

資 料

PCR-RFLP法を用いたポリオウイルス分離株の遺伝子解析

高尾 信一 福田 伸治 野田 雅博 豊田安基江 徳本 静代

Gene analysis of poliovirus isolates using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay

SHIN-ICHI TAKAO, SHINJI FUKUDA, MASAHIRO NODA, AKIE TOYOTA, SHIZUYO TOKUMOTO

(Received Oct. 29, 1997)

緒 言

ポリオ（急性灰白髄炎）は、ポリオウイルス感染により引き起こされる急性感染症で、後遺症として麻痺等の運動障害を残すことがある。我が国においては、1960年に北海道を中心に1年間の患者数が5000名を越えるポリオの大きな流行がみられたことから、1961年に輸入生ワクチンの緊急投与が行われ、更に1963年からは生ワクチンの定期接種が開始された。それにより、我が国におけるポリオは、ほぼ完全に制圧され、現在、国内にはポリオウイルス野生株は常在しないと考えられている[1]。一方で、東南アジアやアフリカ諸国では、今なお、多くの患者の発生が報告されている[2,3]。現在のように、ヒトや物資の交流が頻繁に行われる状況下では、いつ海外から野生株のポリオウイルスが侵入してもおかしくない状況にあり、平常時防疫の重要性が指摘されている[2]。

広島県では、結核感染症サーベイランス事業や伝染病流行予測事業により、主に小児疾患を対象としてウイルス検索を実施しているが、その中には少数例ながらポリオウイルスも分離されている。それらの分離ウイルス株については、当該患者が麻痺等の症状を示していなかったこと、また、ポリオウイルス生ワクチンの投与後に採取された検体からウイルスが分離されたことなどから、これまでその由来についての十分な検討（ワクチン由来株か野生株かの鑑別）はなされていなかった。しかし海外からのポリオウイルス野生株の侵入が否定できない状況においては、国内で分離されたポリオウイルスの由来を正しく鑑別する必要がある。

今回我々は、広島県において1987年から1997年の間に分離された、ポリオウイルス分離株16株について、PCR-RFLP法（Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

assay）を用いた遺伝子学的解析を実施した。その結果、いずれの株もワクチン由来株であることが明らかとなった。さらに、そのうち3株についてはウイルス遺伝子の一部に組み換えを生じていることが判明したので、それらの成績について報告する。

材料と方法

1. ポリオウイルス

(1) 分離株（表1）：広島県感染症サーベイランス事業等により採取された、各種疾病患者由来の検体から、1987年以降に14名の患者から分離されたポリオウイルス分離株16株を対象とした。それらの患者は、いずれも麻痺等の神経症状のみられない、いわゆる“非ポリオ患者”であった。なお、分離株の血清型別は、ポリオウイルス型特異的抗血清を用いた中和試験により同定し、同一検体中に複数の血清型のポリオウイルスが存在していた場合には、一方の型特異的抗血清存在下で、その型のウイルス増殖を抑制した状態で培養細胞（HEp2細胞）に接種し、もう一方の血清型ウイルスのみを単離した。

(2) ワクチン株および野生株：ワクチン株は、現在、我が国でポリオウイルス生ワクチン株として用いられているSabin 1型、2型および3型株を用いた。野生株については、Mahoney株（1型）、MEF-1株（2型）、Saukett株（3型）をそれぞれ用いた。

2. PCR-RFLP法

Balanantら[4]およびFurioneら[5]の方法に準じて、ポリオウイルスのVP1遺伝子領域と3Dポリメラーゼ遺伝子領域の2ヶ所について解析した。

(1) VP1領域のPCR-RFLP法

ポリオウイルス感染培養細胞上清を37℃60分間1 mg/ml Proteinase Kで処理後、フェノール/クロロ

ホルム処理とエタノール処理によりウイルスRNAを抽出した。抽出RNAは、anti-senseプライマーを用いて、42℃60分間逆転写反応を行いc-DNAを合成した後、94℃1分、55℃1分、72℃1分の各反応を30回繰り返した。この際に用いたプライマーは以下の通りである。

anti-senseプライマー (UC1) :

5' GAATTCATGTCAAATCTAGA 3'

senseプライマー (UG1) :

5' TTTGTGTCAGCGTGTAATGA 3'

ウイルス遺伝子は、RT-PCR法で増幅した後、10UのHae III, 10UのDde I, 14UのHpa IIの各制限酵素で37℃2時間反応させた後、3%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した後、切断パターンを解析した。

