

平成15年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

# 目 次

## 課題番号

20030933A KH51041	臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究	梨井 康 …… 1
934A KH51042	組換えDNA食品遺伝子産物の慢性経口毒性評価モデルの確立	廣瀬 雅雄 …… 5
935A KH51043	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦 善治 …… 10
936A KH51044	細胞内脂質輸送系に着目した血清脂質改善薬の開発のための基礎的研究	最上 知子 …… 16
KH51045	粘膜インフルエンザワクチンの実用化に関する研究	佐多 徹太郎 …… 21
937A KH51046	日本人糖尿病感受性遺伝子に基づく脂肪細胞を分子標的とした糖尿病・肥満の予防及び治療薬の開発	門脇 孝 …… 24
938A KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチン開発のための基礎研究	竹森 利忠 …… 27
939A KH51048	ノーウォークウイルスの超高感度核酸定量システム、及びベッドサイド抗原検出システムの開発	武田 直和 …… 31
940A KH51049	ワクチン創製の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島 朝人 …… 38
941A KH51050	食品および環境中の食中毒原因菌の病原因子に対する免疫学的高感度検出法に関する研究	五十君 静信 …… 43
942A KH51051	安全なアジュバントを用いた粘膜ワクチンの開発に関する研究	後藤 紀久 …… 48
943A KH51052	リポソーム表面結合型抗原のアレルギー予防・治療への応用に関する研究	内田 哲也 …… 55
944A KH51053	肺炎球菌感染症の標準的抗体価測定方法の確立に関する研究	岡部 信彦 …… 61
945A KH51054	PPAR $\alpha$ をターゲットとした生活習慣病予防薬の開発	片山 茂裕 …… 64
946A KH51055	感染症領域における先端的遺伝子診断技術の開発に関する研究	薄井 貢 …… 68
947A KH51056	乳幼児下痢症の原因ウイルス検出法に関する研究	西尾 治 …… 71
948A KH51057	可溶性ウイルス受容体等によるウイルス吸着阻止を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口 文広 …… 77
949A KH51058	EPA・DHA含有エステル交換構造脂質の体脂肪蓄積抑制効果に関する研究	斎藤 衛郎 …… 86
950A KH51059	エネルギー消費調節機構に立脚した生活習慣病予防薬に関する基礎研究	大坂 寿雅 …… 89
951A KH51060	遺伝子解析によるヒトエンテロウイルス同定の標準化	清水 博之 …… 93
952A		

## 遺伝子解析によるヒトエンテロウイルス同定の標準化

所 属 国立感染症研究所 ウイルス第二部  
研究者 清水博之

研究要旨 遺伝子解析によるエンテロウイルス同定の有用性を検討するために、カンボジア、中国で分離された多様なエンテロウイルス臨床分離株の遺伝子解析を行った。新たな VP4 配列をデータベースに加えることにより、より精度の高い同定が可能となると考えられる。

### 分担研究者

- (1) 国立感染症研究所ウイルス第2部 清水博之
- (2) (株)三菱化学ビーシーエル研究開発部  
石古博昭

### A. 研究目的

ヒトエンテロウイルスは、大きく、ポリオ、コクサッキーA群、コクサッキーB群、エコーウイルスとそれ以外のエンテロウイルスに分けられ、各々は、さらに多くの血清型に分類される。エンテロウイルスは従来、血清型特異的な中和抗血清を用いて同定されており、現在 65 種類以上の血清型が報告されている。ヒトエンテロウイルスは、死亡例を含む重篤な中枢神経疾患から不顕性感染にいたる、きわめて多様な疾患の起因ウイルスとして臨床的に重要である。日本では、ポリオ、無菌性髄膜炎、手足口病、ヘルパンギーナの各疾患は、感染症法により届け出の義務がある疾患あるいは発生動向調査が必要な疾患とされているが、これらの疾患の多くはエンテロウイルスを起因ウイルスとしており、ウイルス学的実験室診断が必要とされている。特に無菌性髄膜炎、手足口病等のエンテロウイルス感染症は、しばしば小児を中心とした大規模な流行を引き起こし、起因ウイルスの迅速かつ正確な同定が要求される。エンテロウイルス感染症の起因ウイルスの同定は、病巣あるいは他の臨床検体からのウイルス分離同定によ

り行なわれる。ウイルス分離は通常、数種類の細胞を組み合わせを行ない、特異的中和抗血清を用いた中和法により分離ウイルスの血清型を同定するが、一般的に分離同定には時間および手間がかかり、他種類の抗血清を調整する必要がある。

これらを解決するために、我々は、これまでにヒトエンテロウイルス 64 血清型の標準株の VP4 塩基配列のデータベースを構築し、分離株の塩基配列を標準株のデータベースとともに遺伝子系統解析を行い、分離ウイルスの型同定を試みてきた。しかし、一般的にエンテロウイルスなどの RNA ウイルスは遺伝子進化速度が極めて速い。そのため、たとえ同一年度に分離されたウイルスでも地域や流行が異なれば遺伝学的に異なるウイルスである場合が多い。また標準株は数十年前に海外で分離されたウイルスであるため、現在日本で流行しているウイルスと系統が異なる可能性がある。そこで、新たな臨床分離株を精度良く同定するため、ここ数年間の流行で分離されたウイルスの遺伝子の解析を行い、これら分離株のデータベースを蓄積することにより精度の高い系統解析を行えるよう標準化することが本研究の主要な目的である。

近年のエンテロウイルスの分子系統解析の進展により、ヒトエンテロウイルスは大きく 4 種類の cluster (A, B, C および D) に分類されることが明らかとなった。我々は、昨年度までの本研究報告において、日本で最も良く分離される cluster B エンテ

ロウイルス(エコーウイルスおよびコクサッキーBウイルス)については、エンテロウイルス標準株と日本の臨床分離株の VP4 配列により構築したデータベースを利用することにより、新たな臨床分離株についても高い確率で同定可能であることを明らかにした。また、手足口病やヘルパンギーナの原因となる EV71 を含む cluster A エンテロウイルスについても、VP4 遺伝子解析によるウイルス同定が、迅速かつ正確な EV71 の同定法として有用であることを示すことが出来た。

今年度は、これまでに構築したエンテロウイルス VP4 遺伝子データベースの有用性と精度を確認するため、日本以外で分離されたエンテロウイルスを用いて VP4 遺伝子解析を行い、遺伝子解析による同定の精度の確認を行った。とくにカンボジアの臨床検体から分離されたエンテロウイルスは、日本で分離される頻度が低い cluster C エンテロウイルスが高頻度で認められたため、カンボジアのエンテロウイルスを用いて分子系統解析を行い、VP4 遺伝子データベースの改良を試みた。

## B. 研究方法

カンボジア (2001~2003 年) および中国黒竜江省 (1997~2001 年) の急性弛緩性麻痺 (AFP) 患者の糞便検体より分離されたエンテロウイルスを用いて遺伝子解析を行った。カンボジアおよび中国の AFP 患者の糞便検体は、ポリオ根絶計画のための AFP サーベイランスによりポリオウイルス分離同定のために集められた検体であるが、非ポリオウイルスも多く分離されるため、これらの検体を用いて解析を行った。RD, HEp-2 および L20B 細胞を用いてウイルス分離を行い、L20B 細胞分離株以外の非ポリオエンテロウイルスについて、遺伝子解析および中和法による血清型の同定を行った。中和法には、RIVM プール血清あるいは EP-95 (日本で頻繁に分離されるエコーウイルス同定用抗血清パネル) を用いた。中和法による同定が困難な場合、または遺伝子解析によりコクサッキーA 群ウイルス(CAV) であると考えられた分離株については、CAV に対

する単味抗血清を用いた中和法による同定を行った。VP4 遺伝子解析のため、ヒトエンテロウイルスに共通なプライマーセットを用いて 5'非翻訳領域の一部、VP4 全領域、VP2 領域の一部を含む約 650 塩基を RT-PCR で増幅した。PCR 産物の塩基配列を解析し、VP4 領域の全塩基配列を決定した。分子系統解析には、主として VP4 領域を用いたが、必要に応じて他の領域の解析も行った。エンテロウイルス標準株の VP4 配列は、本研究班により以前解析され GenBank に登録された塩基配列を用いた。ヒトエンテロウイルス標準株の VP4 塩基配列データベースとともに遺伝子系統解析を行い、血清型の同定を試みた。分子系統解析は、近隣結合法を用いて行い、系統樹の信頼度はブートストラップ解析により検定した。

## (倫理面への配慮)

本研究においてウイルス分離に用いた糞便検体は、世界ポリオ根絶計画に基づく急性弛緩性麻痺サーベイランスにより適切に集められた検体であり、倫理上の問題はない。

## C. 研究成果

カンボジアで AFP 患者より分離された非ポリオウイルスエンテロウイルスについて、RIVM 抗血清パネルを用いた中和法により同定を試みたところ、50%以上の分離株が同定不能であった。そこで、VP4 領域の遺伝子解析を行い、どの cluster のエンテロウイルスが高頻度に認められるのかについて検討を行った。2001~2003 年のエンテロウイルス分離株の VP4 遺伝子解析によると、cluster B エンテロウイルスは、全エンテロウイルス分離数のそれぞれ、57%、38%および 36%を占めていた。一方、cluster C エンテロウイルスは、全エンテロウイルス分離数の 33%、40%、47%を占めていた。カンボジアのエンテロウイルス分離株の多くが cluster C および A エンテロであることから、RIVM 抗血清パネル等を用いた通常の中和法では同定困難な分離株が多いことが明らかとなった。2002 年の分離株について、

VP4 遺伝子解析による、より詳細な分子疫学的解析を行ったところ、日本ではこれまでほとんど分離が報告されていない cluster C に属する CAV が多く認められた。単味抗血清を用いた中和法および他の遺伝子領域の解析も加味して cluster C エンテロウイルスの同定を行ったところ、7 株の CAV-18 および 7 株の CAV-17 が、2002 年の主要な cluster C エンテロウイルス分離株であった。他に CAV-1, 15, 20 および 24 が同定され、中和法でも遺伝子解析でも同定できない cluster C エンテロウイルスが認められた。中和試験で血清型の同定された 27 株の系統解析の結果、中和試験でエコーウイルス 14 型 (E-14) に同定された 2 株中 1 株は、過去に日本国内で分離された E-14 分離株と、E-25 に同定された 1 株は、過去に日本国内で分離された E-25 分離株とブートストラップ値 70% 以上の確率で単一クラスターを形成し、各血清型に同定された。中和試験で血清型の同定された CAV-9、CAV-15、CAV-17、CAV-18、CAV-20、CAV-24、E-1、E-7、E-12、E-13、E-14 の 2 株中 1 株、E-20、E-24 の計 25 株は、標準株および、日本分離株とブートストラップ値 70% 以上の単一のクラスターを形成しなかった。これらの分離株のうち、CAV-17、CAV-18、CAV-20、E-7 分離株はそれぞれ分離株の単一のクラスターを形成した。中和試験で未同定であった 11 株のうち 1 株が CAV-1 標準株と、1 株が CAV-2 標準株と、1 株が CBV-2 日本分離株と、それぞれブートストラップ値 70% 以上の単一のクラスターを形成し、各血清型に同定された。残り 8 株は、標準株、日本分離株いずれも単一のクラスターを形成しなかった。

中国で分離された 29 株の系統解析の結果、中和試験で CAV-21 に同定された 1 株、E-30 に同定された 4 株、EV71 に同定された 1 株は、各標準株とブートストラップ値 70% 以上の確率で単一のクラスターを形成し各血清型に同定された。CAV-9 に同定された 2 株は過去に日本で分離された CAV-9 と、E-6 に同定された 8 株中 2 株は、日本で分離された E-6 分離株と、E-14 に同定された 3 株中 1 株は、日本で分離された E-14 分離株とそれぞれブー

トストラップ値 70% 以上の確率で各血清型に同定された。E-6 分離株中 8 株中 5 株、E-11 分離株全 6 株、E14 分離株全 3 株、E-25 分離株 3 株中 1 株は、標準株および日本分離株いずれとも単一のクラスターを形成しなかった。また、E-3 に同定された 1 株は E-27 標準株と、E-6 に同定された 8 株中 1 株は E-27 標準株と、E-25 に同定された 3 株中 2 株は日本で分離された E-6 分離株とそれぞれブートストラップ値 70% 以上の確率で単一のクラスターを形成し、中和試験の結果と乖離が認められた。中和試験で未同定であった 12 株のうち 1 株は CAV-9 日本分離株と、4 株は CBV-1 日本分離株と、2 株は CBV-2 日本分離株と、1 株は E-6 日本分離株とそれぞれブートストラップ値 70% 以上の単一のクラスターを形成し、各血清型に同定された。残り 4 株は、標準株、日本分離株いずれも単一のクラスターを形成しなかった。

#### D. 考 察

エンテロウイルスの同定は従来、培養細胞あるいは乳のみマウスを用いてウイルスを分離した後、特異的中和抗血清パネルまたは単味抗血清を用いた中和法により行われてきた。しかし、細胞培養によるウイルス分離同定は時間がかかる場合が多く、抗血清を用いた従来の分離同定法は、多大な労力、経験および他種類の抗血清のストックが必要とされる。特に、cluster A および cluster C に属する CAV については、一般的に培養細胞でのウイルス分離効率が悪いことと CAV に対する抗血清が含まれていないパネルが多いことから、エコーウイルスやコクサッキー B ウイルスと比較して同定が困難な分離株が高頻度で認められる。我々は、昨年度までの本報告において、手足口病やヘルパンギーナに由来する cluster A エンテロウイルスについて、VP4 遺伝子解析によるウイルス同定が迅速かつ精度の高い同定法としてエンテロウイルス感染症の鑑別診断に利用可能であることを明らかにしてきた。

今年度新たに解析したカンボジアおよび中国のエンテロウイルス臨床分離株において、標準株または、

日本で過去に分離されたウイルスとブートストラップ値 70%以上のクラスターを形成した臨床分離株は、カンボジアで 38 株中 5 株 (13.2%)、中国で 41 株中 19 株 (46.3%) に過ぎなかった。中和試験で未同定であった株を含めると、VP4 領域の系統解析によって、血清型の同定されなかった株は、カンボジアで 33 株 (87.8%)、中国で 18 株 (43.9%) だった。さらに中国の株には中和試験と系統解析の結果に乖離の認められた株が 4 株 (13.8%) 認められた。エンテロウイルスは RNA ウィルスで、遺伝子複製の際プルーフリーディング機構を持たないため、ウィルスの遺伝子変異は極めて速い。そのため、カンボジアおよび、中国で分離されたウイルスは、数十年前に分離されたウイルスである標準株あるいは、日本の臨床分離株と分子疫学的関連性が認められず血清型ごとの単一のクラスターを形成しなかった可能性が考えられる。

VP4 領域の系統解析によって血清型の同定されなかった株は、カンボジアで分離株の単一のクラスターを形成した CAV-17、CAV-18、CAV-20、E-7 分離株を含む 17 のクラスター、中国で 8 のクラスターを形成した。今後、これらのウイルスの代表株の VP1 領域を解析し、新たに VP4 領域のデータベースに加えることによって、血清型が同定可能となると考える。西太平洋地域の EV71 の分子疫学的解析から明らかなように、アジア地域で伝播しているエンテロウイルスと分子系統学的に近縁なエンテロウイルスが日本でも流行する可能性は、きわめて高い。そのため、年代、地域を越えた分離株のデータの蓄積によるデータベースの強化は重要であり、VP4 領域の系統解析は、ウイルス血清型の同定に非常に有効な手段となる。

今年度解析したカンボジアの AFP 患者由来のエンテロウイルス分離株は、日本で通常伝播しているエンテロウイルスと明らかに異なる血清型および遺伝子型プロファイルを示した。とくに、日本で分離頻度が低い cluster C エンテロウイルスが多く認められたことが、カンボジアにおけるエンテロウイルス分離株の大きな特徴であった。サーベイランスシステムが同じではないので、単純には比較できない

が、日本におけるエンテロウイルスサーベイランスに由来する分離株で高頻度に認められるウイルスは、cluster B および A に属するエンテロウイルスであり、それらと比較すると cluster C エンテロウイルスの分離頻度は、かなり低い。日本では健常人の糞便からも cluster C エンテロウイルスは、ほとんど分離されないことから、cluster C エンテロウイルス伝播の頻度は、カンボジアと比して明らかに低いものと考えられる。とくに今回カンボジアの臨床検体から高頻度に分離された CAV-17, 18, 20 等は、日本での分離がほとんど報告されていない血清型のエンテロウイルスである。カンボジアにおいては、cluster C エンテロウイルス分離頻度が、2001～2003 年の 3 年間にわたって一貫して高いことから、これらの cluster C エンテロウイルスは、カンボジアに常在するエンテロウイルスであることが示唆された。

従来の中和法によるエンテロウイルス同定では、CAV 特に cluster C に属する CAV の同定は、きわめて困難であった。多くのエンテロウイルス抗血清パネルは cluster C に属する CAV に対する抗血清を含んでいないため、いくつかの抗血清パネルにより同定不能とされた分離株について、再度各 CAV に対する単味抗血清を用いて同定する必要がある、多大な労力と様々な種類の抗血清が必要とされる。遺伝子解析による同定により、従来の中和法と比較して迅速かつ簡便な cluster C にエンテロウイルスの同定が可能となった。我々の構築した VP4 配列データベースには、cluster C エンテロウイルス臨床分離株のデータが、ほとんど入っていないので、今回用いたカンボジア臨床分離株について、血清型に対応した遺伝子解析による同定を行うことは困難であった。しかし、今回得られた cluster C エンテロウイルスの VP4 配列をデータベースに加えることにより、cluster C エンテロウイルスについても、cluster B および A エンテロウイルスと同様、より精度の高い同定が可能となると考えられる。

## E. 結論

VP4 遺伝子解析によるエンテロウイルス同定の実用性を検討するために、カンボジアおよび中国の AFP 患者から分離されたエンテロウイルスについて、遺伝子解析と血清型の相関について検討した。カンボジアのエンテロウイルスは、日本で通常伝播しているエンテロウイルスと明らかに異なる血清型および遺伝子型プロファイルを示し、日本では分離頻度の低い cluster C エンテロウイルス分離株が高頻度で認められた。cluster C エンテロウイルスを含めた海外の臨床分離株の VP4 配列をデータベースに加えることにより、より精度の高いエンテロウイルス同定が可能となると考えられる。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Munemura, T., M. Saikusa, C. Kawakami, H. Shimizu, M. Oseto, A. Hagiwara, H. Kimura, and T. Miyamura. 2003. Genetic diversity of enterovirus 71 isolated from cases of hand, foot and mouth disease in Yokohama City between 1982 and 2000. *Arch Virol* **148**:253-63.
2. 清水博之 (2003) 手足口病、総合臨床増刊号 52,192-197
3. 岩崎琢也、清水博之、永田典代 (2003)、エンテロウイルス 71、病理と臨床 **21**,110-114
4. 遠田耕平、清水博之、宮村達男 (2003)、インドのポリオ根絶の現状、日本医事新報, 4141, 60-61
5. Chiba, Y., M. Kobayashi, T. Chosa, T. Yamamoto, K. Endo, H. Shimizu, L. Li, W. B. Xu, and L. B. Zhang. 2003. Molecular epidemiology of type 2 vaccine-associated paralytic poliomyelitis in china. *Jpn J Infect Dis*

- 56:181-3.
6. Huang S, Greening G, Baker M, Grimwood K, Webber L, Fitzsimons A, Garret N, Graham D, Lennon D, Shimizu H, Pallansch M. 2003. OPV virus circulation and evolution investigated in New Zealand. *Polio Lab Network* **IX**, 2-3
7. Shimizu, H., H. Yoshida, A. Utama, T. Nakayama, T. Saito, K. Watanabe, S. Iizuka, S. Noda, T. Yoneyama, and T. Miyamura. 2003. Surveillance of poliovirus-isolates in Japan, 2002. *Jpn J Infect Dis* **56**:218-9.
8. Yang, C.-F., T. Naguib, S.-J. Yang, E. Nasr, J. Jorba, N. Ahmed, R. Campagnoli, H. van der Avoort, H. Shimizu, T. Yoneyama, T. Miyamura, M. A. Pallansch, and O. Kew. 2003. Circulation of endemic type 2 vaccine-derived poliovirus in Egypt, 1983 to 1993. *J Virol* **77**:8366-8377.
9. Kew, O. M., P. F. Wright, V. I. Agol, F. Delpeyroux, H. Shimizu, N. Nathanson, and M. A. Pallansch. 2004. Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge. *Bull WHO* **82**:1-8.
10. Shimizu H., A. Utama, N. Onnimala, C. Li, L.B.Zhang, Y.J.Ma, Y. Pongsuwanna and T. Miyamura. 2004. Molecular epidemiology of enterovirus 71 infection in the Western Pacific Region. *Pediatrics International* (in press)
11. Arita, M., H. Shimizu and T. Miyamura. 2004. Characterization of *In vitro* and *In vivo* phenotypes of poliovirus type 1 mutants with reduced viral protein synthesis activity. *J. Gen. Virol.* (in press)

## 2. 学会発表

1. Shimizu, H. (2003) Another Neurotropic Enterovirus - Characterization and Pathogenicity of Enterovirus 71-, Structural Forum 2003, Virus-Cell Interaction: Structure to Function, Stockholm, Sweden
2. 有田峰太郎, 清水博之, 宮村達男: ポリオウイルスの神経毒性現象におけるウイルスタンパク質合成の役割 (2003) 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌
3. Andi Utama, 有田峰太郎, 清水博之, 宮村達男: ポリオウイルスとコクサッキーAウイルスの組換えウイルスの作製 (2003) 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌
4. 永田典代, 清水博之, 吉河智城、波多野いく持、原嶋綾子、佐藤由子、佐多徹太郎、倉田毅、野本明男、岩崎琢也: ポリオウイルスレセプター導入トランスジェニックマウス(TgPVR21)の粘膜免疫モデル (2003) 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌
5. 石古博昭、三浦里香、島田康司、山崎修道、武田直和、田川義継、青木功喜、大野重昭、2001-2002年アジアで急性出血性結膜炎の大流行を引き起こしたエンテロウイルスの分子診断と分子疫学 (2003) 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌
6. Utama, A., Shimizu, H. and Miyamura T. 2003. Construction and characterization of chimeric viruses between polio and coxsackie A viruses. 6th Asia Pacific Congress of Medical Virology, Kuala Lumpur, Malaysia
7. Huang, Q.S., Greening, G. Baker, M., Grimwood, K., Webber, L.,

Fitzsimons, A., Gerret, N., Graham, D., Lennon, D. Shimizu, H., Pallansch, M.

Investigating the circulation and evolution of oral polio vaccine strains in New Zealand. 2003. 6th Asia Pacific Congress of Medical Virology, Kuala Lumpur, Malaysia

8. Ishiko, H., R. Miura, Y. Shimada, S. Yamazaki, Y. Tagawa, K. Aoki, S. Ohno, S. I. Bhuiyan, and F. Hug. The molecular diagnosis of enteroviruses caused the pandemic of acute haemorrhagic conjunctivitis in Bangladesh, 2003. 6th Asia Pacific Congress of Medical Virology, Kuala Lumpur, Malaysia

## F. 知的所有権の取得状況

- |           |    |
|-----------|----|
| 1) 特許取得   | なし |
| 2) 実用新案登録 | なし |
| 3) その他    | なし |



---

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

平成16年9月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社