

# ウエストナイルウイルス病原体 検査マニュアル（第4版）

## 目 次

ウエストナイル熱・脳炎の概説	3
ウエストナイルウイルス検査に関する一般的な注意事項	4
検査材料の採取・輸送および保管	4
1. 検査材料の採取	
2. 検査材料の輸送	
検査の進め方	
病原学的検査	5
1. ウイルス分離	5
2. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応法	6
3. リアルタイム PCR (TaqMan PCR 法) について	9
血清学的検査	11
1. IgM 捕捉 ELISA 法	11
2. 中和試験	16
ウエストナイルウイルス感染の診断基準	19

## ウエストナイル熱／脳炎の概説

病原ウイルスはフラビウイルス科フラビウイルス属に属するウエストナイルウイルスである。ウエストナイルウイルスの主要な脊椎動物の宿主は鳥とヒト・馬である。主としてイエカ属の蚊により媒介される。感染環は鳥と蚊によって維持されている。フラビウイルス属の中でも、特に日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マレー溪谷脳炎ウイルス、クンジンウイルスと相同性が高く、抗原的に交叉反応を示す日本脳炎血清型群（Japanese encephalitis serocomplex）に分類される。

ウエストナイルウイルスはアフリカ、ヨーロッパ、中東、中央アジア、西アジアなど広い地域に分布している。1999年夏にそれまで西半球には存在しなかったウエストナイル熱・脳炎がはじめてニューヨークで流行した<sup>1)</sup>。最近のウエストナイルウイルス熱・脳炎の流行としては、アルジェリア(1994)、ルーマニア（1996-1997）、チェコスロバキア(1997)、コンゴ共和国（1998）、ロシア(1999)、アメリカ合衆国（1999～）、イスラエル(2000)などがあげられる<sup>2,3)</sup>。2001年末までに、北米では149例のウエストナイル脳炎患者が発症し、死亡者数は18人認められている。CDCによれば、北米のウエストナイルウイルスは、東海岸から南下西進してフロリダ、ジョージア、テキサス、ルイジアナなど合計44州に拡大し、すでにカナダ・カリブ海諸国にも拡がっている。2002年夏には、全米での患者数は4156人におよび、284人が死亡した。2003年も患者数9862人（死者264人）の患者が発生した。さらに2004年の流行は、カリフォルニア州やアリゾナ州で流行が本格化した。2004年の患者は2539人、死者100人が報告され、2005年には患者3000人、死者119人が報告されている。2006年も蚊が活動する時期に入り、テキサス、ミシシッピ州で患者が発生している。

## ウエストナイルウイルス検査に関する一般的な注意事項

国立感染症研究所においてウエストナイルウイルスは、P3 実験施設で BSL3 の取り扱い基準に従って実施すると規定されている。

### 検体の採取・保存について

一般には、ウイルス分離、ウイルス遺伝子の検出と血清学的診断が基本となる。

急性期の患者血清から、ウイルス分離、RT-PCR による遺伝子の検出が可能である。しかし、検出率は約 40%程度といわれている。また、脳炎患者では、血清とともに髄液よりの分離・検出が有用である。

#### 1) ウイルス分離用材料および RT-PCR 用材料

##### ● ヒトのウイルス分離用材料

急性期患者血清、血漿あるいは髄液および死亡例からの脳組織を用いる。感染初期の血液採取は PCR 反応を阻害するヘパリンによる採血は避けて EDTA で採血し、冷蔵 (4°C) またはドライアイスで凍結して輸送する (-80°C に保存する)。

#### 2) 抗体測定用血清

ヒトの患者血清は、急性期 (発病後 5 日以内)、回復期 (発病後 14 日以上) の二回以上採血を行い、ペア血清として抗体測定に用いる。IgM capture ELISA 法、中和抗体試験、H I 試験、C F 試験、等種々の試験に用いることがあるので、凍結融解を繰り返さないよう凍結保存する前に数本のチューブに分注しておくのが望ましい。抗体検査に血漿を用いることも可能である。

#### 3) 検体材料の輸送：デングウイルス感染症診断マニュアル p 3 および添付図 1, 2 を参照のこと。

## 検査の進め方

### 1. 病原学的検査

#### 1) ウイルス分離材料の前処理

ウイルス分離材料を、乳剤にするために用いる希釈液には、抗生物質を加える。ウイルス分離のために採取した材料は、無菌的でない場合が多いからである。抗生物質としては、カナマイシンまたは、ペニシリン・ストレプトマイシンを、通常細胞培養に用いる量を加える。更にウイルスの不活化を防ぐ目的でウシ胎児血清を5%加えるとよい。ただし、このウシ胎児血清には、使用する前にフラビウイルス日本脳炎血清型群に対する抗体が含まれていないことを、中和試験などで確かめることが重要である。材料が少量の場合は、乳鉢と乳棒またはモーター駆動式ガラスホモジナイザーなどを用いる。

ヒトの死亡例からの脳組織は、10%乳剤を作製した後、10,000rpm, 30分の遠心上清を接種材料とする。更に0.45 $\mu$ mのフィルター濾過を行い最終接種材料とする。

#### <死亡鳥からの分離>

死亡後数時間以内と判断され、腐敗がおこっていない死亡鳥から採取した脳・心臓・腎臓・肝臓・脾臓を用いる。10%乳剤を作製した後、10,000rpm, 30分の遠心上清を接種材料とする。更に0.45 $\mu$ mのフィルター濾過を行い最終接種材料とする。

#### 2) ウイルスの分離法

##### (1) サックリングマウス脳内接種法

生後2～4日齢のサックリングマウス(乳のみマウス)の脳内に、一匹当たり0.02mlないし0.03ml接種し、10日間観察する。ウイルス材料1検体当たり1腹のサックリングマウス(10匹)を使用する。発症マウスは、頸動脈より放血後に採脳する。採取した脳は、一部を

-80°Cに保存し、残りの脳は、蛍光抗体法、H I 試験等ウイルスの同定のために使用する。

## (2) 培養細胞を用いるウイルス分離法

ヒトスジシマカの培養細胞クローンである C6/36 細胞を用いる。この方法は、サックリングマウスの脳内接種法と同等のウイルス分離能を持っている。

### 1. C6/36 細胞の培養および分離材料の接種

ア.  $10^5$  cells / ml の細胞浮遊液を作る。

イ. 組織培養用 6 ウェルプレートに 1 ウェル当たり 2ml を分注し、5%CO<sub>2</sub> 下 28°C で 3 日間培養する。

ウ. 分離材料を接種する前に、密度高く細胞が増殖していることを確かめる。培養液を抜いた後、分離用材料 0.1ml をウェルの細胞上に接種する。1 検体当たり 2 ウェルを使用する。

エ. 分離材料を細胞面に浸すように 2 時間静置する。

オ. 2%ウシ胎児血清を含む細胞維持培地（細胞増殖用培地のウシ胎児血清のみ 2%にしたもの）を 2ml 加え、28°C, 5%CO<sub>2</sub> 下で培養する。

カ. 細胞は、細胞変性 (CPE) の有無を 8 日間顕微鏡観察する。

キ. CPE の観察された時点で、培養液の一部を凍結保存する。CPE が明瞭でない場合も、7 ないし 8 日目で培養液の一部を凍結保存する。残りの上清をプラークアッセイ、RT-PCR 法によりウイルスの有無を同定する。

## 3) RT-PCR 法によるウエストナイルウイルス遺伝子の検出

PCR は、E 領域と NS3 領域の 2 種類のプライマーを用いて実施する。E 領域のプライマーはウエストナイルウイルス特異的である。NS3 領域のプライマーは、感度は良いが日本脳炎ウイルスも増幅される。従って、NS3 のプライマーによりバンドが得られた場合は遺伝子解析を実施する。

材料は患者の髄液、血清あるいは血漿および血液単核球を用いる。ヒト死亡例からの脳組織はウイルス分離用の 10%乳剤を調製し、接種

材料として用いるか、直接脳組織から RNA を抽出する。臓器の場合は、目的外産物が生じやすく、目的外産物が多い場合は精製 RNA を Viral RNA purification kit (Roche) 等で再精製する。

#### <死亡した鳥の場合>

死後 24 時間以内と判断され腐敗していない死亡鳥から採取された脳・心臓・腎臓・肝臓・脾臓を用いる。ウエストナイルウイルスの遺伝子は RNA であるため RNase 等により影響されやすい。従って腐敗している組織は用いない。また、臓器の場合は、RT-PCR 反応の際に目的外産物が生じやすいので、ヒト死亡例の場合に準じた処理を行なう。

#### WNV primer sets

##### 1. E 領域

WNNY514

Cgg CgC CTT CAT ACA CA

(Cgg CgC CTT CAT ACA CW: g2266 株の感度を上げるために  
mix primer に変更)

WNNY904

gCC TTT gAA CAg ACg CCA TA

##### 2. NS3 領域

Fla-U5004

ggA ACD TCM ggH TCN CCH AT

Fla-U5457

gTg AAR TgD gCY TCR TCC AT

フラビウイルスの場合核酸を抽出することなく直接 RT-PCR 反応を行なうこともできる。ただし、感度を高めるためにはキットを用いて RNA を抽出する。我々は、森田らの迅速 RT-PCR 法に準じて、逆転写反応と PCR 反応をワンステップでおこなっている。

精製 RNA 10  $\mu$  l に 1  $\mu$  l dNTP (20mM), 1  $\mu$  l の各プライマー (100pM), 10  $\mu$  l の 10x バッファー (100mM Tris-HCl [pH8.9], 15mM MgCl<sub>2</sub>, 800mM KCl, 5mg/ml BSA, 1% コール酸ナトリウム, 1% TritonX-100), および 10U の逆転写酵素と 4U の TTH DNA 合成酵素を添加攪拌し、PCR の機種により必要があれば 1 滴のミネラルオイルを重層し 53°C 20 分から 40 分間逆転写反応させた後、92°C 60 秒, 53°C 60 秒, 72°C 60 秒の PCR サイクルを 30 回から 40 回、さらに 72°C 5 分を 1 回行う。反応液 5  $\mu$  l をアガロース電気泳動し、エチジウムブロマイド染色により増幅された DNA 断片のバンドを確認する。

作製 1 (RT-PCR mix.) [1 sample 当たり] : 50  $\mu$  l/sample で反応する場合

H <sub>2</sub> O	33.1 $\mu$ l
10x Reaction Buffer	5.0 $\mu$ l
dNTP (2mM)	5.0 $\mu$ l (0.2 mM)
Primer S (100pM)	0.5 $\mu$ l (50 pM)
Primer C (100pM)	0.5 $\mu$ l (50 pM)
RTase (20.0 u/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l (10 u)
TTH-104 (5 u/ $\mu$ l)	0.4 $\mu$ l (2 u)
Sample RNA	5.0 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

作製 2 (RNA を抽出しない場合)

- (1) 1% NP-40 (in PBS-) 5  $\mu$  l + RNase inhibitor (110 u/ $\mu$  l) 10 unit\*または 100 unit\*\* ( sample : \*感染培養液、または\*\*血清)。
- (2) 500  $\mu$  l tube に 5  $\mu$  l ずつ分注。
- (3) sample 5  $\mu$  l を加える。  
(RNA 抽出 sample の場合は 1% NP-40 を入れない tube に sample 10  $\mu$  l を入れる。  
この時は RT-PCR mix. に 1 sample 当たり RNase inhibitor (110 u/ $\mu$  l) 10 u を加える。)
- (4) 泡をたてないように pipetting して、これに RT-PCR mix. 45  $\mu$  l を加え、mixture で攪拌する (mineral oil 1 滴で seal)。
- (5) Thermal Sequencer で次の条件で RT および PCR 反応を行う。



53°C	40 min	(Reverse Transcription)	
92°C	60 sec	(Denaturation)	
53°C	60 sec	(Annealing)	— (30-40 回)
72°C	60 sec	(Extension)	
72°C	300 sec	(Complete Extension)	

(6) 反応産生物 5  $\mu$ l をアガロース電気泳動しエチジウムブロマイド染色により増幅された DNA 断片のバンドを確認する。

### ◎リアルタイム PCR (TaqMan PCR) について

Primer:

WN3' NC-forward (10668-10684) CAG ACC ACG CTA CGG CG

WN3' NC-reverse (10770-10756) CTA GGG CCG CGT GGG

WN3' NC-probe (10691-10714) TCT GCG GAG AGT GCA GTC TGC GAT

WNENV-forward (1160-1180) TCA GCG ATC TCT CCA CCA AAG

WNENV-reverse (1209-1229) GGG TCA GCA CGT TTG TCA TTG

WNENV-probe (1186-1207) TGC CCG ACC ATG GGA GAA GCT C

### 反応液の調整 (ABI Prism 7000)

TaqMan One-step RT-PCR master mix (2x)	12.5 $\mu$ l
Primer 1 (最終濃度 25 pmol)	0.25 $\mu$ l
Primer 2 (最終濃度 25 pmol)	0.25 $\mu$ l
Probe (最終濃度 250nmol)	** (Probe により異なる)
Sample	5.0 $\mu$ l
RT-RTI mix	0.6 $\mu$ l
D. W.	***** $\mu$ l
総量	25.0

Primer 濃度:20 pmol, Probe 濃度:10 nmol でも検査は可能です。ただし、各施設で十分感度等確認のうえ使用してください。

使用機種 (ABI Prism 7000)

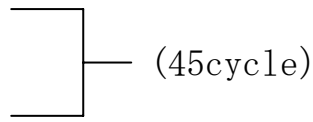
増幅条件

48°C 30min.

95°C 10min.

95°C 15sec.

60°C 1min.



感度は 0.1pfu/tube まで検出可能である。

日本脳炎ウイルス (JaGAR, Beijing 1, Muar, Tenga)、Apoi ウイルスで陰性で、ウエストナイルウイルス (g2266、FCG 株) でも陰性であった。標準株である Eg101 では、検出可能であるが WNENV 領域の場合、感度は低い。

使用機種 (Light Cycler) の場合の TaqMan の条件は下記の如くです。

使用反応液は、LightCycler RNA Master Hybridization Probes を用いる。

\*\*\*\*\*

Light Cycler 用反応液体組成 (Mn 3.5mM)

H <sub>2</sub> O	5.2 μl
MasterMix	7.5 μl
Mn <sup>2+</sup>	1.4 μl
Primer S (100pmol)	0.25 μl
Primer C (100pmol)	0.25 μl
TaqMan Probe	0.44 μl
Sample RNA	5.0 μl
Total reaction volume	20 μl

\*\*\*\*\*

Light Cycler では、下記の時間設定で、RT-PCR 反応を行い、リアルタイムに観察する。

RT 反応	1 サイクル	20 分	61°C
Denature Cycle	1 サイクル	30 秒	95°C
RT 反応	45 サイクル	1 秒	95°C
		30 秒	60°C
Cool Down	1 サイクル	30 秒	40°C

## 2. 血清学的検査

血清反応としては、H I 試験、C F 試験、中和試験、IgM-capture ELISA 法がある。しかし、H I 試験、C F 試験は日本脳炎と強い交叉反応を示すため、ここでは IgM 捕捉 ELISA 法によるウエストナイルウイルス特異的 IgM 抗体の検出法および中和抗体法について詳述する。H I 試験、C F 試験については、日本脳炎診断マニュアルを参照されたい。

### 2) I g M抗体の証明

血清診断では、急性期と回復期のペア血清による抗体上昇により感染を証明するが、単一血清しか採取できない場合がある。IgM 抗体は、感染病日の早期に出現し、しかも、ウイルス特異性が高く、感染を証明できる抗体である。フラビウイルスには、日本脳炎ウイルス血清型群の他にデングウイルス、黄熱ウイルス、ロシア春夏脳炎ウイルスなどのウイルスがある。IgG 抗体がフラビウイルス間で高い交叉反応を示すのに対し、IgM 抗体はフラビウイルス間での比較的特異性に優れた抗体である。たとえ、単一血清しか得られない場合でも、IgM 抗体がウエストナイルウイルスを用いた抗原で証明されればウエストナイルウイルス感染が強く示唆される。ただし、確定診断のためにはペア血清において IgM 抗体が上昇していることを示す必要がある。

### IgM capture-ELISA 法（検査日数：1日）

従来、血清診断は HI 試験で行われてきたが、HI 試験ではデングウイルスやウエストナイルウイルスなど血清学的に交叉反応性を示すウイルスに対する抗体と明確に識別できなかった。HI 試験に代わる血清診断法として、ウイルス感染後の体内でいち早く産生される IgM 抗体を検出することによりウエストナイルウイルス感染を診断することができる。IgG と比較して血中濃度の低い IgM を検出するために、鋭敏な酵素免疫吸着測定法（Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA）を応用して感度を向上させている。

反応原理は以下のようなになる。

- (1) 抗ヒト IgM 抗体をコーティングしたプレートで患者血清中の IgM を捕捉する。
- (2) ウエストナイルウイルス抗原を反応させる。
- (3) 血清中のウエストナイルウイルスに対する IgM と反応したウイルス抗原を、酵素標識した抗ウイルス抗体 (IgG 抗体) で検出する。  
(検出用抗体に IgM が含まれていると固相の抗ヒト IgM と反応してしまう。)
- (4) 酵素に対する発色基質を加え、抗ウイルス抗体と抗原との反応を発色により検出する。  
(抗体の結合量は発色の程度として表現される。)

#### [試薬・機材]

操作手順に含めて記す。

#### [操作手順]

- (1) 市販の抗ヒト IgM を  $2 \mu\text{g/ml}$  に希釈し、プレートへ分注 ( $0.1 \text{ ml/well}$ ) する。
  - \*Coating buffer, pH 9.6:市販品もある
  - \*抗ヒト Ig M ( $\mu$  chain specific ) Goat serum は、アフィニティ 精製した市販のポリクローナル抗体を使用する。
  - \*プレートは、市販の ELISA 用平底プレートを使用する。最近 Nunc 社などから高吸着性 ELISA 用プレートも発売されており、これを用いると感度をあげることが可能である。抗ヒト IgM は、 $4\sim 5 \mu\text{g/ml}$  に希釈して用いる。
- (2) 希釈した抗ヒト IgM を固相表面へコーティングする。

プレートは、各検体につきウイルス抗原と未感染対照抗原で反応するようにレイアウトする。また、コーティングしないでプレートの非特異的反応を検出するためのプレートコントロールウェルを割り振る。

  - \*プレートをシールテープやサランラップなどで蒸発防止して、室温に 2 時間以上置く。場合により、このステップを冷蔵庫内に一晩置いても良い。
- (3) 抗ヒト IgM のコーティングが完了後、プレートをバッファで洗浄する。

- \*洗淨バッファーは 0.05 % Tween 20 を含むリン酸緩衝食塩水 (PBS) を用いる。
- (4) プレートのコーティングの間に、被験血清の準備を行う。
- \*被験血清 (1 vol.) と血清用希釈液 (100 vol.) とを混合する。
- \*血清希釈には、フラビウイルスに対する抗体を含まないウシ血清、ブロッコエース、牛血清アルブミンなど市販のキャリアタンパクを 10 % 程度添加する。
- (5) 抗ヒト IgM 抗体をコーティングし洗淨したプレートへ、希釈した被験血清を 0.1 ml ずつ加える。
- \*ウイルス抗原、非感染上清ともに複数のウェルを使って、結果の信頼性を確保する。
- (6) プレートを室温に 60 分間置く。
- \*このステップを冷蔵庫内で一晩行うことも可能である。  
冷蔵庫内で一晩反応させる場合は、蒸発防止のためプレートをシールする。
- (7) 被験血清と反応の終了したプレートを洗淨する。
- \*被験血清を取り扱う際には手袋を着用する。
- \*被験血清のふくまれた洗淨バッファーは流しに直接捨てないで、滅菌のできる容器に溜めておき、実験終了後に滅菌してから廃棄する。
- \*洗淨は 3 回以上行う。ELISA 法では洗淨操作が最も重要で、非特異的反応の大半を低減することができる。
- (8) ウエストナイルウイルス抗原と室温 2 時間以上反応させる。
- \*抗原として使用するウエストナイルウイルスは、Vero 細胞 (9013) で増殖させて用いる。
- \*培養したそれぞれのウエストナイルウイルスの抗原力価を ELISA で測定する。
- \*非感染の Vero 細胞 (9013) 培養液を、対照抗原および力価調整用の抗原希釈液として使用する。0.1%  $\beta$  プロピオラクトンで不活化したウイルス抗原も、多少抗原力価が低下するが使用可能である。
- (9) 抗原との反応後、プレートを洗淨する。
- \*ウイルス抗原は滅菌してから廃棄する。
- (10) プレートに結合したウイルス抗原を酵素標識した抗ウイルス抗体

で検出する。

(11) プレートを室温に 60 分間置く。

(12) プレートを洗浄する。

(13) 発色基質液を準備する。

\* 発色基質は用いた酵素の種類により選択する。

例としてパーオキシダーゼの検出系について記載する。

\* 発色基質 TMB (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine)

(14) 発色液を加え (0.1 ml/well)、暗所で室温 10 分間反応させる。

(15) 発色を停止する。

\* TMBの場合は、1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を 0.1 ml/wellに加える。

(16) ELISA 用の吸光度計で吸光度を測定する。

\* 吸光度の波長は、使用した発色基質により決定する。

(TMB の場合は 450nm で測定する。)

\* 吸光度の測定は、発色停止後 1 時間以内に行う。

以上で測定が完了したので、次に結果の評価を行う。

(17) 得られた吸光度より被験血清の抗体の有無を判定する方法は、  
(ウイルス抗原との反応で得られた吸光度値- プレートの非特異的発色値) P/  
(未感染コントロール抗原で得られた吸光度値- プレートの非特異的発色値) N  
= P/N Index Value とし、

>2.0 を IgM 抗体陽性、<2.0 を陰性とする。

(1) ただし、陰性血清を用いた OD 値が未感染コントロール抗原で  
得られた吸光度値を上回った場合、この値を N として使用する。

(2) Index Value が 2.0 以上 2.2 以下であった場合は、血清を階段  
希釈し 100 倍、200 倍、400 倍、800 倍を用いて再検し、OD 値が  
低下することを確認する。非特異的反応ではきれいなカーブを描  
かない場合が多い。

(3) 日本脳炎抗原に対しても陽性反応を示す場合は、(ウエストナ  
イルウイルス抗原との反応で得られた P/N Index:W/ (日本脳炎ウ  
イルス抗原で得られた P/N Index:J) =W/J Index Value とし、  
>1.5 以上を陽性とする。1.0 以上 1.5 未満は、中和試験結果と総  
合して判定する。

---

《サンドイッチ ELISA 法による JEV, WNV の抗原量の測定法》

本法により両ウイルスの抗原量を揃え、上記 IgM capture-ELISA を実施し、JEV と WNV の鑑別診断に用いる。

1. IgG の固相化

◎IgG: Anti-Flavivirus monoclonal antibody (D1-4G2-4-15) 10  $\mu$  g/mL

ATCC より Hybrydoma 購入 (HB112)

◎Plate: Nunc 社,

◎Diluent: 0.05M Carbonate buffer, pH9.5

(\*Coating buffer, pH 9.5:市販品もある)

方法:100  $\mu$  l/well, 4°C Overnight

2. 一次反応

◎WNV 抗原:g2266(Vero 上清)

◎JEV 抗原:JaGAr01(Vero 上清)

◎Diluent: 0.1% BSA, 0.05% Tween-20, PBS

方法: 標準抗原、参照品、検体を上記の希釈液で一次希釈

↓

希釈用 Plate(蛋白の吸着しない 96well plate)で 2 倍階段希釈

↓

0.05% Tween-20, PBSを用いて固相化したPlateを 6 回洗淨後、希釈した抗原を 100  $\mu$  l/well 添加

↓

室温、60min.反応

3. 二次反応

◎HPRO-IgG: HPRO-Anti Flavivirus monoclonal antibody (D1-4G2-4-15) IgG

500x ( 3  $\mu$  g/ml)

◎Diluent: 0.1% BSA, Tween-20, PBS

方法:0.05% Tween-20, PBS を用いて一次反応の終了した Plate を 4 回洗淨する.

↓

希釈した HPRO-IgG を 100  $\mu$  l/well 添加

↓

室温、30min.反応

4. 発色

発色基質液を準備する。

\*発色基質は、用いた酵素の種類により選択する。

例として、パーオキシダーゼの検出系について記載する。

- \*発色基質 TMB (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine)  
発色液を加え (0.1 ml/well)、暗所で室温 10 分間反応させる。  
発色を停止する。
- \*TMBの場合は、1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を 0.1 ml/wellに加える。  
ELISA 用の吸光度計で吸光度を測定する。
- \*吸光度の波長は、使用した発色基質により決定する。  
(TMB の場合は 450nm で測定する。)

抗原量を揃える場合、OD 値 1.2~1.5 の範囲内で合わせる。希釈液は陰性抗原として使用する Vero 細胞上清 (2%FBS 含有) を使用する。

---

### 3) 中和 (NT) 抗体価の測定法

本方法は、ウエストナイルウイルスを使用するため P3 施設を有する施設に限定される。

中和抗体価の測定は特に重要である。IgG 抗体のフラビウイルス間の高い交叉性は、蛍光抗体法、CF 法、HI 試験法において認められるが、中和抗体測定法においてはウイルス特異性が高い。中和抗体測定法は、アフリカミドリザル腎細胞由来 Vero 細胞を用いたプラークアッセイについて述べる。

#### ● Vero 細胞を用いたウエストナイルウイルスの中和試験法

##### 1) 材料

- a. 被検血清：個々の血清を 56°C、30 分間非働化する。
- b. Vero 細胞：ヒューマンサイエンス細胞資源バンクより購入 Vero 9013 株
- c. Eagle's MEM：MEM (ICN Biomedical, Inc 製、Earle's salt, L-glutamine を含む)  
粉末を 5 倍濃度に溶解し、ミリポア濾過後 200ml ずつ分注し、-20°C 以下で保存。  
日水製薬製の Eagle's MEM を用いることも可能である (この場合、高圧滅菌後の培地に L-glutamine を規定量追加すること)。
- d. 細胞増殖用培地：10%FBS-Eagle's MEM pH 7.35



- e. 重層培地：2%FBS－MEM--1%メチルセルロース培地 pH 7.75
- f. 希釈液：2%FBS－MEM pH 7.35
- g. 細胞継代用トリプシン液：詳しくは日本脳炎の章を参照のこと
- i. Plaque Assay 用プレート：6 well Cluster。
- h. 組織培養用プラスチックフラスコ（75 または 150 cm<sup>2</sup>）
- j. 牛胎児血清(FBS)： 56℃, 1 時間非働化して用いる。

## 2) 細胞プレートの作成手順

- a. 細胞の継代と同様にトリプシン処理を行い、細胞増殖用培地を用いて細胞数を  $2 \times 10^5$  cell/ml に調製する。
- b. 6 穴プレートに 2ml/well ずつ分注し、均一な細胞シートになるようにプレートを前後左右によく振とうした後、37℃, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で静置培養する。
- c. 培養 1 日後に使用する。80～90% 程度の細胞シートが形成されていれば使用可能。

## 4) 中和試験法

- a. 非働化した検査血清を希釈液で 5 倍にうすめ、2 倍階段希釈を行う。
- b. 保存ウイルスを、ウイルス力価の成績から計算して、200PFU/100  $\mu$ l になるように希釈し、これを攻撃ウイルスとする（氷浴中）。
- c. 血清の各希釈液に攻撃ウイルスを等量加える  
（氷浴中）。  
対照ウイルスは、希釈液に攻撃ウイルスを等量加える  
（氷浴中）。
- d. 各試験管は、よく振とう混和してから 37℃ の恒温水槽内で 90 分間中和反応をさせる。
- e. 中和反応の終わった各試験管は、すみやかに氷浴中に移す。
- f. 細胞プレートの培養上清を完全に除く。その後の細胞面の洗浄は必要としない。
- g. 対照ウイルス、血清・ウイルス混和液のそれぞれを、well あたり 100  $\mu$ l を壁面より接種する。

- h. 対照ウイルスは 12 well、血清・ウイルス混和液の場合は 3 well ないし 4 well を用いる。
- i. 接種直後に接種液が細胞全面に行き渡るようにプレートを軽く動かす。
- j. ウイルス吸着時間は、37°C, CO<sub>2</sub>インキュベーター内で 90 分。その間 15 分毎にプレートを動かして接種液が細胞全面に潤うようにする。
- k. ウイルス吸着反応終了後、接種液を除かずに、1%メチルセルロースMEM重層培地 3mlを各well に加え、37°C, 5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で、6日間培養する。
- l. 6日間の培養終了後、各 well の重層培地上へ 10%ホルマリン液（ホルマリン原液は 37%であるが、これを 100%に見立て、M/100 P B S (-) [pH 7.2]を用いて 10 倍に希釈したもの）を 1.5ml 加えよく振とうし、培地とホルマリン液を混和後、室温で 1 時間以上放置する。（1日間放置してもかまわない）。
- m. ホルマリン固定終了後、水道水にて培地・ホルマリン液を洗い落とす。
- n. メチレンブルー染色液を各 well に 1.5ml 加え 1 時間室温に放置する。  
染色終了後、水道水にて染色液を洗い落とし、プラークカウントを行う。染色したプレートは永久保存が可能である。

#### 4) プラーク計数と中和の判定

判定としては、対照群のプラーク数および対照陽性血清の抗体価が次の条件に適合した場合、検査は適正となる。

- a. ウイルス対照群のプレートの、プラーク数の平均値が 50～100 の間にあること。
- b. 血清希釈のそれぞれのプラーク減少率から、50%プラーク減少率を求め、その血清希釈倍数を中和抗体価とする。

## ウエストナイルウイルス感染の診断基準

次のいずれかにあてはまれば「ウエストナイルウイルス感染」とする。

1. ウエストナイルウイルスが分離される。
2. RT-PCR 法による遺伝子検査で、ウイルス特異的遺伝子が検出される。
3. ウエストナイルウイルス特異的 IgM 抗体が血中および脳脊髄液中に検出される。
4. ウエストナイルウイルス中和抗体が検出され、急性期と回復期のペアー血清で4倍以上の上昇が認められる。

### (註) 注意事項

- 1) 確定診断のためには、IgM 抗体においても急性期に比し、回復期の血清で上昇していることを確認する必要がある。
- 2) IgM 抗体、中和抗体においてウエストナイルウイルスに対する抗体価が日本脳炎ウイルスに対するよりも高力価であることを確認する必要がある。

## References

1. Melnick, J.L.: Classification and nomenclature of viruses. *Progr. Med. Virol.*, 17, 290-294, 1974
2. Bundo K, Igarashi A : Antibody capture ELISA for detection of immunoglobulin M antibodies in sera from Japanese encephalitis and dengue hemorrhagic fever patients. *J Virol Methods*, 11, 15-22, 1985
3. Goro K. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. *J Virol Methods*, 72, 27-41, 1998
4. Mariko T. Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, 41, 311-322 1993
5. Lanciotti RS. Rapid detection of WNV from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 38:4066-4071. 2000
6. RS. Lanciotti., et al. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* 286:2333-2337, 1999.
7. Giladi M, Metzker-Cotter E, Martin DA et al. West Nile encephalitis in Israel, 1999: The New York connection. *Emerging Infectious Diseases* 7:659-661, 2001
8. Briese T, Jia X-Y, Huang C. Grady LJ, Lipkin WI. Identification of Kunjin/West Nile-like flavivirus in brains of patients with New York encephalitis. *Lancet* 354:1261-1262

\*\*\*\*\*

平成 14 年 10 月 28 日  
平成 15 年 2 月 12 日改訂  
平成 15 年 8 月 28 日改訂  
平成 16 年 8 月 11 日改訂  
平成 17 年 5 月 18 日改訂  
平成 18 年 7 月 3 日改訂

ウイルス第一部  
高崎 智彦  
倉根 一郎

Fax:03-5285-1188 e-mail: [takasaki@nih.go.jp](mailto:takasaki@nih.go.jp)

\*\*\*\*\*