

# 1. 直接検出法

## a. 電子顕微鏡法

**材料** 一般には、糞便がよく用いられる。

**実施** 前処理：低速遠心あるいはろ過で、細菌や残渣を除いたのち、超遠心し濃縮して試料とする。簡便法では、この操作を省略してもよい。

簡便法：①糞便を蒸留水で10%浮遊液とし、これに等量の1%酢酸アンモニウムを加える。②混和後、電顕用グリットにマウントする。③2%リンタンクスチン酸でネガティブ染色して観察する。

## b. 蛍光抗体法 (immunofluorescence assay ; IFA)

**材料** 主な検査材料と対象になるウイルスは以下のとおりである。

**皮膚**：単純ヘルペス、水痘・帯状ヘルペス、**脳**（生検材料）：単純ヘルペス、麻疹、狂犬病、**角膜塗抹**：単純ヘルペス、**水疱内容塗抹**：単純ヘルペス、水痘・帯状ヘルペス

**検体採取法** 治療前の局所病巣からできるだけ早期に採取する。このとき、病巣の表層細胞以下の基底細胞感染部位を綿棒で強くぬぐいとる。また、水疱の場合は滅菌針を用い、上部の皮膚を除去し、病巣基底細胞を強くぬぐいとる。

**実施** ①材料の塗抹：綿棒で採取した検体を無蛍光スライドガラスに円を描くよう均一に塗抹する。

②風乾：乾燥が不完全であると、検体がはがれることがあるので注意する。

③固定：塗布した検体の上に約0.5mlのアセトンを滴下して10分間固定する。

④**蛍光染色**：至適濃度に希釈したFITC標識抗ウイルス抗体を塗抹標本に滴下し、湿潤箱中で37℃、30～60分反応させる。

⑤**洗浄**：PBSで5分ごとに3回洗浄し、吸取紙で余分の水分を軽く取り除き、封入する。

⑥**鏡検**：蛍光顕微鏡を用いて、200～400倍で観察し判定する。IFAによるウイルス抗原の染色像を図12-1に示した。

**注意** ①非特異蛍光が認められる場合があるので、必ず陰性コントロールをおく。

②検体の採取の良し悪しが結果に大きく影響する。

**試薬** 各種ウイルス IFA 用試薬がデンカ生研から発売されている。研究目的を含めて IFA によるウイルス抗原検出のための検査材料について、感染症別に示した（表12-3）。

## c. 酵素免疫測定法 (EIA, ELISA)

ウイルス抗原検出用の EIA には、2種類の方法がある。1つは、既知のウイルス抗体をポリスチレン製のマイクロプレートやビーズ、マイクロパーティクルなどに固相化しておき、検体中に存在するウイルス抗原を反応させ、次に酵素標識抗ウイルス抗体を結合させて基質の発色によりウイルス抗原を検出するサンドイッチ法である。

もう1つは、固相化された抗体と結合したウイルス抗原に抗ウイルス抗体を結合させ、さらに酵素標識抗グロブリン抗体を結合させる間接法である。以降の手順は前法に準じて実施する。

**材料** 現在市販されている EIA 用測定キットの主な検査材料は以下のとおりである。

**角膜擦過物**：アデノウイルス (TFB)、**鼻咽頭吸引液**：RSウイルス (シスメックス・ピオメリュウ)、**糞便**：ロタウイルス (TFB、アボットジャパン)。

**検体採取法** 治療前の局所病巣をできるだけ早期に採取する。アデノウイルスなどは病巣部分を強く擦過し十分な基底細胞を採取する。このとき、分泌物は極力採取しないよう注意する。

### 糞便中ロタウイルス抗原検出法

**実施** ①検体の調製は、糞便を約0.1～0.2g相当量採取し、1～2mlの希釈液に懸濁させる（約10～20%懸濁液）。

②検体数、コントロール数に合わせ、**抗体不溶化マイクロトレイ**をマイクロウェルホルダーにセットする。なお、検体と試薬は室温に戻しておく。

③**検体および陰性コントロール**を100μl、**陽性コントロール**を2滴（100μl）、それぞれ指定されたウェルに分注、滴下し、マイクロプレートを室温で30分間反応させる。

表 12-3 蛍光抗体法によるウイルス感染臓器での抗原検出

	ウイルスと疾患	生 検	剖検（凍結またはホルマリン固定）
ク ラ ス 2 (危 険 度 分 類)	1. ヘルペスウイルス 単純ヘルペス	皮膚粘膜疾患 脳炎、 全身感染(新生児、 成人)	皮膚、粘膜 脳(全域)、三叉神経節 胎盤、肝、副腎、脾、食 道、肺ほか全臓器
	水痘・帯状疱疹	皮膚粘膜疾患 全身感染	皮膚、食道、神経節、脾 ほか全臓器
	サイトメガロ EB	先天性、後天性 伝染性単核球症 急性結膜咽喉炎、 肝炎、全身感染	胎盤、肺・脾ほか全臓器 リンパ系臓器、肝
	2. アデノウイルス	急性結膜咽喉炎、 肝炎、全身感染	肝、肺ほか全臓器
	3. B型肝炎	B型肝炎	肝
	4. パポバウイルス JC	進行性多巣性白質 脳症	脳、脊髄
	パピローマ	疣贅、尖圭コンジ ローム	皮膚、子宮頸部
	5. パラミクソウイルス 麻疹	皮膚粘膜疾患 巨細胞性肺炎	咽頭粘膜擦過 肺生検
	脳炎	髄液	肺、脳、胸腺、リンパ節 ほか全臓器
	重急性硬化性全脳 炎	髄液	脳、リンパ節ほか全 臓器
ムンプス RS	巨細胞性肺炎	唾液腺、脳、脾ほか全臓器	
6. 風疹	先天性風疹症候群	咽頭擦過	肺 胎盤、胎児眼・耳ほか全 臓器
7. インフルエンザ(A, B)肺炎		鼻・咽頭粘膜	肺、脳ほか全臓器
8. ピコルナウイルス ポリオ1～3	急性前角灰白髄炎 ヘルパンギーナ	咽頭粘膜	脊髄、脳ほか全臓器
コクサッキーB	心筋炎 全身感染	心筋	心、肺、脳ほか全臓器 同上
コクサッキーA16	手足口病	水疱内容	
エンテロ71	〃	〃	
エンテロ70	急性出血性結膜炎	角結膜擦過	眼、脳、脊髄ほか全臓器
エンテロ72	肝炎(A型)	肝	肝
9. 日本脳炎	日本脳炎	髄液	脳
10. HTLV-1	ATL	血液、リンパ節	全臓器

④反応終了後の検体を除去し、洗浄液を各ウェルに満たし、トレイミキサーにかけ、洗浄液を3回取り替えて洗浄する。

⑤**酵素標識抗体**を各ウェルに2滴（100μl）滴下し、混和させる。

⑥各ウェルに**ビオチン標識抗体** 50μlを加え、ただちに**アビジン液** 50μlを加え、室温で30分間反応させる。

⑦④の洗浄操作を4回繰り返す。

⑧各ウェルに**o-フェニレンジアミン基質溶液** 100μlを加え、マイクロプレートを遮光し、室温で15分間反応させる。

表 12-3 つづき

	ウイルスと疾患	生 検	剖検（凍結またはホルマリン固定）
ク ラ ス 3	HIV-1, 2	血液、リンパ節	脳、リンパ節ほか全臓器
	ラブドウイルス	髄液	脳、脊髄、神経節ほか
	ヘルペスウイルスB ワクチニアウイルス ブニヤウイルス	髄液 皮膚粘膜水疱内容 血液	脳ほか全臓器 皮膚ほか全臓器 腎、脳下垂体、脾ほか全 臓器
未分類	クロイツフェルト- ヤコブ病	髄液	脳ほか
ク ラ ス 4	ポックスウイルス	水疱内容、痂皮	全臓器(1979年根絶)
	アレナウイルス	血液、肝	全臓器
	フィロウイルス	血液	全臓器
	ブニヤウイルス	血液、肝	肝ほか全臓器
	トガウイルス	血液、肝	〃

⑨各ウェルに**反応停止液** (1N硫酸) 50μlを加える。

**判定** マイクロプレートのブランク用ウェルを対照として、波長492nmでそれぞれのウェルの吸光度を測定する。結果が判定保留の場合は、再度検査するか、あるいは検体を濃縮して検査するのが望ましい。