

リアルタイム PCR のみで陽性となった 2 件は、リアルタイム PCR における Ct 値が 38 前後であったことから、検体に含まれる遺伝子量が少なかったため、nested-PCR 法よりも感度の高いリアルタイム PCR 法でのみ検出されたものと推察された。

また、検出された麻しんウイルスの遺伝子型は、A 型、D4 型、D9 型、D8 型、H1 型と多種であったことから、今回用いたリアルタイム PCR 法は、種々の遺伝子型の麻しんウイルス遺伝子に対して高感度に検出可能であることが示された。

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

分担研究項目：自治体における麻疹と風疹の排除に関する  
公衆衛生学的データの収集・解析に関する研究

研究分担者	小澤邦壽	群馬県衛生環境研究所
研究協力者	齋藤美香	群馬県衛生環境研究所
	後藤考市	群馬県衛生環境研究所

## 要旨

本邦の麻疹・風疹排除に向けて、感染症サーベイランスにより各自治体の迅速な対応が必要である。今年度は麻疹・風疹流行の現状として、群馬県内における麻疹・風疹患者報告状況と検査状況について調査した。その結果、風疹流行期には麻疹疑い症例の報告が増加し、さらにこの症例のうち風疹と確定した症例と麻疹・風疹以外の症例が約半数ずつであった。また、臨床診断例により風疹以外の類似疾患が風疹と届出されている可能性も考えられた。今後、麻疹・風疹の排除における確実な鑑別診断に向けて、地衛研での確実な検査体制を構築することが重要である。

## A. 目的

本邦における麻疹の検査診断は、「麻しんに関する特定感染症予防指針」の改正（平成25年4月1日施行）公布により、可能な限り全例遺伝子検査を実施することとなり、ほとんどの自治体では麻疹排除に向けて検査体制が構築あるいは強化されることとなった。麻疹と同様に、風疹については平成32年度までに排除達成を目標としている。しかし、風疹については平成24年から患者が増加し、特に妊婦の風疹感染で問題となっている CRS が懸念されている。これより、風疹排除に向けて各自治体の迅速な対応が必要である。自治体における感染症サーベイランス（患者情報サーベイランスと病原体サーベイランス）は、有効に機能することで麻疹と風疹の流行状況や見通し

を正確に把握するための基礎データとなる。これらのデータから、自治体および医療機関が患者情報の共有や検査診断の必要性を十分認識し、確実な検査体制を構築する必要がある。すなわち、感染症患者情報の収集、また、医療機関からの検体収集とその検査が鍵となる。

そこで、今年度の研究は、麻疹及び風疹の現状として平成25年の群馬県における麻疹・風疹報告状況および麻疹・風疹検査状況について調査した。

## B. 方法

群馬県では、麻疹排除に向けた麻疹の積極的疫学調査の一環で、麻疹疑い患者の検体について麻疹ウイルス遺伝子検査の結果が陰性であった場合に、風疹ウイルス遺伝子検査を平

成25年4月から実施している。これより、風疹届出報告および風疹検査状況の詳細は、平成25年4月から現在までの集計とした。群馬県における風疹の報告状況については、NESIDにより医師から届出された診断等の情報を収集し、また、風疹患者の症状等の情報を解析した。さらに、群馬県衛生環境研究所における風疹遺伝子検査の実施状況についても調査した。

### C. D. 結果と考察

群馬県で届出された麻疹について、全数報告疾患となった平成20年から23年まで報告数は激減し、平成24年以降は報告されていない。風疹については、同じく平成20年以降は年間数例の報告で推移していた。しかし、平成24年以降は患者報告が増加傾向を示し、平成25年は年間54件であり過去6年間で最大となった。平成25年の風疹患者報告について、平成25年4月以降の届出数は40件であり、その内訳は検査診断例が29件(72.5%)、臨床診断例が11件(27.5%)であった。

検査診断例29件の内訳は、医療機関で風疹IgM抗体検査またはペア血清風疹抗体検査が実施された24件(82.8%)と、群馬県衛生環境研究所で麻疹疑い症例からの風疹ウイルス遺伝子検査が陽性となった5件(17.2%)であった。この5件については、麻疹疑い症例11件について麻疹ウイルス遺伝子検査を実施したところ、全て陰性であったが、その11件全てに風疹ウイルス遺伝子検査を実施したところ、5件(45.5%)の陽性が確認された。これより、麻疹疑い症例は、風疹の症例および麻疹・風疹ともに陰性の症例でそれぞれ約半数を占めていたことが確認された。これは、今後の麻疹・風疹排除の段階で、特に麻疹・風疹の確実な鑑別診断ととも

に、これらの類似疾患の病原体検索についても考慮する必要性が示唆された。さらに、現在の風疹の診断は、ウイルス遺伝子検査を必須条件としておらず、臨床診断や抗体検査等の検査診断で風疹と認定されている。届出の情報から、医療機関の中にはIgM(±)であったが、臨床医の判断で検査診断例にされたと考えられる報告があった。

