

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興再興感染症研究事業）

「麻疹ならびに風疹排除およびその維持を科学的にサポートするための
実験室検査に関する研究」

分担研究報告書

「麻疹リアルタイム PCR 法の導入に関する研究」

研究分担者

駒瀬 勝啓

国立感染症研究所ウイルス第3部

研究協力者

中津祐一郎、染谷健二、關文緒、田原舞乃、酒井宏治

国立感染症研究所ウイルス第3部

長野秀樹、駒込理佳、岡野素彦

北海道立衛生研究所

青木洋子

山形県衛生研究所

小川知子、小倉 惇、堀田千恵美

千葉県衛生研究所

七種美和子

横浜市衛生研究所

児玉洋江

石川県保健環境センター

皆川洋子、安井善宏

愛知県衛生研究所

加瀬哲男、倉田貴子、上林大起、尾崎瑤子

大阪府立公衆衛生研究所

村田祥子

山口県環境保健センター

濱崎光宏、吉山千春、石橋哲也

福岡県保健環境研究所

加藤 峰史

沖縄県衛生環境研究所

研究要旨

日本において麻疹の病原体検出法として汎用されているのはN遺伝子、並びにH遺伝子を標的にした nested RT-PCR 法(以下 RT-PCR 法)である。またN遺伝子の RT-PCR 法は麻疹ウイルスの遺伝子型解析にも用いられている。RT-PCR 法は感度にすぐれた方法であるが、手技がやや煩雑であり時間がかかる事、また、反応チューブを開け電気泳動が必要な事からコンタミが危惧される等の欠点がある。本研究では RT-PCR 法に代わる麻疹の病原体検出法としてリアルタイム PCR 法を日本に導入するために、麻疹、風疹レファレンスセンター(以下、麻疹/風疹 RC)とともに、米国 CDC が確立したリアルタイム PCR の評価を行った。麻疹/風疹 RC、10 施設において 3 回(1カ所は 6 回)ずつ実施された検量線解析では、ほぼすべての試験で試験成立要件を満たしていた。また、RT-PCR 法と比較した感度、特異度は 93.8%、95.9% (判定保留と陽性とした場合)であり、現行の RT-PCR 法とほぼ同等の精度を持つと考えられた。今回、麻疹/風疹 RC が検討、評価した結果から、プロトコールの一部を改訂することで本法を麻疹検査診断に使用できると判断した。

A. 研究目的

麻疹は WHO が排除、根絶を目指す感染症で、あり、日本が所属する WHO 西太平洋地域(WPR)

では 2012 年(現在は 2012 年以降できるだけ早く)までに排除を達成する事を目指している。日本においては 2006-2008 年に 10-20 代

を中心とした麻疹の流行があったことから、2007 年末に「麻しんに関する特定感染症予防指針」を告示し、補足的麻疹風疹ワクチン接種を導入することで 10 代の感受性者を減少させるとともに、麻疹、風疹を全数届出疾病としサーベイランス体制の強化に努めた。これら施策の効果もあり、2012 年、2013 年の麻疹報告数は 300 例を下回り、またかつての流行株であった遺伝子型 D5 の麻疹ウイルスは 2010 年 5 月以降、3 年以上にわたり検出されていない。これらから日本の現状は、実質的に麻疹排除に近い状態にあると考えられている。

麻疹検査診断法には病原体検出法と血清診断法がある。それぞれに特徴があり、検出感度に優れる時期が異なる事から、その特徴を理解して麻疹の診断に利用する事が重要である。特に現在のように麻疹排除期に近づいた状況では、診断が一般により困難になる事が知られており、検査診断だけでなく臨床経過、周囲の流行状況、患者のワクチン接種歴、渡航歴等の疫学的情報も考慮した診断が求められている。これらも考慮して、平成 25 年 4 月の改訂された「麻しんに関する特定感染症予防指針」では可能な限り血清診断法と病原体検出法を併用する事を求めている。

現行の RT-PCR 法は nested PCR 法を採用している事から、手技の煩雑さ、コンタミの可能性等が問題となっている。リアルタイム PCR 法は nested PCR に匹敵する感度を持つとともに、簡便、かつ反応チューブを開ける必要がないのでコンタミの可能性が低い等の利点をもつ病原体検出法であるが、反面、機器、試薬等により結果が影響を受ける事も考えられる。また、リアルタイム PCR 法では遺伝子解析は実施しないので、遺伝子型解析のスキームも組み込んだ結果判定までのアルゴリズムの検討も必要となる。

本研究はリアルタイム PCR 法を麻疹の病原体診断法として日本に導入するにあたり、機器、試薬の影響等を検証し、様々な条件のもとでも同様な結果をえる事が可能かを検討する目的として、10 カ所の麻疹/風疹 RC の協力を得て実施した。

B. 研究方法

- 1) 感染研において試験法プロトコールを作成し、また、プライマー、プローブ、並びに参照 RNA を準備し、麻疹/風疹 RC に配布した。
- 2) 麻疹/風疹 RC では各所が通常使用している機器、試薬を使用して、配布された参照 RNA を用いて検量線の再現性を検証した。
- 3) また麻疹/風疹 RC で保存されている過去に RT-PCR 法で診断された検体をリアルタイム PCR 法で診断し、その感度、特異度を比較した。これらの結果は感染研において解析された。

倫理面への配慮

臨床材料は疫学研究における倫理指針に基づき個人情報の保護等に配慮して行われた。

C. 研究結果

1) 10 施設で行われた計 33 回の検量線解析の結果を解析した。「slope が-3.1 から-3.8 の間であること」、「 R^2 値が 0.98 以上であること」および「参照 RNA 5×10^2 コピー/反応が Ct=40 以内で検出されること」の 3 つの基準のうち、「 R^2 値が 0.98 以上であること」、「参照 RNA 5×10^2 コピー/反応が Ct=40 以内で検出されること」は全ての試験で満たしていた。「slope が-3.1 から-3.8 の間であること」も、 $32/33 = 97.0\%$ で満たしていた。以上の結果より、ほぼ全ての施設で適切な試験が安定的に実施可能であると判断された。また、プロトコールと同様の機器・試薬で試験を行った 4 施設 (12 回の検量線解析) とその他の 7 施設 (21 回の検量線解析) を比較したところ、前者の方が感度および特異度が高い可能性が示唆された (表 1、表 2、表 3)。

2) RT-PCR 法との比較

RT-PCR 法により過去に判定された合計 179 検体の評価が実施された。その内、RT-PCR 法陽性が 85 検体 (遺伝子型情報ありが 77 検体)、RT-PCR 法陰性が 94 検体で

あった。リアルタイム PCR の結果、判定保留となった検体は 24 検体あった (24/179 = 13.4%)。判定保留の多くは、陰性対照である水が陽性であった試験や、陽性対照の設定をもう一段階低濃度にするのが妥当であった試験で発生しており、試験系の再検討により改善されるものと考えられた。陰性対照である水からも検出された試験結果を除外したデータをもとに RT-PCR とリアルタイム PCR の比較解析を行った結果、リアルタイム PCR も十分に高い感度や特異度を示していた (表 4-1、表 4-2)。判定保留を陰性と判断した場合、偽陰性率が高くなることから、「判定保留の場合には、従来の nested-PCR 法等を行い、判定を行う。」とするのが妥当であると考えられた。また、判定可能であった (判定保留をのぞいた) 155 検体の内、RT-PCR の判定と一致するものが 150 検体 (150/155 = 96.8%)、不一致なものが 5 検体 (5/155 = 3.2%) であり、高い一致率を示した。不一致な 5 検体は全て、RT-PCR 陽性検体でリアルタイム PCR 陰性という結果であった。本リアルタイム PCR は RT-PCR (nested RT-PCR、特に H 遺伝子の nested RT-PCR) より感度がやや低いと思われるため、妥当な結果だと考えられる。遺伝子型の情報があつた 77 検体の中には、A、B3、D4、D5、D8、D9 および H1 型が含まれており、リアルタイム PCR 法は全ての遺伝子型で検出可能であった。(表 5)。

D. 考察

リアルタイム PCR 法の選択は、報告されている複数のリアルタイム法を感度、再現性、現在流行している遺伝子型を検出できる点等から比較検討し、上記の検討条件を満たし、かつ、WHO が標準法として推薦している米国 CDC 法を採用した。

今回、10ヶ所の麻疹/風疹 RC で通常業務で使用している機器、試薬を用いて検量線解析を実施したところ、ほとんどの試験で成立要件を満たした。また、RT-PCR 法で得診断のついた検体を用いてリアルタイム PCR 法の感度、特異度を比較したところ 93.8%、95.9% (判定保留を陽性とした場合)

であり、現行の RT-PCR 法とほぼ同等の感度、特異度を持つ試験法と考えられた(表 4-2)。

一方、陰性対照が $Ct \leq 40$ で検出される場合や、検出感度より高い濃度の陽性対照を判定規準として設定したため、試験の感度がやや下がった検査例等が存在した。陰性対照が $Ct \leq 40$ で検出される場合は試薬と機器の組み合わせにより起こった可能性が高いと推測され、今回の評価の際に各施設で用いられた試薬や機器、反応条件等の情報を共有することで、この問題は解決しようと考えられた (表 2 および表 3)。また、感度を低下させないためにできる限り低濃度のスタンダード RNA を陽性対照とするのが適当である事、またすべての試験で 5×10^1 コピー/反応が検出されている事から、試験成立要件の陽性対照濃度の範囲を現行のプロトコールの $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^0$ コピー/反応から $5 \times 10^1 \sim 5 \times 10^0$ コピー/反応に改訂すべきだと判断した。

リアルタイム PCR を用いた時の診断までのアルゴリズム(案)を図 1 に示した。今回の結果から、判定保留の検体を RT-PCR 法により再検査を行うのならば、より精度が向上すると考えられた。

F 結論

本研究で検討したリアルタイム PCR 法は検量線の再現性、検体を用いた感度、特異度の検証から十分に使用できると判断されたが、プロトコールの一部を改訂することにより高い精度で日本における麻疹検査診断法として使用できると考えられた。地衛研の麻疹検査の負担を軽減させるためにも早期に導入していきたい。一方、リアルタイム PCR 法を含めた検査診断体制を充実させるためにも精度管理の実施が必要と考えられた。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzuki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. (2013) Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. *J Virol.* 87:1105-1114.
 - 2) Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushi S, Tahara M, Nagata N, Ami Y, Mizutani T, Kurane I, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Komase K, Morikawa S, Takeda M. (2013) Canine distemper virus associated with a lethal outbreak in monkeys can readily adapt to use human receptors. *J Virol.* 87:7170-5.
 - 3) Tahara M, Ito Y, Brindley MA, Ma XM, He JL, Xu ST, Fukuhara H, Sakai K, Komase K, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K and Takeda M. (2013) Functional and structural characterization of neutralizing epitopes of measles virus hemagglutinin protein. *J Virol.* 87:666-675.
 - 4) Tahara M, Ohno S, Sakai K, Ito Y, Fukuhara H, Komase K, Brindley MA, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K, and Takeda M. (2013) The receptor-binding site of the measles virus hemagglutinin protein itself constitutes a conserved neutralizing epitope. *J Virol.* 87:3583-6.
 - 5) Nakatsu Y, Ma X, Seki F, Suzuki T, Iwasaki M, Yanagi Y, Komase K, Takeda M. (2013) Intracellular transport of the measles virus ribonucleoprotein complex is mediated by Rab11A-positive recycling endosomes and drives virus release from the apical membrane of polarized epithelial cells. *J Virol.* 87:4683-93.
 - 6) Nakayama T, Sawada A, Kubo H, Kaida A, Tanaka T, Shigemoto N, Komase K, Takeda M. (2013) Simple method to differentiate measles vaccine from wild-type strains using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Microbiol immunol.* 57:246-51.
 - 7) 染谷健二 駒瀬勝啓 竹田 誠、2012年の海外の麻疹情報、病原微生物検出情報、2013, 34 (2) ; 24-25
 - 8) 駒瀬勝啓 染谷健二 竹田 誠、日本における麻疹ウイルス流行株の変遷 2009~2012、病原微生物検出情報、2013, 34 (2) ; 36-37
 - 9) 倉田貴子 上林大起 駒野 淳 西村公志 加瀬哲男 高橋和郎 大平文人 松井陽子 伊達啓子 熊井優子 久保英幸 改田 厚 後藤 薫 長谷 篤 大阪市保健所 廣川秀徹 吉田英樹 内野清子 三好龍也 田中智之 森 嘉生 大槻紀之 坂田真史 駒瀬勝啓 竹田 誠、大阪府内における 2012 年の風疹患者発生状況、病原微生物検出情報、2013, 34 (4) ; 97-98
 - 10) 森嘉生 大槻紀之 岡本貴世子 坂田真史 駒瀬勝啓 竹田 誠、風疹ウイルスの遺伝子型別動向と検査診断マニュアル改訂、病原微生物検出情報、2013, 34 (4) ; 99-100 (2013)
 - 11) 梶山桂子 古川英臣 宮代 守 佐藤正雄 伊藤孝子 酒井由美子 植山 誠 眞野理恵子 衣笠有紀 戸川 温 高田 徹 田村和夫 駒瀬勝啓 タイからの B3 型麻疹ウイルス輸入例—福岡市、病原微生物検出情報、2013, 34 (7) ; 201-202
 - 12) 岡本貴世子、森嘉生、落合雅樹、庵原俊昭、大槻紀之、海野幸子、竹田誠、駒瀬勝啓 抗風疹 IgG 国内標準品の作製、および ELISA 法による IgG 抗体価 (国際単位) と HI 抗体価の相関性の解析 臨床化学、2013, 42; 146-150
 - 13) 山岸拓也、伊東宏明、八幡裕一郎、中島一敏、松井珠乃、高橋琢理、木下一美、砂川富正、奥野英雄、多屋馨子、大石和徳、駒瀬勝啓、三崎貴子、丸山絢、大島孝弘、清水英明、岩瀬耕一、岡部信彦、小泉祐子、平岡真理子、瀬戸成子、杉本徳子、荷見奈緒美、熊谷行広、大塚吾郎、杉下由行、甲賀健司、鈴木理恵子、亜南弥生子、舟久保麻理子、弘光明子、松本要、阿部勇治、氏家無限 潜在的な疫学リンクが疑われた D8 型ウイルスによる麻疹広域散发事例、病原微生物検出情報、2013、(速報)
2. 学会発表
 - 1) 駒瀬勝啓、竹田誠、庵原俊昭、皆川洋子、安井善宏、山下照夫、改田厚、秋吉京子 麻疹ウイルス流行株の推移とウイルス鑑別方法の検討、第 54 回日本臨床ウイルス学会、

- 倉敷、2013年6月8日～9日
- 2) 酒井宏治、關文緒、網康至、染谷健二、田原舞乃、大槻紀之、西条政幸、森川茂、山口良二、駒瀬勝啓、竹田誠、犬ジステンパーウイルスのヒト SLAM 利用応獲得に必要な変異、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 10 日～12 日
- 3) 田原舞乃、酒井宏治、駒瀬勝啓、前仲勝実、竹田誠、受容体結合領域を含む複数の主要エピトープを変化させた麻疹ウイルスの解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 10 日～12 日
- 4) 池野翔太、鈴木基臣、寺原和孝、石毛真行、駒瀬勝啓、竹田誠、森川裕子、中山哲夫、柳雄介、竹山春子、横田恭子、ヒト化マウスの麻疹ウイルスベクター評価系の応用、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 10 日～12 日
- 5) 内野清子、三好龍也、岡山文香、芝田有理、田中智之、森嘉生、駒瀬勝啓、竹田誠、堺市における風疹の流行状況と検査結果の解析、評価、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 10 日～12 日
- 6) 竹田誠、田原舞乃、駒瀬勝啓、麻疹ウイルスの抗原性の安定性は強固に保証されているか 第 17 回日本ワクチン学会、津、2013 年 11 月 30 日～12 月 1 日
- 7) Katsuhiko Komase, Makoto Takeda, Progress towards measles elimination after introduction of supplementary immunization in Japan, Sitges, Spain 7th Vaccine & ISV congress, 2013 年 10 月 27 日～29 日
3. その他
- 1) シンポジウム 駒瀬勝啓、麻疹の状況と検査診断について、衛生微生物技術協議会第 34 回研究会 名古屋 2013 年 7 月 11 日～12 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
2. その他 なし

表 1. 試験法の違いによる試験の感度と特異度の比較

	手順書と同じ 4 施設	その他の 7 施設
5 コピーが検出不可 (Ct>40)	0/12=0%	9/21=42.9%
水でも検出 (Ct<40)	0/12=0%	4/21=19%
0.5 コピー以下が検出可能 (Ct<40)	1/12=8.3%	9/21=42.9%

表 2 良好な結果が得られた機器と試薬の組み合わせ

機器	試薬
ABI 7500 (または ABI 7500 Fast)	TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix
ABI 7500 (または ABI 7500 Fast)	QuantiTect Probe RT-PCR kit
ABI 7500 Fast	One step PrimeScript RT-PCR kit (Perfect Real Time)
Roche LightCycler 480 system II	TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix
ABI stepOne Plus	QuantiTect Probe RT-PCR kit

表 3 問題がある可能性が考えられた機器と試薬の組み合わせ

機器	試薬
Roche LightCycler 480	QuantiTect Probe RT-PCR kit
ABI stepOne Plus	TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix

表 4-1. RT-PCR とリアルタイム PCR の比較解析

		Real-time PCR			
		陽性	判定保留	陰性	
				Ct > 40	反応せず
cPCR	陽性	54	7	1	3
	陰性	0	3	0	71

表 4-2. RT-PCR とリアルタイム PCR の感度と特異度

	判定保留を	
	陰性を含む	陽性を含む
感度	83.1%	93.8%
特異度	100%	95.9%

表 5. 遺伝子型別のリアルタイム PCR の判定結果 (括弧内は%)

	A	B3	D4	D5	D8	D9	H1	合計
cPCR 陽性	10	3	3	20	25	11	5	77
Real-time 陽性	6 (60)	1 (33.3)	2 (66.7)	20 (100)	21 (84)	9 (81.8)	4 (80)	63 (81.8)

Real-time 判定保留	2 (20)	2 (66.7)	0 (0)	0 (0)	3 (12)	2 (18.2)	0 (0)	9 (11.7)
Real-time 陰性	2 (20)	0 (0)	1 (33.3)	0 (0)	1 (4)	0 (0)	1 (20)	5 (6.5)

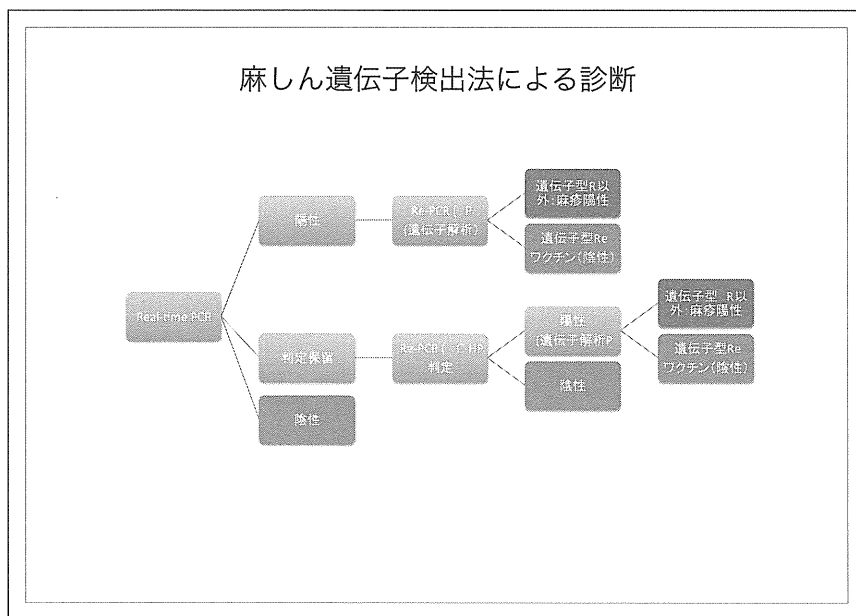


図 1 麻疹遺伝子検出法の診断アルゴリズム (案)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興再興感染症研究事業）

分担研究報告書

「麻疹ならびに風疹排除およびその維持を科学的にサポートするための
実験室検査に関する研究」

分担研究報告書

「麻疹、風疹の検査診断に関する研究」

研究分担者 駒瀬 勝啓	国立感染症研究所ウイルス第3部
研究協力者	
三好正浩、駒込理佳、長野秀樹、岡野素彦	北海道立衛生研究所
大西麻美、伊藤はるみ	札幌市衛生研究所
青木洋子	山形県衛生研究所
小川知子、堀田千恵美、平良雅克、仁和岳史、小倉惇	千葉県衛生研究所
渡邊美樹	茨城県衛生研究所
水越文徳	栃木県保健環境センター
長島史子	宇都宮市衛生環境試験所
塚越博之	群馬県衛生環境研究所
小川泰卓	埼玉県衛生研究所
大泉佐奈江	さいたま市健康科学研究センター
横井 一	千葉市環境保健研究所
長谷川道弥、林志直、甲斐明美、住友眞佐美	東京都健康安全研究センター
七種美和子、小澤広規、熊崎真琴、川上千春、宇宿秀三、高井麻美、畔上栄治、上原早苗、 船山和志、森田昌弘	横浜市衛生研究所
小野範子、一村美恵子、高木大輔、鈴木祐子、羽布津昌子、岩田眞美	横浜市健康福祉局健康安全部
鈴木理恵子	神奈川県衛生研究所
清水英明	川崎市衛生研究所
山口純子	横須賀市健康安全科学センター
望月響子	相模原市衛生研究所
大沼正行	山梨県衛生公害研究所
内山友里恵	長野県環境保全研究所
池ヶ谷朝香	静岡県環境衛生科学研究所
柴原乃奈	静岡市環境保健研究所
神保達也	浜松市保健環境研究所
児玉洋江、成相 絵里、崎川曜子	石川県保健環境センター
堀本栄詞	富山県衛生研究所
小和田和誠	福井県衛生環境研究センター
皆川洋子、安井善宏、小林慎一、平松礼司、小栗信、広瀬かおる、山下照夫	愛知県衛生研究所
加瀬哲男、倉田貴子、上林大起、駒野淳	大阪府立公衆衛生研究所
村田祥子、國吉香織、岡本(中川)玲子、戸田昌一、富田正章、調恒明	

