

学位論文題名

Detection of measles virus from clinical samples using the polymerase chain reaction

(ポリメレースチェーンリアクション法を用いた臨床検体からの麻疹ウイルスの検出)

学位論文内容の要旨

麻疹は一般的には臨床像の明かな疾患である。しかし、母親からの移行抗体が存在する乳児期や、免疫グロブリンの投与を受けている場合、ワクチンの投与を受けている場合は非典型的な経過をたどる。このような症例においては、血清学的な診断が勧められているが診断までに時間を要し、多くの症例では後方視的な診断となり実用的には十分ではない。迅速で感度の良い麻疹診断のために、逆転写反応（以下RTと略す）に引き続きポリメレースチェーンリアクション法（以下PCR法と略す）を用い麻疹ウイルスゲノムを検出する方法が報告されている。今回我々は、RT-PCR法により麻疹患児の臨床検体から麻疹ウイルスRNAの迅速検出(24時間以内)を試みたので報告する。

〔対象〕

麻疹ウイルス株 陽性コントロールとしてVero細胞で分離したLEC株を用いた。

臨床検体 対象検体は、CDCの診断基準で臨床的に麻疹と診断された患児（7カ月～14歳、男児16例、女児16例）32例から採取した血清32検体、咽頭ぬぐい液16検体、中枢神経症状を呈した児4例の髄液9検体、血清5検体、非典型的経過を呈した麻疹患児2例の血清1検体、咽頭ぬぐい液2検体である。咽頭ぬぐい液の一部を除きすべて凍結保存検体である。非典型症例の1例は6カ月男児で、周囲に麻疹の流行あり麻疹様の発疹を認めたが発熱、咳嗽、コプリック斑を認めなかった症例、もう1例は11カ月男児で、1カ月前に麻疹患児と接触した為に予防的にγグロブリンを投与されており、4日間の発熱、非麻疹様丘疹、肺炎の所見を認めたが、コプリック斑は認めなかった症例である。

陰性コントロールは、非麻疹患児10例の咽頭ぬぐい液10検体、血清10検体、麻疹以外の中枢神経系感染症患児10例の髄液10検体を用いた。

〔方法〕

血清あるいは髄液は60,000gで2時間超遠心分離し、得られた沈渣からRNAを抽出した。咽頭ぬぐい液は200μlの磷酸緩衝液を加え以下同様の方法でRNAを得た。RTは逆転写酵素(Rous-associated virus 2 reverse transcriptase)とrandom hexadeoxynucleotideプライマーを用い、42℃1時間行ない次いで95℃5分間で逆転写酵素を不活化した。得られた相補的DNAの増幅は、感度を上げるため2ステップ(Nested PCR)で行なった。Godecらが

設定したプライマーを用いて35サイクルの初回増幅し、ついでその内側に新たに20塩基のプライマーを設定し25サイクルの2回目増幅を行なった。1サイクルはdenaturation 94℃一分間、annealing 55℃一分間、extension 72℃一分間行ない、増副産物は1.4 %アガロースゲルに電気泳動しエチジウムブロマイド染色で観察した。

増幅産物の同定は2種類の制限酵素による切断パターンにより行なった。

PCR法による実験は少なくとも2度施行した。

PCR法を施行した19例の同一検体について血清麻疹IgM抗体の測定をELISA法で行なった。

〔結果〕

感度 このRT-PCR法の系における検出感度は、標準株として用いた麻疹LEC株のRNAで50 fgまで検出が可能であった。

特異性 得られた増幅産物を制限酵素Alu IとRSA Iで処理、期待されるサイズに切断されることにより確認した。

臨床応用 RT-PCR法により、血清32検体中24検体(75%)に、咽頭ぬぐい液16検体中13検体(81.3%)に、全例32例中27例(84.4%)において陽性結果を得た。陽性であった検体は、発疹出現2日前から発疹出現後8日目までであった。1例でコプリック斑出現1日前の血清検体から陽性結果を得た。RT-PCR法により得られた増副産物の制限酵素による切断パターンは、すべて予想されたサイズであった。麻疹脳炎4例中3例の髄液で陽性結果を得た。陽性のものは中枢神経系症状出現後0日目が1例、1日目が2例で、それ以後は陰性であった。非典型的経過の2例は陽性結果を得た(1例は後方視的な抗体測定で麻疹感染が証明された)。血清IgM測定による検索の陽性率は、測定した19例中13例が陽性で68.4%であった。陰性コントロールへのコンタミネーションは見られなかった。

〔考察〕

麻疹は、予防接種によるコントロールの努力にもかかわらず現在でも一般的で感染性の高い疾患である。

本研究においてRT-PCR法による麻疹ウイルスRNAの検出率は84.4%であり従来の診断方法よりも優れていた。また、凍結保存血清からRNAを検出できたことは、検体の入手、保存、輸送が容易で、後方視的な診断や多施設間での研究が可能である。

RT-PCR法により陽性結果を得たのは、発疹出現2日前から発疹出現8日後までで、このことから従来考えられていたより麻疹ウイルス血症が長いことが示唆された。また早期の迅速診断により、潜伏期間中の麻疹の診断が可能で、臨床の場で麻疹の疑いのある児の早期隔離等により院内感染や流行をより小さく抑えることが可能と考えられた。

さらに、非典型的な経過を呈する麻疹、母体からの移行抗体が残存する乳児期の麻疹や、なんらかの理由でガンマグロブリンの投与を受けている児における修飾麻疹の診断が可能であった。また、麻疹ワクチンの接種を受けている児の麻疹の診断や、抗体産生の見られない症例の麻疹感染の診断にも有用と考えられた。また、中枢神経系合併症を呈した麻疹において、発症早期の髄液から陽性所見を得たが、発症6日目以降比較的早く検出されなくなることが判明した。

RT-PCR法による検索は、麻疹の迅速診断、非典型的麻疹の診断、合併症の診断に有用であった。RT-PCR法は麻疹診断法として有用な手段になりうる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 皆 川 知 紀

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 高 田 賢 藏

副 査 教 授 小 林 邦 彦

学 位 論 文 題 名

Detection of measles virus from clinical samples using the polymerase chain reaction

(ポリメレースチェーンリアクション法を用いた臨床検体からの麻疹ウイルスの検出)

麻疹は一般的には臨床像の明かな疾患である。しかし、移行抗体が存在する乳児期や、免疫グロブリンの投与、ワクチンの投与を受けている場合は非典型的な経過をたどる。このような非典型的な症例では、主に血清学的な診断が用いられるが時間がかかり、かつ後方視的な診断である。迅速で感度の高い麻疹診断法の確立のために、申請者は、RT-PCR法の有用性について種々の臨床像を呈した麻疹感染症の検体を用いて検討を行った。

【対象】麻疹ウイルス陽性コントロールはVelo細胞で分離したLEC株を用いた。臨床検体は、CDCの診断基準で麻疹と診断された患児の血清、咽頭ぬぐい液、中枢神経症状を呈した児の髄液、血清、非典型的経過を呈した麻疹の血清、咽頭ぬぐい液、巨細胞肺炎で死亡した免疫不全症のホルマリン固定肺組織、SSPEの咽頭ぬぐい液、末梢単核球、生検脳組織（ホルマリン固定）などである。陰性コントロールは、非麻疹患児の咽頭ぬぐい液、血清、麻疹以外の中枢神経系感染症の髄液である。

【方法】血清や髄液は60,000gで2時間超遠心分離し、得られた沈渣からグアニジン法でRNAを抽出した。逆転写反応はrandom hexadeoxynucleotideプライマーを用い、42℃1時間行ない、95℃5分で逆転写酵素を不活化した。得られた相補的DNAの増幅は、2ステップ（Nested PCR）で行なった。Codecらが設定したプライマーを用いて初回35サイクル、ついでその内側のプライマーを設定し25サイクルの増幅を行なった。増幅産物は1.4%アガロースゲルに電気泳動しエチジウムブロマイド染色で観察した。増幅産物の同定は2種類の制限酵素による切新パターンにより行なった。

【結果】感度：このRT-PCR法の系における検出感度は、標準株として用いた麻疹LEC株のRNAで50fgまで検出が可能であった。特異性：得られた増幅産物を制限酵素Alu IとRSA Iで処理、期待されるサイズに切新されることにより確認した。典型的な麻疹での検出率：血清32検体中24検体（75%）に、咽頭ぬぐい液16検体中13検体

(81.3%) に、全体で32例中27例 (84.4%) に陽性であった。ウイルスRNA陽性は、発疹出現2日前から発疹出現後8日目まで認められた。1例でコプリック斑出現1日前の血清で陽性だった。麻疹脳炎4例中3例の髄液で陽性だった。陽性のうち、中枢神経系症状出現後0日が1例、1日が2例で、それ以後は陰性であった。非典型的経過例 (抗体測定で麻疹感染を証明) は何れも陽性だった。血清IgM測定による検索の陽性率は、測定した19腕中13例が陽性で68.4%であった。陰性コントロールへのコンタミネーションは見られなかった。巨細胞肺炎のホルマリン固定肺組織でウイルスRNAが検出できた。SSPEの脳脊髄液は3例中1例に陽性、末梢単核球は2例に陽性だった。SSPEのホルマリン固定脳組織では、封入体陽性例でウイルスRNA陽性であったが、封入体陰性例では陰性であった。

【考察】麻疹は、予防接種によるコントロールの努力にもかかわらず現在でも一般的で感染性の高い疾患である。本研究においてRT-PCR法による麻疹ウイルスRNAの陰出率は84.4%であり従来の診断方法よりも優れていた。また、凍結保存血清からRNAを検出できたことは、検体の入手、保存、輸送が容易で、後方視的な診断や多施設間での研究が可能である。典型的麻疹で、RT-PCR法により陽性結果を得たのは、発疹出現2日前から発疹出現8日後までと、従来考えられていたより麻疹ウイルス血症が長く存在することが示唆された。また早期の迅速診断により、潜伏期間中の麻疹の診断が可能で、臨床の場で麻疹の疑いのある児の早期隔離等により院内感染や流行をより小さく抑えることが可能と考えられた。さらに、非典型的な経過を呈する麻疹、移行抗体が残存する乳児期の麻疹や、なんらかの理由でガンマグロブリンの投与を受けている児における修飾麻疹の診断が可能であった。また、麻疹ワクチンの接種を受けている児の麻疹の診断や、抗体産生の見られない症例の麻疹感染の診断にも有用と考えられた。中枢神経系合併症を呈した麻疹において、発症早期の髄液から陽性所見を得たが、発症2日目以降比較的早く検出されなくなることが判明した。ホルマリン固定組織からのウイルスRNAの検出が可能であったことから、本法は保存された古い組織での検索にも用いられると考えられる。SSPE患児の末梢単核球にウイルスRNA陽性であったことから、持続感染は単核球にもあることが推測された。以上から、RT-PCR法による検索は、麻疹の迅速診断、非典型的麻疹の診断、合併症の診断に有効であるばかりではなく、ホルマリン固定された保存組織におけるウイルスRNA検出にも応用出来る点で、有用な手段となりうると考える。

本研究は、麻疹ウイルスゲノム検出におけるRT-PCRの有用性を、典型、非典型、及び神経系麻疹などの臨床検体を用いて証明した。特に、本法により、通常の麻疹におけるウイルス血症は予想外に長い反面、脳炎等に於ける髄液中の消失が著しく早いことを見出した点、SSPEで末梢単核球に持続感染している可能性のあること、またホルマリン固定組織からのウイルスRNAの検出が可能であることを証明した点を、審査員一同は評価し、博士 (医学) の学位に値するものと判定した。