

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。

この中で①発熱、発疹の症状を呈しており、②咽頭ぬぐい液、血液、尿のうち、2種類以上の検体で遺伝子検査を実施し、③検体採取日が発病後7日以内であったものを「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事例」とし、該当する2629事例について精査した。このうち、914事例(35%)からは麻しんウイルス以外の病原体が検出されていた。病原体の種類は風しんウイルスが最も多く、次いでヒトヘルペスウイルス6型、パルボウイルス B19型、ヒトヘルペスウイルス7型が多く検出されていた(図1)。また、2種類以上の病原体が検出されているものが34事例あった。

D. 考察

本調査の結果から、麻しん疑い事例には多岐にわたる病原体が関与していることが明らかになった。麻しん以外の病原体検索については施設によって実施項目が異なるため、実際の検出割合は今回の調査結果よりも高いものと推測される。検出されたウイルスの種類から、臨床所見が類似している風しんの他、突発性発疹、伝染性紅斑、手足口病、ヘルパンギーナなどが「麻しん疑い」として紛れ込んでいる可能性が示唆された。麻しんのみならず、他の発熱発疹性疾患も視野に入れた検査診断が求められる。

E. 結論

調査結果から麻しん疑い事例には様々な発熱発疹性疾患が紛れ込んでいることが示唆された。各自治体ではこれらの鑑別診断を視野にいれた検査を実施することも重要である。

今後は収集したデータをより詳細に解析

し、臨床症状と検査結果の関連性を明らかにしていく。

F. 健康危険情報

該当なし

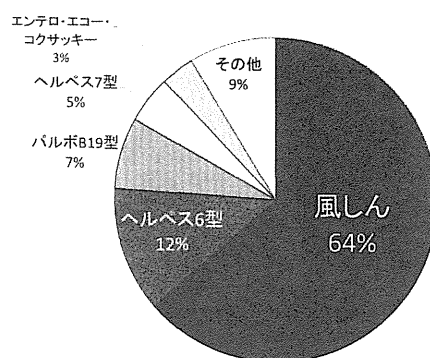
G. 研究発表

1. なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 麻しん以外に検出された病原体(n=914)



厚生労働科学研究費補助金（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」班

分担研究報告書

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

研究分担者 調 恒明 山口県環境保健センター
研究協力者 村田祥子 山口県環境保健センター
本永恭子 山口県環境保健センター
岡本玲子 山口県環境保健センター
戸田昌一 山口県環境保健センター

研究要旨 日本における麻疹ウイルス検出法として、現在汎用されているNested RT-PCR法について、22カ所の地方衛生研究所の参加による麻疹ウイルス検出感度測定及び麻疹ウイルス遺伝子検出に関する外部精度管理（EQA）をおこなった。スタンダードRNAを用いた検出感度の測定では施設間で100倍程度の感度の差がみられた。また、同時に実施したFTAカード法を用いたBlind sampleからの麻疹ウイルスRNAの検出についてはH1型のサンプルからの検出率は86.4%であった。B3型のサンプルについては全ての施設でB3型が検出された。しかし、プロトコールの解釈が施設により異なっていた可能性があり、PCR反応系に添加したRNA量の確認等、現在追加調査を実施し、結果を再検討しているため今回は中間報告とする。

A. 研究目的

平成19年12月「麻しんに関する特定感染症予防指針」（以下、特定指針）が告示され、国内の麻疹排除に向けての取り組みがはじまった。平成25年4月には特定指針の改正が行われ、その中で都道府県が設置する地方衛生研究所において、原則として麻疹疑い患者全例にウイルス遺伝子検査等を実施し、可能な限り麻疹ウイルスの遺伝子配列の解析を行うことが明記された。また、WHOの麻疹排除認定の定義には「質の高いサーベイランス」も要件の一つであり、National Laboratory（日本では国立感染症研究所）により精度管理された施設による

検査診断に基づいたサーベイランスが求められている。このような状況の中、日本では地方衛生研究所における麻疹ウイルス検査の外部精度管理が行われていない状況にある。麻疹ウイルス検出法としてはReal-time PCR法の導入が急がれているが、本研究では、現在汎用されているNested RT-PCR法について、検出感度の比較、N遺伝子、H遺伝子の検出ならびに遺伝子解析技術についての精度管理を実施し、地方衛生研究所における麻疹ウイルス検査の状況の把握と精度管理のあり方について検討を行った。

B. 研究方法

1. 精度管理に参加する地方衛生研究所への試料等の配布

全国の地方衛生研究所のうち、22施設に国立感染症研究所（以下、感染研）で準備された「麻疹ウイルス遺伝子検出検査（Nested RT-PCR法）のEQA(External Quality Assessment)」プロトコールを配布しスタンダードRNA、FTAカード法によるBlind sample 3検体を常温で郵送した。

2. スタンダードRNAを用いた検出感度の比較

プロトコールに従いスタンダードRNAを 10^7 コピー/ μL から 10^1 コピー/ μL まで段階希釈し、そのうち、 10^4 コピー/ μL から 10^1 コピー/ μL について、各施設で通常の麻疹ウイルス検査に使用している機器、試薬を用いた検出感度の測定を行い、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た。

3. Blind sampleからの麻疹ウイルス検出

3検体のFTAカード(No.1~No.3)をプロトコールに従い溶出後、各施設で通常の麻疹ウイルス検査に使用している方法によりRNAの抽出、逆転写反応(RT)及びPCRを行い、1stPCR、Nested PCR実施後のゲル泳動写真とともに検出結果の報告を求めた。

4. ダイレクトシーケンス法による遺伝子解析

Blind sampleについて、Nested RT-PCRを実施した後、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た。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た。

C. 研究結果

1. 精度管理に参加する地方衛生研究所への試料等の配布

乾燥状態のスタンダードRNA及びFTAカードの常温での郵送配布について、各施設とも破損、異常は認められなかった。また、感染研発送後、3日以内には全ての施設へ配布が完了した。

