

麻疹疑い症例からのウイルス検出状況

伊東愛梨 三浦美穂 矢野浩司 大浦裕子

Virus detection and analysis from patients diagnosed with measles.

Eri ITO, Miho MIURA, Koji YANO, Yuko OHURA

要旨

厚生労働省は 2008 年に麻疹に関する特定感染症予防指針を定め、麻疹排除に向けた取り組みを開始した。これにより麻疹疑い症例が発生した場合、可能な限り検体を確保し全数検査を行う事が推奨された。宮崎県では、2008 年より麻疹の全数検査を実施するとともに、遺伝子検査による診断を行う体制を整えている。2012 年 8 月末にタイへの渡航歴がある患者から麻疹ウイルスが検出され、10 月の麻疹終息宣言までに計 8 名の麻疹患者が発生し、すべての患者から D8 型麻疹ウイルスが分離、検出された。今回、2012 年 1 月から 2013 年 1 月末までに麻疹疑いで当所に搬入された 38 名のうち、麻疹ウイルスが検出されなかった 30 名について、麻疹ウイルスと同様の症状を起こすウイルスについて分離および遺伝子検査を行った。検査の結果、11 名から他のウイルス (hRV1 名, RSV2 名, インフルエンザウイルス 1 名, 風疹ウイルス 2 名, コクサッキーウイルス A6 型 2 名, コクサッキーウイルス A9 型 1 名, アデノウイルス 2 型 2 名) が分離、検出された。麻疹は臨床診断が困難なことから、麻疹の患者数を確実に把握するためには、麻疹の遺伝子検査に加えて、他のウイルス検出も積極的に行う必要があると考えられた。

キーワード 麻疹ウイルス, 修飾麻疹, 遺伝子検査

はじめに

2012 年 8 月末から 10 月にかけて、宮崎県において麻疹の輸入事例が発生した。当所には 2012 年 1 月から 2013 年 1 月末までに 38 名の麻疹疑い患者の検体が搬入され (図 1)、遺伝子検査を実施した。近年、ワクチン既接種者における修飾麻疹の増加、それに伴う典型的な麻疹患者が減少し、麻疹症例を経験したことのない医師が増えていること、麻疹の血清診断における偽陽性や偽陰性により臨床診断が困難であることが報告されている¹⁾²⁾。

そこで今回、麻疹疑い患者の麻疹ウイルス遺伝子検査を実施し、陰性であった場合、麻疹と類似する症状を起こすウイルスについて分離および遺伝子検査を行ったので報告する。

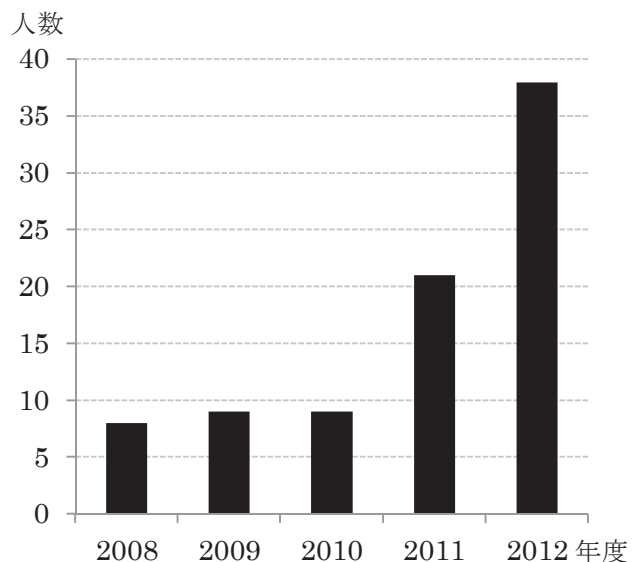


図 1 2008 年から 2012 年までの当所における麻疹疑い患者数の推移

材料と方法

2012年1月から2013年1月25日までに、麻疹疑い患者38名から採取された107検体(咽頭ぬぐい液38検体、尿36検体、血液32検体、便1検体)を用いた。

1 検体の前処理

1) 咽頭ぬぐい液

細胞培養用維持培地 [1%牛胎児血清加 Eagle's MEM (日本製薬) にペニシリン, ストレプトマイシンをそれぞれ100単位, 100 γ /mlの割合で加えたもの] に浮遊させた後, 3000rpm \times 10分間遠心した上清を用いた。

2) 尿

ウイルス分離は, 1500rpm \times 10分間遠心後, 沈渣を1~1.5mlの細胞培養維持培地に再浮遊させたものを用いた。遺伝子検査は未処理の原尿を用いた。

3) 血液

クエン酸ナトリウム加末梢血液をFicoll-paque (HISTOPAQUE-1.077) を用いて血漿と末梢血単核球に分離し, 末梢血単核球をウイルス分離および遺伝子検査に用いた。

4) 便

細胞培養用維持培地で10%乳剤とした後, 3000rpm \times 20分間遠心した上清をフィルター(ポアサイズ0.2 μ m)に通したものを用いた。

2 細胞培養法

Vero/hSLAM, RD-18S, HEp-2, Vero, RD-A, Caco-2の6種類の細胞を用い, 4代まで継代し, 細胞変性効果(CPE)がみられたものを分離陽性とした。分離陽性検体は各ウイルスの中和抗体を用いて型別を行った。

