

Nix W A らの方法に従い、cDNA の合成、エンテロウイルス VP1 領域遺伝子検出のための 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。塩基配列の同定には Blast 検索を行い、genotype を推定した。

4. ウイルス分離

Vero 細胞、RD 細胞、直腸がん由来 HRT-18 細胞を用いてエンテロウイルス CODEHOP PCR 陽性検体のみをウイルス分離を試みた。細胞変性効果(CPE)を示した細胞上清を用いて RNA を抽出し、エンテロウイルス CODEHOP PCR を施行し、genotype を推定した。

【倫理面についての配慮】

本研究を施行するのに当たり埼玉医科大学病院 IRB で承認を受けた(承認 No. 08-011)。臨床材料の採取については「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や個人の尊厳及び人権の尊重、個人情報保護に配慮した。検体提供に際してのインフォームドコンセントを行い、患者家族からの同意書が提出されている。

C. 研究結果

エンテロウイルス CODEHOP PCR 法で陽性検体は 33 検体(20.1%)、検体別に見ると髄液 3 検体(10.7%)、咽頭ぬぐい液 17 検体(23.9%)、便検体(20.1%)であった。Genotype が同定できたのは髄液 1 検体、咽頭ぬぐい液 8 検体、便 5 検体であった。同定された genotype は髄液検体からはコクサッキーウイルス A9、咽頭ぬぐい液からはコクサッキーウイルス A4、2 検体; コクサッキーウイルス A6、2 検体; コクサッキーウイルス A9、2 検体; ライノウイルス A33、2 検体; エコーウイルス 30、1 検体であり、便からはコクサッキーウイルス A2、コクサッキーウイルス A4、コクサッキーウイルス A9、コクサッキーウイルス A10 であった(表)。

ウイルス分離された検体は 11 検体であった。HRT-18 細胞で分離されたのはコクサッキー A4、コクサッキー A6、コクサッキー A9、コクサッキー A10 であった。また、RD-A 細胞で分離されたのはコクサッキー A2 とライノウイルス A33 であった。

2009 年にコクサッキー A9 が髄液、咽頭ぬぐい液、便

から同定されたウイルスの系統樹を図に示した。この塩基配列は 2008 年にイギリスで検出された配列と 95% の相同性を示した。また、2003 年福岡で分離されたウイルスとも近縁であった。

D. 考察

無菌性髄膜炎は B 群エンテロウイルスの検出例が多いと示唆されているが、今回提出されたサンプルではコクサッキー A9 とエコー 30 以外は A 群エンテロウイルスとライノウイルスであった。1997 年から 1998 年の夏に福島で採取したサンプルでのエンテロウイルス PCR 法での検討では、熱性発作を起こした小児から A 群エンテロウイルスが高頻度に検出されたと報告されている。今回 検討したサンプルでも 2008 年の夏に採取された咽頭ぬぐい液、便から A 群エンテロウイルスが検出された。

A 群エンテロウイルスの髄液からはウイルスが検出されにくい例があるが、便からコクサッキー A10 が同定された症例で同時に提出された髄液からはウイルスの検出はできなかった。

今回、3 歳男子から提出された髄液、咽頭ぬぐい液、便からコクサッキー A9 が検出された。コクサッキー A9 について病原微生物検出情報の無菌性髄膜炎患者からの主なウイルス分離・検出報告によると 2008 年は全国で検出例がなく、2009 年は全国で 13 件の報告があり、エンテロウイルス検出状況からも 2009 年の検出例が多く全国的に 2009 年に流行していたことと一致する。髄液から得た塩基配列を系統樹解析するとイギリスの髄液のウイルスと相同性があり、また、2003 年に福岡から分離されたウイルスとも近縁であった。

2010 年春頃から西日本地方でエンテロウイルス 71 による無菌性髄膜炎の報告が多かったが、2010 年検討したサンプルからは検出されなかった。

結論

無菌性髄膜炎を疑う熱性痙攣小児患者のサンプルをエンテロウイルス CODEHOP 法で解析した。塩基配列が確定したサンプルでは A 群エンテロウイルスの検出例が多かったが、2009 年のサンプルでは B 群エンテロウイルスであるコクサッキー A9 が検出された。

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：無菌性髄膜炎を疑う熱性痙攣小児患者からのエンテロウイルスの検出，第58回日本ウイルス学会学術集会，徳島市，2010年11月

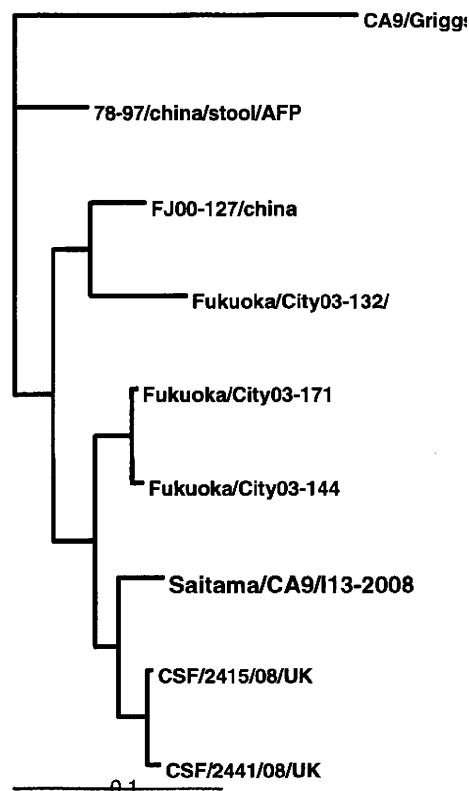
H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

表 無菌性髄膜炎を疑う熱性痙攣小児患者から同定されたウイルスの検出状況

NO.	発症年・月	年齢と性別	検出検体	CODEHOP法同定ウイルス	ウイルス分離、分離ウイルス(細胞)
1	2008年 7月	1歳 F	咽頭ぬぐい液	CV-A4	CV-A4(HRT-18)
			便	CV-A4	CV-A4(HRT-18)
2	2008年 7月	2歳 F	咽頭ぬぐい液	CV-A4	-
3	2008年 7月	3歳 M	咽頭ぬぐい液	CV-A6	CV-A6(HRT-18)
4	2008年 7月	1歳 F	咽頭ぬぐい液	CV-A6	CV-A6(HRT-18)
5	2008年 7月	2歳 M	便	CV-A10	CV-A10(HRT-18)
6	2009年 2月	0歳 F	咽頭ぬぐい液	E-30	-
7	2009年 6月	9歳 F	咽頭ぬぐい液	CV-A9	-
8	2009年 8月	3歳 M	髄液	CV-A9	CV-A9(HRT-18)
			咽頭ぬぐい液	CV-A9	CV-A9(HRT-18)
			便	CV-A9	CV-A9(HRT-18)
9	2010年 5月	2歳 M	便	CV-A2	CV-A2(RD-A)
10	2010年 6月	0歳 F	咽頭ぬぐい液	RV- 33	RV- 33(RD-A)
11	2010年10月	6歳 M	咽頭ぬぐい液	RV- 33	RV- 33(RD-A)

