

## 38. 麻疹の詳細な疫学調査と迅速検査法の確立

倉田 貴子 (大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課)

### 1. 目的

2008年から国と都道府県が連携し、2012年の麻疹排除を目標に麻疹の全数把握が始まっている。年々ワクチン接種率は向上してきているが、府内の地域によってはワクチン接種率にばらつきがあり、麻疹の予防に対する認識がまだ十分に浸透していない。2007-2008年の全国的な麻疹の流行では典型的な臨床症状を示さない修飾麻疹や成人麻疹の割合が増加しており、それに伴って地方衛生研究所の実験室診断の重要性が増してきている。しかし、これまでに推奨されていた麻疹ウイルス検出プロトコールは判定に至るまでに長い時間を要するため迅速な診断は困難であった。従って、従来法よりも迅速な麻疹検査法を確立すること、そしてその実験室診断に付随する疫学情報を収集し、麻疹流行の動態を明らかにすることを目的とした。

### 2. 材料と方法

#### 1) 麻疹ウイルスとPCR

乾燥弱毒生麻疹ワクチンピケン CAM® (ピケン、大阪、日本)および2007年から2009年に大阪府内で発生した麻疹疑い症例患者の咽頭拭い液および EDTA 血から QIAamp Viral RNA mini Kit(QIAGEN, Hilden, Germany)、QIAamp RNA Blood Mini Kit(QIAGEN)を使用して抽出した RNA を用いて RT-nested Polymerase Chain Reaction (PCR)を行った。

プライマーは国立感染症研究所の病原体検出マニュアル[1]および既報の論文[3]をもとに、麻疹ウイルスの H および N 遺伝子を標的として作成し、first PCR には SuperScript® One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq (Invitrogen, California, U.S.A.)、second PCR には ExTaq (Takara、滋賀、日本)を用いた。PCR の条件は、プライマーの T<sub>m</sub> 値をもとに増幅産物の大きさを考慮し、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (Takara)を用いて各サイクルの温度とサイクル数について検討した後に決定した。陽性コントロールとしてワクチンから抽出した RNA、陰性コントロールとして精製水を使用し、試薬の調製は隔離された部屋で専用ピペットおよびフィルター付きチップを用いて行った。

#### 2) 系統樹解析および分子疫学調査

麻疹 PCR で N 遺伝子が増幅されたサンプルは、QIAGEN MinElute Purification kit(QIAGEN)を用いて精製した後 BigDye® Terminators v1.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems Inc. CA, U.S.A.)を使用して ABI3130 シークエンサー(Applied Biosystems)でダイレクトシークエンスを行った。得られた配列と各遺伝子型のリファレンス株[4]の N 遺伝子の N 末端 450bp 領域について CLUSTAL W を用いて系統樹解析を行い、麻疹患者の疫学情報とあわせて検討した。

### 3. 結果

#### 1) PCR法の確立

既報の論文と国立感染症研究所のマニュアルをもとにプライマーを決定し(表1)、麻疹ウイルスのH遺伝子とN遺伝子の増幅が同一サーマルサイクラーで行えるようにアニーリング温度の検討を行った。N遺伝子の増幅はpMVGTr2をfirstおよびsecond PCR両方に使用する seminested PCRとした。温度条件はfirst PCRを50 30分、94 3分を1サイクル、94 40秒、58 40秒、72 1分を30サイクル、72 10分を1サイクルで行い、second PCRを94 2分を1サイクル、94 1分、60 1分、72 1分を30サイクル、72 7分を1サイクルとして行った。これによりPCRにかかる時間はfirst PCR(RT-PCR)で2時間36分、second PCRで2時間24分となり、検出感度は $10^{-0.4}$  TCID<sub>50</sub>で従来法(first PCRで5時間13分、second PCRで5時間24分、検出感度 $10^{0.6}$  TCID<sub>50</sub>)から大きな改善がみられた。

表1. 使用プライマーの配列

プライマー名	増幅領域	プライマー配列 (5' 3')	用途
MHL1	H遺伝子	ACGGATGATCCAGTGATAG	1st PCR
MHR1	H遺伝子	TTGAATCTCGGTATCCACTC	1st PCR
MHL2	H遺伝子	TACCTCTCATCTCACAGAGG	2nd PCR
MHR2	H遺伝子	CACCTAAGGCTAGGTTCTTC	2nd PCR
NP1053F	N遺伝子	GCTATGCCATGGGAGTAGGAGTGG	1st PCR
pMVGTr2	N遺伝子	GAGGGTAGGCGGATGTTGTT	1st および 2nd PCR
pMVGTrf1	N遺伝子	CGATCTTACTTTGATCCAGC	2nd PCR

#### 2) 麻疹ウイルスの系統樹解析と分子疫学調査

2007年から2009年7月の期間に麻疹疑い症例と診断された81名の患者の咽頭拭い液およびEDTA血液から抽出したRNAを用いて上記の方法でPCRを行い、31名(38.27%)のサンプルから麻疹ウイルス遺伝子を検出した。2007年は検査を行った51検体中22検体(43.13%)、2008年は20検体中8検体(40.0%)、2009年は現在までのところ10検体中1検体(10.0%)で麻疹ウイルス遺伝子の増幅がみられた。ウイルスが検出された患者31名のうち、ワクチン接種歴が確認されたのは2名で、残り29名はワクチン接種歴不明または未接種の患者であった。

