

ポリオウイルス感染症の 実験室診断マニュアル

目 次

1.	疾患の概説	3
2.	検査に関する一般的注意	5
	検査材料の採取	
	検査材料の輸送	
	作業上の注意	
	検査の進め方	
3.	検査方法	8
	1) ウイルスの分離	
	2) ウイルスの同定	
	3) ダイレクトシーケンス法を用いたポリオウイルスの型内株鑑別	
	4) 微量中和試験による血清学的検査	
	5) 環境水からのポリオウイルス分離法	
4.	引用文献	38
5.	連絡先	39
6.	執筆者	39

1. 疾患の概説

ポリオ(poliomyelitis)は、脊髄性小児麻痺あるいは急性灰白髄炎とも呼ばれる運動麻痺を起こす重篤なウイルス感染症である。起因ウイルスであるポリオウイルスは、小型球形の RNA ウイルスで、分類上ピコルナウイルス科の中のエンテロウイルス属に属している。1-3 型の血清型があり、生ワクチンおよび不活化ワクチンがポリオの発症予防に広く用いられている。感染症法では2類感染症に分類されている。

ポリオウイルスは口から取り込まれると咽頭や小腸で感染が始まる。局所のリンパ組織で増殖して血液中に入り、ウイルスは全身に拡散する。ウイルスが脳血管関門をこえて中枢神経に達した場合、脊髄の前角細胞に運ばれ、そこで良く増殖する。その結果、神経細胞が破壊され支配領域の運動神経麻痺をおこす。末梢神経に取り込まれたウイルスが、神経軸索を介し逆行性に中枢神経に至る伝播経路の存在も明らかにされている。ウイルスが細胞に感染、吸着、侵入するためには、免疫グロブリンスーパーファミリーの一員である宿主細胞のポリオウイルス受容体と結合することが必須である。ポリオウイルス受容体遺伝子がクローニングされ、この受容体がポリオウイルスの増殖の種特異性や組織特異性の決定に重要な関与をしていることが明らかになった。ポリオウイルス受容体を発現し感受性を獲得したトランスジェニックマウスが開発され、サルにかわる感染実験動物モデルとしてウイルス伝搬経路の解析や神経毒力試験に使われている。また、ヒトポリオウイルス受容体を発現したマウス細胞は本稿で述べるように迅速なウイルス診断に欠くことのできない細胞として広く使用されている。

ポリオウイルスに感染しても、大部分が症状のない不顕性感染(90-95%)や感冒様の不全型(4-8%)である。症状がさらに進行し無菌性髄膜炎や一過性の麻痺(1-2%)を呈する場合もある。麻痺型ポリオは感染者の 0.1-2%くらいとされている。自然感染の場合、ウイルス感染から発症までの潜伏期は普通 7-14 日である。ウイルスの糞便への排泄は通常 1-2 ヶ月くらいまでである。ポリオの感染は、免疫不全のある患者では長引くことはあるが、一般には急性であってウイルスが持続感染することはない。通常、発熱の最中あるいは解熱期に左右非対称の弛緩性麻痺が出現する。急性期をすぎると 6 ヶ月くらいまで麻痺の回復はあるがその後は麻痺が固定されて残ることが多い。臨床的には野生株によるポリオ麻痺もワクチン由来株によるものも区別は出来ない。ポリオと区別しがたい麻痺症状がエコーウイルス、コクサッキーウイルス、エン

テロウイルス 71 などの非ポリオエンテロウイルスによっておこることがある。またギランバレー症候群もポリオとの鑑別を要する疾患として重要である（1）。

我が国では、1961 年より弱毒生ポリオワクチン接種が始まり、それ以来患者発生は激減した。1981 年以降、野生型ポリオウイルスの感染による麻痺患者の発生はない（2）。1988 年、WHO による全世界レベルでのポリオ撲滅計画が始まった。徹底的な生ワクチン投与により、まずポリオウイルスの野生株を地上から排除しようというものである。WHO ポリオ撲滅戦略の鍵である急性弛緩性麻痺(*acute flaccid paralysis ; AFP*)の概念をよく理解したうえで、ポリオの鑑別診断を行うことが重要である。1991 年以降アメリカ大陸から（3）、1997 年以降西太平洋地域から（4）ポリオを根絶した戦略は、基本的に AFP をすべてポリオ疑診例として扱い、報告を義務づけ、発症から速やかにウイルス分離のための便検体を採取することを徹底したことである。2012 年現在、地域固有の野生株ポリオウイルス常在国は、パキスタン、アフガニスタン、ナイジェリアの 3 か国である。

野生株の常在しない国でポリオ患者の集団発生をみた場合（5）、原因となったポリオウイルスがワクチン株の変異したものなのか、あるいはどここの地域から侵入してきた野生株なのか調べるのが、極めて重要である。ポリオウイルス感染では不顕性感染や不全型感染が多いので、麻痺を伴わない無菌性髄膜炎、上下気道感染症、下痢症等の患者からポリオウイルスが分離された場合でも、患者のワクチン歴、海外渡航歴に注意して、常に野生株の侵入の可能性に留意することが必要である。実際、我が国でも 1993 年、滋賀県で海外旅行直後のインフルエンザ様患者の咽頭拭い液から輸入野生株が分離されたことがあった（6）。

2. 検査に関する一般的注意

検査材料の採取

検査をより正確で効果あるものにするために検体は発症後できるだけ早く採取する。ポリオウイルスが分離されるのは麻痺の発現後 1-2 ヶ月位までである。検査材料としては糞便が最も効率よくウイルス分離のできる材料として推奨される。咽頭拭い液からもウイルスが分離できる場合がある。髄液からウイルスが分離できれば、直接病因との関係が明らかになるが、一般にはウイルス分離は困難である。糞便からの検査材料は抗生剤を通常の 5 倍濃度入れた PBS(+)で 10%乳剤をつくって調整する。その際クロロホルム処理をおこなうと、細菌やカビをとり除くことができる。咽頭拭い液の調整は滅菌綿棒で局所をぬぐい、直に細胞培養液に浸して密栓し、2 時間ほど液に溶出させる。それを良く攪拌した後遠心し、その上清が検査材料となる。髄液はそのまま細胞に接種できる。

検査材料の輸送

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、検体送付書には被験者の氏名、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℃で長期間保存できる。

送付先にはあらかじめ検体数、搬入予定などを連絡しておく。ポリオ疑い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（VP1 塩基配列解析とリアルタイム PCR 法による鑑別試験）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。

(<http://www.nih.go.jp/niid/ja/biorisk-guidance/945-yuso2011.html>)。

作業上の注意

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いけない。

- 1) 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。
- 2) 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。
- 3) 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°C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して、感染研では35°Cで分離同定を行っている。

検査の進め方

検査を進めて問題なのは、ポリオウイルス以外のエンテロウイルスとの区別である。L20B細胞(7)というヒトポリオウイルス受容体を発現しているマウスの細胞を使えば、ポリオウイルスだけを選択的に分離できるのでポリオウイルスの分離、同定は非常に容易になった。同定は4種類のプール抗血清パネルを使って中和法(8, 9)で行う。結果の報告に当たってはワクチン接種の有無、時期、海外渡航歴等について記載しておくことが必須である。

