

FIG 1 Sensitivity of our RT-QPCR assay. Vero/hSLAM cells were infected with MV at the indicated PFU per well. The number of MV-infected cells (EGFP-positive cells) is also shown (IU/well). Total RNA was extracted from the cells at 36 h postinfection, and RT-QPCR assay was performed on extracted RNA. The amplified products were separated by electrophoresis on a 3% agarose gel. A no-template control was used to test for contamination. Plasmids pMV(+)<sub>323</sub>-EGFP and pGEM-T-actin were used as positive controls for QPCR.

and is highly susceptible to MV. We considered the possibility that MVs in otosclerotic tissues might be defective, mutant viruses that exhibit altered tropism. Therefore, we used both Vero/hSLAM and II-18 cells for coculture experiments. Defective MV strains from patients with subacute sclerosing panencephalitis have been shown to infect Vero/hSLAM cells efficiently (11, 30).

Patient samples were examined by one of the three protocols. The first protocol was performed for patients 1-1 to 1-5 (Table 1). Patient 1-4 was diagnosed with tympanosclerosis. Bone fragments were directly cocultured with 90% confluent Vero/hSLAM and II-18 cells and observed for 7 to 12 days. However, no CPE was observed. Furthermore, viral RNA was not detected in cocultured cells by RT-QPCR (Fig. 3).

The second protocol was performed for patients 2-1 to 2-11 (Table 1). Patient 2-8 was diagnosed with cholesteatoma. Fresh bone fragments were collected immediately after surgery and incubated in McCoy's 5A medium in a 10-cm dish. During the incubation, the cells grew in a centrifugal pattern from the bone (Fig. 4A). If MV is present in primary cell culture as previously reported (8), coculture of primary cultured cells with cells permissive for MV could facilitate the isolation of MV. However, Vero/

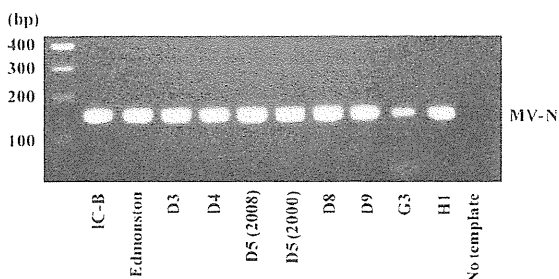


FIG 2 Assessment of the QPCR primer pair used. QPCR assay was performed on cDNAs obtained from different MV isolates using the N-f/N-r primer pair. pMV(+)<sub>323</sub>-EGFP, which carries the complete genome of the IC-B strain, was used as a positive control. The amplified products were separated by electrophoresis on a 3% agarose gel.

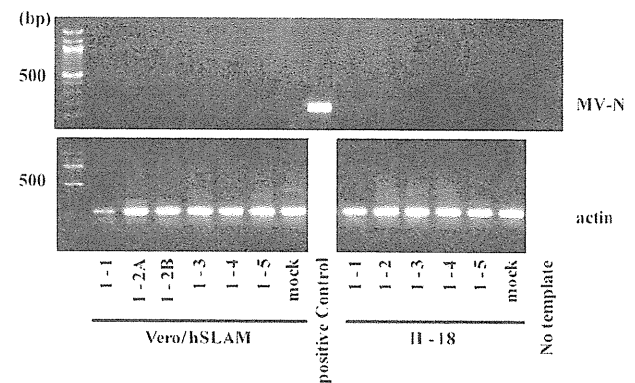


FIG 3 RT-QPCR of 5 samples in the first protocol. Patient numbers are indicated below the lanes (patients 1-1 to 1-5). The stapes bone from sample 1-2 was divided into superstructure (1-2A) and footplate (1-2B). Total RNA was extracted from Vero/hSLAM and II-18 cells cocultured with stapes bone samples. The amplified RT-QPCR products were separated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel.

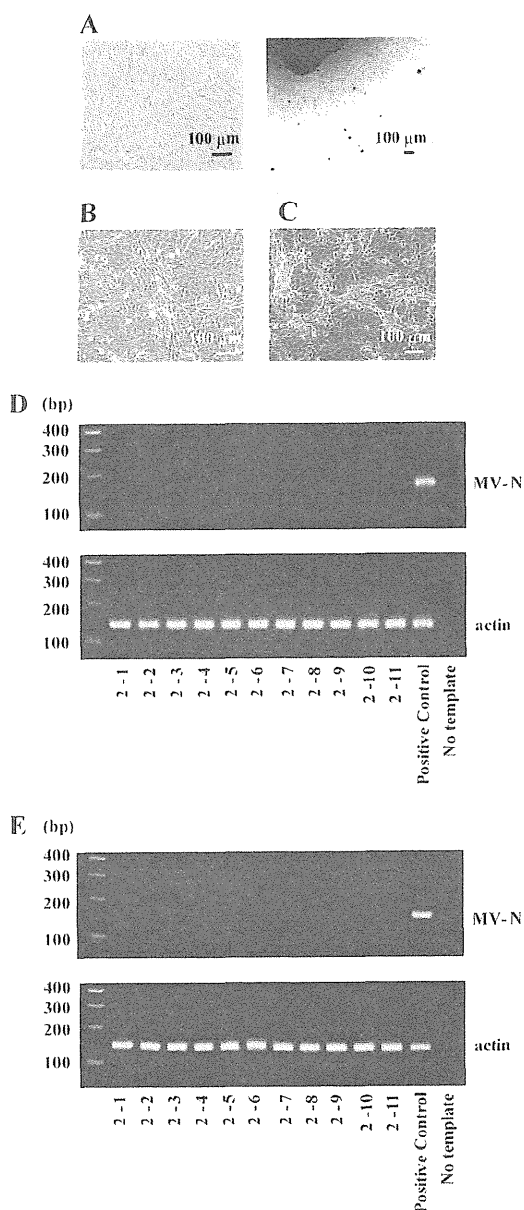
hSLAM (Fig. 4B) and II-18 (Fig. 4C) cells cocultured with primary cells did not show any CPE such as syncytium formation. Similarly, no CPE was observed in any primary cell cultures. Furthermore, the N mRNA was not detected in any primary cell cultures (Fig. 4D) or cultured stapes bones (Fig. 4E) by using RT-QPCR.

The third protocol was performed for patients 3-1 to 3-11 (Table 1). We assessed total RNAs directly extracted from fresh frozen bones. The RNA quantity was assessed by amplifying  $\beta$ -actin, which was detected in all samples by using RT-QPCR. However, the MV N mRNA was not detected in any samples (Fig. 5).

## DISCUSSION

Many hypotheses have been proposed to explain the cause of otosclerosis, including persistent MV infection. In the present study, we could not detect MV in otosclerotic samples by using coculture experiments with highly susceptible cell lines and a highly sensitive RT-QPCR method.

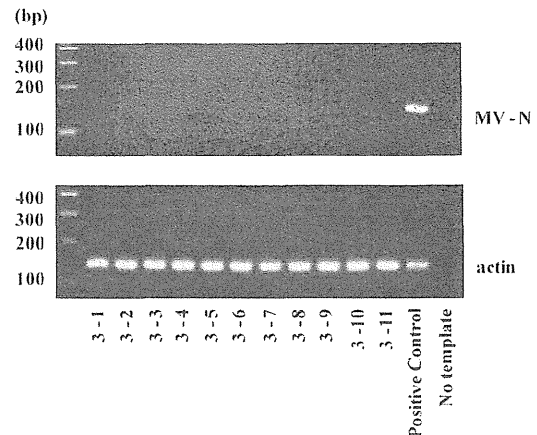
The possibility that persistent viral infection of the otic capsule might cause otosclerosis was first proposed based on the histological similarity between otosclerosis and PD. In 1986, McKenna et al. reported that electron microscopy observations detected filamentous structures within the dilated ER of osteoblasts and preosteoblasts in two of four stapes bones with active otospongiosis and that their morphological findings were similar to those for subacute sclerosing panencephalitis (22). The theory of virus etiology has been supported by many reports (4, 8, 13–17, 26). Recently, Sziklai et al. showed that MV N mRNA could be detected in all of 160 otosclerotic stapes bones by using the RT-PCR method (39). Furthermore, Gantumur et al. reported that MV N mRNA was detected in primary cells derived from stapes bones (8). However, no study has isolated infectious MV from otosclerotic tissues, so it remains to be proven whether MV indeed causes otosclerosis. Grayeli et al. could not confirm persistent MV infection in patients with otosclerosis (9). In agreement with the report by Grayeli et al., we could not prove the presence of persistent MV infection using three different protocols. Vero/hSLAM and II-18 cells cocultured with stapes bones or primary cells derived from them did not show any CPE, and the N mRNA of MV was not



**FIG 4** Primary cultures and RT-QPCR for 11 samples in the second protocol. (A) Primary cell cultures were established from stapes bones. The cells migrated out of the bone samples and reached maximal growth after 3 to 4 weeks of culture. Two examples are shown. (B and C) Primary cells were cocultured with Vero/hSLAM (B) or II-18 (C) cells. No CPE was observed. (D and E) Total RNA was extracted from primary cells (D) and cultured stapes bones (E) in the second protocol. Patient numbers are indicated below the lanes (patients 2-1 to 2-11). The amplified RT-QPCR products were separated by electrophoresis on a 3% agarose gel.

detected using total RNA obtained from cocultured cells, stapes bones, or primary cells.

In the 1950s, MV of genotype A was prevailing in acute cases in many countries (36). In Japan, Taniguchi et al. succeeded in isolating MV using the chorioallantoic membrane in 1954, and this isolate was of genotype A (43). Viruses of genotypes D1, E, and F were mainly reported during the 1960s and 1970s in some coun-



**FIG 5** RT-QPCR for 11 samples in the third protocol. Patient numbers are indicated below each lane (patients 3-1 to 3-11). Total RNA was extracted from stapes bone immediately after surgery. The amplified RT-QPCR products were separated by electrophoresis on a 3% agarose gel.

tries, but these genotypes have not been detected since the late 1980s. Nakayama et al. reviewed Japanese isolates and reported that the strains of MV isolated in Japan since 1984 were classified into three different genotypes, C1 (before 1985), D3 (1985 to 1990), and D5 (1990 to 2000), and that genotype C1 prevailed for a long period before 1985 (25, 32). Sporadic outbreaks of H1 in Tokyo and D9 in Yamagata were reported in 2000 and 2004, respectively (23, 45). In our study, the patient age ranged from 23 to 67 years (mean, 51.05 years). If these patients were persistently infected with MV, then genotype A, C1, D1, D3, or D5 would be able to be detected in otosclerotic samples. We confirmed that our method can amplify the N genes of genotypes A, D3, D4, D5, D8, D9, G3, and H1. We did not examine genotypes C1 and D1. However, given the sequence similarity among genotypes A, C1, D1, and D3 (Table 3), it is highly likely that our method can also amplify the N genes of genotypes C1 and D1.

It may be argued that the titer of MV in otosclerotic tissues is too low to be detected or that the virus may be mutated so that it cannot infect surrounding cells. In those cases, the coculture method might fail to isolate MV from otosclerotic tissues. However, these possibilities raise another question, i.e., whether such a virus could ever cause disease. Furthermore, the MV hypothesis cannot explain why otosclerosis is extremely rare among Africans (1, 42) despite the fact that MV is a major cause of child deaths in Africa. Additionally, the localization of filamentous structures observed in otosclerotic cells (22) is quite different from that in MV-infected cells, in which viral filamentous structures are observed in the cytoplasm, not in the ER.

