

分 担 研 究 報 告

麻疹感染初期におけるサイトカイン動態

班 員：山内 一也（日本生物科学研究所）
小船 富美夫、網 康至（国立感染研）、
甲斐 知恵子、三浦 竜一、佐藤 宏樹（東大・農学部）

Dynamics of cytokines at an early stage of measles virus infection

Chieko KAI¹, Yasushi AMI², Hiroki SATO¹, Ryuichi MIURA¹,
Fumio KOBUNE³, Kazuya YAMANOUCHI³

¹Laboratory of Veterinary Microbiology, Graduate School of Agriculture and Life Sciences

The University of Tokyo, ²National Institute of Infectious Diseases, ³Nippon Institute for Biological Science

ABSTRACT

SSPE is considered to be caused by the persistence of measles virus (MV). Disturbance in the rapid elimination of MV after infection is suspected to lead to the virus persistence. To understand the persistence mechanisms, we investigated the immune mechanisms at an early stage of infection using a monkey model of acute measles with characteristic clinical signs which we had successfully established. IFN, IL8, IL6 and IL10 were observed to increase in plasma of monkeys after MV infection.

【はじめに】

亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) は麻疹ウイルスの持続感染によるとされている。急性麻疹ではウイルスは急速に排除されるが、この排除機構の攪乱がウイルスの体内での持続感染につながるものと考えられる。麻疹ウイルスの感染初期のウイルス排除機構および持続感染機構に関する免疫機構の検討を行なうため、我々が世界に先駆けて開発した麻疹ウイルスの自然感染症状を再現する動物モデルを用いて、感染後のサイトカイン動態と病理組織学的変化の検索を行った。昨年度の初期変化後のサイトカイン動態を観察するため、本年度は長期観察を行った。

【材料と方法】

13、14、16歳齢のカニクイザル計4頭にケタラル麻酔下において麻疹ウイルス (MV) NK株、 $10^{5.5}$ TCID₅₀ / ml を2頭に、MV-HIB株、 $10^{5.75}$ TCID₅₀ / ml を残り2頭に気管内接種し、経日的に採血して血中サイトカイン量をELISA法にて測定した。

次に実験以前に血漿中IL8量を測定し比較的低い個体を選出した3歳齢のカニクイザル2頭にケタラル麻酔下においてMV-HL-MoBr3株、 $10^{5.5}$ TCID₅₀ / ml を皮下接種した。その後経日的に採血して末梢白血球数の動態、リンパ球サブセットの比率変化を測定した。また血清中サイトカイン動態については、インターフェロン活性をVSVウイルス増殖抑制試験において、他のサイトカインについてはELISA法を用いて測定した。20日目に安楽殺後採血し剖検を行なった。解剖後、常法に基づいて病理組織学的検索を行ない、また凍結切片を作成してウイルス抗原およびサイトカイン抗原を免疫組織化学的に検索した。

【結果】

昨年度の実験成果から血漿中 IL8 量が増加する個体が見いだされたので、MV をカニクイザル 4 頭に接種した実験において、血漿中 IL8 量の変化を追跡したところ、個体差のあるものの、血漿中 IL8 量が感染以前に既に高値を示すもの以外では上昇することが確認された。前年の 2 検体でも既に高い値を示すものは変化しなかったが、感染以前に低値を示した個体で上昇が見られた結果と相関した。しかも昨年度より長期経過を観察した結果、2 峰性あるいは 3 峰性のピークがある傾向が認められた (図 1)。

そこで新たにカニクイザル 2 頭に MV-HL 株の接種実験を行い、末梢血中の血球変化とサイトカイン動態を長期に観察し、病理組織学的検索もあわせて行った。昨年度は早期の病理所見を観察するため 6 日目で安楽殺したのに対し、本年度は 20 日目まで観察した。

MV 感染後、末梢血白血球数は感染後これまでの実験と同様に 5 日頃まで減少する傾向を示した。その後急速に回復し 8 ~ 11 日には平常値に至ることが観察された (図 2)。CD4/CD8 比も 4 日目には低値を示し、その後の回復は遅く麻疹の動物モデルとして再現性のある状態を呈していると考えられた (図 3)。

血漿中インターフェロン活性は、感染後 2 ~ 4 日目から上昇し始め、4 日目から急激に上昇し 5 日目にピークに達したのは前回の実験と再現性を有し、その後減少傾向を示した。減少速度は上昇速度と比較するとゆるやかにおこり 11 日目には低値となった (図 4)。血漿中サイトカインのうち、IL-8 濃度は 3 日目、5 ~ 6 日目、11 日目の 3 峰性のピークを示すことが観察された (図 5)。IL-6 は 4 ~ 5 日目にピークを示し、IL-10 は 1 検体で弱いながら 8 日目から上昇を示して 11 日はプラトーに達しその濃度が長く持続する傾向が観察された。

病理学的検索については今回の 20 日の剖検例と前回の接種 6 日の剖検例をあわせて、リンパ組織を中心に病理組織学的に比較検討をおこなった。接種 6 日のリンパ節においては、軽度のろ胞の萎縮が観察され、ろ胞の中心に類上皮細胞あるいはマクロファージ様細胞が観察された。同細胞を抗マクロファージ抗体である HAM56 で染色したところ陽性細胞であった。ろ胞周囲あるいは傍皮質には巨細胞が観察され、ウイルス抗原陽性であった。脾臓では、中心動脈周囲のリンパ球にウイルス抗原が観察された。胸腺では、巨細胞の形成が顕著で、巨細胞及び随質のリンパ球にウイルス抗原が観察された。その他、膀胱粘膜及び気管リンパ小節にもウイルス抗原陽性リンパ球が観察された。気管では、気管支粘膜上皮細胞に抗原が観察された。接種 20 日では、リンパ節及び脾臓のろ胞過形成が観察された。巨細胞およびウイルス抗原陽性リンパ球はいずれの臓器にも観察されなかった。

[考 察]

感染後 5 ~ 6 日目頃白血球数が最も減少し、その後回復した結果はこれまでの研究と再現性があった。CD4/CD8 率はやや回復するものの比較的低い値を 2 週後も持続し、免疫抑制状態が持続すると考えられた。

血漿中インターフェロン活性は感染後ウイルスの増殖に伴って産生されウイルスの排除に関与していると考えられた。今回 IFN γ の測定を試みたヒトに対する抗体が交差反応性を示さなかったため測定できず、IFN の種類を同定することはできなかったが、感染後ウイルスの増殖期に伴って速やかに濃度が上昇することなどから抗ウイルス作用の強い α 、 β 型と推測され、ウイルス排除に関与していると考えられる。

