

デングウイルス感染症診断マニュアル

目 次

デング熱・デング出血熱の概説

デングウイルス検査に関する一般的な注意事項

検査材料の採取・輸送および保管

1. 検査材料の採取

2. 検査材料の輸送

検査の進め方

1. 検査順序

2. 検査結果の報告

病原学的検査

1. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応法

(Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)

2. ウイルス分離

3. ウイルス感染価の測定法

4. ペルオキシダーゼ・抗ペルオキシダーゼ法

(Peroxidase- anti-peroxidase, PAP)

血清学的検査

1. IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法

2. 中和抗体価の測定

デングウイルス感染の診断基準

引用文献

デング熱の概説

デングウイルスはフラビウイルス科に属する1本鎖RNAの球形ウイルスであり、交叉反応を示すが交叉防御免疫が成立しない4つの血清型（1～4型）が存在する。デング（dengue）とは、スペイン語の dengüero（英語の dandy）からきており、その激しい背部痛による姿はしゃれ者（dengüero=dandy）があたかも気取って歩くような姿に似ていることから、この呼び名があるとされている(1)。デングウイルスの主な媒介蚊はネッタイシマカ（*Aedes aegypti*）で、ヒト一蚊一ヒトのサイクルで伝播する。森林ではサル一蚊一サルの伝播様式もあると言われる。国内に常在するヒトスジシマカやヤマダシマカなども媒介蚊になりうる(2)。臨床の特徴は3～10日間の潜伏期の後に、全身の不快感、倦怠感といった前駆的症状にはじまり、突然の発熱、頭痛、全身の筋肉痛がほぼ同時に出現する。発熱は二峰性であることが多いが、約1週間ほどで解熱する。発疹は発熱の後半期に出現することが多い。デング熱(Dengue Fever[DF])は本来、自然治癒傾向の強い良性疾患であるが、時には血小板減少による出血症状を伴ったデング出血熱(Dengue Hemorrhagic Fever [DHF])にまで移行することがある。さらにデングショック症候群(Dengue Shock Syndrome [DSS])まで進行し、適切な治療を施さないとショック死する危険性の高い重篤な病型に至る。流行地は東南アジア、中南米など熱帯地域であり、WHO では年間数百万人の患者発生と数万人単位の死亡があると推計している。近年、再興感染症として世界的に拡がりつつある。わが国では1940年代の一時期に関西以西でデング熱の流行がみられたとの記録があるが、それ以降、国内感染のない感染症であるが、近年、輸入感染症として持ち込まれる症例が増えつつある(3)。したがって、流行地域からの不明熱・発疹疾患を呈する入・帰国者については、本症の感染を疑い検査・診断を行う必要がある(4)。

デングウイルス検査に関する一般的な注意事項

デングウイルスはP2実験施設でBSL2の取り扱い基準に従い行う。即ち、患者または疑わしい患者由来の検査材料等を取り扱う際にはレベル2以上の施設を備えた検査室で行う。

検査材料の採取・輸送および保管

1. 検査材料の採取

(1) ヒトの血液

1) 急性期の血液・血清

発症後5～6日以内(発熱期、解熱以前)のものが望ましい。この時期の検体は、ウイルスあるいはウイルス遺伝子の検出に適する。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、0～4℃に保ち検査室内に直ちに輸

送する。ウイルス分離用の検体は -80°C 以下で保存する。

2) 回復期の血清

発症後 10 日以上経過していることが望ましい。この時期の血清は抗体（特に IgM 抗体）の検出に適する。検体は $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ に保ち、注意して輸送するが、凍結して輸送しても良い。抗体検査用の血清の保存は -20°C で良いが、IgM 抗体を含む感染初期の血清を長期間保存する場合は -60°C 以下で保存する方が良い。検体は小分けして保存し、出来るだけ凍結・融解を繰り返さない方が良い。

(2) 蚊

ネッタイシマカなどの蚊の材料は、直ちに乳剤にしてウイルス分離に供しない場合は、蚊のままチューブに入れドライアイスで輸送し、 -80°C に保管する。特に、吸血蚊はヒト血中の抗体でウイルスが中和されるために、血液が消化されるまで（約 24 時間）生かしておいた後、 -80°C で保管する。

2. 検査材料の輸送

- (1) 検査材料（検体）は漏れのないように包装のうえ、区別できるように記号等を付し、発泡スチロール箱に収める。また、他の場所へ検査を依頼する場合は、郵政省告示第 760 号（平成 2 年 12 月 28 日号外）に基づき、図 1 のように包装のうえに感染性物質であることを明示して輸送する。
- (2) 検査材料は採取後、直ちに検査室に搬送する。
- (3) 検査材料を送付するときには、氏名、年齢、性別等の必要事項を記入のうえ、検査材料と一緒に送付する。なお、送付するところには、検体数、搬入予定時刻などをあらかじめ連絡しておくこと。

検査の進め方

1. 検査順序

検査材料を受理した検査室では直ちに検査を実施する。検査順序の概略は図 2 のとおりである。ヒトからの検査材料（血液および血清）の場合、ウイルスの分離、血清中の抗体価の測定（IgM-capture ELISA 法、IgG-ELISA 法、中和抗体測定、等）および遺伝子検査法（RT-PCR）によるウイルス遺伝子の検査が可能である。蚊を検査材料にした場合、ウイルス分離およびウイルス遺伝子の検査が可能である。

2. 検査結果の報告

検査結果については、「 Dengue ウイルス感染の診断（13 頁）」の事項等に基づいて、速やかに書面で関係者等に報告する。

病原学的検査

病原学的検査には、主に PCR 法によるウイルス遺伝子の検出とウイルスそのものを分離する方法がある。前者は迅速で、特異的プライマーを用いて型別診断が可能である。また、PCR 産生物を用いて、塩基配列を解析することにより分子レベルでの検査が行える。後者のウイルス分離は確実な検査・診断法であり、golden standard と言われる。患者検体からのウイルス分離では、従来は蚊（主にオオカの一種）への注射法(5)または乳のみマウスの脳内接種による方法が用いられていたが、最近では培養細胞に感染させる方法が有用である。

1. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応法

(Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) : (検査時間 : 6 時間)

この RT-PCR 法は逆転写反応 (Reverse transcription, RT) とポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction, PCR) を 1 本のチューブ内で行う方法で、迅速且つ簡便であり、contamination の危険も少ない(6)。

(1) 試薬・機材

Isogen-LS (和光純薬)

Chloroform

Iso-propanol

TTH DNA ポリメラーゼ (Toyobo (TTH-104))

逆転写酵素 (RTase、[Life Science inc.])

Nonidet P-40

エタノール

H₂O (DNase, RNase-none detected, 0.2 μm filtered H₂O)

ミネラルオイル

エチジウムブロマイド

Ribonuclease inhibitor (宝酒造)

NuSieve GTG(3:1)アガロース

pHY marker (宝酒造)

ミューピッド 2 (コスモバイオ)

UV transilluminator (フナコシ)

ポラロイドフィルム (ISO 3000)

(2) RNA の抽出 (所要時間 : 1.5 時間)

患者血液または血清およびウイルス感染培養液から市販の Isogen-LS と chloroform を用いて RNA を抽出する方法を述べる。方法は次の通りである。

- 1) sample 50 μl に ISOGEN-LS 200 μl を加える。
- 2) mixture で mix する。
- 3) chloroform 40 μl を加える。(chloroform 0.2 ml/1ml ISOGEN-LS)
- 4) mixture で激しく mix する。
- 5) 12K(12,000rpm)以上で 10 分間(4°C)遠心。
- 6) 上清 (150 μl をとる。
- 7) 上清(150 μl)に 150 μl iso-propanol を加える。軽く混ぜて室温で 5 分間放置。
- 8) 12K(12,000rpm)以上で 10 分間(4°C)遠心。
- 9) 上清を捨てる。
- 10) pellet を約 300 μl の 75% ethanol で洗浄。
- 11) 7,500 rpm で 6 分間(4°C)遠心。
- 12) 上清を捨て室温で 5-6 分間乾燥する。
- 13) H₂O 50 μl で再浮遊。
- 14) 再浮遊した sample は-80°Cに保存。

(3) Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)法

(検査時間：3～4時間)

精製 RNA 10 μl に 1 μl dNTP (20mM), 1 μl の各プライマー (Table 1) (100pM), 10 μl の 10x バッファー (100mM Tris-HCl [pH8.9], 15mM MgCl₂, 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 合成酵素を添加し攪拌し 1 滴のミネラルオイルを重層し 53°C 10 分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 回行い、さらに 72°C 5 分行った。反応産生物 5 μl 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。検査方法は次の通りである。

作成 1 (RT-PCR mix.) [1 sample 当たり]

H ₂ O	80 μl
10x Reaction Buffer	10 μl
dNTP	1 μl (20 mM)
Primer S	1 μl (100 pM)
Primer C	1 μl (100 pM)

RTase (20.0 u/ μ l) 0.5 μ l (10 u)
 TTH-104 (8 u/ μ l) 0.5 μ l (4 u)

作成 2

- 1) 1% NP-40 (in PBS-) 5 μ l + RNase inhibitor (110 u/ μ l) 10 u*または 100 u**
 (sample : *感染培養液の場合、または**血清の場合)。
- 2) 500 μ l tube に 5 μ l ずつ分注。
- 3) sample 5 μ 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 μ l を入れる。この時は RT-PCR mix. に 1 sample 当たり RNase inhibitor (110 u/ μ 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. 90 μ l を加え、mixture で攪拌して、mineral oil 1 滴で seal。
- 5) Thermal Sequencer (使用機種 : IWAKI TSR-300) で次の条件で RT および PCR 反応を行う。

		槽
53°C	600 sec (Reverse Transcription)	C
92°C	60 sec (Denaturation)	A
53°C	60 sec (Annealing)	C
72°C	60 sec (Extension)	B
72°C	300 sec (Complete Extension)	B

(30-40 回)

- 6) 反応産生物 5 μ 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。

2. ウイルス分離

患者および野外で採集された蚊からウイルスを分離することは、臨床、疫学も重要である。日本脳炎ウイルスはじめ種々のアルボウイルスの分離に多く用いられている *Aedes albopictus* 由来培養細胞 C6/36 株を用いたウイルス分離法について記載する。

2-1. 血液からのウイルス分離法

デングウイルスの分離にはヘパリン血が最も良い。しかし、PCR 検査用にはヘパリン血は適さないので、PCR 検査も同時に行う場合には EDTA で採血したものをを用いる。

(1) 準備する器具と試薬

培養器 (28°C)

Eagle's MEM

非必須アミノ酸液 (100 x conc.)

ウシ胎児血清 (56°C, 30 分非働化したもの)

PBS

組織培養用プレート (24 well)、培養用プラスチックチューブ (平底)

(2) 培養液の調整

Eagle's MEM に非必須アミノ酸液 0.2mM を添加する。これにウシ胎児血清を 10% になるように添加したものを細胞増殖用培養液とし、2% になるように添加したものを細胞維持培養液として用いる。

(3) 検査方法

- 1) C6/36 細胞を細胞増殖用培養液を用いて 24well プレートに培養する。
- 2) 培養 1 日後のプレートの培養液を除き、検体を細胞維持培養液で 10 倍に希釈したものを well あたり 50~100 μ l 接種して、培養器内に静置する。
- 3) 静置培養 1 時間後、細胞維持培養液を加えて培養器 (28°C) で培養する。
- 4) 7~10 日培養後、培養上清を採取する。採取された検体は直ちに分離の確認を行う。
- 5) C6/36 細胞はデングウイルス感染により細胞変性効果 (CPE) を示さないことが多いので、採取した検体をさらに新しい C6/36 細胞に接種すると分離の効率が高まる場合がある。

(4) 分離の確認

PCR 法によりウイルス遺伝子の検出および Vero 細胞などによるプラーク形成法によりウイルス分離を確認する。さらに、抗デングウイルス抗体に対する中和等により確認する。

2-2. 野外採集蚊からのウイルス分離法

(1) 準備する器具と試薬

ろ過用フィルター (口径 0.45 μ ニトロセルロースフィルター、ミリポア一製ディスポ)。その他は血液からのウイルス分離法の器具と試薬に準ずる。

(2) 検査方法

- 1) C6/36 細胞を細胞増殖用培養液を用いて 24well プレートまたはプラスチックチューブ (平底) に培養する。
- 2) 被検材料の蚊を 100 匹以内を 1 プールとし、各プールに 2-4 ml の細胞

- 維持培養液を加え、ホモジナイズする。
- 3) 2,000-3000 rpm で15分間遠心する (4°C)。
 - 4) 遠心上清をろ過用フィルターでろ過し、このろ過液を well またはチューブあたり 100 μ l ずつ接種する。
 - 5) 静置培養1時間後、細胞維持培養液を加えて培養器 (28°C) で培養する。
 - 6) 7~10日培養後、培養上清を採取する。採取された検体は直ちに分離の確認を行う。

3. ウイルス感染価の測定法 (検査日数: 7~9日)

(1) 検査方法

- 1) Vero 細胞を 6well 平底プレートに播く (5×10^5 cells/3 ml/well)。
- 2) 35°C, 5% CO₂ 培養器内で1日培養する。
- 3) 培養液を捨て、被検ウイルス液を接種 (200 μ l/well)。
- 4) 35°C, 5% CO₂ 培養器内で60分間吸着。
- 5) 1% Methylcellulose-MEM (2%FBSを含む)維持培地を加える (3 ml/well)。
(1st. overlay 培地に 0.9% low melting agarose を用いる方法もある。
この場合、培養 5-6 後に 2nd. overlay 培地として 0.04% neutral red-agarose を用いて染色してプラークをカウントする。)
- 6) 35°C, 5% CO₂ 培養器内で7~9日培養する。
- 7) 10%ホルマリン (in PBS) 液で固定 (室温 30分)。
- 8) 水道水で洗浄後、0.038%メチレンブルー液で染色する。
- 9) プラークをカウントして、感染価を算定する。

4. Peroxidase- Anti-Peroxidase (PAP) (ペルオキシダーゼ・抗ペルオキシダーゼ) 法 (検査日数: 4~5日)

この方法は細胞内ウイルス抗原をペルオキシダーゼと抗ペルオキシダーゼの抗原抗体複合物をフォーカスとしてとらえることができ、Focus Forming Unit (FFU) として感染価測定やウイルスの中和抗体測定法に応用できる (7, 8)。

(1) 試薬・機材

- MEM 培養液
- ウシ胎児血清 (56°C, 30分非働化済)
- PBS
- エタノール

抗デングウイルスウサギ血清
抗ウサギ IgG ヤギ血清 (Cappel 社製)
PAP complex (Cappel 社製)
ベンチジン 4 塩酸塩
H₂O₂
96well 平底マイクロプレート
CO₂ 培養器
顕微鏡

(2) 検査方法

- 1) 細胞を 96well 平底マイクロプレートに播く (5x10⁴cells/100 μ l/well)。
- 2) 37°C, 5% CO₂ 培養器内で 1 日培養する。
- 3) 被検ウイルス液を 96well 丸底マイクロプレートを用いて 10 倍階段希釈する。
- 4) 培養液を捨て、被検ウイルス液を接種 (25 μ l/well)。
- 5) 37°C, 5% CO₂ 培養器内で 90 分間吸着。
- 6) PBS で 1 回洗浄 (100 μ l/well)。
- 7) 維持培地を加える (100 μ l/well)。
- 8) 37°C, 5% CO₂ 培養器内で 48~72 時間培養する。
- 9) エタノールで固定 (室温 10 分)。
- 10) PAP 染色は各ステップとも室温または 37°C で 30~40 分づつ静置して行う。
各ステップ毎に PBS で 1 回洗浄 (100 μ l/well)。
 - ・ 抗デングウイルスウサギ血清; 1:1,000 希釈 in PBS (100 μ l/well)。
 - ・ 抗ウサギ IgG ヤギ血清(Cappel 社製); 1:500 希釈 in PBS (50 μ l/well)。
 - ・ PAP complex (Cappel 社製); 1:10,000 希釈 in PBS (50 μ l/well)。
- 11) ペルオキシダーゼ反応; 0.3 mg/ml ベンチジン 4 塩酸塩 in PBS+0.01% H₂O₂ (50 μ l/well)、室温約 5 分。
- 12) 水道水で洗浄、乾燥。
- 13) フォーカス (低倍率の顕微鏡下でみる) を計数する。

血清学的検査

従来、デングの血清診断は HI 試験で行われてきたが、HI 試験では日本脳炎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、デングウイルスに対する抗体とを明確に識別できない。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

はやく産生される IgM 抗体を検出することでデングウイルス感染を診断できる。

(デングウイルスに対する Ig M 抗体はウイルス種特異的で、日本脳炎ウイルスとの反応は問題とならない程度であると考えられている)。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、反応系の感度を向上させることができる(9)。

1. IgM-capture enzyme-linked immuneosorbent assay (ELISA)法 (検査日数：1日)

IgM capture-ELISA 法の反応原理は以下のようになる。

- a. 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。
- b. デングウイルス抗原を反応させる。
- c. ヒト血清中のデングウイルスに対する 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。)
- d. 酵素に対する発色基質を加え、抗体のウイルス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。)

(1) 試薬・機材

Coating buffer, pH 9.6

Anti-Human IgM (μ chain specific) Goat serum

プレート

洗浄バッファー

抗原

未感染の C6/36 cell 培養液

発色基質

発色停止液

(2) 検査方法

- 1) 市販の抗ヒト Ig M を 500 倍に希釈し、プレートへ分注 (0.1 ml/well) する。

*Coating buffer, pH 9.6

Na₂CO₃. 0.4 g

NaHCO₃. 0.73 g

H₂O. make up to 250 ml

*Anti-Human Ig M (μ chain specific) Goat serum は、アフィニティー精した市販のポリクローナル抗体を使用する。

ZYMED 社（コスモバイオ取り扱い）製の抗ヒト IgM は 1 mg の包装なので、500 倍に希釈すると 2 μ g/ml の濃度となって、ELISA 用プレートのタンパク濃度に不足しない。

*プレートは、市販の ELISA 用平底プレートを使用する。

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発色のみ行って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用 well 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で一晩行うことも出来る。

3) 抗ヒト IgM のコーティングが完了したら、プレートをバッファーで洗浄する。

*洗浄バッファーには 0.05 % Tween 20 を含むリン酸緩衝食塩水 (PBS) を用いる。

*洗浄は原則として、自動洗浄装置を用いて行う。洗浄操作および洗浄後の廃液、等の処置は B S L 2 の基準に則り行うこと。捕捉的にバッファーをポリエチレン製の洗浄ビンなどに入れて洗浄操作を行うこともできるが、汚染の危険のないように対処しなければならない。

*洗浄は、各 well へバッファーを満たして捨てる操作を 3 回以上繰り返す。最後の洗浄では、well へバッファーを満たし、そのまま 5 分間置いてからする。

*洗浄したプレートはペーパータオルなどで水分を除去する。

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.) とを混合して、101 倍の希釈血清を作る。

*血清の希釈には、フラビウイルスに対する抗体を含まないウシ血清、ブロックエースなど市販の キャリアータンパクを 10 % 程度に添加する。

5) 抗ヒト IgM をコーティングし洗滌したプレートへ、希釈した被験血清を 0.1 ml ずつ加える。

*V-Ag、N-Ag とともに複数のウエルを使って、結果の信頼性を確保すること。

6) プレートを室温に 60 分間置き、反応させる。

*状況によって、このステップを冷蔵庫内で一晩行うことも可能である。

冷蔵庫内で一晚反応させる場合は、蒸発防止のためプレートをシーリングすること。

- 7) 被験血清との反応の終了したプレートを洗浄する。
 - *被験血清を取り扱う際には手袋を着用すること。
 - *被験血清のふくまれた洗浄バッファ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捨てること。
 - *洗浄は3回以上行う。ELISAでは洗浄操作が最も重要で、非特異的反応の大半を低減することができる。

- 8) デング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デングウイルスは、1型から4型までのプロトタイプデングウイルス株をC6/36細胞で増殖させて用いる。
 - *デングウイルスの増殖は、血清型およびウイルス株において培養温度に影響を受けることが観察されている。したがって、ウイルス抗原の調整は予備実験を行って十分に検討する必要がある。なお、デングウイルスの増殖と培養温度についての観察は文献(10)を参照のこと。
 - *培養したそれぞれのデングウイルスの抗原力価をELISAで測定し、Mixする。このために、4つの血清型に対して同じような反応性を有する抗体（フラビウイルス交差反応性な抗体、デング感染ヒト血清など）を用いて抗原の titer を調整した後、Mixする。
 - *未感染の C6/36 細胞培養液を、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。

- 9) 抗原との反応後、プレートを洗浄する。
 - *ウイルス抗原は流しに直接捨てないで、滅菌してから捨てること。
- 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。
 - *このシステムでは、4つの血清型ウイルス抗原を Mix して反応させているので、すべてのウイルスにおなじような反応性を示す抗体（フラビウイルス特異的な抗体、あるいはデングに感染したヒト血清などより IgG を精製して使用する。）
 - *検出用抗体に IgM が含まれていると、固相にコートされた抗ヒト IgM と反応する。

- 11) プレートを室温に 60 分間置き、反応させる。

12) プレートを洗淨する。

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

Ortho-phenylenediamine 2HCl (OPD)...10 mg のタブレット状の試薬が市販されている。

* バッファー (pH 5.0)

Citric acid (final 0.1 M).....2.34 g

Na Phosphate (final 0.2 M).....4.56 g (as Na₂HPO₄·2H₂O)

H₂O.....make up to 500 ml

115 °C、10 分間オートクレーブする。

* 組成(使用直前に調製する。)

OPD.....10 mg

バッファー25 ml (プレート2枚分)

30 % H₂O₂.....0.01 ml

14) 発色液を加え (0.1 ml/well)、暗所で室温 30 分間反応させる。

15) 発色を停止する。

* OPD の場合は、2.5 M H₂SO₄ を 0.05 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。

(OPD の場合は 492 nm で測定する。)

* 吸光度の測定は、発色停止後 1 時間以内に行うこと。

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)

/ (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)

= Index Value とし、2.00 以上を IgM 陽性、2.00 以下を陰性とする。

2. 中和抗体価の測定：(検査日数：6－8日)

被検血清のデングウイルスに対する中和抗体価の測定はVero細胞を用いて行う。中和抗体の測定は型特異性を識別できる利点がある。

(1) 試薬・機材]

MEM培養液

ウシ胎児血清(56℃, 30分非働化済)

メチルセルロース

10%ホルマリン液

0.038%メチレンブルー液

組織培養用6wellプレート

恒温槽

CO₂培養器

(2) 検査方法

- 1) 被検血清を56℃, 30分非働化する。
- 2) 被検血清を希釈液で10倍に希釈し、その後4倍階段希釈する。
- 3) デングウイルスを200pfu/200 μ lになるように調製した攻撃ウイルスと、希釈被検血清を等量混合し、35℃, 30分間中和反応を行う。一方、ウイルスコントロールとしては、血清の代わりに希釈液と等量混合し、同様に処理する。
- 4) 中和反応を終えた検体を、組織培養用6wellプレートに単層培養した細胞上に200 μ lずつ接種し、35℃, 5% CO₂培養器内で60分間ウイルス吸着をおこなう。
- 5) 1%メチルセルロースMEM培地を3ml重層し、35℃, 5% CO₂培養器内で5-7日間培養。
- 6) 10%ホルマリン液で細胞を固定・水洗後、0.038%メチレンブルー液で染色後プラーク数を数える。
- 7) 50% plaque reductionを計算し、中和抗体価を算定する。

デングウイルス感染の診断基準

次のいずれかにあてはまれば「デングウイルス感染」とする。

1. 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。
2. デングウイルスが分離される。

3. IgM capture-ELISA 法でデングウイルス特異的 IgM 抗体が認められる。
4. 抗デングウイルス中和抗体価が急性期と回復期の血清で 4 倍以上の上昇が認められる。
5. 上記いずれにもあてはまらず、HI 抗体がペア血清で 4 倍以上の上昇を示した場合には、デングウイルス感染が疑われるが、他のフラビウイルス感染である可能性もある。

引用文献

1. 岡部信彦：WHO 西大西洋地域におけるデング熱について。臨床とウイルス 23(4), 212-218, 1995.
2. 江下優樹：日本産の蚊諸種のデングウイルス媒介能に関する実験的研究。帝京医学雑誌 5(1), 17-27, 1982.
3. Yamada, K., Takasaki, T., Nawa, M. and Kurane, I.: Laboratory diagnosis of imported dengue cases. Jap. J. Trop. Med. Hyg. 27(1), 75-77, 1999.
4. Yamada, K., Nawa, M., Takasaki, T., Yabe, S. and Kurane, I.: Laboratory diagnosis of dengue virus infections by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Jap. J. Inf. Dis. 52, 150-155, 1999.
5. Rosen, L. and Gubler, D. J.: The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. Am. J. Trop. Med. Hyg., 23, 1153-1160, 1974.
6. Morita, K., Tanaka, M. and Igarashi, A.: Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 29, 2107-2110, 1991.
7. Okuno, Y., Fukunaga, T., Srisupaluck, S. and Fukai, K:
A modified PAP (Peroxidase-Anti-Peroxidase) staining technique using sera from patients with dengue hemorrhagic fever (DHF): 4 step PAP staining technique. Biken J. 22, 131-135, 1979.
8. 奥野良信：PAP (ペルオキシダーゼ・抗ペルオキシダーゼ) 法を応用したウイルスの中和抗体測定法。臨床とウイルス 8(4), 43-46, 1980.
9. Nawa, M., Yamada, K., Takasaki, T., Akatsuka, T. and Kurane, I.: Sero-cross-reactive immuneoglobulin M responses in dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7(5), in press 2000.
10. Mohamed, H., Castillo, L. del C., Sinniah, M. and Igarashi, A.: Elevated incubation temperature enhanced antigen production of dengue type 2 and 3 viruses. Tropical Medicine 37, 21-27, 1995.

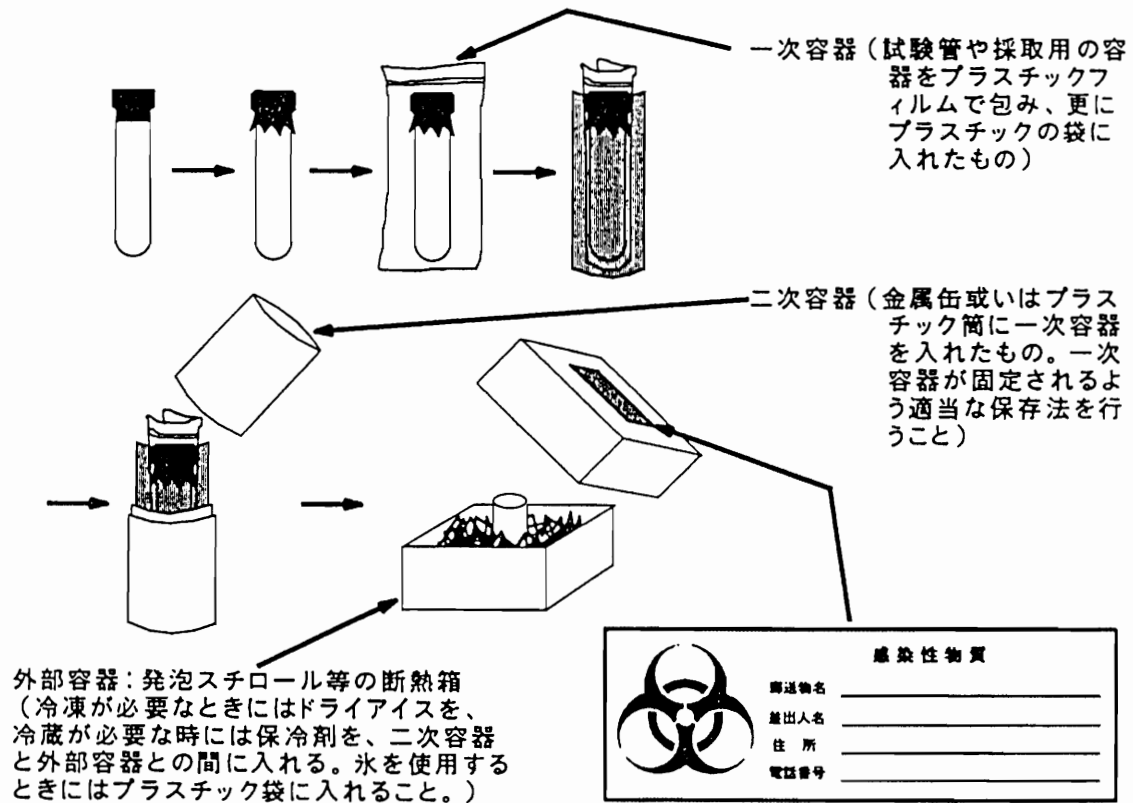


図1 検査材料の包装

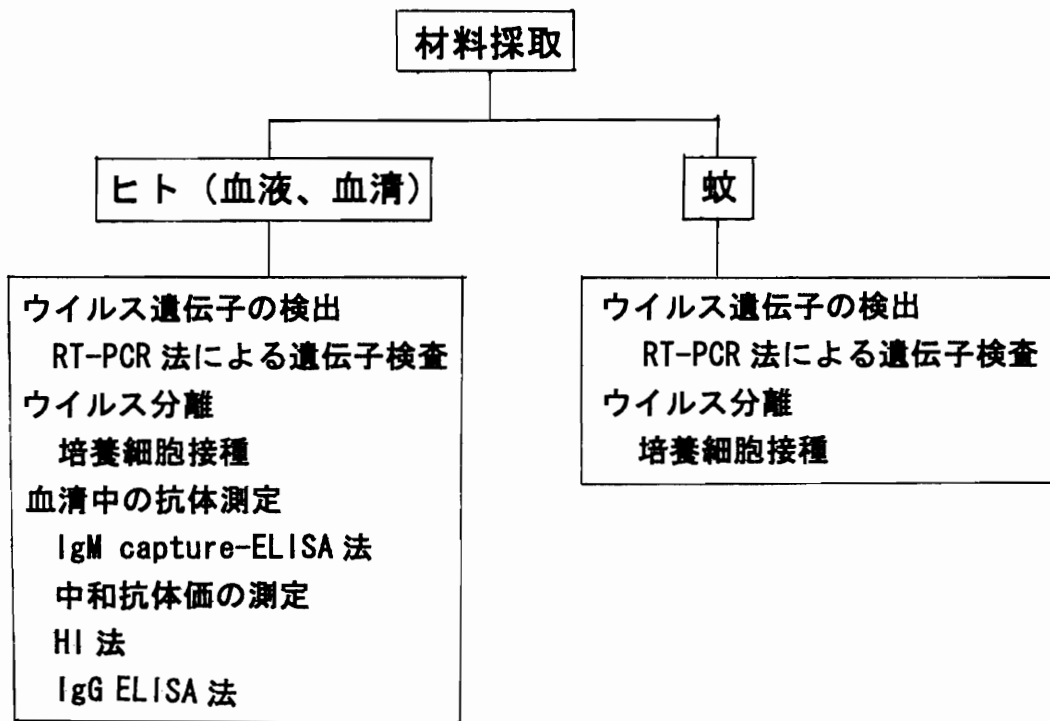


図2 デングウイルスの検査の順序

Table 1 Nucleotide sequences of dengue virus primer

primer	sequence	gene	product size (bps)
D1s	GGACTGCGTATGGAGTTTGT	E	490
D1c	ATGGGTTGTGGCCTAATCAT	NS1	
D2s	GTCCTCTGCAAACACTCCA	E	230
D2c	GTGTTATTTGATTTCCCTG	E	
D2 (TR) s	GCATAGAGGCTAAGCTGACC	E	263
D2 (TR) c	AAGGGGACTCACTCCACAAT	E	
D3s	GTGCTTACACAGCCCTATTT	E	320
D3c	TCCATTCTCCAAGCGCCTG	NS1	
D4s	CCATTATGGCTGTGTTGTTT	NS2a	398
D4c	CTTCATCCTGCTTCACTTCT	NS2b	
Dus	TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG	C	511
Duc	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	PreM	

D1, 2, 3, 4; dengue type 1, 2, 3, 4 s; sense primer, c; complimentary primer,
u; universal primer

蛍光プローブを用いたデングウイルスの高感度検出法

(TaqMan real time reverse transcriptase polymerase chain reaction: TaqMan RT-PCR) :
(検査時間 : 4 時間)

蛍光プローブは、PCR における非特異的な増幅産物には反応せず、標的 PCR 増幅産物にしか反応しないので、非常に高い特異性をもつ。また、TaqMan RT-PCR 法は、one step で行う方法で、PCR 増幅産物を反応チューブから取り出すことなく、蛍光強度の変化に基づいた特異的 PCR 増幅産物のみをリアルタイムに定量することができる。よって、従来の RT-PCR 法のように電気泳動あるいはサザンハイブリダイゼーションなどによる増幅産物の確認が不要である(1)。

(1) 試薬・機材

- High Pure Viral RNA Kit (Roche)などの RNA 抽出キット (Cat.No.11858882001)。
- H₂O (DNase, RNase-none detected, 0.2 μm filtered H₂O)
Applied Biosystems-
- TaqMan One -Srep RT-PCR Master Mix Reagents (Cat.No.4309169)
- ABI PRISM Optical Adhesive Cover Starter Kit (Cat.No.4313663)
- ABI PRISM Optical Adhesive Covers and 96-Well Optical Reaction Plate
(Cat.No.4314320)
- ABI Prism 7000 Sequence Detection System instrument (PE Applied Biosystems)

(2) RNA 抽出 (所要時間 : 30 分)

患者血清およびウイルス感染培養液から High Pure Viral RNA Kit (Roche)などを用いて RNA を抽出する。

(3) TaqMan RT-PCR 法 (検査時間 : 3 ~ 4 時間)

【Mixture の作成】

(TaqMan RT-PCR mix.)	[1 sample 当たり]	至適濃度
H ₂ O	5.96 μ l	
TaqMan universal master mix (2 ×)	12.5 μ l	
RT/RNase Inhibitor Mix	0.6 μ l	
Primer S(100pmol/ul)	0.25 μ l	900 nM
Primer C(100pmol/ul)	0.25 μ l	900 nM
*TaqMan prob(11.0uM)	0.44 μ l	200 nM
Sample RNA	5 μ l	
Total reaction volume	25 μ l	

*TaqManプローブは溶解した状態で発送される。Concentrationはまちまちで、11-15uMの範囲。各型のプローブの最適濃度を使用する。例)13.0uM=13000nM →13000nM//200nM(推奨濃度)=65→65 希釈すればよい→全量 25ul/65=0.38ul→TaqMan probは 0.38ul入れ、H₂O

で調節(0.06 プラス)する。(2~3uM程度の差であれば低い濃度に容量を統一してtestすることも可能である。)

(4)ABI Prism 7000 Sequence Detection System instrument で次の条件で RT-PCR 反応を行い、リアルタイムに観察する。

48°C	30min (Reverse Transcription)	}	(40cycles)
95°C	10min		
95°C	15sec (Denaturation)		
57°C	1min (Annealing)		

*1 検体につき 2wells ずつ行う。

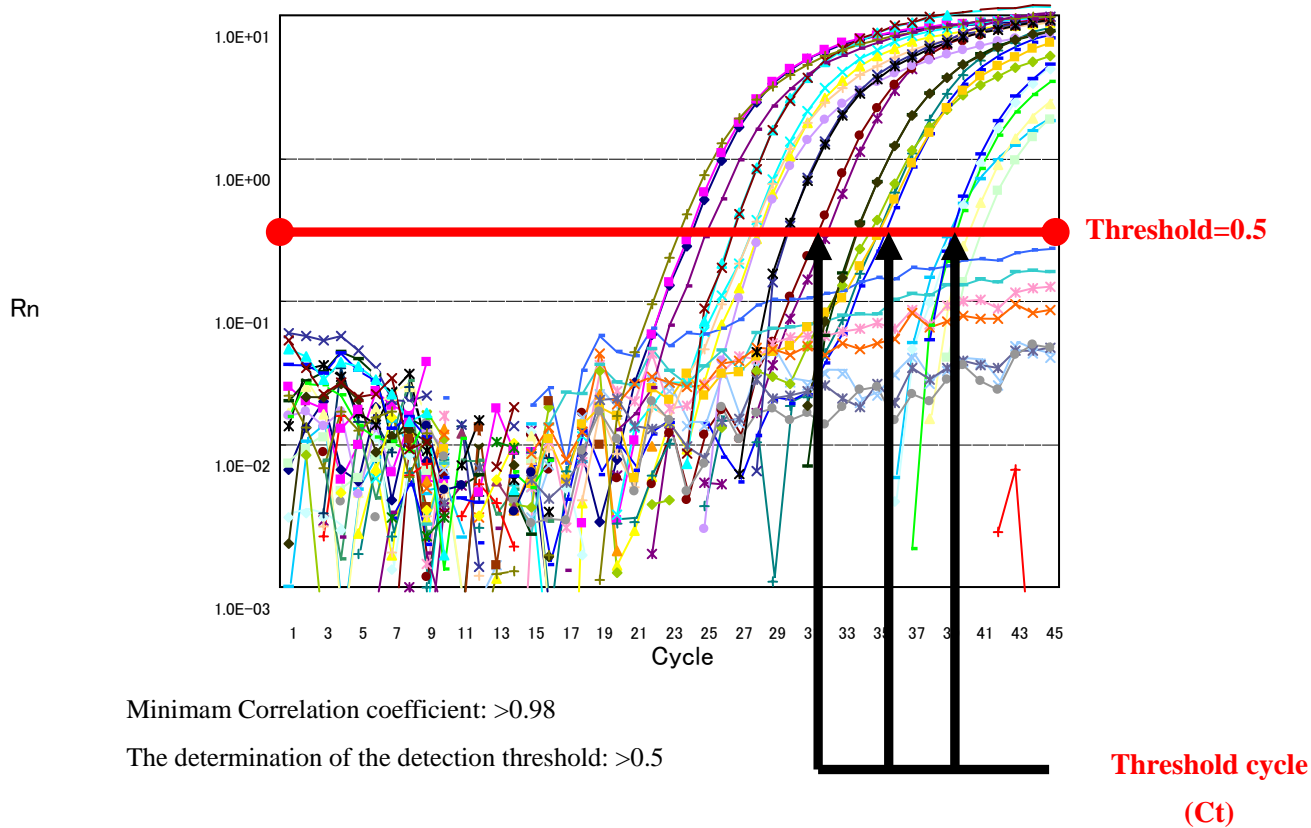
*1 検体につき dengue virus1-4 型までのプライマー/プローブを用いる。

* 初回はdengue virus1-4 型の $-10 \sim -10^6$ 希釈陽性コントロールを作製し、waveを確認してみる。
2 回目からの陽性コントロールは各型 2wellsおけば十分である。

96 wells plate

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Satndard Den1En493 D1 posi. cont	Satndard Den1En493 D1 posi. cont	Satndard Den2MGBEn545 D2 posi. cont	Satndard Den2MGBEn545 D2 posi. cont	Satndard Den3MGBEn27 D3 posi. cont	Satndard Den3MGBEn27 D3 posi. cont	Satndard Den4En734 D4 posi. cont	Satndard Den4En734 D4 posi. cont
B	UnKnown Den1En493 検体1	UnKnown Den1En493 検体1	UnKnown Den2MGBEn545 検体1	UnKnown Den2MGBEn545 検体1	UnKnown Den3MGBEn27 検体1	UnKnown Den3MGBEn27 検体1	UnKnown Den4En734 検体1	UnKnown Den4En734 検体1
C	UnKnown Den1En493 検体2	UnKnown Den1En493 検体2	UnKnown Den1En493 検体2	UnKnown Den1En493 検体2	UnKnown Den1En493 検体2	UnKnown Den1En493 検体2	UnKnown Den1En493 検体2	UnKnown Den1En493 検体2

* Threshold=0.5 として、threshold cycle 値(Ct)を確認する。Ct37 以下は陽性。Ct=37 の場合は再テストまたは、要検討 (ウイルス分離の結果を待つ)。Ct38 以上は陰性または要検討 (C6/36 ハーベスト待ち等)。



引用文献

- (1) Ito M, Takasaki T, Yamada K, Nerome R, Tajima S, Kurane I. Development and evaluation of fluorogenic TaqMan reverse transcriptase PCR assays for detection of dengue virus types 1 to 4. J Clin Microbiol. 2004 Dec;42(12):5935-7.

Table 1

Oligonucleotide primers and probes used in the TaqMan RT-PCR

Type	Identification		Sequence (5'-3')	Size	Gene
type1	D1MGBEn469s	forward	GAACATGGRACAAAYTGCAACYAT	67	E
	D1MGBEn493p*	probe	ACACCTCAAGCTCC		
	D1MGBEn536r	reverse	CCGTAGTCDGTCAGCTGTATTTCA		
type2	D2MGBEn493s	forward	ACACCACAGAGTTCCATCACAGA	68	E
	D2MGBEn545p*	probe	CGATGGARTGCTCTC		
	D2MGBEn568r	reverse	CATCTCATTGAAGTCNAGGCC		
type3	D3MGBEn1s	forward	ATGAGATGYGTGGGAGTRGGAAAC	70	E
	D3MGBEn27p*	probe	AGATTTTGTGGAAGGYCT		
	D3MGBEn71r	reverse	CACCACDTCAACCCACGTAGCT		
type4	D4TEEn711s	forward	GGTGACRTTYAARGTHCCTCAT	75	E
	D4TEEn734p**	probe	CCAAGAGACAGGATGTGACAGTGCTRGGATC		
	D4TEEn786c	reverse	WGARTGCATRGCTCCYTCCTG		

* MGB probes が 5'末端に FAM reporter dye と共にラベルされている。3'末端には quencher dye TAMRA はラベルされていない。

** 5'末端に FAM reporter dye がラベルされている。3'末端には quencher dye TAMRA がラベルされている。

→プローブを注文する際は、

Dengue virus1,2 および 3 は MGB プローブで発注すること。

Dengue virus4 は通常プローブで発注すること。