



[100巻記念特集号によせて]

Multiplicity of Infection (MOI) – 教科書に書かれていらないウイルス学Ⅱ –



白 澤 浩

(2024年9月10日公表)

Key words: ウィルス学, multiplicity of infection, MOI, 最終講義

I. はじめに

「最終講義にかえて：教科書に書かれていらないウイルス学」[1]で、予告したMOI (Multiplicity of Infection)について教科書に書かれている内容、そして書かれていることを本稿では伝えたい。最初にお断りしておくが、本稿に関連することは、他分野の研究者から訊ねられることも度々であったので、大学院レベルの内容まで言及した。

MOIについて、教科書で詳細が書かれていらないのは、この概念が難しいからではない。概念は単純で、MOI=感染性のウイルス粒子数／細胞数であり、細胞にウイルスを感染させた時に、「1細胞当たりに感染する感染性ウイルス粒子数」と定義される。極めてシンプルな概念でありながら、そこから「導かれる理論は意外」で興味深い。しかし、臨床における実際のウイルス感染プロセスは複雑そして多様であり、現在の私達の理解は、そのプロセスを完全に説明できる域には残念ながら到達できていない。従って、MOIは現代の教科書のレベルを超えた内容を議論するために必要な基本概念ではあるものの、初学者には無用の長物に留まっているのが現状である。

II. Multiplicity of Infection (MOI) とは

Multiplicity of Infection (MOIあるいはm.o.i.)は、細菌に感染し、細胞を融解するウイルスであるファージ感染の研究過程で提唱された「ウイルスの濃度尺度」とも言えるもので[2]、欧米人の多くは、「エム・オー・アイ」と発音するが、日本人の研究者は、「モイ」と発音することも多い。私は、論文で記述する時には、一度スペルアウトした後に、‘an moiもしくは, an m.o.i.’と書くことしている。医学論文を検索すれば分かるが、MOIと省略される医学専門用語は沢山あるからだ。ただし、日本の研究者はMOIと書くことが多いので、本稿ではMOIと記すことにする。

すでに述べたように、MOIは、ウイルス感染細胞当たりの感染性ウイルス粒子数と定義され、ウイルスを薬剤と同じように考察するために導入された概念ではあるが、ウイルスは薬剤と同列で語れる程、単純ではない。最近は、細菌、寄生虫感染においても、MOIで感染動態を説明しようとする文献を散見するようになったが、その場合には「ウイルス粒子」を「細菌」や「寄生虫」に置き換える。

ウイルス研究者であれば経験的に知っているが、正確に予測できないことの一つに「ウイルス

千葉大学名誉教授、千葉大学大学院医学研究院分子ウイルス学

Hiroshi Shirasawa. Multiplicity of infection (MOI) – virology not in textbooks Ⅱ –

Professor Emeritus, Department of Molecular Virology, School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670.

Phone & Fax: 043-423-0740. E-mail: sirasawa@faculty.chiba-u.jp, sirasawa@gmail.com

Published September 10, 2024.

の増殖・回収」がある。そんな基本的なことを予測できないのかと意外に思うかもしれない。分かりやすい例で言えば、シャーレの細胞に2倍量のウイルスを感染させても、2倍量のウイルスが回収できるわけではない。むしろ少ないウイルスを感染させた方が、収量は上ることが多いが、ウイルス量が少な過ぎると、感染すらしない。正確に言えば、感染しているのだが、感染したように見えない。

インビトロでのウイルス感染実験を行ったことのない研究者は、「えっ?」と思うかもしれないが、ウイルス感染が単純ではない一端であり、考察は本稿の後半で述べる。しかも、顕微鏡で観察していくと、どの程度の細胞変性が起きている時がウイルス回収に最適かを言い当てることは、慣れた細胞と慣れたウイルスの組み合わせにおいて経験的にしかできない。そもそも、ウイルスを試験管内で増殖させること自体が多くのウイルスにおいて難しい。

研究論文において、ウイルス感染実験の条件に、最低限、用いた細胞とMOIの記述がなければ、信用に足りる論文とは言えないのだが、ウイルス感染のメカニズムには、私達が知らない複雑さが残されており、いまだに解決すべき問題がある[3]。

