

# 徳島県におけるポリオウイルス分離株の分子疫学的考察

徳島県保健環境センター

山本 保男・竹谷美智子・嶋田 啓司

A Study of Molecular Epidemiology on Poliovirus isolates in Tokushima Prefecture

Yasuo YAMAMOTO, Michiko TAKEYA and Keiji SHIMADA

Tokushima Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences

Key Words : ポリオウイルスワクチン Poliovirus Vaccine, 塩基置換 Base substitution  
PCR-SSCP 法 PCR-SSCP analysis

## I はじめに

1998年からスタートしたWHOのポリオ根絶計画は着実に成果が上がり我が国が属する西太平洋地区も2000年10月にポリオ根絶宣言がなされた。このポリオ根絶計画においてSabin株による生ワクチン(OPV)の貢献ははかりしれない。しかし、生ワクチンのため生体内で塩基置換を起こすことにより病原性を復帰し、頻度は少ないがワクチン関連マヒ(VAPP)を引き起こすことが知られている。我々は徳島県におけるポリオウイルス分離株についてPCR-RFLP法で全ての分離株がワクチン株由来であることを報告したが<sup>1)</sup>、今回同じ分離株についてPCR-SSCP法で塩基置換の有無について検討したので報告する。

## II 材料及び方法

供試されたポリオウイルス(以下、PV)は過去徳島県において分離された12株(PV1:4株, PV2:5株, PV3:3株)である。対照としてワクチン株(Sabin1型, 2型, 3型)と野生株(1型, 2型, 3型)を用いた。RT-PCR法により増幅した部位は既報<sup>1)</sup>と同じく、キャプシド蛋白質で中和エピトープに深く関与するP1・VP-1遺伝子領域(塩基番号2402~2881)とポリメラーゼをコードするP3・3D遺伝子領域(塩基番号6086~6376)の2カ所を増幅した。増幅DNAはミニゲルによるPCR-SSCP法<sup>2),3)</sup>を実施し、プレキャストポリアクリルアミドミニゲル<sup>4)</sup>(オリエンタルインスツルメント社)を使用した。方法は以下のとおりである。

## 1 前処理

PCR産物1 $\mu$ lと緩衝液(95%ホルムアミド, 10mMEDTA, 0.05%ブロムフェノールブルー, 0.05%キシレンシアノール)9 $\mu$ lを混合し, 95 $^{\circ}$ C5分加熱し, 4 $^{\circ}$ Cで急冷後10 $\mu$ lを泳動した。

## 2 泳動条件

### (1) VP-1領域

7.5%ゲル, 40w, 120min., 20 $^{\circ}$ C

### (2) 3D領域

PV1型:10%ゲル, 40w, 120min., 15 $^{\circ}$ C

PV2・3型:7.5%ゲル, 40w, 90min., 20 $^{\circ}$ C

### (3) HaeIII処理DNA:10%ゲル, 40W, 120min., 20 $^{\circ}$ C

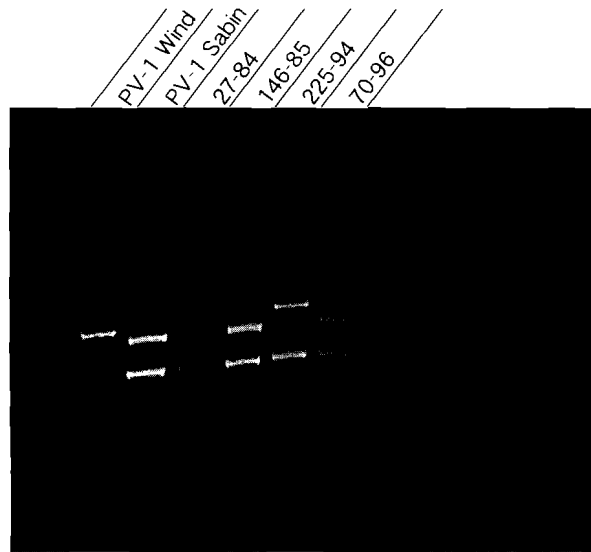
### (4) 泳動用緩衝液:トリス・グリシン緩衝液(25mMTris, 192mMGlicine)

