

短報

麻疹疑い患者からの麻疹ウイルス 検出状況と遺伝子解析

鈴木理恵子, 金城恵子, 高橋淳子,
近藤真規子, 黒木俊郎

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

Rieko SUZUKI, Keiko KINJYO, Junko TAKAHASHI,
Makiko KONDO and Toshiro KUROKI

はじめに

麻疹は、一般的には「はしか」とも呼ばれ、麻疹ウイルス (Paramyxovirus科Morbillivirus属) による感染症で、38℃前後の高熱に続き、咳や鼻水 (カタル症状)、口腔内に出現するコプリック斑、全身に出現する特有な発疹が特徴の全身性ウイルス感染疾患である。感染経路は空気感染、飛沫感染、接触感染など様々であるが感染力が非常に強い上、罹患すると稀に急性脳炎を発症し、精神発達遅滞等の重篤な後遺症が残る場合や、さらに稀ではあるが、亜急性硬化性全脳炎を発症した場合には数年以内に死に至る。このような麻疹の感染力や重篤性、流行した場合の社会に与える影響を考えると、予防に積極的に取り組むべき重要な疾患である。

我が国においては、麻疹患者発生の減少に伴い、自然感染による免疫増強効果が得づらくなってきたことから、予防接種は、それまでの1回接種から2回接種へと移行し、より確実に免疫を獲得できる体制をとっていた。しかし、2007年には首都圏の10~20歳代を中心に大流行が起こった。厚生労働省は「麻しんに関する特定感染症予防指針」(以下、指針)(2007年12月28日厚生労働省告示第442号)を策定し、予防接種の対象者を拡大するなどの施策を推進し、2012年度までの麻疹排除を目標としたが達成に至らなかった。その後、指針の一部を改訂(2013年3月30日改訂厚生労働省告示第126号)し、2015年度までに麻疹排除を達成し、WHO(世界保健機関)西太平洋地域事務局の排除認定をうけ、引き続き麻

疹の排除状態を維持することを目標とした。

また、「感染症の予防及び感染症患者に対する医療に関する法律」が2008年に一部改正され、麻疹を5類感染症の全数報告疾患として指定し、届出には臨床診断および麻疹IgM抗体測定または病原体の検出などの検査診断を満たすこととなった。しかし、麻疹IgM抗体検査は、麻疹以外の疾患でも陽性になることがあり、厚生労働省は2010年11月、麻疹の確定診断にはPCR法等による病原体検査診断の実施を推奨し、2013年に改訂された指針には、原則として全例にウイルス遺伝子検査等を実施し、麻疹ウイルスが検出された場合には遺伝子配列の解析の実施が明記され、土着株による感染ではないことを遺伝子型解析により明らかにすることになった。神奈川県では、病原体による検査診断が強化された2010年11月より、5類全数報告疾患として届出のあった麻疹疑い症例について、PCR法による遺伝子検査および陽性例について遺伝子型解析を実施している。2007年の麻疹の大流行後、患者報告数は徐々に減少していたが、2013年末から2014年にかけて、全国的に麻疹報告数の増加がみられ、2014年には、神奈川県においても麻疹報告数の増加がみられたことから、その流行状況および流行株の遺伝子学的特徴について報告する。

材料および方法

2014年1月から12月に神奈川県域(横浜市、川崎市、横須賀市、相模原市を除く)で発生した麻疹疑い症例58例133検体(咽頭ぬぐい液57検体、血液36検体、尿40検体)について、病原体検出マニュアル第2版麻疹¹⁾(以下:麻疹マニュアル)に準じ、麻疹ウイルス遺伝子の検出と解析を行った。

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、抽出用検体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℃15分、85℃5秒逆転写反応を行いcDNAを作製した。

2. 麻疹ウイルス遺伝子の検出と解析

麻疹マニュアルに従い、N遺伝子、H遺伝子の増幅を行った。遺伝子の増幅には、N遺伝子増幅用プライマー (pMvGTf1m, pMvGTr1:1st, pMvGT2m, pMvGTr2:2nd), H遺伝子増幅用プライマー (MHL1, MHR1:1st, MHL2, MHR2:2nd) およびPerfectShot Ex-Taq (Loading dye mix) (タカラバイオ) を用い、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。N遺伝子の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、N遺伝子領域の配列情報を構築した。検出株にWHOが定めた遺伝子型参照株を加え、解析ソフトMEGA5²⁾を用いて、Neighbor-Joining法によるN遺伝子 (450bp) 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患者からのウイルス検出状況を示した。

2014年1月から12月に搬入された麻疹疑い例58例133検体について、麻疹ウイルス遺伝子の検出を行ったところ、2014年1月、2月、3月に1例ずつ、5月2

例、6月6例、7月4例、8月3例、11月2例の計20例43検体から麻疹ウイルス遺伝子が検出され、検出率は34.5% (咽頭拭い液33.3%, 血液25.0%, 尿37.5%) であった。麻疹ウイルスは、2010年の病原体の検査診断の実施以降、2011年に1例 (2.2%), 2013年に3例 (4.7%) 検出されたのみであったが、2014年は20例 (34.5%) と増加した。全国的には、2013年末から麻疹患者の増加がみられ、2014年4月以降の麻疹患者報告数は減少傾向であったが³⁾、神奈川県内では2014年の5月から8月にかけて患者数の増加がみられた。麻疹ウイルス遺伝子が検出された20例の詳細を表2に示した。

20例中ワクチン接種歴無あるいは不明は16例、接種歴有が4例であった。20歳以下の4例は接種歴無で、うち3例は1歳以下であり、定期ワクチンの接種前に感染した。20歳以上では、16例中12例がワクチン接種歴無あるいは不明であったが、4例は接種歴有と回答している。接種歴があっても、感染を防御するために必要な抗体価を保有していないこともある。また、罹患歴が明確でない、ワクチン接種歴不明または1回である場合には、積極的にワクチン接種をおこない、感染を防御できる抗体を獲得することが予防として重要である。

20症例43検体について、検体ごとのウイルス遺伝子検出率を見てみると、咽頭ぬぐい液が100%と最も高く、次いで尿93.8%, 血液は64.3%と低かった。血液の14例

表1 発病月別麻疹疑い例からの麻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
2014年 1月	2	2	1	1	1	0	0	
2月	3	3	1	0	1	0	0	
3月	2	2	1	2	1	0	1	
4月	6	6	2	3	0	0	0	
5月	7	7	4	4	2	1	2	
6月	11	10	9	9	6	4	6	
7月	8	8	7	6	4	2	3	
8月	9	9	6	6	3	1	1	
9月	1	1	0	1	0	0	0	
10月	2	2	1	1	0	0	0	
11月	6	6	3	6	2	1	2	
12月	1	1	1	1	0	0	0	
合計	58	57	36	40	20	19	15	
(検出率%)					(34.5)	(33.3)	(37.5)	

表 2 麻疹ウイルス遺伝子検出例の詳細 (2014年 1月~12月)

症例 No.	発症日	年齢	性別	麻疹ワクチン接種歴	PCR結果			採取病日	遺伝子型	備考
					咽頭ぬぐい液	血液	尿			
1	1月20日	1	F	無	検出	NT	NT	8	B3	渡航歴あり(フィリピン)
2	2月10日	25	F	有	検出	NT	NT	6	B3	
3	3月22日	28	M	不明	検出	NT	検出	5	B3	
4	5月24日	19	M	無	検出	NT	検出	6	D8	麻疹患者との接触歴あり
5	5月24日	29	M	不明	検出	検出	検出	7	D8*	
6	6月23日	22	M	不明	NT	検出	検出	2	D8	麻疹患者との接触歴あり
7	6月20日	29	M	不明	検出	検出	検出	7	D8	
8	6月25日	31	F	不明	検出	検出	検出	7	D8	
9	6月25日	21	F	無	検出	不検出	検出	8	D8	
10	6月25日	45	F	無	検出	検出	検出	10	D8	
11	6月23日	31	F	無	検出	NT	検出	11	D8	
12	7月4日	26	M	無	検出	検出	検出	1	D8	麻疹患者No.11(家族)との接触歴あり
13	7月7日	33	F	無	検出	不検出	検出	5	D8	麻疹患者No.8(家族)との接触歴あり
14	7月11日	49	M	有	検出	検出	検出	2	D8	麻疹患者No.10(家族)との接触歴あり
15	7月20日	0	F	無	検出	不検出	検出	9	D8	
16	8月1日	29	F	有	検出	検出	不検出	1	D8	麻疹患者No.15(家族)との接触歴あり
17	8月6日	32	F	有	検出	不検出	検出	5	B3	
18	8月17日	0	F	無	検出	不検出	NT	6	B3	
19	11月7日	41	M	不明	検出	検出	検出	6	D8	渡航歴(ベトナム)
20	11月7日	58	F	不明	検出	NT	検出	12	D8	渡航歴(ベトナム)

