

# エボラ出血熱診断マニュアル

平成24年3月

## 目次

エボラ出血熱の概説 .....	p 2
エボラウイルス感染症の検査に関する注意事項 .....	p 2
検査材料の採取・輸送 .....	p 2
病原学的検査	
1. ウイルス分離法 .....	p 3
2. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応法 .....	p 4
3. ウイルス抗原検出 ELISA .....	p 9
血清学的検査	
1. 間接蛍光抗体法 .....	p 11
2. IgG ELISA .....	p 12
3. IgM capture ELISA .....	p 13
エボラウイルス感染症の診断基準 .....	p 15
引用文献 .....	p 16
緊急時連絡先 .....	p 17

## エボラ出血熱の概説

エボラ出血熱はフィロウイルス科エボラウイルスによる感染症で、その致死率は50～90%と非常に高い。自然宿主は不明で、ワクチン・治療薬もない。これまでアフリカのガボン、スーダン、コンゴ共和国（旧ザイール）、象牙海岸、ウガンダで流行がみられた。非流行地での発生は、ガボンから南アフリカへ移動した医師の発症（死亡）例がある（1996年）。2007年には、新種のエボラウイルス（ブンディブギョエボラウイルス）がウガンダで分離された。また、2008年フィリピンの養豚施設のブタに感染が流行し、同時期にヒトへの感染も確認されている。エボラウイルスは、ヒトへの病原性の強さからレベル4の病原体に分類される。実験室診断には、エボラウイルスの分離、RT-PCRによるゲノムの検出、ELISAによるウイルス抗原の検出、さらに蛍光抗体法あるいはELISAを用いた特異抗体の検出がある。剖検組織や生検皮膚（ホルマリン固定）からもウイルス抗原・ゲノムを検出できる。

診断に当たっては、患者の本感染症の発生地であるガボン、スーダン、コンゴ共和国、象牙海岸、ウガンダまたはその周辺国へ旅行・滞在、あるいは熱帯雨林地域への立ち入りの有無が参考になる。自然宿主からヒトへの感染経路は不明である。ヒトからヒトへの2次感染は血液、体液、排泄物等との直接接触による。アフリカでの大流行においては、注射器、ビニール手袋、マスク等の不足に起因する院内感染が大きな要因であった。

## エボラウイルス感染症の検査に関する注意事項

エボラウイルス感染症のウイルス学的検査は、国立感染症研究所（村山庁舎）ウイルス第一部第一室において可能である。

国立感染症研究所においては、現在のところ感染性のあるエボラウイルスの取り扱いが認められていないので、血清学的診断のための抗原の作製にエボラウイルスを用いることができない。そこで組換え核蛋白を抗原とした診断法を開発し、採用している。また、ウイルス学的検査は「国立感染症研究所病原体等安全管理規定」に基づいて行われる。

## 検体の採取・輸送

1. 検体：エボラウイルス感染症の診断のための検体には、血清、咽頭ぬぐい液、尿および剖検例での各種臓器が利用できる。急性期エボラ出血熱の実験室診断には、ウイルス抗原またはゲノムの検出と特異的 IgM 抗体の検出を試みる。これらの検査には患者血清を採取し検査に供する。また、ウイルス分離用の検体には、血清だけでなく咽頭ぬぐい液、尿も用いられる。ウイルス性出血熱が疑われた患者から採取された血液は、採取翌日までに当研究室に届けることが可能であれば、血清分離することなく冷蔵のまま当研究室に輸送されることが望ましい。しかし、血清分離を行った上でドライアイス詰めにして当研究室に輸送してもかまわない。輸送の際は、検体が包装外部に漏れないよう厳重に処置を施す。血清の保存が必要な場合は、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存する。血清学的診断には、急性期と回復期（発症2週間以降）に採取されたペア血清の抗体検査を同時に行う必要がある。剖検例では、皮膚、脾臓、肝臓、腎臓組織がウイルス分離、ウイルス抗原・ゲノムの検出に用いられる。
2. 検体の輸送：当研究室に検査を依頼する場合には、郵政省告示第 618 号（平成9年12月4日）に基づき、検体が外部にもれないように包装のうえ、感染性物質であることを明示して輸送する。当研究室に持参する場合は、本所の「感染性材料（病原体等及び診断用のヒトあるいは動物の検体）の輸送に関するマニュアル（持参の場合）」（問い合わせ先：国立感染症研究所 業務課 TEL: 03-5285-1111）に従う。
3. 検体の情報：検体を当研究室に送付するときには、以下の情報を検体とともに、または、前もって連絡する。

氏名、年齢、性別、国籍、職業、臨床症状、検体の採取された日時および発症からの日数、海外渡航歴、その他

## 病原学的検査

1. ウイルス分離法：  
Vero E6 細胞を用いてウイルス分離検査を行う。

A) 試薬・機材

- 1 Vero E6 細胞
- 2 CO<sub>2</sub>培養器(37°C)
- 3 D-MEM
- 4 ウシ胎児血清(FBS、56°C30分非働化済のもの)
- 5 リン酸緩衝液 (PBS (-))
- 6 組織培養用フラスコ(25 cm<sup>2</sup>, できればベンチレーションキャップ付)
- 7 組織培養用ペニシリン・ストレプトマイシン(Gibco-BRL 社)
- 8 遠心管
- 9 抗エボラウイルス抗体 (血清) (例えば国立感染症研究所ウイルス第1部で作製した抗エボラ核蛋白ウサギ血清)
- 10 遠心機

