

別紙

地方衛生研究所における麻疹検査実績(2009年1週~48週) 記入例

検体No.	年齢	性別	発病日	検体採取日	臨床症状	発生の状況	接種歴	ワクチン接種歴	検体種別	RT-PCR	IgM抗体	その他(検査項目及び結果)	備考
1	16歳2ヶ月	男	2009.08.20	2009.08.24	発熱(39.0)、発疹	散発	なし	あり (接種時期不明)	拭い液	HA遺伝子陰性 NP遺伝子陰性	/	未実施	入院中、解熱後経過改善中に検体採取
									血液	HA遺伝子陰性 NP遺伝子陰性	陽性	未実施	
									その他	--	--	--	
2								拭い液		/			
								血液					
								その他					
3								拭い液		/			
								血液					
								その他					
4								拭い液		/			
								血液					
								その他					
5								拭い液		/			
								血液					
								その他					

厚生労働科学研究費補助金

統括研究報告書

「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

福岡県では依然として麻疹が流行していること、IgM 抗体の検出など実験室内診断による麻疹の確定診断の割合が上昇してきたこと、平成 19～21 年度の麻疹ウイルス主流株は日本固有の D5 型であること、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ることなどが明らかとなった。麻疹排除を実現していくためには、今後とも継続して PCR 等の実験室内診断により麻疹ウイルスの遺伝子型を解析してその動向を把握する必要があること、集団生活をしている小学生～大学生等へのワクチン接種率を上げることが重要であることが示唆された。

研究協力者

世良暢之¹、吉富秀亮¹、中山志幸^{1,2}、
石橋哲也¹、千々和勝己¹、小野塚大輔¹、
川本大輔³、樋脇 弘³

(¹福岡県保健環境研究所、²福岡県筑紫保健
福祉環境事務所、³福岡市保健環境研究所)

A 背景と目的

世界保健機構 (WHO)・西太平洋事務局による 2012 年までの麻疹排除を達成するため、各地方自治体が麻疹ワクチン対策 (ワクチン接種率の向上) などを積極的に推進する一方で、各地方衛生研究所は国立感染症研究所 (感染研) より提供された麻疹診断マニュアル (第 2 版) に基づいた精度の高い麻疹検査診断を推進していかなければならない。

本研究では、九州内での麻疹排除に向けた病原体サーベイランスの整備、麻疹レファレンス

センターとしての実験室診断技術の精度向上と普及、麻疹患者に関する解析を実施することを目的とした。そのため、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と同時に、福岡県感染症情報から得られた患者報告数、感染症流行予測事業で得られた抗体価及びワクチン接種率に関するデータについて検討したので、その結果について報告する。

B 研究方法

麻疹患者の週別及び年齢群別報告数は、福岡県感染症情報のデータを用いた。

麻疹ウイルスの遺伝子型は、平成 15 年以降に福岡県保健環境研究所 (福岡県保環研)、福岡市保健環境研究所 (福岡市保環研) 及び北九州市環境科学研究所 (北九州市環科研) に搬入され保存されていた、麻疹患者 8 名の咽頭拭い液 11 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 12 検体について、上記の

麻疹診断マニュアル（第2版）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及びシーケンス解析を実施した。

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、first PCRではpMvGTf1m、pMvGTr1を用い、nested PCRとシーケンスにはpMvGTf2m、pMvGTr2を用いた。HA遺伝子のPCRはN遺伝子のPCR法と同様に行い、first PCRはcDNA 5μlを鋳型として、98℃ 10秒、アニーリング53℃ 30秒、72℃ 1分を30サイクル、nested PCRはfirst PCR産物5μlを鋳型として、アニーリングの温度を55℃とした以外はfirst PCRと同様に行った。プライマーは、first PCRにはMHL1とMHR1、nested PCRにはMHL2とMHR2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遺伝子の塩基配列を決定、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。

健常者の麻疹ウイルスに対するPA抗体保有状況及びワクチン接種率は感染症流行予測調査事業のデータを用いた。

(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及び感染症流行予測調査事業に基づいて搬入

された検体を用いており、倫理面への対応は個人情報保護等に十分配慮して実施した。

C 研究結果

感染研・感染症情報センターの報告によると、平成21年12月24日現在、福岡県は千葉県、東京都、神奈川県、埼玉県、大阪府、愛知県について年間麻疹報告数が多い。福岡県の麻疹の患者報告数は、平成19年が120箇所の小児科定点医療機関からの報告数、平成20年以降は全医療機関からの報告数となっているため正確な比較はできないが、平成19年が343例、平成20年が677例であったのに比較すると、平成21年は24例と劇的に減少し、沈静化している状態である。図1に福岡県における麻疹の週別報告数の経年変化を示した。これによると平成19年は30週から40週にかけて35週をピークとした流行が見られたのに対し、平成20年は例年より早い3週から17週にかけて5週をピークとした流行が見られた。図2に年齢群別麻疹累積報告数の経年変化を示した。これによると、平成19年は、乳幼児、小学生、中学生相当の0～14歳で290例、高校生、大学生相当の19歳までを含めると330例と全体の96%を占め、平成20年は0～14歳で387例、高校生、大学生相当の24歳までを含めると568例と全体の84%を占め、集団で生活をしている学校でのワクチン対策が麻疹の感染拡大を防ぐために重要であると思われた。

図3に平成15～21年度に福岡県内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)9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、3例がワクチン株由来であるA型、1例がH1型の3つの遺伝子型に分類された。H1型麻疹ウイルス1株は福岡市保環研に平成15年に搬入され保存

されていた検体から検出されたものである。検討株数も少ないため早計には断定できないが、福岡県においては全国と同様ここ数年 D5 遺伝子型による麻疹患者の発生であると推測された。平成 21 年の麻疹患者 24 例の内訳は、血清 IgM 抗体の検出等の検査診断が 19 例 (79%)、臨床診断が 5 例 (21%)、またワクチン接種歴は 12 例 (50%) であった。さらに診断が難しい修飾麻疹 5 例はいずれも検査診断が実施されていた。しかしこれらの確定診断はすべて医療機関や民間検査機関等で実施されたもので、地方衛生研究所で PCR 等の遺伝子検査を実施したのではなく、今後の課題となった。平成 21 年度における九州内の地方衛生研究所の遺伝子検査状況を表 1 に示したが、麻疹 (疑い含む) 発生例が少なかったこともあり、検査件数は総じて少なかった。

感染症流行予測調査事業による麻疹ウイルスに対する PA 抗体保有状況を表 2、3 及び 4 に示した。平成 19 年度は全国的に大学生を中心に麻疹の流行が報告されたが、福岡県保環研における調査結果からは 20 歳前後において特に抗体陰性率が高いわけではなく、0~1 歳の年齢層で抗体陰性率が 70.4% と最も高かった。ワクチン接種歴と比較すると、接種歴の有る 154 検体 (42.1%) のうち 2 検体 (1.3%) で抗体陰性であった。平成 20 年度は、北九州地域を中心に約 400 名の麻疹患者の報告があったように、患者の多くは 20 歳以下の年齢層であった。調査の結果、0-1 歳の年齢層では抗体陰性率が 53.8% と最も高く、ワクチン接種歴と比較すると、接種歴が有る 189 検体のうち 6 検体 (3.2%) で抗体陰性で、20 歳未満の年齢層では 5 名がワクチン接種歴が有るにもかかわらず抗体が陰性であった。平成 19 年と同様、0-1 歳の年齢層での抗体陰性率の高さは、同年齢層のワクチン

接種率が低いことによるものと考えられた。平成 21 年度はワクチン接種歴が有る 298 検体のうち 11 検体 (3.7%) で抗体陰性であり、20 歳未満の年齢層では 237 名中 6 名 (2.5%) でワクチン接種歴が有るにも関わらず抗体陰性であった。平成 20 年 4 月より 5 年間、麻疹及び風疹の混合ワクチンである MR ワクチンの接種が従来の 2 回 (1 歳児、小学校入学前) に加え、第 3 期 (中学 1 年生)、第 4 期 (高校 3 年生) が追加され、ブースター効果が期待されているが、抗体価が低い成人年齢層についても、ワクチンの追加接種を勧めることで流行を予防することが可能となると考えられる。

