

## 特殊濾紙によるサイトメガロウイルスマス・スクリーニング法の開発

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

先天性サイトメガロウイルス感染のマス・スクリーニングのために昨年度開発した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について、その感度や特異性を明確にした。また、倫理委員会の承認のもと、検体の収集を開始した。

### A. 研究目的

[先天性CMV感染スクリーニング]

CMVは、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る。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。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・スクリーニ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。われわれは、簡便迅速かつ安価な先天性CMV感染のマス・スクリーニング法を開発してきた。昨年度の本研究事業の成果として、特殊濾紙で収集した尿中のCMVのゲノムコピー数を測定できる方法を報告した。本年度は、その感度等の詳細について検討した。

### B. 研究方法

[リアルタイムPCR法]

IE2もしくはUL83遺伝子を標的としたプライマー（0.2 $\mu$ m）を用い、95 $^{\circ}$ C 10分の初期ステップ、95 $^{\circ}$ C 30秒及び60 $^{\circ}$ C 1分の増幅ステップを50サイクルまで測定した。定量の標準として、IE2をコードするcDNAを含む発現プラスミド、及びUL83遺伝子全長をPfuIポリメラーゼを用いてPCR増幅しpcDNA3にクローニングすることにより構築したプラスミドを使用した。

（倫理面の配慮）

本研究は、各医療機関及び国立感染症研究所の倫理委員会の承認を受け、尿検体の提供者もしくはその保護者の書面での同意に基づき行われた。

### C. 研究結果

1. 尿中のCMVゲノムコピー数の迅速測定法

1) 昨年度報告したIE2遺伝子を標的とする以外に、UL83遺伝子を標的とするリアルタイムPCR法を確立した。（図1）。

2) CMV粒子を人為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、DNAを溶出後、リアルタイムPCR法における感度と定量性を検討した（図1）。感度（検出限界）を解析したところ、ディスク当たり10コピー程度、即ち、3000コピー/mlと先天性CMV感染を検出するのに十分であった。さらに、リアルタイムPCR反応液にspikeしたプラスミドDNAと比較すると、尿にウイルスをspikeしたものは、約10%程度が検出されている結果となった。その理由として、a) 尿分が濾紙分から完全には洗い流せないなどのために、反応が阻害された、b) 濾紙からのDNA溶出効率が低かったなどが考えられる。

3) 各協力施設での倫理委員会による承認や、医師及び看護婦との打ち合わせも終了し、濾紙の回収が開始された。

### D. 考察

1) 特殊濾紙からのDNA溶出操作を省いてリアルタイムPCRでCMVコピー数を測定する方法を現在開発中で、これにより溶出したDNAを用いた場合の問題点であるPCRに伴う非特異的なDNA増幅やコンタミネーションを避けることが可能となることに加え、省力化が可能になることが期待される。

2) より多数の濾紙検体を18年度は解析することになるため、解析データのデータベース化なども準備していく

必要があると思われる。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Krug LT, Teo CG, Tanaka-Taya K, Inoue N: Newly identified human herpesviruses. *In: (Eds)IW Fong, K Alibek Emerging Infectious Diseases of the 21st Century*. Springer, NY. (印刷中)
- 2) 井上直樹, 野澤直樹: HCMV のゲノム構造と遺伝子機能. *日本臨牀* 64 (増刊3): 377-385, 2006
- 3) 野澤直樹, 井上直樹: CMV の先天性感染機構. *日本臨牀* 64 (増刊3): 446-450, 2006
- 4) Wang G, Xu H, Wang Y, Gao X, Zhao Y, He C, Inoue N, Chen HD: Higher prevalence of human herpesvirus 8 DNA sequence and specific IgG antibodies in patients with pemphigus in China. *J Am Acad Dermatol* 52(3): 460-467, 2005

### 2. 学会発表

- 1) 野澤直樹, 片野晴隆, 中村幸之助, 福井良子, 山本由美子, 小村仁美, 筒井祥博, 倉根一郎, 井上直樹: モルモットサイトメガロウイルス感染動物モデルを利用するための分子生物学的方法の構築. 第20回ヘルペスウイルス研究会 (2005. 6, 名古屋)
- 2) 野澤直樹, 古谷野 伸, 片野晴隆, 福井良子, 山本由美子, 中村幸之助, 小村広美, 筒井祥博, 倉根一郎, 井上直樹: 先天性サイトメガロウイルス感染による感覚器障害の実態把握及びモルモット感染モデルを用いた障害発生機序解明のための緑色蛍光蛋白を発現する組換え体ウイルスの作製. 第9回日本神経ウイルス研究会 (2005. 6. 11, 浜松)
- 3) Fukui Y, Yamamoto Y, Yanagi M, Nozawa N, Kurane I, Inoue N: Establishment of a sensitive reporter cell line for human cytomegalovirus. 30<sup>th</sup> International Herpesvirus Workshop IHW2005 (2005. 7. 30-8. 4, Finland)
- 4) Nozawa N, Katano H, Nakamura K, Fukui Y, Yamamoto Y, Tsutsui Y, Kurane I, Inoue N: Construction and application of a recombinant guinea pig cytomegalovirus expressing green fluorescent protein for analyses of the mechanisms of congenital cytomegalovirus infection. 30<sup>th</sup> International Herpesvirus Workshop IHW2005 (2005. 7. 30-8. 4, Finland)
- 5) Wang GQ, Yamamoto Y, Fukui Y, Nozawa N, Takayama M, Schmid DS, Kurane I, Inoue N: Characterization of VZV promoters and development of reporter cell lines for VZV. 12<sup>th</sup> International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections (2005. 10. 6-8, Osaka)
- 6) Nozawa N, Suzutani T, Omori K, Koyano S, Fukui Y, Baba Y, Ogawa H, Yamamoto Y, Yanagi M, Komura H, Kurane I, Inoue N: Development of novel diagnostic assays for human cytomegalovirus(HCMV)infection

and their applications. 12<sup>th</sup> International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections (2005. 10. 6-8, Osaka)

- 7) Nozawa N, Katano H, Nakamura K, Fukui Y, Yamamoto Y, Tsutsui Y, Kurane I, Inoue N: Molecular and pathological characterization of guinea pig cytomegalovirus infection. 12<sup>th</sup> International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections (2005. 10. 6-8, Osaka)
- 8) 井上直樹, 野澤直樹, 倉根一郎: ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 及び水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) の力価の迅速測定用レポーター細胞の樹立. 第53回日本ウイルス学会学術集会 (2005. 11. 20-22, 横浜)
- 9) 野澤直樹, 片野晴隆, 筒井祥博, 倉根一郎, 井上直樹: モルモットサイトメガロウイルス感染動物モデルを利用するための分子生物学的方法の構築と緑色蛍光蛋白を発現する組換えウイルスの作製. 第53回日本ウイルス学会学術集会 (2005. 11. 20-22, 横浜)

## F. 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

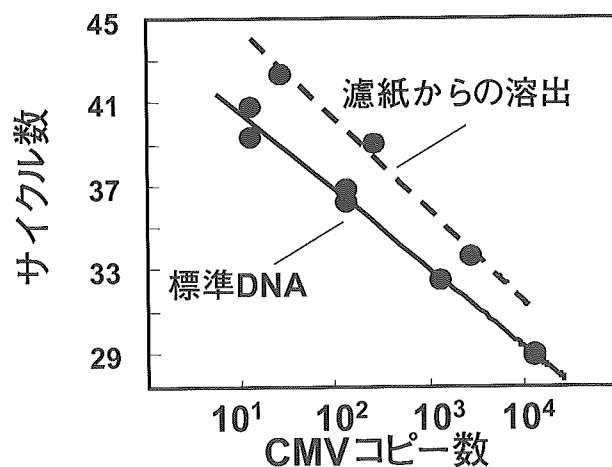


図1 濾紙から溶出したDNAを用いたリアルタイムPCRの定量性と感度

## サイトメガロウイルス分子診断法の確立

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 呉宮 永子（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）

### 研究要旨

ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）分子診断のターゲットとして、株間の多形性が少ない糖タンパク H（glycoprotein H）を選択し、検討した。日本人から分離された3株と GenBank に登録されている15株の gH 遺伝子アラインメントから、多形の少ない C 末端側の部位をターゲットに選定した。nested PCR 法、real-time PCR 法、LAMP 法を用いた DNA 検出系を作成したところ、それぞれの感度は5、10、100コピーであった。

### A. 研究目的

近年、DNA ウイルスであるヘルペスウイルスに、株間でかなり多形性の高い遺伝子が存在すると報告されてきた。ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）遺伝子中にも非常に多形性の高い遺伝子が存在し、たとえば糖タンパク N では50%、糖タンパク O では46%、UL144 では33%のアミノ酸に多形が存在する。本課題の中心となる研究は、聴覚障害児の乾燥臍帯から HCMV のゲノムを検出し、先天性サイトメガロウイルス感染を後方視的に確定診断することであるが、上記の事実は、感度の良い偽陰性の少ない DNA 診断には、多形の少ない部位をターゲットとした分子診断法が重要であることを示唆している。そこで本研究では、日本人から分離された HCMV 株のシーケンスと GenBank に登録されているシーケンスを基に、多形が少ないことが知られている糖タンパク H 遺伝子（glycoprotein H ; gH）の中からさらに多形の少ない部位を同定し、そこをターゲットとした分子診断法を確立する。

### B. 研究方法

#### 1. ウイルス株とシーケンス：

日本人から分離された HCMV 3 株、GenBank に登録されている15株の gH 遺伝子のシーケンスを用いて解析した。

#### 2. gH 遺伝子のクローニング：

検査の感度の決定や定量 PCR の標準として用いる DNA として、AD169株 gH 遺伝子の一部をクローニングした。nested PCR 用に設計、合成した outer primer set（cmvgH-NP-OF、cmvgH-NP-OR；図1）を用い、PCR で gH 遺伝子の一部を増幅後、T-cloning 法によって pGEM- T にクローニング。シーケンスを確認後、プラスミドはキアゲンのカラムを用いて精製し、吸光度から遺伝子の濃度を決定して用いた。

### C. 研究結果

#### 1. ターゲット部位の決定とプライマーの設計：

HCMV gH 遺伝子は多形の少ない遺伝子として知られている（多形の存在するアミノ酸は4.5%）。そこで、合計18株の gH 遺伝子のアラインメントを作成した。その結果、多形は N 末端側に多く、C 末端側は比較的構造が保たれていることが明らかとなったので、DNA 診断のターゲットとしてここを選択した（図1）。この部位に感度の高い nested PCR 法、ゲノム量を定量できる real-time PCR 法、最近開発された PCR 法より簡便な Loop-mediated isothermal amplification（LAMP）法を用いた DNA 診断法を設計した。なお、real-time PCR のプライマー並びにプローブの設計には ABI 社ホームページ上に、LAMP のプライマーの設計には栄研化学のホームページ上に公開されているソフトを用いた。それぞれのプライマーの位置とシーケンスは図1、表1のとおりである。

nested PCR 用のプライマーは多形の存在する部位をさけて設計することが可能であったが、real-time PCR のプライマー中にはそれぞれ1カ所の多形が存在する。特に forward primer（cmvgH-RT- F）は3' 端に塩基の違いを持つ株が1株報告されており、このような株では偽陰性となる危険性があった。ただ、この塩基置換を持つのは18株中1株だけであり、実用上問題はないと考えた。LAMP 法は合計8カ所のプライマー結合部位が必要である。この設計はソフトに頼るしかなく、多形性のある部位をさけることはできなかった。

#### 2. 感度の決定：

プラスミドにクローニングした AD169株の gH 遺伝子を用い、それぞれの検査法の条件と感度を決定した。

nested PCR 法の outer primer set だけでは、DNA の検出に約1,000コピー必要であったが、nested とすることで5コピーのゲノムでも検出できた。real-time PCR 法は

DNA の検出に10コピー必要であったが、定量性は優れていた。一方、LAMP 法での検出限界はおよそ100コピーで、簡便性に優れてはいるものの、感度は前2者には及ばなかった

3. 臨床検体の解析：

それぞれの検査を臨床検体を用いて比較した（表2）。検体は腎移植後の3名の患者血液で、pp65検出による antigenemia 検査を終えたものである。antigenemia 検査で

の抗原陽性細胞数と real-time PCR 法によるゲノムコピー数の間には相関が見られ、また、感度は real-time PCR 法の方が高かった。nested PCR 法はもっとも感度が高いため、antigenemia 検査で陰性であった検体からも HCMV ゲノムの検出ができた。一方、LAMP 法は100コピー以下のところで、陽性、陰性の結果が安定せず、偽陰性がかかりみられた。

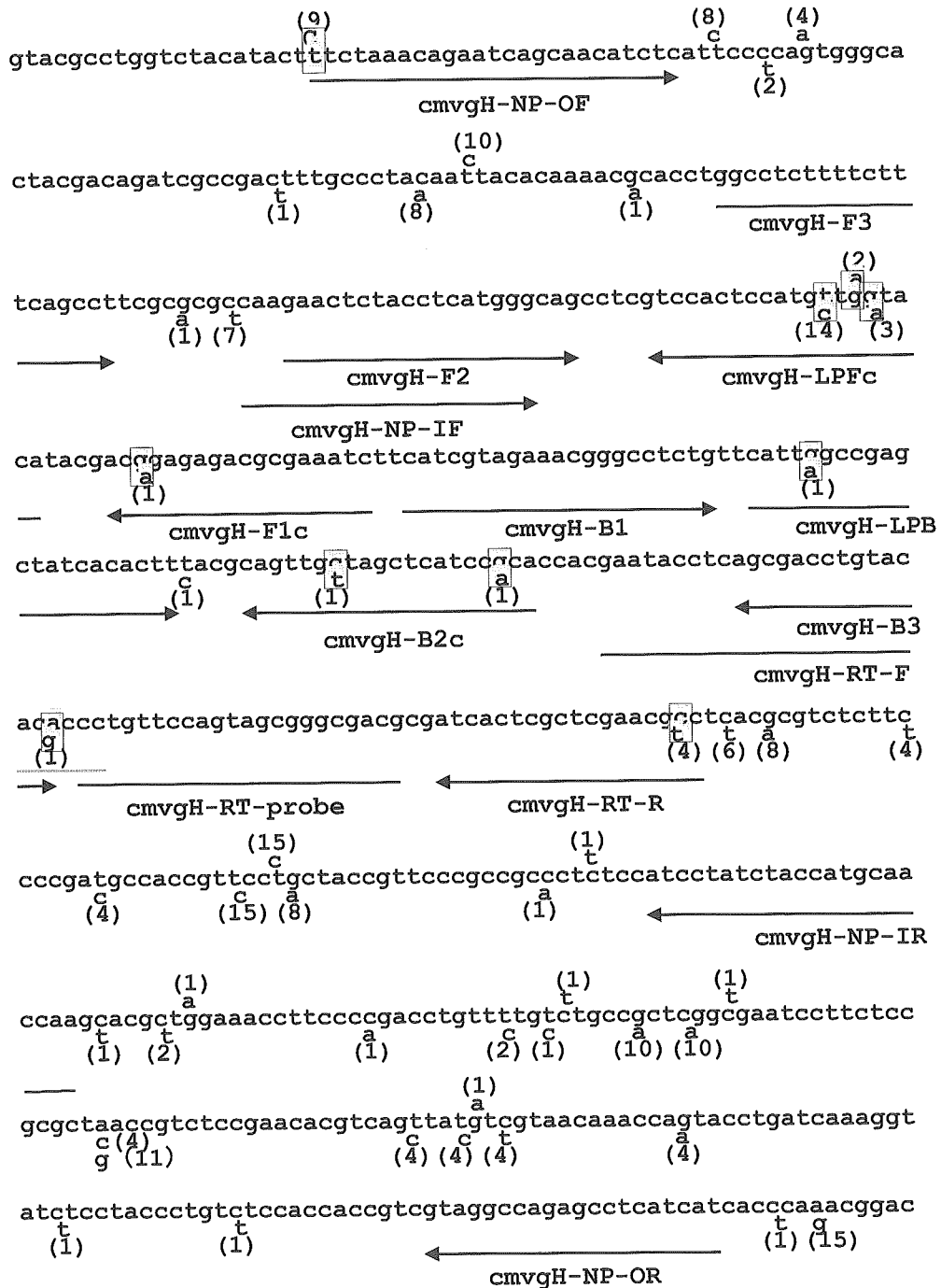


図1 プライマーターゲット部位と株間の多形。AD169株とほかの17株を比較し、違う塩基がある株数を括弧内にしめた。さらにプライマー内に存在する多形は枠で囲んだ。

表1 LAMP のプライマーのシーケンス

Name of LAMP primers	Sequence
cmvgH-F1cF2	5'-gatttcgcggtctctccgctcgt-gaactctacctcatgggcag-3' (F1c-F2)
cmvgH-F3	5'-ggcctcttttctttcagcct-3'
cmvgH-LPFc	5'-tgtaccaacatggagtggac-3'
cmvgH-B1B2c	5'-catcgtagaaacgggcctctg-tgcggatgagctagcaactg-3' (B1-B2c)
cmvgH-B3c	5'-gggtgtgtacaggtcgcct-3'
cmvgH-LPB	5'-cattggccgagctatcacactt-3'

表2 腎移植後患者血液の解析

	Date of detection <sup>a</sup>	Antigenemia <sup>b</sup>	Real-Time PCR number of copy	Nested PCR	LAMP
					Turbidity/(DNA electrophoresis) <sup>c</sup>
P1	0629	0	0	-	-/(-)
	0708	0	0	-	-/(-)
	0724	0	0	-	-/(+)
	0730	0	0	-	-/(-)
	0806	0	0	-	-/(-)
	0813	0	0	-	-/(-)
	0820	0	0	+	-/(-)
	0827	300	239	+	+/(+)
	0910	21	24	+	+/(+)
	0918	1	12	+	+/(+)
	0913	0	81	+	+/(+)
P2	0909	0	0	-	-/(-)
	0918	0	0	-	-/(-)
	0925	0	4	+	-/(-)
	1001	0	0	-	-/(-)
	1008	2	107	+	-/(-)
	1016	10	297	+	+/(+)
	1022	70	2551	+	+/(+)
	1029	2	38	+	+/(+)
	P3	0725	0	0	-
0806		0	0	-	-/(-)
0813		0	0	+	-/(-)
0827		0	3	-	-/(-)
0912		0	3	+	-/(-)
0917		0	0	+	-/(-)
1001		0	5	+	+/(+)
1008		1	30	+	+/(+)
1022		4	13	+	-/(-)
1029		0	9	+	-/(+)

a. 検体採取月日

b. pp65陽性細胞数 (1.5×10<sup>5</sup>白血球あたり)

c. LAMP の結果を濁度で反対したものを分子に、電気泳動で判定したものを分母に示した。

## D. 考 察

現在、われわれの施設で行っている乾燥臍帯からの HCMV ゲノムの検出は本研究の nested PCR 法を用いているが、本法は5コピーのゲノムを検出できる感度の良い検査であることが証明された。今後、さらに多くの臨床分離株のシーケンスを行い、本検査で偽陰性となるような株が存在しないことを明らかにしたい。

最近開発された LAMP 法は反応温度が一定で、検査の迅速化、簡便化が図れる検査法として注目されている。実際に SARS をはじめ、いくつかの微生物の診断法として臨床応用されている。この検査では6ないし8個のプライマー結合サイトを用いるため、特異性が高いことが知られている。しかし、プライマーの設計が難しく、ソフトを用いて設計しても必ずしも陽性の結果が得られるとは限らないことをわれわれは経験している。さらに、これまで報告されてきた微生物診断用 LAMP 法の多くは株間での多形を検討していない。今回の研究から、多形が少ない部位を選んででも、数多い LAMP のプライマーを完全に保存された部位で設計することは不可能であり、常に多形が原因で偽陰性となる株が存在することを念頭に置かなければならないことが明らかとなった。現時点では HCMV の診断に LAMP 法を用いることは適当ではないと判断した。

## E. 結 論

本研究で開発した nested PCR 法は感度が優れており、HCMV 診断に適した検査である。また、感度はやや劣るものの、定量 PCR として real-time PCR 法も開発できた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kaneko H, Iida T, Aoki K, Ohno S, Suzutani T: Sensitive and rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus DNA by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microb* 43: 3290-3296, 2005
- 2) Yokota S, Yokozawa N, Okabayashi T, Suzutani T, Fujii N: Induction of suppressor of cytokine signaling-3 by herpes simplex virus type 1 confers efficient viral replication. *Virology* 338: 173-181, 2005
- 3) Saijo M, Suzutani T, Morikawa S, Kurane I: Genotypic characterization of the DNA polymerase and sensitivity to antiviral compounds of foscarnet-resistant herpes simplex virus type 1(HSV-1) derived from a foscarnet-sensitive HSV-1 strain. *Antimicrob. Agents Chemother* 49: 606-611, 2005

### 2. 学会発表

- 1) Ishibashi K, Yanagida T, Tokumoto T, Tanabe K, Shirakawa H, Yamaguchi O, Toma H, Suzutani T: Reinfection of cytomegalovirus with different strain from donors is a major cause of acute rejection in renal

transplantation. 100<sup>th</sup> annual meeting of the American Urological Association (2005. 5. 25, San Antonio, USA)

- 2) Kaneko H, Kawana T, Suzutani T: Evaluation of mixed infection cases with both herpes simplex virus types 1 and 2. 12<sup>th</sup> International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections (2005. 10. 6-8, Osaka)
- 3) Zhao D-C, Suzutani T, Hashimoto K: HSV replication up-regulates SOCS1 and SOCS3 expression in the FL cells. 12<sup>th</sup> International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections (2005. 10. 6-8, Osaka)
- 4) Ishibashi K, Tokumoto T, Tanabe K, Yanagida T, Yamaguchi O, Toma H, Suzutani T: Superinfection of cytomegalovirus with different strain from donors is a major cause of acute rejection in renal transplantation. 12<sup>th</sup> International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections (2005. 10. 6-8, Osaka)
- 5) Nozawa N, Suzutani T, Omori K, Koyano S, Fukui Y, Baba Y, Ogawa H, Yamamoto Y, Yanagi M, Komura H, Kurane I, Inoue N: Development of novel diagnostic assays for human cytomegalovirus(HCMV)infection and their applications. 12<sup>th</sup> International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections (2005. 10. 6-8, Osaka)
- 6) 石橋 啓, 橋本浩一, 金子久俊, 錫谷達夫: サイトメガロウイルス AD169株の HUVEC への感染とその影響. 第53回日本ウイルス学会学術集会 (2005. 11. 20-22, 横浜)
- 7) 橋本浩一, 錫谷達夫, 石橋 啓, 金子久俊, 細矢光亮: RSV に対する siRNA の in vitro, in vivo における検討. 第53回日本ウイルス学会学術集会 (2005. 11. 20-22, 横浜)

### 3. 特別講演

- 1) 錫谷達夫: カシス果汁の抗微生物活性. 第21回産学官交流のつどい (2005. 7. 7, 福島)
- 2) 錫谷達夫: 水痘と帯状疱疹. 第5回福島感染コントロール研究会 (2005. 7. 16, 郡山)
- 3) 錫谷達夫: サイトメガロウイルス感染症の話. 第4回みちのくウイルス塾 (2005. 7. 17, 仙台)
- 4) 錫谷達夫: 単純ヘルペスウイルスの免疫回避機能と潜伏感染. 南大阪眼科勉強会 (2005. 11. 7, 大阪府狭山)

## G. 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よる研究

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第二）

研究協力者 李 立（浜松医科大学病理学第二）

### 研究要旨

本研究の目的は、先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染症によって難聴がなぜ起きやすいかを明らかにする実験モデルを作製し、その病理発生に関わる要因を明らかにし、ヒトにおける予防法のための基礎を確立することである。私達は発育期マウス脳へマウス CMV（MCMV）を感染させて内耳への感染を解析する方法を確立してきた。今回は、より自然に近い腹腔内感染によって内耳に感染するモデルを作製した。出生2日目のマウス腹腔内へMCMVを感染させ、脳へPBSあるいはリポポリサッカライド（LPS）を4回注入して、感染後6日目に脳および内耳を取り出し、免疫染色でウイルス感染細胞の分布、およびブランクアッセイ法でウイルス感染価を測定した。その結果、単にウイルスのみを腹腔内感染しても脳あるいは内耳へ感染しないが、LPSの脳内投与により感染が強まり、脳より内耳の方が感受性しやすく、内耳においては蝸牛リンパ節、外リンパ腔壁および血管内皮に感染しやすいが、内リンパ腔には感染しにくいことが明らかになった。

### A. 研究の目的

サイトメガロウイルス（CMV）の先天感染は全出産の0.4% - 1%に起こることが知られている。出生時に小頭症、脳室の拡大、小脳低形成、小眼球症などの脳形成障害が生ずる場合と、出生時は無症状で生後数年して、精神発達障害、難聴、視力障害、てんかんなどが生じてくる場合がある。特に先天性CMV感染による感音性難聴は、非遺伝性難聴の主要な原因であると考えられている。先天性CMV感染症と難聴の関係は世界的に注目され、本研究班でも疫学的、臨床的調査研究が行われている。

私達はCMVの感染による発育期脳障害が如何に生ずるかその病理発生についてマウスを用いて実験モデルで研究してきた。その結果、発育期脳において未分化な神経系細胞である神経幹・前駆細胞がCMVに特に感受性が高いことが明らかになった。この神経幹・前駆細胞の分化に伴って、グリア系細胞では溶解感染を伴う急性感染し易く、神経細胞では持続感染し易いことを示した。

本研究の目的は、発育期のCMV感染によって難聴がなぜ起きやすいかを明らかにする実験モデルを作成し、その病理発生に関わる要因を明らかにし、ヒトにおける予防法のための基礎を確立することである。

この研究のために前年度は、発育期マウス脳へマウスCMV（MCMV）を直接感染させ、内耳への感染を解析する方法を確立した。すなわち感染後のマウスの内耳を病理組織学的に解析出来るように、固定法、脱灰法、薄切の方法、ウイルス抗原の局在を同定する免疫染色法を

確立した。

今回は、より自然なCMV感染による内耳への感染を解析するために、MCMVの腹腔内感染による内耳への感染を試みた。

### B. 研究方法

#### 1) 感染方法

出生後2日目のBALB/cマウスにMCMV（ $1 \times 10^5$ PFU）を腹腔内投与して、感染6日後に屠殺し、脳と内耳への感染を調べた。MCMVを単に腹腔内投与するだけでは脳および内耳への感染は非常に軽度であることが分かったので、細菌のエンドトキシンであるリポポリサッカライド（LPS）を脳内投与することによって感染を促進する試みを行った。生後1日目にLPS（ $5 \mu\text{g} / 5 \mu\text{l}$  PBS）を投与し、生後2日目にMCMV（ $1 \times 10^5$ PFU）腹腔内投与し、感染1日、3日、5日後にLPSを脳内投与して感染後6日目に脳と内耳への感染を調べた。対照群としてLPSの代わりにPBS（ $5 \mu\text{l}$ ）を脳内投与した。

#### 2) 内耳の組織標本の作製

エーテル麻酔下で左心室から4% paraformaldehyde（1 ml）を注入して灌流固定後脳を摘出し、脳と頭部組織を別々に2日間後固定した。脳はパラフィン包埋・薄切し、マウス頭部はさらに室温約一週間0.3M EDTAで脱灰した。脱灰後、蝸牛の矢状断と平行に頭部を切り出してパラフィン包埋し、切片を作製した。

#### 3) 免疫染色

MCMVの前初期抗原IE1およびIE3に対する抗体、早

期抗原 E1 に対する抗体によるパラフィン切片を用いた免疫染色によってウイルス感染細胞を同定した。神経系細胞の同定には、神経細胞マーカーに対する抗 NeuN 抗体、グリア細胞に対しては抗 GFAP 抗体を用いた。さらにウイルス抗原と神経系細胞抗原に対して二重染色を行った。

#### 4) ウイルス感染価の測定

側頭骨の内耳を含む部分を切り出し、ホモジネートにして、プラークアッセイを行った。ウイルス感染価は両側内耳当たりで換算した。

### C. 研究成果

#### 1) 生存率

LPS を脳内投与した群では感染後 6 日の生存率は約 55% で、PBS を脳内投与した群では 90% 以上生存した。

#### 2) ウイルス抗原陽性細胞の内耳および脳における比較

PBS を脳内投与して、MCMV を腹腔内投与した群においては、免疫染色でウイルス抗原陽性細胞は内耳においても、脳においても認めなかった (図 1 : PBS 及び図 3 A)。

LPS を脳内投与した群においては、内耳においてウイルス抗原陽性細胞は著しく増加した (7 匹中 3 匹) (図 1 : LPS 及び図 3 B)。これに対して LPS を投与した同じマウスの脳においてウイルス抗原陽性細胞の増加は軽度であった (図 1 : LPS)。

#### 3) 内耳および脳におけるウイルス感染価の LPS による増強

対照群の PBS 投与においては、内耳および脳において、 $1 \times 10^2$  PFU / organ 以下であったが、LPS の投与によって、内耳では約 30 倍、脳では約 6 倍上昇した (図 2)。

#### 4) 内耳におけるウイルス抗原陽性細胞の局在

LPS 投与群の内耳におけるウイルス抗原陽性細胞の局在は、外リンパである前庭階 scala vestibula (SV)、鼓室階 scala tympani (ST) の内皮およびその周囲の血管内皮や間質で認められた (図 3 B 及び C)。その他蝸牛神経節でもウイルス抗原陽性細胞を認めた。しかし、内リンパである中央階 Scala media (SM)、コルチ器では認めなかった (図 3 C)。ウイルス抗原陽性細胞の認められた部位には好中球・単核球を主体とする炎症性細胞の浸潤を伴っていた。

ウイルス抗原と神経細胞マーカーの二重染色において、螺旋神経節ではウイルス抗原陽性細胞は神経細胞でなく非神経細胞であった (図 3 D)。

#### 5) 結 論

- (1) LPS の脳内投与によって MCMV の腹腔内感染によって脳および内耳への感染を促進することが分かった。
- (2) LPS の脳内投与によって、MCMV の腹腔内感染は脳より内耳により強く感染することが明らかになった。
- (3) 内耳においては、内リンパ腔およびその周囲の血管内皮に感染しやすいことが分かった。
- (4) ウイルス感染細胞は非神経細胞であった。

### D. 考 察

私達は既に MCMV を周産期脳に直接感染させて、内耳での感染細胞の免疫組織学的検出方法を確立した。今回はより自然な感染経路に近い腹腔内感染によって内耳へ感染するモデルを確立した。マウスにおける出生直後 (周産期) 感染はヒトでは胎生後期の感染に相当する。この時期に MCMV を単に腹腔内感染しても、内耳および脳に感染し難いことが分かった。そこで、炎症性サイトカインなどを誘導し、MCMV の感染を増強することが知られている LPS を脳内に投与することによって、MCMV の感染を内耳で特に増強することが明らかになった。LPS 投与とともに MCMV を腹腔内投与すると、脳より内耳に有意に高頻度で感染しやすいことが明らかになった。これらの結果は以下のふたつの点から興味ある事実であると考えられる。

第一に、人における先天性 CMV 感染症において脳より内耳により感染しやすく、脳障害を伴わない難聴が起こりやすいことを示唆している。まだ脳以外の臓器と比較してないが、内耳は CMV が特に感染しやすい部位である可能性が高い。血液・脳関門と血液内耳関門が CMV の感染感受性という観点から基本的に異なることを示唆している。内耳の外リンパ腔に感染しやすく、内リンパ腔には感染し難いことは興味ある事実である。如何なる要因が働いているのか今後の課題である。

第二に、LPS の投与によって MCMV の脳および内耳への感染が増強したことである。LPS には幾つかの作用が知られているが、Toll-like receptor (TLR) -4 への作用を介して炎症性サイトカインを喚起することが知られている。炎症を契機にして CMV の脳および内耳への感染が強まる可能性を示唆している。さらに LPS は血液・脳関門に対して影響を与えることも知られている。LPS の如何なる作用が MCMV の脳および内耳への感染を増強するかは今後の課題である。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Tsutsui Y, Kosugi I, Kawasaki H: Neuropathogenesis in cytomegalovirus infection: indication of the mechanisms using mouse models. *Rev Med Virol* 15(5): 327-345, 2005
- 2) Kosugi I, Kawasaki H, Tsuchida 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(Berl)* 109(5): 475-482, 2005
- 3) 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* 76(3): 398-405, 2005
- 4) Matsukage S, Kosugi I, Kawasaki H, Miura K, Kitani H, Tsutsui Y: Replication and Viral Gene Expression



of Murine Cytomegalovirus in Mouse Embryonic Stem Cells during the Differentiation. Birth Defects Research (Part A) 76: 115-125, 2006

- 5) 筒井祥博:  $\beta$  ヘルペスウイルスの中樞神経系感染. 日本臨牀 (印刷中)
2. 学会発表
  - 1) Tsutsui Y, Matsukage S, Kosugi I, Kawasaki H: Susceptibility to Murine Cytomegalovirus in Mouse Embryonic Stem Cells. 12<sup>th</sup> International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, Cosmosquare International Education and Training Center (2005. 10. 6-8, Osaka)
  - 2) Tsutsui Y, Ishiwata M, Kawasaki H, Kosugi I: Neuron-specific expression of the immediate-early 2 protein of murine cytomegalovirus in the developing mouse brain. 10<sup>th</sup> International CMV/Betaherpesvirus Workshop (2005. 4. 24-28, Williamsburg, VA, USA)
  - 3) Kawasaki H, Mocarski ES, Kosugi I, Tsuchida T, Tsutsui Y: Cyclosporin A inhibits mouse cytomegalovirus infection in the neural stem/progenitor cells. 10<sup>th</sup> International CMV/Betaherpesvirus Workshop (2005. 4. 24-28, Williamsburg, VA, USA)
  - 4) 筒井祥博, 鈴木弘美, 河崎秀陽, 小杉伊三夫, 韓 桂萍: 〈ワークショップ〉神経幹細胞へのマウスサイトメガロウイルスの潜伏感染の可能性. 第53回日本ウイルス学会学術集会 (2005. 11. 20-22, 横浜)
  - 5) 李 立, 小杉伊三夫, 河崎秀陽, 韓 桂萍, 土田 孝, 筒井祥博: Experimental cytomegalovirus infection of mouse inner ear: the establishment of infection via the immunomodulation by lipopolysaccharide. 第53回日本ウイルス学会学術集会 (2005. 11. 20-22, 横浜)
  - 6) 韓 桂萍, 三浦克敏, 小杉伊三夫, 河崎秀陽, 筒井祥博: Epidermal growth factor (EGF) によるマウス脳のサイトメガロウイルス感染感受性の亢進. 第53回日本ウイルス学会学術集会 (2005. 11. 20-22, 横浜)
  - 7) 松影昭一, 河崎秀陽, 小杉伊三夫, 筒井祥博: ES細胞の分化とサイトメガロウイルス (CMV) 感染感受性の定量的解析. 第45回日本先天異常学会学術集会 (2005. 7. 14-16, 東京)
  - 8) 河崎秀陽, 小杉伊三夫, 土田 孝, Han Gui Ping, 筒井祥博: 発育期脳におけるサイクロフィリン発現とサイトメガロウイルス感染感受性との関連. 第9回日本神経ウイルス研究会研究集会 (2005. 6. 11, 浜松)
  - 9) 河崎秀陽, 小杉伊三夫, 土田 孝, 松影昭一, 韓 桂萍, 筒井祥博: 発育期脳におけるサイトメガロウイルス感染感受性とサイクロフィリン発現との関連. 第94回日本病理学会総会 (2005. 4. 14-15, 横浜)
  - 10) 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) 前初期遺伝子発現と感染感受性の定量的解析. 第94回日本病理学会総会 (2005. 4. 14-15, 横浜)
  - 11) 小杉伊三夫, 河崎秀陽, 土田 孝, 松影昭一, 筒井祥博: 発育期サイトメガロウイルス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94回日本病理学会総会 (2005. 4. 14-15, 横浜)

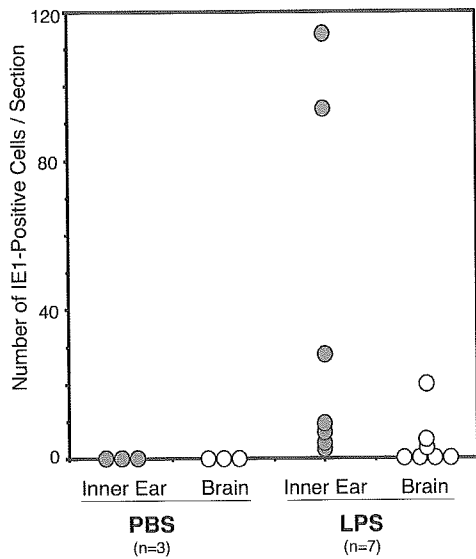


図1 内耳及び脳組織標本一切片あたりのMCMV-IE1抗原陽性細胞数

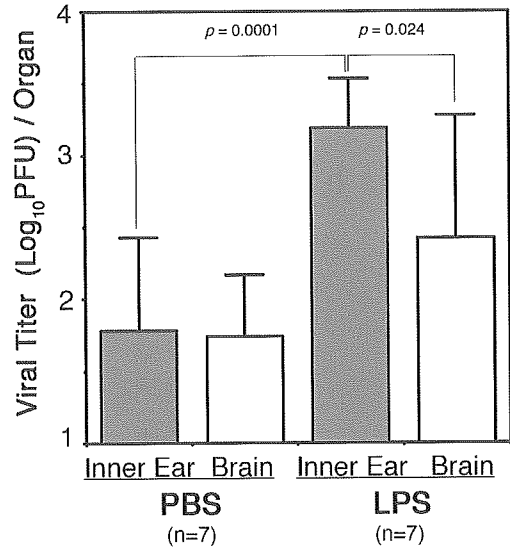


図2 プラークアッセイによって計測した内耳及び脳におけるウイルス量

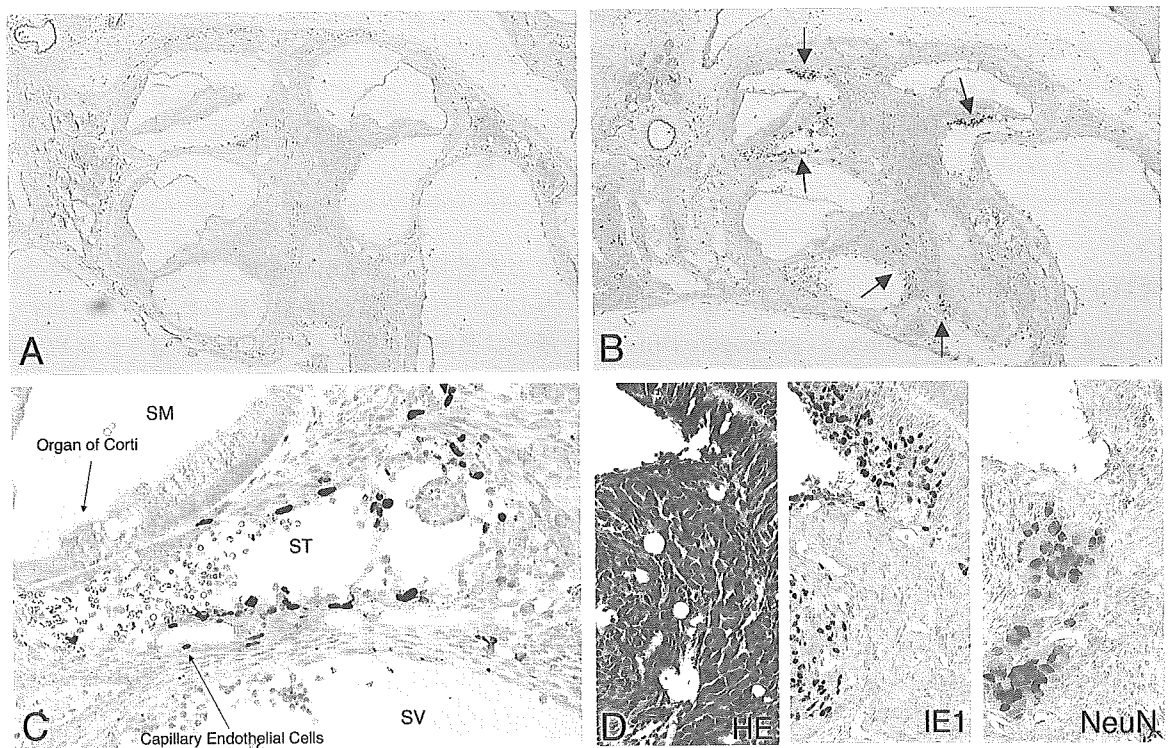


図3 A. PBSを投与されたMCMV感染6日後の蝸牛組織におけるIE1抗原の免疫染色。  
 B. LPSを投与されたMCMV感染6日後の蝸牛組織におけるIE1抗原の免疫染色。IE1陽性細胞(矢印)が外リンパ周囲、螺旋神経節に認められる。  
 C. Bの一部の拡大写真。SV; 前庭階、ST; 鼓室階、SM; 中央階。  
 D. 螺旋神経節におけるHE染色、IE1染色、NeuN染色。

## モルモットサイトメガロウイルスを用いた実験的ウイルス性内耳障害

分担研究者 片野 晴隆（国立感染症研究所感染病理部）

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 倉田 毅（国立感染症研究所感染病理部）

研究協力者 佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）

研究協力者 佐藤 由子（国立感染症研究所感染病理部）

### 研究要旨

サイトメガロウイルスによる先天性難聴の発症機構を解明することを目的に、モルモットサイトメガロウイルス（GPCMV）の水平および垂直感染モデルにおける GPCMV 感染細胞の局在を免疫組織化学により明らかにした。モルモットの内耳への感染実験では GPCMV 感染細胞は前庭階、鼓室階などの外リンパ液領域とらせん神経節に見られ、蝸牛管、コルチ器などの内リンパ液領域には見られなかった。妊娠モルモットへの感染実験では親モルモットの胎盤内にウイルス GPCMV 感染細胞を認めた。胎児の内耳では外リンパ液領域と神経節および中耳に GPCMV 感染細胞が認められ、一方で、蝸牛管などの内リンパ液領域では GPCMV 感染細胞は見られなかった。これらの結果から、GPCMV 感染におけるモルモット難聴のメカニズムとして、コルチ器周辺の出血等による循環障害、および、神経節の破壊による神経伝導障害が考えられた。これらの知見はヒトのサイトメガロウイルスによる難聴のメカニズムを考える上で重要な示唆を含むものと思われる。

### A. 研究目的

ヒトサイトメガロウイルス（human cytomegalovirus、HCMV）は先天性ウイルス感染症としては最も頻度の高いウイルスである。HCMV は新生児の約 1% から検出され、そのうちの約 14% に何らかの症状が見られる。新生児における HCMV 感染症は無症候性のウイルス血症から巨細胞封入体を伴う致死性の脳炎まで、様々な程度の疾患がある。聴覚障害は先天性 HCMV 感染症の中でも最も頻度の高いものであり、HCMV が検出された幼児の 10-15% 程度が将来、何らかの聴覚障害を持つとされる。このように、先天性 HCMV 感染が聴覚障害と関連することは明かであるが、その病因メカニズムには不明な点が多い。ヒト臨床検体を用いた試験管外実験や動物実験では HCMV は経胎盤的に胎児に感染することが明らかになっている。モルモットは妊娠期間が 10 週と比較的短期であり、胎盤の構造がヒトに近似していることから、モルモットにモルモットサイトメガロウイルス（Guinea pig cytomegalovirus、GPCMV）を感染させた動物モデルは 1970 年代から垂直感染のモデルとして利用されてきた。1980 年代後半まで多くの研究がなされ、垂直感染モデルにおける内耳の変化や経胎盤感染の病理が報告された。組織学的な内耳の変化は出血と巨細胞封入体のある細胞を伴った炎症細胞浸潤が主であり、ライスナー膜、血管条、らせん神経節（蝸牛神経節）に障害が見られることが難聴と関連すると考えられてきた。また、垂直感染モデルの胎盤には GPCMV 感染細胞が検出された。こ

うした所見は GPCMV 感染が直接的に難聴の病因に関与しているという証拠と考えられた。しかし、これらの研究は高感度な免疫組織化学が開発される以前のものであり、内耳、特に蝸牛における GPCMV 感染細胞の詳細な局在は分かっていない。そこで、モルモット動物モデルにおける GPCMV 感染細胞の詳細な局在を検索する目的で、本研究ではモルモットを使った 2 つの感染実験を行った。一つは内耳に GPCMV を直接接種する実験系、もう一つは妊娠モルモットにウイルスを接種する系であり、ウイルスを接種したモルモット、および胎児の内耳における GPCMV 感染細胞の局在を、抗 GPCMV 抗体を用いた免疫組織化学で検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 内耳への感染実験

Hartley 系クリーンモルモット（体重 200 g）8 匹を用い、そのうち 4 匹を実験群として右中耳胞をメスで開放し正円窓より  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/0.002 ml の GP-CMV ウイルス液を歯科用 1/6 針を用いて注入した。対照群では同じ針で正円窓を穿刺した。ウイルス液は感染唾液腺乳剤を 10% DMSO / ハンクス液で調整した。実験群、対照群とも術後正円窓部をゼルフォームで覆った。

#### 2. 妊娠モルモットへの感染実験

妊娠 5 週の Hartley 系クリーンモルモットの背臀部皮下に  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/0.5 ml の GPCMV ウイルス液を接種した。出産直前に麻酔下で胎児と母体の全臓器を摘出し 10% 緩衝ホルマリンで固定した。

### 3. 病理標本の作製と免疫組織学的検索

耳を含めた全臓器の組織は10%緩衝ホルマリンで固定し、蝸牛などの硬組織を含むサンプルは10% EDTA で14日間脱灰を行った。パラフィン包埋したブロックから薄切片を作製し、シランコートガラススライドに貼付した。脱パラフィン後、0.25%トリプシン処理にて抗原賦活化処理を行い、リン酸バッファーで洗浄後、抗 GPCMV マウスモノクローナル抗体を一次抗体として反応させた。洗浄後、免疫組織化学染色ではビオチン標識抗マウスIgG抗体を二次抗体として、三次抗体にはペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを順次反応させ、ジアミノベンチジンで発色後、アルコール脱水、キシレン透徹、封入後、検鏡した。また、免疫染色とは別に各標本はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色で全体の形態変化を観察した。

#### (倫理面への配慮)

動物実験は当該施設(国立感染症研究所)の承認の後、国立感染症研究所動物実験ガイドラインに沿って行われた。

## C. 研究結果

### 1. 内耳への感染実験

組織学的所見の詳細は前年度の報告書に記載した。実験群では前庭階、鼓室階の著明な出血とリンパ球浸潤が見られ、らせん神経節にもリンパ球浸潤、出血が確認された。これらの部位には多くの巨細胞封入体も見られた。免疫組織化学ではライスナー膜の前庭階側、前庭階、鼓室階の出血、炎症巣の中に、GPCMV 感染細胞を認めた。蝸牛管の中には軽い出血を認めたが、GPCMV 感染細胞は認められなかった。卵形嚢、球形嚢、平衡斑、三半規管、内リンパ嚢などの内リンパ領域にも同様に軽い出血はあるものの、GPCMV 感染細胞は見あたらなかった。一方、らせん神経節では変性、壊死部分に一致して GPCMV 感染細胞が認められた。これらの所見を総合すると、GPCMV が直接接種された内耳では外リンパ液領域に GPCMV 感染細胞が分布し、コルチ器などの感覚器細胞を含む内リンパ液領域では GPCMV 感染細胞は認められない。また、神経節領域にも GPCMV 感染細胞が見られることから、内耳では GPCMV は外リンパ液と神経組織を介して広がっていくものと推察された。

感染モルモットには内耳以外にも唾液腺、腎臓、膵臓、脈絡叢に免疫組織化学で GPCMV の GPCMV 感染細胞が認められた。一方で、対照群のモルモットにはこれらの変化は認められなかった。

### 2. 垂直感染実験

10匹の妊娠モルモット(妊娠5週)に GPCMV を接種した。胎児の組織学的所見の詳細は前年度の報告を参照されたい。1匹の母親モルモットには GPCMV の全身感染症が見られ、免疫組織化学では肝、脾など多くの臓器に GPCMV 感染細胞が認められた。また、他の母親モルモットの肝、脾などに、まばらながらも GPCMV 感染細胞を認めた。胎盤では数例のモルモットに明らか

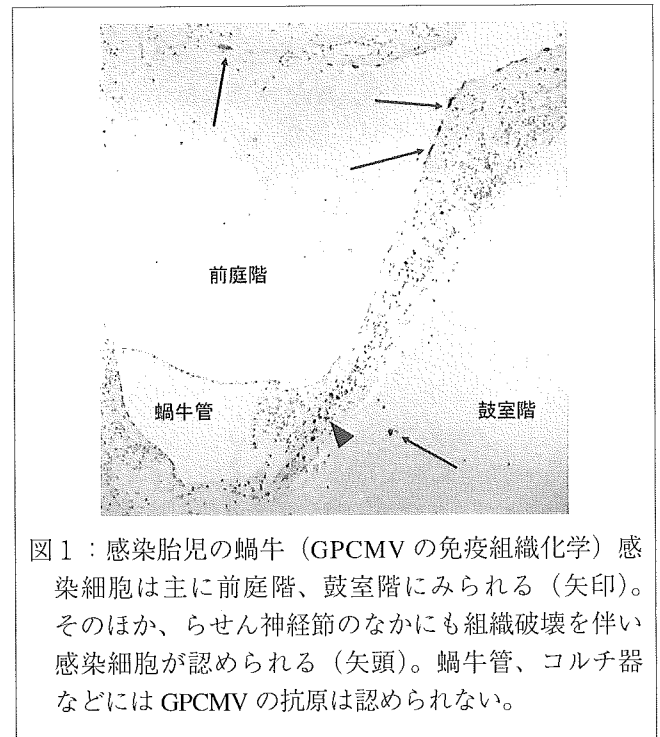


図1：感染胎児の蝸牛(GPCMVの免疫組織化学)感染細胞は主に前庭階、鼓室階にみられる(矢印)。そのほか、らせん神経節のなかにも組織破壊を伴い感染細胞が認められる(矢頭)。蝸牛管、コルチ器などにはGPCMVの抗原は認められない。

な GPCMV 感染細胞を認め、経胎盤感染を示唆する所見であった。胎児の内耳には前庭階、鼓室階に出血、炎症が、らせん神経節に神経細胞の脱落と壊死が認められ、これらの領域に免疫組織化学で GPCMV 感染細胞が認められた(図1)。出血、炎症の程度や GPCMV 感染細胞の数は胎児ごとにばらつきがあった。蝸牛管、コルチ器、卵形嚢、球形嚢、平衡斑、三半規管、内リンパ嚢などの内リンパ液領域には GPCMV 感染細胞は見あたらなかった。また、内耳以外では中耳腔の内壁に GPCMV 感染細胞を認め(図2)、また、腎臓にも GPCMV 感染細胞が検出される胎児があった。こうした所見より、垂直感染モデルの胎児の内耳においても外リンパ液領域および神経組織が GPCMV 感染細胞の主な分布であり、内リンパ液領域には GPCMV 感染細胞は見られなかった。

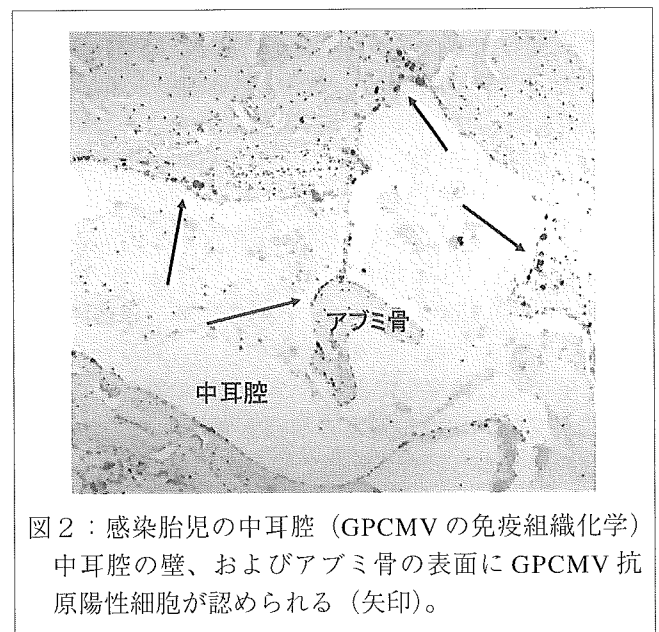


図2：感染胎児の中耳腔(GPCMVの免疫組織化学)中耳腔の壁、およびアブミ骨の表面にGPCMV抗原陽性細胞が認められる(矢印)。

## D. 考 察

本研究でわれわれは GPCMV 感染実験モデルにおける GPCMV 感染細胞の局在を免疫組織化学で明らかにした。内耳における GPCMV 感染細胞の局在は主に前庭階、鼓室階といった外リンパ液領域とらせん神経節内であり、コルチ器を含む蝸牛管や卵形囊、球形囊、平衡斑、三半規管、内リンパ囊などの内リンパ液領域には GPCMV 感染細胞は見られなかった。このことは GPCMV が水平感染モデルでも、垂直感染モデルでも、内耳においては外リンパ液、および神経組織を伝わって、広がることを示唆する。

CMV が経胎盤感染することはヒトでもモルモットでも実験的には示されているが、ヒトの臨床検体を用いた研究は少ない。また、ヒトの胎児や難聴者の内耳のサンプルを調べた報告もまれであり、CMV 感染がどのように難聴を引き起こすかはいまだに不明な点が多い。1970年代から1980年代に報告された CMV の動物実験の結果では (i) モルモットモデルでは経胎盤感染を起こすが、マウスでは胎盤を介さない感染が起こる、(ii) 垂直感染モデルの胎児にもウイルス性の内耳炎が起こる、(iii) 垂直感染モデルでは蝸牛の奇形が見られることがある、などの点が明らかにされている。さらに、GPCMV を直接内耳に接種したモデルの組織学的所見として (i) 前庭階、鼓室階といった外リンパ液領域と、らせん神経節内に巨細胞封入体を伴った GPCMV 感染細胞が見られる、(ii) 中耳に著明な線維化を認め、(iii) コルチ器を含む蝸牛管や卵形囊、球形囊、平衡斑、三半規管、内リンパ囊などは萎縮しているものの GPCMV 感染細胞は見られないことが明らかにされている。本研究における GPCMV 感染細胞の局在もこれらの所見に合致するものであり、GPCMV を接種した内耳ではウイルスは外リンパ液を介して拡散し、内リンパ液領域には GPCMV 感染細胞は見られない。加えて、今回の検索では垂直感染モデルにおける胎児の内耳においても同様の傾向が認められた。免疫組織化学は HE 染色標本で巨細胞封入体を検索するよりも高感度に GPCMV 感染細胞を検出でき、事実、HE 染色標本で巨細胞封入体が見あたらないところでも免疫組織化学では多くの GPCMV 感染細胞が検出された。従って、本研究ではこれまでの報告よりも、より正確な GPCMV 感染細胞の局在を示したものと思われる。

CMV が内耳に感染するルートとして3つの経路が考えられる。すなわち、外耳道からの感染と神経からの感染、そして血行性感染である。これまでの報告では血行性感染が体内における通常の経路と考えられていたが、本研究の結果からは垂直感染でも、水平感染でも、内耳の中では GPCMV は外リンパ液を介して広がることを示唆された。また、らせん神経節には垂直感染モデルでも、水平感染モデルでも GPCMV 感染細胞が認められたことから内耳では外リンパ液と神経組織を介した伝搬が主たるウイルスの拡散法なのであろう。いずれのモデ

ルにおいても蝸牛管を含む内リンパ液領域では GPCMV 感染細胞は見られず、感覚器として重要な働きを示す、内毛状細胞、外毛状細胞を含むコルチ器はいずれも感染していなかった。しかし、コルチ器周辺の血管には感染による破壊と出血があり、炎症細胞浸潤が著明であったことから、コルチ器周辺には循環障害が起きていることが予想される。また、らせん神経節には感染による明かな組織破壊と神経細胞の脱落、壊死が認められたことから、らせん神経節内で、機能的な神経伝導障害が起こっていることが予想される。したがって、本研究結果から予想される GPCMV 感染による難聴のメカニズムとしては、コルチ器周辺の循環障害とらせん神経節内の神経伝導障害が考えられる。これらの知見はヒトのサイトメガロウイルスによる難聴のメカニズムを考える上で重要な示唆を含むものと思われる。今後、ヒトの臨床サンプルや他の動物を使った実験により、確認していくことが望まれる。

## E. 結 論

GPCMV 水平感染、垂直感染実験系における GPCMV 感染細胞の局在を免疫組織化学により明らかにした。GPCMV 感染細胞は前庭階、鼓室階などの外リンパ液領域、および、らせん神経節に見られ、蝸牛管、コルチ器などの内リンパ液領域には GPCMV 感染細胞は見られなかった。これらの結果から、GPCMV 感染におけるモルモット難聴のメカニズムとして、コルチ器周辺の出血等による循環障害、および、神経節の破壊による神経伝導障害が考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Satoh M, Kaneko A, Kokaze A, Katano H, Sata T: Seroprevalence of human herpesvirus 8 on vanuatu islands in eastern Melanesia. *Jpn J Infect Dis* 2006 (in press)
- 2) Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Kanno T, Sata T, Katano H: Quantitative analysis of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus(KSHV)in KSHV-associated diseases. *J Infect Dis* 193: 773-782, 2006
- 3) Hishima T, Oyaizu N, Fujii T, Tachikawa N, Ajisawa A, Negishi M, Nakamura T, Iwamoto A, Hayashi Y, Matsubara D, Sasao Y, Kimura S, Kikuchi Y, Teruya K, Yasuoka A, Oka S, Saito K, Mori S, Funata N, Sata T, Katano H: Decrease of Epstein-Barr virus-positive AIDS-related lymphoma in the era of highly active antiretroviral therapy. *Microbes Infect* 2006 (in press)
- 4) Katano H, Hogaboam CM: Herpes virus-associated pulmonary hypertension. *Am J Resp Crit Care Med* 172: 1485-1486, 2005

### 2. 学会発表

- 1) 上野智規, 後藤希代子, 片野晴隆, 佐多徹太郎, 入江伸吉: GFP-PML 発現細胞株を用いた

HCMV, HSV-1感染の検出系 - HSV-1の新規検出系の開発を目指して - 第20回ヘルペスウイルス研究会 (2005. 7, 名古屋)

- 2) 上野智規, 片野晴隆, 栄鶴義人, 倉田毅, 佐多徹太郎, 入江伸吉, 後藤希代子: GFP-PML 発現細胞株を用いた HCMV 薬剤感受性試験法の確立. 第53回日本ウイルス学会総会 (2005. 11. 20-22, 横浜)
- 3) 上野智規, 片野晴隆, 佐多徹太郎, 入江伸吉, 後藤希代子: GFP-PML 発現細胞株を用いた HSV 感染細胞の新規検出系の開発. 第53回日本ウイルス学会総会 (2005. 11. 20-22, 横浜)

#### G. 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

## 緑色蛍光蛋白（GFP）発現組み替えモルモット CMV の作製

分担研究者 井上 直樹（国立感染症研究所）

協力研究者 野澤 直樹（国立感染症研究所）

### 研究要旨

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聴覚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）を発現する組換えモルモット CMV を作製し、培養細胞系における増殖性に親株との差異がないことを明らかにした。

### A. 研究目的

〔難聴発症機序解析のための感染動物モデル〕

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、CMV の先天性感染から聴覚障害にいたる過程、特にウイルスの増殖様式の解析に寄与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 GPCMV を作製する。昨年度の予備実験結果を基に、本年度は組換えウイルスを作出し、その増殖性を検討した。

### B. 研究方法

#### 1) 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）は、10%仔牛血清を含む Ham's F12 培地にて培養した。GPCMV は 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に従った。

#### 2) 組換え GPCMV の作製（図 2）

SV40 プロモーターにより GFP 遺伝子が発現されるカセットを、EcoRI L 断片中にコードされる GP35 と GP37 の間に挿入したトランスファープラスミドを構築した。このプラスミド DNA とゲノム DNA を GPL 細胞に Fugene6 を用いて遺伝子導入し、細胞内で相同的組換えを起こさせた。約 1 週間後の感染細胞を培養液ごと凍結融解・sonication 処理し、組換え GPCMV と野生型

GPCMV の混合液を得た。これを 24 穴プレートの多数のウェル中の GPL 細胞に感染させ、アガーを重層後培養し、緑色蛍光蛋白の発現が認められるプラークを採取する。このプラーク精製過程を数回繰り返すことで、野生型ウイルスを含まない組換えウイルス標品を得た。

（倫理面の配慮）

本研究は、国立感染症研究所の倫理委員会の承認を受け、組換え GPCMV の作成は遺伝子組換え生物等の第二種使用等拡散防止措置の大臣確認に対する承認を得て行われた。

### C. 研究結果

〔GFP を発現する組換え体 GPCMV の作製とその増殖性の検討〕

1) GFP を発現する組換え GPCMV の構築法をデザインし（図 1）、組換え DNA の 2 種使用に関する大臣確認実験の承認を得た。そこで、デザインに基づき組換え GPCMV を得た。組換え体の構造確認は、GP35 及び GP37 に設定したプライマーを用いた PCR 産物が GFP 遺伝子カセットを含むことで長くなることを利用した方法（図 2）、及び大量に組換えウイルスを培養後ゲノム DNA を精製し、HindIII 切断産物が大きくなったことを証明するサザンプロテイング法（図 3）の 2 通りで行った。複数の組換え GPCMV クローンが得られ、すべて期待されるゲノム構造であった。

2) 得られた組換えウイルスと野生型ウイルスを GPL に感染後、その増殖の経時的变化を解析した。組換えウイルス量については、蛍光顕微鏡下で緑色蛍光を呈するプラーク数及び感染細胞を筒井らが作成した抗モルモットモノクローナル g-1 を用いて反応後 DAB にて免疫染色されたプラーク数を計数することにより定量した。また、野生型ウイルスは DAB 染色によった。これらの方法により得られた組換え及び野生型両ウイルス量の経時的变化はほぼ同一であり、組換え GPCMV の培養細胞内での増殖性は野生型ウイルスと変わらないと結論した。

## D. 考 察

組換え GPCMV のモルモット個体、特に内耳、での増殖性について、親株との比較を含め現在検討を進めている。今後病原性を規定するウイルス因子の解析を可能にするために、BAC などの構築を図る予定である。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Krug LT, Teo CG, Tanaka-Taya K, Inoue N: Newly identified human herpesviruses. *In: (Eds)IW Fong, K Alibek Emerging Infectious Diseases of the 21st Century.* Springer, NY (印刷中)
- 2) 井上直樹, 野澤直樹: HCMV のゲノム構造と遺伝子機能 日本臨牀 64 (増刊 3): 377-385, 2006
- 3) 野澤直樹, 井上直樹: CMV の先天性感染機構. 日本臨牀 64 (増刊 3): 446-450, 2006
- 4) Wang G, Xu H, Wang Y, Gao X, Zhao Y, He C, Inoue N, Chen HD. Higher prevalence of human herpesvirus 8 DNA sequence and specific IgG antibodies in patients with pemphigus in China. *J Am Acad Dermatol* 52: 46-467, 2005

### 2. 学会発表

- 1) 野澤直樹, 片野晴隆, 中村幸之助, 福井良子, 山本由美子, 小村仁美, 筒井祥博, 倉根一郎, 井上直樹: モルモットサイトメガロウイルス感染動物モデルを利用するための分子生物学的方法の構築. 第20回ヘルペスウイルス研究会 (2005. 6, 名古屋)
- 2) 野澤直樹, 古谷野伸, 片野晴隆, 福井良子, 山本由美子, 中村幸之助, 小村広美, 筒井祥博, 倉根一郎, 井上直樹: 先天性サイトメガロウイルス感染による感覚器障害の実態把握及びモルモット感染モデルを用いた障害発生機序解明のための緑色蛍光蛋白を発現する組換え体ウイルスの作製. 第9回日本神経ウイルス研究会 (2005. 6.11, 浜松)
- 3) Fukui Y, Yamamoto Y, Yanagi M, Nozawa N, Kurane I, Inoue N: Establishment of a sensitive reporter cell line for human cytomegalovirus. 30<sup>th</sup> International Herpesvirus Workshop IHW2005 (2005. 7. 30-8. 4, Finland)
- 4) Nozawa N, Katano H, Nakamura K, Fukui Y, Yamamoto Y, Tsutsui Y, Kurane I, Inoue N: Construction and application of a recombinant guinea pig cytomegalovirus expressing green fluorescent protein for analyses of the mechanisms of congenital cytomegalovirus infection. 30<sup>th</sup> International Herpesvirus Workshop IHW2005 (2005. 7. 30-8. 4, Finland)
- 5) Wang GQ, Yamamoto Y, Fukui Y, Nozawa N, Takayama M, Schmid DS, Kurane I, Inoue N: Characterization of VZV promoters and development of reporter cell lines for VZV. 12<sup>th</sup> International Conference on Immuno-

biology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections (2005. 10. 6-8, Osaka)

- 6) Nozawa N, Suzutani T, Omori K, Koyano S, Fukui Y, Baba Y, Ogawa H, Yamamoto Y, Yanagi M, Komura H, Kurane I, Inoue N: Development of novel diagnostic assays for human cytomegalovirus(HCMV)infection and their applications. 12<sup>th</sup> International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections (2005. 10. 6-8, Osaka)
- 7) Nozawa N, Katano H, Nakamura K, Fukui Y, Yamamoto Y, Tsutsui Y, Kurane I, Inoue N: Molecular and pathological characterization of guinea pig cytomegalovirus infection. 12<sup>th</sup> International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections (2005. 10. 6-8, Osaka)
- 8) 井上直樹, 野澤直樹, 倉根一郎: ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 及び水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) の力価の迅速測定用レポーター細胞の樹立. 第53回日本ウイルス学会学術集会 (2005. 11. 20-22, 横浜)
- 9) 野澤直樹, 片野晴隆, 筒井祥博, 倉根一郎, 井上直樹: モルモットサイトメガロウイルス感染動物モデルを利用するための分子生物学的方法の構築と緑色蛍光蛋白質を発現する組換えウイルスの作製. 第53回日本ウイルス学会学術集会 (2005. 11. 20-22, 横浜)

## F. 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



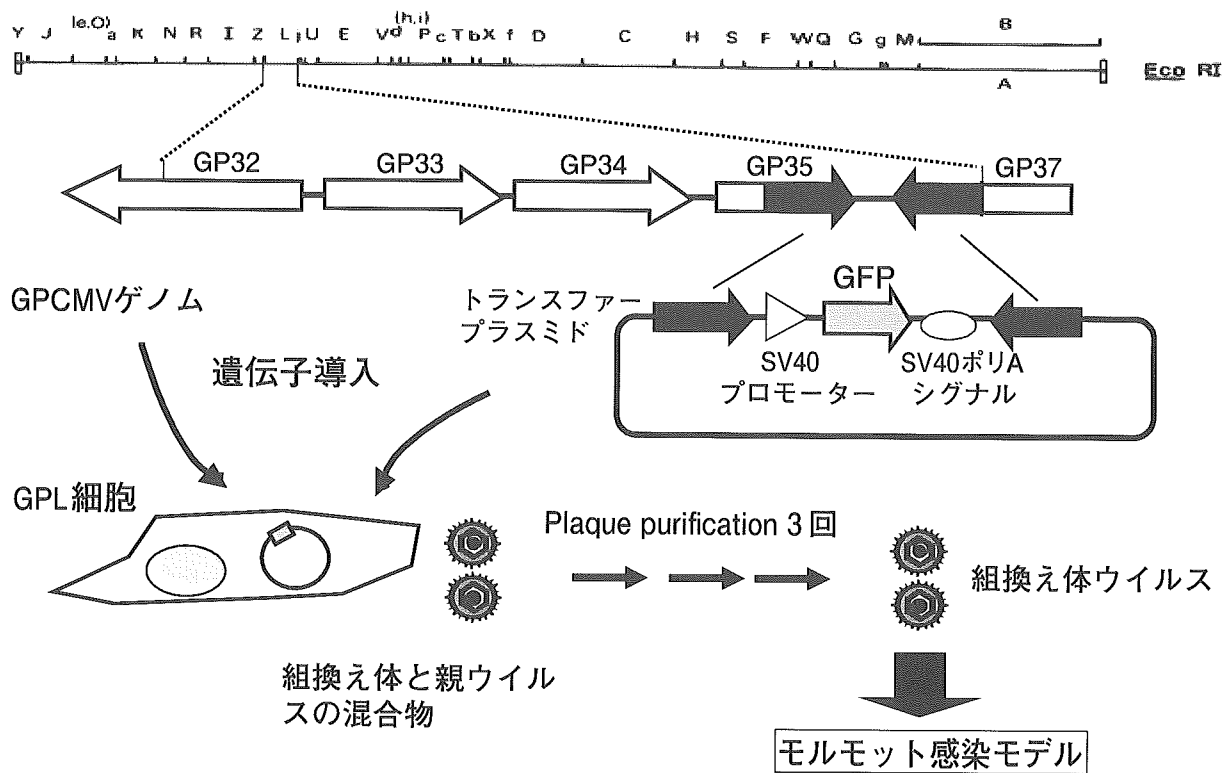


図1 緑色蛍光蛋白（GFP）を発現する組換え GPCMV の構築デザイン

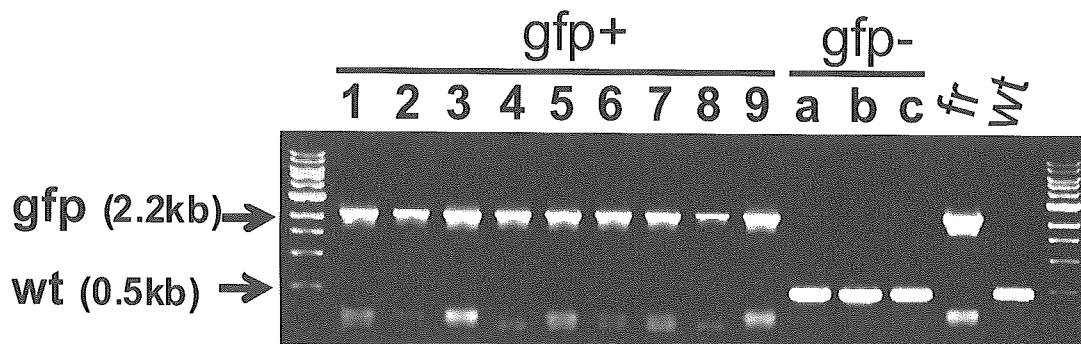


図2 緑色蛍光蛋白（GFP）を発現する組換え GPCMV 候補クローンのPCRによる確認

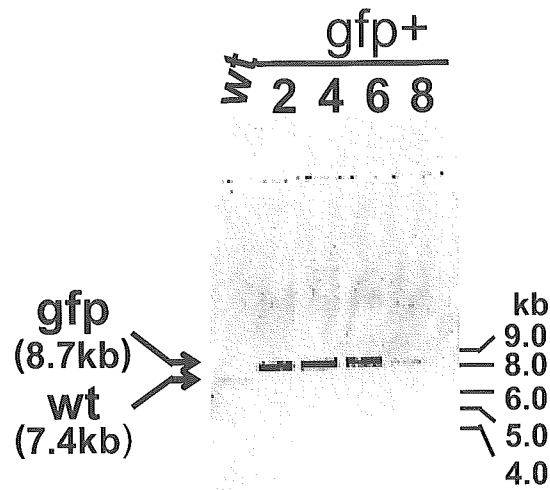


図3 緑色蛍光蛋白（GFP）を発現する組換え体 GPCMV のゲノム構造のサザンブロット法による確認

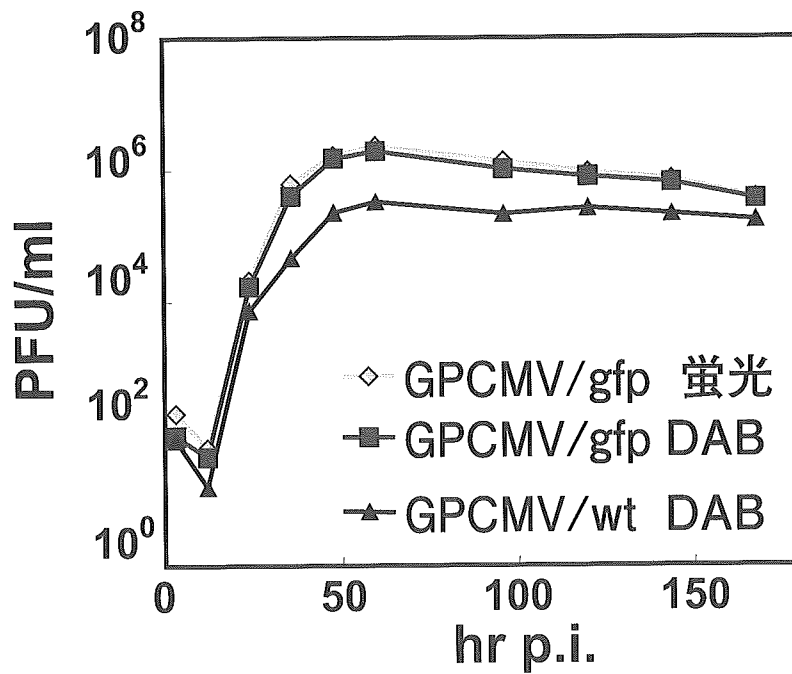


図4 緑色蛍光蛋白（GFP）を発現する組換え GPCMV の培養細胞での増殖性

## 小動物における ABR 検査の実際

分担研究者 小川 洋（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）  
研究協力者 岡野 渉（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）  
研究協力者 佐藤 聡（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）

### 研究要旨

実験動物の聴力障害の程度を評価する方法の一つに聴性脳幹反応（ABR）を用いる方法がある。聴性脳幹反応を安定して正確に記録するためには、検査機器の整備と検査方法に習熟することが必要である。昨年度はモルモットにおける ABR の測定を行ったが、本年度はより小さな個体であるマウスを用いて実際の ABR 記録の装置を整備し ABR の記録を行った。

### A. 研究目的

先天性 CMV 感染による聴覚障害の発症機序を解明するためには、CMV 感染小動物を用いた他覚的聴力検査が必須である。この研究の目的は、聴性脳幹反応（ABR）を安定して正確に記録するシステムを構築することであり、検査機器の整備、検査方法の習熟が必要不可欠である。本年度は最新の ABR 検査装置、電気シールド防音室を整備し、実際にコントロールとして感染していない小動物の ABR の記録を行った。

### B. 研究方法

#### I. ABR を計測する際に必要な機器、環境の整備

ABR を計測するためには刺激音発生装置と ABR 検査装置が必要である。刺激発生装置は powerlab (AD Instruments 社製、オーストラリア) を用い、刺激音は tone burst を用いスピーカーは Tucker Davis 社製 ES1。ABR 検査装置は Tucker Davis 社製（オーストラリア）、sound level meter は Ono Sokki LA511、amplifier は GRASS P55 を用いた。できるかぎり電磁波などの影響の少ない環境とするために、金網で囲まれた聴力検査室において、動物、アイソレーター準備しアースをとり測定した。

#### II. ABR 記録法（麻酔、電極の取り付け）

動物に対して、ジエチルエーテルで吸入麻酔後、フェントバルビタール（商品名：ネンプタール）を 30mg/kg で腹腔内投与し図 1 のように電極を刺入し、音刺激（刺激音は 20,000Hz の tone burst）を与え、ABR を測定した。

#### （倫理面の配慮）

実験動物の取り扱いに関しては福島県立医科大学動物実験ガイドラインに沿って、愛護的に行った。

### C. 研究結果

刺激音の周波数は 20,000Hz で刺激音圧は 76.5dB SPL から 36.5dB SPL まで変化させ、ABR を測定した。そのうち、図 1（1-1~1-4）に 76.5dB SPL、66.5dB SPL、51.5dB SPL、36.5dB SPL における ABR の波形を示す。音圧の低下とともに I から III 波の波形が小さくなり、36.5dB の刺激音圧では I から III 波は消失している。

### D. 結論

本装置を用いることにより、マウスの ABR を安定して記録することが可能であった。CMV 感染モデルにおける聴力の評価、聴力障害の程度を推察することが可能であると考えられた。本装置を用いることにより、今後は CMV 感染をしたモルモット、マウスの感染実験系を用い、ABR を計測し、聴覚障害の評価が可能である。

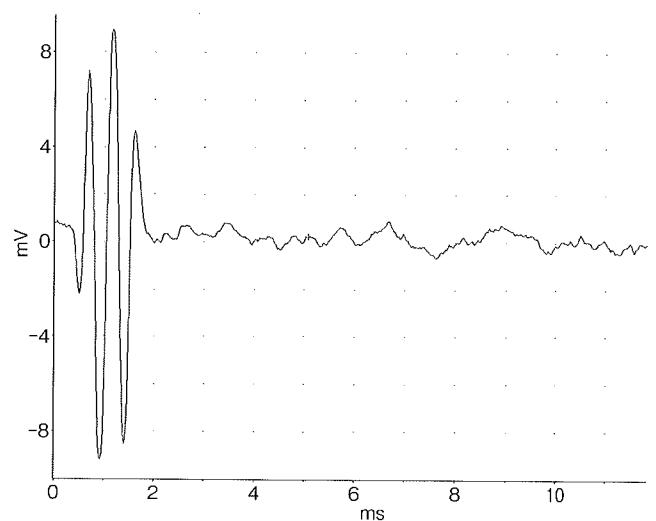


図 1 - 1 76.5dB SPL

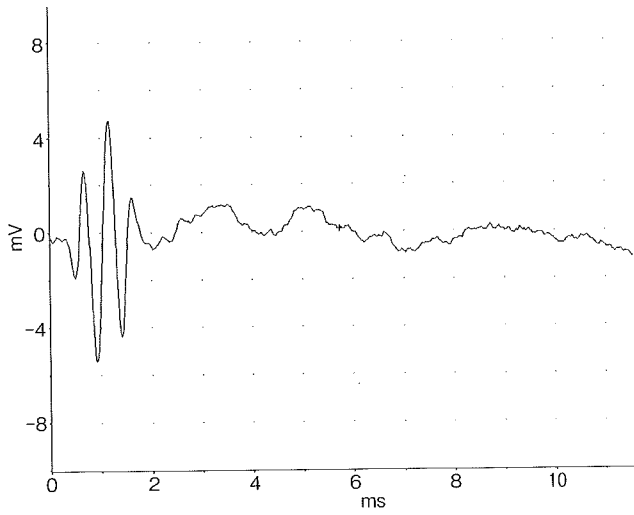


図1-2 66.5dB SPL

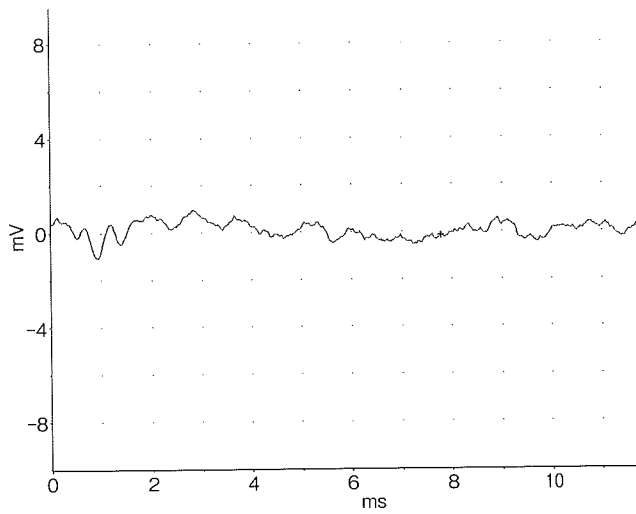


図1-3 51.5dB SPL

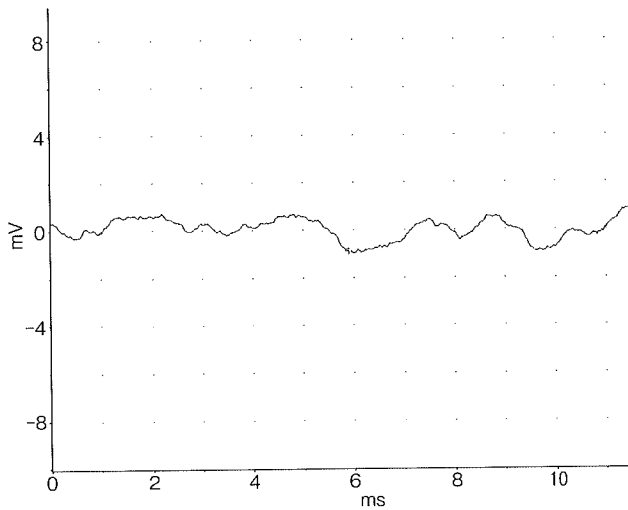


図1-4 36.5dB SPL

## E. まとめ

当科における小動物に対する ABR 測定の実際について報告した。小動物に対する ABR 評価のための聴力検査システムを整備した。

## F. 研究発表

なし

## G. 知的財産の出願・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