

令和元年7月10日~11日

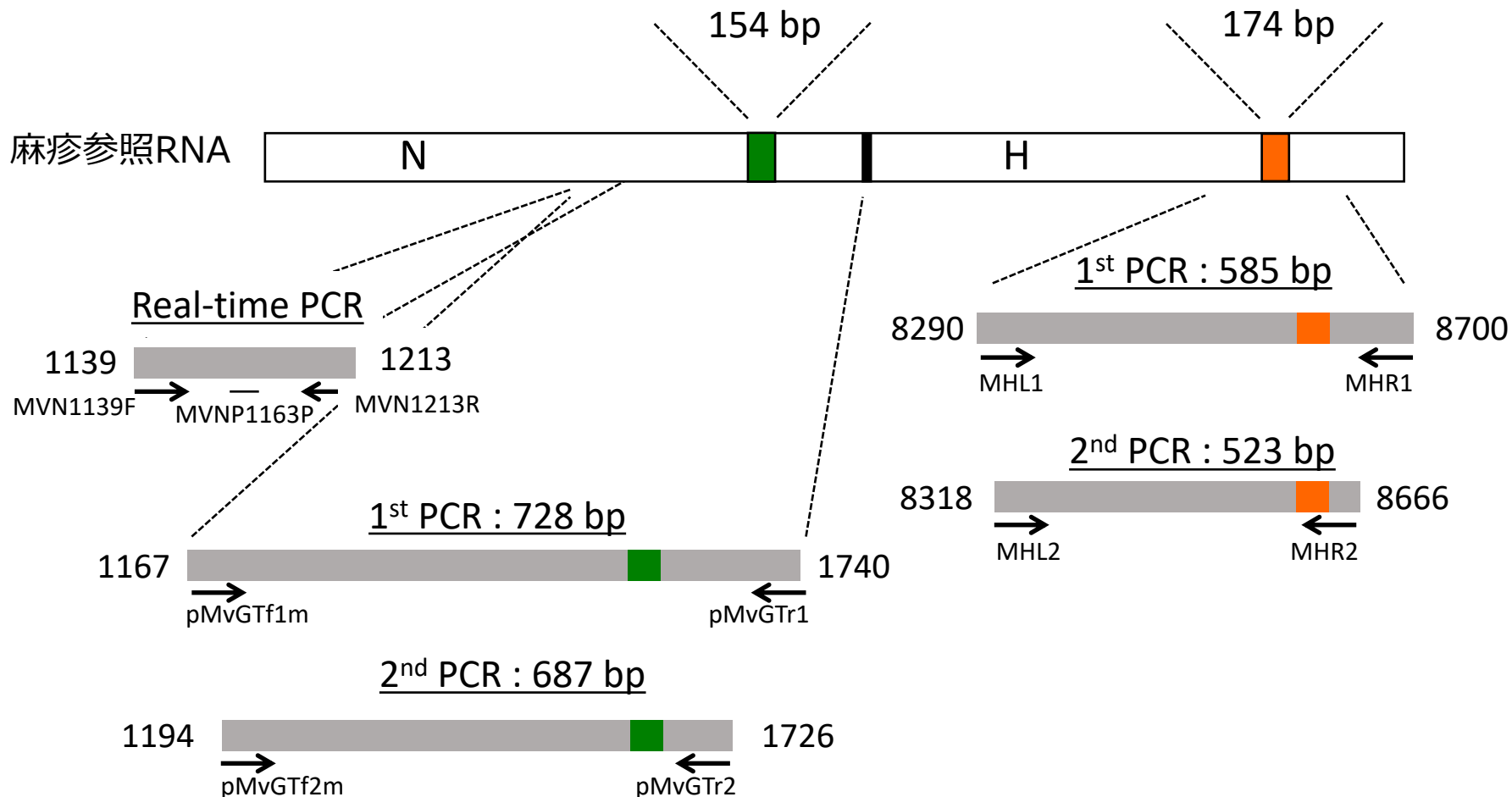
衛生微生物技術協議会第40回研究会 熊本市民会館

麻疹・風疹 レファレンスセンター報告

国立感染症研究所 ウイルス第三部第二室 森 嘉生 (風疹)
第一室 大槻 紀之 (麻疹)

