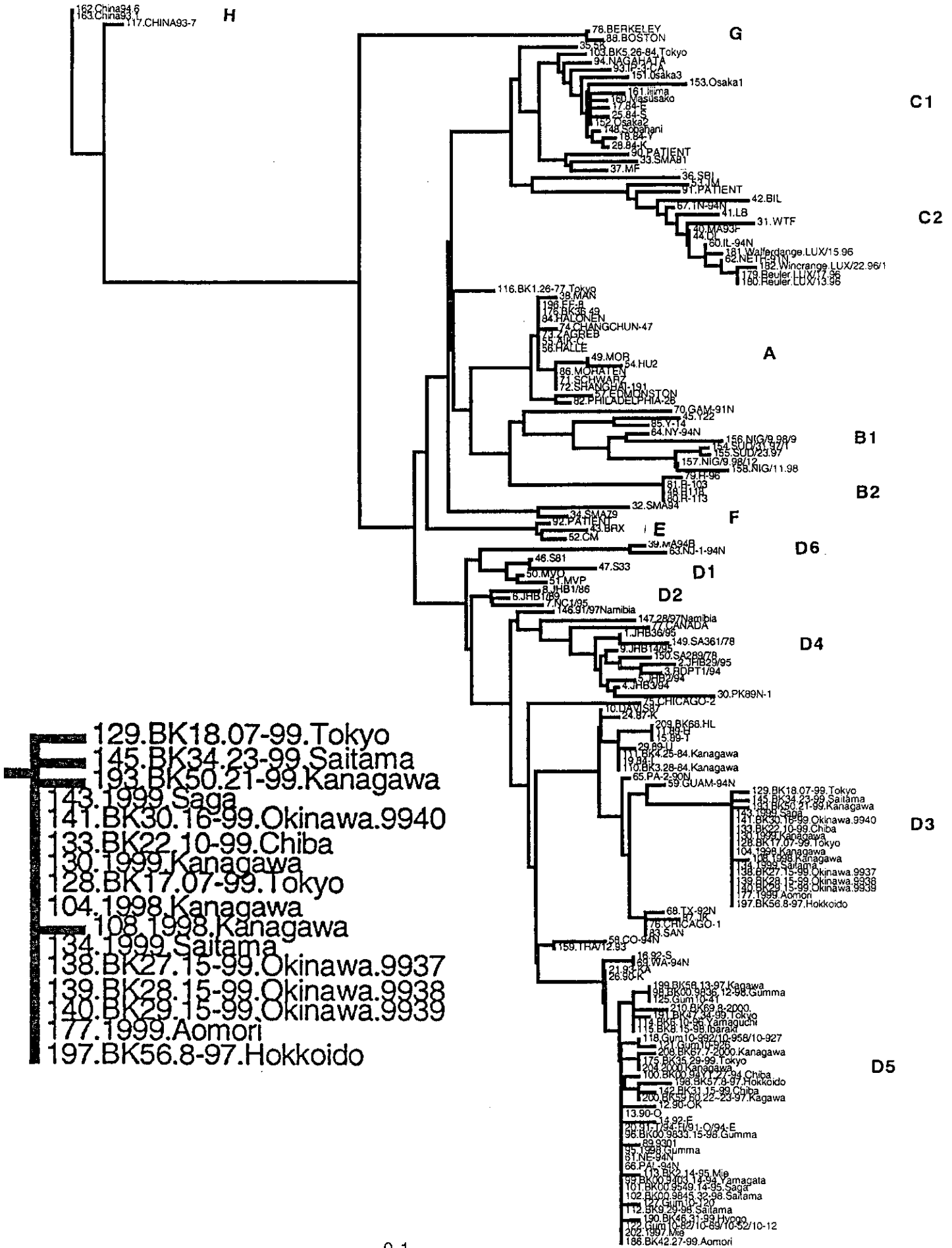


Fig.1



0.1

表-1 SVF4症例の検索結果

症例	年齢(性)	ワクチン接種		臨床 症状	ウイルス		抗体価	
		(年月日)	経年*		分離	遺伝型	中和	IgM (PA)
1	12(M)	88-10-19	11	軽	+	D3	2,048	1.280
2	10(F)	90-09-19	9	軽	+	D3	512	10
3	13(F)	86-09-10	12	軽	+	D3	2,048	<10
4	12(F)	87-09-09	12	軽	+	D3	1,024	<10

