

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

統括分担研究者 駒瀬 勝啓 国立感染症研究所
研究協力者 皆川 洋子、秦 真美、續木 雅子、田中 正大、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確に把握し早期の対策を図ることで麻疹の撲滅を目的に開始された麻しん全数把握事業等愛知県における麻疹サーベイランス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（輸入例か否かの決定に重要）サーベイランスの円滑な実施を可能とするため、昨年度ウイルス検出用検体の保存温度条件が検出感度に及ぼす影響について検討した。①今年度は、臨床検体からのウイルス遺伝子検出を経時的に繰り返して保存期間の影響を調べるとともに、検体保存液組成及びグリセリン添加効果を検討した。②さらに愛知県では2007年2月に開始した麻しん全数把握について、定点把握との比較検討及び2008年全数報告疾患となってからの患者報告数に関する解析を試みた。

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℃）において保存した臨床検体（咽頭ぬぐい液1件）について、検出を繰り返して検討した。麻疹ウイルス野外株（KA）をVero hSLAM細胞に接種して準備した検体を表のような組成の液体（ただしVB: veal broth, BSA: bovine serum albumin, PBS: phosphate-buffered saline）に-20℃に保存し（陽性対照は-80℃）Vero hSLAM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への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臨床検体（1例）を用いた検討したところ1、2、3週間4℃に保存後も麻疹遺伝子検出可能であることが判明した。表1に示した組成の保存液中に保存した

麻疹ウイルス含有検体からのウイルス検出結果を示す（表1、図1）。

②2008（平成20）年における、麻疹患者報告数及び2007年全数報告数、参考に2006年の定点報告数を表2に示す。

D. 考察

①Vero hSLAM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。

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。

②愛知県における麻疹発生報告状況は、定点から全数報告への移行により、定点報告によっても把握可能であった14歳以下のみならず、15歳以上の患者発生把握に有効なことが確認された。

E. 結論

①1検体のみであるが臨床検体を用いて数週間4℃に保存後も麻疹遺伝子検出可能であることが判明した。さらにグリセリン添加により-20℃保存検体から4ヶ月後もウイルス分離が期待できることもわかった。今後は実験室診断機会の増加が見込まれるため、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プロトコル開発が必要である。②愛知県における麻疹発生報告状況をみると全数報告への移行は、15歳以上の麻疹患者把握精度の向上をもたらしと考えられる。今後の重要な課題として、発疹性疾患における実験室診断率の向上が残っている。

G. 研究発表など

1. 論文発表

Hata M, Tanaka S, Kumagai N, Noma M, Ichinohe K, Hashimoto M, Yamashita T, Minagawa H: Genetic analysis of HA gene of Influenza A (H3N2) viruses isolated from returning travelers at Chubu International Airport in Aichi Prefecture, Japanese J Infect Dis 62 (1):78-80, 2009.

2. 学会発表

續木雅子, 櫻井博貴, 広瀬かおる, 竹内一仁, 皆川洋子: 愛知県における2007年・2008年麻疹患者発生状況 平成20年度愛知県公衆衛生研究会、愛知県大府市、2009年1月

東海ラジオ 2008年10月3日 アイランドEYE「はしか予防追加接種について」(皆川 洋子)

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

3. 報道取材等

NHK名古屋 2008年5月16日 金曜トーク「今年も懸念される麻疹流行」(皆川 洋子)

図1 保存検体からの麻疹ウイルス検出結果 (TCID50)

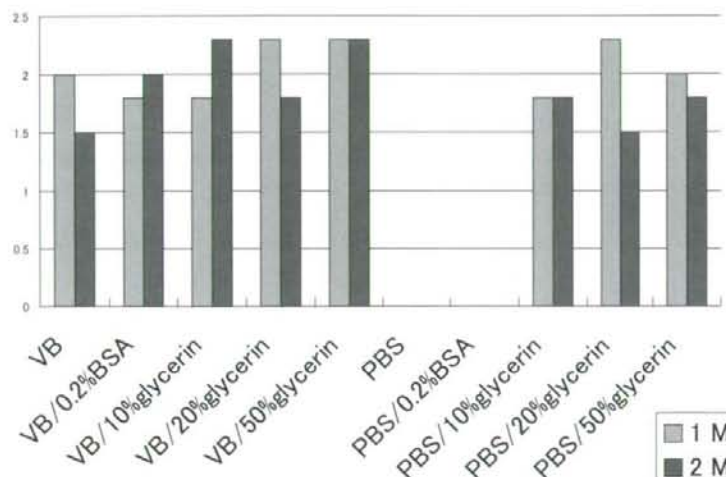


表1 VerohSLAM細胞を用いたウイルス分離 (CPE検出)

	VB	VB/0.2%BSA	VB/10%glycerin	VB/20%glycerin	VB/50%glycerin*
1 M	+	+	+	+	/
2 M	+	+	+	+	/
4 M	-	+	+	+	/
	PBS	PBS/0.2%BSA	PBS/10%glycerin	PBS/20%glycerin	PBS/50%glycerin*
1 M	-	-	+	+	/
2 M	-	+	+	+	/
4 M	-	-	+	+	/

ただしVB:veal broth, BSA: bovine serum albumin, PBS: phosphate-buffered saline.