MV infection may have the capacity to trigger a pathological process which can cause otosclerosis even after elimination of MV. In addition, autoimmunity and genetic factors have been suspected to play a role in triggering otosclerosis lesions. If so, it might be very difficult to demonstrate that MV plays a key role in triggering the pathogenic process, because there is no suitable animal model of otosclerosis.

Some studies have detected MV mRNA or protein in samples from patients with PD (7) like those with otosclerosis. However, others have never detected evidence of paramyxoviruses in sam-

TABLE 3 Comparison of sequences for different measles virus genotypes

Measles virus	Genotype	Sequence in comparison to primer <sup>a</sup> :	
		N forward (5'GAACTCGGTATCACTGCC3')	N reverse (3'TCCTGGTAGCTCATTCTC 5')
Edmonston	A	GAACTCGGTATCACTGCC	<u>TCTCGGTAGCTCATTCTC</u>
Mvi/Tokyo.JPN/84/K	C1	GAACTCGGTATCACTGCC	<u>TCTCGGTAGCTCATTCTC</u>
Mvi/Bristol.UNK/74	D1	<u>GG</u> ACTCGGTATCACTGCC	TCCTGGTAGCTCATTCTC
Ichinose-B95a	D3	GAACTCGGTATCACTGCC	TCCTGGTAGCTCATTCTC

<sup>a</sup> Bases different from the primer sequence are underlined.

ples from PD (19, 29). Thus, whether MV infection plays a role in the pathogenesis of PD is also still controversial.

In conclusion, the present study did not find any evidence of MV infection in stapes bones from patients with otosclerosis in Japan. This finding, together with the similar study from Grayeli et al. (9), raises doubts regarding the role of MV infection in the pathogenesis of otosclerosis.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Y. Nakatsu, K. Komase, and M. Takeda for MV cDNAs.

This work was supported by a grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

#### REFERENCES

- Altmann F, Glasgold A, Macduff JP. 1967. The incidence of otosclerosis as related to race and sex. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 76:377–392.
- Arnold W, et al. 2007. The influence of measles vaccination on the incidence of otosclerosis in Germany. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 264:741–748.
- Arnold W, Friedmann I. 1990. Immunohistochemistry of otosclerosis. *Acta Otolaryngol. Suppl.* 470:124–129.
- Arnold W, Niedermeyer HP, Lehn N, Neubert W, Hofer H. 1996. Measles virus in otosclerosis and the specific immune response of the inner ear. *Acta Otolaryngol.* 116:705–709.
- Chen W, et al. 2007. Single-nucleotide polymorphisms in the COL1A1 regulatory regions are associated with otosclerosis. *Clin. Genet.* 71:406–414.
- Enders JF, Peebles TC. 1954. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86:277–286.
- Friedrichs WE, et al. 2002. Sequence analysis of measles virus nucleocapsid transcripts in patients with Paget's disease. *J. Bone Miner. Res.* 17:145–151.
- Gantumur T, Niedermeyer HP, Neubert WJ, Arnold W. 2006. Molecular detection of measles virus in primary cell cultures of otosclerotic tissue. *Acta Otolaryngol.* 126:811–816.
- Grayeli AB, et al. 2000. No evidence of measles virus in stapes samples from patients with otosclerosis. *J. Clin. Microbiol.* 38:2655–2660.
- Hashimoto K, et al. 2002. SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *J. Virol.* 76:6743–6749.
- Hotta H, et al. 2006. Full-length sequence analysis of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus, a mutant of measles virus, isolated from brain tissues of a patient shortly after onset of SSPE. *Microbiol. Immunol.* 50:525–534.
- Jin L, Beard S, Hunjan R, Brown DW, Miller E. 2002. Characterization of measles virus strains causing SSPE: a study of 11 cases. *J. Neurovirol.* 8:335–344.
- Karosi T, et al. 2007. Expression of measles virus receptors in otosclerotic, non-otosclerotic and in normal stapes footplates. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 264:607–613.
- Karosi T, et al. 2006. Detection of osteoprotegerin and TNF-alpha mRNA in ankylosed Stapes footplates in connection with measles virus positivity. *Laryngoscope* 116:1427–1433.
- Karosi T, et al. 2006. Antimeasles immunoglobulin G for serologic diagnosis of otosclerotic hearing loss. *Laryngoscope* 116:488–493.
- Karosi T, et al. 2005. Codetection of measles virus and tumor necrosis factor-alpha mRNA in otosclerotic stapes footplates. *Laryngoscope* 115:1291–1297.
- Karosi T, et al. 2008. Disease-associated novel CD46 splicing variants and pathologic bone remodeling in otosclerosis. *Laryngoscope* 118:1669–1676.
- Markou K, Goudakos J. 2009. An overview of the etiology of otosclerosis. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 266:25–35.
- Matthews BG, et al. 2008. Failure to detect measles virus ribonucleic acid in bone cells from patients with Paget's disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93:1398–1401.
- McKenna MJ, Kristiansen AG, Haines J. 1996. Polymerase chain reaction amplification of a measles virus sequence from human temporal bone sections with active otosclerosis. *Am. J. Otol.* 17:827–830.
- McKenna MJ, Mills BG. 1989. Immunohistochemical evidence of measles virus antigens in active otosclerosis. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 101:415–421.
- McKenna MJ, Mills BG, Galey FR, Linthicum FH, Jr. 1986. Filamentous structures morphologically similar to viral nucleocapsids in otosclerotic lesions in two patients. *Am. J. Otol.* 7:25–28.
- Mizuta K, et al. 2005. An outbreak of measles virus infection due to a genotype D9 at a junior high school in Yamagata, Japan in 2004. *Jpn. J. Infect. Dis.* 58:98–100.
- Nakatsu Y, et al. 2008. Measles virus circumvents the host interferon response by different actions of the C and V proteins. *J. Virol.* 82:8296–8306.
- Nakayama T, Zhou J, Fujino M. 2003. Current status of measles in Japan. *J. Infect. Chemother.* 9:1–7.
- Niedermeyer H, Arnold W, Neubert WJ, Hofer H. 1994. Evidence of measles virus RNA in otosclerotic tissue. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 56:130–132.
- Niedermeyer HP, Arnold W. 1995. Otosclerosis: a measles virus associated inflammatory disease. *Acta Otolaryngol.* 115:300–303.
- Noyce RS, et al. 2011. Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog.* 7:e1002240.
- Nuovo MA, Nuovo GJ, MacConnell P, Forde A, Steiner GC. 1992. In situ analysis of Paget's disease of bone for measles-specific PCR-amplified cDNA. *Diagn. Mol. Pathol.* 1:256–265.
- Ogura H, et al. 1997. Efficient isolation of subacute sclerosing panencephalitis virus from patient brains by reference to magnetic resonance and computed tomographic images. *J. Neurovirol.* 3:304–309.
- Ohno S, Ono N, Takeda M, Takeuchi K, Yanagi Y. 2004. Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *J. Gen. Virol.* 85:2991–2999.
- Okafuji T, Fujino M, Nakayama T. 2006. Current status of measles in Japan: molecular and seroepidemiological studies. *J. Infect. Chemother.* 12:343–348.
- Ono N, et al. 2001. Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor. *J. Virol.* 75:4399–4401.
- Radecke F, et al. 1995. Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J.* 14:5773–5784.
- Richardson CD, Scheid A, Choppin PW. 1980. Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N-termini of the F1 or HA2 viral polypeptides. *Virology* 105:205–222.
- Riddell MA, Rota JS, Rota PA. 2005. Review of the temporal and geographical distribution of measles virus genotypes in the prevaccine and postvaccine eras. *J. Virol.* 79:287.
- Schrader M, Poppendieck J, Weber B. 1990. Immunohistologic findings in otosclerosis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 99:349–352.
- Shirogane Y, et al. 2010. Epithelial-mesenchymal transition abolishes the susceptibility of polarized epithelial cell lines to measles virus. *J. Biol. Chem.* 285:20882–20890.

39. Sziklai I, Batta TJ, Karosi T. 2009. Otosclerosis: an organ-specific inflammatory disease with sensorineural hearing loss. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 266:1711–1718.
40. Takeda M, et al. 2005. Long untranslated regions of the measles virus M and F genes control virus replication and cytopathogenicity. *J. Virol.* 79: 14346–14354.
41. Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y. 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406:893–897.
42. Tshifularo MI, Joseph CA. 2005. Otosclerosis among South African indigenous blacks. *East Afr. Med. J.* 82:223–225.
43. Ueda S. 2009. Development of measles vaccines in Japan. *Vaccine* 27: 3230–3231.
44. Yagi T. 2002. Incidence and characteristics of otosclerosis in the Japanese population. *Auris Nasus Larynx* 29:257–260.
45. Zhou J, et al. 2003. H1 genotype of measles virus was detected in outbreaks in Japan after 2000. *J. Med. Virol.* 70:642–648.

ARTICLE

Received 30 Aug 2012 Accepted 2 Nov 2012 Published 4 Dec 2012

DOI: 10.1038/ncomms2252

# Cooperation between different RNA virus genomes produces a new phenotype

Yuta Shirogane<sup>1,\*</sup>, Shumpei Watanabe<sup>1,\*</sup> & Yusuke Yanagi<sup>1</sup>

An RNA virus population generally evolves rapidly under selection pressure, because of high error rates of the viral RNA polymerase. Measles virus, an enveloped RNA virus, has a fusion protein mediating fusion of the viral envelope with the cell membrane. Here we observe that a non-fusogenic recombinant measles virus evolves, after passages, into mutant viruses which regain the ability to induce membrane fusion. Unexpectedly, we identify a mutant virus possessing two types of genomes within a single virion: one genome encoding the wild-type fusion protein, the other a mutant version with a single amino-acid substitution. Neither the wild-type nor mutant protein by itself is able to mediate membrane fusion, but both together exhibit enhanced fusion activity through hetero-oligomer formation. Our results reveal a molecular mechanism for the 'cooperation' between different RNA virus genomes, which may have implications in viral evolution and in the evolution of other macromolecules.

<sup>1</sup>Department of Virology, Faculty of Medicine, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan. \* These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to Y.S. (email: yuuta@virology.med.kyushu-u.ac.jp).

An RNA virus population generally evolves rapidly under selection pressure, because of the high error rate of viral RNA polymerase<sup>1–5</sup>. This feature of RNA viruses is thought to have an important role in viral pathogenesis and survival under selection pressure, exemplified in the evolution of the human immunodeficiency virus and the hepatitis C virus<sup>3,5–7</sup>. The high mutation rate may allow these viruses to develop resistance to host immune responses and antiviral drugs, a major complication in the efforts to control their infection.

Measles is an acute contagious viral disease characterized by high fever and a maculopapular rash, and remains a major cause of infant death in developing countries<sup>8</sup>. In rare cases, persistent infection in the central nervous system causes lethal subacute sclerosing panencephalitis, several years after acute infection. Measles virus (MV), the causative agent, is an enveloped RNA virus in the family *Paramyxoviridae*. MV has two envelope glycoproteins, a receptor-binding hemagglutinin (H) and a fusion (F) protein mediating fusion of the viral envelope with the cell membrane. Binding of the MV H protein to a cellular receptor is thought to trigger conformational changes in the neighbouring F protein, leading to virion-to-cell fusion or cell-to-cell fusion (syncytium formation) in infected cells<sup>9</sup>.

