

電気泳動後、UV ライト上でバンドのサイズを確認して血清型を決定する。泳動液は Tris-acetate-EDTA でも良い。我々はミューピッドの電気泳動装置を使用している。

表 PCRプライマー塩基配列

Primer 名	Sequence (5'-3')	Position	Sizu(bp)	serotype
Beg 9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1-28		
End 9	GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG	1062-1036		
RVG 9	GGTCACATCATAACAATTCT	1062-1044	1062	
aAT 8	GTCACACCATTTGTAAATTTCG	178-198	885	8
aBT 1	CAAGTACTCAAATCAATGATGG	314-335	749	1
aCT 2	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	411-435	652	2
aDT 4	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	480-498	583	4
aET 3	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	689-709	374	3
aFT 9	CTAGATGTAACACTACAACACTAC	757-776	306	9

## ウイルスの分離培養

培養細胞による下痢症ウイルスの分離培養は A 群と C 群ロタウイルス, アストロウイルスおよびアデノウイルスで成功している。下痢症がロタウイルスに起因するかどうかを検査するには前述のような方法があり, 培養細胞を用いた分離培養はほとんど行われなくなっている。しかし特別な目的や大量のウイルスを必要とする研究には分離培養を試みることになる。

A 群ロタウイルスの培養には初代サル腎細胞, MA104細胞 (アカゲザル腎由来株化細胞) が使われていた。近年 CaCo2細胞 (ヒト大腸癌由来株化細胞) を用いた C 群ロタウイルスの分離培養が報告され<sup>5)</sup>, CaCo2細胞は A 群ロタウイルスにも良い感受性を示すことが観察された。また CaCo2細胞はアストロウイルスの分離培養にも使用され, 腸炎アデノウイルスの培養には Graham293細胞が一般的に用いられている。

ここでは CaCo2細胞を用いたロタウイルスの分離方法を記す。

### 1. 器具および試薬

ガラスホモジナイザー

組織培養用ローラーチューブまたはボトル

回転培養器または振盪培養器

0.45 $\mu$ m フィルター

Eagle's MEM 培地

GIT 培地 (和光純薬株式会社)

牛胎児血清

アセチル化トリプシンまたはトリプシン III (Sigma 製)

ラテックス凝集または ELISA キット

PBS または蒸留水

HCFC-141b (ダイキン工業) またはクロロホルム

### 2. 分離方法

- 1) 10~20%便乳剤に HCFC-141b またはクロロホルムを等量加え, 完全に混じるまで攪拌し, 3,000rpm 10分間遠心, 遠心上清を接種材料とする。
- 2) 材料中のウイルス粒子またはウイルス抗原の検出を行う (電顕, ラテックス凝集法, ELISA 法など)。
- 3) ロタウイルス陽性材料を用いる。接種材料を0.45 $\mu$ m のフィルターで濾過し, 20

$\mu\text{g/ml}$  のトリプシンを等量加え、 $37^{\circ}\text{C}$  20分間処理する。

- 4) 3%牛胎児血清加GIT培地で培養したCaCo2細胞をEagle's MEM培地で2回洗い、0.2mlのトリプシン処理接種材料を少なくとも2本のチューブまたはボトル1~2本に接種し、 $37^{\circ}\text{C}$  1時間、吸着させる。15分毎に接種液で細胞面を被うように軽くゆする。
- 5) 接種材料を完全に取り除く。
- 6) ( $1\sim 4\mu\text{g/ml}$ )トリプシンを含む維持培地(Eagle's MEM)1~2mlを加えて、 $37^{\circ}\text{C}$ で回転培養または振とう培養する。トリプシン濃度は使用する細胞とトリプシンのLotによって異なるので、予め試験を行い細胞が1週間程度維持できる最大量を用いる。
- 7) 6~7日間培養し、細胞変性を観察する。細胞変性の有無にかかわらず1回は必ず継代する。
- 8) 凍結融解を2回行い、同材料を接種したチューブまたはボトルの培養液をプールして、次回への接種材料とする。
- 9) 新しいCaCo2細胞へ各検体0.2mlずつ接種し、1時間の吸着後、接種材料を除いてトリプシン加維持培地を加え、 $37^{\circ}\text{C}$ で回転または振とう培養する。

細胞変性の出現に3~4回の継代を必要とする場合もある。ウイルスの増殖はラテックス凝集法またはELISA法で確認する。

MA104細胞を使用して分離を行う場合は、維持培地に加えるトリプシン濃度をCaCo2細胞の場合より高くした方がよいようである。また継代のたびに接種材料を必ずトリプシン処理することが必要である。初代サル腎細胞は一般には入手困難であるが、使用する場合はCaCo2細胞の方法に準じる。

アストロウイルスの分離培養は、ロタウイルスの場合とほぼ同様であるが、吸着時間を2時間にする。

#### CaCo2細胞使用上の注意事項

1. プラスチックボトルを使用した方がよい。
2. 細胞継代にトリプシンを用いない方がよい(A群およびC群ロタウイルス、アストロウイルスの分離培養の場合)。
3. 完全にシートになり、細胞が完全に分化していることを確認してから使用する。分化していないと細胞数が少ない。

## 継代方法の例

1. 培養液を完全に除く。
2. PBS(-)+0.02%EDTA 液で2回洗う。
3. ピペットで少量の GIT 培地を細胞面に強く吹きつけ細胞を剥離させる。ピペッティングで細胞を出来るかぎり細かくする。ピペッティングをするとき、培地に FCS が入っていると泡立つので、加えない方がよい。
4. 3%FCS 加 GIT 培地で細胞を 1 : 3 ~ 1 : 4 にして新しいボトルに入れ、培養する (6 ~ 10日 でフルシートとなる)。

## 文 献

1. Taniguchi K. et al., J. Infect. Dis. 155, 1159-1166 (1987)
2. Urasawa S. et al., Microbiol, Immunol. 32, 699-708 (1988)
3. Laemmli U.K., Nature (London) 227, 680-685 (1970)
4. Gouvea V. et al., J. Clin. Microbiol. 28, 276-282 (1990)
5. 大瀬戸光明 医学のあゆみ 168(2) 177-178 (1994)

## ウイルス性下痢症診断マニュアルの配付について

このマニュアルは衛生微生物技術協議会の下部組織として設置されているレファレンス委員会の指針に従い、国立感染症研究所ウイルス第二部がとりまとめたものです。

部数に限りがありますので、各研究機関で一冊だけお持ち下さい。

また、中に添付してある返信用紙を記入していただき後日返送して下さい。このマニュアルは適宜バージョンアップしてゆく予定ですが、改訂版をお送りする際の宛名としても重要ですので返信用紙の返送をお願い致します。E-mailでお送りいただいても結構です。

### 返信用紙返送先

国立感染症研究所ウイルス第二部

武田 直和

〒162-8640 新宿区戸山 1-23-1

Phone: 03-5285-1111 (ext.2522)

Fax: 03-5285-1161

E-mail: ntakeda@nih.go.jp

## 返信用紙

マニュアルをお持ちになった方の、

1. 所属機関名
2. 所属機関の郵便番号と住所  
〒
3. 所属機関の電話番号
4. 所属機関のファックス番号
5. 連絡者名
6. 連絡者の E-mail アドレス

### 返信用紙返送先

国立感染症研究所ウイルス第二部

武田 直和

〒162-8640 新宿区戸山 1-23-1

Phone: 03-5285-1111 (ext.2522)

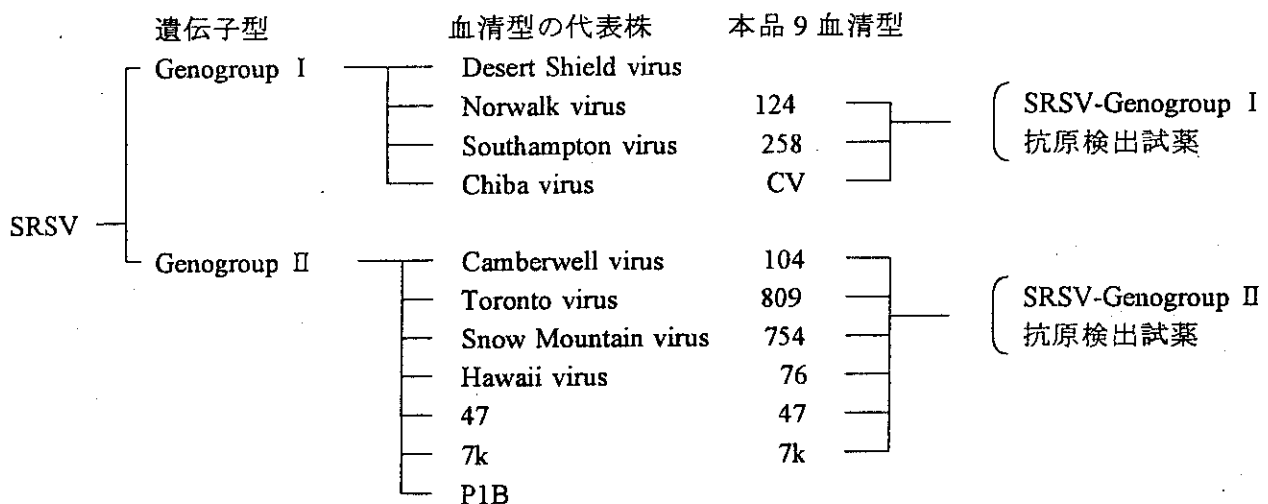
Fax: 03-5285-1161

E-mail: ntakeda@nih.go.jp

## EIA 法による SRSV 抗原検出用キット S R S V - E I A

本品は、マイクロプレートに抗 SRSV 抗体を固相し、捕捉された SRSV をペルオキシダーゼ標識抗 SRSV 抗体で検出する EIA 試薬です。

SRSV-Genogroup I 抗原検出試薬は、下記の血清型のうち、Genogroup I の 3 血清型に対する抗体を混合して用いた EIA 試薬です。また Genogroup II 抗原検出試薬は、下記の血清型のうち、Genogroup II の 6 血清型に対する抗体を混合して用いた EIA 試薬です。これら 9 血清型に対する抗体は、組換えバキュロウイルスで作製された 9 血清型の SRSV 中空ウイルス粒子 (VLPs) を免疫抗原として得られたものです。以下に血清型の代表株と本品 9 血清型についての関係を示します。



### 【特徴】

1. SRSV を特異的に検出します。
2. 反応時間、洗浄の時間も含めて約 3 時間で全操作を終了できます。

### 【キットの構成】

1. 抗 SRSV-G I 抗体固相プレート 8 ウェル×12 本 (1 プレート)  
 抗 SRSV-Genogroup I ポリクローナル抗体 (ウサギ) (0.08ug/ウェル) を固相したもので、防腐剤としてアジ化ナトリウムを 0.08w/v % 含みます。  
 (SRSV-Genogroup I 検出用)
2. 抗 SRSV-G II 抗体固相プレート 8 ウェル×12 本 (1 プレート)  
 抗 SRSV-Genogroup II ポリクローナル抗体 (ウサギ) (0.08ug/ウェル) を固相したもので、防腐剤としてアジ化ナトリウムを 0.08w/v % 含みます。  
 (SRSV-Genogroup II 検出用)

3. 対照プレート 8 ウェル×24 本 (2 プレート)  
 正常ウサギグロブリン (0.08ug/ウェル) を固相したもので、防腐剤としてアジ化ナトリウムを 0.08w/v % 含みます。
4. 緩衝液 500mL 1 本  
 塩化ナトリウム 0.85w/v %、ウシ血清アルブミン 0.5w/v % 及び Tween20 0.05vol % を含むリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液です。
5. 陽性コントロール G I 2.0mL 1 本  
 SRSV-Genogroup I の中空ウイルス粒子を至適濃度に希釈した溶液で、防腐剤としてアジ化ナトリウムを 0.08w/v % 含みます。  
 (SRSV-Genogroup I 検出用)
6. 陽性コントロール G II 2.0mL 1 本  
 SRSV-Genogroup II の中空ウイルス粒子を至適濃度に希釈した溶液で、防腐剤としてアジ化ナトリウムを 0.08w/v % 含みます。  
 (SRSV-Genogroup II 検出用)
7. 酵素標識抗体 G I 0.45mL 1 本  
 ペルオキシダーゼ標識抗 SRSV-Genogroup I ポリクローナル抗体 (ウサギ) を含むリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液です。  
 (SRSV-Genogroup I 検出用)
8. 酵素標識抗体 G II 0.45mL 1 本  
 ペルオキシダーゼ標識抗 SRSV-Genogroup II ポリクローナル抗体 (ウサギ) を含むリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液です。  
 (SRSV-Genogroup II 検出用)
9. 基質液 22mL 2 本  
 3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン (0.3mg/mL)、過酸化水素 0.0075vol % を含む溶液です。
10. 洗浄原液 500mL 1 本  
 塩化ナトリウム 8.5w/v %、Tween20 0.5vol % を含むリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液です。
11. 反応停止液 12mL 4 本  
 0.3mol/L の硫酸溶液です。
- 添付品  
 プレートホルダー 4 枚

