



Master's Lectures – 5

センダイウイルス (HVJ) の マウス肺病原性の機構

神戸大学 名誉教授
神戸女子大学 名誉教授
山形厚生病院 院長

ほん ま もり お
本 間 守 男

Morio HOMMA

はじめに

私が第20回小島三郎記念文化賞を頂いたのは今から29年前の1984年。現役の研究生活から離れて既に20年、今では新しい知見に触れる機会も少なくなりました。ここでは授賞の対象となったセンダイウイルスに関する仕事を継時的に展開し、その意義などについて、我が田に水を引きながら披露させていただくことで責めを果たしたい。

センダイウイルス発見の歴史

1952年、私が医学部2年生の頃、東北大学付属病院で新生児の間に肺炎が流行し、17人の患者が発生し、そのうち11人が死亡するという事件が起こった。その頃はペニシリンは既に出回っており、ペニシリンの無効な肺炎の病原因子としてウイルスが疑われ、当時の常套手段に従って、剖検肺乳剤をマウスに経鼻接種するという方法で、新種のウイルスの分離に成功した。その結果は、1953年、黒屋、石田、白取の連名で、「新生児に流行性の肺炎を起こすウイルス」として報告された。しかしこれと相前後して、日本の他の研究室からも、同じウイルスが無処置のマウスから分離されるに及び、新生児肺炎としての病原性は否定されざるを得なくなった。その後、関係者からなる委員会が設置され、このウイルスを Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ) と呼ぶことが決まり、1955年の第3回日本ウイルス学会で正式に承認された。このような日本の動きとは別に、世界的には最初に発見された地名に因ん

だセンダイウイルスと言う名が既に使われており、今でもこれが通り名となっている。センダイウイルスは、発育鶏卵内の漿尿膜で増殖し、漿尿液中に排泄、蓄積される。ここで増えたウイルスは、鶏の赤血球を凝集するという点ではインフルエンザウイルスと似ているが、それとは抗原性を異にするほか、溶血能と言う際立った生物学的特徴を持っている。また1958年、阪大微研・岡田が発見したHVJによる細胞融合現象は、同種のみならず、異種の細胞との間でも融合を起こすので、それ以後このウイルスは、ウイルス学以外の細胞を扱う研究者の間でも広く利用されるようになった。このように、センダイウイルスは、インフルエンザウイルスとは全く異なる特徴を持つことが明らかになったが、これらの生物活性とその活性を担っているウイルスの構造との関係は不明のままであった。このような時代背景のもとに私のセンダイウイルスの研究がはじまった。

1. 宿主依存性修飾現象の発見

センダイウイルスは、現在ではパラインフルエンザウイルス科のパラインフルエンザウイルス1型(マウス型)と位置づけられている。既に述べたように、センダイウイルスは発育鶏卵で良く増殖するが、そこで増えたウイルス(以下 Egg-Sendai と略記)は表1に示すような多彩な生物活性を持っている。私が研究を始めた1956年当時の日本では、未だ組織培養の技術は一般化されておらず、それを用いたウイルスの研究もごく僅かの研究室に限られていた。そんな中で、日沼頼夫先生(京大名誉教授、当時は東北大助教授)の命ずるままに、日夜手探りの状態でその技術の習得に励み、一年がかりで漸く

ウイルスの研究に利用できるまでになった。そこで最初に行ったのがEgg-Sendaiをマウス由来の線維芽細胞であるL細胞に感染させる実験であった。感染24時間後、もとの線維状の細長い細胞はプラズマ細胞と見紛うばかりの丸い細胞にその姿を変えていた(写真1)。ウイルスの示す細胞変性効果を初めて目の当たりにしたその時の感動は、未だに新鮮である。この美しく変身した細胞に魅せられ、幻惑されて、それから40年に及ぶ私のセンダイウイルス研究の遍歴が始まった。このL細胞で増えたウイルスを使えば、それまでのように卵を孵化させる手間が省け、いつでも好きな時にウイルスが使えると喜んだのも束の間、L細胞で増えたウイルス(以下L-Sendaiと略記)は、増殖の母体となったL細胞に

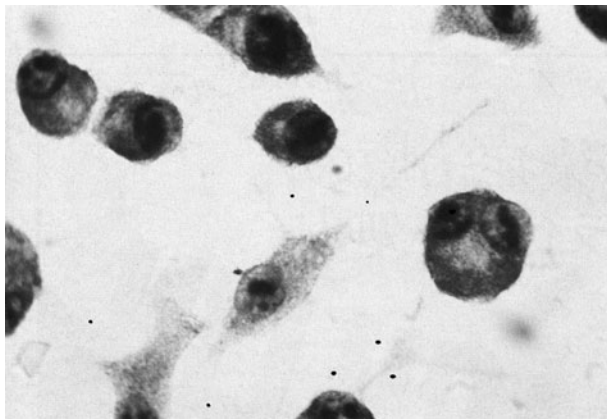


写真1 センダイウイルスのL細胞に対する細胞変性効果

細長い線維状のL細胞(中央)は、卵で増えたウイルスEgg-Sendaiの感染により、偏在した核を持った丸い細胞に変化する。この感染細胞で産生された娘ウイルスL-Sendaiは、非活性型で、L細胞に対する感染性をはじめ、いろいろな生物活性を消失している(表1参照)。

感染できないという予期せぬ事実遭遇した。そのうえ、L-SendaiはEgg-Sendaiの持つ溶血能、細胞融合能や後で述べるマウスに対する肺病原性も同時に欠如している。しかしこの非活性型のL-Sendaiも、卵に対する感染性だけは保っており、そこで増えたウイルスは、また元の活性型のEgg-Sendaiの性状に戻っている。すなわちEgg-SendaiからL-Sendaiへ、またその逆方向への性状変換は可逆的で、宿主を変えることに伴って起こるので、その内容は分からぬままに、表面的にはそれと似た現象が観察されていたバクテリオファージの例に倣って、これを宿主依存性修飾と呼ぶことにした(Ishida, Homma)(表1)。しかし後で分かることだが、バクテリオファージの遺伝子が宿主の修飾を受けるのとはその内容を異にしている。これと同じ現象は、L細胞を他のHeLa細胞やMK細胞等の培養細胞に変えても観察される。

2. 非活性型L-Sendaiの感染過程の解析

L-SendaiはなぜL細胞に感染できないのか。そのメカニズムを詳細に解析した結果、L細胞に吸着まではできるが、それに続く侵入過程が阻害されていることが分かった。この発見は、当時のウイルス学にとっては非常に重要な意義を持っている。以前から、ウイルスは宿主となる動物や細胞を選び好みすることが知られており、その宿主嗜好性(トロピズム)は、感染を受ける細胞が、そのウイルスに対するレセプターを持っているか否かによって決まるといふ、いわゆる「レセプター依存性トロピズム」の考えが支配的であった。この概念は、アメリカの

表1 宿主依存性修飾現象

性状	Egg-Sendai (活性型)	↔	L-Sendai (非活性型)
赤血球凝集能	+		+
ニューラミニダーゼ活性	+		+
細胞融合能	+		-
溶血能	+		-
卵-感染症	+		+
培養細胞-感染症	+		-
マウス肺病原性	+		-

センダイウイルスの赤血球凝集能とニューラミニダーゼ活性はHANA糖タンパクが担っており、宿主の影響を受けない。L-Sendaiはそれ以外の生物活性を消失するが、卵に対する感染性は保っており、そこで増えたウイルスはEgg-Sendaiの性状を取り戻す。卵が例外的宿主であるとの認識が、本研究の「肺病原性の機構」を解析する動機となった。

Holland が、ピコルナウイルスの研究結果に基づいて提唱したもので、その一連の研究が非常に明快であったがために、いつの間にかこの考えが暗黙のうちに他のウイルスにも普遍化されていった。これに対して L-Sendai の成績は、少なくともセンダイウイルスに限っては、レセプターへの吸着に続く別の侵入過程のあることを示したことになる。

3. 非活性型 L-Sendai を活性化する試み

非活性型の L-Sendai が発育鶏卵に感染できるということは、その遺伝子は正常に機能していることを示している。そこで、この非活性型ウイルスを活性化させることを精力的に試みた。その結果、幾多の思考錯誤を経て、数年がかりで漸くこのウイルスを薄い濃度のトリプシンで処理することによって活性化することに成功した (Homma)。しかも活性化後のウイルスは、L 細胞に対する感染性のみならず、溶血能 (Homma) や細胞融合能 (Homma, Tamagawa) のほか、マウスに対する肺病原性をも一挙に回復する。一方それまで、センダイウイルスに特徴的な溶血現象や細胞融合現象は、それぞれ別々に研究されてはいたが、その本体に迫るような研究成果は得られていなかった。しかし、この2つの活性が、トリプシン処理によって感染性と同時に回復するという事は、これらの現象はすべて感染性の発現と軌を一にするウイルス吸着後の侵入過程に関わっていることを示唆している。折りしも、コロンビア大学の Morgan らはセンダイウイルスの細胞内侵入機構を電子顕微鏡学的に研究しており、細胞膜に吸着したウイルスは、その後ウイルスの外側の膜 (エンヴェロープ) を細胞膜に融合させ、中味の遺伝物質のみを細胞内に侵入させるという、いわゆる「エンヴェロープ融合説」を提唱した (写真2)。この説は、トリプシンによるセンダイウイルスの活性化現象を理解するには非常に好都合で、トリプシンの作用は L-Sendai のエンヴェロープ融合能を活性化することにある、と一元的に解釈することが可能となった。さらに溶血や細胞融合現象は、エンヴェロープ融合を基にして展開される二次的な現象として理解することができるようになった (Homma, K. Shimizu, Y. Shimizu, Ishida)。

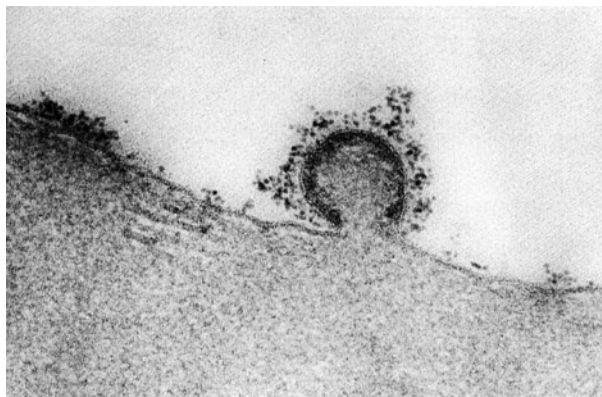


写真2 センダイウイルスの細胞内侵入像

ウイルスのエンヴェロープと細胞膜が融合して、中味の遺伝子のみが細胞内に侵入する。ウイルス表面は、ウイルスであることを示すために、フェリチン抗体で黒くまぶされている。ここで用いたウイルスは非活性型の L-Sendai をトリプシンで活性化したウイルスである (清水洋子撮影)。

4. センダイウイルス活性化の分子機構

そのころ、SDS-PAGE (Sodium Dodesyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) 法で、アデノウイルスの構成蛋白を分子量の大きさに従って分ける方法が Maizel らにより開発されていた。この手法を用いてアメリカの Kilbourne らは、インフルエンザウイルスのレセプターに吸着する HA 糖タンパクとそのレセプターを破壊するニューラミニダーゼ活性を持つ NA 糖タンパクが、それぞれ別々のスパイクを形成することを明らかにした。これに対しセンダイウイルスでは、これら2つの活性を、後日我々が HANA と命名した分子量 67,000 の1つの糖タンパクが担っているという重要な発見が、戸沢らによってなされた (Tozawa, Watanabe, Ishida)。そこで同じ手法を用いて、トリプシン処理前後の L-Sendai を比較することで、エンヴェロープ融合能を担う構造タンパクを同定できると考えた。その結果、非活性型の L-Sendai では、HANA のほかに F と名づけた分子量 65,000 のもう一つの糖タンパクが見つかり、これがトリプシン処理によって分子量 51,000 の F1 と 15,000 の F2 とに開裂し、活性型の Egg-Sendai と同じパターンを示すようになることが明らかになった (Homma, Ohuchi)。さらにその後の解析で、トリプシン活性化後に出現する F1 には、遊離の N 末端を持つ Phe-Phe-Gly-Ala-Val-Ile-と

続く疎水性のアミノ酸配列が現れ、これがエンヴェロップ融合能の発現に必要な構造であることが分かった (Itoh, Homma)。しかもこの配列は、パラミクソウイルスに属する他のウイルスの間でも非常に良く保存されている (図1, 2)。

5. センダイウイルスはなぜ卵で増えるのか

L-Sendai と同じ非活性型のウイルスは、L細胞のほかにも、用いた限りの他のすべての培養細胞からも産生される。このことから、それまで世界中の研究者が何の疑いも無くウイルスの継代に用いてきた

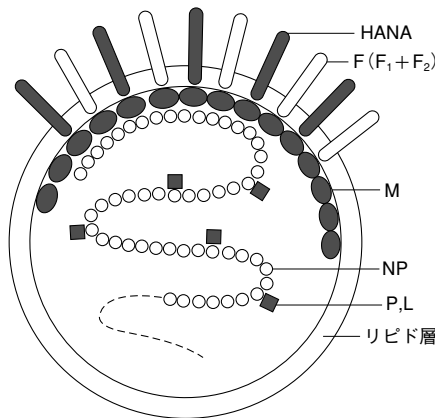


図1 センダイウイルスの模型図

エンヴェロップ(リビド層)上にはHANAとFの2種類の、糖タンパクから成るスパイクがある。HANAは細胞表面のシアール酸を含むレセプターに吸着する活性(HA)と、レセプターを破壊するニューラミニデース活性(NA)の2つを併せ持っている。Fはトリプシンで活性化後F1とF2に開裂し、エンヴェロップ融合能を発現する。

発育鶏卵は、ウイルス増殖の点から見れば、全く例外的な宿主であるということに気が付いた。一体、卵というブラックボックスの中に、このウイルスを活性化させるどんな仕掛けがあるのだろうか。既に述べたように、センダイウイルスは卵の漿尿膜で増え、漿尿液中に蓄えられる。そこで、もしかしたらこの漿尿液の中にトリプシン様の活性化物質があるのではないかと考え、L-Sendaiを試験管の中で漿尿液と合わせたところ、感染性と溶血能が時間経過と併行して回復することが分かった。一方、その試験管の中にトリプシンインヒビターを入れておいた場合には、このような回復は全く起こらなかった。その後の研究で、漿尿液の中にある活性化物質の本体は、予想通りトリプシンに似たセリンプロテアーゼであることが明らかになった (Muramatu, Homma)。しかも卵の中ではそのプロテアーゼが、このウイルスの活性化に丁度都合の良い濃度で存在しているということには、偶然とはいえ自然の妙に驚かされた。

6. センダイウイルスはなぜマウスの肺に病気を起こすのか

センダイウイルスにとって発育鶏卵が例外的な宿主であるとの認識に達すると、それまで漫然と抱いていた或る疑問が瞬時に蘇ってきた。私が細菌学教室に入った頃、隣の部屋ではマウスを使った感染実験が行われていたが、その時の疑問というのは、なぜセンダイウイルスはマウスの肺に病気を起こすの

	F ₂ サブユニット	F ₁ サブユニット

Sendai	Gln Ser Arg Phe Phe Gly Ala Val Ile Gly	Thr Ile Ala Leu Gly Val Ala Thr Ser Ala Gln
HPIV 3	Thr Lys Arg Phe Phe Gly Gly Val Ile Gly	Thr Ile Ala Leu Gly Val Ala Thr Ser Ala Gln
BPIV 3	Thr Lys Arg Phe Phe Gly Glu Ile Ile Gly	Thr Ile Ala Ile Gly Ile Ala Thr Ser Ala Gln
NDV	Gln Lys Arg Phe Ile Gly Ala Ile Ile Gly	Ser Val Ala Leu Gly Val Ala Thr Ala Ala Gln
SV 5	Arg Arg Arg Phe Ala Gly Val Val Ile Gly	Leu Ala Ala Leu Gly Val Ala Thr Ala Ala Gln
	↑	
	トリプシン開裂部位	
		HPIV 3: ヒトパラインフルエンザウイルス3型 BPIV 3: ウシパラインフルエンザウイルス3型 NDV: ニューキャッスル病ウイルス SV 5: シミアンウイルス5

図2 トリプシン活性化後に出現するF1のアミノ酸配列

センダイウイルスのF糖タンパクは、トリプシン処理によりF1とF2とに開裂し、F1のN末端側にエンヴェロップ融合に必要な疎水性アミノ酸配列が出現する。この配列は、他のパラミクソウイルス間でも良く保たれている (Itoh, Homma)。

か、正確には、感染ルートを気道以外の腹腔、血管、脳内に変えた場合でも、なぜ肺にしか病気を起こさないのかということであった。一方、マウスの殆ど全ての臓器がこのウイルスに対するレセプターを持っていることは、それ以前に三重大学の伊藤らが報告していた。とすれば、このウイルスの肺病原性はレセプター以外にその原因を求めなければならないことになる。そこで発育鶏卵の場合と同じように、マウスの肺の中にもウイルスを活性化させる仕組みがあるのではないかと考えた。それを証明するための実験を行った結果、センダイウイルスの肺内での増殖は、気管支および細気管支に限られ、そこで産生されたウイルスは常に活性型で、多段増殖を行いながら周囲に感染を拡大する、ということが分かった。この状況は、L-Sendai を卵に接種した時と似ており、マウスの肺の中にもこのウイルスを活性化させるトリプシン様プロテアーゼの存在が示唆される。しかし卵と異なり、マウスの場合には非活性型ウイルスを接種したのでは肺内での増殖は起こらない。このことは卵の場合は、ウイルスを活性化させるプロテアーゼは漿尿液の中に遊離した状態で存在するが、マウスの肺の中ではそのようなプロテアーゼは遊離した状態では存在しないことを示している (Tashiro, Homma) (図 4)。

7. プロテアーゼ変異株を用いたマウス肺病原性の解析

野生株を用いたセンダイウイルスの感染実験から、肺の中のトリプシン様プロテアーゼがマウスの肺病原性に関わっていることが示唆されたが、これをさらに確かめるために、トリプシン抵抗性の変異ウイルス TR を作り感染実験を行った。TR ウイルスは、*in vitro* ではトリプシンに抵抗性でキモトリプシンでのみ活性化されるが、それを未処理の非活性の状態でもマウスに接種しても病原性は示さない。これを予めキモトリプシンで活性化してから接種した場合には、接種量に応じた肺内での増殖が見られる。しかし、この場合の増殖は一段増殖に留まり、肺病変を示す迄には至らない。TR のトリプシン感受性復帰変異株 TSrev は、再び野生株と同じ病原性を獲得する。すなわち、マウス肺内では TR を活性化するキ

モトリプシン様プロテアーゼは働いていないと考えられる。この成績は、上述の成績と共に、ウイルスの肺病原性が、宿主側に存在するトリプシン様プロテアーゼによって規定される「プロテアーゼ依存性病原性」の考えを提示した最初のものとなった (Tashiro, Homma) (図 3, 4)。

8. トリプシンインヒビターによる感染阻止の試み

マウスの肺の中にあるトリプシン様プロテアーゼが、センダイウイルスの肺病原性を規定しているとすれば、予めマウスにトリプシンインヒビターを投与することにより、ウイルスの増殖を抑え、病変の拡大を阻止することが期待される。そこで色々なインヒビターについて検討した結果、アプロチニンがマウスをセンダイウイルスの致死感染から防御できることが分かった (Hayashi, Hotta, Itoh, Homma)。その他のインヒビターにも感染防御効果は見られたが、副作用の点で問題を残した。この成績は、現在ウイルス感染症に用いられている特異的な治療薬が限定的であることに鑑み、センダイウイルスと似たプロテアーゼ依存性の活性化機構を持ったウイルス感染症に、トリプシンインヒビターが治療薬として用いられる可能性を示した点で重要な意義を持っている。事実この方向でのプロテアーゼ依存性感染症の研究や、そのような感染症にプロテアーゼインヒビターを治療の目的で使用する試みが、エンヴェロープを持ったインフルエンザ、コロナ、エイズ、レオ、メタニューモウイルス等で展開されており、今後の発展が期待される。

9. プロテアーゼ変異ウイルス TR をワクチンとして用いる試み

既に図 4 に示したように、キモトリプシンで活性化した TR はマウスの肺に感染はするが、その増殖は一段増殖に留まり、病変を起こす迄には至らない。しかし、肺の中での一段増殖の結果、マウスの体内には、IgG, IgM, IgA 抗体のほか細胞性免疫も誘導され、野生株の攻撃に対して強い感染防御を示す (Tashiro, Homma), (Maru, Homma)。これまで色々な感染症に対して弱毒生ワクチンが開発されているが、弱毒化の機構が不明のまま使用されているのが

