

表1 日本の麻疹ワクチン・風疹ワクチン接種動向の動き

年	事 項
1977年	風疹ワクチンの中学生女子への接種開始
1978年10月	麻疹ワクチンの定期接種開始 (1歳以上)
1989年4月	MMR ワクチン接種開始
1993年4月	MMR ワクチン接種中止
1994年10月	風疹ワクチンの男女への接種 (生後12カ月~90カ月未満)
1994年10月	風疹ワクチン中学生男女への接種 (2003年9月まで)
2006年4月	MR ワクチン開始 MR ワクチン2期接種も開始
2008年4月	MR ワクチン3期, 4期接種の開始 (2013年3月まで)

MMR ワクチン：麻疹・ムンプス・風疹ワクチン, MR ワクチン：麻疹・風疹混合ワクチン

に MR ワクチン2期接種が開始された。2008年4月からは、5年間の時限措置で中学校1年生世代を対象に第3期接種が、高校3年生世代を対象に第4期接種が開始された<sup>1)</sup> (表1)。一方、風疹ワクチンの定期接種が始まったのは1977年からで当時の対象者は中学生女子だけであったが、1994年10月から対象者を1歳以上の男女に変更し、MR ワクチン2期が開始されるまでは1回接種が実施されてきた。

MR ワクチン第4期接種の評価を行った報告は少ないため、第4期の接種歴と接種約1年後の抗体価を調査し、第4期接種の有用性について検討した。

### 対象と方法

対象は2010年~2012年の3年間M看護学校に入学し、本研究について同意を得た245人 (男性25人, 女性220人, 年齢18~37歳 (中央値18歳)) である。26人は第4期の接種対象者の該当年齢を上回っているが、第3期の接種対象者は存在しない。入学時に採血し、麻疹および風疹抗体価を酵素免疫法 (EIA 法) で測定した。なお、EIA 法はデンカ生研のウイルス抗体 EIA 「生研」麻疹 IgG (Cat#322685) および風疹 IgG (Cat#323378) を用いて添付文書に従い測定した。判定は2.0EIA 価以下を陰性、2 EIA 価から4 EIA 価未満を判定保留、4 EIA 価以上を陽性とした。これまでの麻疹または風疹の既往歴は保護者に依頼し

表2 麻疹・風疹ワクチンの接種回数

(人)

接種回数	麻疹 (%)	風疹 (%)
0回	15 (6.1)	20 (8.2)
1回	38 (15.5)	76 (31.0)
2回	182 (74.3)	140 (57.1)
3回	4 (1.6)	4 (1.6)
不明	6 (2.4)	5 (2.0)

てアンケート調査により行い、ワクチン歴に関しては母子手帳の中に記載されている予防接種記録による確認を依頼した。

統計学的検討は、血清抗体価は2を底とする対数に変換すると正規分布するため、2を底とする対数に変換後に行った。2群間は Unpaired t test で解析した。多群間の比較は、等分散性の検定として Browne-Forsythe test を行い、各群の比較は Holm-Sidak's multiple comparisons test を行った。統計ソフトは GraphPad Prism 6 for Windows ver6.01を使用した。

### 結 果

#### 1. 麻疹ワクチン・風疹ワクチン接種回数の検討

麻疹ワクチンの接種回数は、0回接種者6.1% (15/245人)、1回接種者15.5% (38/245人)、2回接種者74.3% (182/245人)、3回接種者1.6%

表3 罹患歴がない者におけるワクチン接種回数と抗体陽性率（接種回数不明者を除く）

疾患	接種回数	対象 (人)	陽性者 (人)	陽性率 (%)	平均抗体価 (log <sub>2</sub> EIA 価)
麻疹	0回	7	5	71.4	2.30±2.47
	1回	33	30	90.9	3.61±1.24
	2回	174	172	98.9	4.24±0.94
	3回	4	4	100	3.98±1.10
	合計	218	211	96.8	3.53±1.44
風疹	0回	16	13	81.3	3.32±2.76
	1回	70	64	91.4	3.67±1.38
	2回	135	128	94.8	3.67±0.98
	3回	4	4	100	3.08±0.83
	合計	225	209	92.9	3.43±1.49

(4/245人), 不明2.4% (6/245人)であった(表2)。一方, 風疹ワクチンの接種回数は, 0回接種者8.2% (20/245人), 1回接種者31.0% (76/245人), 2回接種者57.1% (140/245人), 3回接種者1.6% (4/245人), 不明2.0% (5/245人)と, 両ワクチンともに少なくとも1回以上の接種率は高率であった。麻疹ワクチンと風疹ワクチンの接種回数を比較したところ, 風疹の複数回接種者の割合が58.8%であったのに対し, 麻疹は75.9%と麻疹の方が有意に高率であった ( $P < 0.0001$ )。風疹の1回だけの接種者76人中38人(50%)は, 12カ月から90カ月までの期間ではなく第4期に接種していた。

## 2. ワクチン接種回数と抗体価との関係

麻疹, 風疹ともに罹患の既往があると抗体価の上昇がみられるため, ワクチン接種回数と抗体価の比較は, それぞれの罹患がない者を対象として行った。麻疹の既往歴がない者の抗体陽性率は96.9% (216/223人)であった。ワクチン接種回数別では1回接種群の陽性率は90.9% (30/33人), 2回接種群では98.9% (172/174人), 3回接種群で100% (4/4人), 接種回数不明100% (5/5人)であった(表3)。平均抗体価±標準偏差 (log<sub>2</sub>EIA 価) は, 1回接種群では3.608±1.241であったのに対し, 2回接種群では4.235±

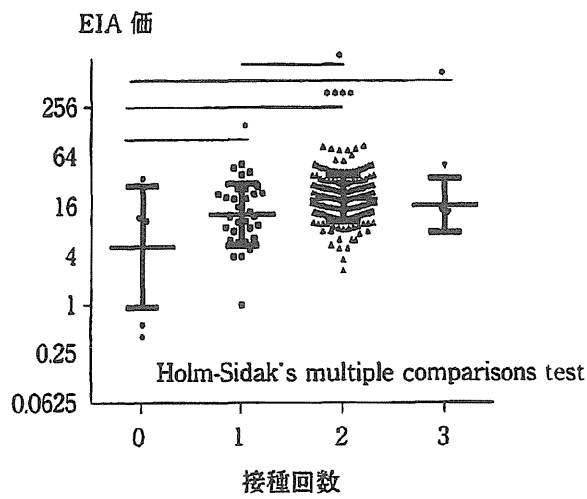
0.9362と複数回接種した方が有意に高値であった ( $P=0.0107$ ) (図1a)。

一方, 風疹既往歴なし群の抗体価陽性率は93% (212/228人)であった。ワクチン接種回数別では, 1回接種群で91.4% (64/70人), 2回接種群で94.8% (128/135人), 3回接種群で100% (4/4人), 接種回数不明100% (3/3人)であった。平均抗体価±標準偏差 (log<sub>2</sub>EIA 価) は, 1回接種群で3.666±1.381, 2回接種群で3.666±0.9841となり, 両群の間に有意差は認められなかった ( $P=0.9998$ ) (表3, 図1b)。風疹に関しては, 接種回数による平均抗体価の差を認めなかったため, 既往歴がない1回接種者のみを対象として接種時期による抗体価を比較した。第4期での接種群 ( $n=32$ ) の平均抗体価±標準偏差 (log<sub>2</sub>EIA 価) は3.69±1.72, 第4期以外での接種群 ( $n=38$ ) (接種後経過期間6~22年; 中央値15年) では3.64±1.03であり, 両群間に有意差は認められなかった ( $P=0.8865$ ) (表4)。

## 3. 麻疹・風疹既往者におけるワクチン接種(表5)

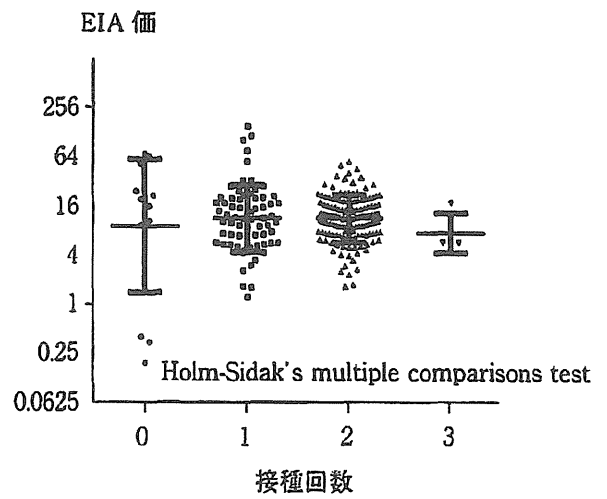
既往歴がある者についてワクチン接種の有無による抗体価を比較した。麻疹では接種なし群の平均抗体価±標準偏差 (log<sub>2</sub>EIA 価) は4.03±2.13, 接種あり群では5.19±1.21となり有意差は

a. 麻疹



Brown-Forsythe test  
P value | 0.0007

b. 風疹



Brown-Forsythe test  
P value | <0.0001

図 接種回数別の麻疹・風疹抗体価

表4 風疹の既往歴がなく、風疹ワクチン接種回数が1回の者を対象としたときの接種時期による抗体価の比較

接種時期	人数	平均抗体価 (log <sub>2</sub> EIA 価)	P value
4期接種	32	3.69 ± 1.72	0.8865
4期以外に接種 (接種後6~22年)	38	3.64 ± 1.03	

表5 罹患歴がある者におけるワクチン接種回数と抗体価

疾患	接種回数	人数	平均抗体価 (log <sub>2</sub> EIA 価)	P value
麻疹	0回	7	4.03 ± 2.13	0.3037
	1回	5	5.19 ± 1.21	
風疹	0回	4	3.27 ± 0.67	0.0102
	1回	5	5.59 ± 1.18	

認められなかった ( $P=0.3037$ )。一方、風疹では接種なし群の平均抗体価±標準偏差 ( $\log_2$ EIA 価) は  $3.27 \pm 0.67$ 、接種あり群では  $5.59 \pm 1.18$  と、接種あり群が有意に高値であった ( $P=0.0102$ )。

