

## B.研究方法

予備実験として、成人対照者 30 名の血液を用いて乾燥濾紙血液と血清を同時に作成し、乾燥濾紙血液と血清での麻疹抗体価の相関を検討した。抗体価の測定は、セロディア麻疹（富士レビオ社製）の麻疹抗体価測定キット（PA 法）を用いた。マイクロプレートに直径 4.5mm の濾紙血液を 3 枚パンチし、PBS110  $\mu$ l を加え、室温で 2 時間溶出したものを血清 8 倍希釈とした。希釈溶液 25  $\mu$ l を分注したマイクロプレートに希釈血清あるいは濾紙溶出液 25  $\mu$ l を分注し、512 倍まで希釈した。その結果、 $y$ （濾紙血液） $=0.988x$ （血清） $r=0.9586$  と良好な相関が得られた（図 1）。これより、濾紙血液を用いて麻疹抗体価を測定することが可能であることが確認された。

今回の調査は、2005～2006 年の 2 年間に妊婦甲状腺スクリーニング検査を行った濾紙血液のうち、目的外使用に同意の得られた血液を用いた。1961～1990 年生まれを 5 年毎の出生年群に分け、各出生年群の上限を 400 人として計 2202 人を対象とした。なお、麻疹罹患歴あるいはワクチン接種歴は確認していない。

## C.研究結果

1:16 未満の抗体陰性者は明らかに麻疹感受性者と考えられるが、妊婦全体での 1:16 以上の平均抗体保有率は、96.9%であった（表 1）。1961～1965 年出生群では 1:16 以上の抗体保有率は 99.1%であったのに対し、1976～1980 年出生群では 98.3%、1981～1985 年出生群では 96.0%、さらに 2007 年末で 17～21 歳の

1986～1990 年出生群の抗体保有率は 91.6%と低値であった。

1:128 あるいは 1:256 以上の抗体価が発症予防レベルと言われているが、妊婦全体での 1:128 および 1:256 以上の平均抗体保有率はそれぞれ 88.8%、78.3%であった。1:128 以上の抗体保有率は、1961～1965 年出生群では 90.0%であったのに対し、1981～1985 年出生群では 87.8%、1986～1990 年出生群では 81.4%と低値であった。1:256 以上の抗体保有率は、1961～1965 年出生群では 81.0%であったのに対し、1981～1985 年出生群では 77.5%、1986～1990 年出生群では 68.5%と低値であった。1986～1990 年出生群を、それ以前の出生年群と比較すると、1:16 以上、1:128 以上、1:256 以上の抗体保有率が全ての出生年群より有意に低値であった（ $P < 0.05$ 、図 2）。

## D.考察

検体の送付や保管が血清に比べ簡便な乾燥濾紙血液での麻疹抗体価や HIV 抗体価等の測定が可能であることを、我々は既に報告しているが、今回は麻疹抗体価（PA 法）が可能であることを明らかにした。

札幌市では全国的な流行のあった 2001 年に 925 人の小児科定点医療機関からの報告があったが、2003 年には 118 人と減少し、2005 年、2006 年には報告が見られなかった。また、成人麻疹の定点報告もなかった。しかし、2006 年秋からの首都圏を中心とした流行に伴い、札幌市では 2006 年 12 月～2007 年 1 月に

かけて 10 人の麻疹患者（成人 5 人、小児 5 人）の発生があり一度終息した。しかし、2007 年 8 月以降、再び小児～30 歳台までの成人例を含む麻疹患者発生が続き、2008 年 2 月末までに 300 名を超える医療機関からの報告があり、いまだ終息していない。

麻疹流行を防ぐ唯一の手段はワクチン接種である。1978 年 10 月から、生後 12 か月から 90 か月未満の小児を対象に、1 回法での麻疹ワクチン定期接種が開始した。その後、2006 年 4 月からは、生後 12～24 か月に至るまでの間と、5～7 歳未満の小学校就学前の 1 年間の 2 回接種となった。札幌市の麻疹ワクチン接種率の推移をみると、2001 年の「北海道はしかゼロ作戦」以降は高い接種率が維持され、3 歳児健診受診児での接種率は 2004 年からは 95%以上を維持している（図 3）。しかし、1998 年以前はワクチン接種率が 90%を下回ることが多く見られた。

今回の調査で麻疹抗体保有率は若年ほど低値であったが、若年者での **secondary vaccine failure** やワクチン未接種に起因するものと推定される。このことは妊婦以外の同世代の女性や男性にも当てはまるものと考えられ、この年代の麻疹感受性者への積極的なワクチン接種が必要である。

#### E. 結論

検体の送付や保管が血清に比べ簡便な乾燥濾紙血液で麻疹抗体価（PA 法）が可能であることを明らかにした。

さらに、1961～1990 年生まれの妊婦スクリーニング乾燥濾紙血液を用いて麻疹抗体価を測定したが、若年妊婦ほど麻疹抗体保有率は低下し、1986～1990 年出生群の抗体保有率はそれ以前のすべての出生群に比べ有意に低値であった。このことは妊婦以外の同世代の女性や男性にも当てはまるものと考えられる。

以上より、乾燥濾紙血液を用いた妊婦の麻疹抗体保有率の調査は、麻疹蔓延防止対策に有用である。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産の出願・登録状況

