

風疹
第二版

目次

1. 風疹の概説
2. 検査に関する一般的注意
 - 2-1. 実験室、実験者
 - 2-2. 検査材料の採取
 - 2-3. 検査材料の輸送
 - 2-4. 検査の進め方
 - 2-5. 検査の判定
 - 2-6. 感染症法届け出基準における病原体診断の取り扱い
3. 血清学的検査
 - 3-1. 赤血球凝集抑制 (Hemagglutination Inhibition: HI) 抗体測定法
 - 3-1-1. 試薬類
 - 3-1-2. 血清処理
 - 3-1-3. 赤血球凝集素 (Hemagglutinin、HA) の定量
 - 3-1-4. HI 本試験
 - 3-1-5. 一般的な注意
 - 3-1-6. 評価の目安
 - 3-2. IgM 酵素免疫抗体測定 (IgM-EIA)
 - 3-2-1. 評価の目安
 - 3-3. IgG 酵素免疫抗体測定 (IgG-EIA)
 - 3-3-1. 評価の目安
4. 遺伝子学的検査
 - 4-1. ウイルス RNA 抽出および逆転写反応
 - 4-1-1. 試薬
 - 4-1-2. ウイルス RNA の抽出
 - 4-1-3. 逆転写反応 (RT)
 - 4-2. 風疹ウイルス NS 遺伝子の検出
 - 4-2-1. 試薬

4-2-2. 1st PCR および nested PCR 反応

4-2-3. One-step RT-PCR 法による風疹ウイルス NS 遺伝子の検出

4-3. 風疹ウイルス E1 遺伝子の検出および遺伝子解析

4-3-1. 試薬

4-3-2. RT-PCR および nested PCR

4-3-3. PCR 産物の精製とダイレクトシーケンス反応

4-3-4. シーケンス結果の解析

5. ウイルス分離

5-1. 使用細胞

5-2. 分離方法

5-3. 同定方法

5-3-1. 蛍光抗体法

6. 検出ウイルスの命名法

7. 引用文献

8. 検査依頼先

9. 執筆者

1. 風疹の概説

風疹は *Togavirus* 科 *Rubivirus* 属のプラス鎖 RNA ウイルスである風疹ウイルスの飛沫感染によって引き起こされる急性感染症であり、感染後 2～3 週間の潜伏期間を経て発症する。発熱（38～39℃）・発疹（全身性の小紅斑や紅色丘疹）・リンパ節腫脹（主に耳介後部、頸部および後頭部）が三主徴である。発熱・発疹は数日で消失するが、リンパ節腫脹は 3～6 週間持続する。成人では関節炎の症状もしばしば認められるが、ほとんどは一過性に終息する。稀に血小板減少性紫斑病や脳炎等の合併症を見ることがあるが、基本的に予後は良好な疾患である。また不顕性感染も小児で 30～50%、成人で 15% 程度存在すると言われていたとともに、三主徴の全てが揃わない場合も多く、このような場合臨床診断は困難であり、検査診断が重要である。また、麻疹、溶血性連鎖球菌による発疹、伝染性紅斑、エンテロウイルス感染症等と鑑別診断が必要となることがあり、検査診断が有効である。

風疹が臨床ウイルス学的に重要なのは、先天性風疹症候群（*Congenital Rubella Syndrome* : CRS）の存在による。風疹に免疫の無い女性が妊娠初期（特に 3 ヶ月以内）に風疹ウイルスに感染すると、その出生児に CRS を発症することがある。CRS の 3 大症状は白内障、先天性心疾患、難聴であるが、その他網膜症、血小板減少、肝脾腫、身体および精神の発達遅延などを伴うこともある。CRS の検査・診断マニュアルは「先天性風疹症候群」の項に記す。

2. 検査に関する一般的注意

2-1. 実験室、実験者

風疹ウイルスはクラス 2 の病原体に分類されているので、P2 実験施設で BSL2 の取り扱い基準に従って作業を行う。

試験者は予め風疹抗体価を測定し、抗体が無いか低い場合（HI 抗体価 16 倍以下）には風疹ワクチンを接種し、抗体の獲得や上昇を確認してから検査に従事することが望ましい¹⁾。

2-2. 検査材料の採取

検体としては、抗体測定用に血清、ウイルス分離やウイルス遺伝子検出用に咽頭ぬぐい液、血漿、尿、脳脊髄液等を用いる。滅菌容器に採取、密栓後ウイルス分離やウイルス遺伝子検出用のサンプルは-80℃で保存する。

検体の採取時期は検査の結果を左右する重要な要素である²⁾。ウイルス分離およびウイルス遺伝子検出を行う場合、発疹出現前後数日が最も検出率が高く、前後一週間を越えると検出率が著しく低下する。血清中抗風疹 IgM は発症後 4-28 日に検出率が高いが、発症 3 日以内だと検出できないことがある。風疹の診断目的での抗風疹 IgG あるいは赤血球凝集抑制抗体の測定の場合には、急性期と回復期のペア血清が必要とされる。

- 1) 咽頭ぬぐい液：滅菌綿棒の先端の綿球を運搬用培地（TM: transport medium）等に浸して被験者の咽頭部分をこすり、その綿棒を保存液の中で撹拌したのち、綿棒を取り出し密栓する。
- 2) 血漿：抗凝固剤として EDTA またはクエン酸を用いて採取する。RT-PCR 反応の妨げになるためヘパリンを用いてはならない。風疹ウイルスの場合、末梢血リンパ球（PBMC）からのウイルス分離／遺伝子検出は検出率が低いとされる²⁾。
- 3) 尿および脳脊髄液：そのまま-80℃に保存
- 4) 血清：血液採取後、分離してから保存する。抗体測定のみを使用する場合には-20℃での保存でもよい

2-3. 検査材料の輸送

ドライアイスによる凍結状態のまま、検査を行う施設に送る。炭酸ガス分圧上昇による pH 低下はウイルス活性を低下させるおそれがあるので、密閉容器のふたをビニールテープ等でシールする。送付にあたっては検体番号等必要な情報を記入し検体のとり違い等生じないように配慮する。

2-4. 検査診断の進め方

風疹の検査診断として、血清学的方法および病原体検出法が利用可能である。血清学的方法としては、IgM 酵素免疫抗体測定法、IgG 酵素免疫抗体測定法および赤血球凝集抑制（HI）抗体測定法などが利用可能であるが、急性期の血清を用いる IgM 酵素免疫抗体測定法が一般的である。補体結合（CF）抗

体の測定はその感度の低さから勧められない。

病原体検出法としては、咽頭拭い液、血液、尿などを検体にしてウイルス分離およびウイルス遺伝子検出が可能である。ウイルス分離は分離同定までに時間がかかること、および分離可能な検体採取時期がウイルス遺伝子検出よりも短期間であること等から、まずは RT-PCR によるウイルス遺伝子検出法を行うことが一般的である。

2-5. 検査の判定

血清中 IgM 抗体の検出 (IgM-EIA 強陽性)、または病原体検出 (ウイルス分離またはウイルス遺伝子検出) のいずれかが陽性であれば風疹ウイルス感染陽性と判定する。