During our study on the mechanism of MV entry, we accidentally found ‘cooperation’, a new form of viral evolution dependent on a mixture of two different RNA virus genomes, and revealed the molecular mechanism for this phenomenon.

## Results

**Fusion assay inconsistent with one recombinant virus.** To facilitate our studies on MV entry, we produced the enhanced green fluorescent protein (EGFP)-expressing recombinant MV that has the H protein fused with the FLAG-TEV-MYC tag at its C terminus (H-tag; Supplementary Fig. S1a). Unlike the virus possessing the wild-type (wt) H protein, this virus did not form syncytia in Vero cells expressing the signalling lymphocyte activation molecule, a receptor for MV (Vero/hSLAM cells<sup>10</sup>; Supplementary Fig. S1b), presumably because the added tag adversely affected the interaction of the H protein with the receptor and/or the F protein. However, after a few passages the virus started to cause cell-to-cell fusion, and two independent three-time-passaged stocks (P3-1 and P3-2) produced large syncytia (Fig. 1a). Viruses were plaque-purified from these stocks, and their H, F and matrix (M) genes encoding the proteins involved in membrane fusion were subjected to sequence analysis after reverse transcription (RT)-PCR of RNA isolated from infected cells. In the F protein, the P3-1 virus stock had the N462K substitution, whereas the P3-2 stock had the G264R substitution. There was no amino-acid substitution in their H (H-tag) and M proteins. The F(N462K) protein has already been reported to exhibit enhanced fusion activity<sup>11</sup>.

We evaluated the role of these substitutions in the fusion activity of the viruses. Vero/hSLAM cells transfected with plasmids encoding H-tag and F(N462K) proteins, but not those with plasmids encoding H-tag and wt F proteins, formed extensive syncytia, as expected (Fig. 1b). However, no syncytia were detected in cells transfected with plasmids encoding H-tag and F(G264R) proteins. Co-expression of the M protein did not affect syncytium formation (Fig. 1b). Thus, there was a discrepancy between the phenotype of the P3-2 virus and the result of the plasmid-mediated fusion assay.

We then rechecked the sequence data for the P3-2 virus, and found two overlapping peaks corresponding to amino-acid position 264 in the F gene of the P3-2 virus (Fig. 1c), but not in that of the P3-1 virus (Fig. 1d). The major peak indicated R264, whereas the minor one indicated the wt G264 (overlooked in our

initial examination), suggesting that the P3-2 virus contained two types of genomes differing in the F gene. As paramyxoviruses are known to have the ability to include several genomes in one viral particle, called polyploidy<sup>12–14</sup>, our observation is not unexpected.

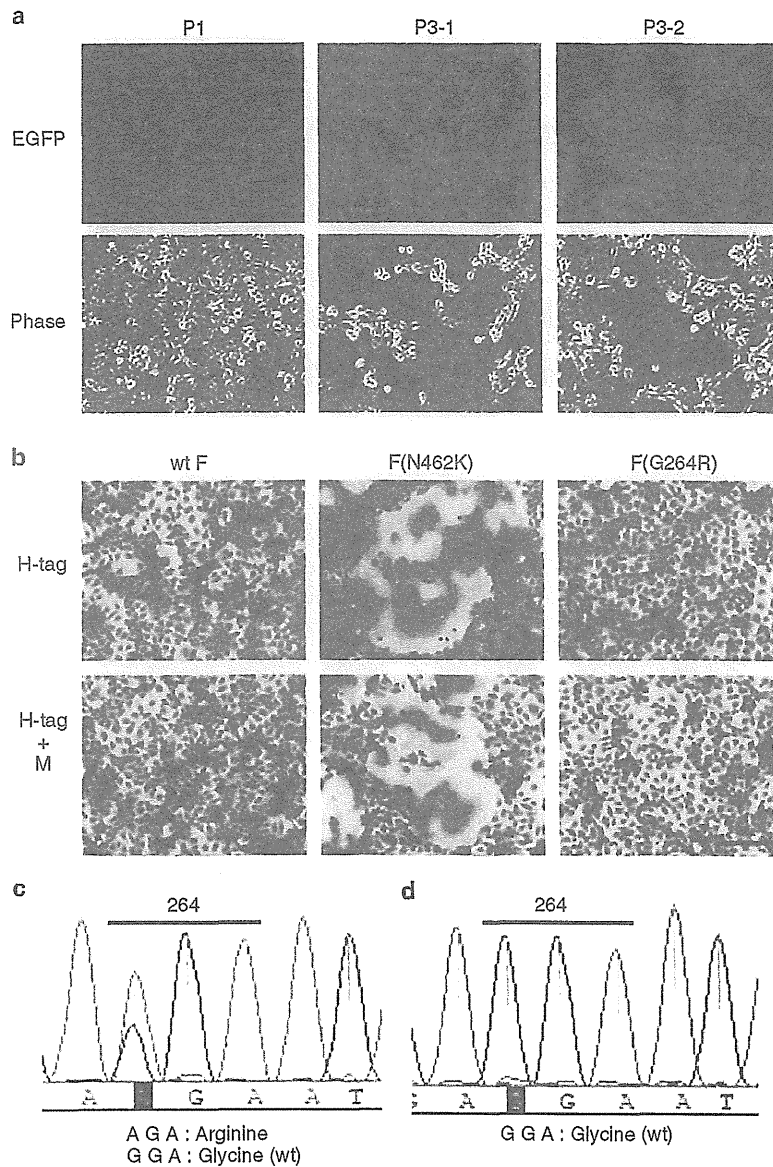
## A mixture of two F protein variants exhibits a new phenotype.

Next, we transfected Vero/hSLAM cells with plasmids encoding H-tag, wt F and F(G264R) proteins, and found syncytium formation in transfected cells (Fig. 2a). The result indicates that wt F and F(G264R) proteins together, but not individually, can mediate membrane fusion in conjunction with the H-tag protein. We then performed the fusion assay at different temperatures. At 30 °C, syncytia were observed in Vero/hSLAM cells expressing H-tag and F(G264R) proteins, but not in those expressing H-tag and wt F proteins (Fig. 2b). On the other hand, syncytia were formed in Vero/hSLAM cells expressing H-tag and wt F proteins after 10 min of incubation at 50 °C (Fig. 2c). It seems that temperature-dependent functions of wt F and F(G264R) proteins are neutralized by mixing them, as the combined F proteins functioned at 37 °C.

The fusion assay was also performed by co-expressing the wt H protein in place of the H-tag protein (Fig. 2d). Syncytia were observed in Vero/hSLAM cells expressing wt H and wt F proteins, but not in those expressing wt H and F(G264R) proteins. However, Vero/hSLAM cells expressing wt H, wt F and F(G264R) proteins formed larger syncytia than those expressing wt H and wt F proteins, suggesting that the combined wt F and F(G264R) proteins exhibit enhanced fusion activity as compared with the wt F protein alone. Quantitative fusion assay confirmed this synergistic effect (Fig. 2e). Interestingly, when both wt F and F(G264R) proteins were present, even receptor-negative Vero cells developed syncytia (Fig. 2f; discussed below). Taken together, these results indicate that the mixed F proteins exhibit a new phenotype different from either wt F or F(G264R) protein (Fig. 2g).

The F protein of paramyxoviruses, including MV, is known to form functional trimers<sup>15,16</sup>. Therefore, hetero-oligomeric proteins exhibiting a new phenotype may be formed when wt F and F(G264R) proteins are co-expressed. In fact, a co-immunoprecipitation assay revealed the complex formation between wt F and F(G264R) proteins (Supplementary Fig. S2a). Fusion assays were performed at various ratios of the plasmid encoding the wt F protein to that encoding the F(G264R) protein (Supplementary Fig. S3). Several small syncytia were formed in Vero/hSLAM cells transfected with the 9:1 ratio of the plasmids, whereas syncytia were more extensively observed in those transfected with the 5:5 or 1:9 ratio. The results indicate that smaller amounts of the wt F protein compared with the F(G264R) protein were enough to induce efficient membrane fusion. It is thus likely that the heterotrimer with one wt F and two F(G264R) monomers has more fusogenicity than those with other combinations of monomers.

On the basis of these data, we propose a possible model for the new phenotype of the combined F proteins (Supplementary Fig. S4). The binding of the H protein to a cellular receptor triggers conformational changes of the F protein from the pre- to the post-fusion form during membrane fusion<sup>9</sup>. In our model, the conformational stability of its pre-fusion form has to be appropriate for the F protein to exhibit fusion activity upon receptor binding by the H protein. If the pre-fusion form of the F protein is too stable, receptor binding may not be able to trigger conformational changes in the F protein required for membrane fusion. This probably applies to the wt F protein acting in conjunction with the H-tag protein at 37 °C. On the other hand, if its stability is too low, as exemplified by the F(G264R) protein at



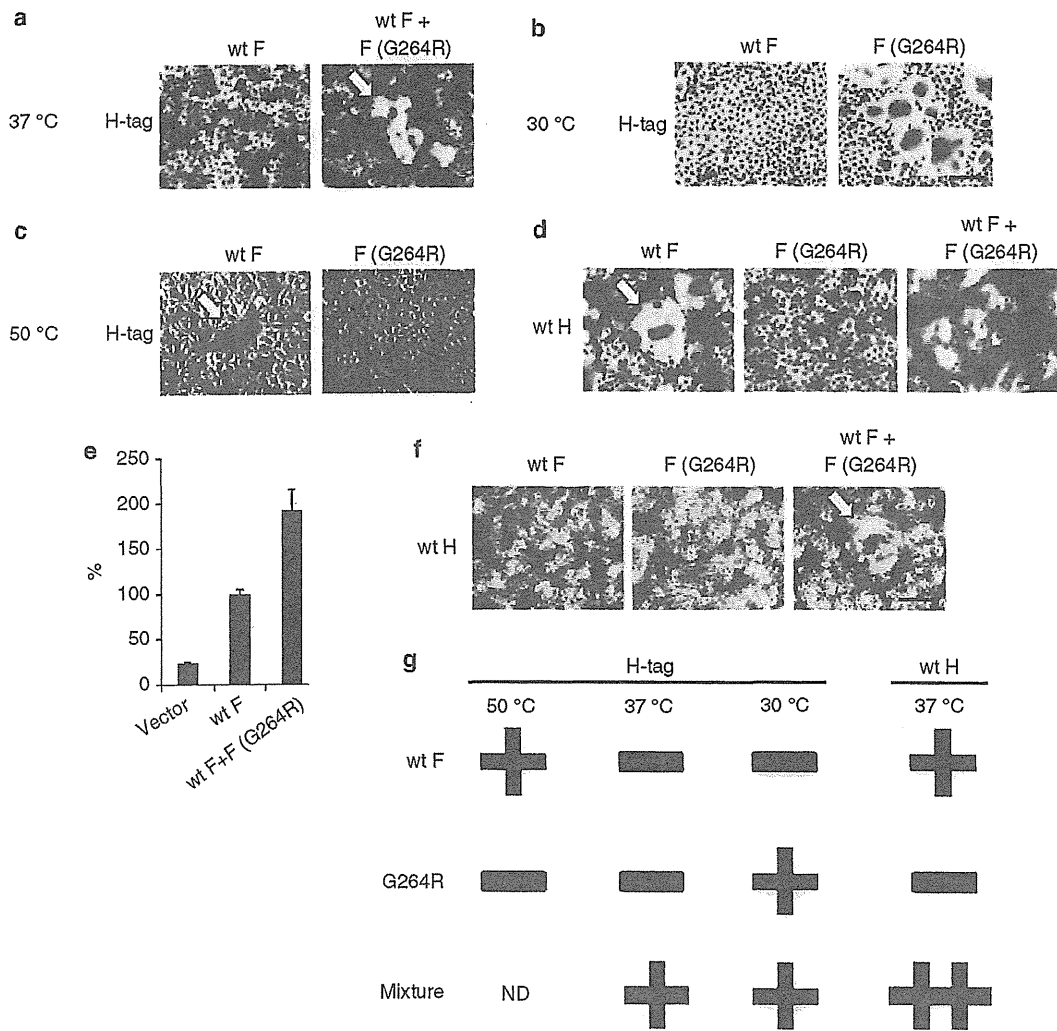
**Figure 1 | Discrepancy between results from a recombinant virus and plasmid-mediated fusion assay.** (a) Vero/hSLAM cells were infected with the P1 stock (passaged once) and two P3 stocks (P3-1 and P3-2) of the recombinant MV possessing the H-tag protein. At 2 days post-infection, the cells were observed under a fluorescence or phase-contrast microscope. (b) Vero/hSLAM cells were transfected with expression plasmids encoding H-tag and wt F or mutant F proteins, without (upper) or with (lower) that encoding the M protein. At 36 h post-transfection, cells were subjected to Giemsa staining and observed under a light microscope. (c,d) Sequence data of plaque-purified viruses from P3-2 (c) and P3-1 (d) stocks. Scale bars, 200  $\mu$ m.

