

検査実施標準作業書

検査実施標準作業書

[マイコプラズマ試験]

SUP No. XXX

試験品の種類 培養細胞

検査項目 マイコプラズマ汚染否定試験

試験法 PCR法によるマイコプラズマゲノムの検出

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作成者 ○○課 山田太郎

承認者 斎藤隆次郎
(検査部責任者)

実施日 平成 年 月 日

	年月日	作成・改訂者	承認者	改訂理由
作成	平成 26 年 月 日	山田太郎	斎藤隆次郎	
第 1 回改訂	平成 26 年 月 日	浦島太郎	山田太郎	検出キットの変更
第 2 回改訂				
第 3 回改訂				
第 4 回改訂				
第 5 回改訂				
第 6 回改訂				
第 7 回改訂				
第 8 回改訂				
第 9 回改訂				
第 10 回改訂				

○○○研究所

○○課

○○○研究所

○○課

細胞感受性試験標準作業書

- 検査の項目
マイコプラズマ汚染否定試験
- 試験品の種類
培養細胞
- 検査法
原理：細胞培養液の上清について、マイコプラズマ特異的なプライマーを用いた PCR でマイコプラズマ遺伝子を検出する。判定は電気泳動で PCR 産物の有無で行う。
出典：タカラバイオ社製 PCR Mycoplasma Detection Set の取扱説明書
- 検査等に用いる試薬
① PCR Mycoplasma Detection Set : TAKARA
② 蒸留水
- 検査等に用いる機器・器具及び器材
1) 機器・器具
① 炭酸ガス培養装置
② ボルテックス
③ 冷却离心机
④ サーマルサイクラー
⑤ マイクロ冷却离心机
⑥ マイクロピペット
⑦ チューブオープナー
2) 器材
① マイクロチューブ (1.5ml) 及びマイクロチューブラック (冷蔵冷凍用)
② フィルター付き滅菌チップ (p=2, 10 用, p=20 用, p=100 用, p=200 用, p=1000 用)
③ PCR 用チューブ・蓋及びチューブラック (冷蔵冷凍用)

- 作業環境、操作上の注意
1) 作業中は必ず使い捨ての手袋、マスク及び白衣を着用する。
2) 作業中、マイクロピペットで吸引する時はフィルター付きチップを使用し、チューブの口を開ける時はその前に軽く遠心し、チューブオープナーを使用すること。
3) 試薬の調整は試薬専用のクリーンベンチ内で行うこと。その際クリーンベンチのファンを止め、コンタミ防止、Etase 及び RNase の侵入防止に細心の注意を払うこと。

- 検査工程により作業エリアを区分する。

作業内容	作業エリア
試験品の前処理	無菌室 (病原体取扱室)
試薬の調製	専用クリーンベンチ
PCR	化学実験室
電気泳動	化学実験室

- 作業工程の熟習は、検査工程管理チェックシート (別添 No1-3) で確認する。

7 検査法

- PCR 反応に使用する試薬は、全てキットに付属のものを用いる。
- 試験品の前処理
 - 産代後、3~6 日間細胞培養を行った培養上清 1ml を 1.5ml のマイクロチューブに移す。
 - 3000rpm×10 分遠心、上清を検査に用いる。
 - 上清を 94 度、5 分加熱後、冷却 (4 度)、検査を当日行わないなら -20 度保管
 - 試薬の調製
 - 表 1 に従い PCR カクテルを調整する。冷却用ラックを用いる

表 1 1×PCR 反応液の調整

試薬	容量
10×PCR Buffer	5μl
dNTP Mixture	4μl
MCCp F1 Primer	0.5μl
MCCp R1 Primer	0.5μl
Taq DNA Pol	0.25μl
Distilled water	34.75μl
Subtotal	45μl
細胞培養上清	5μl
Total	50μl

- サーマルサイクラーの電源を入れる
- PCR チューブのラベリング(サンプル番号、器性、陰性コントロール)
- PCR 用チューブに反応液を 45μl ずつ分注する。
- 細胞培養上清 5μl を加え、しっかりと蓋を閉める。
- 別の PCR チューブに陰性対照として水 5μl を加え、しっかりと蓋を閉める。
- PCR 用 8 連チューブを速やかに転写機にセットする。
- 8 連チューブをサーマルサイクラーにセットする。
- 液晶画面でマイコプラズマ検査プログラムを選択する。反応条件は、94℃で 30 秒後、[94℃、30 秒間-55℃、2 分間-72℃、1 分間]を 30 サイクル後に 4℃に保持する。
- "RUN" を選択し反応容量を入力する。50μl

14. 反応が終了したら PCR 用チューブを取り出しサーマルサイクラーを止める。
 ・電気泳動
 15. 25%アガロースゲル電気泳動で PCR 産物の鑑別を行う。

8 結果判定

電気泳動写真から PCR 産物の有無を判定する。陰性対照でバンドが確認されないこと、陰性対象で 810bp 付近にバンドが確認できること、370-680bp 付近にバンドが確認された検体は陽性。バンドが確認できないものは陰性と記載する。

作成上の留意点

作業に用いる機器、基材、消耗品、試薬名などは各検査室の状況にあわせ、名称、操作方法など変更訂正する。

マイコプラズマ検出には PCR のほか、リアルタイム PCR、IF など別の原理で測定できる各種キットが販売されている。キットの種類により操作方法、判定法など適宜変更する。

電気泳動、細胞培養についても別途、マニュアルあるいは SOP の作成が望ましい

細胞の調製 (検査に用いた種類を記載)

- ①使用細胞 (検体数) : サンプルリング日 (実施者) ;
 ②使用細胞 (検体数) : サンプルリング日 (実施者) ;
 ③使用細胞 (検体数) : サンプルリング日 (実施者) ;
 ④使用細胞 (検体数) : サンプルリング日 (実施者) ;
 ⑤使用細胞 (検体数) : サンプルリング日 (実施者) ;

PCR 開始日時: 試験実施者

10 × PCR Buffer	5µl	×	=	µl
dNTP Mixture	4µl	×	=	µl
MCGp F1 Primer	0.5µl	×	=	µl
MCGp B1 Primer	0.5µl	×	=	µl
TaKaRa Taq	0.25µl	×	=	µl
Distilled water	34.75µl	×	=	µl
Subtotal	45µl		=	µl

45 µl ずつ分注し、細胞培養上清を 5 µl 加える

94°C	30 秒	
↓		
94°C	30 秒	
55°C	2 分	30cycle
72°C	1 分	
↓		
4°C	∞	

使用した試薬又はキット:
 タカラバイオ PCR Mycoplasma Detection Set Lot.

電気泳動

25%アガロースゲル 調製日:

開始日時: 試験実施者



(レーンの説明)

結果の判定

電気泳動写真から PCR 産物の有無を判定する。陰性対照でバンドが確認されないこと、陰性対象で 810bp 付近にバンドが確認できること、370-680bp 付近にバンドが確認された検体は陽性、バンドが確認できないものは陰性と記載する。

結果判定表

検体番号	判定

判定

測定日時: 判定者:

細胞感受性試験(ひな形)

〇〇〇〇研究所
〇〇部 〇〇課
検査実施標準作業書

検査実施標準作業書(ひな形)

[細胞感受性試験]

SOP No. XXX

試験品の種類 培養細胞

検査項目 細胞感受性試験

試験法 参照ウイルスを用いた力価試験

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作成者 ウイルス課 山田太郎

承認者
(検査部門責任者)

実施日 平成 年 月 日

	年月日	作成・改訂者	承認者	改訂理由
作成	平成26年 月 日	山田太郎	木下静吉郎	
第1回改訂				
第2回改訂				
第3回改訂				
第4回改訂				
第5回改訂				
第6回改訂				
第7回改訂				
第8回改訂				
第9回改訂				
第10回改訂				

細胞感受性試験標準作業書

- 1 検査の項目
ポリオウイルスに対する細胞感受性試験
- 2 試験品の種類
RD-A 細胞およびL20B 細胞
- 3 検査法
原理：弱毒参照ポリオクテン株（B.S.L.1）を用いて力価試験を行う。
出典：World Health Organization. Polio Laboratory manual 4th edition, WHO/TYD/04.10, page 73-79, 2004
- 4 検査毎に用いる試薬
試薬
- ① イーグルMEM 培地：和光(薬番)
 - ② FBS(-)：和光(薬番)
 - ③ FCS：シグマ
 - ④ EDTA-トリプシン溶液：シグマ(薬番)
 - ⑤ トリパンブルー溶液：シグマ(薬番)
- ※培地作製については、「培地作製標準作業書」(番号XXX)を参照すること。
参照ウイルス
弱毒参照ポリオクテン株（NIHSC株）
※参照ポリオウイルスの調製（in house 参照ウイルス）、保管条件は「培地作製標準作業書」(番号XXX)を参照すること。
- 5 検査毎に用いる機器・器具及び器材
- 1) 機器・器具
- ① 脱炭ガス培養装置（バナソニックヘルムスケア）
 - ② 顕微鏡（ニコン）
 - ③ ボルテックス（デルタミキサー-08）
 - ④ マイクロピペット
 - ⑤ 数取器
 - ⑥ 試験管立て
 - ⑦ マルチチャンネルマイクロピペット

- ⑧ 冷蔵庫
 - ⑨ 冷蔵庫
- 2) 器材
- ① 細胞培養用 96穴マイクロプレート
 - ② 15ml 滅菌チューブ
 - ③ 細胞培養プラスチック 25cm²
 - ④ ビルケルチュルク血球計算盤
 - ⑤ フィルター付き滅菌チップ（φ=200 用、φ=1000 用）
 - ⑥ 25ml リザーバー

5 作業環境、操作上の注意

- 1) 作業中は必ず使い捨ての手袋、マスク及び白衣を着用する。
- 2) 作業中、マイクロピペットで吸引する時はフィルター付きチップを使用し、チューブのフタを開ける時はその前に軽く遠心すること。
- 3) 検査工程により作業エリアを区分する。

作業内容	作業エリア
細胞の調製	無菌室（細胞調製室）
ウイルス接種	無菌室（病原体取扱室）
CFEの観察	無菌室（病原体取扱室）

4) 作業工程の地図は、検査工程管理チェックシートで確認する。

7 検査法

- 1 カルチャーボトルの培養液を捨てる。
- 2 FBS で細胞を3回洗浄する。
- 3 トリプシン溶液を1ml加える。
- 4 トリプシン溶液で細胞を消化したからトリプシン溶液は捨てる。
- 5 細胞がすべて壁面から剥がれたのを確認し、10%細胞懸濁液培地 5ml で懸濁し細胞懸濁液とする。（注：懸濁時、泡が立たないようにする。）
- 6 細胞懸濁液とトリパンブルーを等量混合する。
- 7 ビルケルチュルク血球計算盤の片側に5の混合液 10μl を入れ、顕微鏡下で細胞を計測する。

- 1~4×10⁶個/mlになるように細胞懸濁液を希釈する。
- 10³から10⁸までの希釈系列用チューブを準備する。
- それぞれのチューブに20細胞維持培地を9ml入れる。
- マイクロピペットを用いて10⁴と記載されたチューブにウイルス溶液 1ml 加え 10回転倒混和でよく攪拌し 10³希釈とする。
- 10⁸希釈まで同様に調整する(図1)。
- 10⁸から10³まで希釈したウイルス溶液 100μlをウェル番号1から10番に2列ずつ計20穴に加える(図2)。
- 100μlの20細胞維持培地をウェル番号11と12番すべてに加えて細胞コントロールとする。
- すべてのウェルに1~4×10⁶個/mlの細胞懸濁液を100μl加える。
- プレートに蓋をして、36℃、5%炭酸ガス存在下で培養する。
- 7日間観察し、毎日、CPEの出現を記録する。
- ウイルスカ価をKärberの式を用いて計算する(例題)。
- 求めたウイルスカ価のlog値が内部基準の±0.5の範囲に入っていることを確認する。

図 1

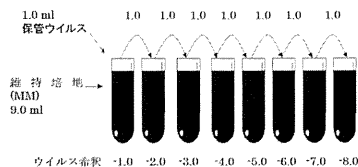
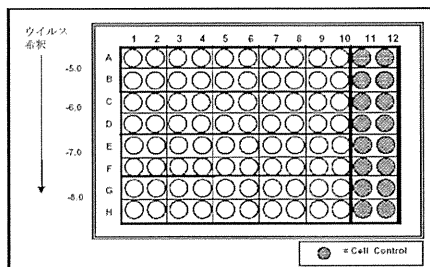


図 2



8 結果判定

In house 参照ウイルス株のウイルスカ価のlog値が内部基準の±0.5の範囲ならば合格、再度試験を行っても範囲外ならば細胞のリカバリー、あるいは新たな細胞入手、ウイルス保管温度管理条件等を検討し適切な対応をとること。

作成上の留意点

培地作製、in house 参照体の調整方法、保管方法は「試験などの調整」の項で別のSOPを作成する。特にin house 参照株の保管は温度管理モニター導入が望まれる。

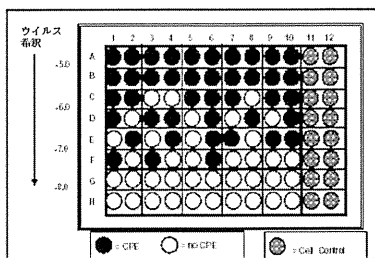
ウイルス同定時のウイルスカ価測定試験のSOPは異なる。

細胞の保存、リカバリー、継代のSOPは、「試験などの調整」の項でSOPを作成すること。

別紙

Kärber 法によるウイルスカ価の計算

公式 $\log CCID_{50} = L - d(S - 0.5)$
 L = 試験で用いられた最も低い希釈倍率(対数)
 d = 各希釈倍率間(対数)の差;
 S = 各希釈倍率における、CPEが出現したウェル数の比率



-5: 20/20=1
 -6: 13/20=0.65
 -7: 9/20=0.45
 -8: 0/20=0

上記の結果を得た時の、計算例

(20ウェル中何個のウェルにCPEが現れたか数え、比率を求め、各希釈列の割合を足す)
 $L = -5.0; d = 1.0; S = 1 + 0.65 + 0.45 + 0 = 2.1$
 $\log CCID_{50} = -5 - 1(2.1 - 0.5) = -6.6$
 ウィルスカ価 = $10^{6.6} CCID_{50} / 0.1 ml$

5 炭性試験工程管理チェックシート

No.1

細胞の調整

① 使用細胞(継代数): _____ 継代日(実施者): _____

② 使用細胞(継代数): _____ 継代日(実施者): _____

開始日時: _____ 試験実施者: _____

1. ガルナーボトムの培養液を捨てる
2. PBSで細胞を洗浄する。
3. トリアジン溶液を1ml加える。
4. トリアジン溶液で細胞を洗い出したトリアジン溶液は捨てる。
5. 全ての細胞が細胞から剥がれたのを確認し細胞懸濁液を調整し細胞懸濁液とする。
6. 細胞懸濁液をトリアジンブルーで染色混合する。
7. セルカウミュルク血球計算盤がなければ10⁶の細胞懸濁液を入れ、顕微鏡下で細胞を計数
8. 1~4×10⁶個/mlになるように細胞懸濁液を希釈する。

検体番号	細胞懸濁液		希釈
	原液	平均	
		1ml当たりの細胞数	培養
		細胞懸濁液	培養

使用した試薬又はキット

イグM MEM Lot: _____ 使用期限: _____

トリアジン Lot: _____ 使用期限: _____

PBS Lot: _____ 使用期限: _____

FBS Lot: _____ 使用期限: _____

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班
分担研究報告書

麻疹検査診断法（RT-PCR法）の外部精度管理（EQA）法の検討

研究分担者 竹田 誠 国立感染症研究所ウイルス第3部部長

研究協力者 駒瀬勝啓 国立感染症研究所ウイルス第3部第1室室長

研究要旨 麻疹はWHOが排除を目指す感染症であり、排除認定には検査診断に基づく質の高いサーベイランス体制が求められている。また「麻疹に関する特定感染症予防指針」において全数の遺伝子検査が求められている感染症である。現在、地衛研で実施されている麻疹の遺伝子検査（RT-PCR法）の質を担保する目的で外部精度管理（EQA）法を検討し、EQAとして検査感度、特異度、遺伝子解析技術について実施する事とした。またEQAに用いるRNAを含む検体を安定的に、かつ安価に少ない労力で送付する方法を検討した。これらの方法を用いて精度管理を試行し、今後の麻疹検査診断法の精度管理法についてさらに検討していく予定である。

A. 研究目的

麻疹は天然痘、ポリオに続き WHO が排除を目指している感染症である。麻疹排除は「優れたサーベイランス体制が存在する下で、その地域に常在（土着）する麻疹ウイルスによる麻疹の伝播が1年間以上ないこと」と定義されており、排除認定を受けるためには、麻疹症例数を一定数以下にする事とともに、検査診断によるサーベイランス体制の確立や検出された麻疹ウイルス株の鑑別が求められている。日本においては、麻疹検査診断の血清学的診断は民間検査センターで、RT-PCR法による病原体検査は地方衛生研究所に担われている。今後、麻疹排除にむけてより重要になる病原体検査による麻疹診断は、現在のところ外部精度管理（EQA）が実施されておらず、サーベイランスの質の担保のために、EQAの導入を検討する事が求められてくる。本研究は麻疹の病原体検出による検査診断に対するEQA

の方法について検討した。

B. 研究方法

1. RNA 検体の安定性

FTA カードに検体を吸収させ、十分に乾燥させた後、6 mm 口径の穴をパンチでくりぬき、くりぬいた FTA カードを 1.5mL チューブに保存した。RAN を抽出後、real-time PCR 法により RNA 量を定量した。同様に RNastable (Baiomatorica) を含んだチューブに一定量の RNA を加え、遠心エバポレーターで乾燥し、保存した。RNA 量を real-time PCR 法により RNA 量を定量した。

C. 研究結果

1. EQA のデザインの検討

感度、特異度、ならびに遺伝子解析技術に対する EQA の方法を検討した。現在推奨されている麻疹検査診断法は nested RT-PCR 法であるが、病原体マニュアルにはプライ

マー、PCR 反応条件の記載はあるが、検査に使用するキット、機器等を含む具体的な実施法は原則、各施設に任せている。よって施設毎で異なる行程（例えば One-step RT-PCR 法と RT 反応と PCR を別々に実施する Two-step 法等）で検査が行われている事が予想される。感度の EQA 法としては、濃度が一定の標準 RNA（合成 RNA）を送付し、各施設に 10 倍階段希釈液を作製してもらい、それを一定量、日常実施している方法の最初の反応液に添加し、検出限界を調べる方法を採用した。また、検査の特異度、並びに遺伝子解析技術の評価には、ブラインド検体（陽性検体、陰性検体）を配布する事とした。日常用いている方法でブラインド検体を検査し、陽性、陰性を判定してもらい、さらに陽性検体の遺伝子解析、遺伝子型解析を実施してもらい遺伝子解析の精度を評価する事とした。

2. RNA 検体の送付法の検討

麻疹ウイルスは RNA ウイルスであることから、EQA には RNA を検体として送付する必要がある。よって分解されやすい RNA 検体を劣化なく、手間、コストを最小にして送付する方法が求められる。FTA カードは病原体を失活させ、RNA を一ヶ月程度、室温で保持しても RNA の品質に大きな変化を与えないことから、ブラインド検体の送付法として採用した。また、汎用されている RNA 抽出キット（Qiagen、Roche）を用いて、使用説明書とほぼ同じ方法で、FTA カードからの RNA 抽出が可能である事から RNA 抽出行程の評価にも適当である。一方、濃度管理が求められる標準 RNA（合成 RNA）の送付には RNastable（Biomatrix）を採用した。これらは事前に 1 ヶ月程度の期間保管し、実際に RNA の劣化がほとんどない事を確認した。

D. 考察

麻疹は、WHO が排除を目指す感染症であり、その排除認定には検査診断に基づいた質の高いサーベイランス体制を求められている。また、検査診断の質を担保するために、WHO が認証した国家検査機関（National Laboratory; NL、日本においては感染研）か、NL によって精度管理された検査施設において検査が実施される事を求めている。日本においても平成 25 年 4 月より改正された「麻疹に関する特定感染症予防指針」において、麻疹ウイルスの遺伝子検査を可能な限り全数、国立感染症研究所、または地方衛生研究所で実施するとしており、地方衛生研究所での検査診断の質を担保するために精度管理は必要になってくる。

EQA を実施するにおいて、検体の品質は最も留意しなければならない点である。RNA は非常に不安定である事から、劣化を許容範囲内にとどめ、さらに費用、手間を考慮した検体の送付法が求められる。正確な濃度が求められる感度試験に使用する標準 RNA は RNastable（Biomatrix）を、特異度、遺伝子解析用の検体であるブラインド検体には FTA カードを使用する事とした。ともにおよそ 1 ヶ月の保存期間に大きな品質の低下はなかった。これらによって、ドライアイスによる梱包等の手間なく、安価な普通郵便での発送が可能となった。EQA の効果的な方法について今回のデザインに従って試行し、実施施設に過度に負担のかからない、効果的な方法を検討していく。

平成 28 年 4 月より感染症が改正になり、感染症の発生を予防し、原因を明らかにするための必要な調査を知事の権限で実施できる事となり、地方衛生研究所での検査がより重要になる事が予想される。一方で検査に使用する機器の維持・管理や、EQA を実施するためのコスト、労力が確保

されているとはいえない。これは実施する側である感染研においても同様である。また、地方衛生研究所では多くの病原体の検査を実施している。検査項目毎に EQA を求めるのか、個別の検査項目よりも施設の検査体制全体を評価していくのかも今後検討していく必要がある。

E. 結論

麻疹検査診断法である nested RT-PCR 法の EQA 法を検討した。また、RNA 検体を送付方法について検討した。20 施設程度で EQA 法を試行し、問題点を検討していく。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

a 英文

1. Abo H, Okamoto K, Anraku M, Otsuki N, Sakata M, Icenogle J, Zheng Q, Kurata T, Kase T, Komase K, Takeda M, Mori Y. Development of an improved RT-LAMP assay for detection of currently circulating rubella viruses. *Journal of Virological Methods*. 207, 73-77. (2014)
2. Takahashi T, Arima Y, Kinoshita H, Kanou K, Saitoh T, Sunagawa T, Ito H, Kanayama A, Tabuchi A, Nakashima K, Yahata Y, Yamagishi T, Sugawara T, Ohkusa Y, Matsui T, Arai S, Satoh H, Tanaka-Taya K, Komase K, Takeda M, Oishi K, Ongoing increase in measles cases following importations, Japan, March 2014: times of challenge and opportunity. *Western Pac Surveill R response J* 16; 5(2) 31-3 (2014)

b. 和文

1. 駒瀬勝啓、竹田誠 海外の麻疹の情報 2013病原微生物検出情報 35 (4) ; 97-98 (2014)
2. 山岸拓也、伊東宏明、八幡裕一郎、中島一敏、松井珠乃、高橋琢理、木下一美、砂川富正、奥野英雄、多屋馨子、大石和徳、駒瀬勝啓、三崎貴子、丸山絢、大嶋孝弘、清水英明、岩瀬耕一、岡部信彦、小泉祐子、平岡麻理子、瀬戸成子、杉本徳子、荷見奈緒美、熊谷行広、大塚吾郎、杉下由行、甲賀健史、鈴木理恵子、阿南弥生子、舟久保麻理子、弘光明子、坂本洋、阿部勇治、氏家無限 潜在的な疫学リンクが疑われたD8型ウイルスによる麻疹広域散発事例 病原微生物検出情報 35 (4) ; 100 - 102 (2014)
3. 古川英臣、梶山桂子、宮代守、佐藤正、伊藤孝子、酒井由美子、井出瑤子、植山誠、眞野理恵子、衣笠有紀、戸川温、高田徹、猪狩洋介、駒瀬勝啓 フィリピン渡航者からのD9型麻疹ウイルスの検出-福岡市 病原微生物検出情報 35 (5) ; 132 (2014)
4. 竹田誠、駒瀬勝啓 輸入麻疹と国内伝播感染症 44(6) 206-217 (2014)

学会発表

国際学会

なし

国内学会

1. 岡部信彦、駒瀬勝啓、砂川富正、竹田 誠、多屋馨子、中野貴司、蜂谷正彦、三崎貴子、吉倉 廣、渡瀬博敏、国内の麻疹排除 (measles elimination) 状況に関する考察、第 18 回日本ワクチン学会学術集会 平成 26 年 12 月 6 日～7 日 福岡

2. 多屋馨子、佐藤弘、奥野英雄、新井智、神谷元、八幡裕一郎、伊東宏明、福住宗久、砂川富正、駒瀬勝啓、竹田誠、大石和徳、麻疹・風疹に関する最近の国内疫学情報について、第 18 回日本ワクチン学会学術集会 平成 26 年 12 月 6 日～7 日 福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

特記事項なし

実用新案登録

特記事項なし

その他

特記事項なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班
分担研究報告書

百日咳レファレンスセンター

研究分担者	蒲地一成	国立感染症研究所	細菌第二部
研究協力者	大塚菜緒	国立感染症研究所	細菌第二部
	平松征洋	国立感染症研究所	細菌第二部
	森内 巧	国立感染症研究所	細菌第二部

研究要旨 百日咳病原体サーベイランスの精度向上を目的に、地方衛生研究所を対象に遺伝子検査キットを含むレファレンスの配布を行った。平成26年度は6施設に10件のレファレンスを配布するとともに、パートタクチン(Prn)欠損株とマクロライド耐性菌の国内分離状況を調査した。その結果、2014年の臨床分離株はすべてPrn発現を示し、2011年以降Prn欠損株は減少傾向にあることが判明した。また、2013~14年の分離株はすべてエリスロマイシン感性菌 (MIC, <10 µg/mL) であることを確認した。

A. 研究目的

百日咳はワクチン予防疾患に含まれる小児の急性呼吸器感染症であり、その主な起因菌は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) である。同様な呼吸器症状を引き起こす病原体として百日咳類縁菌 (パラ百日咳菌, *Bordetella holmesii*), *Mycoplasma pneumoniae*, その他ライノウイルスなどの呼吸器系ウイルスが挙げられる。臨床症状からこれらの病原体を鑑別することは難しく、現在の報告患者数には多くの紛れ込みを含むことが示唆される。百日咳の正確な診断には遺伝子検査が有用であり、アウトブレイクなどの病原体検索では必須の検査法となる。

百日咳菌は種々の定着因子を産生するが、近年世界的に定着因子パートタクチン (Prn) の欠損株が出現している。現行の精製百日せきワクチンには感染予防抗原として Prn が含まれることから、Prn 欠損とワクチン

有効性との関係が世界的に論議されている。現在までに Prn 欠損株は日本、欧米、オーストラリアなどで確認されているが、その出現理由はまだ明らかとなっていない。米国では流行株の85%をPrn欠損株が占めたことから、本菌の発生動向には継続した監視が必要である。また、中国ではマクロライド高度耐性の百日咳菌が出現し、臨床現場から高頻度に分離されていることから本菌に対するサーベイランスも重要となる。

本研究は百日咳レファレンス活動として、遺伝子検査キットを含むレファレンスの整備・配布、さらに国内におけるPrn欠損株とマクロライド耐性菌の流行調査を行った。

B. 研究方法

1. レファレンス関係

百日咳類縁菌 *B. holmesii*-LAMP は既報に従ってキット化し、48 試験分を 1 キットとした。百日咳菌, パラ百日咳菌, *B.*

holmesii, *M. pneumoniae* を標的とする 4Plex リアルタイム PCR は一部改良を加え、プライマーとプローブ濃度を至適化した (ver.3.2)。陽性コントロール DNA は conventional PCR およびリアルタイム PCR 用に濃度を調整したものを整備した。

2. Prn 欠損株の流行調査

地方衛生研究所および国内医療機関に百日咳臨床分離株の分与を依頼し、2014 年の国内分離株 15 株を収集した (感染研での分離株を含む)。このうち 2 株は兄弟からの分離株であったことから、疫学的関連性を除いた 14 株をイムノブロット解析に供試した。また、これまでに国内分離された Prn 欠損株と Prn 発現株について、分離月と患者年齢を比較解析した。

3. マクロライド耐性菌の調査

2013~14 年の国内臨床分離株 26 株について、エリスロマイシン (EM) に対する MIC を測定した。中国で報告されている EM 高度耐性菌の MIC は 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であったことから、EM 濃度が異なる 3 種類の CSM プレート (0, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を試験に用いた。判定は 7 日後の菌増殖を指標に行った。

C. 研究結果

1. レファレンス関係

平成 26 年度のレファレンスセンターへの配布は 0 件であった。一方、センター以外の地研には *B. holmesii*-LAMP キット 1 件、4Plex リアルタイム PCR キット 8 件、陽性コントロール DNA 1 件を 6 施設に配布した。

2. Prn 欠損株の流行調査

国内臨床分離株 (260 株) における Prn 欠損株の出現状況を図 1 に示した。Prn 欠損株は 1997 年に初めて出現し、その後増加

傾向を示し、2011 年では最多の分離数 (13 株) を示した。2014 年は 14 株すべてが Prn 欠損株となり、2011 年以降 Prn 欠損株は減少傾向にあることが判明した。なお、Prn 欠損株と発現株の分離月と患者年齢を比較したところ、両者に統計学的な有意差を認めなかった。

3. マクロライド耐性菌の調査

2013~14 年の国内臨床分離株 26 株を EM 添加培地で培養したところ、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ならびに 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の EM 濃度で菌増殖は全株で認められなかった (表 2)。このことから、26 株の EM に対する MIC は <10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と判定した。

D. 考察

百日咳レファレンスセンターでは遺伝子検査の拡充・整備を進め、平成 26 年度から新たな遺伝子検査キットとして 4Plex リアルタイム PCR キット (ver. 3.2) の配布を開始した。今年度は 8 キットの配布を行ったが、レファレンスセンターへの配布は減少傾向を示し、昨年度は 3 件、今年度は 0 件となった。これはレファレンスセンター内における遺伝子検査の整備が完了したことを意味し、今後は検査キットの更新・補充への対応が必要課題となる。

Prn 欠損株の流行調査により、わが国では 2011 年以降 Prn 欠損株が減少していることが新たに判明した。Prn 欠損株は Prn を含有する DPT ワクチンが接種された時期に多く分離されたが、Prn 不含の DPT-sIPV が導入された 2011 年 11 月以降は顕著に減少傾向を示した。このことは Prn 含有ワクチンが Prn 欠損株の選択圧となる可能性を示唆するが、流行株の遺伝子型自体が入れ替わっている可能性も否定出来ない。また、2014 年からは Prn 含有の

DPT-cIPV が導入されたことから、本菌の発生動向には継続した監視が必要である。

中国西安市ではマクロライド高度耐性の百日咳菌が多数分離されるとともに、北京市でも耐性菌の増加が報告されている。これまでわが国ではマクロライド耐性菌の報告例はなく、今回の小規模調査でも耐性菌は検出されなかった。ただし、今後は他国から流入する可能性があるため、臨床分離株の収集と薬剤耐性の定期的なモニタリングは重要な検討課題となる。

E. 結論

遺伝子検査キットを始めとするレファレンス関係の配布・整備を行った。また、百日咳流行株の解析により、わが国では2011年以降 Prn 欠損株が減少傾向にあること、近年の臨床分離株はすべてマクロライド感受性菌であることを確認した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

a. 英文

1. Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, Bouchez V, Cassidy PK, Chiang CS, Dalby T, Fry NK, Gaillard ME, van Gent M, Guiso N, Hallander HO, Harvill ET, He Q, van der Heide HG, Heuvelman K, Hozbor DF, Kamachi K, Karataev GI, Lan R, Lutyńska A, Maharjan RP, Mertsola J, Miyamura T, Octavia S, Preston A, Quail MA, Sintchenko V, Stefanelli P, Tondella ML, Tsang RS, Xu Y, Yao SM, Zhang S, Parkhill J,

Mooi FR. Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. *mBio* 5:e01074, 2014.

2. Nagasawa M, Kaku M, Kamachi K, Shibayama K, Arakawa Y, Yamaguchi K, Ishii Y. Loop-mediated isothermal amplification assay for 16S rRNA methylase genes in Gram-negative bacteria. *J Infect Chemother.* 20:635-8, 2014.
3. Allahyar Torkaman MR, Kamachi K, Nikbin VS, Lotfi MN, Shahcheraghi F. Comparison of loop-mediated isothermal amplification and real-time PCR for detecting *Bordetella pertussis*. *J Med Microbiol.* [Epub ahead of print]

b. 和文

1. 蒲地一成. 微生物 ABC 百日咳. up-to-date 子どもの感染症. 2(2):18-21, 2014.

学会発表

国際学会

1. 該当なし

国内学会

1. 大塚菜緒, 柴山恵吾, 蒲地一成. *Bordetella pertussis* fimbriae are regulated by BvgAS system and Pfim structure. 第88回日本細菌学会総会, 平成27年3月, 岐阜
2. 平松征洋, 大塚菜緒, 柴山恵吾, 鈴木英里, 渡邊峰雄, 蒲地一成. 百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* の自己凝集抑制因子 BipA に関する研究. 第88回日

本細菌学会総会，平成 27 年 3 月，岐阜	該当なし
	実用新案登録
H. 知的財産権の出願・登録状況	該当なし
(予定を含む。)	その他
特許取得	特記事項なし

表 1. 平成26年度のレファレンス関係の配布実績 (平成27年1月現在)

レファレンス	地方衛生研究所	
	レファレンスセンター	その他
<i>Bordetella holmesii</i> LAMPキット	0	1
4PlexリアルタイムPCRキット	0	8
陽性コントロール 百日咳菌	0	0
DNA 百日咳類縁菌	0	1
計	0	10

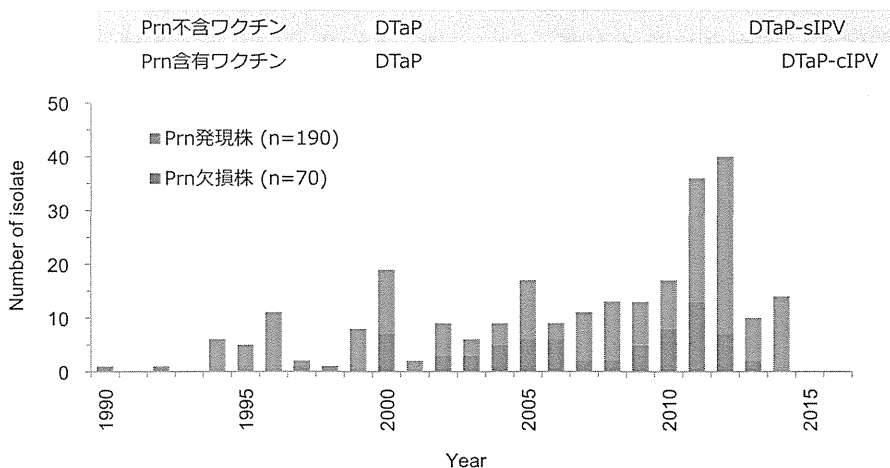


図 1. 日本におけるPrn欠損株の分離状況 (1990~2014年)
2014年に臨床分離された14株はすべてPrn発現株であり，Prn欠損株は2011年以降減少傾向を示した

表 2. 国内臨床分離株のエリスロマイシン添加寒天培地での増殖数 (2013~14年分離株)

EM添加濃度	供試株数	増殖株数
0 µg/mL	26	26
10 µg/mL	26	0
100 µg/mL	26	0

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班
分担研究報告書

結核菌型別分析における精度保証

研究分担者 御手洗聡 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部長

研究協力者 前田伸司 公益財団法人結核予防会懸隔研究所抗酸菌部
結核菌情報科長

研究要旨 結核菌の反復配列多型（VNTR）分析に関する外部精度評価を行った。全79箇所の衛生研究所のうち54施設が参加を希望した。3種類の精製結核菌DNAを送付し、2ヶ月半で全施設から型別結果報告があった。国内結核菌型別に用いられているJATA(12)のローカセットによる3株の分析結果では、全ローサイ完全一致だったのは36施設（66.7%、36/54）、1ローカセット違いが7施設（13%、7/54）、2ヶ所以上の違いが11施設（20.3%、11/54）であった。また、分析方法については、37施設（68.5%、37/54）が、最もシンプルなアガロースゲルを用いた電気泳動による分析、次いで7施設（13%、7/54）がシークエンサーを用いたフラグメント解析を利用していた。正答率に関しては、アガロースゲルによる電気泳動が、シークエンサーを用いたフラグメント解析よりわずかであるが高いという結果だった。さらに、VNTR-4052やVNTR-2163aのローカセットは、正答率が低いことが明らかになり、今後プライマーの変更等の対策が必要であることが判明した。

A. 研究目的

結核菌の型別方法は、IS6110制限酵素断片長多型法から反復配列多型（VNTR）法に世界的な流れとしてシフトしている。VNTR分析法に関しては2006年、フランスパスツール研究所のSupplyらによって国際標準型別法が報告されている。しかし、欧米で広まっている結核菌遺伝型は、日本をはじめとした東アジアで広まっている結核菌の遺伝系統と異なり、国際標準VNTR法の型別能力が低いことが判明した。そこで、国内で分離される主要な結核菌遺伝型に対して型別能力が高いVNTRシステムを当研究所で樹立し、衛生微生物技術協議会結核レファレンス会議の協力を得て普及に努めてきた。実際に結核菌の型別を行って

る施設でのPCR産物の分析方法、分析座位等はアンケート調査でしか調べられていない。

そこで、本研究では、各衛生研究所や専門病院で利用されているVNTR法に関して外部精度評価を行うことで、型別結果を地域間で比較ができる体制を作ることや分析実態の調査を行うことを目的とした。正確に型別が可能な施設のデータを集めることで将来的な全国規模の結核菌型別データベースの構築が可能となる。

B. 研究方法

参加施設の募集：レファレンス会議の各ブロックの代表を通してVNTRに関する外部精度評価への参加希望を取った。

配布結核菌ゲノム DNA のコピー数算出(標準検体の作製): 当研究所と神戸市環境保健研究所で分析を行い、各ローカスのコピー数を算出し、一致することを確認した。

結果報告と分析法の調査: 結果報告用の様式を作成し、実際の分析ローカスや分析手法等の調査も同時に行った。

C. 研究結果

1) 参加希望施設の調査

調査の結果 79 施設の内、54 箇所の施設が本外部精度評価への参加を希望した。当研究所で準備した 3 種類の評価 (EQA) 用結核菌ゲノム DNA を送付した。送付から約 2 か月半で送付施設から型別結果の報告を受け取った。

2) 各施設における VNTR 分析に利用しているローカセット

VNTR 分析システムには、JATA (12)、JATA (15)、ハイパーバリアブル (HV) 及びその他のローサイ (Supply[15]分析システムに含まれる) がある。今回の外部精度保証では最低限 JATA (12) での分析を依頼した。その他に JATA (15) (JATA[12]に追加 3 ローサイ)、HV は 3 ローサイ、他に Supply らの 6 ローサイなどが分析対象ローサイとして想定されるため対応した報告様式を準備した。各分析システムを利用している施設数は、JATA (15)、HV、Supply らのローサイが、それぞれ 37、28、14 であった (図)。HV のローカスは、変化頻度が高く、また高分子 PCR 産物が得られる頻度も高い。そのため分析には困難を伴う。しかし、28 施設 (51.9%、28/54) が型別分析に利用していることがわかった。分析法としては、アガロースゲル電気泳動が 15 施設、次いで自動シークエンサーを用いた

フラグメント解析が 7 施設であった。

3) EQA 株を JATA (12) 分析した場合の正答施設数

各施設で 3 株の QC 株を JATA (12) で分析した場合、全株 12 ローサイ完全正答したのが 36 施設 (66.7%、36/54)、1 ローカス違いが 7 施設 (13.0%、7/54)、2 箇所以上違いが 11 施設 (20.3%、11/54) だった (表)。約 2 割の施設が最もシンプルで分析しやすい JATA (12) においても、2 箇所以上のローサイでコピー数換算等の間違いが生じていることがわかった。

4) PCR 産物のサイズ測定方法

PCR 産物のサイズ測定のための方法として、アガロースゲル電気泳動、フラグメント解析、マイクロチップ電気泳動装置 (マルチナ、島津製作所)、キャピラリー電気泳動装置 (QIAxcel、キアゲン)、キャピラリー電気泳動装置 (コスモアイ、日立製作所) などがあった。今回の調査では、アガロースゲル電気泳動により分析を行っている施設が、37 箇所 (68.5%、37/54) で最も多かった。次いで自動シークエンサーを用いたフラグメント解析が 7 箇所 (13%、7/54)、マルチナと QIAxcel を使っている施設が各 4 施設 (7.4%) であった。また、2 施設 (3.7%) がコスモアイを利用して分析していた。

5) 各分析法と正答率の比較

EQA 用の 3 株を送付し、各 12 ローサイの分析なので $3 \times 12 \times$ (分析施設数) で全回答数を算出して正答数の割合を算出した。アガロースゲルを用いた電気泳動を含めてほとんどの分析法であっても 95%以上の正答率であったが、正答率が 85%以下のキャピラリー電気泳動装置があった。

6) 各ローカスの正答率の比較

分析ローカスごとの正答率を比較すると、どのローカスも 94–100%であった。しかし、VNTR-4052 と VNTR-2163a では、それぞれ 88.9%、76.6%と正答率が低かった。

D. 考察

全国 54 の施設で行われている VNTR 型別法に関する初めての外部精度評価を行った。その結果、得られた PCR 産物のサイズ測定には、68.5%の施設が最もシンプルなアガロースゲル電気泳動を使っていた。また、本分析法は、現時点で最も進んだ技術であると考えられる自動シーケンサーを使ったフラグメント解析法よりも正答率がわずかではあるが高かった。しかしながら、今後は多くの施設がアガロースゲル電気泳動からマイクロチップあるいはキャピラリー電気泳動装置に、あるいはフラグメント解析にシフトしていくと考えられる。正確に分析できる分析システムやコピー数を算出するため、方法及び正答率が低いローカスのプライマーの変更等が必要と考えられる。

E. 結論

国内結核菌型別に用いられている当研究所で樹立した JATA(12)のローカスセットによる 3 株の分析結果比較では、全ローサイ完全一致だったのは 36 施設 (66.7%、36/54) だった。アガロースゲルを用いた電気泳動による分析が最も多く使われており、正答率もこの手法が最も高かった。幾つかのローカスで正答率が低く、増幅効率が悪いことから使用プライマーの変更を含めて再検討する必要がある。

F. 健康危険情報

結核菌株の取扱については、感染症法の基準に適合した実験室内で実施した。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

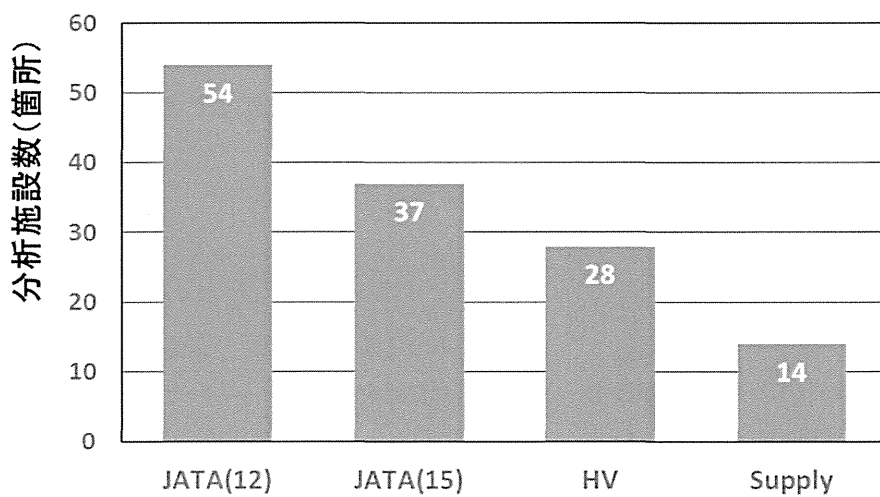


図 VNTR分析システムと報告施設数

表 3株をJATA(12)で分析した場合の正答施設数

	施設数 (54施設中の割合)	
全ローサイ完全一致	36施設	66.7% (36/54)
1ローカス違い	7施設	13.0% (7/54)
2ヶ所以上違い	11施設	20.3% (11/54)

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班
分担研究報告書

動物由来感染症レファレンスセンター 平成26年度活動報告
狂犬病の検査ネットワーク構築と検査系の検証および標準化

研究分担者	森川 茂	獣医科学部長
研究協力者	井上 智	獣医科学部 第二室長
	野口 章	獣医科学部 主任研究官
	奥谷晶子	獣医科学部 主任研究官
	宇田晶彦	獣医科学部 主任研究官
	堀田明豊	獣医科学部 主任研究官
	今岡浩一	獣医科学部 第一室長

研究要旨 平成26年度は、狂犬病のレファレンス機能を向上させるため、動物由来感染症レファレンスセンターに所属している7カ所の地方衛生研究所（地衛研）の協力のもとに17地衛研とレファレンスネットワークを構築して、狂犬病検査について遺伝子検査法の検証をRT-PCRブラインドテストによって行い、抗原検査の標準化を行うために必要となる陽性対照スライドの作製と配布を行った。ブラインドテストでは、国立感染症研究所（感染研）から陽性対照遺伝子と検体を送付して狂犬病検査マニュアル：第2版（感染研の病原体検出マニュアル）に準じた遺伝子診断（RT-PCR）を地衛研で行い、通常使用している機器・試薬等を使用した検査が可能であり、合成した陽性対照遺伝子も配布して使用可能なことを明らかにした。また、本ネットワークの構築によって感染研と地衛研の間でレファレンス機能向上に必要となる検査手技と関連情報の共有および検討すべき課題等が明らかとなりサーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化が期待された。

A. 研究目的

本研究は、動物由来感染症について病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化を行うことが目的である。平成26年度は、狂犬病のレファレンス機能を向上させるため、地方衛生研究所（地衛研）の協力のもとに狂犬病のレファレンスネットワークを構築して狂犬病の検査手法の検証と標準化を行った。

B. 研究方法

1. RT-PCR ブラインドテスト

国立感染症研究所（感染研）から陽性対照遺伝子と検体を送付して、狂犬病検査マニュアル：第2版（感染研の病原体検出マニュアル）に準じた遺伝子診断（RT-PCR）を地衛研において行った後に成績等を取りまとめた。検査では各地衛研で通常使用している機器・試薬等を使用して行った。

※狂犬病検査マニュアル（第2版）
http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/rabies_%2020120608.pdf

地衛研に検体番号（サンプル 1、サンプル 2、サンプル 3）のみを記した 3 本の検体を送付して、RT-PCR を行って頂いた後に、各地衛研の成績と課題等について感染研で取りまとめた。

■送付検体

- ・ 検体 RNA : 3 本（使用時まで室温保存）。
サンプル 1 = 陰性検体
サンプル 2 = 陽性検体
サンプル 3 = 陽性検体（注※）
※ サンプル 3 は、検出感度の高い One step RT-PCR で陽性となり、Two step RT-PCR で陰性となる RNA 濃度を配布（感染研で使用した機器・試薬での成績）。
- ・ Positive control RNA : 1 本（使用時まで室温保存）。
- ・ プライマー : 9 本（10g、304、JW12(C)、JW12(T)、JW6(DPL)、JW6(E)、JW6(M)、N7(C)、N7(T)）(100pmol/ul in TE)。

検体 RNA :

- ・ 陽性検体 : 狂犬病ウイルス固定毒 (CVS-11 株) を感染させたマウス脳由来の抽出 RNA + 犬脳由来の抽出 RNA を使用。
- ・ 陰性検体 : 犬脳由来の抽出 RNA を使用。
- ・ Positive control RNA : RT-PCR の標的遺伝子を組み込んだプラスミド (pGEM-T Easy Posicont) を利用して、当該遺伝子の RNA 増幅後に DNaseI 処理を行ってから抽出した RNA を使用。

※ RNA は、RNAstable tube (Biomatrix) に分注後に、スピードバックで乾燥して室温で送付。検査まで、室温にて遮光・乾燥状態で保存可能。

※ 使用方法 : 狂犬病検査マニュアル (第 2

版) を参照。

- ① Positive control を含む全ての検体は 40 ul の DNase・RNase Free DW で溶解。
- ② One step RT-PCR : プライマーに N7(mix) と JW6(mix) を使用。検体 RNA は原液の 10ul を使用。Positive control RNA は原液を DNase, RNase Free DW で 10^{-5} に希釈して、その 10ul を使用。
- ③ Two step RT-PCR : RT プライマーに JW12(mix)、PCR プライマーに 10g と 304 を使用。RT には RNA 原液の 10ul を使用。

2. 直接蛍光抗体法の陽性対照スライド

狂犬病が疑われた動物の確定診断では、脳の塗抹標本を作製して直接蛍光抗体法によってウイルス抗原の検出を行う。現在、狂犬病ウイルスは感染症法で三種病原体に指定されており、ウイルス株を持たない地衛研では検査に必要となる陽性対照スライドを作成することができない。

そこで、感染症法で三種病原体の規制除外病原体（人を発病させるおそれがほとんどないものとして厚生労働大臣が指定）とされた狂犬病ウイルス固定毒 HEP 株を使用して陽性対照スライドを作製し、動物由来感染症レファレンスセンターに配布した。

C. 研究結果

1. RT-PCR ブラインドテストの結果

One step RT-PCR (図 1) :

- ・ K 地衛研のサンプル 2 と N 地衛研の陽性対照 RNA 以外は、全て感染研と同じ結果が得られた。
- ・ K 地衛研で陽性検体が陰性となったが、

- 追試を行うことによって陽性となった。
- ・ N地衛研で使用した陽性対照 RNA が陰性となったが、使用濃度を調整することで陽性となった。

Two step RT-PCR (図 2) :

- ・ F 地衛研のサンプル 3 と K 地衛研のサンプル 2 以外は、全て感染研と同じ結果が得られた。
- ・ F 地衛研で 2 種類の RT 試薬を使用したところサンプル 3 の検出感度が異なった。
- ・ K 施設で陽性検体が陰性となったが、追試を行うことによって陽性となった。使用した試薬と反応条件が異なっていた。

使用したサーマルサイクラー :

感染研 : ASTEC GeneAtlas

A : TaKaRa PCR

Termal cycler Dice Model TP600

B : ABI 2720 Thermal Cycler

C : BIO RAD

D : ABI GeneAmpPCR System 9700

E : ABI GeneAmpPCR System 9700

F : BIO-RAD My Cycler

G : Bio-Rad C1000 / S1000

H : ABI Veriti Thermal Cycler

I : ABI GeneAmp PCR System 9700

J : ABI veriti Thermal Cycler

K : ABI

L : ABI GeneAmp PCR System 9700

M : ASTEC PC-818-02

N : ABI GeneAmpPCR System 9700

O : ABI GeneAmp PCR System 9700

P : TaKaRa TP-600

One step RT-PCR の反応条件 (図 3) :

- ・ K 地衛研のみ異なる試薬と反応条件で

RT-PCR が行われた。

- ・ 4 地衛研で PCR 反応が半量 (25ul) であった。

2. 直接蛍光抗体法の陽性対照スライド

狂犬病ウイルス固定毒 HEP 株を脳内接種したサックリングマウスの脳をガンマ線照射することによって塗抹組織内の感染性ウイルスを検出限界以下 (10FFU) に不活化することができた。また、ガンマ線照射された脳組織で作成した塗抹スライドを、アセトン固定処理した後に陽性対照スライドに使用することとした。

スライドの取り扱いについて

- ・ 受け取り後、検査に使用するまで冷凍庫にて保存してください (-80°C、なければ可能な範囲で低温の冷凍庫)。
- ・ 冷凍庫からスライドグラスを取り出して 5-10 分・室温で風乾 → 25 倍希釈した FITC 標識抗体 (1%エバンスブルーを 500 倍希釈で添加して使用) をスライドの塗抹ウェルに約 100ul 重層 → 湿潤箱内で室温・暗所 30 分反応 → PBS(-)で洗浄 → DW で脱塩 → 風乾 → 封入剤を使用してカバーグラスで封入 → 蛍光顕微鏡観察 (残りの FITC 標識抗体原液は遮光・凍結保存で長期保存可能) 使用方法の詳細は狂犬病検査マニュアル (第 2 版) を参照。
- ・ スライドグラスには使用した脳材料と作成日等が記載してあり、ロット管理等を可能にしている。

D. 考察

我が国同様に狂犬病清浄を半世紀にわたり維持してきた台湾で、かなり前から野生動物 (イタチアナグマ) に狂犬病が侵淫し