

牛のアルボウイルス検査マニュアル (2018年6月14日版)

目次

1.	本マニュアルの位置付け	1
2.	検査材料の採取、処理、保管、輸送の際の温度管理	2
3.	検査に用いる試薬および培養細胞	5
4.	細胞の取り扱い	8
5.	ウイルス分離（回転培養法）	18
6.	ウイルスの接種および回収（フラスコを使用した場合の方法）	30
7.	ウイルス力価の測定（タイトレーション）	39
8.	中和試験	44
9.	核酸抽出および RT-PCR 法	51
10.	リアルタイム RT-PCR 法	56
11.	検査結果の解釈について	59
12.	参考文献	61

1. 本マニュアルの位置付け

わが国では、吸血昆虫であるヌカカが媒介するアルボウイルスによる牛や他の反芻動物の感染症として、アカバネ病、アイノウイルス感染症、チュウザン病、イバラキ病、ブルータングが家畜伝染病予防法における届出伝染病に指定されており、また、ヌカカと蚊が媒介すると考えられる牛流行熱も同じく届出伝染病に指定されている。これらの疾病については、疾病の特徴、検査の手順や内容が病性鑑定マニュアル（農林水産省消費・安全局監修、全国家畜衛生職員会発行）に記載されており、診断基準が示されている。しかし、アルボウイルスの検査全般に関する基本的な手技、材料の取り扱い、検査結果の解釈等に関しては、全国の家畜保健衛生所等の診断施設において、十分に統一されていない状況にある。そこで、全国の診断施設において同様の方法で検査および診断がなされるための一助として、**農研機構動物衛生研究部門 九州研究拠点において実施している方法をもとに**本マニュアルが作成された。本マニュアルを病性鑑定マニュアルと併用することで、アルボウイルス感染症の各種検査および診断に活用して頂きたい。

2. 検査材料の採取、処理、保存、輸送の際の温度管理

血液の採取、処理、保存

ウイルス分離用にはヘパリン入り採血管、中和試験用には血清用採血管を使用する。ウイルス分離用血液は、採取後に転倒混和した後はただちに低温（氷上あるいは4℃）に維持する。

その後、遠心分離（2,000×g、15分、4℃）を行う。遠心分離後（写真1）は、血漿については安全キャビネット内で無菌的に採取してチューブ等に移し（写真2）、-80℃で保存する。

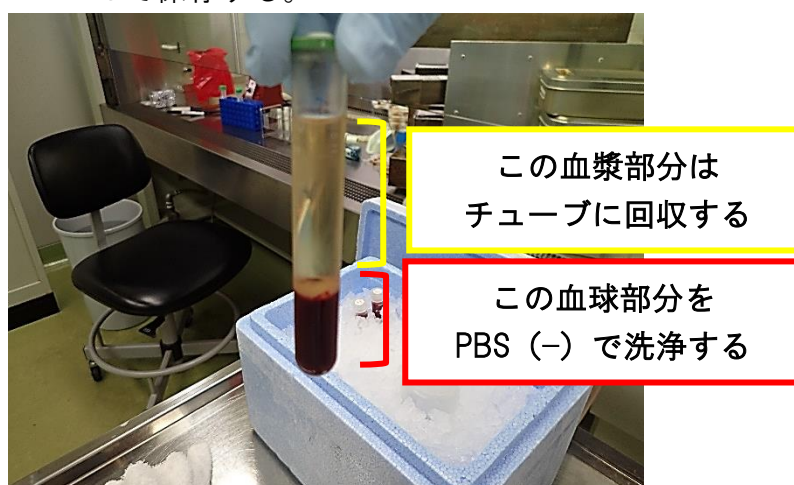


写真1 遠心分離後のヘパリン加血液

血球（バフィーコート部分を含む）は、**血球表面に付着したウイルスに対する抗体を除去するため、冷却した滅菌PBS (-) で3回洗浄する。**3回目の洗浄後は滅菌PBS (-) で元の液量に戻してチューブ等に移し（写真2）、-80℃で保存する。

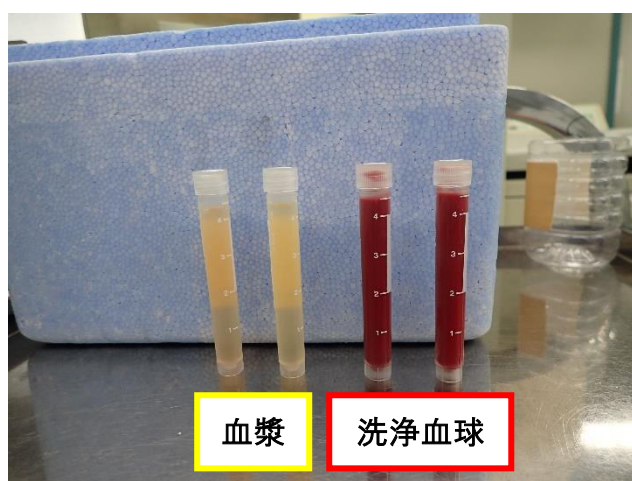


写真2 チューブに移した血漿と洗浄血球

なお、ここで述べる洗浄とは、以下の作業を示す。

- ① 血漿を採取した後の血液材料に冷却した滅菌 PBS (-) を加えてピペッティングにより混和した後、遠心分離する (2,000 ×g、10 分、4 °C)。
- ② アスピレーターで上清を取り除く。
- ③ 上記①と②の操作を3回繰り返す。
- ④ 滅菌 PBS (-) を加えて元の血液量に戻す。

オルビウイルス属のアルボウイルス（イバラキウイルス、チュウザンウイルス、ブルータングウイルス）は、血漿中に浮遊した状態で存在するよりも、血球表面に付着している傾向にある。そのため、血球分画を洗浄することでウイルスに結合した抗体が取り除かれ、さらに、一度凍結融解して血球を壊すことでウイルス粒子が血球から遊離するため、これらの処理によってオルビウイルス属の分離効率が高められる。一方、オルソブニヤウイルス属（アカバネウイルス、アイノウイルス、ピートンウイルス、サシュペリウイルス、シャモンダウイルス）は血漿から分離されることが多い。

中和試験用の血清は、血清分離用の採血管に採取した血液から遠心分離 (2,000 ×g、15 分、4 °C) して回収し、-20~-30 °Cで保存する。なお、血清が分離しやすくなるよう、血清分離用の血液を採取後に半日程度室温で静置しても問題ない。

なお、EDTA 加血液は PCR 検査には使用可能であるが、ウイルス分離には適さない (EDTA の作用により培養細胞が剥離するおそれがあるため)。

ウイルス検査用臓器材料の採取と乳剤の作製

ウイルス検査用の臓器材料は、なるべく無菌的に採取し、滅菌処理された容器（50 mL コニカルチューブ、6 ウェルプレート等）に入れ、ただちに氷上に置く。その後、すぐに乳剤を作製するか、 -80°C で保存する。

乳剤を作製する際には、乳鉢等を使用して、安全キャビネット内で材料を破砕した後、7.5% NaHCO_3 （MEM に対して 2%の液量）と抗生物質（ゲンタマイシン等）をあらかじめ添加した MEM を加える。牛胎児血清（FBS）は MEM に加えない。MEM の液量は、検査材料が 10%~20%程度になるように調整する。その後、遠心分離（ $2,000 \times g$ 、20 分、 4°C ）を行い、上清をセラムチューブ等に移してすぐに使用するか、 -80°C で保存する。材料の破砕には**ビーズ式ホモジナイザー**等も使用可能である。

検査材料の保管

アルボウイルスを含む材料は、原則として -80°C で保存する。アルボウイルスは温度に敏感であり、 -70°C より上の温度における凍結状態では力価が低下するので注意する。また、凍結融解によってもウイルス力価が低下するので、ウイルス分離用の材料では凍結融解の回数をなるべく最小限にするように注意する。

検査材料の輸送の際の温度管理

アルボウイルスを含む材料を輸送する際は、 -80°C に保存した材料をそのままドライアイス入りの保冷容器に入れて輸送することが望ましい。ドライアイス入りの容器で輸送することが困難な場合には、材料を一度 37°C で溶解し、溶解後すぐに氷上 $\sim 4^{\circ}\text{C}$ で保管し、そのまま 4°C で冷蔵輸送を行う。通常の冷凍輸送（ -15°C 前後）は、アルボウイルスの力価が低下しやすいので適さない。

3. 検査に用いる試薬および培養細胞

試薬

アルボウイルスの検査に使用するおもな試薬類の調製方法を以下に示す。

Eagle's MEM (イーグル最小必須培地)

- Eagle's MEM “Nissui”① 100 g
- Tryptose phosphate broth (TPB) 31.3 g
 - 上記2つの粉末を10.6 LのDWに溶解する
 - 1 L用のボトルに900 mLずつ分注する
 - オートクレーブ(121 °C、20分)
 - 十分に冷めてから各ボトルにL-グルタミン溶液(下記参照) 15 mLをクリーンベンチ内で添加する
 - 4 °C保存

Earl's solution, 1× (アール液)

- NaCl (塩化ナトリウム) 68 g
- KCl (塩化カリウム) 4 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (塩化カルシウム二水和物) 2.6 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (硫酸マグネシウム7水和物) 2 g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (リン酸二水素ナトリウム二水和物) 1.6 g
- グルコース 10 g
- 1%フェノールレッド 3 mL
 - 上記の材料をDW 10 Lに溶解
 - 900 mLあるいはそれ以下の液量に分注してオートクレーブ

1%フェノールレッド

- フェノールレッド 5 g
 - DW 500 mLに溶解
 - NaOH 約1~1.5 mL添加 (pHを上げてフェノールレッドを溶かすため)

L-グルタミン溶液

- L-グルタミン 38.93 g
- アール液 2 L
 - 0.20 μm のメンブレンフィルターでろ過滅菌(オートクレーブ不可)
 - 100 mL程度に分注して-20 °C保存

7.5 % NaHCO₃ (炭酸水素ナトリウム水溶液、あるいは「重曹」)

NaHCO₃ (炭酸水素ナトリウム) 75 g を DW 1 L に溶解

- 0.20 μm のメンブレンフィルターでろ過滅菌 (オートクレーブ不可)
- 100 mL 程度に分注して 4 °C 保存

PBS (-), 10× (リン酸緩衝生理食塩水、10 倍濃縮液)

- NaCl (塩化ナトリウム) 800 g
 - KCl (塩化カリウム) 20 g
 - Na₂HPO₄ (リン酸水素二ナトリウム・無水) 115 g
(↑ Na₂HPO₄・12H₂O を使用する場合は 290 g)
 - KH₂PO₄ (リン酸二水素カリウム) 20 g
- DW 10 L に溶解
 - 使用前に DW で 10 倍に希釈してオートクレーブ

PTE (トリプシン-EDTA/PBS (-))

トリプシン 1.25 g をおよそ 900 mL 程度の PBS (-) に溶解

- スターラーによる混和
- EDTA (エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム) 0.25 g を添加して混和
- PBS (-) で 1 L にメスアップ
- 0.20 μm のメンブレンフィルターでろ過滅菌
- 100 mL 程度に分注して -20 °C 保存

ファンギゾン (アムホテリシン B 1.25 mg)

ファンギゾン 1 バイアル (アムホテリシン B 50 mg) をアール液 40 mL に溶解

- 分注して -20 °C 保存
(使用時には 500 倍に希釈する)

培養細胞

アルボウイルスの検査では、おもに以下の 2 種類の株化細胞を使用する。いずれも、フラスコを使用する場合にはキャップを緩めて開放系で培養し、中角瓶を使用する場合にはゴム栓等で密封した閉鎖系で培養する。

- BHK-21 細胞：シリアンハムスター腎由来 (写真 3)
3~4 日間の間隔で 1:6~1:8 の割合で継代する。

50 代を目安に使用を終了し、新しいストックに切り替える。

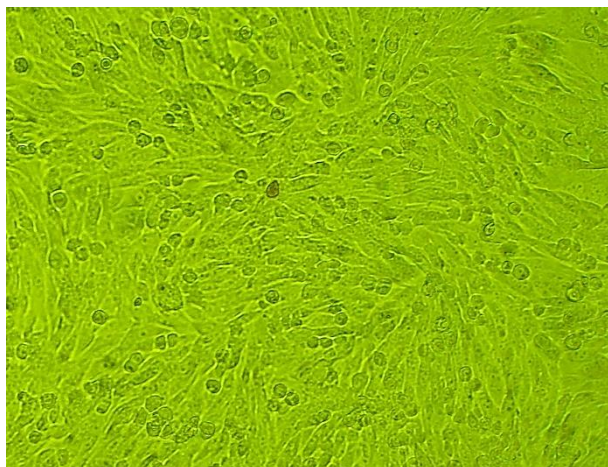


写真3 BHK-21 細胞の顕微鏡観察像

- HmLu-1 細胞：ハムスター肺由来（写真4）
7 日間の間隔で 1：4～1：5 の割合で継代する。
60 代を目安に使用を終了し、新しいストックに切り替える。

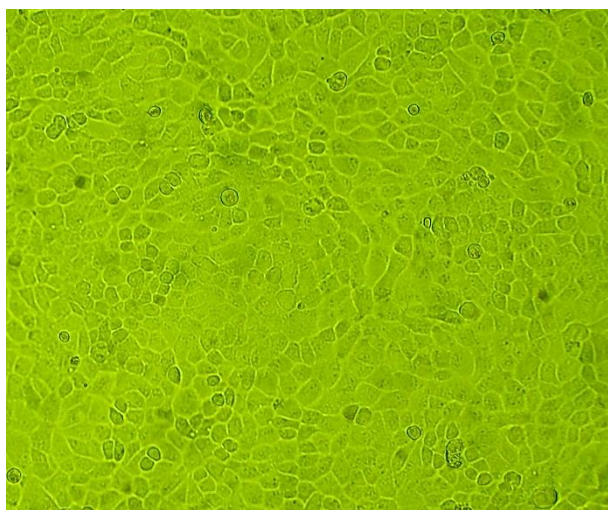


写真4 HmLu-1 細胞の顕微鏡観察像

上記の継代間隔を目安として、定期的な継代を行う。継代が不規則になったり、培養の条件が不適切になったりすると細胞の状態が悪化することがあり、結果としてウイルスに対する感受性が低下するので注意する。また、見た目は正常のようであっても、ウイルスの力価が上がらないなど、何らかの異常がみられたら使用を中止し、冷凍保存ストックを解凍して使用する。これらのことから、培養細胞は、状態が良く、継代数の少ないストックをなるべく多く凍結保存しておく必要がある。

4. 細胞の取り扱い

保存していた細胞を起こす操作（クリーンベンチを使用）

1. ウォーターバスを 37 °C に設定しておく。
2. 培養液を調製する。（50 mL チューブや 100 mL ガラスボトル等を使用）

【BHK-21 細胞】

MEM + 炭酸水素ナトリウム水溶液（1.5 %） + 牛胎児血清（FBS：2.5 %）
+ 牛血清（BS：2.5 %）

細胞を起こす際は上記のように FBS と BS を等量混和し、次回以降の継代で BS のみを 5 % 添加することで、細胞の状態をより良く保つことができると考えられることから、動衛研九州研究拠点では経験的にこのような配合にしている。

【HmLu-1 細胞】

MEM + 炭酸水素ナトリウム水溶液（1.5 %） + FBS（10 %）

いずれの細胞も「フラスコもしくは培養瓶で使用する液量（T75 フラスコでは 20 mL、中角瓶では 30 mL を目安） + 10 mL」の培養液を調製する。

なお、炭酸水素ナトリウム水溶液は MEM のボトルに入れて時間が経過すると pH が変化してしまうので、必ず使用時に MEM に添加して使用する（細胞の継代、ウイルス分離、中和試験など、他の操作をする際も同様）。また、本マニュアルでは通常の培養時に抗生物質を使用しない方法を示す。

3. 15 mL チューブに培養液 10 mL を入れる。
4. 細胞を超低温冷凍庫あるいは液体窒素タンクから取り出し、ウォーターバスで融解させる。
5. 融解後、すぐに細胞を 15 mL チューブの培養液に移す（1~2 mL **ガラスピペット等**もしくはマイクロピペットを使用）。
6. 遠心分離（200~300 ×g、5 分、室温）。

7. アスピレーターで上清を吸引して除去する。
8. 培養液を 5 mL 程度取り、15 mL チューブあるいはフラスコ/培養瓶の中で細胞のペレット（遠心処理によって生じた細胞の塊）をピペッティングによって十分にほぐす（写真5）。

先端部の射出口が細い 5 mL ガラスピペットを使用するか、もしくはゴム球をつけたガラスピペット等で力強くピペッティングをして培養容器内壁に当てることにより、細胞の1個1個がバラバラに離れるようにする。



写真5 ピペッティングの様子（ゴム球を使用した例）

9. 細胞浮遊液を培養液の全量に加えて、チューブあるいはボトルを回すようにゆすって混和する。
10. 細胞浮遊液をフラスコ/培養瓶に移す。
11. 顕微鏡下で細胞の状態を観察した後、37 °C、5 % CO₂（開放系の場合）で培養する。

BHK-21 細胞は、次の継代以降に加える血清は「BS 5 %」とする。HmLu-1 細胞は、次の継代の際に加える血清は「FBS 5 % + BS 5 %」として、それ以降は「BS 10 %」とする。

本マニュアルでは、通常の培養に BS を使用する例を説明する。BS に代えて

FBS を使用することも可能であるが、FBS のロットによっては細胞(とくに BHK-21 細胞) の培養に適するものと適さないものがある。よって、FBS、BS ともに購入前にロットチェックを行うことが望ましい。

なお、本マニュアル中の「FBS」は牛胎児血清、「BS」は子牛もしくは若い成牛から採取した血清(いずれも市販品)を示す。

細胞の継代（クリーンベンチを使用）

細胞を顕微鏡下で観察し、細胞の状態やコンタミの有無を必ず確認してから以下の手順にて継代を行う。

1. ガラスボトル等（滅菌処理済）に培養液を調製する（写真6）。

【BHK-21 細胞】

MEM + 炭酸水素ナトリウム水溶液（1.5 %） + BS（5 %）

【HmLu-1 細胞】

MEM + 炭酸水素ナトリウム水溶液（1.5 %） + BS（10 %）

いずれの細胞も「20 mL（T75 フラスコ）～30 mL（中角瓶）×本数 + 遠心分離を行うチューブ本数×10 mL」の培養液を調製する。



写真6 ガラスボトルに調整した培養液

2. アスピレーターを使用し、培養瓶もしくはフラスコから古い培養液を吸引して除去する（写真7）。

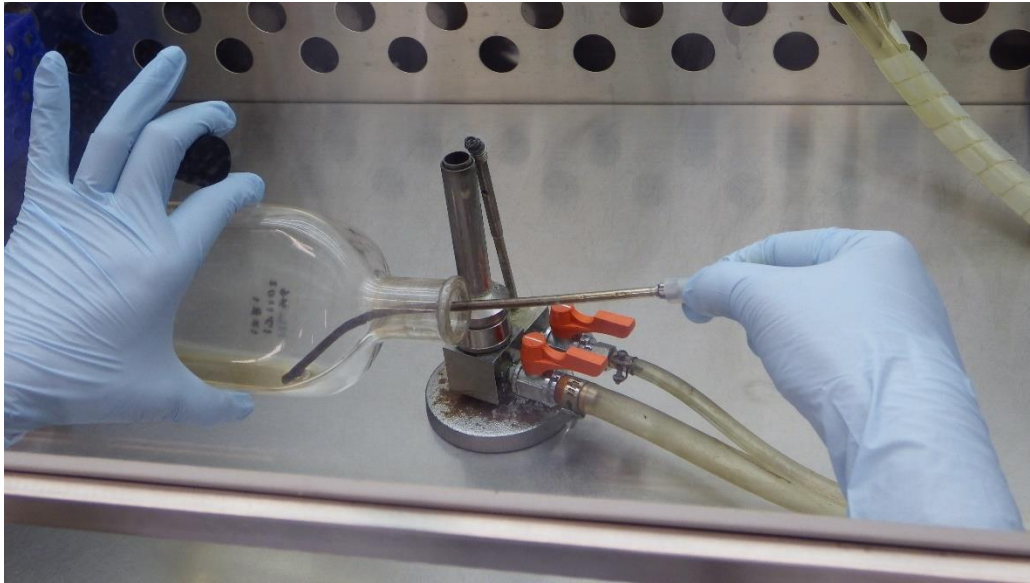


写真7 培養液を吸引する様子

- 滅菌 PBS (-) を、細胞に直接当たらないように注意して添加する (写真8)。
(滅菌 PBS (-) の液量は、中角瓶で 20 mL、T75 フラスコでは 15 mL を目安とする。)

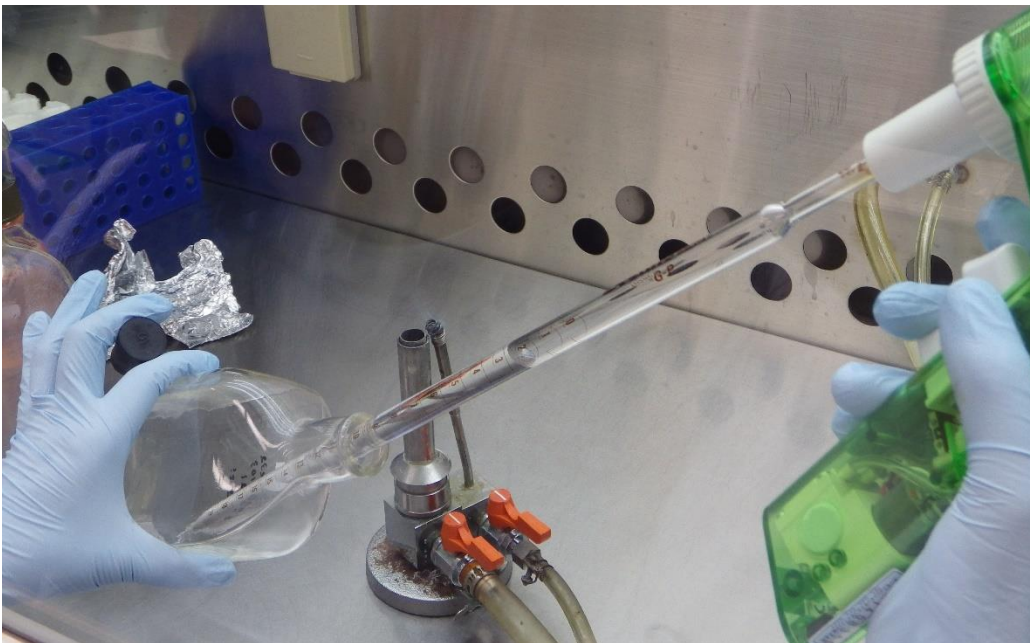


写真8 PBS (-) を入れる様子

- 培養瓶/フラスコを揺らして滅菌 PBS (-) で細胞表面を洗い、その後にアスピレーターで吸引して除去する。

5. PTE 2～3 mL を添加し、細胞を消化する（写真9）。
（PTE 添加量は中角瓶では 3 mL、T75 フラスコでは 2 mL を目安とする。）
なお、BHK-21 細胞は室温で容易に消化されるのでクリーンベンチ内に静置すればよいが、HmLu-1 細胞は室温では消化に時間がかかるため、37 °C のインキュベーターに静置するとよい。

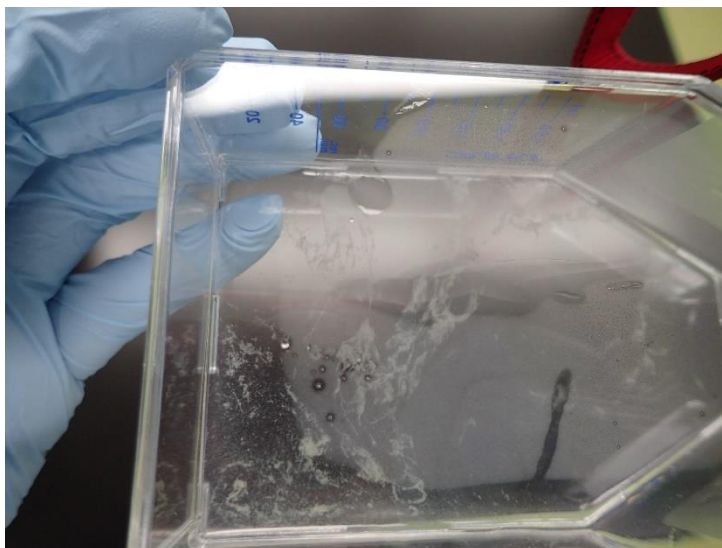


写真9 消化により細胞がはがれた様子

6. 細胞が培養瓶/フラスコの接着面から剥がれるのを確認したら、培養液 5～10 mL 程度を入れてピペティングにより浮遊させ（写真10）、そのまま 15 mL チューブ（無菌）に移す（写真11）。



写真10 細胞が剥がれた後、培養瓶に培養液を入れる様子



写真 11 細胞浮遊液を 15 mL チューブに移す様子

7. 遠心分離 (200~300 ×g、5 分、室温)。
8. アスピレーターで上清を吸引して除去する (写真 12)。細胞のペレットを吸引しないように注意する。

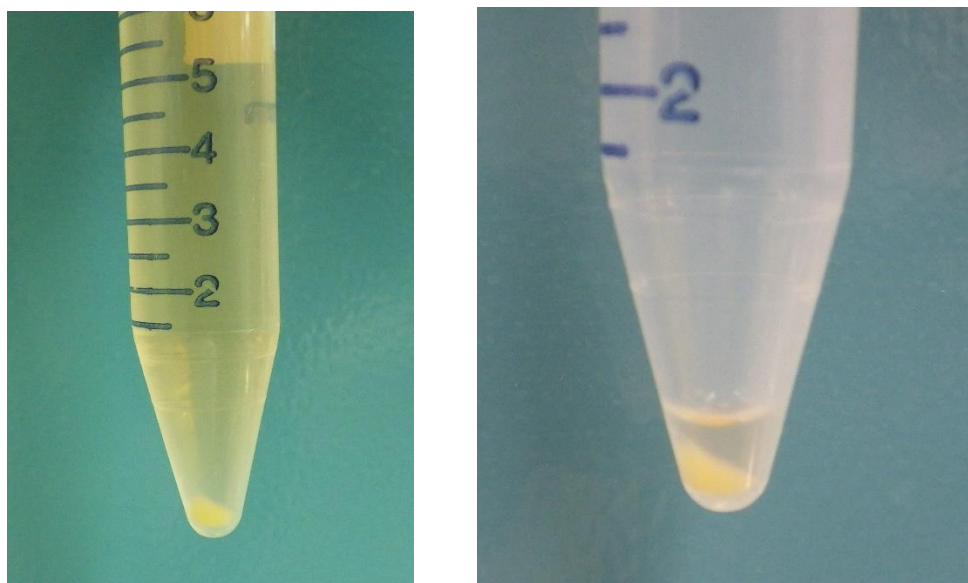


写真 12 上清吸引前 (左)、吸引後 (右)

9. 培養液を 5 mL 程度取り、**15 mL チューブ等の中で**細胞のペレットをピペッティングによりほぐす。
(細胞の塊を残さないために、先端部が細い 5 mL ガラスピペットを使用するか、もしくはゴム球をつけたガラスピペット等で力強くピペッティングをして培養容器内壁に当てることにより、細胞の 1 個 1 個がバラバラになるよ

うにする。)

10. 細胞浮遊液をガラスボトル等の培養液（全量）に入れ、そのガラスボトル等を手で振盪して細胞を均一にし（写真 13）、20～30 mL ずつ培養瓶/フラスコに移す。



写真 13 ガラスボトルをゆらして細胞を均一にしている様子

11. 顕微鏡下で細胞の状態を観察し、フラスコの場合は 37 °C、5 % CO₂ で培養する（写真 14）。培養瓶の場合は、密栓の状態で 37 °C で培養する。



写真 14 フラスコを使用した CO₂ インキュベーターでの培養の様子

細胞の凍結保存（クリーンベンチを使用）

細胞を顕微鏡下で観察し、細胞の状態やコンタミの有無を必ず確認してから保存のための処理を行う。基本的には、中角瓶もしくは T75 フラスコ 1 本分の細胞を 1.5 mL クライオチューブ 2~3 本に保存する。なお、細胞の保存は通常の継代のタイミングよりも少し早く行うべきであり、細胞が培養瓶/フラスコの底面にシートした日に保存するくらいがよい。

1. **15 mL チューブ等**（滅菌処理済）に培養液を調製する。

【遠心用培養液】 遠心分離を行うチューブ本数×10 mL

MEM + 炭酸水素ナトリウム水溶液（1.5 %）

【保存用培養液】 保存用チューブ本数×1 mL

MEM + 炭酸水素ナトリウム水溶液（1.5 %） + FBS（20 %） + DMSO（10 %）

DMSO：火気厳禁、滅菌処理不要。室温では細胞毒性を示すため、保存用培養液は調製後に氷上に置いておく。

上記保存用培養液の代替として、市販の細胞凍結保存液を使用することも可能である。

2. アスピレーターを使用し、培養瓶/フラスコから古い培養液を吸引して除去する。
3. 滅菌 PBS（-）を、細胞に直接当たらないように注意して添加する。
（滅菌 PBS（-）の液量は、中角瓶で 20 mL、T75 フラスコでは 15 mL を目安とする。）
4. 培養瓶/フラスコを揺らして滅菌 PBS（-）で細胞表面を洗い、その後にアスピレーターで吸引して除去する。
5. 上記 3. と 4. をもう一度繰り返す。
6. PTE 2~3 mL を添加し、細胞を消化する。
（PTE 添加量は中角瓶では 3 mL、T75 フラスコでは 2 mL を目安とする。）
7. 細胞が培養瓶/フラスコの接着面から剥がれるのを確認したら、遠心用培養液 10 mL 程度を入れてピペッティングにより浮遊させ、そのまま 15 mL

チューブ（滅菌処理済）に移す。

8. 遠心分離（200～300 ×g、5 分、室温）。
9. アスピレーターで上清を吸引して除去する。
10. 保存用培養液を 2～3 mL 程度取り、15 mL チューブの中で細胞のペレットをピペティングによりほぐす。
（先端部が細い 5 mL ガラスピペットを使用するか、もしくはゴム球をつけた 5 mL あるいは 10 mL ガラスピペット等で力強くピペティングをして培養容器内壁に当てることにより、細胞の 1 個 1 個がバラバラになるようにする。）
11. 複数本の培養瓶/フラスコの細胞を保存する場合、1 本の 15 mL チューブ等に細胞浮遊液全量をプールした後、軽く振盪して細胞を均一にする。
12. 細胞浮遊液を 1 mL ずつ 1.5 mL クライオチューブに移す。
13. 細胞浮遊液の入った 1.5 mL クライオチューブを－80 °Cで保存する。
なお、凍結する際には、細胞浮遊液の入ったチューブをすぐに－80 °Cに保管すると細胞が損傷するため、細胞の冷凍保存に適した（－1 °C/分程度の冷却速度となるような）凍結保存容器に入れて一晩以上静置するか、あるいはチューブを厚手のペーパータオルに包んで空気の層を作って（写真 15）超低温冷凍庫に入れ、一晩以上静置する。その後はチューブボックスに移して－80 °Cで 1 年程度保存することが可能である。また、長期保存の場合には、液体窒素タンクで保存する。