濱崎光宏、石橋哲也	山口県環境保健センター
古川英臣	福岡県保健環境研究所
坂田和歌子	福岡市保健環境研究所
安藤克幸	北九州市環境科学研究
吾郷昌信	佐賀県衛生薬業センター
島崎裕子	長崎県環境保健研究センター
清田直子	長崎市保健環境試験所
門口真由美	熊本県保健環境科学研究所
加藤聖紀	熊本市環境総合センター
三浦美穂	大分県衛生環境研究センター
濱田結花	宮崎県衛生環境研究所
加藤峰史、仁平稔、新垣絵里、高良武俊、岡野祥、喜屋武向子、久高潤	鹿児島県環境保健センター
平良勝也	沖縄県衛生環境研究所
田中智之、内野清子、三好龍也、岡山文香、芝田有理、吉田永祥、沼田富三	沖縄県健康増進課
中津祐一郎、染谷健二、關文緒、田原舞乃、酒井宏治	堺市衛生研究所
	国立感染症研究所ウイルス第3部

研究要旨

2012年に世界保健機関(WHO)が設定した「Measles & Rubella strategic plan 2012-2020」では、2020年までにWHO 6地域のうち、5つの地域から麻疹とともに風疹の排除を達成する事を目標としている。WHOの麻疹排除の定義は「質の高いサーベイランス体制の下で12ヶ月間以上、その地域で流行していた麻疹ウイルスによる感染の伝播がない事」としており「質の高いサーベイランス」の要件の一つとして、WHOにより適格性認定を受けたNational Laboratory (NL:日本においては国立感染症研究所)、あるいはNLにより精度管理された施設による検査診断に基づいたサーベイランス体制を求めている。本小班では、WHOの要件に満たすサーベイランス体制の確立をめざし、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診断体制を構築し、かつそれを効率的に運営できる環境をつくることを目的としている。また、検査によってえられたデータ、経験から、より正確に麻疹を診断するための情報を収集、共有する事も目的としている。本年の成果は以下である。

- 1) 2013年において本研究班で把握された地方衛生研究所で実施されたPCRによる麻疹、並びに風疹の検査症例数はそれぞれ2200症例、2700症例を超えていた(一部の地衛研の情報は含まれていない)。麻疹の検査症例数は2012年の検査症例数よりおよそ400症例増加した。また風疹の検査数は風疹の流行を反映して検査数は大幅に増大した(2012年の具体的データなし)。
- 2) 麻疹検査症例のうち、RT-PCR法で麻疹ゲノムが検出された症例は55症例(遺伝子型A、未確定(NT; Not Typedを含む))であった。検出された遺伝子はH1, D9, D8, B3であり特に遺伝子型B3の検出数が多かった。愛知県ではB3ウイルスによる集団発生が8-9月、12月にあった。その他の多くは孤発例であった。
- 3) 風疹検査症例のうち951症例が風疹RT-PCR陽性であった。検出されたウイルスの遺伝子

型は2Bが主流であり、1Eがそれに次いだ。また、遺伝子型の決定が困難だった症例や解析されなかった症例もあった。2013年には14,000例以上の風疹症例が報告されたがそれに比べると地衛研での検査診断数は少なかった。これは風疹の検査診断に対する国からの指示、補助等が明確でなかったため、自治体において風疹の検査診断を引き受けるのに消極的であった事も理由の一つであると考えられた。

- 4) CRS, CRI の検査は北関東ブロックで36例、南関東・甲信静ブロックで3例、愛知県で2例実施され、それぞれ19例、1例、1例からPCR法でウイルスが検出された。また、CRS症例において8ヶ月間にわたり咽頭拭い液、血液、尿からウイルスが検出されたケースがあった。
- 5) 風疹PCR陽性症例において、発疹出現後3日間のIgM抗体陽性率はおよそ40-70%であり、IgM抗体検査の結果の解釈には病日を考慮する必要がある事が明らかになった。また、デンカ生研の風疹IgM抗体キットは麻疹症例、デング症例、伝染性紅斑症例の血清と交差反応しなかった。風疹IgG抗体陽性者にも風疹罹患者がいたことから、風疹は再感染がある可能性が考えられた。
- 6) 麻疹PCR陰性例から、風疹ウイルス、パルボウイルスB19、HHPV6、HHPV7、コックサッキーウイルス9型、エンテロウイルス等が検出された。これらの診断は麻疹症例の否定に有用であった。
- 7) 感染研と10ヶ所の麻疹・風疹レファレンスセンターで麻疹ウイルスN遺伝子を標的とした、米国CDCが確立したリアルタイムPCR法を評価した。検量線の再現性、現行のRT-PCR法と感度、特異度を比較した結果から麻疹検査診断法として使用できると判断した。また、東京都では独自にH遺伝子を標的としたリアルタイムPCR法を確立し、現行のRT-PCRと同等の感度、特異度を持つ事を示した。愛知県では麻疹、風疹のRT-PCRを同時にできる方法を確立し、検査診断の効率化した。
- 8) 沖縄県においては2012年にWHOの求める排除の要件に照らして麻疹排除状態にあるとした。2013年もすべての麻疹疑い症例が検査診断された上で、麻疹症例の報告がない事から麻疹排除状態が維持されていると考えられた。

A. 研究目的

WHOでは麻疹の排除を「優れたサーベイランス体制が整った下で、常在性の麻疹ウイルスによる麻疹症例が12ヶ月間以上ない事」と定義し、サーベイランスの質を示す指標を示している。日本ではこれに対応するために「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り、さらに平成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。さらに平成25年4月1日より改訂された「麻疹に関する特

定感染症予防指針」では、地方衛生研究所において全例のウイルス遺伝子解析の実施を求めている。本研究は医療機関、保健所、地方衛生研究所、感染研を結んだネットワークを構築し、さらにPCR法を中心とした検査技術を標準化し、効率的で精度の高い麻疹検査診断サーベイランス体制を確立する事を目的としている。また得られる情報からより麻疹、風疹の検査診断法を検討する事も目的としている。

B. 研究方法

- 1) 各地区または検査状況をアンケート等で麻疹、風疹の検査状況を把握し解析する。
- 2) 病原体検出マニュアル等に沿って依頼検

体から麻疹、風疹の RT-PCR 法、ウイルス分離法、IgM 抗体測定等の検査を実施し、麻疹あるいは風疹の診断を行う。また、ウイルス遺伝子が検出された場合、塩基配列を決定して系統樹解析を行い、遺伝子型を決定する。検査陽性例の場合、疫学的調査を行いウイルスの伝搬の経路を調査する。

- 3) 陰性症例によっては、麻疹と混同しやすい発熱、発疹性疾患の検査を実施する。
- 4) 咽頭拭い液、血液、尿の 3 種の検体採取までの病日を調査し、検査に則した検体が確保されているか評価する。
- 5) リアルタイム PCR 法等の麻疹ウイルス、風疹ウイルスの新たな精度の高い、効率の良い遺伝子診断法を検討、評価する。
- 6) 地域における麻疹排除の進捗を確認するために WHO の麻疹排除基準に基づき排除の達成の状況を検討する。

倫理面への配慮

臨床材料は疫学研究における倫理指針に基づき個人情報の保護等に配慮して行われた。

C. 研究結果

- 1) 2013 年に本研究班で確認された地方衛生研究所で実施された麻疹検査症例数はおおよそ 2200 症例であった。うち、RT-PCR 検査陽性症例は 74 症例であった (表 1)。検出されたウイルスは遺伝子型 D8、D9、H1、B3 型並びにワクチン株由来である A 型であり、2006～2008 年の流行株の主流であり現在の日本の定着株を考えられている D5 型 (バンコクタイプ) は検出されていない。2013 年に初めて日本で検出された B3 型ウイルスがもっとも高い頻度で検出された。多くはフィリピンでのアウトブレイクと関連していた。愛知県等で集団発生も見られたが、その他の検出例の多くは孤発例であり 2 次感染等の拡大がないケースが多かった。
- 2) 2013 年に本研究班で確認された地方衛生研究所で実施された風疹の検査症例数はおおよそ 2700 症例であった。うち、RT-PCR

検査陽性症例は 1248 症例であった (表 1)。検出されたウイルスは遺伝子型 2B, 1E, 1j 型並びにワクチン株由来である 1a 型であった。一方、遺伝子型解析が行われていない症例や解析困難なケースもあり、not typed とされた症例も多かった。

- 3) 風疹の流行に伴い、CRS, CRI の検査依頼も北関東ブロックで 36 例、南関東・甲信静ブロックで 3 例、愛知県で 2 例あった。それぞれ 19 例、1 例、1 例から PCR 法でウイルス (遺伝子) が検出された (表 2)。また、CRS 症例においては長期のウイルスの排出が知られている。一例でそのフォローアップを実施したところ。8ヶ月間にわたり咽頭拭い液、血液、尿からウイルスが検出された。
- 4) デンカ生研の風疹 IgM 抗体検出キットを用いての風疹患者の発疹出現後の病日と IgM 抗体の検出頻度を検討したところ、発症後 3 病日以内では IgM 抗体の検出率は 40-70%であった。IgM 抗体による診断は検体採取日に留意する必要がある。また、麻疹、デング患者血清とは交叉反応はしなかった。風疹 IgG 抗体陽性者からも風疹ウイルスが検出された例があり、風疹の再感染の可能性が示された。
- 5) 麻疹 PCR 陰性例から、風疹ウイルス、パルボウイルス B19、HHPV6、HHPV7、コックスサッキーウイルス 9 型、エンテロウイルス等が検出された等が検出された。これらの鑑別診断は麻疹症例の否定に有用であった。
- 6) 感染研、麻疹、風疹レファレンスセンターでリアルタイム PCR 法の評価を実施した。各研究所で実施した検量線解析の結果、ほとんどの試験で検査の 3 つ成立基準である「slope が -3.1 から -3.8 の間であること」、「R² 値が 0.98 以上であること」、「参照 RNA 5×10² コピー/反応が Ct=40 以内で検出されること」を満たし、様々な機器、試薬の組み合わせで提示した米国 CDC で開発されたリアルタイム法が可能である事が示された。また、RT-PCR 法で過去に診断された検体を用いてリアルタイム

PCR法の感度、特異度を検討したところ93.8%、95.9%（判定保留と陽性とした場合）であり、現行のRT-PCR法とほぼ同等の精度を持つと考えられた。また、東京都で確立したH遺伝子を標的としたリアルタイムPCR法も現行RT-PCR法(N遺伝子法)より高い感度、同等の特異度を示した。愛知県ではブロックごとに異なる温度設定が可能なサーマルサイクラーを利用して麻疹PCR、風疹PCRを同時に実施する方法を開発し、検査の効率化が可能な事を示した。

- 7) 沖縄県では2012年に、WHOが示すサーベイランスの指標に照らして、沖縄県が麻疹排除状態にある事を示した。2013年も麻疹疑い例39例すべてを検査診断した上で麻疹症例が0であった事から麻疹排除状態を維持していると判断した。

D. 考察

2013年に地方衛生研究所で実施された麻疹検査数は本研究班で把握されただけでも2200症例以上あり昨年度とほぼ同等の検査数であった。またPCR陽性数は74検体であり、2013年の麻疹報告症例数のおよそ1/3であった。また麻疹報告症例数のおよそ1/4が臨床診断、およそ5/12がPCR検査以外の検査診断である。平成25年4月に改訂された「麻疹に関する特定感染症予防指針」では麻疹IgMの測定を実施するとともにPCRのための検体を地衛研に提出するよう求めていたが、地方衛生研究所で実施された検査数は昨年とほぼ同等であり、改訂された「特定感染症予防指針」がまだ十分に医師、自治体等に浸透していない事も考えられた。一方、排除期に近い状態にある麻疹では診断の陽性的中率が下がっている。その状態で臨床診断による麻疹や、偽陽性が出現する確立の高かったIgM検査による(2012年12月より改良されたが)麻疹が本当に麻疹なのかは今後、丁寧に検証していく必要もあろう。地衛研で実施されるPCR法を中心とした病原体検査は重要であることから現場の業務を支えるための人材、予算の行政面からのサポートは今後必要であ

る。

本研究班で把握された風疹のPCR検査数は約2700であり、風疹の流行に反映して検査数は増加した(過去の情報は無い)。一方、風疹のPCR検査を地方衛生研究所で実施する事が、公式に国からは求められておらず、また、予算措置もされていないことから、検査の実施に消極的な自治体もあった。2014年4月に公布される予定の「風しんに関する特定感染症予防指針」によって、風疹検査体制も整備されていくことが期待される。

2013年に検出された麻疹ウイルス株は海外から由来していると思われる遺伝子型D8、D9、H1、B3型ウイルスであった。特にフィリピンのアウトブレイクに関連したB3型ウイルスの検出は2014年においても継続している。これらのウイルスが1年間以上、継続して検出されれば、新たな定着株、流行株とされ、麻疹排除の定義から外れることになる。昨年度、本研究班で遺伝子型決定部位の解析だけでは、由来する場所や侵入の時期が異なったウイルスでも遺伝子配列が同一である可能性が示し、またより長い遺伝子の比較でも鑑別できない可能性を示した。ウイルス学的解析とともに、疫学調査を充実させ、丁寧に伝播ルートを解析していく事が麻疹排除達成に必要なようになってくるだろう。また、そのためにはウイルスのより詳細な解析を可能にするウイルス分離も重要になる。また今後も高いワクチン接種率を維持していく事はさらに重要である。

風疹が成人男子を中心に流行したことから、地方衛生研究所における検査数が増大した。検査の負担を減少させるためにもリアルタイムPCRの導入が急がれる。麻疹におけるリアルタイムPCRの使用の目処がついたので早期に導入をはかって行く予定である。

2012年に沖縄県は他にさきがけて麻疹ゼロ宣言を行った。2013年も高いサーベイランスの質を維持したなかで麻疹症例が0であり、排除状態が継続していると考えられた。今後も“ゼロ状態”を維持していくことが期待される。また、他の自治体から同様の動きが続くことも期待される。

E. 結論

2013年の麻疹報告数は232例と昨年につづき300症例を下回った。一般に感染症の流行が減少すると診断は困難になる事が知られており、検査診断は益々重要になる。今後はリアルタイムPCR法の導入等の効率的な検査法の導入をすすめていくとともに、検査の精度管理等の検討をすすめて、より正確な麻疹症例数の把握やサーベイランス体制を向上させていくことが麻疹排除の達成、維持に必要であろう。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyoshi M, Komagome R, Ishida S, Kikuchi M, Sato H, Ito H, Nagano H, Okano M. Recent progress toward measles elimination in Hokkaido, Japan, during 2011 to 2012. *Japanese Journal of Infectious Diseases* (in press)
- 2) Aoki Y., Mizuta K., et. al. : Isolation of Vaccine-Derived Measles Viruses from Children with Acute Respiratory Infection: Tohoku *J. Exp Med.*, 2013, 230, 111-115
- 3)
- 4) Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzuki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. (2013) Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. *J Virol.* 87:1105-1114.
- 5) Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushi S, Tahara M, Nagata N, Ami Y, Mizutani T, Kurane I, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Komase K, Morikawa S, Takeda M. (2013) Canine distemper virus associated with a lethal outbreak in monkeys can readily adapt to use human receptors. *J Virol.* 87:7170-5.
- 6) Tahara M, Ito Y, Brindley MA, Ma XM, He JL, Xu ST, Fukuhara H, Sakai K, Komase K, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K and Takeda M. (2013) Functional and structural characterization of neutralizing epitopes of measles virus hemagglutinin protein. *J Virol.* 87:666-675.
- 7) Tahara M, Ohno S, Sakai K, Ito Y, Fukuhara H, Komase K, Brindley MA, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K, and Takeda M. (2013) The receptor-binding site of the measles virus hemagglutinin protein itself constitutes a conserved neutralizing epitope. *J Virol.* 87:3583-6.
- 8) Nakatsu Y, Ma X, Seki F, Suzuki T, Iwasaki M, Yanagi Y, Komase K, Takeda M. (2013) Intracellular transport of the measles virus ribonucleoprotein complex is mediated by Rab11A-positive recycling endosomes and drives virus release from the apical membrane of polarized epithelial cells. *J Virol.* 87:4683-93.
- 9) Nakayama T, Sawada A, Kubo H, Kaida A, Tanaka T, Shigemoto N, Komase K, Takeda M. (2013) Simple method to differentiate measles vaccine from wild-type strains using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Microbiol immunol.* 57:246-51.
- 10) 安井善宏、伊藤雅、安達啓一、尾内彩乃、中村範子、小林慎一、山下照夫、皆川洋子、氏木里衣子、山下敬介、伴友輪、鈴木英子、福永玲奈、飯田篤、吉兼美智枝、成瀬善巳、服部悟、土屋啓三、深瀬文昭、望月真吾、片岡泉、大鷲雄二、片岡博喜：渡航歴の無い麻疹集団発生からの B3 型麻疹ウイルス検出－愛知県、病原微生物検出情報 34(11):345-346, 2013.
- 11) 染谷健二 駒瀬勝啓 竹田 誠、2012年の海外の麻疹情報、病原微生物検出情報、2013, 34 (2) ; 24-25
- 12) 駒瀬勝啓 染谷健二 竹田 誠、日本における麻疹ウイルス流行株の変遷

- 2009～2012、病原微生物検出情報, 2013, 34 (2) ; 36-37
- 13) 倉田貴子 上林大起 駒野 淳 西村公志 加瀬哲男 高橋和郎 大平文人 松井陽子 伊達啓子 熊井優子 久保英幸 改田 厚 後藤 薫 長谷 篤 大阪市保健所 廣川秀徹 吉田英樹 内野清子 三好龍也 田中智之 森 嘉生 大槻紀之 坂田真史 駒瀬勝啓 竹田誠、大阪府内における2012年の風疹患者発生状況、病原微生物検出情報、2013, 34 (4) ; 97-98
 - 14) 森嘉生 大槻紀之 岡本貴世子 坂田真史 駒瀬勝啓 竹田 誠、風疹ウイルスの遺伝子型別動向と検査診断マニュアル改訂、病原微生物検出情報、2013, 34 (4) ; 99-100 (2013)
 - 15) 梶山桂子 古川英臣 宮代 守 佐藤正雄 伊藤孝子 酒井由美子 植山 誠 眞野理恵子 衣笠有紀 戸川 温 高田 徹 田村和夫 駒瀬勝啓 タイからのB3型麻疹ウイルス輸入例—福岡市、病原微生物検出情報、2013, 34 (7) ; 201-202
 - 16) 岡本貴世子、森嘉生、落合雅樹、庵原俊昭、大槻紀之、海野幸子、竹田誠、駒瀬勝啓 抗風疹 IgG 国内標準品の作製、およびELISA法によるIgG抗体価(国際単位)とHI抗体価の相関性の解析 臨床化学、2013, 42; 146-150
2. 学会発表
- 1) 児玉洋江、成相絵里：麻疹を疑う症例からの風疹ウイルス遺伝子検出事例について、第41回北陸公衆衛生学会(富山県)、2013年11月
 - 2) 児玉洋江、成相絵里、崎川曜子：北陸地区麻疹・風疹レファレンスセンター報告、地方衛生研究所全国協議会東海北陸支部微生物部会(富山県)、2014年3月
 - 3) 安井善宏、小林慎一、山下照夫、皆川洋子：発疹症検体における麻疹・風疹ウイルス遺伝子同時検査の試み、第54回日本臨床ウイルス学会学術集会、2013年6月8-9日、倉敷市
 - 4) 皆川洋子：平成25年度東海地区麻疹・風疹レファレンスセンター報告、平成25年度地方衛生研究所全国協議会東海・北陸支部微生物部会、高岡市
 - 5) 内野清子、三好龍也、岡山文香、芝田有理、田中智之、森嘉生、駒瀬勝啓、竹田誠、堺市における風疹の流行状況と検査結果の解析、評価、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月10日～12日
 - 6) 駒瀬勝啓、竹田誠、庵原俊昭、皆川洋子、安井善宏、山下照夫、改田厚、秋吉京子 麻疹ウイルス流行株の推移とウイルス鑑別方法の検討、第54回日本臨床ウイルス学会、倉敷、2013年6月8日～9日
 - 7) 酒井宏治、關文緒、網康至、染谷健二、田原舞乃、大槻紀之、西条政幸、森川茂、山口良二、駒瀬勝啓、竹田誠、犬ジステンパーウイルスのヒトSLAM利用応獲得に必要な変異、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月10日～12日
 - 8) 田原舞乃、酒井宏治、駒瀬勝啓、前仲勝実、竹田誠、受容体結合領域を含む複数の主要エピトープを変化させた麻疹ウイルスの解析、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月10日～12日
 - 9) 池野翔太、鈴木基臣、寺原和孝、石毛真行、駒瀬勝啓、竹田誠、森川裕子、中山哲夫、柳雄介、竹山春子、横田恭子、ヒト化マウスの麻疹ウイルスベクター評価系の応用、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月10日～12日
 - 10) 竹田誠、田原舞乃、駒瀬勝啓、麻疹ウイルスの抗原性の安定性は強固に保証されているか 第17回日本ワクチン学会、津、2013年11月30日～12月1日
 - 11) Katsuhiko Komase, Makoto Takeda, Progress towards measles elimination after introduction of supplementary immunization in Japan, Sitges, Spain 7th Vaccine & ISV congress, 2013年10月27日～29日
3. その他
- 1) ウェブページからの情報提供
麻疹患者調査事業における麻疹患者報告状況(2013年)(2014年)
http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/2f/msl/msl_8.html

- http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/2f/msl/msl_2014.html（政令市を含む愛知県内医療機関から届出の翌開庁日中に掲載・更新
- 2) マスメディアへの情報提供・愛知県における風疹の流行状況、予防接種、ウイルスとPM2.5の比較について
 - 3) 名古屋テレビ「ドデスカ！」クエスチョン枠内、2013年4月1日放送
 - 4) 「東海にも風疹じわり」中日新聞、2013年4月5日付朝刊
 - 5) 風疹の流行状況、予防法等について、東海テレビ放送 スーパーニュース枠内、2013年4月8日放送
 - 6) 風疹の流行状況、予防接種対象等について、
- CBC中部日本放送 「イッポウ！」枠内、2013年4月10日放送
- 7) 風疹の流行状況、予防接種助成について、NHK名古屋報道部、2013年5月30日放送
 - 8) シンポジウム 駒瀬勝啓、麻疹の状況と検査診断について、衛生微生物技術協議会第34回研究会 名古屋 2013年7月11日～12日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
 2. その他 なし

表1 地方衛生研究所で実施された麻疹、風疹の検査

ブロック・県	麻疹				風疹			
	検査症例数	陽性数	遺伝子型(検出数)	報告症例数	検査症例数	陽性数	遺伝子型(検出数)	報告症例数
北海道	73	0		2	73	36	2B (32) NT (4)	109
東北・新潟	76	0		1	71	31	2B (21) 1E (4) NT(6)	209
北関東	1122	12	D8, D9, B3, A	117*	1108	411	2B, 1E, 1a	4968*
南関東・甲信静	226	7	D8 (3) B3 (2) A (2)	41*	226	98	2B, 1E	1866*
北陸	16	0		0	6	3	2B, NT	64
愛知県	103	19	H1(2), D9(2), B3(14), NT(1)	25	103	22	2B (18) 1E (1) NT(3)	375
近畿#	411	19	B3(3), D8(8), H1(3), A(3)	49	372	262	2B(219), 1E(24), 1j(17), NT(17)	4351*
中・四国	79	10	B3 (6), D8(1), A (3)	9	148	52	2B(18), 1E (1), NT(33)	342
九州	87	7	B3 (5), D9(1), A (1)	3*	29	7	2B, NT	876
沖縄	39	0		0	102	29	2B(28)	52*
合計	2232	74	B3, D8, D9, H1, A, NT	247	2738	1248	2B, 1E, 1j, 1a, NT	13212

* 各ブロックにおける報告麻疹症例数、感染症発生動向調査より引用

京都市を除く

NT: not typed

表2. 地方衛生研究所で実施されたCRS, CRIの検査

ブロック、県	検査症例数	陽性数
北関東	36	19
南関東、甲信静	3	1
愛知県	2	1

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「麻疹ならびに風疹排除およびその維持を科学的にサポートするための実験室検査に関する
研究」

(H25-新興-一般-010)

分担研究報告書

発疹性疾患の鑑別実験診断法に関する研究

研究分担者： 氏名 森 嘉生 所属 国立感染症研究所ウイルス第三部第二室

要旨

世界的に麻疹だけではなく風疹についても排除の動きが活発化してきている。日本においては2013年に風疹の大規模流行が発生し、1999年以降最大の先天性風疹症候群の患者発生報告があった。麻疹および風疹排除に向けて両疾患の発生状況を正確に把握するためには、臨床症状、疫学的状況の解析、血清学的検査の他に、ウイルス学的実験室検査が重要である。本研究では簡便、迅速かつコンタミネーションの危険性の低いと考えられる風疹ウイルス検出 Real-time RT-PCR 法の導入を目指し、全国10カ所の麻疹風疹リファレンスセンターの協力の下、本法の評価を行った。臨床検体を用いた検討ではコンベンショナル RT-nested PCR で陽性となった75%の検体のみで本法は陽性と判定されず感度が低いことが示された。しかし、簡便性、迅速性、実験室コンタミネーションの危険性回避の観点から考えるとその導入は有益であると考えられる。

および遺伝子型決定用 RT-PCR 法について、使用する試薬および参照 RNA の至適濃度の検討を行った。その結果、これらの RT-PCR において、麻疹検査マニュアル記載の試薬を使用した方法が高感度検出に適していることが明らかとなった。また、参照 RNA は1000コピー/5 μ L で使用するのが適当であることが示された。加えて既報の風疹ウイルス遺伝子検出 Real-time RT-PCR について、すべての遺伝子型の参照ウイルス株を検出可能であることを明らかにした。本研究により RT-PCR 法を用いた風疹遺伝子検査法について整備を行うことができた。今後は Real-time RT-PCR 法についても検査への応用を進めていく必要がある。

研究分担者： 森 嘉生・国立感染症研究所ウイルス第三部第二室室長

A. 研究目的

麻疹については世界的な排除計画が進められているが、Measles and Rubella initiative が発表した 2012-2020 年の行動計画においては、風疹に対しても 2020 年までに WHO 6 地域のうち 5 地域で排除を達成することを目標に掲げている。WHO 西太平洋地域では、風疹の排除目標年は具体的には定められていないが、風疹制御促進と先天性風疹症候群の予防が進められている。

日本において風疹が 2008 年に全数把握疾患に指定されて以降、患者報告数は年々減少していたが(2008 年 283 例、2009 年 147 例、2010 年 87 例)、2011 年より再び上昇に転じ、2013 年には 14,357 件の風疹患者が報告される大きな流行となった。それに伴い、同年の先天性風疹症候群の報告数は 32 件と 1999 年に先天性風疹症候群の全数把握が始まって以来最大の発生となった。

麻疹および風疹の確実な診断のためには、臨床症状、疫学的状況の解析、血清学的検査の他に、ウイルス学的実験室検査が重要である。これまでに風疹においては高感度な RT-nested PCR 法を開発し、病原体検出マニュアルに掲載することで広く普及を図ってきた。しかしながら RT-nested PCR 法は比較的手技が煩雑であること、コンタミネーションの危険性が高いことが問題点としてあげられている。そこで我々はこれまでに手技が簡便でコンタミネーションの危険性の低い Real-time RT-PCR 法についても開発を行ってきた。本研究では全国 10 カ所の麻疹風疹リファレンスセンターの協力のもと風疹 Real-time RT-PCR 法の評価を行った。

さらに近年の日本の風疹ウイルス流行株について分子疫学的な解析をおこなった。

B. 研究方法

<風疹ウイルス遺伝子検出 Real-time RT-PCR の評価>

全国 10 カ所の麻疹風疹リファレンスセンターに Real-time RT-PCR プライマーおよびプローブを配布し、段階希釈した参照 RNA を用いて、系がうまく機能するか、さらに検出感度について評価した。

加えて、各施設で現行のコンベンショナル RT-nested PCR によってすでに風疹ウイルス遺伝子陽性および陰性と判定されている各 10 検体を用いて、現行のコンベンショナル RT-nested PCR 法との比較解析を行った。

<日本における風疹ウイルス流行株の分子疫学的解析>

近年、本研究室で遺伝子解析された株および DDBJ 等の遺伝子データベースに登録された日本の風疹ウイルス株について系統樹解析を行い、流行株の傾向を検討した。遺伝子解析には E1 遺伝子領域内の遺伝子型決定領域 739bps を用いた。

