

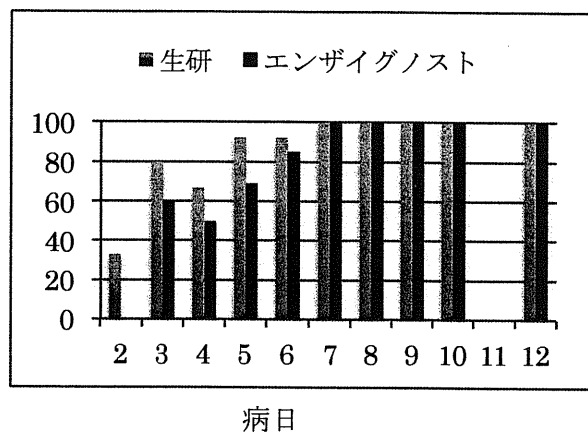
チン接種後、約4ヶ月を経て麻疹ワ
クチン株が検出された症例について
第15回日本ワクチン学会学術集会

東京都日本教育会館、2011年12月
10日～11日

表 1.伝染性紅斑血清中の IgM 抗体の検出

検体	HPVB19		麻疹		風疹
	PCR	IgM(生研)	IgM (生研)	IgM (エンザイグノスト)	IgM (生研)
1	+	+ (7.4)	+ (1.6)	-	-
2	+	+ (5.0)	+ (1.7)	-	-
3	+	+ (2.5)	-	-	-
4	+	+ (7.1)	+ (1.7)	-	-
5	+	+ (5.6)	-	-	-
6	+	+ (7.4)	+ (2.2)	-	-
7	+	+ (3.6)	+ (1.2)	-	-

図 1 各キットの麻疹 IgM 抗体検出率



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

早期麻疹排除及び排除状態の維持に関する研究

分担研究項目：全国自治体の麻疹診断における連携強化に関する研究

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

要旨

麻疹排除を確認するためには、麻疹疑い症例について、全国の地方衛生研究所が全例にウイルス検査診断を行うことが求められている。ウイルス検査の結果、本邦の麻疹の発生状況の詳細が判明したと同時に、麻疹の診断根拠および届出に付随する新たな問題点も浮上してきていることから、ウイルス検査と麻疹に対する医療機関の態勢について、現状とその問題点を調査した。その結果、届出や衛生環境研究所へのウイルス検査の依頼について、各医療機関により区々であり、検体採取の遅れが明らかとなった。ウイルス感染症の診断は、麻疹ウイルスの証明イコール確定診断である。麻疹に対する理解を詳細かつ明瞭にしていくには、今後も全国の地方衛生研究所が、全例にウイルス検査を行う取り組みを続けることが必要である。

A. 目的

2012年までに本邦における麻疹排除を達成し、それを確認するためには、各地方自治体と医療機関が患者情報の提供や検査診断の必要性を十分認識し、確実なウイルス検査につなげる体制を構築する必要がある。つまり、麻疹患者発生の検知と、それに続く迅速な医療機関からの検体収集と、各地方衛生研究所でのウイルス確認検査が鍵となる。厚生労働省の通知（2010年11月）により、麻疹疑い症例については、全国の地方衛生研究所が全例にウイルス検査診断を行うことが求められている。当初、麻疹全例のPCR検査は、地方衛生研究所にとって過剰な負担ともなりかねないと危惧されたが、この2年間の麻疹疑い症例数の激減もあり、ほぼ混乱なく実施されているようである。得られた麻疹ウイルス検査の結果から、本邦の麻疹の発

生状況の詳細が判明したと同時に、麻疹の診断根拠および届け出に付随する新たな問題点も浮上してきている。そこで、今年度の研究は、麻疹ウイルス検査と麻疹に対する医療機関の態勢について、現状とその問題点を検討した。

B. 方法

群馬県では、衛生環境研究所内に患者情報サーベイランスと病原体サーベイランスの両者を有効に機能させる感染制御センターが存在する（図1）。麻疹の取り組みとして、麻疹流行を即時に把握するため、センターでは、県医師会から法的麻疹診断定義に含まれない麻疹疑い症例を含む症例報告について提供される。さらに、各医療機関や保健所からの疫学や届出に関する情報、そして衛生環境研究所で実施した

麻疹ウイルス検査の結果を併せてまとめ、必要な各機関に情報還元している。これらの取り組みで得られた情報を基に、2010年度、2011年度における群馬県の麻疹ウイルス検査と届出状況について調査した。2011年度については、2011年12月現在のデータである。

C. D. 結果と考察

群馬県における2010年度と2011年度の麻疹届出と麻疹ウイルス検査状況について表1に示した。2010年の報告例では、県医師会と保健所からの疑い症例報告は23件であった。さらに、臨床診断と、主に民間検査機関の血清抗体価を診断にしていると考えられる検査診断の結果を基にした各医療機関からの届出数は全体で8件であった(保健所に直接、麻疹疑いの相談があった症例を含む)。そのうち、臨床診断例は3件、検査診断例は5件であった。衛生環境研究所へのPCR検査依頼は全体で8件であり、結果は全て陰性であった。同様に、2011年度では、県医師会と保健所からの疑い症例報告は15件、届出数が全体で4件、そのうち、臨床診断例は3件、検査診断例は1件であった。また、PCR検査の依頼は全体で9件であり、全て陰性であった。これらの報告から、届出や衛生環境研究所へのウイルス検査の依頼について、各医療機関により区別であることが明らかとなった。症例定義に準じている症例については、PCR検査を依頼しない医療機関、つまり、臨床あるいは血清診断で届出されているが、麻疹ウイルスが証明されていない症例が含まれ、麻疹の可能性は少ないと判断される可能性が高い。麻疹の実態が十分把握されていない状況であることが分かった。さらに、PCR検査において麻疹ウイルスが陰性であったにもかかわらず、届

出が取り下げられなかった症例もあり、この場合、麻疹ではない可能性が極めて高いと考えられる。次に、衛生環境研究所にPCR検査を依頼された検体の採取状況について表2に示した。早く採取された検体では、発病日から1日目であり、遅い検体では13日後であった。この採取期間の差は、血清抗体価を測定した後に再度、検体を採取してから依頼している医療機関が存在するためであることが分かった。国立感染症研究所感染症情報センターの「医師による麻疹届出ガイドライン第三版」では、麻疹ウイルス検出用の検体は、臨床診断後すぐに発疹出現後7日以内に採取されたものが好ましく、血清抗体価検査と平行して行うよう通達されている。このことから、検体採取の遅れは、麻疹の確定診断への弊害となっていると考えられる。

ウイルス感染症の診断は、直接ウイルスを検出することで、確定診断ができるようになった。麻疹は不顕性感染が殆どないことから、麻疹ウイルスの証明イコール確定診断となる。また、適切な時期に採取された3種の患者検体(咽頭ぬぐい液・血液・尿)のいずれから麻疹ウイルスが検出されなければ、まず麻疹を否定するものと考えてよい。これらを行っていくためには、地方衛生研究所、各保健所、そして各医療機関が連携をはかり、さらに、臨床医あるいは各保健所担当者へのウイルス検査の重要性についての認識を促すことも必要である。全例にウイルス検査を行うという、手間も費用もかかるが画期的ともいえる世界に類を見ない取り組みを、今後も全国の地方衛生研究所が続けることにより、麻疹に対する理解が、さらに詳細かつ明瞭になるであろう。

E. 結論

麻疹の診断根拠および届出に付随する新たな問題点を解決する為には、地方衛生研究所、各保健所、そして各医療機関が連携をはかること、そして、麻疹ウイルスの証明イコール確定診断であることから、全国の地方衛生研究所が、全例にウイルス検査を行う取り組みを続けること、が必要である。

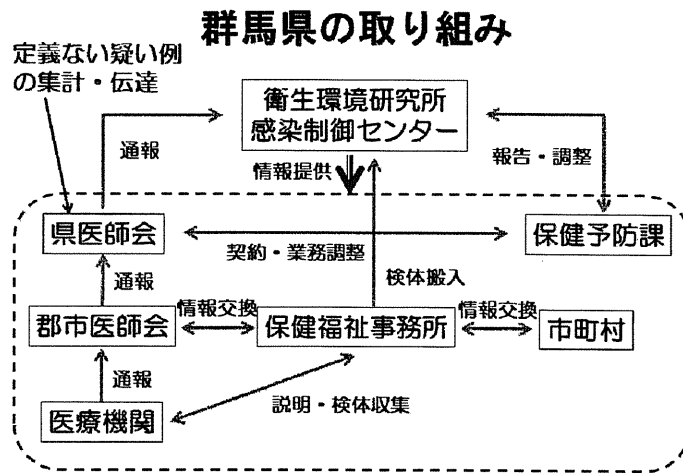


図 群馬県の取り組み

表1 群馬県の麻疹届け出と検査状況

H22年度							
定義なし 含む症例数	IgM等 実施	IgM等 結果	衛研PCR	届出数	臨床診断 検査診断	届出 削除数	
17	12	3 (+)	4 全て(-)	6	3	1	
保健所へ連絡 6			3 (+)	4 全て(-)	2		
					3		
					2		
H23年度							
定義なし 含む症例数	IgM等 実施	IgM等 結果	衛研PCR	届出数	臨床診断 検査診断	届出 削除数	
14	8	4 (+)	8 全て(-)	4	3	1	
保健所へ連絡 1			1 (-)		1	1	

* 不明を除く

表2 群馬県における麻疹検体採取状況

H22年度				H23年度					
依頼 No.	検体days		PCR	依頼 No.	検体days		PCR		
	咽頭	血液	尿		咽頭	血液	尿		
1		10	10	—					
2	1		1	—	1	10	10	—	
3		4		—	2	8	8	—	
4	6		6	—	3	9	9	—	
5	7			—	4	13	13	13	—
6	3	3	3	—	5	8	8	—	
7		6	6	—	6	6	6	—	
8	7	7	7	—	7	6	6	—	
9		5	5	—	8	7	7	7	—

**平成 23 年度 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**

「血清麻疹 IgM 測定キットの特異性および感度の検証」

研究分担者	調 恒明	山口県環境保健センター
研究協力者	渡邊宜朗	山口県環境保健センター
	戸田昌一	山口県環境保健センター
	濱岡修二	山口県環境保健センター
	富田正章	山口県環境保健センター

研究要旨

麻疹排除については、2012 年度の達成を目指し様々な取り組みが進められている。その中で地方衛生研究所(以下地衛研とする)においては、疑い症例を含む麻疹患者の確実な検査診断が求められている。現在、国内の地衛研においては RT-PCR 法による遺伝子検査を最優先に実施しているが、民間試験検査機関では、主に IgM 抗体の検査が行われている。民間試験検査機関で使用されている麻疹特異的 IgM 抗体検査キット(以下キットとする)による陽性例の中には、伝染性紅斑や突発性発疹等、麻疹以外の発疹性疾患によって高い IgM 値を示す例が含まれていることが国立感染症研究所やレファレンスセンターで確認されている。

そこで、中国・四国ブロックの各地衛研から分与を受けた血漿(血清)を用いて、市販されている 2 社の検査キットについて特異性、感度を検討した結果、現在広く使用されている検査キットの改良が必要と考えられた。

A. 研究目的

平成 22 年 11 月 11 日付け健感発 1111 第 2 号厚生労働省健康局結核感染症課長通知を受け、ほぼ全ての自治体において麻疹の検査体制が整備された。

定点報告から全数報告に切り替わった 2008 年には、11,015 名の麻疹患者の発生報告があったが、予防接種の

接種勧奨等の対策により 2009 年には 739 名と激減し、2010 年 457 名、2011 年 434 名と減少を続けている。

しかしながら、海外からの輸入例による集団発生が各地で確認されており、麻疹排除達成のひとつの指標となる麻疹確定症例が年間人口 100 万人に対し 1 人未満という基準には未だ達していない。

発生報告の中には、臨床診断や民間試験検査機関による IgM 抗体検査結果のみにより診断がなされ届出に至っているものがあるが、我々地衛研においては、それらの患者の検体を確保し確実な検査診断に努めなければならない。

そのような中、遺伝子検査とともに実施している IgM 抗体検査に使用するキットについて、伝染性紅斑や突発性発疹等の他の発疹性疾患においても陽性となることが確認され、精度の高い検査を実施しないまま発生報告がなされている症例が含まれている。

