

た(92.81%)。これらの結果、本邦にも様々なアナプラズマの存在が明らかとなり、これらの詳細な性状を検討すると共に、検査法を検討し、人及び家畜等への感染について調査する必要があると思われる。

## E. 結論

*E.muris* の増殖が DH82 細胞で可能となり、抗体調査のための蛍光抗体用抗原として使用できることがわかった。HF565 株の培養は増殖が不十分で、今後更に検討が必要であった。DH82 細胞で増殖させた *E.muris* 及び *A.phagocytophila* を抗原として、ライム病流行地である北海道の病院で採血された 197 の患者血清について抗体調査を行ったところ、5 血清から *E.muris* 抗体が検出できた。しかし、*A.phagocytophila* 抗体陽性血清は認められなかった。

*E.muris*、HF565 株、*E.chaffeensis* および *A.phagocytophila* について遺伝子検出のための PCR 法の検討を行った。作成したプライマーは、いずれも結果は良好で検査に用いる事が可能であった。日本の各地で採取されたダニについて PCR 法でアナプラズマ DNA の検出を試みたところ、320 個体 (281 サンプル) 中 9 サンプルが陽性であり、シークエンスの結果、*E.muris*、HF565 株を検出するとともに、3 種類の新しいアナプラズマ DNA が含まれていることが明らかとなった。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Okada, H., T. Tajima, M. Kawahara, and Y. Rikihisa. Ehrlichial proliferation in endothelial cells and lethal liver necrosis in immunocompetent mice experimentally infected with HF strain most closely related to *Ehrlichia chaffeensis*. J. Comp. Pathol. 124: 165-171, 2001.

### 2. 学会発表

1. M. Kawahara, E. Isogai, C. Suto, S. Shibata, H. Fujita, T. You, Y. Nishioka, Y. Tsuji, Y. Rikihisa  
Detection of 16S rRNA Genes of Several *Ehrlichia* spp. in Ticks in Japan and USA, and Serosurvey for Human Exposure to *Ehrlichia muris* and the HGE Agent in the Area Where Lyme Disease is Endemic. The 101<sup>st</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology. May 21-23, 2001. Orlando Florida
2. 楊 孝康、磯貝恵美子、磯貝 浩、木村浩一、川原 眞 ライム病を中心としたダニ媒介性疾患の現状 第 74 回 日本細菌学会総会 (2001.4)

## H. 知的所有権の取得状況

なし。

## 謝辞

本研究は、北海道医療大学の磯貝恵美子博士、ひがし十勝病院の楊 孝康医師、清水赤十字病院の西岡 洋医師、酪農学園大学の辻 正義博士、オハイオ州立大学の力久泰子博士らの協力を得て行われた。DH82 細胞、*E.chaffeensis*、蛍光抗体検出用 *A.phagocytophila* 抗原、および抗 *A.phagocytophila* モノクローナル抗体はオハイオ州立大学の Dr. Rikihisa Y より、*E.chaffeensis* 感染患者血清は CDC の Dr. Jacqueline E.D. より分与を受けた。また、CDC の Dr. Sumner J. よりプライマー EC9 および EC12A のシークエンスおよびその反応条件について情報の提供を受けた。各位に深謝します。

## 7. 髄膜炎菌検査法の標準化についての研究

分担研究者 井上 博雄 愛媛県立衛生環境研究所長

**研究要旨** 感染症法 4 類全数報告に該当する髄膜炎菌性髄膜炎は、わが国では近年毎年 10 例前後と僅少であり、臨床的関心も薄らぎ、診断能力・検査能力の低下が危惧される。当研究では、再興感染症として突発的に集団感染や地域流行など健康危機の事態が発生する可能性のある髄膜炎菌性髄膜炎への関心を啓発するとともに、衛生研究所や病院検査へ検査法の標準化とその普及を図った。又その検査法を用い、扁桃摘出術を行った扁桃からナイセリア菌分離・同定を行い 45 検体中 1 検体、また臨床での咽頭ぬぐい液から 170 検体中 1 検体、それぞれ *Neisseria lactamica* を分離した。更に、感染症診断・検査手法の計画的な維持、向上、開発及び普及とその精度管理を可能とするためには衛生微生物協議会での感染研-地研レファレンスネットワークの活用と充実、ひいては制度化が望まれることを考察した。

### A. 研究目的

髄膜炎菌性髄膜炎は髄膜炎菌（*Neisseria meningitidis*）を原因とし、集団発生や地域流行を起こすことから、流行性脳脊髄膜炎とも呼ばれる。世界的にメッカ巡礼による流行など年間約 50 万人が発症し劇症型では致死率 10～15%にも達する。わが国では、1945 年約 4,400 例をピークとし、以後漸次減少し、1960 年代後半からは 100 例を切り、この 10 数年間は 10 例前後となっている。この現状から、臨床的関心も薄く、診断検査能力の低下が危惧される一方、再興感染症として海外からの持ち込み等による集団発生や地域流行の勃発など健康危機の事態に遭遇する可能性もあり、当疾患に対する関心の喚起と診断検査能力の向上普及が望まれる。

この研究において標準化された検査法を用いて扁桃炎患者における髄膜炎菌保有状況の調査を試み、更に、地方衛生研究所及び病院検査室への普及を図った。

一方、感染症による健康危機管理の観点から見れば、質の保証された公衆衛生学的な感染症検査体制の整備は、国民が安全で安心な生活を営む上での重要な行政的基盤整備である。髄膜炎菌検査に留まらず、計画的な感染症検

査体制のバックボーンとして衛生微生物協議会における感染研-地研レファレンスネットワークの重要性を再確認し、その活用と充実、ひいては制度化について考察する。

### B. 研究方法

- (1) 検査法の標準化：厚生科学研究「髄膜炎菌性髄膜炎の発生動向調査及び検査方法の研究」（主任研究者 神奈川県衛生研究所 山井志朗）で検討されている検査法マニュアルから、選択して標準化を試みた（図 1）。

#### 1) 咽頭ぬぐい液の採取方法

滅菌化学綿棒各 1 本ずつで両側扁桃腺表面をぬぐい、滅菌試験管に入れる。

綿棒は乾燥しやすく、菌が死滅する恐れがあるため、採取直後に平板塗布が理想的である。困難な場合、あらかじめ滅菌試験管に滅菌 PBS 等を 0.3ml 位入れておく。輸送保管中は冷蔵かあるいは 25～35℃に保つ。10～20℃の中途半端な温度では菌は死滅しやすい。長時間（半日程度以

上) 輸送する場合は Stuart 培地に穿刺し、冷蔵する。

## 2) 咽頭ぬぐい液の培地への接種

2本の綿棒を MTM 培地の全面に塗布する。

## 3) 疑わしい集落を血液寒天培地に転培する。

髄膜炎菌の集落は正円形、直径 1~2 mm、灰白色、半透明、表面平滑で光沢がある。エーゼで触れたとき、集落全体が動くような堅い集落、白色で堅い感じの集落、集落周辺が緑がかっている集落および培地に食い込む様な扁平な集落は髄膜炎菌ではない。分離直後は小型の集落 (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>) が多く、長時間または継代により大型、扁平、やや透明な集落 (T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>) となる。  
半透明な集落が平板全面に純培養状に発育する場合もある。