B) 検査方法

- 1 Vero E6 細胞の単層を, PBS (-)で洗浄する.
- 2無菌的に採取された血清を 2%ウシ胎児血清含有 D-MEM (維持培地) で 10 倍希釈し, 細胞に接種する. 雑菌の混入が考えられる検体の場合は, 通常使用量の 5 倍のペニシリン・ストレプトマイシンを加え, 3,000 回転で 20 分間遠心した上清を用いる.
- 337°Cで 1 時間吸着させる.
- 4被験液を取り除き, 維持培地を用いて細胞を培養する.
- 5毎日細胞変性効果 (CPE) 出現の有無を確認する.
- 6CPE が認められた場合には, 抗エボラウイルス抗体を用いた間接蛍光抗体法でエボラウイルスであるか否かを同定する. CPE が認められない場合には, 一部の細胞を盲目継代 (blind passage) する. また, 残りの細胞は, 間接蛍光抗体法によるエボラウイルス抗原の検査, 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応法に供する.

2. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応法 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) :

ウイルスゲノムの検出のための RT-PCR にはコンベンショナル RT-PCR 法あるいは、TaqMan プローブ検出によるリアルタイム RT-PCR 法を採用している。RT-PCR には表 1 に記載したプライマーセットおよび TaqMan プローブを用いる。検体としては、血清や組織が用いられるが、非働化した検体では増幅効率が著しく低下する。

表 1. エボラウイルス感染症の診断に用いられるプライマーセット、プライマーの塩基配列、ターゲット遺伝子と PCR 産物の大きさ。

コンベンショナル RT-PCR		
プライマー名	プライマーの塩基配列 (方向)	ターゲット遺伝子産物の大きさ
FiloNP-Fe	5'-TGGCAATCAGTDGGACACATGATGGT (+)	Filovirus (NP) (594 bp)
FiloNP-Fm	5'-TGGCTTACYACAGGYCACATGAAAGT (+)	
FiloNP-Re	5'-GAAGCTGATTCRITTCITYTTCTGATGGAA(-)	
FiloNP-Rm	5'-GTGTGTGATTCAGTTTTYTGGAGGTGGAA(-)	
FILO-A	5'-ATCGGAATTTTTCTTTCTCATT (+)	Filovirus (L) (419bp)
FILO-B	5'-ATGTGGTGGGTATAATAATCACTGACATG (-)	
RES-NP1	5'-GTATTTGGAAGGTCATGGATTC (+)	Ebola (Reston) NP (337bp)
RES-NP2	5'-CAAGAAATTAGTCCTCATCAATC (-)	
リアルタイム RT-PCR		
プライマー、プローブ名	プライマー、プローブの塩基配列 (方向)	ターゲット遺伝子産物の大きさ
Filo-A2_3	5'-AAGCATTCCCTAGCAACATGATGGT (+)	Filovirus (L) 293bp
Filo-A2_4	5'-AAGCATTTCCCTAGCAATATGATGGT (+)	
Filo-B	5'-ATGTGGTGGGTATAATAATCACTGACATG (-)	
Filo-B_ravn	5'-GTGAGGAGGGCTATAAAAGTCACTGACATG (-)	
Filo-B_BI	5'-ATGTGGGGGRTTATAATAATCACTYACATG (-)	
FAM-EBOg	5'-CCAAAATCATCACTIGTGTGGTGCCA-3'	
	(5'6-FAM, 3'TAMRA)	
FAM-EBOsud	5'-CCGAAATCATCACTIGTITGGTGCCA-3'	
	(5'6-FAM, 3'TAMRA)	
FAM-MBG	5'-CCTATGCTTGCTGAATTGTGGTGCCA-3'	
	(5'6-FAM, 3'TAMRA)	

#### A) 試薬・機材

- 1 High Pure™ Viral RNA Kit (Roche Diagnostics)

- 2 マイクロ遠心機
- 3 Titan™ One Tube RT-PCR System (Roche Diagnostics)または Ready-to-Go RT-PCR (Pharmacia Biochemica)
- 4 Expand High Fidelity PCR システム (ロシュ)
- 5 DEPC 処理済純水 (ニッポンジーン)
- 6 サーマルサイクラー
- 7 サーマルサイクラー用マイクロチューブ
- 8 核酸電気泳動用 2%アガロースゲル
- 9 DNA 分子量マーカー (100bp ラダーもしくは 200-600 塩基の間を同定できるもの)
- 10 アガロースゲル電気泳動槽

以下のものは検体が組織の場合に必要なもの。

- 11 RNA Bee™ (TEL-TEST, コスモバイオ社取扱)
  - 12 ホモジナイザー (1.5ml のプラスチックチューブとそれにあったプラスチック製ディスポーザブルペステルが市販されている)
  - 13 クロロフォルム
  - 14 2-プロパノール
  - 15 70%エタノール
- リアルタイム RT-PCR を行う場合
- 16 QuantiTect Probe PCR Kit (GIAGEN)
  - 17 ライトサイクラー (ロシュ)
  - 18 反応キャピラリーあるいは反応チューブ (ライトサイクラー用)

## B) 検査方法

### B)-1 RNA 抽出および逆転写反応

- 1 血清からウイルス RNA を High Pure™ Viral RNA Kit を用いて抽出する。血清 200µl から 50µl の精製 RNA 液を得ることができる。検体が組織の場合、RNA を RNA Bee™ にて抽出する。方法はキットの取り扱い説明書を参照のこと。必ず正常血清等の陰性コントロールを置く。
- 2 Ready-to-Go RT-PCR (Pharmacia Biochemica)を用いる場合、ランダムプライマーを 0.5 µg/tube, 精製 RNA 5 µl を加え、さらに DEPC 処理済純水を最終量が 50µl となるように加える。

3 逆転写反応を以下の条件で実施し、cDNA を合成する.

