

疑似ウイルス中和試験によるポリオウイルス血清学的検査

方法の概略：

本測定では、96-well plate もしくは 384-well plate の使用が可能である。以下では、384-well plate を用いた測定条件を示す。96-well plate を用いた測定条件は、別途記載する。

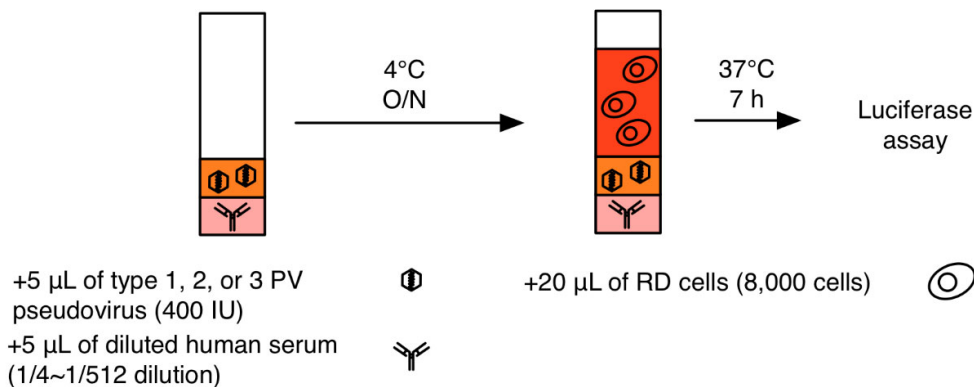
384-well plate を用いた測定条件（図1）。

試験1日目：血清検体の希釈、疑似ウイルスの添加、4°Cでの保温（一晩の間、反応させる）まで行う。

試験2日目：細胞の添加、ルシフェラーゼ活性の測定を行う。

試験3日目：測定結果の解析を行う。

図1. ポリオウイルス疑似ウイルスによる中和試験



準備するもの：

1. 細胞と培養液

・細胞は、国立健康危機管理研究機構国立感染症研究所(感染研)ウイルス第二部から分与する RD-A 細胞 (GPLN 提供細胞) を使用する。

・血清の希釈およびウイルスの調製には、1%FCS 含 D-MEM の維持培養液 (Maintenance Medium, MM) を使用する。

・細胞浮游液の調製には、5%FCS 含 D-MEM の増殖培養液 (Growth Medium, GM) を使用する。

2. 疑似ウイルス

感染研ウイルス第二部から分与する Sabin 1, Sabin2, もしくは Sabin 3 のカプシドを持つポリオウイルス疑似ウイルスを使用する（およそ 10^7 IU/mL の力価の疑似ウイルス）。分与された疑似ウイルスは、分注して -80°C 以下に凍結保存する。

3. 標準抗血清

感染研ウイルス第二部から分与する標準抗血清を用いる。128 もしくは 256 倍のポリオ中和抗体を含んでいる。MM で希釈して、32 倍のポリオ中和抗体を含むものを調製し、分注して -80°C 以下に凍結保存する。

