

## 「ポリオウイルスの種と組織特異性」

Keyword: ポリオ, ポリオウイルス, polio, polio virus, 種特異性, 組織特異性, 受容体, IRES

東京大学の野本です。学生の時に、核酸化学の研究を始めました。核酸 (nucleic acid) といえば遺伝子そのものですが、私の専攻したのは遺伝子工学ではなく核酸の化学でした。しかし、核酸の研究は奥が深く、ウイルスの遺伝子の研究にまで入ってゆくことになりました。ポリオウイルスの全ゲノムを決定した論文を発表するなどに至り、生物学を学び、感染症学を学び、ポリオマウスをやるようになりました。私自身は、もともとは有機化学者で、まだ生物学の専門家ではないという気持ちで研究に取り組んでいます。

最初に研究で取り組んだのがポリオウイルスでした。何故ポリオウイルスかと言いますと、ポリオウイルスが、ウイルス研究の中で一番進んでいるからです。ウイルス学での新発見は、ポリオウイルス研究から出ています。私は、ポリオウイルスに取り組んで 30 年やってきましたが、まだまだ分からないことが多く、どうしてポリオを引き起こすのか、どうしたら押さえ込めるかを残された時間を使って取り組んで行きたいと考えています。

本日は、このポリオウイルスが、どういうものか、どのようにして感染するのか、どのように伝播して最終的に麻痺を引き起こすのか、さらにウイルスが解明できたら逆に積極的にウイルスを利用しようとする考え方、現在の WHO (世界保健機構) のポリオ根絶計画 (注：野本先生も委員の一人) とその進行状況などについてお話します。

動物に感染するウイルスの基本型は、A、B、C、の 3 種しかありません (図 1)。ポリオウイルスは A タイプです。このウイルス核酸がゲノムで、遺伝情報がつまっています。ウイルスは細胞に感染し子孫を増やします。しかし、核酸は非常に不安定な物質で、周囲に多

く存在する分解酵素により分解されますので、必ず保護膜で守られています。この場合には、蛋白 (キャプシド蛋白) が保護膜となっています。ウイルスの外側が蛋白ですから、感受性細胞に感染する時のウイルスの受容体はこの蛋白の殻の上にあります。同様に、ウイルスが体内に入った時に生体防御系 (免疫系) が認識するのもこの殻の部分の蛋白です。

B、C については簡単に説明します。B は、外側にエンベロープと呼ばれる膜を有します。これらは、細胞膜と基本的には同様な構造の脂質二重層とエンベロープ蛋白からなります。C は、A や B のきちんとした構造を有さずウイルス核酸の周りを蛋白がぺたぺた付いたような弱い構造になっています。したがって、C の形のウイルスでは必ず外側にエンベロープを有します。B、C タイプは外側がエンベロープですから、これが A 同様に、細胞に感染する時の細胞膜と結合する役目をします。

ウイルスは多くは粘膜から侵入するのですが、体内に取り込まれたウイルスは、最初の標的組織で複製されます。最初の標的組織は、ポリオウイルスでしたら消化管ですし、インフルエンザウイルスでしたら呼吸器で、インフルエンザは呼吸器で疾患発症します。

ポリオウイルスは、その後体内を伝播し、最終の標的組織に到達して複製されます (図 2)。なぜ、どういう経緯をたどり、ウイルスは最終的な組織にいたるのか、ウイルスはあたかも標的とした組織を狙っているように見えますが、そうではなく、分子レベルでみると体内を伝播したウイルスと細胞組織の相互作用の総和から、最もうまくゆく細胞にウイルスが入ってゆくと理解されます。

ポリオウイルスの場合には中枢運動神経細胞であり、肝炎ウイルスの場合には肝臓細胞ということになります。

図 1

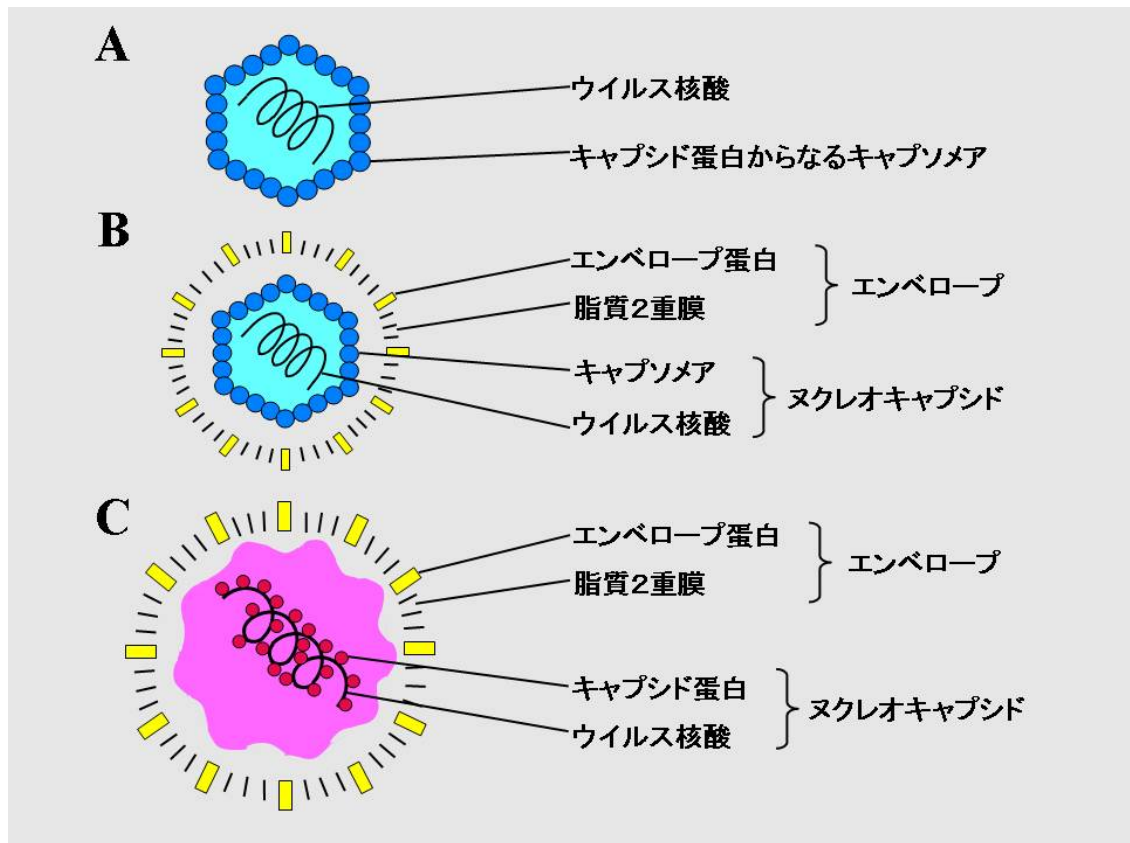
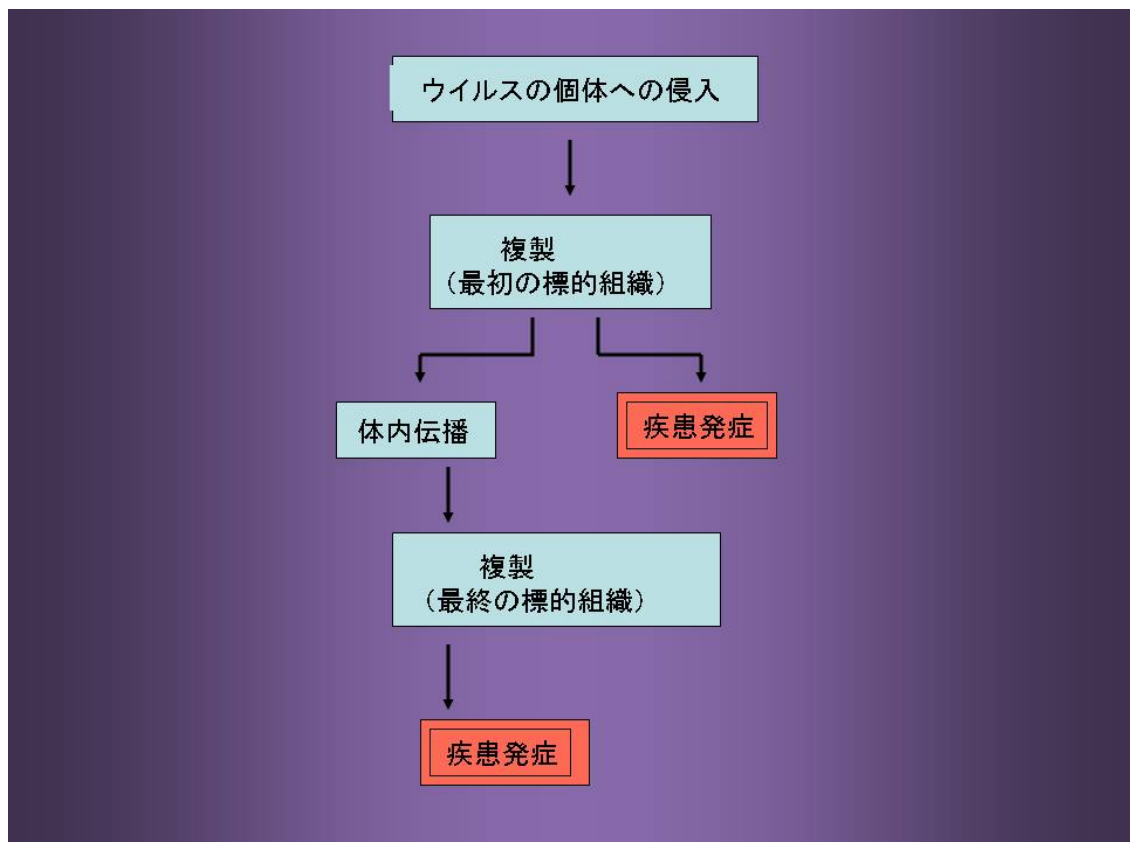


図 2



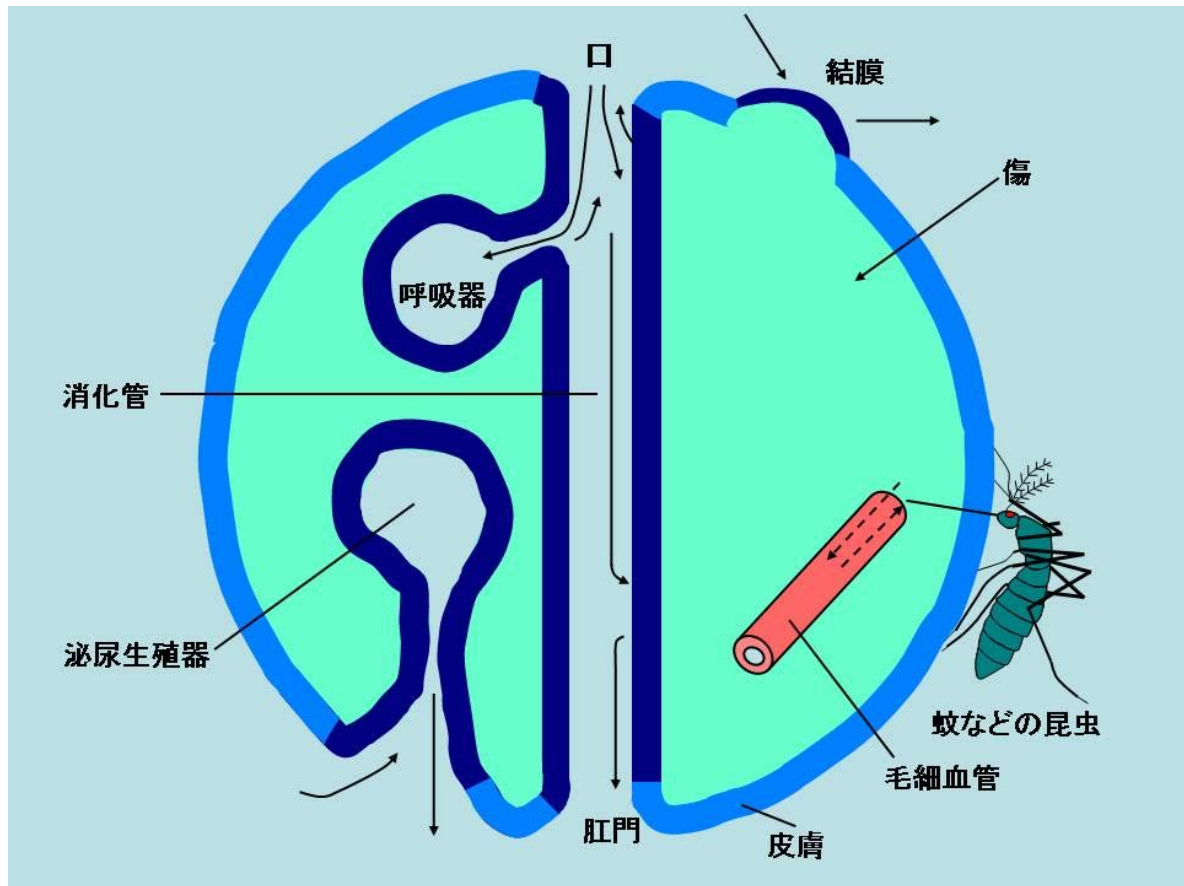


図 3

図 3 は人間を示したものでうまく表現されていると思います。上の口から入り、消化管、肛門となるのが真ん中の部分。呼吸器、消化管、泌尿生殖器、結膜（目）も記されています。濃いブルーで示されたところが粘膜の部分を示しています。粘膜は最も感染されやすいところですが、前にも話したように、どの粘膜も感染されやすいわけではなく、侵入したウイルスと細胞組織の相互作用によって決まります。皮膚などの物理的バリアからウイルスが入ることはまず無理ですが、傷ができた場合や蚊に刺された場合などは、ウイルスが毛細血管に直接注入されることになります。

図 4 は、粘膜の上皮細胞を示したもので、濃く示された細胞が感染細胞です。ウイルスに感染した粘膜の上皮細胞がウイルスの複製をつくりますが、ウイルスの放出方向には上、下の 2 つあります。この図では上側（管空側といい、腸管などでは内側に当たるのですが、

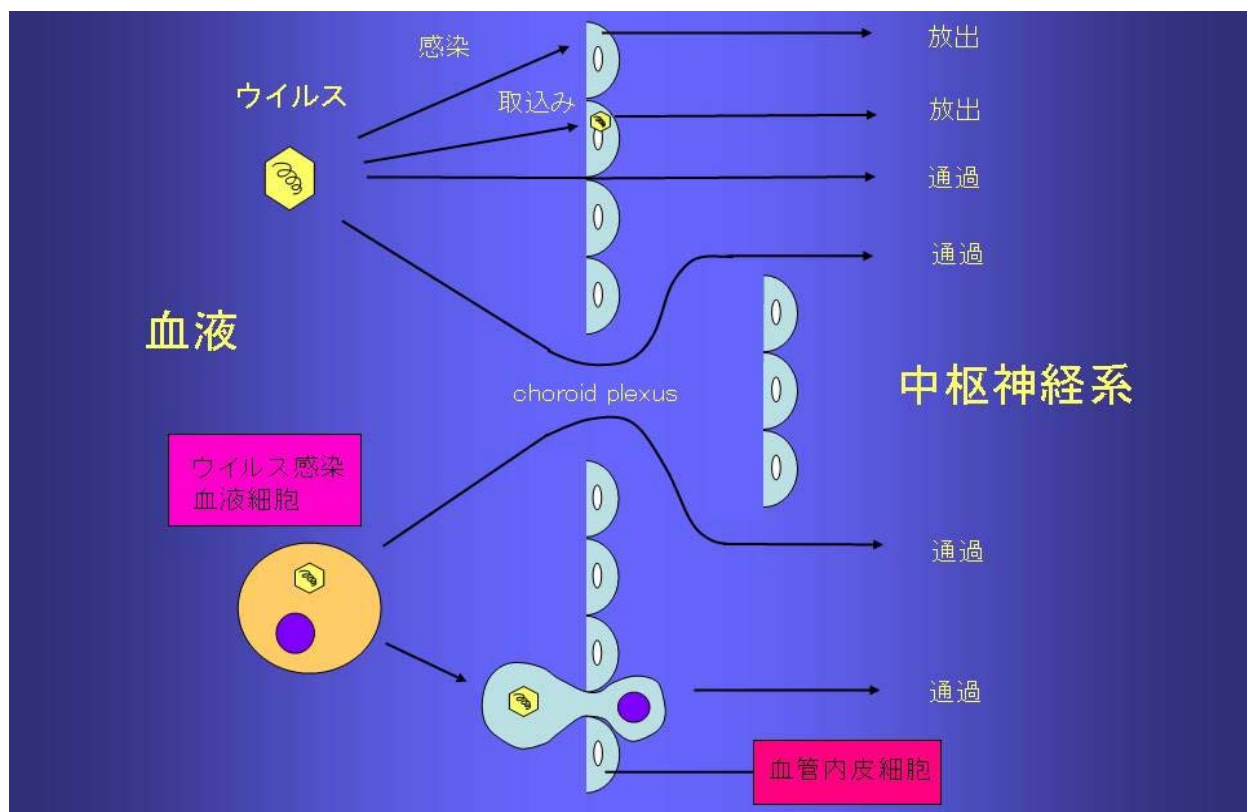
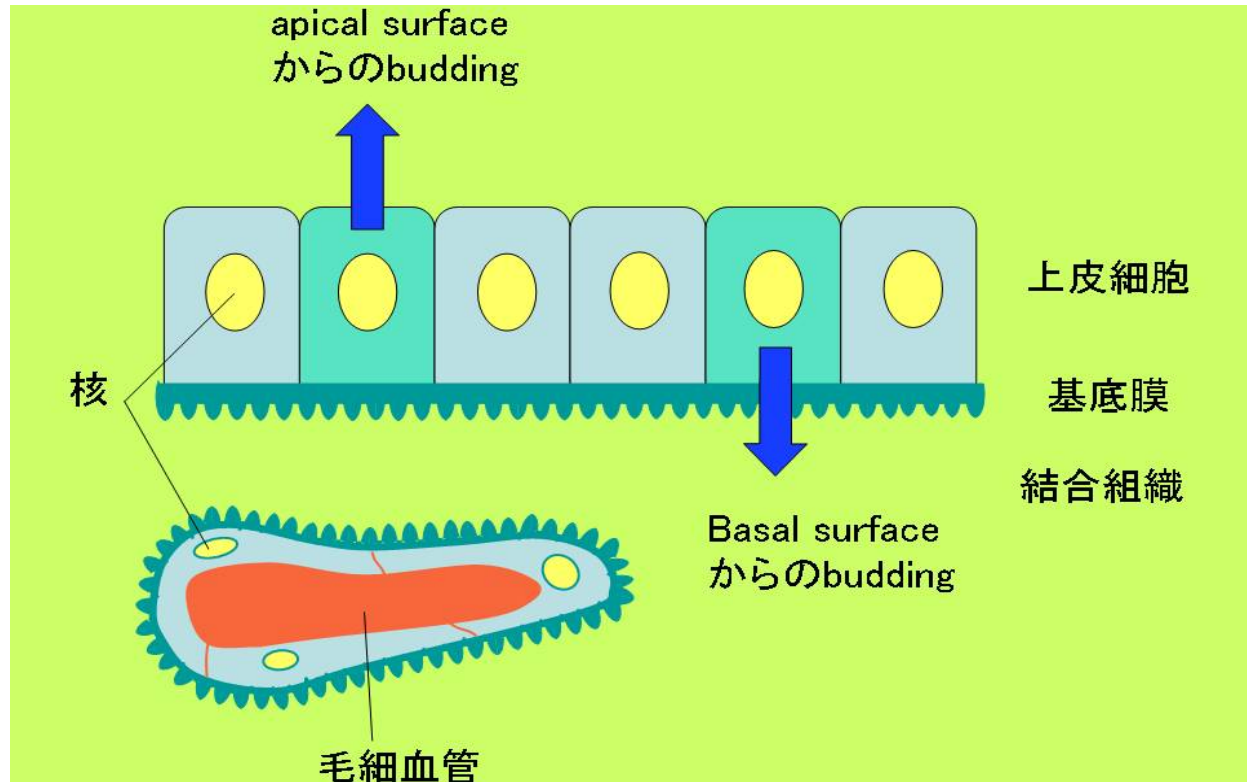
空気と接触するという意味で外側です）への、つまり Apical Surface（突起膜）からの Budding（出芽）と Basal Surface（基底膜）からの下側への Budding（出芽）です。ポリオウイルスは両側から出芽（Budding）します。Apical Surface（突起膜）側からの出芽は、基本的にたいしたことにはなりません。外側ですので、呼吸器であれば呼吸器感染だけで終わります。それに対して、Basal Surface（基底膜）側からの出芽はウイルスが体内に入ることになり、毛細血管の内皮細胞から血管に入り体中に広がることになります。

血液から中枢神経への移行のメカニズムはまだ分かっていません。エボラウイルスなどは、血管の内皮細胞に感染して入り込むと考えられていますが、血液脳関門（BBB : Blood Brain Barrier といいます）がありまして、ここを通れるウイルスはなかなかありません。ところが、ポリオウイルスはこの Blood Brain Barrier（血液脳関門）を通過できます（図 5）。

私たちが考えているのは、血管内皮細胞がポリオウイルスを取り込んで中枢神経側に放出するメカニズムが必ずあるということです。

このメカニズムを追求して 10 年近く研究していますが未だ困難な課題です。うまい実験系も出来上がったとは言えない状況です。

図 4、 図 5



他にはコロイド・プレクサス（脈絡叢）を通過するメカニズムがありますが、このメカニズムで入っても脳脊髄液の関門を通過しなければなりません。

もう一つは、血球の細胞に感染し、細胞ごと血管の内皮細胞を通るメカニズムで、これは無いとは言えないと思います。それは、ポ

リオは人間のモノサイト（Monocyte：単球、単核白血球）に感染するといわれているからですが、そんなに効率が悪いものではないと思われます。もっと効率よく入っていることが分かってきています。以上が血液から中枢神経への移行のメカニズムに関するものです。

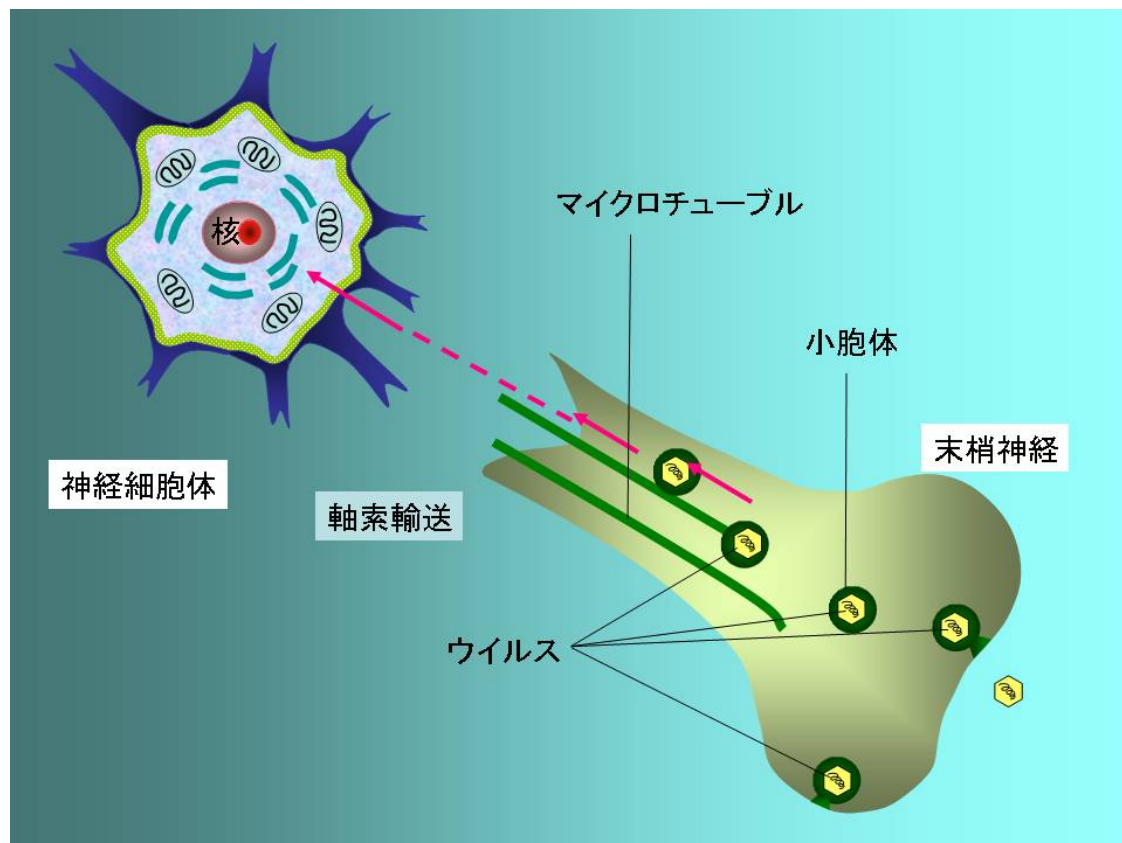


図 6

中枢運動神経細胞から末端の筋肉細胞まで軸索が伸びて繋がっています。一つ一つの細胞に対して軸索が繋がっているわけです。人の足の筋肉細胞では、この軸索の長さは1m以上にもなります。1つ1つの神経が1つ1つの骨格筋の細胞につながり、筋肉と中枢の運動神経が軸索で結ばれていることとなります。ポリオウイルスは、この骨格筋から逆行性にシナプス（抹消神経）から軸索を通して中枢神経に入ることが知られています（骨格筋から神経軸索を経由して中枢神経系に到る体内伝播機構：図6）。同じように神経を伝播するウイルスにはヘルペスウイルスがあり、そのあるものは帯状疱疹を生じさせます。また、狂犬病のウイルスも同じで、足を噛まれ