III. 何故、MOIを議論しなければならないのか

多くの学習者は、ウイルスが細胞に感染する典型的なイメージとして、1つのウイルス粒子が細

胞に吸着・侵入して、細胞内で増殖し、10~100倍のウイルス粒子が生じて、感染が広がるという図式を示され、見てきたかの如き説明を受ける。この感染は、lytic infection（融解感染）と呼ばれる（図1①）。この図1のイメージは、MOI=1の感染である。しかし、MOI=1では、ウイルス感染は成立しにくいことが知られている[4]にもかかわらず、分かりやすくシンプルに概念を伝えていることが仇となり、この図式を見た人は「ウイルス粒子は1個でも感染するものだ」と盲信してしまうことになる。

感染動態を既定する因子は、感染の速度、感染の効率、細胞の感受性（ウイルスレセプターの発現度等）、等々様々だが、理論的に重要なのは、

A) 感染する細胞の比率

B) 感染性を有するウイルス粒子（感染性ウイルス粒子）の数

であることが分かっている。つまり、MOIによって既定される。結局、ウイルスも容量依存（dose effect）性に作用するということだと思うかもしれないが、ここで、一つ落とし穴がある。「感染性ウイルス粒子数」とは何なのか？ということであるが、物理的なウイルス粒子のうち実際に感染性を有する完全なウイルス粒子は一部であると、当座は理解して頂いて、詳細は後ほど考察する。

およそのイメージとして、ウイルス粒子は1/10~1/100程度の粒子しか感染性がないと考えられている。感染性ウイルス粒子数は、plaques・アッセイ（plaque formation assay）に

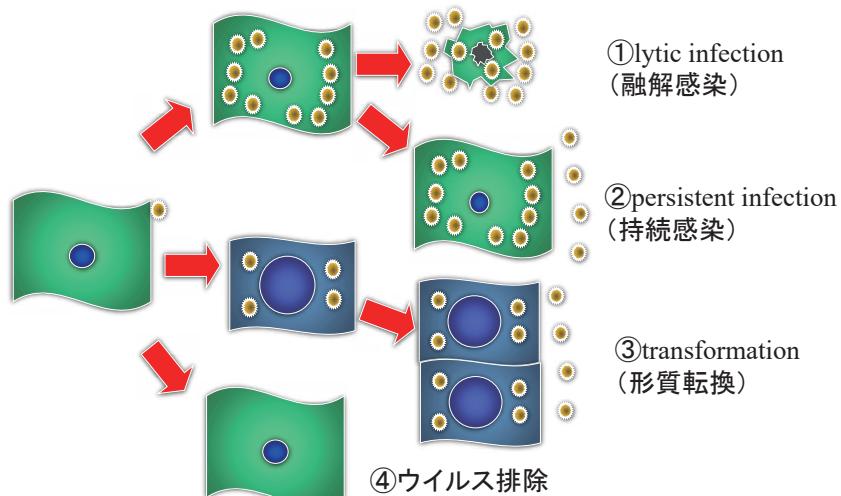


図1 ウイルス感染細胞の運命

よってのみ算定され、その絶対数は pfu (plaque formation unit) を単位として表わされ、pfu/ml を PFU と書くことが一般的である。ウイルスの定量法として、学生実習でも行う TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose 50)* も簡易的に用いられ、pfu と比例関係にあると考えられ、相対的なウイルス量の比較には用いても良いが、絶対数を求めるための定量法ではない。plaquer・アッセイは手技的に難しく、かつて、学生実習でplaquer・アッセイを行ったこともあったが、成功率が低いため止めた経緯がある。しかし、医学論文において MOI と共に pfu が感染実験条件として記述されていなければ、その文献データの信頼性は疑った方が良い。pfu に対して、物理的なウイルス粒子数は、タンパク量や核酸量などから推測することが可能で、PU (particle unit) 等で表される。一般的に、pfu < PU の関係が成り立つ。

*TCID₅₀は、50%の細胞に細胞変性効果 (Cytopathogenic effect, CPE) が生じるウイルス量を1 TCID₅₀と定義し、CPE を観察するタイミングにより変動するものの、タイミングは既定されていないため、相対量の評価にしか用いられない。

IV. ウィルスの細胞感染

MOI の説明に移る前に、前提となる細胞のウイルス感染について、理解しておく必要がある。ウイルスの感染は、宿主細胞へのウイルス粒子の吸着、侵入、複製、ウイルス粒子の放出というプロセスを経る。この分子メカニズムは、近年の分子

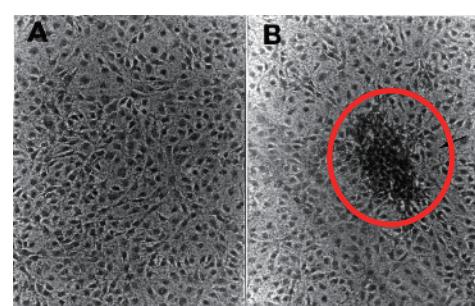
生物学的手法を用いた研究により、極めて詳細が理解されるようになった。だから、ウイルス感染のプロセスを全て理解したとするのは早計である。しかし、現象自体は極めて重要なので、学生実習でもウイルスによる CPE を観察してもらっている。

ウイルスが感染した細胞の運命は少なくとも 4 通りある。通常、教科書的には「ウイルス排除」を除く 3 通り、もしくは「形質転換」を更に除いた 2 通りが説明されている。

1. 融解感染 (lytic infection): 感染細胞では、アポトーシスが誘導され、ウイルスが放出され、放出されたウイルスは他の宿主細胞に感染し、増殖する (図 1, 図 2 融解感染)。つまり、この感染様式では、細胞死が誘導される。赤線で囲んだ部分の変化 (図 2, 左パネル: 赤線で囲んだ部分) は、CPE と呼ばれ、細胞が変性もしくは細胞死に至りシャーレの底面から剥がれている。一方で、青線で囲んだ部分の細胞 (図 2, 左パネル: 青線で囲んだ部分) のように生存している部分もあることに注目して欲しい。一般的に、MOI が高ければ、CPE はこのように巣状に出現した後に、全体に広がり、最終的に全細胞が死滅する。

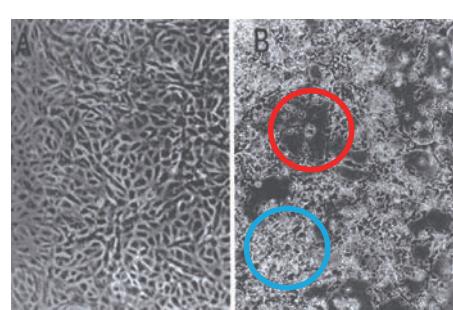
教科書的には、上記のように説明にされているが、実は、MOI が低い時には、CPE が消失し、健常状態に復帰し、ウイルスが消失してしまう場合がある。詳細に調べると、ウイルスは一度増殖した後に減少し、図に示した細胞とウイルスの組み合わせ (Vero 細胞と Sindbis virus) では、ウイルスは 1 週間ほ

transformation(形質転換)



A: マウスC127細胞
B: パピローマウイルスによりトランスフォームし
フォーカス形成したC127細胞。

lytic infection (細胞融解)



A: Vero細胞
B: SindbisウイルスによりCPEを呈したVero細胞

図 2 ウィルスの増殖と病原性

どで消失してしまう[5]。アポトーシスも一時的に誘導されているのだが、生存した細胞が増殖し、死滅した細胞の隙間を埋めて正常状態に復帰する。これは、**抗ウイルス応答**(antiviral response)によるウイルス排除であり、いわゆる免疫細胞が存在していなくても、ほとんどの細胞はウイルスを排除する仕組みを本来的に持つており、自然免疫(innate immunity)とも呼ばれる。このウイルス排除の主役はtype Iインターフェロン(IFN)である[5]。通常のアッセイでは、この状態は「感染性ウイルス=0」と判定される。

2. **持続感染**(persistent infection): 感染細胞内で、ウイルスが増殖するものの、著明なCPEを示すことなく、ウイルスが放出され、感染が持続する。仮に、この感染をシャーレの中で再現しても、細胞の顕微鏡観察からは判別が難しい(図1持続感染)。
3. **形質転換**(transformation): 感染細胞で、アポトーシスが誘導されることなく、むしろ細胞増殖が促される場合がある。放出されたウイルスは、他の宿主細胞に感染し、増殖する(図1形質転換、図2右パネル)。これらのウイルスは「**腫瘍ウイルス**」と呼ばれる。つまり、この感染様式では、細胞死は誘導されず、むしろ、細胞死は抑制されている。
4. **ウイルス排除**: ウィルスが細胞に感染しても、抗ウイルス応答(antiviral response)あるいは高次の免疫応答によりウイルス排除に成功しうる(図1ウイルス排除)。高次免疫応答の中和抗体によるウイルスの侵入阻止や細胞性免疫による感染細胞の排除により感染が防御される場合もあるが、抗ウイルス応答は、RIG-I, MDA5, TLR, PKR等のRNAセンサーとtype I IFN等のcytokineが主役となる**細胞が持つストレス応答の一部**を成すもので、原始的な初期の免疫応答とも捉えられているが、RNA worldとDNA worldのせめぎ合い[1]の中で、細胞が獲得した基本機能と捉えることができる。少なくとも、私の研究室で用いていた系では、PKR(protein kinase R)が感染直後の最初期応答の中心的な役割を果たしていた[5]。

