

大阪市内の麻疹診断例における麻疹ウイルス検出と分子疫学解析 (2012-2013シーズン)

改田 厚、久保英幸、平井有紀、山元誠司、後藤 薫、廣川秀徹*、入谷展弘、長谷 篤

Measles virus detection from patients diagnosed as measles during 2012-2013 season in Osaka City, Japan.

Atsushi KAIDA, Hideyuki KUBO, Yuki HIRAI, Seiji P YAMAMOTO, Kaoru GOTO,
Hidetetsu HIROKAWA*, Nobuhiro IRITANI and Atsushi HASE

Abstract

Measles virus (MeV) infect human and cause measles. When diagnosed as measles, the MeV detection by laboratory diagnosis using PCR was needed to count accurate number of measles patients. PCR for MeV were performed for 310 clinical specimens collected from 124 patients between January 2012 and May 2013 in Osaka City, Japan. The results showed only 2 patients (March and April in 2013) were MeV-positive (1.6%). One patient was imported case, and the other case was infected by contacting with MeV-positive patient in the pediatric clinics. To identify the MeV genotypes, the phylogenetic analysis was conducted using nucleoprotein genes, which resulting both of two strains were genotype D8. Intriguingly, most of the cases diagnosed as measles were MeV-negative (98.4%). After measles outbreak observed in 2007 in Japan, the MeV detections have been rare in Osaka City, Japan, however, needs to pay attention for the imported case. To prevent MeV infection, the continued high percentage of vaccination is important.

Key words: measles, measles virus, genotype, exanthema, imported case

I 緒言

麻疹ウイルス (MeV) は、ヒトに感染して麻疹を引き起こす。麻疹は、発熱、発しん、カタル症状を主症状とするウイルス感染症であるが、下気道炎 (気管支炎、肺炎)、中耳炎、脳炎等、重篤な合併症状を伴うことがあるため注意が必要である[1]。生ワクチン導入後、先進国では麻疹患者が激減したが、世界では開発途上国を中心に死者が発生している[2]。日本では、春季～初夏にかけて流行が見られていたが、2007年の流行以降、特徴的な季節性は確認されていない[3]。

MeVは、パラミクソウイルス科に属する全長約16 kbの一本鎖RNA (マイナス鎖) ウイルスである。感染力は

非常に強く、1人の患者が何人の感受性者に麻疹を発症させるかを示す基本再生産数は12~18である (インフルエンザウイルスは3~4)[4]。現在、MeVには、24の遺伝子型が報告されており、世界の各地で特徴的な遺伝子型の分布が知られていることから、検出株の遺伝子型別は、伝播経路の解析に有用とされている[5]。

世界保健機関西太平洋地域事務局(WPRO)は、当初、2012年までにアジア西太平洋地域から麻疹を排除する目標を定めていた[6]。日本においても「麻疹に関する特定感染症予防指針 (厚生労働省告示第四四二号)」が策定され、2008年1月1日から麻疹は全数把握対象疾患となり、正確な麻疹患者数把握のため、麻疹診断例については、地方衛生研究所におい

大阪市立環境科学研究所
〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34
Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences
8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan
*大阪市保健所
〒545-0051 大阪市阿倍野区旭町 1-27-1000
Osaka City Public Health Center
1-27-1000 Asahi-cho, Abeno-ku, Osaka 545-0051, Japan

てMeVの遺伝子検査が求められている[7]。麻疹排除の定義は、2008年には「国外で感染した者が国内で発症する場合を除き、麻疹の診断例が1年間に人口100万人当たり1例未満であり、かつ、ウイルスの伝播が継続しない状態にあること」とされていた。現在までのところ、麻疹報告数はかなり減少したが、排除基準に達していない。2012年にはWPROより新たな定義として「適切なサーベイランス制度の下、土着株による感染が1年以上確認されないこと」が示され、麻疹排除達成の認定基準として「適切なサーベイランス制度の下、土着株による感染が3年間確認されず、また遺伝子型解析により、そのことが示唆されること」が示された。これに伴い、「麻疹に関する特定感染症予防指針」も改訂され、2015年までの麻疹排除の目標が掲げられた[7]。一方、麻疹は、ワクチン接種により予防が可能であることから、95%以上の予防接種率を目標に掲げ、取り組みが続けられている。