37 °C, the pre-fusion form may undergo an inappropriate folding before receptor binding, precluding the conformational changes required for membrane fusion. However, the wt F and F(G264R) proteins may induce membrane fusion in conjunction with the H-tag protein at 50 °C (due to reduced stability at a higher temperature) and 30 °C (due to increased stability at a lower temperature), respectively. Mixing the wt F and F(G264R) proteins may produce heterotrimers between these two types of F proteins, which presumably have the intermediate stability between wt F and F(G264R) proteins.

We examined expression levels of the F proteins in transfected cells by western blot analysis (Supplementary Fig. S2b). The expression level of the wt F protein was reduced when it was

co-expressed with the F(G264R) protein instead of expressed alone. Furthermore, the expression level of the F(G264R) protein as produced singly was increased at 30 °C compared with that at 37 °C. Although expression levels of the F protein may not completely reflect the conformational stability of the pre-fusion form of the protein, these results are consistent with the above model.

Our model nicely explains why syncytium formation was observed at 37 °C, when both F proteins were expressed, but further studies are required to consolidate this model. Previously, Boulay *et al.*<sup>17</sup> reported that different influenza virus hemagglutinins formed mixed heterotrimers, which exhibited the intermediate property of the acid-induced activation.



**Figure 2 | A mixture of wt F and F(G264R) proteins exhibits a new phenotype.** (a–c) Vero/hSLAM cells were transfected with expression plasmids encoding H-tag and wt F and/or F(G264R) proteins at 37 °C (a,c) or 30 °C (b). At 36 h post-transfection, the cells were subjected to Giemsa staining and observed under a light microscope (a,b) or, at 24 h post-transfection, cells were incubated at 50 °C for 10 min, and observed under a phase-contrast microscope (c). (d,f) Vero/hSLAM (d) and Vero (f) cells were transfected with expression plasmids encoding wt H and wt F and/or F (G264R) proteins at 37 °C. (e) Cell fusion levels with expression plasmids encoding H and F proteins were determined using the quantitative fusion assay. The activity obtained with the wt F protein was set to 100%. An empty vector was used as a negative control. Error bars, standard deviations. (g) Summary of the fusion activities of wt F protein, F(G264R) protein and their mixture. ND, not done. Scale bars, 200  $\mu$ m (for a,b,d,f) or 100  $\mu$ m (for c). White arrows indicate syncytia (a,c,d,f).

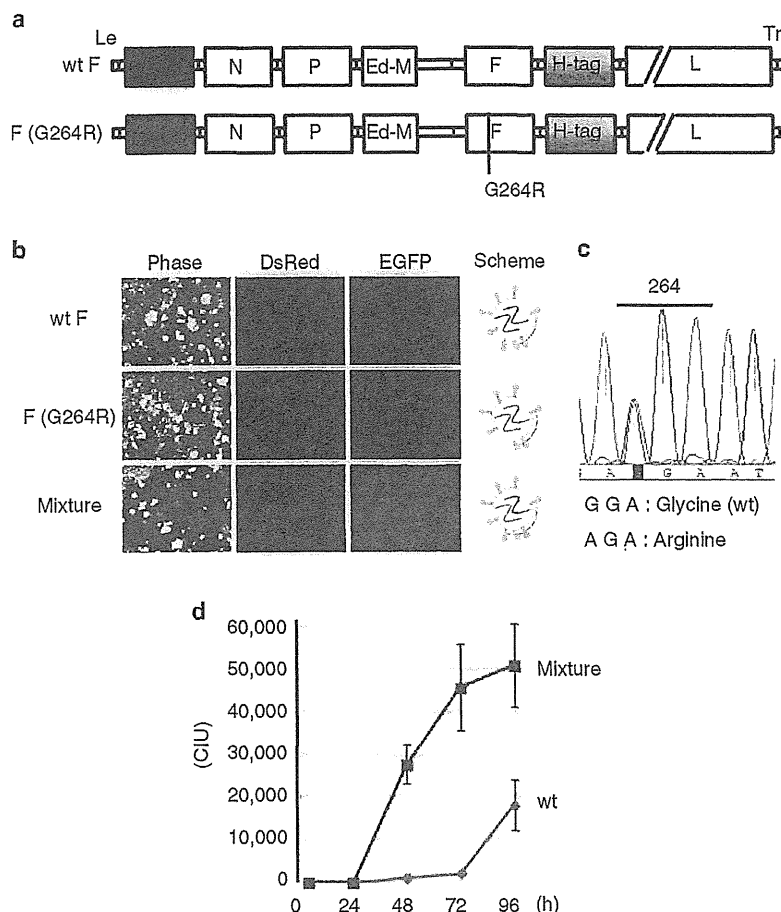
However, influenza virus usually does not have polyploidy, and these influenza virus hemagglutinin heterotrimers did not exhibit a new phenotype, unlike the MV F protein heterotrimers reported in the present study.

**Viruses carrying mixed genomes exhibit a new phenotype.** To validate our findings, we generated the recombinant MV containing these two types of genomes and examined its phenotype. One full-length genome plasmid carried the wt F gene and red fluorescent DsRed gene, and the other had the F(G264R) gene and EGFP gene (Fig. 3a). When both full-length genome plasmids were mixed and used to generate recombinant viruses (mixed genome viruses), infected cells formed syncytia expressing both DsRed and EGFP (Fig. 3b). The cells expressing either DsRed or EGFP (that is, cells infected with viruses containing only a single

type of genome) did not form syncytia (Supplementary Fig. S5). By contrast, when either full-length genome plasmid was used to generate recombinant viruses, syncytium formation was rarely, if any, observed (Fig. 3b). The recombinant virus recovered from syncytia was used to infect cells, and its F gene was sequenced after RT-PCR of RNA isolated from the cells. It retained two different sequences at position 264 of the F protein (Fig. 3c), indicating that the syncytium-forming phenotype of the P3-2 virus is indeed dependent on a mixture of the two types of genomes. Furthermore, a linear relationship was found between the numbers of plaques and dilution rates, by the plaque assay of the same stock of the mixed genome virus (Supplementary Fig. S6). This result indicates that most individual MV particles of the mixed genome virus contain both types of genomes.

Next, we compared the growth of the virus containing the wt F gene with that of the mixed genome virus in Vero/hSLAM cells.





**Figure 3 | Viruses carrying the two different genomes exhibit a new phenotype.** (a) Full-length genome plasmids used for recovery of recombinant viruses. Le, leader. N, nucleocapsid. P, phospho. Ed-M, Edmonston M. L, large. Tr, trailer. (b) Cells infected with recombinant viruses prepared with the full-length genome plasmid carrying the wt F gene, one carrying the mutant F(G264R) gene or both (mixture). The genomes of respective recombinant viruses are schematically shown. Cells were observed under a phase-contrast and a fluorescence microscope. (c) A virus was isolated from syncytium obtained with the mixture of the full-length genome plasmids, and its F gene sequence was determined. (d) Vero/hSLAM cells were infected with the virus carrying the wt F protein alone (wt) or the mixed genome virus (mixture) at a multiplicity of infection of 0.001. The cells and supernatant were collected 4, 24, 48, 72 and 96 h post-infection, and the titres of collected samples (expressed as cell infectious unit (CIU)) were determined in Vero/hSLAM cells. Error bars, standard deviations. Scale bars, 200  $\mu$ m.

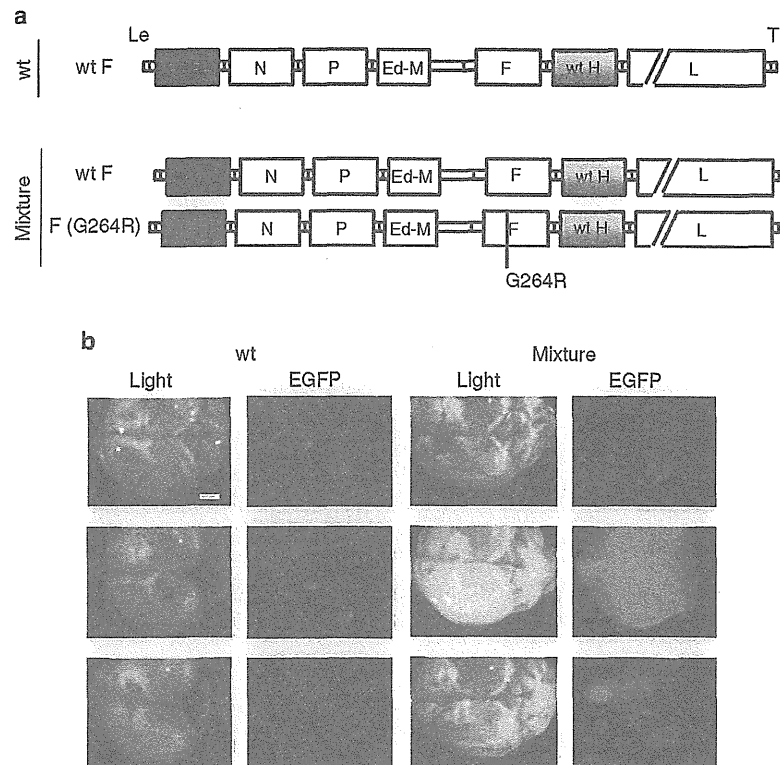
As expected, the mixed genome virus grew faster than the virus containing the wt F gene alone (Fig. 3d). This growth advantage must have allowed the evolution of the recombinant MV with the H-tag protein, producing the mixed genome virus in Vero/hSLAM cells.