2. スタンダードRNAの検出感度について

・N遺伝子検出系

1stPCRでは陰性であった施設が18.2%あったが、Nested PCRでは全ての施設が陽性であった。1stPCRでは陰性から 10^1 コピー/ μL と感度にかかなりの差がみられた。Nested PCRでの感度差は 10^2 コピー/ μL から 10^0 コピー/ μL と100倍程度であった。

・H遺伝子検出系

1stPCRでは陰性から 10^0 コピー/ μL までと、N遺伝子検出系と同様に感度にかかなりの差がみられた。Nested PCRについてもN遺伝子検出系と同様に 10^2 コピー/ μL から 10^0 コピー/ μL と100倍程度であった。

3. Blind sampleからの麻疹ウイルス検出結果

・Sample No.1について

H遺伝子検出系は1st、Nested PCRの両方とも陽性であった施設が9.1%あった。残りの90.9%はNested PCRのみ陽性であった。N遺伝子検出系についても、1st、Nested PCRの両方とも陽性であった施設は9.1%あった。81.8%の施設はNested PCRでのみの検出であった。また、1st、Nested PCRとも陰性の施設が9.1%あった。

・ Sample No.2 について

全ての施設で H 遺伝子、N 遺伝子とも陰性であった。

・ Sample No.3 について

H 遺伝子検出系は 1st、Nested PCR の両方とも陽性であった施設は 18.2%あったが、反対に両方とも陰性で検出できなかった施設が 27.3%あった。N 遺伝子検出系についても、1st、Nested PCR の両方とも陽性であった施設は 9.1%であり、1st、Nested PCR とも陰性で検出できなかった施設が 4.6%あった。また、通常検査の際に使用する参照 RNA は、スタンダード検出系、Blind sample 検出系とも全ての施設で使用され、検出されていた。

4. ダイレクトシーケンス法による遺伝子解析結果

Sample No.1 について N 遺伝子を検出した 91%の施設がウイルス遺伝子配列決定をおこない、そのうちの 95% (全体として 86.4%) の施設から遺伝子型 H1 と報告された。Sample No.3 については N 遺伝子が不検出の施設も H 遺伝子の配列を用いてウイルス遺伝子配列の決定及び遺伝子型の決定が行われた。その結果、全ての施設から遺伝子型 B3 と報告された。

D. 考察

N 遺伝子検出系、H 遺伝子検出系ともに、スタンダード RNA の感度測定の検出において 100 倍程度の感度の差がみられた。この結果については、EQA プロトコルの解釈に差があり、逆転写反応 (RT) をおこなう際に RNA 量を 1 μ L で実施した施設と、各施設で通常検査の際に行っている反応量 (麻疹診断マニュアルによる RNA 量は試薬量と 1:1) を添加し cDNA を作成し、PCR

反応の際に cDNA 量を 1 μ L 添加した施設があった。Blind sample については、ほとんどの施設で同じ遺伝子型が報告された。しかし N 遺伝子検出が陰性の施設では使用した RNA 量に差があったことも懸念された。これらのことから、使用した RNA 量、反応量等の追加調査を現在行っている。今回、各施設で使用している試薬、機器、反応条件さらに機器のメンテナンス状態についてもアンケート調査を行い、回答を得ている。「麻疹診断マニュアル (第 2 版)」に準じた試薬、反応条件でおこなっている施設が多いが、反応条件が異なる施設もあることから今後、これらと結果への影響の有無について解析を実施する予定である。

E. 結論

22施設の地方衛生研究所の参加を得て麻疹ウイルス遺伝子検出検査 (Nested RT-PCR法) についての外部精度管理を実施した。スタンダードRNAによる検出感度の測定では各地研で100倍程度の差が生じる結果となった。Blind sampleからの麻疹ウイルス遺伝子検出ではB3型については100%、H1型については86.4%の施設で遺伝子型の決定ができ、分子系統樹の作成が行われた。各施設で通常使用している試薬、機器等の影響を考慮した解析を今後行っていく予定である。

国内における麻疹の排除状態の維持を持続するためには地方衛生研究所における麻疹ウイルス遺伝子検査が引き続き重要である。今後導入が見込まれる麻疹ウイルス検出系のReal-time PCR法とともに、汎用されているNested RT-PCR法についても、今後も引き続き精度管理を実施し、国内の検査精度の向上を図る必要がある。各施設で使用している機器、試薬等、条件の違いを

考慮した上でEQAが実施できるよう、今後
プロトコル等の作成、実施方法について
考慮する必要があった。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

論文発表

1. なし

学会発表

国際学会

1. なし

国内学会

1. なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

臨床検体を用いた麻疹・風疹リアルタイムPCR法の検討

研究分担者 加瀬哲男 大阪府立公衆衛生研究所

研究協力者 駒野淳 国立病院機構名古屋医療センター
倉田貴子 大阪府立公衆衛生研究所
上林大起 大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨 平成25・26年度に国立感染症研究所で作製された麻疹および風疹リアルタイムPCR法について、当所でのRT-nested PCR法で既に麻疹および風疹ウイルスゲノムの有無が明らかになっている200を越える臨床検体のRNAを用いて検証試験を行った。麻疹リアルタイムPCRでは感度92.3%、特異度は97.6%で、風疹リアルタイムPCRでは感度73.2%、特異度は86.0%であった。風疹において感度が従来法よりもやや劣るものの、複数種の検体で検査した結果と風疹IgM抗体の有無を勘案すれば、検査導入可能であり、実用性は高いと考えられた。

A. 研究目的

麻疹および風疹の迅速且つコンタミネーションの少ない正確な実験室診断には、現行のRT-nested PCR法よりもリアルタイムPCR法が適していると考えられる。このため、平成25・26年度に国立感染症研究所で、米国のCDCで行われている方法をもとに、麻疹および風疹リアルタイムPCR法が考案されたが、臨床検体を用いた十分な検証は行われていなかった。

本年度は、当所でのRT-nested PCR法で既に麻疹および風疹ウイルスゲノムの有無が明らかになっている臨床検体のRNAを用いて、リアルタイムPCRを行い、麻疹および風疹それぞれの系について、感度と特異度を算定し、実際の行政検査への導入の可否を検討する事を目的とした。

