

表1. VAPPが疑われた症例一覧(1)

番号	発症年	月齢	性別	OPV内服	基礎疾患など	地名	文献など
1	2008	7	男	1回目	肛門周囲膿瘍	三重	投稿中
2	2008	11	男	1回目	なし	大阪	文、他、大阪小児科学会雑誌25:5, 2008(抄録)
3	2008文献	10	男	1回目	なし	福島	佐久間、他、小児感染免疫21:213-7, 2009
4	2008文献	4	記載なし	1回目	なし	山口	橋本、他、脳と発達40:343, 2008(抄録)
5	2008文献	6	男	1回目	HBsキャリア	北海道	石羽澤、他、小児感染免疫20:S135, 2008(抄録)
6	2007	9	男	1回目	なし	奈良	清益、他、小児科49:1271-5, 2008
7	2007文献	6	男	1回目	肛門周囲膿瘍	北海道	朝比奈、他、脳と発達39:S343, 2007(抄録)
8	2006文献	18	男	未接種	なし	東京	長澤、他、Neuroinfection11:73, 2006(抄録)
9	2004文献	8	男	1回目	なし	山口	松藤、他、日児誌108:437, 2004(抄録)
10	2000	13	男	2回目	なし	佐賀	石井、他、日児誌107:1631-4, 2003

表2. VAPPが疑われた症例一覧(2)

番号	OPV～発熱	OPV～麻痺	麻痺部位	脊髓MRI所見	神経伝導速度	後遺症
1	19日	23日	右下肢	異常無し	異常無し	有り
2	20日	26日	右下肢	T2強調画像で病変	伝導速度低下	有り
3	15日	18日	左下肢	異常無し	活動電位低下	有り
4	18日	21日	左下肢	記載なし	活動電位低下	有り
5	17日	21日	両下肢	T2強調画像で脊髓前角に高信号	異常無し	有り
6	10月内服、11月発熱(1か月以内)	発熱5日後に項部硬直	左下肢	T2強調画像で高信号(麻痺8病日の軸状断と矢状断)	記載なし	有り
7	15日	21日	両下肢	脊髓前角に異常信号	記載なし	有り
8	～	～	右下肢	未実施	未実施	有り
9	14日	18日	両下肢	記載なし	活動電位低下	有り
10	22日	22日	右下肢	T2強調画像で脊髓前角に高信号(麻痺13病日の軸状断と矢状断)	活動電位、伝導速度とも低下	有り

表3. VAPPが疑われた症例一覧(3)

番号	WBC	CRP	髄液細胞数	髄液蛋白	免疫検査
1	14400	1	15	54	IgG、リンパ球サブセット、PHA、ConA異常無し
2	10700	0.01	5	17	記載なし
3	正常	正常	19	58	免疫グロブリン異常無し
4	記載なし	記載なし	記載なし	記載なし	記載なし
5	軽度増加	記載なし	増多	記載なし	異常無し
6	9600	0.04	156	50	IgG、リンパ球サブセット異常無し
7	記載なし	記載なし	記載なし	記載なし	記載なし
8	記載なし	記載なし	51	38	記載なし
9	記載なし	記載なし	25	記載なし	記載なし
10	10500	0.14	6	30	IgG、リンパ球サブセット異常無し

表4. VAPPが疑われた症例一覧(4)

番号	糞便ウイルス	髄液ウイルス
1	Sabin3型分離陽性	分離&PCR陰性
2	記載なし	記載なし
3	Sabin2、3型分離陽性	分離&PCR陰性(エンテロウイルスPCRも陰性;8、15病日)
4	記載なし	記載なし
5	Sabin株陽性(感染研)	陰性
6	Sabin株陽性(感染研)	陰性
7	Sabin3型分離陽性	分離陽性
8	未実施:2型血清中和抗体上昇	未実施
9	記載なし	エンテロPCR陰性
10	分離&PCR陰性	分離&PCR陰性

表5. 経口生ポリオワクチン添付文書(2009年9月改訂 第6版)より

《副反応～重大な副反応》

- ・ワクチン接種後に極めてまれに弛緩性麻痺例の認められることが報告されている。しかし、これがワクチンだけの原因によるかと確定することは難しい。
- ・わが国での経口生ポリオワクチン接種者に対するワクチン関連麻痺例の出現頻度は1981～2006年の間に免疫異常のない接種者から麻痺患者が出た割合は約486万回接種当たり1人、接触者の場合は約789万回接種当たり1人である。

《接種時の注意》

- ・本剤の接種後およそ1か月間は、抜歯、扁桃摘出、ヘルニアの手術等で緊急性のない場合は、原則として避けることが望ましい。

《その他の注意》

- ・本剤の接種後およそ1か月間は、頻回の筋肉注射(抗生物質等)を行うと、ワクチン関連麻痺例の出現頻度が高くなるという報告があるので、筋肉注射は控えるのが望ましい。この報告によると、原因は筋肉注射を行う薬剤にあるのではなく、筋肉注射という強い刺激と、ワクチンウイルスの中枢神経への侵入の関連を推測している。