42°C 30分

94°C 5分

B)-2 コンベンショナル RT-PCR

1 cDNA を 2  $\mu$ l、それぞれのプライマーを 12.5 pmole/tube、10x reaction buffer を 2.5  $\mu$ l、2.5mM dNTP を 2  $\mu$ l、Expand High Fidelity DNA ポリメラーゼを 0.125  $\mu$ l を加え、さらに精製水を最終量が 25  $\mu$ l になるように加える。

2 PCR を以下の条件で実施する。

94°C 2分

94°C 1分

52°C 1分

72°C 1.5分

50 サイクル

72°C 8分

3 PCR 産物をアガロースゲル(1.5-2.0%)電気泳動して、増幅された DNA 産物を確認する。

4 必要に応じて、Filovirus NP (594bp)をターゲットとした RT-PCR 産物を鋳型とした Nested-PCR を行う。

表 2. Nested-PCR に用いるプライマーセット、プライマーの塩基配列と PCR 産物の大きさ

プライマー名	プライマーの塩基配列 (方向)	ターゲット遺伝子産物の大きさ
Sudan Zaire 2nd F1	5'-CTAATACAYCAAGGGATGCA (+)	Ebola (Sudan, Zaire) NP (425bp)
Sudan Zaire 2nd R1	5'-TGGAGTTGCTTYTCAGCYTCAGT (-)	
Cote Bundi 2nd F1	5'-CTTATACATCAAGGRATGCA(+)	Ebola (Ivory Coast, Bundibugyo) NP (425bp)
Cote Bundi 2nd R1	5'-TGCAACTGYTTTTCKGCCTCAGT(-)	
Reston 2nd F1	5'-CCACCAGGGYATGCATATGGTA (+)	Ebola (Reston) NP (308bp)
Reston 2nd R1	5'-CTGATAACTGTGGGTAGAGA (-)	
MBG NP 2nd F1	5'-AAACTGATTCAGGGGTGRCA (+)	Marburg virus NP (158bp)
MBG NP 2nd R1	5'-CTCGAGGTTTRTTRATCCCTGA (-)	

5 Filovirus NP RT-PCR 産物を 1 $\mu$ l、プライマー Sudan Zaire 2nd F1, Sudan Zaire 2nd R1, Cote Bundi 2nd F1, Cote Bundi 2nd R1 をそれぞれ 12.5 pmole/tube あるいは、プライマー Reston 2nd F1, Reston 2nd R1, MBG NP 2nd F1, MBG NP 2nd R1 それぞれを 12.5 pmole/tube、10x reaction buffer を 2.5  $\mu$ l、2.5mM dNTP を 2  $\mu$ l、Expand High Fidelity DNA ポリメラーゼを 0.125  $\mu$ l を加え、さらに精製水を最終量が 25  $\mu$ l になるように加える。比較定量のために段階希釈したスタンダード DNA を鋳型として用いる。

6 PCR を以下の条件で実施する。

94°C 2分

94°C 1分

54°C 1分

72°C 1分

30 サイクル

72°C 8分

7 PCR 産物をアガロースゲル(1.5-2.0%)電気泳動して、増幅された DNA 産物を確認する。

### B)-3 リアルタイム RT-PCR

1 cDNA を 2  $\mu$ l、それぞれのプライマーを 3.2 pmole/tube、それぞれの TaqMan プローブを 1.1 pmole/tube、2 x QuantiTect Probe PCR Master Mix を 10  $\mu$ l 加え、

さらに精製水を最終量が 20  $\mu$ l になるように加える。

2 PCR を以下の条件で実施する。

95°C 15分

95°C 15秒

52°C 25秒（蛍光検出）

72°C 20秒

45 サイクル

40°C 30秒

3 スタンダード DNA の増幅曲線と比較し、被験体中の DNA 量を定量する。

3. ウイルス抗原検出 ELISA :

エボラウイルス感染症においては患者体内でのウイルス量が多く、一方抗体が産生されないことも多いため、迅速なウイルス感染の証明にウイルス抗原検出 ELISA を用いることができる。ウイルス抗原検出 ELISA の反応原理は以下のようなになる。

- 1 抗エボラウイルス核蛋白モノクローナル抗体をコートしたプレートで患者材料（血清、組織乳剤）中の核蛋白を捕獲する。
- 2 抗核蛋白ウサギポリクローナル抗体を捕獲された核蛋白と反応させる。
- 3 反応したウサギ抗体を、酵素標識した抗ウサギ IgG 抗体で検出する（マウスに反応する標識抗体では、プレートにコートしたモノクローナル抗体と反応してしまう）。
- 4 酵素に対する発色基質を加え、捕獲された核蛋白を発色により検出する（核蛋白量・ウイルス量は発色の程度によって示される）。