## 考 察

日本においては20歳代成人の麻疹・風疹の抗体価は30歳代と40歳代成人の抗体価よりも有意に低下しており、MR ワクチン第3期、第4期接種の必要性が示され<sup>2)</sup>、第3期接種により十分な抗体反応が得られることが報告されている<sup>1)</sup>。また、例数は少ないものの尾崎らの報告では、第3期、第4期の接種により麻疹および風疹抗体の陽性率が100%であったことを示している<sup>3)</sup>。今回は第4期にMR ワクチン接種を受けた年齢層を中心とする200人以上を対象とし、麻疹および風疹の既往歴とワクチン歴の調査を行うと同時に、麻疹、風疹血清抗体価の測定を行った。

今回の調査では、母子手帳でのワクチン接種記録の確認を要請した結果、ワクチン接種回数不明例が極めて少数であった(麻疹2.4%、風疹2.0%)。このことは、母子手帳はワクチンの接種歴を調査するうえで優れたツールであることを示している<sup>4)</sup>。アンケートによる麻疹、風疹の既往歴の調査に関しては、麻疹の既往は病状からはっきりしているためか、既往があるものでは全例抗体価が高値であり、信頼性は高いと思われた。一方、風疹の罹患は、臨床症状のみの診断では不確実であった可能性もあり、既往がある者であっても抗体価が低く、1回のワクチン接種により抗体価の上昇がみられていた(表5)。したがって、風疹は既往の有無にかかわらず風疹ワクチンを少なくとも1回接種するのが望ましいと思われた。

今回の調査では、38人(全体の15.5%)が風疹ワクチンの1回目の接種を4期で受けていた。上記に示したように風疹では罹患歴がはっきりしないこと、また風疹の流行により先天性風疹症候群の発症者数が増加することなどを踏まえると、接種回数の機会を増やすことで少なくとも1回の接種率の向上が期待されるため、現行のようにMR

ワクチンとして2回接種する方式は、風疹流行を抑制するためにも好ましい施策と判断された<sup>5)</sup>。

接種回数と抗体との関係では、麻疹では primary vaccine failure (PVF) があることから2回接種が推奨されている。今回の検討でも麻疹ワクチンの2回接種群では、1回接種群と比較すると抗体陽性率と平均抗体価の高値がともに認められており、2回接種の有用性が示されていた。米国では、風疹は1回接種のみで十分な抗体反応と抗体持続が得られると報告している<sup>6)</sup>。今回の検討では、風疹ワクチン1回接種後6~22年経過した群と、約1年経過した群の平均抗体価に差を認めなかった(表4)。このことは、日本のワクチン株も欧米で広く使われているワクチン株であるRA27/3と同様に、1回の接種で抗体価が長期に持続することを示唆している。なお、麻疹や風疹などの全身性ウイルス感染症では、アポトーシスを行わない長命形質細胞(long-lived plasma cells, LLPC) が誘導され、LLPC が産生する抗体の半減期は約100年の長期である<sup>7)</sup>。今回の風疹ワクチン後の抗体価の結果は、風疹ワクチン接種によっても自然感染と同様にLLPC が誘導されることを示したと推察している。

今回、4人が麻疹、風疹ワクチンともに3回の接種を行っていた。3回接種を受けた理由については調査を行っておらず不明であるが、抗体陽性率は100%と2回接種群より若干高いもの的人数が少なく、平均抗体価は2回接種と差がみられないため、現時点では2回接種で十分な免疫反応が得られていると考えている。一方、接種回数が0回かつ罹患歴がないと回答した者の中に抗体陽性者が麻疹では5人(5/7人)、風疹では13人(13/16人)認められた。これは不顕性感染によるものか、または母子手帳での確認を依頼したが、ワクチン歴が不明なため、ワクチン接種による抗体獲得の可能性があると考えている。

国立感染症研究所疫学情報センターから公開されている情報によると、麻疹は2007年の流行以降、2008年では11,005人、2009年では741人、2010年で457人、2011年で434人、2012年で293人、2013年48週まで215人と年々著しい減少をみてい

る。しかし、風疹は2008年では292人、2009年では147人、2010年では87人と減少をみたが、2011年は371人、2012年には2,353人、2013年48週までは14,291人と、2012年からは流行をみた。また、先天性風疹症候群（CRS）は2012年で4人だったのに対し2013年48週までは26人報告され、風疹の流行にともなう増加をみている。2013年12月現在、MR ワクチン第4期接種が行われてから5年が経過し、第4期接種が終了したが、全国の2012年12月末時点のMR ワクチン接種率は第2期73.6%、第3期73.0%、第4期64.3%と、接種率が高いとはいえない結果である。集団免疫による流行抑制免疫率は、麻疹では90~95%以上、風疹では80~85%以上とされているが<sup>8)</sup>、今回検討した集団では、麻疹では96.9%、風疹では93%とこれを上まわる抗体陽性率を示していた。高い集団免疫率が得られた要因として、看護学生を対象としたため、一般集団よりも予防接種に対する意識が高いためと推察している。今後MR ワクチンの第1期、第2期接種の接種率のさらなる向上に努めることはもちろんであるが、既往歴の有無にかかわらずMR ワクチンを1回も受けていない、またはMR ワクチン歴が不明な20歳代から30歳代の成人での接種勧奨を勧めていくことが、風疹流行抑制およびCRS発症予防には必須である。

## おわりに

MR ワクチン第4期接種約1年後の抗体価を検討したところ、第4期があることで、両ワクチンともに少なくとも1回以上の接種率が向上していた。麻疹では2回接種による抗体価の上昇を認めたことで、vaccine failureの減少が期待され、風疹については接種時期にかかわらず1回の接種に

より抗体価の上昇と抗体の持続が認められ、この世代における風疹流行の抑制が期待される結果であった。

本論文の要旨は第67回国立病院総合医学会で発表した。

## 文 献

- 1) 庵原俊昭：麻疹風疹混合（MR）ワクチン 麻疹ウイルス野生株排除をめざして。小児科診療 72：2281~2286, 2009
- 2) Ihara T：The strategy for prevention of measles and rubella prevalence with measles-rubella（MR）vaccine in Japan. Vaccine 27：3234~3236, 2009
- 3) 尾崎隆男, 西村直子, 後藤研誠他：MR ワクチン第3期および第4期接種の免疫原性。感染症学雑誌 85：250~255, 2011
- 4) 寺田喜平, 小坂康子, 新妻隆広他：大学入学時における既往歴および接種歴調査と抗体検査の比較。日本小児科学会雑誌 110：767~772, 2006
- 5) 尾崎隆男：麻疹 再感染と vaccine failure。小児内科 41：998~1003, 2009
- 6) McLean HQ, Fiebelkorn AP, Temte JL, Wallace GS：Centers for Disease C, Prevention. Prevention of measles, rubella, congenital rubella syndrome, and mumps, 2013：summary recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices（ACIP）. MMWR Recommendations and reports：Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports/Centers for Disease Control 62：1~34, 2013
- 7) Amanna IJ, Slifka MK：Mechanisms that determine plasma cell lifespan and the duration of humoral immunity. Immunol Rev 236：125~138, 2010
- 8) Nokes DJ, Anderson RM：The use of mathematical models in the epidemiological study of infectious diseases and in the design of mass immunization programmes. Epidemiol Infect 101：1~20, 1988

Evaluation of the forth MR vaccination under the result of serum antibody titers in nursing school students

Manami Negoro<sup>1)</sup>, Mizuho Nagao<sup>1)2)</sup>, Shigeru Suga<sup>1)2)</sup> and Toshiaki Ihara<sup>1)2)</sup>

<sup>1)</sup> Division of Clinical Research, Mie National Hospital

<sup>2)</sup> Department of Pediatrics, Mie National Hospital

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

研究代表者 竹田誠 国立感染症研究所ウイルス第三部

### 麻疹・風疹以外の発熱発疹性疾患の病原体遺伝子網羅解析

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第6室長

研究協力者

青森県環境保健センター 古川紗耶

群馬県衛生環境研究所 塚越博之

茨城県衛生研究所 土井育子

川崎市健康安全研究所 松島勇紀 清水英明 岡部信彦

杏林大学医学部 石井晴之 倉井大輔 皿谷健

四国こどもとおとなの医療センター 岡崎薫

国立感染症研究所感染症疫学センター 楠英樹 石岡大成 野田雅博

国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 関塚剛 黒田誠

### 研究要旨

発熱発疹性疾患を引き起こすウイルスには麻疹ウイルスならびに風疹ウイルスのほかにヘルペスウイルス、エンテロウイルス、パルボウイルス B19 などが多数存在するため、迅速・簡便かつ鑑別検査法の開発が望まれる。そこで、本研究では、発熱発疹性疾患を引き起こす 11 種類のウイルスを同時に検出することを目的としたマルチプレックス (RT)-PCR 法の開発を行った。まず初めに、2 つのプライマーセット (Set A; Herpesvirus 1-7 型検出用、Set B; 麻疹ウイルス、風疹ウイルス、エンテロウイルスならびにパルボウイルス B19 検出用) に分け、2 種類の PCR 酵素 (Takara 社ならびに Qiagen 社) を用いて標的遺伝子検出に関する比較を行った。その結果、Set A ではすべての遺伝子型を混合させ PCR を行うと標的ウイルス遺伝子の一部が不検出となることが確認された。そこで、Set A を 2 つのプライマーセットに分けて同様の検討を行ったところ、Qiagen 社の PCR 酵素において良好な標的遺伝子の検出が確認された。一方、Set B においても同社の PCR 酵素により良好な電気泳動パターンが認められた。次に、各プライマーセットを用いて各ウイルス遺伝子の検出感度を調べたところ、10~1000 copies/assay の感度ですべてのウイルスが検出可能であることがわかった。しかしながら、いくつかの臨床検体を用いて本法の有用性評価を行ったところ、Set B において検体の種類により非特異産物が認められた。この非特異産物の生成は、核酸抽出後の DNase I 処理により大幅に回避可能であることがわかった。以上のことから、本方法は多種類の発熱発疹性疾患に関与するウイルスのスクリーニング検査に有用であることが示唆された。

### A. 研究目的

現在、世界保健機関 (WHO) が中心となって、ワクチン接種を徹底することにより世界規模で麻疹ならびに風疹を排除する計画が進められている

<sup>1)</sup>。わが国においても麻疹および風疹排除目標を達成するため、これらの疾患(含疑似症例)の遺伝子検査診断を徹底し、麻疹ならびに風疹排除の達成を科学的に評価することが必要である。一方、

麻疹・風疹検査の中で特に重要となるのが検体中の麻疹および風疹ウイルスを確実に診断することと、麻疹・風疹が陰性の検体においては、発熱発疹性疾患を引き起こす他のウイルスを確実に検出・同定することが必要である。現在、多くの施設では、ウイルスの種ごとに遺伝子検査を行っていることが推定される。しかし、発熱発疹性に関与するウイルスは多種に及ぶため、検査資源(検査費用及び検査時間)を多く費やしていると思われる。そこで、本研究においては、麻疹風疹を含む多種類の発熱発疹性疾患に関与するウイルスの迅速かつ簡便なマルチプレックス(RT-)PCR 法の開発を試みたので概要を報告する。

## B. 研究方法

検体は、川崎市健康安全研究所において麻疹、風疹ならびに手足口病等の発熱発疹性疾患を疑って行政検査として搬入された中で、ヘルペスウイルス 1 型ならびに 3-7 型、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、エンテロウイルスおよびパルボウイルス B19 陽性検体を使用した。ウイルス核酸は、QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)を用いて抽出し、RNA については Random Hexamer ならびに PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) を用いて逆転写反応(RT)を行った。得られた cDNA に 3 つのセットに分けた計 10 対のプライマー(表 1)<sup>2)5)</sup> を添加し、Multiplex PCR Assay Kit (Takara)または Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen)を用いて Multiplex PCR を行った。検出感度は本法で使用するプライマーの増幅領域を含む濃度既知の各ウイルス DNA 産物について段階希釈を行い 1~10000 copies/mL の濃度の試料を作成後測定した。

## C. 結果

まず初めに、ヘルペスウイルス 1-7 型を標的とするプライマーセット(Set A)ならびにエンテロウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、パルボウイルス B19 を標的とするプライマーセット(Set B)による Multiplex PCR を Takara 社ならびに Qiagen 社の試薬を用いて行ったところ、Takara 社と比較して、Qiagen 社は非特異産物が少なく良好な検出パターンが得られた。しかしながら、ヘルペスウ

イルス 1-7 型の template を混合したものについて Multiplex PCR を行った際に、両者の酵素で、ヘルペスウイルス 7 型の標的バンドが検出できないことが判明した。また、ヘルペスウイルス 3 型ならびに 6 型の増幅産物のサイズが近いこと、電気泳動上、両者の判定が困難な可能性が想定された(図 1, 2)。そこで次に、ヘルペスウイルスについて 1 型から 4 型を標的とするプライマーセット(SetA-1)と 5 型から 7 型を標的とするプライマーセット(SetA-2)に分けて再度 Multiplex PCR を行った。その結果、Qiagen Multiplex PCR Kit において良好な電気泳動パターンが得られた(図 3, 4)。また、本法で用いたプライマーの増幅領域を含むヘルペスウイルス 1 型ならびに 3 型-7 型、コクサッキーウイルス A6 型、コクサッキーウイルス A16 型、エンテロウイルス 71 型、麻疹ウイルス D8 型、風疹ウイルス 1E 型ならびに 2B 型、パルボウイルス B19 の各 DNA 産物を用いて Multiplex PCR の検出感度を測定したところ、それぞれ 10~1000 copies/assay の範囲で検出することが可能であった(表 2, 3)。さらに、複数の臨床検体を用いて開発した本法の有用性の評価を行ったところ、Set B において検体の種類により非特異産物が多く認められることがわかった(data not shown)。そこで遺伝子抽出後に DNase I を用いた前処理を実施し、同様の検討を行った結果、DNase I 非処理実験系に比し、非特異産物の減少が認められた(図 5)。

## D. 考察

今回我々は、発熱発疹性疾患を引き起こすウイルスについて迅速ならびに簡便に検出するための Multiplex PCR 法の開発を行った。その結果、Qiagen 社の試薬ならびに 3 つのセットに分けた 10 対のプライマーを用いることにより、10~1000 copies/assay の感度で 11 種類のウイルスを同時に検出することが可能であることが明らかになった。また、本検査法は、約 2500~3000 円/検体で実施することが可能であり、検査費用の縮減ならびに検査時間の短縮が可能であると思われた。

今回のプライマーセットにおいて、Set B (麻疹ウイルス、風疹ウイルス、エンテロウイルスならびにパルボウイルス B19 検出用)において、臨床検体によっては、非特異産物が多く認められ判定が

難しくなる場合があることが判明した。その後の検討で、この非特異産物の発生は風疹ウイルスならびにパルボウイルス B19 のプライマーが主たる原因であることがわかった(data not shown)。また、この非特異産物の生成は DNase I 処理を行うことにより抑制される。しかしながら、通常の DNase I は一本鎖ならびに二本鎖 DNA をともに分解する酵素であるため、本酵素処理により、パルボウイルス B19 の遺伝子を検出することが困難になる。この欠点を克服するため、カムチャッカガニの肝臓に由来する二本鎖 DNA 特異的に活性を示す新規の DNase を用い<sup>9)</sup>、本法のさらなる改良を行う必要がある。