さて、ここまで説明をしておきながら気が引けるが、以上の説明は単に幾多の文献的観察に適合するように都合よく考えられた教科書的説明あるいは「医学常識」に過ぎない。

抗ウイルス応答自体は、古くから知られていたものの、比較的近年になって詳細が解明されつつあるということと、この段階でウイルスが排除されると、**感染していないと評価されてしまうため**、臨床的には感染防御への寄与の程度が過小評価されがちである。特に、疫学データから、この最初期の抗ウイルス応答が完全に抜け落ちてしまうために、多くのウイルス感染症で実態が不明のままアプローチできないか無視されている。うまく説明できないウイルス感染症の疫学データには、このメカニズムで説明できるものが多々あると私は考えている。

抗ウイルス応答は、感染防御の第一次防波堤であり、第二次防波堤としての高次の免疫応答に至る以前の感染の鍵を握っている。知らず知らずのうちに、多くのウイルス感染がこの段階で排除されていると考えられ、**感染自体は成立しているものの、「感染」と臨床的に捉えることが難しい**。

持続感染では、理論上、細胞死は誘導されないが、融解感染とウイルス排除が同時に存在しても持続感染となる。持続感染と混同されることが多いヘルペスウイルスの「**潜伏感染**(latent infection)」では、ウイルスは複製を停止し、粒子も放出されないとされる。ただし、ヘルペスウイルスは、融解感染もしくは持続感染を経た後に潜伏感染に移行すると理解するのが正しい。また、いわゆる潜伏期(latent period)の「**潜伏**」とも混同されるので注意されたい。

ここまで説明すると、「ウイルス感染」の定義自体が極めて曖昧なものであることに気付かれたと思う。「群盲、象(ウイルス感染)を評す」が、現在の私達がウイルス感染の理解について置かれている状況であることを知っておく必要がある。

V. 感染する細胞の比率

細胞数と感染性ウイルス粒子数が1:1、つまりMOI=1の感染を考えてみる(図3)。例えば、100個のバケツと100個のボールを用意して、各ボールは必ずいずれかのバケツに同じ確率で入るものとして、バケツめがけてランダムに100個のボールを投げ入れる。一体、何個のバケツにボールが入るだろうか?

答えは、「理論上、63%のバケツにはボールが入るが、37%のバケツには、ボールは入らない」である。あるバケツにボール1個が入る期待値は1/100なのだが、2個以上のボールが入るバケツが生じるために、全くボールが入らないバケツが生じてしまう。

同じ原理により、MOI=1で細胞にウイルスを感染させた場合、63%の細胞は感染するが、37%の細胞は感染しない。MOI=0.2では、感染細胞は18%であり、ほぼ直感に近いが、全ての細胞にウイルスを感染させようとすると、MOI=1では不十分であり、MOI=5程度までウイルス量を増やすと、ようやく99%程度の細胞にウイルスを感染させることができる。

この現象は、ポアソン分布により説明できると教科書には書かれており、ポアソン分布を熟知していれば、ポアソン分布により全く感染しない細胞は $1/e^{MOI}$ であるので、1つ以上のウイルス粒子が感染する細胞の比率は、 $1 - 1/e^{MOI}$ であることが分かる。

VI. ウィルスの細胞感染モデルの一般化 (ポアソン分布)

細胞がn存在し、ウイルス粒子が偏りなく必ず感染する(つまり感染性のウイルス粒子)と仮定する。

MOI=λとすると、各細胞にx個のウイルス粒子が感染する確率P(x)は、ポアソン分布により、

$$P(x) = \lambda^x / x! e^{-\lambda}$$

となる(証明は、二項分布のn→∞の極限を求めることによりできる。証明がないと納得できない方のために証明の概略を図4に記した)。

上記の式を暗記するか、必要な時に参照すると、様々な現象がポアソン分布に従うことを確認できるので、この式の意味を一度理解しておくことをお勧めする。

例えば、 $P(0) = 1/e^{\lambda}$ であるので、期待値1の事象が起こらない確率は、 $1/e \approx 0.37$ である。期待値2, 3, 4, 5の場合には、それぞれ $1/e^2 \approx 0.14$, $1/e^3 \approx 0.05$, $1/e^4 \approx 0.02$, $1/e^5 \approx 0.01$ となる。よく使うのは、期待値3(時として5)である。今、100種類のサンプルが同じ比率で沢山あったとしよう。ランダムにサンプルを100回ピックアップすると、37%の種類を逃してしまう。それでは、95%をカバーしたい時には、何回トライすれば良いだろうか? 答えは、300回である。生物学的な

MOI	$1 - 1/e^{MOI} (%)$
0.2	0.18 (18%)
1	0.63 (63%)
5	0.993 (99.3%)

ポアソン分布により、感染細胞の比率は $1 - 1/e^{MOI}$ となる

図3 Multiplicity of Infection (MOI) と感染細胞の比率

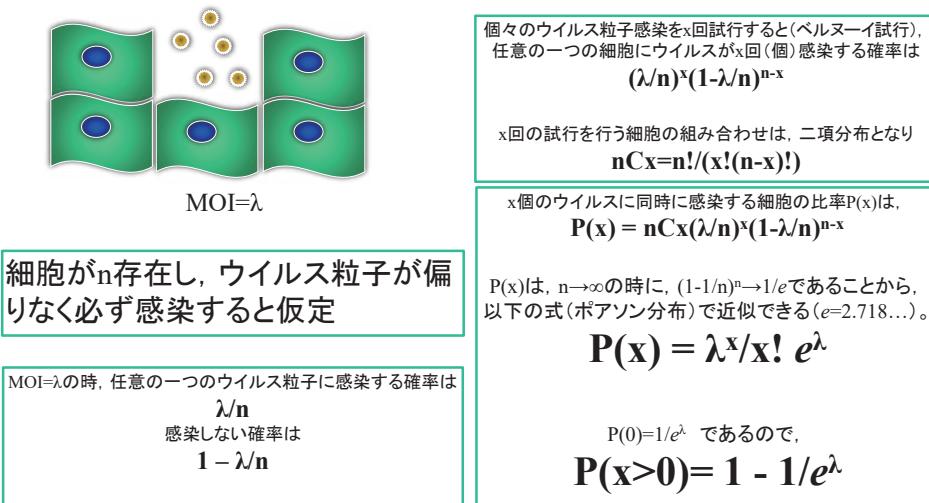


図4 ウィルス粒子の感染モデル（ポアソン分布）

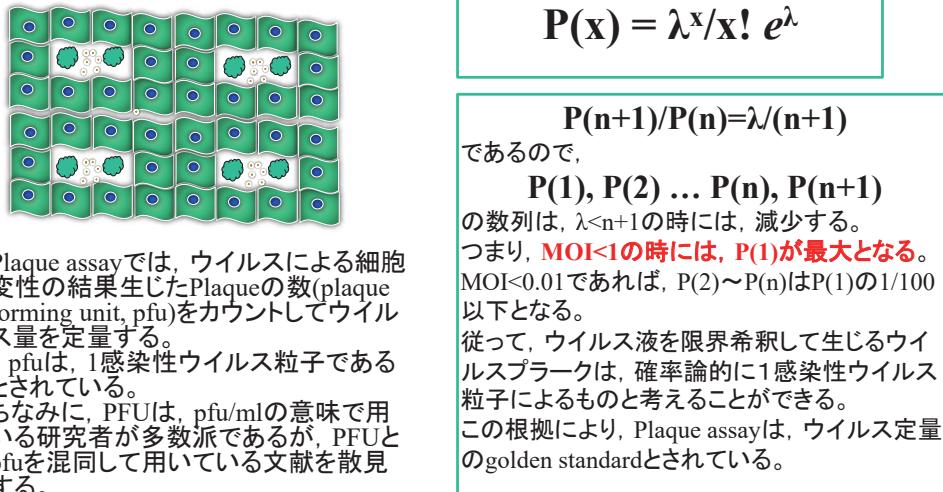


図5 MOI概念の応用 1 – plaque forming unit (pfu) によるウイルス定量

事象では、3回が好まれる。生物学実験は、最低3回行うべきだとされる根拠もある。余談だが、センター試験の足切り倍率を3倍と設定した根拠もある。後述するように、ウイルス感染実験では、私は $MOI >= 5$ を使うように指導している。 $MOI = 3$ でも良いのだが、 MOI 自体の誤差を考慮すると $MOI = 5$ の方が確実であると考えている。しかし、 $MOI = 5$ の実験条件が厳しい時には、 $MOI = 3$ も許容範囲と考えている。実際、予備実験では $MOI = 3$ で行うこともある。

VII. 感染性ウイルス粒子数と pfu

すでに述べたように、感染性のウイルス粒子数は、plaques・アッセイにより pfu として求める

が、 pfu が感染性ウイルス粒子数に等しいとする根拠は、ポアソン分布になるからだと、煙に巻くように教科書には書かれている（図5）。ポアソン分布による証明を図中に示したが、限界まで希釈したウイルス液を十分な数の細胞に感染させた場合（ MOI が極めて低い条件の場合）、2つ以上のウイルス粒子により形成されるplaquesが生じる確率が極めて低いことは、直感的に理解できる。

VIII. ウィルス感染実験の条件

ウイルスが感染することにより生じる細胞の変化を知りたい時、細胞と同数の感染性ウイルス粒子を感染させても、非感染細胞がバックグラウン

ドになるため、正確なデータを得ることができなくなる。

例えば、抗ウイルス応答により、感染直後から極めて短時間のうちに細胞はType 1 IFNの產生を行う。筆者が扱っていた実験系では、分単位で細胞は応答し、感染直後からType 1 IFNは、mRNA レベルで発現上昇し、定常状態では極めて低レベルのtype 1 IFNが幾何級数的に急上昇する。Type 1 IFNの初期応答は、ポジティブ・フィードバックを有しているため、波状に増強しながら、抗ウイルス状態が周辺細胞に波及して鉄壁の抗ウイルス状態を築き上げる。この抗ウイルス状態の反応の中には、アポトーシス誘導によるウイルス隔離も含まれている。ウイルスがアポトーシスを誘導するというよりも、ウイルスの増殖・拡散を抑制するために細胞は自ら死滅していると考えるのが適切である。Type 1 IFNは、產生細胞のみならず、隣接する細胞にも作用し、ゲノムの10%にも相当するISGs (interferon stimulated genes) が発現誘導される。これらの遺伝子群の発現は、感染細胞と非感染細胞では異なる制御を受けるものも多数存在すると考えられ、複雑な相互作用により MOI = 1での感染実験では再現性のある実験を行うのが極めて難しくなると考えられる。

それでは、一体どのくらいのウイルス量を感染させれば再現性のある実験が可能かを考えると(図6)、MOI = λ とした時のウイルス感染しない細胞の割合は、

$$P(0) = \lambda^0 / 0! e^\lambda = 1/e^\lambda \text{であることから,}$$

$$P(0) < 0.01 \text{つまり, } 99\% \text{以上の細胞に感染させる}$$

$$P(0) = 1/e^\lambda < 0.01 \text{を求める} \rightarrow \lambda > 4.6$$

通常の生化学実験においては、99%以上の精度があれば十分であるので、MOIを5以上に設定すれば良いことになる。MOI=10が設定できるのであれば、MOI=10くらいには上げたいと考える。実験条件とウイルスにもよるが、MOI=10~20前後が通常のウイルス調整液の限界である。

また、低いMOIでの感染実験の結果は、(感染細胞由来のtype I IFN等の影響を受けた) 感染していない細胞が混入したデータであることを考慮する必要があることも MOIとポアソン分布を知っていれば理解することができるが、この事象を考慮していない論文は多々ある。

IX. まとめ: MOIの問題点

MOIは、ウイルス感染を解析する時に、有用なツールであり、ウイルス研究者に必須のツールとなっている。しかし、いくつかの問題点があることにお気づきかと思う。主な論点を以下に挙げる。

1. 感染性ウイルス粒子とは一体何か? (ウイルス側の因子)

「感染性ウイルス粒子とは、構造、機能に欠損のないウイルス粒子である」と単純に考えることは出来ない。仮に、 $\Delta 1$, $\Delta 2$ それ

$$P(x) = \lambda^x / x! e^\lambda$$

近年、ウイルス感染による細胞の変化、あるいはウイルス自体の振る舞いを定量的に計測することが求められるようになってきた。

例えば、感染対象の全ての細胞が感染していることを保証するために必要なウイルス量を知る必要がある。

99%以上の細胞を感染するのに必要なMOIを λ とすると
 $P(0) < 0.01$ となるを求めれば良いので、

$$\lambda^0 / 0! e^\lambda < 0.01$$

両辺の対数をとって

$$\ln(1/e^\lambda) < \ln 0.01$$

$$-\lambda < -4.6$$

$$\lambda > 4.6$$

つまり、MOIを5以上で実験すれば、99%の精度が得られる。

図6 MOI概念の応用 2—ウイルス感染実験で用いるべきウイルス量

- ぞの形質が欠損しているウイルスが存在したとすると、両者が同時に感染すると互いに補完して感染性ウイルス粒子と同じ振る舞いをすると想定される。特に、インフルエンザウイルスのようにゲノムが分節しているウイルスでは、分節が欠損した非感染性ウイルスであっても、multiplicityが上昇すれば、相互の補完により感染性を獲得できるものと考えられる。一般的に、低いMOIでは感染が成立しないことは多くのウイルスで確認されている[4]。おそらく、多くのウイルスは、ある一定の集合体となって初めて感染性を獲得するものと想定されるが、ゲノムと構造が安定しているエンベロープを持たない小型のウイルス（例えば、ノロウイルス）等では、単体のウイルス粒子でも感染する確率は高いかもしれない。いずれにせよ、感染性ウイルス粒子の実体は未解明である。
2. MOIを算出する条件として、細胞の感染感受性が一定であることを想定している（細胞側の因子）

MOIが低い時には、特に感染初期において、細胞毎に抗ウイルス状態に確率論的(stochastic)な差が生じると考えられる。感染の初期に巣状のCPEが誘導される理由であると考えられる。抗ウイルス応答が極めて俊敏に起きる応答であることが分かって来たが、数量的に動態を予測することは現時点では出来ていない。おそらく、かなり複雑な数理モデルでも構築しない限り、予測不能のように思える。実験室で、ウイルスを増殖・回収するのが職人芸となっている理由はここにある。

3. *in vivo*でのMOIの意義。

細胞レベルでのウイルス感染の理解が進んだとしても、個体レベルでの感染は、高次の免疫応答、多臓器にわたる感染も因子として加わり、複雑・多様になっている。試験管レ

ベルの知見を*in vivo*に持ち込むのは、未だに難しい。結局、説明がつかない時には、免疫応答と臓器特異性のため等と理由をつけて、分かったつもりになっているだけである。事実、多くの不顕性感染のメカニズムが不明であり、持続感染も試験管内で再現するのは難しい現状から、我々の感染に対する理解は登山道の入口あたりをウロウロしている山頂を目指す登山者のような状況なのだろう。

X. おわりに

試験管の中でのウイルス感染とウイルス感染症の臨床との間には、大きな隔たりがある。分かっているつもりにならなければ、臨床は成り立たないが、常に「この医学常識は本当に正しいのか？」と問い合わせなければ進歩はない。かつての医学常識が、いつの間にか覆った例は枚挙にいとまがない。ウイルス感染症を見直す時に避けて通れない基本概念がMOIである。

文 献

- 1) 白澤 浩. (2022) [最終講義に代えて] 教科書に書かれていないウイルス学. 千葉医学98, 113-23.
- 2) Abedon ST, Bartom E. (2013) Multiplicity of Infection. In Maloy S, Hughes K (eds): Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition). Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 509-10.
- 3) Shabram P, Aguilar-Cordova E. Multiplicity of Infection/multiplicity of confusion. Mol Ther 2, 420-1.
- 4) Sanjuán R. (2018) Collective properties of viral infectivity. Curr Opin Virol 33, 1-6.
- 5) Ma X, Ogawa T, Tian Z, Yi R, Tang K, Saito K, Yatabe S, Ohno Y, Muroyama R, Ido E, Matsubara H, Shirasawa H. (2023) PKR-NF-κB Pathway Upstream of IFN-β Induction Is Dysregulated in Oncolytic Sindbis Virus-infected HeLa Cells. Anticancer Res 43, 2923-32.