(2) 3Dポリメラーゼ領域のPCR-RFLP法

VP1領域のPCR-RFLP法の場合と同様の方法でウイルスRNAを抽出した後、同様の反応条件でRT-PCRを行い、3Dポリメラーゼ領域の遺伝子を増幅した。それらの増幅産物は10UのHae III, Dde I, Rsa Iの各制限酵素で37℃, 2時間反応させた後、電気泳動後の切断パターンを解析した。なお、本領域のRT-PCR法に用いたプライマーは以下の通りである。

anti-senseプライマー (UC8) :

5' GATGTCTCTCTTCTTCTTCC 3'

senseプライマー (UG7) :

5' TTTGAAGGGGTGAAGGAACCAGC 3'

結 果

1. VP1領域のPCR-RFLP法による分離株の型内鑑別(野生株かワクチン株かの鑑別)

今回対象としたポリオウイルス分離株は、血清型1型が8株、2型3株、3型5株である(表1)。それら16株について、VP1領域の480塩基をPCR-RFLPによる解析を実施した(図1)。その結果、血清型1型の分離株8株全てが、ワクチン株でSabin 1型株と全く同一の制限酵素切断パターンを示した。同様に、血清型2型の3株はSabin 2型株と、また血清型3型の5株はSabin 3型株と同一の制限酵素切断パターンを示した。これらの結果から、今回対象とした分離株は、いずれもワクチン由来の株であると考えられた。

2. 3Dポリメラーゼ領域のPCR-RFLP解析による遺伝子組み換えウイルスの検出

3Dポリメラーゼ領域のウイルス遺伝子の由来を確かめるために、本領域の291塩基についてPCR-RFLP法による解析を実施した(図2)。その結果、Ys87-2F(a)株については、VP1領域はSabin 1型に一致する遺伝子を持っていたものの、3Dポリメラーゼ領域の遺伝子は、Hae III, Dde IおよびRsa Iの制限酵素による切断パターンがSabin 2型と全く一致しており、本ウイルス株はVP1領域がSabin 1型、3D領域がSabin 2型に由来する遺伝子を持つウイルス株であると考えられた。同様にSE90-37F株については、VP1領域はSabin 3型に一致する遺伝子を持っていたもの

表1 ポリオウイルス分離株とその由来

分離株番号	検体採取年月日	検体	血清型別	患者の臨床症状	患者の年齢	ポリオワクチン接種の有無	ワクチン接種後検体採取までの日数
Ys87-2F(a)	87.11.13	便	1	下痢	8ヵ月	有	14日
Ys87-2F(b)	87.11.13	便	2	〃	〃	〃	〃
T89-73T	89. 4.12	咽頭ぬぐい液	1	発疹	4ヵ月	有	8日
T90-27T	90. 4.27	咽頭ぬぐい液	3	咽頭炎,発熱,口内炎	8ヵ月	有	17日
SE90-46T	90. 5.11	咽頭ぬぐい液	1	上気道炎	2歳5ヵ月	有	2日
SE90-37T	90. 4.18	咽頭ぬぐい液	3	発熱,下痢,口内炎	1歳	有	9日
SE90-37F	90. 4.18	便	3	〃	〃	〃	〃
T91-70T	91.10.19	咽頭ぬぐい液	1	咽頭炎,発熱	8ヵ月	有	5日
T91-71T	91.10.25	咽頭ぬぐい液	1	咽頭炎,発熱,発疹	1歳1ヵ月	有	11日
F93-92F	93.10.29	便	1	下痢	8ヵ月	有	5日
SE94-140T	94.11.10	咽頭ぬぐい液	2	気管支炎	8ヵ月	不明	-
Ys96-5F	96. 4.16	便	2	胃腸炎,下痢	6ヵ月	有	11日
Ys96-33F	96.11. 6	便	1	胃腸炎,下痢	6ヵ月	有	29日
SE97-66T	97. 4.21	便	1	上気道炎,発熱	5ヵ月	有	14日
Hs97-27F	97. 6.12	便	3	下痢	1歳	有	20日
K97-12F	97. 4.21	便	3	気管支炎	9ヵ月	有	14日

の、3Dポリメラーゼ領域の遺伝子増幅産物での切断パターンがSabin 2型と一致しており、本ウイルス株はVP1領域がSabin 3型、3D領域がSabin 2型に由来する遺伝子を持つウイルス株であると考えられた。一方、VP1領域がSabin 3型の遺伝子を持っていたK97-12F株について、3Dポリメラーゼ領域の遺伝子の制限酵素の切断パターンをみると、Hae III, Dde Iによる切断パターンはSabin 1型のそれと一致したが、Rsa Iによる切断パターンは一致していなかった。Sabin 1型の場合、今回の解析の対象とした291塩基配列中には1ヶ所のRsa Iの切断部位があり、86塩基と205塩基の産物に別れる。ところが本株の場合は、190塩基程度の大きさの産物と86塩基の大きさに相当する産物および15塩基程度の大きさ産物の3つに別れていた。このことから、3Dポリメラーゼ領域の遺伝子はSabin 1型に由来するものの、Rsa Iによる切断部位が1ヶ所附加するような変異をもつ遺伝子を有する株と推察された。

考 察

WHOは西暦2000年までにポリオの根絶を目標に掲げている。世界におけるポリオの流行は、弱毒生ポリオワクチンが適切に使用され、接種率の高い国々では、患者の発生は劇的に減少した[1]。我が国もその一例で、1961年の生ワクチン導入以前には、年間1300～5600人程の患者発生がみられたが、現在はほぼ完全

に制圧されている[1]。しかし、ワクチン接種率の低い国々では現在でもポリオ患者が多発しており、その多くが東南アジアとアフリカ諸国からである[1,2]。交通手段の発達や海外との人的物的交流が盛んとなった現在においては、それらの地域から野生型ポリオウイルスが国内に侵入する可能性は以前にも増して高くなっている。このことを裏付ける事例として、1981年には成田空港着の機内の汚水からポリオウイルス1型野生株が分離されており[6]、また1993年には、滋賀県で海外輸入例と考えられるポリオウイルス3型野生株も分離されている[7,8]。一方で、海外からの侵入の危険性だけでなく、我が国からポリオ常在地域へ出かけて行く海外渡航者に対する危険性も指摘されている[1,2]。特に、1975～1977年生まれ年齢層（現在20～22歳）においては、ワクチンを接種しているにもかかわらず、抗体保有率が他の年齢層に比較して極端に低いことが指摘されており[1]、広島県においても同様の調査結果を得ている[9]。これは、その当時に用いられたワクチンのシードロットに問題があったと推察されているようであるが[10]、いずれにしても、それらの年齢層の人達は、今後海外に出かける機会が多くなると予想されることから、ワクチンの再接種により十分な免疫を付けておく必要が有ると考えられる。

従来、ポリオウイルスの野生株かワクチン由来株かの鑑別には、サルを用いた神経毒力試験の他に、rct/40マーカー（Tマーカー）を代表とする各種の

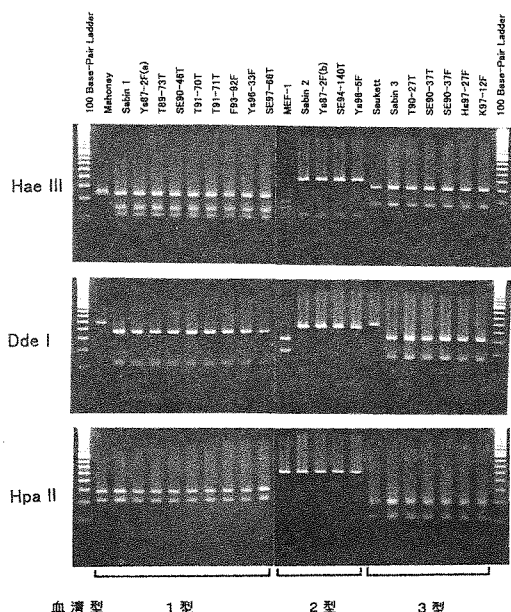


図1 VP1領域のPCR-RELP法によるポリオウイルスの酵素切断パターン

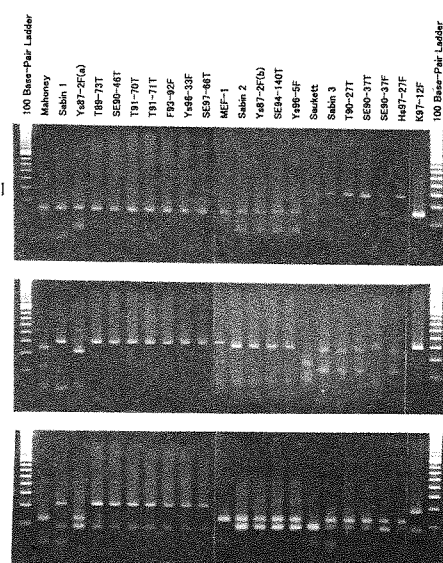


図2 3D領域のPCR-RELP法によるポリオウイルスの酵素切断パターン

マーカー試験が用いられて来た[11]。しかし、それらの生物学的試験方法では、結果が判明するまでに多くの日数が必要である。それらの方法に代わり得る方法として、BalanantらはポリオウイルスのSabin株と野生株との間には、ウイルス遺伝子の塩基配列に違いがあることに着目し、VP1領域の遺伝子の一部をRT-PCR法で増幅し、その増幅産物の制限酵素での切断パターンの比較による鑑別法を報告した[4]。今回、我々はその方法に準じて、広島県内で分離されたポリオウイルス株の由来を調べたところ、いずれの分離株もワクチン由来株であった。

我が国のように野生型のポリオウイルスが常在しない国における、もう一つの問題点としては、接種したワクチン株ウイルスが、生体内で変異することにより、定型的なポリオ症状を呈する患者(ワクチン関連症例)が存在することである[12]。ワクチン株の変異による神経病原性の増強に関するメカニズムとしては、現在のところ、ウイルス遺伝子の特定部分の塩基のポイントミューテーションと、ウイルス遺伝子の組換えが関与していると考えられている[12]。そのうち後者についてFurioneら[5]は、ワクチン関連症例から分離されたポリオウイルスワクチン株のうち、70株中36株(51.4%)が組換え遺伝子を保有していたことを報告し、遺伝子組換えと神経病原性の増強との因果関係を示唆している。今回我々も、彼らの方法に準じて、3D領域のウイルス遺伝子に関して組換えの有無を調べたところ、16株中3株(18.8%)が組換え遺伝子を有する株であることが判明した。今回、我々が対象としたのは、Furioneらの症例とは異なり、いずれも“非ポリオ患者”に由来する株であることから、遺伝子組換えと神経病原性の増強との間には、直接的な因果関係は無いようにも思われる。しかし、ワクチン接種者から排泄されたワクチン株ウイルスの接触感染により、ポリオ様症状を呈した患者が存在することが報告されていることからみて[12]、今回の3株の組換え遺伝子を有する株についても、それらの神経病原性の有無について、更に検討する必要があると考えている。

文 献

[1] 国立予防衛生研究所, 厚生省エイズ結核感染症課 (1997): 日本のポリオ 1962~1995. 病原微生物検

出情報 月報, 18(1), 1-2.

- [2] 社団法人細菌製剤協会, 財団法人予防接種リサーチセンター編 (1993): 1993最新予防接種の知識, p118-122, 社団法人 細菌製剤協会, 東京.
- [3] 千葉靖男, 嶽崎俊郎, 藤原 卓, 米山徹夫, 萩原昭夫, 山本梯司, 南 良二 (1993): 最近の中国山東省におけるポリオ ー流行の終息とウイルス学的検索の現状について. 臨床とウイルス, 21(4), 252-257.
- [4] Balanant, J., Guillot, S., Candrea, A., Delpeyroux, F., and Crainic, R. (1991): The Natural Genomic Variability of Poliovirus Analyzed by a Restriction Fragment Length Polymorphism Assay. *Virology*, 184, 645-654.
- [5] Furione, M., Guillot, S., Otelea, D., Balanant, J., Candrea, A., and Crainic, R. (1993): Polioviruses with Natural Recombinant Genomes Isolated from Vaccine-Associated Paralytic Poliomyelitis. *Virology*, 196, 199-208.
- [6] 甲原照子, 小松俊彦, 緒方もも子, 北村 敬, 高橋純雄, 安方魁人 (1985): 輸入エンテロウイルスの調査研究 ー国際線航空機汚水からのウイルス分離ー. 臨床とウイルス, 13(1), 97-101.
- [7] Yoneyama, T., Fujiwara, T., Yokota, Y., Takemika, Y., and Hagiwara, A. (1995): Characterization of a Wild Poliovirus Type 3 Isolated Japan in 1993. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 48, 61-70.
- [8] 横田陽子, 武壅好美, 米山徹夫, 藤原 卓, 萩原昭夫 (1993): ポリオウイルス3型野生株の分離. 医学のあゆみ, 167(3), 181-182.
- [9] 野田雅博, 徳本静代, 豊田安基江, 高尾信一, 福田伸治 (1996): 広島県におけるポリオウイルスの血清疫学的研究. 臨床とウイルス, 24(5), 409-413.
- [10] 土居 穰, 鎗水 宏, 山本 浩, 安部 忍, 佐藤啓史, 堀江 均, 橋爪 壮 (1993): 経口生ポリオワクチン製造用シードウイルスについて. 臨床とウイルス, 21(3), 123-131.
- [11] 国立予防衛生研究所学友会 編 (1982): 改訂二版ウイルス学 各論, p151-155, 丸善, 東京.
- [12] Crainic, R., Furione, M., Otelea, D., Guillot, S., Balanant, J., Aubert-Combiescu, A., Combiescu, M. and Candrea, A. (1993): Natural evolution of oral vaccine poliovirus strains. p371-390. *In: Kurstak E. (ed.), Measles and Poliomyelitis.* Springer-Verlag Wien New York, New York.