#### E. 結論

今年度の研究により、発熱発疹性疾患を引き起こす 11 種類のウイルスを迅速および簡便に同時検出することが可能な Multiplex PCR 法の開発を行い、DNase 処理などのプロトコールの修正が必要ではあるが、その有用性を確認することができた。本法を用いることにより、発熱発疹性疾患由来ウイルスの検査時間の短縮ならびに検査費用の縮減が可能であると考えられる。

#### F. 参考文献

1. GLOBAL MEASLES & RUBELLA STRATEGIC PLAN:2012-2020.  
([http://www.who.int/immunization/newsroom/Measles\\_Rubella\\_StrategicPlan\\_2012\\_2020.pdf](http://www.who.int/immunization/newsroom/Measles_Rubella_StrategicPlan_2012_2020.pdf))
2. Tanaka T, Kogawa K, Sasa H, Nonoyama S, Furuya K, Sato K: Rapid and simultaneous detection of 6 types of human herpes virus (herpes simplex virus, varicella-zoster virus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, human herpes virus 6A/B, and human herpes virus 7) by multiplex PCR assay. *Biomed Res.* 30;279–285, 2009.
3. Zoll GJ, Melchers WJ, Kopecka H, Jambroes G, van der Poel HJ, Galama JM: General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses: application for diagnostic routine and persistent infections. *J Clin Microbiol.* 30;160–165, 1992.
4. Iturriza-Gomara M, Megson B, Gray J: Molecular

detection and characterization of human enteroviruses directly from clinical samples using RT-PCR and DNA sequencing. *J Med Virol.* 78;243–253, 2006.

5. Mosquera Mdel M, de Ory F, Moreno M, Echevarria JE: Simultaneous detection of measles virus, rubella virus, and parvovirus B19 by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 40;111-116, 2002.
6. Zhulidov PA, Bogdanova EA, Shcheglov AS, Vagner LL, Khaspekov GL, Kozhemyako VB, Matz MV, Meleshkevitch E, Moroz LL, Lukyanov SA, Shagin DA: Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease. *Nucleic Acid Res.* 32; e37, 2004.
7. Shagin DA, Rebrikov DV, Kozhemyako VB, Altshuler IM, Shcheglov AS, Zhulidov PA, Bogdanova EA, Staroverov DB, Rasskazov VA, Lukyanov S. A novel method for SNP detection using a new duplex-specific nuclease from crab hepatopancreas. *Genome Res.* 12;1935-1942, 2002.

#### 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

なし



表 1 発熱発疹性疾患を引き起こすウイルスを標的とした Multiplex PCR のプライマー配列

セット	プライマー名	標的	配列 (5'→3')	塩基長	引用文献	ウイルス		
Set A-1	HSV12F	+	GCCAGAAAAAATACATCGGGTTCATC	279 bp	?)	HSV-1, -2		
	HSV12R	-	TGAGGACAAAAGTCCGATGTCGCTGT	161 bp				
	VZV-F	+	TCCGACATCGAGTCGAATTCAGGTC			229 bp	VZV	
	VZV-R	-	GGTGGGTGAGACCTACACATGCTTT					
	EBV-F	+	CTTAGAATGTTGGCCGGGCTGAAAT	EBV				
EBV-R	-	ATCCAGTACGCTTTTGTGAGCCCAAG						
Set A	CMV-F	+	GCGGTACCGTTOAAAGAAAGCATAA	131 bp	?)	CMV		
	CMV-R	-	TGGCCACTGGGTCTTCATCTCTTTAC					
	HHV-6A/B-F	+	ATGCCCCATCAATGCTGGATAGA	183 bp				
	HHV-6A/B-R	-	CCCTGATCTTACGAGCAAAAGC					
Set A-2	HHV-7F	+	GCCGTTTGGGAAATATTGGAGAGAT	347 bp	?)	HHV-7		
	HHV-7R	-	ACGCAAGACGACCCACTTCTTAAACA					
Set B	Primer 2	+	TCCTCGGGCCCTGAAATGGG	156 bp	?)	Enterovirus		
	EV12	-	ATTGTCACCATAAGGAGCCA	229 bp	4)			
	Su2F	+	CTAGGATTGCTGAAATGATATG				289 bp	5)
	Su2R	-	AAATTTGCTGAATGADTTCTC					
	Rub2F	+	CACGCCCCAGCGACAACT					
Rub2R	-	GAGAGCCATGACRGGGCTGA						
EP2+	+	CAAAAGCATGTGAGTGAAGG	94 bp	Parvovirus B19				
EP2-	-	GTCCTGTGGTCATATGAA						

Multiplex PCR Assay Kit (Takara)

Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen)

