

# 麻疹診断マニュアル（第2版）

平成20年7月

## 目 次

### 序

1. 麻疹の概説
2. 麻疹検査に関する一般的注意
  - 2-1 検査材料の採取, 保存および処理
    - 2-1-1 咽頭および鼻腔ぬぐい液
    - 2-1-2 凝固防止末梢血液
    - 2-1-3 髄液
  - 2-2 実験室内診断基準
  - 2-3 検査試料の輸送
3. 病原学的検査
  - 3-1 培養細胞
    - 3-1-1 必要試薬
    - 3-1-2 細胞増殖用および維持用培養液の調整
    - 3-1-3 細胞の継代培養
    - 3-1-4 細胞の凍結保存
  - 3-2 ウイルス分離方法
    - 3-2-1 咽頭および鼻腔ぬぐい液からのウイルス分離
    - 3-2-2 血液試料からのウイルス分離
    - 3-2-3 剖検組織からのウイルス分離
  - 3-3 分離ウイルス株の同定
    - 3-3-1 中和試験による血清学的同定
    - 3-3-2 感染細胞を用いた間接蛍光抗体法による同定
  - 3-4 分離ウイルス株の増殖・保存
  - 3-5 分離ウイルス株の命名法

4. 遺伝子学的検査（特異遺伝子の増幅／解析）
  - 4-1 材料
  - 4-2 ウイルス RNA 抽出および逆転写反応
    - 4-2-1 主な試薬・機器
    - 4-2-2 ウイルス RNA 抽出
    - 4-2-3 逆転写反応
  - 4-3 N 遺伝子相同解析および分子系統樹解析
    - 4-3-1 主な試薬・機器
    - 4-3-2 N 遺伝子 PCR 法およびダイレクトシーケンス法
  - 4-4 PCR-RFLP 法による HA 遺伝子解析
    - 4-4-1 主な試薬・機器
    - 4-4-2 HA 遺伝子 PCR-RFLP 法
  
5. 血清学的検査
  - 5-1 中和試験法
    - 5-1-1 使用器具
    - 5-1-2 試薬
    - 5-1-3 Vero/SLAM 細胞を感染標的細胞とした同時接種法の術式
    - 5-1-4 使用ウイルス量の二次検定
    - 5-1-5 判定
  - 5-2 赤血球凝集抑制試験法
  - 5-3 ゼラチン粒子凝集法
  - 5-4 酵素抗体測定法
  
6. 略語リスト
  
7. 参考文献
  
8. 検査依頼先
  
9. 緊急時（実験室内暴露）の応急対応と事故対応基準
  
10. 執筆者一覧

## 序

病原体検出マニュアル「麻疹編」は平成 14 年に初版が編集され、既に 6 年が経過した。この間、麻疹の発生疫学にはさまざまな変化が生じ、ワクチン接種も 1 歳児における 1 回（勧奨）接種から、1 歳児および小学校入学前 1 年間の 2 回接種に変更された。また、この 5 年間に限り、中学 1 年および高校 3 年生に補足的接種を行うことになり、平成 24 年を設定目標とした麻疹排除計画が推進されつつある。

昨今の診断技術の進展および麻疹排除計画目標に即し、精度の高い実験室内診断が要求されることから今回、麻疹診断マニュアルを改訂することになった。今回改訂された主たる要点はウイルス分離および遺伝子診断のそれぞれの項である。初版の追補として活用されることを期するものである。

### 1. 麻疹の概説

麻疹は小児の重要な急性熱性発疹性ウイルス感染症で、原因ウイルスは paramyxovirus 科 morbillivirus 属に属する麻疹ウイルス (MV) である。臨床症状は肺炎、中耳炎、罹患中に一時的に強い免疫抑制が生じることからまれに急性脳症などの合併症を併発することもある。致死率は 0.1~0.2% であるが、いっぽうワクチンで予防可能な感染症でもある。典型的な麻疹症例の臨床症状および臨床経過を図 1 に示す。

麻疹ウイルス (MV) は、直径 100~200nm のエンベロープを有する。ゲノムは一本鎖(-)RNA ウイルスで、遺伝子型 (genotype) は A から H に分類されている。わが国では有効なワクチンが開発されているが、依然全国的な流行がみられ、その原因ウイルスは、遺伝子型 D3, D5 あるいは H1 であることが多い。現在 (2008 年) において、年間の患者数は約数万人以上と推計されている。さらに最近の麻疹は小児のみならず成人麻疹や修飾麻疹の多発を特徴としているが、疫学知見の詳細は他書を参照されたい。

このような背景から、平成 18 年から麻疹・風疹ワクチンの 2 回接種法が導入され、また平成 20 年 1 月に「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」に基づき、全数把握疾患に位置づけされている。

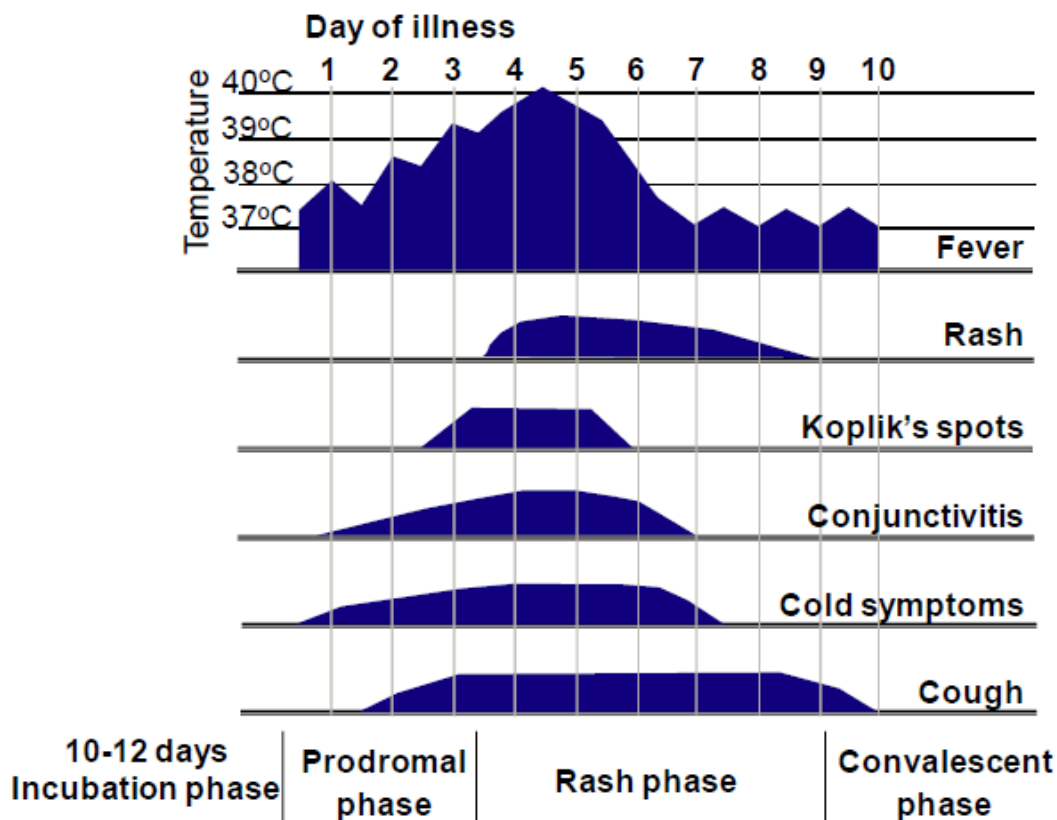


図1 典型的な麻疹症例の臨床所見および臨床経過

(Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection, 2<sup>nd</sup> Eds, WHOより)

## 2. 麻疹検査に関する一般的注意

検査は臨床材料を扱うため感染性因子取り扱いに留意したユニバーサルプレコーション (universal precaution) 操作, バイオセーフティ区域設定, 感染性因子および増幅遺伝子の実験室内汚染と相互汚染に細心の注意が必要である。

術者はあらかじめ MV に対する免疫を保持していること, また未保持者は従事前に予防接種をうけ, 免疫を獲得していることを確認することも重要である。

### 2-1 検査材料の採取, 保存および処理

検査に供する臨床材料は咽頭ぬぐい液, 凝固防止末梢血液, 鼻腔ぬぐい液, 髄液, 尿, 剖検組織などが一般に用いられる。麻疹典型例における免疫応答および好ましい検体採取時期などを図2に示す。