-: Not isolated

図 コクサッキーA9 の系統樹解析(VP1 領域 320bp)



「エンテロウイルス感染症制御のための診断・予防治療に関する国際連携研究」(研究代表者 清水博之)

高知県における Saffold virus に関する血清免疫学及び分子疫学的調査について
研究協力者：細見卓司 (高知県衛生研究所)

研究要旨 高知県に在住する者 488 名を対象に Saffold virus (SAFV) genotype 2 及び 3 に対する血清中の中和抗体価を測定したところ、中和抗体保有率はそれぞれ 71.9%、67.4%、抗体価の幾何平均値は $2^{6.6}(95.7)$ 、 $2^{6.8}(110.9)$ であった。SAFV-2、3 とともに各年齢間で中和抗体保有率に差が認められ、0~4 歳とともに 25%であったが、8~9 歳から 50~59 歳の群ではそれぞれ 56.5~83.5%、63.5~83.3%を推移し、60 歳以上の群では 46.9%、37.5%に低下した。SAFV-2,3 とともに男女間と地域で差は認められなかった。日本の高知県内で広く SAFV-2,3 が流行していたことが伺われた。

また、感染症発生動向調査等の検体から SAFV の検出を試みたところ、SAFV-2 が 7 検体、SAFV-3 が 2 検体、SAFV-NT が 1 検体から検出された。

A.研究目的

Saffold virus (SAFV) はピコルナウイルス科カルジオウイルス属に属するウイルスであり、1981 年に採取された不明熱患者のふん便検体から検出され、SAFV と呼ばれた。以降、遺伝子型 1~9 型まで報告されている。

今回の調査において、高知県における SAFV-2,3 の流行状況を調査するため、高知県在住者の血清中の SAFV-2,3 に対する中和抗体保有状況を調査し、また、感染症発生動向調査の検体について SAFV の検出を行った。

B.研究方法

1.中和抗体保有状況調査

1)血清検体

主として高知県に在住する者 488 名の血清を 2010 年 6 月~10 月に採取した。年齢構成は 0~74 才で、9 群に分けた場合、0-4 才/12 名、8-9 才/85 名、10-11 才/79 名、18-20 才/30 名、21-29 才/51 名、30-39 才/103 名、40-49 才/73 名、50-59 才/23 名、60-74 才/32 名であった。男：女の比率は 1 : 0.95 であった。申告された所在地により地域を分類した場合、高知市以東、高知市、高知市以西、県外の各人数は、それぞれ 38 名、212 名、236 名、2 名であった。(表 1)

2)中和抗体測定

中和抗体測定用のウイルス株について、SAFV-2 は 2010 年 8 月に高知県の

ヘルパンギーナ患者の咽頭ぬぐい液から分離された高知 10-534 株を、SAFV-3は2008年に高知県の無菌性髄膜炎患者の髄液から分離された JPN08-404 株 (HQ902242) を用い、細胞は LLC-MK2 細胞を用いた。

血清検体はウシ胎児血清を 2% 含有したダルベッコ MEM 培地 (2% FBS 含 MEM) で 8 倍に希釈した後、56°C 30 分間非働化した。この非働化検体を 96 穴マイクロプレートを用いて 2% FBS 含 MEM で 2 倍段階希釈により 8 倍から 2048 倍まで希釈した。各希釈段階について 2 穴用意し、各希釈段階の検体 50ul に対して、100TCID₅₀/50ul に調整したウイルス液 50ul を加え、CO₂ インキュベーターで 37 度 3 時間感作した。感作後、5% FBS 含 MEM で $1-2 \times 10^5$ cell/ml に調整した細胞浮遊液を 100ul 加え、SAFV-2 については 17 日間、SAFV-3 については 14 日間、CO₂ インキュベーターで 37°C 培養し、CPE の出現を観察した。

接種ウイルスを 50% 以上中和した検体の最高希釈倍率をもって中和抗体価とした。また、1:8 以上の中和抗体価を有する検体については中和抗体陽性、1:8 未満については陰性と判定した。

2. ウイルス検出調査

1) ウイルス分離

感染症発生動向調査の検体について LLC-MK2 細胞で SAFV 分離を行った。

2) 遺伝子検出

2010 年 4 月～11 月の感染症発生動

向調査の検体について行った。(調査継続中)

検体から RNA を抽出し、DNase 処理したのち、逆転写反応で cDNA を作成し、5'UTR 領域に設計されたプライマーで PCR を行い、目的とするバンドを確認した。目的のバンドが得られた場合、VP1 領域に設計されたプライマーで遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を読み、系統樹解析を行った。VP1 領域の PCR ができなかった場合、5'UTR 領域の塩基配列を解読し、ブラスト検索により GenBank に登録された SAFV のゲノムとの相同性を解析し、SAFV であることを同定した。

(倫理面の配慮)

中和抗体保有状況調査については、事前に高知県衛生研究所疫学倫理審査委員会において審査され、その実施を承認されている。

ウイルス検出調査については、感染症発生動向調査の一環として行っており、倫理的な問題はない。

C. 研究結果

1. 中和抗体保有状況調査

各年齢階層における SAFV-2、SAFV-3 中和抗体陽性率、抗体価の分布及び中和抗体陽性者の抗体価幾何平均値を図 1～4 に示す。SAFV-2、SAFV-3 の中和抗体陽性率はそれぞれ 71.9% (351/488)、67.4% (329/488)、中和抗体陽性者の抗体価の幾何平均値はそれぞれ $2^{6.6}$ (95.7)、 $2^{6.8}$ (110.9)であった。

