

エンテロウイルスの分子ウイルス学的研究

分担研究者 小池智

（（財）東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・微生物研究部門）

研究要旨 エンテロウイルス 71 (EV71)は手足口病の原因ウイルスとして知られていたが、近年重篤な脳炎の原因ともなりうることが明らかにされてきた。ポリオウイルスをはじめとするエンテロウイルス属のウイルスは感染性 cDNA クローンを用いた分子遺伝学的な手法によって大きく進展し、病原性の強弱などがどのように支配されているか明らかになってきている。ところが EV71 に関してはいくつかの分離株について塩基配列が報告されているに留まっていた。昨年度我々は EV71 に感染し脳炎を発症した死亡例からの分離株をもとに感染性 cDNA クローンの構築を行い、本年度はこれをもとに弱毒候補株の作成を行った。

A. 研究目的

EV71 の分子遺伝学的な解析を可能とするために感染性 cDNA クローンを構築し、これに変異を加えた弱毒候補株を作成する。ポリオウイルスにおいては 5' noncoding region の配列の違いがウイルスの毒力に大きな影響を与えることが知られている。そこで EV71 においても同様のメカニズムが存在していると考えられるので EV71 の 5' noncoding region に変異を加えて弱毒化したウイルスの作成を試みた。

B. 研究方法

昨年度作成した SK/EV006/Malaysia 株の感染性 cDNA クローンを材料とした。この感染性 cDNA の 5' noncoding region をポリオウイルス強毒 Mahoney 株や弱毒 Sabin 1 株のものと組換えた。組み換え体から RNA を合成した後 F-Vero 細胞にトランスフェクションし、組み換えウイルスを得た。

C. 研究結果

SK/EV006/Malaysia 株の感染性 cDNA クローンの 745 塩基からなる 5'-noncoding region を

Poliovirus 1 型 Mahoney 株、Sabin 1 株野 5'-noncoding region 742 塩基と置換した (Mah/EV, Sab/EV)。これら 2 つの cDNA クローンから *in vitro* RNA 合成を行い、F-vero 細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションならびに培養は 37℃ と 33.5℃ で行った。トランスフェクション後数日でどちらの感染性クローンをトランスフェクションした細胞からも細胞変性効果が観察された。ウイルス回収時に温度による大きな差は認められなかった。この培養上清を新たな F-vero 細胞で 2 代培養したウイルスの 1 段増殖速度を調べた。親株 EV71 と Mah/EV、Sab/EV はどれも 12 時間程度で 1 ラウンドの増殖がみられ、増殖速度には大きな差がみられなかった。

D. 考察

EV71 はポリオウイルス（約 6 時間）と比較して F-vero 細胞での増殖速度ははるかに遅い（約 12 時間）。増殖速度を規定しているのは 5' noncoding region の遺伝情報であればこの部分を poliovirus Mahoney 株や Sabin 1 株

に入れ換えれば poliovirus と同様の表現型を示すと考えられたが、増殖速度は親株とほぼ同様であった。従って EV71 の増殖速度は coding region 上の遺伝情報によって律速されていると思われる。EV/Sab が親株や Mah/EV と比較し増殖速度が遅いということもなかったため、このウイルスが弱毒化している可能性についても判定できなかった。

E. 結論

SK/EV006/Malaysia 株の感染性 cDNA クロームを元に 5'-noncoding region を ポリオウイルス Sabin 1 株と入れ替えた弱毒候補株を作成した。培養細胞のレベルでは毒力に変化があるかどうか判定することが不可能であったため、サルなどの動物モデルを用いて毒力を検定する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Miki Ida-Hosonuma, Takuya Iwasaki, Choji Taya, Yuko Sato, Jifen Li, Noriyo Nagata, Hiromichi Yonekawa, & Satoshi Koike., Comparison of neuropathogenicity of poliovirus in two transgenic mouse strains expressing human poliovirus receptor with different distribution patterns. *J. Gen. Virol. in press*

