

## 資料

## 2007年の麻疹ウイルス分離状況及びその遺伝子解析

須藤 亜寿佳, 青木 洋子, 水田 克巳

## Isolation and genetic analysis of measles virus in Yamagata, 2007

by Asuka SUTO, Yoko AOKI and Katsumi MIZUTA

2007年、4月から7月までに採取された6名の成人麻疹患者の検体から麻疹ウイルス(MV)の分離及びMV遺伝子の検出を実施した。また、得られたMV遺伝子を用いて遺伝子解析を行い、その遺伝子型別を実施した。MVは患者6名、13検体中7検体(患者5名)から分離され、MV遺伝子は6名の患者全員から検出された。遺伝子解析の結果、患者6名のうち4名については、D5型のMVに感染したことが明らかとなった。また、残りの2患者から分離されたMVは、ワクチン株と近縁であることが明らかとなった。

Key Words : 麻疹, ウイルス分離, 遺伝子型

## I はじめに

麻疹は小児にとって重要な感染症であるが、2007年春から関東地方の教育機関を中心に、成人麻疹の集団発生が相次ぎ、大きな社会問題となった<sup>1)</sup>。その影響は山形県でも成人麻疹患者の発生という形で現れた。2007年の山形県における定点医療機関からの成人麻疹患者の報告は、4月中旬から始まり、9月上旬まで続いた。なお、山形県では6月6日から7月31日まで健康福祉部長通知により麻疹を全数把握疾患扱いとする対応策もとられた。この期間に当所に送付された患者検体は13検体(患者6名分)であった(表1)。今回、成人麻疹患者の検体から麻疹ウイルス(MV)の分離及びMV遺伝子の解析を実施したので報告する。

## II 材料および方法

## (1) 検体

2007年に定点医療機関等を受診し、麻疹であると診断された患者の咽頭拭い液及び血液を検体とした。咽頭拭い液は、2,000rpm 15分間遠心し、その上清を分離に用いた。血液は凝固防止剤としてクエン酸ナトリウムを用いて採血し、これを検体とした。血液に分離剤のFicoll-Paque (Pharmacia Biotech) を3ml加え、1,000rpm 20分間遠心し、白血球部分を採取した。これに滅菌リン酸緩衝液(-PBS)を加え、10,000rpm 10分間遠心した。この操作を2回繰り返して得られた沈渣をセルバンカー(日本全業工業株式会社)で浮遊したものを分離検体とした。

## (2) 分離方法

B95aおよびSlam-Vero細胞をウイルス分離に用いた。

B95a細胞は10% FBS加RPMI1640(ニッスイ)で増殖させ、-PBSで洗浄後、2% FBS加RPMI1640で浮遊拡散させた。拡散浮遊液を12穴プレートに2mlずつ分注し分離に用いた。

Slam-Vero細胞は10%FBS加Eagles' MEM(ニッスイ)で増殖させた後、-PBSで洗浄、0.1%トリプシン(GIBCO BRL)(0.002%EDTA含有)で剥離し、10%FBS加Eagles' MEMで拡散浮遊した。細胞数を $10^5$ /ml濃度に調整し、12穴プレートに2mlずつ分注し増殖させた。フルシートになった事を確認し、増殖用培地を棄て、-PBSで洗浄後、維持用培地である2%FBS加Eagles' MEMを入れ、分離に用いた。

各検体は100 $\mu$ lずつ2穴に接種した。

## (3) 遺伝子解析方法

分離されたウイルス及び検体から既報に従い<sup>2)</sup>、RT-PCR, Nested PCRを実施しMVのN遺伝子領域を増幅した。得られたN遺伝子領域増幅産物は、1.5%アガロースゲル(INVITROGEN)を用いた電気泳動により増幅を確認した。増幅産物をエタノール沈殿後、再度2%アガロースゲル(CAMBREX)で電気泳動し、増幅産物を切り出した後、Gel Extraction kit(QIAGEN)を用いて精製した。精製した増幅産物、Nested PCRに使用したプライマーおよびThermo Sequence 5.5 terminator cycle sequence kit(VERITAS)を用いて増幅後、エタノール沈殿で精製し、沈渣を6 $\mu$ lのLoading Dye(VERITAS)で溶解した。溶液2 $\mu$ lを用いSEQ4 $\times$ 4 Personal Sequence