福岡県内における麻疹ワクチン接種率を表 5 に示した。麻疹ワクチン接種率は毎年少しずつではあるが上昇傾向にあり、今後も 95% 以上を目指して継続していく必要がある。

D 考察

福岡県における麻疹患者発生数は、平成 19 年が 343 例、平成 20 年が 677 例、平成 21 年は 24 例と依然として高い水準にあり、また集団生活をしている小学生~大学生までの年齢層でその大半を占めており、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。

従来、麻疹は典型的な発熱、発疹及びコプリック班等の麻疹症状が出現していれば臨床診断による確定診断が可能であることから、平成 19 年、平成 20 年では臨床診断のみによる麻疹届出が半数以上を占めていた。平成 21 年は IgM 抗体等の検出による検査診断が全体の約 8 割を占め、麻疹排除において重要な段階である検査診断による確定診断の割合が上昇した。しかし、IgM 抗体は麻疹感染後に検出できない時期があるのに対して、遺伝子検査は麻疹の感染初期か

ら検出でき、また迅速に結果報告ができるなど、麻疹ウイルスの伝搬経路や動向を把握する上で有用な検査法である。福岡県においては最近ではD5型による麻疹の流行が主流であると推定されるが、外国からの輸入例等も想定されることから、麻疹ウイルスの遺伝子検査は麻疹の確定診断を行う上で極めて重要な実験室内診断の1つであると思われる。

麻疹患者は集団生活をしている小学生～大学生で多いこと、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、麻疹排除を計画通り推進していくには、小学校～大学生等の集団生活をしている年齢層のワクチン接種率を継続的に上昇させることが重要であると考えられる。

E 結論

今回の調査によって、福岡県では依然として

麻疹が流行していること、主な麻疹ウイルスは日本固有のD5型であること、麻疹排除を実現していくためには、集団生活をしている小学校～大学生等へのワクチン接種率を上げること、PCR等の遺伝子検査による確定診断により麻疹ウイルスの動向等を知ることが重要であることなどが明らかとなった。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H 知的所有権の取得情報

なし

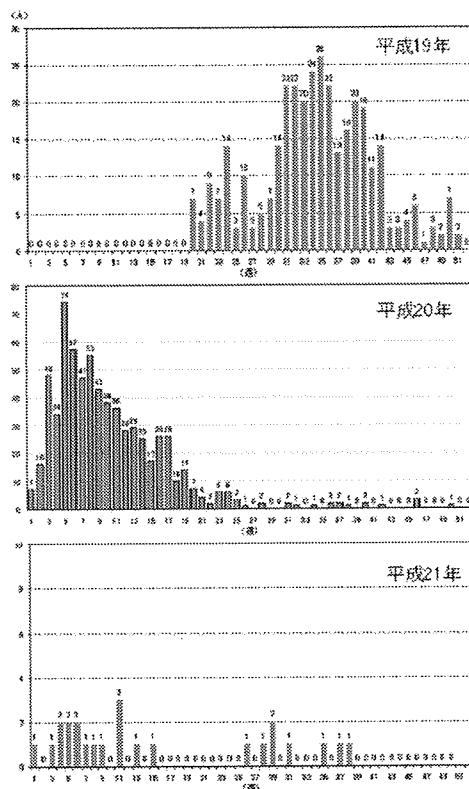


図1 福岡県における麻疹週別報告数 (平成19～21年) (福岡県感染症情報)

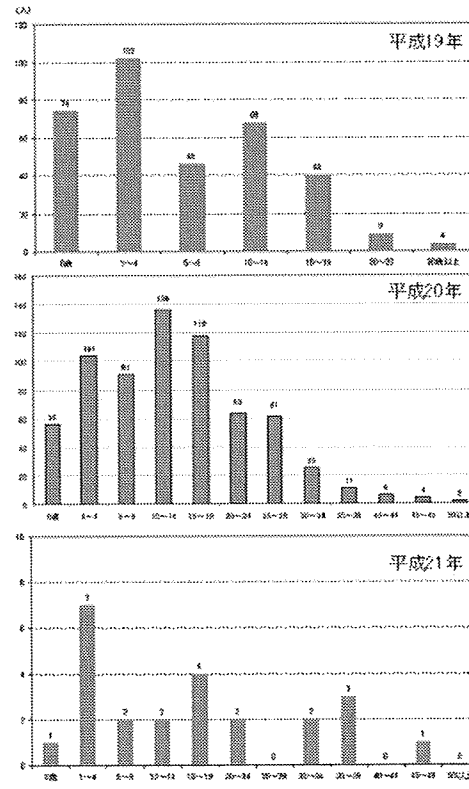


図2 福岡県における年齢群別麻疹累積報告数 (平成19～21年) (福岡県感染症情報)

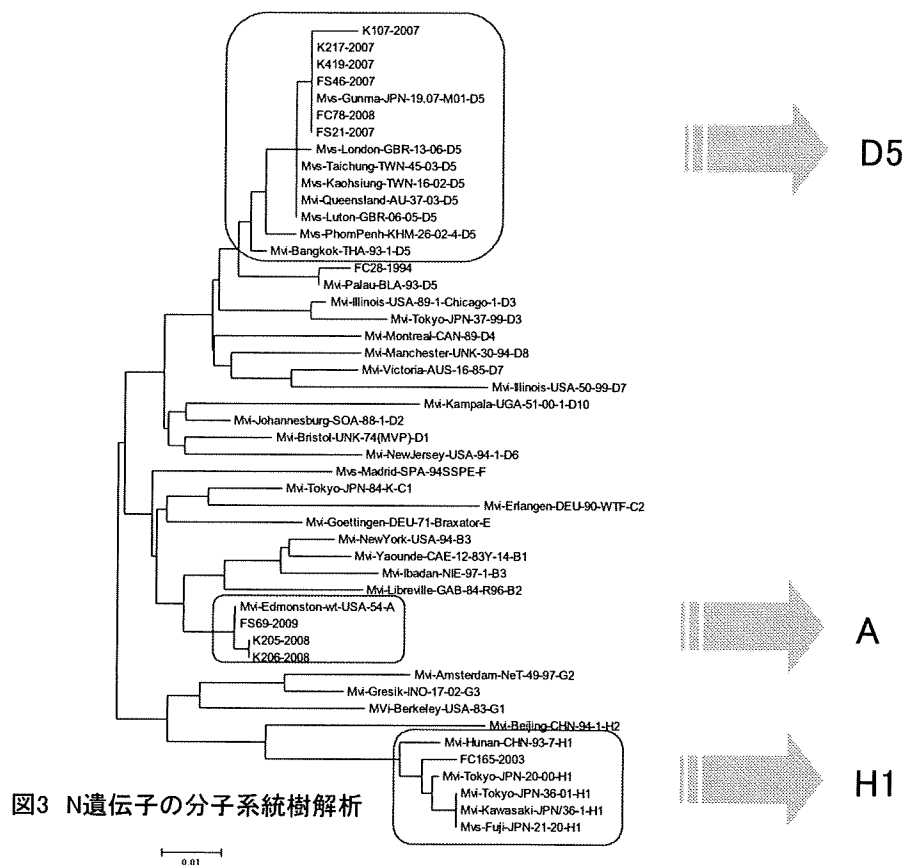


図3 N遺伝子の分子系統樹解析

表1 九州各県における麻疹ウイルスの検査状況(平成21年度)

試験・研究所名	陽性検体数／検査検体数
福岡県保健環境研究所	1/1
福岡市保健環境研究所	0/1
北九州市環境科学研究所	0/1
佐賀県衛生薬業センター	0/0
長崎県環境保健研究センター	0/0
長崎市保健環境試験所	0/0
大分県衛生環境研究センター	0/8
熊本県保健環境科学研究所	0/0
熊本市環境総合研究所	0/0
宮崎県衛生環境研究所	0/10
鹿児島県環境保健センター	0/1

表2 平成19年度 麻疹ウイルスに対するワクチン接種歴別PA抗体保有状況

年齢区分 (歳)	検体数	P A 抗体価											ワクチン 接種歴	
		<16	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	≥ 8192		
0-1	23	19	0	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	なし
	3	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	あり
	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	不明
2-3	8	0	0	0	1	1	3	2	0	1	0	0	0	なし
	7	0	0	0	1	0	3	1	1	1	0	0	0	あり
	6	0	0	1	0	1	2	2	0	0	0	0	0	不明
4-9	3	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	なし
	25	1	0	1	9	4	6	2	1	1	0	0	0	あり
	7	1	0	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	不明
10-14	7	1	0	0	1	2	0	1	1	1	0	0	0	なし
	32	0	1	5	6	9	3	2	3	0	0	0	0	あり
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	不明
15-19	6	0	0	1	0	2	2	0	1	0	0	0	0	なし
	24	1	2	3	1	5	5	0	3	0	0	0	0	あり
	8	0	2	0	1	1	1	3	0	0	0	0	0	不明
20-24	3	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	なし
	20	0	1	0	3	5	4	6	0	0	0	0	0	あり
	24	1	0	1	2	1	7	9	2	1	0	0	0	不明
25-29	5	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	1	なし
	20	0	0	1	0	6	1	4	5	1	0	0	1	あり
	15	1	0	0	1	1	3	5	3	1	0	0	0	不明
30-39	10	0	0	0	1	1	2	3	1	1	0	0	1	なし
	20	0	1	0	0	2	5	5	5	1	0	0	1	あり
	48	0	3	1	5	3	9	11	11	3	0	0	2	不明
40-	9	0	0	0	2	0	2	2	1	2	0	0	0	なし
	3	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	あり
	28	0	1	2	3	3	6	4	4	3	0	0	0	不明
計	366	26	11	20	39	55	70	64	43	17	0	0	8	

表3 平成20年度 麻疹ウイルスに対するワクチン接種歴別PA抗体保有状況

年齢区分 (歳)	検体数	P A 抗体価											ワクチン 接種歴	
		<16	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	≥ 8192		
0-1	12	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	なし
	14	2	2	0	3	0	1	2	0	3	0	0	1	あり
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	不明
2-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	なし
	24	0	0	1	0	0	2	2	5	5	6	3	3	あり
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	不明
4-9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	なし
	40	0	0	0	1	2	2	6	10	8	7	4	4	あり
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	不明
10-14	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	なし
	36	3	1	3	1	3	3	6	7	7	2	0	0	あり
	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	不明
15-19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	なし
	10	0	1	2	1	1	1	1	1	0	1	1	1	あり
	27	1	0	3	2	1	4	4	6	1	2	3	3	不明
20-24	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	なし
	17	0	0	1	0	2	3	2	2	6	1	0	0	あり
	32	2	0	0	1	5	4	6	8	4	1	1	1	不明
25-29	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	なし
	13	0	0	0	1	0	1	2	7	1	1	0	0	あり
	35	1	0	1	3	2	3	6	11	2	2	4	4	不明
30-39	5	0	0	0	0	1	1	0	0	2	1	0	0	なし
	23	1	0	0	0	2	4	4	4	6	1	1	1	あり
	51	0	1	1	3	5	5	9	11	6	8	2	2	不明
40-	7	0	0	0	0	1	1	2	1	1	1	0	0	なし
	12	0	0	1	0	2	1	0	4	1	1	2	2	あり
	26	1	0	2	1	1	3	5	6	5	0	2	2	不明
計	28	13	0	0	0	3	2	3	1	3	3	0	0	

表4 平成21年度 麻疹ウイルスに対するワクチン接種歴別PA抗体保有状況

年齢区分 (歳)	検体数	PA抗体価											ワクチン 接種歴
		<16	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	≥ 8192	
0-1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	なし
	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	あり
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	不明
2-3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	なし
	9	0	0	0	0	2	2	2	2	1	0	0	あり
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	不明
4-9	4	0	0	0	1	0	1	2	0	0	0	0	なし
	117	1	0	1	3	7	16	26	32	28	1	2	あり
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	不明
10-14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	なし
	77	5	0	3	5	11	16	15	15	6	1	0	あり
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	不明
15-19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	なし
	17	0	0	0	0	2	6	3	1	2	2	1	あり
	9	0	0	0	1	3	0	2	2	1	0	0	不明
20-24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	なし
	7	1	0	0	0	0	1	2	1	1	1	0	あり
	4	0	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0	不明
25-29	3	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	なし
	24	1	1	1	0	7	3	5	1	5	0	0	あり
	14	1	1	0	0	4	2	2	4	0	0	0	不明
30-39	7	1	0	1	0	1	3	1	0	0	0	0	なし
	34	2	0	0	3	4	4	4	9	5	3	0	あり
	49	5	0	2	3	4	3	16	11	4	0	1	不明
40-	7	1	0	0	1	1	2	2	0	0	0	0	なし
	11	1	0	0	0	2	1	3	2	1	1	0	あり
	22	0	0	2	2	3	1	3	7	2	1	1	不明
計	419	19	2	11	20	54	63	91	87	56	10	6	

表5 福岡県における麻疹ワクチン接種率(感染症流行予測事業)

年齢区分 (歳)	ワクチン接種率(%)		
	平成19年度	平成20年度	平成21年度
0-1	11.5 (3/ 26)	53.8 (14/ 26)	66.7 (2/ 3)
2-3	46.7 (7/ 15)	100 (24/ 24)	90.0 (9/ 10)
4-9	89.3 (25/ 28)	100 (40/ 40)	96.7 (117/121)
10-14	82.1 (32/ 39)	97.3 (36/ 37)	100 (77/ 77)
15-19	80 (24/ 30)	100 (10/ 10)	100 (17/ 17)
20-24	87 (20/ 23)	89.5 (17/ 19)	100 (7/ 7)
25-29	80 (20/ 25)	92.9 (13/ 14)	88.9 (24/ 27)
30-39	66.7 (20/ 30)	82.1 (23/ 28)	82.9 (34/ 41)
40-	25 (3/ 12)	63.2 (12/ 19)	61.1 (11/ 18)
計	67.5 (154/228)	87.1 (189/217)	92.8 (298/321)

(接種歴不明者を除く)

平成 21 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）

「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」
研究報告書

沖縄県における麻疹全数サーベイランス（2009 年）

研究協力者 平良勝也（沖縄県衛生環境研究所）

研究協力者 中村正治、岡野祥、仁平稔（沖縄県衛生環境研究所）

研究要旨

2009 年、沖縄県の麻疹全数サーベイランスにおいて麻疹疑い例は 60 例報告された。これらの症例については全て検査診断が実施され、検査の実施率は高い水準で維持された。麻疹確定例は 5 例が報告され、そのうち PCR で陽性となった 4 例の genotype 解析では、3 例が遺伝子型 D5、1 例が D8 に分類された。遺伝子型 D8 は、今回が国内で初めての報告例であることから、国外から侵入した麻疹ウイルス株の可能性が高いと考えられた。さらに、疫学調査により本症例は、麻疹が疑われる外国人旅行者との接点を確認され、これが感染源となった可能性が示唆された。

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では、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、2003～2008 年の麻疹患者報告数は 16～41 例（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 2009 年の麻疹サーベイランス成績についてまとめ考察した。

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 及び N 遺伝子の RT-PCR、nested-PCR を実施した。PCR 陽性の場合、塩基配列を決定し genotype 解析を行った。また、咽頭ぬぐい液及び一部の血液は、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。

C. 研究結果

(1) 麻疹患者発生状況

2009 年は、麻疹疑い例 60 例が報告さ

れた。そのうち、麻疹確定例は5例、麻疹否定例は55例であった。麻疹確定例の発生を週別にみると、まず第6週目に1例目が報告され、その後、第8週、第16週、第26週、37週に各1例ずつ散発的に報告された(図1)。

麻疹確定例について、表1に示した。患者の年齢は、1歳未満1例、20歳代2例、40歳代1例、80歳代1例であった。ワクチン接種歴は、なし3例、不明2例であった。いずれの症例も、県外への旅行歴はなく、感染源は不明であった。

(2)麻疹の検査診断実施状況

2003~2009年までの7年間で実施された検査状況について表2に示した。2009年は、前年に続き報告された全ての症例で検査診断が実施された。当所でのPCR検査とウイルス分離は60例(100%)で実施され、医療機関(民間検査センター)でのIgM検査実施は3例(3%)であった。

(3)麻疹ウイルス検出状況

検査依頼があった60例のうち4例から麻疹ウイルス遺伝子が検出された。このうち2例はH遺伝子及びN遺伝子の両方が検出され、残り2例はH遺伝子のみが検出された(表1)。塩基配列を決定しgenotype解析を行った結果、3例は遺伝子型D5、1例は遺伝子型D8型に分類された(表1)。ウイルス分離は、D8型が検出された1例からのみ分離された。

(4)遺伝子型D8検出症例の詳細について

患者は、22歳女性、9月1日から微熱、咳、鼻水、右眼充血の症状があり9月4日に医療機関を受診したが改善せず、9月6日に発熱(39.5℃)、悪寒症状を呈し、翌日発疹を認めたため再度受診し入院となった。麻疹ワクチン接種歴なし、海外

渡航歴はなかった。9月7日の採取血清では、麻疹IgM 7.69、IgG 4.49を示したことから麻疹と確定診断された。

9月9日に採取された麻疹患者の咽頭ぬぐい液および末梢血単核球を用いてRT-nested PCRおよびVero/hSLAM細胞を用いたウイルス分離を試みた。その結果、PCRでは両方の検体で麻疹ウイルスのH及びN遺伝子が増幅され、ウイルス分離では、末梢血単核球でのみ接種後4日目から細胞変性効果が認められた。分離されたウイルス株MVi/Okinawa.JPN/37.09のN遺伝子(456bp)について塩基配列を決定し、系統樹解析を実施した結果、遺伝子型D8に分類された(図2)。

GenBankに登録されている株との相同性検索では、インドやアメリカで分離されている遺伝子型D8の株(FJ223153、AY953415、EU139103)と100%一致した。

保健所による詳細な疫学調査の結果、患者は8月の17日にインフルエンザを発症し救急医療機関を受診していた。その際、待合室に外国人の患者がいたことを患者の母親が記憶していた。医療機関の協力によりカルテを調査したところ、沖縄伝統空手国際大会に参加のため来沖していたインド人の女性11歳が受診していたことが判明し、発熱、発疹の記載が確認された。

(5)麻疹IgM抗体測定

麻疹疑い報告数60例のうち血液検体が提出された41例(68%)でIgM検査を実施し、PCR検査結果と比較した。PCRでは陽性を示し、IgMでは陰性を示した症例は3例で確認された。これらの症例の検体採取時期は、すべて発疹出現日から1日以内であった。これに対して、PCRでは陰性を示し、IgMでは陽性を示した症例は、2例で確認され、IgMの測定値は1.90と1.98であった。

D. 考察

2009年、麻疹疑い例は60例が報告され、これらすべての症例で検査診断が実施されたことから、麻疹全数把握サーベイランスシステムは県内の医療機関に広く定着し、維持されていると考えられた。

麻疹確定した5例のうち、4例はPCRにより麻疹が確定した。しかし、残り1例はPCR陰性、IgMは保留値を示したことから、検査診断では麻疹確定に至らず医療現場においては臨床診断を優先させる形となった。麻疹排除期において、患者の発生が少なくなってきた場合、このような症例について確実な検査診断を行うためには、急性期血清と回復期血清の2点で抗体検査を行うことも検討していかなければならないと考えられた。

今回検出された遺伝子型はD5とD8であった。D5は2006～2008年の国内流行株である。D8はインド、ネパール、バングラディシュなどに分布し、これ以外の地域では輸入症例として報告されている。わが国ではこれまで遺伝子型D8の報告例はなく、今回が国内で初めての症例であった。したがって、本ウイルス株は国外から持ち込まれた可能性が高いと考えられる。また、保健所の詳細な疫学調査によると、患者は麻疹を発症する前に別の医療機関で、麻疹が疑われるインドからの旅行者と接触していたことが確認されたことから、この旅行者が感染源となった可能性が示唆された。

世界保健機構（WHO）は2004年に、麻疹排除のための判断基準の一つとして「麻疹IgM抗体を検出するのに十分な血清サンプルが80%以上の麻疹疑い例から採取されていること」を挙げている。2009年は、麻疹疑い例として報告された60例のうち、IgM検査が実施されたのは41例（68%）で、判断基準の80%にはま

だ満たない状況であった。今後、血清サンプルの収集については、重点課題として取り組んでいかなければならない。

今回のIgM測定において、PCRでは陽性を示し、IgMでは陰性を示した症例が3例、PCRでは陰性を示し、IgMでは陽性を示したのが2例あった。このような症例の場合は、検体採取時期、ワクチン接種歴、擬陽性を考慮しながら、慎重な判断が必要と考えられた。

E. 結論

2009年、沖縄県の麻疹全数サーベイランスにおいて麻疹疑い例は60例報告された。これらの症例については全て検査診断が実施され、検査の実施率は高い水準で維持された。麻疹確定例は5例が報告され、そのうちPCRで陽性となった4例のgenotype解析では、3例が遺伝子型D5、1例がD8に分類された。遺伝子型D8は、今回が国内で初めての報告例であることから、国外から侵入した麻疹ウイルス株の可能性が高いと考えられた。さらに、疫学調査により本症例は、麻疹が疑われる外国人旅行者との接点を確認され、これが感染源となった可能性が示唆された。

F. 研究発表

平良勝也、岡野祥、仁平 稔、糸数清正、久高潤、中村正治、中村優理、和氣亨、中村孝一、小林孝暢、山川宗貞、譜久山民子、石川裕一、糸数公：遺伝子型D8麻疹ウイルスの検出 病原微生物検出情報 30(11)：299-300, 2009