* : H遺伝子で遺伝子型を決定

中 5 例は遺伝子が検出されず、これら 5 例の検体採取時期は、発病日から 5 日以上経過していた。また、尿は 17 例中 16 例から遺伝子が検出されたが、発病当日に採取された 1 例からは、遺伝子が検出されなかった。しかし、発病から 8 日以上経過後に採取された尿 5 検体からは、遺伝子が検出できた。麻疹の病原体検査に適切な検体は、咽頭ぬぐい液、血液、尿であり、採取に適切な時期は、発症 2 - 3 日前から発疹出現後 1 週間程度とされている¹⁾。麻疹の適切な病原体検査には、発病後速やかに、咽頭ぬぐい液を含んだ 2 種類以上の検体を確保することが望ましいが、発疹出現後 8 日以上経過した症例については、尿からの検出が可能であった。検体採取に適切な時期を逸した場合は、尿による検査が有効と考えられた。麻疹ウイルス遺伝子型は、N 遺伝子領域の解析により決定した。その結果、20 例中 B 3 型が 5 例、D 8 型が 14 例であったが、1 例(症例 5)は N 遺伝子領域の増幅ができなかったため、H 遺伝子領域について解析し、D 8 型と決定した。

図 1 に麻疹ウイルスの N 遺伝子 (450bp) の分子系統樹を示した。

今回検出された B 3 型 5 例は、2014 年に香港で報告された Mvs/HongKongCHN/10.14/3[B3] と同一のクラスターを形成していた。5 例のうち 1 月の 1 例(症例 1)

にはフィリピンへの渡航歴があったが、他の 4 例には渡航歴はなく、疫学調査では麻疹患者との接点はなかった。2013 年末から 2014 年にかけては、日本国内においてフィリピンを中心としたアジア諸国からの輸入例が多数報告³⁾され、各地で二次感染事例の報告例⁴⁾もあったことから、この 4 症例も国内での感染事例と思われた。

D 8 型は、ベトナム、インドネシアなどの地域から報告^{3,5)}されている。D 8 型 14 例は 2 つのクラスターを形成し、このうち 11 月に発症した 2 例(症例 19, 症例 20)はベトナムへの渡航歴があり、2014 年にベトナムで報告された Mvs/HoChiMinh.VNM/9.14/MV2[D8] と同一のクラスターを形成していた。この 2 例は、渡航時期および渡航先での立ち寄り場所が一致しており、ベトナムでの感染が推定された。また、この患者からの国内での二次感染の報告は確認されていない。

5 月から 8 月に検出された 12 例は、2012 年にインドで報告された Mvs/UttarPradesh.IND/11.12/6478[D8] と同一のクラスターを形成していた。この 12 例のうち、初めて県域で検出されたのは、5 月の 1 例(症例 4)で、東京都 M 市の学校で麻疹患者との接触歴があった。M 市の学校の麻疹患者は、カザフスタンへの渡航歴のある東京都 H 市の麻疹患者からの二次感染者であることが確認されていた。この学校では、5 月から 6 月にかけて症例

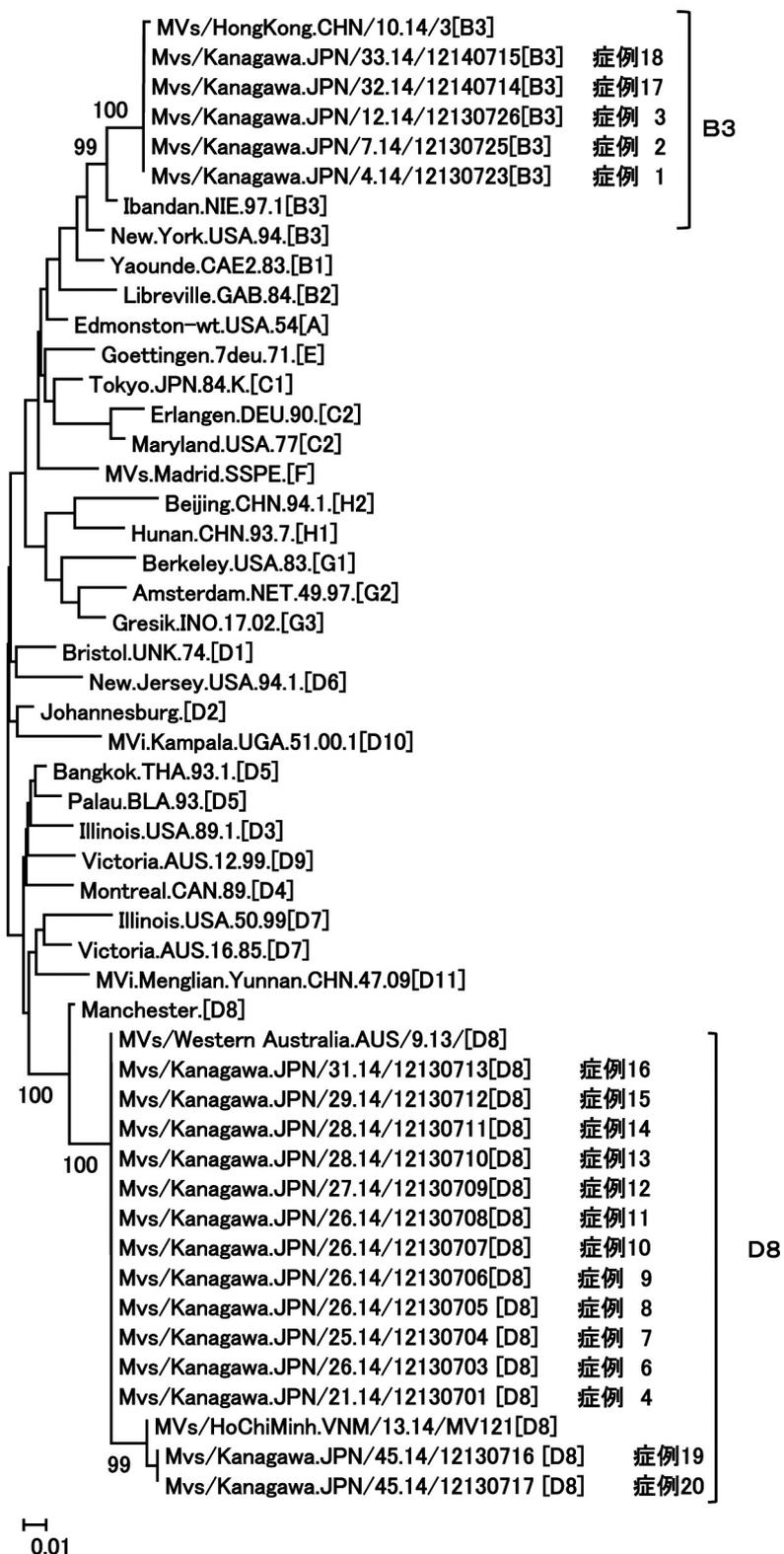


図1 麻疹ウイルスのN遺伝子領域 (450bp) の分子系統樹

4を含む8名の麻疹患者が報告され、学校内で感染が広まっていた。患者の居住地は、東京都市部、横浜市、川崎市、神奈川県域と広域にわたっており、学校以外での二次感染が懸念されていた。6月1例（症例6）は、症例4とは異なる東京都M市の学校での麻疹患者との接触歴が確認されている。この学校での麻疹患者は症例6を含む3名であったが、症例4と症例6の学校間での交流や、患者間の接触歴などの接点は確認できなかった。神奈川県内では6月の下旬以降、渡航歴もなく麻疹患者との接触歴が不明な6例（症例7, 8, 9, 10, 11, 15）の麻疹患者の発生が続き、感染ルートを解明するために疫学調査が行われたが、疫学的接点は見いだせなかった。7月から8月に発生した4例（症例12, 13, 14, 16）は、同居する麻疹患者（症例8, 10, 11, 15）との接触により起こった家族内感染であった。

麻疹は感染力が非常に強い感染症であり、免疫のない集団に1人の発症者が入ると12人～14人に感染させる可能性がある⁶⁾。5月から8月に発生したD8型の患者発生の特徴は、発生地域は県央地区および湘南地区に限定されていたことと、患者の多くは、公共交通機関の利用歴があり、ショッピングモール等、多くの人と接触する機会のある場所へ立ち寄りがあったため、発生時期が4ヶ月の長期に渡っていたことである。今回の事例では、症例間での直接的な接触の確認はできず、感染経路は不明であったが、分子系統樹では同じクラスターを形成することが確認されたことから、5月に東京都で発生した輸入麻疹例を発端に、感染を防御できる十分な抗体を保持しない人々を中心に麻疹が伝播したと考えられた。

神奈川県域では、毎年麻疹ウイルス抗体保有状況の調査⁷⁾を行っており、凝集反応（PA）法で抗体価16倍以上を抗体陽性と判定している。2014年に実施した全国調査⁸⁾では、抗体保有率は95%で、2013年と同等であったが、神奈川県域の抗体保有率は、2012年97%、2013年91%、2014年87%と年々減少傾向である。神奈川県域における麻疹の抗体保有率は全国的にもかなり低く、感染が蔓延しやすい状況である。麻疹の感染拡大を未然に防ぐためには、ワクチン接種による抗体保有することが効果的であるため、今後もワクチン接種の推奨を喚起していく必要がある。

2015年3月27日付でWHO西太平洋地域事務局は、日本を麻疹排除状態にあることを認定した。我が国の指針では、「2015年までの麻疹排除を達成しWHOによる麻

疹排除の認定を受ける」ことを目標とし、適切なサーベイランス体制の下、病原体診断による遺伝子型の解析を実施する取り組みを行い、これを達成することができた。地方衛生研究所は、今後も指針に基づき、麻疹対策の推進に努め、排除状態を維持する取り組みや、発生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には深謝いたします。

（平成27年8月1日受理）

文 献

- 1) 病原体検出マニュアル 麻疹 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) 麻疹2015年3月現在, 病原微生物検出情報 (IASR), **36**, 51-53 (2015)
- 4) 石川真理子, 中島関子, 松島勇紀, 駒根綾子, 清水英明, 大嶋孝弘ほか: フィリピン渡航者からの麻疹ウイルス遺伝子型B3の検出-川崎市, 病原微生物検出情報 (IASR), **35**, 102-103 (2012)
- 5) 国立感染症研究所: 麻疹ウイルス分離 検出情報, 病原微生物検出情報 (IASR)
<<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr-measles.html>>
- 6) 国立感染症研究所: 疾患別情報 麻疹, 感染症情報センター (IDSC)
<<http://idsc.nih.go.jp/disease/measles/QA.html>>
- 7) 鈴木理恵子, 金城恵子, 近藤真規子, 黒木俊郎: 神奈川県 (横浜市・川崎市・横須賀市・相模原市および藤沢市を除く) の麻疹ウイルス抗体保有状況, 神奈川の感染症-平成26年度-
- 8) 佐藤弘, 多屋磐子, 大石和徳; 2014年度麻疹感受性調査および予防接種状況調査実施都道府県: 2014年度麻疹予防接種状況および抗体保有状況-2014年度感染症流行予測調査 (暫定結果), 病原微生物検出情報 (IASR), **36**, 60-62 (2015)