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

協力研究者：中村 貴史

東京大学医科学研究所

研究要旨

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感染を阻害する特異的抗体を同定し、感染症の効果的制御に活用することを目指している。本年度では、生きた細胞を利用した麻疹抗体ライブラリーのスクリーニング法の確立に焦点を当てた。既知の一本鎖抗体による麻疹抗体ディスプレイライブラリーのモデルシステムでは、短時間で簡便に効率よく目的の抗原に対する scFv を分離・同定できることが示唆された。

A. 研究目的

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、そのライブラリーからウイルス感染を阻害する特異的抗体を同定し、感染症の効果的制御に活用することを目指している。

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）、上皮成長因子受容体（EGFR）、又はユビキチンに対する一本鎖抗体（scFv）を使用した。抗体スクリーニングのためのモデル系を確立するため、EGFR、又はユビキチンに対する scFv を、それぞれ

麻疹ウイルスゲノムに挿入したプラスミドを構築し、さらに前者には緑色蛍光タンパク質（GFP）を、後者には赤色蛍光タンパク質（DsRed）を、ウイルス感染細胞において発現するように麻疹ウイルスゲノムへ挿入した。そして、各プラスミド（EGFR: ユビキチン）を 1 : 1 から 1 : 1000 の割合で混合し、リバーソジェネティクス法にて組換え麻疹ウイルスを回収した。各ウイルス液を EGFR 発現腫瘍細胞（ヒト乳癌細胞 MDA-MB231）に直接感染させ、パイオパニングを行った。腫瘍細胞  $5 \times 10^5$  cells を MOI=0.025~0.25 になるように感染させ、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 回感染細胞を洗浄し

た。洗浄後の細胞を 37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。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した。以上の工程を 1 ラウンドとして、3 回繰り返した。3 ラウンドのバイオパニングを繰り返したウイルス液~5µl、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、シーケンスによって回収したウイルスを同定した。

#### 【倫理面への配慮】

本研究における DNA 組換え実験は、第二種使用等拡散防止措置指針に従い、倫理的配慮を厳守しながら実施した。

#### C. 研究成果と考察

1) 1 : 1 からのライブラリーでは、1 ラウンド目より、MDA-MB231 細胞において広範な GFP 発現と細胞融合が観察されたが、DsRed 発現を伴う細胞融合は見られなかった。一方 1 : 1000 のライブラリーにおいては、1 ラウンド目では GFP 発現を伴う細胞融合はごくわずかであったが、ラウンドを繰り返すうちに、多数の GFP 発現を伴う細胞融合が観察された。

2) 次に GFP 発現と細胞融合が見られたウイルスプラークより、ウイルス RNA を回収し、RT-PCR 法により scFv 遺伝子を増幅し、クローニング後、scFv 遺伝子のシーケンスを行った。その結果、1 : 1000 のライブラリーから分離した 10 クローン中、7 個が EGFR scFv であった。これらの結果より、ユビキチンを介してのみ感染する麻疹ウイルスの中に、1 : 1000 という割合で、ごく少量含まれている EGFR を介してのみ感染する麻疹ウイルスも、その標的分子 EGFR を発現している腫瘍細胞でのバイ

オパニングによって簡単に分離できることを確認した。

#### E. 結論

麻疹ウイルス抗体ライブラリーの細胞を用いたバイオパニング法では、短時間で簡単に効率よく目的の scFv を同定できることが示唆された。現在、ヒト末梢血リンパ球から合成した cDNA より scFv 遺伝子ライブラリーを調整し、これらを提示する麻疹ウイルス抗体ライブラリーを構築中である。今後は、そのライブラリーから本年度確立したスクリーニング法により、平成 19 年度同厚生労働科学研究費補助金の成果として作製したヒトエンテロウイルスのレセプターの 1 つである ICAM-1 を恒常的に発現する RD 細胞に対するバイオパニングを行い、ICAM-1 特異的抗体の同定を試み、ICAM-1 をレセプターとして認識するエンテロウイルスの感染を阻害できるかどうかを評価する。

#### 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

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）研究報告書  
ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベランスシステムの検討  
研究報告書

環境水中のヒトパレコウイルス (HPeV) 検出と地域流行との関連

研究協力者 町田 早苗 埼玉医科大学 医学部

研究要旨

2006年4月から2009年3月まで毎月1回下水流入水、計36試料を採取し、HPeVの検出を試みた。その結果、病原微生物検出情報での検出時期（5月～11月）と同時期にHPeVが検出され、春から初冬に流行している可能性が示唆された。同地域での乳幼児便からの検出時期にも一致した。VP1塩基配列解析で同定されたHPeVはHPeV1、HPeV3、HPeV6であり、血清疫学的解析で推定されたのと同様に日本ではHPeV1、HPeV3、HPeV6の不顕性感染が多いことが示唆された。

A. 研究目的

ヒトパレコウイルス (HPeV) は、HPeV1～HPeV6の血清型/遺伝子型であったが、新たにHPeV 7～HPeV 14が報告され、HPeV 1～HPeV 14となった。現在のところ、日本ではHPeV1～HPeV6までが検出されている。HPeV1～HPeV6の血清疫学的な解析や病原微生物検出情報によると特にHPeV1、HPeV3、HPeV6の不顕性感染が多いことが予想される。臨床症状からも急性胃腸炎の報告が多く、河川水や下水などを汚染している可能性がある。今回 我々は下水流入水中のHPeVを検出し、地域での流行との関連性を調べた。

