

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助(新興・再興研究事業)

「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」 麻しん研究小班

研究協力者報告

研究課題：堺市におけるこれまでの麻しん対応と 2007 年の発生状況について

研究協力者	田中智之	堺市衛生研究所
研究協力者	狩山雅代、内野清子、吉田永祥	堺市衛生研究所
	片桐真二、西垣正憲、樋上忍	堺市医師会

研究要旨：

2007 年、当市での全数把握による麻しん患者の報告数は 203 例であった。RT-PCR 法、抗体検査による実験室内診断症例、典型的な臨床症状の見られた症例を含めた麻しん確定診断は 116 例であった。麻しんウイルス遺伝子検出法が最も多く (52.6%)、今後の検査方法に再考の余地を与えた。

6 月に報告のピークがあり、確定患者 116 例の年齢別分布は 1 峰性で、10 歳から 14 歳が 21 例、15 歳から 19 歳が 41 例で両方で半数以上を占めた。

ワクチン接種率を年齢別患者報告数と比較すると、5 歳から 9 歳の年代は 50%、15 歳から 19 歳の年代は 34%、20 歳から 24 歳の年代は 73%で、発生患者数と逆相関にあった。

以上のことから、麻しん全数把握事業は今後も遂行すべき事業であり、さらに、ワクチン接種は麻しん撲滅対策には欠かせない事業であることが、今回の小研究からも改めて認識された。

A. 研究目的

2007 年初めに東京都、埼玉県を中心に麻しん患者の発生があいついで報告され、同年 5 月には大学生の集団発生が多数報告された。過去の麻しん流行時の年齢別発生状況は、3 歳以下の乳幼児が約 90%を占め、成人麻しんは 2~3%であった。しかし、本年の流行は 10~19 歳以上の比較的年長者の麻しん患者の増加が特徴であった。

堺市では 1999 年~2000 年の麻しん大流行を教訓に、2003 年から堺市小児科医会と堺市感染症情報センター（以下、情報センターという。）が協力して「麻しん全数報告の試み」を開始している。この制度を始めてから当市の麻しん確定症例は、2003 年 20 例、2004 年 4 例、2005 年 2 例、2006 年は 1 例であった。しかし、2007 年は 3 月より麻しん患者の報告が急増し 203 例とな

った(表 1)今回、これまで行った麻しん患者全数報告の意義について検討したので報告する。

B. 研究材料と方法

1. 材料

2007年3月から12月の期間に市内医療機関(延べ74機関)から報告された麻しんを疑う患者203例から、採取可能であった90例の咽頭ぬぐい液および末梢血液を対象にウイルス分離と麻しんウイルス遺伝子の検出を行った。

2. 方法

麻しん全数報告システム: これまでの当市の麻しん全数把握事業は、小児科医会会員及び病院が麻しん患者を診察後、別表の調査票(表2)を直ちに情報センターへFAXし、情報センターは直ちに小児科定点へ「麻しん患者発生速報」をFAXにて通知すると共に、小児科医会は保健所、学校保健及び保健所等へ麻しん発生情報を通達し注意を喚起するシステムであった。2007年の麻しん流行期では、成人麻しんの発生が多数であったため、前述の小児科医会中心の対応では不十分との考えから、新たに内科医師会、皮膚科医会が参画した。情報センターは、患者検体採取の方法や衛生研究所への検体搬入、検査結果の還元などのマネジメントを担った。

実験室診断: 発熱、発疹、コプリック斑等麻しん症状が明らかに認められた症例は臨床診断で麻しんと診断された。麻しんIgMおよびIgG抗体は、

各医療機関の成績を用いた。衛生研究所では、前述の咽頭拭い液、末梢血液を用いてVero SLAM細胞による麻しんウイルス分離を試みた。また、RT-PCR法による麻しんウイルス遺伝子検出は、感染研-全国地研共編の「麻しん検査マニュアル」に従った。RT-PCR産物はシーケンスにてウイルスの型別を解析した。

C. 研究成果

流行実態: 2007年第12週から麻しん及び麻しん疑いの患者報告が始まり、第52週までに203例となった。第20週から第25週までは毎週10例以上の報告があり、ピークは第24週28例であった(図1)。

月別発生状況では、6月に報告のピークがあり、全数報告では68例、定点報告12例であった(図2)。

確定患者116例の年齢別分布は、0歳が8例、1歳から4歳が10例、5歳から9歳が10例、10歳から14歳が21例、15歳から19歳が41例、20歳から24歳が11例、25歳以上は15例であった。小児の麻しんが49例(42%)、15歳以上の成人麻しん67例(58%)と成人麻しんが優位を占めた。

ワクチン接種率を年齢別患者報告数と比較すると、5歳から9歳の年代は50%、15歳から19歳の年代は34%、20歳から24歳の年代は73%であった(図3)。

推定感染経路:

小学校、中学校、高校等の集団感染が少なくとも4事例あったが不明症例

が最も多かった。詳細が判明している院内感染事例は、A病院待合室で30歳の麻疹患者から4名の小児（1歳から4歳）への二次感染が確認されている。

当市での初発事例は家庭内感染で、27歳父親から生後4カ月の三女への二次感染で、患児から麻疹ウイルスが分離された。長女、二女は麻疹ウイルスワクチン接種の既往があり、母親は幼児期に麻疹罹患の既往があった。

実験室内診断成績：確定診断症例は116例(57.1%)である(図4)。単独の方法での陽性率は、RT-PCR法46例(39.7%)、抗体検査26例(22.4%)、臨床診断28例(24.1%)で、ウイルス分離は1%に満たなかった。一方、複数の検査による陽性検体は75%に及んだ。麻疹ウイルス遺伝子が検出された検体は全てD5遺伝子型に分類された。

D. 考察

2007年に東京都、埼玉県を中心とした関東地方での麻疹流行は全国に拡大し、堺市でも第12週から麻疹患者の報告がされ始めた。

当市は1999年12月、堺市で始まった麻疹の流行が大阪府内(および全国)に拡大した苦い経験を持っており、この事例を教訓に、誕生日には麻疹ワクチン接種のキャンペーンを実施し、2003年からは「麻疹全数報告の試み」を開始している。このシステムは堺市医師会小児科医会と情報センターが連携して、麻疹患者発生情報

