

大阪市内で検出された麻疹ウイルス株の分子疫学的解析

改田 厚、久保英幸、関口純一郎、入谷展弘、後藤 薫、長谷 篤

Molecular Epidemiology of Measles Virus Strains Detected in Osaka City, Japan

Atsushi KAIDA, Hideyuki KUBO, Jun-ichiro SEKIGUCHI, Nobuhiro IRITANI, Kaoru GOTO, and Atsushi HASE

Abstract

Measles virus (MeV) infects humans and causes measles. To eliminate measles from Japan by 2012, trials to increase the detection capabilities for the MeV using laboratory diagnosis methods are being conducted. Gene amplification and virus isolation tests using cultured cells for MeV were performed on 113 clinical specimens collected from 69 patients during April 2007 and March 2011 in Osaka City. The results showed 26 specimens (21 patients [2007, 20; 2011, 1]) were MeV positive. To identify the MeV genotypes, phylogenetic analysis was conducted using nucleoprotein genes. Of the 26 MeV-positive strains, 24 strains were available for genotyping. The 21 strains detected in 2007 were all of genotype D5, and the 3 strains in 2011 were of D4. Recently, the MeV-positive specimens have been decreasing. To eliminate measles, continuing accurate MeV detection and trials to increase the rates of vaccination is important.

Key words: measles, molecular epidemiology, phylogenetic analysis, genotype

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]。日本では、例年、春季～初夏にかけて流行が見られる[2]。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年間に数十万人の死者が発生している[3]。日本では、2007年の流行以後、麻疹患者の発生は減少しているが、過去の流行時には、数万人の患者と数十人の死者が発生している[4]。また、麻疹患者のうち、数万人に1名の割合で予後が悪い亜急性硬化性全脳炎を引き起こすことが報告されている[5]。

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)[6]。現在、MeVには、23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、伝播経路の解析に有用である[7]。

世界保健機関(WHO)西太平洋地域事務局は、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った。また、WHOからは麻疹診断例について実験室診断をおこなうことが求められている。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、麻疹排除の基準である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、2007~2010年度までの期間に大阪市内でMeV陽性と

なった検体のうち、遺伝子型別が可能であった 24 株について分子疫学的手法を用いた解析をおこない、年度別の陽性株、検出状況について解析をおこなった。

II 材料と方法

1) 臨床検体

検査した臨床検体は、2007～2010年度の期間に大阪市感染症発生病動向調査事業に供与され、臨床的に麻疹が疑われた 69 症例由来 113 検体 (2007 年度、31 症例 42 検体; 2008 年度、5 症例 5 検体; 2009 年度、5 症例 7 検体; 2010 年度、28 症例 59 検体) を対象とした。検体の内訳は、咽頭ぬぐい液 50 検体、血液 36 検体、尿 18 検体、鼻汁 5 検体、髄液 3 検体、結膜擦過物 1 検体であった。

2) B95a 細胞を用いた MeV の分離

培養細胞を用いた MeV 分離については、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。すなわち、接種用検体のうち血液(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) 1000 μ L に懸濁した 50 μ L を接種に用いた。咽頭ぬぐい液は、臨床検体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、1500 rpm で 5 分遠心処理して得られた沈渣を OPTI-MEM 1000 μ L に懸濁した 50 μ L を接種に用いた。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) 500 μ L 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 50 μ L 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。

3) 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。すなわち、血液は、全血の場合は PBMC を、咽頭ぬぐい液、尿については臨床検体 140 μ L 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、hemagglutinin (H) 遺伝子領域に対する RT-PCR (MHL1: 5'-AACGGATGATCCAGTGATAG-3', MHR1: 5'-TTGAATCTCGGTATCCACTC-3') (増幅産物 411 bp)、

nested-PCR (MHL2: 5'-TACCTCTCATCTCACAGAGG-3', MHR2 :5'-CACCTAAGGCTAGTTCTTC-3') (増幅産物 349 bp) 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、Nucleoprotein (N) 遺伝子領域を対象とした RT-PCR 法 (pMvGTf1m: 5'-CGRTCTTACTTYGATCCRGC-3', pMvGTr1: 5'-TTATAACAATGATGGAGG-3') (増幅産物 574 bp) および nested-PCR 法 (pMvGTf2m: 5'-AGAYTAGGRCARGAGATGGT-3', pMvGTr2: 5'-GAGGGTAGGCGGATGTTGTT-3') (増幅産物 533 bp) をおこなった。特異的増幅産物の塩基配列は、Genetic analyzer 3130 (Applied Biosystems) 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 1000 回行い、検定した[12]。

4) 間接免疫蛍光法を用いた MeV 検出

ウイルス分離検査において CPE 陽性となった検体については、その細胞破壊片をスライドガラスにアセトンで固定後、抗 MeV 抗体(抗 Hタンパク質抗体)を用いた間接免疫蛍光法により、MeV 抗原検出をおこなった。蛍光顕微鏡を用いて、陰性コントロールとの蛍光強度を目視で比較し、判定をおこなった。間接免疫蛍光法陽性となった検体について、ウイルス分離検査による MeV 陽性とした。

5) MeV 陽性判定基準

(1) MeV 特異的遺伝子増幅産物の検出、あるいは (2) ウイルス分離検査における CPE 陽性かつ間接免疫蛍光法陽性のいずれか一方が確認された場合、対象となる検体を MeV 陽性と判定した。

III 結果

各年度別の検査対象症例数、MeV 陽性症例数を図に示した(図 1)。麻疹診断例の検体については、正確な検査診断のため、2010 年度より同一患者から可能なかぎり血液、咽頭ぬぐい液、尿の 3 検体を採取することが求められたことから、症例に対して検体数の増加が認められている[13]。

調査期間において、2007年度は、検査症例数は31、MeV陽性症例数は20といずれも調査期間において最も高い値を示し、検査症例数に対するMeV陽性症例数は64.5% (20/31)であった。一方、2008、2009年度については、検査症例数は5例ずつと少なく、陽性症例はなかった。2010年度については28症例の検査を実施したが、陽性例はフランスからの帰国者による1症例のみであった。2007年度のMeV陽性症例について、月別MeV陽性症例数を図に示した(図2)。2007年6月、8月がいずれも5症例ずつと最も多く、次いで7月3症例、4、5、9月の2症例、10月1症例と続いた。11月以降の検出はなかった。麻しん疑い症例、ならびMeV陽性症例の年齢分布(<1歳、1~3歳、4~18歳、19歳<)を表に示した(表1)。2007年度は、分類したすべての年齢層で、麻しん疑い症例、麻しん陽性症例が検出された。一方、2008年度は、検査症例すべてが3歳以下であったのに対し、2009年度、2010年度と経過するにつれ、検査症例の年齢層が高くなる傾向がみられた。MeV陽性症例の検体別の検査結果ならびに患者

情報を示した(表2)。MeV陽性検体26検体のうち、ウイルス分離陽性15検体(57.7%)、遺伝子検出法陽性[H遺伝子陽性25検体(96.2%)、N遺伝子陽性24検体(92.3%)]であったことから、遺伝子検出法はウイルス分離検査と比較して高い感度を示した。しかしながら、症例No.10(血液検体)については、ウイルス分離検査のみMeV陽性であり、遺伝子検出は陰性であった。MeV陽性症例については、N遺伝子が増幅可能であった24株について系統樹を作成し、遺伝子型別を実施した(図3)。その結果、2007年度のMeV陽性株21株(19症例)は、すべてD5であり、日本での検出報告数が多い遺伝子型の1つであった。また、塩基配列の相同性は99.7~100%と高く、系統樹において独自のクラスターを形成したことから、2007年度には大阪市内において近縁なMeV株が流行していたことが示唆された。一方、2010年度のMeV陽性株3株(1症例)については、すべてD4に分類された。