た時にはウイルスは同じ神経経路を通ります。

ここまで、ポリオウイルスがどのように体の中に入って、入った後、体の中をどのように動いているかを説明しました。

\*\*\*\*\*

## Q&A

Q：抹消神経に障害を与えるのがポリオと理解しているのですが、血液から中枢神経への移行がある場合、急性期にはどのような症状となるのでしょうか。また、ポリオウイルスの中枢神経への移行と抹消神経の障害との関連がよく分からないのですが。

A：ポリオウイルスは中枢の運動神経で増え、その細胞機能を破壊します。その結果、その運動神経細胞の支配下にある筋肉が動かなくなります。

\*\*\*\*\*

#### 用語の説明

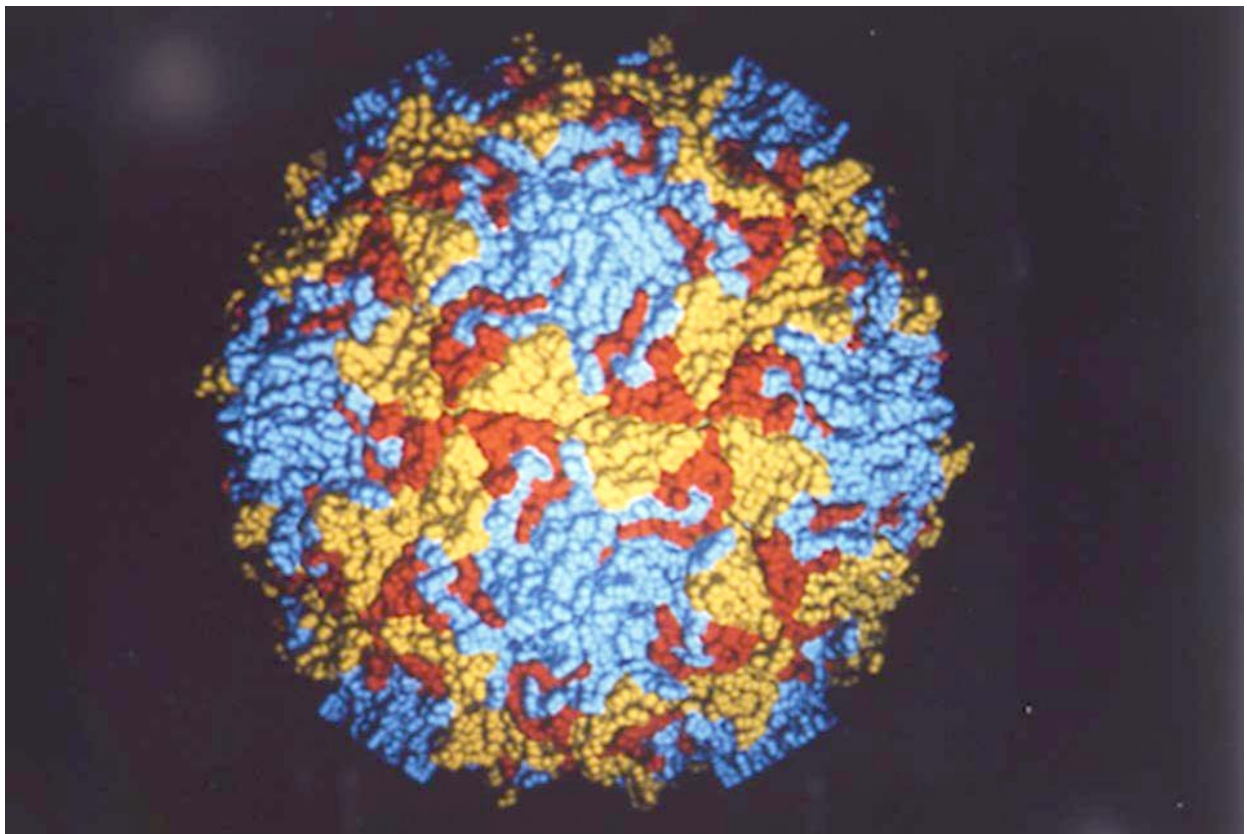
**Blood Brain Barrier (血液脳関門)**： 中枢神経機能に傷害を与えるような物質（たとえば薬剤や毒物）の脳内移行を制限し、神経活動のエネルギー源となる栄養素を選択的に移送する機構のことを言います。その構造は血管内腔を形成する一層の内皮細胞を基底膜が取り

巻き、さらにその外側をアストログリアの足突起が覆っています。脳内皮細胞は末梢内皮細胞に見られる窓構造や微小飲食胞を欠いていますが、その細胞間に密着結合を持つのが特徴です。物質移送の選択性は脳内皮細胞に局在し、可移送性物質はこの密着結合の通過性によるものか、内皮細胞表面の物質特異的な輸送体によると考えられています。

註：用語の説明は、全て「ポリオの会」の担当者が会員の便宜のため追加したもので、責任は担当者にあります。T.S.

#### ● ポリオウイルスの構造

図 7



1985 年、Scripps Clinic で X 線結晶構造解析の結果わかった立体構造を紹介します。ポリオウイルスは4種類の蛋白が60個ずつ集合して粒子を形成しています。4 種の蛋白はそれぞれ VP1、VP2、VP3、VP4 で、VP1、VP2、VP3 が5個集まって最小単位のパentakマーをつくり、

pentamer が12個集合して(12 X 5 で60個)一つのウイルス粒子を形成します。VP4 は粒子の裏側になっていてこの図では見えません。pentamer の中心は、粒子の中心に向かって5回対称軸を形成しています。対称軸のすぐ周りの粒子は表面に突き出ているところがあ

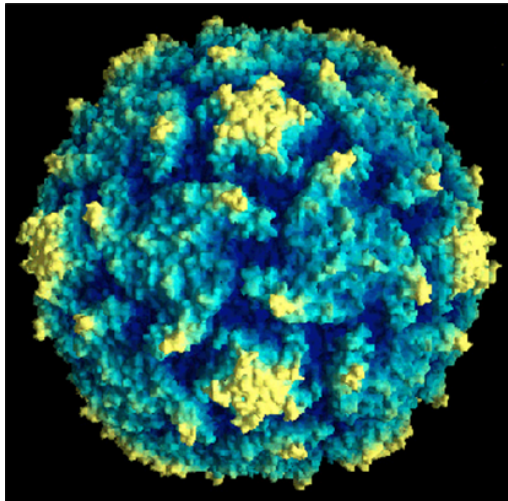
ります。ここは親水性の部分で、人の生体防御系（免疫系）が、ウイルスがいることを認識し、ウイルスを不活性化する抗体をつくります。また、ウイルス表面では最もへこんでいてキャニオンと呼ばれる深い谷のようにな

っている部位があります。この部分はポリオウイルスの受容体（レセプター）を認識する場所であり、ウイルス蛋白が 60 種あるように、この場所も 60 個存在することになります。

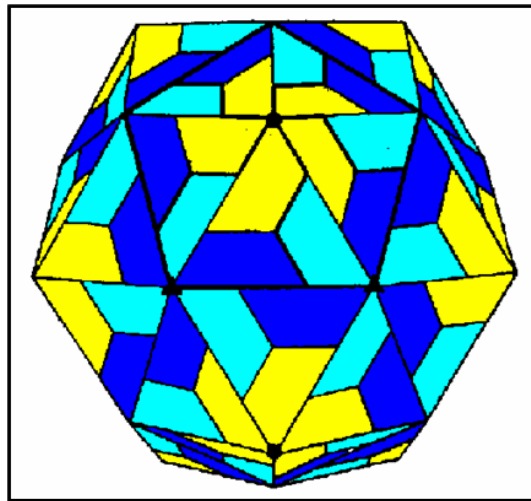
#### 用語の説明

ポリオウイルスは粒子としての大きさは約 30 nm で正二十面体をしている。各々の表面にキャニオンと呼ばれる微小なくぼみがあり、このくぼみをつくっている部位のタンパク質が、ヒト細胞表面にある CD155 という特定のタンパク質（受容体：レセプター）に接触し

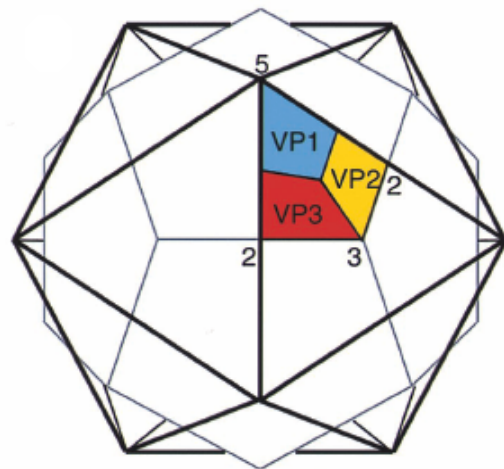
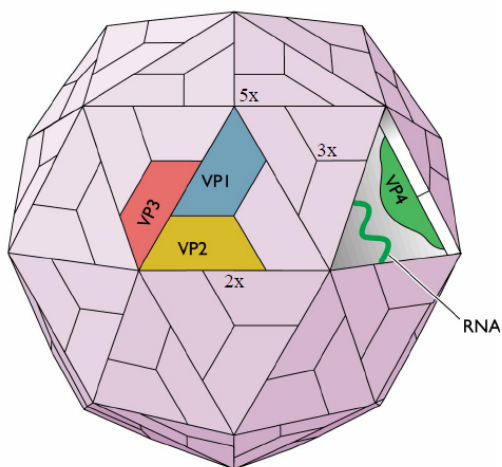
結合して、細胞内に取り込まれる。ウイルスのキャニオンのタンパク質がアクセプターとして、細胞側の CD155 タンパク質がレセプターとなり、ウイルス粒子は細胞へ吸着し取り込まれることによって感染が始まる。



Poliovirus type 1 at 2.9 Angstrom resolution  
[Hogel *et al.* (1985) Science 229 1358]



VP1 VP2 VP3



ポリオウイルスが細胞にどのように侵入するかについてのメカニズムは明確ではありません。私たちには考えがありますが、現在でも国際的に論争が続いています。

細胞膜の受容体（レセプター）に吸着、結合し、細胞膜を通して侵入したポリオウイルスは、脱殻といって外側のキャプシド蛋白が分解されウイルス核酸（ゲノム）が細胞の中に出てきます。ゲノムは細胞質の中に出て、細胞には蛋白合成システムがありますから、この蛋白合成能力を借りてウイルスの暗号がコードしている複製用蛋白とキャプシド蛋白がつくられます。ゲノムの一部は複製複合体といわれる場所をつくり、この中でまずゲノ

ムの RNA により極性が逆の「プラス鎖 RNA」がつけられ、つぎに「マイナス鎖 RNA」がつけられます。それから「マイナス鎖 RNA」が鋳型となり多量の「プラス鎖 RNA」がつけられます。このプラス鎖 RNA が蛋白をつくるメッセンジャーRNA（mRNA）になったり、キャプシド蛋白といっしょになり新しいウイルス粒子になったりします。増殖したウイルスは細胞膜を破って外に放出され、他の細胞に次々と感染していくことになります（図 8）。1 つの細胞から、少なくとも 100 個のウイルスがつけられ、多い時には 1,000 個程のウイルスがつけられることもあります。

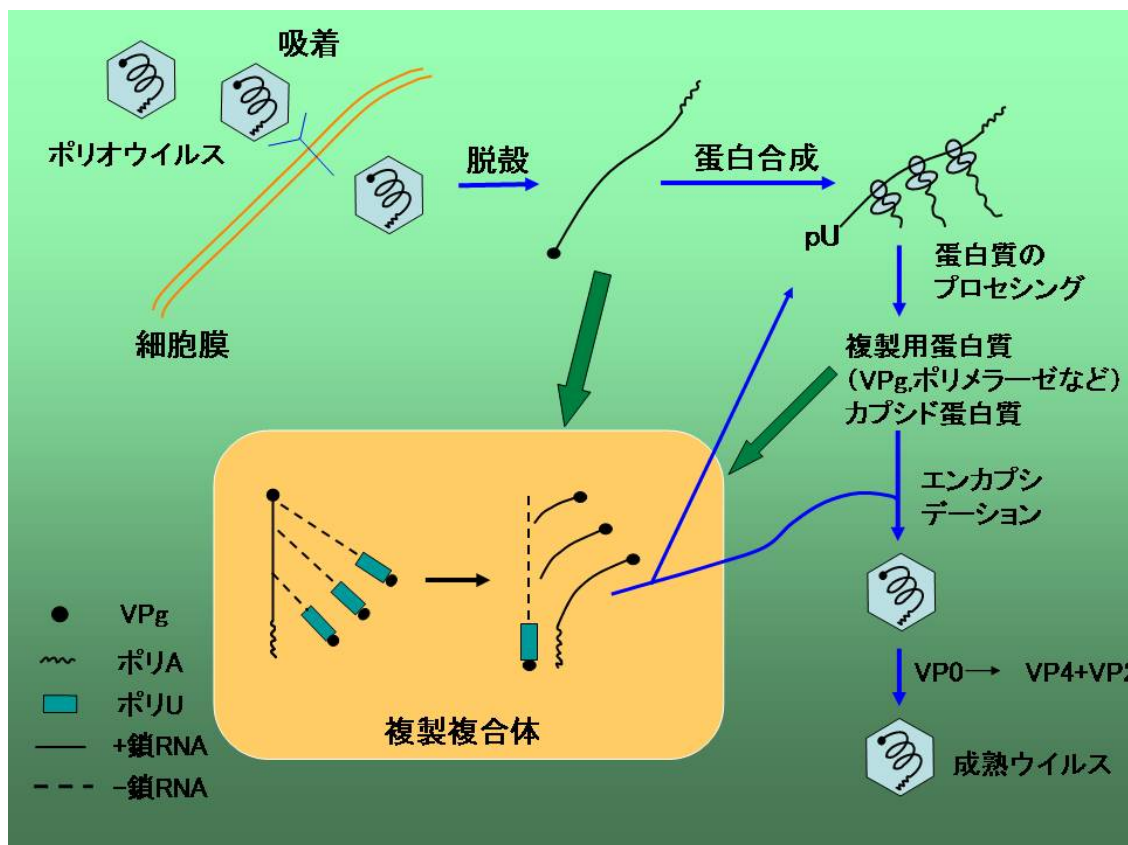


図 8

それではポリオウイルスのゲノム（Genome：ある生物体の全遺伝内容）はどのようなになっているのでしょうか。ここでの記号は、核酸の U（リジン）、A（アデニン）、G（グアニン）、C（シチジン）を示します。4 種の核酸が並んで 7441 個のヌクレオチド（Nucleotide、つまり核酸、それに平均 60 個のポリ A が並んで、これがポリオウイルスの

ゲノムです（図 9）。

ゲノムから蛋白が読まれてゆくのですが、最初にゲノムから大きな蛋白をつくります。それから 2A と 3C という蛋白分解酵素が蛋白を切り、最終的に機能をもつ蛋白ができてきます。これを「蛋白のプロセッシング」といい、長い蛋白がプロセスされて機能をもった蛋白になることを意味します。このことは、最初

はウイルスの研究から分かったのですが、人間の体でも同様な「蛋白のプロセッシング」がおこなわれていることが後になって分かっています。5'側は VP1, VP2, VP3, VP4 で、ウイルスの殻の部分の情報が、3'側はウイルスの

RNA を複製する蛋白の情報がコードされています。3'側の 3D は RNA を合成する蛋白です。5'側に存在する蛋白 VPg は共有結合でつながっており、VPg は RNA 合成の初期に重要な役割をすると分かっています。

図 9 ポリオウイルスのゲノム

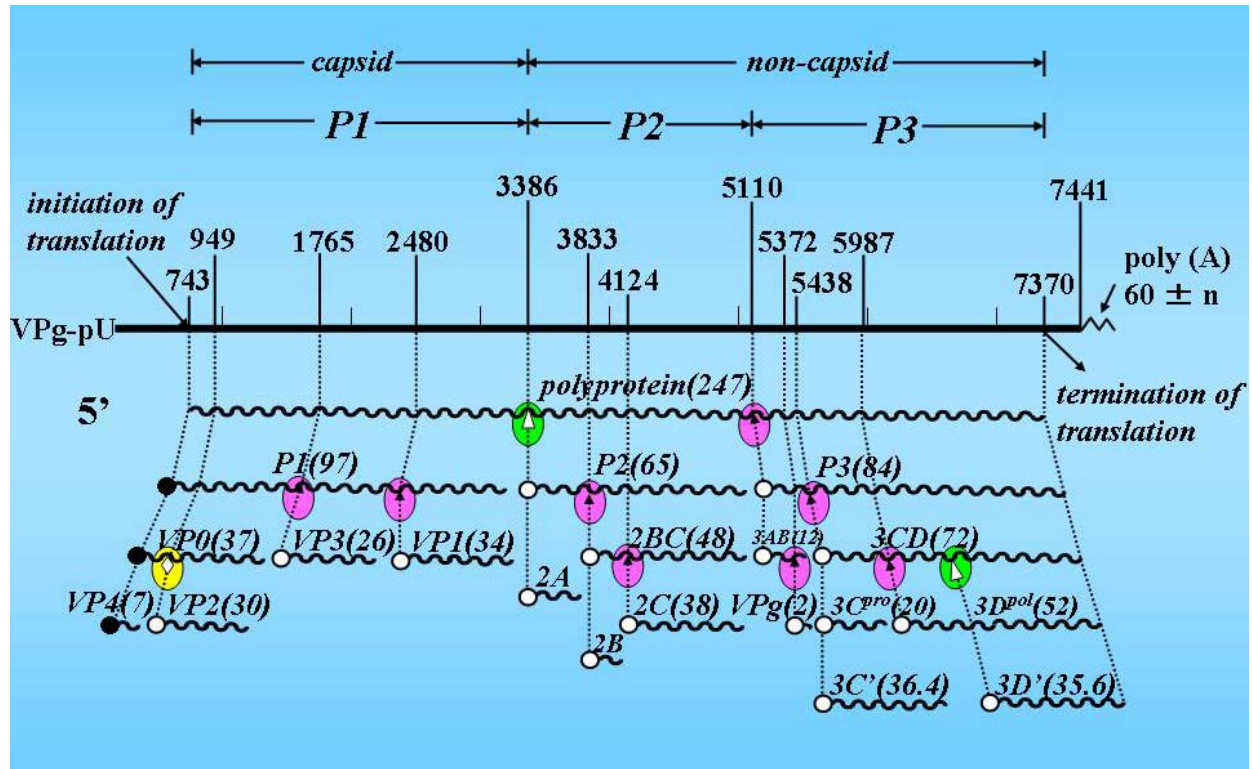
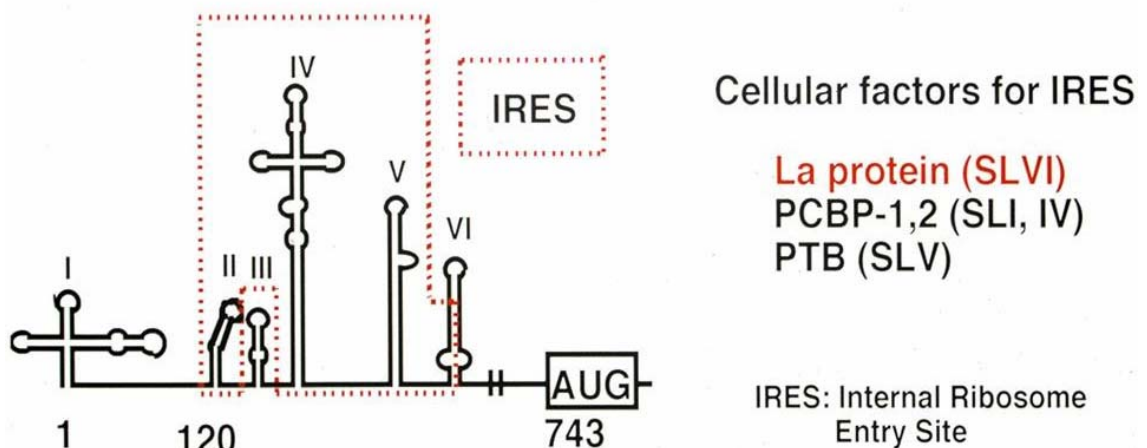


図 10 Poliovirus IRES and Host Factors



## ● ポリオウイルスの IRES (図 10)

蛋白の合成がスタートする時どんなメカニズムでスタートするのかを説明します。人の体のもっているリボソーム (Ribosome) が RNA 上を流れながら蛋白をつくってゆくのですが、リボソームには入るところが決まっています。その場所を IRES (Internal Ribosome Entry Site, アイレス: 配列内リボソーム進入部位) といいます。IRES はポリオウイルスの複製研究から発見されたもので、他の多くのウイルスでも見つかっています。人の細胞のメッセンジャーRNA でも見つかっています。

IRES は非常に複雑な構造になっており、図の点線で囲まれた部分が IRES です。リボソームが IRES に入る時には、RNA バインディング蛋白として La protein (SLVI), PCBP-1, 2 (SLI, IV), PTB (SLV) が Cellular Factors として必要になります。つまり、IRES が活性化するかどうかは、周りにこういう蛋白が存在するかどうかで決まり、存在しない場合にはウイルスが入っても IRES は活性化しない。したがって、リボソームは入ってゆかず、蛋白は合成せず、ウイルスの情報の複製もない。このように、常にウイルス側の分子と細胞側の分子レベルの相互作用がうまくゆかないとウイルスは増えることはできません。

ーームが IRES に入る時には、RNA バインディング蛋白として La protein (SLVI), PCBP-1, 2 (SLI, IV), PTB (SLV) が Cellular Factors として必要になります。つまり、IRES が活性化するかどうかは、周りにこういう蛋白が存在するかどうかで決まり、存在しない場合にはウイルスが入っても IRES は活性化しない。したがって、リボソームは入ってゆかず、蛋白は合成せず、ウイルスの情報の複製もない。このように、常にウイルス側の分子と細胞側の分子レベルの相互作用がうまくゆかないとウイルスは増えることはできません。

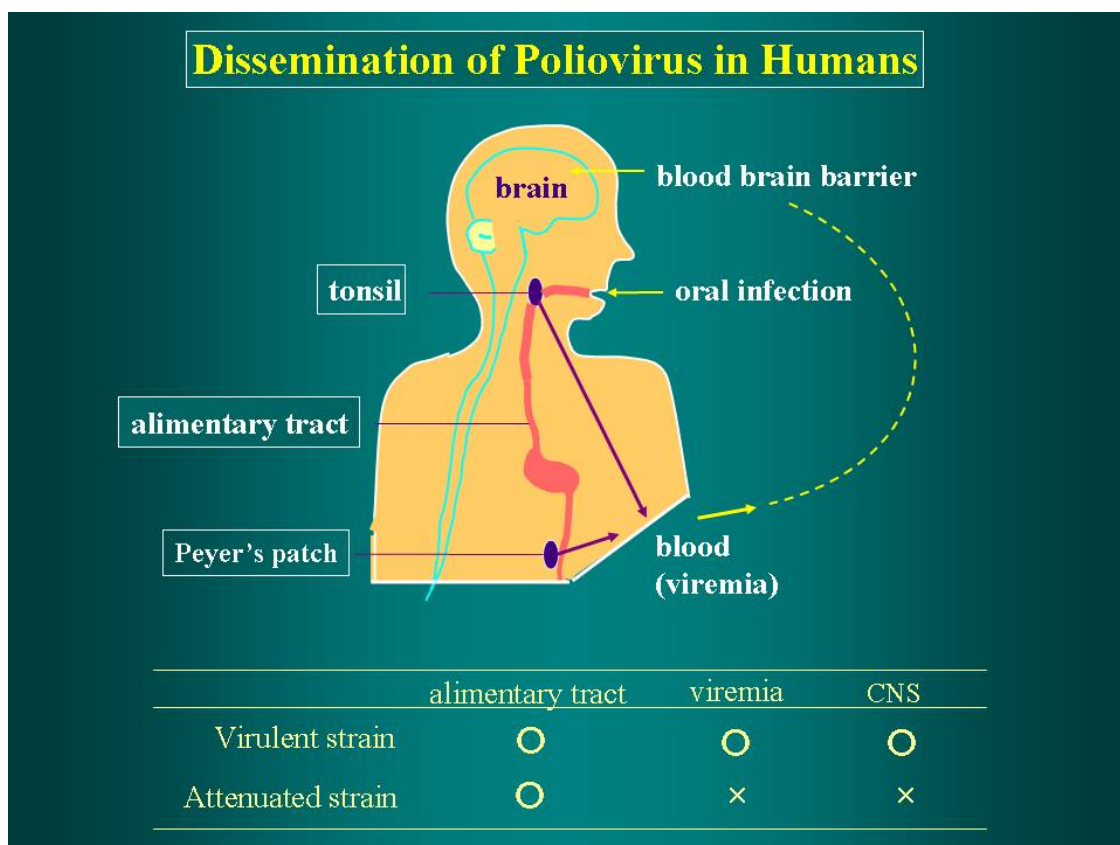


図 11

## ● ポリオウイルスの中枢神経への伝播機構 (図 11、図 12)

ポリオウイルスが人に感染するとどうなるかですが、もう一度伝播経路にもどります。ポリオウイルスは経口感染で、消化管のほぼ全域で増えます。胃では酸性が強いので増えません。ポリオウイルスは酸に強く腸管にまで達します。上部消化管では、扁桃 (tonsil)、

消化管ではパイエル板 (Peyer's patch) を介して血流に入ります。(tonsil, Peyer's patch とともにリンパ組織を構成し、粘膜免疫反応でバリアとなっている)。血流に入ったウイルスは体内どこでもいけます。次に増えたと分かるのは中枢神経で、脊髄前角の運動神経細胞で増え

ます。腰髄で特に増えるので脚にマヒを起こすことが多いのです。脊髄前角細胞は末梢神

経につながっているので、神経細胞が動けなくなり麻痺を生じさせます。

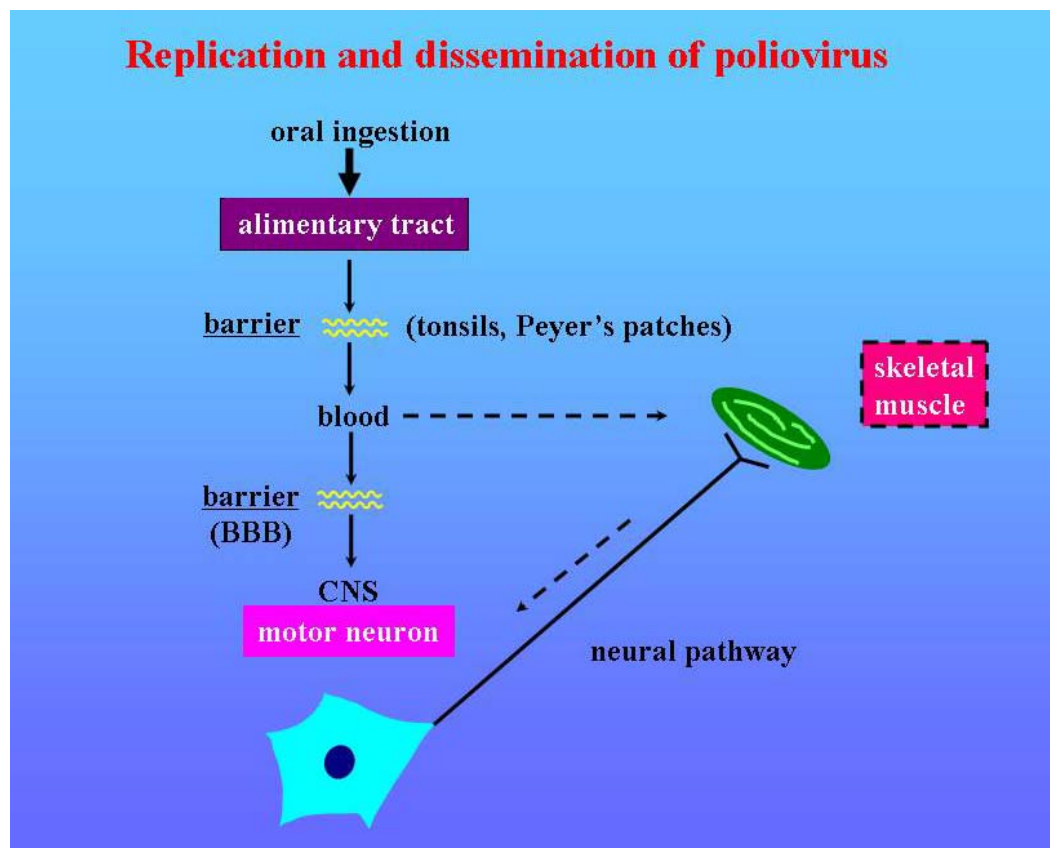


図 12

前に話しましたように、ポリオウイルスは、骨格筋から逆行性にシナプス（抹消神経）から軸索を通して中枢神経に入ることが知られています（骨格筋から神経軸索を経由して中枢神経系に到る伝播機構）。血液 → 骨格筋 → 中枢神経 という経路があってもおかしく

ないと思います。また、消化管から神経細胞の道もあり得ます。しかし、大別すると、ポリオウイルスの中枢神経への伝播機構は、1) 血中から血液脳関門を経由して中枢神経系、2) 骨格筋から神経軸索を経由して中枢神経系、の2つです。

- 私たちが現在行っている研究の内容（ウイルスの病原性研究）

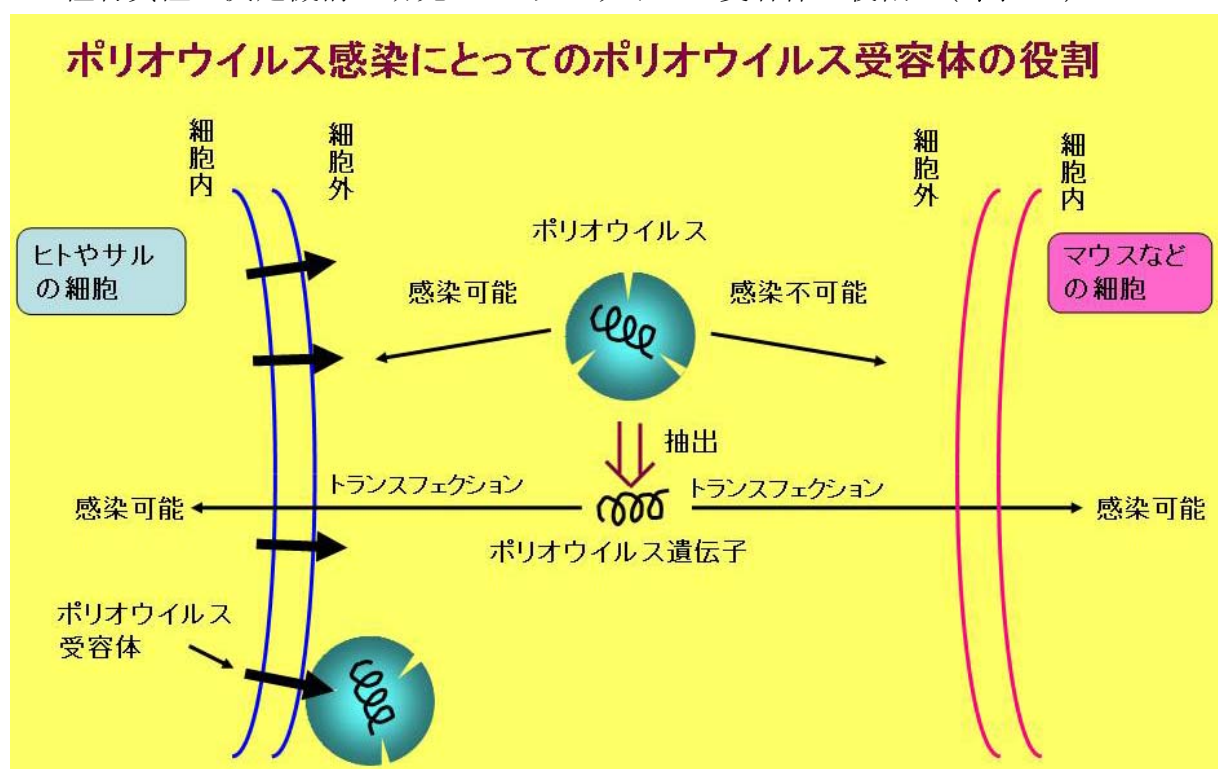
図 13

## ウイルスの病原性研究

1. 種特異性の決定機構
2. 組織特異性の決定機構
3. 体内伝播機構
4. 最終標的細胞への損傷能力

1. 種特異性の決定機構：ポリオウイルスは人とサルにしか感染しない。その理由の研究。
  2. 組織特異性の決定機構：ポリオウイルスは決まった組織でしか増えない。その理由の研究。
  3. 体内伝播機構：ウイルスにより伝播機構が異なるが、それは何が原因で決定されるのかの研究。 2.の組織特異性とも関係がある。
  4. 最終標的細胞への損傷能力：ポリオウイルスは神経細胞でどうやって組織を破壊するのかの研究。
- 以上が全部分かれば、我々はポリオウイルスを完全にコントロールすることができるようになり、逆にウイルスを利用することも可能になると考えられます。

● 種特異性の決定機構の研究：ポリオウイルス受容体の役割（図14）



左側の細胞が人またはサルで、右側の細胞がそれ以外、例えばマウスの細胞を示します。ポリオウイルスが感染して増えるプロセスは、細胞膜の受容体（レセプタ）に吸着、結合し、細胞膜を通過して侵入したポリオウイルスは、脱殻し、ゲノムは細胞質の中に出て、細胞の蛋白合成能力を借りて増えます。ですから、人工的にポリオウイルスのゲノムを取り出し、他の細胞へ移してやれば（これをトランスフェクション：transfection といいます）、細胞質

での複製(感染)が可能となるはずです。つまり、ポリオウイルスの感染初期課程に必要なものが人・サル以外の細胞では欠けていたのです。人、サルの細胞は感染初期に必要なものを持ち、それ以外の細胞は持たない。

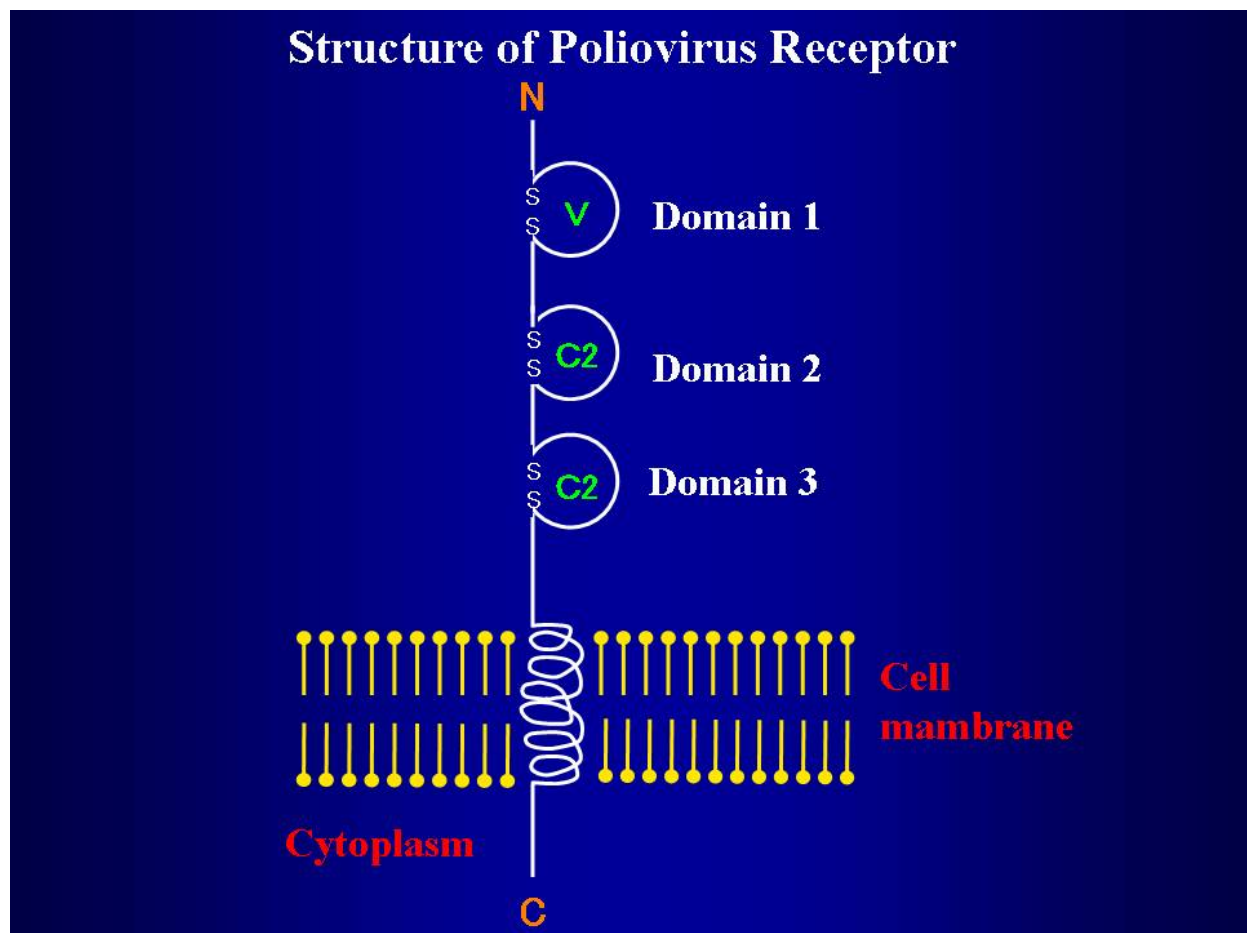
したがって、人、サル以外の細胞に、感染初期過程に必要なものを持たせることが出来れば、ポリオウイルスを細胞質に導入し、ポリオウイルスを増やすことが可能になります。（図14）。

ここに、もう一つの実験があります。放射能でラベルしたポリオウイルスを細胞に結合させた実験をやったのですが、人、サルの細胞では表面にぺたぺた付いたように放射能がカウントされますが、他の細胞では放射能がカウントされません。おそらく受容体があるかないかで決まっているのではないかと考えて、私どものところで、今から 15 年ぐらい前に、人のポリオウイルス受容体の遺伝子および cDNA (Complementary DNA : 相補 DNA) を単離しました。cDNA の塩基配列を解析し

たところ、ポリオウイルス受容体は免疫グロブリン (Ig : Immunoglobulin) スーパーファミリーの一員であることが明らかとなりました。非感受性のマウス L 細胞にポリオウイルス受容体遺伝子を導入したところ、ポリオウイルスに対する感受性を獲得しました。

このことから、人のポリオウイルス受容体遺伝子を持つ Tg (transgenic : 遺伝子組み換え) マウスをつくれば、ポリオウイルスの感染モデルとなる可能性が示唆されました。

● ポリオウイルス受容体の構造 ( 図 15 )



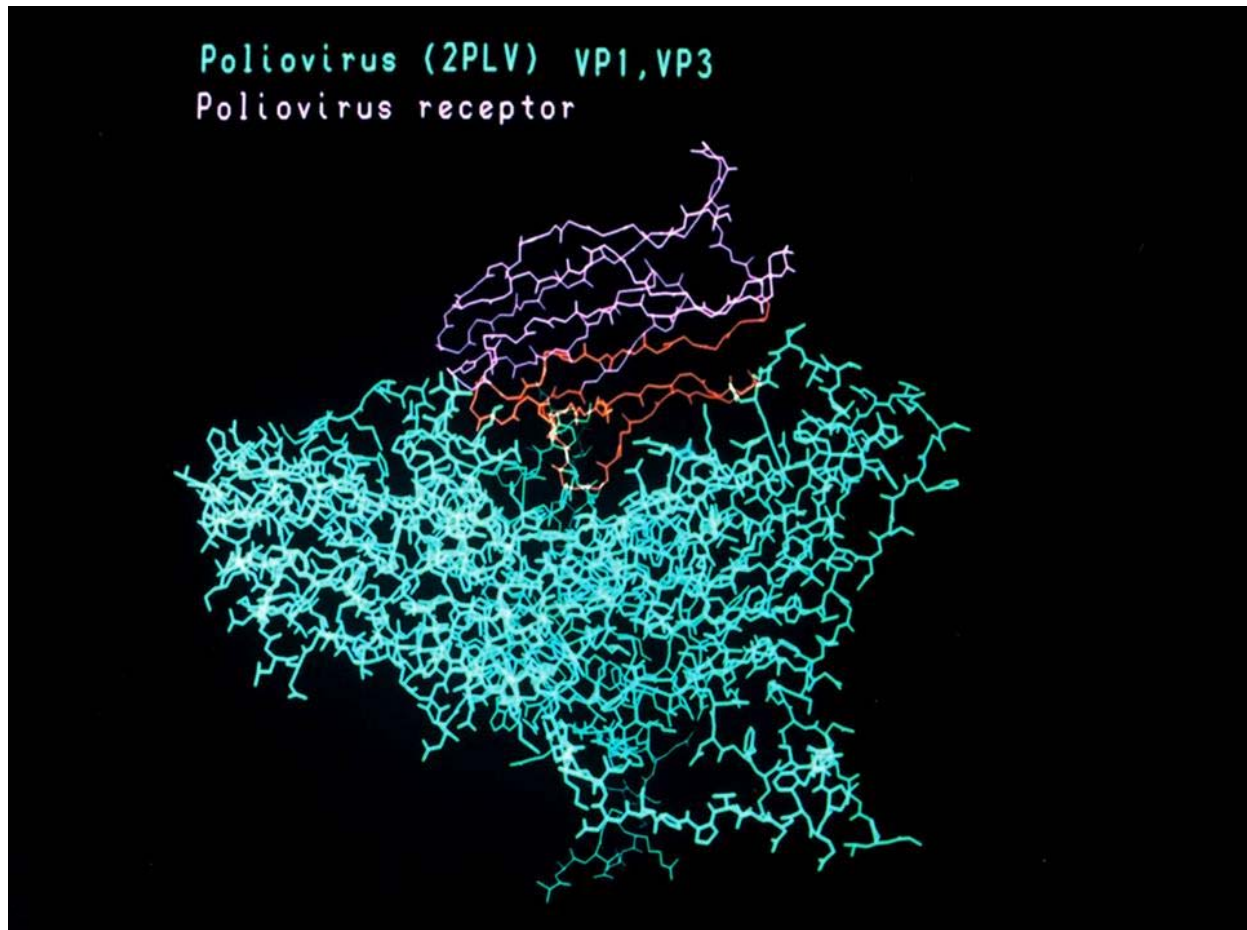
ポリオウイルス受容体の遺伝子からつくられると考えられる蛋白の構造を予測したのがこの図です (図 15)。下側が細胞質、上側が細胞の外側です。外側に 3 個のドメインがありますが、いずれも免疫グロブリンに非常に良く似た構造になっています。免疫グロブリ

ンには、V、C2 タイプがありますが、これに良く似たドメインがポリオウイルス受容体であることが分かっています。現在、細胞分子はあるファミリーを形成していることも分かっています。ポリオウイルス受容体は免疫グロブリン (Ig : Immunoglobulin) スーパーファ

ミリーの一員であることが明らかとなりました。それでは、ポリオウイルスはポリオウイルスの受容体のどこに結合するのか。これは、DNA の遺伝子操作によって切り貼りができます。各ドメインを削り、ポリオウイルスの結合、感染反応を調べることができます。そ

の結果、ポリオウイルスはドメイン番号 1 (Domain1) を認識していることが分かってきました。次にドメイン 1 とポリオウイルスとの結合を調べたコンピュータ・グラフィックを示します (図 16)。VP1、VP3 の二つの蛋白を組み合わせた結果です。

図 16



VP2 を加えると分かりにくくなるので除いてあります。

ドッキングというソフトを使い、計算の時間はかかりますが、あらゆる方向から分子を組み合わせてみて、最もドッキングがうまく行くところを探します。このあと、アミノ酸の構造を変えたり、削ったりして構造を確認します。ここでは、赤の部位がポリオウイルスの受容体であると分かってきています。

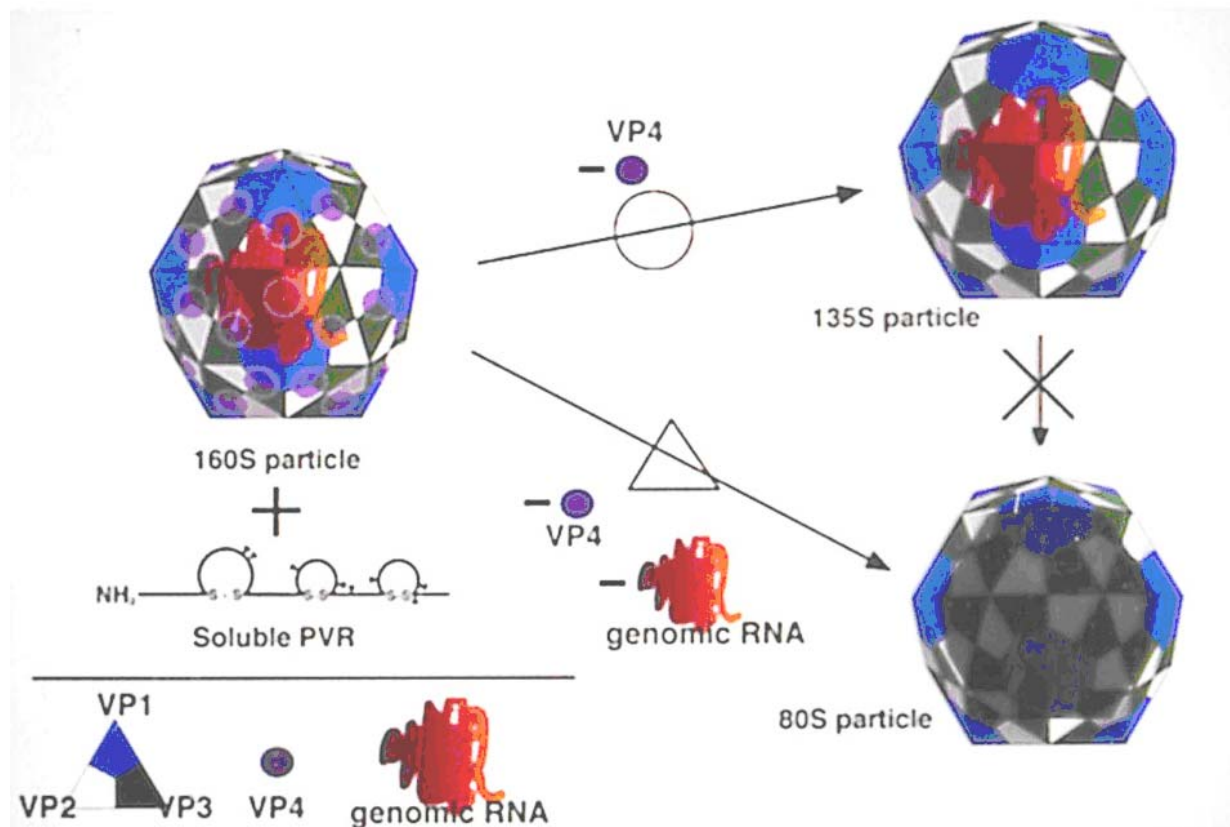
それでは、ポリオウイルスとポリオウイル

ス受容体の相互作用が、ポリオウイルスにどんな影響をあたえるでしょうか。(図 17)。ポリオウイルスを解析すると 160S 粒子(S は遠心の際の沈降係数)と分かります。ポリオウイルスがポリオウイルス受容体と結合した場合、135S 粒子と 80S 粒子となることは以前から分かっていました。135S は VP4 が無い、80S は VP4 とゲノム RNA も無い粒子です。また、135S→80S と長年考えられてきました。私たちは、ポリオウイルス受容体との相互作用であると考えて、完全に精製した受容体を使い、

試験管内で実験しました。その結果判明したのは、135S→80S と長年考えられてきた経路はなく、どちらかに変化するだけということ

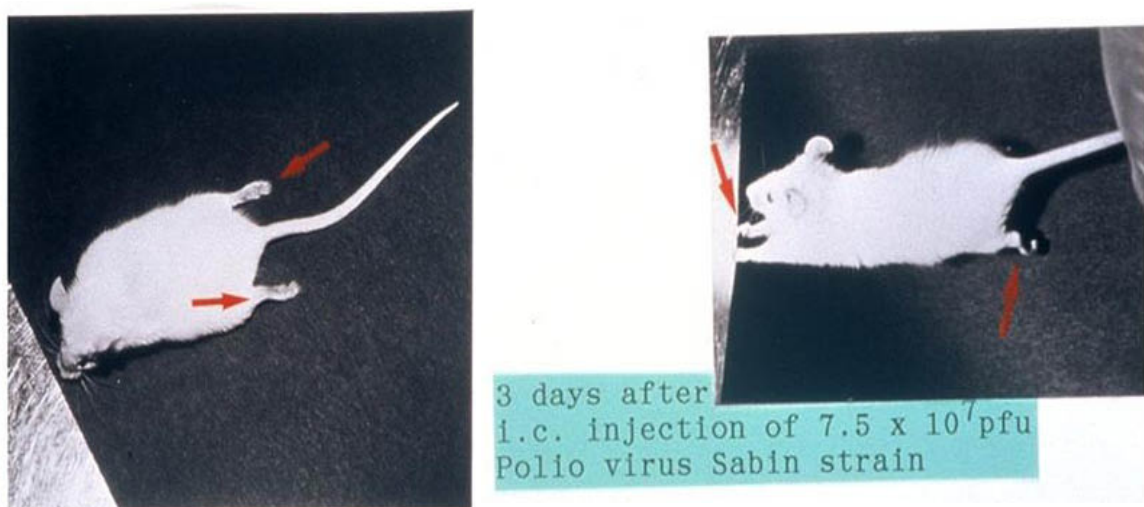
でした。135S は感染失敗で、80S は感染を意味します。

図 17



- トランスジェニック・マウス (Transgenic : Tg マウス) と感染経路 (図 18)

図 18 遺伝子組み換えマウス (ポリオマウス)

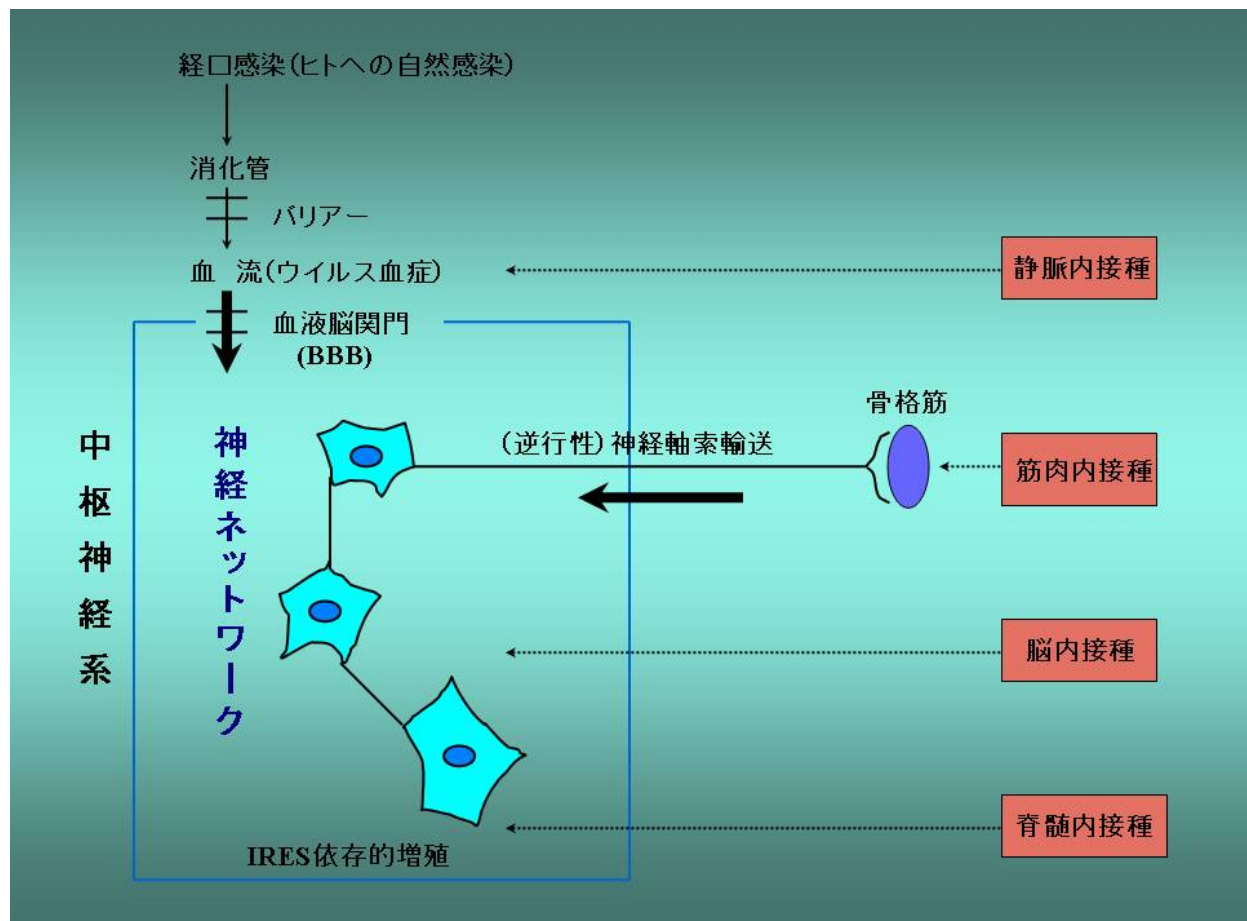


ポリオウイルス受容体遺伝子を単離したのは、種特異性の決定機構の確認が目的ですから、非感受性のマウスに入れました。よく知られているポリオマウスです。これにはICRマウスを使いました。マウスの受精卵に人のポリオウイルス受容体遺伝子を導入し、子供をたくさん生む里親の子宮に戻すことにより、Tgマウス（遺伝子組み換えマウス）を作製しました。人のポリオウイルス受容体は、マウスの全ての臓器にでてきていましたが、最終的に中枢神経系の脊髄や脳幹部の神経細胞に侵入し、病変を起こしました。マウスでもまず

腰髄に感染するようでした。ポリオウイルス抗原は、常に神経細胞にのみ観察され、グリア細胞には観察されなかった。このことは、神経細胞のウイルスによる損傷がマヒの原因となっていることを示している。

臨床的にも組織病理学的にも、Tgマウスはサルに似た症状を示すことから、ポリオウイルスの新しい感染モデルとして期待された。多くのウイルス株を使用し、マウス神経毒性試験を行った。その結果、サル神経毒性試験の結果と良い相関性があることが明らかとなった。

図 19



現在は、脳内接種法および脊髄内接種法によるマウス神経毒性試験法が確立している。また、Tgマウスができて色々な実験が可能となった。静脈注入、筋肉注入が可能となり、伝播経路の解明実験に役立っている。マウス

はサルとは全然異なり、個体差がほとんどないこともよいところである。このため、正確な実験が可能になっています。

ここまでに、最初の「種特異性の決定機構」の話をしました。

## Q&A

Q： ラジオアイソトープで標識する話がありましたが、どんな核種を使い、どのくらいの半減期が必要なのでしょう。

A： ウイルスを感染させて増やす時に標識するのですが、この場合はウイルス蛋白への標識で、核種は<sup>35</sup>Sです。メチオニンとシステインに入っています。半減期は約3ヶ月でしょうか。

Q： 受精卵に何をするとポリオマウスができるのか、もう一度教えて下さい。

A： マウスの受精卵に、キャピラリーというガラスの細い管を使い、人のポリオウイルス受容体遺伝子を注入します。それを里親とい

って子供をたくさん生むICAマウスの子宮に戻します。生まれてきた子供のマウスは、人のポリオウイルス受容体遺伝子を持ちます。

Q： 中枢神経ネットワークとありますが、上の神経細胞に感染すると次々と感染してゆくということですか。もう一つ、受容体の局在はどうなっているのでしょうか。

A： この図の中枢神経ネットワークは本日の話とは関係なく、ポリオウイルスを使って中枢神経のネットワークを調べる目的の研究のためのものです。局在に関してですが、人ではどの臓器にでも出ています。Tgマウスの場合にも肝臓以外にはどこにもでできます。

## 用語の説明

- 1) 免疫グロブリン・スーパーファミリー (Ig スーパーファミリー、Immunoglobulin super-family)：進化的に免疫グロブリンと共通性のある構造をもつ一群のタンパク質。MHC タンパクやT細胞受容体など。
- 2) 免疫グロブリンドメイン：タンパク質の構造で、免疫グロブリン・スーパーファミリーに共通に含まれる70-100アミノ酸の構造。
- 3) 体細胞の神経について：神経細胞はニューロンともいい（といってもこっちのほうがなじみが深いと思いますが）神経系の機能の基本的な単位というような細胞です。ニューロンはほかの神経細胞や刺激受容細胞からの刺激を受け、ほかの神経細胞や筋・腺細胞に刺激を伝えます。この刺激の授受はシナプスで行われています。多くの場合、1個の神経細胞は多数のシナプスを通じて刺激を受け、興奮は

統合された後に神経細胞体に近い軸索部から電氣的スパイクとして軸索を伝わりシナプスに到達します。神経細胞は基本的に細胞体と2種類の突起（樹状突起と軸索）からなります。また、神経細胞は神経系統の中で占める位置により大きさ・形・突起の状態がほぼ決まっています。神経細胞の軸索中には繊維系のほかに、滑面小胞体由来と考えられる小胞とミトコンドリアが見られ、有髄神経ではミエリンに覆われています。ミエリンは神経細胞を取り巻き渦巻き状に重層する膜系で、絶縁体として神経興奮伝導を補助しています（つまり跳躍伝導を可能にしています）。シナプスの大部分は化学シナプスで、多数のシナプス小胞とミトコンドリアを含み、化学伝達のための特殊な構造を示します。

## 2. & 3. 組織特異性の決定機構と体内伝播機構

図 20

### ウイルスの病原性研究

1. 種特異性の決定機構
2. 組織特異性の決定機構
3. 体内伝播機構
4. 最終標的細胞への損傷能力

これから組織特異性の決定機構と体内伝播機構の話に入ります。まず Blood Brain Barrier (BBB：血液脳関門) の通過のところでは、この実験の目的は、ポリオウイルスの Mahoney (マホニー株：I 型、強毒株)、Sabin 1 (セービン 1 株：弱毒の生ワクチン株で

Mahoney 由来。親子関係にありゲノムの構造はよく似ている) を使い、ポリオウイルスが経口に始まる経路を伝播し、Blood Brain Barrier (BBB：血液脳関門) を通過するその効率の程度を、ポリオマウスを使って確認したいということでした (図 21、図 22)。

図 21

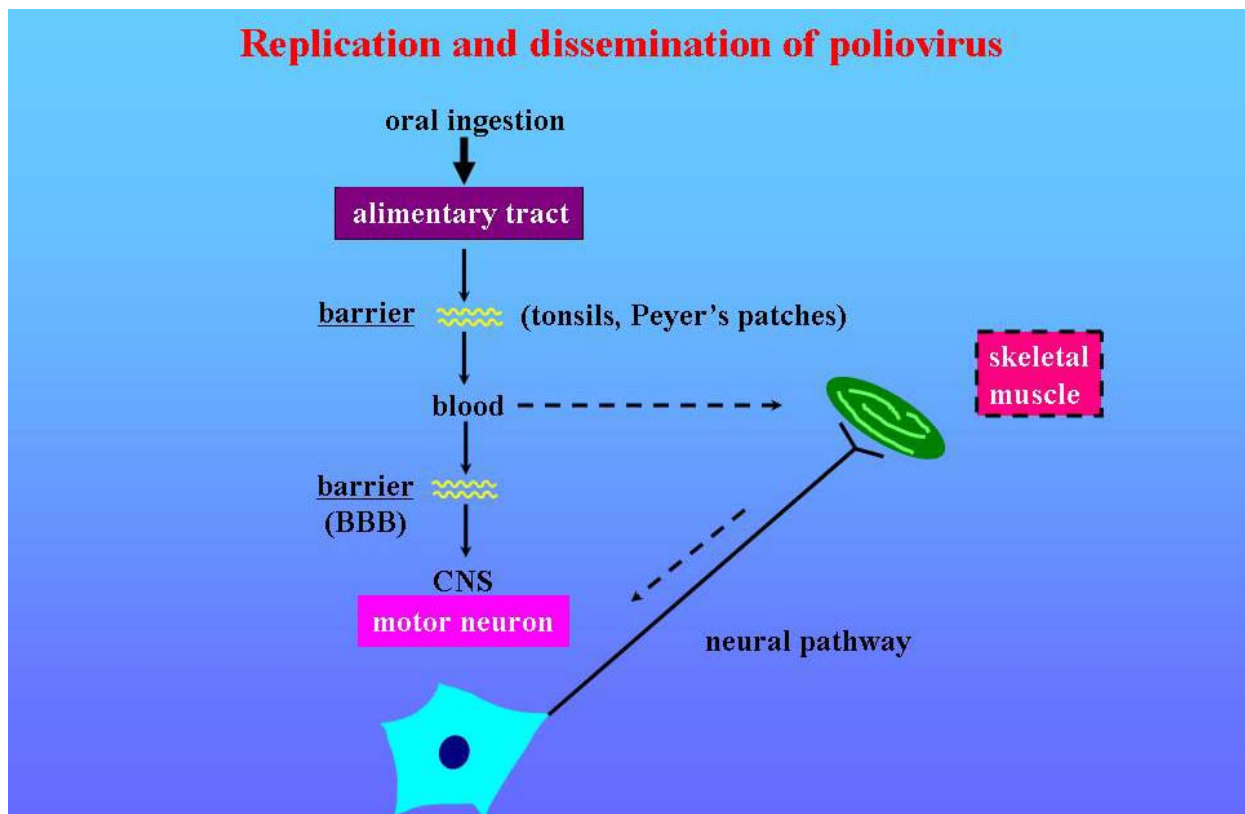


図 22

ポリオウイルスの Mahoney (マホニイ株：I 型、強毒株)、Sabin 1 (セービン 1 株：弱毒の生ワクチン株で Mahoney 由来。親子関係にありゲノムの構造はよく似ている)


Neurotropic Poliovirus Infection			
			
	Tissue Distribution	BBB Permeation	CNS Toxicity
Mahoney	?	?	Strong
Sabin 1	?	?	Very Weak

図 23 Tg マウスでも、Non-Tg マウスでも差がでなかった

	Tgマウス	Non-Tgマウス	ラット
ポリオウイルス (強毒株・弱毒株)	150-250	150-250	
アルブミン		1	
トランスフェリンレセプター に対する単クローン抗体			650
Cationizedラット血清アルブミン			150

各臓器組織細胞への分布はここでは略して、Blood Brain Barrier (BBB：血液脳関門) の通過に入ります。結果は、脳への蓄積については、強毒株、弱毒株に違いはありませんでした。Tg マウスでも、Non-Tg マウスでも同じでした。つまり、人のポリオウイルス受容体の有り無しとも関係ないということになります (図 23)。これは驚くべき結果でした。人のポリオウイルス受容体が関係しないので CNS (中枢神経系) へ入ることが分かりました。おそらく CNS が他のものを取り込む (血液からアミノ酸を取り込むなどの) サイトを使ってポリオウイルスが入るのだと考えられます。

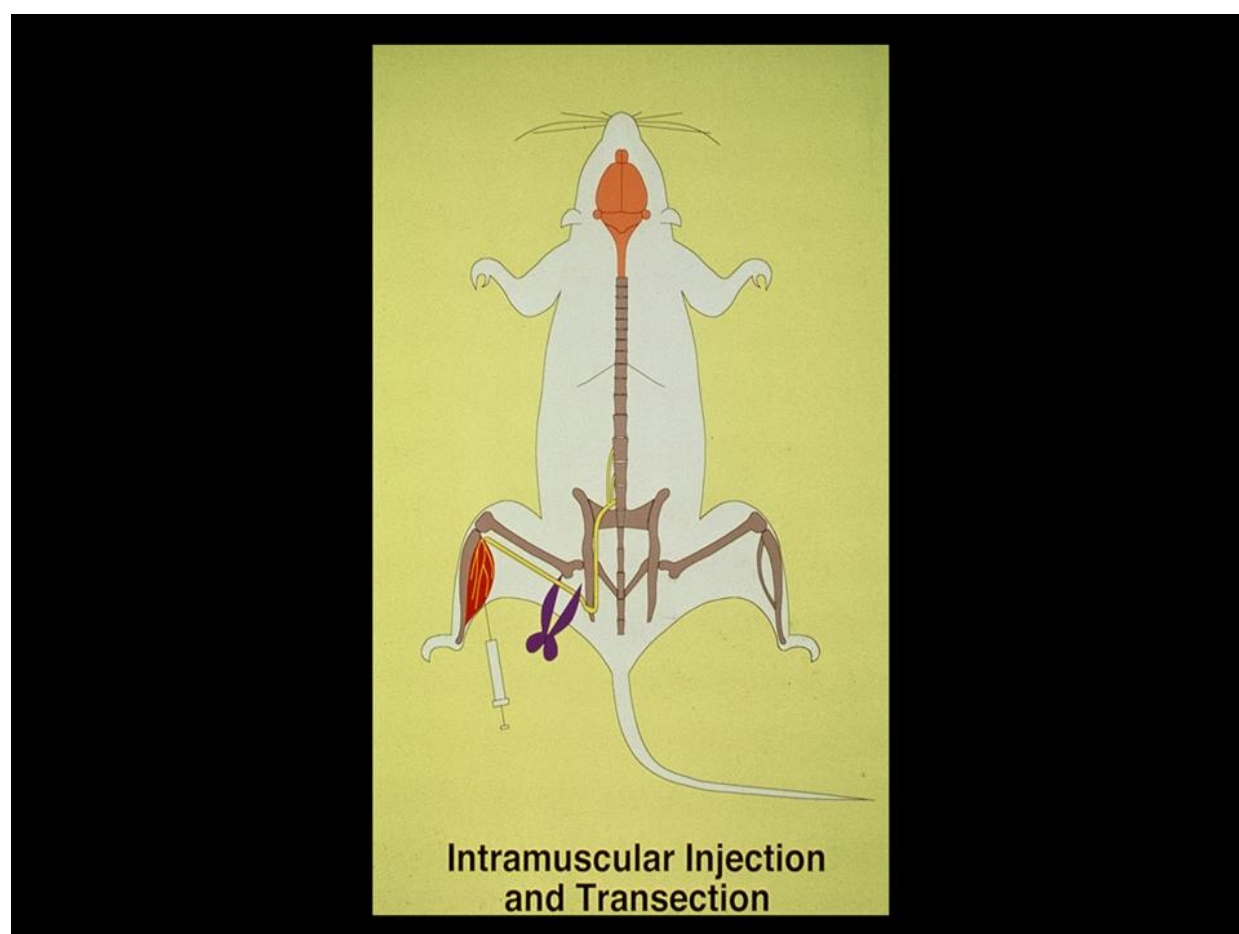
比較のため、単クローン抗体、カチオナイズド・ラット血清アルブミンの例をあげてい

ます。単クローン抗体は CNS (Central Nervous System：中枢神経系) へものを運ぶ世界最速のもので、ポリオウイルスの 3 倍ぐらいの速さです。カチオナイズド・ラット血清アルブミンは、CNS に入ることが分かっており、ポリオウイルスと同程度である。アルブミンは Blood Brain Barrier (BBB) を通過せず、よくコントロール (実験対照：生化学や臨床実験で、実験対象群と結果を比較するために置かれる対照のこと) として使われますので数値は 1 です。

それではどういう分子が CNS (中枢神経系) へのポリオウイルス伝播に必要なのか、10 年近くやっていますが未だ分からず、あらゆる方面から研究しています。

#### ● Tg マウス筋肉内注射と横断面

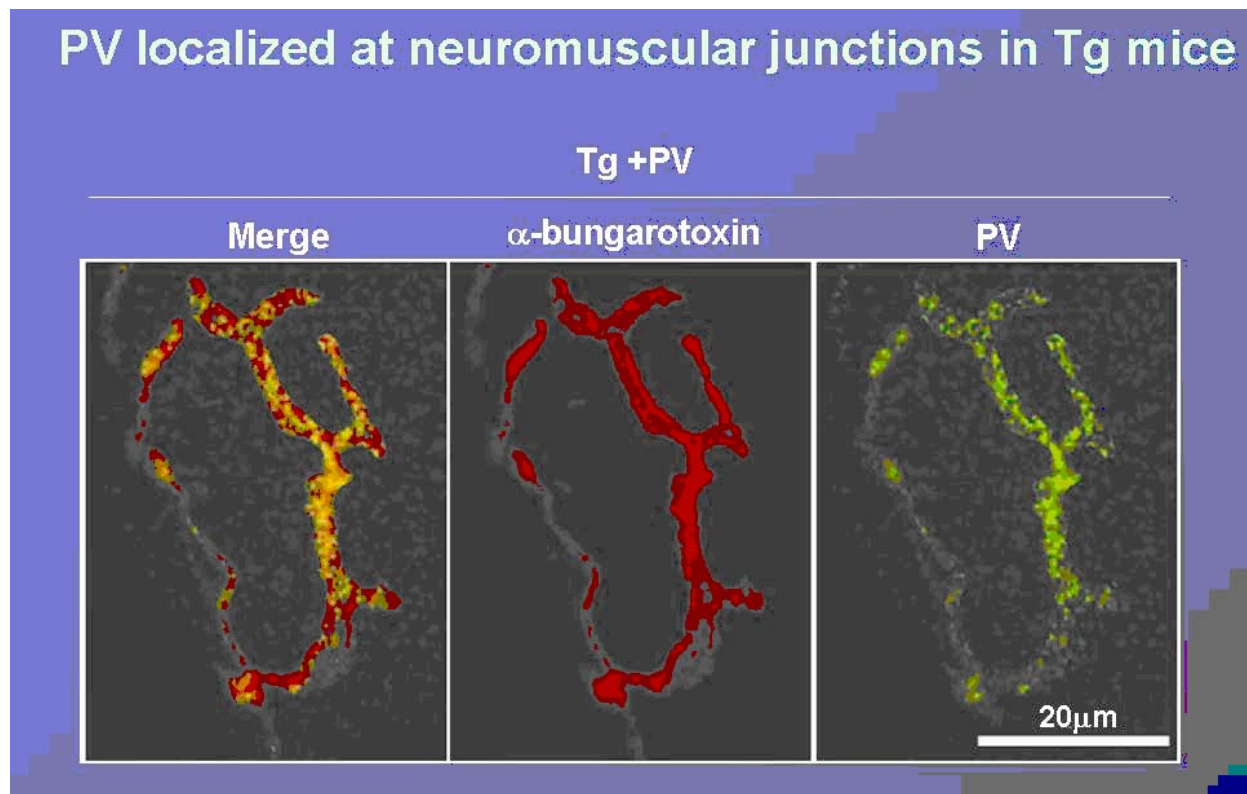
図 24



次は神経の逆行性の軸索輸送です。この実験系はマウスを上から見たものです(図24)。骨格筋として使ったのはふくらはぎの筋肉で、ここにポリオウイルスを注射しています。1つ1つの筋肉細胞から軸索が伸びて坐骨神経を形成し、それから脊髄につながっています。

坐骨神経のウイルス注入部から2cmのところにハサミが描いてありますが、そこで切断し、横断面を観察することにより、ポリオウイルスはどこを通っているのか、その速さはどのくらいかを調べたわけです。

- Tg マウスの Neuromuscular junctions (神経筋接合部) でのポリオウイルスの局在  
図 25



この顕微鏡写真(図25)から、筋肉と神経の接合部にポリオウイルスが集まっていることがわかります。右の写真がポリオウイルス(緑色)を示し、真ん中の写真が  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ -ブングアロトキシシン: 赤色)を示します。 $\alpha$ -bungarotoxin は、Neuromuscular junctions (神

経筋接合部)に集まる物質であることはすでに分かっていますので、この二つの顕微鏡写真をマージさせる(一緒にする)と赤プラス緑で黄色になり、ポリオウイルスが神経筋接合部に集まっていることが分かります。

- ポリオウイルスを筋肉内注入後1.5時間たって電子顕微鏡で見た神経筋接合部

これはポリオウイルスの免疫電子顕微鏡写真で(図26)、金の分子を見ていることになります。Anti-PV (ポリオウイルス抗体)に金分子を付けてやります。そうすると、ポリオ

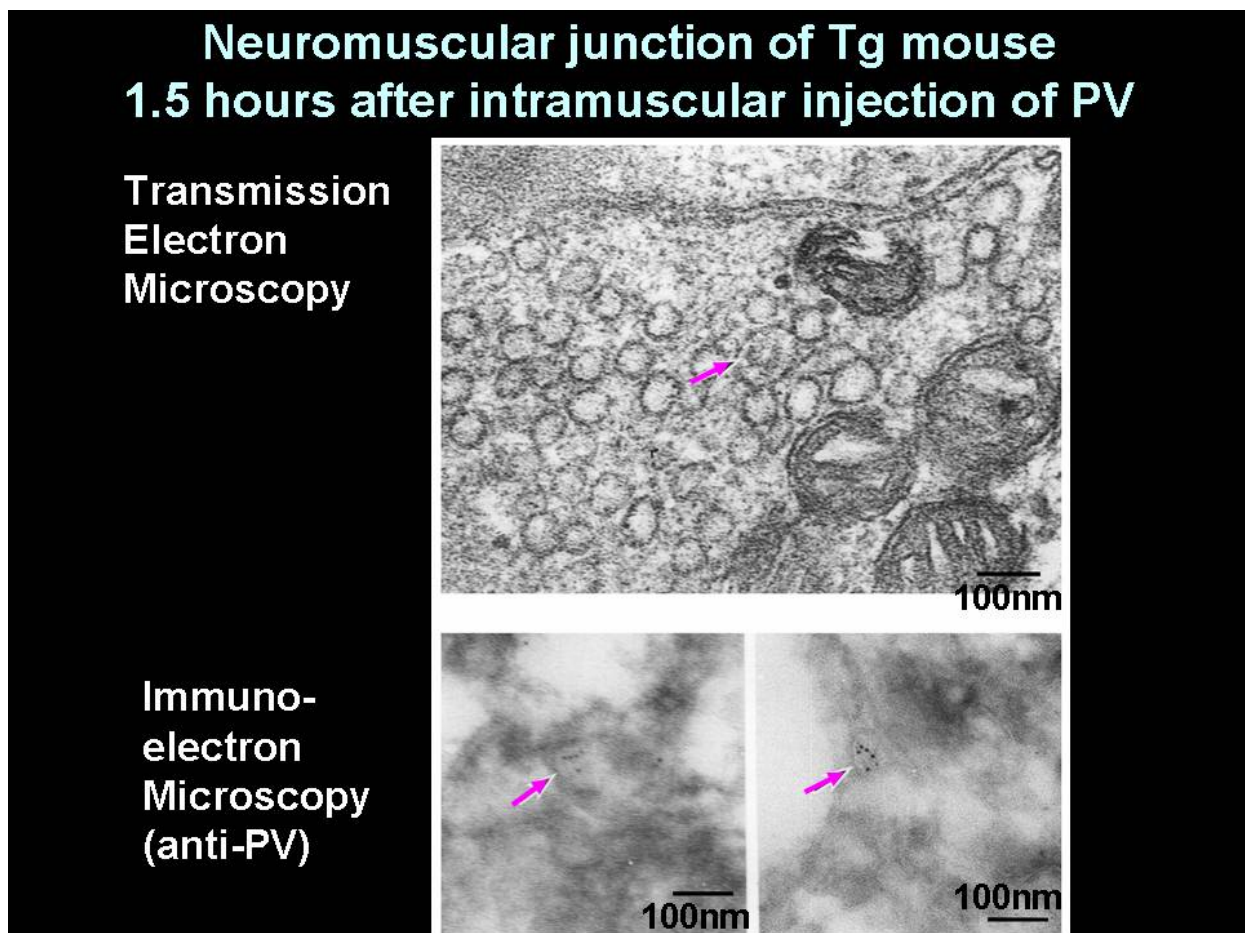
ウイルスのところに Anti-PV (ポリオウイルス抗体)が集まりますので、免疫電子顕微鏡で金が見え、そこにポリオウイルスがあることになります。この写真からも、ポリオウイル