B. 研究方法

2006年4月から2009年3月までA地域の下水流入水2Lを毎月1回（計36回、36試料）採取し、フィルター吸着溶出法で濃縮した。濃縮液は、RNAを抽出し、HPeV1～V6を検出するReal-time PCR法を施行した。Real-time PCR法陽性試料は、5' UTR領域RT-PCRとVP1領域RT-PCR法を行い、塩基配列を解析した。濃縮液をRD-18s細胞、MA104細胞、Vero細胞およびHEp-2細胞に接種しウイルス分離を試みた。

（倫理面への配慮）環境水中の検出なので倫理面では問題ない。しかし、環境水採水場所等が特定できないよう

採水場所を掲載せず、地域への配慮も行った。

### C. 研究結果

#### 1. Real-time PCR 法と 5' UTR PCR 法での下水流入水中の HPeV 遺伝子の検出

下水流入水採取月と Real-time 法での HPeV 検出結果を表 1 に示した。2006 年は 8 月～11 月までの 4 試料、2007 年は 9 月～12 月までの 4 試料、2008 年は 6 月～12 月までの 6 試料と 2009 年 1 月の 1 試料から HPeV 遺伝子が検出された。ウイルス分離を試行したが、ウイルスは分離されなかった。Real-time PCR 法で陽性となった 14 試料について 5' UTR PCR 法を施行し、230bp のバンドが全試料で認められた。ダイレクトシーケンシングにより塩基配列が確認された試料は 7 試料であった。7 試料のうち、相同性 (%) が確認できた塩基配列 ac. No と血清型/遺伝子型を示すと、97%、92%、85%(HPeV3 ; AB084913.1)、89%、86%(HPeV6 ; AB252582)、80%(HPeV6 ; EU77518)、そして 95%(HPeV1 ; L02971.1)、であった。

#### 2. VP1 領域 RT-PCR 法での遺伝子型の決定

Real-time PCR 法での陽性試料について VP1 領域 RT-PCR 法を行った。ダイレクトシーケンシングによ

り塩基配列決定を行ったところ、血清型/遺伝子型が決定できたのは 3 試料であった。相同性 (%)、血清型/遺伝子型と ac. No は 98%(HPeV3; AB084913.1)、96%(HPeV1; S45208.1)、92%(HPeV6; FM242868) であった。確認された血清型/遺伝子型は同試料の 5' UTR 領域で決定されたのと同であった。

### D. 考察

ポリオ流行予測感染源調査において同地域の健康な乳幼児の便を用いてウイルス分離を施行し、2006年9月は8名便から HPeV1 が分離され、感染性胃腸炎の 1 名から HPeV1 が検出された。2007年9月と 2008年9月にはそれぞれ 1 名から HPeV1 が分離されている。同地域の同時期の下水流入水から HPeV が検出されこの時期に流行していたことが予測される。また、病原微生物検出情報での HPeV 検出は、主に 5 月～11 月に報告されているが、今回、下水流入水から検出された期間もほぼ一致しており、この時期に流行している可能性が高い。また下水流入水から HPeV1、HPeV3、HPeV6 が検出され、不顕性感染が示唆されるが、血清疫学解析でも HPeV1、HPeV3、HPeV6 の抗体保有率が高くその結果を指示するものとなった。

E. 結論

下水流入水中から HPeV を検出し、日本では HPeV1、HPeV3 と HPeV6 の流行が春から初冬にかけて起こっている可能性とそのほとんどが不顕性感染であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

町田早苗、岩井雅恵、西村順裕、滝澤剛則、清水博之：環境水中のヒトパレコウイルス (HPeV) 検出と地域流行との関連、第 57 回日本ウイルス学会、東京、2009 年 10 月

H. 知的財産出願・登録状況（予定を含む）

なし

表1 環境水からのHPeV遺伝子検出 (RealTime PCR法と5'UTR PCR法)

	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
2006年	NT	NT	NT	-	-	-	-	+	+	+	+	-
2007年	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
2008年	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
2009年	+	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

+ ; HPeV陽性

- ; HPeV陽性

NT; Not Tested

厚生労働科学研究費補助金  
平成 21 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
分担研究報告書

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

- 1) PV および EV71 の感染を共通に阻害する細胞のキナーゼ阻害剤を同定した。耐性ウイルスの分離・解析を行った結果、抗エンテロウイルス化合物である enviroxime と同じターゲットをウイルスタンパク 3A に持つことが明らかとなった。
- 2) エンテロウイルスの便検体からの直接検出を行うための RT-LAMP 法による検出系を開発した。

A. 研究方法

- 1) PV および EV71 擬似ウイルス粒子を用い、GW5074 の抗エンテロウイルス活性を増強する活性を持つキナーゼ阻害剤の探索を行った。
- 2) エンテロウイルスのうち、PV-like な 5' NTR を持つものに対して RT-LAMP 法のためのプライマーをデザインし、ウイルス株および便検体を用いて検出感度および特異性を確認した。

B. 研究結果

- 1) MEK1/2 阻害剤 (U 0126)、wortmannin および EGFR 阻害剤 (AG1478) は、GW5074 の抗エンテロウイルス活性を増強する活性を示した。また、チロシンキナーゼ阻害剤である Flt3 Inhibitor II は、単独で抗エンテロウイルス活性を示した。耐性ウイルスの解析により、GW5074 は enviroxime と共通のターゲットを持つことが示唆された。
- 2) デザインしたプライマーセットを用いて、少なくとも PV の Sabin 株 400 コピーを検出できた。CBV-like な 5' NTR を持つエンテロウイルスに対しては、7,400-28,000 コピーを検出できた。急性弛緩性麻痺症例の便検体を用いて RT-LAMP 法を行ったところ、PV、A、C 群のエンテロウイルスを効率よく検出できた。

C. 考察

- 1) enviroxime 様の阻害活性を示すために、キナーゼ阻害剤の性質が重要であることが示唆された。
- 2) RT-LAMP 法は、エンテロウイルス陽性便検体を仕分け、ウイルス分離の作業効率を上げるために有用であることが示唆された。

D. 健康危機情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Arita M, Wakita T, Shimizu H: Cellular kinase inhibitors that suppress enterovirus replication have a conserved target in the viral protein 3A similar to that of enviroxime. *J Gen Virol* **90**: 1869-1879, 2009
- 2) Arita M, Ling H, Yan D, Nishimura Y, Yoshida H, Wakita T, and Shimizu H. Development of a reverse transcription- loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system for a highly sensitive detection of enterovirus in the stool samples of acute flaccid paralysis case. *BMC Infect Dis* **9**: 208, 2009

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

エンテロウイルス 71 受容体としての P-selectin glycoprotein ligand-1 の同定

研究協力者 西村順裕 国立感染症研究所 主任研究官

**研究要旨**

エンテロウイルス 71 (EV71) は、小児の発熱性疾患である手足口病の主要な原因ウイルスである。一般に手足口病の症状は軽く、予後も良好である。しかしながら、EV71 は時として重篤な中枢神経疾患を起こす。EV71 感染の分子機構には未知な部分が多いため、本研究では EV71 感染受容体の同定を試みた。ヒト T 細胞 cDNA ライブラリーを用いて EV71 結合分子の発現クローニングを行い、EV71 結合分子として、P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1; CD162) を同定した。PSGL-1 は白血球表面に発現するシアロムチンファミリー蛋白質であり、初期炎症反応に重要な分子である。

EV71 はヒト PSGL-1 のアミノ末端領域に結合した。また、ヒト PSGL-1 発現マウス細胞が EV71 感受性を獲得したことから、PSGL-1 は EV71 の機能的受容体であることが明らかとなった。一方、非白血球系細胞において、EV71 は PSGL-1 非依存的に感染増殖した。したがって、EV71 は複数の受容体を使用することも明らかとなった。PSGL-1 依存的 EV71 感染機構の解析は、手足口病や中枢神経疾患等、EV71 感染症の病原性発現の分子的基盤の解明に役立つことが期待される。

**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、A 群ヒトエンテロウイルスに分類され、コクサッキーウイルス A16 (CVA16) とともに手足口病の主要な病原ウイルスである。手足口病の症状は一般に軽く、通常数日で回復する。しかし、EV71 は時として無菌

性髄膜炎、急性弛緩性麻痺などの様々な神経疾患を引き起こす。EV71 による手足口病の大規模な流行は、1997 年のマレーシア、1998 年の台湾以降、アジア太平洋地域で多発しており、公衆衛生上の大きな問題となっている。特に 2008 年には、安徽省を中心とした中国各地で大規模な手足口病流行



が発生し、120名以上の死亡例が報告された。幸いにも我が国では手足口病重症例の大規模な流行は認められていない。しかし、死亡例を含む手足口病重症例が散発的に報告されている。

特異的ウイルス受容体の同定は、ウイルス感染による病原性発現機構の分子的基盤の解明や予防治療法の開発研究にとって重要である。たとえば、EV71と同様にエンテロウイルス属に分類されるポリオウイルスでは、特異的受容体であるヒトポリオウイルスレセプター (hPVR, CD155) 同定の後、hPVR発現トランスジェニックマウスモデルの樹立された。このマウスにより、神経病原性発現機序やワクチン株の病原性解析等の研究が大きく前進した。また hPVR 発現マウス L929 細胞 (L20B 細胞) は、ポリオウイルスの分離同定に非常に有用な細胞であり、WHO によるポリオ根絶計画にも大きく寄与している。しかしながら、EV71 や CVA16 を含む A 群ヒトエンテロウイルスの受容体は同定されておらず、ウイルス感染・病原性発現を規定する宿主因子の分子的基盤の研究は進んでいない。また、ポリオウイルス分離同定における L20B 細胞に相当する、EV71 が特異的に増殖する細胞株も存在しない。本研究においては、EV71 の受容体同定を試み、さらに EV71 受容体を導入したマウス L929

細胞を樹立した。

## B. 研究方法

### 1. EV71 結合分子の同定

レトロウイルスライブラリーと浮遊系マウス細胞とを組み合わせた発現クローニング法を用いた。Jurkat T 細胞よりレトロウイルス cDNA ライブラリーを作製し、浮遊系細胞であるマウスミエローマ細胞に感染させた。感染細胞を回収し、EV71 1095 株 (EV71-1095) 粒子を固相化したプレートに添加した。結合していない細胞を洗浄除去し、付着細胞を 37°C で 1 週間培養した。プレート上に形成された細胞のゲノムを回収し、ライブラリー由来遺伝子を PCR で増幅した。

