

麻疹患者数の正確な把握のための研究 — 臨床的に麻疹が疑われた症例からのウイルス検出 —

古川英臣・松藤貴久・宮代守

福岡市保健環境研究所保健科学課

Research for the accurate grasp of number of measles patients
- Detection of the virus from measles suspected cases -

Hideomi FURUKAWA, Takahisa MATSUFUJI
and Mamoru MIYASHIRO

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

福岡市では、平成 23 年から平成 27 年に麻疹届出症例が 102 名あり、麻疹ウイルス (MV) の PCR 検査を行ったが陽性は 7 名のみであった。そこで、麻疹と類似の症状を起こす風しんウイルス (RV)、ヒトパルボウイルス B19 (PVB19)、ヒトヘルペスウイルス 6 型、7 型 (HHV) のマルチプレックス PCR 法による検査を追加で実施した。その結果、RV (36 名)、PVB19 (28 名)、HHV (37 名) を検出した。また、MV を検出した 7 名について、MV の遺伝子型を解析したところ、全て海外株 (B3 型、D9 型) であった。さらに、IgM 抗体検査を実施し、PCR 検査結果と抗体検査結果との関係を調べた。

Key Words : 麻疹ウイルス (MV) measles virus, PCR polymerase chain reaction, 遺伝子型 genotype, IgM 抗体 IgM antibodies

1 はじめに

麻疹は、急性熱性発疹性ウイルス感染症で、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律 (感染症法) に基づく 5 類感染症全数把握疾患である。典型的な症状は、発熱 (2 峰性発熱)、上気道炎症状、結膜炎症状、特有の発疹である。感染経路はヒトからヒトへの空気感染 (飛沫核感染) の他に、飛沫感染、接触感染など様々で、日本では通常春から夏にかけて流行する。原因ウイルスである麻疹ウイルス (以下、MV とする) は Paramyxovirus 科 Morbillivirus 属に属し、直径 100~250nm のエンベロープを有する一本鎖 RNA ウイルスである。MV は A から H の clade に分類され、genotype は 23 種類報告されている^{1),2)}。日本で主に流行しているのは D3、D5 タイプであり、ワクチン株は A タイプである¹⁾。感染症法による麻疹の届出基準は、発熱、発疹、カタル症状の 3 つを満たす臨床診断例かあるいは、臨床症状の 3 つすべてを満たし、かつ、病原体診断 (分離、遺伝子、抗体) のいずれかを満たす検査診断例となって

いる。

WHO によると、世界では毎年約 2,000 万人が麻疹を発症し、2005 年の麻疹による死亡者数は約 34.5 万人と推計されている。WHO は、麻疹をワクチンによってコントロール可能な疾患であると位置づけ、各地域におけるゼロ発生、感染連鎖の遮断 (measles elimination : 麻疹排除) を目標としている³⁾。

麻疹排除の定義は、平成 20 年には「国外で感染した者が国内で発症する場合を除き、麻疹の診断例が 1 年間に人口 100 万人当たり 1 例未満であり、かつ、ウイルスの伝播が継続しない状態にあること」とされていた。しかし、遺伝子検査技術の普及により土着株と輸入株との鑑別が可能となったこと等を踏まえ、平成 24 年に世界保健機関西太平洋地域事務局より新たな定義として「適切なサーベイランス制度の下、土着株による感染が 1 年以上確認されないこと」が示された。また、麻疹排除達成の認定基準として「適切なサーベイランス制度の下、土着株による感染が 3 年間確認されず、また遺伝子型解析により、そのことが示唆されること」が示された⁴⁾。

日本では、「麻疹に関する特定感染症予防指針」に基づき、平成 27 年度までに麻疹の排除を達成すること、世界保健機関による麻疹の排除の認定を受け、かつ、その後も麻疹の排除の状態を維持することを目標とし、サーベイランス、疫学調査、検査の徹底等が行われた。その結果、平成 27 年 3 月 27 日、麻疹の排除状態にあることが WHO 西太平洋事務局より認定された。

