

日 本 脳 炎

目 次

I 概説	2
II 検査の進め方	
(1) 患者の診断	2
(2) 疫学調査	2
1) 感染源調査	2
2) 感受性調査	2
III 検査材料	
(1) ウイルス分離材料及び RT-PCR 材料	3
1) ヒトのウイルス分離材料	3
2) コガタアカイエカ等の分離材料	3
3) ブタ血液の分離材料	3
(2) 抗体測定用血清	3
IV ウイルス分離・検出法	
(1) ウイルス分離材料の前処理	4
(2) ウイルス分離法	4
1) 乳飲みマウス脳内接種法	4
2) 培養細胞によるウイルス分離法	4
(3) RT-PCR 法による遺伝子検出	5
(4) 蛍光抗体法(直接蛍光抗体法)	7
V 血清診断	
(1) 赤血球凝集抑制試験(HI 試験)	7
1) HI 試験法の概要	7
2) 被検血清の前処理	9
3) HI 試験の手順	9
4) IgM 抗体の証明	
a. 2-メルカプトエタノール処理法	10
b. 2-ME・ヨードアセトアミド処理法	10
(2) 補体結合試験(CF 試験)	11
(3) 中和試験(NT 試験)	
Vero 細胞を用いた中和試験法	11
1) 材料	11
2) 細胞継代	12
3) 細胞プレートの作成	12
4) 中和試験法	12
5) プラーク計数と中和抗体価の判定	13
6) 試薬の組成	13
a. 細胞増殖用培地	
b. 細胞維持液(ウイルス・血清の希釈液)	
c. 染色液(メチレンブルー溶液)	
(4) 酵素抗体法(ELISA 法)	
IgM capture-ELISA 法	14
1) 原理	
2) 試薬・機材	
3) 操作手順	
VI 確定診断基準と成績の解釈	18

日本脳炎ウイルス

I. 概説

日本脳炎ウイルスは、Flaviviridae 科、Flavivirus 属のウイルスであり、コガタアカイエカが媒介する。カ→ブタ（時にトリ）→カのサイクルで、生態環を作っている。ヒトは日本脳炎ウイルス感染の終末宿主であり、ウイルス増殖動物としてのブタの感染状況が、ヒトでの感染状況を左右していると考えられている。現在、日本脳炎の流行地は、東アジア、東南アジア、南アジアからオーストラリアにまで拡大し、年間数万人の日本脳炎患者が発生している。症状は、定型的な脳炎で、1～2日で40℃以上の高熱となる。頭痛、嘔吐、項部硬直、ケルニッヒ徴候などの髄膜刺激症状が現れ、次いで意識混濁、筋強剛、けいれん等の脳症状が現れる。発症後1週間が病気の極期で、このころに死亡例が多く見られ、致命率は約20%である。その後、熱は次第に低下し、症状も軽快するが、生残者の半数に精神障害、運動障害等の後遺症が残る。近年、日本での日本脳炎確認患者は、1965年以前と比べ激減している。患者発生の強力な抑制因子としては、ヒトに対してのワクチン接種による免疫賦与、コガタアカイエカの減少、ブタ飼育環境の変化の3点がその大きな役割を担っていると考えられている。

II. 検査の進め方

(1) 臨床例の診断

一般には、ウイルス分離と血清診断が基本となる。第7病日までの死亡例の脳組織から、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、発病初期の血液・髄液からのウイルス分離は、稀に成功することがある程度である。臨床症状は、他の類似疾患との鑑別が困難なので、血清学的診断が不可欠である。第7病日以後の患者血清については、HI試験による血清診断が可能となる。原則として急性期（第7病日以内）と回復期（第14病日以降）に採血したペア血清を用い、抗体価の有意な上昇が確認できれば診断が確定する。CF試験でも同様である。また単一血清（回復期）でも、有意なIgM抗体が検出できれば診断可能である。

(2) 疫学調査

疫学調査として、以下の調査が行われており、日本脳炎患者発生を予測する上では参考となる。

1) 感染源調査

ブタの抗体保有状況の調査とくにIgM抗体の証明は、感染時期の特定に欠かせない。この調査から、ウイルスの浸淫状況を知ることが出来る。現在、約30弱の地方衛生研究所に於いて実施されている。日本脳炎ブタ情報は、毎年日本脳炎ウイルスの各都道府県における散布状況を示し、日本脳炎流行予測の指標となっている。