写真 15 厚手のペーパータオルで細胞の入ったチューブを包む様子

5. ウイルス分離（回転培養法）

牛由来の材料やヌカカからアルボウイルスを分離する場合、小試験管を用いた回転培養法が、中角瓶やフラスコ等を用いた静置培養よりも分離効率が高いと経験的に考えられており、本法によるウイルス分離が推奨される。回転培養法の実施が困難な場合には、培養細胞用マルチウェルプレート等を使用し、回転培養法に準じた方法で、1本の試験管を1ウェルと見立ててウイルス分離を行う。

接種前日

BHK-21 細胞、HmLu-1 細胞の両方を T75 フラスコもしくは中角瓶 2 本ずつ用意し、通常の継代と同様の手順で継代を行う。最後に、細胞浮遊液を 100 mL（T75 フラスコ 2 本の場合）もしくは 120 mL（中角瓶 2 本の場合）作り、滅菌済みの小試験管に分注する。（検体数+1）×4 本の小試験管を細胞毎に用意する。

1. ガラスボトル等（滅菌処理済）に培養液を調製する。
【BHK-21 細胞】
MEM + 炭酸水素ナトリウム水溶液（1.5 %） + BS（5 %）
【HmLu-1 細胞】
MEM + 炭酸水素ナトリウム水溶液（1.5 %） + BS（10 %）
いずれも、「100～120 mL + 遠心分離を行うチューブ本数×10 mL」の培養液を調製する。
2. アスピレーターを使用し、培養瓶/フラスコから古い培養液を吸引して除去する。
3. 滅菌 PBS（－）を、細胞に直接当たらないように注意して添加する。
4. 培養瓶/フラスコを揺らして滅菌 PBS（－）で細胞表面を洗い、その後にアスピレーターで吸引して除去する。
5. PTE 2～3 mL を添加し、細胞を消化する。
6. 細胞が培養瓶/フラスコの接着面から剥がれるのを確認したら、10 mL 程度の培養液を入れてピペッティングにより浮遊させ、そのまま 15 mL チューブ（無菌）に移す。

7. 遠心分離 (200~300 ×g、5 分、室温)。
8. アスピレーターで上清を吸引して除去する。
9. 培養液を 5 mL 程度取り、15 mL チューブ等の中で細胞のペレットをピペティングによりほぐす。
10. 細胞浮遊液をガラスボトル等の培養液 (全量) に入れ、そのガラスボトル等を手で振盪して細胞を均一にする。
11. 連続分注器等を使用して、細胞浮遊液を 0.5 mL ずつ小試験管 (滅菌処理済) に入れる (写真 16)。その後、小試験管にキャップ (滅菌処理済：ゴム製やシリコン製) を付ける。

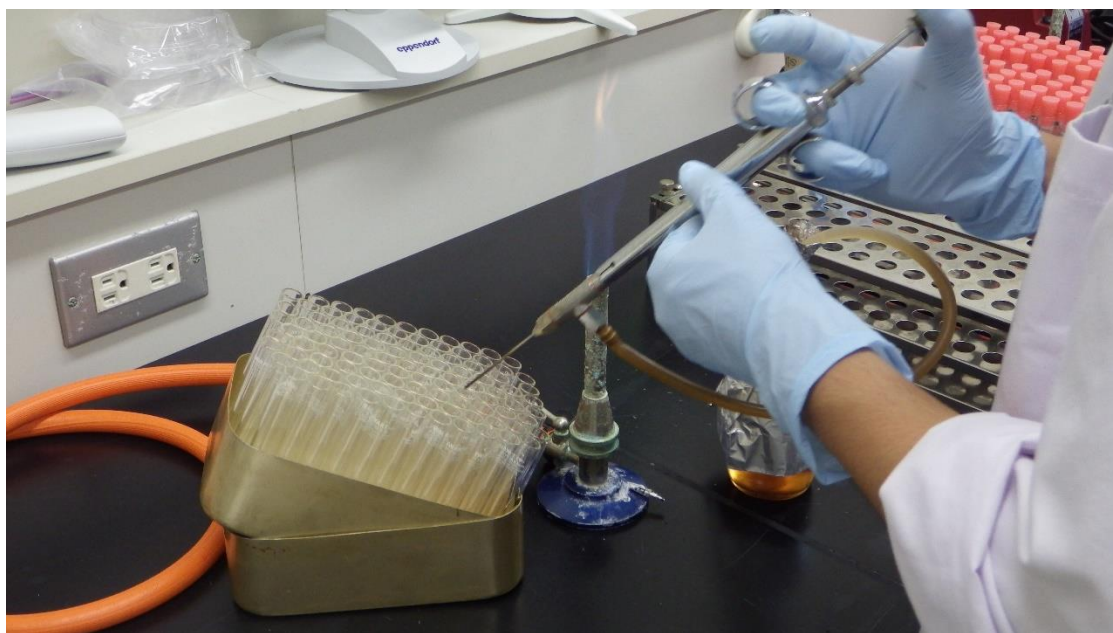


写真 16 連続分注器で細胞浮遊液を分注する様子

12. 小試験管に番号等を記入し、小試験管用のラックに入れる。
13. 浮遊液中の細胞が均一になるようにラックを左右に揺らした後 (写真 17)、各小試験管の番号等の記入部位が上になるようにして (写真 18) 37 °C の恒温室に一晩置く。



写真 17 小試験管を入れたラックを揺らす様子

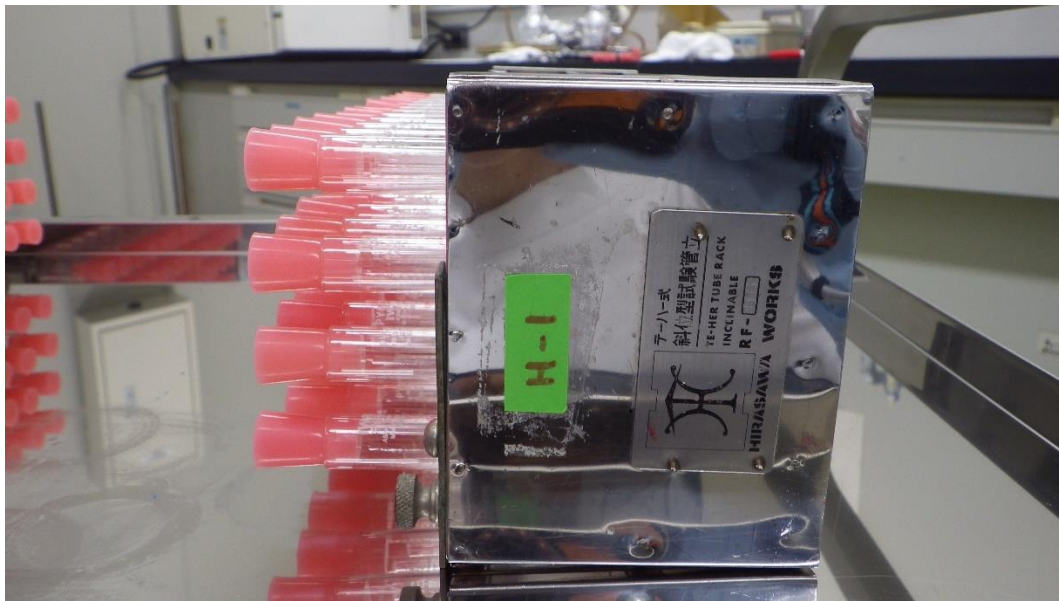


写真 18 ラックに入れた小試験管

キャップ側が少し高い位置になるように小試験管を傾けた状態で静置する。また、各小試験管は番号を記入した側が上になるようにする。

接種当日（下記の作業を行う前に、細胞の状態を顕微鏡下で確認する）

1. クリーンベンチ内で細胞洗浄液と維持液を調製する。

細胞洗浄液：

アール液 + 炭酸水素ナトリウム水溶液（0.5 %）

維持液：

MEM + 炭酸水素ナトリウム水溶液（2 %） + ゲンタマイシン等の抗生物質（目安：10 μ g/mL 程度）

サンプルの種類や状況次第では、ファンギゾンを追加する場合もある。

細胞洗浄液の液量は 小試験管の本数 \times 6 mL

維持液の液量は 小試験管の本数 \times 0.5 mL

を基本とするが、いずれも多めに用意しておいたほうがよい。

2. 連続分注器等を用いて、前日に用意した小試験管内の細胞を 2 mL 細胞洗浄液で 3 回洗う。この作業は、以下の手順で行う。

- ① 小試験管をラックから取り出してキャップを外す（写真 19）。

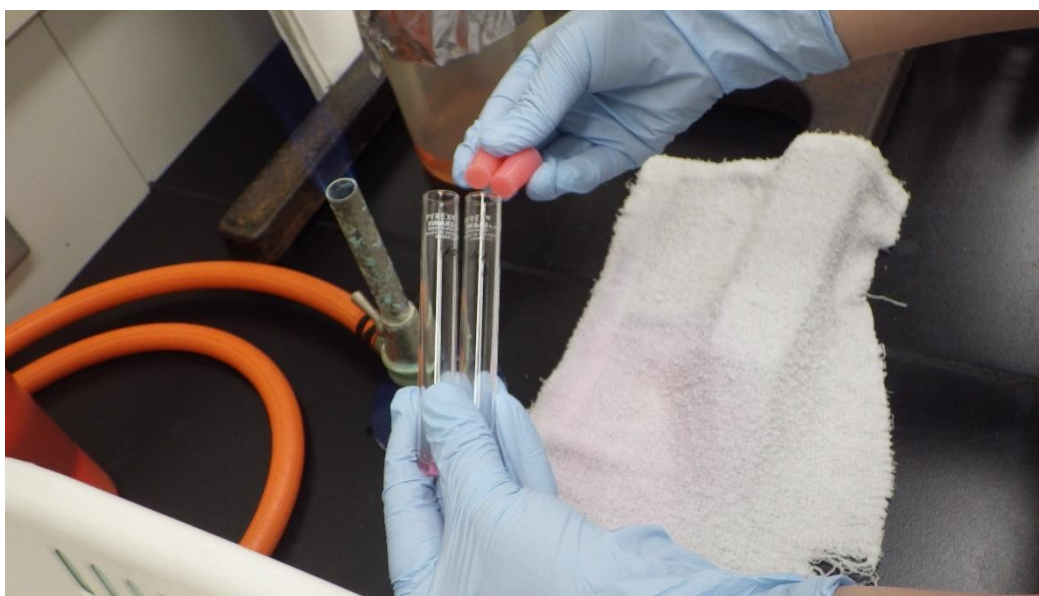


写真 19 キャップを外す様子

- ② 培養液を捨てる（写真 20）。（動衛研九州研究拠点では、廃液が飛び散らないようにするため、塩素系消毒薬を含んだタオル等をバットに敷き、その上に廃液を捨てている）

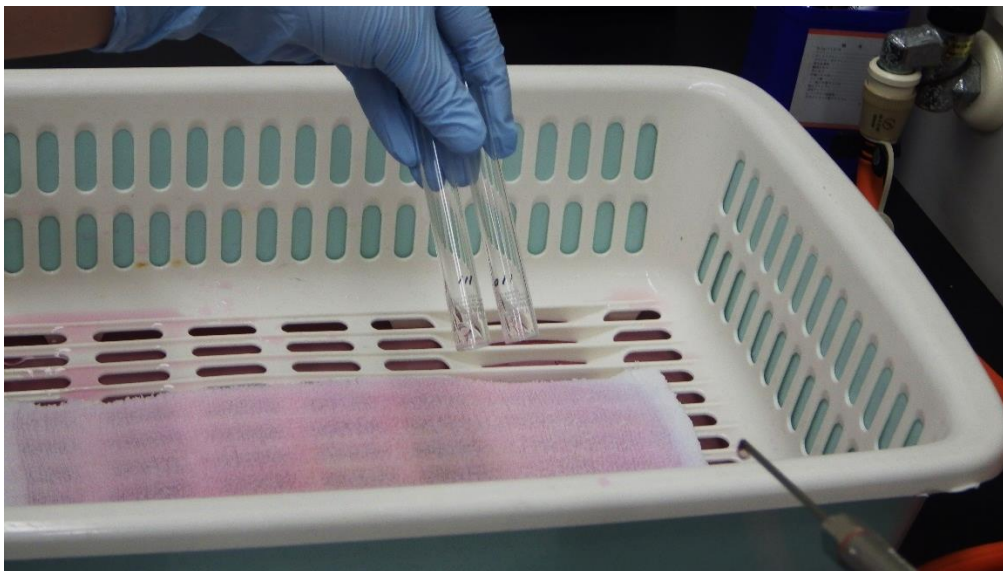


写真 20 培養液を捨てる様子

- ③ 細胞洗浄液を 2 mL 入れる（写真 21）。（細胞に直接当てて入れないように注意する）

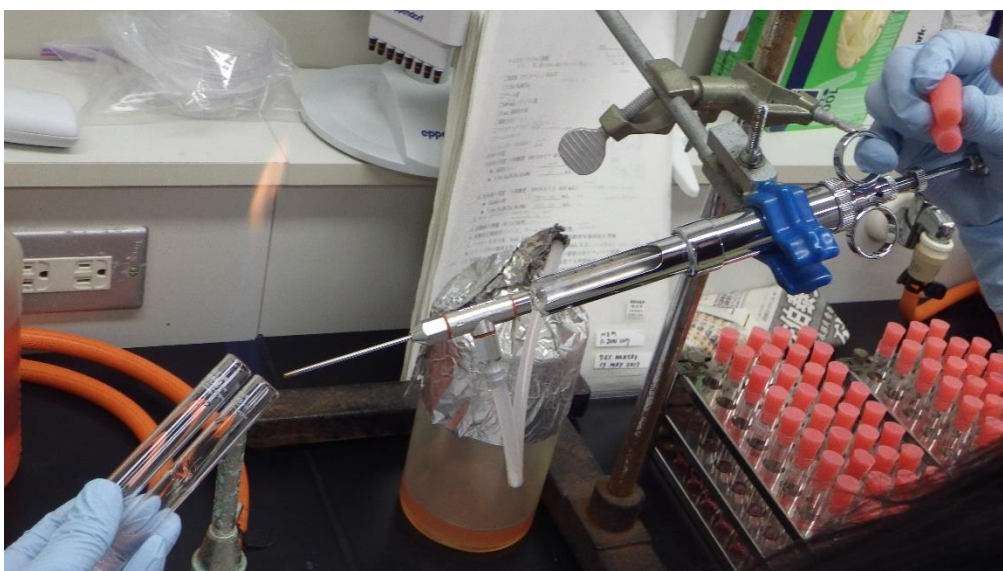


写真 21 細胞洗浄液を入れる様子

- ④ 細胞洗浄液を捨てる。（上記②と同様の方法）
- ⑤ 上記③と④をあと 2 回繰り返す。

- ⑥ キャップを付けて小試験管をラックに戻す（写真 22）。



写真 22 ラックに小試験管を移す様子

なお、連続分注器を用いてこの作業を行う場合、クリーンベンチ内で行うことは困難である。よって、実験台の上でガスバーナーを付けて上昇気流を発生させ、ガスバーナーの近く（周囲半径 30～40 cm 以内を目安）で作業を行う。また、連続分注器の射出口が小試験管に直接触れないように注意する。

3. 洗浄後の細胞が入っている小試験管のキャップを開け、ウイルス分離用の材料を 100 μ L ずつ添加し（写真 23）、再度キャップを付ける。その際、コンタミネーションを避けるため、材料の接種とキャップの開閉を複数の人員で手分けして行うことが望ましい。