A) 試薬・機材

- 1 精製抗エボラウイルス核蛋白モノクローナル抗体（クローン 3-3 D、国立感染症研究所ウイルス第 1 部外来性ウイルス室にて培養上清もしくはマウス腹水より精製）
- 2 ウサギ抗エボラウイルス核蛋白ポリクローナル血清（anti-EBO-NP NIID

- #4, 国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にて作製)
- 3 ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Zymed 社, HRPO-標識 anti-rabbit IgG, affinity purified)
  - 4 陽性コントロール (精製リコンビナントエボラウイルス核蛋白, 国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室にてリコンビナントバキュロウイルス感染細胞より調製)
  - 5 96 ウェル ELISA プレート (Falcon 社製)
  - 6 リン酸緩衝液 (PBS (-))
  - 7 洗浄バッファー (0.05% Tween20-PBS (-))
  - 8 ブロッキングバッファー (5% スキムミルク-PBS (-))
  - 9 不活化バッファー (試料が組織の場合。1% Triton X-100 in PBS (-))
  - 10 Triton X-100 (試料が血清の場合)
  - 11 希釈バッファー (0.5% スキムミルク in PBS (-))
  - 12 ABTS (2,2'-アジノ-ビス-(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)) 発色基質 (Roche Diagnostics, ABTS tablet および Buffer for ABTS)
  - 13 ホモジナイザー (試料が組織の場合。1.5ml のプラスチックチューブとそれにあったプラスチック製ディスポーザブルペステルが市販されている)
  - 14 1.5ml チューブ用マイクロ遠心機 (試料が組織の場合)
  - 15 マイクロプレートリーダー

## B) 検査方法

- 1 精製抗エボラウイルス核蛋白モノクローナル抗体 (クローン 3-3D) を 1 $\mu$ g/ml に PBS (-) で希釈し, 96 穴 ELISA プレートのレーン 1~6 の各ウェルに 100 $\mu$ l ずつ分注する (図 1b)。室温で 2 時間吸着させる (4 $^{\circ}$ C で一夜吸着させてもよい。この場合は, 蒸発を防ぐためプレートをシールする)。図 1b に示したように, 単クローン抗体がコートされたウェル (レーン 1~6, 単クローン抗体陽性ウェル) とコートされないウェル (レーン 7~12, 単クローン抗体陰性ウェル) を準備する。
- 2 抗体液を捨て, 200 $\mu$ l のブロッキングバッファーを各ウェルに分注する。37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる。
- 3 検体の準備を行う。検体が血清の場合には Triton X-100 を最終濃度が 1% にな

るように加え混和する。検体が組織の場合、組織が約 10%になるように不活化バッファーを加えホモジナイズ後 3000 回転 5 分間遠心し上清を検体とする。Triton X-100 を加えることは、ウイルスを不活化するだけでなくウイルス粒子中の核蛋白を粒子外に放出するためにも必須である。処理した検体は、ブロッキングが終了するまで 4℃で保存する。使用時に希釈バッファーで 5 倍に薄める（希釈しない状態では、Triton X-100 によりプレートにコートされたモノクローナル抗体が洗い流される）。陽性コントロールは 1µg/ml に希釈バッファーで希釈する。

- 4 ブロッキングバッファーを捨て洗浄バッファーで 3 回洗浄し、すべてのウェルに 100µl の希釈バッファーを加える。希釈バッファーで 5 倍に希釈した検体および陽性コントロールそれぞれ 100µl を、単クローン抗体陽性ウェル（レーン 1）と陰性ウェル（レーン 7）それぞれに分注し（最終的に 10 倍希釈になる）、それらのウェルから順に 2 倍段階希釈する（10 倍希釈から 320 倍）（図 1b）。37℃で 1 時間反応させる。
- 5 検体を捨て洗浄バッファーで 3 回洗浄し、希釈バッファーで 1,000 倍に希釈したウサギ抗エボラウイルス核蛋白血清 100µl を各ウェルに分注し、37℃で 1 時間反応させる。
- 6 ウサギ血清を捨て洗浄バッファーで 3 回洗浄し、希釈バッファーで 1,000 倍に希釈した HRPO 標識抗ウサギ IgG 抗体 100µl を各ウェルに分注し、37℃で 1 時間反応させる。この間に発色基質を調製する。発色基質を完全に溶解するのに 10 分から 15 分要する。調製した基質は数週間程度なら遮光して 4℃で保存できる。
- 7 標識抗体を捨て洗浄バッファーで 3 回洗浄し、ABTS 発色基質 100µl を各ウェルに分注し、37℃で 30 分反応させる。
- 8 波長 405nm のフィルターを用いて、OD（吸光度）を測定する。単クローン抗体陽性ウェルの OD から、対応する陰性ウェルの OD を差し引いた値を捕捉されたエボラウイルスの核蛋白による OD 値と判定する。

## 血清学的検査

### 1. 間接蛍光抗体法：

エボラウイルスの核蛋白を恒常的に発現する HeLa 細胞（HeLa-EBO-NP 細

胞)を用いた間接蛍光抗体法がエボラ出血熱患者血清の血清学的診断において有用であることを確認している。急性期と回復期(発症2週目以降)のペ  
ア血清を同時に検査することが重要である。また、被験血清を非働化(56°C,  
30分)処理してから検査に供する。

#### A) 試薬・機材

- 1 エボラウイルス核蛋白発現 HeLa 細胞 (HeLa-EBO-NP 細胞)
- 2 D-MEM
- 3 リン酸緩衝液 (PBS (-))
- 4 細胞消化用トリプシン・EDTA 液 (0.25%トリプシン-0.02%EDTA 加 PBS (-))
- 5 蛍光抗体検査用スライドグラス (14 ウェル, AR Brown 社)
- 6 FITC 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体 (Zymed 社)
- 7 10%グリセリン加 PBS (-)
- 8 カバーグラス
- 9 蛍光顕微鏡
- 10 アセトン

#### B) 検査方法

- 1 HeLa-EBO-NP 細胞を継代して2日間培養する。
- 2 PBS (-)で洗浄し、トリプシン処理により HeLa-EBO-NP 細胞を回収する。更に細胞を PBS (-)で洗浄後  $3 \times 10^6$  cells/ml となるように PBS (-)に浮遊する。
- 3 蛍光抗体検査用スライドグラスの各ウェルに細胞浮遊液を 10 $\mu$ l ずつ分配し、完全に乾燥させる。乾燥したら 100%アセトン中で5分間固定する。アセトンを蒸発させた後-80°Cに保管することができる。
- 4 PBS (-)で20倍から2倍段階希釈した被験血清を各ウェルにのせ、37°C, 1時間反応させる。被験血清と同時に抗体陽性コントロール血清を同時に検査する。
- 5 PBS (-)でスライドグラスを洗浄し、PBS (-)で70倍希釈された FITC 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体を各ウェルにのせ、37°C 1時間反応させる。
- 6 PBS (-)でスライドグラスを洗浄後、10%グリセリン加 PBS (-)を用いて封入する。

7 蛍光顕微鏡で FITC シグナルを検鏡する。特徴的な染色パターンが認められれば抗体陽性と判定し、抗体陽性を示した最高希釈倍率の逆数を抗体価とする。

## 2. IgG-ELISA :

リコンビナントバキュロウイルスで発現、精製したエボラウイルス核蛋白を抗原とした IgG 検出を目的とした ELISA (IgG-ELISA, 図 2a)が、診断に有用であることが確認されている。急性期と回復期のペア血清を同時に検査することが重要である。

### A) 試薬・機材

- 1 精製組み換えエボラ核蛋白 (国立感染症研究所ウイルス第 1 部外来性ウイルス室にてリコンビナントバキュロウイルス感染細胞より調製)
- 2 ELISA プレート (Falcon 社)
- 3 リン酸緩衝液 (PBS (-))
- 4 0.05% Tween 20 in PBS (-) (T-PBS)
- 5 5% スキムミルク加 T-PBS (M-T-PBS)
- 6 ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Zymed 社, HRPO-標識 anti-rabbit IgG, affinity purified)
- 7 ABTS 発色基質 (Roche Diagnostics, ABTS tablet および Buffer for ABTS)
- 8 マイクロプレートリーダー

### B) 検査方法

- 1 精製組み換えエボラ核蛋白を 1 $\mu$ g/ml に PBS (-) で希釈し、ELISA プレートのレーン A~D の各ウェルに 100 $\mu$ l 加える。レーン E~H の各ウェルには PBS (-) を 100 $\mu$ l 加える (図 2b)。室温 2 時間または 4 $^{\circ}$ C 一晩おく。レーン A~D のウェルを抗原陽性ウェル、レーン E~H のウェルを抗原陰性ウェルとする (図 2b)。
- 2 各ウェルに 200 $\mu$ l の M-T-PBS を加え、37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる。
- 3 抗原液を捨て T-PBS で 3 回洗浄し、各ウェルに M-T-PBS を 100 $\mu$ l 加える。次いで M-T-PBS で 25 倍に希釈した被験血清 33 $\mu$ l を抗原陽性ウェルのレーン A と陰性ウェルのレーン E にそれぞれ加え (最終的に 100 倍希釈

になる), それらのウェルから順次 4 倍段階希釈 (100 倍から 6,400 倍) する(図 2b). 37°C, 1 時間反応させる.

4 検体を捨て, T-PBS で 3 回洗浄し, 次いで M-T-PBS で 1,000 倍希釈した HRPO 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体 100 $\mu$ l を各ウェルに加える. 37°C, 1 時間反応させる.

5 標識抗体を捨て, T-PBS で 3 回洗浄し, 各ウェルに ABTS 発色基質液 100 $\mu$ l 加え, 37°C, 30 分反応させる.

6 波長 405nm のフィルターを用いて, OD 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エボラ核蛋白抗体による OD 値とする.

### 3. IgM-capture ELISA :

エボラウイルスに対する IgM 検出のための IgM-capture ELISA(図 3a)は, IgG-ELISA と同様に精製組み換えエボラ核蛋白を抗原としたものである. 現時点では, この IgM-capture ELISA のエボラ出血熱の診断における有用性は確かめられていないが, IgM-capture ELISA の結果はその他の検査結果とともに総合的に反映させる. 検査毎に, 精製組み換えエボラ核蛋白をサルに免疫して作製した抗エボラ核蛋白 IgM 抗体陽性コントロール血清と陰性コントロール血清を置く.

