性コントロール)  
これら陽性コントロールはコンタミネーションによる、偽陽性を招く可能性があるため、慎重に取り扱う必要がある。特に臨床検体、抽出したサンプル RNA や反応試薬等が汚染されないように、検査作業の順序、使用する器具、作業スペース等を十分考慮する必要がある。RNA 抽出陽性コントロールを使用する場合は、Type A の検出系で最小限に検出できるようにあらかじめウイルス濃度を調整した H1N1 あるいは H3N2 亜型の季節性ヒトインフルエンザウイルスを使用するとよい。RNA 抽出陽性コントロールを使用しない場合は、RNA 抽出試薬の精度管理(試薬のロット管理、検査する人の定期的な技能チェック、ロット変更時および定期的に行う試薬の性能チェックなど)を行う必要がある。

遺伝子検査の結果解釈にあたっては以下の事項に留意する(図 2 に結果解釈の例を示した)。なお、対照検体である各陰性コントロールは陰性、各陽性コントロールは陽性と、それぞれ予測通りの結果を示していなければならない。

以下に Type A, H5, N1 の検査を同時に行った場合の結果解釈例を示した。**なお、HA 遺伝子の変異により検出感度が低下する場合があるため、H5 HA 遺伝子検出のみの検査では H5 感染例を見逃す可能性がある。H5 感染が強く疑われる場合は、H5 HA 遺伝子検出だけでなく必ず Type A 遺伝子検出も同時に行う事を強く推奨する。**

#### H5 陽性例とする検査結果

- Type A / H5 / N1 の検査結果が + / + / +
- Type A / H5 / N1 の検査結果が + / + / -

上記のように N1 が同定できない場合でも H5 陽性例とする。なお NA が同定できない理由として以下の事が考えられる。

(1) 検査対象の N1 NA 遺伝子に変異が入っていて、プライマーもしくはプローブとの配列が完全に一



致しないために、N1 NA 検出系の感度が低下した、あるいは全く機能しなかった。

(2) NA が N1 以外である。

(3) N1 の検査結果が他の何らかの理由により偽陰性\*となった。

#### H5 陰性例とする検査結果

- Type A / H5 / N1 の検査結果が - / - / -

これら遺伝子検査が陰性であっても、患者が H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染していないという意味ではない。H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染していても、これら遺伝子検査が陰性になる場合があるが、その理由としては以下の事が考えられる。

- (1) 検体採取時に、RT-PCR の検出限界以下のウイルス量しか採取できなかった
- (2) 検体採取が、ウイルスやその遺伝子を排出する適切な時期に行われなかった

#### H1 HA および H3 HA の判定を必要とする検査結果

- Type A / H5 / N1 の検査結果が + / - / -

H1 および H3 の同定を RT-PCR により行う

#### 再検査を必要とする検査結果例

- Type A / H5 / N1 の検査結果が - / + / +

(1) Type A の検査結果が偽陰性\*となった(本来は H5N1 の可能性がある)

(2) H5 および N1 の検査結果が偽陽性\*\*となった

- Type A / H5 / N1 の検査結果が + / - / +

(1) H5 の検査結果が偽陰性\*となった(本来は H5N1 の可能性がある)

(2) Type A および N1 の検査結果が偽陽性\*\*となった

(3) HA が H5 以外である。

- Type A / H5 / N1 の検査結果が - / + / -

(1) H5 の検査結果が偽陽性\*\*となった

(2) Type A および N1 の検査結果が偽陰性\*となった(本来は H5N1 の可能性がある)

- Type A / H5 / N1 の検査結果が - / - / +

(1) N1 の検査結果が偽陽性\*\*となった

(2) Type A および H5 の検査結果が偽陰性\*となった(本来は H5N1 の可能性がある)

- Type A / H5 / N1 の検査結果が + / - / - かつ H1 / H3 の検査結果が - / -

(1) Type A の検査結果が偽陽性\*\*となった

(2) H5 および N1 の検査結果が偽陰性\*となった(本来は H5N1 の可能性がある)

(3) H1 あるいは H3 の検査結果が偽陰性\*となった(本来は H1 あるいは H3 の可能性がある)

(4) ウイルスの HA 亜型が H1, H3, H5 以外の亜型である

\*偽陰性: 本来陽性となるべきところが陰性となる事。その原因には以下の事が考えられる。

- ・ 反応試薬の調整ミス
- ・ 反応試薬やサンプル RNA の分注ミス
- ・ ウイルスの変異により検査の検出感度が低くなり検出できなかった
- ・ サンプル RNA に含まれるウイルス遺伝子数が検査の検出限界以下であった

