

201420033A

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

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 竹田 誠

平成 27(2015)年 3 月

厚生労働省科学研究費補助金

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 竹田 誠

平成 27(2015)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

| | |
|--|----|
| 麻疹検査診断ネットワーク機能の強化に関する研究----- | 25 |
| 駒瀬勝啓(国立感染症研究所 ウイルス第三部)ら | |
| 麻疹の排除評価に関する研究----- | 33 |
| 駒瀬勝啓(国立感染症研究所 ウイルス第三部)ら | |
| 2014年の北海道における麻疹・風疹について----- | 40 |
| 三好正浩(北海道立衛生研究所)ら | |
| 2014年東北・新潟ブロックにおける麻疹・風疹検査状況----- | 46 |
| 青木洋子(山形県衛生研究所)ら | |
| 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----- | 51 |
| 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および風疹の検査状況(2014年)----- | 58 |
| 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および風疹患者報告ならびに地方衛生研究所における検査実施状況(2014年)--- | 66 |
| 児玉洋江(石川県保健環境センター)ら | |
| 愛知県における2014年麻疹集団発生及び麻疹風疹疑似事例における実験室検査の活用----- | 69 |
| 皆川洋子(愛知県衛生研究所)ら | |
| 2013 - 2014年における中国四国地域の麻疹、風疹の流行および検査状況----- | 73 |
| 佐倉千尋(鳥取県衛生環境研究所)ら | |
| 九州における麻疹および風疹検査の現状----- | 79 |
| 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(2014年)----- | 85 |
| 加藤峰史(沖縄県衛生環境研究所)ら | |

| | |
|--|-----|
| 堺市における 2014 年麻疹・風疹の発生状況----- | 89 |
| 内野清子(堺市衛生研究所)ら | |
| 東京都における麻疹および風疹の発生状況と遺伝子検査(2013~2014 年)----- | 92 |
| 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----- | 94 |
| 小澤邦壽(群馬県衛生環境研究所)ら | |
| 麻疹風疹実験室診断の地方衛生研究所における精度管理に関する研究----- | 96 |
| 調恒明(山口県環境保健センター)ら | |
| 臨床検体を用いた麻疹・風疹リアルタイム PCR 法の検討----- | 100 |
| 加瀬哲男(大阪府立公衆衛生研究所)ら | |
| 麻疹ウイルス風疹ウイルス同時検出リアルタイム PCR 系の確立、WHO 推奨系との比較解析、なら びに風疹流行の時系列解析、系統解析----- | 104 |
| 森 嘉生(国立感染症研究所 ウイルス第三部)ら | |
| 麻疹ならびに風疹排除に関する疫学データの収集と分析----- | 110 |
| 砂川富正(国立感染症研究所感染症疫学センター)ら | |
| MR ワクチン効果の基盤的研究----- | 117 |
| 庵原俊昭(国立病院機構三重病院小児科)ら | |
| 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----- | 140 |
| 木村博一(国立感染症研究所感染症疫学センター)ら | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧----- | 145 |

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金

平成 26 年度新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

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)

砂川富正(国立感染症研究所感染症疫学センター)

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、古舘大樹、水嶋好清(札幌市衛生研究所)

青木洋子(山形県衛生研究所)

筒井理華、古川紗耶(青森県環境保健センター)

高橋雅輝(岩手県環境保健研究センター)

柴田ちひろ(秋田県健康環境センター)

阿部美和(宮城県保健環境センター)

中田歩(仙台市健康福祉局衛生研究所)

鈴木理恵(福島県衛生研究所)

青木順子(新潟県保健環境科学研究所)

山本一成(新潟市衛生環境研究所)

小林美保、横田陽子、松田錦弥、塚越博之(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)

田中俊光(千葉市環境保健研究所)
土井育子(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(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)
一村美恵子、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)
岡村雄一郎(長野市環境衛生試験所)
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)
稲畑良(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、安達啓一、尾内彩乃、伊藤雅、小林慎一、
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(大阪府立公衆衛生研究所)
駒野淳(国立病院機構名古屋医療センター)
内野清子、三好龍也、岡山文香、芝田有理、吉田永祥、沼田富三、田中智之、
小林和夫(堺市衛生研究所)
佐倉千尋、加藤喜幸、竹内功二(鳥取県衛生環境研究所)
村田祥子、本永恭子、岡本玲子、戸田昌一(山口県環境保健センター)
濱崎光宏、吉富秀亮、芦塚由紀、中村麻子、堀川和美
(福岡県保健環境研究所)

