

5. パラミクソウイルス (1)

—B95a 細胞が麻疹ウイルス研究に与えた衝撃—

竹内 薫

はじめに

麻疹は発熱、コプリック斑、発疹などの特徴的な臨床症状を示す小児の代表的なウイルス疾患である。強烈な伝播力を示し、WHOの推計によると発展途上国を中心に毎年全世界で3,000万人が罹患し、100万人の乳幼児が死亡している。麻疹ウイルスは患者に一時的な免疫抑制を起こすことが特徴で、二次感染が病気の重篤化の原因となっている。また、まれにはあるが、急性麻疹後脳炎、亜急性麻疹脳炎、亜急性硬化性全脳炎 (subacute sclerosing panencephalitis; SSPE) のような中枢神経系の疾患を起こす。WHOはポリオ根絶に続く予防接種拡大計画 (EPI) として麻疹罹患率、死亡率の大幅な減少を目標に掲げている。

この Overview では麻疹ウイルス研究の流れにおける B95a 細胞の意義とその後の麻疹ウイルス研究に与えた影響について概説したい。

麻疹ウイルス Edmonston 株について

麻疹ウイルス Edmonston 株は典型的な麻疹の症状を呈した David Edmonston からヒト腎臓細胞を用いて1954年に分離された。この Edmonston 原株はさらにヒト腎臓細胞、ヒト羊膜細胞で継代されて世界中の研究室に配られ、麻疹ウイルス研究の標準株として基礎研究に多大の貢献をしてきた。またニワトリ胚細胞等でさらに継代された株は弱毒生ワクチン原株として用いられ、ワクチン開発にも多大の貢献をしてきた。

ところで、この Edmonston 株は Vero 細胞を始めとする多くの非リンパ系培養細胞で増殖することができる。そ

れに反して、Vero 細胞を用いて麻疹患者材料から麻疹ウイルスを分離することは容易ではなく、通常数代の盲継代 (blind passage) を必要とする。また、麻疹患者材料をサルに直接接種するとヒト麻疹様の症状を呈することが知られていたが、Edmonston 株を接種してもサルにそのような症状は起きなかった。これらの疑問は麻疹ウイルスの病原性を考える上で、謎であり、研究の障害であった。

B95a 細胞を用いると麻疹ウイルス野外株を効率良く分離できるという発見

1990年、当時の国立予防衛生研究所麻疹ウイルス部の小船富美夫博士は新世界ザルのマーモセット由来の Bリンパ芽球細胞である B95-8 とそれに由来する B95a 細胞を用いると、麻疹患者材料から麻疹ウイルスをわずか1日で非常に効率良く分離できることを報告した¹⁾。さらに、重要なことに B95a 細胞で分離した麻疹ウイルスはサルに発疹やリンパ球減少といったヒト麻疹様の症状を引き起こしたのである。ここに至って、我々は初めて本来の性質を保持する麻疹ウイルスを手にすることが可能となった。われわれはこれまで本当の麻疹ウイルスではなく病原性を失った「麻疹ウイルスとは似て非なるもの」に全面的に依存して麻疹ウイルスを研究していたのである。

なぜ B95a 細胞は麻疹ウイルスに対して感受性が高いのか？

上述の発見は同時に新たな疑問も提示した。第一の疑問は、なぜ B95a 細胞は麻疹ウイルスに対して非常に感受性が高いのかということである。加えて、B95a 細胞分離麻疹ウイルスは非常に狭い細胞指向性を示し、B95a 細胞を始めとする極く限られたリンパ球系細胞でしか増殖することができなかったが、その理由も謎であった。この謎を VSV シュードタイプウイルスとそれを用いた発現クロニングというエレガントな手法を用いて解決したのが九州大学の柳雄介教授のグループである。柳雄介教授のグループは野外株、実験室継代株を問わず、全ての麻疹ウイルスの本来のレセプターは SLAM であることを明らかにし

筑波大学基礎医学系感染生物学 (〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1)

The impact of B95a cells on measles virus research
Kaoru Takeuchi

Department of Infection Biology, Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba

1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaragi 305-8575, Japan

TEL & FAX: 0298-53-3233

E-mail: ktakeuch@md.tsukuba.ac.jp

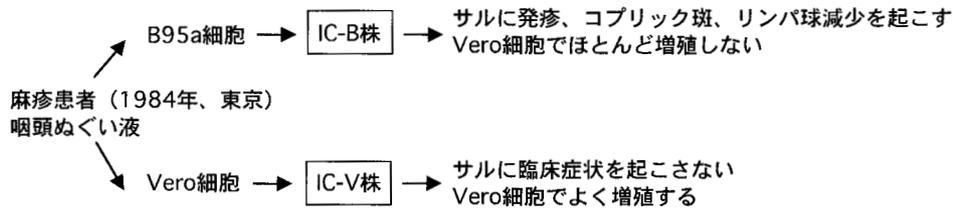
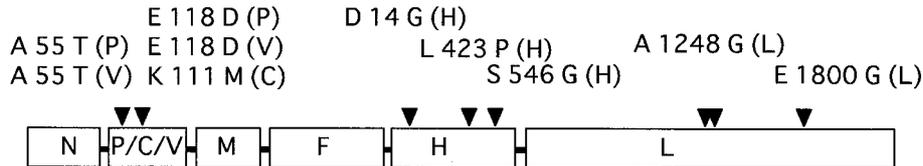


図1 同一患者サンプルに由来する IC-B 株と IC-V 株の表現型の違い。

(A) 9301B vs. 9301V



(B) IC-B vs. IC-V

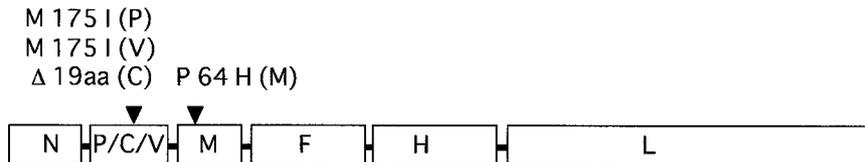


図2 同一患者サンプルに由来する B95a 細胞分離株と Vero 細胞分離 (馴化) 株のゲノムの比較。(A) 9301B 株と 9301V 株の比較。8 カ所の塩基の違いが見出された (▼)。想定されるアミノ酸の変化は 9301B 株でのアミノ酸、アミノ酸の番号、9301V 株でのアミノ酸、() 内に該当するタンパク質の順番に表示した。(B) IC-B 株と IC-V 株の比較。2 カ所の塩基の違いが見出された (▼)。想定されるアミノ酸の変化は IC-B 株でのアミノ酸、アミノ酸の番号、IC-V 株でのアミノ酸、() 内に該当するタンパク質の順番に表示した。IC-V 株の C タンパク質は COOH 末端の 19 アミノ酸が欠失している。

た²⁾。そして、CD46 をレセプターとする麻疹ウイルスは培養細胞での継代により出現してきた変異株と考えられた。この結果は Edmonston 株を麻疹ウイルスの代表株と信じて疑わなかった海外のグループにも衝撃を与えた。

麻疹ウイルスの病原性を規定するものは何か？

第二の疑問は、麻疹ウイルスの病原性を規定するものは何かということである。前述の論文で小船富美夫博士は同一患者サンプルに由来する興味深いウイルスのペアを報告した¹⁾。IC-B 株は 1984 年に東京で採取された患者サンプルより B95a 細胞を用いて分離された株である。IC-V 株は同一の患者サンプルより Vero 細胞を用いて分離された株である。ところが、同一の患者サンプルに由来するにも関わらず、2 つの株は正反対の表現型を示した (図 1)。そこで、われわれは IC-B 株と IC-V 株のゲノムの全塩基配列を決定し、比較することにした。B95a 細胞分離麻疹ウイルスとその Vero 細胞馴化株のゲノムの比較は当時の東京大学医科学研究所の永井美之教授と竹田誠博士のグルー

