

東京都における先天性風しん症候群患者からの風しんウイルスの分離状況

村内 このみ^{a,b}, 岡崎 輝江^c, 柴崎 澄枝^{a,b}, 長谷川 道弥,
新開 敬行^a, 秋場 哲哉^c, 平井 昭彦^a, 貞升 健志^a

2012年以降の全国的な風しんの流行により、東京都においても先天性風しん症候群 (congenital rubella syndrome: CRS) の発生がみられた。東京都健康安全研究センターでは、CRS患者における風しんウイルス排出期間を評価する目的で2013年9月から2015年3月まで風しんウイルス検査を実施した。ウイルス検査のうち、遺伝子検査は高感度かつ迅速性の面で優れているが、実際にウイルス粒子が排出されているか不明である。本研究では、実際のCRS患者からのウイルス分離と風しんウイルスの抗体検査結果から、風しんウイルスの感染性リスクを評価することを目的とした。

都内医療機関でCRSと診断された患者12例を対象とし、咽頭拭い液および尿から継続的に採取した74検体についてウイルス分離検査を実施した。その結果、12例中6例から風しんウイルスが分離された。本ウイルスが分離された期間は最短で生後5日から、最長では生後13か月であった。感染症流行予測調査にて、風しんウイルスの抗体価を測定した結果、平均抗体価は0-3歳から20-24歳の間で全体の平均よりも低く、0-3歳および20-24歳ではそれぞれ41倍、32倍と特に低い結果となった。これらのことから、CRSが疑われた場合には長期的な二次感染のリスクおよび乳幼児における新たな感染の拡大防止のため、出生早期からのウイルス検査を継続的に実施することが必要であると考えられた。

キーワード: 風しん, 先天性風しん症候群, CRS, ウイルス分離, Vero-E6, 遺伝子検査, 2B

はじめに

先天性風しん症候群 (congenital rubella syndrome: CRS) および先天性風しんウイルス感染 (congenital rubella infection: CRI) は、ウイルスに対し免疫のない女性が妊娠初期に風しんに罹患し、その後経胎盤感染により本ウイルスが胎児に感染することで引き起こされる¹⁾。特に、出生児が心疾患や難聴などの先天性障害を引き起こした場合にCRSと診断されるが、その症状が発見されるまでに時間がかかる場合もある。

2012年6月頃からの全国的な風しん流行に伴い、東京都でも風しんの大規模な流行がみられた²⁾。東京都における風しん患者の報告数は、全数報告に変更となった2008年から2011年は各年50件未満だったのに対し、2012年は672件、2013年は3,445件と急増した^{2,3)}。今回の風しんウイルスの流行は主に20代から40代の成人男性が中心であり、推定された感染経路の分類では職場での感染が疑われる例が最も多く、妊婦においてはパートナーからの感染が最も多いことが示された²⁾。これらのことから、20~30代の妊娠の可能性の高い年代における感染リスクが高く、CRS患者やCRI患者の発生が危惧されていた。実際、東京都におけるCRS患者の報告数は1999年から2012年までの14年間で3件

であったのに対し、2013年から2014年の2年間では16件と急増した⁴⁾。

CRS患者はウイルスを長期間排出し、医療機関や保育施設などで新たな感染源になることが懸念される。しかし、CRS患者の風しんウイルス排出期間に関する研究報告は少なく、リスクアセスメントの観点からもCRSおよびCRI患者を対象とした風しんウイルスの排出状況の把握と継続的な検査が必要とされていた。

今回、東京都健康安全研究センター (以下、当センター) では都内医療機関の協力のもと、CRSおよびCRI患者における風しんウイルスの排出期間を評価するため、2013年9月から2015年3月まで風しんウイルス検査を実施した⁵⁾。ウイルス検査のうち、遺伝子検査は高感度かつ迅速性の面で優れているが、実際に風しんウイルス粒子が排出されているか不明であり感染性の評価が困難である。そこで、本研究ではCRS患者から継続的に採取した臨床検体からウイルス分離検査を試み、風しんウイルスの排出期間と感染性を検討する事を目的とした。また、2013年度に実施した都民を対象とした感染症流行予測調査の風しん抗体調査の検査結果を合わせて報告する。

