

リアルタイムPCR法による麻疹ウイルス検出法の開発

田部井 由紀子, 菅野 このみ, 長谷川 道弥, 岩崎 則子, 細矢 博子,
岡崎 輝江, 秋山 麻里, 林 志直, 甲斐 明美

Development of Real-time PCR for the Detection of Measles Virus

Yukiko Tabei, Konomi Kanno, Michiya Hasegawa, Noriko Iwasaki, Hiroko HosoYA,
Terue Okazaki, Mari Akiyama, Yukinao Hayashi and Akemi Kai

リアルタイムPCR法による麻疹ウイルス検出法の開発

田部井 由紀子^a, 菅野 このみ^a, 長谷川 道弥^a, 岩崎 則子^a, 細矢 博子^a,
岡崎 輝江^a, 秋山 麻里^a, 林 志直^a, 甲斐 明美^b

リアルタイムPCR法による麻疹ウイルス (MV) 遺伝子検査法を新たに開発した。本法はMV遺伝子のみを特異的に検出し、類似症状を起こす他のウイルス (PB19, HHV-6,7, RuV, EnV, VZV, EBV) との交差反応はみられなかった。また、本法の検出感度は 3.0×10^0 コピー/tube (10^{-2} TCID₅₀/tube) であり、MVのNP領域におけるnested-PCR法よりも100倍高い感度であった。これらのことから、本法が高感度かつ迅速なMV検査診断法として有用であることが示唆された。

キーワード: 麻疹, 麻疹ウイルス, リアルタイムPCR法

はじめに

麻疹は、発熱と発疹を主症状とする麻疹ウイルス (Measles Virus: MV) による感染症であり、致死率及び合併症率の高い重症疾患である。しかしながら、ワクチン接種によりコントロールが可能な疾患であることから、WHOは麻疹排除 (地域に常在するMVによる伝播の無い状態) を目標として掲げており、すでにWHO汎アメリカ地域では2002年に麻疹排除を達成している¹⁾。

日本が加盟するWHO西太平洋事務局は、同地域において2012年を麻疹排除の目標年としており、同地域の各国では麻疹排除に向けての対策が進められている^{2,3)}。

日本国内では、2001年の小児を中心とした麻疹流行以降、患者数は減少傾向であったが、2007年には10代、20代を中心とした全国的な流行がみられた²⁾。これにより、感染症法における小児科及び基幹定点病院を対象とした「定点把握疾患」であった麻疹は、2008年より全ての医療機関を対象に全ての麻疹患者を報告する「全数把握疾患」となり⁴⁾、さらに、2010年11月からは麻疹疑い例を含む全症例についてのウイルス検査実施が求められている⁵⁾。

東京都においては、2010年7月より保健所に麻疹発生届が提出された症例を対象にMV検査を開始した⁶⁾。伝播性が非常に高い麻疹の検査診断を迅速かつ正確に行うことは、疑似症例を除いた正確な患者数を把握できるだけでなく、二次感染等まん延防止対策を早期に講じられることにも繋がり極めて重要である。

そこで、MV検査の高感度化を図り、迅速かつ正確な診断を可能とするため、リアルタイムPCR法によるMVの遺伝子検出について検討を行ったので報告する。

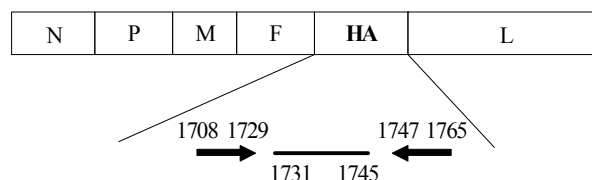
材料と方法

1. リアルタイムPCR法によるMV遺伝子の検出

1) プライマー及びプローブの設定

プライマー及びプローブは、世界の各地域において検出

され⁷⁾、2011年現在GenBankに登録されているMVの23遺伝子型 (A型, B1~B3型, C1~C2型, D1~D10型, E型, F型, G1~G3型及びH1~H2型) 27種類のHemagglutinin (HA) 領域の塩基配列を標的対象に作製した (表1)。なお、プライマー及びプローブの設計にはPrimer Express v 2.0 (Applied Biosystems: ABI) を用いた (図1, 表1)。



