

ヒトに感染が疑われているレトロウイルスとウイルス安全性

遊佐 敬介^{*1, #}, 山口 照英^{*2}, 川崎 ナナ^{*1}

ヒトに感染が疑われているレトロウイルスとウイルス安全性

遊佐 敬介^{*1, #}, 山口 照英^{*2}, 川崎 ナナ^{*1}

(受付: 平成 23 年 2 月 15 日, 受理: 平成 23 年 3 月 30 日)

Xenotropic Murine Leukemia Virus-related Virus and Viral Safety

Keisuke YUSA^{*1, #}, Teruhide YAMAGUCHI^{*2} and Nana KAWASAKI^{*1}

1. はじめに

エイズ患者がはじめて報告されたのは 1981 年である。不幸な血液製剤汚染の例をあげるまでもなく、生物製剤におけるウイルス安全性の問題は常に問われ続けている大きな課題のひとつである。ここ 30 年を振り返ってもエイズウイルスの他に新規のウイルス感染症が相次いで報告された。SARS ウイルス、ニパウイルス、ウェストナイルウイルスなどは大きな社会問題になった。SARS、ニパウイルスは、今後感染者を出す可能はあるものの、幸いなことにこれらはすばやい対応によって局所的な流行で封じ込められてきている。一方感染者の一部に脳炎を発症させるウェストナイルウイルスは、アフリカ北東部から既に北米に侵入し、2010 年には全米で 981 人の感染者が確認されており、メキシコにも広がりつつある。このウイルスは野鳥に感染して運ばれ、蚊によって感染が広がる。こうした人獣新興感染症は感染が広がると、輸血、臓器移植、血液製剤を含めた生物製剤のウイルス安全性に脅威となるので常に監視をしていく必要がある。

最近ある種のレトロウイルスが前立腺癌¹⁾や慢性疲労症候群^{2,3)}の患者群で高率に感染しているという報告が米国であった。しかも健常人でもその 3.7% にウイルス感染が見つかったという報告²⁾があり、議論を呼んでいる。だが、その後ウイルス感染が確認できないとする否定的な報告が相次いだ^{4~8)}。ヒトの疾患とウイルスの因果関係を即断するには、注意深さも必要だ。過去にはウイ

ルスとの関係を疑われるものの、その後確認することができず、結局否定された事例が過去にいくつもあるからである⁹⁾。

2. レトロウイルス感染の報告

2.1 前立腺癌患者でのレトロウイルス感染報告

ことの始まりは、前立腺癌発症に関係する遺伝子を探索する過程で見つかった RNase L 遺伝子である^{1,10)}。この遺伝子を調べてみると、興味深いことに RNase L の 462 番目のアミノ酸は通常アルギニンだが、これがグルタミンに変わっている変異 R462Q をもっている人がいることがわかった。RNase L というのは、RNA の分解酵素のひとつである。ウイルス感染によってインターフェロン type I の分泌を介して、RNase L が活性化され、外界からの RNA を分解し、感染を防ぐ。ちなみにこの抗ウイルスシステムを担う RNase L の遺伝子をノックアウトしたマウスでは、ピコルナウイルス、コクサッキーウイルス B4 などに感染しやすくなることが確かめられている。

常染色体上の遺伝子は通常母方と父方から一つずつ受け継いでいる。R462Q の変異 RNase L を持つ人の前立腺癌の発症率を見ていくと、この変異遺伝子を持つ人 (RQ) は前立腺癌の発症率が、1.5 倍にあがり、二つ持った人 (QQ) では 2 倍にあがる。実際、この変異のために RNase L の活性は本来の 1/3 にまで低下して

^{*1} 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)
National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

^{*2} 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 東京都千代田区霞が関 3-3-2 (〒100-0013)
Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda, Tokyo 100-0013, Japan

責任著者 Corresponding author

しまう。そのため変異 RNase L を二つもっている人は、病原体に対する防御機能が低下していると考えられる。そこで QQ の人で、前立腺癌を発症した患者の癌細胞にウイルスが感染しているかどうかを調べたところ、患者の 40% からマウス白血病ウイルスによく似た未知のレトロウイルスが検出された。そのウイルスは、異種指向性マウス白血病ウイルス関連レトロウイルス (XMRV) と名付けられた。その塩基配列は従来までよく知られている XMLV 系統のものとは違うが、極めて近い。もちろん RNase 活性の低下によって感染しやすくなった結果、ウイルスが見つかっただけかもしれない、癌発症との因果関係を議論するには十分ではない。不思議な点は XMRV が癌細胞そのものではなく、周辺のストローマ細胞に感染している点である¹⁾。その後別の研究グループが、ウイルスはストローマ細胞よりむしろ末期の前立腺癌細胞に感染しており、RNase L の変異とウイルスの感染率は関係がないと報告している¹⁰⁾。またヨーロッパの他のグループは、前立腺癌を同様に調べたが RNase L の変異の有無に関わらず、ウイルスの感染を検出することはできなかった^{4,11)}。XMRV 感染者は北米にのみ存在しているのか、ウイルスはストローマ細胞にのみ感染し、癌細胞には感染していないのか、R462Q 変異は発癌過程と関係しているのかといった点も含め、まだ不明な点が多い。

2.2 慢性疲労症候群患者でのレトロウイルス感染の報告

慢性疲労症候群とは、強度の疲労が長期にわたって続く原因不明の疾患である。Lombardi *et al.*²⁾ は、慢性疲労症候群の患者で 67%、健康人では 3.7% の血液サンプルから XMRV を核酸増幅法によって容易に検出することができたと報告した。おどろいたことに感染細胞からは、ウイルス抗原が容易にみつかり、ウイルスが分離された。ウイルスは血中に比較的高いコピー数で存在し、末梢血中のリンパ球に感染が確認された。感染者のリンパ球を培養すると実際に調べた 5 人の患者すべての細胞でウイルスのエンベロープ抗原が確認されている。もしこれが本当に特異的なウイルス抗原をみているとすると、XMRV はほかのどんなレトロウイルスよりも末梢リンパ球に高い感染率を示していることになる。ところが、この報告に続く複数の独立した研究グループからは、慢性疲労症候群の患者で XMRV 感染の証拠を見つけることはできないという報告が相次いだ⁵⁻⁸⁾。

昨年の 12 月に慢性疲労症候群の患者で XMRV とは異なるが同じマウスレトロウイルスの一種である MLV 関連ウイルス (MLV に近縁のウイルス) が高率でみつかり、

感染と発症の間に関係があるのではないかと報告された³⁾。従来まで慢性疲労症候群の発症は、ウイルス感染のほか多様な原因で起きるのではないかと考えられていた。そのため患者でのウイルス感染の二つの報告は驚きとともに受け止められた。もし慢性疲労症候群とレトロウイルス感染とのあいだになんらかの関係があることが裏づけられれば、極めて重要な発見となるのはいうまでもない。慢性疲労症候群がレトロウイルス感染によって引き起こされるとするなら、抗ウイルス剤による有効な治療が可能になるからである。

まとめるとこうなる。現在ヒトに感染が疑われているウイルスはマウスのレトロウイルスによく似ており、2 種類が報告されている。一つは、XMRV (異種指向性マウス白血病ウイルス関連ウイルス) もう一つは MLV 関連ウイルスである。前者の XMRV は、前立腺癌と慢性疲労症候群の発症との関係が疑われている。このウイルスは、マウス白血病ウイルスに似てはいるがマウス細胞にもはや感染できない。おそらく進化の過程で、げっ歯類から異なる宿主に感染したものと考えられる。異種指向性とは、ヒト細胞などの異種の細胞に感染することができるのに、マウスの細胞にはもはや感染できなくなっているウイルスをいう^{12,13)}。テナガザルやコアラで見つかるレトロウイルスは、南東アジアのげっ歯類のウイルスが、進化のある時点でテナガザルやコアラに感染したものと考えられている^{12,14)}。だからといって、今回報告された XMRV がごく最近マウスからヒトに人間に感染したとは考えにくい¹⁵⁾。また後者の MLV 関連ウイルスは、いまのところ慢性疲労症候群患者で高率に感染していると報告されており、マウスゲノムに見いだされる内在性レトロウイルスとごく近縁のウイルスである。

3. ウイルス検出の真偽

3.1 近縁ウイルスによる実験室の汚染

今回問題になっているレトロウイルスは、生命科学系の実験室では非常に身近なマウスのレトロウイルスの近縁種である。あまりに身近なために、実験室で用いられる細胞や試薬は、レトロウイルスの核酸で汚染されているといつてよいくらいなのである。そのため核酸増幅検査では、既知のマウスレトロウイルスの核酸の混入に十分注意する必要がある。多くのヒト癌細胞株は、ヌードマウスに移植片として移植されたのちに樹立されたという経緯がある。そのため、マウスに移植されたときにマウス個体内で移植細胞への感染がおきた可能性がある¹⁵⁾。また実験室内で感染細胞株から感染していないヒトの細胞株に、ウイルスが水平感染を起こすことも考えられる。

通常ウイルスを扱わない実験室では厳密にウイルスを封じ込めることはないので、ウイルス感染が知らぬ間にひろがっている可能性は十分ある。

またレトロウイルス汚染 DNA は、実験試薬にも含まれている。モノクローナル抗体を産生するマウスハイブリドーマの 50% が異種指向性のマウスのレトロウイルスを分泌していたという報告もある¹⁵⁾。しかも核酸増幅試薬のなかには、低温でのポリメラーゼ活性をブロックするためにマウスモノクローナル抗体が、核酸増幅試薬に含まれているものがある¹⁶⁾。つまりウイルス核酸の有無を調べる際に用いられる試薬が、レトロウイルス DNA で汚染されている可能性があることになる。実際こうした核酸増幅試薬を使い、鋳型をいれずに、核酸増幅を行うと、バンドが検出できるという報告もある¹⁶⁾。したがって、マウスレトロウイルス近縁のウイルス検出を実験室で行う場合は細心の注意を払わなくてはならない。

似たようなことが過去に何度も起きている。1972 年には、ある小児横紋筋肉腫に由来するヒト細胞株で新規のレトロウイルスが発見され、最初のヒト由来の RNA 腫瘍ウイルスとして脚光を浴びた。ところがこのウイルスは、のちにネコ由来の異種指向性のレトロウイルスであることがわかったのである。じつは問題の細胞株は樹立

される前に一時的に猫の脳内で異種移植片として継代されており、ウイルスはこの細胞が移植片として継代されていたときに宿主であるネコから感染したものであった¹³⁾。

3.2 マウスレトロウイルス核酸の混入の可能性

前立腺癌、慢性疲労症候群患者からのレトロウイルスが、マウスレトロウイルスの核酸の混入によるものではないかという疑いが出てきた。その一つは、XMRV の検出には、XMRV でのみ 24 塩基欠損している gag の leader 配列をターゲットにするプライマーが使われてきたが、この欠損は必ずしも XMRV に特異的ではないことがわかったことだ。Hue ら¹⁷⁾によると、欠損領域を標的としたプライマーを使って一般的に実験室で使用される 12 種類の野生由来近交系マウス DNA から内在性の MLV を容易に増幅することができた。同様にヒトの 411 株のがん細胞のうち 5 株から MLV の配列を増幅することも示された。つまり、もしマウス細胞株やヒト癌細胞株の DNA が検体に混入しているとその検体は擬陽性となる可能性が十分あることがわかったのである。

それでは患者から得られた XMRV の塩基配列は、実験室における近縁ウイルスとどんな関係にあるのだろうか¹⁷⁾。患者由来ウイルスの塩基配列をヒトの前立腺癌由

Table 1 前立腺癌、慢性疲労症候群患者での XMRV の検出

患者	健常人	結論	文献
86 人中 9 人が RT-PCR 陽性			Urisman <i>et al.</i> : <i>PLoS Pathog.</i> , 2, e25 (2006) Mar
87 人中 1 人が RT-PCR 陽性	70 人中 1 人が陽性	否定	Fischer <i>et al.</i> : <i>J. Clin. Virol.</i> , 43, 277-283 (2008) Nov
233 人中 14 人が PCR 陽性, 54 人がウイルス抗原陽性	101 人中 2 人が PCR 陽性, 4 人がウイルス抗原陽性		Schlaberg <i>et al.</i> : <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 106, 16351-16356 (2009) Sep
589 人が PCR, RT-PCR 陰性, 146 人のウイルス抗原を検査し陰性	5 人全員が抗原陰性	否定	Hohn <i>et al.</i> : <i>Retrovirology</i> , 6, 92 (2009) Oct 16
800 人弱中陽性 0		否定	Aloia <i>et al.</i> : <i>Cancer Res.</i> , 70, 10028-10033 (2010) Oct
144 人中 32 人が PCR で陽性			Danielson <i>et al.</i> : <i>J. Infect. Dis.</i> , 202, 1470-1477 (2010) Oct
101 人中 68 人が PCR 陽性	218 人中 8 人が PCR 陽性		Lombardi <i>et al.</i> : <i>Science</i> , 326, 585-589 (2009) Oct
136 人検査し, PCR 陰性	95 人検査し, PCR 陽性	否定	Groom <i>et al.</i> : <i>Retrovirology</i> , 7, 10 (2010) Feb
32 人検査し, RT-PCR で陰性	43 人検査し, RT-PCR 陰性	否定	van Kuppeveld <i>et al.</i> : <i>BMJ</i> , 6, c1018 (2010) Feb
186 人検査し, PCR で陰性		否定	Erlwein <i>et al.</i> : <i>PLoS One</i> , 5, e8519 (2010) Mar
51 人検査し, PCR 陰性	56 人検査し, PCR 陰性	否定	Switzer <i>et al.</i> : <i>Retrovirology</i> , 7, 57 (2010) Jul
37 人中 32 人が PCR 陽性	44 人中 3 人が PCR 陽性		Lo <i>et al.</i> : <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 107, 1470-1477 (2010) Sep
151 人検査し, PCR で陰性, 79 人を検査し, RT-PCR で陰性	43 人検査し, RT-PCR 陰性	否定	Barnes <i>et al.</i> : <i>J. Infect. Dis.</i> , 202, 1482-1485 (2010) Nov
198 人検査, PCR 陰性	95 人検査し, PCR 陰性	否定	Henrich <i>et al.</i> : <i>J. Infect. Dis.</i> , 202, 1478-1481 (2010) Nov

文 献

来の 22Rv1 細胞株に感染しているウイルスの塩基配列を比較してみると、22Rv1 細胞株に感染しているウイルスに極めてよく似ていることが分かった。22Rv1 細胞株は、細胞株樹立の過程で XMRV 近縁ウイルスに感染したものと推定されている。以上から患者由来ウイルスは 22Rv1 細胞株のプロウイルスと起源を同じくする可能性でできた。その上患者由来の XMRV は、22Rv1 細胞由来のウイルスに比べて、多様性に乏しく独立のコホートに属する複数の患者由来のウイルスと考えるには極めて不自然に思える。

国内では慢性疲労症候群の患者に関して XMRV 感染の有無を調べた報告があるが、いずれも感染に否定的な発表であった^{18, 19)}。既に述べた状況を考慮すると、XMRV や MLV 関連ウイルス感染は、前立腺癌、慢性疲労症候群といった疾患とは関係がない可能性が高い。一部には感染ウイルスが分離されているので、すべてが近縁ウイルス核酸の混入が原因だと断言はできないが、これらウイルスの実在を疑うのに十分な証拠が蓄積されている段階であるといつてよい (Table 1)。そのため米国では 150 人の慢性疲労症候群の患者検体と同数の健康人の検体を使って複数の研究機関で同じ検出法によって調べる大規模な計画が進行中である²⁰⁾。これによってある程度の最終的な結論がでるものと期待されている。

4. 血液製剤の安全性

HIV, HCV, HBV に関しては、採血された血液は核酸増幅検査によって調べられ、ウイルス汚染血液は除去される体制が既に整っている。もし新規ウイルスのヒトへの感染があれば、広範なスクリーニングを行う体制を整備することは技術上問題ないと考えられる。血漿分画製剤は原料を一部海外からの輸入に頼っているが、たとえ原料に新規レトロウイルスが含まれていたとしても、血漿分画製剤製造工程には、ウイルス不活化、除去工程があり、血漿分画製剤の安全性を脅かす可能性は低い。レトロウイルスはエンベロープをもつウイルスなので、製造工程における界面活性剤処理、熱処理などによって容易に感染性を失うことが予想されるからだ。

Table 2 新規ヒト疾患関連ウイルス検出の際の注意点

1. バックグラウンドの少ない特異的な核酸増幅用プライマーを準備する。
2. 検出する新規ウイルスが、MLV, SV40 などに近縁である場合はこれら近縁のウイルス核酸による汚染に注意する。
3. 標準となる陽性、陰性核酸増幅用サンプルとプライマーを準備し、研究機関配布してそれらを対照とする。

- 1) Urisman, A., Molinaro, R. J., Fischer, N., Plummer, S. J., Casey, G., Klein, E. A., Malathi, K., Magi-Galluzzi, C., Tubbs, R. R., Ganem, D., Silverman, R. H., DeRisi, J. L.: *PLoS Pathog.*, **2**, e25 (2006).
- 2) Lombardi, V. C., Ruscetti, F. W., Das Gupta, J., Pfost, M. A., Hagen, K. S., Peterson, D. L., Ruscetti, S. K., Bagni, R. K., Petrow-Sadowski, C., Gold, B., Dean, M., Silverman, R. H., Mikovits, J. A.: *Science*, **326**, 585-589 (2009).
- 3) Lo, S. C., Pripuzova, N., Li, B., Komaroff, A. L., Hung, G. C., Wang, R., Alter, H. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 15874-15879 (2010).
- 4) Hohn, O., Krause, H., Barbarotto, P., Niederstadt, L., Beimforde, N., Denner, J., Miller, K., Kurth, R., Bannert, N.: *Retrovirology*, **6**, 92 (2009).
- 5) van Kuppeveld, F. J., de Jong, A. S., Lanke, K. H., Verhaegh, G. W., Melchers, W. J., Swanink, C. M., Bleijenberg, G., Netea, M. G., Galama, J. M., van der Meer, J. W.: *BMJ*, **340**, c1018 (2010).
- 6) Erlwein, O., Kaye, S., McClure, M. O., Weber, J., Wills, G., Collier, D., Wessely, S., Cleare, A.: *PLoS One*, **5**, e8519 (2010).
- 7) Groom, H. C., Boucherit, V. C., Makinson, K., Randal, E., Baptista, S., Hagan, S., Gow, J. W., Mattes, F. M., Breuer, J., Kerr, J. R., Stoye, J. P., Bishop, K. N.: *Retrovirology*, **7**, 10 (2010).
- 8) Switzer, W. M., Jia, H., Hohn, O., Zheng, H., Tang, S., Shankar, A., Bannert, N., Simmons, G., Hendry, R. M., Falkenberg, V. R., Reeves, W. C., Heneine, W.: *Retrovirology*, **7**, 57 (2010).
- 9) Voisset, C., Weiss, R. A., Griffiths, D. J.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **72**, 157-196, table of contents (2008).
- 10) Schlaberg, R., Choe, D. J., Brown, K. R., Thaker, H. M., Singh, I. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 16351-16356 (2009).
- 11) Cornelissen, M., Zorgdrager, F., Blom, P., Jurriaans, S., Repping, S., van Leeuwen, E., Bakker, M., Berkhout, B., van der Kuyl, A. C.: *PLoS One*, **5**, e12040 (2010).
- 12) Kurth, R., Bannert, N. *Retroviruses*. Norfolk: Caister Academic Press; 2010.
- 13) Weiss, R., Telch, N., Varmus, H., Coffin, J. *RNA Tumor Viruses: Molecular Biology of Tumor Viruses* (2nd Edition). New York: Cold Spring Harbor Lab, Cold Spring Harbor, NY 1984.
- 14) Voevodin, A. F., Marx, P. A. *SImin Virology*. Ames: Wiley-Blackwell; 2009.
- 15) Weiss, R. A.: *BMC Biol.*, **8**, 124 (2010).
- 16) Sato, E., Furuta, R. A., Miyazawa, T.: *Retrovirology*, **7**, 110 (2010).
- 17) Hue, S., Gray, E. R., Gall, A., Katzourakis, A., Tan, C. P., Houldcroft, C. J., McLaren, S., Pillay, D., Futreal, A., Garson, J. A., Pybus, O. G., Kellam, P., Towers, G. J.: *Retrovirology*, **7**, 111 (2010).
- 18) 佐藤英次, 古田里佳, 倉恒弘彦, 庄嶋貴之, 中富康仁, 保井一太, 宮沢孝幸. 第 58 回日本ウイルス学会学術総会. 徳島 (2010).
- 19) 古田里佳, 杉山武毅, 宮沢孝幸, 佐藤英次, 倉恒弘彦, 保井一太, 平山文也. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会. 徳島. 263 (2010).
- 20) Kaiser, J.: *Science*, **331**, 17 (2011).