中和抗体陽性率及び中和抗体陽性者の抗体価 (Log₂) では、SAFV-2、SAFV-3

ともに年齢階層間で差が認められた。

($p < 0.05$ 、陽性率：クラスカル・ワーリス検定、抗体価：一元配置分散分析)

SAFV-2 中和抗体陽性率は、0-4 才では 25%であったが、8-9 才で 72.9%に上昇し、10-11 才～50-59 才で 56.5～83.5%を推移した後、60-74 才で 46.9%に低下した。最も陽性率が高かったのは 10-11 才であった。SAFV-2 中和抗体陽性者の抗体価の幾何平均値では、0-4 才は $24.0(16.0)$ であったが、8-9 才で $27.8(226.4)$ に上昇し、10-11 才は $28.1(267.0)$ と、最高値を示した。この後、18-20 才から 40-49 才群にかけて $25.3(38.5)$ まで下落した後、50-59 才で $26.8(115.1)$ に再度上昇し、60-74 才で $24.0(16.0)$ に低下した。

SAFV-3 中和抗体陽性率では、0-4 才では 25%であったが、8-9 才では 63.5%に上昇し、10-11 才～50-59 才で 64.4～83.3%を推移した後、60-74 才で 37.5%に低下した。最も陽性率が高かったのは 18-20 才であった。SAFV-3 中和抗体陽性者の抗体価の幾何平均値では、0-4 才では $24.7(25.4)$ であったが、8-9 才で $27.5(176.4)$ に上昇し、10-11 才で $27.7(201.7)$ と、最高値を示した。この後、18-20 才から 40-49 才にかけて $26.0(62.1)$ まで下落した後、50-59 才で $26.3(78.5)$ に再度やや上昇し、60-74 才群で $24.8(28.5)$ に低下した。

これらの年齢階層別の SAFV-2 と SAFV-3 の中和抗体分布状況はよく類似していた。

また、SAFV-2 と SAFV-3 の中和抗体保有に相関が認められた。($p < 0.05$ 、カイ二乗検定、オッズ比 11.9) (表 2)

一方、SAFV-2、SAFV-3 ともに、中和

抗体保有率に男女間の差は認められなかった。(表 3、4) また、住居地域を高知市以東、高知市、高知市以西に分けた場合、地域間で中和抗体保有率に差は認められなかった。(表 5、6)

2. ウイルス検出調査

SAFV 検出結果は表 7 のとおりである。2008 年に SAFV-3 が 2 株ウイルス分離され、うち 1 株は無菌性髄膜炎患者の髄液からの検出であった。同患者のふん便及び咽頭ぬぐい液からも SAFV 遺伝子が検出された。

2010 年は、SAFV-2 が 7 株、SAFV-NT が 1 株検出された。

SAFV が検出された 10 検体中 6 検体で、他ウイルスの共感染が確認された。

同調査は、継続中である。

D. 考察

SAFV-2 中和抗体陽性率について、アメリカ合衆国では 16-83 才令で 74%であったと報告されている。SAFV-3 の中和抗体陽性率について、オランダでは、9 ヶ月令では 30%であったのに対し、2 才では 93%、18-39 才では 98%であり、また、フィンランドでは、2-2.5 才で 77%、カメルーン、マリ、インドネシアでは 100%であったと報告されている。

今回の調査において、高知県の中和抗体陽性率では、SAFV-2 と SAFV-3 について、0-4 才では両方 25%であったものが、8-9 才～10-11 才では 72.9-83.5%、63.5-77.2%と急激な上昇が確認された。また、このときの中和抗体陽性者の抗体価の幾何平均値も、著しく上昇しているのが確認された。

抗体価の幾何平均値は全年齢階層中でも8-9才及び10-11才が高い値を示していた。このことより、8-11才の年代付近でSAFV-2、SAFV-3感染者が増加していると考えられた。SAFV感染拡大の要因に、弱年齢であること及び小学校で集団生活を営むようになることがあるのではなかろうか。

成人の陽性率は50才代に至るまで、概ね60～80%を推移した後、60才以降はそれぞれ、46.9%、37.5%と下降しており、60才以上の高齢者で、SAFV-2,3に対する抵抗性が低いことが考えられた。成人の中和抗体価の幾何平均値でも、同様の動態であったが、SAFV-2,3ともに50才代で上昇がみられたことは特徴的であった。

SAFV-2の中和抗体陽性率については、アメリカ合衆国の結果と概ね同じであったが、SAFV-3については、オランダやインドネシア等の結果と比較すると日本の高知県の結果は低いものであった。

今回の結果では、SAFV-2とSAFV-3は中和抗体保有率、抗体価の幾何平均値ともに年齢階層別分布状況について非常によく類似しており、このことは、SAFV-2,SAFV-3ともに感染・流行成立の要因が類似していることを示しているように思われた。しかし、一方で、我々は抗SAFV-3

ウサギ血清がSAFV-2のCPE形成を阻害した実験結果を得ており（データ未提示）、SAFV-2とSAFV-3が抗原性の交差性を持っている可能性があることから、中和抗体保有状況の類似性の解釈については更なる検討を必要としているとも考えられた。

ウイルスの検出・分離状況については、SAFV-3は2008年に採取され、それ以降は検出されていない。2010年の遺伝子検査では、SAFV-2のみが検出されており、2010年はSAFV-2が流行しているものと考えられた。

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

なし

H. 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

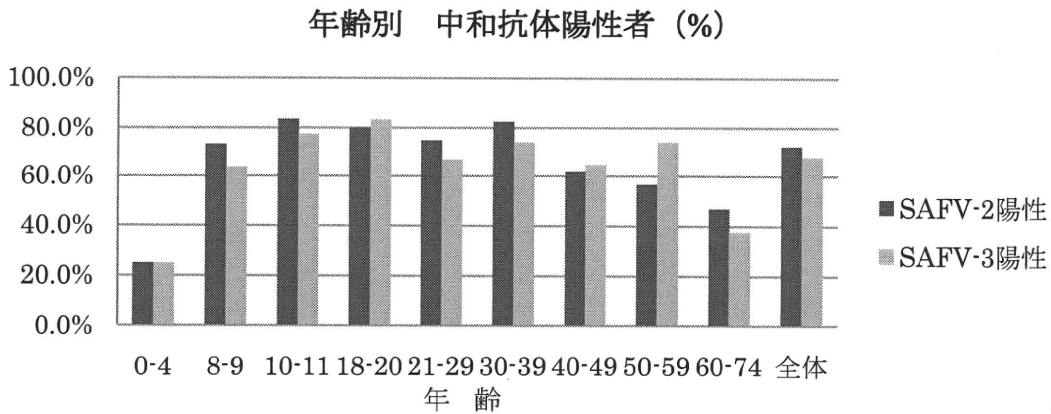
なし

3. その他

なし

年齢	0-4	8-9	10-11	18-20	21-29	30-39	40-49	50-59	60-74	総計	
男性		8	40	44	11	22	62	33	10	20	250
女性		4	45	35	19	29	41	40	13	12	238
高知市以東					6	3	9	13	4	3	38
高知市		1			11	40	84	48	13	15	212
高知市以西		11	85	79	11	8	10	12	6	14	236
高知県外					2						2
計		12	85	79	30	51	103	73	23	32	488

