

増殖培地、維持培地の作成

MEM 培地作成記録用紙

作成日: _____ 作成者: _____

作成量(容量 x 本数): _____ ml x _____ 本

作成
イーグル MEM 培地「ニッスイ」①粉末 (以下イーグル MEM 培地)

Lot No. : _____

以下の表に従って必要量を測り取り混合する。

作成する量に○	作成する MEM 培地の量 (蒸留水の量)	イーグル MEM 培地の必要量	作成した本数 (例 500ml X 4 本)
	1L	9.4g	
	2L	18.8g	
	3L	28.2g	
	4L	37.6g	

オートクレーブ滅菌する (121℃ 15 分)。(時間: _____ ~ _____)

密栓して、冷蔵庫 (2~10℃) に保存

作成日: _____ 作成者: _____

増殖培地

作成する増殖培地 (保管ボトル容量 x 本数): _____ mL x _____ 本

安全キャビネット内で以下の試薬を加える

作成する量に○	容量	7.5%炭酸水素ナトリウム溶液	200mM グルタミン溶液	牛胎児血清	ペニシリン/ストレプトマイシン
	200mL	3.3ml	2.2ml	20ml	0.22ml
	500ml	8.25ml	5.5ml	50ml	0.55ml

維持培地

作成する維持培地 (本数): _____ L(_____ 本)

安全キャビネット内で以下の試薬を加える

作成する量に○	容量	7.5%炭酸水素ナトリウム溶液	200mM グルタミン溶液	牛胎児血清	ペニシリン/ストレプトマイシン
	200mL	5.5ml	2.1ml	4.4ml	0.21ml
	500ml	13.75ml	5.25ml	11ml	0.525ml

添加日時: _____ 添加実施者: _____

試薬添加後は直ちに冷蔵庫で保存する。

試薬等管理標準作業書

SOP No. XXXX

項目 試薬等の調整

適用 ウイルス検査に使用する細胞の継代

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作成者 ○○課 氏名

承認者 氏名
(検査部門責任者)

発効日 平成 年 月 日

○○○研究所
○○課

細胞の継代標準作業書

- 1 検査の項目**
培養細胞の継代 (接着細胞)。
- 2 試薬品の種類**
実験室内において使用している細胞。
- 6 検査等に用いる試薬**
- ① PBS(-)
 - ② Trypsin-EDTA (0.05%)
 - ③ イーグルMEM 培地(10%FBS)
 - ④ トリパンブルー染色液
- 7 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 (機械器具保守 SOP No.)
 - ② メスビベット
 - ③ オートピペッター
 - ④ マイクロピペット
 - 2) 器材
 - ① 細胞培養フラスコ(75cm²)
 - ② 顕微鏡 (機械器具保守 SOP No.)
 - ③ チップ(p=100用)
 - ④ 1.5ml エッペンチューブ
 - ⑤ ビルゲルチュルク血球計算盤
 - ⑥ カウンター
- 8 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) 細胞の計数以外の作業はすべて安全キャビネット内で行うこと
 - 3) 細胞のクロスコンタミネーションを避けるため、細胞ごとに培地は用意し、作業は同時に行わないこと。

試薬管理標準作業書
[細胞の継代]

	年 月 日	作成・改訂者	承認者	改訂理由
作成	平成 年 月 日			
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				

○○○研究所
○○課

9 細胞継代

1. 細胞の状態を観察する。90%程度コンフルエントのものを用いる。細胞や真菌のコンタミネーションが認められるものは使用せず廃棄する。
2. PBS(-)で細胞を3回洗浄する。
3. Trypsin/EDTAを3ml加え、細胞表面に均一に分散させる。Trypsin/EDTAを取り除く。
4. Trypsin/EDTAを1ml加え、細胞全体にいきわたらせる。トリプシン溶液は細胞に直接かからないよう、壁をはわすように静かに加える。
5. 37℃のインキュベーターに5分程度静置。
6. 細胞を顕微鏡で観察し、細胞がはがれていることを確認する。はがれていない場合にはインキュベーターでの静置時間を延長する。
7. イーグルMEM 培地(10%FBS)を10ml加え、泡立たないよう優しくピペッティングし、single cellにする。
8. 7.の増殖培地細胞数をコップエンチューブに100 μlとり、等量のトリパンブルーで染色、生細胞数を計測し、細胞密度を計算する。計数中細胞は冷蔵庫に入れておく。
9. 新しいフラスコに移す。(目安量1-2×10⁶個/ml、25ml、75cm²フラスコ)
 - (1) 目的量の培地を新しいフラスコに入れる。
 - (2) 目安量となるように細胞懸液を新しいフラスコに加える。
 - (3) 以下を明記する。
 - i 自分の名前
 - ii 細胞の名前
 - iii 日付
 - iv 継代数(継代毎に1代ずつ数を増やす)
10. 蓋をしっかりと閉め、37℃のインキュベーターに静置。

培養細胞の継代記録用紙

実施日： _____ 実施者： _____

使用細胞： _____

使用培地 (MEM) Lot No _____
 (自家製の場合で作成記録がある場合は Lot No 記載不要、作成日： _____)

PBS(-) Lot No _____
 (自家製の場合で作成記録がある場合は Lot No 記載不要、作成日： _____)

Trypsin-EDTA (0. 05%) Lot No _____

トリパンブルー染色液 Lot No _____

継代 (開始時間： _____)

継代する細胞が 90% 程度のコンフルエントかどうか顕微鏡で確認する。

細胞名： _____ 継代可能? yes 、No

細胞名： _____ 継代可能? yes 、No

細胞名： _____ 継代可能? yes 、No

細胞名： _____ 継代可能? yes 、No

細胞名： _____ 継代可能? yes 、No

PBS(-) で細胞を 3 回洗浄する。

Trypsin/EDTA を 3ml 加え、細胞表面に均一に分散させる、Trypsin/EDTA を取り除く。

Trypsin/EDTA を 1ml 加え、細胞全体にきわたらせる。

↓
 37℃ のインキュベーターに 5 分程度静置する。
 (時間： _____ ~ _____)

↓
 細胞を顕微鏡で観察し、細胞がはがれていることを確認する。はがれていない場合にはインキュベーターでの静置時間を延長する。

↓
 イーグル MEM 培地 (0% FBS) を 10ml 加え、泡立たないように優しくピペティングし、single cell にする。

↓
 増殖培地細胞数をエッペンチューブに 100 μ l とり、毎量のトリパンブルーで染色、生細胞数を計測し、細胞密度を計算する。計数中細胞は冷蔵庫に入れておく。

細胞名	実測数	細胞密度	希釈

↓
 目的量の培地を新しいフラスコに入れ、冷蔵庫の細胞洗浄液を加える。

- フラスコには以下を明記する。
- i 自分の名前
 - ii 細胞の名前
 - iii 日付
 - iv 継代数 (継代毎に 1 代ずつ数を増やす)

↓
 37℃ の CO₂ インキュベーターで培養する。

終了時間： _____

培養細胞管理標準作業書

試薬管理標準作業書
【細胞の凍結保存】

SDP No. Δ-1

実施項目 細胞の凍結保存

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 ○○××

承認者 Δ△□□
(検査部門責任者)

失効日 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	○○××	△△□□	
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 1 0 回改訂				

○県保健環境研究所
保健科学部 ウイルス課

○県保健環境研究所
保健科学部 ウイルス課

細胞の凍結保存標準作業書

1 目的および適用範囲

実験室内で使用している細胞について凍結保存方法の基準を定め、試験等の信頼性確保を図ることを目的とする。

2 必要な試薬および器具・機材

- ・CELLBANKER® 1plus または CELLBANKER® 1 (日本全薬工業株式会社) (同等品)
- ・PBS (-)
- ・トリプシン-EDTA 液
- ・細胞増殖培地 (10%FBS 加 MEM) (作成については標準手順書「培地作成」を参照)
- ・滅菌チューブ (15ml 容量)
- ・血球計算盤
- ・マイクロピペット、チップ
- ・クライオチューブ (1.8ml 容量)
- ・炭酸ガス培養装置 (機械器具保守 SOP No.)
- ・倒立顕微鏡 (機械器具保守 SOP No.)
- ・遠心分離機 (1,000rpm) (機械器具保守 SOP No.)
- ・ディープフリーザー (-80℃) (機械器具保守 SOP No.) (あるいは液体窒素容器)

3 操作法

- ① 細胞汚染の有無や細胞の状態を確認する。80~90%コンフルエント状態の細胞が望ましい。
- ② 培養フラスコ内の培地を捨て、5ml の PBS (-) で細胞を洗浄する操作を 2 回行う。
- ③ トリプシン-EDTA 液を 5ml 加え細胞を浸漬後トリプシン溶液は捨てる。
- ④ 37℃の炭酸ガス培養装置に入れ、静置する。
- ⑤ 細胞が円形になり剥離してきたら 10ml の細胞増殖培地を加え、ピペティングにより細胞を懸濁させる。
- ⑥ 細胞懸濁液の一部を取り、等量のトリプブルー溶液と混合し血球計算盤で生細胞数を計測する。
- ⑦ 細胞懸濁液を 1,000rpm、5 分遠心し、上清を捨てる。
- ⑧ $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^8$ 個の細胞に対し 1ml の割合で CELLBANKER® を加え優しくピペティングする。
- ⑨ 細胞懸濁液をクライオチューブ(予め、以下の情報を記載しておく)に 1ml ずつ分注する。
1. 細胞名、2. 継代数、3. 凍結年月日
また、保存した細胞の情報を記録簿に記す。
- ⑩ クライオチューブを-80℃のディープフリーザーに入れ凍結する (あるいは液体窒素容器へ)。
- ⑪ 後日、保存した細胞を用いて再起することを確認すると良い。

凍結細胞記録簿

No.	凍結年月日	細胞名	由来	実施者	保存場所	再起培養年月日	備考
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							

細胞の凍結保存記録用紙

実施日： _____ 実施者： _____

使用細胞： _____

使用培地 (MEM) Lot No _____
(自家製の場合で作成記録がある場合は Lot. No. 記載不要、作成日： _____)

FBS (-) Lot. No _____
(自家製の場合で作成記録がある場合は Lot. No. 記載不要、作成日： _____)

Trypsin-EDTA(0.05%) Lot. No _____

トリパンブルー染色液 Lot. No _____

保存 (開始時間： _____)
 保存する細胞が 90%程度のコンプラセントかどうか顕微鏡で確認する。

細胞名： _____ 保存可能? yes , No

細胞名： _____ 保存可能? yes , No

細胞名： _____ 保存可能? yes , No

細胞名： _____ 保存可能? yes , No

細胞名： _____ 保存可能? yes , No

- PBS(-)で細胞を 2 回洗浄する。
- Trypsin/EDTA を 5ml 加え、細胞表面に均一に分散させる。Trypsin/EDTA を取り除く。
- 37℃のインキュベーターに 5 分程度静置する。
(時間： _____)
- 細胞を顕微鏡で観察し、細胞がはがれていることを確認する。はがれていない場合にはインキュベーターでの静置時間を延長する。

イーグルMEM 培地(10%FBS)を 10ml 加え、泡立たないよう優しくピペティングし、single cell にする。

増殖培地細胞数をエッペンチューブに 100 μ l とり、等量のトリパンブルーで染色、生細胞数を計測し、細胞密度を計算する。計数中細胞は冷蔵庫に入れておく。

細胞名	実測数	トータル細胞数	CELLBANKER®添加量

- 細胞懸濁液を 1,000rpm、5 分遠心し、上清を捨てる。
(時間： _____)
- $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 個の細胞に対し 1 ml の割合で CELLBANKER® を加え優しくピペティングする。
- 細胞懸濁液をクライオチューブ(予め、以下の情報を記載しておく)に 1ml ずつ分注する。
i 細胞名
ii 継代数
iii 保存年月日
- 80℃のディープフリーザーに入れ凍結する。

終了時間： _____

試薬管理標準作業書
[細胞の再起培養]

培養細胞管理標準作業書

SCP No. Δ -1

実施項目 細胞の再起培養

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 ○○××

承認者 $\Delta\Delta\Box\Box$
(検査部門責任者)

失効日 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	○○××	$\Delta\Delta\Box\Box$	
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				

○県保健環境研究所

保健科学部 ウイルス課

○県保健環境研究所
保健科学部 ウイルス課

細胞の再起培養標準作業書

細胞の再起記録用紙

1 目的および適用範囲

凍結保存している細胞について再起培養方法の基準を定め、試験等の信頼性確保を図ることを目的とする。

2 必要な試薬および器具・機械

- ・細胞増殖培地 (培地作成については、標準手順書「培地作成」を参照 SOP No.)
- ・70%アルコール綿
- ・滅菌チューブ (15ml 容量)
- ・培養フラスコ (75cm²)
- ・恒温水槽 (37℃)
- ・遠心分離機 (1,000rpm) (機械器具保守 SOP No.)
- ・炭酸ガス培養装置 (機械器具保守 SOP No.)
- ・倒立顕微鏡 (機械器具保守 SOP No.)

3 操作法

- ① 保存されているクライオチューブを取り出し、直ちに37℃の恒温水槽で振盪し素早く融解させる。
- ② クライオチューブの外側を70%アルコール綿で拭く。
- ③ 保存していた細胞懸濁液を10mlの細胞増殖培地が入った15mlチューブに移し混和する。
- ④ 1,000rpm、5分遠心分離し、上清を捨てる。
- ⑤ 5mlの細胞増殖培地を加え細胞を再懸濁する。
- ⑥ 培養フラスコに細胞懸濁液を全量移し、細胞増殖培地15mlを加える。
- ⑦ 培養フラスコに以下の情報を記入する。
 1. 実施者 2. 細胞名 3. 実施日 4. 継代歴
- ⑧ 炭酸ガス培養装置に入れ37℃、5%二酸化炭素下で1晩培養する。
- ⑨ 翌日、細胞の定着状態を確認し、培地を新しい細胞増殖培地に交換する。定着細胞が少ない場合は再度再起培養を行う。

□炭酸ガス培養装置に入れ37℃、5%二酸化炭素下で1晩培養する。
↓ (時間 : :)

□翌日、細胞の定着状態を確認し、培地を新しい細胞増殖培地に交換する。定着細胞が少ない場合は再度再起培養を行う。

終了確認日時 :

実施日 : _____ 実施者 : _____

再起細胞 : _____ 保存年月日 : _____ 継代数 : _____

再起細胞 : _____ 保存年月日 : _____ 継代数 : _____

再起細胞 : _____ 保存年月日 : _____ 継代数 : _____

再起細胞 : _____ 保存年月日 : _____ 継代数 : _____

使用培地 (MEM) Lot No. _____
(自家製の場合で作成記録がある場合は Lot No. 記載不要、作成日 : _____)

PES(-) Lot No. _____
(自家製の場合で作成記録がある場合は Lot No. 記載不要、作成日 : _____)

- 再起 (開始時間 : :)
- 保存されているクライオチューブを取り出し、直ちに37℃の恒温水槽で振盪し素早く融解させる。
- ↓
- クライオチューブの外側を70%アルコール綿で拭く。
- ↓
- 保存していた細胞懸濁液を10mlの細胞増殖培地が入った15mlチューブに移し混和する。
- ↓
- 1,000rpm、5分遠心分離し、上清を捨てる
(時間 : : ~ : :)
- ↓
- 5mlの細胞増殖培地を加え細胞を再懸濁する。
- ↓
- 培養フラスコに細胞懸濁液を全量移し、細胞増殖培地15mlを加える。
- ↓
- 培養フラスコに以下の情報を記入する。
- i 自分の名前
 - ii 細胞の名前
 - iii 日付
 - iv 継代数

病原体検査標準作業書(ひな形)

SCOP No XXX

検査項目 ポリオウイルス分離試験

検体の種類 糞便、咽頭ぬぐい液、髄液

検査法 培養細胞によるウイルス分離

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作成者

承認者
(検査部門責任者)

	年月日	作成・改訂者	承認者	改訂理由
作成	平成 年 月 日			
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				

〇〇〇〇研究所
〇〇部 〇〇課

病原体検査標準作業書

ポリオウイルス分離検査標準作業書

- 検査の項目
ポリオウイルス分離検査
 - 検体の種類
糞便、咽頭ぬぐい液、髄液
 - 検査法
原理：培養細胞によるウイルス分離
- 出典：
- ポリオ実験室マニュアル第4版 World Health Organization. Polio laboratory manual 4th edition, WHO/IVB/04.10, page 73-79, 2004
 - ポリオウイルスの分離の変更 第4版の補足
S1. Supplement to the WHO Polio Laboratory Manual. An alternative test algorithm for poliovirus isolation and characterization
http://apps.who.int/immunization_monitoring/Supplement_polio_lab_manual.pdf
 - ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル
- 検体等の取り扱い
「検体、病原体取扱標準作業手順書*」(別に定める)に基づき扱う。
- 4-1 受付から検査まで
なおウイルス材料の保管・輸送中の凍結・融解の繰り返しはウイルス力価が低下するので避けなければならない。-20℃での保管・輸送が確保できなければ、0-8℃で保管・輸送する。輸送にあたっては冷却が保たれる状態で包装し、検体送付書には検査者の氏名、年齢、ワクチン歴、発病日、検体採取日、検体種別など必要事項を記入のうえ送付する。検体容器には検体種別を明記すること、ポリオウイルスは-20℃以下で長期保存できる。
- 4-2 検査終了後
糞便など臨床検体は検査終了後-20度以下で少なくとも3か月間保存しなければならない。保管した臨床材料、乳剤、分離株を廃棄した場合は、保管台帳に記録すること。WHO ポリオ根絶計画の進捗とともに、施設に長期保存する必要性はなくなるため、不要な分離株はバイオセーフティ規則により、廃棄することが望ましい。

「検体、病原体取扱標準作業手順書」は他の病原体にも利用可能なように汎用性の有るも

のを指定する。

- 検査に用いる試薬等
試薬
抗生物質を高濃度(ペニシリン500U/ml, ストレプトマイシン500μg/ml)含むPBS (+)、クロロホルム、
細胞増殖培養液 (10%FBS 含 MEM)
細胞維持培養液 (2%FBS 含 MEM)
RD-A 細胞、L20B 細胞 (ポリオウイルス受容体を発現しているマウスL細胞)
- ※増殖作製については、「増殖作製標準作業書」(番号XXX)を参照すること。
※細胞の維持管理については、「培養細胞標準作業書」(番号XXX)を参照すること。
- 検査に用いる機器・器具及び器材
1) 機器・器具
ふ卵器あるいは脱酸ガス培養装置 (名称、メーカー名、設置している部屋番号、機器番号)
顕微鏡 (名称、メーカー名、設置している部屋番号、機器番号)
ボルテックスミキサー (名称、メーカー名)
糞便処理用シェーカー (名称、メーカー名)
マイクロビペット(P1000)
マイクロビペット(P200)、
ピペッター
試験管立て
冷凍庫 (名称、メーカー名、設置している部屋番号、機器番号)
冷蔵庫 (部屋番号、機器番号)
バイオハザード対応冷却离心分離機 (名称、メーカー名、設置している部屋番号、機器番号)
 - 器材
50ml 滅菌チューブ
培養チューブ 3ml (例: Thermo Scientific 156758)
フィルター付き滅菌チップ (p-200 用, p-1000 用)
ウイルス希釈用滅菌済み綿付き長チップ (~200μl)
メスピペット
捨て缶
 - 機器点検・消耗品管理

使用する機器は機器保守点検標準作業書に基づき、維持管理を行わなければならない。

炭酸ガス培養装置、冷凍庫、冷蔵庫は「機器保守管理標準作業書」(番号:XXX-YYY)に基づき温度管理を行うこと。

バイオハザード対応冷却离心分離機、クラスIIA/B 安全キャビネット、高圧洗浄装置は「機器保守管理標準作業書」(番号:XXX-YYY)に基づき保守管理を行うこと。

7 作業環境、操作上の注意

通常の実験室では複数の検体を処理する機会が多いと思われる。他の病原体の混入をさけるためにも、あるいは実験者への感染を防ぐためにも、検体の取り扱いには十分注意を払わなければならない。

- 1) 作業中は必ずマスク及びガウン、使い捨ての手袋を着用する。
- 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
細胞の培養	無菌室(細胞培養室)
検体接種	BSL2:病原体取扱室
CPEの観察	BSL2:病原体取扱室

- 4) 分離、同定の作業の際はクラス2の安全キャビネットを使用のこと。
- 5) ポリオウイルスあるいはポリオウイルスを含む可能性のある検体等を取扱う場合には、事前にポリオワクチンを接種する。
- 6) ポリオウイルスの分離(同定)に際して感染細胞の保温は37℃を越えないように注意する。生ワクチンに使われているセービン株は温度感受性であること、また分離中のウイルス変異を極力さけることなどを考慮すること。
- 7) 作業工程の操作は、検査工程管理チェックシートで確認する。

8 検査法の手順

1) 検体の前処理

糞便

10%糞便乳剤の作製

- ① 50 ml のポリプロピレン製の遠心管に、糞便約 2g、抗生物質を含んだPBS(+) 10 ml、クロホルム 1ml を加える。
- ② 20 分間激しく撹拌の後、8,000 rpm 20 分遠心する。

③ 上清を新しいストックチューブにとり、ウイルス分離に用いる。

糞便以外の検体の処理

咽拭い液の調整は液量検定で局所をゆぐい、直に細胞培養液に混して感染し、2時間ほど液に露出させる。それを良く撹拌した後遠心し、その上清が検査材料となる。懸液はそのまま細胞に接種できる。

2) ウイルス分離

接種と観察

- ① ポリオウイルス分離には最小限 RD-A と L20B の 2 種類の細胞を原則として使い、検体・ウイルス分離株の混入を避けるためウイルス分離には培養チューブを使用。一検体あたり各細胞 2 本ずつ使用する。また陰性対照の培養チューブも用意する。
- ② 1) で用意した糞便抽出液の 200µl を各細胞に接種する (RD-A:2 本、L20B:2 本)。
- ③ 35℃で培養し 5 日間観察する。5 日間観察して CPE が現れない時は別の新しい細胞に継代し、更に 5 日間観察する。計 10 日間観察して CPE が現われなければ、ウイルス分離陰性とする。
- ④ 完全な CPE が現われたら、培養液を-20℃に保存する。
- ⑤ RD-A で分離したウイルスは必ず L20B 細胞に再接種する。

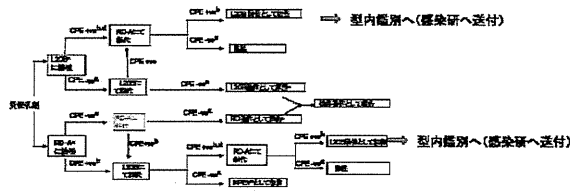
細胞毒性

接種後 24 時間以内に CPE が現われたら、糞便抽出物による非特異的細胞毒性の可能性が高い。新しい細胞にその培養液を 200µl 接種し観察を続ける。初代ウイルスと思われたものでも 2 代目の継代で CPE が現われなければ、糞便抽出物による非特異的変化と考えると良い。計 10 日の観察で分離の結果を判定する。

その他

L20B 以外の細胞でウイルスが分離できたら必ず、L20B 細胞に再接種しポリオウイルスの有無を調べる必要がある(図1)。L20B 細胞はポリオウイルスだけに感受性のある細胞であり、エンテロウイルスとポリオウイルスが混在する時に非常に便利である。稀に L20B 細胞でアデノウイルスやレオウイルス、非ポリオエンテロウイルスが分離される場合があるが、ポリオウイルスとの力価の違いや CPE の形状により区別できることが多い。

ポリオウイルス分離の流れ(WHOマニュアルより)



連絡先: 国立感染症研究所ウイルス第二部第二室
住所: 〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1
電話番号: 042-661-0771

分離の結果次のパターンのもは、ポリオウイルスである可能性がある
RD-A(+)-L20B(+)-RD-A(+)
L20B(+)-RD-A(+)

このため速やかに感染症ウイルス第二部に送付する(通知参照検討中)。

9) ウイルス分離後の対応

- 上記のプロシーに基づき RD-A および L20B で分離されたウイルスはポリオウイルスである可能性が高い。現在、分離株は WHO 標準法であるリアルタイム PCR 法にてポリオウイルスかどうかの確認と、Sabin 株あるいは非 Sabin 株の型内鑑別を同時に行う手法が導入されている。型内鑑別で非 Sabin 株と判定された場合は、さらに VP1 全領域の塩基配列解析を実施し、WHOへ報告する流れである。
- 型内鑑別、塩基配列の検査・報告は WHO による認定ラボ(日本は感染症ウイルス第二部)が、あらかじめ指定されているため、ウイルス分離後は行政検査として直ちに感染症研へ送付する。
- 地方衛生研究所で、感染症研での行政検査と平行して、「ポリオウイルス感染症の臨床診断マニュアル」に基づき塩基配列に基づく同定を行うことができるが、この場合は必ず SOP を作成することが望ましい。
- ウイルス分離、同定後の行政対応は通知に基づく(検討中)
- 国立感染症研究所にはあらかじめ検体数、搬入予定などを連絡。ポリオ陽性患者から分離されたポリオウイルスや、流行予測事業等で分離され、行政検査が必要な場合は国立感染症研究所ウイルス第二部第二室(東京都武蔵村山市学園 4-7-1)に送り、型内株鑑別(リアルタイム PCR 法による鑑別試験と VP1 塩基配列解析)を依頼する。
- 病原体等の輸送・運搬に際しては、輸送中の安全を確保し輸送業者に安心して運搬していただくため、適切な梱包および輸送方法等に留意する。

ポリオウイルス分離検査記録用紙

実施日: _____ 実施者: _____

使用細胞(継代数): L20B (P) _____ 調整日: _____

使用細胞(継代数): RD-A (P) _____ 調整日: _____

検体番号: _____ 投入日: _____ 種類: 咽頭ぬぐい液 ・ 糞便 ・ 髄液

検体番号: _____ 投入日: _____ 種類: 咽頭ぬぐい液 ・ 糞便 ・ 髄液

検体番号: _____ 投入日: _____ 種類: 咽頭ぬぐい液 ・ 糞便 ・ 髄液

検体処理 (糞便)

50 ml のポリプロピレン製の遠心管に、糞便約 2g、抗生物質を含んだ FBS (+) 10 ml、クロロホルム 1ml を加える。

20 分間激しく攪拌の後、3,000 rpm 20 分遠心する。

↓ (時間 : _____ ~ _____ : _____)

上清を新しいストックチューブにとり糞便抽出液とし、ウイルスの分離に用いる。

検体処理 (咽頭ぬぐい液)

ぬぐった綿棒が培養液中に有れば取り除く。

3,000 rpm 20 分遠心する。(時間 : _____ ~ _____ : _____)

上清を新しいストックチューブにとり、ウイルスの分離に用いる。

ウイルス分離

ポリオウイルス分離には RD-A と L20B の 2 種類を原則として使い、検体相互の混入を避けるためウイルス分離には培養チューブを使用、各細胞 2 本ずつ使用する。また陰性対照の培養チューブも用意する。

↓

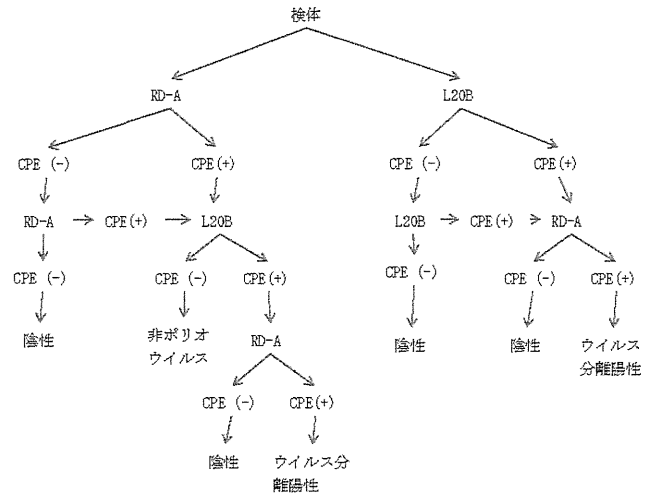
単層になった細胞の増殖培養液を捨て、1ml の維持培養液にかえる。

↓
 検体処理を行ったもの 200 μl を各細胞に接種する (RD-A:2 本、L20B:2 本)。

↓
 38°C で培養し 5 日間観察する。5 日間観察して CPE が現れない時は別の新しい細胞に継代し、更に 5 日間観察する。計 10 日間観察して CPE が現れなければ、ウイルス分離陰性とする。

↓
 完全な CPE が現れたら、培養液を -20°C に保存する。

↓
 RD-A で分離したウイルスは必ず L20B 細胞に接種する、L20B で分離したウイルスは RD-A に接種する。



RD-A細胞を用いたウイルス分離

検体受付日 _____ 試料調製日 _____
 初代接種日 _____ 2代目接種日 _____

検体番号	培養 チュー ブNo.	初代	2代目	L20Bによる分離					L20Bから RD-Aへの 再接種*	判定結果と日付	
		(用いるRD-Aの継代歴P=) 観察日	(用いるRD-Aの継代歴P=) 観察日	(用いるL20Bの継代歴P=) 観察日	1	2	3	4		5	結果と日付
	1										
	2										
	3										
	4										
	5										
	6										
陰性対照	7										
	8										

最終判定は、R-R-, R+L+R+の様に記載 *RD+をL20B+の時は、再度RDに接種し、CPEを確認。分離したウイルスをITDに用いる。
 CPEが観察されたものは“+”～“++++”、CPEが観察されないものは“-”と記載する。

サンプル調製者: _____ 観察者: _____ 最終判定者(日付): _____

L20B細胞を用いたウイルス分離

検体受付日 _____ 試料調製日 _____
 初代接種日 _____ 2代目接種日 _____

検体番号	培養 チュー ブ番号	初代	2代目	RD-A細胞による分離					最終判定結果と日付		
		(用いるL20Bの継代歴P=) 観察日	(用いるL20Bの継代歴P=) 観察日	(用いるRD-Aの継代歴P=) 観察日	1	2	3	4	5	結果と日付	備考
	1										
	2										
	3										
	4										
	5										
	6										
陰性対照	7										
	8										

最終判定は、L-L-, L+R+の様に記載
 CPEが観察されたものは“+”～“++++”、CPEが観察されないものは“-”と記載する。

サンプル調製者: _____ 観察者: _____ 最終判定者(日付): _____

(記入例) RD-A細胞を用いたウイルス分離

検体受付日 2015/4/1 試料調製日 2015/4/1
 初代接種日 2015/4/1 2代目接種日 2015/4/5

検体番号	培養 チュー	初代 (用いるRD-Aの継代歴P=8) 観察日					2代目 (用いるRD-Aの継代歴P=9) 観察日					L20Bによる分離 (用いるL20Bの継代歴P=9) 観察日	L20Bから RD-Aへの 再接種*	判定結果と日付		
		1 1.Apr	2 2.Apr	3 3.Apr	4 4.Apr	5 5.Apr	1 6.Apr	2 7.Apr	3	4	5			1 8.Apr	2	3
A-1	1	-	-	-	-	+	+	4+	(2本ともCPEが出たとき はまとめてよい)			4+	4+		R+L+R+ (9.Apr.)	
	2	-	-	-	-	-	+	4+								
	3															
	4															
	5															
	6															
陰性対照	7															
	8															

最終判定は、R-R-, R+L+R+の様に記載 *RD+をL20B+の時は、再度RDに接種し、CPEを確認。分離したウイルスをITDに用いる。
 CPEが観察されたものは“+”～“++++”、CPEが観察されないものは“-”と記載する。

サンプル調製者: _____ 観察者: _____ 最終判定者(日付): _____

L20B細胞を用いたウイルス分離

検体受付日 2015/4/1 試料調製日 2015/4/1
 初代接種日 2015/4/1 2代目接種日 2015/4/5

検体番号	培養 チュー	初代 (用いるL20Bの継代歴P= 8) 観察日					2代目 (用いるL20Bの継代歴P= 9) 観察日					RD-A細胞による分離 (用いるRD-Aの継代歴P= 9) 観察日	最終判定結果と日付			
		1 1.Apr	2 2.Apr	3 3.Apr	4 4.Apr	5 5.Apr	1 6.Apr	2 7.Apr	3	4	5		1 8.Apr	2	3	4
A-1	1	-	-	-	-	-	+	4+	(2本ともCPEが出たとき はまとめてよい)			4+			L+R+ (8.Apr)	
	2	-	-	-	-	-	+	4+								
	3															
	4															
	5															
	6															
陰性対照	7															
	8															

最終判定は、L-L-, L+R+の様に記載
 CPEが観察されたものは“+”～“++++”、CPEが観察されないものは“-”と記載する。

サンプル調製者: _____ 観察者: _____ 最終判定者(日付): _____

検体番号	最終判定	要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性	判定日	(所内同定実施日*)	(結果*)	感染研への送付日	感染研からの結果戻り	最終結果と判定日
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						

最終判定者(日付):

(記載例)

検体番号	最終判定	要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性	判定日	(所内同定実施日*)	(結果*)	感染研への送付日	感染研からの結果戻り	最終結果
A001	L+R+L+	○ 要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性	2015.08.01	2015.08.02	ポリオ1型	2015.08.02	2015.08.05 Sabin 1	2015.08.05 Sabin 1
	L+R+	○ 要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性	2015.08.01	2015.08.02	ポリオ1型	2015.08.02	2015.08.05 Sabin 1	
A002	R+L-	要型内鑑別 ○	非ポリオウイルス	陰性	2015.08.03					2015.08.03 非ポリオウイルス
	L-L-	要型内鑑別	非ポリオウイルス ○	陰性	2015.08.03					
A003	R-R-	要型内鑑別	非ポリオウイルス ○	陰性	2015.08.03					2015.08.03 陰性
	L-L-	要型内鑑別	非ポリオウイルス ○	陰性	2015.08.03					

検査の信頼性確保試験標準作業書

[マイコプラズマ試験]

SOP No. XXXX

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 (検査部門責任者)

失効日 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	数寄屋優次部	
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

1 検査の項目
マイコプラズマ汚染否定試験

2 試験品の種類
培養細胞

3 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

4 検査等に用いる試薬
① PCR Mycoplasma Detection Set：TAKARA
② 蒸留水

6 検査等に用いる機器・器具及び器材

- 1) 機器・器具
- 炭酸ガス培養装置
 - ボルトックス
 - 冷却离心机
 - サーマルサイクラー
 - マイクロ冷去遠离心机
 - マイクロピペット
 - チューブオープナー
- 2) 器材
- 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)
 - 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)
 - PCR用チューブ・蓋及びチューブラック(冷蔵冷凍用)

6 作業環境、操作上の注意

- 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。
- 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し、チューブオープナーを使用すること。
- 試薬の調製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、DNase及びRNaseの混入防止に細心の注意を払うこと。

4) 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	血清実験室
電気泳動	化学実験室

6) 作業工程の操作は、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

- 継代後、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
MCGp Fl Primer	0.5μl
MCGp Rl Primer	0.5μl
TaKaRa Taq	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、陽性、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連チューブを緩やかに転倒混合した後スピンドウダウンする。
- 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"を選択し反応液量を入力する。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. 2%アガロースゲル電気泳動でPCR産物の確認を行う。

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、陽性対象で 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、器材、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

細胞の調整 (検査に用いた種類を記載)

①使用細胞 (総代数): サンプリング日 (実施者):

②使用細胞 (総代数): サンプリング日 (実施者):

③使用細胞 (総代数): サンプリング日 (実施者):

④使用細胞 (総代数): サンプリング日 (実施者):

⑤使用細胞 (総代数): サンプリング日 (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 R1 Primer	0.5μl	×	=	μl
TaKaRa Taq	0.25μl	×	=	μl
Distilled water	34.75μl	×	=	μl
Subtotal	45μl		=	μl

45μlずつ分注し、細胞培養上清を5μl加える

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

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

2%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、陽性対象で 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

結果判定表

検体番号	判定

判定

判定日時: 判定者:

平成25-27年度
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
総合研究報告書

麻疹、風疹ラボラトリーネットワークの強化に関する研究

研究分担者 駒瀬勝啓 国立感染症研究所ウイルス第3部第1室室長

研究協力者 森 嘉生 国立感染症研究所ウイルス第3部第2室長
竹田 誠 国立感染症研究所ウイルス第3部 部長

研究要旨 感染研・レファレンスセンター・地方衛生研究所で組織する麻疹検査診断ラボラトリーネットワークの機能を強化するために、real-time PCR法を導入、試薬等の配布やアンケートを通して利用を促した。またnested RT-PCR法ならびに遺伝子解析技樹に関するEQAを試行し、検査技術上の問題点を探った。real-time PCR法は約75%の地衛研で実施が検討され、2015年に実施された検査のうちおよそ70%に用いられた。一方、「系の最適化」が不十分な施設もあった。EQAでは陽性検体からバンドが検出されないケースや、遺伝子解析が不正確な施設があった。精度管理等を通じてラボネットワークの強化していく必要があると考えられた。なお、平成27年3月に日本は麻疹排除状態にあるとWHOから認定された。

A. 研究目的

麻疹は天然痘、ポリオについてWHOが排除を目指している感染症である。WHOは麻疹排除を「優れたサーベイランス体制が存在する下で、その地域に常在する麻疹ウイルスによる麻疹の伝播が1年間以上ない状態」と定義し、またその状態が3年間、継続している事を排除認定基準としている。麻疹排除の達成には適切なサーベイランス体制の確立が必須である。日本においては、平成25年4月に改訂された「麻しんに関する特定感染症予防指針」において、麻疹疑い患者の全数検査診断を原則とする事、また民間検査センターで実施する血清IgM検査と、地方衛生研究所(以下地衛研)で実施する遺伝子型解析を含む遺伝子検査を併用する事を求めている。また、特に麻疹排除期においては、流行の原因ウイルスが日本

に常在するウイルスなのか、海外に由来するウイルスなのかの鑑別が求められる。ウイルスの鑑別にはウイルス遺伝子解析が必須であり、地衛研を中心とするラボラトリーネットワークは、麻疹排除、風疹排除を達成し、維持していくためにますます重要となる。

本研究は感染研・麻疹風疹レファレンスセンター・地衛研で構成されている麻疹、風疹ラボラトリーネットワークの機能を強化し、WHOの麻疹、風疹の排除認定を受けるに資するサーベイランス体制の構築を目的としている。

B. 研究方法

1. 麻疹 real-time PCR法の確立及びその評価

麻疹の real-time PCR法を確立し、10

ヶ所の麻疹、風疹レファレンスセンターに、以下の2点について評価を依頼し、試験法ならびに診断手順を確認した。1) 「標準RNAを用いた系の最適化」を各センターで実施し、期待される検査系が再現できるか、2) 過去においてnested RT-PCR法で検査された検体をreal-time PCR法で検査した時、同等の感度、特異度が得られるか。

2. nested RT-PCR法の外部精度管理法(EQA)の検討、ならびにEQAの試行

nested RT-PCR法はreal-time PCR法が導入されても併用される検査法である。real-time PCRで陽性となった場合は、遺伝子解析のために用いられ、real-time PCR法で判定保留となった場合には確認試験として実施される。nested RT-PCRに対するEQAのデザイン、ならびに標準RNAや検体の配布方法について検討した。また参加を希望した22地衛研を対象にEQAを試行した。

3. real-time PCRの導入と利用促進に関する検討

病原体検出マニュアル(以下マニュアル)を改訂し、real-time PCR法を記載した。また早期の導入の促進を踏むため、real-time PCR法に用いるプライマー、プローブ、ならびに標準RNAを73地衛研に配布した。その後、レファレンスセンターを通じて導入状況のアンケートを実施し、周知、ならびに導入を促した。また、年明けに平成27年の麻疹検査実績アンケートを実施し、real-time PCRの使用状況を調査した。

C. 研究結果

1. 麻疹real-time PCR法の確立及びその

評価

麻疹real-time PCR法の評価

10カ所のレファレンスセンターにおいてそれぞれ3回(1カ所は6回)の「標準RNAを用いた系の最適化」を実施したところ、97%(32/33)で最適化の規格を満たしていた。また、nested RT-PCR法との感度、特異度の比較では、判定保留を陽性とした場合、感度は93.8%、特異度は95.9%、判定保留を陰性とした場合、感度83.1%、特異度100%となった。この結果を踏まえて、real-time PCR法はnested RT-PCR法とほぼ同等の感度、特異度であると判断したが、判定保留域をよりせまくするために陽性対照とする標準RNAの置き方を変更した。また判定保留となった場合の検査のフローチャートを定めた(Fig.1)

2. nested RT-PCR法のEQAの検討、ならびに精度管理結果

nested RT-PCR法の感度、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。感度の評価法として、濃度が一定の標準RNA(合成RNA)を送付し、各施設に10倍階段希釈液を調整してもらい、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、系全体の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、又は陰性検体、計3検体)を配布し、日常用いている方法で検査し、陽性、陰性の判定を下し、陽性検体の場合は、遺伝子解析、遺伝子型解析を実施する方法を採用した。EQAへの参加を募り、希望のあった22施設に対して標準RNA、ブランド検体を配布した。陽性ブラインド検体からN遺伝子が検出できない施設が3カ所、結果をスコア化したところ、期待する

値(80%)に達しない施設が1ヶ所存在した。また、遺伝子解析技術に問題のある施設が4カ所あった。

3. real-time PCRの導入と利用促進に関する検討

real-time PCR法に用いるプライマーやプローブは比較的高価であり、個別にオーダーしなければならないことから、これらの試薬を配布する事が検査法確立に着手することを容易にすると考え、約100試験分のプライマー、プローブ、ならびに標準RNAを地衛研に配布した。試薬配布後およそ5ヶ月の時点でアンケートを実施した。約75%の地衛研でreal time PCRの導入を検討し、マニュアルで求めた「標準RNAを用いた系の最適化」を開始していた。また、この時点で3回以上の「最適化」を試行し、最適化された系を確立した地衛研は39カ所あった。これらから、試薬の配布、アンケートの実施が多く、地衛研で導入を検討するきっかけになったと考えられた。一方、陽性だった場合、nested RT-PCR法で遺伝子型、遺伝子配列を決定する必要があることから、従来通り、最初からnested RT-PCRを実施する方が便利であるとする意見や、標準RNAのコンタミネーションによる偽陽性の可能性があることから導入に消極的な意見もあった。また、まだ最適化が十分になされていない地衛研も存在する事から、外部精度管理等を通じて系を調整していく必要があると考えられた。

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が求められる。

麻疹の排除の定義から、麻疹排除が近づいた時期には、ウイルス遺伝子検査が重要であり、品質が担保された方法、施設でウイルス遺伝子検査が実施される事が求められる。麻疹ウイルスの遺伝子検査は、「特定感染症予防指針」に基づき感染研・レファレンスセンター・地衛研により組織された麻疹、風疹ラボラトリーネットワークに担われている。

本研究班ではreal-time PCRの導入、ならびにnested RT-PCRの精度管理を試行する事で、ネットワークの強化を図った。real-time PCRはnested RT-PCRとほぼ同等の感度、特異度をもち、簡便で多検体の処理が可能であり、クロスコンタミネーションの可能性も小さくなる。積極的な使用が望まれる。一方、Real-time PCRにおける系の最適化が不十分と思われる施設や、nested RT-PCRのEQAの結果、検査結果や遺伝子解析が不適切な施設も見いだされた。感染症法の改正もあることから、精度管理等を通じてラボラトリーネットワーク機能の維持、強化をしていく必要がある。

