

東京都内で検出された麻疹ウイルスの NP 遺伝子解析

田部井 由紀子*, 長 島 真 美*, 長谷川 道 弥*, 貞 升 健 志*,
吉 田 靖 子*, 村 田 以和夫*, 諸 角 聖**

Characterization by Sequence Analysis on NP Gene of Measles Virus, Detected in Tokyo

Yukiko TABEL*, Mami NAGASHIMA*, Michiya HASEGAWA*, Kenji SADAMASU*,
Yasuko YOSHIDA*, Iwao MURATA* and Satoshi MOROZUMI**

Keywords: 麻疹 Measles, 麻疹ウイルス *Measles virus*, NP 遺伝子 NP gene

緒 言

我が国における麻疹患者の発生動向をみると、1978 年の麻疹ワクチン定期接種開始以降、患者の発生は減少しつつあるものの依然として年間 10～20 万人規模の患者発生があり、死亡例も毎年 10～30 人程報告されている¹⁾。麻疹による死亡例は 0～4 歳児までの低年齢層に多く見られ、特に 0～1 歳児の占める割合が多いことから、麻疹は小児ウイルス感染症の中でも重要な疾患の 1 つとなっている¹⁾。また、近年では成人麻疹の患者発生も多く、これら患者はワクチン未接種例だけでなく、ワクチン接種を行ったものの獲得抗体が減弱してしまった例が多くを占めていることから、ワクチン接種率の向上と共にワクチン追加接種の必要性も高くなっている。

麻疹の病因となる麻疹ウイルスは、世界保健機関（以下 WHO）の分類によって現在までに A から H の 8 群、22 遺伝子型に分類されている。この麻疹ウイルス遺伝子型は、世界の流行地域ごとに異なっており²⁾、これまで国内の麻疹患者からは主に、D3 型及び D5 型の麻疹ウイルスが検出されていた。しかし、2000 年に国内の成人麻疹患者から分離されたウイルスは、1993 年に中国で分離され、2000 年に韓国で麻疹流行を起こした H1 型であった³⁾。麻疹ウイルスの抗原性状の変化、遺伝子型の変異及び国を超えた伝播があることなどから、今後の麻疹流行の抑制には、住民を対象とした抗体保有調査や流行株の遺伝子型調査も重要となってきている。

当ウイルス研究科では、これまで流行予測調査事業において都民の麻疹ウイルスに対する抗体保有状況を調査すると共に、感染症発生動向調査事業においては麻疹様患者検体からのウイルス検査を実施し、都内医療機関等への情報提供を行ってきた。今回、都内で流行している麻疹ウイルス遺伝子型の動向を調査することを目的に、2001 及び 2002 年度に当ウイルス研究科において検出された麻疹ウ

イルスの遺伝子型解析を行ったので、その調査結果を報告する。

材料及び方法

1. 供試材料

2001 及び 2002 年度（2001 年 4 月から 2003 年 3 月）に、既報⁴⁾に従って麻疹患者の咽頭拭い液から B95a 細胞で分離した麻疹ウイルス液と F 遺伝子領域を標的とした RT-PCR 法⁵⁾で麻疹ウイルス遺伝子が確認された患者咽頭拭い液を試料とした。これら試料数は、2001 年度のものが 28 例及び 2002 年度のものが 25 例の計 53 例である。

2. 検査方法

1) RT-PCR 法による NP 遺伝子の検出

ウイルス RNA の抽出は、麻疹ウイルス液 50 µL 及び患者の咽頭拭い液 100 µL からセパジーン RVR(三光純薬)を用いて行い、滅菌蒸留水 10 iL に再浮遊して、供試 RNA とした⁶⁾。

NP 遺伝子領域を標的とした RT-PCR 法は、既報⁶⁾に準じて行った。すなわち、供試 RNA 5 iL に pMvGTf1 プライマー（5'-CGATCTTACTTTTGATCCAGC-3'）及び pMvGTr1 プライマー（5'-TTATAACAATGATGGAGG-3'）を加えて、56°C1 分、41°C30 分、94°C2 分の逆転写反応後、94°C2 分、53°C3 分、72°C2 分 30 秒の増幅反応を 30 回行った。Nested-PCR は、1st-PCR 増幅産物 3 iL に pMvGTf2 プライマー（5'-AGATTAGGGCAAGAGATGGT-3'）と pMvGTr2 プライマー（5'-GAGGGTAGGCGGATGTTGTT-3'）を加えて 1st-PCR と同様の条件下で増幅反応を行った。2nd-PCR 増幅産物は、アガロースゲル電気泳動を行い 533 bp の特異的なバンドの有無を確認した(図 1)。