増幅された麻疹ウイルス遺伝子をダイレクトシーケンスし系統樹解析を行った結果、2007年に検出されたウイルスのN遺伝子配列は全てがD5型、2008年は4例がD5型、3例がH1型、1例がD4型で、2009年は1例がワクチン株であるA型に分類された(図1)。

D5型のウイルスのN遺伝子配列は、2007年の第7-8週に検出されたウイルスに1bpの違いがみられた以外は、2007-2008年を通して全て一致していた。

3例のH1型ウイルスは、同一時期に接触歴のない2つの家族から検出されたもので、配列は3例とも完全に一致していた。いずれの患者にも渡航歴はなかったが、この配列はBLAST検索の結果、2007年に香港で報告された配列[EU368828] (MVs/Hong Kong.CHN/36.07/1[H1])と100%の相同性を示した。

D4 型のウイルスは、発症直前にイスラエルへの渡航歴のある患者から検出されており、BLAST 検索の結果では 2007-2008 年に米国で発生したイスラエルからの輸入症例で検出された配列 [EU715981], [EU715977], [EU375750] と一致していた。また、A 型ウイルスは MR ワクチン接種後 1 週間の 1 歳児から検出されており、Edmonston-Zagreb 株 [AY486084] などのワクチン株の配列と 99.8% の相同性を示していた。

#### 4. 考察

麻疹は非常に感染力が強いことから、感染拡大防止のためにも迅速な診断が求められていたが、今回迅速な遺伝子検査系を確立することができた。検査時間の大幅な短縮と検出感度の上昇により、今後修飾麻疹などの臨床診断の難しい症例についても迅速に感染の有無を確認できるようになると考えられた。また、今回確立した検査系は、国立感染症研究所で最近新しく公開されている検査法 [2] と同等の感度であることを確認しており、検査精度にも問題がないと考えられた。

2007-2008 年に全国的に見られた麻疹の流行は大阪府内でも確認されており、実際の臨床検体からの麻疹ウイルスの検出および遺伝子型の決定を行うことで、府内の流行状況を明らかにできた。2007 年の流行では全国的に D5 型のウイルスが流行していたが、大阪府内でも D5 型ウイルスが検出され、府内の流行は全国的にみられたものと同様の流行であったと考えられた。一方で、2008 年の臨床検体からは D5, D4, H1 型ウイルスが検出されたことから、府内では多様な遺伝子型の麻疹ウイルス感染がみられた可能背が示唆された。

H1 型ウイルスは 2002-2003 年に全国で散発的な流行がみられたが [5]、それ以降は国内で数例の報告があるのみであった。現在は中国や韓国での流行が知られており [6, 7]、2006 年-2007 年には日本への輸入症例も報告されている。大阪府内で今回検出された H1 型ウイルスの N 遺伝子は 3 例とも同一の配列で、BLAST 検索の結果では 2007 年に香港で検出された H1 型ウイルスの配列 [EU368828] [MVs/Hong Kong. CHN/36.07/1[H1]) と完全に一致した。しかし、いずれの患者にも渡航歴がなかったことから、患者はごく最近国外から大阪府内に持ち込まれた H1 型ウイルスに国内で感染した可能性が高いと考えられた。

D4 型は、ヨーロッパやアフリカ東部および南部、インドなどで発生が報告されているが [4]、日本国内ではこれまでに報告されていなかった。D4 型ウイルスが検出された患者には、発症直前にイスラエルへの渡航歴があり、その遺伝子配列は 2008 年にアメリカで検出されたイスラエルからの輸入症例の配列 [EU715977] (Measles virus strain MVi/New York.USA/7.08) と完全に一致していた。患者が渡航した当時、イスラエルでは D4 型麻疹ウイルスの大規模な流行がみられており、アメリカやベルギーでイスラエルからの麻疹の輸入症例が報告されていた [8]。これらのことから、本症例は D4 型麻疹ウイルスの日本への輸入症例であることが示唆された。

これまで日本は欧米と比較して麻疹発生数が多かったために、麻疹の輸出症例に注意が向けられることが多かった。しかし日本国内の麻疹の発生数はワクチン接種率の上昇により年々減少してきており、今後は輸入症例についても検討していく必要がある。今回確立した検査系は、迅速性にウイルスの感染源に関連する遺伝子情報を供給できることから、今後の麻疹対策に有用であると考えられた。

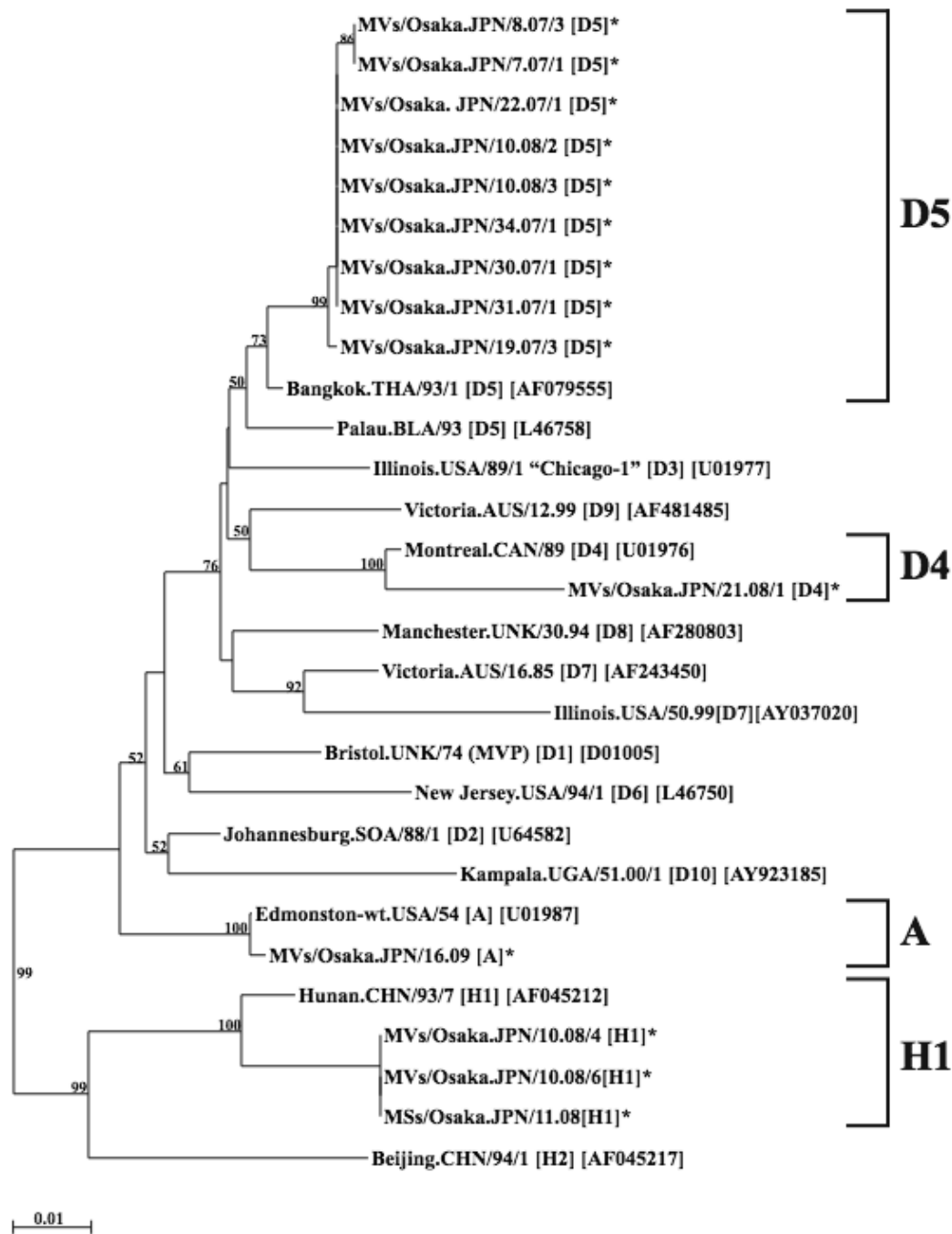


図1 . 2007-2009年7月までに大阪府内で検出された麻疹ウイルスN遺伝子に基づく系統樹 (NJ法)

\* : 大阪府内で検出された株

## 引用文献

1. 国立感染症研究所 病原体検出マニュアル 麻疹 平成 14 年 3 月
2. 国立感染症研究所 麻疹診断マニュアル(第 2 版) 平成 20 年 7 月
3. Korukluoglu, G., Liffick, S., Guris, D. et al. Genetic characterization of measles viruses isolated in Turkey during 2000 and 2001. *Virology*. 2: 58, 2005.
4. WHO. New genotype of measles virus and update on global distribution of measles genotypes. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 80:347-51, 2005.
5. National Institute of Infectious diseases and Tuberculosis and Infectious Disease control division, Ministry of Health, Labor and Welfare.: Measles, Japan, 2001-2003. *Infect. Agent. Surveillance Rep.* 25: 60-61, 2004.
6. Zhang, Y., Ji, Y., Jiang, X. et al. Genetic characterization of measles viruses in China, 2004. *Virology*. 5: 120, 2008.
7. Centers for disease control and prevention (CDC). Elimination of measles –south korea. 2001-2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 56: 304-7, 2007.
8. Lernout, T., Kissling, E., Hutse, V. et al. An outbreak of measles in orthodox Jewish communities in Antwerp, Belgium, 2007-2008: different reasons for accumulation of susceptibles. *Euro. Surveill.* 14(2): pii: 19087, 2009.

## 経費使途明細

項目	用途	金額
消耗品	PCR 試薬・酵素・プライマー合成等	417,628 円
旅費		27,840 円
その他	英文校閲費・振り込み手数料等	54,744 円
合計	(助成金および利子等を含む)	500,212 円