

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班
分担研究報告書

麻疹・風疹検査診断ラボラトリーネットワークの維持、改善に関する研究

研究分担者 国立感染症研究所 ウイルス第三部第二室長 森 嘉生

研究要旨 麻疹および風疹は天然痘、ポリオに続きWHOが排除を目指している感染症であり、各症例数を一定数以下にする事とともに、検査診断によるサーベイランス体制の確立や検出されたウイルス株の鑑別が求められている。本研究では地方衛生研究所における検査状況を把握するため、アンケートにより検査実績を調査した。麻疹については2017年に報告された症例に対して遺伝子型解析まで行われた例が多かったのに対し、風疹は非常に少なかった。これは2017年時点では風疹については全例の遺伝子検査が求められていなかったことに起因すると考えられる。また、どちらの検査もおよそ80%の症例にリアルタイムRT-PCRが使用されており、本法の普及が進んできたものと考えられた。また、遺伝子検査に陽性コントロールとして用いる参照RNAについて、麻疹風疹のいずれも改良を行った。

A. 研究目的

麻疹および風疹は天然痘、ポリオに続きWHOが排除を目指している感染症である。麻疹および風疹の排除は「優れたサーベイランス体制が存在する特定の地域において、1年間以上継続して伝播した麻疹（風疹）ウイルスが存在しないこと」と定義されており、排除認定を受けるためには、各症例数を一定数以下にする事とともに、検査診断によるサーベイランス体制の確立や検出されたウイルス株の鑑別が求められている。日本ではこれに対応するために、麻疹については平成24年12月に「麻疹に関する特定感染症予防指針」を、風疹については平成29年12月に「風疹に関する特定感染症予防指針」を改定し、各疑い例に対し、原則として全例にIgM 抗体検査等の免疫学的検査の実施を求めると共に、地方衛生研究所においてウイルス遺伝子の検出による病原体検査の実施を求めようになった。麻疹については平成27年にWHO西太平洋地域から排除認

定をうけることに、このことが大いに貢献したと考えられている。

これまでに地方衛生研究所における遺伝子検査に使用する参照RNAを整備し、配布を行っている。麻疹の参照RNAはコンベンショナルRT-PCRとリアルタイムRT-PCRで別々の参照RNAを用いなければならず、現場より改善の声が挙がっている。風疹の参照RNAは、遺伝子検出用コンベンショナルRT-PCR法の標的領域には外来の挿入配列があり、増幅産物のサイズで検体由来増幅産物と見分けることができ、参照RNAからのコンタミネーションの防止に役立っている。しかし、遺伝子型決定領域の標的部位については挿入配列を加えておらず、参照RNAからのコンタミネーションの判別は遺伝子配列を確認するまで不可能である。

本研究では2017年の麻疹および風疹の検査診断状況を把握し、検査診断体制の維持、改善する事を目的に、地衛研への検査実績の調査、遺伝子検査法の参照RNAの改良を行な

った。

B. 研究方法

1. 地方衛生研究所の麻疹および風疹ウイルス遺伝子検査実施状況

麻疹・風疹レファレンスセンターを通じて、全国 74 地衛研にアンケートを実施し、2017 年における麻疹・風疹ウイルス遺伝子検査の実施状況を調査した。調査内容は 検査症例数、リアルタイム PCR 法を用いた検査症例数、検査陽性症例数、遺伝子解析を実施した症例数、遺伝子型解析の結果等である。

2. 麻疹および風疹ウイルス遺伝子検査に用いる参照 RNA の改良

麻疹ウイルス RT-PCR 用のプライマー、プローブの認識部位と重ならないように外来遺伝子を参照 RNA に挿入し、問題なく検出可能か検討した。また風疹ウイルス遺伝子型決定領域にプライマー認識部位と重ならないように外来遺伝子を挿入するように合成したプラスミド DNA から RNA を転写合成し、問題なく使用できるかを検討した。

C. 研究結果

1. 地方衛生研究所の麻疹および風疹ウイルス遺伝子検査実施状況

全国 74 の地衛研うち、2017 年に麻疹の検査を行った地衛研は 69 カ所、検査された症例数は 1,516 症例であった。また、麻疹の検査を実施した 69 カ所の地衛研のうち、2015 年から導入されたリアルタイム PCR 法を検査に使用した地衛研は 51 カ所であった。1,516 症例中 1,206 症例の検査にはリアルタイム PCR 法が使用されていた。検査された 1,516 症例のうち、麻疹ウイルス遺伝子が検出された症例数は 213 症例であった（検査陽性）。213 症例のうち 185 症例で遺伝子型解析が試みられ、157 症例から遺伝子型 D8 の麻疹ウイルスが、7 症例から遺

伝子型 B3 の麻疹ウイルスが、2 症例から遺伝子型 H1 の麻疹ウイルスが検出された。またワクチン株である遺伝子型 A が 22 症例から検出された（表 1）。同様に風疹の検査を行った地衛研は 52 カ所、検査された症例数は 706 症例であった。また、風疹の検査を実施した 52 カ所の地衛研のうち、2015 年から導入されたリアルタイム PCR 法を検査に使用した地衛研は 41 カ所であった。706 症例中 539 症例の検査にはリアルタイム PCR 法が使用されていた。検査された 706 症例のうち、風疹ウイルス遺伝子が検出された症例数は 12 症例であった（検査陽性）。12 症例のうち 10 症例で遺伝子型解析が試みられ、3 症例から遺伝子型 2B の風疹ウイルスが、5 症例から遺伝子型 1E の風疹ウイルスが検出された。またワクチン株である遺伝子型 1a が 1 症例から検出された（表 2）。

2. 麻疹および風疹ウイルス遺伝子検査に用いる参照 RNA の改良

麻疹ウイルス RT-PCR 用のプライマー、プローブの認識部位と重ならないように外来遺伝子を参照 RNA に挿入した。作成した RNA を段階希釈し、リアルタイム RT-PCR 法で検出を行なったところ、現行の参照 RNA と同様の検出効率であることが確認された。コンベンショナル RT-PCR 法で検出を試みたところ、目的のサイズで増幅されることから今回作成した参照 RNA 候補は、リアルタイム RT-PCR 法ならびにコンベンショナル RT-PCR 法のどちらにも共通して使用できることが示された。今後はこれを大量調製して品質確認をした上で、地方衛生研究所に配布したいと考えている。

風疹ウイルス遺伝子型決定領域にプライマー認識部位と重ならないように外来遺伝子を挿入するように合成したプラスミド DNA から RNA を転写合成した。作成した RNA を

段階希釈し、リアルタイムRT-PCR法で検出を行なったところ、現行の参照RNAと同様の検出効率であることが確認された(図)。コンベンショナルRT-PCR法(遺伝子型決定領域増幅法)で検出を試みたところ、通常のウイルス由来の増幅産物より大きなサイズで増幅されることが確認された。今後はこれを大量調製して品質確認をした上で、地方衛生研究所に配布したいと考えている。

D. 考察

麻疹ならびに風疹は、WHO が排除を目指す感染症であり、その排除認定には検査診断に基づいた質の高いサーベイランス体制を求められている。また、検査診断の質を担保するために、WHO が認証した国家検査機関(National Laboratory; NL、日本においては感染研)か、NLによって精度管理された検査施設において検査が実施される事を求めている。一方、日本においては「特定感染症予防指針」によって、麻疹および風疹疑い例すべてに麻疹 IgM 抗体検査等の実施を求めると共に、地方衛生研究所におけるウイルス遺伝子の検出による検査の実施を求めている。

地衛研における検査実施状況を把握する目的で、アンケート調査を実施した。風疹に関しては指針が改定される前の調査になるため、全例の遺伝子検査が求められていない時期での調査になることに注意が必要である。麻疹は検査された疑い 1515 症例のうち検査陽性だったのは 14%だったのに対し、風疹疑い症例の場合には 706 症例のうち、2%程度であった。これは風疹を疑ってというよりは、麻疹疑い症例として検査に提出されたものを麻疹検査とあわせて実施したため、陽性率が低かったものと考えられる。

