

狂犬病検査マニュアル

(第3.1版)

令和4年2月

狂犬病 (rabies)

目次

I 狂犬病と狂犬病の検査の概説

II 動物の狂犬病の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 狂犬病の検査の実際

1 直接蛍光抗体法による抗原検出

2 遺伝子検出

(1) RNA抽出

(2) One step RT-PCR

3 ウイルス分離法

(1) マウス脳内接種法

(2) 培養細胞接種法

4 免疫組織化学による抗原検出

V 引用文献

VI 検査依頼先

VII 執筆者一覧

添付図1. 病理組織学的検査

I. 狂犬病と狂犬病の検査の概説

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り、毎年7万人が死亡し、年間で1200 万人以上が曝露後予防接種(post-exposure prophylaxis (PEP))を受けている。本症は、世界中に常在するリッサウイルスによる感染症である。日本では、1956 年のヒト1名、イヌ6頭と1957年のネコ1頭を最後にヒトおよび動物で国内に由来する狂犬病の発生報告はない。しかし、海外でイヌからの咬傷を受けて狂犬病リッサウイルスに感染して帰国後に狂犬病を発症し死亡したヒトが1970 年に1例、2006年に2例、2020年に1例報告されている。現在、狂犬病リッサウイルスによる狂犬病の報告がない国はイギリス・オーストラリア・ニュージーランド等わずか数カ国である。

世界で狂犬病リッサウイルスが流行している動物は、アジアのイヌ、ネコ;アフリカのイヌ、マンダース、ジャッカル;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、マンダースである。狂犬病流行国で動物から咬傷を受けた場合には現地で速やかに医療機関を受診して医師のPEP判断を受ける。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判断する必要がある。なお、曝露前のワクチン接種を受けた者が狂犬病の動物から咬傷をうけた場合でも医師による追加のPEP判断を受ける。流行地への渡航に際しては、渡航先で情報を十分に理解した上で動物と接する機会の多い場合はワクチン接種を事前に受けておくとよい。

<ヒトの狂犬病検査>

「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出:剖検での脳などの神経組織が対象となる。

病理組織学的検査法のうち免疫組織化学によるウイルス抗原検出:生前診断として後頸部皮膚生検を対象に行われる。剖検では脳などの神経組織が対象となる。

(2)RT-PCR 法によるウイルス遺伝子の検出:唾液、脳脊髄液。剖検時の脳などの神経組織でも可能である。

(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、剖検時の脳などの神経組織等で可能である。

(4)抗体測定:血液、脳脊髄液。

<動物の狂犬病検査>

ヒトを咬傷した動物に狂犬病が疑われ観察期間中に発症もしくは死亡した場合には速やかにウイルスの検出率が最も高い脳の脳幹、小脳、海馬を採材して検査を行う。動物の狂犬病検査は、咬傷やウイルス曝露を受けたヒトへのPEPの判断、関係者及び他のリスク動物に対する初期対応(対策)に大切である。

「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出:中枢神経組織(延髄、橋、視床、小脳、海馬)。

(2)RT-PCR法によるウイルス遺伝子の検出:中枢神経組織。

(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):中枢神経組織。

II. 動物の狂犬病の検査に関する一般的な注意事項

「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」は狂犬病ワクチン接種を行い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ウイルスの曝露を受けたと考えられる場合には、速やかに医師の判断に基づいてPEPを行う。

動物に狂犬病が疑われる神経症状がみられた場合には速やかに安楽殺を行い、脳組織について検査を行う。採材は周囲と区画された専用の部屋で行う(BSL2相当の環境)。

検体の取り扱いには、組織等の飛散に十分注意を払い中枢神経系組織、体液、特に唾液や粘膜組織との直接的な接触を避ける。

検査は、延髄、橋、視床、小脳、海馬の各部位について行う。解剖後の作業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装着する。脳摘出後の頭部等の廃棄物は専用の袋で2重に密閉した後にウイルスの不活化を行う。解剖等に使用した道具や、部屋は作業終了後にウイルスの不活化処理を行う。基本的に、狂犬病ウイルスには、一般的な消毒剤が使用可能である。解剖等に使用した部屋の床等の表面には、1%の温湯石けん水や洗剤液、もしくは第4級アンモニア塩の使用が有効である。大切なことは、清浄化のための溶液を噴霧する前に、洗剤で十分に有機物を取り除いておくことである。衣類はオートクレーブで滅菌出来るが可能であれば焼却する。