2) 感受性調査

ヒトの日本脳炎に対する抗体保有調査 全国住民の抗体保有調査（抗体保有状況）を、中和試験法により実施している。中和抗体価の測定結果から日本脳炎感受性者数を把握

することにより、日本脳炎患者の発生する危険性が予測可能となる。

III. 検査材料

(1) ウイルス分離用材料および RT-PCR 用材料

1) ヒトのウイルス分離用材料

死亡した患者の脳組織の採取は、解剖の場合、白質部を除き、灰白質部のみを集める。アンモン角、視床が採取できればウイルス分離率が高い。解剖が困難な例では、市販の脳穿刺針を用い、鼻孔より挿入して脳底を破壊した後、脳神経組織を採取する。 -80°C に保存する。蛍光抗体測定用には、ドライアイスアセトン中に浸した N-ヘキサン中で迅速凍結した後、 -80°C に密栓して保存する。

2) コガタアカイエカ等の分離用材料

直ちに乳剤にしない場合には、分離するまでそのまま -80°C に保存する。

吸血蚊の場合は、吸血液中に日本脳炎抗体があれば中和されてしまうため、1日以上飼育して血液を消化させることが望ましいが、トラップ中で1日以上放置すると大部分の蚊が死亡する。死亡した蚊の体内ではやはりウイルスが不活化するため、理想的には吸血した蚊とそうでない蚊を分別し、それぞれ、1日飼育する群、直ちに凍結保存する群に分けることが理想的である。

3) ブタの血液の分離用材料

血液は、血球を遠心分離した後、血清を直ちにウイルス分離に用いる。直ちに出来ない場合は、ドライアイス・アセトンで急速凍結した後 -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7日以内）、回復期（発病後14日以上）二回以上採血を行い、ペア血清として抗体測定に用いる。HI 試験、CF 試験、IgM 捕捉 ELISA、中和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ため、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。

IV. ウイルスの分離法

(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 $60\mu\text{g/ml}$ または、ペニシリン・ストレプトマイシンでは、通常用いる量の2倍程度加える。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、使用する前に日本脳炎ウイルスに対する抗体が含まれていないことを、HI 試験、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を用いる。

蚊材料の場合は、1 プール当たり (1 ~100 匹) に希釈液 2~4ml を加えて乳剤とする。乳剤は、10,000rpm にて 30 分間遠心し、その上清を接種材料とする。患者の血液は遠心分離した血清がそのまま接種材料となる。

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 μ 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 日令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 (8 ~ 10 匹) を使用する。発症マウスは、頸動脈を切断し放血後に採脳する。採脳した脳は、一部を -80°C に保存し、残りの脳は、蛍光抗体法、HI 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かそれ以上のウイルス分離能を持っている。

1. 必要な器材

- a. 28°C のインキュベーター (CO₂ インキュベーターが望ましい)
- b. 細胞培養液

Eagle's MEM 100ml に 100 倍溶液・非必須アミノ酸 2ml を添加する。これに日本脳炎ウイルスに対する抗体陰性の非働化済みウシ胎児血清を 10ml 添加したものを細胞増殖用培養液とし、2ml 添加したものを細胞維持培養液として用いる。いずれも、適当な抗生物質を規定量加える。

2. C6/36 細胞の培養および分離材料の接種

- ① 1×10^5 cells/ml の細胞浮遊液を作る。
- ② 組織培養用プラスチックプレートに 1 ウェル当たり 1ml を分注し、28°C・5%CO₂ 下で培養する。
- ③ 分離材料を接種する前に、ほぼ単一層を形成するまでに、細胞が増殖していることを確かめる。次いで培養液を除き、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。
- ④ 分離材料を細胞面に浸すように 2 時間、28°C・5%CO₂ 下で静置する。

- ⑤ 2%ウシ胎児血清を含む細胞維持培地を、2ml 加え 28℃で培養する。
- ⑥ 細胞変性 (CPE) の有無を観察する (約 1 週間)。
- ⑦ CPE の観察された時点で培養液の一部は、凍結保存する。残りを HI 試験、中和試験等による同定検査に用いる。

