

図1. 2008年の麻疹疑い例報告数(週別)

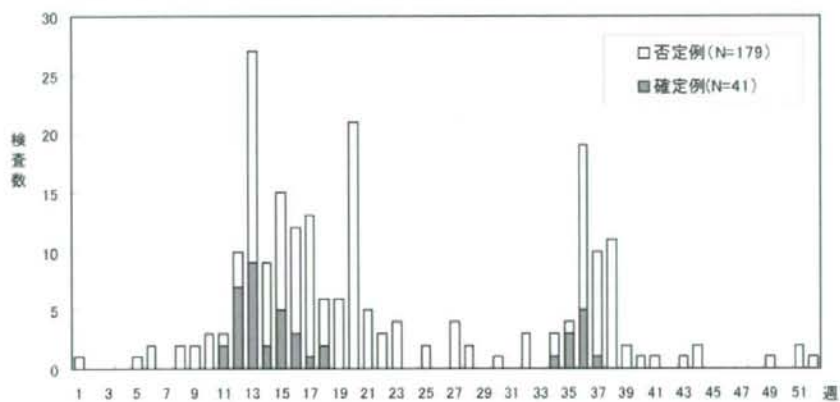


図2. 麻疹確定患者の年齢群別割合 (N=41)

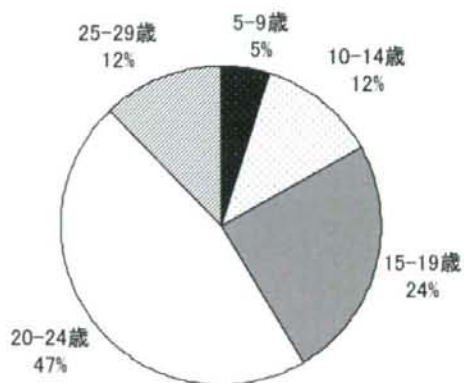


図3. 麻疹確定患者のワクチン接種歴 (N=41)

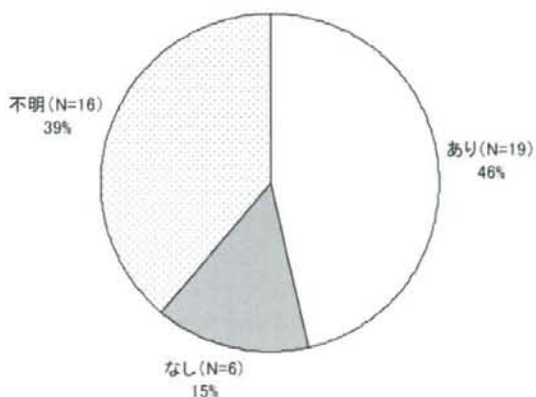


表1. 麻疹全数報告および検査状況 2003-2008

	2003年	2004年	2005年	2006年	2007年	2008年	合計
報告全数	39	33	29	59	132	220	512
医療機関からの検体提出	24	26	27	57	125	217	476
	62%	79%	93%	97%	95%	99%	93%
検査診断	24	31	28	57	129	220	489
	62%	94%	97%	97%	98%	100%	96%
PCR・ウイルス分離(衛生環境研究所)	24	26	27	57	125	217	476
	100%	84%	96%	100%	97%	99%	97%
①咽頭ぬぐい液	18	22	20	54	124	216	454
	75%	85%	74%	95%	99%	100%	95%
②血液	17	20	24	42	75	136	314
	71%	65%	86%	74%	58%	62%	64%
血清学的検査(医療機関)	17	24	11	26	45	57	180
	71%	77%	39%	46%	35%	26%	37%
麻疹確定例	19	16	0	18	22	41	116
	49%	48%	0%	31%	17%	19%	23%
検査による確定例	10	14	0	18	22	41	105
臨床診断による確定例	9	2	0	0	0	0	11
麻疹否定例	20	17	29	41	110	179	396
	51%	52%	100%	69%	83%	81%	77%
検査による否定例	17	16	28	41	107	179	388
臨床診断による否定例	3	1	1	0	3	0	8

表2. 2008年の各発生事例

事例No	発生年月	発生状況	疫学調査に基づく感染源	分離ウイルス	遺伝子型
1	2008年3-4月	集団発生: 24例	関東・関西・中部 : 初発患者は旅行歴あり(東京・大阪・名古屋)	MVi/Okinawa/JPN/11.08/1	D5
2	2008年4月	散发例	不明		
3	2008年4月	散发例	不明	MVi/Okinawa/JPN/15.08/3	D5
4	2008年4月	散发例	関東 : 旅行者(神奈川県)	MVs/Okinawa/JPN/15.08/4	D5
5	2008年4月	散发例(1)	北海道 : 旅行者(北海道)	MVi/Okinawa/JPN/16.08/3	D5
6	2008年4月	散发例	関東 : 修学旅行生(神奈川県)	MVi/Okinawa/JPN/17.08	D5
7	2008年4月	散发例	関東 : 県外旅行歴あり(神奈川県)	MVi/Okinawa/JPN/18.08/1	D5
8	2008年8-9月	集団発生: 9例	関東 : 初発患者は旅行歴あり(神奈川県)	MVs/Okinawa/JPN/34.08	D5
9	2008年9月	散发例	不明	MVs/Okinawa/JPN/36.08	D5

散发例()は、2次感染者数

表3. 麻疹全数報告および検査状況 2003-2008

麻疹 IgM	PCR		
	陽性	陰性	計
陽性	17	5	22
陰性	8	97	105
保留	1	8	9
計	26	110	136

陽性一致率: 17 / 26=65%

陰性一致率: 97 / 110=88%

全体一致率: 114 / 136=84%

種々の麻疹ウイルス感染症例の病日による血清麻疹抗体の動き

研究協力者 庵原俊昭 (国立病院機構三重病院小児科)

研究協力者 中野貴司、田中孝明 (国立病院機構三重病院小児科)

研究要旨 麻疹は発疹が数日以上持続する発熱性疾患である。ヒトが麻疹ウイルスに曝露されたとき、ホストの免疫状態に応じ臨床症状や抗体反応は異なっている。麻疹初感染、一次性ワクチンフェーラー(PVF)、二次性ワクチンフェーラー(SVF)、発熱だけで発疹を認めなかった麻疹ウイルス感染症例を対象に、急性期の血清 IgM 抗体、IgG 抗体パターンを検討した。麻疹初感染および PVF 例では、発疹出現後 2 日以内の IgM 抗体は 3.0 抗体指数以上の値を示し、IgG 抗体は 4.0EIA 価未満 (陰性または同等) であった。SVF 患者の-1~2 病日の IgM 抗体は陰性から 10.08 抗体指数まで様々な値を示していたが、IgG 抗体はすべて陽性であり、IgM 抗体が 3.0 抗体指数以上の例では、IgG 抗体はすべて 128EIA 価以上であった。麻疹ウイルス感染症例では発熱時 IgM 抗体は陰性、IgG 抗体陽性であり、IgG 抗体は極めて短期間に 128EIA 価以上に上昇した。以上の結果から、麻疹ウイルス曝露時の麻疹に対する免疫状態に応じて血清麻疹 IgM 抗体、IgG 抗体は特徴的なパターンを示し、急性期血清 IgM 抗体 IgG 抗体の同時測定は、麻疹ウイルス感染の診断と病態を知る上で有用な検査であることが示された。

A. 研究目的

麻疹はパラミクソウイルス科モルビリウイルス属に属する麻疹ウイルスによる全身性ウイルス感染症で、数日以上持続する発疹と発熱、結膜炎、咳と鼻水などの上気道炎症症状があれば、臨床麻疹と診断される。西太平洋地域(WPRO)に属する日本は、2012 年までに麻疹の排除を目指しており、排除への道筋の一つとして、麻疹の実験室診断による確定診断が上げられている。

麻疹の実験室診断方法として、①末消血単核球(PBMC)、鼻咽頭分泌液、尿からの麻疹ウイルスの分離、②PBMC、鼻咽頭分泌液、尿からの RT-PCR 法または RT-LAMP 法による麻疹ウイルス RNA の検出、③血清 IgM 抗体の検出、④血清抗体の有意上昇がある。また、麻疹ウイルスの曝露を受けても、ホストの免疫状態により、麻疹ウイルス感染症の臨床像は、典型的麻疹、修飾麻疹、発疹を認めない発熱疾患 (麻疹ウイルス感染症)、臨床症状なし、と様々であり、抗体反応も様々である。

今回、ホストの麻疹に対する免疫状態による麻疹ウイルス感染の病態と血清学的診断基準を明らかにするために、麻疹ウイルス曝露後に発熱などの臨床症状を示した麻疹ウイルス感染症例を対象にウイルス学的検討を行った。

B. 研究方法

対象は、麻疹初感染 3 例、PVF1 例 (抗体反応から診断)、SVF8 例、麻疹ウイルス感染により発熱を認めたが発疹を認めなかった麻疹ウイルス感染症 3 例である。ウイルス学的検査は、血清 IgM 抗体、IgG 抗体の測定 (デンカ生研の EIA キット使用)、PBMC からの麻疹ウイルスの分離である。PBMC は Ficoll 比重遠沈法にて EDTA 血から分離し、麻疹ウイルス分離には B95a 細胞を用いた。なお、発疹が出現した症例の病日は発疹出現日を 0 日とし、発熱のみの例では発熱出現日を 0 日とした。発熱出現から発疹出現までの前駆期の期間は 2~4 日間であった。

C. 研究結果

(1)初感染例、PVF 例の検討 (表 1)

初感染例 3 例、PVF の 1 例全例の PBMC から麻疹ウイルスは分離された。また、0~2 病日の IgM 抗体は、3.0 抗体指数以上の陽性を示し、IgG 抗体は陰性または同等であった (4.0EIA 価未満)。

(2)SVF 例の検討

-1~2 病日に検査を行った 8 例中 6 例から麻疹ウイルスは分離された。血清 IgM 抗体は-1~0 病日では 5 例中 4 例が陰性であり、1 病日を過ぎると、4 例中 3 例は 3.0 抗体指数以上の陽性を示した。一方 IgG 抗体は、-1~0 病日では全例陽性で

あり、1~2 病日では 4 例中 3 例が 128EIA 価以上を示し、2 病日を越えて測定した 5 例全例は 128EIA 価以上と、急速に IgG 抗体は上昇していた。

(3)麻疹ウイルス感染症

0~1 病日に検査を行った 3 例中 2 例から麻疹ウイルスは分離された。0~1 病日に測定した延べ 4 検体の IgM 抗体は、1 例のみ 1.34 の弱陽性であったが、他の 3 検体は陰性であり、IgG 抗体は 4 例とも陽性であったが、IgM 抗体陽性の 1 例は早期から IgG 抗体は 128EIA 価以上であった。

D. 考察

ウイルス感染症診断のゴールドスタンダードは病変部位からのウイルス分離であり、麻疹では PBMC、鼻咽頭分泌液、尿からの麻疹ウイルス分離である。初感染例や PVF 例では感染しているウイルス量が多いため、B95a 細胞にサンプルを接種後翌日には麻疹ウイルス分離陽性が確認できるが、SVF 例や麻疹ウイルス感染症例では、感染しているウイルス量が少ないため、ウイルス分離の確認には数日以上必要である。このため、SVF 例などの修飾麻疹例の早期診断には、RT-PCR 法や RT-LAMP 法による麻疹ウイルス遺伝子検出法の方が優れている。

現在、各地方衛生研究所には RT-PCR 法または RT-LAMP 法を行う技術や設備が整っており、行政レベルでの麻疹診断が行われている。しかし、臨床の現場では、依然として麻疹を含めたウイルス感染症の診断には、血清 IgM 抗体と IgG 抗体を測定する抗体検査が広く行われている。

今回の検討で、麻疹ウイルス感染による血清 IgM 抗体・IgG 抗体パターンは、麻疹ウイルス曝露時の免疫状態に応じて特徴的なパターンをとることが示された。即ち、麻疹初感染および PVF 例では、急性期（発疹出現後 2 日以内）IgM 抗体は 3 抗体指数以上の値を示しているが、IgG 抗体は 4.0EIA 価未満（陰性または同等）であった。また、SVF 患者においては、-1~0 病日の IgM 抗体は 1 例を除き陰性から弱陽性であるが、1 病日を過ぎると多くは 3.0 抗体指数以上を示していた。なお、麻疹発症時 IgG 抗体はすべて陽性であり、IgM 抗体が 3 抗体指数以上の例では、IgG 抗体はすべて 128EIA 価以上であった。麻疹ウイルス感

染症例では発熱時 IgM 抗体は陰性、IgG 抗体陽性であり、IgG 抗体は極めて短期間に 128EIA 価以上に上昇した。

以上の結果を表 2 にまとめた。SVF 例では IgG 抗体が 128EIA 単位以上に上昇すると同時に IgM 抗体も 3.0 抗体指数以上を示すが、麻疹ウイルス感染症例では、IgG 抗体が 128EIA 価以上を示しても、IgM 抗体は陰性または弱陽性であった。以上の結果から、麻疹ウイルス感染早期に IgG 抗体が上昇すると症状が出現せず、IgG 抗体の上昇が遅れると軽症の麻疹を発症すると推察された。

今回の検討では、血清 IgM 抗体または（SVF 例では同時に）IgG 抗体が検出されても、PBMC から麻疹ウイルスが高頻度に分離された。今回分離された麻疹ウイルスは PBMC に感染しているウイルスであり、血中抗体は細胞内で増殖しているウイルスには働かないという説を裏付ける結果であった。なお、麻疹ウイルス感染細胞の感染からの回復には、特異的細胞性免疫が重要な役割を担っている。

E. 結論

麻疹ウイルス曝露時の麻疹に対する免疫状態に応じて、麻疹ウイルス感染の臨床像は異なっており、臨床像に合った特徴的な血清麻疹 IgM 抗体、IgG 抗体パターンを示すことが明らかになった。また、麻疹に対する免疫を有していると発症後数日間の経過で IgG 抗体は 128EIA 価以上に急上昇することが示され、病日に応じた血清 IgM 抗体 IgG 抗体の測定は、麻疹ウイルス感染の診断と病態を知る上で有用な検査であることが示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

庵原俊昭：麻疹、小児内科 40 増刊号：1110-1114、2008

2. 学会発表

庵原俊昭、他：成人における年代群別の麻疹・風疹・水痘・ムンプス抗体価の比較検討。第 12 回日本ワクチン学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記することなし。

(表1) 各麻疹ウイルス感染例におけるウイルス額の検討

症例	発熱 (日)	病日*	IgM 抗体	IgG 抗体	PBMC からの ウイルス分離
1) 初感染および PVF 群					
1	-4	1	3.3	1.0	+
2	-3	1	9.45	2.1	+
3	-2	2	8.57	3.1	+
PVF1-1		2	8.59	<2.0	+
PVF1-2		7	14.59	17.3	+
2) SVF 群					
S1		-1	1.7	4.9	+
S2		0	1.8	34.2	+
S3		0	0.47	28.7	+
S4		0	10.08	>128	+
S5		1	0.72	12.0	-
S6		1	7.73	>128	+
S3-2		2	3.44	>128	-
S7		2	8.36	>128	+
S5-2		3	10.85	>128	-
S4-2		4	15.0	>128	+
S8		4	8.56	>128	n.d.
3) 麻疹ウイルス感染症					
V1	0		0.37	10.1	+
V2-1	0		0.37	9.8	-
V2-2	1		1.34	>128	n.d.
V3	1		0.33	11.2	+

PBMC: 末消血単核球、n.d.: 施行せず、PVF: 一次性ワクチン不全、

SVF: 二次性ワクチン不全

*発疹出現日を0病日、発熱出現してから発疹出現までの期間は3日間程度。

IgM 抗体は抗体指数、IgG 抗体は EIA 価:

(表2) 麻疹の病形による血清抗体パターンと PBMC からのウイルス分離

病型	0~1 病日			2~4 病日		
	IgM 抗体	IgG 抗体	ウイルス分離	IgM 抗体	IgG 抗体	ウイルス分離
初感染	++*	-~±	+++	++	-~±	++
PVF	++	-~±	+++	++	-~±	++
SVF	-~+	++	++	++	++++	+
発疹なし†	-	+	+	-~+	++++‡	-

*3.0 抗体指数以上

†発疹なし例の病日は発熱日からであり、発疹出現日より3日ほど早くなる

‡SVF では IgG 抗体が高い血清ほど IgM 抗体も高いが、発熱だけで発疹が出現しなかった症例では、早期から IgG 抗体が上昇し、IgM 抗体の上昇はないか、あっても軽度である。

ワクチン例では麻疹に対する免疫状態に応じ、麻疹ウイルス感染早期に IgG 抗体が上昇すると症状が出現せず、IgG 抗体の上昇が遅れると軽症の麻疹を発症する。

麻疹 LAMP 法の応用 麻疹ウイルス野生株の性状とワクチン株の鑑別

中山哲夫

北里生命科学研究所 ウイルス感染制御 1

【研究要旨】2007年には高校生・大学生を中心に成人麻疹が流行し2008年には小学生を含めて流行が続きやっと流行は沈静化した。2008年ワクチン接種後の副反応と考えられる症例についてLAMP法で遺伝子を増幅し塩基配列を調べることでワクチン株か野生株かの鑑別を行った。周辺で流行がない時にはワクチンウイルスの増殖期の発熱・発疹例はワクチン株と考えられ、ワクチン接種数日以内の副反応例からは麻疹、風疹の遺伝子は検出されなかった。2006年の散発流行例からD9, 2007年の流行例からD5 Bangkok typeが分離され、以前からの流行株を含めてその性状を解析した。F, H発現プラスミドを作製し細胞融合能には差が認められなかった。流行野生株はB95a細胞で分離されVero細胞にはCPEを認めなかった。

1) ワクチン株と野生株との鑑別

麻疹ウイルスの迅速診断法としてLAMP法を開発し、合わせて風疹ウイルスのLAMP法も開発した。麻疹症例の全数報告の臨床診断の基準の中で典型的な麻疹症例は問題ないが、修飾麻疹の例は発熱、発疹、カタル症状のうち一つとウイルス学的診断となっている。麻疹流行時期にはワクチン接種後の副反応例が修飾麻疹の中に紛れ込んでくるため鑑別が必要となる。

MR ワクチン接種の副反応が疑われた5例を対象にRNAを抽出し、麻疹ウイルスN領域、風疹ウイルスE1領域でLAMP法を行った。表1に年齢、臨床症状をまとめて示した。症例1、2、5は接種7-9日後に発熱・発疹を認めており、発疹も全身に出現し、麻疹流行期でもありワクチン株か麻疹ワクチンの副反応か否かの鑑別を行った。症例1、2、5の血清からLAMP法で麻疹ウイルス遺伝子が増幅された。症例3、4はMR ワクチン接種翌日に下肢弛緩性麻痺、痙攣重積を認めた例で副反応が疑われたが生ウイルスの増殖期ではなく髄液からも麻疹、風疹遺伝子は増幅されなかった。増幅されたLAMP産物を精製しFIP primerを用いてF1-B1領域の塩基配列を決定した。我が国で用いられている麻疹ワクチン株はこの領域では塩基配列の差はなく、流行野生株のD5, D9では2-3塩基の変異があ

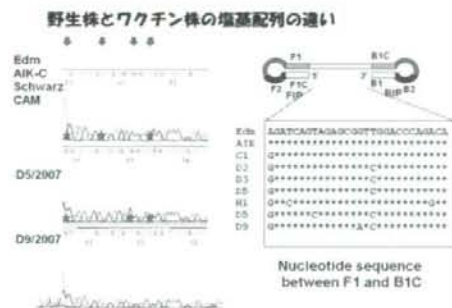
りワクチン株と鑑別ができた(図1)。症例1, 2, 5から検出されたLAMP産物は接種されたワクチン株の塩基配列であった。

表1. MR ワクチン接種後の副反応症例

臨床検体のまとめ						
症例	年齢	発熱	出現日	発疹	検査目的	LAMP 結果
1	1Y10M	+	9-10 days	+	Wild/Vac	+ Vac
2	18Y	+	9-12 days	+	Wild/Vac	+ Vac
3	12Y	-	-	-	接種翌日下肢筋力低下	- 因果関係不詳
4	1Y2M	-	-	-	接種翌日痙攣重積	- 因果関係不詳
5	15Y	+	7 days	+	Wild/Vac	+ Vac

麻疹の流行がなければ発熱・発疹はワクチン株
ワクチン株の増殖期以外での副反応例は関連性はなさそう。

図1. 麻疹 LAMP 産物の塩基配列



2) 最近流行株の性状の解析

2-1) 細胞融合能

我が国で流行してきた麻疹ウイルスの遺伝子解析を継続しており 1985 年以前は C1, 1985-1990 年は D3, 1990 -1997 年は Palau type D5, 1998-2000 年は Chicago type D3, 2000-2005 年は H1, 2007 年から Bangkok type D5, 散発例で D9 が分離されてきた。207-08 年に分離されたウイルスは D5 Bangkok type に属するもので N 遺伝子 450 塩基の中で 1 塩基の変異のみで全国的にもほぼ均一のウイルスが流行していたと考えられる (図 2)。最近流行株から F, H タンパク発現プラスミドを作製し細胞融合能を検討し結果を図 3 に示した。1984 年から流行してきた麻疹ウイルスは C1 (<1985), D3 (1985-90), D5 Palau (1990-97, 2004-05), Chicago D3 (1997-2000), H1 (2000-04), D5 Bangkok (2007-08) が主流流行株で D9 は散発的に検出された。これらのウイルスの細胞融合能を検討した各株から F, H 発現プラスミドを構築し発現実験を行った。B95a 細胞での細胞融合能には差がみとめられなかった。

クローニングした H 遺伝子領域を麻疹ワクチン株 AIK-C の H タンパクを組換え reverse genetics の手法で組換えウイルスを作製した。P/M junction に GFP 遺伝子を挿入し各組換えウイルスは GFP を発現するようにデザインした。野生株の H タンパクを持った組換えウイルスは B95a 細胞には細胞融合を示したが Vero 細胞には感染するが細胞融合は認めなかった (図 4)。これらの GFP 発現組換え麻疹ウイルスを用いることで GFP の発現を数値化し中和抗体を簡単に測定できることから抗原性の解析に使用することを検討している。

図 2. 2007-08 年流行株の麻疹ウイルスの遺伝子解析



図 3. 野生流行株の F, H 発現プラスミドの細胞融合能

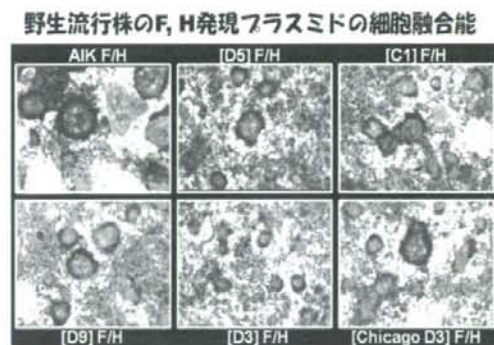
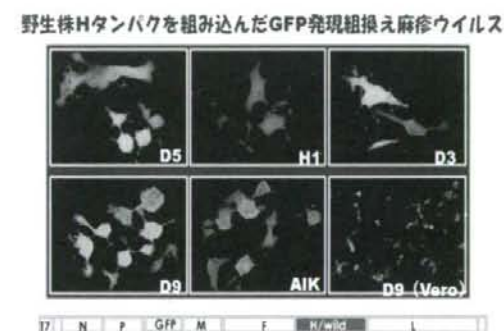