スが神経筋接合部に集まっていることが確認できます。しかも、神経側にあることも分かりました。

この写真には（図 26）、ポリオウイルスの大きさと考えられる物質を含んだ小胞が見えます。専門家が見ると、この小胞は細胞のコンプォネントではなく、細胞側のエンドサイ

トーシスという機構でポリオウイルスが神経側に入り込んでいることが明確に分かるのです。つまり、ポリオウイルスはまず神経筋接合部に集まり、それから神経のシナプス側に、エンドサイトーシスという細胞膜の陥入によって小胞を包むような機構によって入ってゆきます。

図 26



● エンドサイトーシスとエンドソーム（図 27、図 28、図 29）

ポリオウイルスが感染してゆく機構は、前に述べたように、細胞膜の受容体（レセプタ）に吸着、結合し、細胞膜を通して侵入したポリオウイルスは、脱殻といって外側のキャプシド蛋白が分解されウイルス核酸（ゲノム）が細胞の中に出てきます。

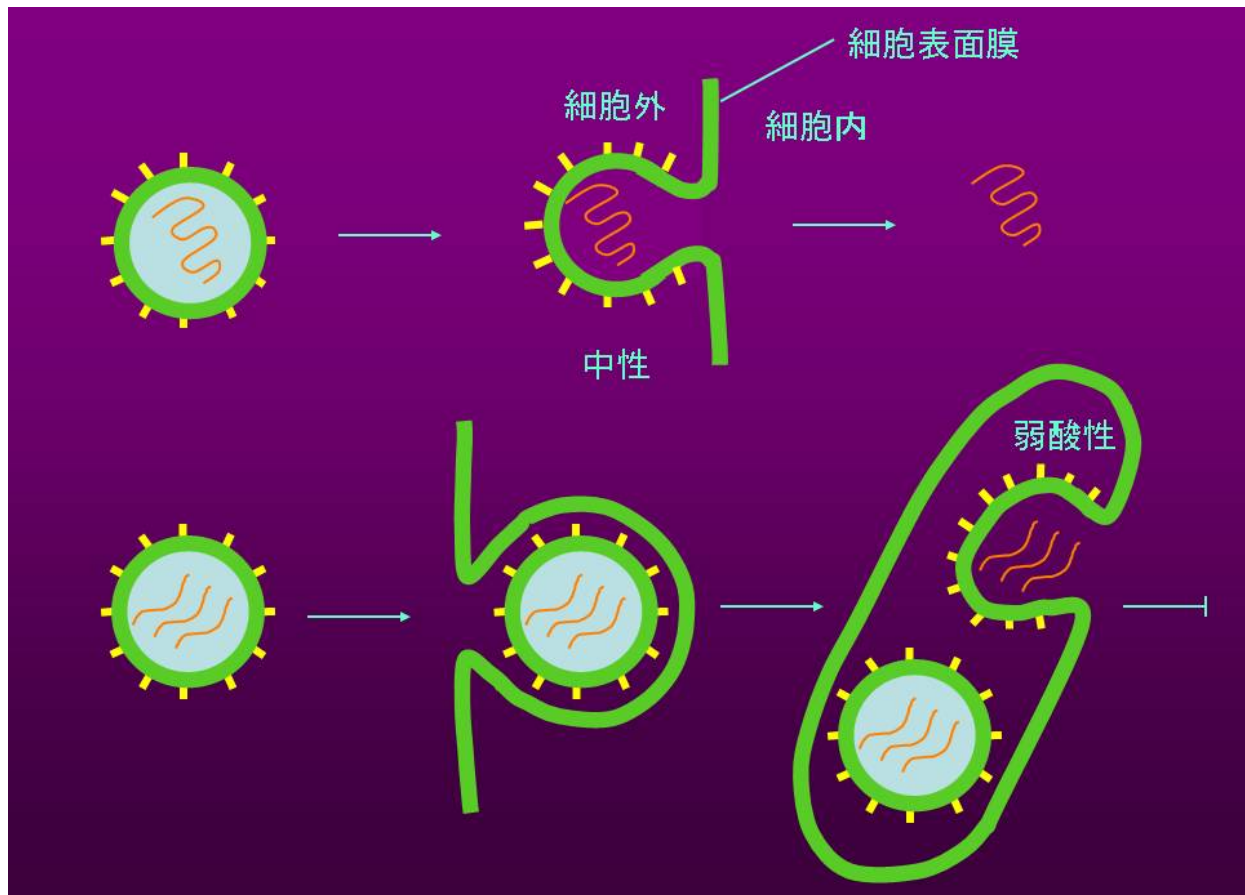
もう一つの機構は、エンドサイトーシス（貧食作用ともいう）で、細胞膜の陥入によって

小胞を介して細胞がポリオウイルスを取り込む機構のことです＜図 27＞。エンドソームとはエンドサイトーシスによって取り込まれた分子の輸送と代謝にあずかる膜小胞で、どこかでエンドソームの膜とウイルスの膜が融合してゲノムが外に（細胞内へ）出てゆくことになります。ポリオウイルスがシナプスから入るのはこの機構と考えられ、シナプスでは

この融合は起こらず、軸索を運ばれて CNS(中枢神経系) 細胞体に至り、そこで膜の融合が生じると想像されます。エンドソームがある特定の部位に至り、そこでエンドソーム膜と

ウイルス膜の融合が生じ、ゲノムが外にでるというメカニズムはまだ知られておりません。この機構は非常に重要で、緊急の研究テーマです。

図 27



ポリオウイルスを注入した部位から 2cm のところでハサミで輪切りにしたところを見たものが(図 28)です。ポリオウイルスの場所を、緑に着色した Anti-PV (ポリオウイルス抗体) で検出します。透過光の図と重ねると、緑色を囲んでいる組織が見えます。この結果、ミエリン鞘で囲まれたところにポリオウイルスが見えることが分かります。つまりポリオウイルスは、軸索の中を通っていることを示しています。

この神経軸索の中のポリオウイルスはどうなっているのかを調べました。前に実験で示したように、ポリオウイルスはポリオウイルス

受容体と融合した時に 160S から 135S、80S に変化するはずでした。しかし、Sucrose Density Gradient Analysis of 35S-labeled PV の方法で解析した結果からは、160S のところにピークがあり、ウイルスは変化していませんでした(図 29)。つまり、ポリオウイルスは、シナプスから入るときに人のポリオウイルス受容体(PVR)に触れたのにもかかわらず変化してなく、ポリオウイルスは感染性の粒子のままでした。

私たちの実験では、完全に精製したポリオウイルス受容体をつくり、in vitro (試験管中) で融合させました。その結果は前述したよう

に、135S または 80S に変わりました。この場合はなぜ構造が変わらないかは説明のつかない

いことで、軸索の中では、ポリオウイルスを変化させない何かがあるのかもしれません。

図 28

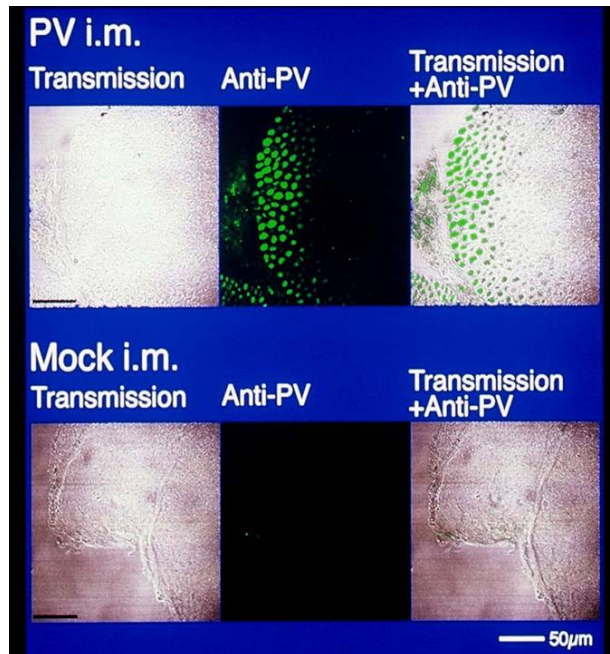


図 29

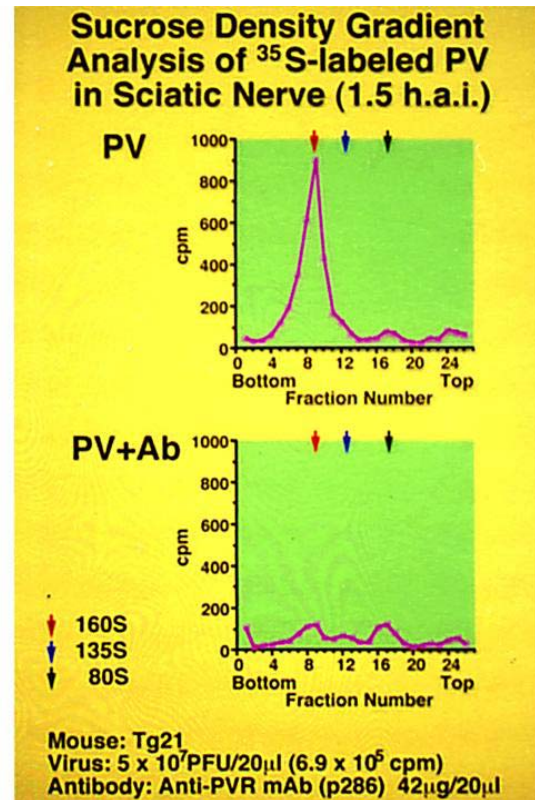
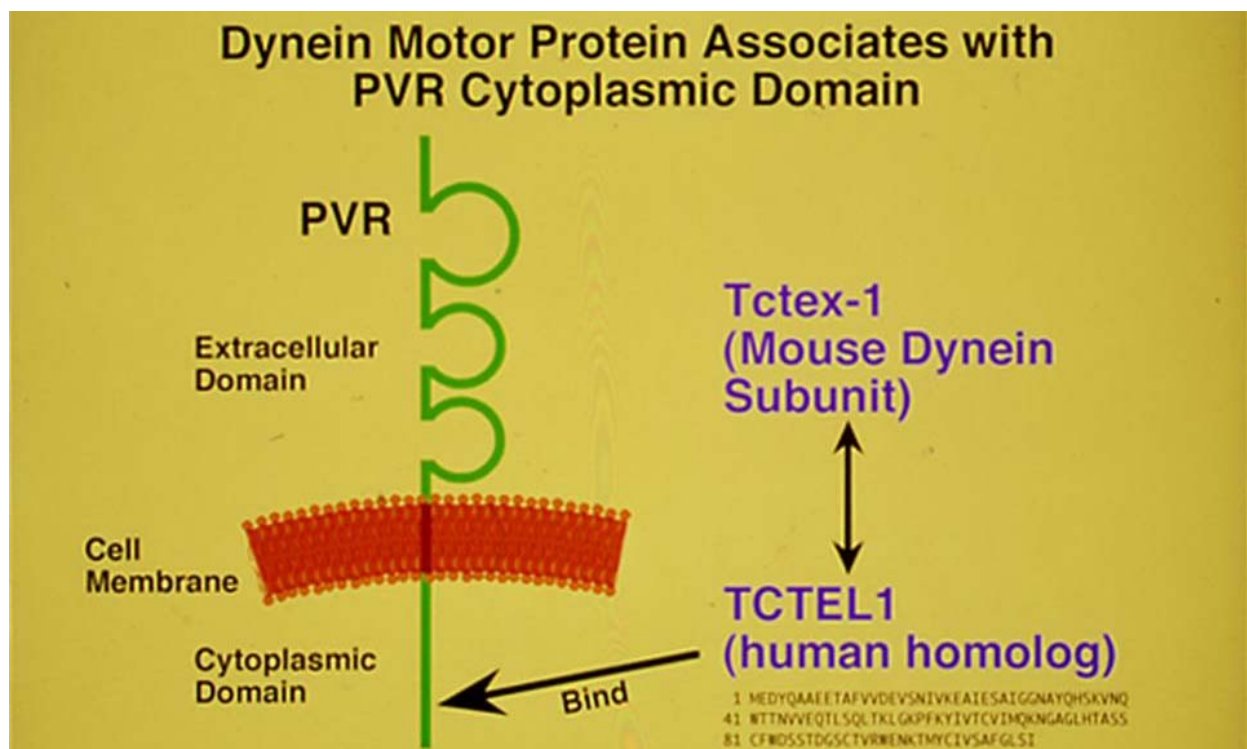


図 30

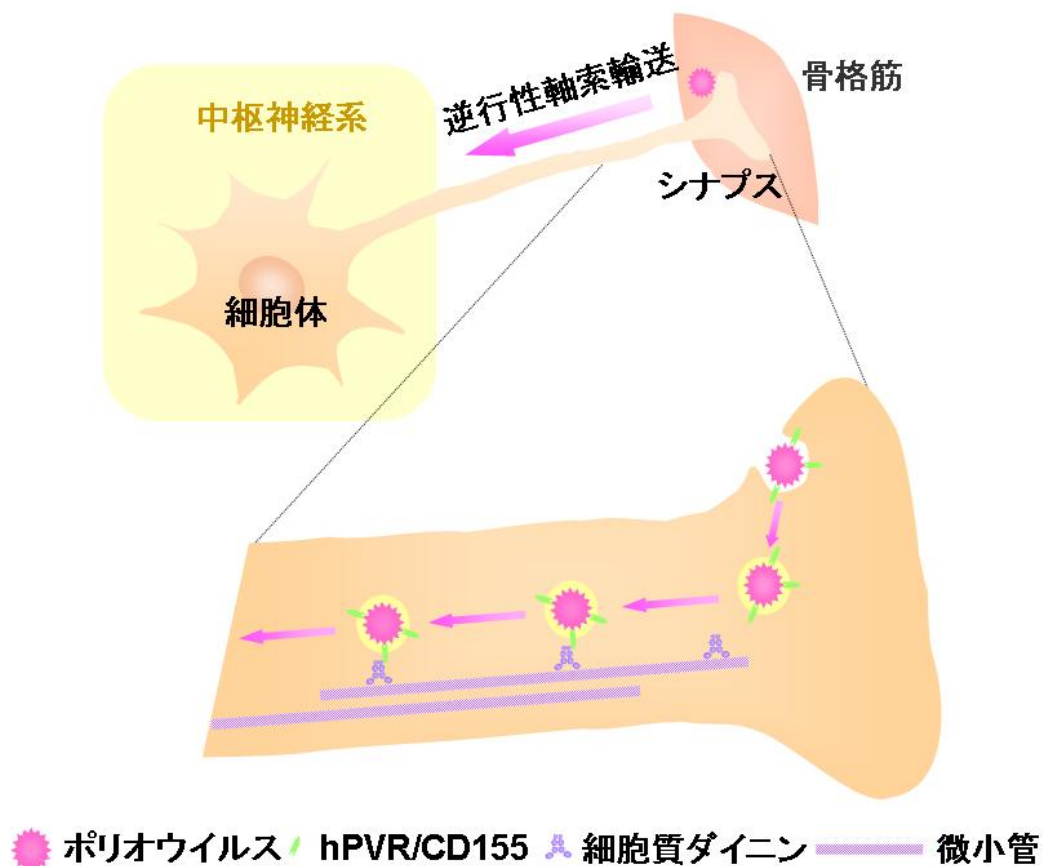


ポリオウイルスは末梢神経からも神経軸索を介して中枢へ到達します。ポリオウイルスはシナプスに発現する人のポリオウイルス受容体（PVR）に結合し、エンドサイトーシスされエンドソームとして神経細胞内に取り込まれ、このエンドソームは、人のポリオウイルス受容体（PVR）に依存して軸索を逆行性に運ばれます（図 21、図 27、図 31）。このエンドソームは人のポリオウイルス受容体（PVR）に依存して運ばれるのですから、人のポリオウイルス受容体（PVR）はどのように関与するのが次に問題となります。そのための実験として、ポリオウイルス受容体（PVR）の部分に結合してくる細胞側の分子を探しました。その結果、TCTEL1 という分子が見つかりました（図 30）。

この分子は、後になり、人のダイニンのサ

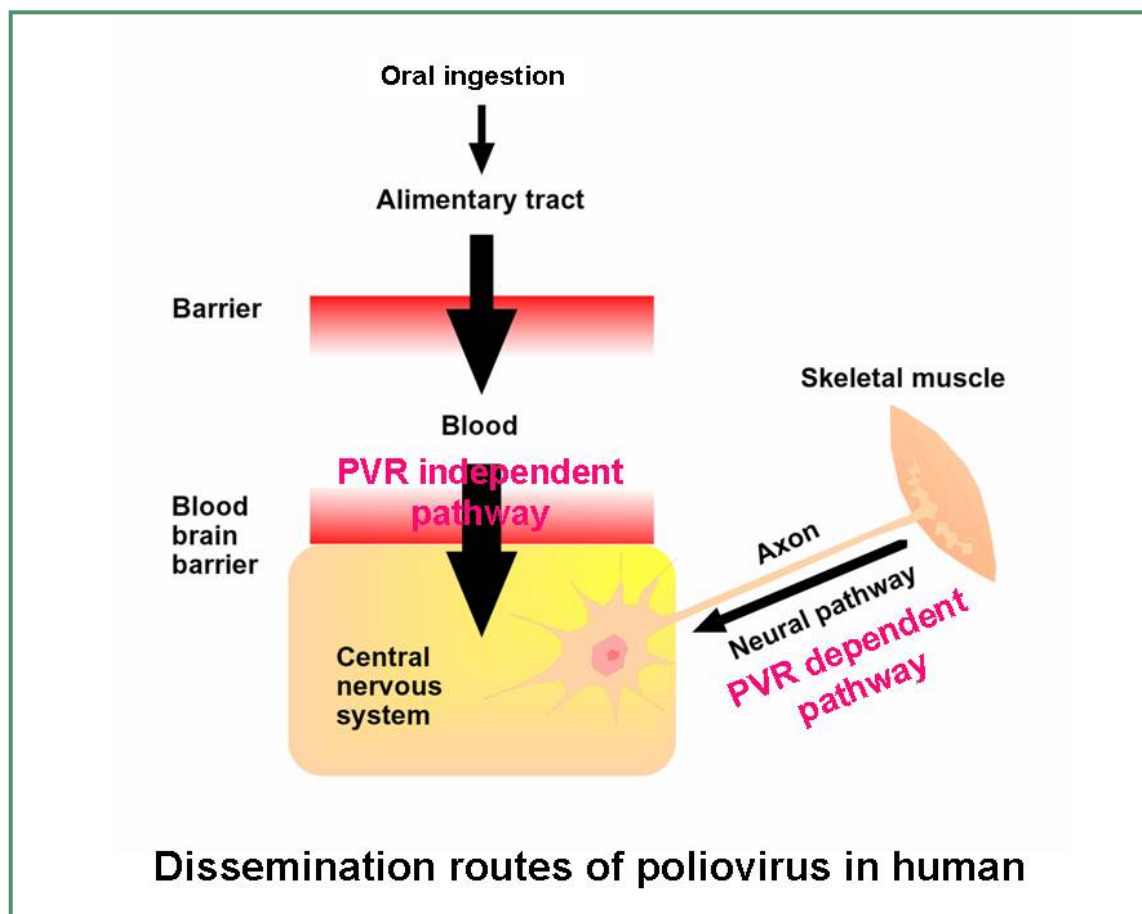
ブユニットであると予測されました。ダイニンはよく知られていて、逆行性に物質を輸送するモーター分子（運動蛋白）です。順行性の輸送に関与するのはキネシンというモーター分子です。つまり、ウイルス粒子を囲むエンドソームの外側に露出している人のポリオウイルス受容体（PVR）の細胞質ドメインは、TCTEL1（ダイニンのサブユニット、マウスの Tctex-1 のヒトホモログ）と直接結合し、エンドソームに包まれたポリオウイルスは、TCTEL1 を含むダイニン複合体により微小管に沿って逆行性に中枢へ到達するモデルが考えられ、実験で確認されました。この成果は、すでに論文として正式に発表されています。しかし、中枢神経細胞体に到達した後脱殻が起こり、複製が始まるわけですがそのメカニズムはよく分かっていません。

図 31



- 2 & 3の研究のまとめ（組織特異性の決定機構と体内伝播機構）

図 32



人のポリオウイルス受容体（PVR）には、ポリオウイルス粒子へ結合する機能とその粒子構造を変化させる機能がある。

in vitro（試験管内）培養細胞系においては、ポリオウイルス受容体（PVR）がウイルス粒子の構造変化に関係していることが判明したが、Tg マウスへの筋肉内接種後の神経シナプス侵入の際は、構造変化が見られないことが分かりました。

ポリオウイルスの CNS（中枢神経系）への侵入経路である Blood Brain Barrier（BBB：血液脳関門）通過を調べるため、静脈内接種後のウイルスの中枢神経系への侵入を観察した結果、ポリオウイルスは、ポリオウイルス受容体（PVR）非依存的に、また、強毒株、弱毒株にかかわらず、効率も高く、非常に速い

速度で CNS（中枢神経系）の各組織に侵入することが分かりました（図 23）。この効率は、強毒株、弱毒株に一切関係ないということで、強毒株、弱毒株というウイルスの性質の違いは CNS（中枢神経系）でのウイルスの増え方の効率、速度にあるといえます。

さらに、筋肉内接種したポリオウイルスは、ポリオウイルス受容体（PVR）依存的に神経軸策内を感染性粒子の形（160S の形）で輸送され（図 32）、中枢神経細胞体に到達した後脱殻が起こり、複製が開始するというのです。

ここまでに、次の「組織特異性の決定機構と体内伝播機構」の話をしました。

## Q&A

Q: Tg マウスで、ポリオウイルスを筋肉内接種すると逆行性に神経軸索を介して中枢神経系へ到達するということだと、人の場合も傷があったらそこから感染すると考えていいのですか。

A: その通りです。人でも、ポリオウイルスが末梢神経から神経軸索を介して逆行性に中枢へ到達する経路が分かっています。それは不活化ワクチンによる事故からなのです。

不活化ワクチンは、強毒株のウイルスをホルマリンで不活化させるのですが、これが不十分だったことから事故が起きました。それは Cutter 事件と呼ばれていまして、1955 年に起こり死亡者もでました（詳細は下記）。筋肉に接種した時、Initial Paralysis（最初のマヒ）があります。強毒株の流行地ではウイルスに感染した人達がおりますので、三種混合ワクチンもそうですが注射をして筋肉を刺激するとポリオを発症しやすくなると考えられています。

特にルーマニアで事故が多かったのですが、その理由は、ルーマニアでは抗生物質などを全て注射で与えていたためと考えられています。

（ヒ症状はどこにでるか）といいますが、接種したところを支配している神経細胞がダメージを受け、その神経細胞が支配している筋肉が動かなくなります。右腕に接種であれば右腕、左腕に接種であれば左腕にマヒが最初に生じました。

このことから、末梢神経から神経軸索を介して逆行性に中枢へ到達する経路があることが証明されました。この経路が現在着目されているのは、強毒株のウイルスが流行している時に注射をしますとポリオを発症することがあります。何故か分からなかったのですが、現在では、注射により筋肉を刺激すると、この逆行性に中枢へ到達する経路を活性化させると考えられて

います。こういうことから、その原因の研究が進みました。したがって、傷からも感染の可能性がありますし、直接ポリオウイルスを入れなくても筋肉を刺激すると逆行性の経路を活性化させ、体内に存在していたポリオウイルスの中枢への伝播を助けることになります。

## 用語の説明

1) **細胞内輸送について**: エンドソームやゴルジ体・リソソーム・分泌小胞などの細胞小器官が、相互に出芽と融合を繰り返して特定の蛋白質を、小胞を介して目的の膜に輸送することです。今回はその中でもエンドソームとエンドサイトーシスについて少し説明します。エンドサイトーシスとは貪食作用ともいい、細胞膜の陥入によって小胞を介して細胞が外環境から種々の分子を取り込む機構のことです。エンドソームとはエンドサイトーシスによって取り込まれた分子の輸送と

代謝にあずかる膜小胞で、初期エンドソームを経てゆっくりと細胞中央に移動し、トランスゴルジ網由来の小胞と融合しつつ、後期エンドソームとなる。

2) **モーター分子(ダイニン、キネシン)**: モーター分子は主に細胞内のさまざまな物質を輸送したりするものです。有名なものでは真核生物界に広く存在している運動蛋白質のダイニンや、微小管上を滑走し小胞などを輸送する運動蛋白質のキネシンがあります。

3) **Cutter 事件**: ポリオのソーックワクチ

ンによる事故。 Cutter社製のワクチン  
投与者 204 名にポリオ 1 型が感染して発  
病し 12 名が死亡した。 ウイルスが塊にな  
っていたためホルマリンが浸透できずに  
不活性化が不十分となったことが確認さ

れた。 これ以後、 抜き取り検査による品  
質検査を改め、 全ロット検査という厳密  
な製造管理手順が用いられるようになった。

4. 最終標的組織への損傷能力

図 33

ウイルスの病原性研究

1. 種特異性の決定機構

2. 組織特異性の決定機構

3. 体内伝播機構

4. 最終標的細胞への損傷能力

図 34

	Tgマウス	Non-Tgマウス	ラット
ポリオウイルス (強毒株・弱毒株)	150-250	150-250	
アルブミン		1	
トランスフェリンレセプター に対する単クローン抗体			650
Cationizedラット血清アルブミン			150

静脈内接種後のウイルスの中枢神経系への侵入を観察した結果、ポリオウイルスは、強毒株、弱毒株にかかわらず、効率も高く、非常に速い速度で CNS（中枢神経系）の組織に侵入することが分かりました（図 34）。この表から分かるように消化管では両方のウイルスともよく増えます。これはワクチン株として重要で、ここで増えることにより効率よく我々の体の防御体制をつくることが可能になります。消化管では病原性を発揮しません。上皮細胞は直ぐに回復するので大丈夫です。Viremia（血流にウイルスがいる状態）には強毒株はよくなるが、弱毒株ではない。また、中枢神経系に直接接種した場合、強毒株はよく増えるが弱毒株は増えないという違いがあります。

つまり、今まで強毒株、弱毒株の伝播経路を調べてきた結果、最終的に CNS（中枢神経系）での強毒株、弱毒株のウイルスの増え方の違いにあるということになったわけです。CNS（中枢神経系）で増えるかどうかはウイルスの組織特異性で、CNS（中枢神経系）については強毒株と弱毒株では組織特異性が異なるということができます。

ウイルスの組織特異性の違いはウイルスのゲノム構造の違い（ゲノムの生物化学的な構造の違い）を反映しています。そこで、CNS（中枢神経系）に感染する 2 種のポリオウイルスの組織特異性を担っているゲノム領域はどこかを調べました。

図 35

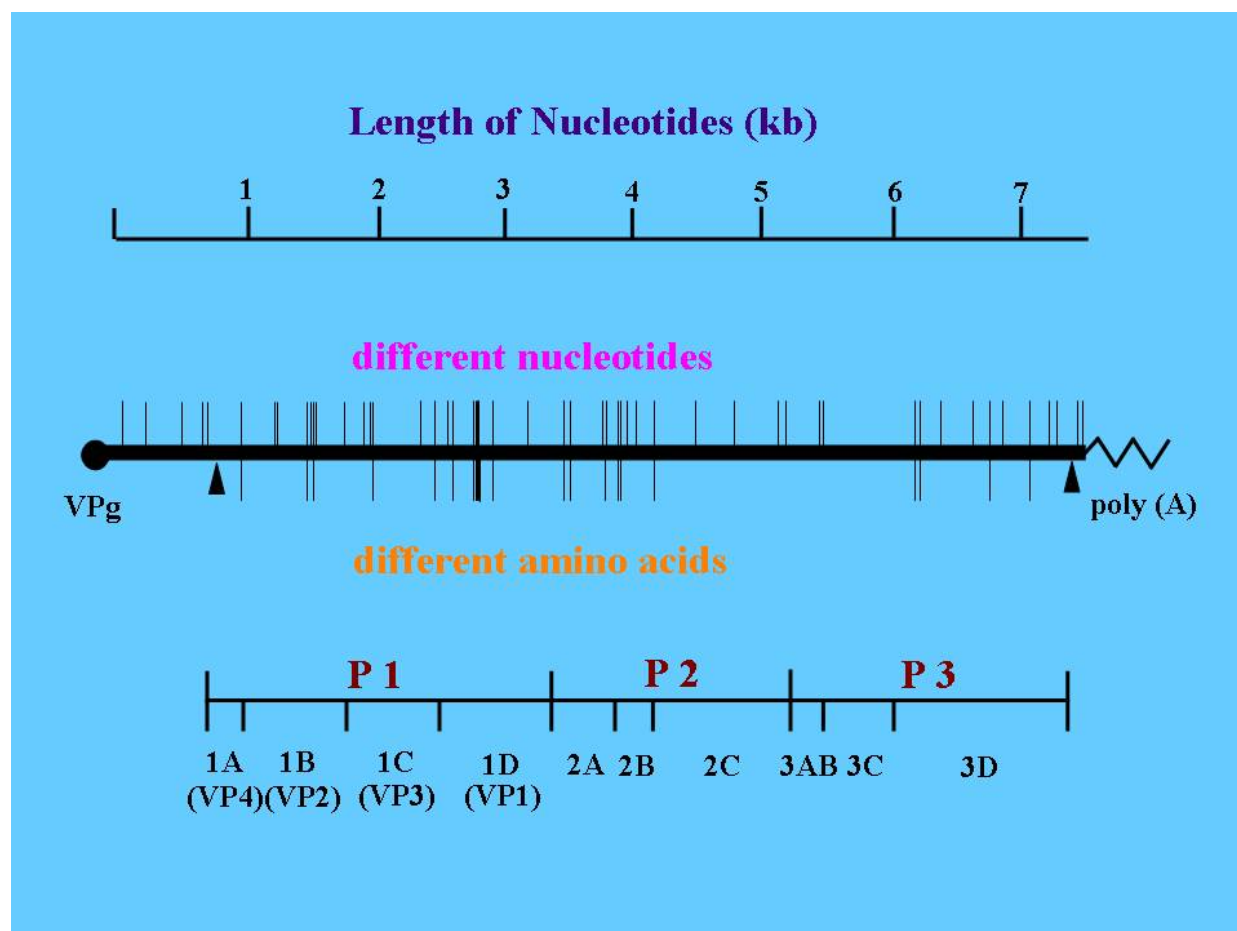
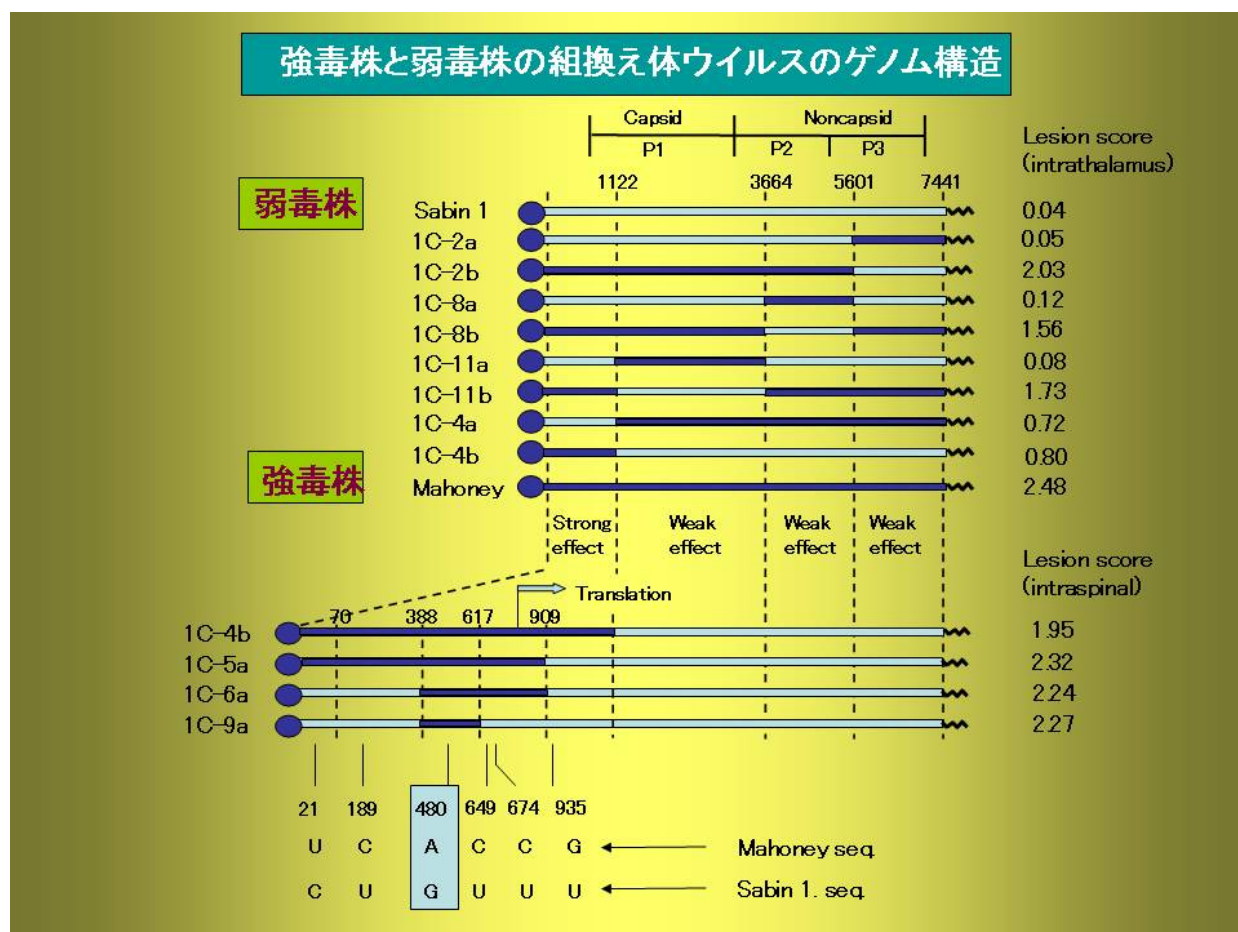


図 36



そのため、強毒株（Mahoney 株）と弱毒株（Sabin 1 株：Mahoney 株由来でゲノム構造は似ている）の全遺伝子構造を決めて比較しました（図 35、図 36）。その結果は、7441 個の核酸の並びのうち 56 個の核酸の違いがあることが分かりました。また、21 個のアミノ酸の違いがあることも分かりました。この違いによってポリオウイルスが増えるかどうかが決まっているのですが、これだけ多くの違いがあっては何処が関与しているのか特定不可能です。そこでこれを知るための実験をやりました。こういう実験は技術的な進歩があり、初めて可能になってきているものです。

強毒株（Mahoney 株）にはブルー、弱毒株（Sabin 1 株）は白でゲノム構造が書いてあります（図 36）。2 種のポリオウイルス株の遺伝子をモザイク様に組み替えます。最初は範囲

を広くとった遺伝子組み換えしたポリオウイルスをつくり、サルの中枢に打ち込んで病原性がどうなったかを調べ、病原性のスコアをとります。その結果、強毒、弱毒を強く支配している領域がどこかが分かります。IC-4b というコードネームの遺伝子から、さらに細かく組み替えた遺伝子をつくりました。この IC-4b 遺伝子で、強毒のシーケンスを、少しずつ弱毒のシーケンスで置き換えてゆき、IC-9a 遺伝子は一箇所だけ強毒のシーケンスをもち、他は全部弱毒のシーケンスとなっています。

これらをもう一度サルの中枢に打ち込んで病原性のスコアをとると十分高い値を示し、強毒を決定づけているゲノム構造は IC-9a 遺伝子の強毒シーケンスであるということが分かってきました。この領域の強毒、弱毒の

核酸の違いは 480 番目の核酸が A (アデニン) であるか、G (グアニン) であるかの違いです。A (アデニン) であれば強毒株 (Mahoney 株) の性質、G (グアニン) であれば弱毒株 (Sabin 1 株) の性質を示します。わずかに一箇所の違いですから、変わりやすい性質であることも示しています

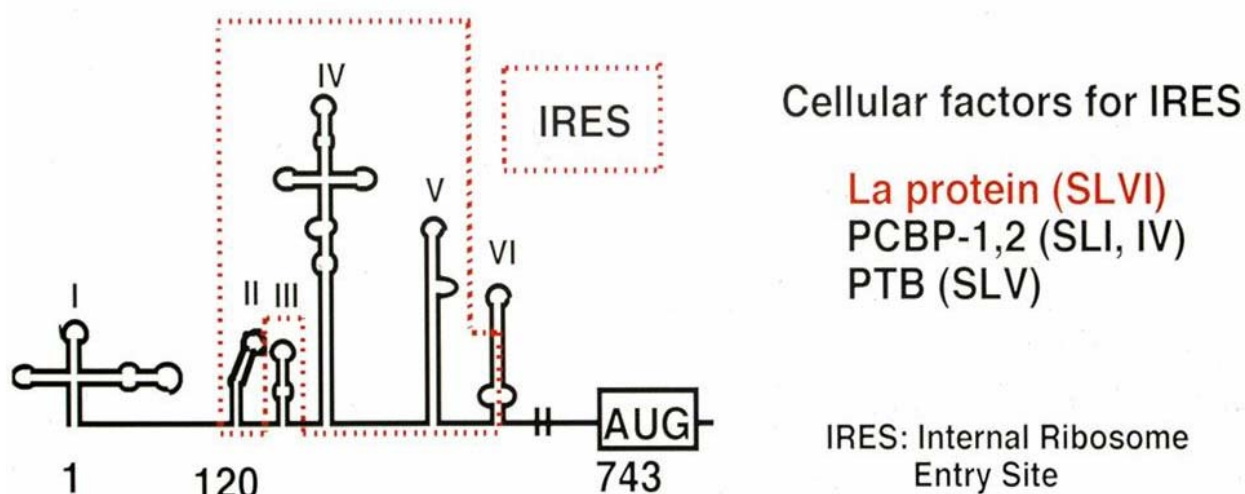
もちろん、ゲノムの中のここだけが決めているわけではなく他にもあるのですが、ここ

が比較的強い病原性を決めているところです。

末端から 480 番目の塩基の場所は、ポリオウイルスのどういう機能を持っている領域かを遺伝子の機能に戻って考えてみると、この領域こそ前に述べたリボソームが入って蛋白をつくる IRES (Internal Ribosome Entry Site、アイレス：配列内リボソーム進入部位) 領域なのです (図 37)。

図 37

## Poliovirus IRES and Host Factors



したがって、強毒株 (Mahoney 株) であれば A (アデニン) をもち、IRES が十分に活性化し、リボソームが入り、蛋白をつくり CNS (中枢神経系) でポリオウイルスが増殖しますが、弱毒株 (Sabin 1 株) では 480 番目が G (グアニン) であるために IRES が活性化せず、蛋白をつくらず、CNS (中枢神経系) でポリオウイルスの増殖もおこらないと考えられます。

それでは消化管では何故増えるのかとなりますが、消化管には IRES 関連のファクターがたくさんあり、利用効率の非常に低い弱毒株 (Sabin 1 株) でも蛋白合成ができ、ウイルスは増殖可能であると考えられます。ポリオウイルスの特異的翻訳開始は IRES (Internal Ribosome Entry Site) 依存的であり、この IRES 活性がポリオウイルスの中枢神経組織特異性に深く関与していることが分かります。

図 38

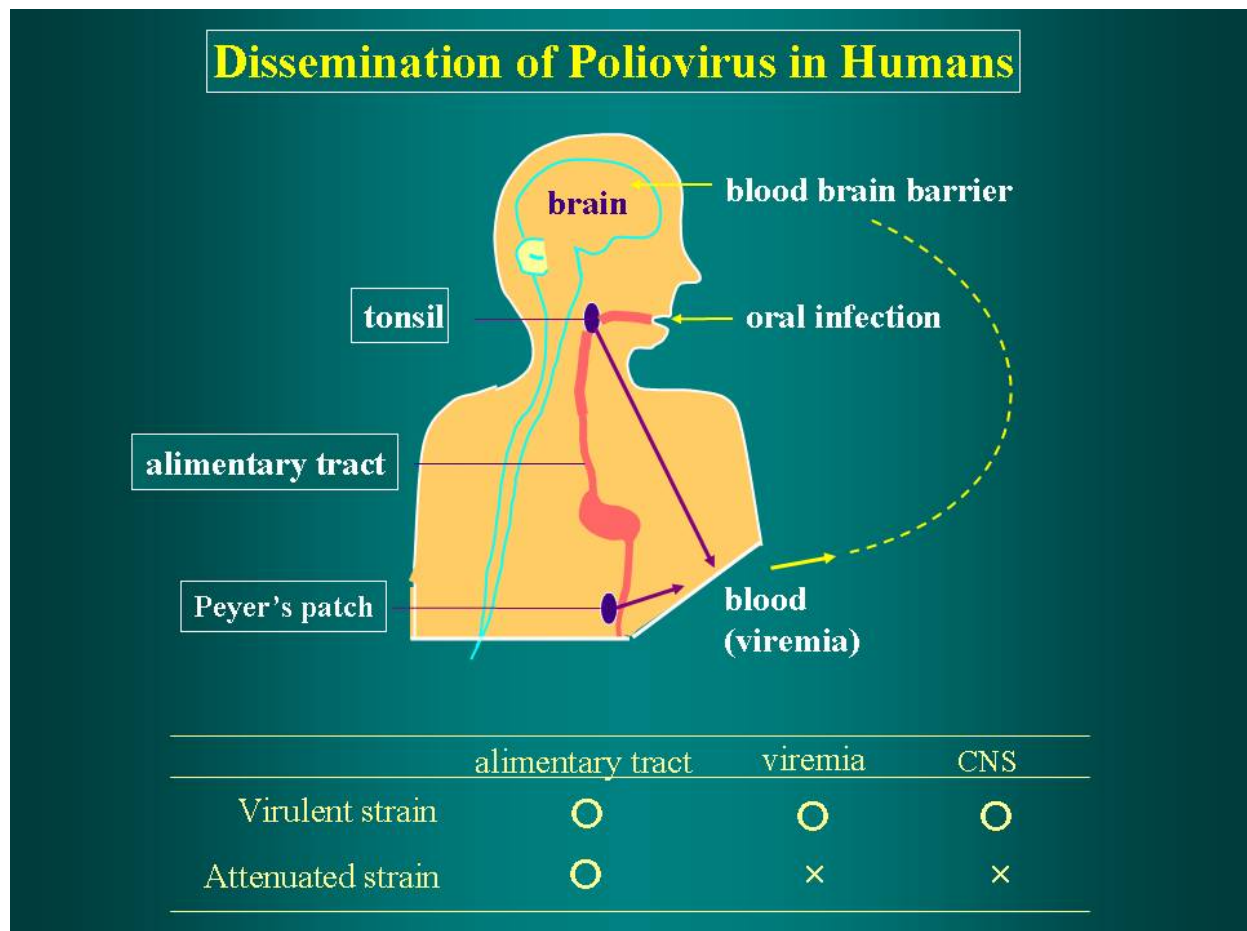
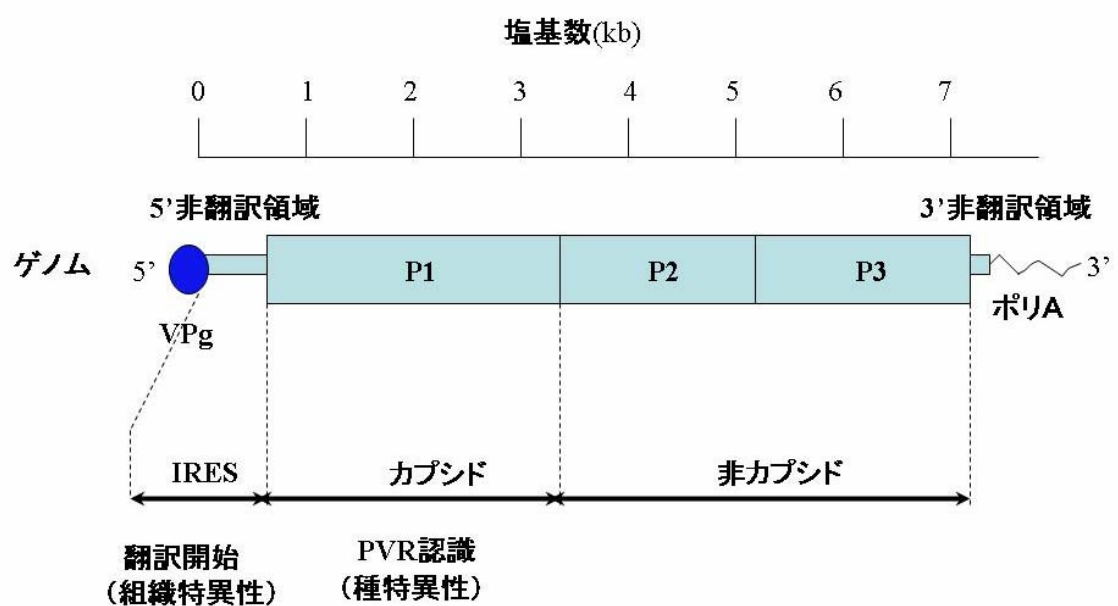


図 39

## ポリオウイルスゲノムの病原性発現における機能



- ここまでのまとめ

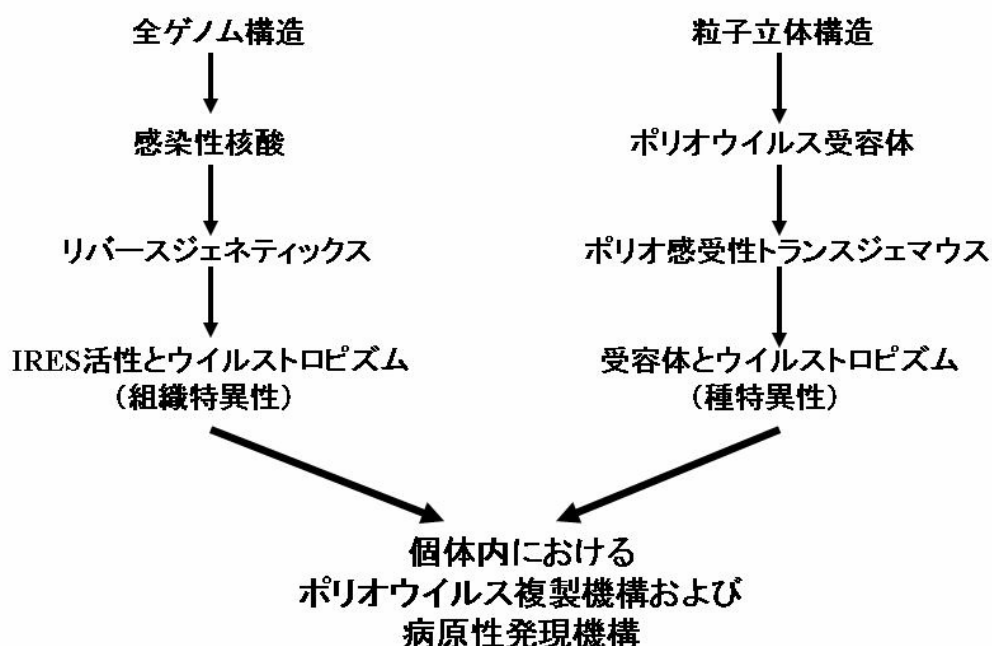
ポリオウイルスのゲノム全体がでていますが、全てのウイルスの病原性は、ウイルス側の分子と細胞側の分子との相互作用の総和として決まります。

- a. ポリオウイルスの種特異性は、遺伝子 P1 からつくられるキャプシド蛋白とポリオウイルス受容体により決定されます。
- b. ポリオウイルスの組織特異性は、ウイルス側は IRES、宿主側は IRES 関連の翻訳開始の諸ファクターによって決定されます。

- ポリオのゲノム構造が決まった後のポリオウイルス研究の歴史

図 40

## ポストゲノムのポリオ研究



全ゲノムが決定された後リバーシジェネティックスの研究方法がとられました。

これは、遺伝子に人工的な変異をどんどん加えて、変異が加わった遺伝子はどのような機能を有するかを逆に調べるのです。人工的な変異を入れて遺伝子の機能を調べることで、ポリオウイルスの強毒、弱毒の違いは480番目の核酸がA（アデニン）またはG（グ

アニン）の違いしか無いことを明らかにしました。この領域こそ IRES 領域であり、IRES が強くはたらく所では増殖するという IRES 活性とウイルス親和性に依存する組織特異性決定機構を明らかにしました。これは病原性研究の中で、大きな概念を確立したことになります。

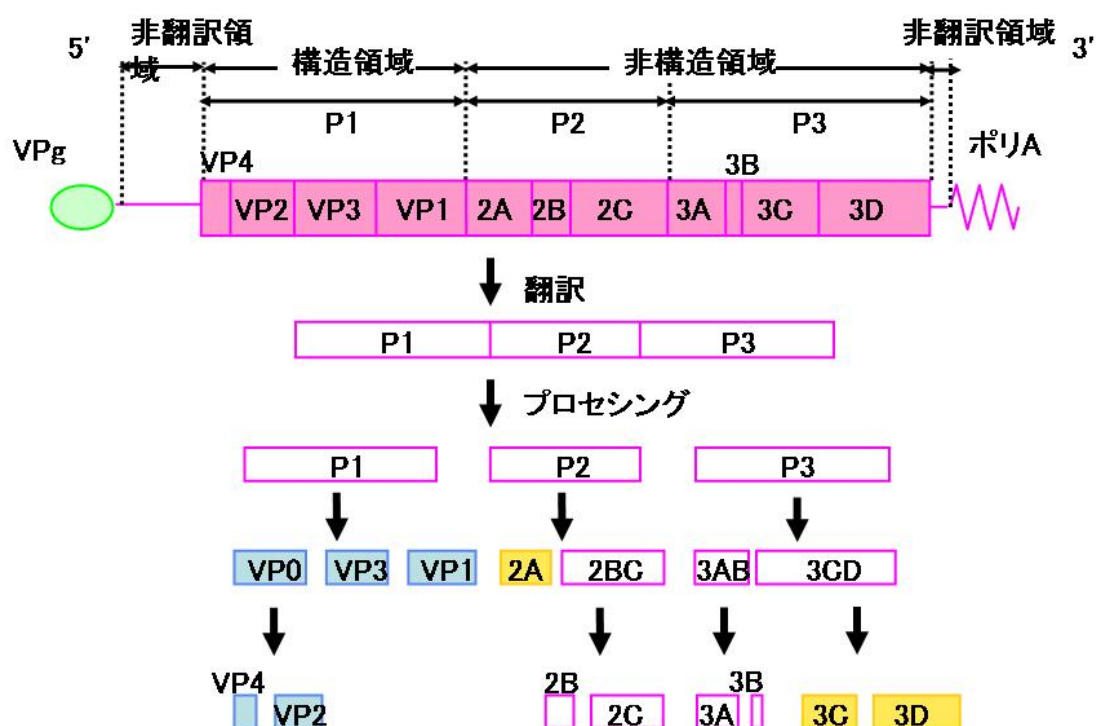
一方、ポリオウイルスの立体構造からは、ポリオウイルスはこの立体構造のどこの部位を使って細胞に結合、感染するかはの課題に対して、人のポリオウイルス受容体がクローニングされました。人のポリオウイルス受容体を入れて、ポリオウイルスに感受性のある Tg マウスがつくられました。人のポリオウイルス受容体をもてばウイルス感受性を獲得する