3) 日本脳炎ウイルスの RT-PCR 法による遺伝子検出

[I] 逆転写 PCR 法 (従来法)

日本脳炎ウイルス遺伝子の PCR によく用いられるプライマーは、E 領域に設定されていることが多い。代表的なものは次のようである。

JE8K-S: 5' ATG GAA CCC CCC TTC 3'

JEER: 5' AGC AGG CAC ATT GGT CGC TA 3'

その産物の大きさは 381bp である。

さらに以下のプライマーを用いれば Nested PCR も可能である。

JE8K inner-S: 5' ATC GTG GTT GGG AGG GGA GA 3'

JEER inner-C: 5' AGC ACA CCT CCT GTG GCT AA 3'

その産物の大きさは、326bp である。

もちろん、preM 領域、NS3 領域で設定したプライマーも使用可能である。

フラビウイルスの場合核酸抽出することなく培養液、血清等から直接 RT-PCR 反応に用いることができる。PCR 法は、森田らの迅速 RT-PCR 法に準じて、逆転写反応と PCR 反応をワンチューブで行うと便利であり、コンタミネーションの危険性も減る。ただし、感度を高めるためには RNA 抽出キットを用いて RNA を抽出して実施する。

反応条件は、53℃・10 分 (逆転写)、92℃・2 分 (熱変性) の後、92℃・1 分、53℃・1 分、72℃ 1 分を 35 サイクル繰り返し、72℃・5 分間伸長反応を行う。

Nested PCR の反応条件は、92℃ 5 分 (熱変性) の後、92℃・1 分、53℃・1 分、72℃・1 分を 25 サイクル繰り返し、72℃・5 分間伸長反応を行う。

[II] リアルタイム逆転写-PCR (TaqMan) 法

a. 遺伝子 1 型・3 型共通検出用

● プローブ

JEen585pb: ACT RAA CAC TGA AGC GT-MGB

● プライマー

JEen562s-585: CTG GAY TGT GAR CCA AGG A

JEen623c-585: GAH CCC ACG GTC ATG A

b. 遺伝子 1 型検出用

● プローブ

JEen1082pb: CTC AAG CAG CAA A-MGB

● プライマー

JE1&3en1052s-1082: ATG GGA ATT AYT CAG CGC AAG T

JE1en1119c-1082: GGG AGC GTT TGG AGT TAC AGT AA

c. 遺伝子 3 型検出用

● プローブ

JE3en1082pb: CCC AGG CGG CAA A-MGB

● プライマー

JE1&3en1052s-1082: ATG GGA ATT AYT CAG CGC AAG T

JE3en1119c-1082: AGG AGC ATT GGG TGT TAC TGT AAA

反応液の調整 (ABI Prism 7000)

TaqMan One-step RT-PCR master mix (2x) 12.5 μ l

Primer 1 (最終濃度 25 pmol) 0.25 μ l

Primer 2 (最終濃度 25 pmol) 0.25 μ l

Probe (最終濃度 250nmol) ** (Probe により異なる)

Sample 5.0 μ l

RT-RTI mix 0.6 μ l

D.W. ***** μ 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.

(45cycle)

60°C 1min.

感度は 0.1pfu/tube まで検出可能である。遺伝子 1 型 3 型共通セットは 35 サイクル以降非特異的に上昇しやすい傾向があるので、ct 値 35 サイクル以降で陽性の場合、必ず 1 型および 3 型型別セットで確認する。

4) 蛍光抗体法（直接蛍光抗体法）

検査材料は、ウイルス分離と同じでよく、その凍結切片またはスタンプ標本をアセトンで室温 10 分間固定した後、標識抗体を重層する。湿潤箱で、37℃、60 分間または 4℃で一晩反応させ、その後、反応しなかった余分な標識抗体を PBS で充分洗浄した後、乾燥し、緩衝グリセリン液で封入する。蛍光顕微鏡下で、細胞質内に黄緑色の蛍光が見えれば陽性である。