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

^b 当時: 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科

^c 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科

材料と方法

1. ウイルス分離検査

1) 対象患者

対象患者は2013年1月1日から2015年3月31日までに生まれた患者で、次の①または②のいずれかの要件を満たす者とした⁵⁾。

- ① 妊娠中に風しんに罹患した母から生まれた風しんウイルス IgM 抗体陽性の児
- ② 出生後、症状および抗体検査等から CRS と診断された児

2) 対象検体

2013年9月から2015年3月までに都内の医療機関の協力のもと CRS と診断され、保護者等の同意が得られた患者12例から数か月毎に採取された咽頭拭い液64検体、尿10検体の計74検体を用いた。今回の調査期間中にCRI患者はいなかった。なお、研究実施にあたっては当センター倫理審査委員会による倫理審査に付し、2013年9月9日付で承認された(25健研健第750号)。

3) ウイルス分離検査

CRS 患者 12 例から採取された 74 検体を対象とし、Vero-E6 細胞を用いてウイルス分離検査を実施した。Eagle's MEM 培地 (日水製薬) 500 mL あたり 200 mmol/L-Alanyl-L-Glutamine Solution (和光純薬) を 5 mL, PENICILIN-STREPTAMYCIN (MP Biomedicals) を 5 mL, Sodium Bicarbonate 7.5% Solution (MP Biomedicals) を 5 mL, ウシ胎児血清 (GIBCO) を 50 mL 添加した 10%MEM 培地を育成培地として使用した。また、育成培地のウシ胎児血清を除いたものに 10 mg/mL トリプシン液 (MP Biomedicals) を 1 mL, 10 %グルコース液 (エーディア) を 10 mL および 100 倍濃縮ビタミン液 (コージンバイオ) を 20 mL を添加したものを維持培地として使用した。24 穴プレートに Vero-E6 細胞を単層培養し、フルシートになった時点で PBS (-) で洗浄後、検体を 1 穴当たり 20 ~ 50 μ L 接種した。35°C で 1 時間吸着後、維持培地を 1 mL 加え 35°C で培養した。接種後 3 日目および 7 日目に培養液を交換し、10 日間培養を 1 継代として 3 代目まで継代した。2 代目および 3 代目への継代は、培養液 1 mL に培養終了後の固着細胞を剥がした懸濁液 200 μ L を接種した。3 継代目まで培養後、顕微鏡下での風しんウイルスによる細胞変性効果 (cytopathic effect: CPE) を確認した。CPE が判定できない場合には、遺伝子学的手法によりウイルス分離株の確認を行った。

4) ウイルス分離株の確認

(1) 狭領域 RT-nested PCR 法

3 継代目の培養液から QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) によりウイルス RNA を抽出した。風しんウイルスゲノムの E1 領域をターゲットとした RT-nested PCR 法⁶⁾により、143 bp の特異的遺伝子の確認を行った。特異的バンドが確認された場合は当該部位を切り出し、QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) または Amicon

Ultra 0.5 mL (Millipore) を用いて精製後、これらの核酸について BigDye®v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) にてシーケンス反応を行った。ゲルろ過後の産物を ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて塩基配列を得た。塩基配列が風しんウイルス E1 領域と相同性を示した場合にウイルス分離陽性と判定した。

(2) 限界希釈法

ウイルス分離検査の増殖度の確認のため、対象検体の元検体およびウイルス分離上清 (3 継代目) を PBS (-) で 10 倍段階希釈し ($10^0 \sim 10^{-5}$)、上記と同様にウイルス RNA を抽出後、狭領域 RT-nested PCR 法を行い、各希釈液における増幅度を比較した。

5) ウイルス型別検査 (広領域 RT-nested PCR 法)

風しんウイルス陽性であった分離株について、国立感染症研究所の病原体検出マニュアル⁷⁾ に準拠して遺伝子型別検査を実施した。すなわち、風しんウイルスの型別決定部位である E1-(2) 領域および E1-(3) 領域の 2 領域について広領域の RT-nested PCR を行った。E1-(2) 領域で 466 bp, E1-(3) 領域で 423 bp のバンドが確認された場合は、これらの部位を切り出し前述の方法により塩基配列を得た。

