



## (抄訳) インフルエンザ様疾患の患者検体からの インフルエンザ A/H5 ウイルスの検出に推奨される診断検査法

(2004年2月19日)

原文：[http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/guidelines/labtests/en/](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/labtests/en/)

### 一般的情報

ヒトのインフルエンザ A ウイルス感染の実験室での診断は、一般的に抗原の直接検出 (direct antigen detection)、培養細胞を用いたウイルス分離、インフルエンザウイルス特異的 RNA の RT - PCR (逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応) による検出で行われる。

この検査法の推奨に関する文書は、インフルエンザ A/H5 感染の臨床あるいは疫学上の根拠のある、インフルエンザ様疾患の患者検体の検査を依頼される検査施設に対する提言として準備された。この文書では、診断検査を実際に行う際に必要な手順のすべては記載していないので、詳細は適宜、参考文献あるいは WHO インフルエンザ協力センターから入手すること。

インフルエンザ A/H5 感染例の症例定義は、「世界規模のインフルエンザ A/H5 サーベイランスに関する WHO ガイドライン」を参照。

原文：[http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/guidelines/globalsurveillance/en/](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/globalsurveillance/en/)

和訳：<http://idsc.nih.go.jp/others/topics/flu/33who-globals.html>

インフルエンザ A/H5 ウイルスの検出に最も適しているのは、発症後 3 日以内に採取された鼻咽頭拭い検体である。検体の取り扱いはずべて、標準的バイオセーフティ指針に従い行われなければならない。

参考1：「インフルエンザ A/H5 感染の検査診断のためのヒト検体採取に関する WHO ガイドライン」

原文：[http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/guidelines/humanspecimens/en/](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/humanspecimens/en/)

和訳：<http://idsc.nih.go.jp/others/topics/flu/25who-humansps.html>

参考2：「WHO laboratory biosafety guidelines for handling specimens suspected of containing highly pathogenic avian influenza A/H5 virus」

原文：[http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/guidelines/handlingspecimens/en/](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/handlingspecimens/en/)

和訳：未収

検査施設での初期の検査の目標としては、インフルエンザ A ウイルスの感染を迅速に診断し、その他の一般的な呼吸器ウイルス感染を除外することである。この診断の結果は 24 時間で得られるはずである。

## インフルエンザ診断の手順

インフルエンザ A の診断に利用できる検査方法には以下がある：

1. 迅速抗原検査：結果は 15～30 分で得られる。
  - *Near-patient* 検査：商品化されている（参照：Nicholson, Wood & Zambon, 2003）
  - *IFA*（免疫蛍光抗体法）：広く用いられており、インフルエンザ A および B を含む他の 5 種類の呼吸器ウイルスにも感度が高い（参照：Lennette & Schmidt, 1979）
  - *EIA*（酵素免疫法）：インフルエンザの NP（核タンパク）に対するもの
2. ウイルス培養：2～10 日で結果が得られる。
3. PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）：現在流行中の A/H1, A/H3, B の HA（血球凝集素）の塩基配列に特異的なプライマーを用いることが一般的となっている。検査結果は 24 時間以内に得ることができる。

以上の様な検査により、インフルエンザ A 陽性の結果が得られた検体については、後述する H5/N1 検査の方法による詳細な検査が行われる必要がある。インフルエンザ A/H5 検出の特殊検査を行うに当たり、検査能力に限界のある施設は以下の 1 および 2 の対応を取ること。

1. 検体を、国立インフルエンザセンターあるいは、他の推奨されるリファレンス研究

施設へ送付し、特定と特性検査を依頼する（以下を参照）。

「インフルエンザ A/H5 感染を実験室診断するための、ヒトと動物由来検体の保存と輸送に関する WHO ガイドライン」

原文：[http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/guidelines/transport/en/](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/transport/en/)

和訳：<http://idsc.nih.go.jp/others/topics/flu/24who-strage.html>

「インフルエンザ A/H5 感染の診断検査のための WHO リファレンス研究施設」

原文：[http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/guidelines/referencelabs/en/](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/referencelabs/en/)

和訳：<http://idsc.nih.go.jp/others/topics/flu/23who-ref.html>

2. 該当 WHO 国事務所あるいは、WHO 地域事務所へ連絡し、検体あるいは分離ウイルスが、詳細な検査のために他の検査施設へ送られたことを報告する。

## インフルエンザ A/H5 の特定

### *IFA (免疫蛍光抗体法)*

臨床検体あるいはウイルスの細胞培養の両方でのウイルス検出が可能。

### 検査に必要な材料

- WHO Influenza Reagent Kit for the Identification of Influenza A/H5 Virus (1997–98, 2003 or 2004 version). The reagents in this kit for the immunofluorescence assay include:
  - influenza type A/H5-specific monoclonal antibody pool
  - influenza A type-specific and influenza B type-specific monoclonal antibody pools
  - influenza A/H1 and an A/H3 subtype specific monoclonal antibodies
- Anti-mouse IgG FITC conjugate
- Microscope slides
- Cover slips, 24 x 60 mm
- Mountant
- Acetone
- Immunofluorescence microscope.