*経年：麻疹ワクチン接種後麻疹罹患までの経過(年)

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

微生物系統株の収集・保存事業（感染症ライブラリー）の構築に関する調査研究
～麻疹ウイルスの保存事業に適合した新培養システムの樹立～

分担研究者 小船 富美夫（国立感染症研究所室長）

研究要旨 ヒト臍帯血(Cord Blood)から麻疹ウイルス(MV)に極めて高い感受性を示すCOBL細胞を樹立した。本細胞の麻疹ウイルスに対する感受性はB95a細胞の1.5～10倍であった。また、レトロウイルス、EBウイルスの放出を欠くことから、B95a細胞に代わる宿主細胞として、麻疹のサーベイランス、野外MVの分離、中和試験の指示細胞、その他MVの病原性など基礎研究に極めて有用な宿主細胞となろう。

はじめに

先にわれわれは野外麻疹ウイルス(MV)にきわめて高い感受性をしめすB95a細胞（マーマセットBリンパ球由来B95-8亜株細胞）¹⁾を樹立した。現在、本細胞は国内外の研究施設に導入されMV²⁾のほかに牛痘ウイルス³⁾、イヌディステンパーウイルス⁴⁾など Morbillivirus の基礎研究に広く用いられている。しかしながら、B95a細胞は感染性EBウイルスの産生細胞系であるためバイオハザード対策上の問題を包含している。また、B95a細胞を用いて患者検体よりウイルス分離を試みるとき、一度出現した細胞変性（融合細胞）が培養中に消失する場合がある。これはB95a細胞においてもなお増殖が困難な野外MVの存在することを示唆した。そこで麻疹の自然宿主であるヒトの臍帯血(Cord Blood)細胞からB95a細胞よりさらに高感受性でしかもレトロウイルス、EBウイルスなどの感染性因子の放出を欠くモノレイヤー細胞培養系の樹立を試みた。

1. 目的

麻疹ウイルス株の収集、保存（麻疹ライ

ブラリー）に適した高感受性細胞系を樹立することを目的とした。具体的にはMVの自然宿主であるヒトの臍帯血細胞由来の細胞培養系を樹立した。

2. 方法

1) 臍帯血（Cord Blood = COBL）：F産婦人科病院よりインフォームド Consentのもとに採取、供与された正常分娩のヘパリン加COBLを使用した。

2) COBL細胞の培養：COBL 10 ml をPBS10mlで2倍に希釈し、リンパ球分離液（LSM:Lymphocyte separation medium）に重層した。1500回転、10分間の遠心上清をさらに1500回転、20分間の遠心した。沈渣を滅菌留水10mlをくわえて浮遊し、数秒間放置。混入した赤血球を破壊した後、直ちに2倍濃縮のRPMI-1640培養液で等張にもどした。この操作を2回繰り返した後、適量の培養液（10%ウシ胎仔血清加RPMI1640）に浮遊、細胞濃度を $10^{5.0}/\text{ml}$ に調製した。

3) インターロイキン2（IL-2）：IL2（ $0.01 \gamma/\text{ml}$ ）を添加した細胞浮遊液1.0mlを24穴プラスチック・プレート各穴

に分注、37℃炭酸ガス培養した。培養後2日間隔で新鮮な培養液に交換した。30日間培養、観察し、この間に形成された細胞コロニーを継代、モノレイヤーとした。

4) 培養液：RPMI-1640培養液（0.2% NaHCO₃含）の8%ウシ胎仔血清添加を増殖培養液（GM）、4%添加を維持培養液（MM）として使用した。

5) 細胞の継代：トリプシン消化はせずに強いピペティングで細胞を剥離、浮遊した。継代は5日間隔で3～5倍に培養した。細胞の培養状態を良好な状態で維持するため2日間隔で新鮮な培養液に交換した。

6) MVに対する感受性：発疹出現後3日までの末梢血液5検体について、血液100μl中のウイルス感染価をCOBL細胞およびB95a細胞で比較検討した。

7) Flowcytometry：COBL細胞の浮遊液をPharmingen社製マウスFITCラベルモノクローナル抗体、抗CD2、CD3、CD4、CD8、CD16、CD19、CD34、CD45、CD46、CD56、CD69を用いてCOULTER（Epics-XL-MCL）フローサイトメーターで解析した。

8) 逆転写酵素の検出：非放射性の逆転写酵素アッセイキット（Roche Cat.No.1468）を用い、ELISA法でCOBL細胞エキストラクトの逆転写酵素を検出した。

9) EBウイルス遺伝子の検出：COBL細胞の培養液および細胞の音波破碎液についてEBウイルス遺伝子をPCR法で検出した。

9) パラミクソウイルス感受性：牛痘ウイルスRPV（L株）、イヌディステンパーウイルスCDV（Ondersteport株）、ムンプスウイルス（Urabe Wild strain）に対する感受性を検討した。

3.結果

当細胞培養系は現在安定した状態で継代、

維持されておりCOBL Cellと命名した。

MV感染にともなう細胞変性の出現：感染後10～18時間に融合細胞を特徴とする細胞変性を出現（図-1B）、24～36時間には全域に拡大した。本細胞はMVに対する極めて高い感受性細胞であることが判明した。

MV感受性の比較：5検体の麻疹患者血液1.0ml中から検出されるウイルス量をB95a細胞およびCOBL細胞間で比較した。その結果、B95a細胞では 2.5×10^2 , 5.2×10^2 , 2.4×10^1 , 1.4×10^3 , $2.6 \times 10^{2.0}$ CCID/mlであった。一方、COBL細胞では 3.5×10^2 , 1.2×10^3 , 4.0×10^2 , 2.4×10^3 , 6.4×10^2 CCID/mlであった。すなわちCOBL細胞の野外MVに対する感受性は対B95a細胞比1.5～10.0倍高いことが明らかにされた（表-1）。

PCRによるEB遺伝子の検出：細胞培養液中の遺伝子は陰性であったが細胞破碎検体は陽性であった。この結果、COBL細胞はEBV遺伝子を包含するが培養液中への粒子放出は陰性であると考えられた。

Flowcytometry：検索した細胞表面の各分子に対するモノクローナル抗体のうちCD4、CD46、CD69とCOBL細胞表面が明瞭な反応を示した。これらの成績からCOBL細胞はT細胞系、マクロファージ系細胞の混在する培養細胞系であることが判明した（表-2）。

パラミクソウイルス感受性：RPV、ムンプスウイルス（野外株）に明瞭な細胞変性を示した。CDVに対しても感受性を示した。

4.考察

ヒト臍帯血からMV高感受性細胞としてCOBL細胞を樹立した。本細胞はレトロウイルスの混在はなく、EBウイルスの放出を欠いている。さらに麻疹ウイルスに対し

B95a細胞の1.5～10倍の高い感受性をしめすことから、B95a細胞に代わる宿主細胞として、感染症ライブラリーの構築に極めて有用な培養細胞系となろう。さらに麻疹のサーベイランス、中和試験の指示細胞として、MV病原性など基礎研究に広く利用されるものと考えられる。

5. 文献

1. Kobune F, et al ; Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. J. Virol.,64, 700-705,1990
2. Manual for the laboratory diagnosis of Measles virus infection. WHO, Global Programme for Vaccines and Immunization Expanded Programme on Immunization. 1998
3. Kobune F, Sakata H, and Sugiura A; B95a, a marmoset lymphoblastoid cell line, as a sensitive host for rinderpest virus. J. gen. Virol.,72, 687-692, 1991
4. Kai C, et al.; Use of B95a cells for isolation of Caine Distemper virus from clinical cases. J.Vet.Med.Sci.,55.1067-1070, 1993

Table-1

The comparison of the MV quantity detected
in the B95a and the COBL cells

Sample	Specimen	SFU/ml* in	
		B95a	COBL
9983	Blood	2.5×10^2	3.5×10^2
9984	Blood	5.2×10^2	1.2×10^3
9985	Blood	2.4×10^1	4.0×10^2
9994	Blood	1.4×10^3	2.4×10^3
0013	Blood	2.6×10^2	6.4×10^2
0044	Blood	1.5×10^2	2.7×10^2
0043	Blood	3.0×10^1	6.0×10^1

* syncytium forming unit

Table-2

Flowcytometry of the COBL cells

MoAb	COBL	Cord Blood
CD2	-	+
CD3	-	+
CD4	+	+
CD8	-	+
CD16	-	-
CD19	-	+
CD34	-	+
CD45	-	+
CD46	+	+
CD56	-	-
CD69	+	+

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書
新興感染症成人麻疹の発生状況と病態に関する研究

分担研究者 小浜友昭（国立感染症研究所麻疹室）
協力研究者 岡田晴恵（国立感染症研究所麻疹室）
協力研究者 小船富美夫（国立感染症研究所麻疹室）
協力研究者 佐藤威（国立感染症研究所麻疹室）

