

## 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(2013-2015 シーズン)

改田 厚<sup>1</sup>、久保英幸<sup>1</sup>、平井有紀<sup>1</sup>、山元誠司<sup>1,2</sup>、廣川秀徹<sup>3</sup>、入谷展弘<sup>1</sup>、西尾孝之<sup>1</sup>

### Detection and molecular analysis of measles viruses detected in Osaka City, Japan during 2013-2015 season

Atsushi KAIDA, Hideyuki KUBO, Yuki HIRAI, Seiji P YAMAMOTO, Hidetetsu HIROKAWA,  
Nobuhiro IRITANI and Takayuki NISHIO

#### Abstract

Measles is a highly contagious infection caused by the measles virus (MeV). Detection of MeV genome using PCR is important to count accurate number of measles patients. PCR for MeV were performed for 199 clinical specimens collected from 73 patients between June 2013 and May 2015 in Osaka City, Japan. The results showed no MeV was detected in 2013 and 2015. However, 14 patients were MeV-positive (29.8%, 14/47) in 2014. To identify the MeV genotypes, phylogenetic analysis was conducted using nucleoprotein genes, which resulting B3, 8; H1, 4; D8, 1 and A, 1. Genotypes B3 and H1 were firstly detected since 2007 in Osaka City. Those genotypes would be from foreign countries or surrounding area of Osaka City, and were temporally spread in the city.

**Key words:** measles, measles virus, genotype, elimination

#### 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[A, B(1-3), C(1, 2), D(1-11), E, F, G(1-3), H(1, 2)]が報告されている[5]。世界の各地で特徴的な遺伝子型の分布が認められており、MeVの

伝播経路の解析に有用である[5]。世界で使用されるMeVのワクチン株は、A型に分類される[6]。日本では、2007年以降、D5型が過去、複数年にわたって主流のMeV株として検出されたことから、固有の遺伝子型とされている。D5型については、2010年5月を最後に国内では検出されていない[7]。

世界保健機関西太平洋地域事務局(WPRO)は、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た[8]。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けるMeV遺伝子検査が求められた[9]。日本では、2012年までの麻疹排除は困難であったが、同指針の改定にともない、2015年までの麻疹排除の目標を掲げていた。2015年3月27日には、WPROにより日本の「麻疹排除」が認定された[10]。

- 
- 1) 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
  - 2) 大阪府立公衆衛生研究所  
〒537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69  
Osaka Prefectural Institute of Public Health, 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan
  - 3) 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 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka 545-0051, Japan

本研究では、2013年6月~2015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、2013年6月~2015年5月の期間に大阪市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73症例由来199検体を対象とした。検体の内訳は、全血(60)、血清(9)、咽頭ぬぐい液(69)、尿(61)であり、検査対象者の年齢層は、0-9歳(22例、30.1%)、10-19歳(9例、12.3%)、20-29歳(19例、26.0%)、30-39歳(12例、16.4%)、40-49歳(9例、12.3%)、50-59歳(1例、1.4%)、60歳以上(1例、1.4%)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[11]。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を分離し、OPTI-MEM(サーモフィッシャーサイエンティフィック)1,000 µl に懸濁した140 µl を、咽頭ぬぐい液、尿については臨床検体140 µl を用いて、QIAamp Viral RNA mini kit(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、遺伝子型別を実施するため、増幅産物の塩基配列をGenetic analyzer 3130(サーモフィッシャーサイエンティフィック)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>) [12] または Clustal X(version 2.0、<http://www.clustal.org/>) [13]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[14]。近隣結合法(Neighbor-joining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[15]。

## 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)。2013年(6~12月)、2015年(1~5月)は、それぞれ19例、7例の検査をおこない、MeV陽性例はなかった。一方、2014年は、47例中14例(29.8%)がMeV陽性であり、2007年の麻疹流行以降、市内では、最多の陽性例数を認めた。遺伝子型別の結果、日本固有の遺伝子型(D5型)は認められず、詳細は、以下の通りであった。2014年2月(B3型、1例)、3月(B3型、3例)、4月(B3型、3例; A型1例)、5月(B3型、1例)、6月(H1型、2例)、7月(H1型、2例)、11月(D8型、1例)。3月のB3型3例は、家族内感染例であり、フィリピン滞在後に帰国した男性から家族2名に感染が拡大した輸入症例および家族内感染例であった。4月のB3型1例(0歳11ヵ月)は、親が麻疹と診断されていることから、家族内感染例と考えられた。4月のA型1例は、ワクチン接種後の発症例であった。6~7月に発生したH1型4例については、陽性者間の