血漿中サイトカイン濃度の測定において、IL8 が 3 峰性のピークを示したのは興味深い。IL-8 は好中球のみならずリンパ球にも働き遊走活性を示す。また好中球を活性化して活性酸素などの産生誘導を惹起し、血管内皮細胞への接着増強や末梢血への好中球動員の促進を行う。末梢血中の好中球数にも増減が認められたが、IL8 の 5 日目のピークからは連動する傾向があり IL8 の関与も推察された。また近年種々のウイルス感染による呼吸器系上皮細胞や T 細胞、好中球からの IL8 産生が報告されている。麻疹ウイルス感染によって産生誘導される IL8 も特異的な作用機序を持っていると考えられるので、今後その作用に関する検討を行いたい。IL-6 は抗体産生細胞の最終分化を誘導する因

子であるが、その他多くの作用が知られている。感染後の急性期蛋白の誘導作用も知られているが、本実験系では初期に一過性に産生が認められたことから急性期反応への関与が示唆される。

IL-10 が1検体で10日以降比較的高い値を示したが、IL-10にはT細胞の増殖阻害作用やCTLの分化誘導作用があるので、後半の免疫抑制や免疫抵抗性などに関与している可能性が考えられる。またIL-10にはIL-6などの産生抑制作用もあるので、今回IL-6がピーク後減少したことへの関与も考えられる。

今回試みたサイトカイン測定においてヒトに対する抗体の交差反応性がなかったため、IL-2、IL-4、IFN γ が測定できなかった。いずれもT細胞の増殖や分化、抗体産生誘導等に関与しており、これらサイトカインネットワークによって免疫系の誘導や抑制が大きく影響を受けることから、今後検討すべき課題であると考えられる。

病理組織学的検索からは、感染初期のリンパ組織や気管周囲、膀胱粘膜におけるウイルス分布が明らかになった。リンパ節のろ胞中心に出現する類上皮様の細胞がマクロファージであることが同定された。本細胞はIFN γ レセプター陽性であり、IFN γ との関連が考えられることから、感染初期の免疫応答におけるIFN γ 産生および機能の解析を行う必要があると考える。

病理組織所見やウイルスの各臓器での消長とあわせてサイトカイン動態を解析することは、感染後回復までの間に生ずる免疫抵抗性機構や免疫抑制機構の全体像を解明するために重要であると考えられ、持続感染機構の解明に寄与すると考えられる。今後さらにサイトカイン数も増やして全体像を解明する予定である。

[文 献]

- 1) Kobune, F., Takahashi, H., Terao, K., Ohkawa, T., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Sakata, H., Yamanouchi, K. and Kai, C.: Nonhuman Primate Models of Measles. *Lab. Anim. Sci.* 46: 315-320, 1996
- 2) 山内一也, 小船富美夫, 網康至, 小長谷昌功, 関沢文, 池田たま子, 岩附研子, 甲斐知恵子.: 麻疹感染におけるウイルス排除の免疫機構. 厚生省特定疾患「遅発性ウイルス感染」調査研究班平成9年度研究報告書. 1998