G. 知的財産の出願・登録状況
該当なし

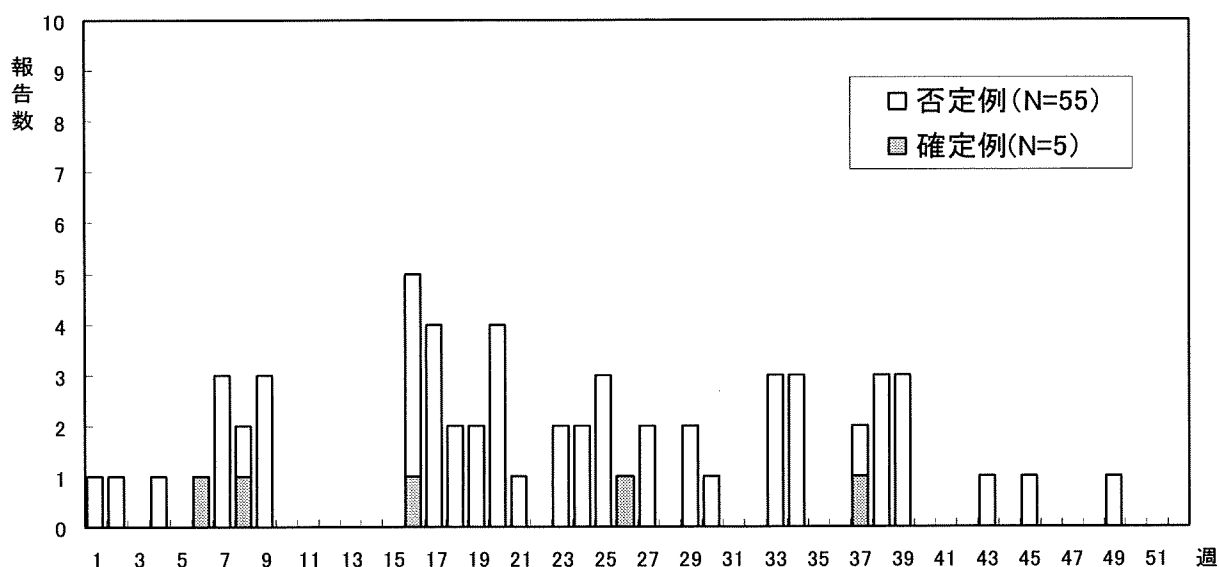


図 1. 2009 年麻疹疑い例報告数

表 1. 麻疹全数報告および検査状況 2003-2009

	2003年	2004年	2005年	2006年	2007年	2008年	2009年	合計
報告全数	39	33	29	59	132	220	60	572
医療機関からの検体提出	24	26	27	57	129	220	60	476
咽頭ぬぐい液	18	22	20	54	124	216	60	454
血液	17	20	24	42	75	136	41	314
尿	-	-	-	-	-	17	1	17
検査診断	29	31	28	59	129	220	60	556
PCR・ウイルス分離(衛生環境研究所)	74%	94%	97%	100%	98%	100%	100%	97%
血清学的検査(医療機関)	83%	84%	96%	97%	97%	99%	100%	96%
PCR・ウイルス分離(衛生環境研究所)	24	26	27	57	125	217	60	536
血清学的検査(医療機関)	17	24	11	26	45	57	2	180
PCR・ウイルス分離(衛生環境研究所)	59%	77%	39%	44%	35%	26%	3%	32%
麻疹確定例	19	16	0	18	22	41	5	121
臨床症状	49%	48%	0%	31%	17%	19%	8%	21%
臨床症状+検査	9	2	0	0	0	0	0	11
臨床症状+検査	10	14	0	18	22	41	5	110
麻疹否定例	20	17	29	41	110	179	55	396
臨床症状	51%	52%	100%	69%	83%	81%	92%	69%
臨床症状	3	1	1	0	3	0	0	8
臨床症状+検査	17	16	28	41	107	179	55	388

表 2. 各麻疹確定症例について

症例 No	年齢	性別	発病日		検体採取日	臨床症状	入院	ワクチン接種歴	海外旅行歴	RT-PCR				ウイルス分離		備考	
			発熱	発疹						咽頭拭い液		血液		咽頭拭い液	血液		遺伝子型
										H遺伝子	N遺伝子	H遺伝子	N遺伝子				
1	49歳	男	2/3	2/3	2/6	発熱、発疹、コプリック斑、結膜充血、肺炎	有	なし	なし	+	+	NT	NT	-	NT	D5	高尿酸血症、服用中のアロプリノールによる薬剤性過敏症候群(DIHS)、HHV-6が重複化に関与
2	29歳	男	2/19	2/24	2/24	発熱、発疹	なし	不明	なし	+	-	NT	NT	-	NT	D5	
3	8ヶ月	女	4/9	4/12	4/13	発熱、発疹、結膜充血	なし	なし	なし	+	-	NT	NT	-	NT	D5	
4	84歳	女	6/12	6/12	6/19	発熱、発疹、上気道炎、結膜充血	なし	不明	なし	-	-	NT	NT	-	NT		IgM±(判定保留) 医療機関で実施。
5	22歳	女	9/1	9/6	9/9	発熱、発疹、上気道炎	有	なし	なし	+	+	+	+	-	+	D8	基礎疾患(腎硬化症)

NT: 検査実施せず

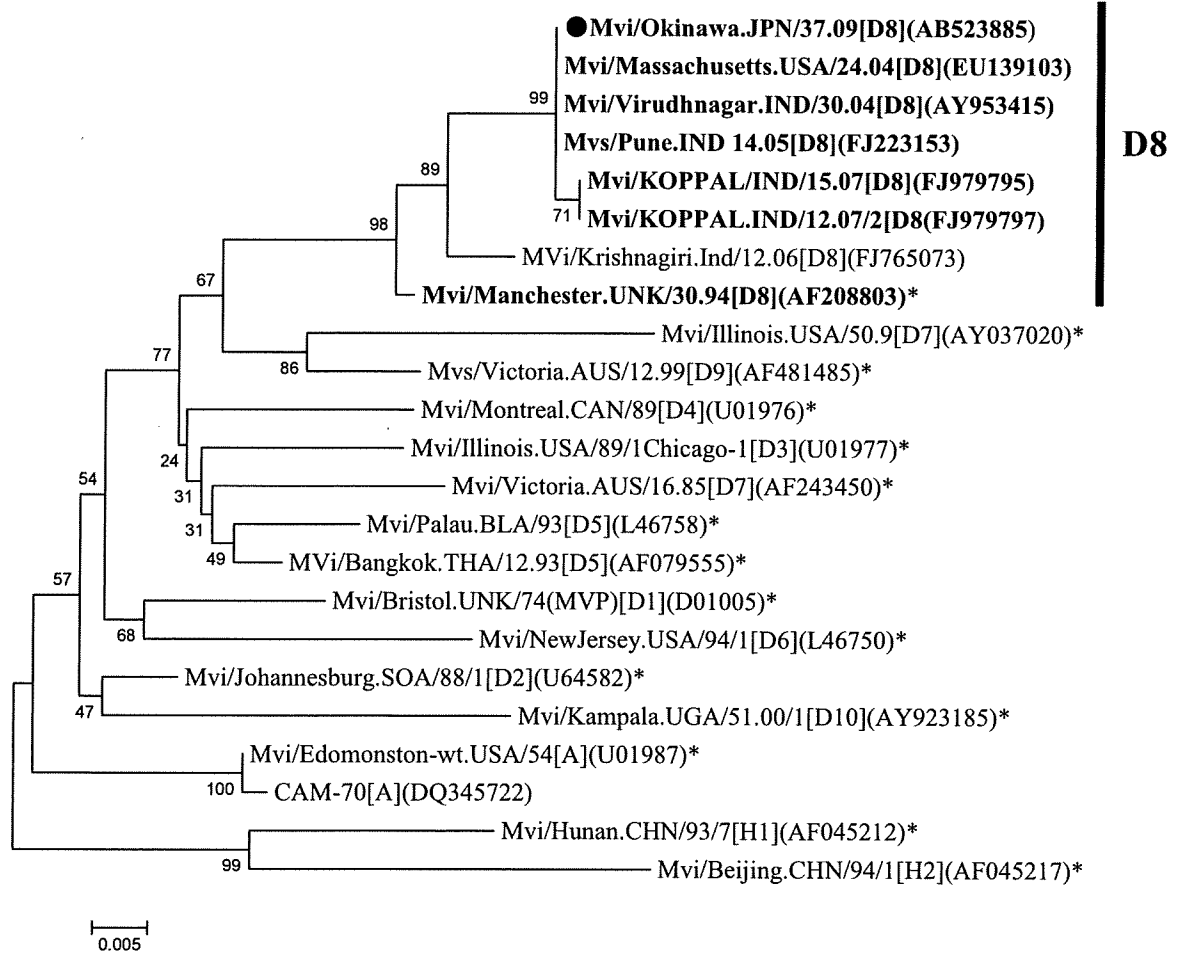


図 2. 麻疹ウイルス N 遺伝子 (456bp) の分子系統樹

●今回分離されたウイルス株

麻疹の実験室診断法：血清診断、ウイルス分離、遺伝子診断

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）

伊藤正寛（京都市公衆衛生研究所）

秋吉京子（神戸市環境保健研究所）

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。麻疹の実験室診断のために、末梢血単核球(PBMC)、尿、咽頭からのウイルス分離について文献レビューをし、遺伝子診断する方法として real-time RT-PCR を開発した。ウイルス分離率は、PBMC が一番感度が高く、次いで尿、咽頭拭い液の順であり、自然麻疹患者では 6 病日まで PBMC から麻疹ウイルスは分離された。Syber Green を用いた Real-time RT-PCR 法の感度は本邦で標準とされる nested RT-PCR と同じあり、迅速性の面で優れていた。ウイルス遺伝子の検出は、咽頭拭い液ではウイルス分離よりも特異度が高く、PBMC ではウイルス分離と感度・特異度は同等であったが、迅速性が認められた。以上の結果から、麻疹のウイルス学的診断には、サンプルとしては PBMC が最も優れており、次に尿、咽頭拭い液の順であり、PBMC からのウイルス分離および real-time RT-PCR によるウイルス遺伝子検索はともに有用な方法であるが、迅速性の面で real-time RT-PCR 法が優れていると判断された。

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状より、臨床診断される。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、国立感染症研究所が認定した施設での実験室診断に基づく麻疹の全数報告が必要である。

麻疹の実験室診断方法として、①末梢血単核球(PBMC)、鼻咽頭分泌液、尿からのウイルス分離、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。

初年度は、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例を対象にウイルス学的検討を行った。今年度は麻疹ウイルス分離について文献をレビューするとともに

real time RT-PCR の有用性について検討した。

B. 研究方法

1)麻疹ウイルス分離のレビュー

麻疹ウイルス分離について書かれた論文をレビューした。

2)麻疹ウイルス real time RT-PCR の検討

対象は臨床的に麻疹が疑われ、本人または保護者の同意を得た後採取した咽頭拭い液 35 検体、末梢血単核球(PBMC)47 検体である。咽頭拭い液は採取後-80℃で、PBMC はフィコール比重遠心法で分離後、セルバンカー液に再浮遊させ-80℃で保存した。ウイルス分離時に融解し、B95a 細胞に接種した。

Real-time RT-PCR は SYBR green RT-PCR 法で行った。RT-PCR のプライマーはエドモントン株 H region より作成し、プローベは野生株（遺伝子型 D5）H region より作成した（表 1）。RT-PCR の条件は、Reverse Transcription は 42℃ 5 分、95℃10 秒で 1 回行い、PCR 反応は 95℃5 秒、60℃31 秒で 40 サイクル行った。

Nested RT-PCR は国立感染症研究所麻疹診断マニュアルにしたがって行った。

C. 研究結果

1)麻疹ウイルスの分離

B95a 細胞を用いると、自然麻疹発症（発疹出現日を 0 病日）6 病日まで麻疹ウイルス分離は可能であった。一方尿からでは、遠心後の上清よりも沈渣の方がウイルス分離率が高く、発症 5 病日までウイルス分離は可能であった。

2) 麻疹ウイルス real time RT-PCR の検討

SYBR Green RT-PCR の感度は麻疹ウイルス 1PFU/0.1ml であり、Nester RT-PCR と同等であった。RT-PCR とウイルス分離との関係を検討すると、咽頭拭い液ではウイルス分離陽性 18 例は全例 Real-time RT-PCR 陽性であり（感度 100%）、ウイルス分離陰性 40 検体中 Real-time RT-PCR 陽性は 13 検体であり、特異度は 47.5%（40 検体中陰性 27 検体）であった（表 2）。次に PBMC では、ウイルス分離陽性 29 検体はすべて陽性であり（感度 100%）、ウイルス分離陰性 25 検体中 Real-time RT-PCR 陽性は 2 検体に過ぎず、特異度は 92%（23/25）であった。

病日による Real-time RT-PCR 陽性率を検討すると、咽頭拭い液、PBMC とともに 6~12 病日まで検出され、咽頭拭い液の陽性率は 94.1%、PBMC は 100%であった（表 3）。

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。文献によると、PBMC が、一番分離率が高くしかも 6 病日までの長期間分離され、次いで尿、咽頭拭い液の順であった。

今回の検討では、real-time RT-PCR 法と nested RT-PCR の感度を比較したが、感度は同等であった。Nested RT-PCR 法は、real-time RT-PCR と比較すると、コンタミによる擬陽性のリスクが高く、時間がかかる検査であり、今回の検討から、nested RT-PCR よりも real-time RT-PCR の方が実用的と思われた。

今回、ウイルス分離と real-time RT-PCR との感度と特異度を比較したが、咽頭拭い液ではウイルス分離の感度が低く、特に 6 病日をすぎるとウイルス分離率は急激に低下したが、PBMC ではウイルス分離と real-time RT-PCR の感度および特異度には大きな差は認められなかった。なお、B95a 細胞を用いると、発症早期では細胞に接種

後翌日にウイルス分離が確認できるが、6 病日ではウイルス分離の確認までに数日かかることから、PBMC に感染しているウイルス量が少ない修飾麻疹患者や、発症後数病日以上経過している患者からのサンプルを用いて早期診断するためには、real-time RT-PCR 法の方が優れていると思われた。

一般に PBMC からウイルス分離を行うときは、サンプル採取から早い時期に行うことが原則である。しかし、今回の検討で、セルバンカーを用いて -80°C に保存していた PBMC を融解して用いても麻疹ウイルスが分離され、real-time RT-PCR も陽性であった。セルバンカーを用いて PBMC を一時的に保存し、時間が取れたときに検査を行う方法は、麻疹患者が多く発症し、サンプル数が多いときは実際的な方法であり、今後日常検査において試みるべき有用な対策と思われた。

現在麻疹排除を目指して、麻疹ウイルス感染を診断するために、血液（EDTA 血）、咽頭拭い液、尿の 3 種類のサンプル採取が勧められている。今回の検討結果から、麻疹ウイルスの分離または遺伝子診断をするためには、PBMC が一番適切なサンプルであり、次いで尿、咽頭拭い液であった。臨床上、尿意が訴えられる人では尿の採取は容易であり、咽頭拭い液の採取は比較的苦痛を与えるサンプル採取方法である。このような観点から、3 種類のサンプルが採取できないときは、尿意が訴えられない人では、EDTA 血 > 咽頭拭い液 > 尿が優先度の高い順位であり、尿意が訴えられる人では、EDTA 血 > 尿 > 咽頭拭い液の順位になり、積極的な EDTA 血の採取が麻疹診断上有用と思われた。

E. 結論

麻疹のウイルス学的診断には、PBMC からのウイルス分離および real-time RT-PCR を用いた PBMC からの麻疹ウイルス遺伝子検索がともに有用であるが、早期診断を考えると、real-time RT-PCR 法の方が優れた検査であった。

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Ihara T: The strategy for prevention of measles and rubella prevalence with

measles-rubella vaccine in Japan. Vaccine 27:3234-3236, 2008

・ Nagai M, Ihara T, et al: Modified adult measles outbreaks in Japan. J med Virol 81:1094-1101, 2009

・ 庵原俊昭: 麻疹風疹(MR)混合ワクチン-麻疹ウ

イルス排除を目指して- . 小児科診療 62:2563-2570, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況
特記することなし。

(表1) Primer と Probe の設定

Primer : Edmonston strain H region

Forward : CAGATGACAAGTTGCGAATGGA (8385-8406)

Reverse : CTCGCAGAGTGCTTGGA (8435-8455)

Probe : wild strain (genotype D5) H region

TGCTTCCAGCAGGCGTGTAAGG

(表2) ウイルス分離と Real-time RT-PCR 法との相関

		RT-PCR		感度	特異度	P value
		陽性	陰性			
1) 咽頭拭い液	ウイルス分離 陽性	1 8	0	100%	67.5%	
	陰性	1 3	2 7			
2) PBMC	ウイルス分離 陽性	2 9	0	100%	92%	
	陰性	2	2 3			

(表3) 病日によるウイルス分離と RT-PCR の陽性率

	病日	ウイルス分離			RT-PCR		
		陽性	陰性	陽性率	陽性	陰性	陽性率
1) 咽頭拭い液	0-3	2	4	33.3	4	2	66.7
	4-5	1 1	0	100	1 0	0	100
	6-12	5	1 3	27.8	1 6	1	94.1
2) PBMC	0-3	5	2	71.4	5	0	100
	4-5	1 9	0	100	1 2	0	100
	6-12	1 9	2	90.5	1 3	0	100

第 II 期麻疹・風疹混合ワクチン接種による ブースター効果について

中山哲夫1)、岡藤輝夫 2)、岡藤隆夫 2)

- 1)北里生命科学研究所 ウイルス感染制御 1、
2)岡藤小児科

【研究要旨】我々は 1994 年から麻疹ワクチン接種後の抗体持続について継続調査を続けており今回 2008 年に血清の得られた 320 例を対象にワクチン接種後の年数、MR II 期接種の有無により麻疹ウイルス中和抗体、風疹ウイルス HI 抗体の持続に差があるかどうかを検討した。初回接種から 4.5-8 年の小児で MR II 接種群では麻疹中和抗体平均値は $2^{5.15}$ 、風疹 HI 抗体の平均値は $2^{7.08}$ と MR II 非接種群の麻疹中和抗体 $2^{4.48}$ 、風疹 HI 抗体 $2^{6.53}$ より有意に高い抗体値を維持していることが明らかとなった。

A. 研究目的

我々は 994 年から麻疹ワクチン接種後の抗体持続について継続調査を行っている。麻疹流行がコントロールされ不顕性感染によるブースターを受ける機会が減少しワクチン接種後 6 年後には 10 %において中和抗体が陰性化することを報告した。2006 年から麻疹・風疹混合ワクチンを用いて 1 歳代(MR I)と小学校入学前の 1 年(MR II)2 回接種が始まった。MR II 接種のブースター能を検討し MR II 接種の有無による抗体持続能を検討し MR II 接種の効果を知るとともに長期継続観察することで将来的なワクチン政策に役立てることができる。

B. 研究方法

1)対象

岡藤小児科で初回麻疹、風疹ワクチン接種を行い、保護者に研究の趣旨を説明し同意を得られた 320 例を対象とした。

2)麻疹中和抗体(NT)

GFP 遺伝子を組み込んだ麻疹 AIK-C 株を攻撃ウイルスとして用いる 100%CPE 抑制法で行った。血清は 1:4 希釈から 2 倍階段希釈し 100TCID₅₀ の攻撃ウイルスと中和反応後、96 穴プレートに単層培養した B95a 細胞に接種し 100%CPE を抑制する血清希釈の最大値を中和抗体価とした。

3)風疹 HI 抗体

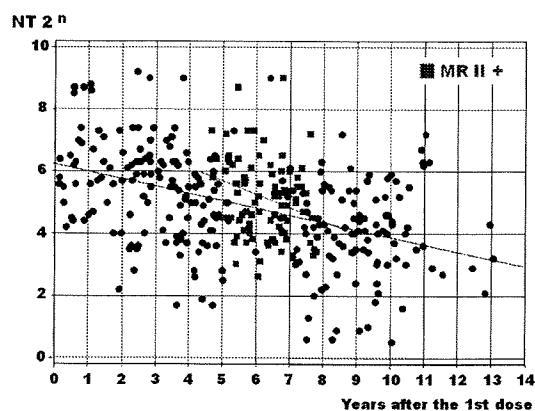
予研法により HI 抗体を測定した。

C. 結果

1)麻疹 NT 抗体の持続

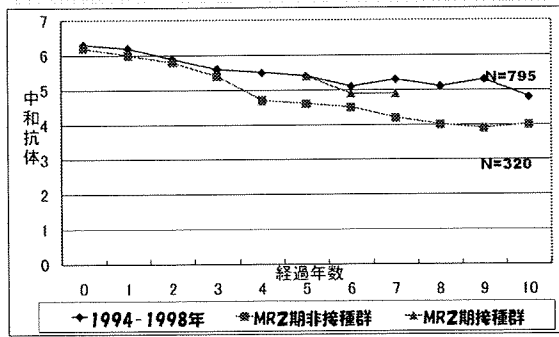
麻疹ワクチン接種後の5年を経た児童の中には MR II 接種を受けている児童と接種を受けていない児が混在しており MR II 接種児と非接種児に分けて検討した。麻疹ワクチン初回接種後の年数で抗体価の分布を図 1 に示した。初回接種 5 年後で MR II 接種群では $2^{5.36\pm 1.17}$ 、MR II 非接種群で $2^{4.56\pm 1.33}$ と高い平均 NT 抗体価を示したが有意差は認められなかった($p: 0.0815$)。

Ⅰ期麻疹ワクチン接種後の抗体価の推移



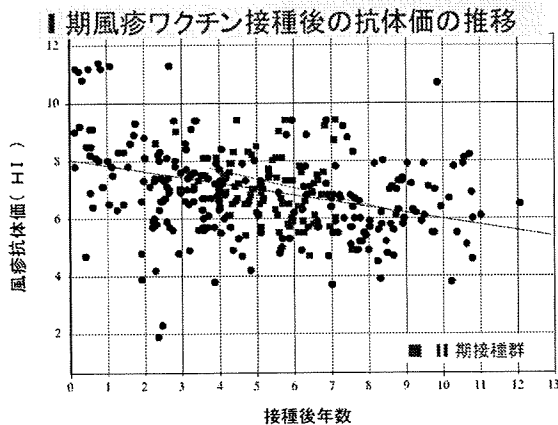
麻疹が流行していた 1994-1998 年の 795 例の血清疫学調査の結果と合わせて図 2 に示した。2008 年の血清調査の結果は初回接種の 3 年後から低下がはじまり MR II 接種により抗体価は麻疹流行期の抗体推移と同じ減衰直線となる。

I 期麻疹ワクチン接種後の経過年数と中和抗体の推移
II 期麻疹ワクチン接種によるブースター効果



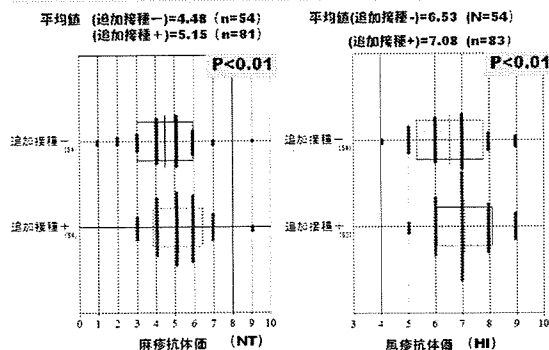
2) 風疹抗体価

風疹ワクチン初回接種 4 年後から MR II 接種児が認められ MR II 接種児の平均 HI 抗体価は 27.4 で非接種児の 26.4 より有意に高い抗体価を示した



麻疹・風疹初回ワクチン接種から 4.5-8 年たった学童における抗体価を MR II 接種児と非接種児の間で比較した。MR II の追加接種を受けた学童の麻疹 NT 抗体平均値は 2^{5.15}、風疹 HI 抗体の平均値は 2^{7.08}と MRII 非接種群の麻疹中和抗体 2^{4.48}、風疹 HI 抗体 2^{6.53} より有意に高い抗体価を維持していることが明らかとなった。

麻疹・風疹ワクチン接種後4.5~8年の小児を対象にして



D. 考案

麻疹患者報告のなかった 1998-2004 までの血清疫学調査では約 10%において初回接種 6-7 年で NT 抗体が陰性化するが今回の調査では中和抗体陰性血清は認めなかった。2007-08 の麻疹の流行によりブースター効果を認めているものと考えられる。MR II 接種を受けた学童で麻疹、風疹抗体の平均値が追加接種を受けていない学童より高い抗体価を示したことから MR II 追加接種により抗体レベルが持ち上げられることが明らかとなった。2012 年麻疹排除を目指しその後の血清抗体の持続状況は継続調査を行う必要がある。

E. 結論

MR II 接種児において麻疹、風疹抗体の平均値は追加接種を受けていない児童より高い抗体価を示し MR II 接種者は高い免疫能を維持しており免疫能増強に有効に働いていることが明らかとなった。

F. 研究発表

- 1 論文発表
なし
- 2. 学会発表

岡藤輝夫、岡藤隆夫、中山哲夫：第 II 期麻疹風疹混合ワクチン接種によるブースター効果について。第 13 回日本ワクチン学会 9.26-27, 2009. 札幌

G. 知的財産の出願、登録状況

なし

麻疹ウイルス野生株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 I

【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年には小児科領域にも流行が拡大しやっと流行は沈静化した。2008年から MRIII, MRIV の接種が始まり麻疹コントロール期に入ると修飾麻疹が増加し典型的な症状をとらないためワクチン接種後の副反応例との鑑別が困難となる。周辺で流行がない時にはワクチン接種後ワクチンウイルスの増殖期の発熱、発疹症例はワクチン株と考えられるが散発的な流行野生株とウイルス学的に鑑別する必要がある。昨年度は Loop mediated isothermal amplification (LAMP)法により遺伝子を増幅し塩基配列を決定する方法を報告したが、ワクチン株、野生株特異的なプライマーを作製し塩基配列を検索しなくても1回の反応で鑑別する LAMP 法、real time PCR Tm assay、TaqMan PCR 法を開発した。

