

## ポリオウイルス分離株の遺伝子解析による鑑別

徳島県保健環境センター

山本 保男・嶋田 啓司・岡田 貴志

The Differential test of Poliovirus Isolates Using Gene Analysis

Yasuo YAMAMOTO, Keiji SIMADA and Takasi OKADA

Tokushima Prefectural Institute of Public Health and Environmental sciences

### Abstract

The results of the differential test of the Poliovirus isolates, using the PCR-RELP assay in the VP 1-region, it was totally vaccine derived strains.

However, using the PCR-RELP assay in the 3 D-region, all of type 3 strains recombined to type 2 strain.

Key words : ポリオウイルス Poliovirus, ワクチン株 vaccine strain, PCR-RFLP PCR-RELP assay, 遺伝子組み替え recombination

### I はじめに

ポリオ（小児麻痺＝急性灰白髄炎）はポリオウイルスの感染により中枢神経が侵され、急性弛緩性麻痺（Acute Flaccid Paralysis: AFP）が引き起こされる急性感染症である。我が国においては1960年に届出患者数が5,600人という戦後最大の流行となったが、不活化ポリオワクチン（Salk vaccine）及び弱毒生ポリオワクチン（Sabin vaccine）の導入で患者発生数は激減し、ポリオは制圧された。国内においては、1971年と1980年に各1例ずつ野生株によるマヒ型ポリオ患者が発生して以来患者発生はみられず、現在我が国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<sup>1)</sup>。一方、世界的にはWHOの世界ポリオ根絶計画が1988年からスタートし、着実に成果が上がっている。南北アメリカ大陸のポリオウイルス野生株の根絶<sup>2)</sup>に続き、我が国が属する西太平洋地域でのポリオ根絶宣言も2000年10月にだされた。

このような状況の下、研究室等で保管されているポリオウイルス野生株の保管強化、及び将来的には全てのポリオウイルス野生株を根絶するプログラムが始まりつつあることから、当センターで保存中のポリオウイルス分離株について、VP 1領域のPCR-RFLP法（polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay）により、ワクチン株か野生株かの鑑別試験を行った。さらにポリオウイルスによ

くみられる遺伝子組み替えの有無について3D領域のPCR-RFLP法を実施したのでその成績を報告する。

### II 材料及び方法

#### 1 供試ポリオウイルス

供試ポリオウイルスは、1983年から1998年までの間で、徳島県において分離されたポリオウイルス12株（表-1）と、対照としてワクチン株（Sabin 1型・2型・3型）、及び野生株（1型・2型・3型）を用いた。分離株は全て感染性胃腸炎・発疹症等の非ポリオ患者由来でありその内訳は血清型1型が4株、血清型2型が5株、血清型3型が3株である。

#### 2 PCR-RFLP法

ポリオウイルスからのRNA抽出は、市販の核酸抽出剤ISOGEN-LS（ニッポンジーン）を用い、抽出RNAは10 $\mu$ lの蒸留水で溶解し、RT-PCRに供した。

鑑別試験は、Balanantら<sup>3)</sup>の方法に準じて、ポリオウイルスキャプシド領域で、中和エпитープに深く関与するP1・VP1遺伝子領域について解析した。

遺伝子の組み替え体については、Furioneら<sup>4)</sup>の方法に準じてポリメラーゼをコードするP3・3D遺伝子領域に

表-1 ポリオウイルス分離株の由来及びワクチン接種状況

分離株番号	血清型別	患者年齢	性別	臨床診断名	検体	検体採取日	ワクチン接種有無	ワクチン接種後日数
133-83	3	1	女	感染性胃腸炎	糞便	1983.11.29	有	12
27-84	1	7 M	男	感染性胃腸炎	糞便	1984.6.8	不明	
248-84	2	4	男	感染性腸炎	糞便	1984.11.19	不明	
128-85	2	7 M	女	発疹症	咽頭拭い液	1985.5.15	不明	
134-85	3	1	女	感染性胃腸炎	糞便	1985.5.17	有	16
135-85	3	5	男	感染性胃腸炎	糞便	1985.5.17	不明	
146-85	1	6 M	男	発疹症	咽頭拭い液	1985.6.4	不明	
303-85	2	9	男	感染性胃腸炎	糞便	1985.11.13	不明	
225-94	1	9 M	女	感染性胃腸炎	糞便	1994.11.10	有	22
69-96	2	6 M	女	感染性胃腸炎	糞便	1996.3.27	有	8
70-96	1	11M	男	感染性胃腸炎	糞便	1996.3.28	有	1
175-98	2	7 M	女	感染性胃腸炎	糞便	1998.10.26	不明	

