

# チクングニアウイルス検査マニュアル Ver. 1.1

平成25年 2月18日

# 目 次

- 1、概説
- 2、一般的な注意事項
- 3、検査材料の採取及び輸送
  - 1 検査材料の採取
  - 2 検査材料の輸送
- 4、検査の進め方
- 5、検査材料の前処理
  - 1 準備する器材等
  - 2 前処理
- 6、ウイルス分離
  - 1 準備する器材等
  - 2 分離
- 7、遺伝子検査
  - 1 RNA の抽出
  - 2 Real-time RT-PCR (TaqMan Probe 法)
  - 3 Conventional RT-PCR 法
- 8、血清学的検査
  - 1 IgM 迅速診断キット
  - 2 IgM 捕捉 ELISA 法
  - 3 中和試験
- 9、チクングニアウイルス感染症の診断基準
- 10、参考文献

## チクングニア熱概説

チクングニア熱はチクングニアウイルス感染により引き起こされる蚊媒介性急性熱性ウイルス性疾患である。臨床症状はデング熱に類似し、時に激しい関節痛、発疹を伴う。近年、アフリカ、南アジア、東南アジアの熱帯・亜熱帯地域を中心に流行が報告されている。チクングニアウイルスはトガウイルス科アルファウイルス属に分類される球状（直径約 70nm）の RNA ウイルスである。2007 年には温帯地域で初めての流行がイタリアで確認され、さらに 2010 年 9 月にはフランス南部においても国内流行が発生した。イタリア、フランスにおけるチクングニア熱の国内流行は日本にも生息するヒトスジシマカにより媒介されているため、チクングニアウイルスの日本への侵入、定着の可能性は否定できない。平成 23 年 2 月 1 日付けで「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」で 4 類感染症全数把握疾患に指定された。当該患者を診断した医師はただちに保健所を經由して都道府県知事に届け出ることが求められる。また、同時に検疫法にも検疫対象疾患として指定された。

### 第 1 一般的な注意事項

チクングニアウイルスは、バイオセーフティレベル (BSL) 3 実験施設での取り扱いが必要であるが、患者または疑わしい患者由来等の検査材料を検査する場合は、チクングニアウイルスが確認されるまで BSL2 以上の施設で検査を行ってもよい。また、オーストラリアで時に流行しているロスリバーウイルスは、近縁のウイルスであるが本ウイルスは BSL2 の実験施設で取り扱える。

### 第 2 検査材料の採取及び輸送

検査材料の採取及び輸送にあつては、次のとおりの確な材料を選んで安全に採取し、迅速かつ安全に検査室へ輸送する。

#### 1 検査材料の採取

##### (1) ヒトの血液

発症後 5~6 日以内のものが望ましい。この時期の血液は、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 入り採血管で採血し、0~4℃またはドライアイスで凍結して直ちに輸送する。ウイルス分離用の検体は -80℃に保存する。

##### (2) 蚊

チクングニアウイルスを媒介するのは、主にヤブカの仲間であるが、広い地域に分布し、しかも蚊の生息する場所が人の生活と密接に関係しているなどの理由から、特にネッタシマカとヒトスジシマカが重要な媒介蚊とされている。これらの蚊を対象

に「港湾区域等衛生管理業務について」（平成 11 年 9 月 20 日付 厚生省生活衛生局食品保健課検疫所業務管理室長通知）の別添 2「調査マニュアル」のⅢ蚊族調査マニュアルに従って検体を採取する。採取された蚊は、採取年月日、採取場所、種類毎により最大 100 個体までを 1 プールに区分けしてチューブ等に入れ、送付する。月に複数回の調査を行う場合においては、上記区分毎に $-20^{\circ}\text{C}$ 以下（できれば $-40^{\circ}\text{C}$ 以下）で保存すれば、一ヶ月分の検体であればウイルス遺伝子の検査は可能である。幼虫、卵で採取された蚊で検査を要する場合には、羽化させて成虫にしたものを用いる。ウイルス分離用の検体は $-80^{\circ}\text{C}$ に保存する。

## 2 検査材料の輸送

検体を輸送または郵送する場合には、郵政省告示第 760 号（平成 2 年 12 月 28 日号外）に基づき、次のとおりに行う。検査材料を検査機関へ輸送する際は、必ず事前に連絡し、到着日、輸送手段などについて確認する。

### (1) 輸送に当たっての留意点

- 1) ドライアイス等の保冷剤を用いる場合は密閉された容器の中に入れてはならない。
- 2) 検体の包装の損傷、事故等が起きた場合、運搬者は送り主に連絡する。
- 3) 連絡を受けた送り主は、プラスチック袋等で包装し一時的に安全確保措置を行なうか、または指示を行なう。その後汚染された可能性のある場所の消毒等を実施する。

### (2) 検査材料の持参輸送に用いる容器とその表示

#### 1) 一次容器

検査材料を入れてラベルを貼った防水性、密封性の主容器である。この容器に破損・漏洩があったときに備え、材料中の全ての液体を吸収するのに十分な量の吸収剤に包む。検体番号、患者氏名、材料名、採取年月日時間等必要事項を記入する。

#### 2) 二次容器

一次容器を物理的な衝撃や水の侵入から保護するための容器である。この中には複数の一次容器を入れてもよい。その場合は二次容器が三次容器中で動かないように緩衝剤で包む。検体の検査結果等詳細な情報を記載した書類及び内容物リストを封筒に入れて貼付する。

#### 3) 三次容器

輸送中に物理的な損傷や水等から二次容器を守るための容器である。

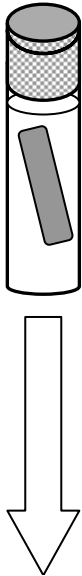
WHO の「感染性物質の輸送規則に関するガイダンス」を参考にする。

WHO が使用している感染性物質であることを示すラベル（バイオハザードマーク）を貼付する。

- \* 輸送先（輸入食品・検疫検査センター）と送り主の名称、担当者名、住所、電話番号、24 時間対応可能な連絡先、Fax 番号、E-mail アドレスを明記する。
- \* UN3373 のラベルを貼付する。
- \* ドライアイスを使用した場合はラベル(STP-803)を貼付し、使用したドライアイス量を表示する。

図 感染性材料の輸送方法  
 (\* 感染性材料は三層に包装する。)

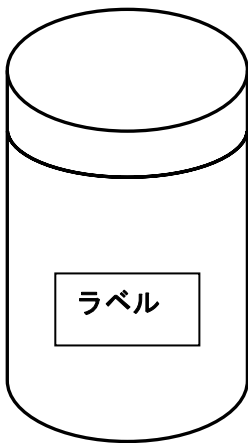
一次容器



\* 破損した場合に液体全部を吸収するために十分な量の吸収材とともに包装する

二次容器

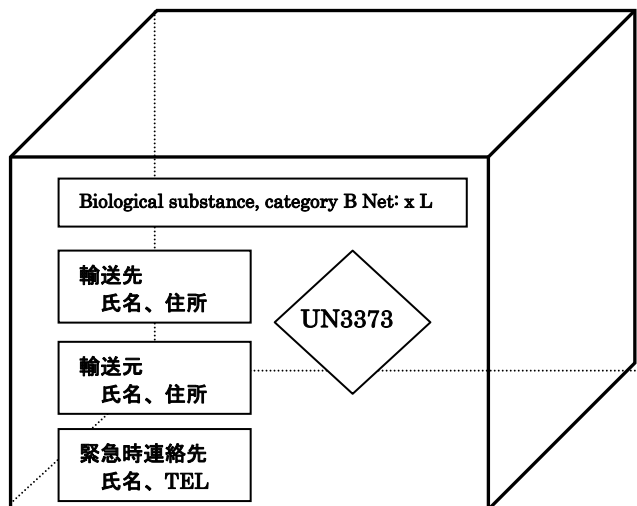
二次容器を  
 外側容器（三次容器）に  
 入れて封をする。



外側容器

(三次容器)

\* 外装容器は輸送時に、物理的な損傷などの外部の影響から内容物を保護する。  
 最小外寸は10cm×10cmとする



\* クッション材で包んだ複数の一次容器をひとつの二次容器に入れることができるが、破損した場合に液体全部を吸収するために、十分な吸収材を追加する必要がある

※ ゆうパックで送付の場合は、以下の四重梱包とする。

1. 検査後の残余血清は、感染研感染症情報センター第三室より配布するポリプロピレン製スクリーキャップチューブ（一次容器）に入れ、凍結する。

2. 輸送中の衝撃による破損を防ぐため、チューブラックに入れる等、各チューブが接触しないようにする。
3. 内容物を十分に吸収できる紙・布等とともに耐漏性の二次容器に入れ、密閉する。
4. 保冷のため、保冷剤とともに発泡スチロール箱に入れる。ドライアイスは用いない。
5. ダンボール箱等の外装容器（三次容器）に入れる。血清送付票（様式8）は二次容器と三次容器の間に入れる。
6. さらにジュラルミン製の箱（四次容器）に入れる。

### 第3 検査の進め方

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1のとおりである。

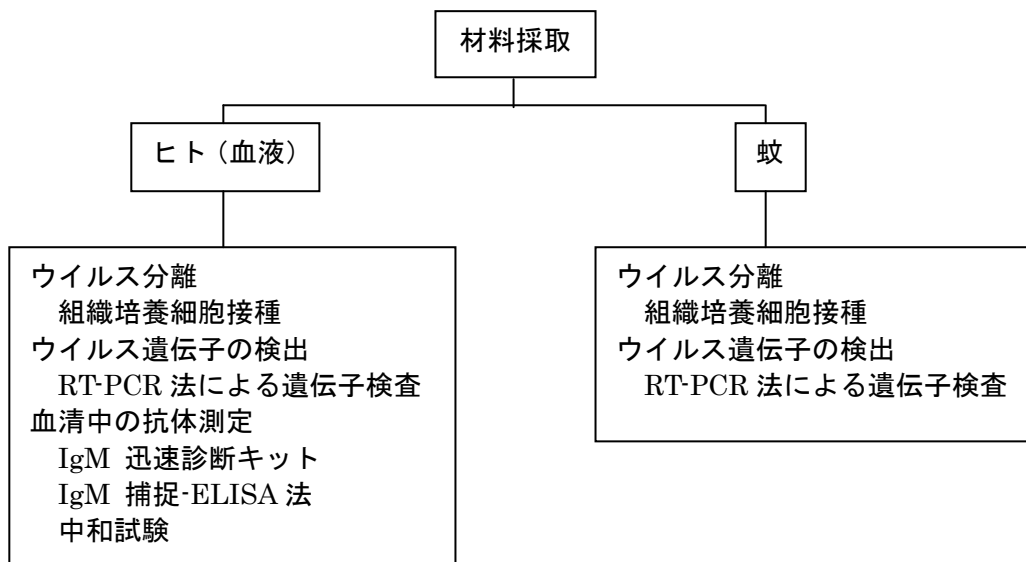


図1 チクングニアウイルスの検査

## 第4 検査材料の前処理

### 1 準備する器材等

#### (1) 器材及び試薬等

- 1) イーグル MEM (EMEM) ; (ニッスイ EMEM①等)
- 2) PBS(-) ; NaCl 10.00g, KCl 0.25g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.43g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25g / DW 1,000ml pH7.2
- 3) 非必須アミノ酸溶液-10mM(100×) ; (GIBCO 等)
- 4) L-グルタミン-200mM (100×) / PBS(-) ; 2.92%w/v 濃度
- 5) 炭酸水素ナトリウム / PBS(-) ; 8%w/v 濃度
- 6) ウシ胎児血清 (56°C、30 分間非働化済)
- 7) 抗生物質
- 8) ホモジナイザー
- 9) ろ過用フィルター (0.2~0.45 μm)
- 10) 滅菌シリンジ等 (乳剤ろ過用)

#### (2) 試薬の調製

##### 破碎用 EMEM

- 1) EMEM を蒸留水で溶解し 121°C、15 分滅菌する。
- 2) 非必須アミノ酸溶液 (最終濃度 100 μM ; 1×) を添加する。
- 3) 滅菌済 L-グルタミン (最終濃度 2mM ; 1×) を添加する。
- 4) 炭酸水素ナトリウムで pH 調整 (橙色になるまで) する。
- 5) ウシ胎児血清及び抗生物質を添加する。

### 2 前処理

#### (1) 血液 (血清)

採取した患者血液より血清を分離してウイルス分離、遺伝子検査及び血清学的検査用材料とする。但し、C6/36 細胞を使用してウイルス分離を実施する場合は、ヒトの血液成分が細胞の生育を阻害することがあるため、細胞維持培養液等で 10<sup>1~2</sup> 倍に希釈した血清をウイルス分離用材料とする。

#### (2) 蚊

搬入された蚊は、1 プールごとに破碎液 (2%ウシ胎児血清、100 μM 非必須アミノ酸、200U/ml ペニシリン、200 μg/ml ストレプトマイシン、および 0.25 μg/ml アンフォテリシン B を添加した EMEM、または PBS) を加えて乳剤を作成する。

\* 1~50 個体までなら 500 μl (ウイルス分離用に 200 μl、RT-PCR 用に 250 μl)、51~100 個体なら 1,000 μl (ウイルス分離用に 200 μl、RT-PCR 用に 250 μl) の破碎液をそれぞれの蚊のプールへ加えて、ホモジナイザーで乳剤を作成する。この蚊乳剤を軽く遠心し (3,000×g で約 3 分)、得られた遠心上清をポアサイズ 0.2~0.45 μm (マイコプラズマを除く為には 0.2 μm) の濾過用フィルターで濾過し、ウイルス分離及び遺伝学的検査用材料とする。

## 第5 ウイルス分離

本法の実施は、チングニアウイルスを培養するため、BSL3 施設を有する施設に限定する。

### 1 準備する器材等

#### (1) 器材及び試薬等

- 1) アフリカミドリザル腎臓由来 Vero 細胞 (9013 株、ATCC 株)
- 2) ヒトスジシマカ由来 C6/36 細胞
- 3) イーグル MEM (EMEM)
- 4) PBS(-)
- 5) 非必須アミノ酸溶液-10mM (100×)
- 6) L-グルタミン-200mM (100×) /PBS(-)
- 7) 炭酸水素ナトリウム /PBS(-)
- 8) ウシ胎児血清 (56°C、30 分間非働化済)
- 9) 抗生物質
- 10) 細胞増殖用培養液・細胞維持培養液
- 11) CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C、28°C)
- 12) 組織培養用プレート
- 13) 細胞継代用トリプシン液

#### (2) 試薬の調製

##### 細胞増殖用培養液・細胞維持培養液

- 1) 蒸留水を用いて溶解し 121°C、15 分滅菌した EMEM に、C6/36 細胞用に非必須アミノ酸溶液 (最終濃度 100 μM ; 1×) を添加する。
- 2) 滅菌済 L-グルタミン (最終濃度 2mM ; 1×) を添加する。
- 3) 炭酸水素ナトリウムで pH 調整 (橙色になるまで) する。
- 4) これにウシ胎児血清を 10%v/v 濃度に添加したものを細胞増殖用培養液とし、同様に 2%v/v 濃度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。

### 2 分離

#### (1) 分離操作

- 1) C6/36 細胞または Vero 細胞 (9013 株) 等を組織培養用プレートに接種し、5%CO<sub>2</sub> 存在下で C6/36 細胞は 28°C、Vero 細胞は 37°C で培養する。
- 2) 細胞が密度高く増殖していることを確認した後、ウイルス分離用材料を細胞に接種し、5%CO<sub>2</sub> 存在下で C6/36 細胞は 28°C、Vero 細胞は 37°C で培養する。
- 3) 約 7 日後に培養液を回収し、一部を別に用意しておいた細胞に重層して、再度同じ条件で細胞変性効果 (CPE) が見られるまで培養を継続する。
  - \* CPE が認められない場合や微弱な場合は、さらに盲継代を繰り返す。
  - \* 本ウイルスは、C6/36 細胞、Vero 細胞のいずれにおいても非常によく増殖し、顕著な CPE が観察され易い。検体間のコンタミネーションにも注意すること。

#### (2) 分離の確認



- 1) CPE の観察された時点で、培養液の一部を回収し-80℃で凍結保存する。
- 2) CPE が明瞭でない場合も、7~8 日目で培養液の一部を凍結保存する。
- 3) 残りを用いて RT-PCR 法によりウイルスの有無を確認する。

## 第6 遺伝子検査

### 1 RNA の抽出

ウイルス RNA 抽出キットを使用して RNA を抽出する。本マニュアルでは QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いた抽出法を示す。(他使用キット例：EZ1 Virus Mini Kit v2.0(QIAGEN))

#### (1) 器材及び試薬等

- 1) 遠心分離器
- 2) ボルテックスミキサー
- 3) マイクロピペット
- 4) フィルター付きマイクロピペットチップ
- 5) 滅菌マイクロチューブ (1.5ml：以下、「マイクロチューブ」とする。)
- 6) QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- 7) 純エタノール

#### (2) 試薬の調製

1) Carrier RNA の Buffer AVE への添加 (以下、「Carrier RNA・Buffer AVE」と略す。)  
Carrier RNA (凍結乾燥品) のチューブに Buffer AVE を 310  $\mu$ l 添加し、Carrier RNA を完全に溶解する。次いで、これを適量マイクロチューブに分注し、-20℃で冷凍保存する<sup>①</sup>。

#### 2) Buffer AW1 の調製

使用前に純エタノールを 25ml 添加する。室温で 1 年間安定であるが、使用はキットの有効期限までとする。

#### 3) Buffer AW2 の調製

使用前に純エタノールを 30ml 添加する。室温で 1 年間安定であるが、使用はキットの有効期限までとする。

#### (3) 操作手順<sup>②</sup>

1) Carrier RNA・Buffer AVE の入ったマイクロチューブを冷凍庫から取り出し、室温で完全に融解する。

2) Buffer AVL 中に沈殿物がないこと確認し<sup>③</sup>、Buffer AVL を Carrier RNA・Buffer AVE の入ったマイクロチューブに加え、静かに 10 回転倒混和する<sup>④⑤</sup> (以下、「Buffer AVL・Carrier RNA」と略す。)

なお、Carrier RNA・Buffer AVE の分注量と加える Buffer AVL の関係は、次式のとおり。

$$n \times 0.56 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 10 \mu \text{ l/ml} = z \mu \text{ l}$$

n：同時に処理するサンプル数

y：計算から求められた Buffer AVL の容量

z : Buffer AVL に添加する Carrier RNA ・ Buffer AVE 量

- 3) マイクロチューブに Buffer AVL ・ Carrier RNA を 560  $\mu$ l 量り取り、検体を 140  $\mu$ l 添加し、15 秒間ボルテックスし、室温 (15~25°C) で 10 分間インキュベートする。インキュベート後、マイクロチューブを数秒間スピンドウンして溶液を収集し、検体溶液とする。
- 4) 検体溶液に純エタノールを 560  $\mu$ l 添加し、15 秒間ボルテックスした後、マイクロチューブを数秒間スピンドウンして混合溶液を収集する。
- 5) QIAamp スピンカラム (以下、「カラム」と略す。) とコレクションチューブを連結させ、カラムの縁を濡らさないようにカラムに混合溶液を 630  $\mu$ l (混合溶液の半量) 添加し、キャップを閉めて 6,000  $\times$  g (8,000rpm) で 1 分間遠心分離する。遠心分離後、カラムを新しいコレクションチューブに連結させ、ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。
- 6) 注意深くカラムのキャップを開き、カラムの縁を濡らさないようにカラムに残りの混合溶液 (630  $\mu$ l に相当する。) を添加し、キャップを閉めて 6,000  $\times$  g (8,000rpm) で 1 分間遠心分離する。遠心分離後、カラムを新しいコレクションチューブに連結させ、ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。
- 7) 注意深くカラムのキャップを開き、カラムに Buffer AW1 を 500  $\mu$ l 添加し、キャップを閉めて 6,000  $\times$  g (8,000rpm) で 1 分間遠心分離する。遠心分離後、カラムを新しいコレクションチューブに連結させ、ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。
- 8) 注意深くカラムのキャップを開き、カラムに Buffer AW2 を 500  $\mu$ l 添加し、キャップを閉めて 20,000  $\times$  g (14,000rpm) で 3 分間遠心分離する。遠心分離後、カラムを新しいコレクションチューブに連結させ、ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。
- 9) 再度、20,000  $\times$  g (14,000rpm) で 1 分間遠心分離し、遠心分離後、カラムを新しいマイクロチューブに連結させ、ろ液の入ったコレクションチューブは捨てる。
- 10) 注意深くカラムを開き、カラムのフィルター上に Buffer AVE を 60  $\mu$ l 添加し、キャップを閉めて室温で 1 分間インキュベートする。インキュベート後、6,000  $\times$  g (8,000rpm) で 1 分間遠心分離し、捕集された液を検体 RNA 抽出液とする。

(注意点)

- ① Carrier RNA ・ Buffer AVE の凍結融解は、3 回まで可能である。
- ② 全ての遠心操作は室温 (15~25°C) で行い、検体や Buffer AVE も室温 (15~25°C) に戻してから使用する。
- ③ Buffer AVL 中に沈殿物がある場合は、80°C でインキュベートする。
- ④ 泡立ちを避けるためにボルテックスで混和してはならない。
- ⑤ Buffer AVL ・ Carrier RNA は、2~8°C で最高 48 時間まで安定である。また、この溶液は 2~8°C で保存すると沈殿を生じるが、使用直前に 80°C でインキュベートして再融解する。80°C でのインキュベートは 5 分以内で行い、6 回を越えてはならない。

## 2 Real-time RT-PCR (TaqMan 法)

### (1) 器材及び試薬等

- 1) Applied Biosystems 7000 シリーズなど Real-time PCR System
- 2) 96-well PCR プレートおよび 8 連 PCR チューブ
- 3) Optical Adhesive Film および Optical 8-Cap
- 4) QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN)
- 5) ボルテックスミキサー
- 6) マイクロピペット
- 7) フィルター付マイクロピペットチップ
- 8) 滅菌マイクロチューブ (1.5ml)
- 9) プライマーおよびプローブ

プライマーおよびプローブ	シーケンス (5' -3' )
Taq-Chik607F (10849)	GCR CCM TCT KTA ACG GAC AT
Taq-Chik672R (10894)	GCC CCC RAA GTC KGA GGA R
Taq-Chik638P	FAM-TAC CAG CCT GCA CYC-MGB

\* 各プライマーはTEで100  $\mu$ Mに調製し、プローブとmixしたものを小分けして-80°Cで冷凍保管しておくが良い。

### (2) 操作手順

- 1) マイクロチューブに次表に従い反応液の必要量を調製する。

(反応液)

試薬名	容量
2 $\times$ QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	12.5 $\mu$ l
Forward Primer (25 $\mu$ M)	1.00 $\mu$ l
Reverse Primer (25 $\mu$ M)	1.00 $\mu$ l
*Probe	** $\mu$ l
QuantiTect RT Mix	0.25 $\mu$ l
RNase free Water	** $\mu$ l
計	20.0 $\mu$ l

\* ProbeのConcentrationはまちまちで、6~15  $\mu$ Mの範囲。Final Concentrationが0.1~0.2  $\mu$ Mになるように、RNase free WaterでTotal Volumeを調節する。

- 2) 調製後、泡立たない程度に良く混和（軽くボルテックス、タッピング、ピペッティング等）し、スピンドウン（管壁や蓋についた試薬を落とす程度）する。
- 3) Real-time RT-PCR 反応液を PCR プレートおよびチューブに 20  $\mu$ l ずつ分注する。
- 4) Real-time RT-PCR 反応液を分注したウェルに Negative Control (DW)、検体 RNA 抽出液、Positive Control の順に各々5  $\mu$ l ずつに加え、フィルムおよびキャップをする。サンプル添加時のクロスコンタミネーションを防止するため、ウェルの上をアルミ箔で被い、添加する部分だけアルミ箔を除く。
- 5) プレートを機器にセットする。チューブの場合、四隅にダミーチューブをセットする。次の反応条件によりランをする。

(反応条件)

	Cycle	Temperature (°C)	Time
RT		50	30min
PCR initial activation		95	15min
PCR	40-45	94	15sec
		57	60sec

\* Fast PCR 試薬、対応機を使用して迅速に検査を行う場合。

対応機器

Applied Biosystems 7500、ViiA 7、7900、StepOne 各シリーズ

器材及び試薬等

- 1) Fast System 対応機
- 2) Fast Optical 96 (48)-well Reaction Plate (0.1mL) および Fast Reaction Tubes
- 3) Optical Adhesive Film および Optical 8-Cap
- 4) TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix

(反応液)

試薬名	容量
4X TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix	5.0 $\mu$ l
Forward primer (25 $\mu$ M)	0.80 $\mu$ l
Reverse primer (25 $\mu$ M)	0.80 $\mu$ l
*Probe	** $\mu$ l
Rnase free Water	** $\mu$ l
計	15.0 $\mu$ l

\* ProbeのConcentrationはまちまちで、6~15  $\mu$ Mの範囲。Final Concentrationが0.25  $\mu$ Mになるように、RNase free Waterで Total Volumeを調節する。

(反応条件)

Step	Cycle	Temperature (°C)	Time
RT	1	50	5min
RT inactivation/initial denaturation	1	95	20sec
PCR	40-45	95	3sec
		57	30sec

### (3) 結果の評価と判定

測定波長 530nm において 38 サイクル以内 (Ct 値<sup>※</sup>) に産物の増幅がみられたものを陽性とする (データの解析については「リアルタイム PCR によるチクングニアウイルス、ウエストナイルウイルス RNA の検出法 (第 2 版)」等を参照)。38 サイクル以降に立ち上がった場合は、判定を保留するか再検査を行う。

※Ct: cycle threshold は S 字曲線が立ち上がりある閾値を超えるサイクル数である。Light cycler は Cp ; Crossing point を採用しており、S 字曲線の立ち上がりのカーブを検知するので、Ct 値よりやや早いサイクル数を示す場合がある。

## 3 Conventional RT-PCR 法

Conventional RT-PCR 法に用いるキットは、基本的に何を用いてもよいが、逆転写反応については、キットに添付されているマニュアルに従って行うこと。本マニュアルでは SuperScript One-Step RT-PCR with Platinam Taq (invitrogen) を使用した RT-PCR 法を示す。

### (1) 器材及び試薬

- 1) サーマルサイクラー
- 2) 電気泳動装置
- 3) UV 照射装置
- 4) 写真撮影装置
- 5) ボルテックスミキサー
- 6) 遠心分離機
- 7) マイクロピペット
- 8) フィルター付きマイクロピペットチップ
- 9) 滅菌マイクロチューブ (1.5ml)
- 10) PCR 用チューブ (0.2ml)
- 11) SuperScript One-Step RT-PCR with Platinam Taq (invitrogen)
- 12) RNase inhibitor (40U/ $\mu$ l)
- 13) 100bp DNA ladder
- 14) 2%-アガロースゲル
- 15) 6×Gel loading dye
- 16) 1×TAE 電気泳動バッファー ; 50×TAE (ニッポンジーン社等) を 50 倍に希釈
- 17) エチジウムブロマイド染色液
- 18) プライマー

名称	シーケンス (5' -3' )	サイズ (bp)
Chik10294s	ACG CAA TTG AGC GAA GCA CAT	約300
Chik10573c	AAA TTG TCC TGG TCT TCC TG	

\*各プライマーは TE で 100  $\mu$  M に調製したものを小分けして -80°C で冷凍保管しておくが良い。

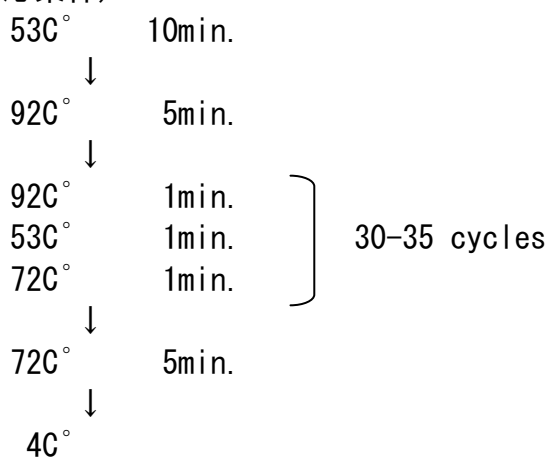
### (2) 操作手順

- 1) マイクロチューブに次表に従い反応液の必要量を調製する。  
(反応液)

試薬名	容量
×2 reaction Buffer	25.0 $\mu$ l
Forward Primer (100 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
Reverse Primer (100 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
RT/PLATINAM Taq	1.0 $\mu$ l
RNase Inhibitor (40U/ $\mu$ l)	0.6 $\mu$ l
RNase free water	17.4 $\mu$ l
計	45.0 $\mu$ l

- 2) 調製後、泡立たない程度に良く混和（軽くボルテックス、タッピング、ピペッティング等）し、スピンドウン（管壁や蓋についた試薬を落とす程度）する。
- 3) 反応液を PCR 反応チューブに 45  $\mu$ l ずつ分注する。
- 4) 反応液を分注した PCR 反応チューブに Negative Control (DW)、検体 RNA 抽出液、Positive Control の順に各々 5  $\mu$ l ずつ加え、確実にキャップする。
- 5) 管壁や蓋についた試薬を落とす程度スピンドウンし、PCR 反応チューブに気泡がないことを確認後、サーマルサイクラーにセットし、次の反応条件により増幅をする。

(反応条件)



- 6) 増幅後、6×Gel loading dye 2  $\mu$ l と PCR 増幅液 10  $\mu$ l をよく混合（ピペッティング）し、2%に調製したアガロース（以下、「ゲル」とする。）のウェルに混合液を 10  $\mu$ l 入れる。
- 7) 電気泳動装置で 100V、30~40 分間、-から+へ電気泳動する。
- 8) 泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド染色液に入れ、15~30 分間染色する。染色後、ゲルを 5~10 分間水洗し、UV 照射装置にセットし、260~300nm の UV を照射して写真撮影する。

### (3) 結果の評価と判定

検査結果の評価と判定は、想定される増幅産物のサイズ（約 300bp）のバンドの存在の有無を確認することで行う。

## 第7 血清学的検査

### 1 IgM 捕捉 ELISA 法

チクングニアウイルスに対する IgM 抗体はウイルス種特異的であり、日本国内にヒトに病原性を有するアルファウイルスが存在しないことから有用な血清学的検査法である。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 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. チクングニアウイルス抗原を反応させる。
- c. ヒト血清中のチクングニアウイルスに対する IgM と反応したウイルス抗原を、酵素標識した抗アルファウイルス抗体 (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 Vero 細胞\*上清 (培養液)  
発色基質  
発色停止液  
\*ウイルス抗原を作製した細胞

#### (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  
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 ( $\mu$  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  $\mu$ 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(4℃)で一晩行うことも出来る。
  - \*市販品 ; Human IgM Capture Microplate (BioMedical Reserch Inst.) も使用可能である。
  
- 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BSL 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、0.1%カゼイン含有 PBS (-) を用いる。
  
- 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 とともに複数のウェルを使って、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4℃で一晩反応させることも可能である。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) チクングニア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チクングニアウイルスは、Vero 細胞で増殖させて用いる。  
 \* チクングニアウイルスの増殖は、比較的容易でウイルス接種後 3 日目位の上清を回収する。  
 \* 抗原の不活化は、0.08%ホルマリンを添加し、4°C下で 90 日間不活化する。  
 \* 未感染の Vero 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アルファウイルス抗体で検出する。  
 \* 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  
 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)  
 H<sub>2</sub>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 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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。

### 3 中和試験

本法の実施は、チクングニアウイルスを使用するため、P3 施設を有する施設に限定する。中和抗体測定法は、Vero 細胞を用いたプラークアッセイについて示す。

#### (1) 器材及び試薬等

- 1) Vero 細胞 (9013 株等)
- 2) イーグル MEM
- 3) L-グルタミン
- 4) 細胞増殖用培養液・細胞維持培養液
- 5) 重層用培養液
- 6) 細胞継代用トリプシン液
- 7) 組織培養プレート (6 ウェル)
- 8) 組織培養用プラスチックフラスコ (75 または 150 cm<sup>2</sup>)
- 9) ウシ胎児血清 (56°C、30 分間非動化済)
- 10) CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C)
- 11) 10%ホルマリン液 (37%ホルマリン原液を 100%と見なして PBS(-) で調製)
- 12) 30 倍濃度メチレンブルー溶液;メチレンブルー 2.25g, 1M NaOH 0.375ml/DW 200ml
- 13) PBS(-)
- 14) チクングニアウイルス (保存ウイルス)

#### (2) 試薬の調製

- 1) 細胞増殖用培養液・細胞維持培養液  
「第5 ウイルス分離」の「2 試薬の調製」と同様に調製する。
- 2) 重層用培養液：
  - ① スターラーバーを入れた 500ml の耐熱容器にメチルセルロース (4,000CP : 和光純薬 136-02155) 4 g を計り取る。
  - ② 別の耐熱容器に細胞維持培養液を 400ml 作る。
  - ③ メチルセルロースと細胞維持培養液を同時に 121°C、15 分間滅菌する。
  - ④ 滅菌終了後、冷めないうちに両方を混合し、スターラーで 20 分間攪拌する。
  - ⑤ その後、氷で冷やしながら攪拌し、液が透明になったら攪拌を止める。
  - ⑥ これにウシ胎児血清を 2%に添加しさらに 30 分以上攪拌したものを重層用培養液とする。

### (3) 操作手順

#### 1) 細胞プレートの作成手順

- ① Vero 細胞をトリプシン処理し、細胞増殖用培地を用いて  $2 \times 10^5$  cell/ml の細胞浮遊液を作る。
- ② 組織培養用 6 ウエルプレートに 1well 当たり 2~3ml を分注し、均一に拡散するようにプレートを前後左右によく振とうした後、5%CO<sub>2</sub> 下 37°C で 1 晩培養する。
- ③ 使用する前に、80~90% 程度の細胞シートが形成されていることを確かめる。

#### 2) 操作手順

- ① 被検血清を 56°C、30 分間非働化する。
- ② 非働化した検査血清を細胞維持培養液で 5 倍にうすめ、2 倍階段希釈を行う。
- ③ 保存ウイルスを、ウイルスカ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）。
- ④ 血清の各希釈液に攻撃ウイルスを等量加える（氷浴中）。
- ⑤ 検査対照として、細胞維持培養液に攻撃ウイルスを等量加えたものを対照ウイルスとする（氷浴中）。
- ⑥ 各試験管は、よく振とう混和してから 37°C の恒温水槽内で 90 分間中和反応をさせる。
- ⑦ 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。
- ⑧ 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ない。
- ⑨ 対照ウイルス、希釈血清と攻撃ウイルス混和液のそれぞれ 100  $\mu$ l を well に壁面より静かに接種する。
- ⑩ 対照ウイルスは 2 well、希釈血清とウイルス混和液は 3well または 4well を用いる。
- ⑪ 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動かす。
- ⑫ ウイルス吸着時間は、5%CO<sub>2</sub> 下 37°C 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。
- ⑬ ウイルス吸着反応終了後、接種液を除かずに、重層用培養液 3ml を各 well に加え、5%CO<sub>2</sub> 下 37°C で 3 日間培養する。
- ⑭ 3 日間の培養終了後、各ウエルの重層用培養液上へ 10%ホルマリン液を 1.5ml ずつ加え、室温で 1 時間以上放置する。（1 日間放置しても良い）
- ⑮ ホルマリン固定終了後、水道水にて培地とホルマリン液を洗い落とす。
- ⑯ 使用直前に 30 倍濃度メチレンブルー溶液を DW で 30 倍希釈したメチレンブルー染色液を各 well に 1.5ml ずつ加え 1 時間室温に放置する。
- ⑰ 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。

#### 3) プラーク計数と中和

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。

- ① ウイルス対照群のプラーク数の平均値が 50~100 の間にあること。
- ② 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。

### (4) 結果の評価と判定

中和試験により抗体が血清中に検出される（ペア血清による抗体陽転又は抗体価の有意な上昇が確認される）。

## **第8 チクングニアウイルス感染症の診断基準**

次のいずれかにあてはまれば「チクングニアウイルス感染症」とする。

- (1) チクングニアウイルスが分離される。
- (2) RT-PCR 法による遺伝子検査で、チクングニアウイルス特異的遺伝子が検出される。
- (3) IgM capture ELISA 法でチクングニアウイルス特異的 IgM 抗体が検出される。  
\* 通常はペア血清による測定を行い判定することが望ましい。短期で複数回海外渡航した人など IgM 抗体陽性はいつ感染したものなのか判断できないため、医師により血小板・白血球数の減少など一般検査所見および症状を考慮して診断する必要がある。
- (4) 中和試験により抗体が血清中に検出される（ペア血清による抗体陽転又は抗体価の有意な上昇が確認される）。

## **第9 参考文献**

- (1) 「チクングニヤ熱媒介蚊対策に関するガイドライン」（平成21年厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
- (2) 「検疫法に基づく検査実施区分について」（平成20年5月30日付 食安検発第0530004号 検疫所業務管理室長）
- (3) 「ウエストナイルウイルス検査の手引き」（平成16年3月2日 事務連絡 検疫所業務管理室）
- (4) 「港湾区域等衛生管理業務について」（平成11年9月20日付 厚生省生活衛生局食品保健課検疫所業務管理室長通知）
- (5) 「蚊族のフラビウイルス検査に係る検体の保存・送付方法等について」（平成13年6月20日 事務連絡 検疫所業務管理室検疫業務係長）
- (6) 「リアルタイム PCR による Dengue ウイルス、ウエストナイルウイルス RNA の検出法（第2版）」
- (7) Chang-Kweng Lim, et al. Chikungunya virus isolated from a returnee to Japan from Sri Lanka: Isolation of two sub-strains with different characteristics. Am. J. Trop. Med. Hyg. 81(5):865-868. 2009.
- (8) WHO 「感染性物質の輸送規則に関するガイダンス 2009-2010 版」