

アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワークの強化に関する研究

麻疹風疹対策におけるラオスとのラボネットワークの構築について

研究分担者 山本 久美 (国立感染症研究所感染症情報センター 協力研究員)
駒瀬 勝啓 (国立感染症研究所ウイルス3部)

研究要旨 ラオス国立検査疫学センター(National Center for Laboratory and Epidemiology: NCLE)との Laboratory network 構築を目標に、文献・インタビューによる情報収集、現地訪問による各担当者との面会等から、network 構築に関する実現性の assessment および課題の洗い出しを行い、先天性風疹症候群(CRS)発生の危険性を検討するために、妊娠可能年齢の女性に対する風疹の血清疫学調査を実施した。

種々の情報収集から、ラオス国内における慢性的な問題として、「財源の確保と人材の育成及びそれらの維持」の必要性があげられ、国内のインフラ整備に関して多くの課題がみられたが、今回我々が NCLE との協力のもと実施した調査の結果、ラオス・ビエンチャン市の比較的教育・医療水準が高いと考えられる 15 歳から 35 歳の女性においても、風疹ワクチンを過去に接種したことがあるものはおらず、全体で 8 割程度の抗体保有率(全て感染による)であり、年齢群の年齢が上がるにつれて抗体保有率が上昇すること、さらに、今回の対象では生活・社会環境にかかわらず、風疹感染の危険性があることがわかった。この結果をもとに、WHO WPR LaoPDR Office では、本年 12 月をめどに実施を予定している麻疹ワクチンの接種キャンペーンにおいて、9 か月から 19 歳までの全年齢を対象に MR ワクチンを使用することを本格的に検討し始めるなど、本調査がラオス NCLE の capacity building に貢献しただけではなく、ラオス国内の予防接種政策を含めた麻疹風疹をめぐる公衆衛生対応に大きな影響と、非常に重要な示唆を与えることができた。

National Institute 間の network/collaboration を考える際には、その国の公衆衛生上の貢献という観点は外せず、サーベイランスや outbreak response 等、Laboratory だけではなく Epidemiology の側面からの collaboration を同期しながら、決して近視眼的ではない、中長期的な視野のもとで、本質的に相手国のためになる活動、かつ、根付いていくことができるもとを模索しながら活動していくことが重要と考えられた。

A. 研究目的

本研究班において、駒瀬勝啓ウイルス第三部第一室長を代表とする我々のグループでは、「ラオスにおける風疹並びに先天性風疹症候群(CRS)の血清疫学調査」として、ラオス国内における風疹の血清疫学調査を実施してきた。この調査を実施する目的として、ラオス

の風疹をめぐる公衆衛生の改善に重要な情報を与えることができるのはもちろんのこと、今回の活動を通して、ラオスの国立検査疫学センター(National Center for Laboratory and Epidemiology: NCLE)との国際的な技術協力体制の構築も視野に入れており、今後の中長期的な連携を目指して活動を行った。本研究

班においては、1年目は文献および当時日本に滞在していたラオス国籍の医師に対するインタビューを通じた今後の連携体制構築の実現性に関する assessment、2年目は現地視察の上、各関連機関を訪問し、関係者と直接 discussion したうえでの実現性や本調査における公衆衛生上の課題と提言、抱えている問題等の洗い出し、3年目は実施に至ったビエンチャン市における妊娠可能年齢の女性における風疹の血清疫学調査の結果について報告した。

今回は3年間の活動を総括するとともに、我々の活動における中長期的展望と課題に関して考察する。

B. 研究方法

1. 文献検索、およびラオス国籍の医師に対するインタビューによる現地の状況と今後の連携に関する assessment

(ア) 使用した文献一覧

- ① WHO/EPI, "National Immunization Data - EPI Summary by country, Lao PDR", 2007
- ② WHO/UNICEF, "Review of National Immunization Coverage 1980-2007, Lao PDR" August 2008
- ③ WHO/WPR, "Country Health Information Profile, Lao PDR", 2008
- ④ WHO/UNICE, "Child Survival Profile, Lao PDR", 2007
- ⑤ WHO, Weekly epidemiology record, "Measles Vaccine: WHO Position Paper", No.14, 2004, 79, 129-144
- ⑥ WHO, Weekly epidemiology record, "Rubella Vaccine: WHO Position Paper", No.20, 2000, 75, 161-172
- ⑦ WHO/WPR, "Measles Bulletin", Vol.2, Issue 4-Dec.2008
- ⑧ 財団法人 海外法人医療基金「ベトナム

ム、カンボジア、ラオスの医療事情：

1. ラオスの保健・衛生・医療事情」
2003 年度報告(在ラオス日本大使館医務官の報告による)

- ⑨ 田中政宏ら、「インドシナ諸国における鳥インフルエンザ流行とその対策の現状、2006年3~4月の現地調査から」、インフルエンザ, Vol.8, No.1 (2007-1)

(イ) インタビュー対象者

Dr. Manilay PHENGXAY

(ラオス国籍、当時東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻、元 JICA/EPI および WHO/Lao PDR Country Office 勤務)

2009年2月20日に、ラオスの実験室的・疫学的サーベイランス体制、WHO による Expanded Programme on Immunization (EPI)疾患を含む Vaccine Preventable Diseases (VPDs)における予防接種率や流行状況、outbreak に対する response capacity 等を含む11項目に関して、質問票に従い、インタビュー調査を実施した。

2. 現地訪問により関係者とのディスカッションによる課題の洗い出し

(ア) 面談した各関係者

NCLE

Dr. Phengta VONGPHRACHANH

Dr. Darouny PHONEKEO

その他スタッフ

Ministry of Health (MoH), National Immunization Program (NIP)

Dr. Chansay PATHAMMAVONG

その他スタッフ

WHO, West Pacific Region, Lao PDR Office

Dr. Manilay PHENGXAY

Dr. Reiko TSUYUOKA

Dr. Keith FELDON

Dr. Justin DENNY

その他スタッフ

3. ラオス・ビエンチャン市における妊娠可能年齢の女性に対する風疹の血清疫学調査

2010年10月25~29日、11月1~5日の合計10日間において、ラオス・ビエンチャン市に所在し産婦人科医療を提供する中心的な役割を担う以下の4つの医療機関：Mahosot, Mittaphab, Sethathirath hospitals, Mother and Child Hospital (MCH)を受診した15歳から35歳の女性で同意が得られたものを対象に、採血および質問票によるインタビュー調査を行い、風疹に対する抗体をEIA法で測定するとともに、風疹の抗体保有と危険因子との関連を、EpiData (European Field Epidemiology Training Program: EPIET 提供)を用いて解析した。質問票の内容としては、年齢、結婚の有無、妊娠および出産の詳細、家族の人数、居住する村等における居住者の数、職業、収入の程度、教育レベル、麻疹・風疹・破傷風に関するワクチン接種歴等とした。本調査の実施主体はNCLE、およびラオス Field Epidemiology Training (FET)コースとし、NIID、およびWHO/WPR LaoPDR Officeがサポートする体制で実施した。風疹抗体の測定に関する詳細は、駒瀬研究分担者の報告を参照のこと。

(倫理面への配慮について)

風疹の血清疫学に関連する検体、検体採取、検査、結果解析は全てラオス国内で実施しており、倫理面に関しては、ラオス国内の倫理委員会の承認を得た。対象者には十分に説明したうえで同意が得られたもののみ実施し

た。その他の調査において、倫理的配慮の必要な項目はない。

C. 研究結果

1. 文献検索、およびラオス国籍の医師に対するインタビューによる現地の状況と今後の連携に関する assessment

ラオスはインドシナ半島中央部に位置し、国の中央部をメコン川が流れ、17の province からなる。メコン川に沿った平地と高地・山岳地帯からなる人口586万人(2006年)、GDP/capita はUS\$500(2008年)で、最貧国のひとつである。近年、著しい経済発展を遂げつつあり、都市部における人口の流入が激しい。国内には47の民族がおり、少数民族が高地や山岳地帯に居住している。これらの中には貧しい民族が多く、健康の指標も悪く、基本的な教育も行きとどいていない場合が多い。これらの地域では、国全体での識字率が男性85%、女性64%であるが、男女の識字率にさらに開きが見られ、特に女兒において学校教育を完了する割合が低いなどの特徴がみられる。

WHO が掲げる EPI の疾患を含む VPDs の公衆衛生・感染症対策においては、いずれも WHO/WPR LaoPDR Office の強力なサポートにより成立している現状がある。定期接種としては EPI 対象疾患の5つ(麻疹、DPT、ポリオ、BCG、B型肝炎)に関して実施されているが、特に小児の対象者における2007年の接種率をみると、BCG56%、ポリオ(3回接種済み者)46%、B型肝炎(3回接種済み者)50%、DPT(3回接種済み者)50%、麻疹40%であった。麻疹に関して見てみると、2000年以降は例年40%前後の接種率であり、2000年から2007年までの接種率の平均値は、48%(36%-55%)であった。さらに、

文献④によると、2000年当時麻疹における都市部の接種率は60.7%であったのに対し、地方では36.5%であった。前述の山岳地帯にすむ民族等に対するインフラ整備の悪さが感染症対策の停滞に直結している状態がみられる。さらに、2008年のデータによると、定期予防接種におけるラオス政府の費用負担は全体の6%、ワクチン確保における同負担は13%との報告もあり、ラオスにおいて定期予防接種実施のための財源の確保は最も重要な課題の一つと言える。

定期接種の接種率の停滞が著しいため、麻疹等の特定の感染症予防に関連しては、補足的予防接種キャンペーン(Supplementary Immunization Activities: SIAs)に頼らざるを得ない状況があり、近年で記録されているSIAsは、2007年の麻疹に対するもので、WHOなどのサポートの下、9か月から15歳までの小児を対象に、200万人以上に接種を実施し、96%の接種率を記録した。

2. 現地訪問により関係者とのディスカッションによる課題の洗い出し

NCLEは、唯一の感染症における国立の研究所として公衆衛生上重要な機能を果たしている。麻疹風疹に大きくかわるウイルス部門では、全スタッフ数6名で、病原体サーベイランス該当疾患のうち、インフルエンザ、デング熱、麻疹等、すべてのウイルス性感染症の検査にあっている。NCLEは、2008年1月よりWPRO measles/rubella laboratory networkに参加しているため、原則、WHOの定めた症例定義にのっとりサーベイランスを実施しているが、その代表性に関しては疑問が残るとWHO/WPR LaoPDR Officeは評価している。

NCLEの職員は、保健省に属する国家公務員であるが、支給される給料が非常に安い(日本円にして月給1万円以下)ため、仕事に対するモチベーションが低く、NCLEの仕事だけでは家族を養えないということから、多くの職員が他の復職を持っており、傾向として何らかのincentiveがあるものに対しては、積極的に参加するものが多いという情報が得られた。

WPR LaoPDR Officeにおいては、麻疹や風疹のように、ラオス国内において公衆衛生上重要であると考えられるVPDsに関しては、WHOとしても取り組むべき課題と考えており、NCLEに対する技術的な支援は非常に重要であること、さらに、NCLEのcapacity buildingになるのであれば、WPR LaoPDR Officeとしても、積極的にサポートすることが可能であること等の意見が得られた。NCLEの将来的なcapacity buildingになることが重要なポイントであるとの指摘があった。

ラボネットワークの構築の一環として、こちらから提案した先天性風疹症候群(CRS)発生の危険性を鑑みた麻疹風疹等の血清疫学調査の実施等については、NCLE側からは残念ながら積極的かつ前向きな意見は聞かれなかった。しかしながら、WPR LaoPDR Officeとの意見交換の中では、その公衆衛生上の重要性、およびラオスにおけるcapacity buildingへの貢献の度合いに関しては、非常に前向きかつ協力的な意見が得られた。

3. ラオス・ピエンチャン市における妊娠可能年齢の女性に対する風疹の血清疫学調査

医療機関別にそれぞれMahosot 193名

(22.8%), Mittaphab 223 名 (28.4%), Sethathirath 251 名(32.1%), MCH 131 名 (16.7%)の合計 784 名の協力を得ることができた。年齢中央値は 25.1 歳(95%信頼区間(CI) : 24.7-25.4)で、その年齢の内訳は 15~19 歳 62 名(7.9%)、20~24 歳 330 名 (42.1%)、25~29 歳(31.9%)、30~35 歳 142 名(18.1%)であった。

結婚の有無に関しては、独身 148 名 (18.9%)、既婚 632 名(80.6%)、離婚 2 名 (0.3%)、返答拒否 2 名(0.3%)であった。妊娠中のものは 545 名(69.5%)、そうでないものは 239 名(30.5%)であった。

職業は、主婦 272 名(34.7%)、事務職員 237 名(30.2%)、販売員 91 名(11.6%)、学生 83 名(10.6%)、無職 56 名(7.1%)、農業 18 名(2.3%)、その他 27 名(3.4%)という内訳であった。

教育レベルに関しては、大学修了者 101 名(12.9%)、高校修了者 416 名(53.1%)、中学修了者 172 名(21.9%)、小学校修了者 92 名(11.7%)、学校に未修学のもの 3 名 (0.4%)という結果であった。

麻疹・風疹・破傷風のワクチン接種歴に関しては、以下の通りであった。麻疹：1 回 17 名(2.2%)、2 回 24 名(3.1%)、なし 411 名(52.4%)、不明 332 名(42.3%)、風疹：あり 0 名(0.0%)、なし 784 名(100.0%)、破傷風：1 回 47 名(6.0%)、2 回 101 名 (12.9%)、3 回 85 名(10.8%)、4 回 81 名 (10.3%)、5 回 358 名(45.7%)、なし 19 名 (2.4%)、不明 93 名(11.9%)。

風疹の抗体保有率に関しては、全体で 83.2%(95%CI : 80.4% - 85.7%)で、年齢が高くなるに従って、抗体保有率は上昇していた(詳細は駒瀬研究分担者報告書参照のこと)。

風疹の抗体保有と生活環境・社会的因子との関連に関しては、いずれの因子も風疹

の抗体保有との関連性は認められなかった。

D. 考察

1. 文献検索、およびラオス国籍の医師に対するインタビューによる現地の状況と今後の連携に関する assessment

文献①によれば、ラオスの定期予防接種において優先度の高い課題として、1. 実施費用の不足分を補う財源の確保、2. 母子保健や EPI に関わる固定された部署・部門の確立と福祉政策、3. データとワクチン供給マネジメントにおける質の向上、とされている。前述の通り、ラオス国内における定期接種に絡む財源の確保は最も重要な課題の一つと言える。