\*\*偽陽性: 本来陰性となるべきところが陽性となる事。その原因には以下の事が考えられる。

- ・ 反応試薬の調整ミス
- ・ サンプル RNA、試薬、器具等のコンタミネーション
- ・ 検査の非特異反応

なお再検査を行う場合は、元の検体から再度 RNA を抽出して遺伝子検査を行う。

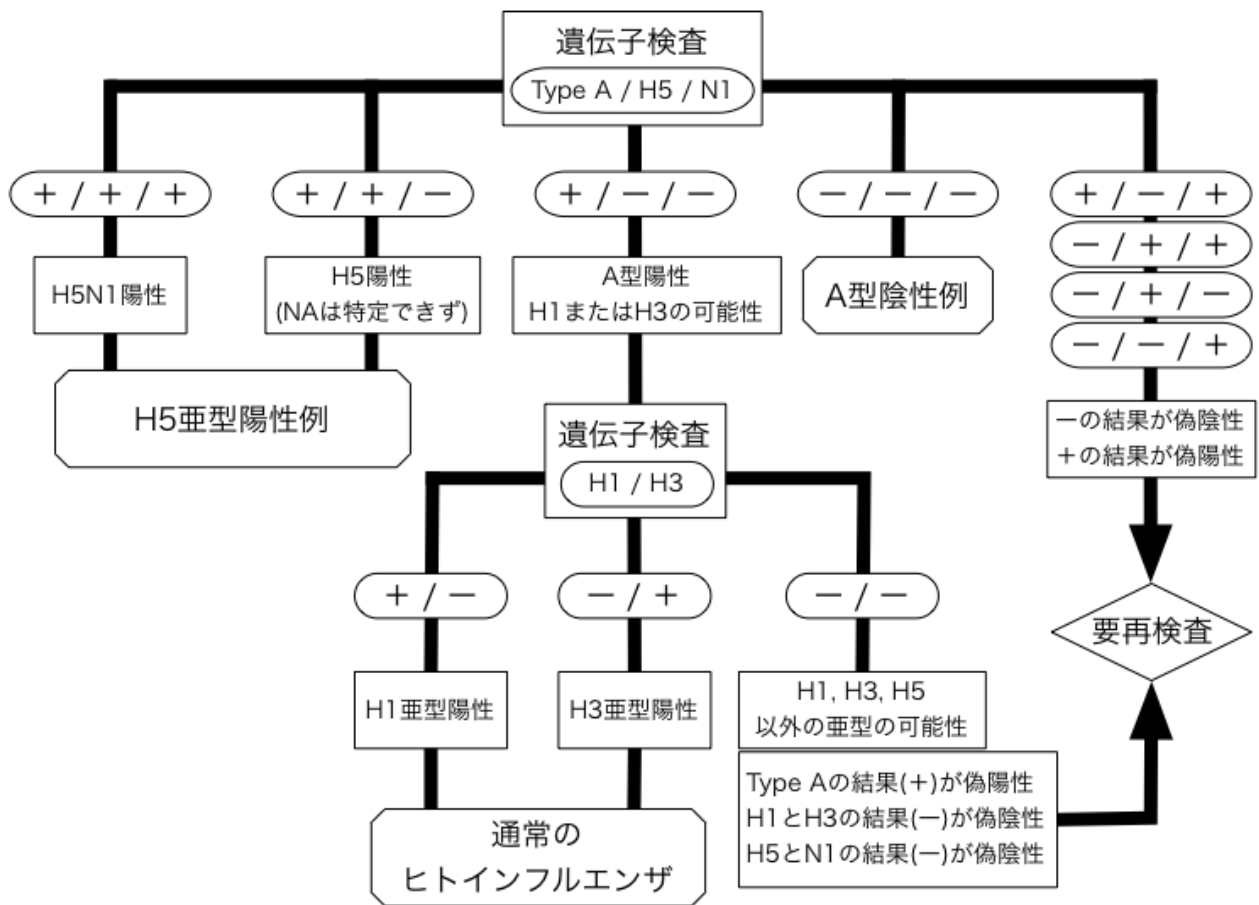


図2 遺伝子検査の結果解釈例

## Part II

### ウイルス検査法

#### 1 インフルエンザウイルス分離のための臨床検体

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。検査材料には、咽頭拭い(Throat swab)液\*、鼻腔洗浄液(Nasal wash)、鼻咽頭分泌液(Nasopharyngeal secretions:NPS)、鼻腔拭い(Nasal swab)液\*、うがい液、鼻汁鼻かみ液などが一般的に用いられる。

\*咽頭や鼻腔を拭った綿棒を浸す液には、0.5%ウシ血清アルブミンフラクションV (BSA)、ペニシリン(100-500 U/ml)、ストレプトマイシン(100-500  $\mu$ g/ml)、ゲンタマイシン(100  $\mu$ g/ml)およびアンフォテリシンB(2  $\mu$ g/ml)を添加した細胞培養培地(MEM培地または199培地)またはPBS(-)を用いる。**生理食塩水はpHが不安定となるため使用しない。**

#### 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氷中または4°C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°C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°C以下に保存し、輸送も凍結状態で行う。**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 臨床検体またはウイルス培養液からの RNA の抽出

##### 3.1 器具および試薬

マイクロ遠心機、マイクロピペット(200、1000  $\mu$ l)、100%エタノール、滅菌微量遠心チューブ(1.5ml)、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN Cat#52904)

##### 3.2 RNA 抽出

QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて RNA 抽出を行う場合のプロトコールを下記に示した。なお、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すること。

1) 140  $\mu$ l の検体またはウイルス培養液をキャリア RNA 添加済みの Buffer AVL 560  $\mu$ 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、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、必要に応じて PPE を強化する。

↓

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

↓

3) 混合液 630  $\mu$ l を QIAamp スピンカラムに注入し、キャップを閉めて 6000  $\times$  g (8000rpm) で 1 分間遠心する。カラムを新しいコレクションチューブに移す。ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。この作業をもう一度繰り返す。

↓

4) Buffer AW1 500  $\mu$ 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。カラムを新しいコレクションチューブに移し、ろ液の入ったチューブは捨てる。

↓

5) Buffer AW2 500  $\mu$ 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。

↓

6) カラムを新しいコレクションチューブに移し、フルスピード (20000  $\times$  g、14000rpm) で 1 分間遠心する。

↓

7) カラムを新しい 1.5ml チューブに移し、Buffer AVE 60  $\mu$ 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 RNA は速やかに遺伝子検査に使用し、保存する場合はできるだけ  $-70^{\circ}\text{C}$  以下で保存する。