#### A) 試薬・機材

1 精製組み換えエボラ核蛋白 (国立感染症研究所ウイルス第 1 部外来性ウイルス室にてリコンビナントバキュロウイルス感染細胞より調製)

2 ELISA プレート (Falcon 社)

3 リン酸緩衝液 (PBS (-))

4 0.5% Tween 20 in PBS (-) (T-PBS)

5 5% スキムミルク加 T-PBS (M-T-PBS)

6 IgM 抗体捕捉用抗ヒト IgM 抗体 (ヤギ F(ab')<sub>2</sub> Anti-Human IgM, Biosource International, Inc. Tago Products)

7 ウサギ抗エボラウイルス核蛋白ポリクローナル血清 (anti-EBO-NP, NIID #4, 国立感染症研究所ウイルス第 1 部外来性ウイルス室にて作製)

8 ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Zymed 社, HRPO-標識 anti-rabbit

IgG, affinity purified)

- 9 陽性コントロール（精製組み換えエボラ核蛋白をサルに免疫して 3 週目に採取された血清）
- 10 陰性コントロール（陽性コントロールと同じサルから免疫前に採取された血清）
- 11 ABTS 発色基質(Roche Diagnostics, ABTS tablet および Buffer for ABTS)
- 12 マイクロプレートリーダー

## B) 検査方法

- 1 捕捉用抗ヒト IgM 抗体を PBS (-) で 1 $\mu$ g/ml 以上の濃度になるように希釈し, ELISA プレートの各ウェルに 100  $\mu$ l 加える. 4 $^{\circ}$ C で一晩置く.
- 2 捕捉用抗体を捨て, T-PBS で 3 回洗浄し, 各ウェルに 200 $\mu$ l の M-T-PBS を加える. 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる.
- 3 M-T-PBS を捨て, T-PBS で 3 回洗浄し, M-T-PBS 100 $\mu$ l を各ウェルに加える. 次いでレーン A とレーン E のウェルに, M-T-PBS で 10 倍希釈した被験血清 100 $\mu$ l を加え (20 倍希釈になる), さらに 20 倍から 160 倍になるようにそれぞれ 2 倍段階希釈する (図 3b). 陽性コントロールおよび陰性コントロールを置く. 37 $^{\circ}$ C 1 時間反応させる.
- 4 被験血清を捨て, T-PBS で 3 回洗浄後, レーン A~D の各ウェルに M-T-PBS で 1 $\mu$ g/ml に調整した精製エボラ核蛋白を 100 $\mu$ l 加え, 37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる. 一方, レーン E~H の各ウェルには M-T-PBS 100 $\mu$ l を加える(抗原陰性コントロール).
- 5 抗原液を捨て, T-PBS で 3 回洗浄後, M-T-PBS で 1,000 倍希釈した抗エボラ核蛋白血清 100 $\mu$ l を各ウェルに加え, 37 $^{\circ}$ C 1 時間反応させる.
- 6 抗エボラ血清を捨て, T-PBS で 3 回洗浄後, M-T-PBS で 1,000 倍希釈した HRPO 標識抗ウサギ IgG 抗体 100 $\mu$ l を各ウェルに加え, 37  $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる.
- 7 抗ウサギ IgG 抗体を捨て, T-PBS で 3 回洗浄後, 各ウェルに ABTS 発色基質液 100 $\mu$ l 加え, 37 $^{\circ}$ C, 30 分反応させる.
- 8 波長 405nm のフィルターを用いて, OD を測定する. 抗原陽性ウェルの OD 値から, 対応する抗原陰性ウェルの OD 値を差し引いた値を抗エボラ核蛋白 IgM 抗体による OD 値と判定する.

## エボラウイルス感染症の診断基準

次のいずれかが満たされた場合、「エボラウイルス感染症」とする。

- 被験検体からエボラウイルスが分離された。
- 被験検体から RT-PCR 法でエボラウイルスゲノムが検出された。
- 被験検体から抗原検出 ELISA 法で、エボラウイルス核蛋白が検出された。
- 間接蛍光抗体法または IgG ELISA で判定された急性期と回復期に採取されたペア血清のエボラウイルスの核蛋白に対する抗体価が、4 倍以上の有意に上昇した。

次の場合、「エボラウイルス感染症」を疑う。

- IgM-capture ELISA で、EBO-NP に対する特異的 IgM 抗体が検出された。

## 引用文献

1. 森川茂. ウイルス性出血熱. 臨床病理 特 108 号, 105-110, 1998.
2. Ksiazek TG, Rollin PE, Williams AJ, Bressler DS, Martin ML, Swanepoel R, Burt FJ, Leman PA, Khan AS, Rowe AK, Mukunu R, Sanchez A, Peters CJ. Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen, and IgG and IgM antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. J Infect. Dis. 179 Suppl 1:S177-87, 1999.
3. Jahring PJ. Filoviruses and Arenaviruses. In Manual of Clinical Microbiology, 6th Edition, edited by Murray PR et al, pp 1068-1081, ASM Press, Washington DC, 1995.
4. Niikura M, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, Miranda ME, Morikawa S. Ebola viral antigen-detection enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody to nucleoprotein. J. Clin. Microbi. (in press).
5. Prehaud C, Hellebrand E, Coudrier D, Volchkov VE, Volchkova VA,

- Feldmann H, La Guenzo B, Bouloy M. Recombinant Ebola virus nucleoprotein and glycoprotein (Gabon 94 strain) provide new tools for the detection of human infections. *J. Gen. Virol.* 79:2565-2572, 1998.
6. Sanchez A, Ksiazek TG, Rollin PE, Miranda ME, Trappier SG, Khan AS, Peters CJ, Nichol ST. Detection and molecular characterization of Ebola viruses causing disease in human and nonhuman primates. *J Infect. Dis.* 179 Suppl 1:S164-9,1999.
  7. Saijo M, Niikura M, Morikawa S, Ksiazek TG, Meyer RF, Peters CJ, Kurane I. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoproteins. *J. Clin. Microbiol.* 39:1-7, 2001.
  8. Saijo M, Niikura M, Morikawa S, Kurane I. Immunofluorescence Method for Detection of Ebola Virus Immunoglobulin G, Using HeLa Cells Which Express Recombinant Nucleoprotein. *J. Clin. Microbiol.* 39:776-778, 2001.

