

東京都における風しんウイルスの検出状況について (2012-2013年度)

角田 徳子^a, 長谷川 道弥^a, 岡崎 輝江^a, 村内 このみ^a, 秋山 麻里^a,
林 志直^a, 甲斐 明美^b

東京都では2010年から積極的疫学調査事業として麻しんの全数検査を実施しており、遺伝子検査において麻しんウイルスが陰性と判断された場合、類似感染症の鑑別目的で風しんウイルスの遺伝子検査を行っている。2011年度以前に風しんウイルスはほとんど検出されていなかったが、2012年度においては麻しんの積極的疫学調査検体から風しんウイルスの検出が増加した。さらに積極的疫学調査以外でも風しんを疑う検体が多く搬入され、6月以降に風しんウイルス陽性件数も大きく増加した。2013年度に入っても同ウイルスの検出は続き、陽性数は4月にピークとなり、その後も一年を通じ検出が見られた。

2012～2013年度に搬入された風しんを疑う検体について、風しんウイルスの遺伝子検査を実施した結果、9割以上が遺伝子型2Bで占められており、陽性患者数の内、半数以上は20代から40代の男性であった、またワクチン接種率と陽性患者数間にはある程度の関連性が認められ、風しんのまん延防止にはワクチンが有効である可能性が改めて示唆された。

キーワード: 風しん, 遺伝子検査, 遺伝子型別, 2B, 1E, 流行, 2012年度, 2013年度, ワクチン接種率

はじめに

風しんはトガウイルス科に属する一本鎖RNAウイルスが原因となるウイルス感染症で、飛沫感染等により発疹、発熱、リンパ節腫脹を主症状とする主に小児の疾患である。類似感染症である麻しんに比べ感染力も弱く比較的軽症の疾患であるが、風しんの抗体を持たない妊娠初期の女性が罹患した場合、胎児の死産やCRS (先天性風しん症候群) と呼ばれる先天性の障害を引き起こす可能性がある¹⁾。

風しんウイルスは現在13の遺伝子型に分けられており、型によっては既に消失したものや地域限定的もしくは散発的に見られるもの、世界的に検出されているものなど流行状況は多岐に渡る²⁾。我が国では現在2020年までの風しん排除達成を目標としており、ワクチン接種の充実などの対策が進行している³⁾。

2012年から2013年にかけて日本全国的に風しんの大規模な流行が発生した。東京都においても同様の流行が見られ⁴⁾、それに付随しCRS例も多く報告された。

東京都健康安全研究センターへの搬入検体においては、2011年度以前には風しんウイルスの検出はほぼ無かったが、2012年度は風しんを疑う検体 (都の麻しん積極的疫学調査⁵⁾検体で麻しんウイルスが陰性だった検体も含む) が多く、風しんウイルスの検出も大きく増加した。また2013年度も前年度より風しんウイルス陽性数は減少したものの同様の検出傾向が続いた。

これらの風しんの流行状況について、検出状況と遺伝子解析による型別結果を中心に報告する。

実験方法

1. 検査材料

2012年4月から2014年3月までに当センターにおいて、麻しんの積極的疫学調査で麻しん陰性となった検体、区および政令市依頼で行った先天性風疹症候群の積極的疫学調査検体や発生動向調査において風しんを疑う検体、および臨床症状から風しんを疑う検体は、2012年度に632件 (咽頭ぬぐい液575件, 尿28件, 血清5件, 臍帯血1件, その他鼻腔ぬぐい液等23件), 2013年度に613件 (咽頭ぬぐい液536件, 尿34件, 血清10件, 直腸ぬぐい液4件, その他鼻腔ぬぐい液等29件) あり、それらについて風しんウイルスの遺伝子検査を行った。

また、国の事業である感染症流行予測調査事業として、都内に居住する健康な都民から採取した血清 (2012年度は0歳から66歳まで計338件, 2013年度は0歳から70歳まで計358件) を用い、HI試験による風しんウイルス抗体価検査およびワクチン接種歴の聞き取り調査から、風しん患者数とワクチン接種についての関連性を調べた。

2. 検査方法

1) 遺伝子抽出と逆転写反応

対象検体は種類に関わらずいずれもセパジーンRV-R (エーディア) を用いてRNAの抽出を行った。逆転写酵素としてAMV Reverse Transcriptase (Life Science) を用い、既報論文⁶⁾を参照し、プライマー (R7: 5'-CCA CAA GCC GCG AGC AGT CA-3') を加え56°C1分, 41°C60分, 94°C5分の条件で逆転写反応と逆転写酵素の不活化を行いcDNA

^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター微生物部

を得た。

2) Nested PCR

1st PCRはcDNA5 μLを鋳型とし、既報論文⁶⁾を参照し、プライマー (R2: 5'-CAA CAC GCC GCA CGG ACA AC-3') を加え、94°C30秒、55°C30秒、72°C30秒を40サイクルの温度条件で行った。

Nested PCRは1st PCR産物を3 μL使用し、プライマー (R11: 5'-CTC GAG GTC CAG GTC CYG CC-3, R8C: 5'-GAA TGG CGT TGG CAA ACC GG-3') を用い、94°C30秒、60°C30秒、72°C30秒を30サイクルの温度条件で行った。PCR産物は2%アガロースゲルにて電気泳動を行い、標的サイズの約130 bpのバンドを確認したものを風しんウイルス陽性と判定した。なおPCR反応についてはTaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) を用いた。

3) 遺伝子型別

国立感染症研究所の風しん検出マニュアル第二版 (<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/Rubella121217.pdf>) を参考に、型別決定部位であるE1領域の739 bpを対象とし、E1-(2)とE1-(3)の二つの断片についてそれぞれNested PCRを行った。エキストラバンドが多く見られたり、ウイルス量が少ないことに起因すると思われるが、バンドそのものの出現率が非常に低かったため、TaKaRa LA Taq (タカラバイオ) を用い (BufferはIIを用い、試薬の分量は試薬の説明書に従った)、1st PCRの温度条件は変えず、Nested PCRはアニーリングの温度をE1-(2)は60°C、E1-(3)は64°Cに変更した。PCR産物は2%アガロースゲルにて電気泳動を行い、E1-(2)は466 bp、E1-(3)は423 bpのバンドを確認したのものについてシーケンス反応を行った。

4) ダイレクトシーケンス法

標的サイズの増幅が見られたPCR産物はAmicon Ultra 0.5 mL (Millipore) を用いてPCR産物を精製した。また、標的サイズの増幅が見られたがそれ以外にも増幅が見られた場合、ゲルからの切り出しをQIAquick PCR purification Kit (QIAGEN) を用いて行った。これらをBigDye®v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) にてシーケンス反応を行い、ABI PRISM3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて塩基配列を決定した。

5) 遺伝子解析

得られた遺伝子配列は、Chromas Pro (Technelysium Pty Ltd) およびGENETYX (株式会社ゼネティクス) を用いてアラインメントを行い、E1-(2)とE1-(3)の配列をつなげ型別判定部位の739 bpを得た。その配列はBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) によりNCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) に登録されたウイルス遺伝子配列との相同性解析を行った。型別判定領域である739 bpすべてを読めず、E1-(2)とE1-(3)のどちらかである400 bp弱程度しか読めなかった検体についても同様にBLASTを行い、型を推測した。

6) 抗体検査

流行予測事業として搬入された血清は、風疹ウイルス

HI試薬「生研」(デンカ生研) を用い、試薬の添付書類を参考にしてHI試験を行い、風しんウイルス抗体価を判定した。またワクチン接種歴の有無については、各保健所から提出された個票にて確認を行った。

結果及び考察

1. 搬入された検体の臨床診断名と検査結果

積極的疫学調査として麻しんの遺伝子検査を行い、麻しん陰性のものについて風しんウイルスの遺伝子検査を行っている。また、2012年度においては風しんの流行拡大が懸念されたことから、同年7月には積極的疫学調査検体として、麻しんおよび風しんの遺伝子検査を同時に行うこととした⁷⁾。この同時検査期間は2012年7月2日から7月31日までであり、表1に示す「麻しん・風しん」という診断名はこの時期の検体が主である。

それらの検体以外にも、区や市の積極的疫学調査検体としての風しんおよび先天性風しん症候群の検体や、感染発症動向調査検体として持ち込まれる検体で、診断名には風しんと記載されていない検体でも、発疹や発熱が症状として記載されていたものに関しては風しんも疑い遺伝子検査を行ってきた。これらの検体について、風しんウイルス陽性と判断した検体の診断名別(「疑い」との記載も含む)での検出状況を表1-1、1-2に示す。