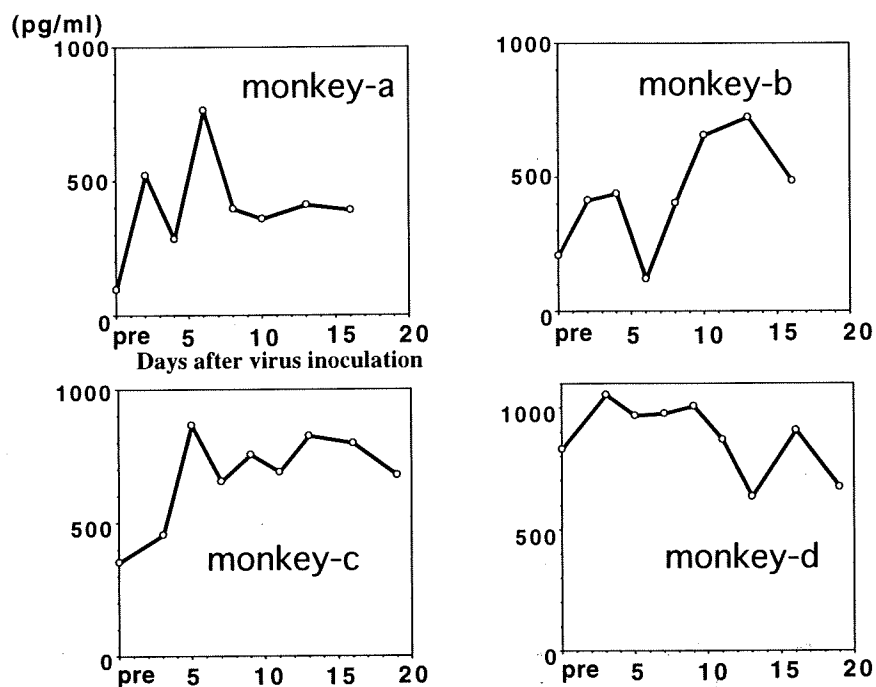


図1 MV感染後血漿中 interleukin-8量

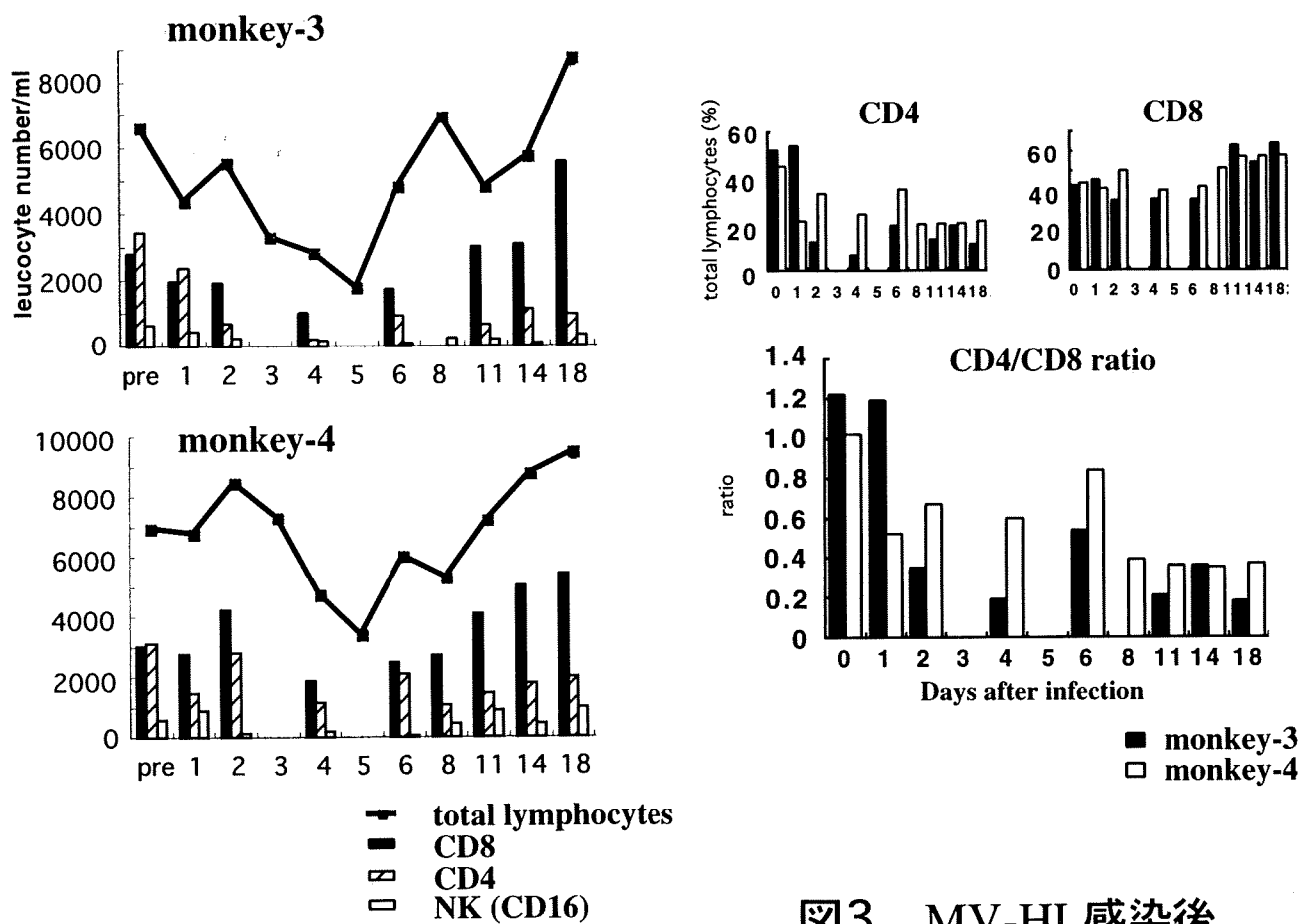


図2 MV-HL 感染後の白血球数

図3 MV-HL感染後 T細胞サブセット比

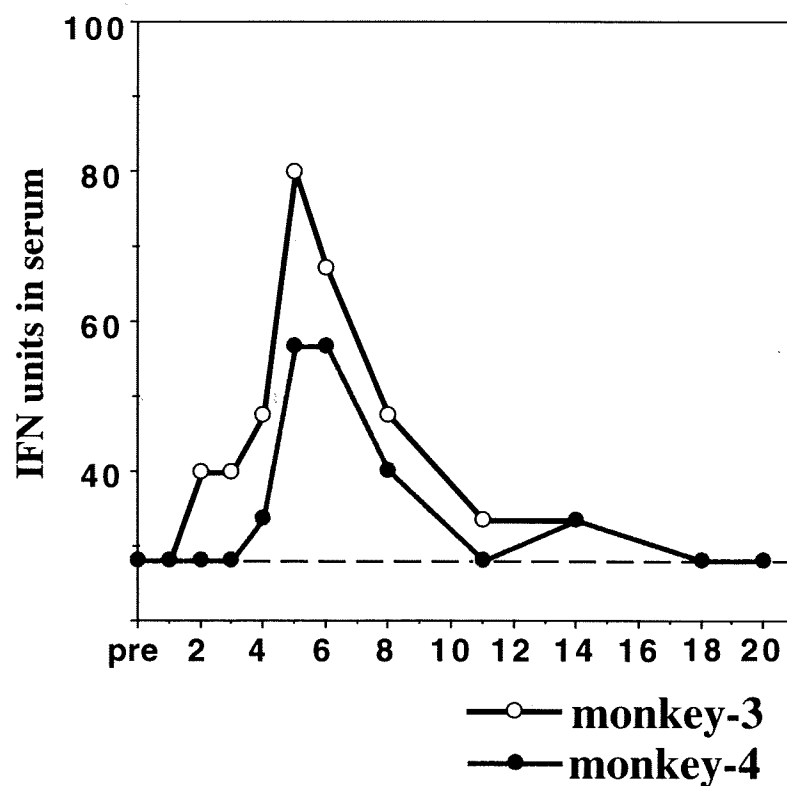


図4 MV-HL感染後血漿中interferon活性

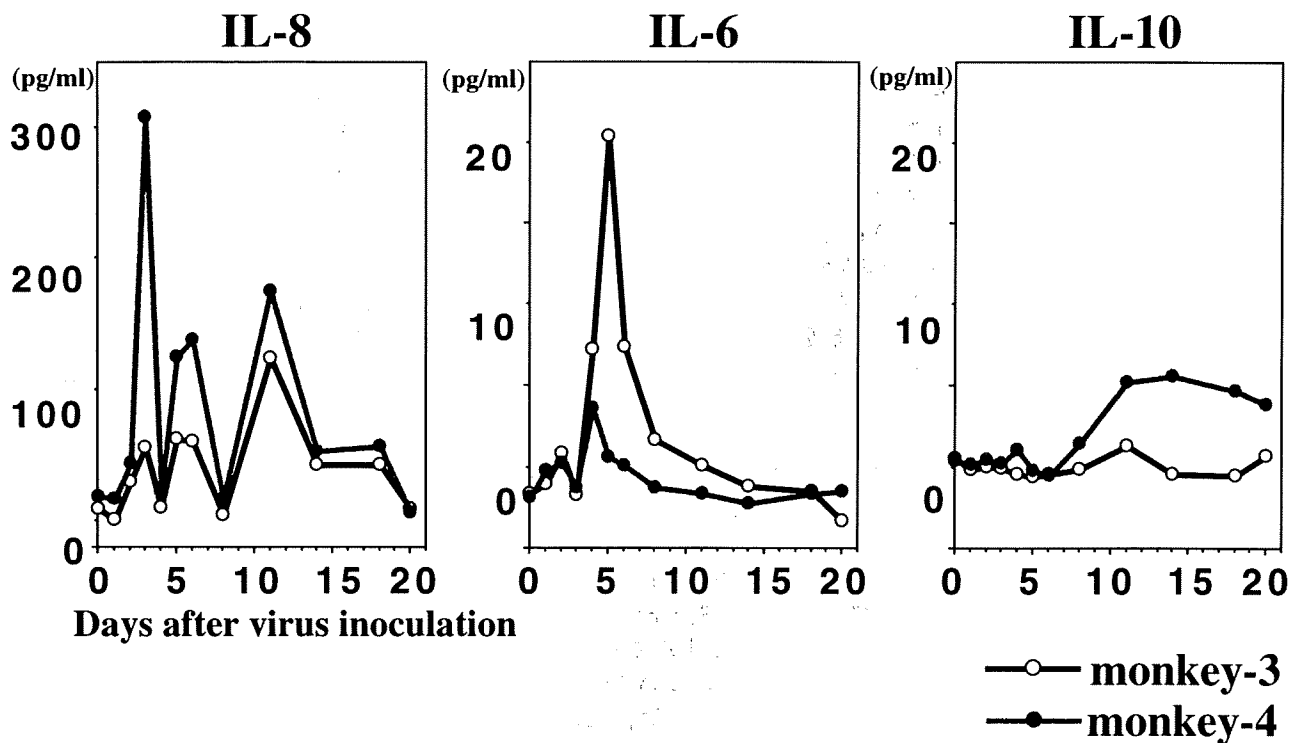


図5 MV-HL感染後血漿中サイトカイン量

麻疹ウイルスの向神経性と持続感染：マウスモデルでの研究

班 員： 小船富美夫(国立感染症研究所・安全性研究部)
研究協力者： 網 康至(国立感染症研究所・動物管理室)
山内一也(日本生物科学研究所)
甲斐知恵子(東京大学・農学部・獣医微生物)

Development of SSPE models in mice

Fumio KOBUNE¹, Yasushi AMI², Kazuya YAMANOUCHI³, Chieko Kai⁴

¹Department of Safety Research on Biologics, ²Division of Experimental Animal, National Institute of Infectious Disease, ³Nippon Institute for Biological Science, ⁴Laboratory of Veterinary Microbiology, Graduate School of Agriculture and Life Science, The University of Tokyo

ABSTRACT

Measles virus(MV) CH2 strain had induced acute necrotizing encephalitis and led to death within 7 to 10 days when inoculated to one day old mice brain. We produced a new strain of virus, CH2-Ab30(Ab30), by passaging CH2 strain in MoMo-9 cells under the presence of several kinds of anti-serum. This virus persistently infected in vitro with no fusion and smaller size of plaque than CH2 strain. All mice intracerebrally inoculated 10^3 TCID₅₀ of Ab30 were survive during the observation period while 5 of 13 mice inoculated CH2 at the same dose were dead. However one of five autopsied mice at 15 days p.i. clearly had focal accumulation of inflammatory cells with gliosis in the brain stem. This suggested that Ab30 strain was one of the useful candidates of MV to produce mice models of SSPE.

【はじめに】

代表的な遅発性ウイルス感染症である亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) が麻疹ウイルス (MV) の中枢神経系での持続感染であることが判明して久しい。しかしながら、その発病機構の研究に進展は見られていない。われわれは先に、野外 MV に対する高感受性細胞系および向神経系 MV を用いた急性麻疹脳炎の動物実験モデルの確立を試み、以下の結果を得た。

- 1)サル実験系において向神経性 MV は、末梢より中枢(特に脳)へ容易に侵入することを見出した。
- 2)向神経性 MV のリスサルへの脳内接種により脱髄病変を誘発した。
- 3)新生マウス、ハムスターに対して確実に急性脱髄性脳炎を誘発する CH2 株ウイルスを入手した。本年は、新たに見出したマウスに脱髄脳炎を誘発する CH2株、その持続感染性ウイルス CH2-Ab30株を作出しその神経病原性を検討した。