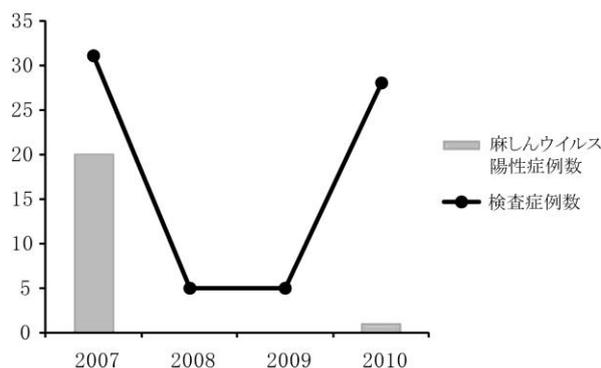


図1 麻しん疑い症例数と麻しんウイルス陽性症例数の推移(2007~2010年度)

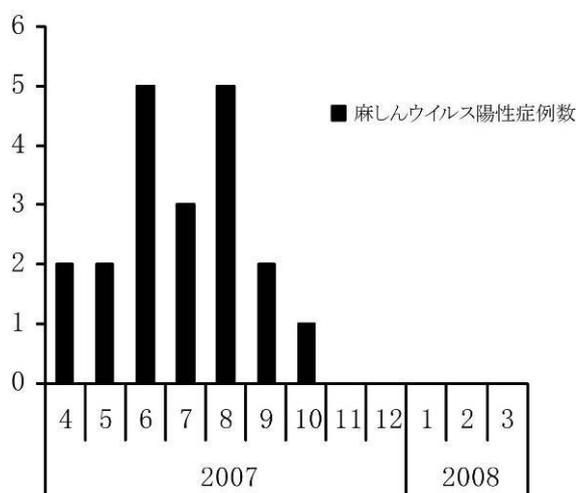


図2 月別麻しんウイルス陽性症例数(2007年度)

表1 麻しん疑い症例における患者の年齢分布

年度	1歳未満	1~3歳	4~18歳	19歳以上
2007	7(2)	11(7)	10(9)	3(2)
2008	1	4	0	0
2009	0	3	2	0
2010	4	4	8	12(1)

()内は、麻しんウイルス陽性症例数

IV 考察

2007年度は、全国的に麻しんの流行が認められ、各地でMeV検出の報告が相次いだ[14-17]。従来、麻しんについては、子供を中心に患者数の増加が認められていたが、2007年度は高校生や大学生、成人に多くの麻しん患者が発生し、学級閉鎖など社会的に大きな影響を及ぼした[18]。

現在は、2012年の麻しん排除に向けて、(1)95%以上の予防接種率の達成と維持(第1期、1歳代;第2期、小学校就学前1年間、さらに2008年4月1日より5年間の期限付きで実施される、第3期、中学校1年生;第4期、高校3年生相当世代への定期接種)、(2)麻しんの全数把握(2008年1月1日より)(3)麻しん発生時の迅速な対応による感染拡大予防、(4)麻しん診断例については、可能な限り地方衛生研究所で遺伝子検査を実施することが取り組まれている。

2007年以降、麻しん発生数は減少し、2008年(第1~52週)に届出された麻しん患者は11,005、2009年741、2010年457(人口100万対3.58)であり、麻しん排除の基準(人口100万人対1未満、輸入症例は除外)に近づきつつある[19]。2010年の457のうち、約3割は臨床診断例であり、検査診断例のほとんどはIgM抗体

検査であった[20]。MeV の IgM 抗体検査については、伝染性紅斑の原因ウイルスであるパルボウイルスB19 や突発性発しんを引き起こすヒトヘルペスウイルス6型、ならびにデングウイルスと交差反応を起こすことが報告されている[21,22]。交差反応の観点から、IgM 値のみに基づく検査診断では、正確でない判定につながる可能性があることから、現在、IgM 値と MeV 感染との関連について、「最近の知見に基づく麻しん検査診断の考え方」が公表されている[23]。従来、IgM 検査の結果から麻しんと診断された症例のうち、実際には MeV 感染を伴わないものが少なくないと推測される。一方、遺伝子検査については、高感度であること、判定までの時間が短い点、塩基配列を解読することで遺伝子型別が可能であることから伝播経路の解析に重要であり、利点が多い。しかしながら、適切な時期に採取された検体でなければ正確な判定は難しい。正確な診断には、臨床症状、疫学的知見、血清学診断、ウイルス分離検査等の結果を含めた総合的な解析が重要である。

大阪市においても、MeV 陽性症例は激減しており、2008～2010年度の期間について、当研究所で検査した38症例のうち、陽性例は1症例のみ(フランスからの帰国者)であった。この症例については遺伝子型がD4であり、当時、欧州で流行していた遺伝子型と同一であったことから、本症例は海外からの輸入症例であると考えられた。今後、国内の患者数の減少が予想される中、海外からの麻しん輸入症例の増加が懸念される。

WHOが定める麻しん排除の基準の1つに、95%以上の高いワクチン接種率がある。2008年度の都道府県別麻しんワクチン接種率は、第1期 94.3%、第2期 91.8%、第3期 85.1%、第4期 77.3%であった。2009年度においてもほとんど変化はなく、いずれも目標とする95%に達していない[19]。麻しんは、ワクチン接種で予防が可能である。ワクチン接種率の向上が「麻しん排除」には必須であり、今後の大きな課題になると考えられる。

2007年の日本における麻しん流行では、海外でのスポーツイベントに参加した日本の少年野球チームから麻しんが広がり、麻しん輸出国として批判された[24]。最近では、国内での発生よりも海外からの輸入症例が圧倒的に多く、国内に持ち込まれた後、周囲の人に感染が広がるケースが増えている[25]。ヨーロッパでは、2010年が麻しん排除の期限であった[26]。ヨーロッパでの麻しん患者発生数は減少傾向にあったが、2011年春季に麻しん患者の集団発生が相次いで発生しており、排除は達成できていない[27]。渡航先において、麻しんの流行が認められている場合は、渡航前に予防接種を受けることが感染予防に有効な手段である。

麻しん排除の基準を達成するのは容易ではない。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。

表2 麻しんウイルス陽性検体の検査結果ならびに患者情報

症例No.	検体 No.	検体の種類	ウイルス分離 (B95a)	RT-PCR (H 遺伝子)	RT-PCR (N 遺伝子)	遺伝子型	年齢、性別	検体採取日
1	S07-021	血液	+	+	-	*NT	18y 5m, 男	2007/4/19
2	S07-031	咽頭ぬぐい液	+	+	+	D5	2y 11m, 女	2007/4/25
3	S07-039	咽頭ぬぐい液	-	+	+	D5	18y, 男	2007/5/1
4	S07-055	血液	+	+	+	D5	26y, 女	2007/5/14
5	S07-088	咽頭ぬぐい液	+	+	+	D5	1y 7m, 女	2007/6/19
6	S07-094	咽頭ぬぐい液	+	+	+	D5	2y 0m, 男	2007/6/27
7	S07-097	咽頭ぬぐい液	+	+	+	D5	2y 3m, 男	2007/6/29
8	S07-098	咽頭ぬぐい液	+	+	+	D5	5y 3m, 男	2007/6/29
9	S07-099	咽頭ぬぐい液	-	+	+	D5	1y 0m, 女	2007/6/30
10	S07-101	血液	+	-	-	NT	14y, 女	2007/7/2
	S07-102	髄液	-	+	+	D5		
11	S07-112	咽頭ぬぐい液	-	+	+	D5	10y 7m, 女	2007/7/17
12	S07-115	血液	+	+	+	D5	8y 4m, 男	2007/7/23
	S07-116	コブリック部ぬぐい液	-	+	+	D5		
13	S07-135	咽頭ぬぐい液	+	+	+	D5	17y 6m, 女	2007/8/8
	S07-136	血液	+	+	+	D5		
14	S07-145	結膜擦過物	-	+	+	D5	26y 11m, 女	2007/8/13
15	S07-146	血液	-	+	+	D5	16y 2m, 女	2007/8/14
16	S07-148	咽頭ぬぐい液	-	+	+	D5	0y 9m, 男	2007/8/21
17	S07-150	血液	-	+	+	D5	8y 7m, 男	2007/8/29
18	S07-155	咽頭ぬぐい液	-	+	+	D5	1y 1m, 女	不明
19	S07-170	咽頭ぬぐい液	-	+	+	D5	1y 0m, 女	2007/9/18
20	S07-185	咽頭ぬぐい液	+	+	+	D5	0y 9m, 男	2007/10/6
21	S10-1578	血液	+	+	+	D4	22y, 男	2011/3/2
	S10-1579	咽頭ぬぐい液	+	+	+	D4		
	S10-1580	尿	+	+	+	D4		

