

201318046A

厚生労働省科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

麻疹ならびに風疹排除およびその維持を科学的に

サポートするための実験室検査に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 竹田 誠

平成 26(2014)年 3 月

厚生労働省科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

麻疹ならびに風疹排除およびその維持を科学的に

サポートするための実験室検査に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 竹田 誠

平成 26(2014)年 3 月

目次

I. 総括研究報告

- 麻疹ならびに風疹排除およびその維持を科学的にサポートするための実験室検査に関する研究----- 1
竹田 誠(国立感染症研究所 ウイルス第三部)

II. 分担研究報告

- 麻疹リアルタイム PCR 法の導入に関する研究----- 55
駒瀬勝啓(国立感染症研究所 ウイルス第三部)ら
- 麻疹、風疹の検査診断に関する研究----- 62
駒瀬勝啓(国立感染症研究所 ウイルス第三部)ら
- 発疹性疾患の鑑別実験診断法に関する研究----- 71
森 嘉生(国立感染症研究所 ウイルス第三部)
- 2013 年の北海道における麻疹・風疹について----- 80
三好正浩(北海道立衛生研究所)ら
- 2013 年1月～12月の東北・新潟ブロックにおける麻疹および風疹患者発生報告と検査状況----- 86
青木洋子(山形県衛生研究所)
- 千葉県の麻疹・風疹の現状と北関東ブロックにおける麻疹・風疹検査状況----- 92
小川知子(千葉県衛生研究所)ら
- 南関東・甲信静ブロックにおける麻疹検査診断(平成 25 年)----- 97
七種美和子(横浜市衛生研究所)ら
- 北陸ブロックにおける麻疹ならびに風疹の現状(2013 年)----- 102
児玉洋江(石川県保健環境センター)ら
- 愛知県における 2013 年麻しん・風しんの発生状況、麻疹集団発生経験、及び麻疹・風疹疑同時検査による麻疹及び風疹遺伝子検出の実地評価----- 106
皆川洋子(愛知県衛生研究所)ら
- 中国四国地区における麻しん及び風しんの検査状況について----- 112
村田祥子(山口県環境保健センター)ら
- 九州における麻疹および風疹検査の現状----- 116
濱崎光宏(福岡県保健環境研究所)ら
- 沖縄県の麻疹および風疹検査状況(2012-2013 年)----- 121
加藤峰史(沖縄県衛生環境研究所)ら

風疹ウイルス流行状況と検査診断-----	126
田中智之(堺市衛生研究所)ら	
平成25年度研究協力報告書-----	134
長谷川道弥(東京都健康安全研究センター)ら	
自治体における麻疹と風疹の排除に関する公衆衛生学的データの収集・解析に関する研究--	136
小澤邦壽(群馬県衛生環境研究所)ら	
麻疹ウイルスの分子疫学および分子進化に関する研究-----	138
木村博一(国立感染症研究所感染症疫学センター)	
調 恒明(山口県環境保健センター)ら	
風疹診断するための IgM 測定および麻疹・風疹ウイルスのリアルタイム PCR 検出法の検討-----	142
加瀬哲男(大阪府立公衆衛生研究所)ら	
発熱呼吸器症状患者からの風疹ワクチンウイルスの検出-----	147
木所 稔(国立感染症研究所ウイルス第三部)ら	
MR ワクチン効果の基盤的研究-----	152
庵原俊昭(国立病院機構三重病院小児科)ら	
III. 研究成果の刊行に関する一覧-----	161
VI. 研究成果の刊行物-----	165

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金
平成 25 年度新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
総括報告書

麻疹ならびに風疹排除およびその維持を科学的にサポートするための
実験室検査に関する研究

研究代表者

竹田 誠 国立感染症研究所ウイルス第三部

研究分担者

小澤邦壽 群馬県衛生環境研究所
調 恒明 山口県環境保健センター
加瀬哲男 大阪府立公衆衛生研究所
庵原俊昭 国立病院機構三重病院
駒瀬勝啓 国立感染症研究所ウイルス第三部
森 嘉生 国立感染症研究所ウイルス第三部
木所 稔 国立感染症研究所ウイルス第三部
木村博一 国立感染症研究所感染症疫学センター

協力研究者

三好正浩、駒込理佳、長野秀樹、岡野素彦(北海道立衛生研究所)
大西麻美、伊藤はるみ(札幌市衛生研究所)
青木洋子、水田克巳(山形県衛生研究所)
齋藤美香、塚越博之、後藤考市(群馬県衛生環境研究所)
小川知子、堀田千恵美、平良雅克、仁和岳史、小倉惇(千葉県衛生研究所)
横井一(千葉市環境保健研究所)
渡邊美樹(茨城県衛生研究所)
水越文徳(栃木県保健環境センター)
長島史子(宇都宮市衛生環境試験所)
小川泰卓(埼玉県衛生研究所)
大泉佐奈江(さいたま市健康科学研究センター)
長谷川道弥、林志直、甲斐明美、住友眞佐美(東京都健康安全研究センター)
七種美和子、小澤広規、熊崎真琴、川上千春、宇宿秀三、高井麻美、

畔上栄治、上原早苗、船山和志、森田昌弘(横浜市衛生研究所)
小野範子、一村美恵子、高木大輔、鈴木祐子、羽布津昌子、岩田眞美
(横浜市健康福祉局健康安全部)
鈴木理恵子(神奈川県衛生研究所)
清水英明、松島勇紀、岡部信彦(川崎市衛生研究所)
山口純子(横須賀市健康安全科学センター)
望月響子(相模原市衛生研究所)
大沼正行(山梨県衛生公害研究所)
内山友里恵(長野県環境保全研究所)
池ヶ谷朝香(静岡県環境衛生科学研究所)
柴原乃奈(静岡市環境保健研究所)
神保達也(浜松市保健環境研究所)
堀元栄詞(富山県衛生研究所)
小和田和誠(福井県衛生環境研究センター)
児玉洋江、成相絵里、崎川曜子(石川県保健環境センター)
皆川洋子、安井善宏、小林慎一、平松礼司、小栗信、広瀬かおる、山下照夫
(愛知県衛生研究所)
加瀬哲男、倉田貴子、上林大起、尾崎瑤子、駒野淳(大阪府立公衆衛生研究所)
田中智之、内野清子、三好龍也、岡山文香、芝田有理、吉田永祥、沼田富三
(堺市衛生研究所)
村田祥子、國吉香織、岡本(中川)玲子、戸田昌一、富田正章、調恒明
(山口県環境保健センター)
濱崎光宏、吉山千春、石橋哲也(福岡県保健環境研究所)
古川英臣(福岡市保健環境研究所)
坂田和歌子(北九州市環境科学研究)
安藤克幸(佐賀県衛生薬業センター)
吾郷昌信(長崎県環境保健研究センター)
島崎裕子(長崎市保健環境試験所)
清田直子(熊本県保健環境科学研究所)
門口真由美(熊本市環境総合センター)
加藤聖紀(大分県衛生環境研究センター)
三浦美穂(宮崎県衛生環境研究所)
濱田結花(鹿児島県環境保健センター)

加藤峰史、仁平稔、新垣絵里、高良武俊、岡野祥、喜屋武向子、久高潤

(沖縄県衛生環境研究所)

平良勝也(沖縄件健康増進課)

石井晴之、倉井大輔、皿谷健(杏林大学医学部第1内科)

浅田和豊、菅秀、長尾みづほ、根来麻奈美、谷口清洲

(国立病院機構三重病院小児科)

落合仁(落合小児科)

渡辺正博(すずかこどもクリニック)

二井立恵、伊左地真知子(白子クリニック小児科)

染谷健二、關 文緒、酒井宏治、田原舞乃、中津祐一郎、藤井薫、

大槻紀之、岡本貴世子、坂田真史、永井美智、安楽正輝、松山州徳

(国立感染症研究所ウイルス第三部)

永田典代(国立感染症研究所感染病理部)

竹内史比古、関塚剛史、黒田誠

(国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター)

砂川富正、中島一敏、加納和彦(国立感染症研究所感染症疫学センター)

高島義裕(世界保健機関西太平洋地域事務局)

研究要旨

麻疹に関する特定感染症予防指針が改正され、平成 27 年度までに麻疹排除を達成し WHO の認定を受けるという目標が掲げられた。そのためには、サーベイランスの質の高さを証明しうる優れた実験室診断技術とその体制が必要である。一方、昨年度以来、風疹の大きな流行がみられ、多数の先天性風疹症候群(CRS)の出生が報告された。平成 26 年 4 月に新たに「麻疹に関する特定感染症予防指針」が適用され、風疹の予防対策、サーベイランスが強化される予定である。本研究班の主な目的は、地方衛生研究所や国立感染症研究所に輸送された臨床検体の実験室検査に関して、実用性を重視しつつも、麻疹風疹実験室診断の技術を最高水準にまで高めることである。本年度は、麻疹と風疹のリアルタイム PCR 法の導入に関する研究、麻疹ウイルスと風疹ウイルスの分子疫学的解析、自治体における麻疹と風疹の排除に関する公衆衛生学的データの解析、麻疹と風疹 IgM 測定に関する研究などを実施した。クロスコンタミネーションのリスクを低減し、且つ利便性の観点からリアルタイム PCR 法の導入は不可欠と考えられる。麻疹と風疹のリアルタイム PCR 法が開発された。感度においては、従来の RT-nested PCR 法より低いことが示された。今後、試験結果をどのように実験室診断の判定に利用していくのかについて検討が重要である。一方、これまでの IgM ELISA キットによ

る麻疹の偽陽性が問題視されていたが、開発された改良キットでは、他の発疹性疾患との非特異的反応がほとんど出ないことが示された。ウイルスの分子疫学的解析から、麻疹は依然として排除(あるいは排除に近い状態)が続いていると考えられたが、風疹ウイルスは、複数の株が継続して流行していると考えられた。世界では、2020年までにWHOが区分する世界の6つの地域のうちの5つの地域で、麻疹ならびに風疹(CRS含む)を排除することを目標に掲げている。国立感染症研究所と地方衛生研究所との連携をさらに進めてわが国の麻疹風疹対策、特に実験室サーベイランス機能を高め、わが国の感染症対策に資するのみならず、世界の麻疹風疹対策のリーダーシップと取っていくことを今後も目指していく。

A. 研究目的

平成 19 年 12 月「麻疹に関する特定感染症予防指針」(以下、麻疹特定指針)が告示され、平成 24 年度までの麻疹排除を目指した活動が進められ、わが国は排除の達成に大きく近づいた。平成 25 年 4 月からは麻疹特定指針が改正され、改正された指針では、(1)平成 27 年度までの、麻疹排除の達成、(2)WHO による排除の認定という具体的な目標が掲げられている。その目標達成のためには、サーベイランスの質の高さを証明しうる優れた実験室診断技術ならびに体制が不可欠であり、麻疹特定指針でも(1)IgM による血清診断、(2)ウイルス遺伝子検出による病原体診断、(3)ウイルス遺伝子配列解析によるウイルス伝播経路の解明を麻疹診断例の可能な限り全例に対して実施するとされている。一方、昨年度以来、風疹の大きな流行がみられ、2013 年以降現在(2014 年 2 月)に至までに 38 例の先天性風疹症候群(CRS)の出生が報告されている(感染症発生動向調査)。現在、平成 26 年 4 月からの適用を目指して「風疹に関する特定感染症予防指針」(以下、風疹特定指針)の作製が進められている。世界においても、Global Vaccination Action Plan (GVAP)が 2012 年の WHO 総会において採択され、麻疹ならびに風疹の排除を世界各国が協力して目指すことが約束された。国際的観点からも、麻疹風疹対策は、最も重要な課題のひとつである。予防接種への取り組み、届出・検査対象の選定、予算措置、自治体と国との連携のあり方など、行政的な方針の多くは、特定指針の中にも明記されると考えられ、また、より具体的な対策は、麻疹対策推進会議、厚生労働省審議会、排除認定会議などで、状況を見

据えながら決定されていくと考えられる。本研究班の目的は、地方衛生研究所(以下、地研)や国立感染症研究所(以下、感染研)に輸送された臨床検体の検査に関して、実用性を重視しつつ、しかしながら麻疹ならびに風疹の実験室診断技術を最高水準にまで高めることに主眼を置き、(1)解析手法の選別、(2)解析手法の精度ならびに感度の向上、(3)精度管理法の開発などの科学的な研究を推進するものである。加えて世界的にも最も高い水準にあるわが国の麻疹ウイルスの解析手法を用いて、麻疹ワクチンによる予防効果の本質(液性免疫と細胞性免疫の関連、抗原性基盤の解明)について研究し、国際的な麻疹対策の科学的な基盤を築くことを目的とする。

B. 研究方法

(1)麻疹風疹リアルタイム RT-PCR 検査法の開発

迅速性、正確性(コンタミ回避)、操作性において必要性が高い。麻疹風疹同時検出系を開発し、普及させる。分離したウイルス液、これまでに収集された臨床検体(～100 検体)ならびに今後収集する(～100 検体/年を予定)を試料に用いて麻疹風疹同時検出リアルタイム RT-PCR 法を開発する。平成 26 年度までに一部の地研での試験運用、平成 27 年度までに全国への普及を目指す。

(2)麻疹風疹のリアルタイム RT-PCR 検査法の精度管理に関する研究

いかなる検査も適切に実施されていることを保証する精度管理が必要であり、WHO による認定に不可欠である。平成 27 年度までに精

度管理法を開発し、普及させる。精度管理のための検体パネルを作成する。平成 27 年度までに地方衛生研究所における精度管理の実施を目指す。

(3) 麻疹風疹の遺伝子検出法の感度ならびに精度に関する研究

ウイルスの遺伝子配列は株毎に異なるため、株によっては同じ遺伝子検出法を用いても検出感度は異なる可能性がある。株毎の差の出ない検出法を開発するとともに、検出の限界レベルを明らかにする。現在流行している約 10 種の遺伝子型について、上記(1)のリアルタイム RT-PCR 法の感度を解析する。地研の現場で、従来の RT-nested PCR 法との感度比較解析を実施する(これまでに収集された臨床検体(～100 検体)ならびに今後収集する(～100 検体/年を予定))(平成 27 年度までに)。

(4) 麻疹 IgM ELISA 試験の偽陽性の科学的な原因究明と解決法の研究

麻疹の IgM ELISA の偽陽性の原因を解明し、検査結果の判断に役立てる。偽陽性反応の出ない血清診断キットの開発に役立てる。麻疹風疹以外の発熱発疹性疾患での偽陽性率を解析する(平成 26 年度までに)。他の病原体に対する IgM 抗体の上昇との相関を明らかにする(平成 26 年度までに)。また、偽反応例において認識されている麻疹抗原を特定や、偽陽性反応の出ない新規血清診断キットの開発を目指す(平成 27 年度までに)。

(5) 風疹 IgM ELISA 試験の感度と精度に関する研究

風疹の IgM ELISA 検査の精度(偽陽性の頻度)について、平成 26 年度までに明らかにする。すでに収集されているさまざまな発熱発疹性疾患患者の血清(～100 検体を予定)を用いて市販の風疹 IgM ELISA キットの偽陽性率を明らかにする。

(6) 麻疹ウイルス系統樹解析の向上に関する研究

現在の 450 塩基を用いた系統樹解析では、流行の解明には不十分である。より精度の高い系統樹解析法を開発し、流行把握(国内株、輸入株の区別等)に役立てる。可能な限り検体を収集し、現在の N 遺伝子の 450 塩基に加えて、H 遺伝子の全域を増幅する(過去の検体ならびに今後収集される検体(～100 検体を予定))。H 遺伝子の配列情報を収集し、株の区別をより明確にする系統樹解析法を開発する(平成 26 年度までに)。また、quasispecies 解析を導入した比較開発法を開発する。

(7) 発熱性発疹疾患の安価かつ精度の高い病原体鑑別試験法に関する研究

麻疹風疹に類似の疾患は複数あるが、安価かつ容易に鑑別できる実験室診断法はない。平成 26 年度までにその開発を目指す。最も簡便な方法は(RT-)PCR 法である。試薬の選別、バッファーの工夫、プライマーの条件検討などで、(地研の現場でも実用可能な)安価かつ精度の高い multiplex-(RT-)PCR 法を開発する(平成 27 年度までに)。

(8) 麻疹ウイルス、風疹ウイルス分離の普及手段に関する研究

分離ウイルスを得ることは、詳細な遺伝子解析、抗原性解析などのため不可欠である。その普及のための研究を実施する。現在の麻疹風疹ウイルス分離細胞(Vero/hSLAM 細胞)は、凍結後大部分が死滅するという問題点があり、ウイルス分離に即応できない。凍結保存によっても死滅しない細胞の開発(平成 26 年度までに)ならびに簡易な分離法(特殊なスピッツの応用)を開発し、多くの地研で実用可能なものを目指す。

(9) ワクチン効果の基盤研究

麻疹ウイルスに対する液性免疫ならびに細胞性免疫の効果持続の基盤について解明する。

(10) 自治体をモデルにした麻疹排除に関する公衆衛生学的データの収集・解析に関する研究

群馬県をモデルにした麻疹排除に関する科学的データの収集・解析を行い、自治体レベルで本疾患が排除されているか否かについて検討を行う。群馬県をモデルにした麻疹排除に関する科学的データの収集・解析を行い、自治体レベルで本疾患が排除されているか否かについて検討を行うとともに排除に不可欠な公衆衛生学的な施策について検討を行う。

(11) 麻疹・風疹以外の発熱発疹性疾患の病原体遺伝子網羅解析

麻疹・風疹以外の発熱発疹性疾患の原因となる病原体遺伝子の遺伝子解析を行う。麻疹・風疹患者(特に疑似症例)のうち、麻疹ウイルスあるいは風疹ウイルスの関与が否定される

症例が多く、問題化している。そこで、これらの症例について、次世代シーケンサーあるいは RDV 法などによる発熱発疹性疾患の原因となる病原体遺伝子の遺伝子解析を行う(平成 27 年度まで)。

C. 研究結果

(1) 麻疹リアルタイム PCR 法の導入に関する研究。

開発した麻疹リアルタイム PCR 法を用いて 10 施設(麻疹風疹リファレンスセンター)で行われた計 33 回の検量線解析の結果を解析した。その結果、ほぼ全ての施設で適切な試験が安定的に実施可能であると判断された。RT-PCR とリアルタイム PCR の比較解析を行った結果、リアルタイム PCR も十分に高い感度や特異度を示していた。しかしながら、判定保留を陰性と判断した場合、偽陰性率が高くなる事から、「判定保留の場合には、従来の nested-PCR 法等を行い、判定を行う」とするのが妥当であると考えられた。判定可能であった(判定保留をのぞいた)155 検体では、リアルタイム PCR の判定結果と RT-PCR の判定結果とには高い一致率を示した。不一致な 5 検体は全て、RT-PCR 陽性検体でリアルタイム PCR 陰性という結果であった。本リアルタイム PCR は RT-PCR (nested RT-PCR、特に H 遺伝子の nested RT-PCR)より感度がやや低いと思われるため、妥当な結果だと考えられる。遺伝子型の情報があつた 77 検体の中には、A、B3、D4、D5、D8、D9 および H1 型が含まれており、リアルタイム PCR 法は全ての遺伝子型で検出可能であった(詳細は、駒瀬勝啓分担研究報告書を参照)。

(2) 麻疹、風疹の検査診断に関する研究

1. 2013 年において本研究班で把握された地研で実施された PCR による麻疹、並びに風疹の検査症例数はそれぞれ 1800 症例、2200 症例以上であった。
2. RT-PCR 法で麻疹ゲノムが検出された症例は 55 症例(遺伝子 H1, D9, D8, B3)であった。特に遺伝子型 B3 の検出数が多く愛知県では B3 ウイルスによる集団発生があった。
3. 風疹検査症例のうち 951 症例が風疹 RT-PCR 陽性(遺伝子型 2B, 1E)であった。
4. CRS, CRI の検査は北関東ブロックで 36 例、南関東・甲信静ブロックで 3 例、愛知県で 2 例実施され、それぞれ 19 例、1 例、1 例から PCR 法でウイルスが検出された。
5. 風疹 PCR 陽性症例において、発疹出現後 3 日間の IgM 抗体陽性率はおよそ 40-70%であった。また、デンカ生研の風疹 IgM 抗体キットは麻疹症例、デング症例、伝染性紅斑症例の血清と交差反応しなかった。
6. 麻疹 PCR 陰性例から、風疹ウイルス、パルボウイルス B19、HHPV6、HHPV7、コクサッキーウイルス 9 型、エンテロウイルス等が検出された。これらの診断は麻疹症例の否定に有用であった。

(詳細は、駒瀬勝啓分担研究報告書を参照)

(3) 発疹性疾患の鑑別実験室診断法に関する研究(風疹ウイルス検出リアルタイム PCR 法に関して)

開発した風疹ウイルス検出リアルタイム PCR 法について参照 RNA を用いて性能評価を行

った(実施施設:麻疹風疹リファレンスセンター10カ所)。全施設の集計結果において使用試薬による明らかな感度の差は認められなかった。次に、臨床検体を用いて本方法とコンベンショナル RT-nested PCR (NS 領域増幅 RT-nested PCR) 法との結果を比較した。判定基準(陽性コントロール)の設定によって、「判定保留」の出現率が大きく変化することが予想された。陽性コントロールを 5 コピー/反応で設定した 3 施設では RT-nested PCR 陽性検体における判定保留率が 8.0%であったのに対し、50 または 500 コピー/反応で設定した 7 施設では判定保留率が 35.5%であった。コンベンショナル RT-nested PCR 陰性検体 (n=97) は Real-time RT-PCR で全て陰性であった(偽陽性率 0%)が、コンベンショナル RT-nested PCR 陽性検体では、判定保留を陽性と含めた場合でも、101 検体中 76 検体のみが陽性であった(感度 75.2%)。患者の咽頭拭い液/鼻汁においてウイルス濃度が高くなりやすく、Real-time RT-PCR での陽性率が高くなることが示唆された。検体採取日で集計したところ、0-1 病日では 87.2%と最も検出率が高いが、日数を経るごとに検出率が低下する傾向があった。(詳細は、森嘉生分担研究報告書を参照)

(4) 風疹ウイルスの分子疫学的解析

2010~2013 年に日本で検出された風疹ウイルスの遺伝子型は 2B, 1E, 1J, 1a であり、2B および 1E が主に検出された。特に遺伝子型 2B は年々検出率が増加し、2013 年の流行株の大多数を占めていた。2009 年以前には日本で遺伝子型 2B や 1E は検出されておらず、2010 年以降から報告されるようになった。

また、2010～2011年と2012～2013年では同じ遺伝子型2Bや1Eであっても流行株に関連性はなく、異なる由来によるものと推測された。2012～2013年に流行したウイルスについては、遺伝子型2Bウイルスは東南アジア流行株と非常に近縁であった。

(詳細は、森嘉生分担研究報告書を参照)

(4)自治体における麻疹と風疹の排除に関する公衆衛生的データの収集・解析に関する研究

本邦の麻疹・風疹排除に向けて、感染症サーベイランスにより各自治体の迅速な対応が必要である。今年度は麻疹・風疹流行の現状として、群馬県内における麻疹・風疹患者報告状況と検査状況について調査した。その結果、風疹流行期には麻疹疑い症例の報告が増加し、さらにこの症例のうち風疹と確定した症例と麻疹・風疹以外の症例が約半数ずつであった。また、臨床診断例により風疹以外の類似疾患が風疹と届出されている可能性も考えられた。今後、麻疹・風疹の排除における確実な鑑別診断に向けて、地衛研での確実な検査体制を構築することが重要である。

(詳細は、小澤邦壽分担研究報告書を参照)

(5)風疹診断するためのIgM測定に関する検討

2013年に大阪府内で発生したnested PCR陽性であった風疹症例35例について、風疹特異的IgM抗体をEIAを用いて測定した。IgM測定値は試薬の添付文書に従い、インデックス表示に換算したものをを用いた。また、山形県と石川県からは3症例について風疹PCR陽性患者のIgMインデックス値の提供を受けた。IgMイン

デックス値と発疹出現後日数(発疹出現日を病日0とする)の相関をしらべた。合計38症例において、発疹出現後3日までに採取された血清(血漿を含む)では14/28(50.0%)が基準値1.2未満となり陰性を示したが、4日目以降では10/10(100%)が陽性となった。

(詳細は、加瀬哲男分担研究報告書を参照)

(6)MRワクチン効果の基盤的研究(麻疹IgM ELISAキットに関して)

改良された麻疹IgM抗体測定試薬は、A社試薬およびB社試薬と比べると感度、特異度は同等で、A社試薬で認められた麻疹以外の発疹性疾患との非特異反応も認められなくなった。改良された麻疹IgM抗体測定試薬は麻疹診断上有用と判断された。

(詳細は、庵原俊昭分担研究報告書を参照)

(7)麻疹ウイルスの分子疫学および分子進化に関する研究

麻疹ウイルス(MeV)の詳細な分子疫学および分子進化解析を行うため、Bayesian Markov Chain Monte Carlo method (Bayesian MCMC法)による遺伝子型のH遺伝子領域に関する時系列系統解析および尤度によるselection pressure解析を行った。その結果、H遺伝子領域における遺伝子型の出現は約125年前に遡ると推測された。また、H遺伝子の進化速度は他の呼吸器ウイルスの主要抗原に比し、比較的遅いことがわかった(4.94×10^{-4} substitutions/site/year)。Positive selection sitesは2か所のみ確認され、中和抗体のエピトープと異なる部位であった。これらのことから、種々の遺伝子型のMeVのH抗原領域の遺伝学的保存性は極めて高いことが示唆された。

(詳細は、木村博一、調恒明分担研究報告書を参照)

D. E. 考察と結論

平成 19 年 12 月に「麻疹特定指針」が告示され、平成 24 年度までの麻疹排除を目指した活動が進められた。平成 22～24 年度に実施された厚生労働省研究費補助金、新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業、早期麻疹排除及び排除状態の維持に関する研究(研究代表者、竹田誠)では、「WHO が求める排除証明のための判断基準には、さらなる検査診断の強化が必要ではあるが、(当初目標通り 2012 年度内に)わが国が実質的な排除状態に至ったと判断して妥当であろう」と結論づけた(平成 25 年 3 月総合研究報告書)。平成 25 年 4 月から適用された改正「麻疹特定指針」では、平成 27 年度までに麻疹排除について WHO の認定を受けるといった具体的な目標が掲げられている。「麻疹排除」の定義は、「ある一定の地域(国)において、土着のウイルス株による感染の伝播が 12 ヶ月以上ないこと」であるが、排除の「認定」要件は、その状態が 36 ヶ月以上続くこととされている。認定のためのプロセスとして、まずは、わが国においてわが国の現状を評価する委員会(National Verification Committee: NVC)を設け、毎年、麻疹ならびに風疹に関するわが国の状況をまとめた年次報告書を、NVC(委員長:岡部信彦先生)が、西太平洋地域事務局が設置する Regional Verification Commission: RVC)へ提出し、評価を受けることになる。そのため改訂された「麻疹特定指針」には、麻疹排除認定会議(NVC)の設置が明記されており、平成 25 年 10 月にわが国の最初の

年次報告書が NVC から RVC に提出され、現在評価を受けている。平成 19 年 12 月の「麻疹特定指針」の告示以降のわが国の麻疹対策の進展は目覚ましく、報告患者数のうちの約 25% において流行ウイルス株の遺伝子情報が明らかにされた。年次報告書の中でも非常に重要な位置を占めている。1990 年以降わが国の土着株と考えられていた D5 遺伝子型の麻疹ウイルスは、2010 年 5 月を最後に検出されておらず、それ以降も、感染が遮断されていることを十分に納得させることができるデータが示されている。そういった点から、今回の年次報告書をもってわが国が麻疹排除の認定を受ける可能性はある。一方、海外からの輸入株が多数報告されており、そのこと自体は心配すべきことではあるが、わが国が麻疹排除に至ったことを別の視点から示唆するデータである。

麻疹の実験室診断のための主な検査法は、IgM ELISA 法を用いた血清学的検査、ならびに RT-PCR 法を用いたウイルス検出である。IgM ELISA に関しては、わが国で最も汎用されているデンカ生研社製の IgM ELISA 検査キットにおいて、風疹や伝染性紅斑といった他の発熱発疹性疾患の患者で、偽陽性が出ることもあり、麻疹の正確な検査診断、ならびに排除の証明の障害となっていた。しかしながら、本研究班の庵原らが示したように、IgM ELISA キットが改良され、その改良キットでは、風疹、伝染性紅斑を含む麻疹以外の発疹性疾患との非特異的反応が出ないことが示されており、すでに市場に流通している。本研究班の駒瀬らが、主に民間検査会社で実施される麻疹 IgM ELISA 検査の(個人情報を含まない)総合的なデータを収集する方法を検討しており、血清診断においても、今後、大きく対策が進み、わが国の麻疹排除の証

明に貢献すると考えられる。一方、ウイルス遺伝子検出については、これまで主に RT-nested PCR 法が用いられてきた。感度的には最も信頼がおける一方、操作の煩雑性(とくには一度増幅した遺伝子産物を含むチューブを解放する必要があるので)からクロスコンタミネーションによる偽陽性の危険性が心配されてきた。RT-nested PCR 法によるクロスコンタミネーションは、単に試験実施者の力量が上がれば発生しないというものではなく、試験環境が相当に整っている必要がある。私の知る限り、それだけ恵まれた試験環境や予算が保証された地研は少なく、感染研においても、他の業務の都合上、それだけの環境を整えることは容易ではない。クロスコンタミネーションの回避、試験時間の短縮、ワークロードの軽減などを目的にリアルタイム PCR 法の導入が求められてきた。本研究班で駒瀬らが報告している方法を、今後導入していく予定であるが、感度において RT-nested PCR 法に劣ることが示されており、試験結果をどのように実験室診断の判定に利用していくのかについて検討が必要である。リアルタイム PCR による陽性例は、IgM ELISA の結果によらず「麻疹」という診断が下せると考えられる。一方、判定保留や陰性例においては、病日、臨床症状、血液生化学検査データ、利用可能であれば IgM ELISA の結果などを総合的に判断する必要がある。特に血液生化学検査データの活用は重要であり、トランスアミナーゼの上昇を伴わない LDH の上昇は、麻疹症例に比較的特徴的である。実施可能な施設であれば、従来の RT-nested PCR 法を追加で実施することも検討すべきである。IgM ELISA の結果が早急に必要の場合(民間検査センターの結果が待てない場合)には、公的機関(地研や感染研)に

おいて IgM ELISA 検査を実施することも検討の余地があり、緊急の場合は感染研で対応できると考えている。

麻疹対策の成功の一方、昨年度以来、麻疹の大きな流行がみられ、2013 年以降現在(2014 年 2 月)に至までに 38 例の CRS の出生が報告された(感染症発生動向調査)。MR ワクチンによる予防効果は、麻疹に対しても風疹に対してもほぼ同等であり、麻疹対策の成功から考えれば、2006 年以降の MR ワクチンを用いたワクチン施策は有効であったと考えられる。実際に、風疹の大流行にもかかわらず 20 歳以下の若年世代、すなわち 2006 年以降の対策によって 2 回の麻疹、風疹ワクチン接種機会の与えられた世代では、ほとんど風疹の発生は見られなかった。流行の中心は、風疹の定期接種機会のなかった成人男性である。同時に、予防接種制度の変遷により、結果として比較的接種率の低かった一部成人女性での患者発生が見られた。このことが CRS 児の出生に繋がっている。現在、平成 26 年 4 月からの適用を目指して「風しん特定指針」の作製が進められている。「風しん特定指針」では、「早期の CRS 発生阻止と 2020 年度までの風疹排除」が目標に掲げられる予定である。麻疹と同様に、「わが国における風しん患者の発生数が一定数以下になった場合には、類似の症状の疾病から風しんを見分けるためには、病原体を確認することが不可欠であることから、原則として全例にウイルス遺伝子検査の実施を求めるとされ、その検査機能を地研ならびに感染研に求めている。感染症法にもとずき、従来から CRS の診断目的の風疹ウイルス検出検査は実施されていたが、「風しん特定指針」においては、すでに CRS と診断された児のフォローアップのための風疹ウイルス

検出検査もまた、地研や感染研で実施することができるよう明記されている。

麻疹と同様、風疹の実験室診断のための主な検査法は、IgM ELISA 法を用いた血清学的検査、ならびに RT-PCR 法を用いたウイルス検出である。本研究班の解析においては、今のところ風疹 IgM ELISA キットによる偽陽性の問題はみつかっていないので、現在の市販キットが有効に活用できると考えられる。検出感度においては、本研究班の加瀬らも発症後 4 日目以降であれば全例が陽性になったと報告している。

ウイルス遺伝子検出については、麻疹と同様に、主に RT-nested PCR 法が用いられてきた。やはり、感度的には最も信頼がおける一方、クロスコンタミネーションのリスクは高い。本研究班の森らが風疹のリアルタイム PCR 法を報告しており、今後、活用する予定である。しかしながら、麻疹のリアルタイム PCR 以上に感度において RT-nested PCR 法に劣ることが示されており、試験結果の総合的な判定方法を検討しなければならない。少なくとも傾向としては、病日が早ければウイルス排出が多く、特に鼻咽頭ではウイルス量が多く、リアルタイム PCR 法において大多数の症例ではウイルスが検出できると予想できる。一方、病日が 4 日を過ぎれば、リアルタイム PCR 法の信頼度は低下するが、IgM ELISA 値がほぼ確実に陽性になると考えられる。最前線で迅速な診断を求められる保健所や自治体、医師にとっては、民間検査センターの IgM ELISA の結果を待てない場合が多いであろうが、現状ではケースバイケースの対応が必要である。風疹が疑われた患者が発生した場合、その患者と接触機会のある特に妊娠可能年齢の女性で、ワクチン接種歴が不確かな場合、積極的に

MR ワクチンの接種を実施すべきである。もちろん、その場合、妊娠中でないことを慎重に確認する必要がある。MR ワクチンは、数多いワクチンの中で、安全性も有効性も特に高いワクチンであり、ワクチン接種を躊躇う理由は無い。

世界では、2012 年に GVAP が WHO 総会で採択され、麻疹ならびに風疹の排除を世界各国が協力して目指すことが約束されている。GVAP では、2020 年までに WHO が区分する世界の 6 つの地域のうちの 5 つの地域で、麻疹ならびに風疹 (CRS 含む) を排除するとしている。2020 年は、わが国が東京オリンピックを開催する年である。米国を含む他の国々をみても、わが国の地研の活動を中心とした病原体検査機能は非常に優れている。それは、一線で働く地研の方々の努力に負うところが多く、予算、人員の削減により、機能の維持が困難になりつつある。感染研においても予算と人員の削減のため、年々、機能を維持することが難しくなりつつあり、2020 年も目標とした麻疹風疹対策に不安は残る。感染研と地研との連携(助け合い)をさらに進めてわが国の麻疹風疹対策、特に実験室サーベイランス機能を一層高め、わが国の感染症対策に資するのみならず、世界の麻疹風疹対策のリーダーシップと取っていくことを目指していく。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Aoki Y., Mizuta K., et. al. :

- Isolation of Vaccine-Derived Measles Viruses from Children with Acute Respiratory Infection: *Tohoku J. Exp Med.*, 2013, 230, 111-115
2. Ikeno S, Suzuki M, Muhsen M, Ishige M, Kobayashi M, Ohno S, Takeda M, Nakayama T, Morikawa Y, Terahara K, Okada S, Takeyama H, Yokota YT. (2013) Sensitive detection of measles virus infection in the blood and tissues of humanized mouse by one-step quantitative RT-PCR. *Front Microbiol.* 4:298.
 3. Ito M, Iwasaki M, Takeda M, Nakamura T, Yanagi Y, Ohno S. (2013) Measles virus non-structural C protein modulates viral RNA polymerase activity by interacting with a host protein SHCBP1. *J Virol.* 87:9633-42.
 4. Kurata T, Kanbayashi D, Kinoshita H, Arai S, Matsui Y, Fukumura K, Matsumoto H, Odaira F, Murata A, Konishi M, Yamamoto K, Nakano R, Ohara T, Otsuru E, Komano J, Kase T, Takahashi K. Late onset of vaccine-associated Measles in Adult with severe clinical symptoms: a case report. *Am. J. Med.* 2013 Nov 7. pii: S0002-9343(13)00929-7. doi: 10.1016/j.amjmed. 2013.10.015. [Epub ahead of print]
 5. Krumm SA, Takeda M, Plemper RK. (2013) The measles virus nucleocapsid protein tail domain is dispensable for viral polymerase recruitment and activity. *J Biol Chem.* 288:29943-53.
 6. Miyoshi M, Komagome R, Ishida S, Kikuchi M, Sato H, Ito H, Nagano H, Okano M. Recent progress toward measles elimination in Hokkaido, Japan, during 2011 to 2012. *Japanese Journal of Infectious Diseases* (in press)
 7. Nakatsu Y, Ma X, Seki F, Suzuki T, Iwasaki M, Yanagi Y, Komase K, Takeda M. (2013) Intracellular transport of the measles virus ribonucleoprotein complex is mediated by Rab11A-positive recycling endosomes and drives virus release from the apical membrane of polarized epithelial cells. *J Virol.* 87:4683-93.
 8. Nakayama T, Sawada A, Kubo H, Kaida A, Tanaka T, Shigemoto N, Komase K, Takeda M. (2013) Simple method to differentiate measles vaccine from wild-type strains using loop - mediated isothermal amplification (LAMP). *Microbiol immunol.* 57:246-51
 9. Otsuki N, Nakatsu Y, Kubota T, Sekizuka T, Seki F, Sakai K, Kuroda M, Yamaguchi R, Takeda M. (2013) The V protein of canine distemper virus is required for virus replication in human epithelial cells. *PLoS One* [in press]
 10. Otsuki N, Sekizuka T, Seki F, Sakai

- K, Kubota T, Nakatsu Y, Chen S, Fukuhara H, Maenaka K, Yamaguchi R, Kuroda M, Takeda M. (2013) Canine distemper virus with the intact C protein has the potential to replicate in human epithelial cells by using human nectin4 as a receptor. *Virology*. 435:485-92.
11. Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzuki Y, Iwata-Yoshikawa 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. (2013) Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. *J Virol*. 87:1105-1114.
 12. Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushi S, Tahara M, Nagata N, Ami Y, Mizutani T, Kurane I, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Komase K, Morikawa S, Takeda M. (2013) Canine distemper virus associated with a lethal outbreak in monkeys can readily adapt to use human receptors. *J Virol*. 87:7170-5.
 13. Tahara M, Ito Y, Brindley MA, Ma XM, He JL, Xu ST, Fukuhara H, Sakai K, Komase K, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K and Takeda M. (2013) Functional and structural characterization of neutralizing epitopes of measles virus hemagglutinin protein. *J Virol*. 87:666-675.
 14. Tahara M, Ohno S, Sakai K, Ito Y, Fukuhara H, Komase K, Brindley MA, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K, and Takeda M. (2013) The receptor-binding site of the measles virus hemagglutinin protein itself constitutes a conserved neutralizing epitope. *J Virol*. 87:3583-6.
 15. Takaki H, Takeda M, Tahara M, Shingai M, Oshiumi H, Matsumoto N, Seya T. (2013) MyD88 pathway in plasmacytoid and CD4+ dendritic cells primarily triggers type I interferon production against measles virus in a mouse infection model. *J Immunol*. 191:4740-7.
 16. Tanaka-Taya K, Satoh H, Arai S, Yamagishi T, Yahata Y, Nakashima K, Sugawara T, Ohkusa Y, Matsui T, Saito T, Kanou K, Shimada T, Kinoshita H, Yamashita K, Yasui Y, Tada Y, Mori Y, Takeda M, Sunagawa T, Oishi K. Nationwide Rubella Epidemic - Japan, 2013. *MMWR* 2013; 62(23), 457-462.
 17. 庵原俊昭：ウイルス感染症に既罹患か否か検査を行うのはCF法、HI法、EIA法のどれがよいですか？田原卓浩総編集、総合小児医療「プライマリ・ケアの感染症」、pp38-41, 2013 中山書店、東京
 18. 庵原俊昭、要藤裕孝、堤裕幸、吉川哲史：改良された抗麻疹 IgM 抗体検出 EIA 試薬の評価．*医学と薬学* 69(6):969-975, 2013
 19. 庵原俊昭：ワクチンによる医療従事者の麻疹・風疹・ムンプス・水痘・イン

- フルエンザ感染予防対策．医療
67(5):206-209, 2013
20. 大橋正博、河村吉紀、浅野喜造、松本祐嗣、加藤伴親、西村直子、尾崎隆男、菅 秀、庵原俊昭、落合 仁、竹内宏一、馬場宏一、吉川哲史：MR ワクチンと水痘ワクチン同時接種の効果ならびに安全性．日本小児科学会雑誌 117:1416-1423, 2013
 21. 岡本貴世子、森嘉生、落合雅樹、庵原俊昭、大槻紀之、海野幸子、竹田誠、駒瀬勝啓 抗風疹 IgG 国内標準品の作製、および ELISA 法による IgG 抗体価（国際単位）と HI 抗体価の相関性の解析 臨床化学、2013, 42; 146-150
 22. 梶山桂子 古川英臣 宮代 守 佐藤正雄 伊藤孝子 酒井由美子 植山誠 眞野理恵子 衣笠有紀 戸川温 高田 徹 田村和夫 駒瀬勝啓 タイからの B3 型麻疹ウイルス輸入例一福岡市、病原微生物検出情、2013, 34 (7); 201-202
 23. 倉田貴子 上林大起 駒野 淳 西村公志 加瀬哲男 高橋和郎 大平文人 松井陽子 伊達啓子 熊井優子 久保英幸 改田 厚 後藤 薫 長谷篤 大阪市保健所 廣川秀徹 吉田英樹 内野清子 三好龍也 田中智之 森 嘉生 大槻紀之 坂田真史 駒瀬勝啓 竹田 誠、大阪府内における 2012 年の風疹患者発生状況、病原微生物検出情報、2013, 34 (4) ; 97-98
 24. 駒瀬勝啓 染谷健二 竹田 誠、日本における麻疹ウイルス流行株の変遷 2009～2012、病原微生物検出情報、2013, 34 (2) ; 36-37
 25. 坂田真史、森 嘉生、竹田誠 風疹の海外の状況（地域別流行状況、予防接種等の対応）病原体検出情報、34(4) ; 91-92, 2013
 26. 染谷健二 駒瀬勝啓 竹田 誠、2012 年の海外の麻疹情報、病原微生物検出情報、2013, 34 (2) ; 24-25
 27. 竹田誠（監修）（2013）知ってほしい麻疹、風疹 Q&A（改訂）、財団法人日本予防医学協会
 28. 中津祐一郎、竹田誠、（2013）麻疹ウイルスと宿主の攻防-自然免疫応答の観点から-、臨床とウイルス、41:196-204
 29. 森嘉生 大槻紀之 岡本貴世子 坂田真史 駒瀬勝啓 竹田 誠、麻疹ウイルスの遺伝子型別動向と検査診断マニュアル改訂、病原微生物検出情報、2013, 34 (4) ; 99-100 (2013)
 30. 安井善宏、伊藤雅、安達啓一、尾内彩乃、中村範子、小林慎一、山下照夫、皆川洋子、氏木里衣子、山下敬介、伴友輪、鈴木英子、福永玲奈、飯田篤、吉兼美智枝、成瀬善巳、服部悟、土屋啓三、深瀬文昭、望月真吾、片岡泉、大鳥雄二、片岡博喜：渡航歴の無い麻疹集団発生からの B3 型麻疹ウイルス検出ー愛知県、病原微生物検出情報 34(11):345-346, 2013.
 31. 山岸拓也、伊東宏明、八幡裕一郎、中島一敏、松井珠乃、高橋琢理、木下一美、砂川富正、奥野英雄、多屋馨子、大石和徳、駒瀬勝啓、三崎貴子、丸山絢、大島孝弘、清水英明、岩瀬耕一、