

2. エンテロウイルスの診断法に関する基礎的研究

分担研究者 今井 俊介 (奈良県保健環境研究センター所長)

共同研究者 北堀 吉映 (奈良県保健環境研究センター総括研究員)

研究要旨 2001年、奈良県中・南部でコクサッキーB群5型ウイルス(CB5)を原因ウイルスとした無菌性髄膜炎が流行した。患者は明らかな地域流行と散发流行に区別され、また発生期間も異なることから両者間にはウイルス学的に異なる遺伝子型による発生の可能性が示唆された。本研究では、これらウイルスの遺伝子学的差異を診断する方法として、VP1から2C領域での4種の制限酵素による多型性解析を行った。結果、全症例の標的遺伝子領域でDde IおよびHpa IIでは3断片、Hae IIIでは4断片が得られSma Iでは断片化は観察されなかった。以上の事から、遺伝子学的差異を明らかにする“簡易的診断法”としてのPCRとRFLP法の組み合わせは、将来的に新たな多型性解析診断法の確立を目指すもので、特に疫学的検索に有益であると期待される。

A. 研究目的

2001年、奈良県中および南部でCB5を原因とした無菌性髄膜炎、肺炎を含む上気道炎、胃腸炎およびヘルパンギーナが多発した。特に、注目される点として無菌性髄膜炎患者の発生様式で、限局した地域での短期集中的流行とそれに近接する広範囲での長期散発的流行が観察されたことである。

本報では、煩雑な手法からなる遺伝子配列判読とは異なる方法として、PCRとRFLP (Restriction fragment length polymorphism) による多型性解析診断法を開発する可能性を模索しての基礎的研究を目的とした。

B. 研究方法

1. 対象と標準株

2001年6月25日から11月9日の間に、県内の医療機関で無菌性髄膜炎と診断された生後11ヶ月児から10歳児までの患者髄液からウイルス分離・同定を試み、CB5と判定された34例を検索対象とした。尚、標準

株Faulknerは国立感染症研究所から提供を受けた。

2. RNA抽出、PCRおよびRFLP

RNA抽出はRNAzol (Tel-Tese Inc., TX) を用いた。cDNAの合成はSuperScript RNase H逆転写酵素 (Gibco BRL) で42℃の反応を行った。PCRの方法はCaro V¹らの方法に従って遺伝子増幅(約1470 bp)を行った。RFLPは標準株FaulknerおよびDBGET databaseに登録されるCB5の塩基配列から、米山ら²⁾が報告したポリオウイルスのRFLP法を参考にDde I (C↓TNAG)、Hpa II (C↓CGG)、Hae III (GG↓CC) およびSma I (CCC↓GGG) の4種制限酵素による多型性解析を行った。

C. 研究結果

1. 患者発生、発病日および年齢

患者発生とその地域分布は、最も多く観察されたのが桜井市在住者で3組の兄弟を含む20名の発生であった。桜井市は本県中央

東南部に位置し、東部から南部の一部周囲は山間部で西部から北部周囲が他の市町村と隣接する。他の14名の発生分布は、櫃原市3名、御所市2名、三宅町2名、川西町2名および新庄町、高田市、上牧町、斑鳩町でそれぞれ1名が観察され8市町におよぶもので比較的桜井市に隣接する位置にあった。初発患者は櫃原市在住で6月25日に発症し、おおよそ2週後に桜井市在住の患者が2週間(7月17日~8月5日)の短期間で多発した。その後、8月10日から11月9日の間に8名の患者が発生地域を異にして散発的に観察された。患者の好発年齢はおおむね5歳をピークとするもので、1歳児でも5名の患者が観察された。

2. 制限酵素切断による PCR 産物の多型性解析

遺伝子増幅は DBGET database に登録される標準株 Faulkner (AF114383) を参考に、Caro V らの報告するプライマーを用いて行った。その結果は細胞変性が明瞭であったすべての検体で、期待される約 1466 bp の増幅産物が得られた。それらの遺伝子産物の一部から、制限酵素 *Dde* I、*Hpa* II、*Hae* III および *Sma* I による多型性解析を行ったところ、*Dde* I および *Hpa* II では3断片、*Hae* III では4断片が得られたが、*Sma* I では断片は観察されなかった。すべての症例で同じ多型性が認められた。尚、標準株 Faulkner は約 650 bp の遺伝子産物が優先的に増幅された為、期待される 1466 bp の遺伝子産物は得られなかった。

D. 考察

エンテロウイルスの血清型と遺伝子配列との関連性に関する研究は、ポリオウイルスで重点的に検討がなされた結果、血清型を反映する遺伝子領域として VP1 領域の重要性が指摘されている。現在、多くのエンテロウイルス属の遺伝子配列が判読されつつあり、VP4-VP2 junction あるいは 5'-nontranslated region (NTR)^{3,4)}より、VP1 領域がより血清型と相関することを支持する多くの報告がなされつつある¹⁾。しかし、エンテロウイルスに共通な遺伝子増幅が可能なプライマーの報告は極めて乏しく(5'-nontranslated region (NTR))、配列判読の障害となっていた。2001年、Caro V ら

は VP1 から 2C 領域のエンテロウイルスに共通なプライマーを発表した。

本報では、血清学的に CB5 と同定した地域流行と散発流行の原因ウイルスが、同一遺伝子による流行であるのか、あるいは異なる遺伝子型による二重流行であるのかについての疑問に、Caro V らのプライマーを用い遺伝子増幅を行い、4種の制限酵素切断による多型性解析を行った。解析結果は、いずれの分離ウイルスにおいても切断パターンは同様に、両者の流行は同一ウイルス遺伝子が原因であった可能性が強く示唆させるものであった。最後に、わが国でのコクサッキーB群5型の流行は、感染症発生動向調査結果から1984年、1989年および1994年に大流行を記録しており、本県でも1994年に同ウイルスによる流行を観察している。無菌性髄膜炎は種および型を異にして、毎年エンテロウイルスによる発症が報告されている。今後、これらの疫学的調査に我々が示した新たな遺伝子解析診断法を導入することは、より迅速で正確な情報が得られるものと期待される。

E. 結論

血清学的に同一と判定した地域流行事例と散発流行事例の原因ウイルスは、PCR-RFLPによる多型性解析法で遺伝子学的に同一ウイルスが原因であったことが明らかになった。今回、我々が示した手法はエンテロウイルス属の遺伝子増幅可能な領域で、且つ遺伝子学的に重要とされている VP1 領域を含む領域を標的としていることで汎用性を有しているものとして重要と考えられる。また、将来的に新たな多型性解析診断法の確立を目指す基礎的研究と考えている。

参考文献

1. V. Caro, S. Guillot, F. Delpeyroux, et al.: J. General Viro., 82, 79-91 (2001)
2. J. Li, T. Yoneyama, H. Yoshida, et al.: Res. Virology, 146, 415-422 (1995)
3. M.S. Oberste, K. Maher and M.A. Pallansch: Virus Res., 58, 35-43 (1998)
4. M.S. Oberste, K. Maher, D.R. Kilpatrick, et al.: J. Virol., 73, 1941-1948 (1999)

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 北堀吉映、丸橋欣之、松山郁子、足立 修、田口和子、立本行江、青木喜也、吉澤弘行、竹部久勝：コクサッキーB群5型ウイルスを原因とする無菌性髄膜炎の地域流行と散在流行における遺伝子型の差異に関する検討、奈良県保健環境研究センター年報、36、110-112、2002。

2. 学会発表

1. 北堀吉映、足立 修、田口和子、立本行江、青木喜也：CB5を原因とする無菌性髄膜炎の地域流行事例と散発事例における遺伝子型の差異に関する検討、第38回近畿地区ウイルス疾患協議会研究会、京都、2002。
2. 北堀吉映：奈良県で発生したコクサッキーB群5型を原因とする無菌性髄膜炎の地域流行と散発流行におけるウイルス遺伝子型の差異に関する検討、第18回地研近畿支部疫学情報部会定期研究会、京都、2002。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

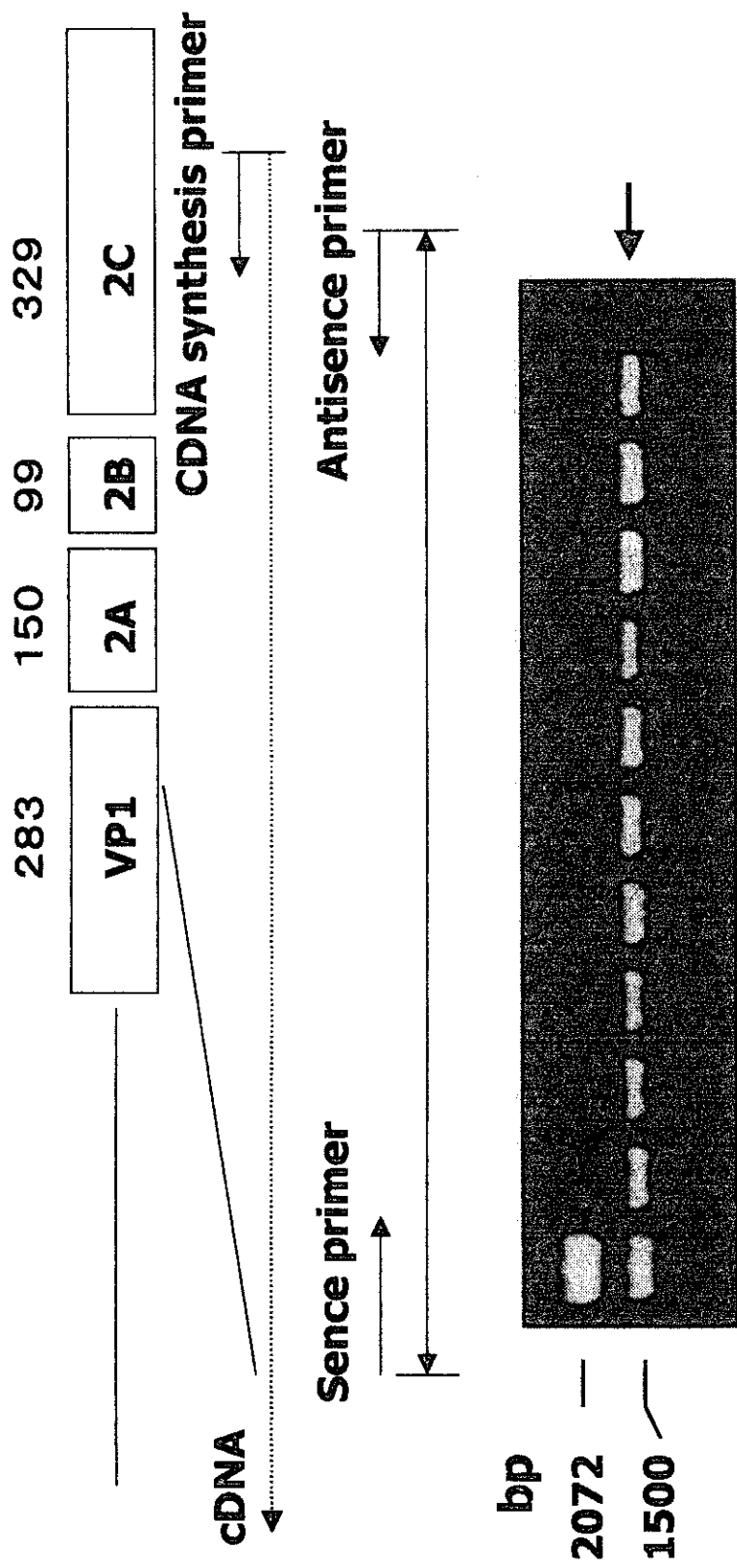


図1 VP1-2C領域の遺伝子増幅

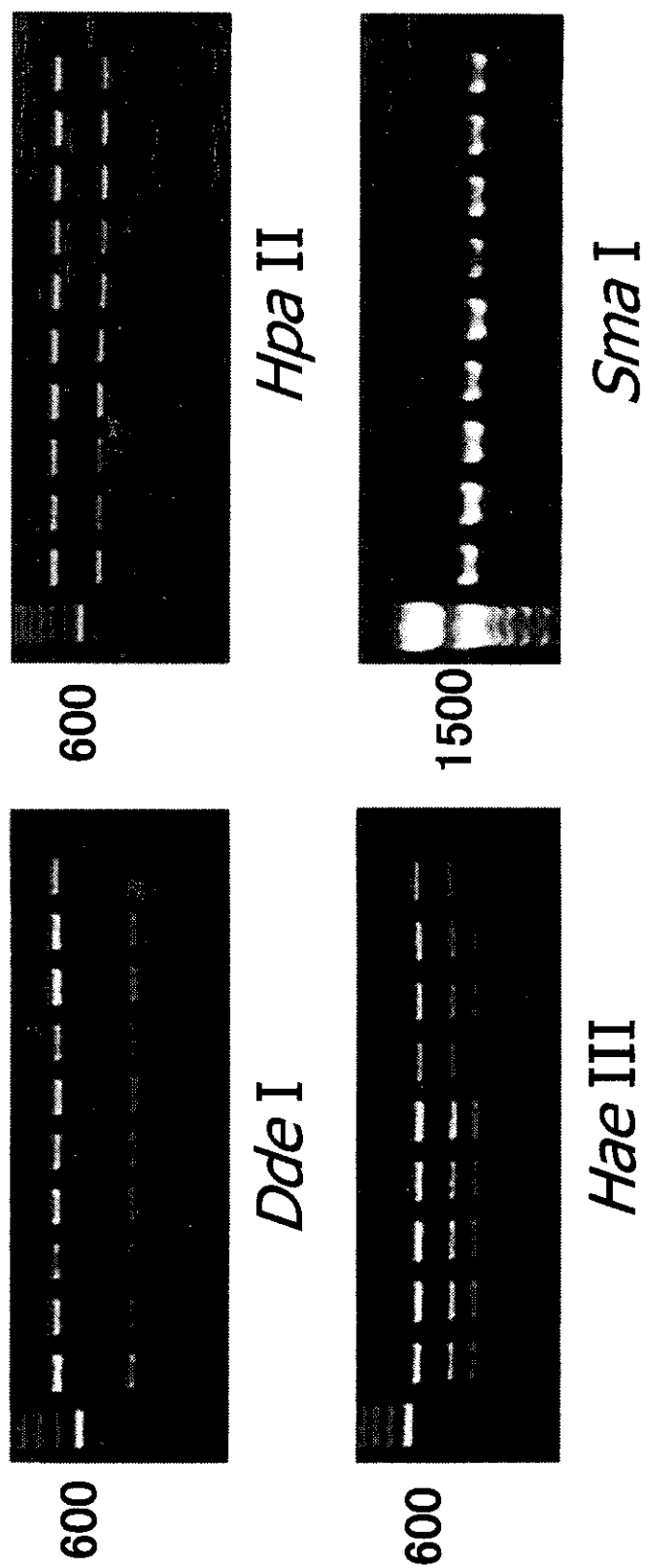


図2 制限酵素処理による多形性解析

3. ヘルペスウイルスの診断法についての研究

分担研究者 林 皓三郎 (神戸市環境保健研究所長)

研究要旨 Real Time PCR 法によって眼ヘルペス感染症の際のウイルス DNA 量を定量的に検出した。角膜上皮炎、角膜実質炎、ブドウ膜炎患者の涙液から得られたウイルス DNA 量はウイルスの活動性病変の程度によく一致した。本法によるウイルス DNA 量の定量的検出は角膜病変の病型診断に有用であるとともに、抗ウイルス薬の治療効果の判定にも有用であった。角膜実質炎の際にも上皮性活動病変があると、急性期の樹枝状角膜炎と同程度のウイルス量が検出されるので抗ウイルス薬によって治療を続ける必要性の判定に役立つ。

実験的マウス角膜ヘルペスでは、涙液と角膜からのウイルスの検出は急性期に限られるが、三叉神経節からは急性期に上昇後、約 1 log 程度のウイルス DNA 量の低下があるがそのまま長期に存続する。緑内障治療薬として使われるラタノプロスト、ステロイド(ベータメタゾン)をマウスに点眼すると涙液中のウイルス量が増えることがわかった。マウスに潜伏感染したウイルスは角膜に UV 照射すると再活性化し涙液に放出される。この際細胞の CdK インヒビターであるロスコピチンを投与すると、その再活性化が抑えられるので、涙液中のウイルス DNA 量も低下する。

A. 研究目的

- 1) 眼ヘルペス(特に角膜ヘルペス)患者の涙液中の単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1) DNA 量を real time PCR 法によって定量しそのウイルス量と臨床病型との関係を調べることによって、診断治療に資する。
- 2) 実験的角膜ヘルペスモデル(マウス)における角膜、三叉神経節におけるウイルス DNA 量を定量しその増減を調べることによって、病理発生との関係を調べる。またステロイド、緑内障治療薬点眼による影響から、それらの薬剤投与とウイルス増殖との関係を調べる。
- 3) 潜伏感染期のマウスモデルの角膜に UV 照射を行いウイルスの再活性化による涙液中へのウイルス DNA の放出の有無を調べるとともにその抑制を細胞の CdK インヒビターであるロスコピチンを用いて試みた。2)、3)によって角膜ヘルペスの病理発生とそれに対する予防・治療についての手がかりをうる事をめざしている。

B. 研究方法

1. Real time PCR (ABI PRISM 7700 Sequence Detector)を用いた。HSV-1 DNA polymerase の部分に primer を設定した。

primers:

5'-ACATCATCAACTTCGACTGG-3'

5'-CTCAGGTCGTCTTCTTGTCC-3'

probe:

5'-GGTGAACATCGACATGTACGG-3'

2. いろいろな病型の角膜ヘルペス(上皮型角膜炎 38 眼/38 例、活動性実質炎 22 眼/22 症例、非活動性実質炎 8 眼/8 症例、内皮炎 3 眼/3 症例、遷延性上皮欠損 9 眼/9 症例)、両側帯状角膜変性患者にエキシマレーザー切除を行って 3 日後の涙液、ブドウ膜炎患者 6 眼/6 症例の前房水、角膜ヘルペスの既往のある角膜(6 眼/6 症例)から DNA を抽出した。涙液・前房水採取に際しては患者に

検査内容を十分に説明し了解を得た。

3. 動物実験と各種薬剤の効果：

Balb/C マウス (8 週令、♀) 腹腔内にケタラール、セラクターを投与し麻酔後、角膜を 27 ゲージ針を用いて擦過してから HSV-1 (McKrae 株 5×10^5 PFU/ml, 0.01ml/eye) を結膜嚢に滴下した。

経日的に涙液 (シルマー試験紙による) 眼球、眼瞼、三叉神経節を取り DNA を抽出して ウイルス DNA 量を定量した。

抗緑内障薬、ステロイドの効果については、感染翌日から生理食塩水、0.1% 燐酸ベタメサゾン、0.5% チモロール、0.005% ラタノプロストの点眼 (2 回/日) を行い 3 日目に涙液を採取、4 日目に角膜を摘出した。潜伏感染時については感染翌日から 1 週間とその後 4 週後から生理食塩水、0.1% 燐酸ベタメサゾン、0.005% ラタノプロストの 1 日 2 回点眼を行い、経時的に涙液を採取して HSV-1DNA 量を測定した。

Vero 細胞に HSV-1 を感染後、ロスコピチン (0、1、25 μ M) を含む MEM で 24 時間培養し、ウイルス価、ウイルス DNA 量を測定した。

マウス角膜ヘルペスの潜伏感染期に、角膜に UV 照射してウイルスの再活性化を試みた。UV 照射の 2 日前から当日までロスコピチン 3mM を一日 3 回点眼し、照射後経過を追って涙液中のウイルス DNA を定量した。

実験動物の取り扱いについては、ARVO Resolution に準じて、マウスにいたずらに苦痛を与えないように十分の注意を払って実験を行った。

C. 研究結果

1. このアッセイ法によって広い範囲のウイルス DNA 量が直線関係の定量線にのり ($=1-10^7$ copies) 容易に定量出来た。
2. 患者涙液中の HSV-1DNA は上皮性角膜へ

ルペス患者の 81.5% (3.9×10^6 copies/sample)、活動性実質炎の 59.1% (8.9×10^5 copies/sample)、ブドウ膜炎患者前房水からは 16.7% (3.82×10^5 copies/sample)、角膜片からは 83.3% (1.9×10^4 copies/sample) が検出された。

エキシマレーザー後の帯状角膜変性患者涙液からは $1.3-2.00 \times 10^5$ copies/sample の HSV DNA が検出された。しかし非活動性実質炎、遷延性上皮欠損及び内皮炎患者からは検出できなかった。アシクロビル投与によって臨床症状が改善すると、検出される HSV-1DNA 量は減少し検出限度以下に低下した。活動性実質型角膜炎のウイルス DNA 量は急性期の上皮性角膜ヘルペス量よりは低いが、しかしその差は 1/2 log 程度である。

3. マウス角膜に HSV-1 感染後、DNA 量は急激に増加し 7 日目には 6.5×10^5 copies/mg tissue に達するがそれ以後急速に減少し 10 日後には検出限界以下になる。三叉神経節では角膜よりやや遅れて DNA 量の上昇が見られるが 7 日後には同じくピークに達する (1.1×10^6 copies/mg tissue)。その後 DNA 量は次第に低下するが、約 1-2 log 程度の低下にとどまりその値が持続する。
4. ステロイド、抗緑内障薬 (チモロール、ラタノプロスト) を点眼したマウスの感染急性期に涙液中に検出されるウイルス DNA 量は、生理食塩水、ベタメサゾン、チモロール群の間では差がなかった ($1-1.5 \times 10^5$ copies/sample)。これにたいしてラタノプロスト点眼群では涙液中のウイルス DNA 量は 2.5×10^5 copies/sample と上昇していた。角膜の HSV DNA 量もラタノプロスト、ベタメサゾン群が 1.2×10^6 copies/10 corneas に対しチモロール群 5×10^5 copies/sample、生理食塩水群 9.3×10^4 copies/sample であった。
5. 潜伏感染後、再度ラタノプロスト、ベタメサゾンを点眼する前に HSV DNA を検出した眼数は生理食塩水群では 2/14 眼 (3.79×10^5 copies/sample)、ベタメサゾン群 3/14 眼 (1.16×10^5 copies/sample)、ラタノプロスト群 6/14 眼 (1.6×10^5 copies/sample) であっ

た。再点眼後は各群共に大きな変化はなかったが、DNA 検出眼の平均量は、生理食塩水群 (3.05×10^6 copies/sample)、ベタメタゾン (1.18×10^7 copies/sample)、ラタノプロスト (9.87×10^6 copies/sample) とベタメタゾン、ラタノプロスト 群では増加が認められた。

6. ロスコピチンは 10-30 mM の濃度で著名に HSV-1 の増殖を抑制する(ウイルス感染価、DNA 量ともに)。

この際培養細胞 (Vero 細胞) に対しては細胞毒性は認められなかった。

急性感染期にロスコピチン (3 mM) を点眼すると涙液中の HSV DNA 量は低下傾向にあるが、差が得られなかった。

角膜感染後 4 週を経過した潜伏感染マウスに UV 照射によって再活性化を図る 2 日前からロスコピチン (3 mM) を点眼 (3 回/日) すると、生理食塩水点眼群にくらべて、涙液中に HSV DNA が検出される%が低下する。(UV 照射後 3-5 日後の陽性率：生食水群 80-95%、ロスコピチン群：45-50%)。

涙液中のウイルス DNA 量もそれに対応してロスコピチン点眼群のほうが少ない(生食水群 $10^2 - 10^4$ copies/sample、ロスコピチン群 $10^{0.5-1} - 10^2$ copies/sample)。

D. 考察

1. Real time PCR 法によって広い範囲のウイルス DNA copy 数に対応して直線関係が得られ、信頼性が高い定量値がえられた。この方法によって各種の眼ヘルペス感染症について、涙液という比較的容易に得られるサンプルからウイルス DNA を定量的に検出することができた。特に活動性のウイルス病巣の有無と DNA の検出がよく並行するので抗ウイルス薬の効果判定、継続、中止の臨床的判断に非常に有用であると考えられる。また前房水が得られればブドウ膜炎の病因的診断にも有力な方法である。

エキシマレーザー後の涙液から HSV DNA

が検出されたことは、この方法によって三叉神経節から潜伏ウイルスが再活性化された可能性が高い。このところ近視の矯正など汎用されているが、ヘルペス再活性化について十分な検査と対応が必要なことを示している。

2. マウスの実験的角膜ヘルペスで、三叉神経節ではウイルス DNA 量が存続するが、infectious center assay や in situ hybridization で予測されたよりも高い値で持続すると考えられる。現在感染後 2 ヶ月までの値を見ているがさらに長期にどう変化するか検討が必要である。ステロイドとともに、汎用される抗緑内障薬ラタノプロストが点眼されるとウイルス DNA 量が増える傾向である。また潜伏ウイルスが再活性化することが臨床例と共に報告されているが、われわれのマウスモデルでも再活性化にラタノプロストが促進的に働き、おそらくはウイルスの shedding によって涙液中の HSV DNA 量が増えることが示された。

これまで再活性化の動物モデルはなかなかえられなかったが real time PCR 法によって感度よくウイルスが shedding されるのを検出できる可能性があり UV 照射後に涙液中にウイルス DNA がかなりの頻度で検出された。この系でもラタノプロストが再活性化を促進することが示された。今後このモデルを持ち再活性化の研究を進めたい。

ロスコピチンは細胞の CdK の inhibitor である。CdK は HSV の増殖サイクルが進むには必須の酵素であるがこれを抑えることでウイルス増殖が抑えられる。

使用濃度では細胞毒性はあまり認められず(特に神経細胞は増殖しないので) in vivo での効果を調べた。DNA 量の減少などから考えると、潜伏感染からの再活性化を抑えうるかもしれない。

E. 結論

Real time PCR 法によって眼ヘルペス感染症について、涙液、前房水、角膜ボタン、などからウイルス DNA を定量出来た。ウイルス量はウ

イルスの活性病巣の有無に関連するので、診断、抗ウイルス薬の効果判定に有用である。実験的マウス角膜ヘルペスでもウイルス量を検出できる。ラタノプロストによるウイルス増殖、再活性化促進が涙液に shedding されるウイルス DNA 量から推測される。ロスコピチンはウイルスの再活性化を抑える可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. T. Inoue, Y. Inoue, K. Hayashi, Y. Shimomura, Y. Fujisawa, A. Aono, Y. Tano.: Effect of herpes simplex virus-1 gD or gD-IL-2 DNA vaccine on herpetic keratitis. *Cornea* 21, S79-S85, 2002.

2. 学会発表

1. K. Araki-Sasaki, K. Hayashi, T. Tanaka, T. Mano, M. Miyasaka.: Rise of Th1 associated chemokines in herpes simplex virus- (HSV-1) infected cornea and fall of homeostatic chemokines in the draining lymph nodes. ARVO Meeting Ft. Lauderdale, May 5, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

4. プリオン病に関する迅速診断法の開発についての研究

分担研究者 田中 智之 (堺市衛生研究所長)

研究要旨 これまでプリオン病の診断に、血清などの体液を用いるより簡便な測定方法、プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法と免疫磁気ビーズを用いた方法、の構築を検討してきた。併せてこれらの系で反応する蛋白質についてウェスタン・ブロット法解析し、約 30kD の蛋白質が認められた。検出系に用いた #4 モノクローナル抗体はウェスタンブロット法で、市販の PrP^{SC} 特異的抗体と類似の反応性を示した。しかし、反応生成物のサイズは PrP^{SC} とは異なり、#4 モノクローナル抗体が PrP^{SC} を認識している可能性について、今後の更なる解析が必要であることが判明した。

A. 研究目的

プリオン病は異常プリオン蛋白の中樞神経系への異常沈着によるが、他の一般的な方法と異なり、プリオン蛋白の持つ特異性によりその診断方法にも特徴が見られる。現在最も信頼性のある免疫組織染色方法、ウェスタン・ブロット(WB)法があるが、これらは用いられる抗体により左右される。その他遺伝子検査法、ノックインマウスを用いたバイオアッセイ法がある。

これまで Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD) を主とせるプリオン病の診断系の開発に携わってきた。モノクローナル抗体の作製による免疫染色、可溶性プリオン蛋白に対して反応性のあるモノクローナル抗体の作成およびそれを用いた ELISA 法による検出系の構築を図ってきた。検出感度を高めるために磁性ビーズを用いて血清中や体液中のプリオン蛋白の検出方法を構築してきた。

一方、これらの検出系の検討には、CJD 患者の血清あるいは体液が是非であるが、その入手は困難で十分な検体が得られなかった。

そこで今回、それまで用いた抗プリオン蛋白モノクローナル抗体が血清中のいかなる蛋白と反応するのかをウェスタン・ブロット法で検討した。

また、幸いにも、CJD の一患者から得られた髄液 (CSF) を用いて、モノクローナル抗体との反応性について検討した。

B. 研究方法

1) 検体には、前報の ELISA 法及び磁性ビーズ法で高い OD 値を示した血清を用いた。また、弧発性 CJD 患者から得られた CSF を用いたが、採取時に血液混入・溶血を認めた。

2) 使用抗体

プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体；#4 抗体、#26 抗体、#281 抗体、#49 抗体、#526 抗体は既に作製したものを、スクレイピー型プリオン蛋白 (PrP^{SC}) に対する抗体は市販の 3F4 抗体を用いた。

3) WB 法

検体は protease K (PK) 処理、非処理群に分け、処理群には 20 μ g の PK を用いた。血清は 10cc を #4 抗体-Sepharose 固相カラムを用いて反応抗原物を抽出した。ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) 後、セミドライブロッティングを行った。膜に転写した後 HRPO-標識 #71 モノクローナル抗体と反応させ、ECLTM (Amasham 社製) にて発光し

フィルム上に感光させた。一方、CSFは20 μ lを用いPK処理後、5 μ lを型のごとくPAGEし、上記の希釈抗体を一次抗体として反応させた。次にHRPO標識抗マウスIgGウサギ抗体を二次抗体として反応後、同様にECLTMにて発光しフィルム上に感光させた。

C. 研究結果

ELISA法による高OD値を示した血清は、WS法で約30kDの大きさを有する蛋白であることが判明された(図1)。この蛋白が可溶性のプリオン蛋白か否かの確認は必要で、現在、アミノ酸解析を検討中である。

一方、CJD患者CSFのWBによる解析では同様に約30kDの蛋白を認めた。#4抗体と3F4抗体の反応態度は、PK非処理検体では同様に約30kDと約15kD付近で反応生成物を認めた(図2)。PK処理検体では#4、3F4抗体共に3.5kDから6.5kDの大きさに反応生成物が認められた。

以上の成績は、

- 1) WB反応生成物がPrP^{SC}特異性であるか否か、
- 2) #4モノクローナル抗体は3F4抗体と類似の反応パターンを示したがPrP^{SC}を認識しているのか否か、

は不明である。今後の詳細な検討が必要と考えられた。

D. 考察

今回、プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体の反応性をWB法にて検討した。これまでモノクローナル抗体を用いたELISA法や磁性ビーズを用いた検出系を構築し、血清を用いて可溶性プリオン蛋白の検出を試みてきた。これらの系では大腸菌発現プリオン蛋白は50pg/mlの感度で検出可能であった。また人血清を用いた検出でも高い反応のみられる検体が認められていた。

これらはWB法でプリオン蛋白特異モノクローナル抗体と反応する蛋白であることが判明した。さらにCJD患者の髄液中からは、正常人血清中から検出される濃度より高いプリオ

ン蛋白の存在が示唆された。しかし、文献的にみてスクレーピー型プリオン蛋白と比較してみると、そのサイズは小さくPrP^{SC}であるとの結論には慎重な解析が必要である。

ELISA系あるいは磁性ビーズを用いた検出方法は可溶性のプリオン蛋白を検出する手段としては利用可能である。また、可溶性プリオン蛋白の体液中濃度がプリオン病発症の一つの要因と成り得るか否かは今後の検討を待たねばならないし、また、高濃度プリオン蛋白がPrP^{SC}コンパートに関連するか否かについても検討しなければならない。可能性があれば本研究のELISA系測定法は役立つと思われる。

しかし、今回のWB反応が非特異性のものであるならばプリオン病診断に最も基本的であるPrP^{SC}の検出方法としては可能性の低いかも知れない。

今後は、スクレーピー型人プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体の作製が必要である。3F4抗体の使用も可能であるが、価格、ライセンス等クリアしなければならない問題が多く、自製のものがベストと考える。

PrP^{SC}特異抗体が得られれば、上に述べた#4抗体を組み合わせた新たな検出系の構築は体液中のPrP^{SC}診断の可能性を与えてくれると考えられる。

E. 結論

ELISA法及び磁性ビーズを用いた可溶性プリオン蛋白検出系で検出された血清中にはWestern-blotting法で、約30kDの蛋白であることが示された。またCJD患者髄液中にも同様のサイズの蛋白が検出され、PK処理においても#4抗体は3F4抗体と類似の反応生成物を示した。しかし、反応生成物から#4抗体がPrP^{SC}を認識しているかについては今後の解析が必要である。

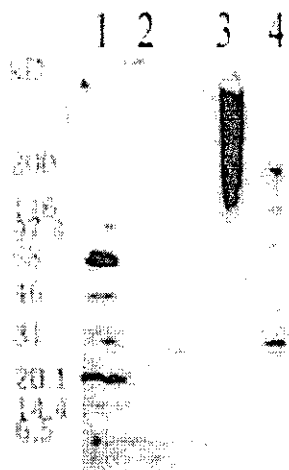


Fig. 1 Western-blotting 法による血清中プリオン蛋白の解析

1. ECL MW marker
2. normal mouse IgG sepharose column を用いた ELISA 高 OD 血清
3. #4 抗体 sepharose column を用いた ELISA 低 OD 血清
4. #4 抗体 sepharose column を用いた ELISA 高 OD 血清

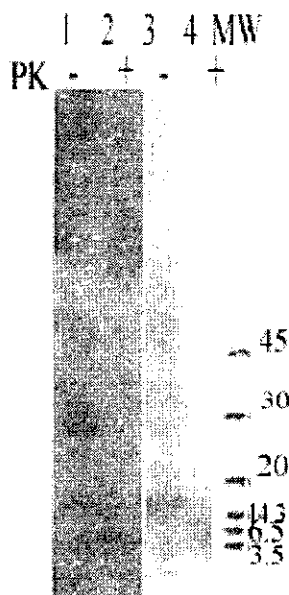


Fig. 2 Western-blotting 法を用いた CSF の解析

1. #4 モノクローナル抗体との 反応 [PK(-)]
2. #4 モノクローナル抗体との 反応 [PK(+)]
3. 3F4 抗体との反応 [PK(-)]
4. 3F4 抗体との反応 [PK(+)]

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 田中智之、北元憲利、村本 環、藤井秀治、阪本晴彦、吉田宗平、辻 力、北本哲之: ヒト型プリオン蛋白のコドン 219 polymorphism を認識する新しい単クローン抗体の作製 —その診断的価値— 病理と臨床 2001; 19(1), 91-93
2. Muramoto T, Tanaka T, Kitamoto N, Sano C, Hayashi Y, Kutomi T, Yutani C, Kitamoto T: Analysis of Gersmann-Strussler syndrome with 102Leu219Lys using monoclonal antibodies that specifically detect human prion protein with 219Glu. Neuroscience Letters: 288(2000), 179-182
3. Kitamoto T, Mohri S, Ironside JW, Miyoshi I, Tanaka T, Kitamoto N, Itohara S, Kasai N, Katsuki M, Higuchi J, Muramoto T, Shin RW: Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prion. Biochem.Biophys.Res.Commun 2002, June 7; 294(2): 280-6

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

5. アデノウイルスの検査法に関する研究

- I. アデノウイルス感染症診断における適切な検査法の選択に関する研究
及び
- II. 感染性胃腸炎におけるアデノウイルス検出法に関する研究

分担研究者 荻野 武雄 (広島市衛生研究所長)

共同研究者 野田 衛、池田 義文、平崎 和孝
(広島市衛生研究所生物科学部)

研究要旨 I. 広島市で分離されたアデノウイルス 22 型中間型株 Ad22/H8、9 型および Ad22/H10、19、37 型はヘキソンおよびファイバー領域の塩基配列分析により、それぞれ Ad22/H8 型および Ad22/H19、37 型であることを明らかにした。

II. 全国の地方衛生研究所における感染性胃腸炎の検査体制をアンケートにより調査し、各自治体におけるアデノウイルス検査体制の実態を把握した。また、実例として広島市での感染性胃腸炎のアデノウイルス検査を電子顕微鏡観察法、免疫学的抗原検出法、細胞培養法で行い、得られた検査結果について比較検討した。

I. アデノウイルス感染症診断における適切な検査法の選択に関する研究

A. 研究目的

昨年度の本研究において広島市で 1983 年から 2000 年の間に分離されたアデノウイルス 22 型分離株はいわゆる中間型で、中和試験では 22 型を、血球凝集抑制試験では 8 または 9 型 (Ad22/H8、9) と 10、19 または 37 型 (Ad22/H10、19、37) を示す 2 種類が認められたことを明らかにした。本年度はこれらの 22 型ウイルスのヘキソンおよびファイバー領域の塩基配列を調べることを目的とした。

(倫理面への配慮)

本研究は病原微生物検査法の検討、それに伴う病原微生物の解析を行ったものであり、倫理面での問題点は含まれない。

B. 研究方法

22/H8、9 型は遺伝子型 A 型として 890357C 株、B 型として 960528C 株を、22/H10、19、37 型は A 型として 870006C 株、B 型として 880249C 株を用いた (平成 13 年度報告書参照)。対照株としてアデノウイルス 8 型、19a 型、22 型、37 型の標準株を用いた。プライマーはヘキソン領域部分増幅用に HS294 (5'-CACGTACTTTGACATCCGCG-3') と HA2000 (5'-TTTGCGGCGGAAAGGTAGTC-3') との組み合わせ、ファイバー領域部分増幅用に F1 (5'-AAGGGATGTCAAATTCC-3') と R1 (5'-CTGGTGGTGGGAGA-3') との組み合わせを使用した (平成 13 年度報告書参照)。また、プロトタイプ塩基配列は genbank の登録されている配列を使用した。

C. 研究成果

1. ヘキソン領域の塩基配列

ヘキソン領域の一部を増幅するプライマーを用いて PCR を行い、いずれも約 1600bp のバンドが検出された。塩基配列を決定した 1568bp において、22/H8、9 型では A、B 型間で 6 塩基異なり、両遺伝子型は位置が異なるものの総数で 18 塩基がプロトタイプと異なっており、22/H10、19、37 型では A、B 型とも同一で、プロトタイプと 19 塩基が異なっていた。すなわち、22/H8、9 型、22/H10、19、37 型はプロトタイプと調べた領域全体で、それぞれ 1.1、1.2% 異なり、増幅部分の遺伝子は 22 型であると結論した。なお、22/H8、9 型の A 型、B 型と 22/H10、19、37 型との間では、それぞれ 1 塩基、7 塩基が異なっていた。

2. ファイバー領域の塩基配列

ファイバー領域増幅プライマーを用いて PCR を行い、約 1200bp のバンドが検出された。解析した 1197bp において、22/H8、9 型の塩基配列は A、B 型は同一で、genbank に登録されている 8 型プロトタイプの塩基配列とは 2 塩基のみ異なり、99.8% が一致した。なお、genbank に登録されている 9 型プロトタイプの塩基配列とは 95 塩基が異なっていた。22/H10、19、37 型では、1205bp のうち genbank に登録されている 19a 型の塩基配列と A 型は同じであり、B 型では 3 塩基が異なっていた。また、A、B 型間では 2 塩基が異なっていた。なお、genbank に登録されている 19a 型と 37 型プロトタイプの塩基配列は同じであり、当所で分離した 19a、37 型も同一配列であった。このことから 22/H8、9 型のファイバー遺伝子は両遺伝子型とも 8 型、22/H10、19、37 型のファイバー遺伝子は両遺伝子型とも 19a、37 型と結論した。

D. 考察

昨年度の本研究において、広島市で 1983 年から 2000 年の間に分離されたアデノウイルス 22 型分離株 21 株はいわゆる中間型で、中和試験では 22 型を、血球凝集抑制試験では 8 または

9 型 (Ad22/H8、9 型) と 10、19 または 37 型 (Ad22/H10、19、37 型) を示す 2 種類が認められた。また、全ウイルス DNA の制限酵素切断解析により、それぞれに 2 種類の遺伝子型が認められ、ヘキソン領域 PCR 産物の制限酵素切断解析の比較から両中間型は 22 型のプロトタイプと HaeIII で異なるものの、22 型であることが推定され、中和試験の結果と矛盾しなかった。さらに、ファイバー領域増幅 PCR 産物の制限酵素切断パターンから 22/H8、9 型は 22/H8 型、22/H10、19、37 型は 22/H19、37 型である可能性が考えられることも報告した (前年度報告報告書)。

今回、これら 22 型分離株の塩基配列を調べた。ヘキソン領域の塩基配列は全配列ではなく一部についての検討であるが、22 型と同一であり、塩基配列上からも分離株は 22 型と考えられた。ファイバー領域の検討では 22/H8、9 型は 8 型のファイバー配列とほとんど同じで 22/H8 型であることが、22/H10、19、37 型は 19a および 37 型と同じと考えられ、22/H19、37 型であることが塩基配列上からも示された。すなわち、中和試験、血球凝集抑制試験、全ウイルス DNA の制限酵素切断解析、PCR 産物の制限酵素切断解析、塩基配列の比較の各検査、分析結果は矛盾しなかった。前年度にも述べたように、アデノウイルスの同定においては、従来法である中和試験、HI 試験法と近年多用される遺伝子検査法は互いに排他的でなく、相補的であると考えられ、検査目的、検査時の状況等を勘案し、適宜組み合わせることで、より的確、迅速なウイルス同定が行えるものと考えられる。

E. 結論

広島市において分離されたアデノウイルス 22/8、9 型、22/10、19、37 型はヘキソン、ファイバー領域の塩基配列分析から、それぞれ 22/H8 型、22/H19、37 型と同定された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

II 感染性胃腸炎におけるアデノウイルス検出法に関する研究

A. 研究目的

感染症法 4 類感染症である感染性胃腸炎の原因ウイルスとして、ロタウイルス、カリシウイルスとともにアデノウイルスも重要な位置を占めている。全国規模で行なわれる感染症発生動向調査においては各地のデータを比較検討する際、各自治体でどのような検査体制が採られているかが解析結果に影響する。このことから全国地方衛生研究所(地衛研)における感染性胃腸炎の検査体制の実態を把握する目的で、アンケート調査を行なった。また、実例として、感染症発生動向調査の一環として当所で行っている感染性胃腸炎患者のアデノウイルス糞便検査について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究のアンケート調査の質問項目は病原微生物検査に関するもので、個人情報に関する事項は含まれておらず、特定の個人等に不利益を及ぼすことはない。また、実例検討では病原微生物検査法の検討であり、倫理面での問題点は含まれない。

B. 研究方法

アンケート調査は愛媛県立衛生環境研究所との共同作業で、地方衛生研究所全国協議会に加入している 76 機関を対象に行なった。詳細は当研究班・本年度分担研究報告(感染性下痢症病原体検査の標準化についての研究、分担研究者:愛媛県立衛生環境研究所井上博雄)を参照。また、広島市の実例検討は、1999 年 1 月から 2002 年 7 月の間、広島市感染症発生動向調査で当所に感染性胃腸炎(乳児嘔吐下痢症、胃腸炎、嘔吐を一部含む)と臨床診断され、検査依頼があった検体を用いた。電子顕微鏡(電顕法)はネガティブ染色法、ELISA 法は属共通抗原検出系であるアデノクロン、40/41 型特異抗原検出系であるアデノクロン E を、培養細胞は

HEp-2 細胞、分離ウイルス同定には中和試験を用いた。

C. & D. 研究成果および考察

1. アンケート調査結果

アンケートに回答があった地衛研は都道府県立で 46 機関、指定都市立で 10 機関、市立・特別区立で 14 機関であった。このうち、感染症法に基づく病原体サーベイランス検査として、感染性胃腸炎についてウイルス検査を実施している地衛研はそれぞれ、42、9、7 機関であった。検査手順に関しては次項 2. 広島市の実例検討結果で述べる。

(1) 腸管アデノウイルス(40/41 型)検査実施状況(表 1)

a. 都道府県立 42 衛生研究所

ウイルス検査を実施していると答えた 42 機関のうち 40 機関が腸管アデノウイルス検査を行っていた。電顕法をルーチンに用いているのは 14 機関で、2 機関が追加検査として用いていた。ELISA 法は 23 機関がルーチンに、4 機関が追加検査として行っていた。Latex 法は 12 機関がルーチンに、その他の免疫学的検査法として 3 機関がイムノクロマト法を、1 機関が EIA 法をルーチンに用いていた。遺伝子検査は 1 機関がルーチンに、3 機関が追加検査法として用いていた。培養細胞での分離同定は 5 機関がルーチンに、3 機関が追加検査法として行っており、同定は 3 機関が中和試験、1 機関が PCR 法、1 機関が記載なしであった。

b. 指定都市立 9 研究所

10 機関中 9 機関が腸管アデノウイルス

検査を行っていた。電顕法は3機関がルーチンに、1機関が追加試験として行っていた。ELISA法は5機関がルーチンに、2機関が追加試験で、Latex法は1機関がルーチンに行っていた。遺伝子検査は3機関が追加検査法として用いており、培養細胞での分離は行われていなかった。

c. 市立・特別区立7地衛研

4機関が腸管アデノウイルス検査を行っており、そのうち4機関がELISA法、1機関が電顕法をルーチンに用いていた。

以上から、腸管アデノウイルスに地衛研で最も多く使用されている検査法は抗原検出法で、なかでもELISA法であった。なお、アンケートで確認はしていないが、ここで用いられているELISA法は40/41型特異抗原検出系のELISA法と考えられる。従来から下痢症ウイルス検査法の基本的手法であった電顕法は都道府県立でみても4割弱と少なく、また最近多用されている遺伝子検査法も腸管アデノウイルスに対しては使用している機関は少なかった。

(2) 非腸管アデノウイルス(40/41型以外)検査実施状況(表2)

a. 都道府県立42衛生研究所

ウイルス検査を実施していると答えた42機関のうち36機関が非腸管アデノウイルス検査を行っていた。電顕法は11機関がルーチンに、ELISA法は6機関がルーチンに、2機関が追加検査として行っていた。Latex法は8機関がルーチンに、1機関が追加検査として用いており、その他の免疫学的検査法としてイムノクロマト法、EIA法を、それぞれ2、1機関が行っていた。遺伝子検査は1機関がルーチンに、3機関が追加検査法として用いていた。培養細胞での分離同定は29機関がルーチンに、2機関が追加検査法として行っており、同定は記載のあった全機関が中和試験で行っていた。その他の検査法として1機関がRFLP法、SSCP法を行っていた。RFLP法、SSCP法は使い方によって極めて有効な方法であ

り、もっと多くの地衛研が取り入れても良いと考えられる。

b. 指定都市立9研究所

9機関が非腸管アデノウイルス検査を行っていた。電顕法は3機関がルーチンに、1機関が追加検査で行っていた。ELISA法、Latex法はそれぞれ2機関、1機関がルーチンに用いていた。遺伝子検査は3機関が追加検査法として、培養細胞での分離は6機関がルーチンとして行っており、分離ウイルスの同定は記載のあった全機関が中和試験で、そのうちの1機関がRFLP法を併用していた。

c. 市立・特別区立7地衛研

3機関が検査を行っており、そのうち1機関が電顕法をルーチンに、1機関がELISA法を追加検査で、2機関がLatex法をルーチンに、1機関が培養法をルーチンに行っていた。

以上から、非腸管アデノウイルスが想定される場合、地衛研で最も多く使用されている検査法はウイルス分離と中和試験による同定であり、次いで抗原検出法であった。なお、ここで用いられているELISA法、Latex法は属共通抗原検出系法と考えられる。

2. 広島市の事例検討結果

(1) 感染性胃腸炎からのアデノウイルスの検出状況

1999年1月から2002年7月の間に感染症発生動向調査で当所に検査依頼のあった感染性胃腸炎(乳幼児嘔吐下痢症、嘔吐、胃腸炎を含む)の症例数は297例で、病原体陽性は135例、このうちアデノウイルス陽性は24例であった。当所における糞便検体のアデノウイルス検査の手順を図1に示す。他のウイルス検査についても一部記したが、二重下線がアデノウイルス検査を示している。PCR法はダイフロン処理後の遠心上清を核酸抽出キットで処理後、行っているが、当所ではPCR法は主としてカリシウイルスを対象としており、アデノウイルスには通常、用いていない。アデノウイルスの最終的な血清型同定結果は1型3例、2型7

例、3型6例、40/41型6例、血清型未同定2例であった(表3)。なお、アンケート調査で調べた全国地衛研の検査手順も当所とほぼ同じであった。地衛研間での違いは検体処理が異なっていることで、その主なものは、①ELISAなどの抗原検出法に当所と同じく10%乳剤をそのまま用いている機関の他、10%乳剤のダイフロン処理液遠心上清を用いている機関があること、②PCR法にダイフロン処理後の遠心上清を用いている機関と超遠心沈査を用いている機関があることなどであった。

(2) 各検査での意義付けと各検査結果の比較検討(表3)

アデノウイルス陽性24例中、同一糞便材料を用いて電顕法、免疫学的抗原検査法、分離培養法を実施できたのは表3に示す22例で、各検査での陽性は多い順に分離培養14例、アデノクロン12例、電顕観察10例、アデノクロンE6例であった。血清型別にみると1型3例、2型7例、3型6例、40/41型6例、血清型未同定2例であった。

各検査法による比較での主な点は、①分離培養陽性14例は全てアデノクロンEで陰性であり、全て非腸管アデノウイルスであった。また、逆にアデノクロンE陽性6例は全て分離培養陰性であった。②アデノクロンE陽性6例は全てアデノクロン陽性であり、アデノクロンE陽性6例のうち5例が電顕法で陽性であった。③電顕法陽性10例のうちアデノクロン陰性は1例であった。④分離培養陽性14例中、電顕法でも陽性例は4例であった。⑤電顕法またはアデノクロンの一法のみ陽性例は各1例で、型別不能であった。

以上の結果は腸管アデノウイルスと呼ばれる40/41型は分離培養が困難なこと、アデノクロンEは40/41型特異的抗原を効率よく検出することと一致する。また、40/41型以外の非腸管アデノウイルス、いわゆるコンベンショナルアデノウイルスには分離同定が最も有効なこと、アデノクロンはアデノウイルス属共通抗原を用いた検出系であること、電顕法では検出するために多数のウイルス粒子が必要なこと、電顕法あるいはアデノクロンのみで検出した場合は型

別ができないなど、従来から言われている各検査法の特徴と一致した結果であった。これらを総合すると、今回の検討件数は少ないものの、感染性胃腸炎には細胞分離とアデノクロンEを組み合わせるのが検出率、コスト、手間の上から妥当と考えられる。また、細胞での分離培養ができない場合には検出率は下がるが、アデノクロンとアデノクロンEの組み合わせが最適と考えられる。これまで下痢症検査の基本的検査法とされてきた電顕法のメリットは他の胃腸炎起因ウイルスも同時に検索できる点にあった。しかし、もっとも頻度も高く、重要であると考えられるいわゆるSRSVの検出法は近年、遺伝子検査に移行しており、電顕の重要性が薄らいできている。事実、今回の調査でSRSV検査に遺伝子検査法を使用している地衛研は都道府県立、指定都市立、市立・特別区立で、それぞれ、41、8、4機関、一方電顕法は、それぞれ、22、6、2機関であった(感染性下痢症病原体検査の標準化についての研究報告、分担研究者：愛媛県立衛生環境研究所井上博雄参照)。維持費、技術面などとも考え合わせると必ずしも電顕法による検索が以前ほど重要でなくなっていると考えられ、このことは地衛研のアンケート調査で電顕の使用機関が意外と少いことと符合している。

E. 結論

1. 腸管アデノウイルスに地衛研で最も多く使用されている検査法は抗原検出法で、なかでもELISA法であった。
2. 非腸管アデノウイルスが想定される場合、地衛研で最も多く使用されている検査法はウイルス分離と中和試験による同定であり、次いで抗原検出法であった。
3. 広島市の検討では、感染性胃腸炎には細胞分離とアデノクロンEとの組み合わせ、細胞での分離ができない場合にはアデノクロンとアデノクロンEの組み合わせが最適と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1. 腸管アデノウイルス(40/41型)検査実施状況

研究所名	電顕 観察	免疫学的抗原検査			遺伝子 検査	分離 培養
		ELISA	Latex	その他		
1	○	○	-	-	-	-
2	-	-	-	-	○	-
3	○	○	-	IC	-	-
4	-	○	○	-	-	○
5	-	-	-	-	-	-
6	○	-	-	-	-	-
7	-	-	○	-	△	○
8	-	△	-	-	-	-
9	○	○	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	○
11	○	○	-	-	-	-
12	-	○	-	-	-	-
13	○	○	-	-	-	-
14	-	-	○	-	-	-
15	-	○	-	-	-	-
16	-	○	-	-	-	-
17	○	○	-	-	-	-
18	○	○	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-
20	-	-	○	-	△	-
21	-	○	-	-	-	-
22	-	-	○	-	-	-
23	-	-	○	-	-	-
24	-	○	-	-	-	-
25	△	○	-	-	△	-
26	-	○	○	-	-	-
27	-	○	-	-	-	-
28	-	○	-	-	-	-
29	△	○	-	-	-	-
30	○	-	○	IC	-	-
31	○	-	-	IC	-	-
32	○	○	-	-	-	-
33	○	△	-	-	-	-
34	○	○	-	-	-	-
35	-	-	○	-	-	-
36	-	-	○	-	-	○
37	-	○	-	-	-	-
38	-	△	○	EIA	-	-
39	-	△	-	-	-	-
40	○	-	○	-	-	○
41	-	○	-	-	-	-
42	-	○	-	-	-	-
101	-	-	-	-	-	-
102	△	○	-	-	-	-
103	-	○	-	-	△	-
104	-	△	-	-	△	-
105	-	○	-	-	-	-
106	-	○	-	-	-	-
107	○	○	-	-	-	-
108	○	△	○	-	△	-
109	○	-	-	-	-	-
1001	-	-	-	-	-	-
1002	-	-	-	-	-	-
1003	-	○	-	-	-	-
1004	-	○	-	-	-	-
1005	○	○	-	-	-	-
1006	-	○	-	-	-	-
1007	-	-	-	-	-	-

1-42: 都道府県、101-109: 指定都市、1001-1007: 市立・特別区
 ○: ルーチンに実施、△: 追加検査として実施、-: 実施せず
 IC: イオンクロマト法、EIA: 酵素抗体法

表2. 非腸管アデノウイルス(40/41型以外)検査実施状況

研究所名	電顕 観察	免疫学的抗原検査			遺伝子 検査	分離 培養
		ELISA	Latex	その他		
1	○	-	-	-	-	○
2	-	-	-	-	△	○
3	○	-	-	IC	-	-
4	-	○	-	-	-	○
5	-	-	-	-	-	-
6	○	-	○	-	-	○
7	-	-	○	-	△	○
8	-	△	-	-	-	-
9	○	-	-	-	△	○
10	-	-	-	-	-	○
11	-	-	-	-	-	○
12	-	-	-	-	-	○
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	○	-	-	○
15	-	-	-	-	-	○
16	-	○	-	-	-	-
17	○	○	△	-	-	○
18	○	○	-	-	○	○
19	-	-	-	-	-	○
20	-	-	-	-	-	-
21	-	○	-	-	-	○
22	-	-	-	-	-	○
23	-	-	-	-	-	○
24	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	○
28	-	-	-	-	-	○
29	-	-	-	-	-	○
30	○	-	○	IC	-	○
31	○	-	-	-	-	○
32	-	-	-	-	-	○
33	○	-	-	-	-	-
34	○	○	-	-	-	○
35	-	-	-	-	-	△
36	-	-	-	-	-	○
37	-	-	-	-	-	○
38	-	-	○	EIA	-	○
39	-	△	-	-	-	△
40	○	-	○	-	-	○
41	-	-	○	-	-	○
42	-	-	○	-	-	-
101	-	-	-	-	-	-
102	△	○	-	-	-	○
103	-	-	-	-	△	○
104	-	-	-	-	△	-
105	-	-	-	-	-	○
106	-	-	-	-	-	○
107	○	○	-	-	-	○
108	○	-	○	-	△	○
109	○	-	-	-	-	-
1001	-	-	-	-	-	-
1002	-	-	-	-	-	-
1003	-	-	○	-	-	-
1004	-	-	-	-	-	-
1005	-	-	-	-	-	-
1006	-	△	-	-	-	-
1007	○	-	○	-	-	○

1-42: 都道府県、101-109: 指定都市、1001-1007: 市立・特別区
 ○: ルーチンに実施、△: 追加検査として実施、-: 実施せず
 IC: イオンクロマト法、EIA: 酵素抗体法