

東京都におけるムンプスウイルスの検出状況について (2016年)

栗田 さや子^a, 長谷川 道弥^a, 鈴木 愛^a, 岡崎 輝江^a, 中山 愛子^b, 坂本 哲理^a, 加來 英美子^a,
新開 敬行^a, 貞升 健志^a

近年, 流行性耳下腺炎は4~5年ごとに全国的な流行を繰り返している. 都内では2009~2010年に大きな流行が発生したが, 2015~2016年にかけて再び流行が認められた. 2016年に当センターに搬入された流行性耳下腺炎及び無菌性髄膜炎の患者検体82件からムンプスウイルス遺伝子が検出され, うち53件からムンプスウイルスが分離された. 検出されたウイルスの遺伝子型を調べたところ, 配列情報が得られた80件のうち, ワクチン株と一致するB型1件を除く79件すべてがG型であった. 分子系統樹解析により71件がGw, 8件がGeの各亜型に分類され, それらはさらに複数のグループに分かれたことから遺伝的多型が認められた.

キーワード: ムンプス, ウイルス分離, 遺伝子型別, Ge, Gw, 分子系統樹解析, ワクチン, 2016年

はじめに

流行性耳下腺炎 (以下ムンプス) は感染症法に基づく5類感染症定点把握疾患であり, 耳下腺の腫脹と疼痛, 発熱を主症状とし, その特徴的な顔貌から「おたふくかぜ」と呼ばれる¹⁾. 耳下腺の腫脹のみならず, 無菌性髄膜炎 (1~10%) や感音性難聴 (0.1~0.25%) 等の合併症を引き起こす頻度も高い. 潜伏期間は2~3週間で, 発症の6日前後から唾液中に感染性ウイルスが排出され, 飛沫感染や接触感染により伝播する²⁾. 全感染者の30~35%存在する不顕性感染者もウイルスを排泄し, 感染源となりうる¹⁾. 感染予防には弱毒生ワクチンの接種が唯一の方法であるが³⁾, 日本では定期接種対象でなく, 4~5年ごとに全国的な流行を繰り返している. 都内では2009~2010年に大きな流行が発生したのに続き, 2015~2016年に再び流行が認められた.

原因ウイルスのムンプスウイルスは, パラミクソウイルス科Rubraviridae属に属し, マイナス1本鎖RNAゲノムとエンベロープを持つ⁴⁾. 2012年にWHOにより提唱された分類法では⁴⁾, ゲノム中最も多型性に富み, 細胞膜透過性への関与が示唆される膜蛋白をコードする⁵⁾, small hydrophobic (SH) 遺伝子領域の塩基配列 (316塩基) を基にAからNまでの12遺伝子型に分類される (EとMは欠番). 国産ワクチン株は日本固有の流行株と考えられるB型であるが, 1999年に国内流行株として出現したG型が, 2000年以降流行の主体となる状況が継続している⁶⁾. このような状況を踏まえ, 流行年となった2016年に都内で流行したムンプスウイルスの検出状況について報告する.

材料と方法

1. 材料

2016年1月から12月の1年間に, 感染症発生動向調査事業により都内26か所の病原体定点医療機関から搬入された

ムンプス患者検体109件 (咽頭ぬぐい液107件, 尿1件, 耳管開口部擦過物1件) に加え, 流行がピークを迎えた7月以降に基幹定点医療機関から搬入された無菌性髄膜炎患者検体35件 (髄液24件, 咽頭ぬぐい液8件, 尿3件) についても対象検体とした. ムンプスウイルスが検出された検体については, 医療機関が記載した調査票から, 患者の年齢や周囲のムンプス流行状況, ワクチン接種歴を参照し検討に用いた.

2. 分離検査

1) ウイルスの分離

ムンプスウイルスの分離は「ムンプスウイルス病原体検査マニュアル」³⁾に従って行った. Vero細胞に検体を接種し, 5%CO₂存在下の37°Cで1~2週間培養して細胞変性効果 (以下CPE) を観察した. 継代時は凍結を避け, 細胞剥離液200µlを次世代細胞の培養液へ添加し継代した. CPEが出現したものは血球吸着試験 (HAD試験) 及び中和試験を実施した.

