

# ムンプスウイルス病原体検査マニュアル

## [目次]

流行性耳下腺炎（ムンプス）の概要 .....	2
おたふくかぜワクチンの概要 .....	5
検査に関する一般的な注意事項 .....	6
1. ムンプスウイルスの分離培養 .....	6
2. 血清学的検査 .....	7
3. 遺伝子解析 .....	8
4. 検査材料の輸送 .....	8
病原学的検査 .....	10
1. RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 法 .....	10
2. SH 遺伝子領域の塩基配列の決定（ダイレクトシーケンシング） .....	14
3. ムンプスウイルスの分子系統解析 .....	16
4. ムンプスウイルスの Real-time PCR .....	25
5. ウイルス分離 .....	28
6. ウイルス感染価の測定法 .....	31
7. アビジン・ビオジン酵素抗体法（ABC 法）による抗原検出 .....	33
血清学的検査 .....	34
1. IgM 検出 ELISA 法 .....	34
2. IgG 検出 ELISA 法 .....	36
3. 補体添加中和抗体測定法（CNT 法） .....	37
4. 赤血球凝集抑制(HI)試験 .....	38
ムンプスの診断基準 .....	39
参考文献 .....	40

## 流行性耳下腺炎（ムンプス）の概要

### 原因：

ムンプスウイルスによる感染症であり、飛沫感染あるいは接触感染で伝播する。基本再生産数（R0）（1人の感染者から二次感染をさせる平均的な人数）は4～7である（麻疹は12～18、風疹は5～8）<sup>1)</sup>。ムンプスウイルスは、パラミクソウイルス科パラミクソウイルス亜科ルブラウイルス属の一本鎖マイナス鎖RNAウイルスである。我が国ではワクチン接種率が30～40%と低迷しているため流行は制御されておらず、4～5年ごとに全国規模の流行が繰り返されている（図1）。永井らの推計によれば、2005年のピーク時には135.6万人[127.2~44.0万人]、最も少なかった2007年でも43.1万人[35.5~50.8万人]の患者が発生していると思込まれる<sup>2)</sup>。

### 好発年齢：

成人の発症状況に関する正確なデータは無いが、小児科定点からのデータでは患者の9割は10才未満である（図2）。一方で、20～40歳代の成人においても発症のピークがあるという報告がある<sup>3)</sup>。

### 潜伏期間：

潜伏期は通常16～18日間で、患者は発症の数日前から感染性ウイルスを排出する。学校保健安全法では、流行性耳下腺炎を第2種学校感染症に指定し、「耳下腺、顎下腺、舌下腺の腫脹発現後5日を経過し、かつ全身状態が良好になるまで出席停止とすること」としている。全感染者の30～35%も存在する不顕性感染者は、ウイルスを排泄し、感染源となりうる<sup>1)</sup>。

### 症状：

通常は耳下腺の腫脹を伴って発症する。多少の痛み、発熱や全身倦怠感、食欲不振、頭痛なども伴う。予後は一般に良好であるが、無菌性髄膜炎、感音性難聴、脳炎、精巣炎、卵巣炎、睪炎など種々の合併症を引き起こす。腫脹は下顎骨の後縁と耳たぶ下部の間にみられ、前下方へ拡がる。腫れるスピードはきわめて早く、数時間で最高に達することもあるが、通常は1～3日でピークに達し、3～7日で消退する。一側の腫脹が他側に比べ1～2日先行することが多いが、一側の場合も25%ある。酸っぱい食べ物で痛みが強調される。大多数の患者では耳下腺のみが侵されるが、全症例の10～15%では顎下腺も侵される。疼痛は耳下腺よりも少ないが、腫脹の消退は耳下腺の場合より遅い。舌下腺腫脹は少ない<sup>4)</sup>。

図1 流行性耳下腺炎患者報告数の推移，1982年第1週～2013年第27週

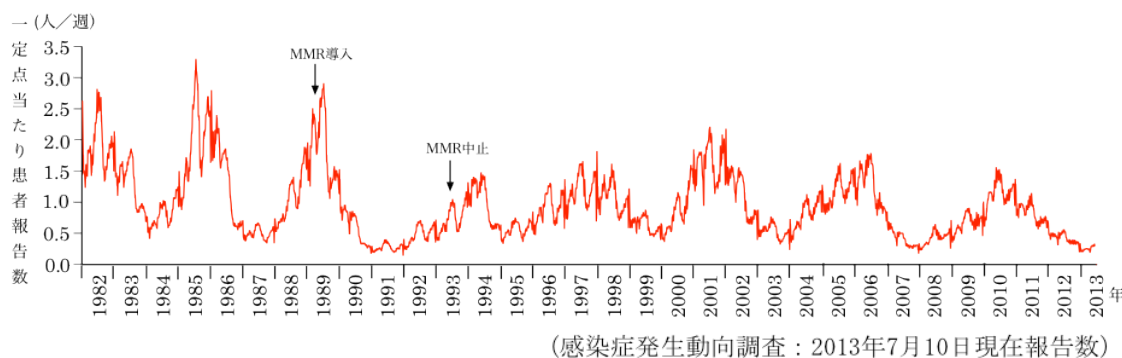
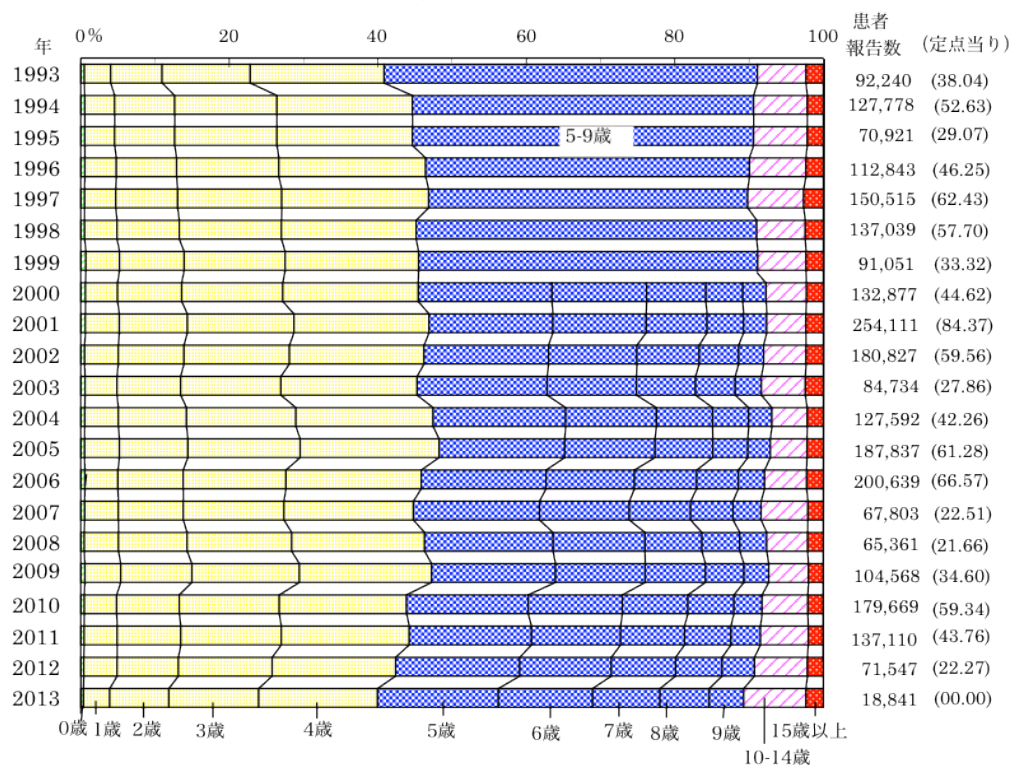


図2 ムンプス患者の年齢分布，1983～2013年（感染症発生動向調査）



合併症：

- (1) 無菌性髄膜炎：全患者の65%以上に髄液の細胞数増多が認められるが、無症状のことが多い。髄膜炎の症状を示すのは10%程度である。耳下腺腫脹の数日後に発熱、頭痛、嘔吐などの髄膜刺激症状が出現するが、完治する。男児では女児の3-5倍発症する頻度が高い。
- (2) 睾丸炎：思春期以降の成人男性では20～30%前後の頻度で見られる。睾丸炎の発症は耳下腺腫脹8日以内のことが多い。睾丸の腫大と激痛を訴え、体温上昇、頭痛、悪心、下腹部痛を伴う。殆どは片側だけであるが、30-40%に睾丸の萎縮がみられる。機能障害は10数%に認められるが、絶対的不妊は稀である。

- (3) 卵巣炎：成人女性では7%に認められる。ほとんどの例で不妊症とはならない。
- (4) 腭炎：重篤な腭炎は稀であるが、軽症のものはしばしばみられ、胃痛、発熱、嘔吐、ショックなども出現する。夜間、激しい腹痛で来院して流行性耳下腺炎とわかることも多い。
- (5) 感音性難聴：ムンプス難聴は予後不良である。かつてムンプス難聴の発生頻度は1.5万～2万人に1人程度の希な合併症と考えられてきた。しかし、近年の報告では患者の0.1～1%程度に発症し<sup>5)6)</sup>、年間700～2,300人のムンプス難聴が日本で発生していると推定されている。頻度の高い片側性難聴は、好発年齢が小児期であることもあり、気づかれない場合が多い。一般的に日常生活に支障は無いといわれているが、成人では耳鳴りやめまいを伴うことも多く、また、患者は他人とのコミュニケーションにストレスを感じているという報告もある<sup>1)</sup>。両側高度感音性難聴の発症はまれであるが、発症すると補聴器や人工内耳の装着を必要とし、患者への負担は大きい。また、中学生以前の発症では速やかな言語指導を行わないと言語能力を失う可能性がある。
- (6) 脳炎、脊髄炎：発生頻度は1：5,000。耳下腺腫脹時と、その7～10日後に発症する二型がある。
- (7) その他：まれに心筋炎、腎炎、関節炎、血小板減少性紫斑病、甲状腺炎などの合併が知られている。

#### 区別すべき他の病気

- (1) 反復性耳下腺炎：自然消失するが、不定期的に反復する耳下腺炎で、通常片側の耳下腺全体のびまん性腫脹（全体に腫れる）が数日～数週間続く。主たる原因は唾液管末端拡張症である。成人にもみられるが、主に10歳以下に発症し、5～6歳にピークがある。原因の炎症は口腔内常在菌が疲労その他で体力が低下した際に逆行性に感染して起こる。20歳以上の女性では、シェーグレン症候群をまず否定する。またコクサッキー、パラインフルエンザ3型、EBウイルス(伝染性単核症)などのウイルス感染で耳下腺腫脹がみられることがある。この場合、耳下腺腫脹は比較的短期間（数日）で消退することが多い<sup>4)</sup>。
- (2) 頸部リンパ節炎
- (3) 急性化膿性耳下腺炎
- (4) 唾石症

治 療：原因療法はなく、もっぱら対症療法のみを行う。

予 防：

ムンプスの予防には弱毒生ワクチン（おたふくかぜワクチン）接種が唯一の方法である。国内では2014年時点で、2種類のワクチン（星野-L32株(北里第一三共)、鳥居株（武田薬品））が流通している。免疫ができるまでに4週間を要する。有効率は94%以上とされており、1才以上であれば接種可能。現在は、任意接種であるが、集団生活を始める前に接種することが望ましい。

保育所等の管理：

学校保健安全法は流行性耳下腺炎を、第2種学校感染症に指定し、耳下腺、顎下腺、舌下腺の腫脹発現後5日を経過し、かつ全身状態が良好になるまで出席停止とすることとしている。学校伝染病の中ではみずぼうそうと並んで一番欠席の多い病気である。しかし、耳下腺腫脹発症以前の無症状期からウイルスを排出していることと、不顕性感染が多いことから、ワクチンの接種率を高く維持して、集団免疫率を高く保つ以外に集団発生を防止することは困難である。

## おたふくかぜワクチンの概要

ワクチンの種類：

ワクチンは、流行性耳下腺炎を予防する唯一の方法である。現在、国内で入手可能なワクチンは、鳥居株（武田薬品工業）、星野-L32株（北里第一三共ワクチン）、の2種類である。いずれもニワトリ胚細胞を用いて製造される弱毒生ワクチンである。世界的にはアメリカで1967年に開発されたJeryl Lynn株およびその派生株であるRIT4385が最も広く用いられている。ロシアを含む東欧諸国やインドでは旧ソ連で開発されたLeningrad-3株、およびその改良株であるLeningrad-Zagreb株が用いられている。2013年現在、おたふくかぜ含有ワクチンを国の定期接種に導入している国は世界で117カ国あり、2回接種が110カ国、1回接種が7カ国である。そのほとんどがMMR（おたふくかぜ(mumps)、麻しん(measles)、風疹(rubella)三種混合）ワクチンとして接種されている。定期接種を導入していない国は76カ国（39%）で、先進国では日本のみである。我が国においても1989年4月から、MMRワクチンによる定期接種が開始されが、含有するムンプスワクチン（占部株）に起因する無菌性髄膜炎が問題となり、1993年にMMRワクチンは中止された。現在は、単味ワクチンによる任意接種が行われているが、接種率は30-40%程度に留まっている。

接種上の注意点：

以下のいずれかの項目に該当する場合は接種をしてはならない。

- 1) 明らかな発熱を呈している者
- 2) 重篤な急性疾患に罹患している者
- 3) ムンプスワクチン成分によってアナフィラキシーを呈したことがある者
- 4) 免疫機能に異常のある疾患を有する者、および免疫抑制を来す治療を受けている者
- 5) 妊娠している者
- 6) 上記以外に予防接種を行うことが不適切な状態にある者

副反応：

軽度のものとして、接種後 2 週間前後に軽度の耳下腺腫脹と微熱が数%に認められる。耳下腺腫脹は多くの場合が一側性であり、両側性でも程度は軽く一過性で消退する。重篤なものとして、無菌性髄膜炎があるが、発生頻度は自然感染(1.24%)に比べて高くない(0.06~0.03%)<sup>7)</sup>。その場合は入院加療を行う。また、アナフィラキシーの発生も少ないながら報告されている (0.1%未満)。その他、稀な副反応として、脳炎・脳症、血小板減少紫斑病、難聴、精巣炎などの報告がある。

## 検査に関する一般的な注意事項

### 1. ムンプスウイルスの分離培養

ウイルス分離は本疾患の最も直接的な診断方法であるだけでなく、得られたウイルスの性状や遺伝子を解析することにより、様々な情報を得ることができる。また、分離したウイルスは中和試験の攻撃用ウイルスや HI 試験の HA 抗原など診断用ツールとして用いることもできることから、ウイルス分離は実験室診断の基本といえる。

実施施設：

野外株は P2 レベル（ワクチン株は P1）の取り扱い基準に従う必要があり、感染が疑われる患者由来の検査材料を取り扱う際には BSL2 の施設で行う。

検査材料の採取<sup>8)</sup>：

- (1) 唾液： ムンプスウイルスは唾液に多く排出されるので、唾液を採取する。

採取する場合は、発症後できるだけ早い時期（0～2 日以内）に採取する。綿棒に十分唾液を含ませた後に直ちに氷冷した生理食塩水もしくは MEM 培地(2%FCS もしくは 0.5%ゼラチン、及び抗生物質を含む)に浸す。検体の保存温度は 2 日間くらいまでは 4℃でよい。それ以上保存する場合には -80℃の冷凍庫あるいは液体窒素中に保存する。ウイルスが不活化するので、検体の凍結融解は最小限にとどめる。RT-PCR や Real-time PCR 用にウイルス RNA を抽出する場合には、検体をそのまま用いる。ウイルス分離を行う場合には検体を遠心分離（3,000 回転、10 分）、またはメンブランフィルター(セルロースアセテート膜、ポアサイズ 0.45-0.8 μm)によって除菌し、検査材料とする。