We also examined viral spread in hamster brains, which do not have efficient receptors for MV. For this experiment, we newly recovered recombinant MVs expressing the wt H protein, not the H-tag protein, and 7-day-old hamsters were inoculated intracerebrally with the virus containing the wt F gene or the mixed genome virus (Fig. 4a). Six days after inoculation, hamster brains were collected, and examined under fluorescence and stereoscopic microscopes (Fig. 4b). The mixed genome virus spread in the brains (probably by cell-to-cell fusion), while the virus containing the wt F gene alone infected individual cells, but did not produce syncytia. Viruses recovered from the brain inoculated with the mixed genome virus still had both types of genomes (Supplementary Fig. S7). Thus, ‘cooperation’ of two different genomes can provide a virus with the ability to propagate in non-host, receptor-negative tissues, in which the wt virus does not propagate.

## Discussion

In the present study, a mutant cooperatively acting with the wt was observed. This mutant F(G264R) protein enhances membrane fusion and viral growth only when expressed together with the wt F protein. Therefore, the viral genetic composition changes from a single type of genome to a mixture of two different genomes. It should be noted that this phenomenon is different from complementation, because the two genomes do not complement each other, but produce a new phenotype through ‘cooperation’.

Is ‘cooperation’ a common event? We have passaged the recombinant MV expressing the H-tag protein in Vero/hSLAM cells, and recovered, altogether, eight viruses that regained the ability to induce membrane fusion, including P3-1 and P3-2 described in this study. Among them, six viruses had the single substitutions that endowed their F proteins with increased fusion activity, such as F(N462K). One virus had the genome encoding the F protein with the N92D and G264R substitutions, as well as that encoding the wt F protein, such as the P3-2 stock. This virus was also found to cause syncytia through ‘cooperation’ of the two genomes. Thus, ‘cooperation’ may not be common, but not very



**Figure 4 | Efficient spread of the mixed genome virus in hamster brains.** (a) Full-length genome plasmids used for recovery of recombinant viruses expressing the wt H protein. (b) Seven-day-old hamsters were inoculated intracerebrally with the virus carrying the wt F protein alone (wt) or the mixed genome virus (mixture). Six days after inoculation, their brains were collected and observed under stereoscopic and fluorescence microscopes. Scale bars, 2 mm.

rare, either (two out of eight events in this example). Furthermore, the mixed genome virus expressing wt F and F(G264R) proteins retained its genomic composition even after five passages (data not shown), suggesting that ‘cooperation’ is a stable phenomenon, at least in this case.

Does ‘cooperation’ occur in the natural world? Long-term transmission of defective RNA genomes has been reported in dengue virus isolates, although the mechanism remains to be elucidated<sup>18</sup>. ‘Cooperation’ may be an explanation for this phenomenon. Furthermore, cooperation could occur for any proteins forming functional oligomers. We suspect that protein complexes containing heterogeneous subunits necessary for their function might have arisen through the cooperation between wt and variant alleles. Further studies on many viruses, especially paramyxoviruses in which polyploidy occurs, may reveal more examples of cooperation.

MV can infect various cultured cells independent of known receptors albeit at low efficiencies (100- to 1000-fold lower than that of SLAM-dependent infection)<sup>19</sup>. This inefficient infection has been postulated to account for MV infection of neurons in human patients<sup>20</sup>. This mode of infection presumably occurs because the F protein may sometimes be activated when the H protein interacts with molecules other than known receptors. Enhanced fusion activity of the F protein, as exhibited by the adapted MV in the present study, may increase the rate of this activation, and allow MV to infect receptor-negative cells, such as Vero cells (Fig. 2f), hamster brain cells (Fig. 4b) and neurons in patients with subacute sclerosing panencephalitis. Furthermore, virus populations with mixed genomes could be evolutionary intermediates, which with time may adapt to infection in receptor-negative cells of host or non-host species.

## Methods

**Viruses.** Recombinant viruses based on the IC-B strain<sup>19</sup> were recovered as described previously<sup>21</sup>. The M gene was replaced by the Edmonston strain M gene to facilitate virus particle formation<sup>22</sup>. Full-length genome plasmids p(+ )HHRz-MV323-DsRed(H-tag/wtF) and p(+ )HHRz-MV323-EGFP(H-tag/F(G264R)) were mixed when recovering the recombinant virus containing two types of genomes.

**Fusion assay.** Cells were transfected with expression plasmids encoding MV H and F proteins, together with or without that encoding the Edmonston M protein. For the quantitative fusion assay, HEK293T cells were co-transfected with expression plasmids encoding MV H, MV F, firefly-luciferase and *Renilla*-luciferase. At 5-h post-transfection, the cells were mixed with Vero/hSLAM cells expressing the T7 RNA polymerase (Vero/hSLAM-T7). The *Renilla*-luciferase gene is encoded downstream of the T7-promoter, and its transcription is activated by fusion between Vero/hSLAM-T7 and HEK293T cells. At 24 h post-transfection, activities of both luciferases in the cells were analysed using Dual-luciferase reporter assay system (Promega), according to the manufacturer’s instructions. *Renilla*-luciferase activity was divided by firefly-luciferase activity (directed by the herpes simplex virus thymidine kinase promoter) to correct transfection efficiency.

**Immunoprecipitation and western blot analysis.** HEK293T cells were co-transfected with expression plasmids encoding the HA-tagged wt F protein (wt F-HA) and/or FLAG-tagged F(G264R) protein (F(G264R)-FLAG). The cells were lysed in a radioimmunoprecipitation assay buffer (1% NP-40, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS), followed by centrifugation. The supernatants were pre-cleared by protein A-Sepharose (GE Healthcare AB), and a small amount of each supernatant was collected as a cell-lysate sample. The rest of the supernatant was incubated with anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma-aldrich)-treated protein A-Sepharose. The immunoprecipitates were collected by centrifugation and washed three times with radioimmunoprecipitation assay buffer. The supernatants were also collected for determining protein expression levels (Supplementary Fig. S2b). The samples were analysed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted with an anti-HA-tag antibody or anti-FLAG antibody.

## References

- Holland, J. *et al.* Rapid evolution of RNA genomes. *Science* **215**, 1577–1585 (1982).
- Domingo, E. & Holland, J. RNA virus mutations and fitness for survival. *Ann. Rev. Microbiol.* **51**, 151–178 (1997).
- Eigen, M. Viral quasispecies. *Scientific Am.* **269**, 32–32 (1993).
- Duffy, S., Shackleton, L. A. & Holmes, E. C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 267–276 (2008).
- Lauring, A. S. & Andino, R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *Plos Pathog.* **6**, e1001005 (2010).
- Coffin, J. M. HIV population dynamics *in vivo*: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **267**, 483–489 (1995).
- Domingo, E. *et al.* Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB J.* **10**, 859–864 (1996).
- Bryce, J., Boschi-Pinto, C., Shibuya, K. & Black, R. E. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* **365**, 1147–1152 (2005).
- Lamb, R. A. & Parks, G. D. In: *Paramyxoviridae: the viruses and their replication*. *Fields Virology*, (eds Knipe, D. M. & Howley, P. M.) 1449–1496 (Lippincott Williams & Wilkins, 2007).
- Ono, N. *et al.* Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor. *J. Virol.* **75**, 4399–4401 (2001).
- Doyle, J. *et al.* Two domains that control prefusion stability and transport competence of the measles virus fusion protein. *J. Virol.* **80**, 1524–1536 (2006).
- Hosaka, Y., Kitano, H. & Ikeguchi, S. Studies on the pleomorphism of HVJ virions. *Virology* **29**, 205–221 (1966).
- Dahlberg, J. E. & Simon, E. H. Physical and genetic studies of Newcastle disease virus: evidence for multiploid particles. *Virology* **38**, 666–678 (1969).
- Rager, M., Vongpunsawad, S., Duprex, W. P. & Cattaneo, R. Polyploid measles virus with hexameric genome length. *EMBO J.* **21**, 2364–2372 (2002).
- Plempner, R. K., Brindley, M. A. & Iorio, R. M. Structural and mechanistic studies of measles virus illuminate paramyxovirus entry. *Plos Pathog.* **7**, e1002058 (2011).
- Lee, B. & Ataman, Z. A. Modes of paramyxovirus fusion: a Henipavirus perspective. *Trends Microbiol.* **19**, 389–399 (2011).
- Boulay, F., Doms, R. W., Webster, R. G. & Helenius, A. Posttranslational oligomerization and cooperative acid activation of mixed influenza hemagglutinin trimers. *J. Cell Biol.* **106**, 629–639 (1988).
- Aaskov, J., Buzacott, K., Thu, H. M., Lowry, K. & Holmes, E. C. Long-term transmission of defective RNA viruses in humans and *Aedes* mosquitoes. *Science* **311**, 236–238 (2006).
- Hashimoto, K. *et al.* SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *J. Virol.* **76**, 6743–6749 (2002).
- Yanagi, Y., Takeda, M. & Ohno, S. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J. Gen. Virol.* **87**, 2767–2779 (2006).
- Seki, F. *et al.* The SI Strain of measles virus derived from an SSPE patient possesses typical genome alterations and unique amino acid changes that modulate receptor specificity and reduce membrane fusion activity. *J. Virol.* **85**, 11871–11882 (2011).
- Tahara, M., Takeda, M. & Yanagi, Y. Contributions of matrix and large protein genes of the measles virus Edmonston strain to growth in cultured cells as revealed by recombinant viruses. *J. Virol.* **79**, 15218–15225 (2005).

## Acknowledgements

We thank E. Domingo, J.C. de la Torre and S. Ohno for invaluable comments. This work was supported by MEXT KAKENHI grant number 24115005, JSPS KAKENHI grant number 21249032, 24790444 and grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare (the Research Committee of Prion Disease and Slow Virus Infection) of Japan.

## Author contributions

Y.S., S.W. and Y.Y. designed the experiments, and analyzed the data. Y.S. and S.W. performed the experiments. Y.S. and Y.Y. wrote the paper.

## Additional information

**Supplementary Information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**Reprints and permission information** is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

**How to cite this article:** Shirogane, Y. *et al.* Cooperation between different RNA virus genomes produces a new phenotype. *Nat. Commun.* **3**:1235 doi: 10.1038/ncomms2252 (2012).

