

COVID-19 血清学的検査マニュアル

国立感染症研究所

令和2年6月

内容

COVID-19の血清学的検査に関する注意事項.....	2
検体の採取・輸送.....	2
1. 検体の採取.....	2
2. 検体の輸送.....	2
ウイルスの取り扱い.....	3
1. ウイルスの感染実験：.....	3
A) 試薬・機材.....	3
B) 感染実験.....	3
血清学的検査法.....	4
1. 間接蛍光抗体法（INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY, IFA）：.....	4
A) 試薬・機材.....	4
B) 検査法.....	5
2. SARS-CoV-2感染細胞溶解液を用いたELISA法.....	6
A) 試薬・機材.....	6
B) 方法.....	6
3. 中和試験法.....	8
A) 試薬・機材.....	8
B) 検査法.....	8
参考文献.....	9

COVID-19の血清学的検査に関する注意事項

COVID-19感染症の血清学的検査において、中和試験は感染性ウイルスを扱うためBSL3実験室で実施する。また、IF抗原およびELISA抗原について、SARS-CoV-2感染細胞溶解液を使用する場合には、抗原作製作業はBSL3実験室で行う。感染性ウイルスを用いる代わりに、シュードタイプウイルスや組換え蛋白抗原を使用することにより、BSL2実験室で行うことが可能となるが、本マニュアルでは感染性ウイルスを用いた最も古典的な方法を取り扱う。

【本マニュアルに関する問い合わせ先】

〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1 国立感染症研究所
COVID-19血清学的検査WG
Email: sars2-ab@nih.go.jp

検体の採取・輸送

1. 検体の採取

COVID-19感染症の血清学的検査のための検体には、血清あるいは血漿が有用である。ただし、ヘパリン処理済み血漿は非特異反応が報告されていることから、血漿を得るための凝固阻止剤にはヘパリン処理はなるべく避ける。

2. 検体の輸送

検体採取後直ちに施設内で-70°C以下の冷凍庫に保存し、ドライアイスを用いて冷凍したまま輸送する。ドライアイスは密閉した容器に入れないこと。詳細は、「2019-nCoV(新型コロナウイルス)感染を疑う患者の検体採取・輸送マニュアル」(国立感染症研究所 HP)最新版を参照のこと。

ウイルスの取り扱い

1. ウイルスの感染実験：

ウイルスの感染実験はBSL 3 実験室で行う。Vero E6/TMPRSS2 細胞はSARS-CoV-2 の分離に適しており (Matsuyama S *et al.*, 2020)、感染・増殖効率が高い。また、感染後の細胞変性効果で完全に細胞が剥離するためTCID₅₀によるウイルス力価測定が可能である。ただし、いったん分離されれば、他のVero系の細胞でも感染・増殖することが確認されている (例、VeroE6, Vero (ATCC由来), Vero (JCRB9013))。

A) 試薬・機材

- 1) Vero E6-TMPRSS2 細胞 (JCRB1819 VeroE6/TMPRSS2, JCRB細胞バンク)
- 2) CO₂ 培養器 (37°C、5%CO₂)
- 3) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
- 4) 抗生物質 (Geneticin G418、ペニシリン、ストレプトマイシン等)
- 5) ウシ胎仔血清 (FBS、56°C30 分処理による熱非働化されたもの)
- 6) 細胞培養用カルチャーボトル
- 7) ウイルス液 (SARS-CoV-2 JPN/TY/WK-521株)
- 8) 必要に応じてピペッター、チップなど

B) 感染実験

- 1) 細胞培養用カルチャーボトル等に単層培養されたVero E6/TMPRSS2 細胞を 準備する (培養培地 : DMEM (low glucose) with 10% FBS and 1 mg/mL Geneticin G418, Penicillin (100 unit/mL), Streptomycin (100 ug/mL))。
- 2) 細胞を PBS で一回洗浄し、維持培地 (DMEM (low glucose) with 2% FBS and Penicillin (100 unit/mL), Streptomycin (100 ug/mL)) を加える。
- 3) ウイルス液を接種し (multiplicity of infection, m. o. i. を 0.1から3.0、必要に応じて決定) CO₂培養器内で維持する。
- 4) 翌日、CPEを観察し目的に応じて感染細胞あるいは細胞上清を得る。

血清学的検査法

本稿に記載の COVID-19 の血清学的検査に必要な抗原の準備には、感染性 SARS-CoV-2 が必要とされる。また、急性期の COVID-19 患者血清には感染性 SARS-CoV-2 が含まれている可能性がある。血清検体は、抗体検出時の非特異的反応を減弱させるため検査前に 56°C、30 分の加熱処理を行うが、この操作により SARS-CoV-2 の感染性は 1 万分の 1 以下に低下する。ただし、熱処理により血清中のウイルスが完全に不活化されない可能性もあるので、急性期患者血清の検査の場合は、加熱処理後も安全キャビネット内で取り扱う。

1. 間接蛍光抗体法 (indirect immunofluorescence assay, IFA) :

SARS-CoV-2 感染細胞および非感染細胞を適した割合 (例 感染細胞 : 非感染細胞 = 1 : 4) で混ぜて、蛍光抗体用スライドグラスに吸着させ、アセトン固定した上で抗原とする。感染細胞のウイルス抗原に反応する抗体が被検血清中にあるか否かを調べることにより、SARS-CoV-2 に対する特異的抗体を検出する方法である。検査用抗原を準備しておけば比較的簡単に検査が出来るが、判定に時間と経験を要する。ただし、SARS-CoV-2 に対する抗体は他のコロナウイルスにも交差結合すると報告されているので (例 SARS-CoV-1)、その試験成績の解釈には注意を要する。尚、蛍光抗体検査用スライドグラスへのウイルス抗原準備は、BSL 3 実験室で行う。

A) 試薬・機材

- 1) Vero E6/TMPRSS2細胞 (JCRB1819 VeroE6/TMPRSS2, JCRB細胞バンク)
- 2) ウイルス液 (SARS-CoV-2 JPN/TY/WK-521株)
- 3) CO₂ 培養器 (37°C、5%CO₂)
- 4) 細胞増殖培地 (DMEM (low glucose) with 10% FBS and 1 mg/mL Geneticin G418, Penicillin (100 unit/mL), Streptomycin (100 ug/mL))
- 5) 維持培地 (DMEM (low glucose) with 2% FBS and Penicillin (100 unit/mL), Streptomycin (100 ug/mL))
- 6) 細胞培養用プラスチックボトル
- 7) 蛍光抗体検査用スライドグラス
- 8) リン酸緩衝液 (PBS)
- 9) 細胞消化用トリプシン EDTA 液 (0.25%トリプシン-0.02%EDTA を含む PBS)

10) FITC 標識抗ヒト IgG 抗体

11) 37°Cインキュベータ、蛍光顕微鏡

12) 必要に応じてマルチチャンネルピペッター、ピペッター、チップなど

B) 検査法

- 1) 細胞増殖培地でプラスチックボトルに培養した Vero E6/TMPRSS2 細胞に細胞 1 つあたり 1 つの感染性 SARS-CoV-2 を感染させる条件で (m. o. i. が約 1) で SARS-CoV-2 を接種する。
- 2) ウイルス接種後約 20 時間後に PBS で感染細胞を洗浄し、トリプシン処理により細胞を回収する。このとき、感染細胞は巨細胞形成を示す程度で変性・剥離が進んでいない方がよい。感染細胞を更に 1 回 PBS で洗浄後、非感染細胞を同様に処理し、感染細胞および非感染細胞を 1 : 4 で混和する。約 3×10^6 cells/ml となるように PBS に浮遊する。蛍光抗体用スライドガラスの各ウェルに細胞浮遊液を 10 μ L ずつ加え、放置し完全に乾燥させる。乾燥時にウイルスを完全に不活化させる目的で UV を 2 時間以上照射する。その後、100%アセトンで 5 分間固定後し、風乾する。以上の操作は BSL 3 実験室の安全キャビネット内で行う。
- 3) 作製した抗原スライドは使用まで -80°C で保管する。
- 4) 使用時に抗原スライドを室温に戻す。
- 5) 被検血清を PBS で 20 倍から 2 倍段階希釈し、希釈血清を 20 μ L ずつ、抗原スライドの各ウェルにのせ、37°C 1 時間反応させる。被検血清とともに抗体陽性、陰性コントロール血清も同時に反応させる。
- 6) PBS でスライドガラスを洗浄し、PBS で適宜希釈した FITC 標識抗ヒト IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific, #A11013 の場合は 200 倍) を 20 μ L ずつ各ウェルにのせ、37°C 1 時間反応させる (反応中はスライドが乾かないように湿潤箱に入れる)。
- 7) PBS でスライドを洗浄後、10%グリセリン入り PBS で封入する。
- 8) 蛍光顕微鏡で特異蛍光を検鏡する。特異的な染色像が認められた場合に抗体陽性と判定し、抗体陽性を示した最高希釈倍数を抗体価とする。

2. SARS-CoV-2感染細胞溶解液を用いたELISA法

SARS-CoV-2 感染細胞抗原を96ウェルマイクロプレートに吸着させ、そこに結合する SARS-CoV-2 特異抗体を検出する方法で、一度に多数の検体を処理できるという利点がある。

A) 試薬・機材

- 1) Vero細胞 (JCRB9013 VERO, JCRB細胞バンク)
- 2) ウイルス液 (SARS-CoV-2 JPN/TY/WK-521株)
- 3) 細胞増殖培地 (DMEM に5%非働化済み FBS を含む)
- 4) 96 ウェル ELISA プレート (下記のプロトコルでは、half-well plate, coster #3690使用)
- 5) リン酸緩衝液 (PBS)
- 6) 0.05 % Tween-20 含有 PBS (T-PBS)
- 7) Nonidet P-40 (NP40) もしくはその代替品
- 8) 塩化亜鉛 $ZnCl_2$
- 9) 5%スキムミルク含有 T-PBS (M-T-PBS) (例 スキムミルク 雪印メグミルク)
- 10) ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(H+L)抗体 (HRP標識抗体、例 Thermo Fisher Scientific, #A18811)
- 11) ABTS 発色基質 (例 Roche Diagnostics, ABTS tablet 及び buffer for ABTS)
- 12) ELISA リーダー
- 13) ELISA ウォッシャー
- 14) 37°Cインキュベータ、蛍光顕微鏡
- 15) 必要に応じてマルチチャンネルピペッター、ピペッター、チップなど

B) 方法

- 1) m. o. i. が約3になるようにウイルスをVero 9013細胞に感染させ、感染 27時間後に感染細胞を回収する。同時に非感染細胞も回収する。感染、非感染細胞をそれぞれ 1% NP40ならびに1 mM $ZnCl_2$ を含む PBS で溶解し、4°C、12000 回転で 10 分遠心し、その上清を抗原として用いる。SARS-CoV-2 感染 Vero 9013細胞および非感染細胞から得られた抗原をそれぞれ陽性抗原、陰性抗原とする。

- 2) 陽性、陰性抗原を PBS であらかじめ検討して設定した倍率で希釈し、陽性抗原 $50\mu\text{l}$ を 96 ウェルプレートの A~D レーンに、陰性抗原を E~H レーンに加え、室温で 2 時間又は 4°C で一晩置く。
- 3) M-T-PBS を用いて 100 倍に希釈した非働化済み血清を A1、B1 ならびに E1、F1 に $50\mu\text{L}$ ずつ加え（各サンプル 2 点で測定を行い、陽性抗原ウェルと陰性抗原ウェルに配置が対応するように）、 37°C で 1 時間反応させる。陽性判定のため、プレート毎に陽性対照検体を配置する。（後述）

補足：一般的には、抗原を固層化した後にブロッキングを施す場合が多い。今回は、検体の希釈ならびに標識抗体の希釈をブロッキング溶液で行なっていること、また予備検討の結果、固層化後のブロッキングの有無は結果に影響を与えなかったことから、ブロッキング処理を省略している。

- 4) ついで各ウェルを T-PBS で洗浄後、M-T-PBS で 1000 倍希釈された HRP 標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体 $50\mu\text{l}$ を各ウェルに加え、 37°C で 1 時間反応させる。
- 5) 各ウェルを T-PBS で洗浄後、各ウェルに ABTS 発色基質液 $50\mu\text{l}$ を加え、遮光下で 37°C 、30 分反応させる。
- 6) ELISA リーダーを用いて、OD（波長 490nm のフィルターを対照として波長 405nm のフィルターで測定）を測定する。抗原陽性ウェルの OD から対応する抗原陰性ウェルの OD を差し引いた値を抗 SARS -CoV-2 抗体による OD 値とする。
- 7) 抗原陽性ウェルの OD から対応する抗原陰性ウェルの OD を差し引いた値が、陽性対照検体の値よりも高い場合は抗 SARS -CoV-2 抗体陽性、低い場合は抗 SARS -CoV-2 抗体陰性と判断する。

補足：感染研では、新型コロナウイルス流行前に得られた健常人血清を用いて上述の試験を行い、この流行前血清の「平均値+1×標準偏差」の値をカットオフ値と設定し、この値と同等の値を示す希釈陽性検体を陽性対照検体として用いている。感染細胞溶解液を用いた ELISA 法は他のコロナウイルスに対する抗体による非特異反応も検出されることから、本法で陽性と判断した検体に関しては、後述の中和試験法による確認試験が必要不可欠である。本法における陽性判定基準は、中和試験法による確認試験の実施を前提としたものであることに注意すること。

3. 中和試験法

SARS-CoV-2の中和試験は、他のコロナウイルスとの交差反応もなく特異性が高く、また、感度も高い。なお、中和試験は、感染性 SARS-CoV-2を用いるためBSL 3実験室で行う。

A) 試薬・機材

- 1) Vero E6/TMPRSS2細胞 (JCRB1819 VeroE6/TMPRSS2, JCRB細胞バンク)
- 2) ウイルス液 (SARS-CoV-2 JPN/TY/WK-521株)
- 3) CO₂ 培養器 (37°C、5%CO₂)
- 4) 細胞増殖培地 (DMEM (low glucose) with 10% FBS and 1 mg/mL Geneticin G418, Penicillin (100 unit/mL), Streptomycin (100 ug/mL))
- 5) 維持培地 (DMEM (low glucose) with 2% FBS and Penicillin (100 unit/mL), Streptomycin (100 ug/mL))
- 6) 96 ウェルマイクロプレート
- 7) 5 ml プラスチックチューブ
- 8) 20%ホルマリン
- 9) 1%クリスタルバイオレット染色液
- 10) マルチチャンネルピペッター、ピペッター、チップなど

B) 検査法

- 1) 96ウェルマイクロプレートにVeroE6/TMPRSS2細胞を準備する。接種法であれば96ウェルマイクロプレートに単層となるように事前に準備する。巻き込み法の場合はフラスコから細胞を剥がし、細胞浮遊液とする。いずれもおよそ10⁴細胞数/ウェルとなるように調整する。(例 1プレート/T25フラスコ)
- 2) 細胞維持培地を用いて 100TCID₅₀/50 μLのウイルス液を作成する。
- 3) 細胞維持培地を用いて被検血清を5倍から160倍まで2倍階段希釈する。なお、被検血清の対照として攻撃ウイルス液を接種しないウェルも準備するとよい(希釈倍率5倍のみ/最終希釈倍率は10倍)。
- 4) 準備したウイルス液と希釈した被検血清を等量混合し37°Cで一時間反応させる。最終希釈濃度は10倍から320倍となる。
- 5) 反応後、96穴プレートに準備した細胞に100 μL添加する(接種法)。巻き込み法で

は反応液を100 μ Lずつ96穴マイクロプレートに移し、その後、細胞浮遊液を100 μ L ずつ加える。

- 6) 37°C 5-6日間培養後、各ウェルの細胞変性効果（CPE）の有無について倒立顕微鏡を用いて観察する。
- 7) ホルマリン固定（室温30分以上、一晩でも可）後にプレートを水洗し、クリスタルバイオレット液で染色（10分以上）・水洗後、最終判定を行う。
- 8) ウイルス液を被検血清と中和させることによりCPEが抑えられている場合には中和抗体陽性と判定する。なお、1段階希釈 2ウェルで実施した場合は100% CPE阻止の最高希釈倍数を中和抗体価とし、4ウェルで実施した場合は 2ウェル以上でCPE出現が抑制された最高希釈倍数を中和抗体価とする。

参考文献

- 1) SARS診断マニュアル (<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/SARS-manual.pdf>)
- 2) Matsuyama S *et al.*, Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020. 117:7001-7003.
- 3) Kumar M *et al.*, Inactivation and safety testing of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. J Virol Methods. 2015. 233:13-18