V. 血清診断

血清反応としては、HI 試験、CF 試験、中和試験、IgM 捕捉 ELISA 法がある。

(1) 赤血球凝集抑制試験（HI 試験）

フラビウイルスの HA 反応は、pH に依存している。日本脳炎ウイルスは、至適 pH が 6.4～6.8 である。

1) HI 試験法の概要

- ① 被検血清の前処理：アセトン抽出によるインヒビター除去処理、補体の非働化、血球による非特異凝集素吸収処理
- ② 2 倍段階希釈された被検血清と 4HA 単位の抗原を等量混和する。
- ③ 抗原抗体反応は、4℃一晩行う。
- ④ 翌日至適 pH になるように調製された血球希釈液（VAD）に浮遊したガチョウ赤血球を加え 37℃ 1 時間反応後、血球凝集抑制を示す血清の最高希釈倍数を HI 抗体価と判定する。

材料と方法

HI 用ウイルス抗原：市販品を使用するのが便利である。例えば HI 用ウイルス抗原はデンカ生研から市販している。

ガチョウ血球：市販品を使用するのが便利である。例えばニッポンバイオテストラボラトリーより市販している。

※ガチョウ血球の代わりに、あひる又は生後一日のヒヨコの血球を用いることも可能である。ガチョウ血球を使用する場合は、HI の際に血清を血球で吸収して非特異的凝集反応を除かなくてはならない。ヒヨコ血球はそのような処理は不要であるが、供給量確保の面で変動が大きい。

8%ストックガチョウ血球は、下記の DGV（Dextrose-Gelatin-Veronal）を用いて作製する。これを、使用直前に VAD（Virus Adjusting Diluent）で 24 倍希釈する。

[試薬の調整法]

◎ DGV の作り方：

局方バルビタール	0.58g
ゼラチン	0.6g
局方バルビタールソーダ	0.38g
特級 CaCl ₂	0.02g
特級 MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.12g
特級 NaCl	8.5g
特級デキストロース	10.0g

蒸留水で、全量 1,000ml とし、121℃で 10 分間高压滅菌した後、4℃に保存する。

◎ 0.01M PBS (pH 7.4)

1/15M Na₂HPO₄ (9.464g/1000ml) 160.8ml : ①

1/15M KH₂PO₄ (9.08g/1000ml) 39.2ml : ②

①+②+1140 (DW)=1340ml 1340ml

③を下記の割合で混合する。

1000ml (③) + 8.5g (NaCl)

◎ 被検血清および抗原希釈液： 卵白アルブミン (EA) または牛血清アルブミン (BSA) を 0.4%に加えた pH9.0 のホウ酸緩衝液 (BS) を用いる (ES・BS または BSA・BS)

◎ pH9.0 のホウ酸緩衝液 (BS) の作り方：

1.5M NaCl 80ml

0.5M H₃BO₃ 100ml

1.0M NaOH 24ml

蒸留水で全量を 1,000ml とする

血球希釈液 (VAD) の作り方： 等量の pH9.0 の BS を加えたとき、所定の pH になるようなリン酸緩衝液である。表 1 に段階的 pH の緩衝液を示す。

表 1 血球希釈液 (VAD)

pH	6.0	6.2	6.4	6.6	6.8	7.0
1.5M NaCl	100	100	100	100	100	100
0.5M Na ₂ HPO ₄	32	62	112	160	192	240
1.0M NaH ₂ PO ₄	184	169	144	120	104	80

それぞれ蒸留水を加え、1,000ml とする

2) 被検血清の前処理

- ア. 被検血清を 0.1ml 小試験管にとる。
- イ. これに、約 2ml の冷アセトン (-20℃に保存してあったもの) を加え、ゴム栓をして良く振とうする。5 分間氷浴中にて抽出
- ウ. 1,500rpm 5 分間遠心後上清を捨てる。
- エ. イ・ウの操作を 2 回繰り返す。
- オ. 沈澱物を試験管内壁に広げ、デシケーターに入れロータリーポンプで陰圧にし、1 時間乾燥する。
- カ. 完全に乾燥したら、pH9.0 の BS を 1.0ml 加え、沈澱物を浸し、4℃に一夜置き完全に溶解させる。
- キ. 56℃, 30 分非働化する
- ク. 生理食塩水で洗浄したガチョウ血球ペレットを 0.05ml 各処理血清に加え、4℃15 分放置後、3,000rpm 5 分間遠心を行い、上清を別の試験管に移す。(血球吸収処理)
- ケ. これら、全ての処理を終えた血清は、10 倍に希釈されている。
- コ. 処理済み残血清の再使用
密栓して 4℃または-20℃に保存し、再使用することができる。
少なくとも一ヶ月間は抗体価に変化はない。

3) HI 試験の手順

基本操作は、一般に行われる HI 試験と同じである。

- ア. 抗原の一次定量： 抗原を 0.4%EA・BS で 2 倍段階希釈し、pH6.0~7.0 の VAD で希釈した血球を加える。37℃ 1 時間後 HA 価を判定する。HI 試験には、至適 pH の VAD を用いた場合に 4 単位/25 μ l になるように修正する。
〔注〕 2 次定量として、希釈調整した抗原の Back titration を行い、4 単位/25 μ l であることを確認する。
- イ. 被検血清の希釈： 前処理済み血清は、0.4%EA・BS で 2 倍段階希釈を行う。(25 μ l/well)
- ウ. 4 単位の抗原を、プレート上の希釈血清液に等量加える (25 μ l/well)。
- エ. 振とう混和後、カバーをして 4℃に 1 晩静置する。
- オ. 8%ガチョウ血球を、至適 pH の VAD を用いて、24 倍に希釈し 50 μ l/well 加える。

カ. プレートにカバーをして、37°Cで1時間反応させ判定する。

4) IgM 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、患者が早期に死亡した場合等、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、感染を確実に証明できる唯一の抗体である。フラビウイルスは、日本脳炎ウイルスの他にデングウイルス、ロシア春夏ダニ脳炎など、近縁のウイルスがあり、IgG 抗体価だけでは、たとえペア血清で抗体価が上昇していたにしても、日本脳炎であると確定診断をすることが出来ない。IgM 抗体は、IgG 抗体と比較した場合、フラビウイルス間での特異性に優れた抗体であり、単一血清しか得られない場合でも、IgM 抗体が日本脳炎を用いた抗原で証明されれば臨床経過を考慮して確定診断が可能となる。特異的 IgM 抗体の証明には、下記の方法が用いられる。

a. 2-メルカプトエタノール (2-ME) 処理法

IgM 抗体は、2-ME 等のような SH 試薬により S-S 結合が解離される。同時に抗体との反応性が消失する。そのため 2-ME 処理前と処理後の抗体活性を比較することにより、間接的に IgM 抗体を証明する。すなわち、2-ME 処理後の抗体価が処理前に比べて低ければ、被検血清には IgM 抗体が存在していたことになる。

方法： 血清を PBS で 2 倍に希釈し、0.2M の 2-ME を等量混合する (2-ME は使用時ごとに調製すること)。37°C で 1 時間反応させた後、20 倍量の冷アセトンで 2 回抽出 (血清の前処理で述べた同じ方法) する。沈殿物を乾燥させた後、使用した血清量の 10 倍量の BS (pH9.0) を加え、4°C で 1 夜かけて溶解したものを 10 倍希釈の 2-ME 処理検体とする。対照として 2-ME 処理しないものを置き、処理前に対して処理後の HI 抗体価が、1/8 以上低下が認められたときに IgM 抗体陽性と判定する。

最近では、悪臭のある 2-ME に代わって 0.01M Dithiothreitol (DTT) も用いられている。成績はいずれも同じである。

b. 2-ME・ヨードアセトアミド処理法

0.2M の 2-ME で 4°C、24 時間反応させ、この混合物を透析チューブに入れ、0.02M ヨードアセトアミド加 0.01M PBS 溶液 (処理血清の 100 倍量) 中で、4°C で一晚透析後、アセトン処理する。本法は上記の方法よりもより、精度が高い処理法である。判定しがたい結果の場合は、本法により再検する。

※後述する IgM 捕捉 ELISA 法にて確認することもできる。

[試薬の組成について]

- a. 0.2M 2ME (用事調整)
 - 2ME 1.4ml
 - 0.01M PBS 100ml
- b. 0.02M ヨードアセトアミド加 0.01M PBS 溶液
 - ヨードアセトアミド 3.6992g
 - 0.01M PBS 1000ml

(2) 補体結合試験 (CF 試験)

CF 試験に用いる抗原は、HI 試験で用いた抗原が使用できる。日本脳炎の抗体検査としては HI の方が CF よりもはるかに感度が高い(文献 12, 13, 14)。方法は、一般の方法とまったく同じであるので省略する。

(3) 中和 (NT) 試験

中和抗体価の測定はウイルス特異性の点から重要である。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 試験法等で認められるが、IgG 抗体の測定法で特異性があるのは、中和抗体測定法である。中和抗体測定法は、今までニワトリ胎児細胞 (CE) を用いたプラーク減少法が用いられてきた。この方法は、ニワトリ孵化鶏卵 (9 日卵) を使用するため細胞の作製に手間がかかること、また、孵化鶏卵の入手が困難になったことなどから、CE に代わる継代細胞による中和試験法の開発が望まれるようになった。ここでは、CE に代わって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。

1) 材料

- ① 被検血清：個々の血清を希釈液⑥にて 10 倍に希釈し、56°C、30 分非働化する。
- ② Vero 細胞：ヒューマンサイエンス細胞資源バンク Vero9013 の感受性が高い。
- ③ Eagle's MEM ; たとえば、日水製薬製の Eagle's MEM を用いる場合、高压滅菌後の培地に L-glutamine を規定量追加する。
- ④ 細胞増殖用培地：10%FBS-Eagle's MEM pH 7.4 [組成-1]。
- ⑤ 重層培地：2%FBS-MEM-1%メチルセルロース培地 pH 7.75 [組成-2]。
- ⑥ 希釈液：2%FBS-MEM pH 7.4 [組成-3]。
- ⑦ 細胞継代用トリプシン液：トリプシン-EDTA [生研] (0.25%トリプシン, 0.014 モル EDTA) を M/100 PBS(-) [pH 7.2] で 2 倍に希釈し (0.125%トリプシン, 0.007 モル EDTA)、5ml ずつ分注し-20°C以下で保存する。
- ⑧ プラーク用プレート：6 穴プレート。
- ⑨ 細胞継代用プラスチックフラスコ：150 cm² Tissue Culture-Flask (plug seal Cap)
- ⑩ 牛胎児血清 (FBS)：56°C、30 分、非働化して用いる。

※ FBS の lot チェックの際には日本脳炎ウイルスに対する中和抗体価を測定し、

抗体陰性の FBS を使用する必要がある。

2) 細胞の継代と維持

- ① 培養液を除き、細胞を PBS(-) で 1 回洗浄する。
- ② トリプシン液を加え、細胞表面を潤した後、トリプシン液を取り除く。
- ③ 37°C で 5 ~ 10 分後、フラスコ表面からの細胞脱落が認められたら細胞増殖用培地で細胞を分散させる。
- ④ 3×10^5 cell / ml の濃度になるように、細胞増殖用培地で細胞数を調製して、150 cm² (75 cm²) プラスチックフラスコに 40ml (20ml) 植え込む。
- ⑤ 37°C で培養し、培養 3 ~ 4 日毎にこの継代を繰り返して細胞を維持する。

3) 細胞プレートの作成

- ① 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 2×10^5 cells/ml に調製する。
- ② 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°C, 5% CO₂ インキュベーター内で静置培養する。
- ③ 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である。
* 1×10^5 cell/ml に調整して細胞を植え込み、2 日後に使用することも可能である。

4) 中和試験法

- ① 検査血清を希釈液で 10 倍にうすめ、56°C 30 分非働化した後、2 倍階段希釈を行う。
- ② 保存ウイルスを 200PFU/100 μl になるように希釈し、これを攻撃ウイルスとする (氷浴中)。
- ③ 各希釈血清 400 μl に攻撃ウイルス 400 μl を等量加える (氷浴中)。
対照ウイルスは、希釈液 1ml に攻撃ウイルス 1ml を等量加える (氷浴中)。
- ④ 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。
- ⑤ 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。
- ⑥ 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。
- ⑦ 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 μl を壁面より接種する。
- ⑧ 対照ウイルスは 6~12 ウェル、血清・ウイルス混和液の場合は 3 ウェル~4 ウェルを用いる。
- ⑨ 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。
- ⑩ ウイルス吸着時間は、37°C, 5%CO₂ 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。