4. ヒト血清検体

ヒト血清検体は 56°C で 30 分処理により非働化し、中和試験実施まで -20°C で凍結保存する。

5. 試薬および機器

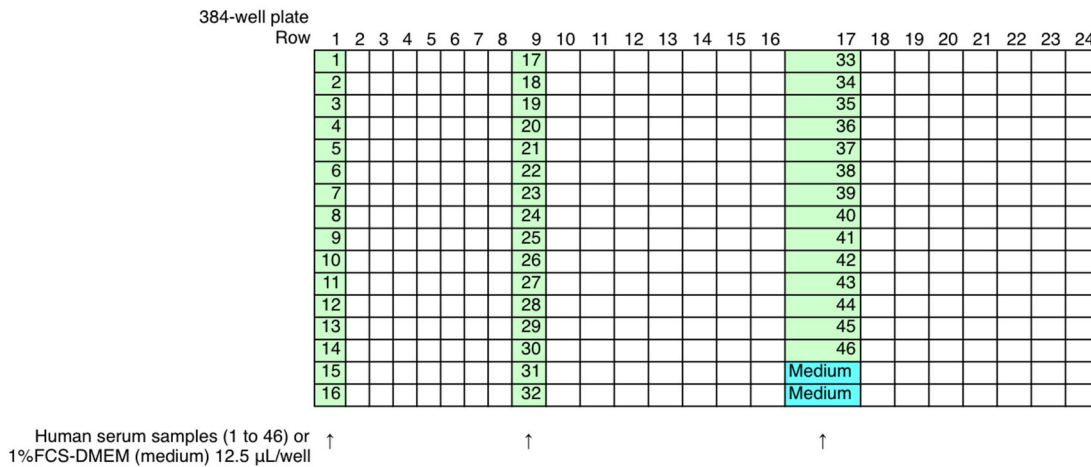
・ ヒト血清希釈用 384-well プレート (Thermo Fischer Scientific, 264574 または同等の物)

ヒト血清の希釈の際に原液を分注するマザープレートとして使用する。マザープレート 1 枚あたり最大で 46 検体が検査可能。ただし、1 回の測定の中では、中和試験の陽性コントロールとして、抗

令和 8 年度(2026 年度) 感染症流行予測調査 調査術式
 ポリオ感受性調査・疑似ウイルスを用いた測定

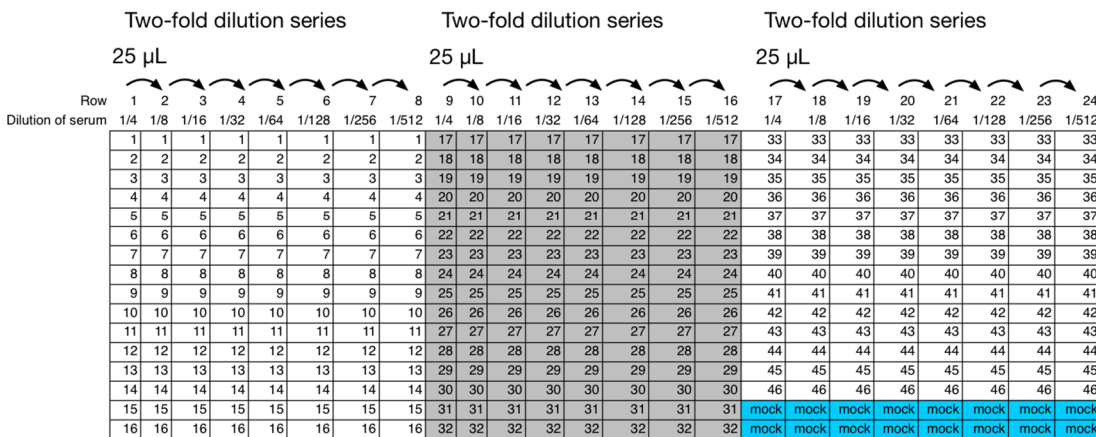
3. ヒト血清検体 (最大 1 プレートあたり 46 検体) を 1 列目, 9 列目, 17 列目に 12.5 μ L ずつ加え (列 1, 9, 17 では, 1 well あたり総量 50 μ L)、10 回ピペッティングし、よく混和する。17 列目の最後の 2 well にはヒト血清検体ではなく 12.5 μ L の MM 培地を加える (mock 処理。ヒト血清非存在下での PV_{pv} 感染の測定用の well である)。マザープレート 1 枚につき、最大でヒト血清 46 検体と mock 処理 16 well の測定が可能である。また、1 回の測定の中には、中和試験の陽性コントロールとして、抗 PV 標準血清の測定を含める必要がある。検体数が 46 未満のプレートがある場合、そのプレートに抗 PV 標準血清検体を測定する well を確保することができる。検体数が 46 で well に余裕がない場合には、マザープレートをもう一枚使用して標準抗 PV 血清の測定を行う。図 3 にヒト血清 46 検体測定時の 384-well のレイアウトを示す。

