

マールブルグ病診断マニュアル

平成 24 年 3 月

目次

マールブルグ病の概説	p 2
マールブルグ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 8
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
マールブルグウイルス感染症の診断基準	p 15
引用文献	p 15
緊急時連絡先	p 16

マールブルグ病の概説

マールブルグ病は、マールブルグウイルス（フィロウイルス科）による感染症である。1967年にヨーロッパで、ウガンダから輸入されたアフリカミドリザルの初代腎細胞培養作業に関連したマールブルグウイルス感染症の流行が発生し、患者31名中7名が死亡した。これが初めて確認されたマールブルグ病の流行である。その後マールブルグ病は、アフリカで散発例が報告されるにとどまっていたが、1999年コンゴ共和国（旧ザイール）東部で初めて大規模な流行が報告された。ウイルスは、ヒトへの病原性の強さからクラス4の病原体に分類される。エボラウイルスと同様に宿主はコウモリ類であると考えられている。宿主からヒトへの感染経路は不明である。ヒトからヒトへの感染は血液、体液、排泄物等との直接接触による。実験室診断には、マールブルグウイルスの分離、血清抗体の検出（IgMやIgGを蛍光抗体法あるいはELISA法で検出する）、RT-PCR法、ウイルス抗原の検出（ELISA法等）が行なわれる。診断には、臨床症状の他、患者の渡航歴（アフリカのウガンダ、ケニア、コンゴ共和国等への旅行、滞在、あるいは熱帯雨林等の地域への立ち入りの有無）が参考になる。

マールブルグウイルス検査に関する注意事項

マールブルグ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マールブルグ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マールブルグ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：マールブルグウイルス感染症の診断のための検体には、血清が有用であるが、剖検例では肝、脾などの各種臓器が利用できる。急性期マールブルグ病の実験室診断には、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、尿も用いられることがある。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°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、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 CO₂培養器(37°C)
- 3 D-MEM
- 4 ウシ胎仔血清(FBS、56°C, 30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 cm², 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 抗マールブルグウイルス抗体 (血清) (例えば国立感染症研究所ウイルス第1部で作製した抗マールブルグ核蛋白ウサギ血清)

B) 検査方法

- 1 Vero E6 細胞の単層を, PBS で洗淨する.
- 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, 3000 回転で 20 分間遠心した上清を用いる.
- 3 37°C, 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.
- 6 CPE が認められた場合には, 抗マールブルグウイルス抗体を用いた間接蛍光抗体法でマールブルグ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りマールブルグ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用に供する.

2. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応 (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. マールブルグ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'-GAAGCTGATTTTCRTTCTTYTTCTGATGGAA(-)	
FiloNP-Rm	5'-GTGTGTGATTTTCAGTTTTTYTGGAGGTGGAA(-)	
FILO-A	5'-ATCGGAATTTTTCTTTCTCATT (+)	Filovirus (L) (419bp)
FILO-B	5'-ATGTGGTGGGTTATAATAATCACTGACATG (-)	
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'-ATGTGGTGGGTTATAATAATCACTGACATG (-)	
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 (クシユ)
- 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となる.
- 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 (QIAGEN)
 - 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 200 μ l から 50 μ l 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 μ g/tube, 精製 RNA 5 μ l を加え, さらに DEPC 処理済純水を最終量が 50 μ l 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 μ l、それぞれのプライマーを 12.5 pmole/tube、10x reaction buffer を 2.5 μ l、2.5mM dNTP を 2 μ l、Expand High Fidelity DNA ポリメラーゼを 0.125 μ l を加え、さらに精製水を最終量が 25 μ 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 μ 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 μ l、2.5mM dNTP を 2

μl、Expand High Fidelity DNA ポリメラーゼを 0.125 μl を加え、さらに精製水を最終量が 25 μl 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 μl、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 μl 加え、さらに精製水を最終量が 20 μl 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 :

マールブルグ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 抗マールブルグ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 精製抗マールブルグウイルス核蛋白モノクローナル抗体（クローン 2A7 および 2H6、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 ウサギ抗マールブルグウイルス核蛋白ポリクローナル血清（NIID-MBG-NP/#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マールブルグウイルス核蛋白, 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% TritonX-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つ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 精製抗マールブルグウイルス核蛋白モノクローナル抗体 (クローン 2A7 または 2H6) を 1 μ g/ml に PBS で希釈し, レーン 1~6 の各ウェルに 100 μ 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 μ 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, 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 $^{\circ}$ C 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 1 μ g/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 100 μ l 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 100 μ l 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°C, 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マールブルグウイルス核蛋白血清 100 μ l を各ウェルに分注し, 37°C, 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 100 μ l を各ウェルに分注し、37°C, 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°C 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 100 μ l を各ウェルに分注し、37°C, 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マールブルグ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