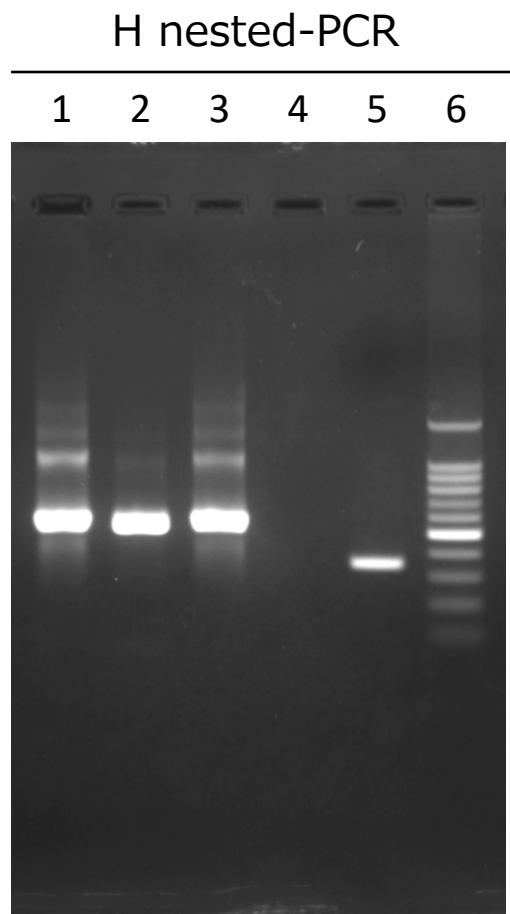
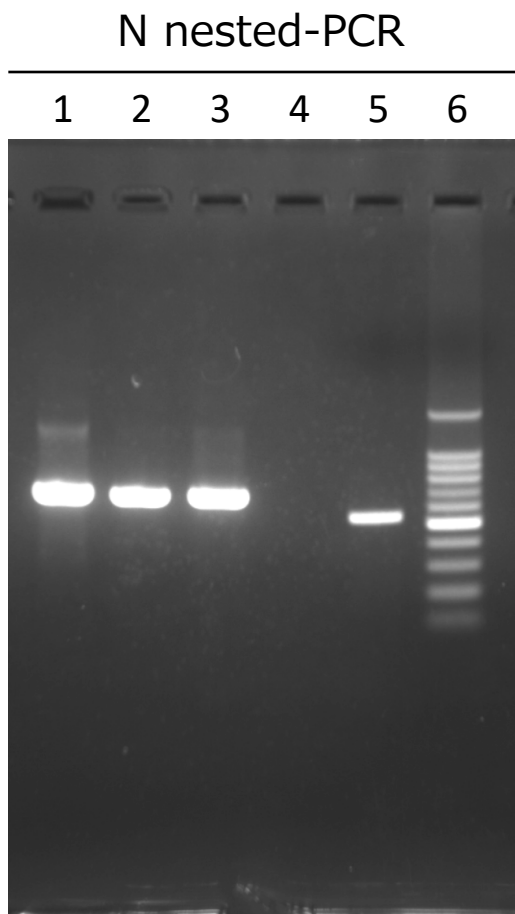
1. ウイルス遺伝子検査に用いる参照RNAの更新について
麻疹
風疹
2. 病原体検出マニュアルの改定について
風疹
3. 麻疹ウイルス遺伝子解析に関して
4. 今年度の予定

新規麻疹参照RNA (陽性コントロール)



新規参照RNAはReal-time RT-PCRとconventional RT-PCRの両方の陽性コントロールとして使用可

新規麻疹参照RNA (陽性コントロール) - conventional PCR

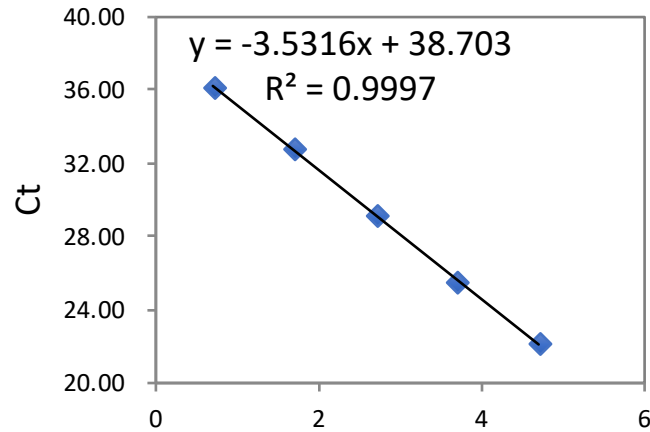


1. 新規参照RNA (10^2 コピー/ μ l)
2. 新規参照RNA (10^1 コピー/ μ l)
3. 現陽性RNA
4. 陰性対照
5. サイズマーカー
6. 100bp ラダー

