

東京都内ARIサーベイランスにおけるヒトメタニューモウイルスの検出と Conventional RT-nested PCR法の構築による遺伝子解析（2025年4月～6月）

黒木 絢士郎^a, 熊谷 遼太^a, 九澤 香織^a, 小泉 美優^a, 北村 有里恵^a, 浅倉 弘幸^a, 林 志直^a, 高橋 久美子^a,
和田 紀乃^a, 岡田 若葉^a, 天野 有紗^a, 豊田 奈々佳^a, 長島 真美^b, 三宅 啓文^a, 貞升 健志^c, 千葉 隆司^c
(外部機関査読者: 平井 昭彦^d)

ヒトメタニューモウイルス (human metapneumovirus: hMPV) は、呼吸器感染症の原因ウイルスの1つであり、特に小児や高齢者では重症例を引き起こすことがある。2025年4月7日以降、急性呼吸器感染症 (ARI) は感染症法上の5類感染症に位置付けられ、病原体定点サーベイランスの対象となり、hMPVもその対象病原体の1つとされた。一方で、hMPVはこれまでサーベイランスの対象とはなっておらず、疫学的知見に関する報告が限られている。本研究では、東京都におけるARIサーベイランス事業の一環としてhMPV検査を実施し、都内の流行状況を調査した。さらに、分子疫学的解析を目的として、NおよびG遺伝子領域を検出するConventional RT-nested PCR法を構築し、遺伝子解析を行った。その結果、2025年4月～6月にARIサーベイランスとして検査を行った679検体中17検体 (2.5%) でhMPV陽性となった。遺伝子型別を行った結果、B2が最も多く検出され (13検体, 81.3%)、次いでA2b2が多くみられた (2検体, 12.5%)。さらに、遺伝子解析により、都内A2b2株はG遺伝子領域に111塩基の重複配列を有していたことが確認された。系統樹解析では、都内検出株は海外で検出された株との関連が推察され、そのうち都内B2株は大きく2つに分かれたクラスターにそれぞれ属した。

キーワード: ヒトメタニューモウイルス, hMPV, Conventional RT-nested PCR, 系統樹解析, ARIサーベイランス

は じ め に

ヒトメタニューモウイルス (human metapneumovirus: hMPV) は、パラミクソウイルス科ニューモウイルス亜科メタニューモウイルス属に分類されるマイナスイオンRNAウイルスで、2001年に小児の呼吸器感染症として発見された¹⁾。国内での流行時期は3月～6月とされており²⁾、臨床症状は咳嗽、上気道炎、発熱などが挙げられ、小児および高齢者では重症化することがある。

hMPVのゲノム長は約13,000塩基で、N-P-M-F-M2-SH-G-Lの8つの遺伝子領域から構成される³⁾。ヒトに感染するウイルスの中では、RSウイルスの遺伝子配列と最も類似している。遺伝子型はG遺伝子配列に基づきA型およびB型の2つに大きく分類され、それぞれA1, A2およびB1, B2の4つのサブグループに分けられる。さらに、A2はA2a, A2b1 (またはA2b) およびA2b2 (またはA2c) の3つの遺伝子型に分類される。特にA2b2は近年、G遺伝子領域に180塩基または111塩基の重複配列を有する株の検出が国内外で報告されている⁴⁾。

2025年4月7日から急性呼吸器感染症 (Acute Respiratory Infection: ARI) が感染症上の5類感染症に位置付けられ、

病原体定点サーベイランスの対象となった⁵⁾。これにより、発熱の有無を問わず風邪様症状を呈する疾患において、検出される病原体の対象範囲が拡大され、hMPVもその対象病原体の1つとされた。特にhMPVに関しては、従来サーベイランス対象ではなかったことから、疫学的知見に関する報告例が限られていた。

本研究は、東京都のARIサーベイランス事業の一環としてhMPV検査を実施し、都内の検出状況を調査した。さらに、hMPVの分子疫学的解析を目的として、NおよびG遺伝子領域を標的としたConventional RT-nested PCR法を構築し解析を行った。本稿では、その概要について報告する。