## 4) オキシダーゼ試験およびグラム染色

1. 新鮮集落にオキシダーゼ試験用試薬を直接滴下するか、試薬を滴下したろ紙に新鮮菌を塗抹する。数秒で青紫色に発色すると陽性 (ナイセリア属菌は陽性)

2. Hucker の変法を用いてグラム染色

## 5) 糖からの酸産生性および硝酸・亜硝酸還元試験

1. Kellogg 培地等の平板 1~2 枚全体に菌を発育させ、1 チューブ当たり 2 白金耳程度の菌体をかきとる。ブドウ糖、麦芽糖、ショ糖、果糖、乳糖を 1% に添加した各 CTA 培地表面から 0.5~1 cm 程度までに菌を接種し、接種部を混和、白濁後管底まで穿刺。35~37°C 24 時間培養後、培地上部の黄変で陽性、赤変で陰性 (培地全体の変色は雑菌混入による)

2. Kellogg 培地等で 16~18 時間培養した菌を硝酸塩・亜硝酸塩還元性試験用培地に 1 白金耳程度接種し、35~37°C で 24~48 時間培養。試薬 1 (スルファニル酸

0.8 g .5N 酢酸 100ml)、試薬 2 (N,N-ジメチル-ナフチルアミン 0.5 g .5N 酢酸 100ml) 共に褐色ビンで冷蔵したものを等量混ぜ、その 2 滴を培地に滴下し、数秒後、硝酸塩培地が赤変すれば陽性、あるいは赤変せずに亜鉛末を加えて赤変しないものも陽性、赤変すれば陰性と判定。

ダーラム管中のガスの有無を観察する。生化学的性状を表 1 に示す。

## 6) 酵素プロファイルによる鑑別・同定

ID テスト、ゴノチェックテスト等のキットを用いて補助的に行う。病原性ナイセリア属菌およびモラクセラカタリス等の鑑別には、β-ガラクトシダーゼ、ハイドロキシペロリルアミノペプチダーゼおよびγ-グルタミルアミノペプチダーゼの保有の有無を用いることができる (表 2)。迅速な鑑別や生化学性状が典型的でない株の鑑別に有用。対象とする菌は MTM 培地等の選択培地で発育したオキシダーゼ陽性のグラム陰性双球菌に限られる。

## 7) 菌株の保存

1. 綿棒保存：滅菌綿棒で寒天平板上の 18 時間培養菌を平板からできるだけ多く掻き取り、滅菌スクリーキャップ付チューブに入れて、-20°C~-80°C で冷凍保存。数ヶ月生存。冷蔵保存で 1 週間位、室温で 3~7 日位。保存容器に滅菌シリカゲルを入れるとよい。

2. ゼラチン・ディスク法：菌保存液を真空または常圧下で蒸発させ、ディスク状に乾燥保存。長時間保存可能。

## (2) 標準化検査法の普及

1) 健康保菌者の存在は知られているが、上部気道感染への関与は不明である。また、病院で臨床から提出される咽頭ぬぐい液での細菌検査では通常は髄膜炎菌が対象となることは無い。そこで、E 大学病院、M 病院の医師、検査技師と協議の上、髄膜炎菌検査

法の普及も兼ね、MTM 培地を配布し、通常の咽頭ぬぐい液検体からの髄膜炎菌分離を試みた。前記、標準化培養法を共有した上、疑わしい菌のある場合、当所に伝えることとした。さらに、E 病院耳鼻科医師と協議の上、扁桃腺摘出術を施行した摘出扁桃の供与を受け、その断面をMTM 培地に塗布して分離培養を試みた。

## 2) 中四国衛生研究所細菌検査担当への普及

標準化培養法の普及を目的として、当所にて研修会を開催し、地研担当者の参加のもと実技研修を行った。また、中四国ブロック地研協議会微生物部会において継続的に討議を行い、連絡を密にしている。なお、当ブロックから3地研が、健康保菌者調査に加わっている。

## 3) 倫理面への配慮

特に臨床材料からの菌分離については、臨床医からインフォームドコンセントを行うべく、事前に確認した。

## C. 研究結果

病院材料からの分離培養結果を表3に示す。現在までの所、髄膜炎菌は分離されていないが、E 大学病院検査室および摘出扁桃腺からそれぞれ1株ずつ *N. lactamica* が分離されている。

この試みの実施によって少なくとも担当者へ標準化された髄膜炎菌分離培養法は普及した。また、中四国の各県および政令市における行政での細菌検査の中核である地研担当者への技術研修を通じ髄膜炎菌性髄膜炎の再認識と、髄膜炎菌分離培養法が普及した。

## D. 考察

中四国地研担当者については、研修会に続き、中四国ブロック地研協議会微生物部会や通常の連絡網を通じ情報交換を密にして、標準化した検査法の普及、定着を図った。特に、地研担当者にとっては中四国ブロックレベル、全国レベルでの情報交換が一定の技術レベルを維持し、向上するためには必要だと考える。

また、それぞれの県(市)内病院検査室の実態は不明であるが、経済性と効率性追求の風潮から、細菌検査等外部委託され、多くの県(市)では臨床診断検査能力、公衆衛生検査能力など県内のトータルな微生物検査能力は激減しているのではないかと憂慮される。

当研究の対象である髄膜炎菌については、現在患者発生は僅少で、国内の菌保有状況が不明であり、一方海外での多発、地域流行の現状に鑑み、将来、再興感染症として健康危機を起こす可能性があり、国内での常時細菌学的監視が必要となる。

さらに、髄膜炎菌検査のみに留まらず、感染症法による感染症サーベイランスと予防対策の観点からも、また健康危機管理の観点からも、計画的な感染症検査体制の整備は国民が安全で安心な生活を営む上での重要な行政基盤整備である。

この視点から過去、幾多の障壁を超えて現在に至っている衛生微生物協議会での感染研一地研レファレンスネットワークは、行政的検査体制基盤整備の財産であり、バックボーンとなるもので今後活用と充実、ひいては、国と自治体の壁をとり払った行政一体となった制度に昇華することが望まれる(表4)。

## E. 結論

髄膜炎菌検査法の標準化を通じ、地研および病院検査室への普及を図った。その過程で、臨床検体材料で咽頭ぬぐい液 1/170、摘出扁桃 1/45 にそれぞれ *N. lactamica* を分離した。

また、髄膜炎菌検査に留まらず、行政上の計画的な感染症検査体制整備が重要であり、感染研一地研レファレンスネットワークの制度化が望まれた。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

なし。

## H. 知的所有権の取得状況

なし。

図 1 咽頭からの病原性ナイセリアの分離・同定マニュアル

検体を採取した綿棒で MTM 培地全面に塗抹  
加湿、炭酸ガス培養（ローソク培養）35℃～37℃

20 時間程度培養

疑わしい集落がなければさらに一晩培養

疑わしい集落 2～3 個を個別に釣菌し、血液寒天培地に転培する  
（釣菌する集落数は限定ではない）

18 時間程度培養

オキシダーゼ試験陽性、グラム陰性双球菌

糖からの酸産生性および硝酸・亜硝酸還元性試験

酵素プロファイルによる鑑別・同定

菌株の保存・輸送

表 1 ナイセリア属菌および近縁種の生化学的性状

	オキシ ダ-ゼ	酸産生性					還元性		
		ブドウ糖	麦芽糖	シヨ糖	果糖	乳糖	硝酸塩	亜硝酸塩	ガス産生
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	+	—	—	—	—	—	—	—
<i>N. meningitidis</i>	+	+	+	—	—	—	—	—	—
<i>N. lactamica</i>	+	+	+	—	—	+	—	+	+
<i>N. polysaccharea</i>	+	+	+	—	—	—	—	+	+
<i>M. catarrhalis</i>	+	—	—	—	—	—	+	+	+