をリアルタイムに市内の医療機関、小学校、保育所等に連絡するシステムである。

この制度実施後の麻疹確定症例は、2003年20例であったが、2004年4例、2005年2例、2006年1例と減少傾向であった。この間、表面的な麻疹発生状況は減少しているが、ワクチン接種による根本的予防策が不十分であったと言わざるを得ないことが本年の流行から判明した年齢分布から推察された。

2007年8月にわが国における麻疹排除計画が策定された。主な内容は95%以上の予防接種率の達成と維持、麻疹・風疹報告を定点把握感染症から全数把握感染症に変更、地方麻疹対策会議の設置などである。それと共に2012年までに全国的な麻疹レファレンスシステムの充実、遂行が求められ、2012年にはWHOと歩調合わせべく麻疹撲滅宣言を謳うものである。当市の2003年より培ってきた麻疹全数報告体制は、今後も引き続き活用し、国の麻疹排除の目的達成の支援に努めていきたい。

E. 結論

2007年堺市麻疹全数報告は、第12週から報告がはじまり、6月の患者報告数のピークとともに、第52週までに203例の患者報告があった。咽頭拭い液、末梢血液などの臨床検体からRT-PCR法46例、抗体検査26例、ウイルス分離13例が、臨床診断のみ28例(重複診断を含む)を加えて116例の

確定診断を得た。

15歳以下の小児麻疹 49例(42%)、
15歳以上の成人麻疹 67例
(58%)

であった。患者報告数が高い年代は15歳から19歳の41例(34%)である。麻疹確定例の116例のワクチン接種率を年齢別に比較すると、5歳から9歳は50%、10歳から14歳及び15歳から19歳は34%、20歳から24歳が73%で、高い発症患者の年齢層とワクチン接種歴の低い年齢層は逆相関であった。

感染経路は、高校の集団感染、院内感染、家庭内感染が認められたが不明が最も多かった。

F: 健康危機情報

なし

G: 研究発表

1) 論文発表

なし

2) 学会発表

内野清子、三好龍也、田中智之
堺市における2007年麻疹
流行疫学と麻疹対策
第55回日本ウイルス学会学
術集会 札幌市 2007年10
月

H: 知的財産権の出願、登録状況

なし

表 1. 堺市のこれまでの麻しん発生状況（成人麻しん）

平成 11 年	160	
平成 12 年	556	
平成 13 年	153 (0)	
平成 14 年	14 (2)	
平成 15 年	20 (1)	堺市麻しん全数把握事業開始
平成 16 年	4 (0)	(確定診断 116 例)
平成 17 年	2 (2)	
平成 18 年	1 (1)	
平成 19 年	203	
平成 20 年	(調査研究継続中)	

麻 疹 患 者 調 査 票

1. 患者基礎情報 患者ID番号かイニシャル () 男・女
 生年月日 平成 年 月 日 (歳 ヲ月)
 住所 堺市 丁
2. 発病年月日 平成 年 月 日
3. 予防接種歴 なし (1歳誕生日時の住所 堺市 堺市以外)
 あり (平成 年 月 日 ワクチンLot番号)
 受けなかった理由は? (1歳未満、病気のため、時間がなかった、副作用が心配だから、効果に疑問があるから、卵アレルギーがあるから、信念から、その他)
4. 推定感染経路 (家族、幼稚園、保育園、友人、診療所、病院、不明)
5. 有熱期間 日間
6. 合併症 なし・あり (気管支炎、肺炎、脱水症、熱性けいれん、中耳炎、髄膜炎、脳炎 その他 (
7. 転帰 治癒・入院 (病院) ・死亡・後遺症
8. 通院日数 日
9. 診断根拠 症状 (コプリック班、色素沈着、
 抗体検査 月 日 結果 月 日 結果
 HI HI
 E I A I g G E I A I g G
 E I A I g M E I A I g M
- 10 初診から麻疹診断までの日数 (初診日を1日として) と通院回数 日 回
11. 麻疹診断まで院内で隔離していましたか? はい・いいえ
12. 診断後の隔離処置
 隔離室で待たして診察室で診察 隔離室で診察 診察時間を別にする
13. 治療 (ガンマグロブリン・抗生剤・鎮咳剤・整腸剤・補液・その他)
14. この患者から院内感染と思われる患者がありましたか あり・なし
- 報告医療機関名 () 報告者名 ()
 標榜科 小児科 内科 外科 産婦人科 その他 ()
 感染症サーベイランス定点ですか? はい・いいえ

表 2. 堺市麻しん全数把握患者調査表

図 1. 平成 19 年麻しん報告 (週別)

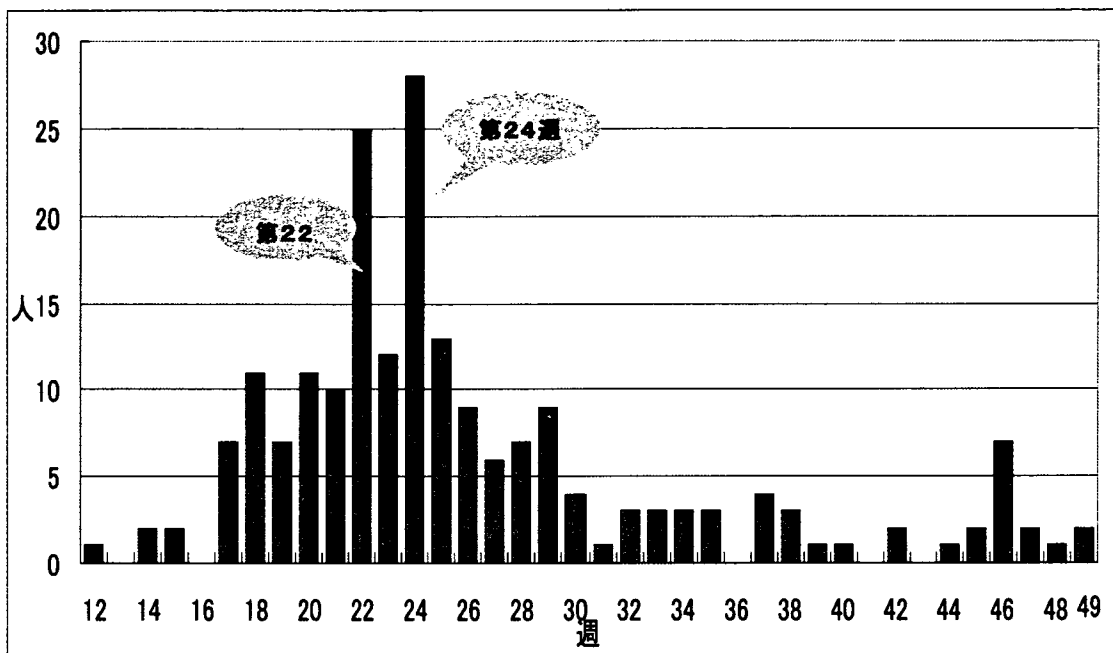


図 2. 平成 19 年麻しん報告 (月別)

