

病原体検出マニュアル

麻疹（第 3.3 版）

平成 27 年 8 月

目次

I. 麻疹概説

II. 検査に関する一般的な注意

1. 実験者、実験室
2. 検査材料の採取
3. 検体の取扱い方法

III. 病原体検出法

1. ウイルス遺伝子検出法
 - 1-ア) 麻疹ウイルス遺伝子検出検査の進め方
 - 1-イ) real-time RT-PCR 法
 - 1-ウ) conventional RT-PCR 法
 - 1-エ) 系統樹解析
 - 1-オ) 命名法
2. ウイルス分離法
 - 2-ア) ウイルス分離法
 - 2-イ) リンパ球分離法

IV. 血清学的検査

1. IgM 抗体検査法 (EIA 法)
2. IgG 抗体検査法
 - 2-ア) IgG-EIA 法
 - 2-イ) PA 法

V. 麻疹検査診断に関する注意事項

VI. 文献

VII. 執筆者

VIII. 改訂履歴

I. 麻疹概説

麻疹は、麻疹ウイルスによる発熱、発疹を伴う急性呼吸器感染症である。潜伏期間は10日～14日間。初期の臨床症状は38～39度の発熱、咳嗽、鼻水、結膜充血等のカタル症状で、3-4日間継続し、一時、やや解熱する（カタル期）。その後、再度発熱し、39度以上の高熱とともに（2峰性発熱と呼ばれる）、麻疹特有の発疹が耳後部・顔面から出現し、3-4日間かけて体幹、四肢へと広がる。この間、高熱は持続する（発疹期）。また、発疹出現の1-2日前には口腔内粘膜にコプリック斑と呼ばれる白色の小斑点が出現する。発症後8日目ごろから熱が下がり始め、発疹が次第に退色し、回復へ向かう（回復期）。患者は、発症の2-3日前から発疹出現後4-6日頃までウイルスを放出し、感染源となる。麻疹は一時的に強い免疫抑制を誘導する事から、約30%の患者が脳炎、肺炎、中耳炎などの合併症を起こす。脳炎を発症した場合、およそ半数が死亡するか障害を残すといわれている。またごく稀ではあるが亜急性硬化性全脳炎（Subacute Sclerosing Panencephalitis; SSPE）と呼ばれる予後不良の脳炎を起こすこともある。不十分な免疫をもった人が麻疹ウイルスに感染した場合、比較的軽症で非典型的な経過をたどる「修飾麻疹」と呼ばれる麻疹を発症する事がある。修飾麻疹患者からも麻疹は感染する。麻疹は感染症法において第5類の全数把握感染症に分類されている。有効な治療薬はなく、ワクチン接種による感染（発症）予防が唯一の対処法である。

麻疹ウイルスはパラミクソウイルス科モルビリウイルス属に属する、約16,000塩基のマイナス鎖RNAゲノムを持つウイルスである。宿主細胞に由来するエンベロープを持っている。麻疹ウイルスの自然宿主は主にヒトであり、空気感染、飛沫感染、接触感染等で感染する。感染力は極めて強い。麻疹ウイルスはゲノムの遺伝子配列から24の遺伝子型に分類されているが（図6,表2）(1)、血清型は単一であり、1960年代に開発された麻疹ワクチンは現在でもすべての遺伝子型のウイルスに対して有効である。

WHOは麻疹の排除を目標としており、2020年までにWHO6地域のうち、5地域以上で麻疹排除の達成を目指している(2)。WHOが目指す麻疹排除とは「適切なサーベイランス制度の下で、ある一定の地域（国等）から土着株（国あるいは地域等の流行株）による感染が1年間以上確認されないこと」と定義されている(2)。このため、発生した麻疹が、土着株によるものなのか、あるいは海外からの輸入ウイルスによるのかを鑑別する必要がある。ウイルスの鑑別には麻疹ウイルスの遺伝子解析が必須であることから平成25年に改訂された「麻疹に関する特定感染症予防指針」では可能な限り血清学的診断とともに麻疹ウイルスの遺伝子解析を実施することを求めている(3)。

II. 検査に関する一般的な注意

1. 実験者、実験室

麻疹ウイルスはBSLレベル2に属するウイルスなので麻疹疑い症例からの検体の取り扱いにはBSL2実験室で行う。麻疹患者検体を扱う可能性が高い検査実施者は事前に麻疹に対する抗体がある事を確認するか麻疹ワクチン（あるいは麻疹風疹混合ワクチン等麻疹ワクチンを含むワクチン）を接種する事が強く推奨される。

2. 麻疹の検査材料、採取時期

麻疹の検査検体には患者の 1) 咽頭拭い液、2) 血液(血球部分) 3) 尿、4) 血清が主に用いられる。検査方法は病原体検出法と血清学的診断法に分かれる。それぞれの検査には適切な検体、検体採取時期がある(表1)。

検体の保管法は、血清学的検査に用いる血清は採取後-20℃で保存する事が推奨される。病原体検出に用いる検体は、ウイルス分離が目的ならば咽頭拭い液、尿は4℃で、血液は末梢血リンパ球を分離し4℃で保存し、採取後24時間以内に分離を開始する事が望ましい。real-time RT-PCR等の遺伝子検出法を行う場合は、48時間以内に検査を開始できるならば咽頭拭い液、尿、血液より分離した末梢血リンパ球は4℃で、検査の実施が48時間以降の場合は-80℃に保存する。

(表 1)

	検査方法	検体	採取に適切な時期
病原体検出	cRT-PCR real-time RT-PCR	咽頭拭い液、末梢血リンパ球、尿、(*血清)	発症前2-3日前から発疹出現後1週間程度 (*血清：発症日～発疹出現3日ごろまでの検体では検出される事がある)
	ウイルス分離	咽頭拭い液、末梢血リンパ球、尿	発症前2-3日前から発疹出現後3日間程度
血清学的診断	IgM 抗体検出 (IgM ELISA法)	血清	発疹出現後4日目～28日目
	IgG 抗体価測定 (IgG ELISA法, PA法等)	血清 (ペア血清)	1回目：発症前～発疹出現後4日目頃まで 2回目：1回目の採血から2週間～4週間後、 発疹出現後 2週間～4週間後

3. 検体の処理方法

ウイルス分離およびウイルス遺伝子検出の検査材料として、風疹と共通の臨床材料（咽頭拭い液、凝固防止末梢血液、尿）が推奨される(4)。なお、検査診断の材料としての評価は定まっていないが鼻腔拭い液、全血、血漿、血清からもウイルス遺伝子が検出される可能性がある。麻疹特異的抗体の検出には血清、または血漿を用いる。これらの検体の採取方法、取扱い方法の例を下記に挙げる。

1) 咽頭および鼻腔拭い液（ウイルス分離培養および遺伝子検査）：

合成樹脂素材のスワブ採取スティック（例：Sterile Swab Applicators, Copan 社製）で咽頭あるいは鼻腔粘膜をぬぐい、ウイルス保存輸送液（1～3mL）に浸漬する。ウイルス保存輸送液は市販品（例：BD ユニバーサルトランスポート検体輸送用培地、BD 社製）のほか、自家調整液*が使用できる。検体は 3,000rpm, 20 分間遠心し、上清を検査に用いる。

* 0.5%ウシ血清アルブミンフラクション V (BSA)、ペニシリン（100-500U/mL）、ストレプトマイシン（100-500 μ g/mL）、ゲンタマイシン（100 μ g/mL）およびアンフォテリシン B（2 μ g/mL）を添加した細胞培養用培地（MEM 培地等）または PBS(-) を用いる。

2) 凝固防止末梢血液（ウイルス分離培養および遺伝子検査）：

クエン酸ナトリウムまたは EDTA 加末梢血液を用いる（2～5mL）。ヘパリン加末梢血液の場合は、RT-PCR 反応を阻害するため、ウイルス分離培養のみに供する。採血された凝固防止血液は以下の処理操作を行い、末梢血単核球細胞 (PBMC) を分離する。

[方法 1]

1. 凝固防止血液 2mL に等量の PBS を混和する。
2. あらかじめ Ficoll-Paque（比重 1.077）3mL を分注した遠心チューブに 2 倍希釈した血液を静かに重層する。
3. 1,300 \times g、20 分間遠心する。
4. 表層から順に血漿（約 2 倍希釈）、PBMC、比重液および赤血球成分に分画される。PBMC はウイルス分離および遺伝子検査に供する。なお血漿は抗体価測定に使用できる。
5. 分画された PBMC は PBS で 3 回洗浄後、凍結保存液 [10%DMSO 加ウシ胎児血清 (FBS)] に所定の濃度（ $2 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$ cells/ml）で調整し、-80 $^{\circ}$ C で凍結保存する。同様に血漿は -20 $^{\circ}$ C に保存する。

[方法 2]

1. 凝固防止血液を 3,000rpm、20 分間遠心する。
2. 遠心された液の上層は血漿画分、下層は血球画分の 2 層に分画される。血球画分表層の白色を呈する細胞成分をゲルローディングチップ等により回収する。
3. 回収された細胞を元の量のウイルス輸送保存液または細胞維持用培養液に再浮遊して検体とする。
4. その他の画分は方法 1 に準じて保存する。

[方法 3] 血漿成分とリンパ球の分離法

1. 血液を室温で 1,800rpm、20 分遠心する。
2. 血液成分が混入しないよう上清（血漿成分）を回収する。
3. 血液成分に採血量の 2 倍量となるように PBS を加える（採血量が 5ml ならば、10ml となるように PBS を加える）。
4. スイングローターを用いて室温で 1,800rpm（400-800g）、30 分間遠心する
5. 上清（2 倍希釈された血漿成分）とリンパ球分離液の境界面に形成されたリンパ球層を回収する。
6. 回収したリンパ球に 2 倍量以上の PBS を加え、室温で 250-300g、10 分間遠心して洗浄する。この操作を計 3 回行う。血漿成分、リンパ球を保存する。