### 2. フローサイトメトリーによる EV71-PSGL-1 結合の検出

293T 細胞に一過性に PSGL-1 分子を発現させた。この細胞と EV71 を氷上で 30 分反応させ、細胞に結合した EV71 を蛍光標識抗 EV71 抗体で染色した。

### 3. 免疫沈降による EV71-PSGL-1 結合の検出

可溶性 PSGL-1-Fc キメラ蛋白質と EV71 を反応させ、Protein G ビーズで免疫沈降させた。共沈した EV71 VP1 蛋白質をウエスタンブロッティングで検出した。

### 4. L-PSGL-1.1 細胞の樹立

マウス L929 細胞にヒト PSGL-1 発現

プラスミドをトランスフェクションし、ブラストシジン存在下で培養後、ヒト PSGL-1 発現の高いクローンを選択した。

### C. 結果

#### 1. EV71 結合分子の同定

EV71 結合プレートによるパンニングの結果、EV71 結合コロニーとして4クローンを得た。これらの細胞ゲノムからは、ヒト *PSGL-1* 遺伝子が検出された。

#### 2. PSGL-1 の EV71 結合領域の同定

PSGL-1 と EV71 の特異的結合にするために、フローサイトメトリーによる EV71 結合アッセイを行った。アッセイには、PSGL-1 をほとんど発現していないヒト 293T 細胞を用いた。293T細胞にヒト PSGL-1 を一過性に発現させたところ、細胞表面に EV71 1095株(EV71-1095)粒子が結合した。一方、シアロムチン蛋白質であるヒト CD34 分子、ヒト CD43 分子、あるいはマウス PSGL-1 を発現させた場合には、EV71-1095 は結合しなかった。また、EV71-1095 と PSGL-1 との結合は、抗 PSGL-1 抗体により濃度依存的に阻害された。さらに、マウス PSGL-1 のアミノ末端領域を、ヒト PSGL-1 の相当領域に組換えたキメラ PSGL-1 を発現させた場合にも、EV71-1095 は結合した。以上の結果より、EV71-1095 は、

ヒト PSGL-1 の アミノ末端領域に特異的に結合することが明らかとなった。

#### 3. ヒト PSGL-1 発現マウス L929 細胞における EV71 増殖

ヒト PSGL-1 分子により、EV71 の細胞侵入・ウイルス増殖が誘導されるかを解析するために、EV71 非感受性であるマウス L929細胞にヒト PSGL-1 を発現させ (L-PSGL-1.1 細胞)、EV71 感受性を評価した。L-PSGL-1.1 細胞に EV71-1095 を感染させた場合、細胞変性効果 (CPE) と細胞内での EV71 抗原が検出された (感染後 4 日目)。さらに、CPE と EV71 抗原の発現は、L-PSGL-1.1 細胞細胞を抗 PSGL-1 抗体で前処理することにより阻害された。したがって、PSGL-1 は EV71 と結合するのみならず、EV71 の侵入および増殖にもかかわる機能的受容体であることが明らかとなった。

#### 4. 細胞株における PSGL-1 発現と EV71 増殖

各種細胞株を用い、PSGL-1 発現と EV71 増殖との関連を解析した。ヒト白血球由来細胞である Jurkat T 細胞、U937 細胞、MOLT-4 細胞において、PSGL-1 は高発現していた。これらの細胞での EV71 増殖が PSGL-1 依存的かどうかを解析するため、細胞と抗 PSGL-1 抗体とを反応後 EV71-1095 を感染させ、EV71 増殖を評価した。

Jurkat T 細胞と U937 細胞では、抗 PSGL-1 抗体処理により EV71 増殖が阻害された。MOLT-4 細胞では顕著な EV71 増殖は認められなかったが、抗 PSGL-1 抗体処理により、感染細胞から回収されるウイルス力価が低下した。

一方、非白血球系細胞表面には、PSGL-1 はほとんど発現していなかった。RD 細胞（多くの EV71 株が効率よく増殖し、顕著な CPE をおこす）は臨床検体からの EV71 分離に頻用されるにもかかわらず、EV71 増殖は抗 PSGL-1 抗体によって阻害されなかった。以上の結果から、非白血球系細胞では PSGL-1 非依存的に EV71 が増殖することが明らかとなった。

#### 5. PSGL-1 結合性による、EV71 の分類

EV71-1095 を含む代表的な分離株 8 株を用い、PSGL-1 結合および PSGL-1 依存的ウイルス増殖を検討した。まず、PSGL-1 結合性を解析するために、可溶性 PSGL-1-Fc キメラ蛋白質を用いた免疫沈降を行った。EV71-1095 を含む 5 株は共沈したが、02363 株、BrCr 株、Nagoya 株は共沈しなかった。したがって、EV71 分離株は、PSGL-1 結合株 (EV71-PB) および PSGL-1 非結合株 (EV71-non-PB) に分類できることが明らかとなった。