#### 緊急時連絡先

国立感染症研究所ウイルス第1部

部長 倉根一郎

TEL: 03-5285-1111 / (home) 03-3221-1733

FAX: 03-5285-1169

e-mail: kurane@nih.go.jp

国立感染症研究所村山分室ウイルス第1部外来性ウイルス室

室長 森川 茂

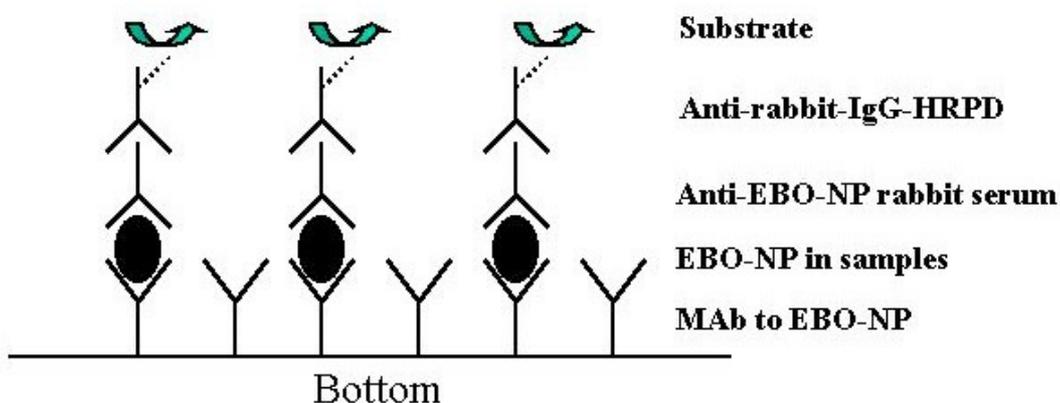
TEL: 042-561-0771 (内線791) / (home) 042-378-2864

FAX: 042-564-4881

e-mail: morikawa@nih.go.jp

図1. 抗原検出 ELISA の原理 (a) と ELISA プレートの各ウェルにおける固相化された単クローン抗体の有無, 被験血清の希釈倍率および陽性・陰性コントロール抗原の位置 (b) .

(a)



(b)

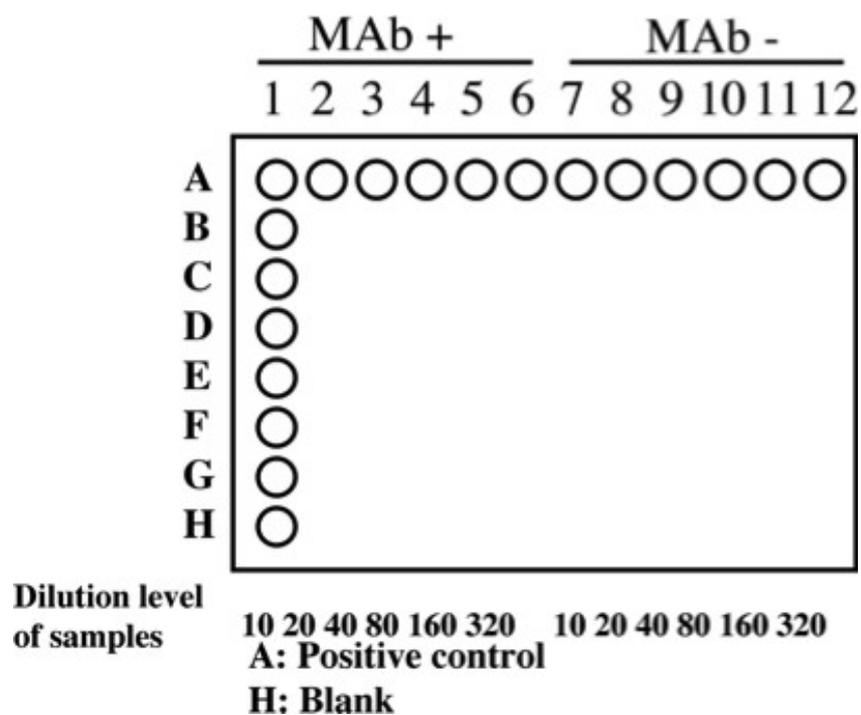
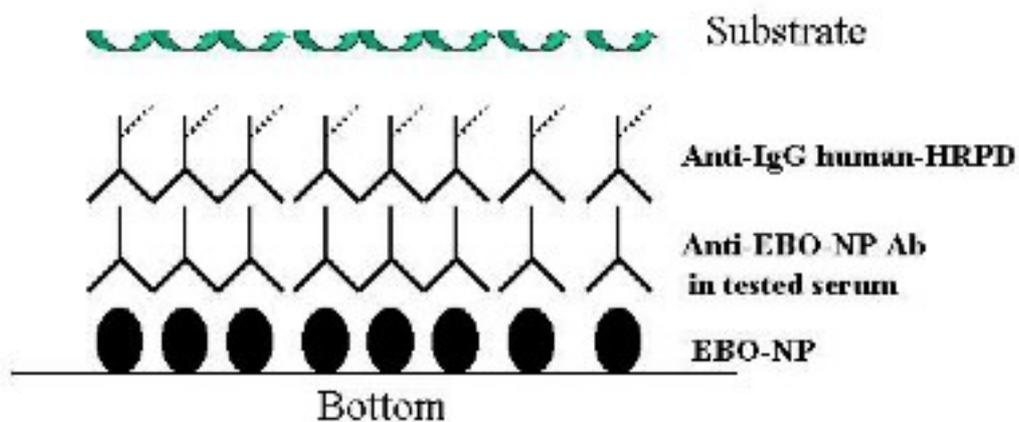


図2. IgG ELISAの原理 (a) と ELISA プレーートの各ウェルにおける固相化された抗原の有無, 被験血清の希釈倍率および陽性・陰性コントロール血清の位置の説明 (b) .

(a)



(b)

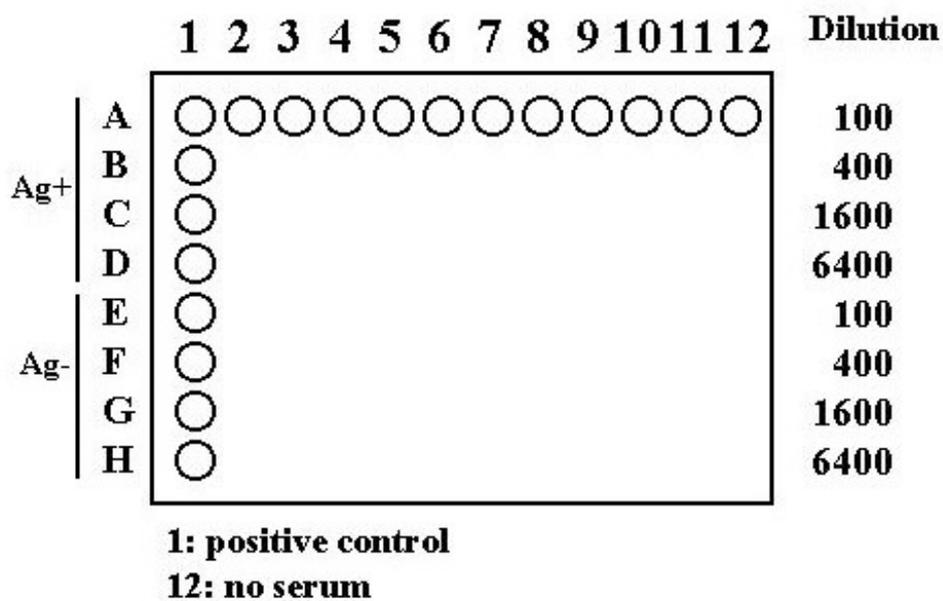
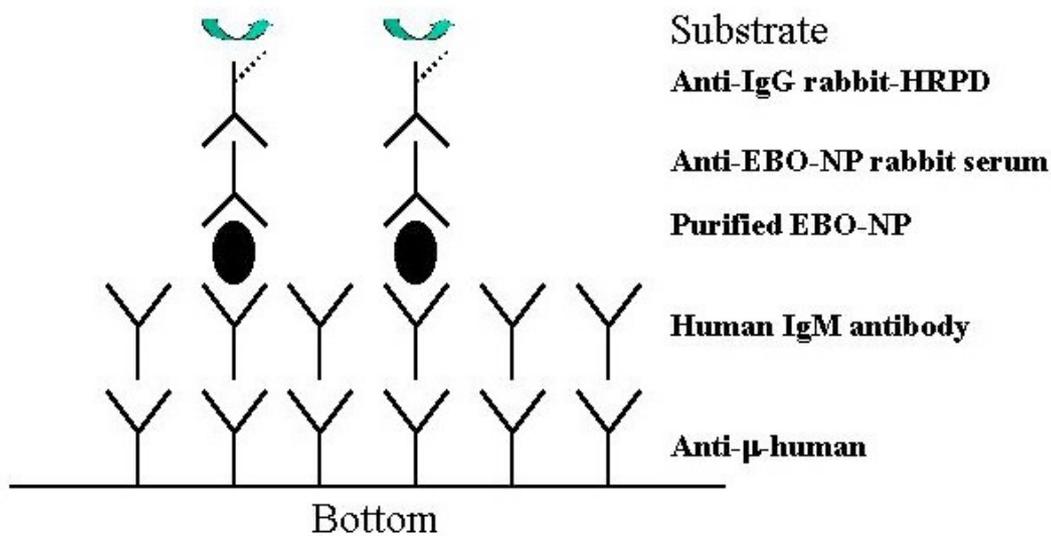


図 3. IgM-capture ELISA の原理 (a) と ELISA プレーートの各ウェルにおける被験血清の希釈倍率, 加える抗原および陽性・陰性コントロール血清の位置の説明 (b) .

(a)



(b)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilution
Ag+	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	20
	B	○												40
	C	○												80
	D	○												160
Ag-	E	○												20
	F	○												40
	G	○												80
	H	○												160

- 1: Positive control**  
**11: Negative control**  
**12: Blank**