

資料

広島県内で認められた, 異なる遺伝子グループに属する ヒト・メタニューモウイルスの混合流行について

高尾 信一, 島津 幸枝, 福田 伸治, 宮崎 佳都夫, 妹尾 正登

An epidemic of human metapneumovirus (hMPV) infection: Co-circulation of two distinct genetic groups of hMPV in Hiroshima Prefecture.

SHINICHI TAKAO, YUKIE SHIMAZU, SINJI FUKUDA, KAZUO MIYAZAKI and MASATO SENO

(Received Nov. 13, 2007)

Key words: ヒト・メタニューモウイルス, 混合流行, 遺伝子グループ

要 旨

我々は2003年3月から7月にかけて, 広島県内においてヒト・メタニューモウイルスを原因とする小児の呼吸器感染症の流行を経験した。その際にreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法によってhMPVの感染が確認された患者を対象に, 彼らから検出されたhMPV株の分子系統樹解析結果と, 患者の発生場所や検体採取月日を併せて解析することで, 複数の地域で異なる遺伝子学的グループに属する2種類のhMPV株が混合流行を起こしていたことを明らかにすることができた。

groupに属するウイルス株が同時に混合して流行する場合のあることが判っている[9-12]。しかしその一方で, ごく限られた地域において, 異なるgroupに属するhMPV株が同時期に, 同じ地域で混合流行を起こすか否は, 未だ不明である。

今回我々は2003年3月から7月にかけて, 広島県内においてhMPV感染症の大きな流行を経験し, その際に検出したhMPV株について分子疫学的解析を実施した結果, 異なるgenetic groupに属するhMPV株が, 同時期に, 同じ地域で混合して流行していたことを明らかに出来たので, その概要を報告する。

序 文

2001年にオランダのvan den Hoogenら³⁾, 小児の急性呼吸器感染症患者の鼻咽腔吸引液からParamyxoviridaeに属する新しいウイルスを分離し, human metapneumovirus (hMPV) と命名した[1]。彼らの報告以降, 世界各国でhMPVの分離あるいはreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いてのhMPV遺伝子の検出例が多数報告されるようになった[2-6]。日本国内においても, 我々のグループが初めてhMPVによる小児の呼吸器疾患の流行事例を報告しており[7], そうした報告例から, hMPV感染症の臨床像や疫学的な実態が明らかになりつつある。また, ウイルスの遺伝子塩基配列を元にした分子系統解析の結果から, hMPVは2つの異なる遺伝子学的グループ (genetic group) に大別されることも明らかになっている (group Aとgroup B)[3, 8-12]。それに関連した研究から, hMPV感染症の流行に際して, 国レベルあるいは比較的広い地域を対象に流行を捕らえた場合には, 同一流行シーズン中に2つの異なる

対象および方法

1. 対 象

広島県内9カ所の小児科医療機関において, 2003年3月から7月の間に急性呼吸器症状を原因として受診した小児のうちで, RT-PCR法を用いたウイルス遺伝子学的検査によって, hMPVの感染が確認された患者77名 (患者の内訳は, 急性気管支炎: 26名, 急性肺炎: 19名, 急性上気道炎: 15名, 喘息性気管支炎: 9名, 急性細気管支炎: 4名, その他の疾患: 4名) を対象とした。なお, それらの患者の臨床症状等については, 我々が前報[7]において報告している。

2. RT-PCR法によるhMPV遺伝子の検出

hMPV遺伝子の検出は, 患者の鼻咽腔拭い液あるいは鼻汁から抽出したRNAを鋳型とし, hMPVのFタンパクをコードする領域の450bpを増幅するプライマー・ペアであるMPVF1f (5'-CTTGGACTTAATGACAGATG-3') とMPVF1r (5'-GTCTTCTGTGCTAACTTTG-3') を用い

て1st PCRを実施し、その後、1st PCRで増幅した領域の内側357bpを増幅するように設計したMPVF2f (5'-CATGCCGACCTCTGCAGGAC-3') とMPVF2r (5'-ATGTTGCAYTCYYTTGATTG-3') のプライマー・ペアを用いたnested-PCR法でhMPVの遺伝子検出を行った[1].