【材料と方法】

CH2 株ウイルス感染リンパ系細胞 (MoMo-9 細胞)を感染初期サル抗体、回復期サル抗体、高度免疫ウサギ抗体の存在化で30代継代処理し、抗体存在下でも持続感染する CH2-Ab30 (Ab30) 株を作出した(図1)。

マウスはBALB/c マウス生後1日齢の新生マウスを用い、脳内にそれぞれのウイルス株 $10^3/10\mu\text{l}$ を接種し、症状、生死を観察した。接種後経時的に脳を無菌的に採材しウイルス感染価を測定した。接種後15日に剖検を行い脳を採材し、10% 中性緩衝ホルマリンで固定、通常の方法に従って病理切片を作成し、病理組織学的検討を行った。一部の材料については抗 NPウサギ抗体を用いたウイルス抗原をABC法を用いて免疫組織学的染色を行った。また、同様に抗ウシ GFAP (glial fibrillary acid protein) ウサギ抗体を用いた染色も行った。

[結果と考察]

Ab30株は、CH2株と比較して継代細胞での細胞変性効果が、明らかに変化した。CH2株では、fusion 活性が高く巨細胞を含む大きな ブラック を形成するのに対して、Ab30 株では細胞融合することなく、円形化にとどまりブラックサイズも小型化した。

昨年度報告したように、CH2 株 10^4 TCID₅₀ を1日齢哺乳マウスに脳内接種すると接種7日から10日で100% 発症、致死する。脳病変は、壊死性の変化が著しく、脱髄をともなうものの SSPE モデルとしてはより緩慢かつ持続的な感染を成立させる必要があると考えられた。そこで、接種ウイルス感染価を低く 10^3 TCID₅₀ にするとともに、in vitro で抗体存在下でも持続感染する Ab 30 株 を用いた感染実験を行い比較検討した。

CH2 株接種マウスでは接種7日から神経症状が観察され、発症したマウスはすばやく死亡した。接種9日以降13例中5匹が死亡した。Ab30 株接種マウスでは、顕著な神経症状を呈することなく死亡することもなかった(表1)。脳におけるウイルス感染価は、CH2 株接種群では接種9日で、 10^4 TCID₅₀ に達したが、Ab30 株接種群では接種7日まで 10 TCID₅₀ であった(表2)。いずれの群においても接種9日以降ウイルス感染価は検出限界以下であった。接種15日における脳病変および抗原検索結果は表2に示した。CH2株接種マウス1例で壊死巣をともなう硬化性病変が観察された。本例では全脳にわたって glial fibre のび慢性の増加が観察され、硬化性全脳炎を呈していると考えられた。壊死巣の周囲ではウイルス抗原は検出されず、壊死を共なはない炎症細胞およびグリア細胞の集簇巣において神経細胞あるいはグリア細胞の細胞質内にウイルス抗原が検出された。その他の例においては軽度の炎症細胞集簇巣がされるにとどまったが、数例でウイルス抗原が検出された。Ab30 株接種群ではほとんどの例で病変は観察されなかったが、1例で炎症細胞の集簇をともなう gliosis が観察されたが、同部位にはウイルス抗原は検出されなかった。

CH2株接種では、今回感染ウイルス価を低くしても予想したように壊死性の変化が弱くならず、発症率が低下するにとどまり、より緩慢な病変形成を作出できなかった。それに反して、Ab30 株は明らかにCH2 株と比較して壊死性の変化を引き起こす作用が弱く、今回の接種ウイルス価が低かったものの、神経病原性が確認されたので、今後接種量を検討するなどして SSPE により近似する感染モデルになりうる可能性が示唆された。

マウス感染モデル系の確立の意義は、感染免疫を詳細に解析できること、又様々なミュータントマウスやノックアウトマウスを用いることができることにあると考えられる。中枢神経持続感染モデルの作出にこれらのマウスを用いれば、宿主側の持続感染機構の解明に役立つと考えられる。また、既に入手している神経親和性を欠く野外 MV と、向神経性ウイルスCH2 株および CH2-Ab30 株との遺伝子レベルでの比較、リバースジェネティクスによる向神経性遺伝子の同定などを計画している。

[文献]

- 1) Kobune, F., Takahashi, H., Terao, K., Ohkawa, T., Ami, Y., Suzuki, Y., Nagata, N., Sakata, H., Yamanouchi, K. and Kai, C.: Nonhuman primate models of Measles. Lab. Anim. Sci. 46:315-320, 1996.