同定されたポリオウイルス分離株については、ワクチン株か、ワクチン由来ポリオウイルスか、野生株かを鑑別するため型内鑑別試験を行う(図1)(9, 10)。ポリオウイルスの抗原性の差異に基づくELISA法やカプシド遺伝子変異を検出することが可能なリアルタイムPCR法等が、標準的な型内鑑別試験法として、WHOポリオ実験室ネットワークに導入されている。WHOによる型内鑑別試験は、WHOによる技術評価および精度管理試験等を実施した上で、試薬等の分与を受け、WHO指定ポリオ実験室において実施することが規定されている。そのため、日本では、感染研以外の施設でWHO標準法によるポリオウイルス型内鑑別試験を実施することは認められていないことから、本マニュアルからは割愛した。感染研では現在、ポリオウイルス分離株の型内鑑別としてリアルタイムPCR法を実施し、最終的な確認試験として、VP1全領域の塩基配列解析を行っている。野生株と判明した場合はVP1領域の塩基

配列を決め、相同性および分子系統解析により、いままでに分離された野生株との近縁性を調べる。

ポリオウイルス感染症の場合、ウイルス分離による病原体検査が確定診断の基本である。血清中和抗体価の測定では野生株とワクチン株との区別ができないので血清診断は補助的手段であるが、流行予測事業等による血清疫学調査は集団の免疫状態に関する貴重な情報を提供している。

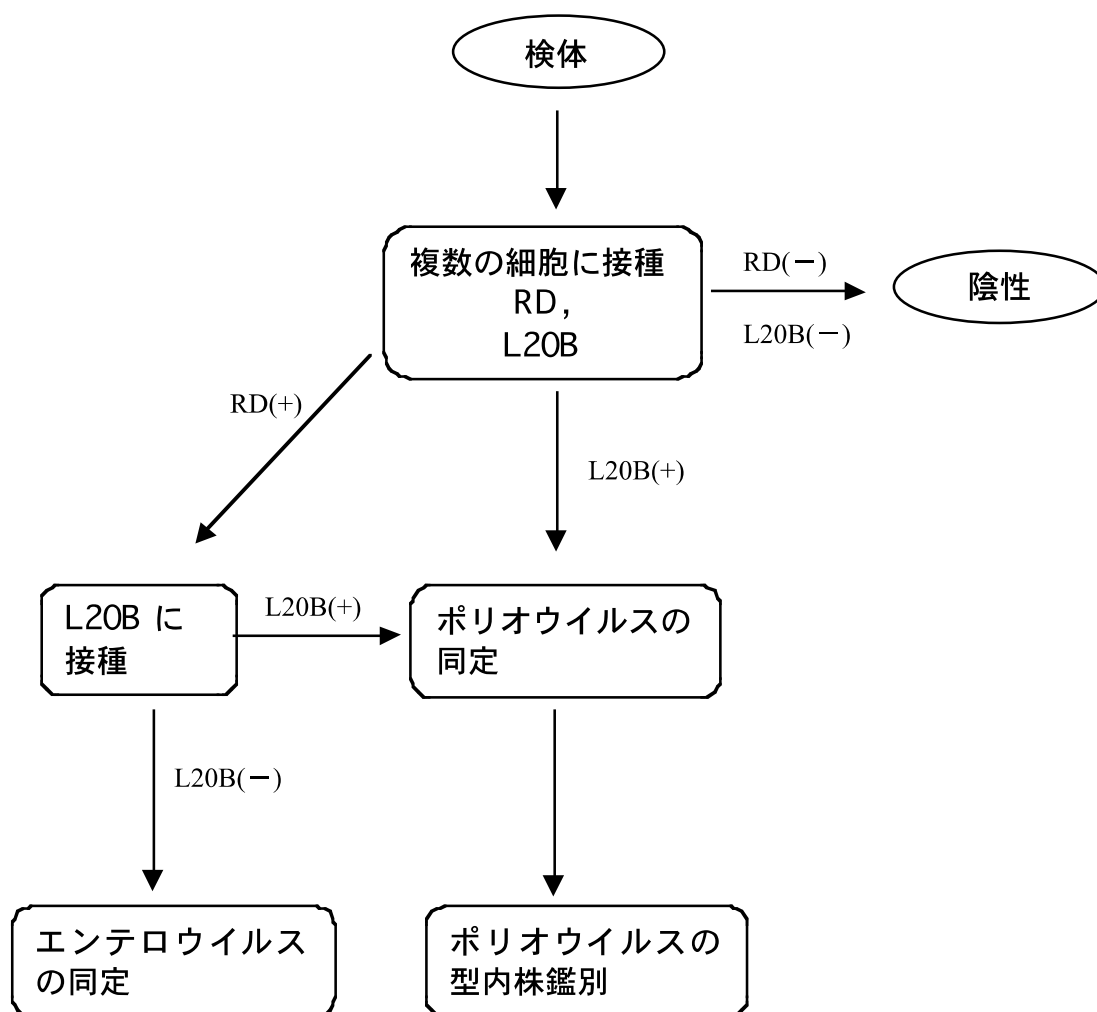


図 1. 検査の進め方と L20B 細胞の使用法

3. 検査方法

1) ウイルスの分離

準備するもの

1. 試薬・細胞

抗生物質を高濃度(ペニシリン 500U/ml, ストレプトマイシン 500 μ g/ml)含む PBS (+)、クロロフォルム、細胞増殖培養液 (10%FBS 含 MEM)、細胞維持培養液 (2%FBS 含 MEM)

RD 細胞、HEp-2 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)等、ポリオウイルスに感受性のある複数の細胞を使用する。

2. 機材

炭酸ガス培養装置、24 穴細胞培養プレート、マイクロピペット(P1000)、マイクロピペット(P200)、滅菌済み綿付きチップ (~200 μ l)、ストックチューブ(2 ml 用)

操作

1. 10%糞便抽出液の作製

- ① 50 ml のポリプロピレン製の遠心管に、糞便 1 g、抗生物質を含んだ PBS (+) 8.5 ml、クロロホルム 1.5 ml を加える。
- ② 20 分間激しく攪拌の後、3,000 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、ウイルスの分離に用いる。

2. 接種と観察

- ① 24 穴の培養プレートを使用する。検体相互の混入を避けるため図 2 のごとく、1 穴ずつ空けて細胞を用意する。

検体 1		検体 2		検体 3	
	検体 4		検体 5		検体 6
検体 7		検体 8		検体 9	
	検体 1 0		検体 1 1		細胞対照

図 2. 分離用プレートの使い方

- ② 単層になった細胞の増殖培養液を捨て、1 ml の維持培養液にかえる。
- ③ 1. で用意した糞便抽出液の 100-200 μ l を細胞に接種する。複数の細胞を使うなら 1 検体あたり 1 穴で良い。
- ④ 35 $^{\circ}$ C で培養し 7 日間観察する。7 日間観察して CPE が現われない時は別の新しい細胞に継代し、更に 7 日間観察する。計 14 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。
- ⑤ 完全な CPE が現われたら、培養液を-20 $^{\circ}$ C に保存する（初代ウイルス）。
- ⑥ 初代ウイルスを新しい細胞に接種して、はっきりした CPE が再び現れたら培養液を-20 $^{\circ}$ C に保存する（2 代目ウイルス）。ウイルスの同定には力価の高くなった 2 代目ウイルスを用いる。