B. 研究方法

2007年から2014年までに発疹性疾患を

疑い大阪府立公衆衛生研究所で実施された行政検査において、血液・咽頭拭い液、尿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、従前の標準検査法であるRT-nested PCR (conventional PCR) 検査の結果と相関を解析した。実地検査には従前法で陽性と陰性の結果になった検体をあわせて麻疹261検体および風疹220検体を供した。試薬はTaqMan Fast Virus 1-step Master Mix (ABI社)を、機器はStepONEplus (ABI社)を使用した。検体のCt値がコントロール(5 copy/reaction)のCt値未満の場合を陽性、Ct値40以上を陰性、それ以外を判定保留とした。結果の解析においてはリアルタイムPCRの判定保留は陰性と評価した。

C. 研究結果

麻疹ではconventional PCR陽性検体の92.3% (48/52検体) がリアルタイムPCR陽

性(Ct:20.38-34.85, median 29.60)となり、特異度は97.60% (204/209検体)であった(表1)。一方、風疹ではconventional PCR陽性検体の73.2% (93/127検体)がリアルタイムPCR陽性(Ct:22.06-34.89, median 29.87)となり、特異度は86.0% (80/93検体)であった(表1)。

麻疹では、conventional PCRで陽性、リアルタイムPCR陰性となった偽陰性検体が7.7%(4/52)であったが、風疹では26.8%(34/127)と割合が高く、風疹で偽陰性となった検体のうち52.9%(18/34)は判定保留(Ct: 33.9-35.9, median 34.9)であった。

また、風疹で偽陽性となった13検体について精査したところ、7検体は患者の風疹IgM抗体陽性または他の検体種のリアルタイムPCRで風疹ウイルスが検出された事例であったことから、事実上の偽陽性とは言い難い検体であり、リアルタイムPCRは、conventional PCRより高感度な場合もあることが示された。

D. 考察

麻疹リアルタイムPCR法は麻疹検査を高い特異度で行うことができ、実地に適すると考えられた。風疹リアルタイムPCRは、ウイルス排泄量が多く感染拡大が懸念される事例の捕足には有用だが、ウイルスゲノム量が比較的少ない場合の感度は十分高くないため、複数の検体種での検査や風疹IgM抗体の結果を総合的に判断することで、実地に耐えうると考えられた。また、発生頻度が低く症例数が少ない先天性風疹症候群疑い事例の検査は、conventional PCRを用いて検査する方が適切であると思われる。実験系として改善すべき点としては、風疹診断の一層の感度・特異度の改善と鑑別診断を勘案した発疹性疾患検査のアルゴリズム

最適化が求められる。また、風疹で偽陰性となった検体のうち判定保留が占める割合が高かったため、今後全国的に導入した後に判定基準の調整が必要となる可能性が考えられた。今後は新検査法を導入した結果として、行政効果とコストパフォーマンスに関する評価が求められる。

E. 結論

国立感染症研究所が作製した麻疹および風疹のリアルタイムPCR系について、臨床検体を用いて検討した結果、複数種類の検体を用いて検査することで、現行のRT-nested PCR法に替えて導入可能であると考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

- (1) 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.
- (2) 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.
- (3) 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.

学会発表

国際学会

1. Satoshi Takeda, Daiki Kanbayashi, Takako Kurata, Hironori Yoshiyama, Jun Komano, Measles virus as a potential oncolytic virotherapy against B cell lymphomas, 第73回日本癌学会学術総会、横浜 (2014)
 2. Daiki Kanbayashi, Takako Kurata, Tetsuo Kase, Kazuo Takahashi, Jun Komano : Cross-Neutralization of Rubella Virus Strains with Human Sera Measured by A Novel High-Throughput Neutralization Assay, The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity、奈良 (2014).
- 国内学会
3. 上林大起, 倉田貴子, 福村和美, 畑中己穂, 田邊雅章, 松本治子, 駒野淳, 加瀬哲男, 高橋和郎: 麻疹と修飾麻疹について~MR ワクチン 2 回接種の重要性~, 第 18 回日本ワクチン学会学術集会、福岡 (2014)
 4. 倉田貴子, 上林大起, 加瀬哲男, 高橋和郎, 福村和美, 畑中己穂, 田邊雅章, 松本治子, 五十嵐愛子, 北島博之, 駒野淳: 大阪府における麻疹の流行と先天性麻疹症候群の検査診断, 第 18 回日本ワクチン学会学術集会、福岡 (2014)
 5. 倉田貴子, 上林大起, 駒野淳, 加瀬哲男, 高橋和郎: ヒト胎盤由来細胞における麻疹ウイルスの増殖 kinetics, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜 (2014)

6. 上林大起, 倉田貴子, 駒野淳, 加瀬哲男, 高橋和郎: HI 抗体価で評価されてきた麻疹に対する感染防御力は流行ウイルスに対して正しい判断をあたえるのか? 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜 (2014)
7. 倉田貴子, 上林大起, 西村公志, 加瀬哲男, 駒野淳: 水面下における麻疹の流行レベル推定, 第 73 回日本公衆衛生学会総会、宇都宮 (2014)
8. 上林大起, 倉田貴子, 駒野淳, 加瀬哲男, 高橋和郎: 生物発光を利用した麻疹ウイルス検出系の実験室診断への応用~流行要因解明に向けて~, 第 73 回日本公衆衛生学会総会、宇都宮 (2014)
9. 駒野淳, 上林大起, 倉田貴子, 加瀬哲男: 麻疹ウイルス感染評価システムの確立と中和活性測定系への応用, H25 年度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)「麻疹ならびに麻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」(H25-新興-一般-010) 研究班第 1 回班会議 東京 (2014)
10. 倉田貴子, 上林大起, 加瀬哲男, 高橋和郎: 先天性風しん症候群の検査診断, 衛生微生物技術協議会第 35 回研究会、東京 (2014)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

特許取得

該当なし

実用新案登録

該当なし

その他

該当なし

MV		RT-nested PCR	
Real-time PCR		+	-
	+	48	5
	-	4	204

N=261

RV		RT-nested PCR	
Real-time PCR		+	-
	+	93	13
	-	34	80

N=220

麻疹 (MV) におけるRT-real time PCRのRT-nested PCRに対する感度 92.3%、特異度97.6%、偽陰性率4/52 (7.7%) .

風疹 (RV) におけるRT-real time PCRのRT-nested PCRに対する感度 73.2%、特異度86.0%、偽陰性率34/127 (26.8%) .

表1 麻疹 (MV) および風疹 (RV) 検査における感度・特異度

厚生労働科学研究費補助金（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」班
分担研究報告書

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

研究分担者 森 嘉生 国立感染症研究所ウイルス第三部第二室

研究協力者 大槻紀之、岡本貴世子、坂田真史
国立感染症研究所ウイルス第三部第二室

研究要旨 これまでに麻疹検査と同時に実施可能な風疹Real-time RT-PCR法を構築したが、本法はRT-nested PCR法よりもやや感度が低いことが示された。そこで、Real-time RT-PCR法で感度が低い原因を検討した。しかし原因が明らかとならなかったため、本邦をしようして風疹検査を実施しても誤判定がないようにするための判定アルゴリズムを作成した。また、近年の日本の風疹ウイルス流行株の分子系統学的な時系列地理別解析を行い、日本の2010～2014年の流行は、異なる由来を持つ複数のウイルスによって引き起こされたことを明らかにした。

A. 研究目的

Measles and Rubella initiative が発表した 2012-2020 年の行動計画において、麻疹だけでなく風疹についても 2020 年までに WHO 6 地域のうち 5 地域で排除を達成することを目標に掲げられている。WHO 西太平洋地域では、風疹の排除目標年は具体的には定められていないが、風疹制御促進と先天性風疹症候群の予防が進められている。日本においては 2004 年の流行以来患者報告数の少ない状況が続いてきたが、2013 年に 1 万 4 千人を越える風疹患者と 40 名を越える先天性風疹症候群患者の発生があった。これに伴い、厚生労働省から「風しんに関する特定感染症予防指針」が示され、早期に先天性風疹症候群の発生をなくすとともに、平成三十二年度までに風疹の排除を達成することが目標として掲げられた。本指針において、風疹サーベイランスの強化が求め

られている。特に必要性に応じて地方衛生研究所でのウイルス遺伝子検査等の実施を行うことが示されていることから、検査に用いることができる実用性の高い風疹の遺伝子検出法の整備普及が必要とされる。

これまでに風疹においては高感度な RT-nested PCR 法を開発し、病原体検出マニュアルに掲載することで広く普及を図ってきた。しかしながら RT-nested PCR 法は比較的手技が煩雑であること、コンタミネーションの危険性が高いことが問題点としてあげられている。そこで我々はこれまでに手技が簡便でコンタミネーションの危険性の低い Real-time RT-PCR 法についても開発を行ってきた。昨年度は全国 10 カ所の麻疹風疹リファレンスセンターの協力のもと風疹 Real-time RT-PCR 法の評価を実施し、本法は特異度が高いが、RT-nested PCR 法よりもやや感度が低

いことが示された。そこで、Real-time RT-PCR 法で感度が低い原因を検討するとともに、やや低感度であっても齟齬がないように判定を行うためのアルゴリズムを検討した。

また、風疹排除の確認のためには、「適切なサーベイランス精度の下、土着株による感染が1年以上確認されないこと」が必要であり、遺伝子解析による風疹ウイルス野外株の解析によって、どのようなウイルス株が流行しているのか明らかにしていく必要がある。そこで、日本の風疹ウイルス流行株について時系列、地理的な解析を行い、近年どのようなウイルスが流行してきたかを検討した。

B. 研究方法

1. <風疹ウイルス遺伝子検出 Real-time RT-PCR 法の感度の検討>

風疹ウイルス遺伝子検出 Real-time RT-PCR 法の感度がやや低い原因を探るため、参照 RNA を用いて 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った。

2. <風疹ウイルス遺伝子検出 Real-time RT-PCR 法を使用する際の判定アルゴリズムの検討>

風疹ウイルス遺伝子検出 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麻疹の検査診断アルゴリズム（国立感染症研究所ホームページ麻疹）を参考に検討した。

3. <日本における風疹ウイルス流行株の分子疫学的な時系列地理別解析> 地方衛生研究所を中心に解析され、DDBJ 等の遺伝子データベースあるいは、

NESID に登録された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検討した。遺伝子解析には E1 遺伝子領域内の遺伝子型決定領域 739bps を用いた。

C. 研究結果

1. <風疹ウイルス遺伝子検出 Real-time RT-PCR 法の感度の検討>

昨年までの検討で、本法は臨床検体を用いた場合、RT-nested PCR 法よりもやや感度が低いことが示された。そこで、再度風疹ウイルス遺伝子検出 Real-time RT-PCR 法と RT-nested RT-PCR 法の感度を検討するため、希釈段階した参照 RNA（遺伝子型 1a ウイルス由来）を同時に測定した。その結果、両方法とも検出限界濃度は 5 コピー／反応と差は認められなかった。次に近年流行している株では、Real-time RT-PCR 法の増幅効率が悪い可能性を考え、プライマー・プローブ認識部位の検討を行ったが、近年流行している遺伝子型ウイルスで目立った変異等は認められなかった。さらに 5 種類のウイルス（遺伝子型 1a, 1E, 1G, 1J, 2B）を用い、Real-time RT-PCR 法でそれぞれのウイルスに対する PCR 増幅効率を検討したが、増幅効率の差は認められなかったことから、近年の流行株について本法の感度が低くなっていることは考えにくいことが示された。臨床検体中のような夾雑物の多い検体から検出する際に本法の感度が低下する可能性を考え、咽頭拭い液にウイルス液を添加して疑似検体を作製し、そこからの回収効率の変化を検討した（図 1）。その結果、5 種類のウイルス（遺伝子型 1a, 1E, 1G, 1J, 2B）を用いた場合、回収率に大きな差は認められなかった。以上のことから、今回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原因について明らかにならなかった。