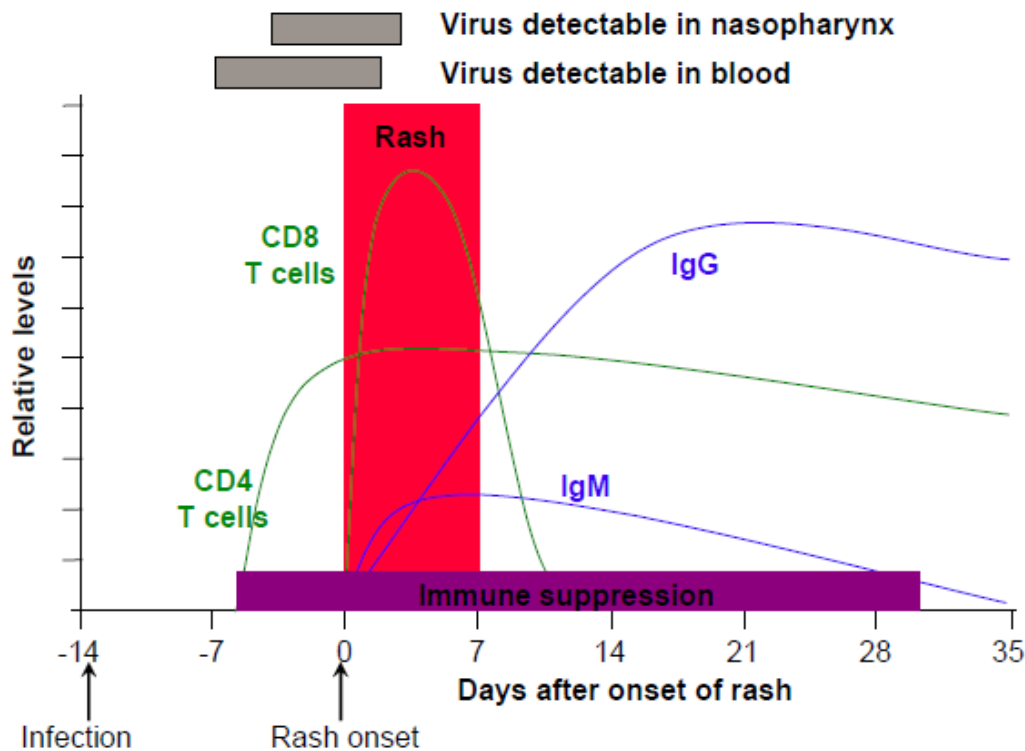


図2 麻疹典型例における免疫応答および検体採取時期

(Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection, 2<sup>nd</sup> Eds, WHOより)

### 2-1-1 咽頭および鼻腔ぬぐい液

(至適検査：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に浸漬、保存する。保存は採取後 48 時間以内に検査に供する場合は 4℃ 保冷保存、それ以外の場合は -80℃ 凍結保存する。滅菌綿棒は後述する遺伝子検査に不適の場合があるため、使用しないことが望ましい。ウイルス保存輸送液は自家調整された液、市販のキットあるいは同等品を用いる。検体は 3,000rpm, 20 分間遠心し、上清を検査に用いる。

### 2-1-2 凝固防止末梢血液

(至適検査：ウイルス分離培養および遺伝子検査)

ACD（クエン酸ナトリウム）加末梢血液を用いる。ヘパリン加末梢血液の場合

合は、ウイルス分離培養のみに供する。

採血された抗凝固防止血液は以下のいずれかの処理操作を行う。

#### [方法 1]

- 1) ACD 加血液に等量の PBS を混和する。
- 2) あらかじめ Ficoll-paque (比重 1.077) 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) 1,300g, 20 分間遠心する。
- 4) 表層から順に血漿 (約 2 倍希釈), 末梢血単核球細胞 (PBMC), 比重液および赤血球成分に分画される。血漿はウイルス分離, 遺伝子検査および抗体価測定用, PBMC はウイルス分離および遺伝子検査に供する。
- 5) 分画された PBMC は PBS で 3 回洗浄後, 凍結保存液[10%DMSO 加牛胎児血清 (FBS) ]に所定の濃度 ( $2 \times 10^4 \sim 10^6$  cells/ml) に調整し,  $-80^\circ\text{C}$  で凍結保存する。同様に血漿は $-20^\circ\text{C}$  (一部はウイルス分離用として $-80^\circ\text{C}$ ) に保存する。

#### [方法 2]

- 1) ACD 加血液を 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ローダチップなどにより回収する。
- 3) 回収された細胞を元の量のウイルス保存液あるいは細胞維持用培養液 (MM) に再浮遊し, ウイルス分離試料とする。
- 4) その他の画分は方法 1 に準じて保存する。

#### 2-1-3 髄液

(至適検査: ウイルス分離培養および遺伝子検査, まれに抗体価測定)

採取された髄液をそのまま用いる。 $-80^\circ\text{C}$  で保存する。

#### 2-1-4 尿 (至適検査: ウイルス分離培養および遺伝子検査)

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。-80°C で保存する。

#### 2-1-5 剖検組織（至適検査：ウイルス分離培養および遺伝子検査）

亜急性硬化性全脳炎（SSPE）ウイルスは細胞結合性が強いため、ウイルスを分離する場合、特殊な組織処理が必要である。-80°C で保存する。

なお、凍結切片を用いた免疫組織検査では組織の急速凍結処理（n-ヘキサン・アセトンドライアイス）が必要である。処理方法は他の成書を参照されたい。

#### 2-2 実験室内診断基準

つぎのいずれかあるいは複数の結果が得られた場合、MV 感染とする。

- 1) MV 野生株が分離（検出）・同定される。
- 2) MV 特異遺伝子が検出・解析される。
- 3) MV 特異的 IgG 抗体の陽転あるいは対血清（急性期および回復期）中の抗体価の 4 倍以上の上昇が確認される。
- 4) MV 特異的 IgM 抗体が検出される。

#### 2-3 検査試料の輸送

検査材料は採取容器から内容物が漏出しないような適切な包装をした後、温度管理下（一般に-80°C 以下、凍結状態の保持が困難な場合は非凍結状態で 4°C に保持が望ましい）で検査依頼機関へ送付される。なお、採取後 48 時間以内に検査に供する場合は 4°C 保冷保存でもよい。

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律施行規則（平成 10 年厚生労働省令第 99 号）第 31 条の 36 第 1 項打 2 号ホおよび第 4 号の規定に基づき、特定病原体等の運搬に係る容器等に関する基準が定められ、平成 19 年 6 月 1 日から適用されている。詳細については以下のサイトを参照されたい（<http://mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou17/03.html>）。

検査材料には必要事項（個体識別等）を明記するとともに、送付リストを添付する。



### 3. 病原学的検査

病原体（ウイルス）培養検査は正常培養（感染標的）細胞にウイルスを感染させ MV の増殖を確認する検査であることから、検査結果が得られるためには一定の日数を要する。また検査では感染性のウイルスを扱うため、バイオセーフティを考慮した操作が求められる。

一方、ウイルス分離・同定は最も信頼性の高い診断法である。また、分離株の血清学的・遺伝学的解析を行うことと株の保存は重要である。

#### 3-1 培養細胞

本稿では柳らにより樹立された Vero/SLAM（signaling lymphocyte-activation molecule, CD150）細胞による MV の培養法について記述する。

なお、初版マニュアルに記載された B95a 細胞、CBMC 細胞、Raji 細胞も野生株に感受性である。また Vero 細胞、MRC-5 細胞は MV ワクチン株に感受性である。

#### [Vero/SLAM 細胞の継代培養]

##### 3-1-1 必要試薬

- Minimum essential medium（MEM） 500ml（Gibco, Cat. No. 11095-080 あるいは同等品）
- FBS 35ml
- ペニシリン/ストレプトマイシン（Penicillin 50,000U/ml, Streptomycin 50mg/ml） 1ml
- Geneticin（Gibco, Cat. No. 10131-035, 50mg/ml） 4ml
- EDTA 0.02%-トリプシン 0.1%-PBS 液
- リン酸緩衝生理食塩液（PBS-）
- 細胞凍結保存液（自家調整、市販品 セルバンカー（BIOLABO）、あるいは同等品）

##### 3-1-2 細胞増殖用および維持用培養液の調整

細胞増殖用培養液（GM）は MEM に FBS, Penicillin, Streptomycin および Geneticin を所定量加え調整する。FBS の最終濃度は 7% である。

### 3-1-3 細胞の継代培養

細胞の継代培養は 7 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 3 倍量の増殖培地に再浮遊させ 3 本のフラスコに分注する方法が一般的である。

#### 〔継代培養操作手順〕

- 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 2ml を加え、細胞を消化する。
- 4) 新鮮な GM 7ml を加え、ピペッティングにより細胞を均一に分散させる。
- 5) 新しい 75cm<sup>2</sup> フラスコに細胞浮遊液 3ml を分注する。
- 6) さらに新鮮な GM 20 ml を加え、5%CO<sub>2</sub> 存在下、37°C で静置培養する。

### 3-1-4 細胞の凍結保存

Vero/SLAM 細胞は MV 高感受性細胞であるが、継代歴が進んだ細胞では MV 増殖に対する感受性は低下する。このため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。