2) 中和試験によるウイルスの同定

HAD試験陽性の細胞については, 市販のムンプスウイルス抗血清 (デンカ生研) を用いて中和試験を実施した. CPEの出現程度に応じ, 細胞剥離液を1~256倍に段階希釈して抗原液とし, 37°Cで抗血清と1時間中和した抗原液と, 無処理の抗原液の2系統を, Vero細胞に接種し, 37°Cで培養した. 培養2~3日後, 中和した抗原液でCPEが抑制され, 無処理の抗原液でCPEが出現した場合, 抗原となったウイルスをムンプスウイルスと同定した.

3. 遺伝子検査

1) RT-nested PCR法によるムンプスウイルス遺伝子の検出

^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

ムンプスウイルスの遺伝子検査は細矢らの方法⁷⁾に基づきRT-nested PCR法を行った。QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて検体からRNAを抽出した後、F1プライマー及び逆転写酵素としてAMV Reverse Transcriptase XL (TOYOBO) を用いて56°C1分、41°C60分、94°C5分の条件で逆転写反応及び不活化を行いcDNAを得た。このcDNAから、TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (Takara) を用い、94°C30秒、55°C30秒、72°C30秒を30サイクルの条件で既報⁷⁾のプライマーセットによりphosphoprotein (P) 遺伝子領域の223塩基を対象としたNested PCR法を行った。得られたPCR産物について電気泳動を行い、目的の位置にバンドが検出されたものを遺伝子検査陽性とした。

2)ダイレクトシーケンス法による塩基配列の決定

遺伝子型の検査は病原体検査マニュアル³⁾に従い行った。前述のRT-nested PCR法で陽性と判定された検体について、SH遺伝子領域を含む560塩基を対象としたRT-nested PCR法を行い、PCR産物を電気泳動し標的となる分子量のバンドを含むゲルを切り出した後、QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。次いでBigDye® v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行い、ABI PRISM3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を取得した。

3)遺伝子型別の確認と分子系統樹解析

取得した塩基配列は、公共の遺伝子データベース (GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を利用したBLAST解析を行った。また型別判定部位 (SH遺伝子領域316塩基) の分子系統樹解析では、レファレンスデータとして病原体検査マニュアル³⁾に記載されたワクチン株の配列及びGenBankに登録された分離株の配列を使用し、遺伝子解析ソフトであるMEGA6を用いて近隣結合 (Neighbor-joining: NJ) 法による分子系統樹を作成した。樹形の信頼性に関してはブートストラップ法を用いて確認を行った。

結 果

1. ムンプスウイルス遺伝子の検出とウイルス分離

ムンプスウイルスの感染が疑われた80検体及び無菌性髄膜炎2検体からムンプスウイルスの遺伝子が検出され、うちムンプス疑いの51検体及び無菌性髄膜炎2検体からムンプスウイルスが分離された。年間を通じて検出されたが、6～7月 (第25～30週前後) に搬入された検体から最も多く検出された (図1)。これは都内 (図2) 及び全国⁸⁾ のムンプス患者報告数の推移と同様の傾向を示した。

前回大流行のあった2009年以降について、遺伝子検出数に対する分離数の比率 (以下、分離率) を感染症発生動向調査報告書の数字から算出すると、例年は40～50%前後であるのに対し、2016年は65%と高い値となった (図3)。

遺伝子検出数を男女別に見ると、男性48件、女性29件、不明 (無記載) 5件であった。年齢別に見ると、男性は5歳の7件が最も多く、各年齢層で広く検出された。女性は7歳が11件と突出した検出となったが、5歳以下の検出数は3件

のみであった (図4)。

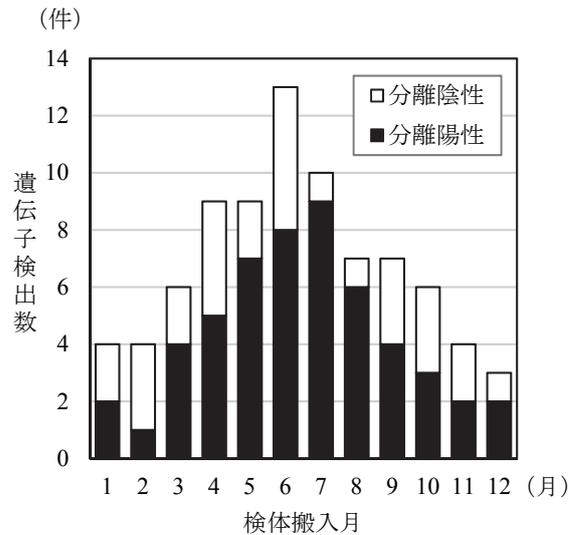


図1. 遺伝子検出数と分離陽性件数 (月別)

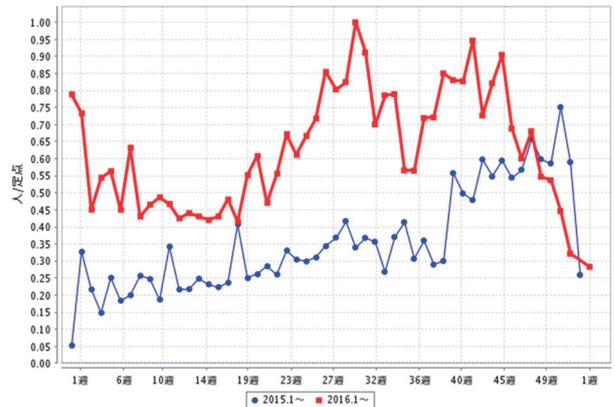


図2. 流行性耳下腺炎患者報告数の推移 (2015～2016年) (東京都健康安全研究センターHP WEB感染症発生動向調査より)

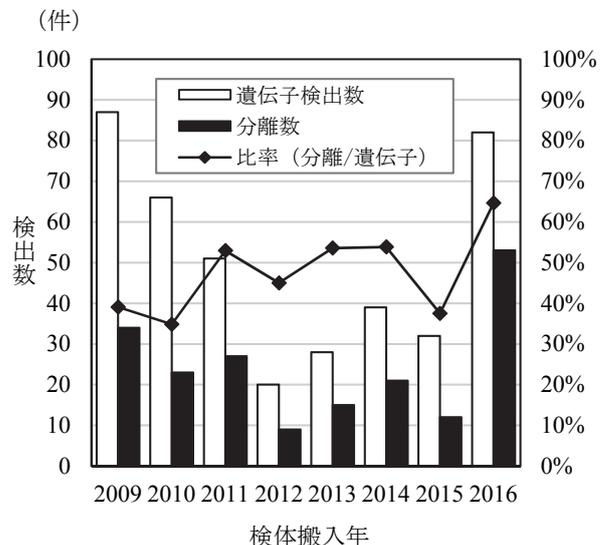


図3. 遺伝子検出数に対する分離数の比率 (経年)

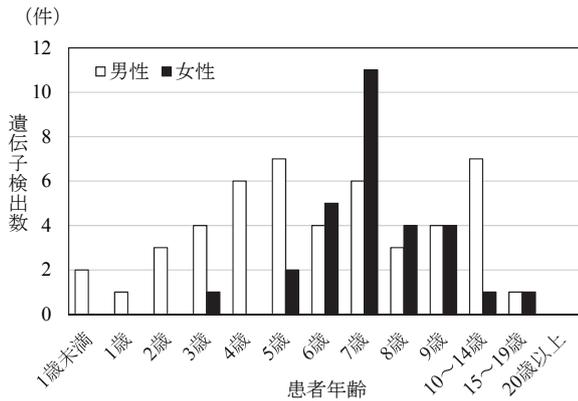


図4. ムンプスウイルス遺伝子検出数 (男女別年齢別)

2. 遺伝子型と分子系統樹解析

遺伝子検査陽性検体82件のうち80件で、遺伝子型を決定するSH遺伝子領域の塩基配列を得た。GenBankを利用しBLAST解析を行ったところ、1件が国産ワクチン株の鳥居株と一致するB型、その他79件すべてがG型であった。B型の1件は無菌性髄膜炎の検体であったが、ワクチン接種歴の情報が無く、ワクチン接種との関連性は不明である。G型はさらに2つの亜型に分類され、2009年当時の流行状況からGe(東日本型)、Gw(西日本型)と命名されているが、その地理的分布は東西に固定されたものではない⁹⁾。今回得られた塩基配列について、国内分離株と共に分子系統樹解析を行ったところ、71件(90%)がGwに、8件(10%)がGeに分類された。さらに同一亜型内でも複数のグループを形成しており、Gwは8つ、Geは4つのグループに分けられ、遺伝的多型が認められた(図5)。各グループと検出時期や分離率との間に明らかな関係性は認められなかったが、検体提供医療機関の所在地との関連を調べたところ、Geは区部のみで検出され、Gwについても、23区東部ではグループ7、F区ではグループ1、M市ではグループ8が集中的に検出される等、流行株の系統が地域により異なる傾向が見られた(表1)。

3. 発生状況とワクチン接種率

ムンプスウイルスの遺伝子が検出された82件について、検体調査票から発生状況とムンプスワクチンの接種歴を調査した。発生状況の内訳を見ると、散発27件(33%)、小学校での集団感染18件(22%)、幼稚園・保育所での集団感染9件(11%)、地域流行12件(15%)、家族内感染7件(9%)、無記載が9件(11%)であった。またムンプスワクチンの接種歴については、1回以上の接種歴有りが20件(24%)、接種歴無しが43件(52%)、不明または無記載が19件(23%)であった。

考 察

1. 分離検査

2016年に検出されたムンプスウイルスの分離率(65%)

の高さは特徴の一つとなっている。これは2016年と同程度の遺伝子検出があった2009年の分離率(39%)と比べると約1.7倍の高い値である。ムンプスウイルスは凍結融解で力価が下がりやすく、ウイルス分離の成否は培養細胞や検体の状態にも大きく左右されるため、分離率上昇の明確な理由を確定することはできないが、ウイルスの細胞への感受性に関して、過去の流行株から変異が生じている可能性も考えられる。分離株の動向を注視し、分離率の維持及び向上を図ることは今後の課題でもある。

2. 遺伝子検査

今回検出された遺伝子型では、同一亜型内でも複数のグループを形成していた。このうち検出数で2割近くを占めるGwのグループ6は、1999年に埼玉県で¹⁰⁾、2005年に横浜市¹¹⁾でそれぞれ分離された株の配列と一致した。1999年の分離株から国内で初めてG型の検出が確認され⁹⁾、その後日本でG型が独占的に流行している状況を考慮すると、流行の主体がG型へと変化した時期の遺伝子配列を維持した株が、現在まで継続的に流行の要因として存在することが分かった。

各グループと検体提供医療機関の所在地との関連では、Geは区部のみで検出され、Gwについても、23区東部やF区、M市のように同一グループが集中的に検出される地域が見られた。このことから、都内では多系統の株が流行していたものの、地域によっては特定の系統が集中して検出される等、人の移動が激しい都内でも流行株に地域性が生じていた可能性が示唆された。これはムンプスに罹患する主な年齢層が幼児期～学童期であるため、学校や保育所等で同一株による集団感染が発生しやすいこと、また成人に比べ行動範囲が居住地周辺に偏っていることが影響していると考えられる。実際に今回の調査対象でも、発生状況として集団感染や地域流行があるものが82件中39件(47%)を占め、散発とされたものでも近い時期・地域で同じグループの株による集団感染や地域流行が発生しているケースが多く認められた。このような同一系統の株による地域流行の発生を考慮すると、地域内の流行拡大阻止及び他地域への伝播抑制のためにも、ワクチン接種による感染予防措置は重要である。

ムンプスワクチンは1981年に任意接種として使用が開始され、1989年に麻しんムンプス風しん混合(MMR)ワクチンが定期接種に導入されたが、副反応としての無菌性髄膜炎発生が問題となり1993年に定期接種対象から除外されて以降、ムンプス単味ワクチンの任意接種が現在まで続いている²⁾。国立感染症研究所が国内血清銀行の血清を用いて行った抗体保有状況調査によると、2012~2013年において、5~9歳の約60%、10~14歳の約70%がムンプスIgG陽性であったが、ワクチン接種歴情報が無いためワクチン由来の抗体獲得者割合は不明である¹²⁾。ワクチンの有用性を評価するためには、国の感染症流行予測調査事業のような、ワクチン接種歴と抗体保有状況がリンクした広域調査が必要である。

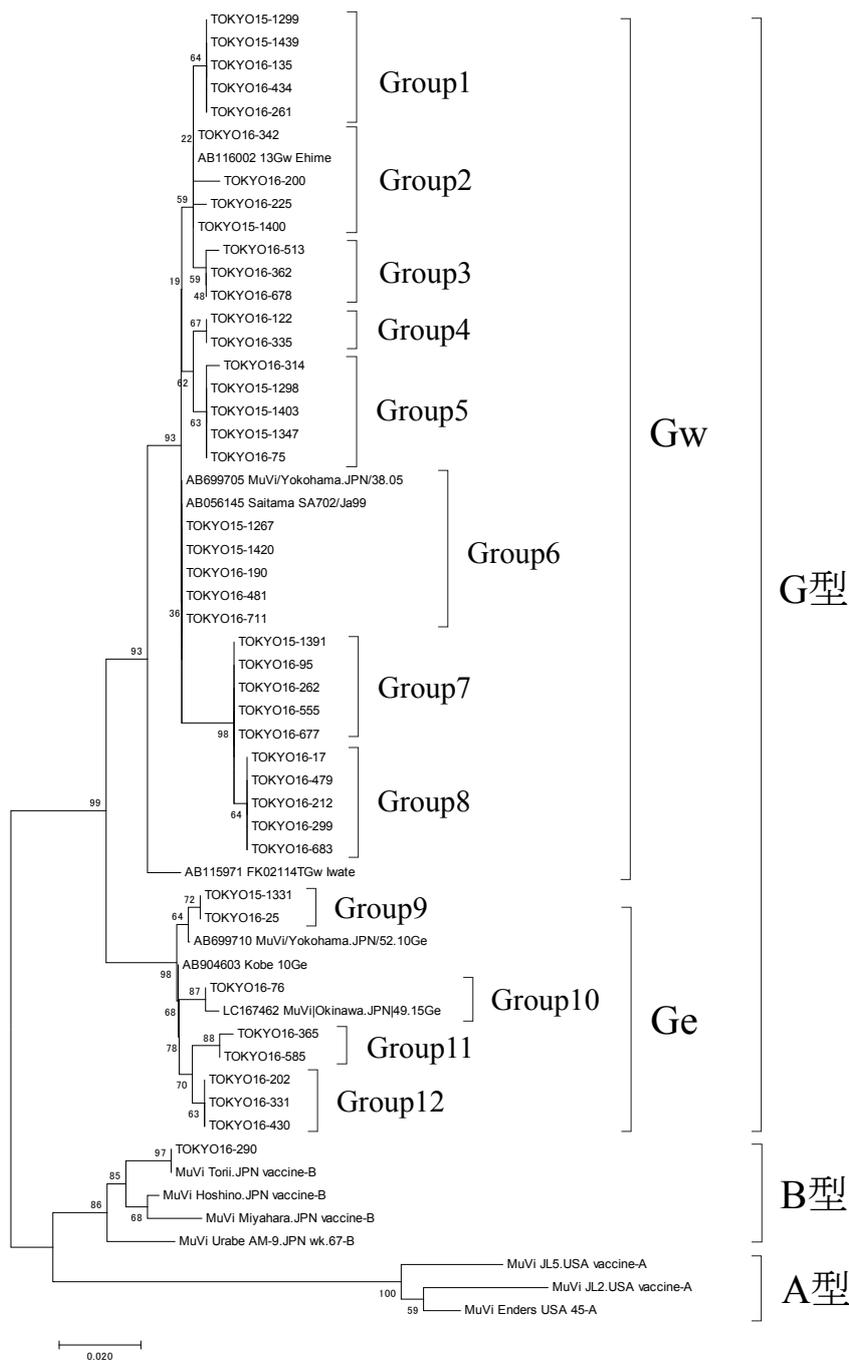


図5. 東京都において検出されたムンプスウイルスのNJ法による分子系統樹解析 (2016年)
 (同一グループが多検体で構成される場合は最大5検体に絞り作成した。)

表1. 遺伝子型 (G型) グループ別検出数 (医療機関の所在地域別)

	23区東部			23区中部			23区南部	23区北部			多摩北部				多摩南部		計	
	A区	B区	C区	D区	E区	F区	G区	H区	I区	J区	K市	L市	M市	N市	O市	P市		
Gw	1					6		1				3					10	
	2				1			1	1			1					4	
	3											3					3	
	4															2	2	
	5							1		4								5
	6				1	3				2	1				2	4		13
	7	2	1	16	1	1	1					2						24
	8					2				2			3	2			1	10
Ge	9								2								2	
	10									1							1	
	11			1	1												2	
	12					1		2									3	
計	2	1	17	3	8	7	2	3	1	11	1	9	3	4	6	1	79	

今回、無菌性髄膜炎の検体1件から国産ムンプスワクチン株と一致する遺伝子が検出された。ワクチン接種との関連は不明であるが、ワクチンによる副反応や、ムンプスウイルスの変異等の解明のために遺伝子検査データの蓄積及び解析は重要である。米国で製造され、現在世界で広く使用されているワクチン株はA型であるが、2005～2006年及び2009年に米国でG型株による流行が発生したことから、A型ワクチンの免疫持続性が新興のG型株に対しては低下する可能性も示唆されている¹³⁾。また、G型ウイルスの中和能に関して、国産ワクチン株（星野株）誘導抗体はB型と同程度にG型を中和できる一方、A型ワクチン誘導抗体では若干低下するとの報告もある¹⁴⁾。型別分析や疫学解析の結果は都内にとどまらず、国内外における感染症予防施策の検討への参考資料となり得ることから、今後もムンプスウイルスの動向把握と継続的な検査データの収集及び流行株の解析等に取り組み、情報提供を行っていく。

ま と め

2016年の都内におけるムンプスウイルスの検出状況について分析を行った。ムンプス及び無菌性髄膜炎の検体82件からムンプスウイルス遺伝子が検出され、うち53件からウイルスが分離された。分子系統樹解析では、国産ワクチン株と一致するB型1件を除き、都内の流行株はすべてG型、そのうち90%がGw、10%がGe亜型に分類され、各亜型もさらに複数のグループに分かれた。疫学的情報と照合すると、地域によって流行株のグループに違いが出る傾向が示唆された。

文 献

- 1) 国立感染症研究所感染症疫学センター：病原微生物検出情報, **34**, 219-220, 2013.
- 2) 国立感染症研究所感染症疫学センター：病原微生物検出情報, **37**, 185-186, 2016.
- 3) 国立感染症研究所：ムンプスウイルス病原体検査マニュアル
- 4) World Health Organization: *Wkly. Epidemiol. Rec.*, **87**, 217-224, 2012.
- 5) Takeuchi, K., Tanabayashi, K., Hishiyama, M., *et al.*: *Virology*, **225**, 156-162, 1996.
- 6) 木所 稔, 竹田 誠：病原微生物検出情報, **34**, 224-225, 2013.
- 7) Hosoya, M., Honzumi, K., Sato, M., *et al.*: *J. Clin. Virol.*, **11**, 117-124, 1998.
- 8) 国立感染症研究所：感染症週報, **18**, 10, 2016.
- 9) 木所 稔, 村野けい子, 加藤大志, 他：病原微生物検出情報, **37**, 194-195, 2016.
- 10) Uchida, K., Shinohara, M., Shimada, S., *et al.*: *Microbiol. Immunol.*, **45**, 851-855, 2001.
- 11) Momoki, T.S.: *Jpn. J. Infect. Dis.*, **66**, 226-231, 2013.
- 12) 森野紗衣子, 佐藤 弘, 奥野英雄, 他：病原微生物検出情報, **37**, 199-201, 2016.
- 13) 国立感染症研究所：おたふくかぜワクチンに関するファクトシート（平成22年7月7日版）
<http://www.mhlw.go.jp/stf2/shingi2/2r9852000000bx23-att/2r9852000000bybc.pdf>（2017年8月23日現在。なお本URLは変更または末梢の可能性がある）
- 14) Inou, Y., Nakayama, T., Yoshida, N., *et al.*: *J. Med. Virol.*, **273**, 97-104, 2004

Current Status of Mumps Virus Detection in Tokyo (January–December 2016)

Sayako KURITA^a, Michiya HASEGAWA^a, Ai SUZUKI^a, Terue OKAZAKI^a, Aiko NAKAYAMA^b,
Tetsuyoshi SAKAMOTO^a, Emiko KAKU^a, Takayuki SHINKAI^a, and Kenji SADAMASU^a

Recently, there have been recurrent nationwide epidemics of mumps every 4–5 years. In Tokyo, two large-scale epidemics occurred between 2009 and 2010 and between 2015 and 2016. Mumps virus genome was detected by reverse transcription-nested polymerase chain reaction (RT-nested PCR) in 82 of 144 samples from patients with infectious parotitis or aseptic meningitis brought to our center in 2016, and 53 strains of mumps virus were isolated.

Sequence data obtained from 80 cases confirmed genotype G, except for one sample coinciding with the vaccine strain. The sequences were classified into subtypes Gw and Ge by molecular phylogenetic analysis and further subdivided into eight groups of Gw and four groups of Ge.

Keywords: mumps, virus isolation, genetic analysis, Ge, Gw, phylogenetic tree analysis, vaccine

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

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out