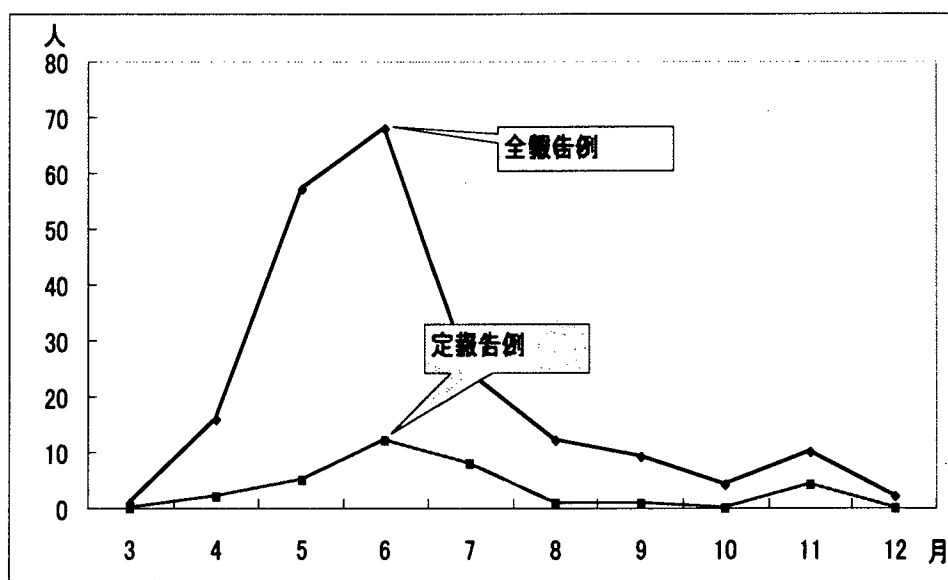


図 3. 麻しん年齢別患者数とワクチン接種率

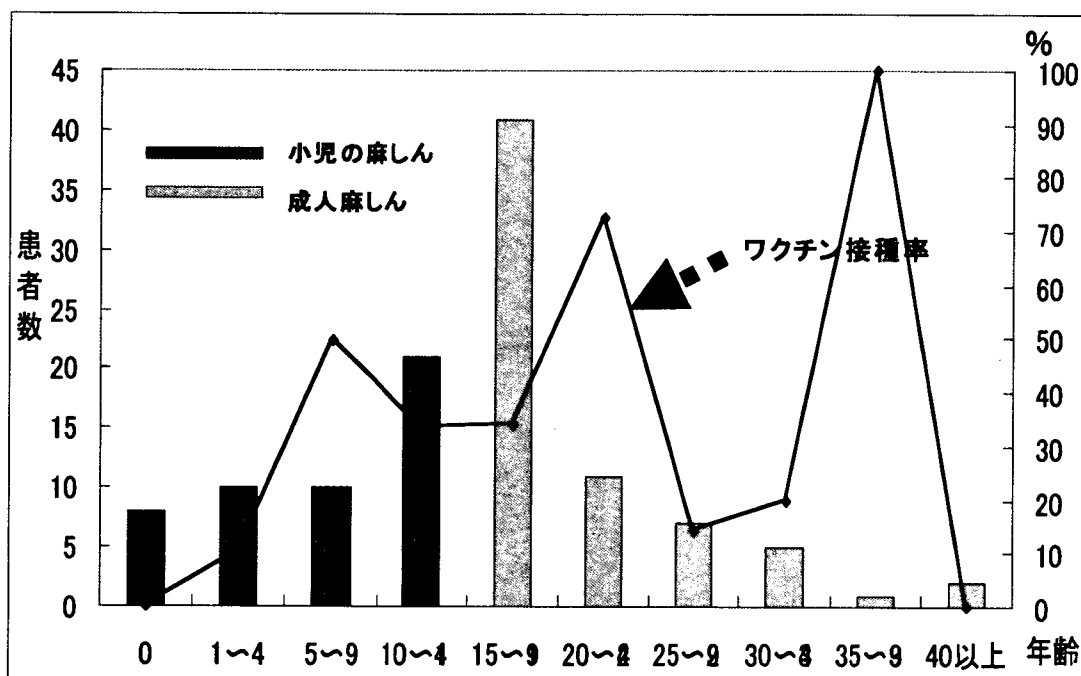


図 4. 麻しん確定診断 116 例の内訳 (重複例含む)

	PCR	抗体検査	ウイルス分離	臨床診断のみ
RT-PCR	46	3	11	
			1	
抗体検査		26		
ウイルス分離			1	
臨床診断のみ				28

沖縄地方における麻疹サーベイランスシステムの確立

平良 勝也 沖縄県衛生環境研究所

研究要旨

沖縄県では、麻疹を排除するための対策の一つとして、全数把握制度による麻疹サーベイランスシステムを構築し2003年1月より実施している。本研究では、まず、このサーベイランスシステムの有効性を検証するため、2003-2007年のサーベイランス成績を分析した。その結果、全数把握システム導入後、麻疹患者は年間20例前後で推移し(2005年は発生なし)、2006年と2007年には感染源及び症例間のつながりもすべて明らかにされたことから、本県の麻疹サーベイランスシステムは有効に機能していることが示唆された。次に、検出された麻疹ウイルス(MV)のNucleoprotein(N)遺伝子に関する分子疫学解析を行った。その結果、県内におけるMVの遺伝子型は、H1、D3、D5が確認され、それぞれのウイルス株は、国内の分離株と同じクラスターに位置し、高いホモロジーを示した。

