随 筆

私のウイルス研究

—ボックスウイルスから水痘ワクチン開発へ—

高橋 理明

(大阪大学名誉教授)

私は昭和29年阪大医学部を卒業し、昭和30年4月大学院医学研究科学生として微研感染病理学で勉学を始めた。大学院生活が始まってみると感染病理学部という名ではあったが実際にはウイルス学の研究、それも今から考えるとまさにウイルス学の揺籃期における勉学であった。未だ培養細胞のなかった当時、単細胞としてマウスのエールリッヒ腹水癌細胞が重用されており、先づその系を用いてエクトロメリアウイルスの増殖をしらべることを手伝った。そしてそのウイルスがエールリッヒ細胞に感染するとA、B2種類の封入体ができるが、その封入体とウイルス抗原性との関係を知るために当時米国のCoons博士によって開発されたばかりの蛍光抗体法でしらべるのが私に与えられたテーマであった。蛍光色素 fluorescein isocyanate の合成法を当時理学部の有機化学教室の芝哲夫博士（当時助手、現阪大名誉教授）に親切に指導して頂いたことを思い出す。ボックスウイルスには家兎粘液腫 (rabbit myxoma)、センイ腫があり、特に粘液腫は極めて致死性である。このウイルスを皮下に注射すると良性腫瘍ができるが全身感染をおこして死亡する。その封入体の抗原性をしらべるのに早速蛍光抗体法を応用した。ところが抗 myxoma 抗体をつくるのに生きたウイルスでは家兎は死ぬし、不活化ウイルスでは強い免疫ができない。

そこでウイルス液を紫外線で不活化し、その照射時

間を10分、8分…と漸次短くして一週間毎に注射すると10⁶の致死量を注射しても何の病変もおこさない程の強い免疫ができた。その抗血清を用いると封入体の箇所に鮮明な蛍光がみられた。ところでボックスウイルスにはワクチニアエクトロメリアなどのグループと rabbit myxoma, fibroma のグループ、fowlpox のグループと大きく分けて3つのグループがあり、そのウイルス粒子の大きさ、形態は似ているが抗原性の交叉はないとされていた。私はどうも納得がいかず、幸いに自分で作った抗 myxoma の強力な抗体があるのでそれを用いてエクトロメリア感染エールリッヒ細胞、ワクチニア感染細胞を染めてみた。いずれもB型封入体に一致して鮮明な蛍光がみられた。念のために補体結合反応でしらべても明らかに交叉陽性の成績がえられた。その結果を当時発刊されて間のない Biken Journal で発表したところ、早速ボックスウイルスの大家であるオーストラリアのFenner博士から非常に興味があるのでその血清を送って欲しいとの手紙が届いた。Fenner博士は私共の成績を確認し、共通抗原はウイルス粒子の nucleoprotein にあると「Virology」に発表した。そしてウイルスの分類に関する成書に、ボックスウイルス群に共通抗原の存在することが私共によって見出されたと記載された。それは大学院時代の仕事として私にとって大変嬉しかったことであり、又通説であっても必ずしも正確でないこともあり、時には自分で慎重にしらべる必要があるということも痛感した。

大学院修了後、微研の麻疹研究部に助手として採用された。麻疹研究部では、奥野教授が麻疹ワクチンの開発に全力を注いでおられたので、そのお手伝いをすることになった。奥野教授は麻疹以外にもインフルエンザ、ポリオの生ワクチンの開発にも意欲を注いでおられ、私は鶏胚細胞を用いたポリオウイルスの弱毒化

Retrospect of my study on viruses—from poxvirus to development of varicella vaccine

Michiaki Takahashi

Emeritus Professor of Osaka University

Director, The Research Foundation for Microbial Diseases at Osaka University

3-1, Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-1

の研究をも命ぜられた。結果的には当時既にセーピンの生ワクチンが開発され、世界的に実用化されようとしていた時期であったので、私のポリオ研究は実を結ぶことはなかった。しかし安定でしかも弱毒マーカーのはっきりしたポリオウイルスの弱毒化の研究で得た経験は大きかった。ポリオウイルスはニワトリ胎児細胞では殆ど殖えないが、感受性のあるサル腎細胞と交互継代すると、4～5代の継代で温度感受性などのマーカー、及びサルの脳内接種において著明な弱毒化がおこることを知った。このことは後に水痘ワクチンを開発する際に大いに参考になった。

1963年10月からロックフェラー財団の奨学金を得て米国に留学することになった。丁度その前年アデノウイルス12型を哺乳ハムスターに注射すると、腫瘍が発生するということが米国で報告され、癌とウイルス関係者にセンセーションをまきおこしていた。私は以前からヒトウイルスによる発癌に興味をもっていたので、報告者のヒューストンのペイラー大学のTrentin博士の下に留学した。Trentin博士はウイルス学者ではなく、マウスを用いた癌の生物学的研究者であり、アデノウイルスの発癌のメカニズムの研究という私の所期の目的には必ずしも適当なところではなかったが、同じペイラー大学医学部にウイルス研究者として有名なメルニック博士がウイルス学、疫学部門を主宰しておられ、そのRapp博士と知り合う機会を得た。同博士はその後新設されたペンシルバニア州立大学医学部の微生物学部門の主任教授として赴任され、1990年引退されるまで親交を結ぶこととなり、1969年より私共の研究室から荻野武雄（現広島市衛生研究所長）、山西弘一（現阪大医学部微生物学講座教授）、白木公康（現富山医科薬科大学教授）、早川安彦博士（現仙台市衛研微生物科長）らが次々と留学した。

ヒューストンには1年滞在したが、縁あって2年目はフィラデルフィア、テンプル大学医学部のフェルズ研究所に日本から留学しておられた山本信人博士の研究室でバクテリアファージの遺伝学を学んだ。たまたまこの研究室に名古屋大学小児科から古川宣博士（その後金沢医大微生物学教授）が留学して居られ、机を並べて研究することとなった。そこに1年滞在した後帰国したが、古川博士はその後ペンシルバニア大学ウィスター研究所のPlotkin博士の下でサイトメガロウイルスの研究に長期従事された。その縁でのちに私が水痘ワクチン開発の研究を行うこととなったとき、風疹ワクチンの開発者であり、小児科領域でのワクチンの権威者であったPlotkin博士から多大の助力をうけ

た。米国留学を振り返ってみると研究としての業績は余りあげられなかったが、思いがけない人脈が得られ、結果的には後の私の研究に役立つ大きな恩恵をうけたと思っている。

1965年末帰国後アデノウイルスによるトランスフォーメーションについての研究を始めた。当時アデノ12型は腫瘍原生、5型は非腫瘍原生の代表とされていた。この両ウイルスをしらべてみるとヒト培養細胞ではどちらも増殖するが、ハムスター細胞では5型は増殖するが、12型では増殖せずごく一部の細胞がトランスフォーメーションをおこす。そこで5型でもハムスター細胞で非増殖性にすればトランスフォーメーションをおこる可能性があると考え、5型ウイルスの温度感受性変異株、宿主依存性変異株を多数分離した。予想通りこれらの変異株はハムスターの継代細胞株（Nil）でトランスフォーメーションをおこすことがわかった。その頃から制限酵素によるDNA解析がすみ、5型、12型とも5'末端にEIAと称されるトランスフォーメーションに関連する遺伝子が証明された。しかしアデノ12型の腫瘍原性が証明された当初予想されたヒト癌との関係については、Trentinらが精力的にヒト癌組織中にアデノウイルス特異的腫瘍抗原をみつけようとしたが成功せず、ヒト培養細胞でもトランスフォーメーションは全く証明されず、アデノウイルスとヒト癌の関係は否定的となった。

1971年、さきのRapp博士らが紫外線で不活化した単純ヘルペスウイルスによってハムスター培養細胞のトランスフォーメーションがおこることを発表し、世界的な注目を集めた。当時単純ヘルペス2型ウイルスが子宮癌と関係があるのではないかと、その血清疫学が盛んに行われていた頃である。私はアデノウイルスでの成績からみて条件変異株を得れば、紫外線で不活化しなくてもトランスフォーメーションの研究が進められるのではないかと、そうすればヒト癌との関係の研究も進めやすくなるのではないかと考えた。そこで大学院を終えていた山西弘一博士の協力を得て多数の単純ヘルペスウイルスの温度感受性変異株を分離した。そしてハムスター、ヒト培養を用いてトランスフォーメーションの研究を行なったが、アデノウイルス以上に困難であり、ハムスター培養細胞では辛うじてトランスフォーメーション細胞が得られたが、ヒト培養細胞では多大の努力をしてもついに継代できるトランスフォーム細胞は得られなかった。単純ヘルペスウイルスのヒト癌との関連性については現在は疑問視されている。

一方奥野教授によるウイルス生ワクチンの開発研究は麻疹ワクチンの後、ムンプス、風疹ワクチンと進められ、1972年頃にはどちらも実用化の目途がついた状態になり、残された主要な小児の感染症でワクチンが望まれているのは水痘となっていた。水痘については私には格別の思いがあった。私事にわたって恐縮であるが、米国留学中私の3才の長男が水痘にかかり、水疱が全身に広がり高熱が3日間もつづき、これは軽視できない病気だと思った。そのとき以来水痘がワクチンによって予防できればとの思いは絶えず私の念頭にあった。

しかし水痘ウイルスはいわゆる cell-associated の性質をもっていて、cell-free のウイルスを得にくいことはよく知られていたのでワクチンの開発は容易ではないと予想していた。もう一つの問題はヘルペスウイルスの一つとして latency の性質があり、水痘ウイルスの場合、将来の帯状疱疹の発病の可能性を考慮する必要があった。水痘ウイルスの最初の分離者である Weller 博士は、水痘ウイルスについての総説の中で、潜在性の問題があるので水痘のワクチン開発は困難であろうと述べていた。しかしよく考えてみれば水痘は自然に殆どの小児がかかる疾患であり、latency はワクチンウイルスで特におこる問題ではない。そして latency と関連して考えられる発癌性の問題も水痘ウイルスでは全く証明されていない。ハムスターでの腫瘍原性ははっきりしているアデノウイルスでもヒト細胞でのトランスフォーメーションはおこらない。単純ヘルペスウイルスも新生のハムスター接種にでさえ腫瘍をつくらないし、ヒト培養細胞でもトランスフォーメーションは証明されない。これらの事実及び自らの研究から水痘ウイルスがヒトの癌と関連しているとは到底考えられず、もし水痘ワクチンが開発できれば、そのもたらす利益は極めて大きいであろうと確信をもって水痘ワクチンの開発を進めた。

水痘ウイルスは当時大阪警察病院小児科部長をしておられた丸山義一博士に依頼し、患者の水疱液を採取してもらい、私自身が警察病院に赴いてそれを受取り、その患児が岡という姓であったので、分離したウイルスを岡株と名付けた。1972年のことである。今や

水痘ワクチン株として Oka strain は世界的に有名となっているが、その当時は思いもしなかったことである。

弱毒化には従来の方法で、しかも確率の高い方法を用いることとした。そのときにかつてのポリオウイルスの弱毒化の経験が役立った。水痘ウイルスは極めて宿主特異性が強くヒト以外の動物細胞では殆ど増殖しない。しかしモルモットの胎児細胞ではある程度増殖することがわかったので、モルモット細胞を継代に用いることにした。岡株ウイルスを最初やや低温の34℃でヒト細胞に11代継代したのち、モルモット胎児細胞で12代継代した。継代後のウイルスは39℃でやや温度感受性であり、モルモット胎児細胞に対する吸着性や増殖性ももとの株や他の株より高まっていることがわかった。実際最近になって岡原株とワクチン株の塩基配列の違いについて、Immediately Early (IE) gene 62のところに集中して変異がおこっていることがわかった。これは恐らくモルモット細胞に継代中におこったと思われる。IE gene は水痘ウイルスの増殖の初期に関係している重要な gene であり、弱毒に関連している可能性が大きい。

水痘ワクチンの臨床研究については浅野喜造博士（現藤田保健衛生大学教授）、神谷齊博士（現国立三重病院長）馬場宏一博士（阪大小児科講師、現開業）等多くの方の熱心な協力を得た。国外に於ても Gershon 博士（現コロンビア大学教授）Plotkin 博士らの協力があり、幸いにして水痘ワクチン（岡株）は世界的に使用されつつある。

振り返ってみると、私のウイルス研究はボックスウイルスに始まり、麻疹、ポリオ、アデノ、単純ヘルペスとうつりかわり、水痘ワクチンの開発へとたどりついた。大学院以来の10年間位は、自分は研究者としてやっていけるのかという不安感のようなものはずっとあった。研究者としての生活は普通30年以上に及ぶことが多いが、その中で実際自ら没頭できる期間はそんなに長くはないと感じる。若い研究者の方々は今を大切に、深く且つ広い視野をもって研究を進められることを期待して、私のつたない寄稿としたい。