次に、Jurkat T 細胞における PSGL-1 依存的 EV71 増殖を検討した。

EV71-PB 株 5 株は PSGL-1 依存的に増殖した。一方、EV71-non-PB 株のうち 2 株、02363 株と Nagoya 株は増殖したものの、その増殖は抗 PSGL-1 抗体で阻害されなかった。つまり、PSGL-1 非依存的に Jurkat T 細胞で増殖した。また、EV71-non-PB である BrCr 株は、Jurkat T 細胞において増殖しなかった。

#### D. 結論

以上のように、Jurkat T 細胞などの PSGL-1 発現白血球細胞においては、PSGL-1 が EV71-PB 株の宿主受容体であることを明らかにした。また、RD 細胞等の PSGL-1 をほとんど発現していない非白血球系細胞において、EV71 は PSGL-1 非依存的に増殖することを示した。つまり、PSGL-1 以外の EV71 受容体が存在することを示唆した。

PSGL-1 はシアロムチンファミリー膜蛋白質であり、主に骨髓系・リンパ球系細胞および血小板に発現している。PSGL-1 のアミノ末端領域は細胞外に位置し、セレクチンやケモカインと相互作用する。この相互作用は、炎症初期過程における白血球の遊走・接着・浸潤に重要である。中枢神経疾患と宿主受容体との関連に興味もたれるが、PSGL-1 は中枢神経細胞に発現していない。しかしながら、EV71 脳炎患者の中枢神経組織には CD68 陽

性マクロファージ／ミクログリアを中心とした炎症性細胞の浸潤が認められる。したがって、PSGL-1 発現炎症細胞と PSGL-1 依存性 EV71 感染が中枢神経疾患発症に関与する可能性も考えられる。

また、PSGL-1 結合性により、EV71 が分類できることを見いだした。現在のところ、EV71 の PSGL-1 結合性と EV71 病態との関連は不明である。今後、PSGL-1 を中心とした新たな視点からの EV71 感染分子機構に関する研究の進展が期待される。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, Miyamura T, Wakita T, Shimizu H: Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. Nat Med 15: 794-797, 2009

##### 2. 学会発表

1) 西村順裕、宮村達男、脇田隆字、清水博之: エンテロウイルス 71 と PSGL-1 受容体との結合には PSGL-1 アミノ末端領域のチロシン硫酸化が重要である. 第 57 回日本ウイルス学会. 千代田区、2009 年 10 月

2) 宮村紘平、西村順裕、安保雅博、脇田隆字、清水博之: ヒト PSGL-1 発現マウス L929 細胞におけるエンテロウイルス 71 増殖とウイルス遺伝子変異の解析. 第 57 回日本ウイルス学会. 千代田区、2009 年 10 月

##### 3. 総説

西村順裕、清水博之: エンテロウイルス 71 受容体としての P-selectin glycoprotein ligand-1 の同定. ウイルス 59: 195-204, 2009

#### 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

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金  
「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、本ウイルスのポリプロテインのプロセッシング機構を解析した。アイチウイルスのポリプロテインのプロセッシングに関与するプロテアーゼは3Cおよびその前駆体のみであった。3C、3CD とともにポリプロテインをプロセッシングしたが、3CD が全ての切断部位を効率良く切断できたのに対し、3C では2A のN末端の切断効率が著しく低下していた。哺乳動物細胞ツーハイブリッド解析および免疫沈降による解析の結果、3CD は2A に強く結合したが、3C には強い2A 結合能は認められなかった。2A および3CD 変異体を用いた解析から、2A のN末端の切断には、3CD と2A 間の強い結合が深く関与していることが示唆された。

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。ウイルス発見以来日本および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、アフリカでも血清疫学研究や胃腸炎患者便からのウイルスRNA検出が行われており、胃腸炎事例の約3%あるいはそれ以下の低率ではあるが、アイチウイルスが検体から発見される唯一の胃腸炎関連ウイルスであるという報告もある。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。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。

ピコルナウイルスのポリプロテインは、ウイルス自身のコードするプロテアーゼによりプロセッシングされる。ピコルナウイルス共通のプロテアーゼは3Cであり、ウイルスによっては2AやLもプロテアーゼ活性をもつ。ポリオウイルスのP1のプロセッシングには3Cではなく3CDが必要である。本研究では、本ウイルスのポリプロテインのプロセッシング機構を解析した。

B. 研究方法

Vero細胞抽出液中で各種ウイルスタンパク質を翻訳させ、 $[^{35}\text{S}]\text{Met}/\text{Cys}$ で標識した。タンパク質間の相互作用を、哺乳動物細胞ツーハイブリッド解析および免疫沈降により調べた。

C. 研究結果

Vero細胞抽出液中で、3Cプロテアーゼを不活性化させたポリプロテイン(PP-3Cm)を翻訳させるとポリプロテインの切断が起こらなかったことから、アイチウイルスのポリプロテインのプロセッシングに関与するプロテアーゼは3Cおよびその前駆体のみであると考えられた。PP-3Cmと同時に3Cあるいは3CDを翻訳させるとPP-3Cmのプロセッシングが観察された。しかし、3Cによるプロセッシングにおいては、ウイルス本来のポリプロテインのプロセッシングおよび3CDによるPP-3Cmのプロセッシングと比較して、2AのN末端での切断効率の著しい低下が認められた。プロテアーゼの基質としてより単純にしたLuc-2A(LuciferaseのC末端にVP1のC末端7アミノ酸と2Aを融合させた)ポリペプチドと、3Cあるいは3CDを同時に細胞抽出液中で合成した場合でも、3CDは2AのN末端を効率良く切断したが、3Cはほとんど切断しなかった。