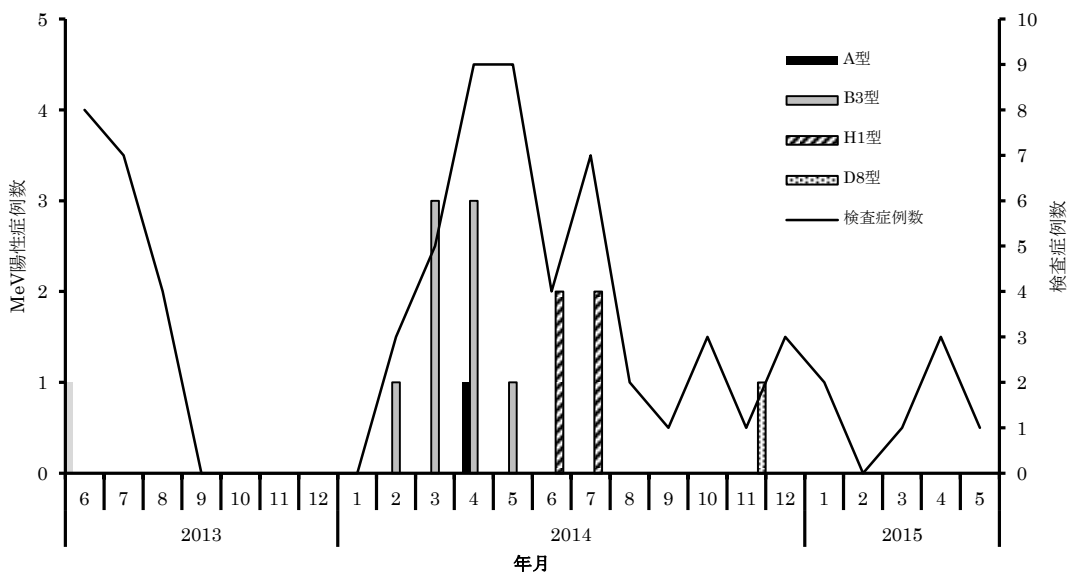


図1 麻疹診断症例数と麻疹ウイルス陽性症例数の推移(2013年6月~2015年5月)

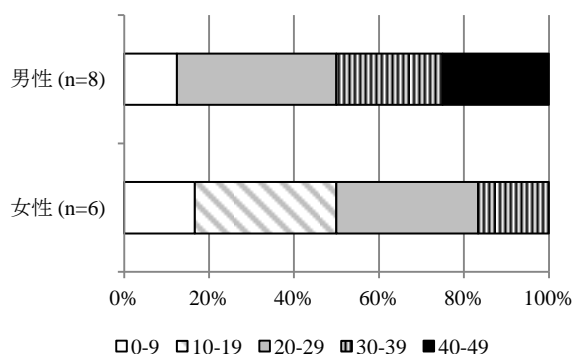


図2 MeV 陽性者の性別内訳および年齢分布 (2013年6月~2015年5月)

疫学的関連は不明であった。11月のD8型1例は、海外渡航歴はなく、感染原因は不明であった。期間中に検出されたB3型8株間、H1型4株間の塩基配列の相同性はそれぞれ100%であった。

MeV 陽性者の性別内訳、年齢分布を図に示した(図2)。陽性者の性別は、男性8名、女性6名であり、年齢分布は、0-9歳(2例、14.3%)、10-19歳(2例、14.3%)、20-29歳(5例、35.7%)、30-39歳(3例、21.4%)、40-49歳(2例、14.3%)、50歳以上(0例)であった。男性のみ40-49歳の年齢層に陽性者が認められた。女性の10-19歳代の2例は、A型1例18歳、B3型1例19歳であったことから、MeV 陽性者のうち、野生型MeV 陽性例は、13例中11例(84.6%)が19歳以上の年齢層であり、10例(76.9%)は、20歳以上の成人であった。

#### IV 考察

本研究において、2013年(6~12月)、2015年(1~5月)の麻疹診断例は、すべてMeV 陰性であったことから、これらが「麻疹」であった可能性は非常に低く、症状は、他の病原体感染あるいは他の原因に起因すると考えられた。

一方、2014年は、検査した47例中14例がMeV 陽性となり、高い陽性率(29.8%)を示した。2007年は、日本国内で麻疹流行が認められた年である。大阪市内では、2007年度に31例の麻疹診断例の検査をおこない、20例の陽性を認めた(すべてD5型、陽性率64.5%) [16]。一方、2008年1月~2013年5月の期間に検査した201例のうち、MeV 陽性例はわずか3例のみであった(1.5%) [16]。2014年は、市内において2007年以降で最多のMeV 陽性例が認められた年であり、検出株は、すべて日本固有の遺伝子型(D5型)ではなかった。

2014年の遺伝子型は、2~5月はB3型、6、7月は、H1型を主流に推移した。輸入症例と家族内感染例が確認されたB3型と比較して、H1型陽性者の疫学的関

連は不明であった。しかし、H1型陽性者が、6、7月の短期間に集中して発生したことから、共通した感染機会の可能性が考えられた。B3型は、2014年にフィリピンを中心とした流行が、H1型は中国固有の遺伝子型として報告されている[7,17]。いずれの遺伝子型も2007年以降、市内で検出されていないことから、2014年は、海外あるいは周辺地域から市内へ持ち込まれたMeV株が、一過性の小規模な感染拡大を引き起こしたものと推測された。

2014年のMeV 陽性者は、野生株が検出された13名中10名(76.9%)が20歳以上の成人であった。MRワクチンI期、II期の接種率の向上が、低年齢層の患者発生が少ない原因の一つかもしれない[18]。

本調査における野生型MeV 陽性者13名のうち、過去にワクチン接種歴があったのは2名のみであり、他は不明、あるいは接種なしであった。麻疹の唯一の予防はワクチン接種である。麻疹発生時の感染拡大予防、輸入症例との接触リスク、麻疹排除未達成地域への渡航なども考慮し、ワクチン未接種者へのワクチン接種が強く望まれる。

現在、日本は「麻疹排除」状態となった。今後は、国外から持ち込まれる様々な遺伝子型のウイルス株の限定的な感染が発生すると予想される。輸入症例への迅速な検査対応と感染拡大予防対策、予防接種率の向上と高い接種率の維持が重要な課題になると思われる。

当所では、麻疹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、麻疹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、「麻疹排除」状態の維持に貢献したい。

#### V 結論

- 大阪市内におけるMeV 陽性例は、2013年6月~2015年5月の期間に調査した73例のうち14例(19.2%)であった。日本固有の遺伝子型(D5型)は検出されていない。

- 2014年検出株の遺伝子型は、B3型8例、H1型4例、D8型1例、A型(ワクチンタイプ)1例であった。大阪市内において、2007~2013年の期間にB3型およびH1型MeVは検出されていないことから、2014年は海外あるいは周辺地域から持ち込まれたB3型およびH1型MeVの感染が広がった可能性が考えられた。

- 麻疹診断例におけるMeV 遺伝子検査の実施は検査診断として重要であり、遺伝子型別は、野生株・ワクチン株の鑑別、および感染経路の解析に有用であった。

**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。

#### 参考文献

- 1) 中山哲夫. 麻疹ワクチン. ウイルス 2009; 59(2): 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(2): 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(2): 265-302.
- 5) World Health Organization. Measles virus nomenclature update: 2012. *Wkly Epidemiol Rec.* 2012; 87(9): 73-81.
- 6) Rota JS, Wang ZD, Rota PA, and Bellini WJ. Comparison of sequences of the H, F, and N coding genes of measles virus vaccine strains. *Virus Res.* 1994; 31(3): 317-330.
- 7) 麻疹 2015 年 3 月現在. 病原微生物検出情報 2015; 36(4): 51-53.
- 8) World Health Organization WPRO. Monitoring Measles Surveillance and Progress Towards Measles Elimination. *Measles Bulletin* 2007; 1(13): 1-6.
- 9) 厚生労働省. 麻しんに関する特定感染症予防指針. 告示第 126 号, 平成 25 年 3 月 30 日.
- 10) World Health Organization WPRO. Brunei Darussalam, Cambodia, Japan verified as achieving measles elimination. 24 March 2015.
- 11) 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: 国立感染症研究所; 2008.
- 12) 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.
- 13) Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, and Higgins DG. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(24): 4876-4882.
- 14) Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980; 16(2): 111-120.
- 15) Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39(4): 783-791.
- 16) 改田 厚, 久保英幸, 関口純一朗, 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) Takahashi T, Arima Y, Kinoshita H, Kanou K, Saitoh T, and Sunagawa T, et al. Ongoing increase in measles cases following importations, Japan, March 2014: times of challenge and opportunity. *Western Pac Surveill Response J.* 2014; 5(2): 31tyydf-33.
- 18) 多屋馨子, 佐藤 弘, 大石和徳, 厚生労働省健康局結核感染症課. 麻疹含有ワクチン接種率調査: 2008~2013 年度の推移. 病原微生物検出情報 2015; 36(4): 62-64.