なお、平成27年3月に日本は麻疹排除状態にあるとWHOから認定された。

E. 結論

麻疹検査診断ラボラトリーネットワークの機能を強化するために、real-time PCR法を導入、試薬等の配布やアンケートを通して利用を促した。またnested RT-PCR法ならびに遺伝子解析技術に関するEQAを試行し、検査技術上の問題点を探った。real-time PCR法は短い期間にかなり普及したと考えられたが、一方、いくつかの検査上の問題も見つかった。今後もEQA

等を通じてラボラトリーネットワーク機能の維持、強化を継続していく必要があると思われた。

なお、平成 27 年 3 月に日本は麻疹排除状態にあると WHO から認定された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

a. 欧文

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 Response J* 16; 5(2) 31-3 (2014)
3. Sakai K, Sekizuka T, Ami Y, Nakajima N, Kitazawa M, Sato Y, Nakajima K, Anraku M, Kubota T, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Kuroda M, Takeda M. (2015) A mutant H3N2 influenza virus uses

an alternative activation mechanism in TMPRSS2 knockout mice by loss of an oligosaccharide in the hemagglutinin stalk region. *J Virol*. 89: 5154-8.

4. Seki, F., Someya, K., Komase, K. and Takeda, M. (2016) A chicken homolog of nectin-4 functions as a measles

b. 和文

1. 駒瀬勝啓、染谷健二、竹田誠、日本における麻疹ウイルス流行株の変遷 2009-2011、病原体検出情報 34(2); 26-7 2013
2. 染谷健二、駒瀬勝啓、竹田誠、2012年の海外の麻疹情報、病原体検出情報 34(2); 24-5 2013
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 竹田誠、駒瀬勝啓 輸入麻疹と国内伝播感染症 44(6) 206-217 (2014)
 7. 竹田誠、駒瀬勝啓、麻疹排除へ向けて、化学療法領域 31:1326-32 (2015)
 8. 竹田誠、駒瀬勝啓、近年の歩みとこれからの課題、生体の科学 66:309-12 (2015)
 9. 駒瀬勝啓、染谷健二、竹田誠、麻疹検査診断の現状、病原微生物検出情報 36:59-60 (2015)
 10. 染谷健二、駒瀬勝啓、竹田誠、海外の麻疹の状況-2014年のWPR、EUR、AMRの状況、病原微生物検出情報 36:68-70 (2015)
 11. 駒瀬勝啓、日本の麻疹の状況と麻疹排除の進捗、モダンメディア61(4):81-90 (2015)
 12. 駒瀬勝啓、欧米における麻疹の状況と日本の麻疹排除の維持、感染炎症免疫 45(3) : 86-8 (2015)
- 学会発表
- 国際学会
なし
- 国内学会
1. 駒瀬勝啓 (シンポジウム)、麻疹、風疹ウイルスと検査診断について、第26回公衆衛生情報研究会 2013年1月24日~25日 沖縄
 2. 竹田誠 栃木県小児科医会、小山地区医師会講演会、わが国の麻疹風疹対策-麻疹風疹検査診断と注意点、世界の麻疹風疹事情と日本の取り組み 2013年2月9日
 3. 竹田誠 第33回広島小児科アレルギー研究会 麻疹の国内、世界最新事情-流行、ワクチン、研究 2013年2月21日
 4. 竹田誠、国立感染症研究所 FETP 講義 ウイルス感染症 (麻疹風疹を中心に) 2013年4月8日
 5. 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
 6. 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
 7. 駒瀬勝啓、竹田誠 麻疹排除の進捗状況-流行ウイルスの解析による評価-第56回日本臨床ウイルス学会学術集会 平成27年6月13日~14日 岡山
 8. Kouji Sakai, Yasushi Ami, Tsuyoshi Sekizuka, Minori Kitazawa, Katsuhiko Nakajima, Masaki Anraku, Noriko Nakajima, Katsuhiko Komase, Kazuaki Takehara, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro, Makoto Kuroda, Makoto Takeda, Molecular determinants of proteolytic activation of respiratory Ortho- and Paramyxoviruses in vivo, 第14回あわじしま感染症・免疫フォーラム

平成 27 年 9 月 8 日～11 日 淡路島

9. 竹田誠、酒井宏治、網康至、北沢実乃莉、中島勝紘、SANGSRIRATANAKUL Natthanan、安楽正輝、中島典子、駒瀬勝啓、竹原一明、長谷川秀樹、田代真人、A natural host animal model revealed the essential role of the host protease TMPRSS2 for respiratory paramyxovirus pathogenicity, 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 平成 27 年 11 月 22 日～24 日 福岡

10. Kouji Sakai, Tsuyoshi Sekizuka, Yasushi Ami, Minori Kitazawa, Katsuhiko Nakajima, Noriko Nakajima, Masaki Anraku, Katsuhiko Komase, Kazuaki Takehara, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro, Makoto Kuroda, Makoto Takeda, The stalk oligosaccharide of influenza A virus hemagglutinin protein modulates protease specificity for virus activation and pathogenicity. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 平成 27 年 11 月 22 日～24 日 福岡

11. 關文緒、染谷健二、田原舞乃、中津祐一郎、酒井宏治、駒瀬勝啓、竹田誠、ニワトリ nectin-4 の同定と初代鶏胚繊維芽細胞への麻疹ウイルス感染における役割、第 63 回日本ウイルス学会学術集会 平成 27 年 11 月 22 日～24 日 福岡

12. 駒瀬勝啓、大園強、緑川圭、三柴雅昭、渡辺創、永田明義、梅木和宣、竹田誠、麻疹 IgM EIA キットの改良が麻疹排除に与えたインパクト、第 18 回日本ワクチン学会学術集会 平成 27 年 11 月 14 日～15 日 犬山

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

- 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

麻しん遺伝子検出法による診断

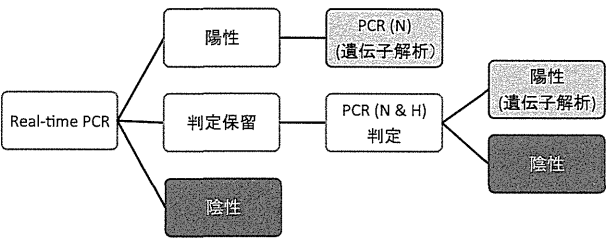


Fig.1