研究要旨

成人麻疹は18歳以上の成人にみられる急性麻疹ウイルス感染症である。この成人麻疹は一般的に種々の合併症を併発しやすく、臨床的に重症化する傾向にあるとされる。今回、我々はこの成人麻疹の患者の末梢血から、麻疹ウイルスを分離しその遺伝子型を検索するとともにPBMC画分のサブセット別リンパ球絶対数の変化、各種細胞接着分子の消長などを経時的に患者の病態とともに比較した。その結果、麻疹罹患時に誘導される免疫不全の主因のひとつとされるリンパ球減少症が年長者ほど著しくおこり、またその回復も遅延することがわかった。これは、成人麻疹の重症化の一因と示唆された。

A. 研究目的

最近、成人麻疹が増加しているとの報告が散見されているが、その実態（患者数や病態）は不明であるため、昨年から感染症発生動向調査に加えられている。現在の麻疹ワクチン接種率は7割前後と低迷し、麻疹の大流行が起こらなくなった一方で、自然感染の機会が減ったため、今後年長児や成人の感受性者が増加する傾向にある。また、ワクチン接種者においても獲得免疫の時間的衰退とともにSVF (secondary vaccine failure) が報告され、一回のワクチン接種では終生免疫を賦与できないことを示唆している。これらの状況下において、成人麻疹の動向を把握しワクチンの追加接種の必要性の有無を検討する必要から、成人麻疹の症例を集め、ウイルス学的、感染免疫学的解析を行った。

B. 研究方法

1. 麻疹感染患者の末梢血からB95a細胞を用いて野麻疹ウイルス(MV)を分離し、PCR法と遺伝子配列の解析(NP遺伝子のC末端1230-1685の塩基配列)から遺伝子型の分類を行った。分離された成人麻疹由来ウイルスは国立感染症研究所ウイルス製剤部麻疹室のバンクに登録された。

2. 患者末梢血の単核球画分のサブセット別感染細胞数とサブセット別リンパ球絶対数を測定し、麻疹感染により誘導される免疫不全の主因の一つであるリンパ球減少症の重症度とその回復を経時的に解析、臨床症状と併せ解析した。

3. また重症なリンパ球減少は非感染細胞のアポトーシスによるものと示唆されていることから、アポトーシス関連分子、活性化分子などの細胞内外の接着分子の消長を解析した。

4. 患者の血漿から、PA法を用いて、IgMも含め抗体価を測定した。

C. 研究結果

我々は成人麻疹患者6名から2株のウイルスの分離に成功し、その遺伝子分類を行った結果D5タイプであった。さらに検索を要するが、特異的遺伝子変異は認められないと考えられた。

また、ウイルス分離がされた患者のサブセット別リンパ球数は、発疹出現日を第1病日として第2病日でリンパ球数330/ul、CD4T細胞132/ul、CD8T細胞78/ulと著明なリンパ球減少状態にあった。麻疹肺炎を伴った成人麻疹の患者では、第10病日でリンパ球数125/ul、CD4T細胞28/ul、CD8T細胞25/ulであり、正常値までの回復に40日を要した。

D. 考察

成人麻疹におけるリンパ球減少症は年少(乳児を除く)者のそれより著しく、AIDS発症者の末期に類似する。またその回復も加齢とともに遅延していた。リンフォペニアは麻疹感染の免疫不全誘導の主因と考えられ、これに連動して、二次的な日和見感染等の併発の誘因となると示唆される。この重症なリンパ球減少症の重症化と回復の遅延が麻疹感染の成人での重症化の一因と考えられた。今回成人麻疹患者から分離された麻疹ウイルスの遺伝子型はD5型であり、日本に広く分布してい

るようであった。例数が少ないために結論は出せないが、重症例の多い成人麻疹に特異的なウイルス株が存在することは考えにくい。

F. 研究発表

1. 論文発表

Okada H, Kobune F, Sato TA, Kohama T, Takeuchi Y, Abe T, Takayama N, Tsuchiya T, Tashiro M: Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. Arch. Virol. 145: 1-15, 2000.

2. 学会発表

Okada H, Kobune F, Sato T, Yoshino N, Tashiro M, Takayama N, Tsuchiya T, Takeuchi Y: Comparative analysis of cell markers of PBMC from measles patients and vaccinees. XI. International Congress of Virology (Sidney, Australia) p. 10, 1999.

