

学 位 論 文 題 名

小児ヒトメタニューモウイルス感染症の
ウイルス学的、臨床学的検討

学位論文内容の要旨

<緒言>

2001年、van den HoogenらによりヒトRSウイルス(hRSV)と同様の症状を呈する28人の小児の鼻咽頭から新しいウイルス、ヒトメタニューモウイルス(human metapneumovirus:hMPV)が分離された。その後、いくつかの国でhMPV感染症の報告が相次ぎ、小児だけでなく成人にも感染するcommunity-acquired respiratory virusの一つと報告された。そこで、我々は、日本においてhMPV感染症が存在するかどうかを調べるために、日本人血清における抗hMPV抗体保有率を調べた。また、hRSVとhMPVの初感染はどちらが早いのかを確かめるために、小児(5歳以下)における抗hRSV抗体保有率と抗hMPV抗体保有率を比較した。次に小児hMPV感染症の臨床像を把握するためにhMPV感染症の診断をウイルス分離、reverse-transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)法、血清学的診断にて行い、その臨床像を明らかにした。最後に迅速診断の試みとして鼻汁中のhMPV感染細胞を間接蛍光抗体法にて検出するアッセイを行った。

<材料と方法>

142例の血清(年齢1ヶ月~35歳)を2003年3月~4月、北見赤十字病院にて収集し抗hMPV抗体を間接蛍光抗体法で測定した。間接蛍光抗体法は継代3代目猿腎細胞にhMPVを感染させたものを抗原に用い、10倍未満のものを陰性とした。小児100例の血清(年齢1ヶ月~5歳)を2001年~2002年にかけて、苫小牧王子病院にて収集し、抗hMPV抗体を間接蛍光抗体法で、抗hRSV抗体を中和抗体法にて測定した。抗hRSV中和抗体測定法にはLong strainを使用し、4倍未満のものを陰性とした。

山口、札幌、広島において、658例の鼻咽頭スワブを637例の気道感染症小児より収集し、RT-PCR法を行った。RT-PCR法で陽性であった患児16例から21例の検体を追加収集した。山口では、外来において、2000年6月~2002年9月の間、246例(年齢1ヶ月~13歳)の患児より、札幌では、2002年9月~2003年5月の間、hRSVとインフルエンザウイルスの迅速診断が陰性であった患児353例(入院306例、外来47例、年齢1ヶ月~12歳)より、広島では、hMPVの流行期であった2003年3月~5月において、hRSVとインフルエンザウイルスの迅速診断が陰性でかつ、ウイルス分離で陰性だった38例(年齢8ヶ月~5歳)の患児より検体を収集した。268例の鼻咽頭スワブを用い、継代3代目猿腎細胞にてウイルス分離を行った。血清はRT-PCR法でhMPV陽性の26例の患児より、急性期に26例、回復期に10例を収集した。血清抗hMPV-IgG抗体、IgM抗体は間接蛍光抗体法で測定し、それぞれ、10倍未満を陰性とした。

2004年の4月～5月にかけて、気道感染症のために入院した48例の患児から鼻咽頭スワブを2検体ずつ収集した。一方の検体はRT-PCR法にて、もう一方は間接蛍光抗体法にてhMPVの検出を行った。スワブで採取した上皮細胞にて塗抹標本を作成し、抗hMPVマウスモノクローナルIgG抗体を用いた間接蛍光抗体法にてhMPV抗原の検出を行った。

全ての検体は両親に説明した上で、同意を得てから収集した。

<結果>

日本人142例における抗hMPV抗体保有率は全体で72.5% (102/142) だった。抗hMPV抗体保有率は6ヶ月未満で60% (6/10) だったが、6～12ヶ月では33.3% (3/17) と一度低下し、その後は年齢の増加に伴い上昇し10歳以上で全例が陽性となった。

一般的に母親からの移行抗体が存在する4ヶ月未満では抗hMPV抗体保有率と抗hRSV抗体保有率に有意差を認めなかった。4ヶ月から1歳で抗hMPV抗体保有率は11% (3/27) であり、抗hRSV抗体保有率の48% (13/27) と比較し有意に低かった ($P=0.006$ by Fisher's exact test)。1歳以上の各年齢群における抗体保有率に有意差を認めなかった。