3) 尿（検査：ウイルス分離培養および遺伝子検査）：

10 から 50mL の尿を採取する。ウイルス分離培養には 1,000~1,500rpm、10 分間遠心した沈渣細胞を 2~3mL のウイルス輸送保存液に再浮遊させたものを用いる。遺伝子検査には未処理の採取尿液あるいは沈渣細胞を用いる。

4) 血清、血漿（抗体価測定）：血液採取後、分離して使用する。

5) 血清、血漿（ウイルス遺伝子検査）：検体から QIAamp Viral RNA mini kit（キアゲン社）等で RNA を抽出し使用する。

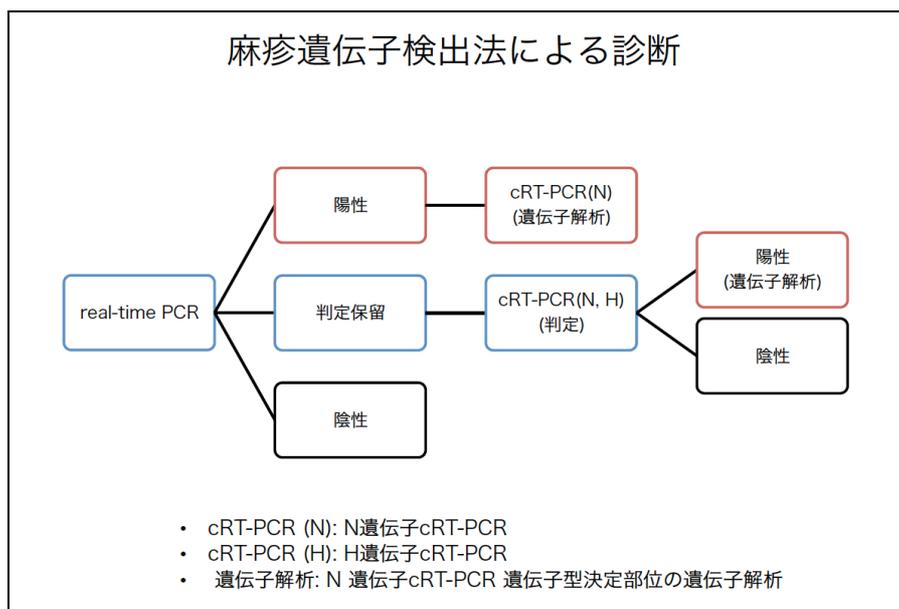
6) 全血（ウイルス遺伝子検査）：Nuclospin RNA Blood（タカラバイオ社）等を用いて全血より RNA を抽出し使用する。

Ⅲ. 病原体検出法

1. ウイルス遺伝子検出法

1-ア) 麻疹ウイルス遺伝子検出検査の進め方

以下に記載するreal-time RT-PCR法とconventional nested RT-PCR(cRT-PCR)法 (N遺伝子検出法ならびに H遺伝子検出法)を麻疹ウイルス遺伝子検出法として用いる。試験工程の煩雑さやクロスコンタミネーション(交叉汚染)の可能性を考慮して、原則としてreal-time RT-PCR法を第一選択とする。なお、麻疹のサーベイランスではウイルスの遺伝子解析、遺伝子型解析が重要なのでreal-time RT-PCR法において「陽性」であった場合、N遺伝子に対するcRT-PCRを実施し、PCR産物の塩基配列を決定し、系統樹解析により麻疹ウイルスの遺伝子型を決定する。real-time RT-PCRが「陰性」の場合は、「検査陰性」とする。「判定保留」の場合はH遺伝子、N遺伝子のcRT-PCRを実施し、いずれかが検出された場合は「陽性」とする。N遺伝子cRT-PCRでバンドが検出された場合には塩基配列を決定し、系統樹解析により遺伝子型解析を実施する(図.1)。ワクチン株を標的として各検査法における検出感度を比較すると、H遺伝子cRT-PCR \geq real-time RT-PCR \geq N遺伝子cRT-PCRの傾向がある。なおreal-time RT-PCR法、cRT-PCR法ともに感度が高いため、検体同士、あるいは過去の検査検体や陽性対照等からのコンタミネーションが起こらない様、細心の注意が求められる。少なくともRNAを抽出する場所、逆転写反応液やPCR反応液等のマスターミックスを作製する場所と、PCR反応を行ったチューブを開ける場所は物理的に隔てる。また、原則としてそれぞれの場所で使用する機器、試薬、実験着、靴等は共通で使用しない事が好ましい。



(図 1)

1-イ) real-time RT-PCR 法

A) 概要

TaqMan プローブを用いた real-time RT-PCR による麻疹ウイルス N 遺伝子の検出法について述べる(図 2)(5)。本方法を行う際は、陽性コントロールとして *in vitro* 転写により作製されたスタンダード RNA を用いる。陰性コントロールとして水および水を検体として RNA 抽出を行ったサンプル (RNA 抽出の陰性コントロール) を用いる。ここでは、クロスコンタミネーションの起こる可能性を最小限にするために、RT 反応と real-time PCR 反応を同ウェル上で行う 1-step real-time RT-PCR 法について記載するが、RNA 抽出後、先に RT 反応を行い合成した cDNA を用いて同様の試薬・手順で real-time PCR のみを行う事も可能である。また反応サイクルが風疹リアルタイム RT-PCR 法と同じなので、麻疹、風疹の検査を同時に実施する事も可能である(4)。ここでは、ライフテクノロジー社の TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix および Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムを用いた方法を示す。

麻疹検出用 real time - PCR

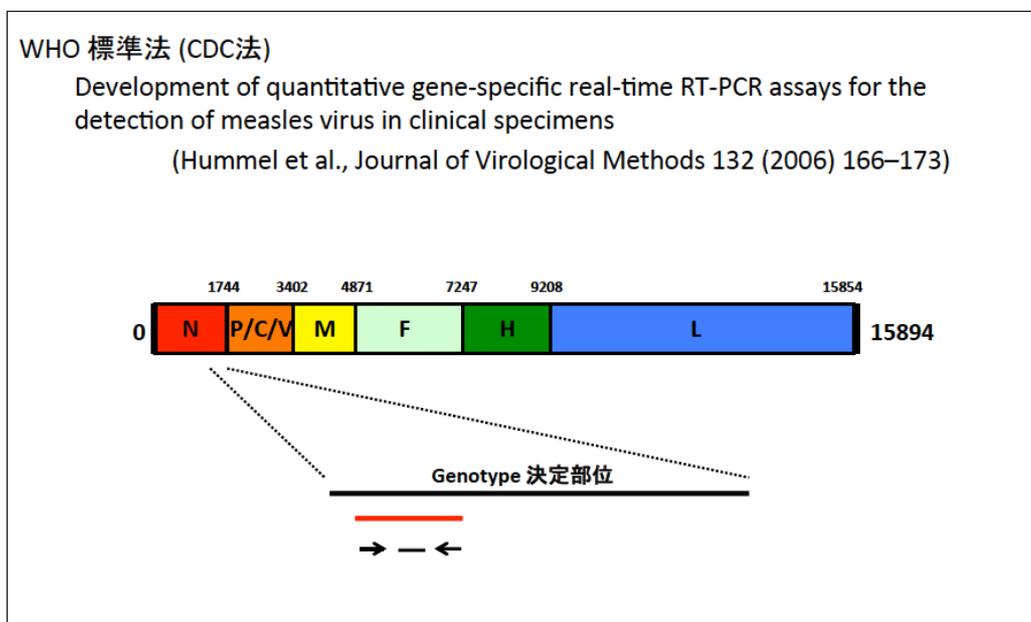


図 2

B) 主な試薬・機器

ウイルスRNA抽出キット (例: QIAamp Viral RNA Mini Kit ; キアゲン社)

real-time RT-PCR用マスターミックス (例: TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix ; ライフテクノロジーズ社)

マイクロピペット (各容量のもの)

フィルター付きピペットチップ (上記のマイクロピペットに対応したもの)

1.5ml エッペンドルフチューブ (核酸低吸着タイプ (例: DNA LoBind Tube 1.5mL ; エッペンドルフ社) を推奨)

1.5ml エッペンドルフチューブ用高速冷却遠心機

96well reaction plate (例: MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL ; ライフテクノロジーズ社)

プレートシール (例: MicroAmp Optical Adhesive Film ; ライフテクノロジーズ社)

遺伝子増幅装置 (例: Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システム ; ライフテクノロジーズ社)

RNase free 水、又は専用希釈液 (例: Easy Dilution ; タカラバイオ社)

N 遺伝子増幅用プライマーおよび検出用プローブ

- Forward Primer (MVN1139F): 5' TGGCATCTGAACTCGGTATCAC 3' (10 μ M)
- Reverse Primer (MVN1213R): 5' TGTCCCTCAGTAGTATGCATTGCAA 3' (10 μ M)
- Probe (MVNP1163P): 5' FAM-CCGAGGATGCAAGGCTTGTTCAGA-TAMRA 3' (6.25 μ M)

陽性コントロール

- スタンダード RNA (乾燥状態 ; 12 μ l に溶かして 10⁷ コピー/ μ l) (RNA 保護剤として RNAsable™ (Biomatrix, Inc) 添加)