表 2 髄膜炎菌の鑑別に用いる酵素プロファイル

	$\gamma$ -glutamyl aminopeptidase	Hydroxyprolyl aminopeptidase	$\beta$ -galactosidase
<i>N. meningitidis</i>	+	/	—
<i>N. gonorrhoeae</i>	—	+	—
<i>N. polysaccharea</i>	—	+	—
<i>N. lactamica</i>	—	/	+
<i>M. catarrhalis</i>	—	—	—

/ : 鑑別に用いない

表 3 臨床材料からの病原性ナイセリア菌分離培養結果

病 院	検査実施施設	材 料	検査数	分離数
E 大学病院	同病院検査室	咽頭ぬぐい液	170	1( <i>N. lactamica</i> )
M 病院	同病院検査室	咽頭ぬぐい液	40	0
E 病院	当所	摘出扁桃	45	1( <i>N. lactamica</i> )

表 4 地研—感染研のレファレンス活動の推移と望ましいあり方

草 創 期	現 状	望 ま し い あ り 方
<ul style="list-style-type: none"> <li>・主として研究者個人間の コンサルタント的役割</li> <li>・予研、地研とも経費、労力 で多大な負担とならない事</li> <li>・現状業務に若干プラス程度 の活動</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・支部センター活動 エンテロウイルス 溶連菌 カンピロバクター</li> <li>・委員会活動 レファレンス開発（試薬等） マニキュアル作製 等</li> <li>・希少感染症技術向上事業研修 評価：病原微生物検出情報等 日常活動をサポート</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・事業から制度へ</li> <li>・システムとして検査の質の保証</li> <li>・行政における検査能力の向上と質 の保証</li> </ul>

## 8. 手足口病及びヘルパンギーナの検査法に関する 開発・改良についての研究

分担研究者 宮崎 豊 愛知県衛生研究所長  
協力研究者 山下 照夫、桃島 由佳、伊藤 雅、栄 賢司  
(愛知県衛生研究所)

**研究要旨** エンテロウイルスの全血清型63種のうち遺伝子翻訳開始部位から400塩基（VP4全域とVP2の一部：VP0）の配列が未だ報告されていない41血清型について、その標準株を用いて塩基配列の決定を試みた。既に公表されている22種の血清型についての塩基配列と今回我々が得た結果を合わせて解析したところ、63種の血清型ウイルスは4つのグループに分けられ、それぞれA～D群のヒトエンテロウイルスの分類と一致した。また、実際に分離されたヒトエンテロウイルスA群53株（8血清型）について、同様の系統樹解析を行なったところ、それぞれの血清型と一致したグループに分類することができた。さらに、中和反応によっては血清型別分類が不能であった25株も塩基配列の系統樹解析によりCA16型とEV71型に分離可能であった。以上の結果から、遺伝子解析による血清型別分類はエンテロウイルスの診断において有効な手段となる可能性が強く示唆された。

### A. 研究目的

エンテロウイルスは小児感染症の原因ウイルスの一つで、感染症発生動向調査の対象疾患としては無菌性髄膜炎、脳炎、手足口病、ヘルパンギーナ等の起因ウイルスとして知られている。本ウイルスは中和反応による血清型別により63種類に型別分類されているが、その血清型により病気との関わりや流行に相違がある。したがって型別分類を実施することは公衆衛生上も重要なことと考えられるが、その為の中和反応を行なうには組織培養の技術が必要なだけでなく、63種全ての抗血清を常備する必要があり、また、多くの労力と時間も必要となる。一方、遺伝子解析技術の進歩に伴い、最新のウイルス分類学においては遺伝子型を主体とした分類が進められている。そこでエンテロウイルスの血清型別分類を遺伝子型で実施することが多くの研究者から提案されている。同ウイルスの遺伝子解析では、VP1領域については全ての血清型の塩基配列が既に報告されているが、VP4領域について

は石古らの報告があるものの、41種類の血清型については未だその塩基配列についての報告はなされていない。そこで本研究においては、これら41種類の血清型のウイルス標準株を用いて、そのVP4～VP2の一部にいたる領域400塩基（VP0領域）の配列の決定を試みるとともに、実際の分離株について遺伝子の塩基配列に基づく血清型別分類が可能か否かについて検討を加える。また、一般的には最も中和反応との関係が深いとされるVP1領域を用いた型別分類法と比較することで、VP0領域を用いた型別分類法の問題点についても検討を加える。

### B. 研究方法

国立感染症研究所から分与されたコクサッキーウイルスA（CA）1～8、10～15、17～20、22 および 24 型、エコーウイルス 2、3、7、13～21、24、26、27、29、および 31～33 型、エンテロウイルス 68 および 69 型を乳の



みマウスあるいは細胞培養にて培養した。乳のみマウスは PBS(-)にて 10%乳剤とした後、遠心し、その上清に等量のクロロホルムを加えて処理した後、ポリエチレングリコール (8%)、と食塩 (0.5M) を加え、4℃にて一晩放置した。10,000 rpm、10 分間遠心した沈渣を遠沈前と同量の滅菌蒸留水に再浮遊した。ウイルス培養細胞は凍結融解を繰り返したのち、10,000 rpm、10 分遠心分離した上清を用いた。

供試したウイルスは、2000 年～01 年の感染症発生動向調査の病原体検査により手足口病およびヘルパンギーナ患者から分離されたヒトエンテロウイルス A 群に属するウイルス 53 株 (CA2 型 5 株、4 型 4 株、5 型 4 株、6 型 3 株、8 型 13 株、10 型 3 株、16 型 5 株、エンテロウイルス (EV) 71 型 16 株) と、未同定ウイルス 25 株の計 78 株で、これらの株を上記の方法と同様に処理した。

各ウイルス液から TRIzol LS Reagent (Gibco BRL) を用いて RNA を抽出し、Oligo dT とランダムプライマーを用いて cDNA を作成した。PCR 法は石古らが使用したのと同じ VP4 領域の前後を増幅する Olive らのプライマーを用い、その配列 (翻訳開始部位から 400 塩基: VP0) を決定した。その他の標準株の塩基配列は公的データベース (GenBank, EMBL, DDBJ) から得た。各塩基配列は市販の遺伝子解析ソフト (GENETYX) にて解析した。

### C. 研究結果

標準株 41 株と分離株 78 株全てから PCR 産物が得られ、その塩基配列が決定できた。今回の我々の解析結果と既に報告されているデータとを合わせて、中和反応によるエンテロウイルスの全血清型 63 種類について標準株の VP0 領域の塩基配列 (400 塩基) について系統樹解析を実施した。その結果、これらの標準株は系統樹上 4 つのグループに分かれ、各グループはウイルス分類学における A～D 群ヒトエンテロウイルスの分類と一致した。また、分離株 78 株のうち中和反応により血清型の判明した 53 株について系統樹解析を行なった結果、それぞれ各血清型の標準株と同じクラスターに収束された (図 1-A)。ほとんどの血清型では信頼性の指標となる Bootstrap 値は 90% 以上であったが、CA6 型と CA10 型はそれぞれ 76% と 56% と低い値であった。CA6 型についてその相同性を比較したところ、CA6 型標準株に対しては 79% であったのに対し、CA10 型標準株とも 76.5%

と比較的高い値を示した。一方 CA10 型分離株は、同型標準株に対しての相同性は 76.5% と比較的低かったが、CA6 型標準株に対しては 74.2% の値を示していた。

一方、未同定ウイルス 25 株は全て手足口病患者由来であったが、遺伝子解析の結果 20 株が CA16 型、5 株が EV71 型に分類された (図 1-B)。これらの株と血清型別分類株から実際に分離された CA16 及び EV71 ウイルスとの相同性を調べたところ、CA16 及び EV71 の全ての株において 95% 以上あった。このことから、中和反応によって血清型別分類が可能な株と不可能な株の間にも、遺伝子型としては違いないことが明らかとなった。したがって、中和反応による血清型別分類が不可能な場合でも、今回我々が示した VP0 領域の塩基配列に基づく血清型別分類が高い信頼性をもって実施可能なことが示された。

### D. 考察

今回の検討の結果、A 群ヒトエンテロウイルスについては、VP4 と VP2 上流 (VP0 領域) の 400 塩基の配列を比較した系統樹解析により、血清型別分類が可能なことが強く示唆された。しかし、CA6 型や CA10 型のように標準株との相同性が比較的低いだけでなく、血清型の異なる標準株と比較的相同性が高いものが存在することも明らかとなった。したがって、その他の血清型の株においても同様な現象が現れる可能性も十分に考えられる。今後さらに検体数を増やし、VP0 領域の塩基配列の解析による血清型別分類の精度を確認する必要があると考えられた。

近年、EV71 型による手足口病が重症化し、脳炎や死に至る例も報告されている。一方、CA16 型や CA10 型も手足口病を発症するが、重症化するとの報告はない。したがって、我が国に於ける手足口病患者の重症化の可能性及びその割合を知るためには、分離ウイルスの正確な型別分類が必要と考えられる。しかしながら、今回の供試株のうち未同定であった 25 株全てが手足口病患者由来であったことから判るように、これらのウイルスでは中和反応による血清型別分類が困難な場合がしばしば存在する。そのような場合、今回我々が示したように VP0 領域を用いた遺伝子解析による血清型別分類法は一層有効な手段と期待される。

また、CA2～8 型、および 10 型ウイルスはヘルパンギーナを引き起こすことで知られるが RD-18S 細胞を用いても分離培養が困難なも

のが多く、乳のみマウスを使った検査が必要とされる。しかしながら、その中和反応には多数の乳のみマウスが必要となることから、今回我々が試みた遺伝子解析による血清型別分類は実験動物の使用数を減らす意味においても重要であろう。また、今後は直接患者検体からウイルス遺伝子を回収し、その血清型別分類を遺伝子解析によって行なうことも検討に値すると考えられる。

## E. 結論

ヒトエンテロウイルスA群のVP4とVP2上流(VP0領域)の400塩基の配列を比較した系統樹解析により、血清型別分類が可能であった53株(8血清型)の分離ウイルスを血清型と一致したグループに分類することができた。また、血清型別分類が不能であった25株についても遺伝子解析の結果CA16型とEV71型に分類可能であった。今回の結果から、遺伝子解析による血清型別分類はエンテロウイルスの診断において有効な手段となる可能性があることが強く示唆された。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yamashita, T., M. Ito, H. Tsuzuki, K. Sakae: Identification of Aichi virus infection by measurement of immunoglobulin responses in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 39: 4178-4180, 2001.
2. Sasaki, J., Y. Kusuhara, Y. Maeno, N. Kobayashi, T. Yamashita, K. Sakae, N. Takeda, K. Taniguchi: Construction of an Infectious cDNA Clone of Aichi Virus (a New member of the family Picornaviridae) and mutational analysis of a stem-loop structure at the 5' end of the genome. *J. Virol.* 75: 8021-8030, 2001.

### 2. 学会発表

1. 山下照夫、伊藤 雅、椛島由佳、都築秀明、榮 賢司：ウシ由来と思われる新型コブウイルスのRT-PCR法による検出抗体保有状況。第49回日本ウイルス学会学術総会 大阪 2001.10.18-20.
2. 伊藤 雅、山下照夫、椛島 由佳、都築秀明、榮 賢司、新井礼子、篠川 旦、長谷川斐子：RT-PCR法による Parechovirusの同定について。第49回日本ウイルス学会学術総会 大阪 2001.10.18-20.