なし

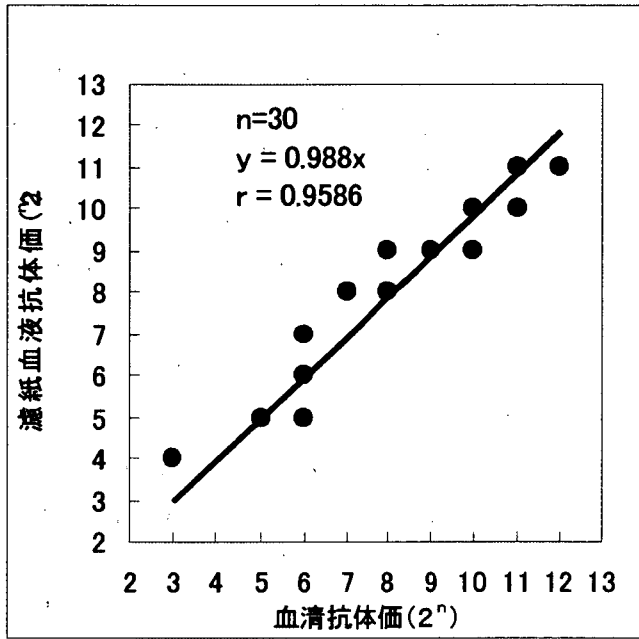


図1. 乾燥濾紙血液と血清での麻疹抗体価の相関

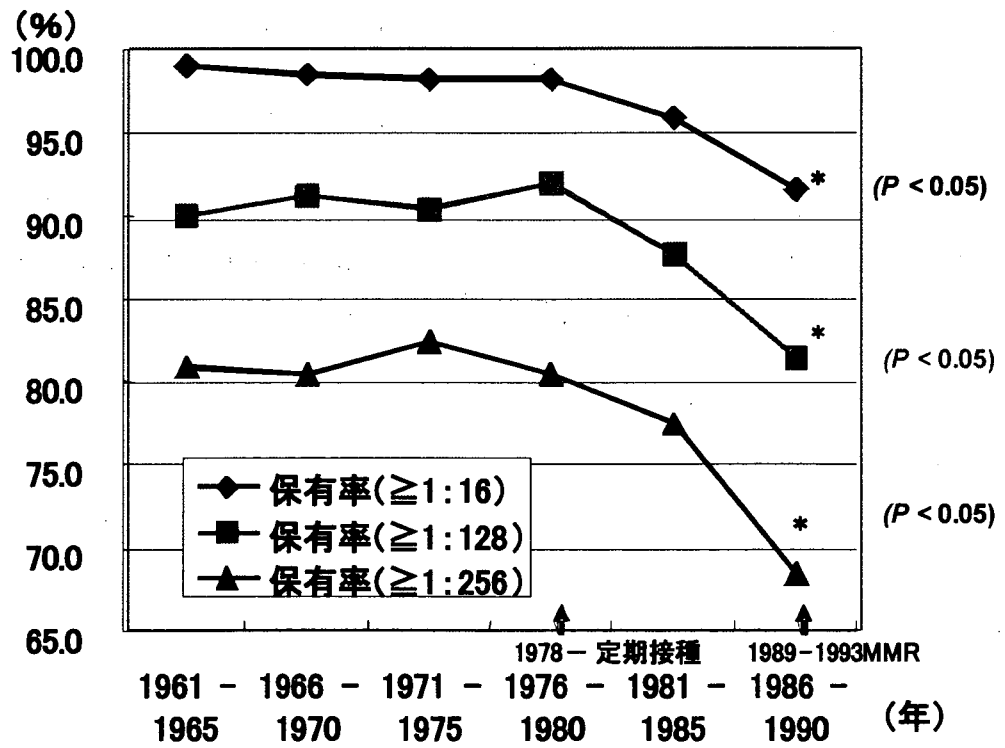


図2. 出生年群別麻疹抗体 (PA) 保有率

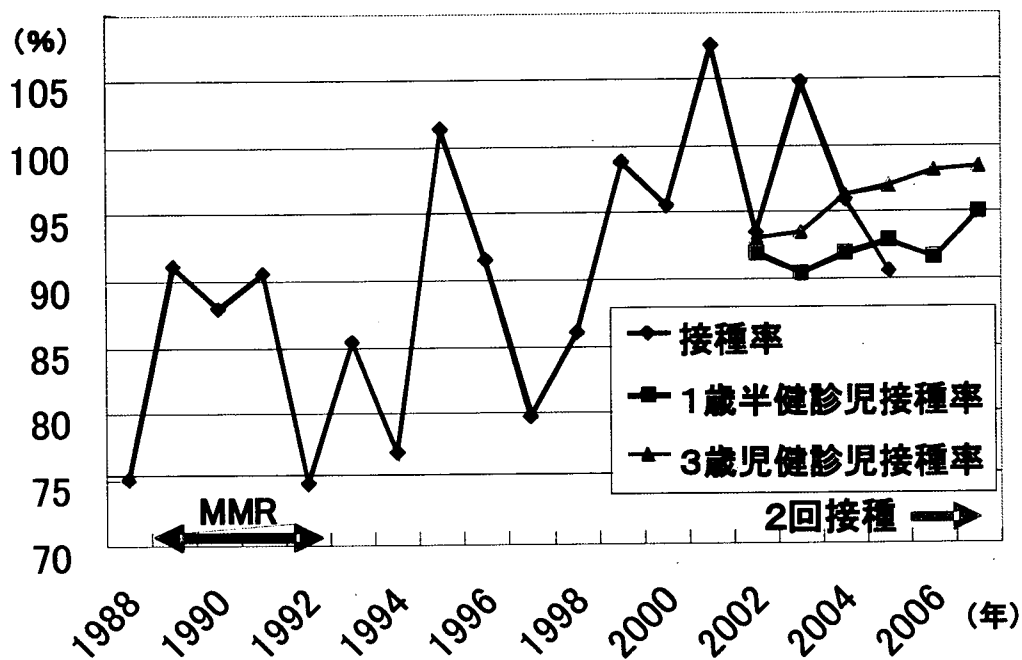


図3. 札幌市における麻疹ワクチン接種率の推移

表1. 出生年群別妊婦麻疹抗体 (PA) 保有率

出生年群	1961 - 1965	1966 - 1970	1971 - 1975	1976 - 1980	1981 - 1985	1986 - 1990	計
検査件数 (人)	231	400	400	400	400	371	2202
保有率 (%) (≥1:16)	99.1	98.5	98.3	98.3	96.0	91.6	96.9
保有率 (%) (≥1:128)	90.0	91.3	90.5	92.0	87.8	81.4	88.8
保有率 (%) (≥1:256)	81.0	80.5	82.5	80.5	77.5	68.5	78.3

## 2007年の北海道における麻疹について

協力研究者 岡野素彦、長野秀樹、地主勝(北海道立衛生研究所微生物部)

### 研究要旨

2007年の北海道における麻疹患者の報告数は、小児麻疹が461例、成人麻疹が387例で総計848例であった。室蘭保健所管内で最初の流行があり、4月末から約2ヶ月間続いた。さらに、夏季にかけて滝川、苫小牧、釧路保健所管内でも流行があった。また、年末には紋別、北見、帯広保健所管内において流行した。患者の年齢構成では15歳以上の成人麻疹が約半数の47%を占めた。予防接種歴については「なし」が61%、「あり」が31%であった。麻疹患者の約30%が予防接種を受けていたことは、これまで実施されてきた1回接種では不十分であることを示唆している。麻疹ウイルス検査については、供試検体として咽頭拭い液を用いたが、RT-PCR法にてウイルスゲノムを検出できたのは37検体中25件で陽性率は68%であった。この25例についてNP遺伝子の系統樹解析を実施し、genotypeを調べたところ全例D5型であった。さらに、系統樹解析に用いた450塩基は全例で100%一致した。発生時期とgenotype分析から、北海道で流行した麻疹ウイルスは本州での流行が波及した結果であると思われる。

### A. 研究目的

北海道では、2001年の流行を受け、小児科医会や行政を中心として「北海道はしかゼロ作戦」が展開されてきた。その結果、2005、2006年の麻疹患者報告数は減少傾向にあった。しかし、2006年末から関東地方において麻疹の発生があり、2007年には北海道においてもいくつかの地域で流行があった。また同年は、北海道だけではなく、麻疹の全国的な流行が報告された。このような近年にない流行を受け、2012年までに麻疹を排除するための施策の一つとして、2008年から全数報告となった。さらに、全数報告のための検査室診断の必要性から病原体サーベイランスを充実させることが重要である。今回は、麻疹流行動態の解明と病原体サーベイランスの充実を目的として、ウイルス学的検査や麻疹患者について検討を行った。

### B. 研究方法

小児麻疹については小児科定点から、定点以外の医療機関を受診した患者については管轄保健所からの情報を収集した。また、成人麻疹については基幹定点から、定点以外の医療機関は同様に保管所からの情報について収集解析した。これらの患者情報については主に年齢構成及びワクチン接種歴について検討した。医療機関から提供された麻疹患者の咽頭拭い液については、キアゲン社のキットを用いて直接ウイルスRNAを抽出した。このRNAを鋳型としてRT-PCR法にて麻疹ウイルスN蛋白のC末端側をコードする遺伝子領域の536塩基を増幅した。RT-PCR法の手技は国立感染症研究所が作成した病原体検査マニュアルに従った。増幅されたPCR産物を精製し、ダイレクトシーケンシング法にて塩基配列を決定した。そのうち、N蛋白のC末端150残基をコードする450塩基について近隣接合法による系統樹解析を実施し、麻疹ウイルスのgenotypeを

決定した。

### C. 研究結果

北海道における 2007 年の麻疹患者定点報告について図1に示した。小児麻疹の定点報告では、5月から6月にかけてピークがみられ、一度下降したものの、10月から再び上昇し始めた。また、基幹定点から報告される成人麻疹では、5月にピークを形成し、その後いくつかのピークを伴いながら9月には終息したかにみえたが、11月から上昇に転じた。これは地域ごとの流行を反映しているものと推察された。そこで、管轄保健所毎に報告数をみると、7月中旬の時点では、室蘭、苫小牧、滝川に小流行を認め、一方、12月末の時点ではさらに釧路、北見、紋別、帯広、札幌に小流行が認められた(図2)。また、2007年の全道における報告数は小児麻疹が461例で、成人麻疹が387例、合わせて848例の報告であった。

全道で報告された麻疹患者848例について、その年齢構成と予防接種歴の関係を調べた。図3の上段に示した年齢階層別報告数をみると、10-14歳の階層が最も多く、次いで15-19歳であった。下段の予防接種歴を百分率でみると、年齢が上昇するにつれて予防接種歴がある患者が多くなる傾向がみられ、1回接種の効果が減弱されていることが示された。

ウイルス学的検査では、咽頭拭い液からウイルスRNAを抽出し、図4に示した条件でnested RT-PCRを実施した。37例の咽頭拭い液のうちからRT-PCRで麻疹ウイルスRNAが検出されたのは25例(68%)であった。検体採取日については、発症後5日までに採取しているケースがほとんどで、3日目がもっとも多かった。また、検出率については4、5日目が比較的高い傾向にあった(図5)。一方、RT-PCR陽性例について

genotypeを決定したところ全例がD5型であった。これは全国で流行している株と同じ型であった。また、北海道での流行株はその配列も完全に一致し、さらに群馬県の流行株3株のうち2株と完全に一致した(図6)。

### D. 考察とまとめ

北海道における流行の開始時期とgenotype分析から、首都圏を中心とした本州での流行株が北海道に波及したと推察された。また、2007年の流行のパターンとして、10代の患者が多いことが特徴としてあげられる。その中にはワクチン接種歴のある例も含まれ、これまで実施されてきた1回接種では、不十分であることを示唆している。

日本においては2006年6月から2回接種が導入され、2012年の麻疹撲滅をめざしている。また、将来的には少数発生時における全例において検査室診断が必要となることから、病原体サーベイランスシステムの確立に向け、高い精度の検査法の充実とともに、検体採取時期や種類および選定などが肝要と思われる。

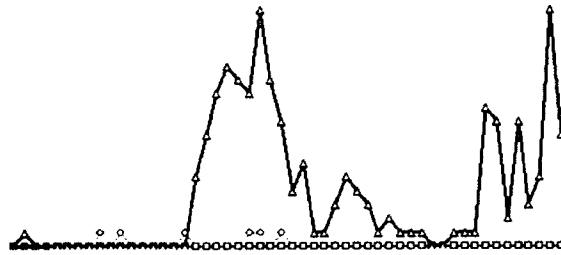
### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

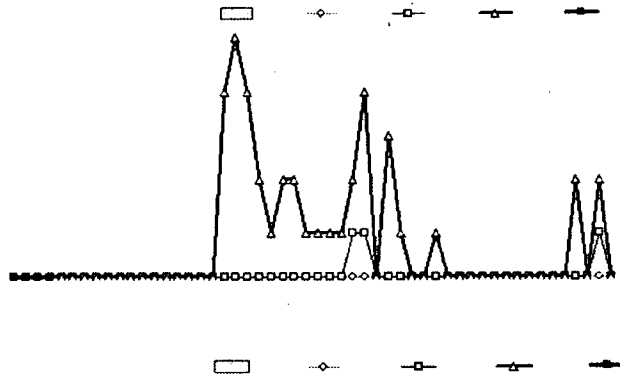
1. 長野秀樹、伊木繁雄、佐藤千秋、地主勝、石田勢津子、奥井登代、岡野素彦. 2007. 北海道における麻疹 PA 抗体保有状況—過去5年(2002年から2006年まで)における感染症流行予測調査から—。北海道立衛生研究所報. 57:79-82.
2. 地主勝、伊木繁雄、長野秀樹、奥井登代、岡野素彦. 2007. 2006年度の北海道における麻疹 PA 抗体保有調査. 北海道立衛生研究所報. 57: 83-85.