C) スタンダードRNAを用いた試験の最適化

C-1) スタンダードRNAの希釈

① 乾燥状態のスタンダード RNA に、12 μ l の RNase free 水を加え、10⁷ コピー/ μ l の溶液を作製する。RNase free 水を加えた後、15 分間ほど室温に放置してから、泡立たないようにマイクロピペットによるピペッティングまたは軽いタッピングを行い、溶解する。spin down して 4°C におく。

② チューブ 9 本に 90 μ l の水を分注し、「5 \times 10⁶」「5 \times 10⁵」「5 \times 10⁴」「5 \times 10³」「5 \times 10²」「5 \times 10¹」「5 \times 10⁰」「5 \times 10⁻¹」「5 \times 10⁻²」とラベルする。

③ 10⁷ コピー/ μ l のスタンダード RNA 10 μ l を、「5 \times 10⁶」チューブに加え、マイクロ

ピペットによるピペッティングまたは軽いタッピングで攪拌し、spin down する (5×10^6 コピー/ $5 \mu\text{l}$ となる)。

④ 「 5×10^6 」チューブの $10 \mu\text{l}$ を「 5×10^5 」チューブに加え、軽く攪拌し spin down する。

⑤ ④と同様に、「 5×10^5 」から「 5×10^4 」、「 5×10^4 」から「 5×10^3 」と移していき、「 5×10^2 」までの 10 倍段階希釈を作製する。

⑥ 「 5×10^6 」、「 5×10^5 」チューブは今回の最適化には使用しない。「 5×10^6 」は $10 \mu\text{l}$ ずつに分注後、 -70°C 以下で保存し「スタンダード RNA (5×10^6 コピー/ $5 \mu\text{l}$)」として、次回以降の最適化に用いる。「 5×10^5 」は $10 \mu\text{l}$ ずつに分注後、 -70°C 以下で保存し、「スタンダード RNA (5×10^5 コピー/ $5 \mu\text{l}$)」として D-2) 陽性コントロールの調整に用いる。

C-2) 反応液の調製 (以下、Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムを使用の場合)

① プライマー 2 種類、プローブ、 $4 \times$ TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix を氷上で溶解し、混和しておく。

② 氷上にチューブを置き、別紙 1 に従って 9 ウェル分の反応液を調製する。(プライマーの終濃度が 400nM 、プローブの終濃度が 250nM となる。)

③ 96well reaction plate の 8 ウェルに、② を $15 \mu\text{l}$ ずつ分注する。

④ 水および C-1 で作製したスタンダード RNA (「 5×10^4 」「 5×10^3 」「 5×10^2 」「 5×10^1 」「 5×10^0 」「 5×10^{-1} 」「 5×10^{-2} 」の 7 種類) を $5 \mu\text{l}$ ずつ対応するウェルに加える。

⑤ プレートシールで封をした後、反応液を軽くスピンドウンする。

⑥ Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システムにセットし、以下の条件で反応を行う。

Assay : 「Absolute Quantification (Standard Curve)」

Run Mode : 「Standard 7500」

Reporter : FAM、Quencher : TAMRA

50°C で 5 分、 95°C で 20 秒の後、 95°C 15 秒、 60°C 1 分を 50 サイクル

C-3) データ解析

試験を 3 回、独立して実施し、以下の 4 つの基準を満たしていることを確認する。

① 段階希釈したスタンダード RNA で作製した検量線の slope が -3.1 から -3.8 の間であること。

(1 サイクルで 2 倍の DNA 断片に増幅する理想的な PCR 反応の場合、slope は -3.32

になる。)

② 段階希釈したスタンダード RNA で作製した検量線の R^2 値が 0.98 以上であること。

③ 5×10^1 コピー/反応のスタンダード RNA が $Ct \leq 40$ で検出されること。

④ 陰性コントロールである水が陰性 ($Ct > 40$) であること。

ただし、検量線は $Ct \leq 40$ で検出できた希釈までで作製する (通常、 $5 \times 10^1 \sim 5 \times 10^0$ コピー/反応まで)。これらの条件を安定して満たさない場合は、機器の校正、試薬類の再調整などを検討する。

D) 検査の実施

D-1) ウイルス RNA 抽出

ウイルス RNA (vRNA) の抽出は、キット添付文書に準じて行う。

同時に水を検体として RNA 抽出を行い、RNA 抽出の陰性コントロールとして使用する。

抽出 RNA は、 -80°C (-70°C 以下が望ましい) で保存する。

D-2) 陽性コントロールの調整

陽性コントロールに希釈するスタンダード RNA は「 10^4 コピー/ μl 」以上の濃度で必要量に小分けし、 -70°C 以下で保存する事が奨められる。通算 4 回以上の凍結融解は避ける。検査に用いる陽性コントロールは用事調整とする。保存法、調整法の一例を示す。C-1)⑥にて -70°C 以下で保存した「スタンダード RNA (5×10^5 コピー/ $5 \mu\text{l}$)」 $10 \mu\text{l}$ を融解し、 $90 \mu\text{l}$ の RNase free 水を加え $100 \mu\text{l}$ の「スタンダード RNA (5×10^4 コピー/ $5 \mu\text{l}$)」とし、 $5 \mu\text{l}$ ずつ分注し -70°C 以下で保存する。陽性コントロールの調整の際には、「スタンダード RNA (5×10^4 コピー/ $5 \mu\text{l}$)」 $5 \mu\text{l}$ を融解し、 $45 \mu\text{l}$ の RNase free 水を加え「スタンダード RNA (5×10^3 コピー/ $5 \mu\text{l}$)」とする。新しいチューブに「 5×10^2 」「 5×10^1 」「 5×10^0 」とラベルし、それぞれに $90 \mu\text{l}$ の RNase free 水を加える。「スタンダード RNA (5×10^3 コピー/ $5 \mu\text{l}$)」 $10 \mu\text{l}$ を「 5×10^2 」チューブに加え、軽く攪拌し spin down し、「スタンダード RNA (5×10^2 コピー/ $5 \mu\text{l}$)」を作製する。同様に 10 倍階段希釈し「スタンダード RNA (5×10^1 コピー/ $5 \mu\text{l}$)」「スタンダード RNA (5×10^0 コピー/ $5 \mu\text{l}$)」を作製する。 5×10^1 および 5×10^0 コピー/ $5 \mu\text{l}$ の二点を陽性コントロールとして、 $5 \mu\text{l}$ /反応で使用する。 5×10^0 コピー/反応が $Ct \leq 40$ の場合は 5×10^0 コピー/反応を陽性コントロールとして判定に使用し、 5×10^0 コピー/反応が $Ct > 40$ の場合のみ 5×10^1 コピー/反応を陽性コントロールとして判定に用いる。コンタミを避けるため、高濃度のスタンダード RNA を希釈する作業は次項の「D-3) real-time RT-PCR 法による N 遺伝子の検出」を実施する場所とは別の場所で行う。

D-3) real-time RT-PCR 法による N 遺伝子の検出

まず、別紙 2 に必要事項を記入の上、必要な試薬量を計算する。検体以外に必要なサンプルは、①陰性コントロール（水）、②RNA 抽出の陰性コントロール（水を検体として RNA 抽出したもの）、③陽性コントロール（スタンダード RNA、 5×10^1 および 5×10^0 コピー/反応）の 3 種類（4 サンプル）である。反応液の調整および反応条件は「C-2）反応液の調整」と同様に行う。ただし、判定には Ct=40 までしか使用しないので、サイクル数を 50 サイクルから 40 サイクルに変更可能とする。

D-4) 試験成立条件

陰性コントロール（水、水を検体として RNA 抽出したもの）が陰性であり、陽性コントロール（ 5×10^1 コピー/反応）が Ct \leq 40 となった場合に試験が成立する。

D-5) 判定

D-2) に従って、判定に用いる陽性コントロールを選択する。検体の Ct 値が陽性コントロールの Ct 値以下の場合に「陽性」、陽性コントロールの Ct 値より大きく且つ Ct 値が 40 以下の場合に「判定保留」、Ct 値が 40 より大きい場合に「陰性」と判断する。「判定保留」の場合には、H 遺伝子および N 遺伝子 cRT-PCR を実施し、いずれかの cRT-PCR が陽性だった場合「陽性」とする。ただし、real-time RT-PCR では PCR 産物のサイズ等を確認できないことから、判定には十分注意する。特に検体が「1 種類」しかない症例を陰性と判断する場合には、可能ならば 2 回以上の独立した real-time RT-PCR を行う事が望ましい。

「陽性」と判断した場合は、N 遺伝子 cRT-PCR を実施し、PCR 産物の塩基配列を決定し、系統樹解析により麻疹ウイルスの遺伝子型を決定する。なお、発症前 3 週間以内に麻疹（または MR）ワクチンを接種した麻疹疑い患者検体が real-time RT-PCR 法で陽性となった場合、ワクチンによる副反応の可能性が考えられる。ワクチン株は遺伝子型 A であり、またワクチン株以外の遺伝子型 A のウイルスは、近年、報告されていない。よって後述する N 遺伝子 cRT-PCR を実施し、遺伝子型 A（ワクチン株）が検出された場合はワクチンによる副反応とし、麻疹「陽性」としない。

D-6) トラブルへの対応

試験を行った結果、陽性コントロールが検出できない等の問題が認められた場合は、分注した別のコントロールを使用する等、適切に対応する。試験系に問題が認められた場合は「C) スタンダード RNA を用いた試験の最適化」を参照して試験系の再評価を行う。

別紙 1

スタンダード RNA を用いた試験系の最適化

実施年月日	
-------	--

	数	名前
陰性コントロール	1	水
スタンダード RNA (7段階希釈)	7	
合計	8	
合計+1(反応数)	9	

	1 反応あたり(μl)	必要量(× 反応数)	終濃度
水	7.6	68.4	
4 × TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix	5	45	1 ×
MVN1139F (10μM)	0.8	7.2	400nM
MVN1213R (10μM)	0.8	7.2	400nM
MVNP1163P (6.25μM)	0.8	7.2	250nM
	15	(15 × 8 ウェル)に分注	
サンプル	5	5	
	20	20	