ついて解析した。

(1) VP1領域のPCR-RFLP法

RT-PCRは、以下の方法で行った。抽出RNAをanti-senseプライマー(UC1)を用いて、42℃60分間逆転写反応を行った後、94℃30秒、55℃1分、70℃1分の反応を30回繰り返した。プライマーは以下のとおりであり、増幅産物は480塩基対である。

UC-1 5' GAATTCATGTCAAATCTAGA

UG-1 5' TTTGTGTCAGCGTGAATGA

増幅したウイルス遺伝子は、10UのHaeIII、DdeI、HpaIIの各制限酵素で37℃2時間反応させた後、3%アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色後切断パターンを解析した。

(2) 3D領域のPCR-RFLP法

3Dポリメラーゼ領域のRT-PCR法は、抽出RNAをアンチセンスプライマー(UC-8)で逆転写後PCR反応を実施した。プライマーは以下のとおりであり、増幅産物は291塩基対である。

UC-8 5' GATGCTCTCTTCTTCTTTCCC

UG-7 5' TTTGAAGGGTGAAGAACCAGC

制限酵素はHaeIII、DdeI、RsaIを使用した。その他の条件はVP1領域のPCR-RFLP法と同様の方法で行った。

III 結果

1 VP1領域のPCR-RFLP法による鑑別

今回供試したポリオウイルス分離株のPCR-RFLP法による鑑別試験結果を図-1に示した。その結果、血清型1型分離株4株のうち、27-84株と225-94株は、ワクチン株(Sabin1)では480塩基対のPCR産物が230塩基対、140塩基対、110塩基対に切断されるべきHaeIIIにおける切断

部位を2カ所喪失しており野生株と同じパターン(480塩基対)を示した。しかし、この2株はHpaIIとDdeIの切断パターンがワクチン株と同じパターンを示していることから、この2分離株はワクチン由来株と判定された。血清型2型、3型については、使用した3種類の制限酵素とも分離株とワクチン株の切断パターンが一致し、ワクチン由来株と判定された。

また、血清型2型と判定していた248-84株は、切断パターンをみるとわずかに血清型1型が混在していた。

2 3D領域の解析による遺伝子組み替えウイルスの検出

3D領域における遺伝子組み替えの有無についてPCR-RFLP法で解析した(図-2)。

血清型1型分離株(4株)、血清型2型分離株(5株)とも切断パターンはそれぞれワクチン株の切断パターンと同じであり遺伝子の組み替えは起こっていないことが判明した。しかし、血清型3型の分離株は3株(133-83、134-85、135-85)とも遺伝子の組み替えが起こっていることが判明した。これらのウイルスはVP1領域はワクチン株(Sabin3型)と同じ遺伝子を保有していたが、3D領域の遺伝子は血清型2型ワクチン株(Sabin2型)と同じであった。

また、VP1領域の解析と同様に、248-84株は血清型2型ウイルスにわずかながら血清型1型ウイルスが混在していることが判明した。

IV 考察

WHOのポリオ根絶計画は順調に進展し、1988年には350,000例の患者報告数が、2000年には2,600例まで急減した。今後はアフリカ地区と東南アジア(特にインド)が大きな目標となる。全世界のポリオウイルスが野生株からワクチ

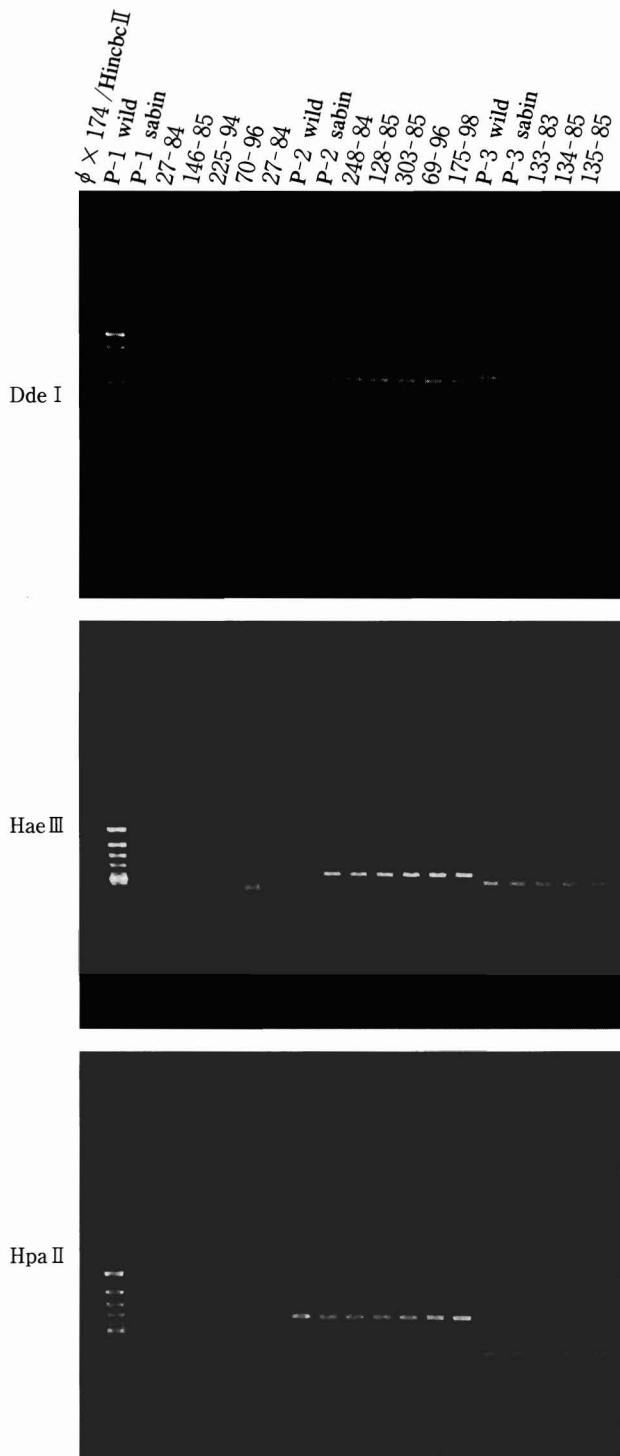


図-1 ポリオウイルス VP-1 領域の PCR-RFLP 法による切断パターン

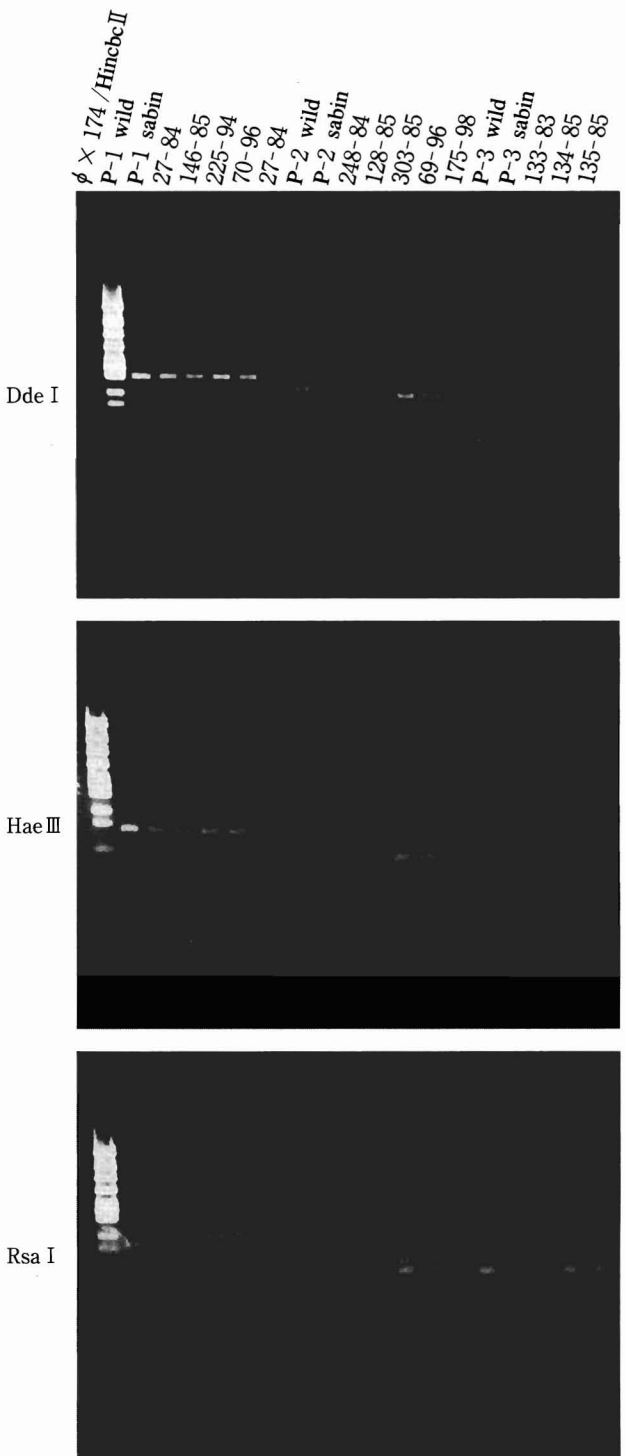


図-2 ポリオウイルス 3D 領域の PCR-RFLP 法による切断パターン

ン株に置き換わった時点で、野生株のみならずワクチン株の根絶も視野に入ってくるのが予想される。

2000年10月に我が国が属する西太平洋地区のポリオ根絶宣言が出されたことから、過去徳島県で分離されたポリオウイルスについて、ワクチン株か否かの鑑別試験を PCR-RFLP 法で実施したところ、分離株全てがワクチン株由来であった。しかし、血清型 2 型、3 型は 3 種類の制限酵素全てでワクチン

ン株と同じであったが、血清型 1 型については 4 株のうち 2 株が遺伝子変異を起こした結果、Hae III における切断部位を喪失し、野生株とおなじパターンであった。このうち 1 株はワクチン接種後 21 日目に検体採取されたものである。通常、ワクチン接種後 4～6 週間はワクチン株の排泄が続くといわれており、このケースは既に遺伝子変異が起こっているワクチン株の感染を受けたものか、或いはワクチン接種後体内で

遺伝子変異を起こしたもののなにか不明である。高尾ら<sup>5)</sup>の成績ではワクチン接種後最長29日までの分離株における PCR-RFLP 法での切断パターンは全てワクチン株と同じであった。一方、健康小児（ワクチン接種後最短6ヶ月）からのポリオウイルス分離株での成績<sup>6)</sup>では高頻度で切断部位が喪失していることが判明している。また、下水からの分離株でも切断部位を喪失し遺伝子変異が起こっていることが判明している<sup>7)</sup>。米山ら<sup>8)</sup>によると、ワクチン由来株 VP1 領域の塩基配列において0～2%の差異がみられることから、今回の血清型1型の2株もこの範疇に入るものと推測された。ポリオウイルスは revertant がでやすいことはよく知られており、ワクチン製造時においてもウイルス増殖温度(33～34℃)と時間は厳密である。我々のウイルス分離は通常37℃で行っており、ウイルス分離時に遺伝子変異が起こった可能性も否定できない。

一方、ポリオウイルスは recombination の頻度も高く、Emini ら<sup>9)</sup>によればポリオ1型においてワクチン株由来変異株と強毒株 (Mahoney) 由来変異株を混合増殖させたとき、P1 領域が Sabin で P3 領域が強毒株である Mahoney の組み替え体が1:10<sup>4</sup>の割合で引き起こっていたことを報告している。さらに Furione ら<sup>4)</sup>は遺伝子組み替えがポリオウイルスの神経病原性復帰のメカニズムの一つであることを示唆している。このため我々も3D領域における遺伝子組み替えについて検討したところ12株中3株が組み替えを起こしていたことが判明した。高尾ら<sup>5)</sup>の成績では16株中3株に組み替えが起こっておりワクチン接種後9～16日の検体採取であった。我々の成績において3株中2株はワクチン接種後16日目の検体採取であった。ワクチン接種後早い段階で組み替えが起こっていることが判明した。ただし遺伝子の組み替え自体はワクチン株同志の組み替えであるので問題はない。

recombination, revertant の出現頻度が高いことはポリオ生ワクチンの宿命であるが、ワクチン関連マヒ患者の発生など看過できない問題を含んでいる。現在、生ワクチンにより野生株ポリオウイルスによる AFP が根絶された後、不活化ポリオワクチンの導入が議論されようとしている。

## V 結 論

- 1 VP1 領域の PCR-RFLP 法によりポリオウイルス分離株の鑑別試験を行った結果、分離株は全てワクチン株由来であった。しかし、血清型1型分離株4株のうち2株は制限酵素 HaeⅢ における切断部位を喪失しており、遺伝子変異を起こしていた。
- 2 3D 領域の PCR-RFLP 法によりポリオウイルスの遺伝子組み替え体の有無を調べた結果、血清型3型分離株3株全ての3D領域が血清型2型遺伝子に組替わっていた。

## 文 献

- 1) 国立感染症研究所, 厚生省結核感染症課: 病原微生物検出情報, 21 (10), 3-5 (2000)
- 2) CDC. MMWR. 43: 720-722 (1994)
- 3) Balanant, J; Guillot, S; Candrea, A; et al. Virology, 184, 645-654. (1991)
- 4) FURIONE, M; Guillot, S; Otel ea, D; et al. Virology, 196, 199-208 (1993)
- 5) 高尾信一, 福田伸治, 野田雅博他: 広島県保健環境センター研究報告, 5, 15-18 (1997)
- 6) 田部井由紀子, 吉田靖子, 長谷川道弥他: 東京衛研年報, 50, 20-23 (1999)
- 7) 松浦久美子, 石倉康宏, 中山 喬他: 富山衛研年報, 22, 91-96 (1999)
- 8) 米山徹夫, 吉田 弘, 清水博之他: 国立予防衛生研究所年報-平成8年度-, 65 (1997)
- 9) Emini, EA; Leibowitz, J; Diamond, DC; et al. Virology, 137, 74-85 (1984)