そこで、国内で主として使用されている A 社のキット及び国内流通の少ない B 社製のキットを用い、キット間の差異を比較し有用性について検討した。

B. 研究方法

中国・四国ブロックの各地衛研において 2010 年 4 月から 2011 年 8 月末までに搬入のあった患者検体のうち、血漿(血清)検体 43 検体の分与を受け、当センター保管の 19 検体を含め 62 検体について A 社及び B 社製キットによる麻疹特異的 IgM 抗体検査を実施し、検査結果と遺伝子検査結果等を比較しキットの有用性について検討した。

C. 研究結果

A 社のキットでは 28 検体が陽性、8 検体が判定保留となった。一方、B 社のキットでは、7 検体が陽性、6 検体が判定保留となった。62 検体のうち各

地衛研実施により遺伝子検査が陽性であった 9 検体については、A 社で陽性 7 検体、判定保留 1 検体及び陰性 1 検体となり、B 社で陽性 6 検体、判定保留 2 検体及び陰性 1 検体という結果が得られた。A 社のキットで陽性を示したものの多くが B 社キットで陰性であることが確認された。一方、B 社のキットで陽性及び判定保留を示した検体については、判定保留の 1 検体を除き、A 社のキットでは全て陽性を示した(図 1)。

表 1 に検体採取までに要した日数別に検体数をまとめた。遺伝子検査陽性で IgM 抗体陽性を示した検体は、3 から 14 病日の期間に集中した。2 病日以内に採取された 2 検体については、両キットで陰性あるいは判定保留を示した。

A 社キットの抗体指数別検体数を麻疹の検査診断アルゴリズムに従い振り分けたものを表 2 に示す。遺伝子検査陽性、A 社キット陽性を示した 7 検体のうち 6 検体は抗体指数 8 以上、1 検体についても 7.98 と高い値を示していた。しかし、麻疹遺伝子が検出されていない検体についても 4 検体で 8 以上を示しており、1.21 から 5 までの区分については、14 検体あった。麻疹確定例が遺伝子検査にて検出された 9 検体のみと考えると、A 社キットによる偽陽性は 21/53 (39.6%) となる。

D. 考察

A 社のキットでは、遺伝子検査陽性を除く 53 検体のうち 21 検体が陽性を

示した。B社のキットでは、1検体であった。このことからA社キットでは偽陽性となる可能性が高くなることが明らかになった。一方、B社キットにおいては麻疹への特異性が高く、その他の発疹性疾患等による交差反応が少ないことが考えられた。

A社及びB社ともに陽性となった検体は、1検体を除き全て遺伝子検査で陽性となっている。遺伝子検査陰性であった1検体については、本調査実施にあたり検体の分与を受けた時点でかなりの日数が経過しており、追跡調査が困難であったが、A社及びB社ともに陽性の場合、遺伝子検査で検出される可能性が高いと考えられた。

IgM陰性及び判定保留の検体で遺伝子検査陽性となった検体については、発病からの検体採取の期間が短く(当日採取及び翌日採取)IgM抗体価が十分に上昇していなかったことが考えられた。

E. 結論

この度の結果から国内で主に使用されているA社のキットによる確定診断は困難であることが考えられた。一方、B社のキットでは麻疹に対する特

異性は高いと考えられるが、感度の点では、発病早期の検体では偽陰性になる可能性が示唆された。

未だ民間試験検査機関の検査結果による診断により届出がなされていることが散見されること及びWHOが示す検査診断法にIgM抗体検査が盛り込まれていることから、キットの改良による検査精度の改善が急務と考えられた。

国内においては、IgM抗体検査は補助的な診断に使用されていることから、遺伝子検査については、今後も適切な時期の検体採取及び確実な検査診断に努めなければならない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

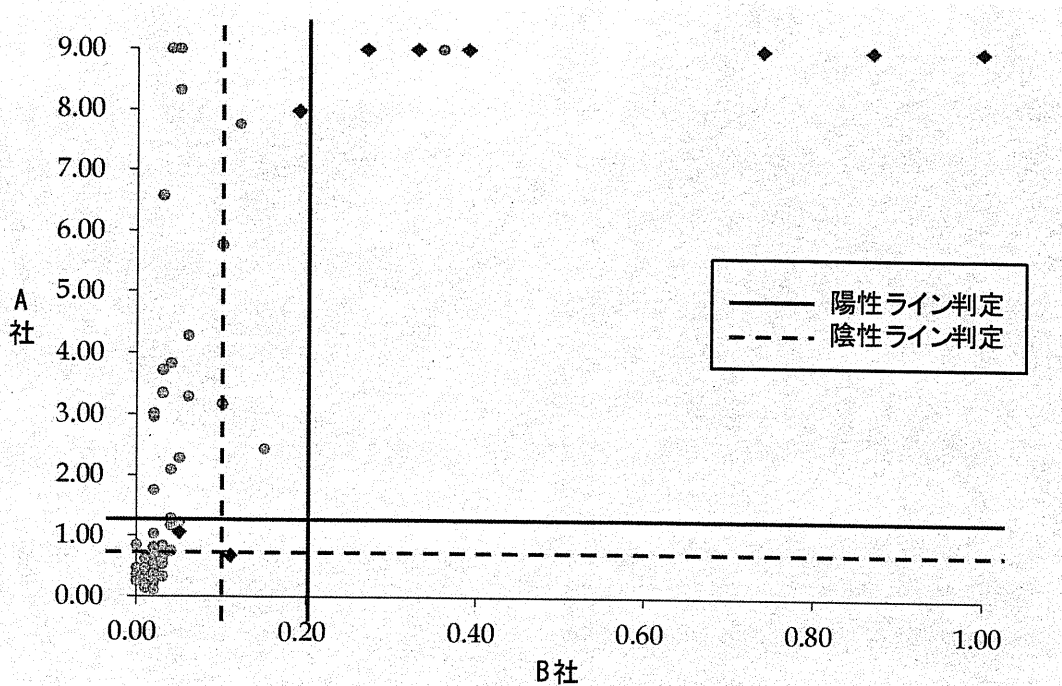
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし



※1) ◩はPCR陽性検体
 2) 判定基準 A社 陽性:>1.2、判定保留 $0.8 \leq \lg M \leq 1.2$ 、陰性:<0.8
 B社 陽性:>0.2、判定保留 $0.1 \leq \lg M \leq 0.2$ 、陰性:<0.1

図 1. キット別抗体指数の分布

表 1. 検体採取日数別 IgM 抗体検査結果

所要日数	検体数	A社陽性	B社陽性
0~2	10	1	1
3~5	22	7 (3)	2 (2)
6~7	6	5 (2)	2 (2)
8~14	17	10 (2)	2 (2)
15以上	5	4	0
不明	2	1	0

※1) 所要日数は発病日を0日とする

2) ()内は遺伝子検査陽性数

表 2. 抗体指数別検体数 (A 社)

抗体指数	検体数
$IgM < 0.8$	26 (1)
$0.8 \leq IgM < 1.21$	8 (1)
$1.21 \leq IgM < 5.0$	14
$5.0 \leq IgM < 8.0$	4 (1)
$IgM \geq 8.0$	10 (6)

※ ()内は遺伝子検査陽性数

【判定基準】

陽 性 : $IgM > 1.2$

判定保留 : $0.8 \leq IgM \leq 1.2$

陰 性 : $IgM < 0.8$

麻疹性疾患の鑑別実験診断法に関する研究

研究分担者： 氏名 森 嘉生 所属 国立感染症研究所ウイルス第三部第二室

要旨

麻疹と類似した発疹性疾患には風疹、突発性発疹、エンテロウイルス感染症、伝染性紅斑などがあり、麻疹疑い例のうちにはこれら類似疾患の患者が少なからず含まれていると考えられる。そのため、麻疹排除に向けて麻疹発生状況を正確に把握するためには、麻疹だけでなく類症疾患についても検査診断の整備が求められる。風疹は2011年に比較的大きな地方流行が発生し、複数の地方衛生研究所で検査の行われた麻疹疑い症例の検体から多くの風疹症例が存在することが報告された。本研究では2010-2011年に日本で検出された風疹ウイルスの多くは、これまで日本で報告のなかった遺伝子型のウイルスであったことから、本研究では病原体検出マニュアルに掲載されている風疹遺伝子検査用RT-PCR法2種が、これらのウイルスの検出に適しているかを再検討した。さらに質の高い風疹遺伝子検査体制の整備のため、高感度なプライマーセットの設定およびポジティブコントロールの作製を試みた。

A. 研究目的

WHO 西太平洋地域は、麻疹排除の目標年を2012年と定めており、本邦もその目標に向けて麻疹対策に取り組んでいる。

麻疹と類似した発疹性疾患には風疹、突発性発疹、エンテロウイルス感染症、伝染性紅斑などがあり、麻疹疑い例のうちにはこれら類似疾患の患者が少なからず含まれていると考えられる。確実な麻疹発生状況の把握のためには、麻疹だけでなく類症疾患についても即座に検査診断が行える体制の整備が求められる。

風疹は三日はしかとも呼ばれ、麻疹に類似した症状を示すことが知られている。2008年に全数把握疾患に指定されて以降、患者報告数は年々減少していたが（2008年303例、2009年147例、2010年90例）、2011年には比較的大きな風疹の地域流行が認められ、368例の報告があった。今回の流行の特徴は、1）20～40代の成人男性が患者の主体であったこと、2）地方衛生研究所で検査が行われた麻疹疑い症例の中から多くの風疹症例の紛れ込みが認められたこと、3）これまで日本では輸入例のみ、もしくは全く報告のなかった遺伝子型（1Eおよび2B）のウイルスが流行の主体であったことが挙げられる。遺伝子型2Bのウイルスは、これまでに日本で検出された遺伝子型のウイルスとは塩基配列が8～10%異なるとされており、病原体検出マニュアル 風疹（平成14年3月編）に記載されているRT-PCR法で感度よく遺伝子を増幅できるか十分に検討がなされてこなかった。

そこで本研究では病原体検出マニュアルに記載のRT-PCR法が2011年に流行した遺伝子型のウイルスを感度よく検出できるかを明らかにし、さらに高感度なプライマーセットを設定することを

行った。また、今回設定したRT-PCR法のポジティブコントロールの作製も試みた。

B. 研究方法

＜風疹ウイルス遺伝子検出用RT-PCRプライマーセットの比較＞

GenBankに登録された風疹ウイルス遺伝子配列を用い、病原体検出マニュアル記載のRT-PCRプライマーセットA-DおよびE1P5-E1P8、ならびに新たに設計したプライマーセットNSの認識部位の各遺伝子型間の変異蓄積を検討した。さらに遺伝子型1a、1Eおよび2Bのウイルスを用いて、それぞれのプライマーセットでの検出効率を検討した。

＜風疹ウイルス遺伝子検出用RT-PCRのポジティブコントロールRNAの作製＞

RT-PCR法は高感度なため、コントロールRNAがわずかにでも検体に混入した場合、コントロールRNA由来の遺伝子増幅が起きて、試験判定を誤る可能性がある。そこで、コントロールRNAのプライマーセットNSで増幅される領域に無関係な配列を挿入することで、コントロールRNAからの増幅産物は、風疹ウイルス野外株由来の増幅産物よりもサイズが大きくなり、電気泳動により容易に判別できるように設計した。また、コントロールRNAの元となるウイルス株には、遺伝子型1aに属するT0-336ワクチン株の親株を用いた。遺伝子型1aウイルスは現在流行が認められていないことから、塩基配列を決定することで、コントロールRNAのコンタミネーションは否定可能である。また、この領域にはT0-336ワクチン株と比較して3つの塩基置換があり、ワクチン株由来の増幅かも判定可能になる。