当所では、平成 23 年から平成 24 年に麻疹届出症例 48 名の PCR 検査を行ったところ、すべて MV 陰性であった。そこで、原因ウイルスを明らかにし、麻疹患者数を正確に把握するため、平成 23 年から平成 27 年に届出のあった症例 102 名について、麻疹と類似の症状を起こす風しんウイルス（以下、RV とする. ）、パルボウイルス B19（以下、PVB19 とする. ）、ヒトヘルペスウイルス 6 型・7 型（以下、HHV とする）の PCR 検査を追加して行うとともに、IgM 抗体検査を実施したので結果を報告する。

2 材料および方法

2.1 材料

平成 23 年から平成 27 年に、麻疹として届け出のあった 102 名由来の 252 検体（尿 81 検体、咽頭ぬぐい液 71 検体、血液 100 検体）を用いた（表 1, 2）。

ほとんどの症例で血液が採取されており、尿、咽頭ぬぐい液及び血液の 3 検体すべてが採取されたのは約半数の 54 名であった。症例は、30 歳代までが 87 名で 85% を占め、年齢または性別不明者が 3 名であった。

病日は、1 週間以内が 62 名、2 週間以内が 30 名、それ以降及び不明者が 10 名であった。届出基準にある発熱、発疹及びカタル症状の 3 つ全てを認める症例は 52 名、発熱及び発疹のみを認める症例は 39 名であった。渡航歴があったのは 11 名で、ベトナム 3 名、韓国 1 名、フィリピン 5 名、タイ 1 名、マレーシア 1 名であった。

PCR 検査は 252 検体すべてについて実施し、抗体検査は血清が確保できた 57 検体（56 名分）について実施した。

表 1 麻疹届出数及び検体数

平成	23 年	24 年	25 年	26 年	27 年	計
届出	27	19	30	16	10	102
UR	21	14	23	14	9	81
NP	18	14	23	10	6	71
BL	26	19	29	16	10	100

（UR：尿、NP：咽頭ぬぐい液、BL：血液）

表 2 麻疹届出 102 名の概要

年齢	男	女	不明	合計
0 ~ 19	19	18	2	39
20 ~ 39	30	18	0	48
40 ~ 59	9	3	0	12
60 ~	1	1	0	2
不明	0	1	0	1
合計	59	41	2	102

2.2 方法

2.2.1 検体の前処理

咽頭ぬぐい液は、1,750 G（3,000 rpm）で 30 分間遠心し、上清を検体とした。

尿は 500 G（1,500 rpm）で 10 分間遠心し、尿を 1mL 程度残して上清を廃棄し、沈渣細胞を浮遊させたものを検体とした。

血液 2mL に等量の PBS を混和し、あらかじめ Ficoll-paque（分離液、比重 1.077）3mL を分注した遠心チューブに血液を静かに重層し、1,300 G で 20 分間遠心した。表層から順に血漿（PBS で約 2 倍希釈になったもの）、末梢血単核球細胞（以下、PBMC とする. ）、分離液および赤血球成分に分画されるので、PBMC を PBS で 3 回洗浄後、MEM に浮遊させたものを検体とした。また、抗体検査に用いる血液は、1,300 G（2,500 rpm）で 10 分間遠心し、得られた血清（上清）を検体とした。

2.2.2 RNA 抽出及び逆転写反応

2.2.1 で得られた検体から、キアゲン社製 QIAamp Viral RNA mini kit を用いて、RNA 抽出を行った。方法はキットの添付文書に従った。

逆転写には Invitrogen 社製 SuperScript® III Reverse Transcriptase を使用した。前述の抽出した RNA 溶液 15 μ L、DNase/RNase free water 4.25 μ L、5X First-Strand Buffer（試薬キットに付属）4.5 μ L、10mM dNTPs 1.5 μ L、0.1M DTT（試薬キットに付属）1.5 μ L、Random Primer（タカラバイオ社製、1.0 μ g/ μ L）0.75 μ L、RNase inhibitor（38 unit/ μ L）1.0 μ L、SuperScript® III 1.5 μ L を添加して総量 30 μ L にした後、50°C 60 分、99°C 5 分のインキュベーションにより cDNA 合成と逆転写酵素の不活化を行った。

2.2.3 MV, RV conventional PCR（以下、cRT-PCR とする. ）及び遺伝子型別

cRT-PCR は、国立感染症研究所監修の麻疹診断マニュアル（第 2 版、平成 20 年 7 月）及び風疹第二版に準じて行った。タカラバイオ社製 PerfectShot® Ex Taq（Loading dye mix）を用い、麻疹では N 遺伝子領域、HA 遺伝子領域、風しんでは NS 遺伝子領域に対して、RT-PCR、nested-PCR を実施した後、特異的増幅産物が認められた