E1-(2) 領域と E1-(3) 領域について、得られた塩基配列は遺伝子解析ソフトである Chromas Pro (Technelysium Pty Ltd) および MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) Version 6 を用いてアライメント処理し、2 領域をつなげて得られた 739 bp の型別決定部位の塩基配列を NCBI の BLAST により相同性検索を行うと共に、データベースより抽出した他の配列や既知の配列⁸⁾を用いて作成した系統樹を用いて解析した。

2. 感染症流行予測調査

1) 対象検体

都内に居住する 0 歳から 70 歳までの健康な都民 357 名を対象とした。中央区、台東区、渋谷区、豊島区、江戸川区、町田市、西多摩、南多摩および多摩府中の計 9 保健所の協力を得て、2013 年 4 月から 9 月に対象者から採血した血清 357 検体を用いた。

2) 風しんウイルス HI 試験

血清 100 μ L に PBS (-) 300 μ L, 25% カオリン浮遊液 (デンカ生研) を加えてよく攪拌し、2,000 rpm で 20 分遠心した。さらに、50% ガチョウ赤血球浮遊液 50 μ L を加えて氷冷で 1 時間反応後上記と同様に遠心し、得られた上清を HI 試験に用いた。HI 試験の判定は、赤血球凝集を完全に阻止した検体の最終希釈倍数を HI 抗体価とした。HI 抗体価が 8 倍以上を陽性と判定し、抗体保有とした。

なお、風しんウイルス HA 抗原 (デンカ生研) は希釈液を用いて段階希釈し、0.25% ガチョウ赤血球浮遊液を加えて 4°C 1 時間反応させた。完全凝集した終末の希釈倍数をその抗原の HA 価とし、HA 価 4 単位を保持するように希釈した抗原液を試験に用いた。

結 果

1. ウイルス分離検査結果

Vero-E6 細胞を用いた分離検査では顕微鏡下で CPE の判別が困難であった。そのため、分離検査に供試した全ての検体 (3 継代目の培養液) について狭領域 RT-nested PCR 法による遺伝子検査を用いて判定した。その結果、ウイルス分離検査では 74 検体中 19 検体 (7 例) が陽性となった。この 19 検体について、元の検体と 3 継代目のウイルス培養上清を用いて比較を行った。その結果、元の検体では 1 から 10³ 倍希釈まで、ウイルス培養上清では 10¹ から 10⁵ 倍希釈まで風しんウイルスが検出された (図 1)。各検体について元検体とウイルス培養上清とのウイルス量を比較すると、2 検体は元の検体と同等だったが、残りの 17 検体は元の検体より 10 倍以上高く、10⁴ 倍高い希釈倍率まで検出された培養上清もあった。以上の結果から、元の検体よりも高い希釈倍率まで確認できた 17 検体 (6 例) をウイルス分離陽性と判定した (表 1)。

	× 10 ⁿ (n=)	ウイルス分離液 (3 継代目)					
		0	1	2	3	4	5
検体原液	0				2	2	
	1		1		1	1	1
	2			1		1	2
	3					5	2
	4						

図1. 限界希釈法による希釈倍率に応じた風しんウイルス検出状況

表1. 風しんウイルス分離検査結果

	陽性数/検体数(%)	
咽頭拭い液	17 / 64	(26.6%)
尿	0 / 10	(0%)
合計(検体)	17 / 74	(23.0%)
合計(患者)	6 / 12 例	(50.0%)

分離陽性検体はすべて咽頭拭い液で、64 検体中 17 検体 (26.6%) であり尿からは分離されなかった。分離された風しんウイルス 17 株について遺伝子型別解析を行った結果、全てが 2B 型であった (図 2)。

月齢別によるウイルス分離結果の比較では、最短では生後 0 か月 (生後 5 日) から、最長では生後 13 か月まで風しんウイルスが分離された (図 3)。3 か月毎のウイルス分離陽性率でみると、生後 3 か月で 25.0% (3/12 例)、生後 6 か月以降で 8.3% (1/12 例) であった (図 4)。

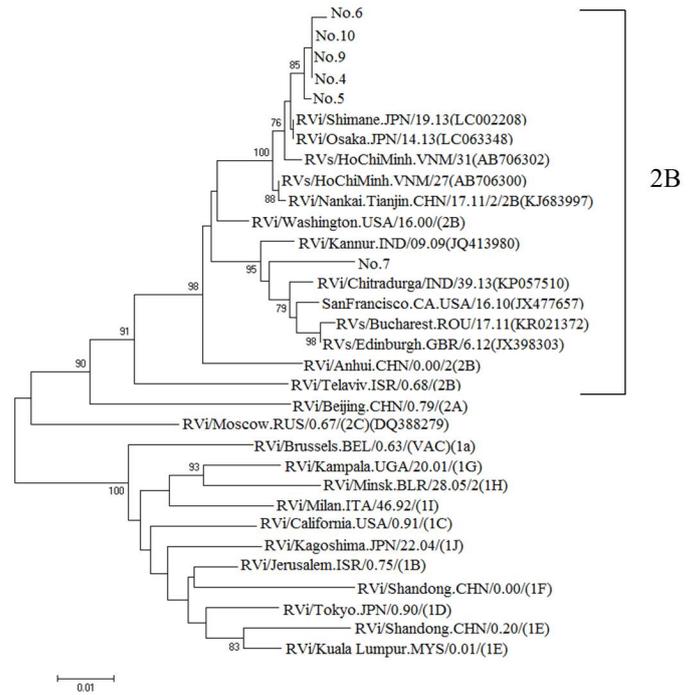


図2. 風しんウイルス E1 領域 739 bp における分子系統樹 (N J 法)

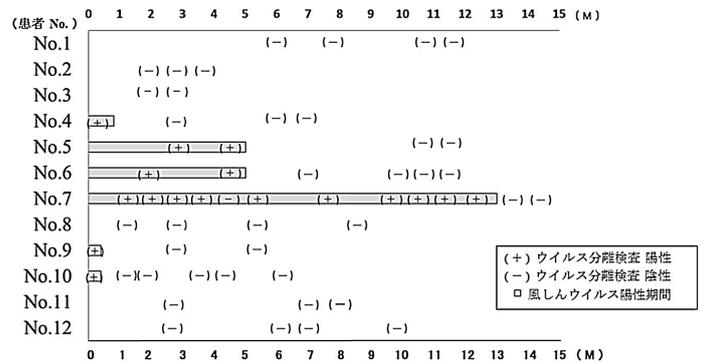
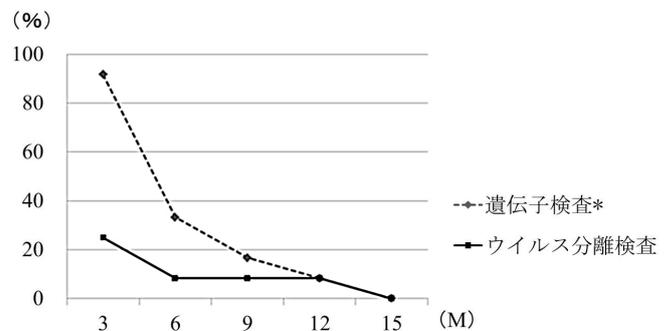


図3. 月齢別風しんウイルス検出状況 (ウイルス分離検査)



*東京都における先天性風しん症候群および先天性風しん感染児を対象とした風しんウイルス遺伝子検査, IASR, 36(7), 120, 2015

図4. 月齢別風しんウイルス陽性期間

2. 感染症流行予測調査結果

風しんウイルスに対するHI抗体価を検討した結果、調査対象者357例のうち抗体保有者は330例であり（92.4%）、平均抗体価は58倍であった。年齢階層別に抗体保有率および平均抗体価を比較した結果、0-3歳、20-24歳および35-39歳の風しん抗体保有率が80%台とやや低い結果となった。また、平均抗体価は一番高い40歳以上で106倍であったが、0-3歳から20-24歳の間で全体の平均よりも低く、0-3歳および20-24歳ではそれぞれ41倍、32倍と特に低い結果となった（図5）。

