

ウイルス感染症の効果的制御のためのRNAゲノム抗体ライブラリーの開発

研究協力者：中村 貴史

東京大学医科学研究所

研究要旨

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。本研究では、RNAをゲノムとしてもつ弱毒化麻疹ウイルスの他に類ない特性を応用し、ウイルスに一本鎖抗体を提示させた革新的抗体ディスプレイライブラリーを作成する。そして、その技術を用いてウイルス特異的抗体を同定し、免疫抗体法をベースにした実験室診断システムの確立を目指している。本年度では、麻疹抗体ライブラリーの作成に焦点を当てた。GATAWAYシステムを利用したプラスミドライブラリーの構築と、T7ポリメラーゼ発現ワクシニアウイルスを利用したレスキューシステムにより、より多様性の高い麻疹ウイルス抗体ライブラリーを作成した。細胞を利用した抗体スクリーニングでは、短時間で簡便に効率よく scFv の同定できる可能性が示唆された。今後は、細胞に換えて、ウイルスそのものや、ウイルス蛋白、又はウイルス感染細胞に対するバイオパニングを行い、ウイルス特異的抗体の同定を試みる。それを元にして、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を目指す。

A. 研究目的

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。

本研究では、RNAをゲノムとしてもつ弱毒化麻疹ウイルスの他に類ない特性を応用し、ウイルスに一本鎖抗体を提示させた革

新的抗体ディスプレイライブラリーを作成する。そして、その技術を用いてウイルス特異的抗体を同定し、免疫抗体法をベースにした実験室診断システムの確立を目指している。

B. 研究方法

研究材料として、麻疹ウイルスワクチン株（Edmonston 株）、一本鎖抗体（scFv）合

成ライブラリー（イギリス Geneservice Ltd）を使用した。多様性の高いプラスミドライブラリーの構築のため、GATAWAY システム（Invitrogen 社）を利用した。プラスミドライブラリーから麻疹ウイルスを効率良くレスキューするため、T7 RNA ポリメラーゼ発現ワクシニアウイルスと N、P、または L 発現ヘルパープラスミドを用いた。次に、これらの方法によって得られた麻疹ウイルス抗体ライブラリーの性質を検討するため、以下のように細胞を用いた抗体スクリーニングを試みた。腫瘍細胞 5×10^5 cells を MOI=0.025~0.25 になるようにウイルスライブラリーを感染させる。1 時間のインキュベーション後、感染していないウイルスを除去し、OPTI-MEM（Invitrogen 社）で 4 回感染細胞を洗浄する。洗浄後の細胞と $5 \sim 10 \times 10^5$ cells のウイルス産生細胞（Vero- α His）を 37°C、5%CO₂ の条件下で共培養する。培養 2~3 日後、ウイルス感染細胞を回収し、2 回の凍結融解処理によりウイルス液を回収する。以上の工程を 1 ラウンドとして、3 ラウンド以上繰り返す。3 ラウンド以上のバイオパンギングを繰り返したウイルス液 ~5 μ l、もしくはウイルスプラークから、ウイルス RNA を回収し、RT-PCR 法により scFv 遺伝子を増幅し、変異 H 発現ベクターにクローニングし、20 クローンを得た。各クローンと F 発現プラスミドをバイオパンギングで使用した腫瘍細胞にコトランスフェクションし、高い融合活性を示した 5 クローンを決定した。

【倫理面への配慮】

なし

C. 研究成果と考察

1) GATAWAY システムによるプラスミドライブラリーの構築

T7 プロモーター下に麻疹ウイルス全長 cDNA を含むプラスミドに、その H 遺伝子と融合蛋白になるように scFv ライブラリー遺伝子を挿入する。通常のライゲーション反応によるプラスミドライブラリーの構築では、目的とするプラスミドの獲得効率が悪く、同時に不安定なものであった。この問題を解決するため、 λ フェージの部位特異的組換え反応を利用したプラスミドライブラリーの構築法の開発を試みた。その結果、この構築法では、非常に効率よく、安定して目的とするプラスミドを獲得することが可能となり、 10^6 のライブラリーサイズとなった。

2) 新しいレスキューシステムの構築

T7 ポリメラーゼ発現ワクシニアウイルスを感染した 293- α His 細胞に、1) で構築した scFv と GFP 発現ユニットを挿入した麻疹ウイルス全長 cDNA プラスミドライブラリーと、T7 プロモーター下にあるウイルス蛋白（N、P、及び L）発現プラスミドをトランスフェクションした。2 日後に Vero- α His 細胞を加え、培養を続けた結果、4~5 日目には 70~80% の細胞が GFP 発現と細胞融合した。この新しいレスキューシステムによって、培養シャーレ面積 1 cm² あたり 1×10^4 TCID₅₀ というウイルス産生に成功した。

3) 麻疹ウイルス抗体ライブラリーの細胞におけるバイオパンギング

本工程で選別された 5 クローンの scFv 遺伝子のシーケンス解析を行った。その結果、5 クローン中、3 クローンが同一のシーケンスを示した。これらの結果より、バ

イオパニングに加えて細胞融合アッセイを組み合わせることにより、短時間で簡便に効率よく scFv の同定できる可能性を示唆した。現在、同定された scFv を 293T 細胞で発現させ、ニッケルチャージ親和性レジンにより精製した scFv 抗体の親和性と特異性を検討中である。

- 2. 実用新案登録
なし
- 3. その他
なし

E. 結論

GATWAY システムを利用したプラスミドライブラリーの構築と、T7 ポリメラーゼ発現ワクシニアウイルスを利用したレスキューシステムにより、麻疹ウイルス抗体ライブラリーを作成した。細胞を用いたイオパニングでは、短時間で簡便に効率よく scFv が同定できる可能性を示唆した。今後は、細胞に換えて、ウイルスそのものや、ウイルス蛋白、又はウイルス感染細胞に対するイオパニングを行い、ウイルス特異的抗体の同定を試みる。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標的とし、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を目指す。

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

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
(研究代表者：清水博之)

カンボジア糞便検体を用いたヒトパレコウイルス(HPeV)の分子疫学解析

研究代表者： 清水博之 国立感染症研究所 ウイルス第二部
研究協力者： 町田早苗 埼玉医科大学 医学部
西村順裕 国立感染症研究所 ウイルス第二部

研究要旨

ヒトパレコウイルス(Human parechovirus: HPeV)は、2007年までにHPeV1からHPeV6までの血清型/遺伝子型が報告され、2009年2月には新たにHPeV7とHPeV8が報告された。HPeV1-6の検出報告によると日本ではHPeV5を除くHPeVが検出されているが、HPeV5はアメリカ、オランダなどで報告されその地域および時期により異なる血清型のHPeVが伝播している可能性がある。また、HPeVと臨床症状や重症化との関連性は明らかとされていない。今回、HPeV1-6を迅速かつ感度良く検出するためにRealTime-PCR法を引用し、カンボジアの急性弛緩性麻痺(Acute flaccid paralysis: AFP)患者の糞便検体からHPeV1-6検出を試みた。RealTime-PCR法で256検体から18検体陽性(7.0%)となり、陽性となった検体からHPeV1、HPeV3、HPeV5が同定され、HPeV5は日本では検出例がない血清型/遺伝子型であり、地域により伝播するHPeVのタイプが異なっていることが示唆された。AFP患者ではHPeV陽性18検体のうち10検体からエンテロウイルスが検出され、エンテロウイルスとの重感染も多いことも推測された。

A. 研究目的

ヒトパレコウイルス(Human Parechovirus, HPeV)は、ピコルナウイルス科パレコウイルス属に分類される。HPeV1とHPeV2はかつてEcho virus 22型と23型と呼ばれていたが、1999年に新しくパレコウイルス属と命名された。2007年までにHPeV3からHPeV6までの血清型/遺伝子型が報告され、2009年2月にはHPeV7とHPeV8が新たに報告された。HPeV1-6の検出報告によると日本ではHPeV5を除く血清型が検出されているが、HPeV5はアメリカ、カナダ、オランダでは検出されており、地域および時期により異なる血清型のHPeVが伝播している可能性が考えられている。

日本ではHPeV1-6は主に4歳以下の小児患者からの分離例が多く、急性胃腸炎、呼吸器症状患者等、多様な臨床症状の患者からの分離されている。最近の報告では、HPeV3型が症状の重症化との関連性があるとされているが、HPeV6型も脳炎や髄膜炎からの分離例もあり、HPeV感染と臨床症状の関連性はほとんど解明され

ていない。また、オランダでは、HPeV感染とエンテロウイルスの重感染例も報告されている。

これまでの日本での報告によると分離株からのHPeVの報告例が多い。ウイルス分離をせず検体から直接HPeVを迅速かつ感度よく検出するために糞便検体や髄液からHPeV1-6を検出するRealTime-PCR法が報告されている。HPeVの血清型解析にはVP1領域のRT-PCR法を行い、塩基配列を決定する必要がある。

今回、我々はカンボジアの急性弛緩性四肢麻痺(AFP)患者由来の糞便検体を用いて、Real Time-PCR法によるHPeV1-6の検出状況とその陽性サンプルの分子疫学を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 検体

2006-2007年間にカンボジアのAFP患者128人から提出された糞便各2検体、計256検体を用いた。

2. RNAの抽出およびcDNAの合成

糞便検体からWHOポリオラポトリーマニュアルに従って便乳剤を製し、便乳剤からHigh Pure Viral RNA Kit (Roche)を用いてRNAを抽出した。各RNAからPrime Script[®] 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)を用いてキット中のRandom 6mersでcDNAを合成した。

3. Real Time-PCR法

Benschopらの方法(J Clin Virol, 2008)に基づいた5' NTR領域のprimer、probeを用いたReal Time-PCR法により、HPeV1~6の検出を行った。7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems)仕様書に従い、仕様SDSシステムソフトウェアによる検量線を用いた定量法で解析した。

4. 5' UTR RT-PCR法およびVP1領域のRT-PCR法

Real-Time PCR陽性サンプルは、5' UTR RT-PCR法とVP1領域のRT-PCR法を施行した。5' UTR RT-PCR法とVP1 RT-PCR法は、van der Sandenら(J Clin Virol, 2008)により報告されたprimerを用いた。5' UTR RT-PCR法のバンドからはHPeVの塩基配列を確認し、VP1 RT-PCR法では血清型の同定を行い、その塩基配列を決定した。

5. エンテロウイルスCODEHOP PCR法

エンテロウイルスVP1部分遺伝子検出のためにCODEHOP PCR法を行った。nested RT-PCR法を施行し、350~400bpのバンドが検出された検体を陽性とした。PCR増幅産物を精製し、ダイレクトシーケンシングを行い、塩基配列を解析した。

【倫理面についての配慮】

本研究で用いた臨床材料の採取は、「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及び人権の尊重、個人情報の保護に配慮して実施した。

C. 研究結果

カンボジアのAFP由来糞便検体256検体からRealTime-PCR法でHPeV陽性検体は18検体(7.0%)が陽性となった。RealTime陽性18検体中5' UTR RT-PCR陽性は12検体(4.7%)であった。検出バンドからいずれもHPeVの塩基配列を確認した。RealTime-PCR陽性で5' UTR RT-PCR陽性、VP1 RT-PCR陽性で血清型が同定

できたのは8検体(3.1%)であった(表1)。

AFP患者128名中HPeV陽性者13名(10.2%)であった。13名のうち2検体ともに陽性となったのは5名であった。この陽性者5名のうち、5' UTR領域RT-PCR陽性とVP1 RT-PCRで血清型が同定できたのは4名であった。4名からは2検体とも同一の血清型が同定でき、HPeV1が2名、HPeV3が1名、HPeV5が1名となった(表1)。

RealTime-PCRで陽性となった18検体でエンテロウイルスVP1 CODEHOP PCRでエンテロウイルスが検出されたのは10検体であった。同定血清型はコクサッキーA1(CA1)、コクサッキーA2(CA2)、エンテロウイルス11(E11)、エンテロウイルス14(E14)、エンテロウイルスB群(HEV-B)、エンテロウイルス71(EV71)、エンテロウイルス88(EV88)であった。HPeV陽性13名中7名からエンテロウイルスが検出された。2検体共にHPeVが検出され血清型が同定できた4名中3名からCA1、E14、HEV-Bが検出された。

D. 考察

日本での多くの報告でHPeVはかつて保存されていた分離株から検出されており、臨床材料の糞便や髄液から直接検出された報告は少ない。今回、HPeV1-6までの検出を糞便中から直接RNAを抽出し、迅速で感度の高いRealTime-PCR法で解析した。

カンボジアのAFP由来糞便検体256検体から18検体(7.0%)が陽性となった。陽性検体をRealTime-PCR法と同領域の5' UTR RT-PCR法で確認できたのは12検体(4.7%)であり、VP1 RT-PCRで血清型を同定できたのは8検体(3.1%)であった。5' UTR RT-PCR法のバンドから血清型を同定できないがHPeV塩基配列を確認した。検出率は感度によるものと推測されるが、このRealTime-PCR法はHPeVのサーベイランスに利用できると考えられる。最近報告されたHPeV7、HPeV8もこの方法で検出可能であるかどうか検討を要する。カンボジアのAFP患者128名中13名(10.2%)HPeV陽性であった。そのうち提出された2検体共にHPeVが検出されたのは5名であった。5名中2名からはHPeV1が検出された。1986年にジャマイカでHPeV1が原因とされるAFPアウトブレイクが報告されている。

表 1 便検体からの遺伝子検出

HPeV遺伝子検出患者No.	検体No.	Real-time PCR	5'UTR PCR	VP1 PCR (genotype)	CODEHOP PCR (entero, genotype)
1	CAM3099	+			
2	CAM3120	+	+		
3	CAM3131	+			
4	CAM3132	+	+		+ (EV88)
	CAM3133	+			
5	CAM3150	+	+		
6	CAM3177	+	+	+ (HPeV1)	
7	CAM3178	+	+	+ (HPeV1)	
	CAM3187	+	+	+ (HPeV5)	+ (HEV-B)
	CAM3188	+	+	+ (HPeV5)	+ (HEV-B)
8	CAM3209	+	+	+ (HPeV3)	+ (CA1)
	CAM3210	+	+	+ (HPeV3)	+ (CA1)
9	CAM3213	+	+	+ (HPeV1)	+ (E14)
	CAM3214	+	+	+ (HPeV1)	+ (E14)
10	CAM3223	+			+ (E11)
11	CAM3249	+			
12	CAM3258	+			+ (EV71)
13	CAM3339	+	+		+ (CA2)
Total 13 人	18 検体	18 検体	12 検体	8 検体	10 検体

今回検出された2名もHPeV1によるAFPとも考えられるが、そのうち1名はEV14重感染例でありエンテロウイルスもAFPとの関連が指摘されているので関連性は更に多くの例を解析する必要がある。他8名からは1検体のみ陽性でその多くの場合ウイルスRNAが少量で血清型を同定できなく不顕性感染例の可能性が高い。カンボジアの糞便から日本国内で検出されていないHPeV5が検出された。日本ではHPeV1、HPeV3、HPeV6が多く検出されているので地域により検出されるHPeV血清型/遺伝子型が異なる可能性が示唆された。

E. 結論

カンボジアのAFP患者由来糞便検体からRealTime-PCRによるHPeV1-6の検出を試みたところ、256検体中18検体(7.1%)陽性となった。

陽性となった検体からHPeV1、HPeV3、HPeV5が同定され、HPeV5は日本では検出例がない血清型であった。提出検体2検体からHPeVが検出され、血清型が同定された4名からエンテロウイルスの重感染が認められた。AFPとの関連性は今後多数の検体の解析をする必要がある。また、RealTime PCRは高感度かつ半日で検出が可能でありHPeV1-6のサーベイランスに応用できる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

町田早苗、西村順裕、清水博之：カンボジアにおけるHuman parechovirus (HPeV)分子疫学解析。第56回日本ウイルス学会学術集会。岡山市。2008年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

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

エンテロウイルス感染マウスモデルの解析

研究分担者： 有田峰太郎 国立感染症研究所 ウイルス第二部

研究要旨

PVおよびEV71の擬似ウイルス粒子を用いて、PVおよびEV71の感染を阻害する化合物を同定した。同定した化合物の中で、GW5074 (Raf-1阻害剤)はPVおよびEV71の複製を共通に阻害した。

A. 研究方法

PV および EV71 擬似ウイルス粒子を調製し、LOPAC1280 化合物ライブラリーの存在下での複製を、ルシフェラーゼ活性を指標として測定した。PV および EV71 の複製を阻害した化合物については、ウイルス株の感染の阻害効果の測定および耐性変異株の分離を試みた。

B. 研究結果

EV71 の感染を特異的に阻害する化合物を3つ同定し (metrifudil, *N*6-benzyladenosine および NF449)、また PV および EV71 の感染を共通に阻害する化合物として GW5074 (Raf-1 阻害剤) を同定した。感染細胞の細胞変性効果の発現を指標として耐性変異株の分離を試みた結果、metrifudil, *N*6-benzyladenosine および NF449 に対する耐性変異株は分離されたが、GW5074 に対する耐性変異株は分離されなかった。

C. 考察

同定した化合物のうち、EV71 の感染を特異的に阻害する化合物 (metrifudil, *N*6-benzyladenosine および NF449) は、耐性変異株が分離されたことから、ウイルスタンパク質を標的として感染を阻害することが示唆された。一方、GW5074 に対する耐性変異株は分離され

なかったため、その標的を同定することはできなかった。このことは、GW5074 は、PV および EV71 の複製の中で非常に保存された部位もしくは複製過程を標的としていることを示唆する。

D. 健康危機情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

Minetaro Arita, Takaji Wakita, and Hiroyuki Shimizu. 2008. Characterization of pharmacologically active compounds that inhibit poliovirus and enterovirus 71 infectivity. *Journal of General Virology* 89: 2518-2530

Minetaro Arita, Yasushi Ami, Takaji Wakita, and Hiroyuki Shimizu. 2008. Cooperative effect of the attenuation determinants derived from poliovirus Sabin 1 strain is essential for attenuation of enterovirus 71 in the NOD/SCID mouse infection model. *Journal of Virology* 82: 1787-1797

2. 学会発表

有田峰太郎、脇田隆宇、清水博之、GW5074 のエンテロウイルス複製阻害活性に関する解析、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月

F. 知的財産権の出願・登録状況 なし

平成 20 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」
研究報告書

アイチウイルス複製機構の解析

研究協力者 佐々木 潤 藤田保健衛生大学医学部講師

研究要旨

本研究はアイチウイルスの複製機構を分子生物学的に明らかにすることを目的とする。今年度は、非構造タンパク質の一つである 2A タンパク質の機能解析を行った。アイチウイルスの 2A タンパク質は、他の多くのピコルナウイルスの 2A と異なりプロテアーゼ活性が無く、パレコウイルスやトリ脳脊髄炎ウイルスの 2A とともに、アミノ酸配列中に哺乳類の癌抑制遺伝子 H-rev107 と共通のモチーフが存在することが知られている。本研究において、アイチウイルスの 2A タンパク質がゲノム複製に重要な役割を果たしていることが示唆された。H-rev107 ファミリーに属する 2A タンパク質で、ゲノム複製への関与が示されたのは初めてである。

A. 研究目的

アイチウイルスは、カキ関連の胃腸炎集団発生事例から 1989 年に我が国で初めて分離されたピコルナウイルスである。胃腸炎との関連の有無の解明に向け、ウイルス発見以来日本とアジア各国で行われてきた疫学研究に加え、近年、ヨーロッパやブラジル、アフリカでの血清疫学研究結果や胃腸炎患者便からのウイルス RNA 検出事例が報告されるようになった。一方、病原体の増殖機構の理解が感染制御に不可欠であると考えられるが、本ウイルスの複製機構には、未だ不明な点が多い。そこで本研究は、アイチウイルスの複製機構を分子生物学的に明らかにすることを目的とする。

アイチウイルスの非構造タンパク質のひとつである 2A タンパク質は、他の多くのピコルナウイルスの 2A と異なり、プロテアーゼ活性が無く、パレコウイルスやトリ脳脊髄炎ウイルスの 2A とともに、アミノ酸配列中に哺乳類の癌抑制遺伝子 H-rev107 と共通のモチーフが存在することが知られている。パレコウイルス 2A がウイルス RNA 結合能を有することは報告されているが、ウイルス複製に必要なかどうかを含め、2A の詳しい機能は明らかになっていない。そこで今年度はアイチウイルス 2A タンパク質の機能解析を行った。

B. 研究方法

ウイルスゲノム完全長 cDNA クローンのキャプシドコード領域をルシフェラーゼ遺伝子と置換したレプリコンを基に、2 種類の 2A 変異体を作成した。1 つは、136 アミノ酸からなる 2A の 35-127 アミノ酸を、異なる読み枠にコードされる無関係な配列に置換し（フレームシフト [fs] mutant）、もう一つは、H-rev107 ファミリーに属するタンパク質で保存されているモチーフの一つ、NC (Asn-Cys)モチーフを Ala-Ala に置換した (NC mutant)。これらの変異体について、Vero 細胞での複製能および無細胞翻訳-複製系でのプラス鎖・マイナス鎖 RNA 合成能を調査した。また、感染細胞あるいは 2A を単独で一過性発現させた Vero 細胞における 2A の局在を蛍光免疫染色により観察した。

C. 研究結果

両変異体とも Vero 細胞でのゲノム複製は認められなかった。無細胞翻訳-複製系を利用した解析では、マイナス鎖合成量が fs mutant および NC mutant でそれぞれ野生型の 18% と 42% に減少していたのに加え、プラス鎖合成は全く、あるいはほとんど検出できないレベルにまで減少していた。感染細胞および 2A を単独発現させた細胞において、2A は核と細胞質全体に分布し、核周囲に濃い染色像が観察された。

D. 考察

アイチウイルスの2Aタンパク質は、ゲノム複製に重要な役割を果たしていることが示唆された。特に、今回導入した変異はマイナス鎖合成よりプラス鎖合成の方を著しく阻害した。今後、マイナス鎖合成およびプラス鎖合成における2Aの役割を詳細に検討していく予定である。また、ウイルスゲノム複製が細胞質で行われるのに対し、核にも2Aが分布していたことから、ゲノム複製に直接関わるだけでなく、感染細胞にも何らかの影響を与えている可能性も考えられ、2Aの細胞内局在についても今後検討を加えたい。

E. 研究発表

1. 論文発表：

Sasaki J, Taniguchi K: Aichi virus 2A protein is involved in viral RNA replication. **J Virol** 82: 9765-9769. 2008.

2. 学会発表：

石川球美子、佐々木潤、前野芳正、守口匡子、河本聡志、谷口孝喜: アイチウイルス2Aタンパク質の性状解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 岡山, 2008年10月

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究年度＝2008

分担研究者名＝小池智（東京都神経科学総合研究所）

ポリオウイルス感受性動物モデルに関する研究

研究要旨

I. ポリオウイルスの感染防御には IFN 応答が重要であることを昨年度までに示した。今年度はさらに、細胞質内 RNA センサーである RIG-I, MDA5、膜結合型 RNA センサーである TLR3, TLR7 のアダプター TRIF, MyD88 のノックアウトマウスを用い、ポリオウイルス感染防御におけるそれぞれの経路の重要性を調べた。その結果 TRIF による経路が最も重要であることが明らかになった。

II. 昨年度までにヒト genomic DNA をトランスフェクションし、EV71 感受性となったマウス細胞株について報告したが、今年度はその細胞株から EV71 の受容体遺伝子クローニングを行ない、この遺伝子をマウス L929 細胞に導入して EV71 感受性の細胞株を樹立することに成功した。この細胞には EV71, CVA16 に特異的に感染するため、EV71 と CVA16 のウイルス分離を行なう優れた実験系となる可能性がある。

1. ポリオウイルス感受性マウスモデルの研究

A. 研究目的

ポリオウイルス (PV) は糞口感染によりヒトの間を伝播していく。すなわち経口的にヒトの体内に入った PV は消化管、リンパ節で増殖し、ウイルス血症となる。神経系に侵入したウイルスは脊髄や脳幹の神経細胞で増殖し、これらを破壊することにより、四肢のマヒなどに至る。消化管では必ずしも激しい病変を生ずることはないが糞便中等にウイ

ルスが排出され次の感染源となる。ポリオウイルスの封じ込め対策を考える上で経口感染可能な動物モデルを作成し、ワクチンの投与後などのウイルスの排出や伝播の過程での変異の発生などを調べることは重要である。カニクイザルなどの旧世界ザルは経口感染効率が悪く、実験系としても大掛かりなものとなる。効率よく研究する上では経口感染をする小動物モデルが必要である。我々はこれまでヒト PVR 遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (tg) モデルを開発した。

PVR-tgはウイルスの脳内接種、静脈内接種、筋肉内接種、腹腔内接種などでは効率よく感染が成立し、中枢神経系にウイルスが到達しマヒが観察された。ところが経口感染は成立し難かったため、ヒト以外の経口感染動物モデルとはならなかった。我々はポリオウイルスの感染成立には IFN 応答が強く影響を与えていることを IFN α / β レセプターを欠損した PVR-tg マウス (PVR-tg/Ifnar KO)を用いて示した。IFN 応答経路をより詳細に解析することにより、感染効率が高く、よりヒトに近い動物モデルを作成できる可能性がある。最近ウイルスを検知するセンサーの研究が進展し、RIG-I, MDA5 などの細胞内センサー、TLR3, TLR7 などの膜結合型センサーがウイルスの RNA を検知することが判明した。そのため、これらの経路の影響を調べることを企画した。

B. 研究方法

- 1) PVR-Tg21 マウスを RIG-I, MDA5, TRIF, MyD88 ノックアウトマウスと交配し、系統作成を行った。
- 2) 第一段階として、上記系統にポリオウイルス I 型 Mahoney 株を静脈内接種しマウスの生存、組織でのウイルスの増殖、IFN 応答などを調べた。

C. 研究結果と考察

- 1) RIG-I, MDA5 ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して生存率、ウイルスの各組織での増殖、IFN 応答に大きな違いが見られなかった。

- 2) TRIF, MyD88 ノックアウトマウスのうち、TRIF ノックアウトマウスは野生型マウスと比較してウイルス感受性が大きく増しており、野生型が死亡することのない 10^3 PFU 程度のウイルスによっても死亡した。MyD88 ノックアウトマウスはやや感受性が増している程度であった。
- 3) TRIF ノックアウトマウスの肝臓、脾臓、腎臓などの非標的組織においてもウイルス量が増加しており、これらの組織でもウイルスが増殖しやすくなっていた。

これらのことを総合すると、ポリオウイルスの感染は主に TRIF の関与する経路によって検知され、IFN 応答が引き起こされるために効率のよい防御が成立していると考えられた。TLR3 は dsRNA のセンサーであり、TRIF によってシグナルが伝達されている。したがって TRIF の欠損による影響は、TLR3 経路の欠損のためであると考えられる。TLR3 は conventional DC や上皮細胞の一部などに発現していることが知られている。このことはマウスでの感染効率を上昇させるためには、TLR3 経路の消化管での conditional KO などの方法が有効である可能性を示唆している。今後、TRIF ノックアウトマウスの経口感染実験などを行うことが必要である。

II. エンテロウイルス感受性マウス細胞株の樹立

A. 研究目的

EV71 はピコルナウイルス科エンテロウイルス属グループ A に属し、通常はヒトに手足口病を引き起こすウイルスとして知られている。しかし、稀に重篤な脳脊髄炎、ポリオ様マヒを引き起こすことがあり、1970 年代に東ヨーロッパで、1990 年代から 2000 年代にかけて東アジアで大きな流行が見られた。このウイルスの分離は Vero 細胞や RD 細胞を用いて行なわれているが、ウイルスの増殖効率がよくないことやウイルス分離後さらに他のエンテロウイルスとの識別をおこなわなければならないことが問題である。また野生株の神経毒力の測定はサルを用いることが唯一の現実的に可能な方法であり、マウスなどの小動物を用いた実験系を確立することが望まれる。もし、EV71 receptor (EV71R) が同定できれば、マウス細胞にヒト EV71R 遺伝子を発現させ、他のエンテロウイルスなどは感染しない EV71 特異的なスクリーニングシステムを構築することができ、EV71R 遺伝子を導入したマウスを作成すればトランスジェニック動物系を確立できる可能性がある。

我々は昨年までに樹立したヒトゲノム DNA をマウス L929 細胞にトランスフェクションし、EV71 感受性を獲得したマウス細胞株とよとの L929 細胞をマイクロアレイ法で比較することにより EV71R 遺伝子の同定を行なった。この遺伝子を単独で発現させた細胞を作製し、ウイルスの特異性を検討した。

B. 研究方法

- 1) EV71R 遺伝子の同定： 昨年度までに EV71 感受性を獲得した細胞株 Ltr051, Ltr246 を得た。L929 と Ltr051, Ltr246 細胞の RNA を調整し、Whole Human Genome Microarray 4x44K (Agilent) によって発現しているヒト由来 mRNA の比較を行なった。
- 2) L-EV71R 細胞株の樹立： L929 細胞に EV71RcDNA をトランスフェクションして neomycin でセレクションし、それを発現する株を作製した。
- 3) L-EV71R 細胞の感染特異性： L929 細胞ならびに L-EV71R 細胞に enterovirus species A に属する Coxsackievirus (CV) A2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16 を感染させ、CPE の有無により感受性を確認した。

C. 研究結果と考察

- 1) Ltr051 で L929 よりも高レベルで発現していた遺伝子の一つを L929 細胞で単独で発現させたところ、この細胞は EV71 感受性を示した。
- 2) L-EV71R 細胞を樹立することに成功した。
- 3) L-EV71R 細胞、RD-A 細胞の EV71 感染は、細胞を EV71R に対する抗体によって前処理することにより低下することが確認された。
- 4) Ltr051 細胞、RD-A 細胞の EV71 感染は EV71R の細胞外ドメインと免疫グロブリン Fc ドメインを融合させた可溶性 EV71R とウイルスを前処理することにより低下

することが確認された。

- 5) 1)-4)の結果から同定した分子はEV71の受容体であると結論した。
- 6) RD-A細胞、L細胞、L-EV71R細胞のウイルス感受性は表1に示す通りとなった。

表1 L-EV71R細胞等のウイルス感受性の特異性 (CPEの出現を+、-で示した)

ウイルス	RD-A	L929	L-EV71R
CVA2	+	-	-
CVA3	+	-	-
CVA4	+	-	-
CVA5	+	-	-
CVA6	+	-	-
CVA7	+	+	+
CVA8	+	-	-
CVA10	+	+	+
CVA12	+	-	-
CVA14	+	+	+
CVA16	+	-	+
EV71	+	-	+

D. 結論

この方法で得られた遺伝子はEV71R遺伝子としての基準を満たしている。

CVA7, 10, 14はもともとL929細胞に感染するので、これらのウイルスがヒトEV71Rを介して感染するか否かは結論できない。しかし、他のenterovirus species Aに属するウイルスは感染せず、EV71とともに手足口病の原因とされるCVA16は同一分子を介して感染することが明らかとなった。

D. 結論

この遺伝子を単独でマウス細胞に発現した細胞はEV71及びCVA16特異的にウイルス分離を行なうことができるスクリーニングに適した細胞株となり得、実用的に有用である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 小池智、安部優子、永田典代、佐多徹太郎、竹内理、審良静男：ポリオウイルス感染によるIFN応答発動経路の同定 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山市、2008年10月
- 2) 山吉誠也、山下康子、花方信孝、箕輪貴司、竹村太郎、清水博之、小池智：エンテロウイルス71の感染性決定分子の同定 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山市、2008年10月
- 3) Koike S: Interferon induction in response to poliovirus infection in the poliovirus receptor transgenic mice. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, 2008. 09
- 4) 小池 智、安部優子：ポリオウイルスと自然免疫の攻防 第12回日本神経ウイルス研究会、屋久島、2008年7月
- 5) 山吉誠也、山下康子、花方信孝、箕輪貴

司, 竹村太郎、清水博之、小池智: エン
テロウイルス 71 の感染受容体の同定、屋
久島 2008 年 7 月

- 6) Koike S., Abe Y., Studies on poliovirus
RNA sensors, XVth Meeting of the
European Study Group on the Molecular
Biology of Picornaviruses, Barcelona,
Spain, 2008.5.

3. 総説

- 1) 小池智, ポリオウイルスレセプタート
ランスジェニックマウス, LABIO21,
31: 10-13, 2008

G. 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

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
(主任研究者:清水博之)

分担研究報告書

国内の麻疹の現状と教育啓発ならびに麻疹重症化例に関する研究

分担研究者	多屋 馨子	国立感染症研究所感染症情報センター	第三室室長
研究協力者	山本 久美	国立感染症研究所感染症情報センター	第三室研究員
	谷口 無我	国立感染症研究所感染症情報センター	第三室技術補助員
	山本 明史	国立感染症研究所感染症情報センター	第三室技術補助員
	佐藤 弘	国立感染症研究所感染症情報センター	第三室研究員
	岡部 信彦	国立感染症研究所感染症情報センター	センター長

研究要旨

2012年に、国内から麻疹排除を達成するためには、国民全体が麻疹に対する正しい知識を持ち、その予防の重要性を認識することが重要である。そのためには、国内の患者発生状況を正確に把握し、麻疹が決して小児の軽症疾患ではないことを国民に正しく伝える必要がある。そこで、2007年に大規模な流行を経験した東京都にある医療機関を対象に、麻疹の重症化例に関する調査研究を行い、定点把握では不明であった disease burden について調査した。また、情報伝達手段として、平成19年度の本研究班で作成した麻疹教育啓発用DVDを依頼のあった全国1,719施設に送付し、教育啓発に利用してもらった。その効果については、現在調査中であり、まとも次第報告の予定である。本研究班の成果が、麻疹排除に貢献できることを期待したい。

A. 研究目的

2007～2008年にかけて、わが国では、10～20代を中心とする麻疹の全国流行が発生し、特に都内では、流行規模は大きかったが、全数報告になる前の2007年については、麻疹による重症者あるいは死亡者の状況が不明であった。そこで、本研究班の目的である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の中で、特に、麻疹排除に向けた取り組みの一環として、2007年1年間の重

症化例の実態を把握し、今後の麻疹対策に役立てることを目的とした。また、昨年度本研究班で作成した教育啓発用のDVDを希望施設に配布し、情報提供に努めた。その効果について検証し、国民の麻疹に対する知識の向上を図るとともに、麻疹排除に不可欠である予防接種の啓発に努めることを目的とした。

B. 研究方法

1. 麻疹の重症化例に関する検討:2007年

の流行で麻疹による休校が最も多かった東京都を選択し、都内の医療機関で、麻疹患者の診療を行ったと考えられる2129診療科(内科764、呼吸器科180、神経内科123、消化器科232、感染症科13、小児科288、皮膚科278、皮膚泌尿器科40、産科48、産婦人科163)を対象に、2007年の1年間に麻疹の経過中、重症化した症例および死亡した症例について、郵送による質問紙調査を行った。調査対象は、2007年1月1日から12月31日までの1年間に入院した患者で、次の(1)(2)(3)を満たす症例を報告してもらうこととした。(1)24時間以上入院するかまたは死亡退院した、(2)入院あるいは死亡が2007年1月1日から同年12月31日である、(3)入院あるいは死亡の理由、ないしは入院時診断が次のいずれかであった者とした(1)麻疹、麻疹による合併症、麻疹による基礎疾患の増悪、SSPE、2)麻疹ワクチンあるいは麻疹風疹混合ワクチンによる副反応)。

2. 麻疹教育啓発用 DVD の配布: 昨年度の本研究班で作成した教育啓発用 DVD を希望者に配布し、その効果について郵送による調査を行った。

C. 研究結果

1. 麻疹の重症化例に関する検討: 2008年3月10日に調査票を送付し、2008年12月31日までに990診療科から回答を得た。

回収率は46.6%で、内科48.3%、呼吸器科40.3%、消化器科36.2%、神経内科39.0%、感染症科61.5%、小児科53.1%、産科・産婦人科57.8%、皮膚科・皮膚泌尿

器科41.8%であった。

報告麻疹入院例は748例、死亡1例(救急部に入院し、24時間以内に死亡)、ワクチン後の入院2例(麻疹ワクチン後の麻疹発症、麻疹風疹混合ワクチン後の発熱、発疹、好中球減少各1例)であった。

年齢は日齢22日~84歳に分布し、0歳9例、1-9歳9例、10代169例、20代401例、30代113例、40代39例、50歳以上8例、不明2例で、10~30代で全体の92%を占めた(図1)。

診療科別では、内科22%、皮膚科53%、感染症科16%、呼吸器科0.6%、神経内科1.7%、総合診療科2.3%、小児科3.7%、産婦人科0.3%、その他0.1%であった(図2)。

入院理由は、麻疹の重症化が最多で78%を占めた。次いで合併症併発で、肝機能異常が54例で最多であった。その他肺炎50例、気管支炎8例、脳炎5例、髄膜炎3例、気管支肺炎3例、血小板減少症3例、CK異常高値3例、口内炎2例、下痢嘔吐2例、脱水症2例で、横紋筋融解症、麻痺性イレウス、心電図異常、喉頭炎、尿路感染症、腎盂腎炎、角膜炎、外耳道炎、不正性器出血が各1例であった(図3)。妊婦麻疹による入院が5例のうち1名は流産であった。肺炎50例中1例は、呼吸不全となり3次医療機関に転院、1例は肺炎脳炎の両者合併例であった。麻疹脳炎を合併した5例は、16歳、21歳、40歳、42歳、44歳であった。

2. 麻疹教育啓発用 DVD の作成(図4): 昨年度の本研究班で作成後、麻疹教育啓発用に使用してもらうことを目的として、2008年3月10日に、国立感染症研究所感染症情

報センターのホームページ上(2009年2月現在 URL:

<http://idsc.nih.go.jp/disease/measles/Video/measlesVideo.html>)に公開し、配布希望を募集したところ、全国の自治体、医療機関、学校等から、医療機関、学校での研修会や教育啓発用に使用したいとの希望が多数寄せられた。配布した施設数は1719施設であり、施設の種類および所在地は表1および表2に示す通りである。診療所が339施設と最も多く、次いで病院、小学校には200施設以上、保健所・保健センター、市町村特別区、大学、高等学校には100施設以上に配布した。

文部科学省からは、2007年5月に麻疹の教育啓発を目的として、本DVDが全国の公立中学校と高等学校には教育委員会を経由して、国立および私立中学校と高等学校には学校直送で郵送されていたが、送付に気付いていない学校もあった。

D. 考察

麻疹は決して小児の軽症疾患ではない。現在の国内流行は10~20代がその中心となっているが、予防接種未接種者が約半数である。麻疹重症化例の早期把握と国民への情報提供は、今後の麻疹含有ワクチン(麻疹とともに風疹の対策も極めて重要であることから麻疹風疹混合ワクチンの接種が推奨されている)の接種率向上と国内からの麻疹排除に極めて重要である。2007年の流行を受けて、2008年1月から麻疹は全数把握疾患となり、4月から中学1年生(第3期)、高校3年生相当年齢(第4期)に2回目のワクチンが定期接種に導入されたが接種率が低迷している。麻疹、特に入院を必要とする例は多くが

成人である。従来子どもの疾患と思われてきたが、入院診療科も皮膚科や内科が大半をしめ、最も重症な合併症である麻疹脳炎も都内だけで5例報告されており、死亡例も1例報告されたことから、麻疹は決して子どもの軽い病気とあなどることなく、予防接種を徹底したい。罹患による重症化の可能性に加えて、麻疹に関する正確な情報提供が重要と考えられた。

今回作成した麻疹教育啓発用のDVDは各方面から多くの要望が届いており、麻疹の教育啓発に対する関心の高さが伺われるとともに、本DVDがその役割を担うことが期待された。

E. 結論

2012年に、国内から麻疹排除を達成するためには、国民全体が麻疹に対する正しい知識を持ち、その予防の重要性を認識することが重要である。そのためには、国内の患者発生状況を正確に把握し、麻疹が決して小児の軽症疾患ではないことを国民に正しく伝える必要がある。麻疹の予防と排除には、2回の予防接種を徹底することが不可欠であるが、2008年4月から大きく変更となった予防接種制度を正しく伝えるためには、対象者ならびに一般国民に対する情報伝達手段が必要であり、その一環として、本研究班では教育啓発用DVDを作成した。麻疹についての正しい知識を広く提供し、重症化例調査を用いて、麻疹の疾病としてのインパクトを正確に把握するとともに、麻疹の伝播予防ならびに排除に向けた取り組みを実施していくことが重要であり、本研究班の成果が、麻疹排除に貢献できることを期待したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

※なお、本分担研究班の成果は、厚生労働省、文部科学省における麻疹対策に用いられ、文部科学省を通じて2008年5月に全国の中学校と高等学校に本研究班で作成したDVDが教育啓発を目的に配布された。

図1 年齢別麻疹関連入院患者数 (2007年1-12月、東京都内医療機関)
(ワクチン副反応2名)

N=750

回収率: 46.6%時点