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。偽陰性が疑われる場合は異なる検査法で追検査を行う。

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。狂犬病の生前診断法は確立されていないため検査は剖検後の新鮮な脳組織で行う。

「検査担当者に必要な事項」

- 狂犬病ワクチンの曝露前予防接種。
- 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。

「検査に必要な施設等」

- 外部と十分に隔離された部屋(BSL-2)。
- バイオセーフティーキャビネット(クラスII) (バイオセーフティーキャビネット内にはベンチコート等を敷いて感染性溶液の飛散等を防ぐ)。
- オートクレーブの設置(汚染器具のウイルス不活化)。
- 石けん液、エーテル、クロロホルム、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(ウイルスの不活化)。
- 専用着衣(手袋(2重に使用)、着衣、マスク、帽子、ゴーグル、履物等)の使用。

「検査施設に必要な準備事項」

- 緊急時の狂犬病曝露後ワクチン接種(PEP)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. 狂犬病の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。

(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検診した場合には、海外への渡航歴や海外での動物咬傷歴(イヌ、ネコ、コウモリ等の野生動物等)を必ず確認する。疫学情報や臨床症状から狂犬病が疑われた患者は、皮膚生検からのウイルス抗原検出、唾液や髄液からのウイルス遺伝子の検出、ウイルス分離を行う。患者の血液や髄液中の抗狂犬病ウイルス抗体は、発症前の潜伏期間中には検出されないため狂犬病ウイルス感染を証明するものではない。

狂犬病患者の診察、看護、諸検査を行う医療職員は狂犬病ワクチンを受けていることが望ましい。患者が狂犬病と診断された場合には速やかに曝露リスクを判断してワクチン接種の必要な医療職員等にPEPを行う。また患者と接触した家族や友人へのPEPの判断も並行して行う。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。

生前検査

生検組織:免疫組織学化学によるウイルス抗原の検出に用いる。後頸部皮膚(10本程度の毛包を含んでいることが必要)を皮膚生検パンチ等で採取し、ホルマリン固定する。ホルマリン固定サンプルは常温で保存し、検査材料には必ず患者名、組織名、日時を鉛筆で記載する。

唾液・髄液: RT-PCR法を用いた狂犬病ウイルス遺伝子の検出及びウイルス分離に用いる。採取された検体をアウターキャップのクライオチューブ4本にそれぞれ500µl注入して蓋をし、-80℃で冷凍保管する。

死後検査

狂犬病のウイルスは神経指向性が高く、検査には開頭を含めた病理解剖と中枢神経系組織を採取することが必要となる。脳では通常の中性緩衝ホルマリンで固定した材料に加えて、視床、小脳、海馬(アンモン角)を、大豆大に生のまま採取し、冷凍保存(-80℃)しておくことが望ましい。可能であれば髄液・血液も採取する。

(2) 動物の材料

死亡した個体や観察期間中に狂犬病の症状が見られて、安楽殺を行った個体は速やかに解剖を行い検査に必要な脳組織を取り出す。解剖は死後24時間以内に行う。死亡個体の場合は解剖を行うまで冷蔵状態で保管する。狂犬病検査は、死後の自壊が速い脳の組織で行うので適切な温度管理と迅速な検査が必要である。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)で行う。搬送についてもその安全性を十分に確保して行う。

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(2)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」/狂犬病検査に必要な解剖の方法(安全で簡便な脳の取り出し方の1例)(平成18年度厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業・動物由来感染症のサーベイランス手法の開発に関する研究・狂犬病のサーベイランス及び診断に関するワーキンググループ)/狂犬病検査に必要な解剖方法(安全で簡便な脳の取り出し方の1例)(平成21年度厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業・動物由来感染症のサーベイランス手法の開発に関する研究・狂犬病のサーベイランス及び診断に関するワーキンググループ))。結核感染症課から狂犬病に関する多くの通知が出されており上記資料とあわせて参照して頂きたい。

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う。検査は、頭部より取り出した脳の「視床」、「橋」、「延髄」、「小脳」、「海馬」の各部位について行う。切り出した検査部位は、2分して一つを凍結材料とする(保管は-80℃で行う)。

検査材料の輸送において注意すべき点

(1) 検体採取後、4時間以内に検査が可能な施設では、脳組織は冷蔵状態(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。外部施設での検査など、輸送に時間がかかる場合には、脳組織を直ちに凍結し、融解することなく、凍結したまま検査機関に輸送する。

(2) 搬送に際しては、下記の必要事項を記載した書類(データシート)を検査材料に添付する。

必要事項(ヒトサンプルの場合): ①患者IDなど、②年齢、③性別、④採取部位とサンプル数、⑤咬んだ動物の情報、⑥剖検、生検の別、⑦患者のワクチン接種状況、⑧簡単な臨床経過、⑨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」。

必要事項(動物サンプルの場合): 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」。

IV. 狂犬病の検査方法

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、直ちに検査を実施する。

狂犬病感染の実験室内検査は、状況により直接蛍光抗体法または免疫組織化学、RT-PCR法(シーケンス含む)、ウイルス分離のいずれかもしくは複数の検査を行う。また診断の確定は、実験室内検査の結果、臨床診断、疫学データ等を合わせて総合的に行う。

動物については、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。

検査結果については速やかに関係者等に報告を行う。

1 直接蛍光抗体法による抗原検出

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。大型の動物(特にウシ、ウマ等)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と良い。

現在、狂犬病検査に使用するFITC標識抗体「FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin」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)テイエフビー/テイエフビーク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
FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin, Fujirebio Diagnostics, Inc. 201 Great Valley Parkway Malvern, PA 19355 U.S.A. (5ml の DW に溶解済みの原液)
- 1%エバンスブルー溶液
- リン酸緩衝液(D-PBS(-))
- 蒸留水
- 封入材(10%グリセリン-PBS(pH8.4))
- シャーレ
- キムワイプ
- カバーガラス(Matsunami 24 x 60 mm NEO micro cover glass Thickness No.1)
- ハサミ
- ピンセット
- 舌圧子(木製)
- 無蛍光スライドガラス(特注品)
Matsunami 高撥水性印字 黒 3穴 14φ MICRO SLIDE GLASS SF17335等
- 染色バット
- 冷アセトン(-20℃)
- ベンチコート(可能であれば検査材料等の飛沫吸収用に作業領域全域に敷く)
- 湿潤箱(蛍光抗体反应用)
- 洗浄ビン
- 捨て缶
- オートクレーブバッグ
- 蛍光顕微鏡(FITC 検出用のフィルターを使用)
- 陽性対照塗抹スライド

<検査手順(操作は安全キャビネット(クラスII)内で行う)>

1. 検体の脳をシャーレ等に移し、可能な限り延髄、橋、視床、小脳、海馬(左右)の組織^{*1}を1cm角大以下に切り出す。陰性対照は、正常イヌ脳等を-80℃保存に保存をしておき、検査時に融解する。検体と同様にスタンプを作成し陰性対照とする。(検体と陰性対照とでコンタミがおこらないように解剖器具等は同じもので取り扱わない)
2. 切り出した組織を舌圧子に置く。血液が多量についている場合はキムワイプで取り除いてから、無蛍光スライドガラス^{*2}(スライドガラスに汚れがある場合は、70%アルコール

を吹きかけキムワイプできれいにふき取る)に組織をスタンプする(血液は非特異反応の原因になりやすいのでなるべく取り除く)。

スタンプは、各部位について、最低2組を作成し、再検査に備える。(参照:図1)

3. 作成した塗沫スライドは安全キャビネット内で十分に風乾する(10-30分くらい)。
4. 冷アセトン(-20℃)を染色バット等に満たし、塗沫スライドを完全に浸して固定を行う(-20℃で1時間～オーバーナイト)。
5. アセトンから取り出し、十分に風乾する。
6. 指定濃度に希釈した標識抗体*³を塗沫面に滴下する(約 50μl/well) (広がりにくい場合はチップなどの側面で塗布面全体に広げる)。室温・暗所・湿潤箱で 30 分反応させる。
7. 反応液は捨て缶に捨て、スタンプ面を洗浄ビンの PBS(-)で吹きかけて洗い流し、十分量の PBS(-)が入った染色バットに 3-5 分間浸ける。3-5 分後に取り出したら、洗浄ビンに入れた PBS(-)を塗沫面に吹きかけ余分なゴミ等を洗い流す。
8. 再度、PBS(-)に 3-5 分間浸け、同様に洗浄ビンで洗い流す。
9. 蒸留水に 2-3 秒浸して塩を除去して風乾をする。余分な水滴は、塗布面をこすらないように気を付けてキムワイプで吸い取る。
10. 10%グリセリン-PBS(pH8.4)*⁴を適量滴下してカバーガラスをかけて蛍光顕微鏡で観察する。

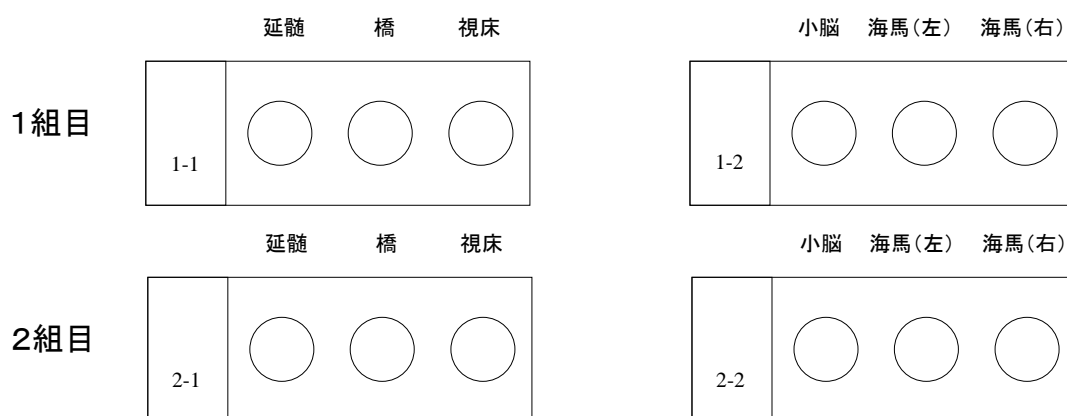


図. 1 RV-FA スライドスタンプ

*1 脳組織(検査部位)

Reference: (3)

*2 3穴無蛍光スライドグラス

Matsunami 高撥水性印字 黒 3穴 14φ MICRO SLIDE GLASS SF17335 (特注品)等

*3 標識抗体

FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin, Fujirebio Diagnostics, Inc. 201 Great Valley Parkway Malvern, PA 19355 U.S.A.の凍結乾燥品を所定量(5ml)のDWで溶解し原液とする。検査数にあわせて原液を25倍量のPBS(-)で希釈し、1%エバンスブルー溶液を2μl/ml(500倍希釈)の割合で加える。

*4 10%グリセリン-PBS(pH8.4)

Reference: (4)

2 遺伝子検出

RT-PCR法は主として脳組織について行われるが、ヒトの生前診断では唾液や髄液を利用して行われる。複数の検体を取り扱う場合には、実験室内における遺伝子の汚染に注意を払う。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。

(1)RNA抽出

<必要な試薬、器具、機材(指定品目または同等品を使用)>

- Ceramics YTZボール(φ2mm)入り2ml tube(チューブの底から10mmほど) スクリューキャップマイクロチューブ(2ml) ザルスタット 72.693.00003 相当品
- スクリューキャップマイクロチューブ(ループキャップ 1.5ml) IWAKI 2752-015 相当品
- TRIZOL reagent (Invitrogen、No:15596-026)
- クロロホルム
- イソプロパノール
- ミニビード・ビーター 相当品
- 75%エタノール
- DNase, RNase free DW
- マイクロピペット 1000μl, 200μl

- フィルター付チップ 1000 μ l, 200 μ l
- ヒートブロック
- マイクロチューブ用遠心機
- 50ml遠心管
- ボルテックスミキサー

<検査手順>

① 動物の脳組織(犬等)の場合

- 1ml の TRIZOL に 50-100mg の脳組織を加え、ホモゲナイズする。[細胞破碎機としてミニビード・ビーター、Ceramics YTZ ボール入り 2ml tube を使用し 10 秒 2 回ホモゲナイズ(ホモゲナイズの前とインターバルでは氷で十分に冷やしてからビード・ビーターにかける)する。脳材料は、延髄、橋、視床の各 20-30mg ほどを pool した 50-100mg の検体-1 と、小脳、海馬(左右)を同様に pool した検体-2 の2つを別々に TRIZOL でホモゲナイズする。以下、検体-1、検体-2 について RNA 抽出を行う]
- 室温 5 分放置し、0.2ml のクロロホルムを加えボルテックス(15 秒)をする。
- 室温 2-3 分放置し、12,000xg (13,000 rpm)、4 $^{\circ}$ C、10 分遠心する。
- 上層(水層)を別のチューブに移し、0.5ml のイソプロパノールを加え混和する。
- 室温 10 分放置し、12,000xg (13,000 rpm)、4 $^{\circ}$ C、10 分遠心する。
- 上清をチップでほぼ取り去り、壁に残った上清部分を再度 12,000xg (13,000 rpm)、4 $^{\circ}$ C、1 分スピンドウンし、沈殿の反対側の壁面から上清を完全に取り去る。
- 75%エタノール 1ml を入れ、軽く転倒混和し 7,500xg (11,000 rpm)、4 $^{\circ}$ C、5 分遠心する。
- 上清をチップでほぼ取り去り、壁に残った上清部分を再度 7,500xg (11,000 rpm)、4 $^{\circ}$ C、1 分スピンドウンし、沈殿の反対側の壁面から上清を完全に取り去る。
- フタを開けたまま、安全キャビネット内の室温で 5-10 分乾燥する。
- 50 μ l の DW をチューブに入れ 55-60 $^{\circ}$ C、10 分加熱し氷上で冷却後、スピンドウンする。
- すぐに RT-PCR の操作に移る。残りは-80 $^{\circ}$ Cに保存する。

② ヒトの唾液・脊髄液の場合

- 0.5ml の唾液(あるいは 0.5ml の脊髄液)を入れた 50ml の遠心管に、5ml の TRIZOL を加え、ボルテックス(約 15 秒)後、5 本の 2ml のチューブに 5 等分する(1.1ml/tube)。
- 室温 5 分放置し、0.2ml のクロロホルムを加えボルテックス(15 秒)をする。
- 室温 2-3 分放置し、12,000xg (13,000 rpm)、4°C、10 分遠心する。
- 上層(水層)を別のチューブに移し、0.5ml のイソプロパノールを加え混和する。
- 室温 10 分放置し、12,000xg (13,000 rpm)、4°C、10 分遠心する。
- 上清をチップでほぼ取り去り、壁に残った上清部分を再度 12,000xg (13,000 rpm)、4°C、1 分スピンドウンし、沈殿の反対側の壁面から上清を完全に取り去る。
- 75%エタノール 1ml を入れ、軽く転倒混和し 7,500xg (11,000 rpm)、4°C、5 分遠心する。
- 上清をチップでほぼ取り去り、壁に残った上清部分を再度 7,500xg (11,000 rpm)、4°C、1 分スピンドウンし、沈殿の反対側の壁面から上清を完全に取り去る。
- フタを開けたまま、安全キャビネット内の室温で 5-10 分乾燥する。
- 10 μ l の DW を各チューブに入れ 55-60°C、10 分加熱し氷上で冷却後、スピンドウンする。
- 1本のチューブにプールして、すぐに RT-PCR の操作に移る。残りは-80°Cに保存する。

(2) One step RT-PCR

必要な試薬・器具等:

- QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (210210 or 210212)
- DNase, RNase free DW
- 1 x TAE
- 10mg/ml-エチジウムブロマイド(EtBr)溶液
- アガロース(SIGMA、Agarose A0169など)
- DNA サイズマーカー(100bp DNA Ladder、200bp+1kbp DNA Ladder など)
- マイクロチューブ用遠心機
- サーマルサイクラー
- アガロースゲル電気泳動装置
- UVゲル撮影装置
- グローブ
- N7(mix) (10pmol/ μ l-each) / JW6(mix) (10pmol/ μ l-each) プライマーセット
- 10g (10pmol/ μ l) / 304 (10pmol/ μ l) プライマーセット
- Positive control DNA(あるいは RNA) (OneStep 用)

*プライマーの調整

OneStep RT-PCR用プライマーセット1 (606 bp のフラグメントが増幅)(5, 6)

N7(mix)

N7(C): [5' - ATG TAA CAC CCC TAC AAT GG - 3']

N7(T): [5' - ATG TAA CAC CTC TAC AAT GG - 3']

N7(mix) は TとCの塩基がそれぞれ10pmol/μlとなるように調整

JW6(mix)

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

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

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

JW6(DPL), JW6(E), JW6(M)がそれぞれ10pmol/μlとなるように調整

OneStep RT-PCR用プライマーセット2 (1,468 bp のフラグメントが増幅)(7)

10g: [5' - CTA CAA TGG ATG CCG AC -3'] (10pmol/μl)

304: [5' - TTG ACG AAG ATC TTG CTC AT -3'] (10pmol/μl)

Master mixture 1

チェック欄	反応液組成	1 reaction	*N()reaction 分
<input type="checkbox"/>	DW	20μl	μl
<input type="checkbox"/>	5 x Buffer	10μl	μl
<input type="checkbox"/>	dNTP Mixture	2μl	μl
<input type="checkbox"/>	N7(mix) primer	3μl	μl
<input type="checkbox"/>	JW6(mix) primer	3μl	μl
<input type="checkbox"/>	Enzyme mixture	2μl	μl
<input type="checkbox"/>	Total	40μl	μl

Master mixture 2

チェック欄	反応液組成	1 reaction	*N()reaction 分
<input type="checkbox"/>	DW	24 μl	μl
<input type="checkbox"/>	5 x Buffer	10μl	μl
<input type="checkbox"/>	dNTP Mixture	2μl	μl
<input type="checkbox"/>	10g primer	1μl	μl
<input type="checkbox"/>	304 primer	1μl	μl
<input type="checkbox"/>	Enzyme mixture	2μl	μl
<input type="checkbox"/>	Total	40μl	μl

*N reaction = Posicont + Negacont(DW) + サンプル数 + 1 として計算する

Master mixtureを必要数分注する (40μl/tube)

- 陰性コントロール (DW)、抽出したRNA検体、陽性コントロールDNA(あるいはRNA)の順に10 μ l加え、総量50 μ l としてRT-PCR 反応を行う。

サーマルサイクラーの条件

50°C 30 min (チューブは、ヒートブロックが 50°Cになってから入れる)

95°C 15 min

↓

94°C 60 sec

56°C 60 sec

72°C 90 sec

} x40

↓

72°C 10min

4°C

電気泳動

- 1.5% agarose gel (TAE) と 1.0% agarose gel (TAE)を電子レンジで溶解し、サンプル数に応じたコームを使い、ゲルを作製する。
- RT-PCR が終わったサンプルの 5 μ l を約 0.5 μ l の x10 loading buffer とパラフィルム上等で混和し、N7(mix)/JW6(mix)は 1.5% agarose gel、10g/304は 1.0% agarose gel にアプライし、100V で約 30 分泳動する。

エチジウムブロマイド染色・記録

- 最終濃度 0.5 μ g-EtBr /ml-TAE に室温、20 分シェーカーで振り染色する
- DW で脱 EtBr する。

ゲル撮影

- ゲル撮影装置にて撮影し、プリントと同時に電子ファイルとして保存する。

泳動結果の判定

陽性の場合、N7(mix)/JW6(mix)は 606 bp、10g/304 は 1,468 bp のサイズが増幅される。

陽性コントロールおよびサイズマーカーとの比較により、サイズを判定する。

検体に予想付近のバンドが確認されたら、シーケンス反応を行い、遺伝子がリッソウイルスであるかを確定する。

検体にバンドがない場合は、本検査では、陰性とする。

3 ウイルスの分離方法

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)を利用した分離方法がある。マウス接種法は簡便で検出感度の優れた方法ではあるが検査に長い日数(一般に21-28日間の観察)を必要とする。一方、培養細胞を利用したウイルス分離は簡便で、短期間にウイルスの分離が出来る。

(1) 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」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
- *麻酔薬(イソフルラン)
- *ハサミ
- *ピンセット
- *舌圧子
- *針と注射器(2段針(27G)付き1.0ml ディスポ注射器)
- *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)
- *FITC標識抗体 (FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin, Fujirebio)

<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し、10%の検査組織が含まれるようにホモゲナイザー等を使用し調製する。乳剤は遠心(4℃、12,000rpm、5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はストレプトマイシンが500µg/ml、ペニシリンが500U/mlの濃度になるように加える。

マウスへの接種方法:

マウスへの乳剤接種は親指で乳のみマウスの下顎、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間点の頭頂部から脳内に0.1-0.2cm刺して10-20µl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す。マウスが接種事故により死亡しないことを確認して狂犬病発症の観察に移る。死体はオートクレーブによりウイルスの不活化を行って適切に処理する。

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たときの姿勢と振戦を観察)
- *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脳をスライドグラスに塗末、アセトン固定後、直接蛍光抗体法でウイルス検出を行う。

(2) 培養細胞を利用したウイルス分離法

マウス神経芽腫細胞(MNA 細胞)を利用して分離を行う。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)を必要としない点ですぐれているが、野外株で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(0.25 µg/ml、アンホテリシンなどを加える)

*ウシ胎児血清

*抗生物質 Penicillin-Streptomycin、サーモフィッシャー15140122など

*抗カビ剤 Amphotericin B シグマA2942など

*トリプシン 0.05% Trypsin/EDTA サーモフィッシャー25300054など

*FITC標識抗体 (FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin, Fujirebio)

*CO₂ インキュベーター(5%-CO₂、35-37°C)

*スライドグラス 8穴Matsunami高撥水性 TF0808など使用前に、70%エタノールを吹きかけキムワイプなどで表面のゴミなどをふき取り、UV照射をしておく。

<検査手順(操作は安全キャビネット(クラスII)内で行う)>

(1)ホモゲナイザー等を使い10%の検査組織が含まれるようにE-MEM10で乳剤調製する。

(2)2mlマイクロチューブに移し替える。

(3)遠心(4°C、12,000rpm、5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2-3x10⁶個のMNA 細胞を50ml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°C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3枚の8 穴スライドグラスに2 滴滴下(5mlピペット使用で約100µl)してスライド上で培養を行う。残りのウイルス-培養細胞液(およそ半量)はE-MEM10で総量5mlとして培養フラスコ(25cm²フラスコ)で培養を行う。

(8)24時間後、48時間後、72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の感染が強く疑われている場合には以下に進む／／

(10) 3日後のウイルス-培養細胞液を播種した培養フラスコの培地1mlを新たに用意したMNA細胞($2-3 \times 10^6$ /1.5ml)に(4) - (7)と同様な操作で継続する。

(11) (8) - (9)と同様にウイルス抗原を確認する。

(12) もう一度、同様に継代し、陰性の場合には、継代を中止する。陽性の場合には、ウイルスを回収する。

cf. スライドガラスを用いた感染細胞の培養はシャーレ等の容器内で行う。またシャーレ等の容器内には湿らせたペーパータオル等を入れスライド上の培養液の蒸発・乾燥を防ぐ。

4 免疫組織化学による抗原検出

採取された組織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。組織中のウイルスの感染性は中性緩衝ホルマリンで固定することにより喪失する。固定の後に通常の方法でパラフィン包埋、薄切を行い、パラフィン切片を作成する。免疫組織化学に加え、HE染色も同時に行い、組織学的所見を加え、結果を判定する。

< 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N抗原およびP抗原ウサギ抗血清(感染研作成)(8、9)
- * ダコ社製 Envision ポリマー試薬 抗ウサギ抗体用
- * 0.01M クエン酸バッファー(pH6.0)
- * PBS(-)
- * 蒸留水
- * 封入材
- * 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
- * スライドガラス
- * カバーガラス
- * 湿潤箱(免疫組織化学反応用)
- * 光学顕微鏡

[リリーの緩衝ホルマリンの組成]

NaH₂PO₄・2H₂O 44 g

Na₂HPO₄・12H₂O 163.8 g

特級ホルマリン1L

蒸留水全量10 L となるように蒸留水を加える

<検査手順>

- (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回繰り返し、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) クエン酸バッファーにスライドを浸漬しオートクレーブ121°C10分かける。
- (6) 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。
- (7) 過剰の正常ヤギ血清を拭き取り、抗狂犬病ウイルスN抗原およびP抗原抗体と4°C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°Cに保存する)。
- (8) 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。
- (9) Envision ポリマー試薬ウサギ一次抗体用を室温で30分反応させる。
- (10) 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DAB発色キットを用いて発色させ必要に応じて核染を行う。
- (11) 脱水、透徹、封入する。

<結果の判定>

HE染色では、狂犬病で死亡した患者組織には炎症反応は乏しいが、神経細胞中にNegri小体とよばれる特徴的な好酸性細胞質内封入体がみられることがある(添付図1、左)。免疫組織化学では、狂犬病発症者の中枢神経系組織に狂犬病ウイルス抗原を豊富に認め、ウイルス抗原はほぼ全身の神経系組織に分布する(添付図1、右)。生前診断として、発症時の皮膚生検組織に含まれる末梢神経組織にウイルス抗原を確認することもある。

V. 引用文献

狂犬病に関する対応マニュアルについて

- (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。

検査方法に関する資料

- (2) Meslin, F.-X., Kaplan, M.M. and Koprowski, H., eds.: Laboratory techniques in rabies. 4th ed., WHO Geneva, 1996.
- (3) John Bingham, Maria van der Merwe Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. *Journal of Virological Methods* 101 (2002) 85-94
- (4) Robert J. Rudd, Jean S. Smith, Pamela A. Yager, Lillian A. Orciari, Charles V. Trimarchi A need for standardized rabies-virus diagnostic procedures: Effect of cover-glass mountant on the reliability of antigen detection by the fluorescent antibody test. *Virus Research* 111 (2005) 83-88
- (5) Paul R. Heaton, Lorraine M. McElhinney, J. Paul Lowings Detection and identification of rabies and rabies-related viruses using rapid-cycle PCR. *Journal of Virological Methods* 81 (1999) 63-69
- (6) Anh K. Nguyen, Done V. Nguyen, Giang C. Ngo, Thu T. Nguyen, Satoshi Inoue, Akio Yamada, Xuyen K. Dinh, Dung V. Nguyen, Thao X. Phan, Bao Q. Pham, Hien T. Nguyen, and Hanh T. H. Nguyen Molecular Epidemiology of Rabies Virus in Vietnam (2006-2009) *Jpn. J. Infect. Dis.*, 64, 391-396, 2011
- (7) Jean S. Smith Rabies Virus Manual of Clinical Microbiology 1999 1099-1106
- (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.
- (9) Tobiume M., Sato Y., Katano H., Nakajima N., Tanaka K., Noguchi A., Inoue S., Hasegawa H., Iwasa Y., Tanaka J., Hayashi H., Yoshida S., Kurane I., and Sata T. Rabies virus dissemination in neural tissues of autopsy cases due to rabies imported into Japan from the Philippines: immunohistochemistry. *Pathol.Int.* 2009, 59:555-66.

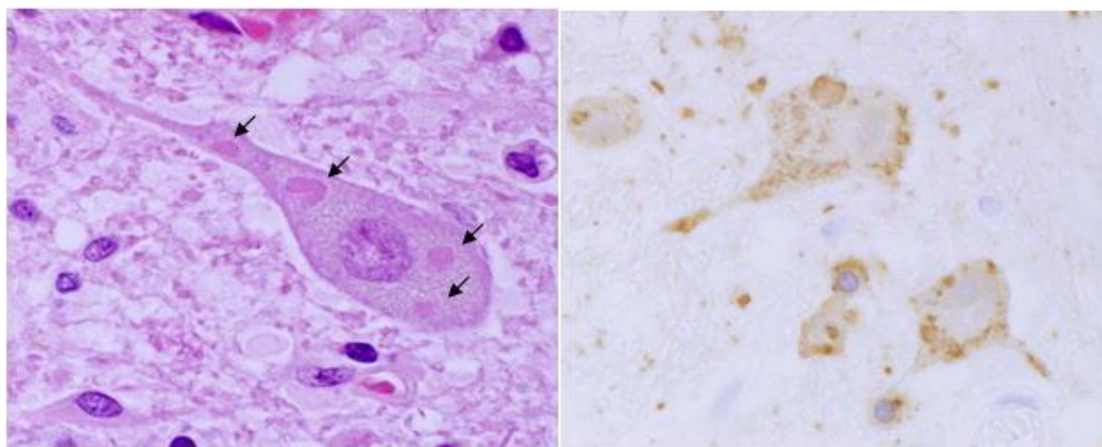
VI. 連絡先

国立感染症研究所 獣医科学部
前田 健
〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1
電話 03-5285-1111 (代表)
FAX 03-5285-1179 (直通)

VII 執筆者一覧

前田 健 国立感染症研究所獣医科学部
井上 智: 国立感染症研究所獣医科学部
野口 章: 国立感染症研究所獣医科学部
加来 義浩 国立感染症研究所獣医科学部
飛梅 実: 国立感染症研究所感染病理部
片野 晴隆 国立感染症研究所感染病理部
林 昌宏: 国立感染症研究所感ウイルス第一部
伊藤 睦代: 国立感染症研究所感ウイルス第一部

添付図1病理組織学的検査



左： ヒト脳幹部の神経細胞にみられるNegri小体(矢印、好酸性細胞質内封入体)

右： 抗狂犬病N蛋白抗体を用いた免疫組織化学。ヒト神経細胞中に狂犬病ウイルス抗原を認める。(国立感染症研究所感染病理部ホームページより転載)