

我が国におけるムンプスウイルスの分子疫学

伊 能 容 子¹⁾ 中 山 哲 夫²⁾¹⁾東京医科大学小児科学講座²⁾北里生命科学研究所ウイルス感染制御学研究室

【要旨と結論】 我々は、2001年1月から2001年7月までに全国7都市で臨床的にムンプス感染と診断された1353人の患者の鼻咽頭ぬぐい液から、ムンプスウイルス872株を分離した。それらのうち57株を、遺伝子型分類のためにF, SH, HN蛋白領域の塩基配列について調査した。日本において4つの異なるムンプスウイルスの遺伝子型が流行しており、異なる地域間で遺伝子型の分布に差が認められ、土着の株のGenotype Bは、Genotype Gに置き換わったが、日本の西側の数カ所でまだ流行していた。Genotype KとLの2つの新しい遺伝子型の流行株をみつけ、これらはSH領域において7%以上の塩基配列の変化を認めた。Genotype Kは1994年に最初に報告され、1990年代に優勢の株と考えられた。Genotype Lは2000年に東京で最初に確認された。57株のうち、11株はBに、35株はGに、3株はKに、8株はLに分類された。我々は新しいGenotype Lの伝播経路と更なる流行の確認のため、ムンプスウイルスの分子疫学の注意深い観察を続ける必要がある。

はじめに

ムンプスウイルスはパラミクソ科ブラウイルス属の1つで、1本鎖negative sense RNAウイルスであり、N, P, M, F, SH, HN, Lの7つの蛋白をコードする¹⁾。fusion (Fと略す)とhemagglutinin-neuraminidase (HNと略す)蛋白はウイルス外殻糖蛋白で、HN蛋白は細胞のシアル酸レセプターへのウイルス結合の最初のステップと、それに続くウイルスの侵入を許す膜融合において重要な役割を担う²⁾。small hydrophobic (SHと略す)蛋白は感染された細胞内に存在するが、ウイルスの感染、転写、複製に絶対必要なものではないと報告されているが、その機能は明らかでない³⁾。

ムンプスウイルスは未だ世界中で流行しており、野生株の遺伝子型分類はウイルスの伝播経路を評価するために有用である。ムンプスウイルスの分子疫学研

究の多くは、SH領域における塩基配列の結果に基づいていた⁴⁻⁷⁾。SH mRNAは316の塩基から成り、57のアミノ酸をコードする^{8,9)}。SH領域は他のどの部分よりも変異率が高く¹⁰⁾、Wuら¹¹⁾はSH領域の塩基配列の差に基づく6つの遺伝子型の新しい分類を提案し、その後いくつかの遺伝子型が報告された^{12,13)}。最新の報告では、A~Jの10個の遺伝子型に分類され、SH蛋白の28~30番目のアミノ酸トリプレットと遺伝子型分類が相関すると報告されている^{7,14)}。アミノ酸トリプレットTIL, IIS, SLS, IML, TISがそれぞれGenotype A, B, E, F, Jの特徴を示した。Genotype CとDの多くの株のトリプレットはそれぞれVVSとIILであり、IILトリプレットはGenotype GとIでも認められた。

我々は、1976年から我が国におけるF, SH, HN領域の塩基配列の結果に基づくムンプスウイルスの分子疫学を報告してきた¹⁵⁾。Genotype Bは1976年から

17年1月12日受付、17年1月26日受理

キーワード：ムンプスウイルス、F蛋白、SH蛋白、HN蛋白、遺伝子型

(別冊請求先：〒160-0023 東京都新宿区西新宿6-7-1 東京医科大学小児科学講座 伊能容子)

1980年代の土着の株で、1990年代早期に分離された株は当時 Genotype D に分類された。近年、流行している野生株のムンプスウイルスは1997年から2000年に東京の近くで Genotype B, G, J に分類され、Genotype G が Genotype B の消滅により優勢となった¹⁶⁾。Uchida らはその報告で新しい小集団 Genotype J を提案し、我々の以前の報告で1994年に分離されたムンプス株は、彼らによって提案された Genotype J であると同定された。それは Tecle ら^{14,17)}によって報告された Genotype A~J とは明らかに異なった。両グループによって報告された遺伝子型分類における2つの J は混乱を起こし、Uchida ら¹⁸⁾は Genotype K を提案した。我々は1993年からのムンプス野生株の遺伝子型の分布における経年的変化に加えて、2000~2001年の流行の間の日本の7つの異なる地域における分子疫学的研究を実施した。我々は、遺伝子型分類の混乱を避けるため、ムンプスウイルスの遺伝子型の分類を整理し直し、この研究で2つの新しい Genotype K と L を提案した。

研究材料および方法

1. ウイルス分離

我々は、ムンプス感染症と臨床的に診断された1,353例の患者から得た鼻咽頭ぬぐい液 (NPS と略す) から、ムンプスウイルス 872 件を分離した。NPS サンプルは、2001年1月から2001年7月までに、日本外来小児科学会ワクチン研究班を組織した全国7都市11名の小児科医 (札幌4名、東京2名、三重、姫路、山口、高松、福岡から各1名) から得られた。本研究を実施した都市と使用した分離株を Fig. 1 に示した。Sapporo K-4/JPN.00 株はムンプス感染症後難聴の患者から分離され、その他は急性耳下腺炎の患者達からであった。NPS サンプルは抗生剤、5%FCS、1%ゼラチンを添加した MEM に浸し、-70°C に保存し、北里研究所に送付された。NPS サンプルは6,000 rpm で10分間遠心し、上清を Vero 細胞に接種し、Vero 細胞で2代経過後、細胞変性効果 (cytopathic effect: CPE) を示さないサンプルはウイルス分離陰性とみなした。

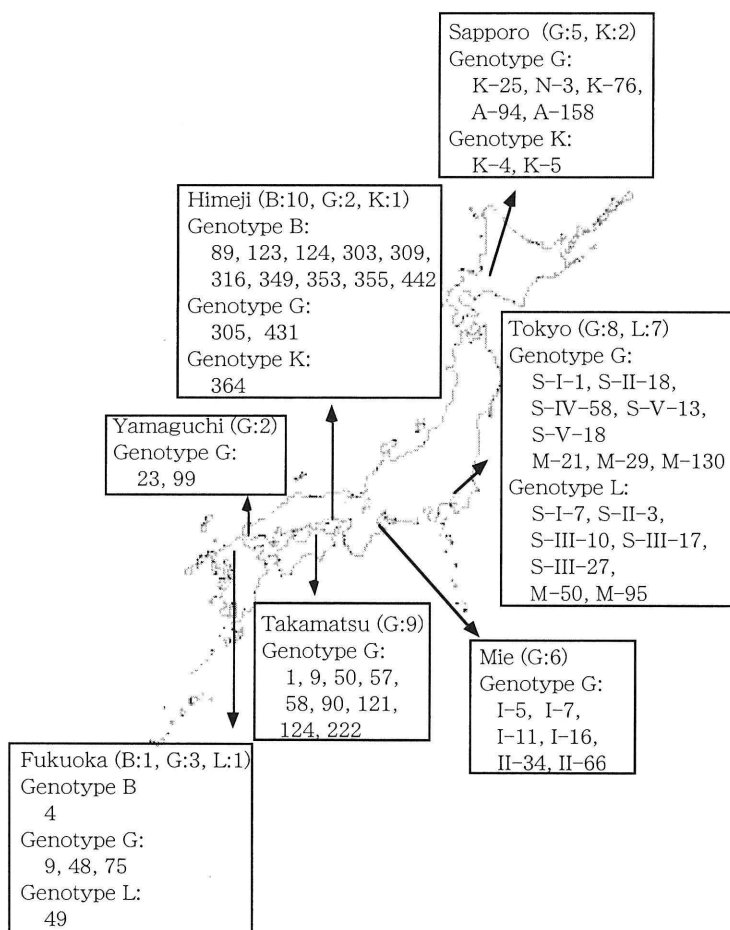


Fig. 1 Geographic distributions of the 57 mumps virus strains investigated in this study.

2. RNA抽出、RT-PCR、塩基配列の解析

reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR と略す) を Fig. 2 に示すように行った。RNA を培養液 200 μ l から抽出し、RNA ペレットを蒸留水 10 μ l の中で浮遊させた¹⁹⁾。ウイルスゲノム RNA を、最初に AMV 逆転写酵素 (Life Sciences, Inc., St. Petersburg, FL) によって 50°C、1 時間で MpF921+ (5'-TCTATAATTCAATTGCCAGA-3') を用いて cDNA に変換した。first PCR は、MpF5+ (5'-ATAGCAGGGAGTTATATGAG-3') と MpL1- (5'-AACCCGTTCTAGACCATCAC-3') のプライマーのセットで行った。nested PCR は、F, SH 領域の塩基配列決定のため、MpF4+ (5'-ACCCATGGATTGTAGCACTGGATG-3') と MpHN1- (5'-CCAATATTCGGAAGCAGGTTTCGGA-3') のセットで 5,666 番目から 6,702 番目までの遺伝子を増幅するよう設計した。HN 領域の塩基配列に対しては、7,791 番目から 8,338 番目までの 548 塩基が、MpHN3+ (5'-GATCCTAGTTACAAATTGCG-3') と MpHN6- (5'-ACCTGCAGTGATAGTCAATCTGTTAG-3') のセットで増幅された。増幅した PCR 産物はゲルから切り出し精製した。塩基配列の決定は、F 領域の 5,666 番目から 6,162 番目までの 497 塩基、SH 領域の 6,218 番目から 6,533 番目までの 316 塩基、HN 領域の 7,830 番目から 8,312 番目までの 483 塩基を解析した。塩基配列の決定は ABI 377A (Applied Biosystems Japan, Tokyo) を用いたダイナーミネーター法で決定した。塩基の配列と系統発生的解析は GENETYX-MAC Version 10 (Software Development Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて行った。

結 果

1. HN 領域の塩基配列の解析

我々は無作為にそれぞれのクリニックからのサンプルを選び、HN 領域の一部の 7,830 番目から 8,312 番目までの 483 塩基の系統発生的解析の結果を Fig. 3 に示した。我々が以前に報告した 6 株 (Mp76-S, Mp80-J, Mp89-K, Mp93-N, Mp93-AK, Mp94-H)¹⁵⁾ と既に報告された外国の株を含めて解析した。今回分離された株は、I, II, III, IV の 4 つの異なるクラスターに分類された。8 株がクラスター I と同定され、そのうち 7 株は東京から、1 株は福岡からの分離株であった。クラスター II は我々の以前の研究で報告された (星野, 宮原ワクチン株, Mp89-K, Mp76-S, Mp80-J の野生株

3 株) Genotype B からなっていた。姫路市からの 10 株と福岡市からの 1 株はクラスター II に属した。クラスター III は 4 株 (札幌 2 株、姫路 1 株、1994 年分離の Mp94-H 株) から成っており、大きなクラスター IV は残りの株 (札幌 5 株、東京 8 株、三重 6 株、姫路 2 株、高松 8 株、山口 2 株、福岡 3 株) から構成された。外国の株についての HN 領域の塩基配列の情報は少なかった^{20,21)}。

2. SH 領域の塩基配列の解析

Tecle ら¹⁴⁾ はムンプスウイルス株が A~J の 10 の異なる遺伝子型に分類されると報告した。Uchida ら¹⁶⁾ は日本の東京と埼玉市における分子疫学を報告し、新しい Genotype J を報告した。これら 2 つの Genotype J の塩基配列は異なり、2 つの Genotype J はムンプスウイルス遺伝子分類の命名法に混乱を来す危険性がある。我々は HN 領域におけるクラスター I, II, III, IV を代表するいくつかの株を選び、SH 領域の塩基配列を外国で報告されている代表株と併せて解析した結果を Fig. 4 に示した。我々は以前の株を再調査し、Mp93-AK は Genotype I, Mp80-J, 89-K, 77-SU, 星野ワクチン株は Genotype B であることが明らかとなった。Mp93-N は Genotype D に分類された。この研究における Mp94-H, Sapporo K-4/JPN.00, Himeji 364/JPN.00 の株と、Uchida ら¹⁶⁾ が報告した SA967/Ja99 は、Lough/UK97 と同じクラスターに分類された。我々は、既に報告されている代表株との間の塩基配列の違いを比較した。Sapporo K-4/JPN.00 株は、Genotype A~J のそれぞれを代表する株との塩基配列の違いが、8.9~15.5% であった。新しい遺伝子型の基準は、SH 領域で 6% 以上の塩基配列の差があることが条件であると報告されている。以上の理由から、Uchida ら^{16,18)} の報告した Genotype J の代わりに新しい Genotype K を提案した。Tokyo M-50/JPN.00 株は、Genotype A~K と比較して、7~13.7% の塩基配列の相違を認めることから、新しい Genotype L を提案した。この研究で提案されたこれら 2 つの新しい Genotype K と L は、SH 領域において 6% 以上の塩基配列の差を認め、既に報告されている遺伝子型とは明らかに異なった^{12,22)}。主流株は、HN 領域での分類と同様の Genotype G に分類された。小流行株は Genotype B, K, L であった。

HN 分類におけるクラスター I は新しい Genotype L、クラスター II は Genotype B、クラスター III は Genotype K、クラスター IV は Genotype G と考えら

Primer design for mumps virus RT-PCR

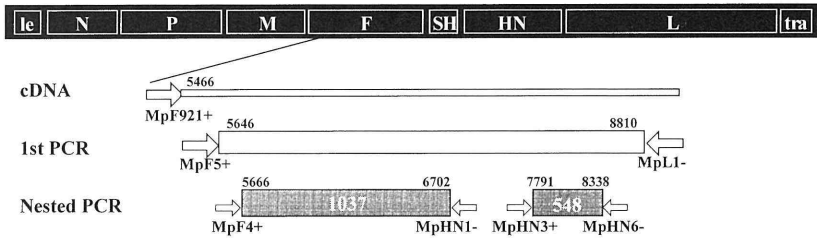


Fig. 2 Design of RT-PCR of mumps virus.

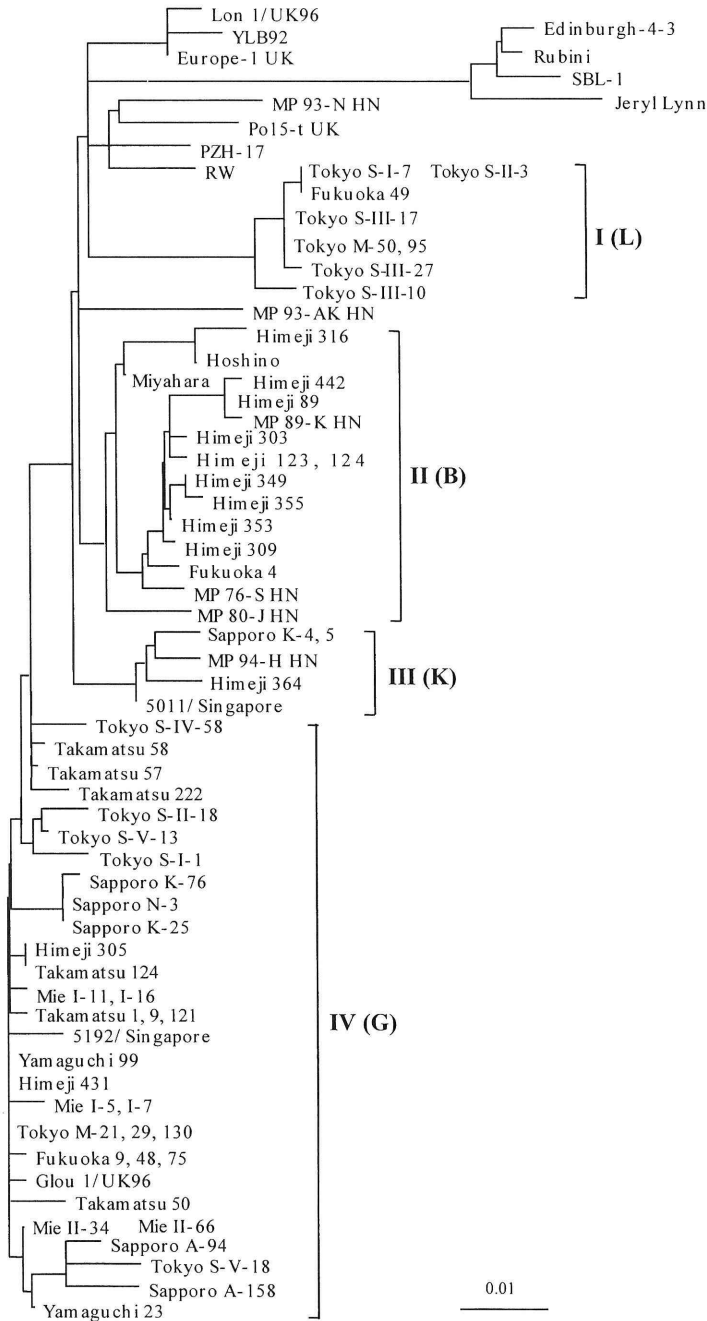


Fig. 3 Phylogenetic analysis of the HN gene.

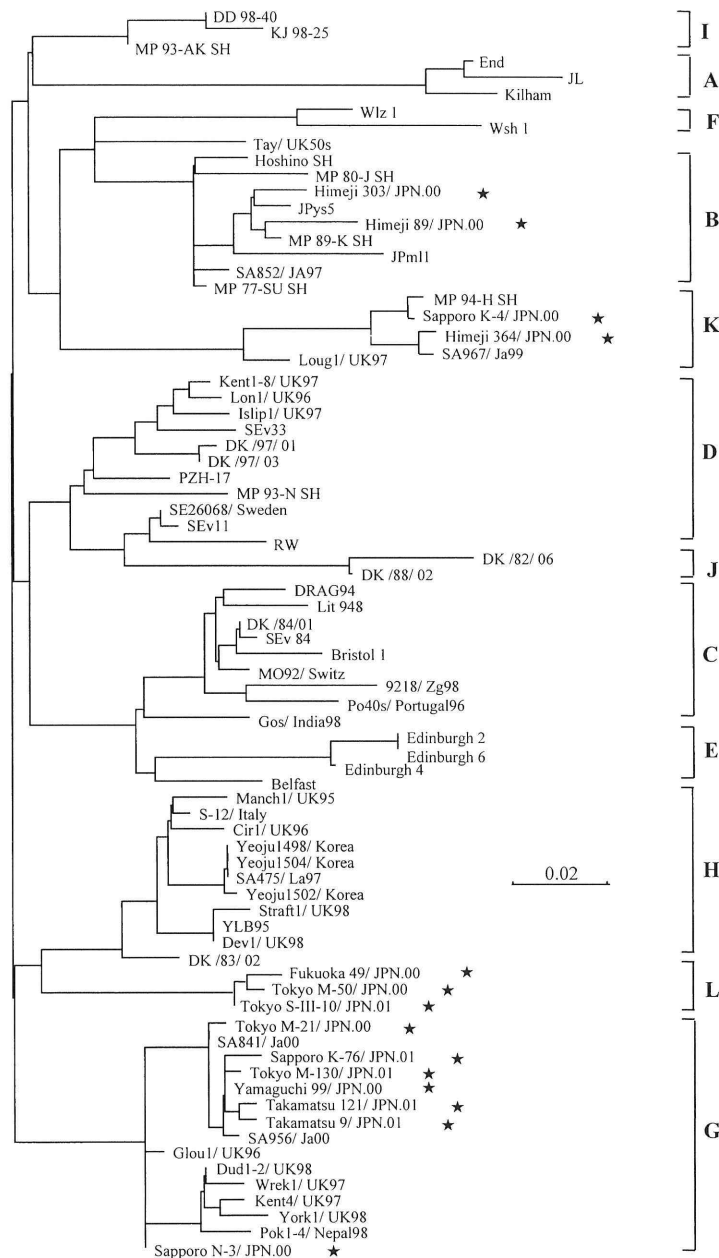


Fig. 4 Phylogenetic analysis of the SH gene, including the results obtained from this study (★).

れた。

Tecle ら¹⁴⁾ は、SH 蛋白の 28～30 番目のアミノ酸トリプレットが遺伝子型分類に密接して関係すると報告した。新しいムンプスウイルス Genotype K と L の塩基配列から推定されるアミノ酸配列を、報告された遺伝子型と合わせて Fig. 5 に示した。日本で分離された Genotype G 株の SH 蛋白の 28～30 番のアミノ酸トリプレットは IIL か ITL であった。新しい Genotype K と L の多くが Genotype D, G, I と同じ IIL であった。トリプレット TIL, IIS, SLS, IML, TIS はそれぞれ Genotype A, B, E, F, J に特異的であった

が、Genotype C と D の多くの株はそれぞれ VVS と IIL を含むことがわかった。アミノ酸トリプレット IIL は Genotype D, I, K, L と G の株の中のいくつかの株でも共通して認められた。同じ Genotype G においては逆に、ITL と IIL の 2 種類のトリプレットが認められた。

SH 領域のアミノ酸による系統発生的解析の結果を Fig. 6 に示した。アミノ酸トリプレット IIS のクラスターには、HN と SH 領域の塩基配列による遺伝子型分類で B に分類された株が集団となった。アミノ酸トリプレット IIL のクラスターには、塩基配列による遺

	10	20	30	40	50	57
[A] SBL1	MPANQPPLYL	TFLLLILLYL	IITLYVWTIL	TINHKTAVRY	AALYQRSCSR	WGFDQSL
[B] Hoshino	...I....PSI.S	..TY....HFF	..S..H..
Himeji 89/JPN.00	★...I.S...PSIVS	..Y....HH..FF	..S..H..
Himeji 303/JPN.00	★...I.L...PS	..A...I.S	..Y....H	..S....FF	..S..H..
[C] BS1	...I..L...VVS	..TY....HLF	..S..H..
[D] RW	...I....RI..	..TY...S..HH..FF	..S..H..
DK-97-03	...I....	..S.....I..	..TY....H	E.....F	..S..H..
MP 93-N	...I....CI..	..TY...QHF	..S..H..
[E] ED2	..LI.....M..RSLS	..TY...S..H	..S....FF	..SV..H..
[F] WLz1	..S.IH...HH	...F...IM	..T..A..QH	..G....LFH	..S..HP
[G] Glou1	...I....I..	..TY....HFFH	..S..H..
Sapporo K-76/JPN.01	★...I....IT	..TY..V..HPYFH	..S..H.P
Yamaguchi 99/JPN.00	★...I....IT	..TY..V..HYFH	..S..H.P
Takamatsu121/JPN.01	★...I....IT	..TY..V..HYFH	..S..H.P
Tokyo M-21/JPN.00	★...I....IT	..TY..V..HYFH	..S..H..
Sapporo N-3/JPN.00	★...I....I..	..TY....HFFH	..S..H..
[H] YLE95	...I....HF...ITS	..TY.A...H	..T....FF	..S..HP
DK-82-03	...I....T....IT	..TY....H	..T....FF	..S..HP
[I] AA9712	...I....MA.I..	..TY....HG.FF	..S.EH..
[J] DK-88-02	...I.L...PT....	..T.....S	..TY..T..H	..H....FF	..S..H..
[K] MP 94-H	...I..S...V....	..A...I..	A.TYN..AQH	..HRG.L..	..S..H.F
Sapporo K-4/JPN.00	★...I..S...V....	..A...I..	A.TY..AQH	..HRG.L..	..S..H.F
Himeji 364/JPN.00	★...I..S...V....	..A...I.F	A.TY..AHH	S..HR..L..	..S..H.F
[L] Fukuoka 49/JPN.00	★...I....	..L.....CI..	..TY...E.H	..T....FF	..S..H..
Tokyo M-50/JPN.00	★...I....	..L.....CI..	..TY...E.H	..T....FF	..S..H..
Tokyo S-III-10/JPN.01★	★...I....	..L.....CI..	..TY...E.H	..T....FF	..S..H..

Fig. 5 Difference of SH amino acid alignments of the 12 genotypes, including the results obtained from this study (★).

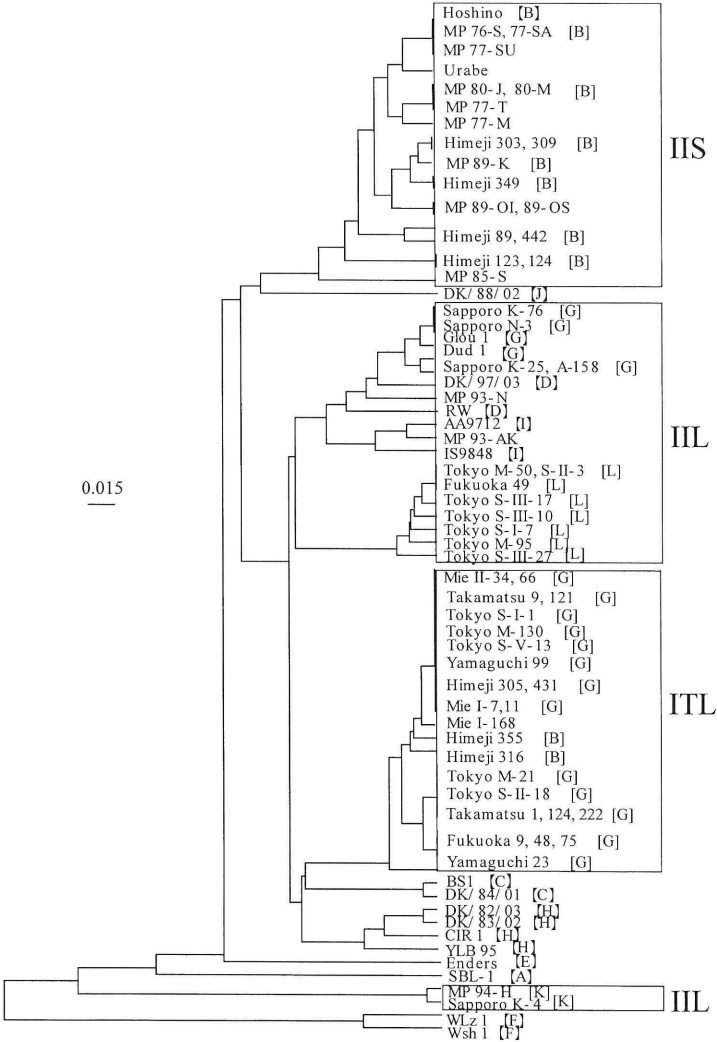


Fig. 6 Phylogenetic analysis of the deduced amino acid of the SH protein.