A.研究目的

麻疹は、感染症法において5類感染症に位置づけられる定点把握対象疾患である。沖縄県は、麻疹を排除するための対策の一つとして、麻疹全数把握のためのサーベイランスシステムを県独自で構築し、2003年1月より先進的に実施している。これにより、定点以外の医療機関(定点外)からも麻疹の報告がなされている。また、このサーベイランスシステムでは、麻疹の発生報告が、疑い例の段階で報告され、全ての症例において検査診断が行われるのが特徴である。

本研究では、これまで実施してきた全数把握による麻疹サーベイランスシステムの有効性を検証するため、2003-2007年の麻疹サーベイランス成績を分析した。さらに、最近の麻疹ウイルスの遺伝子型やその動態を調べるため、検出されたMVのN遺伝子のシーケンス及び分子系統樹解析を行った。

B.研究方法

本県の麻疹サーベイランスシステムの概略を図1に示した。

検査に用いた臨床検体は、本人または保

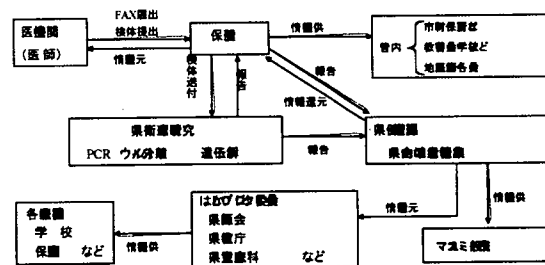


図1. 沖縄県の麻疹サーベイランスシステム

護者から書面にてインフォームドコンセントを得た後、咽頭ぬぐい液及び末梢血液が採取された。これらの臨床検体は、常法にてRNA抽出後、病原体検査マニュアル(国立感染症研究所)に基づいてN遺伝子のRT-PCR、nested-PCRを実施した。また、咽頭ぬぐい液は前処理後、常法にてVero/hSLAM細胞に接種した。

PCR陽性検体についてはダイレクトシーケンスを行い、得られたMVのN遺伝子(385bp)のシーケンスについて、MEGA4(free software)を用いて分子系統樹を作成した。

C.研究結果

2003-2007年に実施された麻疹サーベイランス成績を表1に示した。医療機関

からの麻疹疑い例の報告数は年々増加し、5年間で292例が報告された。報告数が132例と最も多かった2007年は、定点よりも定点外から多く報告された。

全報告例のうち、医療機関が検体を提出し、PCR及びウイルス分離が実施されたのは259例(89%)であった。2005-2007年は、高い検査実施率(93-97%)を維持した。

麻疹が確定した症例は、5年間で合計75例であった。年別では、2003年19例、2004年16例、2005年0例、2006年18例、2007年22例で推移した。これら麻疹確定例のうち臨床症状のみによる診断は2003年の9例と2004年の2例、合計11例(15%)であった。それ以外の64例(85%)は検査による診断が行われた。

PCR及びウイルス分離の結果は、検査した259例中、52例がPCR陽性、そのうち35例でウイルスが分離された。PCRが陽性となった52例について、N遺伝子をシーケンスし、遺伝子型を検索したところ、D3、D5、H1が確認された。年別で見ると、2003年はD5が2例、H1が4例、2004年はD3が3例、H1が5例、2006年と2007年はD5がそれぞれ18例と20例であった。

分子系統樹解析の結果を図2に示した。県内で検出された遺伝子型H1、D3、D5のMV株は、それぞれ国内(札幌市、群馬県、大阪府、東京都、島根県など)で検出されたウイルス株と同じクラスターに位置し、高いホモロジーを示した。しかし、2003年のD5と2006年及び2007年のD5は、それぞれ異なる標準株のクラスターに位置していた。

D. 考察

定点外からの麻疹患者報告数は、全数報告制度の定着率を評価する一つの指標と考えられる。2005年と2006年には、

定点と定点外でほぼ同数となり、2007年は定点外の方が定点よりも多く(1.6倍)報告された。この結果から、本県のサーベイランスシステムは着実に定着してきていると推察された。

PCR検査及びウイルス分離は、2005年以降90%以上の高い実施率を維持しており、その重要性は各医療機関に認識されてきていると考えられた。

2006年と2007年に麻疹が確定した40例は、疫学調査の結果、すべての症例について感染源及び感染経路が特定された。患者のほとんどは高校生または大人で、感染源はすべて県外と推定された。これを発端とした2次または3次感染例も発生したが、短期間で終息した。その理由として、PCR検査による迅速診断と速やかな情報還元が、麻疹発生時における保健所の迅速かつ効果的な対応に寄与していることが考えられた。

これまで全数把握制度で報告された症例の7割以上は、麻疹否定例であった。これは、疑いの段階で報告するという迅速性に重きが置かれたサーベイランスの結果であることが考えられた。

分子系統樹解析の結果、県内で検出された遺伝子型H1、D3、D5のMVウイルス株は、それぞれ国内で検出されたウイルス株と同じクラスターに位置し、高いホモロジーを示した。特に、2006-2007年に検出されたD5の株間のホモロジーは100%一致し、2007年に群馬県や東京圏で検出されたD5とも100%一致した。この結果は、2006-2007年の感染源がすべて県外であったという疫学調査結果を支持した。

E. 結論

過去5年間の麻疹サーベイランス成績を分析した結果、本県の麻疹サーベイランスシステムは有効に機能していること

が示唆された。分子系統樹解析の結果、県内における MV の遺伝子型は、H1、D3、D5 が確認され、それぞれのウイルス株は、国内の分離株と同じクラスターに位置し、高いホモロジーを示した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Katsuya Taira, Masaji Nakamura, Shou Okano, Minoru Nidaira, Jun Kudaka, Kiyomasa Itokazu, Takeyasu Taira, Toru Itokazu, Masao Chinen, Tomimasa Sunagawa, Hirokazu Kimura, Phylogenetic analysis of nucleoprotein (N) gene of measles viruses prevalent in Okinawa, Japan during 2003-2007 (JJID 投稿中)

知念正雄, 浜端宏英, 糸数公, 譜久山民子, 平良勝也, 麻疹排除に向けた取り組み 沖縄県はしか '0' プロジェクト—全数把握事業と移入麻疹発生について—, 臨床と微生物, 35, 1, 2008

2. 学会発表

平良勝也, 岡野祥, 仁平稔, 中村正治, 沖縄県における麻疹全数把握システムの実施状況. 日本獣医公衆衛生学会, 2008年2月 香川

H. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

表 1. 全数報告による麻疹サーベイランス成績

2003-2007 年

	2003年	2004年	2005年	2006年	2007年	合計
麻疹発症数	39	33	29	68	132	292
定点医療機関報告数	23	28	12	31	50	144
症例医療機関の報告数	16	5	17	28	82	148
検査実施回数(検査にかか る数)	29	31	28	69	129	276
検出率	74%	94%	97%	100%	98%	95%
(B) ウイルス検査 能率検査施設 (PCR・ウイルス分離)	24	26	27	67	126	269
検出率	62%	79%	93%	97%	95%	89%
(A) 血清検査 施設数 (gM、IgG測定)	17	24	10	27	46	123
検出率	44%	73%	34%	46%	34%	42%
麻疹罹患 数	19	16	0	18	22	75
検出率	49%	48%	0%	31%	17%	26%
麻疹の 発症 数	8	2	0	0	0	11
検出率	47%	13%	0%	0%	0%	15%
麻疹検査 実施 例	10	14	0	18	22	64
検出率	53%	88%	0%	100%	100%	85%
麻疹罹患 数	20	17	29	41	110	217
検出率	51%	52%	100%	69%	83%	74%

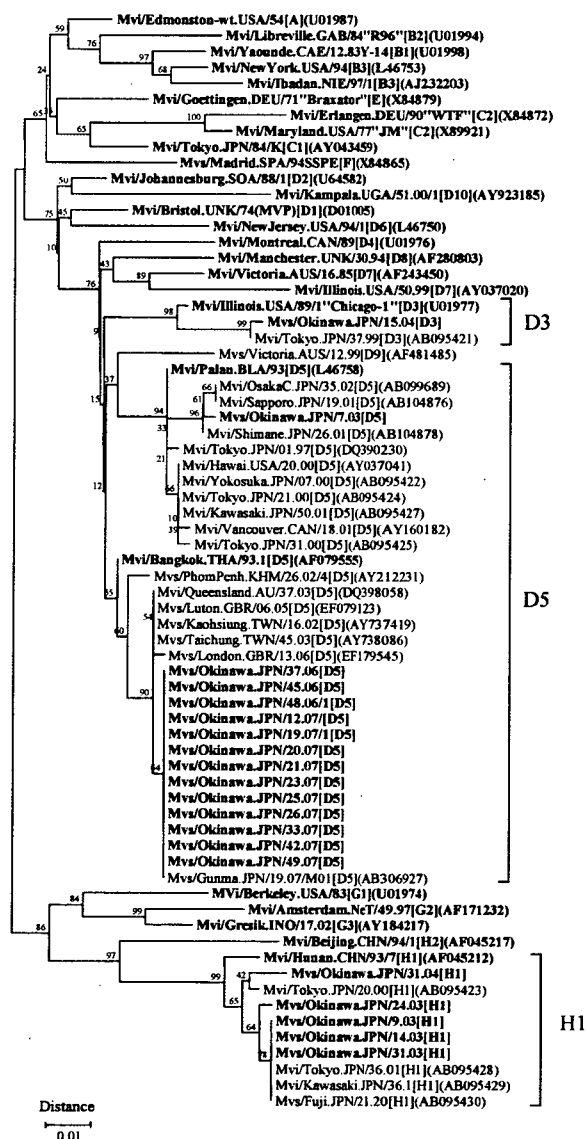


図 2. 2003-2007 年に沖縄県で検出された MV (Ngene) の分子系統樹

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

麻疹及び風疹の全数把握のための迅速な検査法の検討

研究協力者 小倉 肇、 濱野雅子（岡山県環境保健センター）
寺田喜平（川崎医科大学 小児科）

研究要旨：

2008年1月から全数把握対象となった麻疹及び風疹の病原体サーベイランスのため、感染症発生動向調査で病原体検索を担当する地方衛生研究所において、迅速且つ比較的簡便に実施しうる麻疹ウイルス及び風疹ウイルスの遺伝子検出法として、RT-LAMP法とRT-PCR法を比較検討した。麻疹ウイルスワクチン株では、RT-LAMP法で ≥ 0.11 CCID₅₀/testまで検出し得た。RT-PCR法では、1st-PCRで ≥ 1.1 CCID₅₀/test、nested-PCRで ≥ 0.0011 CCID₅₀/testまで検出し得た。風疹ウイルスワクチン株では、RT-LAMP法で ≥ 0.012 PFU/testまで検出し得た。RT-PCR法では、1st-PCRでは検出できなかったが、nested-PCRで ≥ 1.2 PFU/testまで検出し得た。各検査法における検体前処理～判定までの最短所要時間は、RT-LAMP法では麻疹ウイルス風疹ウイルスともに約155分であった。RT-PCR法では、麻疹ウイルスの場合約665分、風疹ウイルスの場合約490分であった。RT-LAMP法は、増幅産物で詳細な遺伝子解析を行うことが困難であるという欠点はあるが、迅速性・簡便性に優れること、同一条件で麻疹・風疹両ウイルスを同時検索可能であることから、患者の迅速な鑑別診断と病原体スクリーニング検査法として有用であると考えられた。

A. 研究目的

感染症発生動向調査において、2008年1月より麻疹および風疹の患者全数把握体制がスタートし、従来は定点把握対象感染症として小児科の定点医療機関で診断報告されてきた麻疹及び風疹の患者数は、すべての年齢を対象に全医療機関で診断報告されることとなった。この2つの感染症に関しては、当面臨床症状のみによる診断も認められているが、全数報告対象感染症の患者報告基準は、基本的に臨床症状と微生物学的または免疫学的検査結果の双方を元に診断することとなっている。従来は主としてIgM抗体保

有の確認ないしは抗体の有意上昇をもって確定診断がなされたが、この方法では病原体側の特徴をとらえることができない。また、公衆衛生行政の見地から見れば、麻疹および風疹ともに感染力の強い感染症であり、学級閉鎖等、早急な蔓延防止対策のために迅速な早期診断が不可欠であるとともに、ワクチン開発などの中長期的対策のためには、病原体そのものの解析も欠かせない。以上の理由から、全数把握対象感染症となった麻疹および風疹の診断と病原体捕捉のために、迅速かつ特異的な微生物学的検出法を検討した。

平成 19 年度は、感染症発生動向調査で病原体検索を担当する地方衛生研究所等において、迅速且つ比較的簡便に実施できる麻しんウイルス及び風疹ウイルスの遺伝子検出法として、RT-LAMP 法と RT-PCR 法を比較検討した。

