

マウスノロウイルス

池 郁生

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター実験動物開発室

要 約

マウスノロウイルス (MNV) は 2003 年に RAG2/STAT1 両遺伝子欠損マウスから分離報告された新しいウイルスである。MNV は、マウスの病原体としてと、ヒトのノロウイルスのモデルとしての 2 点から注目されている。マウス病原体としては、一部の免疫不全系統で致死性である一方で、ほとんどの健康なマウスでは感染しても無症状である。しかしながら MNV の環境安定性は高く、また持続感染する例が多い。現在、国内での汚染状況の把握が進行中であり、多くの動物実験施設で MNV 感染が見つかっている。帝王切開や胚移植で清浄化が可能である。病原性研究の進展、検査体制の整備や汚染状況を見ながら、微生物コントロールの対象とすべきか議論されている。ヒトのノロウイルスのモデルとしての MNV は、感染マウスでヒトのような急性胃腸炎を示さないが、ノロウイルス属で唯一 MNV が細胞培養で増殖可能であること、ヒトノロウイルスとの物理性状の類似性、潰瘍性大腸炎やクローン病といった多因子性疾病のコントリビューターとしてなど様々な観点から急速に研究が進んでいる。

1. 病原体：マウスノロウイルス Murine norovirus (MNV) (科名：カリシウイルス科, 属名：ノロウイルス属)。症状：無症状, 死亡

a. 形態・ゲノム構造・タンパク質

ほぼ球状の正 20 面体でエンベロープを欠く。1 本鎖のプラス鎖 RNA (サイズ：7.4 kbp) で、3' 末端にポリ A を有し、5' 末端には RNA の感染性に必須な分子量 14.3 kDa の VPg と呼ばれるタンパク質が共有結合する。3 つの ORF が存在する。ゲノムの 5' 側に非構造タンパク質が、3' 側に構造タンパク質がコードされている。分子量約 60 kDa のカプシドタンパク質 1 種類が主要構造タンパク質 (VP1) である。VPg とは別に分子量 22 kDa のタンパク質 (VP2) がポリオン中に存在すると考えられている。ピコルナウイルスと相同性を有する非構造タンパク質として、ヘリカーゼ, プロテアーゼ, RNA 依存性 RNA ポリメラーゼが知られている。

b. 増殖

細胞質内で増殖し、感染細胞内には 2 種の主要なプラス鎖 RNA が検出される。ゲノムサイズの RNA は非構造タンパク質の mRNA として、サブゲノムサイズの RNA はカプシドタンパク質と 3' 末端の小さ

な ORF の mRNA として機能する。非構造タンパク質はポリプロテインとして翻訳され、ウイルスのプロテアーゼにより開裂し成熟した各種非構造タンパク質となる。ゲノムサイズの 2 本鎖 RNA が存在することから、ネガティブ鎖を介して複製が行なわれるものと考えられている。

c. 培養

MNV はマウスの樹状細胞およびマクロファージ系細胞でよく増殖する。マウスマクロファージ系腫瘍細胞株である RAW264 細胞および RAW264.7 細胞に感染させて増殖させることができる。

d. 株

MNV では、多数のウイルス株が世界各地で分離されている (MNV-1, MNV-2, MNV-3, MNV-4, S7 など)。ノロウイルス属には、ヒトのノロウイルス (NV) のほか、ブタノロウイルス, ウシノロウイルスが知られ、VP1 遺伝子の塩基配列を基にしたホモロジー解析で 5 つの genogroup (GI ~ GV) に分けられる。MNV の分離株はすべて GV に属する。

e. 物理化学的性状・不活化法

MNV は環境安定性が高いと言われる。これは、室温で 14 日保存した糞便から MNV を RT-PCR で検出

可能なことから推察される。一方、MNVは、カリシウイルス科のネコカリシウイルス(ベジウイルス属)と異なり、70%エタノール感受性が高く、瞬時に感染価が減少する。紫外線による不活化も有効である。

2. 感染様式

a. 感受性動物種

MNVはマウスだけが感受性動物とされている。ヒトのノロウイルス(NV)のほか、ブタ、ウシでもノロウイルスが知られているが、動物種間における交差感染の報告はない。自然免疫の機能不全マウスにおいて致死的な感染を起こす。肺、肝臓、脾臓、小腸などでウイルスは増殖し、病理組織学的には肝炎、間質性肺炎、腹膜炎、胸膜炎などが認められる。

b. 地理分布

アメリカやヨーロッパなど世界中のマウスが高頻度に汚染されており、2005年に報告された北米の研究施設を対象とした調査では約22%のマウスがMNV抗体陽性であった。国内のマウスの調査結果においても、本ウイルスの感染が確認されている。

c. 伝播経路

糞便中に排出されたウイルスが経口感染する。不顕性感染例でも腸管や腸間膜リンパ節では長期間感染が持続し、ウイルス排出は感染後8週間以上続くことが報告されている。MNVは同居によって容易に感染が成立する。マウス系統によって各臓器におけるMNV核酸量に差がみられる。MNVの垂直感染の報告はない。

d. 感染率および致死率

日本国内におけるMNVの汚染状況は調査が始まったばかりであるが、今までの報告によるとコンベンショナル施設におけるMNV感染率は高いと予想される。一方、長年に渡って多くの感染マウスが飼育されてきたにも関わらず、特定の自然免疫系の欠損マウスを除いて病原性を示唆する報告はほとんどない。以上の知見に基づけば、実験マウスコロニーで感染個体が発見されても、淘汰やクリーニング等の緊急対応は一般に不要と考えられる。今後、汚染状況や病原性に関する情報を集積しつつ、各施設の用途に合わせた対応方針を慎重に検討していくことが必要である。

e. 感染経過

Manuel, C.A.らの報告によると、4週齢のICRマウスを用いた同居感染実験の報告では、同居2週目ですべてのマウスの糞便がRT-PCRでMNV陽性、同

居4週目にすべてのマウスで抗MNV抗体陽性であった。MNV汚染床敷を用いた4週齢のICRマウス感染実験でも、遅くとも10週目にはRT-PCRでMNV陽性、12週目に抗MNV抗体陽性という。MNV感染マウスは3か月以上ウイルス核酸の糞便からの排泄が持続する。

f. 病理

免疫学的に正常な野生型マウスでは臨床的变化は軽微である。ウイルス株によりすぐに排除されるもの、持続するものがある。腸管膜リンパ節、腸管、脾臓などでウイルスは増殖する。病理組織学的変化は概して軽微とされる。

g. 病原性

通常、本ウイルスによるマウスの感染は不顕性である。ヌードマウスやscidマウスなどのT細胞やB細胞が欠如している免疫不全マウスでも不顕性感染となる。一方、STAT1欠損マウスやIFN $\alpha\beta\gamma$ レセプター欠損マウスなどのインターフェロン系自然免疫の不全マウスは本ウイルスに高い感受性を示し、脳炎、肺炎、肝炎を伴う致死的な感染となることが報告されている。

h. 診断

臨床的な診断は困難である。ELISAあるいはIFAによる抗MNV抗体産生や、RT-PCRによるMNVゲノムの検出により検査が可能である。MNV感染マウスでは持続感染例が多く、また糞便中でMNVは比較的安定であるので、検査個体が抗MNV抗体陽性あるいはRT-PCR陽性であった場合、同一系統の個体もMNV陽性であること、そして抗MNV抗体陽性個体のケージから採取した糞便がRT-PCRでMNV陽性となることも多い。

i. 実験への影響

インターフェロン系機能に異常があるマウスでは、臨床症状を現し死亡率も高いため、本ウイルスを排除する必要がある。一方、通常のマウスにおける不顕性感染例でMNVが実験成績に影響を及ぼしたとの報告は少ない。しかし、MNVがマクロファージで増殖することから、マクロファージ機能やインターフェロン応答、特に腸管免疫系を解析する実験では問題となる可能性がある。また、以下の感染モデルの項で述べるように、炎症性大腸炎やクローン病のモデルでMNVが憎悪因子となる報告がある。MNVに関する論文は、ここ2009年頃から爆発的に増えているため、今後もMNVが実験へ影響する報告がなされる可能性があり、継続的な情報収集が必要である。

3. 感染制御 / 予防

a. バイオセーフティ

一部の免疫不全マウスで病原性が確認されていることから、MNV はバイオセーフティレベル 2 に分類されている (下記の 5. d 項参照)。今後、国内での検査体制の整備や汚染状況の把握が進み次第、国立大学法人動物実験施設協議会が策定した「実験動物の授受に関するガイドライン」および「感染動物実験における安全対策」への追加も検討される予定であるが、現時点では未決定である (上記 2. d 項も参照のこと)。

b. 清浄化方法

MNV 感染マウスからのウイルス排除には、帝王切開や胚移植が有効である。

4. 検査方法

a. 分離

一般に糞便等からウイルス分離を行う際は、RAW264 系細胞が用いられる。

b. 抗体検査

精製 MNV や組換え抗原を用いた抗体検査 (ELISA, IFA) が実用化されているが、市販の診断キットはない。日本チャールス・リバー株式会社モニタリングセンターでは MFI 法による血清検査を請け負っている。

c. PCR

盲腸内容物や糞便などから MNV の核酸を検出する RT-PCR 法が実用化されている。MNV 陽性検体が入手できる場合は自家検査も可能である。実験動物中央研究所 ICLAS モニタリングセンターに RT-PCR 検査を依頼することができる。

d. 組織病理学

免疫染色により、腸間膜リンパ節や脾、小腸、肺などのマクロファージ・単球・小腸上皮細胞に MNV 抗原が検出される。

5. 感染実験

a. 感染症モデル

炎症性大腸炎: *Helicobacter bilis* 感染マウスに MNV を共感染させると大腸の病理組織学変化が憎悪する。

クローン病: クローン病感受性遺伝子である ATG16L1 を低レベルで発現させたマウスはパネート細胞の抗菌ペプチド分泌産生に異常が生じるが、

MNV はこのマウスに持続感染し、パネート細胞にインターフェロン γ や腫瘍壊死因子 α といった pro-inflammatory サイトカイン遺伝子発現を誘導し、デキストラン硫酸ナトリウム投与に反応して腸に潰瘍を起こすことから、クローン病様症状発症のコントリビュータとして働くのではないかと言われる。

b. 封じ込めレベル

国立感染症研究所では MNV について、病原体のバイオセーフティレベル (BSL), 感染実験の動物バイオセーフティレベル (ABSL) とともにレベル 2 としている。

謝辞

本ウイルスの日本における研究はまだ中途にあり、本項記述には、久和茂先生 (東京大学), 遠矢幸伸先生 (日本大学), 國田智先生 (筑波大学), 後藤一雄先生 (帝京大学), 片山和彦先生 (国立感染症研究所), 山田靖子先生 (同), 酒井宏治先生 (同), 高木弘隆先生 (同) など多くの研究者の講演・意見を参考にした。著述については文献欄に記載したが、学会発表等については記載していない。皆さん、色々ありがとうございました。

主要文献

- ・ Karst, S.M. *et al.* 2003. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* 299: 1575–1578.
- ・ Hsu, C.C. *et al.* 2006. Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine noroviruses. *Comp. Med.* 56: 247–251.
- ・ Henderson, K.S. 2008. Murine norovirus, a recently discovered and highly prevalent viral agent of mice. *Lab. Anim. (NY)* 37: 314–320.
- ・ Manuel, C.A. *et al.* 2008. Soiled-bedding sentinel detection of murine norovirus 4. *J. Amer. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 47: 31–36.
- ・ Goto, K. *et al.* 2009. Molecular detection of murine norovirus from experimentally and spontaneously infected mice. *Exp. Anim.* 58: 135–140.
- ・ 久和 茂. 2009. マウスにおけるマウスノロウイルス感染症. *Labio21* 38: 6–8.
- ・ 後藤一雄. 2009. わが国の実験用マウスにおけるマウスノロウイルスの汚染状況. *Labio21* 38: 9–13.
- ・ 遠矢幸伸. 2003. カリシウイルスと感染症. 獣医微生物学第二版 (見上 彪監修), 文永堂出版, 東京.