我々はこれまでに、ポリプロテインのプロ

セシングにおいて 2A に導入した変異が 2A の N 末端での切断効率低下を引き起こす場合があること、および哺乳類ツーハイブリッド法による解析において 2A と 3CD が相互作用することを観察している。そこで、Luc-2A あるいは 5 種類のその 2A 変異体のいずれかと 3CD を同時に細胞抽出液中で合成し、切断効率ならびに Luc-2A と 3CD 間の相互作用を調査した。その結果、2A の N 末端の切断効率と Luc-2A と 3CD 間の相互作用には相関が認められた。

#### D. 考察

以上の結果は、アイチウイルスのポリプロテインの切断部位のうち、2A の N 末端のみが効率良く切断されるために 3C ではなく 3CD という形のプロテアーゼを必要とすることを示し、その切断には 3CD と 2A 間の相互作用が深く関与している可能性を示唆している。そのメカニズムとして、3CD がポリ

プロテインの 2A 領域に結合することで、ポリプロテインの構造変化がおこり、それまで隠れていた VP1/2A 切断部位が 3CD プロテアーゼによって認識されるようになるという可能性が考えられる。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表：

Ishikawa K, Sasaki J, Taniguchi K: Overall linkage map of the nonstructural proteins of Aichi virus. *Virus Res* 147: 77-84, 2010

##### 2. 学会発表：

佐々木潤、石川球美子、前野芳正、河本聡志、守口匡子、谷口孝喜: アイチウイルス 3CD による 2A の N 末端の切断. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 東京都、2009 年 10 月

#### F. 知的財産権の出願・登録状況 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）研究報告書  
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

研究年度＝2009

分担研究者名＝小池智（東京都臨床医学総合研究所）

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、Toll-like receptor 3 (TLR3) 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この経路の重要性を調べた。その結果 TLR3 を介した type I IFN 誘導経路がポリオウイルスの感染防御に最も重要であることが明らかになった。TLR3 は樹状細胞、マクロファージの他腸管の上皮などに発現していることが知られているため、ポリオウイルスの経口感染成立との関与が考えられる。

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、Scavenger receptor B2 が受容体のひとつであることを明らかにした。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。この細胞にはこれまで調べたすべての EV71 株が感染するため、EV71 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。

I. 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が効率が悪く、実験系としても大掛かりな

ものとなる。効率よく研究するに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 $\alpha$ / $\beta$ レセプターを欠損した PVR-tg マウス (PVR-tg/Ifnar1 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。近年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。昨年度までに TLR3 および TLR4 のアダプターである TRIF のノックアウトマウスを用いてこの経路がポリオ感染防御に最も重要な役割を果たしていることを見いだしたので、今年度はさらに TLR3 ノックアウトマウスを用いて、TLR3 がポリオウイルス検知のために主要なセンサーであるか否かを検討した。

## 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

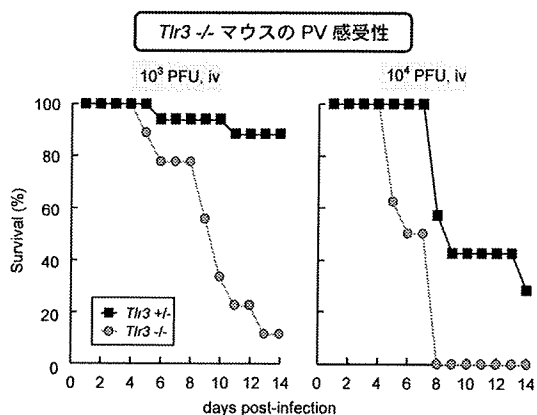
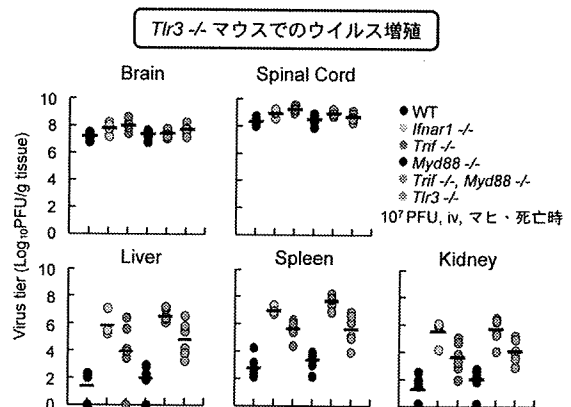
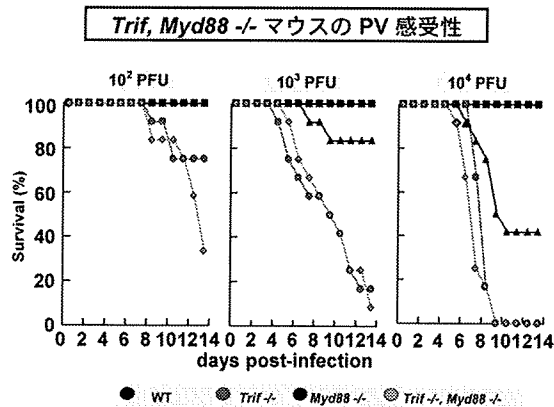
統作成を作成済みである。今年度はさらに TLR3 ノックアウトマウスとの交配を行い新たな系統を作成した。

- 2) 上記系統にポリオウイルス I 型 Mahoney 株を種々の dose で静脈内接種しマウスの生存を調べた。また  $10^7$ PFU 接種後の組織でのウイルスの増殖、血中 IFN の誘導や IFN-stimulated gene (ISG) の誘導などの IFN 応答を野生型、あるいはノックアウト系統間で比較検討した。

## C. 研究結果

- 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、麻痺発症時のウイルスの各組織でのタイター、血中 IFN の誘導や ISG 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。TLR3 ノックアウトマウスにおいてもほぼ同等に感受性が增大していることが認められ。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、TLR3 ノックアウトマウスではウイルス接種後の血中 IFN が検出レベル以下にまで低下しており、ISG の誘導も低下していた。
- 4) TRIF、TLR3 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。

#### D. 考察

上記のことを総合すると、ポリオウイルスの感染は主に TRIF の関与する経路特に TLR3 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、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 あるいは TLR3 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。

#### E. 結論

ポリオウイルス経口感染モデルの作成は非常に困難であるが、マウスの免疫系などを破壊したマウスは新たな実験モデル作成にひとつの可能性であると考えられる。

## II. エンテロウイルス 71 受容体の同定

### 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、ウイルスの特異性などを検討した。

### 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。Ltr051 細胞や Ltr246 細胞で L929 細胞よりも高いレベルで発現していた遺伝子が実際に形質転換細胞内にインテグレートしているかどうかを確認し、インテグレートしている遺伝子については cDNA を単離し、EV71R として機能するかどうか調べた。
- 2) 形質転換細胞のウイルス株特異性の検討：Ltr051 細胞の受容体と Ltr246 細胞の受容体がウイルス株によって異なった活性を示すかどうか、複数の EV71 株を用いてウイルス感受性の違いを調べた。
- 3) 抗 SCARB2 抗体を用いてヒト脳で SCARB2 の発現があるかどうかを調べた。

### C. 研究結果

- 1) Ltr051 で L929 よりも高レベルで発現していた遺伝子の一つ SCARB2 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。さらに感染は EV71 抗体により阻害されることなどからこれが Ltr051 細胞に発現している EV71R であると結論した。
- 2) Ltr246 細胞にかんして同様のアプローチを行った。複数の異なる会社によって開発されたマイクロアレイチップを用い

て解析を行ったが、現在までに遺伝子の同定には至っていない。

- 3) Ltr051 細胞はこれまでに調べたすべての EV71 株に対して効率よく感染が成立するが、Ltr246 細胞は全般的に感染効率が低く、1095 株のような一部のウイルス株に対しては感染が成立しにくいことが判明した。
- 4) SCARB2 抗体により免疫染色によりヒト神経細胞に発現が確認された。

#### D. 考察

この方法で得られた SCARB2 は EV71R としての基準を満たしている。Ltr246 細胞に発現する EV71R や Nishimura らによって報告されている PSGL-1 と異なりウイルス株による選り好みもなく、すべてのウイルス株に対して受容体として機能することができるので SCARB2 が主要な EV71R である可能性が高い。また SCARB2 は中枢神経系の神経細胞にも発現が見られるので、EV71 による脳炎もこの受容体を介して感染する可能性が示された。

#### E. 結論

SCARB2 はすべての EV71 株に対して効率よく感染を成立させることができると考えられるため、これ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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, Hanagata N, Minowa T, Takemura T, Koike S : Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat. Med.*, 15:789-801, 2009

##### 2. 学会発表

- 1) Yamayoshi S, Koike S : Species specificity of enterovirus 71 is determined by quality and quantity of viral receptor. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2009.9.9-11 (Awaji)
- 2) 小池智 : ポリオウイルス感染モデルマウスの研究 第 57 回日本ウイルス学会学術集会シンポジウム 2009.10.25-27 (東京)
- 3) 大岡静衣、永田典代、小池智、野本明男 : カニクイザルを用いたポリオウイルス経口感染実験 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009.10.25-27 (東京)
- 4) 鳥羽 (安部) 優子、永田典代、佐多徹太郎、竹内理、審良静男、小池智 : ポリオウイルス感染による IFN 応答には TRIF を介する TLR 経路が重要である 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009.10.25-27 (東京)

##### 3. 総説

- 1) 小池智 ポリオウイルスのトロピズム

実験医学 27: 1585-1589, 2009

- 2) 小池智 ポリオウイルス病原性と自然免疫 医学のあゆみ 229: 1065-1069, 2009
- 3) 小池智 ポリオウイルス感染と自然免疫 メディカル・サイエンス・ダイジェスト 35: 222-225, 2009
- 4) 山吉誠也、小池智: SCARB2はエンテロウイルス71の受容体である 細胞工学 28: 1044-1045, 2009
- 5) 小池智: エンテロウイルス71受容体SCARB2の同定 ウイルス 59: 189-194, 2009

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

「ヒトエンテロウイルス71受容体を用いたウイルス感染実験系」出願番号: 特願2009-120748 (平成21年5月19日 国内出願)

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし