

IV 報 文

1988年に本県で分離された麻疹ウイルス変異株の性状

斎藤博之* 佐藤宏康* 安部真理子* 原田誠三郎*
天野憲一** 須藤恒久*** 森田盛大*

I 緒言

1987年から1988年にかけて本県において大流行した麻疹は患者4000名、死者10名を数えた。この時期に分離された麻疹ウイルス4株と1990年に分離された2株について性状分析を行ったところ、エンベロープに局在する糖蛋白¹⁾²⁾の一つであるhemagglutinin (HA)に変異があることがわかった。HA蛋白は細胞表面のレセプターを認識し、感染成立に重要な役割を果たす蛋白と言われている^{3)~5)}。

麻疹ウイルスは変異は起こさないと考えられてきたが⁶⁾、最近のモノクローナル抗体を用いた研究ではHA蛋白のエピトープに株間で少しずつの違いがあることがわかってきた^{7)~12)}。

本研究では、分離株のHAが標準株(Edmonston株)のそれに比して分子量が大きいこと、サル血球凝集能が欠落していること、及び、サル腎由来の細胞に感染しないことを見いだした。このような大きな変異をもつ麻疹ウイルスはこれまで報告されていないと考えられるのでその概要を報告する。

II 方法

A. ウイルス分離

ウイルスは麻疹患者の咽頭拭い液から、マーマセットB細胞由来のB95a細胞を用いて分離された。この細胞は国立予防衛生研究所麻疹ウイルス部の小嶋高美夫博士から分与頂いた。培地は5%牛仔胎児血清(FCS)を添加したRPMI 1640を用いた。B95a細胞は、5mlシャーレでconfluentになるまで培養し、培地交換の後咽頭拭い液1mlを加えてさらに一週間培養した。CPEを確認した後-80℃で凍結し、これを分離株とした。サル腎由来のVero, JINET, BSC-1の各細胞株は5%FCSを含むイーグルMEM培地にて培養した。

B. ウイルス試料調製

麻疹分離株はB95a細胞で培養した後、図1に示すとおり精製した。また、対照としてEdmonston株も同様に処理した。

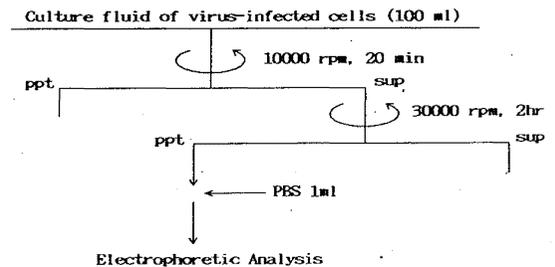


図1. 麻疹ウイルスの濃縮方法

C. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウエスタンブロット解析

Laemmliの系¹³⁾に従い、7~10%指数勾配ゲルを用いて行った。ウエスタンブロットは、ゲルをニトロセルロース膜に転写した後、HA蛋白に対するウサギ抗血清によりHA蛋白のバンドを検出した¹⁴⁾。この抗血清は東京大学医科学研究所獣医学研究部の吉川泰宏博士から分与頂いた。

D. 血球凝集試験

Bで調製した試料を感染価 10^4 TCID₅₀/50 μ l相当に希釈してマイクロプレート法による血球凝集試験を行った。血球はアフリカミドリザルのものを用いた。

III 結果

A. 細胞への感染性

表1に示すとおり全ての分離株はB95a細胞でのみ分離できた。B95a細胞で分離されたウイルスをVero, JINET, BSC-1のサル腎由来細胞に接種しても

*秋田県衛生科学研究所 **秋田大学医学部実験実習機器センター ***秋田大学医学部微生物学教室

表1 ウイルス分離成績

	Cell-line				NT*
	Vero	BSC-1	JINET	B95a	
Edmonston	+	+	+	+	+
No. 2	-	-	-	+	+
24967	-	-	-	+	+
25006	-	-	-	+	+
25076	-	-	-	+	+
26319	-	-	-	+	+
26662	-	-	-	+	+

*麻疹ウイルス診断用抗血清（デンカ生研）による中和試験の判定

CPE は認められなかった。また、これらの細胞で3代継代（CPE が現れなくとも3日おきに盲継代）し、その培地を B 95 a 細胞に加えても CPE は認められなかった。この結果は、これらの分離株が、Edmonston 株と違ってサル腎由来細胞には感染しないことを示しているものと考えられた。

B. HA 蛋白の分子量

図2にEdmonston株と分離株のウェスタンブロット

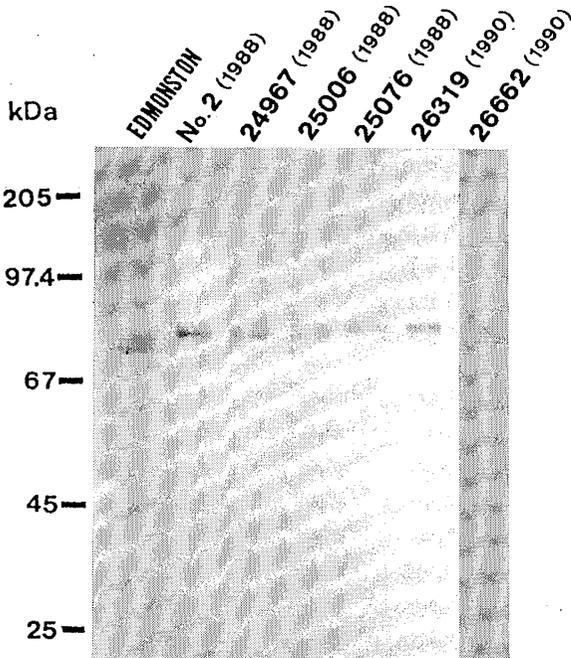


図2. 麻疹分離株のウェスタンブロット

表2 麻疹分離株HA蛋白の分子量の比較

STRAIN	MW. OF HA
EDMONSTON	73 kDa
No. 2 (1988)	80
24967 (1988)	80
25006 (1988)	80
25076 (1988)	80
26319 (1990)	80
26662 (1990)	80

を示す。Edmonston 株と分離株の分子量を比較すると、前者が73 kDa なのに対し、後者は80 kDa と大きく異なっていた（表2）。

C. 血球凝集試験

表3に示すとおり、Edmonston 株が512倍のHA価を示したのに対し、分離株では凝集が認められなかった。

表3 麻疹分離株の血球凝集試験成績

STRAIN	HA TITER
EDMONSTON	512
No. 2 (1988)	<4
24967 (1988)	<4
25006 (1988)	<4
25076 (1988)	<4
26319 (1990)	<4
26662 (1990)	<4

IV 考 察

上記 A. B. C. に示された成績はいずれも HA 蛋白の生物学的機能にかかわる問題であり、過去にこのような報告が無かったこともあわせて極めて興味深い。HA 蛋白は糖蛋白であるが、このような分子量の違いがペプチド鎖に由来するものか、あるいは糖鎖に由来するものか

は今後解析すべき重要な課題であると考えている。何故ならば、サル腎由来細胞に感染しなかったことや、サル血球凝集能が欠落していることは HA 蛋白分子上の細胞レセプター認識部位に異変があることを示唆しているからである。

本研究において明らかとなった HA 蛋白の変異と病原性との関係は未だ不明であるが、HA 蛋白が感染成立に重要な役割をはたしていることを考えれば興味もたれるところである。すなわち、このデータはウイルス感染の機構を分子レベルで解明する糸口となり得るであろうことを示唆していると考えられる。

1987 年から 1988 年にかけての麻疹の流行は、ワクチン未接種者を中心に広がった。麻疹ウイルスの HA 蛋白に上述のごとき変異が認められたが、従来の麻疹ワクチンは依然有効であると考えられる。しかしながら、MMR ワクチンにおける無菌性髄膜炎の副作用が明らかとなり、各地方自治体が MMR ワクチンの実施に慎重となっている今日、接種率の低下が懸念されているが、麻疹の流行を阻止するためには、麻疹単独ワクチンに切り替えるなどして接種率の向上をはかる必要があるだろう。

いずれにしても、今回得られたデータをベースにして、今後麻疹ウイルスの変異を更に検討していきたいと考えている。

文 献

- 1) Kingsbury, D. W. et. al. Orthomyxo-and paramyxovirus and their replication. Virology, Raven Press, New York, 1157 (1985)
- 2) Norbby, E. et. al. Measles. Virology, Raven Press, New York, 1305 (1985)
- 3) Bellini, W. J. et. al. Immunoreactivity of the purified hemagglutinin of measles virus. Infect. Immun. 32 1051 (1981)
- 4) McFarlin, D. E. et. al. Monospecific antibody to the hemagglutinin of measles virus. J. gen. Virol. 48 425 (1980)
- 5) Norbby, E. et. al. Identification of measles virus-specific hemolysis inhibiting antibodies separate from hemagglutination-inhibiting antibodies. Infect. Immun. 11 231 (1975)
- 6) Majer, M. et. al. Measles virus. Strains of human viruses. 131 Karger, Basel (1972)
- 7) Birrer, M. J. et. al. Antigenic variants of measles virus. Nature 293 67 (1981)
- 8) Trudgett, A. et. al. Antigenic differences in the hemagglutinin of measles and related viruses. Virology 109 180 (1981)
- 9) ter Meulen, V. et. al. Antigenic characterization of measles and SSPE virus hemagglutinin by monoclonal antibodies. J. gen. Virol. 57 357 (1981)
- 10) Sheshberadaran, H. et. al. Monoclonal antibodies against five structural components of measles virus. I. Characterization of antigenic determinants on nine strains of measles virus. Virology 128 341 (1983)
- 11) Sato, T. A. et. al. Characterization of major structural proteins of measles virus with monoclonal antibodies. J. gen. Virol. 66 1397 (1985)
- 12) Sheshberadaran, H. et. al. Characterization of epitopes on the measles virus hemagglutinin. Virology 152 58 (1986)
- 13) Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 227 680 (1970)
- 14) Burnette, W. N. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal. Biochem. 112 195 (1981)