図 4. 野生株 H タンパクを発現する組換え麻疹ウイルス



研究発表

1 : 論文発表

学会発表

- 1) 森地振一郎 他. 臓器よりエンテロウイルスが陽性であった心内膜繊維弾性症の

- 1例 第49回日本臨床とウイルス学会
犬山 2008.6.14-15
- 2) 由井郁子 他. RS ウイルス再感染と
quasispecies-20 シーズン(1985-2005)の
調査 第49回日本臨床とウイルス学会
犬山 2008.6.14-15
- 3) 松原啓太 他. ムンプスウイルスにおけ
る EIA 値と F, HN, N タンパク抗体の関連
についての検討 第49回日本臨床とウイ
ルス学会 犬山 2008.6.14-15
- 4) 竹内 薫 他. 神経芽細胞(SH-SY5Y)にお
けるムンプスウイルス増殖に重要な領域
の同定 第56回日本ウイルス学会 岡山
2008.10.26-28
- 5) Ji YX 他. Amino acid substitutions in
Matrix (M), fusion (F), and
hemagglutinin (H) proteins of wild
measles virus for adaptation to Vero
cells. 第56回日本ウイルス学会 岡山
2008.10.26-28
- 6) 小河原修 他. 新型インフルエンザワクチ
ンの臨床試験(2) 第12回日本ワクチン
学会 熊本 2008.11.8-9.
- 7) 岡田 純 他. 集団感染防止のための入
学前麻疹抗体検査とワクチン接種の検討
第12回日本ワクチン学会 熊本
2008.11.8-9.
- 8) 樋口 彰 他. 風疹、ムンプスウイルスの
envelop 蛋白を発現する組換え麻疹ワク
チン株の作製 第12回日本ワクチン学会
熊本 2008.11.8-9.
- 9) 澤田成史 他. RS ウイルス、インフルエ
ンザウイルスの外殻タンパク質を発現す
るキメラ麻疹ウイルスの作製 第12回日
本ワクチン学会 熊本 2008.11.8-9.
- 10) 中山哲夫 麻疹ウイルスワクチン株と野
生株の鑑別 第40回日本小児感染症学会
名古屋 2008.11.15-16.
- 2) 中山哲夫 ワクチン推進ワーキンググル
ープ設立の経緯と活動計画 第12回日本
ワクチン学会 熊本 2008.11.8-9.
- 2: 学会発表
- 1) Yoshida N, Fujino M, Miyata A, Nagai T,
Kamada M, Sakiyama H, Ihara T,
Kumagai T, Okafuji T, Okafuji T,
Nakayama T. Mumps virus reinfection is
not a rare event confirmed by reverse
transcription loop-mediated isothermal
amplification. J Med Virol 2008;80:
517-523.
- 3) Shinjoh M, Miyairi I, Hoshino K,
Takahashi T, Nakayama T. Effective and
safe immunizations with live-attenuated
vaccines for children after living donor
liver transplantation. Vaccine 2008. 26:
9859-9863.
- 4) Sakata M, Komase K, Nakayama T.
Histidine at position 1042 of the p150
region of a KRT live attenuated rubella
vaccine strain is responsible for the
temperature sensitivity. Vaccine 2009. 27:
234-242.
- 5) Nagai M, Ji YX, Yoshida N, Miyata A,
Fujino M, Ihara T, Yoshikawa T, Asano Y,
Nakayama T. Modified adult measles in
outbreaks in Japan, 2007-08. J Med Virol
(in press)

知的財産権の出願・登録状況
なし

シンポジウム、教育講演

- 1) 中山哲夫 教育セミナー 麻疹・新たな
展開 第49回日本臨床とウイルス学会
犬山 2008.6.14-15

厚生労働科学研究費補助金
分担研究者報告書

麻疹検査診断ネットワーク、並びに RT-PCR 法の精度管理用 reference RNA に関して

研究分担者：駒瀬勝啓¹
国立感染症研究所ウイルス第3部第2室

研究要旨

2012 年までの麻疹排除達成をめざして、2008 年 4 月からの MR ワクチンの補足的接種とともに 2008 年 1 月から麻疹、風疹の全数届出性が導入された。世界保健機構 (WHO) による麻疹排除の達成の定義には、National Control Laboratory (日本においては国立感染症研究所) により精度管理された方法で、麻疹疑い例の 80% 以上が検査診断されている事が要件としてあげられている。しかし、国際的な評価基準からの意味からだけでなく、麻疹の検査診断は麻疹の感染拡大を阻止するためにも重要である。本小班は迅速、WHO の評価基準にあった麻疹検査診断を円滑に行うために、医療機関、保健所、地方衛生研究所、感染研間の連携による検査実施体制の確立と充実を目指している。そのため、9 ヶ所の地方衛生研究所を麻疹・風疹レファレンスセンターとし、感染研と各県、政令都市の地衛研を結ぶ麻疹検査診断ネットワークの中核とした。また、日本における検査診断の標準法とされた RT-PCR 法の運用方法、並びに標準参照品 (reference RNA) による検査精度管理法を検討した。

研究目的

「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」に基づく届出基準の改正により、2008 年 1 月 1 日より麻疹及び風疹は全数届出疾病となった。また、平成 19 年 12 月 28 日に告示された「麻疹に関する特定感染症予防指針」では、麻疹が一定数以下になった場合、原則、全数検査診断を行う事とし、麻疹検査診断体制の強化を盛り込んでいる。麻疹検査診断の必要性は下記の理由による。

1. 麻疹は感染力の非常に強い感染症であり、迅速かつ正確に感染者を把握する事が感染の拡大阻止、さらには社会的混乱を最少にすることに有効である。
2. 臨床症状だけでは診断が困難な修飾麻疹が増加している。
3. 発疹、発熱等の類似の症状を示す疾患が存在する。
4. 日本が所属する WHO 西太平洋事務局

(WPRO) の定めた麻疹排除の評価基準には、年間人口 100 万人あたり、確定麻疹症例数が 1 未満であること、95% 以上の予防接種率により国民の 95% 以上が麻疹に対する免疫を維持していること等と共に、麻疹検査診断による精度の高い麻疹サーベイランス体制の確立をあげている。

5. 麻疹検査診断により得られるウイルスゲノムの情報はウイルスの由来、移動コース等のトレースを可能にし、感染源の同定、あるいは海外からの輸入例か否かの判断ができる。

このような背景をふまえて本研究は、麻疹の検査診断体制を強化、充実するために、地方衛生研究所、感染研を結んだネットワークを構築すること、並びに検査技術を標準化する事を目的としている

方法、結果:

麻疹検査診断ネットワークの構築

2008年6月に行われた衛生微生物技術協議会研究会・レファレンス委員会において、地衛研、感染研による麻疹、風疹検査診断体制の強化のための麻疹・風疹レファレンスセンターの設置が承認された。感染研が世話役となり、北海道、東北、関東・甲信・静岡、東海、北陸、近畿、中国・四国、九州、ならびに沖縄の9地区の地衛研の中にレファレンスセンターを設置し、感染研、レファレンスセンター、地衛研の各役割を以下のように定めた。1) 感染研においては標準的な麻疹検査診断方法の確立、検査等に必要の標準品の準備・配布、研修、精度管理等の実施、厚労省、WHOへの報告等の実施、2) レファレンスセンターにおいては感染研からの情報、標準品等を地区内の地衛研へ連絡、配布、検査診断についての助言等を実施する。さらに地区内の地衛研に集められた血清、血漿検体の麻疹IgM抗体測定の実施。また、必要に応じて感染研と共に地区内の地衛研のバックアップ。3) 地衛研においては、入手した尿、咽頭拭い液、血液からRT-PCR法を中心とした麻疹検査診断、塩基配列解析、genotype解析の実施(図1)。

標準検査診断法の策定

レファレンスセンターを通じた地衛研へのアンケートでは、RT-PCR法による麻疹検査診断が最も対応可能であるとの意見が多かった。また、麻疹IgM ELISA法は、WHOが指定する検査診断の標準法であるが、麻疹の発症初期検体においてはRT-PCR法より感度が劣る傾向があること、パルボウイルスB19等と交差反応を起こす事などの事も考慮して標準検査診断法としてRT-PCR法を採用した。麻疹検査マニュアル第2版にあるH遺伝子、N遺伝子検出系の2つのRT-PCR法の感度を評価し、感度の優れているH遺伝子RT-PCRを第一選択とし、陽性だった場合、genotype決定のためのNP遺伝子解析を実施する手順を決定した。

RT-PCR精度管理用reference RNAの作製

RT-PCR法の精度管理を目的として、陽性対照をかねたreference RNAを作製した。ワクチン株のゲノムcDNAを鋳型として*in vitro*転写法でRNAを合成後、RNA濃度を測定し反応液中に含まれるゲノムコピー数を推測した。この値を基準に希釈し、3倍希釈ではRT-PCR法でN遺伝子が検出できるが、10倍に希釈すると検出できない濃度のレファレンスRNAを調整した。このRNAは鋳型DNAゲノムが残留していないこと、10回の凍結融解後でもN遺伝子が検出されることを確認した上でレファレンスセンターを通じて各地方衛生研究所にRT-PCR用reference RNAとして配布した。

考察：麻疹検査診断による麻疹サーベイランス体制は、麻疹の感染拡大阻止だけではなく、麻疹排除までの過程に必須な麻疹動向を正確に把握するためにも重要である。また、精度の高いサーベイランス体制は麻疹排除がなされたことを証明するためにWHOが定めている要件にもふくまれている。本研究は、これらの期待に応えうるによる麻疹検査診断ネットワークを構築する事にある。日本においては検査診断の標準法として、RT-PCR法を採用することになった。麻疹のRT-PCR法診断法は、開発されてから時間がたっており、すでに地方衛生研究所によっては独自の方法を持っているところもある。今回は、感染研が提案している麻疹検査マニュアルによる方法だけではなく、それ以外の方法においても精度管理ができるよう、検出限界の3倍程度の濃度のreference RNAを調整し、このRNAを確実に検出できるRT-PCR法の調整を各地衛研に依頼した。このreference RNAを中心に、RT-PCRの精度管理を実施していく。一方、WHOが推奨しているIgM ELISAに対して、今後、RT-PCR法を標準法として実施することが優位であることをWHOに提示していく必要がある。レファレンスセンターにおけるIgM測定はこのデータの蓄積に必要である。一方、現在は医療機関においては、麻疹検査診断の必要性があまり認識されていない場合があり、検体採取のタイミングを

逸することがある。医療関係者には、例え典型例であっても検査診断を実施するという認識を共有してもらいが必要となる。また検体、情報の伝達、運搬等を担う保健所を含む行政側との積極的な連携が、今後、麻疹検査診断体制の強化に重要となる。

結論:

地方衛生研究所、感染研間の連携による麻疹検査実施体制ができつつある。今後、検査診断による麻疹サーベイランス体制の強化には、行政、医療機関と

の連携、認識の共有が重要となってくる。

健康危険情報：なし

1. 研究発表

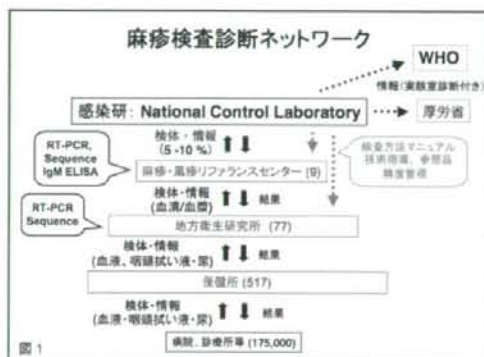
IASR Vol. 30 No2, 2009

2. 知的財産権の出願・登録状況(予定をふくむ)

1) 特許；特になし

2) 実用新案登録；なし

3) その他；なし



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
研究協力項目：麻疹ウイルス N 遺伝子検出定量のためのリアルタイム RT-PCR 法の
開発

研究協力者 木村博一 国立感染症研究所感染症情報センター
研究分担者 駒瀬勝啓 国立感染症研究所ウイルス第三部

研究要旨

麻疹ウイルス（MeV）遺伝子（標的遺伝子:N 遺伝子）検出及び定量のためのリアルタイム RT-PCR 法の開発を新たに行った。本方法の感度は、10copies/assay で、 $10^1 \sim 10^7$ copies/assay まで定量が可能であった。各種遺伝子型の MeV（A, D3, D5, D9 及び H1 型）の検出・定量も可能であった。また、他のウイルス（RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス及びエンテロウイルス）との交差反応は認められなかった。麻疹患者由来咽頭拭い液（Ts）には、 $3.9 \times 10^3 \sim 5.2 \times 10^6$ copies/mL の MeV 遺伝子が含まれていた。以上のことから、本方法によって、高感度・特異的かつ迅速に種々の遺伝子型の MeV を検出・定量できることが示唆された。

A. 研究目的

2012 年を目標とした麻疹排除計画の遂行状況を正確に把握するためには麻疹患者の正確な実験室内診断が必要であることは言うまでもない。今まで、麻疹の検査診断には、他のウイルス疾患と同様に種々の検査法が開発されてきた。今回、高感度・特異的かつ迅速な麻疹ウイルス検出・定量法のためのリアルタイム RT-PCR を新たに開発した。

B. 研究方法

1. 臨床検体及びウイルス

麻疹患者由来咽頭拭い液（Ts）22 検体を臨床検体とした（表 1）。また、麻疹ウイルス分離株として、CAM-70（genotype A）、MVi/Okinawa.JPN/31.01[D3]（genotype D3）、MVi/Okinawa.JPN/03.03[D5]（genotype D5）、MVi/Yamagata.Jpn/3.04[D9]（genotype D9）、MVi/Okinawa.JPN/14.03[H1]（genotype H1）を用いた。MeV の培養には SLAM/Vero 細胞を用いた。

2. プライマー及びプローブの設計

種々の遺伝子型の麻疹ウイルス N 遺伝子のアライメントを基に新たにプライマーとプローブを設計した（表 2）。

3. RNA 抽出及び逆転写反応（RT）

臨床検体あるいはウイルス浮遊液の RNA 抽出には High Pure Viral RNA Kit（Roche Diagnostics）を用いた。手順は取扱説明書に従った。RT は、抽出 RNA 5 μ L、ランダムヘキサマー（20 pmol）4 μ L、5 x RT-PCR Buffer（containing 10 mM of each dNTP）4 μ L、PrimeScript RT Enzyme Mix I（DTT free, Takara, 含 10 units/ μ L RNase inhibitor）1 μ L、DNase/RNase 不含 distilled water 1 μ L、計 20 μ L で行った。反応温度条件は 37 $^{\circ}$ C・15 min、85 $^{\circ}$ C・5 秒であった。

表 1. 患者データ及び Ts から分離された MeV 遺伝子型及び Ts 中の MeV コピー数

Patient	Strain	Onset of rash	Sampling date	Copies**	Genotype	Vaccination	GenBank accession number
1	MVs/Okinawa.JPN/15.08/3	4 Apr, 2008	4 Apr, 2008	4.4 x 10 ⁵	D5	Unknown	AB447511
2	MVs/Okinawa.JPN/16.08/1	14 Apr, 2008	14 Apr, 2008	2.8 x 10 ⁵	D5	Unknown	AB447513
3	MVs/Okinawa.JPN/16.08/2	18 Apr, 2008	*14 Apr, 2008	6.8 x 10 ³	D5	Unknown	AB447512
4	MVs/Okinawa.JPN/16.08/3	16 Apr, 2008	17 Apr, 2008	8.4 x 10 ⁴	D5	Unknown	AB447514
5	MVs/Okinawa.JPN/18.08/1	29 Apr, 2008	29 Apr, 2008	1.6 x 10 ⁵	D5	Yes	AB447515
6	MVs/Okinawa.JPN/21.07	23 May, 2007	23 May, 2007	7.4 x 10 ⁴	D5	Yes	AB447510
7	MVs/Okinawa.JPN/37.06	11 Sep, 2006	12 Sep, 2006	8.9 x 10 ⁴	D5	No	AB447495
8	MVs/Okinawa.JPN/38.06	19 Sep, 2006	22 Sep, 2006	5.3 x 10 ⁵	D5	No	AB447494
9	MVs/Okinawa.JPN/39.06/1	27 Sep, 2006	27 Sep, 2006	5.2 x 10 ⁶	D5	Unknown	AB447496
10	MVs/Okinawa.JPN/39.06/2	27 Sep, 2006	27 Sep, 2006	1.2 x 10 ⁶	D5	Yes	AB447497
11	MVs/Okinawa.JPN/39.06/3	28 Sep, 2006	28 Sep, 2006	3.4 x 10 ⁶	D5	No	AB447498
12	MVs/Okinawa.JPN/39.06/5	28 Sep, 2006	28 Sep, 2006	2.6 x 10 ⁵	D5	No	AB447499
13	MVs/Okinawa.JPN/40.06/1	1 Oct, 2006	5 Oct, 2006	1.2 x 10 ⁶	D5	Yes	AB447500
14	MVs/Okinawa.JPN/40.06/2	6 Oct, 2006	6 Oct, 2006	1.3 x 10 ⁴	D5	No	AB447501
15	MVs/Okinawa.JPN/41.06/1	9 Oct, 2006	10 Oct, 2006	1.1 x 10 ⁶	D5	No	AB447502
16	MVs/Okinawa.JPN/41.06/2	9 Oct, 2006	10 Oct, 2006	3.6 x 10 ⁵	D5	No	AB447503
17	MVs/Okinawa.JPN/42.06/1	21 Oct, 2006	*20 Oct, 2006	6.0 x 10 ⁴	D5	No	AB447504
18	MVs/Okinawa.JPN/45.06/1	7 Nov, 2006	7 Nov, 2006	2.0 x 10 ⁴	D5	Unknown	AB447505
19	MVs/Okinawa.JPN/45.06/2	6 Nov, 2006	7 Nov, 2006	1.3 x 10 ⁵	D5	Unknown	AB447506
20	MVs/Okinawa.JPN/45.06/3	7 Nov, 2006	7 Nov, 2006	3.9 x 10 ³	D5	Unknown	AB447507
21	MVs/Okinawa.JPN/48.06	30 Nov, 2006	2 Dec, 2006	1.1 x 10 ⁵	D5	No	AB447508
22	MVs/Okinawa.JPN/50.06	14 Dec, 2006	15 Dec, 2006	1.6 x 10 ⁵	D5	Yes	AB447509

* Sampling was performed the day fever appeared.

**Copies are expressed as per mL of throat swab.

表 2. プライマー及びプローブ配列

Primer or Probe	Sequence (5' to 3') ^a	Polarity ^b	Location ^c	
Primer	MV-F	CAS RGT GAT CAA ART GRR ARY GAG CT	+	1368-1393
	MV-R	YCC TGC CAT GGY YTG CA	-	1600-1616
Probe ^d	MV-T	FAM-TCY GAT RCA GTR TCA AT-MGB-NQF	-	1530-1546

^a Mix bases in degenerated primers and probes are as follows: S=G/C, R=A/G, Y=C/T.

^b +, sense; -, anti-sense.

^c Corresponding nucleotide position of Mvi/Edmonston-wt.USA/54[A] strain full-length genome (GenBank accession No. AF266288).

^d Probe is labeled with 6-carboxyfluorescein (FAM) reporter dye at the 5' end, and with minor groove binder (MGB)-non-fluorescent quencher (NQF) at the 3' end of the oligonucleotide.

4. リアルタイム PCR の至適化

常法に従い、プライマー・プローブ濃度及び PCR 反応条件の至適化を行った。

5. 合成 RNA 及び検量線用プラスミド作成

MeV (CAM-70 株由来) の全長 *N* 遺伝子の cDNA を作成した。この cDNA を基に T7RNA ポリメラーゼにより、*N* 遺伝子全長 RNA を作成した。また、表 1 のプライマーを用い、各遺伝子型のウイルス RNA を基に PCR 産物を作成し、pCR2.1-TOPO vector に遺伝子産物を組み込んだ。次に、リコンビナントプラスミドを常法に従い、*E. coli* に発現させ、発現菌体からプラスミドを精製した。さらに、精製溶液を 260nm の吸光度によりプラスミド濃度を決定した。また、同時に各遺伝子型のプラスミドの塩基配列もダイレクトシーケンス法により決定した。

6. 咽頭拭い液 (Ts) 中の MeV 遺伝子型の決定

Ts の MeV の RNA 抽出及び RT-PCR は常法に従って行った。PCR 増幅産物はダイターミネーター法により塩基配列を解析後、近隣結合法で系統樹解析を行い、遺伝子型を決定した。

C. 研究結果

1. プライマーとプローブ濃度及び反応条件について

本法におけるプライマーとプローブの至適値に関するデータを図 1 及び 2 に示す。各々の最小 Ct 値 (threshold cycles value) は、プライマーは 900nM、プローブは 250nM であった。また、アニーリング温度は 58°C が至適値であることがわかった (図示せず)。したがって、リアルタイム PCR の反応条件は、cDNA 2 μ L、プライマー (MV-F/MV-R) 900nM、プローブ (MV-T) 250nM とし、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) を含め全量 20 μ L とした。反応条件は、uracil-*N*-glycosylase (UNG) amplicon degradation (50°C・2分)、UNG 変性と DNA ポリメラーゼ活性化反応 95°C・10分、続いて 95°C・15秒、58°C・1分を 50 サイクルとした。

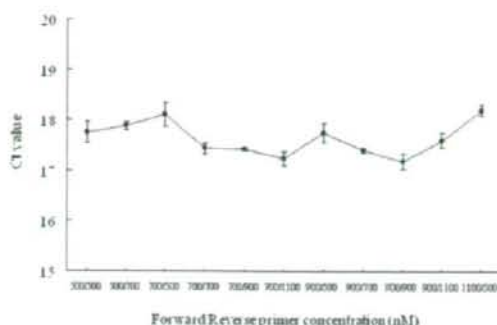


図 1. プライマーの至適濃度

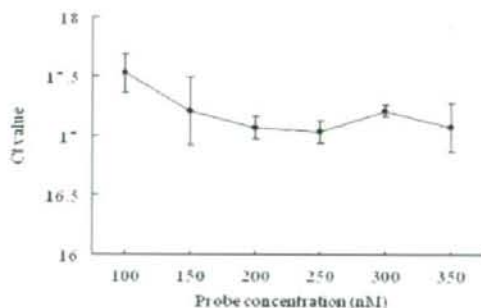


図 2. プローブの至適濃度

2. 本法の感度と定量直線性について

合成 RNA (全長 *N* 遺伝子) による本法の直線性及び感度に関するデータを図 3、各遺伝子型 MeV RNA による本法の直線性及び感度に関するデータを図 4 に示す。希釈された RNA コピー数と Ct 値から考慮して、本法の感度は 10 copies/assay であることが推定された。次に、プラスミドコントロールを用いた定量直線性に関するデータを図 5 に示す。図より、本法は $10^1 \sim 10^7$ copies/assay において、良好な定量直線性を示した。

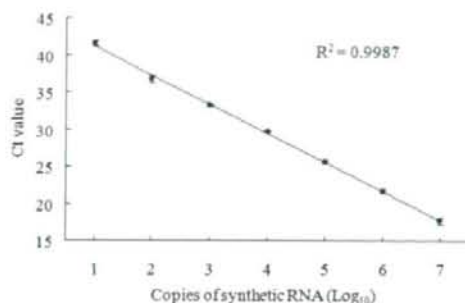


図 3. 本法の直線性及び感度 (合成 RNA)

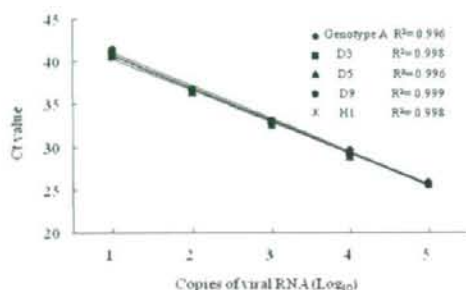


図4. 本法の直線性及び感度 (ウイルス RNA)

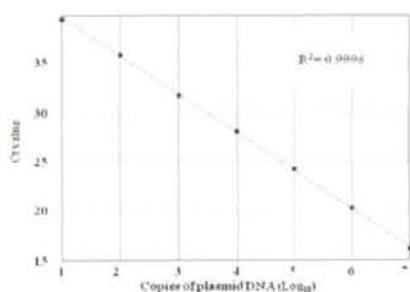


図5. クローン化プラスミドによる直線性及び感度

3. 咽頭拭い液(Ts)中の MeV 遺伝子型及び N 遺伝子定量値について

表 1 に Ts から分離された MeV の遺伝子型及び Ts 中の N 遺伝子コピー数を示す。遺伝子型はすべて D5 で、N 遺伝子コピー数は $3.9 \times 10^3 \sim 5.2 \times 10^6$ copies/mL であった。

D. 考察

本邦においては、種々の遺伝子型 (A, D3, D5, D9 及び H1 型) の MeV が検出されている。したがって、リアルタイム RT-PCR 法においては、これらの MeV を確実に検出・定量可能にする必要がある。また、他の発熱・発疹を引き起こすウイルスや MeV と近縁なウイルスとの交差反応性がないことも重要である。新たに開発した本法では、 $10^1 \sim 10^7$ copies/assay までの直線定量性が得られ、また、MeV 以外のウイルスとの交差反応性も見られなかった。ウイルスの遺伝子型による反応性の差異も見られなかった。また、短時間で RT が可能な試薬を使うことにより、検査時間を短縮できた。以上のことから、本法によって、種々の遺伝子型の MeV を高感度・特異的かつ迅速に検出・定量可能であることが示唆された。

本研究においては、リアルタイム RT-PCR 法における種々の反応条件を評価するため、One-Step 法に関する評価は行わなかった。キャリアオーバーコンタミネーションのリスク低減やさらなる迅速化をめざし、本法を改良していく必要性もあろう。

E. 結論

今回新たに開発されたリアルタイム RT-PCR 法によって、高感度・特異的かつ迅速に、種々の遺伝子型の MeV を検出・定量可能であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Taira K, Nakamura M, Okano S, Nidaira M, Kudaka J, Itokazu K, Taira T, Itokazu T, Chinen M, Sunagawa T, Kimura H: Phylogenetic Analysis of Nucleoprotein (N) Gene of Measles Viruses Prevalent in Okinawa, Japan, during 2003-2007. *Jpn J Infect Dis* 61(3): 247-248, 2008
- 2) Akiyama M, Kimura H, Tsukagoshi H, Taira K, Mizuta K, Saitoh M, Nagano M, Sutoh A, Noda M, Morita Y, Sakatsume O, Okabe N, Tashiro M: Development of assay for the detection and quantitation of measles virus nucleoprotein (N) gene using real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR). *J Med Microbiol* in press.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
呼吸器ウイルス研究小班総括研究報告書

ウイルス感染症の効果的制御のためのサーベイランスシステムの検討
—呼吸器ウイルス感染症の実験室診断法の研究—

分担研究者（呼吸器ウイルス研究小班統括）野田 雅博
国立感染症研究所ウイルス第三部 主任研究官

研究協力者

木村 博一 国立感染症研究所感染症情報センター 室長
水田 克巳 山形県衛生研究所 研究主幹（兼）微生物部長
五十嵐郁美 福島県衛生研究所 技師
塚越 博之 群馬県衛生環境研究所 技師
平田明日美 栃木県保健環境センター 技師
大内 好美 滋賀県衛生環境センター 主査
小村 珠喜 島根県保健環境科学研究所 研究員
南 亮仁 佐賀県衛生薬業センター 技師
中村 正治 沖縄県衛生環境研究所 主任研究員
斎藤 義弘 東京慈恵会医科大学小児科 講師（兼）医局長
松田 俊二 国立病院機構愛媛病院 小児科医長（兼）臨床研究部部長
菅井 和子 国立病院機構横浜医療センター 小児科医長
秋山 美穂 国立感染症研究所感染症情報センター 非常勤

協力研究員

青木 洋子	山形県衛生研究所	糸数 清正	沖縄県衛生環境研究所
須藤亜寿佳	山形県衛生研究所	平良 勝也	沖縄県衛生環境研究所
大金 映子	栃木県保健環境センター	藤塚 麻子	国立病院機構横浜医療センター小児科
田中千香子	滋賀県衛生環境センター		

研究要旨

急性呼吸器感染症（ARI）の総合的なサーベイランス体制の構築およびレファレンス機能強化を図る目的で以下の研究を実施した。

ARI 症例由来試料のウイルス検索を試みた結果、RS ウイルス（RSV）、ヒトメタニューモウイルス（hMPV）、ライノウイルス（RV）、ヒトボカウイルス（hBoCV）、パラインフルエンザウイルス（PIV）、アデノウイルス（AdV）等が多数分離された。

1988-2007 年の間に分離された AdV-1, -2, -3, -4, -5 および 6 型のヘキソン、Hypervariable region（HVR）のシークエンス解析結果から、各血清型では、長期にわたり 99-100% の相同性で塩基が保

保存されていることが明らかとなった。

RSVの分子疫学解析を実施した結果、分離RSV (Subgroup A および B) 株間の *N*, *F* および *G* 遺伝子の塩基配列のホモロジーは高く、遺伝学的に近縁なRSV (Subgroup A ではGA2, Subgroup B ではBA) が流行の主流であることが明らかになった。ARI 患児62名のRSV分離状況と臨床背景に関して検討を行った結果、患児月齢は、生後3週間から生後44ヶ月 (平均±SD 13.3ヶ月±10.5ヶ月)、男児40名女児22名であった。RSV培養陽性は22名、うち迅速キットでは陰性が3名いた。RSV培養陽性群での検体採取病日は3.7±1.4日、RSV迅速キット陽性だったが培養陰性群の検体採取病日は4.4±1.4日だった。RSV培養陽性/陰性で入院期間、入院中の治療内容に差はなかった。RSVに起因する乳幼児の肺炎や細気管支炎などウイルス側の遺伝学的な要因を解明するため、入院加療を必要とした気管支炎乳幼児患者から分離されたRSV17株のNucleoprotein (*N*), Glycoprotein (*G*) 及び Fusion (*F*) 遺伝子に関する分子疫学解析を行った。その結果、7株はSubgroup A, 10株はSubgroup B に分類され、さらに *G* 遺伝子の系統解析から、それぞれの分離株は固有のクラスターに分類され Subgroup A ではGA2, Subgroup B ではBA に分類された。以上のことから、GA2やBAに属するRSVも乳児の気管支炎に関与することが推定された。

東北地方で分離されたRV計91株のVP4-2遺伝子の系統解析を行った。系統樹上、90株はgenogroup A, 1株はgenogroup B に分類された。genogroup A に属する株はさらに多数のクラスターに分かれた、同地方で流行していたRVはgenogroup A に分類される多彩な遺伝子型のウイルスが主体であった可能性が示唆された。

ARI患者から採取された臨床検体 (鼻・咽頭拭い液) 701検体からhBoVの検出を試みた結果、14検体からhBoV遺伝子が検出された。検出hBoV遺伝子のうちの7株について全領域 (5,299bp) 解析し、系統樹解析を行った結果、6株はgroup1に、1株はgroup2に分類された。

重症心身障害児 (者) 病棟における2006年と2007年の2年間の感染症流行について調査を行った結果、ノロウイルス感染症、インフルエンザ、ヘルパンギーナの流行および他の病原体不明感染症の流行が毎年2-3回みられた。

愛媛病院職員のウイルス抗体検査を実施した結果、風疹抗体は陰性7.2%、疑陽性2.7%、ムンプス抗体は陰性3.2%、疑陽性14.4%と高頻度であった。麻疹および水痘帯状疱疹抗体はそれぞれ数人が疑陽性であった。

RSVによる好酸球の活性化に関する機序解明を目的とした研究を行った。RSVと好酸球をPAF (Platelet Activating Factor) の存在下、共培養した場合RSVは有意に好酸球表面に吸着し、このとき好酸球表面の接着因子 (αMb2, CD11b/CD16) 発現が有意に亢進した。さらに、好酸球からの活性酸素 (O_2^-) 放出も増強した。以上のことから、RSVは好酸球を活性化し、好酸球のエフェクター機能を増強することが示唆された。

ARIウイルス検査に伴う標準品の供給体制を構築するため、RSV, RV, PIV, hMPV およびhBoCV等のそれぞれの標準株および/あるいは国内臨床分離株等を増殖、遺伝子情報等を解析しレファレンス参照株として保存した。また、遺伝子情報のジーンバンクへの登録、プローブの作成等を継続実施した。

地方衛生研究所等で頻繁に使用する病原体検出マニュアルのARIウイルス分野を充実するため、ヒトメタニューモウイルス編を公開した。

A.研究目的

わが国においてインフルエンザウイルス (InflV) を除く他の急性呼吸器感染症 (ARI) ウイルスについて、包括的なレファレンス機能は未だ充分には確立されていないことから、国立感染症研究所、地方衛生研究所、大学、医療機関等の密接な連携体制のもと、全国レベルでの充実したARI対策に資するための総合的なレファレンス体制の構築および機能強化に関する研究を行う。今年度は研究第二年度である。

B.研究方法

以下の項目について研究を実施した。

1. 各地域レベルでのARI分離株のウイルス学的解析および代表株の系統保存・遺伝子情報の集積を行う。
2. 病原検索法〔ウイルス分離培養法、遺伝子増幅 (PCR) 法等〕及び血清抗体測定法などの検査法の標準化、精度の向上等に関する検討を行うとともに検査法の普及を図る。
3. ARIウイルス検査に伴う標準品 (ウイルス株、抗血清、プローブ等) の供給体制を充実する。
4. 血清疫学調査を試み、それぞれのウイルスの流行実態を血清疫学的に把握する。
5. ARIウイルス感染と病態について、感染ウイルス側および生体側から種々の検索、解析を実施する。
6. 医療施設内におけるARIの感染実態を調査し、院内感染制御に関する方策を検証する。

C.研究結果

山形県、福島県、栃木県、群馬県、滋賀県、島根県、佐賀県および沖縄県域のARI ウイルスサーベイランスをそれぞれ実施した。その結果、RS ウイルス (RSV) が 79 株、ヒトメタニューモウイルス (hMPV) が 62 株、ライノウイルス (RV) が 56 株、パラインフルエンザウイルス (PIV) が 85 株およびヒトボカウイルス (hBoCV) が 17 株それぞれ分離/検出された。その他、InflV、アデノウイルス (AdV)、ムンプスウイルス、エンテロウイルスおよびヘルペスウイルス等が多数、分離検出された〔水田、青木、須藤、五十嵐、平田、塚越、大内、田中、小村、南、中村、平良〕。

山形県においてはウイルスサーベイランスを効果的に実施するための、独自のシステムを開発している。このシステムを活用して 1988-2007 年の間に分離された AdV-1, -2, -3, -4, -5 および-6 型のヘキソン、Hypervariable region (HVR) のシーケンス解析を行った。その結果、各血清型では、長期にわたり 99-100%の相同性で塩基が保存されていることが明らかとなった。HVR が、血清型を決定する部位として安定して保存されていることが示唆され、この部位はむしろ Serotype-specific region と呼ぶべきであることを提唱した〔水田、青木、須藤〕。

栃木県におけるウイルスサーベイランス検査体制の整備等を図り、これまで検査未対応のARI ウイルスを対象にウイルスサーベイランスを実施した。その結果、RSV, hMPV, RV および hBoCV 等が検出され、これらウイルスの県内の流行をウ

ウイルス学的に確認した [平田, 大金, 船渡川]。

沖縄県における 2006 年～2008 年の間の RSV 感染症の発生状況を調査した結果、いずれの年も夏季 (雨期) に流行がみられ、全国の流行期 (主に冬季) と異なっていた。検出された RSV の遺伝子解析結果から流行ウイルス株は Subgroup A (GA2) 型が主流であったが、Subgroup B (BA) 型の流行も確認された [中村, 糸数, 平良, 木村, 野田]。

2007 年秋～2008 年春の間、気道症状を来たし国立病院機構横浜医療センターを受診し鼻汁検体採取可能であった児 62 名の RSV 分離状況と臨床背景に関して検討を行った。対象児の月齢は、生後 3 週間から生後 44 ヶ月 (平均 \pm SD 13.3 ヶ月 \pm 10.5 ヶ月)。男児 40 名女児 22 名。RSV 培養陽性は 22 名、うち迅速キットでは陰性だったが培養陽性だった児が 3 名いた。保険適応などの理由で RSV 迅速検査を施行していなかった児で、RSV 培養陽性だった児が 4 名いた。RSV 培養陽性群での、検体採取病日は 3.7 ± 1.4 日、RSV 迅速キット陽性だったが培養陰性群の検体採取病日は 4.4 ± 1.4 日だった。RSV 培養陽性、陰性で入院期間、入院中の治療内容に差はなかった [菅井, 藤塚, 木村, 野田]。

RSV に起因する乳幼児の肺炎や細気管支炎などのウイルス側の遺伝学的な要因を解明するため、入院加療を必要とした気管支炎乳幼児患者から分離された RSV17 株の Nucleoprotein (N), Glycoprotein (G) 及び Fusion (F) 遺伝子に関する分子疫学解析を行った。その結果、7 株は Subgroup A、10 株は Subgroup B に分類さ

れ、さらに G 遺伝子の系統解析から、それぞれの分離株は、固有のクラスターに分類され Subgroup A では GA2, Subgroup B では BA に分類された。以上のことから、GA2 や BA に属する RSV も乳児の気管支炎に関与することが推定された [塚越, 菅井, 木村, 水田, 秋山, 斎藤, 野田]。

2001～07 年に山形県および福島県において分離された RV 計 91 株の VP4-2 遺伝子の系統解析を行った。系統樹上、90 株は genogroup A (RV-A)、1 株は genogroup B (RV-B) に分類された。RV-A に属する株はさらに多数のクラスターに分かれた。以上のことから、調査期間中、東北地方で流行していた RV は genogroup A に分類される多彩な遺伝子型のウイルスが主体であった可能性が示唆された [平田, 水田, 五十嵐, 秋山, 木村, 野田]。

2007 年から 2008 年の間に ARI 患者から採取された臨床検体 (鼻・咽頭拭い液) からヒトボカウイルス hBoV の検出を試みた。その結果、供試した 701 検体のうち 14 検体から hBoV 遺伝子が検出された。検出された hBoV 遺伝子のうちの 7 株について全領域 (5299bp) 解析し、系統樹解析を行った結果、6 株は group1 に、1 株は group2 に分類された [五十嵐, 水田, 斎藤, 大内, 田中, 菅井, 平田, 秋山, 木村, 野田]。

2008 年～2009 年の間に分離された RSV32 株の抗 RSV ヒト化モノクローナル抗体 (商品名: シナジス, アボット) に対する中和反応性を検討した。その結果、いずれの供試株も抗 RSV ヒト化モノクローナル抗体に対して $100 \times 2^{15-16}$ 倍の中和価が得られ、2007 年度までと同様の傾向で

あった〔野田, 水田, 斎藤, 菅井, 木村〕。

重症心身障害児(者)病棟における平成19年と20年の2年間の感染症流行について調査を行った。その結果, ノロウイルス感染症, インフルエンザ, ヘルパンギーナの流行および他の病原体不明感染症の流行が毎年2-3回みられた。全国の重心病棟では, 約0.5回/病棟/年の感染症流行がみられ, ノロウイルス感染症(0.13回/病棟/年), インフルエンザ(0.1回/病棟/年)より病原体不明感染症(0.2回/病棟/年)の流行頻度が最も高かった。

愛媛病院職員のウイルス抗体検査を実施した結果, 風疹抗体は陰性7.2%, 擬陽性2.7%, ムンプス抗体は陰性3.2%, 擬陽性14.4%と高頻度であった。麻疹, 水痘帯状疱疹抗体は数人に擬陽性があるのみであった〔松田〕。

感染喘息の増悪因子の詳細を解明するため, RSVによる好酸球の活性化に関する機序解明を目的とした研究を行った。RSVと好酸球をPAF(Platelet Activating Factor)の存在下, 共培養した場合RSVは有意に好酸球表面に吸着した。また, このとき好酸球表面の接着因子

(aMb2, CD11b/CD16)発現が有意に亢進した。さらに, 好酸球からの活性酸素(O₂)放出も増強した。以上のことから, RSVは好酸球を活性化し, 好酸球のエフェクター機能を増強することが示唆された〔木村, 塚越, 野田〕。

昨年度に引き続いてARIウイルス検査に伴う標準品の供給体制を拡充するため, RSV, RV, PIV, hMPV等のそれぞれの国内臨床分離株増殖および遺伝子情報解析

を継続実施し, レファレンス参照株として保存した。あわせてウイルス増殖に適した各種株化細胞を追加保存した。また, ウイルス株の血清学的同定に用いる標準抗血清はそれぞれのウイルスが血清学的に多型であること, 多くの機関において遺伝子解析が日常的に実施可能であることなどから, 遺伝子情報のジーンバンクへの登録, プローブの作成等の一層の進展を図った〔野田, 木村, 水田, 平田, 五十嵐〕。

地方衛生研究所で実施されている病原体サーベイランスを実施する際の標準的な実験室検査法とするため, 病原体検出マニュアルhMPV編を公開した。さらに, 現在RVおよびPIV編等を作成中である〔水田, 塚越, 平田, 木村, 野田〕。

D. 考察

研究第1年次に引き続き, 総合的かつ効果的なARIサーベイランス体制を推進するための包括的な研究を実施した。

ARI症例の病原検索を試みた我々の研究結果から, RSV, hMPV, RV, PIV, AdV等のウイルスが多数検出され, 臨床症状等から呼吸器症状のみならず感染喘息をはじめとした多様な疾患に関与していることが推定された。これまで地域で流行したRSV, hMPV等の分子疫学解析からいくつかの興味ある知見が得られているが, 今年度はさらに詳細な解析を実施した。また, 今年度は新たにRV分離株の分子疫学解析と新興ARIウイルスの一つのhBoCVについて, わが国の株の全領域遺伝子解析を実施したことは特記すべき成果と考える。ウイルス検索, 疫学情報等,