3. 細胞毒性

- ① 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な細胞毒性である。新しい細胞にその培養液を 100-200 μ l 接種し観察を続ける。
- ② 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、糞便抽出物の非特異的変化と考えて良い。計 14 日の観察で分離の結果を判定する。

4. 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 の性状により区別できることが多い。

2) ウイルスの同定

準備するもの

1. 試薬・細胞

抗ポリオウイルス血清プール（市販）、細胞培養液（前出）、同定に使用する細胞はウイルス分離のものと同じ細胞を使用するのが原則である。細胞浮游液は増殖培養液で調整する。

2. 機材

炭酸ガス培養装置、96穴細胞培養プレート、マイクロピペット(P1000)、マイクロピペット(P200)、滅菌済み綿付きチップ（～200 μ l、～1000 μ l）、ウイルス希釈用滅菌済み綿付き長チップ（～200 μ l）、ウイルス希釈用試験管

操作

基本的にはマイクロプレート上で20単位のプール抗血清と約100TCID₅₀の分離ウイルス希釈検体を、50 μ lずつ等量混ぜ、2時間中和後、細胞浮游液を100 μ l加える。作業の迅速化のため、事前の分離ウイルスの力価試験は通常省略する。

- ① 図3に示した様にマイクロプレートをセットアップする。

		プール抗血清 P1+P2+P3		プール抗血清 P1+P2		プール抗血清 P1+P3		プール抗血清 P2+P3		ウイルス 対照		細胞 対照	
希釈		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
被検ウイルス X	-4	A											
	-5	B											
被検ウイルス Y	-4	C											
	-5	D											
Back titrations:		E											
被検ウイルス X		F											
被検ウイルス Y		G											
		H											
			-4		-5		-6		-7		-8		

図3. マイクロ法によるポリオウイルスの同定

- ② 4種類の抗血清プールを 50 μ l ずつ、それぞれの穴に加える。
- ③ ウイルス対照の穴に 50 μ l の維持培養液を加える。
- ④ Back titration の穴に 50 μ l の維持培養液を加える。
- ⑤ 細胞対照の穴に 100 μ l の維持培養液を加える。
- ⑥ ウイルス希釈列を 10^{-1} - 10^{-8} までつくる。
- ⑦ 0.9 ml の維持培養液を試験管に加える。
- ⑧ 1 本目の試験管に滅菌チップまたはピペットで 100 μ l のウイルス液を加える。
- ⑨ 良く攪拌した後、新しいチップに換えて 100 μ l を 2 番目の試験管に加える。
- ⑩ この操作を繰り返して 10^{-8} までウイルスを希釈する。
- ⑪ 希釈した分離ウイルス 50 μ l を、抗血清を加えてある穴、ウイルス対照の穴、Back titration の穴に加える。この際、高い希釈のウイルスから加えていけば、チップはウイルス毎に 1 本で済む。
- ⑫ プレートミキサー上で 1 分間震盪する。
- ⑬ 35~37 $^{\circ}$ C で 2 時間保温(中和)する。
- ⑭ 中和の時間に細胞をトリプシン消化し、 $1-2 \times 10^5$ 個/ml の細胞浮游液をプレート 1 枚につき 10 ml 用意する。
- ⑮ 細胞を 100 μ l ずつ中和の終わったプレートの穴に加える。
- ⑯ 35 $^{\circ}$ C の炭酸ガス培養装置で保温する。

判定

- ① 倒立顕微鏡で 7 日間 CPE を観察し、図 4 に示す CPE の出現パターンにより、血清型を判定する。
- ② 原則として攻撃ウイルス量が 32-320TCID₅₀ から外れているときは再検査する。ただし、320 を越えても P1+2+3 のプール血清で CPE が陰性の場合には、再検査の必要はない。

CPEの出現パターン				判定
プール中の抗体の血清				
P1+P2+P3	P1+P2	P1+P3	P2+P3	
—	—	—	+	1 型
—	—	+	—	2 型
—	+	—	—	3 型
—	—	+	+	1. 2 型混合
—	+	—	+	1. 3 型混合
—	+	+	—	2. 3 型混合
—	+	+	+	1. 2. 3 型混合
+	+	+	+	*非ポリオウイルス

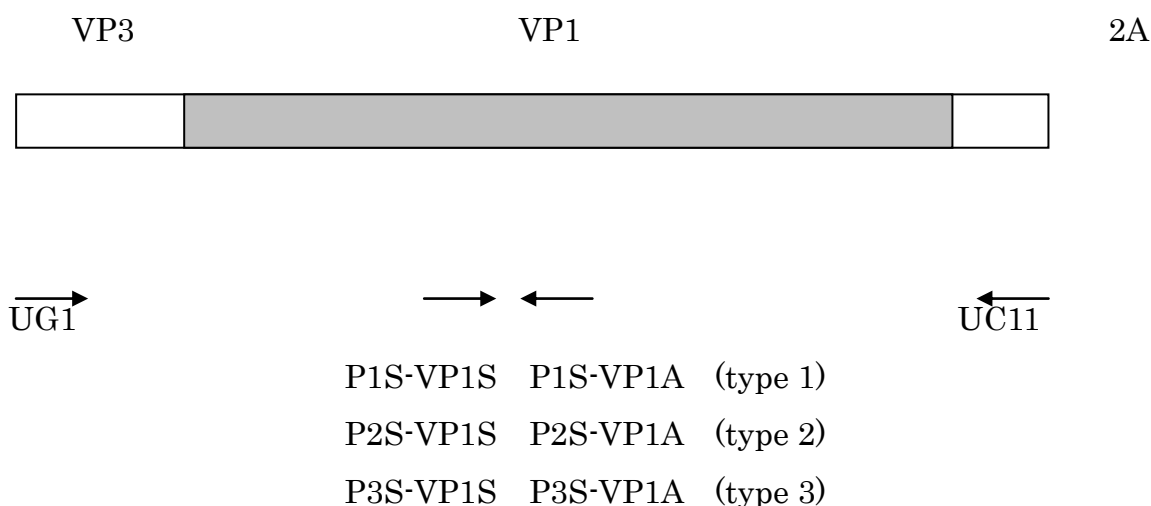
*：非ポリオウイルスまたは非ポリオウイルスとポリオウイルスの混合

+：CPE(+), -：CPE(-)

図4. ポリオウイルス血清型の判定

3) PCR ダイレクトシーケンス法によるポリオウイルスの型内株鑑別

分離されたポリオウイルスがワクチン株かワクチン由来ポリオウイルス (vaccine-derived poliovirus; VDPV)、野生株かの鑑別の必要性が生じた場合は、VP3-2A を主な標的にしたダイレクトシーケンス法にて VP1 全長の塩基配列を調べ、ワクチン株の配列との比較を行う。ウイルス RNA 抽出までウイルスの取り扱いにはクラス 2 の安全キャビネットを使用する。RNA の抽出、および RT-PCR の方法はいろいろあるが、どの方法でも良い。ここでは我々の使用している方法を簡単に記す。方法の概略を図 5 に示す。



<プライマー (5'-3') >

UG1 TTTGTGTCAGCGTGTAATGA (VP3:3402-2421, AY184219, Sabin1)

UC11 AAGAGGTCTCTATTCCACAT (2A:3504-3486, AY184219, Sabin1)

P1S-VP1S TCAATCTTTTACACCTACGG (VP1:3023-3042, AY184219, Sabin1)

P1S-VP1A TTCGAAATACCAACATACGG (VP1:3087-3068, AY184219, Sabin1)

P2S-VP1S TCGGTGTTTTACACCTATGG (VP1:3025-3044, AY184220, Sabin 2)

P2S-VP1A TTAGCAATTCCCACGTAGGG (VP1:3089-3070, AY184220, Sabin 2)

P3S-VP1S TCCATATTTTACACCTATGG (VP1:3014-3033, AY184221, Sabin 3)

P3S-VP1A TTGGCTAACCCACGTATGG (VP1:3078-3059, AY184221, Sabin 3)

Reference sequence.

