

千葉市における 2018 年の風疹ウイルスの検出状況

坂本 美砂子、吉田 茜、西川 和佳子、横井 一

(環境保健研究所 健康科学課)

要旨 2018年に麻しん又は風しんを疑う症例として304名880検体のウイルス遺伝子検査を実施したところ、86名170検体から風疹ウイルスが検出され、過去4年間に比べて風疹ウイルス陽性症例が急増した。2018年の風しん流行はワクチン未接種又は接種歴不明の40～54歳の男性を中心とした国内感染であり、ほぼ同一のウイルス株(遺伝子型1E)の国内伝播によるものであると考えられた。全国的な流行状況も本市と同様であり、2019年もその流行は継続中である。風しん排除のためには、この流行を終息させる必要があり、風疹ウイルスに対する免疫を持たない成人への予防接種対策と風疹ウイルスの遺伝子検査による患者の正確かつ迅速な把握を継続することが重要である。

Key Words : 風しん, ウイルス遺伝子検査, 予防接種

1. はじめに

風しんは、風疹ウイルスによる急性感染症で、発熱・発疹・リンパ節腫脹を3主徴とする¹⁾。厚生労働省は「風しんに関する特定感染症予防指針」²⁾において、早期に先天性風しん症候群(CRS)の発生をなくすとともに、2020年度までに風しんの排除(適切なサーベイランス制度の下、土着株(国あるいは地域等の流行株)による感染が1年以上確認されないこと)を達成する目標を示した。その後、当該指針は2017年に一部改正され³⁾、風しん排除の目標達成に向けて「風しん診断後直ちに届出を行うこと」、「風しん患者が1例でも発生した場合に法第15条に規定する感染経路の把握等の調査を迅速に実施するよう努めること」および「原則として全例にウイルス遺伝子検査等を行い、可能な限り風疹ウイルスの遺伝子配列の解析を実施すること」となった。

本市では、麻しん又は風しんを疑う症例について麻疹ウイルス(MV)および風疹ウイルス(RV)の遺伝子検査を実施してきた。2014年から2017年の4年間で、238名の検査を実施した結果、RVの検出は2名であったが、2018年は86名と急増した。そこで、風しん排除の目標達成の一助として、RVの検出状況および遺伝子検査で得られた知見について報告する。

2. 検査対象

2018年1月から2018年12月に麻しん又は風しんを疑い、当所でMVおよびRV遺伝子検査を実施した症例は304名(男性193名、女性111名)であった。年齢幅は0～90歳、年齢群別では0～4歳が最も多く41名(男性19名、女性22名)、次いで50～54歳が40名(男性29名、女性11名)であった(図1)。

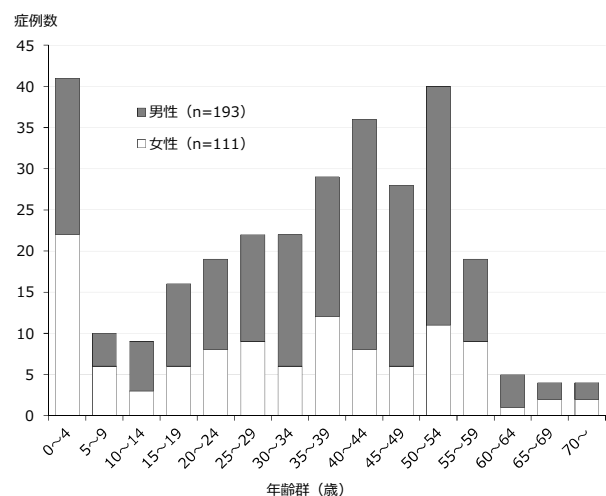


図1 検査対象の年齢群・性別分布

3. 検査材料と方法

3.1 検査材料

検査対象304名から採取された検査材料880検体(咽頭ぬぐい液 297 検体、血液 295 検体、尿 287 検体、髄液 1 検体)について MV および RV の遺伝子検査を実施した。

咽頭ぬぐい液は、医療機関が採取した滅菌綿棒又は合成樹脂素材のスティックを少量の滅菌生理食塩水に浸漬した状態で搬入された。これを滅菌生理食塩水とともに BD ユニバーサルバイラルトランスポート検体輸送用培地 (BD 社製) に移した後、1,300rpm で 20 分間遠心分離し、上清をウイルス RNA の抽出に使用した。髄液も咽頭ぬぐい液と同様に遠心分離後、その上清を使用した。血液(凝固防止処理)は、1,300rpm で 20 分間遠心分離した後、血漿分画と血球分画の間に形成された白色の細胞分画(末梢血単核球細胞)を回収し、これに血漿および赤血球を加え 600 μ L としたものを使用した。尿は、1,300rpm で 20 分間遠心分離し、沈渣細胞を分取して使用したが、沈渣細胞が得られない場合は尿をそのまま使用した。

3.2 Real-time RT-PCR 法

検体 200 μ L から High Pure Viral RNA Kit (Roche 社製) を用いてウイルス RNA を抽出した。この RNA について、Real-time RT-PCR 法による MV⁴⁾ および RV⁵⁾ の遺伝子検出を実施した。

Real-time RT-PCR 法で MV 又は RV の遺伝子が検出された症例については、Prime Script RT reagent Kit (タカラバイオ社製) により cDNA を作製し、MV の N 遺伝子⁶⁾ 又は RV の E1 遺伝子⁵⁾ を増幅させるための Conventional RT-nested PCR 法を行った。なお、RV の E1 遺伝子増幅では、1st PCR にプライマー E1-2F と E1-12R を使用して 908bp を増幅させ、次いで Nested PCR にプライマー E1-6F と E1-3R を使用して 829bp を増幅させた。このため、長鎖の増幅と高 GC 含量の鋳型増幅に最適化された酵素 TaKaRa LA Taq with GC Buffer (タカラバイオ社製) を用いた。

3.3 シークエンスと塩基配列の解析

Conventional RT-nested PCR 法で得られた RV の PCR 産物 (829bp) について、ダイレクトシークエンス法により塩基配列を決定した。MEGA6⁷⁾ を使用し、得られた E1 遺伝子 (8731-9469 位) の塩基配列 (739bp)⁵⁾ を ClustalW でアライメント後、近隣結合法による系統樹解析を実施して遺伝子型を決定した。

4. 結果

Real-time RT-PCR 法による遺伝子検査を実施した 880 検体のうち、MV は 1 検体 (血液) のみから検出された。RV は 170 検体から検出され、その内訳は咽頭ぬぐい液が 71 検体 (23.9%)、血液 56 検体 (19.0%)、尿 43 検体 (15.0%) であった (表 1)。

表 1 検査材料別の RV 検出状況

検査材料	検体数	陽性数	検出率 (%)
咽頭ぬぐい液	297	71	23.9
血液	295	56	19.0
尿	287	43	15.0
髄液	1	0	-

検査対象 304 名のうち RV 陽性症例は 86 名 (28.3%)、陰性症例は 217 名 (71.4%) であった。RV 陽性症例の年齢幅は 17~69 歳であり、0~14 歳の RV 陽性症例は 0 名であった。年齢群別では 50~54 歳が最も多く 19 名 (6.3%)、次いで 40~44 歳および 45~49 歳がともに 13 名 (4.3%) であった。なお、MV 陽性症例 1 名 (0.3%) は、0~4 歳の年齢群に認められた (図 2)。

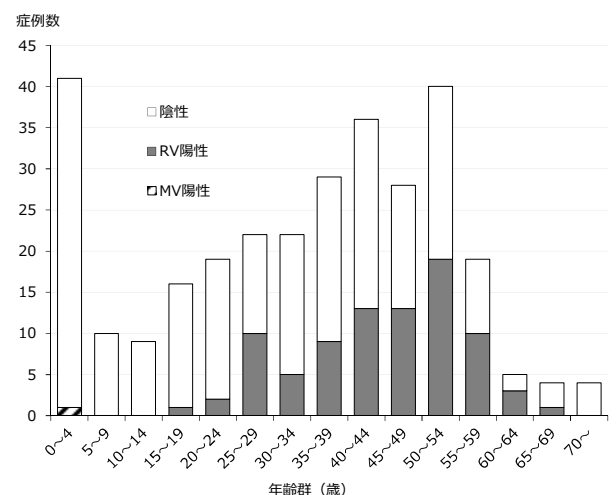


図 2 遺伝子検査の結果 (年齢群別)

また、RV 陽性症例 86 名の性別は男性が 76 名 (88.4%)、女性が 10 名 (11.6%) であり、30~54 歳の陽性症例 59 名 (68.6%) は全て男性であった (図 3)。なお、データとして示していないが、発症月別の RV 陽性症例数は 7 月に 9 名、8 月に 28 名、9 月に 17 名、10 月に 15 名、11 月に 9 名、12 月に 8 名と推移し、8 月をピークに減少傾向を示した。