表1 患者検体別ウイルス分離および遺伝子検出結果

No.	年齢	性別	検体	検体採取日	ウイルス分離	RT-PCR	nested PCR	MV遺伝子型
1	22	女性	咽頭拭い液	2007/4/24	-	-	+	D5(2007-1)
			全血	2007/4/24	+	-	+	
			咽頭拭い液	2007/4/25	-	-	-	
2	27	不明	咽頭拭い液	2007/4/27	-	-	-	D5(2007-2)
			全血	2007/4/27	+	-	+	
3	27	女性	咽頭拭い液	2007/5/7	-	-	+	D5(2007-3)
			全血	2007/5/7	+	-	+	
4	15	女性	咽頭拭い液	2007/6/27	-	-	+	MVワクチン株 CAM-70 近縁株
			全血	2007/6/27	-	-	-	
5	27	女性	咽頭拭い液	2007/6/27	+	+	+	D5(2007-4)
			全血	2007/6/27	+	+	+	
6	25	男性	咽頭拭い液	2007/7/3	+	+	+	MVワクチン株 CAM-70 近縁株
			全血	2007/7/3	+	+	+	

System (amersham pharmacia biotech) でN遺伝子領域の456bpの塩基配列を決定し、遺伝子型別を実施した。

### III 結 果

#### (1) 分離成績

流行期間中、当所で分離を行った検体数は13検体で、うち7検体からMVが分離された(表1)。咽頭拭い液よりも血液のMV分離率が高かった。

#### (2) 遺伝子解析結果

遺伝子解析の結果、4名の患者から分離検出されたMVの遺伝子型は、日本DNAデータバンクに登録された既知のD5型MVと99%から100%の相同性があったため、D5型であることがわかった。このことは系統樹解析でも明らかとなった(図1)。2007年のD5型MV4株間の塩基配列の相違は1bp以下であった。また、2名の患者からMVワクチン株CAM-70と近縁のウイルスが分離された。(表1)

### IV 考 察

本年、山形県で分離された成人麻しんのMVの多くがD5型であることが明らかとなった。全国でもD5型が多く検出されている<sup>3)</sup>ため、本年の流行の主流を成すのはD5型のMVであると考えられた。

本年分離したD5型のMVは、2002年から2003年に流行したMVと異なるクラスターに分類されるとの報告がある<sup>3)</sup>。今年分離された4株と山形県で2001年から2002年に分離されたD5型のMVとの塩基配列の相違を検証したところ、2001年分離のD5型MVとは10から12bpの相違が、2002年分離のD5型MVとは15から16bpの相違がある

ことが明らかになった。以上の結果から、2007年に分離されたD5型MVは、2001年から2002年に分離されたD5型MVとは異なるクラスターに分類されることが予想され、このことは系統樹解析で明らかとなった(図1)。

山形県では、2001年から2004年までの間に10株のMVを検出している<sup>3)</sup>。2001年、2002年はD5型、2003年はH1型、2004年はD9型のMVが分離されており、流行する遺伝子型が変化していることがわかる<sup>3)</sup>。最も近年に山形県で起こった麻しんの集団発生は、2004年の中学校におけるもので<sup>3)</sup>、その時の流行株はD9型であった。2004年以降分離されたMVでD9型の報告は全国的にも無い<sup>4)</sup>ため、D9型は2004年以降流行していないことが推察された。

今回検査した6名のうち2名の患者からワクチン株と近縁のMVが検出された。この2名についてワクチン接種歴などの詳細なデータは得られていないが、ワクチン接種後麻しんであることが疑われた。

2007年は、全国的に成人麻しんが流行し、大きな社会問題となった。特に10~20歳代に多く発生し、山形県で定点医療機関から報告された成人麻しん患者は、10代4名、20代12名、30代6名であった。2005年度の感染症流行予測調査事業における、山形県民の麻しんPA抗体保有状況は、10代から30代全てが100%の抗体保有率であった<sup>5)</sup>。また、調査対象者の50%以上が何らかの麻しんワクチンを接種したことがあると回答している<sup>5)</sup>。このような状況にもかかわらず、成人麻しんが流行したことの原因として、ワクチン接種後、自然発生麻しんの減少で、MVに暴露される機会が無かったために、高い免疫を維持できず、結果として感染防御に十分な抗体を保有して

いない人が増加していることがあげられている。併せて、極少数ではあるが、PA抗体を全く持たない人も存在しており、1回のワクチン接種だけでは、感染防御に十分な抗体価を得られない人がいることも明らかとなっている。

平成18年から、麻しんワクチンが2回の定期接種に変更になった。また、このたびの流行で、1回のワクチン接種しかしなかった年代の人に追加接種する機会を設けることになったが、これらの対策が徹底されなければ、今後も本年と同様の流行が起こる可能性は否定できない。

本年の麻しんの流行は終息を迎えた。国は、近い将来麻しんを撲滅するための施策を進めており、そのなかで、検査の重要性を強調している。今後も麻しんの検査体制をさらに強化していくことが重要と考えられた。

## 文 献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター：病原微生物検出情報 28, 249-250, 2007
- 2) K, Mizuta et al. : Jpn.J.Infect.Dis., 58, 98-100, 2005
- 3) 国立感染症研究所感染症情報センター：病原微生物検出情報 28, 244-245, 2007
- 4) 厚生労働省健康局結核感染症課，国立感染症研究所感染症情報センター．平成17年度（2005年度）感染症流行予測調査報告書
- 5) 国立感染症研究所感染症情報センター：病原微生物検出情報 速報
- 6) 水田克巳，青木洋子，他：2005年の山形県内における風疹，麻疹に対する抗体保有状況，山形衛研所報 39, 28-40, 2006

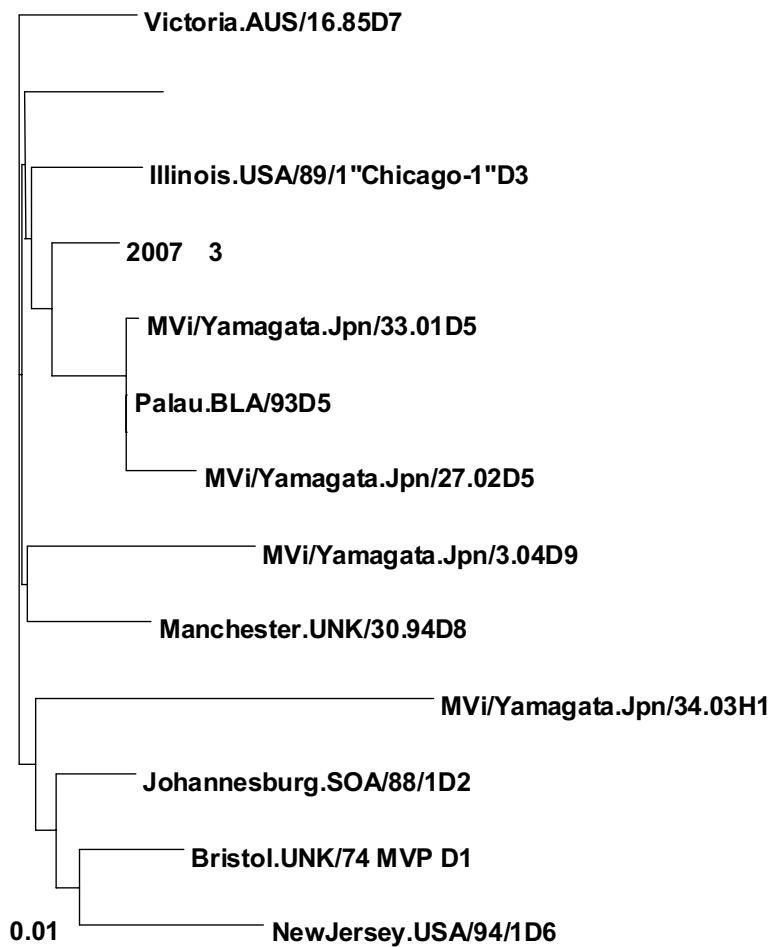


図1 分子系統樹解析（\*は2007年分離株を示す）