*細胞毒性激しくCPE検出不可。

表2 愛知県における麻疹患者数の把握状況

年	報告数 [人]	年齢	予防接種 [人] (%)		
			済	未	不明
2006年 (定点報告のみ)	(43)	0~14歳 15歳~ 0	/	/	/
2007年 (愛知県全数把握事業 2月1日~12月31日)	212	0~14歳 89 15歳~ 123	4か月~82歳 57 (27)	87 (41)	68 (32)
2008年 (感染症発生動向調査 1月1日~12月31日)	198	0~14歳 103 15歳~ 95	2か月~59歳 48 (24)	86 (43)	64 (32)

厚生労働科学研究費補助金
平成20年度 新興・再興感染症研究事業
分担研究報告書

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（大阪府）

2007-2008年大阪府における麻疹診断

研究協力者

加瀬哲男

倉田貴子

宮川広実

大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課

大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課

大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課

研究要旨

大阪府では2007年から2008年に発生した麻疹疑い症例について、患者血液のPBMC分画から抽出したRNAを用いたRT-nested PCR法と血清分画を用いたIgM ELISAを行い、結果の比較を行った。試験した30検体のうち24検体(76.6%)でPCRとIgMの判定は一致していたが、PCR陽性だった4検体でIgM陰性または判定保留、PCR陰性だった2検体でIgM陽性であった。PCRとIgM ELISAの判定の違いは、発症からサンプル採取までの日数や患者の免疫状態の影響により生じたと考えられ、それぞれの検体における麻疹の診断は、PCR法やIgM ELISAの判定とあわせて患者のワクチン接種歴や感染者との接触歴、臨床症状などとともに総合的に判断する必要があることが示唆された。

A. 研究目的

麻疹の実験室診断として現在麻疹IgM ELISAが最もよく用いられている。それ以外にもRT-nested PCR法、培養細胞を用いたウイルス分離が行われているが、麻疹IgMの値とPCRの結果の相関性を検討した国内での報告は少ない。そこで、2007-2008年に麻疹疑い症例として本研究所に搬入された血液検体について検査結果を比較し、それぞれの症例の経過とIgMおよびPCRの結果について検討することを目的とした。

B. 研究方法

1) 検体の準備

2007-2008年に大阪府立公衆衛生研究所に検査依頼があった麻疹疑い症例のEDTA血液2mlを用いた。検体は室温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・血漿の回収は、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。

3) RT-nested PCRによる麻疹ウイルスの検出

麻疹ウイルスのHおよびN遺伝子を標的としたRT-nested PCRを行った。H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、N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、RT-hemi-nested PCR (1st PCR: NP1053F GCTATGCCATGGAGTAGGAGTGG, pMVGT2; 2nd PCR: pMVGT2, pMVGT2)を行った。反応条件は、1st PCRでは50°C30分、94°C31分1サイクルの後、94°C40秒、58°C40秒、72°C1分を30サイクル、72°C10分ののち4°C保存であった。2nd PCRでは94°C2分1サイクル、94°C1分、60°C1分、72°C1分の30サイクル、72°C7分ののち4°C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ケンシングによって塩基配列が決定された。得られたN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) 麻疹 IgM の測定

IgM の測定は、それぞれの検体から回収した血漿を使用し、ウイルス抗体 EIA 生研 麻疹 IgM (デンカ生研)を用いて添付の手順書通りに試験実施し、IgM インデックス値で表記した。

C. 研究結果

2007-8年に麻疹(疑い症例を含む)発症から発熱を病日0として、1-11日目に採血された血液30検体について、PBMC 分画の RT-nested PCR および IgM ELISA を行った。30検体のうち PCR 陽性であった15検体について、11検体で IgM 陽性(1.2以上)、3検体で IgM 陰性(0.8未満)、1検体で判定保留(0.8以上1.2未満)であった(表1)。PCR と IgM 両方陽性であった11検体は、発症後3-10日に採血された検体であった。PCR 増幅産物の遺伝子配列から9検体は D5 型、2検体で HI 型ウイルスであることが確認された。また、PCR 陽性 IgM 陰性および判定保留の検体(NO. 1, 4, 8, 26)は、いずれも発症後1-2日に採血された検体で、D5型ウイルスが確認された。PCR 陰性であった15検体のうち12検体で IgM 陰性、1検体

(NO. 18)で判定保留、2検体(NO. 24, 30)で IgM 陽性であった(表2)。判定保留であった NO. 18 は発症後4日目の検体で、PCR にて HIV6B および HHV7 が検出された。IgM 陽性であった2検体(NO. 24, 30)のうち NO. 24 はワクチン接種歴があり、麻疹患者との接触歴がない患者由来の発症後4日目に採血された検体で、IgM は1.42、同日の血清の IgG 値は11.4であった。NO. 30 は麻疹患者との接触歴があったことから、発症2日前に麻疹 HI 検査が行われており、HI 抗体価は32倍であった。今回の PCR および IgM 検査は、発症5日目の検体で行われ、IgM は3.77であった。

D. 考察

麻疹の診断法として最も一般的な IgM ELISA は、RT-nested PCR 法と30検体中23検体(76.6%)で相関した結果を示した。PCR 陽性で IgM が陰性または判定保留であった4検体は、いずれも発症初期(発熱を病日0とした時の1-2日目の)検体で、ウイルスは増殖しているものの、IgM 抗体の誘導が十分におきていなかったと考えられた。PCR 陰性で IgM 判定保留の検体(NO. 18)は、麻疹ウイルス感染と類似した症状を示す他のウイルスゲノムが検出されたことから、IgM 値への非特異的な反応の影響が示唆された。また、PCR 陰性で IgM 陽性であった NO. 24 と 30 は発症後4-5日目の検体であったが、いずれも PCR と IgM 両方が陽性であった検体よりも IgM 値が低く、誘導されている抗体量は少なかった。特に NO. 24 については、ワクチン接種歴があり十分な IgG 抗体を保有している患者で、麻疹患者との接触歴もなかったことから、IgM の陽性反応は非特異的であった可能性が考えられた。NO. 30 はワクチン歴は不明であったが、他の麻疹患者との接触歴があり、典型的な症状を呈していたことから麻疹であった可能性が高い。また、発症前にみられた高い麻疹 HI 抗体価は、ブースター効果によるものと考えられ、ウイルスの増殖が抑制されたために核酸の検出ができなかった可能性も考えられた。

PCR 法による麻疹ウイルス核酸の検出は、麻疹発症直後から診断することができ、IgM ELISA よりも早期診断に適していた。また、IgM ELISA は、30検体中2検体(6.6%)で非特異的な反応が判定保留-陽性と判断されたことから、カットオフ値が適正か今後検討していく必要がある。しかし、ウイルス核酸量も患者の免疫状態に大きく左右されることから PCR 法も万能とはいえず、麻疹の診断は、患