+, 陽性; -, 陰性

*NT: not tested

V 結論

大阪市内における MeV 陽性患者は、2008年度以降、発生していない(輸入症例を除く)。麻疹全数把握に基づく実診診断体制が整ったことから、質の高いサーベイランスの継続が重要である。一方、今後はワクチン接種率向上が麻疹排除に向けた大きな課題となると考えられる。

謝辞 MeV の実診診断につきまして、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、各区保健センター担当者の皆様に深謝いたします。

(本研究は、平成22~24年度当研究所一般研究課題「大阪市内で検出された麻疹ウイルス株の分子疫学的解析」として実施したものである)

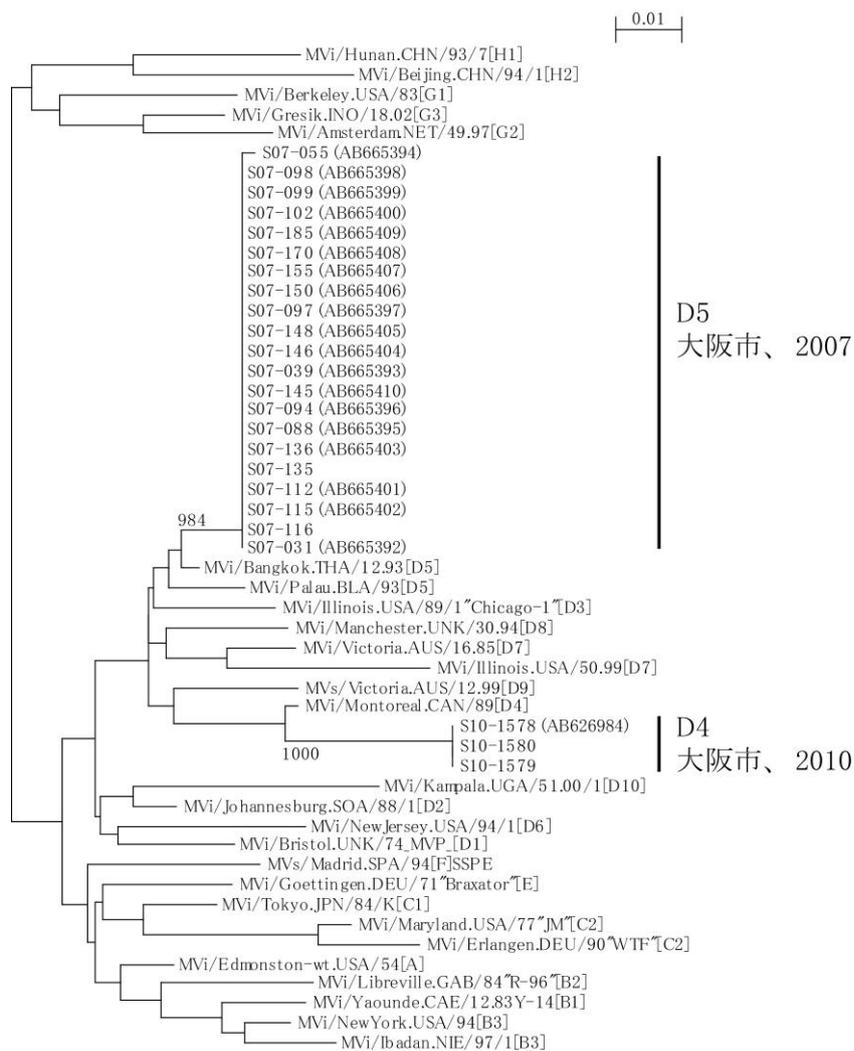


図3 大阪市内で検出された MeV 株の分子系統樹

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。大阪市内で2007年度に検出された MeV 株は S07-、2010年度に検出された株は S10- とそれぞれ記載し、()には、GenBank accession number を記した(各株の詳細な情報は、表2に記載)。同一患者由来の複数検体(S07-115, S07-116; S07-135, S07-136; S10-1578, S10-1579, S10-1580)で検出された MeV 株の塩基配列は、いずれも 100%一致していたことから代表とする 1株のみ GenBank への登録をおこなった。MeV 参考株の GenBank accession number は、「麻疹検出マニュアル(第2版)」に記載されている。

参考文献

- 1) 中山哲夫. 麻疹ワクチン. ウイルス 2009; 59: 257-266.
- 2) 多屋馨子. 麻疹. 感染症発生動向調査週報 2003; 3: 12-18.
- 3) 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.
- 4) 麻疹 1999～2001年. 病原微生物検出情報 2001; 22: 273-274.
- 5) 小倉壽、瀬戸俊之、綾田稔. 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE)に関する最近の知見. 臨床と微生物 2008; 35: 41-46.
- 6) Fine PE. Herd immunity: history, theory, practice. *Epidemiol Rev* 1993; 15: 265-302.
- 7) World Health Organization. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection (Second edition). 2007.
- 8) World Health Organization WPRO. Monitoring Measles Surveillance and Progress Towards Measles Elimination. *Measles Bulletin* 2007; 13: 1-6.
- 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) <通知> 麻しんの検査診断について. 病原微生物検出情報 2011; 32: 44.
- 14) Akiyoshi K, Suga T, Haruta T, Yoshida K, Taba R, Yamakawa M, et al. Isolation of measles virus classified as D5 genotype during an outbreak in Kobe City, Japan, in 2007. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61: 506-507.
- 15) Ban F, Masui Y, Inouye S. 2007 measles outbreaks among Tokyo youths: analysis of data on serum IgM antibody detection at a commercial diagnostic laboratory. *Kansenshogaku Zasshi* 2008; 82: 198-204.
- 16) Nagano H, Jinushi M, Tanabe H, Yamaguchi R, Okano M. Epidemiological and molecular studies of measles at different clusters in hokkaido district, Japan, 2007. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62: 209-211.
- 17) Taira K, Nakamura M, Okano S, Nidaira M, Kudaka J, Itokazu K, et al. Phylogenetic analysis of nucleoprotein (N) gene of measles viruses prevalent in Okinawa, Japan, during 2003-2007. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61: 248-250.
- 18) Nagai M, Xin JY, Yoshida N, Miyata A, Fujino M, Ihara T, et al. Modified adult measles in outbreaks in Japan, 2007-2008. *J Med Virol* 2009; 81: 1094-1101.
- 19) 国立感染症研究所感染症情報センター. 麻しん予防接種情報.
<http://idsc.nih.go.jp/disease/measles/01.html>
- 20) 麻疹 2010年. 病原微生物検出情報 2011; 32: 31-32.
- 21) 駒瀬勝啓、竹田誠. 麻しん排除を目指した麻しん検査診断体制の問題点. 病原微生物検出情報 2011; 32: 41-42.
- 22) 佐藤弘、多屋馨子、高崎智彦、神田橋宏治、菅谷明則. デング熱および突発性発疹と考えられる症例における麻疹IgM抗体陽性例. 病原微生物検出情報 2010; 31: 269-271.
- 23) 国立感染症研究所麻疹対策技術支援チーム. 最近の知見に基づく麻疹の検査診断の考え方. 2010;
<http://idsc.nih.go.jp/disease/measles/pdf01/arugorizumu.pdf>
- 24) Chen TH, Kutty P, Lowe LE, Hunt EA, Blostein J, Espinoza R, et al. Measles outbreak associated with an international youth sporting event in the United States, 2007. *Pediatr Infect Dis J* 2010; 29: 794-800.
- 25) 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.
- 26) Progress Toward Measles Elimination --- European Region, 2005-2008. *MMWR* 2009; 58: 142-145.
- 27) World Health Organization. Measles outbreaks in Europe. 2011;
http://www.who.int/csr/don/2011_04_21/en/index.html