

感染症流行予測術式_COVID19 令和 7 年 4 月版

1. COVID-19 の血清学的検査に関する注意事項

1. SARS-CoV-2 のウイルスストック作製および血清学的検査のウイルス液使用時は BSL3 実験室で実施する。
2. 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℃、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、加熱処理後も安全キャビネット内で取り扱う。
3. 作業者の安全確保のため、下記の個人防護具(PPE)を装着する。全ての PPE は実験および検査ごとに交換し、オートクレーブ処理を施すこととする。
 - ・ 二重の手袋
 - ・ ディスポーザブルガウン
 - ・ キャップ
 - ・ N95 マスク(もしくはその同等品)
 - ・ 防水性アームカバー

2. 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

血清または血漿は-70℃ 以下(ない場合は通常の-20℃)の冷凍庫で保存し、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。

3. ウイルスストックの作製

ウイルスの感染実験はBSL3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。

準備

1. 細胞と培養液

- Vero E6/TMPRSS2 細胞(JCRB1819 VeroE6/TMPRSS2、JCRB 細胞バンク)を使用する。
- 細胞培養には、細胞増殖培地(DMEM (low glucose) with 10% FBS, 1 mg/ml Geneticin G418, Penicillin (100 unit/ml), and Streptomycin (100 µg/ml))を使用する。
- ウイルスの希釈等には維持培地(DMEM (low glucose or high glucose) with 2% FBS, Penicillin (100 unit/ml), and Streptomycin (100 µg/ml))を使用する。
- ウシ胎仔血清(FBS)は56°C、30分処理による熱非働化されたものを使用する。

2. ウイルス

- 流行予測事業では当初～R5年度中和試験の攻撃ウイルスとして、SARS-CoV-2 祖先株のSARS-CoV-2/JPN/TY/WK-521/2020(PANGO 系統 A) が、使用されていた。
- R6年度以降の流行予測事業では、年度ごとに指定・配布されたSARS-CoV-2 参照株を使用する。基本的には前年度秋期に使用されたワクチン株を用いることとなった。

3. 試薬・機材

- PBS
- CO₂ 培養器(37°C、5%CO₂)
- 細胞培養用カルチャーボトル
- ピペッター、チップなど

操作

- 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。
- 2) 細胞をPBS で一回洗浄し、維持培地を加える。
- 3) ウイルス液(multiplicity of infection, m. o. i.を0.01 から0.1)を接種し、37°CのCO₂培養器内で1時間吸着させる。
※例 m.o.i.が0.1の場合、2 x 10⁷ 細胞数/T225 フラスコに2 x 10⁶ TCID₅₀のウイルス液を接種する。
- 4) 吸着反応後、維持培地を交換し、37°CのCO₂培養器内で静置培養する。
※例 T225 フラスコに45 mlの維持培地で培養する。
- 5) 感染24時間後にCPEを確認し、細胞培養上清を回収する。
- 6) 培養上清を分注し、-70°C以下に凍結保存する。
- 7) ウイルスストックのTCID₅₀を測定し、試験毎に新しいストックを使用する。

4. 微量中和試験による血清学的検査

中和試験は感染性 SARS-CoV-2 を用いるため、BSL3 実験室で行う。細胞浮遊液を用いた巻き込み法で行う。

準備

1. 細胞と培養液

- ・ 細胞は、Vero E6/TMPRSS2 細胞 (JCRB1819 VeroE6/TMPRSS2, JCRB 細胞バンク) を使用する。
- ・ 試験の 2-3 日前に継代したものを用いる。使用時には細胞の状態に異常がないかを顕微鏡下で確認する。
- ・ 血清・ウイルスの希釈および細胞浮遊液の調整には維持培地を使用する。

2. ウイルス

- ・ ウイルスは流行予測事業において年度ごとに指定される国内標準株を使用する。
- ・ 試験毎に新しいウイルスストックを使用する。

3. 参照抗血清

- ・ 国立感染症研究所で調製した参照抗血清を用いる。参照抗血清の中和抗体価と希釈方法は別添の資料を参照する。

4. 試薬・機材

- ・ 20%ホルマリン
- ・ クリスタルバイオレット染色液
- ・ CO₂ 培養器 (37℃、5%CO₂)
- ・ 96 ウェルマイクロプレート (丸底と平底)
- ・ 15 ml もしくは 50 ml のプラスチックチューブ
- ・ マルチチャンネルピペッター、ピペッター、チップなど

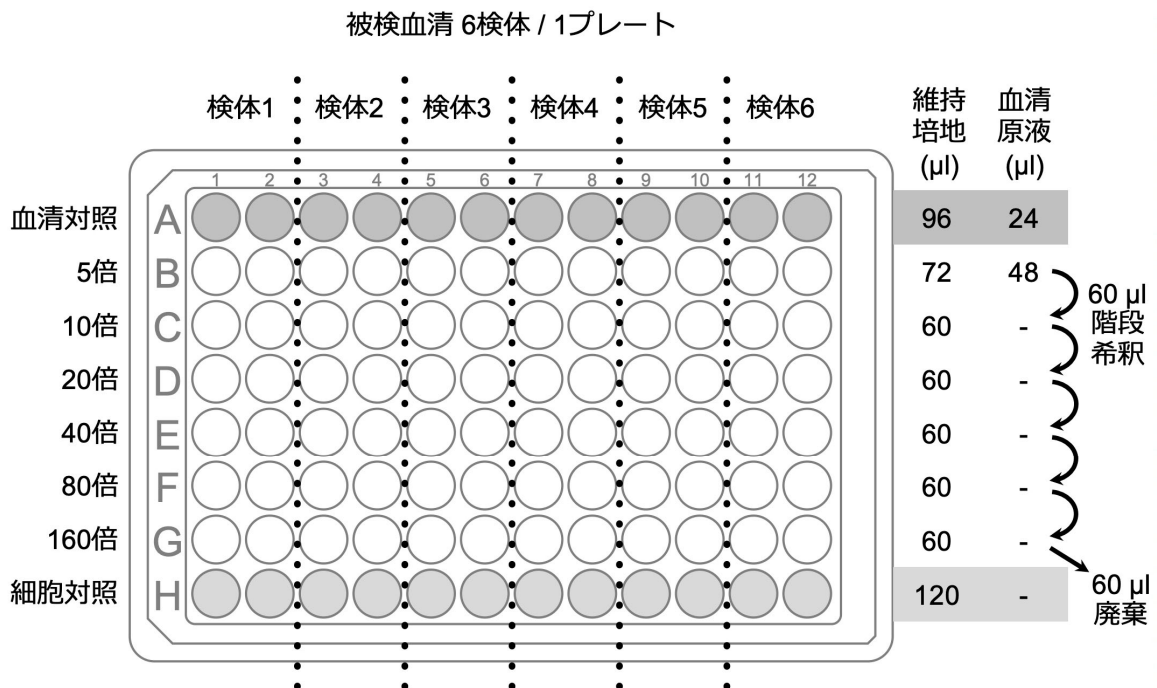
操作

1. 血清希釈用プレートの調整 (BSL2 実験室)

- ・ 血清希釈用プレートは、丸底の 96 ウェルマイクロプレートを用いて下図1のように配置する。
- ・ 被検血清の対照としてウイルス液を接種しないウェルを準備する(最終希釈倍率 5 倍のみ)。
- ・ 細胞対照として血清を接種しないウェルも準備する。

- 1) 【血清対照の調整】 A 行の各ウェルに維持培地 96 μl を分注し、血清原液 24 μl を 2 ウェルずつ加える。
- 2) B 行の各ウェルに維持培地 72 μl を分注し、血清原液 48 μl を 2 ウェルずつ加える。
- 3) C 行から H 行の各ウェルに維持培地を 60 μl 分注する。
- 4) 12 チャンネルピペッターを用いて B 行から G 行まで 60 μl ずつ被検血清を 2 倍階段希釈する。

図1. 血清希釈用プレートの配置



2. バックタイトレーション用プレートの調整 (BSL2 実験室)

バックタイトレーション用プレートは、下図 2 のように配置する。

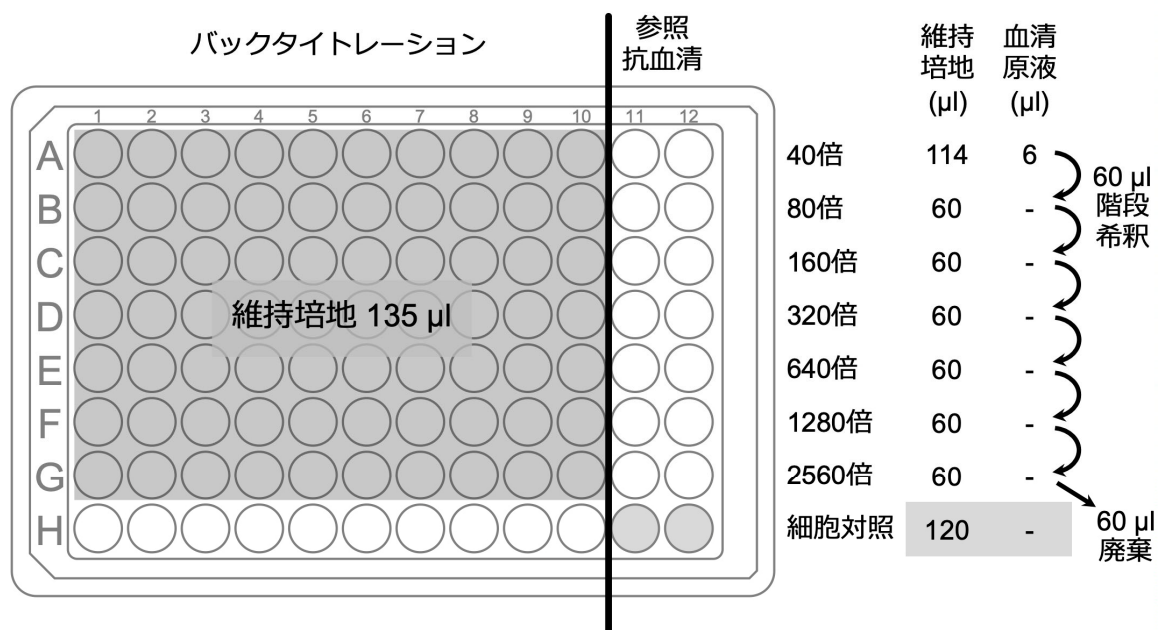
なお、補足資料(1)に試験管法を用いたバックタイトレーション法を示した。

また、R6 年度以降の参照抗血清は配布時に送付する補足資料(2)に従って希釈する。

下記は一例:R5 年度まで使用されていた WK-521 用参照抗血清の希釈法を示す

- 1) 参照抗血清での中和測定用ウェルの A 行には、維持培地 114 μ l を分注し、参照抗血清 6 μ l を加える。B 行から G 行までの各ウェルに維持培地を 60 μ l 分注する。
- 2) B 行から G 行まで 60 μ l ずつ参照抗血清を 2 倍階段希釈する。
- 3) バックタイトレーション測定用の A 行から G 行の各ウェルに、維持培地を 135 μ l 分注する。

図2. バックタイトレーション用プレートの配置



3. 細胞浮遊液とウイルス希釈液の調整 (BSL2 実験室)

- 1) VeroE6/TMPRSS2 細胞を準備する。フラスコから細胞を剥がし、細胞浮遊液とする。およそ 1×10^5 細胞数/ml となるように調整する。(例 1 プレート/T25 フラスコ)

4. ウイルス希釈液の調整と添加（BSL3 実験室）

- 1) 維持培地を用いて 100 TCID₅₀/50 µl のウイルス液を調整する。
- 2) 血清希釈用プレートの B 行から G 行の全ウェルと参照抗血清の中和測定用ウェル A 行から G 行に、100 TCID₅₀/50 µl のウイルス液を 60 µl 加える(図 3、図 4)。
- 3) バックタイトレーション用プレートの H 行の各ウェル(参照抗血清用の 11 列と 12 列は除く)に 100 TCID₅₀/50 µl のウイルス液を 150 µl 加える(図 4)。
- 4) バックタイトレーション用プレートの H 行から A 行までウイルス液の 10 倍階段希釈(135 µl の維持培地に 15 µl の各希釈ウイルス液を添加)を作製する。チップは希釈行ごとに交換する。
- 5) 37℃ で 1 時間反応させる。被検血清の最終希釈濃度は 5 倍から 160 倍となる。

図3. 血清希釈用プレートへのウイルス液添加

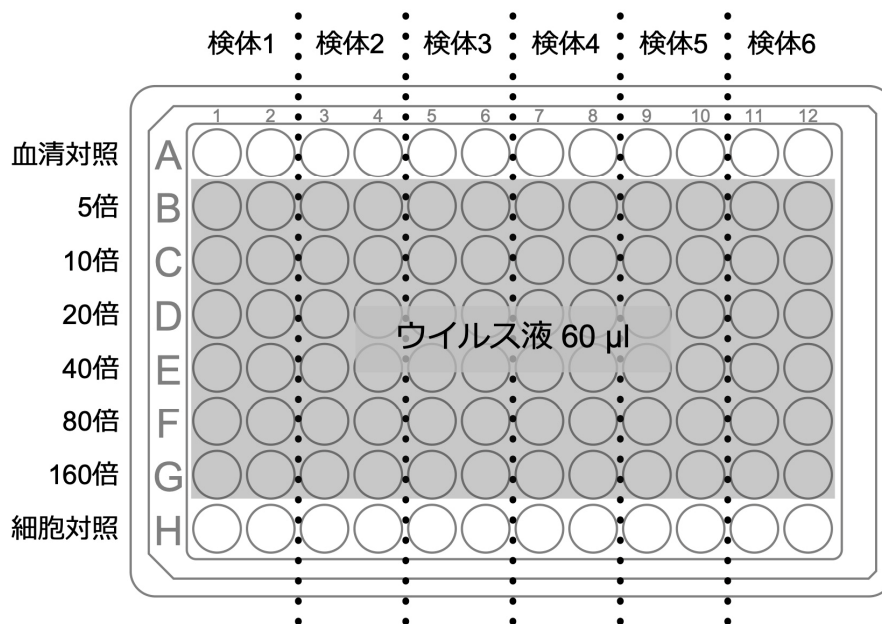
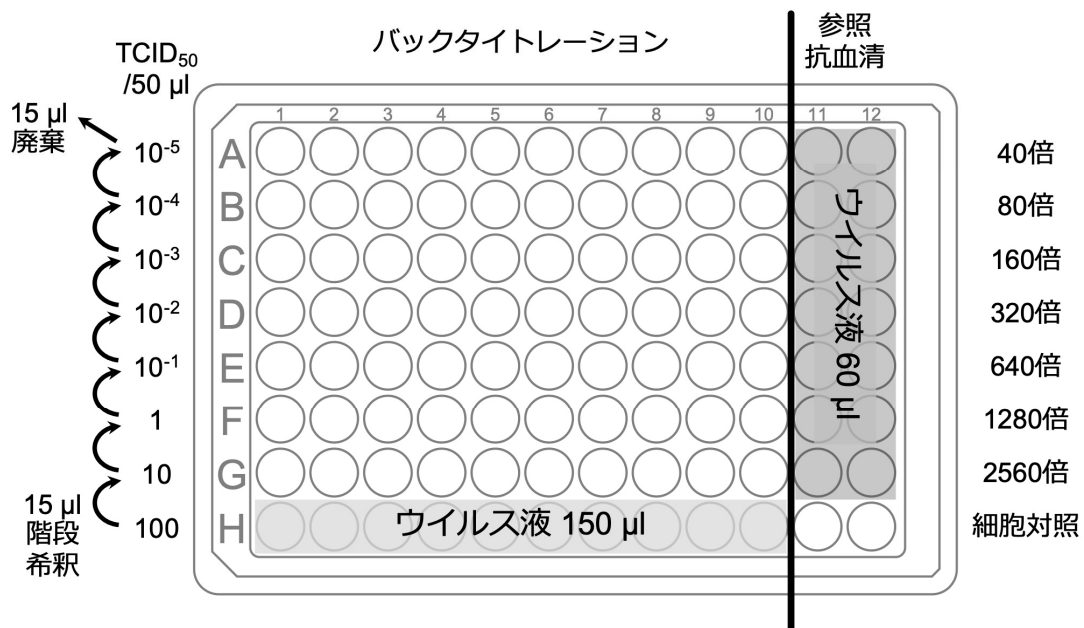


図4. バックタイトレーション用プレートへのウイルス液添加と階段希釈

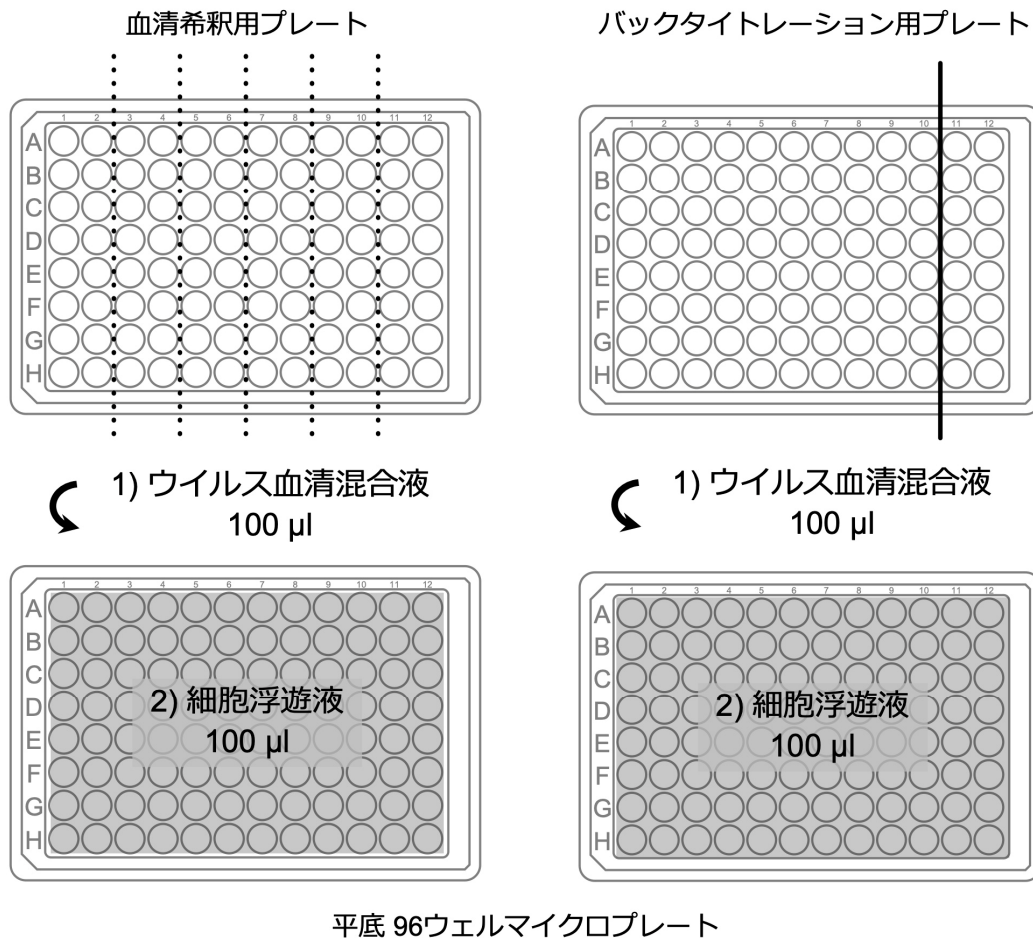


5. 細胞とウイルス血清混合液の添加 (BSL3 実験室)

下図 5 のように細胞を添加する平底 96 ウェルマイクロプレートを用意する。

- 1) 平底 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに 1 時間反応後のウイルス血清混合液を 100 μ l 移す。
- 2) 上記のプレートの各ウェルに VeroE6/TMPRSS2 細胞浮遊液 (1×10^5 細胞数/ml) を 100 μ l 加える。
- 3) 37°C の CO₂ 培養器内で 5-6 日間培養する。

図5. 細胞とウイルス血清混合液添加



平底 96ウェルマイクロプレート

6. 観察と固定 (BSL3 実験室)

- 1) 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し、判定を行う。
- 2) ホルマリン固定 (室温 30 分以上、一晩でも可) する。

7. 染色と判定 (BSL2 実験室)

- 1) クリスタルバイオレット染色液で染色 (10 分以上)・水洗後、判定の再確認を行う。
- 2) ウイルス液を被検血清と混合させることにより CPE が抑えられている場合には中和抗体陽性と判定する。2 ウェルで実施した場合は 2 ウェル CPE 阻止 (ウェル内の約 5 割以上の細胞が生残している) の最高希釈倍数を中和抗体価とする。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。

8. 再検査

- ・ 参照抗血清の抗体価が期待値の 4 倍以上又は 1/4 倍以下の時にも再検査を行う。ただし、くりかえして同じ結果が得られたときは、この成績を最終結果とする。
- ・ 2 ウェルで実施した場合に最小希釈血清 (5 倍) で 1 ウェルのみ CPE が出現した検体については 4 ウェル実施で再検査とする。
- ・ 血清対照に細胞毒性が観察された検体については 4 ウェル実施で再検査とする。
- ・ バックタイトレーションの成績が 32～320 TCID₅₀/50 µl から外れているときは、ウイルス希釈が誤っている可能性があるので再検査を検討する。

9. 検査結果

NESID から入力可能な中和抗体価データは、<5, 5, 10, 20, 40, 80, ≥160 である。

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

令和 6 年 9 月改訂 令和 3 年 1 月版より一部改訂: 攻撃ウイルスおよび参照血清に関する記載
令和 7 年 4 月改訂 令和 6 年 9 月版より一部追記: 補足資料に関する記載