A. 研究目的

現在世界中で使用されている麻疹ワクチンはその多くは Edmonston 株に由来し Genotype A に属する。一方、現在我が国で流行しているウイルスは Genotype D5 Bangkok type に属し散発的に D9 のウイルスが検出されている。2007-8年の麻疹の流行後、すべての学童が麻疹ワクチン2回接種を受けることができるように中学1年、高校3年生を対象にキャッチアップが始まり 2012年には麻疹排除を目指している。麻疹コントロール期に入ると修飾麻疹の症例が増加し典型的な症状を認めないことから診断が困難で見逃されることが多い。またこうした症例も短期間ではあるがウイルスを排泄しており新たな感染源となる可能性がある。

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基準の中で典型的な麻疹症例は問題ないが、修飾麻疹の診断基準は発熱、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。ワクチン接種後の副反応例と修飾麻疹の鑑別が必要となる。

B. 研究方法

1)対象

麻疹ワクチンとして、AIK-C, Schwarz FF-8, CAM を用いた。野生流行株は D5 Palau type,

D5 Bangkok type をもちいた。

2) LAMP 法

N 領域 C 末の部位に設定しすでに報告したプライマーを用い63°Cで1時間反応させ LAMP 陽性の検体は LAMP 産物を精製し塩基配列を決定した。1321 位の遺伝子はワクチン株で A, 野生株は G でワクチン株、野生株に特異的な FIP プライマーを設定し図 1 に示した。

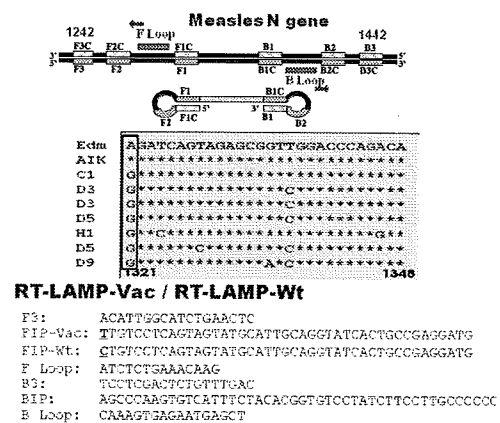


図 1. LAMP 法によるワクチン株と野生株の鑑別用のプライマー

3) real time PCR TM assay

LAMP 法で設定した同一領域で real time 用 PCR プライマーを設定した。抽出した RNA は LAMP F3 プライマーで cDNA を合成し Roche LightCycler 480 II で SYBR Green を加えた増幅反応後に Melting assay を行い Tm 値を測定した。

4) TaqMan real time PCR

1321 位の塩基はワクチン株が A、野生株が G であることから+センスプライマーの 3' 末端にワクチン株野生株特異的プライマーを設定した。1397-8 位のワクチン株の塩基配列は GA、野生株は AG で-センスプライマーの 3' 末端部位を認識するように特異プライマーを設定した。変異のない部位に TaqMan Probe を設定した(図2)。

Real time TaqMan PCR assay

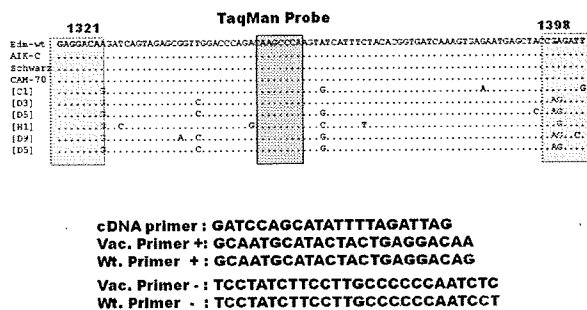


図 2. TaqMan PCR のプライマーデザイン

C. 結果

1) LAMP 法

LAMP FIP プライマーは LAMP 法の DNA 増幅の基本となるダンベルループを形成するプライマーで一塩基の違いで反応時間が異なってくる。Schwarz、CAM、野生株の LAMP 法による増幅反応を図 3 に示した。ワクチン株はワクチンプライマーによる増幅時間が野生株プライマーより約 2 分早く、野生株は逆に野生株プライマーの反応時間が早くなる。MR ワクチン接種 14 日後の発熱・発疹例はワクチンプライマーのみで増幅された。一方、自然感染の成人麻疹例は野生株プライマーでワクチン株プライマーより早く増幅された。

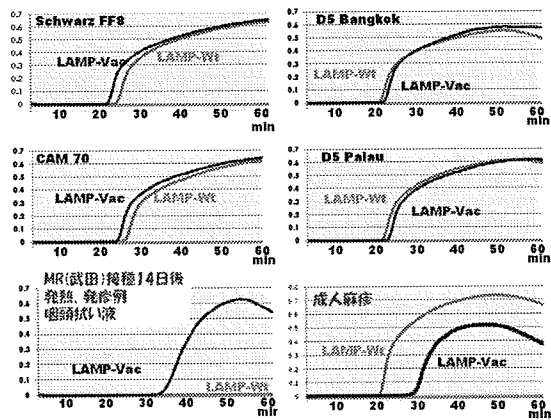


図 3. ワクチン株と野生株 LAMP 法

2) SYBR Green TM assay

SYBR Green を加えた real-time PCR を行い徐々に温度変化を加えて 50% の DNA が denature する温度を算出する Tm assay を行った。結果を図 4 に示した。1塩基の違いでも融解温度の差が認められる。ワクチン株 3 株における増幅領域では塩基配列には変異がなくワクチン株の Tm 値 84.5-84.7°C で、野生株の Tm 値は 85.5-87.0°C でワクチン株と野生株の鑑別ができる。

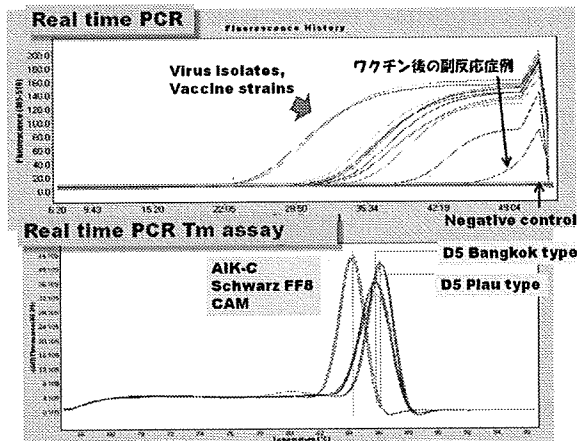


図 4. SYBR green real-time PCR Tm assay

3) TaqMan PCR

+、-センスプライマーの 3' 末端を特異的な塩基配列に合わせた特異プライマーを設定し増幅反応を行った。1X10⁵ TCID₅₀/mL のウイルス液から抽出した RNA から cDNA を合成し階段希釈しワクチン株特異プライマーセットと野生株特異プライマーセットで反応感度を比較し結果を図 5 に示した。AIK-C ワクチン株はワクチンプライマーで 10⁻⁶ 希釈まで検出されたが野生株プライマーでは 10⁻⁵ 希釈まで検出された。一方、野生株では、逆に野生株特異プライマーが感度良く検出され各々の特異プライマーセットを用いると 10 倍高い感度で増幅できた。

ワクチン接種後の副反応例の TaqMan PCR の結果を示した。ワクチン株特異プライマーで増幅されたが野生株のプライマーでは増幅されなかった。

D. 考案

ワクチン株と野生株の簡便鑑別法を開発した。各鑑別方法の特徴をまとめて表 1 に示した。