C. 研究結果

<参照 RNA を用いての風疹ウイルス遺伝子検出 Real-time RT-PCR の検討>

麻疹風疹リファレンスセンター10カ所より回答を回収した。本検討においては、検出機器が6種類、使用試薬は3種類が使用された段階希釈した参照 RNA を各施設において3回の測定を実施して頂いた(試験数 n=33)。参照 RNA の検出限界コピー数までの希釈段階の測定結果(試験数 n=33)から作成された検量線の slope は、平均-3.431±0.222 であり、

理想的な PCR 反応で得られる slope -3.32 と同等であった。検量線の R^2 値の平均は 0.994 ± 0.005 であり、基準となる 0.98 を十分に満たしていた。Ct 値 40 以下で検出された最大希釈液の濃度を検出限界コピー数として集計したところ、5-500 コピー／反応の範囲であった (図 1)。そのうち、5 コピー／反応が 33 試験中 24 件と最多であった。

施設 C では ABI Taqman Fast Virus 1-step master mix と QIAGEN QuantiTect Probe RT-PCR kit を使用して感度の比較が行われたが、両者で感度の差は認められていない。施設 A でも 4 種類の試薬 (上記 ABI と QIAGEN キットに加え、Invitrogen 社 SuperScript III platinum One-step Quantitative RT-PCR system および Roche 社 LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes) を使用して比較が行われたが、感度の差はなかったとの報告を頂いた。全施設の集計結果においても使用試薬による明らかな感度の差は認められなかった。

<臨床検体を用いての風疹ウイルス遺伝子検出 Real-time RT-PCR の検討>

臨床検体を用いて検討した結果を以下の基準案で判定し、コンベンショナル RT-nested PCR (NS 領域増幅 RT-nested PCR) において得られた結果と比較した。

「検体の Ct 値が陽性コントロールの Ct 値以下の場合に「陽性」、陽性コントロールの Ct 値より大きく且つ Ct 値が 40 以下の場合に「判定保留」、Ct 値が 40 より大きい場合に「陰性」と判断する。」

この基準に従うと陽性コントロールの設定によって、「判定保留」の出現率が大きく変化することが予想された。そのため、陽性コントロールを 5 コピー／反応で設定した 3 施設

と、50 または 500 コピー／反応で設定した 7 施設で分けて集計した。5 コピー／反応で設定した 3 施設では RT-nested PCR 陽性検体における判定保留率が 8.0%であったのに対し (表 1)、50 または 500 コピー／反応で設定した 7 施設では判定保留率が 35.5%であった (表 2)。

判定保留を陽性と判定して、全施設の合計で検討した (表 3)。コンベンショナル RT-nested PCR 陰性検体 (n=97) は Real-time RT-PCR で全て陰性であった (偽陽性率 0%)。一方、コンベンショナル RT-nested PCR 陽性検体では、101 検体中 76 検体のみが陽性となった (感度 75.2%)。

検体種別で集計すると、コンベンショナル RT-nested PCR 陽性検体において、咽頭拭い液／鼻汁 (n=49) では 83.6%と Real-time RT-PCR の陽性率が最も高く、次いで尿 (n=24) の 75.0%であり、血液成分 (全血、血清、血漿、PBMC、n=24) では 62.5%と最も陽性率が低かった (図 2A)。Real-time RT-PCR 陽性となった臨床検体での平均 Ct 値は、咽頭拭い液／鼻汁 (n=41) で 32.0 ± 3.5 と最も低く、尿 (n=18) で 34.6 ± 3.0 、血液成分 (n=15) で 35.9 ± 2.3 であり (図 2B)、患者の咽頭拭い液／鼻汁においてウイルス濃度が高くなりやすく、Real-time RT-PCR での陽性率が高くなることが示唆された。

検体採取日で集計したところ、0-1 病日では 87.2%と最も検出率が高いが、日数を経るごとに検出率が低下する傾向があった (図 2C)。

<日本における風疹ウイルス流行株の分子疫学的解析>

2010～2013 年に日本で検出された風疹ウイルスの遺伝子型は 2B, 1E, 1J, 1a であり、2B

および 1E が主に検出された。特に遺伝子型 2B は年々検出率が増加し、2013 年の流行株の大多数を占めていた。世界的には遺伝子型 2B, 1E, 1G, 1H, 1J が主に検出されている。特に東—東南—南アジアにおいては、遺伝子型 2B および 1E が主流である。日本の株は 2009 年以前にはこの遺伝子型 2B や 1E ウイルスが検出されておらず、2010 年以降から報告されるようになった。また、2010～2011 年と 2012～2013 年では同じ遺伝子型 2B や 1E であっても流行株に関連性はなく、異なる由来によるものと推測された。2012～2013 年に流行したウイルスについては、遺伝子型 2B ウイルスは東南アジア流行株と非常に近縁であった。(図 3)

D. 考察

<風疹ウイルス遺伝子検出 Real-time RT-PCR の感度について>

本 Real-time RT-PCR の検出限界コピー数は、風疹参照 RNA (遺伝子型 1a ウイルス由来) を用いた検討によって、概ね 5~50 コピー/反応であることが分かった。この値は、コンベンショナル RT-nested PCR 導入前にリファレンスセンターにおいて同一の風疹参照 RNA を用いて検討して頂いた検出限界 2~20 コピー/反応 (麻疹共通法の場合) と大きな差はなかった。しかしながら、臨床検体においては、コンベンショナル RT-nested PCR で陽性となった検体の約 25%が陰性と判定され、コンベンショナル RT-nested PCR より本 Real-time RT-PCR の方が、感度が低いことが示された。本 Real-time RT-PCR とコンベンショナル RT-nested PCR では遺伝子の異なる部位を認識しているため、本 Real-time RT-PCR

のプライマー・プローブ認識部位に変異のあるウイルス株が存在していたことで感度が低かったことは否定できない。しかしながら、本 Real-time RT-PCR では臨床検体中から今年の主流であった遺伝子型 2B、1E およびワクチン株である遺伝子型 1a ウイルスのいずれも検出できていること、事前の検討においてもプライマー・プローブ認識部位の配列保存性が非常に高いこと、ならびにすべての遺伝子型の代表ウイルスを検出できることが確認されていることから、臨床検体でコンベンショナル RT-nested PCR より感度が低かったのは、ウイルス株間の配列の差というよりは、臨床検体中の風疹ウイルス遺伝子濃度がそれほど高くないため、手法のわずかな感度の差を受けやすかったのかもしれない。特に血液成分では、Real-time RT-PCR 陽性であっても Ct 値は 35.9 ± 2.3 と検出限界コピー数の平均 Ct 値 37.6 ± 1.8 と近いことから検体中ウイルス濃度の低さが伺える。

コンベンショナル RT-nested PCR 陰性検体は、Real-time RT-PCR 法においてすべて陰性と判定されたことから、本法の特異度は非常に高いことが示された。

<風疹ウイルス遺伝子検出 Real-time RT-PCR の判定基準について>

陽性コントロール濃度を 50~500 コピー/反応に設定した場合、コンベンショナル RT-nested PCR 陽性検体のうち 35.5%が判定保留となった。判定保留率を下げるためには、できる限り低濃度の陽性コントロールを使用することが重要と考えられる。ただし、低濃度での反応が安定しないこともあり、複数濃度の陽性コントロールを使用することが望ましい (図 4)。すなわち、試験ごとに濃