積極的疫学調査の「麻しん」と診断された検体からのウイルス検出数は2012年度には373件中181件(48.5%)、2013年度には226件中72件(31.9%)であったが、「麻しん

表1-1 2012年度の風しん検査検体の診断名

2012年度 診断名	風しんウイルス		
	検査件数※	陽性件数	陽性%
麻しん	373	181	48.5
麻しん・風しん	41	25	61.0
不明発疹症	85	7	8.2
突発性発疹	26	1	3.8
風しん	24	17	70.8
手足口病	3	1	33
インフルエンザ	1	1	100
先天性風しん症候群	1	1	100

※陽性が検出された診断名のみ記載

表1-2 2013年度の風しん検査検体の診断名

2013年度 診断名	風しんウイルス		
	検査件数※	陽性件数	陽性%
麻しん	226	72	31.9
不明発疹症	172	18	10.5
手足口病	85	4	4.7
突発性発疹	42	3	7.1
伝染性紅斑	20	1	5.0
風しん	14	5	35.7
先天性風しん症候群	6	4	66.7
麻しん・風しん	4	3	75.0
伝染性単核症	1	1	100
胆汁うっ滞	1	1	100

※陽性が検出された診断名のみ記載

・風しん」で搬入された検体からの風しんウイルス検出率が2012年度には41件中25件 (61.0%)、2013年度には4件中3件 (75.0%) と高く、症状のみからの麻しんと風しんの鑑別診断が難しい現状が考えられた。

流行時期である2012年度は2013年度に比べ、「風しん」のみを疑う検体が多く搬入され (2012年度は24件、2013年度は14件)、その陽性率も70%以上と高い数値を記録した。また、2013年度は「先天性風しん症候群」の検体が増え、その陽性率は高く (2013年度の風しんウイルス陽性率は66.7%)、拡大が懸念されたこともあり、ウイルス排出期間に関する知見の集積のため、同10月より都内医療機関の協力の下、当センター独自の病原体レファレンス事業としてCRS・CRI (先天性風しん感染) の遺伝子検査を行っており、現在もフォローアップ検査を継続中である。

2. 遺伝子解析結果

検査材料の内、2012年度には234検体、2013年度には112検体を風しんウイルス陽性と判定した。それらの合計346検体 (検体種：咽頭ぬぐい液330件、尿11件、血清2件、直腸ぬぐい液1件、臍帯血1件、不明1件) の内、同じサンプルで複数検体あるものはその内の1つを選び、その他検体残量や検出時期、年齢層等を考慮し検体を選び出し、合計256件について遺伝子型別試験を行った。

130 bp のバンドが得られ、遺伝子解析で風しんウイルスの存在が確認された検体においても、型別試験のPCRでは増幅バンドが得られないことが多く、型別判定領域の内、ほぼすべての配列が得られた検体は147件であった。また両断片ともにバンドが得られなかった検体は70件、どちらか一方でバンドが得られた検体は39件であった。風しん検出マニュアル第二版によると、このような場合にはウイルスの遺伝子量が少ないと考えられるため、細胞培養法によるウイルス分離を推奨しているが、今回ウイルス分離検査は未実施である。

型別の結果、型別判定領域の内一部が読めており型が推察できた検体についての結果も含め、2B型が163件

(87.7%)、1E型が22件 (11.8%) と圧倒的に2Bが多く、またその割合は2年間でほぼ変わらず、都内の風しんの流行は2B型によるものが主であったことが示唆された (図1)。

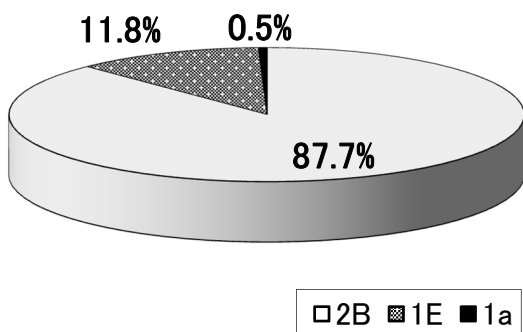


図1 風しんウイルス遺伝子型別 (2年分)

また、これ以外の型の検出は一部のワクチン由来株 (1a型) を除き確認できなかった。2011年以降、東南アジアの流行型である2Bと1Eが国内に入り、これらが日本全国で流行しているため⁸⁾、東京都においてもこの流行に沿った結果となったと思われる。