RV 陽性症例 86 名に認められた主な症状は、発疹 (86 名、100%)、発熱 (75 名、87.2%)、リンパ節腫脹 (51 名、59.3%) であり、これら風しんの 3 主徴全てが認められた症例は 44 名 (51.2%) であった。なお、3 主徴の他に結膜充血が 53 名、上気道炎が 29 名、関節痛・

筋肉痛が 26 名、咳が 19 名、鼻汁・鼻閉が 17 名、胃腸炎が 4 名、眼脂が 4 名、コプリック斑が 2 名に認められた。

推定感染源の記載があった RV 陽性症例 10 名は男性が 6 名、女性が 4 名であった。男性 6 名のうち 4 名が職場、1 名が地域流行、1 名が家族であったが、女性 4 名については、全て家族からの感染であった。また、海外渡航歴がある陽性症例が 3 名認められたが、全て帰国後 3 週間以上経過した後の発症であった。

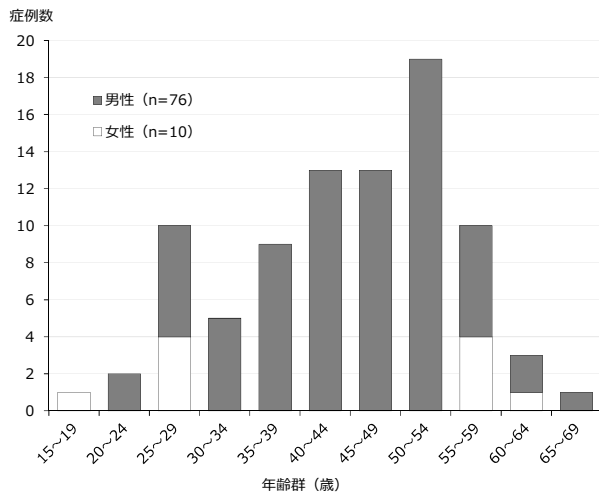


図 3 RV 陽性症例の年齢群・性別分布

RV 陽性症例 86 名のうち、咽頭ぬぐい液、血液、尿の 3 種類が採取された症例は 85 名であり、残り 1 名は咽頭ぬぐい液のみ未採取であった。咽頭ぬぐい液が陽性となった症例が 85 名中 71 名 (83.5%) と最も多く、次いで血液が 86 名中 56 名 (65.1%)、尿が 86 名中 43 名 (50.0%) の順であった。検査材料の陽性パターンと症例数を見ると 2 種類以上の検体が陽性となるパターンを示した症例が RV 陽性症例 86 名中 61 名 (70.9%) に認められた。すなわち、咽頭ぬぐい液・血液・尿が陽性となるパターンを示した症例は 23 名 (26.7%)、咽頭ぬぐい液・血液の陽性パターンを示した症例は 19 名 (22.1%)、咽頭ぬぐい液・尿の陽性パターンを示した症例は 15 名 (17.4%)、血液・尿の陽性パターンを示した症例は 4 名 (4.7%) であった。また、3 種類のうち 1 種類のみが陽性となった症例も 25 名 (29.1%) 認められ、その内訳は咽頭ぬぐい液が 14 名 (16.3%)、血液が 10 名 (11.6%)、咽頭ぬぐい液が未採取の症例 1 名を含む)、尿が 1 名 (1.2%) であった (表 2)。

表 2 検査材料の陽性パターンと症例数

陽性パターン			症例数 (%)
咽頭ぬぐい液	血液	尿	
+	+	+	23 (26.7)
+	+	-	19 (22.1)
+	-	+	15 (17.4)
-	+	+	4 (4.7)
+	-	-	14 (16.3)
-	+	-	10 (11.6)*
-	-	+	1 (1.2)

