

Hypervariability of *UL144* gene sequences has also been reported [Lurain et al., 1999]. *UL144* is one of the ORFs and encodes a homolog of the herpes simplex virus entry mediator [Benedict et al., 1999; Bale et al., 2001]. *UL144* ORF can be categorized into three major groups, however no apparent correlation between *UL144* variants and HCMV pathogenesis has been identified [Bale et al., 2001].

There have been no similar molecular epidemiological studies on HCMV isolates from an Asian population except for a few studies on *gB* [Shiu et al., 1994; Numazaki et al., 2000]. HCMV clinical strains isolated from Japanese infants and children during the last two decades were studied. Genetic variability in the α sequence, *UL144* region, and *gB* genes, and their association with clinical course was investigated. In addition, the findings were compared with those from Western countries.

MATERIALS AND METHODS

Virus Strains

Seventy-four HCMV strains were studied. These were isolated during 1983–2003 from the urine of 60 Japanese infants and children in Sapporo, Japan. Of these, 10 newborn babies were confirmed to have asymptomatic congenital HCMV infection by routine screening of urine for HCMV excretion. Forty-five patients (1 month–5 years 4 months; mean, 11 months), all immunologically normal, had a HCMV mononucleosis or hepatitis by perinatal or horizontal infection. Five immunocompromised hosts (9 years 10 months–23 years 1 month; mean, 15 years 11 months) who were receiving anti-cancer or immunosuppressive agents were included as HCMV reactivation. Of the 74 strains, 24 were collected from 10 children, that is, 2–3 strains were isolated serially from the same patients. The interval between each isolation ranged from 1 month to 1 year. The laboratory strain AD169 was also included. Samples of urine were inoculated onto MRC-5 cells for HCMV isolation. Virus isolates were stored at -80°C until further examination.

DNA Isolation

Virus isolates were cultured in MRC-5 cells in 24-well semi-microplates containing 1 ml of culture medium (Eagle's MEM with 2% fetal calf serum) per well. When an extensive cytopathic effect was present, the cells were washed once and mixed viral genomic and cellular DNA was extracted using QIAamp DNA Minikit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA). Isolates were passaged less than four times prior to DNA extraction. Of 74 stocked-virus strains, 48 could be re-isolated with tissue culture; however, the remaining 26 strains could not, and DNA was extracted from stored-virus fluid directly.

PCR Amplification

Three regions of the HCMV genome, that is, the α sequence, *UL144*, and *gB*, were analyzed using poly-

merase chain reaction (PCR). Forward primer for the α sequence region was our original (TTCC CCGGGAAT-CAAACAG), and reverse primer was described by Zaia et al. [1990] (TTTTAGCGGGGGGGTGAAA). The *UL144* region was amplified using the primer pair described by Lurain et al. [1999] (forward: TCGTATTA-CAAACCGCGGAGAGGAT; reverse: ACTCAGACACG-GTTCCGTAA).

After denaturing at 94°C for 5 min and cooled to 80°C , the PCR mixture was seeded with thermostable Taq polymerase (Promega, Madison, WI). Forty cycles of amplification were carried out with a DNA thermal cycler (PE-ABI, Foster city, CA). Each cycle consisted of warming at 95°C for 40 sec, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 10 min. Amplicons were visualized on 2% agarose gels.

gB genotypes were determined by PCR-RFLP analysis using enzymes *Hinf* I and *Rsa* I as described by Chou and Dennison [1991].

DNA Sequencing

The concentrated PCR products were sequenced directly with the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE-ABI). The sequencing products were analyzed on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (PE-ABI). Consensus nucleotide sequences for the α sequence and *UL144* were determined by visual inspection of forward and reverse strands.

Phylogenetic Analysis

Sequence alignments were accomplished using web based Clustal W alignment programs. Unrooted phylogenetic trees were constructed for the α sequence and *UL144* DNA sequence data using the above website. They were visualized and edited using TREE VIEW.

RESULTS

α Sequence Variability

At first, attempts were made to amplify the α sequence gene using the primer pair described by Zaia et al. [1990]; however, only 9 of the 74 (12%) strains (7 of the 48 re-isolated strains and 2 of the 26 stocked-virus fluid) could be amplified. Therefore, the forward primer was changed to our original one. As a result, the α sequence of 60 of the 74 (81%) strains (39 re-isolated strains and 21 stocked-virus fluid) could be amplified. The PCR products ranged rather broadly in length from 162bp to 238bp.

PCR products were sequenced directly. Analysis of the nucleotide sequences of the region of 60 strains revealed differences from 0% to 43% between strains. Phylogenetic analysis was conducted with 48 strains except for 12 strains which were isolated from the same subjects and had identical sequences (Fig. 1). In the unrooted tree, there were five major groups (A, B1, B2, C1, and C2) approximately (Fig. 1).

Each cluster consisted of 19, 8, 8, 9, and 4 strains, respectively. There was 0%–27% nucleotide differences

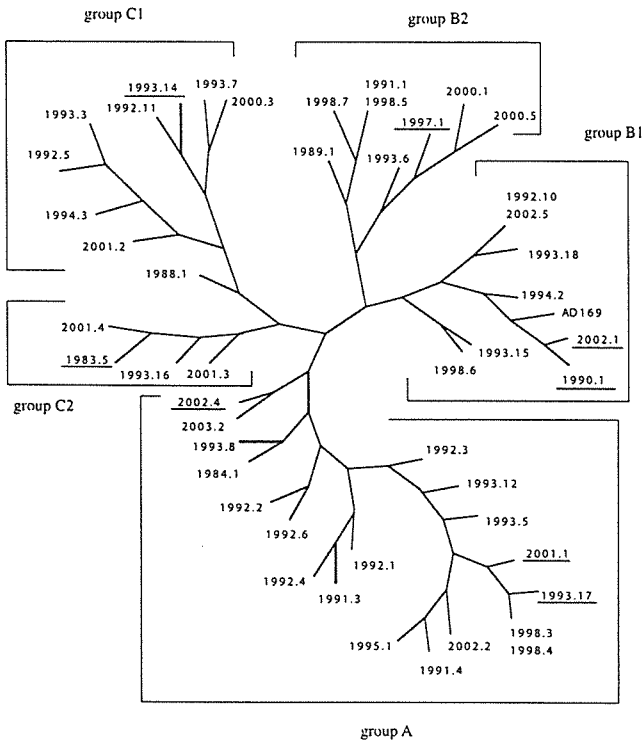


Fig. 1. Unrooted phylogenetic dendrogram showing the relationship of 48 human cytomegalovirus (HCMV) strains with respect to *a* sequence polymorphisms. AD169 strain is included. Numbers with underlines indicate isolates from congenital infection.

among strains located in the same group. They contained strains which were isolated from subjects with variable clinical symptoms. Each cluster includes 1–3 isolates from infants with a congenital infection. The dates of isolation of strains belonging to each group were 1984–2002, 1990–2002, 1989–2000, 1988–2001, and 1983–2001 in groups A, B1, B2, C1, and C2, respectively. Serial isolates from the same patients possessed identical sequences for *a* sequence regions.

UL144 Variability

Sixty-three (85%) strains (all 48 re-isolated strains and 15 stocked-virus fluid) yielded *UL144* gene PCR products which had 737-bp length. The HCMV laboratory strain, that is AD169 lacks 19 ORFs including *UL144*, thus AD169 did not yield amplicons [Cha et al., 1996; Lurain et al., 1999; Bale et al., 2001].

Unrooted phylogenetic trees were edited using 52 field isolates except for 11 isolates which had identical sequences from the same subjects (Fig. 2). This schema segregated 52 strains into three major groups. Phylogenetic trees were also made with our 52 isolates and the strains described in Lurain et al. [1999]. We confirmed that the group designations of our strains (1–3) conformed to the scheme proposed by them (data not shown).