2. 学会発表

第 49 回日本ウイルス学会 小池智、李継芬、細沼美樹、清水博之、岩崎琢也、永田典代 「エンテロウイルス 71 の感染性 cDNA の構築」

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

サルを用いた実験感染モデルの開発

エンテロウイルス 71 感染実験サルにおける接種経路による病態の相違

分担研究者 岩崎琢也 国立感染症研究所感染病理部・長崎大学熱帯医学研究所
網 康至 国立感染症研究所動物管理室
清水博之 国立感染症研究所ウイルス第二部
研究協力者 永田典代 国立感染症研究所感染病理部

研究要旨 カニクイザルに対し、エンテロウイルス 71 を静脈内および脊髄内に接種し、二つの感染経路による病態を比較した。両群において、初発神経症状に大きな差異がみられた。脊髄内接種後のサルは弛緩性麻痺を、一方、静脈内接種後のサルは小脳失調症状を最初に呈した。ウイルス学的ならびに組織学的解析においては、両接種群ともに中枢神経におけるウイルス増殖の場と病変の局在の差異は、脊髄内接種を行った腰髄を除き、認められなかった。エンテロウイルス 71 の静脈内接種後のカニクイザルの病態はヒトの自然感染と非常に類似しており、ヒトの病態ならびにワクチン開発、治療の実験モデルとして、本感染実験モデルは非常に有用である。

A. 研究目的

エンテロウイルス 71 (EV71) はポリオウイルスと同様、重篤な神経症状を引き起こす神経向性のエンテロウイルスである。昨年度は種々の EV71 株をカニクイザルの脊髄内に接種し、ウイルスの由来とカニクイザルの感受性と患者臨床症状との相関を明らかにした。今年度は静脈内接種した結果と比較を行い、神経向性と病態をより明らかにし、さらに実験モデルとしての可能性を探索した。

B. 材料と方法

動物

育成カニクイザル（筑波霊長類センターにて SPF 管理下で飼育）を計 5 頭用いた。いずれの動物も血清学的には EV71 ならびにポリオウイルスに対する感染既往がないことを血清学的に確認した。

動物飼育、繁殖、感染実験においては国立感染症研究所の動物実験委員会規定及びバイオセーフティー委員会規定に従って行った。

ウイルス

髄膜炎患者由来の BrCr 株を用いた。

実験計画

ウイルス接種は脊髄内接種 (*i.sp.*) (n=2) もしくは静脈内接種 (*i.v.*) (n=3) を行った。1 頭あたり $10^{5.5}$ CCID₅₀/0.1ml 量を接種した。ウイルス接種後経時的に咽頭、直腸拭い液および血液を採取した。臨床症状 10 日間観察し、経過中に座位不能となったものはその時点で過麻酔により安楽殺後解剖した。観察終了後は同様に解剖に供した。

ウイルス分離

経時的に採取した咽頭、直腸拭い液および血清、解剖時に採取した組織乳剤を検索した。Vero 細胞を用い、マイクロタイター法で感染価を測定し、Kärber 法で CCID₅₀ を算出した。

中和抗体価

経時的に採取した血清を用いて血清中の中和抗体価を Vero 細胞を用いて測定した。

血球動態解析

経時的に採取した血液から Percoll を用いて常法通り単核系細胞を分離し、抗サル CD3, 4, 8, 16, 20 抗体を用いて血球動態をフローサイトメトリー解析した。

病理組織学的解析

解剖時に採取した組織材料を 10%ホルマリン緩衝液で固定し常法通りパラフィン切片を作製した。HE および KB 染色による病理組織学的解析と抗 EV71 ウサギ血清を用いた免疫組織化学法によるウイルス抗原の検出を行った。

C. 結果

臨床症状

i.sp. 群では 2-5 日目に強い弛緩性麻痺を示し、瀕死状態に陥った。*i.v.* 群では 4-7 日目に企図振戦から始まる神経症状を示し、更に一頭では弛緩性麻痺を続発し、8 日目には瀕死となった。各個体の経過と症状は図 1 に示した。皮膚所見に異常は認められなかった。

ウイルス分離

結果は表 1 と図 2 に示した。*i.v.* 接種後 4 日目の咽頭拭い液 (2/3 頭)、血清 (2/3 頭)、解剖時の中枢神経組織 (全頭) からウイルスが分離された。その他の材料は陰性であった。*i.v.* 接種群では大脳、脊髄、*i.sp.* 群では大脳、延髄で感染価が高かった (昨年度報告書も参照のこと)。

中和抗体価

i.v. 後 8、10 日目に上昇が見られた (3/3 頭)。

血球動態解析

i.v. 群の解析結果を図 3 に示した。4、8 日目の好中球数の明らかな増加 (3/3 頭)、遅れて発症した 2 頭では 8 日目には CD16 と CD20 陽性細胞を主体としたリンパ球増多がみられた。

病理組織学的解析

いずれも脳全体の炎症性変化を主体とし、大脳皮質、小脳核、脳幹部に神経細胞の変性、壊死を認めた。大脳皮質においては運動領、知覚領ともに病変がみられた (図 4A,B)。*i.sp.* 接種群での脊髄の評価は困難であったが、*i.v.* 接種群で脊髄神経細胞の病変を確認した (図 4C,D)。神経細胞病変に一致してウイルス抗原が検出された。なお、図 2 にウイルス分離と

抗原検出の相関を示した。*i.sp.*接種群は
大脳、脳幹部でのウイルス抗原検出率が
*i.v.*に比べて高かった（昨年度報告書も参
照のこと）。接種経路による感染部位と
病変の相違は無かった。

D. 考察

*i.sp.*接種後の動物は弛緩性麻痺から
始まる神経症状を示したが、*i.v.*接種後の
動物は企図振戦から始まる神経症状を発
症した。ウイルス感染と増殖、排泄およ
び感染動物の臨床症状、血球動態と中和
抗体価の上昇について図 5 にまとめた。
組織学的には 2 つの接種法で感染細胞と
病変の局在は一致し、いずれも大脳皮質、
小脳核、脳幹部の神経細胞の変性、壊死
を認め中枢神経全体の浮腫と炎症性反応
が顕著であった。これらの病変はウイル
ス感染によって引き起こされたものであ
った。このようにカニクイザルでは EV71
の血行感染後、ウイルスは中枢神経に到
達し企図振戦、運動失調を症状とする脳
幹部脳炎を引き起こした。神経症状、ウ
イルス分離、血球像、病理を含む感染病
態は患者のそれとほぼ一致し、このウ
イルスの感染病態を知る上で本モデルが有
用であることを示した。

E. 結論

EV71 感染患者はポリオ様弛緩性麻痺、
髄膜炎、小脳失調、脳幹脳炎など多様な
神経症状を示すことが知られている。カ
ニクイザルの感染実験において EV71 の
感受性細胞は非常に広範であり、運動神
経細胞のみならず、知覚野における錐体

細胞にも感染が見られることが明らかと
なった。このことから患者の病態に影響
する一因として、ウイルスの神経毒力の
強弱、量と中枢神経の侵入経路が挙げら
れることが推測された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nagata N, Shimizu H, Ami Y, Tano Y,
Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Miyamura T,
Sata T and Iwasaki T. Pyramidal and
extrapyramidal involvement in experimental
infection of enterovirus 71 in cynomolgus
monkeys. J. Med. Virology. (in press)

2. 学会発表

永田典代、清水博之、網 康至、田野良
夫、須崎百合子、原嶋綾子、佐藤由子、
長谷川秀樹、佐多徹太郎、岩崎琢也：カ
ニクイザルを用いたエンテロウイルス 71
の病態解析。第 49 回日本ウイルス学会、
2001 年 11 月大阪

永田典代、岩崎琢也、佐多徹太郎、長谷
川秀樹、倉田 毅、原嶋綾子、佐藤由子、
網 康至、清水博之：エンテロウイルス
71 とポリオウイルスの神経病現性：カニ
クイザルでの解析。第 90 回日本病理学
会総会、2001 年 4 月東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 EV71 接種後カニクイザルにおけるウイルス分離の結果

Monkey ID	Sample	Days after inoculation									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Intraspinal	Serum					0/2					0/2
	Throat swab					0/2					0/2
	Rectal swab					0/2					0/2
Intravenous	Serum					2/3					0/3
	Throat swab					2/3					0/3
	Rectal swab					0/3					0/3

図 1 EV71 接種後カニクイザルの臨床症状

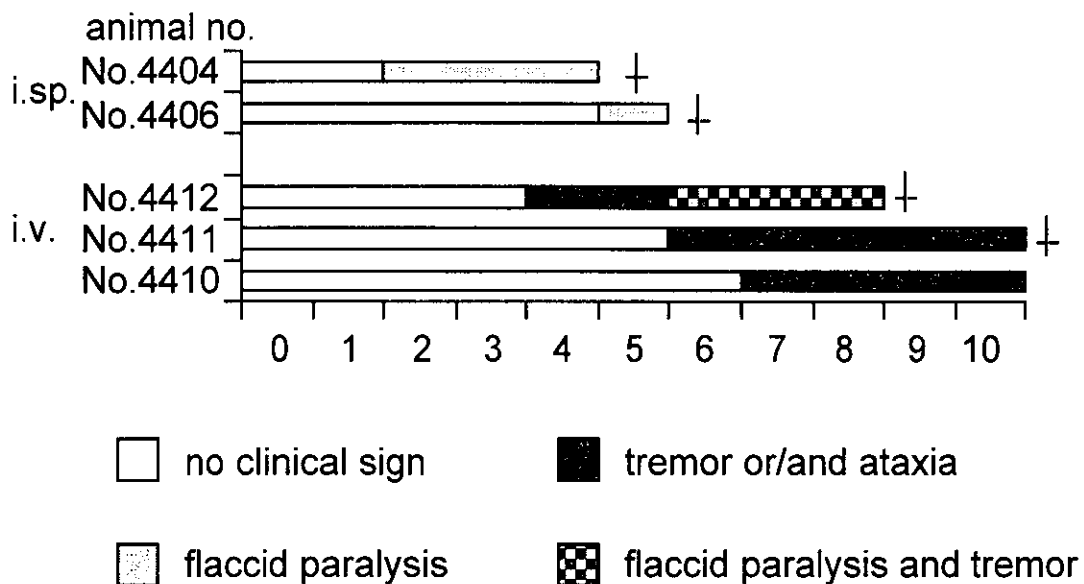


図2 EV71 静脈内接種後のカニクイザル組織におけるウイルス感染価

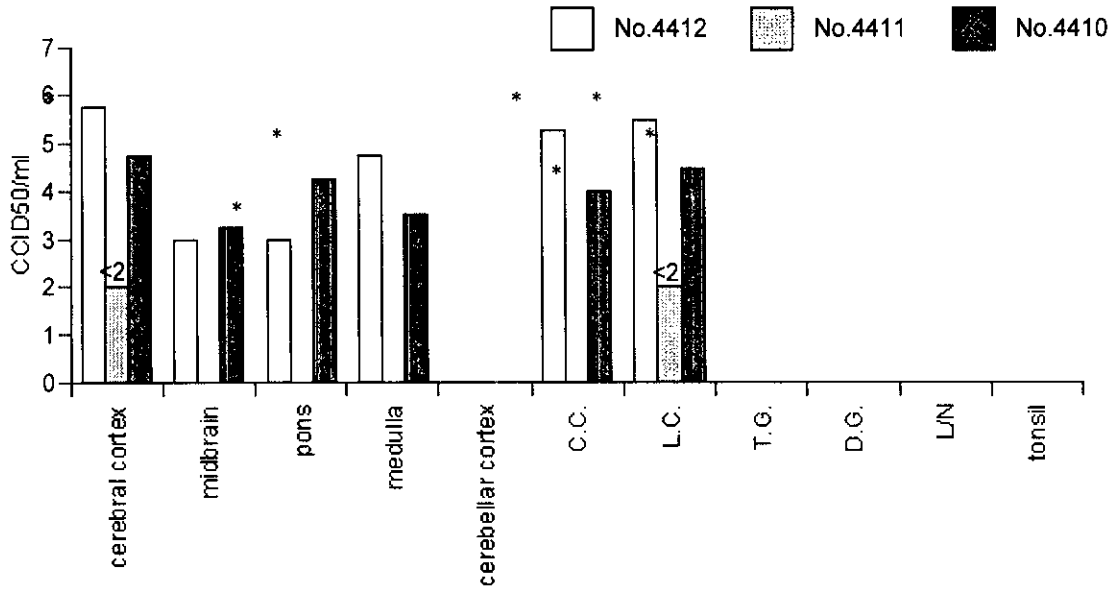


図3 EV71 静脈内接種後のカニクイザル末梢血の血球動態解析

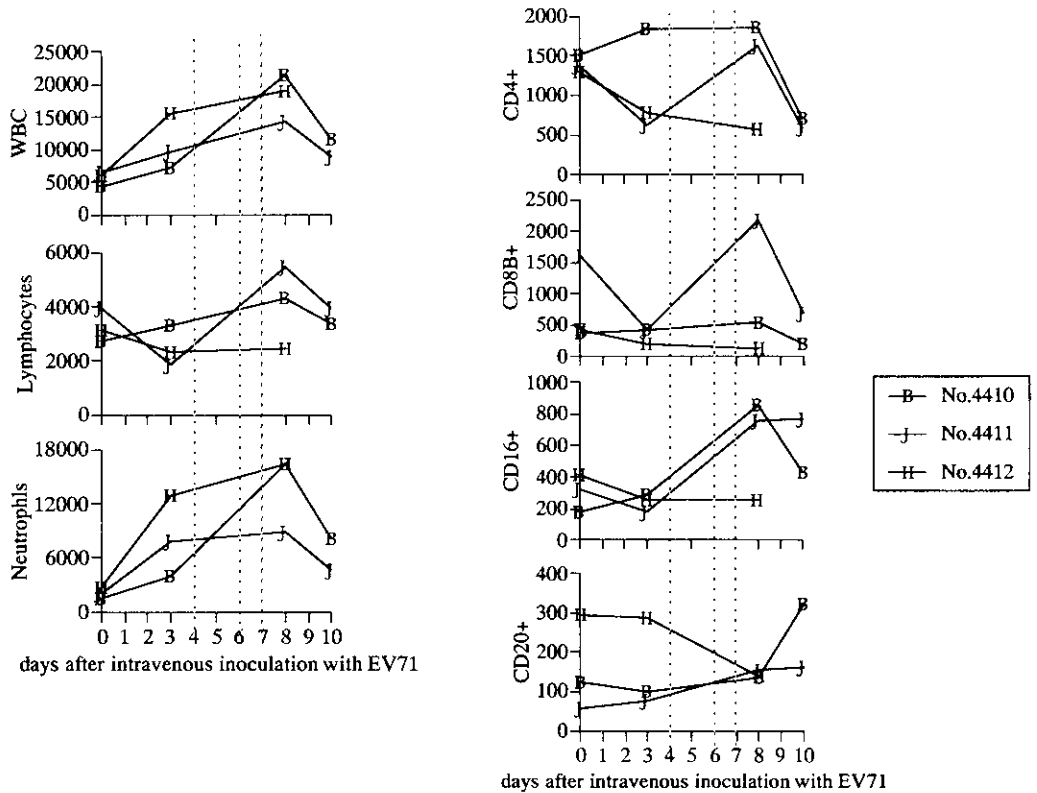


図4 EV71 静脈内接種後のカニクイザルの神経組織病変

大脳皮質運動領 (A) と大脳皮質知覚領 (B) はいずれも神経細胞の変性と壊死がみられ、それに伴い広範な炎症性反応がみられた (HE 染色、撮影倍率 x4)。さらに、腰髄 (C,D) においても神経細胞の変性、壊死が見られ、それに伴った炎症性反応がみられた。しかし残存する神経細胞も散見された (HE 染色、x2, x20)。

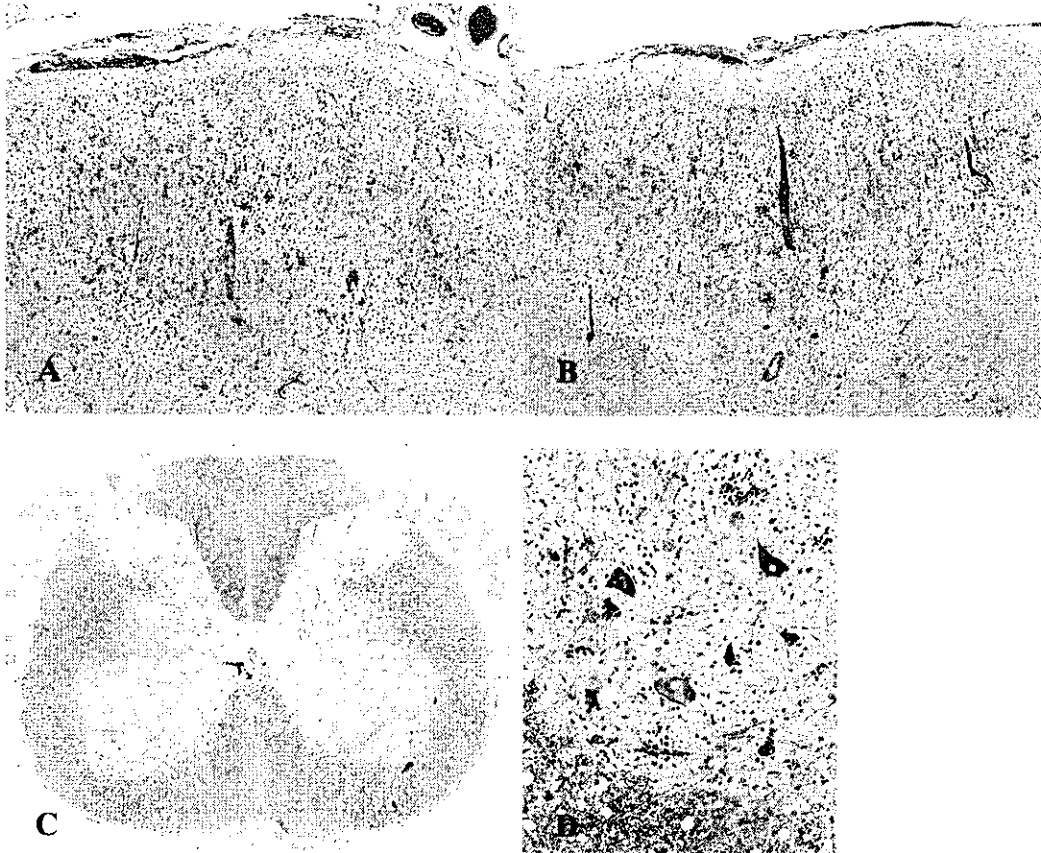
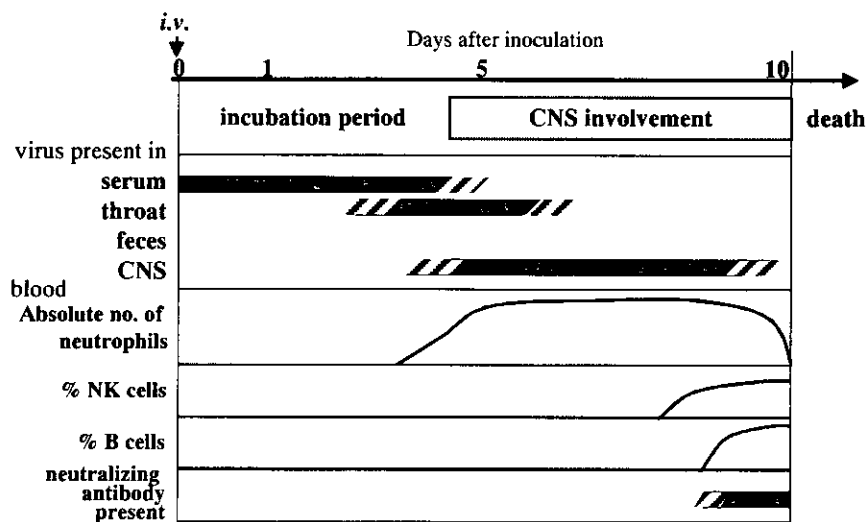


図5 EV71 静脈内接種後のカニクイザルにおける病態



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌	巻	頁	年
Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Harashima A, Hatano I, Suzuki Y, Yoshii K, Yoshii T, Nomoto A, Kurata T	Comparison of neuropathogenicity of poliovirus type 3 in transgenic mice bearing the poliovirus receptor gene and cynomolgus monkeys.	Vaccine	19:	3201-8	2001
Nagata N, Shimizu H, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzuki Y, Sato Y, Miyamura T, Sata T and Iwasaki T	Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of enterovirus 71 in cynomolgus monkeys	J. Med. Virol.			印刷中
Kew O, Morris-Glasgow V, Landaverde M, Burns C, Shaw J, Garib Z, André J, Blackman E, C Freeman J, Jorba J, Sutter R, Tambini G, Venczel L, Pedreira C, Laender F, Shimizu H, Yoneyama T, Miyamura T, van der Avoort H, Oberste S, Kilpatrick D, Cochi S, Pallansch M, and de Quadro C	Outbreak of Poliomyelitis in Hispaniola Associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus.	Science			印刷中
Yoneyama T, Yoshida H, Yoshii K, Shimizu H, Miyamura T	Necessity of two-stool sample test for sensitive detection of poliovirus.	Jpn J Infect Dis	54	250-1	2001
Yoneyama T, Yoshida H, Shimizu H, Yoshii K, Nagata N, Kew O, Miyamura T	Neurovirulence of Sabin 1-derived polioviruses isolated from an immunodeficient patient with prolonged viral excretion.	Dev Biol (Basel)	105	93-8	2001
岡部信彦	感染症発生動向調査について 感染症法と感染症サーベイランス。	厚生 の 指標	48	1-7	2001
岡部信彦	感染性胃腸炎: 発症病理をめぐって、感染性胃腸炎の治療	小児科 診療	64	983-8	2001
岡部信彦	感染症トピックス 1)インフルエンザ脳炎・脳症 2)ポリオワクチン中止の経過と今後のポリオの動向	東京小 児科医 会報	20	74-8	2001
岡部信彦	これからの感染症と生活指導 学校伝染病の現在の問題点	小児保 健研究	60	216-9	2001
岡部信彦	ウイルス感染症の制圧の歴史と展望	小児内 科	33	321-5	2001
岡部信彦	小児疾患の診断基準—ポリオー	小児内 科	33	322-3	2001
大石 功, 山崎謙治	ウイルス感染よりみた免疫応答—ポリオウイルス	臨床と 微生物	27	67-72	2000
山崎謙治, 奥野良信	2000年大阪府で流行した手足口病の遺伝子診断および分子疫学的解析	感染症 学雑誌	75:	909-15	2001
吉田紀美, 近藤玲子, 山下育孝, 大瀬戸光明	手足口病患者からのエンテロウイルス71型の分離、愛媛県	病原微 生物検 出情報	21	11	2000

飯塚節子、武田積代、板垣朝夫	島根県における2000年の手足口病の流行状況	病原微生物検出情報	22	170-1	2001
Yamashita, T., Sugiyama M, Tsuzuki H, Sakae K, Suzuki Y, Miyazaki Y	Application of a RT-PCR for identification and differentiation of Aichi virus, a new member of the picornavirus family associated with gastroenteritis in humans	J. Clin. Microbiol	38	2955-61	2000
山下照夫	ピコルナウイルス科コブウイルス属に分類されたアイチウイルス	臨床とウイルス	28	209-18	2000
細矢光亮	日常臨床に役立つ感染症の診断治療	小児感染免疫	12	134-7	2000
Hosoya M, Ishiko H, et al	Association of nonpolio enterovirus infection in the central nervous system of children with febrile seizures.	Pediatrics	107	e12	2001
細矢光亮, 石古博昭, 他	熱性痙攣の原因に関するウイルス学的検討	小児感染免疫	13	149-53	2001
川崎幸彦, 細矢光亮, 他	福島県下における小児期発症急性脳炎／脳症105例の疫学的臨床的検討	日児誌	105	695-702	2001
細矢光亮	ポリオ以外のエンテロウイルス感染症	小児内科	33	324-5	2001
Ida-Hosonuma M, Iwasaki T, Taya C, Sato Y, Li J, Nagata N, Yonekawa H, Koike S	Comparison of neuropathogenicity of poliovirus in two transgenic mouse strains expressing human poliovirus receptor with different distribution patterns	J. Gen. Virol			印刷中