## H. 知的所有権の取得状況

なし。

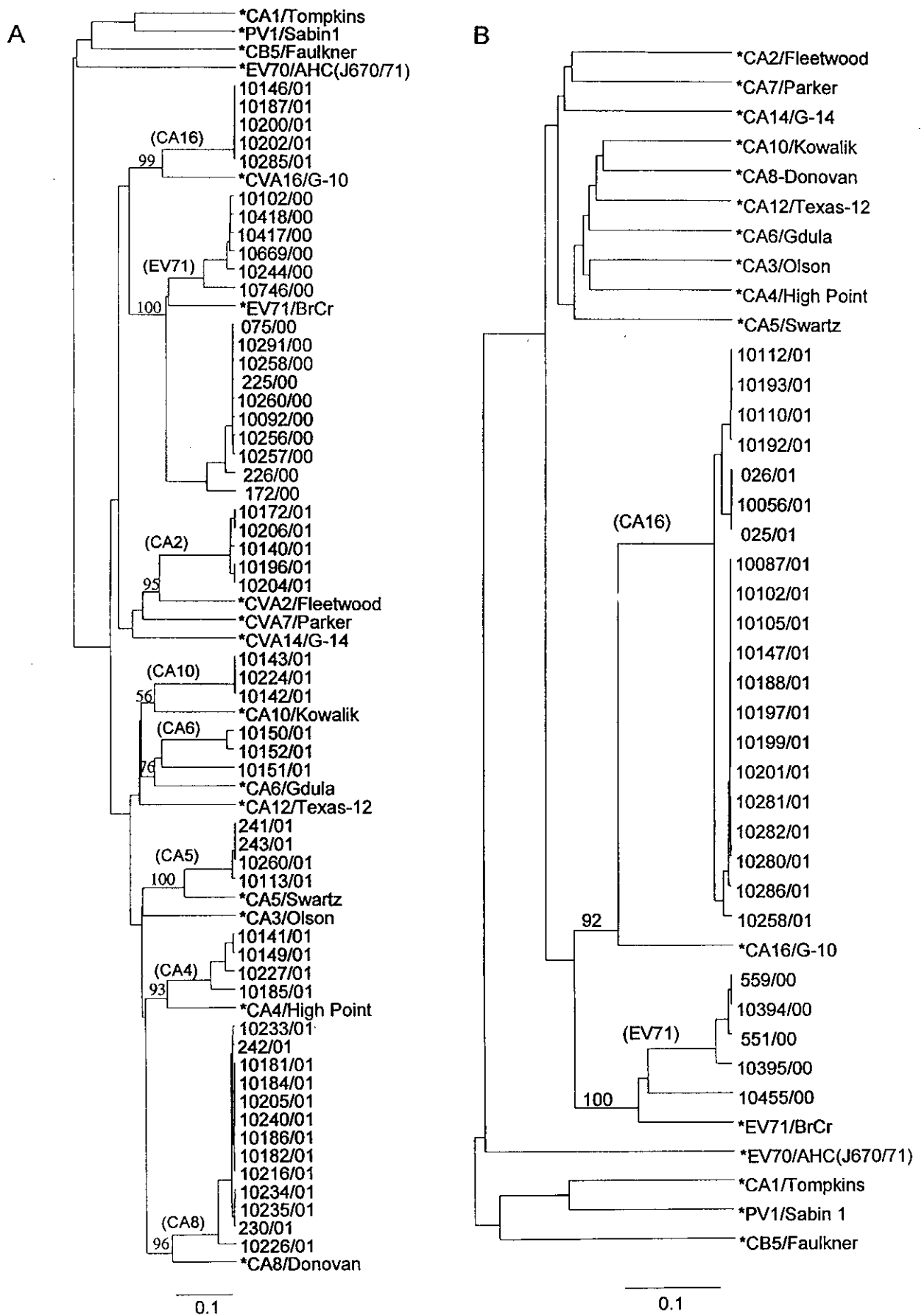


図1 分離株 (A : 血清型別同定株、B : 同・未同定株) のVP0領域の塩基配列による系統樹解析 (UPGMA法) \* : 標準ウイルス株

## 9. 診断・検査法の普及に関する研究

分担研究者	岡部 信彦	国立感染症研究所感染症情報センター長
共同研究者	山下 和予	同上主任研究官
	斎藤 剛仁	同上
	加藤 信子	同上技術補助員

**研究要旨** 分担研究者および共同研究者の所属する感染研感染症情報センターでは、疾患サーベイランスとともに病原体サーベイランスを行っている。平成12年度には、個別患者および集団発生ごとの個票がオンラインで情報センターに集まり、全国で分離された病原体に関し疾患別、病原体別、発生状況別などについて検体採取日順に並べた一覧表を作り、これを厚生省WISHネットに掲載するようになった。保健所、地研などではこれらの集計された還元情報が速やかに得られるようになった。一般への情報提供としては、これらのうち重要と思われるものについて随時図表化するなどして、ホームページ上に掲載するようにしている。平成13年度には、これらに関するシステムの一部変更などが行われた。感染研および地研が協力して診断・検査マニュアルの作製が行われているが、感染症情報センターでもその一部を担当し作成中である。検査法を含めた感染症対策に関する講習会の実施などについては、現在感染症情報センターにおいて、全国あるいは各地を対象とした感染症危機管理研修会の開催などを行っている。

### A. 研究目的

近年、感染症は国民の健康にとり益々大きな脅威となっている。感染症の発生情報を正確に把握し、その結果を国民や医療関係者に的確に提供することは、感染症の制圧に向け最も重要な方策の一つである。新たに、施行された「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（感染症法）」においては、73疾患について全数ないし定点からの報告が義務づけられている。診断にあたっての臨床所見の重要性は言うまでもないが、血清および病原体診断の確定診断における持つ意義は大きい。血清や髄液中の特異抗体を調べる方法としてELISA、HI法、中和法等が用いられ、一方、病原体診断においても病原体分離やPolymerase chain reaction（PCR）等種々の方法が用いられる。しかし、診断方法の選択は施設ごとに異なっている場合が多い。さらに、同様の方法を用いていたとしても、

多くの場合全国的に標準化されたものではなく、精度、特異性やレファレンスは施設ごとに異なっていることが多い。このことは、種々の感染症の発生に関する情報の信頼性を損なうことにもなりうる。本研究においては、このような問題を解決するために、上記73疾患を中心として、以下の4点を目的として行うものである。（1）各感染症に対する血清および病原体診断法を確立、あるいは再検討する、（2）広く行われている診断・検査法については標準化、精度管理のシステムを構築する、（3）診断・検査法を全国的に普及させるための基礎資料を作製する、（4）検査法マニュアル作製の基礎資料を作製する。以上のように、本研究は、感染症の診断・検査をとおして、その制圧に直接的に関わるものである。従って、国民の保健・医療の向上に大きく貢献するものである。

分担研究者は、ことにこれらの情報の収集と提供という点が主な担当となっている。

## B. 研究方法

平成11年4月に施行された感染症の予防及び感染症の患者の医療に関する法律（感染症法）では、サーベイランスシステムの強化が示されている。また感染症を正しく把握し的確に対応するためには病原体に関する情報も重要であり、患者発生状況サーベイランスと同様に病原体に関する情報の収集、分析及び提供と公開も必要であることが同法では明確にされている。さらに、提供・公開していく内容は一般国民や第一線の医療現場にいる者にとって有益な情報になること、とされている。感染症法では対象疾患を1-4類に類型し、そのすべてが感染症サーベイランスの対象疾患となっている。得られた情報は各地域でも解析・還元されるが、保健所⇒都道府県等⇒厚生省⇒感染研、地研⇒感染研がそれぞれオンラインで結ばれ、厚生省および感染研で国全体のデータとして解析し、還元が行われている。国全体の情報は中央感染症情報センターである感染研感染症情報センターがとりまとめて情報還元を行うことになっているが、都道府県等の単位については地域におけるより詳細な感染症情報の分析と提供のために、地方感染症情報センターが整備されつつある。病原体情報については、地方衛生研究所（地研）で分析された結果が同じく国を経由して感染症情報センターに通知されることになっている。感染症情報センターでは病原体情報についても、同様にそのデータを集計、解析して情報の還元を行っている。これらの情報はWISH ネットを使ったクローズドな情報提供と、ホームページを利用した広い情報提供の二つの方法がある。本研究は、これらを利用してより有効な情報の提供を図ろうとするものである。

### （倫理面への配慮）

本研究では、取り扱う情報の中に個人が特定されるような情報が含まれたとしても、それを研究の結果として含むようなことはしない。従って研究成果の公表にあたって個人的情報が含まれることはない。万一個人的情報が本研究の中に含まれる場合には、それに関する機密保護に万全を期するものである。

## C. 研究結果

2000年1月からは、個別患者および集団発生ごとの個票がオンラインで感染症情報センターに集まり、全国で分離された病原体に関し疾患別、病原体別、発生状況別などについて検体採取日順に並べた一覧表を作り、これを厚生省WISHネットに掲載するようになった。その結果、保健所、地研などではこれらの集計された還元情報が速やかに得られるようになった。一般への情報提供としては、これらのうち重要と思われるものについて随時図表化するなどして、ホームページ上に掲載している。

平成13年度は、病原体情報システムの改善のために、衛生微生物技術協議会検査情報委員会などを介して地研各ブロックにおける意見要望などをまとめ、インフルエンザ分離情報入力改善のためのVersion4.2配布（平成13年10月）、WISH-Net無手順接続廃止に伴う通信部分のシステム変更に伴う連絡およびVersion4.3への修正（FDおよびアニュアルの配布、平成14年1月）、Version4.3に発生した不具合修正のための機能改善システムVersion4.4の配布を行った（平成14年2月）。なおこれらの研究および実施は、本研究班単独によって行っているものではないため、その内容の一部には他研究班の報告書と重複の可能性があることを申し添えておく。

感染研内あるいは公的な研究班などで診断・検査マニュアルの作製が行われたものについて、感染症対策およびサーベイランスに関与あるいは感染研・地研の業務にかかわりが大きく、その方法を速やかに広く伝える必要があると思われるものについては、情報センターのホームページ上で、これを掲載しているところである。これまでに平成11年度科学技術振興調整費「院内感染の防止に関する緊急研究」報告書（PDF版）、溶血レンサ球菌レファレンスセンター報告書（PDF版）、衛生微生物協議会小レファレンス委員会「ジフテリア予防対策マニュアル」などがホームページ上に掲載されている。現在本研究班の活動として、感染研および地研が協力して診断・検査マニュアルの作製が行われているところであるが、感染症法対象疾患すべてについて完成した場合、情報センターのホームページにこれをすべて掲載することは物理的に困難であり、情報の提供先を別途考慮する必要がある。

この診断・検査マニュアルについて分担研究者は、流行性角結膜炎、咽頭結膜熱、マラリア、突発性発疹症、伝染性紅斑などを感染症

情報センターとして担当し、現在進行中である。

検査法に関する講習会、実施などについては、現在感染症情報センターにおいては、毎年1回全国の感染症危機管理研修会の開催を行っている。対象は全国都道府県・指定都市の衛生主幹部局および管内保健所の医師である。平成13年度も2日間にわたり、受講者約130名を対象に感染症に関する研修を行った。

## D & E. 考察と結論

病原体情報については、地方衛生研究所（地研）で分析された結果が同じく国を經由して感染症情報センターに通知されていたが、従来その結果は最初の情報収集者である保健所あるいは地研、地方感染症情報センターなどに還元されるためには、長時日を要していた。2000年1月からは、個別患者および集団発生ごとの個票がオンラインで情報センターに集まるようにシステムが改善されたため、全国で分離された病原体に関し疾患別、病原体別、発生状況別などについて検体採取日順に並べた一覧表を作り、これを厚生省WISHネットに掲載するシステムが構築されるようになった。その結果保健所、地研などではこれらの集計された還元情報が速やかに得られるようになった。しかし、その利用度はまだそれほど高いものではなく、情報提供である我々側の情報の作成方法の問題などとともに、受けて側の電子化および端末の機械の問題など、今後改善すべき課題も多くある。そのために病原体情報システムの改善を目的として、衛生微生物技術協議会検査情報委員会などを介して地研各ブロックにおける意見要望などをまとめ、逐次システムの改善修正のための研究実施を行い、より効率の良い質の高いサーベイランスの実施を目指しているところである。但しこのためにはサーベイランス全体の広範な領域にその対象が及ぶため、これらの研究および実施は、本研究班のみではなくその他の研究班活動に支援も受けながら総合的に行っており、報告内容の一部には他研究班への報告書と重複の可能性がある。

感染症情報センターホームページのアクセス件数は月およそ1万以上と高くなっており、医療機関、保健行政機関、研究検査機関、教育機関、メディア、一般国民など、広く利用されつつある。その中で、公的な研究班などで作成された感染症の診断などに関するマニュアル等の掲載は、感染症診断のための知識の啓発、技術の普及のために有用である。し

かし、今後これらをすべて掲載していくことは不可能であり、新たなサーバーあるいはウェブの設置など、将来に向けての検討が必要である。

感染症情報センターで行っている感染症危機管理研修会は、都道府県・指定都市の衛生主幹部局および管内保健所の医師が対象であり、受講者の数は限られている（1回120-140名）。しかし受講者は、地域に戻り地域での研修会を開催するなど、活発な動きとなっており、情報センターはこれを積極的にバックアップするようにしている。実際に受講者がその後研修会などで発表されたものと類似の感染症発生時例に遭遇し、直ちに地域および感染研と連携して積極的実地疫学調査および病原体検索を行い、アウトブレイクの対応に寄与したという事例が増加しつつある。今後感染症への適切な対応が可能になる人材がさらに育って行くことが期待される場所である。

感染研、地研、病院検査室、大学、民間検査施設への診断・検査法の普及のための、講習会や実習のシステムを構築するためには、これらのノウハウを利用することも含め、さらなる議論を重ねることが必要である。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 感染症情報センターホームページ  
<http://idsc.nih.go.jp/index-j.html>
2. 感染症発生動向調査について -感染症法と感染症サーベイランス- 岡部信彦 厚生の指標 48(6):1-7, 2001.
3. 感染症法から見た新興・再興感染症 岡部信彦 日本内科学会雑誌 90(9):1733-1737, 2001.
4. インターネットによるインフルエンザ患者発生の毎日報告システム 斎藤剛、藤井紀男、桑崎俊昭、中谷比呂縦、重近範行、中村 修、進藤奈邦子、岡部信彦 日本医事新報 4041:11-16, 2001.
5. インフルエンザ迅速抗原検出検査及びインターネットを用いた「MLインフルエンザ前線データベース」の試み 砂川富正、大山卓昭、岡部信彦、西藤

成雄 ISR 22(12):315-316, 2001.

H. 知的所有権の取得状況

なし。

## 10. 麻疹ウイルス診断・検査法

### 野外麻疹ウイルスの分離と遺伝子型解析 及び

#### ゼラチン粒子凝集法（PA法）を用いた新しい麻疹IgM抗体測定法の開発

分担研究者 田代 真人 国立感染症研究所ウイルス製剤部長  
協力研究者 佐藤 威 国立感染症研究所ウイルス製剤部主任研究官

**研究要旨** WHOにより世界的な麻疹撲滅計画が進められている。そのためには、麻疹感染の有無の診断を正確に行う必要がある。第一番目に、現在我が国で流行している麻疹ウイルスを分離し遺伝子型別を行う事により、日本国内での野外麻疹ウイルスの流行状況の把握を行った。第二番目に、血清疫学的な検査法では、ウイルス感染後早期に出現するIgM抗体の測定が重要である。また、世界的麻疹根絶計画では簡便で低価格のIgM抗体測定法が要求されている。流行予測事業の麻疹抗体測定法に用いられているゼラチン粒子凝集法を応用しIgM抗体測定法の開発を行った。

#### (1) 野外麻疹ウイルスの分離と遺伝子型解析

##### A. 研究目的

我が国では、麻疹ワクチンの定期接種（1978年）が導入されて以来、麻疹の流行規模は減少している。しかし、依然として毎年4月から5月に患者数がピークになっている。最近では年間を通して日本各地で小規模な流行が発生している。一方、麻疹は主に幼児が感染し「二度掛かりなし」と認識されてきたが、数年来成人が麻疹に感染する症例報告が増えている。成人麻疹では肺炎や脳炎、消化管出血などの合併症を伴い、重症になりやすく重要な問題となっている。また、ワクチン接種によって抗体陽性となった後に免疫が低下し麻疹に罹患するSecondary vaccine failureや、新生児麻疹、妊婦麻疹等も重要な問題となっている。

一方、世界の麻疹患者報告数は年間約60万人と報告されている。また、発展途上国では麻疹感染による乳幼児の死亡が毎年数10万人以上になっており深刻な問題となっている。WHOによる世界的な麻疹撲滅計画が進められているにもか

かわらず、世界における麻疹ワクチンの接種率は、依然として低迷している。WHOでは麻疹撲滅計画にあたって、1) 麻疹ワクチンの接種率の向上、2) 補足的な麻疹ワクチンの接種(catch-up, keep-up, and follow-up)の実施、3) 麻疹サーベイランスの強化。これら3点の重要性を強調している。

野外麻疹ウイルスの分離と遺伝子型の研究では、1998年WHO“Standardization of the Nomenclature for Genetic Characteristics of Wild-type Measles Viruses”の会議において、野外麻疹ウイルス分離株の分子疫学的解析によってウイルスの命名法の世界的統一が提案された。1998年からN遺伝子のC末端450塩基の違いに基づいて、世界の麻疹ウイルスの遺伝子型を15型に分類した。しかし、2001年になってさらに改定され、2001年には20の遺伝子型に分類されるようになった。

この研究では、ウイルス分離法、遺伝子解析法の確立について検討を行った。



## B. 研究方法

(倫理面への配慮)

臨床検査材料は、患者（成人麻疹）または、患者（幼児）の両親との間でインフォームドコンセプトを経た後に、ウイルス分離、麻疹抗体測定(PA、PA-IgM)、リンパ球数等の血液成分の検索のため、EDTA血液、咽頭ぬぐい液を採取した。また、一方では、各地方衛生研究所からの感染症研究所ウイルス製剤部への検査依頼サンプルの抗体測定や分離ウイルスの遺伝子解析を行った。

## C. 研究結果

### 1. ウイルス分離材料：

2001年4月から10月までに感染研にウイルス分離依頼のあった検体と各地方衛生研究所に於て霊長類マーマセットのリンパ球B95a細胞に接種し野外ウイルス株の分離を行った。材料を細胞に接種後培養液を交換しながら少なくとも2～3週間の観察を行った。

ウイルス分離材料は、1) EDTA採血した血液、2) 咽頭ぬぐい液、3) 尿、等が適している。ウイルス分離材料の輸送は、EDTA採血した血液は常温の状態に輸送する。咽頭ぬぐい液は綿棒等で採取し2%牛胎児血清を加えたイーグル培地に入れドライアイス等で凍結した状態で輸送する。尿についても同様に凍結した状態で輸送する。ウイルス分離材料の輸送は、公共の交通システムを利用する事になるので、輸送にあたっては材料の梱包は液もれや容器の破損がないように充分な注意が必要である。

### 2. ウイルス分離材料の採取時期：

検体採取後感染研に到着し細胞接種までに要した日数は、咽頭ぬぐい液や尿の場合には、ドライアイス等で凍結した状態で輸送されるのでほとんどの場合問題がない。

EDTA採血した血液の場合には、採取後直ちに細胞接種するのが望ましい。しかし、郵便や宅急便で輸送する場合には、検体採取後細胞接種までに要する時間や日数が短時間である事が必要である。

### 3. ウイルス分離結果：

日本の各地で分離されたウイルスは、札幌（6株）、秋田（1株）、埼玉（1株）、東京（10株）、川崎（4株）、横浜（1株）、和歌山（4株）、島根（7株）、西宮（3株）、宮崎（3株）、長崎（4株）、沖縄（7株）であった。

島根と沖縄の分離ウイルスは、各衛生研究所で分離された。また、札幌、秋田、埼玉、川崎、横浜、和歌山、西宮、宮崎、長崎の分離ウイルスは、EDTA採血した血液より分離した。血液サンプルは各地から感染研に郵送された。遠隔地からの血液サンプルの輸送では、採血から細胞接種までの日数とウイルス分離の例を示すと、採血後1日目4/4、2日目9/13、3日目3/4、4日目5/8、5日目1/1例にウイルス分離が可能であった。ウイルス分離は材料採取後4日から5日目までの血液サンプルでも可能であった。この事は発展途上国等での細胞培養施設のない医療現場からの材料のウイルス分離には有効な方法と考える。

### 4. 年令分布：

最近ウイルス分離した患者の年令分布は、1才以下（7人）、2～3才（10人）、4～6才（10人）、7～10才（7人）、11～20才（8人）、21才以上（9人）であった。

年令分布は幼児から成人に至るまで幅広くウイルス分離が可能であった。

ウイルス分離陽性となった材料は、直ちに麻疹標準抗血清を用いて同定試験を行う。

### 5. 遺伝子型

遺伝子型はN遺伝子のC末端(1,230～1,685)の塩基配列から遺伝子型をCLUSTAL W (解析ソフト)を用いて系統樹を作成した。図1に示すように、遺伝子型は日本全国ほとんどの地域でD5型であった。一方、すべての株が沖縄ではD3型であった。D3型は2000年には東京、高知等でも分離されていた。また、今回の解析では川崎（7月2日、27週）と、東京（7月21日、29週）で、遺伝子型H1が分離された。また、10月には静岡でもH1型が分離された。H1型はWHOの報告では中国や韓国の流行株である。日本は麻疹ウイルスの輸出国とされているが、日本にも近隣諸国から入って来ていると思われる。なお、今後H1型が日本国内でどのように広がるかについては、さらに長期間の追跡が必要である。

## 6. 野麻疹ウイルス分離株の命名法

MVi/City.Country/Weeks-Year/ Strain number [Genotype]と表示する。

Mvi :

ウイルス分離を組織培養によって得た場合。  
(Mvs : 臨床材料のRNAからウイルス遺伝子を検出した場合。)

City :

市名、あるいは県名

Country :

国名 (WHOでは3文字を推奨している。)

Weeks :

ウイルス分離のために材料を採取した週を1年を52週として表記する。

Year :

ウイルスを分離した西暦。

Strain number :

ウイルス分離の場所及び週が同一の場合には整理番号を付ける。

Genotype :

遺伝子型を、CLUSTAL W (解析ソフト)を用いて系統樹を作成する。

特殊な臨床材料からのウイルス分離した場合にはGenotypeの後に記載する。

(MIBE)

measles inclusion body encephalitis

(SSPE)

subacute sclerosing panencephalitis

## 参考文献

1. WHO, Weekly epidemiological record No. 32, 2001, 76, 241-248.
2. WHO, Weekly epidemiological record No. 33, 2001, 76, 249-256.

## (2) ゼラチン粒子凝集法 (PA法) を用いた新しい麻疹IgM抗体測定法の開発

### A. 研究目的

麻疹ワクチン接種効果の評価や流行予測事業等の疫学調査を行う際、麻疹ウイルスに対する感染防御能を知ることが必要である。そのためには、血清疫学試験が有効な手段である。試験法としてはいくつかあるがそのうち中和法は、麻疹ウイルスに対する感染防御能を的確に知ることが出来ると云われているが判定に長時間を要する。また、現在のところ標準測定法がない。ELISA法、蛍光抗体法は感度が高い反面非特異反応が出やすい。また、高価な測定装置を必要とする等の点で標準化が困難である。HI法は、非特異反応がない事や、多数の血清サンプルを同時に扱いやすい事から麻疹抗体測定法として標準化されてきた。しかし、HI法は中和法に比べて感度が低く、最近入手困難となっているアフリカミドリザル血球を使用するため、一般の研究室や検査室では、HI抗体測定に支障を来している。このためにHI試験法に代わる抗体測定法の開発が必要である。すでに、我々は赤血球凝集抑制 (HI) 試験法よりも簡便で感度、特異性にすぐれているゼラチン粒子凝集 (PA) 法を開

発した。このPA法を用いて感染症情報センターでは麻疹流行予測事業による疫学調査が行われている。

一方、WHOによる麻疹根絶計画において、IgM抗体の簡便な測定法の開発が求められている。風疹、デング、パルボB19、ヘルペスウイルス (HSV-6 or 7)等の麻疹以外のウイルスによる熱性発疹性疾患と区別するためにはIgM抗体測定による診断が必要である。通常、ウイルス感染症の早期診断ではIgM抗体捕捉酵素抗体 (ELISA) 法が一般的な測定法として用いられている。我々は、測定法の標準化の難しいELISA法にかわる簡便なIgM抗体測定法の開発を試みた。簡便なIgM抗体測定するために、このPA法にIgM抗体捕捉酵素抗体法を応用して麻疹に対するIgM抗体 (以下PA-IgM法) 測定法の開発を試みた。

(倫理面への配慮)

臨床検査材料は、患者 (成人麻疹) または、患者 (幼児) の両親との間でインフォームドコンセプトを経た後に、ウイルス分離、麻疹抗体測定 (PA、PA-IgM)、リンパ球数等の血液成分の検索のため、EDTA血液、

咽頭ぬぐい液を採取した。また、一方では、各地方衛生研究所からの感染症研究所ウイルス製剤部への依頼サンプルの抗体測定や分離ウイルスの遺伝子解析を行った。

## B. 研究方法

IgM抗体捕捉を用いたPA-IgM法は、U底96穴マイクロプレートに抗ヒトIgM抗体を固相化した。0.5%カゼイン-PBSで麻疹患者血清を2倍階段希釈（10倍～20,480倍）し、室温3時間静置した。プレートを0.05% PBS/Tで5回洗浄後、麻疹ウイルス（豊島株）感作ゼラチン粒子（50 $\mu$ l）を加え、室温で一晩静置した。抗ヒトIgM抗体に捕捉された血清中のIgM抗体と麻疹ウイルス感作ゼラチン粒子が吸着した場合にはゼラチン粒子の凝集像が認められ抗体陽性と判定し、一方、抗体陰性の場合にはボタン状となって区別することができる。抗体価は検体希釈の終末点の逆数から求めた。

## C. 研究結果

### (1) 麻疹自然感染者のIgM抗体の検出

麻疹自然感染者の血漿あるいは、血清サンプルのPA-IgM抗体価の測定をした。IgGとIgM抗体を含むPA抗体の測定では、発疹出現後第1日目から高い抗体価が検出され5日目までの間に全例陽性となった。また、PA抗体価の上昇は発疹出現後から約3ヶ月間続いた。IgM抗体は発疹出現後第3から5日目までに全例が陽性となった。IgM抗体価は発疹出現後約7から14日目までに最高値に達し、14日目から徐々に抗体価が減衰し約3ヶ月で検出されなくなった。PA-IgM抗体は発疹出現後5日目以降ではすべての麻疹患者のIgM抗体が陽性となった。また、発疹出現後1日から5日目までの約半数は、PA抗体価が<16と陰性にもかかわらず、IgM抗体価が高く測定される（図2）。従って、感染初期の発疹出現後から5日目まで及び、発疹出現後30日以後はPA-IgM法よりもIgM抗体捕獲ELISA法が高感度に測定出来る。また、アイソトープを標識した麻疹ウイルス感染細胞の抽出液と発疹出現後1日から5日目までの早期の血漿サンプルの免疫沈降法とSDS-電気泳動法の解析

により、この早期のIgM抗体は麻疹ウイルスの内部蛋白質NP抗原と反応した。ウイルス粒子表面蛋白質であるH蛋白質に対する抗体は遅れて出現した。また、3ヶ月後にはIgMに対する免疫沈降法でも全く検出されなくなった。

### (2) 麻疹ワクチン接種者のIgM抗体

弱毒生麻疹ワクチン接種後、PA法によるIgM抗体は10日目以降に検出されるようになる。14日目に抗体価がピークに達する。しかし、ワクチン接種後約3週目にはほとんどの接種者のIgM抗体価の低下が認められる。従って、弱毒生麻疹ワクチン接種者のIgM抗体の持続期間は自然感染の場合と較べて短期間であった。またIgM抗体価が著しく低い事がわかった。

## D. 考察

本法は、凝集パターンを判定する事によって麻疹ウイルスに対するIgM抗体価を測定する事に特徴がある。また、ELISA法と異なり複雑な操作や高価な測定機器を使用せずにマイクロピペット1本で測定が可能である。手技が簡単であり電気を必要としない事でどんな場所でも測定可能である。また、最終判定は凝集パターンを肉眼的に観察する事によって行える。従って、PA抗体価とIgM抗体価の両者間で比較する事が可能となった。だが、本法で使用する麻疹感作ゼラチン粒子は通常のPA法に用いる濃度よりもさらに約10倍程度希釈して使用するために、粒子の沈降速度が遅くなり、凝集パターンの判定が可能になるのは室温に約16時間静置する事が必要である。

## E. 結論

WHOによる麻疹根絶計画において簡便なIgM抗体測定法の開発が望まれている。本法はWHOの要求を十分に満たしている。また、従来から行われているIgM抗体捕獲ELISAと同様に、麻疹ウイルス感染を適確に診断する簡便法である。今後、麻疹根絶のための疫学調査においては大量需要の必要の際には一人あたりの価格を下げる事が出来る事が期待される。麻疹の早期診断のためのWHOの要求を十分に満たす方法と云える。また、WHOでは1999年に今まで欧米諸国で

開発されたELISA法を含む種々の方法について検討したが、コストや技術的な様々な問題点が指摘された。一方、本法については簡便で再現性がある事から、WHOの麻疹根絶会議（2000年）において唯一採用される事になり、その後アフリカ、南米等の発展途上国等で検討中である。

lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. Arch. Virol. 145: 905-920 2000

4. 佐藤 威 他8名 野外麻疹ウイルスの分離 病原微生物情報 Vol 22. No 11p278-279 2001

## 参考文献

1. Miyamura K. et al. Comparison of gelatin particle agglutination and hemagglutination inhibition tests for measles seroepidemiology studies. Arch. Virol., 142:1963-1970, 1997.
2. Sato TA, et al. Development of a gelatin particle agglutination reagent for measles antibody assay. Arch. Virol., 142:1971-1977, 1997.

## H. 知的所有権の取得状況

なし。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Okada, H., Sato, T. A., Katayama, A., Higuchi, K., Shichijo, K., Tsuchiya, T., Takayama, N., Takeuchi, Y., Abe, T., Okabe, N., Tashiro, M.: Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. Arch. Virol. 146: 859-874, 2001
2. Takeuchi, K., Miyajima, N., Kobune, F., Tashiro, M.: Comparative nucleotide sequence analyses of the entire genomes of B95a cell-isolated and Vero cell-isolated measles viruses from the same patient. Virus Genes 20: 253-257, 2000
3. Okada, H., Kobune, F., Sato, T. A., Kohama, T., Takeuchi, Y., Abe, T., Takayama, N., Tsuchiya, T., Tashiro, M.: Extensive