- ⑪ ウイルス吸着反応終了後、接種液を除かずに、1%メチルセルロース加 MEM 重層培地 3ml を各 well に加え、37°C、5%CO₂ 下で 4～6 日間培養する。
- ⑫ 4～6 日間の培養終了後、各 well の重層培地上へ 10%中性緩衝ホルマリン液（ホルマリン原液は 37%であるが、これを 100%に見立て、M/100 PBS(-) [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）。
- ⑬ 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。
- ⑭ 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、プラーク数を算定する。染色したプレートは長期保存が可能である。

5) 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 50～150 の間にあり、 χ^2 表から $P > 0.05$ であること。
- b. 血清希釈のそれぞれのプラーク減少率から、Reed-Muench 法により 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。
- c. 患者血清の診断には、急性期血清と回復期血清を用い、回復期血清の中和抗体価が有意に 4 倍以上、上昇していれば感染した可能性がある。

6) 試薬の組成について

- a. 細胞増殖用培地：10%FBS-Eagle's MEM 「組成-1」

5x 濃度 Eagle's MEM	200 ml
非働化済み FBS	100 ml
7% NaHCO ₃	15.7 ml (最終濃度 0.11%)
カナマイシン(60mg/ml)	1 ml
滅菌蒸留水	783.3ml
	1, 100ml

- b. 重層培地：2%FBS-Eagle's MEM -1%メチルセルロース培地··「組成-2」
 - A) Eagle's MEM (L-グルタミン不含・高圧滅菌可 日水製薬)····· 9.4 g
DW ······ 958.5 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)

A)、B)を121°C、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。

100 x conc. L-glutamine 10 ml
非働化済み FBS 20 ml
7% NaHCO₃ 31.5 ml (最終濃度 0.22%)
(この重曹濃度は、通常の細胞増殖培地の2倍濃度である)

c. ウイルス・血清の希釈液

5倍濃度の Eagle's MEM 100 ml
非働化済み FBS 10 ml
7% NaHCO₃ 7.6 ml (最終濃度 0.11%)
penicillin・streptomycin (1万単位) . . . 5 ml
滅菌蒸留水を加えて 500 ml にする。

d. 30x濃度のメチレンブルー溶液

メチレンブルー 2.25 g
DW 200 ml
1N NaOH 0.375 ml
≐ 200 ml

使用時に DW で 30 倍に希釈して用いる。

(4) 酵素抗体法 (IgM 捕捉 ELISA 法) (検査日数: 1日または2日)

従来、日本脳炎の血清診断は 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、日本脳炎ウイルスに対する抗体とを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で日本脳炎ウイルス感染を診断できる。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、反応系の感度を向上させることができる。

1) 原理

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) 日本脳炎ウイルス抗原を反応させる。
- (3) ヒト血清中の日脳ウイルスに対する 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。)

2) 試薬・機材

この項は操作手順が煩雑なため、操作手順に含めて記す。

3) 操作手順

- (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 ₂ CO ₃	0.4 g
NaHCO ₃	0.73 g
H ₂ O	make up to 250 ml

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

例えば、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ウェルを割り振る。

*プレートをシールテープやサラ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-Tween) 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 の基準に基づいて行うこと。

- *洗淨は、各ウェルにバッファーを満たして捨てる操作を3回以上繰り返す。
- *洗淨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（PBS-Tween）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。
 - *V-Ag、N-Ag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) 日本脳炎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日本脳炎ウイルスは、中山株（または北京株）とJaGAr株を蚊由来C6/36細胞で増殖させて混合して用いる。
 - *培養したそれぞれの日本脳炎ウイルスの抗原力価をELISAで測定し、混合する。
このために、2株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）を用いて抗原のtiterを調整した後、混合する。
 - *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、プレートを洗淨する。
 - *ウイルス抗原は、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、2つの日本脳炎ウイルス抗原を混合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。
* 被検血清中に日本脳炎ウイルス特異的 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)10mg 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。

$$\text{Index Value} = \frac{\text{(ウイルス抗原との反応で得られた吸光度値 - プレートの非特異的発色値)}}{\text{(未感染抗原で得られた吸光度値 - プレートの非特異的発色値)}}$$