### (5) 染色・写真撮影:SYBR-gold(Molecular Probes社)で20分間染色後254nmの紫外線を照射し写真撮影した。

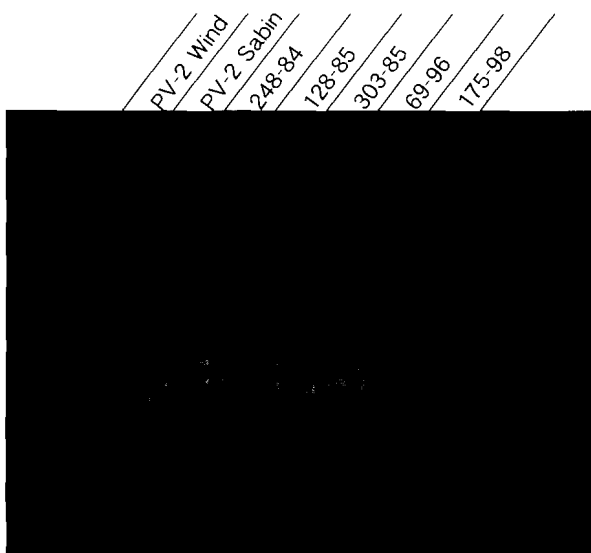
## III 結果

### 1 VP1領域

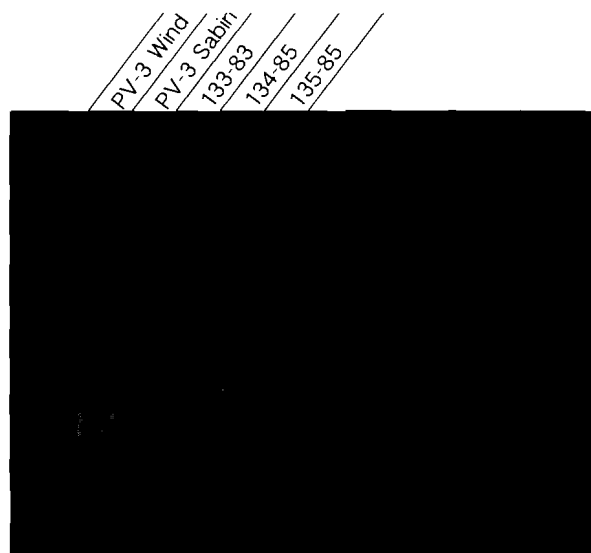
VP1領域のSSCP像を図-1に示した。PV-1は4株の分離株の内2株(27-84, 225-94)がワクチン株であるSabin-1と異なるパターンを示した。この2株はPCR-RFLP法によるワクチン株の鑑別試験の結果, HaeIIIの切断部位を



PV-1



PV-2



PV-3

図-1 ポリオウイルス VP1 領域の SSCP 像

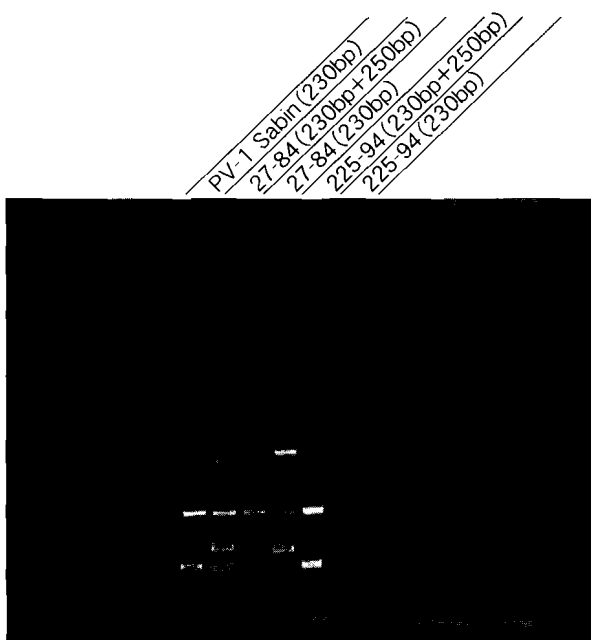
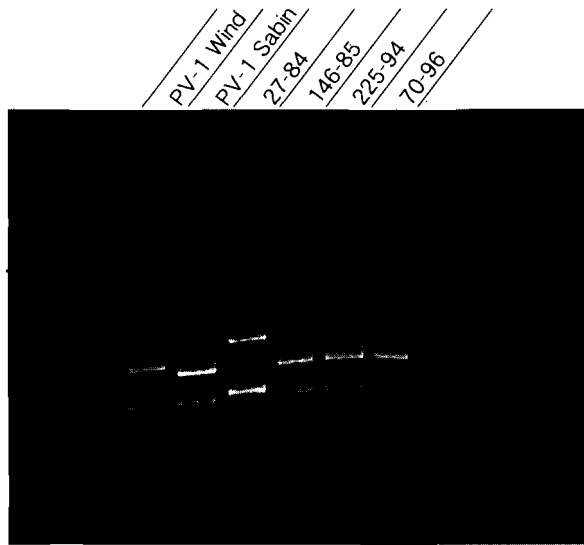


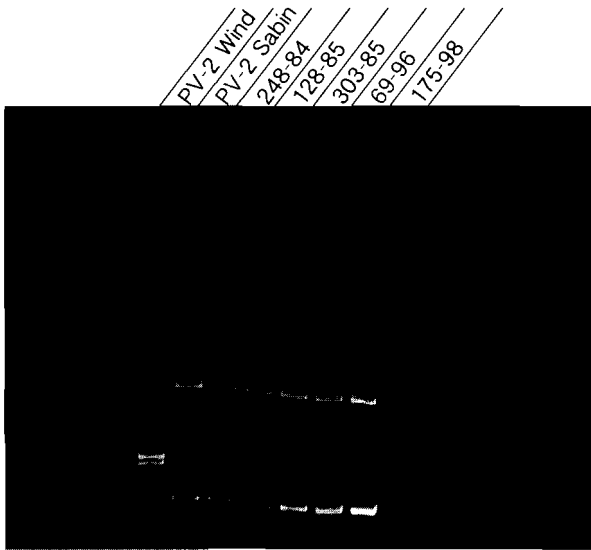
図-2 PV-1 HaeIII消化 DNA の SSCP 像

喪失していた分離株であり、PCR-RFLP 法と PCR-SSCP 法の結果が一致した。次に27-84株と225-94株について塩基置換を起こしている場所を推定するために HaeIII 処理 DNA の SSCP 像を比較した (図-2)。(レーン1は Sabin-1 DNA (230bp)、レーン2は27-84株 DNA (230bpと250bp混合物)、レーン3は27-84株 DNA (230bpのみ)、レーン4は225-94株 DNA (230bpと250bp混合物)、レーン5は225-94株 DNA (230bpのみ)である。この結果から明らかなように230bpは3株とも同じパターンを示し、2分離株の塩基置換が起こっていないことが判明した。しかし、250bpについては2株が異なるパターンを示した。この2分離株については、HaeIII切断部位の塩基置換が異なるのか、あるいは切断部位の塩基置換は同じであるが、その他の部位で異なる塩基置換が起こっているのか不明である。

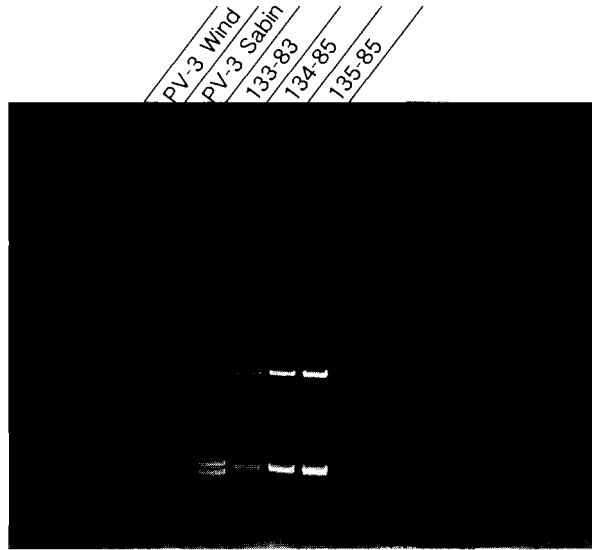
なお、今回の条件では PV-1 野生株は分析できなかった。



PV-1



PV-2



PV-3

図-3 ポリオウイルス 3D 領域の SSCP 像

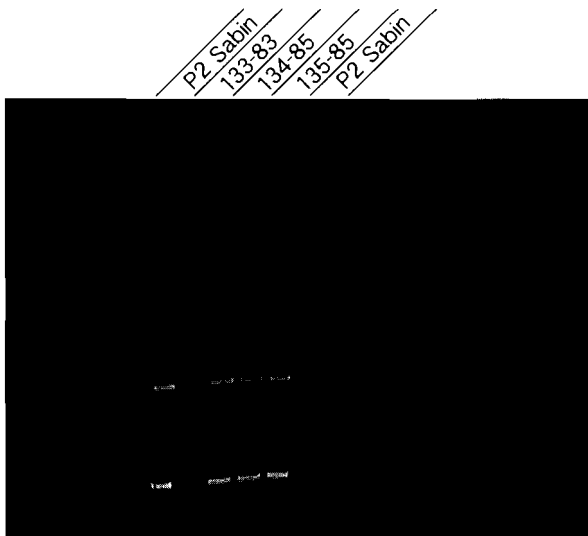


図-4 PV-2 Sabin 株と PV-3 分離株の 3D 領域 SSCP 像

PV-2 は 5 株の分離株の内 1 株 (303-85) が Sabin-2 と異なるパターンを示し、塩基置換が起きていることが判明した。

PV-3 も 1 株 (133-83) が塩基置換を起していることが判明した。

以上のことから、VP1 領域では 12 株の分離株のうち 4 株が塩基置換を起していることが判明した。

## 2 3D 領域

3D 領域の SSCP 像を図-3 に示した。

PV-1 は 27-84 株が異なるパターンを示した。PV-2 は全て同じパターンであった。PV-3 は分離株は全て同じパターンであったが、野生株とワクチン株である Sabin-3 と異なるパターンであり、PV-2 とよく似たパターンであった。このため Sabin-2 と PV-3 分離株を同時に分析した結果、PV-3 分離株の 3D 領域は Sabin-2 と同一であった (図-4)。このことは既報<sup>3)</sup>のとおり、PV-3 分離株の 3D 領域は PV-2 と組み替えを起していた結果と一致した。

表-1 ポリオウイルス分離株の SSCP 分析結果

分離株番号	血清型別	患者年齢	ワクチン接種歴	ワクチン接種後日数	VP1領域	3D領域
27-84	1	7M			×	×
146-85	1	6M				
225-94	1	9M	有	22	×	
70-96	1	11M	有	1		
248-84	2	4				
128-85	2	7M				
303-85	2	9			×	
69-96	2	6M	有	8		
175-98	2	7M				
133-83	3	1	有	12	×	
134-85	3	1	有	16		
135-85	3	5				

\* 表中×印は塩基置換が起こっていたことを表す

VP-1 領域と 3D 領域の結果を表-1 に示した。今回試験に供した分離株12株の内、VP-1 領域で 4 株、3D 領域で 1 株の塩基置換がみられた。このうち 1 株 (27-84) は両方の領域で塩基置換を起こしていた。

#### IV 考 察

生ポリオワクチンに使用されている Sabin 株は生体内での増殖のみならず、in vitro での増殖時に塩基置換が起こることが知られ、ワクチン製造時における増殖温度、時間は厳密である。松浦ら<sup>3)</sup>は環境中からの分離株78株中42株 (53.8%) が Sabin 株と異なる塩基配列をもち、その差は各血清型とも1.4%以下であったことを報告している。また、吉田ら<sup>6)</sup>は環境中のワクチン由来ポリオウイルス 3 型 (VDPV-3) 29株の内13株が塩基置換をおこし、神経毒性を復帰していたことを報告している。今回我々は RT-PCR 産物の SSCP 分析法で、塩基置換の有無を検討した結果12株中4株 (33.3%) に塩基置換がみられた。このうち133-83株はウイルス分離時に塩基置換した可能性は否定できないが、ワクチン接種後12日目ですでに塩基置換がみられた。また、27-84株は VP-1 と 3D の両領域で塩基置換がみられた。この株が分離された患者のワクチン接種歴は不明であるが、年齢、検体採取時期から、ワクチンを服用していたことが推測された。

3D 領域は12株中1株のみ塩基置換がみられ、VP-1 領域に比べ頻度は低かった。

ポリオウイルスの神経毒性を決定しているゲノム領域は全領域に存在しているが、ゲノムの 5 末端付近に強い決定基が存在していることが明らかになっている<sup>7)</sup> (PV-1 : 塩基番号480, 525, PV-2 : 塩基番号481, PV-3 : 塩基番号472)。我々が試験を行った VP1 領域と 3D 領域にも弱いながらも

神経毒性を決定している領域があり、その領域にも塩基置換を起こしていることが明らかになり、生ポリオワクチン用ウイルス株の遺伝的不安定性が改めて明らかになった。

OPV は VAPP の他、神経独力を復帰した変異ワクチンウイルス (vaccine derived poliovirus : VDPV) の伝播によるポリオの流行が報告されている。OPV によるポリオ根絶が現実的となった現在、VAPP や VDPV による発症例をなくし、さらに OPV 廃止後のポリオウイルス抗体の維持のため不活化ポリオワクチンの早期導入が求められる。

#### IV まとめ

過去徳島県において分離されたポリオウイルスの VP-1 領域と 3D 領域について、PCR-SSCP 法を用いて塩基置換の有無について検討した。その結果、VP-1 領域では12株中4株に塩基置換が認められた。3D 領域では12株中1株のみ塩基置換が認められた。

#### 文 献

- 1) 山本保男, 嶋田啓司, 岡田貴志: 徳島県保健環境センター年報, 19, 9-12 (2001)
- 2) 関谷剛男: 蛋白質・核酸・酵素, 41(5), 539-545 (1996)
- 3) 菅野康吉: 蛋白質・核酸・酵素, 41(5), 638-642 (1996)
- 4) 山本保男, 嶋田啓司: 徳島県保健環境センター年報, 20, 71-74 (2002)
- 5) 松浦久美子, 石倉康宏, 中山喬他: 富山衛研年報, 23, 108-112 (2000)
- 6) Yoshida H, Horie H, Matsuura K et al: Lancet, 356, 1461-1463 (2000)
- 7) 野本明男: 臨床と微生物, 24(2), 13-17 (1997)