

平成 21 年度厚生科学研究費補助金(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(国立感染症研究所)

横浜市における かぜ様疾患の患者を対象とした
麻疹ウイルスのスクリーニング調査

研究協力者 七種美和子(横浜市衛生研究所)

研究要旨

1999 年 10 月から 2009 年 7 月の期間に、発疹を伴うかぜ様疾患の小児から採取された 99 検体を検査材料として RT-PCR を行い、6 検体から麻疹ウイルスを検出した。PCR 産物の遺伝子解析の結果、2 症例はワクチンの副反応、4 症例は地域流行株を原因とする修飾麻疹であった。修飾麻疹発症の要因としては、①乳児期に麻疹に感染し、低レベルの免疫を獲得していた、②PVF、③母体由来の移行抗体が残っていた、④SVF が考えられた。

A. 研究目的

麻疹は 2008 年 1 月から感染症法の全数把握疾患に位置づけられ、診断した医師すべてに届出が義務付けられたことで、より正確に患者発生を把握できるようになった。しかし、修飾麻疹は臨床症状のみで麻疹と診断することは極めて困難で、検査診断による患者把握の精度の向上が課題となっている。修飾麻疹は他の発疹症と間違えられることも少なくないことが指摘されている。そこで、発疹を伴うかぜ様疾患の症例における修飾麻疹症例の実態把握を目的とした。

B. 研究方法

1) 検査材料

1999 年 9 月から 2009 年 7 月の期間に、横浜市内 11 か所の病原体医療機関において、発疹を伴う気道炎症状を呈した小児から採取された咽頭ぬぐい液 99 検体を用いた。麻疹

(疑いを含む)と診断された患者の検体、および、ウイルス分離検査あるいは遺伝子検査によって何らかのウイルスが検出された検体は、調査対象から除外した。

2) ウイルス遺伝子検出と分子系統解析

麻疹ウイルス遺伝子の検出は、国立感染症研究所の病原体検査マニュアルに従って実施した。-80°C で保存されていた検体から High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いて RNA を抽出し、PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用いて cDNA を合成後、PerfectShot® Ex Taq (Loading dye mix) (TaKaRa) を用いて HA および N 遺伝子領域の nested PCR を行い、アガロースゲル電気泳動により増幅の有無を確認した。PCR 陽性の場合にはダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し、neighbor-joining 法で分子系統解析を行い、遺伝子型を同定した。

3) 患者情報の収集

PCR 陽性症例のワクチン接種歴、麻疹罹患歴、臨床経過等について、主治医に電話あるいは FAX で聞き取りを行った。

C. 研究結果

調査した 99 検体中 6 検体から麻疹ウイルスが検出された。このうち 4 検体は HA、N 遺伝子領域の PCR のいずれも陽性であり、残りの 2 検体は HA 遺伝子領域の PCR のみ陽性であった。検体採取年別の検査成績を表 1 に示した。PCR 陽性となった検体は、2000 年:2 検体、2007 年:1 検体、2008 年:3 検体であった。分子系統解析の結果、2000 年の検体から検出された 2 株は A 型、2007 年の 1 検体および 2008 年の 3 検体から検出された 4 株は D5 型に分類された。D5 型の 4 株は、Bangkok.THA/93/1 株と同じクラスターに属した(図 1、図 2)。

PCR 陽性の 6 症例について、検出された株の遺伝子型と疫学データを表 2 に示した。症例 1 および症例 2 で検出された株は A 型で、患者の年齢は 1 歳 1 カ月および 1 歳 11 カ月であった。症例 1 は発病の 6 日前、症例 2 は 11 日前にワクチンを接種していた。症例 3 から症例 6 で検出された株は D5 型で、患者の年齢は 0 歳 7 カ月から 12 歳 9 カ月であった。症例 4 および症例 6 はワクチン接種歴を有しており、接種時期は、症例 4 は発病の 3 か月前、症例 6 は発病の 10 年前であった。

主治医からの情報を表 3 に示した。いずれの症例も自然感染の経過と比較して軽症であった。症例 3 は発疹の様子から麻疹が疑われていた。また、症例 5 では、出現順序は典型的ではないが麻疹様の発疹を認めた。

D. 考察

今回の調査では、病原体発生動向調査において採取された 99 検体について、病原体検査マニュアルに記載された方法で PCR を実

施し、6 検体から麻疹ウイルス遺伝子が検出された。このうち 2 検体は HA 遺伝子領域の PCR のみが陽性となり、HA 遺伝子領域の PCR は N 遺伝子領域の PCR と比較して感度が高いことが示唆された。これまでに当所で麻疹患者の咽頭ぬぐい液を検体として実施した PCR 検査では、今回のような不一致例は認められていない。これらのことから、検体中のウイルス量が多い場合は特に問題はないが、修飾麻疹やワクチンの副反応などで検体中のウイルス量が少ない場合は HA 遺伝子領域の PCR が適していると考えられた。

分子系統解析の結果とワクチン接種歴から、症例 1 および 2 はワクチンの副反応であると考えられた。一方、症例 3~6 で検出された株は D5 型で、2007 年以降の国内流行株と同じクラスターに属していたことから、地域流行株を原因とする修飾麻疹であると考えられた。修飾麻疹発症の要因としては、母体からの移行抗体が残っている乳児やヒトγグロブリンを投与された場合のほか、麻しんワクチン接種後、年数の経過とともに免疫が低下して麻疹に罹患した例(Secondary vaccine failure:SVF)も同様の経過をとることが知られている。今回確認された 4 症例の発症要因としては、症例 3 は、麻疹罹患歴、ワクチン接種歴ともに無いとのことであったが、自然感染例と比較して軽症で経過も短かったことから、母体由来の移行抗体が残っている乳児期に麻疹に罹患し、低レベルの免疫を獲得していた可能性が考えられた。症例 4 は、ワクチン接種の 3 カ月後の発病であることから、primary vaccine failure(PVF)と考えられた。症例 5 は、患者の年齢が 0 歳 7 カ月であったことから、母体由来の移行抗体が残っていたと考えられた。症例 6 は、ワクチン接種後 10 年が経過していることから、SVF と考えられた。

これまで、横浜市における感染症発生動向調査では、検査依頼書に麻疹あるいはその疑

いのあることが記載されている場合に検査を実施していた。症例 3 および症例 5 では麻疹様の発疹が認められており、医療機関と情報の共有が出来ていれば検体搬入時に検査が実施された症例であった。一方、症例 4 および症例 6 では、スクリーニング検査が有用であったと考えられ、修飾麻疹症例の把握には、患者情報の収集が極めて重要であるとともに、今回実施したようなスクリーニング検査も一助となることが示唆された。

E. 結論

1999年10月から2009年7月の期間に、感染症発生動向調査において発疹を伴うかぜ様疾患の小児から採取された99検体を対象とした調査で、地域流行株を原因とする修飾麻疹4症例を確認した。発症の要因としては、①乳児期に麻疹に感染し、低レベルの免疫を獲得していた、②PVF、③母体由来の移行抗体が残っていた、④SVFが考えられた。修飾麻疹症例の把握には、医療機関と患者情報を共有し、典型的な麻疹の症状がみられない症例も検査診断が行われるサーベイランス体制の構築が重要と考えられる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

なし

2) 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 検査成績(検体採取年別)

検体採取年	検体数	PCR陽性検体数	
		H遺伝子	N遺伝子
1999(9月~12月)	2	0	0
2000	16	2	1
2001	8	0	0
2002	9	0	0
2003	7	0	0
2004	11	0	0
2005	16	0	0
2006	10	0	0
2007	5	1	1
2008	4	3	2
2009(1月~7月)	11	0	0
合計	99	6	4

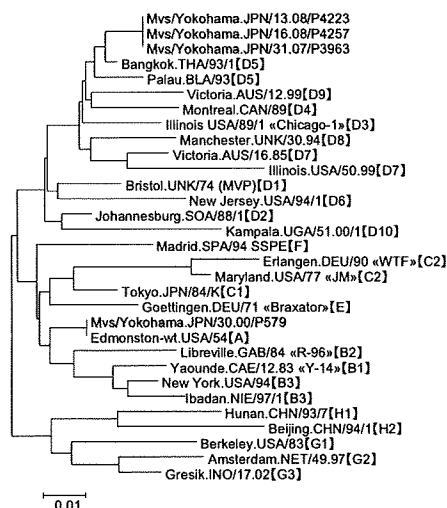


図1 麻疹ウイルスの分子系統樹(N遺伝子領域)

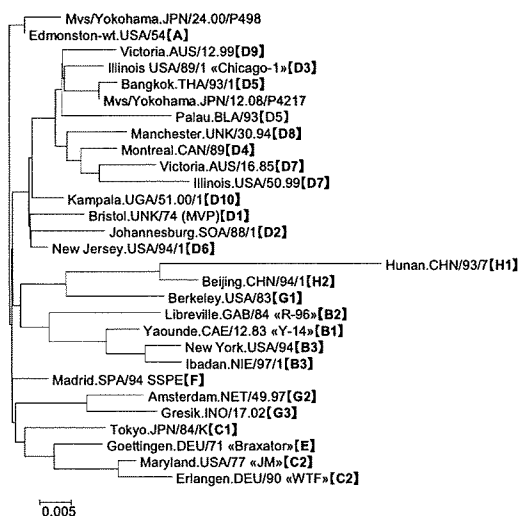


図2 麻疹ウイルスの分子系統樹(HA遺伝子領域)

表2 PCR陽性症例

症例 No.	検体No.	遺伝子型	発病日	検体採取日	年齢	性別	臨床診断名	ワクチン接種歴
1	P498	A *	2000.6.12	2000.6.17	1y1m	女	発疹症	あり (2000.6.6)
2		A	2000.7.11	2000.7.24	1y11m	男	夏かぜ発疹症	あり (2000.7.11)
3	P3963	D5	2007.8.1	2007.8.3	8y10m	女	ウイルス性発疹症	なし
4	P4217	D5 *	2008.3.15	2008.3.15	1y3m	男	ウイルス性発疹症	あり (1y0m時点)
5	P4223	D5	2008.3.22	2008.3.24	0y7m	女	発疹症	なし
6	P4257	D5	2008.4.13	2008.4.15	12y9m	男	夏かぜ発疹症	あり (1998.4)

* :HA遺伝子領域の塩基配列解析で同定

表3 主治医からの情報

症例 No.	発病日	経過等	備考
3	2007.8.1	8月1日 発熱(39℃) 3日 受診、検体採取 発熱(39℃)、発疹(+)、コプリック(-) 6日 発熱(-)、発疹(-)	* 発疹の様子から麻しんが疑われた * 麻しん罹患歴(-) * 麻しん患者との接触歴(-)
4	2008.3.15	3月10-11日 発熱(39℃) 15日 受診、検体採取 発熱(39℃)、発疹(+)、結膜炎(+) コプリック(-)	* 丘疹(胸・首・背中にぼつぼつとした発疹)
5	2008.3.22	3月22日 受診 おむつかぶれ、発疹(+) 23日 休日外来受診 発熱(38.6℃)、発疹(++) 24日 再受診、検体採取 発熱(-)、発疹(+++) 26日 再受診 発熱(-)、発疹(±)	* 麻しん様の発疹 * 発疹が体幹部に出現 * 発疹がさらに広がった
6	2008.4.13	4月15日 受診、検体採取 発熱(38.5℃)、発疹(+)	* 丘疹(顔面・躯幹・手掌・足底) * 同時期に、患者が通う中学校で同様の症状を呈する患者が多数発生していた

石川県における麻疹抗体価調査結果について（2007～2009年）

（麻疹ウイルス小班）協力研究者： 倉本 早苗 石川県保健環境センター

研究要旨

当センターの調査研究ならびに国の感染症流行予測事業により、2007～2009年の3年間、石川県在住者計695人について麻疹ウイルスの抗体保有状況を調査した。その結果、2009年の若年齢階層（4～24歳）の抗体価が前2年に比較し高い傾向にあることがわかった。

また、調査対象者の麻疹の予防接種率が調査期間中に年々上昇していた。これは、2008年からの国や県による麻疹対策の結果、追加予防接種対象者のみならず他の年齢階層にも予防接種の推進を促したためと考えられた。

一方、1999年に実施した麻疹抗体保有状況調査と今回の調査結果を比較した結果、10年前に比べ近年はほぼ全年齢階層において抗体価が低くなっていることがわかった。この結果から、今後麻疹の再流行が危惧されるが、今回の調査結果から予防接種体制のさらなる強化により、それは回避可能であると思われた。

1 はじめに

2007年のWHOによる「西太平洋地域からの麻疹排除宣言」を受け、我が国では2008年より麻疹排除計画を実施している。一方、石川県では2002年より全国に先駆け麻疹患者の全数把握を行う石川県麻疹迅速把握事業など様々な麻疹対策を講じてきており、当センターにおいても2008年度より麻疹に関する調査研究を実施している。そこで、本調査研究ならびに国の感染症流行予測事業により、2007年から当県における麻疹ウイルスの抗体調査を実施してきたので、3年間の調査結果について若干の考察を加え報告する。

2 対象および方法

検体は、2007～2009年の各年7～9月に県内在住者から採取された血清を使用し、対象者数は2007年が236人（男性78人、女性158人）、2008年が212人（男性65人、女性147人）、2009年が247人（男性90人、女性157人）であり、対象者

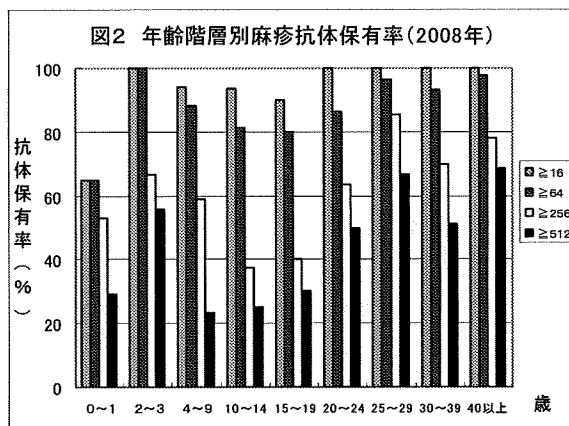
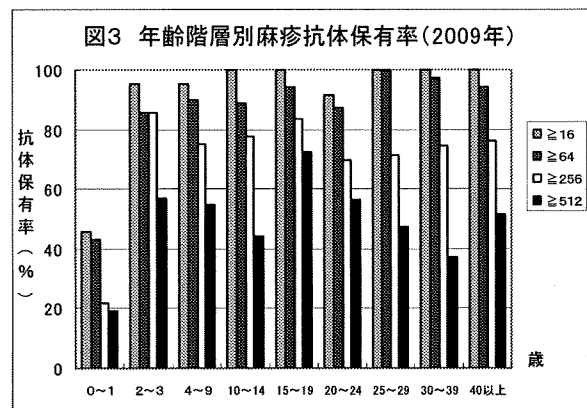
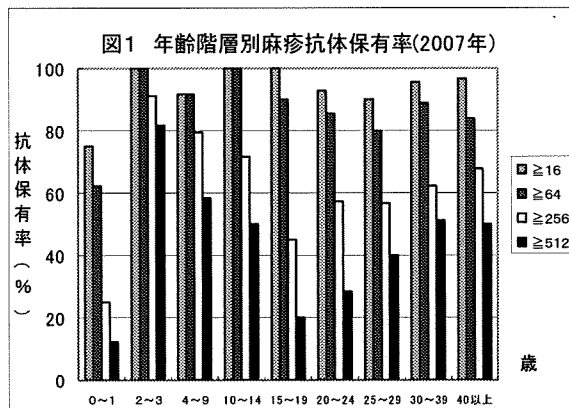
は年齢により9階層（0-1歳、2-3歳、4-9歳、10-14歳、15-19歳、20-24歳、25-29歳、30-39歳、40歳以上）に分け、各階層は25人程度とした。なお、対象者に対しては、当センター疫学倫理審査委員会にて承認の得られた方法でインフォームドコンセント等を行い、同意の得られた対象者については年齢、性別、予防接種歴、罹患歴などを調査した。

麻疹ウイルス抗体価測定は、ゼラチン粒子凝集法キット（富士レビオ社）を使用し実施した。

3 成績

3・1 2007～2009年の麻疹抗体保有状況

各年の年齢階層別の麻疹抗体保有状況は図1～3のとおりである。抗体陽性者（抗体価1:16以上の人）は、いずれの年でも0-1歳を除く各年齢階層においてほぼ95%を超えていた。また、感染防御に有効とされる抗体価1:64以上の抗体保有者は、0-1歳を除く各年齢階層で80%を超えていた。



なお、1:512以上の高抗体価保有者の割合は、2007年では15～24歳で、また2008年では4～19歳でそれぞれ40%未満と他の階層に比べて低率であったが、2009年にはそのような傾向を認めなかった。

3・2 調査対象者の麻疹予防接種歴

各年における調査対象者の麻疹予防接種歴を表1に示した。

年齢階層(歳)	2007年			2008年			2009年		
	対象者数	予防接種歴のある人(%)	うち5年以内の接種者(%)	対象者数	予防接種歴のある人(%)	うち5年以内の接種者(%)	対象者数	予防接種歴のある人(%)	うち5年以内の接種者(%)
0～3	19	78.9	100.0	26	73.1	100.0	57	59.6	100.0
4～9	24	95.8	39.1	17	94.1	50.0	20	95.0	89.5
10～14	14	92.9	7.7	16	87.5	0.0	18	100.0	27.8
15～19	20	80.0	0.0	20	80.0	18.8	18	83.3	40.0
20～24	28	39.3	9.1	22	59.1	23.1	23	65.2	46.7
25～29	30	36.7	9.1	27	59.3	37.5	21	76.2	43.8
30～39	45	22.2	10.0	43	32.6	21.4	35	45.7	43.8
40以上	56	10.7	0.0	41	9.8	25.0	55	16.4	44.4
計	236	44.5	26.7	212	52.8	38.4	247	57.5	61.3

各年における予防接種歴を比較すると、年々接種率の上昇傾向（特に10歳以上）がみられ、さらに、このうち5年以内に接種した人の割合が明らかに増加していた。

4 考 察

(1) 2007～2009年の麻疹抗体価調査結果

WHOは麻疹排除の指針の一つとして、「麻疹の予防接種率が95%以上であること」をあげているが、2006年からの第2期予防接種開始、2008年からの「麻疹排除計画」による第3期、4期予防接種開始の効果もあり、当県における2008年の第1期～4期の予防接種率は93.0%、94.8%、92.5%、86.6%と、かなり良好な結果であった。今回の3年間の調査期間中に、年々予防接種率が高くなっていったこともこれらの対策の効果といえよう。また、追加予防接種対象年齢である第2期（就学時；5-6歳）、第3期（中学1年生；12-13歳）および第4期（高校3年生；17-18歳）以外の年齢階層においても予防接種率が高くなっていったのは、近年の国や県の麻疹対策や、2007年の麻疹流行時におけるマスコミ報道などにより県民全体の意識が向上したことによるものと推測される。

さらに、今回の対象者のうち、過去5年以内に予防接種をうけた者の多くは2回目の接種と考えられ、2009年の調査結果において前2年と比較し高抗体価保有者が増えていたことは、2回目の予防接種によるブースター効果と思われる。

(2) 1999年の調査結果との比較

1999年に当センターにおいて実施した同様の調査結果¹⁾において、1:16以上の抗体価を保有する人は、5歳以上の年齢階層で95%を超えており、また1:512以上の高抗体価保有者の割合は5歳以上の年齢階層で70%以上であった。本結果と今回の3年間の調査結果を比較すると、この10年間に高抗体価保有者の割合が下がってきていることがわかった。この理由の一つとして考えられるのは患者数の減少であろう。即ち、患者数の減

少により、自然感染によるブースター効果の機会が減少し、高抗体価保有者の割合が低下したのではないかと考えられる。ちなみに、1999年の感染症発生動向調査における全国の定点からの麻疹患者報告数は22,552人で、実際にはこの10倍以上であったと推測される。それに対し、今回の調査期間である2007～2009年では、大きな流行のあった2007年でも定点からの同患者報告数は3,133人で、また全数報告に移行した2008年では11,005人、2009年では741人であり、この10年間に患者数は著しく減少したと考えられる。

(3) 今後の流行予測

麻疹に関するサーベイランス体制や予防接種体制の強化により、2012年までの麻疹排除計画が着実に進んでいることは間違いないが、1999年と2007～2009年の麻疹抗体価調査結果の比較から、近年は高抗体価保有者が減少していることが明らかとなり、今後麻疹が再流行する危惧は否定できない。しかし、一方で2007～2009年の調査結果から、2回以上の予防接種により抗体価は顕著に上昇することが裏付けられたので、今後の予防接種体制のさらなる強化により再流行を回避させることが可能であると考えられる。

今後の麻疹排除の過程の評価として、また排除後の再流行阻止のために、今後も継続して県民の抗体保有状況の把握ならびに患者発生動向の監視を行う必要があるだろう。

5 結 論

(1) 2007～2009年の麻疹抗体価調査結果

2007～2009年に、石川県在住者の麻疹抗体価調査を実施した結果、いずれの年も2歳以上の年齢階層においては約80%以上の人が十分な抗体（抗体価1:64以上）を保有していた。また、1:512以上の高抗体価保有者の割合は、2007年では15～24歳で、また2008年では4～19歳でそれぞれ40%未満と低率であったが、2009年にはそのような傾向を認めなかった。なお、調査対象者の予防接種

率は年々高くなり、その傾向は麻疹排除計画による追加予防接種対象者以外の年齢階層にも及んでいた。

(2) 今後の流行予測

1999年と2007～2009年の麻疹抗体価調査結果を比較した結果、10年前に比べ近年では県民の麻疹に対する抗体価が低い傾向にあるため、今後の再流行が危惧される。しかし、今回の調査結果から予防接種の徹底によりその危惧は回避できると思われた。

参考文献

1) 米澤由美子, 大矢英紀, 尾西 一, 庄田丈夫:
石川県における麻疹ウイルスの抗体調査. 北陸公衆衛生学会誌, **27**: 32, 2000

5 健康危険情報 特になし

6 研究発表

1) 倉本早苗, 児玉洋江, 杉盛耕益, 尾西 一:
石川県における麻疹ウイルスの抗体調査 (2007～2009年). 第37回北陸公衆衛生学会. 石川県, 2009年11月

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サーベイランスシステムと
実験室診断に関する研究事業） 麻疹ウイルス研究小班

麻疹ウイルス実験室診断の向上－検体搬送・保存溶液の検出感度への影響に関する研究及び
東海地区麻疹レファレンスセンター活動等について

統括分担研究者 駒瀬 勝啓 国立感染症研究所
研究協力者 皆川 洋子、小林 慎一、續木 雅子、広瀬かおる、山下 照夫 愛知県衛生研究所

研究要旨 地方衛生研究所における麻疹サーベイランス・システム整備及び実験室診断の精度向上を目的として、①麻疹疑い患者からの実験室診断用検体保存液組成が検出感度に及ぼす影響について検討した。②東海地区レファレンスセンターとして麻疹IgM(ELISA)抗体検査proficiency test、PCR精度管理及びブロック地研におけるリアルタイムPCR検査体制セットアップを促進した。③麻しん全数把握事業等愛知県における麻疹患者サーベイランスの報告状況を解析した。

A. 研究目的 ワクチン予防可能疾患(VPD)のうちポリオの次のターゲットとされ、日本の属するWHO西太平洋地域(WPRO)では排除達成目標年が2012年に迫っている麻疹について、病原体サーベイランス・システム整備の一助とするため、地方衛生研究所（地衛研）における麻疹実験室診断の精度向上をめざして以下の検討を行った。①麻疹ウイルスの検出及び遺伝子型別（輸入例か否かの決定に重要）サーベイランスの円滑な実施を可能とするため、ウイルス検出用検体保存液組成及びグリセリン添加が検出感度に及ぼす影響について検討した。②東海地区レファレンスセンターとして麻疹IgM(ELISA)抗体検査proficiency test、PCR精度管理及び地区地衛研におけるリアルタイムPCR検査体制のセットアップ促進をはかった。③麻しん患者発生報告体制の変革期にあたり、全数把握事の開始及び全数報告疾患への移行前後の愛知県における麻疹患者報告状況の変化を解析した。

B. 研究方法

①麻疹ウイルスの検出及び遺伝子型別をサーベイランスとして円滑に行えるよう、麻疹ウイルス野外株(KA)をVerohSLAM細胞に接種して準備した検体を表のような組成の液体(ただしVB: veal broth, BSA: bovine serum albumin, PBS: phosphate-buffered saline)に試験研究機関に到達する前段階の医療機関等で通常検体保存に用いられているが感染性麻疹ウイルスの長期保存には不相当とされる温度条件(-20℃)に保存し(陽性対照は-80℃) VerohSLAM細胞上での麻疹ウイルス分離を実施し、8ヶ月まで経時的にウイルス検出の有無及び残存感染価を検討した。②感染研により行われた麻疹IgM(ELISA)抗体検査proficiency testに参加するとともに、東海地区4地衛研に麻疹ウイルスRNAを含む検体を配布してnested RT-PCR精度管理を実施した。駒瀬小班の木村ら(参考文献)により開発された麻疹ウイルス検出用リアルタイムRT-PCR検査に必要なプライマー及びTaqManプローブセットを配布した。③愛知県衛生研究所内にある愛知県感染症情報センターに寄せられた麻しん全数把握事業への報告及び感染症発生動向調査への報告結果を、主に報告制度変更の影響や検査室診断の実施状況に関して解析した。(倫理面への配慮)本研究で用いる臨床検体及び患者情報は、「疫学研究における倫理指針」に基づき、材

料提供者および家族の個人の尊厳及び人権の尊重、個人情報保護に配慮して実施する。症例の分析においては、個々の症例が特定できないよう配慮して行う。

C. 研究結果

①表1に及び図1に、様々な組成の保存液中に-20℃にて保存した麻疹ウイルス含有検体からのウイルス検出結果を示す(表1、図1)。図1左側に示すとおりveal broth (VB)ベースの保存液を用いた場合は、8か月間保存後も感染価の残存を確認できた。