とし、>2.00 を IgM 陽性、<2.00 を陰性とする。=2.00 の場合は、再検査または判定保留とし、中和試験で判定する。

VI. 確定診断基準と成績の解釈

1) ウイルスの分離および遺伝子の検出

疑似日本脳炎患者の血清あるいは髄液から、RT-PCR 法で直接ウイルス遺伝子を検出するか、ウイルスを分離した場合は、日本脳炎ウイルス感染が確定する。

2) 抗体検査の解釈

(1) HI 抗体価の上昇で判断する場合：ペア血清（急性期および回復期血清）を検査した時、急性期から回復期にかけて4倍以上の抗体価上昇があり、かつ最高値が1:320以上を確実、1:160をほぼ確実、1:40~1:80を疑わしいとし、中和試験を実施する。

(2) CF 抗体価の場合：ペア血清で4倍以上の抗体上昇がありかつ最高値1:16以上を確実、1:8をほぼ確実、1:4を疑わしいとし、中和試験を実施する。

(3) 中和抗体価の場合：ペア血清で4倍以上の中和抗体価の上昇が認められれば確実である。

(4) 特異的 IgM 抗体が検出されれば、単一血清でも確定診断が可能である。

*以上の診断基準は、現在の日本においては、発病前にデングウイルス・西ナイルウイルス等のフラビウイルス属の流行地への海外渡航歴の無い患者に対するものとする。

文 献

- 1) Melnick, J.L.: Classification and nomenclature of viruses. *Progr. Med. Virol.*, 17, 290~294, 1974
- 2) 大谷 明 : 改めて日本脳炎を考える, *感染・炎症・免疫*, 15(6), 1~8, 1985
- 3) 五十嵐 章 : ヒトスジシマカ培養細胞クローンC6/36を用いた野外採取コガタアカイエカからの日本脳炎ウイルスの分離方法, *熱帯医学*, 22, 255~264, 1980
- 4) 五十嵐 章 : デング出血熱について. *Infection Inflammation Immunity*, 22, 1~19, 1992
- 5) Clarke DH, Casals : Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg*, 7, 561~573, 1958
- 6) 内山圭梧 : 日本脳炎に関する研究 (第一報). *日本伝染病学会雑誌*, 36, 108, 1962

- 7) 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
- 8) 矢部貞雄、中山幹男、山田堅一郎、北野忠彦、新井陽子、堀本泰介、増田剛太、見籐歩、田代真人：輸入デングウイルス感染症のウイルス学的診断. 70, 1160~1169, 1996
- 9) Morita K, Tanaka M, Igarashi A : Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* , 29, 2107~2110, 1991
- 10) 木村朝昭、弓指孝博、山崎謙治、小田美光、原 嘉宏、木村明生、中村 央、吉田政弘、峯川好一：PCR法による野外採取蚊からの日本脳炎ウイルスゲノムの検出. 大阪府立公衛研所報, 30, 59~64, 1992
- 11) 高崎智彦. <感染症ごとにみたウイルス感染症の診断と対策>日本脳炎・ウエストナイル熱. 臨床検査, 53, 77-81, 2009
- 12) Buescher EL, Scherer WF, Grossberg SE, Chanock FM, Philpot VB Jr. Immunologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan. I. Antibody responses following overt infection of Man. *J. Immunol.* 83:582-593, 1959.
- 13) Scherer WF, Kitaoka M, Grossberg SE, Okuno T, Ogata T, Chanock FM. Immunologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan. II. Antibody responses following inapparent human infection. *J. Immunol.* 83:594-604, 1959.
- 14) 大谷明. 日本脳炎及びその関連疾患の血清診断. *日本臨床* 18:113-116, 1960.

執筆者 小野哲朗 大分県衛生環境研究センター
吉田靖子 東京都衛生研究所
平位芳江 川崎市衛生研究所
高崎智彦 国立感染症研究所
倉根一郎 国立感染症研究所

平成 25 年 8 月 8 日 改訂

連絡先 〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1
国立感染症研究所ウイルス第一部
高崎 智彦
TEL:03-5285-1111 (2526)
Fax:03-5285-1188
e-mail:takasaki@nih.go.jp