表1 中和抗体保有状況調査の対象者の属性



年齢階層	0-4	8-9	10-11	18-20	21-29	30-39	40-49	50-59	60-74	全体
SAFV-2	25.0%	72.9%	83.5%	80.0%	74.5%	82.5%	61.6%	56.5%	46.9%	71.9%
SAFV-3	25.0%	63.5%	77.2%	83.3%	66.7%	73.8%	64.4%	73.9%	37.5%	67.4%

図1 SAFV-2とSAFV-3の中和抗体陽性率

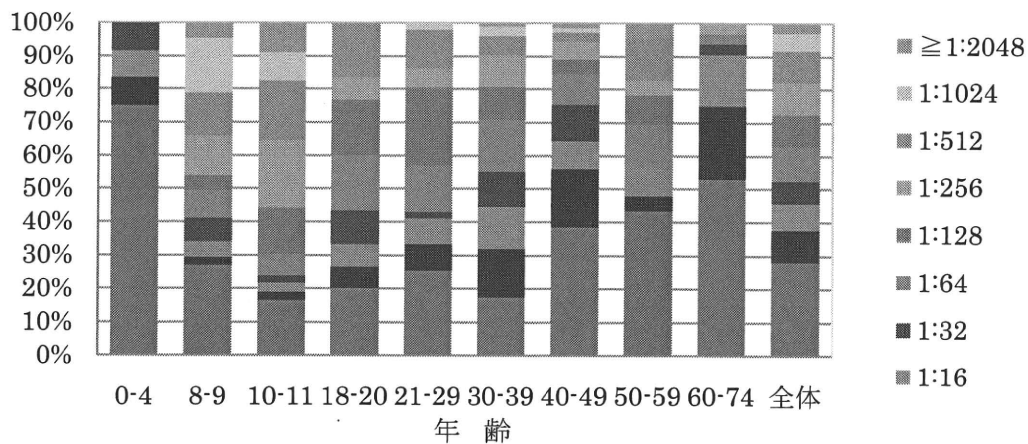


図2 SAFV-2の中和抗体価の年齢別分布 (%)

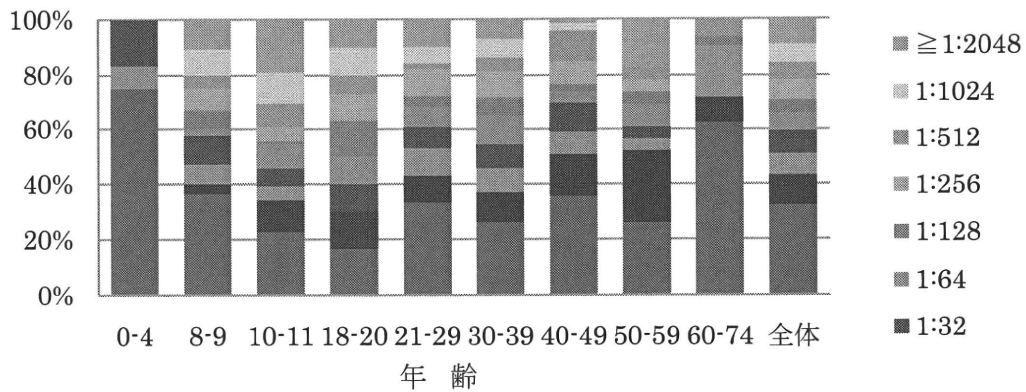
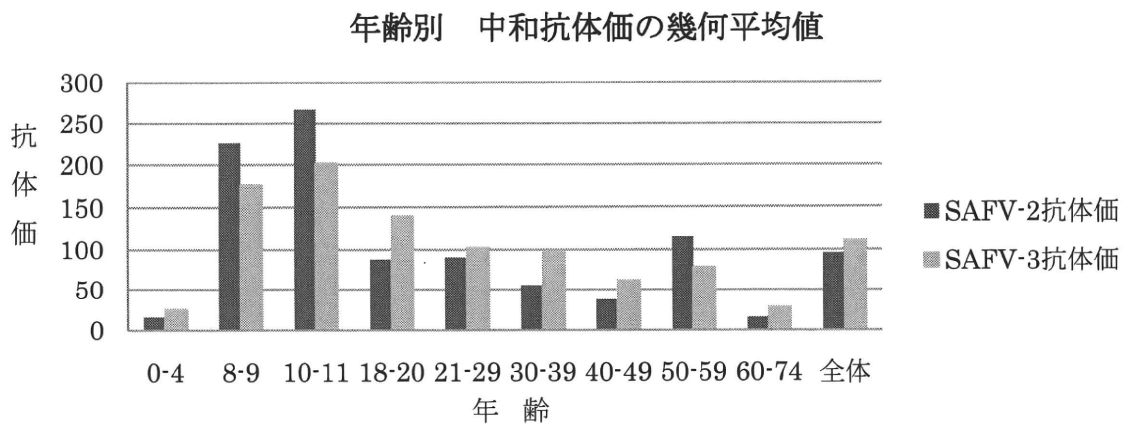


図3 SAFV-3の中和抗体価の年齢別分布(%)



