

Human Metapneumovirus の検出方法の開発と検出状況

伊藤 文明 山本美和子 野田 衛^{*1} 池田 義文
松本 勝^{*2}

我々は, Human Metapneumovirus (hMPV) の検出に Real-Time PCR を用い, 広島市域における流行状況の把握を目的として検査を行なった。

hMPV の検出状況は、391 検体中 41 検体 (10.5%) から hMPV 遺伝子が検出された。月別にみると、1 月から 8 月まで検出され、3 月が最も多く 46 検体中 17 検体 (37.0%) であった。臨床診断名別に見ると、検出率が最も高いのは、RS ウィルス感染症で 50% (1/2), 百日咳で 45.4% (5/11), その他の呼吸器系感染症が 12.5% (25/200) であった。

今回の調査で広島市域においても 3 月をピ-クとして検出されており、毎年同時期に流行している可能性もあり、今後とも継続していく必要があると考えられた。

キーワード： メタニューモウイルス, Metapneumovirus, hMPV, PCR, Real-Time PCR 法

はじめに

2001 年にオランダで急性呼吸器感染症の原因ウイルスとして Paramyxoviridase に属するウイルスが発見され, Human Metapneumovirus (hMPV) と命名された¹⁾。日本においては, 2003 年に後藤ら²⁾により hMPV の検出が報告され, その後, 鈴木ら³⁾が喘息様疾患の患者から hMPV 検出した症例について報告し, その存在が明らかになり, 高尾らの報告⁴⁾により本邦での流行の可能性が指摘されているが, 感染および流行状況など疫学的な実態については未だ明らかではない。

広島市においては, 感染症発生動向調査事業で当所に搬入される呼吸器感染症の検体について, 細胞培養法など今までの方法ではウイルスが検出されないが, 臨床症状から hMPV が疑われるものが散見される。このような状況の中, hMPV について検査可能な方法を確立し, 広島市域における流行状況を把握することを目的として Real-Time PCR を用いて検査実施したので報告する。

方 法

1 対象

2006 年 1 月から 12 月に広島市感染症発生動向調査事業における病原体検査の目的で呼吸器感染

症と診断あるいは疑われた患者から採取された咽頭拭い液, 鼻汁のうち HEF, HEp2, RD18S, Vero, MDCK の 5 種類の培養細胞で分離陰性の 391 検体 (391 人) を用いた。

陽性コントロールは, 広島県立総合技術研究所の高尾信一先生より分与された hMPV 株を用いた。

2 PCR 法による hMPV 遺伝子の検出

拭い液からのウイルス RNA 抽出は, 拭い液 70 μl を QIAamp RNA Mini kit (Qiagen) を用い抽出し, 精製 RNA を 70 μl の溶出液に回収した。逆転写反応は, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits

表 1 RT 反応液の組成と反応条件

試薬	容量(μl/tube)
10X RT buffer	10
25X dNTPs (100mM)	4
10X random primers	10
oligo dT(0.5ug/μl)	1
DW	20
template RNA	50
MultiScribe RT	5
Total reaction volume	100

反応条件

25 10min. 37 60min. 95 5min. 4

*1 : 現 国立医薬品食品衛生研究所

*2 : 退職

表2 Real-Time PCR のプライマー

プライマー	塩基配列	
センス NL-N_f-s	GCATGCTATATTAAAAGAGTCTC	
アンチセンス NL-N_r-s	TCTGCAGCATATTGTA(A/G)TCAG	
プローブ NL-N	FAM-6-5'-TG(C/T)AATGATGAGGGTGTCACTGC(G/A)GTTG-3'-TAMRA	

表3 Real-Time PCR 反応液の組成および反応条件

1 Real-Time PCR 反応液組成 (50 μl 系)

試薬	容量
100pmol/μl センスプライマ -	0.2 μl
100pmol/μl アンチセンスプライマ -	0.3 μl
100pmol/μl Taq Man Probe	0.1 μl
DW	19.4 μl
Taq Man Universal Master Mix	25 μl

2 反応条件

温度	時間	回数
95	10 分	1 回
95	15 秒	
55	1 分	50 回

(ABI)を用い,精製RNA液50 μlからcDNAを合成した。逆転写反応液にはオリゴdT (Invitrogen)を添加した。反応液組成及び反応条件を表1に示す。

PCR法は,高尾ら⁴⁾の報告したもの用い,Real-Time PCR法はJeroen Maertzdorfら⁵⁾の報告したプライマー及びTag Manプローブを一部改変し,hMPV遺伝子の確認を行った。Real-Time PCRは,9500 Real-Time PCR System (ABI)を用い,反応は50 μl系でTaq Man Universal Master Mix (ABI)により行った。プライマー,TagManプローブの塩基配列を表2に,反応液組成および反応条件を表3に示す。

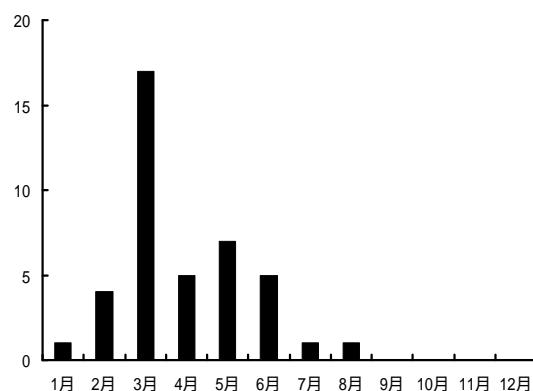


図1 hMPV月別検出状況(2006年)

結 果

1 プライマーとプローブの評価

我々が使用したReal-Time PCR用プライマー及びTagManプローブは,高尾ら⁴⁾の報告したプライマーによるPCRの結果と陽性コントロールで一致し,感度は1管当たり10個あれば検出可能であった。

2 月別検出状況

hMPV遺伝子は,391検体中41検体(10.5%)から検出された。検出されたhMPV 41検体の月別検出状況を図1に示す。

hMPVの検出状況を月別にみると,1月から8月まで検出され,検出数は3月が最も多く41検体中17検体(41.5%)から検出された。次に5月が7検体(17.1%),4月と6月が各5検体(12.2%),2月が4検体(9.8%),1月,7月,8月が各1検体検出され,9月から12月は検出されなかった。hMPVは,2月から6月の5ヶ月で92.7%から検出された。

月別の検査検体数と検出数を表4に示す。

表4 月別検査数とhMPV検出数及び検出率(2006年)

	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
検体数	24	22	46	31	49	59	37	30	37	11	16	29	391
検出数	1	4	17	5	7	5	1	1	0	0	0	0	41
検出率(%)	4.2	18.2	37.0	16.1	14.3	8.5	2.7	3.3	0	0	0	0	10.5

表5 臨床診断名別検出状況(2006年)

	計	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9-12月
百日咳	検出数	5	-	-	5	-	-	-	-	-
	検体数	11	-	1	5	3	-	-	1	-
咽頭結膜熱	検出数	5	-	-	3	1	-	1	-	-
	検体数	92	4	2	5	2	1	3	11	8
インフルエンザ	検出数	3	-	2	-	1	-	-	-	-
	検体数	20	6	7	2	3	1	-	-	1
A群溶連菌咽頭炎	検出数	1	-	-	-	1	-	-	-	-
	検体数	13	1	-	3	1	2	3	2	-
RSウイルス感染症	検出数	1	1	-	-	-	-	-	-	-
	検体数	2	1	1	-	-	-	-	-	-
ヘルパンギーナ	検出数	1	-	-	-	-	-	-	1	-
	検体数	10	1	-	-	1	2	2	2	-
その他呼吸器疾患	検出数	25	-	2	9	2	7	4	1	-
	検体数	200	8	6	21	16	36	44	18	20
計	検出数	41	1	4	17	5	7	5	1	1
	検体数	348	21	17	36	26	42	52	34	30
										90

検出割合が最も検出割合が大きい月は3月で37.0% (17/46)であった。次が2月で18.2% (4/22), 4月 16.1% (5/31), 5月 14.2% (7/19), 1月 4.1% (1/22), 8月 3.3%, 7月 2.7% (1/37)の順で, 9月から12月の93検体からはHMPVは検出されなかった。

3 臨床診断名別検出状況

HMPVが検出された臨床診断名別検出状況を表5に示す。

臨床診断名別に見ると その他の呼吸器系疾患を含む7疾患 348検体中 41検体からHMPVが検出された。検出数が最も多いのは, 百日咳と咽頭結膜熱で各5検体から検出され, インフルエンザ3検体, RSウイルス(RSV)感染症, A群溶連菌咽頭炎, ヘルパンギーナ各1検体から検出された。その他の呼吸器系疾患は25検体から検出された。

百日咳は, 3月に検査した5検体(5/5)すべてから検出した。咽頭結膜熱も3月の検出率が高く60% (3/5)で, 4月, 6月に1検体検出された。インフルエンザからは2月2検体, 4月1検体から検出された。RSV感染症は1月1検体, ヘルパンギーナからは8月に1検体検出された。年間を通しての検出率は百日咳 45.4% (5/11), 咽頭結膜熱 5.4% (5/92), インフルエンザ15% (3/20), A群溶連菌7.7% (1/13), RSV感染症 50% (1/2), ヘルパンギーナ 10% (1/10),

その他の呼吸器系感染症が 12.5% (25/200)であった。これら7疾患で 11.8% (41/348)の検出率であった。最も検出数の多い3月をみると47.2% (17/36)がHMPVであった。

考 察

HMPV感染症は, 春期を中心に流行する感染症であるとの報告⁴⁾がなされている。今回, 我々が1年間調査した結果でも, 3月をピークとし2月から6月に検出数が多く, 1月から8月まで検出され, 春先を中心に行なっている可能性が示唆された。

臨床診断名別に見ると, 百日咳, 咽頭結膜熱, インフルエンザ, A群溶連菌, RSV感染症, ヘルパンギーナの6疾患からHMPVが検出された。また, その他の呼吸器疾患からの検出も多く, その臨床症状は, 軽い上気道炎から喘息用疾患, 気管支炎, 肺炎などであった。

今回の調査で広島市域において3月をピークとして検出されており 每年同時期に流行し, 集団発生の可能性もあり 今後とも継続して調査する必要があると考えられた。

本研究は, 広島市衛生研究所18年度調査研究課題として実施したものである。(19年度継続)

文 献

- 1) van den Hoogen BG et al: A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease, Nat med, 7, 719 ~ 724(2001)
- 2) 後藤郁男 他 : インフルエンザ様患者からの Human metapneumovirus の分離 - 宮城県 -, 24, 64 ~ 65(2003)
- 3) 鈴木 陽 他 : 端息をきたした小児からの human metapneumovirus の検出. 感染症誌, 77, 467 ~ 468(2003)
- 4) 高尾信一 他 : 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(2004)
- 5) Jeroen Maertzdorf et al : Real-Time Reverse transcriptase PCR assay detection of Human Metapneumovirus from all known genetic lineages. J Clin Microbiol, 42, 981 ~ 986(2004)