IgM 抗体の測定は非常に有用であるが、弱陽性の場合には必ずしも風疹ウイルス感染を反映する訳ではないので注意が必要である。また血清が急性期および回復期において採取されている場合は、HI 抗体価の4倍以上の上昇や、IgG 抗体価の明らかな上昇も陽性の判定根拠となる。この場合採取時期の異なる同一患者の血清は、同時に測定するのが原則である。顕性感染の場合、発疹が出現してから遅くとも4日後には HI 抗体および IgM 抗体の上昇が見られる。逆に、発疹直後 (0~3 日) の血清では場合によっては陰性とすることがあるので、血清の採取時期には注意を要する。ウイルス分離および遺伝子検出の場合は先の項目でも触れたように検出可能期間は発疹出現前後1週間程度であることを念頭に置き検体の採取が肝要である。

2-6. 感染症法届け出基準における検査診断の取り扱い

感染症法における届出基準においては、「全身性の小紅斑や紅色丘疹」、「発熱」および「リンパ節腫脹」の3つすべての臨床症状を示した症例を臨床診断例とすると定められている。しかし、三徴候がすべてそろわない場合も多く、その場合は届け出基準を満たすために病原体診断が必要となる。

風疹の病原体診断の基準は、

1. 分離・同定による病原体の検出
2. 検体からの直接の PCR 法による病原体遺伝子の検出
3. 抗体の検出 (IgM 抗体の検出、ペア血清での抗体陽転又は抗体価の有意な

上昇)

である。このいずれかを満たす場合に、届出に必要な臨床症状1つ以上と合わせ、検査診断例として届け出基準をみたすこととなる。

3. 血清学的検査

3-1. 赤血球凝集抑制(Hemagglutination Inhibition: HI)抗体測定法³⁻⁵⁾

3-1-1. 試薬類

下記に調製方法を示すがいずれも市販品があれば代替できる。

1) カオリン処理用試薬

1. PBS(-) (Dulbecco の PBS) pH7.2~7.4

NaCl8.0g, KCl0.2g, Na₂HPO₄1.15g, KH₂PO₄0.2g を蒸留水に溶解し全量を 1,000ml とする。

2. 25%カオリン懸濁液

カオリン(Fisher または Aldrich 製)25g に PBS(-)100ml を加えて作製する。カオリンは PBS(-)で 3 回洗う。上清の pH が 7 以上であることを確認したら、液面の高さを攪拌前につけた印にあわせる。

2) 赤血球用試薬

1. DGV(Dextrose-Gelatin-Veronal)

NaCl8.0g, ベロナール0.575g、ベロナール-Na0.375g、CaCl₂0.02g、MgSO₄・7H₂O、ゼラチン 0.6g、ブドウ糖 10g を蒸留水に溶解し、全量を 1,000ml とする。

2. ガチョウ赤血球浮遊液

ガチョウ赤血球は市販されている。それを DGV で 3 回洗ったあと、DGV で 8%浮遊液を作製し、4℃に保存する。採血後 3~4 週間保存できる。50%浮遊液は使用直前に、8%浮遊液を 1500rpm 10 分間遠心し上清を捨てた後、等量の DGV を加え作製する。HI 試験では後述の希釈液で 0.25%浮遊液を作り使用する。正確な 0.25%浮遊液はシアンメトヘモグロビン標準液および比色計を用いて調製する。

3) 希釈液

1. PBSpH 6.8

NaCl9.0g、Na₂HPO₄0.67g、KH₂PO₄0.72g、NaN₃1.0g を蒸留水に

溶解し全量を 1,000ml とする。

2.カルシウムマグネシウム液

CaCl₂4.0g,MgCl₂・6H₂O4.0g を蒸留水に溶解し 100ml とする

3.1%ゼラチン

ゼラチン 1.0g に蒸留水 100ml を加え 115°C10 分高压滅菌する。小分分注し、4°Cにて保存。使用時に温浴でとくす。

3.抗原および血清希釈液

PBSpH6.8 200ml に牛血清アルブミン 0.2g、1%ゼラチン 1.0ml を加えたものを使用する。

4.赤血球浮遊液作製用希釈液

上記 3 の希釈液 200ml に 2 のカルシウムマグネシウム液 2 ml を加える。

3-1-2. 血清処理

血清中には HA 反応を抑制する非特異的インヒビターが存在するので、予めカオリン処理によってこれを取り除く。また赤血球に対する自然凝集素は、大量の赤血球で吸収する。非働化された血清では、インヒビターが除けない場合もあるので、非働化した血清は用いない。抗体陽性と陰性の参考血清も同時に処理する。血清処理は以下に示すマイクロプレートまたは試験管で行う。

1) マイクロプレート法

- i) 平底マイクロプレートの穴を一つおきに使う。被検血清各 25 μ l を入れる (図 1)。
- ii) 25%カオリン 0.1ml ずつを血清の入っている穴にいれる。カオリンが不均一にならないように、時々カオリン液を再浮遊させ素早く分注する。
- iii) プレート上面の水分を拭き取ってからシールする。
- iv) プレートを手で激しく振る。室温に 20 分放置する。
- v) プレートを振った後、プレート遠心機で 1500rpm、3 分間遠心する。
- vi) 遠心後はプレートを水平に保持しシール穴側面を濡らさないようにし、シールをはがす。
- vii) 各穴に 8%赤血球浮遊液を 50 μ l および PBS(-)を 25 μ l 加える
- viii) 再びシールをし、プレートを軽く振って赤血球をよく混和させる。
- ix) プレートを 4°Cに 1 時間から 1 夜おく。この間 2 度プレートを振って赤血

球を再浮遊させる。

x) プレートを遠心(1500rpm、3分間)してからシールをはがす。この上清が処理済み 1:8 希釈血清となる。

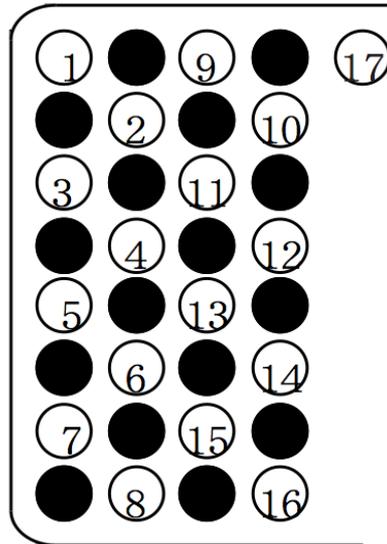


図1 マイクロプレートでの血清のカオリン処理
平底マイクロプレートの穴を1つおきに使う。

2) マイクロチューブ法

i) 血清 50 μ l を 1.5ml のマイクロチューブにとる

ii) PBS (-) を 150 μ l 加える

iii) 25%カオリン液を 200 μ l 加え、激しく振る。室温 20 分放置、その間に 2、3 回震盪する

iv) 2000rpm 20 分遠心後、上清を別のマイクロチューブに移す。

v) 50%赤血球浮遊液を 12.5 μ l 加え、氷浴に 1 時間おく又は 4°C 1 夜放置する。この間、時々チューブを振って血球を再浮遊させる。

vi) 2000rpm、20 分 4°C で遠心後、上清を回収する。これを 1:8 希釈血清とする。

3-1-3. 赤血球凝集素 (Hemagglutinin、HA) の定量

HI 試験を実施する前に使用する HA 抗原の力価を測定しなくてはならない。

HA 抗原は凍結乾燥されたものが市販されている。

1) 溶解した HA 原液を、希釈液を用いて 1:2 に希釈し、その 50 μ l を 96 穴

U 底マイクロプレートの穴 No.1 (横長においた場合の最も左端の列) にとる。同じものを2列つくり、HA 希釈を2列同時に行うようにする。また必要 (より詳細に HA 定量を実施したい場合に) に応じて原液を 1:3 および 1:10 に希釈したのもも2列同時に希釈する。

- 2) 希釈液を No.2 から 12 まで $25\mu\text{l}$ ずつ加える
- 3) $25\mu\text{l}$ 用ダイリ्यूーターで2倍階段希釈を No.11 の列まで行う (No.12 の列は血球対照として使用)
- 4) 希釈液を各穴に $25\mu\text{l}$ ずつ加える
- 5) 各穴に 0.25% 赤血球浮遊液を $50\mu\text{l}$ 加える
- 6) プレートをすぐにマイクロプレートミキサーなどを用いよく混和させる (5秒ずつ3回)。血球の混和が十分でないと不完全凝集が続き HA の定量が正確に行えなくなる場合がある。
- 7) プレートを冷蔵庫 (4-10°C) に1時間置く
- 8) プレートを室温にだして 5-10 分後にプレートを観察し結果を判定する。完全または部分凝集した終末の希釈倍数を、その HA 原液の HA 価とする。この値を T とすると、HA 原液を T/4 倍に希釈した液 (4 単位 HA の力価に相当) を HI 試験に使用する抗原とする。例えば原液の HA 価が 32 の場合には原液を 8 倍希釈したものを HI 試験に使用する。

3-1-4. HI 本試験

U 底マイクロプレートの穴を図 2 のように振り分ける。

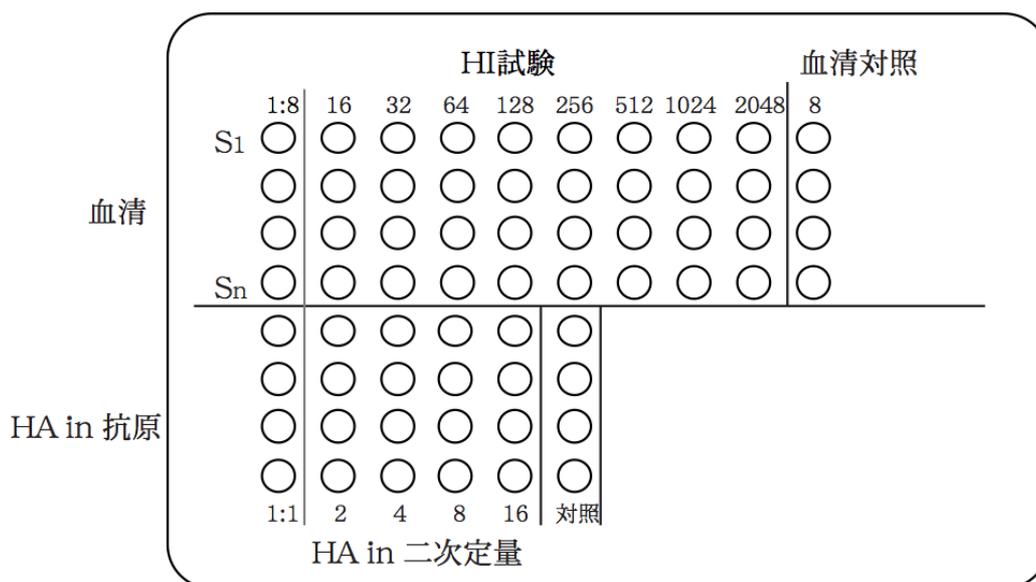


図2 検体および対照のマイクロプレート上でのレイアウト例

- 1) 処理済み血清を<HI 試験>の 1:8 の穴に 50 μ l、<血清対照>の 1:8 の穴に 25 μ l とる。他の穴には希釈液を 25 μ l ずつ入れる。
- 2) 25 μ l ダイリ्यूターで 2 倍階段希釈を行う
- 3) <HI 試験>の穴に調製した HA 抗原 25 μ l ずつを、<血清対照>の穴に希釈液 25 μ l ずつを加える。マイクロミキサー等で混和後、室温に 1 時間放置する。
- 4) HA 抗原の 2 次定量を行う。<HA 二次定量>の 1:1 希釈の穴に<HI 試験>の穴に加えたのと同じ抗原を 50 μ l 入れる。後は先に述べた HA 試験の要領で 2 倍階段希釈実施後、希釈液を 25 μ l 加える。
- 5) 0.25%赤血球浮遊液 50 μ l ずつをすべての穴に加え十分に混和する。
- 6) プレートを冷蔵庫 (4-10°C) に 1 時間置く
- 7) HA を完全阻止した最終希釈倍数を、その血清の HI 抗体価として判定する。<血清対照>をみて自然凝集素が吸収されているかどうか分かる。抗体陽性および陰性対照を設定している場合は対照血清の HI 価が正しくできているかをみる。<HA 二次定量>で HA 価が 4 倍であることを確かめる。

3-1-5. 一般的な注意

HI 試験におけるマイクロプレート測定法において、HI 抗体価に変動を与える要因としては液量が最も大きいと思われる。プレートに分注する際の液量と、希釈に用いるダイリ्यूターの容量が正確に 25 μ l であるかどうかには注意する必要がある。またプレートに直接風が当たり、液が蒸発して液量の低下を起こさせないように注意する。

また、HI 抗体測定に必要な試薬がセットになっている検査試薬も販売されており使用が可能である。このような検査キットを使用する場合にはキットの使用説明書に従い操作判定を行う必要がある。

3-1-6. 評価の目安

一般に HI 抗体の測定では過去の感染の有無を評価するものであり、一点の HI 抗体の測定では、直近の風疹感染を反映する訳ではないが、下記のように高い HI 抗体価は直近の風疹感染を反映しうる可能性があるが、その判定に

は臨床症状等を含め十分な検討が必要である。また、急性期および回復期の 2 点の血清を測定し 4 倍以上の抗体価の上昇が認められれば、風疹の感染があったと判断できる。

顕性感染の場合、一般に発疹が出現してから 4 日後には HI 抗体の上昇が見られ、発疹出現後 1-2 週で最高価 (1:256 から 1:8192 程度) に達する。7 ヶ月から 3 年後くらいまでは、128 倍程度の抗体価で安定する。512 倍以上の抗体価が発疹出現後 7 ヶ月以上持続した例はない。従って 512 倍以上の抗体価の場合は、初感染後 7 ヶ月以内か、再感染によるブースターである可能性が高い。近年の HI 抗体高値は不顕性再感染によるものが多いと考えられる。

3-2. IgM 酵素免疫抗体測定 (IgM-EIA)

間接法 EIA キットならびに IgM 抗体捕捉法による EIA キットとの 2 種類があり市販されている。いずれのキットも使用説明書の記載に従って操作し、キットに添付されている血清を標準にし、判定する。

3-2-1. 評価の目安

キットの判定基準に基づき判定を行う。ただし弱陽性の場合には必ずしも直近における風疹の感染を反映する訳でないので注意が必要である。再感染の場合でも症例の約 50% に IgM 抗体が検出されるので、IgM 抗体の有無だけでは初感染との判別は困難である。一般に再感染例では、持続期間が短く抗体価も低い。

なお、CRS が疑われる症例においては「血清中に風しん特異的 IgM 抗体の存在 (ただし出生後の風疹感染が除外できるものに限る)」ことが病原診断の基準となっており臨床診断とあわせて CRS の確定診断の基準となる。

3-3. IgG 酵素免疫抗体測定 (IgG-EIA)

間接法の EIA キットが市販されている。いずれのキットも使用説明書の記載に従い操作し判定する。

3-3-1. 評価の目安

抗体価は HI 抗体価とほぼ相関し注意点も同じであり、抗体の有無だけでは感染の証明にはならないことに注意が必要であり、感染の有無を評価するには急性期および回復期のペア血清の抗体価を同時に測定し有意な上昇を確認する必要がある。

4. 遺伝子学的検査

検体から RNA を抽出し、風疹ウイルス遺伝子の一部を RT-nested PCR によって増幅し、解析を行う。最初に感度の高い非構造蛋白質 (NS) 遺伝子増幅 RT-nested PCR を行うことが推奨される。さらに陽性であった検体については、エンベロープ蛋白質 E1 遺伝子増幅 RT-nested PCR により増幅した産物を用いて、遺伝子配列解析および遺伝子型決定を行う (図 3)。なお、初版に掲載されていたプライマーセット A-D は、一部の遺伝子型のウイルスが検出できないことがあるため、使用を控えた方がよい。また、風疹ウイルスゲノムは GC 含量が非常に高い (約 70%) ため、高 GC 含量鋳型増幅に対応した逆転写反応試薬および PCR 試薬を用いることが推奨される。本マニュアルでは、例示として麻疹診断マニュアル (第 2 版) ⁶⁾、「遺伝子学的検査」に記載の方法と共通のキットを使用する方法を示す。

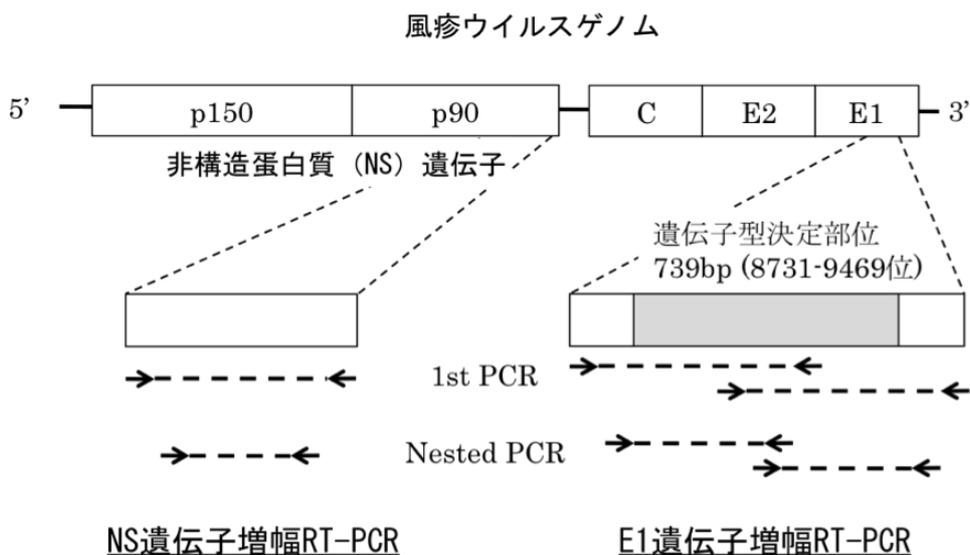


図 3 風疹ウイルス RT-PCR 増幅部位

4-1. ウイルス RNA 抽出および逆転写反応

4-1-1. 試薬

- RNA 抽出キット：一般的な RNA 抽出キットおよびウイルス RNA 抽出キット (例：High Pure Viral RNA kit；ロシュアプライドサイエンス社)

を用いることができる。

- 逆転写酵素 [例：PrimeScript RT reagent kit (PerfectReal time)；タカラバイオ社]

4-1-2. ウイルス RNA の抽出

ウイルス RNA の抽出は、RNA 抽出キットの説明書に従って行う。抽出 RNA は直ちに逆転写反応に用いるか、-80℃に保存する。麻疹診断マニュアル（第2版）による方法と同様に行っても構わない。

4-1-3. 逆転写反応（RT）

ここでは、反応に必要な試薬がキットの中にすべて含まれる PrimeScript RT reagent kit (Perfect Real Time)（タカラバイオ社製）を用いた方法を記載する。

前項（4-1-2）で抽出した RNA 溶液 10μL, 5×PrimeScript Buffer 4μL, PrimeScript RT Enzyme Mix I 1μL, Random 6mers 4μL, RNase Free dH₂O 1μL を添加して総量 20μL にした後、37℃15分、85℃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、NS 遺伝子あるいは E1 遺伝子の検出および解析を行う。

RNA	10μL
5×PrimeScript Buffer	4μL
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1μL
Random 6mers (100μM)	4μL
RNase Free dH ₂ O	1μL
合計	20μL

4-2. 風疹ウイルス NS 遺伝子の検出

4-2-1. 試薬

- PCR 酵素 [例：PerfectShot Ex-taq (Loading dye mix)；タカラバイオ社]
- NS 遺伝子増幅用プライマー

用途	プライマー名	認識領域 (bp)	方向*	配列
1st PCR	NSL F3	5746-5762	F	TCC TTG CGC CGAAGA CT
	NSL B3-6	5984-6001	R	AGA GGG GGT CCA CTT GAG
Nested PCR	F2 nest	5811-5829	F	CCA CTG AGA CCG GCT GCG A
	B2 nest	5948-5967	R	GCC TCG GGG AGG AAG ATG AC

* F : Forward primer、 R : Reverse primer

- アガロースゲル (1.5~2.0%)
- DNA 分子量マーカー (例 : 100bp DNA Ladder)

PCR は、PCR チューブ中にプライマーを除く、2×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。

4-2-2. 1st PCR および nested PCR 反応

1) 以下の試薬およびプライマーセットを混合し、PCR 反応を行う。

PerfectShot Ex-Taq	25μL
cDNA	5μL
Forward primer: NSL F3 (20μM)	1μL
Reverse primer: NSL B3-6 (20μM)	1μL
DNase/RNase free water	18μL
合計	50μL

反応	条件	サイクル数
1. Denaturation	94°C 3分	1
2. PCR 反応	Denaturation	30
	Annealing	
	Extension	
3. 最終 Extension	72°C 3分	1

2) 以下の試薬を混合し、nested PCR 反応を行う。

PerfectShot Ex-Taq	25 μ L
1st PCR 産物	5 μ L
Forward primer: F2 nest (20 μ M)	1 μ L
Reverse primer: B2 nest (20 μ M)	1 μ L
DNase/RNase free water	18 μ L
合計	50 μ L

反応	条件	サイクル数
1. Denaturation	94 $^{\circ}$ C 3分	1
2. PCR 反応	Denaturation	98 $^{\circ}$ C 10秒
	Annealing	60 $^{\circ}$ C 30秒
	Extension	72 $^{\circ}$ C 45秒
3. 最終 Extension	72 $^{\circ}$ C 3分	1

3) 電気泳動

1.5~2.0%アガロースゲル (TAE buffer 使用) を用い、Mupid ミニゲル泳動槽等で 10 μ L の PCR 産物を泳動する。エチジウムブロマイドによる染色後、トランスイルミネーターで蛍光検出する。風疹ウイルス遺伝子が存在した場合、1st PCR の増幅産物として 256bp、nested PCR の増幅産物として 157bp のバンドが認められる。

4-2-3. One-step RT-PCR 法による風疹ウイルス NS 遺伝子の検出

NS 遺伝子の検出には One-Step 法を用いた変法を用いることができる。検体には 4-1-2 で抽出した RNA を用いる。

4-2-3-1. 試薬

- RT-PCR 酵素 [例: QIAGEN OneStep RT-PCR kit; QIAGEN 社製]
- RNase Inhibitor [例: Recombinant RNase Inhibitor; タカラバイオ社]
- PCR 酵素 [例: Takara Ex-taq; タカラバイオ社]
- NS 遺伝子増幅用プライマー: 4-2-1 で示したもの

4-2-3-2. One-step RT-PCR および Nested PCR 反応

1) 以下の試薬およびプライマーセットを混合し、RT-PCR 反応を行う。

RNase-Free dH ₂ O	6.25 μ l
5 \times Qiagen OneStep RT-PCR buffer	5 μ l
5 \times Q Solution	5 μ l
dNTP Mix	1 μ l
Forward Primer NSL F3 (20 μ M)	0.75 μ l
Reverse Primer NSL B3-6 (20 μ M)	0.75 μ l
Qiagen One Step Enzyme Mix	1 μ l
RNase Inhibitor (40U/ μ L)	0.25 μ l
鋳型 RNA	5 μ l
Total Volume	25 μ L

反応	条件	サイクル数
1. 逆転写反応	50 $^{\circ}$ C 30 分	1
2. 逆転写酵素不活化	95 $^{\circ}$ C 15 分	1
2. PCR 反応	Denaturation	40
	Annealing	
	Extension	
3. 最終 Extension	72 $^{\circ}$ C 10 分	1

2) 以下の試薬およびプライマーセットを混合し、nested PCR 反応を行う。

dH ₂ O	18.875 μ l
10 \times Ex Taq buffer	2.5 μ l
dNTP Mixture (2.5mM each)	2 μ l
Forward Primer F2 nest (20 μ M)	0.5 μ l
Reverse Primer B2 nest (20 μ M)	0.5 μ l
Ex Taq (5U/ μ L)	0.125 μ l
RT-PCR 産物	0.5 μ l
Total Volume	25 μ L

反応	条件	サイクル数
1. Denaturation	94°C 3分	1
2. PCR 反応	Denaturation	98°C 10秒
	Annealing	60°C 30秒
	Extension	72°C 45秒
3. 最終 Extension	72°C 3分	1

3) 電気泳動

4-2-2. と同様に電気泳動を行い、遺伝子増幅の確認を行う。

4-3. 風疹ウイルス E1 遺伝子の検出および遺伝子解析

世界保健機関（WHO）によって、風疹ウイルスの遺伝子型分類は、E1 遺伝子内の sequence window 領域（739bp、8731-9469 位）の遺伝子配列を参照株の遺伝子配列と比較解析することで行うことが定められている。臨床検体から sequence window 領域全長を一度に増幅させることが困難であることが多いため、二断片に分けて RT-nested PCR で増幅させたのち、遺伝子配列解析に用いる。ときに NS 遺伝子の検出が可能であった場合でも、E1 遺伝子の両断片あるいは片方の断片しか増幅できないことがある。その場合、検体中のウイルス遺伝子量が少ないことが考えられるため、ウイルス分離を行った後、分離サンプルを用いて E1 遺伝子の検出および遺伝子解析を行うと良い。

4-3-1. 試薬

「4-2. 風疹ウイルス NS 遺伝子の検出」で使用する試薬の他、以下の試薬を用いる。

- E1 遺伝子増幅用プライマー

5'断片 E1-(2)

用途	プライマー名	認識領域 (bp)	方向*	配列
1st PCR	E1-2F	8633-8652	F	AGC GAC GCG GCC TGC TGG GG

	E1-2R	9119-9138	R	CCA GCG CGT ATG TGG AGT CC
Nested PCR	E1-6F	8664-8683	F	ACA CCG TGA TGA GCG TGT TC
およびシーク エンシング	E1-10R	9110-9129	R	ATG TGG AGT CCG CAC TTG CG

* F : Forward primer、 R : Reverse primer

3'断片 E1-(3)

用途	プライマ ー名	認 識 領 域 (bp)	方向*	配列
1st PCR	E1-7F	8991-9010	F	TTG TGG GGG CCA CGC CAG AG
	E1-12R	9521-9540	R	TGT GTG CCA TAC ACC ACG CC
Nested PCR およびシーク エンシング	E1-3F	9070-9089	F	CGG CGA GGT GTG GGT CAC GC
	E1-3R	9473-9492	R	ACC CGC GCG CTC GCG CGA TC

* F : Forward primer、 R : Reverse primer

- PCR 産物精製キット (例: QIAquick PCR Purification Kit; キアゲン社)
- DNA ゲル抽出キット (例: QIAquick Gel Extraction Kit; キアゲン社)
- シークエンシングキット (例: BigDye® Terminators Cycle Sequencing Kit; アプライドバイオシステムズ社)

4-3-2. 1st PCR および nested PCR

4-1-3. で調整した cDNA を用い、4-2. 風疹ウイルス NS 遺伝子の検出と同様のキットを用いて行う。反応条件は以下に示す。

1) PCR 反応

PerfectShot Ex-Taq			25μL
cDNA			5μL
	5'断片 E1-(2)	3'断片 E1-(3)	
Forward primer (20μM)	E1-2F	E1-7F	1μL
Reverse primer (20μM)	E1-2R	E1-12R	1μL
DNase/RNase free water			18μL
合計			50μL

反応	条件	サイクル数
1. Denaturation	94°C 3分	1
2. PCR 反応	Denaturation	98°C 10秒
	Annealing	61°C 30秒
	Extension	72°C 45秒
3. 最終 Extension	72°C 3分	1

2) 以下の試薬を混合し、nested PCR 反応を行う。

PerfectShot Ex-Taq			25μL
1st PCR 産物			5μL
	5'断片 E1-(2)	3'断片 E1-(3)	
Forward primer (20μM)	E1-6F	E1-3F	1μL
Reverse primer (20μM)	E1-10R	E1-3R	1μL
DNase/RNase free water			18μL
合計			50μL

反応	条件	サイクル数
1. Denaturation	94°C 3分	1
2. PCR 反応	Denaturation	98°C 10秒
	Annealing	E1-(2): 59°C 30秒 E1-(3): 66°C 30秒
	Extension	72°C 45秒
3. 最終 Extension	72°C 3分	1

3) 電気泳動

1.5%アガロースゲル (TAE buffer 使用) を用い、Mupid ミニゲル泳動槽等で 10μL の PCR 産物を泳動する。エチジウムブロマイドによる染色後、トランスイルミネーターで蛍光検出する。1st PCR の増幅産物は 5'断片 E1-(2) で 506bp, 3'断片 E1-(3) で 551bp のバンドとして認められる。一方、nested PCR の増幅産物は 5'断片 E1-(2) で 466bp, 3'断片 E1-(3) で 423bp とのバンドとして認められる。

4-3-3. PCR 産物の精製とダイレクトシーケンス反応

1) PCR 産物の精製

PCR 産物が電気泳動で確認できたならば、PCR 産物の精製を行う。単一バンドとして認められた場合には市販の PCR 産物精製キットを用いると簡便である。バンドが複数認められた場合には、ゲルから目的のバンドのみを切り出して精製する。シーケンスプライマーは、通常 nested PCR に使用したプライマーを使用することが出来る(すなわち、5'断片 E1-(2)の場合、E1-6F または E1-10R、3'断片 E1-(3)の場合、E1-3F または E1-3R) (図4)。プライマー E1-3R を用いたダイレクトシーケンス反応では、波形がきれいに出ず、十分なデータを得られないことがある。その場合は、プライマー E1-S4R: CGG CGG TGA CGA ACT TCC (9405-9422 塩基領域に対応) を用いて解析を行う。

2) シーケンス反応

以下の試薬およびプライマーを混合し、サイクルシーケンス反応を行う。

H ₂ O	10 μ L
Primer (3.2 μ M)*	1 μ L
BigDye Terminator Ready Reaction Mix	8 μ L**
精製 PCR 産物 (5-20ng/ μ L)	1 μ L

*Primer: 5'断片 E1-(2)の場合、E1-6F または E1-10R、3'断片 E1-(3)の場合、E1-3F または E1-3R を用いる。

**BigDye Terminator Ready Reaction Mix は×5 BigDye sequencing buffer で希釈可能であるが、至適希釈率は各自で検討を行う必要がある。

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

3) シーケンス反応産物精製およびシーケンス解析

AutoSeq G-50 (GE ヘルスケア) 等を用い、未反応ダイターミネーターを除去する。この精製産物を DNA シークエンサーにより解析し、遺伝子配列の決定を行う。

4-3-4. シークエンス結果の解析

5'断片および 3'断片の遺伝子配列情報をつなぎ合わせて、739bp からなる遺伝子型決定領域 (8731-9469 位) の配列情報を構築する (図 4)。

```

8633
AGCGACGGGGCCTGCTGGGGCTTCCCCACCGACACCGTGATGAGCGTGTTCGCCCTTGCTAGCTACGTCCAG
E1-2F→                               E1-6F→

                               8731
CACCCCTACAAGACCGTCCGGGTCAAGTTCCATACAGAGACCAGGACCGTCTGGCAACTCTCCGTTGCCGGC
Sequence window start

GTGTCGTGCAACGTCACCACAGAACACCCGTTCTGCAACACGCCGCACGGACAACTGGAGGTCCAGGTCCCG
CCCGACCCCGGGGACCTGGTTGAGTACATTATGAATTACACCGCAATCAGCAATCCCGTGGGGCCTCGGG
AGCCCGAATTGTCATGGCCCCGATTGGGCCTCCCCGGTTTGCCAACGCCATTCCCCTGACTGCTCGCGGCTT
GTGGGGGCCACGCCAGAGCGTCCCCGGCTGCGCCTGGTGCAGCCGACGACCCCTGCTGCGCACTGCCCT
E1-7F→

GGGCCCGGCGAGGTGTGGGTCACGCCGTTATAGGCTCTCAGGCGCGCAAGTGCGGACTCCACATACGGCT
E1-3F→                               ←E1-10R ←E1-2R

GGACCGTACGGCCATGCTACCCTCGAAATGCCCGAGTGGATTACAGCCCACACCACCAGCGACCCCTGGCAC
CCACCGGGCCCTTGGGGCTGAAGTTCAAGACAGTTCGCCCCGGTGGCCCTGCCACGCGCTTAGCGCCACCC
CGCAATGTGCGTGTGACCGGGTGTACCAGTGCGGTACCCCCGCGCTGGTGAAGGCCCTTGCCCCCGGGGA
GGGAATTGCCATCTCACCGTCAATGGCGAGGACGTCGGCGCCTTCCCCCTGGGAAGTTCGTACCGCGCC
←E1-S4R

                               9469
CTCCTCAACACCCCCCGCCCTACCAGGTCAGCTGCGGGGGCGAGAGCGATCGCGCGAGCGCGGGTCATT
Sequence window end ←E1-3R

                               9540
GACCCCGCCGCGCAATCGTTTACCGGCGTGGTGTATGGCACACA
← E1-12R

```

図 4 遺伝子型決定領域 (sequence window) 周辺の cDNA 配列

TO-336.GMK5 株 (TO-336 ワクチン株の親株、遺伝子型 1a、accession number: AB588192) の配列を示す。E1-(2)断片および E1-(3)断片増幅プライマー結合部位を、それぞれ赤および青字で示す。遺伝子型決定領域の最初と最後の 10 塩基ずつを黒太字で示す。

現在 WHO が中心となって、各国の実験室から報告された風疹ウイルス遺伝子情報をもとに遺伝子型分類が行われている⁷⁾。現在のところ風疹ウイル

スは2つの Clade に大きく分けられることが判明している。さらに Clade 1 には10つの遺伝子型（1a, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1h, 1i, 1j）が、Clade 2 には3つの遺伝子型（2A, 2B, 2C）が存在する。アルファベットの小文字で表記された遺伝子型は仮（provisional）の遺伝子型である。WHO によって定められたそれぞれの遺伝子型の参照株の配列（表）とあわせて分子系統樹解析を行うことにより、検出されたウイルスがどの遺伝子型に分類されるのかが判定できる（図5）。また世界各国から報告された配列データを用いて分子疫学的な解析が行え、検出されたウイルスによる感染が輸入例か否かを判別することなどが可能となる。なお、分子系統樹解析について実施が難しい場合は必要に応じ、国立感染症研究所ウイルス第三部で解析のサポートが可能である。

また WHO では世界的な風疹サーベイランスのため、風疹ウイルス遺伝子の配列情報を DDBJ/EMBL/GenBank へ登録することを強く推奨している。なお DDBJ/EMBL/GenBank 登録作業についても国立感染症研究所ウイルス第三部でサポートが可能である。

表 風疹ウイルス各遺伝子型の参照株

遺伝子型	参照株名	Accession Number
1a	RVi/BEL/63[1a]VAC	AF188704
	RVi/NJ.USA/61[1a]VAC	M30776
	RVi/PA.USA/64[1a]VAC	L78917
	Rvi/Toyama.JPN/67[1a]	AB047330
1B	RVi/Jerusalem.ISR/75[1B]	AY968207
	RVi/Tiberias.ISR/88[1B]	AY968209
	RVi/BeneBerak.ISR/79[1B]	AY968208
1C	RVi/Los Angeles.CA.USA/91[1C]	AY968212
	RVi/SLV/02[1C]	AY968211
	RVi/PAN/99[1C]	AY968217
1D	Rvi/Tokyo.JPN/90CRS[1D]	AY968214
	Rvi/Saitama.JPN/94[1D]	AY968216
1E	RVi/Dezhou.CHN/02[1E]	AY968210
	RVi/MYS/01[1E]	AY968221

1F	Rvi/Linqing.CHN/00[1F]	AY968213
	RVi/Dangshan.CHN/00[1F]	AY968215
1G	Rvi/UGA/20.01[1G]	EF588978
	Rvi/Ontario.CAN/27.05[1G]	EF588970
	RVi/Minsk.BLR/29.04[1G]	AM258945
1h	Rvi/Novokuznetsk.RUS/04[1H]	EF421977
	Rvi/Minsk.BLR/28.05[1H]	AM258953
1i	Rvi/Milan.ITA/46.92[1I]	AY161360
	Rvi/London.GBR/86[1I]	AF039122
1j	Rvi/Kagoshima.JPN/22.04[1J]	AB285129
	Rvi/Miyazaki.JPN/10.01 [1J]CRS	AB285130
2A	RVi/Beijing.CHN/79[2A]	AY258322
	RVi/Beijing.CHN/80[2A]VAC	AY258323
2B	RVi/TelAviv.ISR/68[2B]	AY968219
	Rvi/Seattle.WA.USA/16.00[2B]	AY968220
	RVi/Anqing.CHN/00/2[2B]	AY968218
2C	Rvi/Moscow.RUS/67[2C]	DQ388279
	Rvi/Moscow.RUS/97[2C]	DQ085340

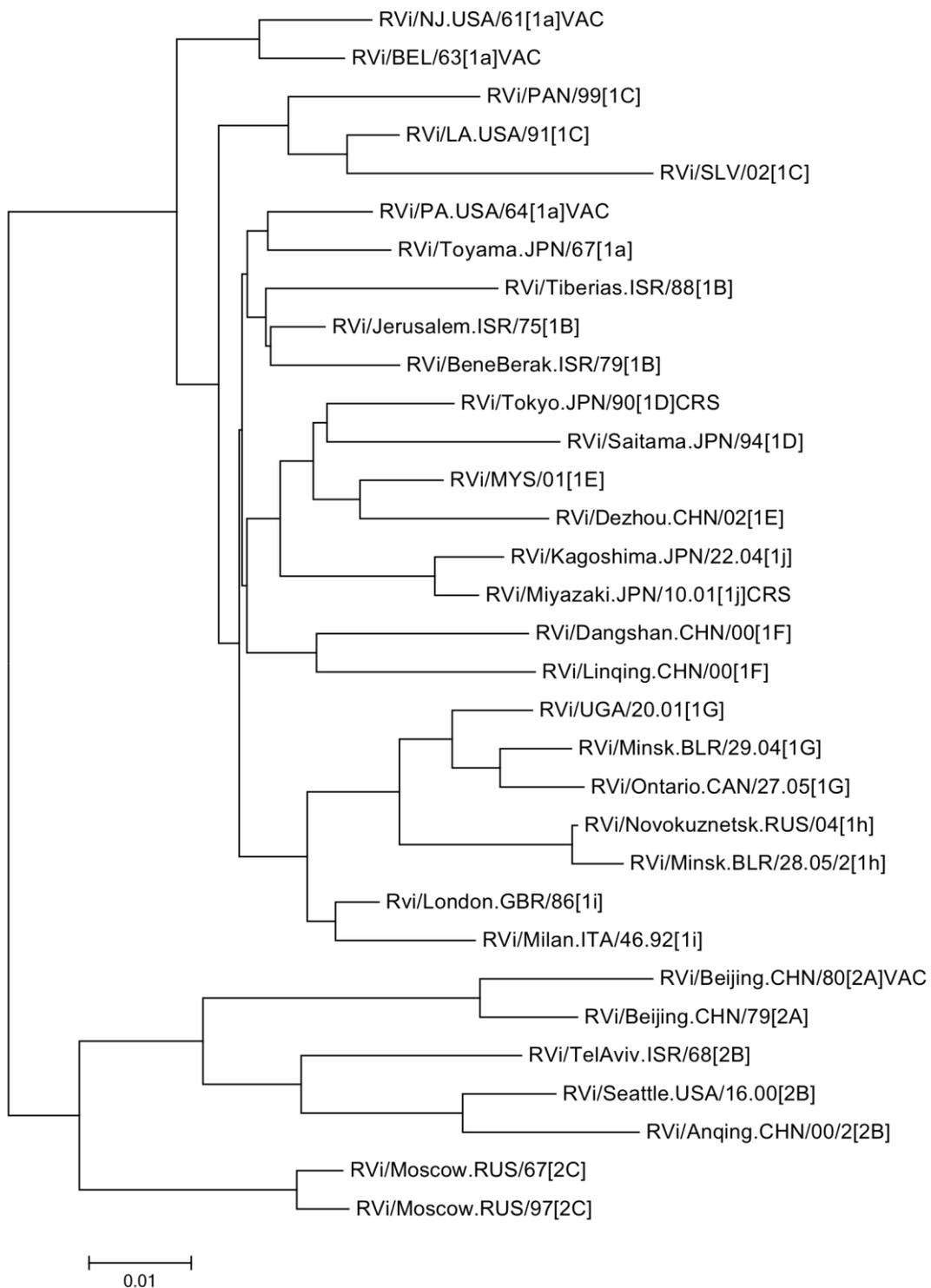


図5 風疹ウイルス参照株による系統樹

E1 遺伝子の遺伝子型決定領域 (739bp) の配列情報を用いて近隣接合法によって解析を行った。現在 13 種の遺伝子型に分類されている。

4-4. RT-PCR の陽性コントロール

上記 RT-PCR に使用する陽性コントロールは国立感染症研究所ウイルス第三部で配布している。

5. ウイルス分離

ウイルスの分離および同定には 3～4 週間を要する。

5-1. 使用細胞

多くの細胞が風疹ウイルス感受性であるが、Vero、VeroE6 および RK-13 細胞が国内外での実績が多い（国立感染症研究所ウイルス第三部では主に RK-13 細胞を用いている）。なお、臨床症状等より麻疹ウイルス感染と区別が困難な場合は、麻疹ウイルスの分離方法に則し、ヒト SLAM 発現 Vero 細胞を用いて分離を行うことも可能である。また、風疹ウイルスの増殖は抗真菌剤のファンギソンによって抑制されるので、ウイルス分離のための培養液には加えない方がよい⁸⁾。

5-2. 分離方法

以下は国立感染症研究所で実施している方法をもとに記載するが、細胞種による差や同じ細胞でも至適培地の条件が異なるので、各検査室にて詳細は検討することが望ましい。

- 1) 8%牛血清 (BS) を添加した Eagle's MEM に浮遊させた RK13 細胞 (3×10^5 cells/ml) をプラスチックフラスコ (12.5cm^2) に一本あたり 4ml 蒔き、37°C の炭酸ガス培養器で 2 日間培養する。
- 2) 0.2ml の検体を接種する。室温で 1 時間吸着した後、接種材料をのぞかずに 2%BS を含む培養液を 4ml 加え 35~37°C の炭酸ガス培養器で培養する (35°C の方が望ましいが 37°C でも分離可能である)。検体が尿の場合は接種材料を除いた後に培地を加える (尿は細胞への毒性が強いため)。翌日に細胞変成効果 (CPE) がみられた場合はサンプルの非特異的な毒性によると考えられるので新しい培養液に交換する。接種後 4 日目に培養液を交換し、接種後 7 日目まで培養を続ける。通常この段階ではウイルスによる CPE はみられない。
- 3) 感染細胞を培養液とともに凍結融解し、その一部 (1ml) を新しい細胞に

接種し、同様に培養する。通常この継代培養を3回繰り返すが、CPEが観察できるようになれば回数を減らすことができる。培養終了後細胞を凍結融解し、その後3000rpm、20分の遠心上清を分離試料としウイルス同定を行う。一般に風疹ウイルスによるCPEは弱いためCPEが観察できなくとも分離試料中に風疹ウイルスが存在している可能性が十分にある。また風疹ウイルスによるCPEは特徴がないのでCPE観察による分離同定の判定は事実上困難である。

5-3. 同定方法

風疹ウイルスの同定にはウイルス遺伝子検出 (RT-PCR)、蛍光抗体法によるウイルス抗原検出、抗血清による中和法等があるが、中和法は時間がかかることや中和抗体の確保など手間がかかるため推奨しない。本マニュアルでは遺伝子検出法 (既述) および蛍光抗体法による抗原検出法を記載する。なお、判定までの時間が短く、分子疫学的な解析も可能となるウイルス遺伝子検出を第一選択として使用することが推奨される。

5-3-1. 蛍光抗体法

使用細胞・試薬等はウイルス分離と同様のものを使用するが、細胞の培養はガラス製チャンバースライド (8チャンバー) で行う。

- 1) RK-13 細胞をチャンバースライドで培養し、分離試料 25 μ l を接種し 35~37°Cで1時間放置後、培養液を0.4ml 加え 35~37°Cの炭酸ガス培養器内で培養する
- 2) 感染後 CPE が現れたら (約 3-4 日、CPE が認められない場合でも 5-7 日目)、細胞を PBS で洗浄した後、チャンバーを外し、冷アセトンで 10~15 分固定する。(アセトン固定の代わりに以下の固定を行っても良い。その際はチャンバーを外す必要はない。4%パラホルムアルデヒドで 30 分間固定する。PBS で洗浄後、0.5%TritonX-100 加 PBS を室温 15 分で感作し、膜透過処理をする)。
- 3) 固定した細胞に一次抗体として市販されている抗風疹ウイルス精製マウスモノクローナル抗体 (例: abcam ab34749, USBiological R9700-05A) を 1~2 μ g/mL に希釈し、一区画あたり 100~200 μ l 加え、保湿箱に入れ 37°C1 時間処理する。

- 4) PBS で 5-6 回洗浄後、FITC 標識抗マウス IgG 抗体（濃度にもよるが 1 : 300~500 希釈）を 100~200 μ l のせ保湿箱に入れ 37°C 1 時間反応させる
- 5) PBS で 5-6 回洗浄後、蛍光観察用封入剤をのせてカバーガラスをおき、蛍光顕微鏡で観察する。同様に処理した非感染細胞を対照とし、風疹ウイルスに特異的な蛍光が検出される場合を風疹ウイルス陽性と判定する。

6. 検出ウイルスの命名法

WHO によって、風疹ウイルス野外株の命名方法が以下の通りに示されている⁹⁾。

1) 臨床材料から細胞培養により分離されたウイルス株

RVi/City.Country/Weeks.Year/isolation number[Genotype]

2) 臨床材料由来 RNA から遺伝子が検出されたウイルス株

RVs/City.Country/Weeks.Year/isolation number[Genotype]

City : 臨床検体の得られた市名もしくは都道府県名

Country : 臨床検体の得られた国名の略称（日本の場合 JPN）

Weeks : 臨床材料が採取された週（1 年を 52 週として表記）

Year : 臨床材料が採取された年

Isolation number : 臨床材料が採取された都市および週が同一の場合の整理番号（オプション）

Genotype : 遺伝子型

CRS 患者の臨床材料から得られたウイルス株には[Genotype]の後ろに CRS と記載する。

また、ワクチン株には[Genotype]の後ろに VAC と記載される。

例

1998 年 3 週目に東京都で 2 番目に採取されたウイルス株。ウイルスが分離されており、遺伝子型は 1D。

RVi/Tokyo.JPN/03.98/2[1D]

1997年17週目にロンドンで採取されたウイルス株。CRS患者由来でウイルス遺伝子が検出されており、遺伝子型は1B。

RVs/London.GBR/17.97[1B]CRS

7. 引用文献

- 1) 平原史樹ほか：風疹流行および先天性風疹症候群の発生抑制に関する緊急提言。厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業分担研究班 風疹流行にともなう母子感染の予防対策構築に関する研究、2004.
- 2) World Health Organization: Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. Second edition. WHO/IVB/07.01. 2007.
- 3) 加藤茂孝：風疹 HI 抗体価測定の方法。臨床とウイルス、19(2)、127-130、1991.
- 4) 加藤茂孝：血清処理用カオリンの酸処理は必要条件ではない。臨床とウイルス、22(2)、S75、1994.
- 5) Inouye, S.: Micro-modification of kaolin treatment of serum for the rubella hemagglutination-inhibition test. J. Med. Microbiol., 9, 501-502, 1976.
- 6) 田代真人ほか：麻疹診断マニュアル（第2版）、2008.
- 7) World Health Organization: Update of standard nomenclature for wild-type rubella viruses, 2007. Wkly. Epidemiol. Rec., 82(24), 216-222, 2007.
- 8) Umino, Y and Tashiro, M.: Inhibition of rubella virus growth by Fungizone. Vaccine, 19, 1369-1372, 2001.
- 9) World Health Organization: Standardization of the nomenclature for genetic characteristics of wild-type rubella viruses. Wkly. Epidemiol. Rec., 80(14), 126-132, 2005.

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三部
〒208-0011東京都武蔵村山市学園 4-7-1
Tel:042-561-0771
Fax:042-565-3315

9. 執筆者

森 嘉生、大槻紀之、岡本貴世子、坂田真史、竹田 誠：国立感染症研究所
ウイルス第三部

安井善宏、皆川洋子：愛知県衛生研究所