Reporter: FAM、Quencher: TAMRA

Stage 1	1 cycle	50 °C	5 min
Stage 2	1 cycle	95 °C	20 sec
Stage 3	50 cycle	95 °C	15 sec
		60 °C	1 min

別紙 2

麻疹 N 遺伝子 Real-time RT-PCR 法

実施年月日	
-------	--

	数	名前
陰性コントロール	1	水
	1	水から RNA 抽出したもの
陽性コントロール	1	スタンダード RNA 5×10^0 コピー/反応
	1	スタンダード RNA 5×10^1 コピー/反応
検体数		
合計		
合計+1(反応数)		

	1 反応あたり(μ l)	必要量(\times 反応数)	終濃度
水	7.6		
4 \times TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix	5		1 \times
MVN1139F (10 μ M)	0.8		400nM
MVN1213R (10 μ M)	0.8		400nM
MVNP1163P (6.25 μ M)	0.8		250nM
	15	(15 \times 合計)に分注	
サンプル	5	5	
	20	20	

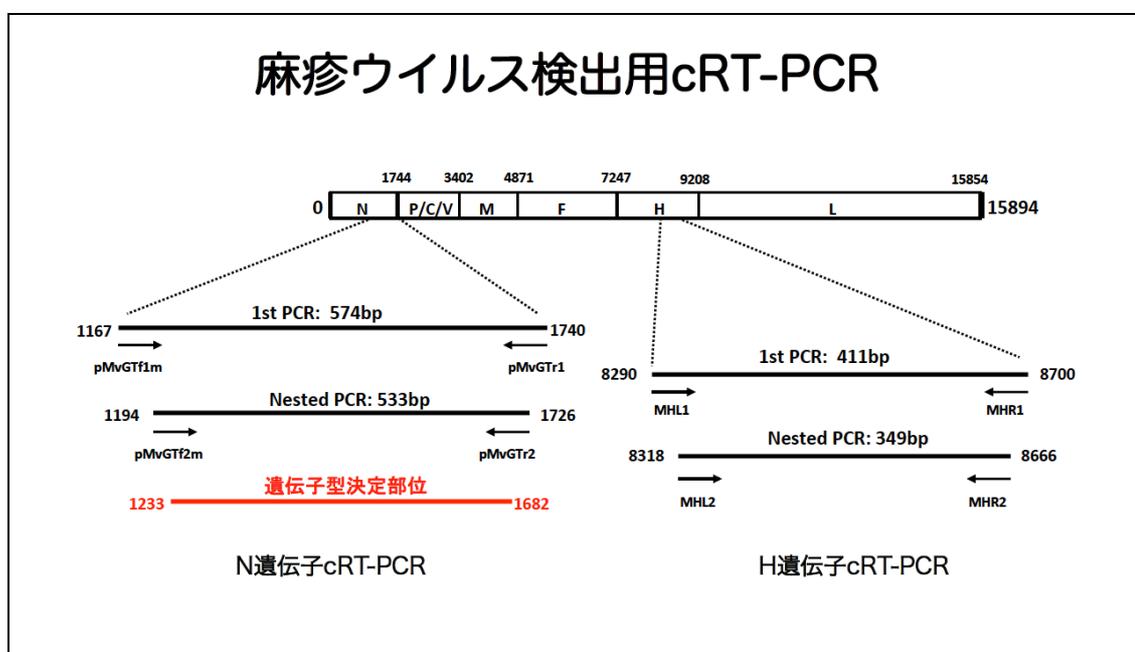
Reporter: FAM、Quencher:

TAMRA

Stage 1	1 cycle	50 °C	5 min
Stage 2	1 cycle	95 °C	20 sec
Stage 3	40 (or 50) cycle	95 °C	15sec
		60 °C	1min

1-ウ) Conventional RT-PCR法 (cRT-PCR法)

cRT-PCR法による麻疹ウイルス遺伝子検出法としてN遺伝子、H遺伝子を標的とした増幅法を述べる。なおN遺伝子cRT-PCRの増幅部分は麻疹ウイルスのWHOが定めた遺伝子型決定部位450塩基 (麻疹ウイルスアンチゲノム上の1233-1682位、麻疹ウイルスN mRNA上の1178-1627位 図3)を含んでおり、real-time RT-PCR法において「陽性」となった場合にも麻疹ウイルスの遺伝子解析、遺伝子型解析を行うために実施が求められている。遺伝子増幅サイクルはN遺伝子法、H遺伝子法同じなので「検査診断」として用いる場合には同時に行う事が望ましい。以下に方法の概略を述べる。



(図3)

A) 検体、試薬、機器、プライマー

A-1) 検体

咽頭拭い液、血液 (PBMCs)、尿あるいは分離された麻疹ウイルス株を用いる。咽頭拭い液、PBMCsおよび尿は、発疹出現前2-3日から発疹出現後1週間程度の間に取り込まれたものが麻疹ウイルス遺伝子検査に望ましい。

A-2) 試薬

- ウイルスRNA抽出キット (例: QIAamp Viral RNA Mini Kit; キアゲン社等)
- 逆転写酵素 (例: PrimeScript RT reagent Kit; タカラバイオ社)

- Taq DNA Polymerase (例: PerfectShot Ex Taq (Loading dye mix); タカラバイオ社)
- DNA 分子量マーカー (例: 100bp DNA Ladder ニッポンジーン社等)
- アガロース
- 麻疹参照RNA (国立感染症研究所より配布 図4)
- サイズマーカー-N (533bp)、サイズマーカー-H (349bp)

A-3) 機器

- サーマルサイクラー (例: ABI9600; アプライドバイオシステムズ社等)
- 電気泳動装置 (例: ミューピッド; アドバンス社)
- 1.5ml エッペンドルフチューブ用高速冷却遠心機
- 1.5ml エッペンドルフチューブ用卓上高速冷却遠心機 (例: チビタン; ミリポア社)
- PCR チューブ用遠心機

A-4) プライマー

下記のプライマーを合成し20 μ Mに調整する。

N 遺伝子 cRT-PCR用プライマー				
用途	Primer 名	向き	プライマー配列	サイズ*
1 st PCR	pMvGTf1m	Forward	5'-CGRTCTTACTTYGATCCRGC-3'	574bp
	pMvGTr1	Reverse	5'-TTATAACAATGATGGAGG-3'	
Nested PCR	pMvGTf2m	Forward	5'-AGAYTAGGRCARGAGATGGT-3'	533bp
	pMvGTr2	Reverse	5'-GAGGGTAGCGGATGTTGTT-3'	

* サイズ: PCRで増幅される遺伝子のサイズ

H 遺伝子 cRT-PCR用プライマー				
用途	Primer 名	向き	プライマー配列	サイズ*
1 st PCR	MHL1	Forward	5'-AACGGATGATCCAGTGATAG-3'	411bp
	MHR1	Reverse	5'-TTGAATCTCGGTATCCACTC-3'	
Nested PCR	MHL2	Forward	5'-TACCTCTCATCTCACAGAGG-3'	349bp
	MHR2	Reverse	5'-CACCTAAGGCTAGGTTCTTC-3'	

* サイズ：PCRで増幅される遺伝子のサイズ

B) RT-PCR反応

B-1) ウイルスRNAの抽出

ウイルスRNAの抽出は、キットの添付文書に準じて行う。

抽出したRNAは直ちに逆転写反応を行うか -80°C で保存する。精製水等を用いてRNA 抽出工程の陰性対照とする。

B-2) 逆転写反応

逆転写反応 (RT) は、反応に必要な試薬がキットの中に全て含まれるPrimeScript RT reagent Kit; タカラバイオ社製を用いた方法をここでは述べる。RNA抽出液 $10\mu\text{l}$, 5X PrimeScript Buffer $4\mu\text{l}$, PrimeScript RT Enzyme Mix I $1\mu\text{l}$, Random 6mers $4\mu\text{l}$, RNase Free dH_2O $1\mu\text{l}$ を添加して総量 $20\mu\text{l}$ にした後, 37°C 15分, 85°C 5秒の加熱によりcDNA合成と逆転写酵素の不活化を行う。合成されたcDNA はN遺伝子cRT-PCR, H遺伝子cRT-PCRに用いる。この際、RNA抽出工程、及びRT-PCR工程の陰性対照も同時に反応にかける。

逆転写反応液の組成	量
RNA	$10\mu\text{l}$
5X PrimeScript Buffer	$4\mu\text{l}$
PrimeScript RT Enzyme Mix I	$1\mu\text{l}$
Random 6mers	$4\mu\text{l}$
RNase Free dH_2O	$1\mu\text{l}$
Total volume	$20\mu\text{l}$

B-3) N 遺伝子 cRT-PCR 法

B-3-1) PCR 反応

ここでは PCR チューブ中に予め 2X PCR Master mix および Loading dye が分注された PerfectShot Ex Taq (Loading dye mix); タカラバイオ社製を用いた方法を示す。

N 遺伝子 cRT-PCR 用 1st PCR プライマーセットを下記の 1st PCR 反応液に、また Nested PCR 用プライマーセットを Nested PCR 反応液に加える。

1st PCR では 1st PCR 反応液に逆転写反応により合成した cDNA 5 μ L を加え、下記の PCR 反応を行う。Nested PCR 反応は、Nested PCR 反応液に 1st PCR 産物 5 μ L を加え、同じく上記の条件で行う。なお、陽性対照 RNA (感染研より配布)、RT-PCR 陰性対照、RNA 抽出工程陰性対照も同時に PCR を実施する。