検体について陽性と判定した。

麻疹ウイルス PCR 陽性となった検体の N 遺伝子領域 (450 塩基) について, ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) を用い, ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。得られた塩基配列は, 近隣結合法 (Neighbor-joining (NJ) 法) により分子系統樹を作成し, 遺伝子型を決定した。使用したプライマーを表 3 に示す。

表 3 MV, RV cRT-PCR プライマー

用途	名称	配列
MV (N) 1st PCR	pMvGTf1m	CGR TCT TAC TTY GAT CCR GC
	pMvGTr1	TTA TAA CAA TGA TGG AGG
MV (N) Nested PCR	pMvGTf2m	AGA YTA GGR CAR GAG ATG GT
	pMvGTr2	GAG GGT AGG CGG ATG TTG TT
MV (HA) 1st PCR	MHL1	AAC GGA TGA TCC AGT GAT AG
	MHR1	TTG AAT CTC GGT ATC CAC TC
MV (HA) Nested PCR	MHL2	TAC CTC TCA TCT CAC AGA GG
	MHR2	CAC CTAAGG CTA GGT TCT TC
RV 1st PCR	NSL F3	TCC TTG CGC CGAAGA CT
	NSL B3-6	AGA GGG GGT CCA CTT GAG
RV Nested PCR	F2 nest	CCA CTG AGA CCG GCT GCG A
	B2 nest	GCC TCG GGG AGG AAG ATG AC

2.2.4 マルチプレックス PCR

RV, PVB19, HHV の PCR は, タカラバイオ社製 Multiplex PCR Assay Kit を使用したマルチプレックス PCR で実施した。1 検体あたりの PCR 反応液及び使用したプライマーを表 4 及び表 5 に示す。PCR 反応液 45 μ L に 2.2.2 で合成した cDNA を 5 μ L を添加し, 1st PCR, nested-PCR を実施した後, 特異的増幅産物が認められた検体について陽性と判定した。1st PCR, nested PCR の PCR 反応条件は同一である (表 6)。

表 4 1 検体あたりのマルチプレックス PCR 反応液

試薬	添加量
DNase/RNase free water	16.15 μ L
プライマー (25 μ M)	
RV (Forward, Reverse)	各 1.0 μ L
PVB19 (Forward, Reverse)	各 0.4 μ L
HHV (Forward, Reverse)	各 0.4 μ L
Mix1 (キットに付属)	0.25 μ L
Mix2 (キットに付属)	25 μ L
合計	45 μ L

表 5 マルチプレックス PCR プライマー

用途 (サイズ)	名称	配列
HHV 1st nested (762 bp)	HHVF	ATAATT GGC AAT GAA CAC CGT T
	HHVR	GAT CCT TTT TGAGAT GCC CAAGG
RV 1st (513 bp)	E1P5	GCC ATG CTA CCG TCG AAATGC C
	E1P8	GCA CAG CAA GCG AGTAAG CCA G
PVB19 1st (242 bp)	PVB-1	CAC TAT GAAAAC TGG GCAATAAAC
	PVB-2	AAT GAT TCT CCT GAA CTG GTC C
RV nested (363 bp)	E1P6	GGC TGAAGT TCAAGA CAG TTC GC
	E1P7	GCAGCC CAC TCC GCC CAG GTC
PVB19 nested (218 bp)	PVB-3	ATAAAC TAC ACT TTT GAT TTC CCT G
	PVB-4	TCT CCT GAA CTG GTC CCG

表 6 マルチプレックス PCR 反応条件

Temperature	Time	Cycle
94 $^{\circ}$ C	60 sec.	1
94 $^{\circ}$ C	30 sec.	
55 $^{\circ}$ C	90 sec.	40
72 $^{\circ}$ C	90 sec.	
72 $^{\circ}$ C	10 min.	1
10 $^{\circ}$ C	Hold	