岡田晴恵、小船富美夫、佐藤威、田代真人、土屋喬義、宮塚幸子、高山直秀、武内可尚：麻疹ウイルス感染患者における免疫抑制機構の年齢別解析 第47回日本ウイルス学会総会（横浜）抄録 p. 289, 1999.

岡田晴恵、小船富美夫、佐藤威、片山未来、佐藤直子、田代真人、岡部信彦、土屋喬義、高山直秀、武内可尚、宮塚幸子、片山章、樋口薫、七条孝三郎：麻疹ワクチン被接種者と麻疹患者との宿主反応の比較 第3回日本ワクチン学会学術集会（名古屋）抄録 p. 51, 1999.

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

デングウイルスバンクの構築に関する研究

分担研究者 倉根 一郎（国立感染症研究所ウイルス第1部部長）
共同研究者 高崎 智彦（国立感染症研究所ウイルス第1部室長）
山田堅一郎（国立感染症研究所ウイルス第1部主任研究官）

研究要旨 デングウイルス感染症は東南アジアを中心として広がっており、re-emerging infectious disease（再興感染症）の一つとして、世界的に重要な感染症になっている。わが国では現在、国内感染のない感染症であるが、近年、流行地からの入・帰国者などによって輸入感染症としてわが国に持ち込まれ症例が多くみられる。そこで、これら輸入デングウイルス感染症の検査・診断体制を整備すると共に、分離ウイルス株の収集、保存および分子生物学的性状の解析を行い、本感染症の厚生行政に資することを目的とした。

A. 研究目的

デングウイルス感染症は東南アジア、中南米など熱帯地域で広がっており、再興感染症の一つとして、世界的に重要な感染症である。わが国でのデングウイルス感染症は1940年代の一時期に関西以西で流行がみられたとの記録があるが、それ以降、国内感染のない感染症である。近年、東南アジアなど流行地からの入・帰国者などによって輸入感染症として持ち込まれる症例がみられる。そこで、これら輸入デングウイルス感染症の検査・診断体制を整備すると共に、分離ウイルス株の収集、保存および分子生物学的性状の解析を行い、本感染症の厚生行政に資することを目的とする。

B. 研究方法

ウイルス：プロトタイプデング

ウイルス（1型:Hawaii, 2型:

New Guinea C, 3型:H83,

4型:H241）と患者検体からの分離株を用いた。

患者検体：熱帯地域からの入・帰国者で、デングウイルス感染の疑いなど不明熱疾患で検査依頼のあった血液、血清、髄液などを使用した。

ウイルス分離：患者検体を蚊由来細胞株 C6/36 に感染させ、28℃で7日間培養し、培養上清を供試した。分離ウイルスは Vero 細胞とサル胎児肺細胞（MFL）によるプラーク法で確認した。

ウイルス遺伝子の検出：RT-PCR は Morita, K. et al (J. Clin. Microbiol. 29, 1991) の方法に基づいた

one-tube 法で行った。プライマーは dengue universal primer と dengue type specific primer を用いた (Table 1)。

IgM 抗体 : IgM-capture ELISA による IgM 抗体の測定は Dengue ウイルス 1-4 型の抗原量を調整して混合したものを抗原として行った。また、IgM 抗体用市販キット (MRL) も併用した。

C. 研究結果

これまで輸入 Dengue 感染症患者検体から得られたウイルス分離株は Table 2 の通りである。大部分はタイ、インド、インドネシアなど東南アジアからの帰国者からのものであったが、フィリピン、パラグアイなどからの入国者の検体からも分離された。分離された 26 株の型別は 1 型 ; 9 株、2 型 ; 11 株、3 型 ; 4 株、4 型 ; 2 株であった。ウイルスが分離できた検体の大半では、IgM 抗体が陰性であったが、3 検体からは IgM 抗体が検出された。

D. 考 察

わが国では、Dengue ウイルス感染症は国内感染のない感染症であるが、近年、東南アジアなど流行地からの入・帰国者などによって輸入感染症として持ち込まれる症例がみられる。その実数は把握されていないが、増加傾向にあると思われる。これら輸入感染症