臨床診断では麻疹・風疹およびそれ以外の疾患等の判断が難しい場合があることから、風疹以外の類似疾患が風疹とカウントされている可能性も考えられた。

以上から、麻疹・風疹の排除における確実な鑑別診断に向けて、地衛研での確実な検査体制を構築することが今後の課題である。

### E. 結論

麻疹・風疹の排除に向けて、各自治体による地衛研での麻疹・風疹検査診断およびそれ以外の類似疾患について、今後、確実な検査体制を構築することが重要である。

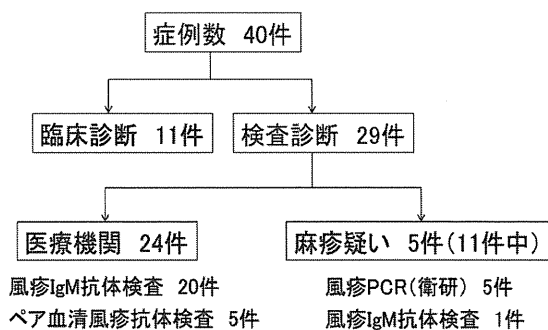
### G. 研究発表

なし

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H25年4月～最終報告分



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

麻疹ウイルスの分子疫学および分子進化に関する研究

研究代表者

竹田 誠 国立感染症研究所ウイルス第三部

研究分担者

木村博一 国立感染症研究所感染症疫学センター

調 恒明 山口県環境保健センター

研究協力者

齋藤美香 小澤邦壽 群馬県衛生環境研究所

石井晴之 倉井大輔 皿谷 健 杏林大学医学部第1内科

竹内史比古 関塚剛史 黒田 誠 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター

加納和彦 国立感染症研究所感染症情報センター

村田祥子 戸田昌一 岡本玲子 山口県環境保健センター

## 要旨

麻疹ウイルス (MeV) の詳細な分子疫学および分子進化解析を行うため、Bayesian Markov Chain Monte Carlo method (Bayesian MCMC 法) による遺伝子型の *H* 遺伝子領域に関する時系列系統解析および尤度による selection pressure 解析を行った。その結果、*H* 遺伝子領域における遺伝子型の出現は約 125 年前に遡ると推測された。また、*H* 遺伝子の進化速度は他の呼吸器ウイルスの主要抗原に比し、比較的遅いことがわかった ( $4.94 \times 10^{-4}$  substitutions/site/year)。Positive selection sites は 2 か所のみ確認され、中和抗体のエピトープと異なる部位であった。これらのことから、種々の遺伝子型の MeV の *H* 抗原領域の遺伝学的保存性は極めて高いことが示唆された。

### A. 目的

本邦の麻疹および風疹の排除を証明するためには、それぞれの疾患の国内患者発生数を確定する正確なウイルス学的検索が必要である。特に、麻疹・風疹の排除状態においては、症例の鑑別診断として分子生物学的な手法による麻疹・風疹の解析およびそれらの疾患以外の発熱発疹性疾患の原因となる病原体遺伝子の遺伝子解析による病原体検索が重要となる。さらに、それらの病原体の抗原蛋白質における遺伝子やアミノ酸解析等の分子進化の解明は、ワクチンの効果およびウイルスの免疫機能への影響を推定するのに必要である。

今回の研究は、世界で流行した MeV の全ての遺伝子型について、Bayesian MCMC 法を用いた抗原蛋白質である *H* 遺伝子領域の詳細

な時系列系統解析を行った (文献 1)。また、尤度を用いた selection pressure 解析を行った (文献 2)。

### B. 方法

麻疹遺伝子バンク (MeaNS) に登録されている MeV の A~H2 型を代表する WHO 参照株を含む 463 株における *H* 遺伝子塩基配列 (1854nt) を材料とした。

シーケンスのアライメントには ClustalW を使用した。また、系統樹をわかりやすく簡便にするために、同年に分離された株及び塩基配列の相同性が高い株について、代表株以外を取り除き、最終的に WHO 参照株を含めた 297 株を使用した。KAKSAN4 v4.0 により、塩基置換モデルを GTR+ $\Gamma$  に決定し、その後の解析に使

用した。分岐年代の推定には、BEAST v1.7.5 を使用した(文献3)。Selection pressure は Data Monkey を使用し、解析法には SLAC、FEL および IFEL を用いて、dN(非同義置換)/dS(同義置換)を  $p$ -value により解析した。

### C. 結果

ベイズ法(Bayesian MCMC 法)により、 $H$  遺伝子の全塩基配列(1854nt)から時系列分子系統樹を作成した(図)。その結果、全ての株がそれぞれの 24(A~H2)の遺伝子型のクラスターに分岐した。最初の共通始祖ウイルスからの分岐は 1918 年(95%信頼区間(CI) : 1889~1941)に見られ、進化速度は、 $4.94 \times 10^{-4}$  (95%CI :  $4.36 \times 10^{-4} \sim 5.50 \times 10^{-4}$ ) substitutions/site/year であった。

Selection pressure 解析では、 $p < 0.05$  で考慮した。SLAC 法により配列全体の dN/dS が 0.25 (95%CI: 0.23–0.27) であった。また、Positive selection sites について、FEL および IFEL 法では、2 アミノ酸が共通して該当した。1 つは 240 番目のアミノ酸であり、240S→NあるいはG、240S→YあるいはSの置換が、もう1つの575番目のアミノ酸では、575Q→LあるいはKの置換が該当した。一方、negative selection sites については、FEL および IFEL 法で多くのアミノ酸が該当した。その中で共通したアミノ酸は 147 箇所であった(表)。

### D. 考察

今回の Bayesian MCMC 法による時系列系統解析の結果から、世界で検出された MeV の  $H$  遺伝子について、出現時期あるいはある期間における進化速度の推定が可能となり、遺伝子型の出現は約 125 年前に遡ると推測された。呼吸器ウイルスの主要抗原における進化速度について、以前の報告ではヒトパラインフルエンザウイルス 1 型 (HPIV1) の HN 遺伝子領域は  $7.68 \times 10^{-4}$  substitutions/site/year、RS ウイルスの G 遺伝子領域では  $1.8 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year、インフルエンザウイルス A(H1N1) の HA 蛋白遺伝子領域では 2~

$3 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year と推測されている(文献4~6)。今回の MeV の  $H$  遺伝子領域の解析結果は他の呼吸器ウイルスよりも数倍遅く、これは MeV  $H$  遺伝子の進化速度がより緩やかに生じていることが推測された。

Negative selection site は、蛋白構造の長期の安定性を維持することから、本研究で推定された 147 箇所の negative selection は蛋白構造の最適化に寄与していることが推定された(文献7,8)。また、Positive selection site は、免疫系に変化をもたらすアミノ酸置換を生じる可能性があり、本研究によって 2 箇所のアミノ酸の存在が示唆された。今回観察されたアミノ酸置換は、 $H$  蛋白構造あるいは感染防御抗体のエピトープに大きな影響を与えないことが推測された(文献9)。これは、 $H$  抗原領域のアミノ酸は保存性が高く、現行の MeV ワクチンが高い効果を示すことが示唆された。また、これらのアミノ酸を含む  $H$  蛋白領域については MeV の機能との関連性について詳細な解析が必要であろう。

### E. 結論

Bayesian MCMC 法を用いた時系列系統解析および尤度を用いた Selection pressure 解析は、MeV の  $H$  遺伝子領域における全遺伝子型の分子進化および、Positive selection site を推定可能にした。本研究で用いた分子レベルでの遺伝学的研究は、ウイルスの主要抗原領域における蛋白構造の変化あるいはワクチンの効果を研究するうえで有用かつ画期的な解析法である。

### F. 参考文献

1. Thorne JL, Kishino H, Painter IS (1998) Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Mol Biol Evol* 15: 1647–1657.
2. Pond SL, Frost SD (2005) Datamonkey: Rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics* 21:

- 2531–2533.
- Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7: 214.
  - Mizuta K, Saitoh M, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Aoki Y, et al. (2011) Detailed genetic analysis of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein gene in human parainfluenza virus type 1 isolates from patients with acute respiratory infection between 2002 and 2009 in Yamagata prefecture, Japan. *Virology* 8: 533.
  - Yoshida A, Kiyota N, Kobayashi M, Nishimura K, Tsutsui R, et al. (2012) Molecular epidemiology of attachment glycoprotein (G) gene in respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection in Japan in 2009/2010. *J Med Microbiol*. Jun; 61 (Pt 6): 820-829.
  - Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y (1992) Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56: 152–179.
  - Domingo E (2007) Virus evolution. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 5th ed. Vol. 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp 389–421.
  - Loewe L (2008) Negative selection. *Nature Education*: 1.
  - Hashiguchi T, Kajikawa M, Maita N, Takeda M, Kuroki K, et al. (2007) Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19535–19540.

### G. 研究発表

なし

### H. 知的財産の出願・登録状況

なし

表 MeV 全遺伝子型の H 遺伝子領域における selection pressure

### Positive selection sites

aa position	Change	<sup>†</sup> FEL	<sup>††</sup> IFEL
240	S→N or G	*	*
	S→Y or S	*	*
282	N→G or K or H or D or S or Y		*
303	E→G or D		*
	D→E or H		*
315	K→E or R or Q		*
476	F→L or I or V	*	
	L→F	*	
477	K→R or N	*	
481	N→Y or S or D	*	
546	S→G	*	
	G→S	*	
575	Q→L or K	*	*

### Negative selection sites

aa common sites	FEL	IFEL
147sites	242 sites	157 sites

$p < 0.05$

<sup>†</sup>FEL: Fixed effects likelihood

<sup>††</sup>IFEL: International fixed effects likelihood

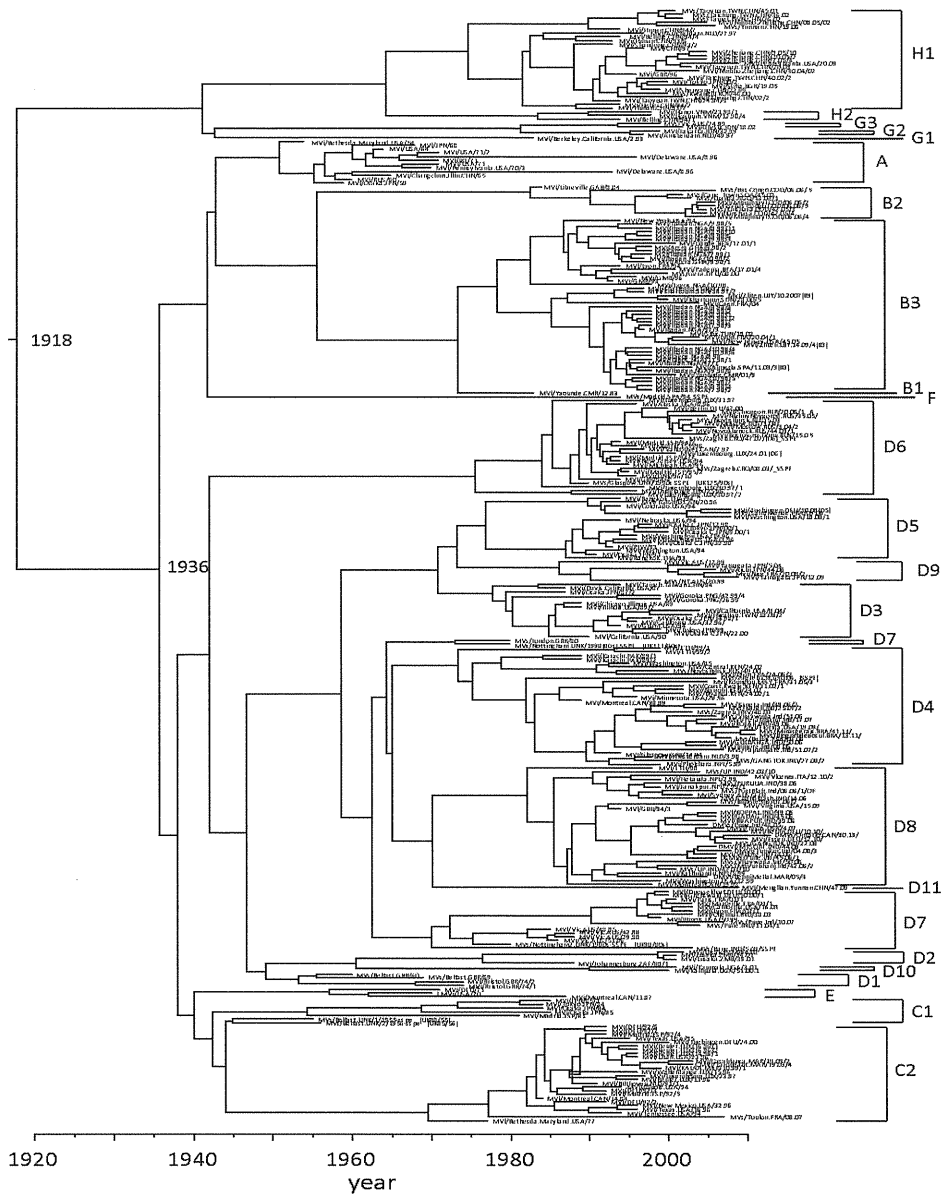


図 Bayesian MCMC 法による MeV 全遺伝子型の H 遺伝子分子系統樹

## 風疹診断するための IgM 測定および麻疹・風疹ウイルスのリアルタイム PCR 検出法の検討

研究分担者 加瀬哲男  
研究協力者 倉田貴子  
上林大起  
駒野 淳

大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課  
大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課  
大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課  
大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課

### 研究要旨

風疹特異的 IgM 抗体測定による風疹診断は、非常に有用な方法であるが、その採材時期についての検討はほとんど行われてこなかった。我々は、風疹ウイルスが PCR で確認された風疹患者の風疹特異的 IgM が、どの病日から検出可能であるかどうかについて検討した。その結果、発疹後 3 日以内では、PCR 陽性かつ IgM 陰性例を 50% の症例で観察したが、4 日以後では 100% の症例が PCR 陽性かつ IgM 陽性を示した。風疹を血清 IgM 測定でのみ診断する場合は、発疹出現後 4 日が必要である。病日早期の風疹診断には PCR 検査を併用しなければならない。

麻疹、風疹をウイルス学的に診断するために、遺伝子診断特に nested PCR 法が最も多用されている。ただし、nested PCR 法はコンタミネーションの危険性が高く、また作業手順が複雑であるので、それに代わるリアルタイム PCR 法の実用化が求められてきている。リアルタイム PCR 法を普遍化するには、プライマー、プローブ設計以外にも条件設定が必要である。当所の StepOnePlus (ABI 社) を使用した場合は、国立感染症研究所が推奨した温度条件よりアニーリング温度を 2 度上げることによって非特異反応が 20% に軽減することがわかった。一方、nested PCR 法とリアルタイム PCR 法の結果は、100% 一致しなかった。このため、リアルタイム PCR 法を用いた麻疹、風疹診断には、患者の疫学情報やワクチン接種歴などを加味し、nested PCR 試験を追加するなど慎重な判断が求められることがわかった。

### A. 研究目的

#### 1) 風疹 IgM 測定による診断感度についての検討

一昨年から続く風疹の大規模な流行において、その検査診断には EIA による風疹 IgM 測定が主に使用されている。しかし、その診断感度については具体的な検討がなく、実験室診断である PCR 陽性となった患者においても風疹 IgM が陰性になる症例が多数見られていた。そのため EIA による風疹 IgM 測定の診断感度を明らかにすることを目的とした。

#### 2) real-time PCR の条件検討について

現在行われている nested PCR 法による麻疹および風疹ウイルスの検査は、煩雑で時間もかかるため、リアルタイム PCR 法への移行が検討されている。本研究では国立感染症研究所にて開発されたリアルタイム PCR 法において測定器材として ABI 社の StepOnePlus を用いた時の条件

検討および臨床検体を用いた検討を試みた。

### B. 研究方法

2013 年に麻疹風疹疑いで当所に搬入された検体について麻疹 Nested PCR および風疹 Nested PCR を国立感染症研究所のマニュアルに従ってを行った。

風疹 IgM 測定はウイルス抗体 EIA 「生研」ルベラ IgM (デンカ生研) を用いて行った。また、山形県衛生研究所および石川県環境保健センターからは PCR 陽性検体についての IgM インデックスに関する情報提供を受けた (山形県衛生研究所 青木洋子先生、石川県環境保健センター 児玉洋江先生に感謝します)。

リアルタイム PCR は国立感染症研究所が示した、プローブおよびプライマーを用いた。



## C. 研究結果

### 1) EIAによる風疹IgM測定の診断感度

2013年に大阪府内で発生した nested PCR 陽性であった風疹症例 35 例について、風疹特異的 IgM 抗体を EIA を用いて測定した。IgM 測定値は試薬の添付文書に従い、インデックス表示に換算したものをを用いた。また、山形県と石川県からは 3 症例について風疹 PCR 陽性患者の IgM インデックス値の提供を受けた。IgM インデックス値と発疹出現後日数(発疹出現日を病日 0 とする)の相関をしらべた。合計 38 症例において、発疹出現後 3 日までに採取された血清(血漿を含む)では 14/28 (50.0%)が基準値 1.2 未満となり陰性を示したが、4 日目以降では 10/10 (100%)が陽性となった(図 1)。

### 2) リアルタイム PCR の条件検討

国立感染症研究所から配布された陽性コントロールを用い、推奨されたプロトコールで ABI 社の StepOnePlus を使用してスタンダード RNA の測定を行った。slope は  $-3.1 \sim -3.6$ 、 $R^2$  値は  $0.978 \sim 0.999$  であった。臨床検体を用いた検討では、nested PCR で麻疹陽性検体 10 検体、風疹陽性検体 10 検体、麻疹・風疹ともに陰性であった検体 10 検体を用いてリアルタイム PCR を行った。その結果、風疹検出系では、陽性 10 検体のうち 9 検体(90%)で増幅がみられ、陰性の検体では非特異的な増幅は見られなかった。一方、麻疹検出系では陽性 10 検体のうち 9 検体(90%)で増幅がみられたが、陰性 10 検体のうち 7 検体(70%)でも増幅がみられた(図 2)。麻疹陰性 10 検体について試薬と反応条件を再検討した結果、annealing 温度を  $2^\circ\text{C}$  上げることで非特異反応は 2/10(20%)に減少した(図 3)。

## D. 考察

EIA による風疹 IgM インデックス値は、発疹出現後 4 日以降で確実に陽性( $>1.2$ )になった。従って、風疹の IgM による診断に非常に有効であるが、風疹発症直後~3 日までの症例における検査では PCR 法を併用する必要があることが明らかになった。

麻疹・風疹のリアルタイム PCR は、いずれも nested PCR よりも感度は落ちるものの、90%の陽性検体を検出することができた。また、非特異反応は、推奨プロトコールの反応条件を検討することで、風疹は 0/10 (0%)、麻疹は 2/10

(20%)にまで低下できた。リアルタイム PCR 法による麻疹・風疹診断は、複数種類の検体(咽頭ぬぐい、血液、尿)で検査を実施すること、疫学情報の収集をこれまで通り十分行う事で、行政検査に導入可能であると考えられた。

## E. 結論

EIA による風疹特異的 IgM 測定は、発疹出現後 4 日以降では風疹を正確に診断できると考えられる。また、麻疹および風疹のリアルタイム PCR 法による診断は、臨床検体への応用が可能であり、次年度以降は臨床検体の検査を積極的にを行い、データを蓄積する必要がある。

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kurata T, Kanbayashi D, Kinoshita H, Arai S, Matsui Y, Fukumura K, Matsumoto H, Odaira F, Murata A, Konishi M, Yamamoto K, Nakano R, Ohara T, Otsuru E, Komano J, Kase T, Takahashi K. Late onset of vaccine-associated Measles in Adult with severe clinical symptoms: a case report. *Am. J. Med.* 2013 Nov 7. pii: S0002-9343(13)00929-7. doi: 10.1016/j.amjmed.2013.10.015. [Epub ahead of print]

### 2. 学会発表

1) 大阪府における風疹流行の現状と疫学解析  
駒野淳、倉田貴子、上林大起、西村公志、大平文人、松井陽子、福村和美、松本治子、高橋和郎、入谷展弘、久保英幸、長谷篤、廣川秀徹、吉田秀樹、塩見正史、信田真理、八木由奈、宮浦徹、内野清子、田中智之 第 72 回日本公衆衛生学会総会 2013 年 10 月

2) 大阪府における風疹の流行状況と先天性風疹症候群患児への支援体制について  
加瀬 哲男、倉田 貴子、上林 大起、永井 沙織、西村 公志、松本 一美、大平 文人、松井 陽子、福村 和美、松本 治子、高橋 和郎、駒野 淳、玉井 圭、北島 博之 第 45 回 日本小児感染症学会総会・学術集会 2013 年 10 月 26 日

3) 風疹ウイルス感染ハイスループット評価システムの  
確立と中和抗体価測定への応用《優秀ポスター賞》

上林大起、倉田貴子、片山雄大、駒野淳、加瀬哲男、高橋  
和郎 第61回日本ウイルス学会学術集会 2013年11月  
10日

4) ヒト胎盤由来細胞に麻疹ウイルス感染が及ぼす細胞  
生理学的影響

倉田貴子、上林大起、駒野淳、加瀬哲男、高橋和郎 第  
61回日本ウイルス学会学術集会 2013年11月10日

5) 先天性風疹症候群(CRS)および関連症例について  
上林大起、倉田貴子、高橋和郎、駒野淳、加瀬哲男 第  
17回日本ワクチン学会学術集会 2013年11月30日

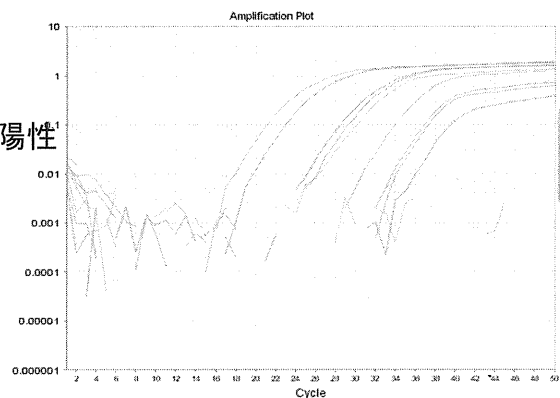
6) 麻疹における家族内2次発生について  
加瀬哲男、倉田貴子、上林大起、高橋和郎、駒野淳 第  
17回日本ワクチン学会学術集会 2013年11月30日

#### **知的財産権の出願・登録状況**

なし

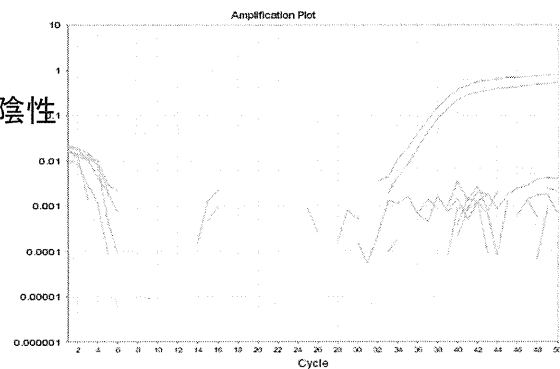


3  
麻疹  
3.1s.InP.1 陽性  
3. 検体



3.3.  
偽陰性

麻疹・風疹  
3.1s.InP.1 陰性  
3. 検体



3.3.  
偽陽性  
3. 値  
3. 38.1

図3. 3.1社3.1 Onl Plus でのリアルタイムP.1法の条件検討  
3nml nInu温度2°C上昇

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

### 発熱呼吸器症状患者からの風疹ワクチンウイルスの検出

研究代表者：氏名 竹田 誠 所属 国立感染症研究所ウイルス第三部第二室  
研究分担者：氏名 木所 稔 所属 国立感染症研究所ウイルス第三部第二室  
研究協力者：氏名 大槻紀之 所属 国立感染症研究所ウイルス第三部第二室

#### 要旨

鼻水などの呼吸器症状、39℃発熱を呈した患者の臨床材料より(山形県衛生研究所にて)分離された不明病原体の同定を目的とした。VeroE6 細胞にブラック形成能があり、赤血球吸着試験は陰性であった。次世代シーケンス解析では、リード数は少ないながら、パラインフルエンザ、風疹ウイルス、マイコプラズマなどが検出された。病原体の濃縮精製後の解析から風疹ワクチン TO-336 株であることが明らかになった。抗風疹血清でブラック形成を中和できることを確認した。国内で使用されている風疹ワクチン株はいずれも高温(39℃)で増殖しない(温度感受性)。今回の試料から得られた風疹ウイルスも温度感受性を有することを確認した。患者は、検体採取の約3週間前に麻しん風しん混合ワクチンを接種しており、本ワクチン株が検出されたものと考えられた。患者の主訴の因果関係は不明であるが、比較的長期に風疹ワクチン株が検出される可能性があることが明らかになった。

#### A. 研究目的

山形県衛生研究所において臨床材料より分離された、VeroE6 細胞に細胞変性を引く起こす検体の同定を目的とした。

#### B. C. 研究方法と研究結果

##### 【材料】

臨床所見：鼻水、39℃発熱、散発例

検体：

咽頭拭い液、山形県衛生研究所においてトリプシン存在下 VeroE6 細胞で培養、CPE 陽性(山形県にて、

hMPV, Para1-4, RS, Entero, Parecho, Flu いずれも PCR 陰性) また、増殖にトリプシン非要求性であることも確認済

検体は、ウイルス3部にて VeroE6 細胞を用い数回継代したものを各試験に用いた。

## 【方法と結果】

### 1. プラック形状の確認

VeroE6 細胞を用いて、常法に従いプラックアッセイを実施した。この結果【図 1】に示す形状のプラック形成を接種量依存的に確認できた。なお、プラック形成箇所には巨細胞などの特徴的な細胞変性効果は認められなかった。ニュートラルレッド染色による生細胞での染め分けが困難であったため、プラッククローニングは実施しなかった。

### 2. 赤血球吸着試験

VeroE6 細胞に検体を接種し 37℃で 1 週間培養した後、常法に従い赤血球吸着試験を行った。試験に用いたモルモット・緬羊・ニワトリの赤血球いずれにおいても特異的な血球吸着は確認できなかった。なお、吸着反応は pH6.8-7.0 程度で反応温度は室温および 4℃で実施した。

### 3. 次世代シーケンスによる同定

検体培養液より遺伝子を抽出し次世代シーケンスを用い検体中に含まれる遺伝子配列を既存データベースと比較したところ、いくつかの病原体の配列が検出された(図2-1)。検出された病原体の遺伝子配列は、パラインフルエンザ、風疹、マイコプラズマなどであるがその検出量は取り立てて多い物ではなく、培養上清からの得られた遺伝子による同定は出来なかった。そこで、培養上清を PEG 沈殿、並びに密度勾配を用いた超遠心を行い、濃縮精製した試料を用いて同様に次世代シーケンスを用いた網羅的解析を行ったところ図 2-2 に示すように、検出されたウイルス遺伝子は風疹ウイルスのみとなった。

なお、図 2-1、2-2 で示されている Waddila の配列は細胞ミトコンドリア配列を病原体として、遺伝子バンクに登録されている物で有り病原体の配列ではない。

また、得られた風疹ウイルスのコンセンサス配列を、既存の風疹ウイルス遺伝子配列と比較したところ、TO-336 ワクチン株とわずか 3 塩基のみの違いで有り、風疹ウイルス TO-336 株が検体中に存在していることが確認できた。

### 4. 濃縮・精製サンプルの電子顕微鏡による観察

3で得られた、濃縮精製試料を電子顕微鏡を用いて観察したところ図 3 に示すようなウイルス様粒子を認めることができた。エンベロップを持つウイルスであることが同定された。

### 5. 中和法によるウイルス同定

次世代シーケンスによる、網羅的解析の結果より風疹ウイルスであることが強く疑われたため、RK13 細胞および抗風疹血清を用いプラック減少法で検体中のウイルスが中和されるかを確認した。この結果、試料中に含まれるウイルスは抗風疹血清により、プラック形成が完全に抑制されることが確認できた(図 4)。ここまでの結果より、検体中に風疹ウイルスが存在していることが確認できた。

### 6. 得られた風疹ウイルスの温度感受性の確認

TO-336 ワクチン株を含む国内で使用されている風疹ワクチンウイルスはいずれも高温(39℃)で増殖しないという温度感受性を有する。今回得られたウイルスは TO-336 ワクチン株であることが強く疑われるため、その温度感受性を確認し

た。その結果、試料および対照群として使用した、TO-336 ワクチン株いずれも、35 及び 37℃では十分に増殖出来た一方で、39℃では増殖が出来ず、試料から得られた風疹ウイルスもワクチン株同様温度感受性を有することが確認できた(図 5)。

#### D. E. 考察と結論

実施した試験の結果より、検体中に含まれているウイルスは風疹ウイルス TO-336 株であると判断した。本結果の判明後、さらなる患者情報を収集したところ、検体採取の約 3 週間前に、麻しん風しん混合ワクチン(TO-336 株を有効成分として含む)を接種しており、本ワクチン株が検出されたものと考えられた。なお、本ウイルスと患者の主訴の因果関係は不明である。さらに、得られた遺伝子置換が、VeroE6 での継代により生じたのか、患者の体内で生じた物かは不明であ

る。

本検体の同定を行うにあたり、患者のワクチン接種歴などを事前に詳細に調べることにより、同定への時間短縮がのぞめた物と考えられ未知の病原体の同定に関しては可能な限り多くの患者情報を収集することが有効であることが考えられた。

