

ヒト・メタニューモウイルス感染症

Human metapneumovirus:hMPV

きく た ひで あき
菊 田 英 明
Hideaki KIKUTA

はじめに

呼吸器感染症の原因ウイルスとして、RSウイルス、パラインフルエンザウイルス、インフルエンザウイルスなど知られているが、未だ原因不明とされる呼吸器感染症が数十%存在している。2001年、RSウイルスと同様の臨床症状を呈する小児から、新しいウイルスとしてヒト・メタニューモウイルスが発見され、呼吸器感染症の中の5~10%を占めていることが明らかとなった。また、このウイルスは2003年に重症急性呼吸器症候群(severe acute respiratory syndrome: SARS)の病原体として発見されたSARSコロナウイルス、高病原性トリ・インフルエンザウイルスと異なり、最近新たにヒトに感染したウイルスではなく、以前からヒトの間で流行してきたウイルスであり、世界中に存在し、単に今まで発見されなかったウイルスであると推測されている。さらに、呼吸器感染症を起こすウイルスとして、2004、2005年にヒトコロナウイルスNL63、HKU1が次々と発見された。今後も、呼吸器感染症を起こすウイルスの発見が期待される。今回、ヒト・メタニューモウイルスのウイルス学的特徴、ウイルス検出法、小児の臨床症状、動物モデルなどについて解説する。

I. ウイルス学的特徴

1. 分類

ヒト・メタニューモウイルス (Human metapneu-

movirus: hMPV) は13.35kbのマイナス鎖のssRNAウイルスで、大きさは150~600nm、形状は多形性もしくは球形でエンベロープを有し13~17nmの突起構造をもつ。パラミクソウイルス科(Family Paramyxoviridae)、ニューモウイルス亜科(Subfamily Pneumovirinae)、メタニューモウイルス属(Genus *Metapneumovirus*)に属する。赤血球凝集能を欠き、RSウイルス(respiratory syncytial virus: RSV)と同じニューモウイルス亜科に属し、塩基配列の類似性からメタニューモウイルス属に分類された¹⁾。これまでメタニューモウイルス属にはトリに感染するトリ・ニューモウイルス(avian pneumovirus: APV)しか発見されていなかったが、今回発見されたウイルスはヒトに感染する初めてのメタニューモウイルスである。APVには4種類のサブグループ(A, B, C, D)が存在するが、hMPVのアミノ酸配列は、そのうちのサブグループCに最も類似しているが、トリには感染しない。現在までに発見されているヒトのウイルスの中で遺伝子が一番似ているウイルスは、臨床症状も似ているRSVである。

2. 遺伝子構造

hMPVの遺伝子は、RSVと異なり2個の非構造蛋白を欠き、APVと同様の8個の遺伝子をもち、3'側からN-P-M-F-M2-SH-G-Lの順番の遺伝子配列を示す²⁾。M2にはM2-1とM2-2の2個のORFが存在する。

ウイルス表面には、F, G, SH蛋白が存在する。F蛋白は融合蛋白のことで細胞膜同士が融合し合胞体の形成に、G蛋白はレセプターとの吸着に関連する

と推定されている。ウイルスの中央にはウイルス RNA とコンプレックスを形成する N, P, L 蛋白が存在し, N 蛋白は nucleoprotein でゲノム RNA とヌクレオカプシドを形成する。P 蛋白と L 蛋白それぞれ phosphoprotein と large polymerase protein のことで, 転写酵素活性をもつ。エンベロープとヌクレオカプシドの間には matrix protein である M 蛋白と M2 蛋白が存在する。最近の研究から, G, SH, M2-2 遺伝子はウイルス増殖に必須の遺伝子ではないことが分かってきた。レセプターに吸着するのに必要と考えられる G 蛋白がなくとも, 感染が成立することから G 蛋白を介さない感染経路の存在が推測される。

遺伝子の系統樹解析から, RSV と同様に大きく 2 つのグループ (グループ 1, 2: 最近グループ A, B と呼ばれている) に分かれる²⁻⁴⁾。さらにそれぞれのグループが 2 つのサブグループ (サブグループ A, B: 最近サブグループ 1, 2 と呼ばれている) に分かれる。塩基配列から予想される N, P, M, F, M2 蛋白のアミノ酸の配列は 2 つのグループ内でよく保たれているが, SH, G 蛋白のアミノ酸配列はグループ内で大きな差異が存在するが, サブグループ内ではアミノ酸配列はよく保たれている。

II. ウイルス検出法

1. 抗原検出

鼻咽頭スワブの細胞を, 単クローン抗体を使用し蛍光抗体間接法で hMPV 抗原の検査を行った。上皮細胞と思われる細胞に hMPV 抗原が検出され, 鼻咽頭粘膜の上皮細胞でウイルスが増殖していると推測された。特異性は 97% と高かったが, 感度は Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR 法) と比較して 73% と低く, ウイルス検出法としては適していなかった⁵⁾。

2. hMPV RNA 検出および遺伝子解析

現在, ウイルスの証明には, 鼻咽頭スワブから RNA を取り cDNA を合成し, F, N, L 遺伝子などのよく保存された部位の遺伝子増幅を行う RT-PCR 法で, ウイルス RNA を検出することが一番感度の高い方法である。さらに PCR 産物の塩基配列を行い系統樹解析で, グループ, サブグループを決定し

ている。

現在まで, 世界各国から hMPV の検出の多くの報告がある。著者らの行ったインフルエンザウイルス, RSV 感染を迅速診断キットで除外した呼吸器感染症の患児から, 1 年間に収集した鼻咽頭スワブ 426 検体での hMPV の陽性率は 8.8% であった⁶⁾。この陽性率は, 今まで報告されている陽性率と一致しており, 本邦における 1 年間の呼吸器感染症の中で hMPV が原因と考えられる呼吸器感染症の頻度と思われる。既知の呼吸器ウイルスを除外し, このウイルスの流行時期の 3 カ月間に収集した 38 検体での陽性率は 63.1% であった。この頻度は, hMPV の流行時期においては, 今まで原因不明とされてきた呼吸器感染症の約半分が, hMPV が原因で発症している可能性を示唆している。

hMPV が検出された呼吸器感染症の児は 1 ~ 2 歳が最も多く, 平均年齢は 2 歳 6 カ月であり, 乳幼児期に hMPV の感染を受けていることが示唆された。ウイルス排泄は, 発症後 1 ~ 2 週間持続していた。また, 院内感染を起こした患児の検査から, 潜伏期間は 4 ~ 6 日と推測された。流行時期は, 本邦においては 3, 4, 5 月の限られた時期であった。ただし, 夏にも検出される症例があったことは通年性に存在する可能性がある。また, 流行時期に札幌と広島という離れた地区で, 2 つのグループの hMPV 株が同時に流行していた。

3. ウイルス分離

研究開始時は, アカゲザルの腎臓からコラゲナーゼ処理により浮遊細胞を採取し, 継代 3 代目の腎臓細胞を使用してウイルス分離を行っていた。その後, LLC-MK2 細胞でもウイルス増殖が良好であることから, 現在この細胞株を使用するのが一般的である。2001 年まで, このウイルスが発見されなかった理由として, 以下の 3 つが考えられる。第 1 に, このウイルスに感受性のある細胞が少ないこと。第 2 に, 牛血清を除き, さらにトリプシン存在下で 2 ~ 3 週間と非常に長い期間の培養が必要であること。第 3 に, ウイルス感染を示す細胞変性の判断が難しいこと, である。最近, すべての hMPV 株が培養時にトリプシンを必要とするものではなく, F 蛋白のアミノ酸 1 個の違いにより必要性が変化するという報告がある。

一般的にウイルス分離がウイルス証明のゴールドスタンダードであるが、このウイルスを分離することは難しい。著者らも、RT-PCR法で陽性であった検体の約1/3からしかウイルス分離には成功しなかった⁶⁾。このことは、現在、培養によりウイルスを分離することが、診断のゴールドスタンダードではないと考えられる。

Ⅲ. 抗体検査

1. hMPV 感染 LLC - MK2 細胞を用いた 蛍光抗体間接法

抗体の検査法には蛍光抗体間接法、酵素免疫法、中和法などの報告があるが数カ所からの報告があるのみである。著者らは、LLC-MK2細胞にhMPVを感染させ、これを抗原として蛍光抗体間接法で抗体価を測定している。その結果は、IgG抗体陽性率は、移行抗体が消失する6カ月以上1歳未満では17%と最も低く、その後は次第に上昇し、10歳以上では全例陽性となっていた。このことから、日本では6カ月頃から感染が始まり、遅くとも10歳までに一度は全員が感染すると推測された(図1)⁷⁾。

RT-PCRでhMPVが検出された呼吸器感染症の血清26例中、約半数は、急性期にすでにIgG抗体が存在し再感染、残り半分はIgG抗体は急性期に陰性であるが、回復期に陽性となり初感染と推測された。IgM抗体は初感染、再感染いずれでも検出されることがあり、初感染、再感染の鑑別には使用できなかった⁶⁾。以上の結果から、再感染が小児期

においても頻繁に起きていることが証明された。再感染を繰り返す理由としては、hMPV感染の再感染を防ぐのに十分な免疫が1回の感染では得られない可能性が推測された⁸⁾。

2. バキュロウイルスを用いた蛍光抗体間接法

F蛋白を組み込んだバキュロウイルスをTn5細胞に感染させてF蛋白を発現させ、この細胞を用い蛍光抗体間接法によりヒト血清中のF蛋白に対する抗F蛋白抗体価を測定する検査法を開発した⁹⁾。このバキュロウイルスを用いた方法は、従来のhMPV感染LLC-MK2細胞を用いた蛍光抗体間接法と比較し、短時間で感染細胞を準備することができ、抗体価がよく相関し、より感度が高く、今後これを用いた検査が行われるであろう。また、ヒト血清中の抗F蛋白抗体はhMPVに対する抗体の主要な部分を占め、これが中和活性をもつことが推測された。

Ⅳ. 動物モデル

近年、hMPVは、サル、ラット、ハムスター、シロイタチ、マウスなどに感染することが分かり、これら動物を使用してhMPV感染症の病態、免疫応答、ワクチンの開発などが報告されている¹⁰⁻¹⁶⁾。これら動物への感染実験によると、hMPVの経気道感染により、数日後から上気道、下気道でのウイルス増殖が始まり、2週間程度持続するとされた。この結果は、hMPV感染症の患者における潜伏期間、

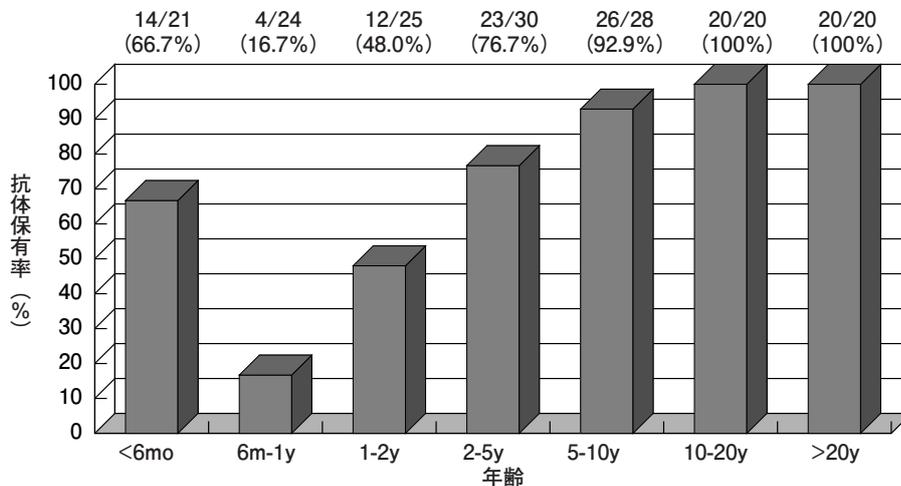


図1 抗hMPV抗体保有率

ウイルス排泄期間と一致していた⁶⁾。これら動物で hMPV に感染している細胞は、主に上気道、下気道の睫毛上皮細胞であり、まれにタイプ 1 型の肺胞細胞、マクロファージに限られていた。呼吸器以外の組織でのウイルス増殖はみられない。臨床での患者の鼻咽頭スワブの上皮細胞と思われる細胞に hMPV 抗原を検出した結果と一致していた⁵⁾。病理所見としては、鼻腔、気管、細気管支の睫毛上皮細胞の糜爛、破壊、細胞構築の乱れ、細胞間の浮腫、気道の周辺に好中球の細胞浸潤、肺胞内への細胞浸潤などが認められた。また、動物実験で、hMPV の感染により気道過敏性が生じることは、臨床での喘鳴の発症、気管支喘息の増悪などを示唆する報告である。hMPV の F 蛋白に対する抗体は中和活性をもっていること、また NK, T 細胞を欠損させたマウスでは、ウイルスの排泄期間が長くなるという報告があり、免疫不全状態において hMPV 感染症が重症化する可能性があることを示唆している。

hMPV のワクチンとして、パラインフルエンザ 3 型のワクチンに hMPV の F 遺伝子を付けたワクチン、SH, G, M2-2 の欠損させたウイルスが報告されている¹⁴⁻¹⁶⁾。これらのワクチンにより、中和抗体、細胞傷害性 T 細胞が誘導されることが示されている。また、これらワクチンが hMPV グループ 1, 2 の両方を予防できることも示された。この結果は、著者らが作成した、F 蛋白に対する単クローン抗体がグループ 1, 2 の両方に中和活性をもっていたこ

と一致している¹⁷⁾。

V. 臨床症状

臨床症状は RSV に極めて類似しており、特に乳幼児の喘鳴をきたす疾患（細気管支炎、喘息様気管支炎など）と hMPV との関係を示す報告が多い^{18, 19)}。著者らが RT-PCR 法で hMPV を検出した 61 例の患児の臨床診断は、喘鳴を伴う気管支炎いわゆる喘息様気管支炎が 38% と一番多く、その他、上気道炎、気管支炎、肺炎であった⁶⁾。2 つのグループの違いによる臨床症状の重症度に有意の差を認めなかった。合併症として、急性中耳炎、気管支喘息の増悪、熱性痙攣、急性胃腸炎などがみられた。臨床症状は、発熱（平均：4.7 日）、咳嗽、鼻汁がいずれも 90% 以上の患児でみられ、その他、呼吸困難、嘔吐、下痢、頭痛がみられた。理学所見は、呼吸音のラ音聴取、喘鳴（平均：5.3 日）、咽頭発赤、陥没呼吸、チアノーゼであった（図 2）。胸部 X 線単純写真では、約 25% に気管支周囲の浸潤陰影または肺胞浸潤陰影も認めた。血液検査では、特異的な変化はなく、白血球数、CRP の変化も、一般的なウイルス感染症の検査結果を示した。

低出生体重児、高齢者、骨髄移植などの免疫不全状態の患者では重症の下気道感染症の原因となる^{20, 21)}。健康成人は急性上気道感染症であることが多いが、気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive

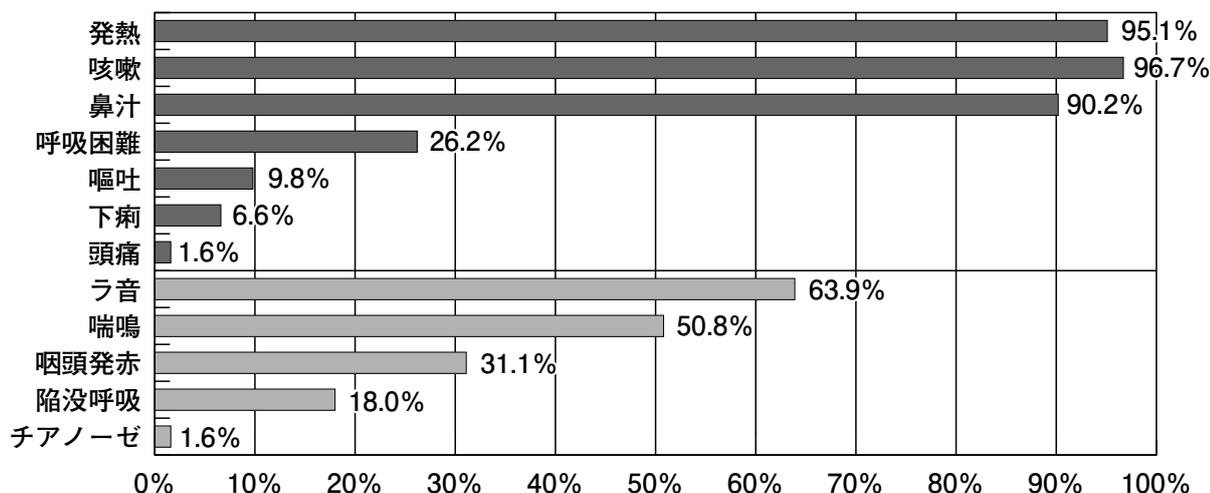


図 2 hMPV 感染者 (61 例) の臨床症状理学所見

pulmonary disease: COPD) の患者の急性増悪に hMPV が関与するという報告もある²²⁾。

動物実験などからも、ウイルス増殖は呼吸器に限られ、ウイルス血症は起こさないものと考えられるが、hMPV による上気道炎の後、脳炎／脳症を引き起こし、剖検で肺と脳組織から hMPV RNA が証明された 1 歳の幼児が報告されている。今後、原因不明の脳炎／脳症の原因の 1 つに hMPV も考慮しなければならない²³⁾。

VI. RSV との比較

呼吸器感染症の中で、hMPV 感染症は RSV 感染症より頻度は少なく、hMPV と RSV の抗体保有率を比較すると、4 カ月～1 歳では hMPV の抗体保有率が低く、RSV が hMPV より早期に初感染を起こすと推測される²⁴⁾。hMPV と RSV 感染症の臨床症状および検査所見はほぼ同様であるとの報告が多く、個々の症例において臨床的に鑑別できないが、hMPV 感染症は RSV 感染症より、高熱が多く、喘鳴は同程度にみられるという報告が多い。また、RSV の方が、やや重症であるとする報告が多い。

hMPV と RSV が重感染を起こすと、呼吸器感染症が重症化するという報告がある。RSV による重症の細気管支炎患者 30 例の 70% で、肺胞洗浄液中に hMPV が検出され、RSV による細気管支炎に hMPV が重感染すると重症化するという²⁵⁾。また、他の報告では 3 歳以下の ICU 入院患者 85 例のうち 18% が hMPV 感染を起こしており、このうち RSV との重感染が 60% に認められたという。一方、ICU にいかなかった RSV 感染症の患者 120 例で hMPV は感染していなかった。このことから、重感染が気道感染症の重症化に関係するという²⁶⁾。以上のように、hMPV 感染症は RSV 感染症の重症化のリスク因子であることを示唆する報告が多いが、RSV 感染症の重症化に hMPV の重感染は影響を及ぼさないとする報告もあり、今後より詳細な検討が必要と考えられる。

患者の鼻汁中の炎症性サイトカイン (IL-12, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL8, IL-10) を調べた報告では、hMPV 感染では RSV やインフルエンザ感染と比較してこれらサイトカインの鼻汁中の量は少なく、hMPV と RSV による免疫反応が異なることが

示唆されている²⁷⁾。また最近、動物の感染実験で hMPV による IFN- α 産生が RSV より多いという報告がある。

VII. 診断法

臨床的には、乳幼児が春に喘鳴、発熱を伴う気道感染症で受診し、RSV が迅速診断キットで陰性の場合、hMPV 感染症を疑う必要がある。その患児の鼻咽頭スワブ中に RT-PCR で hMPV RNA が検出できたら、キャリアーは少ないため、hMPV 感染症と診断してよい。さらに、急性期の血清で抗 hMPV 抗体が陰性であれば初感染、陽性であれば再感染と考えられる。RT-PCR の検査ができない場合でも、抗 hMPV 抗体の陽転化がみられたときは初感染と診断してよいが、抗 hMPV 抗体のみで再感染を診断することは現在困難である。現在、一般臨床の場で RSV、インフルエンザウイルスのように、hMPV 感染症を迅速に診断できる検査法はなく、迅速診断キットの開発が必要と考えられる。

おわりに

以上、hMPV は RSV と同様に、乳幼児の急性呼吸器感染症、特に喘鳴をきたす疾患の重要な原因ウイルスであり、RSV 同様このウイルスの重要性が明らかになった。現在、ウイルスの証明は、RT-PCR 法による hMPV RNA の検出が最も鋭敏な検査法であり、初感染、再感染の鑑別には血清学的診断が必須である。

文 献

- 1) van den Hoogen B.G., de Jong J.C., Groen J., et al.: A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 7: 719-724, 2001.
- 2) van den Hoogen B.G., Bestebroer T.M., Osterhaus ADME, et al.: Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology* 295: 119-132, 2002.
- 3) Biacchesi S., Skiadopoulos M.H., Boivin G., et al.: Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology* 315: 1-9, 2003.
- 4) Ishiguro N., Ebihara T., Endo R., et al.: High genetic diversity of the attachment (G) protein of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* 42: 3406-3414, 2004.

- 5) Ebihara T., Endo R., Ma X., et al.: Detection of human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal secretions by an immunofluorescent antibody test. *J Clin Microbiol* **43**: 1138-1141, 2005.
- 6) Ebihara T., Endo R., Kikuta H., et al.: Human metapneumovirus infection in Japanese children. *J Clin Microbiol* **42**: 126-132, 2004.
- 7) Ebihara T., Endo R., Kikuta H., et al.: Seroprevalence of human metapneumovirus in Japan. *J Med Virol* **70**: 281-283, 2003.
- 8) Ebihara T., Endo R., Ishiguro N., et al.: Early reinfection with human metapneumovirus in an infant. *J Clin Microbiol* **42**: 5944-5946, 2004.
- 9) Ishiguro N., Ebihara T., Endo R., et al.: Immunofluorescence assay for detection of human metapneumovirus-specific antibodies by means of baculovirus-expressed fusion protein. *Clin Diag Lab Immunol* **12**: 202-205, 2004.
- 10) Kuiken T., van den Hoogen B.G., van Riel DAJ, et al.: Experimental human metapneumovirus infection of *Cynomolgus* Macaques (*Macaca fascicularis*) results in virus replication in ciliated epithelial cells and pneumocytes with associated lesions throughout the respiratory tract. *Am J Pathol* **164**:1893-1900, 2004.
- 11) MacPhail M., Schickli JH, Tang R.S., et al.: Identification of small-animal and primate models for evaluation of vaccine candidates for human metapneumovirus (hMPV) and implications for hMPV vaccine design. *J Gen Virol* **85**: 1655-1663, 2004.
- 12) Alvarez R., Harrod K.S., Shieh W.J., et al.: Human metapneumovirus persists in BALB/c mice despite the presence of neutralizing antibodies. *J Virol* **78**:14003-14011, 2004.
- 13) Hamelin M.-È., Yim K., Kuhn K.H., et al.: Pathogenesis of human metapneumovirus lung infection in BALB/c mice and cotton rats. *J Virol* **79**: 8894-8903, 2005.
- 14) Tang R.S., Schickli J.H., Mia M., et al.: Effects of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus antigen insertion in two 3' proximal genome positions of bovine/human parainfluenza virus type 3 on virus replication and immunogenicity. *J Virol* **77**: 10819-10828, 2003.
- 15) Biacchesi S., Skiadopoulos M.H., Yang L., et al.: Recombinant human metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and/or attachment G glycoprotein: deletion of G yields a promising vaccine candidate. *J Virol* **78**: 12877-12887, 2004.
- 16) Buchholz U.J., Biacchesi S., Pham Q.N., et al.: Deletion of M2 gene open reading frames 1 and 2 of human metapneumovirus: Effects on RNA synthesis, attenuation, and immunogenicity. *J Virol* **79**: 6588-6597, 2005.
- 17) Ma X., Endo R., Ebihara T., et al.: Production and characterization of neutralizing monoclonal antibodies against human metapneumovirus F protein. *Hybridoma* **24**: 201-206, 2005.
- 18) van den Hoogen B.G., van Doornum GJJ, Fockens J.C., et al.: Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. *J Infect Dis* **188**: 1571-1577, 2003.
- 19) van den Hoogen B.G., Osterhaus D.M., Fouchier R.A.: Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* **23**: S25-S32, 2004.
- 20) Pelletier G., Dery P., Abed Y., et al.: Respiratory tract reinfections by the new human metapneumovirus in an immunocompromised child. *Emerg Infect Dis* **8** : 976-978, 2002.
- 21) Ulloa-Gutierrez R., Skippen P., Synnes A., et al.: Life-threatening human metapneumovirus pneumonia requiring extracorporeal membrane oxygenation in a preterm infant. *Pediatrics* **114**: e517-e519, 2004.
- 22) Hamelin M.E., Cote S., Laforge J., et al.: Human metapneumovirus infection in adults with community-acquired pneumonia and exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Infect Dis* **41**: 498-502, 2005.
- 23) Schildgen O., Glatzel T., Geikowski T., et al.: Human metapneumovirus RNA in encephalitis patient. *Emerg Infect Dis* **11**: 467-470, 2005.
- 24) Ebihara T., Endo R., Kikuta H., et al.: Comparison of seroprevalences of human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus. *J Med Virol* **72**: 304-306, 2004.
- 25) Greensill J., McNamara P.S., Dove W., et al.: Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis* **9** : 372-375, 2003.
- 26) Konig B., Konig W., Arnold R., et al.: Prospective study of human metapneumovirus infection in children less than 3 years of age. *J Clin Microbiol* **42**: 4632-4635, 2004.
- 27) Laham F.R., Israele V., Casellas J.M., et al.: Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy. *J Infect Dis* **189**: 2047-2056, 2004.