例についてウイルス学および血清学的に実験室内診断を行ってみると、ウイルス遺伝子は解熱日 (37°C になった日とする) を含み、それより以前の検体から検出された。それに対し、IgM 抗体は解熱日の 3 日前から検出され、解熱日以降、陽性例は上昇した。即ち、ウイルス分離は解熱日以前の検体から可能であり、これまで分離された 26 株は大半そのような検体からであった。分離株の大部分は東南アジアで感染したものであったが、今後、熱帯各地で感染した検体からウイルスを分離し、これらの分離株について生物学的性状を調べると共に、塩基配列を解析して、ウイルスの病原性や発病機構を分子遺伝子学的に解析することが肝要であると考えられる。

E. 研究発表

論文発表

1. Yamada, K., Takasaki, T., Nawa, M. and Kurane, I.: Laboratory diagnosis of imported dengue cases. *Jap.J.Trop.Med.Hyg.* 27(1), 75-77, 1999.
2. Yamada, K., Nawa, M., Takasaki, T., Yabe, S. and Kurane, I.: Laboratory diagnosis of dengue virus infection by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

- and IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Jpn.J.Infect. Dis.*, 52, 150-155, 1999.
3. Yamada , K., Takasaki, T., Nawa, M., Nakayama, M., Arai, Y.T., Yabe, S. and Kurane, I.: The features of imported dengue fever cases from 1996 to 1999. *Jpn.J.Infect. Dis.*, 52(6), 257-259, 1999.
4. Nawa, M., Yamada, K., Takasaki, T., Akatsuka, T. and Kurane, I. :Serotype-cross-reactive IgM responses in dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin.Diag.Lab.Immun.* (in press).

Table 1 Nucleotide sequences of dengue virus primers

Code ^{a)}	Sequence	
	5'	3'
Den U s	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG	
Den U c	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC	
D 1 s	GGACTGCGTATGGAGTTTTG	
D 1 c	ATGGGTTGTGGCCTAATCAT	
D 2 s	GCATAGAGGCTAAGCTGACC	
D 2 c	AAGGGGACTCACTCCACAAT	
D 3 s	GTGCTTACACAGCCCTATTT	
D 3 c	TCCATTCTCCCAAGCGCCTG	
D 4 s	CCATTATGGCTGTGTTGTTT	
D 4 c	CTTCATCCTGCTTCACTTCT	

a) s ; sense primer, c ; complementary primer,
 Den U ; dengue universal ,
 D 1,-2, -3, -4 ; dengue virus type 1, 2, 3 and 4

Table 2 Isolation of dengue viruses

No.	Age, Sex	Country	Period	Days	Type
DV92-01-1	23, M	Thailand	92.3.5-3.15	11	D1
DV94-05-1	30, F	Indonesia	94.2.23-3.5	11	D2
DV95-08-1	23, M	Thailand	95.4.14-5.19	36	D1
DV95-28-1	20, M	India	95.8.25-9.30	37	D2
DV96-17-1	18, M	Thailand	96.7.15-8.8	25	D3
DV96-19-1	23, M	India	96.8.18-8.25	8	D2
DV96-33-1	23, M	India	96.10.3-10.30	28	D4
DV98-d-1	32, F	Thailand	98.2.3-3.9	35	D2
DV98-g-1	25, M	Thailand	98.3.10-3.28	19	D2
DV98-07-1	23, M	Bangladesh	98.6.5-6.24	20	D1
DV98-11-1	45, M	Thailand	98.7.15-7.31	17	D1
DV98-13-1	29, M	Thailand	98.6.1-7.25	55	D1
DV98-23-1	57, M	Indonesia	98.8.14-9.6	24	D3
DV98-35-1	22, M	Thailand	98.9.14-10.6	23	D1
DV98-36-1	24, M	Thailand	98.10.6-10.14	9	D1
DV98-37-1	33, M	India	98.9.22-10.3	12	D2
DV98-41-1	59, F	Philippines	98.11.26-11.29	4	D1
DV98N-8-1	29, F	Malaysia	98.8.9-8.23	15	D2
DV98N-13-1	20, M	Thailand	98.8.1-8.29	29	D2
DV98N-27-1	19, F	Thailand	98.8.15-10.2	49	D3
DV99-10-1	25, M	Thailand	99.4.30-5.7	8	D4
DV99-23-1	30, F	Thailand	99.8.7-8.16	10	D2
DV99-24-1	14, M	Philippines	99.8.17-8.31	15	D3
DV99-30-1	48, M	India	99.9.15-9.20	6	D2
DV99-35-1	34, F	Myanmar	99.10.13-10.28	16	D2
DV99-36-1	44, F	Paraguay	99.4.10	-	D1