プが先行して進めており、9301B 株と 9301V 株のゲノムの比較より、8 ケ所の変異が P/C/V, H, L 遺伝子に見出されていた (図 2A)³⁾。一方、IC-B 株と IC-V 株のゲノムを比較するとわずか 2 ケ所の違いしか見つからなかった⁴⁾。しかも、驚いたことに麻疹ウイルスのエンベロップタンパク質をコードする H 遺伝子の塩基配列は全く同一であった。この結果を素直に解釈すれば、麻疹ウイルスの病原性や細胞指向性決定に重要なのは、エンベロップタンパク質ではなく、P/C/V や M タンパク質のような内部タンパク質あるいはアクセサリータンパク質であるということになる。この結果は麻疹ウイルスの細胞指向性は主に H タンパク質で決まるという現在のセオリーでは説明できず、今後の課題として残っている。

B95a 細胞分離麻疹ウイルスのリバースジェネティクス

麻疹ウイルスのリバースジェネティクスは 1995 年に Edmonston ワクチン株を用いて構築されていた⁵⁾。ところが、麻疹ウイルスの病原性を解析するために Edmonston

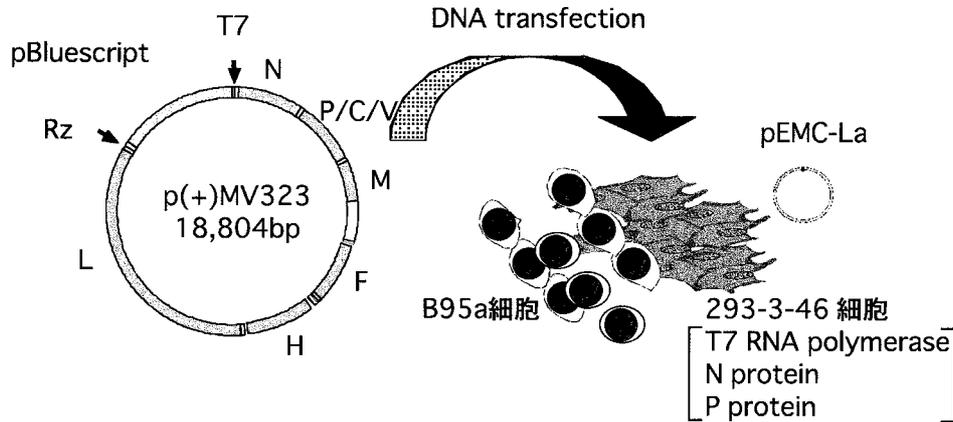


図3 IC-B株の完全長cDNAを含むプラスミドp(+)-MV323から感染性ウイルスを回収する方法。

p(+)-MV323はpBluescriptベクター、T7プロモーター(T7)下流に挿入されたIC-B株の完全長cDNA、転写されたRNAの3'末端を揃えるためのリボザイム配列(Rz)を含む。感染性ウイルスの回収はT7RNAポリメラーゼ、麻疹ウイルスNタンパク質、麻疹ウイルスPタンパク質を恒常的に発現する293-3-46細胞(Martin Billeter博士より恵与)にp(+)-MV323プラスミド、麻疹ウイルスLタンパク質を発現するpEMC-Laプラスミド(Martin Billeter博士より恵与)をトランスフェクションし、翌日B95a細胞を重層することにより行った。

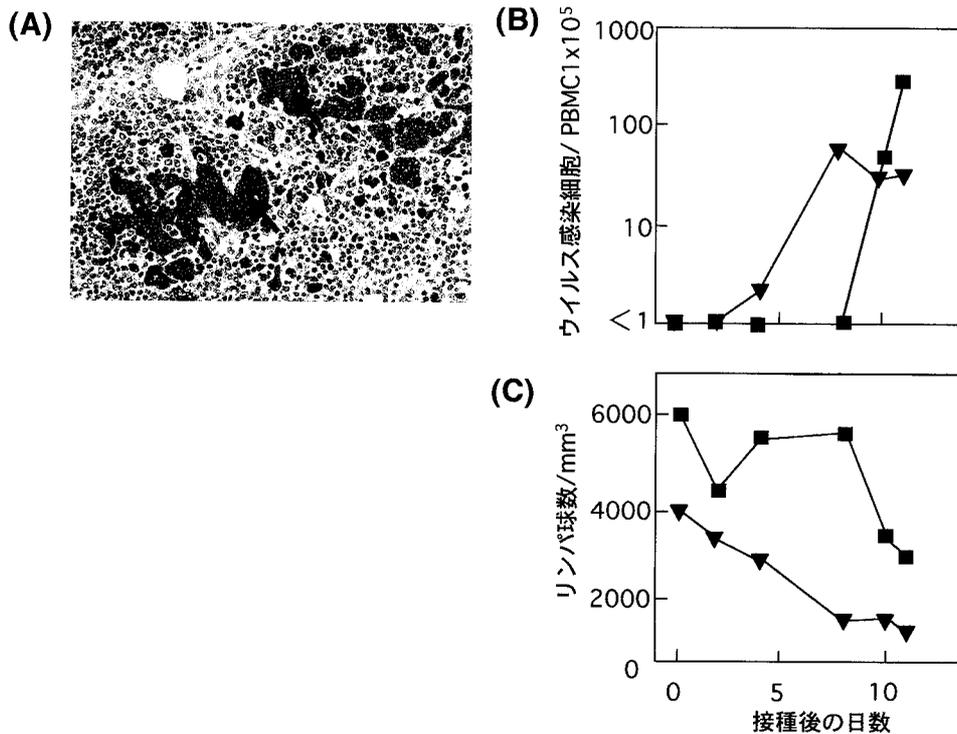


図4 p(+)-MV323プラスミドから回収したウイルス(IC323)のサル接種実験。

(A) IC323を接種したサルの胸腺に見出された巨細胞。数多くの巨細胞(矢印)が検出された。HE染色。(B) IC323を接種したサルのPBMC中のウイルス感染細胞の増加。2頭のサル(▼)(■)の結果を示した。(C) IC323を接種したサルのリンパ球数の減少。2頭のサル(▼)(■)の結果を示した。

ワクチン株を用いることは前述した理由から適当ではない。どうしても、病原性麻疹ウイルス株をベースにしたリバーシジェネティクスが必要である。そこで、われわれはIC-B株をベースにしたリバーシジェネティクスを作るこ

とを試み、ついにcDNAから感染性ウイルスを回収することに成功した(図3)⁶⁾。回収したウイルスをサルに接種したところ、サルに発疹とコプリック斑が出現し、胸腺には数多くの巨細胞が認められた(図4A)。また、PBMC

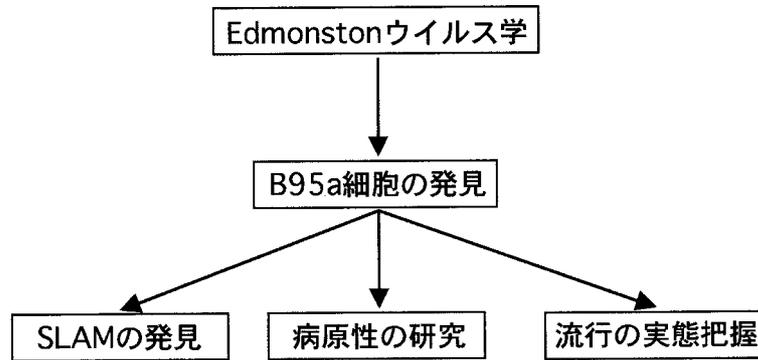


図5 B95a細胞が切り拓いた麻疹ウイルス研究の新たな領域.

中のウイルス感染細胞は経時的に増加し、(図4B), リンパ球減少が経時的に認められた(図4C). このように, p (+)MV323から回収されたウイルス(IC323)は親株であるIC-B株と同様の病原性を保持していることが確かめられた. 最近, われわれはこのシステムを用いて, Edmonston株のHタンパク質を持つIC-B株, IC-B株のHタンパク質を持つEdmonston株を作製した. これらのキメラウイルスの細胞指向性を解析したところ, 未知の麻疹ウイルスレセプターがVero細胞上に存在する可能性が示唆された⁷⁾. 現在, 確認の実験を行っているところである. IC-B株とIC-V株で見出された2ヶ所の変異のどちらが重要かを調べる実験も, キメラウイルスを作製し, 培養細胞での解析を進めつつある. 今後, サルへの接種実験でそれらの変異の病原性における役割が解明できるものと期待される.

B95a細胞によって初めて可能になった 麻疹ウイルスの分子疫学

麻疹ウイルスの分子疫学的解析を困難にしていたのは, やはり麻疹ウイルス野外株の分離効率の悪さであった. ところがB95a細胞の出現によって状況は一変した. B95a細胞を用いると患者材料から非常に効率良く麻疹ウイルスを分離できるので, RT-PCRの技術と相まって, 世界中で瞬く間に数多くの麻疹ウイルス野外株が分離され, 遺伝子型に分類された. WHOは麻疹ウイルスの分離にはB95a細胞を用い, Nタンパク質のCOOH末端に相当する450塩基の塩基配列を決定して遺伝子型を決定することを推奨している. 現在のところ20の遺伝子型がWHOより提唱されている. 最近の報告によると, 日本全国ほとんどの地域で分離される麻疹ウイルスはD5型であるが, 沖縄ではD3型であり, 中国や韓国の流行株であるH1型も国内で確認されている⁸⁾. このように, B95a細胞は麻疹流行の実態把握や麻疹根絶に向けたプロジェクトにも多大の貢献をしている.

おわりに

われわれは培養細胞を用いて日常的にウイルスを分離している. しかしながら, 分離に用いた細胞によりウイルスに選択が起こり, 特定の株を分離している可能性はないだろうか? ウイルス分離に用いる細胞の重要性は全てのウイルスにあてはまる. われわれはこの事に常に注意を払わなければならない. 小船富美夫博士は麻疹患者材料を種々の細胞に感染させてみるという非常に基礎的な実験により, 独創的な業績を挙げた. B95a細胞がなかったら, SLAMが麻疹ウイルスレセプターであるという発見も, 病原性麻疹ウイルスのリバースジェネティクスも, 麻疹ウイルスの分子疫学もなかったであろう. 基礎的な仕事をおろそかにしてはならないという警鐘である.

謝 辞

Overviewを担当する機会を与えて頂いたプログラム委員の先生方に感謝いたします. B95a細胞分離麻疹ウイルスのリバースジェネティクスは国立感染症研究所で行ったものであり, 共同研究者の竹田誠博士, 宮嶋直子さんをはじめ御協力頂いた国立感染症研究所の多くの先生方に感謝いたします.

文 献

- 1) Kobune, F., H. Sakata, and A. Sugiura (1990). Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. *J. Virol.* **64**: 700-705.
- 2) Tatsuo, H., N. Ono, K. Tanaka, and Y. Yanagi (2000). SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature.* **406**: 893-897.
- 3) Takeda, M., A. Kato, F. Kobune, H. Sakata, Y. Li, T. Shioda, Y. Sakai, M. Asakawa, and Y. Nagai (1998). Measles virus attenuation associated with transcriptional impediment and a few amino acid changes in the polymerase and accessory proteins. *J. Virol.* **72**: 8690-8696.

- 4) Takeuchi, K., N. Miyajima, F. Kobune, and M. Tashiro (2000). Comparative nucleotide sequence analysis of the entire genomes of B95a cell-isolated and Vero cell-isolated measles viruses from the same patient. *Virus Genes*, **20** : 253–257.
- 5) Radecke, F., P. Spielhofer, H. Schneider, K. Kaelin, M. Huber, C. Dötsch, G. Christiansen, and M. A. Billeter (1995). Rescue of measles viruses from cloned cDNA. *EMBO J.* **14** : 5773–5784.
- 6) Takeda, M., K. Takeuchi, N. Miyajima, F. Kobune, Y. Ami, N. Nagata, Y. Suzaki, Y. Nagai, and M. Tashiro (2000). Recovery of pathogenic measles virus from cloned cDNA. *J. Virol.* **74** : 6643–6647.
- 7) Takeuchi, K., M. Takeda, N. Miyajima, F. Kobune, K. Tanabayashi, and M. Tashiro (2002). Recombinant wild-type and Edmonston strain measles viruses bearing heterologous H proteins : role of H protein in cell fusion and host cell specificity. *J. Virol.* **76** : 4891–4900.
- 8) 佐藤威, 竹内薫, 田代真人, 林康一, 飯塚節子, 山本正悟, 中村正治, 菊池賢, 武内可尚 (2001). 野外麻疹ウイルスの分離, 病原微生物検出情報, **22**, 278–279.