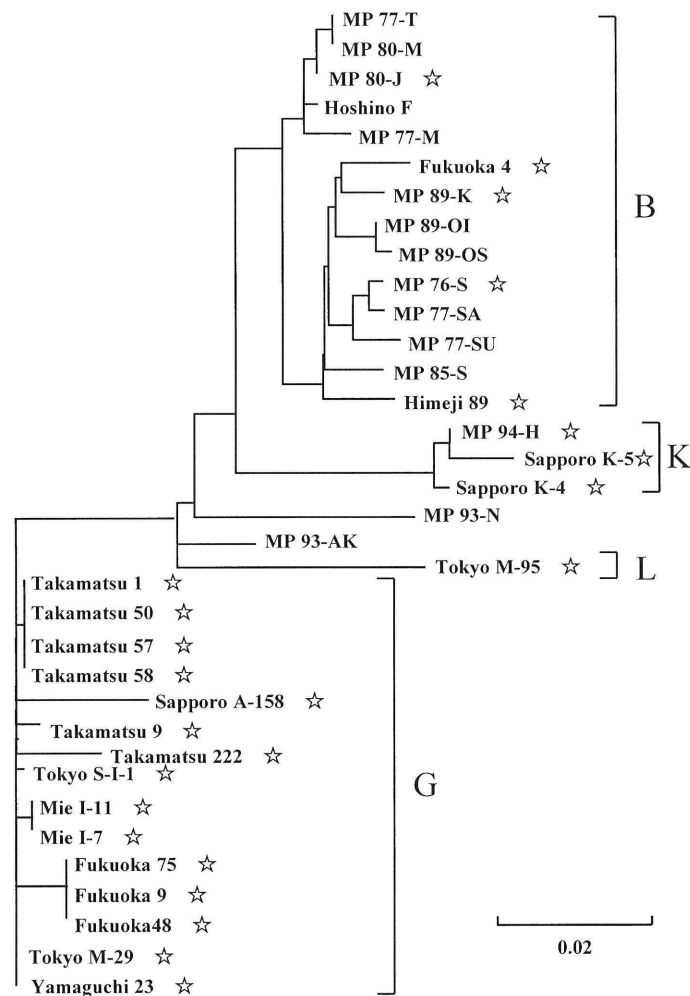


Fig. 7 Phylogenetic analysis of the F gene, including the strains analyzed in part of the HN gene (☆).

伝子型分類で G, D, I, L, K に分類された株が混在し、アミノ酸トリプレット ITL のクラスターには、塩基配列による遺伝子型分類で Genotype G と最近の Genotype B 株が混在していた。

3. F 領域の塩基配列の解析

HN と SH 領域の塩基配列による遺伝子型分類と、これまで Tecle ら¹⁴⁾ によって報告されてきた SH 蛋白のアミノ酸トリプレットによる遺伝子型分類には、違いがあった。次に、HN 領域で分類を行った株の一部を用いて、F 領域の一部の 497 の塩基配列における系統発生的解析を行い、結果を Fig. 7 に示した。HN 領域において Genotype B であった株は共通するクラスターを形成し、Genotype K であった株、Genotype G であった株はそれぞれ異なる一群のクラスターを形成した。この結果より、F 領域の塩基配列による遺伝子型分類は HN 領域での分類と一致し、F, SH, HN 領域の塩基配列による遺伝子型分類は共通であると考

えられた。

考 察

我々は、1976 年から 1980 年代のムンプスウイルス株は Genotype B であり、我々が以前報告したムンプスウイルス株 (Mp93-N, Mp94-H) は Genotype D と K になると考えられると報告した。Genotype K と L は 2000 年から 2001 年のこの流行で発見された。Genotype B は 1990 年以前に優勢であった土着の株であり、Genotype K は 1990 年代に主に流行していた株と思われた。Takahashi ら²³⁾ は麻疹ウイルスでは単一の遺伝子型が優勢であるのに対して、ムンプスではいくつかの遺伝子型が日本で同時流行していると報告した。彼らはムンプスウイルスの分布が地域によって全く異なる特徴を持つとも報告している。Uchida ら¹⁶⁾ は Genotype B は東京周辺で Genotype G に完全に置き換わったと報告した。Genotype B, K (1980～1990 年

代に優勢)の過去の主流株は最近ではマイナーな株となり、新しい Genotype L と共に主流株の Genotype G に置き換わっており、遺伝子型の分布には地域差があることが明らかとなった。今回の調査では Genotype B が 11 株分離され、それらの大部分は姫路市のものであった。高松と三重では Genotype G のみが分離された。57 株中、11 株は B に分類され、35 株は G に、3 株は K に、8 株は L に分類され、Genotype L は 2000 年に東京で初めて確認された。我々の以前の報告^{15,23)}と併せて考えると、Genotype B は 1980 年代と 1990 年代早期に優勢な株であり、Genotype K は Genotype D と J の散発的な流行と共に 1990 年代後期の主流株遺伝子型であった。これらは 2000~2001 年に Genotype G に置き換わっており、G がどこからきたのか疫学的に興味ある問題である。Genotype G は 1991 年にイギリスで報告されており、1998 年のいくつかの流行はネパールから補充されたイギリス陸軍にさかのぼる Genotype G によって引き起こされた¹²⁾。最近、韓国で Genotype H の流行が報告され¹³⁾、ヨーロッパでも Genotype H が報告された¹²⁾。1999~2000 年の間にシンガポールにおいて、高いワクチン接種率にもかかわらずムンプスウイルスの流行が報告されたが、HN 領域の塩基配列のデータが少なかったため、その遺伝子型を決定できなかった²⁴⁾。Lim らは 8 株のシンガポール株が占部株 (Genotype B) に密接した関係があるが、シンガポールの株間で相同性の高いクラスターになったと報告した。我々はシンガポールから報告された塩基配列の結果 (HN 領域の 483 塩基)の一部を解析し、その結果を我々の結果と合わせ Fig. 3 に示した。5192/Singapore は HN クラスター IV (Genotype G) に分類され、5011/Singapore と残りの株は同じ HN クラスター III (Genotype K) に分類された。地理的な分子疫学的特徴は、ヨーロッパやアジアの最近のムンプスの流行において区別できなくなり、Genotype G、H もヨーロッパ、アジアで分離された。Genotype L は東京で優勢に分離され、福岡で Genotype L が 1 株分離されたが、その伝播経路をさかのぼることはできなかった。

分子疫学の報告の大部分は SH 領域に基づき、SH 蛋白の 28~30 番目のアミノ酸トリプレットは遺伝子型分類に密接に関係していると報告されている。新しい Genotype K と L の推定されるアミノ酸配列を、報告された遺伝子型と共に Fig. 5 に示した。日本で分離された Genotype G 株の 28~30 番目のアミノ酸トリ

プレットは、IIL か ITL であった。アミノ酸トリプレット IIL は、Genotype D, G, I, K, L の中でも発見された。また、同じ Genotype G に ITL と IIL の 2 種類のトリプレットが認められた。Fig. 6 に示した SH 領域のアミノ酸による系統発生的解析においても、トリプレット IIL のクラスターに Genotype G, D, I, L, K が混在し、ITL のクラスターに Genotype G, B が混在していた。以上の結果より、SH 蛋白の 28~30 番目のアミノ酸トリプレットによる遺伝子型分類には意味がないことになる。

ムンプスウイルスは細胞融合を通して感染が拡大する。細胞融合のプロセスにおいて、HN 蛋白は細胞膜のシアル酸に付着し、HN 蛋白の立体構造の変化を引き起こす。この反応がそれに続く細胞融合反応の引き金となり、F1 蛋白のアミノ末端にある fusion domain が HN 蛋白と F 蛋白との間の相互作用により細胞膜脂質層へと突出する^{2,25)}。HN 蛋白と F 蛋白はウイルス感染に絶対必要であり、特に中和抗体にとって免疫応答のターゲットとして重要な抗原部位である。しかしながら HN と F 領域の結果に基づいた分子疫学的研究の報告は少なかった^{20,21,26)}。SH 領域は超可変域と考えられているため、SH 領域の塩基配列の結果に基づく分子疫学的研究が行われた。SH 領域で 6% 以上の変異があれば別の遺伝子型と考えると報告があり、他の領域の塩基配列では少なくとも何% 以上の変異があれば別の遺伝子型の株であると考えるか、国際的にもはっきり定められていない。ムンプスと同じパラミクソウイルスに属する麻疹ウイルスでは、H 蛋白領域で 2% 以上の変異で別の遺伝子型と考えられている。ムンプスもその構成蛋白である HN, F 領域の分類を行い SH 領域での分類と一致したことより、SH 領域で 6% 以上の変異を別の遺伝子型とすることの妥当性が明らかとなった。SH 領域において異なる遺伝子型にも関わらず、Örvell ら²⁷⁾は Genotype C, D, G, H, I が類似した抗原性を示すと報告しており、我々も新しい遺伝子型ウイルスの抗原性を調べ、日本で流行していた株 Genotype B, G, K, L は抗原性が類似していることを報告している²⁸⁾。現在までのところ我が国で使用されているワクチン株は genotype B で、流行株との間には大きな抗原性の変化はなく、ワクチンの効果に影響を及ぼすようなことはないと考えられる。外国との交流も密になり今後外国からの輸入感染の拡大も危惧されるため、ムンプスウイルスの分子疫学調査は外国の株のデータの蓄積されて

いる SH 領域を対象に継続する必要がある。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導ならびに御校閲を賜りました東京医科大学小児科学講座星加明德教授に深甚なる謝意を表します。また本研究にあたり直接の懇切な御指導、御協力を頂きました北里生命科学研究所ウイルス感染制御室の方々に深く感謝致します。

本論文の要旨の一部は第43回日本臨床ウイルス学会において発表した。

文 献

- 1) Carbone KM, Wolinsky JS: Mumps virus. Fields Virology, 4th edition. Knipe DM, Howley PM, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 1381-1400, 2001
- 2) Tanabayashi K, Takeuchi K, Okazaki K, Hishiyama M, Yamada A: Expression of mumps virus glycoproteins in mammalian cells from cloned cDNAs: both F and HN proteins are required for cell fusion. *Virology* **187**: 801-804, 1992
- 3) Takeuchi K, Tanabayashi K, Hishiyama M, Yamada A: The mumps virus SH protein is a membrane protein and not essential for virus growth. *Virology* **225**: 156-162, 1996
- 4) Yeo RP, Afzal MA, Forsey T, Rima BK: Identification of a new mumps virus lineage by nucleotide sequence analysis of the SH gene of ten different strains. *Arch Virol* **128**: 371-377, 1993
- 5) Künkel U, Schreier E, Siegl G, Schultze D: Molecular characterization of mumps virus strains circulating during an epidemic in eastern Switzerland 1992/1993. *Arch Virol* **136**: 433-438, 1994
- 6) Afzal MA, Buchanan J, Heath AB, Minor PD: Clustering of mumps virus isolates by SH gene sequence only partially reflects geographical origin. *Arch Virol* **142**: 227-238, 1997
- 7) Örvell C, Kalantari M, Johansson B: Characterization of five conserved genotypes of the mumps virus small hydrophobic (SH) protein gene. *J Gen Virol* **78**: 91-95, 1997
- 8) Elango N, Kövamees J, Varsanyi TM, Norrby E: mRNA sequence and deduced amino acid sequence of the mumps virus small hydrophobic protein gene. *J Virol* **63**: 1413-1415, 1989
- 9) Elliott GD, Afzal MA, Martin SJ, Rima BK: Nucleotide sequence of the matrix, fusion and putative SH protein genes of mumps virus and their deduced amino acid sequences. *Virus Res* **12**: 61-75, 1989
- 10) Takeuchi K, Tanabayashi K, Hishiyama M, Yamada A, Sugiura A: Variations of nucleotide sequences and transcription of the SH gene among mumps virus strains. *Virology* **181**: 364-366, 1991
- 11) Wu L, Bai Z, Li Y, Rima BK, Afzal MA: Wild type mumps viruses circulating in China establish a new genotype. *Vaccine* **16**: 281-285, 1998
- 12) Jin L, Beard S, Brown DWG: Genetic heterogeneity of mumps virus in the United Kingdom: identification of two new genotypes. *J Infect Dis* **180**: 829-833, 1999
- 13) Kim SH, Song K-J, Shin YK, Kim JH, Choi SM, Park KS, Baek LJ, Lee YJ, Song J-W: Phylogenetic analysis of the small hydrophobic (SH) gene of mumps virus in Korea: identification of a new genotype. *Microbiol Immunol* **44**: 173-177, 2000
- 14) Tecle T, Böttiger B, Örvell C, Johansson B: Characterization of two decades of temporal co-circulation of four mumps virus genotypes in Denmark: identification of a new genotype. *J Gen Virol* **82**: 2675-2680, 2001
- 15) Kashiwagi Y, Takami T, Mori T, Nakayama T: Sequence analysis of F, SH, and HN genes among mumps virus strains in Japan. *Arch Virol* **144**: 593-599, 1999
- 16) Uchida K, Shinohara M, Shimada S, Segawa Y, Hoshino Y: Characterization of mumps virus isolated in Saitama prefecture, Japan by sequence analysis of the SH gene. *Microbiol Immunol* **45**: 851-855, 2001
- 17) Tecle T, Mickiené A, Johansson B, Lindquist L, Örvell C: Molecular characterisation of two mumps virus genotypes circulating during an epidemic in Lithuania from 1998 to 2000. *Arch Virol* **147**: 243-253, 2001
- 18) Uchida K, Shinohara M, Shimada S, Segawa Y, Kimura K, Hoshino Y: Characterization of the F gene of contemporary mumps virus strains isolated in Japan. *Microbiol Immunol* **47**: 167-172, 2003
- 19) Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann Biochem* **162**: 156-159, 1987
- 20) Yates PJ, Afzal MA, Minor PD: Antigenic and genetic variation of the HN protein of mumps virus strains. *J Gen Virol* **77**: 2491-2497, 1996
- 21) Örvell C, Alsheikhly A-R, Kalantari M, Johansson B: Characterization of genotype-specific epitopes of the HN protein of mumps virus. *J Virol* **78**: 3187-3193, 1997
- 22) Johansson B, Tecle T, Örvell C: Proposed criteria for classification of new genotypes of mumps virus. *Scand J Infect Dis* **34**: 355-357, 2002
- 23) Takahashi M, Nakayama T, Kashiwagi Y, Takami T, Sonoda S, Yamanaka T, Ochiai H, Ihara T, Tajima T: Single genotype of measles virus is dominant whereas several genotypes of mumps virus are co-circulating. *J Med Virol* **62**: 278-285, 2000
- 24) Lim CS, Chan KP, Goh KT, Chow VTK: Hemag-

- glutinin-neuraminidase sequence and phylogenetic analyses of mumps virus isolates from a vaccinated population in Singapore. *J Med Virol* **70**: 287–292, 2003
- 25) Dutch RE, Leser GP, Lamb RA: Paramyxovirus fusion protein: characterization of the core trimer, a rod-shaped complex with helices in anti-parallel orientation. *Virology* **254**: 147–159, 1999
- 26) Tecle T, Johansson B, Yun Z, Örvell C: Antigenic and genetic characterization of the fusion (F) protein of mumps virus strains. *Arch Virol* **145**: 1199–1210, 2000
- 27) Örvell C, Tecle T, Johansson B, Saito H, Samuelson A: Antigenic relationships between six genotypes of the small hydrophobic protein gene of mumps virus. *J Gen Virol* **83**: 2489–2496, 2002
- 28) Inou Y, Nakayama T, Yoshida N, Uejima H, Yuri K, Kamada M, Kumagai T, Sakiyama H, Miyata A, Ochiai H, Ihara T, Okafuji T, Nagai T, Suzuki E, Shimomura K, Ito Y, Miyazaki C: Molecular epidemiology of mumps virus in Japan and proposal of two new genotypes. *J Med Virol* **73**: 97–104, 2004

Molecular epidemiology of mumps virus in Japan

Yoko INOU¹⁾, Tetsuo NAKAYAMA²⁾

¹⁾Department of Pediatrics, Tokyo Medical University

²⁾Laboratory of Viral Infection, Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University

Abstract

We isolated 872 strains of mumps virus from naso-pharyngeal secretions in seven different districts of Japan from January 2000 to July 2001. Among them, 57 strains were geno-typed by nucleotide sequencing in part of the fusion (F), small hydrophobic (SH), and hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein regions. Four different genotypes (B, G, K, and L) of mumps virus were co-circulating in Japan and the distribution of genotypes varied in geographically different districts. Two new clusters designated as genotypes K and L had more than 7 % nucleotide variation in the SH gene. Among the 57 strains, 11 were classified as B, 35 as G, three as K, and eight as L, which was mainly isolated in Tokyo. Genotype B was the indigenous strain and genotype K was introduced in 1994. Genotypes B and K co-circulated in the 1990s and were replaced by genotype G in 2000. We should continue to study mumps virus molecular epidemiology.

〈Key words〉 Mumps virus, Fusion (F) protein, Small hydrophobic (SH) protein, Hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein, Genotype