## 4 ウイルス遺伝子検出法による H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの同定

### 4.1 リアルタイム RT-PCR (TaqMan Probe 法) による同定

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 (RT) で合成する必要がある。ここでは RT 反応と PCR 反応をシングルチューブで行う TaqMan Probe 法を用いたリアルタイム One-step RT-PCR により、H5 HA 遺伝子、N1 NA 遺伝子および A 型インフルエンザウイルスの M 遺伝子の検出を同時に行って、H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスを同定する方法を示す。反応は 1 チューブ内で連続的に行い、増幅産物をリアルタイムに検出するため、電気泳動が不要であり、判定までの時間短縮も可能となる。また通常は、反応後のチューブを開ける必要がないので、電気泳動等のポスト PCR 操作によるコンタミネーションの可能性がなく、

コンタミネーションによる偽判定のリスクを減らす事ができる。

なお、最近報告された H7 および H9 亜型検出方法に関する論文を参考文献として列挙する。ただし、HA 遺伝子は遺伝子配列が多様性に富んでいるため、論文に記載された方法を用いたとしても、流行株とプライマーもしくはプローブ配列との間に相違がある場合などは、流行株を確実に検出できるかどうか分からない。従って、論文に記載された方法を使用するにあたっては、流行株が検出できるかどうかなど情報収集を行うとともに、各施設では反応条件、検出感度や特異性などについて十分な検討を行う必要がある。

#### 4.1.1 機材および試薬

マイクロ遠心機、マイクロピペット(2、20、200、1000  $\mu$ l)、RNase-free 滅菌蒸留水<sup>※1</sup>、滅菌微量遠心チューブ(1.5ml)、96well リアルタイム PCR 反応プレート、8 連ストリップキャップまたはプレートシール、リアルタイム PCR 装置、プライマー、TaqMan プローブ、QuantiTect® Probe RT-PCR Kit (QIAGEN Cat#204443)、RNase Inhibitor 20Units/  $\mu$ l(100  $\mu$  L) (ABI Cat#N808-0119)

<sup>※1</sup> 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。検査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検査ごとに使用する。

#### 4.1.2 リアルタイム RT-PCR 用プライマーおよびプローブについて

(A 型同定用)

Type A M 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ:

MP-39-67For	5'-CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTATC
MP-183-153Rev	5'-TGACAGRATYGGTCTTGTCTTTAGCCAYTCCA
MP-96-75ProbeAs	5'-(FAM)ATYTCGGCTTTGAGGGGGCCTG(MGB)

PCR 産物の長さ: 146bp

(H5 亜型同定用)

H5 HA 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ:

H5HA-205-227v2-For	5'-CGATCTAGAYGGGGTGAARCCTC
H5HA-326-302v2-Rev	5'-CCTTCTCCACTATGTANGACCATTC
<sup>※2</sup> H5HA-205-227-For(2010)	5'-CGATCTAAATGGAGTGAAGCCTC
<sup>※2</sup> H5HA-326-302-Rev(2010)	5'-CCTTCTCTACTATGTAAGACCATTC
H5-Probe-239-RVa	5'-(FAM)AGCCAYCCAGCTACRCTACA(MGB)

H5-Probe-239-RVb

5'-(FAM)AGCCATCCCGCAACACTACA(MGB)

PCR 産物の長さ: 122bp

※<sup>2</sup> 最新の流行株を効率よく検出するために、RNase-free water の一部をこれらプライマーに置き換えて添加する

(N1<sup>※3</sup> 同定用)

N1 NA 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ:

N1-For-474-502-v2            5'-TAYAACTCAAGGTTTGAGTCTGTGCTTG

N1-Rev-603-631-v2           5'-ATGTTRTTCCTCCAACCTCTTGATRGTGTC

N1-Probe-501-525-v3        5'-(FAM)TCAGCRAGTGCCATGATGGCA(MGB)

PCR 産物の長さ: 161bp

※<sup>3</sup> H1N1pdm09 ウイルスの N1 NA 遺伝子に反応する場合がある。

## 参考文献

H7亜型同定用リアルタイムRT-PCR法が記載された論文

- Tsukamoto K, Noguchi D, Suzuki K, Shishido M, Ashizawa T, Kim MC, Lee YJ, Tada T. (2010) Broad Detection of Diverse H5 and H7 Hemagglutinin Genes of Avian Influenza Viruses by Real-Time Reverse Transcription-PCR Using Primer and Probe Sets Containing Mixed Bases. J Clin Microbiol 48: 4275-4278.
- Sidoti F, Rizzo F, Costa C, Astegiano S, Curtoni A, Mandola ML, Cavallo R, Bergallo M. (2010) Development of Real Time RT-PCR Assays for Detection of Type A Influenza Virus and for Subtyping of Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. Mol Biotechnol 44: 41-50.

H9亜型同定用リアルタイムRT-PCR法が記載された論文

- Ben Shabat M, Meir R, Haddas R, Lapin E, Shkoda I, Raibstein I, Perk S, and Davidson I. (2010) Development of a real-time TaqMan RT-PCR assay for the detection of H9N2 avian influenza viruses. J Virol Methods 168: 72-77.
- Hiromoto Y, Uchida Y, Takemae N, Hayashi T, Tsuda T, and Saito T. (2010) Real-time reverse transcription-PCR assay for differentiating the Pandemic H1N1 2009 influenza virus from swine influenza virus. J Virol Methods 170: 169-172.

