

授乳後など新生児が熟睡した状態（自然睡眠下）で行う。初回検査は原則として生後2～5日目に出生した医療機関において実施する。初回検査で「refer」の場合は、日を改めて退院前に確認検査を実施する。確認検査で「refer」の場合は、1ヶ月児健康診査時に再確認検査を行う。低出生体重児や早産児等で入院治療を行っている場合はその治療が終了した段階で初回検査を実施するものとし、その場合新生児期を経過していても検査対象とする。

〈検査後の対応〉

1ヶ月健康診査での再々検査でもreferの場合は精密検査が可能である医療機関に紹介され、耳鼻咽喉科的な診察、聴性行動反応検査、精密ABR、ASSR（聴性定常状態反応検査）などを受け、聴力が確定するまで経過観察される。難聴と診断された場合はすぐに療育を開始する。

C. 研究結果

平成16年1月から12月までの新生児聴覚スクリーニングを受検者数2814名であり、初回検査 pass 2788名（99.08%）、両側refer 10名（0.36%）、片側refer 16名（0.57%）であった。確認検査を26名中18名が受検しpass 7名（0.25%）、両側refer 6名（0.21%）、片側refer 5名（0.18%）であった。再確認検査は16名が受検し、pass 10名（0.36%）、両側refer 2名（0.07%）、片側refer 4名（0.14%）であった。精密検査受検者数は6名（0.21%）であり、その内訳は正常2名（0.07%）、聴覚障害両側0人（0%）、片側4名（0.14%）であった。

D. 考察

今回の受検者には両側障害はなかったが受検者数が増加すれば先天性難聴の発症率0.15%に近似した結果が得られると思われた。平成13年度厚生科学研究ではAABRを用いた検査で入院中の2回の検査での両側refer率は0.38%、片側refer率は0.60%であつ

たが今回の福島県での結果で2回目検査後のrefer率は、両側refer率0.21%、片側refer率0.18%と厚生省科学研究の結果を下回っていた。初回検査、2回目、3回目と繰り返すうちにreferが減少しており、他の都道府県では2回目までしかスクリーニングとして認めていないが福島県では3回目までをスクリーニングとしていることで、精密検査機関を受診する新生児の数が7人から5人へと減少しており精密検査機関を受診しなければならないという保護者の負担を軽減することができたと思われる。

今回片側難聴と診断された4例の聴力はまだ確定していないが今後も継続して経過観察する予定である。平成17年以降は精密聴力検査が必要となった患児の臍帯検査を行い、CMV感染の有無の検索、一方でCMV感染マス・スクリーニングにより感染が疑われた患児が新生児聴覚スクリーニングでどのような結果を示すのか解析を進める。

E. 結論

平成16年1月から試行的に開始された福島県新生児聴覚検査事業について報告した。

2814名受検したが両側聴覚障害者は0名、片側聴覚障害者は4名であった。福島県では出産後の入院中だけでなく1ヵ月健診時の再々検査までをスクリーニングとしており、そのため精密検査機関受診者数を減少させることができた。今後、県内ではスクリーニングを行う地域を随時拡大する予定であり、今回の片側難聴症例も含め、長期的に難聴児の経過観察、原因の検索を行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

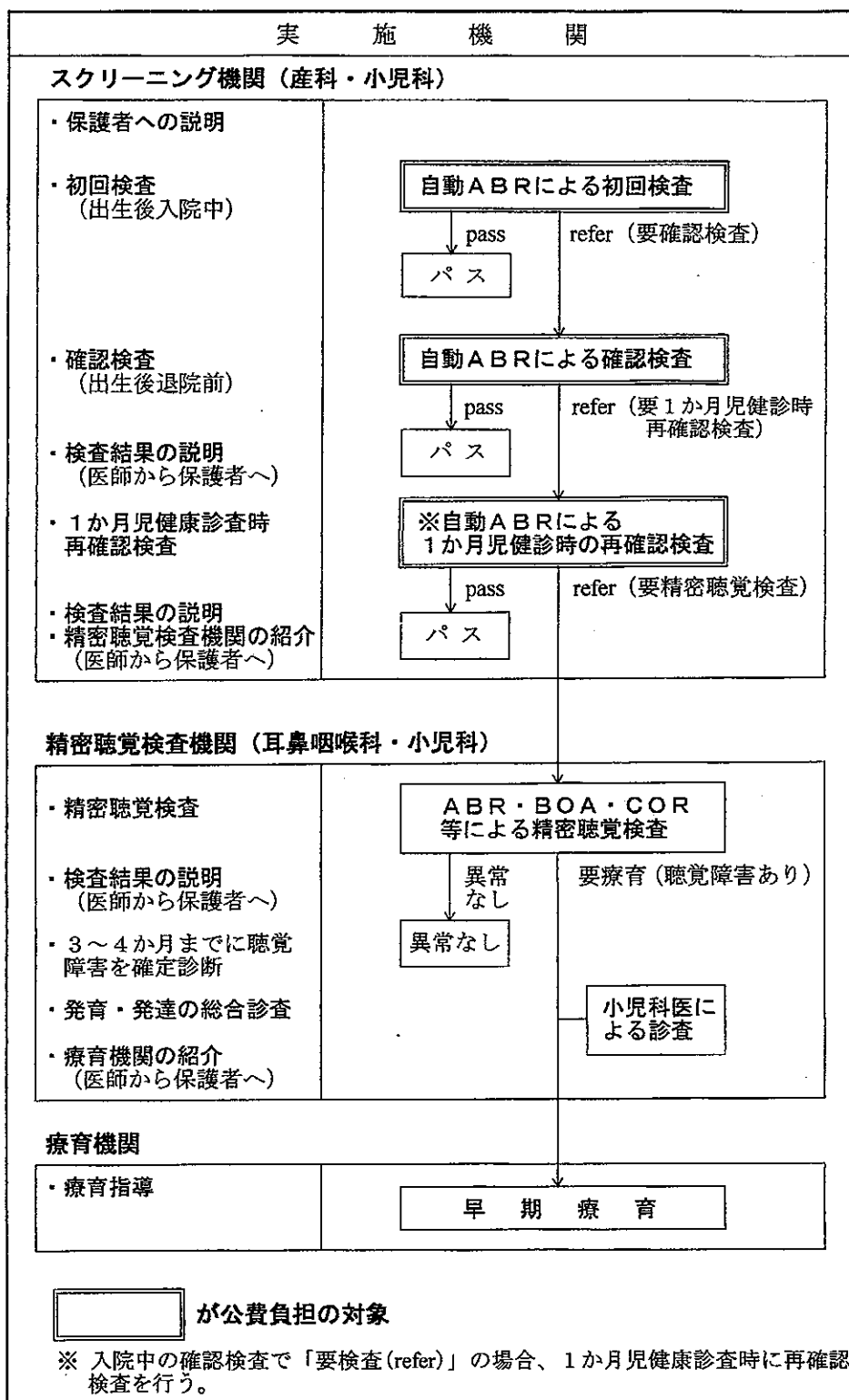


図1 健康診査福島県新生児聴覚検査事業における検査の流れ

「福島県新生児聴覚検査事業の手引き」（平成15年12月福島県発行）より引用

先天性サイトメガロウイルス感染による障害発症機構の解析に関する研究

分担研究者 井上 直樹（国立感染症研究所）

研究協力者 野澤 直樹（国立感染症研究所）

研究要旨

1. 尿の収集を紙おむつに装着できるような特殊濾紙で行い、その濾紙から DNA を回収し real-time PCR 法にて尿中の CMV ゲノムコピー数を解析できる先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染の検査法を確立した。先天性 CMV 感染のマスキングでは特殊濾紙ごと PCR を行い陽性・陰性を判定する。本研究では、この方法を発展させ、特殊濾紙で収集した尿中の CMV ゲノムコピー数を簡便に測定できる方法を開発した。
2. 先天性感染の小動物モデルであるモルモットを用いた CMV 感染増殖様式の解析から経胎盤感染と障害発生のメカニズムを明らかにすることを目的として、緑色蛍光蛋白（GFP）を発現する組換え体モルモット CMV の作製を行う。本年度は組換え体作製に必要な基礎的条件の検討を行った。

A. 研究目的

CMV は幼小児期に自然感染により症状のない顕性感染を成立させ生涯その宿主に潜伏する。妊婦の初感染により胎盤を通して胎児へ感染し（先天性感染）、流産や出生児の発達障害の原因となることが知られている。感染胎児の約 1 割が出生時に明白な障害を持って生まれ、さらに出生時無症候児の約 1 割が数年のうちに難聴などの感覚器障害を伴う後遺症を発症すると考えられている。先天性感染児においては高力価の CMV が尿中に排泄されており、生後 3 週間以内の尿検体中を用いることにより自然感染と区別して先天性 CMV 感染を診断できる。世界的にみて全出生児の 0.2-1% に先天性 CMV 感染が発生していると思われている。我国での先天性感染の実態は、札幌医大のグループが四半世紀を費やして約 1 万人の新生児の尿を調査した先駆的な研究がある。しかしながら、尿の収集、保存、尿からのウイルス分離や PCR による CMV DNA の検出などには、膨大な労力と費用が必要であるため、新生児を対象とした先天性感染のマスキングは普及していない。さらに、先天性感染例における尿中の CMV ゲノムコピー数と発症や病態との関連は不明である。また、出生後からの時間経過に伴う尿中の CMV ゲノムコピー数の推移についても解析はなされていない。我々は、簡便迅速かつ安価な先天性 CMV 感染のマスキング法を開発してきたが、本研究では、この方法を発展させ尿中の CMV ゲノムコピー数の測定に応用可能であるかを検討した。

先天性感染の防止には、ワクチンの開発が最も有効であると考えられる。しかしながら、先天性感染率の低下を指標に CMV 抗体陰性妊婦を対象とした治験によってしかワクチンの有効性は評価できないため感染動物モデルが必要となる。CMV は

宿主特異性が高くヒト CMV は小動物に感染しないことから動物固有の CMV を用いることとなる。胎盤の構造の違いからマウス CMV は先天性感染を起こさないが、モルモット CMV (GPCMV) は胎児に感染し、聴覚障害も生じさせるため有用なモデル系である。しかしながら、GPCMV の研究は、ゲノムの全塩基配列が決定されていないことや感染初期に発現される前初期蛋白に対する抗体が存在しないなど、感染増殖様式の解析を行うにあたり様々な制約がある。そこで、本研究では、緑色蛍光蛋白 (GFP) を発現する組換え体 GPCMV を作成し、簡便にモルモット内での感染増殖様式を解析し経胎盤感染と障害発生のメカニズムを明らかにすることを可能にする。

B. 研究方法

1) PCR 法

通常の PCR は、IE2 遺伝子を標的としたプライマー (0.5・M)、3mM MgCl₂ 存在下で rTaq ポリメラーゼ (Takara) を使い、94°C 3 分の初期ステップ、94°C 30 秒及び 72°C 2 分の 40 サイクル、72°C 8 分の最終ステップの条件で行った。検出限界は CMV ゲノム 10 コピーである。

Real-time PCR は、IE2 遺伝子を標的としたプライマー (0.2・M) を使い、95°C 10 分の初期ステップ、95°C 30 秒及び 62°C 1 分の増幅ステップを 50 サイクルまで測定した。標準直線は、IE2 をコードする cDNA を含む発現プラスミド (ES Huang 博士より分与) を希釈したものをを用いて作製した (図 1)。

2) GPCMV の増殖とゲノム DNA の精製

モルモット肺由来繊維芽細胞 (GPL) JH4 clone

1(ATCC CCL-158)は、10%仔牛血清を含む Ham's F12 培地にて培養した。GPCMV は ATCC より購入し (VR682)、GPL 細胞を用いて増殖させた。ゲノム DNA 調製のために大量の感染細胞を得る時には感染細胞を未感染細胞と 1:5-1:10 となるように培養し、3-4 日後に 50-70%程度の細胞で細胞変性効果 (CPE) が見られる条件下で細胞を集め、nucleocapsid DNA として精製する方法 (Martin ら、1982; Straus ら、1981) に従った。即ち、感染細胞を界面活性剤を含む緩衝液で溶解後、細胞由来の核酸を酵素分解し、ここからウイルスキャプシドを含む分画を超遠心により回収後、プロテアーゼ処理、フェノール抽出によりキャプシドにパッケージングされていた GPCMV ゲノム DNA を精製した。

(倫理面の配慮)

臨床検体を現時点ではまだ用いていないため、倫理面の配慮を特別に考慮する必要はない。今後報告した方法に基づき臨床検体を扱うため現在倫理委員会に承認申請中である。

C. 研究結果

1. 先天性感染スクリーニング陽性児尿中の CMV ゲノムコピー数の迅速測定法の開発

1) IE 2 領域を標的として 100,000 から数コピーの範囲で定量可能な高感度 real-time PCR 法を確立した (図 1)。

2) CMV 粒子や感染細胞を人工的に加えた健常成人の尿 (通常 CMV DNA 陰性) を特殊濾紙などにをしみこませ乾燥後、濾紙から直径 3mm のディスクを打ち抜いたものを出発材料として用意した。このディスクから DNA を溶出する条件を通常の PCR 法及び real-time PCR 法を用いて検討した。特殊濾紙としては 3 メーカーの数種類を検討しその中で、S&S 社製 IsoCode 濾紙より DNA を簡便な操作により溶出する条件を見出した。溶出された DNA 量を real-time PCR 法で定量し、検出限界を解析したところ、30 コピー程度であった (図 2)。

2. 緑色蛍光蛋白 (GFP) を発現する組換え体 GPCMV の作成のための条件検討

1) GPCMV 培養条件としてモルモット繊維芽細胞 GPL 及びモルモット胎児胚由来細胞 104C の比較を行った。少なくとも CPE やプラークの観察及びウイルス収量の点では GPL が優れていた。ヒト CMV 新鮮分離株同様培養液中のフリーの感染粒子は少なく、感染細胞から未感染細胞への接触による伝播の方が効率的であった。

2) 精製したゲノム DNA を EcoRI もしくは HindIII で切断後プラスミドベクターにクローニング

した。このライブラリークローンの一部について挿入断片の末端部分の塩基配列を決定し、既知の制限酵素地図や塩基配列情報とつき合わせてクローンの同定を進めている。現在までにマップしたクローンを図 3 に示した。

3) GPCMV の DNA を細胞に遺伝子導入するために燐酸カルシウム法や複数の市販のリポソームを用いる方法を比較検討した。Fugene 6 による方法によってのみ細胞毒性がなくウイルスプラークの形成が可能であった (図 4)。24 穴プレート条件で 0.5 g GPCMV ゲノム DNA、1.5 l Fugene 6 の条件で約 100 程度のプラークを回収できた。プラーク数と導入 DNA 量の間には相関があった。遺伝子導入により得られたプラークが GPCMV 由来であることを初期蛋白に対するモノクローナル抗体 E16 (浜松医大筒井博士より分与) を用いた蛍光抗体法により確認した (図 5)。

4) GFP を発現する組換え体 GPCMV の構築法をデザインし (図 6)、現在大臣確認実験の承認申請を進めている。

D. 考察

1. 先天性感染スクリーニング陽性検体の解析

1) 特殊濾紙を用いて尿検体を収集する利点は、収集の簡便さのみならず、検体を室温で整理して保存できる点にもある。また、濾紙表面には微生物を不活化させる薬剤が塗布されているためバイオハザードの観点からも安全性が確保できる。本研究ではそうした利点を生かし、収集され CMV が陽性と判定された検体について、スクリーニングに用いたものと同じ濾紙検体からもう一枚ディスクを打ち抜くことにより容易に CMV ゲノムコピー数を測定することを可能にした。

2) 先天性感染児尿中の CMV は一般に 10^5 ゲノムコピー/ml 以上の濃度が予想されているので本方法にはコピー数定量に十分な感度があると言える。

3) 今後の技術的な課題として、この特殊濾紙を用いた CMV ゲノムの定量法が唾液や血液などにも応用可能かを検討する。

4) 本研究で開発した方法により家庭において尿採取が容易にできるようになることから、より多くの経時的な尿検体の収集が可能となる。このことにより、先天性感染例における尿中の CMV ゲノムコピー数と発症や病態との関連や出生後からの時間経過に伴う尿中の CMV ゲノムコピー数の推移について解析できるようになると期待される。

2. 組換え体 GPCMV の作成

1) 現在 GPCMV ゲノムの定量を可能とする

real-time PCR 法の開発を行っている。この real-time PCR によるゲノム量の定量、組換え体 GPCMV から発現される GFP の検出、及びモノクローナル抗体による初期蛋白の検出を組み合わせることで、どの組織部位もしくはどのタイプの細胞で、どのフェーズ（ウイルス侵入、前初期遺伝子発現、初期遺伝子発現）までの感染がどの程度のコピー数を伴って起こるかが明らかにできるようになり、生体内における感染後のウイルス動態について詳細な知見を蓄積できるようになる。

- 2) 現在準備を進めている組換え体 GPCMV の細胞内、モルモット内での増殖性が親株と同等であることが示されれば、組み換えに用いている部位に他の遺伝子を導入できることを意味し、今後 BAC などの構築にこの部位が利用できることとなる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) G. Wang, H. Xu, Y. Wang, X. Gao, Y. Zhao, C. He, N. Inoue, H. Chen. Detection of human herpesvirus 8 DNA sequence and specific IgG antibodies in patients with pemphigus. *J. Am. Acad. Dermatol.*印刷中
- 2) N. Inoue, T. Spira, L. Lam, J.L. Corchero, W. Luo. (2004) Comparison of serologic responses between Kaposi's sarcoma- positive and -negative men who were seropositive for both human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus. *J. Med. Virol.* 74:202-206.
- 3) L.T. Krug, V.P. Pozharskaya, Y. Yu, N. Inoue, M.K. Offermann. (2004) Inhibition of infection and replication of human herpesvirus 8 in microvascular endothelial cells by alpha interferon and phosphonoformic acid. *J Virol.* 78:8359-71.
- 4) V. Pozharskaya, L.L. Weakland, J.C. Zimring, L.T. Krug, E.R. Unger, A. Neisch, H. Joshi, T. Kroll T, N. Inoue, Offermann MK. (2004) The impact of viral interferon regulatory factor-1 expression on responsiveness to interferon alpha and the production of infectious human herpesvirus 8 by BCBL-1 cells. *J.Virol.* 78:6621-6635.
- 5) S. Koyano, A. Araki, Y. Hirano, K. Fujieda, T. Suzutani, K. Yagyu, K. Muroho, N. Inoue. (2004)

Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection using dried umbilical cords. *Ped. Infect. Dis. J.* 23:481-482.

2. 学会発表

井上直樹, T Spira, L. Lam, JL Corchero, W. Luo. HHV-8 と HIV 重感染者におけるカポジ肉腫発症群と比発症群の間での免疫反応の比較 第 19 回ヘルペスウイルス研究会 2004 年 6 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

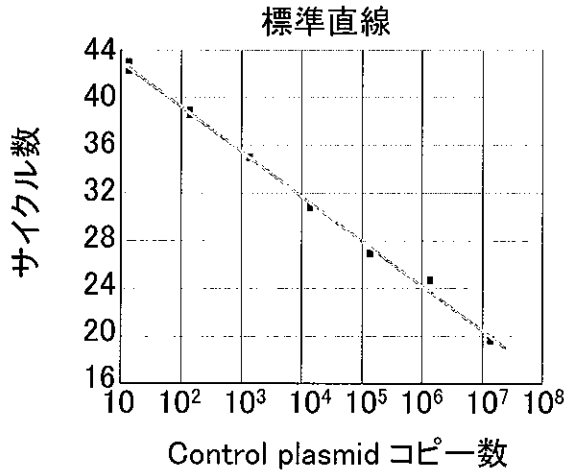
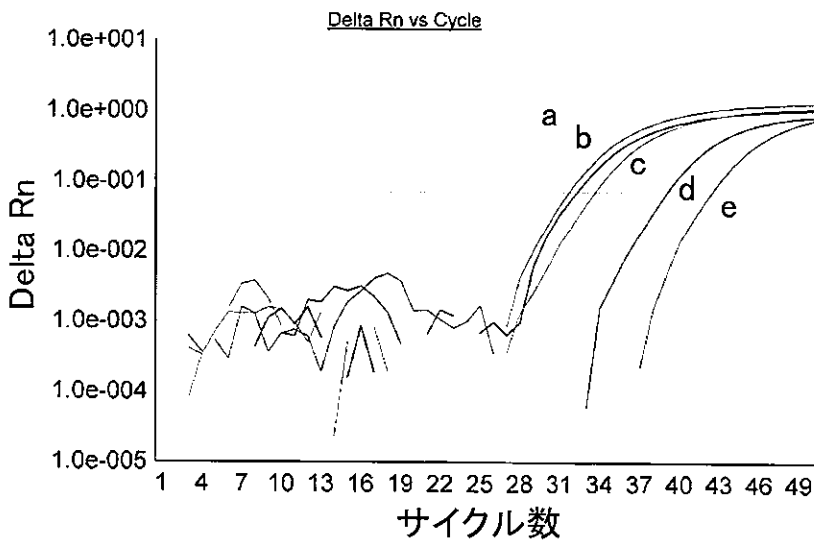


図1 ヒトCMVに対するreal-time PCR法



- a: 陽性DNA (4.7x10³コピー)
- b: 10³コピースパイク
- c: ディスクから溶出 (10³コピー)
- d: ; (10²コピー)
- e: ; (10コピー)

図2 特殊濾紙を用いて収集した尿中のCMVゲノム量の定量

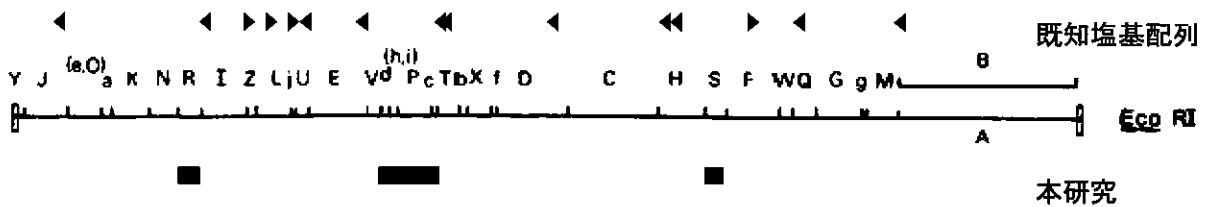


図3 GPCMVゲノムのプラスミドへのクローニング

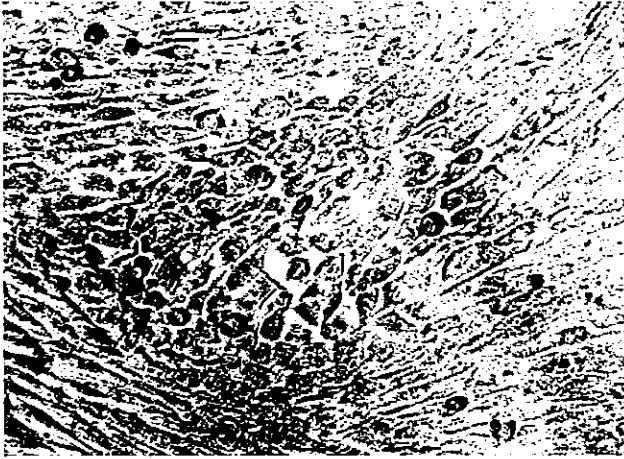


図4 GPCMV ゲノム導入後のプラーク形成

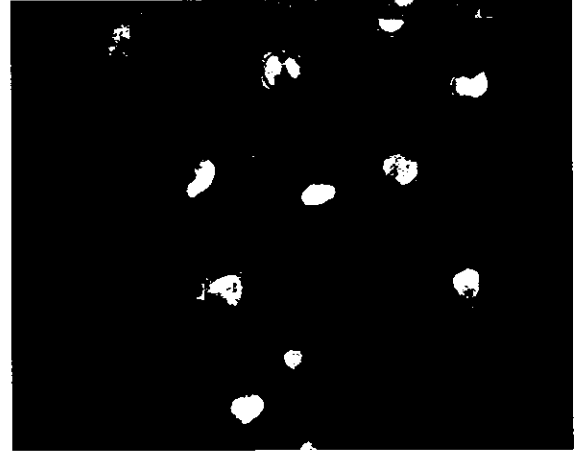


図5 モノクローナル抗体による確認

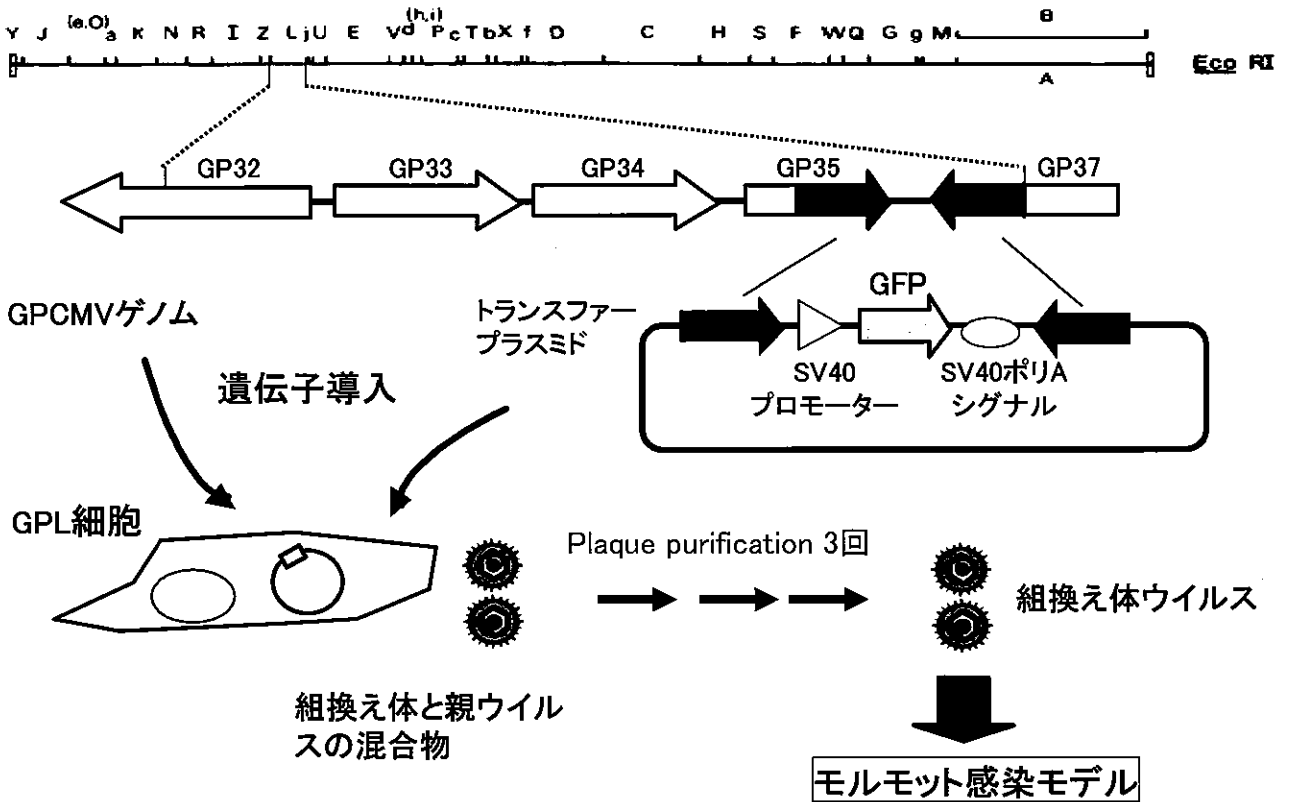


図6 緑色蛍光蛋白（GFP）を発現する組換え体 GPCMV の構築デザイン

サイトメガロウイルス血清型の解析

分担研究者 錫谷達夫（福島県立医科大学医学部微生物学）

研究協力者 石橋 啓（福島県立医科大学医学部微生物学）

呉宮永子（福島県立医科大学医学部微生物学）

研究要旨

ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）の糖蛋白B（glycoprotein B; gB）、糖蛋白H（gH）は、ウイルスが細胞に感染する最初のステップ“吸着”に関与する因子である。これらの糖タンパクに対する抗体の一部は、補体の非存在下でウイルスの感染性をなくす中和抗体であるし、ヒトが産生する抗CMV中和抗体のほとんどは、この2つの糖タンパクに対するものである。近年、gBやgHの中和抗体のエピトープに多型性があり、HCMVには血清型とも呼べる株間での抗原性の差があることが明らかとなってきた。本研究では、聴覚障害の重要な病因である先天性HCMV感染症の発症病理、疫学を解析することを目的に、血清抗体価から感染しているHCMVの血清型を予想できるELISA系を作製した。このELISAはウイルス感染細胞を抗原とする既存のELISAの90%の感度を有していた。この新たなELISAを用いて、日本人ボランティアから得た血清を解析した結果、1) 日本人に感染しているHCMVはAD-169タイプのウイルスが2/3、Towneタイプのウイルスが1/3であった。2) 日本人のHCMV感染率は若年者ほど低下する傾向にあり、今後、先天性HCMV感染症の発症頻度は高まることが予想された。今年度の研究で作製したELISA系の有用性が示されたので、今後例数を増やして先天性HCMV感染症の発症頻度を予想し、健康危険情報としてとりまとめたい。

A. 研究目的

ゲノムの複製が正確なDNAウイルスでは、突然変異率が低く、株間の多型は少ないと考えられている。ところがヘルペスウイルス科のウイルスは、DNAウイルスであるにもかかわらず株間でかなり多型が存在し、それが表現形の差となっていることが明らかにされてきた。ヘルペスウイルスの1種、ヒトサイトメガロウイルス（Human cytomegalovirus; HCMV）では、この多型が中和抗体のエピトープ中に存在し、株間で“血清型”とも呼ぶべき抗原性の差が存在する。そのため、HCMVに既に感染して免疫を持っている妊婦が、妊娠中に抗原性の異なる別のHCMV株に重感染し、先天性CMV感染症の児を出産することが明らかにされた（Boppana et al. *N Engl J Med* 344: 1366-1371, 2001）。

一般に、ウイルス感染症に対する防御機構としては細胞性免疫が主体である。しかし、胎児期の免疫能、特に細胞性免疫は未成熟で、この時期は母体から獲得する移行抗体に頼った防御を行う。そのため、妊婦の持つ抗体で防御できないHCMV株の重感染は、初感染と同様の意味を持つこととなる。本研究では、異なる血清型HCMV重感染の頻度を予測す

るため、日本人から分離されたHCMV株を解析し、血清型の多様性とそれぞれのタイプの頻度を明らかにする。また、健康人からHCMVを分離することは困難であるので、血清抗体価からその人に感染しているHCMVのタイプを予測できるELISA系を確立し、日本人に感染しているHCMV株の疫学的な調査を行う。

B. 研究方法

1. ウイルス株：

HCMV株としてAD-169株、Towne株、および日本人から分離した20株を用いた。ウイルスの培養には、テロメラーゼの強制発現によって不死化したヒト由来線維芽細胞株hTART-BJ1 cellsを用いた。

2. 遺伝子シーケンスの解析：

gB、gH遺伝子をPCR法で増幅し、これをテンプレートとして塩基配列をPCR directed sequencing法にて解析した。

3. gB、gHエピトープの発現・精製

PCRでgB、gHのエピトープ部分を血清型の異な

るウイルスより増幅し、そのそれぞれを pGEX にクローニングした。この plasmid を大腸菌にトランスフェクションし、エピトープとなるペプチドを Glutathion S-transferase (GST) の C 末端側に融合したタンパクとして発現させた。融合タンパクはアフィニティーカラムで精製した。

4. ELISA

精製した GST と融合したウイルス抗原あるいは GST を 96 well ELISA plate に 1 well あたり 1 µg 添加し、4°C over night 結合させた。3% ウシアルブミン添加リン酸緩衝生理食塩水で 2 時間ブロッキング後、検体である血清を 50 µl 加え、2 時間インキュベートした。プレートを洗浄後、ペルオキシダーゼラベル抗ヒト IgG ウサギ血清を室温で 2 時間反応、さらに洗浄後、ペルオキシダーゼの基質を 20 分間反応させ、発色させた。プレートリーダーで 405 nm の吸光度を測定し、検体の価から GST を抗原とした時の価を差し引き、0.25 以上の価を示した検体を陽性と判定した。

5. 血清検体

今回の実験に用いた血清は、福島県立医科大学の学生、教員のボランティアと東京女子医科大学泌尿器科での腎移植のドナーから得たものである。

(倫理面への配慮)

協力者には研究の内容を充分説明し、協力の意思を得るとともに、結果の取り扱いに細心の注意を払った。なお、この研究については福島県立医科大学倫理委員会の審査と許可を受けた。

C. 研究結果と考察

1. 臨床分離 HCMV 株の解析

1) gB 遺伝子の多型性：

これまで、gB には遺伝子型 (genotype) として 4 種の subgroup があり、種々の疾患との関連の有無が議論されている。そこで、実際に日本人に感染しているサイトメガロウイルスにも同様の多型性があるか否かを 20 株の臨床分離株について調べた。その結果、Towne 株と同じ型である Group1 には 20 株のうち 17 株が属しており、AD169 株と同じ Group2 に属するものは認められなかった。ほかの 3 株は Group3 に分類された。Group4 は Group2 と同様に認められなかった。

次に、gB に存在するエピトープとして知られている AD-1、AD-2 site のアミノ酸配列の多型を比較し

た。Towne 株と AD169 株の AD-1 site は同じアミノ酸配列であったが、臨床分離株の中に 585 番目のアミノ酸が Ala から Val に、同時に 613 番目の Leu が Phe に置換された株が 3 株認められた。AD-2 site は Towne 株と AD169 株では異なるシークエンスを持つが、日本人から分離された HCMV 株では、この 2 種が半数ずつ存在した。

以上の結果をまとめると、遺伝子型と AD-1、AD-2 のシークエンスの多型は、それぞれ 2 種に区分できるウイルスが日本人に感染している。遺伝子型とエピトープのタイプの間には遺伝的な連鎖はなく、3 つの部位が独立して多形を示していた。

2) gH 遺伝子の多型性：

gH の中和エピトープを調べると、臨床分離株 20 株のうち 13 株は AD169 と同じ、7 株は Towne と同じであった。また、gB が Group3 に分類された 3 株の gH はすべて AD169 型であった。したがって、HCMV 感染者が再度 HCMV 感染を受けた時、その株の gH の抗原性が既に感染していた HCMV のものと異なるものである確率は 38% である。

2. ELISA 系の作製と評価：

gB のエピトープ AD-2 には、中和抗体のターゲット site I と中和に関与しない抗体のターゲット site II が存在する (Fig. 1)。site I には、報告されているとおり Town 株タイプと AD-169 株タイプのアミノ酸配列が、site II には Towne タイプ、AD-169 タイプのほか、我々が調べた株中に新たなシークエンスを持つ株 (136 株) が存在した。そこで、それぞれのタイプのコドン 60~77、50~54 の部分を PCR で増幅し、pGEX にクローニングした。gH の中和エピトープには AD-169 と Towne の 2 つのタイプが存在する (Fig. 2)。それぞれを PCR で増幅して、pGEX にクローニングした。作製した plasmid を大腸菌にトランスフェクションし、GST と各抗原ペプチドの融合タンパクを発現させた。これをアフィニティークロマトグラフにて精製した。AD-169 株由来の gH エピトープの発現・精製を 1 例として Fig. 3 に示した。

こうして精製した 3 つのエピトープ由来の計 7 種の抗原と GST そのもの、合わせて 8 種の抗原を 96 well plate に結合させ、ELISA 系を作製した。この ELISA 系をヒト血清を用いて検討した結果 gB の AD-2 site I のエピトープは中和抗体のエピトープであるが、株間に多型の認められないコドン 70 以降

がエピトープであり、感染しているウイルスのタイピングには利用できない。gB の AD-2 site II の抗原は、ウイルスをタイピング出来る抗原であったが、中和には関与せず、また、この部位に対して検出可能な抗体を保有するヒトは、全 HCMV 抗体保有者の 10~20% 程度しかいなかった。gH のエピトープは、中和抗体のエピトープであるとともに、タイピングに利用可能なものであった。

以上の結果をもとに、中和抗体を測定でき、ウイルスのタイピングも可能な gH のエピトープ 2 種 (AD-169, Towne 由来) と全ての HCMV の共通中和抗原として gB AD-2 site I、あわせて 3 種の抗原を用い、この ELISA 系の感度を検討した。用いた血清は、SRL 社で HCMV 抗体陽性と診断されていた腎移植ドナー血清 119 検体である。119 検体中 108 例が ELISA に用いた 3 種の抗原のいずれかに反応し、抗体陽性と診断できた。つまり、今回作製した ELISA は市販の ELISA の 90.2% の感度であった。

さらに検体数を 207 に増やして解析した結果は以下のとおりであった (Fig. 4)。血清は 11~79 才、平均 47 才の方々から提供されたもので、76.8% の方が抗体陽性となった。陽性者のうち 78.6% は gB に対する抗体が検出されたが、21.4% は陰性で、gH に対する抗体によって診断された。

逆に gH に対する抗体が陽性となった検体は 79.9% で、残り 20.1% は gB による抗体のみで診断された。gH に対する抗体のタイピングを行うと AD-169 型のウイルスに対する抗体のみを持つヒトが 45.5% と約半数、Towne 型のウイルスに対する抗体のみを持つヒトが 16.4%、両方のウイルスに重感染しているヒトが 17.6% とそれぞれおよそ 5 人に 1 人という割合であった。この結果から、日本人で HCMV に感染しているヒトのおよそ 2/3 は AD-169 タイプのウイルスに、1/3 は Towne タイプのウイルスに感染していることが明らかとなった。今後さらに例数を増やし、妊娠中に妊婦の免疫で抑制できない HCMV の重感染が起こる確率を正確に算定したい。

最後に、本研究で用いた血清の各年齢別の抗 HCMV 抗体保有率を Fig. 5 にまとめた。既に多くの論文で報告されているとおり、若年者で HCMV の感染率が低下しており、今後、妊娠中の HCMV 初感染例の増加が予想される。

D. 結論

gH の中和エピトープによって、血清抗体価から感染しているウイルスのタイプを予想でき ELISA を

開発した。さらに、この抗原と gB の AD-2 site I エピトープを使うことによって、感染細胞全体を抗原とする ELISA の 90% 程度の感度を持った ELISA 系が作製できた。

上記の ELISA を用い、日本人に感染している HCMV は AD-169 株に近い抗原性を持つものが優位であることが解った。また、HCMV の感染率が年代とともに低下し、今後、先天性 HCMV 感染症発生の頻度が増加することが予想された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kaneko, H., S. Mori, O. Suzuki, T. Iida, S. Shigeta, M. Abe, S. Ohno, K. Aoki and T. Suzutani. The cotton rat model for adenovirus ocular infection: antiviral activity of cidofovir. *Antiviral Res.* 61:63-66 (2004)
- 2) Yokota, S., N. Yokosawa, T. Okabayashi, T. Suzutani, S. Miura, K. Jimbow and N. Fujii. Induction of suppressor of cytokine signaling-3 by herpes simplex virus type 1 contributes suppression of interferon signaling pathway and replication of virus. *J. Virol.* 78: 6282-6286 (2004)
- 3) Koyano, S., T. Suzutani, Y. Hirano, A. Araki, K. Yagyu, K. Muro, N. Inoue and K. Fujieda. Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by using dried umbilical cords. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 23: 481-482 (2004)
- 4) Kimura, K., K. Ishioka, K. Hashimoto, S. Mori, T. Suzutani, T.L. Bowlin and S. Shigeta. Isolation and characterization of NMSO3-resistant mutants of respiratory syncytial virus. *Antiviral Res.* 61: 165-171 (2004)
- 5) Murata, M., H. Gouda, K. Yano, S. Kuroki, T. Suzutani and Y. Katayama. An electrochemical device for the assay of the interaction between a dioxin receptor and its various ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 137-141 (2004)
- 6) Hashimoto, K., B.S. Graham, S.B. Ho, K.B. Adler, R.D. Collins, S.J. Olson, W. Zhou, T. Suzutani, P.W. Jones, K. Goleniewska, J.F. O'Neal and R.S. Jr. Peebles. Respiratory syncytial virus in allergic lung inflammation increases Muc5ac and gob-5. *Am. J.*

Respir. Crit Care Med. 170: 306-312 (2004)

- 7) Hashimoto K, B.S. Graham, M.W. Geraci, G.A. FitzGerald, K. Egan, W. Zhou, K. Goleniewska, J.F. O'Neal, J.D. Morrow, R.K. Durbin, P.F. Wright, R.D. Collins, T. Suzutani, R.S. Peebles Jr. Signaling through the prostaglandin I₂ receptor IP protects against respiratory syncytial virus-induced illness. *J. Virol.* 78: 10303-10309 (2004)
- 8) Saijo, M., T. Suzutani, S. Morikawa and I. Kurane. Genotypic characterization of the DNA polymerase and sensitivity to antiviral compounds of foscarnet resistant HSV-1 derived from a foscarnet-sensitive herpes simplex virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 606-611 (2005)

2. 学会発表

- 1) 橋本浩一、細谷光亮、石橋 啓、金子久俊、錫谷達夫. STAT-1 欠損マウスを用いた重症 Respiratory Syncytial Virus 感染症発症病理の検討 第52回日本ウイルス学会学術集会 横浜 (2004)
- 2) 金子久俊、橋本浩一、石橋 啓、青木功喜、大野重昭、錫谷達夫. LAMP 法による単純ヘルペスウイルスの迅速同定 第52回日本ウイルス学会学術集会 横浜 (2004)
- 3) 石橋 啓、橋本浩一、金子久俊、錫谷達夫. ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) タイプ別抗体の測定とその臨床応用. 第52回日本ウイルス学会学術集会 横浜 (2004)
- 4) 横田伸一、横沢紀子、岡林環樹、錫谷達夫、藤井暢弘. HSV-1 感染による宿主 JAK/STAT ネガティブレギュレーター SOCS3 の誘導とその意義. 第52回日本ウイルス学会学術集会 横浜 (2004)
- 5) 茂田士郎、森修一、山瀬利博、杉井俊二、田島朋子、錫谷達夫. コロナウイルス感染症に対する抗ウイルス剤の開発-ポリオクソメタレート抗コロナウイルス効果-. 第14回抗ウイルス化学療法研究会 名古屋 (2004)
- 6) 錫谷達夫、金子久俊、森修一、橋本浩一. 黒色果汁の抗ウイルス効果の検討. 第14回抗ウイルス化学療法研究会 名古屋 (2004)
- 7) 金子久俊、川名尚、錫谷達夫. 単純ヘルペスウイルス1型、2型混合感染症の解析. 第58回日本細菌学会東北支部総会 仙台 (2004)

3. 特別講演

- 1) 錫谷達夫. ヘルペスウイルスのインターフェロ

ン抵抗性. 第14回抗ウイルス化学療法研究会、名古屋、2004.

- 2) 錫谷達夫. 感染症予防対策. 福島県国保地域医療学会. 7月10日 福島市
- 3) 錫谷達夫. 移植後サイトメガロウイルス感染症の発症病理. 第10回福島移植フォーラム. 7月17日 福島市
- 4) 錫谷達夫. 先天性サイトメガロウイルス感染による聴覚障害. 平成16年度病診連携懇談会. 11月17日 福島市

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

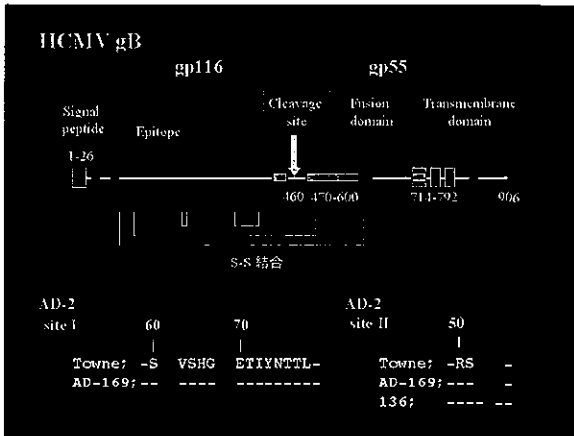


Fig. 1 gB の構造と、エピトープのアミノ酸配列。
gB は 906 アミノ酸からなる膜貫通型の糖タンパクで、タンパク分解酵素によって 116 Da と 55 Da の2つのタンパクに切断される。異なるシーケンスを持つ AD-2 site 中の2つエピトープを下段に示した。

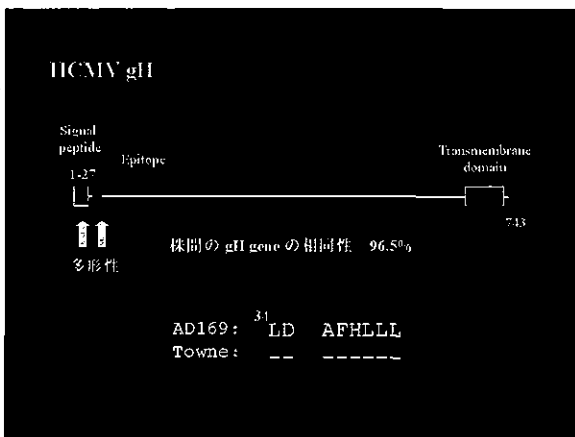


Fig. 2. gH の構造と、エピトープのアミノ酸配列。
gH は 743 アミノ酸からなる膜貫通型の糖タンパクで、エピトープには2種の多型が存在する。

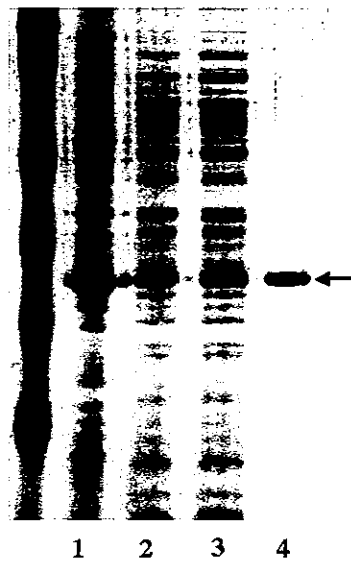


Fig. 3. GST-gH エピトープ融合タンパクの発現と精製。
Lane 1; sonicate した菌の pellet, Lane 2; supernatant, Lane 3; supernatant を affinity column にかけた flow through, Lane 4; 精製した融合タンパク

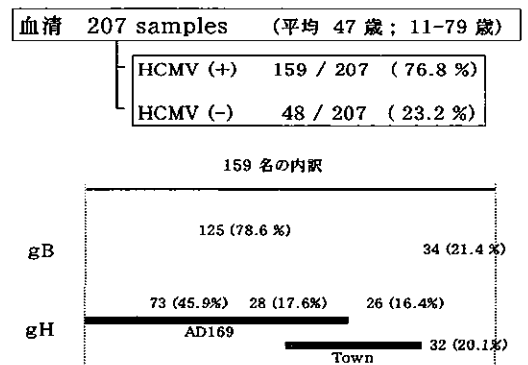


Fig. 4. ELISA による血清抗体価の測定。

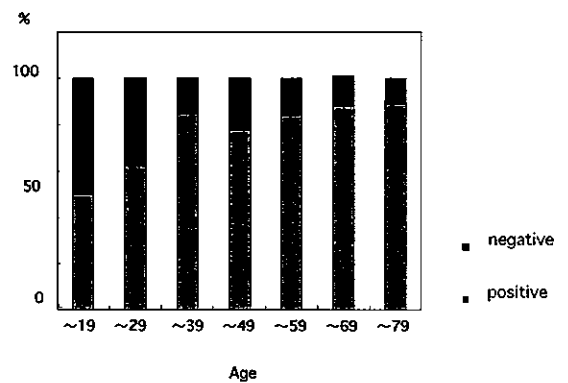


Fig. 5. 日本人の年代別 HCMV 抗体保有率。

抗体療法の開発に関する研究

分担研究者 竹腰正隆（東海大学医学部分子生命科学）

研究要旨

HCMV 感染症の予防と治療用のヒト中和抗体作りをめざしている。主要中和抗原を担う gB と gH に対する抗体作りを主とし、液性免疫かく乱系の Fc レセプターに対する抗体もめざす。治療を念頭に置き、抗体はホール化して植物での大量生産を試みる。現在、抗原となる gB や Fc レセプターの大量培養と精製の条件が整い、Fab 抗体ホール化ベクターおよび植物発現ベクターも設計通り構築できた。これからは、すでに得られている Fab 中和抗体をホール化し植物での生産を進める。

A. 研究目的

現在、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）感染症の予防と治療には、アシクロビルやガンシクロビルといった核酸アナログが用いられている。薬剤の活性化にはリン酸化が必要だが HCMV は主要なリン酸化酵素であるチミジンキナーゼ遺伝子を持っていない。このため抗ウイルス剤の効果が他のヘルペスウイルス群に比べて弱い。そこでこれらの薬剤とはまった作用機序の異なる抗ウイルス剤として、ヒト中和抗体を用いることができれば、HCMV 感染症の予防と治療に大きな福音となると考えられる。

これまでのところウイルス中和エピトープを担う抗原としては下記の 3 種が存在すると言われている。

中和抗原	糖鎖有	糖鎖無
gB (gCI)	UL55 58k-116k	102k
gH (gCIII)	UL75 86k	84k
gN (gCII)	UL73 50~60k	15k

本研究では主として主要中和抗原である gB と gH に対する中和抗体の取得を目指した。一方、中和抗原ではないが液性免疫かく乱系として IgG の Fc 領域に結合することによって抗体を排除する Fc レセプター遺伝子が近年になって同定された。それは下記の 2 種である。

Fc レセプター	糖鎖有	糖鎖無
TRL11	34k	24k
UL119-8	68k	33k

同じヘルペスウイルスグループに属する HSV での研究から、これら Fc レセプターに対する中和

抗体が存在すると、本来のウイルス中和抗体の効果が增大することが知られている。このため本研究では TRL11 と UL119-8 に対するヒト中和抗体の産生も目指した。

治療用抗体の研究は世界的に盛んに行われている。しかしウイルスに対する抗体の開発はあまり活発とはいえず、実用化されたものは呼吸器感染症の原因となる RSV に対するものだけである。特に HCMV においては中和抗原の多様性が指摘されており、抗体開発には多くの臨床株のデータが必要と思われる。ヒト抗体で有名なアメリカの抗体開発メーカーの研究者の 1 人は、ウイルスに対する抗体はその知識を保有する大学に責任がある、とまで言う。本研究は HCMV の臨床分離株を多く有する研究者ら（本研究の分担研究者でもある）とのネットワークを活用して、HCMV 感染症の予防と治療に有効なヒト抗体の開発に真摯に取り組むものである。

B. 研究方法

研究法は大きく分けて 2 つからなる。1 つはすでに得られた抗 HCMV 中和ヒト Fab 抗体のホール化である。これは抗体価の高いヒトから得た中和 Fab 抗体（論文や学会で発表済み）をホール抗体 (IgG1) に変換し、植物での大量生産を試みるものである。ホール化することにより、中和抗体価の上昇と血中半減期の増大が期待できる。また生産の場として植物を用いることにより、既存の方法よりも安価にかつ大量に抗体を生産できる利点がある。

もう 1 つの試みは抗原となるタンパク質（中和抗原、Fc レセプター）のバキュロウイルスの系を

用いた生産である。これら抗原が生産できればヒト抗体産生マウスであるKMマウスに免疫することにより、ハイブリドーマ法によってヒト抗体を得ることができる。これら抗原を生産するため大腸菌の系を用いたが、膜タンパク特有の構造の複雑さからか、うまく生産することができなかった。またエレクトロポレーションを用いたDNA導入でKMマウスを直接免疫したが、抗体価の上昇は認められなかった。このため複雑な折りたたみタンパクの産生が可能なバキュロウイルスの系を用いることにした。

1. ヒト Fab 抗体のホール化と植物発現ベクターの構築

Fab 抗体のうちL鎖は全領域が含まれるが、H鎖に関しては VH-CH1 しか含まれず、CH2-CH3 を欠いている。そこで我々の研究室ですでにクローニングした抗 HBs 抗体遺伝子 CL4(IgG1)の CH1-CH2-CH3 領域を用いてホール化を行う。CH1 の5'側 15塩基ほど離れた所に制限酵素の ApaI サイトが存在する。これは IgG1-4 まで共通である。したがって、IgG 由来の Fab は VH 領域を ApaI で切り出し、CL4 の CH1-CH3 領域にクローニングすることでインフレームにホール化することができる。IgG 以外の Fab の場合は ApaI サイトと CH1 の5'側 15塩基ほどを付加したプライマーで VH 領域を増幅して、同じように CL4 の CH1-CH2-CH3 領域にクローニングする。

植物発現ベクターとしては共同研究を行っているドイツのフランフォファー研究所の分子生物学応用生態学研究所ライナー・フィッシャー部長から供与された pTRAcKc-ERH をベースに抗体遺伝子の L鎖と H鎖の2つの遺伝子を導入できるように改造する。

2. 抗原タンパクのバキュロウイルス系での生産

中和エピトープを担う gB, gH および Fc レセプターの TRL11, UL119-8 についてバキュロウイルス系での生産を行う。そのためにいずれのタンパク質も本来の分泌シグナルをそのまま利用して、培養液中に分泌させる。また膜貫通ドメインは除去する。タグとしては His-Tag を C 末端に付加し、精製に利用する。バキュロウイルスの感染には一般に用いられる Sf9 細胞に加え、タンパク産生効率の良い Tn5 細胞も抗原生産時に用いる。そして、分泌タンパク質の精製を容易にするため無血清培地で培養する。以上の条件で産生を試みる。使用する組換えバキュロウイルス作製用インサーショ

ンベクターは Invitrogen 社の pFastBac1 と Pharmingen 社の pVL1392 である。前者はバキュロウイルスゲノムが Bacmid の形で大腸菌に入っているため、大腸菌内で組換えが行える(Bac to Bac システム)。後者は欠損したバキュロウイルスゲノムと一緒にトランスフェクションして Sf9 細胞で組換え体を作製する。

(倫理面への配慮)

本研究で用いる抗体遺伝子は東海大学医学部倫理委員会によって承認された実験によって得られたものであり、倫理面には十分な注意を払っている。

C. 研究結果

1-1. ヒト Fab 抗体のホール化ベクターの構築

IgG1 ホール抗体遺伝子である CL4 を ApaI-XbaI で切断して CH1-CH2-CH3 領域約 1kb を切り出した。一方、ホール化ベクターの基盤となるベクター CV1 の SfiI-XbaI 領域を切り出し、そこに SfiI-ApaI-XbaI の切断部位を含む合成リンカーをクローニングした。得られた CV1-SX4 を ApaI-XbaI で切断し、そこに CL4 の ApaI-XbaI 領域をクローニングしてホール化ベクターである Fab2IgG を完成させた。構築部位に関してはシーケンシングを行い塩基配列の確認を行った。

1-2. 植物発現ベクターの構築

ベクターの出発材料として pBluescript(pBs)を用いた。まず pBs のマルチクローニングサイトの PstI-BamHI を切断し、そこに植物用分泌シグナルとなる LPH 配列を合成リンカーの形で導入した。このシグナルに関してはオリジナルの配列を改変して使用する植物であるタバコの使用コドンへの最適化を行った。さらに分泌シグナルが適切に切り出されるかどうかをデンマーク工科大学の予測サイト (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) を用いて検定した。リンカー導入に際して、PstI-BamHI サイトがなくなるようにリンカーを設計した。次に LPH を導入した 5'側の HincII-EcoRI サイトに pTRAcKc-ERH 由来の植物用プロモーターの 0.7kb を導入した。次に LPH の 3'側の XbaI-SacII サイトに pTRAcKc-ERH 由来の植物用 polyA シグナルの 0.3kb を導入した。得られたベクターを pPLA と名付けた。これを L鎖用と H鎖用に分けるために、pPLA の 5'側にある XhoI サイトと 3'側にある SacI サイトをそれぞれ L鎖用に EcoRI-NotI サイト、H鎖用に AscI-HindIII サイトに変換した。これらベ

クターに関してはシーケンシングを行い塩基配列の確認を行った。L鎖とH鎖を植物に導入するために次に植物導入用ベクターpTRAcK-ERHの改造を行った。pTRAcK-ERHのAscI-FseI領域を切り出し、代わりにAscI-HindIII-EcoRI-NotI-FseIサイトを含む合成リンカーを導入し、pTRAcK-HEと名付けた。これによりFab抗体をIgG1に変換して植物で発現させるために必要なすべてのベクターが完成した。

2. 抗原タンパクの産生

使用したバキュロウイルスベクターのInvitrogen社のpFastBac1とPharmingen社のpVL1392について産生量の比較を行った。その結果、pFastBac1を用いたBac to Bacの系で産生量が多かったので、以後はBac to Bacの系を中心に実験を行った。

2-1. gBの産生

gBタンパクの膜貫通ドメインの直前、アミノ酸で1-750番までの領域をPCRで増幅しバキュロウイルスに導入して発現させた。産生の確認はgBのN端を認識するモノクローナル抗体TI-23を用いてウエスタンブロットで行った。予想される分子量にバンドが認められgBの産生を確認した。現在、培養条件を検討中で大量生産のための条件を決めつつある。最終的には250mLでの振盪培養を行う。これとは別にgBの分割発現の検討を行っており、gBを3個に分割して主要な抗原部位(AD1,2,その他)を単独で発現させるための組換えバキュロウイルスの構築を行っている。

gHについても組換えバキュロウイルスの構築を始めている。

2-2. Fcレセプターの産生

Fcレセプターに関しては既存の抗体がないためHis-Tagに対する検出法でその産生を確認した。TRL11に比べUL119-8の方が産生量が多かったので、UL119-8の生産を先に進めた。産生されたタンパク質は培養上清に分泌されるため、感染細胞の培養上清からの精製を試みた。最初はうまく精製されなかった。そこで培養上清を硫酸沈殿し、グリセロールを含むバッファーで十分透析を行ってからNi-NTAカラムにかけてアフィニティ精製を行ったところ特異的な吸着バンドを認めた。糖鎖の付き方がまちまちなのか、電気泳動では幅広のバンドとして検出された。一方、同様の方法でTRL11の産物を精製したところ、UL119-8に比べて薄いバンドが検出された。

現在、大量培養、大量精製法について種々の検討を行っている。Sf9に比べタンパク産生効率の高いといわれるTn5であるが、確かに数倍は生産量が多いことを確認した。培養法については静地培養、振盪培養、スピナーフラスコによる比較を行っている。

D. 考察

Fabホール化ベクターおよび植物発現ベクターに関しては、設計通りのベクターが構築できたことをシーケンシングによって確認した。実際にこれらのベクターがうまく働くかどうかは、今後のFabのホール化と植物での産生実験にかかっている。ただ分泌シグナルの切り出しに関しては、実際に使用予定の抗体の配列を用いて、人工知能+隠れマルコフ連鎖予測システムで検定したところ、正しく切り出されると予測された。我々はすでに植物でのホール抗体の産生に成功しているので、抗HCMV中和抗体に関しても問題なく植物で産生できると思われる。

抗原タンパクの産生に関しては、これまで大腸菌の系やDNA免疫でマウスに導入する方法を取ってきたがうまく行かなかった。今回のバキュロウイルスの系においては、問題なく産生されているようなので今後の生産が期待できる。特にFcレセプターに関してはこれまで報告例が無く、世界で初めての産生と思われる。またカラムを用いた精製も問題点を解決したので順調にできそうである。

E. 結論

HCMV感染症の予防と治療に用いるヒト中和抗体を作るために、抗体産生用に用いる2種のベクターの構築を行った。また抗原タンパクの生産もバキュロウイルスの系で順調に進んでいる。中和抗原を担うgBタンパクだけではなく、中和抗体の働きを妨害するFcレセプターの産生にも成功した。今年度は予定通りの進捗状況であり、計画通りに研究が遂行できる確信が得られた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tachibana H, Takekoshi M, Cheng XJ, Nakata Y, Takeuchi T and Ihara S. Bacterial expression of a human monoclonal antibody-alkaline

phosphatase conjugate specific for *Entamoeba histolytica*. *Clinic Diag Lab Immunol* 11(1):216-8. 2004.

2) Yano A, Maeda F, and Takekoshi M. Transgenic Tobacco Cells Producing the Human Monoclonal Antibody to Hepatitis B Virus Surface Antigen. *J Med Virol.* 73(2):208-15. 2004.

3) Yano A, and Takekoshi M. Transgenic plant-derived pharmaceuticals - the practical approach? *Expert Opin. Biol. Ther.* 4(10):1565-8. 2004.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

先天性サイトメガロウイルス感染症による難聴発生機序の動物実験モデルに関する研究

分担研究者 筒井 祥博（浜松医科大学病理学第二）
研究協力者 小杉伊三夫（浜松医科大学病理学）
李 立（浜松医科大学病理学第二）
河崎 秀陽（浜松医科大学病理学第二）

研究要旨

マウスサイトメガロウイルス (MCMV) はヒトサイトメガロウイルス (HCMV) と遺伝子構造、細胞特異性、感染動態がよく類似している。私達は MCMV を発育期マウスに感染させて内耳病変を起こす実験モデルを作成し、先天性 CMV 感染症による難聴の発生機序の解明を目指す。今回発育期マウス脳に MCMV を感染させ、内耳における感染細胞を免疫組織化学的に検出する方法を確立した。さらに腹腔内感染による内耳感染モデル、感染の時期による感染動態等について検討が必要である。

A. 研究目的

1) 研究の背景：サイトメガロウイルス (CMV) は胎生期の感染によって脳障害の生ずる最も頻度の高いウイルスである。全出産の 0.4-1.0% に胎内感染し、そのうち 5—10% が重篤な巨細胞性封入体症として、黄疸、出血傾向、肝脾腫などを伴って生まれ、生後まもなく死亡することが多い。脳では強い小頭症、脳室壁の石灰沈などが特徴的である。胎内感染した子供の約 10% は出生時には無症状で、生後数年してから、精神発達遅滞、てんかん、視力障害、難聴、痙攣などの脳障害が生ずると報告されている。発生機序の解明と予防法が望まれる。これらの研究はヒトの材料だけでは限界がある。私達はヒト CMV (HCMV) とその遺伝子構造、感染様式が類似しているマウス CMV (MCMV) をマウス胎盤、マウス胚あるいはマウス胎仔脳に感染させて、脳への感染様式、脳障害の発生について解析してきた。

2) 明らかにしてきたこと：

(1) 胎生期マウス胎盤に手術的に MCMV を注入し、胎生後期あるいは新生児期に解析した。その結果、胎生期には脳が感受性が高く、特に脳室壁の未分化神経系細胞が感受性が高いことが明らかとなった (Li & Tsutsui, Teratology 2000)。さらに新生児期に発育障害や小頭症が出現することが判り、ヒトの先天性 CMV 感染症によく類似したモデルであると考えた。

(2) 大脳スライス培養による感受性の解析：出生直後から生後 3 週までの発育段階の異なるマウスから脳を取り出し、大脳スライスを作成して MCMV を感染したところ、発育段階が早期なほど感受性高く、発育が進むにつれて感受性が低下した。しかし、脳室壁の未分化神経系細胞に感受性細胞が持続することが明らかとな

った (Kawasaki et al., Lab Invest 2002)。

(3) 培養神経幹・前駆細胞の感受性の解析：胎生期マウス脳から Reynolds & Weiss (1992) の方法で epidermal growth factor (EGF) 存在下で神経幹・前駆細胞を neurospheres として培養し、MCMV に対する感受性、増殖および分化への影響を解析した。その結果、神経幹・前駆細胞は MCMV に感受性を示し、ウイルス抗原の発現、感染性ウイルスを産生することが明らかとなった。MCMV の感染によって、神経幹・前駆細胞の増殖及び分化が抑制されることも明らかとなった (Kosugi et al., Lab Invest 2000)。

(4) 発育期脳の神経細胞の持続感染：発育期マウス脳は MCMV の感染によって主として脳室壁の未分化な神経系細胞および未分化なグリア系細胞に溶解感染しやすく、感染後時間が経過して慢性化すると神経細胞に感染が持続しやすいことが明らかとなった (Tsutsui et al., Arch Virol 1995; Shinmura et al., Am J Pathol 1997)。さらに神経細胞は innate immunity を回避しやすいことが明らかにした (Kosugi et al., Am J Pathol 2002)。さらに感染神経系細胞はアポトーシスを回避しやすく (Kosugi et al., Acta Neuropathol 1998)、これらにより感染神経細胞は持続感染に移行し易いと考えた。

3) 本研究の目的：本研究の目的は、(1) サイトメガロウイルス (CMV) が発育期内耳へ感染しやすいかどうか、種々の感染ルートおよび感染時期について検討し、発育期脳あるいは他の全身臓器との感受性について比較する。(2) 内耳の如何なる細胞が感受性を有するか明らかにするため、ウイルス抗原を認識する抗体と、細胞特異抗原の二重染色によって解析する。さらに(3) 感染が如何なるタイプの感染であることを明らかにするために、MCMV の前初期、早期

および後期のウイルス抗原および *in situ* hybridization によるウイルスゲノムの検出によって感染動態を明らかにする。(4) 変異ウイルスを用いた解析：私達は既に MCMV 早期遺伝子 e1 が神経細胞特異性を示すことを明らかにした。この e1 遺伝子プロモーターに標識蛋白である GFP あるいは Ds-Red をつないだ組換え体を挿入したウイルスを BAC 法で作成して神経細胞で発現しやすいウイルスを感染させ、内耳での発現を解析する。(5) 神経機能に影響を与えるかどうかを明らかにし、ひいては感音性難聴のような機能障害と関連するかどうかを明らかにする。

B. 研究方法

1) 感染方法：C57BL/6 および BALB/c マウスについて、出生 24 時間以内の周産期マウス脳および腹腔に MCMV を感染させる。感染後 3 日、5 日、7 日、14 日目に脳および内耳を含む側頭部を取り出し、4% PFA で固定する。

2) パラフィン連続切片による内耳の同定：EDTA 脱灰法によって、パラフィン切片で内耳を同定する方法の確立：冠状および矢状断で連続切片の作成。

3) HE 染色による内耳の構造の同定

4) ウイルス抗原発現細胞の免疫染色による同定：MCMV の前初期抗原 IE1 および IE3 に対する抗体、早期抗原 E1 に対する抗体と神経系細胞に反応する抗 NeuN、抗 GFAP、抗 Olig2 抗体を用いた解析。

5) 変異ウイルスによる後期遺伝子発現の検出：MCMV 後期遺伝子に HCMVIE-promoter によって発現する lacZ 挿入変異ウイルス(RM461) は Dr. Mocarski (Stanford Univ.)より供与された。

6) *In situ* hybridization によるウイルスゲノムの検出：DAKO genpoint system を用いた MCMV DNA 及び mRNA の検出。

7) BAC (Bacterial artificial chromosomes)法による変異ウイルスの作成：MCMV BAC genome (pSM3fr)および Shuttle vector (pST76KS)は Dr. Koszinowski (Munich Univ.)から供与された。MCMV-e1 promoter に GFP および Ds-Red を連結した遺伝子を組み込んだ shuttle vector と MCMV-BAC genome を用いて変異ウイルスを作製する。

(倫理面の配慮)

本研究は浜松医科大学動物実験施設の動物実験倫理委員会の審査を受けて実験を行った。

C. 研究成果

1) C57BL/6 マウス新生児(生後 1 日)脳内に LD50 の 3 倍量の MCMV (Smith 株)を接種し、一週間後 4% PFA で灌流固定した後脳と内耳を含む側頭部を採取した。採取後数日-1 週間の後固定後、1-2 週間の 0.3M EDTA 処理によって脱灰標本を作製することができた。

2) 脱灰後に側頭部組織の顎下部から鼓膜上部を結ぶ断面を作製しパラフィン包埋後、この断面に平行に薄切することで蝸牛の全体像(頂部から底部まで)の標本を作製することができた。一匹のマウスから約 30 枚の連続切片が作製可能である。

3) 今回行った接種ウイルス量の多い急性期の感染では、感染細胞は螺旋神経節と鼓室階に認められた。螺旋神経節ではウイルス抗原(IE1 と E1)は神経細胞には認められず、非神経細胞(シュワン細胞及びグリア細胞)に認められた。鼓室階では内皮細胞と内皮下の間質細胞にウイルス抗原が認められた。前初期抗原と早期抗原との分布に差はみられず、またコルチ器への感染は認められなかった。

4) MCMV genome の 161605-163015 に存在する MCMV-e1 promoter (1.4 kbp)を PCR 法で増幅後 EGFP 発現ベクターにクローニングし、MCMV-e1Pro1.4-EGFP を作製した。このベクター内の MCMV-e1 promoter が MCMV 感染及び MCMV-IE3 蛋白によって活性化することを確認した。現在、promoter 領域の上流と polyA 領域の下流に相同組み替えに必要な flanking 配列を組み込んでいる。今後このコンストラクトを shuttle vector に組み込んで BAC 法で e1-promotor で EGFP が発現する変異ウイルスを作製する予定である。

D. 考察

先天性 CMV 感染症は出生時に重篤な脳障害を起こす場合と、周生時は無症状で生後しばらくして、精神発達遅滞、視力障害、難聴、てんかん等の障害が生じてくる場合がある。生後時間を経て生じてくる障害のなかで難聴は比較的頻度の高い障害である。如何にして難聴が生ずるかその発生機序を明らかにすることは、ヒトの症例の解析のみでは困難である。MCMV は HCMV とその感染感受性、感染動態が類似しているため、マウスを用いた MCMV による難聴のモデルが出来れば病理発生の解明に有効である。

今回の我々のマウスを用いた MCMV の内耳感染の結果はまだ予備的な段階であるが、今後

の研究にとって基礎的な知見を得ることが出来た。1) 内耳を含む側頭部を EDTA で脱灰することによって、内耳をパラフィン切片で組織学的に示すことが可能であり、方向性を決めることも出来る。2) 周産期マウス脳への感染によって内耳へ感染することをウイルス抗原に対する免疫組織学的解析で明らかにした。今回検出された感染細胞は、予想に反して神経細胞でなく非神経細胞であった。感染の方法を腹腔内感染あるいは胎生期の感染にすることによって、また感染の時期を検討することによって神経細胞への影響を明らかにして行く。

私達は CMV が発育期脳に感染して神経細胞に持続感染し、その結果、難聴を含む脳機能障害が生ずるという仮説のもとに研究している。上記の研究と平行して、シナプスにおいて NMDA レセプターはグルタミン酸レセプターとして働き、long term potentiation を起し、神経機能に関与すると考えられている。発育期マウス脳への MCMV の感染によって、NMDA レセプターの発現が如何に影響を受けるか解析した。MCMV が in vivo および in vitro の初代培養神経細胞に感染すると、NMDA レセプターの発現が抑制されることを明らかにした。

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表

1) 発表論文

- (1) 筒井祥博.宿題報告 III.サイトメガロウイルス感染症における神経病原性の発生機序.日本病理学会会誌第 93 巻 2 号 59-77 頁, 2004 年
- (2) Li R-Y, Kosugi I, Tsutsui Y. Activation of murine cytomegalovirus immediate-early promoter in mouse brain after transplantation of the neural stem cells. *Acta Neuropathol* 2004; 107: 406-412.
- (3) Kosugi I, Kawasaki H, Tshuchida T, Tsutsui Y. Cytomegalovirus infection inhibits the expression of N-methyl-D-aspartate receptors in the developing mouse hippocampus and primary neuronal cultures. *Acta Neuropathol* 2005 (in press).
- (4) Han G-P, Miura K, Ide Y, Tsutsui T. Genetic analysis of JC virus and BK virus from a patient with progressive multifocal leukoencephalopathy with hyoer IgM syndrome 1. *J Med Virol* 2005 (in press).

2) 学会発表

- (1) 松影昭一, 河崎秀陽, 土田 孝, 小杉伊三

夫, 筒井祥博: ES 細胞の分化におけるサイトメガロウイルス(CMV)の前初期(IE)遺伝子発現と感染感受性. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会 2004.11.21

2) 小杉伊三夫, 河崎秀陽, 土田 孝, 松影昭一, 筒井祥博: 発育期脳におけるサイトメガロウイルス持続感染と脳障害発症機構の解析—感染神経細胞における NMDA レセプター発現の抑制—. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会 2004.11.21

3) 河崎秀陽, 小杉伊三夫, 土田 孝, 松影昭一, 筒井祥博: サイトメガロウイルスのサイクロフィリンを介した神経前駆細胞への感染抑制作用. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会 2004.11.21

4) 土田 孝, 馬場 聡, 河崎秀陽, 小杉伊三夫, 松影昭一, 筒井祥博: F9 細胞を用いたリボザイムによるマウスサイトメガロウイルス再活性化の抑制. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会 2004.11.21

5) 河崎秀陽, 小杉伊三夫, 新井義文, 松影昭一, 土田 孝, 筒井祥博: 神経前駆細胞におけるサイクロスポリン A のサイトメガロウイルス感染抑制効果. 第 93 回日本病理学会総会 2004.6.10

6) 松影昭一, 新井義文, 河崎秀陽, 土田 孝, 小杉伊三夫, 筒井祥博: サイトメガロウイルス(CMV)前初期遺伝子発現トランスジェニック(Tg)マウスから ES 細胞の樹立と分化の解析. 第 93 回日本病理学会総会 2004.6.10

7) 小杉伊三夫, 河崎秀陽, 新井義文, 土田 孝, 松影昭一, 筒井祥博: ウイルス遺伝子導入神経幹細胞の病態解析: サイトメガロウイルス前初期蛋白の幹細胞機能に及ぼす影響の解析. 第 93 回日本病理学会総会 2004.6.10

8) 新井義文, 松影昭一, 河崎秀陽, 土田 孝, 小杉伊三夫, 筒井祥博: マウスサイトメガロウイルス(MCMV)早期遺伝子 e1 導入トランスジェニック(Tg)マウス ES 細胞の神経特異的発現. 第 93 回日本病理学会総会 2004.6.10

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし



MCMV 感染マウスの内耳組織像：A. MCMV 感染一週間後のマウス内耳組織。HE 染色。B. MCMV IE1 蛋白陽性細胞の局在。ウイルス感染細胞は、螺旋神経節と鼓室階内面に認められる。C. 螺旋神経節の強拡大。D. C の連続切片における MCMV IE1 蛋白陽性細胞の局在。ウイルス抗原は螺旋神経節の非神経細胞に認められる。E. C の連続切片における、神経細胞マーカー（NeuN 蛋白）の局在。D と対比すると、螺旋神経節内の神経細胞にはウイルス抗原は発現していない。