②麻疹IgM(ELISA)抗体検査proficiency test成績は、他のレファレンスセンターとともに良好であった。nested-double RT-PCR法による麻疹ウイルス遺伝子検出の外部精度管理は、今年度は新型インフルエンザウイルス検査や食中毒検査の合間に実施した。地衛研間における検出感度のバラツキは1管以内と許容される範囲であった(表2)。TaqManプローブ法によるリアルタイムRT-PCR検査は、ノロウイルス及び新型インフルエンザウイルス検出目的で、既に東海地区の5地衛研全てで稼働しているため、今回の麻疹用プライマー・プローブセット配布によりリアルタイムRT-PCR検査も併用可能となった。

③2009(平成21)及び2008年における麻疹患者報告数、2007年全数報告数、参考に2006年の定点報告数を表3に示す。2009年は前年に比べ全国と同様愛知県においても麻疹患者報告数が減少した。内訳をみると患者年齢は低下し、1歳以上で予防接種歴のない者の割合が減少している。また2008年1月以降麻しん発生届には、診断方法として病原体検出、血清IgM抗体検出若しくはペア血清での抗体検出等が明記されたことをうけ、検査室診断結果を付した報告が2008年以降過半数を占め、2009年には7割に達した。

D. 考察

①VerohSLAM細胞を用いたウイルス分離は、保存液組成によっては-20℃保存であっても8ヶ月後に可能であった。今回検討したBSA濃度は0.2%であったが、横浜市からの情報では5%BSA添加培地において保存された検体から数年後に麻疹ウイルス分離可能であったとのことである。BSAのコストとのバランスをはかりながら濃度についてさらに検討する余地がある。

②麻疹ウイルス遺伝子検出の現行法nested double RT-PCR法は鋭敏であるが、手技が煩雑で全工程に8時間程度を要する。麻疹発生時に迅速な検査対応をはかるには、現行法と同程度の感度を維持しつつ、より簡便・短時間に結果を返すことを可能とする検査法の導入が必要である。今回東海地区にプライマー・プローブセットを配備したリアルタイムRT-PCRプロトコルの感度は、開発者によるとnested double RT-PCR法と同等～1/10程度とされている。集団発生等で患者確認が急がれる場合等に、活用が期待される。

③愛知県における麻疹発生報告状況の変化をみると、定点→全数報告体制への移行は、従来基幹定点のみが報告していた15歳以上の患者発生について、一般診療所の内科や皮膚科からも報告がみられ、有効であることが確認された。病原体確認若しくは血清診断結果の付された報告の割合は、集団発生が頻発した2007年には、民間衛生検査所における検査用試薬需給逼迫等の影響もあり11%と低かったが、2008年は50%を超え、2009年は71%と順調に増大している。報告された検査結果の大部分は血清IgM抗体検出若しくはペア血清抗体価上昇でありPCR（2008年2件、2009年0件）やウイルス分離（2008年1件）は少なかった。当所あるいは名古屋市衛研への検査依頼は、残念ながら未だ少なく、今後は他県と同様輸入麻疹発生にも対応できる分子疫学の有用性啓発や検体収集その他医療機関及び保健所との連携を含め、さらなる体制強化が必要である。

E. 結論

①検体保存液として、veal brothにグリセリン及びBSA添加すると、-20℃に8か月間保存してもウイルス感染価が残存しうることが判明した。②今後実験室診断件数増に備え、現行のnested double RT-PCR法について検出感度の精度管理を行った。また、現行法と同程度の感度を維持しつつより短時間で結果の返せるリアルタイムRT-PCR法のセットアップをはかった。③愛

知県における麻疹発生報告状況において、2008年1月に行われた全数報告への移行は、15歳以上の麻疹患者把握精度の向上をもたらし、2年目となる今年度は検査室診断の付された報告が7割を占めた。今後地衛研への検査依頼増加をはかり、輸入例等の分子疫学を可能にするウイルス分離及びRT-PCR実施症例を増やす必要がある。

G. 研究発表など

1. 論文発表

山口通代、広瀬かおる、續木雅子、櫻井博貴、竹内一仁、木村隆、増井恒夫、皆川洋子：麻しん患者における麻しんの予防接種歴と症状との関係-愛知県感染症対策協議会事業「麻しんに関するアンケート調査」から-、愛知県衛生研究所報 59：1-9, 2009.

續木雅子、広瀬かおる、増井恒夫、皆川洋子：愛知県麻しん全数把握事業における2007年患者報告状況と感染症発生動向調査との比較、日本公衆衛生学会雑誌 56(9)：674-681, 2009.

2. 学会発表等

皆川洋子：平成21年度東海地区麻疹・風疹レファレンスセンター報告、平成21年度地方衛生研究所全国協議会東海・北陸支部微生物部会、岐阜県岐阜市、2010年3月5日

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

参考文献

Akiyama M, Kimura H, Tsukagoshi H et al. Development of an assay for the detection and quantification of the measles virus nucleoprotein (N) gene using real-time reverse transcriptase PCR. J Med Microbiol 58:638-643, 2009.

図1 保存検体からの麻疹ウイルス検出結果 (TCID50)

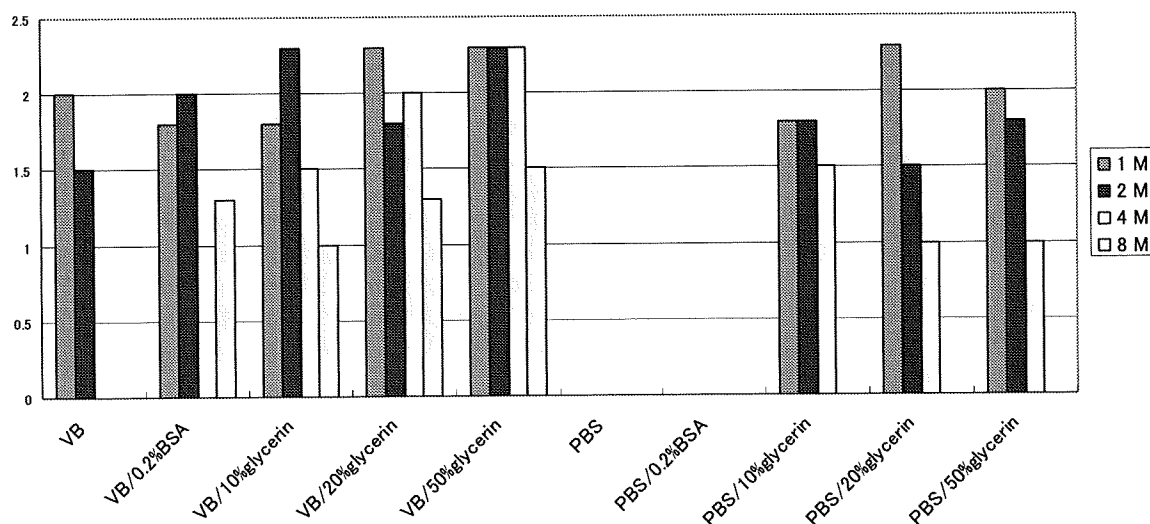


表1 VerohSLAM細胞を用いたウイルス分離(CPE検出)

	VB	VB/0.2%BSA	VB/10%glycerin	VB/20%glycerin	VB/50%glycerin*
1 M	+	+	+	+	
2 M	+	+	+	+	
4 M	-	+	+	+	
8 M	-	+	+	+	
	PBS	PBS/0.2%BSA	PBS/10%glycerin	PBS/20%glycerin	PBS/50%glycerin*
1 M	-	-	+	+	
2 M	-	+	+	+	
4 M	-	-	+	+	
8 M	-	-	-	-	

ただしVB:veal broth, BSA: bovine serum albumin, PBS: phosphate-buffered saline.

*細胞毒性激しくCPE検討不可。

表2 麻疹ウイルスRNAを用いたRT-PCR精度管理結果

参加機関/対象機関	5/5	100%
2月10日現在実施済	5/5	100%
2月10日現在報告書提出済	4/5	80%
陽性	陽性 4/4	100% (報告4機関中)
陽性検体が陽性を示した最大希釈倍数 (log10)	HA: 5 ~ 6 NP: 5 ~ 6	100% (報告4機関中) 100% (報告4機関中)
陰性検体	陰性 4/4	100% (報告4機関中)

表3 愛知県における麻疹患者数の把握状況

年	2006 (定点報告)	2007 (愛知県全数把握事業 2月1日 ~12月31日)	2008 (全数調査対象 ・ 感染症発生動向 調査 1月1日 ~)	2009 (感染症発生動 向調査)
患者年齢	0~14歳	4か月~82歳	2か月~59歳	6か月~41歳
報告数(人)	43	212	198	28
0~14歳[人](%)	43(100)	89(42)	103(52)	19(68)
15歳~[人](%)	0	123(58)	95(48)	9(32)
予防接種[人](%)				
済		57(27)	48(24)	14(50)
未		87(41)	86(43)	8(29)
不明		68(32)	64(32)	6(21)
病原体診断有[人](%)		24(11)	104(53)	20(71)

厚生労働科学研究費補助金
平成 21 年度 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（大阪府）
近畿ブロックレファレンス活動と 2009 年の麻疹検査

研究協力者 加瀬哲男
倉田貴子
宮川広実
研究分担者 駒瀬勝啓

大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課
大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課
大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課
国立感染症研究所 ウイルス 3 部

研究要旨

大阪府立公衆衛生研究所では 2008-2009 年は、近畿ブロックレファレンスセンターとして各地方衛生研究所に麻疹遺伝子検査用試薬一式を配布して、各地方衛生研究所において麻疹の検査が可能となるように支援した。またその一環として麻疹ウイルスの RT-PCR の実地研修を行った。

2009 年の大阪府における麻疹検査では 1 例のみにワクチン株に相当する A 型ウイルスを検出したが、その他の検体からはウイルスは検出されなかった。また、近畿ブロック全体においてもその 1 例を除いて麻疹ウイルスは検出されなかった。

A. 研究目的

近畿ブロックレファレンスセンターとしては、ブロック内地方衛生研究所で麻疹の実験室診断を行うことが可能になるように国立感染症研究所の協力、指示のもとに、物質的、技術的支援を行うこと。さらに臨床診断に加えて、実験室診断においても、麻疹が確定し正確にサーベイランスが行われ、その実態が明らかになるような態勢をつくることを目的とする。

B. 研究方法

1. 近畿ブロックにおける麻疹検査

平成 21 年の近畿ブロック麻疹風疹レファレンスセンターとしての活動は表 1 に示した。すなわち平成 21 年 2 月

に国立感染症研究所で作成された病原体検出マニュアルに記載された試薬等を近畿ブロック内 14 地方衛生研究所に配布した。同年 4 月に参加を希望した 4 地方衛生研究所に対して RT-PCR による麻疹ウイルス遺伝子の検出方法について研修伝達を行った。同年 8 月には和歌山市衛生研究所の検査材料について確認のための再検査を行った。同年 12 月に麻疹検査の実施状況についてアンケート調査を行った。なお平成 22 年も麻疹ウイルス検査のための試薬等についてはブロック内各地方衛生研究所に配布する。

2. 大阪府立公衆衛生研究所における麻疹検査

大阪府立公衆衛生研究所では 2009 年に病原体検出マニュアルに従い 31 検体について RT-PCR を実施した（その中には和歌山市衛研から依頼のあった 7 検体を含む）。また、デンカ生研のウイルス抗体 EIA 「生研」麻疹 IgM をもちいて麻疹ウイルス IgM 抗体を測定した。

C. 研究結果

1. 近畿ブロックにおける麻疹検査

アンケート調査の結果は表2に示した。平成21年度に検出された麻疹ウイルスは大阪府が報告したワクチン株であるA型1例のみであった。

2. 大阪府立公衆衛生研究所における麻疹検査（2009年）

大阪府立公衆衛生研究所における麻疹検査の結果を表3に示した。麻疹ウイルス遺伝子が検出できたのは症例8の1検体のみであった。IgM検査では症例6が陽性と判定されたが、ウイルスは検出されなかった。

D. 考察

近畿ブロックでは、8カ所の地方衛研で麻疹ウイルスを検出するためのRT-PCRが実施された。また、3衛研ではウイルス分離試験も行われた。しかしながら、麻疹ウイルスは、大阪で検出されたA型のみであった。これは、麻疹の発生が少なかったことが、最も大きな原因と思われるが、衛生研究所で行われた麻疹ウイルス検査の大部分が、麻疹疑い症例で類症鑑別を行うことを目的とされたためと思われる。全ての地方衛研でいえることであるが、麻疹の確定診断を目的としての検査はほとんど行われなかったと思われる。麻疹は全数把握疾患として位置づけられているが、全数において病原体を確定するための態勢はいまだ十分とはいえないと思われる。

当所の検査においても類症鑑別を行うことを目的とした検査が大半を占めたため、実際に流行した可能性のある

ウイルスを検出することができなかった。流行ウイルスの把握は血清学的診断ではできないので、今後はウイルス学的な確定診断を目的とした検査を積極的に行っていく必要があると思われる。

E. 結論

近畿ブロック内の地方衛生研究所で行われた麻疹ウイルス検査では大阪府から報告された1例（ワクチン株に相当するA型）を除いて、麻疹ウイルスの検出報告は提出されなかった。これは麻疹ウイルスが排除されたというよりは検査態勢が整っていなかったことを示していると思われる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1

2009年近畿ブロックレファレンスセンターの活動状況

2009年2月 近畿ブロック14地研に試薬等を配布

2009年4月 麻疹RT-PCR研修（於：大阪府公衛研）
大阪市、東大阪市、和歌山市、奈良県

2009年8月 和歌山市の検体について確認試験

2009年12月 麻疹検査実施状況アンケート調査

表 2

平成21年度近畿地研麻疹ウイルス検査状況					
	RT-PCR(検体数)	陽性数	分離(検体数)	陽性数	遺伝子型
滋賀県	0	0			
京都府	0	0			
京都市	1	0			
大阪府	13	1			A
大阪府(和歌山市)	7	0			
大阪市	5	0	5	0	
東大阪市	0	0			
兵庫県	2	0			
神戸市	12	0	12	0	
尼崎市	0	0			
姫路市	0	0			
奈良県	2	0			
和歌山県	0	0			
和歌山市	7	0			
堺市	25	0	23	0	
合計	74	1	40	0	

表 3 大阪府立公衆衛生研究所における麻疹検査(2009年)

症例	発症日(発熱)	採取日	sample	性別	年齢	ワクチン歴	IgM	PCR	Genotype
1	/08/12/29	/09/01/05	咽頭拭い	F	35y4m	不明		-	
1	/08/12/29	/09/01/05	全血	F	35y4m	不明		-	
2	/09/01/02	/09/01/09	咽頭拭い	F	81y	不明		-	
2	/09/01/02	/09/01/09	全血	F	81y	不明	0.08	-	
3	/09/03/06	/09/03/10	全血	F	10y1m	なし		-	
3	/09/03/06	/09/03/10	咽頭拭い	F	10y1m	なし		-	
4	/09/03/08	/09/03/12	全血	F	1y7m	2008年9月	1.5	-	
4	/09/03/08	/09/03/16	全血	F	1y7m	2008年9月	0.97	-	
5	/09/03/18	/09/03/24	咽頭拭い	M	1y	09/03/12 MR		-	
6	/09/03/17	/09/03/26	咽頭拭い	M	35y9m	不明		-	
6	/09/03/17	/09/03/26	全血	M	35y9m	不明	4.06 (3/23)	-	
7	/09/04/05?	/09/04/	咽頭拭い	M	31y	不明		-	
7	/09/04/05?	/09/04/	全血	M	31y	不明	2.06(4/8)	-	
8	/09/04/14	/09/04/16	咽頭ぬぐい	M	1y0m	09/04/07 MR		+	A
8	/09/04/14	/09/04/16	全血	M	1y0m	09/04/07 MR		-	
9	/09/06/10	/09/06/20	全血	F	18y2m	高3でワクチン接種		-	
9	/09/06/10	/09/06/20	咽頭ぬぐい	F	18y2m	高3でワクチン接種		-	
10	/09/06/17	/09/06/22	全血	M	1y10m	2008/9/3MR	<0.8 (6/22)	-	
10	/09/06/17	/09/06/22	咽頭ぬぐい	M	1y10m	2008/9/3MR	<0.8 (6/22)	-	
11	/09/07/29	/09/08/04	全血	F	0y10m	なし	1.03	-	
11	/09/07/29	/09/08/04	咽頭ぬぐい	F	0y10m	なし		-	
12	2009.4.7	2009.4.15	咽頭ぬぐい	M	1	2008.11.28		-	
13	2009.4.12	2009.4.15	咽頭ぬぐい	F	1	2008.12.4		-	
14	2009.4.19	2009.4.24	咽頭拭い	F	1	2009.2.24		-	
14	2009.4.19	2009.4.24	PBMC	F	1	2009.2.24	1.01	-	
15	2009.4.25	2009.4.30	PBMC	M	1y8m	2008.8.27	0.78	-	
16	2009.5.24	2009.6.1	咽頭拭い	F	21	2008.11.28		-	
16	2009.5.24	2009.6.1	PBMC	F	21	2007.10.5	0.59	-	
17	2009.9.14	2009.9.16	咽頭ぬぐい	F	18	2回2009年5月		-	
18	2009/10/22?	2009.10.28	咽頭ぬぐい	F	30	有1回		-	
18	2009/10/22?	2009.10.28	全血	F	30	有1回		-	

平成 21 年度 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 研究報告書

中国・四国ブロックにおける地方衛生研究所での麻疹検査実績について

研究協力者 戸田昌一 山口県環境保健センター

研究要旨

2009 年における中国・四国ブロックの各地方衛生研究所での詳細な麻疹検査実績を取りまとめ、麻疹検査対応に対する問題点を考察した。その結果、より多くの麻疹疑い例が、地方衛生研究所に検査依頼されるようなシステムを構築するとともに、麻疹否定例についての検査実績についても系統的に集計、評価するシステムが必要であることが示唆された。また、地方衛生研究所での検査については、複数種の検体を複数の検出方法により検査を実施することにより、確実な麻疹検査を実施することが求められる。

A. 研究目的

2012 年に設定されたアジア西太平洋地域からの麻疹の排除 (elimination) の達成目標に向け、我が国においても 2 回の定期ワクチン接種、中学 1 年及び高校 3 年年齢を対象とした補足的ワクチン接種により集団免疫の維持を図るとともに、全数報告による麻疹サーベイランスの強化が進められている。麻疹の発生数が排除のレベルまで低下してきた時点においては、すべての麻疹疑い例に対して、その疫学的な情報の把握とともに、ウイルス分離同定、ウイルス遺伝子の検出、または、麻疹 IgM 抗体の検出などの実験室診断による確定診断が必要とされている。

麻疹の発生数は、2008 年に 11,005 名の患者が報告されたが、2009 年における麻疹患者数 (第 1 週-48 週) は 712 名と大幅に減少してきている。しかしながら、現在、麻疹疑い例に対する検査診断例については、民間試験検査機関での IgM 抗体検出によるものが多く、今後の麻疹排除に向け、精度管理された地方衛生研究所での実験室検査がより大きな役割を果たすことが期待されている。

このような状況において、中国・四国ブロックにおける地方衛生研究所での麻疹疑い例の検査実績を詳細に把握することにより、当該ブロックにおける現時点での麻疹検査の実態を明らかにするとともに、麻疹排除に向けたこれからの課題について考察をすることを目的とした。

B. 研究方法

別紙に示す様式により報告された中国・四国ブロック内の 10 地方衛生研究所での 2009 年における検査実績をとりまとめ、地方衛生研究所での麻疹確定診断数及び否定診断数と、病原体発生動向調査における麻疹患者報告数と比較した。