※咽頭ぬぐい液が未採取の症例 1 名を含む

RV 陽性症例 (発症日不明の 1 名を除く 85 名) の発症日を 0 病日として、検査材料の採取期間と陽性率を検体ごとに検討した。咽頭ぬぐい液の陽性率は、0~1 病日で 88.6% (31/35)、2~3 病日で 78.9% (30/38)、4~5 病日で 100% (5/5)、6~7 病日で 75.0% (3/4)、8 病日以降で 50.0% (1/2) であった。血液の陽性率は、0~1 病日で 75.0% (27/36)、2~3 病日で 63.2% (24/38)、4~5 病日で 20.0% (1/5)、6~7 病日で 50.0% (2/4)、8 病日以降で 50.0% (1/2) であった。尿の陽性率は、0~1 病日で 52.8% (19/36)、2~3 病日で 55.3% (21/38)、4~5 病日で 20.0% (1/5)、6~7 病日で 25.0% (1/4)、8 病日以降で 0.0% (0/2) であった (図 4)。

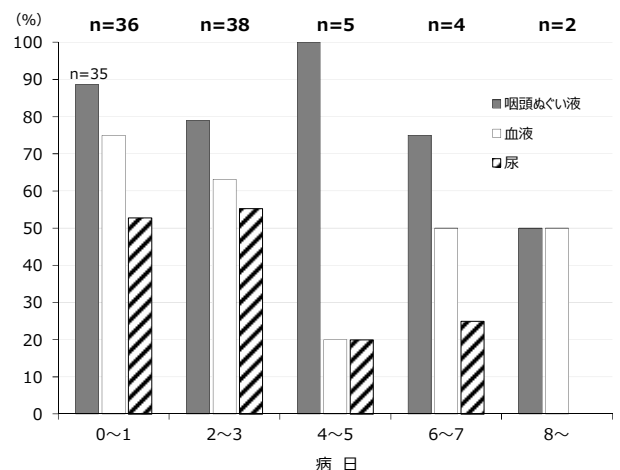


図 4 病日・検査材料別の RV 陽性率

RV 陽性症例 86 名のうち遺伝子型を決定できた症例は 74 名であり、全て 1E 型であった (図 5)。また、解析した 739bp の塩基配列の相同性は 99.6~100% であった。なお、MV 陽性症例 1 名の遺伝子型は決定できなかった。



図5 風疹ウイルス E1 遺伝子の系統樹

RV 陽性症例 86 名の風しん含有ワクチン接種歴は、接種あり 4 名 (4.7%)、未接種 29 名 (33.7%)、不明 53 名 (61.6%) であり、未接種と不明が全体の 9 割以上を占めた (図 6)。

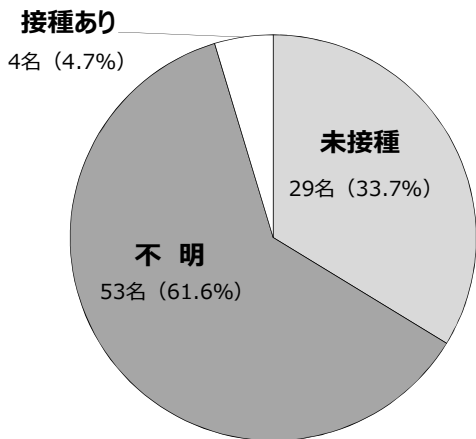


図 6 RV 陽性症例の風しん含有ワクチン接種歴

なお、接種ありの陽性症例は 25~29 歳の男性 2 名、35~39 歳の男性 1 名、55~59 歳の女性 1 名の計 4 名のみであった (図 7)。

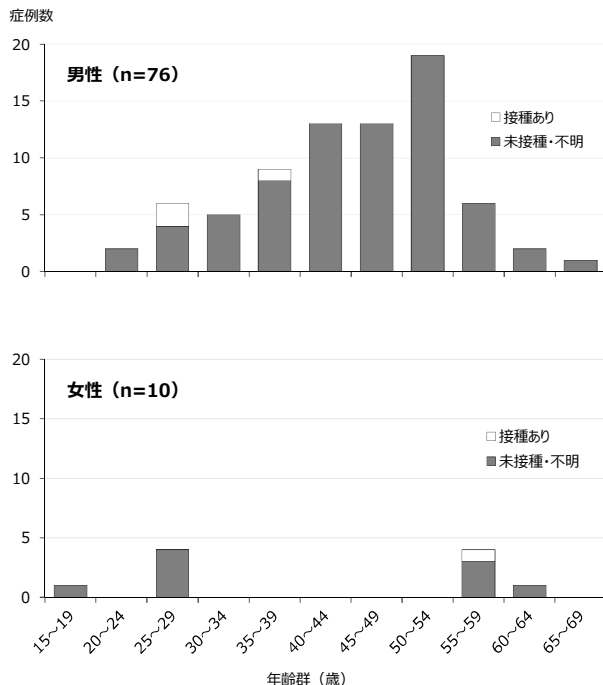


図 7 RV 陽性症例における性別・年齢群別のワクチン接種歴

5. 考察

2018 年における本市の検査対象 304 名のうち、RV 陽性症例は 86 名であった。RV が検出された検査材料

は、RV の遺伝子検査で推奨⁸⁾されている咽頭ぬぐい液、血液、尿であった。中でも咽頭ぬぐい液は、RV 陽性症例 85 名中 71 名 (83.5%) が陽性となり、RV の検出に最も適していると考えられた。また、今回の検査では、2 種類以上の検体が陽性となるパターンを示した症例が 86 名中 61 名 (70.9%) に認められたが、咽頭ぬぐい液、血液又は尿のいずれか 1 種類のみが陽性となった症例も 25 名 (29.1%) に認められたことから、風しん患者 (IgM 抗体が陽性となる前の感染初期を含む) の正確な把握による感染拡大の防止を目的とした場合、これら 3 種類の検査材料を検査することは、陽性症例の判定漏れを防止する上で重要であると考えられた。

病日・検査材料別の RV 陽性率については、咽頭ぬぐい液が 7 病日まで 75% 以上であったが、8 病日以降は 50% に減少した。血液および尿では 4 病日以降の陽性率が 50% 以下に減少した。また、尿は 4~5 病日を除くいずれの病日においても咽頭ぬぐい液又は血液に比べて陽性率が低く、8 病日以降は陰性となった。以上のことから、発病日から検査材料採取までの期間は 3 病日以内が適切であることが明らかとなった。この結果は、咽頭ぬぐい液と尿は発疹出現後 7 日目程度までウイルス遺伝子が検出されるが、血液については、抗体の出現とともに検出率が低くなるため IgM 抗体が偽陰性となりやすい発疹出現後 0~3 病日以内がウイルス遺伝子検査に適した時期であるとの報告⁹⁾とほぼ一致するものであった。しかしながら、今回の検査では、血液中の抗体の影響を受けにくい尿の陽性率が血液に比べて低かったこと、発症から検査材料採取までの期間が 3 病日までの検査材料 (咽頭ぬぐい液 73 検体、血液および尿がともに 74 検体) が多く、4 病日以降の検査材料 (咽頭ぬぐい液、血液および尿が各 11 検体) が少ないことから、今後も遺伝子検査で得られたデータを蓄積し、同様の検討を継続する必要があると考えられた。

風しん患者の 15~30% (小児で 30~50%、成人で 15% 程度) に不顕性感染が存在することから¹⁾、臨床診断による風しん患者とその感染経路の正確な把握は困難である。また、発疹・発熱・リンパ節腫張の 3 主徴が全て揃わない症例も認められ、抗体検査で風しんと確定診断された成人 27 名のうち、発疹・発熱・リンパ節腫張の 3 主徴全てが認められた症例は 20 名 (74.0%) であったことが報告されている¹⁰⁾。一方、風しん患者に典型的な所見とされる後頸部リンパ節炎や融合しない発疹は、2~3 割程度に認められるにすぎず、臨床所見から風しんを正確に診断するのは困難であるとの報告もある¹¹⁾。本市においても、3 主徴が全

て揃った RV 陽性症例は 86 名中 44 名と約半数であり、臨床診断の難しさが示唆された。

検査対象 304 名のうち 217 名 (71.4%) は MV および RV が不検出であった。特に、0~4 歳の年齢群における検査対象は 41 名であり、他の年齢群と比べて検査対象が最も多かったにもかかわらず、MV 陽性症例が 1 名のみであったことから、この年代を中心に麻疹又は風しんの症状に類似した発疹性ウイルス疾患等の紛れ込みが存在すると考えられた。また、従来から麻疹に特有な臨床所見とされてきたコプリック斑は、MV 検出例の約 28%、RV 検出例の約 17%、パルボウイルス B19 型検出例の約 2% に認められ、MV 以外の感染でも出現することが明らかになっている¹²⁾。本市においても RV 陽性症例 2 名にコプリック斑が認められており、麻疹又は風しんと他の発疹性ウイルス疾患等を臨床所見から確実に鑑別することは困難であると考えられた。このような現状から、風しんの診断にはウイルス遺伝子の検出による検査診断が極めて重要である。

全国の風しん患者報告数は、2014 年の 319 名から減少を続け、2017 年は 91 名になった。しかし、2018 年には 2,917 名と急増し、2019 年も第 31 週時点で 2,061 名の患者が報告されている¹³⁾。患者報告数は、30~40 歳代の男性 (男性全体の 60%) と 20~30 歳代 (妊娠出産年齢) の女性 (女性全体の 64%) に多く、風しん含有ワクチンの接種歴は、未接種又は不明が 9 割以上を占めている¹³⁾。また、患者から検出された RV の遺伝子型は 1E が主流である¹⁴⁾。

本市における風しんの流行状況も全国とほぼ同様の傾向を示した。2018 年における RV 陽性症例は 7 月に 9 名、8 月に 28 名と急速に増加し、男性の陽性症例 (76 名) は女性 (10 名) の 7.6 倍となった。陽性症例 86 名のうち、40~54 歳の男性が 45 名と半数以上を占めた。風しん含有ワクチンの接種歴は、未接種あるいは不明が全体の 9 割以上を占め、接種ありの陽性症例 4 名に 40~54 歳の男性は含まれていなかった。以上の結果から、2018 年 7 月から始まった本市の風しん流行は、RV に対する免疫を十分に持たない 40~54 歳の男性が中心であることが明らかになった。また、Real-time RT-PCR 法により検出された陽性症例 74 名の RV の遺伝子型は全て 1E に分類され、塩基配列の相同性も 99.6~100% であった。一方、海外渡航歴がある陽性症例も 3 名認められたが、帰国後 3 週間以上が経過した後の発症であり、RV の潜伏期間 (2~3 週間)¹⁾ を考慮すると、全て国内での感染であると考えられた。以上のことから、2018 年の流行は遺伝子型 1E に分類されるほ

ぼ同一のウイルス株が国内で伝播したものであると考えられた。現在、世界的に流行している RV の遺伝子型は 1E と 2B が殆どであり、日本国内においても 2012 年以降に検出される RV の遺伝子型は 1E あるいは 2B に限定されていることから、遺伝子型の情報のみでは、風しん排除の目標達成に必要な「土着流行株の伝播の把握」が困難となっている¹⁴⁾。本市で検出された RV の塩基配列も相同性が 99.6~100% であったことから、ウイルス株の伝播を追跡することは困難であり、現行の遺伝子型分類よりも詳細な系統樹解析の構築が必要であると思われる。

ワクチン政策の結果、近年の風しん患者の中心は小児から成人へと変化している¹³⁾。風しん含有ワクチンの定期接種を受ける機会がなかった世代は、昭和 37 (1962) 年 4 月 2 日から昭和 54 (1979) 年 4 月 1 日生まれの男性、すなわち風疹 HI 抗体保有率が約 80% と他の世代に比べて低い 39~56 歳の男性¹³⁾であり、本市においても風しん流行の中心となった世代である。したがって、今後の風しん流行を防ぐためには、この世代の男性を対象としたワクチン接種が重要である。

全国的な風しん患者報告数の急増を受けて、厚生労働省は風しんの追加的対策を発表し、RV に対する抗体保有率が低い 39~56 歳の男性を対象に、風しん抗体検査によって抗体陰性を確認した後のワクチン接種を推進している¹⁵⁾。風しん排除の目標を達成するためには、現在の流行を終息させることが必要であり、風疹 HI 抗体保有率が低い 39~56 歳の男性に対する積極的なワクチン接種が望まれる。また、妊娠出産年齢の女性における風疹 HI 抗体保有率 (抗体価 8 倍以上) は、約 95% 以上で維持されているが、妊婦検診において RV 感受性者と判定される HI 抗体価 (8 倍未満、8 倍および 16 倍)¹¹⁾ の女性の割合は 20 歳代前半で 27%、20 歳代後半で 22%、30 歳代で 14% 存在することから¹³⁾、妊娠 20 週頃までの妊婦における先天性風しん感染と CRS の発生に注意が必要である。本市における女性の RV 陽性症例は 10 名であったが、そのうち 4 名が 20 歳代後半 (年齢群 25~29 歳) であり、ワクチン接種歴も未接種又は不明であった。この陽性症例 4 名の妊娠については不明であるが、このうち 2 名の推定感染源は家族であったことから、家族が RV に感染していた場合の妊婦への RV 感染と CRS の発生リスクが懸念された。2015~2018 年の期間において CRS の報告はなかったが、2019 年は国内で既に 3 件報告されていることから¹⁶⁾、今後の動向を注視するとともに、妊娠出産年齢の女性および妊婦の周囲における RV 感受性者 (特に 39~56 歳の男性) を減少させることが重要である。

2020年の東京オリンピック・パラリンピックを控え、これまで以上に海外との交流が活発になり、風しん流行国からRVが持ち込まれるリスクが高くなることが想定される。しかし、RVが持ち込まれても、事前のワクチン接種によりRVに対する免疫を獲得していれば感染を防ぐことが可能である。WHOによる風しん排除の定義は、ある一定の地域（国等）から、土着株による感染が12か月以上確認されないことおよび質の高いサーベイランス制度の下で「RVの土着性の感染伝播」によるCRSの事例が認められないことの2点となっている¹⁷⁾。このことから、風しん排除状態の証明には、①「風しん診断後直ちに届出を行い、全例にウイルス遺伝子検査を行うこと」、②「法第15条による積極的疫学調査により、全例が海外感染例又は海外感染例と疫学リンクのあることを証明すること」および③「ウイルスの塩基配列の解析を行い、国内の流行株によるものかあるいは海外からの輸入株によるものかを鑑別すること」が必要である。風しん排除の目標達成に向けて、成人に対するワクチン対策の推進が不可欠であることは言うまでもないが、RVの遺伝子検査による患者の正確かつ迅速な把握とウイルス株の塩基配列が果たす役割も極めて大きいことから、今後も関係機関と連携して風しん患者の早期確定およびワクチン接種による感染拡大とCRS発生の防止対策を継続することが重要である。

文献

- 1) Dwyer DE, Robertson PW and Field PR : Broadsheet: Clinical and laboratory features of rubella, *Pathology*, 33, 2001, 322-328.
- 2) 厚生労働省：風しんに関する特定感染症予防指針，平成26年3月28日告示第122号
- 3) 厚生労働省：風しんに関する特定感染症予防指針，平成26年3月28日告示第122号（平成29年12月21日一部改正・平成30年1月1日適用）
- 4) 田部井由紀子，菅野このみ，長谷川道弥，他：リアルタイムPCR法による麻しんウイルス検出法の開発，東京都健康安全研究センター研究年報，第62号，2011，43-48.
- 5) 国立感染症研究所：風疹（第3.2版），病原体検出マニュアル，平成29年8月
- 6) 国立感染症研究所：麻疹（第3.4版），病原体検出マニュアル，平成29年4月
- 7) Tamura K, Stecher G, Peterson D et al. : MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0, *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2013, 2725-2729.
- 8) World Health Organization : Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection; Second edition, WHO/IVB/07.01, Geneva, 2007
- 9) 森 嘉生，大槻紀之，岡本貴世子，他：風疹の検査法，病原微生物検出情報月報，39, 2018, 35-36.
- 10) 加藤博史，今村顕史，関谷紀貴，他：成人における風疹の臨床像についての検討，*感染症誌*，87, 2013, 603-607.
- 11) 先天性風疹症候群（CRS）診療マニュアル作成委員会：先天性風疹症候群（CRS）診療マニュアル，日本産科・新生児医学会編，2014年1月
- 12) Kimura H, Shirabe K, Takeda M et al. : The Association Between Documentation of Koplik Spots and Laboratory Diagnosis of Measles and Other Rash Diseases in a National Measles Surveillance Program in Japan , *Front Microbiol* , 10 , 2019 , <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00269>
- 13) 国立感染症研究所 感染症疫学センター，風疹流行に関する緊急情報：2019年8月7日現在，<https://www.niid.go.jp/niid/images/epi/rubella/2019/rubella190807.pdf>（2019.8.20 アクセス）
- 14) 森 嘉生，坂田真史，竹田 誠：近年の風疹ウイルスのウイルス学的変遷，病原微生物検出情報月報，40, 2019, 134-135.
- 15) 厚生労働省健康局健康課予防接種室：風しんの定期接種制度の変遷について，病原微生物検出情報月報，40, 2019, 130-131.
- 16) 国立感染症研究所 感染症疫学センター：先天性風しん症候群（CRS）の報告（2019年6月19日現在），<http://www.niid.go.jp/niid/ja/rubella-m-111/700-idsc/8588-rubella-crs.html>（2019.8.20 アクセス）
- 17) World Health Organization : WHO Global Vaccine Action Plan 2011-2020, Geneva, 2012