PCR 反応液の組成

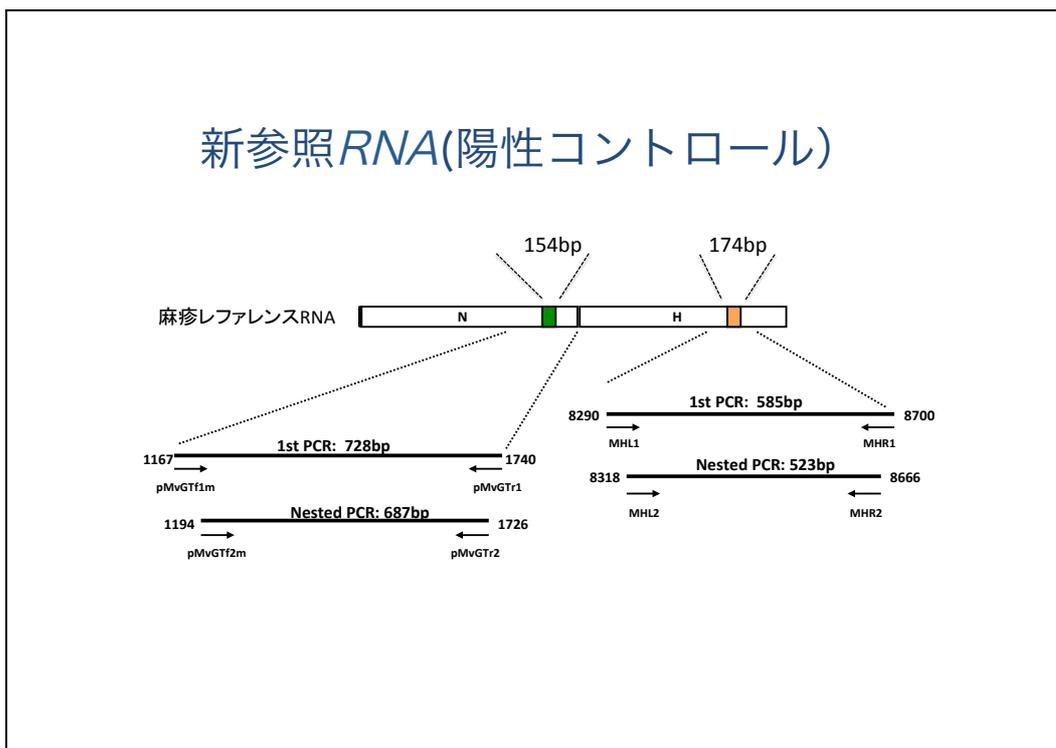
PCR 反応液の組成	1 st PCR 反応液	Nested PCR 反応液
PerfectShot Ex Taq (master mix)	25 μ L	25 μ L
cDNA (1 st) 又は 1 st PCR 産物 (Nested)	5 μ L (cDNA)	5 μ L (1 st PCR 産物)
Primer (forward) (20 μ M)	1 μ L	1 μ L
Primer (reverse) (20 μ M)	1 μ L	1 μ L
RNase/DNase free H ₂ O	18 μ L	18 μ L
Total volume	50 μ L	50 μ L

PCR 反応条件

反応		条件	サイクル数
1. Denaturation		98°C 10 sec	1
2. PCR 反応	Denaturation	98°C 10 sec	30
	Annealing	53°C 30 sec	
	Extension	72°C 1 min	
3. Extension		72°C 5 min	1

B-3-2) 電気泳動

1.5%のアガロースゲル (PerfectShot Ex Taq を使用の場合 TAE buffer を使用する) を用い、Mupid ミニゲル電気泳動槽等での Nested PCR 反応液 5 ~10 μ L を電気泳動する。エチジウムブロマイドによる染色後、増幅された DNA フラグメントをトランスイルミネーター上で確認する。麻疹ウイルス遺伝子が存在していた場合、Nested PCR 産物として 533bp のバンドが検出される (1st PCR 産物は 574bp)。なお、陽性対照 RNA は Nested PCR 産物として 687bp のバンドが検出される (1st PCR 産物は 728bp)。感染研が配布した サイズマーカー-N を同時に泳動すると 533bp のバンドが現れるので サイズの判定に便利である。RT-PCR 陰性対照、RNA 抽出工程陰性対照においてバンドが検出されず、適切なサイズの陽性対照が検出された時のみ、診断が可能である。N 遺伝子が検出された時には 「C) 麻疹ウイルス遺伝子型決定部位の塩基配列の決定」 に従って塩基配列を決定し、遺伝子型を解析する。



(図 4)

B-4) H 遺伝子 cRT-PCR 法

B-4-1) PCR 反応

H 遺伝子 cRT-PCR 法は H 遺伝子用のプライマーセットを用いる点のみを代えれば、前述

の N 遺伝子 cRT-PCR 法と同じ方法で実施できる。同じ PCR サイクルなので N 遺伝子 cRT-PCR 法と H 遺伝子 cRT-PCR 法を 1 台のサーマルサイクラーで同時に反応させる事が可能である。

H 遺伝子 cRT-PCR 用 1st PCR プライマーセットを前述の 1st PCR 反応液に、H 遺伝子 Nested PCR 用プライマーセットを同様に前述の Nested PCR 反応液に加える。1st PCR 反応液には逆転写反応で合成した cDNA を 5 μ L 加え、上述の PCR 反応を行う。1st PCR 終了後、Nested PCR 反応液に 1st PCR 産物 5 μ L を加え、同様の条件で Nested PCR 反応を行う。なお、陽性対照 RNA (感染研より配布)、RT-PCR 陰性対照、RNA 抽出工程陰性対照も同時に PCR を実施する。

B-4-2) 電気泳動

1.5 ~ 2 %のアガロースゲル (PerfectShot Ex Taq を使用の場合 TAE buffer を使用) を用い、N 遺伝子 cRT-PCR 法と同様に Nested PCR 反応液 5 ~10 μ L を電気泳動し、増幅された遺伝子産物を確認する。麻疹ウイルス遺伝子が存在していた場合、Nested PCR 産物として 349bp のバンドが検出される (1st PCR 産物は 411bp) 。なお、陽性対照 RNA は Nested PCR 産物として 523bp のバンドが検出される (1st PCR 産物は 585bp) 。RT-PCR 陰性対照、RNA 抽出工程陰性対照においてバンドが検出されず、適切なサイズの陽性対照が検出された時のみ、診断が可能である。感染研が配布した サイズマーカー H を同時に泳動すると 349bp のバンドが現れるので サイズの判定に便利である。

C) 麻疹ウイルス遺伝子型決定部位の塩基配列の決定

N 遺伝子 c-RT PCR 法で麻疹ウイルス遺伝子が検出された時、PCR 産物の塩基配列を決定し、系統樹解析により遺伝子型を決定する。

C-1) 試薬、機器等

- DNA 精製キット (例: QIAquick PCR Purification Kit; キアゲン社)
- DNA 精製キット (例: QIAquick Gel Extraction Kit; キアゲン社)
- シークエンシングキット (例: BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit; アプライドバイオシステムズ社)
- 未反応ダイターミネーター除去用スピンカラム (例: AutoSeq G-50; GE ヘルスケアバイオサイエンス)
- DNAシークエンサー (例: ABI310; アプライドバイオシステムズ社)

C-2) PCR 産物の精製

目的とする PCR 産物が増幅された場合には、DNA 精製キットを用いて PCR 産物を精製する。電気泳動で単一のバンドが観察された場合は反応液をそのまま QIAquick PCR Purification Kit 等の PCR 産物精製キットを用いて精製する。バンドが複数認められた場合にはアガロースゲルから目的のサイズのバンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction kit 等でゲルから DNA を抽出する。

C-3) シークエンス反応

シークエンス用プライマーは N 遺伝子 nested PCR 用プライマーを用いる。必ず双方向から解析し、塩基配列を確認する。以下の試薬及びプライマーを混合してシークエンス反応液を調整し下記のシークエンス反応を行う。BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit を 8 倍程度希釈して使用する事も可能であるが、反応条件の適正化が必要な場合もある。

シークエンス反応液の組成

試薬	量
BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	8 μ L
Primer (3.2 μ M) (pMvGTf2m 又は pMvGTr2)	1 μ L
精製 PCR 産物 (5-20 ng/ μ L)	1 μ L
H ₂ O	10 μ L
Total volume	20 μ L

シークエンス反応条件

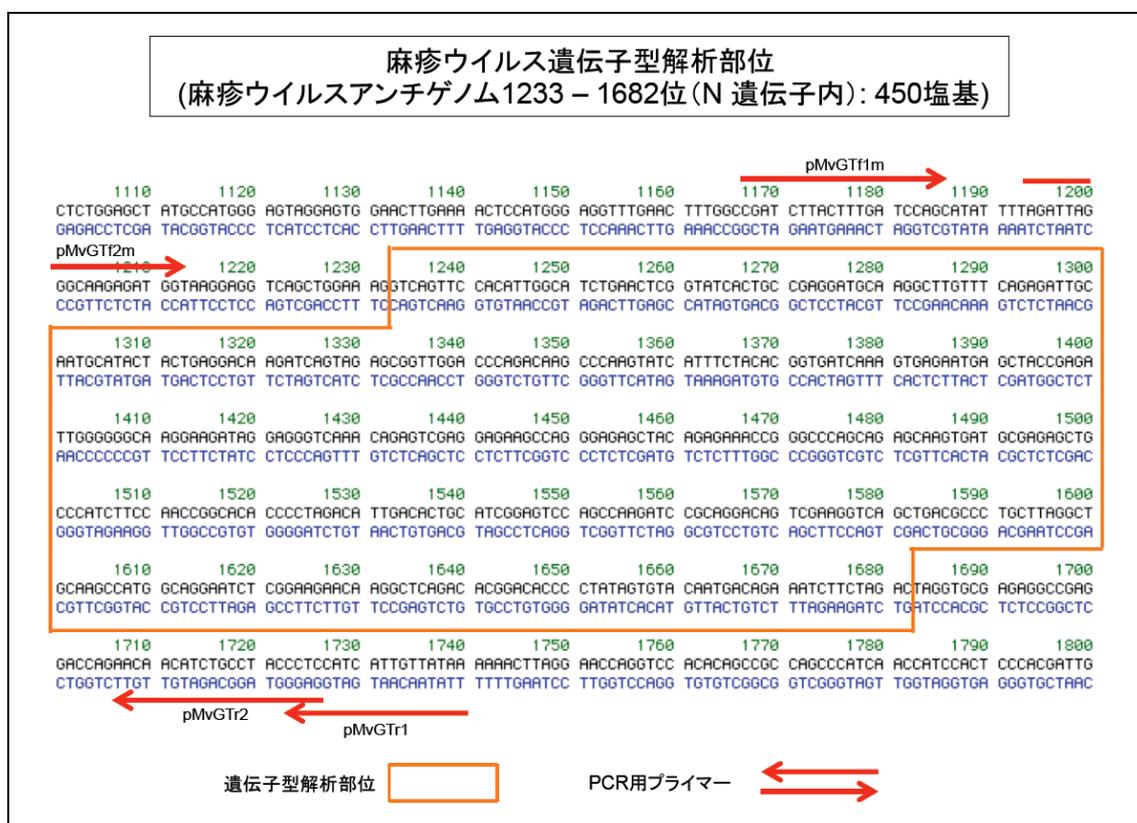
反応条件	サイクル数
96°C 1 min	1
96°C 10 sec	25
50°C 5 sec	
60°C 4 min	

C-4) シークエンス反応産物の精製並びにシークエンス解析

シークエンス反応液から AutoSeq G-50 等を用いて、未反応ダイターミネーターを除去し、DNA シークエンサーで解析し、遺伝子配列を決定する。

1-エ) 系統樹解析

配列が決定された N 遺伝子中の遺伝子型決定部位 450 塩基の配列 (麻疹ウイルスアンチゲノム上の 1233-1682 位、麻疹ウイルス N mRNA 上の 1178-1627 位 (450 塩基; genotype A のワクチン株の配列 (accession number AB046218 を参照) (図 5) (1)、ならびに WHO が定めている各遺伝子型参照ウイルスの配列を用いて系統樹解析を行い、遺伝子型を決定する (図 6、表 2)。系統樹解析は、市販のソフトウェア (例: Genetyx など) やインターネット上に公開されている Clustal W (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>、DNA Data Bank of Japan: DDBJ) などを使用し、得られた塩基配列のアライメントをおこない、近隣結合法 (Neighbor-joining 法) によって系統樹を作成する。



(図 5)

1-オ) 遺伝子配列の命名法

WHO では検出されたウイルスの遺伝子型決定部位の配列の命名法を以下のように定めている。定められた方法で命名する事で、ウイルスが検出された年、疫学週、検出された県、又は政令市、国、ウイルス分離がなされたかどうか、遺伝子型、SSPE 等特殊なウイルスであったかがわかる (1)。

A) 記載法

まず、解析された対象が分離されたウイルスか検体からのダイレクト PCR の結果かを以下の方法で記載する。

MVi: 分離されたウイルスを解析した場合は MVi とする。

MVs: 咽頭拭い液等の検体から抽出した RNA から直接 PCR 法で検出された麻疹ウイルス遺伝子を解析した場合は MVs とする。

次いで / (スラッシュ) の後、検査を実施した衛生検査所が所在する県名、又は政令指定都市名を記載する。都市名の際は C(city) をつける。ピリオドの後に日本を示す JPN を記載する。

再度スラッシュを記載し、次いで発症週¹⁾ (疫学週)、ピリオド、年 (西暦の下 2 桁) を記載する。もし同一週に複数の検体がある場合や検体を区別したい時はスラッシュを続けその後に番号等をつけることも可能である (任意)。

次いで角括弧内に遺伝子型を記載する (例[A])。

なお SSPE 患者由来の麻疹ウイルスは SSPE、Measles inclusion body encephalitis (MIBE) 患者に由来する麻疹ウイルスの場合は MIBE、ワクチン接種後にあまり時間をおかずしてワクチン株が検出された場合は Vac と丸括弧内に記載する (例 (SSPE), (Vac)等)。

¹⁾ 「発症週」の記載に関して、: 麻疹は先ず「発熱」があり、3-4 日してから「発疹」が出現するのが一般的な経過である。WHO では「発疹」が出現した週を「発症週」とする事としているが、日本の現状では記載されている「発症週」が「発熱」か「発疹」が判らない場合や、発症週の記載がない場合がある。よって、命名法における「発症週」の記載は、下記の優先順位に従う事とする。

- 1) 発疹出現週が判るのならば「発疹の発症週」
- 2) 発疹か発熱かが判らない場合には「発症週 (発熱又は発疹)」
- 3) 発症週の情報がない場合には「検体採取週」。

また、SSPE, MIBE の場合は「検体採取週」を記載する事とする。

以下に例を示す (実在するものではありません)

(例 1) MVi/Osaka. JPN/13. 14 [D8]

2014 年疫学週 13 週に大阪府で発症し、分離された麻疹ウイルス、遺伝子型 D8 の配列

(例 2) MVs/KawasakiC. JPN/28. 12[D4] (SSPE)

2012 年疫学週 28 週に川崎市において採取された SSPE 患者検体から検出された麻疹ウイルス遺伝子型 D4 の配列

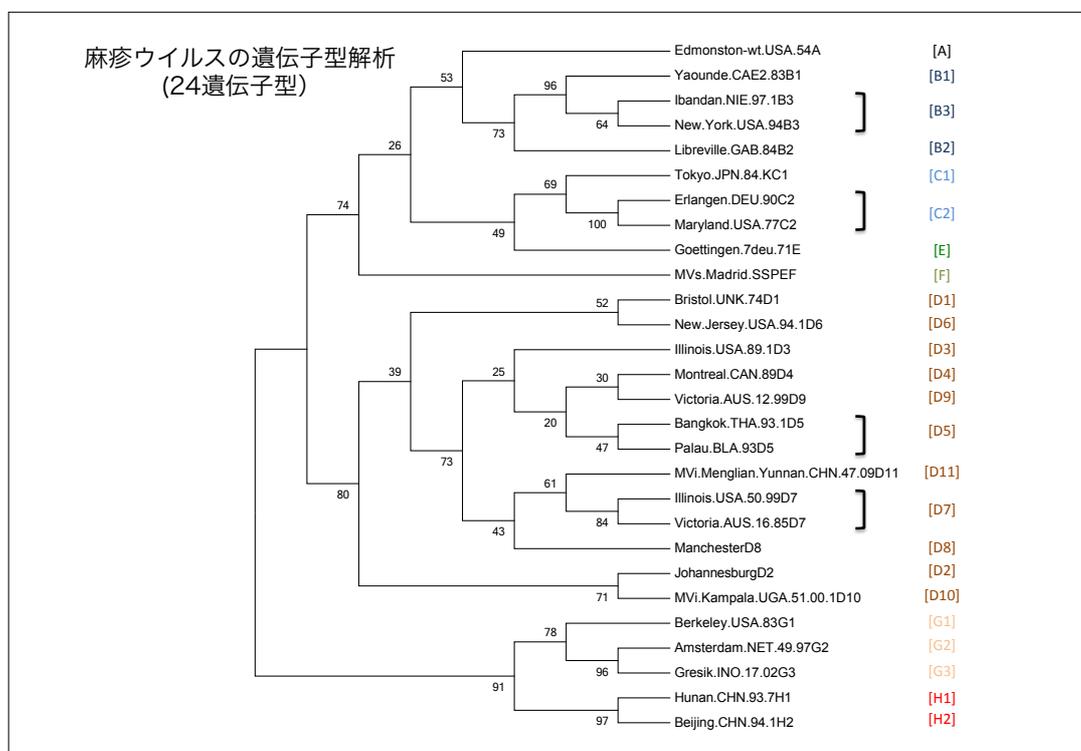
(例 3) MVs/HiroshimaC. JPN/33.10/2[D8]

2010 年疫学週 33 週に広島市で発症した 2 番目の患者から採取された検体から検出された麻疹ウイルス遺伝子型 D8 の配列

なお、ウイルス量が少ない場合、real-time PCR 陽性でも N 遺伝子 cRT-PCR で検出できない場合もある。その場合、遺伝子型不明 (Not Typed) とする。ワクチンによる副反応が疑われ、N 遺伝子 cRT-PCR で検出ができない場合には、H 遺伝子 cRT-PCR により増幅された H 遺伝子の塩基配列を解析し、BLAST 検索することでワクチン株かどうかの鑑別ができる事もある。

また、遺伝子解析の結果は NESID 病原体検出情報システムに登録する。また可能な限り DDBJ 等の遺伝子バンクにも登録する。

PCR 産物の遺伝子解析、系統樹解析、遺伝子バンクへの登録等が困難な場合は、国立感染症研究所ウイルス第 3 部に依頼する事もできる。



(図 6)

表 2. 遺伝子型決定用参照麻疹ウイルス遺伝子名、Accession No. 一覧(文献 1 一部修正)

Genotype	Name (Genebank)	Accession No.
A	MVi/Maryland. USA/0. 54	U01987
B1	MVi/Yaounde. CMR/12. 83	U01998
B2	MVi/Libreville. GAB/0. 84	U01994
B3	MVi/New York. USA/0. 94	L46753
	MVi/Ibadan. NGA/0. 97/1	AJ232203
C1	MVi/Tokyo. JPN/0. 84	AY043459
C2	MVi/Maryland. USA/0. 77	M89921
	MVi/Erlangen. DEU/0. 90	X84872
D1	MVi/Bristol. GBR/0. 74	D01005
D2	MVi/Johannesburg. ZAF/0. 88/1	U64582
D3	MVi/Illinois. USA/0. 89/1	U01977
D4	MVi/Montreal. CAN/0. 89	U01976
D5	MVi/Palau/0. 93	L46758
	MVi/Bangkok. THA/12. 93	AF079555
D6	MVi/New Jersey. USA/0. 94/1	L46750
D7	MVi/Victoria. AUS/16. 85	AF243450
	MVi/Illinois. USA/50. 99	AY037020
D8	MVi/Manchester. GBR/30. 94	AF280803
D9	MVi/Victoria. AUS/12. 99	AF481485
D10	MVi/Kampala. UGA/51. 00/1	AY923185
D11	MVi/Menglian. Yunnan. CHN/47. 09	GU440571
E	MVi/Goettingen. DEU/0. 71	X84879
F	MVi/Madrid. ESP/0. 94 (SSPE)	X84865
G1	MVi/Berkeley. USA/0. 83	U01974
G2	MVi/Amsterdam. NLD/49. 97	AF171232
G3	MVi/Gresik. INO/18. 02	AY184217
H1	MVi/Hunan. CHN/0. 93/7	AF045212
H2	MVi/Beijing. CHN/0. 94/1	AF045217

2. ウイルス分離法

2-ア) ウイルス分離法

本稿では柳らにより樹立された Vero/hSLAM (signaling lymphocyte-activation molecule, CD150) 細胞による麻疹ウイルスの培養法について記述する(6)。なお、初版マニュアルに記載された B95a 細胞も野生株に感受性である(7)。

A) Vero/hSLAM 細胞の培養に必要な培地および試薬

- DMEM (Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium) : グルコース 4500 mg/L (high glucose)、L-グルタミン、Sodium Carbonate を含む。自家調整または市販品 (シグマ Cat. No. D6429-500ML 等) または MEM (Minimum Essential Medium) (ギブコ Cat. No. 11095-080 等)
- 牛胎児血清 (FCS)
- 抗生剤 (ペニシリン/ストレプトマイシン)
- Geneticin(G418) 50 mg/ml 溶液:自家調整または市販品(ギブコ Cat. No. 10131-035 等)
- EDTA-トリプシン : 0.1%トリプシン-0.02% EDTA-PBS 液
- PBS(-)
- 細胞凍結保存液 : 自家調整または市販品 (BIOLABO セルバンカー等)

B) 細胞増殖用(GM)および細胞維持用(MM)培地の調整

Vero/hSLAM 細胞を麻疹ウイルス感受性に保つ為に GM には Geneticin を添加する。GM に Geneticin を添加せずに培養する場合は、ウイルス感受性に影響がないと思われる継代 15 代以内に細胞を用いる。元となる凍結保存細胞の準備には Geneticin を添加した培地で培養した細胞を使用するのが望ましい。

- 細胞増殖用培地 (GM) : DMEM 500ml に FCS 35 ml (最終濃度 7%)、Geneticin 4ml (最終濃度 0.4 mg/ml) およびペニシリン、ストレプトマイシンを加え調整する。
- 維持培養液 (MM) : DMEM 500ml に FCS 25ml (最終濃度 5%) およびペニシリン、ストレプトマイシンを加え調整する。

C) 細胞の継代培養手順

細胞の継代培養は、3-4 日間隔で、培養フラスコ 1 本を消化して得られた総細胞を 1/5 ~1/10 に希釈して行う。

(75cm² フラスコで培養する場合)

1. 古い培養液をフラスコから除く。
2. PBS で細胞表面をリンス後、フラスコから除く。この操作を 1-2 回行う。
3. EDTA/トリプシン 0.1%-PBS 液 2ml をフラスコに加え、37°Cにおいて細胞を消化する。
4. 5 分ごとにフラスコを観察し、細胞が丸くなりはがれるまで消化を行う。
5. 新しい GM 8ml をフラスコに加え、ピペッティングにより細胞を均一に分散させる。
6. 新しい 75 cm² フラスコに細胞浮遊液 1~2ml を分注する。
7. さらに新鮮な GM 15~20ml を加え、5%CO₂ 存在下、37°Cで培養する。

D) 細胞の凍結保存手順

Vero/hSLAM 細胞は、Geneticin を添加した培地で培養した、継代歴の若い細胞を凍結保存し、ロット管理することが望ましい。細胞は、増殖期（細胞継代後 2~3 日目）の細胞が凍結保存に適している。通常 75cm² フラスコ 1 本から 3 本の凍結ストックを作製する。

1. 継代培養手順に準じて EDTA/トリプシンで消化後、GM を加えピペット操作により細胞を分散させる。
2. 細胞浮遊液を 15ml 遠心管にいれ、1,500 rpm 5 分間室温で遠心する。
3. 沈渣細胞に所定量の凍結保存用培地を加え、泡立てないようにピペッティングで細胞を均一に再浮遊させる。
4. 凍結保存用チューブに分注する。
5. -80°Cのフリーザーに一晩おき、1~2 日後に液体窒素中に保存する。
6. 後日、凍結したロットのうちの本を融解し、細胞の生存率や保存状態を確認する。

E) 凍結保存細胞からの培養手順

Vero/hSLAM 細胞は高密度で培養を開始すると接着率が良い。凍結保存手順に述べた細胞量で凍結保存した場合、培養開始は 25cm² フラスコを用いる。

1. 凍結細胞を 37°Cの water bath または流水にて素早く融解する。
2. 融解した細胞に適量のあらかじめ 37°Cに温めた GM を加え、15,000rpm、5 分間室温で遠心する。
3. 沈渣細胞に 6 ml の GM を加え、泡立てないようにピペティングし細胞を再浮遊させる。
4. 25cm² フラスコに細胞浮遊液を分注し、5%CO₂ 存在下、37°Cで培養を開始する。

5. 培養開始 24 時間後に顕微鏡で観察し、細胞が付着していることを確認後、培地を新しい GM へ交換する。
6. 培養 2～3 日目に継代する。

F) ウイルス分離手順

咽頭および鼻腔拭い液は II. 3. 検体の処理方法、1) 咽頭および鼻腔拭い液 に従って検体を処理する。あるいはそのまま試料として用いることも可能である。全血の場合はあらかじめ PBMC を分離し、これを接種試料に用いる。PBMC の分離法は II. 3. 検体の処理方法、2) 凝固防止末梢血液 の項を参照のこと。また 尿は II. 3. 検体の処理方法、3) 尿に従って処理した沈渣細胞を用いる。各試料は、細胞毒性を考慮して 2 希釈（原液（尿においては 2 倍希釈）および 10 倍希釈液）を準備するのが望ましい。

（試料接種手順）

1. あらかじめ Vero/hSLAM 細胞をフラスコまたはプレートに単層形成させる。
2. 各試料の一部を MM で 10 倍希釈し、2 希釈（原液（尿においては 2 倍希釈）および 10 倍希釈された液）を準備する。
3. 準備した Vero/hSLAM 細胞の培養液を除き、各試料を接種する。
4. 37°C、60 分間おく。
5. 新鮮 MM を加え、37°C、5%CO₂ で培養する。
6. 接種プレートは毎日観察し、細胞変性効果（CPE）の有無を確認する。CPE が観察されない場合、培養 7 日後に接種細胞を継代する。

（ウイルス分離中の細胞継代手順）

1. 接種細胞を PBS で洗浄後、EDTA/トリプシンを加え 37°C で細胞を消化する。
2. 細胞が丸くなりはがれたことを確認し、新しい MM を加える。1/3 量を同サイズの新しいフラスコまたはプレートにまき、接種細胞（2 継代目）として 37°C で培養する。
3. さらに 7 日間観察を行う。
4. CPE が観察された場合、培養液と細胞をともに回収し、半量を新しい Vero/hSLAM 細胞とともに培養する。半量は -80°C で保存する。

G) 分離ウイルスの増殖、保存手順

分離したウイルスは継代歴の若いうちに保存する。分離ウイルス株の性状解析等、研究に使用する目的では、高い力価の感染価を示すこと、熱不活化ウイルスや欠損干渉

(DI)粒子などの含有が少ないことが望ましい。また、限界希釈法等によりウイルスのクローニング操作を行うことが望ましい。

1. 培養細胞にウイルスを感染させ培養する。
2. CPE が培養細胞の約 80%に観察される時期に新しい MM と交換する。
3. CPE が全面に広がったところで培養液と細胞を回収し、 -80°C で保存する。
4. 保存したウイルス感染細胞および培養液は凍結融解あるいは超音波処理を行う。その後 4°C で 3000rpm 10 分間程度遠心を行い、その上清を解析用ウイルス液として使用する。回収した上清は分注し、使用するまで -80°C で保存する。
5. 保存したウイルス液は、ロットごとにあらかじめその感染価を測定する。