Mortality of MV infected mice

| | 3d | 6d | 9d | 12d | 15d | total |
|------|----|----|----|-----|-----|-------|
| CH2 | 0 | 0 | 4 | 1 | 0 | 5/13 |
| Ab30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/13 |

表1 接種マウスの死亡数

Infectivity titration

| days p.i. | 3d | 5d | 7d | 9d | 15d |
|-----------|------|------|------|------|-----|
| CH2 | 0 | 1.00 | 1.00 | 4.25 | 0 |
| | 0 | 2.75 | 0 | 4.00 | 0 |
| Ab30 | 1.00 | 1.00 | 0 | 0 | 0 |
| | 1.25 | 1.00 | 1.00 | 0 | 0 |

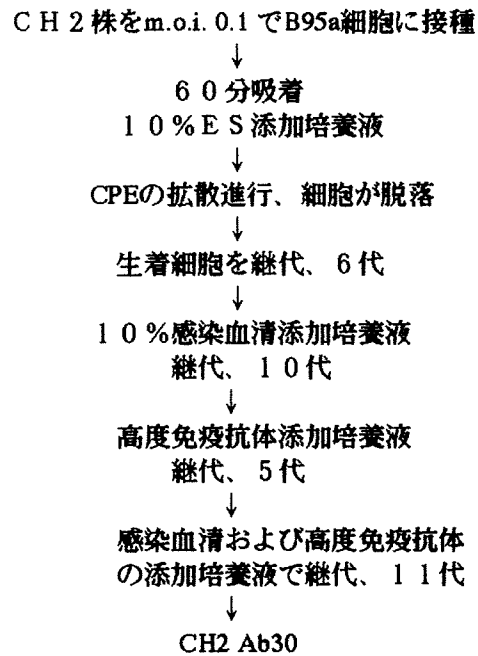
10% homogenates of mice brain, TCID50/1ml

Histopathological lesions in brains at 15d p.i.

| | lesion | MV Ag |
|------|----------------------------------|-------|
| CH2 | 1 (-) | - |
| | 2 (-) | + |
| | 3 (-) | - |
| | 4 inflammatory cell infiltration | + |
| | 5 focal necrosis | + |
| Ab30 | 1 inflammatory cell infiltration | - |
| | 2 (-) | - |
| | 3 (-) | - |
| | 4 (-) | - |
| | 5 (-) | - |

表2 脳におけるウイルス感染価の推移と脳病変

図-1 抗体処理CH2株ウイルスの作出



CH2株感染価 : 105.5TCID50/ml

CH2 Ab30 感染価 : 107.0TCID50/ml

ES : 野外MV感染6日血清 (中和抗体価<8)

感染血清 : 中和抗体価64

高度免疫抗体 : ウサギ血清、中和抗体価50,000)

麻疹ウイルスのマウス神経病原性の多様性について

班 員：堀田 博（神戸大・医・微生物）

研究協力者：片山 友子（神戸大・医・微生物）

研究協力者：本間 守男（神戸女子大・家政）

Heterogeneity in neurovirulence of measles virus

Hak HOTTA¹, Yuko KATAYAMA¹ and Morio HOMMA²

Department of Microbiology, Kobe University School of Medicine¹ and
Faculty of Home Economics, Kobe Women's University²

ABSTRACT

Most, but not all, of the measles virus field strains that had been isolated in B95-8 cells and passaged in Vero cells for a few times (early-passage Ve strains) exhibited neurovirulence when inoculated intracerebrally into mice. Thus, heterogeneity in neurovirulence was evident among those Ve strains. After being passaged in Vero cells for twenty times, however, all the virus strains (late-passage Ve strains) lost the neurovirulence in mice. The neurovirulent, early-passage Ve strains had capacity to grow efficiently in the mouse brain, possessing high affinity to B95-8 cells but much lower affinity to Vero cells. Single point mutations were identified in the M protein of one of two late-passage Ve strains and in the H protein of two of three late-passage Ve strains. It was unclear, however, as to whether these mutations in fact account for the neurovirulence. On the other hand, no mutation was observed in the P and F proteins between early- and late-passage Ve strains.

【はじめに】

亜急性硬化性全脳炎（SSPE）は、麻疹罹患後平均7年の潜伏期間の後、100万人に1人～数人の割合で発症する稀な中枢神経系の疾患である。SSPEは麻疹ウイルス変異株の脳内持続感染によっておこるとされているが、麻疹ウイルスの中枢神経系に対する親和性がウイルス株によってどの程度異なるかについてはあまり研究がなされておらず、また、中枢神経親和性を規定する麻疹ウイルス遺伝子の変異についてもほとんど何も知られていない。

我々はこれまでに、Vero細胞で得られた麻疹ウイルス野外株が、乳飲みマウスに脳内接種により神経病原性を発現することをみてきた。本研究では、麻疹ウイルス野外株のマウス神経病原性はウイルス株により異なること及びその病原性はVero細胞で継代することにより著しく減弱することを明らかにし、これらのウイルス株の遺伝子解析を通して、マウス神経病原性を規定するウイルス遺伝子の同定を試みた。

【方 法】

1) 麻疹ウイルスの分離及び継代：

麻疹患児の咽頭拭い液からB95-8細胞を用いて分離された麻疹ウイルスを、同細胞にて数代継代した後、Vero細胞に接種してプラクを形成するウイルス株（Ve株）を得た¹⁾。このVe株をVero細胞で3～5代継代したものをearly passage株、18～20代継代したものをlate passage株として以下の解析に供した。実験によっては、Ve株をB95-8細胞でさらに1代継代したものも用いた。

2) マウス神経病原性の検討：

麻疹ウイルス Ve 株を感染させた Vero 細胞あるいは B95-8 細胞の浮遊液を 10~200 PFU/0.02ml/マウスの割合で、2 日令の乳飲みマウスに脳内接種し、脳炎症状による死亡の有無により、神経病原性について検討した。また、上記感染細胞の培養上清についても、脳内接種により、神経病原性の有無について調べた。

