



図1 海外旅行者から分離された4株の新型エンテロウイルスとB群エンテロウイルス標準株の5'UTR、VP1、および3D領域における系統樹解析 (UPGMA法)
 3D領域で同一クラスターを形成したウイルスは太字で、分離4株は遺伝子型の後ろに(株名)で、コクサッキーウイルスA9型標準株を矢印で示した。

表1 中和反応による同定不能株の遺伝子解析による型別

分離株	渡航先	遺伝子型別	相同性(アミノ酸)
TN97-0487	THA, NEP	E-9	78.3(88.5)
TAS92-1482	THA, INA, SIN	EV-73	77.4(89.9)
T97-1831	THA	EV-73	83.7(95.7)
TS94-0534	TUR, SIN	EV-79	86.7(94.6)
NH95-0601	NEP, HKG	EV-79	92.6(99.1)
DT94-0227	IND, THA	EV-97	85.3(97.5)
T92-1499	THA	E-17	67.1(71.2)
TN94-0349	THA, NEP	CV-A9	73.3(79.9)

旅行先: HKG; 香港、INA; インドネシア、IND; インド、NEP; ネパール、
SIN; シンガポール、THA; タイ、TUR; トルコ

表2 コクサッキーウイルス A9 型標準株と分離株 TN94-0349 との交叉中和反応

ウイルス	抗血清による中和抗体価	
	CV-A9	TN94-0349
CV-A9	1280	<8
TN94-0349	<8	3200

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書（平成 19 年度）

ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討
エンテロウイルスによる小児期中枢神経合併症サーベイランスについて

研究協力者：中野貴司（国立病院機構三重病院 臨床研究部 国際保健医療研究室長）
共同研究者：鈴木由紀、松野紋子、田中孝明、一見良司、延時達朗、高橋純哉、下野吉樹、
永嶋有希子、庵原俊昭（国立病院機構三重病院）、
山内昭則、荒井祥二郎（三重県保健環境研究部）

研究要旨

エンテロウイルスは、ポリオウイルスによる麻痺、エンテロウイルス 71 型による脳炎など、特に小児で頻度の高い重篤な中枢神経合併症を起こすことが知られている。3 年間の小児科入院患者 4232 例中、15 例の脳炎、脳症、脊髄炎があり、エンテロウイルスが原因のものは 3 例で、原因として最多であった。それ以外に、エンテロウイルスの関与が疑われた例が 2 例あった。エンテロウイルス感染症とその中枢神経合併症を迅速かつ正確に把握するためのサーベイランスシステムを強化するには、臨床症例からの適切な検体採取法ならびに実験室診断法に関する指針の作成と、診断基準の統一が有用であると考えた。

A. 研究目的

エンテロウイルス属は、手足口病やヘルパンギーナなど小児期によくみられる感染症の原因ウイルスとして頻度が高い。そしてまた、ポリオウイルスによる麻痺、エンテロウイルス 71 型による脳炎など重篤な中枢神経合併症を起こすことも知られている。小児におけるその実態を把握し、効果的なサーベイランスの実施に役立てることを目的として、小児科病棟入院患者について検討した。

B. 研究方法

2005～2007 年の 3 年間に、三重病院小児科病棟に入院した児を調査対象とした。

これら患者のうち、脳炎や脊髄炎など中枢神経障害を呈した例について解析した。なお、化膿性髄膜炎と無菌性髄膜炎の症例については、今回は中枢神経障害例に含めなかった。

（倫理面への配慮）

患者の個人情報特定されることのないように十分注意するとともに、解析に用いたデータについても個人の人権やプライバシーが侵害されることのないよう、取り扱いに配慮した。

C. 研究結果

2005～2007 年の 3 年間で 4232 例の入院例があった。これら症例の中で、脳炎や脊

髄炎など中枢神経障害を呈した者は 15 例であった(表 1)。

15 例中 3 例 (症例 4, 7, 9) では、エンテロウイルスの関与が強く疑われ、同定できた原因としては最も頻度が高かった。その他にも、咽頭ぬぐい液や糞便を検体とした PCR 法にてエンテロウイルス陽性であった患者が 2 名存在した (症例 11, 15) が、ウイルス型別同定や他の臨床症状を考え合わせた結果、原因ウイルスとは確定できなかった。その他の感染症では、インフルエンザウイルス B 型による脳症、マイコプラズマによる脳炎がそれぞれ 1 例ずつであった。

エンテロウイルスの関与がほぼ確定あるいは疑われた症例について、簡単に臨床経過を紹介する。症例番号は、表 1 に示したものをを用いた。

(症例 4)

・2 歳 6 ヶ月男児。脊髄炎の患者で、ポリオ様麻痺を呈した。発症は冬季 2 月で、発熱に引き続いて両下肢の筋力低下を来したが、幸い後遺症無く回復した。髄液細胞数 78/3、蛋白 63mg/dl で、急性期の脊髄 MRI 検査、神経生理検査でも異常所見があった。糞便からエンテロウイルス 71 型が分離された。咽頭ぬぐい液と髄液検体では分離 & PCR ともエンテロウイルス陰性であった。エンテロウイルス 71 型に対する血清中和抗体価は、麻痺急性期と 2 週間後ともに 256 倍であった。

(症例 7)

・5 歳 4 ヶ月男児。急性小脳失調の患者で、ヘルパンギーナ罹患時に一過性の神経症状を呈した。髄液細胞数 12/3、蛋白 45mg/dl であった。糞便と咽頭ぬぐい液の PCR 検査でコクサッキー A6 型陽性で、髄液検体は陰性であった。

(症例 9)

・6 歳 3 ヶ月男児。手足口病罹患時にけいれんと意識変容を来し、髄膜脳炎と診断した。髄液細胞数 206/3、蛋白 42mg/dl であった。糞便と咽頭ぬぐい液の PCR 検査でエンテロウイルス 71 型陽性であったが、髄液では陰性であった。後遺症無く回復した。

(症例 11)

・11 歳 3 ヶ月女児。気管支喘息発作後に左下肢麻痺を発症し、回復せずに後遺症を残した (Hopkins' 症候群 ; Acute post-asthmatic amyotrophy)。髄液細胞数 55/3、蛋白 47mg/dl であった。糞便と咽頭ぬぐい液のエンテロウイルス VP4 領域 PCR 検査で陽性であったが、ウイルス同定には至れなかった。

(症例 15)

・14 歳 2 ヶ月男児。発熱で発症し、約 2 ヶ月にわたって精神症状を呈した。辺縁系脳炎に類似した病態と考えた。髄液細胞数 4/3、蛋白 24mg/dl であった。糞便、咽頭ぬぐい液、髄液のエンテロウイルス 5' 非コード領域 PCR 検査が陽性であったが、VP4 領域 PCR とウイルス分離は陰性であった。インフルエンザ H3N2 ウイルスに対する抗体価が、急性期 20 倍、2 週間後 640 倍、4 週間後 1280 倍、と有意に変動した。

D. 考察

小児期のウイルス感染症に伴う中枢神経系合併症としては、脳炎や脳症・脊髄炎など重篤で時には致命的あるいは後遺症につながることもあるが頻度は低いものもあれば、無菌性髄膜炎や熱性けいれんのように発症頻度は高いが通常は予後良好なものも存在する。エンテロウイルスは、これらのいずれをも引き起こすことがよく知られて

いる。インフルエンザウイルスやムンプスウイルスなども中枢神経合併症を来すが、今回私たちが検討した三重病院3年間の入院例における重篤な中枢神経障害の原因としては、エンテロウイルスの頻度が最も高かった。したがって、小児期ウイルス感染症からの重篤な病態を制御するためのサーベイランスシステム構築に際して、エンテロウイルスは重要な対象と考えられた。

本分担研究で呈示した例からわかるように、エンテロウイルスの関与が疑われるものの確定できない症例が存在する。今後検討しなければならないことは、どのような症状の患者に対して、どのような検体（咽頭ぬぐい液、糞便、髄液）を採取し、どこの施設（病院、コマーシャルラボ、地方衛研）でどのような方法（ウイルス分離、PCR）で実験室診断を行えばよいかという指針の作成と、確定診断基準の統一であろう。すなわち、臨床・実験室を統合した標準ガイドラインが作成できれば有用であると考え

E. 結論

エンテロウイルス属は、小児期中枢神経合併症を来す原因ウイルスとして重要である。手足口病やヘルパンギーナなど、Common Diseaseの原因でもあり、患者の各種検体で陽性であった際の解釈や中枢神経障害病因として確定するための診断基準を今後明示したい。

F. 研究発表

(論文発表)

1. 中野貴司. ポリオワクチン. 日本医師会雑誌. 135 巻、10 号. P2191-2195、2007 年 1 月.
2. 中野貴司. ポリオワクチン. 小児科臨床. 60 巻、9 号. P1787-1794、2007 年 9 月.

3. 中野貴司. 予防接種 Q & A ~ポリオ. 小児内科. 39 巻、10 号. P1661-1671、2007 年 10 月.

(学会発表)

1. 永嶋有希子、一見良司、中野貴司、延時達朗、高橋純哉、庵原俊昭、堀内功一. 第 10 回東海小児感染症研究会. 気管支喘息発作後に左下肢麻痺を発症した 11 女児の 1 例. 2006 年 12 月 2 日. 名古屋市.
2. 鈴木由紀、中野貴司、松野紋子、田中孝明、一見良司、延時達朗、高橋純哉、下野吉樹、庵原俊昭. 第 242 回日本小児科学会東海地方会. エンテロウイルス感染症による中枢神経合併症について. 2008 年 2 月 11 日. 津市.

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

表1. 中枢神経障害患者15例（三重病院；2005～2007年）

診断名	年齢 (y)	病原体	ウイルス分離			PCR		
			咽頭	鼻液	髄液	咽頭	鼻液	髄液
1 腸炎	2歳7月	不明						
2 腸炎	2歳10月	不明						
3 腸炎	2歳11月	不明	陽性	陽性	陽性			
4 骨髄炎	2歳4ヶ月	エンテロV	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
5 インフルエンザ脳症	2歳4ヶ月	インフルエンザ B	陽性		陽性			陽性
6 疝気	4歳7ヶ月	不明						
7 小腸炎	5歳4ヶ月	コクサッキー 組	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
8 その他	5歳10ヶ月	不明	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
9 髄膜炎	6歳4ヶ月	エンテロV	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
10 マイコプラズマ脳症	6歳4ヶ月	マイコプラズマ						
11 ノブキス脳炎	11歳3ヶ月	エンテロV	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
12 腸炎	12歳4ヶ月	不明	陽性	陽性	陽性		陽性	陽性
13 腸炎	12歳4ヶ月	不明	陽性	陽性	陽性			
14 腸炎	14歳1ヶ月	不明						
15 腸炎	14歳1ヶ月	インフルエンザ A? エンテロV	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性

厚生労働省科学研究費補助金
ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討研究事業
分担研究報告書

上気道炎患者由来検体からの高感度エンテロウイルス検出法に関する検討

吾郷昌信 長崎県環境保健研究センター

研究要旨

来院時、上気道炎症状を呈した患者の咽頭ぬぐい液からのウイルス分離を試みた。最終的に上気道炎と診断された患者 157 名うち、49 名 (31%) からエンテロウイルス (HEV) が分離された。分離された 49HEV のうち、48 ウイルスは HEV B に分類されるエコーウイルス 5 型(E-5), E-6, E-7, E-9, E-17, E-24, E-25, E-30、コクサッキーウイルス B4 型(CV-B4), CV-B5 であり、HEV A に属するウイルスは CV-A3 の 1 株であった。手足口病患者由来 51 検体からは 5 株の未同定ウイルスが分離された以外はウイルス分離できなかった。また、ヘルパンギーナ患者 8 名の検体からもウイルスを分離することはできなかった。

A. 研究目的

100 以上にも上る血清型が存在するエンテロウイルスは、上気道炎、ヘルパンギーナ、手足口病等のように比較的軽微な症状を示す疾患から無菌性髄膜炎や脳炎などのような重篤な中枢神経疾患に至る多彩な疾患の原因ウイルスである。一般にエンテロウイルスは、アデノウイルスと並んで夏期における普通感冒(夏かぜ)の代表的なウイルスとして知られているが、わが国における実態は明らかにされていない。

エンテロウイルスの分離同定は、培養細胞を用いた組織培養法でウイルスを分離し、中和試験によって血清学的に行われてきた。しかし、検査方法が煩雑な上に検査に長時間を要し、さらに、培養細胞で分離困難なウイルスや、型別困難な

ウイルスが出現するなどの問題点がある。培養細胞で分離困難なウイルス、特にコクサッキーウイルス A (CV-A) に属するウイルスは、乳呑みマウスを用いて分離同定が行われてきたが、培養細胞を用いた方法よりさらに煩雑である。近年、臨床検体から直接 RT-PCR 法でウイルス遺伝子を増幅し、VP4 領域の塩基配列を解読することにより迅速にウイルスの型別同定が行われるようになってきたが、比較的保存された領域のためエンテロウイルスであることは確認できるものの、型同定が困難な場合も多い。最近、Nix らによって開発された Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers (CODEHOP)を用いてエンテロウイルス間で多様性のある VP1 領域を増幅する CODEHOP-PCR 法が、より高率にエンテ

ロウイルスの型別同定を可能にする方法として注目されている。

本研究では夏かぜにおけるエンテロウイルスの侵淫状況を明らかにするために臨床検体からの CODEHOP-PCR 法を用いた高感度検出法の検討を行うことを目的とし、今回は先ず培養細胞を用いて上気道炎患者検体からのウイルス分離・同定を行った。

B. 研究方法

2007年8月から10月初旬までの期間に長崎県下の小児科医院において、来院時、上気道炎症状を呈した患者より採取された咽頭ぬぐい液216検体を材料とした。ウイルス分離には HEp-2、RD-18S、Caco-2、Vero 細胞を使用した。ウイルスの型別同定は、抗血清を用いて中和法により行った。

C. 研究結果

来院時、上気道炎症状を呈した患者216名のうち、最終的に上気道炎と診断された患者は157名であった。157名の患者から採取した咽頭ぬぐい液から62株のウイルスが分離(分離率40%)され、HEV 49株、ヒトパレコウイルス1株、アデノウイルス(Adeno)3株、未同定ウイルス10株であった。上気道炎患者から分離されたウイルス中、HEVは79.0%を占めた。分離された49株のHEVの内訳は、48株がHEV Bに分類されるエコーウイルス5型(E-5)、E-6、E-7、E-9、E-17、E-24、E-25、E-30、コクサッキーウイルスB4型(CV-B4)、CV-B5であり、E-5が12株、E-6が5株、E-30が4株、CV-B4が15株、CV-B5が7株で他はそれぞれ1株ずつであった。HEV Aに属するウイル

スはCV-A3の1株のみであった。

ヘルパンギーナの患者8名からはウイルスは分離できなかった。また、手足口病(HFMD)の患者由来51検体からは、未同定ウイルス5株が分離された以外はウイルス分離できなかった。

D. 考察

今回、上気道炎と診断された患者157名からの培養細胞を用いたウイルス分離率は、約40%であった。分離されたウイルスのうち、HEVが約80%と極めて高率であったが、検体を採取した期間が8月下旬から10月上旬までの約2ヶ月間と短期であったため、HEVによる夏かぜの割合を反映する結果であるとはいえない。今後、夏かぜの流行期間全体を通じたウイルス分離を行う必要があるものと思われる。

上気道炎患者から分離されたHEVは、CV-A3の1株を除いて他の48株は全てHEV Bに属するウイルスであり、CV-Aの分離率は極めて低率であった。また、HEV Aに属するCV-Aが原因ウイルスとなるヘルパンギーナやHFMDからは未同定の5株以外は分離することができなかった。これは、使用した培養細胞がCV-Aに対して感受性が低いことによるものと考えられるが、現行の培養細胞では何れ使用しても高率にCV-Aを分離することは難しい。従来、CV-Aの分離、同定には乳呑みマウスが多用されてきたが、煩雑である上に判定まで長期間を要し、本法が使用できるのは飼育施設有する研究機関に限られる。したがって、これらの方法に変わる高感度検出法が必要であり、CODEHOP-PCR法によって増幅したVP1領域の塩基配列を決め、同定す

る方法もその1つである。

今後、今回使用したサンプルを再度 CODEHOP-PCR 法に基づく同定を行い、分離率を比較検討すると共に、培養細胞ではほとんど分離できなかった CV-A をどの程度検出、同定できるかなどについて検討を進めて行く予定である。

E. 結論

CV-A が原因ウイルスである上気道症状伴う手足口病やヘルパンギーナの患者検体からは培養細胞では分離できなかったことから、乳呑みマウスを用いなくてもこれらのウイルスを迅速且つ高感度に検出できる方法の確立が必要である。

研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金新興再興感染症研究事業
「ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討」
報告書

ヒトコミュニティに循環する腸管系ウイルスの研究
研究協力者 吉田弘 国立感染症研究所

研究要旨

アジア諸国のエンテロウイルスの流行状況を把握するために中国雲南省 CDC と急性弛緩性麻痺患者から分離された 195 株の非ポリオエンテロウイルスについて **molecular typing** を行った。その結果 HEV-A, B, C 群に 5,34,5 の各血清型が含まれており、EV81, 83, 96 等日本では報告のない血清型の流行が推定された。ウイルスゲノムの VP1 部分領域の分子系統解析により他のアジア地域と異なる塩基配列を持つウイルスが雲南省で流行していることが明らかになった。**molecular typing** 法は迅速に血清型が明らかになるのみならず、地域間伝播を推定するツールであるといえる。

A. 研究目的

ヒトエンテロウイルスの多くが不顕性感染であるため、感染患者数が疫学的な閾値を越えてアウトブレイクの存在を認識する。そのため国内外のウイルス流行状況についての情報の蓄積がアウトブレイク時の迅速診断に貢献する。しかし隣接するアジア各国のエンテロウイルスの流行像、特にウイルスゲノム情報についての情報は限定的である。こうした状況の下、アジア地域のウイルスゲノム情報の比較解析を行うため中国雲南省 CDC との共同研究を行った。中国雲南省はラオス、ベトナム、ミャンマーと国境を接し人口 4200 万人を擁する中国南部の省である。

ポリオウイルス検出を目的とした AFP (急性弛緩性麻痺) サーベイランスでは、非ポリオエンテロウイルス (NPEV) も分離される。しかし分離された NPEV の詳細は不明であった。今般 1997 年から 2004 年までの利用可能な NPEV について分子系統学的に解析を行った

B. 方法

AFP サーベイランスの下 1997-2000 年及び 2004 年に計 1219 人の AFP 患者より糞便が採取された。糞便材料は常法

に従い便乳剤を調製し RD-A、Hep-2、L20B 細胞に接種した。ポリオウイルスとして同定された分離株以外のウイルスについて、Oberste 等の方法により VP1 領域の部分塩基配列を決定した。更にこれらの配列は GenBank より得られた標準株と比較を行った。得られた塩基配列はクラスタリングを行い標準株と塩基配列 (アミノ酸) と配列で 75% (88%) 以上相同なものを同一血清型とした。同一クラスターを形成する分離株について代表的な株を選び、中和反応により確定した。アデノウイルスは簡易キットを用いて判定した。

分子系統解析は HEV-A,B は各々 685、654bp, HEV-C は 322bp を用い、kimura-2 parameter により塩基置換を推定、近隣結合法により系統樹を作成した。

C. 結果と考察

1219 患者より 211 株のウイルスが分離された (16.2%)。うち HEV-A, B, C 群に属する分離株は各 5、158、32 株であった。また HEV-A, B, C 群には各々 5、34、5 血清型が含まれていた。なお B 群に属する判別不能株は 1 株、C に属する判別不能株は 5 株だった。なお D 群に属

するウイルスは分離されなかった。エンテロウイルス以外にアデノウイルス 12 株及び判別不能な 1 株も分離された。

分離株及び GenBank より得られたアジア地域の株の遺伝子情報を比較し分子系統解析を行った結果、HEV-A では EV71 について日本で分離された株と中国株でクラスターが形成され地域内伝播の可能性が示唆された。また興味深いことに 2000-2002 年に世界中で大きな流行を起こした E 13 の遺伝子型は雲南株と大きく異なっていることが明らかになった。

一方雲南省で分離された HEV-A,B,C に属するいずれの血清型もアジア地域で分離されているほとんどの株と異なり限局した地域で流行しているものと推察された。しかし中国のほかの地域の情報が限定的であるため更に多くの遺伝子情報との比較が必要であると考えられた。

他方日本では報告のない血清型 (EV81,83,96 など) も見出されており、臨床像の詳細な検討及び検出法の設定など今後の課題である。

D. 結論

エンテロウイルスの遺伝子診断を行うことで型別同定のみならず、アジア地域内の伝播の様子を考察することができた。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Takao S, Wakatsuki K, Yoshida H, Shimizu H and Wakita T

Neutralization Assays for Echovirus 18 Isolates in 2006 Japanese Journal of Infectious Diseases Jpn. J. Infect. Dis., 60 (1), 65-66, 2007

2) Tuul R, Enkhtuya B, Nymadawa P, Kobune F, Suzuki K, Yoshida H and Hachiya M Measles Outbreak after a Post-Honeymoon Period in Mongolia, 2001 Japanese Journal of Infectious Diseases Vol. 60 No. 4, P. 198-199, 2007

3) Fujimoto T, Shinohara M, Ito M, Okafuji T, Okafuji T, Nishio O, Yoshida H, Shimizu H, Chikahira M, Phan GT, Ushijima H Detection of Dual-Infected Cases of Adenoviruses and Coxsackieviruses Type B by Real-Time PCR but not by the Conventional Viral Culture Technique. Clinical Laboratory 605-609, 2007

4) Iwai M, Takizawa T, Nakayama T, Matsuura K, Yoshida H, Hasegawa S, Obara M, Horimoto E, Kurata T, Horie H Evaluation of a two-dose administration of live oral poliovirus vaccine for wild and virulent vaccine-derived poliovirus type 1, 2, 3 strains in Japan. Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 2008, 40(3), 247-253 "

5) Bingjun T, Yoshida H, Yan W, Lin L, Tsuji T, Shimizu H, Miyamura T. Molecular typing and epidemiology of non-polio enteroviruses isolated from Yunnan Province, the People's Republic of China. Journal of Medical Virology 80:670-679, 2008

2.学会発表

- 1) 吉田弘 シンポジウムⅡ「環境水系の感染症」環境水系の感染症：オーバービュー 第48回臨床ウイルス学会,2007年6月2-3日、富山市
- 3) 若月紀代子、川本大輔、香月隆延、渡邊香奈子、吉田弘 福岡市における Human Parechovirus 4 の分離,第48回臨床ウイルス学会,2007年6月2-3日、富山市

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

便乳剤からのエンテロウイルス遺伝子検出

研究者 西村 順裕 国立感染症研究所 研究員

エンテロウイルスは糞口感染あるいは経口飛沫感染によって伝播し、腸管で複製する。このため、長期間にわたりウイルスが糞便中に排出される。したがって、感染者の糞便から作製された便乳剤を培養細胞に感染させ、細胞変性効果を観察する方法により、ウイルス分離が行われてきた。しかしながら、この方法は結果を得るまでに数週間を必要とするなどの欠点があった。そこで、近年報告された VP1 CODEHOP PCR 法を用いて、便乳剤から直接、エンテロウイルス遺伝子を増幅することを試みた。その結果、VP1 CODEHOP PCR 法を応用することにより、細胞培養を経ることなく、エンテロウイルスを検出、同定することができた。その検出感度は、細胞培養法と同程度以上であった。

A. 研究目的

エンテロウイルスはピコルナウイルス科エンテロウイルス属に分類される RNA ウイルスである。エンテロウイルスはエンベロープを有しない、+鎖の一本鎖 RNA ゲノムをもつ小型のウイルスである。エンテロウイルスは糞口感染あるいは経口飛沫感染によって伝播すると考えられている。口から接種されたウイルスは喉頭を経て腸管に達し、複製を始める。このため、長期間糞便中からウイルスが検出される。たとえば代表的なエンテロウイルスであるポリオウイルスの場合、感染後数週間は糞便中にウイル

スが排出される。このため、ポリオウイルス感染者の糞便から便乳剤を作製し、ポリオウイルス感受性をもつ培養細胞の培養液に添加すると、その細胞は数日のうちに細胞変性効果(CPE)を示す。こうして分離したウイルスがどんなウイルスであるかを解析するには、標準血清を用いた感染性の中和法、あるいはウイルスキャプシドをコードするウイルスゲノムを RT-PCR によって増幅し、得られた塩基配列からゲノタイプを推定する方法が使用されている。しかし、このように細胞培養を経由する方法にはいくつかの問題がある。1)ウイルスを細胞に感染さ

せてから CPE が現れるまでに日数がかかる、2)細胞培養設備のない研究室ではウイルス分離が不能、3)培養細胞で CPE を示さない、あるいは増えないウイルスは分離できない、といった問題点がある。近年、Nix らにより、エンテロウイルスの VP1 コード領域のゲノムを高感度に増幅する方法 (VP1 CODEHOP PCR)が発表された。この方法を用いると、ウイルスを培養細胞で増やすことなく、便乳剤から直接の PCR により、VP1 遺伝子の増幅、シーケンス、ゲノタイピングができると思われる。そこで、便乳剤からの VP1 CODEHOP PCR がどのくらい有効であるのか、基礎データの蓄積を行った。

B. 研究方法

便検体および便乳剤の調整

カンボジアの急性弛緩性麻痺 (AFP) 患者の便検体からの便乳剤作製は、WHO ポリオラボラトリーマニュアルに従って行った。便検体 2g を、10ml の PBS(+)および 1ml のクロロホルムで処理し、最終的に 2ml の便乳剤を回収した。

便乳剤からの RNA 回収

High Pure Viral RNA Kit (Roche)および QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いた。ともに取扱説明書に従い、便検体 200ul を処理し、最終的に 50ul

の RNA 溶液を回収した。

RT-PCR

VP4-VP2 RT-PCR には Access RT-PCR System (Promega)を用いた。VP1 CODEHOP-PCR は、Nix らの報告どおりにおこなった。

増幅産物のシーケンスおよび Blast 検索

RT-PCR にて増幅された遺伝子断片の塩基配列を決定後、Blast により相同性検索した。最も高いスコアを示したデータベースに基づいて、ゲノタイプを決定した。

培養細胞によるウイルス分離

Hep-2 および RD 細胞を用いた。24 ウェルプレートでフルシートになった細胞培養液に、便乳剤 200ul あるいは 100ul を加え、1 週間 CPE の出現を観察した。この後 200ul を新しい細胞に感染させ、さらに 1 週間観察を行った。

C. 研究結果および考察

RNA 回収方法の検討

RNA 回収方法が PCR 結果に影響するかどうかを検討した。High Pure Viral RNA Kit (Roche)あるいは QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて、便乳剤 100 検体からの RNA 抽出を行った。このようにして回収した RNA より、VP4-VP2 PCR あるいは VP1 CODEHOP PCR を行った。

PCR による陽性検体数は、Roche VP4-VP2 で 21、Roche VP1 CODEHOP

PCR で 33、QIAGEN VP4-VP2 で 22、QIAGEN VP1 CODEHOP PCR で 30 であった。以上の結果から、Roche と QIAGEN のキットによる PCR 陽性率には差がないものと考えられた。また、VP4-VP2 PCR にくらべ、VP1 CODEHOP PCR の方が検出感度が高いものと考えられた。なお、以上の 100 検体における細胞培養での CPE 陽性検体数は 23 であった。したがって、PCR による便乳剤からの直接遺伝子検出法は、従来の培養細胞 CPE による方法と比べて、同程度の感度があるものと考えられた。以上をふまえ、以下の実験においては、Roche のキットを用いて RNA を回収し、VP1 CODEHOP PCR を行うこととした。

急性弛緩性麻痺患者の便検体からのエンテロウイルス遺伝子検出

上記の 100 検体に加え、さらに 156 検体の便乳剤をもちいて、VP1 CODEHOP PCR を行った。合計 256 検体からの VP1 CODEHOP PCR 陽性数は、57 であった。これらの陽性遺伝子産物のシーケンスに基づいて Blast 検索を行ったところ、細胞培養で頻繁に分離されるエンテロウイルスのみならず、コクサッキーウイルス A1 型、コクサッキーウイルス A19 型などの、細胞培養では増殖しないといわれているエンテロウイルス群も多数検出された。この結果から、VP1 CODEHOP

PCR は、培養細胞で増えないエンテロウイルスの検出および同定にも役立つことが確認できた。

以上のように、VP1 CODEHOP PCR は、便乳剤からも高感度にエンテロウイルスを検出できる方法であることが裏付けられた。従来の VP4-VP2 RT-PCR では、エンテロウイルス属で高く保存されている領域をターゲットとしているため、PCR 成功率が高いかわりにゲノタイピングが困難であるという問題があった。これに対し VP1 CODEHOP PCR は、VP4-VP2 RT-PCR に比べて高感度であるのみならず、エンテロウイルス属で多様性の高い VP1 遺伝子の配列を得ることができるため、ゲノタイピングも容易である。培養細胞を用いたエンテロウイルス同定では、2 週間もの日数が必要であるが、VP1 CODEHOP PCR は RNA 抽出からゲノタイピングまで、二日間以内で行うことが可能である。高感度かつ高速な遺伝子検出法として、利用価値の高い方法である。今後、さらに検体数を増やし、未知のエンテロウイルスの同定や疾病との関わりを調査していく予定である。

臨床分離株のウイルス増殖性と細胞レセプターとの相互作用の検討に関する研究

協力研究者：中村 貴史

千葉県がんセンター 研究局

研究要旨

感度の良い病原体サーベイランスシステムと連動した精度の高い実験室診断システムの確立は、ウイルス感染症の制御戦略を検討する上で、極めて重要である。日常的に検出される呼吸器・腸管感染ウイルスであるエンテロウイルス、およびアデノウイルスの病態は、血清型の別によって極めて多彩である。ウイルス感染は、宿主細胞における受容体（レセプター）を認識することによって成立することから、ウイルス感染の効果的制御を目指し、各血清型のウイルス増殖とレセプターの相互作用に焦点を当てた。臨床検体由来のエンテロウイルス、およびアデノウイルスをより簡便に効率よく分離・培養するため、標準株を用いて様々な細胞株での増殖性とそのウイルスレセプターの発現を検討した結果、より広範なエンテロウイルスの分離・培養には ICAM-1 レセプターの発現が必要であることを見出した。そして、ICAM-1 発現 RD 細胞クローン 8 を構築し、その細胞では従来の RD 細胞では増殖しない C 群に属するエンテロウイルスも増殖させることが可能となった。一方、アデノウイルス 11 型では、従来の分離培養に使われている細胞以外にも大腸癌、肺癌、膵臓癌の細胞株で高い増殖性を示した。

A. 研究目的

感度の良い病原体サーベイランスシステムと連動した精度の高い実験室診断システムの確立は、ウイルス感染症の制御戦略を検討する上で、極めて重要である。日常的に検出される呼吸器・腸管感染ウイルスであるエンテロウイルス、およびアデノウイルスの病態は、血清型の別によって極めて多彩である。現在、ウイルス同定には、中和試験や RT-PCR 法が使

われている。一方、細胞培養によるウイルス分離は、上記の 2 つの方法より時間を要するけれども、分離培養されたウイルスは、その病原性や変異を詳細に解析するために極めて有益である。

本研究では、ウイルス感染が、宿主細胞における受容体（レセプター）を認識することによって成立することに注目し、各血清型のウイルス増殖とレセプターの相互作用に焦点

を当て解析し、これらから得た知見を新興・再興ウイルス感染症の発生を迅速かつ感度良く検出するための基盤情報および研究資源として活用することを目的とする。

B. 研究方法

研究材料として、臨床分離サンプルを使用する前に、ヒトエンテロウイルス 35 株の標準株 (A 群の CAV2/Ohio1 株、CAV3/Nancy 株、CAV4/JVB 株、CAV10/Kowalik 株、CAV16/G-10 株、CAV71/BrCr 株、CAV71/Hungary78 株、CAV71/258Blugaria 株、CAV71/C7Osaka 株、CAV71/Nagoya 株、CAV71/SIIsehara 株、B 群の E4/Pesacek 株、E4/DuToit 株、E5/Noyce 株、E6/D' Amori 株、E6/Cox 株、E6/Burgess 株、E7/Wallace 株、E9/Hill 株、E11/Gregory 株、E11/Silva 株、E13/DelGamen 株、E17/CHHE29 株、E18/Metcalf 株、E24/DeCamp 株、E25/JV4 株、E30/Bastianni 株、C 群の CAV1/TT 株、CAV11/Belgium1 株、CAV13/Flores 株、CAV15/G9 株、CAV17/G12 株、CAV18/G13 株、CAV21/Kuykendall 株、D 群の EV68/Femon 株) を用いて、3 種類の細胞におけるエンテロウイルスレセプターの発現とウイルス増殖を検討した。HEp2 細胞 (ヒト喉頭癌細胞)、RD 細胞 (ヒト横紋筋腫細胞)、Vero 細胞 (アフリカミドリザル腎由来細胞) のレセプター発現は、4 種類の抗体 Anti-CAR antibody (Upstate 社)、Anti-DAF antibody (Chemicon 社)、Anti-ICAM1 antibody (chemicon 社) による FACS 解析法によって、ウイルス増殖性は細胞における簡易ウイルス力価測定法によって検討した。

HEp 細胞より RNeasy キット (Qiagen 社) により RNA を回収し、Titan RT-PCR キット (Roche 社) によって、ヒト ICAM-1 レセプターをクロ

ーニングした。この遺伝子を発現するレンチウイルスベクターを構築し、RD に感染後、安定して ICAM-1 を発現する 10 個のクローンを選別した。各クローンの ICAM-1 発現レベルは、Anti-ICAM1 antibody 抗体による FACS 解析法によって検討した。次に、最も高い発現クローン細胞におけるウイルス増殖性は細胞における簡易ウイルス力価測定法によって検討した。

ヘルパンギーナと診断された患者の咽頭ぬぐい液から分離したエンテロウイルス CAV2 と CAV4、無菌性髄膜炎と診断された患者の咽頭ぬぐい液から分離したエンテロウイルス CAV9、および上気道炎と診断された患者の咽頭ぬぐい液から分離したアデノウイルス 11 型を用いて、5 種類の細胞 (Caco2 細胞、HEp2 細胞、RD 細胞、ICAM-1 発現 RD 細胞クローン 8、Vero 細胞) と Caco2 細胞以外の大腸癌細胞株、肺癌、膵臓癌、乳癌、食道癌、肝癌癌、および神経芽種の細胞株におけるウイルス増殖を簡易ウイルス力価測定法によって検討した。又、アデノウイルス 11 型のレセプターである CD46 の発現は、Anti-CD46 antibody (BD 社) 抗体による FACS 解析法によって検討した。

【倫理面への配慮】

本研究で用いる臨床材料の採取は、「疫学研究における倫理指針」に基づき、材料提供者および家族の個人の尊厳および人権の尊重、個人情報保護に配慮して実施した。

C. 研究成果

FACS 解析より、HEp2 細胞は全てのレセプターを、RD 細胞は CAR と DAF を、Vero 細胞は CAR を発現していた。一方簡易ウイルス力価測定より、他の細胞と比較して RD 細胞では、35 種類のウイルスの中、29 種類のウイルスが

最も高い増殖性を示した。RD細胞で増殖しないウイルス (CAV11、CAV13、CAV15、CAV17、CAV18、EV68) の中で、CAV11、CAV13、CAV15、CAV18 は HEp2 細胞においてのみ、高い増殖性を示したが、CAV17 と EV68 は、どの細胞においても増殖することが出来なかった。

レンチウイルスベクターにより作成した ICAM-1 発現 RD 細胞クローンは、すべて安定して ICAM-1 を発現していた。特にクローン 8 は、最も高い ICAM-1 の発現を示した。そのクローン 8 における CAV11、CAV13、CAV15、CAV18 の増殖性を検討したところ、効率の良いウイルス増殖を確認した。次に HEp2 細胞、ICAM-1 発現 RD 細胞クローン 8、および Caco2 大腸癌細胞 (CAR、DAF および ICAM-1 を発現している) における CAV11、CAV13、CAV15、CAV18 の増殖性を比較検討したところ、どのウイルスも ICAM-1 発現 RD 細胞クローン 8 において、最も高い増殖性を示した。

咽頭ぬぐい液からの臨床分離エンテロウイルス、又はアデノウイルスの Caco2 細胞、HEp2 細胞、RD 細胞、ICAM-1 発現 RD 細胞クローン 8、Vero 細胞における増殖性を検討した結果、CAV 4 型と CAV9 型は RD 細胞 (と ICAM-1 発現 RD 細胞クローン 8) において、アデノウイルス 11 型は Caco2 細胞において最も高い増殖性を示した。より感受性が高い細胞種を見つけるため、20 種類の腫瘍細胞株における増殖性も検討した結果、アデノウイルス 11 型では Caco2 細胞と同じ大腸癌の細胞 (HT29)、肺癌 (A549)、膵臓癌 (AsPC1) の細胞株で高い増殖性を示した。一方、CAV4 と CAV9 は、どの癌細胞でも増殖しにくいことが分かった。又、高い感受性を示した細胞株と低い感受性を示した細胞株において、アデノウイルス 11 型の細胞レセプターである CD46 の発現を検討した

結果、CD46 は全ての癌細胞株において高発現しており、有意な発現量の差は見られなかった。

D. 考察

標準株を用いた各細胞における増殖性の解析より、多くのヒトエンテロウイルスは RD 細胞において、効率よく増殖した。C 群に属する 4 種類のウイルス (CAV11、CAV13、CAV15、CAV18) は、RD 細胞と Vero 細胞ではなく、HEp2 細胞のみで増殖することが可能であることより、レセプター解析の結果とあわせて考えると、HEp2 細胞のみで発現している ICAM-1 レセプターが重要であると考えられる。一方、2 種類の CAV17 と EV68 のウイルスは、3 種類の細胞でも増殖しなかったことより、未知のレセプターが存在するというを示唆している。

RD 細胞は、C 群に属する 4 種類のウイルス (CAV11、CAV13、CAV15、CAV18) の増殖に抵抗を示したが、その細胞に ICAM-1 レセプターを安定して発現させることによって、高い増殖性を獲得したことから、この 4 種類のウイルスの感染には ICAM-1 レセプターが重要であると考えられた。さらに、ICAM-1 発現 RD 細胞クローン 8 は、臨床検体サンプルから広範なエンテロウイルスの分離・培養に役立つと期待される。

臨床分離株である A 群に属する CAV4、および B 群に属する CAV9 とも、RD 細胞において効率よく増殖し、これは標準株を用いた結果と一致していた。又、RD 細胞以外の 20 種類の腫瘍細胞株における増殖性も検討した結果、どの癌細胞でも感受性は低く、エンテロウイルスの分離・培養には RD 細胞が最適であると示唆された。一方、臨床分離株であるアデノ

ウイルス 11 型は、Caco2 細胞と同じ大腸癌の細胞と、肺癌、膵臓癌の細胞で高い感受性を示し、アデノウイルス 11 型の分離には Caco2 以外の細胞株も有効となり得ることが示唆された。又、高い感受性を示した細胞株と低い感受性を示した細胞株において、ウイルスレセプター CD46 の発現量の差は見られなかったことより、アデノウイルス 11 型の増殖性の違いは、CD46 レセプターというよりも、他の細胞因子に関係していることが示唆された。

E. 結論

臨床検体より、日常的に分離される呼吸器・腸管感染ウイルスであるエンテロウイルス、およびアデノウイルスを簡便に効率よく分離・培養するため、標準株を用いて様々な細胞腫での増殖性とそのウイルスレセプターの発現を検討した結果、より広範なエンテロウイルスの分離・培養には ICAM-1 レセプターの発現が必要であることを見出した。そして、ICAM-1 発現 RD 細胞クローン 8 を構築し、その細胞では従来の RD 細胞では増殖しない C 群に属するエンテロウイルスも増殖させることが可能となった。一方、アデノウイルス 11 型は大腸癌、肺癌、膵臓癌の細胞で高い増殖性を示した。今後、これらの知見は、新興・再興ウイルス感染症の発生を迅速かつ感度良く検出するための基盤情報および研究資源として活用する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金

ウイルス感染症のための効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討

ピコルナウイルス小班 分担 研究報告書

パレコウイルスの抗体保有状況の解析

主任研究者 清水博之 国立感染症研究所 ウイルス2部室長

協力研究者 町田早苗 埼玉医科大学

協力研究者 西村順裕 国立感染症研究所 ウイルス2部

研究要旨 パレコウイルス(HPeV)各血清型の伝播状況を把握するために年齢別健康人血清を用いて HPeV1-3 型の抗体保有状況を解析した。HPeV1 型の抗体保有率は平均 93%で、HPeV3 型は 72%であった。HPeV1 型と HPeV3 型は国内に広く蔓延している可能性があり、乳幼児期に不顕性感染していることも示唆された。HPeV2 型の抗体保有率は平均 21%と低く、6 歳から 15 歳までの抗体保有率は 36.5%で乳幼児期の不顕性感染が推測されるが、15 歳から 50 歳未満の抗体保有率は 10%と低く、HPeV2 伝播は少なくなっているものと考えられた。

A. 研究目的

Human Parechovirus (HPeV) 1 型と 2 型は、かつては Enterovirus 属(エコーウイルス 22 型および 23 型)に分類されていたが、Stanway らによりピコルナウイルス科の中の独立した属である Parechovirus 属に再分類された。最近の報告では、我が国で HPeV1 型、3 型、4 型、6 型が分離されている。HPeV2 型は、かつては分離されていたが、1986 年以降分離報告はない。HPeV は急性胃腸炎や呼吸器症状患者から比較的多く分離されているが、脳炎や髄膜炎患者からの分離も報

告されている。我が国における、各 HPeV 血清型の伝播状況および特定疾患と関連性については明らかにされておらず、ウイルス感染症の効果的な制御のために感染源などを解析する上で血清疫学解析は重要である。今回、我々は年齢別健康人血清を用いて HPeV1-3 型の抗体保有状況を解析したので報告する。

B. 研究方法

1 歳から 59 歳までの健康人血清計 235 検体を用いた。被験血清については表 1 に示した。被験血清検体を 1:8

から 1 : 2048 まで 2 倍階段希釈し、Vero 細胞で発現する CPE 抑制を指標とした血清中和抗体法で抗体価を測定した。血清抗体価 8 倍以上を陽性とした。中和抗体法に使用したウイルス株は、HPeV1 型は Harris strain、HPeV2 型は Williamson strain、HPeV3 型は A308/99 strain を用いた。(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者および家族等の人権・尊厳、利益について十分配慮して行った。採血に際しては、当該施設においてインフォームドコンセントを実施し、試料から個人が特定されないよう配慮した。

C. 研究結果

HPeV1 型の抗体保有率を見ると 3 歳以下では 54.5%、4 歳～5 歳では 78.8%、6 歳から 10 歳未満では 94.5%、20 歳以上では 95%以上であった(図 1)。

HPeV2 型は、全体的に抗体保有率(平均 21%)が低く、特に 5 歳以下と 16 歳から 50 歳未満で平均 10%と低かった。しかし、6 歳から 15 歳までの抗体保有率は 36.5%であった(図 2)。

HPeV3 型抗体保有率は平均 72%であり、年代別に見ると 3 歳以下では 45.5%、4 歳～5 歳では 78.8%となった。6 歳から 10 歳未満では 88.9%、10 歳から 20 歳未満では 70.0%、20 歳から 30 歳未満では 87.5%、30 歳～

40 歳未満では 77.5%、40 歳～50 歳未満 55.0%そして 50 歳～60 歳未満 75.7%であった(図 3)。

HPeV 1 型と HPeV 3 型の抗体保有を 3 歳以下の子供でみると両型の陰性者より片方のみの陰性が多かった(表 2)。

D. 考察

HPeV 1 型は、今回検討した血清では 8 歳以上でほぼ 100%の抗体保有率で広く国内に蔓延していることが推測された。

HPeV3 型に対する抗体保有率は、平均 72%と HPeV1 より低く、各年齢群で抗体保有率の多少のバラツキが認められた。HPeV1 型と HPeV3 型共に乳幼児期に不顕性感染することが示唆された。

HPeV2 型は、全体的に抗体保有率(平均 21%)が低く、特に 5 歳以下と 16 歳から 50 歳未満で低かった。学童期に一旦保有率が高くなり、その後低くなるパターンとなり、流行期・非流行期の存在が示唆された。国立感染症研究所病原体検出情報によると、1986 年以来 HPeV2 の分離報告はないが、HPeV2 の不顕性伝播の可能性が明らかになった。

HPeV 1 型と HPeV 3 型の抗体保有を 3 歳以下の子供でみると両型の陰性者より片方のみの陰性が多く、感染伝