

表1. 麻疹ウイルス検出結果

検体種別	RT-PCR陽性	ウイルス分離
咽頭拭い液	12(30%)	9(23%)
血液	10(32%)	8(26%)
尿	0	0
合計	22(29%)	17(22%)

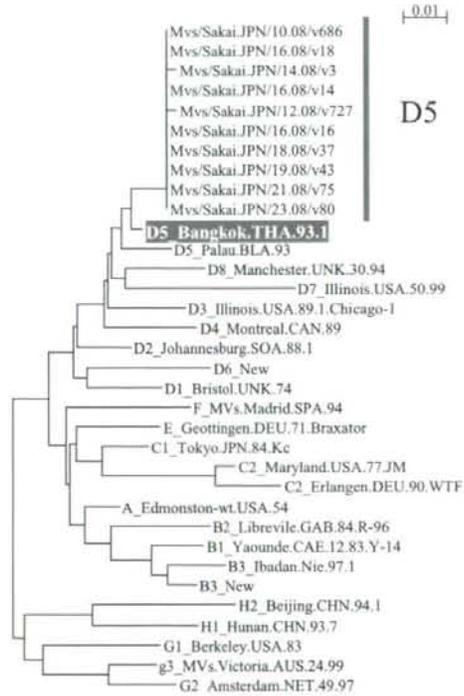


図4. 麻疹ウイルス系統樹解析

表2.ELISA測定結果

麻疹ウイルス遺伝子検出陽性例(10例)

No	年齢	発病から検体採取までの期間	ワクチン歴	IgM抗体(指数)	IgG抗体
v686	27Y11M	4	不明	陰性(0.68)	陰性
v3	11Y6M	4	無	陰性(0.35)	陰性
v15	9Y11M	5	有	陽性(8.41)	陽性
v17	34Y	5	不明	陽性(9.21)	陽性
v19	8Y7M	3	有(H12)	陽性(1.86)	陰性
v38	32Y7M	7	不明	陽性(9.15)	陽性
v41	9M	10	不明	陽性(9.48)	陽性
v43	14Y11M	4	無	陽性(7.10)	陰性
v57	13Y	4	無	陽性(3.94)	陰性
v81	18Y7M	2	有	陽性(9.22)	陽性

麻疹ウイルス遺伝子検出10例でウイルス分離

麻疹ウイルス遺伝子検出陰性例(21例)

No	年齢	発病から検体採取までの期間	ワクチン歴	IgM抗体(指数)	IgG抗体
v674	1Y	5	不明	陰性(0.65)	陰性
v33	3Y11M	4	不明	陰性(0.62)	陽性
v34	2Y4M	6	不明	陰性(0.43)	陽性
v44	6Y10M	2	有	陰性(0.23)	陽性
v45	4Y6M	3	有	陰性(0.17)	陽性
v55	1Y5M	1	無	陰性(0.34)	陰性
v78	4Y5M	3	不明	陰性(0.25)	陽性
v87	59Y5M	2	不明	陰性(0.16)	陽性
v103		不明	不明	判定保留(0.95)	陽性
v105	2Y8M	5	有	陰性(0.32)	陽性
v109	1Y1M	2	有	陰性(0.19)	陰性
v111	1Y6M	4	有	陰性(0.18)	陽性
v120	1Y6M	5	有	判定保留(0.94)	陽性
v139	20Y	3	不明	陰性(0.26)	陽性
v150	2Y7M	6	有	陰性(0.56)	陽性
v153	20Y1M	2	不明	陰性(0.32)	陽性
v160	8M	5	無	陰性(0.32)	陰性
v165	15Y9M	4	有	陰性(0.31)	陽性
v208	26Y11M	3	無	陰性(0.14)	陽性
v224	22Y9M	4	有	陰性(0.69)	陽性
v349	16Y7M	2	不明	陰性(0.59)	陽性

陽性: IgM抗体指数>1.20 陰性: IgM抗体指数<0.80 判定保留: 0.80=<IgM抗体指数=<1.20

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討
麻疹ウイルス研究小班 研究分担者 駒瀬 勝啓

北海道における麻疹について
—発生状況と検査診断(2008年)—

協力研究者 長野秀樹、地主勝、岡野素彦(北海道立衛生研究所感染症センター)

研究要旨

麻疹は2008年1月1日から全数報告の対象疾患となったが、同年の北海道における麻疹患者報告数は、1,462例で、うち615例は札幌市からの報告であった。第17週(4月)の報告数が最大で125例あり、30週(7月)以降は5名以下の報告であった。予防接種歴については「あり」が29%、「なし」が45%であった。年齢分布では、20歳未満がほぼ8割を占め、2007年と同じ傾向であった。麻疹ウイルス検査については、供試検体として咽頭拭い液を用いたが、RT-PCR法でウイルスゲノムを検出できたのは28検体中20件で陽性率は71%であった。この20例についてNP遺伝子の系統樹解析を実施し、genotypeを調べたところ全例D5型であった。

A. 研究目的

北海道では、2001年の流行を受け、小児科医会や行政を中心として「北海道はしかゼロ作戦」が展開されてきた。その結果、2005、2006年の麻疹患者報告数は減少傾向にあった。しかし、2006年末から関東地方において麻疹の発生があり、2007年には北海道においてもいくつかの地域で流行があった。また同年は、北海道だけではなく、麻疹の全国的な流行が報告された。このような近年にない流行を受け、2012年までに麻疹を排除するための施策の一つとして、2008年から全数報告となった。さらに、全数報告のための検査室診断の必要性から病原体サーベイランスを充実させることが重要である。今回は、麻疹流行動態の解明と病原体サーベイランスの充実を目的として、ウイルス学的検査や麻疹患者について検討を行っ

た。

B. 研究方法

2008年1月1日から麻疹が全数報告疾患となったため、管轄保健所から報告されるようになり、これらについて集計解析した。患者情報については主に年齢構成及びワクチン接種歴について検討した。医療機関から提供された麻疹患者の咽頭拭い液については、キアゲン社のキットを用いて直接ウイルスRNAを抽出した。このRNAを鋳型としてRT-PCR法にて麻疹ウイルスN蛋白のC末端側をコードする遺伝子領域の536塩基を増幅した。RT-PCR法の手技は国立感染症研究所が作成した病原体検査マニュアルに従った。増幅されたPCR産物を精製し、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。そのうち、N蛋白のC末端