H) 間接蛍光抗体法

分離されたウイルスが麻疹ウイルスかどうか確認する時に用いる。

● 試薬

1. 抗麻疹ウイルス Nucleoprotein、ポリクローナル抗体 (Novis Biologicals, Cat. No. NB100-1856 (ウサギポリクローナル抗体) 等)
2. 蛍光標識 (FITC 等) 二次抗体
3. ブロッキング用血清 (二次抗体の動物種にあわせて準備する。または FCS で代用する。)
4. 固定液 : 2.5%ホルマリン/0.5%TritonX100-PBS 液、またはアセトン/メタノール 1:1 混合液 (一般に細胞の形態維持にはホルマリン固定が優れるが、抗原性の維持には有機溶媒のほうが優れる。上記の抗体は双方の固定で染色可能である。)

● 間接蛍光抗体法手順

(感染細胞の準備)

1. あらかじめ Vero/hSLAM 細胞をプレート上に単層形成させる。
2. 用意したプレートにウイルスを感染させる。陰性対照用に非感染細胞、陽性対照用に既知の麻疹ウイルス感染細胞を準備する。
3. CPE を確認後 (感染 1~2 日目) 固定、染色を行う。染色中には細胞表面が乾燥しないよう注意する。

(染色手順)

1. 細胞表面を PBS で 3 回洗浄する。
2. 固定液を加え室温で 20 分間固定する。
3. 固定液を除き、PBS で 3 回洗浄する。

4. PBS で最終濃度 1～2%にブロッキング用血清を希釈する（1～2%ブロッキング用血清-PBS 液）。細胞に加えブロッキング処理する。室温で 30 分間、静置。
5. 抗麻疹ウイルス抗体を 1～2%ブロッキング用血清-PBS 液で希釈する。添加したブロッキング血清-PBS 液を除いた後、抗体を細胞へ添加する。室温で 1 時間、静置。
6. 添加した抗体を除き、PBS で 3 回洗浄する。
7. 蛍光色素標識二次抗体を 1～2%ブロッキング用血清-PBS 液で希釈する。細胞へ添加し、室温、30 分間静置する。
8. PBS で 3 回洗浄する。
9. 適当量の PBS を加え、蛍光顕微鏡で陰性対照、陽性対照および感染細胞を観察し、特異蛍光の有無を調べる。

IV 血清学的診断法

血清学的検査は、個人／集団を対象とした特定病原体に対する診断、抗体保有状況、罹患歴、ワクチンの効果判定などの用途に用いられる。検査法は、HI 試験（赤血球凝集抑制試験）、EIA 法（酵素抗体法）、PA 法（ゼラチン粒子凝集法）、中和試験、PHA 法（受身赤血球凝集法）、IFA 法（間接蛍光抗体法）などが一般的である。なお、WHO は麻疹の検査診断法として EIA 法による IgM 抗体の検出を推奨している。本稿では、EIA 法による IgM、IgG 検出法、並びに PA 法について概説する。

1. IgM 抗体検査法 (EIA 法)

IgM-EIA は、血清（または血漿）中の IgM 抗体を、酵素標識した抗体（酵素標識抗体）とその標識酵素に反応して発色する基質を用いて検出する方法である。直接吸着法、サンドイッチ法を応用した EIA-IgM 測定キット*が市販されている。直接吸着法とは、マイクロプレートに固層化した麻疹ウイルス抗原に結合した抗麻疹ウイルス IgM 抗体を、酵素標識抗ヒト IgM 抗体で検出する方法である。一方、サンドイッチ法とは、マイクロプレートに抗ヒト IgM 抗体を固層化し、これに結合したヒト抗麻疹ウイルス IgM 抗体に麻疹ウイルス抗原を反応させ、麻疹 IgM 抗体と結合したウイルス抗原を酵素標識抗ウイルス抗原抗体で検出する方法である。IgM-EIA は感度が高く、一定の範囲で定量性があり、煩雑な操作を必要とせずに短時間で結果を得ることができる一方で、検体の採取期間が不適切であると IgM 抗体が検出できないことがある（検査検体の採取は発疹出現後 4-28 日以内が良い）。また、ヒトパルボ B19 ウイルス（伝染性紅斑）、突発性発疹（HHV6、

7)、風疹ウイルス、EB ウイルス、サイトメガロウイルス等の感染者から抗麻疹ウイルス IgM 抗体が検出(擬陽性、偽陽性)となる事も知られている(8)。修飾麻疹の場合には IgM 抗体が陰性の場合もある。よって検査結果の判定には注意が必要である。使用法はそれぞれの取扱い説明書を参考にしてほしい。

* ウイルス抗体 EIA「生研」麻疹 IgM：デンカ生研、エンザイグノスト麻疹/IgM：シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス

2. IgG 抗体検査法

血清中の抗麻疹ウイルス IgG 抗体価の推移を測定し判定できる事がある。ペア血清(発疹出現後 1 週間以内の急性期血清と発疹出現後 2~4 週間後の回復期血清)を準備し、2 つの血清を同時に同じ検査法で検査し IgG 抗体価が有意に上昇した場合、麻疹と診断する。一般的に IgG 抗体価が 2 倍以上上昇した時、有意な上昇と考える。なお修飾麻疹では急性期においても抗体価が著明な高値を示す場合がある。この場合、ペア血清で有意な抗体価の上昇が確認できない場合もある(急性期ですでに高値なのでそれ以上の上昇がない)。

2-ア) IgG-EIA 法

抗麻疹ウイルス IgG 抗体の検出には、IgM-EIA 同様に EIA-IgG 測定キット*が市販されている。使用法はそれぞれの取扱い説明書を参考にしてほしい。

* ウイルス抗体 EIA「生研」麻疹 IgG：デンカ生研、エンザイグノスト麻疹/IgG：シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス

2-イ) PA 法

粒型化したゼラチンに麻疹ウイルス抗原を吸着させた人工担体に抗麻疹ウイルス抗体が結合すると凝集反応が起こり、凝集塊が形成されることを原理としている。測定には、EIA のように測定機器(比色計)を必要とせず、目視により結果判定ができる。PA 法もキット*が市販化されており、本邦では感染症流行予想調査における抗体保有状況の調査でも用いられている。使用法は取扱い説明書を参考にする事。

*セロディア-麻疹：富士レビオ

V. 麻疹検査診断に関する考察

麻疹は WHO 等が排除をめざしている感染症であり、排除の認定には検査診断

に基づく質の高いサーベイランスが求められている。また排除の定義から遺伝子解析によるウイルスの鑑別も求められている。これらから平成 25 年に改訂された「麻疹に関する特定感染症予防指針」では麻疹疑い例は全例に原則、血清学的検査だけでなく、遺伝子検査の実施を求めている。

一方、感染症において症例数が減少した時は検査の陽性的中率（Positive Predictive Value; PPV）が下がり偽陽性が出現する確率が高まる事が知られている。麻疹症例数が減少した現在では検査を用いても正しい診断が困難な場合がある。伝染性紅斑患者や突発性発疹患者血清からクロス反応等によってある頻度で麻疹 IgM 抗体が検出されている（偽陽性例）。また real-time RT-PCR、cRT-PCR は感度が高いために、環境中に過去の試験検体等の残査がごく微量に存在する場合、それらを検出する可能性も指摘されている（偽陽性例）。逆に不適切な時期に採取した検体を用いたために陰性と診断されるケースも考えられる（偽陰性例）。検査の特性や限界を理解する必要がある。

- 病原体検出法、血清診断法の結果は一致しているか？
- 病原体検出法においては複数の検体からウイルスゲノムが検出されたか？
- 検体の採取時期は適切であったか？
- 患者の周囲で麻疹の報告があるか？
- 発疹出現の 7～21 日前に海外（特に流行地域）への渡航歴はあるか？
- ワクチン接種歴、罹患歴があるか？
- 最近、麻疹ワクチン（または MR ワクチン）を接種したか？
- 修飾麻疹特有の抗体価の動きはしていないか？
- 臨床経過は麻疹として矛盾がないか？

等に留意し、検査結果を慎重に判断していく事が求められる。

VI. 文献

- 1) World Health Organization, Measles virus nomenclature update: 2012, Wkly Epidemiol Rec. 2012. 87(9): 73-80.
- 2) World Health Organization, Framework for verifying elimination of measles and rubella, Wkly Epidemiol Rec. 2013. 88(9): 89 - 100.
- 3) 厚生労働省告示第 126 号：麻疹に関する特定感染症予防指針（平成 24 年 12 月 14 日一部改正・平成 25 年 4 月 1 日適用）平成 25 年 3 月 30 日
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou21/dl/241214a.pdf>

- 4) 森嘉生ら、病原体検出マニュアル 風疹 第三版
- 5) Hummel KB, et al. Development of quantitative gene-specific real-time RT-PCR assays for the detection of measles virus in clinical specimens, J Virol Methods. 2006. 132(1-2): 166-73.
- 6) Ono N, et al. Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor. J Virol. 2001. 75: 4399 - 4401.
- 7) Kobune F, et al. Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. J Virol. 1990. 64: 700-705.
- 8) Woods CR, False-positive results for immunoglobulin M serologic results: explanations and examples. J Ped Infect Dis Soc. 2013. Doi; 10.1093/jpids /pis133.

VII. 執筆者

国立感染症研究所ウイルス第3部

駒瀬勝啓、染谷健二、關文緒、中津祐一郎、田原舞乃、酒井宏治、竹田誠

麻疹・風疹レファレンスセンター

長野秀樹、三好正浩、青木洋子、小川知子、七種美和子、児玉洋江、皆川洋子、安井善宏、加瀬哲男、倉田貴子、佐倉千尋、村田祥子、濱崎光宏、世良暢之、加藤峰史、平良勝也

群馬県衛生環境研究所 塚越博之

神戸市環境保健研究所 秋吉京子、奴久妻聡一

VIII 改訂履歴

第1版 平成14年3月

第2版 平成20年7月

第3.1、2版 平成27年3月

第3.3版 平成27年8月