3) マウス脳内でのウイルス増殖の測定：

ウイルスの脳内接種後経日的に脳を摘出し、冷凍保存することなく組織を擦りつぶして 10%浮遊液を調製した。これを 10 倍階段希釈し、Vero 細胞あるいは B95-8 細胞に接種して、脳内ウイルス感染価を求めた。

4) ウイルス遺伝子の解析：

ウイルス感染細胞あるいはその培養上清から Trizol を用いて RNA を抽出し、それを鋳型として cDNA を合成した。その cDNA と麻疹ウイルス遺伝子特異的プライマーを用いて、常法²⁴⁾に従い PCR 法により麻疹ウイルスの P、M、F 及び H 遺伝子の全コーディング領域を増幅した。増幅断片の塩基配列を決定し、推定アミノ酸配列を求めた。

【結果】

1) Early passage Ve 株のマウス神経病原性：

Early passage Ve 株 (T4Ve-4, T8Ve-6, T11Ve-4) 感染 Vero 細胞浮遊液 (10~100 PFU/マウス) を乳飲みマウスに脳内接種すると、マウスは 5~10 日後に脳炎症状を呈し、ほぼ全例死亡した (図 1)。上記感染細胞の培養上清を脳内接種した場合には、マウスの死亡率は約 20%であり、感染細胞浮遊液脳内接種の場合より低かった (表 1)。また、上記ウイルス株を B95-8 細胞に感染させて得られた細胞浮遊液を用いた場合には、死亡までの期間が 2~3 日間延長され、最終死亡率が 20%程度低くなる傾向がみられたが、マウス神経病原性は明らかに認められた (図 1)。なお、比較のために用いた B95-8 細胞のみで分離継代されたウイルス株は、いずれもマウス神経病原性を示さなかった (data not shown)。

2) マウス神経病原性に関する Ve 株間の多様性：

5 種類の異なる early passage Ve 株 (T4Ve-4, T8Ve-4, T11Ve-4, K52Ve-2, N13Ve-3) のマウス神経病原性について比較検討したところ、T4Ve-4, T8Ve-4, T11Ve-4 の 3 株についてはすべてのマウスが死亡したのに対して、K52Ve-2 株では半数が死亡するのみであり、N13Ve-3 株では、最も高い感染価を接種したにもかかわらず死亡するマウスはみられなかった (表 2)。これらの成績より、マウス神経病原性に関して、異なる Ve 株の間で多様性の存在することがわかった。

3) Vero 細胞継代によるマウス神経病原性の減弱：

Vero 細胞で継代することにより、Ve 株のマウス神経病原性が変化するか否かについて調べるために、early passage (4 代継代) 株と late passage (18 代継代) 株について比較検討した。供試した 3 種の分離株いずれにおいても early passage 株では 90~100%のマウスが死亡したが、late passage 株では死亡するマウスはみられなかった (表 3)。これらの成績より、Ve 株のマウス神経病原性は、Vero 細胞で継代することにより著しく減弱することがわかった。

4) マウス脳内ウイルス感染価の推移：

マウス神経病原性を有する early passage 株 (T4Ve-4) を脳内接種し、経日的に脳内のウイルス感染価を測定した。B95-8 細胞を用いて測定した感染価は、接種 4 日後には $10^9 \sim 10^{10}$ TCID₅₀/グラムと高値を示し、ほぼプラトーに達した (図 2)。一方、このウイルスは Vero 細胞に対する親和性は明らかに低下しており、Vero 細胞で測定した場合の感染価は 10^4 PFU/グラム以下であった。

一方、マウス神経病原性の消失した late passage 株 (T4Ve-18) の脳内ウイルス増殖は early passage 株に比べて低く、B95-8 細胞で測定した感染価は感染 4~8 日後に $10^6 \sim 10^7$ TCID₅₀/グラム程度であった。しかし、このウイルスは Vero 細胞に対する親和性は比較的よく保持されていた。

5) Ve 株の遺伝子塩基配列及び推定アミノ酸配列の解析：

3種類の異なる分離株について、early passage 株 (T4Ve-3, T8Ve-3, T11Ve-3) と late passage 株 (T4Ve-20, T8Ve-20, T11Ve-20) の P, M, F, 及び H 遺伝子の全コーディング領域を決定し、推定アミノ酸配列について比較検討した。P 蛋白と F 蛋白については、Vero 細胞での継代によるアミノ酸変異は全く認められなかった (図 3)。M 蛋白に関しては、供試した 2 株中 1 株に (図 3)、また H 蛋白に関しては 3 株中 2 株に、1 アミノ酸のみの点突然変異が認められた (図 4)。しかし、これらの点突然変異がマウス神経病原性を直接的に規定しているか否かについては明確にし得なかった。

[考 察]

本研究により、B95-8 細胞で分離され Vero 細胞で継代された麻疹ウイルス分離株 (Ve 株) の多くは、Vero 細胞での継代期間の短い時 (early passage) には、強いマウス神経病原性を示すことが明らかになった。B95-8 細胞のみで分離継代された麻疹ウイルス分離株はマウス神経病原性を示さなかったことより、上記の神経病原性を有する Ve 株は、1) B95-8 細胞で分離されたウイルス材料の中に少数含まれていたか、あるいは 2) Vero 細胞中で突然変異をおこしたものであり、その後 Vero 細胞培養により選択されてきたものと思われる。現時点ではいずれの機序によるものであるか確定することはできないが、マウス神経病原性を規定する因子を研究するうえで、これらのウイルス株は有用なものであると考えられる。

マウス神経病原性を有する Ve 株を Vero 細胞でさらに継代すると、その神経病原性は著しく減弱した。神経病原性を有する Ve 株 (early passage 株) はマウス脳内で効率良く増殖し、B95-8 細胞を用いて測定すると高い感染価が得られるが、Vero 細胞に対する親和性はむしろ低いものであった。一方、Vero 細胞継代により神経病原性の低下した Ve 株 (late passage 株) は、Vero 細胞親和性は当然保持しているが、マウス脳内での増殖能は減弱していた。我々はこれまでに、early passage 株はアフリカミドリザル赤血球に吸着しないが、late passage 株は吸着することをみているが、マウス神経細胞に対する吸着に関してはアフリカミドリザル赤血球と逆の現象がおこっている可能性が考えられる。他に、early passage 株はマウス神経細胞に存在する種々のウイルス複製機構を効率よく利用できるが、Vero 細胞への適応に伴ってその機能が低下した、という可能性も除外することはできない。

early passage 株と late passage 株は同一の親株に由来しており、マウス神経病原性を含む限られた形質のみが異なっているため、神経病原性を規定する遺伝子を検索するうえで有利である。これらのウイルス株を用いて、P、M、F 及び H 蛋白の推定アミノ酸配列の変異について検討した。P 及び F 蛋白については、early passage 株と late passage 株の間で変異は全く見られなかった。一方、M 蛋白では供試した 2 組のうち 1 組で 1 カ所の点突然変異が、また H 蛋白では供試した 3 組のうち 2 組でそれぞれ 1 カ所の点突然変異が認められた。しかし、H 蛋白の点突然変異部位は同一ではなかった。我々はこれまでに、Ve 株のアフリカミドリザル赤血球吸着能を規定すると考えられる H 蛋白の変異について解析を行ってきたが、今回の解析と同様に、それぞれの親株由来のペアで特有の点突然変異を見出したものの、すべてのペアに共通の特定の変異部位は認められなかった。同一の形質変化をひきおこす複数の異なった点突然変異があるのかもしれない。本研究の成績より、early passage 株と late passage 株の間のマウス神経病原性の違いは P 蛋白あるいは F 蛋白に起因するものではないと考えられるが、M 蛋白及び H 蛋白の変異の意義については今後検討する必要があると思われる。

[文 献]

- 1) Shibahara, K., Hotta, H., Katayama, Y. and Homma, M.: Increased binding activity of measles virus to monkey red blood cells after long-term passage in Vero cell cultures. *J. Gen. Virol.*, 75:3511-3516, 1994
- 2) Katayama, Y., Hotta, H., Nishimura, A., Tatsuno, Y. and Homma, M.: Detection of measles virus nucleoprotein mRNA in autopsied brain tissues. *J. Gen. Virol.* 76: 3201-3204, 1995
- 3) Katayama, Y., Shibahara, K., Kohama, T., Homma, M. and Hotta, H.: Molecular epidemiology and changing distribution of genotypes of measles virus field strains in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 35:2651-2653, 1997

- 4) Katayama, Y., Kohso, K., Nishimura, A., Tatsuno, Y., Homma, M. and Hotta, H.: Detection of measles virus mRNA from autopsied human tissues. *J. Clin. Microbiol.*, 36:299-301, 1998

Table 1. Comparison of neurovirulence between cell-associated virus and cell-free virus

| Virus strain | Dead/Total (%) |
|-----------------------|----------------|
| T4Ve-4 | |
| Cell-associated virus | 10/10 (100) |
| Cell-free virus | 2/10 (20) |
| T11Ve-4 | |
| Cell-associated virus | 8/10 (80) |
| Cell-free virus | 2/9 (22) |

Table 2. Diversity of neurovirulence among different strains of measles virus

| Virus strain | Inoculum (PFU/mouse) | Dead/Total (%) |
|--------------|-------------------------|----------------|
| T4Ve-4 | 50 | 10/10 (100) |
| T8Ve-4 | 10 | 10/10 (100) |
| T11Ve-4 | 100 | 10/10 (100) |
| K52Ve-2 | 50 | 5/10 (50) |
| N13Ve-3 | 50 | 0/10 (0) |
| | 200 | 0/10 (0) |

Table 3. Disappearance of measles virus neurovirulence by passage in Vero cell cultures

| Virus strain | Dead/Total (%) | |
|--------------|----------------|--------------|
| | 4th passage | 18th passage |
| T4Ve | 10/10 (100) | 0/10 (0) |
| T8Ve | 10/10 (100) | 0/10 (0) |
| T11Ve | 9/10 (90) | 0/10 (0) |

Fig. 1. Comparison of neurovirulence between Vero-associated virus and B95-8-associated virus

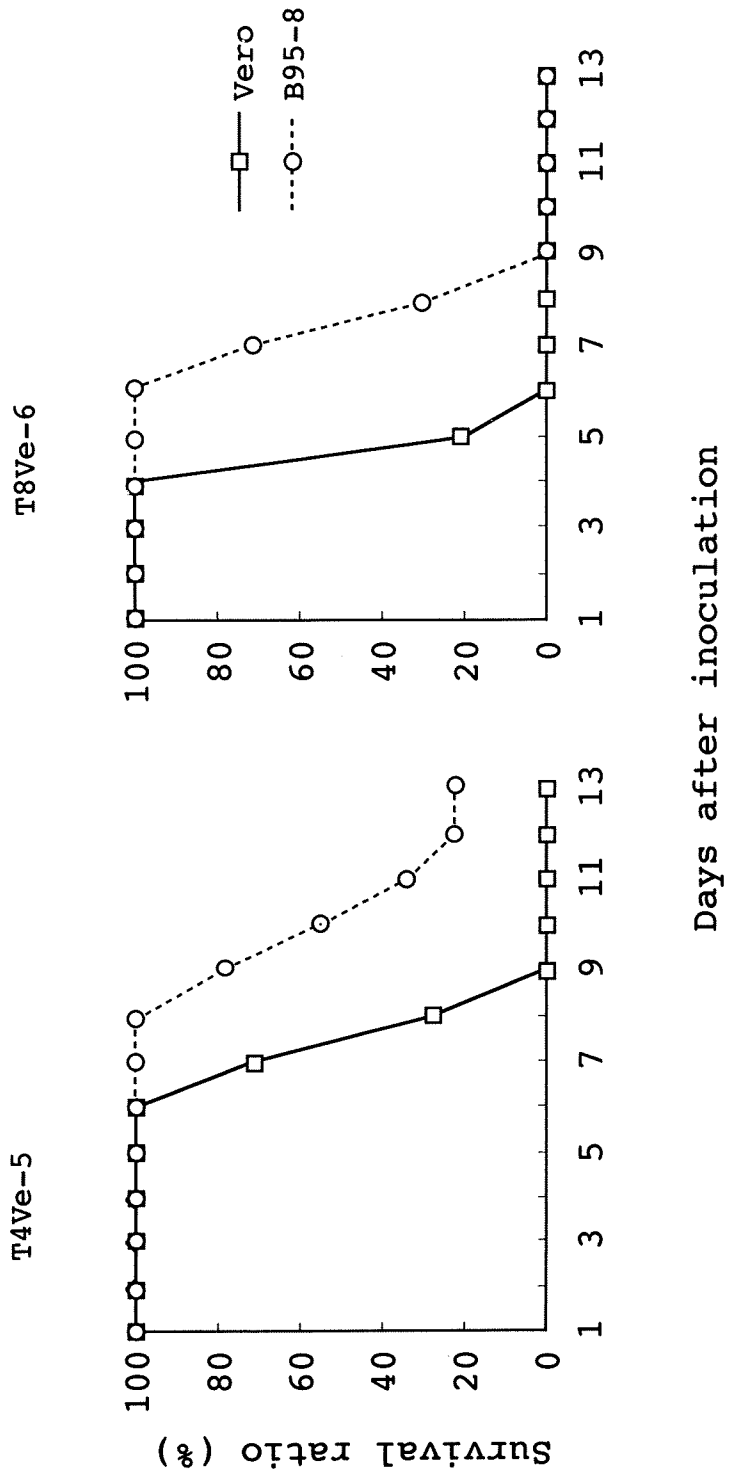


Fig. 2. Virus titers in the brain of mice inoculated with T4Ve-4 and T4Ve-18

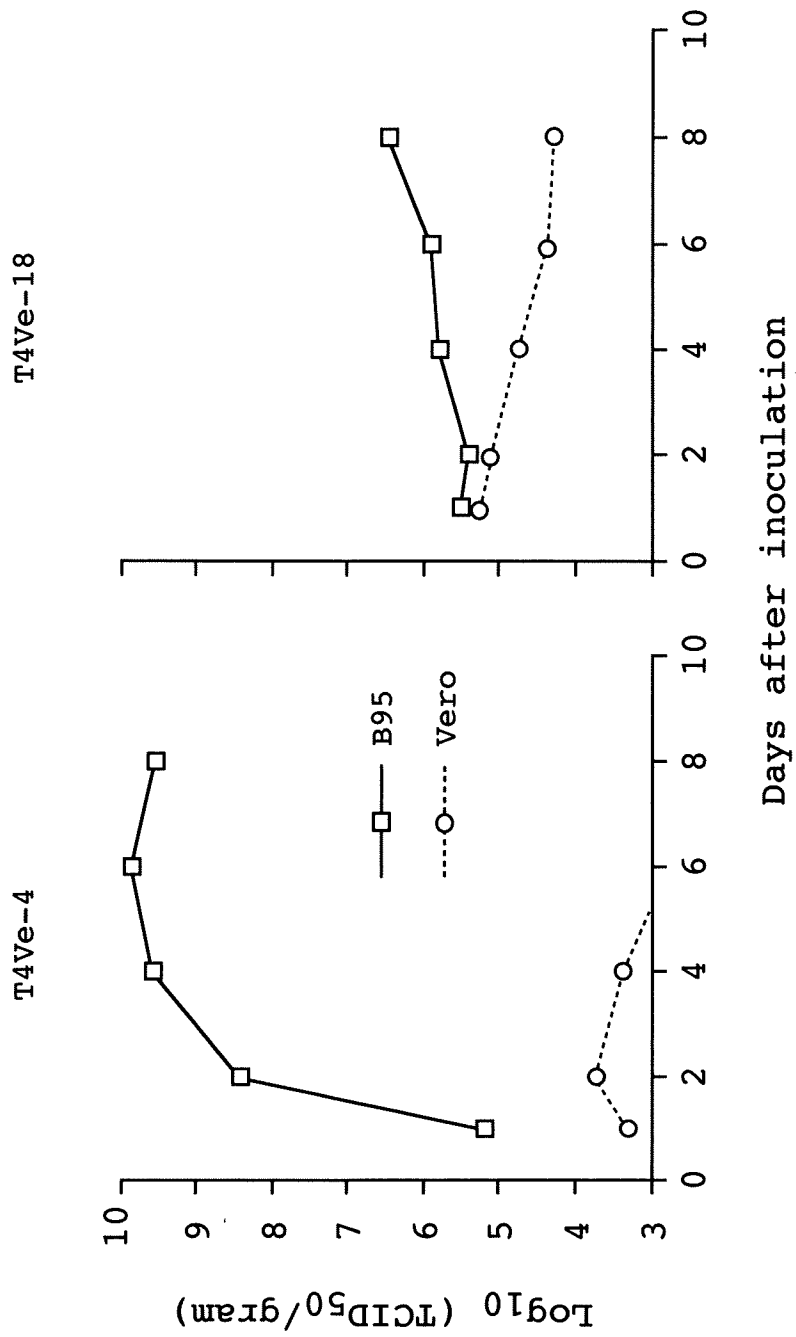


Fig. 3. Comparison of amino acid sequences of the P, M and F proteins between early- (Ve-3) and late-passage strains (Ve-20) of measles virus

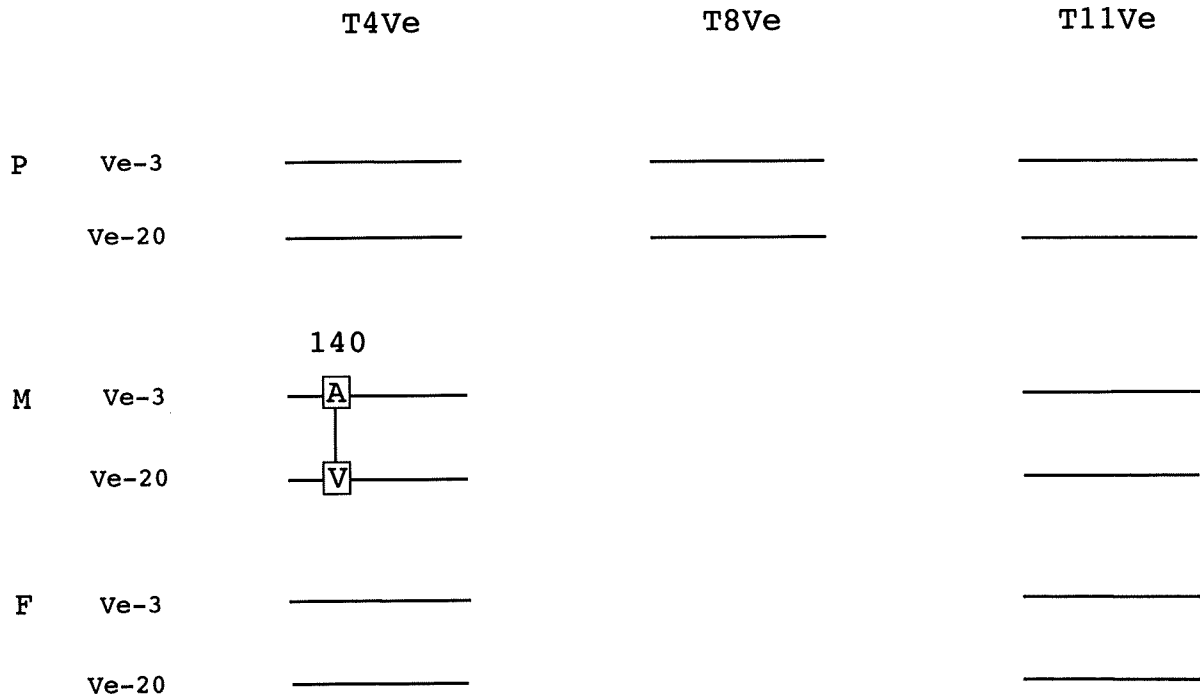


Fig. 4. Comparison of amino acid sequences of the H protein between early- (Ve-3) and late-passage strains (Ve-20) of measles virus