者の臨床症状やワクチン接種歴、ほかの感染者との接触歴など総合的に判断する必要があると考えられた。

E. 結論

大阪府では2007年から2008年に発生した麻疹(疑い症例を含む)患者について、患者血液のPBMC分画から抽出したRNAを用いたRT-nested PCR法と血漿分画を用いたIgM ELISAを行い、結果の比較を行った。比較した30検体のうち24検体でPCRとIgMの結果は一致していたが、PCR陽性だった4検体でIgM陰性または判定保留、PCR陰性だった2検体でIgM陽性であった。PCRとIgM ELISAの判定の違いは、発症からサンプル採取までの日数や患者の免疫状態の影響により生じたと考えられ、それぞれの検体における麻疹の診断は、PCR法やIgM ELISAの判定とあわせて患者のワクチン接種歴や感染者との接触歴、臨床症状などとともに総合的に判断する必要があることが示唆された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kurata T, Miyagawa H, Furutani E, Kase T, Takahashi K. An outbreak of measles classified as genotype H1 in 2008 in Osaka Prefecture. *Jpn J Infect Dis* 62:76-77, 2009
2. 倉田貴子、宮川広実、加瀬哲男、高橋和郎、古谷悦美：大阪府内で発生したH1型麻疹ウイルスの国内感染事例 病原微生物検出情報 Vol. 29 No. 6 (No. 340) 2008
3. 倉田貴子、宮川広実、加瀬哲男、高橋和郎、金野浩、三好洋子、山本威久：大阪府内で検出されたD4型麻疹ウイルスの輸入症例 感染症学雑誌 Vol. 30 No. 2 (No. 348) 2009

2. 学会発表

1. 倉田貴子、宮川広実、古谷悦美、三好洋子、金野浩、山本威久、加瀬哲男、高橋和郎：大阪府内における麻疹ウイルスの分離・検出状況 第56回 日本ウイルス学会学術集会、岡山市、2008年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 麻疹検査における PCR 陽性検体の IgM (EIA)検査値

検査番号	年齢	発症日	発症日の症状	検体採取日	発症後日数	PCR	型別	IgM (EIA)	IgM 判定
1	23	/07/05/10	発熱	/07/05/11	1	+	D5	1.08	保留
26	11 y 8m	/07/08/27	発熱	/07/08/28	1	+	D5	0.225	陰性
4	12	/07/05/30	発熱	/07/06/01	2	+	D5	0.37	陰性
8	6	/07/06/30	発熱	/07/07/02	2	+	D5	0.29	陰性
5	8m	/07/06/01	発熱	/07/06/04	3	+	D5	7.15	陽性
10	25	/08/02/29	発熱	/08/03/03	3	+	D5	6.74	陽性
3	28	/07/05/16	発熱	/07/05/20	4	+	D5	8.8	陽性
7	4	/07/06/19	発熱	/07/06/23	4	+	D5	9.95	陽性
2	14	/07/05/15	発熱	/07/05/20	5	+	D5	10.18	陽性
9	14	/07/07/25	発熱	/07/07/31	6	+	D5	10.45	陽性
20	9m	/07/07/11	発熱	/07/07/19	8	+	D5	11.32	陽性
6	12	/08/4/19	発熱	/08/04/28	9	+	D5	10.1	陽性
11	34	/08/02/27	発熱	/08/03/07	9	+	H1	10.11	陽性
25	13	/07/08/18	発熱	/07/08/27	9	+	D5	10.6	陽性
12	9m	/08/02/26	発熱	/08/03/07	10	+	H1	11.29	陽性

表 2 麻疹検査における PCR 陰性検体の IgM (EIA)検査値

検査番号	年齢	発症日	発症日の症状	検体採取日	発症後日数	PCR	型別	IgM (EIA)	IgM 判定
14	4	/08/02/27	発熱	/08/02/28	1	-	-	0.2	陰性
28	12y4m	/07/02/26	発熱	/07/03/01	3	-	-	0.43	陰性
15	1y6m	/07/05/26	発熱	/07/05/30	4	-	-	0.21	陰性
18	1y1m	/07/12/09	発熱	/07/12/13	4	-	-	0.82	保留
19	6y2m	/08/04/26	不明	/08/04/30	4	-	-	0.18	陰性
23	11m	/08/01/14	発熱	/08/01/18	4	-	-	0.16	陰性
24	16y1m	/08/08/11	発熱	/08/08/15	4	-	-	1.42	陽性
27	61	/08/05/10	不明	/08/05/14	4	-	-	0.24	陰性
30	36y	/07/06/09	発熱	/07/06/14	5	-	-	3.77	陽性
17	1y2m	/08/4/22	? 発熱 4/25-	/08/04/28	6	-	-	0.46	陰性
22	81	/08/01/02	発疹	/09/01/09	7	-	-	0.08	陰性
13	15	/08/02/20	発熱	/08/02/28	8	-	-	0.6	陰性
21	14y11m	/08/05/08	発熱	/08/05/16	8	-	-	0.49	陰性
16	1y1m	/07/12/08	発熱	/07/12/19	11	-	-	0.56	陰性
29	不明	不明	不明	/07/05/28	不明	-	-	0.31	陰性

「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」

麻しんウイルス研究小班

研究分担者 駒瀬勝啓

中国四国ブロックの麻しん全数把握にむけた実験室検査体制整備

研究協力者：小倉肇、濱野雅子（岡山県環境保健センター）

研究要旨：

2012年を目標にした麻しん排除を達成するためには、実験室診断が不可欠となる。中国四国ブロックにおける麻しん全数把握に向けた検査体制を確立するために、まず、地方衛生研究所(地研)における検査の実態を調査し、問題点の抽出を行った。その後、中国四国の各地研での検査体制を確立する上で必要な検査マニュアル・情報の伝達、検査消耗品の整備、麻しん陽性コントロール RNA 配布を行った。また、レファレンスセンターとして必要となる麻しん IgM ELISA 法検査の精度管理に参加した。各地研の意見をまとめて、麻しん全数把握に向けた実験室検査体制確立に必要な提言をまとめた。

