

# ジカウイルス感染症診断マニュアル

## 目 次

ジカ熱・ジカ出血熱の概説

ジカ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

血清学的検査

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

2. 中和抗体価の測定

ジカウイルス感染の診断基準

引用文献

## ジカウイルス病（ジカ熱）の概説

ジカ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る。ジカ（zika）とは、ウイルスが分離されたウガンダの森の名前である。ジカウイルスの主な媒介蚊はネッタイシマカ（*Aedes aegypti*）で、ヒトー蚊ーヒトのサイクルで伝播する。森林ではサルー蚊ーサルの伝播様式も存在する。国内に常在するヒトスジシマカやその仲間も媒介蚊になりうる。臨床的特徴は2-12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。症状はデング熱と似ているが重病感がないが多く、数日で回復する。発疹は発熱とともにあるいはやや遅れて出現することが多い。ジカ熱（Zika fever[ZIKF]）は本来、自然治癒傾向の強い良性疾患であるが、時にギランバレー症候群を引き起こす可能性が指摘されている。また、2014年から2016年にかけてのブラジルでの流行では、妊婦の感染による小頭症児の発生が強く疑われている。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。

### ジカウイルス検査に関する一般的な注意事項

ジカウイルスは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) 急性期の血液または血清、および尿

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（血清または血漿が望ましい）は-80℃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0~4℃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℃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℃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、ヒトスジ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、蚊のままでチューブに入れドライアイスで輸  
送し、-80℃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℃  
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、基本 3 重包装のうえ所属機関の病原体等の輸送・運搬に関する取  
扱い要領に基づいて適切に輸送する。
- (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、「ジカウイルス感染の診断」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。

- (註) ジカウイルス感染が疑われる妊婦、死亡した胎児または新生児(小頭症児)  
の検査に関しては、後日これを別にマニュアルを定めることとする。

## 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確定診断が可能である。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 とされる。

### 1. ウイルス遺伝子検出

#### (1) コンベンショナル one-step RT-PCR 法 (文献 3)

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

本法は一般的なサーマルサイクラー (遺伝子増幅装置) を使用して、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い、特定のウイルスゲノム部位を増幅する方法である。簡便かつ安価である。通常はアガロースゲル電気泳動像により増幅を確認する。また、リアルタイム PCR 装置を用いて SYBR Green I によるリアルタイム検出にも応用可能である (例 : SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR kit, Invitrogen Cat. No. 11736-059)。

以下にプライマーセットを記す。増幅サイクルは 40 以下とする。

Primer	Sequence(5'-3')	Size(bp)	Gene
ZIKVENVF	GCT GGD GCR GAC ACH GGR ACT	364	E
ZIKVENVR	RTC YAC YGC CAT YTG GRC TG		

増幅 (電気泳動) 後、残った増幅産物について塩基配列を決定することが可能である。

#### (2) フラビウイルス共通コンベンショナル RT-PCR 法 (文献 4)

Primer	Sequence(5'-3')	Size(bp)	Gene
cFD2	GTG TCC CAG CCG GCG GTG TCA TCA GC	261	NS5
MA	CAT GAT GGG RAA RAG RGA RRA G		

ジカウイルスの遺伝子配列では、MA は 9028-9049、cFD2 は 9263-9288 に相当する。

#### (3) リアルタイム RT-PCR 法 (TaqMan 法) (文献 5)

(TaqMan real time reverse transcriptase polymerase chain reaction: TaqMan RT-PCR) : (検査時間 : 3~4 時間)

Primer & Probes	Position	Sequence(5'-3')	Gene
ZIKV 835	835-857	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC	E
ZIKV 911c	911-890	CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC	
ZIKV 860-FAM	860-886	CGGCATACAGCATCAGGTGCATAGGAG	
ZIKV 1086	1086-1102	CCGCTGCCCAACACAAG	E
ZIKV 1162c	1162-1139	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	
ZIKV 1107-FAM	1107-1137	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA	

プライマー&プローブの有効期限は1年とする。使用するRT-PCRキットによっては、MR766株（アフリカ型）に対して835-911セットの方が明らかに感度が低いことや、逆にブラジル株（アジア型）に対しては835-911セットの方がやや感度が高くなることもある。1086-1102の方が型に左右されない傾向がある。

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やシーケンシングによる増幅産物の確認が不要である。

詳細は以下の通りである。

#### (1) 試薬・機材

- High Pure Viral RNA Kit (Roche) (Cat.No. 11858882001) あるいは同等のRNA抽出キット。
- Distilled Water (DNase RNase-free D.W.であればメーカーは特に問わない)
- QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix (QIAGEN Cat# 204443)を第一推奨とするが、デングウイルスゲノム検出に使用するキットも同様に使用可能である。RNA-direct Realtime PCR Master Mix (東洋紡 Cat# QRT-101)など他のキットも使用可能であるが、その場合はキットの反応サイクルに従うこと。リアルタイムPCR装置がViiA7である場合、AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents (ライフテクノロジー)がより適合する。
- ABI MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate (Cat. No. 4346906、Applied Biosystems)あるいは同等品。BIOplastics社のEU 8-tube Strip (Cat. No. B77001)等を使用してもよい。
- StepOnePlus System (Applied Biosystems) あるいは同等機器 (Prism 7700 Sequence

Detection System instrument など)

(2) RNA 抽出 (所要時間 : 30 分)

患者血清、尿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。溶出は 50~100ul の間で行う。

その他、プレシジョンシステム (E7003) MagDEAR Viral DNA/RNA 200(GC) や QIAGEN (52906) QIAamp Viral RNA Mini Kit あるいは OMEGA (R6874-02) EZNA Viral RNA Kit などを使用できる。それぞれキットの使用法により抽出すること。

※尿検体の処理について

尿は静置または軽く遠心して上清を用いる。沈査が混じっても構わないが、細胞成分が多いと非特異反応が起きる場合がある。

(3) TaqMan RT-PCR 法 (検査時間 : 2~3 時間)

【Mixture の調製】 (QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix を用いる場合)

(TaqMan RT-PCR mix.)	[1 反応当たり]
Nuclease-free D.W.	4.85 ul
2 x QuantiTect Probe RT-PCR master Mix	12.5 ul
フォワード鎖プライマー (10pmole/ul)	1 ul
リバース鎖プライマー (10pmole/ul)	1 ul
*TaqMan probe (10uM, 10pmole/ul)	0.4 ul
Sample RNA	5 ul
QuantiTect RT-Mix	0.25 ul
Total reaction volume	25 ul

\*TaqMan プローブは通常溶解した状態で発送される。Concentration はまちまちで、通常 10-14uM の範囲だが、この範囲であれば上記の反応系で希釈せずそのまま使用しても構わない。到着後分注し、遮光して冷凍保存。使用時なるべく遮光状態で取り扱うことが望ましい。

(4) StepOnePlusSystem またはこれと同等の機器で次の条件で RT-PCR 反応を行い、リアルタイムに増幅を観察する。条件はデングウイルスゲノム検出の場合と同じである。使用するキットによっては下記の条件が適当でない場合があるので、その場合はキットのプルとコールに準じること。

48°C	30 min (Reverse transcription)	} (40cycles)
95°C	10 min (PCR initial heat activation)	
95°C	15 sec (Denaturation)	
57°C	1 min (Annealing/extension)	

\*1 検体につき 2 wells ずつ (duplicate) で行う。

\*Threshold = 通常 Auto (機器によって異なるのでそれぞれの機器の説明書に従

う)として、threshold cycle 値(Ct)を確認する。Ct36 以下は陽性。Ct37 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 (ウイルス分離の結果を待つ等など)。

## 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。しかし、Vero 細胞あるいは BHK 細胞でも分離は可能である。

### 2-1. 血液からのウイルス分離法

ジカ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(500mL、調整済み市販品で構わない)

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)

組織培養用プレート (12-または 24-well)

#### (2) 培養液の調整

Eagle' s MEM に非必須アミノ酸液 (終濃度 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。このとき培養液量は 0.5 mL とする。
- 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 50~100ul 接種して、培養器内に静置する。
- 3) 静置培養 1~4 時間後、細胞維持培養液を 0.5 mL 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 細胞はジカ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、抗ジカウイルス抗体による中和等試験より確認する。

### 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  $0.45\mu\text{m}$  ニトロセルロースフィルター、ミリポアー製ディスポ）。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 24-well 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 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) 2000-3000 rpm で 15 分間遠心する（4℃）。
- 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  $\mu\text{l}$  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℃）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：5~6 日）

#### (1) 準備する器具と試薬

Eagle' s MEM (500mL、調整済み市販品で構わない)  
ウシ胎児血清（56℃、30 分非働化したもの）  
組織培養用プレート（6-well）  
その他通常の細胞培養に使用する試薬・機器

#### (2) 培養液等の調製

Eagle' s MEM 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ウイルス希釈液として用いる。培養液には適宜抗生物質を加える。

重層培地の作製法を以下に示す。

- A) Eagle's MEM (L-グルタミン不含・高圧滅菌可 日水製薬)・・・ 9.4 g  
D.W. . . . . . 960.7 ml
- B) Methyl Cellulose . . . . . 10g (粉末のみを 1,000ml のボトル  
に入れ、回転子も入れる)

※ Methyl Cellulose 4000cp(#136-02155)：和光純薬を使用する。

[メチルセルロースの溶解法について]

A)、B)を 121℃、15 分滅菌した後、A) を B) に加え (まだ熱いうちに) スターラーで回転させる。メチルセルロースの濁りが均一になったら、さらに氷水中にてスターラーを回し、均一に透きとおるまで、回転を続ける。

使用前に次の試薬を加える。[必ず用時調整とする]

- L-glutamine (200 mM) [Gibco #25030] . . . . . 10 ml  
非働化済み FBS . . . . . 20 ml  
7.5% NaHCO<sub>3</sub> [Gibco #25080] . . . . . 29.3 ml (最終濃度 0.22%)

メチレンブルー (プラーク染色液) の組成を以下に示す。

- メチレンブルー粉末 . . . . . 2.25 g  
DW . . . . . 200 ml  
1N NaOH . . . . . 0.375 ml  
÷ 200 ml

使用時に D.W. で 30 倍に希釈して用いる。

### (3) 検査方法

- 1) Vero 細胞を 6well 平底プレートに播く (5x10<sup>5</sup>cells/2 ml/well)。
- 2) 35℃, 5% CO<sub>2</sub> 培養器内で 1 日培養する。
- 3) 培養液を捨て、ウイルス希釈液にて階段希釈した被検ウイルス液を接種 (100~200ul/well) する。
- 4) 35℃, 5% CO<sub>2</sub> 培養器内で 60 分間吸着。
- 5) 重層培地を加える (2 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 4～5 日後に 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% CO<sub>2</sub> 培養器内で 4～6 日培養する。
- 7) 10%ホルマリン液 in PBS 液で固定 (室温 30 分以上)。
- 8) 水道水で洗浄後、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、ウイルス希釈倍数と接種容量から、ウイルス原液の感染価 (plaque forming unit:pfu) を算定する。

### 血清学的検査

ジカウイルスは、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルスと近縁であり、IgG 抗体では比較的強い交差反応を示す。しかし、IgM 抗体は比較的ウイルス種特異的で、鑑別可能であることが多い。IgG と比較して血中濃度の低い IgM を検出するために、患者血清中の IgM 抗体を捕捉する IgM 捕捉酵素免疫吸着測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) を応用し、反応系の感度・特異性を向上させることができる

#### 1. IgM-capture enzyme-linked immunosorbent 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. ジカウイルス抗原を反応させる。
- c. ヒト血清中のジカウイルスに対する 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 ( $\mu$  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 IgM 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

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. . . . . 0.4 g

NaHCO<sub>3</sub>. . . . . 0.73 g

H<sub>2</sub>O. . . . . 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 μg/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 分間置いてからすてる。

\*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こと。
- 7) 被験血清との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こと。
  - \*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捨てること。
  - \*洗淨は 3 回以上行う。 ELISA 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) ジカ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ジカウイルスは、プジカウイルス株 (MR766 株) を C6/36 細胞あるいは Vero 細胞で増殖させて用いる。
  - \*ジカウイルスを不活化する場合は、1/150 容量の 10%ホルマリン溶液を加えて 1 ヶ月 4℃下で不活化する。不活化により感度が下がる場合は、BSL2 施設で生ウイルスを抗原として用いる。
- 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フラビウイルス抗体で検出する。
- 11) プレートを室温に 30 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、ペルオキシダーゼの検出系について記載する。もちろん TMB を用いる方法は価格が高いが Ready to use で容易である。

\* 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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

$\text{H}_2\text{O}$ .....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 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ .....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  $\text{H}_2\text{SO}_4$  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、3.00 以上を IgM 陽性、3.00 以下を陰性とする。

デングウイルス IgM 捕捉 ELISA キット (Focus 社) を改変して実施する方法

Dengue virus IgM Capture DxSelect

Ref No. EL1500M

Focus Diagnostics, Cypress CA, USA

Focus 社のキットは、抗フラビウイルス抗体 (6B6C) を使用しているため、デングウイルス抗原の代わりにジカウイルス抗原を用いることで、「ジカウイルス IgM 捕捉 ELISA キット」として代用することができる。ただし cut-off 血清はデングウイルス用であるので使えないため、下記方法で判定する。

(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、3.0 以上を IgM 陽性、2.0 以上 3.0 未満を判定  
保留、2.0 未満を陰性とする。  
判定保留は中和抗体測定により、最終判断する。

2. 中和抗体価の測定：(検査日数：5～6 日)

被検血清のジカ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

通常の細胞培養に用いる試薬・機器一式

2-3 ウイルス感染価の測定で使用した培地および溶液

中和反応を行うためのチューブ、プレートおよび 37°C インキュベーター

(2) 検査方法

- 1) 被検血清を 56°C, 30 分非働化する。
- 2) 被検血清をウイルス希釈液で 10 倍に希釈し、その後 4 倍階段希釈する。
- 3) ジカウイルスを 200pfu/200 u1 になるようにウイルス希釈液で調製した攻撃ウイルスと、希釈被検血清を等量混合し、37°C, 60 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、血清の代わりにウイルス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 6-well プレートに単層培養した細胞上に 100～200 u1 ずつ接種し、35 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培養器内で 60 分間ウイルス吸着をおこなう。

- 5) 重層培地を 2 ml 重層し、35°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養器内で 5~7 日間培養。
- 6) 10%ホルマリン液 in PBS で細胞を室温で 30 分以上固定し水洗後、メチレンブルー液で染色する。洗浄・乾燥後プラーク数を数える。
- 7) コントロールに対しプラーク数が 50%以下となる最大の血清希釈倍数を算出し、中和抗体価とする (50%プラーク減少中和抗体価)。

### ジカウイルス感染の診断基準

次のいずれかにあてはまれば「ジカウイルス感染」とする。

1. RT-PCR 法による遺伝子検査で、血中あるいは尿中にウイルス特異的遺伝子が検出される。
2. ジカウイルスが分離される。
3. IgM capture-ELISA 法でジカウイルス特異的 IgM 抗体が認められる。
4. 抗ジカ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。

#### 参考文献

1. IASR (2014 年 2 月号). フランス領ポリネシア・ボラボラ島帰国後に Zika fever と診断された日本人旅行者の 2 例.  
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr-vol35/1774-infectious-diseases/source/vector/idsc/iasr-in/4401-pr4083.html>
2. IASR (2014 年 10 月号). タイ・サムイ島から帰国後にジカ熱と診断された日本人旅行者の 1 例.  
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/route/transport/1715-idsc/iasr-in/5033-kj4161.html>
3. Faye O, Faye O, Dupressoir A, Weidmann M, Ndiaye M, Alpha Sall A. 2008. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. J. Clin. Virol. 43: 96-101.
4. Kuno G. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. J Virol Methods. 1998 May;72(1):27-41. 5. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerg Infect Dis. 2008;14(8):1232 - 1239.