本研究では、2012年1月～2013年5月の期間に大阪市内医療機関で麻疹と診断された症例について、MeV遺伝子検査をおこなうとともに、陽性株の分子疫学解析をおこなった。

II 材料と方法

1) 臨床検体

臨床検体は、2012年1月～2013年5月の期間に大阪市内感染症発生動向調査事業に供与され、臨床的に麻疹が疑われた124症例由来310検体を対象とした。検体の内訳は、全血(91)、血清(31)、咽頭ぬぐい液(94)、尿(92)、鼻汁(2)であり、検査対象者の年齢層は、0-9歳(13例、10.5%)、10-19歳(16例、12.9%)、20-29歳(35例、28.2%)、30-39歳(39例、31.5%)、40-49歳(17例、13.7%)、50-59歳(0例、0%)、60歳以上(4例、3.2%)であった。

2) MeV 遺伝子検出および遺伝子型別

遺伝子検出方法については、国立感染症研究所から公表されている「麻疹診断マニュアル(第2版)」に従い、実施した[8]。すなわち、血液(全血)については、モノ・ポリ分離溶液(DSファーマバイオメディカル)により末梢血単核球(PBMC)を分離し、OPTI-MEM(インビトロジェン)1000μLに懸濁した140μLを、咽頭ぬぐい液、尿については臨床検体140μLを用いて、QIAamp Viral RNA Mini QIAcube kit(QIAGEN)、QIAcube(QIAGEN)によりウイルスRNAを抽出した。その後、PrimeScript RT reagent Kit(タカラバイオ)によりcDNAを合成した。PerfectShot® Ex Taq(Loading dye mix)を用いて、Nucleoprotein(N)遺伝子領域に対するRT-PCR、nested-PCRをおこなった後、特異的増幅産物が認められた検体について陽性と判定した。陽性となった検体については、遺伝子型別を

施するため、増幅産物の塩基配列をGenetic analyzer 3130(Life Technologies)を用いて解読した。N遺伝子領域[1,302~1,751(450塩基、Edmonston株に換算)]について、BioEdit(version 7.0.5.3、<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)[9]またはClustal X(version 2.0、<http://www.clustal.org/>)[10]によりアライメント後、Kimura 2パラメータ法により遺伝的距離を計算した[11]。近隣結合法(Neighbor-joining(NJ)法)により分子系統樹を作成し、MeVの遺伝子型を決定した。樹型については、ブートストラップを1,000回行い、検定した[12]。

3) B95a細胞を用いたMeVの分離

遺伝子検査でMeV陽性となった検体については、MeV分離株を樹立するため、培養細胞を用いてウイルス分離を試みた。分離の方法は、国立感染症研究所から公表されている「麻疹診断マニュアル(第2版)」[8]に従い、実施した。血液(全血)については、核酸抽出用に処理したPBMC 50μLを接種に用いた。咽頭ぬぐい液は、臨床検体50μLを直接細胞に接種した。尿は、沈殿物があるものについては、1500rpmで5分遠心処理して得られた沈渣をOPTI-MEM 1000μLに懸濁したうちの50μLを接種した。沈殿物がない尿については、そのまま接種に用いた。分離用の細胞にはB95a細胞を用い、48穴プレート、1%ウシ胎児血清含有RPMI培地(インビトロジェン)500μLを用いて36°C 5% CO₂条件下で培養した。培養開始後、7日間経過した培養上清の50μLを新しい細胞に接種し、更に7日間培養後、細胞変性作用(CPE)が観察されたものをCPE陽性と判定した。