B. 研究材料と方法

1. 供試ウイルス

ウイルス検出用試料として、麻しんウイルス乾燥弱毒生ワクチン(AIK-C 株、(株)北里研究所製、製造番号：MA002、ウイルス含有量 ≥ 7000 CCID₅₀ / バイアル)、風疹ウイルス乾燥弱毒生ワクチン(TO-336 株、武田薬品工業(株)製、製造番号：E601、ウイルス含有量 ≥ 1400 PFU / バイアル)を用いた。

2. ウイルス RNA の抽出

乾燥生ワクチンを当所使用のウイルス検体輸送液(10.0%牛血清アルブミン 0.5%ゼラチン 0.47%HEPES 500U/ml ペニシリン 500 μ g/ml ストレプトマイシン 500 μ g/ml カナマイシン 添加 Ear1'BSS) で $10^0 \sim 10^6$ 倍に段階希釈したものから、核酸抽出装置(QIACube : QIAGEN 社製)と市販のウイルス RNA キット(QIAamp viral RNA mini kit : QIAGEN 社製)で RNA を抽出して供試検体とした。

3. RT-LAMP 法

RT-LAMP 法は、麻しんウイルスは Fujino, M.らの方法 (J. Med.Virol., 76, 406-413, 2005)、風疹ウイルスは Mori, N.らの方法 (J. Clin.Microbiol., 44, 3268-3273, 2006) に従い、抽出 RNA 5 μ l を表 1 に示すプライマーセットにより Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (RT-160C : 栄研化学(株)社製)を用いて 63 $^{\circ}$ C60 分間増幅を行い、濁度を経時的に測定して装置内蔵の解析ソフトにより自動判定した。

4. RT-PCR 法

麻しんウイルスの RT-PCR 法は HA 遺伝子を標的とする方法 (「病原体検出マニュアル」国立感染症研究所編、「麻しん」、11-13, 2002)、風疹ウイルスの RT-PCR 法は E1 遺伝子を標的とする方法 (「病原体検出マニュアル」国立感染症研究所編、「風疹」、9-12, 2002) に従って、それぞれ 1st-PCR、nested-PCR を実施した。使用したプライマーセットを表 2 に示す。麻しんウイルス RT-PCR は、抽出 RNA 5 μ l を 42 $^{\circ}$ C35 分逆転写し、その全量を増幅した。PCR 条件は、94 $^{\circ}$ C2 分プレヒート後 94 $^{\circ}$ C2 分 53 $^{\circ}$ C3 分(nested は 55 $^{\circ}$ C3 分)72 $^{\circ}$ C2.5 分を 30 サイクル増幅、ファイナルエクステンション 72 $^{\circ}$ C7 分で実施した。風疹ウイルスの RT-PCR は抽出 RNA 5 μ l を 42 $^{\circ}$ C60 分逆転写し、その 3/20 量を増幅したため、RNA 量換算としては 0.75 μ l であった。PCR 条件は 1st、nested ともに、94 $^{\circ}$ C2 分プレヒート後 94 $^{\circ}$ C1 分 55 $^{\circ}$ C2 分 72 $^{\circ}$ C1.5 分を 30 サイクル増幅、ファイナルエクステンション 72 $^{\circ}$ C5 分 で実施した。

(倫理面への配慮)

本研究は、研究材料として臨床検体、実験動物を使用しておらず、倫理面への配慮は必要ない。

C. 結果

1. RT-LAMP 法と RT-PCR 法による麻しんウイルスの検出

麻しんウイルスは、RT-LAMP 法では 10^3 倍希釈(≥ 0.11 CCID₅₀ / test)まで検出し得た。RT-PCR 法では、1st-PCR で 10^2 倍希釈(≥ 1.1 CCID₅₀ / test)、nested-PCR で 10^5 倍希釈(≥ 0.0011 CCID₅₀ / test) まで検出し得た(表 3)。

2. RT-LAMP 法と RT-PCR 法による風疹ウイルスの検出

風疹ウイルスは、RT-LAMP 法では 10^3 倍希釈 (≥ 0.012 PFU / test) まで検出し得た。RT-PCR 法では、1st-PCR では検出できなかったが、nested-PCR で 10 倍希釈 (≥ 1.2 PFU / test) まで検出し得た (表 4)。RT-LAMP 法と同量の RNA を増幅した場合の風疹ウイルス RT-PCR の検出限界を換算すると、nested PCR で ≥ 0.18 PFU になった。

3. RT-LAMP 法と RT-PCR 法の検査所要時間の比較

各検査法における検体前処理～判定までの最短所要時間は、RT-LAMP 法では麻疹ウイルス風疹ウイルスともに約 155 分であった。RT-PCR 法では、麻疹ウイルスの場合約 665 分、風疹ウイルスの場合約 490 分であった。(図. 1)

D. 考察

RT-LAMP 法と RT-PCR 法の検出感度を比較すると、同量の RNA を増幅した麻疹ウイルスの場合、RT-LAMP 法は RT-PCR 法 (1st) の 10 倍、RT-PCR 法 (nested) の 100 分の 1 であり、RT-LAMP 法が優れているとはいえなかった。一方、風疹ウイルスの場合は、増幅に供試得た RNA 量を等量と仮定して換算した場合の RT-PCR 法 (nested) と比較しても RT-LAMP 法が勝っていた。

検査所要時間では、RT-LAMP 法が麻疹ウイルス、風疹ウイルスともに RT-PCR 法の $1/4 \sim 1/3$ の時間で検出でき、迅速性では RT-LAMP 法が優れていた。また、麻疹ウイルス及び風疹ウイルスの RT-LAMP 法は同一の増幅条件であるため、少数の検体であれば同時検索が可能であり、逆転写、増幅条件ともに異なる両ウイルスの RT-PCR 法より有利と考えられる。

RT-LAMP 法のもう一つの利点は、新たな機器整備の必要がないことである。RT-LAMP 法には専用の測定機器である

Loopamp リアルタイム濁度測定装置が必要であるが、多くの地方衛生研究所においては SARS 対策用としてすでに整備されており、新規にこの検査法を導入しても機器購入の必要はない。

一方、RT-LAMP 法は、増幅産物を詳細な遺伝子解析に使用できない欠点があり、検出感度も考慮した場合、現時点では二者択一ではなく、RT-PCR 法との使い分けが効果的と考えられる。すなわち、ウイルス排出量が多いと考えられる有熱期の患者等の迅速診断に RT-LAMP 法を用い、陽性であれば速やかに報告するとともに RT-PCR 法を実施して詳細な解析を行う。麻疹ウイルスの場合は、RT-LAMP 法陰性の場合も RT-PCR 法を行ってウイルスの有無を確認する必要がある。

E. 結論

- (1) RT-LAMP 法の検出感度は、麻疹ウイルスでは nested RT-PCR 法より低く、風疹ウイルスでは nested RT-PCR 法より高かった。
- (2) 検査所用時間は、RT-LAMP 法は RT-PCR 法の $1/4 \sim 1/3$ であり、迅速性に優れ、増幅条件が同一であることから麻疹・風疹両ウイルスの同時検索も可能であった。
- (3) RT-LAMP 法は、増幅産物が遺伝子解析に使用できない欠点はあるが、迅速・簡便であり、RT-PCR 法と適切に組み合わせることで、患者の迅速な鑑別診断と病原体スクリーニングがより効率的に行う。

F. 研究発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表. 1 RT-LAMP法による麻疹ウイルス及び風疹ウイルス検出用プライマーセット

ウイルス名	プライマー名*	塩基長 (base)	塩基配列
麻疹 ウイルス	MV - F 3	18	5'-ACA TTG GCA TCT GAA CTC-3'
	MV - FIP	42	5'-TGT CCT CAG TAG TAT GCA TTG CAG GTA TCA CTG CCG AGG ATG-3'
	MV - F-Loop	14	5'-ATC TCT GAA ACA AG-3'
	MV - B 3	18	5'-TCC TCG ACT CTG TTT GAC-3'
	MV - BIP	48	5'-AGC CCA AGT GTC ATT TCT ACA CGG TGT CCT ATC TTC CTT GCC CCC C-3'
	MV - B-Loop	17	5'-CAA AGT GAG AAT GAG CT-3'
風疹 ウイルス	RuV - F 3	20	5'-GCA TCT GGA ATG GCA CAC AG-3'
	RuV - FIP	35	5'-AGA GGC CAG CTG CGC GTA CCG CGC GTG CAC CTT CT-3'
	RuV - F-Loop	15	5'-CCA GAG GAG TAG GCG-3'
	RuV - B 3	18	5'-CCG CTT GTG CGA GTA GTG-3'
	RuV - BIP	34	5'-ACC GCG TGC GAG GTT GAA TGT CGG TGG GGA AGC C-3'
	RuV - B-Loop	15	5'-CCT GCC TTC GGA CAC-3'

* 区別のため、原著論文のプライマー名に麻疹ウイルス用はMVを、風疹ウイルス用はRuVを付加した

表. 2 RT-PCR法による麻疹ウイルスおよび風疹ウイルス検出用プライマーセット

ウイルス名	1st or nested	プライマー名	塩基長 (base)	塩基配列
麻疹 ウイルス	1st用	MHL1	20	5'-AAC GGA TGA TCC AGT GAT AG-3'
		MHR1	20	5'-TTG AAT CTC GGT ATC CAC TC-3'
	nested用	MHL2	20	5'-TAC CTC TCA TCT CAC AGA GG-3'
		MHR2	20	5'-CAC CTA AGG CTA GGT TCT TC-3'
風疹 ウイルス	1st用	E1-A	20	5'-GGC CTC TTA CTT CAA CCC TG-3'
		E1-B	20	5'-CCG AGG CCC CAC CGG GAC TG-3'
	nested用	E1-C	20	5'-GCG GCA GCT ACT ACA AGC AG-3'
		E1-D	20	5'-TCG GGC GGG ACC TGG ACC TC-3'

表. 3 麻疹ウイルスの RT-LAMP 法と RT-PCR 法による検出感度の比較

Sample No.	希釈	供試ウイルス量 (CCID ₅₀)	RT-LAMP	RT-PCR*	
				1st	nested
1	1	≧110	+	+	+
2	10	≧11	+	+	+
3	10 ²	≧1.1	+	+	+
4	10 ³	≧0.11	+	-	+
5	10 ⁴	≧0.011	-	-	+
6	10 ⁵	≧0.0011	-	-	+
7	10 ⁶	≧0.00011	-	-	-

*増幅に供し得たウイルスRNA量は、RT-LAMP、RT-PCRともに 5μl

表. 4 風疹ウイルスの RT-LAMP 法と RT-PCR 法による検出感度の比較

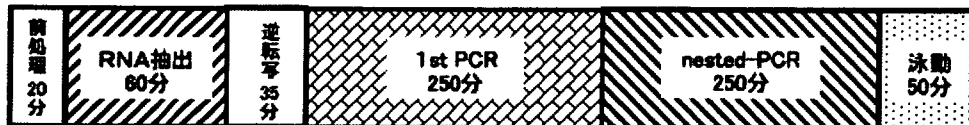
Sample No.	希釈	供試ウイルス量 (PFU)	RT-LAMP	RT-PCR*	
				1st	nested
1	1	≧12	+	-	+
2	10	≧1.2	+	-	+
3	10 ²	≧0.12	+	-	-
4	10 ³	≧0.012	+	-	-
5	10 ⁴	≧0.0012	-	-	-
6	10 ⁵	≧0.00012	-	-	-
7	10 ⁶	≧0.000012	-	-	-

増幅に供し得たウイルスRNA量は、RT-LAMP 5μlに対し、RT-PCR 0.75 μl

RT-LAMP 法
(麻疹・風疹共通)
155 分



RT-PCR 法
(麻疹ウイルス)
665 分



RT-PCR 法
(風疹ウイルス)
490 分

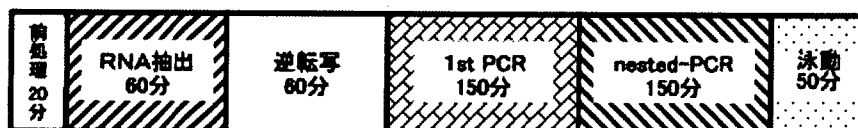


図1. RT-LAMP 法と RT-PCR 法の検査所要時間比較

麻疹のサーベイランス・システムの確立

研究協力者 川瀬 貴子、宮川 広実、廣井 聡、加瀬 哲男、高橋 和郎
(大阪府立公衆衛生研究所)

研究概要

大阪府ではH19年度より大阪小児科医会が中心となり麻疹の全数把握疫学調査を開始した。本研究では、この全数把握システムと連動して、診断に苦慮する麻疹疑い症例について既法よりさらに迅速で高感度の麻疹遺伝子検出法を開発し、疫学研究での有用性を評価した。

A. 研究目的

大阪府ではH19年度より大阪小児科医会が中心となり麻疹の全数把握疫学調査を開始した。本調査では大阪小児科医会会員が臨床的に診断した麻疹患者(疑い例を含む)の疫学情報が大阪府立公衆衛生研究所にある大阪府感染症情報センターに集積され、その一部の情報がホームページに掲載、発信され流行防止対策に寄与される。しかし、患者登録される症例は麻疹疑い例もふくまれ、実験室内診断は行わない場合もあり、全例迅速には確定診断されてはいない。本研究では、この全数把握システムと連動して、実際の麻疹疑い症例の患者検体において効率的な麻疹の実験室診断を行うことを目的とし、既法よりさらに迅速で高感度の麻疹遺伝子検出法を開発し、疫学研究での有用性を評価することを目的とした。

B. 研究方法

1) 臨床検体の採取

大阪府の感染症定点に報告された麻疹症例および大阪小児科医会会員から検査依頼があった麻疹(疑い)症例について、患者の咽頭拭い液2mlとEDTA血液2mlのいずれか、または両方を採取した。咽頭拭い液は、

検体は室温または4℃で公衆衛生研究所に搬入され、検査に供するまでは4℃で保存された。

2) 検体からのRNA抽出とPCR

EDTA全血からのPBMC回収は、国立感染症研究所の病原体検査マニュアルに従った。PBMCからのRNA抽出はQIAamp RNA Blood Mini Kit(QIAGEN)を用いて行った。咽頭拭い液は6000rpm 5分遠心して上清を回収し、QIAamp Viral RNA mini kitを用いてRNA抽出した。

3) RT-nested PCRによる麻疹ウイルスの検出

麻疹ウイルスのHAおよびNP遺伝子を標的としたRT-nested PCRを行った。HA遺伝子の増幅には国立感染症研究所の病原体検査マニュアルに示されたプライマー(1st PCR: MHL1, MHR2; 2nd PCR: MHL2, MHR2)を使用したRT-nested PCRを行い、NP遺伝子の増幅には上記のマニュアルのプライマーと新規に作製したプライマーを組み合わせるRT-hemi-nested PCR (1st PCR: NP1053F GCTATGCCATGGGAGTAGGAGTGG, pMVGTr2; 2nd PCR: pMVGTf2, pMVGTr2)

を行った。反応条件は、1st PCRでは50℃ 30分、94℃3分1サイクルの後、94℃40秒、

58℃40秒、72℃1分を30サイクル、72℃10分ののち4℃保存であった。2nd PCRでは94℃2分1サイクル、94℃1分、60℃1分、72℃1分の30サイクル、72℃7分ののち4℃保存で行った。増幅産物は2%アガロースゲル電気泳動で可視化して確かめられ、増幅したものはシークエンシングによって塩基配列が決定された。得られたNP遺伝子の配列を用いて系統樹解析を行い麻疹ウイルスの遺伝子型を決定した。

それぞれのPCRでは麻疹ワクチン(ピケン)から抽出したRNAを10倍希釈した陽性コントロールと鋳型の代わりに精製水を入れた陰性コントロールを使用した。

4) ウイルス分離

それぞれの咽頭拭い液もしくは血液から分離されたPBMCはB95a細胞に接種され、37℃で7~10日培養した。その間にCPEが見られたものを麻疹ウイルス分離陽性とした。

C. 結果

1) 大阪府の麻疹発生状況

行政と医療機関からの麻疹患者発生情報を集めて確認・集計した結果、大阪府内での2007年の麻疹発生者数は907名で、年齢別区分では5歳未満が191名、5歳以上14歳未満が284名、15歳以上が431名であった。

2) 麻疹の実験室診断

2)-1 麻疹ウイルスPCR法の条件の決定

上記のように設定した麻疹ウイルスPCRの検出感度はHA遺伝子、およびNP遺伝子において $10^{0.4}$ TCID₅₀で、PCRの所要時間は1st PCRが2時間36分、2ndPCRが2時間24分であった。

2)-2 臨床検体の麻疹ウイルス検査結果

2007年1月から12月までに大阪府立公衆衛生研究所に依頼があった検査は52症例で、そのうち30症例が定点医療機関から、19症例は定点外医療機関から、3症例は行

政検査であった。依頼のあった52症例のうち22症例(42.3%)はPCR検査陽性、13症例(25%)は麻疹ウイルス分離陽性で、分離陽性の検体は全てPCR陽性であった。22例の陽性例のうち、1例は第11病日の末梢血単核球から麻疹ウイルス遺伝子が検出された。PCRで臨床検体から増幅されたNP遺伝子について系統樹解析を行った結果、いずれも麻疹D5型であることが明らかになった。

D. 考察

本研究において、短時間で効率的な麻疹ウイルスRT-nested PCR検査法を本衛生研究所で確立できた。従来の方法では1回のPCRで5時間程度、2回のPCRで10時間以上の時間が必要であったが、本法では2回のPCRで5時間程度と所要時間が従来法の半分となった。また、本法での検出感度は $10^{0.4}$ TCID₅₀で、感染研の方法より10倍感度が高い。また、得られた増幅産物は偽陽性なく全て麻疹ウイルス由来遺伝子であった。被検者52例の血清麻疹抗体価の有意な上昇の確認については検討できず、対象集団での感度、特異性については評価ができなかった。しかし、発症第11病日の検体から遺伝子を検出できたこと、ウイルス分離陽性かつPCR陰性の症例が存在しなかったことより、本方法の感度と特異性は比較的高度であると推定される。増幅産物をダイレクトシークエンスすることにより、迅速なウイルスの遺伝子型別が可能であり、本法は今後麻疹ウイルスの診断検査に有効な検査方法となると考えられた。

E. 結論

麻疹疑い症例の患者検体において効率的な麻疹の実験室診断法として、既法よりさらに迅速で高感度の麻疹遺伝子検出法を開発した。実際の臨床検体の検査では、52症