A. 研究目的

麻しんは、2012年を目標にした国内排除を達成するために、2008年1月から全数把握対象感染症となった。

麻しん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ける実験室診断が不可欠となる。

そこで、中国四国ブロックにおける麻しん検査実情を調査し、検査体制を確立するために必要な検査消耗品の整備をはかり、問題点を抽出する目的で研究を行った。

B. 研究方法

1. アンケート調査

中国四国支部に所属する地研の麻しんウイルス検査担当者に対してメールによるアンケートを2008年7月と2009年1月に行った(別表1, 2)。

(倫理面への配慮) 本研究におけるアンケート調査の対象は中国四国ブロックの地研であり、倫理面で問題を生ずるおそれはない。

2. 検査マニュアル・情報の伝達

新しく改訂された麻しん検査マニュアルを各地研に伝達した。また、検査に関わる各種の情報や麻しんウイルスに感受性の高いVero/SLAM細胞の国立感染症研究所からの入手方法を伝達した。

3. 麻しん検査のための消耗品の整備

各地研で麻しん検査に必要な消耗品を調査した

後、レファレンスセンターで一括購入して配布した。

4. IgM ELISA 法検査の精度管理参加

国立感染症研究所麻しんウイルス研究駒瀬小班より送付を受けたIgM ELISA 検査キット(デンカ生研)を用いて、精度管理のためのパネル血清20件の抗体価を測定し、精度管理を受けた。

C. 研究結果と考察

アンケート調査の結果、中国四国ブロックのすべての地研から回答があった。表1に示すように、中国四国10地研における検査可能項目中 rt-PCR 法はすべての地研で検査可能であるとのことであった。免疫血清学的検査のうち IgM 抗体検査可能は2地研であった。ウイルス分離が可能と回答した9地研ではVero/SLAM 細胞またはB95a 細胞を使用していた。

これらの結果より、とりあえず今年度は rt-PCR 法による検査をできるだけ行って、年度末に結果を報告してもらうこととした。

IgM ELISA 法については、当センターが精度管理を受けた後に、来年度より必要に応じて各地研より送られてくる血清を用いて検査することとした。なお、当センターの精度管理の結果は国立感染症研究所の結果と95%一致した。この結果はWHOの求める90%以上の一致であり、中国四国ブロックの麻しんレファレンスセンターとしてWHOの基準を満たすことになった。

ウイルス分離培養については、B95a 細胞を使用している地研に対して、よりウイルス感受性の高いVero/SLAM 細胞が使用できるように国立感染症研究所から入手した当細胞使用許可申請書を配布し、各自で入手させた。

中国四国ブロックにおける2008年1月か

ら12月の検査実施状況は表2の通りであった。2008年7月現在で患者数20名24検体、2008年12月末では患者数39名49検体(咽頭拭い液31件、血清10件、血餅4件、末梢血単核球2件、糞便1件、皮膚擦過物1件)、患者以外の血清258件であった。この患者以外の血清については、8月以降3地研において感染症担当職員または看護学生に対してIgG ELISA 法 またはPA法検査を実施して抗体測定をしていたためであり、総検査検体数は307件となった。自治体の感染症担当者の麻しん抗体価を測定して対策しておくことは、その自治体の麻しん排除に向けた配慮を示すものと考えられる。

7月の時点で、検査実施地研数は10地研中半数の5地研であったが、12月末には6地研となった。アンケートの結果から検査実施地研数が伸び悩んでいるのは、これまでの定点報告から全数報告となったため、定点医療機関からの検査検体が搬入されなくなった(行政検査の依頼がない)ことが原因となっていると考えられた。

麻しん検査検体の搬入がどのように行われているかの調査によれば(表3)、広島市が民間検査会社と委託契約している他はすべて保健所職員による搬入であった。広島市でも集団発生した場合は保健所による搬入であった。

麻しん排除計画に基づく検査の問題点をアンケートしたところ次のような意見があった。

・麻疹撲滅に向けて、このような検査を実施することは意義あることと考えるが、最終的に麻疹患者を全数把握するために、疑い患者のウイルス検査を地方衛生研究所が担当することになるのであれば、地方衛生研究所で検査を実施することの根拠(出来れば法的な)を明確にいただきたい。

・今後、修飾麻しん等の非典型的の症例が増加すると予想されるので、医療機関に対しては採取すべき検体の種類と望ましい採取時期を、また、地研に対しては検査結果の判定基準（抗体検査、複数の系によるPCRで一方のみ陽性となった場合等）を明確にしておく必要がある。

・医療機関からの検体輸送は保健所が担当すると予想されるが、その点についての周知を徹底していただきたい。

自治体感染症担当課の意見でも、全数報告となった麻しん実験室診断に対して、厚生労働省から各自治体衛生主管部へ協力要請文書を出してもらわないと、研究班事業だけでは保健所に対して動きがとれないとのことであった。

今後、レファレンスセンターにおいてIgM ELISA 検査を実施する場合、保健所が積極的疫学調査と位置付ければインフォームドコンセントは必要でなからう。しかし、班研究事業であれば、倫理委員会を通し、患者さんのインフォームドコンセントが必要になると思われる。

「来年度以降、インフォームドコンセント付きの血清検体を中国四国レファレンスセンター（岡山）に送付することは可能ですか」とのアンケート質問に対して次のような意見があった。

- ・臨床医からインフォームドコンセント付きの血清検体の提供があれば送付は可能。
- ・承諾を得られれば送付は可能。
- ・検体送付回数によるが、あまり多くなければ送付は可能。
- ・県関係機関と協議を必要とするが、当所としては実施方向で調整・検討したい。
- ・現在の所、血清検体が当センターに搬入される予定はないが、必要であれば、本庁主管課と協議の上対応する。
- ・血清検査の依頼実施はこれまでない。研究と