# ウイルス感染症の診断

IHARA TOSHIAKI

庵原俊昭

◎国立病院機構三重病院小児科

**要 旨** 古典的なウイルス学的診断方法は、ウイルス分離、IgM 抗体の検出、抗体の有義上昇である。近年分子ウイルス学の進歩により、迅速診断キットが開発され、ウイルス遺伝子増幅法が臨床に応用されるようになった。幅広くなったウイルス学的診断方法を有効に活用するためには、適切なサンプル採取と適切な結果の評価が大切である。

## はじめに

ヒトに感染するウイルスの種類は多く、感染したウイルスにより、その病態や臨床像は異なっている。臨床現場では病態や病像から感染したウイルスを推測し、推測したウイルスにあったウイルス学的検査を行い、病原体診断を行っている<sup>1)</sup>。また、抗体検査は感染症の診断だけでなく、感染症の疫学調査や院内感染予防のための職員健診に用いられている<sup>2,3)</sup>。本稿ではウイルス学的検査によるウイルス感染症の診断について解説する。

## ■ウイルス学的検査が必要なとき

多くのウイルス感染症は、臨床症状や臨床経過および地域の流行状況から診断されている。しかし、疫学的視点から感染症の診断が必要なとき、患者の予後を推定し、治療方針を決定するとき、献血や手術時における他者への感染防止を図るときなどではウイルス学的検査が行われる(表1)。麻疹や風疹のようにワクチン接種率上昇により流行規模が小さくなった感染症では、伝染性紅斑、突発性発疹、エンテロウイルスによる発疹症との

表1 ウイルス感染症診断時にウイルス学的検査が必要なとき

- 1) 疫学的視点から検査を必要とするとき
  - ① ワクチンなどにより流行規模が小さくなった感染症の確定診断
  - ② 地域で流行しているウイルス感染症の診断
  - ③ 患者を早期に発見し、防疫上の措置を行う必要があるとき
  - ④ 特定のウイルスに対する変異や薬剤感受性の調査
  - ⑤ 院内感染防止のためにワクチン予防可能疾患の免疫状態の調査
- 2) 患者の予後を推定し、治療方針を決定するとき
  - ① 類似した病像を呈する感染症の鑑別診断
  - ② 治療が可能なウイルス感染症の診断
  - ③ 免疫不全者(児)におけるウイルス感染症の診断
  - ④ ワクチン後のウイルス感染症の診断
- 3) 献血や手術時における他者への感染防止
- 4) ワクチン接種後に発生した臨床反応の原因の究明

鑑別のために、ウイルス学的診断が必須である<sup>4)</sup>。また、地域で流行があるときの急性耳下腺腫脹はムンプスであるが、地域での流行がないときの急性耳下腺腫脹の原因のほとんどはムンプス以外である<sup>5)</sup>。流行がないときのウイルス感染症の診断

表2 日常経験する臨床症状と代表的な原因ウイルス

無菌性髄膜炎	エンテロウイルス ムンプスウイルス 単純ヘルペスウイルス	胃腸炎	ノロウイルス サボウイルス ロタウイルス
脳炎	エンテロウイルス ムンプスウイルス 単純ヘルペスウイルス 日本脳炎ウイルス	発疹性疾患	腸管アデノウイルス アストロウイルス 水痘帯状疱疹ウイルス 単純ヘルペスウイルス
急性弛緩性麻痺	ポリオウイルス エンテロウイルス		HHV6, HHV7 EBウイルス 麻疹ウイルス 風疹ウイルス
呼吸器感染症	インフルエンザウイルス パラインフルエンザウイルス RSウイルス アデノウイルス ライノウイルス ヒトメタニューモウイルス コロナウイルス ボカウイルス	先天性感染	エンテロウイルス パルボウイルス B19 風疹ウイルス サイトメガロウイルス 単純ヘルペスウイルス 水痘帯状疱疹ウイルス
伝染性単核球症	EBウイルス サイトメガロウイルス	周産期感染	単純ヘルペスウイルス サイトメガロウイルス

HHV6: ヒトヘルペスウイルス6型, HHV7: ヒトヘルペスウイルス7型

B型肝炎ウイルス, C型肝炎ウイルス, ヒト免疫不全ウイルスは周産期感染するが無症状。

にはウイルス学的検査が必要である。

日常臨床でよく遭遇する胃腸炎, 呼吸器感染症の起因ウイルスは複数あり, 一部のウイルスは迅速診断が可能である。臨床症状から推定される起因ウイルスを表2に示した。また, 輸血時の感染を防止するために, 献血時にはB型肝炎ウイルス (hepatitis B virus: HBV), C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV), ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus: HIV), ヒトT細胞白血病ウイルス (human T cell leukemic virus: HTLV) の検査が行われている。

## ■ウイルス学的診断方法

ウイルス感染症のウイルス学的診断方法を表3に示した。代表的なウイルス学的検査法を紹介する。

### 1. ウイルス分離

ウイルス学的診断方法のゴールドスタンダードは, 感染病巣からのウイルス分離である。病巣以

表3 ウイルス学的診断方法

- |  |
|--|
| ①病変部位からのウイルス分離                           |
| ②病変部位からのウイルス蛋白, ウイルス遺伝子の検出               |
| ・迅速診断法                                   |
| 気道感染: インフルエンザウイルス, RSウイルス, アデノウイルス, hMPV |
| 眼感染: アデノウイルス                             |
| 消化器感染: ロタウイルス, アデノウイルス, ノロウイルス           |
| ・PCR, real-time PCR                      |
| ・LAMP, real-time LAMP                    |
| ③血清IgM抗体の検出                              |
| ④血清抗体 (IgG抗体) の有意上昇                      |

hMPV: ヒトメタニューモウイルス

外の部位からウイルスが分離されたときは注意が必要である。しかし, エンテロウイルスによる無菌性髄膜炎時には便からのウイルス分離が, 全身性サイトメガロウイルス (cytomegalovirus: CMV) 感染症時には尿や唾液からのウイルス分離が診断の参考となる。分離されたウイルスを用いて, ウイルス遺伝子型の検索や変異の検討, 抗

表4 ウイルス分離用サンプル採取・サンプル輸送の原則

- ①病変部位（咽頭拭い液，後鼻腔液，ときに便）から綿棒を用いてサンプルを採取する
- ②採取したサンプルは検体輸送培地（ないときは生理食塩水）に入れ，乾燥させないようにする
- ③木の綿棒でサンプルを採取した場合は，綿棒を攪拌後サンプル液を絞り落とし，綿棒を取り除いておく<sup>\*1</sup>
- ④血液はEDTAを用いて採取する<sup>\*2</sup>
- ⑤髄液・尿・糞便・気管支肺胞洗浄液・鼻腔吸引液はそのまま保存する
- ⑥細胞に接種するまでの期間が短期間（1週間まで）の場合は，4℃で保存する
- ⑦細胞に接種するまでの期間が長期間の場合は-80℃で保存する．-20℃では保存しない
- ⑧PBMCを保存する場合は，EDTA血をフィコール比重遠心法で分離後，セルバンカー<sup>®</sup>に再浮遊させ，-80℃以下で保存する
- ⑨臨床症状および分離を目的とするウイルスを検査側に伝える

\*1: 木材は抗ウイルス作用や殺菌作用がある。

\*2: ヘパリンはPCRによる核酸増幅を抑制する作用がある．近年はヘパリン血でもPCRを走らせる方法が開発されている。

・-20℃で保存すると，エンベロープを持つウイルスでは融解時エンベロープが破壊される。

・エンテロウイルスによる無菌性髄膜炎を疑うときは，髄液・便・咽頭拭い液を採取する。

・麻疹や風疹を疑うときは，咽頭拭い液・EDTA血・尿を採取する。

・エンテロウイルスの場合は便中に長期間ウイルスが排出され，麻疹の場合は回復後も尿中にウイルス抗原が検出される。

・パルボウイルスB19（血清中）やHHV6（PBMCに感染）は回復後も検出される。

ウイルス薬に対する感受性検査，ワクチン開発などが行われている。流行状況から疫学的検討が必要な場合は，各県・政令指定都市の地方衛生研究所（地研）に調査の協力を依頼する。

効果的にウイルス分離を行うためには，適切な検査材料の採取と適切な輸送，保存が大切である。ウイルス分離を行ううえでの基本事項を表4に記載した<sup>1,6)</sup>。病変部位から綿棒で採取したサンプルは，1~2mLのウイルス検体輸送培地（ゼラチンやウシ血清アルブミンなどのウイルス安定剤が入った細胞培養液）に入れ，乾燥させないようにする。水疱液を採取する場合は，表面を生理食塩水で清拭し，水疱内容をツベルクリン注射器で採取後，0.2mLの生理食塩水を追加する。

サンプル採取後1週間以内に細胞に接種するときは4℃で，細胞に接種するまでに1週間以上要する場合は-80℃で保存する。エンベロープを有するウイルスを-20℃で保存すると，融解時にウイルスが失活するため，ウイルス分離用サンプルは-20℃では保存しない。末梢血単核球（peripheral blood mononuclear cell: PBMC）を長期間保存する場合は，フィコール比重遠心法で分離後，セルバンカー<sup>®</sup>に再浮遊させ-80℃以下で保

存する。

分離しようとする目的ウイルスにより，分離に用いる細胞は異なっている（表5）<sup>7-11)</sup>。採取した検査材料の患者情報，目標とするウイルスなどを検査側に連絡することが大切である。ウイルス増殖は細胞変性効果（cytopathic effect: CPE）の出現で判定する。CPE出現までの期間は，早いと翌日，遅いと3週間以上必要である。数代盲継代するとCPEが出現することもある。分離されたウイルスは中和試験や蛍光抗体法で同定する。

## 2. ウイルス抗原検出検査

近年，病巣部からウイルス蛋白を迅速に検出する検査法が開発されている<sup>7-9)</sup>。迅速診断検査法が市販されている対象ウイルスを表3に示した。測定にはラテックス凝集法（latex agglutination test: LA），酵素免疫法（enzyme immunoassay: EIA），免疫クロマト法が用いられている。いずれもウイルス蛋白とウイルス蛋白に対するモノクローナル抗体を反応させ，反応を金コロイド等により可視化させたものである。多くは10<sup>4</sup>/mL以上のウイルスが存在すると陽性になる。ウイルス分離よりも感度は劣るが迅速性に優れている。

表5 目的とするウイルスと分離に用いる細胞

ウイルス	分離に用いる細胞
麻疹ウイルス	B95a 細胞, Vero-SLAM 細胞
風疹ウイルス	RK 細胞, Vero 細胞
ムンプスウイルス	Vero 細胞
VZV, HSV, CMV	ヒト線維芽細胞 (HF)
HHV6, HHV7	臍帯血由来末梢血単核球 (PBMC)
インフルエンザウイルス	MDCK 細胞, 発育鶏卵
RS ウイルス	HEp-2 細胞, FL 細胞, Vero 細胞
ヒトメタニューモウイルス	LLC-MK2 細胞, VeroE6 細胞
アデノウイルス	A549 細胞, HEp-2 細胞, RD 細胞
エンテロウイルス	HF 細胞, HEp-2 細胞, Vero 細胞, RD-18S 細胞, GMK 細胞
ライノウイルス	HF 細胞, HEp-2 細胞, Vero 細胞
パラインフルエンザウイルス	Vero 細胞, VeroE6 細胞, LLC-MK2 細胞, HeLa 細胞

VZV: 水痘帯状疱疹ウイルス, HSV: 単純疱疹ウイルス, HHV: ヒトヘルペスウイルス

・Vero-SLAM 細胞は Vero 細胞に麻疹ウイルス野生株のレセプターである SLAM を遺伝子挿入した細胞。

・ウイルス分離は薬剤耐性などのウイルスの性状解析や抗原性の解析に必要である。

・インフルエンザウイルスでは分離されたウイルスはワクチン候補株の選定に用いられる。

CMV 感染における好中球中の pp65 抗原検出は、移植患者などの免疫不全宿主における CMV 感染症の早期診断に有用である。

### 3. ウイルス核酸検査

ウイルス感染症の診断やウイルス感染症の病態の解明に、polymerase chain reaction (PCR) や loop-mediated isothermal amplification (LAMP) を用いた核酸検出法, real-time PCR や real-time LAMP を用いたウイルス核酸の定量的検討が行われている。多くは専門の研究機関で行われているが、比較的頻度の高い HBV, HCV, HIV, 単純ヘルペスウイルス, CMV, EB ウイルスなどはコマーシャルラボでも検査が可能である。

2012 年を目途に排除を目指している麻疹では、咽頭拭い液, PBMC, 尿を用いた PCR 検査が診断に必須である。地研で検査するシステムが整理されている。2010 年から成人男性を中心に流行している風疹も咽頭拭い液, PBMC, 尿を用いた PCR 検査が診断に有用である。

PCR, LAMP ともに感度に優れた方法である。しかし、これらの検査法は必ずしも感染性のある

ウイルス粒子を検出していないこと、ときに潜伏感染しているウイルスを検出する危険性があること等、検査の限界を理解しておくことも大切である。多くのウイルス感染症では、病巣や末梢血から検出されるウイルス量と病勢とはよく一致している。ウイルス量が定量的に解析できる real-time PCR や real-time LAMP は、臨床経過の診断や病態研究に用いられている。

### 4. ウイルス抗体検査

ウイルス抗体検査法のゴールドスタンダードは、抗体の生物学的活性と抗体量が一度に測定できる(感染防御抗体が検出できる)中和法 (neutralizing test: NT) である<sup>1)</sup>。赤血球凝集抑制法 (hemagglutination inhibition test: HI) も抗体の生物学的活性を測定している。NT は手間と時間がかかるため、簡便に抗体が測定できる EIA 法, 粒子凝集法 (particle agglutination test: PA), LA が開発されている。いずれも抗体の蛋白量を測定する方法であるが、NT や HI との互換性が基準となっている<sup>12)</sup>。

抗体測定方法は、測定原理から 2 種類に分類される(表 6)。一つは血清を 2 倍階段希釈して測

表6 抗体測定の原因と測定方法

1. 階段血清希釈法	2. 一定濃度血清希釈法
1) 抗原抗体反応を検出	1) 検量線から算出
・粒子凝集法 (PA)	・酵素免疫法 (EIA)
・間接蛍光抗体法 (IFA)	・放射性免疫測定法 (RIA)
・免疫付着赤血球凝集法 (IAHA)	・化学発光免疫測定法 (CLIA)
2) 反応せずに残ったウイルス, 抗原または補体を検出	・ラテックス凝集比濁法 (LA)
・中和法 (NT)	
・赤血球凝集抑制法 (HI)	
・補体結合法 (CF)	

階段血清希釈法は一般に手作業で行われ、目視で判定される。抗体価は「倍」で表示される。一方、一定濃度血清希釈法は機械化が可能であり、多数の検体を測定するのに適している。抗体価は「単位」で表示される。

表7 目的に応じて選択する代表的なウイルス抗体検査法

ウイルス	免疫の有無 確認	感染症の診断	
		シングル血清	ペア血清 (有意上昇)
麻疹ウイルス	NT, EIA-IgG, PA	EIA-IgM	EIA-IgG, NT, HI, PA
風疹ウイルス	HI, LA, EIA-IgG	EIA-IgM	HI, LA, EIA-IgG
ムンプスウイルス	EIA-IgG	EIA-IgM	EIA-IgG, HI, NT
VZV	IAHA, EIA-IgG	EIA-IgM	IAHA, EIA-IgG
CMV	EIA-IgG, FA-IgG	EIA-IgM, FA-IgM	EIA-IgG, FA-IgG
EBウイルス	EBNA	VCA-IgM, EADR	VCA-IgG
パルボウイルス B19	EIA-IgG	EIA-IgM	EIA-IgG
インフルエンザウイルス	HI		HI
アデノウイルス	NT		NT, CF
RSウイルス	NT		NT, CF
日本脳炎ウイルス	NT		NT, HI
ポリオウイルス	NT		NT

IAHA: 免疫付着赤血球凝集法, FA: 蛍光抗体法, CF: 補体結合法

・NT, HI, PA, CFでの有意上昇は4倍以上, EIA-IgG, LAでの有意上昇は2倍以上の抗体上昇

・EBV感染では感染早期にEADR抗体, VCA-IgM抗体が検出され, 次いでVCA-IgG抗体が検出され, 抗体陽転化するとEBNA抗体が検出される。EBV持続感染ではEBNA抗体は検出されない。

定する方法であり、抗体価は血清希釈倍数 (倍) で表される<sup>4)</sup>。もう一つは、血清を一定濃度に希釈し、標準血清の検量線から抗体価を求める方法である。抗体価は単位で表される。世界保健機関 (WHO) は値付けした標準血清を作成し、測定方法にかかわらず抗体価を国際単位で表示するよう求めている。HBV, 麻疹, 風疹, 水痘, パルボウイルス B19 などでは標準血清が作成されている。

ウイルス抗体が測定されるのは、ウイルス感染症の診断時と免疫状態の診断時である。目的に

に応じて選択される抗体測定方法を表7に示した。

#### 1) ウイルス感染の診断

ウイルス感染症初感染の診断には、急性期 IgM 抗体の検出と血清抗体の有意上昇が用いられる。本邦で頻用されているデンカ生研の IgM 抗体測定試薬は、早期診断を目的に開発されたため、感度は高いが、ときに非特異陽性や回復後も長期間低い値で陽性が持続することがある<sup>13,14)</sup>。ムンプス IgM 抗体測定試薬は改良され<sup>15)</sup>、現在、麻疹 IgM 抗体測定試薬の改良が行われている。ウイルス血清抗体価は、体内で増殖したウイルス



表8 ウイルス初感染・再感染・再活性化と抗体パターン

感染様式	IgM 抗体	IgG 抗体	
		抗体価	avidity
初感染	+~++	-~+	弱い
再感染	-~+	+++	強い
ワクチン後感染			
一次性ワクチン不全	+~++	-~+	弱い
二次性ワクチン不全	-~+	+++	強い
再活性化	-~+	+++	強い

- ・ウイルス再感染，二次性ワクチン不全，再活性化時には，IgG 抗体は発症早期から上昇していることがあり，有意上昇を示さないことがある。
- ・avidity とは抗原と抗体の結合力のことであり，IgG3 画分に属する抗体は結合力が弱く，IgG1 画分に属する抗体は結合力が強い。再感染などでは早期から IgG1 画分の抗体が上昇するため急性期の血清でも強い avidity が認められる。

量に応じた免疫反応であり，時間の経過とともに IgG 抗体も IgM 抗体も上昇する。1 回の血清 IgM 抗体検査で感染症を診断するためには，発症 48 時間以降に測定することが望まれている。非特異陽性の場合，時間の経過による IgM 抗体の上昇が認められない。

血清抗体の有意上昇とは，急性期と回復期（急性期から原則 2 週間以上あける）の血清抗体価が測定誤差以上に上昇することである。抗体価が倍で表される方法では 2 管（4 倍）以上の，抗体価が単位で表される方法では 2 倍以上の上昇である。

ウイルス感染症再感染，二次性ワクチン不全によるウイルス感染の場合は，ときに発症前から二次免疫応答が始まるため，急性期の血清抗体パターンは，IgM 抗体陰性または弱陽性，IgG 抗体高値を示す（表 8）。IgG 抗体は早期から上昇しているため，有意上昇を示さないことがある。ウイルス再活性化時の抗体パターンは再感染時と同様である。

初感染と再感染の血清診断に，抗原と抗体との結合力（avidity）を測定する方法がウイルスやトキソプラズマなどで用いられている<sup>16)</sup>。初感染の場合，まず循環性 B 細胞依存性形質細胞が抗原との結合力が弱い IgG3 画分に属する抗体を産生し，その後，濾胞性 B 細胞依存性形質細胞が抗原との結合力が強い IgG1 画分の抗体を産生す

る。一方，再感染や二次性ワクチン不全の場合は，循環性 B 細胞依存性形質細胞も抗体を産生するが，早期から濾胞性 B 細胞依存性形質細胞が抗体を産生するため，発症早期でも avidity の強い抗体が検出される。抗体の avidity 測定は，8 モル尿素を含む洗浄液による EIA にて測定する。Avidity が弱い抗体では尿素を含む洗浄液で洗浄すると抗体価が著明に低下する。

## 2) 免疫状態の診断

個人の免疫状態を調べるための代表的な抗体測定方法を表 7 に示した。麻疹発症を予防する抗体価は 120mIU/mL であり，この抗体価は NT では 4 倍，EIA では 4.0EIA 価，PA では 64 倍に相当する<sup>17)</sup>。また，風疹発症を予防する抗体価は 4~10IU/mL であり，10IU/mL とすると，HI 抗体では 16 倍，EIA では 5.0EIA 価に相当する。ワクチン後の免疫を調べるときは，感度，特異度ともに優れた方法で測定する必要がある。

## ■先天性ウイルス感染症の診断

ウイルス感染症の特別な型として先天性ウイルス感染症がある。先天性ウイルス感染症の診断方法を表 9 に示した<sup>18)</sup>。特徴的な症状として，低出生体重児，肝脾腫，出血斑，脳内石灰化，白内障・網膜症，難聴などがある。ウイルスが児に先天性感染すると多くは持続感染するため，胎内の感染

表9 先天性ウイルス感染症の診断

- ①特徴的な臨床症状
- ②出生時のIgM抗体 $\geq 20\text{mg/dL}$
- ③ウイルス分離(原則生後3週以内)
  - ・尿, 唾液, 眼房水(先天性風疹症候群)
- ④ウイルス核酸の検出(PCR, real-time PCR, LAMP)
  - ・臍帯, 尿, 唾液
- ⑤特異的IgM抗体の検出
  - ・IgG抗体は母体からの移行があるため早期診断に用いにくい。
  - ・CMVは周産期感染, 母乳感染があるため先天性感染の診断は生後3週間以内に診断するか, 3週間以上経過した場合は乾燥臍帯を用いて診断する。
  - ・主として母乳により感染するヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV-1)感染の診断は3歳時に行う。

時期にかかわらず出生時からIgM抗体は検出される。IgG抗体は母体から児に移行するため, 早期診断には用いられない。

おわりに

ウイルス感染症の診断方法について解説した。適切にサンプルを採取し, 適切にサンプルを輸送し, 適切に診断方法を使い分け, 適切に診断することが大切である。

文献

- 1) 庵原俊昭: ウイルス感染症の診断. 小児科診療 68: 1992-1999, 2005.
- 2) 庵原俊昭: 麻疹・風疹・水痘・ムンプスに対する病院および地域における感染制御対策の最近の動向. 医療 60: 483-488, 2006.
- 3) 庵原俊昭: 麻疹・風疹・ムンプス(流行性耳下腺炎)・水痘感染対策: 抗体測定とその評価. CAMPUS HEALTH 45: 9-14, 2008.
- 4) 庵原俊昭: 抗体検査: 目的・結果・次にすることは. 小児感染免疫 23: 89-95, 2011.

- 5) 庵原俊昭: ムンプスワクチン接種後のムンプス罹患時における病態と臨床像の特徴. 小児科 42: 1144-1149, 2001.
- 6) 庵原俊昭, 豊田美香, 中野貴司ほか: アメリカ微生物学会(ASM)のウイルス分離用採取ガイドラインからみたわが国のコマーシャルラボの採取方法の検討. 小児感染免疫 11: 103-107, 1999.
- 7) 川上千春, 渡邊寿美, 清水英明ほか: インフルエンザウイルス. 臨床とウイルス 40: 104-112, 2012.
- 8) 藤本嗣人, 花岡 希, 小長谷昌未ほか: アデノウイルス. 臨床とウイルス 40: 115-122, 2012.
- 9) 高尾信一: RSウイルス, ヒト・メタニューモウイルス. 臨床とウイルス 40: 124-133, 2012.
- 10) 水田克己: エンテロウイルス・ライノウイルス. 臨床とウイルス 40: 134-141, 2012.
- 11) 改田 厚, 久保英幸, 入谷典弘ほか: ヒトパラインフルエンザウイルス感染症. 臨床とウイルス 40: 142-149, 2012.
- 12) 庵原俊昭: ウイルス検査法とその評価-抗体測定方法を中心に-. 第11回SRL感染症フォーラム講演集: 4-15, 2007.
- 13) 田中敏博, 小栗 泉, 川出博江: 伝染性紅斑の成人患者における血清中の麻疹ウイルスIgM抗体価の変動. 病原微生物検出情報 31: 268-269, 2010.
- 14) 佐藤 弘, 多屋馨子, 高崎智彦ほか: デング熱および突発性発疹と考えられる症例における麻疹IgM抗体陽性例. 病原微生物検出情報 31: 269-271, 2010.
- 15) 庵原俊昭, 中野貴司, 落合 仁ほか: 改良されたムンプス酵素免疫法(EIA)-IgM抗体検査法の臨床評価. 小児感染免疫 23: 123-129, 2011.
- 16) 庵原俊昭, 谷口清州, 神谷 齊ほか: ワクチン後のムンプス罹患例におけるムンプスIgG抗体とそのAvidityの検討. 臨床とウイルス 24: 389-393, 1996.
- 17) 庵原俊昭ほか: 風疹・麻疹抗体測定法の標準化に関する研究: 抗体測定方法の互換性と感染予防レベルの検討. ウイルス感染症の体外診断薬の再評価に関する基盤整備に関する研究(研究代表者: 小林和夫)平成21年度総括・分担研究報告書, pp19-25, 2010.
- 18) 堤 裕幸: 健常児におけるウイルス感染症. 小児感染免疫 23: 403-407, 2012.

\* \* \*

原 著

## フィリピンからの輸入麻疹患者の発生と臨床ウイルス学的考察

独立行政法人国立病院機構三重病院小児科<sup>1)</sup>, 川崎医科大学附属川崎病院小児科<sup>2)</sup>

浅田 和豊<sup>1)</sup> 一見 良司<sup>1)</sup> 大矢 和伸<sup>1)</sup> 谷田 寿志<sup>1)</sup>

田中 孝明<sup>2)</sup> 菅 秀<sup>1)</sup> 庵原 俊昭<sup>1)</sup>

### 要 旨

2010年8月に三重県で、フィリピンからの輸入関連麻疹症例3例を経験した。フィリピンから帰国した9歳女児は、帰国後に麻疹を発症し、その近隣に在住する乳児が麻疹を発症した。その後、乳児の母親が麻疹ウイルス(MV: Measles virus)に感染し、発熱を認めた。フィリピンから帰国した麻疹患者と、麻疹を発症した乳児から、同じ遺伝子型D9のMVが分離され、遺伝子配列は解析できる範囲でN遺伝子が100%一致していた。MVの潜伏期間と遺伝子型より、フィリピンから帰国した麻疹患者から、乳児にMVが伝播したものと推察された。乳児の母親における麻疹IgG抗体は、発症前で5.4 EIA価であり、発症を予防できるレベルであった。実際、母親の症状は、発熱のみで発疹は認めなかった。しかし母親の抗体価から考えると、生後9か月の乳児の抗体価は低値であったと推測され、そのため麻疹を発症したものと考えられた。

キーワード: 麻疹, 麻疹ウイルス, 輸入感染症, 麻疹移行抗体,  
Human herpesvirus 6 (HHV-6)

### はじめに

麻疹ウイルス(MV: Measles virus)は、パラミクソウイルス科モルビリウイルス属に属するRNAウイルスである。現在のところ、単一の血清型と考えられており、遺伝子型はA~Hの8群、23種類に分類されている<sup>1)</sup>。麻疹は未だに世界各地で流行がみられ、毎年、初春~初夏にかけて流行する。1980年代からの日本における流行株は、遺伝子型C1, D3, D5あるいはH1である<sup>2)</sup>。2010年1月から、フィリピンで麻疹の大流行(遺伝子型D9)がみられ、フィリピンから帰国した後に発症した麻疹患者から同じ遺伝子型のMVが世界各地で検出されている<sup>3)</sup>。麻疹は、ヒト-ヒト感染するウイルス感染症のなかで最も感染力が強く、20分間、同じ部屋にいと感染する。MVは室温で少なくとも34時間生存し続けることができる<sup>4)</sup>。ウイルス排泄期間は、発疹が出現する5日前から、出現して4日後までである。

近年、先進諸国では、麻疹に罹患歴のある成人が減少し、ワクチン接種歴のみの成人が増加している。ワクチン接種歴のみの母親の麻疹IgG抗体価は、罹患歴のある母親の抗体価より低値である<sup>4)</sup>。そのため、児への移行抗体が少なく、生後6か月の時点で、麻疹の

発症を予防できるレベルより下回っている場合が多い。

今回われわれは、フィリピンから帰国後に麻疹を発症した患者より、二次的にMVに感染したと思われる親子例を経験したので報告する。

### 症 例

【症例1】9歳、女児

【麻疹ワクチン接種歴】未接種

【既往歴】0歳時、麻疹に自然罹患(?)

【現病歴(図1,表1)】2010年8月14日、フィリピンから日本に帰国した(同年7月31日~8月14日までフィリピンに滞在)。8月15日、発熱を認め、A診療所を受診した。8月16日~8月20日、B病院を受診した(8月19日、発疹が出現)。8月20日、B病院の血液検査で、麻疹IgM抗体が陽性(10.88 EIA価)と判明した。8月21日、解熱した。8月23日(10時頃)、B病院を再診した。発症6日目(8月20日)の咽頭ぬぐい液からMVが分離され、血液・咽頭ぬぐい液・尿よりRT-nested PCR法にてMVのH遺伝子およびN遺伝子が検出された(図2)。N遺伝子の遺伝子配列解析により、遺伝子型D9と同定された(図3)。

【症例2】生後9か月、女児

【麻疹ワクチン接種歴】未接種

【海外渡航歴】なし

【現病歴(図1,表1)】同年8月24日の夕方、40℃台の発熱を認め、B病院を受診した。8月27日に解熱し、

(平成23年1月19日受付)(平成23年10月12日受理)

別刷請求先: (〒514-0125) 津市大里豊田町357

国立病院機構三重病院小児科 浅田 和豊

E-mail: kazutoyoasada@gmail.com

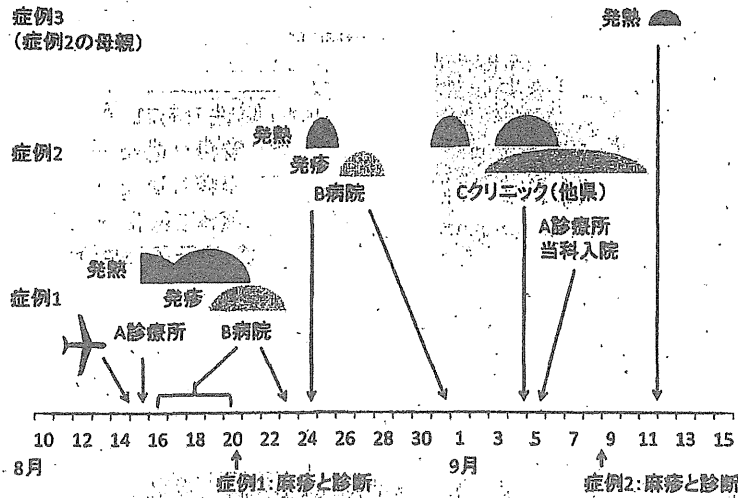


図1 症例1～3の臨床経過

表1 症例一覧

症例	性別	年齢	発熱	発疹	咳嗽	ワクチン歴	自然罹患	血清IgM (EIA) (<0.80)	血清IgG (EIA) (<2.0)	ウイルス分離	PCR	遺伝子
1	女	9歳	+	+		未	+ (?)	10.88	7.2	咽頭 (+) Vero/hSL AM細胞	血液 (+) 咽頭 (+) 尿 (+)	D9
2	女	9か月	+	+	+	未	-	7.14 (発症7日目) ↓ 6.52 (発症9日目)	3.9 (発症7日目) ↓ 26.7 (発症9日目)	PBMC (+) B95a細胞	血液 (+) 咽頭 (+) 尿 (+)	D9
3	女	29歳	+	-	-	不明	-	0.27 (発熱3日前) ↓ 0.30 (発熱3日目)	5.4 (発熱3日前) ↓ 42.2 (発熱3日目)	(-)	血液 (-) 咽頭 (-) 尿 (+)	(-)

四肢・体幹に発疹が出現した。8月31日、39℃の発熱を認め、B病院を再診し、CFPN-PIを処方された。9月1日、解熱した。9月2日、40℃台の発熱、新たな発疹、湿性咳嗽、嘔声、鼻汁を認めた。9月4日、旅行先でCクリニック(他県)を受診し、AZMを処方された。9月5日、発疹が拡大し、A診療所を受診した。経過が長いため、当科紹介され入院した。

【入院時現症】体温38.1℃、呼吸回数30回/分。顔面・体幹の全体に融合傾向のある紅斑を、四肢に数mm～1cm大の紅斑を認めた(掻痒感なし)。軽度の眼脂を認めた。咽頭は軽度の発赤を認め、口腔粘膜にKoplik斑を認めなかった。鼓膜は両側発赤を認めた。

【入院経過】入院後、輸液とCLDM投与で経過をみた。入院2日目、当院耳鼻咽喉科に紹介し、両側中耳炎の診断で鼓膜切開術を施行した。入院3日目に解熱し、体幹の発疹は軽快し、四肢は色素沈着を認めた。

発症7日目(8月31日が発症1日目)に採取した血清より、麻疹IgM抗体陽性(7.14 EIA 価)、IgG抗体陽性(3.9 EIA 価)を認め、麻疹と診断した。末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell: PBMC)からMVが分離され、血液・咽頭ぬぐい液・尿よりRT-nested PCR法にてMVのH遺伝子およびN遺伝子が検出された(図2)。遺伝子配列解析により、遺伝子型D9と同定された(図3)。また、同じ血液・尿よりHuman herpesvirus 6 (HHV-6) (variant B) 遺伝子が検出された(図4)。発症9日目に採取した血清では、麻疹IgM抗体は6.52 EIA 価、IgG抗体は26.7 EIA 価だった。入院5日目、症状も落ち着いていたため、退院した。なお、最初の発疹性疾患は、臨床経過や血液からHHV-6遺伝子が検出されたことから突発性発疹と診断した。

【症例3(症例2の母親)】29歳、女性