マールブルグウイルスの核蛋白を恒常的に発現する HeLa 細胞 (HeLa-MBG-NP 細胞) を用いた間接蛍光抗体法がマールブルグ病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 HeLa-MBG-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 カバーガラス

9 蛍光顕微鏡

B) 検査方法

- 1 HeLa-MBG-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-MBG-NP 細胞を回収する。更に細胞を PBS で洗浄後 3×10^6 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ガラスの各ウェルに細胞浮遊液を 10 μ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 でスライドガラスを洗浄し、PBS で 70 倍希釈した FITC 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体を各ウェルにのせ、37 $^{\circ}$ C、1 時間反応させる。
- 6 PBS でスライドガラスを洗浄後、10%グリセリン加 PBS を用いて封入する。
- 7 蛍光顕微鏡で特異蛍光を検鏡する。特徴的な染色像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、精製したマールブルグ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 精製組み換えマールブルグ核蛋白 (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 -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 ELISA リーダー

B) 検査方法

- 1 精製組み換えマールブルグ核蛋白を 1 μ 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 μ l 加える. レーン E~H の各ウェルには PBS を 100 μ l 加える (図 2b). 室温で 2 時間または 4 $^{\circ}$ C で一晩おく. 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 μ 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 μ l 加える. 次いで M-T-PBS で 25 倍に希釈した被験血清 33 μ 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 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させる.
- 4 検体を捨て T-PBS で 3 回洗浄し, ついで M-T-PBS で 1,000 倍希釈した HRPO 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体 100 μ l を各ウェルに加える. 37 $^{\circ}$ 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 μ l 加え, 37 $^{\circ}$ C, 30 分反応させる.
- 6 波長 405nm のフィルターを用いて, OD (吸光度) 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マールブルグ核蛋白抗体による OD 値とする.

3. IgM-capture ELISA :

マールブルグウイルスに対する 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マールブルグ核蛋白を抗原としたものである. 現時点では, この IgM-capture ELISA のマールブルグ病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、精製組み換えマールブルグ核蛋白をサルに免疫して作製した抗マールブルグ核蛋白 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 精製組み換えマールブルグ核蛋白（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 –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')₂ Anti-Human IgM, Biosource International, Inc. Tago Products）
- 7 ウサギ抗マールブルグウイルス核蛋白ポリクローナル血清（NIID-MBG-NP/#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（精製組み換えマールブルグ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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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°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 μ g/ml に調整した精製マールブルグ核蛋白を 100 μ l 加える。一方, レーン E~H の各ウェルには M-T-PBS 100 μ 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 倍希釈した抗マールブルグ核蛋白血清 100 μ l を各ウェルに加え, 37°C, 1時間反応させる。
- 6 抗マールブルグ血清を捨て 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 μ l を各ウェルに加え, 37°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 μ l 加え, 37°C30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。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マールブルグ核蛋白 IgM 抗体による OD 値と判定する。

マールブルグ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, 「マールブルグウイルス感染症」とする。

- 被験検体からマールブルグウイルスが分離された。
- 被験検体から RT-PCR 法でマールブルグ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, マールブルグ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 MBG-NP に対する抗体価が, 4倍以上の有意に上昇した。

次の場合, 「マールブルグウイルス感染症」を疑う。

- IgM-capture ELISA で, MBG-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. 森川茂. マールブルグ病. 日本医師会雑誌, 臨時増刊号122, 60-61, 1999
3. 森川茂, 田代真人. 出血熱ウイルスの診断体制. 臨床と微生物 24:583-586, 1997
4. 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
5. 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
6. 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