3. 塩基配列の決定および分子系統樹の作成

hMPVの塩基配列は、nested-PCR産物について、ABI PRISM3100 Genetic Analyzerを用いたダイレクトシーケンシング法で決定した。解読した塩基配列のうち334bpについてGenBankに登録されている既知のhMPV株の塩基配列との相同性についてBLASTを用いて比較した。さらに、Kimura-2 parameter法を用いて塩基置換の推定を行った。系統樹解析は、Clustal X (version 1.81) とMega 3プログラムを用いて行い、隣接結合法 (N-J) により分子系統樹を作成した。系統解析の確かさは1000回繰り返しのブートストラップ法により確認した。なお、hMPV株のgenetic groupの呼び方については、Peretらの報告[8]に従い、NDL00-1株およびCAN97-83株が属するグループをgroup Aと、CAN98-75株、CAN98-76株が属するグループをgroup Bと表現した。

本研究に使用したhMPV株の塩基配列はDDBJのデータベース、Accession No. AB113371~AB113376, AB119484~AB119494, AB126605~AB129913に、それぞれ登録している。

結 果

1. 週別患者発生状況

RT-PCR法を用いたウイルス遺伝子学的検査によって、hMPVの感染が確認された77名の患者について、その発生状況を週別に図1に示した。患者の発生は2003年3月の第1週から認められるようになり、7月の第4週まで認められた。

2. hMPV株の分子系統樹解析

今回我々がRT-PCR法で検出したhMPV株、合計77株のうちで、それらを代表する26株と、これまでに論文として報告され、hMPV株の遺伝子塩基配列がGenBankに登録されているNLD00-1株 (Accession No. AF371337)、CAN97-83株 (AY145296)、CAN98-75株 (AY145289)、CAN98-76株 (AY145290) の4株、ヒトのhMPVに近縁なトリMPVの代表株であるAPVC-AF187152株 (AF187152) の合計31株について、それらのF蛋白をコードする遺伝子塩基配列を基に作成した分子系統樹を図2に示した。

我々が広島県内で検出した26株についてみると、標準株として用いたNLD00-1株やCAN97-83株が属するgroup AにはJP/03/10009株からJP/03/10032株までの17株が、またCAN98-75株およびCAN98-76株が属するgroup BにはJP/03/10036株からJP/03/10030株までの合計9株が、それぞれ属していた。なお、株間相互のホモロジーは、group Aに属する17株間では、ヌクレオチドレ

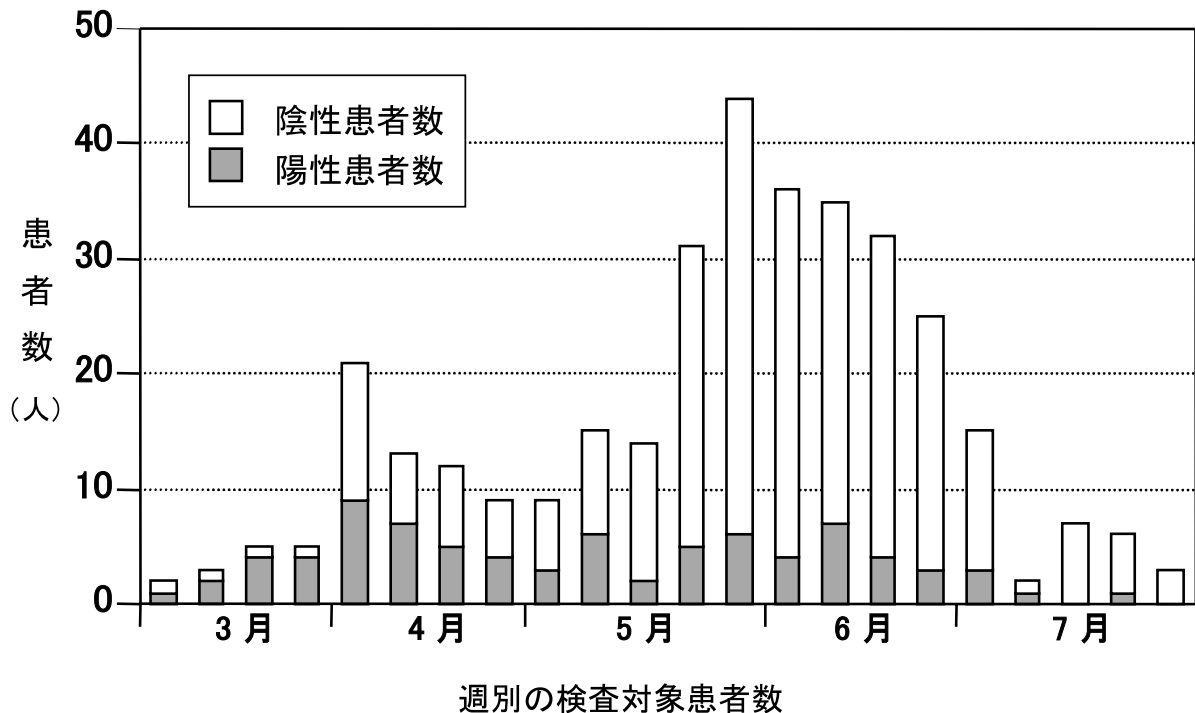


図1 急性呼吸器症状を示した小児の患者からのhMPV検出状況 (2003年)

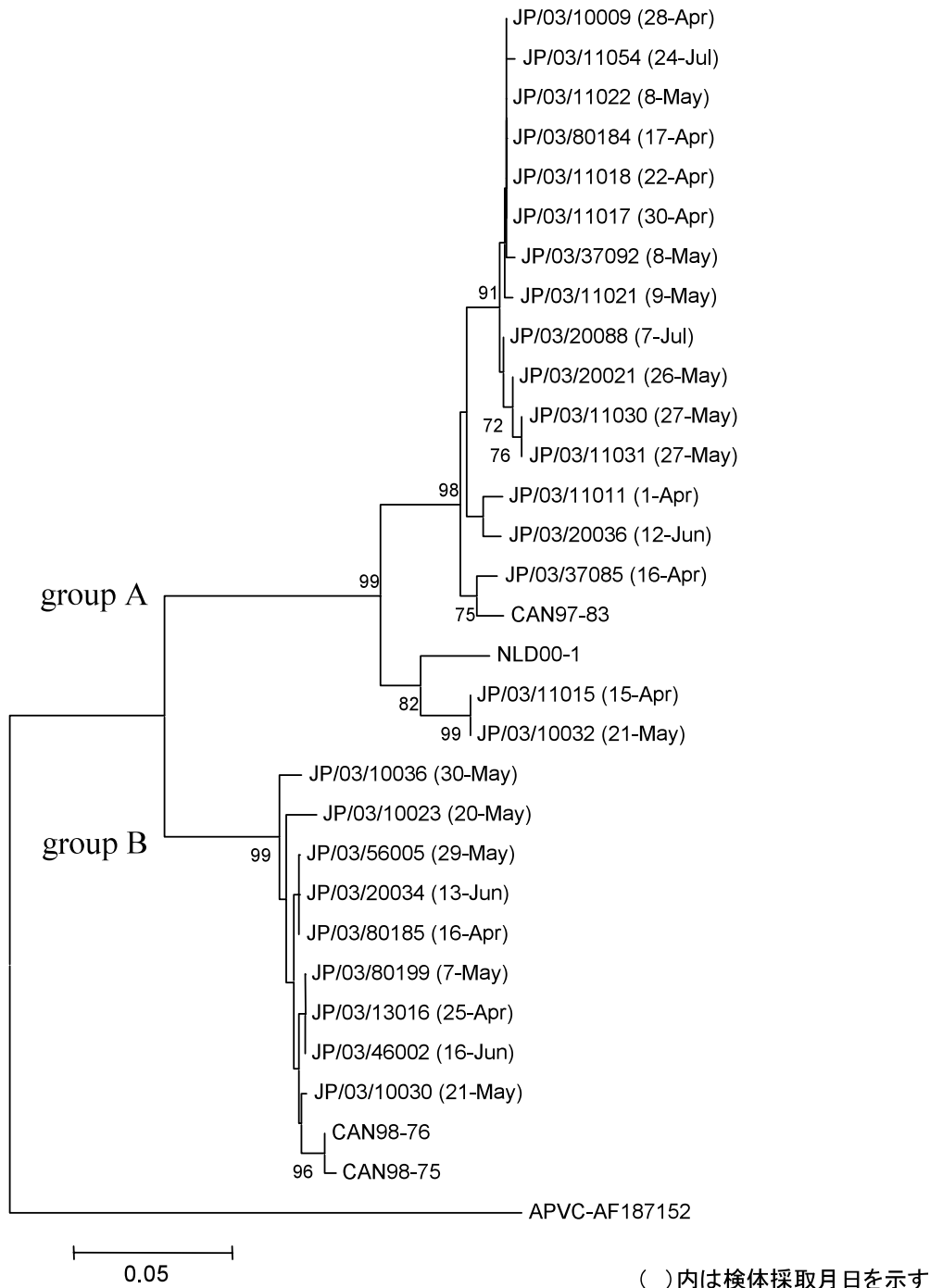


図2 hMPV株の分子系統樹

ベルで92~100%, アミノ酸レベルでは97%のホモロジーを示し, 一方, group Bに属する9株間では, スクレオチドレベルでは96~100%, アミノ酸レベルでは99%以上のホモロジーを示していた. また, group Aとgroup B間でのホモロジーは, スクレオチドレベルでは85~87%, アミノ酸レベルでは95~97%のホモロジーであった.