松藤貴久、古川英臣、宮代守(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)
松本文昭(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)
吉岡健太(熊本県保健環境科学研究所)
岩永貴代(熊本市環境総合センター)
本田顕子(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)
御供田睦代(鹿児島県環境保健センター)
加藤峰史、久場由真仁、新垣絵理、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)
仁平稔(沖縄県北部食肉衛生検査所)
石井晴之、倉井大輔、皿谷健(杏林大学医学部第1内科)
根来麻奈美、長尾みづほ、中村晴奈、浅田和豊、菅秀、谷口清州
(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(白子クリニック小児科)
岡崎薫(四国こどもとおとなの医療センター)
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、伊東真木
(国立感染症研究所ウイルス第三部)
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)
八幡裕一郎、神谷元、奥野英雄、高橋琢理、木下一美、楠英樹、石岡大成、
野田雅博(国立感染症研究所感染症疫学センター)
中島一敏(東北大学大学院内科病態学講座感染制御・検査診断学分野)
蜂矢正彦(国立国際医療研究センター 国際医療協力部)
高島義裕(世界保健機関西太平洋地域事務局)

研究要旨

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、麻疹排除を目指した活動が進められ、平成24年度末には、わが国は麻疹排除に近い(あるいは達成した)状態になった。平成25年4月からは麻疹特定指針が改正され、平成27年度までの麻疹排除の達成とWHOによる認定という具体的な目標が掲げられた。ただし、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とその体制が必要であり、麻疹特定指針でもIgMによる血清診断、ウイルス遺伝子検出による病原体診断、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た。一方、平成25-26年には、風疹の大きな流行がみられ、40例を超える先天性風疹症候群(CRS)に罹患した児が出生した。平成26年4月1日、新たに「風疹に関する特定感染症予防指針」(以下、風疹特定指針)が告示された。風疹特定指針では、風疹においても可能な限り全例に実施する実験室診断検査を実施し、サーベイランスの強化、早期のCRS発生の確実な予防、平成32年(2020年)度までの風疹排除などが具体的な目標として掲げられた。海外においては、2012年にWHO総会がGlobal Vaccine Action Planを採択し2020年までに全世界から麻疹を排除することを決議し、世界各国の更なる国際協力、国際協調を促した。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)に送ら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、国内ならびに国際的な麻疹風疹対策活動に貢献することである。本年度は、麻疹と風疹のリアルタイムPCR法の導入に関する具体的な検討、麻疹ウイルスと風疹ウイルスの分子疫学的解析による流行実態の解明、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、地研で実施されるウイルス遺伝子検査の精度管理などについての研究を実施した。麻疹ウイルスの詳細な遺伝子解析から、わが国の麻疹のかつての流行(土着)株の伝播は、2010年以降遮断されており、また、日本において新たに1年間以上伝播が継続したウイルス(新たな土着株)はないことが示された。すなわち、日本が麻疹排除に成功したことを支持する結果である。一方、依然として、麻疹疑い事例には他の発熱発疹性疾患が紛れ込んでいることも示唆されており、これらの鑑別診断を視野にいれた検査を今後、実施することの重要性が示された。また、22施設の地研の協力を得た麻疹ウイルス遺伝子検出検査の外部精度管理に関する研究では、地研間でのウイルス検出感度の差異が明らかとなり、今後、各施設で使用する試薬、機器等の影響について検討する必要性が示された。しかしながら、開発した麻疹および風疹のリアルタイムPCR系については、臨床検体を用いて検討した結果、現行のRT-nested PCR法に替えて導入可能であることが示された。

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、麻疹排除を目指した活動が進められ、平成 24 年度末には、わが国は麻疹排除に近い(あるいは達成した)状態になった。平成 25 年 4 月からは麻疹特定指針が改正され、平成 27 年度までの麻疹排除の達成と WHO による認定という具体的な目標が掲げられた。ただし、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とその体制が必要であり、麻疹特定指針でも IgM による血清診断、ウイルス遺伝子検出による病原体診断、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た。一方、平成 25-26 年には、風疹の大きな流行がみられ、40 例を超える先天性風疹症候群(CRS)に罹患した児が出生した。平成 26 年 4 月 1 日、新たに「風疹に関する特定感染症予防指針」(以下、風疹特定指針)が告示された。風疹特定指針では、風疹においても可能な限り全例に実施する実験室診断検査を実施し、サーベイランスの強化、早期の CRS 発生の確実な予防、平成 32 年(2020 年)度までの風疹排除などが具体的な目標として掲げられてた。海外においては、2012 年に WHO 総会が Global Vaccine Action Plan を採択し 2020 年までに全世界から麻疹を排除することを決議し、世界各国の更なる国際協力、国際協調を促した。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)に送られた臨床検体の

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、国内ならびに国際的な麻疹風疹対策活動に貢献することである。

B. 研究方法

(1) 麻疹検査診断ネットワーク機能の強化に関する研究

各地区または検査状況をアンケート等で麻疹、風疹の検査状況を把握し解析する。病原体検出マニュアル等に従って麻疹、風疹の RT-PCR 法、ウイルス分離法等の検査を実施する。ウイルス遺伝子が検出された場合、塩基配列を決定して系統樹解析を行い、遺伝子型を決定する。検査陽性例の場合、疫学的調査を行いウイルスの伝搬の経路を解析する。

(詳細は、駒瀬勝啓分担研究報告書を参照)

(2) 麻疹の排除評価に関する研究

地研で解析されたウイルス遺伝子情報を集約し、遺伝子配列により各遺伝子型内のウイルスを細分類し、分類されたウイルス群ごとに流行曲線を作成、同じ配列を持つウイルスの伝播の状況を解析する。それらのデータに患者の発症前の海外渡航歴等の情報を加味して、新たな流行株となったかを解析する。

(詳細は、駒瀬勝啓分担研究報告書を参照)

(3) 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

地研全国協議会に加入している79施設に対

して麻疹疑い事例に関するアンケート調査を実施する。平成21年1月から平成26年9月末までに、麻疹遺伝子検査を実施し陰性だった事例を対象に、(i) 患者の性別、年齢、発病年月日、(ii) 臨床症状、(iii) 麻疹遺伝子検査に使用した検体の種類、採取日および結果、(iv) 麻疹 IgM/IgG 抗体検査の結果、(v) 麻疹以外に検出された病原体について報告を求める。

(詳細は、小澤邦壽分担研究報告書を参照)

(4) 麻疹風疹実験室診断の地方衛生研究所における精度管理に関する研究

全国の地研のうち、22 施設に感染研で準備された「麻疹ウイルス遺伝子検出検査の EQA」プロトコール、スタンダード RNA、Blind sample 3 検体を送付する。プロトコールに従って各施設で通常の麻疹ウイルス検査に使用している機器、試薬、スタンダード RNA を用いた検出感度の測定、ならびに 1stPCR、Nested PCR 実施後のゲル泳動写真とともに結果の報告を求める。続いて 3 検体用いた検出結果の報告を求める。加えて Blind sample について、Nested RT-PCR を実施し、陽性となったサンプルについてダイレクトシーケンス法による遺伝子配列の決定を求める。また、得られたウイルス遺伝子配列について相同解析を行い、リファレンス株を用いて分子系統樹を作成し、ダイレクトシーケンスの波形図、遺伝子配列と共に報告を求める。

(詳細は、調恒明分担研究報告書を参照)

(5) 臨床検体を用いた麻疹・風疹リアルタイム PCR 法の検討

発疹性疾患を疑い実施された検査検体から抽出された RNA を用いて麻疹風疹のリアルタイム PCR を行い、従前の RT-nested PCR 検査の結果と相関を解析する。

(詳細は、加瀬哲男分担研究報告書を参照)

(6) 麻疹ウイルス風疹ウイルス同時検出リアルタイム PCR 系の確立、WHO 推奨系との比較解析、ならびに風疹流行の時系列解析、系統解析

風疹ウイルス遺伝子検出 Real-time RT-PCR 法と RT-nested RT-PCR 法の検出限界濃度の比較、遺伝子型ウイルス間での増幅効率の比較および咽頭拭い液を用いてのスパイクテストを行う。Real-time RT-PCR 法を用いた場合の判定の目安となるフローチャートを作成する。日本の風疹ウイルス株について系統樹解析を行い、流行株の時系列地理別傾向を解析する。

(詳細は、森嘉生分担研究報告書を参照)

(7) 麻疹ならびに風疹排除に関する疫学データの収集と分析

わが国において報告された麻疹患者情報を WPRO ガイドラインに沿って整理するために、WHO ガイドラインに沿いつつ、NESID 患者情報を考慮した定義付けを行う。2012～2014 年にかけて出生、報告された CRS 児について、情報を収集する。秋田県職員の協力を得て、職場における麻疹風疹に関する血清学的調査、罹患やワクチン接種に関連した KAP スタディを実施する。自治体担当者を対象とした麻疹風疹対策シンポジウムを実施する。

(詳細は、砂川富正分担研究報告書を参照)

(8) MRワクチン効果の基盤的研究

臍帯血 117 人、生後 1-11 ヶ月の乳児 123 人を対象に移行抗体の推移について解析する。妊婦 527 人を対象に、出生年を 4 群にわけ、麻疹、風疹の抗体保有状況について解析する。就学前に MR ワクチン 2 期接種を受けた 40 人、小学校 1 年生から中学校 2 年生までの 147 人、高校 1 年生から 3 年生の 37 人、および麻疹ウイルスを含むワクチン(MCV)の 2 回接種歴(2 回目は 3 期接種)がある専門学校 1 年生 40 人を対象にして、MR ワクチン 2 期接種後および 3 期接種後の平均抗体価の推移を解析する。

(詳細は、庵原俊昭分担研究報告書を参照)

(9) 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

ヘルペスウイルス 1 型ならびに 3-7 型、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、エンテロウイルスおよびパルボウイルス B19 陽性の臨床検体を用いる。3 つのセットに分けた計 10 対のプライマーを添加し、Multiplex PCR Assay Kit (Takara)または Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen)を用いて Multiplex PCR を行い、本検出法の性能について評価する。

(詳細は、木村博一分担研究報告書を参照)

C. 研究結果

(1) 麻疹検査診断ネットワーク機能の強化に関する研究

(i) 2014 年に地研で実施された麻疹検査症例

数(把握数)は 2210 症例であった。RT-PCR 検査陽性症例は 415 症例で、412 症例で遺伝子解析がなされた。

(ii) 2014 年に地研で実施された風疹の検査症例数(把握数)は 984 症例であった。RT-PCR 検査陽性症例は 29 症例で、25 症例で遺伝子解析がされた。

(iii) 昨年の風疹の流行に伴い、CRS, CRI の検査を東北・新潟ブロックで 3 例、北関東ブロックで 3 例実施した。

(iv) 横浜市衛研でリアルタイム PCR 法を評価した。麻疹では RT-PCR 法、リアルタイム PCR 法による診断は全て一致した。一方、風疹では RT-PCR 法で風疹陽性となった 16 症例中 11 症例がリアルタイム PCR 法で陰性、1 症例が判定保留と判定された。

(v) 2013 年末にデンカ生研の麻疹 IgM EIA キットで改良前と改良後で比較したところ、偽陽性が減少したことが示された。

(vi) 沖縄県では 2012 年に、WHO が示すサーベイランスの指標に照らして、沖縄県が麻疹排除状態にある事を示した。

(詳細は、駒瀬勝啓分担研究報告書を参照)

(2) 麻疹の排除評価に関する研究

(i) 2014 年の報告麻疹症例数は 463 例で、約 79%にあたる 365 症例で麻疹ウイルス遺伝子が検出され、355 症例で遺伝子型決定部位である N 遺伝子 450 塩基の配列が決定された。検出されたウイルスは遺伝子型 B3 が 261 株、D8 が 57 株、D9 が 22 株、H1 が 15 株であった。

(ii) 遺伝子型 B3 のウイルスは 14 種のサブタイプに分類された。もっとも高い頻度で検出され

たサブタイプは全体のおよそ 74%をしめた。14 群のサブタイプ解析、各地域の詳細な流行疫学調査の結果、遺伝子型 B3 のある特定のウイルスが 1 年間以上継続して伝播していないことが示唆された。

(iii) 遺伝子型 D8 ウイルスは、12 のサブタイプに分類された。もっとも高い頻度で検出されたサブタイプは全体のおよそ 64%をしめた。12 種のサブタイプ解析、各地域の詳細な流行疫学調査の結果、遺伝子型 D8 のある特定のウイルスが 1 年間以上継続して伝播していないことが示唆された。

(iv) 遺伝子型 D9 ウイルスは、19 のサブタイプに分類された。19 種のサブタイプ解析、各地域の詳細な流行疫学調査の結果、遺伝子型 D9 のある特定のウイルスが 1 年間以上継続して伝播していないことが示唆された。

(v) 遺伝子型 H1 ウイルスは、10 種のサブタイプに分類された。10 種のサブタイプ解析、各地域の詳細な流行疫学調査の結果、遺伝子型 H1 のある特定のウイルスが 1 年間以上継続して伝播していないことが示唆された。

(詳細は、駒瀬勝啓分担研究報告書を参照)

(3) 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

全79施設中、麻しん遺伝子検査を実施している74施設より回答があり、合計で約5600事例の報告があった。麻しんが強く疑われ、適切に検体を採取したが遺伝子検査で陰性となっていると判断される2629事例について精査したところ、914事例(35%)から麻疹ウイルス以外

の病原体が検出されていた。

(詳細は、小澤邦壽分担研究報告書を参照)

(4) 麻疹風疹実験室診断の地方衛生研究所における精度管理に関する研究

スタンダード RNA の検出感度について、1stPCR、Nested PCR とともに施設間で感度に、最大 100 倍程度の差が見られた。Blind sample からの麻疹ウイルス検出では、概ね良好な結果が得られていたが、一部の施設で、偽陽性の結果が見られた。ダイレクトシーケンス法による遺伝子解析では、正確に遺伝子型の判定が行われていた。

(詳細は、調恒明分担研究報告書を参照)

(5) 臨床検体を用いた麻疹・風疹リアルタイム PCR 法の検討

麻疹リアルタイムPCRの特異度は97.60%であった。一方、風疹リアルタイムPCR陽性の特異度は86.0%であった。麻疹リアルタイムPCRでは、偽陰性検体が7.7%、風疹リアルタイムPCRでは、26.8%と割合が高く、風疹で偽陰性となった検体のうち52.9%は判定保留であった。一方、風疹リアルタイムPCRの方が、conventional PCRより高感度となる検体もあることが示された。

(詳細は、加瀬哲男分担研究報告書を参照)

(6) 麻疹ウイルス風疹ウイルス同時検出リアルタイムPCR系の確立、WHO 推奨系との比較解析、ならびに風疹流行の時系列解析、系統解析

風疹ウイルス遺伝子検出 Real-time RT-PCR 法と RT-nested RT-PCR 法の感度を比較解析

した。ウイルス株間による感度の違いは、見られなかった。また、咽頭拭い液の添加によるウイルス RNA の回収効率にも大きな影響はみられなかった。臨床検体を用いたこれまでの検討では、風疹ウイルス遺伝子検出 Real-time RT-PCR 法が RT-nested PCR 法よりもやや感度が低いという結果が出ているが、その原因について明らかにならなかった。それらの状況を鑑みて風疹検査で正確な結果を得るための判定アルゴリズムを作成した。2010～2014 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 ウイルス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。また、2010～2011 年と 2012～2013 年では同じ遺伝子型 2B や 1E であっても異なる由来の流行株と考えられた。

(詳細は、森嘉生分担研究報告書を参照)

(7) 麻疹ならびに風疹排除に関する疫学データの収集と分析

方法の項で述べた麻疹症例分類の定義付けに従って確定例を整理し、その結果を経年的(あるいは週ごと)に示した(感染源及び確定方法に関する分類と経年的推移[2011 年～2014 年第 26 週]、感染源及び確定方法に関する分類と週ごとの推移[2011 年～2014 年第 26 週]、感染源及び確定方法に関する分類と血清麻疹 IgM 抗体<8 占める割合の経年的推移[2011 年～2014 年第 26 週])。職場における麻疹風疹に関する血清学的調査、罹患やワクチン接種に関連した KAP スタディでは、麻疹、風疹に関して正確な知識が、まだ十分に普及していないこ

とが伺えた。自治体担当者を対象とした麻疹風疹対策シンポジウムは、東日本・西日本の各会場において無事に終了した。

(詳細は、砂川富正分担研究報告書を参照)

(8) MRワクチン効果の基盤的研究

麻疹では生後 6 ヶ月を過ぎると移行抗体の陽性率は 7.5%となり、風疹では 2.5%となった。移行抗体の半減期は、麻疹 46 日、風疹 48 日と算出された。妊婦の抗体保有状況を検討した結果、麻疹では、1979 年以降に出生した群では抗体陽性率が低く、1984 年以降に生まれた群では平均抗体価も有意に低値であった、風疹については、1984 年以降に生まれた群では、抗体陽性率および平均抗体価ともに有意に低値であった。MR ワクチン 2 期接種後の平均抗体価の推移では、麻疹では接種 5 年後までは平均抗体価は漸減し、その後プラトーに達した。風疹においても、平均抗体価は、接種 6 年後までは漸減し、その後プラトーに達していた。MR ワクチン 3 期後の抗体価の推移では、麻疹、風疹ともに接種 3 年後からプラトーに達していた。

(詳細は、庵原俊昭分担研究報告書を参照)

(9) 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

ヘルペスウイルス 1-7 型を標的とするプライマーセット(Set A)ならびにエンテロウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、パルボウイルス B19 を標的とするプライマーセット(Set B)による Multiplex PCR を評価したところ、改良に必要性が明らかになり、ヘルペスウイルスについて 1 型から 4 型を標的とするプライマーセット(SetA-1)

と 5 型から 7 型を標的とするプライマーセット (SetA-2) に分けて再度評価を行った。その結果、良好な結果が得られた。複数の臨床検体を用いて本法の有用性の評価を行ったところ、Set B において検体の種類により非特異産物が多く認められることがわかった。そこで遺伝子抽出後に DNase I を用いた前処理を実施し、同様の検討を行った結果、DNase I 非処理実験系に比し、非特異産物の減少が認められた。(詳細は、木村博一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 月に適用された改正「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[委員長:岡部信彦先生])が、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、西太平洋地域事務局が設置する Regional Verification Commission: RVC)へ提出し、わが国の麻疹排除状況の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 に提出された。その結果、わが国は「(麻疹が)排除されていると思われるが、(認定のためには)さらなる情報が必要」との判定を受け、排除認定は見送られた。一方、オーストラリア、マカオ、モンゴル、韓国は、排除認定を受けている。いずれにせよ、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、2011 年から 2013 年においては、報告患者数のうちの約 25%において、2014 年に至っては、実に 75%以上において流行ウイルス株の遺伝子情報が明らかにされている。これらの解析データは、年次報告書の中でも非常に重要な位置を占めており、RVC からも非常に高い評価を得ている。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。平成 26 年 12 月には、これらの解析データを含んだ今年の年次報告書が NVC から RVC に提出された。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ことを期待しているし、本研

究班の念願でもある。一方、詳細な疫学、ウイルス遺伝子解析が明らかにしたように、依然として海外からの輸入例が多数報告されている。特に、フィリピンからの輸入症例が目立ち、今後、日本の麻疹対策を、より一層、国際的視点から考えていく必要がある。

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、ならびに核酸増幅法 (RT-PCR やリアルタイム PCR 法など) を用いたウイルス遺伝子検出である。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が、本研究班の活動ならびに検査試薬メーカーの努力もあり IgM ELISA キットが改良され、偽陽性症例は激減した。わが国の麻疹対策の上では、非常に大きな助けになっている。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、そのデータの一部が NVC の年次報告書にも含まれている。しかしながら、WHO では、麻疹の実験室診断において、IgM ELISA 検査による診断を第一に求めており、その試験結果が正しい結果を提供していることの根拠を示すために、麻疹 IgM ELISA 検査を実施する検査施設に対して、WHO が提供するパネル血清を用いた習熟度試験 (proficiency test) を求めている。現在、わが国では、麻疹 IgM ELISA 検査を実施している機関が民間検査会社であることもあり、この試験の実施はできてい

ない。

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こと) 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げ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。研究班では、今後、各施設の試験環境を知った上で、対応を検討する方法を考えていきたい。今のところ、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。本研究班で開発された麻疹リアルタイム PCR 法は、感度においても RT-nested PCR 法と同等であり、今後の実用に十分対応できることが証明された。一方、風疹のリアルタイム PCR 法は、風疹ウイルスゲノムの特性上もあり、感度において RT-nested PCR 法に劣ることが示された。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り、本研究班では、風疹の実験室診断のためのアルゴリズムを作成した。リアルタイム PCR による陽性例は、病原体そのものの検出であり、ワクチン接種後のワクチン株の検出を除外できれば、IgM ELISA の結果によらず「麻疹」や「風疹」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。保健所や医師などに、麻疹風疹リアルタイム PCR 法についての、正しい知識を普及させていく努力が必要である。症例によって、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、2012 年から 2013 年に、風疹の大きな流行がみられ、2013 年以降現在までに 40 例を超える CRS の出生が報告された。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。平成 26 年 4 月 1 日、新たに「風しん特定指針」が告示された。風しん特定指針では、風疹においても可能な限り全例に実施する実験室診断検査を実施し、サーベイラ

ンスの強化、早期の CRS 発生阻止と、平成 32 年(2020 年)度までの風疹排除などが具体的な目標として掲げられている。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。本研究班が目的で掲げるように、風疹についても、より一層実用的(安価かつ簡便)で、且つ、最高水準の実験室検査法の開発を今後も進めていきたい。

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。本研究班の解析の結果、風疹 IgM ELISA キットによる偽陽性の問題はみつからないので、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、昨年度の報告で発症後 4 日目以降であれば全例が陽性と判定できると報告している。

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が、感度において RT-nested PCR 法に劣ることが示されている。ただし、病日が早ければウイルス排出量が多いため、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ことを本研究班では明らかにしている。尿、血液、咽頭(鼻腔)拭い液などの複数の検体を用いれば、その検出率はさらに上昇する。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。最前線ですばやく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総合的な判断を求めるしかない。麻疹や風疹が疑われた、あるいは確定した患者が周囲に発生した場合で、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(ワクチン接種を急がない場合は、抗体価検査をまず実施することがよいと思うが、2 回の接種歴が記録として確認できれば、抗体価検査を実施しなくても、すでに免疫があると通常判断してもよい)。

海外においては、2012 年に WHO 総会が Global Vaccine Action Plan を採択し 2020 年までに全世界から麻疹を排除することを決議し、世界各国の更なる国際協力、国際協調を促し

た。Global Vaccine Action Plan 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。米国など、麻疹風疹対策に先導的な成果を上げてきた国と比較しても、わが国の地研の活動を中心とした病原体検査機能は確実に優っている。それは、現場で働く自治体や地研の方々の努力に負うところが大きく、その一方で、予算、人員の削減により、機能の維持がますます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るが、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本研究班では目指していく。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Abo H, Okamoto K, Anraku M, Otsuki N, Sakata M, Icenogle J, Zheng Q, Kurata T, Kase T, Komase K, Takeda M, Mori Y. Development of an improved RT-LAMP assay for detection of currently circulating

- rubella viruses. *Journal of Virological Methods*. 207, 73–77. (2014)
2. 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 an adult with severe clinical symptoms: a case report. *Am J Med*. 2014. 127(4):e3–4.
 3. Kurata T, Kanbayashi D, Komano J, Kase T, Takahashi K. The reply. Pitfalls of National Surveillance Systems for Vaccine-associated Measles. *Am J Med*. 2014. 127(8):e19.
 4. Kurata T, Kanbayashi D, Nishimura H, Komono J, Kase T, Takahashi K. Increased reports of measles in a low endemic region during a rubella outbreak in adult populations. *Am J Infect Control*. In press.
 5. 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 2011–2012. *Jpn J Infect Dis*. 2014;67(4):311–314.
 6. Miyoshi M, Komagome R, Ishida S, Nagano H, Okano M. Epidemiology and laboratory diagnoses of rubella in Hokkaido district during the Nationwide Outbreak in Japan, 2011–2013. *Jpn J Infect Dis*. 2014; 67(6): 479–484.
 7. Otani S, Ayata M, Takeuchi K, Takeda M, Shintaku H, and Ogura H. (2014) Biased hypermutation occurred frequently in a gene inserted into the IC323 recombinant measles virus during its persistence in the brains of nude. *Virology*. 462–463:91–7.
 8. Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Aina A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. *J Virol*. 88: 5608–5616. 2014.
 9. Takahashi T, Arima Y, Kinoshita H, Kanou K, Saitoh T, Sunagawa T, Ito H, Kanayama A, Tabuchi A, Nakashima K, Yahata Y, Yamagishi T, Sugawara T, Ohkusa Y, Matsui T, Arai S, Satoh H, Tanaka-Taya K, Komase K, Takeda M, Oishi K, Ongoing increase in measles cases following importations, Japan, March 2014: times of challenge and opportunity. *Western Pac Surveill Rresponse J* 16; 5(2) 31–3 (2014)
 10. Yasui Y, Mori Y, Adachi H, Kobayashi S, Yamashita T, Minagawa H: Detection and genotyping of rubella virus from exanthematous patients suspected of having measles using reverse transcription-PCR. *Jpn J Infect Dis*

- 67(5):379-391, 2014.
11. 庵原俊昭:ウイルス感染症の検査法. JOHNS 30:1545-1548, 2014
 12. 庵原俊昭:わが国におけるワクチンの安全性評価についてー現状と課題ー. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 45:630-637, 2014
 13. 岡本貴世子、森嘉生、先天性風疹症候群の予防と風疹抗体価の推移、検査と技術 42(5)、464-469、2014
 14. 加藤峰史、仁平 稔、喜屋武向子 新垣 絵理、高良武俊、岡野祥、久高潤、照屋忍、高嶺明菜、金城恵子、小林孝暢、山川宗貞、伊禮壬紀夫、平良勝也、大野 惇、糸数公、新里 敬、渡辺蔵人、伊波千恵子、知念正雄、フィリピンからの B3 型麻疹ウイルスによる輸入症例、病原微生物検出情報 35(4):103-105, 2014
 15. 小林和夫、田中智之、東野博彦、八木由奈、塩見正司、吉田英樹、廣川秀徹、奥町彰礼、松本治子、田邊雅章、高橋和郎、中川直子、高野正子、入谷展弘、信田真里、松岡太郎、笹井康典 感染症発生動向調査解析評価小委員会（大阪府・大阪市・堺市・東大阪市・高槻市・豊中市・枚方市）、大阪府における麻疹流行状況ー2014年前半ー、IASR Vol. 35 p. 296- 298: 2014年12月号
 16. 駒瀬勝啓 竹田誠 海外の麻疹の情報 2013 病原微生物検出情報 35(4); 97-98 (2014)
 17. 坂田真史、森嘉生、風疹ウイルスの生活環、ウイルス 64(2)、137-146、2014
 18. 調恒明¹⁾、村田祥子¹⁾、戸田昌一¹⁾、岡本(中川)玲子¹⁾、小川知子²⁾、堀田千恵美²⁾、小倉惇²⁾、平良雅克²⁾、仁和岳史²⁾:風疹/先天性風疹症候群の検査、臨床と微生物 Vol.41, No3, 2014.5. 229-234
 19. 砂川富正. わが国の麻疹に関する疫学情報 (2014 年 3 月末時点). ワクチンジャーナル 2(1): 38 -39 2014
 20. 砂川富正. 再びワクチンを用いた対応が重要になってきた麻疹・風疹の状況. チャイルドヘルス 17(9): 638-642, 2014.
 21. 高橋琢理, 有馬雄三, 木下一美, 加納和彦, 齊藤剛仁, 伊東宏明, 中島一敏, 八幡裕一郎, 新井智, 佐藤弘, 多屋馨子, 大石和徳, 砂川富正. 2013~2014年の麻疹海外輸入例のまとめ. IASR Vol. 35 p. 98-100: 2014 年 4 月号
 22. 竹田誠 駒瀬勝啓 輸入麻疹と国内伝播感染症 44(6) 206-217 (2014)
 23. 長野秀樹, 三好正浩, 駒込理佳, 岡野素彦. 風疹の現況とその対策-北海道における情勢を中心に-. 道衛研所報. 2014;64:1-7.
 24. 根来麻奈美、長尾みづほ、菅 秀、庵原俊昭:血清抗体価からみた MR ワクチン第 4 期接種の評価. 小児科臨床 67:1673-1678, 2014
 25. 古川英臣 梶山桂子 宮代 守 佐藤正雄 伊藤孝子 酒井由美子 井出瑤子植山 誠 眞野理恵子 衣笠有紀 戸川 温 高田 徹 猪狩洋介 駒瀬勝啓 フィリピン渡航者への D9 型麻疹ウイルスの検