疾患として、定期の予防接種対象疾患の接種率がいずれも低い中で、早急に解決する必要があると考えられるものは、その感染性の強さ、重症度の高さから、麻疹であると考えられる。麻疹に関しては、WPRO をあげて 2012 年 Elimination という目標のもと、各国がそれぞれの対応を進めており、中でも我が国では 2008 年より MR ワクチンを使用して我が国独自の予防接種キャンペーンを実施している。我が国においては、MR ワクチンの導入とともに、風疹、および CRS の発生が減少している現状があり、風疹対策も WPRO 内で取り組むべき課題として意識が高まりつつある。風疹は、CRS の問題から、出産適齢期の女性のみならず、Herd Immunity の向上による流行の抑制は非常に重要なものとなる。風疹の疾患・病原体サーベイランスも実施されておらず、風疹ワクチンが定期接種に導入されてもいないラオスにおいては、我々が実施するラオスにおける風疹の血清疫学調査は、現在のラオスにおける風疹の

Disease Burden を知る手掛かりになりえるものであり、非常に重要なデータを示すことになると考えられた。

2. 現地訪問により関係者とのディスカッションによる課題の洗い出し

WHO が提唱するサーベイランス、および予防接種政策に関しては、NCLE の Lab 部門、Epi 部門、保健省ともに、WHOWPR LaoPDR Office のサポートの下、継続的に実施されていると考えられた。

中長期的な network 構築を考えた場合、NCLE の capacity building に貢献でき、検討が終了しても自国において継続可能な分野に対する支援が望ましい。しかしながら、NCLE においては、モチベーションだけでは困難な部分もあり、2009~2010 年当時としては、本検討を実施するための費用・予算確保を含めて、具体的な技術支援の方法を明確にしたうえで、さらに WHOWPR LaoPDR Office の協力を得ながら NCLE 側と詳細を検討する必要があると考えられた。

3. ラオス・ビエンチャン市における妊娠可能年齢の女性に対する風疹の血清疫学調査

本調査は、首都であるビエンチャン市内において産婦人科医療を担う主要な 4 医療機関にて行われたものである。WHO や UNICEF によるラオスの識字率、および定期予防接種率などのデータと比較すると、本調査の対象は教育、および医療水準が高い集団であったと考えられる。近年、急速に経済的発展を遂げているラオスであるが、地方から都市部への人口流入が明らかで、地方に住む人口の割合は、1995 年 83%から 2005 年 72.9%に

減少しているという報告もあるものの、本調査の結果がラオス国内の全ての 15~35 歳の女性を代表しているとは言い難い。しかしながら、ラオス国内で比較的教育・医療水準が高いと考えられるこれらの集団においても、風疹ワクチンを過去に接種したことがあるものはおらず、全体で 8 割程度の抗体保有率(全て感染による)であり、年齢群の年齢が上がるにつれて抗体保有率が上昇するという結果は、ラオス国内においては、風疹ワクチンの有効活用がなされない限り、今後も継続的に風疹の流行、CRS の発生が続くことが懸念される。

危険因子に関する解析の結果からは、いずれの因子も統計学的有意差は見られず、風疹の抗体保有、本調査においては風疹の“感染”ということに関しては、どのようなところに住んでいるか、職業は何か、教育、社会経済的水準、過去の妊娠等の状況はいずれも関連はなく、本調査対象の女性においては、どのような生活・社会的環境にあっても、風疹感染の危険性において違いはなかったと解釈される。

4. まとめと今後の課題

ラオスにおける風疹の血清疫学調査は、ラオスにおいて初めて、妊娠可能年齢の女性における風疹感染に関する情報を提供するものとなった。この結果はラオス国内の公衆衛生上のインパクトは非常に大きいと考える。しかしながら、今回の結果は、あくまでも血清疫学であり、加えて、2010 年の一時点での、かつ国内でも教育・医療水準の比較的高い可能性のある集団に対する調査であること、過去の風疹の流行状況に関する情報が全くないこと等に注意が必要である。

現在、ラオスにおいては、風疹や CRS に関する患者および病原体のサーベイランスは一切行われておらず、流行の傾向や発生の全体像等が全く不明の状態である。今後は国内の各サーベイランス体制の確立が急務であると考えられる。

さらに、本調査の成果として、その結果から WHO/WPR LaoPDR Office では、本年 12 月をめどに実施を予定している麻疹ワクチンの接種キャンペーンにおいて、9 か月から 19 歳までの全年齢を対象に MR ワクチンを使用して実施することを本格的に検討している。キャンペーン後の風疹ワクチンの定期接種導入等は今後の検討事項となるが、このことは本調査がラオス NCLE の capacity building に貢献しただけではなく、ラオス国内の予防接種政策を含めた麻疹風疹をめぐる公衆衛生対応全般に大きく影響を与えたものとして、非常に重要な示唆を与えることができた結果であると考えられる。

しかしながら、ラオス国内における慢性的な問題として、「財源の確保と人材の育成及びそれらの維持」の必要性があげられている。今回の調査のように、人材の育成という観点に関しては、技術供与や短期間のトレーニングコースやセミナーの開催等は今後も実現できる可能性があると考えられる。しかし、決して近視眼的ではなく、社会的文化的背景も理解しながら、中長期的な視野のもとで、どのような活動が本質的にラオスのためになるのか、根付いていくことができるのかを模索しながら活動していくことが重要と考える。加えて、National Institute 間の network/collaboration を考える際には、その国の公衆衛生上の貢献という観点が外せない。その際にはサーベイランスや outbreak response 等、Laboratory だけで

はなく Epidemiology の側面からの collaboration を同期して実施していく必要がある。

E. 結論

ラオス NCLE との Laboratory network 構築を目標に、文献・インタビューによる情報収集、現地訪問による各担当者との面会等から、network 構築に関する実現性の assessment および課題の洗い出しを行い、CRS 発生の危険性を検討するために、妊娠可能年齢の女性に対する風疹の血清疫学調査を実施した。

ラオス国内における慢性的な問題として、「財源の確保と人材の育成及びそれらの維持」の必要性があげられ、国内のインフラ整備に関して多くの課題がみられたが、今回の調査の結果をもとに WHO/WPR LaoPDR Office では、本年 12 月をめどに実施を予定している麻疹ワクチンの接種キャンペーンにおいて、9 か月から 19 歳までの全年齢を対象に MR ワクチンを使用して実施することを本格的に検討し始めるなど、本調査がラオス NCLE の capacity building に貢献しただけではなく、ラオス国内の予防接種政策を含めた麻疹風疹をめぐる公衆衛生対応全般に大きな影響と、非常に重要な示唆を与えることができた。

National Institute 間の network/collaboration を考える際には、その国の公衆衛生上の貢献という観点は外せず、サーベイランスや outbreak response 等、Laboratory だけではなく Epidemiology の側面からの collaboration を同期して実施しながら、決して近視眼的ではない、中長期的な視野のもとで、本質的に相手国のためになる活動、かつ、根付いていくことができるもとを模索しながら活動していくことが重要と考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表（著書を含む）
 1. Phengxay M., Hayakawa Y., Phan, T.G., Tanaka-Taya, K., Ueno - Yamamoto, K., Phengta Vongphrachanh, Komase, K., Hiroshi Ushijima. Seroprevalence of rubella and measles virus antibody in Lao PDR. Clin. Lab. (in press)
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金(新興再興感染症研究事業)

平成 20~22 年度分担研究報告書

アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワークの強化に関する研究

研究科題名：グローバルな視点から見たベトナムにおける風疹の血清および分子疫学調査と風疹迅速診断法の開発

分担研究者

藍野大学 藍野健康科学センター	牛島廣治	教授
国立感染症研究所ウイルス第3部	駒瀬勝啓	室長

研究協力者

東京大学 医学系研究科	Tran Dinh Nguyen	大学院生*
パスツール研究所、ホーチミン市	Nguyen Minh Phuong	室長
ホーチミン市第二小児病院	Ha Manh Tuan	院長
ジョージア州立大学	周 玉梅	室員†
イムノプローブ社	野村裕子	室長

(*元ホーチミン市第二小児病院 医師； #元東京大学大学院生)

研究要旨

風疹ワクチンが定期接種となっていないベトナムにおいて風疹の遺伝子診断と分子疫学を行った。先天性風疹症候群および風疹児の風しんウイルスの遺伝子解析をした。これらはインド、中国、韓国で見られる2Bであった。解析したE1領域で僅かであるが型内の変異がみられた。また従来風疹ワクチン株を中心に全塩基配列を決め比較検討した。HVRでは各株間でアミノ酸の大きな置換があること、intergenotypeあるいはintragenotypeの組換えを認めた。発疹と発熱で受診した小児における疫学調査や先天性風疹症候群における疫学調査をした。資料としてベトナム南部の風疹の情報および迅速診断法の開発の情報を加えた。国立感染症研究所、東京大学、ホーチミン市のパスツール研究所・小児病院・民間検査センターとの連携・共同研究が進んだ。

A. 研究目的

風疹ウイルスは、1本鎖(+)RNAウイルスであり、9762の塩基である。グアニジンとシチジンを多く含んでいる。また、2つのORFを有する。5'側のORFは、非構造蛋白のp150とp90で、3'側のORFは構造蛋白でカプシドと2つのE1, E2膜蛋白を有する。E1はリガンドとしての作用および中和能を有する。また3つの非翻訳部分があり、5'側末端、3'側末端2つのORFの間に存在する。風疹ウイルスは1つの血清型であるが、遺伝子型はE1領域の739塩基によって分けられる。2つのCladesと4つの関連する遺伝子型がある。Clade 1は世界で流行しているが、Clade 2はアジア、ヨーロッパの一部の国に限られている。しかし、遺伝子型がはっきりしないものがある。

我々は、未だ分子疫学的報告がないベトナムにおいて遺伝子型を明らかにすること、血清抗体の保有状況を調べ風疹のリスクを明らかにすることにある。

1969年に風疹ワクチンが国際的に使用され始めた。しかし風疹ワクチンが依然としてなされない国がある。風疹に妊娠初期に罹患すると、流産や先天性風疹症候群(CRS)の原因となる。ここでは、発熱・発疹の原因の麻疹と比較しながら風疹の臨床像、検査体制、ベトナム南部の風疹疫学について述べる。この研究の一部はホーチミン第二小児病院においてインフォームドコンセントで得られた臨床症例から、また一部はWHOの支援のもとで行われるパスツール研究所の事業との連携で行われた。ラボネットワークの体制強化を、ベトナム国の国関連の研究機関・大学病院・民間検査センターとわが国の国立感染症研究所・大学

および民間の研究機関、さらに米国の専門家とネットワークで結ぶものである。

さらにここではパスツール研究所が中心となり行ったベトナム南部の疫学調査、イムノプローブ社との現時点までの迅速診断法の共同開発状況について資料として報告する。

B. 研究方法

B-1 風疹ウイルス株の全塩基/アミノ酸配列の決定とウイルスの多様性、自然淘汰の研究

1. 既に全塩基配列がわかっている8つのゲノタイプの19株(一部は我々が解析した)のゲノムのアミノ酸配列を用いた。
2. Gene/Region別に区別し、配列のCompositionとPlotsimilarityを検討した。
3. TN93+ Γ とWAG置換モデルを用い、コドンの塩基配列(sequences at three codon positions and all coding sequences)とアミノ酸の配列に対し、比較系統樹解析と分解進化ネットワーク系統樹解析を行った。
4. 非同義置換率と同義置換率との割合(ω)を計算し、各Gene/Regionに受けた自然淘汰圧を調べた。
5. 各ゲノタイプのウイルスを精製し、ウイルスの構造タンパク質に対する抗体を用い、WBにより抗原抗体反応を調べた。

B-2 ベトナムでの分子疫学的研究

2009~2010年にかけてCRSの3乳児および風疹の3小児の咽頭ぬぐい液を採取した。ウイルスRNAはQiaAmpで抽出した。ランダムプライマーを用いてcDNAを作り、E1

領域を2つのプライマーでPCRをした。さらに2nd PCRを行い、その後遺伝子解析をした。WHOが推薦する全遺伝子型の対照株のシーケンスと比較した。最終的にはE1領域の739塩基を比較した。

B-3 ホーチミン小児科病院外来での風疹ウイルス抗体調査

対象は2007年1～7月でホーチミン第2小児病院を発疹と発熱で訪れた204患者である。風疹抗体検査(EIA法)はホーチミン市のパスツール研究所で行われた。

C. 研究結果

C-1 風疹ウイルス株の全塩基/アミノ酸配列の決定とウイルスの多様性、自然淘汰の研究

1.アミノ酸配列を解析した結果、NSP(非構造領域)およびSP(構造領域)の株間はそれぞれ4.5%と3.8%の差があるだけであるが、HVRにおいては最大33.6%の差があった。P150およびE2の方がP90およびE1よりも差が大きかった。すなわちP90およびE1の同義置換がP150およびE2よりも大きかった。全体的に、ゲノムは、疎水性と脂肪族アミノ酸が多く、特に、HVRとcapsidでは、プロリンとアルギニンが多かった(表1, 2)。

2.さらに行ったNSPとSP遺伝子の3つのコドン部位の配列とアミノ酸配列による系統樹(図1-a, b)とその遺伝子の塩基配列に対する分解進化ネットワーク系統樹解析(図2)を行ったところ、NSP遺伝子による結果、その2種類の系統樹は、あるウイルスの間に共通するネットワークの存在関係を示し、intra- と inter-genotype の遺伝子の組み換えが風疹ウイルスゲノムの進化

を強く支持する(drive)ことを示唆した。

3. 同義置換率と同義置換率との割合(ω)の計算を行い、正の自然淘汰を受けたアミノ酸部位を調べた。風疹ウイルスのゲノムにおいては多くの所ではかなり負の自然淘汰(純化淘汰)を選択されていたが、HVR領域の4か所、capsidおよびE1タンパクの2か所ずつで正の自然淘汰が示された(成績省略)。

4. Clade 1のE2に反応するがClade 2のE2に反応しないモノクローナル抗体を見出し、E2領域の異なった抗原反応性が認められた。

C-2 ベトナムでの分子疫学的研究

6つの株すべてに739塩基の遺伝子解析がなされた。すべて遺伝子型は2Bであった。WHOの2Bの標準株と比較すると1.9～7.2%の差があった。他の遺伝子型とは6.8%～13.1%の差があった(図3)。

C-3 ホーチミン小児科病院での抗体調査

I. 発疹と発熱を有する204人の子ども

- 1) 男性 52.5%、女性 47.5%
- 2) ホーチミン市 70.1%、市郊外 29.4%、地方 0.4%
- 3) 4歳以下 26.0%、5～9歳 46.0%、10～15歳 28.0%
- 4) その中で風疹陽性であった者24.5%
尚 発疹と発熱をもつ児の中で風疹と確定されたのは、WHOでは20～25%(1999年)、ジンバブエでは23%(1996～1997年)、ホーチミン市では70%(2006年、他の報告)であった。

風疹と診断された50例について

- 1) 男 54%、女 46%
- 2) ホーチミン市 74%、

- 郊外 26%
- 3) 4歳以下 26%、5~9歳 46%、
10~15歳 28%
 - 4) 風疹ワクチンの既往なし 94%(47例)、
尚風疹でなかった例で風疹ワクチンの
既往なし 91% (190例)
 - 5) 以前に発疹あり：30%(15例)、
尚風疹でなかった例で以前に発疹あり
：21%(32例)
 - 6) 風疹の1/3は他人からうつされた。
その78%は同級生
 - 7) 風疹抗体陽性児の母親は、これまでお
よび児の発症時に風疹抗体は調べてい
ない。
 - 8) 発熱なし 52%、微熱 36%、発熱期間
約3日
 - 9) 発疹 90%
 - 10) リンパ節腫脹 12% (他の報告 87%、
32%)
 - 11) 関節痛 4% (他の報告 2%)、関
節炎はない
 - 12) 他の症状として：疲労感、咳、鼻水、
食欲不振、疲労
 - 13) 親が風疹という病気を知らない
54% (27例)
 - 14) 親が風疹を知る 23例はマスメディアに
よる
 - 15) 親が風疹に対して正しい知識を持つ
4%

D. 考案

D-1 風疹ウイルス株の全塩基/アミノ酸配列の決定とウイルスの多様性、自然淘汰の研究

遺伝子解析での成績からアミノ酸について検討した。遺伝子レベルで HVR に変化

が多いことはアミノ酸でも認められた。実際はそれ程の変化があってもワクチンは有効である。Intra-および Inter-genotype の組換えが起こり正の淘汰が進化として保存されることが推測できた。この正の自然淘汰は風疹ウイルスの複製、免疫、感染性に関連する利点があると思われた。

領域において Clade1 と Clade2 に異なる反応するモノクローナル抗体を見出したことは今後分類に役立つと考えられた。

D-2 ベトナムでの分子疫学的研究

ベトナムでは EPI プログラムに含まれず、風疹および CRS が常に発生する。われわれの今回の6症例は2Bに属していた。

世界の多くの国では Clade1 のウイルスが検出され、Clade2 は限定されている。2B は今まで、インド、中国、韓国で見出されており、今回新しくベトナムでも見出した。

D-3 ホーチミン小児科病院での抗体調査

風疹ウイルスに妊娠中に感染すると先天性風疹症候群、発達遅滞など児に大きな影響を及ぼす。風疹はワクチンで感染を予防できるものである、その普及が乏しいアジアの国々ではワクチンは急務である。

一方、風疹は発熱を伴う発疹を示す疾患として麻疹と区別されなければならない。ベトナムでは近年麻疹のワクチンが定期接種となったが風疹については経済的な理由などから定期接種になっていない。一部の子どもが有料で風疹ワクチンを行っている。このような状況では麻疹、風疹が混在する可能性があり、臨床診断とともに検査によって診断する必要がある。また、自然感染の割合、ワクチンの効果、先天性風疹症候群率などについて調べることが必要である。一方、アジアの中での人の交流などから風

疹が国境を越えて広がる恐れがある。

したがって東南アジアとの麻疹、風疹の分子疫学は必要であり、ワクチンの普及とともにラボラトリーネットワークの構築も重要と考えられる。

E. 結論

E-1 風疹ウイルス株の全塩基/アミノ酸配列の決定とウイルスの多様性、自然淘汰の研究

われわれが全塩基配列を決めた株を含めて代表的な型の風疹ウイルスのアミノ酸配列の比較を比較した。HVR では各株間でアミノ酸の大きな置換があるものの他の領域でもあった。風疹ウイルスの intergenotype, intragenotype の組換え、正の淘汰が推定された。

E-2 ベトナムでの分子疫学的研究

ベトナムの先天性風疹症候群の3例および風疹の3例の児から、遺伝子型2Bのウイルスを検出した。ベトナムでの初めての遺伝子型の報告である。

E-3 ホーチミン小児科病院外来での抗体調査

ホーチミン市の子どもが発熱と発疹の中25%が風疹であった。風疹の遺伝子診断が可能な民間の研究所(詳細省略)があった。疫学を行うパスツール研究所とともに今後ラボラトリーネットワークの構築が期待された。

F. 今後の研究

ベトナムでは風疹ウイルスの分子疫学的な研究がなされていなく我々が最初である。

パスツール研究所との交流において酵素抗体法を用いた疫学的な調査は可能な事がわかった。我々の分子疫学的調査が今後ベトナムでルーチンの手技として使われることを希望する。さらにベトナムに加えその他の東南アジアとのネットワーク作りが期待される。

風疹ウイルス抗体の迅速簡便なイムノクロマト法の開発にむけてさらに進める(詳細省略)。

ベトナムで得た風疹ウイルスの全遺伝子配列を決め、現在まで報告の全塩基配列と比較する。また

intergenotype, intragenotype の組換えなどがベトナムの株であるかを調べる。

今後、麻疹の情報ならびに麻疹ウイルスの分子疫学、抗体調査も合わせて研究を進める。

G. 政策への提言

本来の研究目的に加え、ベトナムにおいて風疹のワクチンが定期接種になっていないことは、今後とも先天性風疹症候群が発症する危険性を有している。このことは妊娠可能な年齢の女性の60%ほどのみが抗体を有することから理解できる。ベトナムのみならず近隣の途上国の国々でも同様であり早急のワクチンの定期接種が望まれる。

G. 健康危害情報

とくに該当なし。

H. 論文発表

1. Tran D. N., Vu M. P., Ha M. T., Giang T. P. L., Komase K., Mizuguchi M.

- Ushijima H. Viral molecular characterization of the first congenital Rubella syndrome case in Vietnam. Clin. Lab. (in press).
2. Phengxay M., Hayakawa Y., Phan, T.G., Tanaka-Taya, K., Ueno - Yamamoto, K., Phengta Vongphrachanh, Komase, K., Hiroshi Ushijima. Seroprevalence of rubella and measles virus antibody in Lao PDR. Clin. Lab. (in press).
 3. Hayakawa Y., Zhou Y., Mizoguchi M., Frey TK, Ushijima H. Quantative and qualitative assay of reubella IgA antibody in breast milk. J Med Virol. 82 (8) : 1475-1479 (2010)
 4. 牛島廣治、太田由己、早川有子： 将来的なワクチンの展望 シンポジウム「日本のワクチンの展望」日本小児科医会会報 38:27-41, 2009

I. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

資料 1.

ベトナム南部の風疹に関する情報 はじめに

協力者であるパスツール研究所の Nguyen Minh Phuong 研究者を訪問しベトナム南部およびホーチミン市の風疹の疫学情報を得たことによる。

ベトナムの感染症には、マラリア、下痢症、呼吸器疾患、デングなどの他にワクチンで予防可能な疾患もある。ベトナムでは EPI プログラムが結核、ポリオ、DPT、麻疹、B 型肝炎において行われている。麻疹は全

国のワクチン接種によって減少した。また 2005 年から 6 歳以降に再接種のキャンペーンが行われている。現在、麻疹ワクチンは 95%以上の接種率と言われている。

一方、風疹ワクチンは EPI プログラムに含まれていない。ベトナムでの風疹、先天性風疹症候群 (CRS) の疾病負担については良くわかっていない。2003 年に全国レベルでの発熱・発疹のサーベイランスが行われたが、これは麻疹の流行を調べる目的であった。ベトナム南部はホーチミンなど 20 の地区 (県に相当) に分けられる。そして各地区には予防医学センターがある。そこでは地区内のサーベイランスをし、その結果をホーチミン市にあるパスツール研究所に報告される。

2. 3つの情報

資料表 1 はベトナム南部とホーチミン市の人口動態である (表省略)。2009 年南ベトナムでは約 350 万人、その中でホーチミン市が 88 万人である。表から人口の増加がみられる。1 歳以下の子ども、妊婦、妊娠可能な年齢の女性が、ベトナム南部およびホーチミン市でそれぞれ 58 万人、56 万人、263 万人と 11 万人、9 万人、不明である。**資料表 2** は調査された発熱・発疹の患者数と血清診断の結果である (表省略)。麻疹のワクチンが行われたために麻疹が発熱・発疹に占める割合が少なくなった。即ち、麻疹のワクチンがなされたために、風疹の割合が 40%台から 60~70%に高くなった。しかし 2009 年に麻疹の流行があった。これはワクチンの供給が悪く、流行が見られたと言われている。

資料表 3 はさらに 2009 年 8 月から 9 月にかけてベトナム南部の An Giang 地区において

妊娠年齢期の女性に風疹抗体価が調べられた（表省略）。9歳から44歳までの80人である。60.3%の女性が抗体を持っていた。従って自然感染があったことを示す。同時に40%陰性であることはCRSの危険性を示している。風疹の流行があった時、CRSの危険性があることを示している。

3. 検査の状況

ベトナムでは日常診療においては風疹は臨床診断としておこなわれるだけで、検査はなされていない。その理由として（1）CRSを除くと、麻疹にくらべて軽症で済む。（2）現在検査としての確定診断は血清診断である。血液を取って調べるのに6ドル/日かかる。（3）風疹はすぐ良くなるために、あまりその後3~4日後に血液検査には行かない。（4）サーベイランスシステムが組織だて行われない。

4. 予防の難しさ

（1）風疹ワクチンは一部のセクターだけでしか行われない。10ドル/日はベトナムでは高価である。（2）ベトナムの女性は妊娠前に受診する。したがって風疹ワクチンについて話がなされない。（3）妊娠可能な年齢の女性にCRSに対する教育や情報は十分でない。

資料2. 風疹のイムノクロマト法による迅速診断法の開発

1. 研究目的

この研究はイムノプローブ社の協力のもとで行われた。風疹は麻疹と同様に発疹、発熱を伴う疾患で大方の場合は臨床診断がつくが、時に区別がつきにくく血清診断または遺伝子診断

によりことがある。血清診断の場合は従来酵素抗体法が用いられていたが、この方法は大量の検体を同時に取り扱うことができる長所がある一方、測定器の必要、煩雑さなど欠点がある。最近、1検体ずつで抗原あるいは抗体を調べるイムノクロマト法がウイルス抗原あるいは抗体を調べる方法として開発されてきた。我々は下痢症ウイルスであるロタウイルス、ノロウイルスについて抗原検出のためのイムノクロマト法を開発してきたことから今回風疹IgMの抗体測定キットの開発を考えた。現時点キット化するところまでは行っていない。

2. 研究方法と結果

分離風疹ウイルス細胞培養ウイルスを培養し、超遠心法を用いてウイルス抗原を得た。このウイルスを用いて家兎に免疫を行い高力価のIgG抗体を得た。酵素抗体法を用いて抗体の力価を測定した。さらに抗体を精製しポリクローナルIgG抗体でも同様に高力価の抗体を得ることが出来た。IgM、IgGモノクローナル抗体を作製し、現在抗体価を調べている。

抗体の測定のためには安定した大量の抗原があったほうが良い。培養して精製すること以外に大腸菌での発現、その他の抗原の作製を試みている。

3. 考案

現時点では抗体検出用のイムノクロマトの作製は出来ていないが、まずそのための標準血清として家兎のポリクローナル抗体やマウスモノクローナル抗体の作製を行った。抗原測定のイムノクロマトは現時点では可能だが、抗体測定に関しては系をこれから組み立てる予定である。

Table1. Amino acid frequencies of genomic regions of rubella virus genome

AA \ Regions		NSP	p150	MT	HVR	XD	NP	P90	HEL	RDRP	SP	C	E2	E1
Ala	A	15.1	15.7	15.7	19.9	21.4	12.6	14.1	13.7	13.3	11.4	10.8	12.3	11.3
Arg	R	9.7	9.8	12.9	10.6	8.8	10.2	9.5	11.4	8.8	7.9	13.4	7.0	5.0
Asn	N	1.5	1.3	0.0	1.3	1.8	2.6	1.8	2.7	1.6	2.1	1.7	2.1	2.5
Asp	D	5.6	5.3	2.9	7.3	2.8	4.3	6.1	6.7	5.2	4.0	5.3	3.5	3.4
Cys	C	3.1	3.5	1.4	0.7	4.6	4.9	2.5	3.2	2.1	3.8	0.7	5.0	5.0
Gln	Q	2.5	2.2	0.0	1.8	0.2	2.0	3.1	2.4	3.5	3.8	5.0	3.0	3.5
Glu	E	5.6	4.9	8.6	3.4	2.4	4.7	6.6	5.6	7.3	3.9	5.6	1.5	4.3
Gly	G	7.3	7.6	3.3	7.2	8.8	9.9	6.7	6.7	6.5	9.9	9.7	10.6	9.6
His	H	3.3	3.6	7.1	0.9	4.2	3.7	3.0	2.9	3.3	4.1	2.0	7.5	3.5
Ile	I	2.7	2.0	4.3	0.2	3.6	0.4	3.8	4.7	3.6	1.6	1.1	0.9	2.3
Leu	L	8.6	8.3	12.9	2.7	9.5	6.9	9.0	8.8	8.7	7.7	6.8	9.7	7.1
Lys	K	1.5	1.3	2.9	0.0	0.6	0.6	2.0	2.0	2.1	1.3	1.2	0.5	1.9
Met	M	1.6	1.2	0.0	0.0	0.7	1.6	2.1	0.8	2.7	1.3	1.7	2.0	0.6
Phe	F	2.1	1.6	0.0	1.0	0.6	1.0	2.8	2.4	3.1	2.4	2.0	2.1	2.9
Pro	P	8.7	10.7	5.7	27.3	7.7	10.5	5.4	3.6	6.7	11.0	13.5	10.8	9.6
Ser	S	3.9	4.6	5.3	6.4	3.8	6.4	2.9	3.2	2.7	4.7	5.5	3.6	4.8
Thr	T	5.4	4.4	5.7	5.2	4.1	5.0	7.0	7.7	6.8	7.5	6.3	7.8	8.1
Trp	W	2.3	2.8	4.3	0.0	1.2	3.0	1.5	2.0	1.3	2.9	2.3	3.2	3.1
Tyr	Y	2.6	2.0	1.4	0.3	1.8	2.0	3.4	4.0	3.1	2.4	1.3	1.8	3.3
Val	V	7.0	7.2	5.7	3.7	8.4	7.5	6.8	5.7	7.7	6.3	4.0	5.2	8.3

1. Amino acid frequencies with the top three ranks of each indicated genomic region are in boldface.
2. Amino acid frequencies of each indicated genomic region were calculated by using the 19 virus amino acid sequences. NSP: non-structural protein, aa 1-2116, p150: aa 1-1301, MT: methyltransferase, aa 64-133, HVR: hypervariable region, aa 694-800, XD: X domain, aa 818-986, NP: non-structural protease, aa 1001-1300, p90: aa 1302-2116, HEL: helicase region, aa 1335-1586, RdRp: RNA-dependent RNA polymerase region, aa 1596-2116, SP: structural protein, aa 1-1063, C: aa 1-300, E2: aa 301-582, E1: aa 583-1063.

Table2 . Maximum-likelihood parameter estimates for genomic regions of the rubella virus genome

Region	No. of sites	No. of constant sites	% of constant sites	Observed d (range)	Genetic d (range)	Genetic d (ave.)	α
NSP	2116	1892	89.4	0.38-4.44	0.38-5.13	2.73	0.09
p150	1301	1107	85.1	0.46-6.38	0.47-7.50	4.05	0.14
p150: MT	70	69	98.6	0.00-1.43	NA	NA	NA
p150: HVR	107	40	37.4	0.93-33.64	0.96-47.03	20.44	2.12
p150: XD	169	141	83.4	0.00-9.47	0.00-10.68	4.43	0.19
p150: NP	300	256	85.3	0.33-7.33	0.34-9.03	4.15	0.17
p90	815	785	96.3	0.00-1.72	0.00-1.80	0.69	0.08
p90: HEL	252	236	93.7	0.00-3.17	0.00-3.35	1.27	0.38
p90: RdRp	521	507	97.3	0.00-1.34	0.00-1.38	0.46	0.02
SP	1063	953	89.7	0.19-3.76	0.19-4.12	2.41	0.13
C	300	265	88.3	0.00-4.67	0.00-5.06	2.60	0.24
E2	282	239	84.8	0.00-6.74	0.00-8.28	3.97	0.22
E1	481	449	93.3	0.21-2.29	0.21-3.08	1.37	0.06

1. All parameters were estimated by using tree-puzzle version 5.2 program with setting of the WAG- Γ substitution model. **2.** All parameters were calculated by using the 19 virus amino acid sequences. The abbreviations of regions were indicated in table 4-2. **3.** NA: not available, because the values of the parameter estimates are close to internal upper or lower bounds of 95% confidence interval. α : rate heterogeneity shape parameter. d: distance

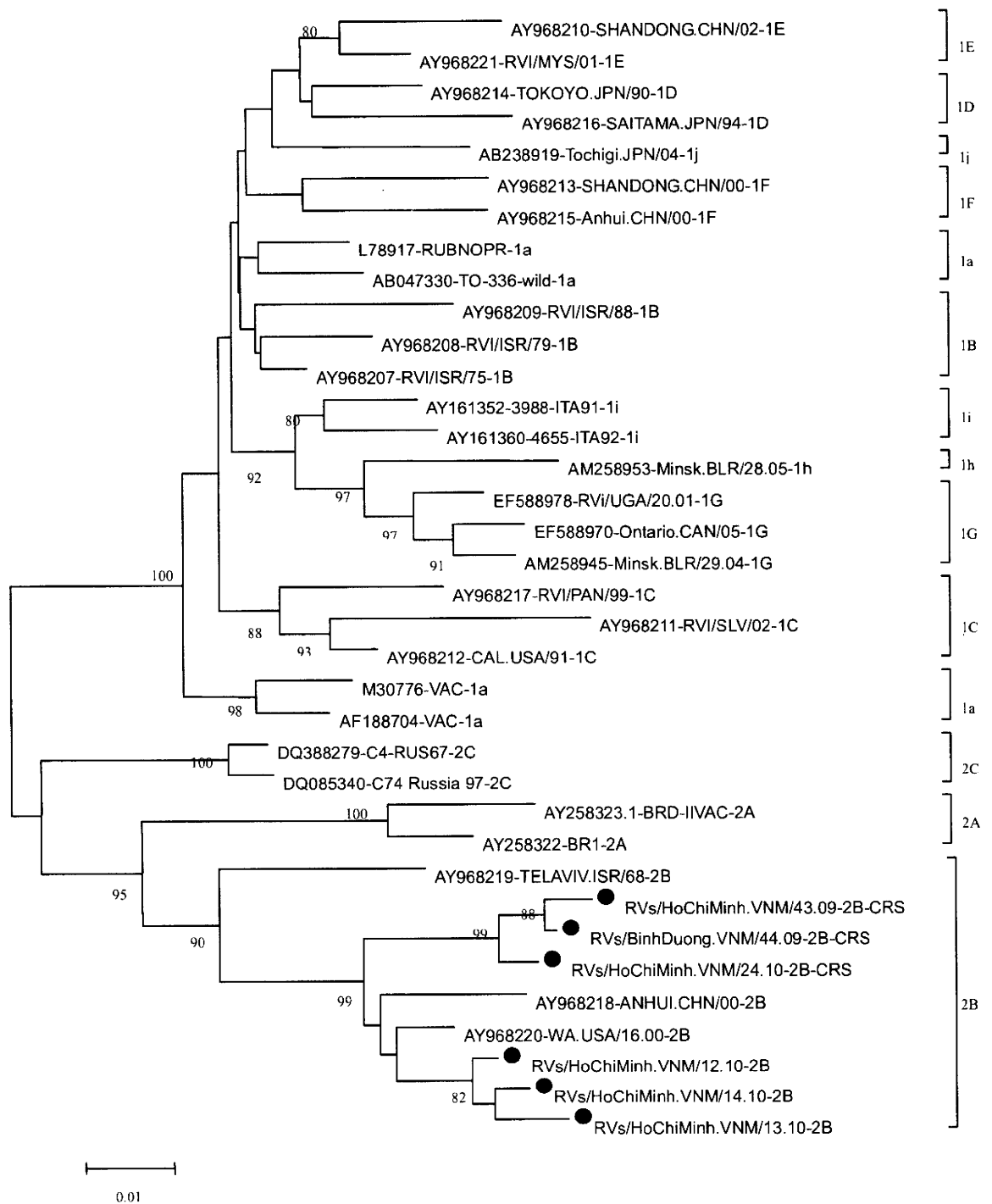


Figure3. Phylogenetic tree was constructed from the studied strains and the reference strains recommended by WHO using the window of 739 nts within the E1 gene (nt 8731-9469) with MEGA 3.1 software. Bootstrap values of greater than 70 % are shown at the branch nodes. The RV strains in this study are marked with solid round.

Fig 1 a_NSP

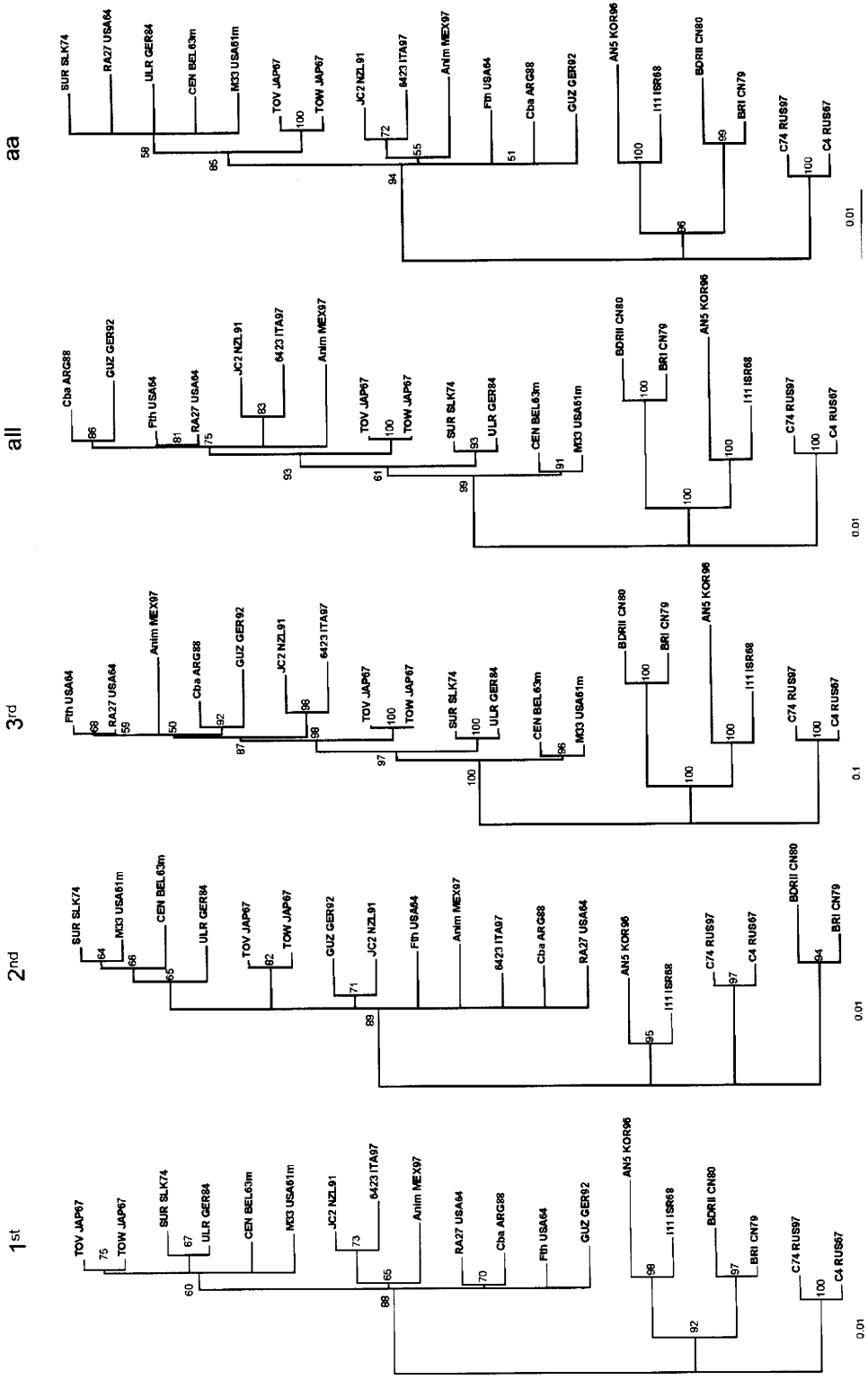
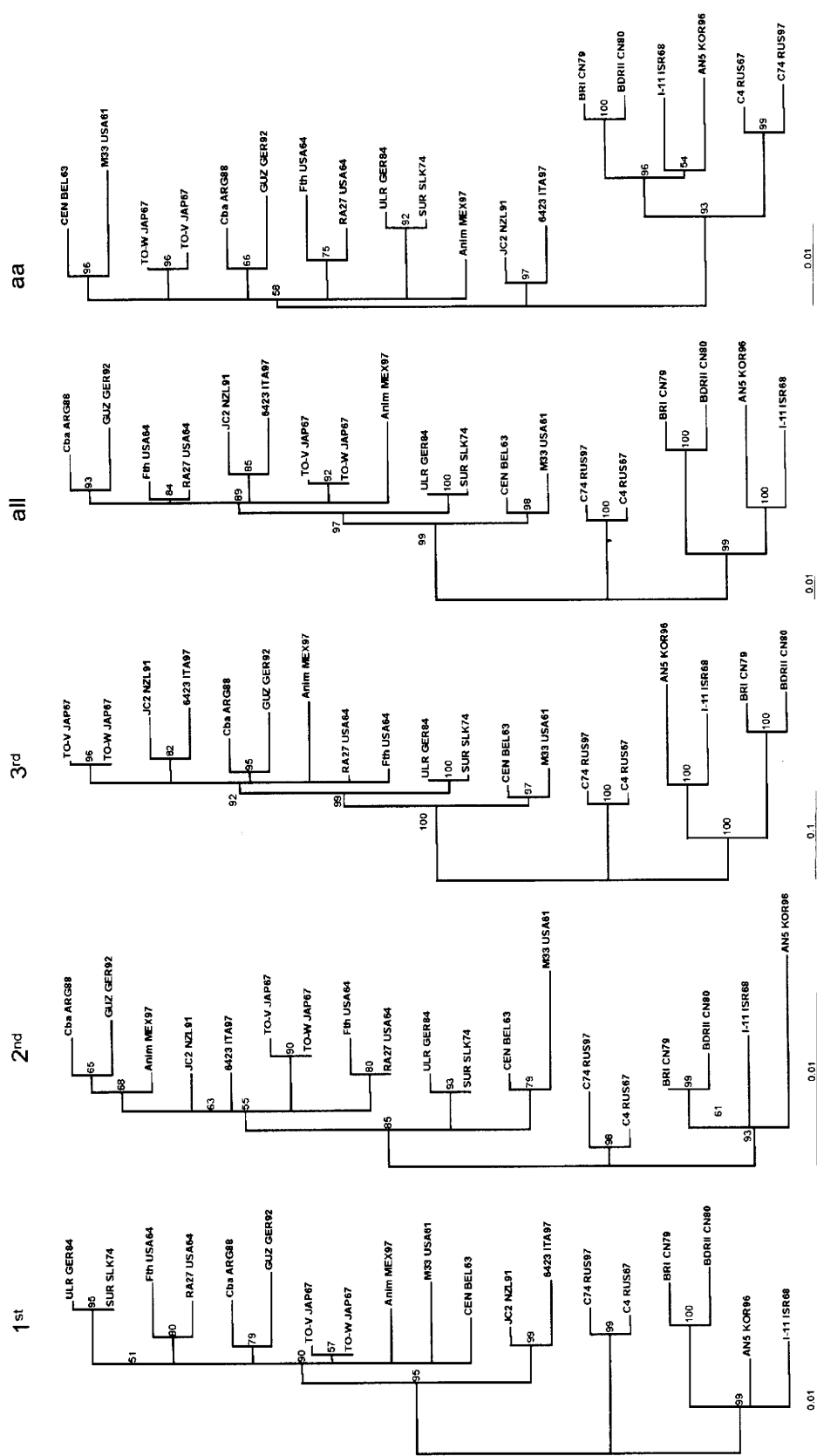


Figure 1 - a, b.

1b_SP



Phylogenetic trees of NSP-ORF (2a) and SP-ORF (2b) amino acid sequences and sequences at each of three codon positions (1st: first position; 2nd: second position; 3rd: third position; all: overall positions; aa: amino acid sequences). Trees were constructed by using TREE-PUZZLE (version 5.2) with 50,000 puzzle steps; reliability values are indicated on each node. Genetic distance (substitutions in 100 nt or aa) calculated by using the TN93 + Γ (for nucleotide sequences) and WAG + Γ (for amino acid sequences) substitution model is indicated by the bar below each tree.