ことが明らかになり、これによって種特異性の概念が確立されました。

現在では、Tg マウスを使って、ポリオウイルスの複製、病原性発現の研究は一体化しています。これまでは現象論的な研究でしたが、今では、分子論的に明確に分かってきています。この段階まで分かったのですからウイルスを利用しようという考えも出てきました。

図 41

## ポリオウイルス(PV)について



### Q&A

Q：逆行性に軸索を介する時、神経の太さには関係がありますか。また、ポリオウイルスの標的細胞には自律神経もはいつているのですか。自律神経系では臨床医師にまともに扱ってもらえないのですが、医療側でのコンセンサスはあるのでしょうか。

A：神経の太さは関係ありません。ポリオウ

イルスの大きさが 30 nm 程度で非常に小さいからです。症状が重い場合には、ポリオウイルスは自律神経細胞へも行くと思います。証明はされていないと思います。ポリオの主な症状が中枢神経障害ですから、医療側は自律神経まで気が回らないのだと思います。自律神経細胞では判明していないと言うのが正

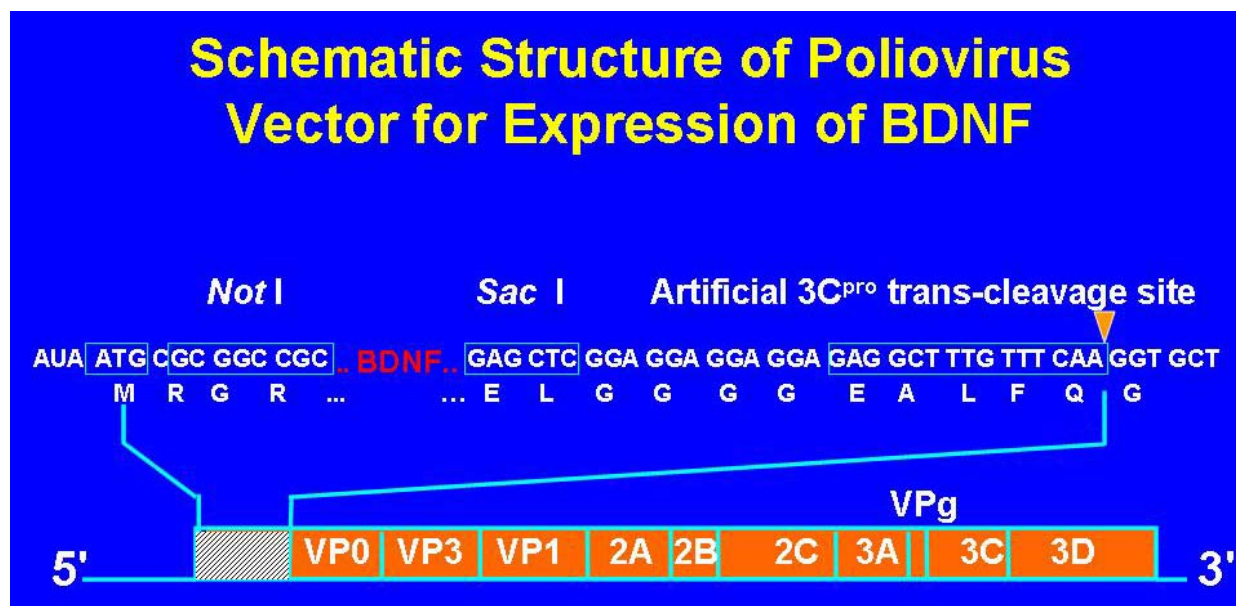
しいと思います。

## ● ポリオウイルスを利用する

ここからは、ポリオウイルスを利用する話をします。ここにポリオウイルスの蛋白と RNA が示されています。右の 3' 側にポリ A があります。P1 は構造蛋白 V1~V4 で、ポリオウイルスの周囲の殻をつくります。P2、P3 は非構造領域で、ここの 3A、3D 側が RNA を複製するための蛋白です。この RNA が翻訳されますと、P1、P2、P3 の蛋白に分かれます。

このような蛋白のプロセッシングで（図 42）の下に記された様な蛋白がつくられます。この蛋白の特徴を生かして運動神経細胞特有の病気を治そうという試みをしました。そのためには、ポリオウイルスに外来の遺伝子を入れる必要があります。入れる場所は、今のところ大きく分けて 3 ヶ所あります。

図 42



前述したように、ポリオウイルスは非常にきちんとした構造をとっており、外部から遺伝子を付けて大きくなると排除する方向に変異しますので、外来のメッセンジャーRNA (mRNA) としては、400 ヌクレオチドぐらいまでしか入れられません。

実際には、カプシド蛋白の前のところに BDNF (brain-derived neurotrophic factor) を入れてみました。BDNF は、脳でつくられる脳由来神経栄養因子とよばれるもので、約 400 ヌクレオチドですから使えると考えました。

ALS (amyotrophic lateral sclerosis : 筋萎縮性

側索硬化症) という病気に BDNF の効果があるとのことでしたので、ポリオウイルスを使って送り込んでやろうという考えからできたベクターです（図 42）。

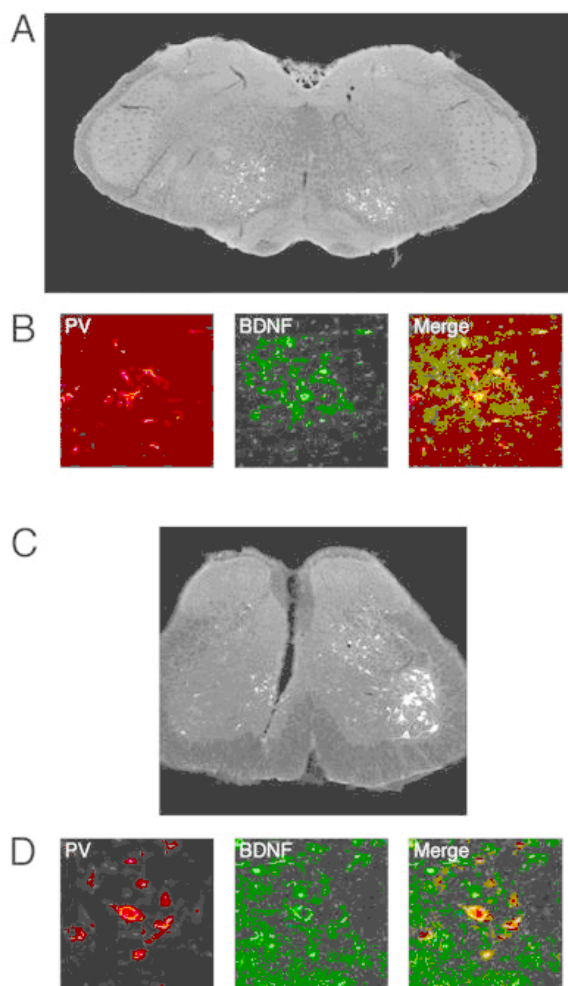
実験は、Tg マウスの骨格筋に BDNF の遺伝子を入れたポリオウイルスを接種し、逆行性に軸索を介して中枢神経系に送り込む方法です。この方法ですと、ワクチン接種を受けて血中にポリオウイルスに対する抗体があっても軸索経由であれば中枢神経系に送り込めるからです。

実際は、Tg マウスの大腿部の筋肉にポリオ

ウイルスを接種し脊髄の部分で調べました。BDNF を赤に、ポリオウイルスを緑に着色して両方の結果をマージ（重ねる）すると黄色の点が出ました。つまり、ここにポリオウイ

ルスが発現し、しかも BDNF が発現しています。運動神経細胞で BDNF が発現していることが分かりました（図 43）。

図 43



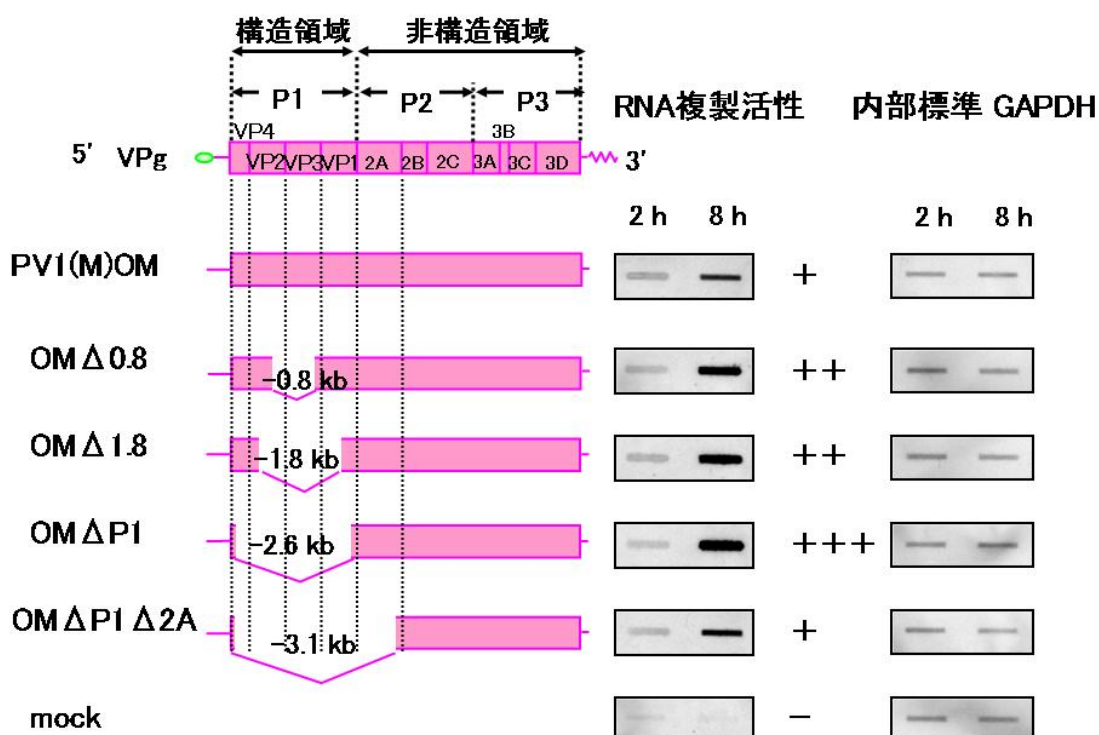
#### ● ポリオウイルスを利用する（図 44～図 47）

ここまできたので ALS のモデルマウスを使って実験をやろうとした時に、BDNF は ALS に効かないというデータが出てきてこの実験は中止になりました。そのため今盛んに研究されている HGF（hepatocyte growth factor：ヘパトサイト・グロース・ファクター、肝細胞増殖因子）を使うことにしました。しかし、HGF は約 3000 のヌクレオチドから成り、全部で 7500 のポリオウイルスに 3000 を入れる

のは不可能です。そこでポリオウイルスの遺伝子をけずることにしました。

どこをけずったらよいかですが、まずは殻を構成する構造領域です。RNA の複製に関与する遺伝子もなるべく温存することにしました。P1 全部（VP1－VP4 まで含む）で 2600 けずりましたが、 $7500 - 2600 + 3000$  ではまだポリオウイルス自体よりも大きくぎりぎりです。そこで考えたのが 2A でした。

図 44



### PV 欠損変異体 RNA の RNA 複製活性

図 45

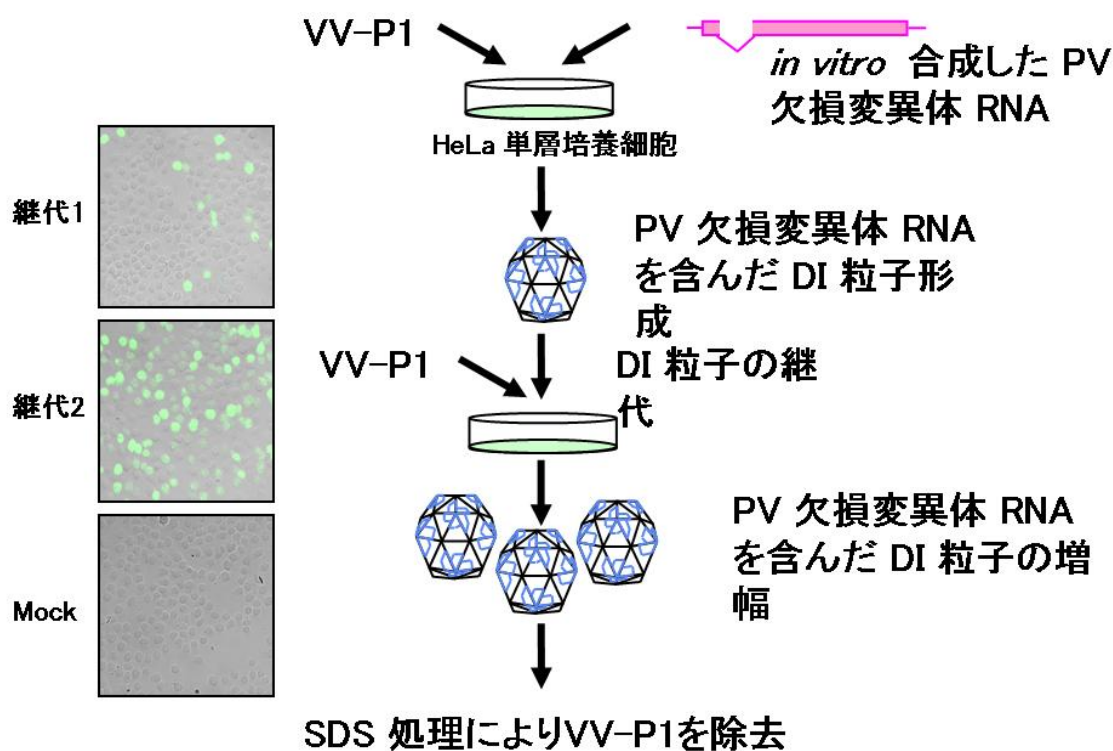
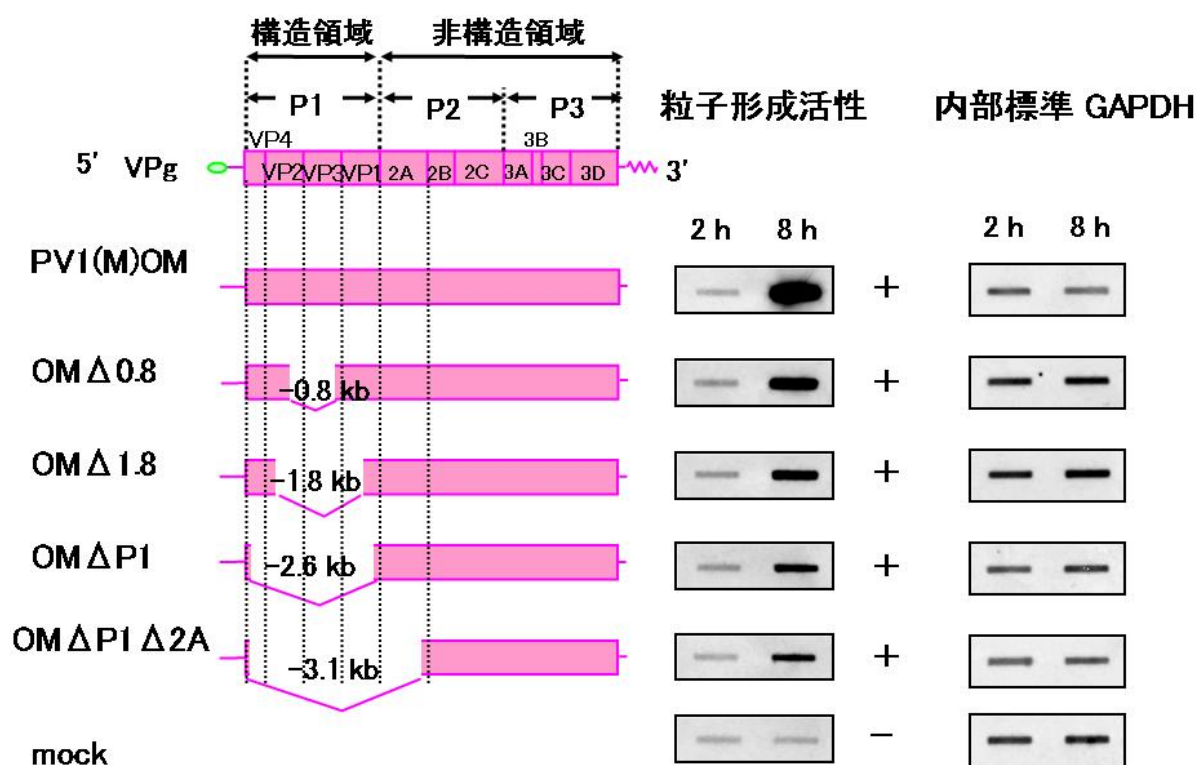


図 46



パッケージングされた PV 欠損変異体 RNA の RNA 複製活性

図 47

## 2A プロテアーゼの機能



### ウイルス RNA 複製

- 必須ではないが、RNA 複製にある程度関与

### 感染細胞に与える影響

- キャップ依存性翻訳の阻害
- 細胞変性効果 (Cytopathic effect ; CPE)

2A はプロテアーゼ (protease : 蛋白分解酵素) で、2A だけを発現させると細胞の蛋白合成をストップさせたり、細胞が変成するなどの強い機能を有します。したがって 2A をけずりたいのですが、2A はウイルス側の RNA の複製に関係しているという以前からの考え方があり、誰も試みた人はいませんでした。研究や仕事は何でもぎりぎりまで追い込まないときちんとした成果にはなりませんので、2A、2B までけずりました。

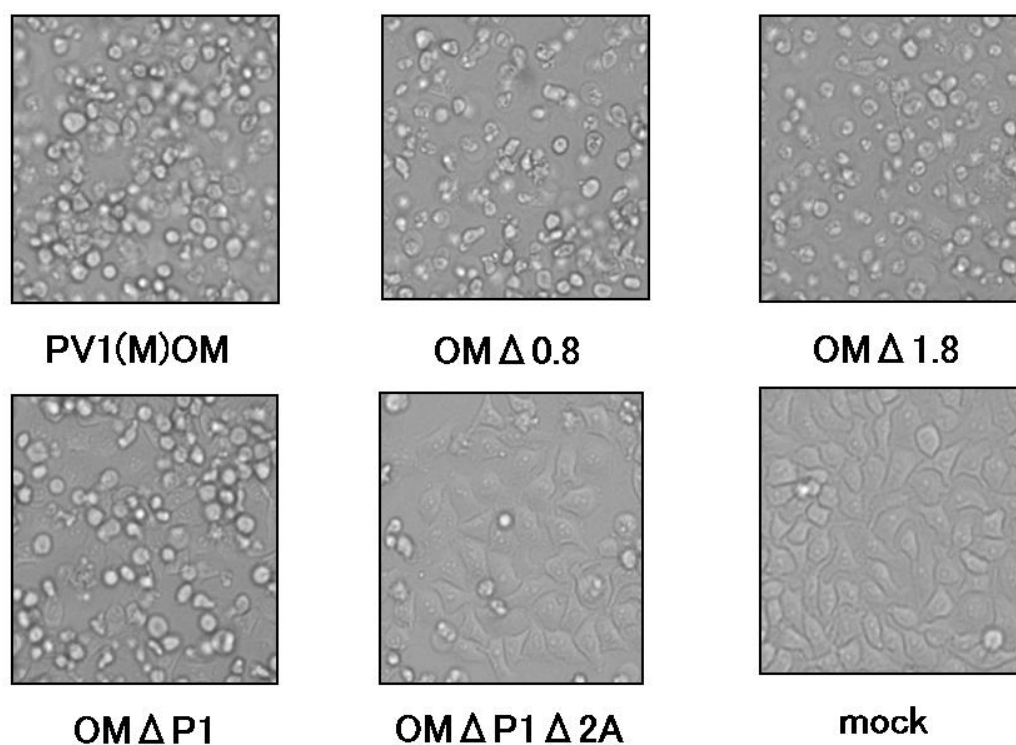
(テーマとはそれますが、実験はぎりぎりの限度までおこなってデータを取らないかぎり、途中までの実験では中途半端で、論文としての価値はかなり低くなります)。

実際には、2B までけずると RNA の複製能力はなくなりますが、驚いたことに 2A までの削除は問題がなかったのです。ポリオウイルスから 2A までをけずっても問題がないの

であれば、細胞変成効果がほとんどないのではないかと期待して次の実験をしました。ここで示した構造の欠損変異体 RNA は細胞中に入れると複製活性を示しますが、RNA ではそのまま使えず、カプシド蛋白で周りをつまないと逆行性に軸索を介して中枢に送り込めません。そこで RNA をカプシド蛋白で囲んでやる実験をしました。これは、ポリオウイルスの欠損変異体 RNA をポリオウイルスのカプシド蛋白でパッケージすることになります。この実験で、パッケージはうまくゆき、3.1k も抜けてパッケージされることが分かりました。3.1k もけずった状態でも、きちんと、RNA はパッケージされ細胞に感染し、複製することが分かりましたので、3.1k けずったところへ 3 k レベルの HGS (hepatocyte growth factor: ヘパトサイト・グロース・ファクター、肝細胞増殖因子) を入れることができました。

● DI 粒子感染細胞の CPE (Cytopathic effect、細胞変成効果、細胞毒性試験)

図 48



DI 粒子感染細胞のCPE発現

P1、2A を除いたポリオウイルスの欠損変異体 RNA ではどうなるかですが、細胞変成効果を培養細胞で試験しました。

図 48 がその結果で、標準株、強毒株（野生株）では 24 時間後に培養細胞上では丸くなっているのがわかります。これが細胞の変成です。その他、0.8k、1.8k けずったもの、カプ

シド蛋白の全域である P1 をけずったものでも細胞の変成が観察されました。

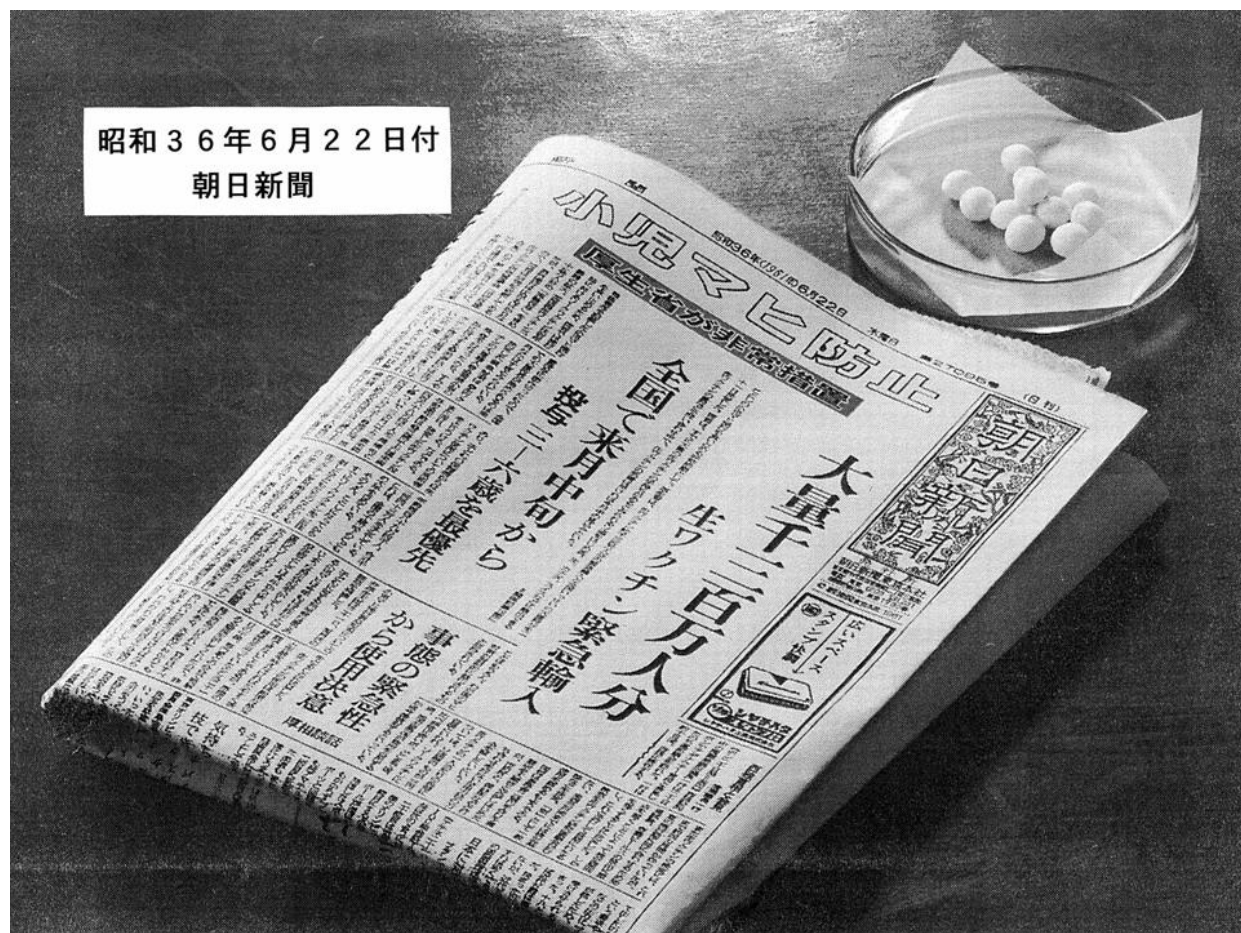
しかし、P1、2A まで除いたものでは細胞の変成効果が観察されませんでした。このことから、2A を抜いたものは有効に使える可能性が高いことが予想されます。

## ● ポリオ根絶計画

昭和 36 年（1961 年）6 月 22 日の朝日新聞の記事で、旧ソ連から 1,300 万人分の生ワクチンを緊急輸入したことを報じています。これが日本の最後の流行でした。それまで日本では学者や官僚の間の議論の結果、不活化ワクチンでゆくことになっていたらしいのですが、

この時に急に生ワクチンになりました。この緊急輸入は役に立ち、このおかげでその後日本のポリオコントロール計画は生ワクチンを使って行われるようになりました。ポリオの国際的な根絶計画も、この生ワクチンを使って行われています。

図 49

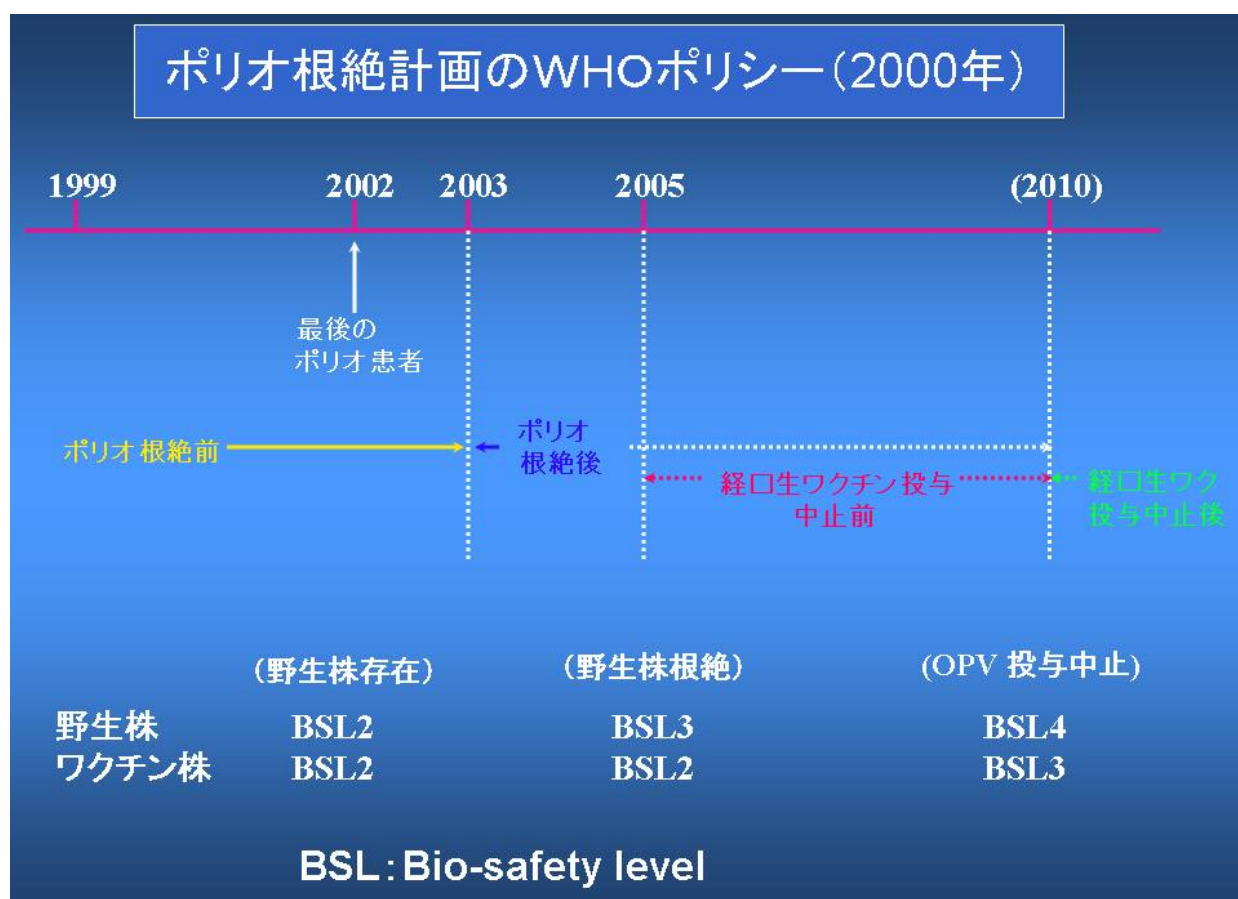


1988年のWHO総会で、ポリオを2000年までに根絶するという決定がなされました。その理由は2つあります。

天然痘が1) 人だけに感染する、2) いいワクチンが存在するという事で根絶されたのと同様、ポリオも1) 人だけに感染する（サルにも感染しますが経口感染はしない）、2) いいワクチンが存在する、ということでスタートしました。その作戦は、全世界の人々に生ワクチンを投与することです。ロータリークラブも入り、世界の隅々にまで行って生ワ

クチン投与をやっています。1988年の時点では、ポリオが流行していた国は125ヶ国、2001年の時点では10ヶ国になりました。患者の数は1988年の1%以下にまで減っていますが、2000年までの根絶計画は失敗でした。WHOは、計画を作り直し2002年に最後のポリオ患者が出るようにし、その後3年サーベイランスを実施し、それでなくなったと判断しようと決めました。特に科学的根拠があるわけではないのですが、天然痘の時は2年でしたのでプラス1年としたようです。

図 50



参考資料： WHO ポリオ根絶計画（2007年5月までのデータ）

Total cases	Year-to-date 2007	Year-to-date 2006	Total in 2006
Globally	183	453	1997
- in endemic countries:	155	415	1870
- in non-endemic countries:	28	37	127

## Case breakdown by country

Country	Year-to-date 2007	Year-to-date 2006	Total in 2006	Most recent case
Pakistan	8	3	40	13 May 2007
India	55	33	676	22 April 2007
Myanmar	5	0	0	19 April 2007
Afghanistan	2	8	31	16 April 2007
Nigeria	90	371	1123	15 April 2007
Somalia	8	24	35	25 March 2007
DRC	12	1	13	16 March 2007
Niger	3	3	11	5 March 2007
Nepal	0	1	5	22 December 2006
Cameroon	0	0	2	6 December 2006
Chad	0	0	1	26 November 2006
Bangladesh	0	3	18	22 November 2006
Angola	0	0	2	14 November 2006
Kenya	0	0	2	13 November 2006
Ethiopia	0	2	17	7 November 2006
Namibia	0	0	18	26 June 2006
Indonesia	0	2	2	20 February 2006
Yemen	0	1	1	2 February 2006

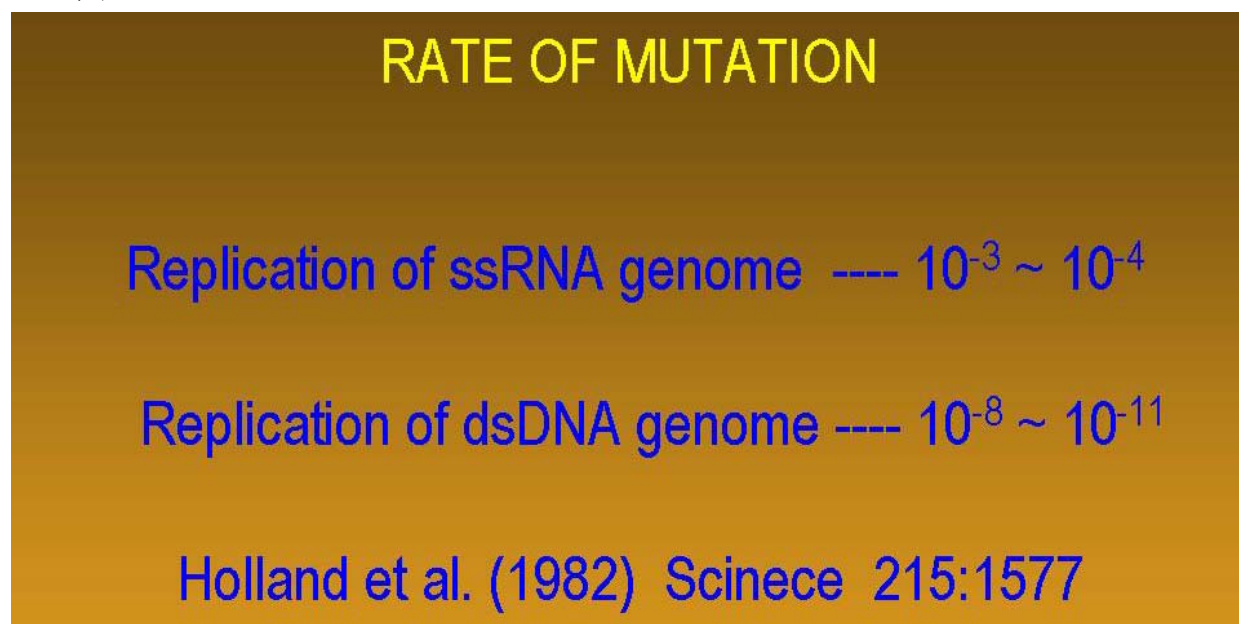
2005 年までに患者が出なければ 2002 年の患者が最後とすることにし、2005 年には野生株はなくなったと判断することにしました。したがって、2005 年からは、経口生ワクチンの投与は中止してゆく方向でゆくと決めました。2010 年ごろには経口生ワクチンの投与は中止するとの計画です。

そうしますとポリオ根絶の予算を他にまわせますので、すでに次の計画が上がっています。ところが、2004 年でまだポリオの患者は

おりますので、WHO は計画変更して 2005 年で最後のポリオ患者にするとしています。

私の個人的な意見ですが、ポリオ根絶計画はさらに遅れるであろうと判断しております。また、生ワクチンをやめるのは危険が大き過ぎると感じております。天然痘で根絶できたのにポリオでは何故困難かといいますと、それは次ページの図 51 を見てください。

図 51



ポリオウイルスのゲノムの長さは7,500(7.5 k) ですから、これを約 10,000 (10<sup>4</sup>) と考えれば、10<sup>4</sup> の核酸がならんでいて 1/10<sup>4</sup> の確率で複製を間違えることになります (変異が生じる)。そうすると複製されたポリオウイルスは全て違ったものになってきます。ポリオウイルスの single-stranded RNA の変異率は天然痘ウイルスの double-stranded DNA の変異率とは比較にならないほど高いのです (10 万倍～1000 万倍)。そのため、ポリオウイルスはワクチン株でも油断ができません。ワクチンの接種率が下がってくると、ポリオウイルスに

感受性のある人が増えてきて、ワクチンを受けた人からウイルスがその地域に広がります。広がっている間に、ワクチンウイルスはワクチンウイルスではなく強毒野生株と同じ力を持つウイルスに変異をしていきます。

実際、こういう変異をしたポリオウイルスが原因で、これまで 4 ヶ所でポリオの発症が起こっています。ですから、今後どういう方法でおさえていくかは難しい問題です。先進国では、不活化ワクチンへの切り替えも始まりましたが、コストもかかりますので先進国に限られるでしょう。

● 最後にウイルス学者としてウイルスの世界について述べます (図 52)

ポリオウイルスが属するエンテロウイルスの世界には、ポリオウイルス以外に、エコーウイルス、コクサッキーウイルス、その他のエンテロウイルスが存在しています。エンテロウイルスは、現在次々に見つかっており番号をつけて区別しています。現在 90 種ぐらい見つかっています。互いに似たウイルスですので、境界のところでは常に侵入しあっています。しかし、ポリオウイルスを人工的に根

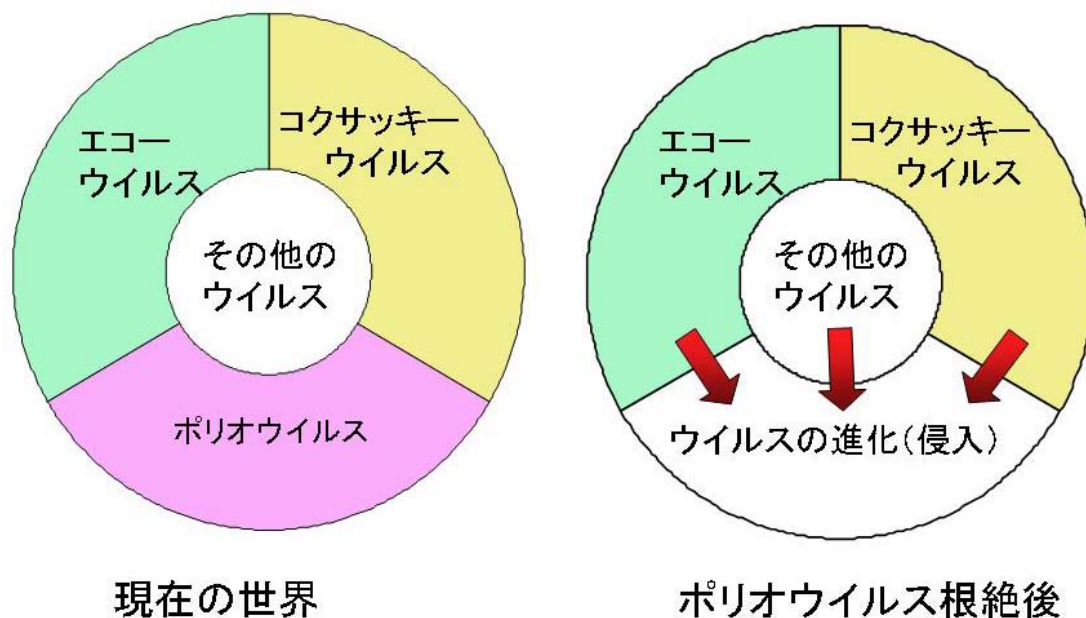
絶すると、境界から他のウイルスが変異し、ポリオウイルスの領域に侵入してきます。

WHO でポリオの根絶計画が出てきた時に、すでに学者グループではこの議論がありました。ポリオを根絶するとポリオウイルスのところに新しいウイルスが生じてきて、またワクチンを開発しなければならなくなります。要するにいたちごっこなのです。私の考えでは、RNA ウィルスに関しては、根絶は基本的

に困難であり、可能なのはコントロールすることであろうと思います。拍手。

図 52

## エンテロウイルス世界の勢力図



### Q&A

Q： 難しかったのですが、面白いお話でした。自律神経のお話など元気付けられました。先生の研究は既にポリオになって数十年たっている私達に役立つのでしょうか。PPS の症状には関係があるのでしょうか。

A： ポリオは急性疾患で、感染した時にはすでに手遅れで対策が無いのが現状ですが、HIV 等は感染してから発症までかなりの時間があるので、今日のような分子論的な研究成果は病気の各ステップで必ず役立つはずで、新しい方法では、栄養因子を分子的に送り込むこと、神経再生などがあります。基礎研究から実際の応用まで時間がかかりますので、直ぐにというわけにはいきませんが、以前に比べると将来が非常に明るくなってきているのを感じます。ポリオウイルスをベクターとして使うなど、私自身も考えてもみなかった

ことです。分子論的に驚くべき新事実が明らかになってきており、神経再生を研究している人たちも、自分たち自身で驚いているのではないかと思います。

Q： 私は、按摩・鍼・灸をやっている理学療養士です。ここの出席者はほとんどがもう手遅れになっている人たちですが、ポリオウイルス研究者の立場から、臨床現場の医師、理学療養士などに対して何かご意見をお願いいたします。

A： これは大変に難しい質問で、私は何か意見を言える立場にはありません。現在の医学的では体の問題は治せません。予防することが出来るだけです。しかし、例えばノーベル賞の小柴先生もポリオです。申し訳ありませんが、現状を受け入れてその上でベストを尽

くすのがよいのではないかとしかいえません。

Q： 今まで分からなかったことが分かったような気持ちになっています。個々人のポリオウイルス受容体（ポリオウイルス感受性遺伝子）の違いにより、個人差はでてくるのでしょうか。

A： あるいはポリオウイルス受容体（PVR）の違いによるポリオ感受性の差があるかもしれませんが分かりません。ただ、日本と米国でPVRのクローニングをした時に、2ヶ所核酸が違っていましたので可能性は残ります。

Q： 子供が生ワクチンを受けた時に、近くで接する親はポリオ感染のリスクがあるのでしょうか。

A： 現在、生ワクチンを受ける子供の数は100万人／年ですから、子供に接触する人の数を3倍の300万人とします。感染する人の数は1～2人／年ですから、感染率は1～2人／300万人で極めて低く、これは交通事故などの比ではなく安全といえます。

Q： 1) 昭和50年から昭和52年に生ワクチンを受けた人は抗体があまり出来ていないといわれています。この人たちはよく海外へゆくのですが、もう一度生ワクチンを受けた方がよいのでしょうか。2) 10月12日のNIHの報告では、米国ではOPVからIPVに変えていつているとのことですが、現時点でIPVに変更してゆけるほど単純な問題なのですか。3) ウイルスの透過電子顕微鏡（TEM）の写真がでていましたが、普通TEMは300kV、超高真空中（ $10^{-7}$  torr）でサンプルを観察しますが、サンプルのウイルスはどのような状態になっているのでしょうか。

A： 1) もう一度ワクチンを受けた方がよいでしょう。あの時のワクチンは、病原性を落とし過ぎたようです。接種しているところは

東京でも3ヶ所あります。2) 米国では、OPV→IPVとなりました。注意せねばならないのは、OPVであればウイルスは腸管で増殖し、粘膜免疫が導入されます。したがって、野生株が入ってきても外へは排出されずサイクルを断つことが可能です。これに対してIPVでは、野生株が入ってきた時、その人自身は血中抗体が高いので大丈夫ですが、消化管はそのままウイルスに開放されており、野生株は排出物に入り外へ出ていきます。そのため、地域に広まる恐れがあります。そこに抗体の無い人が入っていったら感染の危険が高くなります。IPVは100%接種が必須で、米国の小学校ではIPVの接種証明が必要なはずで。私個人の意見では、まだ、国際的にOPV→IPVの方向にするのは早過ぎると考えます。3) TEMでは、サンプルは固化した状態にして観察します。

Q： 1) 北海道の会員から、ワシントン共同通信のニュースがありました。風邪の原因となるコクサッキーウイルスA21をマウスに筋肉注射したら、ポリオに似た症状がでたとのこと。これが先生の言われたポリオを根絶したら新種のポリオウイルスが出てくるということと同じですか。2) ポストポリオマウスというのは可能ですか。

A： コクサッキーウイルスA21はポリオウイルスのグループではありませんが、受容体は免疫グロブリン（Ig : Immunoglobulin）のファミリーであり、可能かもしれません。マウスによっても異なりますので速断はできません。新種のポリオウイルスが現れたのと同じではありません。2) Tgマウスで実験系をつくることは可能だと思います。マウスの寿命は2年程度ですから、その間にマヒが出てくるかを調べるなどが必要と考えられます。

Q： 1) この前米国からPPS関係の人が来た

時、先生の論文をお渡ししたのですが、神経再生が世界的に注目されている現在、PPS 問題で再生をやっている人はいますか。2) 京大、関西医科大などで再生をやっている先生にポリオ患者の話をする、実験的に可能ではないかという人が多いのです。けれども、ほとんどの人がポリオを忘れているか、ポリオ自体を知らない状態で、パーキンソン病や ALS などの流行のものをやっています。

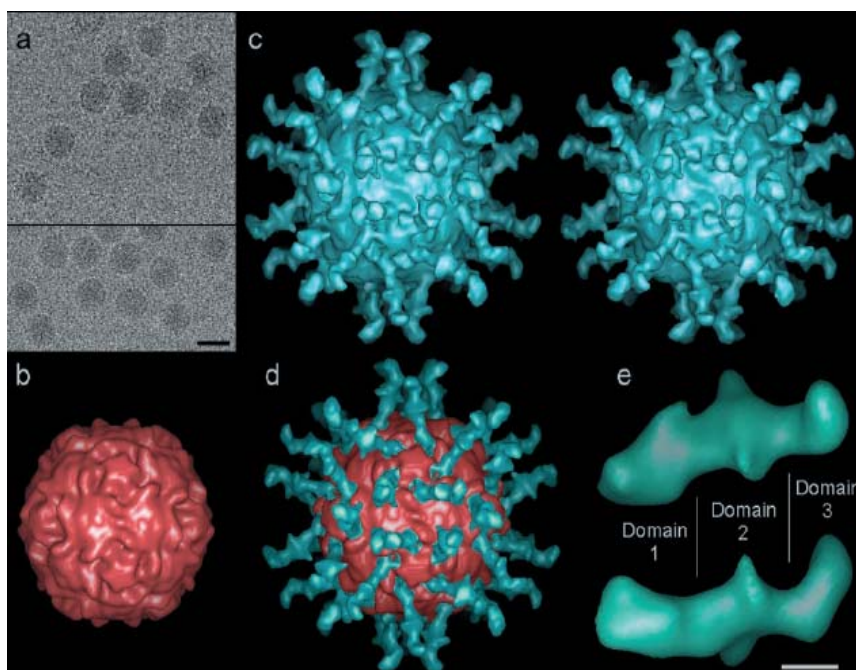
A: 1) 日本で本腰を入れて PPS に取り組んでいる人はいないと思います。しかし、私が今日と同じ様な話をするに興味を持ってくれ

る人は多く、そのなかに PPS に使えるかと聞かれたこともあります。2) ポリオを忘れているか知らないというのは、その通りだと思います。それと、研究者としてのアプローチの仕方の違いもあると思います。つまり、一般的に内因性の病気に対する研究をする場合と、ポリオのような外因性の病気に対する場合では、気持ちの持ち方と言いますか、研究者のスタンスが違います。この研究に対するアプローチの違いから、ポリオを考えていないとか、知らないというような回答が返ってくるのだと思います。(完了)

本日は休日にもかかわらず長時間ありがとうございました。今後ともご指導をお願い申し上げます。(拍手)。野本先生にはご多忙中の所、予定時間を越えて長時間お話しいただき、質問にも丁寧にお答えくださり、本当に有難うございました。ポリオウイルスに関して、このようなめったにうかがえない最先端の高度な内容のお話を聞かせていただけて、出席した一同は、新たな目が開かれ、また積年の疑問が解消されもいたしました。ほんとに熱気溢れる講演会でした。(M.K.)。

## 用語解説

- ポリオウイルス粒子のクライオ電子顕微鏡写真 (黒い棒の長さ = 30 nm)
- ポリオウイルス粒子の 3D CG
- ポリオウイルス粒子 + sPvr (親水性ポリオウイルス受容体) の 3D CG
- ポリオウイルス粒子 + sPvr 結合関係を示す 3D CG
- sPvr (親水性ポリオウイルス受容体) の 3D CG





東京大学大学院医学系研究科 教授 野本 明男 先生 ご略歴

昭和 44 年 03 月 東京大学薬学部卒業  
昭和 49 年 03 月 東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了 薬学博士  
昭和 49 年 04 月 国立衛生試験所 (非常勤)  
昭和 49 年 08 月 米国ニューヨーク州立大学医学部博士研究員、Eckard Wimmer 教授 研究室  
昭和 52 年 08 月 北里大学薬学部助教授 (公衆衛生学)  
昭和 57 年 10 月 東京大学医学部助教授 (細菌学)  
昭和 61 年 12 月 医学博士 (東京大学)  
昭和 62 年 04 月 東京都臨床医学総合研究所部長 (微生物研究部門)  
平成 03 年 09 月 東京大学医科学研究所教授 (ウイルス研究部)  
平成 12 年 02 月 東京大学大学院医学系研究科教授 (微生物学講座) 現在に至る  
平成 13 年 04 月 同研究科附属動物実験施設長 (併任) (平成 15 年 3 月まで)  
平成 15 年 04 月 同研究科附属疾患生命工学センター動物資源研究領域教授 (併任) 現在に至る  
平成 18 年 04 月 日本ウイルス学界 理事長

#### 受 賞 暦

昭和 57 年 10 月 日本生化学会奨励賞  
昭和 60 年 10 月 持田記念学術賞  
昭和 62 年 11 月 野口英世記念医学賞  
平成 06 年 04 月 日経 BP 技術賞 (医療部門)  
平成 11 年 03 月 内藤記念科学振興賞  
平成 14 年 11 月 武田医学賞  
平成 16 年 06 月 日本学士院賞

## 専 門 分 野

### RNA ウイルスの複製と病原性発現機構

平成 16 年度 日本学士院賞： 野本明男 東京大学大学院医学系研究科 教授

「ポリオウイルスの複製と病原性の研究」

野本教授は、小児麻痺の病因であるポリオウイルス増殖の分子機構と病原性に関する研究を通して、ポリオウイルスの生体内伝播と病原性発現のメカニズムを明らかにするとともに、生ワクチンウイルスの弱毒化の最も重要な変異と、その作用機序を明らかにした。さらに、サルでしか行えなかったポリオウイルスの毒性試験に、マウスで行いうるシステムを開発した。