### 4.1.3 リアルタイム RT-PCR (TaqMan Probe 法) 反応

QIAGEN 社の QuantiTect® Probe RT-PCR kit を用いた反応条件を示した。詳細はキットに添付のマニュアルを参照すること。なお、試薬等の分注操作は全て氷上にて行う。

試薬	容量	最終濃度
2×QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	12.5 $\mu$ l	1×
Forward primer (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l	0.6 $\mu$ M
Reverse primer (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l	0.6 $\mu$ M
※ <sup>4</sup> Probe (5 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.1 $\mu$ M
QuantiTect RT Mix	0.25 $\mu$ l	
RNase Inhibitor (20U/ $\mu$ l)	0.1 $\mu$ l	
※ <sup>5</sup> RNase free Water	3.65 $\mu$ l	
RNA template	5 $\mu$ l	
Total 容量	25 $\mu$ l	

※<sup>4</sup> H5 検出用の Probe は以下の量比で混合する

H5-Probe-239-RVa 0.375  $\mu$ l

H5-Probe-239-RVb 0.125  $\mu$ l

※<sup>5</sup> H5 検出の際は、最新の流行株を効率よく検出するために、添加するRNase-free waterを3.65  $\mu$ lから2.9  $\mu$ lに変更し、下記プライマーを別に添加する

RNase-free water 2.9  $\mu$ l

H5HA-205-227-For(2010) 0.375  $\mu$ l(最終濃度 0.15  $\mu$  M)

H5HA-326-302-Rev(2010) 0.375  $\mu$ l(最終濃度 0.15  $\mu$  M)

#### <反応条件>

使用するリアルタイム PCR 装置、試薬および反応容器等によって、最適な反応条件は異なるので、必ず事前に反応条件の最適化を行い、検出感度等の確認をしておく必要がある。以下に、試薬に QIAGEN 社 QuantiTect® Probe RT-PCR Kit、リアルタイム PCR 装置に BioRad 社 Chromo-4、Applied Biosystems 社 Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムまたは Roche Diagnostics 社 LightCycler 2.0 または LightCycler 480 を使用する場合の反応条件を示した。

#### Chromo-4 を使用する場合

50°C 30min.

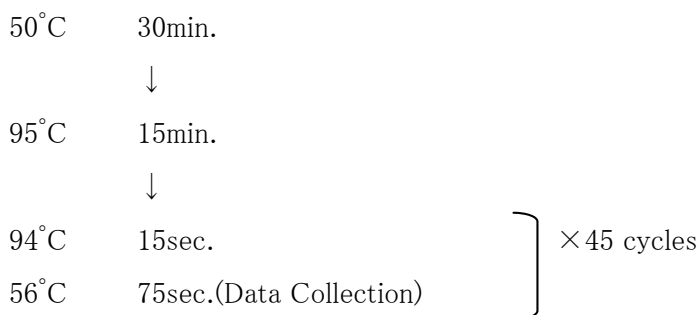




※6 1 分間の反応時間とは別に、約 18 秒の Data 収集時間が必要である。

Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムを使用する場合

(Standard モードで使用)



LightCycler 2.0 および LightCycler 480 を使用する場合

	Analysis Mode	Cycle	Temperature (°C)	Time	Ramp Rate ( °C/sec)	Acquisition Mode
RT	None	1	50	30min.	Max*	None
Denature	None		95	15min.	Max*	None
PCR	Quantification	45	94	15sec.	1.5	None
			56	75sec.	1	Single
Cooling	None		40	30sec.	Max*	None

\* LightCycler 2.0 の場合は 20、LightCycler 480 の場合は 4.4 となる

4.1.4 リアルタイム RT-PCR の結果解釈と判定

TaqMan Probe 法は PCR の伸長反応中に、PCR 増幅領域に結合した TaqMan Probe が Taq polymerase の有する 5' → 3' exonuclease 活性により分解されて発する蛍光シグナルの強度を測定する事で、リアルタイムに PCR の増幅状態をモニターできる方法である。その蛍光シグナルの強度は増幅反応の進行に伴い指数関数的に増えていき、蛍光シグナルを最初に発するタイミングはサンプル中に存在するターゲットとなる核酸量に依存する。蛍光シグナルが立ち上がり閾値を超えた時点の PCR 増幅サイクル数を Ct 値(Cycle

threshold)と呼ぶ。ターゲットとなる核酸が多い場合は、増幅サイクルの初期(Ct 値は小さい)に蛍光シグナルが検出されるが、少ない場合は、増幅サイクルの終盤(Ct 値は大きい)で検出される。系によっては増幅サイクルの終盤で、非特異反応による TaqMan Probe の分解が起きることがある。蛍光シグナルの立ち上がりが確認されたといって、必ずしも特異的にターゲット核酸を検出しているわけではない場合もあるので、検出系の特性を事前に必ず確認する必要がある。

TaqMan Probe 法による Type A、H5、N1 それぞれの検出限界 Ct 値は、H5N1 RNA 陽性コントロールを 10 倍階段希釈し、それをテンプレートに用いれば知る事ができる。特にリアルタイム RT-PCR では、先述した非特異反応と区別するためにも、検出限界付近を含むいくつかの段階希釈した RNA を陽性コントロールとして用い(例えば  $10^{-6}$  希釈が検出限界であった場合、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  希釈を常に陽性コントロールとして使用する)、検査毎に検出限界付近の Ct 値を明確にして、検査毎に精度管理を行う事が望ましい。

リアルタイム RT-PCR では、Ct 値の確認により検査結果の解析および判定を行う。なお、検査結果の判定は、以下の条件が満たされた時のみ有効である。それ以外の場合は、検査中に何らかの事故が発生して検査精度を保つ事ができなかった事が推察されるので、ただちにトラブルシューティングを行い、原因を究明した上で再検査を行う。

(1) 各々の検出系で全ての陽性コントロール(検出限界以下の濃度の陽性コントロールは除く)に、蛍光シグナルの立ち上がりがあり、かつそれが予測された Ct 値の範囲内である事が確認できる。なお、Type A、H5、N1 の各 Ct 値は同じ希釈の陽性コントロールであればほぼ同一である。

(2) 全ての陰性コントロールについて、蛍光シグナルの立ち上がりが確認されない。

検査結果の解析と判定は、各々の検出系 Ct 値を確認して判断する。検体の各々の Ct 値が各々の検出限界の陽性コントロールと同じかそれよりも小さな Ct 値であった場合は陽性と判定し、Ct 値が認められなかった場合は陰性と判定する。ただし、陽性コントロールの検出限界の Ct 値は、その検出系本来の検出限界を示すものではない事に留意する。例えば、サンプルの Ct 値が検出限界の陽性コントロール Ct 値を上回った(例:RT-PCR 陽性コントロールの Type A の検出限界の Ct 値が 37、検体が 38.5 であったケース)としても、蛍光シグナルの立ち上がりが 40 サイクル以内(一般的に PCR の増幅効率が良い系では、検出限界の Ct 値は 40 前後である場合が多く、本検出法の Type A、H5、N1 検出系にもそれが当てはまる)であれば、本来の検出限界付近でその蛍光シグナルをとらえている可能性がある。また、本検出系では同一の H5N1 陽性検体の Type A、H5、N1 の各 Ct 値はほぼ同一である(各 Ct 値が乖離する場合は、乖離した検出系でターゲット核酸に変異が入っている事が考えられる)。他の検出系での蛍光シグナルの立ち上がりや、Conventional RT-PCR の結果を考慮し、最終的な検体の検査結果は、Part I 2章 検査の進め方も参考にして、総合的に判断する。

#### 4.1.5 H5N1 RNA 陽性コントロールの管理・使用について

##### 4.1.5.1 H5N1 RNA 陽性コントロールの使用(複数の希釈 RT-PCR 陽性コントロールを使用する場合)

10倍段階希釈したいくつかのH5N1 RNA陽性コントロールを用いて、それぞれの検出系の検出限界を検査毎に明確にする事で、検査毎に精度管理を行う事ができる。具体的には、検出限界付近の希釈を含む複数の段階希釈したRNA(例えば $10^{-3}$ 希釈が検出限界だった場合、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 希釈を使用するなど)を陽性コントロールとして用いるとよい。陽性コントロールは、できるだけ濃い濃度のRNAを一度に使い切る分だけ小分け分注して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存管理する。小分け分注したRNAは一回の検査毎に使い捨てにする。また、希釈したRNAは分解され易いので、希釈液の作製は氷上で行う事が望ましい。また、希釈後は直ちに使用するようにする。

#### 4.1.5.2 H5N1 RNA 陽性コントロールの使用 (RT-PCR 陽性コントロールを1点のみ使用する場合)

検体数や機器の事情で、RT-PCR 陽性コントロールを1点のみしかおけない場合は、10倍段階希釈したいくつかのH5N1 RNA陽性コントロールを使用して、最初に各検出系の検出限界を求め、求めた検出限界よりも1~2 order 濃い希釈RNAをRT-PCR 陽性コントロールとして使用する(例えば $10^{-3}$ 希釈が検出限界であった場合、 $10^{-1}$ あるいは $10^{-2}$ 希釈をRT-PCR 陽性コントロールとして用いる)。この場合、検出限界が明確ではなくなるので、例えば陽性コントロールよりもCt値が高い検体がある場合など、非特異反応と区別する必要がある時は4.1.5.1の陽性コントロールを使用して再検査を行う事が望ましい。陽性コントロールは、一度に使い切る分だけ小分け分注して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存管理する。小分け分注したRNAは一回の検査毎に使い捨てにする。また、希釈したRNAは分解され易いので、融解後は直ちに使用するようにする。

## 4.2 Conventional RT-PCR 法による同定

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 (RT)で合成する必要がある。ここでは、RT反応とPCR反応をシングルチューブで行うOne-Step RT-PCRと電気泳動により、H5 HA 遺伝子、N1 NA 遺伝子およびA型インフルエンザウイルスのM遺伝子の検出を同時に行って、H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスを同定する方法を示す。

なおPCR法は、その検出感度の高さから、特に電気泳動等のポストPCR操作については、コンタミネーションの大きな元凶となりうるので、動線も考慮したPCRに適切なラボデザインを行い、検査する人は作業フローをしっかりと確認し、コンタミネーションによる偽判定をしないように細心の注意を払う必要がある。

なお、Conventional RT-PCR法を用いたH7およびH9亜型検出方法に関する論文を参考文献として列挙する。ただし、HA遺伝子は遺伝子配列が多様性に富んでいるため、論文に記載された方法を用いたとしても、流行株とプライマー配列との間に相違がある場合などは、流行株を確実に検出できるかどうか分からない。従って、論文に記載されている方法を使用するにあたっては、流行株が検出できるかどうかなど情報収集を行うとともに、各施設では反応条件、検出感度や特異性等について十分な検討を行う必要がある。

#### 4.2.1 機材および試薬

マイクロ遠心機、マイクロピペット(2、20、200、1000  $\mu$ l)、RNase-free 滅菌蒸留水<sup>※1</sup>、滅菌微量遠心チューブ(1.5ml)、96well PCR 反応プレート、8 連ストリップキャップもしくはプレートシール、サーマルサイクラー、プライマー、QIAGEN OneStep RT-PCR kit (QIAGEN Cat#210210)、RNase Inhibitor (Applied Biosystems Cat# N808-0119)

※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。検査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検査ごとに使用する。

#### 4.2.2 プライマーについて

(A 型同定用)

Type A/M 遺伝子検出用プライマー:

Type A/M30F2/08            5'-ATGAGYCTTYTAACCGAGGTCGAAACG

Type A/M264R3/08        5'-TGGACAAANCGTCTACGCTGCAG

PCR 産物の長さ: 244bp

(H5 亜型同定用)

H5 HA 遺伝子検出用プライマー:

H5/ 248-270F        5'-GTGACGAATTCATCAATGTRCCG

H5/ 671-647R        5'-CTCTGGTTTAGTGTTGATGTYCCAA

PCR 産物の長さ: 424bp

(N1<sup>※2</sup> 同定用)

N1 NA 遺伝子検出用プライマー:

N1-580-607F        5'-TGAAGTACAATGGCATAATAACWGACAC

N1-891-918R        5'-CCACTGCATATATATCCTATTTGATACTCC

PCR 産物の長さ: 339bp

※2 H1N1pdm09 ウイルスの N1 NA 遺伝子に反応する場合がある。

#### 参考文献

H7 亜型同定用 conventional RT-PCR 法が記載された論文

- Lee, M.S., Chang, P.C., Shien, J.H., Cheng, M.C., Shieh, H.K. (2001) Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods* 97 13-22.
- J. Pasick, Y. Berhane, H. Kehler, T. Hisanaga, K. Handel, J. Robinson, D. Ojkic, F. Kibenge, M. Fortin, R. King, A. Hamel, D. Spiro, J. Parmley, C. Soos, E. Jenkins, A. Breault, D. Caswell, C. Davies, J. Rodrigue, K. McAloney and F. Leighton (2010) Survey of Influenza A Viruses Circulating in Wild Birds in Canada 2005 to 2007. *Avian Diseases* Vol. 54: 440-445.

#### H9 亜型同定用 conventional RT-PCR 法が記載された論文

- Vincent C.C. Cheng , Jasper F.W. Chan, X. Wen, W.L. Wu , T.L. Que, H. Chen, K.H. Chan, and K.Y. Yuen. (2011) Infection of immunocompromised patients by avian H9N2 influenza A virus. *J Infect* 62: 394-399.

#### 4.2.3 One Step RT-PCR 反応

QIAGEN 社の OneStep RT-PCR kit を用いた反応条件を示した。詳細はキットに添付のマニュアルを参照すること。なお、試薬等の分注操作は全て氷上にて行う。

試薬	容量
RNase-free 滅菌蒸留水	9.5 $\mu$ l
5×QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5.0 $\mu$ l
dNTP 混合液 (containing 10 mM of each dNTP)	1.0 $\mu$ l
sense (+) primer (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l
antisense (-) primer (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix (5 U/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
RNase Inhibitor (20U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
RNA template	5.0 $\mu$ l
Total	25.0 $\mu$ l/test

#### <反応条件>

使用するサーマルサイクラー、試薬、反応容器等によって最適な反応条件は異なるので、必ず事前に反応条件の最適化を行い、検出感度等の確認を行っておく必要がある。以下は、試薬に QIAGEN 社 OneStep RT-PCR kit、サーマルサイクラーに Applied Biosystems 社 GeneAmp® PCR System 9700 を使用する場合の反応条件である。

(H5、N1、Type A 同定用)

50°C 30min.

↓

95°C 15min.

↓

94°C 30sec.

50°C 30sec.

72°C 40sec.

} × 45 cycles

↓

72°C 10min.

↓

4°C

#### 4.2.4 PCR 産物のアガロースゲル電気泳動による確認

##### 4.2.4.1 機材および試薬（感染研での使用例）

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(1.5～2.0%で使用)、分子量マーカー (100 bp DNA ladder, Promega 社 Cat#2101)、エチジウムブロマイド、1×TAE 電気泳動バッファー(50×TAE ニッポンジーン社 Cat#313-90035 を希釈して使用)、6×Gel loading dye (Promega 社 Cat#G1881)

##### 4.2.4.2 電気泳動

One Step RT-PCR にて増幅後、6×Gel loading dye 2  $\mu$ l と PCR 増幅液 10  $\mu$ l をよく混合(ピペッティング)し、1.5%から 2.0%に調製したアガロース(以下、「ゲル」とする。)のウェルに混合液を 10  $\mu$ l 入れる。他のウェルに分子量マーカーを入れる。

↓

電気泳動装置で 100V、30～40 分間、－から＋へ電気泳動する。

↓

泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド染色液に入れ、15～30 分間染色する。染色後、ゲルを 5～10 分間水洗し、UV 照射装置にセットし、UV を照射して写真撮影する。

#### 4.2.5 Conventional RT-PCR の結果解析と判定

各々の RT-PCR 産物の有無とバンドサイズ(Type A:234bp、H5:424bp、N1:339bp)の確認により検査結果の解析および判定を行う。なお、検査結果の判定は以下の 2 つの条件が満たされた時のみ有効である。それ以外の場合は、検査中に何らかの事故が発生して検査精度を保つ事ができなかった事が推察される

ので、ただちにトラブルシューティングを行い、原因を究明した上で再検査を行う。

(1) 全ての陽性コントロールについて、各々予測されるバンドサイズの RT-PCR 産物が存在する事が確認できる

(2) 全ての陰性コントロールについて、各々予測されるバンドサイズの RT-PCR 産物が存在しない事が確認できる

なお、検査結果の解析と判定は、各々の RT-PCR 産物が各々の陽性コントロールと同一のバンドサイズであった場合を陽性と判定し、各々の RT-PCR 産物が各々の陰性コントロールと同一結果が得られた場合を陰性と判定する。最終的な検体の検査結果は、Part I 2章 検査の進め方を参考にして総合的に判断する。また、RT-PCR 陽性コントロールの管理・使用方法については前章を参照する。

#### 4.3 (参考) RT-LAMP 法による H5 亜型および H7 亜型の同定

RT-LAMP 法は同一反応チューブ内において逆転写反応(Reverse transcription:RT)から Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) を等温反応で行う核酸増幅法であり、増幅反応の副産物であるピロリン酸マグネシウムの濁度測定、もしくは紫外線照射により発生する蛍光の目視観察により、増幅した核酸を検出する事ができる。

現在、栄研化学株式会社より以下の H5 亜型および H7 亜型インフルエンザウイルス同定用の RT-LAMP 試薬が販売されており、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) 等により精製した RNA を用いる事で、RT-LAMP 法による H5 亜型および H7 亜型の同定を行う事ができる。使用方法については、各試薬に添付されている使用説明書に従って行う。

(H5 亜型同定用)

- ・「H5 亜型インフルエンザウイルス検出試薬キット」(体外診断用医薬品)
- ・「プライマーセット Avian Flu H5」(「RNA 増幅試薬キット(RT-LAMP)」と組み合わせて使用する)(研究用試薬)

(H7 亜型同定用)

- ・「プライマーセット Avian Flu H7」(「RNA 増幅試薬キット(RT-LAMP)」と組み合わせて使用する)(研究用試薬)

なお、RT-LAMP 法では標的遺伝子の 6 つの領域(反応時間を短縮するためのプライマーも含めると 8 つの領域)に対してプライマーを設定するため、特異性の非常に高い核酸増幅法となっているが、反面、この領域に変異が入った遺伝子を検出する場合には、検出感度が大きく低下する、あるいは全く検出できない事があるので、使用の際には対象となる流行株が検出できるかどうかなどの情報収集を行うとともに、各施

設では検出感度や特異性等について十分に検討する必要がある。また、RT-PCR 法などと比較すると検出系によってはもともと検出感度が低い場合がある。従って、RT-LAMP 法による陰性結果は検査検体からこの検査方法でウイルス遺伝子が検出できなかったに過ぎず、必ずしも検査検体中のインフルエンザウイルスの存在を否定するものではないことに留意しなければならない。

## 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 Madin-Darby canine kidney (MDCK)細胞が用いられている。

### 5.1 MDCK 細胞の培養

#### 5.1.1 培養器具および試薬

MDCK 細胞の単層培養(組織培養用 75 cm<sup>2</sup> 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 cm<sup>2</sup>;12.5 cm<sup>2</sup>, BD Falcon Cat. # 353018)

DMEM 培地 (SIGMA Cat. #6429)

ウシ胎仔血清 (FBS)

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(-))

#### 5.1.2 試薬の調製

##### 増殖用培地

試薬	最終濃度	使用量
DMEM	-	500 ml
FBS	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
ファンギゾン	0.5 μg/ml	1 ml

#### 5.1.3 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 (-) 15 ml を器壁に沿って静かに加え、細胞表面を洗浄する。
- 3) トリプシン/EDTA 1 ml を加え、37 °C の CO<sub>2</sub> インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)で保温する\*。
- 4) 顕微鏡下で細胞が剥がれているのを確認した後、フラスコを軽くたたいて細胞を壁面から完全に剥がす。増殖用培地 5 ml を加え、泡立てないようにピペッティングして細胞を分散させる。細胞を回収し、800 rpm で 3 分間遠心した後、上清を吸引除去し、新たに 10 ml の増殖用培地を加える。
- 5) 増殖用培地 10 ml を加えた新しい 75cm<sup>2</sup> プラスチックフラスコに細胞分散液 2 ml (おおよそ 1×10<sup>6</sup>細胞数/ml に相当) を植え込み、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)で培養する。3~4日 で単層の細胞シートを形成する。12.5cm<sup>2</sup> プラスチックフラスコの場合は、この細胞分散液 0.5 ml を、増殖用培地 2 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、トリプシン処理をしすぎないように注意する。また、30 分以上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、再び 37°C に保温する。

#### 5.1.4 細胞ストックの作製

細胞は、継代数を重ねすぎると性質が変化したり、作業途中の事故等でコンタミさせてしまったりすることがあるため、継代歴の新しいもので細胞のストックを作製しておく必要がある。ある一定の継代歴になれば、細胞を廃棄し、細胞ストックからあらたに起こした細胞を使用することで一定の分離効率を維持する事ができる。継代歴を重ねすぎた細胞ではインフルエンザウイルスの増殖性が低下することもある。

##### \*細胞凍結(細胞ストックの作製)

- 1) 継代時の方法と同様に 4) の遠心まで行い、上清を除去した後、凍結用培地 (Recovery Cell Culture Freezing Medium (GIBCO Cat. No. 12648-010)) に、 $>1 \times 10^6$  cells/ml の濃度で浮遊させる。
- 2) 2ml のセラムチューブに 1ml ずつ分注し、徐々に凍結させるため、凍結処理容器 (バイセル (日本フリーザー (株)) 等、無ければ厚いタオル等で包む) に入れ、-80°C で 1 晩凍結する。
- 3) 翌日、液体窒素タンクに移動させる。

感染研では、細胞のマスターストックは 50 本、ワーキングストックは 100 本作製している。通常ワーキングストック細胞を使用し、継代歴が 25 代になると廃棄し、あらたにワーキングストックを起こして使用している。ワーキングストックが無くなった場合にはマスターストックからワーキングストックを作製する。

##### \*細胞融解(細胞ストックを起こす)

- 1) 液体窒素タンクに保管している細胞チューブを取り出したら、37°C のウォーターバスにチューブを浸け、すみやかに融解する。
- 2) 増殖用培地 15 ml を加えた 75cm<sup>2</sup> プラスチックフラスコに融解した細胞液を加え、37 °C の CO<sub>2</sub> インキュ

ベーター(5% CO<sub>2</sub>)で培養する。

3) 24 時間後、上清を吸引除去し、新しい増殖用培地 15 ml を加え、細胞が単層を形成するまで 37 °C の CO<sub>2</sub> インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)で培養する。

## 5.2 インフルエンザウイルスの分離

### 5.2.1 器具および試薬

MDCK 細胞の単層培養(組織培養用 12.5 cm<sup>2</sup> プラスチックフラスコ\*)

DMEM 液体培地 (SIGMA Cat.#D6429)

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)

リン酸緩衝生理食塩水(PBS(-))

アセチルトリプシン(SIGMA Cat. #T6763)

### 5.2.2 試薬の調整

分離用培地

試薬	最終濃度	使用量
DMEM	-	500 ml
ペニシリン/ストレプトマイシン	100 単位/ml ペニシリン	5 ml
	100 μg/ml ストレプトマイシン	
ファンギゾン	0.5 μg/ml	1 ml

### 5.2.3 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 (-) 5 ml を器壁に沿って静かに加え、細胞表面を洗浄する。分離用培地で同様に洗浄した後、接種材料 0.1~0.2 ml を細胞に接種する\*。

3) 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°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で行う。

4) 30~60 分後\*\*、トリプシン(0.5~5 μg/ml)\*\*\*を含む分離用培地 2.5 ml を加え、34 °C の CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。

5) 細胞変性効果(CPE)の出現を毎日顕微鏡下で観察する。

6) 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。

\*細胞が乾燥しないよう接種材料をすばやく細胞全体に広げる。

\*\*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。

#### 5.2.4 判定方法

培地の HA 活性を測定する。方法についてはインフルエンザ診断マニュアルを参照。

#### 5.2.5 ウイルスの継代培養

HA 活性が検出されなかった場合は、回収したウイルス培養液を 10 倍に希釈して培養細胞に接種する。これを数回繰り返す。前回弱い CPE が確認されたり、低い HA 価が検出されたりした場合は、ウイルス培養液を 100 倍程度に希釈して接種する。

#### 5.2.6 保存方法

ウイルス液は 3000 rpm、5 分間遠心し、細胞の破片を除いた後分注し-70℃以下に保存する。

### 6 孵化鶏卵を用いたインフルエンザウイルスの分離

ヒトの咽頭拭い液等の接種材料から高病原性鳥インフルエンザウイルスを孵化鶏卵で分離培養するには、尿膜腔接種法が最も適している。

#### 6.1 尿膜腔内接種法

##### 6.1.1 孵化鶏卵

卵令:10～11 日齢。

##### 6.1.2 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)。

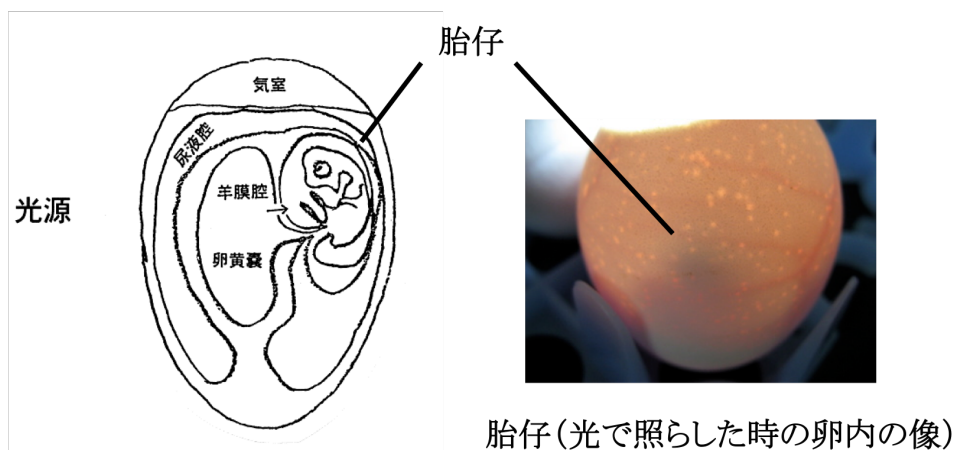


図4 検卵

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。

#### 6.1.3 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)を中心にヨードチンキ、ついで70%アルコールで消毒する。
- 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0.1~0.2mlを孵化鶏卵に接種する。
- 4) 接種後、小穴を木工ボンド等にて塞ぐ。

#### 6.1.4 培養

気室を上にした状態で静置し、加湿して35℃にて、24時間から48時間培養する。高病原性鳥インフルエンザウイルスは鶏胚を殺すので、接種後24時間経過したら、こまめに検卵し、死亡していた場合は、すぐに孵化鶏卵を冷蔵庫内に移動する。

#### 6.1.5 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、ヨードチンキ、ついで70%アルコールにて噴霧消毒後、ハサミ、ピンセット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2~10mlである。

#### 6.1.6 判定方法

0.5%の血球浮遊液(鶏または七面鳥血球)を用いて尿液のHA活性を測定する。方法についてはインフルエンザ診断マニュアルを参照。HA活性が検出された場合は、PCR法にて亜型同定を行う。HA活性が

検出されなかった場合は、回収した尿液を 10 倍に希釈して孵化鶏卵に接種する。これを数回繰り返す。

#### 6.1.7 保存法

分注して-70 °C以下に保存する。

## 検査依頼先

国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

TEL: 042-561-0771、FAX: 042-561-6149

## 執筆者リスト

### 国立感染症研究所

インフルエンザウイルス研究センター

今井正樹

高下恵美

岸田典子

藤崎誠一郎

徐紅

中内美名

高山郁代

松井清彦

影山努

小田切孝人

### 地方衛生研究所

押部智宏（兵庫県立健康生活科学研究所）

小渕正次（富山県衛生研究所）

加瀬哲男（大阪府立公衆衛生研究所）

川上千春（横浜市衛生研究所）

高橋雅輝（岩手県環境保健研究センター）

平良勝也（沖縄県衛生環境研究所）

安井善宏（愛知県衛生研究所）

皆川洋子（愛知県衛生研究所）

調恒明（山口県環境保健センター）