#### 〔凍結保存操作手順〕

培養 3~5 日目の Vero/SLAM 細胞が凍結保存に適している。通常 75cm<sup>2</sup> フラスコ 1 本から 2 本の凍結ストックを作成する。

- 1) 継代培養手順に準じて EDTA/トリプシンで消化後、所定量の新鮮 GM を加え、ピペット操作により細胞を分散する。
- 2) 分散された細胞浮遊液を 15ml 遠心管に入れ、1,500rpm 5 分間遠心する。
- 3) 沈渣細胞を所定量の凍結保存用培地（自家調整あるいは市販品）に泡立たないようにピペッティング操作で細胞を均一に再浮遊させる。
- 4) 細胞凍結用チューブに 1ml ずつ分注する。
- 5) -80°C のフリーザーに一晩、置く。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、細胞の生存率や培養状態を確認する。

### [凍結 Vero/SLAM 細胞の培養]

- 1) 凍結細胞を 37°C の water bath または流水にて迅速に融解する。
- 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、1,500rpm, 5 分間遠心する。
- 3) 沈渣細胞を 6ml の GM を加え、泡立てないようにピペッティング操作し、細胞を再浮遊させる。
- 4) 25cm<sup>2</sup> フラスコに細胞浮遊液を分注し、5%CO<sub>2</sub> 存在下、37°C で培養を開始する。
- 5) 培養 1 日後に細胞がフラスコに接着していることを確認する。
- 6) 培養 5~7 日後に継代培養する。

### 3-2 ウイルス分離方法

#### 3-2-1 咽頭および鼻腔ぬぐい液からのウイルス分離

- 1) あらかじめ 24 穴培養プレートに単層形成させた Vero/SLAM 細胞に試料(原液および 10 倍希釈された液)を 1 穴あたり 100 $\mu$ l ずつ 2~4 穴接種する。
- 2) 36°C で 60 分間静置する。
- 3) 新鮮 MM 900 $\mu$ l を各穴に分注し、36°C, 7 日間静置培養する。
- 4) この間、ウイルス増殖の指標として細胞変性効果 (CPE) 出現の有無を毎日観察する。
- 5) 培養 7 日後に CPE が観察されない場合は、漸次 1)~4) に準じて継代培養を行う。
- 6) ウイルス増殖が確認された場合、後述する分離株の同定を試みる。

#### 3-2-2 血液試料からのウイルス分離

- 1) MM 2.5ml に試料 50 $\mu$ l を混和する。
- 2) あらかじめ 25cm<sup>2</sup> 培養フラスコに単層形成させた Vero/SLAM 細胞に全量を接種し、36°C で静置培養する。
- 3) 培養 16~18 時間後に培養液を除去した後、MM で細胞表面を洗浄する。  
なお、除去培養液および洗浄液はウイルスに汚染されているものとして、処理することが必要である。
- 4) 新鮮 MM 2.5ml を分注し、7 日間培養を継続する。
- 5) この間、適宜、半量の新鮮 MM の交換を行う。

6) 以下，上述の 4)～6)に準ずる。

### 3-2-3 剖検組織からのウイルス分離

亜急性硬化性全脳炎（SSPE）ウイルスは細胞結合性が強いため，ウイルス分離は細切（1mm 以下）された組織小片と感染標的細胞との混合培養を行う。

- 1) 試料を滅菌済み鋏刃で細切する。
- 2) 組織細切を所定量のウイルス保存液に懸濁する。
- 3) Vero/SLAM 細胞浮遊液 2.5ml に組織細切数片混和し，36°C で静置培養する。  
この間，適宜，半量の新鮮 MM に交換する。
- 4) ウイルスの継代培養は分散された培養細胞浮遊液と新鮮培養細胞浮遊液を混和した液を培養する。

### 3-3 分離ウイルス株の同定

分離ウイルス株の同定は一般に，血清学的手法や後述する遺伝子解析などの手法を用いて同定される。その他，物理生物学的性状（核酸の種類，粒子のサイズや形態，HA 活性の欠損確認，プラークサイズの大小など）により株の同定が可能である。なお，Vero/SLAM 細胞における MV の典型的な細胞変性効果（CPE）を図 3 に示す。

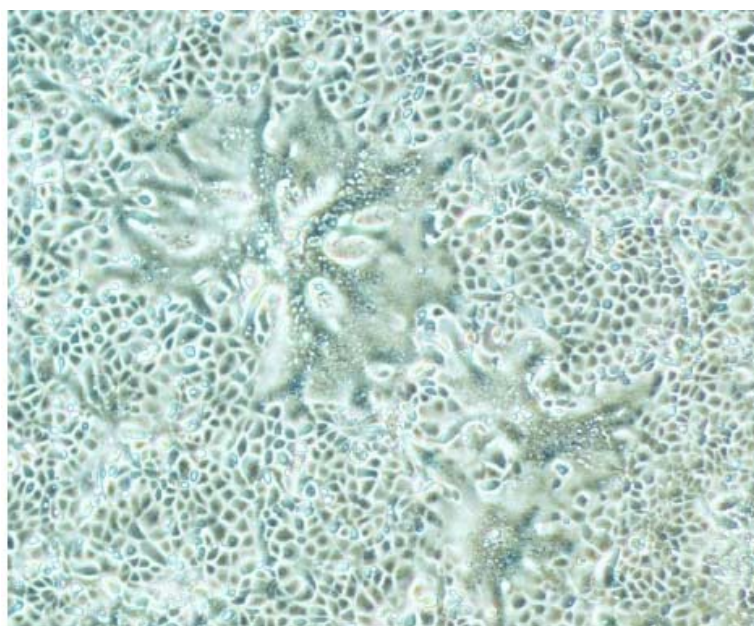


図 3 MV の典型的な CPE（Vero/SLAM 細胞）

### 3-3-1 中和試験による血清学的同定

いずれかの方法による中和試験 (NT) が実施される。また、以下の試験法は、使用される液量、培養プレートの種類と容量、ウイルス接種法 (単層細胞への接種あるいは同時接種) など適宜、改変してもよい。

#### [血清希釈法による同定]

- 1) 2 倍階段希釈した標準抗麻疹血清 (例;デンカ生研 NT 試薬) 50 $\mu$ l に等量の 100TCID<sub>50</sub> に調整した未同定ウイルス液を加え、36°C、60 分間あるいは 4°C、16~18 時間反応させる。
- 2) 標準麻疹ウイルス株の系を同様に作製、反応させる。
- 3) あらかじめ単層形成 (96 穴プラスチックプレート) させた培養細胞に MM 100 $\mu$ l 分注する。
- 4) 反応液 25 $\mu$ l を 1 希釈あたり 2 穴接種し、36°C で静置培養する。
- 5) CPE を観察し、それぞれの系の中和価を求める。中和価は少なくとも 1 穴の CPE を抑制した血清希釈倍数の逆数とする。
- 6) 攻撃ウイルス量がいずれも所定量であったことを確認のうえ、未同定ウイルス株および標準ウイルス株に対するそれぞれの中和価が近似である場合、分離ウイルス株は麻疹ウイルスと同定される。
- 7) 中和価で 4 倍以上の相違がある場合は異なる血清型が推定されるが、MV は現在までのところ血清型は単一である。

#### [ウイルス希釈法による同定]

- 1) 未同定ウイルス液および標準麻疹ウイルス液の 10 倍階段希釈列を作製する。
- 2) あらかじめ適切な濃度 (5~10 倍) に希釈した標準抗麻疹血清 100 $\mu$ l に等量のそれぞれのウイルス階段希釈液を加え、36°C、60 分間あるいは 4°C、16~18 時間反応させる。
- 3) ウイルス対照は標準抗麻疹血清のかわりに陰性血清 (あるいは MM) を用いて同様の系を作製する。
- 4) あらかじめ単層形成 (96 穴プラスチックプレート) させた培養細胞に MM を 100 $\mu$ l 分注する。
- 5) 反応液 25 $\mu$ l を 1 希釈あたり 4 穴接種し、36°C で静置培養する。
- 6) それぞれの系の終末ウイルス感染価を求める。ウイルス対照の示す感染価

から未同定ウイルス浮遊液の感染価を減じた値が 0.5 以上を示す場合、分離株は麻疹ウイルスと同定される。なお、標準株（Edmonston 株）に対する値が同様の結果であることを確認する。

