

16. 麻しんウイルスの分子疫学解析精度の向上に資する新たな解析領域の探索

○諏訪 優希、佐藤 克彦、伊藤 雅、齋藤 典子、皆川 洋子（愛知県衛生研究所）

【研究目的】

麻しんウイルス（MeV）は感染力が極めて強いため、麻しん発生時には正確な分子疫学情報を迅速に提供し、感染拡大阻止に努める必要がある。

分子疫学解析には現在、遺伝子型決定部位である Nucleoprotein 領域の 450 塩基（N450 領域）による型別が世界的に利用されているが、2018 年以降、この領域の解析では区別不能な MeV 株が世界各地で検出され、感染経路等の推定が困難な事例が増加している。

本研究では、N450 領域以外の領域を解析することにより、N450 領域で区別不能な株を識別し、より詳細な分子疫学解析を可能にする解析法の確立を目的とする。

【研究の必要性】

麻しんは MeV による感染症であり、空気感染、飛沫感染など多様な感染経路を示し、感染力が極めて高い。合併症には肺炎、中耳炎等があり、希に重篤な合併症として脳炎、亜急性硬化性全脳炎（SSPE）等を起こすことがある。MeV に対する免疫の無い者が発病すると重症度が高く、約 40%が入院し、患者 1,000 人に対し 1 人の割合で死亡することがある。

日本は 2015 年 3 月から麻しんの排除状態を維持しているが、海外輸入例やこれを契機とした国内感染の拡大例が散発している。2018 年から 2019 年にかけて麻しんが世界的に流行し、日本では 2018 年に 279 例、2019 年に 744 例が報告¹⁾された。現在 MeV は N450 領域の配列により、A~H の 8 タイプ 24 種類（A 型はワクチン株）の遺伝子型に分類されている。2015 年頃までは世界各地で地域ごとに特徴的な遺伝子型が検出されていたが、近年、日本を含めた麻しん排除国増加に伴い検出されるウイルスの多様性が減少し、2018 年および 2019 年に国内で検出された MeV の約 70%を D8 遺伝子型が占め、さらに D8 遺伝子型の約 70%が同じ N450 配列を有していた²⁾。また、N450 領域の塩基配列が一致する MeV 株が世界各地で検出されており、疫学情報から異なるクラスターや別地域からの輸入症例と思われる患者由来の株が区別できない例が増加した。

この課題の解決には次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析が有効であるが、効率的な運用には一定の検体数の確保が必要であるのに加え、解析には数週間を要するため、適切

な感染拡大阻止策を講じるには不向きである。1例の患者から十数例規模の集団感染に繋がった事例も複数報告³⁾されており、少数の検体でも迅速かつ正確な解析結果が得られる手法の開発が必要である。

【研究計画】

2018年以降、愛知県新興再興感染症監視事業により当所に搬入後、real-time RT-PCR法により MeV 遺伝子陽性と判定された 36 例 (D8 遺伝子型 23 例、B3 遺伝子型 13 例) の検体を用いた。各検体から RNA を抽出し、変異が起こりやすいとされる MF-NCR (Matrix および Fusion 遺伝子間の non-coding region) 領域 (1,012 塩基) および H (Hemagglutinin) 遺伝子領域 (1,854 塩基)⁴⁾を RT-nested PCR 法により増幅した⁵⁻⁷⁾。ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し、これらの領域について UPGMA 法による系統解析を行い、N450 領域よりも詳細な分子疫学解析が可能であるか検討した。解析領域の検討および手法の有効性判定にはデータベースに登録された全ゲノム配列を用いた。

【実施内容・結果】

①B3 遺伝子型

MF-NCR 領域の検出率は 11/13 例 (85%) であった。この 11 例について、N450 領域の系統樹と N450 領域と MF-NCR 領域を連結した系統樹を図 1 に示した。配列名先頭の図形は疫学的リンクが確認された株を示し、数字は発症週および発症年 (西暦の下 2 桁)、配列名末尾のアルファベット 3 文字は渡航先の ISO 国名コードである。

N450 領域では、感染時期の異なる株や疫学的に関連のない株が同じグループに含まれていたが、Bodewes らと同様の方法⁸⁾で MF-NCR 領域を連結して解析したところ、感染時期や疫学情報に関連のある株のみが同じグループに属し、関連のない株は異なるグループに分岐した。

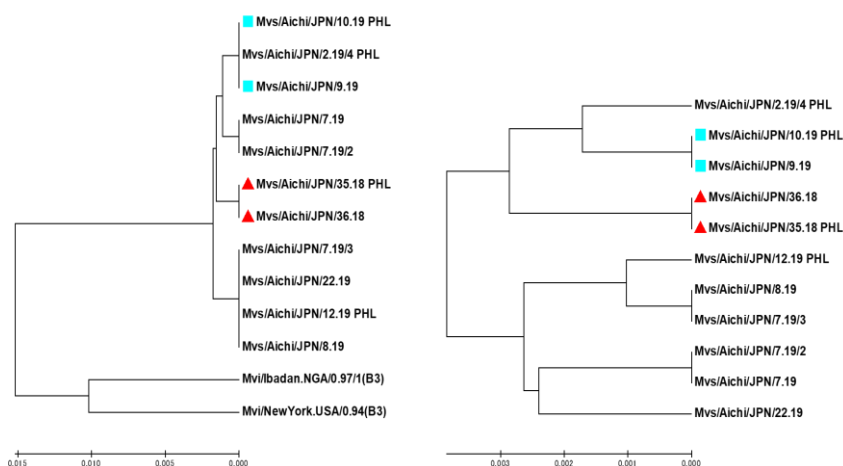


図 1. B3 遺伝子型 (11 例)

左 : N450 領域 (450 塩基)、右 : N450 領域+MF-NCR 領域 (1,462 塩基)

②D8 遺伝子型

MF-NCR 領域の塩基配列が得られたのは 19/23 例 (83%) であった。この 19 例について N450 領域の系統樹と N450 領域に MF-NCR 領域を連結した系統樹を比較したが、解像度があまり改善されなかったため、さらに H 領域を解析した。H 領域の塩基配列が得られたのは 16/23 例 (70%) であり、この 16 例はすべて MF-NCR 領域も解析可能であった。この 16 例について、N450 領域の系統樹と N450 領域に MF-NCR 領域および H 領域を連結した系統樹を図 2 に示した。N450 領域では 13/16 例 (81%) が同一の塩基配列であり、渡航先や感染時期が異なる 4 つの疫学的リンクをもつ株がすべて同じグループに混在していたが、3 領域を連結した系統樹では渡航歴や感染時期に関連のある株が各グループに、関連のない株は異なるグループに分岐した。

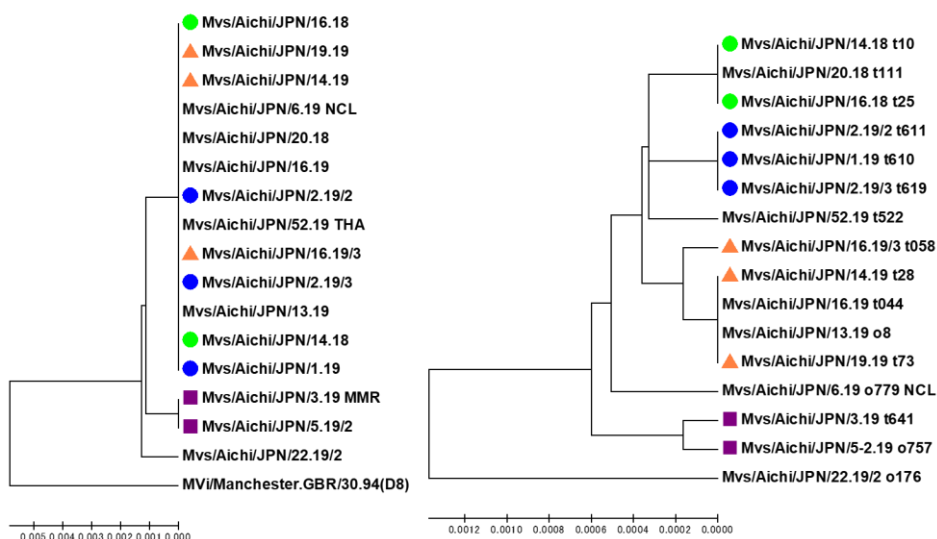


図 2. D8 遺伝子型 (16 例)

左 : N450 領域 (450 塩基)、右 : N450 領域+MF-NCR 領域+H 領域 (3,316 塩基)

③手法の有効性判定

当所では全ゲノム配列を解析できないため、2019 年 1 月から 12 月にカリフォルニア州で流行した MeV の全ゲノム配列 (B3 遺伝子型 : 33 例、D8 遺伝子型 : 29 例)⁹⁾ について 3 領域と全ゲノム配列を図 3 および 4 で比較した。N450 領域の系統樹では B3 遺伝子型の 26/33 例 (79%)、D8 遺伝子型の 22/29 例 (76%) が同一の塩基配列であったため、渡航先や感染時期に関連のない株や異なるクラスターがすべて同じグループに混在していたが、3 領域を連結した系統樹では渡航歴や感染時期に関連のある株が同じグループに、関連のない株は異なるグループに分岐した。また、3 領域を連結した系統樹と全ゲノム配列の系統樹を比較したところ、全ゲノム配列の解像度には劣るものの、全ゲノム配列の 21% (3,316/15,710 塩基) の解析で、ほぼ同等の解像度が得られた。

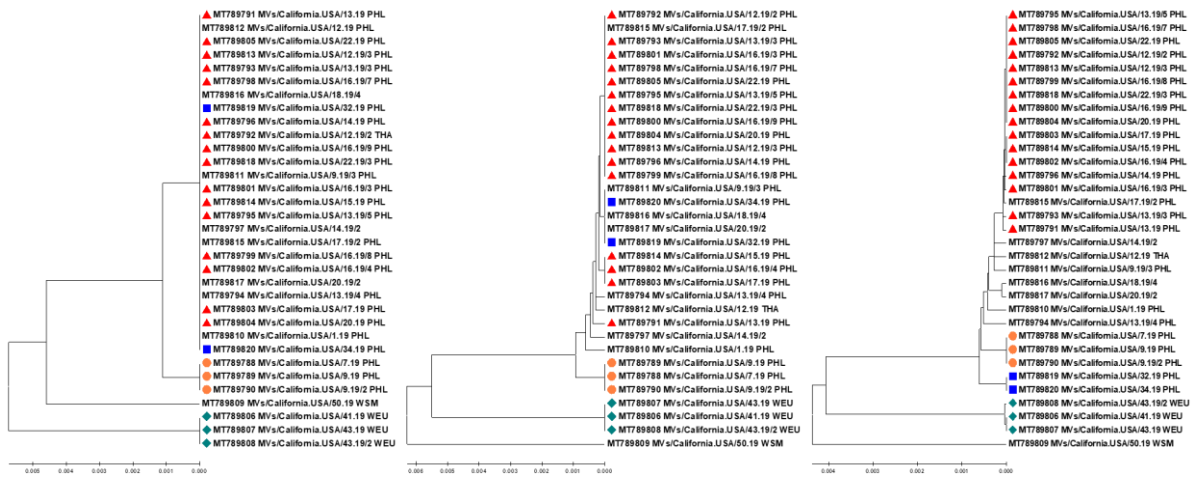


図3. B3 遺伝子型 (33 例)

左 : N450 領域 (450 塩基)、中央 : N450 領域+MF-NCR 領域+H 領域 (3, 316 塩基)、右 : 全ゲノム (15, 710 塩基)

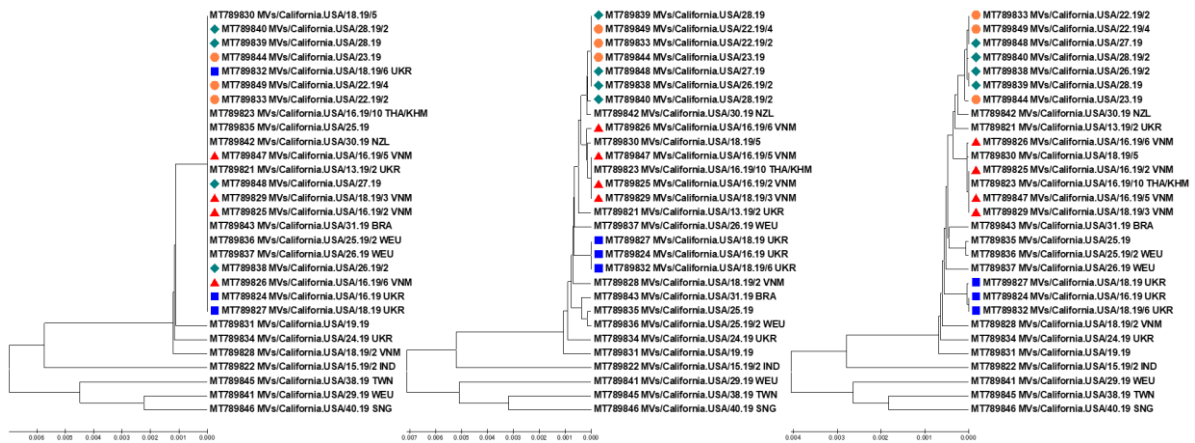


図4. D8 遺伝子型 (29 例)

左 : N450 領域 (450 塩基)、中央 : N450 領域+MF-NCR 領域+H 領域 (3, 316 塩基)、右 : 全ゲノム (15, 710 塩基)

【考察と今後の課題】

本県で検出された B3 遺伝子型 MeV について N450 領域および MF-NCR 領域を連結した解析を行ったところ、N450 領域のみの解析に比べて高い解像度が得られた。また D8 遺伝子型ではさらに H 領域を連結して解析することで、高い解像度が得られた。これは、2018 年および 2019 年に国内で検出された D8 遺伝子型は B3 遺伝子型よりウイルスの多様性が減少していたためと考えられる。2019 年にカリフォルニア州で流行した MeV の塩基配列を用いて、今回確立した 3 領域と全ゲノムを比較したところ、B3 および D8 遺伝子型のどちらにおいても、3 領域による比較は全ゲノムに近い解像度が得られた。

今後の課題は、MF-NCR 領域および H 領域の増幅率の向上である。特に H 領域の増幅率が最も低いため、プライマーの検討など増幅方法を再検討する。

【参考文献】

- 1) 感染症発生動向調査事業年報：
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/allarticles/surveillance/2270-idwr/nenpou/11618-kako2021.html>
- 2) 国立感染症研究所 麻疹ウイルス分離・検出報告数：
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-measles.html>
- 3) 皆川洋子, 愛知県小児科医会会報 2018;108:3-9.
- 4) Penedos AR, et al. PLoS One. 2015 Nov 16;10(11):e0143081.
- 5) Thomas S, et al. Emerg Infect Dis. 2017 Jul;23(7):1063-1069.
- 6) Chibo D, et al. J Gen Virol. 2000 Oct;81(10):2511-2518.
- 7) Li S, et al. Braz J Infect Dis. 2014 Nov-Dec;18(6):581-90.
- 8) Bodewes R, et al. Infect Genet Evol. 2021 Jul; 91:104794.
- 9) Probert WS, et al. J Infect Dis. 2021 Sep 17;224(6):1015-1023.

【経費使途明細】

使 途	金 額
試薬（遺伝子解析（Seq 反応）試薬、遺伝子増幅試薬）	229,328 円
実験器具（泳動槽、ミニ試験管ミキサー）	69,352 円
振込手数料	1,320 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円