年齢	0-4	8-9	10-11	18-20	21-29	30-39	40-49	50-59	60-74	全体
SAFV-2	$2^{4.0}$ (16.0)	$2^{7.8}$ (226.4)	$2^{8.1}$ (267.0)	$2^{6.5}$ (87.9)	$2^{6.5}$ (90.5)	$2^{5.8}$ (55.7)	$2^{5.3}$ (38.5)	$2^{6.8}$ (115.1)	$2^{4.0}$ (16.0)	$2^{6.6}$ (95.7)
SAFV-3	$2^{4.7}$ (25.4)	$2^{7.5}$ (176.4)	$2^{7.7}$ (201.7)	$2^{7.1}$ (139.1)	$2^{6.7}$ (102.3)	$2^{6.6}$ (96.5)	$2^{6.0}$ (62.1)	$2^{6.3}$ (78.5)	$2^{4.8}$ (28.5)	$2^{6.8}$ (110.9)

図4 中和抗体陽性者の抗体価の幾何平均値

		SAFV-3		合計
		<1:8	≥1:8	
SAFV-2	<1:8	98	39	137
	≥1:8	61	290	351
	合計	159	329	488

表2 SAFV-2とSAFV-3の中和抗体保有の相関

性別	<1:8	≥1:8	合計
男性	68	182	250
女性	69	169	238
合計	137	351	488

表 3 SAFV-2 中和抗体保有と性別の相関

性別	<1:8	≥1:8	合計
男性	85	165	250
女性	74	164	238
合計	159	329	488

表 4 SAFV-3 中和抗体保有と性別の相関

性別	<1:8	≥1:8	合計
高知市以東	12	26	38
高知市	61	151	212
高知市以西	64	172	236
高知県外	0	2	2
合計	137	351	488

表 5 SAFV-2 中和抗体保有と地域の相関

性別	<1:8	≥1:8	合計
高知市以東	13	25	38
高知市	68	144	212
高知市以西	78	158	236
高知県外	0	2	2
合計	159	329	488

表 6 SAFV-3 中和抗体保有と地域の相関

No.	検体名	採取日	臨床診断名	検体	検出 SAFV	共感染
1	高知 08-356	2008.6.30	手足口病	咽頭ぬぐい液 *	SAFV-3	EV ,RV
2	高知 08-404	2008.8.27	無菌性髄膜炎	髄液 *・咽頭ぬぐい液・便	SAFV-3	
3	高知 10-534	2010.8.16	ヘルパンギーナ	咽頭ぬぐい液 *	SAFV-2	
4	高知 10-551	2010.8.27	喉頭気管支炎	咽頭ぬぐい液	SAFV-2	
5	高知 10-586	2010.9.22	咽頭結膜熱	咽頭ぬぐい液	SAFV-2	AdV-2
6	高知 10-593	2010.9.30	川崎病	便	SAFV-NT	PeV
7	高知 10-611	2010.11.1	感染性胃腸炎	便	SAFV-2	SaV
8	高知 10-617	2010.10.29	感染性胃腸炎	便	SAFV-2	SaV ,Polio-2
9	高知 10-621	2010.11.1	流行性耳下腺炎	咽頭ぬぐい液	SAFV-2	
10	高知 10-633	2010.11.12	感染性胃腸炎	便	SAFV-2	AdV-40/41,PeV

EV:Enterovirus RV:Rhinovirus AdV:Adenovirus PeV:Parechovirus SaV:Sapovirus Polio:Poliovirus

*:ウイルス分離

表 7 SAFV 検出状況

ヒトカルジオウイルス（Saffold ウイルス）の病原性解析〈第一報〉

協力研究者 大原義朗 金沢医科大学医学部 微生物学部門 教授
姫田敏樹 金沢医科大学医学部 微生物学部門 講師

研究要旨

ヒトを自然宿主とするカルジオウイルス Saffold ウイルス (Saffold virus, SAFV) が、2007 年に初めて発見された。カルジオウイルスは、これまで、げっ歯類に感染するウイルスとして知られており、その代表であるタイラーウイルス (Theiler's murine encephalomyelitis virus, TMEV) が起こすマウスの脱髄は、多発性硬化症の動物モデルとして用いられている。SAFV は、TMEV と高い相同性を保持していることから、TMEV と同様に、脱髄疾患への関与が強く疑われるが、SAFV の具体的な病原性は依然不明である。そこで本研究では、SAFV の病原性を分子ウイルス学的に解析することを目的とし、T7 プロモーターを利用して SAFV 感染性 RNA を作製することが可能な SAFV (高知県臨床分離株 JPN08-404, SAFV type 3) の cDNA クローンを作製した。そして、SAFV のゲノム上には、T7 RNA polymerase による転写を終結させる human preproparathyroid hormone シグナルの相同配列が存在することを発見し、このシグナルによる転写終結からの回避が、T7 プロモーターを利用した SAFV 感染性 RNA 作製に不可欠であることを明らかにした。

A. 研究目的

カルジオウイルスは、これまで、げっ歯類に感染するウイルスとして知られており、その代表であるタイラーウイルス (Theiler's murine encephalomyelitis virus, TMEV) が起こすマウスの脱髄は、多発性硬化症の動物モデルとして用いられている。2007 年、ヒトを自然宿主とするカルジオウイルスとして Saffold ウイルス (Saffold virus, SAFV) が原因不明の発熱患者の便から初めて分離され、その後、呼吸器感染症や手足口病様の疾患の咽頭スワブ、腸管感染症の便、および、無菌性髄膜炎の髄液など、様々な検体からの分離が報告されている。SAFV は、

TMEV と高い相同性を保持していることから、脱髄疾患への関与が強く疑われ、さらに、髄液からの SAFV の分離は、SAFV の神経疾患への関与の可能性を示唆するものであると考えられる。しかし、SAFV の具体的な病原性は依然不明である。

そこで本研究では、SAFV 感染性 RNA を産生する SAFV cDNA クローンを作製し、これを基に、各ウイルス蛋白の変異体を作製することから、SAFV の病原性を分子ウイルス学的に解析することを目的とする。

B. 研究方法

高知県で分離された SAFV type 3 の臨床

分離株 JPN08-404 を材料として、Oligo dT(20) プライマーを用いた逆転写反応により、1st strand cDNA を作製し、次いで T7 プロモーター配列の下流に SAFV の 5'末端配列を繋げたプライマーと SAFV の 3'末端の相補配列を持つプライマーを用いて、long PCR を行い、pBluescript II SK(+) に挿入することで、ウイルスゲノムをクローニングした。さらに、3'末端に 30 塩基の poly(A) 配列を付加することで、完全長のウイルスゲノムを持つ SAFV cDNA クローン (pSAF404) とした。pSAF404 は、直鎖化処理した後、T7 RNA polymerase (RNAP) または CUGA 7 RNAP による RNA 合成の鋳型とした。得られた RNA は、リポフェクチン法により HeLa 細胞に導入し、SAFV を産生させ、感染性 RNA であることを確認した。また、得られたウイルスにおけるプラークサイズおよび growth kinetics を野生型 SAFV と比較することで、感染性 RNA より得られる SAFV の品質を評価した。