実 験 方 法

1. 供試材料

2025年4月7日から6月27日までの間、都内定点医療機関から搬入されたARI症例患者の咽頭ぬぐい液や鼻汁等の臨床検体679検体 (症例) を用いた。搬入月別の検体数は、4月は174検体 (25.6%)、5月は257検体 (37.8%)、6月は248検体 (36.5%) であった。

患者属性は男女比が46:54で、年齢階層別では0～4歳が

^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター健康危機管理情報課

^c 東京都健康安全研究センター微生物部

^d 女子栄養大学短期大学部

表 1. hMPV の N および G 遺伝子領域を標的とした Conventional RT-nested PCR のプライマー配列

方法	名称	種類	塩基配列 (5'→3')	遺伝子領域	増幅産物 サイズ(bp) *
Conventional RT-nested PCR	hMPV_NF1	Outer Forward-primer	GCGAAAAAACGCGTATAA	N/P	1,311
	hMPV_NR1	Outer Reverse-primer	TTGCTGCTTCATTACCCAT		
	hMPV_NF2	Inner Forward-primer	GGATTACCTRAGTGATCTRTC		1,216
	hMPV_NR2	Inner Reverse-primer	CYTTTCCTTCAGGGAAYGA		
	hMPV_GF1	Outer Forward-primer	GGACAAGTRGYATGGARGTR	G/L	981
	hMPV_GR1	Outer Reverse-primer	TAYGARTCRGGRAGATARACATTR		
	hMPV_GF2	Inner Forward-primer	CVATAGACATGYTCAAAGCAA		899
	hMPV_GR2	Inner Reverse-primer	GGATCCATTGTATTTTTCYC		

*リファレンス: Human metapneumovirus isolate 00-1, complete genome (accession: NC_039199.1)

267例 (39.3%) , 5~9歳が90例 (13.3%) , 10~19歳が126例 (18.6%) , 20~29歳が39例 (5.7%) , 30~39歳が38例 (5.6%) , 40~49歳が33例 (4.9%) , 50~59歳が39例 (5.7%) , 60~69歳が17例 (2.5%) , 70歳以上が24例 (3.5%) で, 年齢不詳が6例 (0.9%) であった.

2. 供試材料からの核酸抽出

臨床検体 140 µL から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて核酸抽出を行い, RNA抽出液60 µL を作製した.

3. hMPVの検出方法

1) Real-time PCR法

国立感染症研究所の急性呼吸器感染症サーベイランス遺伝子検査マニュアル (令和7年3月 第1版) に記載されたプライマー (hMPV NL-N2 F [5'-CATAYAARCATGCTATATTTAAAGAGTCTC-3'], hMPV NL-N2 R [5'-CCTATYTCWGCAGCATATTTGTAATCAG-3']) およびプローブ (hMPV NL-N2 Probe [5' (FAM)-CAACHGCAGTRACACC YTCATCATTRCA-3']) を用いた.

RNA抽出液5 µLをテンプレートとし, 試薬はOne Step PrimeScript III RT-qPCR MIX (takara) を用いて増幅を行った (最終反応量25 µL) . QuantStudio 12K FlexリアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems) を使用し, 52°C5分, 95°C10秒反応させた後, 94°C5秒, 57°C30秒のサイクルを45回繰り返した.

2) Conventional RT-nested PCR法の構築

NおよびG遺伝子領域を標的とする Conventional RT-nested PCRのプライマーを独自に設計した (表1) . 本プライマーの設計にあたっては, 最新の流行株に対応できるよう, 2024年度に当センターで検出され次世代シーケンサー (NGS) ⁶⁾により得られたhMPV遺伝子配列と, NCBI Virus database (taxid:162145) に登録された直近の各遺伝子型の配列を参考とした.

RNA抽出液5 µLをテンプレートとし, Omniscript Reverse

Transcription (QIAGEN) 試薬およびOuter Forward-primer を使用して, 56°C1分, 37°C60分, 95°C5分, 20°C1分の条件にて逆転写反応を行った (最終反応量10 µL) . その後, Outer Reverse-primerを含むPCR反応液を加え, 94°C3分反応後, 94°C30秒, 55°C30秒, 72°C1分のサイクルを30回繰り返し, 72°C5分, 20°C1分反応させ1st PCRを行った (最終反応量 50 µL) . 続いて, Inner ForwardおよびReverse primerを用いて, 1st PCRと同じ増幅条件で2nd PCRを実施した (最終反応量 50 µL) . 1stおよび2nd PCRはいずれも TaKaRa EX taq (takara) 試薬を使用した. PCR産物は2%アガロースゲルで電気泳動し, 目的遺伝子の増幅バンドの有無を確認した.

4. 塩基配列の決定および遺伝子型別

RT-nested PCR 産物はExoSAP-IT™ Express PCR Product Cleanup (Applied Biosystems) を用いて精製後, Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行った. 得られた反応産物は, Centri-Sep Spin Columns (PRINCETON SEPARATIONS) を用いて精製し, ABI Prism 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を使用したダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し, Nextclade (v3.15.1) ⁷⁾を用いて遺伝子型別を行った.

5. 分子系統樹解析

NCBI Virus database (taxid:162145) に登録されている全ゲノム配列69株を, NおよびG遺伝子領域に共通な参照株として用いた. これらの参照株は, 検体採取日が比較的近年であり, かつ遺伝子型や地理的分布が多様となるよう選定した. 参照株と本研究で得られた検体の配列を含め MAFFT (ver.7) ⁸⁾を用いてアライメントを実施した. MEGA (ver.10) ⁹⁾を使用してブートストラップ法1,000回の条件で, 近接接合法 (Neighbor-joining法) による分子系統樹を作成した.

表 2. ARI サーベイランスで hMPV が検出された患者の基本属性

患者検体	検体採取日	年齢	性別	臨床症状	備考
1	2025/4/16	56	男	発熱, 咳嗽, 頭痛, 鼻汁, 鼻閉	
2	2025/4/16	51	男	鼻汁, 鼻閉, 気管支炎	
3	2025/4/15	4	女	咳嗽, 鼻汁	ライノウイルスとの重複感染
4	2025/4/16	54	男	発熱, 咳嗽, 肺炎	
5	2025/4/15	37	男	発熱, 咳嗽, 頭痛, 鼻汁, 咽頭炎, 扁桃炎	
6	2025/4/22	2	女	発熱, 咳嗽, 鼻汁, 鼻閉, 咽頭炎, 結膜炎	ライノウイルスとの重複感染
7	2025/4/26	1	男	咽頭炎, 結膜炎	ライノウイルスとの重複感染
8	2025/4/28	2	女	発熱	ライノウイルスとの重複感染
9	2025/5/2	55	女	発熱, 咳嗽	
10	2025/5/7	16	女	発熱, 咳嗽, 鼻汁	
11	2025/4/22	51	女	発熱, 咳嗽, 頭痛, 鼻汁, 咽頭炎	
12	2025/5/13	2	女	発熱, 咳嗽, 鼻汁, 鼻閉	
13	2025/5/9	66	女	咳嗽, 鼻汁, 喀痰, 嗄声	
14	2025/5/17	15	男	咳嗽, 鼻汁, 上気道炎	
15	2025/5/26	39	男	咳嗽, 鼻汁, 鼻閉, 咽頭炎, 咽頭腫脹	
16	2025/6/10	1	女	発熱, 咳嗽, 鼻汁	アデノウイルス2型・ライノウイルスとの重複感染
17	2025/6/23	9	女	発熱	

結 果

1. Real-time PCR法による都内検出状況

Real-time PCR法による検査の結果, ARI症例679検体中17検体 (2.5%) でhMPV陽性となった (表2). 年齢階層別の検出数の内訳は, 0~4歳が6検体 (35.3%), 5~9歳が1検体 (5.9%) 10~19歳が2検体 (11.8%), 30~39歳が2検体 (11.8%), 50~59歳が5検体 (29.4%), 60~69歳が1検体 (5.9%) であった.

また, 供試検体数に対する年齢階層別の検出率は, 0~4歳が2.2%, 5~9歳が1.1%, 10~19歳が1.6%, 30~39歳が5.3%, 50~59歳が12.8%, 60~69歳が5.9%であった.

2. Conventional RT-nested PCR法の検討結果

1) 検出結果

hMPV陽性17検体について, Conventional RT-nested PCR

産物の電気泳動を行った結果, N遺伝子領域では16検体, G遺伝子領域では15検体で増幅が確認された. これらの遺伝子配列を決定し, NCBIに登録した (GenBank Accession No. LC880191~LC880217, LC880430~LC880433) (表3).

2) 遺伝子型別および解析

N遺伝子領域の遺伝子型別を実施した結果, B2が13検体 (81.3%) と最も多く, 次いでA2b2が2検体 (12.5%), A2b1が1検体 (6.3%) であった. G遺伝子領域における遺伝子型別の結果は, 増幅が得られなかった1検体 (患者検体6, A2b1) を除き, N遺伝子領域の結果とすべて一致した (表3). 年齢別の分布では0~4歳および50~59歳におけるB2感染例が多く認められた (表4).

また, 検出されたA2b2株の2検体はいずれも, G遺伝子領域の膜外ドメインに111塩基の繰り返し配列が挿入されており, 37アミノ酸残基の重複が推定された.

表 3. Ct 値と Conventional RT-nested PCR 法による N および G 遺伝子領域の遺伝子型別結果

患者検体	Ct値	N遺伝子領域		G遺伝子領域	
		遺伝子型	Accession No.	遺伝子型	Accession No.
1	25.7	A2b2	LC880191.1	A2b2	LC880205.1
2	30.2	B2	LC880192.1	B2	LC880206.1
3	27.6	B2	LC880193.1	B2	LC880207.1
4	23.5	B2	LC880194.1	B2	LC880208.1
5	25.0	B2	LC880195.1	B2	LC880209.1
6	38.4	A2b1	LC880196.1	N.D.	—
7	32.9	A2b2	LC880197.1	A2b2	LC880210.1
8	24.9	B2	LC880198.1	B2	LC880211.1
9	29.4	B2	LC880199.1	B2	LC880212.1
10	25.2	B2	LC880200.1	B2	LC880213.1
11	28.0	B2	LC880201.1	B2	LC880214.1
12	30.4	B2	LC880202.1	B2	LC880215.1
13	38.1	N.D.	—	N.D.	—
14	27.5	B2	LC880203.1	B2	LC880216.1
15	25.6	B2	LC880204.1	B2	LC880217.1
16	24.1	B2	LC880430.1	B2	LC880432.1
17	25.3	B2	LC880431.1	B2	LC880433.1

N.D. : Not Detected

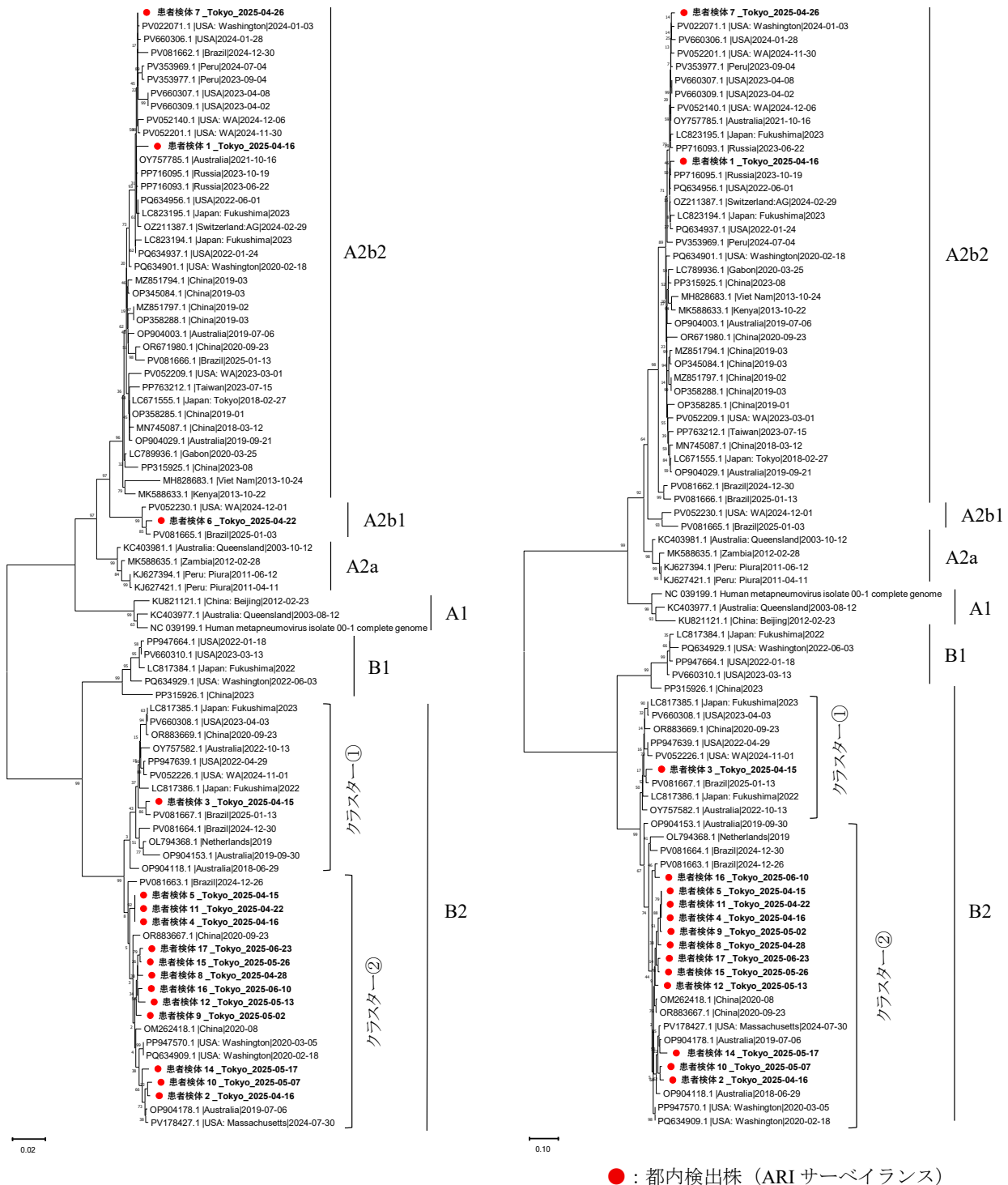
表 4. 年齢層別における hMPV 遺伝子型検出結果

遺伝子型	0~4歳	5~9歳	10~19歳	30~39歳	50~59歳
A2b1	1				
A2b2	1				1
B2	4	1	2	2	4

3) 分子系統樹解析

都内検出株は系統樹上でA2b1, A2b2およびB2の各遺伝子型のクレードにそれぞれ属した (図1). NおよびG遺伝子領域で作成したそれぞれの系統樹において, 各検出株の位置関係は大きく変わらなかった.

都内検出株は, 欧米やオーストラリア, 南米, 中国といった海外検出株と近縁な位置関係にあった. 遺伝子型B2は, 系統樹上で大きく2つのクラスター (①および②) に分かれ, 都内検出株のうち1件はクラスター①に, 残りの12件はクラスター②に属した.