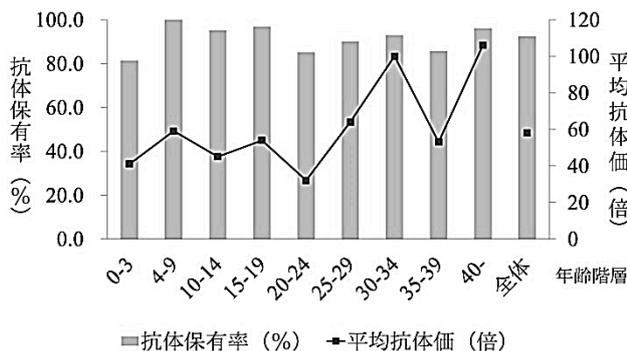


図5. 各年齢階層における風しんHI抗体保有率と平均抗体価（2013年）

考 察

ウイルス分離検査では12例中6例から風しんウイルスが分離され、すべての遺伝子型が2B型であった。2B型は2006年以降に全世界で拡散し、主に日本に近隣である西太平洋や南東アジア地域でみられ、1E型とともに2011年以降日本における風しんの流行の主体となっている⁹⁾。ウイルスが分離されたCRS患者の分離状況をみると、最も早く分離されたのは生後5日であることから、出生直後から本ウイルスが排出されていることが推察された。海外の報告では、生後3か月のCRS患者からの風しんウイルス検出率はウイルス分離検査で40～62%であり、生後1年を経過しても3～20%から本ウイルスが検出される場合があるとしている¹⁰⁻¹²⁾。また、国内の報告では、遺伝子検査で生後約半年は咽頭拭い液や尿からウイルスが検出されるとされている。しかし、今回のウイルス分離検査では生後3か月の風しんウイルス陽性率が25.0%であり、既報¹⁰⁻¹²⁾と比較するとやや低い結果となった。ウイルス分離検査では試験までの試料の保存状態により検出結果が大きく異なるため、それらの要因も考えられた。

継続検査ができた12例の患者の中には、生後1年以上風しんウイルスを排出していた例が1例（8.3%）存在した。また、感染症流行予測調査の結果から0-3歳における風しんウイルスの抗体保有率および抗体価が低かったことから、CRS患者を介した医療機関や保育施設における風しんウイルスの新たな感染拡大に注意すべきと考えられた。

既報の遺伝子検査の結果⁵⁾では、生後間もない時期において、12例全てで複数の検体種から遺伝子が検出されており、スクリーニング検査として遺伝子検査は有用であったと考えられる。しかし、型別検査用の広領域PCR検査系では十分なウイルス量が確保できないと型別が困難となる場合がある。今後、風しん撲滅には型別情報が必要になってくること、ウイルス分離は感染性の指標として確実であること等から、ウイルス分離検査は遺伝子検査と併用して実施すべきものと考えられた。

また、継続検査において検査結果が陰性から陽性に変った検体があり、この原因として検体採取時の不備等が考えられたが詳細は不明であった。以上の結果は、定期的な検査が必要であると同時に、複数回の検査を行う必要性を示唆するものである。

2012年から流行した風しんは、20代から40代の成人男性が流行の中心であった²⁾。2013年の感染症流行予測調査の結果から、20-24歳における風しん抗体保有率および平均抗体価が低かったことから、今後も母子感染のリスクが危惧される。

風しんはワクチン接種により防げる疾患であり、2006年度から1歳児（第1期）および小学入学1年前の幼児（第2期）の2回のワクチン接種を原則としている。厚生労働省によると、都道府県別の第2期風しんワクチン接種率は、2008年度以降、東京都は47都道府県中40位以下と接種率が低く、2013年度では89.7%で45位であった¹⁶⁾。さらに、同年度における感染症流行予測調査では、全体のワクチン接種率が84.7%に対し25-29歳および30-34歳の風しんワクチン接種率は50%台と顕著に低かった¹⁷⁾。これらのことから、風しんおよびCRS、CRI患者の新たなまん延を防止するためにも、20代および30代を含めたワクチン接種率のさらなる向上が必要と考えられた。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル（先天性風疹症候群）第三版，平成27年3月。
- 2) Sugishita, Y., Shimatani, N., Katow, S. *et al.*: Epidemiological characteristics of rubella and congenital rubella syndrome, in the 2012-2013 epidemics in Tokyo, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **68**, 159- 165, 2015.
- 3) 東京都感染症情報センター：風しんの流行状況（東京都2013年）。
<http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/diseases/rubella/rubella2013/>（2016年10月12日現在，なお本URLは変更または抹消の可能性がある）
- 4) 国立感染症研究所：先天性風しん症候群（CRS）の報告（2014年10月8日現在）。
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/rubella-m-111/700-idsc/5072-rubella-crs-20141008.html>（2016年10月12日現在，なお本URLは変更または抹消の可能性がある）