150 残基をコードする 450 塩基について近隣接合法による系統樹解析を実施し、麻疹ウイルスの genotype を決定した。

C. 研究結果

北海道における 2008 年の麻疹患者報告について図 1 に示した。同年の北海道における麻疹患者報告数は、1,462 例で、うち 615 例は札幌市からの報告であった。第 17 週(4 月)の報告数が最大で 125 例あり、30 週(7 月)以降は 5 名以下の報告であった。

全道で報告された麻疹患者 1,462 例について、その年齢構成と予防接種歴の関係を調べた。図 2 に示した年齢階層別報告数をみると、15-19 歳の階層が最も多く、次いで 10-14 歳であった。大学生の在学年齢である 22 歳までを細分すると、高校生である 16、17 歳が最も多かった。5 歳前後の低年齢では報告数は少なかったが、0 歳では 80 例近くの報告があり、低年齢層の中では突出していた。また、予防接種歴では麻疹患者の約 3 割に接種歴があり(図 3)、これは昨年と同じ傾向であった。

ウイルス学的検査では、咽頭拭い液からウイルス RNA を抽出し、図 4 に示した条件で nested RT-PCR を実施した。28 例の咽頭拭い液のうちから RT-PCR で麻疹ウイルス RNA が検出されたのは 20 例(71%)であった。検体採取日については、2007 年の検体と合算すると、発症後 4 日までに採取しているケースがほとんどで、4 日目をもっとも多かった。(図 5)。また、これらの咽頭拭い液 7 例において麻疹ウイルスが分離された。一方、RT-PCR 陽性例について genotype を決定したところ全例が D5 型であった。これは全国で流行している株と同じ型であった。(図 6)。

D. 考察とまとめ

北海道における麻疹の報告数は全国的にも多く、1,462 例であった。年齢層では 10 代が多かった。また、予防接種歴のある例も約 3 割あり、これらは 2007 年と同じ傾向であった。

日本では 2006 年 6 月から 2 回接種が導入され、2012 年の麻疹排除をめざしている。また、将来的には少数発生時における全例において検査室診断が必要となることから、病原体サーベイランスシステムの確立に向け、高い精度の検査法の充実とともに、検体採取時期や種類および選定などが肝要と思われる。

E. 健康危機情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

地主勝、伊木繁雄、長野秀樹、奥井登代、岡野素彦、2008、2007 年度の北海道における麻疹 PA 抗体保有調査。北海道立衛生研究所報、57: 83-85。

2. 学会発表

地主勝、伊木繁雄、長野秀樹、工藤伸一、岡野素彦：2007 年の北海道における麻疹発生状況について。第 60 回北海道公衆衛生学会。札幌市、2008 年 11 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 2008年の発生状況

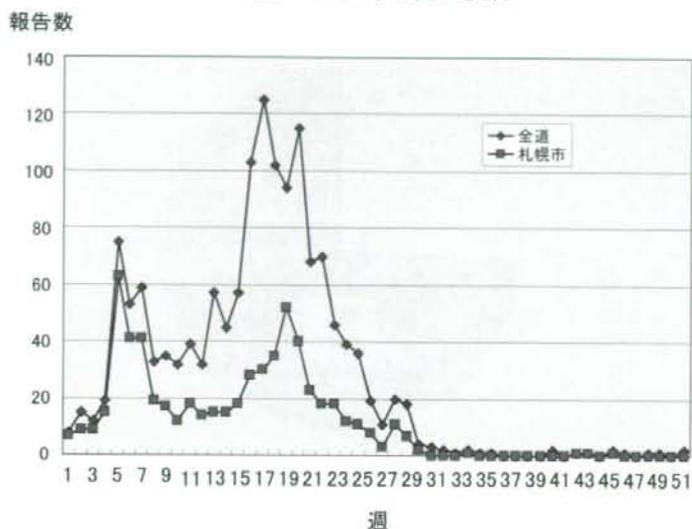


図2 麻疹報告患者の年齢分布

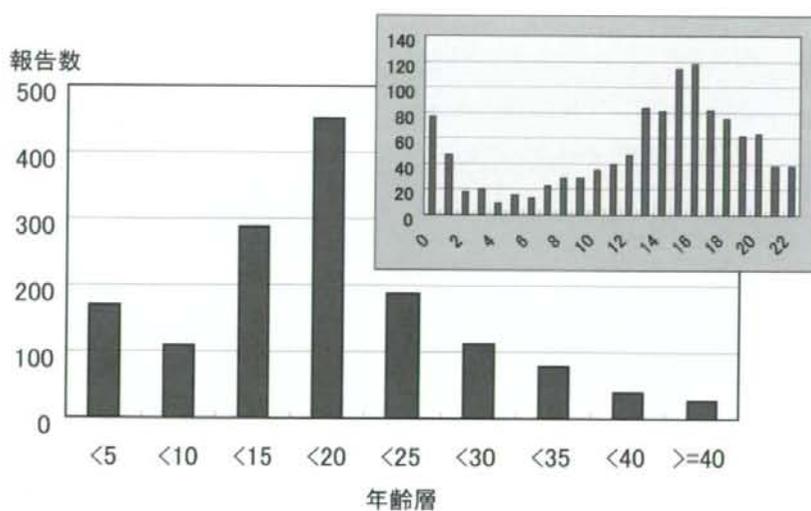


図3 麻疹患者におけるワクチン接種率

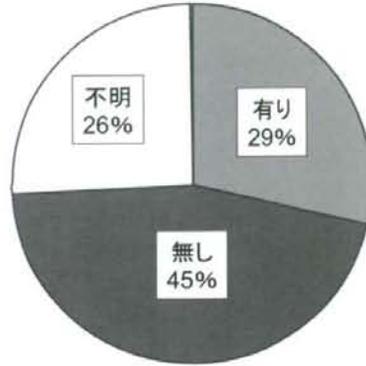


図4 麻疹ウイルスゲノムRNAの検出

RNA分離: QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)

One-step RT-PCR kit (Invitrogen)

プライマー: pMvGTf1/pMvGTr1

50 °C 30 min
94 °C 2 min
94 °C 30 sec } x35
53 °C 30 sec }
72 °C 1 min }
72 °C 5 min }

Nested PCR (Taq Gold)

プライマー: pMvGTf2/pMvGTr2

95 °C 9 min
94 °C 30 sec } x30
55 °C 30 sec }
72 °C 1 min }
72 °C 7 min }

供試検体数: 28 (2008)

RT-PCR陽性数: 20 (71%)-2008

図5 発症日と採材日の関係

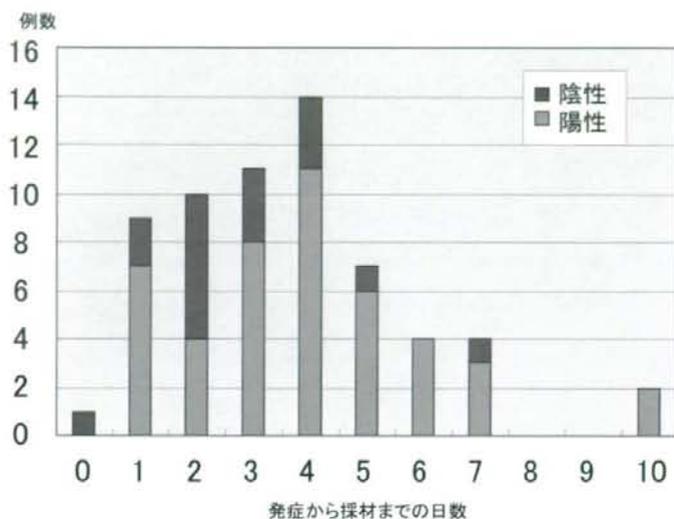
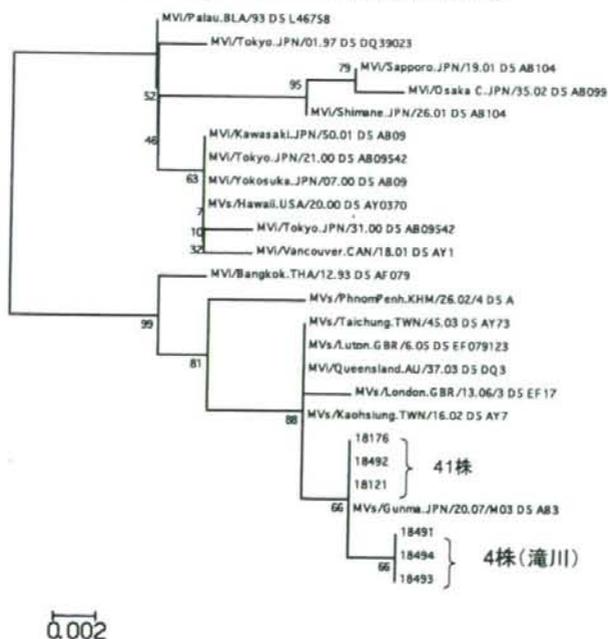


図6 麻疹ウイルスの系統樹解析(D5)



厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症 研究事業）
研究報告書

東北・新潟ブロックの麻疹ウイルス検査状況

研究協力者 青木 洋子

山形県衛生研究所 主任専門研究員

研究要旨 東北・新潟ブロックの麻疹ウイルス検査件数、材料、方法等について状況を把握するとともに、各県から提供された検体について遺伝子検査およびIgM抗体価の測定を行った。また、山形県の一保健所の協力により、平成20年に届出された麻疹患者の診断状況をみた。臨床診断のみによるものが10例中6例、検査診断は4例で行われており、IgM抗体価を測定していた。このうち、2事例について衛生研究所でウイルス検査を行ったところ、ウイルス遺伝子は検出されなかった。

A.研究目的

現在、日本が所属するWHOの西太平洋事務局では、2012年までに麻疹を排除することを掲げている。

麻疹排除にむけた実験室診断を確実に地方衛生研究所で行うため、我々は精度の高い検査を要求される。この技術を確立し、普及させることと、さらには、リファレンスセンターとしての機能を発足させることを目的とした。

B.研究方法

平成20年10月に開催された地方部会において、東北・新潟ブロックの麻疹ウイルス検査の現状を把握した。そしてブロック内から提供された麻疹患者（疑いを含む）咽頭拭い液等23検体を遺伝子検出の、患者血清7検体をIgM抗体価の測定用検体とした。ま

た、PA抗体価512倍以上を保有する健康人血清12検体についてもIgM抗体を測定した。

遺伝子の検出は、病原体検査マニュアル（感染研、以下マニュアル）を基本にし、N遺伝子とHA遺伝子の検出を行った。

IgM抗体の測定は、ウイルス抗体EIA「生研」麻疹IgMキット（デンカ生研）を用いて抗体指数を測定した。

さらに、山形県M保健所の協力により、平成20年に報告された麻疹患者12件について診断基準を精査した。

C.研究結果および考察

①東北・新潟ブロックでは、2007年の首都圏での集団発生に派生した患者検体が数例あったものの、2008年は、秋田県で集団発生により検体が多かった以外、いずれの県でも0～1の検

体であった。検査材料は、咽頭拭い液が多かった。検査方法は、遺伝子検出、分離、PA法による抗体価測定であった(表1)。民間検査機関等で行われた検査の検体を衛生研究所で確保するためには、医療機関や保健所の協力が必要であるとの意見が多かった。これを実現するためには、行政的なバックアップが必要と考えられた。

②山形県では、マニュアルにあるプライマーを用いているが、独自の反応条件で遺伝子検出を行ってきた。このため、検出感度のチェックを感染研から配布されたレファレンスRNAを100倍に希釈して行った結果、N遺伝子、HA遺伝子とも増幅を確認することができた。山形県の従来法は、検査感度としては今後の検査診断に支障がないことがわかった。

この方法で提供された咽頭拭い液等23検体の遺伝子検出を行うと、18検体が陽性、5検体は検出されなかった。これは、各地研での結果と100%一致していた。感度を確認した山形県の条件で遺伝子検出を行ったことか

ら間接的に精度のチェックができ、新潟・東北ブロックにおける麻疹ウイルスの遺伝子検出による検査体制は、整備されていると推察できた。

③IgM抗体価を測定したところ、患者血清7検体中2検体が、健常人血清12検体中1検体で抗体指数陽性であった。

ブロック衛研で実施したPA抗体価では、IgM、IgGの区別がつかず、過去の抗体(ワクチンによるものを含む)も測定してしまい診断には至らないケースがみられた。このためIgM抗体だけを測定することは、診断を助ける一手段であると考えられた。しかし、ワクチン歴がなく、最近の既往歴もない健常人がIgM抗体価陽性であったことからEIA法では、測定に何らかが影響していることが明らかであり、EIA法による検査だけではなく、遺伝子検査等を組合わせて判断することが重要であると考えられた。

④平成20年に山形県M保健所に連絡のあった麻疹患者は12件。うち正式に報告されたものは10件、検査結果

表1 平成20年度麻疹ウイルス検査状況(10月現在)

	検体数(陽性数)		検査材料				検査方法				
	成人	小児	咽頭拭い液	血液	尿	血清	ELISA	中和	RT-PCR法	シーケンス	抗体価測定
A県	0	0	○	-	○	○	○	○	○	○	-
B県	11	1 (1)	○	○	-	-	○	-	○	○	○
C県	0	1 (0)	○	○	-	-	○	-	○	○	-
D県	0	0	○	-	-	-	○	-	○	○	-
E市	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F県	0	0	○	-	-	○	-	-	○	○	○
G市	0	0	○	-	-	-	-	-	○	○	-
H県	1	1 (1)	○	-	-	-	○	-	○	○	-
I県	1 (0)	0	○	○	○	○	○	-	○	○	○

で届出を取下げたもの2件であった。

報告例を診断基準で分けると、臨床診断によるもの6件、検査診断によるもの4件。検査は民間検査センターでIgM、IgG抗体の測定が行われていた。以下に保健所による積極的疫学調査が行われた2事例を図に示した。

事例1は、IgG抗体陽性で臨床診断により届出された。本例は、センター試験受験直後の高校生で、集団発生につながる心配があり保健所が疫学調査を行い、衛生研究所で検査をした。検査検体から麻疹ウイルス遺伝子は検出されず、PA抗体価の上昇もみられなかった。

事例2は、IgM抗体は判定保留、臨床診断により届出された。

採取の時期が早く、検査材料として好条件だったが、遺伝子検査で麻疹ウ

イルス遺伝子は検出されず、IgM抗体測定では、抗体指数は陽性と判定保留の境界値を示した。

保健所での麻疹患者探知は、患者報告時となり、疫学調査に入る頃には検体採取時期を逸していることが多い。事例1、2では、地研での遺伝子検査を総合して判断すると、麻疹感染を疑うことができず、その後の集団的な発生にも至らなかったことから、血清抗体価のみでの診断には限界があると考えられた。

このように典型的な症状が見られない修飾麻疹など診断が難しい事例では、確実な検査を行うための体制作りが必要であることがわかった。

D. 結論

麻疹排除を実現していくためには、全ての患者について確実な検査診断が行われなければならない。遺伝子検出の技術に関しては、感染研からレファレンスRNAを配布し、地研での検査技術を向上させる。さらに、遺伝子データの集積および解析については、来年度の課題となった。

また、IgM抗体価は、疑陽性反応が出やすく、何らかの影響で陽性値を示すことを経験した。診断が難しいとされる修飾麻疹などの場合、この検査のみでは、臨床診断に影響する可能性がある。同時に遺伝子検査等を組み合わせ、確実なものとするのが必須であると考えられた。



厚生労働科学研究費補助金
ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討

麻疹ウイルス研究小班

分担研究者：駒瀬 勝啓

国立感染症研究所ウイルス第3部第3室 室長

「2008年 千葉県における麻疹の流行」

研究協力者：小川 知子

千葉県衛生研究所ウイルス研究室 主席研究員

研究要旨

2008年千葉県の麻疹の流行は、関東高等学校柔道大会千葉県予選大会を機に、県内全域に一気に拡大した。千葉県は2006年以降、毎年小・中・高等学校で集団発生をみている。今回、緊急アンケートを実施し、原因を究明するとともに対策を検討した。麻疹患者の発生を無くするためには、麻疹・風疹ワクチンの2回接種法による接種率を確実に上昇させると共に、衛生研究所は収集した情報を速やかに公開していくこと、麻疹の臨床診断が難しい場合においては、迅速性に優れるRT-PCR検査を積極的に実施していくことが、「麻疹排除」の実現の方法として重要であると考えられた。今後、患者の発生状況に対応して、適切な検査体制を構築していく必要があると考えられた。

A. 研究目的

2012年の「麻疹排除」に向け、厚生労働省が示した2008年1月1日からの「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」の感染症発生動向調査に基づく医療機関からの患者の全数報告に先がけ、千葉県は2007年4月より「千葉県麻疹対応マニュアル」を作成し、麻疹発生把握のため医療機関と学校からの患者の全数報告を開始し、麻疹排除の早期実現に向けて対応している。この様な中で2007年は全国と同様に、千葉県においても麻疹の大きな流行が起り、医療機関および学校からの報告数はそれぞれ1,500人を越えた。さらに2008年は、関東高等学校柔道大会千葉県予選大会に参加した高等学校の生徒から県内全域に患者発生は広がり、2007年同様の大きな流行をみた。

千葉県において2006年以降続いて発生している麻疹の集団発生を、今後起こさないために、2008年の関東高等学校柔道大会千葉県予選大

会に参加した高等学校に対して、緊急アンケート調査を実施し、今後の麻疹対策を検討する事とした。このことにより、麻疹排除を早期に実現していくための地方衛生研究所の役割と問題点を明らかにする。

B. 研究方法

麻疹発生状況は、2008年の千葉県で実施した麻疹全数報告に基づく医療機関および学校からの麻疹患者報告、また、感染症発生動向調査定点報告を用いた。

麻疹患者の検体は、2008年の4月以降に病原体サーベイランスに基づく病原体定点医療機関から収集したもの、集団発生時、散発発生時に保健所、医療機関から衛生研究所に依頼のあったものを検討した。

2008年関東高等学校柔道大会千葉県予選大会に参加した高等学校に対して、緊急アンケート調査は、2008年の千葉県高校柔道部大会に関連した麻しん集団発生の調査報告書 http://www.pref.chiba.lg.jp/syozoku/c_sipp

ei/9kannsennsyou/judo.htmlのとおり実施した。

C. 研究結果

(1) 麻疹の発生状況

千葉県医療機関報告では例年より早い5週から12週にかけて、10週をピークとする流行が見られた。その後、21週から報告数の急激な増加が見られ、22週に報告数はさらに増加した。この流行は23週をピークとし30週以降は急激に減少したが、この21週から29週の期間に県内すべての保健所から麻疹の報告があった(図1)。また、学校からの報告数も同様の経過をとった(図2)。

医療機関報告で、年齢を乳幼児の0~6歳、小学生相当の7~12歳、中学生相当の13~15歳、高校生相当の16~18歳、成人の19~歳の年齢群に分けて週別にこれらの割合の推移を見ると、21週に高校生相当の急激な増加が見られ、その後、高校生・中学生相当の増加が27週まで続き、そして29週以降乳幼児、成人が増加していた(図3)。

学校報告では、高等学校では21週から23週に著しく報告が増加し、その後24週から27週に隔週で減少と増加を繰り返す、29週以降は急激に減少した。これに引き続いて、中学校では24週から26週に、小学校では25週から28週に増加が見られた(図4)。

これら医療機関および学校からの報告から、高校での柔道部の集団発生は校内での二次感染を引き起こし、更に地域の小学校、中学校そして乳幼児、成人へと拡大していったものと考えられた。

ワクチン歴の割合の週別推移(医療機関からの報告)では、医療機関報告で、ワクチン接種歴を1回接種、2回接種、不明、無(未接種)に分けてこれらの割合の推移を見ると、5週から12週および21週から29週の流行時にワクチン接種者が増加する傾向があり、2回接種者の報告も目立った。また、1週から35週の総計では、1回接種43.6%、2回接種4.6%、不明18.5%、無33.3%で、21週から29週の流行時では、1

回接種45.3%、2回接種5.7%、不明14.7%、無34.3%であった(図5)。流行時には感染機会の増加によりワクチン接種者の罹患割合が増加することは知られているが、この時期に2回接種者の罹患が増加した理由には、2回目接種の時期がワクチンで予防が可能とされる感染3日以後で発症を予防することができなかったことが考えられた。

また、今回の流行もワクチンの1回接種者が45%前後存在し、未接種者の存在に加えてsecondary vaccine failureによる発症者の存在が明瞭となった。

(2) 麻疹の検査状況

2008年4月以降に、病原体サーベイランスで収集、医療機関から依頼、学校における集団発生に伴う患者についての麻疹あるいは麻疹疑い患者の咽頭ぬぐい液82検体について分離培養およびRT-PCRを行った。

分離培養には、B95a細胞、COBL細胞、RT-PCRおよびシーケンスは、N遺伝子に設定したプライマーを用い感染症検査マニュアルに準じて実施した。

咽頭拭い液82検体中、培養陽性は17検体、RT-PCR陽性は46検体で、培養陽性のものはすべてRT-PCR陽性であった。RT-PCR陽性の遺伝子型はD5型41例、H1型2例、ワクチン由来のA型1例、未決定1例であった。(図6)。

D. 考察

2008年、千葉県の麻疹の流行は、関東高等学校柔道大会千葉県予選大会を機に、参加した高等学校の生徒から県内全域に一気に広がり、2007年同様の大きな流行をみた。

患者の発生数の割合は、小学校、中学校、高等学校の生徒が依然として多く、小中高校での対策が重要である。現在進められている麻疹・風疹ワクチンの3期、4期の2回接種法による接種率を上昇させると共に、集団で生活している条件等を加えて考慮すると、発症者の早期診断による隔離が封じ込め対策として、重要な問題となると考えられる。衛生研究所が供与を受けた検体の検討では、培養が陽性のすべてが

RT-PCR で陽性で、培養陽性で RT-PCR 陰性の結果はなかったことから、現在の検査体制では、培養よりも結果還元迅速性からも RT-PCR の方が優れていることが示された。

また、医療機関における検査機関での血清の IgM 抗体検査は、結果の還元までに一定の時間を要し、さらには血清の清採取時期によりウイルスが検出されいながら血清 IgM 抗体が陰性の場合も存在する。この間、患者に適切な指導がなされない限り、感染源となり得る。さらに、ワクチン既接種者のいわゆる修飾麻疹が多く存在する現在は、症状のみの診断は困難である。診断を適切に行うためには検査が必要なことを周知するとともに、衛生研究所での検査のサポート体制を充実させ、情報と検体の速やかな流れのための体制を作ることが重要と考えられた。

E. 結論

麻疹患者の発生を無くするためには、麻疹・

風疹ワクチンの3期、4期の2回接種法による接種率を上昇させると共に、衛生研究所は収集した情報を速やかに公開し、麻疹の臨床診断が難しい場合においては、積極的に RT-PCR 検査をしていくことが、「麻疹排除」の実現の方法として重要であり、今後、患者の発生状況に対応して、適切な検査体制を構築していく必要があると考えられた。

F. 健康危機情報 省略

G. 研究発表

http://www.pref.chiba.lg.jp/syozoku/c_sippe/9kannsennsyu/judo.html

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし。

図1 千葉県麻疹全数報告医療機関報告数の推移

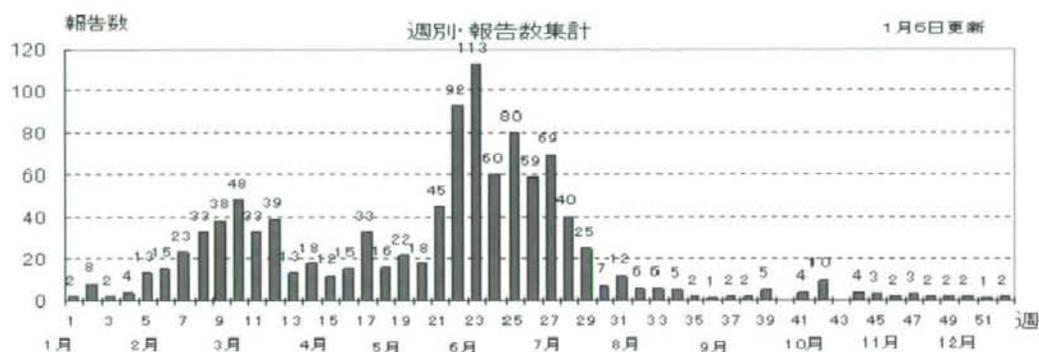


図2 千葉県麻疹全数報告学校報告数の推移



図3 週別、年齢群別報告数の割合

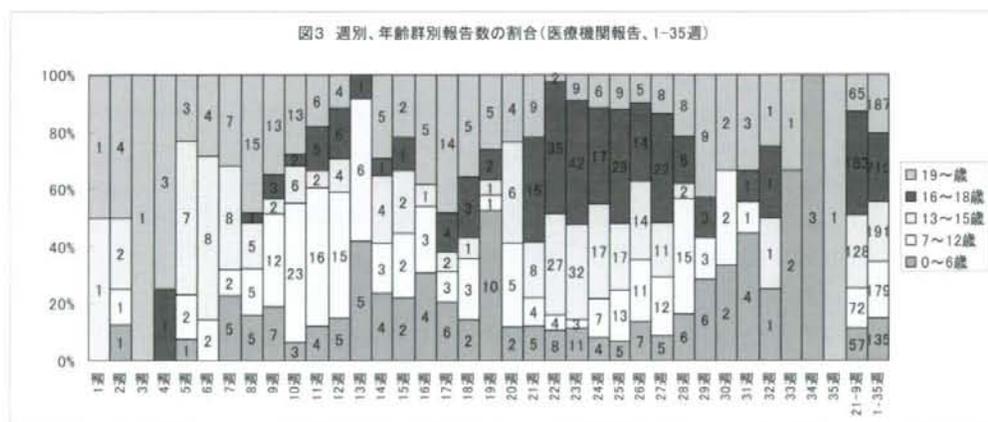


図4 週別、学校別報告

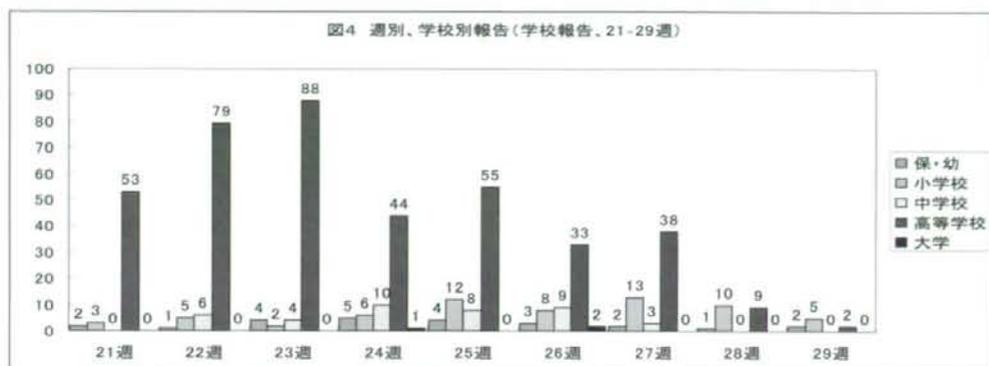


図5 週別、接種歴数の割合

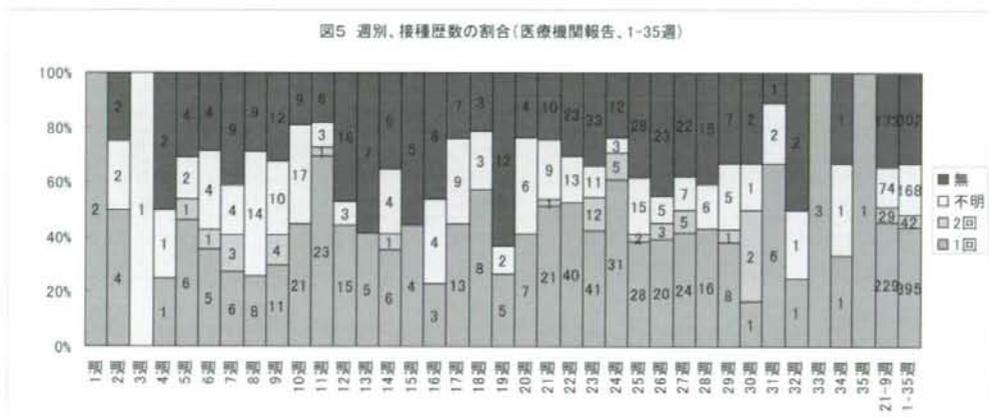
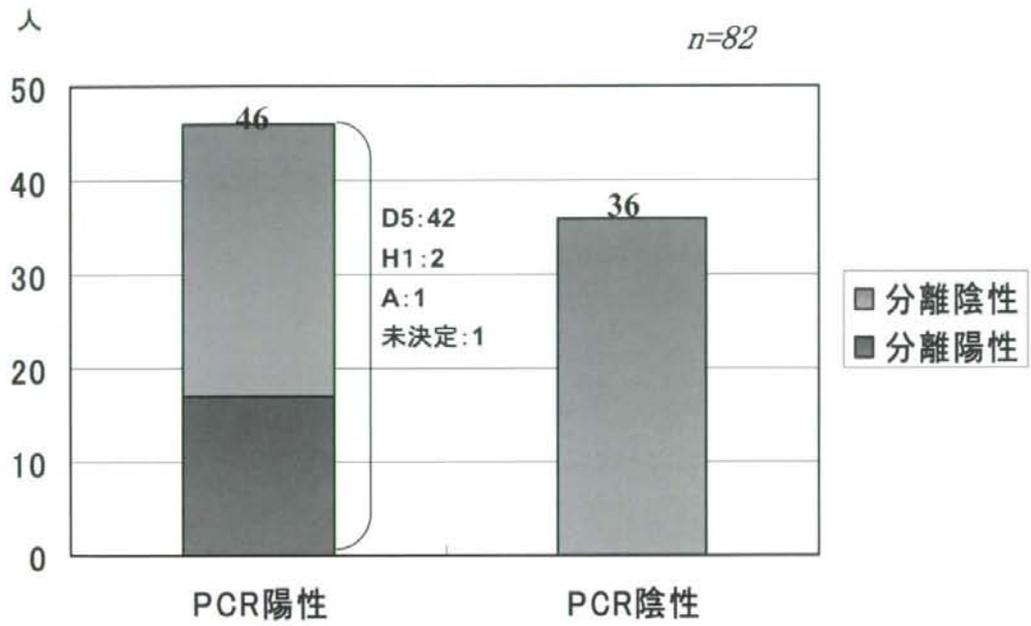


図6 RT-PCR および分離結果



石川県における麻しんのウイルス学的検査状況 (2007年)

(麻しんウイルス小班) 協力研究者 : 倉本 早苗 石川県保健環境センター

研究要旨

2007年の全国的な麻しん流行の際、石川県では「石川県麻しん迅速把握事業」に基づき多くの事例でRT-PCR法等のウイルス学的検査を実施した。

その結果から、RT-PCR法による麻しん遺伝子検出は迅速かつ有効な検査法であり、現場での感染拡大防止対策実施には非常に有用であることが証明された。また、近年の成人麻しんや修飾麻しんが多い状況において臨床症状や免疫学的検査のみでは診断が非常に困難であることが裏付けされた。

1 はじめに

石川県では全国に先駆け2002年から、麻しん患者発生の迅速な把握ならびに感染拡大防止を目的に「石川県麻しん迅速把握事業」(以下、本事業)を開始し、さらに2006年8月から当センターで実施するウイルス学的検査の実施により、本事業の精度向上を図っている。

2007年の全国的な麻しん流行の際、石川県では本事業に基づき多くの事例でウイルス学的検査を実施したので、その概要を報告する。

2 材料および方法

2-1 検体

麻しん患者を診断した医師がウイルス学的検査(遺伝子検出、ウイルス分離)のために採取した咽頭ぬぐい液および血液を用いた。

2-2 麻しんウイルスの検査方法

(1) 遺伝子検出

検体からQIAamp Viral Mini Kit (QIAGEN社製)を用いてRNAを抽出し、「麻しん診断マニュアル、第1版」(国立感染症研究所・地方衛生研究所全国協議会編集、2002年)に従い、RT-PCR法によ

りHA遺伝子ならびにNP遺伝子の検出を行った。

(2) ウイルス分離

B95a細胞(マーマセットB細胞由来)を使用し、37°C、7日間静置培養を行い、細胞変性効果(CPE)の出現を指標とした。培養7日後、CPEを認めない場合は、継代培養を同様に繰り返した。なお、分離ウイルスの同定は、典型的CPEの確認と蛍光抗体法(直接法)によった。

(3) 遺伝子解析

麻しんウイルス遺伝子を検出した際、必要に応じて制限酵素切断片長多型(RFLP)解析によるワクチン株との鑑別、またはダイレクトシーケンス解析による遺伝子型別を行った。

ア RFLP解析

HA遺伝子 nested PCR産物について、制限酵素 *Sau*3AI を用いて RFLP 解析を実施した。なお、反応条件等は麻しん診断マニュアル(第1版)の方法に従った。

イ ダイレクトシーケンス解析

NP遺伝子 nested PCR産物について、ダイレクトシーケンス法により遺伝子配列を決定し、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) のデータベース

を用い解析を行った。なお、DNA シークエンサーは ABI PRISM 310 (アプライドバイオシステムズ社製) を使用した。

3 成 績

3・1 患者発生状況

2007年の本事業における患者報告総数は134人で、その内訳は麻しん(15歳未満)49人、成人麻しん(15歳以上)85人であったが、後に検査結果等による削除もあり最終確定数は74人で、その内訳は麻しん20人、成人麻しん54人であった。初発患者の報告は第16週(4月18日;成人男性)であり、その後患者報告数は段階的に増加し、麻しん、成人麻しんともに第21週をピークに終息に向かった(図1)。

3・2 ウイルス学的検査

(1) 遺伝子検出および分離検査結果

送付された検体の種類とウイルス遺伝子検出状況を表1に示した。

検査依頼のあった患者等の数は73人であり、その内訳は麻しん35人、成人麻しん38人であった。これら全例について、RT-PCRによる遺伝子検出(HAおよびNP)およびB95a細胞による分離検査を実施した。なお、遺伝子検出においてHA遺伝子が検出された場合を陽性とし、2種類の検体が搬入された場合は、いずれか一方でもHA遺伝子が検出された場合を陽性とした。

その結果、RT-PCRで陽性となったのは麻しん16人(45.7%)、成人麻しん18人(47.4%)の計34人(46.6%)であった(図2)。また、73人のうち麻しんウイルスが分離されたのは5人(6.8%)であった。

73人の検体種類別の検出結果は、咽頭ぬぐい液と血液の2種類が送付されたものでは45人中26人(57.8%)が、咽頭ぬぐい液のみでは22人中6

人(27.2%)、また血液のみでは6人中2人(33.3%)が陽性であった。なお、2種類の検体を検査したもののうち、いずれか一方のみが陽性となったものは8人(咽頭ぬぐい液6人、血液2人)であった(表1)。

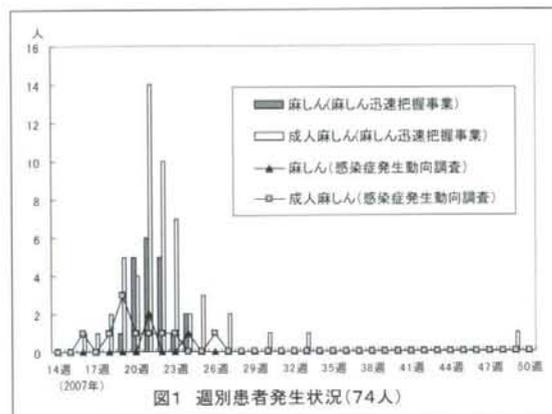


図1 週別患者発生状況(74人)

表1 検体別麻しんウイルス遺伝子の検出結果

検体	被検者数	陽性者数 (割合%)	内訳			陽性者数 (割合%)
			咽頭ぬぐい液 および 血液	咽頭 ぬぐい液	血液	
咽頭ぬぐい液 および 血液	45	26 (57.8)	18	6	2	19 (42.2)
咽頭ぬぐい液	22	6 (27.2)	—	6	—	16 (72.7)
血液	6	2 (33.3)	—	—	2	4 (66.7)
計	73 (100.0)	34 (46.6)	18 (24.7)	12 (16.4)	4 (5.5)	39 (53.4)

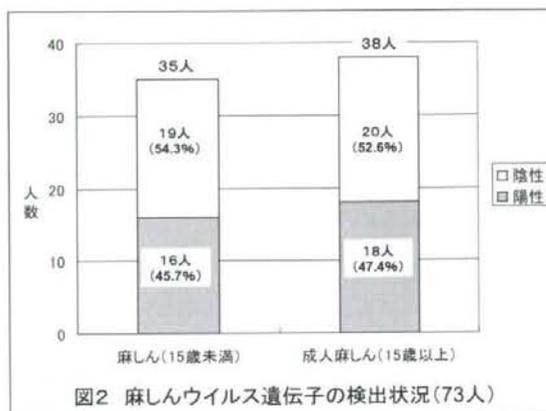


図2 麻しんウイルス遺伝子の検出状況(73人)

(2) RFLP 解析結果

麻疹遺伝子が検出されたもののうち、ワクチン株と野生株の鑑別が必要とされたものは以下の2症例であった。

ア. 症例1

患者は1歳の女児で、発症の7日前に定期的予防接種（MR）を受けていた。明らかな麻疹患者との接触は無いが、予防接種を受けた際、同医療機関に麻疹患者がいたことから鑑別の依頼があった。RFLP 解析の結果、検出遺伝子はワクチン株由来のものであった。

イ. 症例2

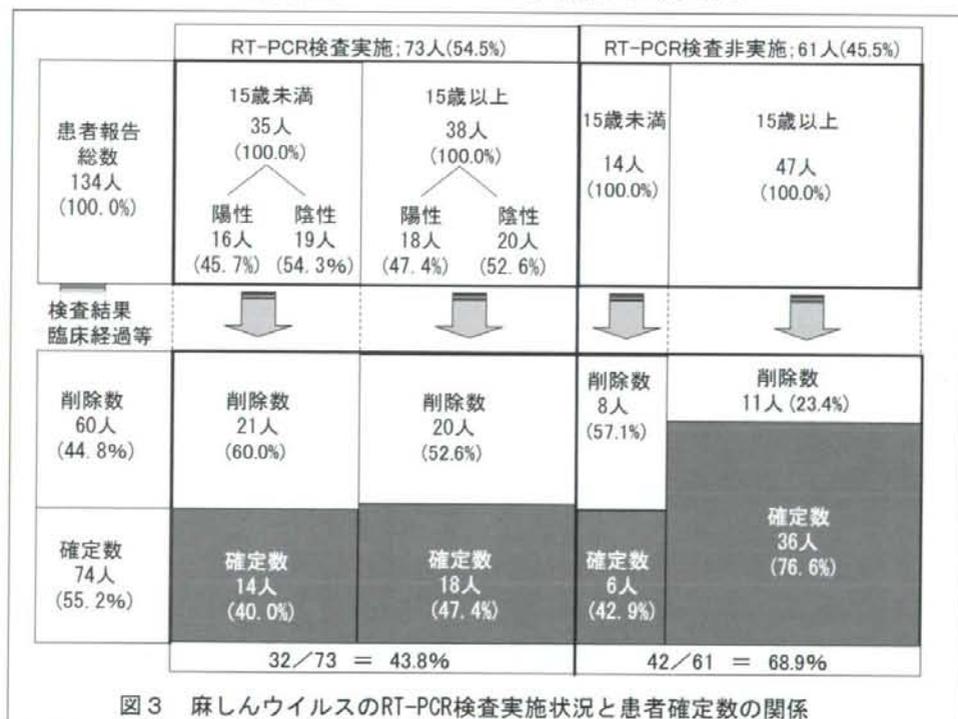
患者は15歳男性で、同じ高校に通う生徒が麻疹を発症したため、感染拡大防止対策として急遽ワクチン（単抗原）が接種され、その8日後に発症した。RFLP 解析の結果、検出遺伝子は野生株由来のものであった。

(3) ダイレクトシーケンス解析結果

麻疹遺伝子が検出された検体のうち7検体のPCR産物（NP 遺伝子）についてダイレクトシーケンスにより塩基配列決定・解析を行った結果、D5型が6検体、A型（Edmonston B；ワクチン株）が1検体であった。なお、A型に分類された株は、上記の症例1由来の検体である。

3・3 RT-PCR 検査状況と患者確定数

RT-PCR の検査状況と患者確定数の関係を図3に示した。患者報告総数134人をRT-PCR実施群と非実施群に分け、患者確定率（確定数/患者報告総数×100%）を比較すると、実施群では43.8%であったのに対し非実施群は68.9%で両者に明らかな差異がみられた。また、麻疹と成人麻疹について個々に比較すると、非実施群の成人麻疹においては、後に臨床経過や免疫学的検査結果から患者であることが否定された症例が23.4%と他の3群（60.0%、52.6%、57.1%）に比べ非常に少なかった。



4 考 察

(1) 患者発生状況

当県で発生した麻しん患者の年齢構成は、15歳以上が圧倒的に多く、特に15～29歳が大半を占めていたが、これは全国的な傾向で、2007年の流行は20歳前後の若者を中心としたものであったといえる。この20歳前後の年齢層は、麻しんに対する抗体を保有していないか、あるいは保有する抗体の力価が低い人の多いことが以前から指摘されており、これらの抗体非保有者あるいは低抗体保有者が学校等の集団生活する場で麻しんウイルスに感染し、さらに彼らの行動範囲の広さが流行を拡大させたと考えられる。

(2) ウイルス学的検査

ウイルス遺伝子の検出率は、咽頭ぬぐい液あるいは血液のいずれか一方のみを検査した場合（約30%）に対して、両方を検査した場合（約60%）の方が高く、さらに、後者においていずれか一方のみから検出される例があったことから、できる限り両方の検体を採取することが望ましい。しかし、今回の結果および経費や患者に与える苦痛を考慮すると、現時点では咽頭ぬぐい液の方が検体としてより適切と考えられる。なお、日本ではまだほとんど用いられていないが、WHOが麻しんウイルスの遺伝子検出用検体として尿も有用であると報告しており、当センターにおいても、今後麻しん検出用検体として尿を選択肢にいれることを検討していきたい。

(3) 今後の課題

本事業の患者報告総数についてRT-PCRの検査状況と患者確定数との関係を見ると、RT-PCR非実施群の成人麻しんでは患者確定率が有意に高く、削除された症例数は少なかった。この結果は、RT-PCR非実施群の成人麻しんの確定数にはRT-PCR検査を実施すれば削除と判定される症例も多く含まれていることを示唆し、成人麻しんにおける診断の難しさを表していると思われる。

以上の結果からRT-PCRによる遺伝子検出は迅

速かつ有効な検査法であり、現場での迅速な感染拡大防止対策実施には非常に有用であることは言うまでも無いが、少数ではあるがRT-PCRの結果と臨床症状や血清学的検査結果とが一致しない事例が報告されており、RT-PCRの結果が陽性でも必ずしも麻しんを発症しているとは限らないケースが存在することが考えられる。この解明には、今後RT-PCRを全国的に導入して同様のケースを積み重ね、総合的に解析する必要がある。

5 結 論

(1) 石川県における患者発生状況

2007年における「石川県麻しん迅速把握事業」による患者報告確定数は74人であった。その内訳は麻しん20人、成人麻しん54人で、中でも特に15～29歳の若年成人層が28人と大半を占めていた。

(2) ウイルス学的検査

2007年の本事業におけるウイルス学的検査の依頼数は73人であり、そのうち34人から麻しんウイルス遺伝子が検出され、5人から麻しんウイルスが分離された。

検体種類別の遺伝子検出結果は、咽頭ぬぐい液と血液の2種類の検体を検査したものでは45人中26人(57.8%)、咽頭ぬぐい液のみでは22人中6人(27.2%)、血液のみでは6人中2人(33.3%)であり、また両方の検体を検査したもののうちいずれか一方が陽性となったのは8人(咽頭ぬぐい液6人、血液2人)であった。

5 健康危険情報 特になし

6 研究発表

- 1) IASR, Vol. 28, No. 8, 2007
- 2) 倉本早苗, 児玉洋江, 尾西 一, 川島ひろ子: 石川県の麻しん流行時におけるウイルス学的検査結果についての一考察(2007年), 第36回北陸公衆衛生学会, 福井県, 2008年11月