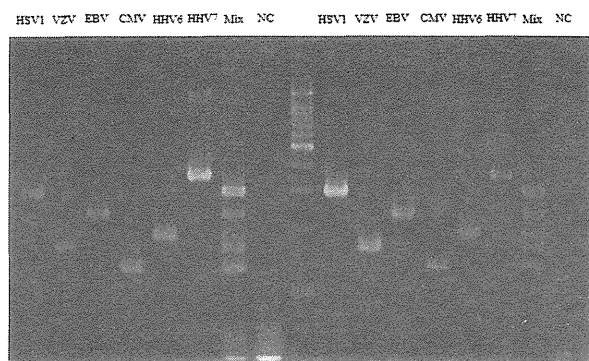


図 1 ヘルペスウイルス 1型から 7型を標的とした(Set A) Multiplex PCR の電気泳動写真

Multiplex PCR Assay Kit (Takara) Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen)

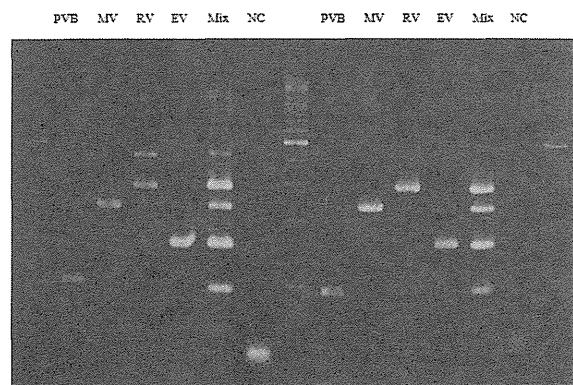


図 2 エンテロウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、パルボウイルス B19 を標的とした(Set B) Multiplex PCR の電気泳動写真

Multiplex PCR Assay Kit (Takara)

Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen)

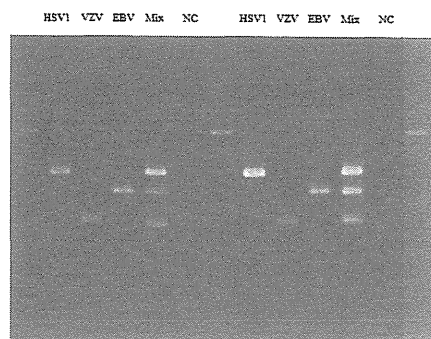


図 3 ヘルペスウイルス 1-2 型、3 型ならびに 4 型を標的とした (Set A-1) Multiplex PCR の電気泳動写真

Multiplex PCR Assay Kit (Takara)

Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen)



図 4 ヘルペスウイルス 5 型、6 型ならびに 7 型を標的とした (Set A-2) Multiplex PCR の電気泳動写真

表 2 ヘルペスウイルスにおける Multiplex PCR の検出感度

	10000	1000	100	10	1
HSV1	+	+	+	-	-
VZV	+	+	+	-	-
EBV	+	+	+	+	-
CMV	+	+	-	-	-
HHV6	+	+	+	+	-
HHV7	+	+	-	-	-

単位は copies/assay

表3 麻疹ウイルス、風疹ウイルス、エンテロウイルスならびにパルボウイルス B19 における Multiplex PCR の検出感度

	10000	1000	100	10	1
MV (D8)	+	+	+	+	-
RV (1E)	+	+	+	-	-
RV (2B)	+	+	-	-	-
EV71	+	+	-	-	-
CA6	+	+	+	-	-
CA16	+	+	+	-	-
PVB	+	+	-	-	-

単位は copies/assay

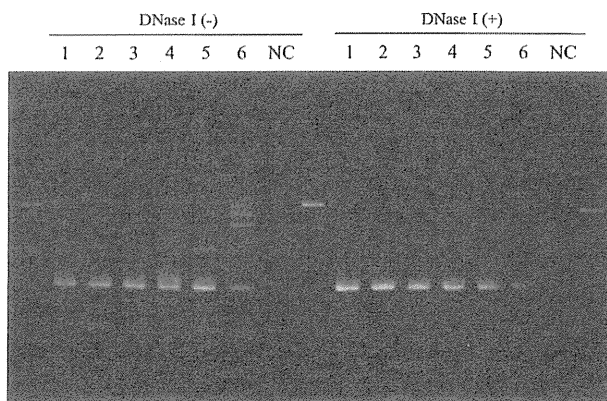


図5 Set B の Multiplex PCR における DNase I 処理による非特異産物の変化

### III. 研究成果の刊行に関する一覧

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

著者氏名	論文タイトル名	雑誌名	巻	ページ	出版年
Abo H, Okamoto K, Anraku M, Otsuki N, Sakata M, Icenogle J, Zheng Q, Kurata T, Kase T, Komase K, Takeda M, Mori Y.	Development of an improved RT-LAMP assay for detection of currently circulating rubella viruses.	Journal of Virological Methods.	207	73-77	2014
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 an adult with severe clinical symptoms: a case report.	Am J Med.	127(4)	e3-4	2014
Kurata T, Kanbayashi D, Komano J, Kase T, Takahashi K.	The reply. Pitfalls of National Surveillance Systems for Vaccine-associated Measles.	Am J Med.	127(8)	e19	2014
Kurata T, Kanbayashi D, Nishimura H, Komono J, Kase T, Takahashi K.	Increased reports of measles in a low endemic region during a rubella outbreak in adult populations.	Am J Infect Control.			印刷中
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 2011-2012.	Jpn J Infect Dis.	67(4)	311-314	2014
Miyoshi M, Komagome R, Ishida S, Nagano H, Okano M.	Epidemiology and laboratory diagnoses of rubella in Hokkaido district during the Nationwide Outbreak in Japan, 2011-2013.	Jpn J Infect Dis.	67(6)	479-484	2014
Takahashi T, Arima Y, Kinoshita H, Kanou K, Saitoh T, Sunagawa T, Ito H, Kanayama A, Tabuchi A, Nakashima K, Yahata Y, Yamagishi T, Sugawara T, Ohkusa Y, Matsui T, Arai S, Satoh H, Tanaka-Taya K, Komase K, Takeda M, Oishi K,	Ongoing increase in measles cases following importations, Japan, March 2014: times of challenge and opportunity.	Western Pac Surveill Response J	16; 5(2)	31-3	2014