各分離株を検体採取月日別に見てみると, group Aに属する株は2003年3月8日から7月24日までの間に検体

が採取されたものであり, group Bに属する株は3月7日から6月16日までの間に採取されたものであった.

3. 広島県内におけるhMPV感染患者の発生状況

hMPVが検出された77名の患者について, 患者の発生場所を図3に示した. また, その内でhMPVのF遺伝子の分子系統樹解析を実施した26名については, 当該患者から検出されたhMPV株名に検体採取月日も併せて表示した.

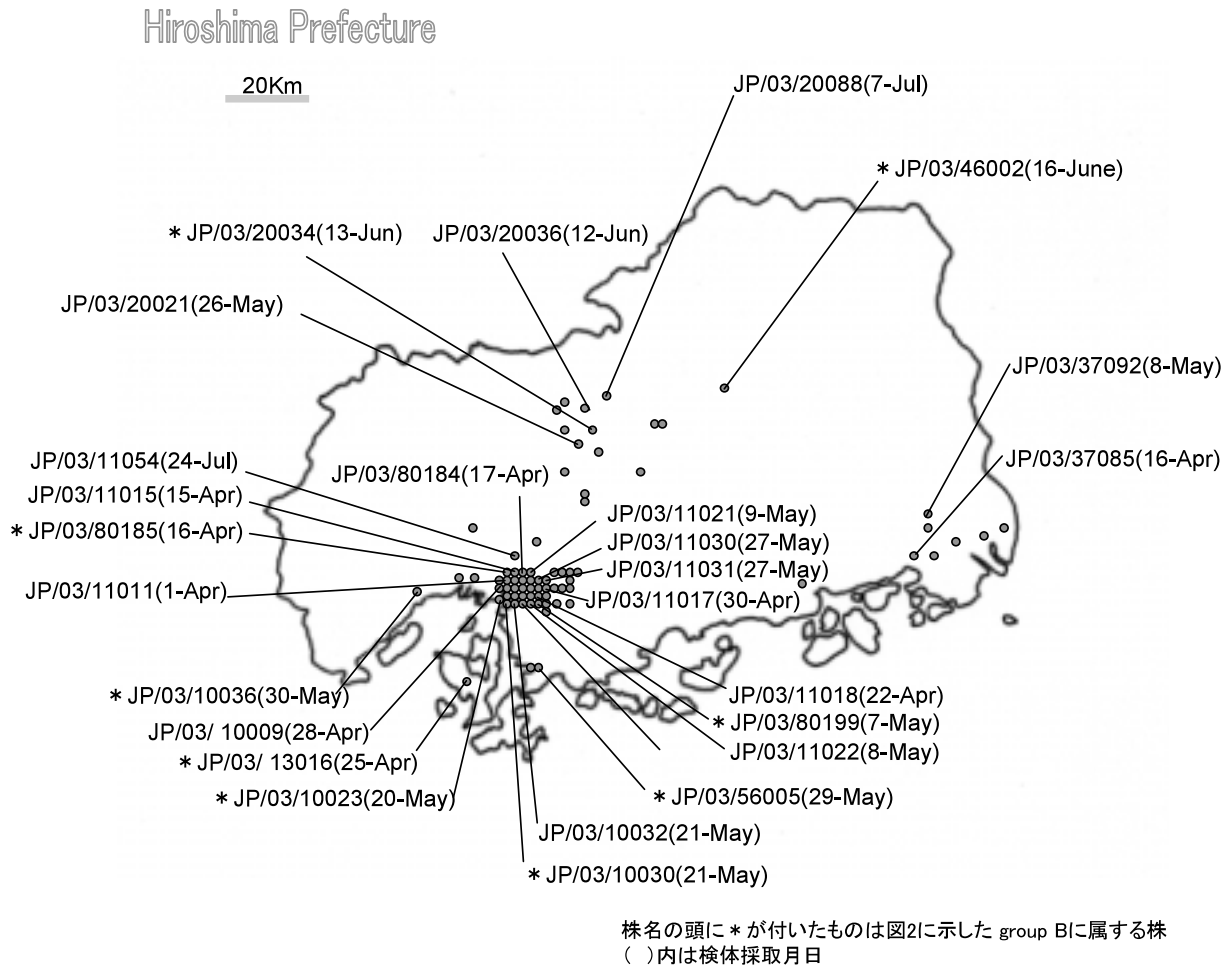


図3 広島県内におけるhMPV感染患者の発生地域と患者から検出されたhMPV株

hMPV陽性患者の発生は、例えばJP/03/10023株に代表される株が検出された広島市内およびその周辺地域で最も多くの患者が確認された。しかし、それ以外にも、例えばJP/03/37092株が検出された広島県東部地域や、JP/03/20021株が検出された広島県北部地域においても複数の患者が確認された。

RT-PCR法により検出されたhMPV株について、その genetic groupに着目してみると、例えば広島市内の患者から2003年5月21日に採取された検体から検出されたJP/03/10032株は、group Aに属していたが、同じ5月21日に同一地域で発生した別の患者から検出されたJP/03/10030株はgroup Bに属していた。同様に4月15日に検体採取された患者から検出されたJP/03/11015株はgroup Aに、同じ地域で4月16日に検体採取された患者から検出されたJP/03/80185株はgroup Bに属していた。この現象は、県北部地域でも認められ、4月12日に検体採取された患者から検出されたJP/03/20036株はgroup Aに、翌日の4月13日に検体採取された患者から検出されたJP/03/20034株はgroup Bに属していた。

考 察

hMPV感染症は、2001年に初めてその存在が明らかにされた、新しいウイルス感染症であるが、世界各国の多くの研究者による積極的な調査・研究によって、この感染症の臨床的、疫学的、ウイルス学的な実態が明らかになりつつある[1-7, 13]。これまでの報告例から明らかになったことは、hMPV感染症の発生は特定の国や地域に限定して発生しているのではなく、おそらく世界各地で発生が認められる一般的な感染症の一つであり[14]、成人においても患者は発生するものの、主に小児、特に5歳以下の乳幼児に多発する疾患であると考えられている[15]。その主たる臨床像は、軽度の上気道炎から肺炎を伴う重度の下気道炎までと比較的幅広く[14-15]、同じParamyxoviridaeに属するヒトRSV感染症の臨床像に類似していることも明らかになっている[15]。一方で、hMPVの表面タンパクをコードする遺伝子であるF geneやG geneをターゲットとした分子系統樹解析から、hMPVは2種類の異なるgenetic groupに分類され[3, 8-12]、また、交差中和試験やモノクローナル抗体を用いた

解析から、それぞれのgenetic groupに属するウイルス株間では抗原的にも区別されることも明らかになっている[16-17].

今回我々は、2003年に認められた広島県内でのhMPV感染症の流行の際に検出された26株のhMPVについて、ウイルスのF geneの遺伝子配列を基にした分子系統樹解析を行った結果、2つの異なるgenetic groupに属するウイルスを検出した。更にそれらのウイルスが検出された患者について、検体の採取日と採取場所とを併せて解析した結果、2003年の3月から7月にかけて広島県内で認められたhMPV感染症の流行においては、患者は県内全域か少なくとも複数の地域で、同時期に発生しており、その際に原因となったhMPVについては、単一のgenetic groupに属する株が流行していたのではなく、group Aとgroup Bの、異なる2種類のgenetic groupに属する株が、同時期に同一地域で混合して流行していたと考えられた。

hMPVと同じParamyxoviridaeに属し、引き起こす臨床像もhMPVと類似しているRSVについては、遺伝子学的にも抗原的にも区別される2つのsubgroup (AおよびB)の存在がよく知られており[18-20]、臨床的にはsubgroup Aに属するウイルスの感染はsubgroup Bのウイルスのそれに比べて、重症化する傾向があることが報告されている[18]。一方hMPVについては、genetic groupの違いと、臨床像との間に因果関係があるという報告は、未だ見当たらない。今回我々がgenetic groupまで解析した26名の患者についても、データは示していないが、検出されたウイルスのgenetic groupと臨床像との間には、特徴的な違いは認められなかった。おそらくhMPV感染症の場合は、ウイルスのgenetic groupと臨床像との間には違いは無いものと推察しているが、この点については、さらに症例を増やして解析する必要があると考えている。