MeF 1708プライマー: 5'-TGCTTCACATGGGACMAAAAARC-3'
MeR 1765プライマー: 5'-CYGAGTCMGAAGCACACA-3'
MeP 1731プローブ: FAM(VIC)-CTGGTGCCGYCACTT-MGB

図1. リアルタイムPCR法に用いたプライマー及びプローブ

2) 反応条件

リアルタイムPCR法の反応条件は、既報⁸⁾に準じて行った。すなわち、供試RNA 5 µLにリアルタイムPCR試薬 [Quanti Tect probe RT-PCR Master Mix (QIAGEN) 12.5 µL, Quanti Tect Rt Mix (QIAGEN) 0.25 µL, RNase Inhibitor (TOYOBO) 0.5 µL] 13.25 µL, 図1に示した100 pmolプライマー (MeF1708及びMeR1765) を各0.5 µL ならびに15 pmolプローブ (MeP1731) を0.5 µLを加え、さらに滅菌蒸留水を5.25 µLを加えて総量25 µLとした反応液をABI Prism 7900HT(ABI)を用いて、50 °C, 40分間, 95 °C, 15分間の逆転写反応後、94 °C, 15秒間及び60 °C, 75秒間の増幅反応を45回繰り返した。MV遺伝子検出の判定は、特異的な増幅曲線を呈し、かつCt値が40未満であったものを陽性とした。

^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科

^b 東京都健康安全研究センター微生物部

表1. 対象としたMVの遺伝子型及び標的部位の塩基配列

株名	遺伝子型	Accession No.	標的部位的配列																					
			1708	Fプライマー			1729	1731	プローブ		1745	1747	Rプライマー		1765									
Edmonston-wt.USA/54	A	U03669	TGC	TTC	ACA	TGG	AAC	MAA	AAR	C	G	TGG	TGC	CGY	CAC	TT	ACA	CAC	GAA	CGM	CTG	AGY	C	
Yaounde.CAE/12.83"Y-14"	B1	AF079552	TGC	TTC	ACA	TGG	GAC	CAA	AAA	CTC	TGG	TGC	CGT	CAC	TTC	TGT	GTG	CTT	GCG	GAC	TCA	G		
Libreville.GAB/84"R-96"	B2	AF079551																					C	
Ibadan.NIE/97/1	B3	AJ239133																						
New York.USA/94	B3	L46752																						G
Tokyo.JPN/84/K	C1	AY047365																						
Maryland.USA/77"JM"	C2	M81898																						
Erlangen.DEU/90"WTF"	C2	Z80808																						
Bristol.UNK/74	D1	Z80805																						
Johannesburg.SOA/88/1	D2	AF085198								T												G		G
Illinois.USA/89-1"Chicago"	D3	M81895																						T
Montreal.CAN/89	D4	AF079554																						
Bangkok.THA/93/1	D5	AF009575																						
Palau.BLA/93	D5	L46757																						
New Jersey.USA/94/1	D6	L46749																						A
Victoria.AUS/16.85	D7	AF247202																						
Illinois.USA/50.99	D7	AY043461																						
Manchester.UNK/30.94	D8	MVU29285																						
Victoria.AUS/12.99	D9	AY127853																						C
kampala.UGA/51.00/1	D10	AY923213																						
Goettingen.DEU/71"Braxator"	E	Z80797																						
MV/s/Madrid.SPA/94 SSPE	F	Z80830								T														A
Berkeley.USA/83	G1	AF079553																						T
Amsterdam.NET/49.97	G2	AF171231																						T
Gresik.INO/17.02	G3	AY184218																						G
Hunan.CHN/93/7	H1	AF045201																						G
Beijing.CHN/94/1	H2	AF045203																						G

3) 陽性標準の作製

リアルタイムPCR法によるMV遺伝子検出における陽性標準として、MVのHA領域に設定したプライマー及びプローブ部位を含む塩基配列（1708-1765）の合成鎖DNAを作製した（ファスマックに合成依頼）。作製した合成鎖DNAは、TE溶液（ナカライテスク）にて溶解して用いた。

2. リアルタイムPCR法の特異性に関する検討

1) MV分離株を用いた検討

都内で発生した麻しん患者由来の検体をB95a細胞に接種して分離同定されたA型、D5型及びH1型のMV分離株300 µLからセパジーンRVR（三光純薬）によりRNAを抽出し、滅菌蒸留水30 µLにて再浮遊したものを供試材料として、リアルタイムPCR法によるMV遺伝子検出を行った。また、麻しんと同様に発疹症を起こすウイルスである風しんウイルス（RuV）、エンテロウイルス（EnV）のRNAならびにヒトパルボウイルスB19（PB19）、水痘・帯状疱疹ウイルス（VZV）、EBウイルス（EBV）、ヒトヘルペスウイルス6型及び7型（HHV-6,7）のDNAを対照として用いた。

2) 合成鎖DNAを用いた検討

MVの23遺伝子型全てが検出可能であるのか否かを確認するため、表1に示した23遺伝子型27種類のうち、同じ位置に変異があるものを除いた10種類について、陽性標準と同様に合成鎖DNAを作製し、それぞれTE溶液にて溶解したものを供試材料として、リアルタイムPCR法によるMV遺伝子検出を行った。

3. リアルタイムPCR法の検出感度に関する検討

1) 合成鎖DNAによる検討

陽性標準として作製した10種類の合成鎖DNAをTE溶液にて溶解後、10段階階希釈を行い 6.0×10^{11} コピー/µLから 6.0×10^2 コピー/µLの希釈系列を作製し、リアルタイムPCR法によるMV遺伝子検出を行って検出感度をコピー数で求めた。

2) MV分離株による検討

10^2 TCID₅₀/25 µLに調製したA型のMV分離株をPBS(-)で10段階階希釈を行い、 10^2 TCID₅₀/25 µLから 10^{-3} TCID₅₀/25 µLの希釈系列を作製した。MVの希釈系列液100 µLからセパジーンRVRによりRNAを抽出し、テンプレートとするRNA量5 µLあたりのウイルス感染価が 10^3 TCID₅₀から 10^{-3} TCID₅₀となるよう滅菌蒸留水20 µLにて再浮遊したものを供試材料とした。これら供試材料5 µLについてリアルタイムPCR法によるMV遺伝子検出を行い、検出感度を感染価で求めた。また、同量の供試材料を用いて、田代ら⁹⁾の方法に従ってMVのNP領域におけるnested-PCR法を行い¹⁰⁾、両法の検出感度について比較を行った。

4. 麻しん患者検体におけるMV遺伝子検査

2011年1月から6月末までに都内保健所より当センターに搬入された麻しん及び麻しん疑いの患者192人から採取された咽頭ぬぐい液187件、尿7件、血液13件の計207件を供試材料とした。供試材料からのRNA抽出は既報¹⁰⁾に従ってセパジーンRVRを用いて行い、これら抽出したRNA5 µLについて、リアルタイムPCR法ならびにNP領域におけるNested-PCR法を行った。

結果及び考察

1. リアルタイムPCR法の特異性に関する検討

1) MV分離株を用いた検討

リアルタイムPCR法によるMV遺伝子検出の特異性を検討するため、当センターにおいて保有しているA型、D5型及びH1型のMV分離株から抽出したウイルスRNA、対照としてRuV、EnVのRNAならびにPB19、VZV、EBV、HHV-6,7のDNAを用いて、本法のMV遺伝子検出における特異性を検討した。その結果、図2のようにA型、D5型及びH1型のMVのみが陽性となり、対照としたRuV、EnV、PB19、VZV、EBV、HHV-6,7は全てで陰性であり、本法がMV遺伝子のみを特異的に検出することが確認された。

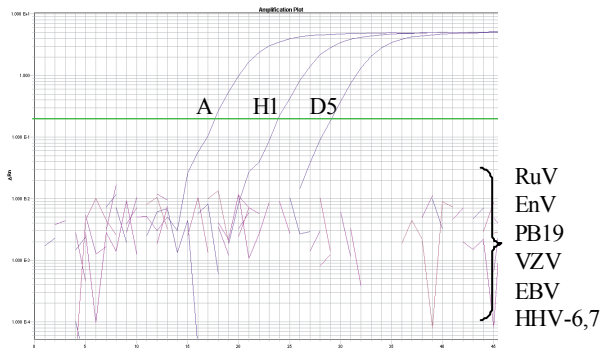


図2. リアルタイムPCR法によるMV遺伝子検出の特異性

2) 合成長鎖DNAを用いた検討

当センターが保有しているMV分離株がA型、D5型及びH1型の3遺伝子型のみであったため、その他の遺伝子型のMVについてもリアルタイムPCR法により検出できるのか否かを確認するため、表1に示した23遺伝子型27種類のうち、同じ位置に変異があるものを除いた10種類の合成長鎖DNAについて、リアルタイムPCR法によるMV遺伝子検出を行った。その結果、本法は合成長鎖DNAの10種類全て、すなわちA型、B1～B3型、C1～C2型、D1～D10型、E型、F型、G1～G3型及びH1～H2型の23遺伝子型全てのMV遺伝子を検出することが可能であった。

2. リアルタイムPCR法の検出感度に関する検討

1) 合成長鎖DNAによる検討

リアルタイムPCR法によるMV遺伝子検出の検出感度を検討するため、10倍段階希釈した10種類の合成長鎖DNAを用いてMV遺伝子検出を行った。その結果、図3のように 3.0×10^0 コピー/tubeから 3.0×10^8 コピー/tubeの範囲内において、サイクル数に比例した増幅曲線が得られ、本法の検出感度は 3.0×10^0 コピー/tubeと推定された。また、図には示さなかったが、その他9種の合成長鎖DNAについても同様に 3.0×10^0 コピー/tubeから 3.0×10^8 コピー/tubeの範囲内において、サイクル数に比例した増幅曲線が得られた。

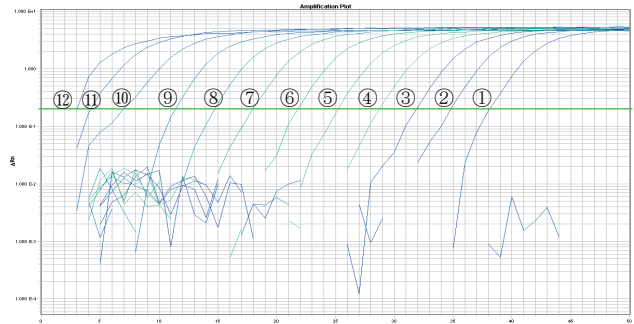


図3. 合成長鎖DNAを用いたリアルタイムPCR法における検出感度の検討

A型のMVと同じ塩基配列の合成長鎖DNAの10倍段階希釈系列による増幅曲線。チューブあたりのコピー数① 3.0×10^0 、② 3.0×10^1 、③ 3.0×10^2 、④ 3.0×10^3 、⑤ 3.0×10^4 、⑥ 3.0×10^5 、⑦ 3.0×10^6 、⑧ 3.0×10^7 、⑨ 3.0×10^8 、⑩ 3.0×10^9 、⑪ 3.0×10^{10} 、⑫ 3.0×10^{11}

2) MV分離株による検出感度の検討

10^2 TCID₅₀/25 μ Lに調製したA型のMV分離株の希釈系列から抽出したRNAを用いて、リアルタイムPCR法によるMV遺伝子検出の検出感度についての検討を行った。その結果、図4のように、 10^{-2} TCID₅₀/tubeから原液である 10^2 TCID₅₀/tube範囲内において、サイクル数に比例した増幅曲線が得られ、本法の検出感度は 10^{-2} TCID₅₀/tubeであることが確認された。また、同じ供試材料を用いて、従来からの方法であるNP領域におけるNested-PCR法を行った結果、図5のようにNested-PCR法では 10^0 TCID₅₀/tubeまで検出でき、今回開発したリアルタイムPCR法は従来法よりも100倍程度感度が高いことが示された。さらに、従来法であるNested-PCR法による検査は判定までに6時間を要するが、リアルタイムPCR法による検査は判定までに3時間しか要しないことから、今回のリアルタイムPCR法によるMV遺伝子検出は高感度かつ迅速な検査であることが示された。

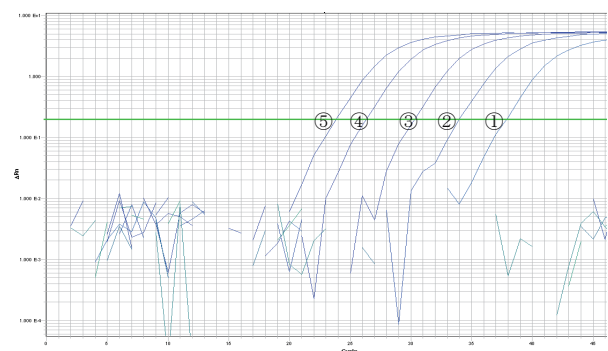


図4. MV分離株を用いたリアルタイムPCR法における検出感度の検討

10^2 TCID₅₀/25 μ Lに調製したA型のMV分離株の10倍段階希釈系列から抽出したRNAによる増幅曲線。チューブあたりの感染価① 10^{-2} TCID₅₀、② 10^{-1} TCID₅₀、③ 10^0 TCID₅₀、④ 10^1 TCID₅₀、⑤ 10^2 TCID₅₀

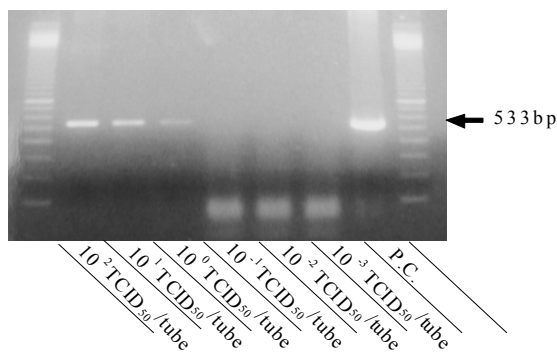


図5. NP領域を標的としたnested-PCR法によるMV遺伝子検出の検出感度

3. 麻しん患者検体におけるMV遺伝子検査結果

2011年1月から6月末までに都内保健所より当センターに搬入された麻しん及び麻しん疑いの患者192人から採取された咽頭ぬぐい液187件、尿7件、血液13件の計207件について、リアルタイムPCR法ならびにNP領域におけるnested-PCR法を行った結果を表2に示した。

患者検体207件のうち、リアルタイムPCR法で陽性は79件、nested-PCR法で陽性は77件であった。リアルタイムPCR法でのみ陽性だった2件は、リアルタイムPCR法のCt値が共に38前後であり、患者検体中に含まれるMV遺伝子量が少なかったため、nested-PCR法より感度の高いリアルタイムPCR法でのみ検出されたものと推察された。また、ここには示していないが、NP領域におけるPCR増幅産物について遺伝子塩基配列の解析を行ったところ、これら麻しん患者検体から検出されたMVの遺伝子型はA型、D4型、D8型及びD9型であったことから、今回開発したリアルタイムPCR法は、これら種々の遺伝子型のMVを患者検体から直接に検出可能であることが示された。

以上のことから、本法は高感度、迅速かつ種々のMV遺伝子型についても検出可能な検査法であり、患者検体における実際の麻しん検査において有用であることが示された。

表2. 患者検体におけるリアルタイムPCR法ならびにnested-PCR法によるMV遺伝子検査結果

		リアルタイムPCR法：計207件	
		(+) : 79	(-) : 128
Nested-PCR法 ：計207件	(+) : 77	77	0
	(-) : 130	2	128

WHO西太平洋事務局は同地域から2012年までに麻しんを排除することを目標に掲げ、日本においても2012年までに麻しんを排除することを目標に掲げている⁴⁾。2006年からワクチン2回接種法を導入し、2008年からは麻しんを全

数把握疾患とするなどの対策によって、実際に患者報告数は減少しており、患者数の減少した現在では麻しん疑い例を含む全症例についてのMVの検査実施が求められている¹⁻⁵⁾。

今後、ワクチン接種率が向上するに伴って、ワクチン接種歴があるために非定型症状を呈する修飾麻しん患者の割合が多くなれば、臨床診断のみでの麻しんの診断は困難になると考えられる。また、伝播性が非常に高い麻しんは、患者一人の見落としから二次感染を起し、さらには流行に至る可能性も考えられる。このため、MV検査による正確な麻しん診断の重要性は高くなっている。加えて、麻しん患者発生時の二次感染等まん延防止対策を早期に講じるためには、MV検査はより迅速なものが求められる。

そこで、我々はMV検査の高感度化を図り、迅速かつ正確な麻しん診断を可能とするため、リアルタイムPCR法による新たなMVの遺伝子検出法を開発した。本法は、類似症状を呈するPB19、HHV6,7等のウイルスは検出せず、2011年現在までに世界で確認されている23遺伝子型全てのMVを特異的に検出でき、従来法と比較して100倍程度の高い感度かつ迅速な検査であった。実際の麻しんサーベイランスにおける麻しん及び麻しん疑い例の患者検体についてのMV検査においても、本法は高感度かつ迅速にMV感染の有無を判定でき、MV検査診断に有用な方法となっている。

今後、麻しん排除に向けて患者数がさらに減少すれば、MV検査によって麻しんを確実に診断することがより重要となってくる。さらに、診断に加えて、輸入症例の解析や感染ルート解析等にも繋がる分子疫学解析も重要である。そのため、今後はMV検査診断の高感度化・迅速化のみならず、疫学解析を含めた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。

ま と め

リアルタイムPCR法による新たなMV遺伝子検出法を開発した。本法は、類似症状を呈するPB19、HHV6,7等のウイルスは検出せず、2011年現在までに世界で確認されている23遺伝子型全てのMVのみを特異的に検出し、遺伝子量では 3.0×10^0 コピー/tubeまで、ウイルス量では 10^{-2} TCID₅₀/tubeまで検出可能であった。また、リアルタイムPCR法は従来法であるnested-PCR法よりも検査時間が短いことから、本法がMVの高感度かつ迅速な検査診断法として有用であることが示された。

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，**32**(2)，31-32，2011。
- 2) 岡部信彦：ウイルス，**57**(2)，171-180，2007。
- 3) WHO, Western Pacific Regional Office: MEASLES BULLETIN, **13**, 1-6, 2007.
- 4) 厚生労働省告示第442号：麻しんに関する特定感染症

- 予防指針, 2008.
- 5) 厚生労働省健康局結核感染症課長: 健感発1111第2号, 麻しんの検査診断について(通知), 2010.
 - 6) 東京都健康安全研究センター所長: 22健研管第1400号, 麻しんに係る東京都健康安全研究センター病原体レファレンス事業の実施について(通知), 2010.
 - 7) WHO: *Weekly Epidemiological Record*, **80**(40), 341-352, 2005.
 - 8) 田部井由紀子, 岩崎則子, 岡崎輝江, 他: 東京健安研七年報, **60**, 73-78, 2009.
 - 9) 田代真人: 麻疹診断マニュアル(第2版), 国立感染症研究所, 2008.
 - 10) 田部井由紀子, 長島真美, 長谷川道弥, 他: 東京健安研七年報, **54**, 32-35, 2003.

Development of Real-time PCR for the Detection of Measles Virus

Yukiko Tabei^a, Konomi Kanno^a, Michiya Hasegawa^a, Noriko Iwasaki^a, Hiroko Hosoya^a,
Terue Okazaki^a, Mari Akiyama^a, Yukinao Hayashi^a and Akemi Kai^a

We developed a method to detect measles virus hemagglutinin (HA) gene by real-time PCR. All 23 measles virus genotypes were detected using this method. Parvovirus B19 (PB19), herpes viruses 6 and 7 (HHV-6, HHV-7), rubella virus (RuV), enterovirus (EnV), varicella zoster virus (VZV) and Epstein-Barr virus (EBV), which cause diseases with similar symptoms, were not detected. The detection limit of this method was 3.0×10^0 copies/tube or 10^{-2} TCID₅₀/tube. The sensitivity of this method was 10^2 times higher than that of a nested-PCR assay targeting a nucleocapsid protein (NP) gene of Measles virus. These results suggest that this method is a highly sensitive and rapid technique for detection of the Measles virus.

Keywords: measles, measles virus, real-time PCR

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan