

風疹ウイルスの遺伝子型に関する研究 —外国の株を用いた研究—

牛島 廣治 (東京大学大学院医学系研究科国際保健学)

周 玉梅 (東京大学大学院医学系研究科国際保健学・

米国ジョージア州立大学生物学教室)

Teryl Frey (米国ジョージア州立大学生物学教室)

要旨

米国など先進国の風疹ウイルス感染症の分子疫学的研究は、子どもから青春期中での感染に変わってきており、その目的は今後の風疹の流行および先天性風疹症候群の防止に向けてである。今回、米国において遺伝子型 I と II に属する 4 つの風疹ウイルス株について全塩基配列を決定した。そして我々が日本で報告した株を含めて 10 の報告された株と比較した。これらのウイルスは 2 つの ORFs を有し、また 3 つの非翻訳領域を有していた。GI の株は 9762 の塩基からなり、GII は 9761 の塩基で 1 塩基 UTR の結合部位が短くなっていた。カプシド、E1 および E2 のモノクローナル抗体の混合抗体は精製したウイルスと反応したが、GII では E2 のバンドが欠如していた。このことから遺伝子型特異な抗原性の存在が示唆された。

緒言

風疹に妊娠中感染すると死産、流産、そして先天性の奇形を子どもに來たす(先天性風疹症候群、CRS)。風疹ウイルスは、約 60-70nm の球形で、エンベロープを有し 1 本鎖の (+) RNA ウイルスである。トガウイルス科のルビウイルス属に属する唯一のウイルスである。そのゲノムは約 10kb の長さで、5'側にキャップ構造を、そして 3'側にポリ A 構造を有する。そして今のところ 1 つの血清型で E1 領域の遺伝子解析から 2 つのゲノタイプに分けられる。また、それぞれサブゲノタイプに分けられている。CRS を來たすことから 1960 年代に幾つかの不活化生ワクチンが開発された。1969 年に最初のワクチンが用いられた。

風疹ワクチンが世界で広く使われるようになってから先進国では目だつた流行がなくなつては來たものの、思春期あるいは思春期後の女性においては今尚妊娠中の危険が残っている。また開発途上国ではまだワクチン計画がなされていない国も多く、流行をみることもある。ワクチンの導入前と後で、遺伝子型が変わつてきたかを知ることも必要である。そして現在、ワクチン用いて世界的に風疹の制圧が考えられている。風疹ウイルスの遺伝子型の解析は新しい対策を考えるため必要である。今回、米国での研究を加えて遺伝子解析、抗原性について報告する。このことによって風疹の流行の抑制と CRS の抑制に役立つと考えられる。

材料と方法

ウイルス株 E1 遺伝子型によってウイルスを選択し、Vero 細胞や RK13 細胞にウイルスを増殖させた。得られたウイルス量をプラーク アッセイで決める。その中で増殖の良い

株を選んだ。GIの属する6423（1997年イタリア ミラノで分離された株）、ANIMA（1997年メキシコで分離された株）と GIIに属するANAM5（1996年、韓国ソウルで分離された株）と I-11（1968年 イスラエル テレアビブで分離された株）を用いた。

遺伝子解析：全塩基配列がわかっている既知の株を参考にしてプライマーを設定しPCRを行った後、遺伝子解析をした。遺伝子解析後に系統樹を作成した。

ウイルス抗原性を決めるためのウイルス精製：目的とするウイルスをVero細胞に感染させた。感染後6-7日目に培養液中のウイルスを得る。プラークアッセイでは約 1×10^8 pfu/mlの値を得た。PEG沈殿でウイルスを濃縮した。さらに超遠心法でウイルスを精製した。精製したウイルスをウェスタンブロット法のため4°Cに保存した。

ウェスタンブロット法：ウイルス粒子をアクリルアミドゲル電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した後、モノクローナル抗体を用いておこなう。C,E1,E2のマウスモノクローナル抗体とアルカリホスファターゼ結合抗マウスIgG抗体を用いた。

結果

図1にはウェスタンブロットティングの結果を示す。GIのE1,E2,Cに対するモノクローナル抗体を用いたところ GIIに属するI-11とANAM5ではE2蛋白が欠損していた。

図2には我々が解析した4つのウイルスと、既に遺伝子解析が報告されている10株を用いた系統について図示する。これらの成績は全塩基、NSP, SPの遺伝子ならびにアミノ酸配列の解析からもANAM5, I-11はGII（現在の分類ではIIAに属する）。6423, ANIMAはGIに属することがわかった。

考察

CRSなど風疹による病気を予防するため幾つかの株が生ワクチンとして用いられている。現在TO-336株、Matuura株、Matsuba株、Takahashi株が日本でもちられ、BRD2株が中国の北京近辺で、RA27/3が欧州、北米を中心として全世界の用いられている。抗原性の上ではGI,GIIは似ており、どの株で用いても風疹ウイルスに対して免疫を有するといわれている。

わが国で昨年からCRSが見られワクチンの接種の必要性が強調されてきたがアジアの国ではワクチンがなされていないところがある。日本、台湾、シンガポールで接種されている。風疹のコントロールのためにアジアの国々で見られる風疹ウイルスの遺伝子型を決めることは必要である。

Katowらの報告では大きく2つの遺伝子型がありGIは世界的にみられGIIはアジアの国で見られる。GIはさらにA-Fに群別化される。またGIIは離れたIIA,IIB,GIIC群に分けられる。Katowの報告からANAM5, I-11はGIIAに属するものである。抗原性の上ではGI,GIIが似ており、どちらの株で用いても風疹ウイルスに対して免疫を有するといわれている。我々の結果ではGIIの2つの株がE2領域においてモノクローナル抗体と反応

しなかった。このことは GI に対して作った E2 のモノクローナル抗体と反応しないことを示しており、抗原性を検討する上でも重要と思われた。

ここでは 4 つの株において系統樹の作成ができた。全塩基配列、NSP、SP を比較しても以前の報告した E1 領域と同じように GI, GII に分けることができた。UTR junction 部位において Anam5 と I-11 株は 1 塩基短かった(詳細省略)。このことが subgenomic RNA の合成および機能への影響の有無に興味がある。

今後の方針

遺伝子解析したウイルスおよびその他のウイルスから感染性クローンを作成する。GI と GII の組換えウイルスの存在、GI, GII 内での組換えウイルスの存在を知ることなどである。

文献

1. Kakizawa J, Nitta Y, Yamashita T, Ushijima H, Katow S. Mutation of rubella virus vaccine TO-336 strain occurred in the attenuation process of wild progenitor virus. *Vaccine* 19: 2793-802, 2001.
2. Zheng DP, Zhou YM, Han YR, Frey TK. Characterization of genotype II *Rubella virus* strains. *Arch Virol* 148: 1835-1850, 2003.
3. Katow S. Molecular epidemiology of rubella virus in Asia: Utility for reduction in the burden of diseases due to congenital rubella syndrome *Pediatrics International* 46: 207-213, 2004.

Figure 1 Western blot analysis of sequenced (RGII) and reference (RGI) virion proteins

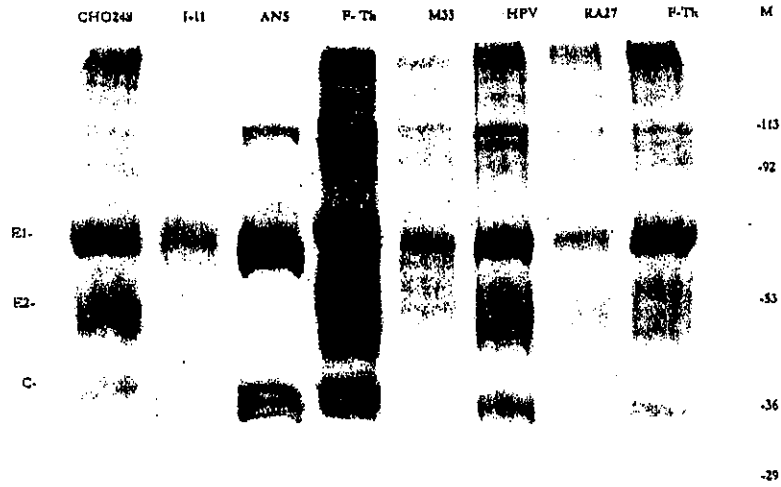
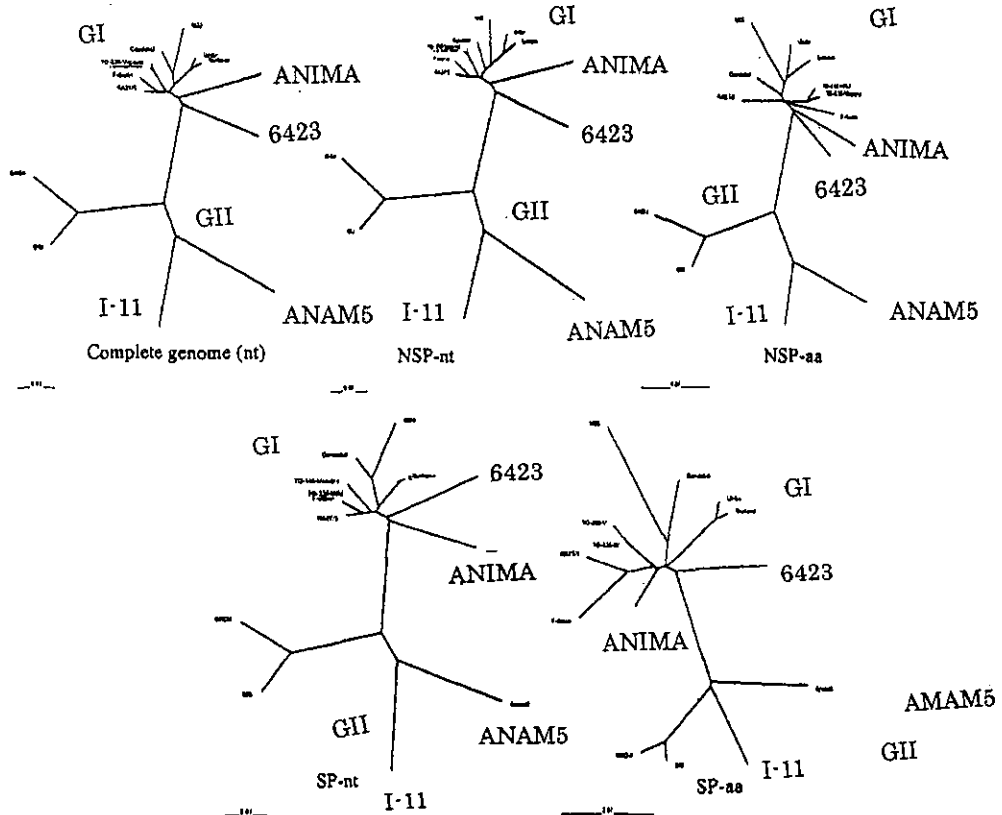


Figure 2 Phylogenetic relationships of sequenced viruses and reference viruses. Phylogenetic tree were constructed by clustalW software with Neighbor joining method. The sequences used for phylogenetic analysis were the complete genomic sequence, the nucleotide (nt) and the amino acid (aa) sequence of non-structural protein ORF and structural protein ORF.



おたふくかぜ生ワクチン接種後の発症例報告

加藤 篤、久保田 耐、田代 真人（国立感染症研究所・ウイルス第三部）

名木田 章（水島中央病院小児科）

田辺 良（船橋市立医療センター小児科）

【背景と目的】

流行性耳下腺炎、通称おたふくかぜは、耳下腺の腫脹、発熱や全身倦怠感、食欲不振、頭痛などを特徴とするムンプスウイルスによって引き起こされる主に幼小児の感染症である。おたふくかぜを予防する唯一の方法は乾燥弱毒生おたふくかぜワクチンの接種である。わが国のおたふくかぜワクチンは1981年に初めて弱毒生ワクチンとして出荷され、一時期麻疹、風疹ワクチンと混合してMMRワクチンとして定期接種された時期もあった。しかし、現在は単味ワクチンとして任意接種されている。

国内のおたふくかぜワクチンの接種率は低く、そのため、抵抗力を持たない幼児が集団内に一定以上を占めるようになると、比較的大きな流行を起こす傾向がある。その流行間隔はほぼ3~4年である。流後期にはムンプスウイルスを数多く分離することができる。ムンプスウイルスには血清型が無いとされてきたが、ウイルス遺伝子を解析すると若干の多様性があり、それに基づきA~Kの11種類の遺伝子亜型に分ける事ができる。新しい遺伝子型のウイルスは、近年増加する傾向にあり、一部にはウイルスが、ワクチン免疫による排除を受けにくくなる様に変化しているのではないかと疑われている。しかし、実験的には、ワクチンで作った抗血清で遺伝子型がワクチン株と同じウイルス株と異なる野外株は、どちらもほぼ同様に中和され、ただちにワクチンの効果が低下している事を示す事実は得られていない。

一方、おたふくかぜ生ワクチンには、自然感染に比べて少ないながらも流行性耳下腺炎を発症する場合、あるいは無菌性髄膜炎を発症する場合があります。ワクチン接種後にこれら症状を呈した場合に、(1)ワクチンによる免疫力が効率よく得られなかった、あるいは機能しなかったために自然感染を起こしてしまう場合と、(2)接種したワクチンが副反応として自然感染と同様の疾病を起こしてしまう場合が、考えられる。そこで、これらを実例によって検証することを試みる事にした。

【材料と方法】

おたふくかぜ生ワクチンを接種した、既往歴の無い幼児にその後流行性耳下腺炎、あるいは無菌性髄膜炎と診断された4例について、ウイルス分離を行なって以降の研究に用いた。

ムンプルウイルスが含まれている検体からRNAを抽出し、Fプライマー：5'-TCA-AGTAGTGTCTCGATGATCTC-3' と R プライマー：5'-AGGTGGCATTGTCTGACATT-G-3' を使ってRT-PCRを行う事によって、SH遺伝子部分を含む549塩基対のDNA断片を増幅させた。

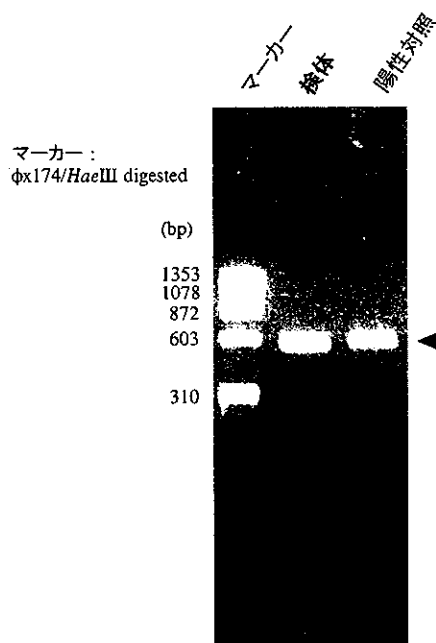
ウイルスの遺伝子型別は、増幅遺伝子部分にあるSH遺伝子の塩基配列を決定し、ワクチン株かどうかの判定を行い、野外株の場合はデータベース上の他の株との相同性を比較してA~Kの11種類の遺伝子亜型を同定した。

【結果】

ワクチン接種後の発症例 1

3歳7ヶ月の女児、1歳10ヶ月の時にムンプスワクチン(武田薬品工業 G704)を接種した。1年9ヶ月後に耳下腺腫脹を訴え来院。血清中のムンプス抗体価は受診時に IgG 38.6、IgM 0.78、その20日後に IgG 496.0、IgM 5.20。流行性耳下腺炎と診断。咽頭ぬぐい液からムンプスウイルスが分離された。

RT-PCRにより SH 遺伝子の増幅を認めた(右図)。塩基配列の結果は、遺伝子型 G に属する1990年代後半から、国内で分離されるようになった新型のムンプスウイルスであることが判明した(表)。本症例は、ワクチン接種後2年以内に、野外株に感染して発症した例であると結論した。



ワクチン接種後の発症例 2

1歳6カ月の女児、1歳5カ月の時にムンプスワクチン(化学及び血清療法研究所 ロット番号不明)を接種した。21日後に耳下腺腫脹を訴え来院。この時の検査でムンプス抗体価は IgG 13.6、IgM 3.25。流行性耳下腺炎と診断。咽頭ぬぐい液からムンプスウイルスが分離された。

RT-PCRにより SH 遺伝子の増幅を認めた。塩基配列の結果、接種したワクチン株と同じムンプスウイルス Miyahara 株であることが判明した。本症例は、おたふくかぜ生ワクチン接種後、ワクチン株により発症した例であると結論した。

ワクチン接種後の発症例 3

5歳1カ月の女児、4歳11ヶ月の時にムンプスワクチン(化学及び血清療法研究所 313)を接種した。16日後に左耳下腺腫脹を訴え来院。この時の検査でムンプス抗体価は IgG 22.7、IgM 3.10、アミラーゼ 418 U/L(基準値 60~200)、WBC 10.9×10^3 個/mm³、CRP 0.35 mg/ml。流行性耳下腺炎と診断。咽頭ぬぐい液からムンプスウイルスが分離された。

RT-PCRにより SH 遺伝子の増幅を認めた。塩基配列の結果、接種したワクチン株と同じムンプスウイルス Miyahara 株であることが判明した。本症例は、おたふくかぜ生ワクチン接種後、ワクチン株により発症した例であると結論した。

ワクチン接種後の発症例 4

2歳2ヶ月の男児(家族歴に特記事項は無い)、2歳1ヶ月の時にムンプスワクチン(武田薬品工業 G803)を接種した。接種後、3週間程して2日ほど明らかな風邪様症状のない発熱を認めた。接種後40日目より39℃を超える発熱を認め来院。その後徐々に活気が低下し、全身状態の悪化が目立つようになった。傾眠傾向を認め、痛み刺激にも反応しなくなった。意識混濁を疑い、髄液検査を実施したところ細胞数は1,500個/mm³(単核球優位、細菌培養陰性)、血液検査ではWBC 5.9×10^3 個/mm³、CRP 0.05 mg/ml 未満であったので、無菌性髄膜炎と診断した。アミラーゼは正常範囲値。脳炎脳症を疑ったが、痙攣、血圧低下、脳波、頭部画像診断における異常は認められな

った。発熱後 12 日目に解熱傾向に向かい、活気も改善し、意識状態も回復し退院した。髄液からムンプスウイルスが分離された。

RT-PCR により SH 遺伝子の増幅を認めた。塩基配列の結果、接種したワクチン株と同じムンプスウイルス Torii 株であることが判明した。念のために、エンテロウイルスの汎用プライマー(EVP4 と OL68-1)を用いて RT-PCR を行ったが、エンテロウイルス特異的な 640 塩基の増幅産物は認められなかった。従って本症例は、おたふくかぜ生ワクチン接種後、ワクチン株により発症した例であると結論した。

【考察】

2000 年~2002 年には、全国規模のムンプスウイルスの流行が起きた。全国各地の地検の協力を得て 70 株を収集し、SH 遺伝子型別によりどのような株が流行したのかを調査をしたところ、流行の主体は、過去の分離株とは異なる G 型株が 37/70、K 遺伝子型 11/70 であり、日本国内で利用しているワクチン株と同じ B 遺伝子型は 6/70 であることが判明した(医薬品等医療技術リスク評価研究事業「安全なワクチン確保とその接種方法に関する総合的研究」平成 15 年度報告書)。

このような新しい遺伝子型の株の出現は、日本だけにとどまらず、韓国、中国、スウェーデンでも報告されており、世界規模で起きている可能性を示唆している。我が国以外の国は、米国で開発された A 遺伝子型に属する Jeryl Lynn 株がワクチンとして用いられている。ワクチン接種したにもかかわらず、成人にも流行性耳下腺炎が発症するケースを挙げて、新型ムンプスウイルス株は、ワクチンによる防御免疫に対して抵抗性をもつ可能性を示唆している。

国内で使われている B 遺伝子型に属するワクチンに対する抗血清を用い、培養細胞レベルで実験した限り、G 及び K 遺伝子の代表ウイルスは B 遺伝子型のウイルスと同様にワクチン抗体で同じように中和された。今のところは遺伝子型間で中和抗原エピソードには大幅な変化は起きていないと言えると思われる(同上、平成 15 年度報告書)。しかし、症例 1 の場合は、ワクチン接種後 1 年 9 ヶ月後に、新しい遺伝子型の野外株感染を受けた事を示す。特筆すべき既往歴が無い事、発症時の抗体応答が正常であることを考慮すると、ワクチン接種後に抗体が上昇しなかったとは考えられにくい。しかし、分離ウイルスが培養細胞レベルでは特段の変化も見あたらない事、また、その後発症児童周囲に感染が拡大した事実がない事を考えると本症例は、ワクチン免疫が新型株に対して有効に機能しなかった為に流行性耳下腺炎になったのではなく、ワクチンの接種が適切に行われなかったために、免疫が惹起できずに野外株に感染して発症した例であると思われる。

一方、症例 2、3 はワクチン株の副反応として 2~3 週間の潜伏期の後に、発症したものと判断される。ワクチン接種後、数%のヒトに軽い耳下腺腫脹と微熱が一過性にみられる事は報告されているが、今回の症例の様に医師に相談する程の症状が出るということは、ワクチンの弱毒化の程度が低いために接種されたヒトによっては接種後に自然感染と区別が付けられないような発症があり得る事を示すものであり、注意が必要である。

症例 4 は、ワクチン接種後に髄膜炎を起こした例であると考えられる。ワクチン接種後、2~3 週間の潜伏期間の後に 1/1,000 程度の頻度で無菌性髄膜炎がみられ、3~4 日間の入院加療が必要になる事は報告されている。しかし、今回の症例は接種後 40 日を経過した後の無菌性髄膜炎発症である点、かつ発症後 12 日間も症状が続いたという点で特異である。発症に至るまでにムンプスウイルス感染を疑わせる要因はなく、

アミラーゼ値も正常であったことから唾液腺中でのムンプスウイルスの増殖は、あったとしても極めて限定的なものであったと推定される。

ムンプスワクチンを普及させるためには、ワクチンの安全性と有効性が十分であるのかをモニターしていく必要があるとともに、優れた動物実験系の開発、及びよりよいワクチンを開発が必要である。

表

| | | | |
|--------------|-------|---|-----|
| Takeda Torii | : 1 | aagaatgaatccctaggggtcgtaacgtctcgtgaccctgccggttgactatgccggcga | 60 |
| | | | |
| Kurashiki | : 1 | aagaatgaatctcatggggtcgtaacgtctcgtgaccctgccggttgactatgccggcga | 60 |
| | | | |
| Takeda Torii | : 61 | tccaacctccccttatacccaacatttctattgctaattcttctctctctgatcataactt | 120 |
| | | | |
| Kurashiki | : 61 | tccaacctccggttatacctcacatttctattgctaattcttcttctctgatcataactt | 120 |
| | | | |
| Takeda Torii | : 121 | tgtatgtctggattatatacaccatcacttacaagactgagggtgcgacatgcatcactgt | 180 |
| | | | |
| Kurashiki | : 121 | tgtatgtctggattacattaacatcacttataagactgagggtgcgacatgcatcactgt | 180 |
| | | | |
| Takeda Torii | : 181 | accagagatccctctctcgtgagggttcgatcactcactctagaaagatctccagttgg | 240 |
| | | | |
| Kurashiki | : 181 | accagagatcctactttcactggagggttcgatcactcaccctaggaagatctccagttgg | 240 |
| | | | |
| Takeda Torii | : 241 | gacaagtcccaatccatcatgcgagaacaagctgcatttaaatgatgccggttcaatcatg | 300 |
| | | | |
| Kurashiki | : 241 | gacaagtcccaatccatcatgcaagaacaatctgcatttgaataatgccggttcaatcatg | 300 |
| | | | |
| Takeda Torii | : 301 | agacataaagaaaa | 315 |
| | | | |
| Kurashiki | : 301 | agacataaagaaaa | 315 |

症例1で分離されたムンプスウイルスのSH遺伝子の配列のワクチン株(武田薬品工業 Torii)との比較。配列の同じ部分に縦線が引いてある。相同率は、291/315 (92.4%)である。この遺伝子配列は、ワクチン株の属するB遺伝子型と異なり、G遺伝子型に分類される。

ムンプスウイルスの遺伝子タイプによる生物学的性状の差

中山 哲夫、吉田菜穂子、藤野 元子（北里生命科学研究所 ウイルス感染制御 I）

駒瀬 勝啓（北里研究所 生物製剤研究所 開発研究部門）

【目的】我々は我が国に流行してきたムンプスウイルスの分子疫学調査を継続し以下の結果を報告してきた。

- 1990 年以前は B、1990 年代は K、2000 年からは G が主流株でその間に地域的に D, I, L が流行し、現在も地域的に genotype の分布に差が認められる（図 1）。現在の主流株は genotype G である。
- 外国、特にヨーロッパでムンプスの流行が報告され、ワクチン株の Jeryl Lynn 株 (genotype A) と抗原性がずれてきていることが報告されている。我が国のワクチン株はすべて genotype B で、Enders 株 (genotype A) で作成した免疫血清は genotype B, J, K, L とは中和能に明らかな差が認められるが、Genotype B, J, K, L 株間では有意な差は認められない。我が国で流行している遺伝子タイプの抗原性には有意差は認められない（図 2）。
- Genotype B のウイルスは Vero 細胞で分離され、B95a 細胞には細胞融合を示すことはなかった。しかしながら、最近流行株、特に genotype G は genotype B と同様に Vero 細胞で分離され、B95a 細胞にも Vero 細胞にも細胞融合を示す（図 3）。

Genotype B, G の細胞親和性の差に関与する遺伝子変異を同定することを目的とした。

図 1 各地のムンプス流行株の遺伝子タイプ

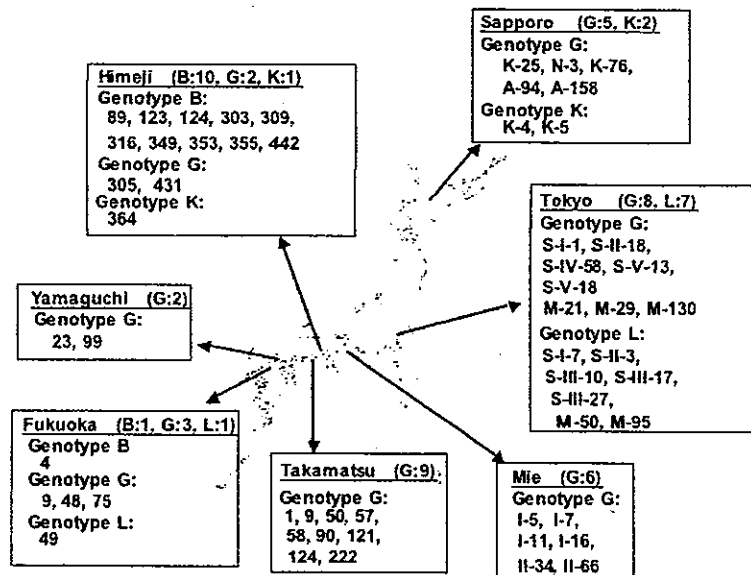
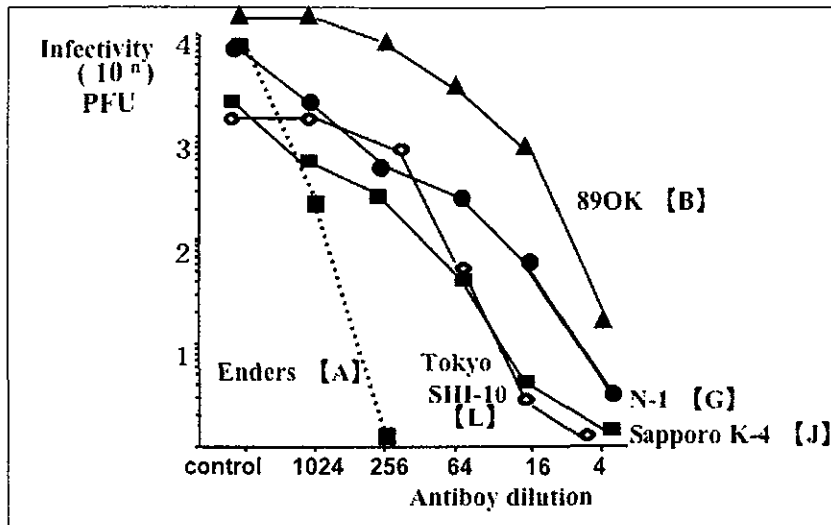


図2 ムンプス遺伝子タイプの抗原性の差



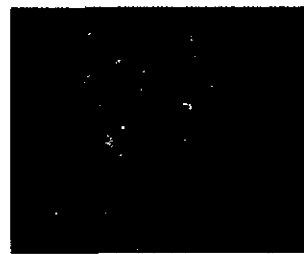
Enders (genotype A)に対する免疫血清の中和

図3 Genotype G, B群のB95a細胞での細胞性効果



Mp/Mie/2. 2002(G)

CPE +



Mp/Hoshino/Vac(B)

CPE -

【対象と方法】① genotype BとしてHoshinoワクチン株、genotype GとしてMie 2, A158, K2, M130, OT III, SV13の各株を用いた。②ムンプスウイルスF, HN領域はPCRで増幅しpBluescript SK II-プラスミドのT7 promotorの下流の multicloning sitesにクローニングした。Vero細胞、B95a細胞にT7 RNA polymeraseを発現する組み換えvaccinia virusを感染させ、F, HN発現プラスミドをtransfectionさせた。③Genotype B Hoshinoワクチン株, genotype G

のSV 13株のF蛋白発現キメラプラスミドは制限酵素を用いてキメラプラスミドを作製した。Point mutationの導入は変異プライマーを作製しPCR法で点変異を導入した。

【結果】① genotype B, G群のF, HN領域の塩基配列の結果から類推されるアミノ酸配列の異なる部位を図4に示した。F蛋白発現領域で9カ所、HN蛋白発現領域で15カ所の変異を認めた。② F, HN発現プラスミドはどの組み合わせでも、Vero細胞に細胞融合を示した。B95a細胞における細胞融合能の誘導能を調べ図5に示した。Genotype B由来のF蛋白発現プラスミドを用いてtransfectionしたときには genotype B, G由来のどのHN発現プラスミドを用いても細胞融合が観察されなかった。一方、下段の genotype G由来のF蛋白発現プラスミドではどのHN発現プラスミドの組み合わせでも細胞融合を示した。

③ B95a細胞への細胞融合能はGenotype GのF蛋白に依存することが明らかとなった。F蛋白領域内に共通して存在する制限酵素を用いてキメラプラスミドを作製しB95a細胞にtransfectionした結果F蛋白領域C末端の3塩基の変異が細胞融合の差に関わる遺伝子変異であることが明らかとなった。④ F蛋白C末端の3塩基の変異を切り替える制限酵素部位がないためにPCR法で変異を導入した。F383位のHoshino株はQ (Glutamine)であるが genotype Gのアミノ酸L (Leucine)に変換する点変異導入プラスミドHoshino F Q383LはB95a細胞に細胞融合を示した。一方、野生株 genotype GのF蛋白383位にHoshino株のQ (Glutamine)を点変異で導入したWild F L383QはB95a細胞に細胞融合を示さなかった (図6)。他の部位では細胞融合に変化はなかった。

| | | F protein alignment | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------------------|---|---|---|---|---|--|--|--|--|--|--------|---|---|
| | | 1 | | | | | | | | | | | 538 aa | | |
| B | Hoshino | A | F | Y | S | V | S | | | | | | Q | V | V |
| | A158 | V | S | C | F | I | P | | | | | | L | I | I |
| G | K2 | V | S | C | F | I | P | | | | | | L | I | I |
| | M130 | V | S | C | F | T | P | | | | | | L | I | I |
| | OT III | V | S | C | F | T | P | | | | | | L | I | I |
| | SV 13 | V | S | C | F | A | P | | | | | | L | I | I |

| | | HN protein alignment | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------|----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--------|
| | | 1 | | | | | | | | | | | | | | 582 aa |
| B | Hoshino | L | M | S | V | A | S | R | G | K | I | T | V | L | Q | N |
| | A158 | F | I | S | T | A | C | S | Q | V | S | I | M | P | T | |
| G | K2 | F | I | S | I | T | A | C | S | Q | V | S | I | M | P | T |
| | M130 | F | I | S | I | T | A | C | S | Q | V | S | I | M | P | T |
| | OT III | F | I | S | I | T | A | C | S | Q | V | S | I | M | P | T |
| | SV 13 | F | I | S | I | T | A | C | S | Q | V | S | I | M | P | T |

図4 Genotype B, GのF, HNアミノ酸の変異

Mumps Virus Cell Fusion in Different Combination of F and HN Expression Plasmids in B95a cells

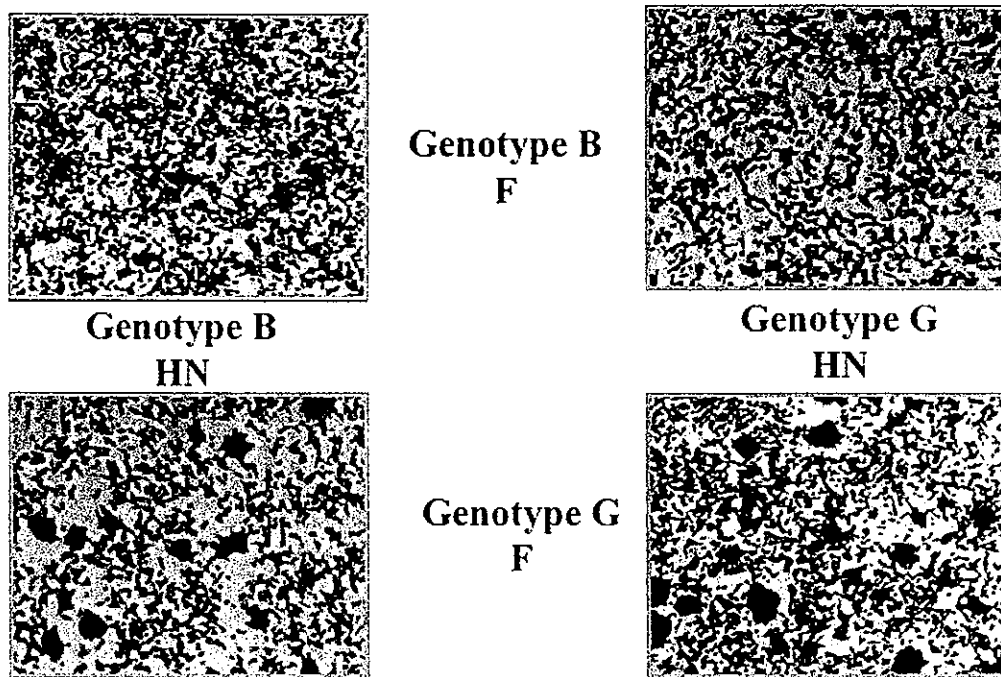


図5 Genotype B, GのF、HN発現蛋白のB95a細胞での細胞融合能

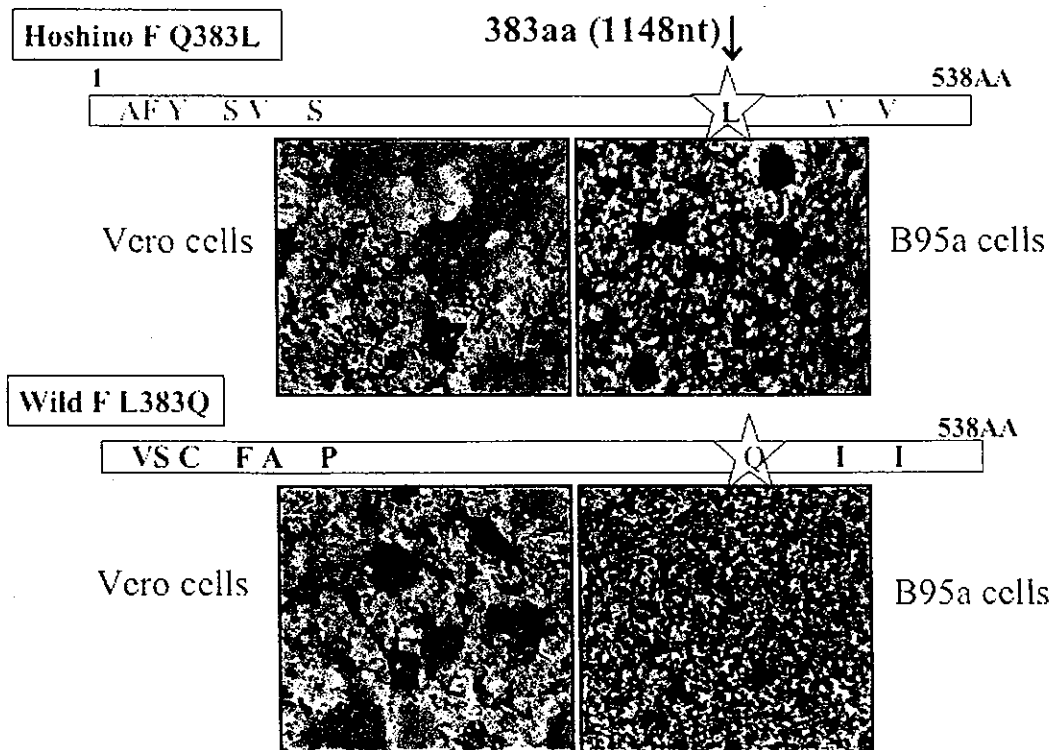
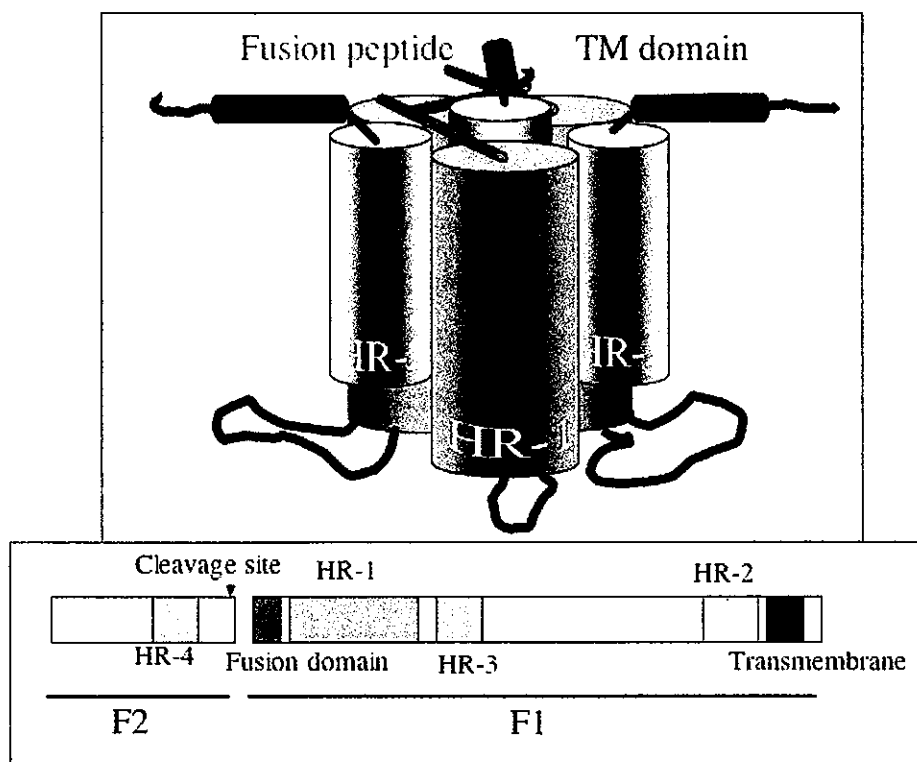


図6 F蛋白発現プラスミドの点変異導入による細胞融合誘導能

【考按】 Genotype Gは日本だけでなくヨーロッパでも流行し、インフルエンザウイルスは地域差がなくなってきた。日本で流行してきた genotype B, G, K, Lの抗原性に大きな差はなかったが、B95a細胞における細胞融合能に差が認められた。この生物学的性状はF蛋白383位のアミノ酸の差が重要なポイントであることが明らかとなった。F蛋白は細胞内proteaseによりF1とF2に解裂しF1のN末端にはFusion domainが存在しheptad repeat 1 (HR-1)とheptad repeat 2 (HR-2)が分子内結合し3量体を形成している。HN蛋白は細胞表面シアル酸receptorと結合すると立体構造が変化し隣接するF蛋白の構造変化を誘導し埋没していたfusion domainが脂質二重膜に突き刺さることで細胞融合を起こしウイルスが感染する。F383位はHR-2の上流に位置し近辺の機能は明らかにされていない。



麻疹ウイルスの温度感受性に関与する遺伝子

中山 哲夫、吉田菜穂子、藤野 元子（北里生命科学研究所 ウイルス感染制御 D）

駒瀬 勝啓（北里研究所 生物製剤研究所 開発研究部門）

【目的】麻疹ウイルスは negative sense RNA ウイルスで遺伝子の変異も少なく単一の抗原性を有しその性状も変化はないように考えられてきた。我々は 1984 年から我が国に流行してきた麻疹ウイルスの分子疫学調査を継続し以下の結果を報告した。

- 1985 年以前は C1、1985-90 年は D3、1990-1997 年は D5、1997-1999 年までは Chicago-type D3、2000 年からは D5 に戻り H1 が検出されはじめ最近では H1 が主流株となってきた。
- 抗原性も少し変化しており、中和抗体価の高いレベルではすべての遺伝子タイプのウイルスを完全に中和する事ができるが、中和抗体の低いレベルでは Chicago-type D3, H1 の中には完全に中和されないウイルス株が存在する。
- Chicago-type D3, D5 の中に重症麻疹症例から分離されたウイルスの中に 39°C でもよく増殖する株 MVi/Tokyo/99-Y【Chicago-type D3】が検出された。こうした特性は強毒株と考えられた。
- 麻疹ワクチン株 AIK-C 株は 39°C で増殖しないが、F, H 発現プラスミドは 39°C でも細胞融合を認めた事、野生株 H 蛋白を組み込んだウイルスは AIK-C ワクチン株と同様に不活化されたことから envelop 蛋白は 39°C の増殖能とは関連しないことがあきらかとなった。Mini-genome assay による麻疹ウイルスの転写・複製活性の検討により 39°C の増殖性には P 蛋白が関与し近縁遺伝子タイプの N 蛋白との interaction が必要であることがあきらかとなった

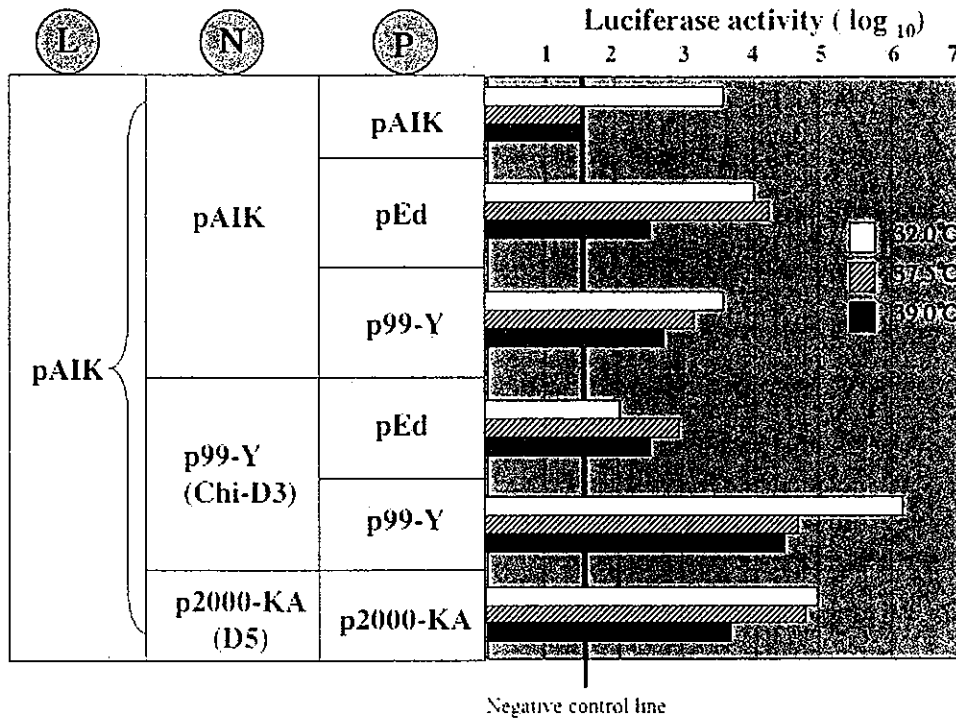
本年度は、N-P 蛋白の相互作用に関連する遺伝子領域を特定することを目的とした。

【対象と方法】①野生株 MVi/Tokyo/99-Y【Chicago-type D3】は 39°C でもよく増殖する株であった。麻疹ワクチン株 AIK-C 株は 39°C では全く増殖しない株で、その親株の Edmonston 株は 39°C ではその増殖が 1/10 以下に低下する。これら 3 株の間の N, P 蛋白発現プラスミドを構築し、各株を用いてキメラ蛋白発現プラスミドを作成した。L 蛋白発現プラスミドは AIK-C 株より作成した。②麻疹ウイルスの転写・複製活性を調べるために、麻疹ウイルス AIK-C 株の leader, trailer sequence の間の翻訳領域を luciferase reporter 遺伝子に置換した麻疹ウイルス mini-genome を作成した。N, P, L 発現プラスミドを作成し、mini-genome と共に B95a 細胞に co-transfection し T7 RNA polymerase の存在下で 33°C、39°C で培養し、細胞内の luciferase 活性を測定する事で麻疹ウイルスの転写・複製活性を検討した。

【結果】① 99-Y, AIK-C, Edmonston 株から N, P 発現プラスミドを作成し異なる組み合わせで mini-genome assay を行った。AIK-C ワクチン株の組み合わせでは Luciferase 活性は 32°C 培養時のみ検出され 37.5, 39°C では活性が全くなかった。

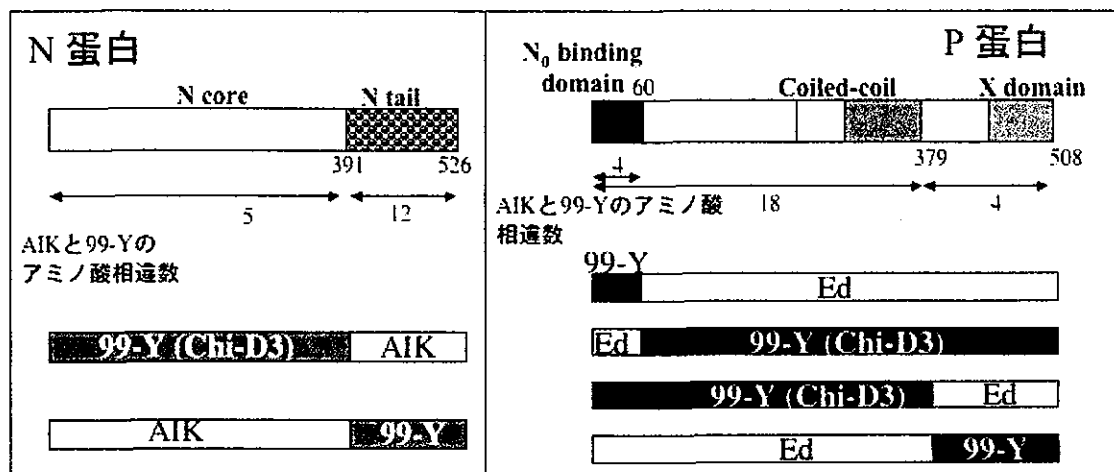
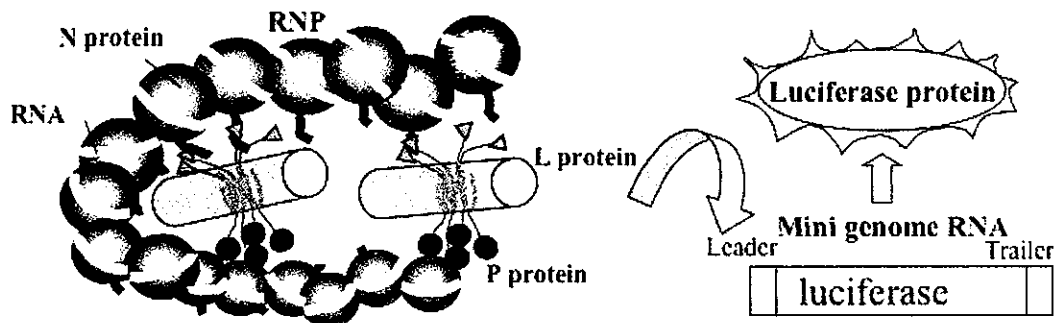
Edmonston, 99-Y由来のP蛋白発現プラスミドを用いると39°Cでもluciferase活性は検出され、99-Y株に由来するN, P 蛋白発現プラスミドの組み合わせでは最も高い活性を示した。

図1 異なるN, P, L発現プラスミドの組み合わせによる温度条件の異なる mini-genome assay



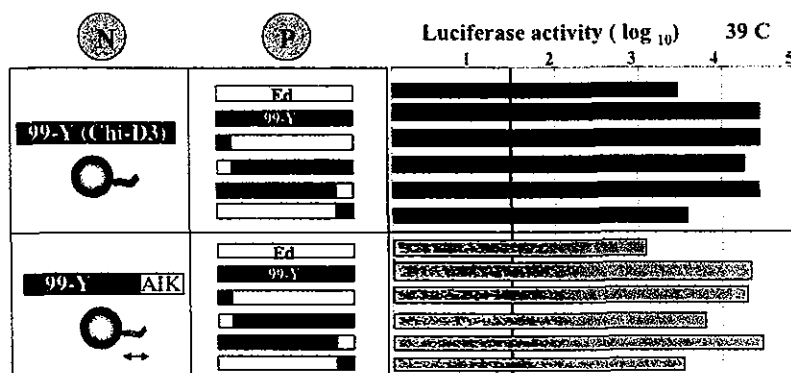
②麻疹ウイルスの転写複製にはN, P, L蛋白が複合体(ribonucleoprotein; RNP)を形成することが必要であり、現在想定されているモデルと既にMappingされている領域を図2に示した。N蛋白は526アミノ酸(AA)を有しN末端から391AAまでのN core領域とC末端のN tailの部分に別れており。N core領域はN蛋白同士の多量体形成と麻疹ウイルスゲノムRNAとのbinding domain、P蛋白とのBinding domainが知られている。N tailはP蛋白X domainと結合することでN-P bindingをより強固なものとする。P蛋白は508AAで四量体を形成しN蛋白との結合領域はN末端60AAのNo binding domainでN coreと結合する。Coiled coilの構造をとる中間部分は安定した構造でL蛋白との結合部位である。X domainでN tailと強固な結合を起こすようになる。N蛋白391部位で99-YとAIK-CのキメラN発現プラスミドを作成した。P蛋白60AAまでのNo binding domain、379 AAからの X domain の部位で切り替えたキメラP発現プラスミドを作成した。

図2 RNPのモデルとmapping、既知のdomainの基づくキメラプラスミドの構築



キメラplasmidの構築

③99-YのN蛋白発現プラスミドをN発現パートナーとして使用し、各種P蛋白発現キメラプラスミドを使用しmini-genome assay を行った。No binding domain, coiled coil regionが99-YのP蛋白のキメラプラスミドでは高いluciferase活性が観察された。N tailの領域をAIK-CのN 蛋白にしたキメラプラスミドでも変化はなかった。高温でのウイルス転写-複製活性はP蛋白のNo binding domain, coiled coil領域が重要と考えられる (図3)



*99-Yの高温での増殖能はP蛋白N末 (N₀ binding domain, coiled coil)で規定されている。
*99-YのN蛋白C末 (N tail)は高温での増殖能には関与していない。

図3 N発現プラスミドを99-Yに由来するプラスミドを用いたmini-genome assay
 ④AIK-CのN蛋白発現プラスミドをN発現パートナーとして用い、各種P蛋白発現キメラプラスミドの組み合わせでminigenome assayを行った。AIK-Cと同じgenotypeの属するEdmonston P発現プラスミドの組み合わせで高いluciferase活性を示した。Edmonston P蛋白X domainを99-Yに置換したキメラプラスミドではluciferase活性は1/100に低下した。P蛋白発現キメラプラスミドの中でX domainが99-Yに置換したプラスミドは低いuciferase活性を示した。AIK-C N蛋白N-tail domainを99-Yの置換したプラスミドはP蛋白X domainが99-Yに由来するプラスミドの組み合わせで高いluciferase活性を示した。

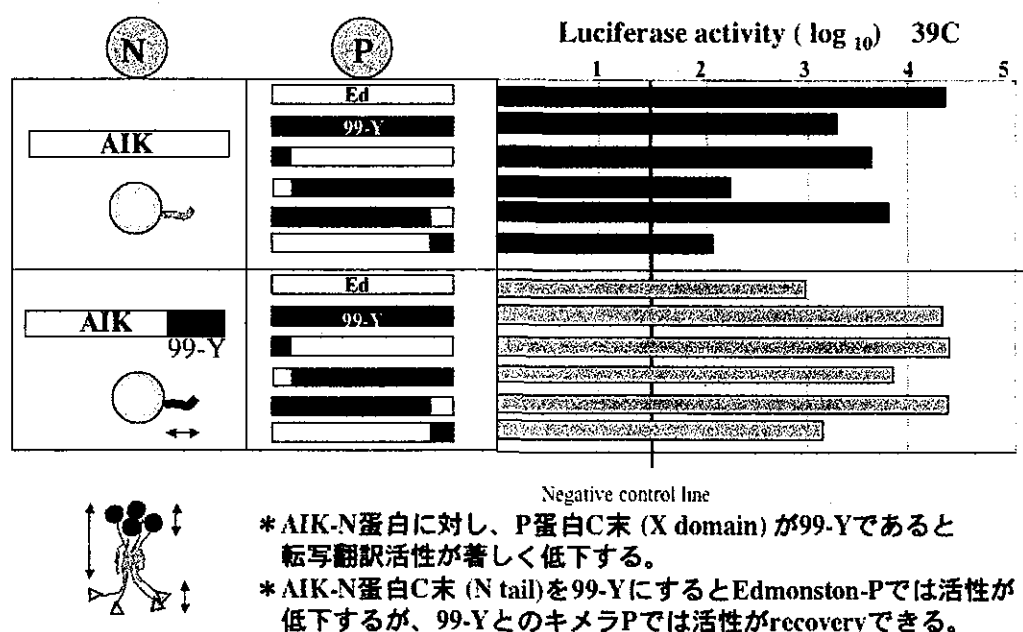


図4 N発現プラスミドをAIK-Cに由来するプラスミドを用いたmini-genome assay

【考按】重症麻疹患者から分離されたウイルスの中に39°Cでもよく増殖するウイルスが見つかり、こうした特性は強毒株と考えられた。39°Cで増殖する99-Yと39°Cで増殖しない麻疹ワクチン株AIK-C株を用いてMini-genome assayによる麻疹ウイルスの転写・複製活性を検討した。Luciferase 活性は麻疹ウイルスの転写、複製活性を反映し、39°Cの増殖性はP蛋白が担っており、P蛋白のNo binding domainからcoiled coil regionがN蛋白N core domainと結合し、さらにgenotype間の結合特異性はN蛋白N tailとP蛋白X domainで近縁遺伝子タイプのN-P蛋白とのinteractionが特異的に制御されていることが明らかとなった。

LAMP 法による麻疹、風疹、ムンプスウイルスの迅速診断

中山 哲夫、吉田菜穂子、藤野 元子、森 伸生（北里生命科学研究所 ウイルス感染制御 I）

ウイルス感染症の実験室診断は、血清反応とウイルス分離が Golden rule であり、急性期と回復期のペア血清の有意な抗体反応により診断されるが、当然のことながら臨床に反映されることはない。急性期の単一血清を用いて IgM 抗体の存在により診断されるが、原則的には初感染の時に検出され再感染時には限界がある。ウイルス分離は実験室診断の根幹となるが、感染性ウイルスのまま検体を保存、輸送するのは細心の注意が必要となる。また、新鮮材料からウイルスを分離するためには感受性細胞を常に準備しておく必要があり、細胞の感受性、検体の保存・輸送状態に依存し、結果を得るまでに時間がかかる。病因診断の重要性から、ウイルス抗原、遺伝子の検出が行われるようになった。抗原検出キットの多くはウイルス抗原に対する monoclonal 抗体を用いて Enzyme linked immunoassay (EIA) もしくは photometric immunoassay の原理で、咽頭拭い液を対象に 10 分前後で結果のでる迅速診断キットが市販されている。蛋白抗原の迅速診断キットの登場は、臨床ウイルスの現場で大きな飛躍をもたらした。しかしながら、ウイルス抗原蛋白を検出する迅速診断キットは感染性ウイルス粒子としては 10^{3-4} TCID₅₀ 程度のウイルス粒子が必要とされ蛋白レベルの迅速診断キットの限界がある。

DNA 増幅法として polymerase chain reaction (PCR) が開発され、PCR 反応は、2 本鎖 DNA をはがし (denature: 90-95 °C)、primer との結合 (annealing: 50-60 °C)、primer を基点とした DNA 鎖の伸長 (extension: 70-75 °C) の 3 サイクルの反応を繰り返すことにより DNA 分子を増幅する。PCR 法は研究室、検査室に急激に普及し遺伝子検索が身近なものとなってきた。

新しい遺伝子増幅法として Loop-mediated amplification (LAMP) 法が納富らによって開発された (1, 2)。LAMP 法の特徴は denature, annealing, extension の温度変化を必要とせずに 60-65 °C の一定温度で DNA を増幅できることで、そのためには 2 本鎖 DNA をはがしながら DNA を合成する *Bst* DNA polymerase と独創的な primer の設定が重要である。

Target となる 200-300 塩基領域に基本となる 6 カ所の primer を設定しその模式図を 図 1 に示した。target 領域の外側に F3, B3 primer を設定、一番内側に F1, B1 領域、そして 図 1 のように F2, B2 領域を設定する。LAMP 法の特徴は 5', 3' 末端に loop を形成させることにある。F1 領域の相補配列に F2 配列をつなげた FIP primer と、B1 の相補配列に B2 配列を付加した BIP primer を設定する。F3, B3, FIP, BIP の 4 種類の Primer が LAMP 反応の基本となる primer である。F1C と F2C の間に (-) sense primer の F Loop primer, B1 と B2 間に (+) sense の B Loop primer を加えることにより DNA 増幅反応の感度と反応

速度を上げることができる(3)。

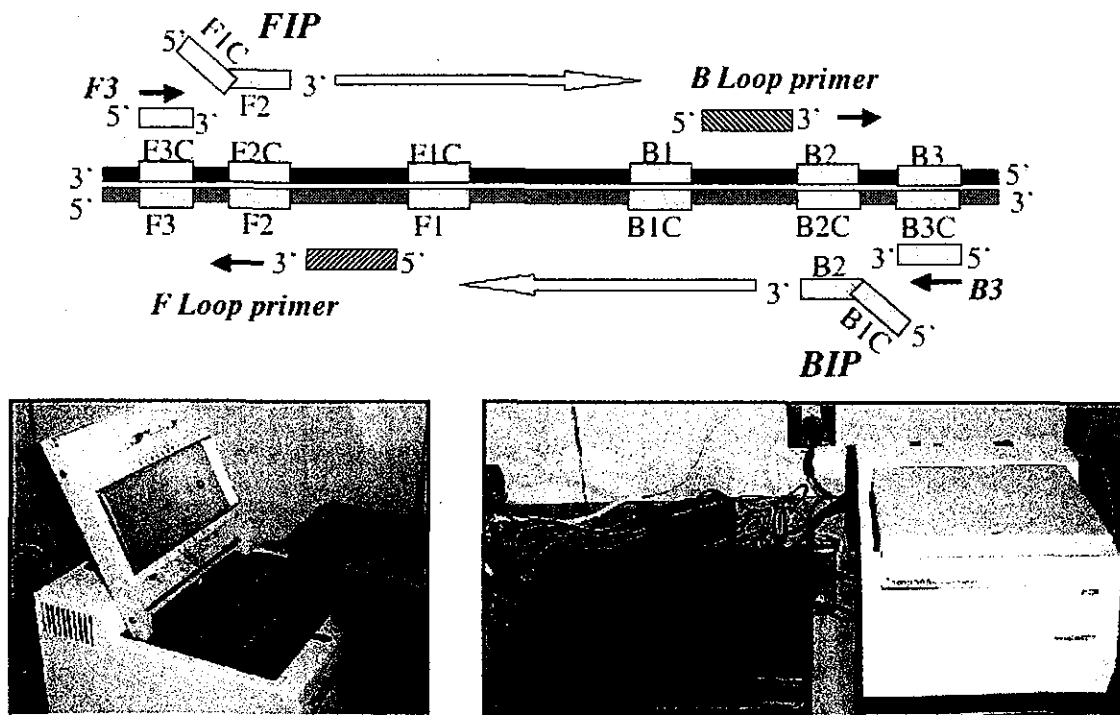


図1. LAMP法のプライマー設定とリアルタイム比濁計

測定方法を簡単に説明する。検体からDNA, RNAを抽出する。LAMP primerの濃度は、F3・B3 primerは5 pM/ul, FIP・BIP primerは40 pM/ul, F loop・B loop primerは20 pM/ulにそれぞれ調整する。反応溶液はLAMP試薬キットの中に2倍濃度の反応溶液と酵素が梱包されており、希釈した各 primer 1ulずつと検体 RNA or DNAを5 ulを加えて最終25 ulに調整しLAMP用の小チューブにいれ real time turbidimeter にかけて60-65℃で30-60分の反応をみる。DNA増幅の副産物のピロリン酸がMg塩を形成することから反応チューブの比濁度を比濁度計(図1)でreal timeに6秒毎に比濁度を測定しDNA増幅の程度を経時的知ることが可能で比濁度0.1以上を陽性と判定する(4)。

我々が扱っているウイルスは麻疹、ムンプスのparamyxovirusで(-) senseのRNAウイルスで、これを例にRT-LAMP法の原理を図2で説明する。

- (1) 麻疹ウイルスRNAは(-) sense RNAであり3'末端からF3C, F2C, F1C, B1, B2, B3の順に並んでおりFIP primerのF2領域がゲノムRNAの結合しRT反応により primer extensionしゲノムRNA-cDNA complexが合成される。
- (2) F3 primerはF3Cに結合し、FIP primerにより合成されたRNA-cDNA 2本鎖をはがしながらF3から primer extensionが始まる。
- (3) F3 primerから伸展したcDNAとゲノムRNAの複合体合成と、cDNA合成と同時に(2)で合成された2本鎖をはがしFIP primedの1本鎖cDNAがはがされる。1本鎖cDNAの5'末端はF1c配列でF1と結合し5' loop構造を形成する。3'

- 末端の B2c 配列に BIP primer の B2 が結合し DNA polymerase 反応が始まる。
- (4) BIP primer の B2 領域から始まった DNA 合成は F1-F1c の loop 構造をはがして 2 本鎖 DNA を合成する。
 - (5) B3c 領域に B3 primer が結合し (4) で合成された 2 本鎖 DNA をはがしながら DNA 合成を進めていく。
 - (6) F1 から B3 領域までの 2 本鎖 DNA と BIP から伸展した DNA がはがされて 1 本鎖 DNA ができる。
 - (7) 1 本鎖 DNA の 5', 3' 末端は loop 構造をとる。この dumb-bell loop 構造が LAMP 反応の基本となる。
 - (8) 5' loop 末端の F1 は primer として伸展し、また、FIP の F2 領域が結合し 2 量体を形成し FIP, BIP から伸展した DNA は DNA 合成中にはがされて 1 本鎖として dumb-bell loop 構造を形成する (7, 10)

Dumb-bell loop 構造が 2 量体、多量体形成の基本構造となって DNA を増幅していく。増幅された DNA は多量体を形成するため電気泳動するとラダーパターンを示す。

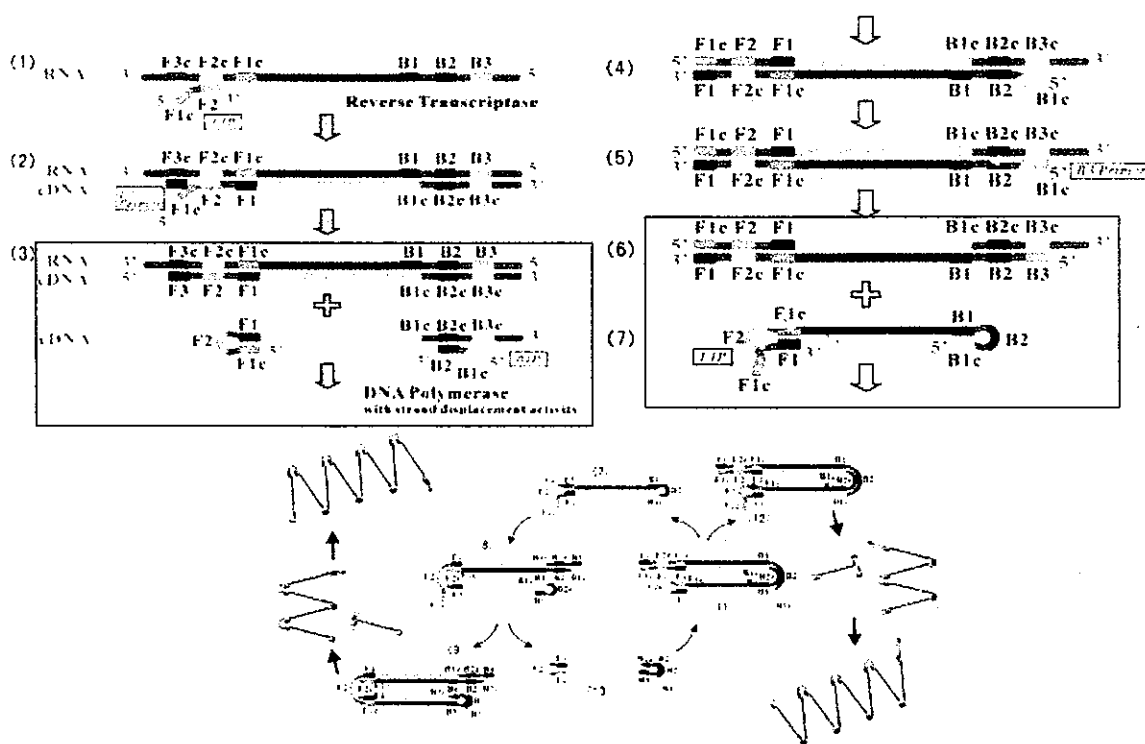


図2 LAMP法の核酸増幅の原理

LAMP 法の臨床応用

我々の研究室では麻疹、ムンプス、Respiratory syncytial virus (RSV)、風疹ウイルスの遺伝子診断をおこなっており従来の RT-PCR 法と検出感度を比較して図3に示した。4x10⁴ TCID50/mL の麻疹ウイルスを用いて nested RT-PCR、LAMP 法の検出感度を調べた。RT-PCR 法では 10⁻³ 希釈まで検出され、LAMP 法の