- 5) 秋場哲哉, 千葉隆司, 長谷川道弥, 他 : 東京都における先天性風しん症候群および先天性風しん感染患者を対象とした風しんウイルス遺伝子検査, *IASR*, **36** (7) , 120, 2015.
- 6) T., J., Bosma, K., M., Corbett, S., O'Shea., *et al.* : PCR for detection of rubella virus RNA in clinical samples, *J. Clin. Microbiol.*, **33** (5) , 1075, 1995.
- 7) 国立感染症研究所 : 病原体検出マニュアル (風疹) 第二版.
- 8) 国立感染症研究所 : 病原体検出マニュアル (風疹) 第三版, 2015.
- 9) 森 嘉生, 坂田真史, 竹田 誠 : 海外の風疹の状況と風疹ウイルス遺伝子型の動向, *IASR*, **36** (7) , 135-137, 2015.
- 10) Cooper, L., Z., Krugman, S. : Clinical Manifestations of Postnatal and Congenital Rubella, *Arch. Ophthalm.*, **77**, 434-439, 1967.
- 11) Lindquist, J., M., Plotkin, S., A., Shaw, L., *et al.*: Congenital Rubella Syndrome as a Systemic Infection. Studies of Affected Infants Born in Philadelphia, U.S.A, *Brit. Med. J.* **2**, 1401-1406, 1965.
- 12) Rawls, W., E., Phillips, C., A., Melnick, J., L., *et al.*: Persistent Virus Infection Congenital Rubella, *Arch Ophthalm*, **77**, 430-433, 1967.
- 13) 加藤茂孝, 川名 尚, 小島俊行編 : 先天性風疹症候群および胎患者風疹感染のウイルス遺伝子診断, 173-178, 2011. 金原出版, 東京
- 14) Katow, S.: Rubella Virus Genome Diagnosis during Pregnancy and Mechanism of Congenital Rubella, *Intervirology*, **41** (4-5) , 163-169, 1998.
- 15) Nagasawa, K., Ishiwada, N., Ogura, A., *et al.*: Congenital Rubella Syndrome: A Case Report on Changes in Viral Load and Rubella Antibody Titers, *Pediatrics*, **137**(5), e20153333, 2016.
- 16) 厚生労働省 : 麻しん風しん予防接種の実施状況.
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou21/hashika.html>
(2016年10月12日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 17) 東京都感染症情報センター : 感染症流行予測調査結果報告書平成25年度 (2013年度)

Isolation of the Rubella Virus from Patients Diagnosed with Congenital Rubella Syndrome in Tokyo

Konomi MURAUCHI^a, Terue OKAZAKI^a, Sumie SHIBASAKI^a, Michiya HASEGAWA^a,
Takayuki SHINKAI^a, Tetsuya AKIBA^a, Akihiko HIRAI^a, and Kenji SADAMASU^a

Outbreaks of rubella had been occurred in Japan from 2012 to 2013. Subsequently, several cases of congenital rubella syndrome (CRS) also had been reported in Tokyo from 2013 to 2014. We previously performed a genetic test to evaluate the period of viral shedding, but it remained unclear whether the rubella virus is actually shed from patients diagnosed with CRS. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the risk of secondary viral infection by isolating the rubella virus from patients diagnosed with CRS and by conducting an antibody test for the rubella virus according to the guidance of the national epidemiological surveillance of vaccine-preventable diseases (NESVPD).

In total, 74 samples that had been continuously collected from 12 patients diagnosed with CRS were examined. The rubella virus was isolated from six of these patients at 5 days to 13 months after birth. The members of the population who did not have a sufficient antibody titer to the rubella virus were 0–3 and 20–24 years of age. Therefore, it was suggested that the risk of secondary infection and the spread of this infection in infants would be high. It is concerned that the risk of a mother transmitting the rubella virus to her child will increase in the future. Consequently, an increase in the vaccination rate for the rubella virus will be required. Testing for the rubella virus after birth is useful for diagnosing CRS and evaluating the risk of secondary viral infection.

Keywords: rubella, congenital rubella syndrome, CRS, virus isolation, Vero-E6, genetic analysis, 2B

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