

ムンプスウイルスの遺伝子型について

齊加志津子, 小川 知子, 岡田 峰幸, 窪谷 弘子, 一戸 貞人

Genotypes of mumps virus

Shizuko SAIKA, Tomoko OGAWA, Mineyuki OKADA
Hiroko KUBONOYA and Sadato ICHINOHE

1. はじめに

ムンプスウイルスは流行性耳下腺炎の原因ウイルスである。日本では1970年代に弱毒生おたふくかぜワクチンが開発され、現在任意接種で使用されている。ムンプスウイルスの血清型は単一であるが、遺伝子型は変化しており現在A~Jの10型に分類されている^{1,2,3,4)}。ワクチンが開発されて30年以上が経過しており、遺伝子型の変異がワクチンの効果に影響することが考えられる。現在のムンプスウイルスの流行株の性状を把握するため分離株の遺伝子型を調べた。

2. 材料と方法

1) 検体

臨床的に流行性耳下腺炎と診断された患者から同意を得た上で咽頭拭い液を採取した。咽頭拭い液はイーグルMEMに牛胎児血清(FCS) 5%を加えた検体採取液中に採取した。

2) ウイルス分離

24穴プレートにVero細胞の単層細胞を形成させ、そこに患者咽頭拭い液0.2mlを接種した。37°C1時間吸着後維持培地(2% FCS加イーグルMEM培地)を加え37°Cで培養した。細胞変性が認められた時、細胞ごと培養液を採取し-80°Cに保存した。1週間観察し細胞変性が認められなかった場合はもう1代継代し同様に試験した。

3) 塩基配列決定

患者から分離されたムンプスウイルス株及び市販ワクチン株(占部⁵⁾、星野⁶⁾、鳥居⁷⁾、NK-M46⁸⁾、宮原⁹⁾、Jeryl Lynn¹⁰⁾)についてSH遺伝子領域の一部の塩基配列を決定した。RNAの抽出はHigh Pure Viral RNA Kit (Roche Diagnostic Co., Germany)、RT-PCRはOne-Step RT-PCR (Invitrogen Co., U.S.A.)、PCR産物の精製はHigh Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostic Co., Germany)をそれぞれ用いて行った。また、シーケンス反応はBig-Dye terminator sequencing Kit ver1.1を用いてABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, U.S.A.)で行った。RT-PCRのプライマーはSH1,5' AGTAG TGTCC ATGAT CTCATとSH2R,5'GCTCA A GCCT TGATC ATTGAを用いた³⁾。また、シーケンス反応

にはSH3,5'GTCGA TGATC TCATC AGGTACを用いた。既にDNA データベース (GENEBANK) に登録されているA~J型それぞれから数株選択し、今回得られた株の塩基配列とともにCLUSTALWを用いて系統樹を作製した。

3. 結果と考察

咽頭拭い液17検体中11検体からムンプスウイルスが分離された。そのうちの10検体について塩基配列を決定した。株の分離場所、分離年及び遺伝子型を表1に、系統樹を図1に示した。1993年埼玉県及び千葉県患者から分離された2株はともにB型、2002年千葉県患者から分離された8株は全てG型であった。Uchidaら²⁾、加藤ら⁹⁾の報告においても最近の分離株はG型が主流であり、今回の千葉県の成績と一致していた。また、ワクチン株についてみると、1963年米国で分離された株に由来するJeryl Lynn株はA型、1960~1970年代に日本で分離された1株及び分離年が明らかでない1株に由来する5株はB型であった(表2)。

表1 分離株の遺伝子型

株名	分離場所	分離年	遺伝子型
Y7/Ja93	埼玉県入間市	1993年	B
K3/Ja93	千葉県千葉市	1993年	B
Chiba826/Ja02	千葉県千葉市	2002年	G
Chiba827/Ja02	千葉県千葉市	2002年	G
Chiba834/Ja02	千葉県千葉市	2002年	G
Chiba843/Ja02	千葉県千葉市	2002年	G
Chiba863/Ja02	千葉県千葉市	2002年	G
Chiba864/Ja02	千葉県千葉市	2002年	G
Chiba872/Ja02	千葉県千葉市	2002年	G
Chiba939/Ja02	千葉県千葉市	2002年	G

表2 ワクチン株の遺伝子型

株名	分離国	分離年	遺伝子型
占部	日本	1967年	B
鳥居	日本	不明	B
星野	日本	1972年	B
宮原	日本	1970年	B
NK-M46	日本	1970年	B
Jeryl Lynn	米国	1963年	A

千葉県衛生研究所

(2004年1月16日受理)

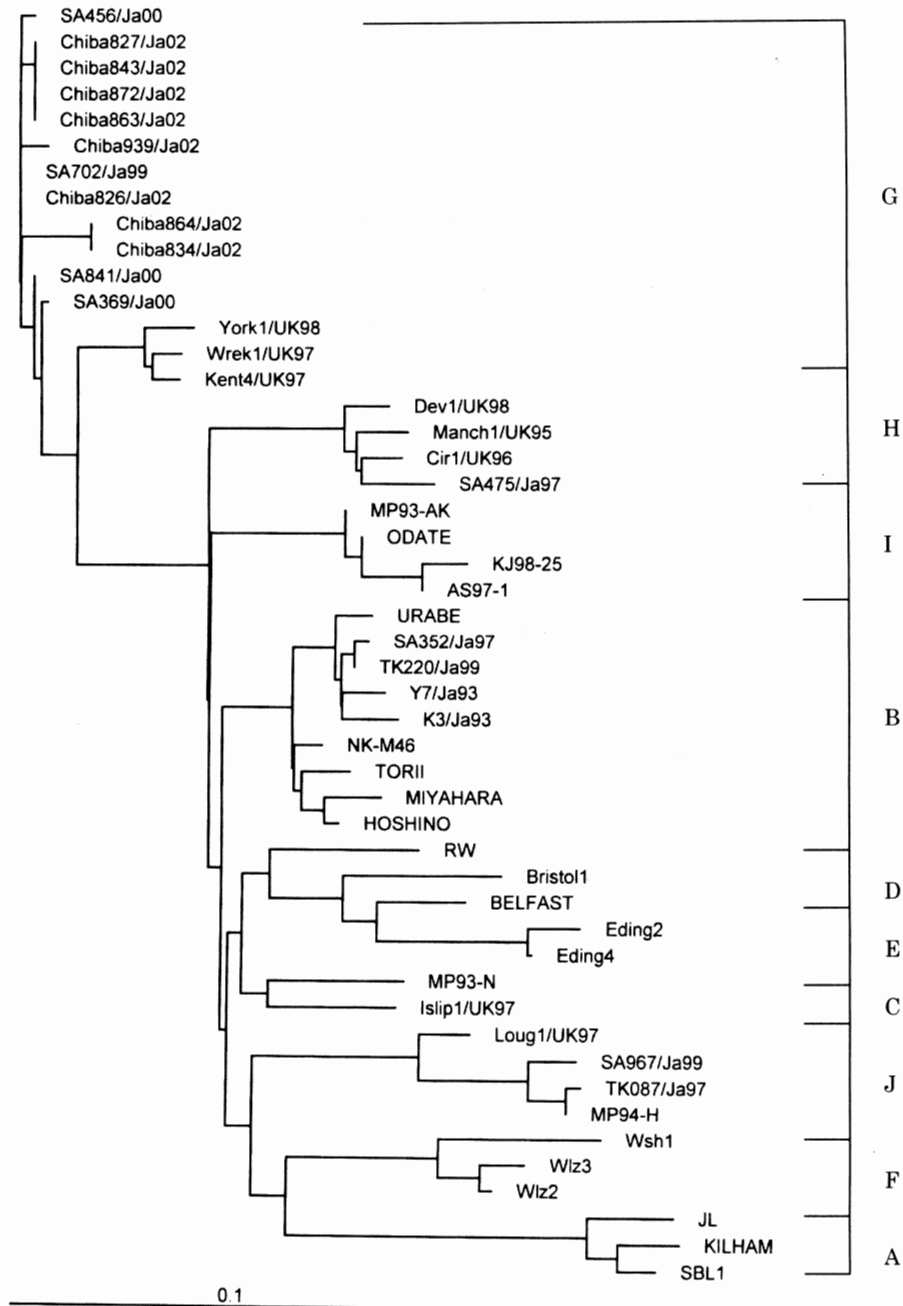


図1 SH遺伝子の塩基配列に基づく系統樹 (NJ法)

ムンプスウイルスのSH遺伝子の機能は核酸塩基の変異による影響を受けにくいので、変異が蓄積されやすく塩基配列の多型を示すので遺伝子型別に用いられている¹⁾。しかしながら、抗原性の変異をみるには、表面抗原であるHNあるいはF遺伝子の変異の情報が必要である。Uchidaら²⁾及び加藤ら³⁾はSH遺伝子と同時にFあるいはHN遺伝子の塩基配列を調べ、FあるいはHN遺伝子にも変異が起きていることを報告している。さらに加藤ら³⁾は、ワクチン株の遺伝子型であるB型のウイルスに対する抗血清を用いてB及びJ遺伝子型ウイルスと中和反応を行い、今のところ抗原性の差は認められていないと報告している。しかしながら、今後抗原性が大きく変異した株が出現する可能性は否定できない。今後HN及びF遺伝子についても検討し、引き続き千葉県での流行株について調査したい。

謝辞

検体採取に御協力いただいた先生方に感謝いたします。

参考文献

- 1) Tecle T, Bottiger B, Orvell C, Johansson B. 2001. Characterization of two decades of temporal co-circulation of four mumps virus genotypes in Denmark: identification of a new genotype. 82, 2675-2680
- 2) Uchida K, Shinohara M, Shimada S, Segawa Y, Hoshino Y. 2001. Characterization of mumps virus isolated in

- Saitama Prefecture, Japan, by sequence analysis of the SH gene. *Microbiol Immunol* 45(12): 851-855
- 3) Uchida K, Shinohara M, Shimada S, Segawa Y, Kimura K. 2003. Characterization of the F gene of contemporary mumps virus strains isolated in Japan. *Microbiol Immunol* 47(2): 167-172
 - 4) 加藤篤, 竹内薫, 久保田耐, 田代真人. 2003. ムンプスウイルスの国内分離状況. *病原微生物検出情報*24(5): 109-110
 - 5) 山西弘一. 1980. おたふくかぜワクチンの長期使用経験. *臨床とウイルス* 8(3): 56-61
 - 6) Sasaki K, Higashihara M, Inoue K, Igarashi Y, Makino S. 1976. Studied on the development of a live attenuated mumps virus vaccine. I. Attenuation of the Hoshino "wild" strain of mumps virus. *Kitasato Arch of Exp Med* 49(1-2):43-52
 - 7) 星野正雄, 西光正彰, 市森有三, 岡右之, 甲野礼作, 山下貢司, 他. 1981. 弱毒ムンプスウイルス鳥居株ワクチン(武田)の開発に関する研究 I. ムンプスワクチン株(鳥居株)の開発とその生物学的性状の解析. *臨床とウイルス* 9(3): 323-330
 - 8) 齊加志津子, 木所稔, 工藤博, 山中隆也, 吉沢重克, 橋爪壯, 他. 1985. 弱毒生おたふくかぜワクチン(千葉血清)の開発に関する研究 I. NK-M46株の開発とその生物学的性状. 1985. *臨床とウイルス*13(3): 367-375
 - 9) 吉川ひろみ, 江藤晶, 緒方和也, 山田昭, 野中實男, 植田浩司, 他. 1984. 弱毒生おたふくかぜ宮原株ワクチン(化血研)の開発に関する研究. I 弱毒生おたふくかぜ宮原株ワクチン(化血研)の生物学的性状. *臨床とウイルス*12(2): 200-211
 - 10) Buynak E B, Hilleman M R, 1966. Live attenuated mumps virus vaccine. I. Vaccine development. *Proc Soc Exp Bio Med* 123: 768-775