図1 北海道における患者定点からの報告(2007年)

小児麻疹



成人麻疹



北海道立衛生研究所ホームページより

図2 北海道における麻疹患者発生状況(2007年)

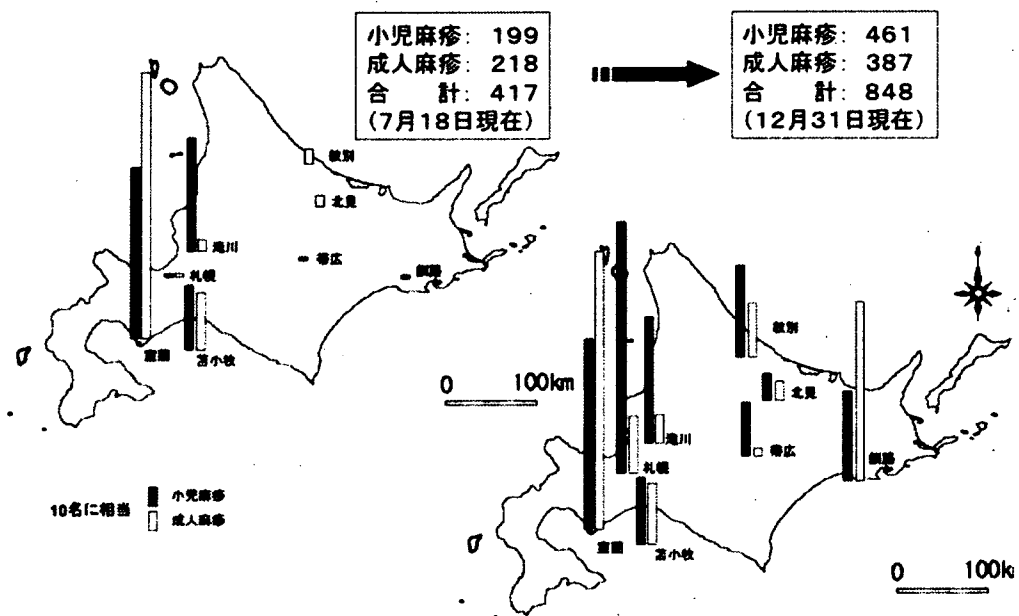


図3 麻疹患者の年齢構成と予防接種歴

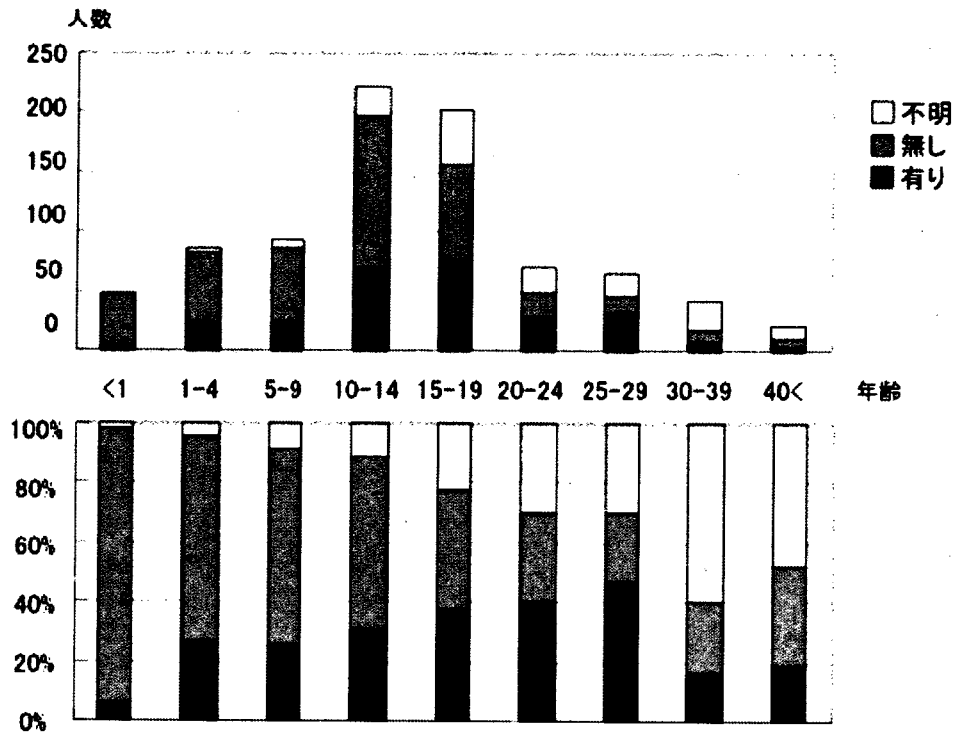


図4 麻疹ウイルスゲノムRNAの検出

RNA分離: QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)

One-step RT-PCR kit (Invitrogen)

プライマー: pMvGTf1/pMvGTr1

50 °C 30 min  
 94 °C 2 min  
 94 °C 30 sec  
 53 °C 30 sec  
 72 °C 1 min  
 72 °C 5 min

} x35

Nested PCR (Taq Gold)

プライマー: pMvGTf2/pMvGTr2

95 °C 9 min  
 94 °C 30 sec  
 55 °C 30 sec  
 72 °C 1 min  
 72 °C 7 min

} x30

供試検体数: 37

RT-PCR陽性数: 25 (68%)



図5 ウイルス検査のための検体採取日の検討

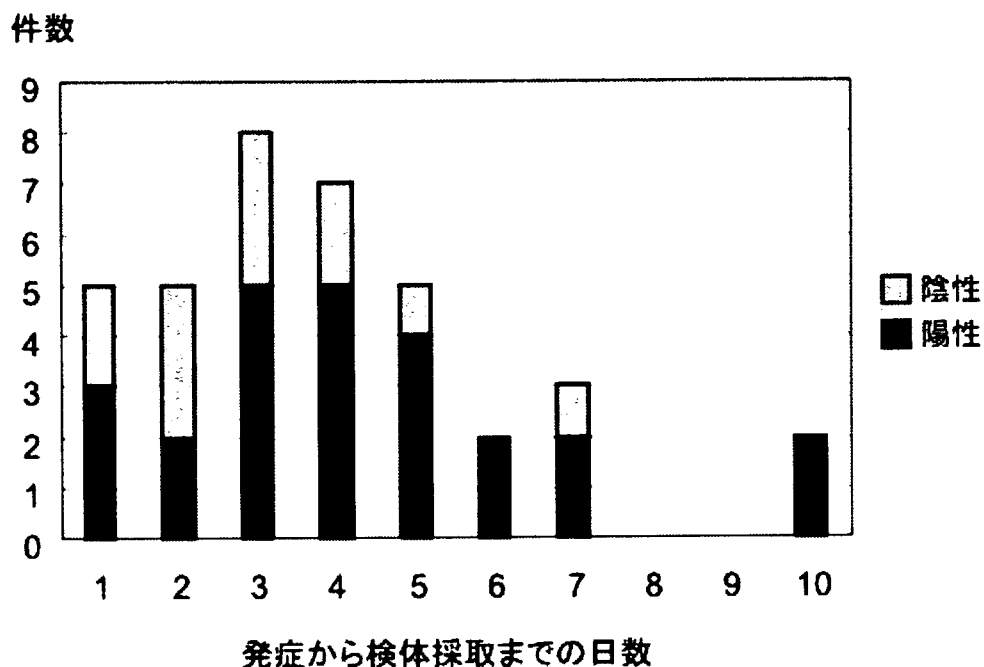
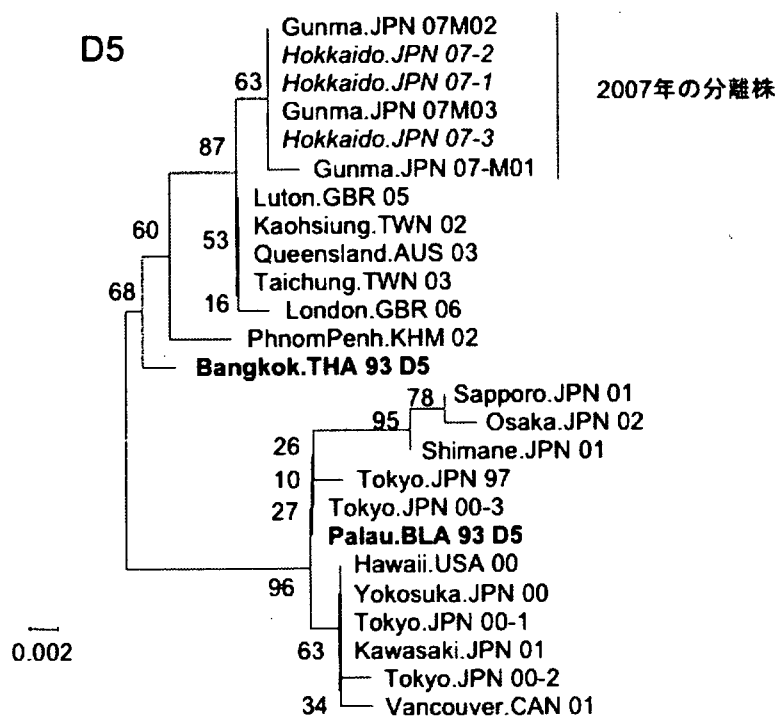


図6 NP遺伝子C末端450塩基による系統樹解析(近隣接合法)



## 厚生労働科学研究費補助金

### ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討

#### 麻疹ウイルス研究小班

分担研究者： 沼崎 啓

国立感染症研究所ウイルス第3部第3室 室長

#### 「2007年 千葉県における麻疹の流行」

研究協力者： 一戸 貞人

千葉縣市原健康福祉センター センター長

小川 知子

千葉県衛生研究所ウイルス研究室 主席研究員

小倉 誠

千葉県衛生研究所感染症学研究室 主席研究員

齊加 志津子

千葉県衛生研究所感染症学研究室 主席研究員

#### 研究要旨

2007年の4月より千葉県で行っている、医療機関と学校からの麻疹全数報告の患者情報、および、病原体サーベイランスで得られた麻疹患者の検体を検討した。医療機関報告、学校報告からの報告はそれぞれ1589例、1636例で、小中高校生に該当する7-18歳は52.8%で半分以上を占めた。麻疹ワクチンの接種率は50.1%で高く、また、流行予測調査における千葉県の麻疹抗体測定では麻疹の発症防御が可能と考えられるPA法256倍の保有率は4-19歳で低かったことより、小中高校生の罹患率増加はsecondary vaccine failureの増加がその理由と考えられた。咽頭拭い液137検体中、培養陽性は42検体、PCR陽性は65検体で、培養陽性のものはすべてPCR陽性で、PCR陽性の遺伝子型はA型4例、D5型61例であった。血清68検体中、麻疹IgM抗体陽性は18例、判定保留6例、陰性44例で、これらのPCR陽性例はそれぞれ17例、4例、12例で、陽性の一致率は高かったが、陰性の一致率は低かった。PCR陽性例について病日とIgMの関連を見ると4病日以降に陰性はなく、報告されている発疹出現後4日以降はIgM抗体検出率が高いことと一致した。また、全体にPCR、IgMの陽性率は低く、不適切な検体の採取時期、あるいは、麻疹以外の疾患の紛れ込みこみが原因と考えられた。2008年から始まる麻疹・風疹の全数報告を有効に運用するためにも、衛生研究所はこれらの収集情報を解析・公開すると共に、医療機関の麻疹診断における検査の重要性を周知し検査サポート体制を充実させていく必要があると考えられた。

#### A. 研究目的

厚生労働省は、2012年に達成を目標としたWHOの西太平洋地域麻疹排除計画をふまえ、2006年に予防接種法に基づき1歳時と小学校就学時の麻疹風疹ワクチンの定期2回接種を開始し、さらに2008年に感染症法に基づく医療機関からの麻しん全数報告、および、中学1年、高校3年に対する麻疹ワクチンの定期3期、4期の2回目接種実施を決定した。

千葉県においても、2006年に県内で麻疹が流行した経験から、2007年4月より「千葉県麻疹対応マニュアル」を作成し、麻疹発生把握のため医療機関と学校からの麻疹の全数報告を、政令市である千葉市を除く県内全域で開始している。

本報告では、千葉県における2007年の麻疹全数報告

を検討し、麻疹排除を早期に実現していくため病原体サーベイランスにおける地方衛生研究所の役割と問題点を明らかにする。

#### B. 研究方法

麻疹発生情報は、2007年の14-52週に千葉県で実施した麻疹全数報告に基づく医療機関および学校からの麻疹患者報告、また、感染症発生動向調査定点報告を用いた。

麻疹患者の検体は、2007年の4-7月に病原体サーベイランスに基づく病原体定点医療機関から収集したもの、集団発生時、散発発生時に保健所、医療機関から衛生研究所に依頼のあったものを検討した。

## C. 研究結果

### (1) 麻疹の発生状況

千葉県麻疹患者全数把握では、医師会および教育委員会等に依頼し、麻疹を診断した医療機関および麻疹が発生した学校から、麻疹患者の情報を所定の報告用紙で保健所へ、さらに、保健所から県の疾病対策課感染症対策室および千葉県感染症情報センター（衛生研究所）に報告し、これらの情報は解析後に毎週ホームページに公開した（図1）。なお、麻疹の報告基準は発生動向調査の医療機関からの届け出基準に準じた。

2007年4月から12月（14週から52週）までに、医療機関から1589例、学校から1636例の麻疹患者の報告があり、医療機関報告（図2）は21週に、学校報告

（図3）は17週にピークを示し、どちらも25週以降は減少していた。共通する対象年齢6歳から14歳についての報告数は、医療機関報告、学校報告、定点報告それぞれ608例、1699例、193例で、定点報告/医療機関報告、定点報告/学校報告、医療機関報告/学校報告の比はそれぞれ0.31、0.17、0.55であった。医療機関報告は、学校報告より少なくその約半分で、定点報告の約3倍で従来推定されている10～15倍より少ないことから、この報告システムが十分周知されておらず、医療機関からのすべての症例が報告されていないことが示唆された。

全年例を対象とした医療機関の年齢別報告数では（図4）、0-1歳、7-8歳、12-15歳、18-19歳にピークがあり、小学生に該当する7-12歳が24.2%、13-15歳が17.4%、16-18歳が11.1%、これらを合わせると52.8%で半分以上を占めた。また、麻疹ワクチンの接種歴は、あり50.1%、なし37.6%、不明12.3%で、接種歴ありが多かった。千葉県の麻疹定点報告の年齢の推移を見るとこの年代の増加は2006年から著明となっていた（図5）。また、国立感染症研究所で行っている流行予測調査における千葉県の2007年麻疹抗体測定では、麻疹の発症防御が可能と考えられるPA法256倍の保有率は、ワクチン接種が行われていない0-1歳を除くと、4-19歳で低く10-14歳で最低となっていた（図6）。小中高校生に罹患が増加していることは未接種者の存在に加えてsecondary vaccine failureが増加していることがその理由と考えられた。

### (2) 麻疹の検査状況

2007年4月から7月に、病原体サーベイランスで収集あるいは医療機関から依頼のあった麻疹あるいは麻疹疑い患者の咽頭ぬぐい液137検体について分離培養およびRT-PCR（以下PCR）を、急性期血清68検体について麻疹特異的IgM抗体の測定を行った。

分離培養にはB95a細胞、COBL細胞、Vero細胞、CEF細胞を用い、PCR法およびシーケンスはN遺伝子に設定したプライマーを用い、感染症検査マニュアルに準じて実施した。抗体測定はエンザイグノスト（DADE BEHRING）を用い、一部については医療機関で行った結果を入手した。

咽頭拭い液137検体中、培養陽性は42検体、PCR陽性は65検体で、培養陽性のものはすべてPCR陽性であった。PCR陽性の遺伝子型はワクチン由来と考えられるA型は4例、残りはすべて流行株と考えられるD5型61例で、これらの培養陽性例はそれぞれ、0例、42例で、ワクチン由来株は培養で検出されなかった（図7）。

血清68検体中、麻疹IgM抗体陽性は18例、判定保留6例、陰性44例で、これらのPCR陽性例はそれぞれ17例、4例、12例で、陽性の一致率は高かったが、陰性の一致率は低かった（図8）。PCR陽性例について調査用紙に記載されている発病後の日数とIgMの関連では、発病後3日まではIgM陰性例が見られた、4日以降は判定保留1例が見られたがIgM陰性例は見られなかった（図9）。これまで報告されているように発病から発疹出現後4日までのウイルス検出率は高く、発疹出現後4日から1ヶ月のIgM抗体検出率は高いことと一致すると考えられた。

## D. 考察

2007年に行った千葉県の麻疹全数報告の学校報告、医療機関報告では、共に1600例前後の麻疹報告があり、年齢では小中高校生が半分以上を占めていた。

麻疹の報告数は、2002年以降「お誕生日に麻疹ワクチンを」キャンペーンによる1歳時の接種率上昇に伴い、全国的に減少していたが、2007年に再び増加している。千葉県でも2006年、2007年に麻疹の報告数は増加しており、また、小中高校生の割合の増加はこの2年間で顕著になっている。今回の調査では、罹患者にワクチン接種者が多いこと、および、麻疹防御レベル抗体の保有率はこの4-19歳で低いことからsecondary vaccine failureの増加が重要な問題と考えられた。

この結果は、麻疹は小中高校生の対策が重要で、現在進められている麻疹風疹ワクチン3期、4期の2回接種法による接種率を上昇させると共に、学校での麻疹発生時の封じ込め対策を徹底しなければならないことを示すと考えられた。

封じ込め対策では、麻疹患者を早期に診断することが重要である。衛生研究所が供与を受けた検体の検討では、培養が陽性のすべてでPCRは陽性でPCR陽性のすべてが培養陰性ではなく、現在の検査体制ではPCRの検出方が優れていることが示した。PCR、IgMの結果においては必ずしも一致率が高くはなく、PCR陽性検体について病日初期のIgMは陰性が多いことから、検体が適切な時期に採取されていないことが考えられた。また、全体にPCR、IgMの陰性例が目立ったが、これは検体採取時期に加えて麻疹以外の症例が紛れ込んでいる可能性が示唆された。

今回データは示さなかったが、報告時に検査を実施している医療機関は極めて少なかった。麻疹診断には他のウイルス性疾患が紛れ込むこと、および、ワクチン既接種者のいわゆる修飾麻疹が多く、症状のみの診断は困難で診断を適切に行うためには検査が必要なこ

とを周知すると共に、衛生研究所が検査のサポート体制の充実することが重要と考えられた。

#### **E. 結論**

2008年から始まる麻疹風疹の全数報告を適正に運用するために、衛生研究所は収集情報を公開し、検査サポート体制を充実させていく必要がある。また、収集した麻疹ウイルスの情報集積等のためのレファレンスセンターも必要と考えられた。

#### **F. 健康危機情報**

省略

#### **G. 研究発表**

なし。

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし。

図1 千葉県の麻疹全数報告の概要

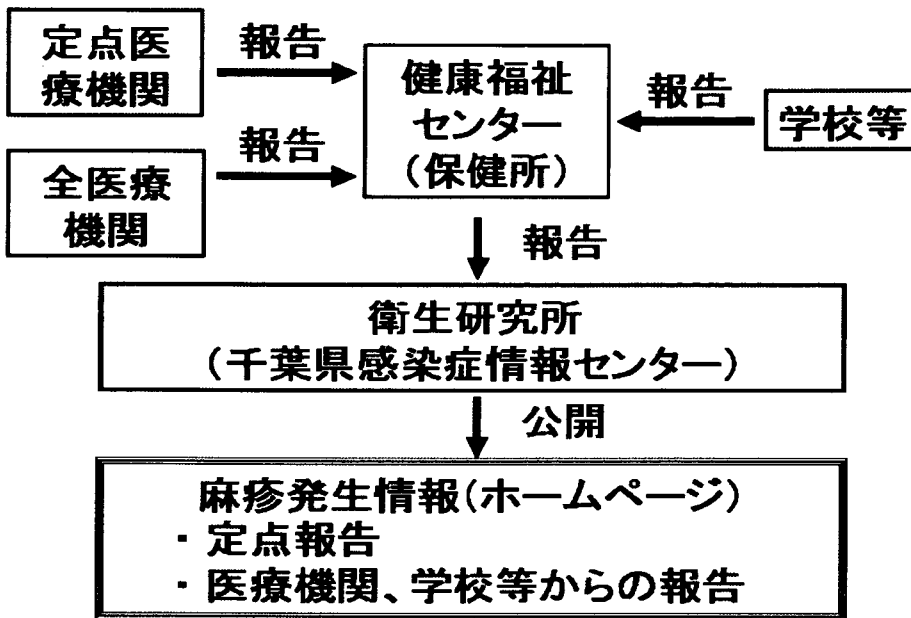


図2 千葉県の麻疹全数報告医療機関報告数の推移

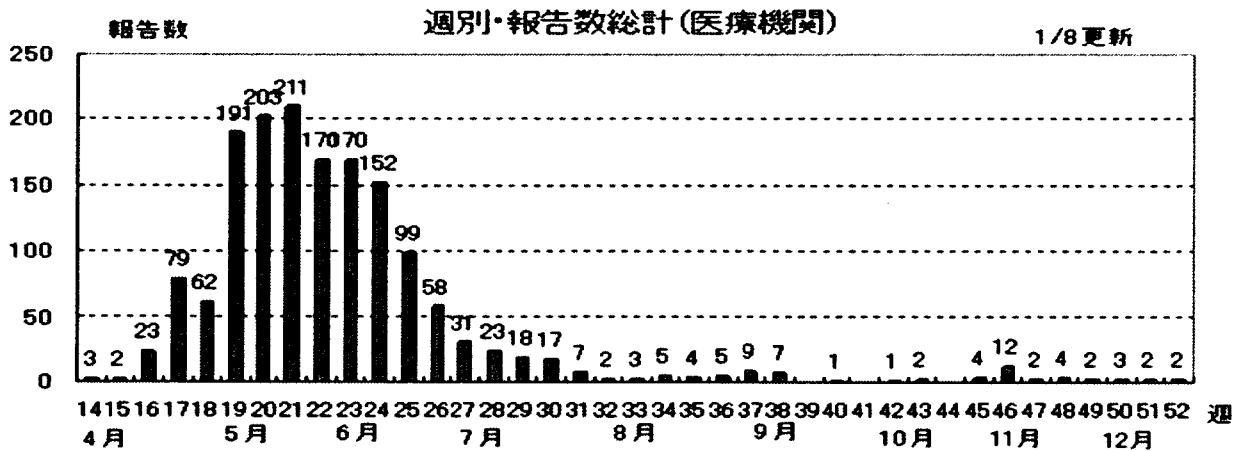


図3 千葉県の麻疹全数報告学校報告数の推移

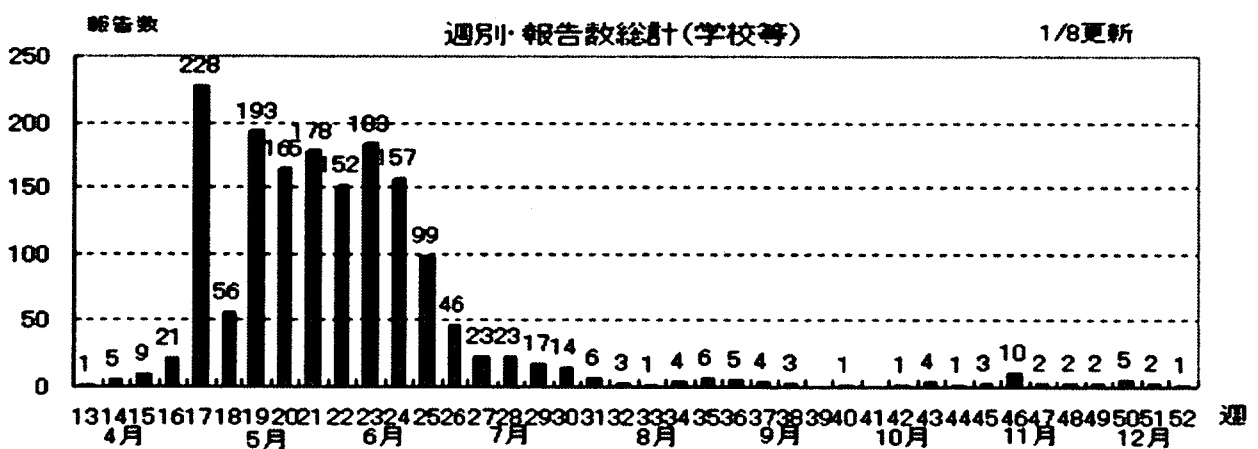


図4 千葉県の麻疹全数報告医療機関年齢別報告数とワクチン接種歴

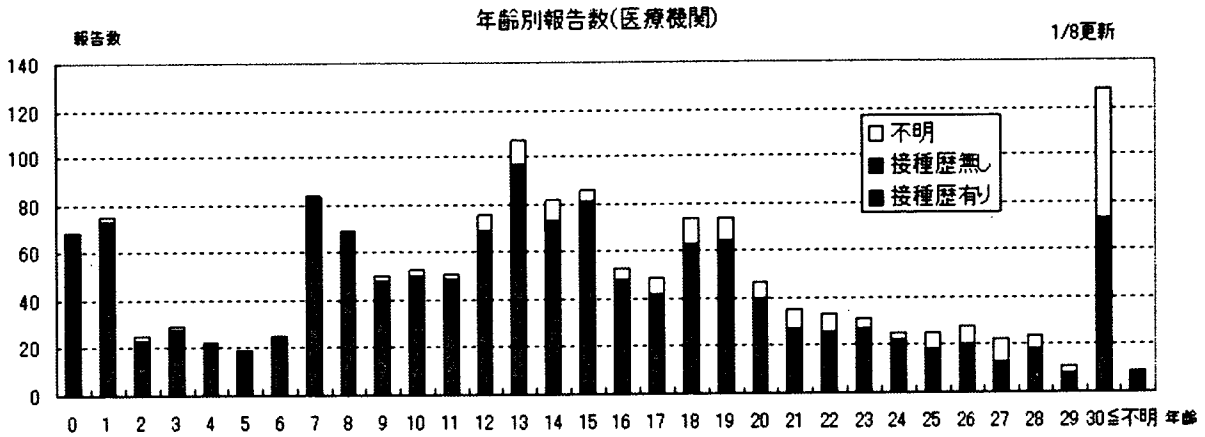


図5 千葉県の定点報告による麻疹患者の年齢割合の推移(2000~2007年)

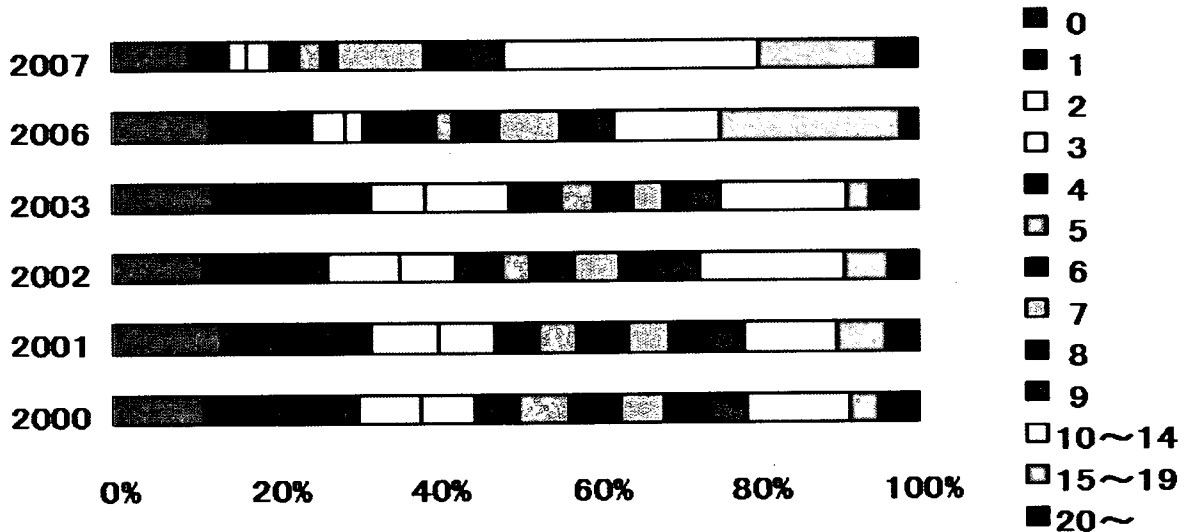


図6 流行予測調査における千葉県の年齢群別麻疹抗体陽性率(PA法256倍以上)

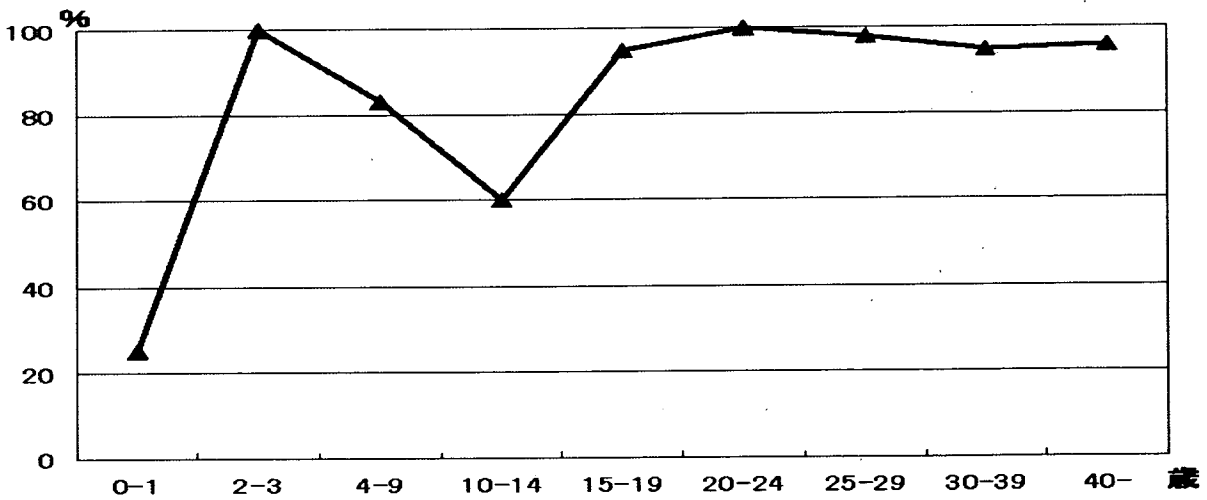


図7 PCR検査と培養検査の関連

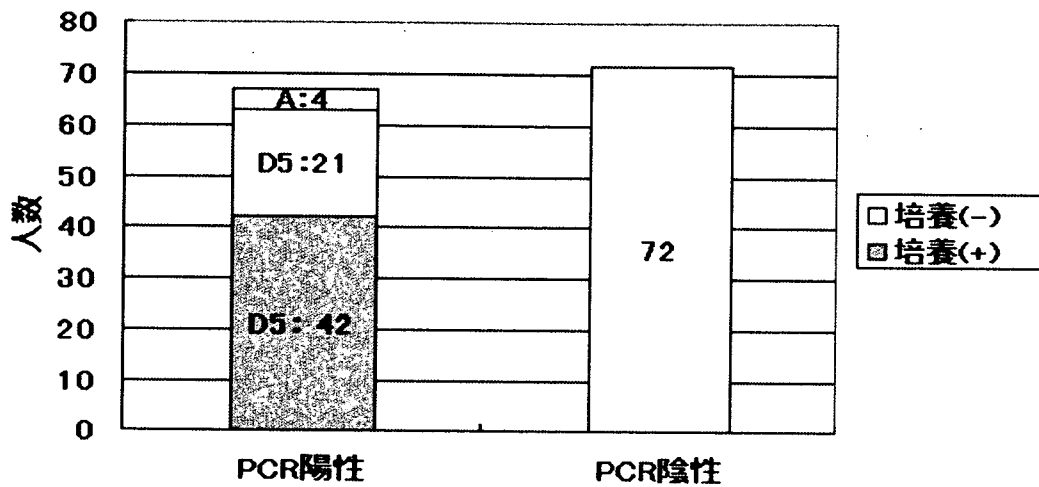


図8 PCR検査とIgM検査の関連

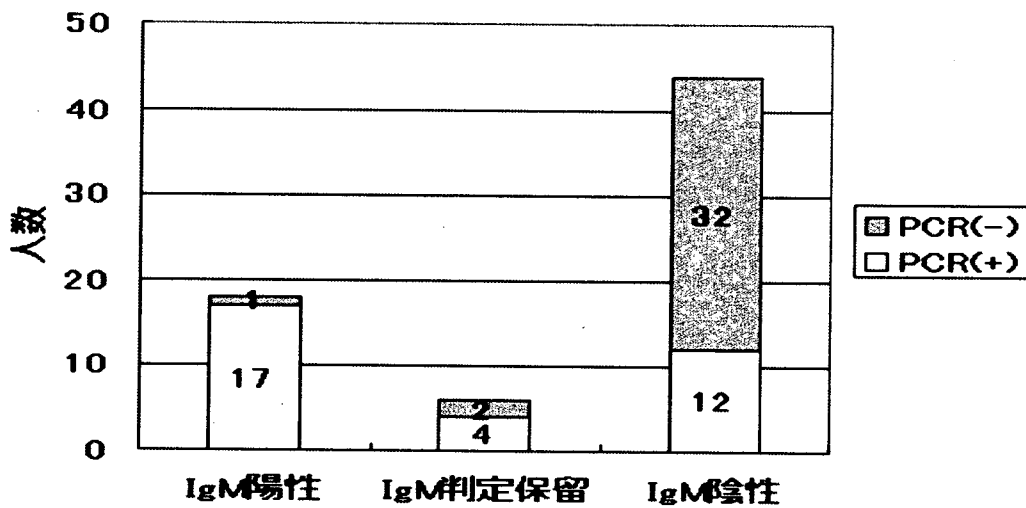
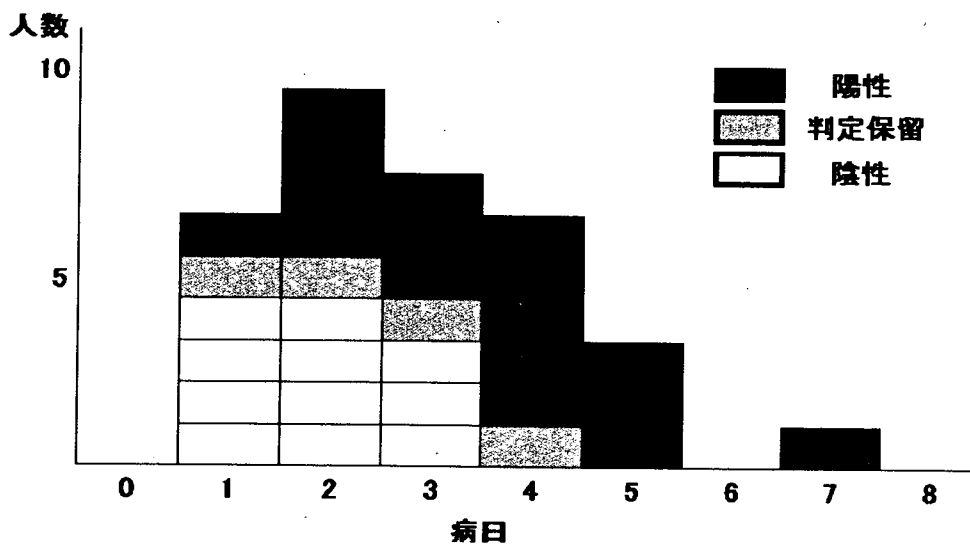


図9 PCR陽性検体におけるIgM抗体と血清採取時期の関連



麻疹ウイルス実験室診断の向上－検体搬送・保存温度の検出感度への影響に関する研究

統括分担研究者 沼崎 啓 国立感染症研究所

研究協力者 皆川 洋子、續木雅子、田中正大、秦 真美、山下照夫 愛知県衛生研究所

研究要旨 地方衛生研究所における麻疹サーベイランス・システム整備及び実験室診断の精度向上を目的として、①麻疹疑い患者からの実験室診断用検体の搬送及び保存温度が検出感度に及ぼす影響について検討した。さらに②麻疹発生を迅速かつ的確に把握し早期の対策を図ることで麻疹の撲滅を目指して2007年2月に開始された愛知県麻しん全数把握事業の報告状況を解析した。

A. 研究目的 ワクチン予防可能疾患 (VPD) のうちポリオの次のターゲットとされている麻疹について、病原体サーベイランス・システム整備の一助とするため、地方衛生研究所における麻疹実験室診断の精度向上をめざす。麻疹ウイルスの検出及び遺伝子型別サーベイランスの円滑な実施を可能とするため、ウイルス検出用検体の保存条件について検討した。さらに2007年に愛知県で実施した麻しん全数把握について、定点把握と比較検討を行った。

B. 研究方法

①麻疹ウイルスの検出及び遺伝子型別をサーベイランスとして円滑に行えるよう、試験研究機関に到達する前段階の医療機関等で通常検体保存に用いられているが感染性麻疹ウイルスの長期保存には不適当とされる温度条件 (4℃及び-20℃) において保存した検体について検討した。麻疹ウイルス野外株 (KA) をVero h SLAM細胞に接種し、低速遠心沈渣及び上清に分けて検体とした。これらの検体を室温、4℃、-20℃に保存し (陽性対照は-80℃) 20時間から21日まで経時的に採取してVero h SLAM細胞上での麻疹ウイルス分離と国立感染症研究所病原体診断マニュアルに記載されたnested double RT-PCR法を並行して実施し、経時的にウイルス検出を検討・解析した。②愛知県衛生研究所内にある愛知県感染症情報センターに寄せられた麻しん全数把握事業への報告及び感染症発生動向調査患者情報への定点報告結果を解析した。

(倫理面への配慮) 本研究で用いる臨床材料の採取は、「疫学研究における倫理指針」に基づき、材料提供者および家族の個人の尊厳及び人権の尊重、個人情報の保護に配慮して実施する。症例の分析においては、個々の症例が特定できないよう配慮して行う。

C. 研究結果

①室温、4℃、-20℃に保存した麻疹ウイルス含有検体からのウイルス分離及びPCR法による麻疹ウイルス検出結果を示す (表1)。室温保存検体はウイルス分離により48から72時間まで、PCRによっては96時間まで検出可能であった。4℃保存検体は分離では96時間まで、-20℃保存検体は同14日まで検出され、4℃及び-20℃ともPCRによっては21日まで検出された。

②2007 (平成19) 年2月から11ヶ月間における、麻疹患者の全数把握及び定点報告数を表2に示す。例年1

月の麻疹発生は少なく、2007年についても2件の患者発生報告は全数把握に含んでいるため、ほぼ1年間にわたる患者数の把握ができたと考えられる。

D. 考察

①Vero h SLAM細胞を用いたウイルス分離では14日に陰性となった検体についてPCR法を行ったところ、4℃及び-20℃保存で21日間経過後、保存で14日間経過後も検出可能であった。今回は実際の患者検体を供する機会がなかったが、今後患者検体を用いた検討が必要である。

また、現行のnested double RT-PCR法は鋭敏な検出法であるが、手技が煩雑で全工程に8時間程度を要するため、同程度の感度を維持しつつより簡便・短時間で結果の出せる検査法の開発が必要である。

WHOの麻疹診断基準では患者血清からのELISA法を用いたIgM抗体検出が採択されているが、病原体サーベイランスとくにワクチン接種後の発症におけるワクチン・野外株鑑別や、輸入 (若しくは輸出) 麻疹が疑われる場合には遺伝子型決定が不可欠である点からも地研実験室においてはウイルス分離・PCR検出を積極的に行う必要性があるのではないだろうか。

②愛知県における麻疹発生報告状況をみると14歳以下の麻しんについては定点報告によって把握可能であったが、15歳以上の成人麻しんは全数把握の導入がなければ捕捉手段のない無床診療所等から多くの報告が寄せられ、基幹定点はセンチネルとしては機能していなかった。今後ワクチン接種率の向上に伴い成人麻しんに占める修飾麻疹はじめ症麻疹の割合がさらに上昇し、これらの患者は基幹定点以外の医療機関を受診すると考えられるので、全数報告への移行は、とくに15歳以上患者の把握に威力を発揮するものと期待される。

E. 結論

①Vero h SLAM細胞を用いたウイルス分離では14日に陰性となった検体についてPCR法を行ったところ、21日間経過後も検出可能であった。現行のnested double RT-PCR法と同程度の感度を維持しつつより簡便・短時間で結果の出せる検査法の開発が必要である。②愛知県における麻疹発生報告状況をみると15歳以上の成人麻しん把握には全数把握がとくに有用であった。麻しんは2008年1月より新たに全数報告対象疾患とされたので、今後は他の先進諸国に比べ低いとされている実験室診断率の向上が、重要な課題として残ることにな



る。

平成19年患者発生状況について 平成19年度愛知県公衆衛生研究会、愛知県大府市、2008 1月

G. 研究発表

1. 論文発表

皆川洋子：図説：発症様式からみた遅発性ウイルス感染症の特徴 日本臨床、65(8)：1356-1359, 2007

2. 学会発表

続木雅子ほか：愛知県麻疹全数把握事業における

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

表1 保存検体からの麻疹ウイルス検出結果

1-1 VerohSLAM細胞を用いたウイルス分離

A 遠心沈渣

	時間(h)	0	20	24 (1d)	48 (2d)	72 (3d)	96 (4d)	168 (7d)	336 (14d)	504 (21d)
保存温度	4℃	ND*	+	+	+	+	+	+	+	-(陰性)
	-20℃	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
	室温	ND	+	+	+	+	-	ND	ND	ND
	-80℃	+(陽性)	+	+	+	+	+	ND	ND	+

ND: not done.

B 遠心上清

	時間(h)	0	20	24 (1d)	48 (2d)	72 (3d)	96 (4d)	168 (7d)	336 (14d)	504 (21d)
保存温度	4℃	ND	+	+	+	+	+	-	-	-
	-20℃	ND	+	+	+	+	+	+	+	-
	室温	ND	+	+	+	-	-	ND	ND	ND
	-80℃	+	+	+	+	+	+	ND	ND	+

1-2 nested double RT-PCR法による増幅

A 遠心沈渣

	時間(h)	0	20	24 (1d)	48 (2d)	72 (3d)	96 (4d)	168 (7d)	336 (14d)	504 (21d)
保存温度	4℃	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
	-20℃	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
	室温	ND	+	+	+	+	+	ND	ND	ND
	-80℃	+	+	+	+	+	+	ND	ND	+

B 遠心上清

	時間(h)	0	20	24 (1d)	48 (2d)	72 (3d)	96 (4d)	168 (7d)	336 (14d)	504 (21d)
保存温度	4℃	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
	-20℃	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
	室温	ND	+	+	+	+	+	ND	ND	ND
	-80℃	+	+	+	+	+	+	ND	ND	+

表2 愛知県における麻疹患者数の把握状況

	定点	定点/全数比	全数把握	把握期間
成人麻疹	11 (13定点)	8.9%	123	2007年2-12月
麻疹	45 (182定点)	50.6%	89	
成人麻疹	0 (13定点)			2006年
麻疹	43 (182定点)			

平成19年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

麻疹のサーベイランス・システムの確立

「麻疹の遺伝子検査方法に関する検討」

統括分担研究者 沼崎 啓（国立感染症研究所ウイルス第三部 第三室 室長）  
研究協力者 伊藤 正寛（京都市東山保健所・所長、京都市衛生公害研究所微生物部門）

研究要旨：麻疹ウイルスのH領域に設定した primer を用いて real-time RT-PCR 法を構築し、他の方法と比較した。SYBR Green RT-PCR 法により  $1-10^6$  copy/ $\mu$ l の麻疹ウイルス RNA を検出可能であり、感度は国立感染症研究所マニュアルによる nested RT-PCR 法とほぼ同等であった。本方法は増幅時間は約 90 分、96 穴プレートを用いると 30 検体の処理が可能、アガロースゲル電気泳動が不必要、また定量的解析が可能である。今後麻疹サーベイランスの検査診断にも利用可能であることが示唆された。今後臨床検体を用いてウイルス分離、他の遺伝子増幅法と比較検討する。