考 察

hMPVは乳幼児における呼吸器感染症の原因ウイルスとして知られているが、本調査では10歳代以降の検出例も多くみられ、特に年齢階層別の検出率においては50歳代が最も高かった。島根県で実施された先行研究¹⁰⁾では、50歳以上の中高齢者においてB2の感染例が多く報告されており、同様の傾向が本研究の結果でみられた。また、hMPVの流行時期は通常3月～6月とされているが、通年性の可能性も指摘されていることから¹¹⁾、年間を通じた疫学的データの継続的な収集が必要である。

遺伝子型別ではB型の検出数が最も多く、サブグループはすべてB2に分類された。また、A型のサブグループはすべてA2であった。2010年代に京都市¹²⁾や石川県¹³⁾、三重県¹⁴⁾、島根県¹⁰⁾などで実施された同様の調査では、A1は今回と同じく検出されなかったが、B1が検出されており、本調査結果との相違がみられた。さらに、COVID-19パンデミック以前はA型が優勢であったが、パンデミック以降はB型の検出が増加したとの報告¹⁵⁾がある。他のARI起因ウイルスにおいてもCOVID-19流行前後で流行状況が変化した傾向があることから¹⁶⁾、hMPV遺伝子型の流行動態にも変化が生じた可能性が示唆された。

都内で検出されたA2b2の2株は、G遺伝子領域に111塩基の重複配列をもっていた。横浜市の報告¹⁷⁾では、180塩基の重複配列をもつ株は2014年に、111塩基の重複配列をもつ株は2017年に初めて検出された。さらに、重複配列をもつ株は、2016年以降に世界各国で検出されているA型株の大部分を占めていると推察される報告もある¹⁸⁾。RSウイルスでもG遺伝子領域に重複配列をもつ株が一部で検出されており、細胞への吸着に関連するG蛋白の変異は感染性への影響力があると推定されていることから¹⁹⁾、hMPVのA2b2株においてはG遺伝子領域のサーベイランスが重要と考えられる。

都内検出株は、欧米やオーストラリア、南米、中国などで検出された株と系統樹上で近縁な関係を示し、世界各地で検出された株との遺伝学的関連性が推察された。COVID-19パンデミック後の行動制限の緩和に伴い、国際的な人の移動が活発化し、2024年は東京都を訪れた外国人旅行者数が過去最高を記録した²⁰⁾。また、2024年12月頃より中国各地においてhMPV感染事例が例年以上に増加したとの報告が相次いだ²¹⁾こともあり、国内でも分子系統樹解析によりhMPVの地理的・時間的な拡散経路を解明することが、今後の感染動向の把握において重要である。

ま と め

本研究では、東京都におけるARIサーベイランス事業の一環としてhMPV検査を実施した。さらに、遺伝子学的精査のためNおよびG遺伝子領域を検出するConventional RT-nested PCR法を構築し、遺伝子解析を行った。その結果、2025年4月7日～6月27日に搬入されたARI症例679件中17件(2.5%)でhMPV陽性となり、0～4歳および50～59歳の年

齢層における感染例が多くみられた。また、遺伝子型別ではB2が最も多く検出され、次いで検出されたA2b2はG遺伝子領域に111塩基の重複配列を有していた。さらに、系統樹解析では都内検出株は海外との関連が推定された。

文 献

- 1) van den Hoogen, B., de Jong J, Groen, J., *et al.*: *Nat Med.*, **7**, 719–724, 2001.
- 2) 菊田英明：小児感染免疫, **18**, 2, 167–171, 2006.
- 3) Nazly, S., John W: *F1000Res.*, **7**, 135, 2018.
- 4) Pinana, M., Vila J., Maldonado C., *et al.*: *J Clin Virol.*, **132**, 104590, 2020. doi:10.1016/j.jcv.2020.104590 (2025年7月29日現在)
- 5) 急性呼吸器感染症(ARI) 厚生労働省：<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou/kekaku-kanzenhou19/ari.html> (URLは2025年7月29日現在。なおURLは変更または抹消の可能性はある)
- 6) Chao, W., Tianli W., Fenlian M., *et al.*: *Virology Journal*, **18**, 40, 2021.
- 7) Nextclade：<https://clades.nextstrain.org/> (URLは2025年7月29日現在。なおURLは変更または抹消の可能性はある)
- 8) MAFFT：<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/> (URLは2025年7月29日現在。なおURLは変更または抹消の可能性はある)
- 9) Molecular Evolutionary Genetics Analysis：<https://www.megasoftware.net/> (URLは2025年7月29日現在。なおURLは変更または抹消の可能性はある)
- 10) 和田美江子, 飯塚節子：島根県保健環境科学研究所報, **55**, 43–45, 2013.
- 11) 菊田英明：ウイルス, **56**, 173–182, 2006.
- 12) 吉岡政純, 石川和弘, 池田雄史, 他：感染症誌, **86**, 755–762, 2012.
- 13) 児玉洋江, 中澤柁哉, 成相絵里, 他：石川県保健環境センター研究報告書, **55**, 23–26, 2018.
- 14) 矢野拓弥, 赤地重宏, 松村義晴：三重県保健環境研究所, **20**, 27–34, 2018.
- 15) Shirato, K., Suwa, R., Nao N., *et al.*: *Jpn. J. Infect. Dis.*, **77**, 137–143, 2024.
- 16) Yuanyuan, Y., Dan W., Qian Z., *et al.*: *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **15**, 1549497, 2025.
- 17) Saikusa, M., Nao, N., Kawakami, C., *et al.*: *Microbiol Immunol.*, **61**, 507–512, 2017.
- 18) Juan, C., Gabriel M., Gerardo, R., *et al.*: *Viruses.*, **14**, 1058, 2022.
- 19) 田中俊光, 横井 一, 水村綾乃, 他：病原微生物検

出情報, **33**, 99–100, 2012.

- 20) 2024年訪都旅行者数等の実態調査結果 東京都庁 :
<https://www.metro.tokyo.lg.jp/information/press/2025/06/2025061303> (URLは2025年7月29日現在. なおURLは変更または抹消の可能性がある)

- 21) Trends of acute respiratory infection, including human metapneumovirus, in the Northern Hemisphere (WHO) : <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2025-DON550> (URLは2025年7月29日現在. なおURLは変更または抹消の可能性がある)

Detection of Human Metapneumovirus in Tokyo and Genetic Analysis by a Conventional Nested RT-PCR Method
– Acute Respiratory Infection Surveillance: April 2025–June 2025 –

Kenshiro Kuroki^a, Ryota KUMAGAI^a, Kaori KUZAWA^a, Miyu KOIZUMI^a, Yurie KITAMURA^a, Hiroyuki ASAKURA^a,
Yukinao HAYASHI^a, Kumiko TAKAHASHI^a, Kotono WADA^a, Wakaba OKADA^a, Arisa AMANO^a, Nanaka TOYODA^a,
Mami NAGASHIMA^a, Hirohumi MIYAKE^a, Kenji SADAMASU^a, Takashi CHIBA^a
(Reviewed by Akihiko HIRAI^b)

Human metapneumovirus (hMPV) is one of the viruses that cause respiratory infections, and particularly severe cases can occur in children and the elderly. Since April 7, 2025, acute respiratory infections (ARIs) have been classified as Class V Infectious Disease under the Act on the Prevention of Infectious Diseases and Medical Care for Patients with Infectious Diseases, making it subject to targeted pathogen surveillance, with hMPV being one of the target pathogens. However, hMPV has not previously been subjected to surveillance, so reports on epidemiological findings have been limited. This study conducted hMPV testing as part of an ARI surveillance in Tokyo and investigated the epidemic status in the city. Additionally, for molecular epidemiological analysis, we established a conventional reverse-transcription–nested polymerase chain reaction method to detect the N and G gene regions and performed genetic analysis. As a result, out of 679 samples tested under the ARI surveillance, 17 samples (2.5%) tested positive for hMPV. When genotyping was performed, the B2 genotype was the most frequently detected among the strains identified in the city (13 samples, 81.3%), followed by A2b2 (2 samples, 12.5%). Furthermore, genetic analysis revealed that the A2b2 strains in Tokyo had a duplication sequence of 111 nucleotides in their G gene region. Phylogenetic analysis indicates that the strains detected in Tokyo are related to strains found overseas, and the B2 strains belong to two major clusters.

Keywords: human metapneumovirus, conventional RT-nested PCR, phylogenetic analysis

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan
^b Junior College of Kagawa Nutrition University