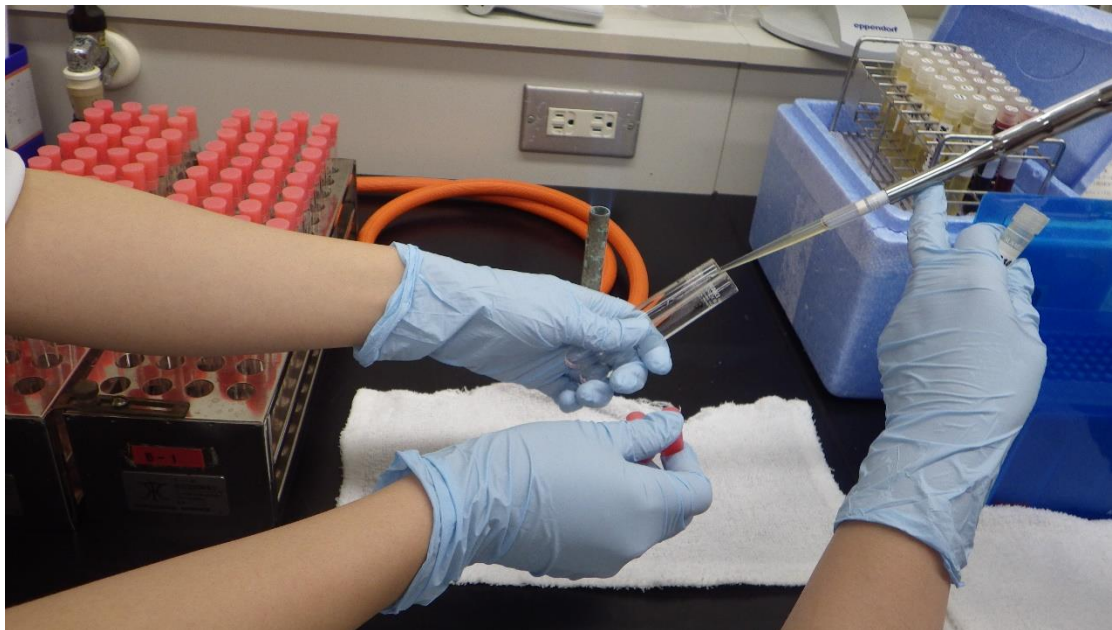


写真 23 ウィルス分離用の材料を入れる様子

4. 各小試験管を番号等の記入部位が上になるようにして小試験管をラックに入れ（写真 24）、37 °Cの恒温室に1 時間静置する。



写真 24 小試験管の入ったラックを恒温室に静置した様子

5. 小試験管のキャップを開け、維持液を 0.5 mL 加え（写真 25）、再度キャップを付ける。
本来であれば接種後も洗浄を行ったほうが良いが、作業効率優先のために省

略している。但し、接種後に細胞毒性が多くみられる場合には接種後の洗浄を行うことが望ましい（血球や臓器乳剤の初代接種後等）。



写真 25 維持液を入れる様子

6. 小試験管を回転培養装置のドラムにセットし、37 °Cで回転培養を行う（写真 26）。回転の速度は 2.0～2.2 r/h とする。



写真 26 回転培養装置に小試験管をセットした様子

接種翌日～接種 6 日後

顕微鏡下で観察を行い、細胞変性効果（Cytopathic effect：CPE）の有無を記録する。接種翌日は、材料中にウイルスが含まれていたとしても CPE がみられることは少ないため、コンタミネーションの有無をチェックする程度でよい。また、室温に置く時間が長いとウイルスの増殖にも影響する可能性があるため、なるべく短時間で観察する。接種翌日の観察は各列（4 本）につき 1 本のみで構わないが、その後は全ての小試験管を少なくとも 2～3 日毎に観察する。

接種 6 日後には、翌日の接種に使用する細胞を小試験管に用意しておく（手順は前述の通り）。

接種 7 日後

各検体（4 本分）の培養上清を回収し、1 本の小試験管にまとめる。回収の際は、回転培養に使用している小試験管をそのまま利用することが可能である（例：No. 1～No. 4 の 4 本で培養した場合、No. 2～No. 4 の培養上清を No. 1 の小試験管にまとめる）。培養上清を入れた後は、小試験管を氷上に静置するか 4 °C に保管する。但し、コンタミネーションにより雑菌が繁殖しているものは回収せず、滅菌処理する。

回収した培養上清を接種材料として、2 代目の接種を行う（手順は前述の通り）。

→ 1 週間後に 3 代目の接種を行い、その後に同条件で 7 日間培養する。

初代～3 代目のいずれにおいても、CPE がみられた場合（写真 27）、その小試験管は当日中に 4 °C に移す。

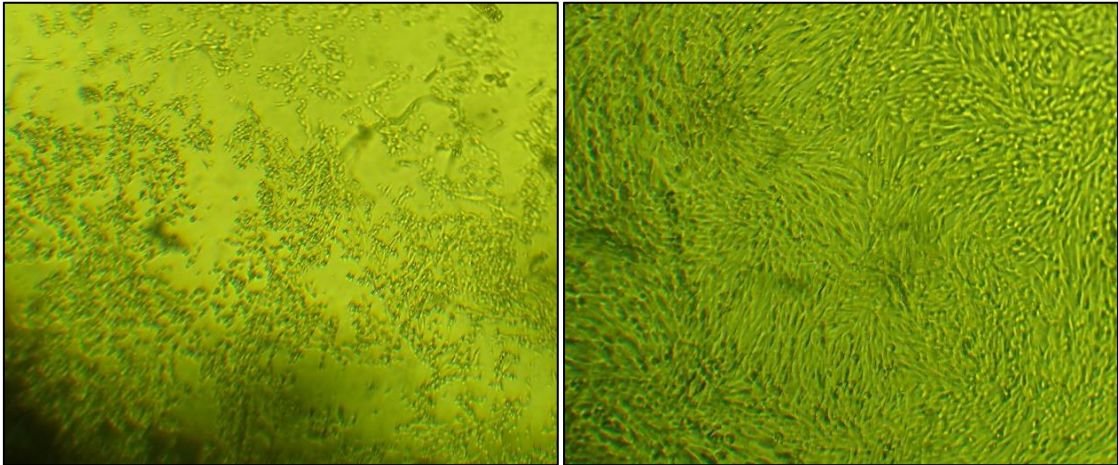


写真 27 回転培養にて観察される CPE の例

左：アカバネウイルス（Akabane virus：AKAV）感染 BHK-21 細胞
右：ウイルス非感染 BHK-21 細胞

ウイルス分離に関する注意点

初代および 2 代目の接種により、同一検体で CPE 陽性と CPE 陰性の小試験管が混在していた場合には、CPE 陽性の培養上清を 2 本の小試験管に接種して残りの培養上清を保存しておき、CPE 陰性の培養上清は別途 4 本の小試験管に接種する。

→ CPE が観察されたら、培養上清をプールした後、維持液で 10 倍～100 倍に希釈して細胞に接種する（小試験管でなく、培養瓶やフラスコを使用可）。3 代目の接種で CPE が観察された場合も同様に、CPE 陽性の培養上清をプールして、（ウイルスが分離された細胞と同じ種類の）細胞に接種する。また、接種後にコンタミネーションが生じた場合には、接種材料を 0.45 μm フィルター等でろ過して再度の接種を行う。

→ CPE が観察された検体については、培養上清をコニカルチューブ等（滅菌処理済）に回収して遠心分離を行い（2,000 $\times g$ 、15 分、4 $^{\circ}\text{C}$ ）、遠心後の上清を 0.5～1 mL ずつチューブに分注して -80°C で保存する。その後、RT-PCR によるウイルスの同定を行う。なお、分離されたウイルスを動衛研への病性鑑定に提出する場合、**2 回以上の継代が完了したもの**を使用する。継代数が少ない材料の場合、CPE ではなく細胞毒性のみ示している場合があるので注意する。

2 代目および 3 代目の接種で使⽤した培養上清は、最終結果が出るまで冷蔵保存しておく。最終結果が得られた後は、CPE がみられなかった検体の培養上清を滅菌して廃棄してよい。

6. ウイルスの接種および回収（フラスコを使用した場合の方法）

接種前日（クリーンベンチを使用）

接種に用いる細胞をあらかじめ培養しておき、接種前日にフラスコあるいは培養瓶に継代する。1本のフラスコ/培養瓶にまく細胞は通常の継代の2倍量とし、接種する材料の本数+1本の細胞を用意する。本マニュアルでは、T75フラスコの使用例を示す。

1. ガラスボトル等（滅菌処理済）に培養液を調製する。

【BHK-21細胞の場合】

MEM + 炭酸水素ナトリウム水溶液（1.5%） + BS（5%）

【HmLu-1細胞の場合】

MEM + 炭酸水素ナトリウム水溶液（1.5%） + BS（10%）

いずれの細胞も、「20~25 mL×フラスコ/培養瓶本数 + 遠心分離を行うチューブ本数×10 mL」の培養液を調製する。

2. アスピレーターを使用し、フラスコ/培養瓶から古い培養液を吸引して除去する。
3. 滅菌PBS（-）を、細胞に直接当たらないように注意して添加する。
4. フラスコ/培養瓶を揺らして滅菌PBS（-）で細胞表面を洗い、その後にアスピレーターで吸引して除去する。
5. PTE 2~3 mL を添加し、細胞を消化する。
6. 細胞がフラスコ/培養瓶の接着面から剥がれるのを確認したら、10 mL 程度の培養液を入れてピペティングにより浮遊させ、そのまま 15 mL チューブ（滅菌処理済）に移す。
7. 遠心分離（200~300 ×g、5 分、室温）。
8. アスピレーターで上清を吸引して除去する。
9. 培養液を 5 mL 程度取り、15 mL チューブ等の中で細胞のペレットをピペティングによりほぐす。

10. 細胞浮遊液をガラスボトル等の培養液（全量）に入れ、そのガラスボトル等を手で振盪して細胞を均一にし、20～25 mL ずつフラスコ/培養瓶に移す。
11. 顕微鏡下で細胞の状態を観察し、37 °C、5 % CO₂ で培養する。

接種当日（前半はクリーンベンチ、後半は安全キャビネットを使用）

冷凍保存（ $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）の材料を接種する場合には、あらかじめウォーターバスを $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ に設定しておき、以下の手順で接種を行う。

1. クリーンベンチ内で、細胞洗浄液と細胞維持液を調製する。

細胞洗浄液：アール液 + 炭酸水素ナトリウム水溶液（0.5%）

維持液：MEM + 炭酸水素ナトリウム水溶液（2%）

細胞洗浄液の液量は フラスコ/培養瓶の本数 \times 80 mL

維持液の液量は フラスコ/培養瓶の本数 \times 25 mL + 10 mL 程度 とする。

2. アスピレーターを使用し、フラスコ/培養瓶から培養液を吸引して除去する。
3. 細胞洗浄液（10~15 mL）を、細胞に直接当たらないように注意して添加する（写真 28）。

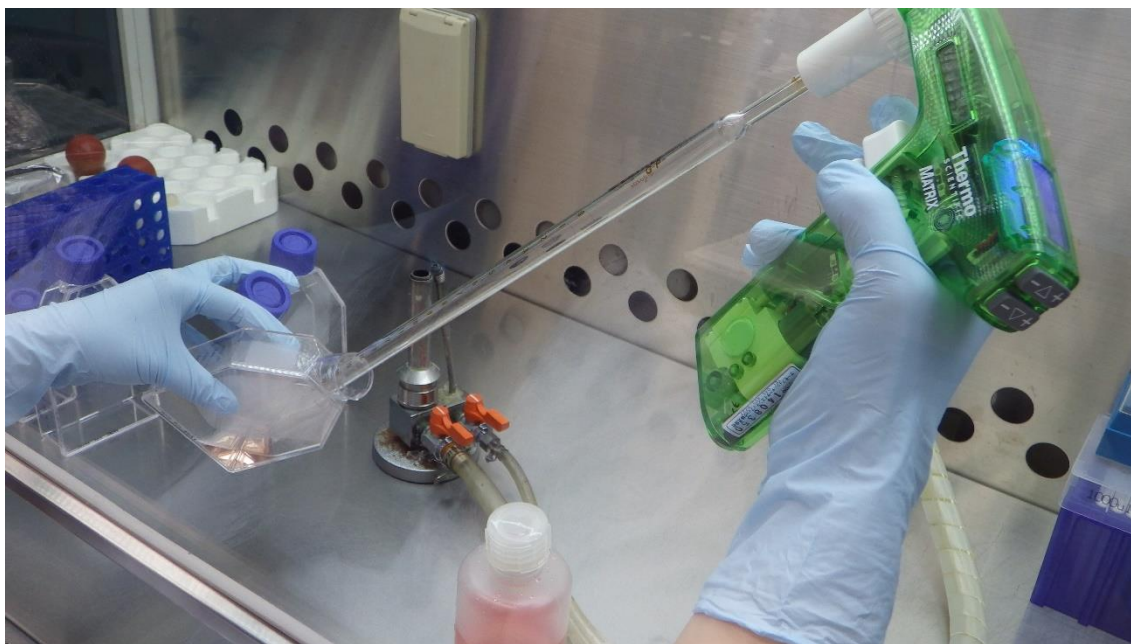


写真 28 細胞洗浄液を入れる様子

4. フラスコ/培養瓶をゆっくり揺らして細胞洗浄液で細胞表面を洗い（写真 29）、その後にアスピレーターで吸引して除去する。

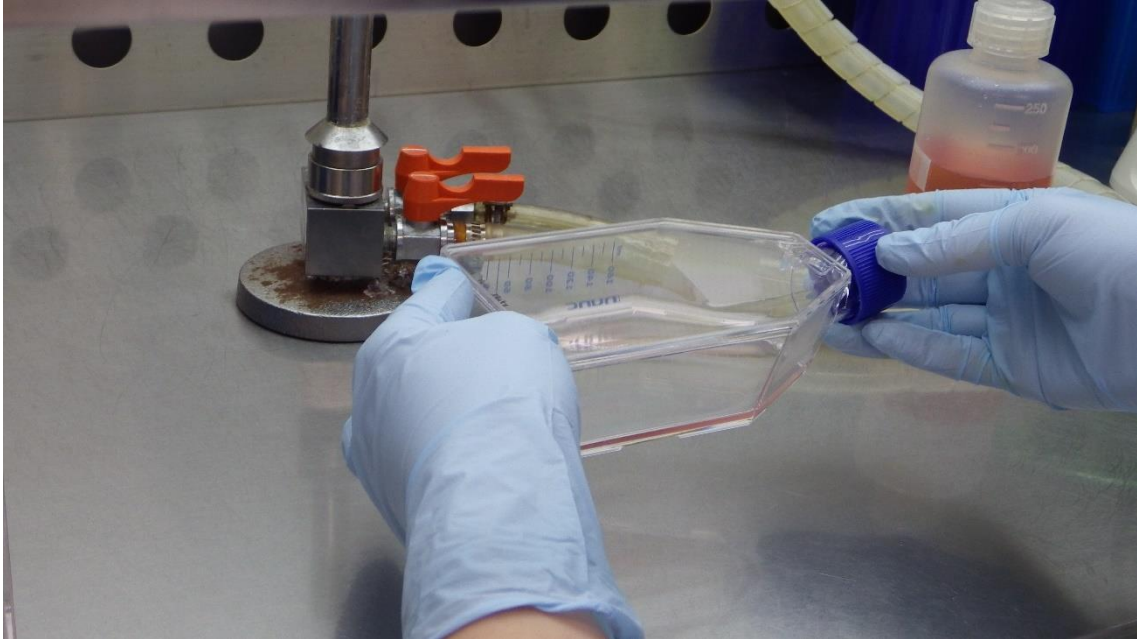


写真 29 フラスコ内の細胞洗浄液を細胞全面に行き渡らせている様子

5. 上記 3. と 4. をもう一度繰り返す。
6. 細胞洗浄液を入れ（3 回目）、除去せずにフラスコ/培養瓶のキャップを閉める。
7. フラスコ/培養瓶をクリーンベンチから出して、細胞が細胞洗浄液に浸るようにして室温で静置しておく。
8. 接種材料が -80°C 保存の場合、ウォーターバスで溶かす。溶けた後は、ただちに氷上に置く。

[以下、9.~12.、14.~15.を安全キャビネットで作業を行う]

9. 接種材料を維持液で希釈する（写真 30、31）。
接種材料の希釈倍率は 10~100 倍を一応の目安とするが、ウイルス力価が低い接種材料の場合には 2 倍でも可。中和試験に用いるウイルスの場合、感染多重度(multiplicity of infection:MOI)=0.01 程度、つまり、1 個の細胞当たり 0.01 TCID₅₀ (50 % tissue culture infectious dose) 程度の力価を接種するのが望ましい。高い MOI で接種すると、感染性のない不完全ウイルス粒子が出現することがある。

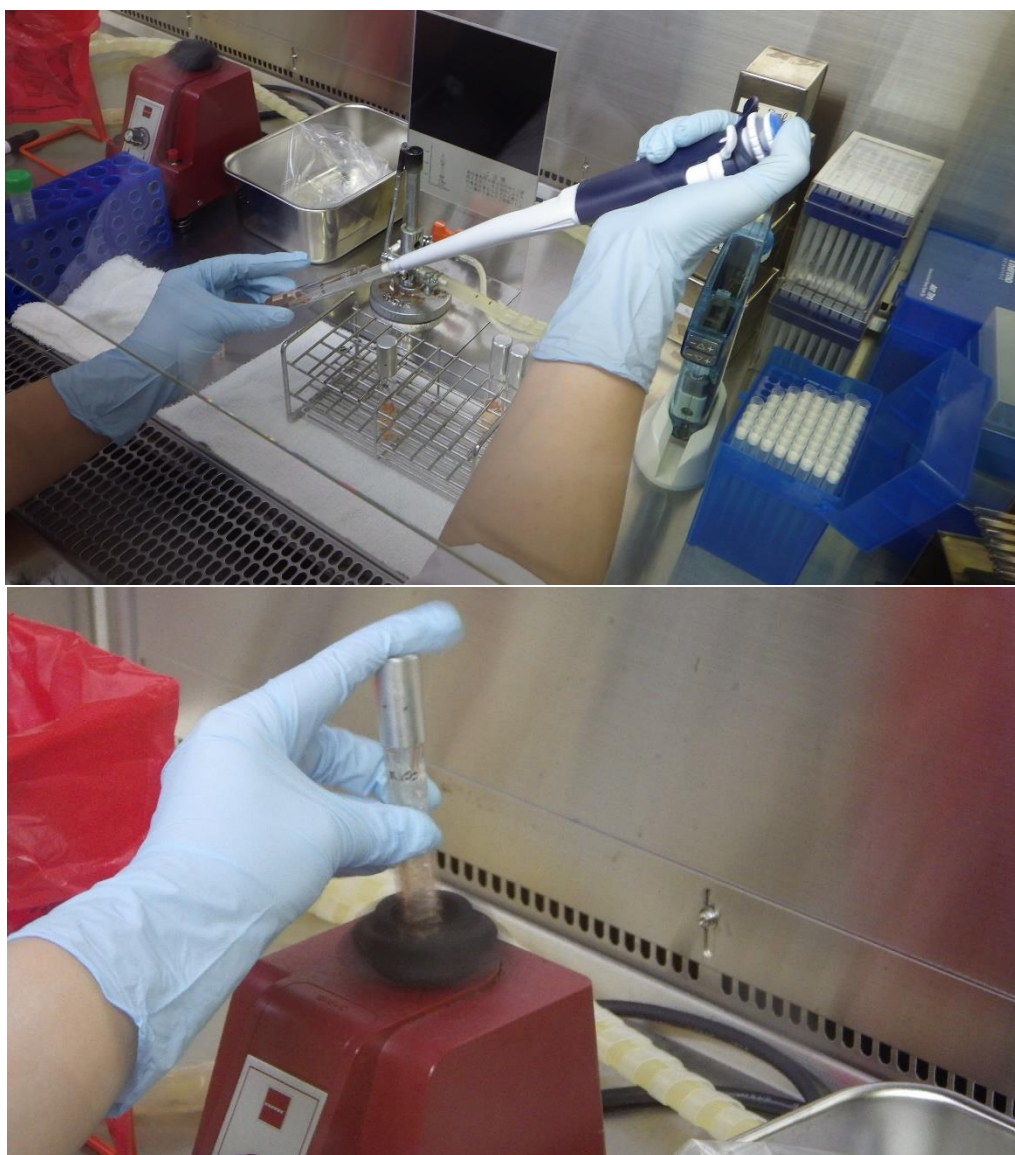


写真 30（上）、31（下） 接種材料を希釈している様子

10. フラスコ/培養瓶のキャップを開け、細胞洗浄液をアスピレーターで吸引して除去する。
11. コントロール用のフラスコ/培養瓶に維持液 1 mL を入れ、キャップを閉じる。
12. ウイルス接種用のフラスコ/培養瓶から細胞洗浄液を除去し（上記 10. と同様）、接種用材料 1 mL を添加して（写真 32）キャップを閉じる。

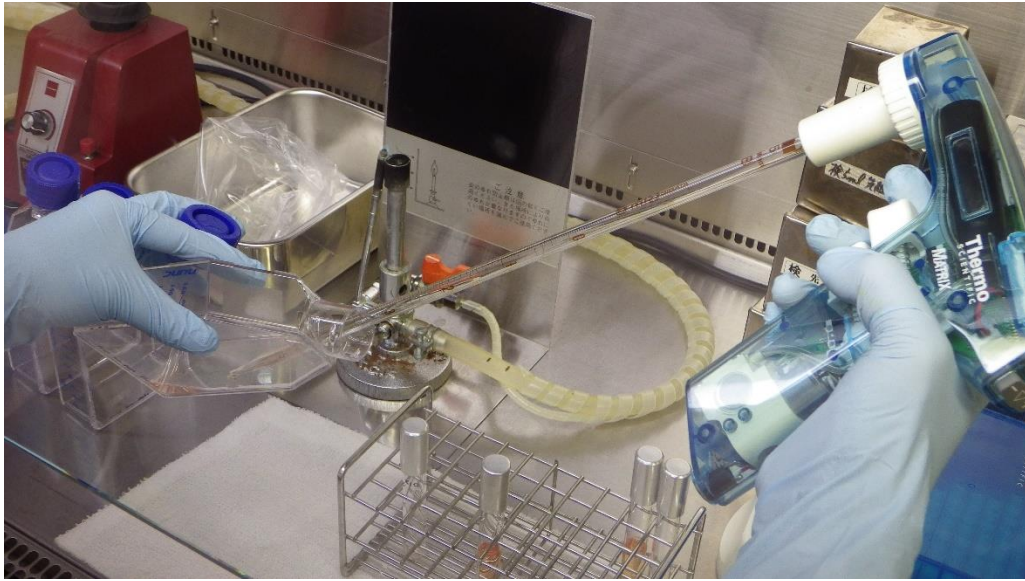


写真 32 接種用材料を入れている様子

13. フラスコのキャップを緩めて 37 °C、5 % CO₂ に 1 時間静置する（培養瓶の場合には密栓）。その間、15 分おきにティルティング（フラスコを揺らす操作）を行い（写真 33）、接種材料が細胞全体に行きわたるようにする。

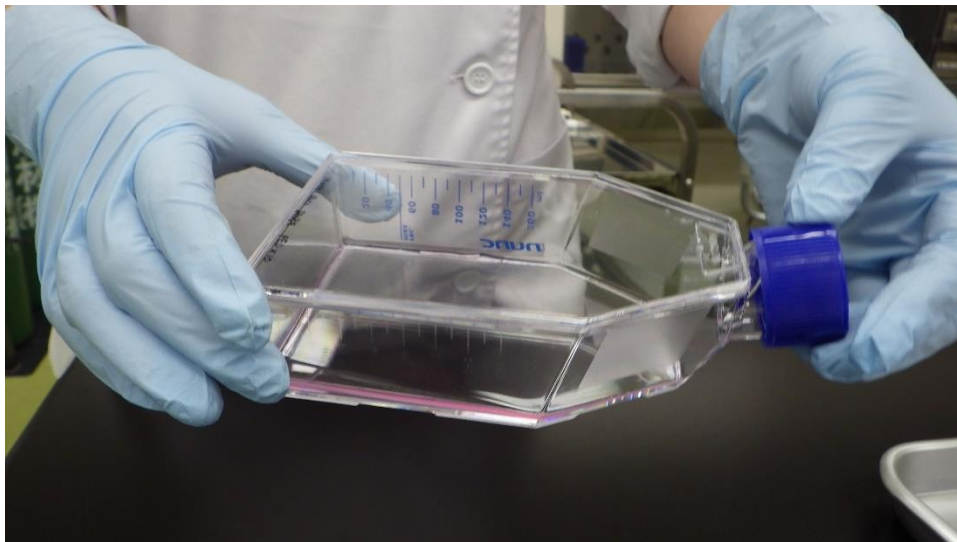


写真 33 ティルティングをしている様子

14. 接種材料をアスピレーターで吸引して除去し（写真 34）、細胞洗浄液を使用して 1～3 回洗浄する。

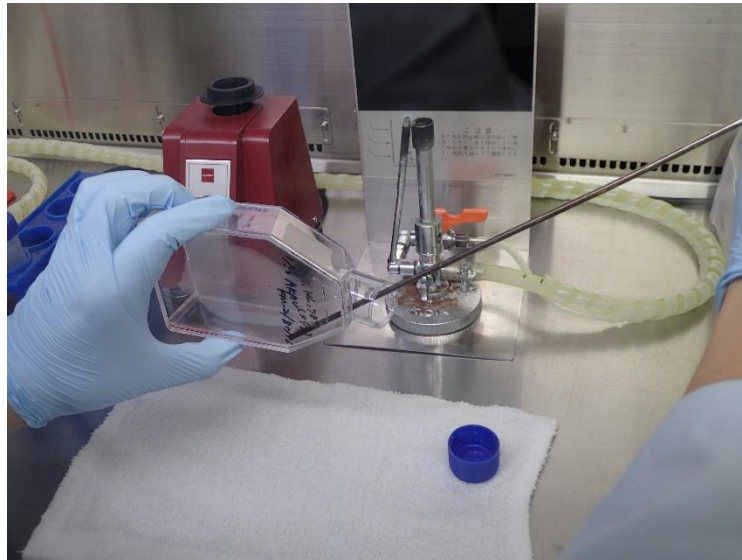


写真 34 アスピレーターを用いて接種材料を除去している様子

15. 維持液 20～25 mL を入れる (写真 35)。

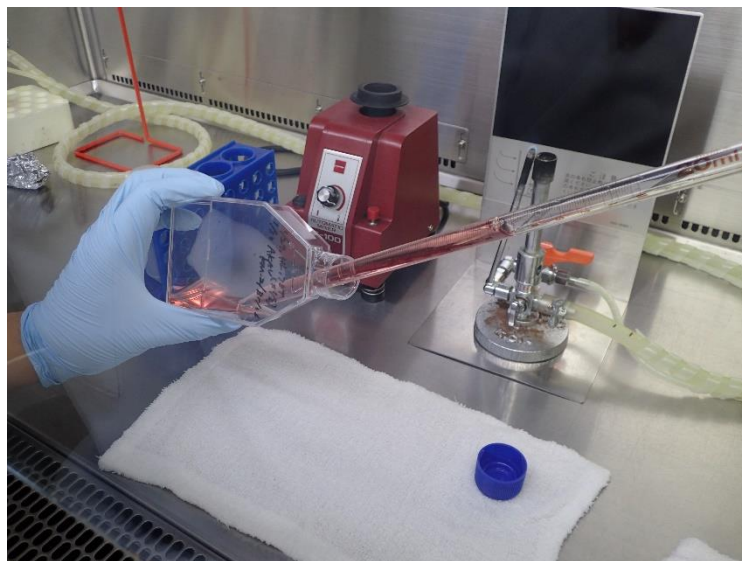


写真 35 維持液を添加している様子

16. 37 °C、5 % CO₂ で培養する。接種後には顕微鏡下で毎日観察を行う。
17. CPE (写真 36) が 50 % 以上みられた段階で培養上清をコニカルチューブ等 (滅菌処理済) に回収して遠心分離を行う (2,000 ×g、15 分、4 °C)。遠心後は上清を 0.5～1 mL ずつチューブに分注して-80 °Cで保存する。

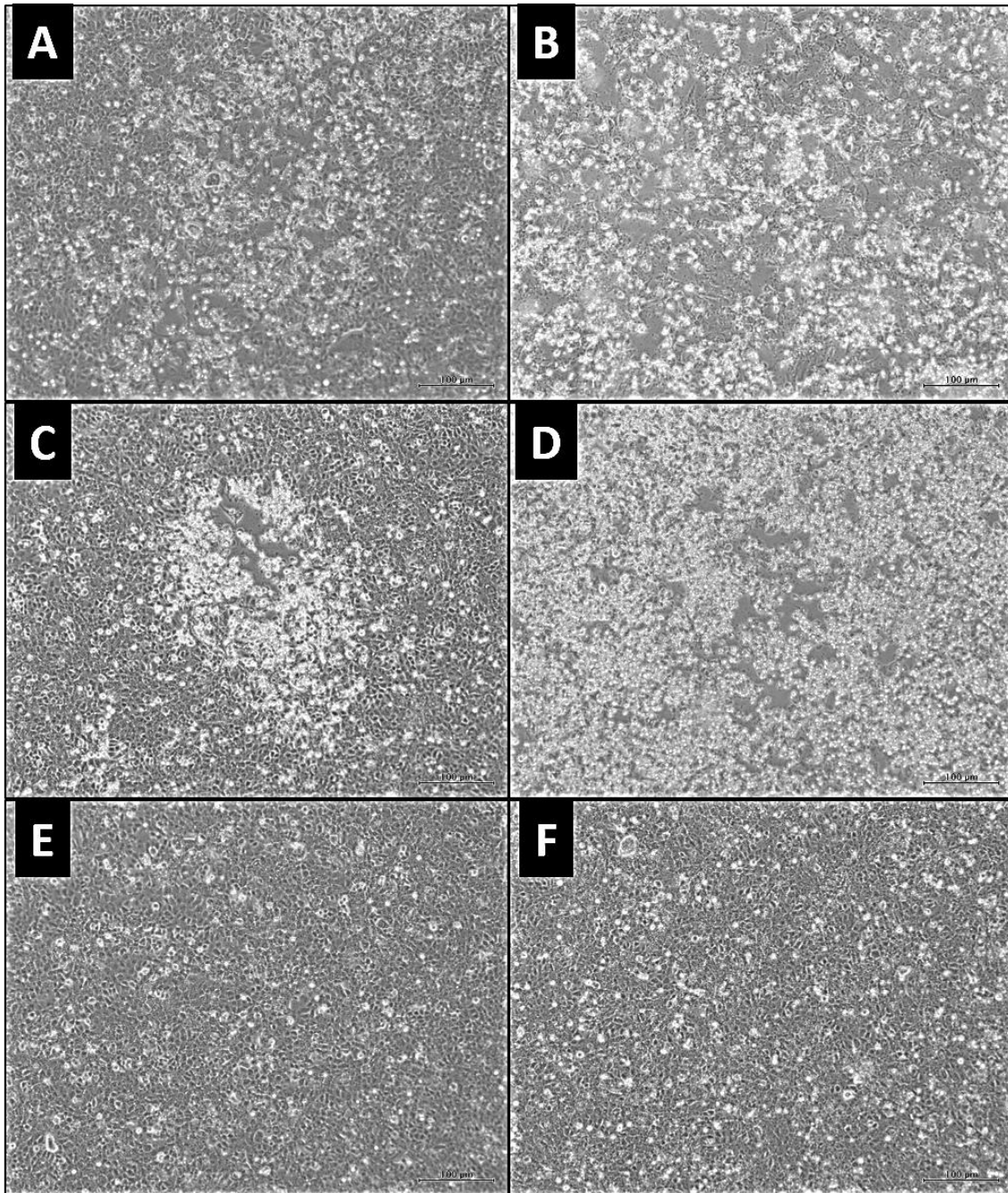


写真 36 観察される CPE の例

AKAV KM-2/Br/06 株感染 HmLu-1 細胞：接種 2 日後 (A)、
接種 3 日後 (B)

流行性出血病ウイルス血清型 2 Ibaraki No. 2 株感染 HmLu-1
細胞：接種 2 日後 (C)、接種 3 日後 (D)

ウイルス非感染 HmLu-1 細胞：維持液添加 2 日後 (E)、
添加 3 日後 (F)

CPE がみられなくても盲継代を行う場合には、接種 7 日後を目安に上記と同様の方法で培養上清の回収・保存を行う。但し、回収した材料を数日以内（およそ 3 日以内）に接種する場合には、凍結融解によるウイルス力価の低下を避けるため、冷凍せずに 4 °C で保存することが推奨される。

ウイルス保存用のチューブには、

- ① ウイルスの種類
- ② 株名
- ③ 継代歴（使用した細胞の種類と継代回数）
- ④ 保存年月日

以上の情報を明記したラベル（写真 37）を必ず貼り付ける。

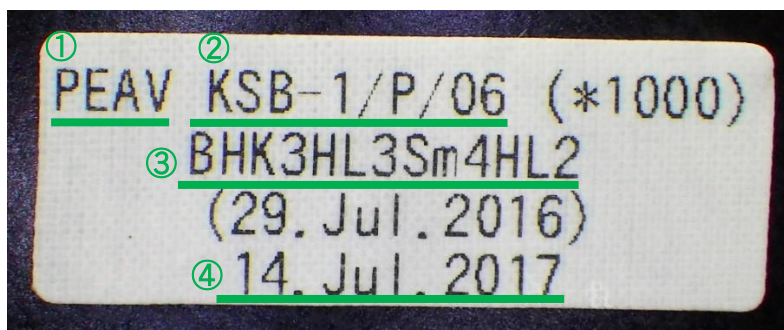


写真 37 ラベルの作成例

7. ウイルス力価の測定（タイトレーション）

本マニュアルでは、HmLu-1 細胞と 96 ウェルマイクロプレートを使用し、同時接種法により TCID₅₀ を求める手順を示す。

本マニュアルに記載の方法には BHK-21 細胞が適さないため、BHK-21 細胞で増殖したウイルスについては、明瞭な CPE がみられるようになるまで HmLu-1 細胞で数回の接種・回収（順化）を行ってから使用する。

力価測定には、一度冷凍保存したウイルスを使用する（他の試験等に使用する同一ロットのウイルスと同じ条件にするため）。前半の作業はクリーンベンチ、後半の作業は安全キャビネットを使用する。あらかじめウォーターバスを 37 °C に設定しておく。

1. クリーンベンチ内で希釈液（MEM + 炭酸水素ナトリウム水溶液 1%）と GIT 培地をガラスボトル等（滅菌処理済）に用意する。

希釈液の液量は 検体数 × 25 mL + 10 mL とし、
GIT 培地の液量は 細胞が中角瓶もしくは T75 フラスコ 1 本の場合、60 mL（96 ウェルマイクロプレート 5~6 枚分）を基本とする。

GIT 培地：牛血清中の細胞増殖促進因子を分取し、その因子と基礎培地を組み合わせた無血清培地。FBS を 10 % 添加した培地と同等の細胞増殖促進効果を有する。細胞培養に使用する牛血清には各種アルボウイルスに対する中和抗体が含まれている可能性があるため、タイトレーションや中和試験には GIT 培地の使用が推奨される。なお、各種アルボウイルスに対する中和抗体を含まない牛血清があれば、その牛血清を通常の培養液に添加してタイトレーションや中和試験に使用することも可能である。

2. 細胞を洗浄、消化、遠心し、細胞浮遊液をガラスボトル等に用意する。
手順はウイルス分離に使用する細胞の準備と同様であるが（滅菌 PBS (-) による洗浄 2 回 → PTE 2~3 mL による消化 → 遠心 200~300 ×g、5 分、室温）、遠心後の細胞は GIT 培地に浮遊させる。その後、細胞浮遊液はクリーンベンチから出し、氷上もしくは 4 °C に静置する。
3. ウイルスの段階希釈用に、希釈液を 1.5 mL マイクロチューブ（滅菌処理済）

に 900 μL ずつ分注する。1 本のウイルスにつき 10 本用意し、分注後はクリーンベンチから出して氷上に静置する。

4. 力価測定を行うウイルス液をウォーターバスで溶かす。溶けた後は、ただちに氷上に置く。

以下、5.~7.を安全キャビネットで作業を行う。

5. ウイルス液を 100 μL 取り、 10^{-1} ~ 10^{-9} まで希釈液で 10 倍段階希釈を行う (写真 38)。



写真 38 ウイルス液の段階希釈をしている様子

6. 各希釈段階について、96 ウェルマイクロプレートの縦 1 列、8 つのウェルに 100 μL ずつ分注する (写真 39)。左側から順に 10^{-1} \rightarrow 10^{-10} となるようにして、(10^{-10} の列から右側に 1 列空けて) 一番右側のコントロールの列には希釈液を 100 μL ずつ分注する。

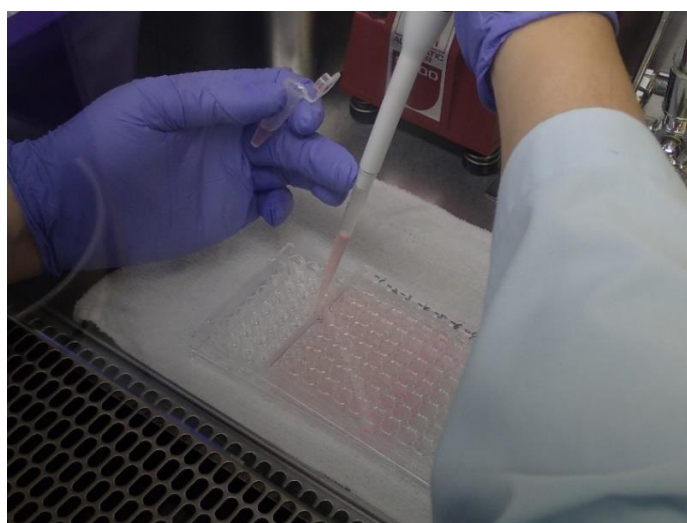


写真 39 希釈ウイルス液を分注している様子

7. すべてのウェルに細胞浮遊液 100 μ L をマルチピペットで添加する（写真 40）。

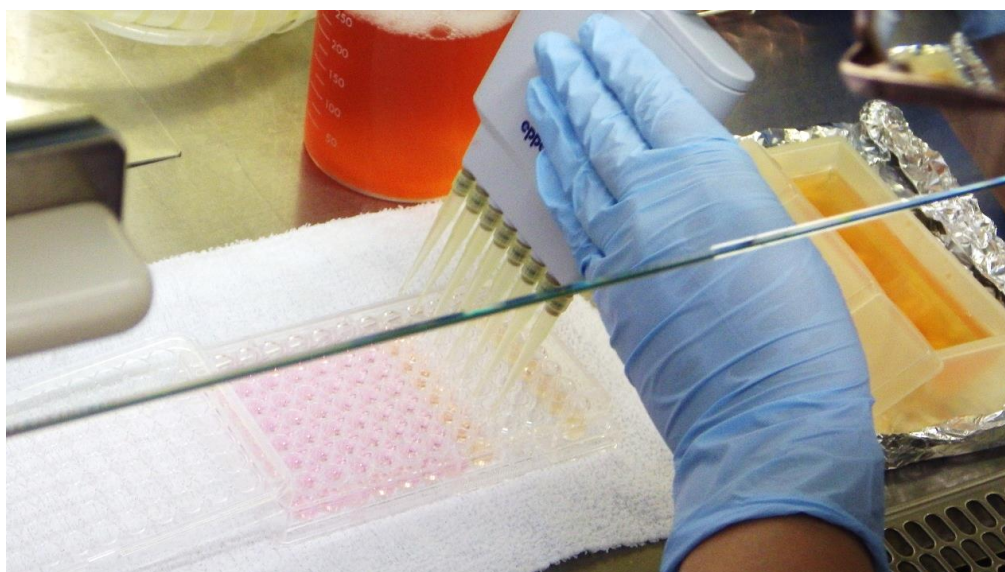


写真 40 細胞浮遊液を分注している様子

8. 細胞の状態を顕微鏡下で観察し、偏りがみられる場合にはプレートミキサー等を使用して細胞の偏りをなくす（写真 41）。その後、37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 で培養する。

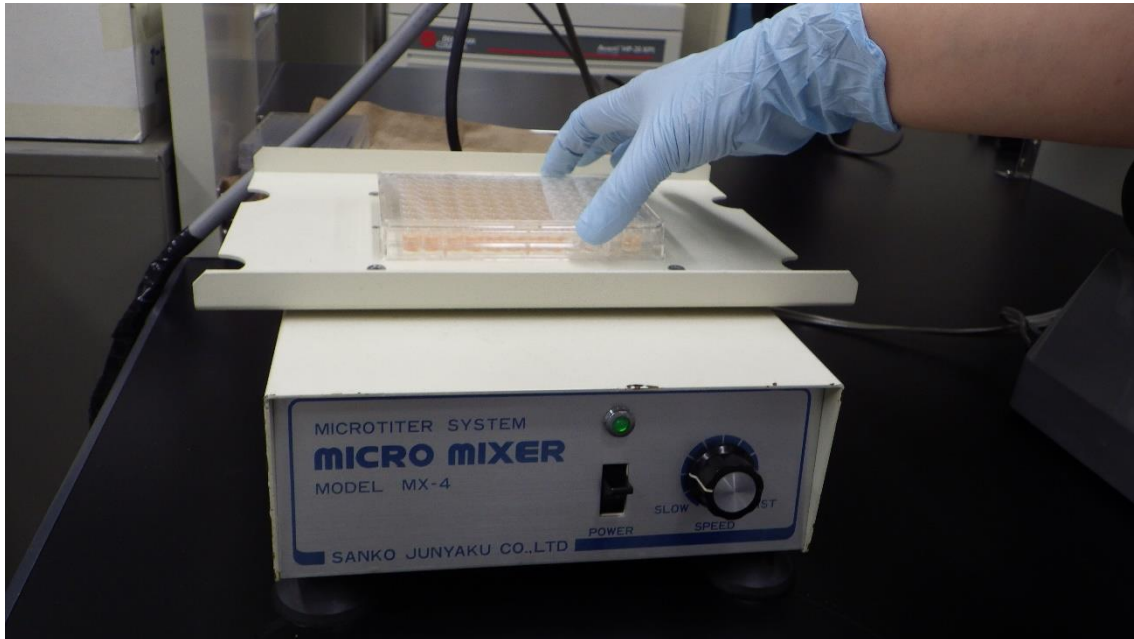


写真 41 プレートミキサーでプレート内の細胞の偏りを取り除いている様子

9. 2～3 日毎に CPE を観察・記録し、接種 7 日後に力価判定を行う。

注意事項、その他

上記の説明では 1.5 mL マイクロチューブを使用して 10 倍段階希釈を「ウイルス液 100 μ L + 希釈液 900 μ L」の液量で行っているが、小試験管（滅菌処理済）を使用して「ウイルス液 200 μ L + 希釈液 1.8 mL」等の液量で 10 倍段階希釈をしても差し支えない。

CPE の有無は 2～3 日毎に観察するが、判定は基本的に接種 7 日後に行う。ウェルの中に少しでも CPE がみられたら CPE 陽性と判定する。

ウイルス力価は Reed & Muench 法 あるいは Kärber 法により計算する。

HmLu-1 細胞と GIT 培地を使用して同時接種法を行う場合、マイクロプレートの製品によって細胞の張り付き方や伸び方が異なるので注意する。よって、本法に適することが確認されたプレートを使用する（例：SUMILON 接着細胞用プレート 96F）。また、GIT 培地はロットによって HmLu-1 細胞の伸び方が若干異なる例もあるため、プレート上での細胞の状態に異常がみられた場合、（可能であれば）異なるロットの GIT 培地の使用を検討する。

同時接種法ができない場合のウイルス力価の測定方法について、その概要を以下に示す。

- ① ウイルス接種の前日に細胞を 96 ウェルマイクロプレートにまいておき (100 μ L / well)、37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂で培養し、接種当日にフルシートの状態にする。
- ② ウイルス接種の直前に細胞の培養液を捨て、細胞洗浄液（ウイルス分離と同様）で 3 回洗浄する。その際、細胞洗浄液をウェルの内壁に伝わらせるように添加する。
- ③ ウイルス液を希釈液で 10 倍段階希釈し、各希釈段階につき 8 つのウェルに 100 μ L ずつ接種する。一番右側のコントロールの列にも希釈液を 100 μ L ずつ分注する。
- ④ 接種 7 日後を目安に力価の判定を行う。

8. 中和試験

本マニュアルでは、HmLu-1 細胞と 96 ウェルマイクロプレートを使用し、同時接種法により中和抗体価を求める手順を示す。

中和試験の攻撃ウイルスとして、同一ロットのウイルス（-80 °C 保存）の力価を測定済みのもを使用する。前半の作業はクリーンベンチ、後半の作業は安全キャビネットを使用する。あらかじめウォーターバスを 37 °C に設定しておく。

1. クリーンベンチ内で希釈液（MEM + 炭酸水素ナトリウム水溶液 1%）と GIT 培地をガラスボトル等（滅菌処理済）に用意する。

希釈液の液量は、

プレートの枚数 × 15 mL

+ ウイルス原液を段階希釈し、200 TCID₅₀/0.1 mL のウイルス液をプレート枚数 × 6 mL 以上用意するのに必要な液量

+ 遠心用のチューブ本数 × 10 mL

を目安とする。

GIT 培地の液量は 細胞が中角瓶もしくは T75 フラスコ 1 本の場合、60 mL（96 ウェルマイクロプレート 5~6 枚分）を基本とする。細胞を複数本使用する場合には、60 mL × 本数分の GIT 培地を使用する。

2. 細胞を洗浄、消化、遠心し、細胞浮遊液をガラスボトル等に用意する。
手順はウイルス分離に使用する細胞の準備と同様であるが（滅菌 PBS（-）による洗浄 2 回 → PTE 2~3 mL による消化 → 遠心 200~300 × g、5 分、室温）、遠心後の細胞は GIT 培地に浮遊させる。その後、細胞浮遊液はクリーンベンチから出し、氷上もしくは 4 °C に静置する。
3. 攻撃ウイルスの希釈用に、希釈液を 1.5 mL マイクロチューブ（滅菌処理済）の必要本数に分注しておく。また、二次検定用として、4 本の 1.5 mL マイクロチューブ（滅菌処理済）に希釈液を 900 μL 入れておき（10 倍段階希釈用）、さらにもう 1 本に希釈液を 500 μL 入れておく（等倍希釈用）。分注後、クリーンベンチから出して氷上に静置する。

4. 力価測定を行うウイルス液をウォーターバスで溶かす。溶けた後は、ただちに氷上に置く。

以下、5.~14.を安全キャビネットで行う。

5. 96 ウェルマイクロプレートの中の中和用ウェル（希釈血清とウイルス液を混和するウェル）すべてに希釈液 50 μL を添加する（写真 42）。



写真 42 希釈液をマルチピペットで分注している様子

6. 96 ウェルマイクロプレートの中の中和用ウェルの先頭列（各希釈血清の列の先頭）に非働化済（56 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分）の被検血清 50 μL を添加する（写真 43）。1 検体あたり 2 列もしくは 4 列を使用する（図 1）。

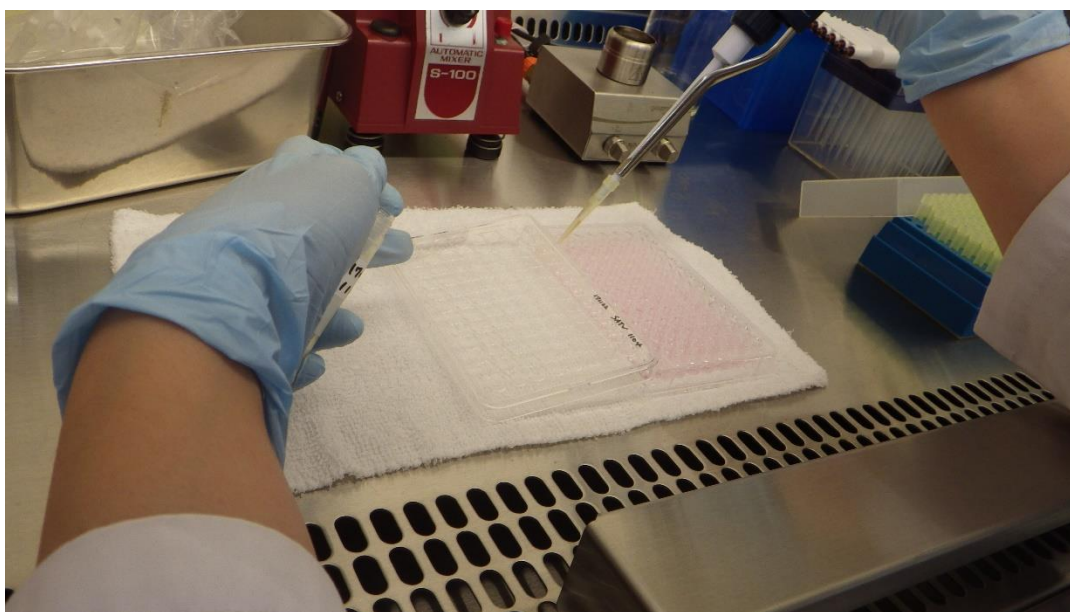


写真 43 血清を添加している様子

【血清希釈倍率】	血清サンプルA	血清サンプルB	血清サンプルC	血清サンプルD	二次検定				【攻撃ウイルス希釈倍率】
×2	Dark Blue	Dark Green	Dark Olive	Dark Purple	Black	Black	Black	Black	10 ⁰
×4	Blue	Green	Olive	Purple	Grey	Grey	Grey	Grey	10 ⁻¹
×8	Blue	Green	Olive	Purple	Grey	Grey	Grey	Grey	10 ⁻²
×16	Blue	Green	Olive	Purple	Grey	Grey	Grey	Grey	10 ⁻³
×32	Blue	Green	Yellow	Pink	White	White	White	White	10 ⁻⁴
×64	Light Blue	Light Green	Yellow	Pink					
×128	Light Blue	Light Green	Yellow	Pink					
×256	Light Blue	Light Green	Yellow	Pink					
					陰性対照 (細胞+培地)				

図 1 中和試験用の 96 ウェルプレート使用例（同一ウイルスを使用して 2 枚以上のプレートを同時に使用する場合、二次検定は 1 枚目のみで可）

7. 続いて、2 倍段階希釈を行う（写真 44）。
 数回のピペッティングにより混和 → 一度すべて吐き出す → 再度 50 μL を吸い取る → 次の列で希釈 この作業を行い、最終列で希釈した後は 50 μL を吸い取り、捨てる。

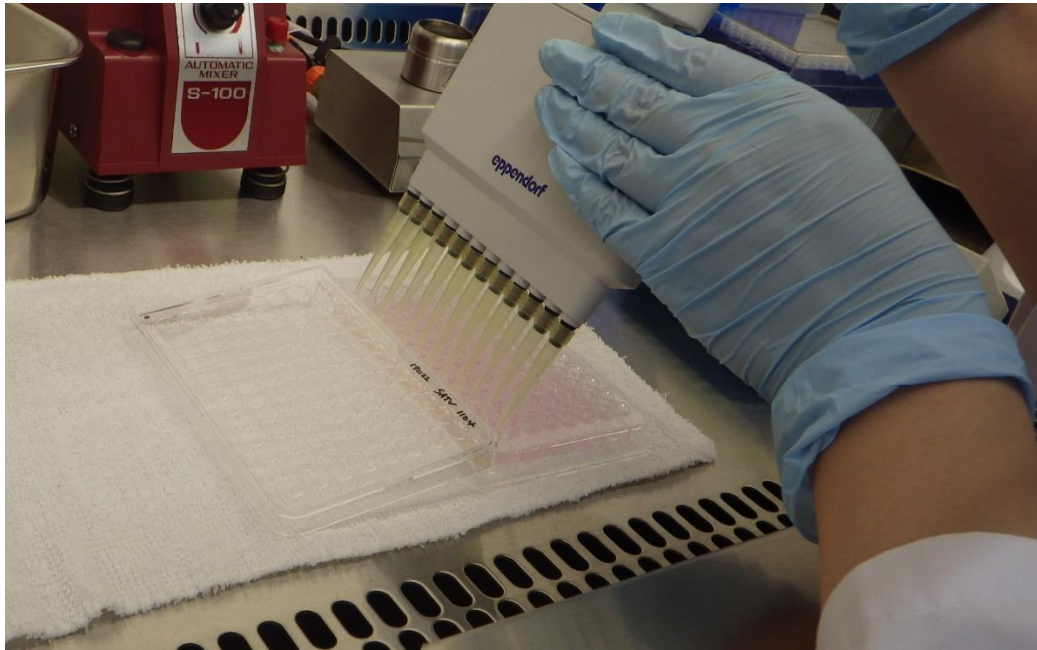


写真 44 血清段階希釈の様子

8. ウイルス液を 200 TCID₅₀/0.1 mL となるように希釈液で希釈し、希釈後は氷上に置く。
9. 希釈したウイルス液を、すべての中和用ウェルに 50 μL ずつマルチピペットで分注する（写真 45）。



写真 45 ウイルス液分注の様子

10. 二次検定用に、希釈液 500 μL の入った 1.5 mL マイクロチューブに希釈したウイルス液 500 μL を加え、ボルテックスで混和する (=二次検定用「 10^0 」)。
11. 希釈液 900 μL の入った 1.5 mL マイクロチューブに、希釈したウイルス液 100 μL を加えてボルテックスで混和する。10 倍段階希釈を「 10^{-1} 」～「 10^{-4} 」まで行う。
12. 二次検定用のプレートあるいはウェルに「 10^0 」～「 10^{-4} 」のウイルス液を 100 μL ずつ添加する。各希釈につき、4 つのウェルを使用する。
13. プレートミキサー等で全体を混和し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、60 分インキュベートする。
14. すべてのウェルに細胞浮遊液 100 μL をマルチピペットで添加する (写真 46)。

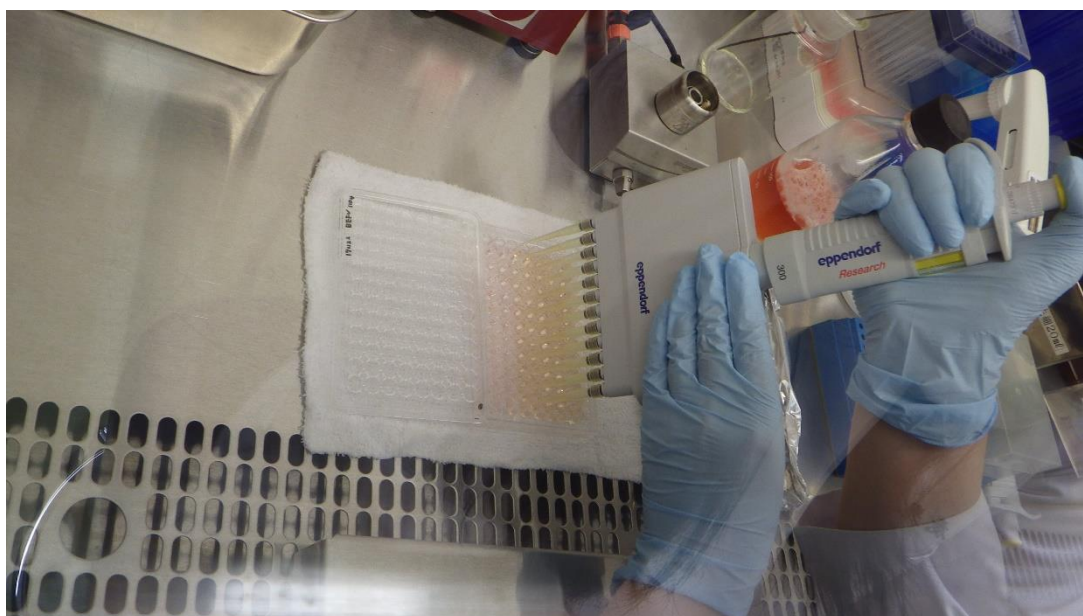


写真 46 細胞浮遊液を添加している様子

15. 細胞の状態を顕微鏡下で観察し、偏りがみられる場合にはプレートミキサー等を使用して細胞の偏りをなくす。その後、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 で培養する。
16. 翌日以降、顕微鏡下で適宜観察して CPE の出現や細胞の異常の有無等を確

認しつつ、7日後に中和抗体価を判定する。

CPE出現阻止（CPEの出現がウェル内の細胞の50%未満）がみられた希釈倍率を中和抗体価とする。

正式な中和抗体価は、Kärber法やReed & Muench法によって算出されるが、通常の検査においては、下表に示すように「2倍」、「4倍」などといった判定方法で差し支えない。

表 中和試験の判定例（「-」と「+」はそれぞれCPE陰性と陽性を表す）

	×2	×4	×8	×16	×32	
血清A	-	-	+	+	+	➡ 4倍
	-	-	+	+	+	
血清B	-	-	+	+	+	➡ 8倍
	-	-	-	+	+	
血清C	-	-	-	+	+	➡ 暫定的に8倍と判定可能 (再試験推奨)
	-	-	+	-	+	
血清D	-	-	+	+	+	➡ 暫定的に8倍と判定可能 (再試験推奨)
	-	-	-	-	+	
血清E	-	-	+	+	+	➡ 再試験 (3管以上の差)
	-	-	-	-	-	
血清F	+	+	+	+	+	➡ 2倍未満
	+	+	+	+	+	

注意事項、その他

攻撃ウイルスを希釈する際、最初の希釈に用いるウイルス原液が微量であると最終的なウイルス力価に誤差が生じやすい。よって、最低でも200 μLの原液を使用する。

二次検定のウイルス力価が $10^{1.5} \sim 10^{2.5}$ TCID₅₀/0.1 mL の範囲に入っていれば、検査は適正と判断できる。上記の範囲外であれば、再試験を行う必要がある。

経験的に、ピートンウイルスではウイルス株によって8倍程度までの牛血清で非特異的なCPEの抑制がみられることがある。ピートンウイルス感染牛でも2~8倍の中和抗体価がみられることもあるため、結果の解釈の際には同居あるいは周辺農場の牛の感染状況等を考慮する。同様に、チュウザンウイルスでも非感染牛で2~8倍程度の中和抗体価がみられることがあるので、結果の解釈には注意する。

同時接種法ができない場合には、前日に細胞を 96 ウェルプレートにまいておき、試験当日に中和反応後のウイルス液＋希釈血清を細胞に接種する方法も可。

上記の説明では 1.5 mL マイクロチューブを使用して 10 倍段階希釈を「ウイルス液 100 μ L + 希釈液 900 μ L」の液量で行っているが、小試験管（滅菌処理済）を使用して「ウイルス液 200 μ L + 希釈液 1.8 mL」等の液量で 10 倍段階希釈をしても差し支えない。

9. 核酸抽出および RT-PCR 法

検査材料（血漿、血球、臓器乳剤、培養上清）からの核酸抽出は、市販の核酸抽出用試薬あるいはキットを使用して行う。

注意すべき点としては、ヘパリン加血液の血漿から核酸を抽出した場合において、ヘパリンによる PCR 阻害効果がみられることである。よって、ヘパリン加血液の血漿から核酸抽出を行う場合、ヘパリン除去能を有する核酸抽出キット等を使用することが望ましい（例：Roche High Pure Viral RNA Kit）。

アルボウイルスの遺伝子を検出する RT-PCR 用のプライマーを以下に示す（配列の向きはすべて 5' - 3'）。下記のプライマーを用いた RT-PCR は、⑨と⑩を除きすべて アニーリング温度 55 °C、PCR サイクル数 35 とする。それ以外の反応条件については、使用する RT-PCR キットの推奨条件を適用する。

- ① 旧シンプ血清群 [加藤ら. 動衛研研究報告 (2013) 改変]
(アカバネ、アイノ、ピートン、サシュペリ、シャモンダウイルスを含む)
Forward “AKAI206F” CACAACCAAGTGTTCGATCTTA
Reverse “SimbuS637-656R ver. 2” GAGAAKCCWGATTTTRGCCCA
増幅産物 484 bp
- ② 流行性出血病ウイルス群 [②～④ Ohashi *et al.*, J Virol Methods (2004)]
Forward “EP3U1416F” CAGCGCYWTATWCGATATTG
Reverse “E31931R” TCCGGAGATACCTCCATTAC
増幅産物 533 bp
- ③ パリアム血清群 (チュウザン、ディアギュラウイルス)
Forward “EP3U1416F” CAGCGCYWTATWCGATATTG (②と同一)
Reverse “P31593R” ATGTGATACGGCAACATTGC
増幅産物 167 bp
- ④ ブルータンゲウイルス
Forward “BTVL3-1” CCTGATGTTTCCAGGACAAATTATACTC
Reverse “BTVL3-2” CCGATAAAGGCAAACCAAGCGAAATCC
増幅産物 708 bp

上記①、②、③、④は1つのチューブに混和してマルチプレックス RT-PCR を行うことが可能である。

⑤ アカバネウイルス [⑤～⑦ 山川, 白藤. 鹿児島県獣医師会会報 (2012)]
Forward “AKAVM-F” AAGCAAGAGGAATGCAGCTCTACA
Reverse “AKAVM-R” CTGTTTTGAGGAGTCGAATAGACC
増幅産物 664 bp

⑥ アイノウイルス
Forward “AINOVM-F” TGCTATAGCCCCTTCATACATTGG
Reverse “AINOVM-R” TGGCATGTTTGCAGTGGTTACAGT
増幅産物 568 bp

⑦ ピートンウイルス
Forward “PEAVM-F” CCTTCCATACGCCATTTAGGTGA
Reverse “PEAVM-R” TGCTCATCACATTCAGATGA
増幅産物 488 bp

上記⑤、⑥、⑦は1つのチューブに混和してマルチプレックス RT-PCR を行うことが可能である。

⑧ 牛流行熱ウイルス [Niwa *et al.*, J Vet Med Sci (2015)]
Forward “BEF-AO-F” GAATCATTATGGGATCGGATC
Reverse “BEF-AO-R” CCAACCTACAACAGCAGATAAAAC
増幅産物 448 bp

⑨ サシュペリウイルス 【アニーリング温度 57 °C、PCR サイクル数 35】
M-Forward “SATV_M_F4” CCACTTAAGGAAGGCACTAGAG
M-Reverse “SATV_M_R5” GATTGCATGAATGCCAATCC
増幅産物 220 bp

⑩ シャモンダウイルス 【アニーリング温度 57 °C、PCR サイクル数 35】
M-Forward “SHAV_M_F4” GTATTATGTCAACTGTGCATTC
M-Reverse “SHAV_M_R” GAGACTTCATCTGAGCTTAG
増幅産物 382 bp

- ⑪ チュウザンウイルス
Forward “CHUV2-F” TCGGATGATAGGATTGTGCG
Reverse “CHUV2-R” GCTTCTTCCATTCTTCATCG
増幅産物 547 bp
- ⑫ ディアギュラウイルス
Forward “DAGV4-F” ATTTACGGGTATGGTCAGAG
Reverse “DAGV4-R” CTAACAGCRATATTGACAC
増幅産物 315 bp

注意事項

オルビウイルス属の流行性出血病、ブルータング、チュウザン、ディアギュラウイルスは、ゲノムとして2本鎖RNAを有するため、逆転写（RT）反応開始時に1本鎖RNAを遊離させる必要がある。よって、RT反応前に検体（RNA）の熱変性（98℃、5分）を行い（写真47）、直後に氷上で急冷し、そのまま氷上に3分間以上静置する（写真48）。その後、氷上に置いたままで試薬類と混和し、RT-PCRに使用する。なお、熱変性を行った後に室温に戻すと、RNAが再度二本鎖の状態に戻るのに注意する。熱変性に用いるRNA液量が5μL以下の場合、dNTP、プライマーやDW（RNase-free water）をあらかじめ混和するなどしてチューブ内の液量を多くする。



写真 47 熱変性処理を行うため、RNA およびプライマーの入った PCR チューブを 98℃に設定したサーマルサイクラーに入れる様子



写真 48 熱変性処理後に PCR チューブを氷上に置く様子

参考として、①、②、③、④のプライマーを同時に使用したマルチプレックス法の手順を以下に示す（QIAGEN OneStep RT-PCR Kit を使用して 25 μ L の系で実施した場合）。

1. 以下のプライマーミックスを作り、混和する。

	$\times 1$	$\times n$
Forward primer (AKAI206F, 50 μ M)	0.5	
Reverse primer (SimbuS637-656 ver. 2, 50 μ M)	0.5	
Forward primer (EP3U1416F, 50 μ M)	0.5	
Reverse primer (E31931R, 50 μ M)	0.5	
Reverse primer (P31593R, 50 μ M)	0.5	
Forward primer (BTVL3-1, 50 μ M)	0.5	
Reverse primer (BTVL3-2, 50 μ M)	0.5	
Total per reaction (μ L)	3.5	

2. プライマーミックス 3.5 μ L を PCR チューブ/プレートに入れる。

3. PCR チューブ/プレートに検体 (RNA) を 5 μ L 入れる。

4. PCR チューブ/プレートを 98 $^{\circ}$ C で 5 分インキュベートする (熱変性)。

5. PCR チューブ/プレート を氷上に移し、3 分以上静置する。

6. 以下のマスターミックスを作り、混和する（熱変性処理前の準備も可）。

	× 1	× <i>n</i>
5 × QIAGEN OneStep RT-PCR buffer	5	
dNTP Mix	1	
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1	
RNase Inhibitor, 40 U/μL (optional)	1	
Nuclease-free water	8.5	
Total per reaction (μL)	16.5	

7. 熱変性処理済みの RNA とプライマーミックスが入った PCR チューブ/プレートに、マスターミックス 16.5 μL を加え、2~3 回ピペティングして混和する。

8. PCR チューブ/プレートの蓋を閉じて、スピンドウンする。

9. 以下の条件で RT-PCR を行う。

	温度	時間	
Reverse transcription	50 °C	30 min	
PCR activation step	95 °C	15 min	
Denaturation	94 °C	30 sec	35 cycles
Annealing	55 °C	30 sec	
Extension	72 °C	1 min	
Final extension	72 °C	10 min	
	10 °C	∞	

10. アガロースゲル（1.5 %）電気泳動により PCR 産物を観察する。

10. リアルタイム RT-PCR 法

多検体を効率的に検査する手段として、いくつかのアルボウイルスに対するリアルタイム RT-PCR 法も開発されている。本マニュアルでは、旧シンプ血清群、アカバネウイルス、アイノウイルス、ピートンウイルスを検出するプライマー・プローブセットを示す（配列の向きはすべて 5' – 3'）。

- ① 旧シンプ血清群検出用プライマー・プローブセット（アカバネ、アイノ、ピートン、サシュペリ、シャモンダ、シュマレンベルクウイルスを検出可能）

Forward “Simbu1_F” TCAACCAGAAGAAGGCCAAGAT
Reverse “Simbu1_R” GGGAAAATGGTTATTAACCACTGTAAA
Probe “Simbu1_Probe” [FAM] TAAGACGGCACAACCAAGTGT [BHQ1]
増幅産物 104 bp

- ② アカバネウイルス特異的検出用プライマー・プローブセット

Forward “Simbu1_F” TCAACCAGAAGAAGGCCAAGAT (①と同一)
Reverse “Simbu1_R” GGGAAAATGGTTATTAACCACTGTAAA (①と同一)
Probe “AKAV_S2_Probe” [HEX] TTACATAAGACGCCACAACCA [BHQ1]
増幅産物 104 bp

- ③ アイノウイルス特異的検出用プライマー・プローブセット

Forward “AINOV1-2F” GCGTGAAGGGACAACCTGGTTC
Reverse “AINOV1-2R” CTCCATTGGACTTAATTATCG
Probe “AINOV1-3_Probe” [HEX] TGCTACTAATGTGCCAGCAGAAGTC [BHQ1]
増幅産物 125 bp

- ④ ピートンウイルス特異的検出用プライマー・プローブセット

Forward “PEAV6F” GTCGACGAGTATTGCTTATCATC
Reverse “PEAV6R-2” CATTGTGGACAACCTTAGTTTGGC
Probe “PEAV6_Probe” [FAM] AATTTAAAGTCTTGTACTTGGC [BHQ1]
増幅産物 130 bp

[①～④ Shirafuji *et al.*, J Virol Methods (2015)]

2 種類のレポーター色素を同時に検出可能なリアルタイム PCR 装置を使用した場合、上記の①と②の組み合わせ、③と④の組み合わせでそれぞれマルチプレックス法が可能である。①と②の組み合わせの場合、プライマーは“Simbu1_F”

と“Simbu1_R”の1組を入れ、“Simbu1_Probe”と“AKAV_S2_Probe”の両プローブを1つのチューブに入れればよい。③と④の組み合わせの場合、上記4つのプライマーと2つのプローブをすべて1つのチューブに入れる。

本法では、レポーター色素としてFAMとHEXの使用例を示しているが、他のレポーター色素でも実施可能である（但し、互いに干渉しない色素の組み合わせで使用する）。また、プライマー・プローブセットを1組のみ使用する場合、BHQ1以外（TAMRA等）のクエンチャー色素を使用しても差し支えない。

本法を含む各種アルボウイルスのリアルタイムRT-PCR法では、使用するキットにより感度の違いが比較的大きいので注意する。

本法におけるマスターミックスの例を以下に示す（SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) を使用した場合）。なお、本法では各検体および対照につき2ウェルを使用する。

	× 1	× n
2 × Reaction Mix	12.5	
Forward primer (SimbuS_TaqMan_F: 50 μM)	0.2	
Reverse primer (SimbuS_Taqman_R: 50 μM)	0.2	
TaqMan probe (Simbu1_Probe: 10 μM) FAM-BHQ	0.3	
TaqMan probe (AKAV_S2_Probe: 10 μM) HEX-BHQ	0.3	
Superscript III RT/Platinum Taq Mix	0.5	
RNase Inhibitor, 40 U/μL (optional)	1	
Nuclease-free water	8	
Total per reaction (μL)	23	

マスターミックス 23 μL に検体（RNA）2 μL を加えて、ピペッティングにより混和する。続いて、以下の条件でRT-PCRを行う（SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit を使用し、装置は MyiQ₂ (BIO-RAD) を使用した場合：写真 49）。

	温度	時間	
Reverse transcription	50 °C	15 min	40 cycles
Inactivation of RT enzyme/initial denaturation	95 °C	2 min	
Denaturation	95 °C	15 sec	
Annealing/extension	60 °C	30 sec	

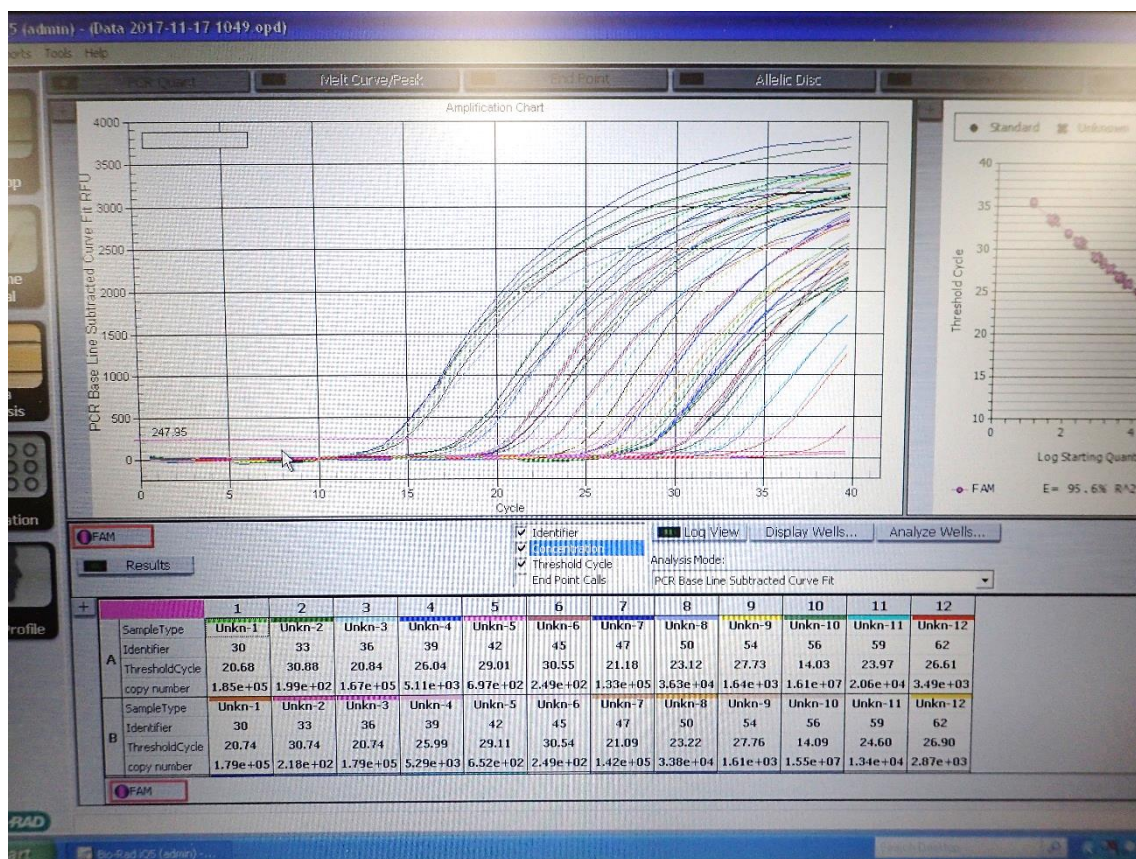


写真 49 リアルタイム PCR の結果を示すグラフの一例

検査における注意事項

1 検体当たり 2 つのウェルを使用して検査を行う。判定の目安として、 Ct 値 15~35 を陽性とする。 Ct 値が 35 を上回る場合には再試験を行い、同様の値となった場合には本法による判定は保留する。

1 1. 検査結果の解釈について

基本的には、以下の6つの項目について得られた情報を総合して診断する。

- ① 症状
- ② 肉眼病変
- ③ 組織病変（免疫組織化学的染色による結果を含む）
- ④ ウイルス学的検査結果（ウイルス分離、RT-PCR）
- ⑤ 抗体検査
- ⑥ 疫学的考察（発生時期、同一農場や周辺での発生の有無、おとり牛の抗体陽転の有無）

上記⑥に関して、アルボウイルスによる流産や熱性疾患、アカバネウイルスによる脳脊髄炎はウイルスの伝播時期である夏～秋の発生が多いのに対し、アルボウイルスによる早産、死産や体形異常子の出産は冬～春にかけて発生が多い傾向がある。また、検査の際には以下の点についても留意する。

異常産

体形異常子では、移行抗体の影響を取り除くため、初乳未摂取の子牛から血清を採取して抗体検査を行う。

流産・死産例では、脳脊髄液や胎子の体液（胸水や腹水）も抗体検査に使用可能だが、血清と比較して低い抗体価となることが多い。

ウイルスの活動期に発生した流産であれば胎子からウイルスが検出される可能性は高いものの、ウイルスの活動期から疾病発生まで数ヶ月が経過している死産や体形異常の例ではウイルスの検出は困難な例が多い。しかしながら、死産胎子からアルボウイルスの遺伝子が検出された例もあることから、アルボウイルスが原因と疑われる症例ではウイルス遺伝子の検出を試みることを望ましい。但し、検体が腐敗している場合には核酸が変性しているため検査には適さない。

ピートン、サシュペリ、シャモンダウイルスは牛異常産への関与が強く疑われているが、不明な点が数多く残されている。そのため、前述の①～⑥の情報を総合し、これらのウイルス感染が原因となって生じた症例であるかどうかを考察する。

脳脊髄炎（アカバネウイルスによるもの）

ウイルスは脳より脳幹部や脊髄から分離あるいは検出されることが多い。

熱性疾患（流行性出血病ウイルス、牛流行熱ウイルス）

流行期に発症牛だけでなく同居牛からも血液を採取しておき、ウイルス分離やウイルス遺伝子の検出を試みることを望ましい。

豚におけるアカバネウイルス感染について

症例数は少ないものの、豚においてアカバネウイルス（Genogroup 1, Iriki タイプ）が原因と考えられる異常産や脳脊髄炎が日本国内で報告されている。病態は牛における症例と類似していることから、牛と同様の検査項目を実施する。

サーベイランスにおける抗体検査について

サーベイランスの検査対象となる「おとり牛」を含む若齢牛では、3.7～4.8 ヶ月齢までは母牛からの移行抗体が検出されることがあるので（Tsutsui *et al.*, 2009）、判定の際にはこのことに留意する。また、イバラキ病等に対するワクチン接種を受けていないか、予め確認する。野外感染の有無は、複数回の採血によって得られた血清における抗体陽転あるいは抗体価の上昇をもって判定する。

1 2. 参考文献

Ohashi, S., Yoshida, K., Yanase, T., Kato, T., Tsuda, T. Simultaneous detection of bovine arboviruses using single-tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 120, 79-85. 2004.

Niwa, T., Shirafuji, H., Ikemiyagi, K., Nitta, Y., Suzuki, M., Kato, T., Yanase, T. Occurrence of bovine ephemeral fever in Okinawa Prefecture, Japan, in 2012 and development of a reverse-transcription polymerase chain reaction assay to detect bovine ephemeral fever virus. *J Vet Med Sci* 77, 455-460. 2015.

Shirafuji, H., Yazaki R., Shuto, Y., Yanase, T., Kato, T., Ishikura, Y., Sakaguchi, Z., Suzuki, M., Yamakawa, M. Broad-range detection of arboviruses belonging to Simbu serogroup lineage 1 and specific detection of Akabane, Aino and Peaton viruses by newly developed multiple TaqMan assays. *J Virol Methods* 225, 9-15. 2015.

山川睦, 白藤浩明. 家畜アルボウイルス感染症診断における遺伝子検査法の活用と実際. 鹿児島県獣医師会会報 49, 8-9. 2012.

加藤友子, 松本春菜, 平島宣昌, 白藤浩明, 山川睦, 梁瀬徹. 国内で分離されたオルソブニヤウイルスを検出するための RT-PCR 法の改良. 動衛研研究報告 119, 47-52. 2013.

全国家畜衛生職員会. 病性鑑定マニュアル第3版. 農林水産省消費・安全局監修. 2008.

Tsutsui, T., Yamamoto, T., Hayama, Y., Akiba, Y., Nishiguchi, A., Kobayashi, S., Yamakawa, M. Duration of maternally derived antibodies against Akabane virus in calves: Survival analysis. *J Vet Med Sci* 71, 913-918. 2009.

本マニュアルは、平成 25～29 年度農林水産省委託プロジェクト研究「食品の安全性と動物衛生の向上のためのプロジェクト（重要家畜疾病の侵入・まん延防止技術の開発）」において作成されました。

平成 30 年 4 月 12 日

作成担当者：農研機構動物衛生研究部門 越境性感染症研究領域
暖地疾病防除ユニット（九州研究拠点） 白藤浩明、梁瀬 徹