図 3. マザープレート内の血清サンプルの配置



4. マザープレートを自動希釈/分注装置にセットし、1 列目、9 列目、17 列目から開始しそれぞれ 8 列目、16 列目、24 列目まで混合速度が 40 μ L/s となるように 1/2 希釈する。図 4 にマザープレートにおけるヒト血清希釈 (46 検体測定時) のレイアウトを示す。

図 4. マザープレート内での血清サンプルの希釈



5. 希釈系列作製後、自動希釈/分注装置に 1 枚のマザープレートにつき 3 枚のドータープレートをセットし、マザープレートからドータープレートに 1 well あたり 5 μ L ずつ希釈された抗体液を分注する。

令和 8 年度(2026 年度) 感染症流行予測調査 調査術式
ポリオ感受性調査・疑似ウイルスを用いた測定

・PV_{pv} 中和反応 (試験 1 日目)

1. PV_{pv} ストック溶液に MM 培地を加えて希釈し、力価が 400 IU/5 μL となるように調製する。
2. 自動分注装置を用いて、ドータープレートに 5 μL/well で PV_{pv} 液を分注する。分注完了後、ドータープレートを遠心し (200 x g, 1 分)、4°Cで一晩保温する。

・RD-A 細胞の添加 (試験 2 日目)

1. GM 培地を用いて 4.0×10^5 cells/mL の RD-A 細胞浮遊液を調整する。225 cm² フラスコに RD-A 単層培養細胞が 100%コンフルエントである場合、10-20 枚のドータープレートが作製可能である。
2. 自動分注装置にドータープレートと RD-A 細胞浮遊液 (4.0×10^5 cells/mL, GM 培地で調製したもの) をセットし、ドータープレートに 20 μL の RD-A 細胞浮遊液を分注する。
3. ドータープレートを遠心し (200 x g, 1 分)、37°Cで 7 時間培養する。

・ルシフェラーゼ活性の測定 (試験 2 日目)

4. 培養後、ドータープレートを 1,000 rpm で 1 秒間遠心し、上清を除去する。
5. 自動分注装置にドータープレートと Steady-Glo 液をセットし、ドータープレートに 5 μL/well で Steady-Glo 液を分注する。
6. ドータープレートをルミノメーターにセットし、0.1 秒/well でルシフェラーゼ活性を測定する。

・測定結果の解析 (試験 3 日目)

1. それぞれのプレートで、mock 処理した well のルシフェラーゼシグナル (ヒト血清非存在下で測定した PV_{pv} 感染でのシグナルである) の平均値を算出する。この値をそのプレートにおける 100%の PV_{pv} 感染のシグナル値として、以下で用いる。
2. mock 処理した well のルシフェラーゼシグナルの平均値を 100%として、各々の well のルシフェラーゼシグナルを%表示する。
3. しきい値未満のシグナルを示した well の中で、最も高い希釈倍率を特定する。しきい値は、各々のラボで、RD-A 細胞を用いた従来法による抗 PV 中和抗体価が決定済みの標準抗血清を用いて、事前に決定した値を用いる (RD-A 細胞におけるしきい値の例として、1 型, 25%, 2 型 : 15%, 3 型 : 50%)。その希釈倍率の逆数をヒト血清検体の中和力価とする。