- (2) 髄液： 髄液を採取する場合には発症後 5～7 日以内に無菌的に採取し、ウイルス分離にはそのまま用いる。保存方法は咽頭ぬぐい液と同様である
- (3) 尿： 発症後 14 日くらいまで尿中にはウイルスの排泄が認められる。採取した尿に抗生物質を添加し、唾液と同様に遠心分離またはメンブランフィルターで除菌し、検査材料とする。保存方法は唾液と同様である。
- (4) 血液： 血液を採取する場合には発症後 1～2 日以内に行う。それ以降の試料からのウイルス分離はむずかしいが、ゲノムは長期間検出される。血漿、PBL いずれからも検出される。保存方法は咽頭ぬぐい液と同様である。

ウイルス分離培養：

Vero(その他 HeLa, Hep2, LLCMK2 等)細胞はムンプスウイルスに高い感受性を示す。ウイルス感染による細胞変性効果(CPE)の程度は、用いる細胞種、ウイルス株によって異なり、不明瞭な場合もあるため、CPE の確認はモルモット赤血球による感染細胞表面への赤血球吸着(HAD)で確かめるのがよい。

ムンプスウイルス同定法とその特徴

検査法	主な器材	手技の程度	感度
補体結合 (CF) 法	補体、感作ヒツジ血球	やや煩雑	低い
中和 (NT) 法	抗ムンプス抗体、Vero 細胞	煩雑	高い
蛍光抗体 (FA) 法	抗ムンプス抗体、Vero 細胞 蛍光標識抗体、蛍光顕微鏡	やや煩雑	高い
RT-PCR 法	RNA 抽出キット、RT-PCR キット シーケンス試薬、PCR 装置 シーケンサー	やや煩雑	高い

## 2. 血清学的検査

ムンプスの血清学的に検査にはいくつかの方法があり、その特性を知って

目的に応じて使い分ける。補体結合反応は、判定の容易さからかつては広く用いられていたが、感度が低いため現在はあまり用いられていない。HI 試験も判定が容易であるが、被検血清の前処理が必要であること、麻疹や風疹の場合に比べて感度が低いことから使われなくなっている。中和抗体法は、感度、特異性ともに優れた方法であるが、細胞培養を必要とし、手技が煩雑で時間を要することから、一般にはあまり使われていない。しかし、その測定値は抗体の感染防御活性を直接反映することから、ワクチンの効果判定には最も適した抗体測定方法である。ELISA 法は陰性陽性の境界を決めるカットオフ値の設定にむずかしさのあるものの、手技の容易さと感度の高さから汎用されている。ELISA 法では急性期の IgM 抗体を検出するか、ペア血清で IgG 抗体価の有意な上昇によって近時感染を診断する。しかし IgM 抗体 ELISA の場合、擬陽性反応が認められる場合があることと、再感染時にも検出されることがあるので注意が必要である。初感染と再感染の鑑別には IgG 抗体の avidity(結合強度)の測定が有用である<sup>7)</sup>。

ムンプスの血清学的検査法の特徴

検査法	主な器材	手技の程度	感度
補体結合(CF)法	補体、感作ヒツジ血球	やや煩雑	低い
赤血球凝集抑制(HI)法	96-well プレート モルモット赤血球	やや煩雑	やや低い
中和抗体法(補体添加法)	攻撃用ウイルス Vero 細胞 24-well プレート モルモット補体	煩雑	高い
ELISA 法	市販キット	容易	高い

### 3. 遺伝子解析

現在、RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction)法によってウイルス遺伝子を増幅し、その塩基配列を解析する手法が広く用いられている<sup>9-11)</sup>。これにより遺伝子型の同定やワクチン株と野生株との鑑別も可能である。検出感度、特異性共に高く、再現性がよいという利点を持つ。しかし、その高い感度故に交差汚染のリスクが高く、検査室の環境整備と手技の徹底をはかる必要がある。最近では、感度と特異性が高く、交差汚染のリスクが低い Real-time PCR が実験室診断として定着しつつある<sup>12)13)</sup>。

### 4. 検査材料の輸送

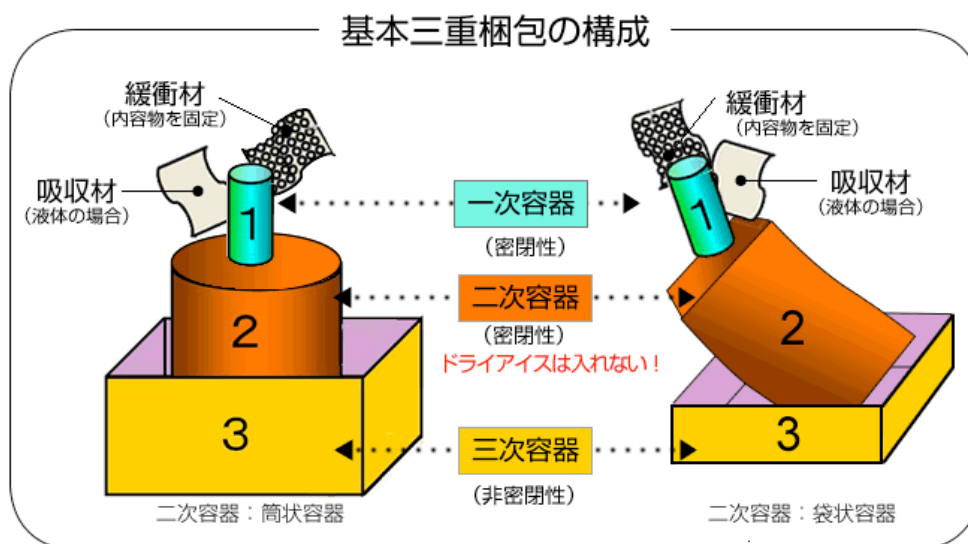
ムンプスウイルス、あるいはムンプスウイルスを含むと考えられる臨床



材料を輸送する際には、送り主は輸送物の梱包や輸送条件が安全性を担保し、法的要件を満たしていることをチェックする責任がある。

具体的な送付方法の詳細については国立感染症研究所のホームページ (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/from-biosafe.html>)等で WHO 監修の「感染性物質の輸送規則に関するガイダンス (2013-2014)」を参照のこと。

ムンプスウイルスの輸送には三重包装が適用される (詳細は上記ガイダンス P23-26 参照)。



### 三重包装の構成と特徴

- (1) 一次容器: 感染性材料を入れてラベルを付した防水性、密閉性の主容器。容器の破損に備えて、検体を吸収するのに十分な量の吸収剤に包む。
- (2) 二次容器: 一次容器を収納して保護するための容器。丈夫で防水性、密封性があるもの。この中に、一次容器を複数入れてもよい。なお、二次容器内には決してドライアイスを入れてはいけない。気化した CO<sub>2</sub> ガスの圧力で二次容器が暴発する危険性がある。
- (3) 三次容器: 中に二次容器を収める。輸送中、外部からの物理的な損傷や水などの影響から二次容器と検体を守る。ドライアイスが必要な場合はここに入れる。その場合には CO<sub>2</sub> ガスが抜ける隙間を設ける必要がある。

\* ゆうパックによる病原体輸送の場合は専用のジュラルミン製のオーバーパック (四次容器) が必要となる。 病原体輸送に関する詳細は <http://www0.niid.go.jp/niid/usr-page/Biosafety/yuso/Upack13.html> を参照。

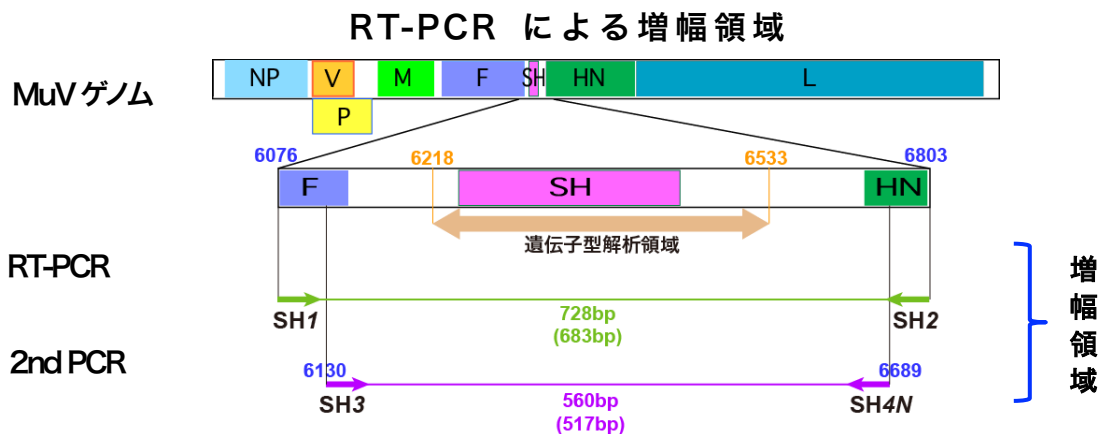
## 病原学的検査

病原学的検査には、RT-PCR 法や Real-time PCR 法などによるウイルス遺伝子の検出と、ウイルスそのものを分離する方法がある。前者は迅速で感度が高く、加えて PCR 産物の塩基配列を解析することによりウイルスの遺伝子型の同定が可能である。後者のウイルス分離は、最も確実な検査・診断法であり、分離されたウイルスを解析することにより、多くの情報が得られるだけでなく、分離ウイルスを診断ツールとして用いることもできる。

### 1. RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction)法

(検査時間：6時間)

ムンプスウイルスはマイナスセンスの一本鎖 RNA をゲノムとして持つため、PCR を行うためにはまず逆転写反応によりウイルス RNA から cDNA を合成する必要がある。通常、遺伝子型 (genotype) 決定のために SH 遺伝子領域 (ウイルスゲノム上 6,218~6,533 塩基領域の 316 塩基) を増幅する。SH 遺伝子はムンプスウイルスゲノム上で最も多型性に富んでいるためである。しかし、新規の遺伝子型が疑われた場合にはさらに HN 遺伝子の配列情報も必要となる<sup>14)15)</sup>。



#### (1) 試薬・器材

- ウイルス RNA 分離キット (Roche、High Pure Viral RNA Kit:1 858 882)
- RT-PCR キット (宝酒造、One Step RNA PCR Kit (AMV) : RR024A)
- 微量高速遠心機 (トミー精工等)
- サーマルサイクラー (ABI 9700 等)
- アガロースゲル泳動装置 (コスモバイオ、ミュールピッド 2 等)
- ゲル撮像装置
- プライマー (PCR 用 & シーケンス用)

## (2) RNA の抽出

(所要時間：30分)

分離したウイルス液からスタートするのが最も確実であるが、髄液や咽頭ぬぐい液等の患者材料も用いることができる。ウイルスから核酸を精製するキットは各種市販されているが、1例として Roche Diagnostics 社のキットを用いた方法を以下に示す。

- 1) 検体 200mL に 400mL の Binding buffer と 4mi の poly A 溶液をキャリアーとして加える（このステップでウイルスが可溶化される）。
- 2) ピペッティングあるいはボルテックスミキサーで混合する。
- 3) キットに添付の Filter unit を Collection tube に差し込む。
- 4) サンプルを Filter unit に入れる。
- 5) 微量遠心機にて 10,000 回転で 15 秒間遠心する（ウイルス RNA は Filter に結合する）。
- 6) Filter unit を新しい Collection tube に移す。
- 7) 450 $\mu$ L の Wash buffer を Filter unit に入れる。
- 8) 微量遠心機にて 10,000 回転で 15 秒間遠心する。
- 9) Filter unit を新しい Collection tube に移す。
- 10) 450 $\mu$ L の Wash buffer を Filter unit に入れる。
- 11) 微量遠心機にて 10,000 回転で 15 秒間遠心する。
- 12) 微量遠心機にて 15,000 回転で 10 秒間遠心する。
- 13) Filter unit を 1.5mL チューブに移す。
- 14) 50mL の Elution buffer を入れる。
- 15) 微量遠心機にて 10,000 回転で 1 分間遠心する。
- 16) 溶出した RNA は直ちに RT-PCR に供し、残りは -80 $^{\circ}$ C で保存する。

## (3) RT-PCR 法

(検査時間：3～4時間)

1 チューブ、1 ステップで cDNA 合成から PCR まで行えるキットが各種市販されている。1 ステップ法には以下のような利点がある。

- 反応系調製が簡素化されるため、調製ミスリスクを低減できる
- 同じ理由から、交差汚染リスクを低減できる
- 高感度である\*

\*：キットによっては感度が低いものもあるので、事前の検討が必要である。

一例として宝酒造の One step RNA PCR Kit (AMV)を用いた方法を示す。

1) One step RNA PCR Kit (宝酒造) の試薬と RNA を以下の様に混合する。

10x One step RNA PCR buffer*	5	μL
25mM MgCl <sub>2</sub> *	10	μL
10mM dNTP*	5	μL
RNase inhibitor*	1	μL
RTase XL*	1	μL
AMV-optimized Taq*	1	μL
SH1 primer (20 pmol/mri *	1	μL
SH2 primer (20 pmol/mri *	1	μL
RNA	5	μL
H <sub>2</sub> O	20	μL
合計	50	μL

\* : 事前にこれらを数十回分まとめた premix を調製し、PCR チューブに 1 反応分(25 μL、もしくは半量の 12.5 μL も可)ずつ小分け分注して-80°Cに凍結保存しておくといよい。

Premix 調製には、検査の省力化、調製ミスの防止、交差汚染の防止、試薬の節約、など多くの利点がある。

#### < RT-PCR 用プライマーの塩基配列 >

SH1; 5'- gcR acY aaa gaR atc agR agR atc-3' (6,076 – 6,099)

SH2; 5'- agc ctt gat cat tga tca tcc -3' (6,803 – 6,783)

R = a/g, Y = t/c/U

2) サーマルサイクラーにセットして以下のサイクルで反応させる。チューブは機械の温度が 42°C になってからセットする。

42°C x 45 min.	} 40 cycles
94°C x 2 min.	
94°C x 30 sec.	
55°C x 30 sec.	
72°C x 1 min.	

3) 反応生成物から 1 μL を取り、1%のアガロースゲル電気泳動に供し、728bp の DNA 断片 (レーン 1) のバンドを確認する。

(4) 2nd PCR ( nested-PCR )

RT-PCR でバンドが検出されなかった場合、2nd PCR を試みる。

RT-PCR 産物を鋳型として下記の primer set を用いて KAPA2G Fast PCR kit (Kapa Biosystems)\*によって SH 遺伝子領域を含む 527 塩基 (ウイルスゲノム上で 6130-6656 塩基) の領域を増幅する。

\*2nd PCR に用いる耐熱性 DNA polymerase は基本的に何でもよい。KAPA2G Fast DNA polymerase は安価で伸長反応が速く、増幅効率も高いので使い勝手がよい。

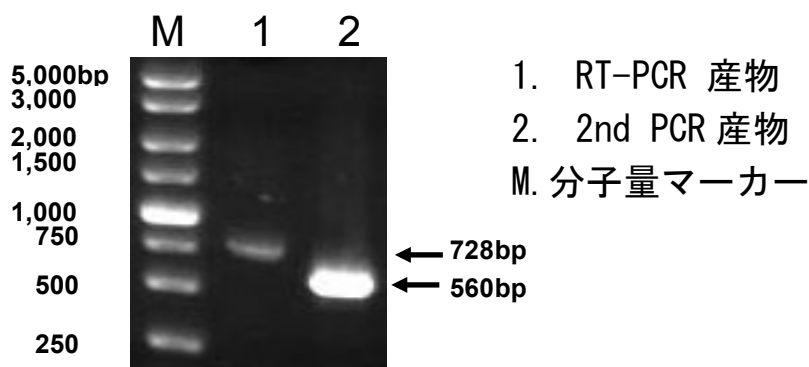
**SH3** ; 5'- tca agY agt gtc gaY gat ctc-3' (6,130 – 6,150) , Y = t/c/U

**SH4N** ; 5'- tgt cag ccg cat tga taa cag g -3' (6,689 – 6,668)

【2nd PCR の反応系】	<使用量>	<最終濃度>
5 x KAPA2G Fast buffer	5.00 $\mu$ L	
10mM dNTP Mix	0.50 $\mu$ L	0.2 mM
KAPA2G Fast DNA polymerase (5 U/ $\mu$ L)	0.10 $\mu$ L	0.02 U/ $\mu$ L
SH3 primer (10 $\mu$ M)	1.25 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
SH4 primer (10 $\mu$ M)	1.25 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
RT-PCR product	1.00 $\mu$ L	
DW	15.90 $\mu$ L	
合計	25.00 $\mu$ L	

【2nd PCR の反応条件】

95°C	1 min	
95°C	10 sec	x 40 cycles
55°C	10 sec	
72°C	12 sec	



## 2. SH 遺伝子領域の塩基配列の決定（ダイレクトシーケンシング）

(検査時間：1日)

PCR産物をテンプレートとしてシーケンス反応に用いることにより塩基配列を決定することが可能である（ダイレクトシーケンス）。PCR産物中にはPCR用プライマーが大量に残存するため、シーケンス反応に供する前に、これらのプライマーを除く処理（clean up）が必要である。例として High Pure PCR Product Purification Kit を用いた方法を示す。また、シーケンス反応後にも余分なダイを除くための clean up 処理が必要となる。ここでは、簡便なゲルろ過による方法を紹介する。

### (1) 試薬・器材

High Pure PCR Product Purification Kit (Roche: 11732668001)

BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life technologies: 4337454)

DyeEx 2.0 Spin Kit, (QIAGEN: 63204)

DNA シーケンサー (ABI 3130xl 等)

### (2) PCR産物の clean up

- 1) 100  $\mu$ L に調整した PCR 反応液に 500mL の結合バッファー（5倍量）を加える。
- 2) ピペッティングあるいはボルテックスミキサーでよく混合する。
- 3) 回収用チューブ内に High Pure フィルターチューブを差し込む。
- 4) フィルターチューブの上側の溶液受けに、ステップ1の試料をピペットで加え、  
卓上型遠心器を用いて、室温にて最大スピードで 30~60 秒間遠心する。
- 5) 溶出液を捨てる（DNA は Filter Unit に吸着している）。
- 6) フィルターチューブをもとの回収用チューブに戻す。
- 7) 500  $\mu$ L の洗浄バッファーを、上側の溶液受けに入れる。
- 8) 最大スピードで 30~60 秒間遠心する。
- 9) 溶出液を捨てる。
- 10) フィルターチューブをもとの回収用チューブに戻す。
- 11) 200  $\mu$ L の洗浄バッファーを、上側の溶液受けに入れる。
- 12) 最大スピードで 60 秒間遠心する。
- 13) フィルターチューブを新しい清潔な 1.5 mL マイクロ遠心チューブに移す。
- 14) 50~100  $\mu$ L の溶出バッファーをフィルターチューブに加える。

15) 最大スピードで 60 秒間遠心し、PCR 産物を回収する。

### (3) シーケンシング反応

- 1) 以下の溶液を混合する。プライマーは PCR の反応に用いたプライマーも使えるが、時に反応がうまく進まない場合があるため、より内側のプライマーを用いると確実である。また、精製 PCR 産物の量は 5-20 fmol/reaction 程度( $\approx$  7~10ng/ $\mu$ L)が望ましく、多すぎると反応がうまく進まない。
- 2) シーケンス用 primer には下記の 4 種類を用いる。
  - SH3 ; 5'- tca agY agt gtc gaY gat ctc -3'
  - SH4N ; 5'-tgt cag ccg cat tga taa cag g -3'
  - SHnes1; 5'- cgt aac gtc tcg tga ccc tg -3' (6238-6257)
  - SH4 ; 5'- agg tgg YaY YRt cYg aYa ttg -3' (6,656 – 6,636)

【反応系】	<使用量>	
5 x dilution buffer	0.75 $\mu$ L	] 希釈した BigDye を事前に調製し、-30°Cに凍結保存しておくことよ。10 回程度の凍結融解では劣化しない。
BigDye v 3.1	0.5 $\mu$ L	
Primer (5 pmol/ $\mu$ L = 5 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ L	
DW	fill up to 5.0 $\mu$ L	
PCR product	1.0 ~ 2.0 $\mu$ L (5~ 20 fmol/tube)	
合計	5.0 $\mu$ L	

- 3) サーマルサイクラーにセットして以下のサイクルで反応させる。50°Cを越えてからチューブをセットする。

#### 【シーケンス反応条件】

96 °C	30 sec	] x 25 cycles
96 °C	10 sec	
50 °C	5 sec	
60 °C	4 min	
4 °C	forever	

### (4) スピнкаラム(DyeEx2.0Spin, QIAGEN)によるダイターミネーター除去

- 1) スピнкаラムを静かにボルテックスしてレジンを再懸濁させる。
- 2) カラムのふたを 1/4 開ける。
- 3) スピнкаラム末端のストッパーを折り取って、スピнкаラムを 2 mL カラ

- ムチューブ（添付）にセットする。
- 4) 750 x g（回転数は厳密に計算する）で3分間遠心操作を行う。
  - 5) スピнкаラムを新しいマイクロ遠心チューブに静かに移す。シーケンシング反応液（10 ～ 20 mL）をゲルベッドの中心にゆっくりとアプライする。
  - 6) 750 x g で3分間遠心操作を行う。
  - 7) マイクロ遠心チューブからスピнкаラムを取り除く。
  - 8) 溶出液をシーケンサー用 96-well プレートにアプライする。
  - 9) セプタ（フタ）をプレートにセットし、3,000 rpm で1分間遠心する。
  - 10) プレートをキャピラリーシーケンサーにアプライする。

### 3. ムンプスウイルスの分子系統解析

SH 遺伝子領域の配列情報をもとにした系統解析によって検出されたウイルスの遺伝子型を同定することにより、流行するウイルスの由来や、ワクチンによる副反応の確定を行うことができる。しかし、SH 遺伝子での系統解析で、時に新型と思われる塩基配列が得られる場合も有る。その場合にはそれに加えて、HN 遺伝子の配列に基づいた系統解析が必要となる<sup>14) 15)</sup>。

系統解析には専用の解析ソフトを用いる。市販のソフトウェアもあるが、web 上でフリー解析ソフトを利用することもできる。今回は代表的なフリー解析ソフトの一つ、ClustalW（配列のアラインメントと近隣結合（NJ）法による系統樹作成ソフト）と、NJplot（ClustalW の解析結果を描画・編集するためのソフト）を例に、解析方法と、系統樹の作成方法について解説する。

#### (1) ソフトウェアのダウンロード

- 1) ClustalW は遺伝子データベース DDBJ (DNA Data Bank of Japan) の web 上 (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/index.php?lang=ja>) で自由に利用できる。NJplot は (<http://doua.prabi.fr/software/njplot>)（下図）から download する。NJplot はあらゆる OS に対応しているので、自分の PC に合ったバージョンを選んで圧縮ファイルを download し（下図参照）、適当なフォルダで解凍する。Windows 版ではプログラム本体は njplot.exe であるが、ヘルプを利用するには同じフォルダに njplot.help が必要となる（unrooted.exe は無根系統樹の表示に必要）。



**NJplot**

NEW: NJplot plots trees in PDF and PostScript formats (not for MacOS).  
 NEW: NJplot allows to open several tree windows.  
 NEW: NJplot can draw multibranching trees with or without branch lengths.

---

NJplot is a tree drawing program able to draw any phylogenetic tree expressed in the [Newick](#) phylogenetic tree format (e.g., the format used by the PHYLIP package). NJplot is especially convenient for rooting the unrooted trees obtained from parsimony, distance or maximum likelihood tree-building methods.






A screen shot of the main window of njplot is available [here](#).

**Use of NJPlot**

Any rooting of the unrooted tree can be interactively specified using the mouse. NJplot also allows zooming, branch swapping, display of bootstrap scores and printing in the PDF format. NJplot can therefore be used as a graphical extension of any package of phylogenetic programs which employs the standard tree format for storing trees (i.e., with most such packages).

**Download NJplot**

Executables and full [source code](#) can be downloaded through our [FTP server](#). You may also use the following table to directly access the version corresponding to your computer:

 <a href="#">Mac OS X</a> <a href="#">MacOS (8.9)</a>	 <a href="#">Linux on PC</a> <small>in case of font problem Use without X11 display: <a href="#">newicktopdf</a></small>	 <a href="#">MS Windows</a>	 <a href="#">Sun-Solaris</a>	 <a href="#">HP Alpha</a>
---	--	--	---	--

Mac ユーザーなら  
ここをクリック

Windows ユーザーなら  
ここをクリック

## (2) 配列データの準備 (Multi Fasta ファイルの作成)

- 1) 塩基配列を決定したムンプスウイルスの遺伝子型を同定するためには、指標となる参照配列が必要となる。2011年9月にWHOの麻疹・風疹ラボネットワーク(LabNet)の会議において、ムンプスウイルスの遺伝子型分類の新たな基準が提案され、そこで新たな参照ウイルス株が提案されている<sup>15)</sup>。以下に、その参照ウイルス株のSH領域配列のMulti Fasta ファイルを掲載する。2012年までに世界中で分離同定され、確定されたムンプスウイルスの遺伝子型はAからNまでの12種類(EとMは欠番)である<sup>16)</sup>。解析対象となるSH遺伝子領域はウイルスゲノム上6,218~6,533塩基領域の316塩基である。
- 2) 遺伝子型を決定するには、この参照配列データに解析したい配列データを加えた新たなMulti Fasta ファイルを作成する。シーケンスした領域が316塩基より長い場合にはあえて短く切りそろえる必要は無い。遺伝子解析に用いるファイル形式にはいくつかの種類があるが、Fasta形式が最も汎用性が高く、構成が単純なので使い勝手がよい。Fasta形式ファイルは2つの部分からなる。最初に「>」で始まる遺伝子名(株名)、次に塩基配列が続く。テキストファイルとして出力する必要があるため、MS wordで作成した場合には、保存する際に『名前を付けて保存』を選択し、フォーマットを『書式なし(.txt)』で保存する。

### < MuV Reference Sequences proposed by WHO LabNet >

```
>MuVi_Enders_USA_45-A
AAGAATGAATCTCCTAGGGTCGTAACGCTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCAATCCAACCTCCCTTATACCTAACATTTCTATTGCTAAT
CCTTCTCTATCTAATCATAACTCTGTATGTCTGGACTATATTGACCATTAACCATAAGACGCGGTTTCGATATGCAGCACTGTACCAGCGATCCTGC
```

TCTCGCTGGGGTTTTGATCAATCACTCTAGAAAAGATCCCCAGTTAGGACAAGTCCCGATCCGTCACGCTAGAACAAGCTGCATTTAAATGAAGCTGT  
GCTACCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_SBL-1\_SWE\_69-A  
AAGAATGAATCTCCTAGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCAAACCAACCTCCCTTATACCTAACATTTCTATTGCTAAT  
CCTTCTCTATCTAATCATAACTCTGTATGTCTGGACTATATTGACCATTAACCATAAGACGGCGGTTGGATATGCAGCACTGTACCAGCGATCCTGC  
TCTCGCTGGGGTTTTGATCAATCACTCTAGAAAAGATCCCCAGTTAGGACAAGTCCCGATCCGTCACGCTAGAACAAGCTGCATTTAAATGAAGCTGT  
GCTACCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_KILHAM. USA\_wk. 50-A  
AAGAATGAATCTCCTAGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCAATCCAACCTCCCTTATACCTAACATTTCTATTACTGAT  
CCTTCTCTACCTAATCATAACTCTGTATGTCTGGACTATATTGACCATTAACCATAAGACGGCGGTTGGATATGCAGCACTGTACCAGCGATCCTTC  
TCTCGCTGGGGTTTTGATCAATCACTCTAGAAAAGATCCCCAGTTAGGACAAGTCCCGATCCGTCACGCTAGAACAAGCTGCATTTAAATGAAGCTGT  
GCTACCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_JL. USA\_wk. 63-A  
AAGAATGAATCTCCTAGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCAATCCAACCTCCCTTATACCTAACATTTCTATTGCTAAC  
CCTTCTCTATCTAATCATAACTCTGTATGTCTGGACTATATTGACCATTAACCATAATACGGCGGTTGGATATGCAGCACTGTACCAGCGATCCTTC  
TCTCGCTGGGGTTTTGATCAATCACTCTAGAAAAGATCCCCAGTTAGGACAAGTCCCGATCCGTCACGCTAGAACAAGCTGCATTTAAATGAAGCTGT  
ACTACCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_JL5. USA\_vaccine-A  
AAGAATGAATCTCCTAGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCAATCCAACCTCCCTTATACCTAACATTTCTATTGCTAAT  
CCTTCTCTATCTCATCATAACCCTGTATGTCTGGACTATATTGACTATTAACCTATAAGACGGCGGTTGGATATGCAGCACTGTACCAGCGATCCTTC  
TCTCGCTGGGGTTTTGATCACTCACTCTAGAAAAGATCCCCAATTAGGACAAGTCCCGATCCGTCACGCTAGAACAAGCTGCATTTAAATGAAGCTGT  
GCTACCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_JL2. USA\_vaccine-A  
AAGAATGAATCTCCTAGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCAATCCAACCTCCCTTATACCTAACATTTCTATTGCTAAC  
CCTTCTCTATCTAATCATAACTCTGTATGTCTGGACTATATTGACCATTAACCATAATACGGCGGTTGGATATGCAGCACTGTACCAGAGATCCTTC  
TCTCGCTGGGGTTTTGATCAATCACTCTAGAAAAGATCCTCAGTTAGGACAAGTCCCGATCCGTCACGCTAGAACAAGCTGCATTTAAATGAAGCTGT  
ACTACCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_Urabe\_AM-9. JPN\_wk. 67-B  
AAGAATGAATCTCCTGGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCGATCCAACCTCCCTTATACCCAACATTTCTATTGCTAAT  
TCTTCTCTCTGATCGTAACTTTGTATGTCTGGATTATATCAACCATCACTTACAAGACTGTGGTGGACATGCAGCACTGTACCAGAGATCCTTC  
TTTCGCTGGAGTTTTGATCACTCACTCTAGAAAAGATCCTCAGCTGGGACAAGTCCCAATCCATCATGCGAGAAAAGCTGCATTTAAATGATGCGGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_Himeji89. JPN\_wk. 00-B  
AAGAATGAATCTCCTGGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCGATCCAACCTCCCTTATACCCAACATTTCTATTGCTAAT  
TCTTCTCTCTGATCATAACTTTGTATGTCTGGATTATATCAACCATCACTTACAAGACTGCGGTGGACATGCAGCACTGTACCAGAGATCCTTC  
TTTCGCTGGAGTTTTGATCACTCACTCTAGAAAAGATCCTCAGCTGGGAAAAGTCCCAATCCATCATGCGAGAAAAGCTGCATTTAAATGATGCGGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_Miyahara. JPN\_vaccine-B  
AAGAATGAATCTCCTGGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCGATCCAACCTCCCTTATACCCAACATTTCTATTGCTAAT  
TCTTCTCTCTGATCATAACTTTGTATGTCTGGATTATATCAACCATCACTTACAAGACTGCGGTGGACATGCAGCACTGTACCAGAGATCCTTC  
TCTCGCTGGAGTTCGATCACTCACTCTAGAAAAGATCCTCAGTTGGGACAAGTCCCAATCCATCATGCGAGAAAAGCTGCATTTAAATGATGCGGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_Hoshino. JPN\_vaccine-B  
AAGAATGAATCTCCTGGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCGATCCAACCTCCCTTATACCCAACATTTCTATTGCTAAT  
TCTTCTCTCTGATCATAACTTTGTATGTCTGGATTATATCAACCATCACTTACAAGACTGCGGTGGACATGCAGCACTGTACCAGAGATCCTTC  
TTTCGCTGGAGTTTTGATCACTCACTCTAGAAAAGATCCTCAGTTGGGACAAGTCCCAATCCATCATGCGAGAAAAGCTGCATTTAAATGATGCGGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_Torii. JPN\_vaccine-B  
AAGAATGAATCCCTAGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCGATCCAACCTCCCTTATACCCAACATTTCTATTGCTAAT  
TCTTCTCTCTGATCATAACTTTGTATGTCTGGATTATATCAACCATCACTTACAAGACTGCGGTGGACATGCAGCACTGTACCAGAGATCCTTC  
TCTCGCTGGAGTTCGATCACTCACTCTAGAAAAGATCCTCAGTTGGGACAAGTCCCAATCCATCATGCGAGAAAAGCTGCATTTAAATGATGCGGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_9218Zg. CRO\_wk. 98-C  
AAGAATGAATCTCCCGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCAATCCAACCCCTTATACCTAACATTTCTATTACTAAT  
TCTTTTATCTGATCATAACTTTGTATGTCTGGGTGGTATCAACCTTACTTATAAGACTGCGGTGGACATGCAGCACTGTACCAGAGATCCCA  
TCTCGCTGGAGTTCGATCACTCACTCTAGAAAAGATCCTCAGTTAGGACGAGTCCAAACCCATCATGAGTGAACAATCTGCATTTAAATGATGCGCT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_Stamford\_Hill. GBR. 51. 98-C  
AAGAATGAATCTCCCGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCGATCCAACCTCCCTTATACCTAACATTTCTATTACTAAT  
TCTTTTATCTGATCATAACTTTGTATGTCTGGGTGGTATCAACCTTACTTATAAGACTGCGGTGGACATGCAGCACTGTACCAGAGATCCTTA  
TTTCGCTGGAGTTCGATCACTCACTCTAGAAAAGATCCTCAGTTAGGACGAGTCCAAATCCATTTAGAGAGAAAAGTGCATTTAAATGATGCGGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_Rugby. GBR. 10. 00-C  
AAGAATGAATCTCCCGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCGATCCAATCCCTTATACCTAACATTTCTATTACTATT  
TCTTTTTATCTGATCATAACTTTGTATGTCTGGGTGGTATCAACCTTACTTATAAGACTGCGGTGCAACATGCAGCACTGTACAAGAGATCCTTA  
TTTCGCTGGAGTTCGATCACTCACTCTAGAAAAGATCCTCAGTTAGGACGAGTCCAAACCCATCATGAGAGAAAAGTGCATTTAAATGATGCGGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_V34. SWE\_wk. 84-C  
AAGAATGAATCTCCCGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCGATCCAACCTCCCTTATACCTAACATTTCTATTACTAAT  
TCTTTTATCTGATCATAACTTTGTATGTCTGGGTGGTATCAACCTTACTTATAAGACTGCGGTGGACATGCAGCACTGTACCAGAGATCCTTA

TTTCGCTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGAAAGATCTCCAGTTAGGACGAGTCTAAATCCATCATGAGAGAACAATTTGCATTTAAATGATGCGGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAAA  
>MuVi\_Lit976.LTU\_wk.99-C  
AAGAATGAATCTCCCGGGTTCGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGGATCCAACCTCCCTTATACCTAACATTTCTATTACTAAT  
TCTTCTTTATCTGATCATAACTTTGTATGTCTGGGTCGACCAACCTCACCTATAAGACTGCGGTGCGACATGCAGCACTGTACCAGAGATCCTCA  
TTTCGCTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGAAAGATCTCCAGTTAGGACGAGTCTAAATCCATCATGAGGGAACAAGTTGCATTTAAATGATGCTGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAAA  
>MuVi\_ge9.DEU\_wk.77-D  
AAGAATGAATCTCCTGGGGTTCGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGGATCCAACCTCCCTTATACCTAACATCTCTAGTGCTAAT  
TCTTCTTTATCTGATCATAACTTTGTATGTCTGGATTATATTAACCATTACTTATAAGACTGCGGTGCGACATGAAGCACTGTACCAAAGATCCTTC  
TCTCGCTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGAAAGATTTCCAGTTAGGACAAGTCCCAATCTCTCATGTGTGAACAAGCTGCATTTAAATGATGCGGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAAA  
>MuVi\_Nottingham.GBR\_19.04-D  
AAGAATGAATCTACTGGGGTTCGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGGATCCAACCTCCCTTATACCTAATATCTCTATTGCTAAT  
TCTTCTTTATCTGATCATAACTTTGTATGTCTGGATTATATTAACCATTACTTATAAGACTGCAGTGCAGACATGAAGCACTGTACCAAAGATCCTTC  
TCCCGCTGGAGTCTCGATCACTCACTATTCTAGAAAGATCTCCAGTTAGGACAAGTCCCAATCTCTCATGCGTGAACAAGCTGCATTTAAGGGATGCTGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAAA  
>MuVi\_Zagreb.CRO\_wk.06-D  
AAGAATGAATCTCCTGGGGTTCGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGTGCATCCAACCTCCCTTATACCTAACATCTCTATTGCTAAT  
TCTTCTTTATCTGGTCATAACTTTGTATATCTGGATTATACTAACCATTACTTATAAGACTGCGGTGCGACATGATGCAGCTGTACCAAAGATCCTTC  
TCTCGCTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGAACGATCTCCAGATAGGACAAGTCCCAATCTCTTATGCGTGAACAAGCTGCATTTAAATGATGCGGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAAA  
>MuVi\_V27.SWE\_wk.83-D  
AAGAATGAATCTCCTGGGGTTCGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGGATCCAACCTCCCTTATACCTAACATCTCTATTGCTAAT  
TCTTCTTTATCTGATCATAAATTTGTATGTCTGGATTATATTAACCATTACTTATAAGACTGCGGGCGGACATGAAGCACTGTACCAAAGATCCTTC  
TCTCGCTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGAAAGATCTCCAGTTATGACAAGTCCCAATCTCTCATGTGTGAACAAGTGGCATTAAATGATGCGGT  
TCGATCATGAGACATAAAGAAAAAA  
>MuVi\_L3\_vector.RUS\_wk.53-N  
AAGAATGAATCTCCTGGGGTTCGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGGATCCAACCTCCCTTATACCTAACATTTCTATTGCTAAT  
TCTTCTTTATCTGATCATAACTTTGTATGTCTGGATTATATTAACCATTACTTATAAGACTGCTGTGCGACATGCAGCACTGCACCAGAGATCCTTC  
TTTCGCTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGAAAGATCTCCATCTAGGACAAGTCCCAATCCATCATGCGGAGAACAAGCTGCATCCAAATGATGCGGC  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAAA  
>MuVi\_L-Zag\_vaccine-N  
AAGAATGAATCTCCTGGGGTTCGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGGATCCAACCTCCCTTATACCTAACATTTCTATTGCTAAT  
TCTTCTTTATCTGATCATAACTTTGTATGTCTGGATTATATTAACCATTACTTATAAGACTGCTGTGCGACATGCAGCACTGCACCAGAGATCCTTC  
TTTCGCTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGAAAGATCTCCATCTAGGACAAGTCCCAATCCATCATGCGGAGAACAAGCTGCATCCAAATGATGCGGC  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAAA  
>MuVi\_Shandong9.CHN\_wk.05-F  
AAGAATGAATCTCCTGGGGTTCGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCAATCCACCCTCCCTTATACCTAACATTTCTATTGCTAAT  
TCTTCTTTATCTGATCATAACTTTGTATGTCTGGATTATGTTAACCATTACTTACAAGACTGCGGTGCAACATGCAGCACTGTACCAGAGATCCCTC  
TTTCGTTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGAAAGATCTCCAACCCGGACAAGTCCCAATCCATCATGGGAGAACAAGCTGCATTTAAATGATGCTGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAAA  
>MuVi\_Zhejiang.CHN\_26.05-F  
AAGAATGAATCTCCTGGGGTTCGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCAATCCACCCTCCCTTATACCTAACATTTCTATTGCTAAT  
TCTTCTTTATCTGATCATAACTTTGTATGTCTGGATTATGTTAACCATTACTTACAAGACTGCGGTGCAACATGCAGCACTGTACCAGAGATCCCTC  
TTTCGTTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGAAAGATCTCCAACCCGGACAAGTCCCAATCCATCATGGGAGAACAAGCTGCATTTAAATGATGCTGT  
TAAATCATGAGACATAAAGAAAAAA  
>Mui\_Zhejiang.CHN\_11.06\_1-F  
AAGAATGAATCTCCTGGGGTTCGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCAATCCACCCTCCCTTATACCTAACATTTCTATTGCTAAT  
TCTTCTTTATCTGATCATAACTTTGTATGTCTGGACTATGCTAACCATTACTTACAAGACTGCGGTGCAACATGCAGCACTGTACCAGAGATCCCTC  
TTTCGTTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGAAAGATCTCCAACCCGGACAAGTCCCAATCCATCATGGGAGAACAAGCTGCATTTAAATGATGCTGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAAA  
>MuVi\_Zhejiang.CHN\_16.08\_1-F  
AAGAATGAATCTCCTGGGGTTCGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCAATCCACCCTCCCTTATACCTAACATTTCTATTGCTAAT  
TCTTCTTTATCTGATCATAACTTTGTATGTCTGGATTATGTTAACCATTAATTTACAAGACTGCGGTGCAACATGCAGCACTGTACCAGAGATCCCTC  
TTTCGTTGGAGTTTCGATAACTCACTCTAGAAAGATCTCCAACCCGGACAAGTCCCAATCCGTCATGGGAGAACAAGCTGCATTTAAATGATGCTGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAAA  
>MuVi\_Glouc.GBR\_wk.96-G  
AAGAATGAATCTCATGGGGTTCGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGGATCCAACCTCCGTTATACCTCACATTTCTATTGCTAAT  
TCTTCTTTATCTGATCATAACTTTGTATGTCTGGATCATATTAACCATTACTTATAAGACTGCGGTGCGACATGCAGCACTGTACCAGAGATCCTTC  
TTTCACTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGGAAGATCTCCAGTTAGGACAAGTCCCAATCCATCATGCAAGAACAATCTGCATTTGAATAATGCGGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAAA  
>MuVi\_Takamatsun1.JPN\_wk.00-G  
AAGAATGAATCTCATGGGGTTCGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCAATCCAACCTCCGTTATACCTCACATTTCTATTGCTAAT  
TCTTCTTTATCTGATCATAACTTTGTATGTCTGGATTACATTAACCATTACTTATAAGACTGTGGTGCAGACATGCAGCACTGTACCAGAGATCCTAC  
TTTCACTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGGAAGATCTCCAGTTAGGACAAGTCCCAATCCATCATGCAAGAACAATCTGCATTTGAATAATGCGGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAAA  
>MuVi\_Sapporo-A158.JPN\_wk.01-G  
AAGAATGAATCTCATGGGGTTCGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGGATCCAACCTCCACTATACCTCACATCTCTATTGCTAAT  
TCTTCTTTATCTGATCATAACTTTGTATGTCTGGATTATATTAACCATTACTTATAAGACTGCGGTGCGACATGCAGCACTGTACCAGAGATCCTTC

TTTCACTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGGAAGATCTCCAGTTAGGACAAGTCCCAATCCATCATGCAAGAACAATCTGCATTTGAATAATGCCGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_Sheffield. GBR\_01.01-G  
AAGAATGAATCTCATGGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGGATCCAACCCCATTAACCTCACATTTCTATTGCTAAT  
TCTTCTTTATCTGATCATAAAGTTGTATGTCTGGATTATATTAACCGTCACTATAAGACTGCGGTGCGACATGCAGCACTGTACCAGAGATCCTTC  
TTTCATTGGAGTTTCGATCACACTCTAGGAAGATCCCGAGTTAGGACAAGTCCCAATCCATCATGCAAGAACAATCTGCATTTGAATAATGCCGC  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_Manchester. GBR\_07.01-G  
AAGAATGAATCTCATGGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGGATCCAACCCCATTAACCTCACATTTCTATTGCTAAT  
TCTTCTTTATCTGATCATAAAGTTGTATGTCTGGATTATATTAACCGTCACTATAAGACTGCGGTGCGACATGCAGCACTGTACCAGAGATCCTTC  
TTTCACTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGGAAGATCCCGAGTTAGGACAAGAACAATCCATCATACAGGAACAATCTGCATTTGAATAATGCCGT  
TTAATCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_Sheffield. GBR\_01.05-G  
AAGAATGAATCTCATGGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGGATCCAACCCCATTAACCTCACATTTCTATTGCTAAT  
TCTTCTTTATCTGATCATAAAGTTGTATGTCTGGATTATATTAACCGTCACTATAAGACTGCGGTGCGACATGCAGCACTGTACCAGAGATCCTTC  
TTTCACTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAAGAAGATCCCGAGTTAGGACAAGTCCCGATCCATCATGCAAGAACAATCTGCATTTGAATAATGCCGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_Bel. GBR\_wk. 88-H  
AAGAATGAATCTCCTGGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCAATCCAACCTCCCTTACCTAACATTTCTATTGCTAAT  
TCTTCTATATCTGATCATAAAGTTGTATGTCTGGATTACATTAACCTACTTATAAAGACTGCGGTGCGACATGCAACACTGTACCAAAGATCCTTC  
TTTCGCTGGAGTTTCGATCACCCTCTAGAAAGATCTCCAGTTAGGACAAGTCTCAATCCTTCATGCGAGAATAAGTTGCATTTAAATGATACCGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_1961. USA\_wk. 88-H  
AAGAATGAATCTCCTGGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCAATCCAACCTCCCTTACCTAACATTTCTATTGCTAAT  
TCTTCTATATCTGATCATAAAGTTGTATGTCTGGATTACATTAACCTACTTATAAAGACTGCGGTGCGACATGCAACACTGTACCAGAGATCCTTC  
TTTCGCTGGAGTTTCGATCATCACTCTAGAAAGATCTCCAGTTAGGACAAGTCTCAATCCTTCATGCGAGAACAAGTTGCATTTAAATGATACCGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_Manchester. GBR\_31.95-H  
AAGAATGAATCTCCTGGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCAATCCAACCTCCCTTACCTAACATTTCTATTGCTGAT  
TCTTCTATATCTGATCATAAAGTTGTATGTCTGGATTACATTAACCTACTTATAAAGACTGCGGTGCGACATGCAACACTGTACCAGAGATCCTTC  
TTTCGCTGGAGTTTCGATCACCCTCTAGAAAGATCTCCAGTTAGGACAAGTCTCAATCCTTCATGCGAGAATAAGTTGCATTTAAATGATACCGT  
TCAATCATAAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_639. TRK\_20.05-H  
AAGAATGAATCTCCTGGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCAATCCAACCTCCCTTACCTAACATTTCTATTGCTAAT  
TATTCTATATCTGATCATAAAGTTGTATGTCTGGATTACATCAACCTCACTTATAAGGCTGCGATGAGACATGCAACACTGTACCAGAGATCCTTC  
TTTCGCTGGAGTTTCAACCACCCTTAGAAAGATCTCCAGTTAGGACAAGTCTCAATCCTTCATGCGAGAATAAGTTGCATTTAAATGATACCGT  
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_024. MNG\_wk. 09-H  
AAGAATGAATCTCCTGGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCAATCCAACCTCCCTTGCACCTAACATTTCTATTGCTAAT  
TCTTCTATGTCTGATCATAAAGTTGTATATCTGGATTACCTTAACCTCACCTATAAAGACTGCGGTGCGACATGCAACACTGTACCAGAGATCCTTC  
CTTCACTGGAGCTTCGATCGCCACTCTAGAAAGATTTCCAGTCAGGACAAGTCTCAATCCTTAATGCAAGAACAAGCTGCATCTACTTGACACCGT  
TCAATCATGAGGCATAAAGAAAAA  
>MuVi\_Odate1. JPN\_wk. 93-I  
AAGAATGAATCTCCTAGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTAGCACTATGCCGGGATCCAACCTCCCTTACCTAACATTTCTATTGCTAAT  
ACTTCTTTATATGATCATAAAGTTGTATGTCTGGATTATATTAACCTCACTTATAAAGACTGCAGTGCAGATGCAGCACTGTACCAGGGATCCTTC  
TTTCGCTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGAAAGATCTCCAGTTAGGACAAGTCTCAATCCATCATGCGAGAACAAGCTGCATTTAAATGATGCCGT  
TTAATCAGGAAATAAAGAAAAA  
>MuVi\_Dg1062. KOR\_wk. 98-I  
AAGAATGAATCTCCTAGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTAGCACTATGCCGGGATCCAACCTCCCTTACCTAACATTTCTACTGCTAAT  
ACTTCTTTATATGATCATAAAGTTGTATGCCTGGATTATATTAACCTCACTTATAAAGACTGCAGTGCAGATGCAGCACTGTACCAGGGATCCTTC  
TTTCGCTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGAAAGATATCCAGTTAGGACAAGTCTCAATCCATCATGCGAGAACAAGCTGCATTTAAATGATGCCGT  
TTAATCCCGAGAAATAAAGAAAAA  
>MuVi\_Sapporo\_K-4. JPN\_wk. 00-J  
AAGAATGAATCTCCTGGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGGATCCAACCTCCCTTACCTAACATTTCTATTGCTAGT  
TCTTCTTTATCTGATTATAGCCTTGTATGTCTGGATTATATAGCCATTACCTACAAGACTGCGGCACAACATGCAGCGCTGCACCGGGATCCTTA  
TCTCGCTGGAGTTTCGATCACTCATTCTAGATAGATCTCTATTTAGGACAAGTCCCAATCCATCATGCGAGAACAAGCTGCATTTGAATGAAGCCGT  
CCAATCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_Leeds. GBR\_09.04-J  
AAGAATGAATCTCTGGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGGATCCAACCTCCCTTACCTAACATTTCTATTACTAGT  
TCTTCTTTATCTGATTATAACCTTGTATGTCTGGATTATATAGCCATTACCTACAAGACTGCGGTACAACATGCAGCGCTGTACCAGGGATCCTTA  
TTTCGCTGGAGTTTCGATCACTCATTCTAGATAGATCTCCATTTAGGACAAGTCCCAATCCATCATACGAGAACAAGCTGCATTTGAATGATGCCGT  
CCAATCATGAGATATAAAGAAAAA  
>MuVi\_RW154. -USA\_wk. 70s-K  
AAGAATGAATCTCCTGGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGGATCCAACCTCCCTTACCTAACATTTCTATTGCTAAT  
TCTTCTATCTGATCATAAAGTTGTATGTCTGGATTATATTAACCTACTTATAAAGACTGCGGTGCGGATGCAGCACTGCACCAAAGATCCTTC  
TTTCGCTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGAAAGATCTCAAATAGGACAAGTCCCGATCCCTCATGCGTGAACAAGCTGCATTTAAATGATGCCGT  
TCAGTCATGAGACATAAAGAAAAA  
>MuVi\_V6. SWE\_wk. 71-K  
AAGAATGAATCTCCTGGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGGATCCAACCTCCCTTACCTAACATTTCTATTGCTAAT  
TCTTCTTTATCTGATCATAAAGTTGTATGTCTGGATTATATTAACCTACTTATAAAGACTGCGGTGCGGATGCAGCACTGCACCAAAGATCCTTC

```

TTTCGCTGGAGCTTCGATCACTCACTCTAGAAAGATCTCCAGTTAGGACAAGTCCCAGTCCCTCATGCGTGAACAAGCTGCATTTAAATGATGCCGT
TCAGTCATGAGACATAAAGAAAAA
>MuVi_V28. SWE_wk. 83-K
AAGAATGAATCTCCTGGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGGGATCCAGCCTCCCTTATACCTAACATTTCTGTTGTTAAC
TCTTCTTTATCTGATCATAAAGTTGTATGTCTGGATTATATTAACCATTACTTATAGACTACGGTGCGGCATGCAGTACTGCACCAAAGATCCTTC
TTTCGCTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGAAAGATCTCCAGTTAGGACAAGTCCCATCCCTCATGCGTGAACAAGCTGCATTTAAATGATGCCGT
TCAGTCATGAGACATAAAGAAAAA
>MuVi_4070. BRA_wk. 06-K
AAGAATGAATCTCCTGGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGGGATCCAACCTCCCTTATACCTAACATTTCTATTGCTAAT
TCTTCTTTATCTGATCATAAAGTTGTATGTCTGGATTATATTAACCATTACTTATAAGACTTCGGTGCGGCATTCAGTACTGCACCAAAGATCCTTC
TTTCGCTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGAAAGATCTCCAGTTAGGACAAGTCCCATCCCTCATGCGTGAACAAGCTGCATTTAAATGATGCCGT
TCAGTCATAAGACATAAAGAAAAA
>MuVi_Fukuoka49. JPN_wk. 00-L
AAGAATGAATCTCCTGGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGGGATCCAACCTCCCTTATACCTAACACTTCTATTGCTGAT
TCTTCTTTATCTGATCATAAAGTTGTATGTCTGGATTATATTAACCATTACTTATAAGACTGCGGAGCGACATGCAACACTATACCAGAGATCCTTC
TTTCGCTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGAAAGATCTCCAGTTTGAACACGTCGCCAGTCCATCATGCGAGATCAAGTTGCATTTAAATGATGCCGC
TCAATCATGAGATATAAAGAAAAA
>MuVi_Tokyo_S-III-10. JPN_wk. 01-L
AAGAATGAATCTCCTGGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGGGATCCAACCTCCCTTATACCTAACACTTCTATTGCTGAT
TCTTCTTTATCTGATCATAAAGTTGTATGTCTGGATTATATTAACCATTACTTATAAGACTGCGGAGCGACATGCAACACTGTACCAGAGATCCTTC
TTTCGCTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGAAAGATCTCCAGTTTGAACACGTCGCCAGTCCATCATGCGAGATCAAGTTGCATTTAAATGATGCCGC
TCAATCATGAGATATAAAGAAAAA
>MuVi_Taylor. GBR_wk. 50s-provi
AAGAATGAATCTCCCGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGGGATCCAACCTCCCTTATACCTAACATTTCTATTGCTAAT
TCTTCTTTCATCTGATCATAAAGTTGTATGTCTGGATTATATTAACCATTACTTATAAGACTGCGATGCGACATGCAGCACTGTACCAGAGATCCTTC
TTTCGCTGGAGTTTCGATCACTCACTCTAGAGAGATCTCCAGCCAGGACAAGTCCCATCCATCATGCGAGGCAAGGCTGCATTTCAACTGATGCCGC
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAA
>MuVi_4286. GBR_wk. 02-provi
AAGAATGAATCTCCTGGGGTGGTAACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGGGATCCAACCTCCCTTGTACCTCACATTTCTATTGCTAAT
TCTTCTTATTTGATCATAAAGTTGTATTTCTGGATTATATTAACCGTTACTTATAAGACTGCAGTGCAGATGCAGCACTGTACCAAAGATCCTTC
TTTCACTGGAGTTTCGATCACTCACTTTAGAAAGAGCTCCAGTTAGGACAAGTCCCATCCATCATTGAGAAACAATCTGCGTTTAAATGATACCAT
TCAATCATGAGACATAAAGAAAAA

```

### (3) ClustalW によるアライメント解析

- \* Multi fasta file が作成できたら、FireFox などのブラウザソフトを使って ClustalW のサイト (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/index.php?lang=ja>) を開く (下図参照)。種々のパラメータ設定はデフォルトのままでよい。
- \* 『選択』 ボタンをクリックして、自身の PC 内に保存した Multi fasta file を選択し、クリックする。『選択』 ボタンの横にファイル名が表示される。
- \* 『Send to ClustalW』 のボタンをクリックする。

The screenshot shows the ClustalW web interface. At the top, there is a navigation bar with 'HOME', '塩基配列の登録', '利用の手引き', '検索・解析', 'FTP・WebAPI', 'レポート・統計', and 'お問い合わせ'. Below this, there is a search bar and a 'サイト内検索' button. The main content area is titled 'ClustalW' and has a 'ヘルプ' link. Under the 'Version' section, there are two radio buttons: '2.1 (Latest version)' (selected) and '1.83 (Modified by D. Kirill Kryukov)'. A red arrow points to the '2.1' option with the text '①まず選択ボタンをクリック'. Under the 'Sequences' section, there is a 'DNA' dropdown menu and a 'sequences' label. Below that, there is a 'File Upload: 選択...' button and a note 'ファイルが選択されていません。' or 'COPY & PASTE:'. A large empty box is shown below the 'File Upload' button. A red arrow points to the 'Send to ClustalW' button in the 'Submit' section with the text '②次にこのボタンをクリック'. Below the 'Submit' section, there is a 'Pairwise Alignment Parameters' section.

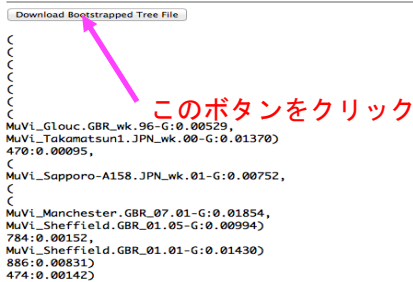
\* しばらくすると解析結果が画面に表示される（下図参照）。

```
Request ID clustalw_1396335391_509331_9200
Download Result Summary

CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignments

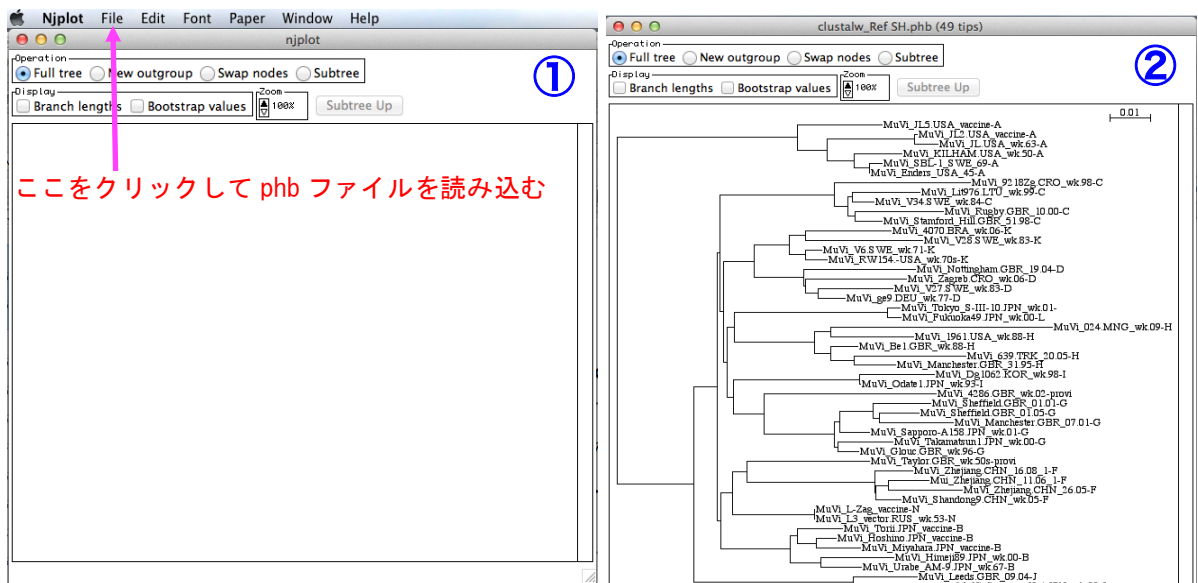
Sequence type explicitly set to DNA
Sequence format is Pearson
Sequence 1: MuVi_Enders_USA_45-A          316 bp
Sequence 2: MuVi_SBL-1_SWE_69-A          316 bp
Sequence 3: MuVi_KILHAM_USA_wk_50-A       316 bp
Sequence 4: MuVi_JL_USA_wk_63-A          316 bp
Sequence 5: MuVi_JL5_USA_vaccine-A       316 bp
Sequence 6: MuVi_JL2_USA_vaccine-A       316 bp
Sequence 7: MuVi_Urabe_AM-9_JPN_wk_67-B  316 bp
Sequence 8: MuVi_Himeji89_JPN_wk_00-B    316 bp
Sequence 9: MuVi_Miyahara_JPN_vaccine-B  316 bp
Sequence 10: MuVi_Hoshino_JPN_vaccine-B  316 bp
Sequence 11: MuVi_Torii_JPN_vaccine-B    316 bp
Sequence 12: MuVi_9218Zg_CRO_wk_98-C     316 bp
Sequence 13: MuVi_Stamford_Hill_GBR_51_98-C 316 bp
Sequence 14: MuVi_Rugby_GBR_10_00-C      316 bp
```

解析結果の画面を最後まで下にスクロールしていくと『Download Bootstrapped Tree File』というボタンがあるのでこれをクリックして phb ファイルを特定のフォルダにダウンロードする。この際、ファイル名は自由に設定できるが、拡張子は『.phb』のままにする。



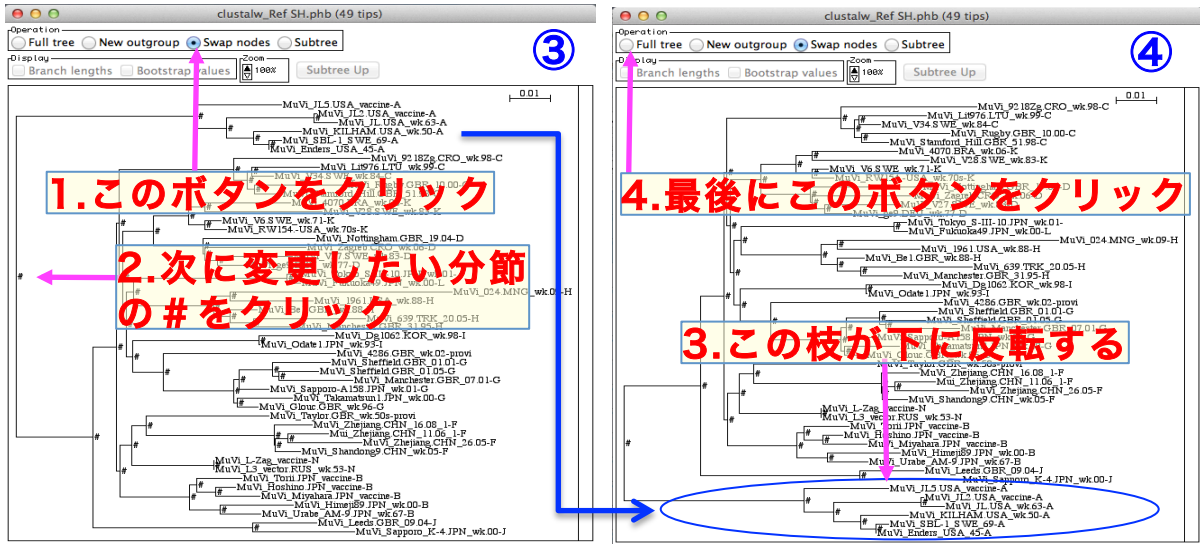
#### (4) 系統樹の作成

- 1) あらかじめダウンロードしておいた NJplot を起動させる。
- 2) メニューバーから『File』を、次に『Open』をクリックして、保存した phb ファイルを選択し『Choose』 ボタンをクリックして、phb ファイルを読み込む（下図①）。
- 3) 系統樹がウインドウに表示される（下図②）。



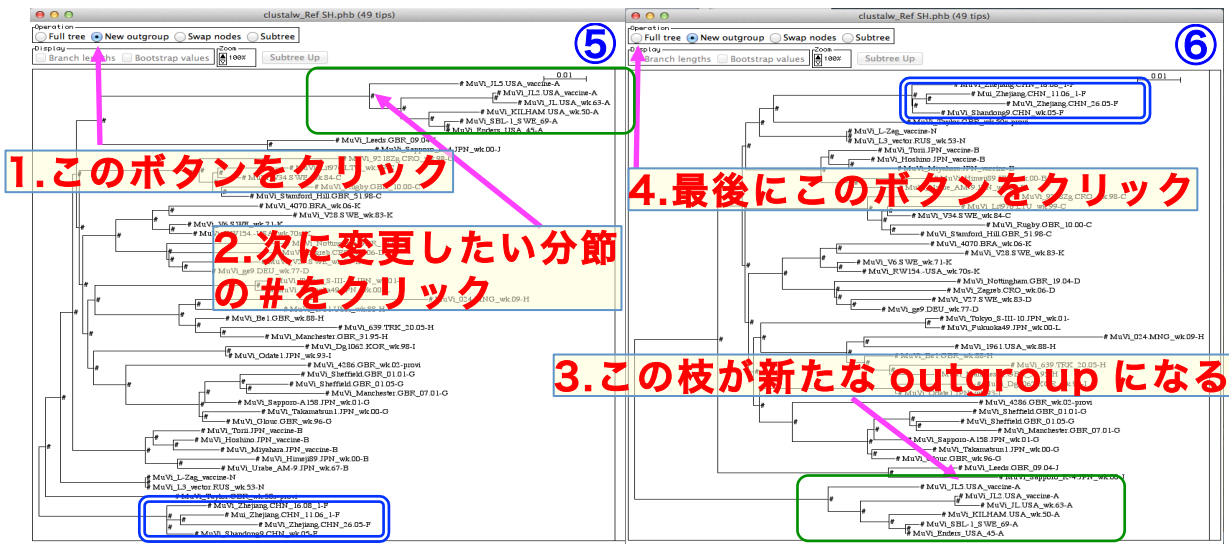
4) 目的に応じて系統樹に修正を加える。修正によって相互の系統関係が変わるわけではない。以下に、よく利用するメニューを解説する。

(ア) 枝の位置を上下に反転する場合は『Swap nodes』ボタンをクリックする(図③)。分節点に『#』が表示されるので、向きを変えたい分節点の『#』を



クリックすると(図③)、分節点から分かれる2つの枝の位置が上下反転する(図④)。最後に『Full tree』ボタンをクリックして最初の状態に戻す。

(イ) 新たに outgroup を設定し直す方法は\*、まず『New outgroup』ボタンをクリックする(図⑤)。図⑤では genotype F (青二重線) が outgroup になっている。分節点に『#』が表示されるので、新たな outgroup に指定したい枝(図では緑で囲った genotype A)の一番根本の分節点の『#』をクリックすると(図⑤)、新たに指定した枝(genotype A)を outgroup とする系統樹が描画される(図⑥)。最後に『Full tree』ボタンをクリックして最初の



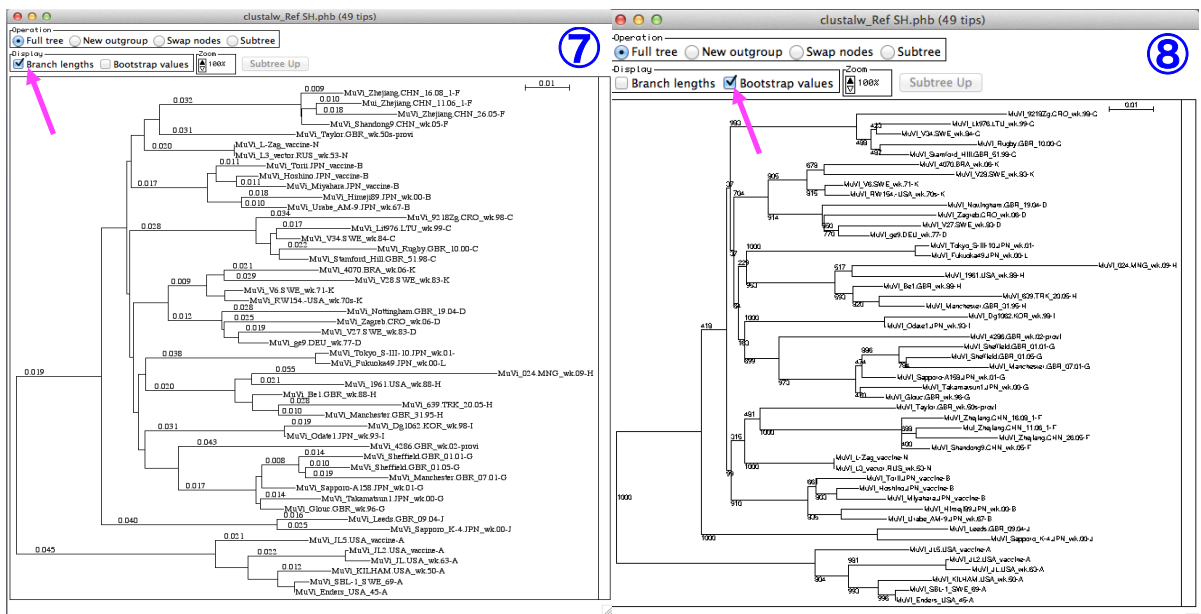
状態に戻す。

- \* : 通常 NJ 法によって系統樹（無根系統樹）を作成する際には、系統学的に遠い生物の配列情報を加えて解析し、それらを outgroup として系統樹を作成する。ムンプスウイルスでは通常 genotype A を outgroup に設定する場合が多い。多くの場合 NJplot では、デフォルト条件で自動的に genotype A を outgroup に選択して描画してくれる。しかし、比較する遺伝子型の組み合わせによっては、見かけ上の outgroup が genotype A 以外になる場合もある（実は各グループ間の系統関係（系統樹のトポロジー）は変わっていないが、見た目が違って見える。outgroup が異なると他のデータと比較しにくい）。その際自分で genotype A を outgroup に設定し直す必要がある。

\*

- (ウ) 系統樹に追加の情報を表示できる。系統学的な距離を表示させる場合には『Branch lengths』ボタンをクリックする（図⑦）。Bootstrap 値\*を表示させる場合には、『Bootstrap values』ボタンをクリックする（図⑧）。これらのボタンをアクティブにするためには『Full tree』ボタンをクリックして最初の状態に戻す必要がある。

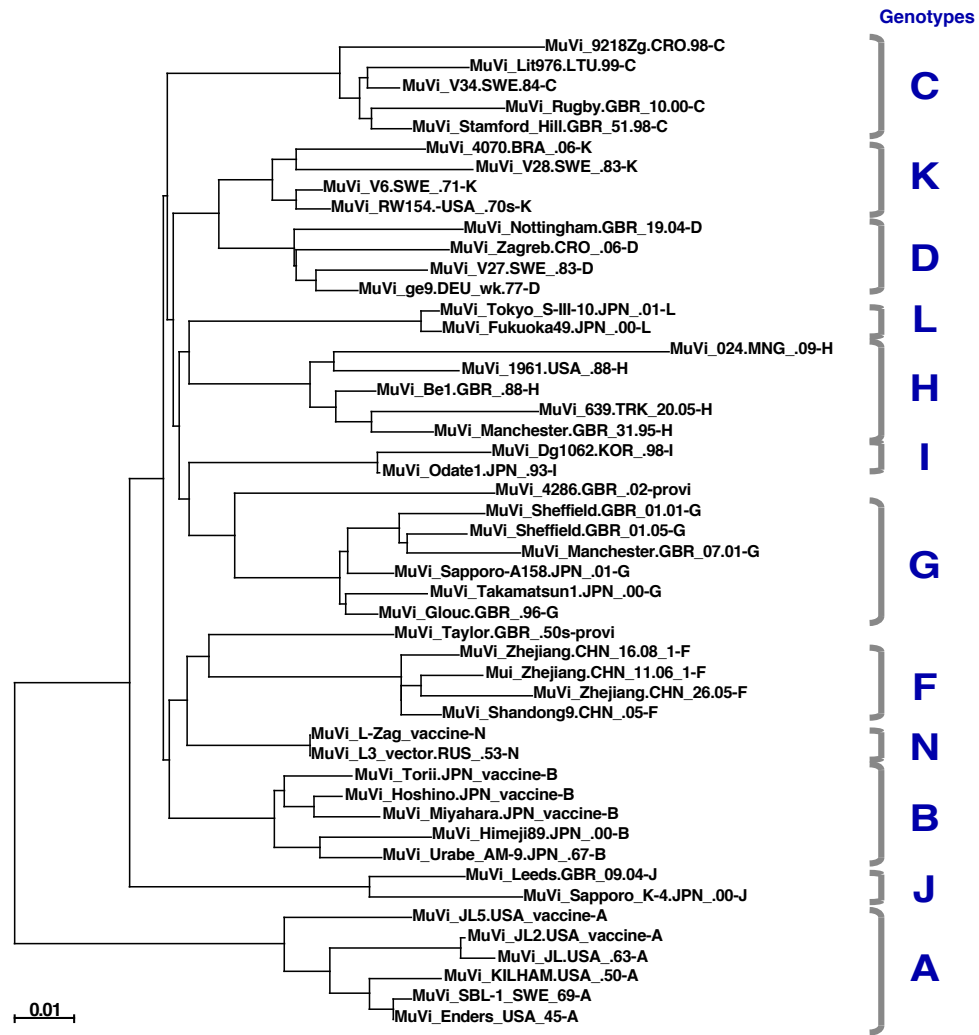
- \* : Bootstrap 値は系統関係の確からしさを示す統計値で、この値が高いほど系統関係がより確からしいことを示す。デフォルトの設定値は 1000 である。



- (エ) 得られた系統樹にさらに色やフォントを変えるなど細かな加工を加えたい場合には、PDF として保存し、イラストレーターなどの描画ソフトで加工すると良い。その場合には、メニューバーから『File』を、次に『Save as PDF』をクリックして、保存すればよい。その際、PDF で見やすいように、フォ



ントを『Helvetica』、フォントサイズを『8 point』に変えておくと良い。  
メニューバーの『Font』から設定変更できる。



参照株による系統樹

#### 4. ムンプスウイルスの Real-time PCR

近年ではその特異性と感度の高さ、簡便さなどの特性からムンプスの実験室診断として Real-time PCR が定着しつつある<sup>12) 13)</sup>。RT-PCR に比べて交差汚染のリスクを回避できる点からも導入が求められている。ケミストリーや装置によって、条件が異なるが、ここでは TaqMan ケミストリーを用いた、Roche Applied Science 社の LightCycler® 480 System を例に解説する。このシステムの特性として、well 間のばらつきが小さく再現性が高く、反応時間が短い。

### (1) ウイルス RNA の抽出

RT-PCR の場合と全く同じである。

### (2) cDNA 合成

たとえば PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa)等を用いてマニュアルに従って random hexamers にて 1st strand cDNA を合成する。

試薬	使用量	最終濃度 (または添加量)
5 × PrimeScript Buffer (for Real Time)	2.0 μL	1 ×
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 μL	
Random 6 mers (100 μM)	0.5 μL	50 pmol
Sample RNA		
RNase Free dH2O		
Total	10.0 μL	

反応条件は下記の通り。

37°C、15 分\*

85°C、5 秒

4°C

### (3) Real-time PCR

Roche Applied Science 社では検出用 probe として ready made の Universal ProbeLibrary (UPL)を販売しており、ムンプスウイルスにも利用可能である。その利点は、ready made であるため比較的安価であること、増幅用の primer set を変えることで他のターゲットにも利用できることなどが上げられる。

#### 1) Primer set

下記の primer set を用い NP 遺伝子内の 77 塩基 (ウイルスゲノム上で 1,398-1,474 塩基) の領域を増幅する。増幅領域については下図参照。(下図のアライメントが示す通り、この領域は遺伝子型間で保存されており、遺伝子型の違いによる影響を受けにくい。)

MuNP1398s; 5' ttc ctc cag ttc aac agc aa 3' (1,398-1,417)

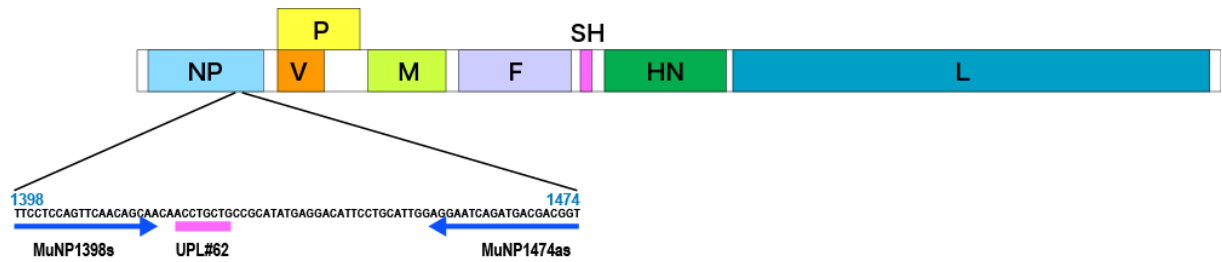
MuNP1474as; 5' acc gtc gtc atc tga ttc ct 3' (1,474-1,455)

#### 2) 検出用 Probe

ゲノム cDNA の検出には Roche の Universal ProbeLibrary (UPL)#62 (cat no.

04688619001)を用いる。

UPL#62 ; 5' acc tgc tg 3' (6,130 – 6,150)



MuV Strain (Genotype)	MuNP1398s	<UPL#62>	MuNP1474as
Y125(B)	1396 TGTTCTCCAGTTCAACAGCAACA	ACCTGCTGCCGCATATGAGGACATTCTGCATTGGAGGAATCAGATGACGACGGTGA	1476
Miyahara(B)	1396 .....	.....	1476
Hoshino(B)	1396 .....	.....T.....T.....C.....	1476
Jeryl Lynn(A)	1396 .....	.....G.....T.....	1476
SBL-1(A)	1396 .....	.....T.....C.....	1476
Drag94(C)	1396 .....	.....G.....T.....T..C.....	1476
Glouc1/UK96(G)	1396 .....	.....T.....	1476
L-Zagreb(N)	1396 .....	.....C.....T.....	1476
ODATE-1(I)	1396 .....	.....A.....T.....C.....	1476
PetroNov(H)	1396 .....	.....A.....T.....A.....C.....A...	1476
SP(F)	1396 .....	.....T.T.....	1476
ZgA/Cro69(D)	1396 .....	.....T.T.....A.....	1476
ZgB/Cro69(X)	1396 .....	.....T.....	1476

\*\*\*\*\* .....

### 3) Standard DNA

ウイルス量を定量したい場合には予め濃度が確定した cDNA を Standard DNA として用いて、検量線を求める必要がある。例えば上記増幅領域の PCR 産物を精製し、その濃度からコピー数を算出し、濃度調整したものを 10 倍階段希釈して  $10^1 \sim 10^7$  copy/ $\mu$ L の Standard DNA 希釈系列を調製する。これをサンプルと同じように反応系に加え、同じプレート上で測定を行う。

- 希釈液には低濃度 DNA ( $10^1 \sim 10^2$  copy) のチューブ壁への非特異吸着を抑えるために、MS2 RNA (Roche) (MS2 ファージのゲノム RNA、Cat.No.165948) を、滅菌蒸留水で 10ng/ $\mu$ L に希釈したものを用いる。
- 希釈系列を調製するチューブも DNA LoBind Tube (eppendorf, Ca.no.: 022431005) のような定吸着性チューブを用いる。

### 4) Real-Time PCR Mixture

LightCycler® 480 Probe Master (cat no : 4 707 494) を用いてマニュアルに従って Real-Time PCR Mixture を調製する。cDNA 以外のコンポーネントをあらかじめ複数検体分をまとめて調製してから、分注すると良い。

コンポーネント	液量 (μL)	備考
H <sub>2</sub> O (バial 2)	2.0~6.0	
2x マスターミックス (バial 1)	10.0	
MuNP1398s (10 μM)	1.0	最終濃度 0.5 μM
MuNP1474as (10 μM)	1.0	最終濃度 0.5 μM
UPL#62	0.2	
-----		
cDNA	1.0~5.0	Standard DNA は 1.0μL
Total 液量		20.0

## 5) Reaction Protocol

LightCycler® 480 でのパラメータ設定は以下の条件で行う。

検出フォーマット: Mono Color Hydrolysis Probe

	セグメント	設定温度 (°C)	時間	グラジエント (°C/sec)	サイクル数	蛍光取得の有無
変性	ポリメラーゼの活性化	95	5 min	4.4	1	None
増幅・定量	熱変性	95	10 sec	2.2	45	None
	アニーリング・伸長反応	60	29 sec			
	シグナル取得	60	1 sec			Single
冷却	冷却	40	10 sec	1.5	1	None

## 5. ウイルス分離

(検査時間: 1週間~3週間)

実験室診断の基本はウイルス分離である。分離ウイルスが診断の直接的物証になるだけでなく、分離ウイルスを中和法や HI 法の抗原として利用するなど、診断のツールとして用いることができる。また、研究の対象として分離ウイルスを解析することにより、様々な情報を得ることができる。

1 週間の培養でウイルスが分離できない場合は、3代まで継代を繰り返す。

### (1) 試薬・器材

一般の細胞培養に用いる試薬 (Eagle MEM、2% FCS、ペニシリン・ストレプトマイシン、0.05% Trypsin-0.02% EDTA、PBS(-))

新鮮モルモット赤血球 (日本バイオテスト)

抗ムンプスウイルスウサギ血清 (自家製あるいはデンカ生研)

アセトン

抗ウサギ IgG-FITC conjugate

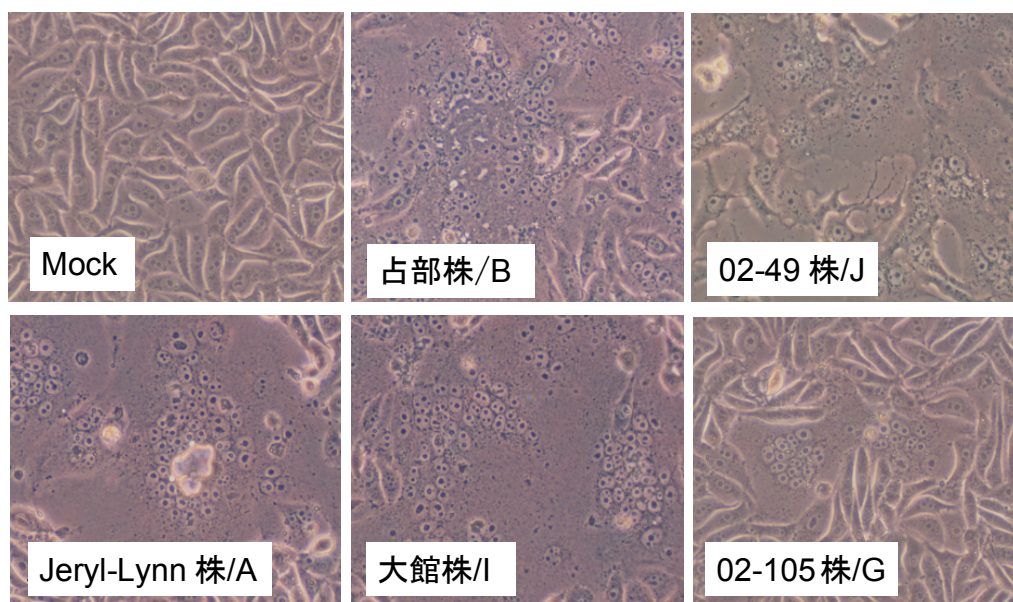
一般の細胞培養に用いる機材 (セーフティーキャビネット、CO<sub>2</sub> インキュベーター、低速遠心機)

無蛍光スライドグラス

蛍光顕微鏡。

## (2) ウイルス分離の方法

1. 24 ウェルのプラスチックプレートに  $2 \times 10^5$ /ウェルの割合で Vero 細胞をまく。
2. 2～3 日後、上清を除き検体を 0.1 mL/ウェルずつ 4 ウェル に接種する。複数の検体を扱うときは、検体相互のコンタミネーションを防ぐために、検体と検体の間を一行空けるか別のプレートを用いる。
3. 37°C で 1 時間吸着後、上清を除き 2% FCS、ペニシリン・ストレプトマイシンを含んだ Eagle MEM を 1 mL 加え、37°C に設定した CO<sub>2</sub> インキュベーターで 7 日間培養する。
4. ムンプスウイルスは明瞭な細胞変性(下図参照)を示さない場合があるので HAD (血球吸着) 試験を行う。培養上清を 0.5 mL ずつ保存した後、HAD 試験を行う。HAD 試験には 0.4%モルモット赤血球を用意する。この時使用する希釈液は Eagle MEM のように Ca イオン、Mg イオンを含むものが良く、PBS(-)は不適當である。また古い赤血球を用いると非特異的な吸着が生じやすくなるのでなるべく新鮮血を用いる。培養液を除き、モルモット赤血球液 0.5mL を加え、4°C で 30 分放置する。希釈液で 4～5 回洗浄してから検鏡する。なお血球吸着の温度は低く維持する。37°C ではウイルスのノイラミニダーゼ活性によりレセプターの糖鎖が分解され、吸着していた赤血球が遊離してしまうためである。
5. HAD(+) のものは次のウイルス同定試験に進む。HAD(-) の場合は保存しておいた培養 7 日目の培養上清を同様のプロトコールで Vero 細胞に接種し、2 代目、3 代目の継代を行う。3 代目の HAD の結果をもって最終判定とする。



**Vero 細胞に各 Genotype のムンプスウイルスを感染させて現れた細胞変性像**

Mock: 非感染 Vero 細胞、株名/遺伝子型、占部株と Jeryl-Lynn 株はワクチン株、その他は野外分離株

### (3) ウイルス同定試験

ムンプスウイルスの同定試験としては RT-PCR による遺伝的診断、抗血清を使用して中和指数を出す方法、蛍光抗体法によるものなどある。ここでは古典的な蛍光抗体法を紹介する。

1. 前記のウイルス分離で HAD(+)となったウェルの細胞と対照の非感染細胞を 0.5mL の 0.05% Trypsin-0.02%EDTA で消化する。
2. 細胞がバラバラになったところで更に 1mL の 2% FCS、ペニシリン・ストレプトマイシンを含んだ Eagle MEM を加え、全量 1.5mL の細胞懸濁液を遠心チューブに回収し、1,500rpm で 5分遠心する。
3. 上清を除き沈殿に 1mL の 2% FCS、ペニシリン・ストレプトマイシンを含んだ Eagle MEM を加え、細胞数を計算し、 $1 \times 10^5$  cell/mL に合わせる。
4. 例えばエアブラウン社の HTC スライドガラス(12 ウェル)に 20 に 2/ウェルずつ 6 ウェルに加える。急ぐときは約 10 分放置した後、キャピラリーで慎重に液の部分を除き、細胞がウェルに残っているのを顕微鏡で確かめた後 2～3 分間乾燥し、 $-20^{\circ}\text{C}$  に保存しておいた冷アセトンで 20 分間のせる。アセトンはすぐに蒸発するので、また 20 せるずつ補いながら 10 分放置する。なお急がない場合スライドガラスを 3～4 時間  $\text{CO}_2$  インキューベーター

ターに置くと細胞がガラスに接着してくるのできれいな標本が出来る。

5. アセトン固定の後、一次抗体として抗ムンプスウサギ血清を 20 セト/ウェルと正常ウサギ血清を 20 正常/ウェルにのせて乾燥しないよう湿度を保つ工夫をした箱に入れ 37°C 1 時間放置する。
6. PBS(-)で 5～6 回洗浄後水分を除き、抗ウサギ IgG-FITC conjugate (濃度にもよるが 1:100 希釈) を全てのウェルに 20 20/ウェルにのせ湿った箱に入れ 37°C 1 時間放置する。
7. PBS(-)で 5～6 回洗い、マウント剤をのせカバーグラスを置き、蛍光顕微鏡で観察する。

## 6. ウイルス感染価の測定法

(検査時間：7 日～10 日間)

### (1) 試薬・器材

カルチャーボトル(75cm<sup>2</sup>)

メスシリンダー (100mL)

6 ウェルプラスチックプレート

EagleMEM

2x EagleMEM

牛胎児血清 (FCS)

ペニシリン・ストレプトマイシン

PBS(-)

アガロース

対照ウイルス液

ニュートラルレッド

0.05%トリプシン- 0.02% EDTA

1%グルタルアルデヒド溶液 (PBS に溶解) なら 3mL/well

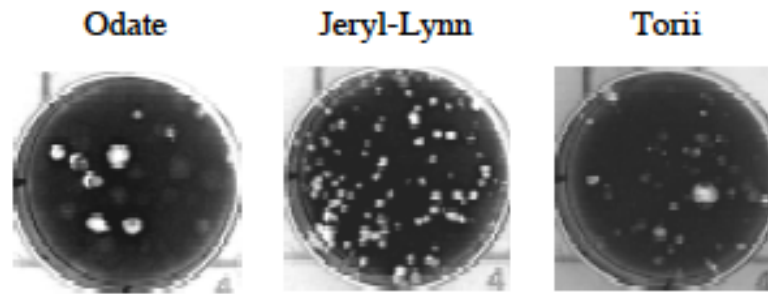
### (2) 操作手順

1. カルチャーボトル(75cm<sup>2</sup>)に継代して 3～4 日目の Vero 細胞の培養液を除き、5mL の PBS(-)で細胞を洗う。
2. 除液後 4mL のトリプシン・EDTA 液を加えて室温で約 3 分間置き、細胞が白濁してきたら細胞が剥がれ落ちないように静かに除液し、ボトルの側面を手で軽くたたいて細胞を十分に剥離させる。
3. 細胞が剥離してばらばらになってきたら増殖培地 (Eagle-MEM、5%FCS、ペニシリン・ストレプトマイシン) を 10mL 加え、駒込ピペットで泡立て

ないよう攪拌し、細胞を均一に懸濁する。カルチャーボトル 1 本当たり 75mL の細胞懸濁液を調製し、1 ウェルに 3mL ずつ細胞を播種し、必要な数だけプレートを用意する。通常コンフルエントの 75cm<sup>2</sup> のカルチャーボトル 1 本より 6 ウェルプレートを 4 枚作製できる。

4. 2～3 日間、37°C で培養する。
5. 小試験管を用意し、10 倍階段希釈を作るため、ウイルス希釈液 (Eagle MEM、2%FCS、ペニシリン・ストレプトマイシン) を 2.7mL ずつ分注する。
6. サンプル 0.3mL を 2.7mL の希釈液の入った試験管に入れ、10<sup>-1</sup> とする。以降同様に 10 倍ずつ階段希釈する。希釈後のウイルス液は氷上に置く。
7. 6 ウェルプレートの培養液を除き、希釈したウイルス液を 0.1mL/ウェルの割合で接種する。通常一希釈当たり 3 ウェルずつ接種する。
8. 37°C で 1 時間吸着させる。その間細胞が乾かないように 15 分おきにプレートを傾け、細胞表面全体にウイルス液を行き渡らせる。
9. 1%アガロース溶液 (蒸留水に 1%になるようアガロースを加え、121°C、15 分間オートクレーブしたもの) と、2x 培地 (2x Eagle MEM、10%FCS、2x ペニシリン・ストレプトマイシン) を事前に 45°C の恒温槽で保温しておく。
10. 吸着が終わったら 1%アガロース液と 2x 培地を等量混合し、3mL/ウェルずつ重層する。すぐにプレートを揺すって接種液と重層培地を十分に混和する。
11. アガロースが固まったら 37°C で培養する。
12. 3～5 日後に 1%アガロース液と 0.09%ニュートラルレッド液を上記同様作製して混合し、1.5mL/ウェルずつ重層する。
13. 2 日後、1%グルタルアルデヒド溶液を 3mL/ウェルずつ加え、遮光して室温で 2 時間以上細胞を固定する。
14. 固定後、細胞面を傷つけないようアガロースをはがし、細胞面を軽く流水で洗った後、水分を切って、乾燥する。
15. ライトボックスの上でプラーク(図参照)を数え、接種容量を勘案して Plaque Forming Unit (PFU/mL) を算出する。





## 7. アビジン・ビオジン酵素抗体法（ABC 法）による抗原検出

（検査時間：1 日）

ムンプスウイルス株によっては細胞に明瞭な細胞変性を起こさず、明瞭なプラークを形成しないことがある。また複数のウイルスが混在する中でムンプスウイルスのプラークだけを計測したい場合<sup>17)</sup>もある。酵素抗体法による抗原特異的染色法はこのような場合でもプラークを正確に計測することができる。

### (1) 試薬・器材

VECTASTAIN Elite ABC（ペルオキシダーゼ）キット（Vector Laboratories: PK-6100、フナコシ取扱い）

抗ムンプスウサギ抗血清（自家製）

ビオチン化抗ウサギ IgG（Vector Laboratories: BA-1000、フナコシ取扱い）

1%塩化コバルト

1%硫酸ニッケルアンモニウム

5mg/mL 3,3 モニウム oriesC することができる。したい場合顕微鏡で観察す: No. D-5637)

1%グルタルアルデヒド（Fisher）

### (2) 作業手順

上記の 3. ウイルス感染価の測定法を用いてプラークを形成させる。ABC 法による染色のみを行う場合には、ニュートラルレッド染色を省いても構わない。

1. 1%のグルタルアルデヒドを 1 ウェルあたり 3mL 入れ、室温で 2 時間固定する。
2. グルタルアルデヒドと重層したアガロースを除き、PBS(-)で 2 回から 4 回細胞を洗う。
3. 99.5%のエタノールで脱水し、風乾する。
4. 直ちに用いない場合には、プレートを-20℃で保存できる。
5. PBS(-)を加えて吸水させる。

6. 1:500 になるように 10%CS-PBS(-) で希釈した抗ムンプスウサギ抗血清を 1 ウェルあたり 0.4mL 加え、室温で 40 分間置く。
7. PBS(-)で 2 回から 4 回洗浄する。
8. 1:300 になるように 1%BSA-PBS(-)で希釈したビオチン化抗ウサギ血清を 0.4mL/ウェルで加え、室温で 40 分間置く
9. PBS(-)で 2 回から 4 回洗浄する。
10. VECTASTAIN ABC Kit Complex を以下のように調製する。
  - PBS(-) 5mL
  - A solution 2 滴
  - B solution 2 滴
11. 0.2mL/ウェル 加え、室温で 40 分間置く。
12. PBS(-)で 2 回から 4 回洗浄する。
13. 基質を以下のように調製し、東洋濾紙 No.1 でろ過する。
  - 5mg/mL DAB 2mL
  - PBS(-) 19mL
  - 1% 塩化コバルト 0.6mL
  - 1% 硫酸ニッケルアンモニウム 0.6mL
  - 過酸化水素水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 13m
14. 1mL/ウェル 加え室温で 1 時間置く。
15. PBS(-)で 2 回から 4 回洗浄する。
16. 99.5%のエタノールで脱水し、風乾する。
17. 染色されたプラークを数える。

## 血清学的検査

血清診断には赤血球凝集抑制(HI)法、補体結合(CF)法、中和抗体測定(NT)法、補体添加中和抗体測定(CNT)法、酵素抗体法(ELISA)などが用いられる。ムンプスの血清学的診断に関しては現在では、その感度、迅速性、簡便さなどから ELISA 法が主流になっている<sup>18)</sup>。しかし、ワクチンの効果判定には抗体の中和活性を直接評価できる CNT 法が最も適している。

### 1. IgM 検出 ELISA 法

(検査時間：6 時間)

ELISA 法を用いると、感染初期に誘導される IgM 抗体を簡便に測定することが

できるので、ムンプスウイルス感染の近時感染の診断が可能である。IgM ELISA 測定キットが市販されている。ここではデンカ生研のキット(ムンプス IgM(II)-EIA「生研」)を用いた方法について概説する。詳細はキットに添付の説明書を参照されたい。ただし、このキットでは非特異反応がしばしば認められること、自然感染による再感染やワクチン接種後の再感染(二次ワクチン不全)では IgM 抗体が誘導されないケースもあるので、注意が必要である。

#### (1) 操作手順

1. 検体数に応じて小試験管を用意し、緩衝液を 2mL ずつ分注する。
2. 検体 10mL ずつ加え十分に攪拌し、前希釈検体とする。
3. ブランク、各検体、陰性対照及び強陽性対照は各 2 ウェルずつ、弱陽性対照は 4 ウェル使用する。
4. 抗ヒト IgM 抗体固相プレートに各対照と前希釈検体を 100mL ずつ一定順序、一定時間間隔で加える。ただし、ブランクのウェルには何も加えない。
5. マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、アルミ箔等で覆い、室温(15～20°C)に 1 時間静置する。
6. ウェルの反応液を同一順序、同一時間間隔で吸引除去する。
7. 各ウェルに洗浄液を約 200mL 加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、再び液を吸引除去する。
8. この操作を 2 回繰り返す。残りの液は清潔なペーパータオル上でプレートを逆さにして叩き、ウェルから洗浄液を完全に除去する。
9. 各検体、陰性対照および強陽性対照の 2 ウェルのうち、1 ウェルにウイルス抗原液を 100mL、残りの 1 ウェルに対照抗原液を 100mL、また、弱陽性対照の 4 ウェルのうち、2 ウェルにウイルス抗原液を 100mL ずつ、残りの 2 ウェルに対照抗原液を 100mL ずつ一定時間間隔で加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、アルミ箔等で覆い、室温に 1 時間静置する。ただし、ブランクのウェルには抗原液を加えない。
10. 各ウェルの反応液を同一順序、同一時間間隔で吸引除去する。
11. 各ウェルに洗浄液を約 200mL 加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、再び液を吸引除去する。
12. この操作を 2 回繰り返す。残りの液は清潔なペーパータオル上でプレートを逆さにして叩き、ウェルから洗浄液を完全に除去する。
13. 各ウェルに酵素標識抗体液 100mL を同一順序、同一間隔で加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、アルミ箔等で覆い、室温に 1 時間静置する。ただし、ブランクのウェルには酵素標識抗体液を加えない。

14. 各ウェルの反応液を同一順序、同一時間間隔で吸引除去する。
15. 各ウェルに洗浄液を約 200mL 加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、再び液を吸引除去する。
16. この操作を 4 回繰り返す。残りの液は清潔なペーパータオル上でプレートを逆さにして叩き、ウェルから洗浄液を完全に取り除く。
17. 各ウェルに基質液 100mL を同一順序、同一時間間隔で加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、遮光して室温に 30 分間静置する。このときブランクのウェルにも基質液を加える。
18. 各ウェルに反応停止液 100mL を同一順序、同一時間間隔で加える。
19. 30 分以内にブランクのウェルを対照としてオートリーダー（波長 450nm/630nm）で測定する。

## 2. IgG 検出 ELISA 法

(検査時間：6 時間)

基本的原理は、プレート底面に固相化されたウイルス抗原に、希釈した被験血清を反応させ、固相化抗原と結合した抗ムンプス IgG 抗体の量を、酵素標識した抗 IgG 抗体の酵素活性を利用して定量するというものである。ELISA 法と CNT 法との間には必ずしも高い相関が認められる訳ではないので、ワクチンの効果判定に用いる際には中和抗体価との相関を確認することが重要である。ここではデンカ生研製の市販キット(ムンプス IgG(II)-EIA「生研」)を用いた方法について概説する。詳細はキット添付の説明書を参照されたい。

### (1) 操作手順

1. 検体数に応じて小試験管を用意し、緩衝液を 2mL ずつ分注する。
2. 検体 10mL ずつ加え十分に攪拌し、前希釈検体とする。
3. ウイルス抗原固相プレートおよび対照抗原固相プレートに各対照と前希釈検体を 100mL ずつ一定順序、一定時間間隔で加える。ただし、ブランクのウェルには何も加えない。
4. マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、アルミ箔等で覆い、室温 (15-20°C) に 1 時間静置する。
5. 各ウェルの反応液を同一順序、同一間隔で吸引除去する。
6. 各ウェルに洗浄液を約 200mL 加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、再び液を吸引除去する。
7. この操作を 2 回繰り返す。残りの液は清潔なペーパータオル上でプレートを逆さにして叩き、ウェルから洗浄液を完全に取り除く。

8. 各ウェルに酵素標識抗体液 100mL を同一順序、同一時間間隔で加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、アルミ箔等で覆い、室温に 1 時間静置する。
9. 各ウェルに洗浄液を約 200mL 加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、再び液を吸引除去する。
10. この操作を 4 回繰り返す。残りの液は清潔なペーパータオル上でプレートを逆さにして叩き、ウェルから洗浄液を完全に除去する。
11. 各ウェルに基質液 100mL を同一順序、同一時間間隔で加え、マイクロプレート用ミキサーで数秒間攪拌し、遮光して室温に 30 分間静置する。
12. 各ウェルに反応停止液 100mL を同一順序、同一時間間隔で加える。
13. 30 分以内にブランクのウェルを対照としてオートリーダー（波長 450nm/630nm）で測定する。

### 3. 補体添加中和抗体測定法（CNT 法）<sup>19)</sup>

（検査日数：7～10 日）

抗体の中和活性を直接測定することから、ワクチンの効果判定や被験者のムンプス感染に対する感受性を評価する上では中和抗体法が最も適した検査法である。しかし、手技が煩雑であり、培養細胞とウイルスを取り扱える環境と、1 週間程度の培養期間が必要であるため、汎用性の高い検査法ではない。

#### (1) 試薬・器材

新鮮モルモット血清、もしくは乾燥モルモット補体（デンカ生研:500-101）

Vero 細胞

希釈液(Eagle MEM 培地、2%FCS, 1%トレハロース、0.2%ゼラチン)

2x Eagle MEM 培地 (10%FCS 含)

1x Eagle MEM 培地 (2%FCS 含)

0.33%ニュートラルレッド(Sigma)（最終濃度 0.0165%で使用）

1%アガロース(Seachem agarose ME; オートクレーブにて溶解)

2%グルタルアルデヒド (50%溶液を PBS で 1:25 倍希釈)

6 well プレート（検体が多い場合には 24well プレート）

CO<sub>2</sub> 培養器

攻撃用ムンプスウイルス\*

\* 攻撃用ウイルスにはプラークの明瞭な株を用いる。あらかじめ感染価を測定しておき、最終的に 1 ウェル当たり 100 個程度 (6well プレート) もしくは 30 個程度 (24well プレート) のプラークができるよう希釈倍率を決める。

## (2) 補体添加中和抗体価測定の手順

1. 被検血清を 56°C、30 分非働化する。
2. 希釈液で新鮮モルモット血清を 100 倍希釈する。乾燥補体の場合は 100 単位/100 $\mu$ L になるように溶解する。
3. 被検血清を希釈液で 4 倍階段希釈する（通常 4<sup>1</sup> から 4<sup>6</sup> 希釈）。
4. 希釈液で希釈した攻撃用ムンプスウイルスと希釈した補体液をあらかじめ等量混合した液を、階段希釈した被検血清と等量混合する。プレートミキサーで十分に混和した後、37°C、2 時間中和反応を行う。一方、ウイルス対照としては、血清の代わりに希釈液と等量混合し、同様に処理する。
5. 中和反応を終えた検体を、Vero 細胞を単層培養したプレートの各 well に 100 $\mu$ L ずつ接種する。各希釈倍率当たり 2well ずつ接種する。37°C、5%CO<sub>2</sub> 培養器内で 15 分おきにプレートを揺すりながら、60 分間ウイルス吸着を行う。
6. 高圧滅菌機にかけて溶かした 1%アガロースと 2x Eagle MEM を等量混合し、0.5%アガロース/MEM 溶液を作成し、それを 45°C に保温する。
7. ウイルス吸着終了後、0.5%アガロース/MEM 溶液を 3 mL/well（24well では 1mL/well）ずつ加え、接種液と均一になるまで混和させる。
8. そのまま、アガロースが固まるまで静置し、固まったら CO<sub>2</sub> 培養器内で 3 - 5 日間培養する（培養日数は用いるウイルス株によって異なる）。
9. 1x Eagle MEM 培地に 1/20 量のニュートラルレッドを加え、1.5mL/ウェル（24well では 0.5mL/well）ずつ加え、そのまま一晩培養する。
10. 2%グルタルアルデヒドを 3 mL/ウェルの割合で加え、遮光して 2 時間室温で固定し、その後、アガロースをはがして水洗、乾燥して保存する。
11. 50% plaque reduction を計算し、中和抗体価を計算する。

## 4. 赤血球凝集抑制 (HI) 試験

(検査日数：2 日)

ムンプスウイルスの HA 反応の場合、室温ではウイルスの持つノイラミニダーゼ活性によりレセプター分子が分解されるため、時間の経過とともに凝集像が非凝集像へと変化してしまう。従って、血球を添加した後の反応は 4°C で行う。また、先に述べたように他のパラインフルエンザウイルスとの間に抗原的な交差性があるので注意を要する

### (1) 試薬・器材

96 ウェル丸底プレート

マルチチャンネルピペット

プレートミキサー

PBS

モルモット赤血球(日本バイオテスト)

Receptor Destroying Enzyme (RDE ; デンカ生研:340016)

遠心機

## (2) 赤血球凝集抑制(HI)試験の手順

1. 市販の RDE を添付の説明書に従って溶解する。
2. 被検血清 0.1mL に対して、0.3mL の RDE 液を加え、37°Cで一晩処理する。
3. RDE 処理血清を 56°C 1 時間加熱し、RDE を不活化させる。
4. モルモット赤血球を必要量とり低速遠心にかけて、上清を捨てる。捨てた分量と同じだけの PBS を加え、穏やかに赤血球を懸濁する。この操作を 3 回繰り返して赤血球を洗浄する。
5. 洗浄した赤血球から、50%と 0.4% (いずれも V/V)の懸濁液を作る。
6. RDE 処理血清に 50%赤血球を 0.1mL 加えて混和し、室温で 1 時間置く。
7. これを 2,500 rpm で 10 分間遠心し、上清を試験に供する。
8. 96 ウェルの丸底プレートとマルチチャンネルピペットを使って被検血清を希釈液で 2 倍ずつの階段希釈系列 (50 $\mu$ L0 ウェル) を作成する。
9. 対照ウェルには、血清の代わりに希釈液を同量加える。
10. あらかじめ 4HA 単位になるように調整したムンプスウイルス抗原を 50m $\mu$ l ウェルで加える。
11. 0.4% モルモット赤血球を各ウェルに 100 $\mu$ l ウェルで加え、よく攪拌する。
12. 4°Cに 2 時間静置し、陰性対照の血球が完全に沈降したところで、判定する。

## ムンプスの診断基準

次のいずれか 2 つ以上にあてはまれば「ムンプス」とする。

1. 患者周囲でおたふくかぜの流行があり、患者に 48 時間以上持続する耳下腺腫脹が認められる。
2. 患者検体からムンプスウイルスが分離される。
3. 患者検体からムンプスウイルス遺伝子が検出される。

4. ムンプスウイルス特異的 IgM 抗体が認められる。
5. HI 抗体あるいはムンプスウイルス特異的 IgG 検出 ELISA 抗体価が急性期と回復期の血清の間で、有意な上昇が認められる。

## 参考文献

1. 国立感染症研究所、2013 年 病原微生物検出情報(IASR)、34(8):219-232
2. 永井正規 他、2009 年 疫学的・統計学的なサーベイランスの評価と改善グループ研究報告書 (-その 9-)、感染症発生動向調査に基づく流行の警報・注意報および全国年間罹患数の推計、厚生労働科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業)「効果的な感染症サーベイランスの評価並びに改良に関する研究 (研究代表者:谷口清州)、平成 20 年度報告書: 70-71、
3. 多屋馨子 他 2006 年 水痘、流行性耳下腺炎重症化例に関する全国調査. 厚生労働科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業)「水痘、流行性耳下腺炎、肺炎球菌による肺炎等の今後の感染症対策に必要な予防接種に関する研究 (研究代表者:岡部信彦)」、平成 18 年度分担研究報告書: p45-49.
4. 千葉峻三 1999 年 流行性耳下腺炎「感染症の診断・治療ガイドライン」日本医師会雑誌 臨時増刊 122(10) :220-224.
5. Hashimoto, H. *et al.*, 2009. An office-based prospective study of deafness in mumps. *Pediatr Infect Dis J.* 28(3):173-175.
6. 喜多村 健、中島 務、2003 年 病原微生物検出情報(IASR)、24(5):107-109
7. Nagai, T, Okafuji T, Miyazaki C, Ito Y, Kamada M, Kumagai T, Yuri K, Sakiyama H, Miyata A, Ihara T, Ochiai H, Shimomura K, Suzuki E, Torigoe S, Igarashi M, Kase T, Okuno Y, Nakayama T. 2007 A comparative study of the incidence of aseptic meningitis in symptomatic natural mumps patients and monovalent mumps vaccine recipients in Japan. *Vaccine* 25: 2742–2747.
8. 厚生省監修微生物検査必携ウイルス・クラミジア・リケッチア検査 1987 年 (第 3 版)、金井興美、山崎修道編、財団法人日本公衆衛生協会、p115-123.
9. Kashiwagi, Y., T. Takami, T. Mori, and T. Nakayama 1999. Sequence analysis of F, SH, and HN genes among mumps virus strains in Japan. *Arch. Virol* 144:593-599.
10. Kim S. H., K-J. Song, Y. K. Shin, J. H. Kim, S. M. Choi, K. S. Park, L. J. Baek, Y. J. Lee and J-W. Song 2000. Phylogenetic analysis of small hydrophobic (SH) gene of Mumps virus in Korea: Identification of a new genotype. *Microbiol. Immunol.* 44(3): 173-177.



11. Uchida K., M. Shinohara, S. Shimada, Y. Segawa, and Y. Hoshino 2001. Characterization of Mumps virus isolated in Saitama prefecture, Japan, by sequencing analysis of SH gene. *Microbiol Immunol.* 45(12):851-855.
12. Krause CH, Eastick K, Ogilvie MM. 2006. Real-time PCR for mumps diagnosis on clinical specimens-comparison with results of conventional methods of virus detection and nested PCR. *J. Clin. Virol.* 37(3):184-189.
13. Boddicker JD, Rota PA, Kreman T, Wangeman A, Lowe L, Hummel KB, Thompson R, Bellini WJ, Pentella M, Desjardin LE. 2007. Real-time reverse transcription-PCR assay for detection of mumps virus RNA in clinical specimens. *J. Clin. Virol.* 45(9):2902-2908.
14. Kidokoro M, Tuul R, Komase K, Nymadawa P, 2011. Characterization of mumps viruses circulating in Mongolia: identification of a novel cluster of genotype H. *J. Clin. Microbiol.* 49(5); 1917-1925,
15. World Health Organization, 2012. *WER* 87: 217-224
16. 木所 稔、竹田 誠. 2013. ムンプスウイルスの新たな分類基準と国内流行状況 病原微生物検出情報(IASR) 34(8):224-225
17. Fukuda, A., M. Hishiyama, Y. Umino, and A. Sugiura. 1987. Immunocytochemical focus assay for potency determination of measles-mumps-rubella trivalent vaccine. *J. Virol. Methods* 15: 279-284.
18. 坂田宏子、山田章雄、菱山美智子、杉浦昭 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)によるムンプス抗体測定 臨床とウイルス 12 (1):81-86.
19. 菱山美智子、伊藤康彦、山田章雄、鶴留雅人、杉浦昭 1984. ムンプスウイルスの補体添加中和試験に関する研究 臨床とウイルス 12(1):74-80.

平成 14 年 7 月 初版

加藤 篤 (国立感染症研究所 ウイルス第三部第四室)

竹内 薫 (筑波大学医学系)

唐牛良明 (京都府衛生公害研究所)

青森県環境保険センター他

平成 15 年 8 月 加筆、修正

加藤 篤 (国立感染症研究所 ウイルス第三部第四室)

長崎県衛生公害研究所

群馬県衛生環境研究所

栃木県保険環境センター

平成 27 年 1 月 加筆、修正

木所 稔 (国立感染症研究所 ウイルス第三部第三室) \*

\*きどころみのも ; 208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1、  
TEL : 042-561-0771(代表) (内線 3530)、Fax : 042-567-5631、  
E-mail : kidokoro@niid.go.jp