### 3-3-2 感染細胞を用いた間接蛍光抗体法による同定

- 1) 所定の濃度に調整した感染培養細胞（回収後、PBS で 1 回洗浄してもよい）をホールスライドグラス（Matsunami No.TF 1205A）に塗抹する。
- 2) 安全キャビネット内で風乾後、冷アセトン・アルコール固定（5 分間）する。
- 3) 8 単位に調整した抗麻疹モノクローナルマウス血清を重層し、モイスチャーチャンバー内に静置し、36°C、30 分間反応させる。
- 4) PBS で 3 回洗浄する。
- 5) 8 単位に調整した FITC 標識抗マウス IgG 血清を重層し、モイスチャーチャンバー内に静置し、37°C、30 分間反応させる。なお、抗麻疹モノクローナルマウス血清の代わりに抗麻疹モルモット/ウサギ血清を用いてもよい。
- 6) PBS で 3 回洗浄後、グリセリン加 PBS で封入する。
- 7) 蛍光顕微鏡下で特異蛍光抗原の有無を観察する。
- 8) 陽性対照として麻疹ウイルス標準株感染細胞および陰性対照として正常培養細胞を同様に処理し、観察する。

### 3-4 分離ウイルス株の増殖・保存

分離ウイルス株の性状解析等の検査・研究に使用するウイルス液は、高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）粒子等の含有が最小限であることが望ましい。なお、同定や研究資産として保存に用いる株は限界希釈法によりクローニング操作を行うことが望ましい。

#### 〔ウイルス液の調製方法〕

- 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鮮な MM に全量、交換する。
- 3) 6～8 時間、培養を継続した後、感染培養液を回収する。
- 4) 凍結融解あるいは超音波処理を行った後、3,000rpm、10 分間遠心沈澱した上清をウイルス液として使用するまで保存（-80°C）する。
- 5) 保存ウイルス液は、株/ロットごとにあらかじめ感染価を測定する。

### 3-5 分離ウイルス株の命名法

WHO “Standardization of the Nomenclature for Genetic Characteristics of Wild- type Measles Viruses”において、野外麻疹ウイルス分離株の分子疫学的解析からウイルスの命名法の統一がつぎのとおり示されている。

- 臨床材料から細胞培養によりウイルス株が得られた場合は、  
Mvi/City. Country/Weeks-Year/Strain number[Genotype]
- 臨床材料の RNA からウイルス遺伝子が検出された場合は、  
Mvs/City. Country/Weeks-Year/Strain number[Genotype]  
と命名する。

City：分離された市名あるいは県名

Country：分離された国名

Weeks：臨床材料が採取された週（1年を52週として表記）

Year：分離された年

Strain number：分離された場所および週が同一の場合の整理番号

Genotype：遺伝子型

その他、特殊な臨床材料からウイルスが分離された場合には Genotype の後に記載する。

(MIBE)：measles inclusion body encephalitis

(SSPE)：subacute sclerosing panencephalitis

## 4. 遺伝子学的検査（特異遺伝子の増幅／解析）

現在、麻疹ウイルス（MV）の遺伝子解析は、主に RT-PCR 法による N 遺伝子増幅・検出、相同性解析、分子系統樹解析あるいは HA 遺伝子の増幅・検出、増幅産物の RFLP（Restricting fragment length polymorphism）が行われている。ここでは、これらの方法の概略を述べる。

### 4-1 材料

材料は、咽頭拭い液、PBMCs、髄液あるいは MV 分離株を用いる。

## 4-2 ウイルス RNA 抽出および逆転写反応

### 4-2-1 主な試薬・機器

- ウイルス RNA 抽出キット (例: High Pure Viral RNA Kit; ロシュ・ダイアグノスティックス社)
- 逆転写酵素 (例: PrimeScript™ RT reagent Kit; タカラバイオ社)
- RNase Inhibitor (例: SUPERase•In™ RNase Inhibitor; アンビオン社  
この RNase Inhibitor は DTT の添加が不要である)
- 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)
- 遺伝子増幅装置 (例: ABI9600; アプライドバイオシステムズ社)

### 4-2-2 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。

抽出 RNA には、RNase inhibitor を 1U/μl 加え、-20°C~-80°C (-80°C が望ましい) で保存する。

なお、DTT (dithiothreitol) は PCR を阻害する場合がありますので、RNase inhibitor, および次項以下の反応系には DTT を含まない試薬あるいはキットを用いることが望ましい。

### 4-2-3 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述べる。前項 (4-2-2) で抽出した vRNA 溶液 10μl, 5X PrimeScript Buffer 4μl, PrimeScript RT Enzyme Mix I 1μl, Random 6mers 4μl, RNase Free dH<sub>2</sub>O 1μl を添加して総量 20μl にした後、37°C 15 分, 85°C 5 秒のインキュベーションにより cDNA 合成と逆転写酵素の不活化を行う。

RT により合成された cDNA を用い、N 遺伝子あるいは HA 遺伝子の解析を行う。



## 作成 (RT-Mix)

vRNA	10 $\mu$ l
5X PrimeScript Buffer	4 $\mu$ l
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1 $\mu$ l
Random 6mers (100 $\mu$ M)	4 $\mu$ l
RNase Free dH <sub>2</sub> O	1 $\mu$ l
<hr/>	
計	20 $\mu$ l

## 4-3 N 遺伝子相同解析および分子系統樹解析

### 4-3-1 主な試薬・機器

- Taq DNA Polymerase (例: PerfectShot<sup>®</sup> *Ex Taq* (Loading dye mix); タカラバイオ社)
- N 遺伝子増幅用プライマー  
pMvGTf1m: 5'-CGR TCT TAC TTY GAT CCR GC-3'  
pMvGTf2m: 5'AGA YTA GGR CAR GAG ATG GT-3'  
pMvGTr1: 5'-TTA TAA CAA TGA TGG AGG-3'  
pMvGTr2: 5'-GAG GGT AGG CGG ATG TTG TT-3'
- 分子マーカー (例: 100bp DNA Ladder)
- アガロース
- DNA 精製キット (例: QIAquick PCR Purification Kit; キアゲン社)
- シークエンシングキット (例: BigDye<sup>®</sup> Terminators 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)
- 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)
- 遺伝子増幅装置 (例: ABI9600; アプライドバイオシステムズ社)
- 電気泳動装置 (例: ミューピッド; アドバンス社)
- DNA シークエンサー (例: ABI310; アプライドバイオシステムズ社)

#### 4-3-2 N 遺伝子 PCR 法およびダイレクトシーケンス法

PCR は、PCR チューブ中にプライマーを除く、2X PCR Master mix および Loading dye が分注された PerfectShot<sup>®</sup> Ex Taq (Loading dye mix); タカラバイオ社製を用いた方法を示す。1st PCR は、PerfectShot<sup>®</sup> Ex Taq チューブに cDNA 5 $\mu$ l を鋳型として、プライマー、DNase/RNase free water を添加して総量 50 $\mu$ l で行う。PCR 反応条件は、98 $^{\circ}$ C 10 秒、アニーリング 53 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分を 30 サイクルで行う。

Nested PCR は、1st PCR 産物 5 $\mu$ l を鋳型として、1st PCR と同様に行う。プライマーは 1st PCR では、pMvGTf1m: 5'- CGR TCT TAC TTY GAT CCR GC -3' , pMvGTr1: 5'-TTA TAA CAA TGA TGG AGG-3'を用いる。Nested PCR とシーケンスのプライマーは、pMvGTf2m: 5' AGA YTA GGR CAR GAG ATG GT -3', pMvGTr2: 5'-GAG GGT AGG CGG ATG TTG TT-3'を用いる。

PCR 産物は、1.5%アガロースゲル電気泳動・エチジウムブロマイド染色後、UV 照射下で目的とするバンド (1st, 574bp, Nested, 533bp) を確認する。次に目的とするバンドが確認できたら、DNA 精製キットを用いて PCR 産物を精製する。

遺伝子配列の決定は、DNA 精製キットにて精製した PCR 産物を鋳型として、市販のシーケンス用キットを用い、サイクルシーケンス反応条件 96 $^{\circ}$ C10 秒、55 $^{\circ}$ C 5 秒、60 $^{\circ}$ C 4 分、25 サイクルを行い、シーケンス試料を作成する。さらに、この試料を未反応ダイターミネーター除去用スピンカラムで精製し、ダイレクトシーケンス法により N 遺伝子配列を決定する。

配列が決定された N 遺伝子の 493 塩基 (position;1214-1706, Edmonston 株に換算) について相同解析を行い、さらに position:1302~1751 (450 塩基) で分子系統樹を作成する。分子系統樹解析は、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 (日本 DNA データバンク (DDBJ) より、<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) 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) によって分子系統樹を作成する。なお、UPGMA 法は、ウイルス遺伝子の系統樹解析には向かないとされている。今までのところ、最近本邦で分離された株の N 遺伝子解析では、遺伝子型 D3, D5 あるいは H1 に分類されることが多い。N 遺伝子解析位置を図 4、解析によって得られた典型的な N 遺伝子の相同解析を図 5、分子系統樹を図 6 に示す。なお、分子系統解析に用いるリファレンス株は、図 6 中の各々の

GenBank アクセション番号を参照のこと。分離株あるいは PCR 産物の相同解析・分子疫学解析が実施困難な場合は、国立感染症研究所に解析依頼が可能である。また、各々の反応系における試薬量・濃度は以下のとおりである。

#### 作成 1 (1st PCR-Mix)

PerfectShot <sup>®</sup> <i>Ex Taq</i>	25 $\mu$ l
cDNA	5 $\mu$ l
Primer (pMvGTf1m および pMvGTr1) (20 $\mu$ M)	各 1 $\mu$ l
DNase/RNase free water	18 $\mu$ l
計	50 $\mu$ l

#### 作成 2 (Nested PCR-Mix)

PerfectShot <sup>®</sup> <i>Ex Taq</i>	25 $\mu$ l
1st PCR 産物	5 $\mu$ l
Primer (pMvGTf2m および pMvGTr2) (20 $\mu$ M)	各 1 $\mu$ l
DNase/RNase free water	18 $\mu$ l
計	50 $\mu$ l

#### 作成 3 (記載キットにおけるシーケンス反応-Mix)

BigDye <sup>®</sup> Terminators Ready Reaction Mix	8 $\mu$ l
精製 DNA 試料	2 $\mu$ l
Primer (pMvGTf2m または pMvGTr2) (3.2 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
DNase/RNase free water	9 $\mu$ l
計	20 $\mu$ l

### 4-4 PCR-RFLP 法による HA 遺伝子解析

#### 4-4-1 主な試薬・機器

- Taq DNA Polymerase (例: PerfectShot<sup>®</sup> *Ex Taq* (Loading dye mix); タカラバイオ社)
- HA 遺伝子増幅用プライマー (MHL1,2 および MHR1,2)  
MHL1: 5'-AAC GGA TGA TCC AGT GAT AG-3'  
MHL2: 5'-TAC CTC TCA TCT CAC AGA GG-3'

MHR1: 5'-TTG AAT CTC GGT ATC CAC TC-3'

MHR2 :5'-CAC CTA AGG CTA GGT TCT TC-3'

- 分子マーカー (例:  $\phi$ 174/*HincII* digest; ニッポンジーン社)
- 制限酵素 (例: *Sau3AI*; クラボウ社)
- アガロース
- 遺伝子増幅装置 (例: ABI9600; アプライドバイオシステムズ社)
- 電気泳動装置 (例: ミューピッド; アドバンス社)

#### 4-4-2 HA 遺伝子 PCR-RFLP 法

PCR は、N 遺伝子の PCR 法と同様に行い、1st PCR は cDNA 5 $\mu$ l を鋳型として、98°C 10 秒、アニーリング 53°C 30 秒、72°C 1 分を 30 サイクル、Nested PCR は、1st PCR 産物 5 $\mu$ l を鋳型として、アニーリングの温度を 55°C とした以外は 1st PCR と同様に行う。

プライマーは、1st PCR には MHL1: 5'-AAC GGA TGA TCC AGT GAT AG-3', MHR1: 5'-TTG AAT CTC GGT ATC CAC TC-3' , Nested PCR には、MHL2: 5'-TAC CTC TCA TCT CAC AGA GG-3' と MHR2: 5'-CAC CTA AGG CTA GGT TCT TC-3' を用いる。

その後 PCR 産物 20 $\mu$ l に *Sau3AI*(10units), 緩衝液および DNase/RNase free water を添加し、総量 50 $\mu$ l で 37°C 12 時間インキュベーションする。消化産物 5 $\mu$ l を 3%アガロースゲルにアプライ後、約 40 分間電気泳動 (100V) を行なう。泳動したゲルをエチジウムブロマイド染色後、UV 照射下で DNA 切断パターンを確認する。HA 遺伝子の解析位置を図 4, 電気泳動結果を図 7 に示す。

理論上、HA 遺伝子の Nested PCR 産物 (349bp) を *Sau3AI* で処理すると Edmonston 株を由来とするワクチン株は、198bp, 95bp, 56bp の 3 つの断片に切断される。1980 年以降、世界的に分離されている contemporary strain は、254bp と 95bp の 2 つの断片に切断される。上述の手順を図 8 に示す。各々の反応系における試薬量・濃度などは以下のとおりである。

#### 作成 1 (1st PCR-Mix)

PerfectShot <sup>®</sup> <i>Ex Taq</i>	25 $\mu$ l
cDNA	5 $\mu$ l
Primer (MHL1 および MHR1) (20 $\mu$ M)	各 1 $\mu$ l
DNase/RNase free water	18 $\mu$ l
計	50 $\mu$ l

#### 作成 2 (Nested PCR-Mix)

PerfectShot <sup>®</sup> <i>Ex Taq</i>	25 $\mu$ l
1st PCR 産物	5 $\mu$ l
Primer (MHL2 および MHR2) (20 $\mu$ M)	各 1 $\mu$ l
DNase/RNase free water	18 $\mu$ l
計	20 $\mu$ l

#### 作成 3 (PCR-RFLP)

Nested PCR 産物	20 $\mu$ l
<i>Sau3AI</i>	2 $\mu$ l (5u/ $\mu$ l)
10X reaction buffer	5 $\mu$ l
DNase/RNase free water	23 $\mu$ l
計	50 $\mu$ l

### 5. 血清学的検査

血清学的検査では赤血球凝集抑制 (HI) 試験法, ゼラチン粒子凝集 (GPA) 法, 酵素抗体測定法 (EIA), NT 法, 間接蛍光抗体 (IFA) 法などが応用され抗体測定が行われる。抗体測定を行うことにより血清学的診断や, 個人/集団の免疫状況を把握することができ, ワクチンの効果判定, 追跡調査, 血清疫学調査が可能となる。

また, 未同定臨床ウイルス株の血清学的な同定法として, NT 法や IFA 法などが応用される。

なお, 使用済みの器具等は適切なウイルス不活化処理を行った後, 実験区域外へ搬出しなければならない。

## 5-1 中和試験法

感染防御能を強く反映する抗体測定法であり、近年の臨床ウイルス株に対する抗体測定が可能であることから、重要な試験法である。また、分離ウイルス株の血清学的な同定を行う際にも応用される。

いっぽう、感染性ウイルスを取り扱うことから BSL2 の施設環境が必要であるため、一部の施設でのみ応用可能な試験法である。

### 5-1-1 使用器具

滅菌済みマイクロプレート (96 穴, フラット型)

マイクロピペット

トレイミキサー

光学顕微鏡

インキュベータ

高圧蒸気滅菌器

### 5-1-2 試薬

培養細胞, 試薬等は病原体検査の項を参照のこと。

### 5-1-3 Vero/SLAM 細胞を感染標的細胞とした同時接種法の術式

- 1) 希釈液 (MM) 25 $\mu$ l を第 1 穴から第 12 穴まで加える。
- 2) 試料 25 $\mu$ l を第 1 穴に加え, 第 1 穴から第 12 穴まで 2 倍階段希釈を行う。  
1 検体について 2 列の希釈列を作成する。
- 3) 対照用陽性血清および陰性血清も同様に 2 倍階段希釈列を作成する。
- 4) ウイルス液 (100TCID<sub>50</sub>/25 $\mu$ l に調整) 25 $\mu$ l を第 1 穴から第 12 穴まで加える。
- 5) キャビネット内でプレートを充分, 振とう混和後, 36°C, 90 分間静置する。
- 6) 細胞浮遊液 (GM で 3X10<sup>6</sup> 個/ml に調整) 100 $\mu$ l を第 1 穴から第 12 穴まで加える。
- 7) 36°C で静置培養する。
- 8) 使用ウイルス量の二次検定が至適の値を示した時点で, 検体, 陽性血清および陰性血清の抗体価を判定する。

#### 5-1-4 使用ウイルス量の二次検定

- 1) 使用ウイルスの 10 倍階段希釈列 ( $10^0 \sim 10^{-4}$ ) を作成する。
- 2) 中和反応と同様に  $36^\circ\text{C}$ 、90 分間静置する。
- 3) 中和反応に用いた細胞浮遊液 (GM で  $3 \times 10^6$  個/ml に調整) 100 $\mu\text{l}$  を第 1 穴から第 6 穴まで加える。
- 4) 希釈液 (MM) 25 $\mu\text{l}$  を第 1 穴から第 6 穴まで加える。
- 5) 各ウイルス希釈列の 25 $\mu\text{l}$  を細胞に接種する。接種穴数は各ウイルス希釈あたり 4 穴とする。細胞対照 (第 6 穴) にはウイルス液の代わりに MM 25 $\mu\text{l}$  を接種する。
- 6)  $36^\circ\text{C}$  で静置培養する。
- 7) ウイルス価を Berens- Karber 法で求める。

#### 5-1-5 判定

少なくとも 1 穴の CPE の発現を完全に抑制した最高血清希釈倍数の逆数を中和抗体価とする。

なお、試験が成立するためには、使用した攻撃ウイルス量が 100TCID<sub>50</sub>/25 $\mu\text{l}$  であること、陽性対照血清、陰性対照血清がそれぞれ所定の中和抗体価を示すこと、細胞対照が正常に増殖していること、検体希釈列に雑菌等の混入がなく、培養細胞が正常に増殖していること、などの要件が成立しなければならない。

#### 5-2 赤血球凝集抑制試験法

特別な施設、設備を必要とせず、感染性ウイルスによる汚染／感染防止に配慮する必要がないため BSL1 に準拠した施設、操作でよいことなどから、これまで血清疫学的調査、血清診断等に最も応用された試験法である。

近年の臨床ウイルス株では赤血球凝集 (HA) 活性が欠損していること、試験に必要なミドリザル赤血球が入手困難な場合が多いことなどの理由から他の測定法に移行するものと思われる。なお、体外診断用医薬品が市販されている。試験はこれらキットに添付の使用説明書に従い実施する。

#### 5-3 ゼラチン粒子凝集法

ゼラチン粒子を人工担体として、精製麻疹ウイルス由来抗原を吸着させた粒子凝集試験である。操作が容易であり、BSL1 に準拠した環境で実施可能なこと、

体外診断用医薬品が市販されていることなどから、多用されている。

現在、粒子に吸着されている抗原は豊島株（A 型）由来であるため、他の遺伝子型に属するウイルス株に対する抗体価と僅かな差が生じていることが推察されている。試験はこれらキットに添付の使用説明書に従い実施する。

#### 5-4 酵素抗体測定法

ウイルス感染細胞および正常細胞培養液を出発試料としてそれぞれ精製・濃縮したウイルスおよび正常抗原をマイクロプレートに固相した系を用いて、酵素・基質反応による発色量を定量し、抗体を測定する方法である。発色量の測定に特殊な機器（イムノリーダー）が必要であるが、BSL1 に準拠した環境で実施可能なこと、迅速性に優れていること、PC による自動解析が応用されているなどの理由から多用されている。各社から体外診断用医薬品キットが市販されている。また、IgM 抗体を検出するキットも市販されており血清診断に多用されている。試験はこれらキットに添付の使用説明書に従い実施する。

## 6. 略語リスト

MV	麻疹ウイルス
ACD	クエン酸ナトリウム
PBS	リン酸緩衝生理食塩液
PBMC	末梢単核球細胞
FBS	ウシ胎児血清
SSPE	亜急性硬化性全脳炎
SLAM	signaling lymphocyte activation molecule
MEM	Minimum essential medium
GM	細胞増殖用培養液
MM	細胞維持用培養液
CPE	細胞変性効果
HA	赤血球凝集
TCID <sub>50</sub>	50%組織培養感染量
DI 粒子	欠損干渉粒子
RFLP	制限断片長多型
vRNA	ウイルス RNA



DTT	ジチオスレイトール
RT	逆転写反応
cDNA	相補的 DNA
HI	赤血球凝集抑制
GPA	ゼラチン粒子凝集
EIA	酵素抗体測定法
NT	中和試験
IFA	間接蛍光抗体
BSL	バイオセーフティレベル

## 7. 参考文献

- 1) WHO: Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection  
Second edition, 2007.
- 2) 大内好美 他: 市販ウイルス保存輸送液およびスワブ採取キットの評価, 臨床とウイルス, 36(1): 61-64, 2008.
- 3) 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, 75(13):4399-4401, 2001.
- 4) Saito, H. *et al.*: Molecular identification of two distinct hemagglutinin types of measles virus by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), Mol. Cell. Probes, 9: 1-8, 1995.
- 5) Takeda, M. *et al.*: The genome nucleotide sequence of a contemporary wild strain of measles virus and its comparison with the classical Edmonston strain genome, Virology, 256: 340-350, 1999.
- 6) 木村博一 他: 群馬県で 1998 年に起こった麻疹流行の解析, 日本医事新報, 3936: 45-49, 1999.
- 7) WHO: New genotype of measles virus and update on global distribution of measles genotypes, Wkly. Epidemiol. Rec, 80: 347-351, 2005.
- 8) Morita, Y. *et al.*: Sequence and phylogenetic analysis of the nucleoprotein (N) gene in measles viruses prevalent in Gunma, Japan, in 2007, Jpn. J Infect. Dis, 60(6): 402-404, 2007.

- 9) Taira, K. *et al.*: Phylogenetic Analysis of Nucleoprotein (N) Gene of Measles Viruses Prevalent in Okinawa, Japan, during 2003-2007, *Jpn. J Infect. Dis*, 61(3): 248-50, 2008.
- 10)野田雅博 他：麻疹ウイルスの抗体測定法, 臨床とウイルス, 25: 154-158, 1997.
- 11)成人麻疹の実態把握と今後の麻疹対策の方向性に関する研究：2002年厚生労働科学研究報告書（主任研究者：高山直秀）.

#### 8. 検査依頼先

- ・ 全国都道府県/政令市衛生研究所
- ・ 国立感染症研究所ウイルス第3部  
〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1  
Tel:042-561-0771  
Fax:042-565-3315

#### 9. 緊急時 (実験室内暴露)の応急対応と事故対応基準

病原体検出マニュアル「RSウイルス」の項に準じる。

#### 10. 執筆者一覧

編集責任者	田代 真人	国立感染症研究所
編集責任者	岡部 信彦	国立感染症研究所
	水田 克巳	山形県衛生研究所
	塚越 博之	群馬県衛生環境研究所
	平良 勝也	沖縄県衛生環境研究所
	關 文緒	国立感染症研究所
	野田 雅博	国立感染症研究所
	木村 博一	国立感染症研究所

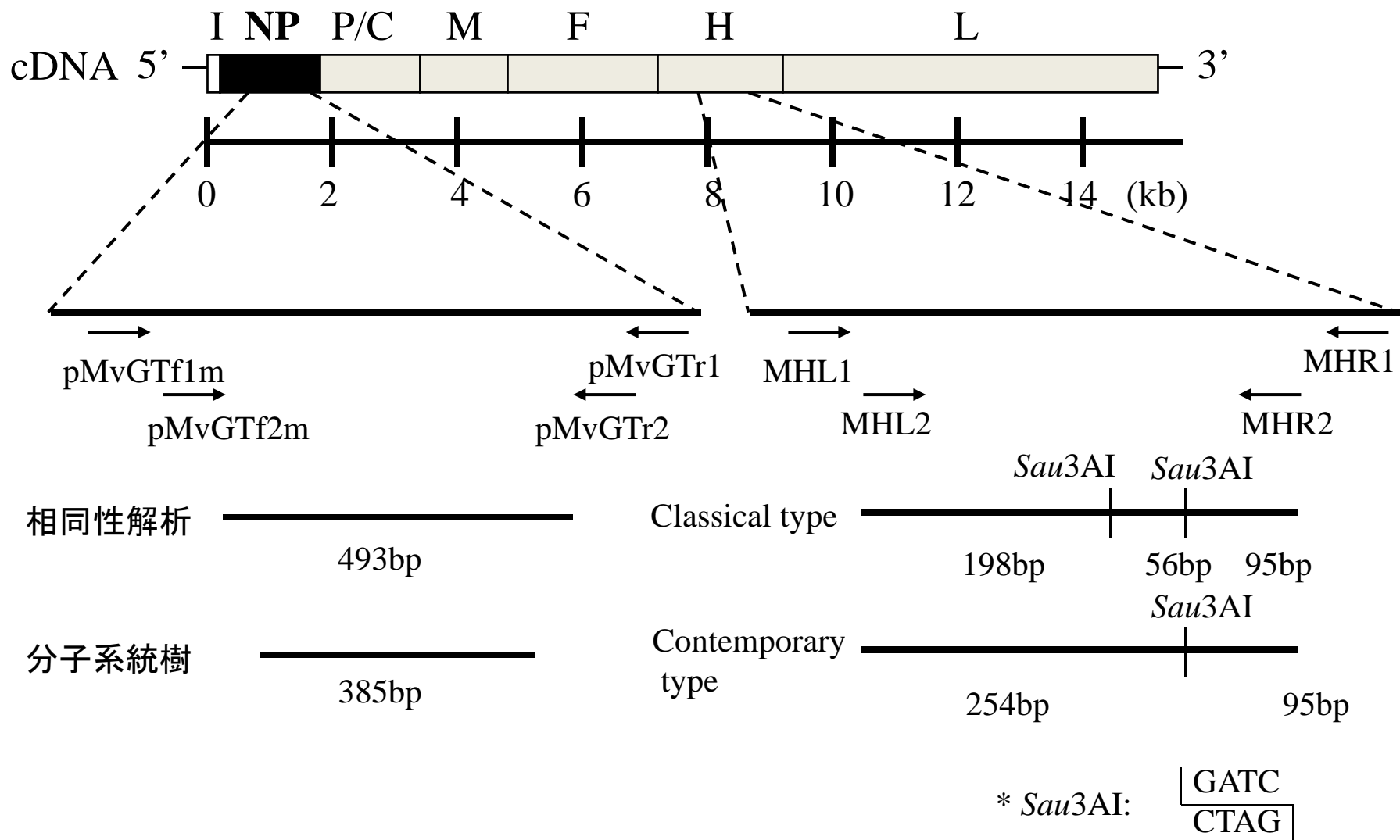


図4 麻疹ウイルス遺伝子解析位置(cDNA)

Mvi/Edmonston-wt. USA/54 [A]	1302 AATGCATACTACTGAGGACAAGATCAGTAGAGCGGTTGGACCCAGACAAGCCCAAGTATC 1361
Mvi/Yaounde. CAE/12. 83"Y-14" [B1]	..... G. .... G. .... A. .... T. .... G. .
Mvi/Libreville. GAB/"R96" [B2]	..... G. .... G. ....
Mvi/Ibadan. NIE/97/1 [B3]	..... G. .... A. .... G. .
Mvi/NewYork. USA/94 [B3]	..... G. .... A. .... G. .
Mvi/Tokyo. JPN/84/K [C1]	..... C. .... G. .... G. .
Mvi/Maryland. USA/77"JM" [C2]	..... A. .... G. .... T. .... G. .
Mvi/Erlangen. DEU/90"WTF" [C2]	..... A. .... G. .... T. .... G. .
Mvi/Bristol. UNK/74 (MVP) [D1]	..... G. .... G. ....
Mvi/Johannesburg. SOA/88/1 [D2]	..... G. .... G. ....
Mvi/Illinois. USA/89/1"Chicago-1" [D3]	..... G. .... C. ....
Mvi/Montreal. CAN/89 [D4]	..... G. .... G. ....
Mvi/Palau. BLA/93 [D5]	..... G. .... C. .... G. .
Mvi/Bangkok. THA/12. 93 [D5]	..... G. .... C. .... G. .
Mvi/NewJersey. USA/94/1 [D6]	..... G. .... C. .... G. .
Mvi/Illinois. USA/50. 99 [D7]	..... G. C. .... G. .... G. .
Mvi/Victoria. AUS/16. 85 [D7]	..... G. C. .... G. .... G. .
Mvi/Manchester. UNK/30. 94 [D8]	..... G. C. .... A. .... T. .... G. .
Mvs/Victoria. AUS/12. 99 [D9]	..... G. .... A. C. .... G. .
Mvi/Kampala. UGA/51. 00/1 [D10]	..... G. .... G. .... G. .
Mvi/Goettingen. DEU/71"Braxator" [E]	..... C. .... G. .... C. .... G. .
Mvs/Madrid. SPA/94 SSPE [F]	G. .... G. .... G. .... G. .
Mvi/Berkeley. USA/83 [G1]	..... C. .... G. .... C. .... G. G. .... G. .
Mvi/Amsterdam. NET/49. 97 [G2]	..... G. .... G. .... G. .... G. .
Mvi/Gresik. INO/17. 02 [G3]	..... G. C. .... G. .... T. .... G. .
Mvi/Hunan. CHN/93/7 [H1]	..... G. C. .... G. .... C. ....
Mvi/Beijing. CHN/94/1 [H2]	..... A. G. .... C. .... G. .... G. .

Mvi/Edmonston-wt. USA/54 [A]	1362 ATTTCTACACGGTGATCAAAGTGAGAATGAGCTACCGAGATTGGGGGCAAGGAAGATAG 1421
Mvi/Yaounde. CAE/12. 83"Y-14" [B1]	... C. .... G. .... G. C. .
Mvi/Libreville. GAB/"R96" [B2]	..... G. .... G. ....
Mvi/Ibadan. NIE/97/1 [B3]	..... G. .... G. C. .
Mvi/NewYork. USA/94 [B3]	... C. .... G. .... G. C. .
Mvi/Tokyo. JPN/84/K [C1]	..... A. .... G. .... T
Mvi/Maryland. USA/77"JM" [C2]	... C. .... A. A. .... G. .... T. .... T
Mvi/Erlangen. DEU/90"WTF" [C2]	... C. .... A. A. G. .... G. .... T. .... T
Mvi/Bristol. UNK/74 (MVP) [D1]	..... AG. .... C. .
Mvi/Johannesburg. SOA/88/1 [D2]	..... AG. ....
Mvi/Illinois. USA/89/1"Chicago-1" [D3]	..... AG. .... C. .
Mvi/Montreal. CAN/89 [D4]	... A. .... AG. ....
Mvi/Palau. BLA/93 [D5]	..... C. AG. ....
Mvi/Bangkok. THA/12. 93 [D5]	..... AG. ....
Mvi/NewJersey. USA/94/1 [D6]	..... AG. ....
Mvi/Illinois. USA/50. 99 [D7]	..... G. .... G. G. .... AG. .... T. G. G. C. .
Mvi/Victoria. AUS/16. 85 [D7]	..... AG. .... C. .
Mvi/Manchester. UNK/30. 94 [D8]	..... AG. ....
Mvs/Victoria. AUS/12. 99 [D9]	..... AG. C. ....
Mvi/Kampala. UGA/51. 00/1 [D10]	..... AG. .... AA. ....
Mvi/Goettingen. DEU/71"Braxator" [E]	..... G. .... G. ....
Mvs/Madrid. SPA/94 SSPE [F]	..... C. ....
Mvi/Berkeley. USA/83 [G1]	..... C. .... G. .... G. .... C. .
Mvi/Amsterdam. NET/49. 97 [G2]	..... G. .... A. T. .... A
Mvi/Gresik. INO/17. 02 [G3]	..... G. .... T. .... A
Mvi/Hunan. CHN/93/7 [H1]	... T. .... G. .... A. ....
Mvi/Beijing. CHN/94/1 [H2]	..... C. .... G. .... A. .... T. ....

図5 麻疹ウイルスリファレンス株のN遺伝子相同解析図 (部分抜粋)

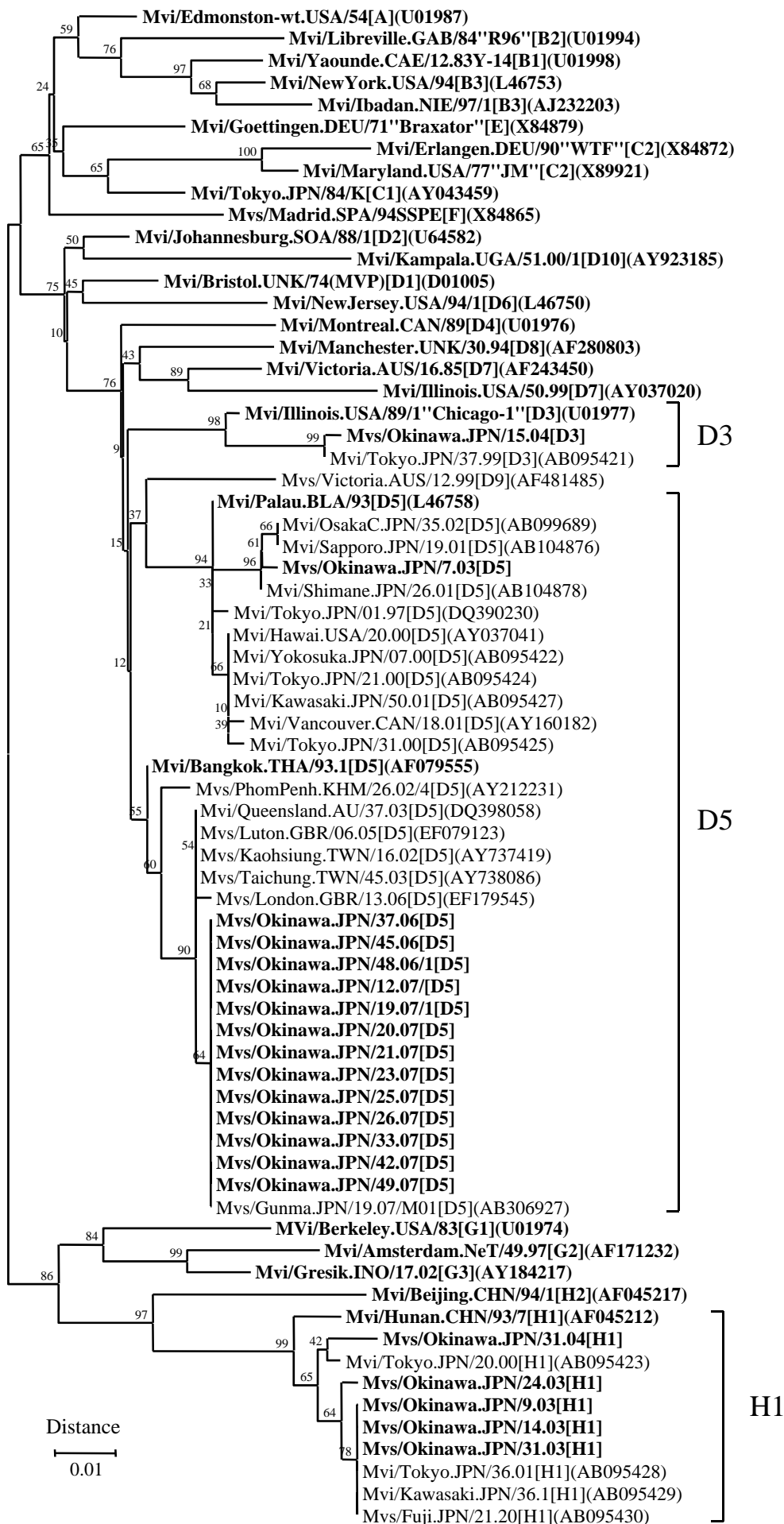


図6 麻疹ウイルスN遺伝子分子系統樹

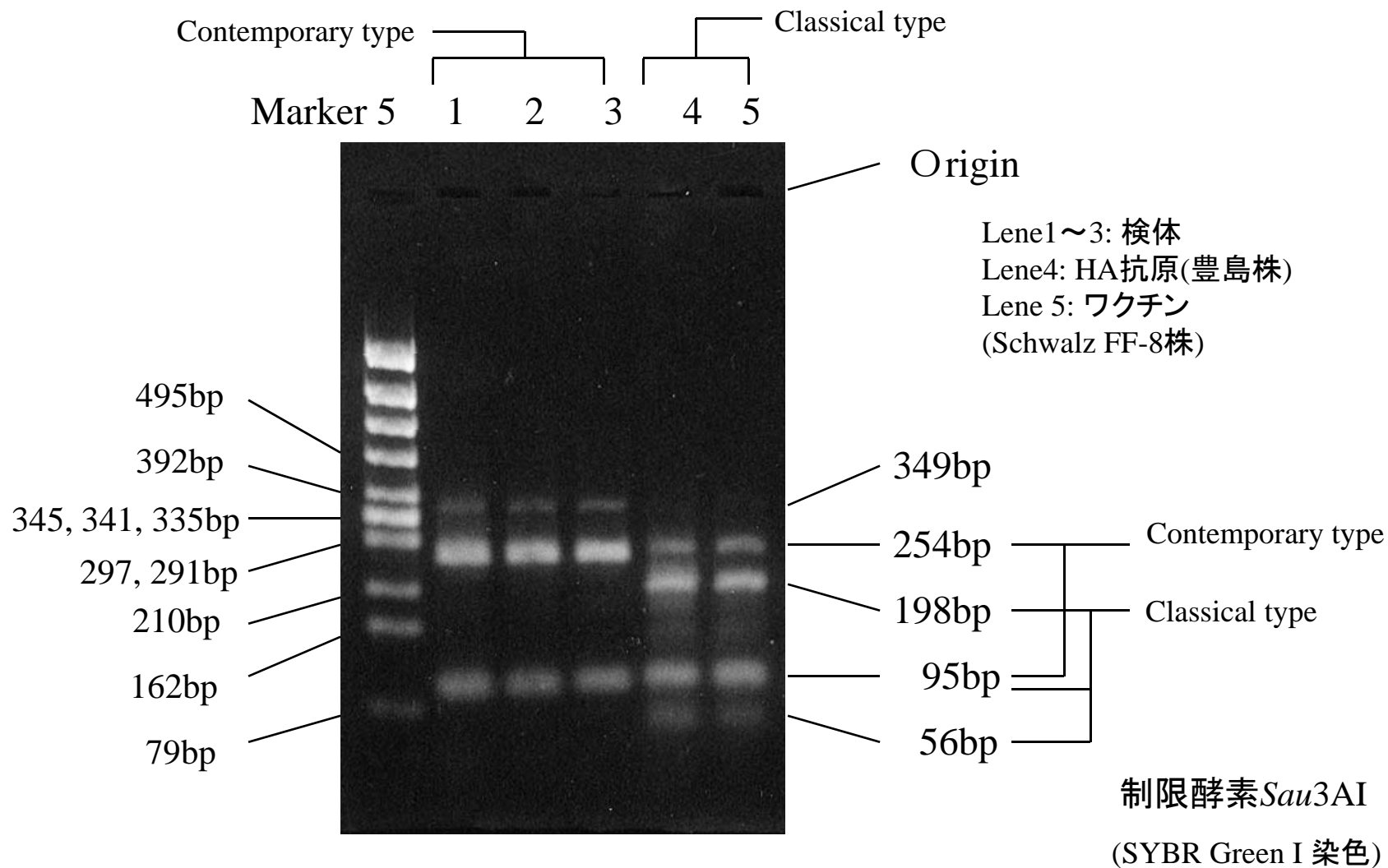


図7 麻疹ウイルスHA遺伝子PCR-RFLP電気泳動結果

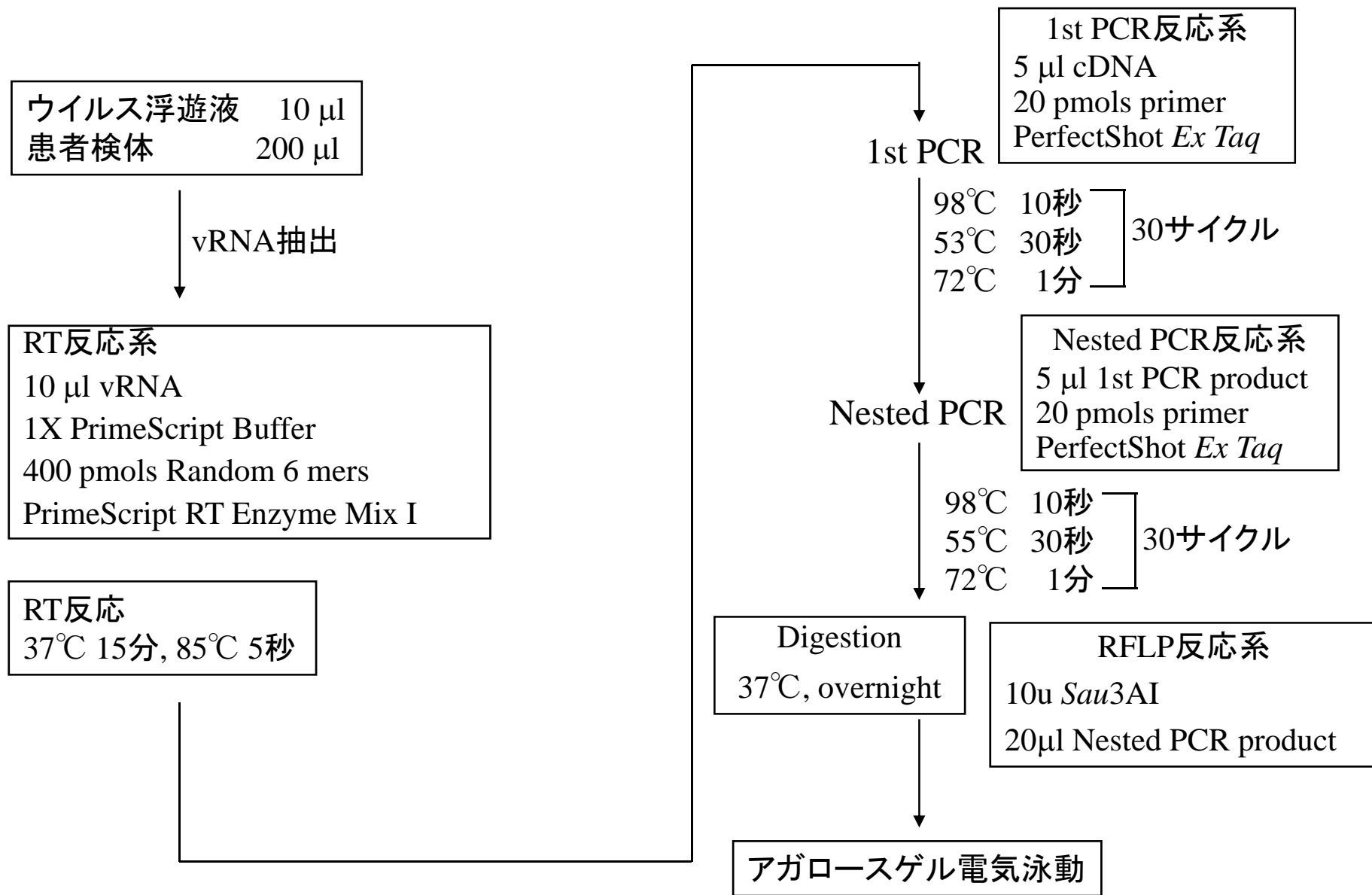


図8 PCR-RFLPによる麻疹ウイルスHA遺伝子解析法