以下に、しきい値 5%での解析例を示す (図 5)。

令和 8 年度(2026 年度) 感染症流行予測調査 調査術式
 ポリオ感受性調査・疑似ウイルスを用いた測定

図 5. データ解析の例

Reciprocal number of serum dilution	4	8	16	32	64	128	256	512	Titer
Sample number									
1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.3	2.7	34.4	68.3	128
2	0.1	2.1	11.8	41.7	77.2	88.6	78.4	88.4	8
3	58.0	67.4	54.2	59.4	96.4	88.5	99.3	97.1	<4
4	27.7	55.8	42.3	66.0	67.2	89.1	78.3	126.3	<4
5	0.3	0.3	2.0	21.5	38.6	52.7	71.8	76.7	16
6	0.2	0.1	0.1	0.6	0.6	0.5	0.8	20.3	256
7	48.0	62.9	49.0	76.6	75.5	73.0	79.4	63.8	<4
8	0.2	0.8	1.1	12.6	28.9	61.1	62.3	71.1	16
9	0.3	0.5	4.2	8.7	21.8	37.5	56.3	74.5	16
10	79.8	107.8	94.1	91.5	67.1	78.3	63.6	75.8	<4
11	0.3	0.4	1.8	21.3	45.6	82.7	67.3	73.8	16
12	0.1	3.2	18.9	39.1	36.1	67.4	64.1	64.7	8
13	0.1	0.1	0.2	0.1	6.6	26.7	47.7	50.7	32
14	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	0.2	0.4	6.9	256
15	0.1	0.1	0.1	2.6	16.1	34.6	57.4	73.6	32
16	0.1	0.1	0.1	2.2	23.5	49.7	69.2	82.4	32
17	0.4	0.2	1.0	0.4	20.1	40.2	62.8	96.5	32
18	0.5	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.4	≥ 512
19	0.4	0.3	0.3	0.2	1.0	1.7	26.7	33.3	128
20	0.5	0.2	0.2	0.2	12.9	27.8	64.2	69.0	32
21	0.4	0.3	1.9	11.4	32.8	49.6	74.2	70.7	16
22	0.3	0.2	0.4	0.3	0.6	9.2	34.5	57.2	64
23	2.6	14.1	37.6	50.7	65.7	52.7	70.9	110.5	4
24	0.3	0.8	3.2	7.2	18.6	50.6	48.9	64.5	16
25	0.4	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3	0.4	≥ 512
26	0.4	0.3	0.3	0.2	0.3	0.4	9.3	34.3	128
27	0.3	0.2	0.4	0.8	0.5	7.5	19.5	38.7	64
28	22.3	45.8	54.2	58.3	48.4	94.8	75.5	78.0	<4
29	0.4	0.3	0.6	0.2	0.4	0.5	3.1	31.6	256
30	0.2	0.2	0.2	1.4	1.1	24.3	47.7	51.2	64
31	0.4	0.1	0.2	0.2	0.2	0.4	21.2	37.2	128
32	0.3	0.1	0.2	0.1	1.3	5.4	16.3	34.1	64
33	12.4	33.2	68.2	70.0	131.8	132.6	102.2	193.5	<4
34	0.3	0.2	3.8	14.0	46.3	65.9	84.9	137.1	16
35	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	0.4	0.3	0.5	≥ 512
36	0.2	0.2	0.1	0.2	0.6	0.3	1.6	19.0	256
37	0.4	0.2	1.7	15.2	35.7	62.6	84.0	79.3	16
38	0.3	0.2	1.5	7.8	11.1	29.9	75.1	150.8	16
39	0.4	2.2	1.5	14.7	39.8	54.3	55.1	86.4	16
40	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	2.6	9.3	51.1	128
41	0.2	0.2	1.2	9.8	34.6	31.4	38.8	76.2	16
42	0.3	0.3	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	≥ 512
43	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.2	≥ 512
44	0.3	0.2	0.1	0.3	0.3	10.4	30.8	62.5	64
45	0.3	0.2	4.0	7.9	15.3	49.8	70.0	77.4	16
46	0.5	0.3	0.4	2.5	19.9	37.9	44.0	73.4	32

4. 再検査

標準抗血清の抗体価が期待値の 4 倍以上又は 1/4 倍以下の時には、再検査を行う。ただし、繰り返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。