

短報

麻疹ん疑い患者からの風疹ウイルス 検出状況と遺伝子解析

鈴木理恵子, 木村睦未, 金城恵子,
近藤真規子, 丹羽加代子¹⁾

Detection and genetic analysis of Rubella virus from suspected Measles patients in Kanagawa Prefecture

Rieko SUZUKI, Mutsumi KIMURA, Keiko KINJO,
Makiko KONDO and Kayoko NIWA

はじめに

風疹は、発熱、発疹、リンパ節腫脹を特徴とするウイルス性発疹症で、症状は不顕性感染から重篤な合併症併発まで幅広い。また、風疹は麻疹、伝染性紅斑、溶血レンサ球菌感染症等の発疹を伴う疾患と症状が類似していることから、臨床症状のみでは風疹と診断することが難しい。そのため確定診断にはPCRやウイルス分離による病原体検査、血清学的検査などの検査室診断が必要な疾患である。神奈川県風疹報告数は、2008年に風疹が全数報告対象疾病になって以降、2010年までは減少傾向であったが、2011年には63例と増加に転じている。2012年には259例と報告数の急増がみられ、2013年第14週までの報告数は503例にのぼり、2012年同時期の報告数5件と比べ100倍の患者数となり、流行が起きた。

神奈川県では、国から通知された2012年までの麻疹排除計画に基づき、麻疹疑い例についてPCRによる病原体診断を実施しているが、2011年5月以降、県域では麻疹疑い例からの麻疹ウイルス遺伝子の検出例はない。そこで麻疹疑い例における原因ウイルスを明らかにするために、麻疹と臨床症状が類似していることと、5類全数報告対象疾病であることから麻疹ウイルス不検出の場合に限り、風疹ウイルス遺伝子についてPCR検査を実施したので、その検出状況と遺伝子解析結果について報告する。

材料および方法

2012年度に県域（横浜市、川崎市、横須賀市、相模原市を除く）で麻疹ウイルスが検出されなかった68例18検体（咽頭ぬぐい液48検体、血液39検体、尿31検体）（表1）の麻疹疑い例について、病原体検出マニュアル第2版風疹¹⁾（以下：風疹マニュアル）に準じ、風疹ウイルス遺伝子の検出と解析を行った。

表1 発病月別麻疹疑い例からの風疹ウイルス検出状況

年月	症例数	検体数			検出 症例数	検出検体数		
		咽頭拭い液	血液	尿		咽頭拭い液	血液	尿
平成24年 4月	8	5	5	3	0	0	0	
5月	5	5	3	4	0	0	0	
6月	7	3	1	4	0	0	0	
7月	4	3	3	3	3	3	1	
8月	6	5	4	2	3	3	1	
9月	3	1	3	0	0	0	0	
10月	1	1	1	1	1	1	1	
11月	5	4	2	2	3	3	0	
12月	7	6	2	1	3	3	0	
平成25年 1月	5	5	4	2	2	2	1	
2月	7	4	5	2	3	3	0	
3月	10	6	5	7	8	5	3	
合計 (検出率%)	68	48	38	31	26 (38.2)	23 (47.9)	7 (18.4)	

1. cDNAの作製

咽頭ぬぐい液は3,000rpm、20分間遠心後、上清を抽出用検体とした。EDTA等の抗凝固剤入り血液は3,000rpm、20分間遠心後、血球分画表層の白血球層を回収し、元の血液と同量のウイルス保存液を添加し抽出用検体とした。尿は1,500rpm、10分間遠心後、沈渣細胞を2~3mlのウイルス保存液に再浮遊させ抽出用検体とした。市販のウイルスRNAキットQIAamp viral RNA mini kit（キアゲン）を用いて、抽出検体140 μ lから説明書に準じてウイルスRNAを抽出した。逆転写反応は、PrimeScript RT reagent kit（タカラバイオ）を用い、5 \times PrimeScript Buffer 4 μ l、PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μ l、Random 6mers 4 μ l、RNase Free dH₂O 1 μ lの反応液に抽出RNA10 μ lを添加し全量を20 μ lとし、37 $^{\circ}$ C 15分、85 $^{\circ}$ C 5秒逆転写反応を行いcDNAを作製した。

2. 風疹ウイルス遺伝子の検出と解析

風疹マニュアルに従い、風疹ウイルス非構造蛋白質（以下：NSと略）遺伝子の増幅は、NS遺伝子増幅用プライマー（NSL F3, NSL B3-6 : 1st, F2nest, B2 nest : 2nd）およびPerfectShot Ex-Taq（Loading dye mix）（タカラバイオ）を用い、NS領域のRT-nested PCRを行った。PCR産物は1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、紫外線下で増幅バンドの有無を確認した。NS遺伝子の増幅が見

神奈川県衛生研究所 微生物部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
1) 前 微生物部

られた検体については、cDNAを用いてエンベロープ蛋白質E1遺伝子の増幅を行った。E1遺伝子の増幅は、E1-(2) (E1-2F, E1-2R: 1 s t, E1-6F, E1-10R: 2nd) とE1-(3) (E1-7F, E1-12R: 1 s t, E1-3F, E1-3R: 2nd) の2種類のプライマーおよびPerfectShot Ex-Taqを用い、E1領域のRT-nested PCRを行った。NS遺伝子の確認された検体について、E1-(2)遺伝子、E1-(3)遺伝子の増幅バンドの有無を確認した。増幅バンドが見られたPCR産物については、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用い、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、E1-(2)およびE1-(3)遺伝子配列情報から、E1遺伝子 (739bp) の配列情報を構築した。解析ソフトMEGA5²⁾を用いて、検出株にWHOが定めた遺伝子型参照株を加えNeighbor-Joining法によるE1遺伝子 (739bp) の系統樹を作成し遺伝子型の解析を行った。

結果および考察

表1に発病月別麻疹疑い例からのウイルスの検出状況を示した。2012年度に搬入された麻疹疑い例は68例118検体 (咽頭拭い液48検体、血液38検体、尿31検体) であったが、いずれの検体からも麻疹ウイルス遺伝子は検出されなかった。この68例について麻疹ウイルス遺伝子の検出を行ったところ、2012年7月3例、8月3例、10月1例、11月3例、12月3例、2013年1月2例、2月3例、3月8例の計26例42検体 (咽頭拭い液23検体、血液7検体、尿12検体) から麻疹ウイルス遺伝子が検出され、検出率は38.2% (咽頭拭い液47.9%、血液18.4%、尿38.7%) であった。麻疹ウイルス遺伝子が検出された26例のうち、咽頭拭い液を含む2種類または3種類の検体の搬入例は、16例39検体 (咽頭ぬぐい液16検体、血液12検体、尿11検体) で、咽頭ぬぐい液、尿での遺伝子検出率は100%、血液は検出率が低く41.6%であった。これは血液からのウイルス分離や遺伝子検出率が低いとされているWHOのマニュアル³⁾と一致しており、咽頭拭い液や尿が第一選択の検体として有効であると思われた。また、今回の麻疹ウイルス遺伝子が検出された検体の採取時期は、一番遅いもので咽頭拭い液および尿では発症9日後、血液では7日後であった。

麻疹疑い患者からの麻疹ウイルス検出例の増加は、麻疹の患者報告数が増加した2012年7月以降からはじまり、10月以降は毎月麻疹ウイルス遺伝子が検出されていた。2011年度の麻疹疑い例からの麻疹ウイルス遺伝子検出率は21.6% (51例中11例)、検出時期は4月から8月までの限られた期間であり、地域の5保健福祉事務所管内 (厚木、平塚、茅ヶ崎、鎌倉、藤沢市) のからの検出で

あったが、2012年7月以降の検出率は38.2%に上昇し、検出地域も6保健福祉事務所管内 (厚木、秦野、茅ヶ崎、鎌倉、三崎、藤沢市) と広がっていた。

表2に年齢および男女別の麻疹ウイルス遺伝子検出状況を示した。麻疹・風疹ワクチンは定期予防接種制度の変更により、ワクチンの接種状況が異なるため、一般的な接種対象年齢を基に6つの年齢層に区分した。2回個別接種の接種率が高く、抗体保有率の高い0歳から12歳年齢層では麻疹ウイルス遺伝子は検出されていないが、その他の年齢層では接種率が低く抗体の保有率が低いことから、麻疹ウイルスの検出数が多いと考えられる。男女比は8:2、年齢別では13歳~22歳9例、23歳~25歳2例、26歳~33歳6例、34歳~50歳8例、50歳以上1例で、男性では23歳~25歳および26歳~33歳の群で検出率が66.7%と高かった。ワクチン接種歴は不明が多く、MRワクチンの接種歴が確認されたのは20歳代女性1名のみであった。

表2 年齢別麻疹ウイルス検出状況 (平成24年4月~平成25年3月)

	検体数			陽性数		
	計	男	女	計 (検出率%)	男	女
0歳~12歳	13	8	5	0	0	0
13歳~22歳	25	12	13	9 (36.0)	7	2
23歳~25歳	3	1	2	2 (66.7)	1	1
25歳~33歳	9	8	1	6 (66.7)	5	1
34歳~50歳	15	11	4	8 (53.3)	7	1
51歳以上	3	3	0	1 (33.3)	1	0
計	68	43	25	26	21	5

13歳~22歳: 2回個別接種 (2回目の接種率が低い年齢層)

23歳~25歳: 個別接種 (2回目の接種無し)

26歳~33歳: 中学生の時に医療機関で個別接種 (接種率が低い)

34歳~50歳: 男性は定期予防接種無・女性は中学校での集団接種

51歳以上 : 定期予防接種無

図1に麻疹ウイルスのE1遺伝子 (739bp) の分子系統樹を示した。麻疹ウイルスが検出された26例のうち、E1タンパク質領域でE1-(2)およびE1-(3)の両領域が増幅でき、E1遺伝子 (739bp) の配列情報を構築できたのは26例中5例のみであり、南~東南~東アジアの広域で報告されている遺伝子型2Bであった。21例はE1-(3)領域の塩基配列を決定できなかったため、塩基配列の決定ができたE1-(2)領域(426bp)について計26例の系統樹解析を行ったところ、E1遺伝子の解析で2B型となった5例と同一のクラスターを形成した。また、E1-(2)領域のみの解析結果では、26例中21例は愛知県で2012年に報告されたRVs/Aichi.JPN/32.12、5例は千葉県で2012年に報告されたRVs/Chiba.JPN/48.12と近縁な2つのサブクラスターを形成した (図2)。2011年に神奈川県で検

出された風疹は11株で、検出は初版風疹マニュアル⁴⁾に記載のあったプライマーセットA-Dを用いており、Neighbor-Joining法による解析結果では同一クラスターを形成する2B型であった。そこで、Ka-Rv2011041を昨年度の代表株として、2012年度検出株と同様に解析を行ったところ、Ka-Rv2011041は2012年度の検出株と同一のクラスターを形成していることが確認された。2011年度、2012年度ともに神奈川県域の患者からの検出株は、2B型で渡航歴がないことから神奈川県近郊での感染が疑われ、2B型が神奈川県を含む首都圏で定着していることが推察された。一方、2013年3月までに全国で報告された風疹ウイルス遺伝子も2B型が主流であったが、大阪府、神戸市からは、2B型に加え1E型の検出報告⁶⁾があり、2012年30週以降に1E型の検出頻度の上昇が報告されていることから、今後、首都圏においても1E型が検出される可能性がある。

今回検体から直接抽出したRNAを用いた検査において、26例中21例は、NS領域およびE1-(2)領域での増幅バンドが確認できたが、E1-(3)領域で得られたのは不鮮明な増幅バンドであった。このため、増副産物を切り出し等の精製処理を行ったが、ダイレクトシーケンス反応ではE1領域について解析データが得られなかった。その要因の一つとしてE1-(3)領域のプライマーの感度に問題があると考えられ、風疹ウイルスを検体から分離後、分離株について遺伝子型を確認することで、E1領域の解析が可能であったとの報告⁷⁾があることから、今後は直接抽出RNAから遺伝子を検出するだけでなく、風疹ウイルスの分離後の遺伝子解析の実施を検討する必要がある。

今回の報告は、麻疹疑い例からの風疹ウイルス検出例であるが、他府県でも同様に麻疹疑い患者から風疹ウイルスが検出されており⁷⁾、全国的な風疹の流行が起こっている。2012年4月、WHOは麻疹排除だけでなく風疹および先天性風疹症候群(CRS)の対策を積極的に取り組む姿勢を示し、2020年までの世界戦略計画を立てている⁵⁾。麻疹排除の定義と同様に風疹排除の定義は、「適切なサーベイランス体制の中で、ある特定の地域において、土着株による感染が1年間以上存在せず、それに関連したCRS症例が確認されないこと」と提唱されている

ことから、麻疹と同様に、適切なサーベイランス体制下で病原体診断を地方衛生研究所が実施することが重要である。風疹は麻疹同様、遺伝子診断および解析を行うことで土着株か否かの判断が可能となるため、今後も麻疹疑い患者から麻疹ウイルスが検出されなかった事例については、風疹の遺伝子診断および解析を行い、その隠れた流行状況の把握を行っていく必要がある。

謝 辞

本調査を実施するにあたり、多大なご協力をいただきました医療機関の関係者の方々、保健福祉事務所ならびに県健康危機管理課の皆様様に深謝いたします。

(平成25年8月1日受理)

参考文献

- 1) 病原体検出マニュアル 風疹 第2版
- 2) Koichiro T., Daniel P., Nicholas P., Glen S., Masatoshi N. and Sudhir N.:MEGA5:Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods,Mol.Biol.Evol.28(10),2731-2739(2011)
- 3) WHO, Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection.Second edition.WHO/IVB/07.01.2007
- 4) 病原体検出マニュアル 風疹 初版
- 5) 倉田貴子, 上林大起, 駒野 淳, 西村公志, 加瀬哲男, 高橋和郎ほか: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 (IASR), **34**, 97-98 (2013)
- 6) 秋吉京子, 須賀知子, 森 愛, 東田京子, 吉村 元, 春田恒和ほか:神戸市における風疹発生状況と脳炎患者からの風疹ウイルスの検出, 2012年3~8月, 病原微生物検出情報 (IASR), **33**, 305-308 (2012)
- 7) 松島勇紀, 中島関子, 加納敦子, 石丸陽子, 清水英明:麻疹疑いの患者から風疹ウイルスが検出された散発事例—川崎市, 病原微生物検出情報 (IASR), **32**, 258-259 (2011)