2. <風疹ウイルス遺伝子検出 Real-time RT-PCR 法を使用する際の判定アルゴリズムの検討>

風疹検査で正確な結果を得るためには、検体の種類、検体の採取時期が重要であり、複数の方法による検査結果が得られる場合、総合して判定することが重要と考え、判定アルゴリズムを作成した(図2)。風疹ウイルス遺伝子検出 Real-time RT-PCR 法を用いて風疹検査を行う場合、可能な限り、咽頭拭い液、尿、血液の3検体を用いることを推奨し、そのうち、一検体でも陽性であった場合、風疹陽性とする事とした。一検体以上で判定保留ならびに全て陰性であった場合、必ずしも風疹陰性と確定できないため、医療機関で併行して実施された IgM 検出法の結果を参考にすることを推奨した。

Real-time RT-PCR 法陰性かつ IgM 試験陰性であった場合、検体の採取日が適切であったかを確認して、風疹でない可能性が高いとして判定することを推奨した。本アルゴリズムは医療機関、保健所、地方衛生研究所等広い範囲で使用可能であると考えられるため、国立感染症研究所ホームページ等に掲載できるかを検討している。

3.<日本における風疹ウイルス流行株の分子疫学的な時系列地理別解析>

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。日本の株は2009年以前にはこの遺伝

子型 2B や 1E ウイルスが検出されておらず、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(図3)。2012~2013年に流行した遺伝子型 2B ウイルスは、東南アジア流行株と非常に近縁であったが、大きく2系統に別れることが示された(2B-2と2B-3)(図4)。2B-2系統のウイルスは2012年に西日本を中心に検出され、主要なウイルス流行株であった。しかし、このウイルスは2013年の半ばから検出されなくなっている。一方、2B-3系統のウイルスは2012年の半ばから検出されるようになり、2013年には全国に広がる流行を示した。この系統に含まれるウイルスが2014年も検出されており、1年以上にわたって土着した可能性が否定できなかった。

D. 考察

風疹ウイルス遺伝子検出 Real-time RT-PCR 法は臨床検体での検討でコンベンショナル RT-nested PCR 法と比較して感度がやや低いが、その原因は明らかとならなかった。本 Real-time RT-PCR 法を使用して風疹検査を行う場合、今回作成した判定アルゴリズムを参考にすることで、誤判定の危険性を減らすことが出来ると考えられる。今後、本法は早急に病原体検出マニュアルに掲載し、地方衛生研究所へ普及することが求められる。近年全世界的に遺伝子型 2B ウイルスが流行しており、遺伝子型のみ情報ではその由来が分からない。一方、分子系統学的な時系列地理別解析によって、日本においては2010~2014年の流行は、異なる由来を持つ複数のウイ

ルスによって引き起こされたことが明らかとなった。これは日本においては周辺諸国の風疹ウイルスの流行状況に合わせて絶えず侵入してきていることが推測される。本解析は風疹排除を確認する上で非常に有用である可能性が示されたことから、今後も継続して解析を行っていく必要がある。

E. 結論

風疹ウイルス遺伝子検出 Real-time RT-PCR 法が現行の RT-nested PCR 法よりやや感度が低い原因は明らかにならなかったが、判定の目安となるアルゴリズムを作成し、実際の検査の使用に役立てるようにした。近年の日本の風疹ウイルス流行株の遺伝子解析を行い、日本の 2010～2014 年の流行は、異なる由来を持つ複数のウイルスによって引き起こされたことを明らかにした。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

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. Yasui Y, Mori Y, Adachi H, Kobayashi S, Yamashita T, Minagawa H. Detection and genotyping of rubella virus from exanthematous patients suspected of

measles using reverse transcription-PCR. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 67, 389-391. 2014

3. 森嘉生、大槻紀之、風疹ウイルスの特徴、臨床とウイルス 42(1)、19-25、2014
4. 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
5. 坂田真史、森嘉生、風疹ウイルスの生活環境、ウイルス 64(2)、137-146、2014

学会発表

国際学会

該当無し

国内学会

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

該当無し

実用新案登録

該当無し

その他

該当無し

図3 風疹ウイルスの系統樹

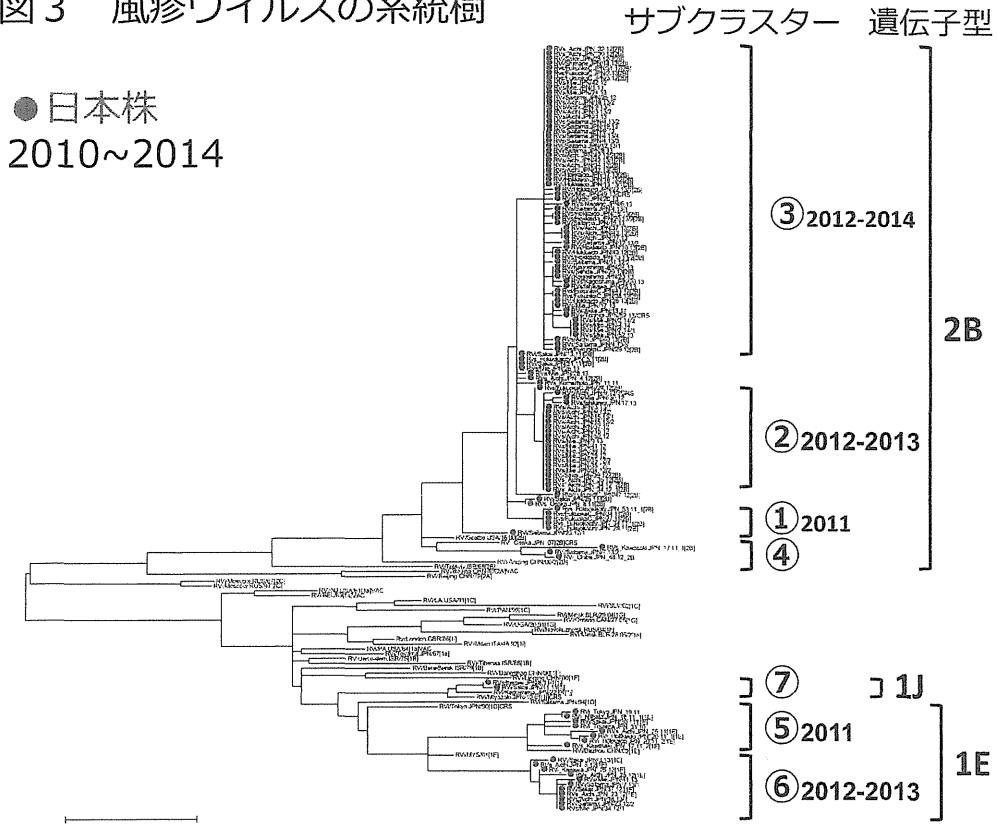
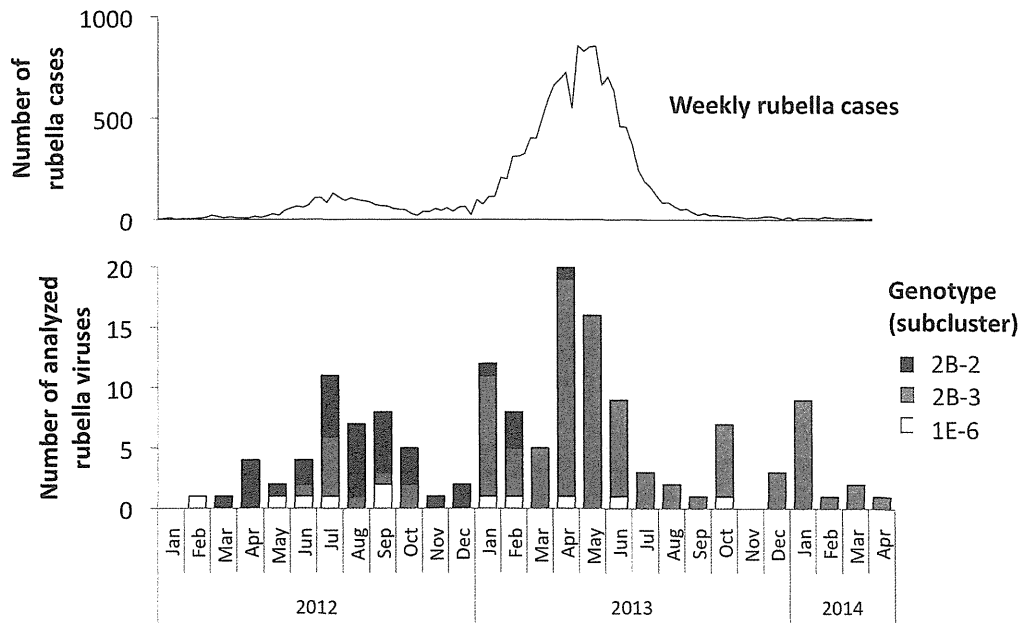


図4 遺伝子型2Bウイルスの時間的分布, 2012-2014



厚生労働科学研究費補助金（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及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」班

分担研究報告書

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

研究分担者 砂川富正 国立感染症研究所感染症疫学センター 室長
研究協力者 八幡裕一郎 国立感染症研究所感染症疫学センター 主任研究官
神谷 元 国立感染症研究所感染症疫学センター 主任研究官
奥野英雄 国立感染症研究所感染症疫学センター 研究員
高橋琢理 国立感染症研究所感染症疫学センター 研究員
木下一美 国立感染症研究所感染症疫学センター 研究員
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 講師

研究要旨 本研究グループ全体では疫学データとラボデータの有効な連携という目標に沿い、(1)国内麻疹患者報告とラボデータの突合による感染源及び確定方法に関する分類と経年的推移分析、(2)先天性風疹症候群症例に関する情報収集と分析、(3)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（秋田県）、(4)主に自治体を対象に、麻疹及び風疹排除における検査情報の重要性を含むコミュニケーションを目的とした麻疹風疹対策シンポジウムの開催、を実施した。(1)によって、日本が大きく麻疹排除に近づいていることが明らかとなった。他の研究項目についても分析が進んでいる。

A. 研究目的

我が国は、麻疹及び風疹のそれぞれの特定感染症予防指針に基づき、2015年までの麻疹排除の WHO による認定、及び 2020年までの出来るだけ早期の先天性風疹症候群（CRS）の発生防止及び風疹排除を目指している。特に、喫緊の麻疹排除（質の良いサーベイランスが存在する決められた地域において 12 か月以上にわたり土着の麻疹の伝播がないこと）の認定に必要な情報を示すにあたり、WHO は 5 つの証拠に関する情報を求めているが、ワクチン導入後の麻疹の疫学に関する詳述は、国内における麻疹排除を示すに当たり、最も重要な資料と位置付けられるものである。この情報に関する、国内の課題となっていることの

一つとして、WHO が求める以下の「Source and method of measles case confirmation（表 1）」の表を十分に埋めることが出来ない、というジレンマがあった（出典：2013年 WPRO 麻疹排除認定ガイドライン＝WPRO ガイドライン）。

SOURCE OF INFECTION	Method of Confirmation	
	Laboratory	Epidemiological Linkage
Endemic		
Unknown	C	D
Imported	E	F
Import-Related	G	H

表 1. Source and method of measles case confirmation

その最たるところとして、この表の中で求められている確定例（confirmed case）

に関する情報（検査確定＝laboratory、疫学的リンクによる確定＝epidemiological linkage）が不十分であったことが挙げられる。その理由として、国内における麻疹の病型は、1）麻疹（検査診断例）、2）麻疹（臨床診断例）、3）修飾麻疹（検査診断例）、の3つであり、検査が行われた症例であっても、現在麻疹の疫学情報としてWHOに報告がなされている、NESID（感染症発生动向調査システム）の患者情報（患者サーベイランス）について、どの程度まで検査情報との突合が行われているか、は明らかではなかった。麻疹排除認定を受けるに当たり、NESID患者情報と、病原体サーベイランス情報、及び病原体専門部等が収集した情報を突合して一つのデータベースにすることは麻疹排除に向けたデータの供出の上で必須の作業であった。また、我が国に疫学的リンクによる確定、と言う病型はない以上、その情報について改めて医療機関・自治体に協力を仰ぎ、情報を収集すること、そして、疫学的な関連を、流行曲線等の発症に関する情報、さらに地理情報から矛盾ない範囲で推定していくことが重要と考えられた。

また、感染源に関する情報として、endemicは土着株（2014年末現在では遺伝子型D5）が遺伝子検査により検出された場合に判明するが、imported, import-relatedを言うためには、症例が海外からのウイルスとの接触があったかどうかを示すための輸入に関する情報としては、NESIDの届出項目の中に「感染地域・国外」とあれば、importedとしての推定が可能である。しかし、基本的に届出時点の調査結果のみという制限があり、他の症例について、追加情報によりimported caseであることが判明したり、また、保健所の調査等により

imported caseとの疫学的リンクが判明した者（import-related case）があつて報告が遅れたりしている場合があることが考えられた。2014年5月1日に厚生労働省より各自治体へ、発生時届出以降に得られた検査情報及び疫学的リンクに関する情報のNESIDへの入力をうながす協力依頼の文書が発出された（健感発0501第1号）。本分担グループにおいては、国としての麻疹排除認定に必要な「Source and method of measles case confirmation」を整理するために、異なる情報源よりデータを一元化（突合）することを試み、それによって国内の疫学状況に関する分析を行った（研究①）。さらに、本研究グループ全体では疫学データとラボデータの有効な連携という目標に沿い、先天性風疹症候群（CRS）症例に関する疫学及びラボ情報の収集と分析の実施を他の研究班（ワクチン大石班）と共同で行っている（研究②）。

他に、職場における麻疹風疹に関する血清学的調査を実施し、罹患やワクチン接種に関連したKAP（知識、態度、実践）スタディを秋田県において実施した（研究③）。我が国では職場での麻疹及び風疹のアウトブレイクが報告されている。感受性者に対してワクチン接種を行うことが唯一の対策であるが、成人において、麻疹及び風疹のワクチンは任意接種であるため、ワクチン接種は個人の予防行動のみに依存する。本研究は成人の麻疹及び風疹ワクチン接種に関連する知識、態度、実践に関する情報を収集し、抗体の有無などとの関連について分析することを目的とした。

さらに麻疹及び風疹排除における検査情報の重要性を含むコミュニケーション戦略を研究する目的により、主に自治体を対象に、麻疹風疹対策シンポジウムを開催し、

麻疹及び風疹排除に関する最新の知見を自治体関係者と共有した（研究④）。これらの活動について述べる。

B. 研究方法

研究①. 国内麻疹患者報告とラボデータの突合による感染源及び確定方法に関する分類と経年的推移分析：我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し、Table 1 の A~H に入れ込むために、原則的に WHO ガイドラインに沿いつつ、NESID 患者情報の限界を考慮して以下のように定義した。

(A) endemic, labo-confirmed: A laboratory confirmed measles case by identifying of infection with D5 as endemic strain

(B) endemic, epi-linked: A non-laboratory confirmed measles case by identifying linkage with D5 case as endemic strain

(C) unknown, labo-confirmed: A laboratory confirmed measles case for which an epidemiological or virological linkage to importation or to endemic transmission cannot be established

(D) unknown, epi-linked: A non-laboratory confirmed measles case for which an epidemiological linkage to importation or to endemic transmission cannot be established

(E) imported, labo-confirmed: A laboratory confirmed measles case with information of being exposed to measles outside country

(F) imported, epi-linked: A non-laboratory confirmed measles case with information of exposed to measles outside country

(G) import-related, labo-confirmed: A laboratory confirmed measles case acquired infection occurring as part of a chain of transmission originating from an imported case as supported by epidemiological or virological evidence, or both

-1. A laboratory confirmed measles cases by identifying the subtype other than D5 as an import-related case

(H) import-related, epi-linked: A non-laboratory confirmed measles case acquired infection occurring as part of a chain of transmission originating from an imported case as supported by epidemiological evidence

-1. A case with information on epidemiological linkage with case having particular ID number (9-digit number in NESID)

-2. A case determined by the epidemiological linkage by comprehensive information including the onset date within 2 weeks range reported from same health center

特に“Method of Confirmation”を決定するために、Laboratory 及び Epidemiological Linkage のそれぞれについて、以下のような作業を行った。

<Laboratory>の以下に基づく整理：

- ・NESID 患者情報に最初から入力されている検査情報
- ・NESID 病原体情報に届け出られ、NESID の ID を確認・付記することが出来た情報
- ・病原体専門部情報による

<Epidemiological Linkage>の以下に基づく整理：

- ・ID 番号同士のリンクが明記の場合

・ID 番号同士のリンクが明記されていない
 場合 – “Geographically and temporally
 related” : epidemiological linkage by
 comprehensive information including the
 onset date within 2 weeks range reported
 from same health center

研究②. CRS に関する情報収集と分析：
 2012～2014 年にかけて出生・報告された
 45 例の CRS 児について、転帰・疫学情報・
 ウイルス学的検査の推移などに関する情報
 について、自治体を通して、あるいは自治
 体の許可を得て医療機関より、あるいは日
 本未熟児新生児学会のネットワークを介し
 て情報を収集する。ワクチン大石班との共
 同の研究となることから、本研究グループ
 においては検査データの推移を中心にデー
 タを記述的にまとめる。

(倫理面への配慮)

本研究の実施については、国立感染症研
 究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査で
 承認されている。

研究③. 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 (秋田県) : 対象は秋田県
 職員のうち調査希望者で、インフォーム
 ド・コンセントを行い同意書にサインした
 134 人とした。調査は 2014 年 6 月 17 日・20
 日の職場の定期健康診査時に採血を行い、
 事前に配布した調査票を回収し、抗体価測
 定 (麻疹抗体価 : PA 法 ; 風疹抗体価 : EIA
 法) を行った。質問紙調査の項目は麻疹・
 風疹の知識、ワクチン接種歴、罹患歴 (麻
 疹・風疹)、麻疹・風疹ワクチンに関する知
 識等とした。

(倫理面への配慮)

本研究の実施については、国立感染症研

究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査で
 承認されている。

研究④. 自治体担当者を対象とした麻疹風
 疹対策シンポジウムの開催 : 2014 年 11 月
 27 日 (国立感染症研究所)、同年 12 月 22
 日 (国立細菌機構大阪医療センター) にお
 いて、麻疹・風疹の最新の動向、検査に関
 する情報、各種関連ガイドラインの解説、
 患者会による情報などについてシンポジウ
 ムを実施した。

C. 研究結果

研究①. 国内麻疹患者報告とラボデータの
 突合による感染源及び確定方法に関する分
 類と経年的推移分析 : 方法の項で述べた分
 類に従って確定例を整理した。その結果を
 経年的 (あるいは週ごと) に示す。

year	2011	2012	2013	2014 (1-26th wk)	total
C - unknown, labo-confirmed	78	95	89	28	290
D - unknown, epi-linked	59	35	32	5	131
E - imported, labo-confirmed	28	13	17	87	157
F - imported, epi-linked	6	4	2	0	12
G - import-related, labo-confirmed	110	63	37	251	461
H - import-related, epi-linked	28	6	0	5	39
total	309	218	177	386	1090

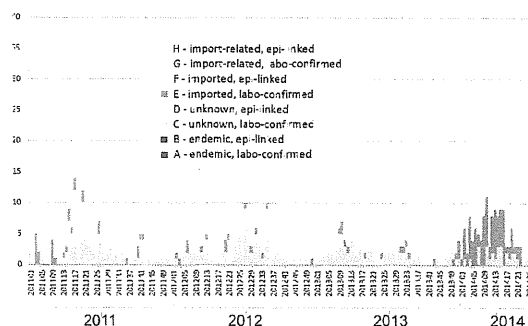


図 2. 感染源及び確定方法に関する分類と

週ごとの推移 (2011年～2014年第26週)

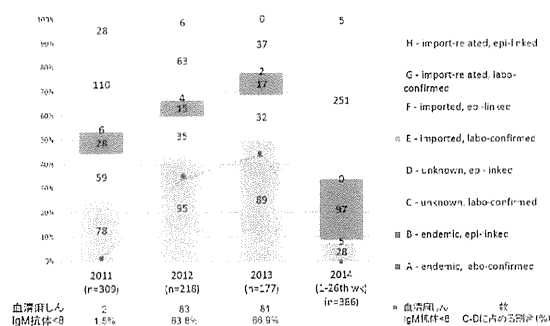


図 3. 感染源及び確定方法に関する分類と血清麻疹 IgM 抗体 <math>< 8</math> 占める割合の経年的推移 (2011年～2014年第26週)

研究②. CRS に関する情報収集と分析：現在、45 例の診療にあたった医療機関に対して情報収集を行っている。結果については来年度に報告の予定である。

研究③. 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 (秋田県)：対象者の性別は男性が 87 人 (65%) で、年齢は 40-49 歳が 55 人 (41%) で最も多かった。学歴は大卒以上が 90 人 (67%) で最多であった。麻疹の罹患歴有と答えた者は 19 人 (14.2%) で、風疹の罹患歴有と答えた者は 29 人 (22%) だった。麻疹 (麻疹単味、麻疹風疹混合ワクチン (MR ワクチン) の何れか) 接種は「1 回接種」が 30 人 (22%)、「2 回接種」が 7 人 (5%) であった。風疹ワクチン (風疹単味、MR ワクチンの何れか) 接種は 1 回接種が 15 人 (11%)、2 回接種が 5 人 (4%) であった。麻疹 PA 抗体価が 16 倍以上は 133 人 (99%) であった。風疹 HI 抗体価が 32 倍以上は 99 人 (74%) であった。自己予防のためにワクチン接種をすると答えた者は麻疹が 21 人 (16%)、風疹が 18 人 (13%) であった。麻疹及び風

疹のワクチンについては「罹患するよりも怖い印象がある」と答えた者が、麻疹で 121 人 (92%)、風疹で 123 人 (92%) であった。「ワクチンの副反応が気になる」と答えた者が 39 人 (29%) であった。「ワクチンは自分だけでなく周囲へ感染させないために接種する」と答えたものが 22 人 (16%) であった。風疹ワクチンは主に胎児を守る目的であると答えた者が 47 人 (35%) であった。「抗体測定を実施した経験がある」と答えた者は 12 人 (9%) であった。麻疹ワクチン接種と関連のある疾患は「自閉症」が 1 人 (1%)、「クローン病」が 1 人 (1%) であった。「先天性風疹症候群 (CRS) について聞いたことがある」と答えた者は 54 人 (41%) であった。2012 年～2013 年の風疹の流行の中心的グループは成人男性であると答えた者が 59 人 (46%)、成人女性と答えた者が 29 人 (23%) であった。成人が MR ワクチン接種を受けやすくなるために必要なこととして、「接種の有効性・安全性についてもっと伝える」が 60 人 (46%) で最も多く、次いで、「病気の怖さについてもっと伝える」が 36 人 (27%) であった。麻疹及び風疹は国内からの排除を目指す対象の疾患であることを聞いたことがないと答えた者が 88 人 (67%) で、聞いたことあると答えた者の 27 人 (21%) を大きく上回った。

研究④. 自治体担当者を対象とした麻疹風疹対策シンポジウムの開催：東日本・西日本の各会場におけるシンポジウムは無事に終了した。

D. 考察

研究①. 国内麻疹患者報告とラボデータの