2.2.5 MV, RV real-time RT-PCR (以下, rt RT-PCR とする。)

平成 27 年 3 月に国立感染症研究所より, 麻疹及び風しんのマニュアルが改訂され, これまで使用していた cRT-PCR に加え, rt RT-PCR が示された。改訂されたマニュアルには麻疹ウイルス遺伝子検出法として用いること, 試験工程の煩雑さやクロスコンタミネーション (交叉汚染) の可能性から, 原則として real-time RT-PCR 法を第一選択とすることが示され, 反応条件が MV と RV は同じであることから, 当所においても平成 27 年 3 月以降は, 2.2.3 の cRT-PCR ではなく, 本項の rt RT-PCR により MV と RV の検査を実施した。

rt RT-PCR は, 国立感染症研究所監修の病原体検出マ

マニュアル麻疹（第3版，平成27年3月）及び病原体検出マニュアル風疹（第三版，平成27年3月）に準じて行った。MV, RVともにライフテクノロジーズ社製 TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix を使用し, Mx3005Pリアルタイム定量PCRシステム（アジレントテクノロジー）を用いた。使用したプライマー及びプローブを表7に示す。

陽性の判定もマニュアルに従い，検体の Ct 値が陽性コントロールの Ct 値以下の場合に「陽性」，陽性コントロールの Ct 値より大きくかつ Ct 値が 40 以下の場合に「判定保留」，Ct 値が 40 より大きい場合に「陰性」と判断した。

なお，「陽性」と判断した場合は，2.2.3 に従い N 遺伝子の cRT-PCR を実施し，PCR 産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定し，系統樹解析により麻疹ウイルスの遺伝子型を決定することとした。

2.2.6 IgM 抗体検査

IgM 抗体検査は，デンカ生研の「ウイルス抗体 EIA「生研」麻疹 IgM」，「ウイルス抗体 EIA「生研」ルベラ IgM」，「ウイルス抗体 EIA「生研」パルボ IgM」を使用し，キットの添付文書に準じて行った。

2.3 麻疹患者の判定

2.2.3 の MV cRT-PCR で特異的増幅産物が認められた場合，または 2.2.5 の MV rt RT-PCR で陽性と判定した場合，麻疹患者とした。

3 結果

3.1 PCR 及び遺伝子型

PCR の結果を表 8 に示す。MV PCR 陽性者は，採取された検体全てが PCR 陽性であった。一方，PVB19 PCR 及び HHV PCR については，陽性者はそれぞれ 28 名及び 37 名で，検体全てが陽性となったのは 4 名及び 3 名であった。また，HHV で血液が PCR 陽性となったのは 19 名であった。

MV PCR 陽性の 7 名の PCR 産物を，ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し，系統樹解析を行った（図 1）。検出された麻疹ウイルスは，B3 型が 4 名，D9 型が 3 名であった。

表 8 PCR 陽性者の検体種類別結果の内訳結果
(UR：尿，NP：咽頭ぬぐい液，BL：血液)

PCR	陽性者	検体数			陽性数			検体全て陽性の人数
		UR	NP	BL	UR	NP	BL	
MV	7	5	7	7	5	7	7	
RV	36	26	33	33	16	20	24	
PVB19	28	21	25	27	10	7	9	
HHV	37	26	33	35	3	21	19	

※ いずれかの検体で陽性となった場合を陽性者とした。

表 7 rt RT-PCR プライマー，プローブ

用途	名称	配列
MV Forward Primer	MVN1139F	TGG CAT CTG AAC TCG GTA TCA C
MV Reverse Primer	MVN1213R	TGT CCT CAG TAG TAT GCA TTG CAA
MV Probe	MVNP1163P	FAM - CCG AGG ATG CAA GGC TTG TTT CAG A - TAMRA
RV Forward Primer	NS(32-54)Fwd	CCT AHY CCC ATG GAG AAA CTC CT
RV Reverse Primer	NS(143-160)Rev	AAC ATC GCG CAC TTC CCA
RV Probe	NS (93-106) Probe	FAM - CCG TCG GCA GTT GG - MGB

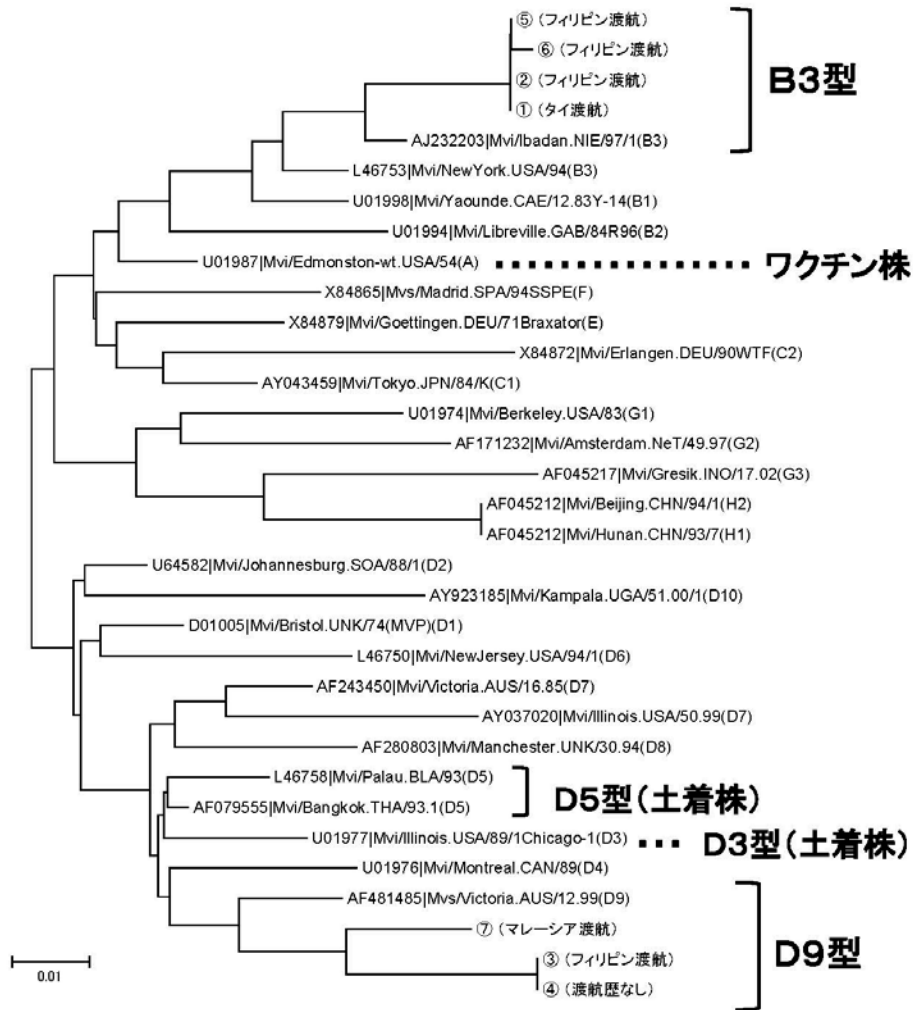


図1 系統樹解析結果

表9 MV PCR 陽性者 (UR : 尿, NP : 咽頭ぬぐい液, BL : 血液)

年齢	性別	病日*	搬入検体			臨床症状			渡航先	
			UR	NP	BL	発熱	カタル	発疹		
①	32	男	21	○	○	○	有	有	有	タイ
②	3	女	8	○	○	○	有	有	有	フィリピン
③	29	男	7	○	○	○	有	有	有	フィリピン
④	30	男	7	○	○	○	有	有	有	無し
⑤	6	男	1	×	○	○	有	有	有	フィリピン
⑥	25	女	8	×	○	○	有	無し	有	フィリピン
⑦	17	男	8	○	○	○	有	有	有	マレーシア

* 病日 : 発症から検体採取までの日数

3.2 抗体検査

IgM 抗体検査を血清が確保できた 56 名について行った結果、麻しん IgM 陽性が 19 名、風しん IgM 陽性が 3 名、パルボ IgM 陽性が 4 名であった。また、1 名については、麻しん及びパルボ IgM がともに陽性であった。

3.3 麻しん患者

麻しん患者と判定した MV PCR 陽性者 7 名の概要を表 9 に示す。陽性者 7 名は採取された全ての検体から MV を検出した。1 名は届出基準にあるカタル症状を確認できなかったが、他の 6 名についてはすべての症状を認め

た。また、表9④の症例については、渡航歴はなかったが、遺伝子型が土着株ではないD9型であった。

3.4 PCRと抗体検査の関係

MV PCRと麻しんIgM抗体検査の結果を表10に示す。陽性一致率が100% (7/7)、陰性一致率が76% (37/49)、全体一致率が79% (44/56)であった。

麻しんIgM抗体検査陽性で、MV PCR陰性となった12名は、RV PCR陽性が2名、PVB19 PCR陽性が4名、HHV PCR陽性が4名、パルボIgM陽性が1名で（一部重複有り）、全て陰性となったのは3名であった。

表10 麻しんにおけるPCRとIgM抗体検査の相関

		PCR		合計
		陽性	陰性	
IgM	陽性	7	12	19
	陰性	0	37	37
合計		7	49	56

4 考察

本調査において、臨床症状が届出基準に合致したのは合計52名で、このうち約9割の46名はMV PCR陰性で、麻しん流行地への渡航歴がなかった。また、麻しん患者と判定した7名の内6名は、臨床症状が麻しん届出基準に合致し、渡航歴があった。さらに、この7名から検出したMVは、遺伝子解析によりB3型とD9型であり、渡航歴のない1名についても、土着株(D3型、D5型)による感染ではないことを確認した。

RVは、遺伝子の検出可能な期間が短く、検出率は発疹出現前後数日に最も高くなるが、前後1週間を越えると著しく低下するため⁶⁾、RV PCR陽性の場合、RVが症状の原因の可能性が高いと考えられる。一方で、PVB19は遺伝子が長期間検出されることがあることから、PCR検査だけではなく、抗体検査の結果等を含め総合的に判断する必要がある⁷⁾。また、HHVは、唾液腺等に持続感染するため、咽頭ぬぐい液から遺伝子が検出されても原因と特定することはできないが、血液から検出された場合や、乳児の患者である場合は症状の原因となる可能性が高い⁸⁾。従って、PCRによる検出数はHHVが最も多いが、血液検体から陽性となったのは19名と少ないことから、本調査の102名はRVに最も多く(36名)感染していたと考えられた。

麻しんIgM抗体検査は、MV PCR陽性の場合、全て陽性であった。しかし、麻しんIgM抗体陽性でMV PCR陰性が12名おり、そのほとんどは、RVなど他のウイル

スを検出しており、麻しんIgM抗体検査は麻しん以外の疾患に罹患している場合も陽性となることが確認された⁵⁾。このため、麻しんの確定にはPCR検査を実施し、総合的に判断する必要があると考えられる。

なお、102名の内、MV PCR陰性だった95名分の届け出については、PCRの結果を速やかに保健所を通して医師に還元した。

今後は、より感度の高い検査を実施するため、MV PCR検査に適した発疹出現後7日以内の検体の確保に努め、RV PCR検査を同時に実施し、医師にその情報を還元することで、麻しん患者の正確な把握に努めていくことが重要であると考えている。また、MV PCR陽性の場合には速やかに遺伝子解析まで実施し、「麻しん排除」状態が維持されていることを確認する必要があると考えている。

謝辞

本調査研究を実施するにあたりご協力を頂きました各区保健福祉センター健康課の皆様へ深謝いたします。

文献

- 1) 国立感染症研究所ホームページ 麻しんとは？
(<http://www.nih.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/518-measles.html>)
- 2) 麻しんウイルス 日本内科学会雑誌第98巻第1号・平成21年1月10日
- 3) 1. 麻しんウイルス —最近の我が国における麻しんの疫学状況、今後の対策— (ウイルス 第57巻 第2号, pp.171-180, 2007)
- 4) 麻しんに関する特定感染症予防指針 平成19年12月28日(平成24年12月14日一部改正・平成25年4月1日適用) 厚生労働省
- 5) 健感発1111第2号「麻しんの検査診断について」平成22年11月11日付け厚生労働省健康局結核感染症課長通知
- 6) 病原体検出マニュアル風疹第二版(国立感染症研究所監修)
- 7) ヒトパルボウイルスB19の検査法 (IASR Vol. 37 p. 9-10: 2016年1月号)
- 8) 病原体検査マニュアル 突発性発疹 Human herpesvirus 6 (HHV-6)および Human herpesvirus 7 (HHV-7) (改訂版, 平成27年8月3日 国立感染症研究所監修)