#### 【使用目的】

ヒト糞便中の SRSV 抗原の検出

#### 【測定原理】

マイクロプレートを用いた E I A 法であり下記の各ステップよりなります。

- ①一次反応：検体中の SRSV 抗原がマイクロプレートウェル中の抗 SRSV 抗体 (ウサギ) と結合し、複合物を形成します。
- ②二次反応：ペルオキシダーゼ標識抗 SRSV 抗体 (ウサギ) を加えるとマイクロプレートウェル中の SRSV 抗原と結合して抗 SRSV 抗体 (ウサギ) - SRSV 抗原 - ペルオキシダーゼ標識抗 SRSV 抗体 (ウサギ) 複合物を形成します。
- ③酵素反応：基質液を加えると、マイクロプレート中のペルオキシダーゼにより呈色します。この吸光度を波長 450nm/630nm で測定します。



## 【操作法】

### 1. 準備する器具など

- |                        |                                     |
|------------------------|-------------------------------------|
| 1) メスピペット 1mL、5mL、10mL | 5) マイクロプレート用ミキサー                    |
| 2) メスシリンダー             | 6) マイクロピペット 5 $\mu$ L ~ 200 $\mu$ L |
| 3) 三角フラスコ (洗浄液調製用)     | 7) オートリーダー (マイクロプレート用比色計)           |
| 4) 小試験管 (検体希釈用)        | 8) 精製水                              |

### 2. 試薬の調製

試薬名	調製方法	調製試薬液	調製後の保存期間
抗 SRSV-G I 抗体固相プレート	ウェルの中に入っている液を除去し使用します		
抗 SRSV-G II 抗体固相プレート	ウェルの中に入っている液を除去し使用します		
対照プレート	ウェルの中に入っている液を除去し使用します		
緩衝液	そのまま使用します		
陽性コントロール G I	そのまま使用します		
陽性コントロール G II	そのまま使用します		
酵素標識抗体 G I	検体数に応じて緩衝液で 100 倍に希釈します	酵素標識抗体液 G I	酵素標識抗体液 G I は当日中に使用します。
酵素標識抗体 G II	検体数に応じて緩衝液で 100 倍に希釈します	酵素標識抗体液 G II	酵素標識抗体液 G II は当日中に使用します。
基質液	そのまま使用します		
洗浄原液	検体数に応じて精製水で 10 倍に希釈します	洗浄液	洗浄液は当日中に使用します
反応停止液	そのまま使用します		

### 3. 検体の調製

- (1) 採取した糞便に 2.5w/v% VEAL INFUSION BROTH 又は 2.5w/v% HEART INFUSION BROTH を加え、良く攪拌し 10% 懸濁液とします。
- (2) 10% 懸濁液を 1.5mL 容遠心チューブに移し、2 ~ 10 °C で 15000 rpm × 10 分間遠心します。
- (3) 上清を回収して、そこに等量の緩衝液を加え希釈検体とします。

### 4. 操作法

検体数に応じてパックから抗 SRSV-G I 抗体固相プレート、抗 SRSV-G II 抗体固相プレート及び対照プレートを取り出し、測定用プレートホルダーにはめ込みます。

SRSV-Genogroup Iを検出する場合は、抗 SRSV-G I 抗体固相プレート及び対照プレートを SRSV-Genogroup IIを検出する場合は、抗 SRSV-G II 抗体固相プレート及び対照プレートを使用します。そのときウェルの中に入っている液は除去し、残液は清潔なペーパータオル上で逆さにして叩き、ウェルから液を完全に除去します。希釈検体、ブランクは各 1 ウェルずつ、陽性コントロールは各 2 ウェル用意します。尚、Genogroup が不明な検体を用いるときは、抗 SRSV-G I 抗体固相プレート、抗 SRSV-G II 抗体固相プレート及び対照プレートを使用して下さい。

#### <ステップ 1> 希釈検体及び陽性コントロールの滴加

##### 1) ① SRSV-Genogroup I を検出する場合

抗 SRSV-G I 抗体固相プレート及び対照固相プレートに、希釈検体、陽性コントロール G I を 100 $\mu$ L ずつ加えます。

##### ② SRSV-Genogroup II を検出する場合

抗 SRSV-G II 抗体固相プレート及び対照固相プレートに、希釈検体、陽性コントロール G II を 100 $\mu$ L ずつ加えます。

2) ラップ又はアルミ箔等で覆い、常温 (15 $^{\circ}$ C $\sim$ 25 $^{\circ}$ C) に 1 時間静置します。

#### <ステップ 2> 酵素標識抗体液の滴加

1) 各ウェルの反応液を吸引除去します。

2) 各ウェルに洗浄液を約 200 $\mu$ L 加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、再び液を吸引除去します。この洗浄操作を更に 2 回繰り返します。残液は清潔なペーパータオル上で逆さにして叩き、ウェルから洗浄液を完全に除去します。

##### 3) ① SRSV-Genogroup I を検出する場合

各ウェルに酵素標識抗体液 G I を 100 $\mu$ L ずつ加えます。

##### ② SRSV-Genogroup II を検出する場合

各ウェルに酵素標識抗体液 G II を 100 $\mu$ L ずつ加えます。

4) ラップ又はアルミ箔等で覆い、常温 (15 $^{\circ}$ C $\sim$ 25 $^{\circ}$ C) に 1 時間静置します。

#### <ステップ 3> 基質液の滴加

1) 各ウェルの反応液を吸引除去します。

2) 各ウェルに洗浄液を約 200 $\mu$ L 加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、再び液を吸引除去します。この洗浄操作を更に 4 回繰り返します。残液は清潔なペーパータオル上で逆さにして叩き、ウェルから洗浄液を完全に除去します。

3) 各ウェルに基質液 100 $\mu$ L を加え、遮光して 常温 (15 $^{\circ}$ C $\sim$ 25 $^{\circ}$ C) に 30 分間静置します。

4) このとき空のウェルに基質液を 100 $\mu$ L 加えブランクとします。

#### <ステップ 4> 反応停止液の滴加

1) ブランクを含む各ウェルに反応停止液 100 $\mu$ L を加えます。

2) ブランクのウェルを対照に 30 分以内にオートリーダー (波長 450nm/630nm) で測定します。

3) 陽性コントロール及び各検体の抗 SRSV-G I 抗体固相プレート、抗 SRSV-G II 抗体固相プレートの吸光度から対照プレートの吸光度を差し引き吸光度差とします。

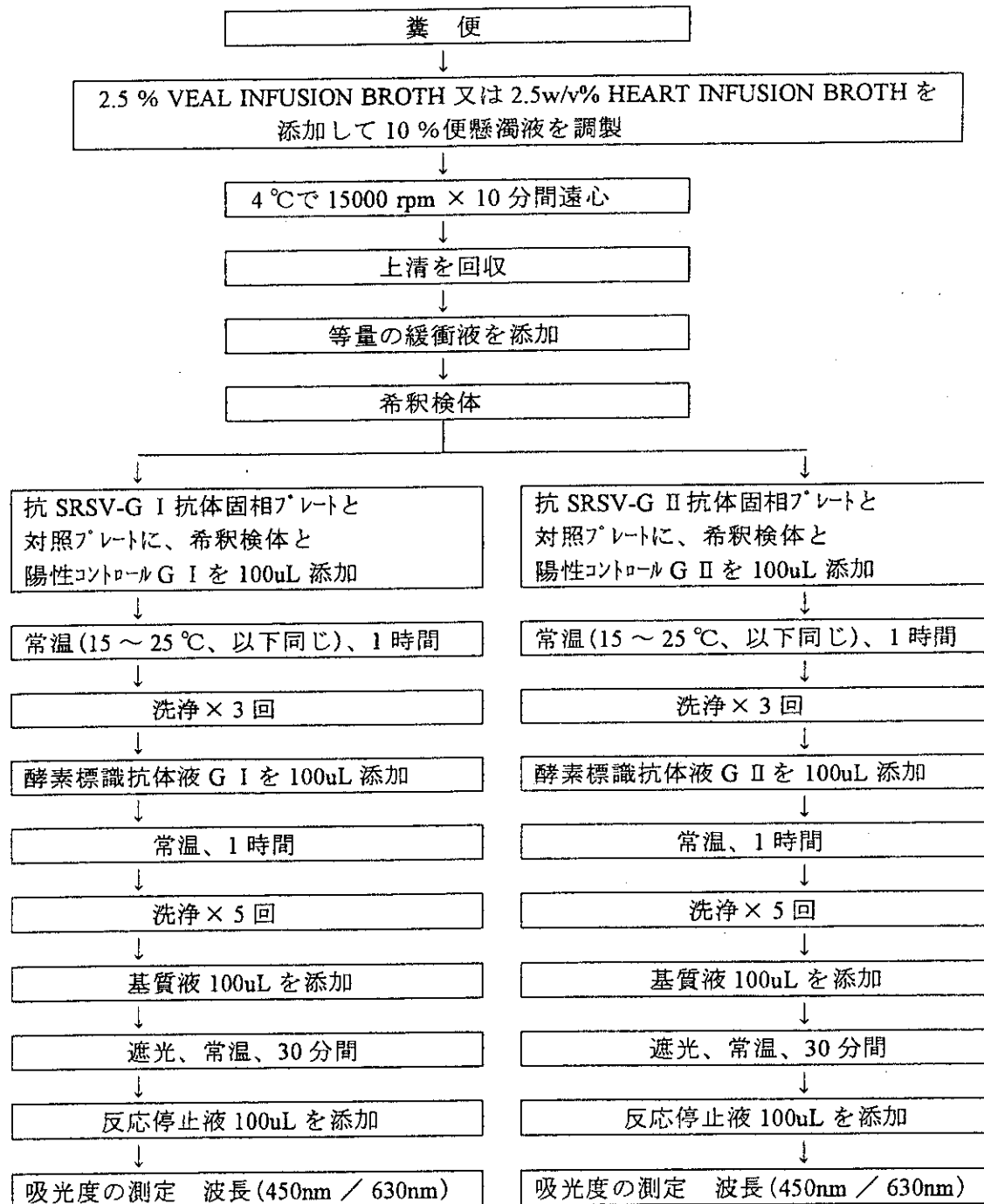
4) 検体の吸光度差を陽性コントロールの吸光度差で割り、その値を各検体の指数とします。

5) 対照プレートの吸光度が陽性コントロールの吸光度を越えた場合、希釈検体を 15000rpm  $\times$  30min (4 $^{\circ}$ C) の条件で遠心し、その上清を用いて再試験して下さい。

【測定結果の判定】

検体の指数が 1.0 以上の時： 陽性  
検体の指数が 1.0 未満の時： 陰性

[操作法のフローチャート]



## 【使用上又は取扱い上の注意】

### 1. 取り扱い上の注意

- 1) 本品の抗 SRSV-G I 抗体固相プレート、抗 SRSV-G II 抗体固相プレート、対照プレート及び陽性コントロールはアジ化ナトリウムを含有しております。誤って目や口に入れたり、皮膚に付着させた場合は水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要であれば医師の手当等を受けてください。
- 2) 反応停止液の硫酸は、腐食性を有しますので、身体や衣服に付着させないように注意してください。また誤って目や口に入れたり、皮膚に付着させた場合は水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要であれば医師の手当等を受けて下さい。
- 3) 試薬が誤って皮膚に付着したり、目や口に入った場合は直ちに大量の水で洗浄等を行ってください。必要であれば医師の手当等を受けて下さい。
- 4) 希釈検体をすぐ検査できない場合は、凍結保存しできるだけ早く使用してください。
- 5) 試験実施に都度、必ず陽性コントロールを測定してください。
- 6) 検体相互の汚染を防ぐため、検体をサンプリングする際、同一チップの使用は避けてください。
- 7) 希釈検体及び酵素標識抗体を加えるときはウェルの壁に付着させないでください。
- 8) 反応時間は定められた時間で行ってください。  
操作開始後は、速やかに全操作を行い、各検体の反応時間が一定となるように操作してください。
- 9) プレーートのウェルは強くこすらないでください。
- 10) 基質液について以下の点にご注意ください。
  - ①別の分注容器(リザーバー等)を使用する際は、基質液専用のものを使用してください。
  - ②一度分注容器に出した基質液をボトルに戻さないでください。
  - ③青色に自然発色したものは使用しないでください。
  - ④窓からの光の強い部屋では、ブラインド等をして使用してください。
  - ⑤酵素反応中は遮光してください。
  - ⑥基質液のフタをあけたまま放置しないでください。
- 11) 製造番号の異なるキットの試薬を組み合わせたり、混ぜ合わせたりして使用しないでください。
- 12) 使用済みの容器は他の目的に転用しないでください。
- 13) 試薬は凍結させないでください。誤って凍結させた場合は使用しないでください。

### 2. 廃棄上の注意

- 1) 本キットの抗 SRSV-G I 抗体固相プレート抗 SRSV-G II 抗体固相プレート、対照プレート及び陽性コントロールにはアジ化ナトリウムが 0.08w/v%に含まれています。アジ化ナトリウムは、鉛や銅と反応して爆発性のある重金属アジ化物を生成することがありますので、大量の水とともに廃棄してください。
- 2) 検体、使用済みの容器及び検査に使用したすべての器具類は、次のいずれかの方法で処理後、廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物又は産業廃棄物の区別をして廃棄してください。
  - ①最終濃度 2vol%グルタルアルデヒド溶液に1時間以上浸漬する。
  - ② 0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液(最終有効塩素濃度 約 5000ppm)に1時間以上浸漬する。
  - ③ 121℃で20分間以上高圧蒸気滅菌をする。

**【貯法・有効期間】**

1. 遮光して2～10℃に保存してください。
2. 有効期間は製造日から6箇月間です。

**【包装】**

96テスト用 1箱

平成 12 年 1 月 13 日

地方衛生研究所  
ウイルス性下痢症担当者 殿

1. ノーウォーク様ウイルス (NLVs) 検出 ELISA キットの配布について

昨年名古屋で開催された衛生微生物技術協議会第 20 回研究会のウイルス情報交換会(ウイルス性下痢症)で紹介いたしました。糞便からノーウォーク様ウイルス (NLVs) を検出する ELISA キットが完成し配布の準備ができました。添付のプロトコルを参照いただき、配布を希望する場合は 1 月 21 日 (金) までに「国立感染症研究所ウイルス第二部、武田直和」宛に返信用紙をお送り下さい。E-mail で返信用紙の内容をお送りいただいても結構です。折り返しデンカ生研株式会社からキットを発送致します。尚、プロトコル中の SRSV は NLVs のことを意味します。

今回配布するキットは Genogroup I の 3 株 (GI) と Genogroup II の 6 株 (GII) をまとめて、それぞれ GI、GII として検出するものです。血清型ごとに検出するものではありません。また血清型特異性が高く、9 株以外の血清型は検出できません。今回のキットに含まれていない Genogroup I の 1 株と Genogroup II の 1 株については現在作製中です。でき次第キットに加えてゆきます。

使用にあたっては以下の条件をご承知おき下さい。

1. 無断でキットを第三者に譲渡しないこと。
2. このキットはまだ開発途上のものです。キットを使って得られたデータはコメントを添えて「国立感染症研究所ウイルス第二部、武田直和」宛に還元して下さい。今後の改良に役立てるためです。是非ご協力ください。集計結果は「衛生微生物技術協議会」あるいは「ウイルス性下痢症研究会」等で報告してゆきます。

本キットは平成 11 年度厚生科学研究費補助金、「新興・再興感染症研究事業：下痢症ウイルスの検出法、予防法、汚染指標および疫学に関する研究」の一環として作製されたものです。

国立感染症研究所ウイルス第二部  
部長 宮村達男

## ELISA キット用返信用紙

ノーウォーク様ウイルス (NLVs) 検出 ELISA キットを希望する

1. 機関名
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
2. 所属機関の郵便番号と住所  
〒
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
3. 所属機関の電話番号
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
4. 所属機関のファックス番号
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
5. 連絡者名
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
6. 連絡者の E-mail アドレス

### 返信用紙送付先

国立感染症研究所ウイルス第二部

武田 直和

〒162-8640 新宿区戸山 1-23-1

Phone: 03-5285-1111 (ext.2522)

Fax: 03-5285-1161

E-mail: ntakeda@nih.go.jp



平成11年 9 月10日 印刷  
平成11年 9 月22日 発行

---

ウイルス性下痢症診断マニュアル (第1版)

---

編集・発行 国立感染症研究所 ウイルス第二部  
衛生微生物技術協議会レファレンス委員会

連絡先 国立感染症研究所ウイルス第二部 武田 直和  
〒162-8640 新宿区戸山1-23-1  
Phone : 03-5285-1111 (ext.2522)  
FAX : 03-5285-1161  
E-mail : ntakeda@nih.go.jp

印刷所 昭和情報プロセス株式会社