Yasui Y, Mori Y, Adachi H, Kobayashi S, Yamashita T, Minagawa H	Detection and genotyping of rubella virus from exanthematous patients suspected of having measles using reverse transcription-PCR.	Japanese Journal of Infectious Diseases	67(5)	389-391	2014
庵原俊昭	ウイルス感染症の検査法	JOHNS	30	1545-1548	2014
庵原俊昭	わが国におけるワクチンの安全性評価についてー現状と課題ー.	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	45	630-637	2014
岡本貴世子、森嘉生	先天性風疹症候群の予防と風疹抗体価の推移	検査と技術	42(5)	464-469	2014
加藤峰史、仁平 稔、喜屋武向子、新垣絵理、高良武俊、岡野祥、久高潤、照屋忍、高嶺明菜、金城恵子、小林孝暢、山川宗貞、伊禮 壬紀夫、平良勝也、大野 惇、糸数公、新里 敬、渡辺蔵人、伊波千恵子、知念正雄	フィリピンからの B3 型麻疹ウイルスによる輸入症例	病原微生物検出情報	35(4)	103-105	2014
小林和夫 田中智之 東野博彦 八木由奈 塩見正司 吉田英樹 廣川秀徹 奥町彰礼 松本治子 田邊雅章 高橋和郎 中川直子 高野正子 入谷展弘 信田真里 松岡太郎 笹井康典	大阪府における麻疹流行状況ー2014 年前半ー	IASR	Vol. 35	296- 298	2014 年
駒瀬勝啓 竹田誠	海外の麻疹の情報 2013	病原微生物検出情報	35(4)	97-98	2014
坂田真史、森嘉生	風疹ウイルスの生活環	ウイルス	64(2)	137-146	2014
調恒明、村田祥子、戸田昌一、岡本(中川)玲子、小川知子、堀田千恵美、小倉惇、平良雅克、仁和岳史	風疹/先天性風疹症候群の検査	臨床と微生物	41(3)	229-234	2014
砂川富正	わが国の麻疹に関する疫学情報 (2014 年 3 月末時点)	ワクチンジャーナル	2(1)	38-39	2014
砂川富正	再びワクチンを用いた対応が重要になってきた麻疹・風疹の状況	チャイルドヘルス	17(9)	638-642	2014
高橋琢理、有馬雄三、木下一美、加納和彦、齊藤剛仁、伊東宏明、中島一敏、八幡裕一郎、新井智、佐藤弘、多屋馨子、大石和徳、砂川富正	2013~2014 年の麻疹海外輸入例のまとめ	病原微生物検出情報	35	98-100	2014
竹田誠 駒瀬勝啓	輸入麻疹と国内伝播	感染症	44(6)	206-217	2014

長野秀樹, 三好正浩, 駒込理佳, 岡野素彦.	風疹の現況とその対策-北海道における情勢を中心に-	道衛研所報.	64	1-7	2014
根来麻奈美, 長尾みづほ, 菅 秀, 庵原俊昭	血清抗体価からみた MRワクチン第 4 期接種の評価	小児科臨床	67	1673-1678	2014
古川英臣 梶山桂子 宮代 守 佐藤正雄 伊藤孝子 酒井由美子 井出瑤子 植山 誠 眞野理恵子 衣笠有紀 戸川 温 高田 徹 猪 狩洋介 駒瀬勝啓	フィリピン渡航者への D9 型麻疹ウイルスの検出-福岡市	病原微生物検出情報	35(5)	132	2014
森嘉生, 大槻紀之	風疹ウイルスの特徴	臨床とウイルス	42(1)	19-25	2014
安井善宏, 尾内彩乃, 伊藤雅, 安達啓一, 中村範子, 廣瀬絵美, 小林慎一, 山下照夫, 皆川洋子, 荒ヶ田智子, 浅井康浩, 加藤勝子, 竹内清美	ベトナム渡航者からの麻疹ウイルス遺伝子 H1 型の検出-愛知県	病原微生物検出情報	35(7)	177-178	2014
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 大嶋孝弘 清水英明 岩瀬耕一 岡部信彦 小泉祐子 平岡麻理子 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 甲賀健史 鈴木理恵子 阿南弥生子 舟久保麻理子 弘光明子 坂本洋 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発事例	病原微生物検出情報	35(4)	100 - 102	2014