C. 研究結果

高知県臨床分離株 JPN08-404 を元に作製した pSAF404 を鋳型として、T7 RNAP により、SAFV 感染性 RNA の合成を行った。しかし、得られた転写産物は、完全長 RNA を含んでおらず、短鎖化された RNA であることが電気泳動により明らかになった。そこで、SAFV ゲノム中にみられる特徴的な配列について、網羅的にモチーフ解析したところ、T7 RNAP による転写を終結させることで知られている human preproparathyroid hormone (PTH) シグナルの相同配列が存在することが見つかった。上述の RNA の短鎖化と、PTH シグナルの関係を確かめると、

PTH シグナルの影響を受けない T7 RNAP の変異体 CUGA 7 RNAP を用いて RNA 合成を行ったところ、完全長 RNA が合成されることが確認された。さらに、PTH シグナルのモチーフを 2 塩基変異させた鋳型を用いることで、通常の T7 RNAP によっても完全長 RNA が合成されることも明らかとなった。また、CUGA 7 RNAP を用いて合成した RNA は、HeLa 細胞に細胞変性効果をもたらし、感染性ウイルス粒子を産生したことから、感染性核酸として機能する RNA であることが確認された。感染性 RNA を導入した細胞から回収された SAFV は、野生型 SAFV と同様のプラークを形成し、さらに同様のウイルス増殖曲線を描くことから、野生型 SAFV の性状を保持したウイルスであることが示唆された。

D. 考察

T7 RNAP を利用した SAFV の感染性 RNA の合成は、SAFV ゲノム上に存在する PTH シグナル相同配列により途中で終結されることが今回初めて明らかとなった。さらに、この問題を回避するためには、PTH シグナルを認識しない T7 RNAP の変異体を用いるか、または、PTH シグナルを壊す変異を導入する必要があることが示された。また、T7 RNAP 変異体により合成した SAFV 感染性 RNA から産生されるウイルスは、野生型 SAFV の性状を保持したウイルスであることも示唆された。これらの結果から、オリジナルの配列を維持した SAFV の感染性 RNA を作製するためには、CUGA 7 RNAP 等の PTH シグナルを認識しない T7 RNAP 変異体の利用が有用であることが示唆された。

E. 結 論

本研究は、SAFV の感染性 RNA の合成を初めて実施したものである。さらに、ピコルナウイルスの感染性クローン作製に汎用される T7 RNAP を SAFV の感染性クローン作製に用いるためには、SAFV のゲノム上に存在する PTH シグナル相同配列による転写終結の回避が不可欠であることを示した世界で初めての成果である。以上のことから、本研究成果は、SAFV のリバースジェネティクスを利用した様々なウイルス学的解析に貴重な情報をもたらすものであると考えられる。今後は、今回作製した感染性クローンを利用して、SAFV の詳細な分子ウイルス学的解析を行うことから、その病原性の解明を目指したい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Himeda T, Hosomi T, Asif N, Shimizu H, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Evasion of a human preproparathyroid hormone (PTH) signal is essential for the synthesis of infectious Saffold virus type 3 RNA by T7 RNA polymerase. (投稿中)

Himeda T, Ohara Y: The roles of two non-structural viral proteins in virus-induced demyelination. (投稿中)

Himeda T, Okuwa T, Nojiri M, Muraki Y, Ohara Y: The anti-apoptotic protein L* of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) contains a mitochondrial targeting

signal. *Virus Res* 155: 381-388, 2011

Okuwa T, Taniura N, Saito M, Himeda T, Ohara Y: Opposite effects of two nonstructural proteins of Theiler's murine encephalomyelitis virus regulates apoptotic cell death in BHK-21 cells. *Microbiol Immunol* 54: 639-643, 2010

Himeda T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Cytokine/chemokine profile in J774 macrophage cells persistently infected with DA strain of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV). *J Neurovirol* 16: 219-229, 2010

2. 学会発表

Ohara Y, Himeda T, Okuwa T, Muraki Y: The profile of cytokine expression involved with virus persistence and virus-induced demyelination. 第 10 回 国際神経免疫学会、バルセロナ、2010 年 10 月

Himeda T, Nojiri M, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Mitochondrial targeting of anti-apoptotic protein L* of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV). *Europic2010*, セントアンドリュース、2010 年 9 月

姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖、大原義朗：タイラーウイルス抗アポトーシス蛋白 L* のミトコンドリア移行。第 58 回 日本ウイルス学会、徳島市、2010 年 11 月

姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖、大原義朗：タイラーウイルス抗アポトーシス蛋白 L* の細胞内局在。第 47 回 日本細菌学会 中部支部総会、新潟市、2010 年 10 月

大原義朗、姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖：タイラーウイルス持続感染において特

異的に変動するサイトカイン産生.
第 15 回 神経感染症学会、福島市、
2010 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

研究報告書

新規カルジオウイルスの病理学的診断法に関する研究

研究代表者 清水 博之 国立感染症研究所 ウイルス第二部 第二室長

研究協力者 永田 典代 国立感染症研究所 感染病理部 第二室長

鈴木 忠樹 国立感染症研究所 感染病理部 第二室 研究員

佐藤 由子 国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官

研究要旨

新規ヒトカルジオウイルスの病理学的診断法を確立することを目的とした。本年度は、陽性参照標本の作製とウイルス抗原検出のための免疫組織化学法に用いる抗体の検討を行った。その結果、ヒトカルジオウイルス脳内接種後の乳のみマウス脳組織標本では、抗脳心筋炎ウイルス（EMCV）抗体を用いて抗原検出が可能であることが判明した。今後は感度、特異性の向上のために抗ヒトカルジオウイルス抗体の作製を予定している。

