

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

風疹ウイルス遺伝子検出法の整備

研究分担者 氏名 岡本貴世子(所属) 国立感染症研究所ウイルス第三部

研究要旨

現在、風疹感染の診断は血清中の IgM 抗体価の測定が主であるが、血清採取時期によっては必ずしも正しい結果が得られない。風疹では発症初期にウイルスが多く排出されるため、ウイルス遺伝子検出との併用が望ましい。これまでにコンタミネーションの恐れのない検出法として、TaqMan リアルタイム PCR 法、Reverse transcription-loop mediated isothermal amplification assay (RT-LAMP) 法の条件検討を行ってきた。本年度は、両者の感度の比較、さらに検出に適した臨床検体の検討を行い、実験室診断利用に必要なデータを収集した。

A. 研究目的

妊娠早期の母体の風疹感染により出生児がしばしば先天性風疹症候群(CRS)と呼ばれる障害をもつ事が知られており、国内では2012年から2013年にかけての流行により、これまでに41名のCRS患児が報告されている。

WHOでは将来、風疹排除を目標としており、麻疹と同様、排除達成を確認するためには実験室診断を要求している。風疹感染の実験室診断はIgM抗体検出によるものが国際的に認められているが、血清採取の時期による偽陰性例などで必ずしも確度の高い診断法とはいえ

ない。一方で麻疹では国内で遺伝子診断が定着しつつあり、麻疹排除計画の進行に貢献している。現在ウイルス遺伝子検出法で汎用されているのはリアルタイムPCR法やLoop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)法である。これらは所要時間が短く、反応後の増幅産物を取り扱わずに検出が可能であるため、遺伝子検出法として今後ますます重要な方法である。

これまでに新しい風疹ウイルス遺伝子検出TaqManリアルタイムPCR法およびRT-LAMP法を作製し、感度および特異性の検討を行っている。本年度は風

疹感染疑い患者より提供された臨床検体での両者の性能評価、風疹ウイルス遺伝子検出に適した臨床検体の検討、臨床検体中のウイルス遺伝子量および IgM 等の抗風疹抗体価と臨床症状との関連を解析し、感染拡大防止のためのデータを得ることを目的とする。

B. 研究方法

公立昭和病院を受診した風疹感染疑い患者 13 名より提供された臨床検体（血漿、咽頭拭い液、尿、鼻咽頭拭い液）を用いて TaqMan リアルタイム PCR 法および RT-LAMP 法性能を比較した。各臨床検体中のウイルス遺伝子量を定量し、ウイルス遺伝子検出に適した臨床検体の種類について検討を行った。ウイルス遺伝子量、患者血清の IgM 抗体価、臨床症状との関連を解析した。

（倫理面への配慮）

臨床検体の収集については国立感染症研究所「ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会」の承認を得ている。

C. 研究結果

血漿では TaqMan 法で 58%(7/12 検体)、LAMP 法で 8.3%(1/12)、咽頭拭い液では TaqMan 法で 61%(8/13)、LAMP 法で 7.7%(1/13)、尿では TaqMan 法で 45%(5/11)、LAMP 法で 9.1%(1/11)、鼻咽頭拭い液では TaqMan 法で 57%(4/7)、LAMP 法で 14%(1/7)の検出率であり、

RT-LAMP 法より TaqMan リアルタイム PCR 法の感度が格段に優れていた（表 1）。検体中のウイルス遺伝子量は鼻咽頭拭い液で最も高く、他の検体の 10～1000 倍であった。IgM 抗体価については、33%(3/9)の陽性率であり、ウイルス遺伝子が検出された患者のうち 38%(3/8)で IgM 陽性となった。

D. 考察

検体種類別では、咽頭拭い液が最も検出率が高かったが、ウイルス遺伝子量は鼻咽頭拭い液の方が咽頭拭い液より 100 倍以上多かった（表 1）。今回の検討数は少なかったが、鼻咽頭拭い液で検出された 4 例とも全て 10^6 copies/mL 台であることから、風疹ウイルス遺伝子検出には鼻咽頭拭い液が適していることが強く示唆された。

本研究で採取された検体は発症（発疹出現）から 2～6 病日であったが、4 病日以内でウイルス遺伝子が検出された症例のうち IgM 抗体価が検出されたのは 29%(2/7)と低く、これまでの報告と同様、発症早期では十分な IgM の上昇が起こっておらず、偽陰性となる可能性が高いことが示唆された。一方で、そのような症例でも TaqMan リアルタイム PCR 法のようなウイルス遺伝子検出法であれば、診断が可能であることが示唆された。

E. 結論

Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)法と TaqMan リアルタイム法を比較した。その結果、RT-LAMP 法より TaqMan リアルタイム PCR 法が風疹ウイルス遺伝子検出には優れていることが示された。また、検体としては鼻咽頭拭い液が適していることが示唆された。

検査センターや医療機関による風疹感染の確認は、血清中の IgM 抗体価の測定、あるいはペア血清の IgG 抗体価の推移により行われており、発症初期においては血清中の IgM による診断より検出率が高いという点から、ウイルス遺伝

子検出法による風疹の診断は今後ますます重要になると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

表1 臨床検体からの風疹ウイルス遺伝子検出

	検体採取 病日		年 齢	性 別	IgG	IgM	血漿		咽頭拭い		尿		鼻咽頭拭い		衛研結果 (Nested)
							TaqMan Log10	LAMP	TaqMan Log10	LAMP	TaqMan Log10	LAMP	TaqMan Log10	LAMP	
1	2	57	男	<2.0	<0.80	3.50	0/3	3.62	0/3	3.49	1/3			ND	
2	2	29	女	<2.0	<0.80	3.84	0/3	3.12	0/3	3.15	0/3			陽性	
3	2	23	男			0	0/3	3.30	0/3					陽性	
4	4	45	男	35	<0.80	0	0/3	0	0/3	3.20	0/3			ND	
5	2	28	男	7.8	5.96	0	0/3	3.98	1/3	5.07	0/3			ND	
6	2	33	男	<2.0	<0.80	4.01	2/3	3.59	0/3	3.39	0/3	6.85	3/3	ND	
7	3	24	男	<2.0	<0.80	3.18	0/3	0	0/3	0	0/3			陰性	
8	3	38	男	<2.0	1.04	3.44	0/3	3.78	0/3	0	0/3	6.30	0/3		
9	6	33	男	29.5	6.59	0	0/3	4.73	0/3	0	0/3	6.27	0/3		
10	2 (川崎 病)	1	男	33	<0.80			0	0/3			0	0/3		
11						0	0/3	0	0/3	0	0/3	0	0/3		
12						0	0/3	0	0/3	0	0/3	0	0/3		
13						4.52	0/3	4.53	0/3	0	0/3	6.66	0/3		