C. 研究結果

中国・四国ブロック 9 県における感染症発生動向調査における麻疹患者報告数と地方衛生研究所への検査依頼数及びその検査結果を表 1 に示す。

表 1. 感染症発生動向調査に基づく麻疹患者発生届数及び地方衛生研究所での検査実績

麻疹患者数及び検査実績	A 県	B 県	C 県	D 県	E 県	F 県	G 県	H 県	I 県	合計
麻疹患者発生届数	2	1	10	23	3	2	5	6	0	52
うち、臨床診断例	0	0	3	6	1	1	2	2	0	15
うち、検査診断例	1	1	7	14	1	0	2	1	0	27
うち、修飾麻疹	1	0	0	3	1	1	1	3	0	10
検査実施数	4	2	3	6	1	0	0	1	3	20
うち、麻疹確定例(陽性)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
うち、麻疹否定例(陰性)	4	2	3	6	0	0	0	1	3	19

感染症発生動向調査において、2009 年第 1-48 週までに報告された麻疹患者数は 51 名であり、臨床診断例が 15 名、検査診断例（修飾麻疹を含む）が 36 名であった。

一方、地方衛生研究所に検査依頼された件数は 20 件であり、そのうち、1 件のみが検査陽性による麻疹確定例であり、残りの 19 件については検査陰性による麻疹否定例であった。

従って、報告された麻疹検査診断確定例 36 例のうちの 35 例までは、医療機関（民間試験検査機関）で検査されたものであった。

また、地方衛生研究所に 20 件の検査実績があったことから、麻疹疑い例について検査依頼があれば検査を実施できる体制にあることが示されたが、多くの麻疹疑い例（検査診断確定例を含む）については地方衛生研究所に検査依頼されていなかった。

地方衛生研究所に検査依頼された 20 例の検体の種類については、拭い液（鼻汁を含む）のみが 14 件、拭い液＋尿が 2 件、拭い液＋血液が 3 件、血液のみが 1 件であった。検体の種類別の検査内容及びその結果を表 2 に示す。

表 2. 検体種類別の検査実施内容及び検査結果

検体種別	検体数	検査結果	検査項目		
			RT-PCR	ウイルス分離	IgM 抗体
拭い液 (鼻汁含む)	19	陽性	0	0	—
		陰性	19	6	—
		未実施	0	13	—
尿	2	陽性	0	0	—
		陰性	2	1	—
		未実施	0	1	—
血液	4	陽性	0	0	1
		陰性	2	1	3
		未実施	2	3	0

地方衛生研究所に搬入された検体は、拭い液が 19 検体と最も多く、そのすべてで RT-PCR による遺伝子検出が試みられたが、すべて陰性であった。また、尿 2 検体についてもすべて RT-PCR による遺伝子検査が実施されたが、2 例とも陰性であった。一方、血液検体については、搬入された検体が 4 検体と少なかったが、その全例で IgM 抗体検査が実施され、そのうちの 1 検体について、検査陽性による確定診断がされた。血液検体からの RT-PCR による遺伝子検出については、4 件のうちの 2 検体で実施されたが、結果は陰性であった。なお、血液検体の残りの 2 検体については血清検体であったことから、RT-PCR による遺伝子検出は実施されなかった。

地方衛生研究所へ搬入された検体について、発症日から何日目に採取されたものであるかを表 3 に示す。

表 3. 地方衛生研究所に搬入された検体採取日

検体採取日	検体数
1 日目(発症日)	2
2 日目	1
3 日目	4
4 日目	2
5 日目	4
6 日目	1
7 日目以降	2
不明	4
合計	20

発症日から検体採取日までの日数については、発症日（1 日目）に採取されたものから 7 日目以降に採取された検体まで多様であり、発症日から 4 病日目以降に採取された検体が 9 検体と約半数を占めていた。また、発症日が不明である検体が 4 検体あった。

なお、地方衛生研究所での検査陽性であった 1 件については、5 病日目での検体採取であり、拭い液及び血液からの RT-PCR による遺伝子検出は陰性であったが、IgM 抗体が陽性であり、検査診断例として確定診断された。

D. 考察

本調査結果から、地方衛生研究所における麻疹検査について、いくつかの問題点が明らかとなった。まず、感染症発生動向調査における 2009 年の麻疹患者報告数は、中国・四国ブロックにおいて 51 名で、そのうち 36 名については検査診断例（修飾麻疹を含む）として報告されていたが、35 名については医療機関又は民間検査機関で検査が実施されており、地方衛生研究所にて検査陽性で確定診断された事例は 1 例のみであった。すなわち、麻疹が強く疑われる症例については、医療機関又は民間検査機関での IgM 抗体検査で検査確定例として報告され、地方衛生研究所に検体が搬送されない、又は、IgM 抗体検査が陽性で麻疹確定例として麻疹発生届が提出された後に採取された検体しか搬入されていない状況にあることが明らかになった。精度管理された地方衛生研究所での確定診断が麻疹排除に向けての重要な要件であることを考えると、麻疹が強く疑われる症例について、検体をどのようにして地方衛生研究所で検査を実施できるようにするかという課題が明確に示された。

一方で、中国・四国ブロックの各地方衛生研究所においては、20 例の検査実績があり、そのうち 19 例について検査陰性によって麻疹を否定している。これは、臨床的には典型的な麻疹と判断されないが、麻疹の可能性が考えられる検体が多く地方衛生研究所に搬入されていることを示している。ワクチン接種による集団免疫の向上により、今後、典型的な麻疹症状を示す症例は減少していくことが予想され、修飾麻疹を含む非典型的な臨床症状の症例について、各地方衛生研究所への検査依頼が増加することが考えられる。しかしながら、地方衛生研究所で検査陰性により麻疹を否定された症例については、発生動向調査における麻疹患者数及び病原体サーベイランスによる麻疹ウイルス検出数に反映されないことから、検査実績が系統的に集計されるシステムが全く存在していない。麻疹排除に向けては、一定数以上の麻疹疑い例について検査診断を行って、検査陰性を確認することが必要とされていることから、今回、中国・四国ブロックでの実績報告に用いたような共通の様式を定め、精度管理された地方衛生研究所での検査実績を把握するシステムを全国的に構築する必要があると考えられる。

各地方衛生研究所での検査体制については、咽頭拭い液検体を用いた PCR 法による麻疹ウイルス特異的遺伝子の検出は、依頼があった全ての症例において検査が実施されているが、PCR 検査に適切とされる発症日から 2-3 以内での検体採取が 3 割程度であった。このことから、医療機関、保健所及び本庁主管課との連携を密にして、適切な時期での検体採取が可能となるような体制を整備するとともに、拭い液、血液及び尿等の複数種類の検体について、PCR 法による遺伝子検出、ウイルス分離及び血清中の IgM 抗体測定等の複数の検出法によって、麻疹検査を確実に実施していく必要が示された。