### 手順

WHO Influenza Reagent Kit に含まれている添付文書に従い実施。

## 結果の解釈

核および細胞質に緑色の蛍光が見られる。細胞密度が適性であることを確かめることが重要。ひとつ以上の破壊されていない細胞が、特異的な細胞内蛍光を示していれば、陽性結果と言える。

市販の A/H1 亜型を判定するためのモノクローナル抗体が、A/H5 亜型（2004 年に見られている株を含む）と交差反応することから、WHO キットに含まれるモノクローナル抗体を用いて確認検査を行う必要がある。

## **ウイルス培養**

ウイルス分離が行われると、得られたウイルスの利用範囲は広い。インフルエンザウイルスの培養には MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) 細胞が最も好ましい。分離されたインフルエンザウイルスの同定には、特異的モノクローナル抗体を用いた IFA 法あるいは、HA (赤血球凝集反応) および HAI (赤血球凝集阻止検査) が用いられる。インフルエンザ A/H5 を含む可能性のある検体や、ウイルス培養細胞を取り扱う場合には、標準的バイオセーフティ手法を取る必要がある。

**黄金律：ヒトからの臨床検体と、ブタあるいは鳥類からの検体は、絶対に同じ実験室で取り扱ってはならない。**

(注：これは、ウイルスの分離および分離されたウイルスの取り扱いについての禁忌である)

## 検査に必要な材料

- Madin-Darby Canine Kidney cells (MDCK). ATCC CCL34.
- WHO Influenza Reagent Kit for the Identification of Influenza A/H5 Virus.  
Reagents for identification of A/H5 in cell culture includes:
  - influenza A/H5 control antigen: inactivated virus
  - goat serum to A/Tern/South Africa/61/ H5
  - chicken pooled serum to A/Goose/Hong Kong/437-4/99
- WHO Influenza Reagent Kit (Annually distributed)  
A (H1N1) and A (H3N2) reference antigens and reference antisera.
- Receptor-destroying enzyme (RDE).
- Red blood cells ( chicken, turkey, human type O, or guinea-pig red blood cells) in Alsever's solution.

## 手順

- 1 . 標準的細胞培養の手法を用いて行う (参照：Lennette & Schmidt 1979 , WHO,

2002)。増殖させたウイルスは、標準的実験室内バイオセーフティ指針に従い  
を取り扱わなければならない(以下を参照)。

「WHO laboratory biosafety guidelines for handling specimens suspected of  
containing highly pathogenic avian influenza A/H5 virus」

原文：[http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/guidelines/handlingspecimens/en/](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/handlingspecimens/en/)

和訳：未収

2. 推奨されるすべての対策を含めた、標準的 HA および HAI 手法を用いる。リフ  
ァレンス血清および抗原については、WHO の動物インフルエンザ診断とサーベ  
イランスに記載されている (WHO 2002 年)。

### 結果の解釈

ウイルス分離株の亜型同定は、コントロール抗原検体と、検査対象の検体との比較で行  
う。インフルエンザ A/H5 亜型と判定されるのは、H5 特異的 HAI 価が他の抗血清に対  
するものより、4 倍以上高い場合である。

非特異的凝集素が血清中にある可能性があり、これが疑陰性反応の原因となる。逆に、  
分離株によっては、血清の非特異的阻害に感受性が高いものもあり、これは疑陽性の反  
応の原因となる。

### **ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)**

PCRは、インフルエンザウイルスゲノムの検出に有効な検査法である。インフルエンザ  
はRNAウイルスであるため、逆転写酵素 (RT) を用いてcDNA (相補DNA) を合成す  
る必要がある。ウイルスゲノムを増幅するには、一対のオリゴヌクレオチドプライマー  
(oligonucleotide primer) を必要とする。このプライマーは既知のインフルエンザ  
A/H5のHAの塩基配列と、N1のそれとに基づいてデザインされており、それぞれの亜  
型 (H5, N1) のRNAだけが増幅されるはずである。このPCR産物を用いて、さらにシ  
ークエンス法などで亜型の確認を行う。