Sabin 1 : AY082688, Sabin 2 AY082679, Sabin 3 AY082683

準備するもの

1. 試薬と実験器具

共通するもの

0.2 ml PCR 用チューブ, 1.5 ml チューブ, フィルター付きピペットチップ (1000, 200, 20, 10 μ l)、マイクロピペット、滅菌精製水 (DW/Milli-Q 水など)、微量高速冷却遠心器、恒温水槽或いはブロックヒーター、ミキサー、卓上型遠心機

RNA 抽出

RNA 抽出用キット (キアゲン : QIAamp Viral RNA Mini kit、ロシュ : High Pure Viral RNA kit など)、エタノール

RT-PCR 反応

各種 RT-PCR キット、sense, antisense プライマー、サーマルサイクラー、電気泳動装置、アガロース、TBE (TAE) バッファー、DNA サイズマーカー、エチジウムブロマイド溶液

直接塩基配列決定 (dideoxy terminator 法による)

プライマー (3.2pmol/ μ l、シーケンス用センス及びアンチセンス)、BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems)、Centri-sep スピンカラム(ABI401762)

操作

1) ウイルス

培養細胞に検体を接種後 CPE が 80-100%現われたものをハーベストする。凍結融解後遠心 (12,000rpm、約 5 分) し、上清をウイルス浮遊液とする。

2) RNA 抽出

市販 RNA 抽出キット、或いは SDS-フェノール抽出法(無菌性髄膜炎検査マニュアルに記載)を用いてウイルス RNA を抽出する。RT-PCR 反応のために RNA 抽出時か

ら既知のウイルスを陽性コントロールとして入れておく。

3) RT-PCR 反応

Access RT-PCR System (Promega) Cat. A1250 の場合

Primer UG1 5'-TTTGTGTCAGCGTGTAATGA-3'
 UC11 5'-AAGAGGTCTCTATTCCACAT-3'

① 下記の反応組成に基づきマスタープールを作製（検体+陽性/陰性コントロール+αを作成）。

滅菌水	27 μl	}	x	}	48 μl ずつ RNA に 追加分注
5x AMV/Tfi Buffer	10 μl				
Mg SO ₄ (25 mM)	4 μl				
dNTP (10 mM)	1 μl				
AMV RTase	1 μl				
Tfi DNA pol	1 μl				
UG1 primer (10 uM)	2 μl				
UC11 primer (10 uM)	2 μl				
Viral RNA	2 μl				

② 抽出した RNA 溶液 3μl とマスタープール 47μl を PCR 用チューブ (0.2 ml) に加え混合（最終容量 50μl）。

③ 以下の条件で反応。

48°C 45 min

94°C 2 min

以下のサイクルを 35 回

94°C 10 sec

50°C 10 sec

65°C 1 min

65°C 5 min

④ ゲル電気泳動による PCR 産物の確認

3 μl を電気泳動し、増幅を確認する(約 1100 b p)。

4) ポリオウイルス VP1 シークエンス

UG1-UC11 で増幅した PCR 産物は、ダイレクトシークエンス法では一気に読むことは困難である。そのため精製した PCR 産物を鋳型にして、2 種類の血清型特異的なインナープライマーを用いてシークエンス反応を行う

<u>Primer</u>	P1S-VP1S	5'-TCAATCTTTTACACCTACGG-3'
	P1S-VP1A	5'-TTCGAAATACCAACATACGG-3'
	P2S-VP1S	5'-TCGGTGTTTTACACCTATGG-3'
	P2S-VP1A	5'-TTAGCAATTCCCACGTAGGG-3'
	P3S-VP1S	5'-TCCATATTTTACACCTATGG-3'
	P3S-VP1A	5'-TTGGCTAACCCCACGTATGG-3'

すなわち 1 検体につき、血清型に応じて 4 種類の primer をシークエンスプライマーとして用いる

1 型	UG1	UC11	P1S-VP1S	P1S-VP1A
2 型	UG1	UC11	P2S-VP1S	P2S-VP1A
3 型	UG1	UC11	P3S-VP1S	P3S-VP1A

操作

① PCR 産物の精製

RT-PCR product 約 47 μ l より、市販キットで精製。最終的に 50 μ l の滅菌水にて溶出する。

②ダイレクトシークエンス反応

以下の試薬を調合。(Total 15 μ l)

1. BigDye Terminator	2 μ l	}	x	}	10 μ l ずつ分注
2. 5X Sequencing Buffer	1 μ l				
3. 滅菌水	7 μ l				
4. Primer (3.3 uM)	1 μ l				
5. Purified RT-PCR product	4 μ l				

② 以下の条件で反応。

96°C 1 min

以下のサイクルを 25 回

96°C 10 sec

50°C 5 sec

60°C 4 min

③ 精製後、シーケンサーにて解析。

結果の解釈

- センス側、アンチセンス側の塩基配列をソフトウェアを用いて修正する。修正にはフリーのMEGA, BioEdit の他、Sequencher 等の市販のソフトウェアを用いる。
- 解析した塩基配列のうち VP1 領域（1 型 906 bp、2 型 903 bp、3 型 900 bp）のみに編集し、ワクチン株の配列と比較する。
- 比較対照とするワクチン株の配列には、必ず以下のアクセッション番号のものを使用する
Sabin 1 : AY082688,
Sabin 2: AY082679,
Sabin 3: AY082683
- ワクチン株との比較の結果 VP1 領域の塩基配列において 1%以上の変異が見られた場合は VDPV として報告する(2 型は 6 か所以上)。1%未満はワクチン株として報告する（2 型は 6 か所未満）。
- 野生株の場合は通常 15%以上の相違が見られる。
- シーケンス後、混合感染が考えられる場合は中和法等により単一の血清型に分離し、それぞれの型の分離株について型内鑑別試験を行う。

(注 1) VDPV の定義は WHO の定義に基づく。

出典 : Polio laboratory manual 4th edition, 2004.WHO/IVB/04.10

http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_IVB_04.10.pdf

2 型 VDPV の定義は 6 個以上の変異と変更された。

出典 : 16th Informal Consultation of The Global Polio Laboratory Network

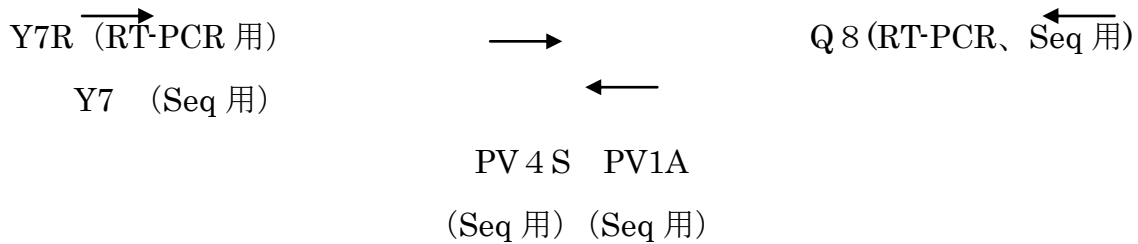
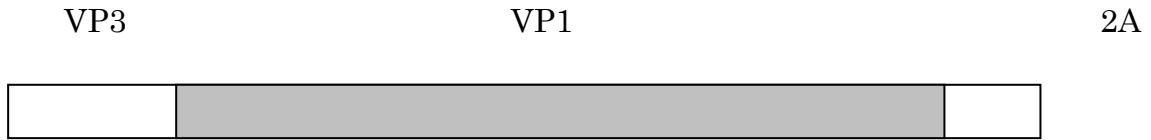
22-23 September 2010, Geneva, Switzerland, WHO/HQ

http://www.polioeradication.org/Portals/0/Document/Resources/GPLN_publications/GPLN_Meeting_recommendations_2010.pdf

WHO による 2 型ワクチン由来ポリオウイルス(VDPV)の定義に関しては感染症法による VDPV の定義と異なることに留意。

4) ポリオウイルス検出のための RT-PCR (WHO 標準法)

米国 CDC により開発された WHO 標準法について参考までに記載する。バッファー系は自家調整、PCR 反応に RAMP ステップが入っていることに留意。本法は野生株、ワクチン株にも反応するとされている。



RT-PCR 用プライマー

Y7R (センス) 5'-GGTTTTGTGTCAGCITGYAAYGA-3' (VP3; 2399-2421)

Q8 (アンチセンス) 5'-AAGAGGTCTCTR TTCCACAT-3' (2A; 3504-3485)

シーケンス用プライマー

PV1A(アンチセンス) 5'-TTIAIIGCRTGICCR TTRTT-3'(VP1;2934-2915)

PV4S (センス) 5'-ACITAYAARGAYACIGTICA-3'(VP1;2810-2829)

Q8 (アンチセンス) 5'-AAGAGGTCTCTR TTCCACAT-3'(2A;3504-3485)

Y7 (センス) 5'-GGGTTTTGTGTCAGCCTGTAATGA-3'(VP3;2399-2421)

プライマー位置は Sabin1 (AY184219)に基づく。PV4S のみ Sabin 2 (AY184220)に基づく

準備

10 x buffer 調製法

1 x buffer には最終濃度 67mM Tris(pH8.0), 17mM NH₄SO₄, 6 μM EDTA, 2mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol (DTT).を含む

① 以下を混合

0.2 ml MgCl₂ (1M)

6.7 ml Tris pH 8.8 (1M)

1.7 ml NH₄SO₄ (1M)

1.2 μl 0.5M EDTA

1.4ml PCR grade H₂O (nuclease-free)

② 1 ml チューブに分注。-20 °C保管

③ 使用前に 1 M DTT 5 μl を溶解したバッファーに添加

操作

1) ウイルス (3-1) と同じ

2) RNA 抽出 (3-2) と同じ

3) RT-PCR 反応

以下の試薬を調合。Total 50 μl 検体+陽性/陰性対象+α を調製)。

1	DW	37 μl	} 47 μl ずつ RNA に追加分注
2	10X RT-PCR Buffer	5 μl	
3	dNTP (10 mM each)	4 μl	
4	RNase Inhibitor (40U/μl)	0.25 μl	
5	RTase (20U/μl)	0.25 μl	
6	Taq DNA pol (5U/μl)	0.5 μl	
7	Y7R primer 40uM	1 μl	
8	Q8 primer 10uM	1 μl	
9	Viral RNA (50 μl elute)	3 μl	

⑤ 以下の条件で RT-PCR (~4 h)

(1) 42°C 45 min

(2) 94°C 3 min

(3) 以下のサイクルを 35 回

1 94°C 30 sec

2 42°C 45 sec

0.4°C/sec to 60°C、 RAMP は必須

3 60°C 2 min

(4) 60°C 5 min

4°C ∞

⑥ 3 μl を電気泳動し、増幅を確認する。

⑦ PCR 産物を精製

4) ダイレクトシーケンス反応

⑧ 以下の試薬を調合。Total 10 μl。

1 BigDye 2 μl

2 5X Buffer 1 μl

3 DNA 20~40 ng μl

4 Primer 3.2 uM 1 μl

5 DW Up to 10 μl

⑨ 以下の条件で RT-PCR (~3 h)

(1) 以下のサイクルを 25 回

1 94°C 20 sec

2 42°C 15 sec

0.4°C/sec to 60°C、 RAMP は必須

3 60°C 4 min

⑩ シーケンスプライマー

(1) Y7

(2) Q8

(3) PV1A

(4) PV4S

⑪ スピнкаラム等で精製後、シーケンサーにて解析

結果の解釈 (3 と同じ)

引用文献

Kilpatrick DR., et.al., Journal of Virological Methods 174 (2011) 128–130

4) 微量中和試験による血清学的検査

準備するもの

1. 細胞と培養液

- ・細胞は、HeLa, RD, HEp-2 などポリオウイルスに感受性のある継代細胞を使用する。
- ・血清希釈には 2%FBS 含 MEM の維持培養液, 細胞浮游液の調整には 5%FBS 含 MEM の増殖培養液を使用する。血清はあらかじめポリオウイルスに対する抑制因子がないことを確かめておく必要がある (牛胎児血清が良い)。

2. ウイルス

ウイルスは、通常、1,2,3 型とも Sabin 生ワクチン株を用いる。

- ・いずれも十分量を作製し、少量ずつ多数分注して -20°C 以下に凍結保存し、試験毎に新しいストックウイルスを使用する。
- ・ストックウイルスの力価はマイクロプレートを用い、1 希釈に 4 穴以上を使用して、 $\text{TCID}_{50}/50\mu\text{l}$ を正確にきめておく。
- ・標準ウイルス株(WHO 標準株)は感染研ウイルス第 II 部から分与可能。

3. 標準抗血清

<標準抗血清の使用の意義>

- ・中和試験の結果は、血清又はウイルスの希釈法、中和の温度と時間、使用した細胞や培養液の種類、培養温度などが影響し、得られる結果にはばらつきが見られることがある。しかし、中和試験ごとに抗体価のはっきりしている共通の標準抗血清をおけば、得られた標準抗血清の抗体価から中和試験が正しくおこなわれたかどうかの目安を得ることができる。また、その抗体価を被検血清の抗体価と共に測定し、両者の抗体価の比を求めると、そのばらつきは単に倍数で示された抗体価のばらつきよりもはるかに小さくなる。そこで共通の標準抗血清を併用して得られた被検血清の中和試験の成績は同じ尺度で比較する

ことが可能になる。

<標準抗血清の取り扱い法>

- ・国内標準血清は感染研ウイルス二部から分与される。各型とも 128 倍のポリオ中和抗体を含む。
- ・溶解血清は 4℃に保存する。直ちに使用しない分は、小試験管に分注して-20℃以下に凍結し保存する。
- ・凍結血清を溶解して使用する場合は、原則として 1 回限りとし、何回も凍結融解を行わない。
- ・このようにして溶解された国内標準抗血清は、微量中和反応術式にしたがって被検血清とまったく同様に非働化、希釈、中和、接種をして中和抗体価を定める。
- ・対応する Sabin ワクチン株に対して、くり返し測定された各型の国内標準抗血清の平均値が期待値として定められている。

操作

1. 血清希釈

- ① 血清は維持培養液で 1:4 に希釈（血清 0.1 ml に希釈液 0.3 ml）し、56°C30 分間非働化する。
- ② マイクロプレートは、図 8 のようにレイアウトする。

		血清 対照	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	細胞 対照	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
試料 1	A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
試料 2	C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
陽性 対照	E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
力価 測定	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
			0	-1	-2	-3	-4						

- ③ 96 穴マイクロプレートの第 1 列、3-10 列目の各穴に、維持培養液を 50 μ l ずつ、滅菌チップ（以下チップ）で滴下、分注しておく。
- ④ 1 希釈の第 1 列目、2 列目及び 3 列目の穴に 1:4 に希釈した血清の 50 μ l を分注する。
- ⑤ 各型とも血清の 1 希釈につき 2 穴ずつを使用し、チップによる血清の倍数希釈を行う。3 段階希釈ごとにチップを換える。
- ⑥ 8 チャンネルピペッターを用いれば 8 本までなら一度に操作が可能である。使用に際し、液切りに気をつける。
- ⑦ 第 11、12 列目は細胞コントロールとする。

2. 中和

血清希釈が終わったら、100TCID₅₀/50μl になるように維持培養液で希釈したウイルス液をチップで血清の希釈列に 50μl ずつ加える。

- ① 血清対照列には維持培養液を 50μl 加える。また、細胞コントロール列には 100μl の維持培養液を加える。
- ② 同時に必ずウイルス対照の力価検定を並行して行い、攻撃ウイルス量が 100TCID₅₀（許容範囲 32-320TCID₅₀）で行われたことを確認する。このため、中和に用いたウイルスをさらに 10 倍段階希釈し、各希釈毎に維持培養液 50μl を分注済みのマイクロプレートの 4 穴を用い、これに希釈したウイルス液を 50μl ずつ加える。
- ③ マイクロミキサーで混和後、蓋をかぶせて炭酸ガス培養器に入れ、35-37℃で 3 時間中和する。

3. 接種

中和を終えたマイクロプレートに別に準備した細胞浮遊液(1-2×10⁵個/ml)を 100μl ずつ加え 35℃で培養する。

4. 観察

接種後 1 週間、CPE の出現の有無を観察する。

5. 再検査

- ① ウイルス対照の成績が 32-320TCID₅₀/50μl からはずれているときは再検査を行う。
- ② 標準国内抗血清の抗体価が期待値の 4 倍以上又は 1/4 倍以下の時にも再検査を行う。

6. 検査結果

抗体価は表 1 のように接種ウイルスを 50%以上中和した血清の最高希釈倍数で表す。

表 1. 中和試験における検査結果判定例

	血清希釈倍数								力価
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
例 1	+	+	+	+	+	+	+	+	< 4
	+	+	+	+	+	+	+	+	
例 2	-	-	-	-	+	+	+	+	1:32
	-	-	-	+	+	+	+	+	
例 3	-	-	-	-	+	+	+	+	1:32
	-	-	-	-	+	+	+	+	

5) 環境水（下水、河川水）からのポリオウイルス検出法

腸管系ウイルスを対象とした環境ウイルスサーベイランスは、ヒト集団で流行している病原体を高感度に検出でき、かつ費用対効果で利点がある。また通常の疾患サーベイランスに比べると、不顕性感染により伝播している病原体も捕捉することができる。

既に WHO はポリオ根絶計画のための 2010-2012 年行動計画(注)に本法を取り入れており、野生株ポリオウイルス、VDPV の伝播監視に用いられている。採水定点を定め定期的に環境水からウイルス検出を行うことで、ポリオウイルスに限らず、腸管系感染症(エンテロウイルス、ノロウイルス等)の地域流行像を把握する目的にも適応可能である。また 1990 年代後半より遺伝子解析が普及してきたことに伴い、疾患サーベイランスより得られたウイルス株との比較が、塩基配列ベースで可能になっている。このことは地域流行像を把握する上で有益である。

(注) 世界ポリオ根絶行動計画 2010-2012

Global Polio Eradication Initiative Strategic Plan 2010–2012

<http://www.polioeradication.org/ResourceLibrary/StrategyAndWork/StrategicPlan.aspx>

濃縮法

環境水中に含まれるウイルス量、種類は用いる材料（流入下水、河川、海水）により様々であり、対象とするウイルス種によって検出方法を選択する。本マニュアルでは下水、河川水を試料とした場合の以下 3 種類の手法について解説する。

陰電荷膜吸着誘出法

酸性下（pH3.5）ウイルスタンパク質は正に帯電し陰電荷膜に吸着すると考えられる。またウイルスは 2 価イオン共存下で陰電荷膜に吸着する。こうした現象により環境水中のウイルスを陰電荷膜に吸着させ、ビーフエキストラクト或いはアルカリ性誘出バッファーにより膜から誘出させることでウイルスを濃縮する。ウイルスは、かなり強く膜に結合しているため、膜を裁断し、誘出液存在下、弱い超音波処理あるいはボルテックス処理などで物理的に膜から誘出させた方が回収率は高い。

セルロース吸着・凝集法

矢野らによって開発された方法。河川水等大容量のサンプルに DEAE セルロースを加え、アニオン系凝集剤を添加、不織布にてセルロース凝集物を回収。ビーフエキストラクト液にてウイルスを回収する。野外にて濃縮可能なのが特徴。下水にも適応可能。

PEG 濃縮法 (WHO マニュアル)

試料 500 ml に PEG、デキストランを加え、分液ロートに静置。下層部を濃縮物として 5-10 ml を得る (x50-100 倍濃縮)。本マニュアルでは、WHO ガイドラインに示された手法を解説する。なお PEG と NaCl を添加後、遠心分離を行い、沈さを PBS で溶解し超遠心分離して濃縮する方法もよく用いられている。

ウイルス分離/検出

濃縮水にはヒト由来以外のウイルスも同時に濃縮されるため、濃縮後のウイルス検出法を目的に従い計画する。また環境水中の重金属、有機物質等も濃縮されることも念頭に入れておく必要がある。一般的に濃縮産物から直接 PCR を行う場合は①反応阻害物質の影響を取り除くため、必要に応じてフェノール処理なども考慮する、②ユニバーサルプライマーを用いた場合、多くは各種血清型/ゲノタイプ混合物になることが多い。

そのためポリオ、エンテロウイルスを対象とする場合は感受性の異なる細胞 2-3 種類 (RD, HEp-2, Vero 等) を用いると比較的容易に分離できる。

環境水濃縮物中のウイルス量に依存するが、例えば 24 穴プレート等を持ちて複数のウェルに接種することで、単離可能である。流入下水の場合、対象人口が大きな場合は濃縮物の含まれるウイルス量/種類が多く、結果として単離が困難になる。その場合、採水量 (100-1000 ml) 或いは濃縮倍率を下げることで単一の血清型を得るポイントとなる。

いずれの濃縮法でもポリオウイルス分離にはポリオウイルス特異的な L20B 細胞を用いると作業効率が高まる。

ウイルス濃縮効率の確認

いずれの濃縮方法を用いた場合でも、事前に、力価が既知の弱毒 Sabin 参照株等を用いて、環境水への添加試験を行い回収率を確認しておく。

1. 陰電荷膜吸着/誘出法 (50 倍濃縮)

本法は水中のウイルスが酸性下 (pH3.5)、Mg イオン共存のもと陰電荷膜に吸着する原理を用いたウイルス濃縮法である(1、2)。類似の手法として酸溶出法がある(3)。

試薬

MgCl₂・6H₂O、ビーフエキストラクト液、HCl、

器具、消耗品

共通するもの (滅菌済み)

ガラスビーカー、50 ml 遠心チューブ、はさみ、ピンセット、ペトリ皿、10、25 ml ピペット、200 μl、1000 μl チップ、セラムチューブ、シリンジフィルター (0.45 μm) スターラー、200 μl、1000 μl チップ用ピペッター、pH 試験紙

ウイルス濃縮用ろ過装置

① 加圧ろ過装置を使う場合

加圧ろ過装置 (参考: アドバンテック KST-142)、混合セルロースエステルタイプ陰電荷膜 (参考: アドバンテック: A045A142C, 孔径 0.45μm、サイズ 142mm)、濾紙(参考: No.131, アドバンテック: 00131150, サイズ 150mm)、加圧ポンプ

② シリンジで加圧濃縮を行う場合

プラスチックホルダー (参考: アドバンテック PP47) , 混合セルロースエステルタイプ陰電荷膜 (参考: アドバンテック A045A047A, 孔径 0.45μm、サイズ 47mm)、50-100 ml ディスポーザルシリンジ

準備

1) 3%ビーフ液

3 g beef extract(Difco)を 100 ml DW で溶解し、オートクレーブ。

2) 2.5M MgCl₂

塩化マグネシウム (6 水和物) (Magnesium Chloride , 6 - hydrate、MW = 95.3022+108=203.3022)

→ 試薬 50.8g を MilliQ 水に溶かして 100 ml に調整。高圧滅菌。

3) 0.5N HCl を準備する

4) ろ過装置の準備

加圧ろ過装置を使う場合

加圧ろ過装置 Advantec, KST-142) のスクリーン上に濾紙(No.131)1 枚と混合セルロースエステルタイプ陰電荷膜 (A045A142C) 1 枚の順にセットし、ハイゼックスなどに入れ、高圧滅菌。

シリンジで加圧濃縮を行う場合

プラスチックホルダーPP47 にフィルター (A045A047A) を装着し、アルミホイル等で覆い、高圧滅菌後、乾燥。

注) シリンジ濃縮の場合 100 ml 当たり、フィルター1 枚を使用。500 ml ならフィルターを装着したホルダーを 5 組使用。

操作

1) 流入下水濃縮

- ① 流入下水試料を 50 ml チューブ等を用いて粗遠心 (3000 rpm、30 分、4℃)
- ② 上清 (500 ml) を滅菌済みビーカーに移す。
- ③ ビーカーをマグネスティクススターラー上に攪拌子とともに設置。

- ④ 2.5M MgCl₂ 溶液 10 ml 添加（最終濃度 0.05M）し攪拌。
- ⑤ 0.5N HCl を用いて、攪拌しながら pH3.5 に調整。
- ⑥ 試料を加圧ろ過装置にてろ過。あるいは 50-100 ml シリンジでろ過。
（ろ過液は滅菌消毒）

注) 加圧装置を用いる場合、試料をろ過するとき、バルブの開閉を繰り返しながら注意深く加圧ろ過 (1kg/cm²) を行う。急速に加圧すると陰電荷膜が破損する。KST-142 を用いた時 5-10 分でろ過終了。

2) ウイルス誘出

(BSC2 にて)

- ① フィルター—ホルダーよりフィルター回収。
- ② 滅菌済みペトリ皿上にフィルターを移し、ピンセットとはさみでフィルターを裁断。50 ml チューブ中に回収
- ③ フィルター片を入れたチューブへ 3% beef extract を 10 ml を加える（50 倍濃縮）。

(注釈) 誘出液量を変えることで濃縮倍率を変更可能である。

- ④ 5 分間シェーカー或いは 1-3 分ボルテックス攪拌

注) 環境水の水質、ウイルス種、器具の出力パワーによって攪拌時間は異なるため、事前に処理時間 1-5 分の間で処理時間による目的とするウイルスの回収率を確認しておいた方がよい。

- ⑤ 上清を新たな 50 ml チューブ（1 回目誘出）に回収。
- ⑥ 3% beef extract を 10 ml、元のチューブの沈さに加える。
- ⑦ 5 分間シェーカー、或いは 1-3 分ボルテックス攪拌
- ⑧ 上清を 50 ml チューブに回収（2 回目誘出）

(注) 2 回誘出を行うことでウイルス回収率が向上する。またフィルターに吸着した共存物質も除去され、フィルターの色が白色がかってくる。

- ⑨ 1回目、2回目の誘出液を入れたチューブを 3000 rpm (15min, 4°C)で遠心。
- ⑩ 上清を各々0.45 μ m シリンジフィルターにてろ過。
 - 注) タンパク質の吸着量が少ないフィルターを用いる。
- ⑪ ろ過液を保管用チューブ（セラムチューブ等）に使用するまで保管（-20°C）
- ⑫ ウイルス分離、PCR 検出へ

注) 環境濃縮物は多種類のウイルスが含まれている。1回目と2回目の誘出を行うことで異なるウイルス量を含む濃縮産物が得られる。24 穴プレート等を用い、感受性の異なる 2-3 種類の細胞を準備、誘出液を 100-200 μ l ずつ 1 回目 6 穴、2 回目誘出液に対し 4 穴というように接種すると、ウエルによっては単一のウイルスを得る可能性が高まる。このように環境水濃縮液には複数のウイルスが含まれているため、ポリオウイルスに特異的な L20B 細胞を用いると、分離の作業効率が高まる。

文献：

- 1) Matsuura K, , et al: . Microbiol Immunol 28:575, 1984
- 2) Iwai M, et al: .Appl Environ Microbiol 72(9):6381-7, 2006
- 3) 片山浩之: モダンメディア 52:9, 2006

2. セルロース吸着凝集法

本方法は陰荷電した水中ウイルスを DEAE セルロースに吸着させて濃縮するもの。衛生試験法に準拠したものである (1、2)。以下、河川水等大容量の場合 (20 L) の適用例である。

消耗品、試薬

DEAE セルロース (繊維状のものを選択)

アニオン系凝集剤

PBS

抗生剤

採水容器 (硬質或いは折り畳み可能なもの。容量 20 L、消毒済み。)

不織布 (ナイロンなどの素材で親水処理した長さ 30 cm、直径 4-7 cm くらいの筒状のもの。採水容器の口径に合わせる。孔径 20 μm 以下)

手袋

輸送容器 (DEAE セルロースを不織布にて回収したあと保存する容器。滅菌済み)

ビーフエクストラクト誘出液

メンブレンフィルター(ポアサイズ 0.22-0.45 μm 、タンパク質低吸着のもの)

準備

DEAE セルロース

0.1M NaOH と 0.1M HCl で活性化したのち水で洗浄し冷蔵保存。

試料水 20 L あたり 50 ml 使用 (乾燥重量約 6g) 最終 0.03% (w/v)

アニオン系凝集剤

滅菌水で 0.02% に調整。5-8 ml ずつ分注。冷蔵保存。

(注) メーカーにより凝集能が異なるため、DEAE セルロースを水に添加し調整した凝集剤のフロック形成を確認する。

ビーフエクストラクト誘出液

ビーフエキス : 30-50 g と NaCl : 10 g、NaNO₃ : 150 g を水に溶解し全量を 1L にしたのち、pH 9 に調整。100-500 ml に分注し、高圧滅菌後、冷蔵保存。

操作

20L 環境水濃縮の場合

- 1) 環境水 20L を採取した容器に DEAE セルロース 50 ml を添加(乾燥重量で 6 g、0.03% (w/v)。よく攪拌する(10 数秒)
- 2) アニオン系凝集剤を 5-8 ml 加え、数秒攪拌。凝集形成を確認。
- 3) 不織布バッグにて凝集した DEAE セルロースをろ過(1 分程度)、回収。
DEAE セルロースを輸送容器に保管。

以下安全キャビネットで作

- 4) DEAE セルロースを含む不織布バッグをよく絞り、余分な水分を取り除く。
- 5) 5-10 ml のビーフエキストラクト誘出液を加え、不織布バッグをよくもみほぐす。
これを数回繰り返す。
- 6) 絞り液をメンブレンフィルターでろ過。ろ液を回収。
- 7) 抗生剤を適量添加。
- 8) pH7 に調整
- 9) -20°C で保管

注)

- 本方法に準じた市販品はウォーターコンセル(日研生物)である。
- アニオン系凝集剤は事前にテストを行い凝集を確認する必要がある (1)。
- 環境水が少容量の場合は不織布バッグで回収することなく遠心分離で回収し、誘出液を加えウイルスを回収することも可能である (3)。
- 小容量の場合(1 L 以下)、凝集剤添加後、DEAE セルロースを遠心分離で回収し、ビーフ液或いはグリシンバッファー (pH 9.0) で誘出してもよい (3)。

(1) 矢野一好, 吉田靖子, 新開敬行, 他: 水道協会雑誌, 60, 10-23, 1986

(2) 衛生試験法・注解、p128-129 金原出版

(3) 林志直他、東京健安研七年報 Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health, 59, 65-67, 2008

3. PEG 濃縮法

本法は WHO が作成したガイドライン (2003 年) の概略である (1)。なお PEG と NaCl を添加後、遠心分離を行い、沈さを PBS で溶解し超遠心分離して濃縮する方法もよく用いられている。

消耗品、試薬

Dextran T40、PEG6000、NaCl、NaOH、滅菌水、pH 試験紙、クロロホルム

器具

50 ml 遠心チューブ、フラスコ、ビーカー、分液ロート、分液ロートスタンド、スターラー、ミキサー、ピペット、メスシリンダー

準備

以下 0.5 L 環境水 4 回分の試薬の調製を示す。

1.) 22% (w/w) Dextran

40 g Dextran T40 (参考 : Amersham – Pharmacia)

(参考デキストラン 40, 500 g 63700 円)

142 ml 滅菌水

マグネティックスターラーを用いて溶解。4 °C で 2 週間保管可能。

2.) 29%(w/w) PEG 6000

363 g PEG6000 (Fluka AG)

888 ml 滅菌水

マグネティックスターラーを用いて溶解。4°C で 2 週間保管可能。

高圧滅菌可能

3) 約 150 ml 5N NaCl

4) 1N NaOH (1N HCl) –pH 調整用

操作

0.5 L 環境水濃縮

- 1) 環境水を 10 分間 1000 g で遠心分離。上清をフラスコに移す。沈さは 4 °C で保管。
- 2) 1N NaOH を用いて上清の pH を中性に調整(pH 7 –7.5). 容量を確認
(通常は 1N NaOH を数 ml 使用)
- 3) 上清 500 ml に 22% dextran39.5 ml、29%PEG6000 を 287 ml、5N NaCl 35 ml を添加。4°C、1 時間スターラにて攪拌 (シェーカーでも可)
- 4) 1L 容量の分液ロートをスタンドに設置。滅菌水を少量注ぎ液漏れの確認。
(バルブはテフロンのものが便利)
液漏れの無いことを確認し。3) を分液ロートに移し、4°C 1 晩静置。(注)
- 5) 注意深くバルブを開き、下層部と境界部を滅菌チューブに分取。(通常は 0.5L あたり 5-10 ml)
- 6) 1)で保管しておいた沈さを懸濁し 5)に加える。20%になるようにクロロホルムを加え 1 分間よく攪拌する。そのあと便乳剤調整と同様、3000 rpm、1 5 分間遠心し上清を滅菌チューブに移し、抗生剤を添加
- 7) 分注し-20°C (可能なら-70°C)にて保管。
(注) 分液ロートの代わりに遠心分離し、沈さを PBS(-)で溶解してもよい

文献

- 1) Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation
WHO/V&B/03.03 (2003) .
http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_V&B_03.03.pdf

4. 引用文献

1. 山本悌司 2000. ポリオ臨床診断マニュアル. 臨床とウイルス, 28 : 116-128.
2. Shimojo H: 1984. Poliomyelitis control in Japan. Rev Infect Dis 6 (Suppl 2): S427-S430.
3. de Quadros CA, et al: 1997. Eradication of wild poliovirus from the America: Acute flaccid paralysis surveillance, 1988-1995. J Infect Dis 175 (Suppl 1): S37-S42.
4. Hagiwara A, et al: 1999. Genetic analysis of wild polioviruses towards the eradication of poliomyelitis from the western pacific region. Jpn J Infect Dis 52: 146-149.
5. Oostvogel PM, et al: 1994. Poliomyelitis outbreak in an unvaccinated community in the Netherlands, 1992-1993. Lancet 344: 655-670.
6. Yoneyama T, et al: 1995. Characterization of a wild poliovirus type 3 isolated Japan in 1993. Jpn J Med Sci Biol 48: 61-70.
7. Pipkin, PA, et al: 1993. Characterization of L cells expressing the human poliovirus receptor for the specific detection of polioviruses in vitro. J Virol Methods 41: 333-340.
8. 米山徹夫 1999. ポリオウイルス感染症の診断. 日本臨床, 57 : 331-335.
9. World Health Organization: 2004. Polio laboratory manual 4th edition., (WHO/IVB/04.10). Geneva: WHO.
10. Li J, et al: 1996. Genetic basis of the neurovirulence of type 1 polioviruses isolated from vaccine-associated paralytic patients. Arch Virol 141: 1047-1054.

5. 検査依頼先

ポリオウイルスが分離された場合の行政検査による型内鑑別(ワクチン株か否かの判別)については、国立感染症研究所ウイルス第二部で対応可能。

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

国立感染症研究所ウイルス第二部

清水博之

TEL : 042-561-0771

FAX : 042-561-4729

E-mail : hshimizu@nih.go.jp

6. 執筆者

富山県衛生研究所

板持雅恵

福岡県保健環境研究所

世良暢之、石橋哲也

東京都健康安全研究センター

林志直

愛知県衛生研究所

山下照夫

国立感染症研究所 ウイルス第二部

清水博之、西村順裕、吉田弘