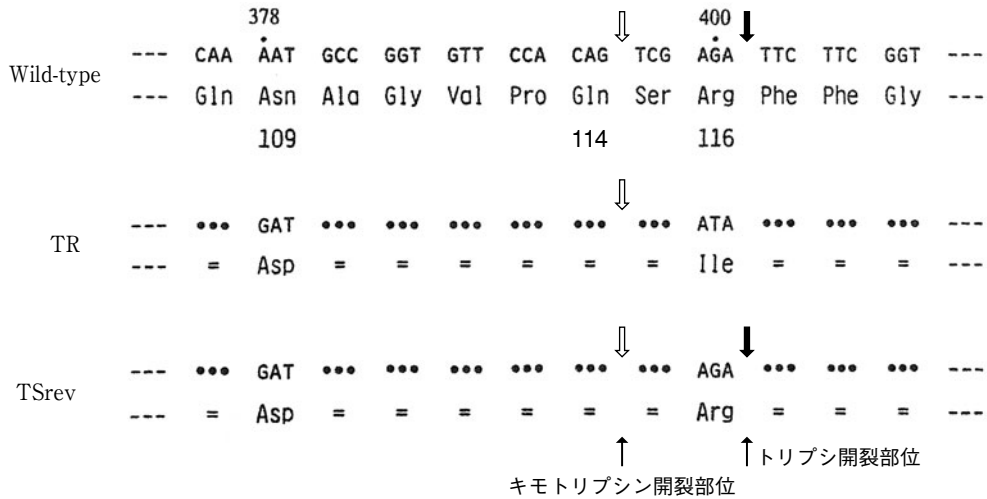


図3 センダイウイルスのプロテアーゼ変異株のF遺伝子解析

F遺伝子のトリプシン開裂部位近辺の塩基配列と、これに対応するアミノ酸配列を示す。野生株ではFタンパクのN末端から116位のアミノ酸はArgで、トリプシンはこのC末端側を開裂してF1のN末端側にPheで始まる20個程の疎水性のアミノ酸を出現する(図2参照)。トリプシン抵抗性変異株TRではこの部分のArgがIleで置換されているので、トリプシンでは開裂されない。TRのトリプシン感受性復帰株TSrevではIleがArgに戻るので再びトリプシン感受性となる。キモトリプシンに対する感受性は、野生株とTRでは大きく異なるが、その開裂部位はどちらも114位のGlnとSerの間にある。このことから、TRではArgからIleへの変化がこの付近の立体構造に影響を与えて、キモトリプシンの働きを容易にしていると考えられる。109位のAsnからAspへの変化はプロテアーゼ感受性とは無関係である(Itoh, Homma)。

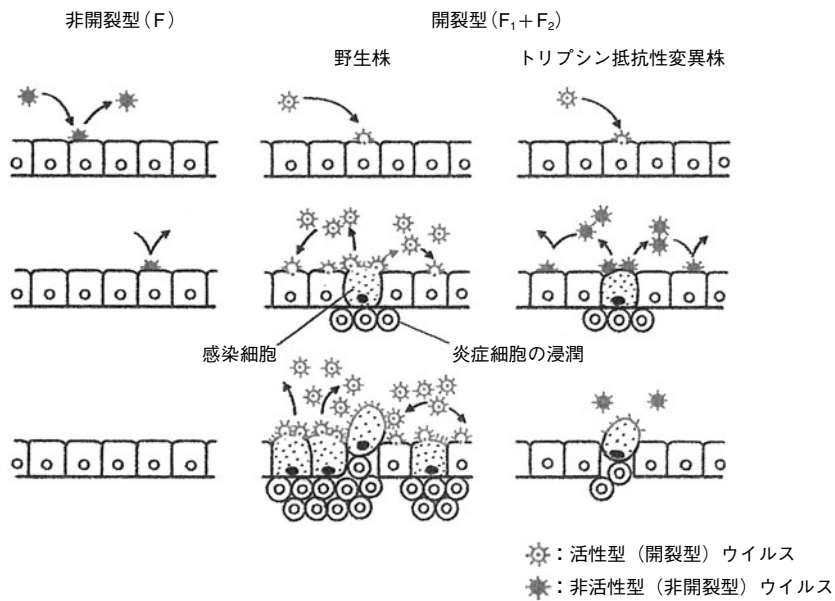


図4 センダイウイルスのマウス肺病原性の発現機序

非開裂型のFを持つ非活性型L-Sendaiは、肺上皮細胞に吸着はするが細胞内へ侵入できず、感染は成立しない(左)。開裂型のF (F₁+F₂)を持つ野生型のEgg-Sendaiおよびトリプシン活性化後のL-SendaiとTSrevは、細胞内に侵入し娘ウイルスを産生する。肺の中にはトリプシン様プロテアーゼがあるので、ウイルスは常に活性化された状態にあり、多段階増殖の結果、感染は肺全野に広がる(中央)。一方、トリプシン抵抗性TRのFをキモトリプシンで開裂活性化後に感染させた場合は、細胞内に侵入し娘ウイルスを産生するが、肺の中のトリプシン様プロテアーゼでは活性化されず、一段増殖に留まり、感染が全肺野に拡大することはない(右)(田代、本間原図)。

現状である。その点、TRは図3に示したように分子レベルでの弱毒化の機構は明らかになっており、生ワクチンとしての新しいモデルを提供したと考えている。

おわりに

研究を始めてから40年、いろいろな思いが忙しく去来するが、よくも飽きずに一つのテーマを追いつけられたものだと我ながら感心している。いま思うに、この仕事を続ける原動力となったのは、研究開始後間もなく出会った宿主依存性修飾現象にあった。この現象を、1958年のウイルス学会で発表した。これが私の処女口演であった。この現象は非常に単純で、多くの研究者の関心を引き質問攻めにあつたあげく、演壇を降りたのは1時間後、制限時間の15分を優に超えていた。その中でM.Y.教授から、自分達も同じような仕事をしているが、我々のウイルスはHA活性だけを持った核酸の無い不完全粒子で、お前のL-Sendaiもそれと同じだ、との内容の大変厳しいコメントを頂いた。私には、L-Sendaiは彼らのとは違うとの自信はあったが、決定的な証拠は無く、この疑いを晴らそうとの執念が、センダイウイルスの研究を深化させていった。数年後、トリプシン処理でL-Sendaiを活性化することに成功したが、ここに至る迄の楽屋裏の詳細については割愛した。それまで教科書的には、ポリオウイルスはトリプシン抵抗性、センダイウイルスは感受性といった記載がなされていたが、その知識が却って研究の妨げになった。私のL-Sendaiの活性化に関するすべての実験結果は、トリプシンの標的はウイルス粒子そのものであることを示唆していたが、実際にトリプシンで処理すると、ウイルスは教科書の記載どおり忽ち不活化されてしまった。後で思うに、教科書に言うトリプシン感受性とは、ウイルスを分類するための便宜的なもので、当時はトリプシンでウイルスが活性化するなどということは、誰も考えもしなかった。このお蔭で大分遠回りをさせられたが、最終的には非常に薄いトリプシンを用いる

ことで、L-Sendaiを活性化することができた。研究を進めるには、いろいろな知識は必要ではあるが、研究者たるもの、既存の知識や常識に捉われてはならぬ、との貴重な教訓を得た。溶血現象や細胞融合現象がL-Sendaiの感染性の活性化と連動しているとの発見は、本稿では紙面の関係上余り触れなかったが、それまで謎の多かったこれらの現象の機序の解明に大いに貢献したと自負している。トリプシンによるL-Sendaiの感染性活性化のメカニズムを理解するには、アメリカのMorgan教授のエンヴェロプ融合説がタイミング良く用意されていた。丁度その頃、日米医学の研究会が札幌であり、彼もそれに参加していたが、口演を終えた若い研究者(当時)に、彼から惜しめない賛辞と激励の言葉を頂いたことは、今でも記憶に新しい。

センダイウイルスによるマウス肺病原性の解析から、宿主の提供するプロテアーゼが病原性の発現に関与していることを初めて示したが、この「プロテアーゼ依存性感染症」の研究が、今後ヒトの感染症の場でも進められ、さらにその治療薬としてのプロテアーゼインヒビターの開発に向けての研究が期待される。秋も深まり、巷ではインフルエンザの流行に備えたワクチンの接種が行われている。研究室レベルでは、インフルエンザウイルスでもプロテアーゼ活性化の研究が進められているが、本稿のセンダイウイルスで示したプロテアーゼ変異ウイルスのワクチン応用への研究も、試みる価値はあると思っている。

これまでの研究を省みるに、色んな障壁を自力で乗り越えて来たとの思いはあるが、それ以上に国内外の先達の残してくれた業績が、直接、間接的に、折々の仕事の支えになっていた。また言うまでも無いことだが、この研究には多くの有能な共同研究者の助けがあった。いちいち名前を挙げる暇は無いが、本稿を進めるに当たっては、当時を回想しながら、久し振りに彼ら一人一人との頭の中での邂逅を楽しませてもらった。このような機会を与えて頂いたモダンメディアの編集委員の方達に、改めて感謝の意を表したい。