#### A. 目的

麻疹は 2008 年 1 月から臨床診断または検査診断に基づいて全数報告されている。検査診断は 1) 血清抗体価測定または 2) 麻疹ウイルスの検出によって行われている。麻疹ウイルスの検出にはウイルスの分離同定または麻疹ウイルス遺伝子の検出が用いられている。遺伝子増幅による麻疹ウイルス遺伝子検出は方法によって感度、特異性が異なっている。今後サーベイランスシステムに適した統一した検査方法による診断基準を設定する必要がある。麻疹ウイルス遺伝子を検出するための検査方法を検討することを目的とした。

#### B. 材料と方法

以下に示す遺伝子増幅方法を比較検討した。

1) RT-PCR（病原体検出マニュアル、国立感染症研究所、平成14年3月）

2) Real-time RT-PCR

Edmonston strain の H 領域に primer-express を用いて primer を設定し、麻疹ウイルス D5 に特異的な probe を設定した。用いた primer と TaqMan probe の塩基配列を示す。  
Forward; CAGATGACAAGTTGCGAATGG,  
Reverse; AAAATCCAAGCACTCTGCGAG  
Probe; ATGCTTCCAGCAGCGTGTAAG  
Real-time RT-PCR は Reverse transcription 42°C, 5 min, PCR reaction は 95°C, 5sec, 60°C 31sec, 40 サイクル行った。増幅遺伝子は TaqMan probe 法と SYBRgreen を用いて検出した。以下、SYBRGreen 法を SYBR green RT-PCR(A) と表記する。

3) SYBR green RT-PCR (B)

Pulnet S らが報告した SYBR Green RT-PCR 法 (J Virol Methods, 128, 79-97, 2005) を SYBR green RT-PCR (B) と表記する。

麻疹患者検体を B95a 細胞に接種し継代培

養後に得られた培養上清液から RNA を抽出した。D5 型野生株ウイルスを Real-time RT-PCR 用に設定した primer を用いて増幅し、in vitro RNA 合成キットを用いて合成した麻疹ウイルス RNA を標準 RNA として用いた。

### C. 結果

#### (1) 感染研マニュアルによる RT-PCR

麻疹野生株 (2007 年流行 D5 型) の培養上清液から RNA を抽出し 10 倍階段希釈し、RT-PCR を行ったところ  $10^{-4}$  まで検出された。(図 1)

#### (2) Real-time RT-PCR

合成 RNA を階段希釈し Real-time RT-PCR, SYBR Green(A) 法により検出したところ、 $10^6 \cdot 10 \text{ copy}/\mu\text{l}$  まで増幅検出された(図 2)。各ウイルス濃度の Threshold の蛍光強度に達するサイクル数(Ct value) から直線状の検量線が得られた

(correlation=0.998, 図 3)。図には示していないが、 $1 \text{ copy}/\mu\text{l}$  まで検出可能であった。感染研による nested-RT-PCR 法により検出された  $10^{-4}$  希釈液のウイルス量は  $2.5 \text{ copy}/\mu$  であった(表 1)。合成 RNA を Real-time RT-PCR により増幅し TaqMan probe を用いて検出すると、SYBR Green 法に比較して Ct Value は高く、感度は低かった。(図 4)

#### (3) SYBR green RT-PCR(B)

2007 年に分離された麻疹ウイルスの培養液 (D5 型) から RNA を抽出し、10 倍階段希釈し Pulnet らの SYBR Green RT-PCR(B) により計算されたウイルスコピー数を比較すると、Real-time RT-PCR(A) 法より感度は低かった。(表 1)

### D. 考察

麻疹の初感染の典型例では臨床症状から診断が可能である。今後日本において麻疹ワクチン接種率が向上し、麻疹患者の発生が減少すると、初感染よりワクチン接種後の麻疹、修飾麻疹が増加することが予想される。修飾麻疹の臨床症状は非定型的のことが多く、検査診断が必要である。現在抗体測定は IgM 抗体またはペア血清、病原体診断はウイルスの分離同定または遺伝子検出が用いられている。麻疹の発生動向の把握にはいくつかの検査方法が必要であるが、今後麻疹の制圧の判定には検査方法の統一が必要である。臨床検体は咽頭ぬぐい液、血液いずれを用いるか、迅速性、簡便性、高感度、高特異性のある検査方法の確立と統一が病原体サーベイランスに必要である。現在多くの衛生研究所は感染症研究所のマニュアルに示された、nested RT-PCR 法を用いているが、本方法は迅速性に欠ける。今後異なった施設における共同研究が必要である。

図 1. 2007 年に分離された麻疹ウイルス (D5 型) の培養液から RNA を抽出し、10 倍階段希釈し nested RT-PCR を行った。lane 2: sizemaker, lane 3:  $10^{-1}$ , lane 4:  $10^{-2}$ , lane 5:  $10^{-3}$  lane 5:  $10^{-4}$

図 2. real-time RT-PCR による合成標準 RNA ( $10^6$ - $10 \text{ copy}/\mu\text{l}$ ) の増幅

図 3. 検量線 ( $10^6$ - $10 \text{ copy}/\mu\text{l}$ )

図 4. 10 倍階段希釈ウイルス液の各 RT-PCR 法による Ct value

表1 麻疹ウイルス遺伝増幅法の比較

RNA Dilution*	Nested RT-PCR	SYBR green RT-PCR(A)	TaqMan Real time RT-PCR	SYBR green RT-PCR(B)
1	+	$5.6 \times 10^4$	$5.6 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$
$10^{-1}$	+	$5.6 \times 10^3$	$5.7 \times 10^3$	$4.3 \times 10^3$
$10^{-2}$	+	$2.9 \times 10^2$	$5.9 \times 10^2$	$2.5 \times 10^2$
$10^{-3}$	+	$1.9 \times 10$	negative	$4.4 \times 10$
$10^{-4}$	+	2.5	negative	negative
$10^{-5}$	negative	negative	negative	negative

2007年に分離された麻疹ウイルス(D5型)の培養液からRNAを抽出し、10倍階段希釈し、それぞれの遺伝子増幅法を行った。各方法毎の検量線からウイルスコピー数を算出した。(copy/ $\mu$ l)

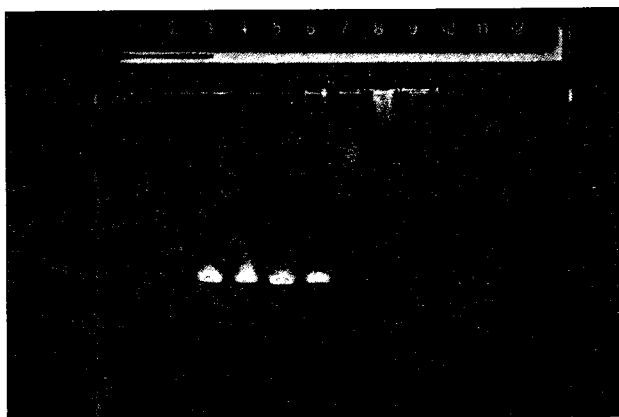


図1

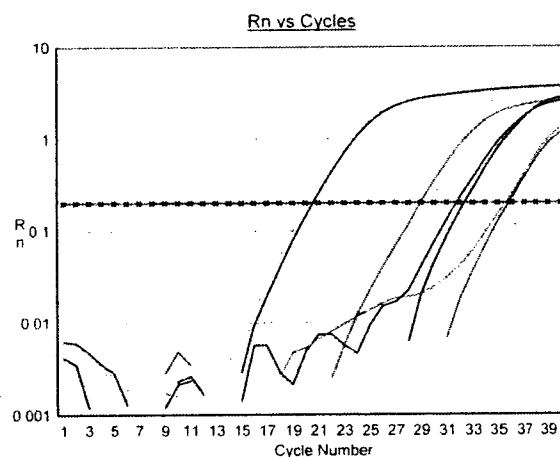


図2

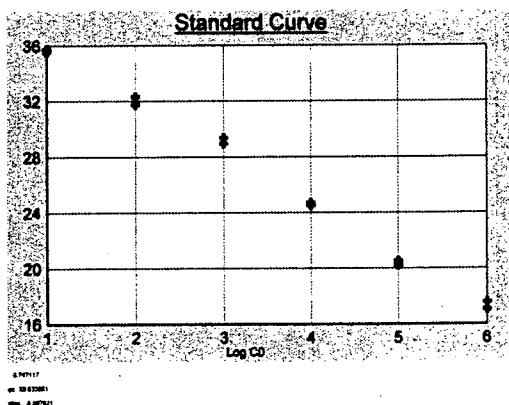


図3

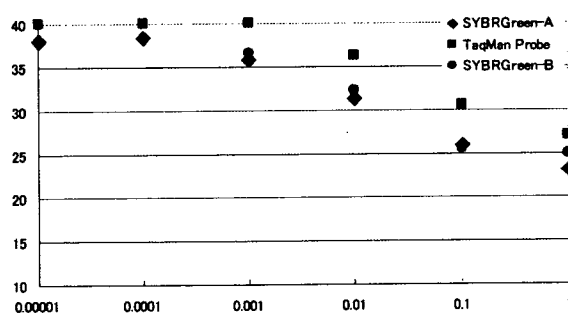


図4