RT-PCR法にて、637例中57例(8.9%)からhMPVが検出された。hMPV陽性率は、山口では0.8%、札幌では8.8%、広島では63.2%であった。臨床診断はWheezy bronchitis (36.9%)、上気道炎(26.3%)、気管支炎(22.8%)、肺炎(14.0%)であった。ウイルス分離を行った268例中7例(2.6%)、RT-PCR法でhMPV陽性であった22例中7例(31.8%)からウイルス分離がされ、RT-PCR法と比べ感度が低かった。hMPV陽性患児より収集した10例のペア血清で抗hMPV-IgG抗体を測定したところ、4倍以上の有意な上昇を認めたのは10例中8例(80.0%)であった。急性期の血清26例中14例(53.8%)は抗hMPV-IgG抗体を認め、hMPV再感染と示唆された。急性期の血清26例中22例(84.6%)は抗hMPV-IgM抗体陽性であったが、コントロール血清100例中11例(11%)が抗hMPV-IgM抗体陽性であり特異度が低かった。hMPV57株はF蛋白遺伝子による系統樹解析により、大きく二つのグループに分かれ、その中でさらに二つのサブグループに分かれた。2003年、3月～5月に札幌、広島においてhMPV(2グループの株)が同時期に流行していた。hMPVのグループ間で入院率に有意差を認めなかった。発症から1～2週間はRT-PCR法でhMPV陽性だった。潜伏期から発症まで4～6日と推定しうる症例があった。

hMPV感染症の迅速診断として、初めて蛍光抗体法を報告した。RT-PCR法と比較した場合、間接蛍光抗体法の感度は73.3%、得異度は97.0%であった。

<考察>

日本においては10歳以上で抗hMPV抗体保有率が100%になったが、日本における抗hMPV抗体保有率はオランダでの抗体保有率(6ヶ月～1歳:25%、1～2歳:55%、2～5歳:70%、5歳以上:100%)とほぼ同様であった。アジアで初めてhMPV感染症の存在を明らかにした。血清学的にhMPVはhRSVより初感染が遅かった。

小児におけるhMPV感染症は幅広い臨床像を取ることが明らかになった。hMPVの陽性率は、外来で他のウイルスを除外せずに検体を収集した山口では0.8%と低く、hRSVとhRSVのみを除外した札幌では8.8%、他のウイルスを除外し、流行期のみ検体を収集した広島では63.2%と高かった。血清学的診断、ウイルス分離と比較してRT-PCR法が最も鋭敏な検査法だった。hMPVのvirus sheddingの持続期間は1～2週間であった。hMPVのグループ間で重症度に有意差を認めなかった。急性期の血清抗

hMPV-IgG 抗体は初感染か再感染かの区別に有用であった。

一般的にウイルス感染症の迅速診断には酵素免疫測定法と蛍光抗体法が用いられる。今回我々の研究により、蛍光抗体法を用いた hMPV 診断は、迅速かつ有用であった。hMPV 感染症の幅広い臨床像を明らかにし、適切な治療を行うためには、臨床応用可能な酵素免疫測定法による迅速診断法の確立が急務である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 正
副 査 教 授 有 川 二 郎
副 査 教 授 瀬 谷 司

学 位 論 文 題 名

小児ヒトメタニューモウイルス感染症の ウイルス学的、臨床学的検討

2001年、ヒトRSウイルス(hRSV)と同様の症状を呈する28人の小児の鼻咽頭からヒトメタニューモウイルス(human metapneumovirus: hMPV)が分離された。申請者は、日本においてhMPV感染症が存在するかどうかを調べるために、日本人血清における抗hMPV抗体保有率を調べた。また、hRSVとhMPVの初感染はどちらが早いのかを確かめるために、小児(5歳以下)における抗hRSV抗体保有率と抗hMPV抗体保有率を比較した。次に小児hMPV感染症の臨床像を把握するためにhMPV感染症の診断をウイルス分離、reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)法、血清学的診断にて行い、その臨床像を明らかにした。最後に迅速診断の試みとして鼻汁中のhMPV感染細胞を間接蛍光抗体法にて検出するアッセイを行った。

142例の血清(年齢1ヶ月~35歳)にて抗hMPV抗体を間接蛍光抗体法で測定した。間接蛍光抗体法は継代3代目猿腎細胞にhMPVを感染させたものを抗原に用い、10倍未満のものを陰性とした。日本人142例における抗hMPV抗体保有率は全体で72.5%(102/142)だった。10歳以上では抗hMPV抗体が全例陽性であり、10歳までにhMPVの初感染が起こることが明らかになった。小児100例の血清(年齢1ヶ月~5歳)にて、抗hMPV抗体を間接蛍光抗体法で、抗hRSV抗体を中和抗体法にて測定した。抗hRSV中和抗体測定法にはLong strainを使用し、4倍未満のものを陰性とした。4ヶ月から1歳で抗hMPV抗体保有率は11%(3/27)であり、抗hRSV抗体保有率の48%(13/27)と比較し有意に低かった。hMPV初感染はhRSVと比べて遅いことが血清学的に明らかになった。

山口、札幌、広島において、658例の鼻咽頭スワブを637例の気道感染症小児より収集し、RT-PCR法を行った。山口では、外来において、2000年6月~2002年9月の間、246例(年齢1ヶ月~13歳)の患児より、札幌では、2002年9月~2003年5月の間、hRSVとインフルエンザウイルスの迅速診断が陰性であった患児353例(入院306例、外来47例、年齢1ヶ月~12歳)より、広島では、hMPVの流行期であった2003年3月~5月において、hRSVとインフルエンザウイルスの迅速診断が陰性かつ、ウイルス分離で陰性だっ

た 38 例（年齢 8 ヶ月～5 歳）の患児より検体を収集した。RT-PCR 法にて、637 例中 57 例（8.9%）から hMPV が検出された。hMPV 陽性率は、山口では 0.8%、札幌では 8.8%、広島では 63.2%であった。臨床診断は Wheezy bronchitis（36.9%）、上気道炎（26.3%）、気管支炎（22.8%）、肺炎（14.0%）であった。

268 例の鼻咽頭スワブを用い、継代 3 代目猿腎細胞にてウイルス分離を行った。ウイルス分離を行った 268 例中 7 例（2.6%）、RT-PCR 法で hMPV 陽性であった 22 例中 7 例（31.8%）からウイルス分離がされ、RT-PCR 法と比べ感度が低かった。

血清は RT-PCR 法で hMPV 陽性の 26 例の患児より、急性期に 26 例、回復期に 10 例を収集した。血清抗 hMPV-IgG 抗体、-IgM 抗体は間接蛍光抗体法で測定し、それぞれ、10 倍未満を陰性とした。10 例のペア血清で抗 hMPV-IgG 抗体を測定したところ、回復期に 4 倍以上の有意な上昇を認めたのは 10 例中 8 例（80.0%）であった。急性期の血清 26 例中 14 例（53.8%）は抗 hMPV-IgG 抗体を認め、hMPV 再感染と示唆された。急性期の血清 26 例中 22 例（84.6%）は抗 hMPV-IgM 抗体陽性であったが、コントロール血清 100 例中 11 例（11%）が抗 hMPV-IgM 抗体陽性であり特異度が低かった。

hMPV57 株は F 蛋白遺伝子による系統樹解析により、大きく二つのグループに分かれ、その中でさらに二つのサブグループに分かれた。2003 年、3 月～5 月に札幌、広島において hMPV（2 グループの株）が同時期に流行していた。hMPV のグループ間で入院率に有意差を認めなかった。発症から 1～2 週間は RT-PCR 法で hMPV 陽性だった。潜伏期から発症まで 4～6 日と推定しうる症例があった。

2004 年の 4 月～5 月にかけて、気道感染症のために入院した 48 例の患児から鼻咽頭スワブを 2 検体ずつ収集した。一方の検体は RT-PCR 法にて、もう一方は間接蛍光抗体法にて hMPV の検出を行った。スワブで採取した上皮細胞にて塗抹標本を作成し、抗 hMPV マウスモノクローナル IgG 抗体を用いた間接蛍光抗体法にて hMPV 抗原の検出を行った。RT-PCR 法と比較した場合、間接蛍光抗体法の感度は 73.3%、特異度は 97.0%であった。

公開発表に際し、副査の有川二郎教授から hMPV が再感染する理由、抗 hMPV 中和抗体測定法、抗 hMPV-IgA 抗体、hMPV が hRSV より遅れて感染する理由、今後 hMPV 感染症の発展性等について、次いで副査の瀬谷司教授から hMPV は重複感染するかどうか、その際キメラウイルスが生じるかどうかについて、また主査の有賀正教授から hMPV の標的細胞、血清における hMPV の検出、hRSV には存在するが hMPV には存在しない NS1/NS2 の意味づけについての質問があったが、いずれの質問に対しても申請者は妥当な回答をした。

本研究は、小児 hMPV 感染症の臨床像を明らかにし、hMPV 感染症診断のための多くの新しい知見を示した点で高く評価される。今後、hMPV 感染症の診断法開発につながっていくことが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、これまでの豊富な研究発表なども併せて、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。