

については、既に欠損しても培養細胞レベルではなんら影響がなく、その一方でマウスでの病原性を著しく低下させることから、既にV欠損型SeVベクターは安全性の高いベクターとして利用されている。一方、C蛋白質を欠損したウイルスを作成することは可能であるが、大きくウイルス産生量を低下(1/100)し、それとともにベクターとしての機能も著しく低下することから実用的ではない。近年C蛋白質にはインターフェロン(IFN)に対抗する能力があることが判明している。そこで、本研究ではその機能だけを削りIFN感受性状態にしたセンダイウイルスにどの程度の発現能力があるのかを検討し、IFN感受性ベクターの実用性を検証した。

## B. 研究方法

(1) C変異を持つウイルスの作製。

抗IFN活性を失ったCm\* (K<sup>151</sup>A, E<sup>153</sup>K, R<sup>157</sup>L)をSeVのcDNAに導入したプラスミドpSeV/Cm\*を作製した。常法に従って、LLCMK2細胞にT7ポリメラーゼ発現ワクチニアウイルス(vTF7.3)を感染させ、次にpT7-N、-P、-LとpSeV/Cm\*をトランスフェクションし組換えウイルス、SeV/Cm\*、を作製した。得られたウイルスの変異部分については、P遺伝子をRT-PCRにより増幅し、その塩基配列により確認した。

変異ウイルスの抗IFN活性の有無は、次のように確認した。HeLa細胞を12穴プレートに均一になるように準備し、そのままあるいは、親株SeVまたは変異SeV/Cm\*を感染させて4時間後にヒトIFN-βを0、10<sup>1</sup>、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup> IU/mlで12時間処理する。その後、水疱性口内炎ウイルス(VSV)を細胞あたりの感染価5で重感染させ、VSVがHeLa細胞で増殖するか否かを24時間後に細胞内のVSV蛋白質発現量により判定した。

(2) IFN対抗能を失ったSeVの培養細胞での増殖性とウイルス蛋白質発現

直径5cmのプレートに均一になるように2fTGH細胞とU3A細胞(2fTGH細胞に由来しSTAT1を欠損した細胞株)を増殖させ、細胞あたりの感染価5で親株SeVまたは変異SeV/Cm\*を感染させ、細胞内ウイルス蛋白質を抗SeV抗体による免疫プロットで、培養上清中のウイルス量をCIUアッセイ(細胞感染価測定法)で測定した。

(3) IFN対抗能を失ったSeVのマウスでの病

原性

5週齢の129S6マウス(002045-M, Taconic Farms Inc.)を購入して実験に使った。麻酔下で10<sup>7</sup>/25 μlの親株SeVまたは変異SeV/Cm\*を経鼻的に感染させた。毎日マウスを観察して体重を測定し、症状が現われたマウスは重篤化する前に安楽殺した。肺の病変は、肉眼的に肺の1/4がピンク色から赤に変わっていた場合には「1」、2/4の場合には「2」、3/4の場合には「3」、4/4(全域)の場合の場合には「4」と記録した。肺内のウイルス量を測定するには、採取した肺を冷やした1mlのDMEMと共にガラスホモジナイザーで壊し、1500xgで20分間遠心した上清をウイルス力価測定に用いた。

## C. 研究結果

(1) 抗IFN能の無いウイルスの作製。

Cm\* (K<sup>151</sup>A, E<sup>153</sup>K, R<sup>157</sup>L)変異を持つウイルスを作製した。CV1細胞で親株SeVと変異SeV/Cm\*にブラックを作らせると、親株SeVのブラックに比べてSeV/Cm\*のブラックは縁辺部の明瞭性に乏しいブラックを形成した(図2)。

作製したSeV/Cm\*が確かに抗IFN能を失っているか否かを確認するためにHeLa細胞にSeV感染させ、その後にIFNを作用させてそのIFNの効果が先に接種されていたSeVにより無効化されたか否かを、最後に重感染させるVSVが増殖できるか否かで評価した(図3)。SeV重感染(mock)の細胞にIFNを0~10<sup>3</sup> IU/mlで処理すると、0または10<sup>1</sup> IU/mlでは細胞内でVSVが増え、VSV蛋白質の産生が細胞内に認められる。しかし、10<sup>2</sup> IU/mlではVSV蛋白質の量が少なくなり、10<sup>3</sup> IU/mlではほとんど何も見えなくなり、IFNの抗ウイルス効果を観察することができる。同じ条件下で、IFNよりも先に親株SeVを感染させておくと、IFNを10<sup>3</sup> IU/mlで処理してもVSV蛋白質は認められ、IFNの抗ウイルス効果がSeVにより発揮されない。SeV/Cm\*を予め感染させたHeLa細胞にはIFN処理を行い、VSV重感染させたところ、濃度に関係なくすべての実験群でVSV蛋白質が認められず。SeV/Cm\*を感染させただけでIFNが産生され、細胞が抗ウイルス状態になった(図3)。このことから、Cに変異を加えたSeV/Cm\*は、IFN抵抗能力を失った株であることが確認された。

(2) IFN対抗能を失ったSeVの培養細胞での増殖性とウイルス蛋白質発現。

外来遺伝子を長期に発現させる安全なSeV

レプリコンには最低限 N、P、L 遺伝子があればよい。P 遺伝子に同じくコードされる C 蛋白質の抗 IFN 能は、ウイルスによる蛋白質発現にとってどれほどの意味を持つのかを評価する目的で、2fTGH 細胞に、感染価 5 で親株 SeV と変異 SeV/Cm\* を感染させ、細胞内ウイルス蛋白質量を比較した(図 4)。どちらの感染細胞も感染後 6 時間目ではウイルス蛋白質の発現は検出限界以下であるが、12 時間目から検出されようになった。このときに、親株と変異ウイルスの間で大きな違いはなかった。親株ではそれ以降 12 時間目以降、蛋白質発現量が 24 時間目まで徐々に増加するのに対して、変異ウイルスは 12 時間目のレベルからやや親株に比べて低い傾向を示した。抗 IFN 能を持たないからといって極端に遺伝子発現が低下したわけではなかった。

細胞の培養上清中のウイルス量を測定すると親株と変異ウイルスはどちらも感染後 24 時間目に最大値を示し、36 時間目には減少した。変異 SeV/Cm\* は増殖速度が単純に遅いのではなく、増殖の経過は親株と同等だが最大量が少ないことがわかった。24 時間目と 36 時間目の培養上清中のウイルスの差はおおよそ 1/10-1/20 であった(図 4)。

(3) IFN 対抗能を失った SeV のマウスでの病原性

個体での評価を行うために親株 SeV と変異 SeV Cm\* をマウスに経鼻感染させた(図 5)。親株 SeV は接種後 1 日目から高いウイルス価を示し、それが維持されていた。マウスの肺病変は、感染後 5 日目には肉眼的に肺の半分を超える病原度 3 に達し、7 日目には症状の程度から安楽殺を行い、肺を観察したところ肺全体にわたる病変(病変度数 4)が認められた。ところが一方、変異 SeV Cm\* は観察期間中まったく肉眼的な肺病変が認められなかった(病変度数 0)。接種したウイルスは肺でほとんど増える事がなく低下を続け、接種後 3 日目以降は検出限界以下になった。変異 SeV Cm\* は、マウスで増殖性を失い、まったく病原性が無いウイルスであった(図 5)。

#### D. 考察

SeV ベクターは、当初ウイルスのゲノムをすべて残したままで、外来遺伝子を付加的に挿入する自立増殖型としてスタートした(図 1)。この自立増殖型は、本来の SeV の性質を引き継いで広範囲な細胞で、多量の外来遺伝子産生が可能である。しかし、単純にベク

ターを物質生産目的で使用するのであれば、増えたウイルスが他に広がり得るという性質は閉鎖環境を使うことにより克服可能であるが、特定の細胞でだけ発現させたい、あるいは、開放的な環境で使用し、周りにばらまく危険性があるとする自立増殖型ベクターでは不都合である。そこで、ウイルスゲノムの転写複製に関係しない遺伝子を除き、それらをヘルパー細胞株から供給するという方法を使って、自立増殖できない欠損型ベクターを作ることが可能であった。この欠損型ベクターは、M、F、HN 遺伝子を単独、あるいはいずれか二つ、あるいは三つ同時に除いた形になっている(図 1)。最低限ゲノムの転写と複製に必要な N、P、L 遺伝子を残したレプリコンの状態に細胞質内発現ベクターとして使うことができる。しかし、P 遺伝子からは、P 蛋白質の他に、V と C 蛋白質が産生され、それらの蛋白質の機能がベクターの安全性にどのように関わるかを検証する必要がある。すでに V 蛋白質については、培養細胞で用いる限りは不必要であることが分かっている一方で、C 蛋白質の欠損はウイルス増殖が大きく損なわれ除く事ができないことも分かっている。そこで、本年度の研究では、最近研究が進んだ C 蛋白質の抗 IFN 機能解析を基に、C 蛋白質が機能上除くことができないのならば、抗 IFN 能だけでもピンポイントで除けないかを検討した。

ウイルスが細胞に感染すると数時間以内に IFN が分泌され、細胞が抗ウイルス状態になることが知られている。もしウイルスベクターに抗 IFN 能を残したまま使用した場合には、新たなウイルス感染に対して細胞が無防備な状態に置かれることになる。もし、このようなベクターを使用するならば、恒に”ウイルスベクターによる恩恵”と”抗ウイルス作用が働かないことによる危険”を天秤にかけて使わざるを得ない。その点で、SeV の C 蛋白質にある抗 IFN を除けるか否かの検証には意味がある。

培養細胞においては親株 SeV と変異 SeV Cm\* の増殖性の差は、おおよそ 1/10-1/20 となり、若干の低下が認められた。本来的に高い発現量を持つ SeV においては、この程度の低下はベクターの使用条件として実用上大きな問題点にならないと思われた。一方、マウスに経鼻的に接種した変異 SeV Cm\* は、ほとんど肺で増えることがなく接種後数日後には肺内のウイルス量が検出限界以下に低下した。これは、個体において IFN 系の自然免疫シス

テムが生体防御上非常に重要な意味を持つ事を示している。

細胞で SeV ベクターを発現させる場合には、C 蛋白質の抗 IFN 能を欠損させてもそれほど大きな欠点にならず、むしろ開放環境中にベクターを利用する際にもし環境中ベクターが飛散したとしても安全性向上に役立つものと思われた。しかし、SeV ベクターを感染により個体に投与することを意図するなば、SeV C 蛋白質の抗 IFN 能欠損は、簡単に生体から排除されてしまうのでベクター機能にとっては致命的欠点になると思われた。

#### E. 研究発表

##### 論文発表

1. Kato, A., K. Kiyotani, T. Kubota, T. Yoshida, M. Tashiro, and Y. Nagai. Importance of anti-Interferon capacity of the Sendai virus C protein for pathogenicity in mice J. Virol. 81: (in press, 2007)
2. Kiyotani, K., T. Sakaguchi, A. Kato, Y. Nagai, T. Yoshida. Paramyxovirus Sendai virus V protein counteracts innate virus clearance

through IRF-3 activation, but not via interferon, in mice. Virology 359: 82-91 (2007)

3. Fujit, S., A. Eguchi, J. Okabe, A. Harada, K. Sasaki, N. Ogiwara, Y. Inoue, T. Ito, H. Matsuda, K. Kataoka, A. Kato, M. Hasegawa, and M. Nakanishi. Sendai virus-mediated gene delivery into hepatocytes via isolated hepatic perfusion. Biol Pharm Bull. 29(8): 1728-1734 (2006)
4. Goto, T., M. Morishita, K. Nishimura, M. Nakanishi, A. Kato, J. Ehara, and K. Takayama. Novel mucosal insulin delivery systems based on fusogenic liposomes Pharmaceutical Research 23: 384-391 (2006)
5. 加藤 篤 シンプル微生物学 改訂第4版 パラミクソウイルス 東 匡伸、小熊恵二 編集 pp269-272 南江堂 2006年5月

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

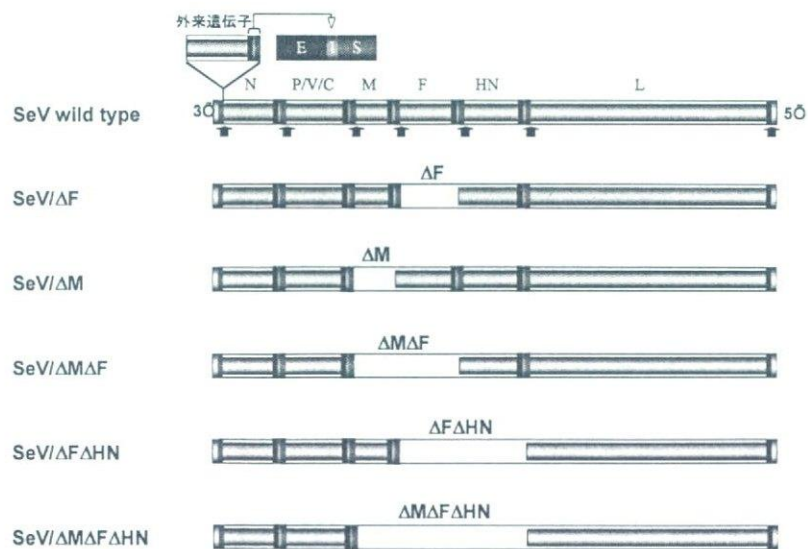


図1. SeV のゲノム構造とその型

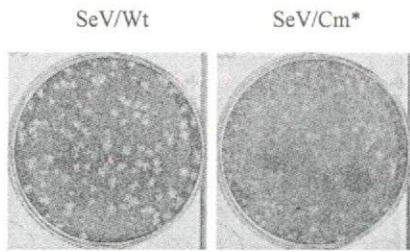


図2. 親株SeVと変異SeV/Cm\*のプラークの形状

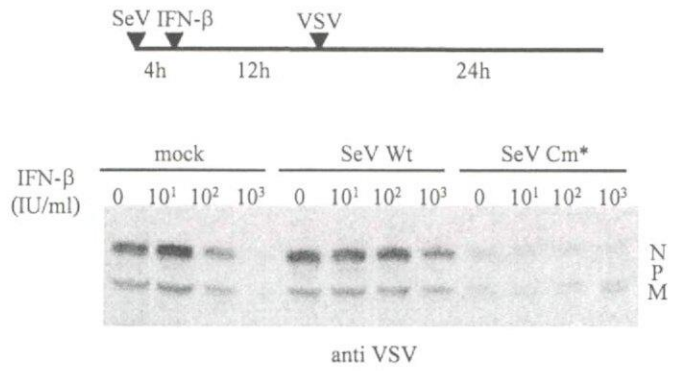


図3. 親株SeVと変異SeV/Cm\*の抗IFN能

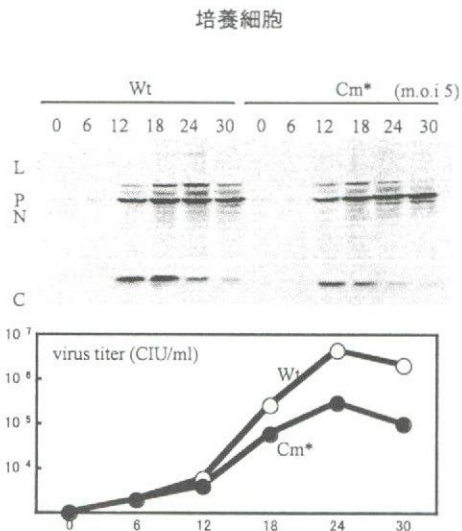


図4. 親株SeVと変異SeV/Cm\*の培養細胞での増殖

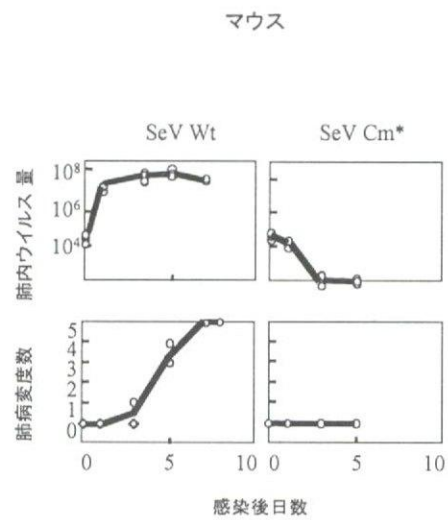


図5. 親株SeVと変異SeV/Cm\*のマウスでの増殖

## 麻疹ウイルスベクターの開発および応用に関する研究

分担研究者：加藤 篤（国立感染症研究所 ウイルス第三部）  
研究協力者：竹田 誠（九州大学 大学院 医学研究院 ウイルス学）

**研究要旨：**麻疹は、人類の代表的な急性ウイルス感染症である。発展途上国を中心に年間約3000万人の罹患者と数十万人の死亡例が報告されているが、有効かつ安全性の高い弱毒生ワクチンが開発されており、適切な使用により、確実に予防することが可能である。麻疹ウイルス弱毒生ワクチンは、その効果、安全性ともに極めて優れたものであるが、それらの性質を担う分子生物学的基盤は、あまり分かっていない。われわれは、麻疹ウイルスを極めて効率よく遺伝子操作する（組換えウイルスを合成する）技術を開発した。その技術を応用することにより（1）ワクチン株の弱毒化、野生株の病原性発現の分子基盤の解明、（2）系統的に弱毒化した組換え麻疹ワクチンの作出、（3）外来性遺伝子を挿入した多価ワクチンの開発、（4）遺伝子治療や癌治療、さらには、再生医療に応用できるウイルスベクターの開発が可能である。われわれは、これまでにワクチン株の培養細胞馴化や弱毒化に関わる多くの変異と、その意義について明らかにした。さらに、麻疹ウイルスゲノムを分節化するという新たな発想で、最大、5つの外来遺伝子を同時に発現することができる麻疹ウイルスの合成に成功し、ゲノム分節技術を応用した新規ベクターの開発に取り組んでいる。

### A. 研究目的

麻疹ウイルスは、パラミクソウイルス科のモルビリウイルス属に属するウイルスである。ヒトのみを自然界での感染宿主とするウイルスで、急性の全身感染を引き起こす。極めて有効かつ、安全性の優れた生ワクチンが開発されているが、そのようなワクチン株の性質を規定する分子生物学的基盤は、ほとんど分かっていない。本研究では、（1）組換え麻疹ウイルスを合成するための効率のよい技術を開発すること、（2）生ワクチン株の性質を規定する分子生物学的基盤を明らかにすること、（3）麻疹ウイルスの小動物モデルを開発すること、（4）多数の外来性遺伝子を挿入することができる麻疹ウイルスベクターを開発すること、（5）麻疹ウイルスベクターの応用性を明らかにすることを目的に実験を行った。

### B. 研究方法

（1）高効率組換え麻疹ウイルス合成系の開発に関して

2000年にわれわれは、野生株本来の性質を維持した麻疹ウイルスを合成する系の開発に成功している(Takeda et al., J. Virol. 2000)。その系の開発により、麻疹ウイルスゲノムの各領域や蛋白質の本来の機能を、感染性ウイルスを用いて、さらには動物モデルを用いて解析する道が開けた。しかし、2000年に開発した系は、cDNA からウイルス合成に至る効率が非常に低く、弱毒（増殖能力の低い）ウイルスの合成が困難であり、研究を推進する上で非常に問題があった。効率の良い系を樹立するためには、組換えワクシニアウイルスを用いて多量の T7RNA ポリメラーゼを発現することが必要であると考えられるが、その場合には、ワクシニアウイルスによる細胞傷害や、

ワクシニアウイルス自身の増殖が問題になる。そこでわれわれは、ワクシニアウイルスが、CHO 細胞内では中期遺伝子の翻訳ができず、後期遺伝子蛋白を発現できないという特性に着目し、T7RNA ポリメラーゼを初期遺伝子用のプロモーター下に組み込んだ組換えワクシニアウイルス vTF7-3 を用いた新たな系の開発を行った(Takeda et al., *Virus Res* 2005)。さらには、安全性への配慮から、用いるワクシニアウイルスを WR 株というヒトへの病原性の有無が明確ではない株を親株とした vTF7-3 から、天然痘撲滅の際に実際に利用されてきた Lister 株を親株とした LO-T7-1 株に置き換えた系の開発を行った(Nakatsu et al., *J Virol Methods* 2006)。ワクシニアウイルスは、CHO 細胞内では増殖しないにもかかわらず、CHO 細胞に依然として中等度の細胞傷害を起こし、数日後には死滅させる。われわれは、その細胞死がアポトーシスによって引き起こされていることを見だし、カスパーゼ阻害剤を利用することにより麻疹ウイルス合成効率の向上を試みた(Takeda et al., *J Virol* 2006; Nakatsu et al., *J Virol Methods* 2006)。VV5-4 細胞は、非増殖性の組換えレトロウイルスによりある特定の遺伝子がノックアウトされた変異 CHO 細胞である。ワクシニアウイルスは、VV5-4 細胞内では、ゲノム複製も中期遺伝子の転写も行うことができず、初期遺伝子の翻訳までしかできない。われわれは、VV5-4 細胞を用いることにより、麻疹ウイルスの合成効率がさらに高まると考え、VV5-4 細胞を用いた系の開発を行った(Takeda et al., unpublished observation)。

(2) 生ワクチン株の性質を規定する分子生物学的基盤の解析に関して

開発した麻疹ウイルスの遺伝子操作系(合成系)を利用して、ワクチン株と野生株とのさまざまな遺伝子領域を組換えたキメラウイルスを、約 20 種類作製した(Tahara et al. *J Virol* 2005)。作製したウイルスをさまざまな培養細胞へ感染させ、その増殖能を解析することにより、生ワクチン株が、さまざまな培養細胞で増殖できるという性質を規定している遺伝子領域を調べた。また、H 遺伝子、M 遺伝子については、点変異を導入した多数の変異ウイルスを作製し、ワクチン株の性質を規定するアミノ酸変異の同定を試みた(Tahara et al. *J Virol* 2005; Seki et al., *J Gen Virol* 2006; Tahara et al., *J Virol* 2007)。さらに、それらの変異が、H 蛋白や M 蛋白の機能にどのような変化をもたらすことにより、ウイルスの増殖性

を変化させているのかについて解析を行った(Tahara et al., *J Virol* 2007; Tahara et al., unpublished observation)。

ワクチン株と野生株との間には、多くの塩基置換がみられるが、中でも P、V、C 蛋白をコードしている P 遺伝子、そして、M と F 遺伝子に存在する各々約 500 と 700 塩基の蛋白非翻訳領域に変異の集積がみられる。そこで、われわれは、それらの遺伝子領域の機能を明らかにすることを目的に、蛋白質発現をノックアウトした変異ウイルス、あるいは、遺伝子領域を欠失させた変異ウイルスを作成し、それら変異ウイルスの性質の解析を行った(Takeuchi et al., *J Virol* 2005; Takeda et al., *J Virol* 2005; Nakatsu et al., *J Virol* 2006)。

(3) 麻疹ウイルスの小動物モデルの開発に関して

麻疹ウイルスの自然界での感染宿主はヒトのみであり、実験的にもサル以外の動物には感染しない。霊長類以外の動物に感染できない主な理由は、麻疹ウイルスが感染に用いることができる受容体をそれらの動物がもたないためである。そこで麻疹ウイルスの受容体であるヒト SLAM 分子を発現するノックインマウスを作成し、その遺伝子改変マウスの麻疹ウイルスへの感受性について検討した(Ohno et al. *J Virol* 2007)。

(4) 多数の外來性遺伝子を挿入することができる麻疹ウイルスベクターの開発に関して

麻疹ウイルスのゲノムは、約 16k の非分節マイナス鎖 RNA である。遺伝子発現機構の性質上、搭載できる遺伝子の数、ゲノム長には限界があり、多数の外來性遺伝子の挿入や、長い外來性遺伝子の挿入は、比較的困難である。また、そのような挿入ができた場合でも、ウイルスの増殖能が極端に低下してしまうため、ベクターとしての利用には不向きである。われわれは、麻疹ウイルスの粒子の多くが、複数本のゲノムを取り込むという性質に着目し、非分節の麻疹ウイルスのゲノムを、複数本の短い分節に分けることにより、多数の外來性遺伝子や、長い外來性遺伝子を搭載できるのではないかと考え、2 分節、3 分節、そして 6 分節のゲノムをもつ麻疹ウイルスの合成を試みた。また、その各々には、4、6、12 箇所転写ユニットを新たに追加し、それら転写ユニットの各々 2、5、6 箇所にレポーター遺伝子の挿入を行い、それら分節ゲノムウイルスの増殖能や外來性遺伝子の発現能について解析した(Takeda et al., *J Virol* 2006;

Takeda et al., unpublished observation).

### (5) 麻疹ウイルスベクターの応用性の研究について

現在、分節ゲノム麻疹ウイルスに外来性抗原を複数個発現させ、SLAM ノックインマウスに感染させることにより、免疫誘導能の有無についての解析を計画している。また、ウイルス増殖に不可欠なH蛋白の発現を欠く分節ゲノム(多遺伝子搭載型)麻疹ウイルスを作成し、遺伝子治療や再生医療用ベクターとしての有効性への検討を進めている。

## C. 研究結果

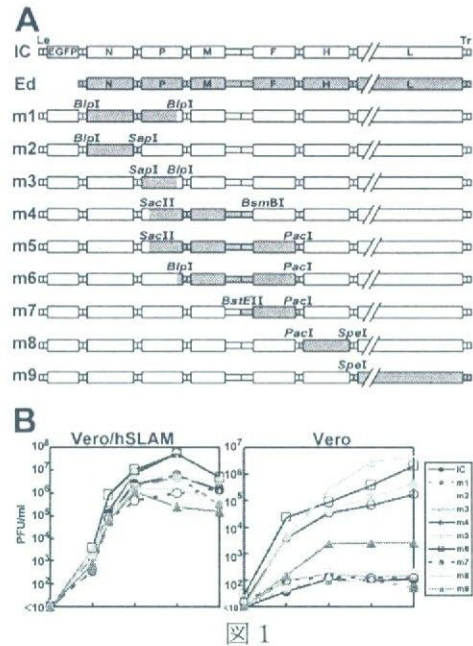
### (1) 高効率組換え麻疹ウイルス合成系の開発に関して

VV5-4 細胞、組換えワクシニアウイルス vTF7-3、カスパーゼ阻害剤を利用することにより、従来の系(2000年開発のもの)と比べて、約 1000 倍効率よく麻疹ウイルスを合成できる系を開発した。本方法では、3.5cm 径の培養皿に撒いた約  $10^6$  細胞のうち、300 から 1000 個の細胞が、導入された cDNA から感染性の麻疹ウイルスの合成を開始できる。われわれの研究室では、これまでに 100 回以上、様々な組換えウイルスの合成を試みているが、ウイルス合成に失敗した例はなく、ウイルス合成の成功率は 100%である。一方、安全性の面を配慮して、われわれは、vTF7-3 の代わりに LO-T7-1 を用いた系を開発した。LO-T7-1 を利用する場合には、VV5-4 細胞を用いるよりも、通常の CHO 細胞(この場合、麻疹ウイルスの受容体 SLAM を発現した CHO/hSLAM を利用する)を用いる方が効率が良いことが分かった。この場合、VV5-4 細胞と vTF7-3 を用いた系と比べると数倍効率が低下するものの依然として、ウイルス回収の成功率は 100%である(Takeda et al., *Virus Res* 2005; Takeda et al., *J Virol* 2006; Nakatsu et al., *J Virol Methods* 2006; Takeda et al., unpublished observation)。

### (2) 生ワクチン株の性質を規定する分子生物学的基盤の解析に関して

麻疹ウイルス野生株は、限られた免疫系の細胞でしか増殖できない。その主な理由のひとつは、野生株の受容体である SLAM の発現がそれらの細胞に限られているからである。一方、麻疹ウイルスワクチン株は、ヒトやサルほとんど全ての細胞株で効率よく増殖できる。われわれは、そのようなワクチン株の

広い細胞指向性は、受容体への結合蛋白である H 蛋白、そして、粒子形成にかかわる M 蛋白、そして、ポリメラーゼ機能を持つ L 蛋白の変化によって引き起こされていることを明らかにした(図 1)。



H 蛋白の変化により、ワクチン株はヒトの有核細胞の全てに発現している CD46 分子を利用できるようになっている。その性質の変化により様々な培養細胞で増殖できるようになっていることが知られていたが、われわれの研究から、CD46 を効率よく利用するように変化するためには、H 蛋白のアミノ酸の複数個の変異が必要であり、特に N481Y の変異は不可欠で、それに加えて N390I、N416D、T446S、T484N、E492G の変異が関係していることが明らかになった(図 2)。

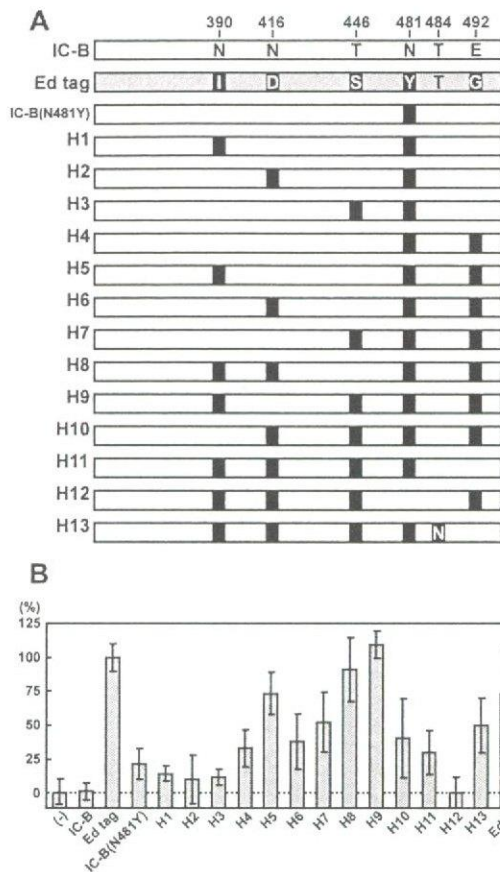


図 2

一方、M蛋白の変化でも、麻疹ウイルスが SLAM の発現の無い細胞で増殖するように変化することが明らかになった。同時に、その変化を規定しているアミノ酸変異は、P64S と E89K であることを明らかにした (図 3)。このふたつのアミノ酸置換によって、M蛋白が H 蛋白の細胞内領域と強く結合するようになり、ウイルスの粒子形成効率を約 100 倍高めることが分かった。この粒子形成効率の向上によって、SLAM が発現していない細胞でも (非効率な侵入を利用して) 麻疹ウイルスが増殖できるように変化することが分かった。一方、これらの変異は、SLAM が発現した本来の宿主細胞での増殖能を低下させることが分かった。その理由は、M蛋白がH蛋白に強く結合することにより SLAM 陽性細胞で引き起こされるH蛋白とF蛋白による膜融合を阻害するためであり、このことが、ワクチン株の弱毒化の一因になっている可能性が示唆された。

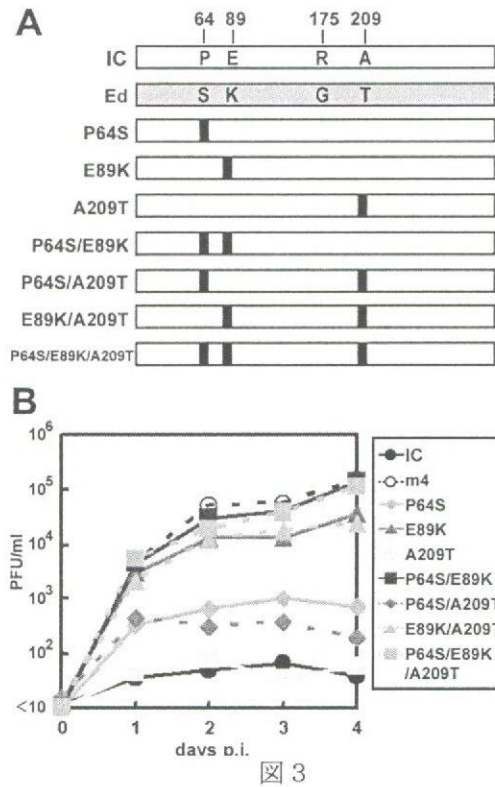


図 3

ワクチン株の L 蛋白も同様に、ワクチン株の様々な培養細胞での増殖にかかわっていることが分かった (アミノ酸の同定には至っていない)。しかし、M蛋白で観察したのと同様に、ワクチン株の L 蛋白は、本来の SLAM 陽性細胞での増殖能の低下を招くようであり、われわれは、ワクチン株の弱毒化との関連に注目している。

C 蛋白の発現を欠いたウイルスの動物 (サル) 感染実験の解析から、C 蛋白が麻疹ウイルスの病原性発現に不可欠であることが明らかとなった。また、培養細胞を用いた詳細な解析から C 蛋白を発現することにより、麻疹ウイルスが宿主の自然免疫 (特に IFN 系) の発動を抑制していることが明らかになった (図 4)。



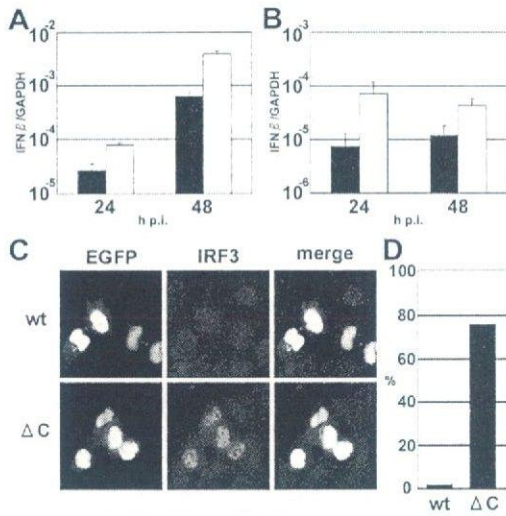


図 4

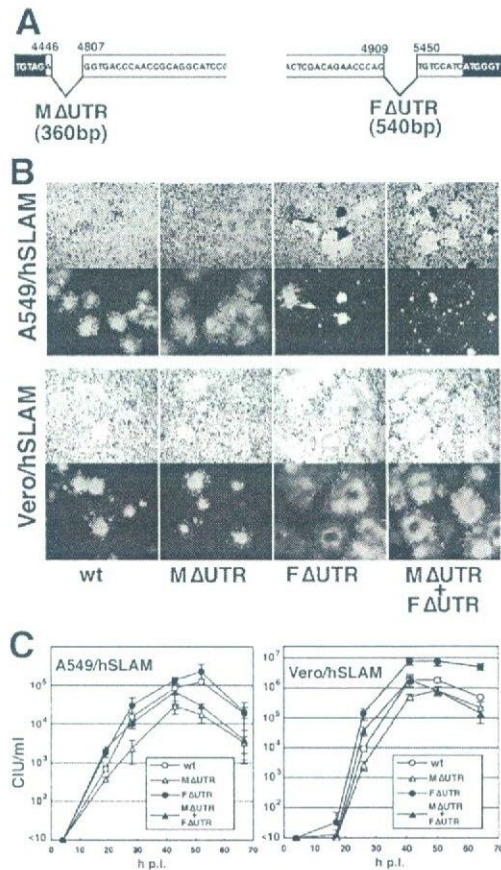


図 5

M、F 遺伝子の非翻訳領域には、おのおの M 蛋白の発現を増強する働き、F 蛋白の発現を抑制する働きがあり、結果としてウイルスの増殖能を維持しつつ、宿主細胞の傷害性を軽減する働きがあることを示した (図 5)

(Tahara et al., J Virol 2005; Tahara et al., J Virol 2007; Seki et al., J Gen Virol 2006; Takeda et al., J Virol 2005; Nakatsu et al., J Virol 2006; Takeuchi et al., J Virol 2005; Tahara et al., unpublished observation)。

(3) 麻疹ウイルスの小動物モデルの開発に関して

ヒトの SLAM 分子は、麻疹ウイルスの受容体であるが、その分子の V ドメインが、麻疹ウイルスの受容体機能に必要十分である。マウスもヒトと同様に SLAM (マウス SLAM) を発現しているが、マウス SLAM に、麻疹ウイルスは結合できない。そこで、われわれは、マウス SLAM の V ドメインだけを、ヒト SLAM のものと置き換えたノックインマウスを作成した。作成したノックインマウスは、健康に生育し、免疫学的にも明らかな異常は認めなかった。ノックインマウスから得た脾臓やリンパ節の細胞に、麻疹ウイルスが効率よく感染することが明らかになった。しかしながら、マウスに直接接種した場合には、麻疹ウイルスは、効率よく増殖することはできなかった。IFN 系は、ウイルス増殖を阻害する宿主側の最も重要な自然免疫機構である。そこで、SLAM ノックインマウスと、IFN 受容体ノックアウトマウスとを掛け合わせ、IFN 受容体ノックアウト SLAM ノックインマウスを作成した。本マウスは、経鼻、経腹腔投与のいずれにおいても麻疹ウイルスへの感受性を示し、全身リンパ系臓器での麻疹ウイルスの増殖と、mitogen 刺激によるリンパ球の増殖を指標としたリンパ球機能の低下を引き起こすことを示した。本マウスを利用することにより、麻疹の病態解明が進むと考える。また、麻疹ウイルスを利用したワクチンやベクター開発に多いに役立つと考えている (Ohno et al., J Virol 2007)。

(4) 多数の外來性遺伝子を挿入することができる麻疹ウイルスベクターの開発に関して

2 分節ゲノム型 2 外來性遺伝子搭載麻疹ウイルス、3 分節ゲノム型 3 外來性遺伝子搭載麻疹ウイルス、および 3 分節ゲノム型 5 外來性遺伝子搭載麻疹ウイルスを作成した。3 種のウイルスともに培養細胞で効率よく増殖し、搭載した外來性遺伝子を効率よく発現した (図 6)。

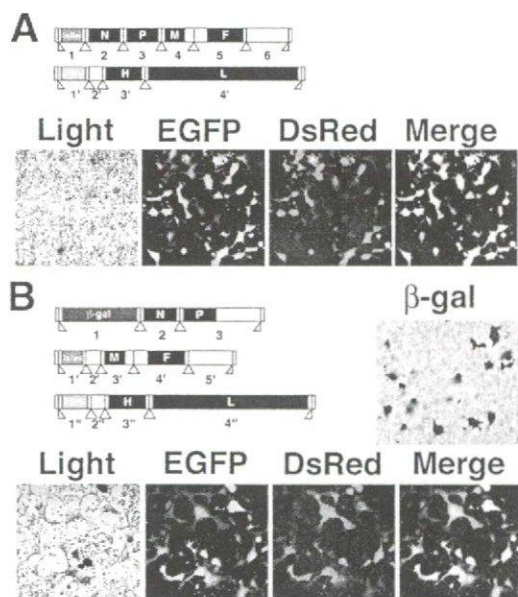


図 6

また、20代の継代後も、外来性遺伝子の発現やウイルスの性質に明らかに変化は認めなかった。6分節ゲノム型6外来性遺伝子搭載麻疹ウイルスの作成を試みた。全てのゲノム分節を同一細胞内で同時に効率よく鋳型活性を有するリボ核蛋白複合体(RNP)にできることが分かり、培養細胞中に麻疹ウイルスに特徴的な多数の巨細胞の形成が起ることを確認した。しかしながら、これら巨細胞からの感染性ウイルス粒子の放出はほとんどなく、ウイルスを継代することはできなかった(Takeda et al., J Virol 2006; Takeda et al., unpublished observation)。

#### (5) 麻疹ウイルスベクターの応用性の研究について

H蛋白を発現プラスミドで供給することによりH遺伝子を欠く2分節ゲノム型2外来性遺伝子搭載麻疹ウイルスの回収に成功した。しかし、プラスミドによるH蛋白の発現では、そのウイルスを継代し、増やすことは困難であった。現在、H蛋白を恒常的に発現する細胞株を作成中である。今後、H遺伝子を欠く、非自己増殖型ベクターのワクチンとしての有効性や、遺伝子治療や再生医療への応用性について検討していく予定である(Takeda et al., unpublished observation)。

#### D. 考察

野生型の性質を維持した麻疹ウイルスを

合成し、組換える技術の開発により、麻疹ウイルスの病原性発現の機構、ワクチン株が弱毒化に至ったその分子生物学的基盤を、生きたウイルスを使って研究することができるようになった。また、われわれの研究により、いまや、麻疹ウイルスを組換えることは極めて容易になり、研究が加速するとともに、研究の領域も大いに広がってゆくと考えられる。

ワクチン株の弱毒化の分子基盤を解明すること、そして、麻疹ウイルスゲノムのさまざまな機能を理解することは、われわれが用いているワクチンを理解し、麻疹ウイルスの病原性発現の機構を知る上で重要であるばかりか、高い有効性と優れた安全性をもつ麻疹ウイルス生ワクチンやそれより得られる知識を、新たなベクターや多価ワクチン開発に利用していく上で大いに役立つであろう。

麻疹の小動物モデルの作成は、麻疹ウイルスの病原性研究や、ワクチンの安全性試験の上でも念願である。SLAM ノックインマウスの開発は、その大きな一歩であると考えている。

麻疹ウイルスのゲノムを分節化するという一見、ウイルスの増殖能に重大な影響を与えそうな改変は、意外にも、ウイルス増殖にとって(少なくとも3分節までは)培養細胞レベルでは大きな問題にはならなかった。むしろ、この改変により、多数の外来性遺伝子の挿入が可能になり、多外来性遺伝子搭載型麻疹ウイルスベクターを構築することが可能になった。麻疹ウイルスを用いたベクターの開発には、いくつかの利点が考えられる。(1)安全性の高い生ワクチン株がある(2)細胞質で増殖し宿主のゲノムに影響を与えない(3)H蛋白を改変することにより特定の細胞へ標的化する技術が確立している、などがあげられる。今後、ワクチン開発や、遺伝子治療、再生医療分野への応用性について、多くの分野の知識を取り入れながら研究を進めていく予定である。

#### E. 研究発表

##### (1) 論文発表

1) Tahara, M., Takeda, M., Seki, F., Hashiguchi, T., Yanagi, Y. Multiple amino acid substitutions in hemagglutinin are necessary for wild-type measles virus to acquired the ability to use receptor CD46 efficiently. J Virol. Dec 20 (2006) [Epub ahead of print]

- 2) Ohno, S., Ono, N., Seki, F., Takeda, M., Kura, S., Tsuzuki, T., Yanagi, Y. Measles virus infection of SLAM (CD150) knock-in mice reproduces tropism and immunosuppression in human infection. *J Virol.* 81: 1650-1659 (2006)
- 3) Nakatsu, Y., Takeda, M., Ohno, S., Koga, R., Yanagi, Y. Translational inhibition and increased interferon induction in cells infected with a C protein-deficient measles virus. *J Virol.* 80: 11861-11867 (2006)
- 4) Nakatsu, Y., Takeda, M., Kidokoro, M., Kohara, M., Yanagi, Y. Rescue system for measles virus from cloned cDNA driven by vaccinia virus Lister vaccine strain. *J Virol Methods.* 137: 152-155 (2006)
- 5) Takeda, M., Nakatsu, Y., Ohno, S., Seki, F., Tahara, M., Hashiguchi, T., Yanagi, Y. Generation of measles virus with a segmented RNA genome. *J Virol.* 80: 4242-4248 (2006)
- 6) Seki, F. Takeda, M., Minagawa, H., Yanagi, Y. The recombinant wild-type measles virus containing a single N481Y substitution in its hemagglutinin cannot use a receptor CD46 as efficiently as that having the hemagglutinin of the Edmonston laboratory strain. *J Gen Virol.* 87: 1643-1648 (2006)
- 7) Yanagi, Y., Takeda, M., Ohno, S. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol.* 87: 2767-2779 (2006)
- 8) Yanagi, Y. Takeda, M., Ohno, S., Seki, F. Measles virus receptors and tropism. *Jpn J Infect Dis.* 59: 1-5 (2006)
- 1) 竹田誠、柳雄介 リバースジェネティクスと麻疹ウイルス 福岡医学雑誌 97: 140-145 (2006)
- (2) 学会発表
- 1) Takeda, M., Hashiguchi, T., Nakatsu, Y., Ohno, S., Seki, F., Tahara, M., Yanagi, Y. Generation of measles virus having segmented RNA genome. 13th International Conference on Negative Strand Viruses. Salamanca, Spain, June 2006
- 2) Takeda, M., Nakatsu, Y., Ohno, S., Seki, F., Tahara, M., Hashiguchi, T., Yanagi, Y. Mononegavirus-derived vectors having genetically engineered three RNA genome segments. Keystone Symposia, Cell Biology of Virus Entry, Replication and Pathogenesis. Santa Fe, New Mexico, USA, February 2006
- 3) Chen, B., Takeda, M., Lamb, R. A. Influenza virus hemagglutinin (H3) requires palmitoylation of its cytoplasmic tail for assembly: M1 proteins of two subtypes differ in their ability to support assembly. Keystone Symposia, Cell Biology of Virus Entry, Replication and Pathogenesis. Santa Fe, New Mexico, USA, February 2006
- 4) Nakatsu, Y., Takeda, M., Ohno, S., Koga, R., Yanagi, Y. The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji Island, Hyogo, Japan, September 2006
- 5) Ohno, S., Ono, N., Seki, F., Takeda, M., Yanagi, Y. The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji Island, Hyogo, Japan, September 2006
- 1) 竹田誠 麻疹ウイルス遺伝子操作系の確立と複製および病原性発現の分子基盤の解析 第54回 日本ウイルス学会 名古屋 2006年11月
- 2) 大野真治、小野伸之、関文緒、竹田誠、柳雄介 ヒト SLAM ノックインマウスの麻疹ウイルス感染の解析 第54回 日本ウイルス学会 名古屋 2006年11月
- 3) 中津祐一郎、竹田誠、木所稔、小原道法、柳雄介 Lister ワクチン株由来 T7 RNA ポリメラーゼ発現組えワクシニアウイルス L0-T7-1 を用いた cDNA からの高効率組換え麻疹ウイルス作出系の確立 第54回 日本ウイルス学会 名古屋 2006年11月
- 4) 中津祐一郎、竹田誠、大野真治、柳雄介 ウイルス感染における麻疹ウイルスCタンパク質の役割 第54回 日本ウイルス学会 名古屋 2006年11月
- 5) 田原舞乃、竹田誠、柳雄介 麻疹ウイルスマトリックス (M) 蛋白質によるウイルス伝播様式の制御機構 第54回 日本ウイルス学会 名古屋 2006年11月
- 6) 田原舞乃、竹田誠、柳雄介 麻疹ウイルスマトリックス (M) 蛋白質によるウイルス増殖の細胞特異性制御機構 第43回 日本ウイルス学会九州支部総会 久留米 2006年9月

7) 中津祐一郎、竹田誠、大野真治、古賀律子、  
柳雄介 麻疹ウイルス C タンパク質による  
IFN経路の阻害 第43回 日本ウイルス学  
会九州支部総会 久留米 2006年9月

F. 知的財産権の出願・登録状況  
発明の名称「分節ゲノム型組換えモノネガ  
ウイルスベクター」  
国際出願日：2006年7月13日

## 現行ワクチンと野外イヌジステンパーウイルス遺伝子系統樹解析及び

### リバーシジェネティクスを用いたベクター開発の試み

分担研究者：加藤 篤（国立感染症研究所 ウイルス第三部）

協力研究者：山口良二（宮崎大学 農学部獣医学科 家畜病理学講座）

研究要旨：ワクチン歴のある3匹の犬から新しく分離されたイヌジステンパーウイルス（CDV）のシークエンスと遺伝子系統樹解析をイヌに使用されたワクチン自身から分離されたワクチンウイルスと同じ解析を行い比較した。3匹の犬は鼻汁、目脂及び下痢等の臨床症状を示し、病理学的には非化膿性脳炎、肺炎、胃腸炎、リンパ球の脱落が見られ日本で最近の流行の主流となる典型的なイヌジステンパー（CD）を示した。封入体は炎症がみられなかった胃に見られ、脳炎が見られても臨床的には症状はなかった。イヌ3匹の諸臓器の最高ウイルス力価は共通して、脾臓、リンパ節、扁桃の全身リンパ系組織であった。新分離はワクチングループと離れてアジア1型のグループ属した。これらの結果から、明確にワクチンウイルスの病原性復帰ではなく、野外株が感染したことがわかり、現在流行しているCDの特徴が示唆された。さらに、近年分離したCDV007Lm株は遺伝子系統樹解析でこれまでにないグループのアジア2型に属し、イヌに対して病原性を保持していることを確認しており、細胞での増殖もかなりいいので、リバーシジェネティクスを用いたベクター作製の対象として開発を試みた。

#### A. 研究目的

イヌジステンパー（CD）は急性又は亜急性の伝染性が高く、しばしば致死性の、呼吸器、消化器、皮膚、神経系に親和性のある全身感染性ウイルス性疾患である。CDはパラミクソウイルス科モルビリウイルス属のマイナス鎖RNA遺伝子イヌジステンパーウイルス（CDV）によっておこる。CDVはイヌやアライグマ、スカンク、キツネを含むイヌ科の動物に感染し、相当野生動物にも浸潤していると思われる。CDは弱毒生ワクチンによって制御されているが、ワクチン接種歴のあるイヌにも日本、ヨーロッパ各国、アメリカでCDが増加してきていることが報告されている。アメリカでは麻疹の流行にもワクチンを接種した若い成人に発生、すなわち、改変生ワクチンを接種後、ワクチン接種後封入体脳炎が発生した報告がある。実験的には証明されていないが、ワクチンを接種したイヌが野外株に感染したのか、ワクチンの病原性が復帰した結果が野外における問題点が残っている。GenBankにある研究室のOnderstepoort株の遺伝子配列とは野外株が異なるという研究は一部でなされているが、これでは、不十分で、実際使用されているワクチン株とCDから新しく分離されたCDV株をシークエンスして比較してこそ感染したものがワクチン株かどうか野外株であるかの

意味がある。この現象が実際にはありそうにはなくてもワクチンの元株からワクチン作製・製造の過程で、細胞順化や動物、細胞による継代によって変化の可能性を確認しておかなければならない。それゆえ、ワクチン接種したイヌから分離したCDVが、接種した弱毒生ワクチンであるか否かを明確にするために、ワクチン自体からウイルスを分離してシークエンスを行った。H遺伝子とP遺伝子を比較に使用した。H遺伝子は親和性や細胞病原性の決定因子であり、P遺伝子はCDV系族のグループ内で最も保存されている。そのために、P遺伝子とH遺伝子は最も系統樹解析を行うのに有用である。

CDの病理学的解析も行われてきた。多くのワクチン接種犬では典型的なCDの臨床症状を示した。我々の経験も含めて日本に見られる近年のCDは主に下痢及び鼻汁と目脂が主症状のように思える。このことをより理解するために、ワクチン歴を有した3匹のCDの特徴を十分に解析し、臨床症状、病理学的所見を記載した。

一般的には、組織内ウイルス抗原分布調査を行うには免疫組織化学的手法を用いる。体内の各臓器のウイルス力価すなわちウイルス量は調べられた報告はない。その理由はCDVの分離や検出にはウイルスの細胞順化が必要であるためにこれまで

定量が不可能に近かったからで、これまでに報告はされていない。組織毎のウイルス抗原分布は免疫組織で調べることができても、臓器ごとのウイルス力価は調べられておらず、これまで、不明であった。我々は新鮮材料臓器から直接ウイルス力価を調べることができることを示した。我々はワクチンと新分離 CDV 株の関連性及びワクチン接種犬の臓器別のウイルス力価を示すことを試みた。

さらに、これまで、分離してきたウイルスの中で、増殖がよく、これまでとは異なるグループで、犬に対して病原性が実験的に確認されているウイルス株 007Lm について全シーケンスを行った後、感染性クローンを作成しリバーシジェネティクスを用いたベクター開発を試みた。

## B. 研究方法

### (1) 動物

ワクチンの接種歴があり、鼻汁目脂及び下痢症状を示す 3 ヶ月齢 3 匹の犬が供与され、犬はそれぞれ、No. 1, 2, 3 と名付けられた。ワクチンは 7 週目と 11 週目に Onderstepoort 株由来のデュラミン 8 (共立製薬株式会社) が使用されていた。

### (2) 病理学的検索と免疫染色

剖検後、標本は 10%ホルマリン固定後パラフィン包埋した。4  $\mu$ m で薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。免疫染色は抗-Nucleoprotein 単クローン抗体及びエンビジョンポリマー (Dako-Japan, Japan) を用いて当研究室の通常の方法で実施した。

### (3) ウイルス分離とタイトレーション

ウイルス分離とタイトレーションは、剖検後の新鮮生材料を収集し、-80°C に保存しておいた。0.2 g の材料を Dulbecco の modified Eagle's MEM にて乳剤を作成して、超音波破碎後遠心した。上清を分離するために 24 穴プレートに準備した犬 SLAM 発現 Vero 細胞 (Vero cell expressing canine signalling lymphocyte activation molecules with tag, Vero-DST 細胞) に感染させた。タイトレーションには 96 穴プレートを用いて 10 倍段階希釈を行い、ウイルスタイターを TCID<sub>50</sub> で表した。

### (4) リバーストランスクリプション (RT) -PCR とシーケンス

CDV 感染 Vero-DST 細胞から Trizol (Invitrogen, CA, USA) を用いて RNA を抽出後、One-Step Pcr kit (AMV) (TAKARA Bio Inc., Japan) を用いて P 遺伝子と H 遺伝子について RT-PCR を行った。それぞれの PCR 産物は 429bp と 2100bp で PCR 精製後、Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems Inc., CA, USA) を用いてシーケンスを行った。シーケンスは Clustal W プログラム (DDBJ) を利用して解析した。系統樹は neighbor-joining 法を使用した

Phylip 95 ソフトウェアパッケージを使用して構築した。

### (5) ヌクレオタイドシーケンス アクセション ナンバー (Genbank database)

P 遺伝子の参照: Yanaka (AB028914), Jujo (AB028916), Hamamatsu (AB028915), Ondestepoort (AF305419), Rockborn (AF181446), SnyderHill (AY286481), Bulgariandog (AF259549), 5804 (AY386315), 01-2689 (AY286488), 01-2690 (AY264266), 01-2663 (AY288308), 01-2676 (AY288309).

H 遺伝子の参照: Onderstepoort (AF378705), Convac (Z35493), SnyderHill (AF259552), Yanaka (D85755), Ueno (D85753), Hamamatsu (D85754), KDK1 (AB025271), Tanuki (AB016776), Dog98-002 (AB025270), Dog5B (AY297453), DogHM-3 (AB040767), Dog26D (AB040766), Dog5VD (AY297454), DogTaiwan (AY378091), 5804 (AY386315), Dogisolate A Den (AF478543), Dogisolate C Den (AF478547), Dog Denmark (Z47761), US89 (Z47764), 01-2689 (AY649446), 01-2676 (AY498692), 01-2690 (AY465925), 00-2601 (AY443350), A75-17 (AF164967).

新分離株の P 遺伝子: Ac96I (AB212959), P94S (AB212960), S124C (AB212961), Vaccine strain (AB212962).

新分離株の H 遺伝子: Ac96I (AB212963), P94S (AB212964), S124C (AB212965), Vaccine strain (AB212966).

### (6) プラスミド

麻疹ウイルスは Dr. Billeter から、BSR T7/5 細胞は Dr. Conzelmann から分与された。麻疹ウイルスのミニゲノムシステムの pBTKII+ をベースとする pMV(+)-323 と pEMC-Pa 及び pEMC-La が用いられた。リバーシジェネティクス作製については結果に並記した。

## C. 研究結果

### (1) 病理学的所見

3 匹の主な病理学的所見は肺炎と時に軽度の胃腸炎 (Table 1) であった。気管支は粘液が見られ、肺ではうっ血は全葉にまた、硬変が多く葉に見られた。胃腸は軽度うっ血とカタルまたは出血性変化が見られた。組織学的には病巣は気管支または肺胞上皮内に好酸性細胞質内封入体を有する気管支-間質性肺炎からなった (Fig. 1 a); 免疫組織では CDV 抗原が細気管支内またはその周囲で陽性であった (Fig. 1 b)。リンパ組織ではリンパ球の脱落は中程度から著明で、抗原陽性細胞は慢性であった。白質では軽度から中程度脱髄及び強抗原陽性炎症細胞浸潤を伴う非化膿性脳炎を示した (Fig. 1 c and d)。胃では病巣内に封入体を認めたが壊死はほとんどみられなかった (Fig. 1 f)、しかし、上皮細胞では広範に明確な CDV 陽性抗原がみ

られた (Fig. 1 g)。すべてのイヌの腸は固有層にリンパ球・形質細胞浸潤を伴うカタル性腸炎がみられた。好酸性細胞質内・核内封入体が神経細胞及びグリア細胞内ならびに腸陰窩上皮 (Fig. 1 e) と胃腺上皮細胞 (Fig. 1 h) にみられた。

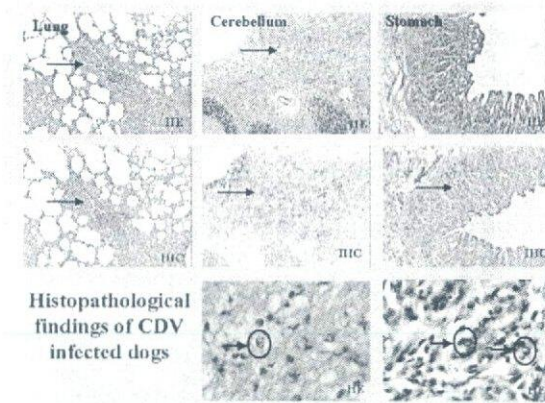


Fig.1. ジステンパーの病理組織及び免疫学的染色による抗原分布

(2) 各臓器のウイルス分離とタイター

イヌの主要臓器すべての新鮮生材料を接種した Vero-DST 細胞で細胞変性効果 (CPE) を毎日観察し、免疫細胞化学染色により陽性を確認した。接種されたワクチン自身からもウイルスが Vero-DST 細胞で分離され、CPE と免疫細胞化学染色と RT-PCR で確認された。

同時に、それぞれの臓器のウイルスタイターが示された (Table 2)。イヌ No.1 では、扁桃、腸間膜リンパ節で  $2.3 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml の最も高いタイターを示した。イヌ No. 2 では最高値が扁桃と腸間膜リンパ節、No. 3 では脾臓であった。No. 1 の脾臓、No. 2 の腸、No. 3 の小脳から分離されたウイルスが P94S, Ac96I, S124C とそれぞれ名付けられ、分子生物学解析に使用された。

(3) 遺伝子系統樹解析

P と H 遺伝子を系統樹にして解析した。P 遺伝子系統樹ではデュラミンワクチンから分離されたウイルスは由来となる Onderstepoort 株や SnyderHill 株と同じ古典的なグループに属しており、新分離 P94S, Ac96I, S124C 株とは遠く離れていた (Fig. 2)。H 遺伝子でも新分離株は同様にワクチン株とは遠く離れていた (Fig. 3)。

Phylogenetic tree of nucleotide sequences of CDV P gene

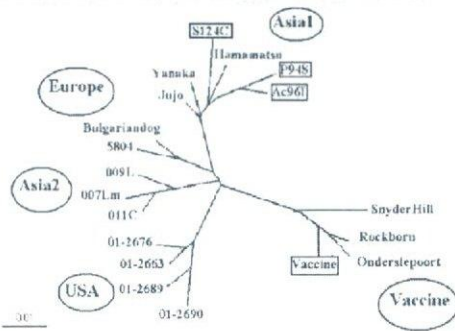


Fig. 2. P 遺伝子による遺伝子系統樹

Phylogenetic tree of amino acid sequences of CDV H gene

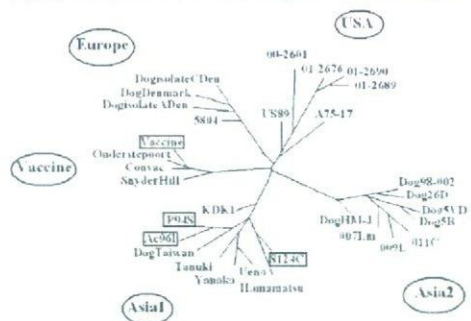


Fig.3. H 遺伝子のアミノ酸配列を用いた遺伝子系統樹

(4) 007Lm 株と CDV 全ゲノムシーケンス

限界希釈によるウイルスクローニングしたのち、全ゲノムシーケンス leader, N, P, M, F, H, L, trailer のすべての遺伝子をシーケンスし (Fig.4)、全体のヌクレオタイドは 15,690 であった。

CDV strain 007Lmの全シーケンス



Fig. 4. ジステンパーウイルス 007Lm 株の全シーケンス

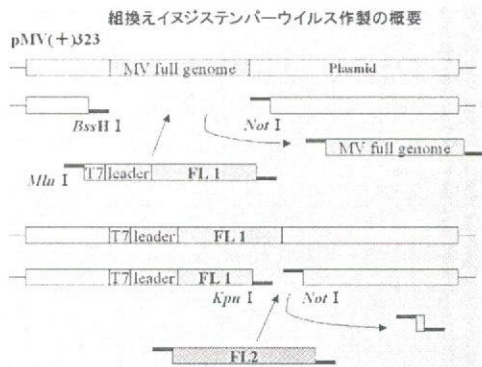


Fig. 5. 組換えイヌジステンパーウイルス作製の概要

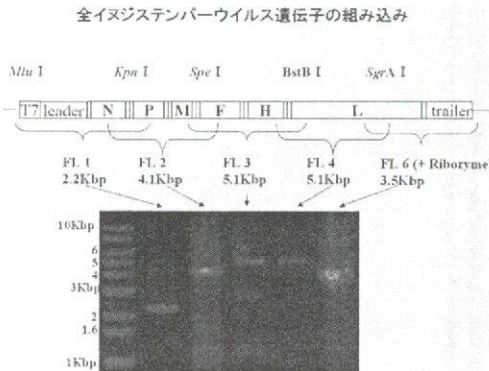


Fig. 6. 全イヌジステンパーウイルス遺伝子の組み込み

### (5) Full genome システム

全ウイルス遺伝子を FL1, FL2, FL3, FL4, FL6 の 5 つフラグメントに分けて、それぞれの PCR 産物は 2.2Kb, 4.1kb, 5.1kb, 5.1kb, 3.5kb であった。FL1 は T7 プロモーターを、また、FL6 は trailer とリボザイムを含んだ。

それぞれのフレームのすべての PCR 産物を TA クローニングにより TOPO Vector に挿入、それぞれを FL1 は制限酵素 *Mlu*I と *Not*I で、FL2 は制限酵素 *Kpn*I と *Not*I で、FL3 は制限酵素 *Spe*I と *Not*I で、FL4 は制限酵素 *Bst*BI と *Not*I で、FL6 は制限酵素 *Sgr*A I と *Not*I で切断、精製後、pBT ベクターにライゲーションした。

### (6) サポートシステム

N, P, L 遺伝子が、サポートシステムとしてそれぞれの PCR 産物 1.6, 1.7, 6.6kb を TOPO ベクターに挿入した。制限酵素による切断については、P 遺伝子は *Nco*I と *Bgl*II、N 遺伝子は *Nco*I と *Bcl*I

I, L 遺伝子は *Nco*I と *Pst*I を用いた。精製後、N と P は各々 pEMC-Pa プラスミッドにライゲーションし、L は pEMC-La プラスミッドにライゲーションした。

### TOPO TA Cloning Kit (with pCR 2.1-TOPO vector)

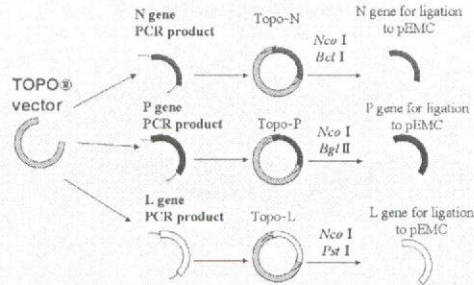


Fig. 7. N,P,L の TOPOVector を用いたクローニング

### Supporting proteins for recombinant CDV

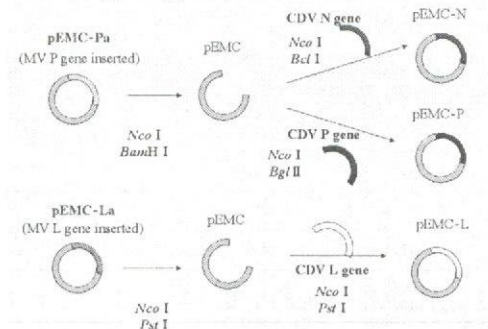


Fig. 8. pEMC への P,N,L 遺伝子の挿入

### Plasmids and proteins for supporting system of recombinant CDV

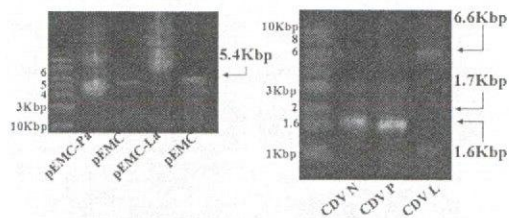


Fig. 9. ジステンパーウイルス遺伝子 P, N, L とプラスミッド pEMC への挿入

### D. 考察

近年、B95a、Vero 細胞と Vero 細胞などいろいろな細胞株が分離のために使用されてきた。しかしながら、CDV 蛋白または遺伝子の表現形質が変化して来る可能性がある。以前、報告したように



Vero-DST 細胞を用いることにより分離後のウイルス遺伝子にはほとんど変化はみられない。CDV は一般に細胞株を用いて分離することにより病原性が低下または消失することが報告されている。しかしながら、Vero-DST 細胞を用いて分離した場合には病原性も保持していることが証明されている。

本研究では、各臓器のウイルスタイターを調べた。興味あることにそれぞれの臓器においてウイルスのタイターが異なってみられた。これは、ウイルスの株や宿主の感受性にもよると思われるが、体系的に定量を行った症例はこれまでにない。これまで報告されて来たように、全身の感染症としてのウイルスが広がっていることが定量的に証明された。これらの同じイヌから同じウイルスがいつも分離されるか興味あるところである。

臨床症状には神経症状はみられず、目やにと鼻汁及び下痢が主であった。免疫組織では脳神経でウイルス抗原陽性及びウイルスが回収され、組織学的には非化膿性脳炎がみられた。明瞭な症状を示さない症例でも脳神経にも感染していることが証明された。近年、広がっている CD は胃腸、リンパ組織、中枢神経に急性及び持続感染する傾向があった。

我々の経験では、多くのワクチンを接種したイヌが未だに CDV に感染する。可能性としてはワクチンの品質・管理の問題や移行抗体の存在があるためにワクチン定着がうまくいかなかった。別の考慮される可能性としてはワクチンの病原性復帰である。この研究では、ワクチン接種時にいくつかの移行抗体を調べ、陰性か低い抗体が存在するのみで、移行抗体の存在はあまり影響がないように思える。この 3 匹のイヌは 7 週齢と 11 週齢にワクチン接種されており、このイヌを取り扱っていたブリーダーでは 1 ヶ月に 700-100 匹がワクチン接種されている。一部のイヌのみが CDV に感染する。したがって、技術的問題やワクチンの品質の問題は考えにくい。しかしながら、イヌがワクチンによって免疫をもつが、しかし、ワクチン株と系統樹で離れている新分離株に感染するのか、免疫がうまくあがってくる前に新分離株に感染するのかどちらかである可能性がある。イヌにワクチン接種して中和反応を調べて詳細を検討する必要がある。

結論としてはワクチン接種歴を有し CD となった 3 匹のイヌから分離したウイルスはワクチン株

から遠く離れており、ワクチン株の病原性復帰でないことが明確となった。

センダイウイルスで代表されるように遺伝子工学の発展に伴いリバースジェネティクスにより、RNA ウイルスを cDNA としてクローニングし、また cDNA からのウイルス回収が可能となっている。

これまでに CDV でもすでに感染性クローンが cDNA からのウイルス回収で幾つか行われてきたが、細胞順化し弱毒化したウイルスが用いられた。我々は Vero-DST 細胞で分離し、また病原性の再現が確認された CDV 007Lm 株を使用した。このウイルス遺伝子系統樹によりアジア 2 型に属し、これまでの CDV と比較して増殖力が強く、親水性アミノ酸領域が 1 つ長く、上清内にウイルスがこれまでの CDV より多く放出される性状を有し、犬に病原性が確認されているためにこの株を用いた。

限界希釈によるクローニングしたもの全ゲノムのシーケンス後、麻疹ウイルスの全ゲノムを含む pMV(+)-323 から、麻疹ウイルスゲノム部位を取り外し、T7 プロモーターとリーダー配列を付加したジステンパーゲノムを 5 つのフラグメントに分けて組込んでいく方法を用いた。

全ゲノムクロノンの作成は現在進行中である。

サポーターシステムにおいては、過去の文献を参考として、麻疹ウイルスの P 遺伝子が組込んである pEMC-Pa と、同じく麻疹ウイルスの L 遺伝子が組込まれている pEMC-La を出発材料にし、それぞれ麻疹ウイルスの遺伝子部位を CDV の遺伝子と組換えるように計画している。完成には今後の更なる検討が必要である。

本研究により感染性クローン完成することにより、CDV の病原遺伝子の特定や、遺伝子間の相互作用などの研究に大きく寄与できると思われる。

#### E. 論文発表

1: Lan NT, Yamaguchi R, Inomata A, Furuya Y, Uchida K, Sugano S, Tateyama S. Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Vet Microbiol.* 115: 32-42. (2006)

Table 1.

**History, clinical signs and gross findings of  
CDV infected dogs**

Dog no.	Breed	Age in months	Clinical history	Main gross findings
1	Papillon	3	Purulent ocular and nasal discharge, cough, vomiting, hemorrhagic diarrhea Vaccination (+)	Multifocal pneumonia, Pleural effusion ascites
2	American Cocker spaniel	3	Purulent ocular and nasal discharge, cough, hemorrhagic diarrhea Vaccination (+)	Multifocal pneumonia, petechia in ileum
3	Shiba	3	Purulent nasal discharge, severe diarrhea Vaccination (+)	Purulent pneumonia

Table 2. ジステンパーウイルスの各臓器のウイルス力価

Organs	Dog 1		Dog 2		Dog 3	
	Virus isolation	Virus titers (TCID <sub>50</sub> /ml)	Virus isolation	Virus titers (TCID <sub>50</sub> /ml)	Virus isolation	Virus titers (TCID <sub>50</sub> /ml)
Pulmonary lymph node	-		+	1.3x10 <sup>4</sup>	+	1.3x10 <sup>2</sup>
Mesentery lymph node	+	2.23x10 <sup>3</sup>	+	4x10 <sup>4</sup>	ND	ND
Lung	-		+	2.25x10 <sup>2</sup>	+	2.7x10 <sup>2</sup>
Tonsil	+	2.23x10 <sup>3</sup>	+	4x10 <sup>4</sup>	ND	ND
Spleen	+	4x10 <sup>2</sup>	-	-	+	5.9x10 <sup>3</sup>
Cerebrum	+	1.3x10 <sup>3</sup>	-	-	+	1.3x10 <sup>3</sup>
Cerebellum	+	4x10 <sup>3</sup>	-	-	+	5.8x10 <sup>2</sup>
Brain stem	+	4x10 <sup>2</sup>	-	-	+	1.3x10 <sup>2</sup>
Cerebral spinal fluid	ND	ND	ND	ND	+	1.3x10 <sup>2</sup>
Small intestine	-	-	-	-	+	1.3x10 <sup>2</sup>
Large intestine	-	-	+	2.2x10 <sup>4</sup>	-	-
Kidney	-	-	-	-	-	-

## ヘルペスウイルスワクチンの評価法の開発に関する研究

分担研究者：井上 直樹（国立感染症研究所 ウイルス第一部 第四室）

**研究要旨** 先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染症の防御にはワクチン開発が必須だと考えられている。ワクチンによる免疫応答及び防御効果を検討する動物モデルとして、小動物ではモルモットが唯一経胎盤感染が可能である。CMVは宿主特異性が高くヒトに感染するCMV（HCMV）はモルモットに感染しないため、モルモットCMV（GPCMV）を用いることになる。しかし、GPCMVの全ゲノム配列は未決定であること、GPCMVに対する特異的抗体がほとんどないことなど、このモデルの利用に当たってはいくつかの制約がある。そこで、本年度は、GPCMVの全ゲノム塩基配列の決定、配列情報をもとにしたGPCMV特異抗体の作成を行なった。

### A. 研究目的

公衆衛生の観点からワクチン開発が重要な疾病として、新生児ヘルペスや先天性CMV感染症がある。前者は、妊婦のHSV初感染ないしは再活性化に伴う産道感染による。抗ウイルス剤の発達により致死的ではなくなったものの依然として重篤な後遺症を残す。一方、先天性CMV感染症は、妊婦の初感染に伴う経胎盤感染により新生児に疾病が発生するものである。その頻度は、全出生児200-500人に1人と高く、顕性感染による致命的障害から、進行性の精神発達障害や難聴などを含め様々な後遺症を生じさせると考えられている。実際、家庭に保存される乾燥臍帯中のCMVを検出する手法を用いて、高度難聴児の15-20%と高い比率で先天性CMV感染が関与することを我々は明らかにしてきた。妊婦の初感染を防御する最も有効な手段はワクチンと考えられる。しかしながら、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、胎盤の構造の違いからマウス・ラットでは先天性CMV感染が起きないことなどから、ワクチンの先天性感染防御効果の評価を容易にできないのが現状である。モルモットCMV（GPCMV）はモルモット胎児に感染し、死産のみならず聴覚障害をも生じさせることができる優れたモデルである。しかしながら、GPCMVゲノムの全塩基配列が決定されていないことや特異的抗体がほとんど存在しないことなどが、感染増殖とワクチンの阻害効果を解析する上で障害となっている。

そこで、GPCMVの全ゲノム塩基配列を決めること、及びその配列情報をもとに感染初期に発現される前初期蛋白に対する特異抗体を作製することを本年度は行なった。

### 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、Strausらの方法に従いゲノムDNAをnucleocapsid DNAとして精製した。

2) GPCMV塩基配列の決定：GPCMVゲノムDNAを制限酵素EcoRI, HindIII, BamHI, XbaI, SacI, BglIIで切断後、pBluescript-KS(+)(Stratagene)にクローニングし、それぞれのプラスミドライブラリーを構築した。プラスミドでカバーできなかった2箇所の小さな領域については、PCR断片を調製した。プラスミド及びPCR断片をBigDye Terminator cycle sequencing kit (Applied)にて反応し、キャピラリーシーケンサーにて塩基配列を決定した。配列はGenetyxソフトにて解析した。翻訳領域の同定や類似性の検討は、DDBJのwebサイトなどを用いた。

3) GPCMV前初期蛋白(GPCMV-IE)に対する抗体の作製: HCMVの前初期蛋白とアミノ酸配列に類似性のある領域のDNAをpGEX6プラスミドにクローニングし、大腸菌BL21株において、GPCMV-IEとGST蛋白の融合蛋白として発現させた。IPTGにより蛋白発現を誘導後、菌体を超音波破碎後低速遠心し、可溶性分画を得た。この分画中のGST融合蛋白をグルタチオンカラムに結合させ、presission proteaseにてGPCMV-IE部分を切り出し精製した。この精製蛋白をウサギで免疫し、特異抗体を得た。

(倫理面の配慮)

遺伝子組換え生物等の使用は、第二種使用等拡散防止措置の機関承認を得て行われた。

### C. 研究結果

#### 1) GPCMVの全塩基配列の決定

GPCMVゲノムを制限酵素で切断して得られたプラスミドライブラリーのマップを図1に示した。これらのプラスミドの塩基配列解析の結果をつなぎ合わせ、GPCMVは約24万塩基からなり、両端に約950塩基の繰返し配列を有していることが明らかとなった。GPCMVの全配列をマウス、ラット、Tupaia、Rheusus、チンパンジーの各CMVの配列とLAGANソフトを用いて比較した。GPCMVを基準にしてその類似性をプロットしてみると、各CMVに対して、中央3分の2の領域で高い相同性があるのに対して、両末端部分では、ほとんど類似性がなかった(図2)。この結果は、翻訳領域の同定においても同じことが見出された。即ち、UL23からUL122に至る中央3分の2領域がヒトCMVなどCMVで統一的に用いられている遺伝子名をGPCMVの翻訳領域の番号として割り付けることが可能であった(図3)。GPCMVの結果は、マウスCMVを基準にして、チンパンジーなどのprimateのCMVと比較した場合のパターンとよく似ていた。しかしながら、ゲノム全体の遺伝子配列の相同性をもとに比較すると、GPCMVは小動物であるマウスやラットと距離が近いわけではなく、他のCMVともほぼ等距離にあることがわかった(図4)。

#### 2) 前初期蛋白に対する抗体の作製

塩基配列解析よりHCMVの前初期蛋白IE2をコードするUL122遺伝子領域が明らかとなり、IE2と相同性が明確な280アミノ酸領域をGST融合蛋白として大腸菌で発現させ、精製後、ウサ

ギを免疫して特異抗体を得た。GPCMVのIE蛋白は、分子量が約120kDaで(図5)、感染細胞の核に存在していることが確認された。また、GPCMV感染動物のパラフィン固定病理組織の染色にも利用できることが確認された。

### D. 考察

GPCMVの全塩基配列の解析により、今後各遺伝子をノックアウトしたような組換えウイルスの作出が可能となり、動物個体での増殖性や病原性を規定する遺伝子の同定など様々な研究を今後展開することが可能となった。

また、前初期蛋白に対する抗体を用いて、各組織における感染様式など詳細な病理解析が可能となった。

### E. 健康危険情報

なし

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

N. Kumar, K. McLean, N. Inoue, D.R. Moles, C. Scully, S.R. Porter, C.G. Teo. Herpesvirus 8 genoprevalence in people at disparate risks of Kaposi's sarcoma. *J. Med. Virol.* 79: 52-59 (2007)

H. Ogawa, T. Suzutani, Y. Baba, S. Koyano, N. Nozawa, K. Ishibashi, K. Fujieda, N. Inoue, K. Omori. Etiology of severe sensorineural hearing loss in children: independent impact of congenital cytomegalovirus infection and GJB2 mutations. *J. Infect. Dis.* 195: 782-788 (2007)

H. Katano, Y. Sato, Y. Tsutsui, T. Sata, A. Maeda, N. Nozawa, N. Inoue, Y. Nomura, T. Kurata. Pathogenesis of cytomegalovirus-associated labyrinthitis in a guinea pig model. *Microbes Infect.* 9: 183-191 (2007)

N. Nozawa, S. Koyano, Y. Yamamoto, Y. Inami, I. Kurane, N. Inoue. A real-time PCR assay using specimens on filter discs as a template for detection of cytomegalovirus in urine. *J. Clin. Microbiol.* (in press, 2007)

井上直樹、野澤直樹 HCMVのゲノム構造と遺伝子機能 日本臨床 64巻増刊号 3: 377-385 (2006)