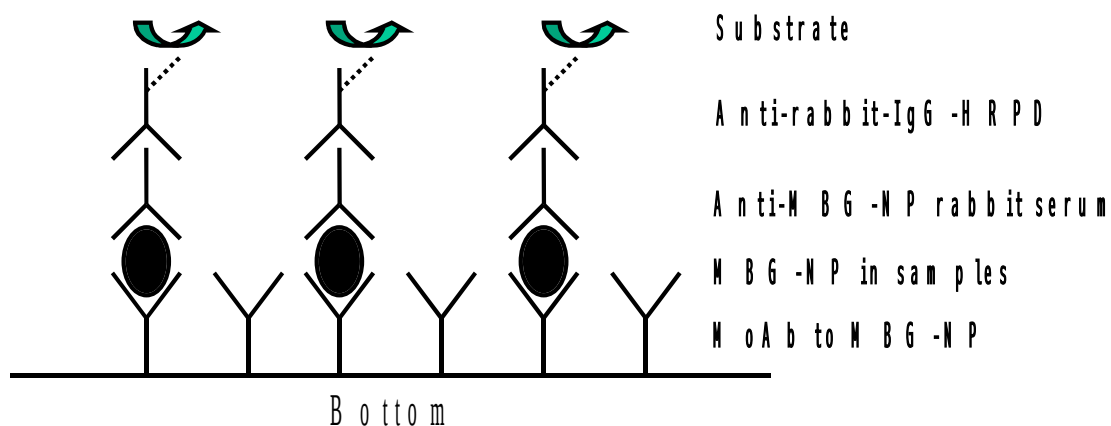
TEL: 042-561-0771 (内線791) / (home) 042-378-2864

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)

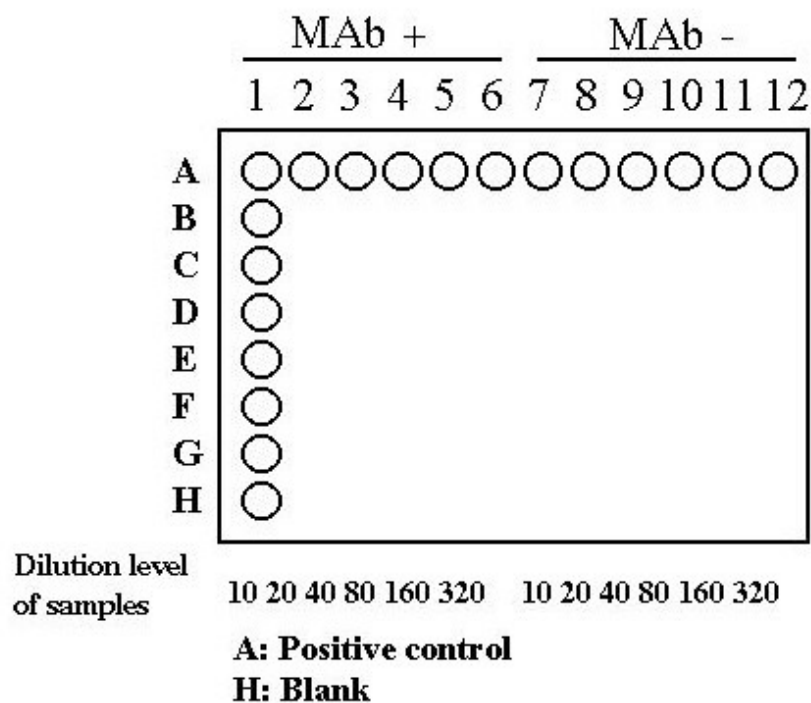
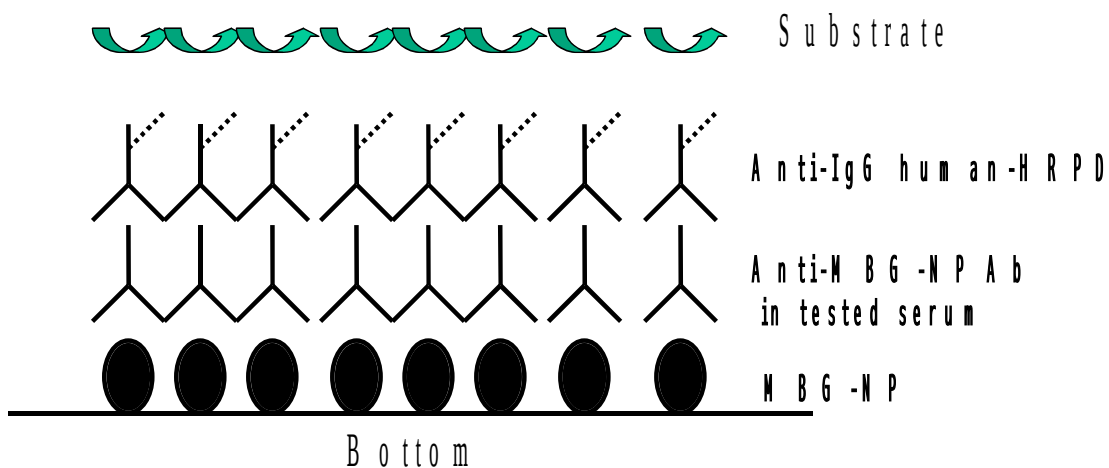


図2. IgG ELISAの原理 (a) とELISAプレートの各ウェルにおける固相化された抗原の有無, 被験血清の希釈倍率および陽性・陰性コントロール血清の位置の説明 (b) .

(a)



(b)

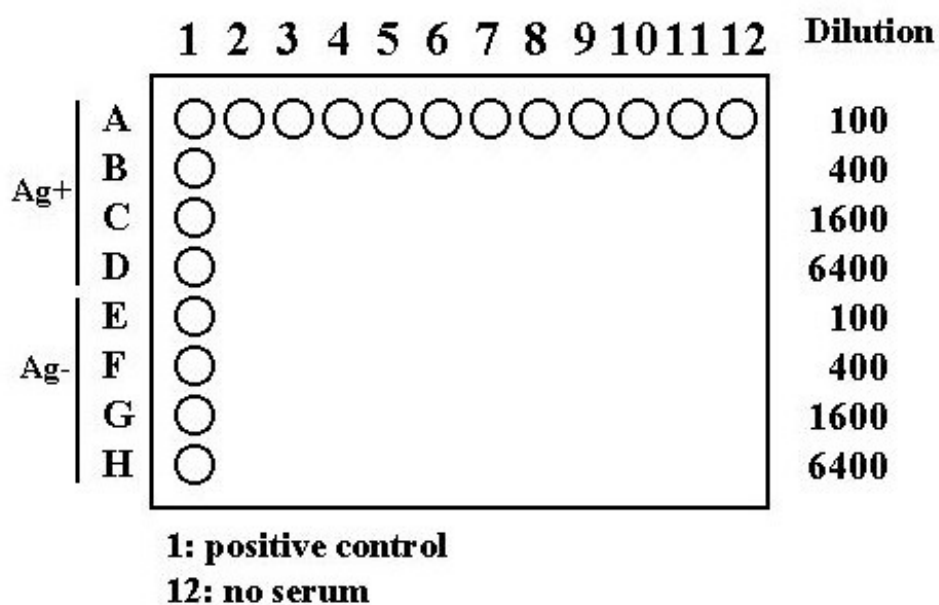
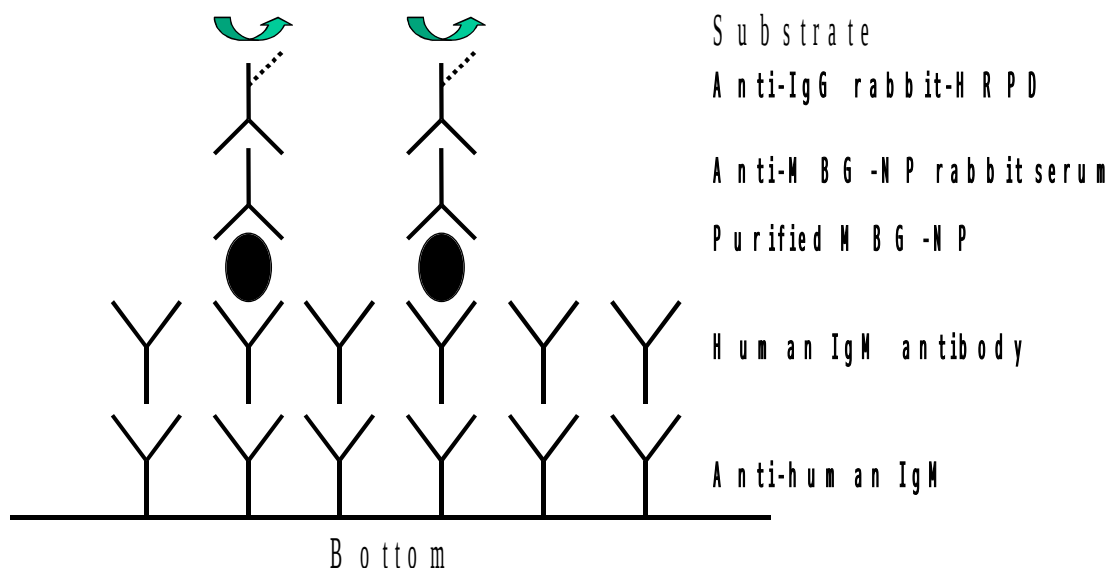


図 3. IgM-capture ELISA の原理 (a) と ELISA プレートの各ウェルにおける被験血清の希釈倍率, 加えられる抗原および陽性・陰性コントロール血清の位置の説明 (b) .

(a)



(b)