文 献

- [1] van den Hoogen, B.G., de Jong, J.C., Groen, J., Kuiken, T., de Groot, R., Fouchier, R.A.M., *et al.* (2001): A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat. Med.*, 7, 719-724.
- [2] Mackay, I.M., Jacob, K.C., Woolhouse, D., Waller, K., Symmis, M.W., Whitley, D.M., *et al.* (2003): Molecular assays for detection of human metapneumovirus. *J.Clin. Microbiol.*, 41, 100-105.
- [3] Boivin, G., Abed, Y., Pelletier, G., Ruel, L., Moisan, D., Cote, S., *et al.* (2002): Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: A new Paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J.Infect.Dis.*, 186, 1330-1334.
- [4] Stockton, J., Stephenson, I., Fleming, D., Zambon, M. (2002): Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg. Infect. Dis.*, 8, 897-901.
- [5] Freymuth, F., Vabret, A., Legrand, L., Eterradossi, N., Lafay-Delaire, F., Brouard, J., *et al.* (2003): Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatr. Infect. Dis.*, 22, 92-94.
- [6] Peiris, J.S.M., Tang, W.H., Chan, K.H., Khong, P.L., Guan, Y., Lau, Y.L., *et al.* (2003): Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. *Emerg. Infect. Dis.*, 9, 628-633.
- [7] 高尾信一, 下菌広行, 柏 弘, 松原啓太, 坂野 堯, 池田政憲ら (2004): 本邦において初めて流行が確認された小児のhuman metapneumovirus感染症の臨床的, 疫学的解析. *感染症誌*, 78, 129-137.
- [8] Peret, T.C.T., Boivin, G., Li, Y., Couillard, M., Humphrey, C., Osterhaus, A.D.M.E., *et al.* (2002): Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J. Infect. Dis.*, 185, 1660-1663.
- [9] Viazov, S., Ratjen, F., Scheidhauer, R., Fiedler, M., Roggendorf, M. (2003): High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. *J. Clin.Microbiol.*, 41, 3043-3045.
- [10] Biacchesi, S., Skiadopoulos, M.H., Boivin, G., Hanson, C.T., Murphy, B.R., Collins, P.L., *et al.* (2003): Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology*, 315, 1-9.
- [11] Boivin, G., Mackay, I., Sloots, T.P., Madhi, S., Freymuth, F., Wolf, D., *et al.* (2004): Global genetic diversity of human metapneumovirus fusion gene. *Emerg. Infect. Dis.*, 10(6), 1154-1157.
- [12] Agapov, E., Sumino, K.C., Gaudreault-Keener, M., Storch, G.A., Holtzman, J. (2006): Genetic variability of human metapneumovirus infection: Evidence of a shift in viral genotype without change in illness. *J.Infect. Dis.*, 193, 396-403.
- [13] Takao, S., Shimozono, H., Kashiwa, H., Shimazu, Y., Fukuda, S., Kuwayama, M., *et al.* (2003): Clinical study of pediatric cases of acute respiratory diseases associated with human metapneumovirus in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 56, 127-129.
- [14] 菊田英明 (2006): ヒト・メタニューモウイルス, *ウイルス*, 56(2), 173-182.

- [15] van den Hoogen, B.G., Osterhaus, A.D.M.E., Fouchier, R.A.M. (2004): Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *Pediatr. Infect. Dis.*, 23, S25-S32.
- [16] Skiadopoulos, M.H., Biacchesi, S., Buchholz, U.J., Riggs, J.M., Surman, S.R., Amaro-Crambo, E., *et al.* (2004): The two major human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically, and fusion (F) protein is a major contributor to this antigenic relatedness. *J. Virol.*, 78(13), 6927-6937.
- [17] van den Hoogen, B.G., Herfst, S., Sprong, L., Cane, P.A., Forleo-Neo, E., de Swart, R.L., *et al.* (2004): Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg. Infect. Dis.*, 10(4), 658-666.
- [18] Walsh, E.E., McConnochie, K.M., Long, C.E., Hall, C.B. (1997): Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain. *J. Infect. Dis.*, 175, 814-820.
- [19] Tsutsumi, H., Onuma, M., Suga, K., Honjo, T., Chiba, Y., Chiba, S., *et al.* (1998): Occurrence of respiratory syncytial virus subgroup A and B strains in Japan, 1980 to 1987. *J.Clin.Microbiol.*, 26(6), 1171-1174.
- [20] Peret, T.C.T., Hall, C.B., Hammond, G.W., Piedra, P.A., Storch, G.A., Sullender, W.M., *et al.* (2000): Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. *J. Infect. Dis.*, 181, 1891-1896.