2) NP 遺伝子塩基配列の決定

NP 領域を標的とした RT-PCR 法によって得られた 2nd-PCR 増幅産物(533 bp)は、低融点アガロースゲルを用

*東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

*Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

**東京都健康安全研究センター微生物部

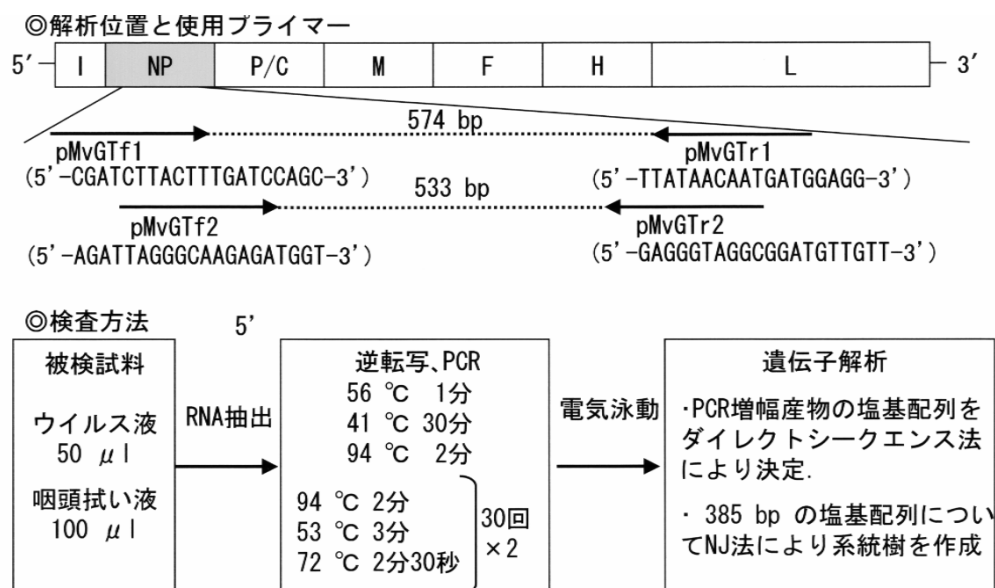


図1. 麻疹ウイルスのNP遺伝子解析における使用プライマーと検査法

いて再度、電気泳動を行い UV 照射下で特異的バンド部位を切り出し、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。これを鋳型 DNA として、pMvGTf2 プライマーと pMvGTr2 プライマーを用いて Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (ABI PRISM) によるシーケンス反応を行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer で遺伝子塩基配列を決定した。得られた遺伝子塩基配列のうち、385 bp について Neighbor-joining 法 (NJ 法) で分子系統樹を作成し、データベース上の登録株と比較した。

結果と考察

1. 都内で検出された麻疹ウイルスの遺伝子型

図2に2001及び2002年度(2001年4月から2003年3月)に当ウイルス研究科で検出された麻疹ウイルス(遺伝子検出のみを含む)53例の遺伝子型を示した。分子系統樹解析の結果、53例はH1型、D5型、A型の3つの遺伝子型に分類された。内訳は、H1型が25例、D5型が24例、A型が4例であった。このうち、現行のワクチン型であるA型が検出された4例は、全てワクチン接種日から検体採取までに数日しか経ていなかったため、いずれも接種したワクチン由来のウイルスが検出されたものと推察された。

H1型に型別された25例は、系統樹上で更に3つのグループに分類された。このうち最も多くを占めたのは、2001年にオーストラリアで検出された Mvs/WA.AU/30.01 株(以下オーストラリア株)と100%の相同性を示すウイルスであり、本ウイルスは2001年度に検出された3例を除き、15例全て2002年度に検出されたものであった。次に多くを占めたのは、2002年に大阪市で検出された Mvi/Osaka.C.JPN/32.02 株⁷⁾と100%の相同性を示すウイルスが2002年度に3例、99.7%の相同性を示したものが2001年度、2002年度に1例ずつ検出された。また、2000年に

アメリカで検出された Mvs/Florida.USA/25.00 株及び2001年にカナダで検出された Mvs/Tronto.Can/8.01/1 株と100%の相同性を示したウイルスが2001年度に2例検出された。

D5型に型別された24例も大きく2つのグループに分類された。このうち検出数が最も多かったのは、2000年にハワイで検出された Mvs/Hawaii.USA/20.00 株(以下ハワイ株)と100%の相同性を示すウイルスで16例、次いで、ハワイ株と99.7%の相同性を示したものが2例あり、これら18例は全て2001年度に検出されたものであった。また、2002年に大阪市で検出された Mvi/Osaka.C.JPN/35.02 株と100%の相同性を示したウイルスが2002年に4例、98.7%相同性を示したものが2001年度に2例検出された。この2例は、同一の院内感染事例から検出されたものであった。

2. 都内における麻疹ウイルス検出状況

図3に都内で検出された麻疹ウイルス遺伝子型の年次推移を示した。検出された麻疹ウイルスの遺伝子型(H1型、D5型及びA型)については、最も相同性の高かったデータベース登録株名で示し、ウイルス遺伝子型と検出時期の関連を調べた。その結果、東京都内で流行していた麻疹ウイルスは、2001年度は主にハワイ株のD5型、2002年度は主にオーストラリア株のH1型であることが明らかとなった。また、2002年に大阪市で検出されたD5型及びH1型は、都内では2001年にすでに検出されていた。

今回の調査によって、都内で流行している主な麻疹ウイルスは、この2年を分岐点として日本固有のD5型から、これまで中国及び韓国での流行遺伝子型であったH1型に変化していたことが明らかとなった。

H1型の麻疹ウイルスによる国内の患者発生は、散発例、成人麻疹例、中学校集団発生例等^{7, 8)}相次いで報告されている。また、これら患者の中には、ワクチン接種歴を有する

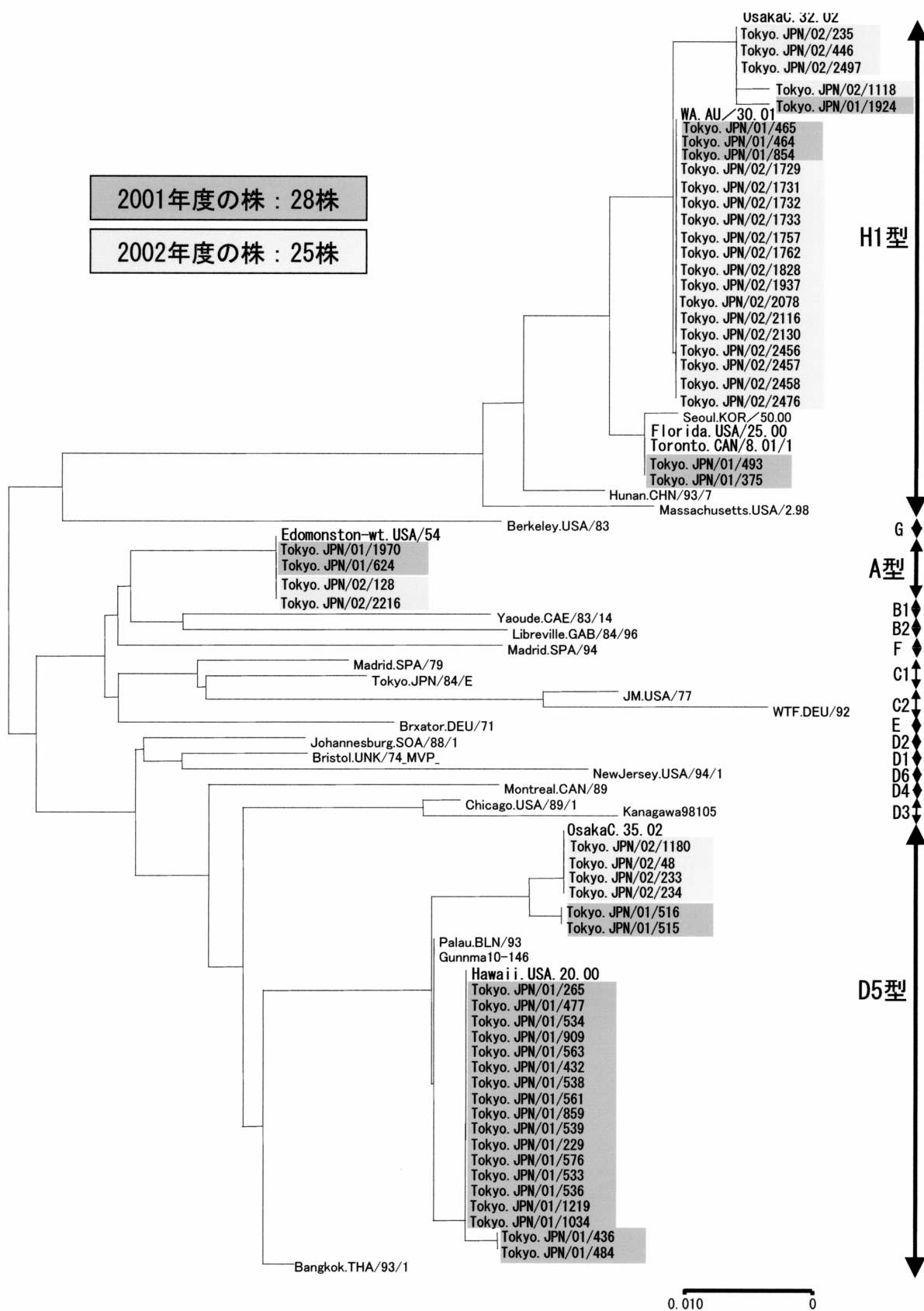


図2. 都内で検出された麻疹 NP 遺伝子 (385 bp) の分子系統樹

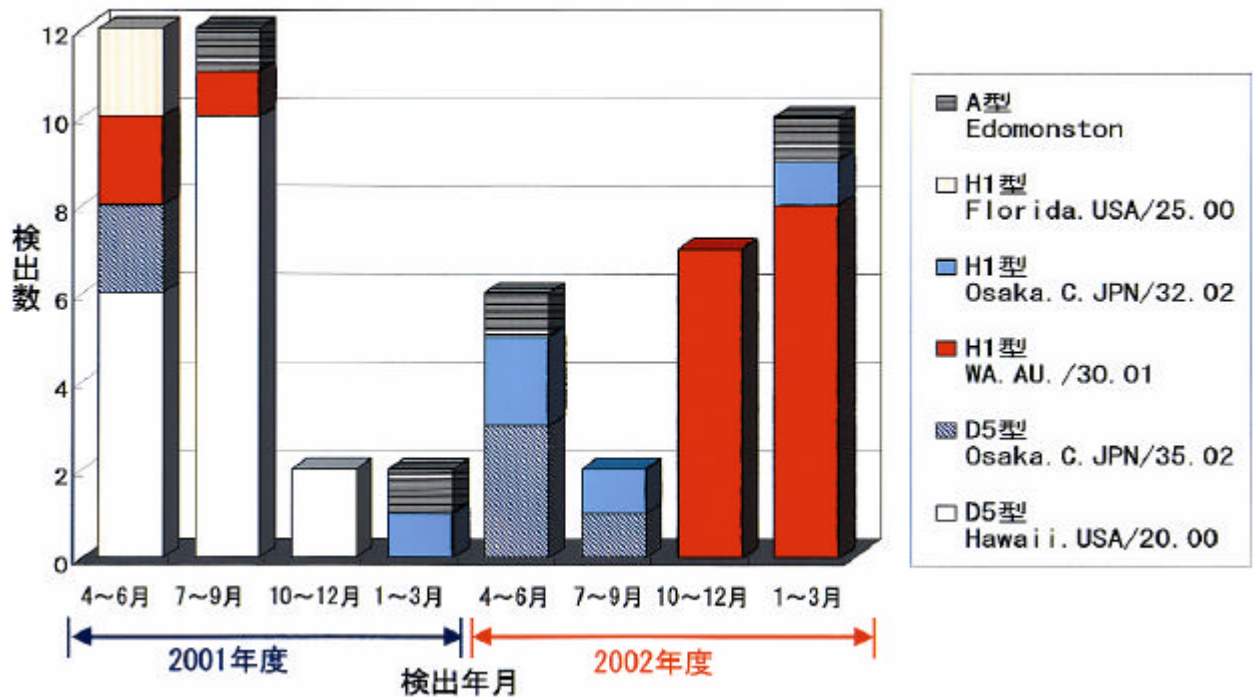


図3. 都内における麻疹ウイルス検出状況

患者も含まれていることから、流行している麻疹ウイルスの遺伝子型の推移や抗原変異に対し、ワクチン株に対する抗体では抑制効果が減弱することも懸念されている。したがって、今後とも継続して都内で流行している麻疹ウイルスの遺伝子型を解析し、その動向を把握すると共にワクチンの有効性等についても評価していく必要がある。

ま と め

都内で流行している麻疹ウイルス遺伝子型の動向を調査することを目的に、2001 から 2002 年度に当ウイルス研究科において検出された麻疹ウイルス 53 例の NP 遺伝子型解析を行った。その結果、都内における麻疹ウイルス主流株は、2001 年度は日本固有の D5 型であったが、2002 年度の主な流行株は、これまで中国及び韓国での流行株であった H1 型であることが明らかとなった。

文 献

- 1) 麻疹の現状と今後の麻疹対策について、国立感染症研究所感染症情報センター、2002.
- 2) *Weekly epidemiological record*, **76**(32), 242-247, 2001 (part1)., **76** (33), 249-251, 2001 (part2).
- 3) 中山哲夫, 藤野元子, 木村慶子: 臨床とウイルス, **31** (1), 30-36, 2003.
- 4) 小船富美夫: 臨床とウイルス, **23**, 60-62, 1995.
- 5) 田部井由紀子, 貞升健志, 吉田靖子, 他: 東京衛研年報, **49**, 17-22, 1998.
- 6) Takeda, M. *et al.*: *Virology*, **256**, 340-350, 1999.
- 7) 久保英幸, 入谷展弘, 村上司, 他: *IASR*, **23**(11), 288-288, 2002.
- 8) 吉田紀美, 竹内潤子, 近藤玲子, 他: *IASR*, **24**(1), 8-8, 2003.