して検体を使用するためのインフォームドコンセントについては、システムがないため、今後検討が必要である。

・検体の送付目的として感染研による精度管理とあるが、患者さんからインフォームドコンセントをとる場合、より具体的に目的を記載する必要がある。どのようにするか。

・患者へのインフォームドコンセントや同意書をいただくことについて、医療機関や行政サイドの協力を得られるかどうか、現時点では不明である。

・IgM抗体測定用の血液の採取は難しく、どの程度の協力が得られるか疑問である。

・検体送付費用が予算化される必要がある。

2008年7月の時点では以上のアンケート結果であり、インフォームドコンセントをとることについては実施上の問題点が指摘された。

2009年1月15日付け、各都道府県衛生主管局への厚生労働省健康局結核感染症課通知によれば、地研における麻しん検査は積極的疫学調査としての位置付けとなっており、インフォームドコンセントの問題は解決したと言える。ただ、文書の内容が全数把握対応ではないので、保健所との連携を密にして円滑に検査を実施できるようにしなければならない。残された問題点としては、「国家的事業ならば検査費用、輸送費用を予算化して欲しい。」ことがあげられる。来年度からレファレンスセンターで実施することになるIgM ELISA法検査に関しては、研究班が続いて予算措置ができるならば、着払いで運送費用を負担できよう。また、精度の高い検査技術習得を目指して、中四国ブロックの全地研は麻しん検査研修を希望しており、2009年度は中国四国ブロックにおける研修を地域保健総合推進事業と連携して企画したい。

以上のように、中国四国ブロック地研における麻しん検査体制は全数把握に向かって一步を踏み出した。

D. 結論

1. 麻しん実験室検査の内、rt-PCR 法検査は中国四国ブロックのすべての地研で可能である。当分はこの方法で検査をできるだけ実施して実績を上げる。

2. 今後、血清を必要とする IgM ELISA 法検査に関しても、インフォームドコンセントを必要としない積極的疫学調査であれば実施が可能となった。精度管理の結果、当センターは中国四国ブロックのレファレンスセンターとして WHO の基準を満たすと認定された。来年度より中国四国ブロックの地研より送付されてくる血清の検査を開始する。

3. 初感染の典型的症例は減少し、修飾麻しん等の非典型的症例の増加が予想されることから、検査に際して採取すべき検体の種類と望ましい採取時期、判定基準を明確にしておく必要がある。

4. 麻しんの発生件数は減少して来るであろうが、全数検査をするならば検査費用、検体輸送費用を予算化する必要がある。

E. 健康危機情報

該当無し

F. 研究発表

濱野雅子、小倉肇：麻しん及び風疹の迅速診断のための検査法の検討。

岡山県環境保健センター年報 32：129-132, 2008

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1. 麻しん実験室診断能力(中四国10地研)

rt-PCR	10
real time PCR	1
	(プロトコールが示されたら)
LAMP	2
IgM ELISA	2
IgG ELISA	4
ウイルス分離培養	9

表2. 麻しん実験室検査実数(中四国10地研)

	2008年7月	2008年12月末
rt-PCR	20	39
real time PCR	0	0
IgM ELISA	6	10
ウイルス分離培養	8	20
IgG ELISA	6	91
PA		178
(検査項目数)	40	338
(検査検体数)	26	307
(検査実施地研)	5	6

表3. 麻しん検査検体搬入

保健所	9
民間検査会社	1
	(契約委託、ただし集発の場合は保健所)

「2012年までに麻疹排除」にむけて地研の役割に関するアンケート（中国四国支部）
添付の麻疹ネットワークイメージ（案）を参照してご回答ください。

1. 麻疹検査はどの方法が可能ですか （O）印を
（ rt-PCR, real time PCR, LAMP, IgM, ベアー血清 IgG, ウイルス分離）
2. 全数報告となった1月1日から今までに、麻疹の実験室診断は何件ありましたか
（ rt-PCR 件、 real time PCR 件、LAMP 件、 IgM 件、 IgG 件
ウイルス分離 件:使用細胞)
3. 検体は何でしたか
（ 咽頭ぬぐい液、 末梢血、 尿、 その他)
4. 地研への検体搬入はどこが担当しますか。
5. とりあえず中四国では、今年度は rt-PCR を中心にしたいと思います。来年度以降、インフォームドコンセント付きの血清検体を中国四国レファレンスセンター（岡山）に送付することは可能ですか。
6. 麻疹排除計画に基づく検査についてご意見があればお寄せください。

地研名

地方衛生研究所における「麻疹の実験室内診断のための検査」
に関するアンケート

1. 2008年1月～12月の間の麻疹検査状況

a) 検体

咽頭拭い液	件
血清	件
その他(具体的に)	件

b) 検査方法

RT-PCR	件
リアルタイムPCR	件
分離培養	件
IgM EIA	件
IgG EIA	件

c) これまでに、検査実施上で、何か問題点がありましたら、お書き下さい。

2. 来年度に、中国四国支部における旅費付きの麻疹検査の技術研修（地域保健総合推進事業等）の実施を希望されますか？

（ はい いいえ ）

3. その他、麻疹検査に関して何かご意見がありましたらお書き下さい。

以上です。ご協力ありがとうございました。

厚生労働科学研究費補助金
分担研究報告書

「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 RT-PCR ワーキンググループ

分担研究者 駒瀬勝啓 国立感染症研究所

研究要旨

平成 19～20 年度の当県における麻疹ウイルス主流行株は日本固有の D5 型であることが明らかとなった。麻疹ウイルスが検出された患者の中にはワクチン接種歴を有する患者も含まれていたことから、流行している麻疹に対応できるよう、今後とも継続して麻疹ウイルスの遺伝子型を解析し、その動向を把握する必要があると考えられた。

研究協力者

世良暢之、中山志幸、石橋哲也、千々和勝己
(福岡県保健環境研究所)

A 研究目的

近年、国内での麻疹患者報告数は減少傾向にあるものの依然として患者発生が見られ、平成 19 年(2007 年)首都圏の大学生を中心とした集団感染が認められた。国立感染症研究所(感染研)・感染症情報センターの報告によると、福岡県は神奈川県、北海道、東京都、千葉県について麻疹報告数が多く、平成 24 年度の麻疹排除を目指して、ワクチン対策などを積極的に進めなければならない状況にある。

本研究では、福岡県内で流行している麻疹ウイルスの遺伝子レベルでの解析を行うことで、伝播経路の推定や発生動向を知ることを目的に、平成 19～20 年度に福岡県内で発生した麻疹患者から採取された検体について、感染研より新たに配布された麻疹診断マニュアル(第 2 版)に準拠して検査を実施したのでその結果について報告する。

B 研究方法

麻疹ウイルスの検査は、麻疹患者 8 人の咽頭拭い液 9 検体と糞便 1 検体(2 名については各 2 検体ずつ搬入)の計 10 検体について、上記の麻疹診断マニュアルに準拠して、麻疹ウイルスの N 遺伝子及び HA 遺伝子を標的とした PCR を実施した(表 1)。

逆転写反応(RT)は PrimeScript™ RT reagent Kit(タカラバイオ社製)を用いて、37℃ 15 分、85℃ 5 秒のインキュベーションにより cDNA 合成を行った。N 遺伝子の PCR は合成した cDNA を鋳型として、PerfectShot® Ex Taq(タカラバイオ社製)を用いて、98℃ 10 秒、アニーリング 53℃ 30 秒、72℃ 1 分を 30 サイクルで行った。Nested PCR は 1st PCR 産物を鋳型として 1st PCR と同様に行った。プライマーは、1st PCR では pMvGTf1m(5'-CGRTCTTACTTYGATCCRG C-3')、pMvGTr1(5'-TTA TAACAATGATGGAGG-3')を用い、Nested PCR とシーケンスには、

pMvGTf2m(5'-AGAYTAGGRCARGAGATGG T-3')、pMvGTr2(5'-GAGGGTAGGCGGATG TTGTT-3')を用いた。HA 遺伝子の PCR は、N 遺伝子の PCR 法と同様に行い、1st PCR は cDNA 5 µl を鋳型として、98°C 10 秒、アニーリング 53°C 30 秒、72°C 1 分を 30 サイクル、Nested PCR は、1st PCR 産物 5 µl を鋳型として、アニーリングの温度を 55°C とした以外は 1st PCR と同様に行った。プライマーは、1st PCR には MHL1(5'-AACGGATGATCCAGT GATAG-3') と MHR1(5'-TTGAATCTCGGTATC CACTC-3')、Nested PCR には MHL2(5'-TAC CTCTCATCTCACAGAGG-3') と MHR2(5'-CACCTAAGGCTAGGTTCTTC-3') を用いた。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動で目的とするバンドを確認した後、ダイレクトシーケンス法により N 及び HA 塩基配列を決定、インターネット上に公開されているソフトウェア Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA、<http://www.megasoftware.net/>)を用いて分子系統樹を作成した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、感染症発生動向調査事業により搬入された検体を用いているため、本研究における倫理面への対応は、特に必要ないものと思われる。

C 研究結果

表 2 に改訂された麻疹診断マニュアルを用いた麻疹ウイルスの検出結果を示した。新しい方法では、最近の流行株も検出できるようにプライマーが再設計されたこと、逆転写反応にランダムヘキサマーを使用していることで検出感度

が上昇していることなどから、当所で検討した 7 検体についても効率よく検出が可能であった。

図 1 に平成 19～20 年度に当県で発生した麻疹患者から検出された麻疹ウイルス(遺伝子検出のみを含む)7 例の遺伝子型を示した。分子系統樹解析の結果、5 例が D5 型、2 例が A 型の 2 つの遺伝子型に分類された。検討株数も少ないため早計には断定できないが、本県においては検討した 2 年間に於いては D5 遺伝子型が流行していると推測された。このうち、現行のワクチン型である A 型が検出された 2 例は、いずれも接種したワクチン由来のウイルスが検出されたものと推察された。

D 考察

我が国における麻疹患者の発生動向をみると、昭和 53 年(1978 年)の麻疹ワクチン定期接種開始以降、患者の発生は減少しつつあるものの依然として年間数万人規模の患者発生があり、近年では成人麻疹の患者発生も報告されている。福岡県は全国でも突出して高い麻疹患者が発生しており、平成 24 年度の麻疹排除を目指して、ワクチン接種率の向上の必要性が高い地域の 1 つである。

麻疹の病因となる麻疹ウイルスは、世界保健機関(World Health Organization, WHO)の分類により A～H の 8 群、23 遺伝子型に分類され、ワクチン株は A 型である。この麻疹ウイルス遺伝子型は、世界の流行地域ごとに異なっており、これまで国内の麻疹患者からは主に、D3 型、D5 型及び H1 型の麻疹ウイルスが検出されていた。当県における麻疹ウイルス主流株も、平成 19～20 年度は日本固有の D5 型であることが明らかとなった。

麻疹ウイルスが検出された患者の中には、ワクチン接種歴を有する患者も含まれていたこ

とから、流行している麻疹に対応できるよう、今後とも継続して県内で流行している麻疹ウイルスの遺伝子型を解析し、その動向を把握する必要があると考えられた。

E 結論

今回の調査によって、当県で流行している主な麻疹ウイルスは、日本固有の D5 型であることが明らかとなった。WHO の報告によると麻疹ウイルスの遺伝子型分布には、国により固有化の傾向があり、地球規模でのグローバル化の中、流行地域から新たな遺伝子型が浸淫しても不思議ではないとされている。遺伝子レベルでの解析は、ウイルスの由来の推定（伝播経路）および動向等を知るうえでも意義あることと思われ、今後も重要な課題の一つと考えられた。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H 知的所有権の取得情報

なし

表1 麻疹ウイルスの検査に用いた検体の内訳

番号	性別	年齢	発病日	検体採取日	検体の種類
FS21-2007	女	1歳	平成19年5月12日	平成19年5月16日	咽頭拭い液
FS26-2007	女	1歳	平成19年5月15日	平成19年5月29日	咽頭拭い液
FS27-2007	〃	〃	〃	〃	〃
FS42-2007	男	23歳	平成19年6月13日	平成19年6月17日	咽頭拭い液
FS46-2007	女	15歳8ヶ月	平成19年5月16日	平成19年5月20日	咽頭拭い液
K107-2007	不明	10ヶ月	平成19年6月22日	平成19年6月27日	咽頭拭い液
K205-2008	不明	不明	平成20年9月17日	平成20年9月19日	糞便
K206-2008	不明	不明	〃	〃	咽頭拭い液
K217-2007	女	不明	平成19年10月4日	不明	咽頭拭い液
K419-2007	不明	不明	不明	平成20年5月22日	咽頭拭い液

表2 麻疹ウイルスの検査結果

	N遺伝子		HA遺伝子	
	First PCR	Nested PCR	First PCR	Nested PCR
FS21-2007	+	+	+	+
FS26-2007	-	-	-	-
FS27-2007	-	-	-	-
FS42-2007	-	-	-	-
FS46-2007	-	+	-	+
K107-2007	+	+	+	+
K205-2008	-	+	-	+
K206-2008	-	+	-	+
K217-2007	-	+	-	+
K419-2007	+	+	+	+
NC	-	-	-	-
PC	-	+	-	+

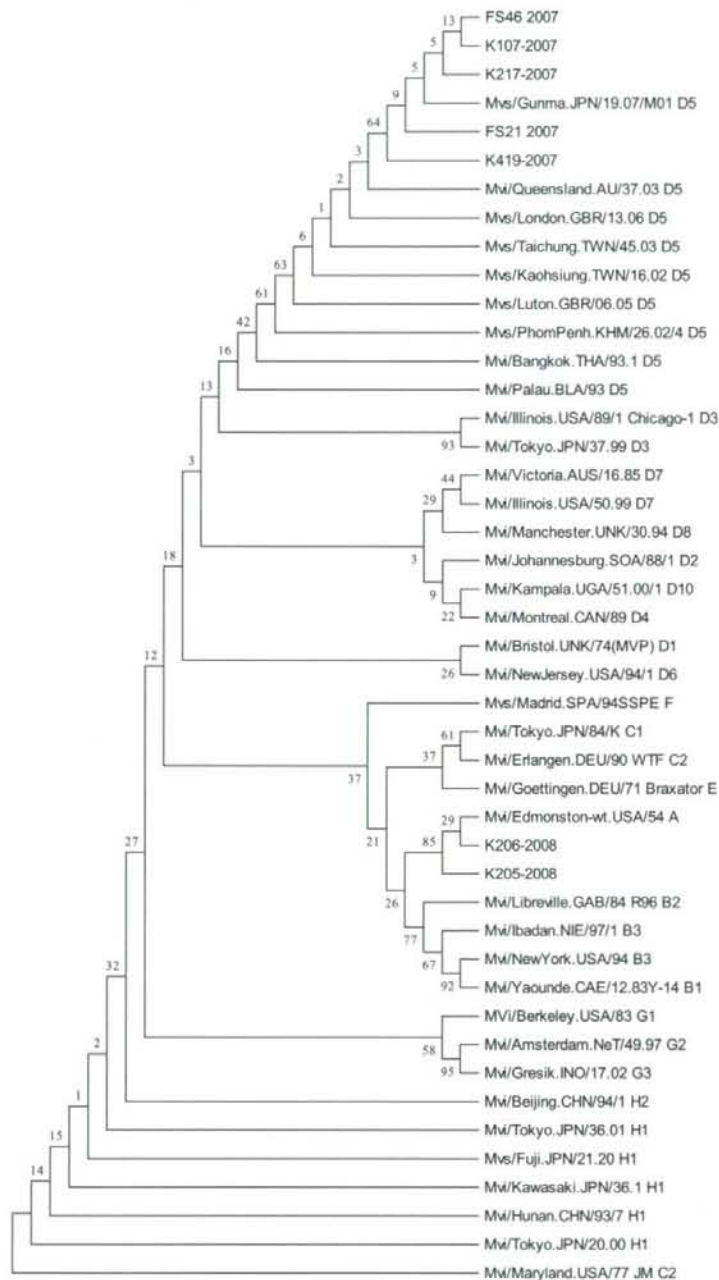


図1 当県で検出された麻疹ウイルスのN遺伝子の系統樹解析結果

2008年の沖縄県における麻疹サーベイランス成績

協力研究者 平良勝也 岡野 祥 仁平 稔 中村正治 沖縄県衛生環境研究所

研究要旨

本研究では、まず2008年の麻疹サーベイランス成績について解析を行った。その結果、220例の麻疹疑い例が報告され、全ての症例で検査診断が実施された。検査診断により麻疹が確定した41例は、15歳以上の成人麻疹が全体の約8割を占め、その半数以上が20代前半であった。県外からの移入例は6件発生し、これが発端となった集団感染例は2件発生した。疫学調査により、これらの集団感染例の感染源および症例間の疫学的リンクが明らかにされた。

次に、医療機関から提出された136検体の血液から分離した血漿を用いて、麻疹IgM抗体の測定を行い、RT-PCR法との相関を検討した。その結果、両検査法の結果の一致率は、陽性例65%(17/26)、陰性例88%(110/97)、全体では84%(114/136)であった。この結果から、IgM抗体測定法はPCR法よりも感度が劣る傾向が認められた。

A. 研究目的

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構築し、2003年1月より実施している。このサーベイランスシステムは、麻疹の発生報告が「疑いの段階」で医療機関から報告され、PCR法による検査診断が行われるのが特徴である。これにより、感染拡大を防ぐための早期対応が可能となり、過去5年間の麻疹患者報告数は、毎年約20例前後(2005年は発生なし)で推移し、長期的な流行はなく、限局した患者発生に留まっている。

本研究では、麻疹全数把握サーベイランスシステムを維持し、精度を向上させることを目的として2008年の麻疹サーベイランス成績について解析した。さらに、集められた患者血液の分離血漿を用いてWHOが麻疹の標準検査診断法として推奨している麻疹IgM抗体測定を実施し、現在実施しているPCR法との相関を検討した。

B. 研究方法

検査に用いた臨床検体は、本人または保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)に基づいて麻疹ウイルス(MV)H遺伝子のRT-PCR、nested-PCRを実施した。PCR陽性の場合、N遺伝子450塩基の塩基配列を決定しgenotype解析を行った。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、MVの分離を行った。

抹消血液は、血漿を分離し、麻疹IgM(II)-EIA「生研」(デンカ生研)を用いて行った。測定方法及び結果の判定はキット添付の手順書に従った。また、一部の検体について麻疹ウイルス抗体キット・セロディア麻疹(富士レビオ)、パイダスアッセイキット麻疹IgG(ピオメリュール)により検査を行った。

C. 研究結果

(1) 麻疹患者発生状況

2008年に報告された麻疹疑い例220例のうち、麻疹確定例は41例、麻疹否定例

は179例であった。最初の麻疹確定例は、まず第13週目に報告され、18週までに計31例が報告された。その後、第19週～33週の間は麻疹の発生はなかったが、第34～37週に再び10例が報告された。(図1)。

麻疹確定患者41例を年齢群別でみると、20～24歳19例(46%)、15～19歳10例(24%)、25～29歳5例(12%)、10～14歳5例(12%)、5～9歳2例(5%)の順であった(図2)。また、麻疹ワクチンの接種歴は、あり19例(46%)、なし6例(14.6%)、不明16例(39%)であった(図3)。

麻疹の各発生事例について表1に示した。散发例は7件、集団感染例は2件、計9件であった。疫学調査の結果、県外からの移入例が6件、感染源不明が3件であった。また、移入例の2件は集団感染の発端となり、1件は屋内のライブコンサート会場で発生し、もう1件は野外でバーベキューをしたグループで発生した。

(2)麻疹の検査診断

2008年と過去5年間で実施された検査状況について表2に示した。2008年は、報告された全ての症例で検査診断が実施された。当所ではPCR検査とウイルス分離が217例(99%)、医療機関では血清学的検査が57例(26%)で実施された。

これらの検査診断により、麻疹が確定した症例は41例であった。PCR検査では40例(咽頭ぬぐい液39例、血液1例)が陽性となり、このうち19例(48%)でウイルスが分離された。PCR陽性例のgenotype解析では、ワクチン由来と考えられるA型が1例、野生株のD5型が39例であった。医療機関で実施された麻疹特異的IgM抗体の測定では2例が陽性となった。

(3)麻疹IgM抗体測定

血液136検体から分離した血漿を用いて麻疹IgM抗体の測定を行い、PCR法との相関を表3に示した。両検査法における結果の一致率は、陽性例65%(17/26)、陰性例88%(110/97)、全体では84%(114/136)であった。

PCRは陽性を示し、IgMは陰性を示した症例は31%(8/26)で確認された。これらの症例の検体採取時期は、すべて発疹出現前～発疹出現後2日以内の発病初期であった。

PCRは陰性を示し、IgMは陽性を示した症例は5%(5/110)で確認された。これらの症例には、最近のワクチン接種によるものと考えられた症例が2例、疫学的背景により麻疹の可能性が高いと考えられた症例が2例、ペア血清を用いたPA法では4倍以上の抗体価上昇を認めなかったが、ミニバイダス麻疹IgGキットではIgG抗体が陽転し、両検査結果が一致しなかったため、さらに検討が必要と思われた症例1例が含まれていた。

D.考察

2008年の麻疹疑い例の報告数は、220例で過去最多の報告数であったが、これらすべての症例で検査診断を達成した。このことから、2003年より実施している麻疹全数サーベイランスシステムが、県内の医療機関に広く浸透し定着していることが示唆された。

検査診断により麻疹が確定した41例は、15歳以上の成人麻疹が全体の約8割を占め、そのうちの半数以上は20代前半であった。この結果から、本県においては現在中高生を対象に進められているワクチンの2回接種だけでは十分な対策とはいえず、20代にも積極的にワクチン接種勧奨を行うことが重要と考えられた。

2008年は、県外からの移入例が6例発

生し、これを感染源とした集団感染が2件発生した。一方、旅行歴がなく、麻疹患者とのリンクが不明な症例も3例報告されており、他の感染源が存在した可能性が示唆された。

2006年以降、本県の麻疹は県外からの移入例を中心とした発生が後を絶たないが、大きな流行には発展せず短期間で終息している。また、これまで発生した集団感染例のほとんどは、保健所の詳細な疫学調査により感染源や症例間の疫学的リンクがすべて明らかにされている。その要因として、PCR検査の高い実施率が維持されていることが挙げられ、これにより早期対応が可能となり、感染拡大防止に寄与していると考えられた。

IgM抗体測定法とPCR法の結果の相関をみると、IgM抗体測定法は、PCR法よりも感度が劣る傾向が認められた。PCR法で陽性、IgM測定で陰性を示した症例は全て検体採取時期が発病初期であり、IgM抗体測定の時期は発疹出現後4日目以降が確実とされていることから、検体採取時期としては適切ではなかったことが考えられた。IgM抗体測定のみで麻疹の診断する際は、検体採取時期を考慮することが重要と思われた。

E. 結論

2008年は、報告された全ての麻疹疑い症例で検査診断が実施された。PCR検査は高い実施率を維持しており、感染拡大防止に寄与した。よって、本県の麻疹全数サーベイランスシステムは高い精度で維持された。IgM抗体測定法はRT-PCR法よりも感度が劣る傾向が認められた。これは麻疹発病初期に検体が採取されていることが原因であり、IgM抗体測定のみで麻疹の診断する際は、検体採取時期を考慮することが重要と思われた。

F. 研究発表

IASR Vol.30 No2, 2009

G. 知的財産の出願・登録状況

該当なし