A. 研究目的

2007年に、1981年から保管されていた発熱患児の便から新しいピコルナウイルスが分離され、Saffold virus (SAFV) と名付けられた。このウイルスはピコルナウイルス科のカルジオウイルス属に分類されたが、これまで知られていたマウスの脳心筋炎ウイルス（EMCV）や Theiler's virus 等のカルジオウイルスは齧歯類や豚にのみ感染し病原性を示すことが知られており、SAFV はヒトから初めて分離されたカルジオウイルスである。最初の報告以来、カナダ、中国、ドイツ、ブラジル、パキスタン、日本などの発熱、呼吸器疾患あるいは下痢発症患児の鼻腔咽頭ぬぐい液や便からこのウイルスが分離されている。しかしながら、いずれの

報告においても疾患との関連性は不明である。われわれは、この新規ヒトカルジオウイルスの病原性を検討していくために、病理学的診断方法を確立することを目的として今年度の研究を行った。

B. 研究方法

陽性参照標本の作製とウイルス抗原検出のための免疫組織化学法に用いる抗体の検討を行った。感染実験には手足口病患者の咽頭拭い液および無菌性髄膜炎患者の髄液から分離された二株の SAFV(高知県衛生研究所細見卓司先生より分与)を用い、BALB/c 乳のみマウス（生後 24 時間以内）の脳内に 10 μ l 量を接種した。

BALB/c は 5 腹使用し、乳のみマウスは合計 34 匹を用いた。2 腹ずつ（各 14

匹) を分離株接種群として、1 腹 (6 匹) は対照群として 2% 牛血清添加 MEM を接種した。ウイルス液接種後 10 日間毎日臨床症状を観察し、その後 27 日間経過を観察した。接種 3 日目、7 日目、10 日目に各群 2 匹ずつ解剖し、大脳、小脳、脳幹を含む左側脳と全身臓器を病理組織標本とした。

免疫組織化学はクエン酸緩衝液 (pH6.0)、オートクレーブ 121°C 10min による抗原賦活化処理を行い、LSAB 法(DAKO)を使用した。抗 EMCV ウサギ血清を一次抗体として使用した。

C. 研究結果

接種 1 日目に発育不良で 3 匹のマウスが死亡した。咽頭拭い液接種群では 8-10 日目に 10 匹中 4 匹、髄液由来株接種群では 9-10 日目に 7 匹中 6 匹が跛行、よろめき歩行、片側への傾斜などを示し、運動失調と判断された。しかしながら、その後臨床症状は回復し、27 日間の観察中の死亡例はなかった。全体的に臨床症状は判断が困難であった。

接種 3 日目の組織標本において非常にわずかに脳神経細胞にウイルス抗原が検出された。また、この部位に一致して軽微な炎症性細胞浸潤が認められた。接種 7 日、10 日目にウイルス抗原は検出されず、また、明らかな炎症所見は認められなかった。

その他の臓器について明らかな感染を示す所見はなかった。

D. 考察

乳のみマウス脳組織に SAFV は感受性を示し、一過性の神経症状を発症させることが明らかとなった。病理組織標本におけるウイルス抗原の局在から、小脳神経伝達の一時的な傷害を引き起こしていることが推察されるが、これについては今後、詳細な検討が必要である。

今回用いた、ヒトカルジオウイルスのヒト分離株は 3 日目のみウイルス抗原陽性細胞が確認され、5 日以降抗原が検出されないこと、炎症性反応がほとんど引き起こされないことから、乳のみマウスの中枢神経系に感受性を示すが増殖力は弱く、致死的ではないことが示された。さらに、マウスのカルジオウイルスに対するウサギ血清はウイルス抗原の検出に用いることが可能であることがわかった。ただし、その感度や特異性は不明である。そこで、精度の高い、正確な病理学的診断方法の確立のため、来年度には抗ヒトカルジオウイルス抗体の作製を予定している。

E. 結論

本年度は、ヒトカルジオウイルス脳内接種後の乳のみマウス脳組織標本作製し、陽性参照標本とした。また、抗脳心筋炎ウイルス (EMCV) 抗体を用いて抗原検出が可能であることを示した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願、登録状況

特になし。

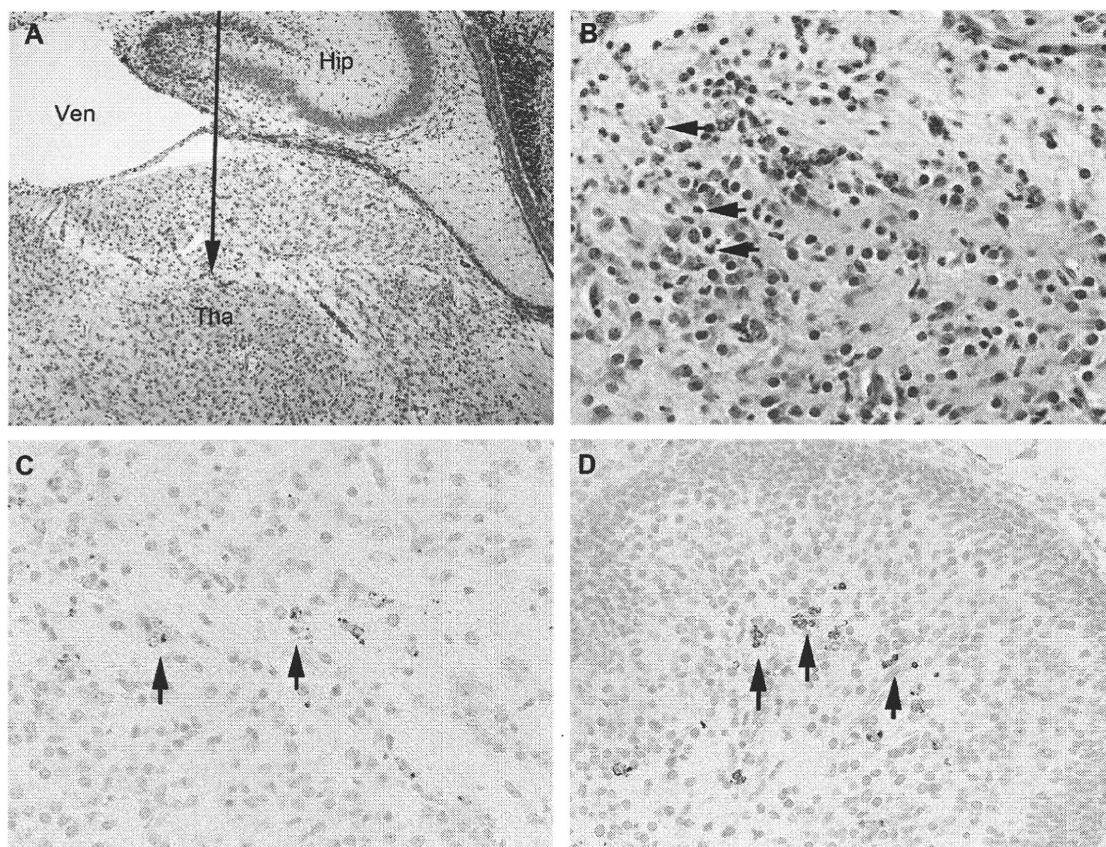


図 咽頭拭い液由来株を接種 3 日目の乳のみマウス脳組織 (接種側)。A, 大脳皮質、海馬、視床に接種による物理的ダメージあるいはウイルス増殖に対する炎症性細胞浸潤が観察された。矢印は接種方向を示した。HE 染色。B, 同部位視床部の拡大。非常にわずかだが、好中球、核崩壊を伴う細胞が認められた (矢印、HE 染色)。C, 同部位、免疫組織化学によるウイルス抗原の検出。少数だが、ウイルス陽性細胞が認められた (矢印、SABC 法)。D, 小脳。まだ小脳皮質、髄質の区別は難しい。この部位の細胞にウイルス抗原が検出された (矢印、SABC 法)。

厚生労働科学研究費補助金
平成 22 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) ゼラチン粒子凝集法を利用したポリオウイルス (PV) の新規同定法を開発した。
- 2) 新規抗エンテロウイルス化合物 T-00127-HEV1 を同定し、T-00127-HEV1 が宿主タンパク質 PI4KB に対する特異的阻害剤であることを明らかにした。

A. 研究方法

- 1) PV受容体の細胞外ドメインとマウスIgG2a抗体のFc部分を持つキメラ分子PVR-IgG2aを精製し、ゼラチン粒子に結合させた。
- 2) PV擬似ウイルス粒子を用い、化合物ライブラリー(72,000化合物)を用いて、複製阻害剤の探索を行った。

B. 研究結果

- 1) PVR-IgG2a を結合させたゼラチン粒子は、ポ PV の存在下で凝集を示した。また、抗 PV 抗体を用いることで、PV の簡便な同定が可能となった。
- 2) 高い抗 PV 阻害活性を示す化合物として、T-00127-HEV1 が同定された。T-00127-HEV1 は、ウイルスの耐性変異から enviroxime 様化合物に分類されることが明らかとなった。また、PI4KB 阻害剤である PIK93 が enviroxime 様化合物であることを見出し、T-00127-HEV1 に特異的な PI4KB 阻害活性があることを明らかにした。

C. 考察

- 1) 開発した新規 PV 同定法は、現在のポリオ根絶計画

において有用である可能性がある。

- 2) PI4KB は、enviroxime 様化合物の一つのターゲットであることが明らかとなった。

D. 健康危機情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Arita M, Masujima S, Wakita T, Shimizu H. Development of a particle agglutination method with soluble virus receptor for identification of poliovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, **48**: 2698-2702, 2010
- 2) Arita M, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Wakita T, Shimizu H. Phosphatidylinositol 4-kinase III beta is a target of enviroxime-like compounds for antipoliovirus activity. *Journal of Virology*, **85**: 2364-2372, 2011

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金 (新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

「エンテロウイルス感染症制御のための診断・予防治療に関する国際連携研究」
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

アイチウイルスは、急性胃腸炎関連のピコルナウイルスである。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、本ウイルスの複製に関与する宿主因子の解析を行った。ウイルス非構造タンパク質と相互作用する宿主タンパク質を同定するため、HeLa 細胞 cDNA ライブラリーの酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行い、その結果、3A と相互作用する宿主タンパク質を得た。哺乳動物細胞ツーハイブリッド解析や免疫沈降による解析により、この宿主タンパク質は、3A 以外にも 2B、2BC、2C、3AB とも相互作用することが明らかとなった。現在、アイチウイルスのゲノム複製におけるこの宿主タンパク質の詳細な役割を検討中である。

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、現在、コブウイルス属に分類されている。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 検出が行われている。散发胃腸炎事例の約 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があり、一部の急性胃腸炎の原因となっているものと考えられている。一方、病原体の増殖機構の理解が感染症制御に不可欠であるが、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。

我々はこれまでに、アイチウイルスのゲノム末端領域や非構造タンパク質の機能解析を行ってきたが、ウイルス複製に関与する宿主因子についての研究は行っていなかった。そこで、今年度は、ウイルス複製に関与する宿主因子の探索を行った。

B. 研究方法

ウイルス非構造タンパク質と相互作用する宿主タンパク質を同定するため、HeLa 細胞 cDNA ライブラリーの酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行った。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り宿主因子とウイルス非構造タンパク質との相互作用を確認した。さらに siRNA を用いて宿主タンパク質発現をノックダウンし、ウイルス複製への影響を調べた。

C. 研究結果

HeLa 細胞 cDNA ライブラリーの酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより、3A と相互作用する宿主タンパク質を同定した。哺乳動物細胞ツーハイブリッド解析により、全てのウイルス非構造タンパク質についてこの宿主タンパク質と相互作用する否かを調査したところ、このタンパク質は 3A 以外にも 2B、2BC、2C、3AB とも相互作用することが明らかとなった。宿主タンパクとこれらのウイルスタンパク質を 293T 細胞で共発現させ、共免疫沈降法による解析を行い、これらの相互作用をさらに確認した。siRNA により宿主因子発現をノックダウンした細胞に、ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだアイチ

ウイルスレプリコン RNA をトランスフェクトし、ウイルスゲノム複製を調査したところ、この宿主タンパク質ノックダウンによる複製阻害が認められた。

D. 考察

以上の結果は、本研究で得られた宿主タンパク質が、2B、2BC、2C、3A および 3AB と結合し、ウイルスゲノム複製において重要な役割を果たしていることを示唆している。2B、2BC、2C、3A および 3AB は膜タンパク質であり、他のピコルナウイルスでは、ウイ

ルス複製複合体形成のための膜構造再構成に関与することも知られている。本研究で得られた宿主タンパク質が、ウイルス複製複合体形成過程で重要な働きをしている可能性が考えられ、現在、詳細な解析を行っている。

E. 研究発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし