

.....
ロタウイルス感染による type III インターフェロン産生誘導

研究分担者 浅野正岳 日本大学歯学部・准教授

研究要旨:マイクロアレー法を用いた検索の結果、ヒト大腸癌由来細胞 HT-29 において、ロタウイルス感染により、type III インターフェロン mRNA の発現が増強されることが解った。この結果は、real-time PCR 法によっても確認された。タンパク質レベルでも type III インターフェロン産生が増強されているか否かについて Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法を用いて検索したところ、ウイルス感染6時間後に最も高濃度の type III インターフェロン産生が認められた。その後経時的に濃度は低下し、感染24時間後に type III インターフェロンは検出されなくなった。他の腸管上皮細胞である T84 および Caco2 細胞を用いて同様に検索したところ、T84 においては type III インターフェロンの産生が認められたが、Caco2 では産生が見られなかった。このことは、cell type 特異的な type III インターフェロン産生調節機構が存在する可能性を示唆するものであった。また、ロタウイルス感染による type III インターフェロン産生には、転写因子 NF- κ B が極めて重要であることが判明した。

A. 研究目的

ロタウイルスは、宿主の免疫機構を回避するシステムを有している。中でも、ロタウイルス non-structural protein 1 (NSP1)による interferon regulatory factor 3 (IRF3)や NF- κ B シグナル伝達系の破壊は、宿主におけるインターフェロン産生を劇的に減少させ、ウイルス増殖にとって有利な環境を作り出す。そこで、免疫回避システムの存在する中で、ロタウイルス感染により誘導される遺伝子にはどのようなものがあるのかという疑問にアプローチするために、我々は、ロタウイルス感染後有意に誘導される遺伝子群の網羅的解析を、マイクロアレー法により行った。その結果、type III インタ

ーフェロン遺伝子がロタウイルス感染により強く発現されることを明らかにしてきた。本研究では、type III インターフェロン産生の増強について、タンパク質レベルで確認すると共に、発現の時間的推移について検討し、そのシグナル経路についても検索することを目的とした。

B. 研究方法

ヒト腸管上皮細胞 HT-29 に、ロタウイルス SA11 を moi 2.6 で感染させ、0、3、6、9、12、24 時間後に培養上清を回収し、R&D 社製 IFN λ ELISA kit を用いて、type III インターフェロンの定量を行った。Transcription factor NF- κ B の関与について検索するために、特異

的阻害剤であるTPCKとisoheleninによる前処理を行い、同様にSA11を感染させ、培養上清中のtype III インターフェロン量を測定した。

C. 研究結果

type III インターフェロンの発現についてELISA法を用いて検討したところ、HT-29においては、感染6時間後に最も高濃度のtype III インターフェロンが検出された。その後、type III インターフェロン量は暫時減少し、感染24時間後にはtype III インターフェロンの産生はbackground levelまで低下した。同様の実験を、T84とCaco2を用いて検討したところ、T84ではtype III インターフェロンの産生が確認できたが、Caco2では産生が認められなかった。RT-PCRにより、全ての細胞でロタウイルス由来のVP6の発現が認められたことから、Caco2においてtype III インターフェロン産生が認められなかったことは、ウイルスの感染が起こらなかったことによるものでは無いことが判明した。

type III インターフェロン産生における転写因子NF- κ Bの関与について、特異的阻害剤を用いて検討した。その結果、TPCK、isohelenin 両阻害剤によるpre-incubationはtype III インターフェロン産生を完全に抑制した。

D. 考察

ロタウイルス感染により腸管上皮細胞であるHT-29およびT84においてType III インターフェロンが産生された。産生量が感染後6時間をピークとして暫時減少したことは、ウイルスによる宿主免疫機構の破壊が感染後一定の時間経過を経て惹起される可能性を示唆するもの

であり、今後検討する必要があるものと考えられた。またCaco2においては、ロタウイルスの感染が起こっているにもかかわらずtype III インターフェロンの産生が認められなかったことは、cell-type specificな産生調節機構の存在を示唆するものであった。NF- κ B 特異的阻害剤による検索の結果、ロタウイルス感染により誘導されるType III インターフェロン産生のシグナル伝達経路は転写因子NF- κ Bを經由していることが明らかとなった。Type III インターフェロンの遺伝子発現は、樹状細胞においてはIRF familyとNF- κ Bにより発現が調節されていると報告されており、IRF familyの関与については、更に検討する必要があるものと考えられた。

E. 結論

ロタウイルス感染は、ヒト腸管上皮細胞HT-29およびT84において、転写因子NF- κ B依存性にtype III インターフェロンの産生を増強することが確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Mikami Y, Asano M, Honda MJ, Takagi M. Bone morphogenetic protein 2 and dexamethasone synergistically increase alkaline phosphatase levels through JAK/STAT signaling in C3H10T1/2 cells. J Cell Physiol, 223, 123-133, 2010.
- 2) Kameoka S, Kuroki Y, Honda K, Kijima N, Matsumoto K, Asano M, Arai Y, Shirakawa

- T. Diagnostic accuracy of micro-computed tomography for osseous abnormalities in the rat temporomandibular joint condyle. *Dentomaxillofacial Radiol*, 38, (7), 465-469, 2009.
- 3) Omagari D, Mikami, Y; Suguro H; Sunagawa K, Asano M; Sanuki E, Moro I, Komiyama K. Poly I:C-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol*, 156, 294-302, 2009.
- 4) Omagari D, Iijima M Suguro H, Sato I, Asano M, Moro I. Differential distribution of mouse polymeric immunoglobulin receptor (mpIgR): Establishment of enzyme-linked immunosorbent assay system for mpIgR. *Scand. J. Immunol.*, 68, 543-551, 2008.
- 5) Suguro H., M. Asano, Y. Kaneko, D. Omagari, B. Ogiso, I. Moro K. Komiyama. 2008. Characterization of human dental pulp-derived cell lines. *International Endodontic Journal*, 41, 609-616, 2008.

2.学会発表

- 1) 浅野正岳、尾曲大輔、茂呂周、小宮山一雄 : Rotavirus infection and host immune system. 6 th Japanese Association of Food Immunology (2010. 6)
- 2) 浅野正岳、尾曲大輔、砂川恵伸、茂呂周、小宮山一雄 : ロタウイルス非構造タンパク質 NSP1 の検出法の開発とその応用、第47回日本消化器免疫学会 (岐阜) (2010. 7)

- 3) 浅野正岳、尾曲大輔、茂呂周、小宮山一雄 : Production of type III IFNs in rotavirus infected intestinal epithelial cells. 14 th International congress of Immunology (兵庫) (2010. 8)
- 4) 浅野正岳、尾曲大輔、小宮山一雄 : ロタウイルス感染とType III インターフェロン産生、日本大学学部連携研究推進シンポジウム(東京) (2010. 12)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

下痢症ウイルスの病原性解析に関する研究

研究分担者 片山 和彦 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨：ノロウイルス（NoV）は冬季の非細菌性集団急性胃腸炎、非細菌性食中毒の主因となるウイルスである。NoVはゲノムとして、約7600塩基からなる1本鎖RNAを有している。ゲノムRNAには、3つの蛋白質コード領域（ORF）が存在し、ORF1に非構造蛋白質、ORF2, 3に構造蛋白質をコードしている。ゲノムRNAは、ORF1とORF2のジャンクション領域（ORF1/2 junction）を境に組換えを起こすことが知られている。北海道で発生した胃腸炎事例より検出されたNoV HK299株は、ゲノム全長塩基配列解析の結果、ORF1/2 junctionでゲノム組換えを起こしたキメラウイルスであることが明らかになった。さらにORF2の塩基配列は、新たな未知のgenogroupに由来することが示唆された。HK299株は、これまでに検出されたことのない新しい構造タンパク質領域を有する株であるため、爆発的流行を引き起こす可能性がある。

A. 研究目的

ノロウイルス（NoV）は非細菌性急性胃腸炎の主たる病因ウイルスである。NoVは、直径38nmの小型球形ウイルスであり、カリシウイルス科に属する。ゲノムとして、約7600塩基からなる1本鎖RNAを有し、ゲノムRNAには、3つの蛋白質コード領域（ORF）が存在する。ORF1に非構造蛋白質、ORF2, 3に構造蛋白質をコードしている。NoVは、全長のゲノム塩基配列情報に基づき、現在1～5まで5つの遺伝子群（genogroup I～V, GI～GV）に分類される。このうちヒトに感染するのはGIII, GVを除くGI, GII, GIVである。それぞれのgenogroupには、GIに16, GIIに17, GIVに1種類のgenotypeが存在することが

明らかにされている。ゲノムRNAは、ORF1とORF2のジャンクション領域（ORF1/2 junction）を境に組換えを起こし、ORF1とそれ以降が異なるgenotypeを示すキメラウイルスが多数報告されている。しかし、現在までに遺伝子組み換えがgenogroup間で生じたキメラウイルスは報告されていない。

北海道で発生した胃腸炎事例より検出されたNoV HK299株のORF2領域の塩基配列を解析したところ、全く新しいgenogroupである可能性が示唆された。ORF2にコードされる構造タンパク質VP1は、ウイルス粒子を形成する主要タンパク質であり、ウイルス粒子の抗原性を規定する。一般に、ウイルスの感染防御、クリアランスには、ウイルス粒子

に対する腸管およびヒト体内での免疫応答が働いていると考えられる。HK299 株は、VP1 が全く新しい配列であるため、今後爆発的な流行を示す可能性がある。

本研究では、HK299 株の分子疫学的解析を施行することで、HK299 株の由来、今後の流行予測を行うことを目的とし、ゲノム全長の塩基配列決定と解析を行った。

B. 研究方法

1. 対象検体

平成 18 年（2006 年）に北海道で発生した急性胃腸炎患者より採取された糞便検体を対象とした。

2. 方法

検体からの RNA 抽出は、定法に従って行った。抽出した RNA は、DNase 処理により混在する DNA を分解除去した後、逆転写に用いた。逆転写反応は、Tx30SXN primer を用い、NoV genome RNA 3' end に存在する poly A tail から 5' end までの cDNA を合成した。COG2F, SKG2R を用いた PCR により、ORF1/2 junction から下流約 300 塩基の Capsid N/S 領域を増幅し、塩基配列をダイレクトシーケンスによって決定した。NoV には、genome 5' end と約 5100nt 近傍に 18 塩基からなる共通配列が存在することが知られている。5100nt 近傍の 18 塩基は、Capsid N/S 領域に含まれていることから、この領域の塩基配列を得ることに成功すると、genome 5' end の塩基配列を予測することができる。Capsid N/S の塩基配列より、デザインした 5' end, 5100nt 近傍をターゲットとした 1S18 primer を用いて、

Capsid N/S 領域を中継点として、1-5000nt, 4950nt - 3' end をそれぞれ KOD DNA polymerase を用いた long distance PCR によって増幅し、約 5kb, 約 2.7kb の増副産物を得た。得られた増副産物の塩基配列を primer walking によるダイレクトシーケンスを用いて決定した。得られた全長塩基配列を確認するため、ほぼ全長の約 7.5kb を標的とした long distance RT-PCR を行い、完全長に近い増副産物を作製し、ダイレクトシーケンスによって塩基配列の確認を行った。Genome の 5' end の塩基配列は、5' RACE 法を用いて決定した。

決定した塩基配列は、CaliciWeb データベース上に登録された NoV の塩基配列およびカリシウイルスの塩基配列と Clustal W を用いてアライメントし、Kimura の 2 パラメータ法によって distance を算出して Neighbor Joining 法 (NJ 法) によって分子系統樹を作成した。系統樹の分岐点検定には boot strap を用いた。また、ORF1, ORF2, ORF3 ごとに領域を分け、同様に解析を行った。遺伝子組み換えの解析には SimPlot, Boot scan を用いた。

(倫理面からの配慮について)

本研究にあたっては、試料提供者の人権、尊厳、利益が保護されるよう提供試料を厳格に管理、保存した。データについて個人が特定されないよう、特段の配慮をした。本研究での動物実験は無い。

C. 研究結果

(Capsid N/S 領域の塩基配列解析)

通常、NoVは5' endとORF2のスタートコドン近傍に18塩基の保存されたシーケンスモチーフを持つ。NoV GIはGTGAATGATGATGGCGTC、NoV GIIはGTGAATGAAGATGGCGTC、NoV GIVはGTGAATGAAGATGGCGTC、マウスノロウイルス(MNV) NoV GVはGTGAAATGAGGATGGCAA、である。さらに第一のスタートコドンから3番目のコドンまでにコードされるアミノ酸残基にもgenogroupの特徴が存在する(図1)。COG2FとSKG2Rにより増幅されたHK299株のCapsid N/S領域は、塩基配列解析の結果ORF2のスタートコドンにユニークな塩基配列GTGAATGAGGATGGCGTCGAGTを有しており、第一スタートコドンからMNVと同様のアミノ酸残基モチーフMRMを有していた。興味深いことに、これまでに報告された全てのMNVはMRMモチーフを持っているが、既報告のGI, GII, GIVは、それぞれMMM, MKMモチーフであった。NoVは、この領域を境にORF1とORF2, 3の遺伝子組み換えを起こし、キメラウイルスが出現する。従って、HK299株は、人に感染するノロウイルス(hNoV)とMNVの組換え体である可能性が考えられた。

(HK299株の全長塩基配列の解析)

HK299株のゲノム全長に渡る分子系統解析を行うため、Long RT-PCRと、PCR産物のダイレクトシーケンスによってHK299株の全塩基配列を決定した。HK299株のgenome 5' endの塩基配列は、ORF2のスタートコドンに存在したGTGAATGAGGATGGCGTCGAGTと同じであった。MNVなど動物のNoVやNoVの属するカリシウイルス科のウイルスとの遺伝子組

み換えの可能性を調べるため、HK299株の塩基配列を、データベース上に報告された121株のカリシウイルスの全長塩基配列とclustalWによってアライメントし、ORF1(非構造タンパク質コード領域)、ORF2-3(構造タンパク質コード領域)に分けてNJ法による分子系統解析を行った(図2)。HK299株はORF1の塩基配列およびアミノ酸配列による分子系統解析では、NoV GIIの新しいgenotypeとして独立したクラスターを形成したが、ORF2-3領域の塩基配列およびアミノ酸配列による分子系統解析では、明らかにGI-GVまでの既報のgenogroupとは異なる独立した新たなgenogroup VI (GVI)クラスターを形成していた。しかし、HK299株のクラスターは、GVであるMNVよりもhNoVのGIIに近縁であることが明らかになった。これらの結果は、HK299株のgenomeがORF1/2 regionで組換えを起こしたことを示唆していた。しかし、MNVとの組換えの可能性は否定的であったが、HK299株は、本研究によってはじめて発見されたNoVのgenogroup間キメラウイルスであることが明らかになった。

そこで、次にORF1, ORF2, ORF3それぞれの領域をアライメントし、分子系統解析を行ったところ、HK299株のORF2領域のみがgenogroup VIとして独立したクラスターを形成することが明らかになった(図3)。この結果は、HK299株が、これまでに報告されている組換え点: ORF1/2 junction領域の他に、ORF2-ORF3の間にも組換え点を有する可能性を示唆していた。

この第2の組換え点の存在を明らかにす

るため、hNoV と全長塩基配列のアライメントを行い、HK299 株を query として SimPlot と Bootscan 解析を行った (図 4)。SimPlot, Bootscan とともに ORF1/2 junction, ORF2/3 junction 領域に組換え点が存在することを示唆していた。ORF1/2 junction は、NoV における主な組換え点として報告されているが、ORF2/3 junction 領域の組換え点はこれまでに報告がない。本領域には、高度に保存された塩基配列、アミノ酸モチーフも存在しないため、遺伝子組み換えのメカニズムは不明である。

D. 結論

北海道で発生した胃腸炎事例より検出された NoV HK299 株は、ゲノム全長塩基配列解析の結果、ORF1/2 junction と ORF2/3 junction でゲノム組換えを起こし、既報の NoV genogroup 以外の第 6 番目の genotype の ORF2 を獲得した GII/GVI キメラウイルスであることが明らかになった。HK299 株は、これまでに hNoV で検出されたことのない新しい構造タンパク質領域を有する株であるため、ヒトの免疫学的感染防御を逃れ、爆発的流行を引き起こす可能性がある。今後の流行動向の注意深い観察が必要である。

健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamashita Y, Ootsuka Y, Kondo R,

Oseto M, Doi M, Miyamoto T, Ueda T, Kondo H, Tanaka T, Wakita T, Katayama K, Takeda N, Oka T. Molecular characterization of sapovirus detected in a gastroenteritis outbreak at a wedding hall. *J Med Virol.* 2010 Apr;82(4):720-6.

2. Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Katayama H, Takeda N, Katayama K, Ohgaki S. Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Apr;76(8):2461-7

3. Iizuka S, Oka T, Tabara K, Omura T, Katayama K, Takeda N, Noda M. Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish. *J Med Virol.* 2010 Jul;82(7):1247-54.

4. Ueki Y, Shoji M, Okimura Y, Miyota Y, Masago Y, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Miura T, Sano D, Omura T. Detection of Sapovirus in oysters. *Microbiol Immunol.* 2010 Aug;54(8):483-6.

5. Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Takeda N, Katayama K, Katayama H. Seasonal distribution and genetic diversity of genogroups I, II, and IV noroviruses in the Tamagawa River, Japan. *Environ Sci Technol.* 2010 Sep 15;44(18):7116-22.

6. Kitajima M, Oka T, Takagi H, Tohya Y, Katayama H, Takeda N, Katayama K. Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses. *J Virol Methods.* 2010 Nov;169(2):269-73.
 7. 片山和彦 ノロウイルス感染症研究の現状と課題 「食品衛生研究」平成 22 年 10 月 5 日発行、vol 60, 15-26, 2010.
 8. 野田衛、山本茂貴、片山和彦、岡智一郎、山下和予、岡部信彦、斎藤博之、東方美保、三瀬敬治、吉澄志磨、植木洋、森功次、林志直、山崎匠子、小原真弓、吉田徹也、小林慎一、中田恵子、入谷展弘、三好龍也、阿部勝彦、山下育孝、糸数清正、仁平稔、田中忍、西川篤、北堀吉映、三谷亜里子、田中誠、熊谷優子ノロウイルス食中毒の調査・検査体制に関する研究の動向 *IASR* Vol. 31 315-316: 2010 年 11 月号
2. 学会発表
1. Oka T, Yokoyama M, Takagi H, Tohya Y, Motomura K, Murakami K, Wakita T, Sato H, Katayama K. Antiviral Development. 4th International Conference on Caliciviruses. Santa Cruz, Chile, Oct 16-19, 2010.
 2. Hnasman, G.S. Chen, L. Georgeiv, I. McLellan, J.S. Katayama K. Kwong, P.D. Crystal Structures of a rare Norovirus P-Domain in Complex with Histo-Blood Group Antigens. 4th International Conference on Caliciviruses. Santa Cruz, Chile, Oct 16-19, 2010.
 3. Motomura, K. Yokoyama, M. Ode, H. Oka, T. Katayama, K. Noda, M. Tanaka, T. Sato, H. Evolution of Norovirus GII/4 in Japan by Genome Recombination. 4th International Conference on Caliciviruses. Santa Cruz, Chile, Oct 16-19, 2010.
 4. Sharp, T.M., GUIX, S., Katayama, K., Crawford, S.E., Estes, M.K. Inhibition of Cellular Protein Secretion by Norwalk Virus Nonstructural Protein P22 requires a Mimic of an Endoplasmic Reticulum Export Signal. 4th International Conference on Caliciviruses. Santa Cruz, Chile, Oct 16-19, 2010.
 5. Yokoyama, M., Oka, T., Katayama, K., Kanda, T., Sato, H. Structural insight into Substrate Recognition based on P4 and P1 residues by Sapovirus 3C-like Protease. 4th International Conference on Caliciviruses. Santa Cruz, Chile, Oct 16-19, 2010.
 6. Kitajima, M., Oka, T., Haramoto, E., Takeda, N., Katayama, K., Katayama, H. Genetic diversity of HUMAN noroviruses and sapoviruses in river water, Japan. 4th International

- Conference on Caliciviruses. Santa Cruz, Chile, Oct 16-19, 2010.
7. Murakami K, Oka T, Wakita T, Matsuda T, Katayama K. ANALYSIS OF MECHANISM OF HUMAN NOROVIRUS BINDING TO CACO-2 CELLS. Fourth International Conference on Calicivirus. Santa Cruz, Chile, Oct 16-19, 2010.
 8. 浅野有香、村上耕介、鈴木さやか、灘野大太、宇理須厚雄、岡智一郎、片山和彦、松田幹 母乳に含まれるヒトノロウイルス感染抑制因子の探索 日本農芸化学会中部支部第159回例会 平成22年10月30日 名古屋<日本農芸化学会中部支部企業奨励賞を受賞>
 9. 斎藤 博之、東方 美保、岡 智一郎、片山 和彦、田中 智之、野田衛「食品検体のノロウイルス検査のためのパンソルビン・トラップ法の開発と拡大適用」第57回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月、徳島
 10. 岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、村上耕介、脇田隆字、片山和彦「ネコカリシウイルスの新規リバーシジェネティクス系の構築」第57回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月、徳島
 11. 北島正章、岡 智一郎、原本英司、武田直和、片山和彦、片山浩之「国内の下水および河川水からの Genogroup IV ノロウイルスの検出および遺伝子解析」第57回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月、徳島
 12. 村上耕介、岡智一郎、脇田隆字、松田幹、片山和彦「ノロウイルスのヒト腸管由来培養細胞への結合様式の解析」第57回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月、徳島
 13. 野田衛、入谷展弘、中田恵子、斎藤博之、田中忍、西川篤、北堀吉映、三谷亜里子、三瀬敬治、山下和予、岡智一郎、片山和彦、岡部信彦「関西で同時多発的に発生したノロウイルス食中毒事例の解析」第57回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月、徳島
 14. 原田誠也、西村浩一、岡智一郎、片山和彦「熊本県における感染性胃腸炎の起因病原体調査とサポウイルス genogroup の年次変化」第57回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月、徳島
 15. 北元憲利、岡智一郎、片山和彦、Hansman GS、三好龍也、田中智之「サポウイルスに対する単クローン抗体の解析」第57回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月、徳島
 16. 高木弘隆、北島正章、遠矢幸伸、岡智一郎、片山浩之、片山和彦、杉山和良「マウスノロウイルス (MNV) のマウス由来培養細胞での増殖性についての検討」
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし
1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

Genogroup specific sequence motif on the genome

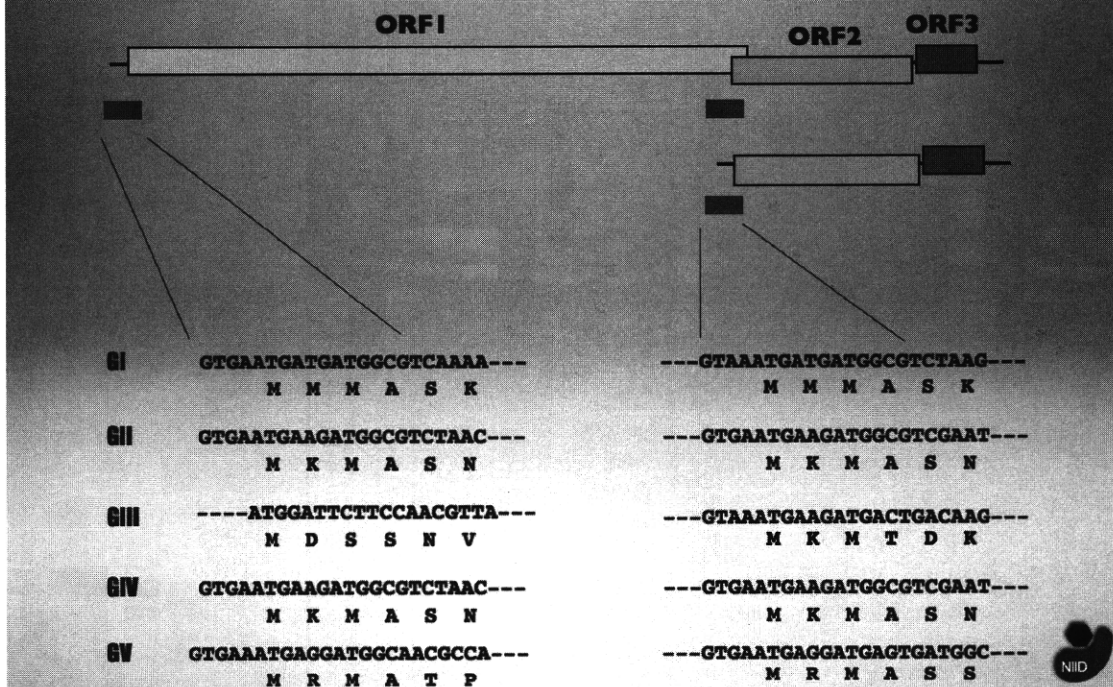


図1. ノロウイルス genogroup I から genogroup V に保存されている RNA 塩基配列モチーフ、アミノ酸配列モチーフを示した。

HK299 was identified as a new NoV genogroup with respect to the structural region amino acid sequence

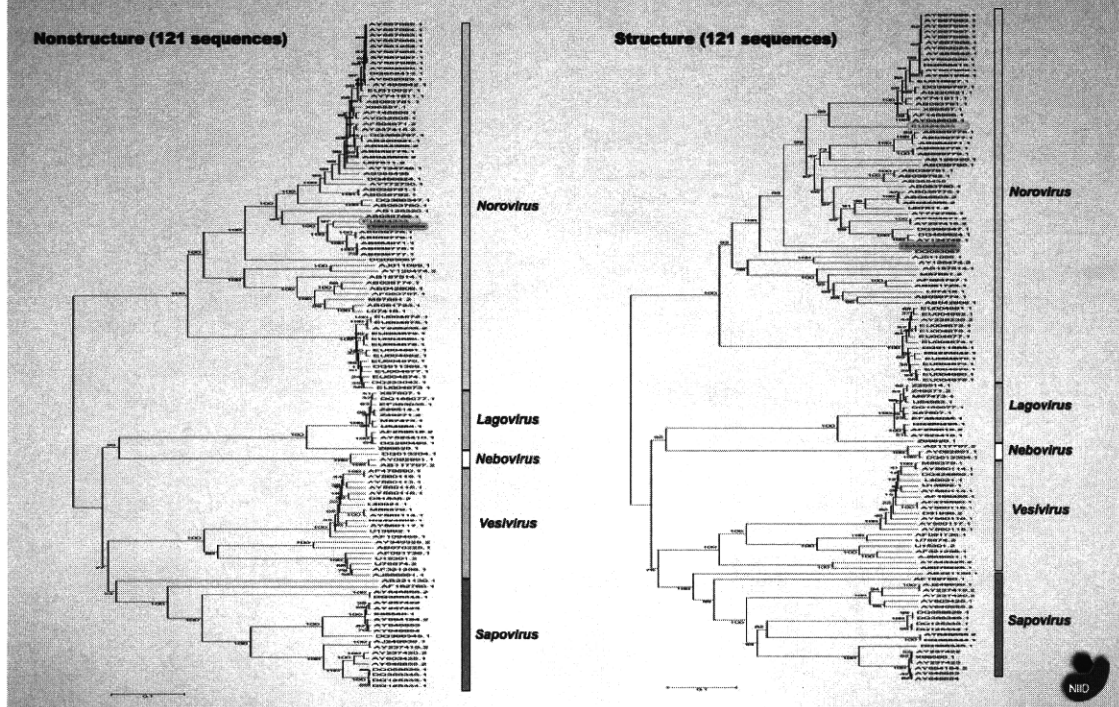


図2. カリシウイルス科に属するウイルス 121 株の分子系統樹。左側には ORF1 にコードされたアミノ酸配列を用いた NJ 法による分子系統樹を、右側には ORF2-3 にコードされたアミノ酸配列を用いた NJ 法による分子系統樹を示した。Norovirus, Sapovirus, Lagovirus, Vesivirus, Nebovirus のクラスターは、異なるグレースケールのバーで示した。HK299 はダークグレーでハイライトした。

Genome recombination was suspected in HK299 with phylogenetic analyses

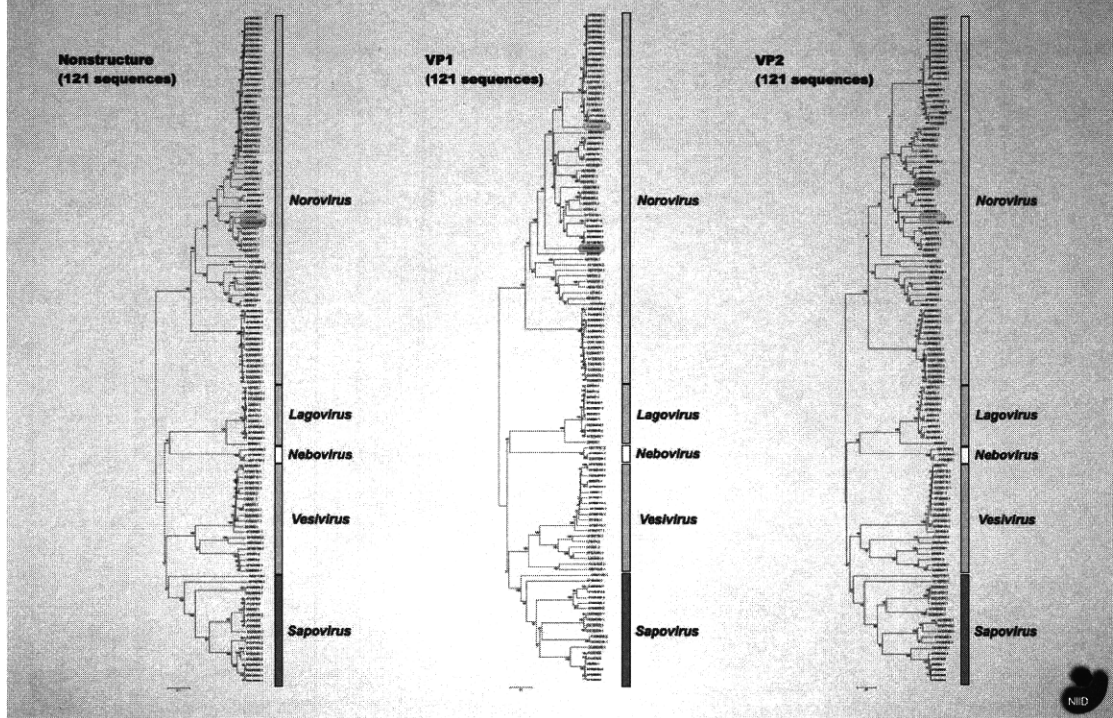


図3. カリシウイルス科に属するウイルス 121 株を用いた ORF 別の分子系統樹。左から ORF1, ORF2, ORF3 にコードされたアミノ酸配列を用いた NJ 法による分子系統樹。図 1 と同様に HK299 株をダークグレーでハイライトした。

The evidence of the inter genogroup recombination

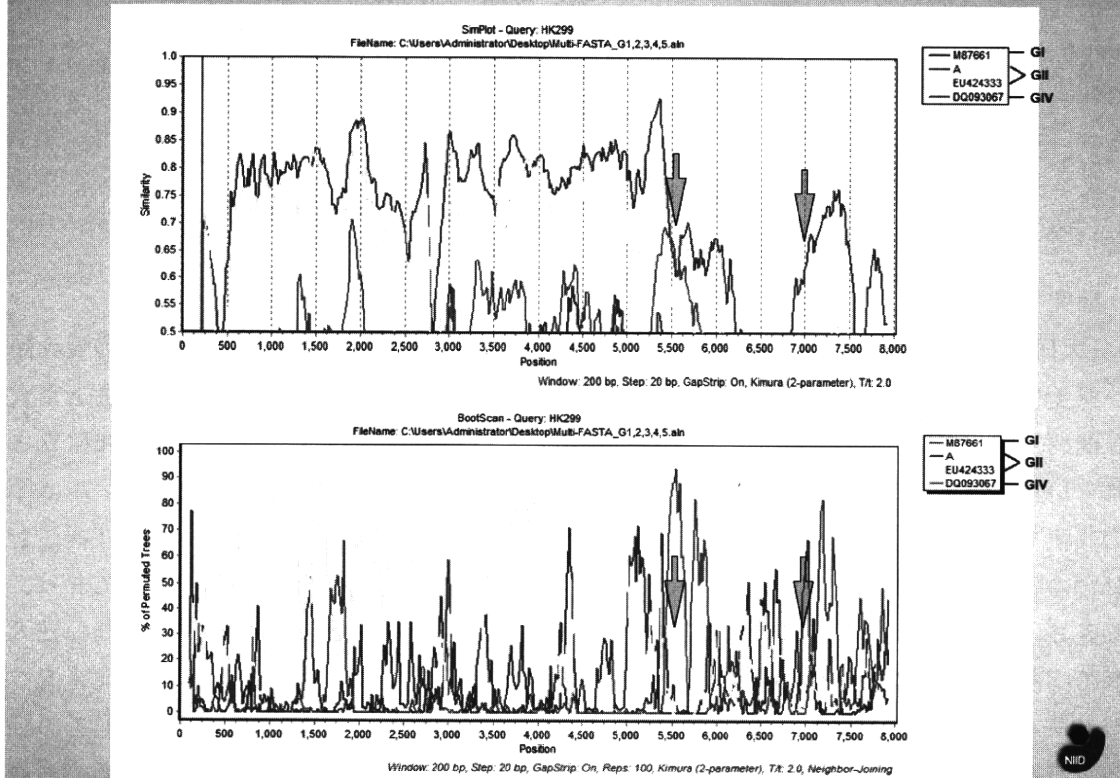


図 4. HK299 株を Query sequence とした SimPlot を上部に、BootScan を株に示した。比較対象とした株をそれぞれのグラフ右上に示した。矢印で、検出された組換え点を示した。

【狂犬病の治療法開発に関する研究】

「狂犬病治療法確立に向けた狂犬病ウイルス街上毒感染マウスモデルの評価」

研究分担者： 西園 晃 大分大学医学部微生物学講座 教授

研究要旨：

狂犬病は狂犬病ウイルスの感染によって引き起こされる脳炎で、ヒトを含む全ての哺乳類が感受性を持つ人獣共通感染症であり、今なお多くの発展途上国において公衆衛生上重大な問題となっている。発症後の致死率はほぼ 100%で、発症後の有効な治療法は未だ確立されていない。有効な治療法の確立のためには動物モデルが必須で、感染マウスモデルはその代表であるが、これまで狂犬病ウイルス感染マウスモデルの多くは街上毒（野外株）を動物の脳や培養細胞等で長期継代して得られた固定毒（実験室馴化株）が用いられており、固定毒は街上毒とは異なり末梢感染が成立しにくい、発症後の経過が早い等、本来の狂犬病の病態を反映しているとは言い難い側面があった。そこで今回は、1970 年代に北米でウッドチャックより分離された街上毒 1088 株をマウスに感染させ、狂犬病モデルとしての評価を行った。1088 株はマウスにおいて脳内 (i.c.) 接種でも右後肢筋肉内 (i.m.) 接種でも致死感染を起こし、その 50%致死量 (LD₅₀) はそれぞれ 6.8 フォーカス形成単位 (FFU) と 2.7×10^3 FFU で、固定毒である CVS 株より末梢感染性が約 30 倍高いことが示された。また潜伏期間および発症後の生存期間も CVS 株接種群と比べて 1088 株接種群では延長している等、1088 株感染マウスは街上毒の病態を反映しており、狂犬病発症モデルマウスとして非常に有用であると考えられた。また、1088 株の弱毒株を作出するため、1088 株をマウス神経芽細胞腫由来である NA 細胞で連続継代を計 30 代行った。30 代継代株 (1088-N30 株) は、NA 細胞への馴化が認められ、i.c.接種では親株と同様にマウスに致死感染を起こし、その LD₅₀ も 5.0 FFU であったが、一方 i.m.接種では発症したマウスの約 82%が耐過し(親株の場合では致死率約 91%)、高度に弱毒化していた。1088 株と 1088-N30 株の全塩基配列を決定し両者を比較したところ、1088-N30 株には 7 塩基置換が認められた。これらのうち 2 つは G タンパク質に認められ、1 つは N 型糖鎖の追加をもたらす変異であった。この変異が弱毒化に重要であると考えられたため、G タンパク質においてこの変異のみを持つ変異株 (1088-N4#14 株) を限界希釈法によりクローニングし、マウスにおける病原性を検討したところ、i.c.接種においては LD₅₀ が 6.8 FFU と親株および 1088-N30 株とほぼ同程度の病原性を示したが、i.m.接種においては発症したマウスの約 60%が耐過し、弱毒化していることが確認された。1088-N30 株・1088-N4#14 株の弱毒性状は発症しても耐過するという特徴であるため、この弱毒化機構の解明は狂犬病発症後の治療法確立につながると考えられた。

【研究目的】

狂犬病はラブドウイルス科リッサウイルス属の狂犬病ウイルスによって引き起こされる致死性のウイルス脳炎である。狂犬病は感染した家畜や野生動物の唾液によって伝播される。全世界で推定年間約 55,000 人が狂犬病によって亡くなっており、そのほとんどがアジアとアフリカに集中している。ヒトでの潜伏期間は長く不安定で、多くは 20-90 日間であるが、2-3 日以内や 1 年以上の場合もある。臨床症状が現れると有効な治療法はなく致死率はほぼ 100%である。現在のところ、曝露後ワクチンを繰り返し接種することが狂犬病の疑われる動物に咬まれた場合の唯一の発症予防手段である。

狂犬病ウイルス感染による脳炎では重篤な神経症状（錯乱、恐水症状、協調運動失調、幻覚、全身性の痙攣、昏睡および呼吸不全等）を呈するにもかかわらず、脳の病理組織像は軽微であり、顕著な神経細胞の変性や壊死が認められないことが知られている。このことから狂犬病による激しい神経症状は脳の器質的障害によるものではなく、むしろ機能的障害によるものであると考えられている。したがって、通常の脳炎すなわち神経細胞が破壊される場合では、神経細胞は再生能に乏しいため回復は難しいが、狂犬病の場合では神経細胞の機能障害を防ぐことができれば、狂犬病からの回復が可能であると推測される。

実際、以上の仮説をもとに 2004 年に Willoughby らにより考案され実行されたのがミルウォーキープロトコルである。ミルウォーキープロトコルでは通常の曝露後治療を行わず、ケタミンやバルビツール酸系薬で患者を昏睡状態にすることで神経機能を抑制、かつ抗 RNA ウイルス薬で

あるリバビリンを併用することで狂犬病ウイルスの増殖を抑制し、その間に患者の免疫系による狂犬病ウイルスの排除を待つという治療法である。これまでに 25 人の狂犬病患者に対してこの治療法が施され、このうち 3 人が回復しているが、治療率がまだ低いこと、治療に莫大な費用がかかるなど問題があり、改善が必要である。

狂犬病の治療法確立には動物モデルの確立が必須であり、狂犬病についてはマウスモデルが最も良く使用されている。ただし、接種するウイルスに野外株である街上毒ではなく、専ら固定毒が用いられてきた。固定毒とは街上毒を動物の脳や培養組織・細胞等で長期継代して作出された株で、現在、実験室馴化株としてワクチン製造や基礎的研究に広く用いられている。固定毒では長期継代の過程で性状の変化、すなわち感染動物における潜伏期の短縮化と一定化や末梢感染性の減少が認められる。したがって、固定毒を用いた動物（マウス）モデルでは、本来の狂犬病を再現しているとは言い難い。

そこで本研究では、狂犬病の治療法確立に向けて、街上毒感染マウスの狂犬病モデルとしての評価を行うことを目的とした。さらに、狂犬病治療法の確立する上で狂犬病ウイルス街上毒の病原性発現機序の解明することも必須であり、それに向けて街上毒から連続継代により弱毒株を確立し、その弱毒化機構を解明することで街上毒の病原性発現機序を解明することも同時に試みた。

【研究方法】

ウイルスとウイルスカ価測定

街上毒には 1970 年代に北米でウッドチャックより分離された 1088 株を用いた。

1088 株には乳飲みマウスの脳で増幅され、10%脳乳剤上清としたものを使用した。

1088 株のマウス神経芽細胞腫来 NA 細胞での継代は 5% FCS・Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) にて盲継代により行い、継代 30 代目を 1088-N30 株として用いた。

1088 株の G タンパク質 N 型糖鎖追加変異株は、継代 4 代目のストックウイルスより限界希釈法によりクローニングした。すなわち、12 ウェルプレートに単層培養された NA 細胞に、1 ウェルあたり 0.5 フォーカス形成単位 (FFU) になるように調整して接種した。ウイルスの接種後、5% FCS-DMEM 培地にて 37°C、5% CO₂ で培養した。培養 11 日目に、各ウェルの上清を回収し、細胞は 1%NP-40 を含む細胞溶解液で溶解し、後述するウェスタンブロットにより G タンパク質の移動度を確認した。糖鎖付加により G タンパク質の移動度が小さくなっていたクローンについては、NA 細胞でさらに増殖させた後、後述する方法により G 遺伝子の塩基配列の確認を行った。こうして得られたいくつかのクローンうち、1088-N4#14 を G タンパク質 N 型糖鎖追加変異株として用いた。

Challenge virus standard (CVS) 株には 5% FCS-MEM 培地にて NA 細胞で増殖したものを用いた。

ウイルス力価の測定は NA 細胞でフォーカス法により行った。すなわち、10 倍段階希釈したウイルス液をそれぞれ 24 ウェルプレートで単層培養した NA 細胞に接種した。1 時間の吸着の後、上清を取り除き、ハンクス液で洗浄後、5%FCS-MEM/1%メチルセルロース培地にて 37°C、5%CO₂ で 3 日もしくは 4 日間

培養した。その後、4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、0.2% Triton X-100 を含む PBS で細胞膜の透過処理を行った後、FITC-RABV N MAb (富士レビオ) で染色した。そして、蛍光顕微鏡下で蛍光フォーカスを計数し、FFU として算出した。

ウイルスゲノム塩基配列の決定

ウイルスゲノム RNA は Trizol (Invitrogen) により抽出・精製した。精製した RNA より、SuperScriptIII (Invitrogen) およびプライマーにランダムヘキサマーを用いて cDNA の合成を行った。この cDNA を鋳型にして、Table 1 に記載された各種プライマーセットと Ex Taq (TaKaRa) を用いて、ゲノム全長をほとんどカバーするように各 DNA 断片の増幅を行った。増幅された DNA 断片は Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel) を用いて精製した後、BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied biosystems) と各プライマー (Table 1) でオートサイクル反応を行い、Applied Biosystems 3130 genetic analyzer (Applied biosystems) によって塩基配列を得た。ゲノムの 5' および 3' 末端については、SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) により両末端の DNA 断片を増幅し、上述の方法で塩基配列を決定した。

ツニカマイシン処理による糖鎖付加阻害実験

単層培養された NA 細胞に各ウイルスを multiplicity of infection (m.o.i.) = 1 で接種し、ツニカマイシン (Sigma) 存在下 (1 µg/ml) もしくは非存在下で 37°C、5% CO₂ にて培養した。培養 28 時間後に、

感染細胞は細胞溶解液にて溶解処理後、ウェスタンブロットに供試した。

NA 細胞におけるウイルス増殖曲線

24 ウェルプレートに単層培養された NA 細胞に各ウイルスを m.o.i. \approx 0.01 もしくは m.o.i. \approx 1 で接種し、5% FCS-MEM 培地にて 37°C、5% CO₂ で培養した。培養 24、48、72 および 96 時間後に培養上清を回収し、フォーカス法に上清中のウイルス力価を算出した。

ウェスタンブロット

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) は Laemmli らによる方法をもとに行った。試料は等量の 2×サンプルバッファー [125mM Tris-HCl (pH 6.8)、4% SDS、10% sucrose、0.01% bromophenol blue および 10% 2-メルカプトエタノール] と混合した後、熱変性処理された。試料は 10% SDS-PAGE にて泳動した。泳動後、分離されたタンパク質はフッ化ポリビニリデン (PVDF) 膜に転写され、5%スキムミルクおよび 0.1% Tween-20 を含む PBS により PVDF 膜のブロッキングを行った。PVDF 膜はまず抗狂犬病ウイルス G タンパク質マウスモノクローナル抗体 (15-13; 杉山誠岐阜大学教授より分与) と、続いて HRP 標識ヒツジ抗マウス IgG 抗体と反応させた。PVDF 膜は SuperSignal West Femto Maximum Substrate (Thermo Fisher Scientific) で処理し、X 線フィルム (Hyperfilm ECL; GE Healthcare) に露光した。

マウス接種試験

10 倍段階希釈したウイルス液を準備し、6 週齢の雌 ddY マウス (九動) の脳内に接種 (i.c., 0.03 ml/mouse)、もしくは右後肢大腿筋に接種 (i.m., 0.05 ml/mouse) し、i.c.接種については 28 日間、i.m.接種については 42 日間、接種したマウスの体重変化、臨床症状および生死を観察した。50% 致死量 (LD₅₀) については Reed and Munch 法により算出した。観察終了後には採血し、血清を分離した。マウス接種試験は大分大学の動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

迅速蛍光フォーカス阻止試験(RFFIT)による抗狂犬病ウイルス中和抗体価(VNA)の測定

RFFIT は先行研究に従って行った。すなわち、96 ウェルプレートにて、マウス血清と等量の 2%FCS-MEM で希釈された CVS 株 (100 TCID₅₀) とを混ぜ、37°C、5% CO₂ で 90 分間反応させた。次に BHK-21 細胞 (1×10⁵ cell/well) をそれぞれのウェルに加え 24 時間培養した。最後に細胞を 90%アセトンで固定し、FITC-RABV NMAb と 37°C で 45 分間反応させ、蛍光顕微鏡下で一視野における感染細胞の有無を観察した。中和力価 (international unit: IU) の決定のため、WHO の国際標準品 [RAI: Anti-rabies Immunoglobulin, Equine, National Institute for Biological Standards & Control (NIBSC)] と比較し、Spearman-Kärber 法により算出した。

【研究結果】

1088 株のマウスにおける病原性の検討: CVS 株との比較

1088 株を成熟マウスに i.c.接種したと

ころ用量依存的に致死感染を起こし、その LD₅₀ は 6.8 FFU であった。固定毒である CVS の LD₅₀ は 1.5 FFU で、i.c. 接種における病原性について両株間に大きな違いは認められなかった。

一方、i.m. 接種では Table 2 に示すように両株とも用量依存的に成熟マウスに致死感染を起こしたが、CVS 株に比べて 1088 株では致死感染がより低い用量でも認められた。i.m. 接種における 1088 株の LD₅₀ は 2.7×10^3 FFU で、CVS 株では 1.9×10^4 FFU であり、i.c. LD₅₀:i.m. LD₅₀ 比をそれぞれ算出し比較すると、1088 株の方が、末梢感染性が約 30 倍高いことが示された。加えて、i.m. 接種における潜伏期間、生存期間についても比較したところ、CVS 株感染に比べて 1088 株感染ではいずれの用量でも潜伏期間および発症後の生存期間ともに延長が認められ、特に 1088 株感染では低用量接種になるほど潜伏期間が延長しバラツキが大きくなる傾向が観察された。また観察された神経症状についても CVS 株感染では全身性の麻痺が急速に進行するのに対し、1088 株感染では麻痺の程度は弱く神経症状の進行は緩徐であったが、いくつかの個体で噛み付き行動が観察された。

NA 細胞での連続継代による 1088 株の弱毒株の確立

1088 株を NA 細胞において計 30 代盲継代を行ったところ、継代 1 代目における培養上清中のウイルスカ価が 10^5 FFU/ml オーダーであったのに対し、30 代目では 10^8 FFU/ml オーダーとウイルスカ価の大幅な上昇、すなわち NA 細胞への馴化が確認された。実際、NA 細胞における増殖性を検討したところ、Fig. 1 に

示すように、1088-N30 株は 1088 株に比べて m.o.i. ≈ 0.01 では約 1,000 倍、m.o.i. ≈ 1 でも約 80 倍ウイルス産生量が亢進していた。

この 1088-N30 株を成熟マウスに i.c. 接種したところ致死感染を起こし、その LD₅₀ は 5.0 FFU で、親株である 1088 株とほぼ同等であった。

一方、i.m. 接種においては、Table 2 に示すように、1088 株 10^6 もしくは 10^5 FFU 接種群では致死率 (Case-fatality rate) がそれぞれ 100% もしくは 70% であったのに対し、1088-N30 株 10^6 もしくは 10^5 FFU 接種群ではほとんどの個体が発症したにも関わらず、致死率がそれぞれ 0% と 11.1% であった。全体で見ても、1088 株接種では 33 匹発症し、そのうち 30 匹が死亡した (致死率約 91%) が、1088-N30 株接種では 28 匹発症し、そのうち 5 匹が死亡 (致死率約 18%) と顕著な弱毒化が認められた。1088-N30 株の臨床症状は、体重減少のみもしくは接種部位である右後肢の軽度の麻痺が認められた程度であった。しかし、1088-N30 株接種で発症し耐過したマウスの約 77% (17/22) で、程度の差はあったが右後肢の麻痺が後遺症として認められた。

1088-N30 株の性状解析

1088 株および 1088-N30 株の全塩基配列を決定し比較したところ、1088-N30 株において計 7 つの塩基置換が認められ、そのうち 3 つはアミノ酸置換を伴う変異であった (Table 3)。認められたアミノ酸置換のうち、2 つのアミノ酸置換は G タンパク質に認められ、さらに 196 番目のアルギニン (Arg) からセリン (Ser) への変異により N 型糖鎖付加配列が生じて

いた (N₁₉₄S₁₉₅R₁₉₆ → N₁₉₄S₁₉₅S₁₉₆)。一方、非コード領域に認められた変異は、これまで知られている機能領域とは異なる部位であった。

196番目の変異 (R196S) 変異により実際に G タンパク質に N 型糖鎖が追加されているかどうかの確認を N 型糖鎖付加阻害剤であるツニカマイシン処理により検討を行った。Fig. 2 に示すように、ツニカマイシン未処理では 1088-N30 株 G タンパク質の移動度は 1088 株 G タンパク質の移動度より小さかったのに対し、ツニカマイシン処理では 1088 株および 1088-N30 株の G タンパク質の移動度は共に未処理の場合よりも大きくなり、しかも同じ移動度を示した。したがって、1088-N30 株 G タンパク質には N 型糖鎖が追加されていることが確認された。

N 型糖鎖追加 1088 株変異株のクローニング

データは示してはいないが、N 型糖鎖の追加をもたらす G タンパク質 R196S 変異は継代の過程において最も早く出現した変異で、継代 4 代目に出現した。加えて Table 4 に示すように、G タンパク質における推定 N 型糖鎖付加部位は、街上毒 (street viruses) では 1 もしくは 2 カ所であるのに対し、固定毒 (fixed viruses) では 3 もしくは 4 カ所と多いことから、G タンパク質への N 型糖鎖の追加すなわち R196S 変異が 1088-N30 株の弱毒性状に大きく関与している可能性が考えられた。

そこで 1088 株 NA 細胞継代 4 代目のストックウイルスより、R196S 変異を単独で有する 1088 変異株のクローニングを限界希釈法により試みた。G 遺伝子において R196S 変異が単独で認められた 7 つのク

ローンのうち #14 (1088-N4#14) を選んで以後の解析に用いた。

1088-N4#14 株の全塩基配列を決定し、親株である 1088 株と比較したところ、R196S 変異加えて 1 カ所、P タンパク質に G61E 変異が認められた (Table 3)。この G61E 変異はいくつかの街上毒でも認められる変異でもあった [AF369289 (coyote, USA), AF369308 (coyote, USA), AF369337 (coyote, USA), AF369313 (dog, Mexico), EU004773 (skunk, Mexico) および AY998275 (dog, China) 等]。

1088-N4#14 株の G タンパク質における N 型糖鎖の追加についてツニカマイシン処理による検討を行ったところ、1088-N30 株の場合と同じ結果が得られ、N 型糖鎖の追加が確認された (Fig. 2)。

1088-N4#14 株の NA 細胞における増殖性も調べたところ、1088-N30 株と同様に 1088 株と比べて増殖性が亢進しており、m.o.i. = 0.01 では約 1,000 倍、m.o.i. = 1 でも約 700 倍ウイルス産生量が高かった (Fig. 1)。

1088-N4#14 株のマウスにおける病原性の検討

1088-N4#14 株の成熟マウスにおける病原性について、1088 株および 1088-N30 株と同様に評価した。1088-N4#14 株を i.c. 接種した場合、LD₅₀ は 6.8 FFU で、1088 株と同じであった。

一方、Table 2 に示すように、1088-N4#14 株の i.m. 接種では 10⁶ FFU 接種において 10 匹発症し、そのうち 5 匹死亡した (致死率 50%)。全体を通して、致死率は約 40% (15/38) で 1088 株 (致死率約 91%) と比較した場合には低下していた