3 遺伝子検査

麻疹ウイルス遺伝子検査は国立感染症研究所「麻疹診断マニュアル(第2版)」に準じて行った。検体からQIAamp Viral RNA Miniキットを用いてRNAを抽出後, RT-PCRを行い, 麻疹ウイルスN遺伝子, HA遺伝子の検出を行った。麻疹ウイルスが検出されなかった場合, 風疹ウイルス, ヒトパルボウイルスB19(B19), アデノウイルス, エンテロウイルス, 発熱や咽頭炎を起こすインフル

エンザウイルス, RSウイルス(RSV), ヒトメタニューモウイルス(hMPV), ライノウイルス(hRV), パラインフルエンザウイルス1型~4型(PIV-1, -2, -3, -4), コロナウイルス(HCoV)OC43, HCoV 229Eの各ウイルスに特異的なプライマーを用いてRT-PCRを行った。RT-PCRで遺伝子が検出された場合は, PCR産物を用いたダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し, 日本DNAデータベース(DDBJ)のBLASTを用いた相同性解析を行い, CLUSTAL Wを利用して型別を行った。

結果

1 検出ウイルス

麻疹疑いで検査依頼のあった38名のうち, 麻疹ウイルスが検出されたのは8名であった。麻疹ウイルスが検出されなかった30名のうち, 11名から麻疹ウイルス以外のウイルスが検出された(hRV1名, RSV2名, インフルエンザウイルス1名, 風疹ウイルス2名, コクサッキーウイルスA6型2名, コクサッキーウイルスA9型1名, アデノウイルス2型2名)。なおB19, hMPV, PIV-1, -2, -3, -4, HCoV OC43および229Eは検出されなかった(表1)。

2 臨床症状

麻疹ウイルスが陽性であった8名のうち, 発症から検体採取までが4病日以上患者は発熱, 結膜充血, コプリック斑などの麻疹特有の症状であるのに対し, 1~2病日の患者では発熱のみ, または発熱と上気道炎などの一般的な風邪様症状のみみられた。一方, 麻疹ウイルスが検出されなかった患者の中には麻疹様の症状を呈する患者もみられた。

3 病日ごとのウイルス検出数

咽頭ぬぐい液, 尿, 血液, 便全ての検体において7病日までにウイルスが検出され, 7病日以降の検体では検出されなかった。

4 検体別ウイルス検出率

麻疹ウイルス検出率は, 咽頭ぬぐい液から16%(6/38検体), 尿から17%(6/36検体), 血液から22%(7/32検体)であり, 血液から最も検出された。

その他のウイルスの検出率は咽頭ぬぐい液から29%(11/38検体)、尿から8%(3/36検体)、血液から3%(1/32検体)であり、咽頭ぬぐい液から最も検出された。また、便1検体については、ウイルス分離によりコクサッキーウイルスA9型が分離された。

考察とまとめ

麻疹が疑われる場合、検体採取時期は発症後1週間以内が好ましいとされ³⁾、感染初期（カタル期：発症後2～4日）では症状が比較的軽く、この時期の臨床症状から麻疹を診断するのは困難である。今回の調査の結果、麻疹ウイルスが検出された患者8名は1～7病日であり、麻疹が疑われる場合は早期の検体採取が望ましいと考えられた。

麻疹と診断した場合は、臨床材料として咽頭ぬぐい液、尿、血液の3セットを検査することが推奨されている。麻疹ウイルスはリンパ節、脾臓、胸腺など全身のリンパ組織を中心に感染、増殖し、リンパ球減少や免疫抑制を引き起こすことから⁴⁾血液検体が重要と考えられる。今回検査対象として107検体を用いたが、血液は32検体と咽頭ぬぐい液や尿に比べて少なかった。今回の調査でも、麻疹ウイルスは血液からの検出率が最も高かったことから麻疹が疑われた場合、血液を優先的に採取することが望ましいと考えられた。

また、他のウイルスは咽頭ぬぐい液からの検出率が高かったことから、麻疹が疑われた場合は血液に次いで咽頭ぬぐい液を採取することで、他のウイルスの検出も可能であると考えられた。なお、麻疹疑い患者からヘルペスウイルス6（HHV6）、ヘルペスウイルス7（HHV7）などの検出報告があることから⁵⁾⁶⁾、麻疹ウイルスが陰性だった検体はこれらのウイルスである可能性も考えられる。

今後HHV6、HHV7等の検査についても検討する必要があると考えている。

平成24年12月14日に麻疹に関する特定感染症予防指針の一部改正により、平成27年度までに麻疹の排除を達成することが目標とされた。麻疹排

除の達成の認定基準として、土着株による感染が3年間確認されないことが示されている。また、世界保健機関は平成24年9月に、日本を含めた32の国及び地域で土着株の流行が無くなっていることを表明している⁷⁾。国内から麻疹排除を確実なものとするためには麻疹の患者数を確実に把握する必要があり、鑑別が必要な他のウイルスについても併せて検査する必要があると考えられる。

謝辞

検体の採取、当所への搬入等にご尽力いただいた医療機関、各保健所の皆様に深謝いたします。

参考文献

- 1) 小澤邦壽 他：地方衛生研究所の検査診断により判明したわが国の麻しんの現状 病原微生物情報, Vol.33.41-42, (2012)
- 2) 永田紀子 他：麻しん症例の病原体診断の必要性 病原微生物情報, Vol.32.80-81, (2011)
- 3) 国立感染症研究所感染症情報センター 麻しん対策技術支援チーム:麻疹の検査診断の考え方(平成24年3月16日)
- 4) 中村英夫：麻疹の病態と診断法 第41回日本小児感染症学会シンポジウム2 小児感染免疫Vol. 22.67-73, (2010)
- 5) 田中幸代 他：大分県における麻しん疑い症例からのウイルス検出状況 大分県衛生環境研究センター, 第38回九州衛生環境技術協議会(平成24年10月23日～24日)
- 6) 梶山 桂子：福岡市における麻しん届出症例の検査状況について 福岡市保健環境研究所, 第38回九州衛生環境技術協議会(平成24年10月23日～24日)
- 7) 厚生科学審議会 感染症分科会感染症部会 麻しんに関する小委員会：麻しんに関する特定感染症予防指針の改正についての概要(平成24年12月14日一部改正・平成25年4月1日適用)

表1 麻疹疑い患者概要

No.	年 齢	性 別	病 日	症 状			PCR			分 離	検出ウイルス	
				発疹	発熱	その他	NS	U	B			
1	35	女	7	○	39.0	筋肉痛、咳、結膜充血、コプリック斑	+	+	+	+		
2	34	女	7	○	39.0	コプリック斑、咳、結膜充血	+	+	+	-		
3	19	女	5	○	39.0	上気道炎、咳	+	+	NT	+		
4	8	女	4	○	38.0	コプリック斑、上気道炎、リンパ節腫脹、結膜炎	+	+	+	+	麻疹	
5	12	女	2		38.6	上気道炎、頭痛	+	+	+	-		
6	26	男	2		39.3	肝機能障害	-	-	+	-		
7	27	男	1	○	39.0	胃腸炎	-	-	+	-		
8	30	男	1		38.5		+	+	+	-		
9	4	男	5	○	40.4	熱性けいれん、口内炎、リンパ節腫脹、結膜充血	+	-	-	-		hRV
10	1	女	5		38.5	口内炎、上気道炎	+	-	-	-		RSV
11	24	男	2		38.2		+	-	-	-		
12	40	男	2		38.3	咽頭炎、咳、鼻水	+	-	-	+	インフルエンザ	
13	22	男	4	○	39.8	結膜充血、咳、鼻水	+	+	NT	-	風疹	
14	46	男	2	○	39.1	関節痛、筋肉痛	+	+	+	NT		
15	12	女	4	○	38.1	上気道炎、咳、鼻水、頭痛	+	-	-	-	CA6	
16	1	男	3	○	38.2	上気道炎	+	+	-	-		
17	0	男	2	○	39.0		NT	NT	NT	+	CA9*	
18	39	男	5		38.9	咽頭炎、頭痛、コプリック斑	+	-	-	-	Adeno2*	
19	1	女	2	○	38.1		NT	NT	NT	+		
20	14	男	8	○	40.5	上気道炎、下気道炎	-	-	-	-	-	
21	42	女	8	○	39.7	関節痛、筋肉痛	-	-	-	-	-	
22	8	男	6	○	39.0	リンパ節腫脹、結膜炎	-	-	-	-	-	
23	3	男	6	○	38.7	咳	-	-	NT	-	-	
24	16	男	4	○	38.1	嘔気・嘔吐	-	-	-	-	-	
25	2	女	2	○	37.6	上気道炎	-	-	-	-	-	
26	31	男	4	○	37.5	上気道炎	-	-	NT	-	-	
27	38	女	2	○	37.2	上気道炎、口腔内白色調湿疹	-	-	-	-	-	
28	7	男	2	○	37.1	口内炎、コプリック斑	-	-	-	-	-	
29	15	女	2	○	37.1	コプリック斑	-	-	-	-	-	
30	41	男	14	○	38.5	麻疹IgM1.96	-	-	-	-	-	
31	13	女	8	○	38.0	麻疹IgM1.49(EIA法)	-	-	-	-	-	
32	39	女	5	○			-	-	-	-	-	
33	78	女	6	○		麻疹IgM1.44(EIA法)	-	NT	-	-	-	
34	44	女	1		37.5	咽頭痛	-	-	-	-	-	
35	38	男	1		38.5		-	-	-	-	-	
36	4	男	2		39.0	上気道炎、鼻汁	-	-	-	-	-	
37	23	女	2		39.1		-	-	-	-	-	
38	17	男	8		39.0	上気道炎、リンパ節腫脹、結膜充血、肝機能障害	NT	NT	-	-	-	

NS：咽頭ぬぐい液 U：尿 B：血液 NT：検査せず *分離ウイルスよりシーケンスで遺伝子型を決定