C. 研究結果

＜風疹ウイルス遺伝子検出用 RT-PCR プライマーセットの比較＞

プライマーセット A-D のプライマー A (20 塩基長) の認識部位は遺伝子型 2A および 2B のウイルス株において、3～5 塩基の変異が認められた。また、同プライマーセットのプライマー C の認識部位においては遺伝子型 2A および 2B ウイルスで、3' 末端のミスマッチが認められた。これらのことから、プライマーセット A-D は遺伝子型 2A および 2B の検出効率が悪い可能性が示唆された。実際、同プライマーを用いて RT-PCR を行ったところ、遺伝子型 1a および 1E のウイルス遺伝子は検出できたが、遺伝子型 2B ウイルスの遺伝子は検出できなかった (図 1)。プライマーセット E1P5-E1P8 および NS は、遺伝子型 1a、1E および 2B のいずれのウイルス遺伝子も検出可能であった。検出感度はプライマーセット 3 種でプライマーセット NS が最も高く、遺伝子型 1a、1E および 2B のいずれのウイルス遺伝子に対しても他のプライマーセットに比べ、約 10 倍の感度で検出が可能であった (図 1)。

＜風疹ウイルス遺伝子検出用 RT-PCR のポジティブコントロール RNA の作製＞

全長のウイルス遺伝子を導入したプラスミドのプライマー NS 増幅部位に 78 塩基を挿入した。このプラスミドから *in vitro* 転写反応により RNA を合成し、コントロール RNA とした。このコントロール RNA をプライマーセット NS で増幅すると予想されるサイズの増幅産物が認められ、容易に野生型ウイルス由来の増幅産物と判別可能であった (図 2)。プライマーセット NS を用いた RT-PCR ではコントロール RNA を 10^2 コピーまで検出可能であった。

D. 考察

病原体検出マニュアル記載の RT-PCR プライマーセット A-D は遺伝子型 2A および 2B ウイルスが検出できない可能性が示唆された。2011 年に日本で検出された風疹ウイルスには遺伝子型 2B ウイルスが数多く存在していた。また世界的にも主流な流行ウイルスとなっている。本プライマーセットを用いた場合、これらのウイルスを見逃す可能性があるため、早急な病原体検出マニュアルの改訂が必要であると考え。改訂法としては本研究で新規に設計したプライマーセット NS が感度の点から見て良いものと考えられる。

2011 年に成人男性に患者が多く認められたのは、中学生女子のみが定期接種の対象であった世代に当たることが原因と考えられる。成人の風疹は症状が比較的軽く、麻疹との鑑別が困難なことが多い。そのこともあり、今後も麻疹疑い症例の中には多くの風疹症例が含まれてくるものと考えられる。それゆえ、麻疹の発生状況を的確に把握するために、麻疹疑い症例で麻疹が否定された場合には、風疹の検査を行うことが推奨される。本研究で得られた結果をもとに、地方衛生研究所における風疹実験室検査体制の整備を進めている

ことが重要であると考えられる。

E. 結論

病原体検出マニュアル記載の RT-PCR プライマーセットの 1 種で最近の遺伝子型ウイルスの検出ができない可能性が示唆された。また、既存の RT-PCR プライマーセットより高感度なプライマーセットの設計を行った。さらに同プライマーセットで使用可能なコントロール RNA の作製を行った。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

竹田 誠、駒瀬勝啓、森 嘉生. 世界麻疹排除計画の現状と世界麻疹風疹実験室ネットワークの役割. 病原微生物検出情報 第 32 巻 第 2 号, pp. 3-4, 2011

倉田貴子、井澤恭子、西村公志、加瀬哲男、高橋和郎、大平文人、松井陽子、梯和代、熊井優子、久保英幸、改田厚、後藤薫、長谷篤、内野清子、三好龍也、森 嘉生、大槻紀之、坂田真史、駒瀬勝啓、竹田誠 大阪府内における 2011 年の風疹患者発生状況 病原微生物検出情報、32(9):6-8, (2011)

森 嘉生、大槻紀之、岡本貴世子、坂田真史、駒瀬勝啓、竹田誠 風疹ウイルスの遺伝子解析 病原微生物検出情報、32(9):11-13, (2011)

多屋馨子、佐藤弘、新井智、北本理恵、岡部信彦、森 嘉生、竹田誠、2010 年度感染症流行予測調査事業風疹感受性調査担当 2010 年度風疹血清疫学調査ならびに予防接種率調査-2010 年度感染症流行予測調査中間報告(2010 年 8 月現在速報) 病原微生物検出情報、32(9):14-17, (2011)

2. 学会発表

倉田貴子、加瀬哲男、高橋和郎、田中智之、駒瀬勝啓、森 嘉生、竹田 誠。2011 年大阪府内における風しん発生状況。第 15 回日本ワクチン学会学術集会、2011

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

図1 風疹ウイルス遺伝子検出プライマーセットの比較

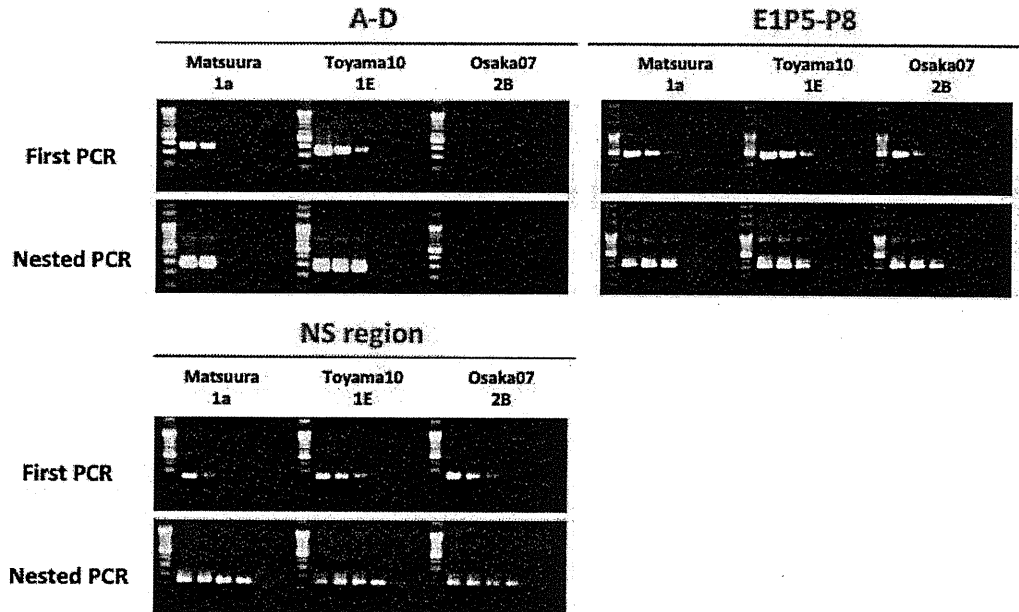
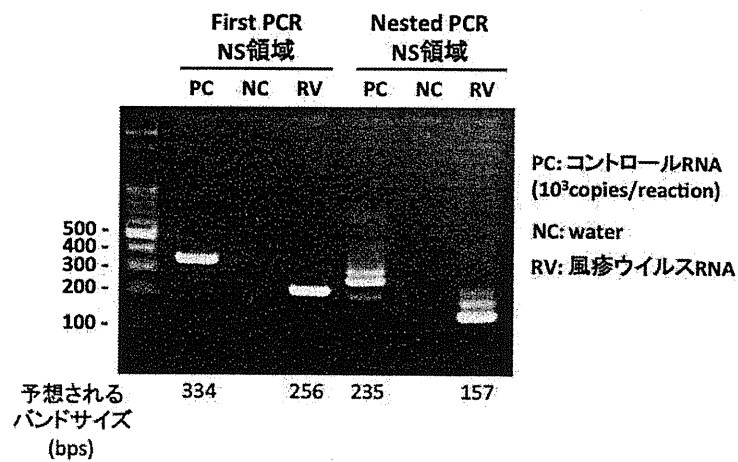


図2 コントロールRNAおよび風疹ウイルスRNA由来増幅産物の比較



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

麻疹ウイルスの流行解析法に関する研究

研究分担者	木村博一	国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者	小澤邦壽	群馬県衛生環境研究所
	齋藤美香	群馬県衛生環境研究所
	水田克巳	山形県衛生研究所
	平良勝也	沖縄県衛生環境研究所
	岡崎薫	香川小児病院
	竹内史比古	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター
	関塚剛史	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
	野田雅博	国立感染症研究所ウイルス第三部
研究代表者	竹田 誠	国立感染症研究所ウイルス第三部

要旨

分子疫学的手法における麻疹ウイルス (MeV) の感染経路をさらに効果的かつ詳細に把握するため、最尤法 (ML 法) による D3, D5, D9, H1 遺伝子型の MeV の時系列系統解析に関する研究を行った。ML 法において、MeV の推定分岐年と進化速度 (置換数/サイト/年) の 2 つのスケールを有する *H* 遺伝子の分子系統樹の作成が可能になった。その結果、D3、D5、D9 および H1 型の MeV は 1905 年頃に分岐、さらに進化速度は、他の呼吸器ウイルスに比し、比較的遅い (4.01×10^{-4} substitutions per site per year) ことが推測された。

A. 目的

2008 年以降、国内の麻疹患者発生数は激減しているが、本疾患の国レベルでの排除を達成するためには、さらに国内患者発生数を減らす必要がある。したがって、今後も分子疫学解析による本疾患の詳細な感染経路の解明はますます重要になると考えられる。今まで、麻疹ウイルス (MeV) を含む種々のウイルスの分子疫学解析には、標的ウイルス遺伝子の塩基配列を基とした近隣結合法 (NJ 法) などが多く用いられてきた。しかし、これらの解析法においては、時系列的な解析要素がないため、流行株の時系列的な伝播を解明することが困難であった。最近、この欠点を補うため、いくつかの時系列系統解析法が考案された。今回の研究は昨年度に引き続き、最尤法 (maximum likelihood method, ML 法) による

MeV D3, D5, D9 および H1 型の *H* 遺伝子領域における詳細な時系列系統解析および selection pressure 解析を行った。

B. 方法

麻疹遺伝子バンク (MeaNS) に登録されている MeV 75 株 (D3, D5, D8, D9 および H1 型) の *H* 遺伝子塩基配列 (1854nt) を材料とした。

分岐年代の推定には、TipDate v1.2 を使用した。RAxML (v3.0) で解析した DR (= different rate 非時計) モデルの尤度と、TipDate で解析した SR (= single rate 時計) モデルと SRDT (= single rate dated tips 分枝先端を分離年とした時計) モデルによる尤度の仮説検定を行った。検定の有意水準には χ^2 分布を用いた。なお、塩基置換速度モデルは、全て GTR で解析した。Selection pressure は、Data Monkey を使用した。

解析法には、SLAC、FEL および IFEL を用いた。

C. 結果

DR モデルに対する SR モデルの仮説検定の結果、 χ^2 分布による値は $p < 0.05$ であった。つまり、有意水準 5% で考慮した場合、DR モデルと SR モデルの対数尤度に有意な差が見られたことから、SR モデルは棄却された。次に、SRDT モデルの場合、 $p = 0.06$ となった。つまり、有意水準 5% で考慮した場合、DR モデルと SRDT モデルの対数尤度に有意な差が見られなかったことから、SRDT モデルを採択した。したがって、SRDT モデルを用いて時系列を導入した分子系統樹を作成した (図)。その結果、1905 年に最初の分岐が見られ、これは D3、D5 および D9 型と H1 型に分岐した。また、D3、D5 および D9 型がそれぞれに分岐したのは 1965 年頃と推定された。進化速度は、 4.01×10^{-4} substitutions per site per 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 (非同義置換) /dS (同義置換) が 0.21 であった。また、Positively selected sites について、SLAC 法では検出されず、FEL および IFEL 法では、2 アミノ酸 (*H* 蛋白遺伝子領域の 476 と 575 番目) が該当した。一方、negatively selected sites については、それぞれの方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 6 箇所 (*H* 蛋白遺伝子領域の 7, 16, 237, 289, 340 および 515 番目) であった。

D. 考察

今回の結果から、MeV の D3、D5、D9 および H1 型について、ML 法による *H* 蛋白遺伝子の時系列を導入した分子系統樹を作成することが可能となった。これは、MeV の 4 種遺伝子型の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であることを明らかにした。進化速度について、他のパラミクソウイルス、例えばヒトパラインフルエンザウイ

ルス 1 型 (HPIV1) の *HN* 遺伝子領域では 7.68×10^{-4} substitutions per site per year、RS ウイルスの *G* 遺伝子領域が 1.8×10^{-3} substitutions per site per year、また、進化速度の速いインフルエンザウイルス A (H1N1) の *HA* 蛋白遺伝子領域が $2 \sim 3 \times 10^{-3}$ substitutions/site/year という報告がある。今回の結果から、進化速度が緩やかに生じていると推測される HPIV1 と近い値であったことから、MeV の *H* 遺伝子の進化速度も HPIV と同様であることが示唆された。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、本研究から 2 箇所のアミノ酸が該当した。また、negative selection site は、免疫系を保つ働きに関連があり、本研究から 6 箇所のアミノ酸が該当した。今後、MeV *H* 領域の蛋白構造と免疫系との関連性を追求するための有用な情報と示唆された。

E. 結論

ML 法を用いた MeV の D3、D5 および D9 型と H1 遺伝子型の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った。さらに、Positive あるいは negative selection site の解析は、免疫系に関わる重要なアミノ酸位置を推定することに有用であると考えられる。

F. 参考文献

1. Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17: 368–376.
2. Goldman N (1993) Statistical tests of models of DNA substitution. *J Mol Evol* 36: 182–198.
3. Rambaut A (2000) Estimating the rate of molecular evolution: incorporating non-contemporaneous sequences into maximum likelihood phylogenies. *Bioinformatics* 16: 395–399.

G. 研究発表

論文発表

1. Tanaka T, Yokoi H, Kobayashi K, Iwanade H, Noguchi Y, Mitsui Y, Okamoto A, Saitoh M, Noda M, Takeda M, Okabe N, Kimura H (2011) First detection of measles virus genotype G3 in a Japanese woman: an imported case. *Jpn J Infect*

Dis 64: 262–263.

H. 知的財産の出願・登録状況

なし。

I. その他

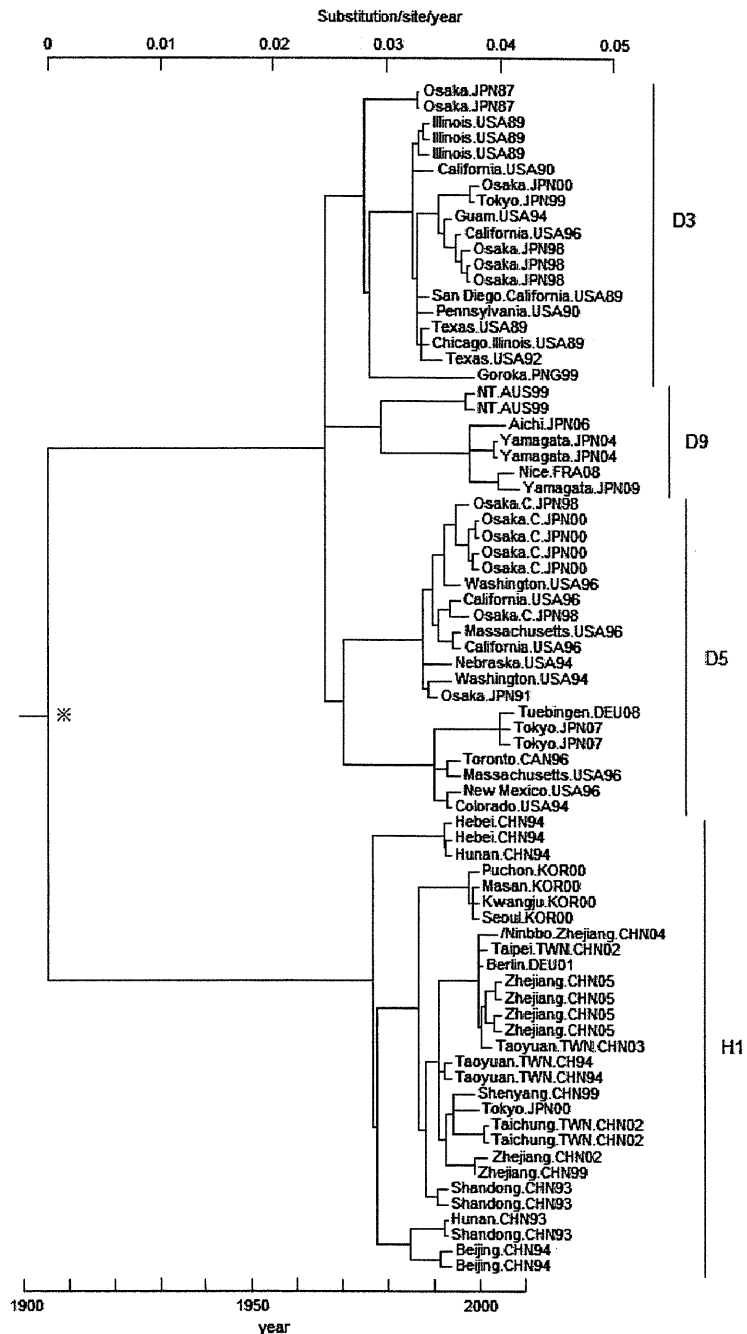


図 ML 法による麻疹ウイルス D3, D5, D9 および H1 型の H 遺伝子分子系統樹

表 麻疹ウイルス D3, D5, D9, H1 型の *H* 遺伝子領域における selection pressure

	SLAC	FEL	IFEL
Positive	0	2	2
Negative	6	44	25

$dN/dS = 0.213185, p < 0.05$

早期麻疹排除及び排除状態の維持に関する研究

研究分担者 柳 雄介 九州大学大学院医学研究院ウイルス学分野

研究要旨

麻疹の病態に関して、(1) 麻疹ウイルス F 蛋白質の変異により融合能が亢進すると、SLAM や nectin 4 のような特異的な受容体がなくても F 蛋白質が活性化され、細胞融合を起こしてウイルスが伝播しうること、(2) 麻疹ウイルスはインフラマゾームを抑制することにより、宿主細胞の IL-1 beta の産生を低下させて自然免疫に対抗すること、(3) 発症に麻疹ウイルスの持続感染が疑われている耳硬化症で、麻疹ウイルス感染の証拠はないことを明らかにした。

A. 研究目的

麻疹ウイルスの病原性をより深く理解するために、下記の3点について研究を行った。

(1) 麻疹ウイルスは、パラミクソウイルス科モルビリウイルス属のマイナス鎖 RNA ウイルスで、エンベロープ膜上に受容体結合蛋白質である hemagglutinin (H) と膜融合を担う fusion (F) 蛋白質という2つの糖タンパク質を持っている。受容体である免疫細胞上の SLAM あるいは上皮細胞上の nectin 4 に H 蛋白質が結合後、F 蛋白質の働きにより細胞表面で膜融合を起こし細胞内に侵入する。しかし、SLAM や nectin 4 を発現していない細胞、たとえば神経細胞にも感染することが知られている。このような SLAM や nectin 4 非依存性の感染機構を明らかにすることを目的とした。

(2) ウイルスが感染すると、細胞は自然免疫応答によりウイルスを排除しようとする。ウイルスに対する自然免疫で最も重要なものはインターフェロンである。それと並んで重要なものに、インフラマゾームによる interleukin 1 beta (IL-1 beta) などの炎症誘発性サイトカインがある。インフラマゾームは caspase-1 を活性化する蛋白質複合体であり、細胞質

受容体、アダプター蛋白質、procaspase-1 から構成される。活性化した caspase-1 は、IL-1 beta と IL-18 のプロセッシングと分泌を制御する。NLRP3 (NOD-like-receptor-family, pyrin domain-containing 3) インフラマゾームは、インフルエンザウイルスやマウス脳心筋炎ウイルスなどの RNA ウイルスを認識することが報告されている。一方、retinoic-acid-inducible gene I (RIG-I) インフラマゾームによって認識されるウイルスも報告されている。麻疹ウイルスとインフラマゾームの相互作用を明らかにすることを目的とした。

(3) 麻疹ウイルス感染は、免疫抑制や中枢神経系での持続感染などの合併症を起こすことが知られている。また、骨異形成によりアブミ骨の可動性が損なわれ、伝音性難聴をきたす原因不明の疾患である耳硬化症の発症に麻疹ウイルスの持続感染が疑われ、実際 RT-PCR により患者組織から麻疹ウイルス遺伝子が検出されている。しかし、その塩基配列やウイルス分離の報告はない。感度の高いウイルス検出法を用いて、麻疹ウイルスの耳硬化症における関与を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

F 蛋白質の融合能は、H 遺伝子と F 遺伝子を培養細胞にトランスフェクトし、顕微鏡で観察するとともに、レポーターを用いた定量法も併用して測定した。組換えウイルスは、これまでに報告されている方法に従って作製した。ウイルスの神経病原性は、10 週齢ハムスターにウイルスを脳内接種し、経時的に動物を観察することにより行った。

IL-1 beta の測定は、培養細胞の上清を ELISA で測定するか、プロセスされた蛋白質の Western blot による検出により行った。shRNA を導入することにより、NLRP3 あるいは RIG-I 産生が低下した細胞株を樹立した。V 蛋白質を欠損した組換え麻疹ウイルスは、既に報告されているものを使用した。レトロウイルスベクターで V 蛋白質を導入することにより、V 蛋白質恒常発現 THP-1 細胞を作製した。蛋白質間の相互作用は、免疫沈降法により解析した。蛋白質の細胞内局在は、コンフォーカル顕微鏡による観察により行った。

手術により摘出されたアブミ骨をそのまま、麻疹ウイルス感受性細胞と共培養するか、あるいは初代培養を作製した後に、共培養を行った。ウイルス遺伝子の検出は、N 遺伝子のプライマーを用いた RT-定量 PCR により行った。

(倫理面への配慮)

組換え麻疹ウイルスや動物を用いた実験は、必要な大臣確認および九州大学動物実験委員会の許可を得て行った。耳硬化症に関する実験は、九州大学医学研究院倫理委員会の許可を得るとともに、患者の同意を得て行った。

C. 研究結果

1. 麻疹ウイルスの膜融合能とトロピズム

膜融合が抑制されるような条件下 (H 蛋白質に変異導入、あるいは受容体陰性細胞での感染) で、膜融合能を示す変異ウイルス 5 株を分離したところ、

H や M 遺伝子には変異が認められず、F 蛋白質に 1 アミノ酸置換が起こっていた。さらに、これまで報告されている SSPE 患者由来のウイルス株の複数で認められる F 蛋白質の変異を 2 種類選択した。これらの変異を持つ 7 種の F 蛋白質は、SLAM 陽性細胞で野生株の F 蛋白質よりも高い融合能を示すだけでなく、野生株の F 蛋白質が膜融合を示さない受容体 (SLAM、nectin 4) 陰性細胞において膜融合活性を示した。これらの F 蛋白質をもつ組換え麻疹ウイルスは、野生型ウイルスとは異なり、受容体陰性細胞に感染して巨細胞を形成するとともに、ハムスターへの脳内接種で神経病原性を示した。

2. 麻疹ウイルスの自然免疫抵抗性

麻疹ウイルス感染は、マクロファージ様細胞であるヒト THP-1 細胞において caspase-1 依存的な IL-1 beta の誘導を引き起こすことが分かった。遺伝子ノックダウン実験により、その誘導は RIG-I インフラマゾームではなく NLRP3 インフラマゾーム依存的に引き起こされることが明らかになった。麻疹ウイルスは、インターフェロンに拮抗する V 蛋白質 (非構造蛋白質) をコードしている。この V 蛋白質を欠損した組換え麻疹ウイルスを THP-1 細胞に感染させたところ、親株にくらべ IL-1 beta をより多く誘導した。V 蛋白質恒常発現 THP-1 細胞 (THP-1/V) では、NLRP3 依存的な IL-1 beta の誘導が抑制された。さらに、免疫沈降法を用いた解析により、V 蛋白質は、自身の C 末端を介して NLRP3 と相互作用することが分かった。THP-1/V 細胞において V 蛋白質と NLRP3 の細胞内局在を観察したところ、未刺激の状態では NLRP3 は細胞質に粒状に分布しているが、インフラマゾームを活性化すると核周囲で V 蛋白質と共局在することが分かった。

3. 麻疹ウイルスと耳硬化症の関係

麻疹ウイルスに対してきわめて感受性が高い Vero/hSLAM 細胞 (SLAM 陽性)、II-18 細胞 (nectin 4 陽性) との共培養、および 1 well あたり 1 pfu 以下の