Each group consisted of 21, 7, and 24 strains, respectively. Analysis of the nucleotide sequence of the region of 52 strains revealed differences from 0% to 17%

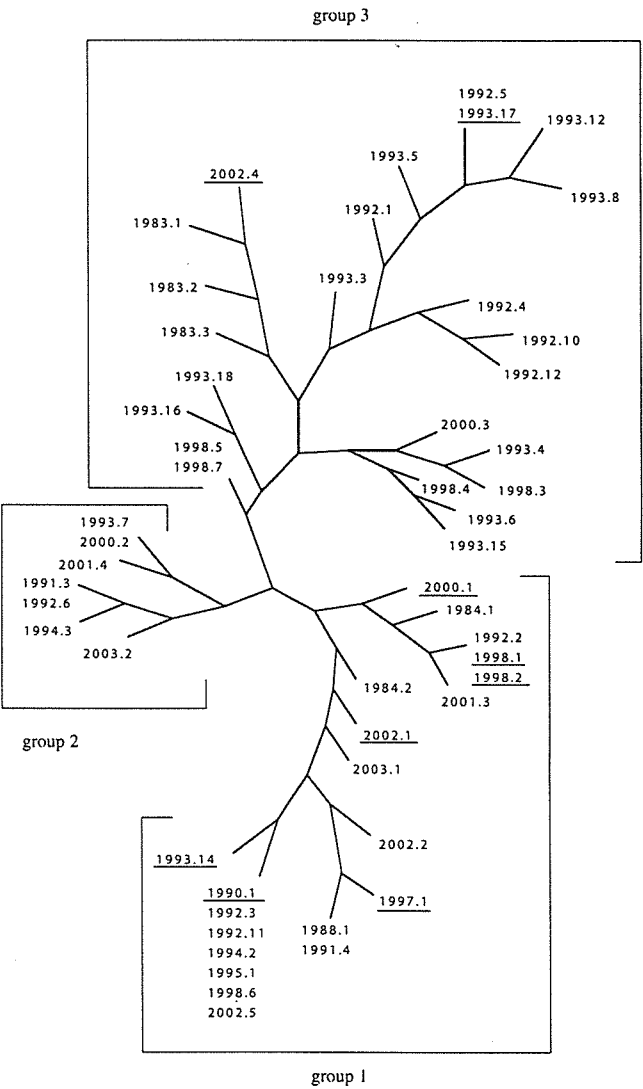


Fig. 2. Unrooted phylogenetic dendrogram showing the relationship of 52 HCMV strains with respect to *UL144* gene variability. Numbers with underlines indicate isolates from congenital infection. Group designations conform to the scheme proposed by Lurain et al. [1999].

between strains. On the other hand, there were only 0%–5% nucleotide differences among strains located in the same group.

The dates of isolations of strains belonging to each group extended over a long time, that is 1982–2002, 1991–2003, and 1983–2002 in groups 1, 2, and 3,

TABLE I. Distribution of Human Cytomegalovirus (HCMV) Glycoprotein B (gB) Genotype and Type of Infection

Group	1	2	3	4
Congenital infection	6	2	1	0
Perinatal/horizontal infection	26	0	15	0
Immunocompromised host	2	0	1	0
Total	34	2	17	0

Fifty-three strains were analyzed.

respectively. In group 1, strains from patients with congenital infections accounted for 33.3% (7/21), however, in groups 2 and 3, they accounted for just 0% (0/7) and 8.3% (2/24), respectively; this difference was statistically significant (χ^2 test, $P < 0.05$).

Nine children serially secreted viruses with identical UL144 sequences. One child secreted different strains at 1 year 7 months and 2 years 2 months old; in these the UL144 gene differed at 25 of 624 nucleotide positions. These two strains, that is, 1984.1 and 1984.2, were categorized to different branches within group 1 (Fig. 2).

gB Variability

The gB gene of 67 of 74 (90%) strains (all 48 re-isolated strains and 19 stocked-virus fluid) could be amplified and analyzed by RFLP assay using enzymes, Hinf I and Rsa I. Excepting the 14 strains isolated from the same subjects, 34, 2, and 17 were identified as gB group 1, 2, and 3, respectively (Table I). None of our strains were classified as group 4. There was no obvious correlation between a certain gB genotype and the type of disease. AD169 was identified as group 2.

Linkage of α Sequence, UL144 Polymorphism, and gB

Strains were compared according to their unrooted phylogenetic dendrogram of α sequence, UL144, and gB genotypes. No apparent linkage of polymorphisms or genotypes was observed. Group A was the dominant genotype in α sequence (39.6% of all isolates), group 3 in UL144 (46.2% of all isolates), and group 1 in gB (68.7% of all isolates). But no relationships were apparent between the dominant genotypes. For example, strains belonging to UL144 group 3 were dispersed to five groups of α sequence and two groups of gB in almost equal ratios (data not shown).

DISCUSSION

This is the first report on HCMV α sequence and UL144 molecular epidemiology from an Asian country. In the unrooted tree of the α sequence region, 48 isolates could be classified into five groups. Each group contained 4–19 strains. However, no apparent linkage of clusters and clinical diseases was observed. The isolation date of strains within each group were varied widely, thus there was no temporal variation of field strains. Serial isolates from the same patients possessed identical sequences in the α sequence region. This suggests that the HCMV does not easily change within subjects even at the locus of the hypervariable α sequence gene.

Bale et al. [2001] analyzed the genetic variability of α sequences of HCMV strains from healthy children in a day care center and from subjects with a congenital infection. They also divided strains into five groups which primarily corresponded to nosocomial infection within the day care center, however any correlation between our five groups and theirs could not be tested

because sequence data on their HCMV strains was unavailable.

In the unrooted tree of the UL144 region, our 63 strains could be clearly classified into three major groups (1–3). Lurain et al. [1999] analyzed UL144 genotypes of clinical HCMV isolates from immunocompromised patients who had had organ transplantation or HIV infection, while Bale et al. [2001] analyzed HCMV from healthy children and neonates. All studies, including in the present study, divided HCMV strains into three major groups with similar designations (1–3). The patient's clinical details in these three studies were different, and there was considerable geographical and temporal variation. However, all showed that groups 1 and 3 were large and group 2 was the smallest. Therefore, the HCMV genetic distribution pattern was similar irrespective of the geographical or temporal variation, and of the genetic background of the host, in terms of UL144 genetic variability.

In our study of the UL144 gene, almost all strains causing congenital infection were located in group 1, in contrast Bale et al. [2001] found that strains causing congenital infections belonged mainly to group 3. This difference cannot be resolved given the small number of cases of congenital infection studied and a much larger study of HCMV strains is required to determine the correlation between congenital infection and UL144 genotype. If particular strain genotypes do infect fetuses more readily, such knowledge would be helpful in predicting congenital infections and developing preventative measures.

Lurain et al. [1999] reported that the UL144 sequence was maintained in all isolates from the same patient, but Bale et al. [2001] found that serial strains from two of four children studied displayed differences. We found that the UL144 sequence of serial strains from 9 of 10 children was identical. But in one child, the isolate at 1 year 7 months differed genetically from that at 2 years 2 months. In the unrooted phylogenetic dendrogram, these two strains fall into different branches, although within the same group, which implies repeated infection with distinct HCMV strains. However, the sequences of the α sequence region and gB genotypes could not differentiate these two strains, emphasizing the need for plural analysis for differentiation of CMV field strains.

gB is a major component of the virion envelope and is transported to the plasma membrane of infected cells [Meyer-König et al., 1998a; Plotkin, 1999]. Chou and Dennison [1991] classified HCMV strains into four variant groups by PCR-RFLP. The hypervariability of the gB region is well established and the correlation between gB and pathogenicity has been examined without any obvious relationship being found [Meyer-König et al., 1998b; Lurain et al., 1999; Lukacs et al., 2001; Humar et al., 2003]. No correlation was found between gB genotype and the type of disease, but the numbers of subjects analyzed in the current study were small. In addition, we do not know the distribution of gB genotypes among healthy persons living in the Sapporo region.

In this study, the gB group 4 isolate was very uncommon (0 of all isolates), which phenomenon has now been observed among HCMV strains isolated in USA and Germany [Meyer-König et al., 1998; Xanthakos and Schleiss, 2003]. Therefore, this may reflect the recent epidemiologic appearance of gB 4 strains, or differences in infectivity or virulence. Further investigations will be needed to elucidate these questions.

In the present study, three genes of HCMV field strains were investigated and great variability in each gene was observed, however there was no correlation between variations. This implies that study of a single gene is inadequate for investigating the molecular epidemiology of HCMV. The infection and pathogenesis of an individual HCMV strain may be defined by the combination of multiple variant genes that it encodes. The genomic variability of HCMV is important to efforts to develop a HCMV vaccine [Plotkin, 1999]. This study provides some basic data on the genetic variability of HCMV in an Asian population and should help to determine the optimal strains for vaccine development.

REFERENCES

- Adler SP, Starr SE, Plotkin SA, Hempfling SH, Buis J, Manning ML, Best AM. 1995. Immunity induced by primary human cytomegalovirus infection protects against secondary infection among women of childbearing age. *J Infect Dis* 171:26–32.
- Bale JF, Jr., Petheram SJ, Souza IE, Murph JR. 1996. Cytomegalovirus reinfection in young children. *J Pediatr* 128:347–352.
- Bale JF, Jr., Murph JR, Demmler GJ, Dawson J, Miller JE, Petheram SJ. 2000. Intrauterine cytomegalovirus infection and glycoprotein B genotypes. *J Infect Dis* 182:933–936.
- Bale JF, Jr., Petheram SJ, Robertson M, Murph JR, Demmler G. 2001. Human cytomegalovirus α sequence and UL144 variability in strains from infected children. *J Med Virol* 65:90–96.
- Benedict CA, Butrovich KD, Lurain NS, Corbeil J, Rooney I, Schneider P, Tschoep J, Ware CF. 1999. A novel viral TNF receptor superfamily member in virulent strains of human cytomegalovirus. *J Immunol* 162:6967–6970.
- Boger RA, Willoughby RE, Pass RF, Zong JC, Jang WJ, Alcendor D, Hayward GS. 2002. Polymorphisms of the cytomegalovirus (CMV)-encoded tumor necrosis factor- α and β -chemokine receptors in congenital CMV disease. *J Infect Dis* 186:1057–1064.
- Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF. 1999. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics* 104:55–60.
- Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. 2001. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Eng J Med* 344:1366–1371.
- Cha TA, Tom E, Kemble GW, Duke GM, Mocarski ES, Spaete RR. 1996. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J virol* 70:78–83.
- Chou S, Dennison KM. 1991. Analysis of interstrain in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes. *J Infect Dis* 163:1229–1234.
- Clarke LM, Duerr A, Feldman J, Sierra MF, Daidone BJ, Landesman SH. 1996. Factors associated with cytomegalovirus infection among human immunodeficiency virus type 1-seronegative and -seropositive women from an urban minority community. *J Infect Dis* 173:77–82.
- Demmler GJ. 1999. Congenital cytomegalovirus infection and disease. *Semin Pediatr Infect Dis* 10:195–200.
- Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. 1992. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Eng J Med* 326:663–667.
- Humar A, Kumar D, Gilbert C, Boivin G. 2003. Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B genotypes and response to antiviral therapy, in solid-organ-transplant recipients with CMV disease. *J Infect Dis* 188:581–584.
- Lukacsi A, Tarodi B, Endreffy E, Babinszki A, Pal A, Pusztai R. 2001. Human cytomegalovirus gB genotypes 1 is dominant in congenital infections in south Hungary. *J Med Virol* 65:537–542.
- Lurain NS, Kapell K, Huang DD, Short JA, Paintsil J, Winkfield E, Benedict CA, Ware CF, Bremer JW. 1999. Human cytomegalovirus UL144 open reading frame: Sequence hypervariability in low-passage clinical isolates. *J Virol* 73:10040–10050.
- Meyer-König U, Vogelberg C, Bongarts A, Kampa D, Delbruk R, Wolff-Vorbeck G, Kirste G, Haberland M, Hufert FT, Laer D. 1998a. Glycoprotein B genotype correlates with cell tropism in vivo of human cytomegalovirus infection. *J Med Virol* 54:75–81.
- Meyer-König U, Haberland M, Laer D, Haller O, Hufert FT. 1998b. Intragenic variability of human cytomegalovirus glycoprotein B in clinical strains. *J Infect Dis* 177:1162–1169.
- Murph JR, Souza IE, Dawson JD, Benson P, Petheram SJ, Pfab D, Gregg A, O'Neill ME, Zimmerman B, Bale JF, Jr. 1998. Epidemiology of congenital cytomegalovirus infection: Maternal risk factors and molecular analysis of cytomegalovirus strains. *Am J Epidemiol* 147:940–947.
- Noyola DE, Demmler GJ, Williamson D, Griesser C, Sellers S, Llorente A, Littman T, Williams S, Jarrett L, Yow MD, The congenital CMV longitudinal study group. 2000. Cytomegalovirus urinary excretion and long term outcome in children with congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 19:505–510.
- Numazaki K, Ikehata M, Chiba S. 2000. Subtyping of cytomegalovirus strains obtained from immunocompetent children. *In Vivo* 14:745–746.
- Plotkin SA. 1999. Vaccination against cytomegalovirus, the changeling demon. *Pediatr Infect Dis J* 18:313–326.
- Rasmussen L, Geissler A, Winters M. 2003. Inter- and intragenic variations complicate the molecular epidemiology of human cytomegalovirus. *J Infect Dis* 187:809–819.
- Schleiss MR. 2003. Vertically transmitted herpesvirus infections. *Herpes* 10:4–11.
- Shiu SY, Chan KM, Lo SK, Ip KW, Yuen KY, Health RB. 1994. Sequence variation of the amino-terminal antigenic domains of glycoprotein B of human cytomegalovirus strains isolated from Chinese patients. *Arch Virol* 137:133–138.
- Tanaka N, Kimura H, Morishima T. 1998. Progress in the management of cytomegalovirus (CMV) infection. *Jpn J Clin Med* 56:167–172 (in Japanese).
- Walker A, Petheram SJ, Ballard L, Murph JR, Demmler GJ, Bale JF, Jr. 2001. Characterization of human cytomegalovirus strains by analysis of short tandem repeat polymorphisms. *J Clin Microbiol* 39:2219–2226.
- Xanthakos SA, Schleiss MR. 2003. Glycoprotein B genotyping of cytomegalovirus strains isolated in a pediatric population. *Pediatr Infect Dis J* 22:462–463.
- Zaia JA, Howkins GG, Churchill MA, Blackshere AM, Pande H, Adler SP, Schmidt GM, Forman SJ. 1990. Comparative analysis of human cytomegalovirus α -sequence in multiple clinical isolates by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assays. *J Clin Microbiol* 28:2602–2607.

Respiratory tract infections due to *Chlamydia trachomatis* in early neonatal period

Kei Numazaki¹⁾, Hideomi Asanuma^{1,2)} and Yuichi Niida^{1,2)}

¹⁾ Department of Pediatrics, Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo, Japan

²⁾ Hokkaido Children's Hospital and Medical Center Otaru, Otaru, Japan

Introduction

Chlamydia trachomatis has been recognized as a pathogen of nongonococcal urethritis (NGU), salpingitis, endocervicitis, pelvic inflammatory disease (PID), inclusion conjunctivitis of neonates, follicular conjunctivitis of adults, infantile pneumonia and associated conditions¹⁾. Genital or ophthalmic chlamydial infections are still recognized as a major public health problem throughout the world including Japan.

Pneumonia due to *C. trachomatis* is a disease limited for the most part to infants less than 6 months of age. It has been suggested that *C. trachomatis* infection in pregnant women may be related to premature labor and to perinatal death. Although transmission of the organism from mothers to their infants generally occurs at the time of delivery with passage of the infant through the infected cervix, the possibility of intrauterine infection at late pregnancy has been reported^{2,3)}.

Reported below are the cases of *C. trachomatis* respiratory tract infections in early neonatal period with the possibility of intrauterine infection.

Materials and methods

1. Patients

Case 1 was a female born by vaginal delivery after 39 weeks' gestation with a birth weight 2,605 g ; Case 2 was also a female born after 40 weeks' gestation by Caesarean section because of fetal distress with a birth weight of 3,025 g. No asphyxia was found at birth and there was no episode of premature rupture of membrane (PROM).

Tachypnea or cyanosis developed days 3 and 13 in Case 1 and 2 respectively. Case 3 was a male born by vaginal delivery after 37 weeks' gestation with a birth weight of 2,982 g ; Case 4 was a female born after 33 weeks' gestation also by vaginal delivery

with a birth weight of 2,265 g. There was an episode of meconium-stained amniotic fluid with Case 3. Chorioamnionitis was found in the placenta of Case 4. Wheeze and tachypnea developed within one day after delivery. Case 5 was a female born after 37 weeks' gestation also by vaginal delivery with a birth weight of 3,714 g. Tachypnea and cyanosis developed from day 1 in Case 5.

Chest radiographs of Cases 1, 2, 3 and 4 on admission showed streaky shadows and reticulogranular infiltrates over whole lung without hyperinflation. That of Case 5 on admission showed streaky shadow over the whole lung without hyperinflation. Blood examination of Cases 1 and 2 revealed increased C-reactive protein (13.1 and 6.5 mg/dL) and hyperleukocytosis (18,700 and 31,200/ μ L) without eosinophilia.

Blood examination of Cases 3 and 4 revealed normal or slightly increased C-reactive protein (0.10 and 0.00 mg/dL) and hyperleukocytosis (38,500/ μ L) in Case 4. Bacterial cultures from throat, urine, blood, feces and cerebrospinal fluid were all negative. Human cytomegalovirus (CMV) was isolated from urine of Case 5. Serum IgG and IgM antibodies against CMV were detected from maternal and infantile sera. Blood examination revealed increased C-reactive protein (2.90 mg/dL) and hyperleukocytosis (20,800/ μ L) without eosinophilia.

2. Microbiological Methods

Nasopharyngeal specimens were collected from the five infants within 2 weeks after birth for antigen detection and the polymerase chain reaction (PCR) study. Endocervical swabs of mothers during pregnancy were also obtained. The PCR assay to amplify *Omp 1* gene and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis were used to detect and distinguish serotypes from genotypes of *C. trachomatis*^{4,5}. At the first step, 1.4 kbp DNA fragment that is larger than a full length of the *Omp 1* gene was amplified. At the second step for nested PCR, 1.2 kbp DNA fragment, a full length of *Omp 1* gene was amplified. Genotyping was performed by *Hinf* I, *Hind* III and *Hha* I restriction analysis of amplified *Omp 1*.

A commercially available EIA kit was also used to detect genus-specific chlamydial antigens^{6,7}. Maternal serum, infantile serum and cord blood samples were obtained for standard microimmunofluorescence (MIF) assay to detect IgG and IgM antibodies against *C. trachomatis*.

Table 1 Clinical and laboratory findings of five cases

Case	1	2	3	4	5
Sex	F	F	M	F	F
Gestational age (weeks)	39	40	37	33	37
Birth weight (g)	2,605	3,025	2,982	2,265	3,714
Mode of delivery	Vaginal	Caesarean	Vaginal	Vaginal	Vaginal
Apgar score at 1 min after birth	9	8	7	8	7
Age at onset (days after birth)	3	13	1	0	1
Symptoms at onset	Tachypnea	Cyanosis	Wheeze	Tachypnea	Tachypnea
Nasopharyngeal chlamydial antigen	+	+	+	+	+
Nasopharyngeal chlamydial DNA	+	+	+	+	+
Specific serum IgM antibodies					
Cord blood	1 : 128	< 1 : 16	< 1 : 16	1 : 32	1 : 32
21 days after birth	1 : 64	1 : 32	1 : 32	1 : 16	< 1 : 16

Table 2 Maternal microbiological findings during pregnancy

Mother of Case	1	2	3	4	5
Premature rupture of membranes	no	no	no	no	no
Findings of placenta	unknown	unknown	unknown	Chorio- amnionitis	normal
Presence of endocervical chlamydial antigen	no	no	no	no	no
Serum antibodies to <i>C. trachomatis</i> (20 weeks' gestation)					
IgG	1 : 256	not tested	not tested	1 : 256	1 : 256
IgM	< 1 : 16	not tested	not tested	1 : 64	< 1 : 16

Results

Diagnosis of *C. trachomatis* infection was made by antigen detection or PCR assay in nasopharyngeal swabs and by the presence of specific serum IgM antibodies by MIF. The serovar that we identified from nasopharyngeal swabs of these infants was type E only. Treatment with ampicillin and amikacin was initiated without success. Respiratory tract symptoms and radiological appearance improved gradually after oral clarithromycin administration (15 mg/kg per day) for total of 14 to 28 days respectively. Clinical and laboratory findings of the five cases are summarized in Table 1. We also examined mothers of the five infants for *C. trachomatis* infections. These mothers had negative chlamydial EIAs during pregnancy (Table 2).

Discussion

C. trachomatis infections during pregnancy may cause a variety of perinatal complications. Low-birth-weight infants and PROM occurred more frequently in women infected with *C. trachomatis*. The fact that neonates having the symptoms of chronic lung diseases also manifested elevated serum IgM levels suggested that these respiratory-tract disorders arose from intrauterine infections during late pregnancy⁸⁾. *C. trachomatis* can lead to chorioamniotic infection. Chorioamnionitis is a frequent finding in prematurity and respiratory insufficiency in premature babies and may be attributable to intrauterine infection.

We evaluated the significance of detection of serum antibodies to *C. trachomatis* by ELISA at different time of pregnancy for early diagnosis of perinatal complications⁹⁾. The incidence of perinatal complications was significantly higher in IgG and IgA antibodies-positive pregnant women at 30 weeks of gestational age. This fact may also indicate maternal acquisition of re- or new chlamydial infection in later part of pregnancy. Intrauterine *C. trachomatis* infections acquired near the time of labor were considered to be associated with perinatal complications.

The serovars that we identified from Japanese infants and pregnant women were similar to those reported in other studies from non-trachoma-endemic areas and were thought to be mainly urogenital tract-origin^{4,5)}. Similar results were also obtained from the study of adult inclusion conjunctivitis in Japan¹⁰⁾. Even some of serovars originally associated with endemic trachoma are occasionally detected in urogenital infection. Antigenic variations of *C. trachomatis* were found among the strains from nasopharyngeal, conjunctival and endocervical origins.

Erythromycin and clarithromycin were thought to be not toxic for fetuses and effective for the treatment of endocervical infection of *C. trachomatis*. Some serological variants of *C. trachomatis* may have different pathogenicity or drug-sensitivity from classic serotypes. Early diagnosis and appropriate treatment of chlamydial infections may reduce perinatal complications. Antigen detection of *C. trachomatis* from the endocervix has been utilized widely for the purpose of the screening of chlamydial infections during pregnancy. These tests are easily performed and less costly but have lower sensitivities than culture and have low positive predictive values in low prevalence populations such as Japan¹¹⁾.

Time of onset of respiratory tract symptoms of the five infants in the present study was within 2 weeks after birth. One infant was born by Caesarean section. Diagnosis of

neonatal chlamydial infections was obtained by antigen or DNA detection from nasopharyngeal swabs and by detection of serum IgG and IgM antibodies to *C. trachomatis*^{2,3)}. However, chlamydial antigen was not detected from any endocervical specimens of mothers.

Control programs emphasizing early diagnosis, targeted screening, and effective treatment will have led to an eventual decline in the incidence of chlamydial infections^{12,13)}. Entirely new approaches to prevention and treatment of chlamydial infections in infants seem to be necessary, including antimicrobial interventions and the development of a vaccine strategy.

References

- 1) Numazaki K, Wainberg MA and McDonald J : *Chlamydia trachomatis* infections in infants. Can. Med. Assoc. J. 1989 ; 140 : 615-622.
- 2) Niida Y, Numazaki K, Ikehata M, Umetsu M, Motoya H and Chiba S : Two full-term infants with *Chlamydia trachomatis* pneumonia in the early neonatal period. Eur. J. Pediatr. 1998 ; 157 : 950-951.
- 3) Numazaki K and Niida Y : Two cases of intrauterine *Chlamydia trachomatis* infection. Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter 2000 ; 18 : 6-8.
- 4) Ikehata M, Numazaki K and Chiba S : Analysis of *Chlamydia trachomatis* serovars in endocervical specimens derived from pregnant Japanese women. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2000 ; 27 : 35-41.
- 5) Numazaki K, Ikehata M, Chiba S, Suzuki K and Hashimoto N : Unclassified serovars of *Chlamydia trachomatis* isolated from Japanese infants. Clin. Microbiol. Infect. 1998 ; 4 : 519-523.
- 6) Numazaki K and Chiba S : Diagnostic value of rapid detection of *Chlamydia trachomatis* by using amplified enzyme immunoassay in infants with respiratory infections. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1993 ; 17 : 233-234.
- 7) Numazaki K, Chiba S, Niida Y, Komatsu M and Hashimoto N : Evaluation of diagnostic assays for neonatal and infantile chlamydial infections. Tohoku J. Exp. Med. 1993 ; 170 : 123-129.
- 8) Numazaki K, Chiba S, Kogawa K, Umetsu M, Motoya H and Nakao T : Chronic respiratory disease in premature infants caused by *Chlamydia trachomatis*. J. Clin. Pathol. 1986 ; 39 : 84-89.
- 9) Numazaki K, Ikehata M, Akashi E, Kusaka T and Chiba S : Seropositivity to *Chlamydia trachomatis* during pregnancy and perinatal complications. J. Infect. Chemother. 1998 ; 4 : 28-31.
- 10) Numazaki K : Oculogenital transmission of *Chlamydia trachomatis*. Int. Med. J. 2000 ; 7 : 61-62.
- 11) Numazaki K, Niida Y and Chiba S : Antigen detection of *Chlamydia trachomatis* from the

- endocervix is not enough for screening of perinatal complications. Am. J. Obstet. Gynecol. 1997 ; 174 : 951-952.
- 12) Numazaki K, Ikehata M, Chiba S and Aoki K : Reduction of trachoma in absence of a disease-control programme. Lancet 1997 ; 350 : 447-448.
 - 13) Numazaki K : Current problems of *Chlamydia trachomatis* infections in Japan. Int. Med. J. 1999 ; 6 : 69-74.

3. 市民(親や子)教育/啓蒙・コミュニケーション

—麻疹根絶に向けての取り組みを中心に—

国立感染症研究所 ウイルス第三部 麻疹室室長

沼 崎 啓

小児科臨床別刷

58：2005—12月号

3. 市民（親や子）教育/啓蒙・コミュニケーション

—麻疹根絶に向けての取り組みを中心に—

国立感染症研究所 ウイルス第三部 麻疹室室長 ぬま 沼 ざき 崎 けい 啓

KEY WORDS ▶ 麻疹根絶, 予防接種, 市民教育/啓蒙

はじめに

麻疹は現在でも、世界中で発展途上国を中心に毎年3,000万人以上の罹患患者と87万5千人の死亡例（致死率3～5%）が発生しているものと推計されている¹⁾²⁾。WHOは国連児童基金、米国CDCとともに2000年に「麻疹による死亡率の減少と地域的な排除のための世界麻疹排除対策戦略計画」を策定した。すでに南北アメリカ大陸、ヨーロッパ、南アフリカや中近東の一部の国々では、徹底的なワクチン接種と監視活動（サーベイランス）を実施してほぼ根絶に近い状態が達成されつつある。

日本を含むWHO西太平洋地域（WPRO）は最も対策の遅れた地域とされ、麻疹根絶の目標達成時期さえも設定されていない状況にあったが、現在2012年を一応の達成目標とする案が検討されている。わが国でも平成18年4月1日から予防接種法に基づく麻しんおよび風しんに係わる定期の予防接種において乾燥弱毒生麻しん風しん混合ワクチンの2回接種が実施されることになった。

本稿では世界的な麻疹根絶に向けての取り組みを中心に、感染制御の観点から市民（親

や子）教育/啓蒙・コミュニケーションについて記載する。

1. 疾病としての麻疹の概要

1. 麻疹ウイルスと病原性

麻疹ウイルスは paramyxovirus 科 morbillivirus 属に属し、直径100～250nmのエンベロープを有する一本鎖 RNA ウイルスである。AからHのタイプに分類され、現在 genotype は22種類報告されており、ワクチン株はAである。麻疹ウイルスのレセプターは1993年に補体調節蛋白であるCD46 (membrane cofactor protein) と発表された³⁾。CD46はヒトのすべての有核細胞に発現しており、サルではよく似たホモログが赤血球にも認められるため、麻疹ウイルスのサル赤血球凝集反応が起こると説明されていた。2000年、Tatsuo ら⁴⁾により新たなレセプターとしてリンパ組織系に特異的に発現するSLAM (signaling lymphocyte activation molecule; CD150) の存在が報告された。SLAMは未熟胸腺細胞、活性化されたリンパ球・単球、成熟樹状細胞に発現し、リンパ球の活性化とIFN- γ 産生制御を誘導すると報告されている。

エンベロープ蛋白のうち、主にF (fusion) 蛋白とH (hemagglutinin) 蛋白が麻疹の病原性に関与するが、F 蛋白はウイルスと宿主細胞の膜融合を引き起こし、宿主細胞へのウイルスの侵入を可能にすることが知られている。1980年代の流行から明らかになったH 遺伝子の変異は、1990年代になってF 遺伝子に及んでいる。

最近の流行株は1950年代の株との間にH 遺伝子で50～60塩基（アミノ酸では16～18カ所）、F 遺伝子では30～33塩基（アミノ酸で2～3カ所）に置換が起こっている。わが国で分離された麻疹ウイルスの遺伝子型は、2001年にはD5 型（沖縄ではD3 型）が大部分で、中国や韓国の分離株の主流であるH1 型は川崎と東京で分離されていたにすぎなかった。しかし、2002～2003年は全国各地でH1 型が分離された。

麻疹ウイルスは後述のカタル期の患者よりの飛沫、鼻汁などを介して気道、鼻腔および眼の粘膜上皮に感染する。麻疹ウイルスは感染後2～4日間、気道粘膜上皮の局所で増殖した後にリンパ球、マクロファージなどに感染して所属リンパ節に運ばれ、そこで増殖する。ウイルスはその後、白血球に感染したまま血流中に入り第一次ウイルス血症をきたす。ウイルス感染は侵入門戸付近から全身のリンパ節に拡大し、第二次ウイルス血症を生じ、臨床症状が出現する。感染力が強く、初感染時の不顕性感染は通常なく、一過性の免疫抑制状態を誘導する。ツベルクリン反応減弱などの細胞性免疫能の低下と、それに伴う細菌の二次感染による合併症、結核の顕性化は古くよりよく知られている。ウイルスは熱、紫外線、酸、アルカリ、エーテル、クロロホルムによって速やかに不活化される。空気中や物体表面では存在時間は短い。

2. 麻疹の臨床像

i) 前駆期（カタル期）

麻疹は一般に感染後10～12日の潜伏期を経

て発症する。38℃前後の発熱が2～4日間続き、倦怠感や不機嫌をが続き、咳嗽、鼻漏、くしゃみなどの上気道症状と結膜充血、眼脂、羞明などの結膜炎症状が出現する。乳幼児では下痢、腹痛などの消化器症状を伴うことも多い。特徴的な発疹出現の1～2日前に頬粘膜の臼歯対面にコプリック斑と呼ばれるやや隆起し紅暈に囲まれた約1mm径の白色小斑点が出現する。コプリック斑の確認は診断的価値が高いが、発疹出現後2日目の終わりまでに消失する。口腔粘膜は発赤し、口蓋部には粘膜疹がみられ、しばしば溢血斑を伴う。

ii) 発疹期

カタル期での発熱が1℃程度下降した後、半日くらいうちに再び二峰性発熱と呼ばれる39.5℃以上の高熱が出現する。同時に特徴的な発疹が耳後部、頸部、前額部より出現し、翌日には顔面、体幹部、上腕におよび、2日後には四肢末端にまで拡大する。発疹が全身に広がるまでは39.5℃以上の高熱が3～4日間持続する。発疹は当初、鮮紅色扁平であるが、まもなく皮膚面より隆起し、融合して不整形斑状の斑丘疹となる。また発疹は指圧によって退色し、一部には健常な皮膚を残す。その後発疹は暗赤色となり、出現の順序で退色する。発疹期には上気道、結膜炎症状は一層強くなり、特有のいわゆる麻疹様顔貌を呈する。

iii) 回復期

発疹出現後3～4日間続いた発熱も回復期に入ると解熱し、全身状態が改善する。発疹は退色し、色素沈着がしばらくの間残り、僅かの糠様落屑を認める。合併症のないかぎり、発症後7～10日には回復する。患者の気道からのウイルス分離は、前駆期（カタル期）の発熱時から可能となるが、発疹の色素沈着以後は分離されない。感染力はカタル期が最も強い。

iv) 合併症

麻疹の二大死因は肺炎と脳炎であり、5歳以下あるいは20歳以上で多い。合併症は年少ほど死に至る危険性が高い。ウイルス性肺炎は病初期に認められるが、発疹期を過ぎても解熱しない場合には細菌性肺炎を考慮すべきとされる。起因菌としては、肺炎球菌、インフルエンザ菌、化膿レンサ球菌、黄色ブドウ球菌などが多い。巨細胞性肺炎は成人の一部、あるいは細胞性免疫不全状態時にみられる特徴的な肺炎である。一般に予後不良であり、死亡例も多い。

中耳炎は麻疹患者の約5～15%にみられる最も多い合併症の一つである。細菌の二次感染により生じる。乳様突起炎を合併することもある。喉頭炎および喉頭気管支炎の合併症も多い。心筋炎、心外膜炎を合併することもある。麻疹の経過中半数以上に、一過性の非特異的な心電図異常がみられる。

1,000例に0.5～1例に脳炎などの中枢神経系合併症を発症する。発疹出現後2～6日に発症することが多いが、麻疹の重症度と脳炎発症には相関はない。患者の約60%は完全に回復するが、20～40%に精神発達遅滞、けいれん、行動異常、神経嚢、片麻痺、対麻痺などの後遺症を残し、致死率は約15%である。

亜急性硬化性全脳炎 (subacute sclerosing panencephalitis, SSPE) は麻疹ウイルスに感染後、学童期などに発症する特徴的な中枢神経疾患である。知能障害、運動障害が徐々に進行し、ミオクローヌスなどの錐体・錐体外路症状を示す。発病までの期間は、麻疹罹患例で平均7年を要し、麻疹ワクチン接種例では平均3年で発病する。麻疹ウイルスの中枢神経系細胞における持続感染により生じるが、本態は不明である。

麻疹初感染時の症状はほとんどが軽症であるが、その後もウイルスのM (matrix) 蛋白、H蛋白、F蛋白の発現に欠損が認められる欠損ウイルス粒子として存在し続ける。in situ reverse transcriptase-PCR (in situ

RT-PCR) により、ウイルス RNA が患者の神経系細胞や血管内皮細胞から検出されたという報告もある。発症から平均6～9カ月で死の転帰をとることもある。発生頻度は、麻疹罹患患者10万人に1人、麻疹ワクチン接種者100万人に1人である。診断は、麻疹の既往歴の確認、血清中の麻疹抗体価 (HI, CF 抗体価) の異常高値 (> 1 : 1280)、髄液中の麻疹抗体の検出などによる。

3. 特殊な麻疹の病型

i) 修飾麻疹 (modified measles)

不十分な免疫下に麻疹ウイルスが感染した場合は軽症の不全型麻疹を発症することがある。潜伏期が14～20日に延長し、前駆期症状は軽微か欠落し、コプリック斑は出現しないことが多い。発疹は急速に出現するが、融合しない。通常合併症はなく、経過も短い。要因としては、移行抗体の残存、 γ -グロブリン投与、secondary vaccine failure (SVF) 状態などがある。

ii) 異型麻疹 (atypical measles)

現行の麻疹ワクチン接種以前は、生ワクチンの発熱率が高く、不活化ワクチンと併用されていた時期があった。不活化ワクチン接種2～4年後に自然麻疹に罹患した際に異型麻疹がみられることがある。4～7日続く39～40℃台の発熱、肺炎、肺浸潤と胸水貯溜、発熱2～3日後に出現する特徴的な非定形発疹が主な症状で、コプリック斑を認めることは少ない。全身症状は1週間くらいのうちに好転し、発疹は1～3週で消退する。回復期の麻疹 HI 抗体価は通常の麻疹に比して著明な高値をとる。

4. 麻疹の診断と治療

ウイルス分離、麻疹特異的 IgM 抗体の検出、急性期と回復期のペア血清での麻疹 IgG 抗体の有意な上昇の確認によって実験室内診断は可能である。わが国では臨床症状のみで診断することが多かったが、抗体測定には、赤血球凝集抑制法 (hemagglutination inhi-

bition: HI), 中和法, ゼラチン粒子凝集法 (particle agglutination: PA), ELISA 法などが用いられている⁵⁾。ウイルスは通常, 咽頭拭い液, 血液などから分離され, カタル期から発疹出現後3日以内の分離率が高い。

ウイルス分離には従来ヒト腎細胞や Vero 細胞を用いて行われてきたが, 細胞変性効果 (CPE) が出現するまでに数週間を必要とした。マーモセットの B 細胞を EB ウイルスでトランスフォームした B95a 細胞⁶⁾や SLAM 遺伝子を組み込み, 発現させた Vero/SLAM 細胞⁴⁾ではウイルス野生株が高率に早期より分離される。麻疹では特異的な治療法は確立されていない。

II. 麻疹の予防とワクチン

麻疹の感染力は極めて強く, 度々集団発生を引き起こしてきた。麻疹は学校保健法に基づく第二種の伝染病に属し, 登校基準としては, 「発疹に伴う発熱が解熱した後3日を経過するまで出席停止とする」とされている。

国内の麻疹ワクチンは, 1966年から, 不活化ワクチン (K: killed vaccine) と生ワクチン (L: live vaccine) の併用法 (KL 法) によって接種が開始された。これは L ワクチン接種前に K ワクチンを接種することにより発熱の軽減化などが考えられたためである。K ワクチンによって感作された後に自然麻疹に罹患したときに, 異型麻疹の発生が問題となった。また, K ワクチンを先に接種することにより L ワクチンによる抗体獲得が得られない場合があることなどから, KL の併用は中止となった。

1969年以降は高度弱毒生ワクチン (FL: further attenuated live vaccine) の単独接種に切り替えられた。1978年から開始された定期麻疹ワクチン接種は FL ワクチンが採用された。現在わが国で市販されているワクチンは, 武田薬品工業の Schwarz-FF8 株, 北里研究所の AIK-C 株, 阪大微研の CAM

株, 千葉血清研の TD97 株の4社由来株ワクチンである。Enders の分離した Edmonston 株由来の AIK-C 株, Schwarz-FF8 株と, 阪大微研で分離した田辺株由来の CAM 株, TD97 株を起源としており, 最終製品はニワトリ胎児胚細胞 (CE 細胞) で増殖したウイルスを含む培養上清を精製して作られている。これらのワクチンは凍結乾燥品であり, 使用時添付の溶解液 (蒸留水) 0.7ml で溶解後, 0.5ml (力価5,000TCID₅₀/0.5ml以上) を皮下接種する。

その後, 安定剤として含まれていたゼラチンがアナフィラキシーショックを含む重篤なアレルギー反応の原因となることが判明し, 1996年から1998年にかけて除去あるいは低アレルギー性ゼラチンへの変更等の改良が加えられた。

1989年, わが国においても MMR ワクチン (統一株) が導入され, 定期接種のワクチンとして麻しんワクチン, MMR ワクチンのどちらを接種してもよいことになった。ところが, MMR ワクチン中に含まれるおたふくかぜワクチン株による無菌性髄膜炎の多発が問題となり, 製造メーカー独自の株を使用した自社株 MMR ワクチンへの切り替えが行われた。これも無菌性髄膜炎多発の解決には繋がらず, MMR ワクチンは1993年に接種中止となった。

現行麻しんワクチンによる免疫獲得率は95%以上と報告されている。接種後の反応としては発熱が約20~30%, 発疹は約10%に認められる。いずれも軽症であり, ほとんどは自然に消失する。

1歳前にワクチン接種を受けた場合は, 1歳以降に再接種 (この場合は定期接種として実施) する必要がある。また, γ グロブリンを投与された後は, 6カ月未満の乳児と同様の理由で効果が得られないため, 3カ月間は接種を行わない。川崎病などの治療で大量療法を受けた場合には, 6カ月間あける必要が

表1 感染症法に基づく麻疹に関する報告のための基準

○診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ、以下の3つの基準をすべて満たすもの。
1. 全身の発疹(回復期には色素沈着を伴う)
2. 38.5℃以上の発熱
3. 咳嗽、鼻汁、結膜充血などのカタル症状 なお、コプリック斑の出現は診断のための有力な所見となる
○上記の基準は必ずしも満たさないが、診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ、病原体診断や血清学的診断によって当該疾患と診断されたもの。

ある。

2003年の「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」(感染症法)改正に伴い、麻疹は4類感染症から5類感染症に分類変更になった。全国約3,000カ所の小児科定点より毎週報告がなされているが、報告のための基準は表1の通りである。

III. WHOの麻疹根絶計画と対策の現状

WHOは、毎年世界で3,000万人以上の麻疹患者と875,000人の麻疹による死亡者が発生しているものと推計している。この死亡数は、全世界の感染症による死亡数14,025,000人のうち、6.24%を占め、単独の病原体としては最大の死亡原因である。

2000年、全世界において麻疹による死亡率を低下させるために、WHOは国連児童基金(UNICEF)、米国疾病管理予防センター(CDC)とともに、「麻疹による死亡率減少と地域的な排除のための世界麻疹排除対策戦略計画(Global Measles Strategic Plan for Measles Mortality Reduction and Regional Elimination)」を策定した¹⁾。具体的な目標を設定し、死亡率減少と地域的な排除のための活動を進めるための枠組みを示し、1回目の

麻しんワクチン接種に加えて、補足的な予防接種活動として、すべての小児に2回目の接種機会を与えることを勧奨している。これにより、これまで接種を受けなかったかあるいは1回目の接種で免疫を獲得しなかった児のすべてに対して麻疹に対する免疫をつけることが可能である。また、この対策活動を行うにあたり、風疹の予防接種およびサーベイランス活動を組み入れていくことが勧奨されている。

現在わが国は、中国、インド、その他の途上国とともに、第一段階である制圧(control)期に含まれている。オーストラリアなどのオセアニア諸国の多くは第二段階の集団発生予防(outbreak prevention)期に、またアメリカ大陸、ヨーロッパ、南アフリカや中近東の一部は、すでに排除(elimination)期としての対策が進んでいる。

米国、カナダなど内因性の麻疹伝播を排除している国では、ワクチン接種率が95%を超えている(米国のデータは2回接種の接種率が91%、1回接種の接種率は96%)。この高い接種率は入学・入園時での麻しんワクチン接種がその条件として要求されていることが大きいと考えられる。これらの国での患者発生はほとんどが輸入例であり、米国の輸入例中第一位は日本からの輸入例である⁷⁸⁾。

イギリス、フランス、イタリア、ドイツなどでも、ワクチン接種の方針はMMRワクチンの2回接種であるが、その接種率は80~90%で、年間の麻疹患者は数千から一万人程度の発生があり、毎年10人までの死亡が報告されている(表2)。

途上国においては、まず可能な限り定期接種において、1回のワクチン接種を徹底することを目標としている。しかし、2回接種方針をとっても定期接種のみでは、全体の接種率を上げることは不可能である。そこで補足的予防接種キャンペーンを行い、対象期間中、対象地域におけるすべての小児に対して

表 2 先進国での麻疹患者発生数と予防接種率

国 名	接種方法	接 種 率	患 者 数	死亡数
米 国	MMR 2 回接種	91% (19~35カ月児, 2 回接種) 以前の 1 回接種の接種率は96%	100人 人口10万当たり 0.04	2001年 2 人
カ ナ ダ	MMR 2 回接種	96% (2 歳児における接種率)	28人(確定診断例, 1999年)	データなし
イギリス	MMR 2 回接種	88% (1999/2000年に 2 歳になる児のコホート)	72人(確定診断例, 2001年)	2 人
フランス	MMR 2 回接種	84.2% (2 歳児 2000年) 90% (6 歳児 2001年)	10,000人(推計値 2000年)	10人以下
ド イ ツ	MMR 2 回接種	84.6%	人口10万当たり 46.8	データなし
イタリア	MMR 2 回接種	80%程度 (2 歳児, 2000年)	人口10万当たり 60	7 人

麻しんワクチンを一斉接種することにより、予防接種率を上げようとしている。

2 回接種の目的は、1 回接種で免疫獲得が困難なもの (primary vaccine failure, PVF) に獲得させることと 1 回目で獲得された免疫を増強させる (学校等での集団発生を予防する) という 2 点である。その結果、1 回接種で免疫を獲得したが、年数の経過と共に免疫の低下が起こり修飾麻疹、非典型麻疹として発症する SVF に対してもある程度の効果が期待できる。

麻疹の潜伏期間中に出国した日本人海外旅行者が現地で発症した事例が報告され、日本は麻疹の輸出国であるとの不名誉な指摘も受けている。今後の問題点としては、SVF の増加、妊婦麻疹およびそれに関連する新生児麻疹の発生、流行地域への旅行時の罹患・再罹患などが考えられる。

これらの問題の解決のためには95%以上のワクチン接種率の向上後に適切な時期に麻しんワクチンを追加接種する必要がある。また麻しんワクチンの改良、次世代ワクチン開発のための研究を進めることも重要である。世界的には麻疹制圧 (control) から集団発生予防 (outbreak prevention), 排除 (elimination) にむけ目標が設定され、さらには根絶 (eradication) に関する議論がなされて

表 3 WHO が区分している麻疹排除に向かう各段階

- 第一段階：制圧 (control) 期
麻疹は恒常的に発生しており、頻回～時に流行が起こる状態、麻疹患者の発生、死亡の減少を目指す時期
- 第二段階：集団発生予防 (outbreak prevention)
期全体の発生を低く抑えつつ集団発生を防ぐことを目指す時期
- 最終段階：排除 (elimination) 期
国内伝播はほぼなくなり、根絶 (eradication) に近い状態

いる (表 3)。

1 歳未満の麻疹は死亡を含む重症化率が高いため、定期接種として、生後 9 カ月前後を麻しんワクチン接種対象年齢にしている国々が途上国を中心に少なくない。麻疹対策の進んでいない地域では、多くの乳児が麻疹患者と接触する可能性が高く、乳児への早期接種は乳児感受性者群の割合を減少させる効果が期待される。

麻疹罹患の危険性が少ない先進国では、1 歳以上を接種対象としている。WHO では、生後 9 カ月以下の児に罹患する可能性が高い流行状態であればあくまで一時的に、生後 6 カ月児からの乳児への接種も可能としてい

る。CDC では、麻疹に罹患する危険性が高ければ、生後6カ月より麻しんワクチン接種を行い得るとしているが、1歳未満で接種を受けた場合には生後12～15カ月で再接種を行うべきであるとしている。

Ⅳ. わが国の麻疹の現状と対策

わが国の年間患者数はこの10年間で明らかに減少しているものの、いまだに定点届け出数25,000人前後、推計で10～20万人程度の発生がある²⁾。年齢別報告数は、2歳以下が全報告数の半数を占めている。わが国の小児へのワクチン接種率は最近全国平均で80%に達したが、地域によっては50～60%と低い状況にある。麻疹に感染することなく、麻しんワクチン未接種のまま成長した成人も麻疹（成人麻疹）の増加も問題となっている。

わが国の麻疹患者は、2001年には年間28.6万人と推計され、米国の116人（2001年）と比較すると約2,500倍の発生率であった。2001年に報告された麻疹患者の年齢は、1歳23%、0歳15%、2歳10%で、0～2歳が報告患者の47%を占めたのに対し、2003年は、0歳は16%で変わらなかったものの1歳19%、2歳7.3%に減少した。3～9歳は不変であった。

年長児の麻疹の割合は2001年10～14歳11%、15～19歳3.5%、20歳以上2.1%であったのに対し、2003年はそれぞれ15%、6.3%、3.7%に増加した。1984年や1991年の流行後は、患者数が少なくなると1～4歳の割合が増加し5歳以上の割合が減少しているが、2001年の流行後は、2002年、2003年と患者数が減少したにもかかわらず、1、2歳の割合が減少して、5歳以上の割合が増加している。ゼラチン粒子凝集反応法（PA法、1：16以上陽性）による2002年度の1歳の麻疹抗体保有率は73.2%で、前年度（43.9%）に比べて上昇していたが、2003年度は61.9%と低下している。

1歳児の麻しんワクチン接種率も45%から78%に増加しており、2001年から始まった「1歳になったらすぐに麻しんワクチン接種を」のキャンペーンが功を奏したと考える。一方、0歳児の抗体陽性者は0～5カ月児で83%から67%、6～11カ月児で32%から14%に減少し、移行抗体の消失時期が早くなっていることが推定された。麻疹はこの10年間、春季を中心とする流行を繰り返してきたが、2004年は全国単位では、流行と呼べる程の発症者の増加はみられなかった。

現在のわが国では乳児が罹患するリスクは途上国と同程度に高いと思われるが、死亡率、重症化のリスクは先進国と同程度に低いと考えられる。わが国においても、麻疹流行時の生後6～11カ月児への予防接種は個人予防、集団予防の視点から緊急接種としての必要性が検討されるべきであるが、この年齢における現行ワクチンの効果および安全性は十分評価されてはいないのが現状である。平常時における乳児への接種の導入については更に継続的な検討が必要である。

平成18年4月1日から予防接種法に基づく麻疹および風疹に係わる定期の予防接種において乾燥弱毒生麻しん風しん混合ワクチンの2回接種が実施されることになった。麻しんおよび風しんワクチンの接種においては、予防接種法施行令で定める対象者は、第1期月齢12カ月～24カ月に達するまで、第2期5歳以上7歳未満で2期は就学1年前から就学前日までの間にあるものとされた。

経過措置としては平成18年4月1日前に麻しんまたは風しんのいずれか一方の単抗原ワクチンの定期接種を受けたものに関しては第2期の接種対象としないものとされた。平成18年4月1日以降に5歳以上7歳未満となるものでいずれの予防接種を受けていないものは第2期の予防接種の対象者となった。

特定の地域において、複数の麻疹患者が短期間に確認された場合には、急速な感染拡大

表 4 麻疹根絶のための WHO 認証麻疹研究・検査施設の役割

- 1) ウイルスの伝播の監視と証明
流行の確認, 流行初期の臨床診断の確認,
症例の確認, 実験室内診断に伴う確定診断
による認定, 麻疹ウイルス株の同定と分離
株の遺伝子的特徴の確認
- 2) 集団における感受性者の監視
予防接種推進に伴う麻疹感受性者の年齢分
布の確定, 広報活動と反響に関する評価
- 3) ワクチン接種後の有害事象に関する研究
- 4) 標準的実験室的手法による各国麻疹検査室
の評価
- 5) 各国麻疹検査室の技術維持のための講習会・
ワークショップ等の開催
- 6) 実験室間ネットワークおよび研究者間の情
報交換体制の構築

が懸念され、流行対策の措置が必要である。家庭や集団生活の場（保育園、幼稚園、学校、職場など）において麻疹に関する知識の普及をはかるとともに、患者と感受性者との接触を減らすように務めるなど、小児を取り扱う医療機関において麻疹の再認識を深める必要性も指摘されている。

同一集団から麻疹患者が発生した場合には、個人予防の視点から、成人を含む感受性者に対して麻しんワクチン接種、ガンマグロブリン製剤の緊急避難的投与等の迅速な感染防御対策も必要である。

V. 麻疹根絶における検査・研究施設の役割

麻しんワクチン接種後に野外ウイルスに暴露されると、症状は出現しないものの、感染することにより免疫力を保持あるいは高めるブースター効果があると考えられる。一時期のわが国のように、患者数がある程度減少した状況では、その機会が少なく、年長者の麻疹患者が増加する現象が認められる。これら

の対策として、前述のようにわが国でも MR ワクチンの 2 回定期接種が決定されたところである。

麻疹対策においてわが国は、自国の麻疹対策を見直し、WHO の麻疹根絶対策戦略計画による徹底的なワクチン接種と監視活動（サーベイランス）強化を推進し麻疹の排除、根絶を図る必要がある。このように麻疹ウイルスを効果的に封じ込め、根絶へと導くためには、ワクチンの二回接種とともに、疫学的監視体制とウイルス学および遺伝子学的特性に基づいた科学的監視体制の充実が不可欠である⁹⁾。

また西太平洋地域の各国に対し技術支援を行い、2012年根絶の目標達成にむけて国際的責務を果たす必要がある。元来、わが国の麻疹に関する基礎的研究レベルは世界のトップクラスとの評価を受けていたので、科学技術および研究成果の面でも西太平洋地域のみならず世界的貢献が期待されている。

国立感染症研究所麻疹室は、これまでの麻疹研究の実績から麻疹根絶の目標達成のための検査研究施設として、WHO の国家麻疹検査施設 (National Measles Laboratory)、地域麻疹レファレンス検査施設 (Regional Reference Laboratory)、世界麻疹特別検査施設 (Global Specialized Laboratory) の三つに指定されることになった。サーベイランスの中心研究施設である WHO 認証麻疹研究・検査施設としては表 4 の各事業を積極的に推進する必要がある。

国内の麻疹対策のためには中央および地方の公衆衛生担当者が、十分にサーベイランスを活用することも重要である。麻疹の流行的発生にあたっては、適正な疫学調査を行い、原因の検討、対策の立案、実施を行う必要がある。

おわりに

国内の麻疹対策はもちろんのことである

が、わが国は西太平洋地域の各国に対し技術支援を行い、2012年根絶の目標達成にむけて国際的責務を果たす必要がある。また科学技術および研究成果の面でも西太平洋地域のみならず世界的貢献も期待されている。

以上のことから、多数の麻疹野生株を収集し、そのゲノムの解析を進め、変異による病原体の構造や機能の変化、病原性の変化を解明するとともに、信頼度の高い迅速診断法ならびに有効性と安全性の高い新たなワクチンを開発する必要がある。麻疹根絶にむけての取り組みにおいて感染制御の観点から市民の教育、啓蒙活動が最も重要であることは言うまでもない。

文 献

- 1) World Health Organization. Progress in reducing global measles deaths : 1999-2002. Wkly Epidemiol Rec 79 : 13~24, 2004
- 2) 国立感染症研究所 感染症情報センター. 麻疹の現状と今後の麻疹対策について, 2002
- 3) Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD : The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). Cell 75 : 295~305, 1993
- 4) Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y. : SLAM (CDw 150) is a cellular receptor for measles virus. Nature 406 : 893~897, 2000
- 5) Helfand RF, Heath JL, Anderson LJ, Maes EF, Guris D, Bellini WJ : Diagnosis of measles with an IgM capture EIA : The optimal timing of specimen collection after rash onset. J Infect Dis 175 : 195~199, 1997
- 6) Kobune F, Sakata H, Sugiura A : Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. J Virol 64 : 700~705, 1990
- 7) Rota P A, Rota J S, Redd S B, Papania M J, and Bellini W J : Genetic analysis of measles viruses isolated in the United States between 1989 and 2001 : Absence of an endemic genotype since 1994. J Infect Dis 189 : S160~164, 2004
- 8) Tipples G A, Gray M, Garbutt M, Rota P A and the Canadian Measles Surveillance Program : Genotyping of measles virus in Canada : 1979-2002. J Infect Dis 189 : S171~176, 2004
- 9) World Health Organization. Update of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses : new genotypes and reference strains. Wkly Epidemiol Rec 78 : 229~232, 2003

☆ ☆ ☆ ☆ ☆ ☆