また、感染症発生動向調査による 2017 年の

麻疹患者報告数は 189 例であり、今回の調査によるとそのうち約 88%で遺伝子型解析が成功したことが示唆された。一方、風疹患者報告数は 93 例であるが、約 10%でしか遺伝子型の解析が完了していないことが示唆された。平成 30 年 1 月より風疹も地方衛生研究所における遺伝子検査が全例に求められるようになったことから、今後はこれらの検査状況に大きな変化が生じることが予想される。今後も地方衛生研究所での検査実績調査を行い、状況の確認をおこなっていききたい。

2015 年より麻疹風疹ウイルス遺伝子検出法として導入したリアルタイム PCR 法の利用状況を調査した。リアルタイム PCR は感度が優れている事に加え、反応終了後にチューブを解放するステップがなく、検査行程での交差交雑のリスクが低減すること、また、一度の多検体を処理できる等の利点があり、感染研では地衛研にリアルタイム PCR 法の導入を勧めてきた。2017 年では地衛研で実施された麻疹疑い 1515 症例の検査のうち 80%、風疹疑い 706 症例のうち 76%がリアルタイム PCR で行われており、リアルタイム PCR 法の普及が進んでいると思われた。

麻疹および風疹ウイルス遺伝子検査用の参照 RNA の新規候補を作成した。麻疹についてはリアルタイム RT-PCR とコンベンショナル RT-PCR の両法に共通して使用できるもので、これを用いることで現場での煩わしさを解消できるものと期待される。風疹については遺伝子型決定領域増幅 RT-PCR でも増幅サイズで判別が可能にしたもので、もし参照 RNA のコンタミネーションが起きた場合でも即座に判別が付き、検査時間の短縮に繋がることを期待される。いずれもなるべく早期に配布を行えるよう準備を進めたい。

E . 結論

アンケート調査で、地方衛生研究所74か所における2017年の麻疹および風疹の検査実態について把握を行なった。また、麻疹ならびに風疹ウイルスの遺伝子検査法の参照RNAの改良を行なった。

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

論文発表

1. Mori Y, Miyoshi M, Kikuchi M, Sekine M, Umezawa M, Saikusa M, Matsushima Y, Itamochi M, Yasui Y, Kanbayashi D, Miyoshi T, Akiyoshi K, Tatsumi C, Zaito S, Kadoguchi M, Otsuki N, Okamoto K, Sakata M, Komase K, Takeda M. Molecular epidemiology of rubella virus strains detected around the time of the 2012-2013 epidemic in Japan. *Front Microbiol.* 10.3389/fmicb.2017.01513, 2017.

学会発表

1. 該当なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1 . 特許取得

該当なし

2 . 実用新案登録

該当なし

3 . その他

該当なし

表1 地方衛生研究所における麻疹検査実績(2017年)

ブロック	検査症例数	陽性症例数	Genotype					ウイルス分離陽性数
			D8	B3	H1	A	NT	
北海道	17	1	1	0	0	0	0	0
東北・新潟	236	61	53	0	0	3	5	15
北関東・千葉・東京	342	38	34	2	1	1	0	5
神奈川・甲・信・静岡	126	14	10	3	0	1	0	2
北陸	64	6	5	0	0	1	0	1
東海	167	27	20	0	0	5	2	3
近畿	183	13	12	0	0	0	1	1
中国・四国	288	27	16	0	1	9	1	4
九州	72	10	6	2	0	1	1	2
沖縄	21	0	0	0	0	0	0	0
計	1516	198	157	7	2	21	10	33

2017年麻疹・風疹遺伝子検査実績調査より

表2 地方衛生研究所における風疹検査実績(2017年)

ブロック	検査症例数	陽性症例数	Genotype				ウイルス分離数
			2B	1E	1a	NT	
北海道	2	0	0	0	0	0	0
東北・新潟	69	1	0	1	0	0	0
北関東・千葉・東京	168	1	1	1	0	0	0
神奈川・甲・信・静岡	111	6	1	1	1	0	0
北陸	6	0	0	0	0	0	0
東海	39	0	0	0	0	0	0
近畿	143	4	1	2	0	1	0
中国・四国	135	0	0	0	0	0	0
九州	33	0	0	0	0	0	0
沖縄	0	0	0	0	0	0	0
計	706	12	3	5	1	1	0

2017年麻疹・風疹遺伝子検査実績調査より

図 風疹ウイルス検出試験 新規ポジティブコントロール