3. 検出時期

2012年1月から月に1検体ずつ陽性検体が検出され始め、2012年4月に入りさらに検出数が増え、同年度の7月、2月、3月に一か月あたり約40検体の陽性数を記録した (図2)。2013年度に入り陽性数は減少したものの依然として高い値で推移し、初夏にピークを迎えその後減少傾向にある。

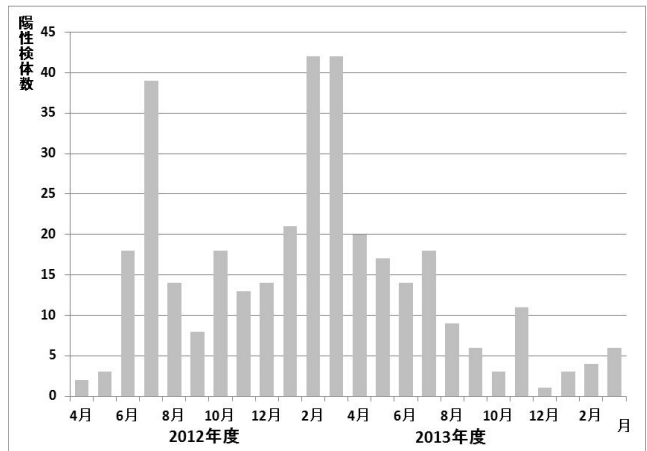


図2 風しん陽性検体数 (月別)

また、遺伝子型別試験において型が推察できた検体のみについて、2B、1Eおよび1a (ワクチン型) の出現割合を2012年4月から月別に示す (図3)。

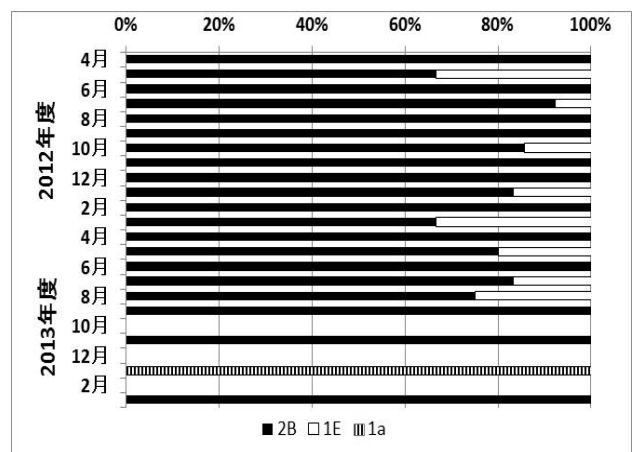


図3 風しんウイルス遺伝子型別 (月別)

2012年度から2013年度の都内の風しんの流行は、年間を通じて2Bを主とし、1Eがある一定量混在している感染状況が窺えた。また1Eの出現状況に季節差は認められなかった。(なおワクチン型が検出されたのは2013年の1月のみであった。)

4. 年齢・性別の解析

2012年度と2013年度の風しん陽性検体の性別・年代別のグラフを図4-1と4-2にそれぞれ示す。それぞれ縦軸は陽性数であるが、最大値は異なるものの、両年度とも20代から40代の男性が流行の中心であったことが示唆された。また女性については2012年には20代がピークで、以下30代、10代と続き、妊娠の可能性の高い年代で陽性数が多いことがわかり、CRSの発生に大きく影響すると考えられた。また全国的にも同様の流行状況を呈しており、ニュース等を通じ国からの呼びかけも行われた⁹⁾。2013年の女性の風しん検出状況は10歳未満の女性がピークであり、年齢内訳は0～3歳が圧倒的多数であった。また前年に引き続き20代も多く見受けられた。

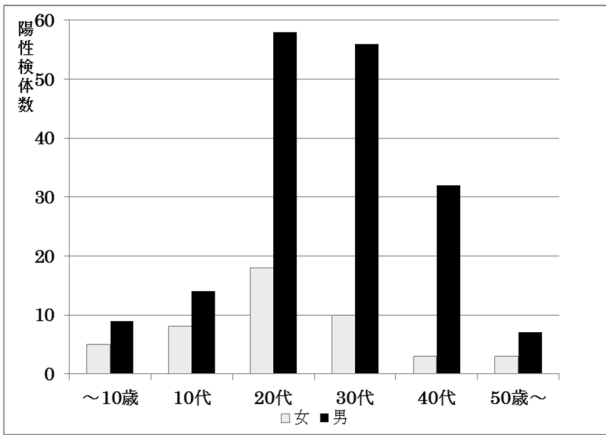


図4-1 性別・年代別の風しんウイルス検出状況 (2012年度)

