

感染症発生動向調査ウイルス検査用検体採取法

愛知県感染症発生動向調査事業（病原体情報）において検査対象とした8疾患は病因ウイルスが複数であるために臨床診断だけでは病原体を特定できないものを主体とし、ウイルス検出（分離）検査を行います。これら疾患の内ヘルパンギーナ、手足口病、無菌性髄膜炎、急性出血性結膜炎は主にエンテロウイルス、咽頭結膜熱、流行性角結膜炎は主にアデノウイルス、インフルエンザはインフルエンザウイルス、感染性胃腸炎はノロウイルス、ロタウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルスをターゲットとしてウイルスの検出を行う予定です。また、現在実施している検出法ではヘルペスウイルス、ムンプスウイルス、レオウイルス等も検出可能です。

その他の感染症については、原因不明の感染症の多発例、これまでとは少し様子が違うと思われる原因不明の感染症例が発生した場合には県単独事業の新興・再興感染症対策事業においてその都度対応致します。

1. ウイルス検査法

ウイルス分離検査が細菌分離検査と大きく異なるのは「ウイルスは培地の中では増殖しない」ということです。ウイルスは生きた細胞、あるいは生きた動物に接種して増殖させなければ分離できません。そのためまず試験管の中で細胞を増殖しておく必要があります。今回対象とした疾患に対して、インフルエンザウイルスを分離するために MDCK 細胞（犬の腎臓細胞）、エンテロ・アデノウイルスの分離のために HeLa 細胞（ヒト子宮経管細胞）と RD-18S 細胞（ヒト横紋筋腫細胞）を使用します。またロタウイルスは ELISA 法、ノロウイルスは RT-PCR 法によってウイルスの検出を行います。

ウイルス検査のフローチャートを図1に示しましたが検査の手順は以下の通りです。

- 1) 検査検体が搬入されるとまずコンピューターに患者データが入力され、検査用の番号がつけられます。
- 2) 検査開始3日前には患者の疾患名と検査用検体の数に従って上記の細胞が準備され、細胞が十分に増殖するのを待ちます。
- 3) 検査開始1日前に検体の処理を行い、雑菌の除去を行います。
- 4) 検体を細胞に接種し、2週間観察します。同時にロタウイルス検出用 ELISA 試験、ノロウイルス検出 RT-PCR を実施します。
- 5) 毎日観察し、細胞が変性（細胞変性効果、CPE）した検体を抜き出し凍結します。残りのサンプルは週2回の培養液交換を行い、2週間観察します。観察終了後は新しい細胞に培養液を移し替え、更に2週間観察します。その結果 CPE が出現しない検体は組織培養法陰性とします。
- 6) CPE が観察された検体はウイルスによるものか否かを確認するために更に同じ細胞にもう1代継代します。
- 7) 1代目と同じように CPE を起こしたサンプルをウイルス陽性サンプルとします。
- 8) CPE の形態、CPE を起こした細胞の種類、診断名によって同定する血清型を選定し、まず日本で比較的良く分離されるウイルスの同定を行います。
- 9) 8) で同定出来なかったサンプルは更に日本では分離されることの少ないウイルスの同定を行います。
- 10) 9) で同定できなかったサンプルは同定不能としますが、エンテロウイルスについては PCR によってエンテロであるか否かを判定します。

従って検査結果として「陰性」、あるいは陽性例については「分離されたウイルス名」あるいは「アデノ NT」（アデノウイルス型別不能）、「エンテロ NT」（エンテロウイルス型別不能）、「同定不能」（エンテロ、アデノ以外のウイルスで現在手持ちの抗血清では同定できない）と記載されることとなります。

以上のような手順でウイルスの同定の結果を出来るだけ早く、遅くとも衛生研究所で検体受付後、2ヶ月以内に返送できるようにします。

図1. 病原体情報ウイルス検出のフローチャート
患者データの登録

分離用細胞の作成 (3日)

患者検体処理
便は10%乳剤を作る

検体を10,000 Gで遠心

上清を滅菌容器に移す

4 一夜放置

ロタウイルス(ELISA) ノロウイルス(RT-PCR)

細胞に接種、2週間観察

判定

判定

CPE(+)

CPE(-)

更にもう1代継代、2週間観察

CPEの出現したサンプルの上清を
もう1代継代する。(2週間) CPE(-)

CPE(+)
陰性

CPE(-)

陰性

検出ウイルスの力価(量)を測定する
(約1週間)

比較的良好に分離されるウイルスの型同定
(約1週間)

判定

まれに分離されるウイルスの型同定
(約1週間)

判定

同定不能ウイルス

2. サンプルの採取法

ウイルス分離に際していかに良いサンプルを採るかということは非常に大切な事ですので、採取から検体搬入までの重要なポイントについて解説します。

まず疾患の病変部位の検体を採取することは言うまでもありませんが、目的とするウイルスが、病変部以外からも排泄される可能性が有ればその部位の検体も採取しておくことで病原ウイルスの推定に役立ちます。例えば無菌性髄膜炎の場合病変部の検体としては髄液が重要ですが、髄液中のウイルスは典型的な症状が出ていても分離されない場合もあります。(髄液中には大量のインターフェロンが出ていて分離を阻害するとも言われています)一方無菌性髄膜炎の原因ウイルスであるエンテロウイルスは咽頭や腸管でも増殖し、特に糞便からは長期間排泄されるため、これらの検体の検査も有効であります。そのために可能な範囲で複数種類の検体の採取をお願いします。 検体採取には出来るだけ衛生研究所から配布した容器をお使いください。

1) 糞便：糞便は親指頭大必要ですが、容器が細くて入れ難いかもしれません（写真右）。できれば2, 3回に分けて入れてください。水洗トイレで採取する場合には便器の水のない部分にトイレットペーパーを重ねて敷き、その部分に排便して採取してください。水様便で固形物が採取できないときは便で濡れたトイレットペーパーも容器に入れてください。乳幼児で水様便の場合紙おむつの内側にティッシュペーパー等を敷き、排便後便で濡れたペーパー部分も入れてください。おむつそのものからはウイルスの回収はほとんど出来ません。

2) 咽頭拭い液：咽頭の病変部位を綿棒で良くぬぐい、添付の保存液（写真2の右側）の中に浸してすすぎ、管壁で良く絞った後、綿棒を取り出してください。木製の柄には殺菌作用のある物質が含まれている場合がありますので使用しないでください。

3) 結膜拭い液：眼瞼結膜を綿棒で強くこすり、結膜保存液（写真2の左側）に入れ、咽頭拭い液と同様の処置をしてください。結膜拭い液の内容は咽頭拭い液と同じものですが、容量が少なくなっています。緊急の場合には咽頭拭い液でも代用出来ます。

4) 水泡内容：水泡表面をアルコール綿で消毒し、局所を注射針等で突き刺し、内容を吸収し水泡内容用容器（写真2左）に入れるか、または局所を綿棒でこすり、結膜拭い液と同様の処置をしてください。

5) 髄液：無菌的に採取された髄液を滅菌容器（写真3）に入れて保存してください。容器には1.8ml 入ります。

6) 血清：血清は原則としてはウイルス分離を行いませんが、必要に応じて病因ウイルスの確認のために抗体の上昇を調べるのに用います。そのためには発病初期とその後2～3週間後のペア血清が必要となります。血清はまず血液約5mlを分離剤入り採血管で採取し、約30分間室温に静置します。

静置後遠心機で3,000回転10分間遠心し、上清を保存容器（写真3.）に移しかえます。

保存液の中には抗生物質（ゲンタマイシン 室温でも有効）と凍害防止剤（0.5%牛アルブミン添加 Veal infusion broth）が含まれていますので、搬入までに3日以上要する場合は凍結して保存してください。一旦凍結した検体は衛生研究所に搬入するまで融解しないようにしてください。

また何かの事情で衛生研究所から配布した容器、特に咽頭拭い液、結膜拭い液を使用しなかった場合には凍結しないで、当日あるいは翌日中に検体を搬入してください。またキャリブレアはウイルス検査には使えませんのでご注意ください。



写真1 . 糞便採取容器

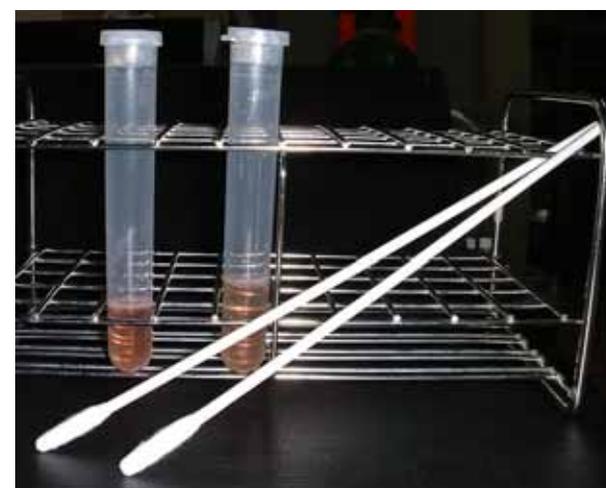


写真2 . 結膜、水泡内容用保存容器（左）
咽頭用保存容器（右）及び綿棒



写真3 . 髄液、血清保存容器
（クライオチューブ）