

[ノート]

検体採取時期による検体中の麻疹ウイルス量及び風疹ウイルス量の比較

荻 美貴* 高井 伝仕 押部 智宏 近平 雅嗣 秋山 由美

Quantitative Analysis of Measles Virus and Rubella Virus in Clinical Samples by Days after Onset

Miki OGI*, Denshi TAKAI, Tomohiro OSHIBE, Masatsugu CHIKAHIRA and Yumi AKIYAMA

Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health Science, 1819-14, Kanno, Kanno-cho, Kakogawa 675-0003, Japan

The changes of viral loads in clinical samples from the patients with measles and rubella, which were collected from the different period after symptom onset, were investigated by using real-time PCR to examine the usefulness of samples.

We monitored the viral loads in specimens obtained from 23 measles-positive cases from 2011 to 2019 in Hyogo prefecture. The median number of genome copies in throat swabs and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) tended to be higher than that in plasma and urine until the 4th day after onset. The viral loads in throat swabs and PBMC decreased from the 4th day of the peak, and the number of genome copies in urine collected after the 6th day was higher or comparable to that in throat swabs. More than 1.0×10^2 virus copies per reaction were detected in the throat swab collected on day 11 and in urine collected on day 13 after onset. These data suggested that throat swabs and urine were important for the diagnosis of infection in the past.

Clinical samples from 82 rubella cases, collected from the first day to the 12th day after onset, were analyzed. The median number of genome copies in throat swabs was higher than that in plasma and urine. Since the viral loads in throat swabs decreased rapidly from the 5th day, it is necessary to collect throat swabs within 4 days after onset.

I はじめに

麻疹は麻疹ウイルスにより引き起こされる感染症で、発熱、コプリック斑、カタル症状、発疹を特徴とする熱性発疹性疾患である。麻疹は空気感染、飛沫感染、接触感染のいずれの感染経路でも感染し、感染力が非常に高い¹⁾。日本はワクチン接種率の向上等に取り組み、2015年3月に世界保健機関西太平洋地域事務局から麻疹の排除認定を受けた²⁾。しかし、排除達成後も輸入例を発端としたアウトブレイクが度々発生していることから^{3,4)}、地方衛生研究所では麻疹ウイルスの遺伝子解析を実施

し⁵⁾、これらのウイルスが国内の常在株となっていないか確認している⁶⁾。

風疹は、発熱、発疹及びリンパ節腫脹を主徴とする急性の熱性発疹性疾患で、上気道粘膜より排泄されるウイルスが飛沫を介して伝播する⁷⁾。2014年3月に告示された「風しんに関する特定感染症予防指針」⁸⁾で「早期に先天性風しん症候群の発生をなくすとともに、平成32年度(2020年度)までに風しんの排除を達成すること」が目標として掲げられた。さらに2017年12月の指針の一部改正により、麻疹と同様に風疹も原則として全例にウイルス遺伝子検査を実施することになった。

麻疹と風疹の遺伝子検査では血液、咽頭ぬぐい液及び尿が採取されるが、麻疹ウイルスの検出率は検体によって38.5~92.3%と差があることを報告した⁹⁾。抗体検査と異なり、病勢の進行に伴って体内で変動・消失するウイルスそのものを捕獲する必要がある抗原検査等では、

感染症部

*別刷請求先:

〒675-0003 加古川市神野町神野 1819-14

兵庫県立健康科学研究所 感染症部 荻 美貴

ウイルスが多く含まれる検体の採取が重要である。麻疹、風疹ともに臨床診断に至るまでに時間を要することがあり、発症から検体採取までの日数にばらつきがある。このため、発症後の日数経過に伴う検体中のウイルス量の変動を知ることは、ウイルスの検出や解析を行う上で有益な情報になる。本稿では、県内の麻疹または風疹の症例について、検体中のウイルス量を測定して、採取時期をふまえた検体におけるウイルスの解析結果等の有用性について検討した。

II 材料と方法

1. 調査対象

2011年4月から2019年8月に神戸市、姫路市及び尼崎市を除く兵庫県内の医療機関から報告のあった症例のうち、conventional RT-PCR法(cRT-PCR法)でそれぞれのウイルス遺伝子が検出された麻疹23例と風疹122例を対象とした。

cRT-PCR法は国立感染症研究所の病原体検出マニュアル^{10,11)}に準じて、麻疹はH遺伝子領域またはN遺伝子領域を、風疹はNS遺伝子領域を増幅した。

2. 麻疹ウイルス及び風疹ウイルスのコピー数の測定

凝固防止された全血から分取した血漿とFicoll-paque™ PLUS (GE Healthcare)を用いて分離した末梢血単核球(PBMC)及び未処理の咽頭ぬぐい液と尿それぞれ120µLからE.Z.N.A.Viral RNA Kit (Omega Bio-Tek)によりウイルスRNAを40~80µL抽出した。

麻疹症例は血漿、PBMC、咽頭ぬぐい液及び尿から、風疹症例は血漿、咽頭ぬぐい液及び尿から抽出したRNA 5µLを用いて、国立感染症研究所の病原体検出マニュアルに従ってTaqManプローブを用いたreal-time RT-PCR法^{10,11)}により、麻疹ウイルスはN遺伝子領域、風疹ウイルスはNS遺伝子領域を増幅した。

陽性コントロールには国立感染症研究所から配布された麻疹と風疹の10⁷コピー/µLのスタンダードRNAをそれぞれEASY dilution (for Real Time PCR)

(TaKaRa)で10倍段階希釈して、5×10⁴コピー/5µL~5×10⁰コピー/5µLを作製した。5×10⁴コピー/5µLから5×10¹コピー/5µLは各々2反応、5×10⁰コピー/5µLは3反応を同時に増幅し、得られた検量線から検体中のウイルス遺伝子数を定量した。定量に当たって、①検量線のslopeが-3.1~-3.8、②検量線のR²値が0.98以上、③5×10¹コピー/5µLのスタンダードRNAのCt(Cycle threshold)値が40以下、④陰性コントロールのCt値が40より大きいことを確認した。

咽頭スワブは採取後に任意量の保存液で希釈されることから、すべての検体におけるウイルス数はreal-time RT-PCR法に用いるtubeあたりの遺伝子数で比較した。数値が検量線の上限值である5×10⁴コピー/5µLを超えた場合は、抽出RNAをEASY dilutionで希釈して再測定した。

III 結果及び考察

1. 検量線の評価

スタンダードRNAを用いた検量線の作成を麻疹は3回、風疹は5回実施した(Fig. 1)。検量線のslopeは麻疹-3.342~-3.619、風疹-3.267~-3.467、R²は麻疹0.986~0.999、風疹0.990~0.997であった。すべての試験において、5×10⁰コピー/5µLのスタンダードRNAのCt値が40以下で検出されたことから、定量検出下限値は麻疹、風疹ともに5×10⁰コピー/5µLとした。

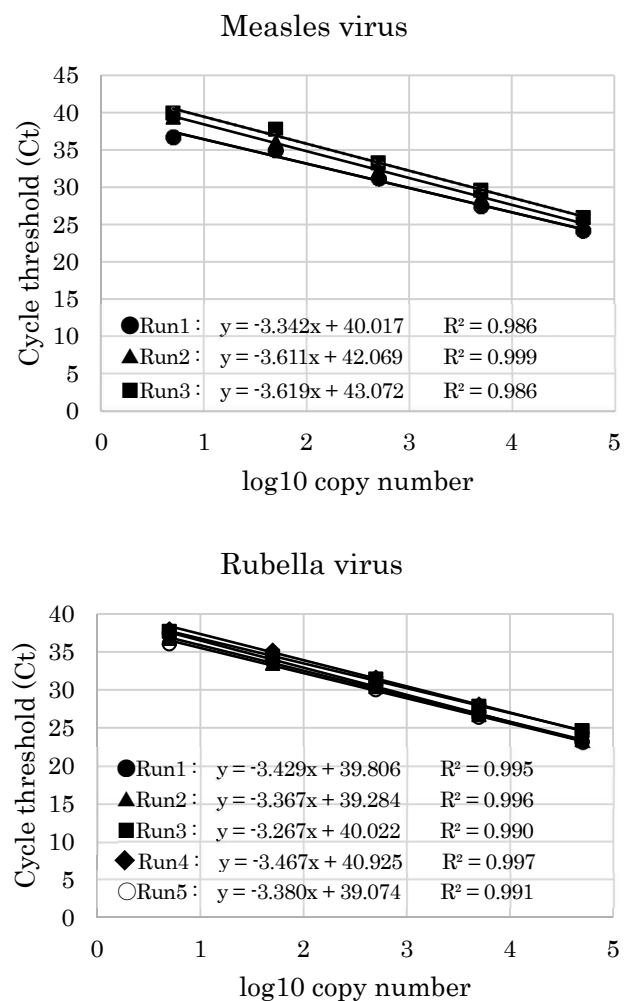


Fig.1 Standard curve obtained through ten-fold serial dilutions of the RNA standard

2. 麻疹患者の臨床症状と検体中のウイルス数の推移

麻疹ウイルスが検出された 23 例すべてで発熱と発疹が認められ、発熱が先行したのが 16 例、発熱と発疹が同日に出現したのが 7 例あった。麻疹では発熱初発日を発症 0 日として、採取日毎の検体中のコピー数の中央値を Fig. 2 に示した。中央値は、定量限界値以下の検体は 0 コピーとして算出した。

血漿での中央値は、症例のない 1, 7, 8 日目を除く 0 ~9 日目で $6.0 \times 10^0 \sim 5.8 \times 10^1$ コピーとなり、他の検体に比べて低い値を示し、発症日によるウイルス量の推移に一定の傾向は認められなかった。10 と 11 日目は定量限界値以下であった。

PBMC は、発症当日が 9.0×10^2 コピー、2 日目 8.8×10^3 コピー、3 日目 5.2×10^1 コピー、4 日目 3.8×10^4 コピーとなり 4 日目をピークに減少し、11 日目は定量限界値以下となった。

咽頭ぬぐい液は、発症当日から 1.2×10^5 コピーと高く、その後も漸増し、4 日目の 2.2×10^6 コピーをピークに減少したが、11 日目でも 1.1×10^2 コピー検出された。

尿は発症当日は 3.1×10^1 コピーと低値を示したが、日数の経過に伴って漸増し、他の検体より遅れて 6 日目に 3.0×10^5 コピーのピークを示した後、減少傾向を辿った。1 検体だけであったが、13 日目でも 7.4×10^2 コピー検出されていることから、さらに病日が経過しても尿からは検出されることが考えられる。

PBMC と咽頭ぬぐい液の検出がピークとなるのは 4 日目、尿は 6 日目で、ピーク値は咽頭ぬぐい液、尿、PBMC

の順に高く、いずれも 10^4 コピーを超えていた。発症後 4 日目までは咽頭ぬぐい液と PBMC のコピー数が尿と血漿よりも多く、6 日目以降は、尿が咽頭ぬぐい液を上回っており、病日の経過に伴って、咽頭ぬぐい液や尿の重要度が増すことが示された。

ワクチン接種と麻疹ウイルスコピー数を比較した (Table 1)。23 例中 10 例がワクチン未接種、1 回接種が 7 例、不明が 6 例であった。ワクチン未接種例では検体採取日に関わらず、すべての検体でコピー数を定量できたが、接種歴を有する 7 症例から採取された 24 検体中 7 検体は定量限界以下であった。2018 年 3 月に沖縄県で発生した集団発生事例では、発症から 7 日以内に検体が採取された麻疹患者 95 例のワクチン接種とウイルス遺伝子量を比較しており、接種歴を有する患者の全血、咽頭ぬぐい液、尿の Ct 値は、接種歴無しの患者の各検体の Ct 値より有意に高いことが報告されている¹²⁾。今回も、未接種 10 例の血漿、PBMC、咽頭ぬぐい液、尿のコピー数の中央値はそれぞれ 1.7×10^1 コピー、 3.5×10^3 コピー、 1.7×10^5 コピー、 1.4×10^3 コピーであったが、接種歴を有する 7 例では 0.0×10^0 コピー、 4.2×10^1 コピー、 1.0×10^3 コピー、 2.0×10^2 コピーとなり、すべての検体でワクチン未接種例が高い値を示した。ただ、発症から検体採取までの日数による検体中のウイルス量の推移を踏まえた検討も必要と思われる (Fig.2)。接種歴を有する症例の発症初期の PBMC、咽頭ぬぐい液や 6 日目以降の尿が 10^4 コピー以下であったことから、ワクチン接種歴が不明の症例において、咽頭ぬぐい液又は尿の

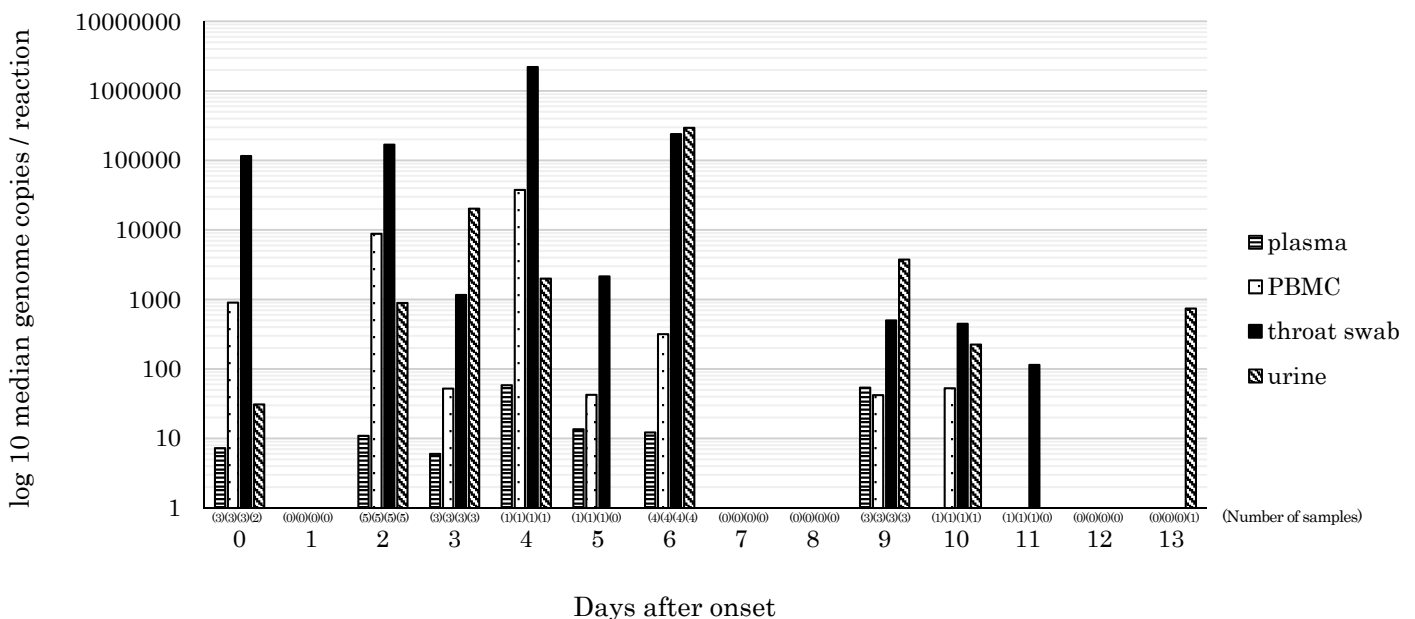


Fig.2 Quantitation of measles virus in clinical samples by the days after the onset

Table 1 Measles virus genome copy number in clinical samples by vaccination status

(1) Non-vaccinee

Case	Days after fever onset	Viral genome copy number (copies/reaction)			
		plasma	PBMC	throat swab	urine
1	0	7.3×10^0	9.0×10^2	1.6×10^5	1.1×10^1
2	0	1.7×10^1	3.5×10^3	1.2×10^5	5.1×10^1
3	2	1.5×10^2	1.7×10^4	8.3×10^5	3.9×10^3
4	2	3.9×10^1	8.8×10^3	1.4×10^6	3.7×10^2
5	2	1.1×10^1	1.3×10^4	1.7×10^5	4.3×10^3
6	2	7.0×10^0	3.1×10^2	3.2×10^4	2.1×10^1
7	4	5.8×10^1	3.8×10^4	2.2×10^6	2.0×10^3
8	6	6.0×10^0	4.9×10^2	4.4×10^5	1.9×10^4
9	9	5.4×10^1	3.2×10^1	5.0×10^2	3.8×10^3
10	13	N/A ^{a)}	N/A	N/A	7.4×10^2

(2) 1 dose of Measles-containing vaccine

Case	Days after fever onset	Viral genome copy number (copies/reaction)			
		plasma	PBMC	throat swab	urine
11	0	$<5 \times 10^0$	4.3×10^1	1.0×10^3	N/A
12	2	9.3×10^0	3.2×10^3	1.2×10^3	8.9×10^2
13	3	$<5 \times 10^0$	$<5 \times 10^0$	2.5×10^2	$<5 \times 10^0$
14	5	1.4×10^1	4.3×10^1	2.2×10^3	N/A
15	6	$<5 \times 10^0$	1.0×10^1	7.3×10^3	1.1×10^1
16	9	$<5 \times 10^0$	4.2×10^1	1.1×10^1	4.0×10^2
17	11	$<5 \times 10^0$ (whole blood)		1.1×10^2	N/A

(3) Vaccination status: Unknown

Case	Days after fever onset	Viral genome copy number (copies/reaction)			
		plasma	PBMC	throat swab	urine
18	3	6.0×10^0	5.2×10^1	1.2×10^3	2.0×10^4
19	3	1.7×10^2	8.8×10^3	2.9×10^5	5.3×10^4
20	6	2.1×10^1	4.0×10^2	4.9×10^5	1.3×10^6
21	6	1.9×10^1	2.3×10^2	3.9×10^4	5.7×10^5
22	9	5.8×10^1	2.4×10^2	1.1×10^4	9.2×10^5
23	10	$<5 \times 10^0$	5.3×10^1	4.5×10^2	2.2×10^2

a) N/A: Not Available

コピー数が 10^4 コピー以上を示した症例 No.18~22 はワクチン接種歴は無かったと推測される。

3. 風疹患者の臨床症状と検体中のウイルス数の推移

感染症法では臨床診断に基づく風疹の届出に、発熱、発疹、リンパ節腫脹のすべての症状が揃うことが必要であるが、今回、風疹ウイルス遺伝子が検出された 122 全症例で認められたのは発疹のみで、発熱は 117 例 (95.9%)、リンパ節腫脹は 65 例 (53.3%) であった。発疹と発熱双方の出現日が記載された 82 例において、発熱が発疹に先行した症例は 32 例 (39.0%)、発熱と発疹が同日に出現した例が 41 例 (50.0%)、発疹が発熱に先行した例が 9 例 (11.0%) であった。このため、風疹ウイルスの検討に当たっては、発熱と発疹のどちらかが先に出現した日を発症日とし、検体採取日までの日数を 0 日 (6 例)、1 日 (30 例)、2 日 (18 例)、3 日 (14 例)、4 日 (6 例)、5~12 日 (10 例) に分けて、検体中に含まれるウイルスコピー数を中央値で示した (Fig. 3)。同じ症例から採取日が異なる複数の検体が採取されている例もあったが、これらも併せて Fig.3 に記載した。定量限界以下であった検体は 0 コピーとして中央値を算出した。

血漿中のウイルスは、発症後 0~2 日は tube あたり 10^2 コピーを超える検体もあった (8 検体/49 検体) が、3 日目の 14 検体のウイルス量は 7.5×10^1 コピーが最も多く、4 日目以降に採取された 14 検体はすべて定量限界以下であった。コピー数の推移を中央値でみると、0 日、1 日、2 日、3 日、4 日、5~12 日すべてで 10 コピー以下であった。

咽頭ぬぐい液での中央値は、0 日、1 日、2 日、3 日、

4 日はそれぞれ 2.7×10^2 コピー ($<5 \times 10^0 \sim 1.8 \times 10^4$)、 2.3×10^2 コピー ($<5 \times 10^0 \sim 1.0 \times 10^4$)、 7.5×10^2 コピー ($5.1 \times 10^0 \sim 2.8 \times 10^4$)、 9.7×10^1 コピー ($<5 \times 10^0 \sim 3.1 \times 10^2$)、 2.8×10^2 コピー ($5.5 \times 10^1 \sim 4.5 \times 10^4$) で、0~4 日は 60.4% (32 検体/53 検体) の症例から 10^2 コピーを超えるウイルスが検出され、5~12 日には 6.4×10^0 コピー ($<5 \times 10^0 \sim 2.4 \times 10^1$) と減少した。

尿では、発症当日は 2.0×10^2 コピー ($<5 \times 10^0 \sim 4.1 \times 10^2$) と咽頭ぬぐい液と同程度あったが、それ以降は急減し、1 日目 8.0×10^0 コピー ($<5 \times 10^0 \sim 1.8 \times 10^2$)、2 日目 7.4×10^0 コピー ($<5 \times 10^0 \sim 1.2 \times 10^2$)、3 日目 3.3×10^0 コピー ($<5 \times 10^0 \sim 8.9 \times 10^1$)、4 日目 1.1×10^1 コピー ($<5 \times 10^0 \sim 2.9 \times 10^2$) となった。8 日目と 10 日目の検体でそれぞれ 4.1×10^1 コピー、 4.4×10^1 コピーのウイルスが検出されたが、10 検体中 6 検体は定量限界以下であった。

検体別にウイルス量の推移をみると、血漿に含まれるウイルスは他検体より少なく、咽頭ぬぐい液と尿から多く検出された。ただ、尿中のウイルス量は発症直後は多いものの短期間で減少しており、麻疹とは異なる推移となった。一方、咽頭ぬぐい液では比較的長期にわたって高い数値を維持しており、風疹検査において必須の検体と思われる。

検体中に含まれるウイルス量を麻疹と比較すると、血漿のようにウイルス量が低値であった検体では、両者はほぼ同程度であった。一方、咽頭ぬぐい液や尿のように高い値を示す検体は、採取日によって異なるが、麻疹は風疹より 10~1000 倍のウイルスが含まれていた。このことが、麻疹ウイルスが長期にわたって検体中に残留す

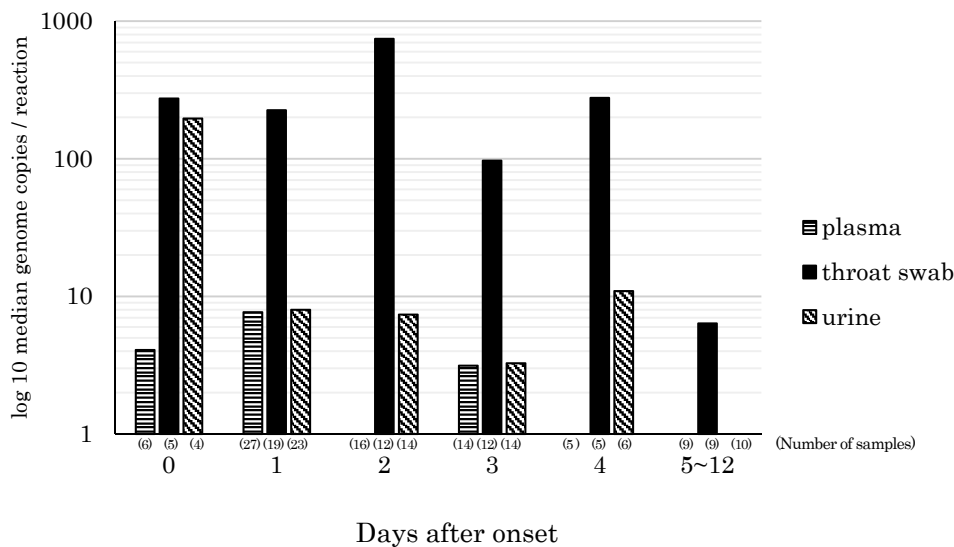


Fig.3 Quantitation of rubella virus in clinical samples by the days after the onset

ることや、初感染時に重症化傾向を有すること、さらには麻疹ウイルスの高い感染性の一因とも考えられる。

82例のワクチン接種歴は、未接種が15例(18.3%)、1回接種が2例(2.4%)、不明が65例(79.3%)であった。接種歴不明の割合が高かったため、接種歴の有無によるウイルス量の詳細な検討はできなかったが、咽頭ぬぐい液のコピー数が 10^5 コピー以上であった5例のうち3例(1.8×10^5 コピー、 1.4×10^5 コピー、 2.8×10^5 コピー)は接種歴は無く、2例(4.5×10^5 コピー、 2.0×10^5 コピー)は接種歴不明であった。接種歴を有する2例では、発症から2日以内に採取された咽頭ぬぐい液が、それぞれ 5.1×10^0 コピーと定量限界以下であった。麻疹同様に、ワクチン接種歴によりウイルス量に差がある可能性が考えられるが、接種歴の把握できる症例でさらなるデータの蓄積が必要である。

IV 結 論

兵庫県における2011～2019年の麻疹陽性23例について、発症から検体採取までの日数別に検体中のコピー数の中央値を比較した。発症後4日目までは、咽頭ぬぐい液とPBMCのコピー数が血漿と尿よりも多い傾向にあった。4日目をピークに咽頭ぬぐい液とPBMCのコピー数は減少し、6日目以降は尿のコピー数が咽頭ぬぐい液よりも多いか同程度となった。咽頭ぬぐい液は11日目、尿は13日目に 1.0×10^2 コピー/反応を超えるウイルスが検出され、発症後日数が経過した患者の診断には咽頭ぬぐい液や尿の採取が重要であることが示唆された。

麻疹82例について、発症から検体採取までの日数別に検体中のコピー数の中央値を比較した結果、調査した0～12日では、咽頭ぬぐい液に含まれるウイルス数は、血漿と尿より多かった。咽頭ぬぐい液に含まれるウイルス数は5日目以降急減するため、発症後4日以内に採取することが望ましい。

謝 辞

検体採取、連絡調整にご協力いただいた県疾病対策課、県健康福祉事務所並びに関係機関の皆様方に深謝いたします。

文 献

- 1) 国立感染症研究所感染症疫学センター ウイルス第3部：麻疹とは(2017年6月7日改定)：<https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ma/measles.html>
- 2) 日本医師会感染症危機管理対策室長：世界保健機関西太平洋事務局による麻しん排除の認定について。平成27年3月27日、(地Ⅲ301)(2015)
- 3) 国立感染症研究所：広島県東広島市内での麻疹集団発生事案について。病原微生物検出情報(IASR), **39**, 53-54 (2018)
- 4) 国立感染症研究所：山形県における麻しんのアウトブレイクについて。病原微生物検出情報(IASR), **39**, 54-55 (2018)
- 5) 厚生労働省：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31年4月19日一部改正・適用)
- 6) 駒瀬勝啓：日本の麻疹の状況と麻疹排除の進捗。モダンメディア, **61**(4), 81-90 (2015)
- 7) 国立感染症研究所感染症疫学センター：風疹とは(2013年05月07日改定)：<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/43-0-rubella-intro.html>
- 8) 厚生労働省：風しんに関する特定感染症予防指針。平成26年3月28日(平成29年12月21日一部改正・平成30年1月1日適用)
- 9) 荻美貴, 高井伝仕, 押部智宏, 近平雅嗣, 稲田忠明：兵庫県における麻疹ウイルスの検出状況と遺伝子解析の有用性(2008～2017年)。兵庫県立健康科学研究所研究報告, **1**, 17-23 (2019)
- 10) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル 麻疹(第3.4版)(2017)
- 11) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル 風疹(第4.0版)(2019)
- 12) 国立感染症研究所：沖縄県における麻疹アウトブレイク一検査対応と得られた知見。病原微生物検出情報(IASR), **40**, 54-55 (2019)

(令和2年2月28日受理)