III 結果

調査期間中の月別検査症例数、MeV陽性症例数を図に示した(図1)。2012年は、60例144検体の検査をおこない、MeV陽性例はなかった。一方、2013年は、1~5月の期間に64例166検体が搬入され、検査数の急激な増加を認めた。特に3月(16例)、4月(18例)、5月(19例)の3ヵ月のみで総検査症例数の42.7%を占めた。2013年は、3月、4月に各1例ずつ合計2症例6検体(各症例につき全血1件、咽頭ぬぐい液1件、尿1件)からMeVが検出された。調査期間におけるMeV検出率は、1.6%と低かった。陽性症例のうち1例は、東南アジアへの渡航歴がある成人男性で、他の1例は、1歳男児で病院の待合室でMeV陽性者との接触があった(表1)。系統樹解析の結果、大阪市検出MeV株の遺伝子型は、いずれもD8であった。日本国内で検出され、データベースに登録されているD8株について、大阪市株とともに系統樹解析をおこなった(図2)。その結果、大阪市株は、2012~2013年に国内の他地域で検出されたD8株と同一のクラスターを形成し、塩基配列相同性は100%

であった。一方、2009～2011年検出株は、2012～2013年検出株と比較して、塩基配列相同性 95.3-99.5%、アミノ酸相同性97.3-100% であった。



図1 麻しん診断症例数と麻しんウイルス陽性症例数の推移 (2012年1月～2013年5月)

MeV 分離株を樹立するため、MeV陽性検体について、B95a 細胞によるウイルス分離をおこなった。その結果、1歳男児の血液検体 (PBMC) のみ MeV に特徴的なCPE が認められた (図3, 矢印)。培養上清を用いた遺伝子検査において、MeV遺伝子強陽性であったことから、MeV分離陽性と判定した (data not shown)。

IV 考察

本研究において、総検査症例数のうち、MeV陽性症例はわずか2例のみ (1.6%) であったことから、調査期間中の麻しん診断例では MeV の関与は非常に低く、症状は、他の病原体感染による可能性が高いと考えられた。実際、2013年の春は、国内の成人における風しん流行が報告されている[13]。他の発しん性疾患が流行した場合、臨床症状のみでは、麻しんと鑑別が困難なことも多く、結果として麻しん診断例が増加すると推測される。今後、正確な麻しん発生数を把握する上で、他の発しん関連ウイルスとの鑑別は重要である。

表1 麻しんウイルス陽性症例の患者情報

No.	年齢	性別	遺伝子型	発症日	検体採取日	その他
1	33歳	男	D8	2013/3/4	2013/3/15	発熱 39.5℃、発疹(紅斑)、目の充血 海外渡航歴あり(2月中旬～下旬:シンガポール、タイ) 抗体検査(3/11) MeV IgG (-), IgM (16.5)
2	1歳7か月	男	D8	2013/3/31	2013/4/4	発熱 41.3℃、発疹、咳、鼻汁 MRワクチン接種歴なし 病院の待合室で感染 (その後の感染拡大はない)

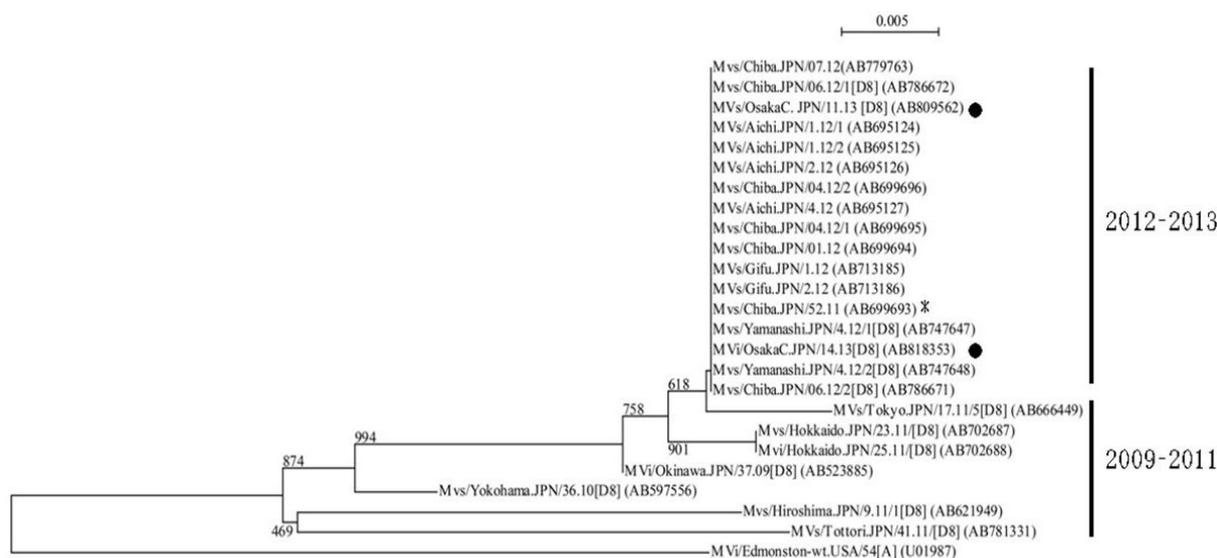


図2 麻しんウイルス株 (D8) の分子系統樹

分子系統樹は nucleoprotein 遺伝子領域 (450 塩基) を用いて、NJ 法により作成した。ブートストラップ値は、クラスターを支持する枝にそれぞれ数字で示した。麻しんウイルス (MeV) D8 型に属する国内検出株と2013年に大阪市で検出された MeV 株について、解析をおこなった。大阪市で検出された株については●を付した。*株は、2011 年第 52 週検出株である。() には GenBank アクセッション番号を記した。アウトグループとして MeV Edmonston 株 (A 型) を用いた。

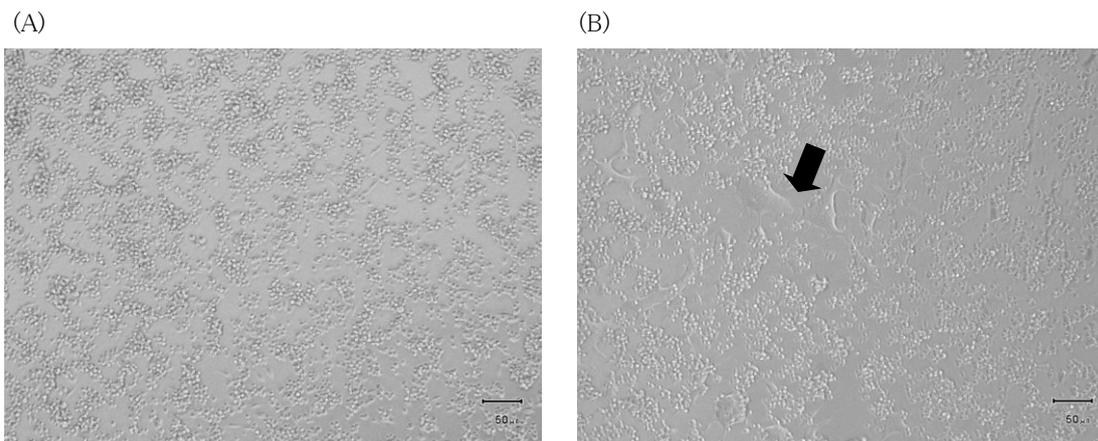


図3 麻しんウイルスの細胞変性作用

B95a 細胞を用いて、麻しんウイルス (MeV) D8 株の分離をおこなった。(A) 陰性コントロール、(B) MeV 陽性者の末梢血単核球を接種したもの。MeV の特徴的なCPE (細胞の融合に伴う合胞体の形成、矢印) が認められた。右下のスケールは、50 μm。

系統樹解析の結果、2012～2013年は少なくとも国内において、複数のD8型の輸入症例が報告されたが、その株は非常に近縁であった。株間の詳細な解析には、更に長い領域を用いた解析が必要と考えられた。

麻しん排除について、日本全国では、麻しん報告数は、2012年に293人(人口100万人対2.32)であり、排除の基準(同1未満)に近づいた。一方、麻しん報告数293のうち、臨床診断のみが77であり、検査診断例のうち、過半数は麻しんIgM抗体検査が占めていた[14]。麻しんIgM抗体検査は、HHV-6、HHV-7、風しんウイルス、パルボウイルスB19、エンテロウイルス等の感染によっても陽性となる場合がある[14]。以上を考慮すると、真の麻しん報告数は293よりもかなり少ないと考えられ、すでに排除基準の1つである「人口100万人対1未満」を達成している可能性がある。また、日本での土着株であるD5の検出が2010年5月以降、国内では認められていないことから、国内では、実質、麻しん排除基準に近い状態であると推測される[15]。大阪市においてもMeV陽性症例数は、2008年1月～2013年5月の期間に調査した201例のうちわずか3例のみであった(1.5%)[16]。当市においても2008年以降は麻しん排除に近い状態にあると考えられる。2007年4月～12月の期間に検出されたMeV陽性例20症例からはすべて土着株(D5)が検出された。一方、2008年1月～2013年5月にMeV陽性となった3症例すべてから非土着株(D4: 1例、D8: 2例)が検出され、2症例に海外渡航歴があった[16]。土着株MeVの検出減少に伴い、市内では、麻しん陽性例に占める輸入症例の割合が高くなった(2/3, 66.6%)。日本の他の地域においても、海外渡航歴のある症例からのMeV検出数が多く報告されている[17-19]。2012年には、宮崎県において、輸入症例から感染が拡大し、小中学校での休校による感染拡大対策がなされた[20]。今後は、輸入症例への迅速な検

査対応と感染拡大予防対策の必要性が高くなると思われる。

輸入症例の増加に伴い、海外で流行しているMeV遺伝子型の検出が報告されている[21]。一方、渡航歴のないケースにおいても、非土着型MeVが検出されている[22]。仕事や旅行等で海外を訪れる機会が多いこと、また、海外から日本への渡航者も多いことを考慮すると、海外で流行するMeVが国内に持ち込まれる機会は少なくない。渡航歴のない発症例については、気づかないうちにMeV陽性者と接触しているのかもしれない。麻しんの唯一の予防はワクチン接種であることから、麻しんが排除されていない地域への渡航に際しては、現地での感染リスクも考慮し、ワクチン未接種者には、ワクチン接種が強く望まれる。

近年、麻しんによる死者数は世界的に減少傾向にある。しかしながら、2011年には世界で158000人が麻しんにより死亡したと推定されており、依然として重要な感染症である[23]。麻しん排除国にとって、麻しん流行地域は、輸入症例の原因にもなりうる。麻しん流行地域でのワクチン接種率向上は、世界の麻しん対策に重要である。

日本では、麻しん排除の目標年が2015年になった。MeV遺伝子検査体制と遺伝子型解析の体制が整ったことから、今後は、予防接種率の向上と高い接種率の維持に重点が置かれることになるだろう。当所では、麻しん疑い症例における迅速かつ正確なMeV検査対応に取り組むことで、麻しんの全数把握ならびに感染拡大予防に寄与するとともに、保健所等関係部局と連携し、日本が目指す麻しん排除に協力していきたい。

V 結論

大阪市におけるMeV陽性例は、2012年1月～2013年5月の期間に調査した124例のうちわずか2例のみで

あった(1.6%)。海外渡航歴、MeV陽性者との接触歴等、疫学的に麻しんの可能性がある場合を除くと、多くの場合は、他の病原体が原因である可能性が高いと考えられた。MeV遺伝子検出、遺伝子型解析体制が整ったことから、今後は、予防接種率の向上と維持に一層の努力が必要と考えられた。

謝辞 MeVの実験室診断につきまして、感染拡大予防の観点から、迅速な検体の採取、保存、当研究所への搬入にご尽力頂いております医療機関、保健所、各区保健福祉センター担当者の皆様に深謝いたします。

(本研究は、平成24～25年度当研究所重点研究課題「多項目遺伝子同時検出法を用いた病原体の検出」の一部として実施したものである)

参考文献

- 1) 中山哲夫. 麻疹ワクチン. ウイルス 2009; 59: 257-266.
- 2) 世界の麻疹制圧の進展と死亡の減少、2000～2007年. 病原微生物検出情報 2009; 30: 54.
- 3) 多屋馨子. 麻疹. 感染症発生動向調査週報 2003; 3: 12-18.
- 4) Fine PE. Herd immunity: history, theory, practice. *Epidemiol Rev* 1993; 15: 265-302.
- 5) Measles virus nomenclature update: 2012. *Wkly Epidemiol Rec* 2012; 87: 73-81.
- 6) World Health Organization WPRO. Monitoring Measles Surveillance and Progress Towards Measles Elimination. *Measles Bulletin* 2007
- 7) 厚生労働省. 麻しんに関する特定感染症予防指針(平成25年3月30日厚生労働省告示第126号). 2013
- 8) 田代真人, 岡部信彦, 水田克巳, 塚越博之, 平良勝也, 關文緒, 他. 麻疹診断マニュアル(第2版). 2008
- 9) Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 1999; 41: 95-98.
- 10) Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 4876-4882.
- 11) Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; 16: 111-120.
- 12) Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39: 783-791.
- 13) 倉田貴子, 上林大起, 駒野淳, 西村公志, 加瀬哲男, 高橋和郎, 他. 大阪府内における2012年の風疹患者発生状況. 病原微生物検出情報 2013; 34: 97-98.
- 14) 麻疹 2012年. 病原微生物検出情報 2013; 34: 21-23.
- 15) 染谷健二, 駒瀬勝啓, 竹田誠. 2012年の海外の麻疹情報. 病原微生物検出情報 2013; 34: 24-25.
- 16) 改田厚, 久保英幸, 関口純一郎, 入谷展弘, 後藤薫, 長谷篤. 大阪市内で検出された麻しんウイルス株の分子疫学的解析. 平成22年度 大阪市立環境科学研究所報告「調査・研究年報」2011; 73: 1-6.
- 17) Aoki Y, Mizuta K, Suto A, Ikeda T, Abiko C, Yamaguchi I, et al. Importation of the evolving measles virus genotype d9 to Yamagata, Japan from Thailand in 2009. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62: 481-482.
- 18) Tanaka T, Yokoi H, Kobayashi K, Iwanade H, Noguchi Y, Mitsui Y, et al. First detection of measles virus genotype g3 in a Japanese woman: an imported case. *Jpn J Infect Dis* 2011; 64: 262-263.
- 19) Watanabe K, Tazawa T, Kon M, Tamura T, Komase K. Imported cases of measles in Niigata, Japan in 2011. *Jpn J Infect Dis* 2012; 65: 268-270.
- 20) 三浦美穂, 伊東愛梨, 矢野浩司, 吉野修司, 大浦裕子, 古家隆. タイから輸入されたD8型による麻疹集団発生事例—宮崎県. 病原微生物検出情報 2013; 34: 33-34.
- 21) 駒瀬勝啓, 染谷健二, 竹田誠. 日本における麻疹ウイルス流行株の変遷 2009～2012 病原微生物検出情報 2013; 34: 36-37.
- 22) 安井善宏, 伊藤雅, 安達啓一, 廣瀬絵美, 藤原範子, 小林慎一, 他. 渡航歴の無い小児および家族内感染者からのD8型麻疹ウイルス検出—愛知県. 病原微生物検出情報 2012; 33: 66-67.
- 23) World Health Organization. Measles. 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/>