

報 告

ワクチン株様のRFLPを示す ムンプスウイルス野生株の分離と性状分析

斎藤 博之 高橋 義博 原田誠三郎 田中 恵子
須藤 恒久 森田 盛大 山田 章雄 山崎 修道

我々は、秋田県大館市周辺において高頻度に無菌性髄膜炎を併発したおたふくかぜの流行事例を経験し、その時分離されたムンプスウイルスの中に、野生株であるにもかかわらずRFLP鑑別法でワクチン株と判定されるものが多数含まれていることを見い出した。本報ではこの分離株の遺伝子解析結果をふまえて流行形態について分子疫学的な考察を行った。

キーワード：ムンプスウイルス, PCR, RFLP

I はじめに

1993年4月から1994年1月にかけて、秋田県大館市を中心に高頻度に髄膜炎を併発する流行性耳下腺炎が波状的に流行した。この時期に同地区で分離されたムンプスウイルスの性状を調べたところ、自然罹患（ワクチン未接種）にもかかわらず *Bam* HI と *Eco* O109I を用いるPCR-RFLP法¹⁾によってワクチン由来株（占部株）と判定されるものが含まれていた。そこで、そのウイルスの起源を調べる一貫として遺伝子解析を行ったので報告する。

II 方 法

【材料】ムンプスウイルスは自然罹患したおたふくかぜ患者咽頭拭液または髄液より Vero 細胞を用いて分離し、HI 試験により同定した。また、RFLPによる鑑別試験には分離株を用いる他に、後述する nested PCR 法による検体からの直接検出も併用した。

【PCR-RFLP】ウイルス培養上清、または検体から直接グアニジンチオシアネート法により RNA を抽出し、以下の条件により nested PCR を行った。

1st. PCR プライマー

MPP1 5' AACCAACTCGTTGAGCAAGG 3'
MPR1 5' TGAACCTGTTGGTGGATAG 3'

2nd.. PCR プライマー

MPF2 5' TACTCATGGCAATCCAGAG 3'
MPR2 5' TCCTGATAAACGGTGTTGAC 3'

反応条件 (1st. 2nd. PCR 共通)

Denature 94°C 2 分

Annealing 44°C 3 分

Extension 72°C 2.5分

サイクル数 35回

これにより RFLP 判定領域を含む 199bp の断片を増幅することができた（図1, 2 参照）。通常の野生株ならば、得られた断片を *Bam* HI と *Eco* O109I で処理することにより、いずれか一方で切断され 57bp と 122bp の断片に分かれるが、占部ワクチン株の場合はどうちらでも切断を受けないのが RFLP 鑑別法¹⁾の原理である（図1, 3 参照）。

【塩基配列決定】PCR で増幅した DNA 断片 199bp を pUC18 にクローニングした後、ジデオキシ法により塩基配列を決定した。ワクチン株等の既知の配列は GenBank より検索した。

III 結 果

1993年10月から1994年1月までの間に大館地区の患者から分離同定されたムンプスウイルス 9 株について上記の方法で解析を行ったところ、3 株が占部株型の RFLP を示した。また、1993年4月から1994年1月にかけて同地区より採取した検体から直接遺伝子を検出したものについては、36例（分離に成功した 9 例も含む）中 19 例が占部株型であった。しかし、1994年2月以降は、1996年10月現在までこの型のウイルスは検出されていない。これらの検出結果を月別に整理したのが図4である。

次に、この占部株型の RFLP を示した流行株と占部ワクチン株との異同をさらに感度の高い方法で調べるために、増幅した DNA 断片 15 例について SSCP 法で比較解析したところ、いずれもワクチン株とは区別される性状を示した（データ省略）。さらにこれを確認するために占部株型の RFLP を示す分離株について PCR 産

図1 ムンプスウイルス検出用PCRプライマーのデザイン

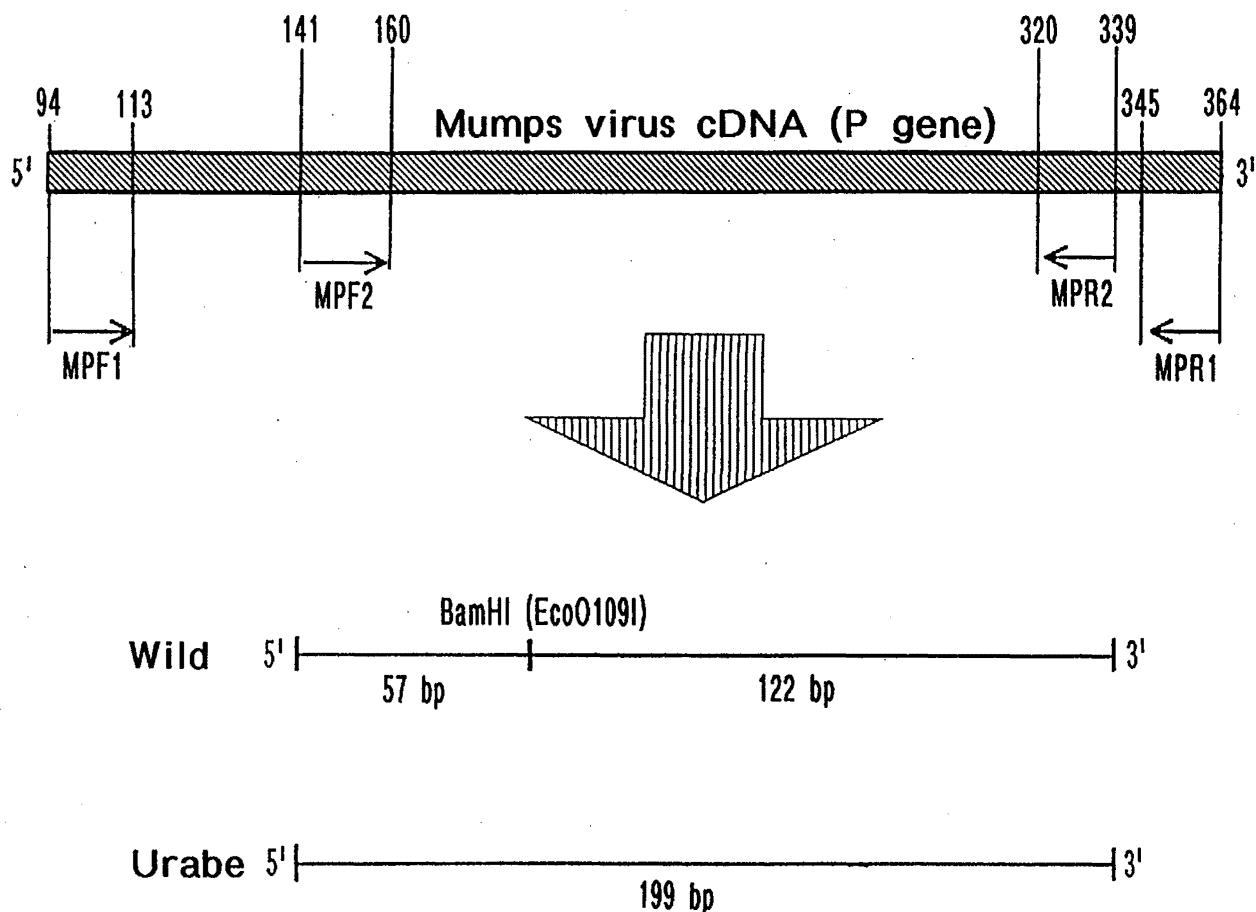
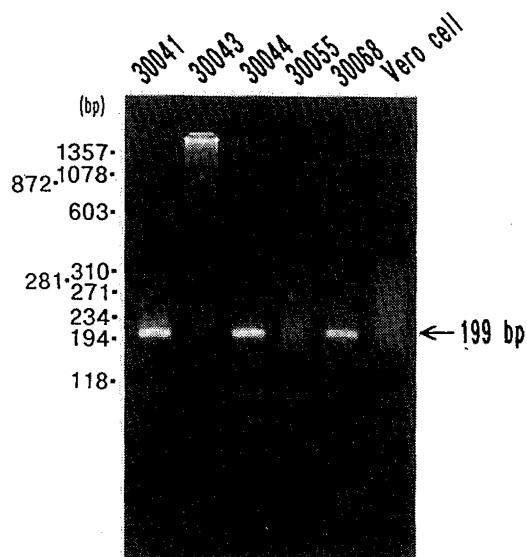


図2 RT-PCRによるムンプス遺伝子の検出
検体番号30041, 30043, 30044, 30068が陽性で30043と
30055は陰性である。



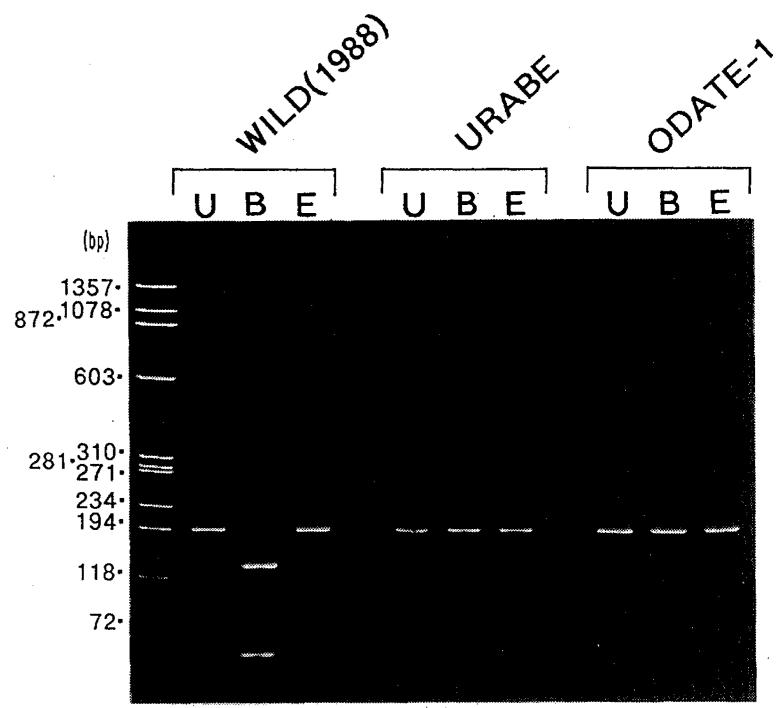
物の塩基配列を決定し、これまでに知られているウイルス株のそれと比較した結果が図5である。これによると、ODATE-1～ODATE-3株は占部ワクチン株と同様に199番塩基がAからGに置換した結果、Bam HI 切断

部位が消失していることがわかった。さらに、占部ワクチン株と比較して4カ所に塩基置換が認められた。この4カ所の塩基置換は、これまで知られている野生分離株、及び他のワクチン株 (Miyahara, Torii, Hoshino) と比較しても共通するものはなかった。図6には該当する遺伝子領域のアミノ酸配列の比較をしめしたが ODATE-1株は占部ワクチン株と比べて2カ所に置換が認められた。

この大館地区におけるおたふくかぜの流行は、無菌性髄膜炎が多発したことが特徴であったが、臨床的な髄膜炎（髄膜刺激症状と20／3 cells per cm³以上 CSF preocytosis をもって診断）の有無と検出されたウイルスの型を整理した結果を図7に示した。占部株型のRF LPを示すムンプスウイルスが検出された19症例の内14例が髄膜炎を併発していた。一方、通常の野生型ウイルスが検出された症例での髄膜炎併発は14例中4例であった。

図8には報告された患者住所をもとに作成した発生地図を示した。同時期に異なる型のウイルスが流行していること、及びそれらが狭い地域に限定して発生していること（占部株型は大茂内～下代野地区、及び池内～飼釣地区、通常の野生型は大館駅前一帯と花岡地区）が見て

図3 RFLP法による型鑑別



U: Undigested
B: BamHI digested
E: EcoO109I digested

図4 ムンプスウイルスの月別検出状況

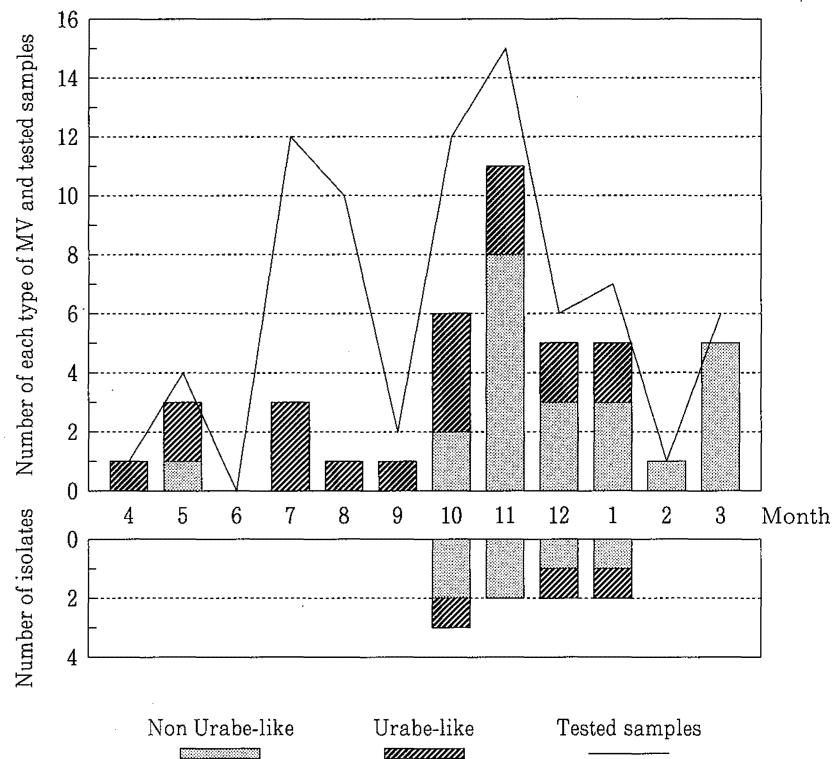


図5 ムンプスウイルスの塩基比較

箱で囲った部分はRFLP法に用いられる判定部位（BamHI 切断部位）である。

MATSUMOTO	163	AAAGAACATTCAGTACCC CACCACATCA CATCAGGGAT CCAAGTCAAA	210	
URABE	163G.....	210
ODATE-1	163TG-C..	G.....	210
ODATE-2	163TG-C..	G.....	210
ODATE-3	163TG-C..	G.....	210
30241(AKITA)	163T.....	210
30355(AKITA)	163	210
30392(AKITA)	163	..G.....	210
MIYAHARA	163	210
MAKINO	163	C.....	210
HAMANISH	163	G.....	210
TORII	163	210
HOSHINO	163T.....	210
ENDERS	163C.....T.....G.....	210
MATSUMOTO	211	GGGCAGAGGC TCAGGGGCCA GGCCCATCAT AGTCTCATCC TCCGAAGGAG	260	
URABE	211	260
ODATE-1	211	260
ODATE-2	211	260
ODATE-3	211	260
30241(AKITA)	211	260
30355(AKITA)	211	260
30392(AKITA)	211	260
MIYAHARA	211	260
MAKINO	211	..A.....	260
HAMANISH	211	260
TORII	211C.....A.....	260
HOSHINO	211	260
ENDERS	211T.....T.....C-C.....C.....	260	
MATSUMOTO	261	GCACTGGAGG GACTCAGATT CCTGAGCCCC TTTTCGCACA AACAGGACAA	310	
URABE	261	310
ODATE-1	261	310
ODATE-2	261	310
ODATE-3	261	310
30241(AKITA)	261	310
30355(AKITA)	261	310
30392(AKITA)	261	310
MIYAHARA	261G.....	310
MAKINO	261C.....	310
HAMANISH	261	310
TORII(V)	261	310
HOSHINO	261	310
ENDERS	261	...A.....T.....G.....	310
MATSUMOTO	311	GGTGGCATT 319		
URABE	311 319		
ODATE-1	311T... 319		
ODATE-2	311T... 319		
ODATE-3	311T... 319		
30241(AKITA)	311 319		
30355(AKITA)	311 319		
30392(AKITA)	311 319		
MIYAHARA	311 319		
MAKINO	311 319		
HAMANISH	311 319		
TORII	311 319		
HOSHINO	311 319		
ENDERS	311T...A 319		

図6 ムンプスウイルスのアミノ酸配列比較

	60	70	80	90	100	
URABE	55	KNIQYP TTSHQGSKSK GRGSGARP11 VSSSEGGTGG TQIPEPLFAQ TGQQGI	106			
ODATE-1	55AP.....	106

取れる。また、この中には家族内感染と思われる事例も含まれていた。

IV 考 察

今回問題となったウイルス株（大館株と命名する）は、RFLPの判定に使われる *Bam* HI 切断部位においては占部ワクチン株と共通していたが、他の部位に特徴的な塩基置換があるため同一の株ではないと考えられる。しかし、その起源（ワクチンの野生化の可能性等）に関する情報については、より広範な遺伝子解析の結果を待たなければならない。RFLP鑑別法は、平成元年に導入されたMMRワクチンの接種に伴う副反応の検査に盛んに用いられた経緯があり³⁾、その簡便さ故に現在でも利用している検査室も多い。しかし、野生株でもワクチン株と判定されるケースもあることが本事業で明らかとなつたため、今後の検査利用には注意が必要である。塩基配列を決定すれば完全に鑑別できることは言うまでもないが、SSCP法によっても大館株とワクチン株は区別できるので多数の検体を扱う場合にはこちらが現実的であると考えられた。

臨床的な特徴として高頻度に髄膜炎を併発したことがあげられるが、図7によると大館株が検出された症例の

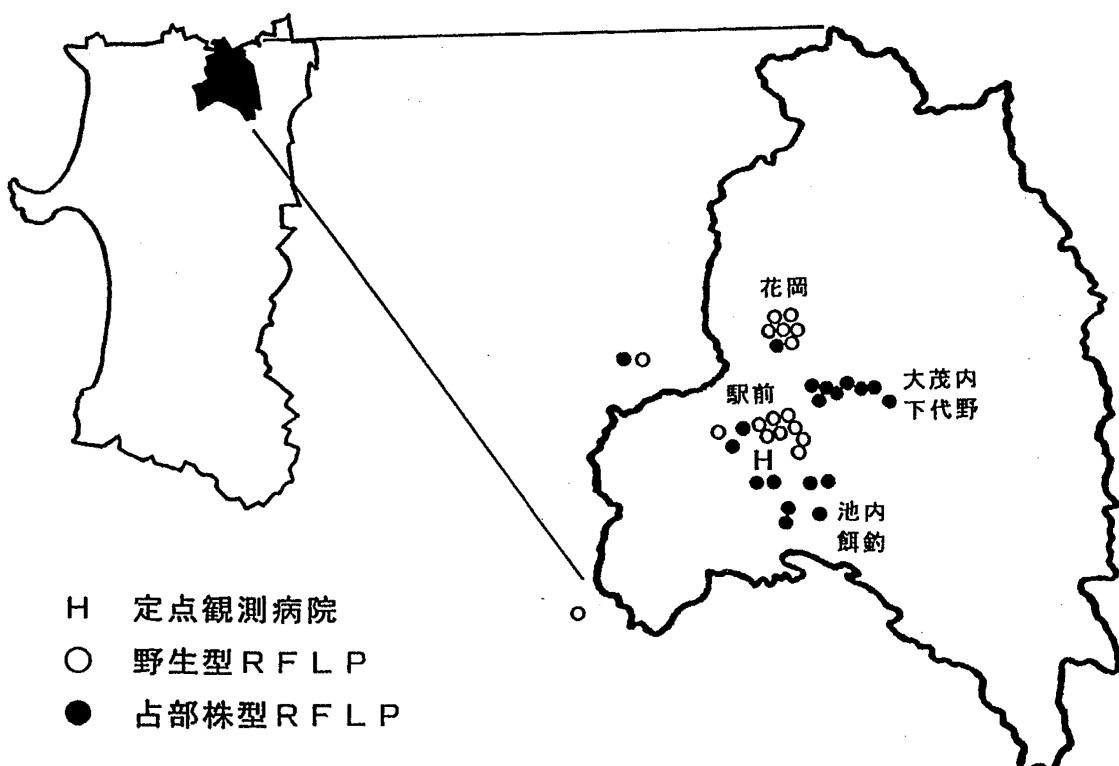
図7 髄膜炎併発例とRFLPの関係
(平成5年4月～平成6年1月)

		RFLP		
		野生型	占部株型	
髄膜炎	-	13	5	18
	+	4	14	18
		17	19	

7割以上が髄膜炎を併発しており、その相関は明らかである。病原性と塩基置換の関係は未だ不明ではあるものの、髄膜炎好発株として大館株を分離できたことは、髄膜炎発症機序の解明のためのモデルになる他、安全なワクチン開発のための対照株として用いることができるなど極めて意義深いものと考えられる。

流行の形態としては、大館市の同一地区内で流行しており家族内感染も含まれること、及び、1994年2月以降検出されていないことから、ある期間限定された地域における流行であったと考えられる。

図8 大館市内におけるムンプス患者の分布 (平成5年4月～平成6年1月)



V 文 献

1. Yamada, A. et al. Differentiation of the mumps vaccine strains from the wild viruses by the nucleotide sequences of the P gene. Vaccine 1990 ; 8 : 553-557.
2. Katayama, K. et al. Differentiation of mumps vaccine strains from wild viruses by single-strand conformation polymorphism of the P gene. Vaccine 1993 ; 11 : 621-623.
3. 山田章雄, 他. ムンプスワクチン接種に伴う無菌性髄膜炎の起因ウイルスの鑑別法. 実験医学 1990 ; 8 : 1181-1184