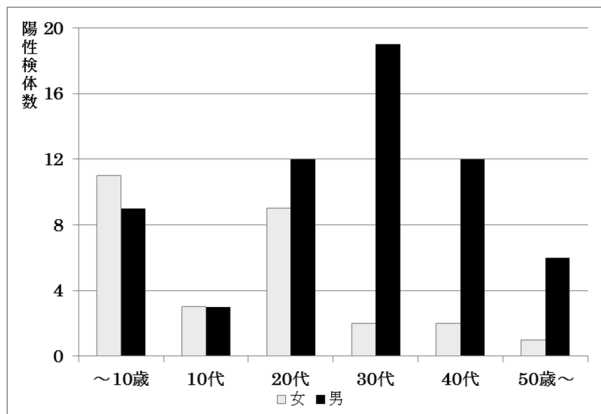


図4-2 性別・年代別の風しんウイルス検出状況 (2013年度)

5. 年齢階層別ワクチン接種率と陽性数

感染症流行予測調査事業として行った風しんウイルス抗体価検査およびワクチン接種歴の聞き取り調査結果から、2012年度・2013年度の風しんワクチン接種率とそれぞれ同年度の風しん陽性数を年齢階層別に図5-1、5-2に示す。

ワクチン接種率の高い年代で風しん陽性数は抑えられ、接種率が低下している年代では陽性数の増加する傾向が見られた。ワクチン接種率と風しん罹患にはある程度の関連

性が認められ、ワクチン接種率の向上で風しんの流行は阻止できると考えられた。また、この図より、2012年度の流行後、35-39歳の年齢階層でワクチン接種率の上昇が認められ、この年代では前年に比べ陽性数が半数以下に減少していることから、一定の効果があったことが示唆された。

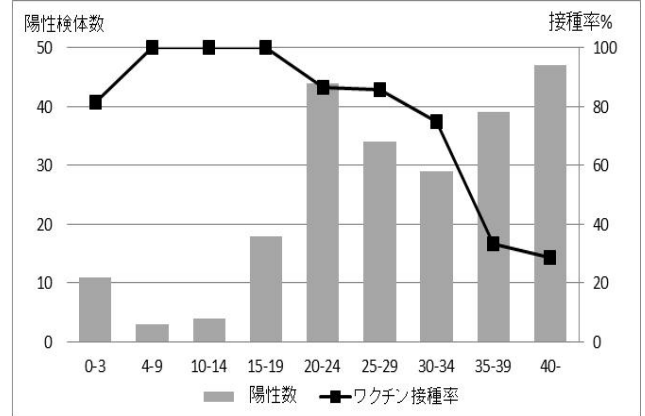


図5-1 2012年度のワクチン接種率と陽性検体数

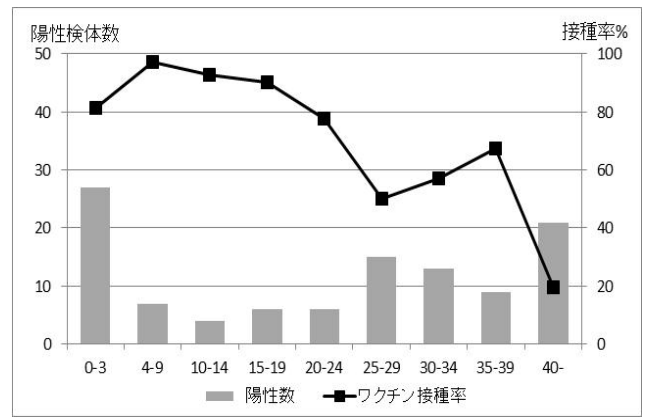


図 5-2 2013 年度のワクチン接種率と陽性検体数

しかし、2013年度の他の年代においては、ワクチン接種率が横ばいもしくは低下傾向を示しており、前年の流行を受けてのワクチン接種の啓発へはつながらなかった可能性が示唆された。特に2年間で流行の中心となった成人男性での流行については、この年代で風しんを含むワクチンの低接種率が指摘されており¹⁰⁾、CRS予防のためにもワクチン未接種者へのさらなる対応が重要であると考えられた。

ま と め

2012年から2013年にかけて全国的な風しんの流行が見られ、当センターにも2012年度には632検体、2013年度には613検体と、多くの風しんを疑う検体が搬入された。遺伝子検査の結果、2012年度は234検体、2013年度は112検体が風しんウイルス陽性と判定された。遺伝子型別を行ったところ、風しんウイルスの型別は一部の1a型（ワクチン株）を除き、約9割程度を2B型が占め、1E型は約1割程度と大きく差が開き、東京都における今回の風しんの流行は主に2B型であった。また、この二つの型は一年を通じて万遍

なく検出され, その出現頻度に季節差はなかった. さらに, 陽性数は兩年度とも20代から40代の男性で特に多く, 陽性数の半数以上を占めており, 流行の中心となっていた.

ワクチン接種率と陽性数の間にはある程度の関連性が認められ, 風しんおよびCRSのまん延防止のためにはワクチン接種率の向上が有効であると考えられる.

今回の風しん大流行の影響を受けて, 2013年6月にはアメリカ疾病予防管理センター (CDC) から, 日本への渡航に関しての警戒レベルを上げるという報告がなされ¹⁾, また, 同機関における「2013年に世界で最も風しんが流行した国ワースト3」にも日本が入るなど, 世界的に日本は「風しんの輸出国」との認識へ変化している.

2020年までの風しん排除目標およびCRSの予防のためには, 医療機関での患者の早期発見と報告, 遺伝子検査による迅速な風しんウイルスの検出や遺伝子型別による疫学調査・流行状況の発信が必要である. さらに, ワクチン接種率の向上への取組みは不可避であり, こうした医療機関と行政との連携が重要なキーとなると考えられる.

文 献

- 1) 国立感染研究所感染情報センター: 病原微生物検出情報, **24**(3), 53-54, 2003.
- 2) WHO: Weekly Epidemiological Record, **24**, 216-222, 2007.
- 3) 風しんに関する特定感染症予防指針 (平成26年3月28日厚生労働省告示第122号).
- 4) Yoshiyuki S., Takuri T., Narumi H., *et al.*: *WPSAR.*, **4**(3), 37-41, 2013.
- 5) 東京都福祉保健局健康安全部長 (依頼): 麻しん検体の搬入について, 平成22年12月6日.
- 6) Bosma T J., Corbett K M., O'Shea S., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **33**(5), 1075-1079, 1995.
- 7) 東京都福祉保健局健康安全部長 (通知): 麻しん及び風しん発生時における検体検査に係る当面の対応について, 平成24年6月29日.
- 8) 森 嘉生, 大槻紀之, 岡本貴世子, 他: 病原微生物検出情報, **32**(9), 260-262, 2011.
- 9) 厚生労働省健康局結核感染症課長 (依頼): 健感発0719第2号, 風しん対策の更なる徹底について, 2012.
- 10) 多屋馨子, 新月 智, 岡部信彦: 病原微生物検出情報, **24**(3), 55-57, 2003.
- 11) Centers for Disease Control and Prevention: Rubella outbreaks in Japan, Poland prompt CDC travel alerts. <http://aapnews.aapublications.org/content/early/2013/06/22/aapnews.20130620-1.full.pdf+html> (2014年10月10日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)

Detection and Analysis of Rubella Virus in Tokyo(2012–2013)

Tokuko TSUNODA^a, Michiya HASEGAWA^a, Terue OKAZAKI^a, Konomi MURAUCHI^a, Mari AKIYAMA^a,
Yukinao HAYASHI^a and Akemi KAI^a

Surveillance for measles by the Tokyo Metropolitan Government started in 2010 and genetic amplification was carried out to detect measles virus in all specimens collected from infected patients. When specimens tested negative for measles, genetic amplification or the detection of rubella virus was conducted as a part of differential diagnosis. In our laboratory, the rubella virus was rarely detected until 2011 however, in 2012, there was a marked increase in rubella positive samples. This rubella virus infection continued to be an epidemic until 2013. Genetic analysis identified, >90% of the rubella virus genotype 2B in samples between 2012 and 2013, and more than half the rubella infected patients were males between the age group of 20-50 years. We studied the association between the rate of rubella vaccination and the number of rubella infection incidences, to highlight the importance of vaccination to prevent the spread of rubella.

Keywords: rubella, genetic analysis, genotype, 2B, 1E, epidemic, 2012, 2013, vaccinated record

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan