

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興再興感染症研究事業）

分担研究報告書

アジアの感染症担当機関とのラボラトリーネットワークの促進と
共同研究体制強化に関する研究

ベトナム北部に流行する麻疹ウイルス、風疹ウイルスの解析

研究分担者 駒瀬勝啓 国立感染症研究所・ウイルス第3部・室長

研究分担者 Trieu Thi Thanh Van National Institute of Hygiene and Epidemiology

研究要旨 WHO では麻疹の排除、風疹、CRS の減少、根絶を目指している。そのためには高いワクチン接種率の維持とともに実験室診断によるサーベイランス体制の確立が必須である。また排除の定義から、麻疹、風疹の流行株の起源の鑑別が重要になってくる。ベトナムにおいては、麻疹、風疹の検査診断は WHO が標準法とする IgM ELISA 法で行われているが、遺伝子検出による診断技術はまだ十分に確立されていない。本研究はベトナム北部の National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE) と共同で、ベトナムにおける遺伝子検出による診断技術、ならびに遺伝子解析技術を確立する事、そしてまた過去に採集された検体からウイルス遺伝子を検出し、過去に流行したウイルスの変遷を調査する事を目的としている。本年は NIHE を訪れ、ベトナムにおける麻疹、風疹の流行状況、検査技術等を確認し、日本で用いている高感度の麻疹ウイルス遺伝子検出系の技術移転を図った。また過去に採取された血清から検出された麻疹ウイルスの遺伝子解析の結果、近年の流行株は遺伝子型 H1 のウイルスであるが、2007 年を境に異なる系統のウイルスが流行した可能性が考えられた。

A. 研究目的

WHO は麻疹、風疹の排除を目指している。日本、中国、東南アジア等が所属する WHO 西太平洋地域 (Western Pacific Region : WPR) では 2012 年までに麻疹の排除を、2015 年までに風疹症例数を人口 100 万人当たり 10 例以下に、先天性風疹症候群 (CRS) を 100 万出生数当たり 10 人以下にする事を目標としている。WHO は麻疹排除の定義を「質の高いサーベイランスが存在するある一定の地域内において、常在する麻疹ウイルスによる麻疹の伝播が 12 ヶ月間以上ないこと」としており、麻疹の排除達成にはワクチン接種率を高く維持し、症例数を減少さ

せるだけではなく、検査診断に基づくサーベイランス体制を確立する事を求めている。さらに排除の最終段階では海外からの輸入麻疹例が増加すると予想され、麻疹の原因ウイルスがその土地に常在する株なのか、あるいは輸入された株なのかの鑑別が必要となる。また、解析されたウイルス遺伝子の情報は、世界のウイルスの分布状況の把握や伝播コースのトレースにも有用である。麻疹ウイルス、風疹ウイルスはともに感染力が強く、免疫が不十分なヒトにはたやすく感染する。これはとりもなおさず、日本での麻疹排除、風疹排除の達成には、周辺国の流行が大きく関連する事を示す。本研

究は WPR における麻疹、風疹排除を推進するために、ベトナムにおける遺伝子診断技術、解析技術の確立を目指している。

B. 研究対象と方法

- ・ベトナムの麻疹、風疹に関する情報の収集、遺伝子検出技術の供与

ベトナム National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE) の Dr. Trieu Thi Thanh Van、ならびに WHO Viet Nam office を訪れ、ベトナムにおける麻疹、風疹の流行状況、検査状況を確認した。また、日本で用いられている高感度の遺伝子検出法の技術供与を行った。

- ・過去に流行した麻疹ウイルスゲノムの解析

NIHE に保管されていた 2006 年、2008 年、2009 年の麻疹 IgM 抗体陽性血清から Qiagen Viral RNA mini kit RNA を用いて RNA を抽出し、麻疹ウイルス遺伝子型鑑別領域増幅用の RT-PCR を実施し、麻疹ウイルスゲノムの検出を試みた。増幅された遺伝子の塩基配列を決定し系統樹解析を実施した。

C. 研究結果

- ・ベトナムの麻疹、風疹の流行状況

ベトナムにおける麻疹は 2008 年から流行の気配がみられ、2009 年に全土にわたるアウトブレイクがあり約 5200 例の麻疹が報告されたが、2010 年 9 月～11 月に 1～5 才の子供を対象とした全国的な補足的ワクチン接種を実施したことから、2010 年は 1826 例、2011 年は 750 例と減少している。2012 年は 12 月までに 450 例が報告されている。一方、風疹は 2008 年にはおよそ 646 例の報告であったが、2009 年、2010 年と増加し、

2011 年には 7259 例となったが、2012 年 12 月までに 120 例前後と流行は収まりつつある。また月齢 12 ヶ月未満の心臓、白内障、難聴を持つ乳児を対象に CRS サーベイランスを行った結果、2011 年では 161 例が、2012 年も 9 月までにおよそ 300 例の CRS 児が確認されている。麻疹症例報告数、風疹症例報告数のすべてが検査診断されたわけではないが、検査方法は WHO のプロトコールに従い、発疹、発熱患者を対象に ELISA 法で麻疹 IgM 抗体を測定、陰性だった場合には風疹の IgM 抗体測定を実施している。

- ・過去に流行した麻疹ウイルスゲノムの解析

2006 年、2008 年、2009 年の麻疹 IgM 抗体陽性患者血清から RNA を抽出し、RT-PCR 法により麻疹ウイルスゲノムの増殖を試みた。2006 年 6 検体、2008 年 17 検体、2009 年 20 検体から麻疹ゲノムの回収に成功した。これらの塩基配列を決定し系統樹解析を行ったところ、すべて遺伝子型 H1 型に分類された。また 2006 年と 2008 年、2009 年の株は同じ遺伝子型 H1 でも異なるブランチに属し、塩基配列で 450 塩基中 10～11 の変異があった。また 2008、2009 年の流行株間の塩基配列の変異は 0～3 であった(図 1)。

D. 考察

麻疹、風疹はともに感染力が強いウイルス性の感染症である。麻疹ウイルスは罹患者に免疫不全を誘発し、およそ 1/3 が合併症にいたる。特に肺炎、脳炎を合併した場合は死亡率が高い。また風疹ウイルスが妊婦に感染した場合、胎盤を通じて胎児に感染し、出生する子供に CRS と呼ばれる障害をもたらす事がある。一方、麻疹、風疹には

有効性、安全性にすぐれたワクチンが存在することから、WHO は麻疹、風疹の排除をすすめており、この計画は公衆衛生上、医療経済上からも大きな意義を持っている。

ベトナムでは麻疹ワクチンは1982年から導入されている。当初は接種率が低く、麻疹の流行を制御できなかったが1990年頃から90%以上の接種率を維持し、また、2002年以降、数回にわたる大規模な補足的ワクチン接種を実施した事から、2003年以降、麻疹は激減し2007年の麻疹の発生率は人口100万人当たり0.2人になるまで減少した。しかしこの年にワクチンが不足し、接種率が86%まで下がったためか2009年には人口100万人当たり60人近い麻疹発生率が報告されている。2010年秋に大規模な補足的ワクチン接種を実施したことから、流行は収束に向かい2012年は、人口100万人当たり5.5人の麻疹発生率まで減少している。今後、1期、2期のワクチン接種率と数年に一度の補足的接種(follow up campaign)が、麻疹排除に重要であろう。一方、風疹は現在までワクチンが導入されておらず、4~5年のサイクルで流行を繰り返している。2009年ごろから風疹の流行のきざしがみられ、2011年には7000人を超す風疹が報告されている。これに伴いCRSを持つ子供の出生数も増加しており、2012年では三カ所の定点病院でサーベイランスを実施したところ300以上のCRS確定例が報告されている。現在、予定を早めて2013年から風疹ワクチンを含むワクチン(MR or MMR ワクチン)の導入を計画している。風疹予防の主たる目的は小児への感染防御ではなく、妊婦への感染を防ぎ、CRSの発生を防ぐ事にある。成人への感染のコントロールはより困難であるが、小児への高い接種率を維持し、風疹の流行

そのものを減少させることがCRSの予防に重要となろう。

前述のように2007年には麻疹の発生率が人口100万人当たり0.2人にまで減少した。2006年以前と2007年以降の麻疹ウイルスの違いは興味深い。過去の検体からの麻疹ゲノムの検出、解析から、2006年のウイルスと2008年以降のウイルスでは同じ遺伝子型H1であるが、異なるブランチに属する事が明らかになった。2006年ウイルスと2009年ウイルスでは麻疹ウイルスN遺伝子末端の遺伝子型決定部位450塩基中に10~11塩基、アミノ酸配列で4~5アミノ酸の変化がみいだされ、異なる由来のウイルスである可能性が考えられた。麻疹の排除は「質の高いサーベイランスが存在するある一定の地域内において、常在する麻疹ウイルスによる麻疹の伝播が12ヶ月間以上ないこと」と定義されており、排除の最終段階では流行する麻疹ウイルスが定着株か輸入株かの鑑別が必要となってくる。遺伝子型別のみではウイルスの鑑別には不十分な事が考えられ、ウイルス学的、疫学的により慎重に麻疹症例を観察する必要がある。

容易に国外旅行ができる現在では、麻疹排除、風疹排除を達成し、その状態を維持していくには、ある特定の国だけでの排除達成では不十分で、少なくともWPR等の様にある一定の広さを持つ地域からの排除が必要になってくる。事実、日本においては麻疹症例が減少した2010年以降、検出された麻疹ウイルスの大部分は、疫学的、ウイルス学的に海外に由来すると考えられるウイルスが検出されており、またこれらが小規模なアウトブレイクを起こす事もある。国内の麻疹、風疹の排除達成は国外、おもに近隣の状況と無関係ではな

い。特に中国、韓国、東南アジア等のように人口が多い国の中心的な研究室と技術、情報の交換等の緊密な連携とれる体制を確立しておくことは今後も重要になると考えられる。

E. 結論

2009年から再興したベトナムの麻疹、並びに2011年に7000例以上報告された風疹の流行は、2012年は減少した。麻疹排除の最終段階ではウイルスの由来の鑑別が求められる。遺伝子型別より詳細なウイルス学的解析が必要な可能性が考えられ、過去の検体からの流行した麻疹ウイルス遺伝子情報を収集、解析することは、今後、必要となるであろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe K, Watanabe K, Tazawa T, Kon M, Tamara T, Komase K. Imported cases of measles in Niigata, Japan in 2011. *Jpn J Infect Dis.* 65(3): 268-70, 2012
- 2) Tran DN, Pham NT, Tran TT, Khamrin P, Thongprachum A, Komase K, Hayakawa Y, Mizuguchi M, Ushijima H. Phylogenetic analysis of rubella viruses in Viet Nam during 2009-2010. *J Med Virol.* 84(4):705-10, 2012
- 3) Ohkura T, Kikuchi Y, Kono N, Itamura S, Komase K, Momose F, Morikawa Y. Epitope mapping of neutralizing monoclonal antibody in avian influenza A H5N1 virus hemagglutinin. *Biochem Biophys Res Commun.* 3; 418(1): 38-43, 2012

- 4) Tahara M, Ito Y, Brindley MA, Ma X, He J, Xu S, Fukuhara H, Sakai K, Komase K, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K, Takeda M. Functional and structural characterization of neutralizing epitopes of measles virus hemagglutinin protein. *J Virol.* 87(1): 666-75, 2012
- 5) Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. *J Virol.* 87(2):1105-14, 2013.
- 6) Nakayama T, Sawada A, Kubo H, Kaida A, Tanaka T, Shigemoto N, Komase K, Takeda M. Simple method to differentiate measles vaccine from wild-type strains using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Microbiol Immunol* (2013) Jan 22 [Epub ahead of print]
- 7) Tahara M, Ohno S, Sakai K, Ito Y, Fukuhara H, Komase K, Brindley MA, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K, Takeda M. The receptor-binding site of the measles virus hemagglutinin protein itself constitutes a conserved neutralizing epitope. *J Virol* (2013) Jan 2 [Epub ahead of print]
- 8) 駒瀬勝啓 Q&A 麻疹検査診断法 日本医事新報 2012 4605: 57-59.
- 9) 駒瀬勝啓、竹田誠 麻疹、風疹、ムンプスの検査診断の現状、臨床と微生物 2012 39(6): 656-662.
- 10) 駒瀬勝啓 麻疹ワクチン、風疹ワクチン

チンの品質管理 臨床とウイルス
2012 40(5):334-341.

2. 学会発表

- 1) 駒瀬 勝啓、高崎智彦、竹田誠 デング熱患者における麻疹 IgM 抗体の検出、第 86 回日本感染症学会学術講演会 長崎 2012 年 4 月 24 日～25 日
- 2) Khamla Lerdsaway, K. Thammavongsa, P. Ounnaphone, B. Khamphaphongphanh, V. Somoulay, P. Vongphrachanh, K. Komase, K. Yamamoto, S. Archkhawong, P. Ketmayoon, M. Phengxay, T. Chanthapaseuth, K. Feldon, J. Denny, H. Lewis、Rubella Susceptibility Study among Women of Child-bearing Age - Vientiane Capital, Lao PDR, 2010, 15th International Congress on Infectious Diseases, Bangkok, 2012 年 6 月 13 日～16 日
- 3) 中山哲夫、改田厚、駒瀬勝啓、麻疹ウイルス野生流行株とワクチン株との鑑別、第 53 回日本臨床ウイルス学会、堺 2012 年 6 月 16 日～17 日
- 4) 駒瀬勝啓、秋吉京子、伊藤正寛、麻疹 IgM 抗体価測定による麻疹検査診断-偽陽性と感度の関係-、第 53 回日本臨床ウイルス学会、堺 2012 年 6 月 16 日～17 日
- 5) 点状出血で発症したパルボウイルス感染症の臨床とウイルス学的検討～麻疹 IgM 抗体との交叉反応について～、第 53 回日本臨床ウイルス学会、堺 2012 年 6 月 16 日～17 日
- 6) 酒井宏治、關文緒、網康至、田原舞乃、中津祐一郎、大槻紀之、福原英雄、福士秀悦、吉川智城、西條政幸、森川茂、前仲勝美、山口良二、駒瀬勝啓、竹田誠、カニクイザルで致死感染症を起こしたジステンパーウイルスのサルレセプターの効率的な利用：ジステンパーウイルスはヒトへの脅威となり得るのか？ 第 60 回日本獣医学会 岩手 2012 年 9 月 14 日～16 日
- 7) 中津 祐一郎、鈴木 忠樹、駒瀬 勝啓、竹田 誠、極性上皮細胞におけるリサイクリングエンドソーム経路を利用した麻疹ウイルス RNP 複合体の細胞膜への輸送と感染性ウイルス粒子の産生：第 60 回ウイルス学会学術集会 大阪、2012 年 11 月 13 日～15 日
- 8) 田原 舞乃、Melinda A. Brindley、福原 秀雄、酒井 宏治、大野 真治、駒瀬 勝啓、Paul A. Rota、Richard K. Plemper、前仲 勝美、竹田 誠、麻疹ウイルス単一血清型決定の分子基盤：第 60 回ウイルス学会学術集会 大阪、2012 年 11 月 13 日～15 日
- 9) 酒井 宏治、關 文緒、網 康至、田原 舞乃、中津 祐一郎、大槻 紀之、福原 秀雄、福士 秀悦、吉河 智城、西條 政幸、森川 茂、前仲 勝美、山口 良二、駒瀬 勝啓、竹田 誠、カニクイザルで致死感染症を起こしたジステンパーウイルスのサルレセプターの効率的な利用：ジステンパーウイルスはヒトへの脅威となり得るのか？：第 60 回ウイルス学会学術集会 大阪、2012 年 11 月 13 日～15 日
- 10) 内野 清子、三好 龍也、森 嘉生、駒瀬 勝啓、田中 智之、いわゆる臨床検体三点セットを用いた風疹ウイルス検出状況：第 60 回ウイルス学会

学術集会 大阪、2012年11月13日
～15日

- 11) 田原舞乃、駒瀬勝啓、竹田誠、麻疹ウイルス H 蛋白質全エpiteープの詳細な解析、第 16 回日本ワクチン学会学術集会 横浜 2012年11月17日～18日
- 12) Kouji Sakai, Fumio Seki, Maino Tahara, Noriyuki Otsuki, Yasushi Ami, Masayuki Saijo, Ryoji Yamaguchi, Katsuhiko Komase, Makoto Takeda and Shigeru Morikawa, Canine distemper virus intrinsically uses monkey receptors and readily adapts to use human receptors as well, 15th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) Singapore 2013年3月11日～13日

- 13) シンポジウム 駒瀬勝啓、麻疹の疫学、実験室検査診断、衛生微生物技術協議会第 33 回研究会 横浜 2012年6月28日～29日
- 14) シンポジウム 駒瀬勝啓、麻疹、風疹ウイルスと検査診断について、第 26 回公衆衛生情報研究協議会、研究会 沖縄 2013年1月24日～25日
- 15) 講演 駒瀬勝啓、麻疹、風疹発生状況、ウイルス検査の概要と精度管理、平成 24 年度地方衛生研究所東海、北陸ブロック微生物部門専門家会議 名古屋 2012年10月18日～19日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. その他 なし

図1. 2006年、2008年、2009年の血清より検出された麻疹ウイルスゲノムの系統樹解析

