

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	p2
HPS 検査に関する注意事項	p3
検体の採取・輸送	p3
病原学的検査	
1. ウイルス分離法	p4
2. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)	p4
血清学的検査	
1. 間接蛍光抗体法	p7
ハンタウイルス肺症候群 (HPS) の診断基準	p8
引用文献	p9
緊急時連絡先	p10

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の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. HPS の診断に有効な臨床症状は、□38.3°C以上の発熱、□呼吸障害、□入院後 1 週間以内の肺内浸出液の貯留や□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—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°C)
- ③ D-MEM (ダルベッコ変法 MEM 培地)
- ④ ウシ胎児血清(FBS, 56°C30 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°C1 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 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 (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 ml 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 ml 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'-CTGTCCAGATTTAGTGTTCCA-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°C	40 秒	}	35 サイクル
43°C	45 秒		
72°C	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

コンピューター上 (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°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 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

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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C, 30 分間) 被験血清を各ウェルにのせ、37 $^{\circ}$ 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 抗体を各ウェルにのせ、37 $^{\circ}$ 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. 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.
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 西條 政幸

TEL: 03-4582-2660

FAX: 03-5285-1169

e-mail: msaijo@nih.go.jp

国立感染症研究所ウイルス第1部第2室

室長 高崎 智彦

TEL: 03-4582-2661

FAX: 03-5285-1169

e-mail: takasaki@nih.go.jp

国立感染症研究所村山分室ウイルス第1部第1室

主任研究官 福士 秀悦

TEL: 042-848-7020

FAX: 042-561-2039

e-mail: fukushi@nih.go.jp