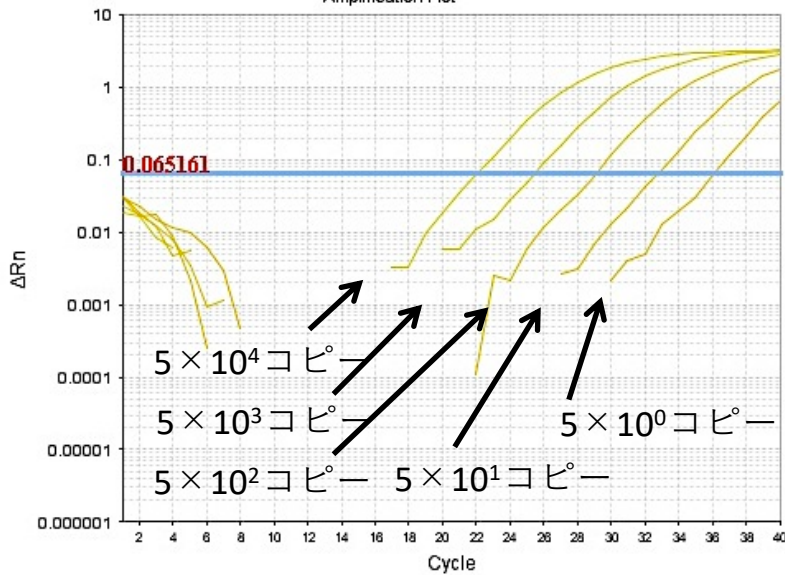
687bp	523bp	参照RNA検出バンド
533bp	349bp	麻疹ウイルス検出バンド

新規麻疹参照RNA (陽性コントロール) - real-time PCR

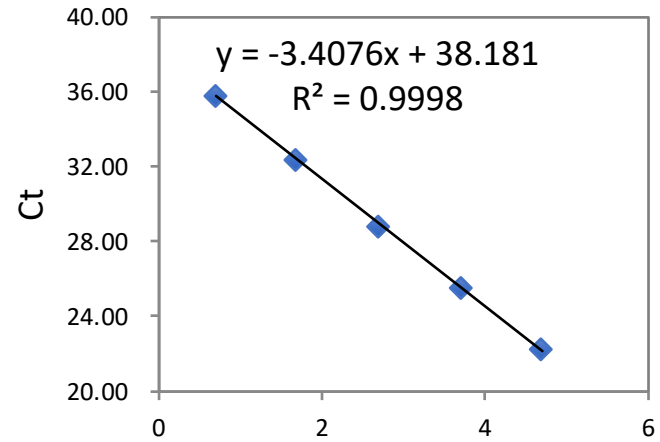
新規麻疹参照RNA



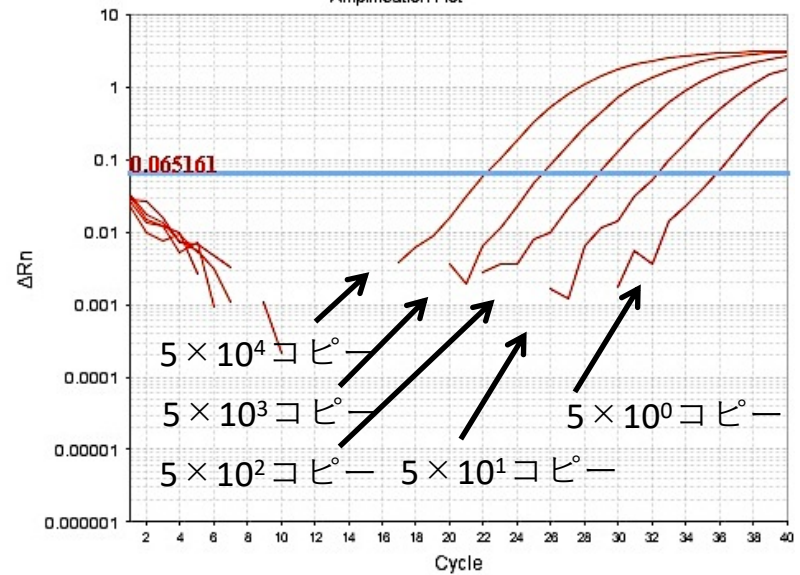
コピー数/反応 (Log10)
Amplification Plot



現在のスタンダードRNA

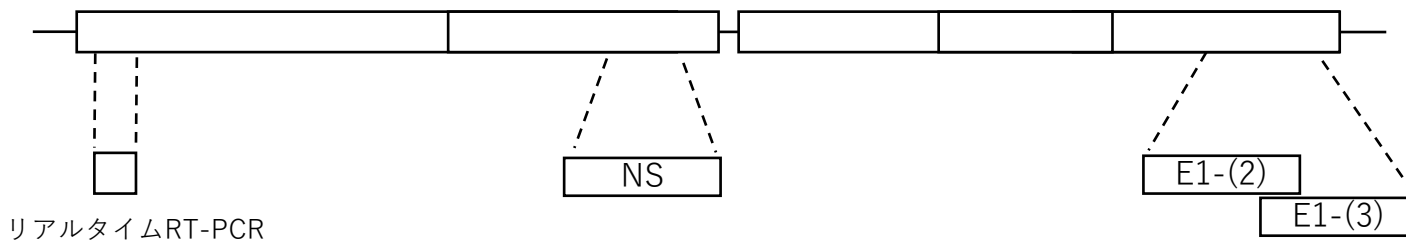


コピー数/反応 (Log10)
Amplification Plot

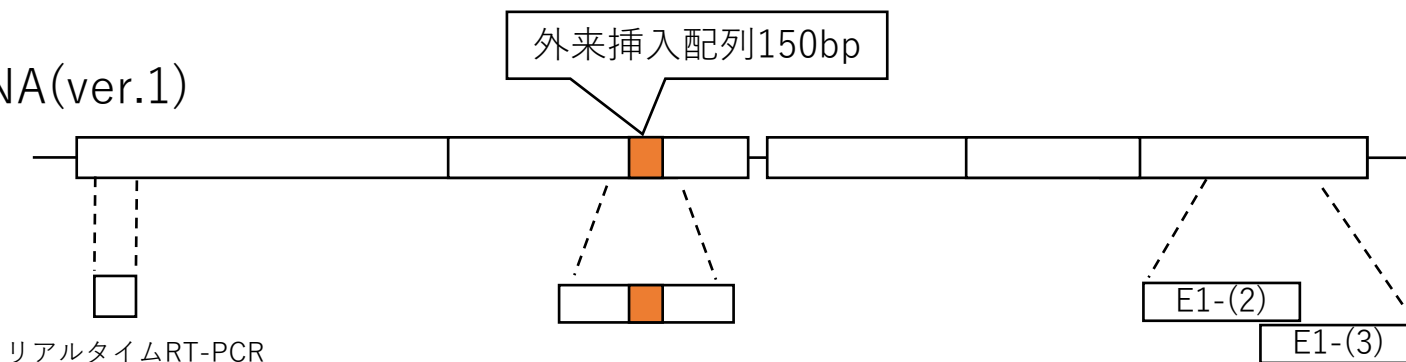


新規風疹参照RNA(ver.2)における外来配列の挿入部位の模式図

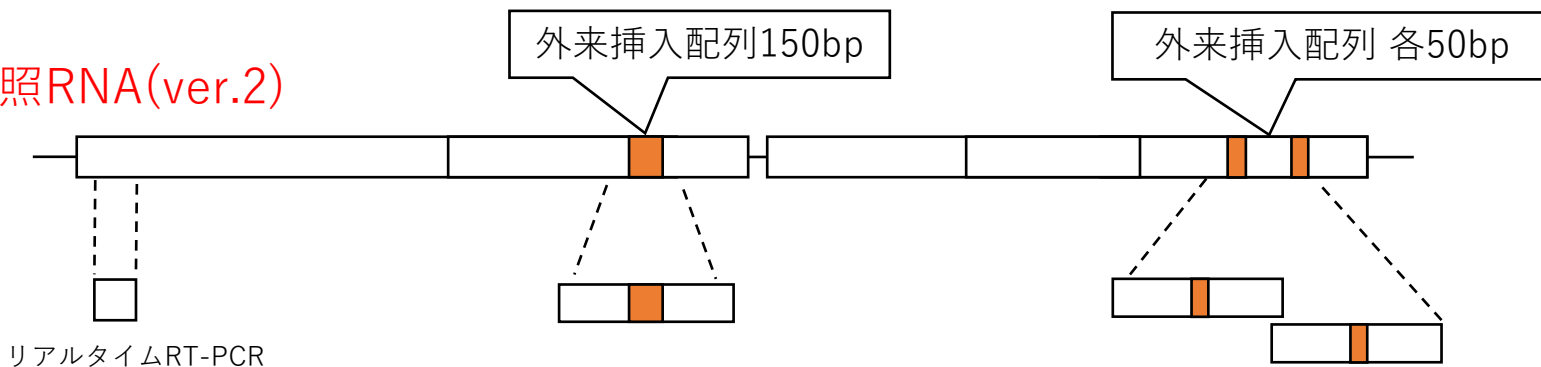
風疹ウイルス野外株ゲノムRNA



参照RNA(ver.1)



新規参照RNA(ver.2)

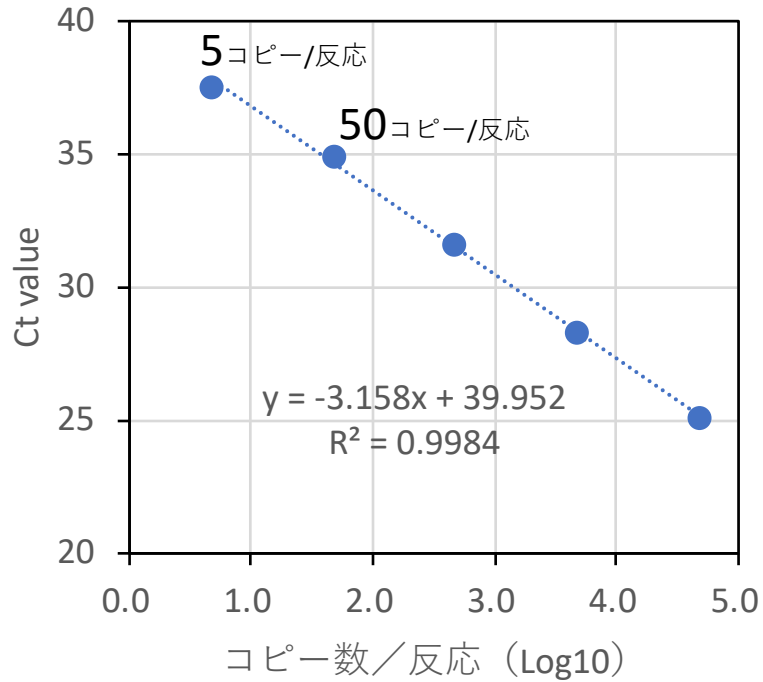


風疹コンベンショナルRT-PCRによる増幅産物のサイズ

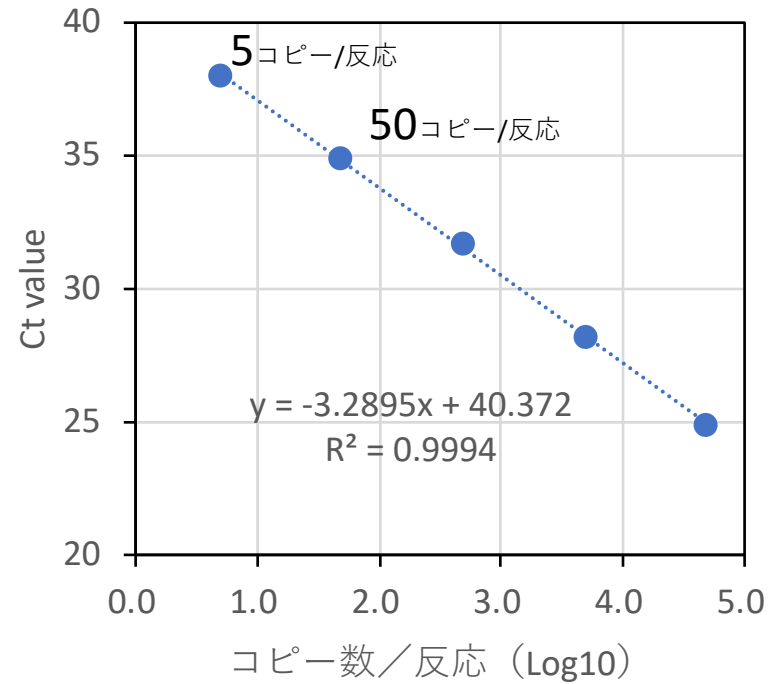
	期待されるバンドサイズ(bp)		
	NS領域RT-PCR	E1-(2)領域RT-PCR	E1-(3)領域RT-PCR
野外株	1st PCR: 256 nested PCR: 157	1st PCR: 506 nested PCR: 466	1st PCR: 550 nested PCR: 423
	+150		
参照RNA (Ver.1)	1st PCR: 406 nested PCR: 307	1st PCR: 506 nested PCR: 466	1st PCR: 550 nested PCR: 423
		+50	+50
新規参照RNA (Ver.2)	1st PCR: 406 nested PCR: 307	1st PCR: 556 nested PCR: 516	1st PCR: 600 nested PCR: 473

新規風疹参照RNA(ver.2)のリアルタイムRT-PCR増幅

参照RNA (ver.1)



参照RNA (ver.2)



病原体検出マニュアル 風疹 第4版について
(2019.7月4日改定)

変更点

1. コンベンショナルRT-PCR（NS遺伝子、E1遺伝子）の実施例変更
PCR酵素：Perfectshot Ex-Taq → Tks Gflex DNA polymerase
2. シークエンス用プライマーの追加、シークエンス反応精製方法の記載変更
3. 参照RNA ver.2について
4. 検体の処理法、輸送、保管についての補足
5. その他 細かな修正

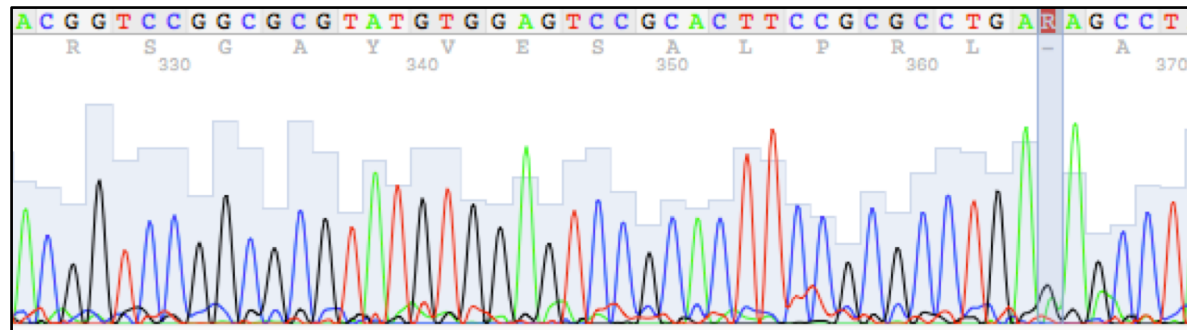
シーケンスプライマーの改良

E1-3R ACCCGCGCGCTC**GCG**CGATC

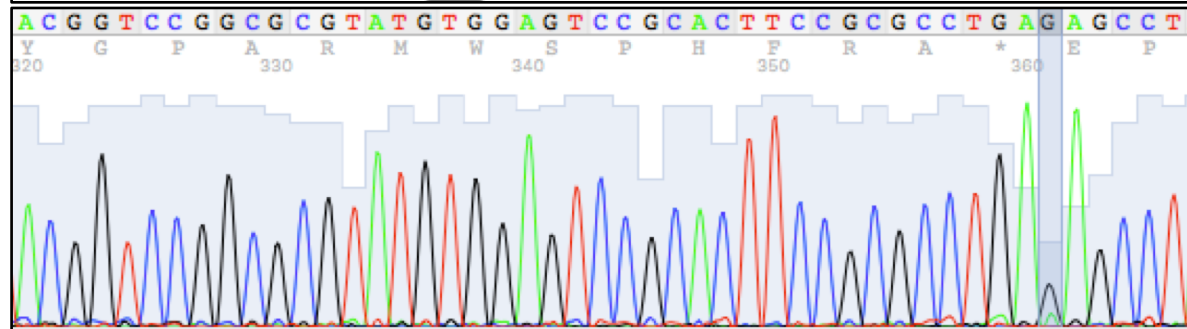
E1-3R'seq ACCCGCGCGCTC**ACA**CGATC

プライマーダイマーの解消。シーケンス反応時のみ使用

E1-3R



E1-3R'seq



シーケンス反応精製方法の記載変更

E1-3R (E1-3R'seq) は精製方法の影響を非常に受けやすい

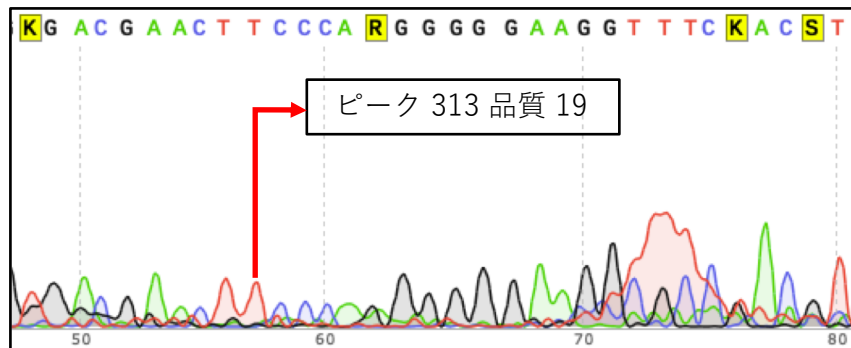
第3.2版

AutoSeq G-50 (GEヘルスケア) 等を用い、未反応ダイターミネーターを除去する。

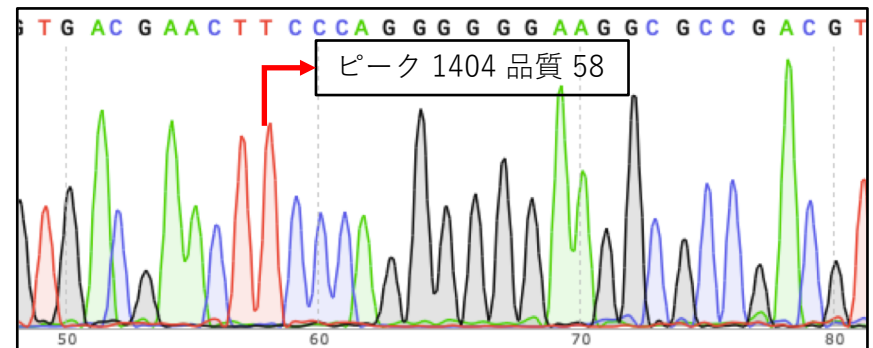
第4.0版

スピンカラム法やエタノール沈殿法等を用いて、未反応ダイターミネーターを除去する。
<中略> 感染研では**Centri-Sepスピンカラム** (Thermo Fisher Scientific) を用いた方法もしくはエタノール沈殿で精製を行ない、良好な結果を得ている。

AutoSeq G-50



Centri-Sep



検体の処理、輸送、保管についての補足

1) 咽頭ぬぐい液または鼻腔拭い液（ウイルス分離培養および遺伝子検査）：合成樹脂素材のスワブ採取スティック（例：Sterile Swab Applicators, Copan社製）で咽頭あるいは鼻腔粘膜をぬぐい、ウイルス保存輸送液（1～3mL）に浸漬する。ウイルス保存輸送液は市販品（例：BDユニバーサルトランスポート検体輸送用培地、BD社製）のほか、自家調整液*が使用できる**。<中略>

** 上記を使用することが望ましいが、難しい場合には滅菌綿棒と少量の滅菌生理食塩水で代用することができる。細菌培養用のキャリア・ブレア培地等は望ましくない。

3) 尿（ウイルス分離培養および遺伝子検査）：

10から50mLの尿を採取する。1,000～1,500rpm、10分間遠心した沈渣細胞を2～3mLのウイルス輸送保存液に再浮遊させたものを用いる。上記の処理を行うことが望ましいが、尿そのものでもウイルス遺伝子を検出可能である。上記の処理を行っても沈渣細胞が得られない場合があるが、その場合には尿検体をそのまま使用する。ウイルス分離に未処理尿検体を使用する場合、そのままだと細胞障害が起きることがあるため2～10倍に希釈して使用する。

検体の処理、輸送、保管についての補足

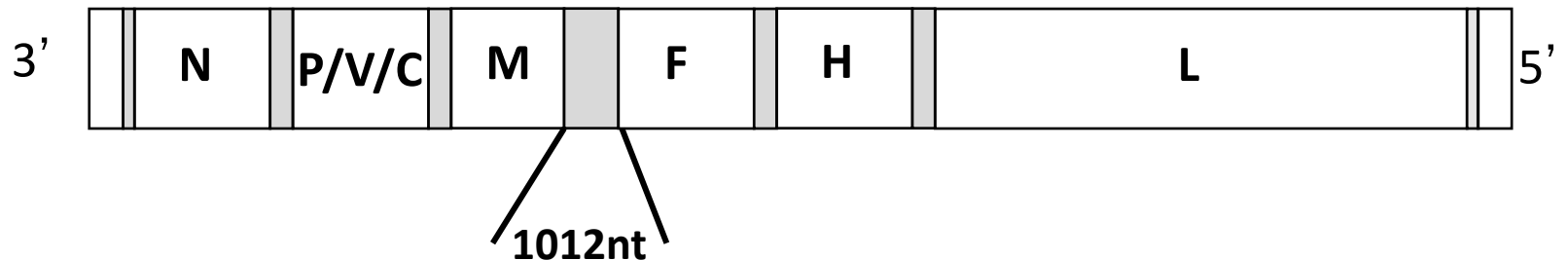
2-4. 検査材料の輸送と保管

検体を採取したら4°Cに保管し、速やかに検査実施施設へ冷蔵状態で輸送する。ウイルス遺伝子検出法あるいはウイルス分離法の実施は、採取後48時間以内を開始することが望ましいが、困難な場合にはそのまま冷蔵保存を行うか（採取後7日ぐらいまで）、-80°Cでいったん冷凍保存する。全血からの血清・血漿・PBMC分離および尿の遠心分離は冷凍前に実施する。検体の長期保存は必ず-80°Cでの冷凍で行うこと。血清学的検査に用いる血清は-20°Cで保存可能である。

麻疹N遺伝子450bpの配列によるウイルスの型別について

世界的に麻疹の発生が減少している状況に於いて現在のN遺伝子450bpの塩基配列による型別だけでは分子疫学的に十分に仕分け出来ない状況になりつつある。

WHOではより詳細な分子疫学を実施するために M/F-NCR (M/F遺伝子間のnon-coding region) の塩基配列による型別を検討している



麻疹ウイルスM/F-NCRの塩基配列に関して

今後、疫学リンクがはっきりせずN450の配列により分子疫学的にも十分な解析が出来なかった場合、M/F-NCRの塩基配列の解析が必要となる可能性

現在は以下の様に考えています

- ✓ M/F-NCRの配列を解析することにより、国内の発生状況の調査に有用であると考えられるウイルス株での配列解析
- ✓ 配列の決定は、感染研ウイルス3部で実施あるいは各施設で実施どちらでも可能とする
- ✓ 感染研で実施した場合でも、その配列の利用は国内の流行の調査及びWHOへの報告にのみデータを利用する
- ✓ 後日、M/F-NCR配列が必要となる場合も考えられるので、可能な限り抽出RNAやcDNAの保存が必要

今年度の予定

- 配布希望施設へ参照RNA ver2の送付
- 麻疹 病原体検出マニュアル 小改定
(参照RNAに関する記載変更)
- 厚労省外部精度管理事業 麻疹・風疹
ウイルス遺伝子配列解析
8月上旬受付開始、9月上旬~10月上旬実施
- AMED研究班（岡本分担班） 実地研修
風疹ウイルス遺伝子配列解析
2月ごろ