### 検査に必要な材料

- QIAamp Viral RNA Mini Kit
- Sterile microcentrifuge tubes, 0.5 and 1.5 ml
- Primer sets

HA gene primers use by the Hong Kong Government Virus Unit modified from  
Yuen et al., 1998:

H5-1: GCC ATT CCA CAA CAT ACA CCC

H5-2: TAA ATT CTC TAT CCT CCT TTC CAA

Expected product size: 358bp

NA gene primers used by the Hong Kong Government Virus Unit modified from Wright et al 1995:

N1-1: TTG CTT GGT CGG CAA GTG C

N1-2: CCA GTC CAC CCA TTT GGA TCC

Expected product size: 615bp

- Positive control (Obtained upon request from a WHO Collaborating Centre for Influenza)
- 10X PCR buffer
- Adjustable pipettes, 10, 20 and 100  $\mu$ l
- Disposable filter tips
- Microcentrifuge, adjustable to 13 000 rpm
- Vortex mixer
- Thermocycler
- Agarose gel casting tray , electrophoresis chamber and power supply
- UV-light box or hand-held UV light (302 nm)

### 手順

詳細は原文を参照。PCR master mixtureを下記に示す。

<i>Reagent</i>	<i>Volume per reaction</i>
10X PCR buffer	5 $\mu$ l
extra MgCl <sub>2</sub> (25 mM): final conc. 2.0 mM	1 $\mu$ l
dNTP (2.5 mM each)	4 $\mu$ l
forward primer (5 $\mu$ M)	5 $\mu$ l
reverse primer (5 $\mu$ M)	5 $\mu$ l
water (molecular grade)	25 $\mu$ l
Taq polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l

a. Aliquot 45  $\mu$ l of master mix into each 0.2-ml PCR tube.

b. Add 5  $\mu$ l cDNA to each tube.

c. Set the follow PCR conditions: (ABI 9700):

94 °C 3 min; 40 cycles of 94 °C 30 sec, 45 °C 30 sec,

72 °C 1 min; 72 °C 7 min.

(PCR conditions optimized using Amersham Pharmacia BioTech System)

## 結果の解釈

期待されるインフルエンザA/H5のPCR産物のサイズは、358 bpで、N1は615 bpである。陽性コントロールなしで、PCRを実施した際には、シーケンス法により確認する。PCRの陰性結果は、そのまま直ちにインフルエンザA（H5N1）の感染を否定するものではない。検査結果は、入手可能な臨床および疫学上の情報と共に解釈しなくてはならない。感染の疑いが強い症例については、これ以外の方法で検査を実施する必要がある。

## 検査による確認

インフルエンザA/H5のすべての検査結果は、WHOのインフルエンザ研究協力センター（WHO Collaborating Centre for Influenza）あるいは他のWHOの推奨するリファレンス研究施設での検査によって確認する必要がある。

「インフルエンザ A/H5 感染の診断検査のための WHO リファレンス研究施設」

原文：[http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/guidelines/referencelabs/en/](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/referencelabs/en/)

和訳：<http://idsc.nih.gov/others/topics/flu/23who-ref.html>

確認検査の結果は、先ずインフルエンザA/H5陽性検体の送付元研究施設へ送付され、その許可が得られた場合にのみ、WHO地域事務所あるいはWHO本部と情報共有する。検査結果は、適切な国家当局が発表するまで機密扱いとなる。

## インフルエンザA/H5感染の血清学的特定

インフルエンザA特異的抗体を測定する血清学的検査方法には、血清凝集阻止検査、酵素免疫抗体法、ウイルス中和試験がある。トリ・インフルエンザA/H5特異的抗体の測定法としては、マイクロ中和試験（microneutralization assay）が推奨される。この方法は、生きたウイルスの取り扱いが必要となるため、実施にはバイオセーフティ・レベル3の封じ込め施設が必要である。

## 参考文献

Fouchier RA et al. (2000). Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 38:4096–4101.

Lennette EH, Schmidt NJ, eds (1979). *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*, 5th ed. Washington, DC, American Public Health Association.

Nicholson KG, Wood JM, Zambon M (2003). Influenza. *Lancet*, 362:1733–1745.

WHO (2002). *WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance*. Geneva, World Health Organization (document WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5, available at: <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/whocdscsrncs2002.5.pdf>).

Wright KE et al. (1995). Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:1180–1184.

Yuen KY et al. (1998). Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet*, 351:467–471.