#### F. 健康危険情報

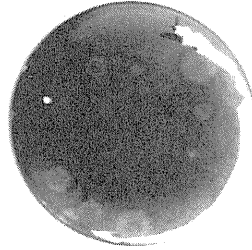
特になし

#### G. 研究発表

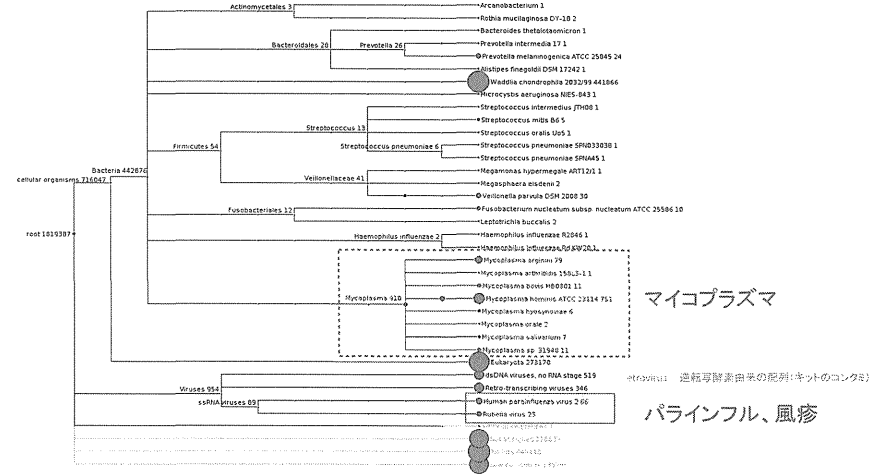
特になし

#### G. 知的所有権の取得状況

特になし

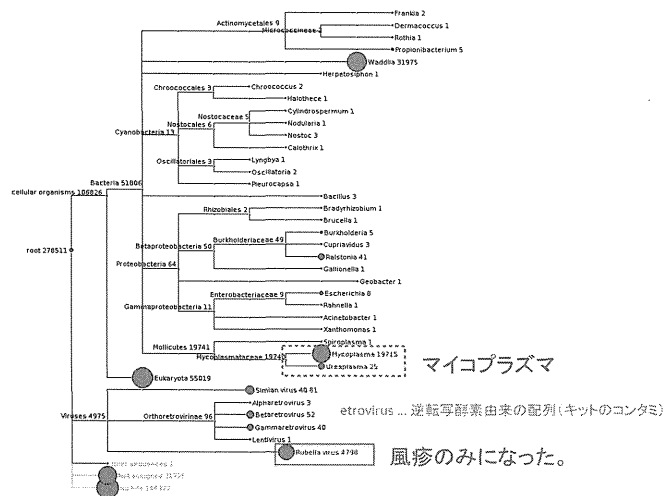


【図1】  
感染後 日目:クリスタルバイオレド/ホルマリンにて染色・固定



マイコプラズマ  
パラインフル、風疹

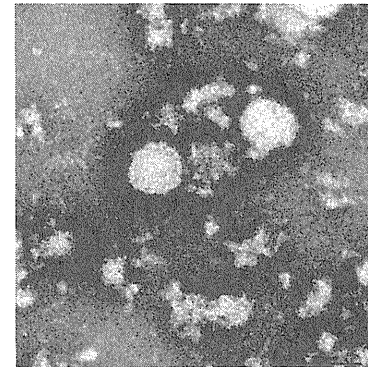
【図 et】  
eroov培養上清の次世代シーケンによる網羅的解析



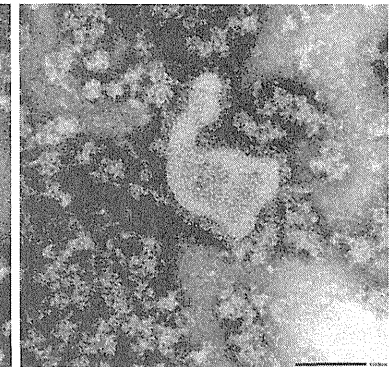
マイコプラズマ

風疹のみになった。

【図 e】  
濃縮・精製サンプルの次世代シーケンによる網羅的解析



所見 不鮮明なエンベロップを有する直径 etr 前後の円形粒子  
鑑別診断 パニヤウイルス、オルソミキソウイルス、パラミクソウイルス、レオウイルス、コロナウイルス  
プニヤウイルスにもっとも類似する印象だが、et は tetr 前後で少し大きい。



所見 大きく比較的明瞭なエンベロップを有する不定形の粒子  
鑑別診断 パラミクソウイルス、オルソミクソウイルス  
ヌクレオカプシドプロテインは認められないのでニューモウイルス属か。



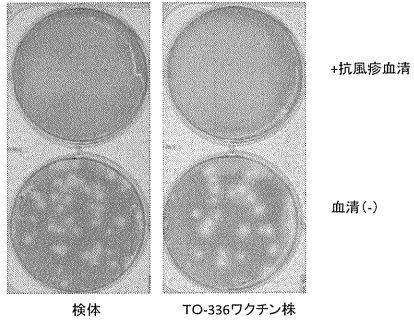


図4: 抗風疹ウイルス血清によるブラック形成抑制(RK13細胞)

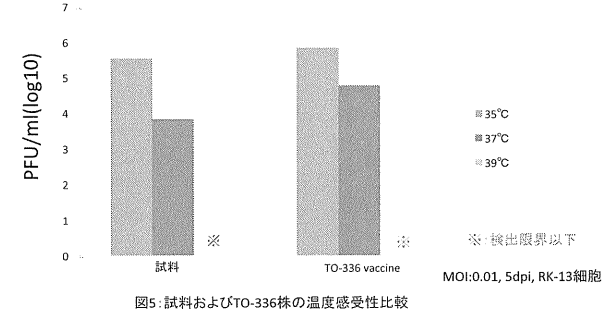


図5: 試料およびTO-336株の温度感受性比較

## MR ワクチン効果の基盤的研究

分担研究者 庵原俊昭（国立病院機構三重病院・院長）

研究協力者 菅 秀、長尾みづほ、浅田和豊、根来麻奈美、谷口清州  
（国立病院機構三重病院小児科）

落合 仁（落合小児科）、渡辺正博（すずかこどもクリニック）

二井立恵、伊佐地真知子（白子クリニック小児科）

**研究要旨** 麻疹、風疹ともにワクチン予防可能疾患である。麻疹ワクチン(MCV)、風疹ワクチン(RCV)、麻疹風疹混合(MR)ワクチンの効果を評価するために、麻疹 IgM 抗体測定方法の改良と看護学生を対象に麻疹、風疹のワクチン接種歴と血清疫学調査、思春期の MR ワクチン接種試験を行った。

改良された麻疹 IgM 抗体測定試薬は、A 社試薬および B 社試薬と比べると感度、特異度は同等で、A 社試薬で認められた麻疹以外の発疹性疾患との非特異反応も認められなくなった。看護学生の MCV および RCV 接種歴調査によると、麻疹では 2 回接種者が多かったが、風疹では 4 期に 1 回目を接種した人が 245 人中 32 人(13.7%)を占めていた。血清疫学調査では、麻疹では 2 回接種群の方が 1 回接種群よりも平均抗体価は高値であったが、風疹では 1 回接種群と 2 回接種群の平均抗体価は同等であった。RCV1 回接種群において、接種後 14～16 年経過した群と接種後 1 年未満の群との間に平均抗体価に差を認めなかった。MR ワクチン接種により、麻疹では 16EIA 価未満の多くは抗体価の上昇を認めたが、風疹では 8～32EIA 価であっても抗体価の上昇を認める人があった。

以上の結果から、改良された麻疹 IgM 抗体測定試薬は麻疹診断上有用と判断された。ワクチン歴調査および血清疫学調査から、麻疹および風疹流行予防対策として MR ワクチン 4 期接種は有用な施策と評価され、本邦風疹ワクチン株も RA27/3 株と同様に 1 回接種で効果的な免疫が誘導できるワクチンと評価された。風疹は麻疹と比べると血清抗体価から発症予防対策を図ることは困難であり、流行抑制のためには積極的な RCV 接種の方が現実的であると思われた。

### A. 研究目的

麻疹、風疹ともにワクチン予防可能疾患である。麻疹ウイルスを含むワクチン (measles containing vaccine, MCV) および風疹ウイルスを含むワクチン (rubella containing vaccine, RVC) の定期接種が開

始されてから、本邦の麻疹、風疹流行規模は縮小しているが、依然として外国からの輸入関連ウイルスによる麻疹の小さな集団発症(outbreak)が認められ、風疹も 1012～2013 年に外国からの輸入株による流行が認められた。

臨床の現場では、麻疹、風疹の診断に IgM 抗体が測定されているが、本邦で頻用されている麻疹 IgM 抗体測定試薬は、パルボウイルス B19 や風疹に対する IgM 抗体と非特異反応を示すことが報告されている。麻疹診断の感度を高めるために、改良された麻疹 IgM 抗体測定試薬の感度、特異度について検討を行った。

平成 20 年度から 5 年間にわたり MR ワクチン 4 期接種が行われたが、4 期接種の効果について、十分に検討されていない。今回は、MR ワクチン 4 期接種の効果について血清疫学の面から評価した。

## B. 研究方法

### (1) 改良された麻疹 IgM 抗体測定試薬の評価

麻疹患者検体は、ベトナム国立公衆衛生疫学研究所(NIHE)に保存されている、2009 年に臨床的に麻疹と診断された患者より採取された血清 110 検体を用いた。風疹患者検体は、2009 年に臨床的かつ血清学的(抗風疹 IgM 抗体陽性)に風疹と診断され、NIHE に保存されている血清 30 検体を用いた。デングウイルス感染症患者検体は、2011~2012 年に臨床的かつ血清学的(抗デング IgM 抗体陽性)にデングウイルス感染症と診断され、NIHE に保存されている血清 20 検体を用いた。

突発性発疹(突発疹)患者検体は、藤田保健衛生大学小児科に保存されていた、臨床経過およびウイルス学的に HHV-6B 初感染が診断された患者血清 15 検体を用いた。伝染性紅斑患者検体は、札幌医大小児科に保存されていた、臨床経過およびウイルス学的にヒトパルボウイルス B19 初感染

が証明された患者血清 57 検体を用いた。

麻疹 IgM 抗体陰性血清として、この数年間に麻疹罹患がない健常成人 78 人の血清を用いた。

抗体測定に用いた測定試薬は、改良した試作品(IgM capture 法、一次抗体、二次抗体の濃度を変更、企業秘密)、従来の A 社試薬(IgM capture 法)および B 社試薬(IgG 吸収法)であり、添付文書にしたがい測定した。

### (2) MCV、RCV 接種歴調査と麻疹・風疹抗体価の検討

対象は 2010~2012 年の 3 年間に M 看護学校に入学した 245 人(女性:男性=220:25、年齢 18~37 歳;中央値 18 歳)である。入学時に麻疹、風疹の既往歴およびワクチン歴を調査した。既往歴およびワクチン歴を記載するに当たっては、母子手帳および保護者に確認するよう学生を指導した。麻疹および風疹の抗体価は、A 社の EIA-IgG 抗体測定試薬を用いて添付文書にしたがい測定した。抗体陽性基準は添付文書にしたがい 4.0EIA 価とし、判定保留は陰性群に含めた。

### (3) MR ワクチン追加接種の効果

入学時の抗体価測定で、麻疹抗体価または風疹抗体価のいずれかが 4.0EIA 価未満の人のうち、MR ワクチン接種を希望した 32 人に MR ワクチンを接種し、接種 4 週間後の抗体価を測定した。

### (4) 統計学的解析

各群の平均 EIA-IgG 抗体価の比較は、抗体価を、2 を底とする対数に変換後、Student's t 検定を用いて行った。群間比較は  $\chi^2$  square 検定を用いた。

(倫理面の配慮) 血清採取に当たっては、

本人または保護者の同意を得てから行った。発表に当たっては氏名が同定されないよう配慮した。

### C. 研究結果

#### (1) 改良された麻疹 IgM 抗体測定試薬の評価

試作品と A 社試薬との比較では、感度 100%、特異度 97.9%(93/95)、陽性一致率 (PPV)100%、陰性一致率 (NPV)97.9% (93/95)、全体一致率 98.9%(186/188)と、極めて高い相関を認めた (表 1)。B 社試薬との比較でも、感度 98.9%(92/93)、特異度 97.9%(93/95)、PPV100%、NPV100%、全体一致率 98.4%(185/188)と極めて高い相関を認めた。

麻疹患者における発疹出現後の日数と各試薬の麻疹 IgM 抗体検出率の比較では、発疹出現日を 1 病日とすると、発疹出現 3 病日までの早期では、試作品の麻疹 IgM 抗体陽性率は 68.8%であり、従来の A 社試薬、B 社試薬と同等であった (表 2)。発疹出現 4~14 病日の中間期では、試作品の麻疹 IgM 抗体の陽性率は 96.7%に上昇し、発疹出現後の 15~28 日の回復期では 100%陽性となった。麻疹 IgM 抗体陽性率の推移も、従来の A 社試薬、B 社試薬と同様であった。

風疹、デング熱、突発疹、伝染性紅斑等の発疹性疾患検体との反応性では、検体数が少ない疾患もあるが、試作品を用いると、いずれも非特異陽性は認められなくなった (表 3)。

#### (2) MCV、RCV 接種歴調査と麻疹・風疹抗体価の検討

ワクチンの接種回数では、麻疹では 1 回接種 15.5%、2 回接種 74.3%であったのに

対し、風疹では 1 回接種 31.0%、2 回接種 57.1%と、麻疹の方が 2 回接種者の割合が有意に高率であった (表 4)。なお、今回の調査では、接種歴および既往歴不明が、麻疹 2.4%、風疹 2.0%と極めて低率であった。

この集団における抗体陽性率は、麻疹では全体 96.9%、1 回接種群 90.9%、2 回接種群 98.9%であり、風疹では全体 93.0%、1 回接種群 91.4%、2 回接種群 94.8%と、いずれも極めて高い陽性率を示した (表 5)。

麻疹または風疹の罹患歴がない人を対象に、MCV および RCV の接種回数ごとの抗体価を比較した (表 6)。麻疹では、一度も接種していない群に比べると、1 回接種群、2 回接種群とも平均抗体価は上昇していた。次に、1 回接種群と 2 回接種群を比較すると、2 回接種群の方が平均抗体価は有意に高値であった ( $P<0.05$ )。一方、風疹においては、1 回接種群と 2 回接種群の間に平均抗体価の有意な差を認めなかった。

風疹 1 回接種群において、風疹ワクチン接種後の期間による抗体価の相違を比較した。今回対象とした集団では、17 年以上前 (1 歳)に接種した人 9 人、14~16 年前 (2~4 歳)に接種した人 20 人、2~13 年前に接種した人 8 人、0~1 年前に接種 (4 期接種)した人 32 人であったが、いずれの群も平均抗体価は同等であった (表 7)。

#### (3) MR ワクチン追加接種の効果

麻疹では接種前の抗体価が 16.0EIA 価未満の 27 人では、2 倍以上上昇した人 21 人 (77.8%)、1.5~2 倍上昇した人 5 人 (18.5%)と、多くの人で抗体価の上昇が認められたが、16.0EIA 価以上の 5 人では有意な抗体価上昇は認められなかった (表 8)。

風疹では 4.0EIA 価未満の群 (抗体陰性