

## B. 研究方法

SAFV と TMEV のアミノ酸配列を比較すると、カプシド蛋白に含まれる受容体との結合に重要な構造領域 (VP1 中の CD-loop および VP2 中の EF-loop) の配列に顕著な相違が認められる。そこで、SAFV 感染性 cDNA クローン (pSAF404)、TMEV 慢性株感染性 cDNA クローン (pDAFL3) および TMEV 急性株感染性 cDNA クローン (pGDVHIFL2) を材料とし、SAFV-VP1 を TMEV-VP1 に組換えたキメラウイルス DAVP1/SAFV および GDVP1/SAFV の作製、および、SAFV-VP1&2 を TMEV-VP1&2 に組換えたキメラウイルス、DAVP12/SAFV および GDVP12/SAFV の作製を試みた。対照として、TMEV では種々の作用を持つ多機能蛋白として知られるものの、子ウイルス粒子形成には必須ではないことが知られているウイルス非構造蛋白 leader を両者の間で組換えた DAL/SAFV および SAFL/DA を作製した。さらに、SAFV leader 蛋白の zinc finger motif に、システインからアルギニンへの変異を導入した SAFLcys を作製し、野生型 SAFV、野生型 DA、DAL/SAFV および SAFL/DA と共に、それぞれ HeLa 細胞に感染させ、感染後の IFN- $\beta$  の発現誘導を RT-PCR により解析した。

(倫理面への配慮)

本研究課題において実施している組換えウイルス作製は、大臣申請による承認を得たものである。また、マウスカルジオウイルスがヒトへの感染性を獲得する可能性のある遺伝子組換えは行っていない。

## C. 研究結果

対照として作製した DAL/SAFV および

SAFL/DA は、それぞれ  $1.9 \times 10^8$  pfu/ml および  $2.6 \times 10^8$  pfu/ml の感染性ウイルスが得られ、野生型 SAFV と同等の増殖能を保持していることが示された。対照的に、SAFV と TMEV の間でカプシド蛋白の一部を組換えた 4 種のキメラウイルス (DAVP1/SAFV, GDVP1/SAFV, DAVP12/SAFV, および GDVP12/SAFV) は、いずれも感染性ウイルスを回収することはできなかった。しかし、キメラウイルス作製のための感染性 RNA をトランスフェクトした細胞からは、キメラウイルスのカプシド蛋白が検出された。

一方、leader 蛋白のキメラウイルスを用いた RT-PCR 解析からは、SAFLcys 感染細胞では、野生型 SAFV 感染細胞と比較して、IFN- $\beta$  の発現が増加していることが示された。さらに、DAL/SAFV 感染細胞においても IFN- $\beta$  の発現が増加していることが示された。対照的に、SAFL/DA 感染細胞では野生型 DA 感染細胞より IFN- $\beta$  の発現が低下していることが示された。

## D. 考察

ウイルス非構造蛋白である leader 蛋白を組換えたキメラウイルスは、野生型ウイルスと同様に増殖したが、カプシド蛋白を組換えたキメラウイルスは回収されなかったことから、SAFV と TMEV の間でカプシド蛋白の組換えが起こる可能性は極めて低いことが示された。またその原因として、感染性 RNA をトランスフェクトした細胞においてキメラウイルスのカプシド蛋白が検出されたことから、子ウイルス粒子の形成過程または子ウイルス粒子の感染性に何らかの問題があることが示唆された。

一方、SAFLcys 感染細胞で IFN- $\beta$  の発現

が増加していたことから、SAFV leader 蛋白は、TMEV leader 蛋白同様、IFN 産生抑制能を持つことが示された。さらに、DAL/SAFV 感染細胞においても IFN- $\beta$  の発現が増加し、対照的に、SAFL/DA 感染細胞では IFN- $\beta$  の発現が低下したことから、SAFV leader 蛋白の IFN 産生抑制能は、TMEV leader 蛋白より強力である可能性が考えられた。

## E. 結 論

本研究より、SAFV (ヒトカルジオウイルス) と TMEV (マウスカルジオウイルス) の間で、カプシド蛋白の組換えが起こる可能性は極めて低いことが示された。このことは、宿主の異なるカルジオウイルスの間で宿主域変異が起こる可能性は低いことを示していると考えられる。

また、SAFV leader 蛋白は、TMEV leader 蛋白と同様に、IFN 産生抑制作用を有しているが、その程度は異なることが示された。ピコルナウイルスの持続感染 (維持型持続感染) において、IFN 産生抑制の程度は、重要な要因であると考えられていることから、今回明らかとなったこの違いは、今後の SAFV 病原性解明において、有用な情報となることが期待される。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Himeda T, Ohara Y: Saffold virus, a novel human cardiovirus with unknown pathogenicity. *J Virol*. 86: 1292-1296, 2012

Himeda T, Nojiri M, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Reverse Genetic Analysis of the Recombination in Theilovirus based on the Infectious cDNA Clones. *J Plant Pathol Microbiol* 2: 112, 2011

Himeda T, Ohara Y: Roles of two non-structural viral proteins in virus-induced demyelination. *J Clin Exp Neuroimmunol*. 2: 49-58, 2011

Himeda T, Hosomi T, Asif N, Shimizu H, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: The preparation of an infectious full-length cDNA clone of Saffold virus. *Virology* 53: 110, 2011

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

### 2. 学会発表

姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖、大原義朗：  
ヒトカルジオウイルス感染性クローン  
の樹立とリコンビネーションの検討、  
第 48 回細菌学会中部支部総会、名古屋、  
2011 年 10 月

Himeda T, Hosomi T, Asif N, Shimizu H, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Synthesis of infectious Saffold virus type 3 RNA by T7 RNA polymerase is terminated by a human preproparathyroid hormone (PTH) signal in the viral genome. *IUMS 2011*、札幌、  
2011 年 9 月

姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖、大原義朗：  
感染応答を制御する 2 つのウイルス非構  
成蛋白、第 23 回日本神経免疫学会、東  
京、2011 年 9 月

姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖、大原義朗：  
無菌性髄膜炎患者の髄液から分離され  
たヒトカルジオウイルス (Saffold virus

type-3) のリバースジェネティクス、平成 23 年度 北陸腸内細菌研究会、富山、2011 年 7 月

姫田敏樹、細見卓司、Nacem Asif、清水博之、大桑孝子、村木 靖、大原義朗：ヒトカルジオウイルス (Saffold ウイルス) 感染性クローンの作製、第 15 回神経ウイルス研究会、金沢、2011 年 5 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

協力研究報告書

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 研究員

小谷 治 国立感染症研究所 感染病理部 研究生

**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する。参照標本を用いて、免疫組織化学染色法に用いるための抗体の作製、選別を行った。また、鑑別診断のための各種エンテロウイルス抗体、カルジオウイルス抗体の交差反応性について検討した。その結果、ホルマリン固定標本パラフィン包埋切片上の SAFV3 抗原を検出するシステムを確立した。sABC 法において、SAFV3 抗原と抗 EMCV 抗体との交差反応性がみられたため、特異性に関しては更に検討が必要である。

#### 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事が知られており、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。われわれは、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て、参照標本の作製、免疫組織化学染色法に用いるための抗体の作製、鑑別診断のための交差反応性の検討を行っている。

#### B. 研究方法

1. 参照標本を用いた免疫組織化学染色

昨年度作製したSAFV感染乳のみマウス脳組織を用いて、SAFV3型高度免疫ウサギ血清（高知県衛生研究所 細見卓司先生より分与）を一次抗体としたストレプトアビジン-ビオチン (sABC)法および蛍光多重染色法を検討した。

#### 2. 鑑別診断のための交差反応性の検討

これまでに作製してあった、ポリオウイルス1型 (PV1)、エンテロウイルス71 (EV71) およびコクサッキーA16ウイルス (CA16)感染カニクイザル組織標本(小脳)および高度免疫ウサギ血清 (抗EMCV、PVおよびEV71抗体)を用いてそれぞれの交差反応性をsABC法で評価した。

#### C. 研究結果

1. 参照標本を用いた免疫組織化学染色。

分与いただいた抗 SAFV3 抗体は、10%ホルマリン緩衝液固定後パラフィン切片を用いた sABC 法によりウイルス抗原を検出すること

が可能であった(図 1)。抗原賦活化方法は pH 9 抗原賦活化剤(ニチレイ)121°C15 分オートクレーブ処理を行った。脳内接種 3 日後の乳のみマウス脳組織にウイルス抗原陽性細胞が存在した。神経細胞マーカー (マウスモノクローナル抗体) を用いた蛍光多重染色法により、殆どのウイルス抗原陽性細胞が Musashi-1 陽性であり、神経幹細胞が SAFV3 の感染細胞であることが示唆された(データは示さない)。

## 2. 鑑別診断のための交差反応性の検討

結果を表 1 にまとめた。抗 SAFV3 抗体と抗 EMCV 抗体はいずれも SAFV3 感染組織におけるウイルス抗原陽性細胞を検出した。ただし、抗 SAFV3 抗体の方が感度は高い。抗 PV 抗体は PV 感染組織でのみ抗原を検出した。さらに、抗 EV71 抗体は EV71 および CA16 感染組織における抗原を検出することが可能であった。

## D. 考察

サル組織ホルマリン固定後パラフィン包埋標本を用いる場合に、高度免疫ウサギ血清は非特異反応が神経細胞等に出やすいため、サル脳・脾臓器アセトン処理パウダーによる吸収あるいは抗体の IgG 精製が必要である。ヒト組織標本を用いる場合も同様と考えられる。抗 SAFV3 抗体ではサル組織標本で血管平滑筋に強い非特異反応がみられた。パラフィン切片を用いた sABC 法によるウイルス抗原の検出で、抗 EMCV 抗体と抗 SAFV 抗体の交差反応性が認められた。抗体の特異性を考慮

する必要があると考えられた。

## E. 結論

ホルマリン固定標本パラフィン包埋切片における SAFV3 抗原を検出するシステムを確立した。特異性については更に検討が必要である。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Abe Y, Fujii K, Nagata N, Takeuchi O, Akira S, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T, Koike S. The toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. *J Virol.* 86:185-194, 2012

### 2. 学会発表

1. Kotani O, Shirato K, Nagata N, Miyazaki A, Ikeda H, Taguchi F, Takahashi K. Neuropathogenesis of mouse-adapted porcine epidemic virus infection in suckling mouse. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo, 2011.9.

## H. 知的財産権の出願、登録状況

なし。

表1 パラフィン切片を用いた免疫組織化学法による各種ピコルナウイルス抗原と抗体の交差反応性

	SAFV3 感染マウス	PV 感染サル	EV71 感染サル	CA16 感染サル
抗 SAFV3 抗体	陽性	陰性	陰性	陰性
抗 EMCV 抗体	陽性	陰性	陰性	陰性
抗 PV 抗体	陰性	陽性	陰性	陰性
抗 EV71 抗体	陰性	陰性	陽性	陽性

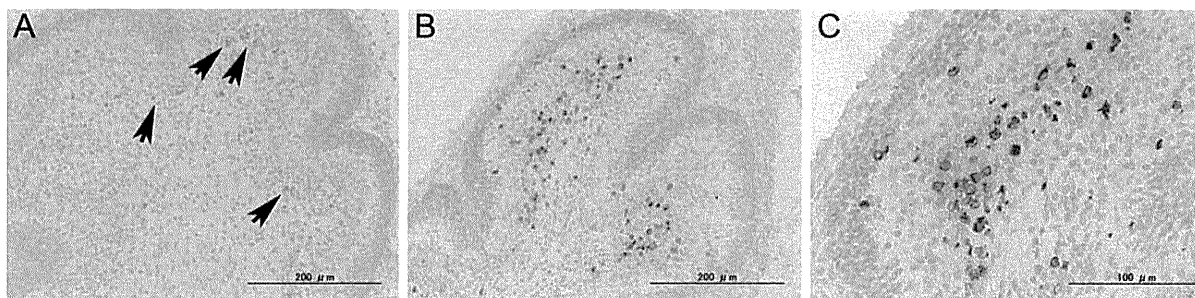


図1 カルジオウイルス SAFV3 を脳内接種した乳のみ BALB/c マウスの小脳。A 抗 EMCV 抗体を用いた sABC 法。陽性細胞数は少ないが、抗原は検出されている。B,C 抗 SAFV3 抗体による sABC 法。ウイルス抗原陽性細胞が小脳髄質に多数存在する。

厚生労働科学研究費補助金  
平成 23 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  
ポリオウイルス新規中和抗体価測定法の開発

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

ポリオウイルス(PV)の新規中和抗体価測定法を開発した。

A. 研究方法

- 1) PV1,2,3型のカプシドを持つ擬似ウイルスを作製し、ヒト血清中の抗PV中和抗体価の新規測定系を開発した。

B. 研究結果

- 1) PV1,2,3型のカプシドを持つ擬似ウイルスを作製した。各々の型の擬似ウイルスは、型特異的抗体によってのみ中和された。これらの擬似ウイルスを用いて、ヒト血清中の中和抗体価を測定した。新規法によって得られた結果は、従来法による測定結果とよい相関を示した。

C. 考察

- 1) 全世界的なポリオ根絶計画が進む中で、健常人が有する抗 PV 中和抗体価を把握することは、その国の PV 感染および再流行に対する脆弱性を監視する上で必須である。開発した新規抗 PV 中和抗体価測定法は、感染性のウイルスを使わない。現在、感染性 PV の管理の重要性が高まりつつある中で、本研究で開発した新規法は有用な抗 PV 中和抗体価測定法として利用される可能性がある。

D. 健康危機情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Arita M, Iwai M, Wakita T, Shimizu H. Development of poliovirus neutralization test with poliovirus pseudovirus for measurement of neutralizing antibody titer in human serum. *Clinical and Vaccine Immunology*, **18**: 1889-1894, 2011
- 2) Arita M, Masujima S, Wakita T and Shimizu H. Particle Agglutination Method for Poliovirus Identification. *Journal of Visualized Experiments*. 50. <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=2824>, doi: 10.3791/2824, 2011

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 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、急性胃腸炎関連ピコルナウイルスである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二つの宿主因子を明らかにした。ウイルス非構造タンパク質と相互作用する宿主因子を酵母 two-hybrid 法でスクリーニングした結果、3A タンパク質と相互作用する宿主タンパク質、ACBD3 を得た。哺乳動物細胞 two-hybrid 解析や免疫沈降解析において、ACBD3 は 3A に加え、2B、2BC、2C、3AB とも相互作用した。さらに、エンテロウイルスの複製に必要な宿主因子であることが最近報告された PI4KB と、ACBD3 が相互作用することが示された。感染細胞の免疫染色により、ACBD3、PI4KB、ウイルスタンパク質がウイルス RNA 複製部位に存在することが示された。ACBD3 あるいは PI4KB のノックダウンにより、ウイルス RNA 複製が阻害された。以上の結果は、アイチウイルス複製部位にウイルスタンパク質/ACBD3/PI4KB 複合体が形成され、ウイルス RNA 複製に重要な役割を果たしていることを示唆する。

### 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、コブウイルス属に分類されている。日本以外にもアジア各国、ヨーロッパ、ブラジル、アフリカで胃腸炎患者便からウイルス RNA が検出されており、世界に広く分布し、一部の急性胃腸炎の原因となっていると考えられている。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。今年度は、本ウイルスの複製に関与する二つの宿主因子 acyl-coenzyme A binding domain containing 3 (ACBD3) と phosphatidylinositol 4-kinase  $\beta$  (PI4KB) を明らかにした。

### 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 HeLa 細胞 cDNA ライブラリーの酵母 two-hybrid スクリーニングにより探索した。タンパク質間相互作用は、哺乳動物細胞 two-hybrid 解析および免疫沈降により解析した。ウイルス感染 Vero 細胞を免疫染色し、ウイルス非構造タンパク質、宿主タンパク質お

よび脂質の細胞内局在を調査した。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

ウイルス非構造タンパク質と相互作用する宿主因子を酵母 two-hybrid 法でスクリーニングした結果、3A タンパク質と相互作用する宿主タンパク質として、ゴルジタンパク質である ACBD3 を得た。哺乳動物細胞 two-hybrid 解析や免疫沈降解析により、ACBD3 は 3A に加え、2B、2BC、2C、3AB とも相互作用することが示された。さらに、エンテロウイルスの複製に必要な宿主因子であることが最近報告された PI4KB と、ACBD3 が相互作用することが明らかとなった。2B、2BC、2C、3A、3AB と PI4KB との直接の相互作用は認められなかった。感染細胞の免疫染色により、ACBD3、PI4KB、ウイルスタンパク質がウイルス RNA 複製部位に存在することが示された。加えて、PI4KB により産生される phosphatidyl-4-phosphate (PI4P) も RNA 複製部位に存在した。PI4KB 特異的阻害剤によるアイチウイルス複製阻害も認められた。また、ACBD3 あるいは PI4KB のノックダウンにより、ウイルス RNA 複製が阻害された。



#### D. 考察

以上の結果は、アイチウイルスゲノム複製部位でウイルスタンパク質/ACBD3/PI4KB 複合体が形成され、PI4P を産生することがウイルス RNA 複製に重要であることを示唆する。我々の論文が公表された後、エンテロウイルスの 3A が ACBD3 と相互作用し、3A/ACBD3/PI4KB 複合体が形成されることが報告された。ACBD3 や PI4KB は、アイチウイルスやエンテロウイルス感染制御のためのターゲットとなりうると考えられる。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Sasaki J, Ishikawa K, Arita M, Taniguchi K: ACBD3-mediated recruitment of PI4KB to

picornavirus RNA replication sites. EMBO J 31:754-766, 2012

2) Sasaki J, Ishikawa K, Taniguchi K: 3CD, but not 3C, cleaves the VP1/2A site efficiently during Aichi virus polyprotein processing through interaction with 2A. Virus Res 163: 592-598, 2012

##### 2. 学会発表

1) Ishikawa K, Sasaki J, Maeno Y, Moriguchi K, Komoto S, Taniguchi K: A Golgi protein interacting with 2B, 2BC, 2C, 3A and 3AB is a host factor required for Aichi virus RNA replication. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo, 2011 年 9 月

F. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生労働省科学研究費補助金(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」  
分担研究報告書

エンテロウイルス71感染増殖解析のための数理モデルに関する研究

分担研究者 小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所 教授

研究協力者 佐藤 佳 京都大学ウイルス研究所 助教

岩見真吾 九州大学理学研究院 准教授

福原充子 京都大学理学部

研究要旨： Enterovirus 71 (EV71)感染症は、近年特にアジア太平洋地域を中心にアウトブレイクを繰り返し、中枢神経合併症も多いことより、公衆衛生上、深刻な問題となっている。本研究では、実験科学と数理科学の融合により、EV71の複製ダイナミクスを定量的に解析する実験手法の開発に成功した。本手法を用いることにより、通常の実験科学に基づいた解析では求めることができない、各ウイルス株の複製における動的なパラメーターを定量的に算出することができた。さらに、本手法から得られたパラメーターは、そのEV71の流行・伝播効率を示すものであることが推察された。アウトブレイクが深刻な問題となっているEV71感染症を考える上で、本手法は有益な情報をもたらすことができる解析手法である可能性が示唆される。

A. 研究目的

小児の手足口病やヘルパンギーナの原因ウイルスであるEnterovirus 71 (EV71)は、ピコルナウイルス科の一本鎖RNAウイルスであり、無菌性髄膜炎・脳炎への進行例が少なくない。EV71感染症は、90代以降アジア太平洋地域でアウトブレイクを繰り返しており、公衆衛生上、大きな問題となっている。

ウイルスの増殖・複製を定量的に理解するひとつの方法として、実験データを基に数学的解析を行う融合研究が挙げられる。この数理科学と実験科学の融合手法を用いることにより、エイズウイルス (Iwami et al, *Retrovirology*, in press) やインフルエンザウイルス (Mitchell et al, *J Virol*, 2011) などのエンベロープウイルスの複製ダイナミクスが定量的に解析されており、ウイルス感染細胞の寿命 (half-life) やバーストサイズ (1個のウイルス感染細胞が生産するウイルス粒子の

量)、基本再生産数 (1個のウイルス感染細胞が生み出す次世代の感染細胞の個数) を定量的に算出することができる。

しかしながら、これまで、EV71を含めたノンエンベロープウイルスの複製ダイナミクスを数理科学解析により定量的に解析された報告はない。そこで、EV71の複製ダイナミクスを定量的に明らかにすることを目的として、以下の実験を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮)

1) 細胞培養

ヒト横紋筋肉腫由来のRD細胞は、10%FCS含DMEMにて培養した。また、その倍加時間を、細胞数計数および数理科学解析により推定した。

2) EV71感染実験

EV71 1095株、KED005株、02363株のウイルス液をMOI 0.01で感染させた。EV71感染実験は、EV71を感染対象細胞に暴露し、CO2インキュベーターで37℃1時間恒温放置することにより行った。感染後の細胞は10%FCS含RPMI1640で2度洗浄し、CO2インキュベーターで培養した。感染後0,1,2,3,4,5日目において、i) 培養上清中のウイルス量、ii) 感染細胞数、iii) 非感染細胞数をそれぞれ、i) RD細胞を用いた限外希釈法によるタイトレーション (cell culture infective dose 50% [CCID<sub>50</sub>])、ii) iii) Alexa488 標識抗VP1抗体を用いた flow cytometry法および細胞数計数、により算出した。各実験はそれぞれtriplicateで行った。

### 3) 実験データに基づく数理科学解析 (図1)

任意時間 $t$ における上清中のウイルス量を $v(t)$ 、非感染細胞数を $x(t)$ 、感染細胞数を $y(t)$ とし、上述の実験によって得られた値を、以下の数式に代入した：

$$dx(t)/dt = px(t) (1 - x(t)/q) - \beta x(t)v(t) \quad (1)$$

$$dy(t)/dt = \beta x(t)v(t) - ay(t) \quad (2)$$

$$dv(t)/dt = ky(t) - rv(t) \quad (3)$$

### 4) (倫理面への配慮)

本研究においてはすべて樹立培養細胞を用いており、その使用にあたり細胞樹立者により倫理的配慮はなされている。実験動物は使用していない。臨床検体等のヒト細胞ならびにゲノム解析は行っていない。

## C. 研究結果

### 1) RD細胞の倍加時間の推定

RD細胞の倍加時間を推定した結果、 $10.57 \pm 0.69$ 時間であった。

### 2) EV71感染実験と数理科学解析

EV71感染実験の結果を図2に示す。この時系列データを数理科学解析することにより、ウイルス感染細胞の寿命 (half-life)、バー

ストサイズ (1個のウイルス感染細胞が生涯産生するウイルス粒子の量)、基本再生産数 (1個のウイルス感染細胞が生み出す次世代の感染細胞の個数) をそれぞれ表1に示す。1095株、KED005株、02363株に感染した細胞の寿命はほとんど差異がなかった。バーストサイズおよび基本再生産数には、1095株とKED005株に、02363株と比較して統計的に有意かつ顕著な差異が認められた。

## D. 考察

### i) 感染細胞の寿命について

1095株、KED005株、02363株に感染した細胞の寿命はほとんど差異がなかった (なお、ここでの「感染細胞の寿命」の定義は、「VP1抗原を発現してから死滅するまでの時間」である)。感染細胞の寿命は、それぞれのウイルスのvirulence/cytotoxicityを示す値である。すなわち、これらのウイルス株の細胞毒性には差異がないことが示唆された。

感染者におけるEV71感染症の病態は、ウイルスそのものの細胞毒性に加え、抗EV71免疫応答などさまざまな要素によって構成され、形成される。無菌性髄膜炎などの重篤例が、特にまだ免疫系の発達が未熟な小児で多発することからも、EV71感染症の病態は、ウイルスの毒性よりもむしろ、宿主応答の差異によって決定されていると推察される。

### ii) バーストサイズと基本再生産数について

感染細胞の寿命に大きな差異は認められなかったのに対し、バーストサイズおよび基本再生産数には、統計学的に有意かつ顕著な差異が認められた (表1)。これらの値は、それぞれのウイルスの複製効率/transmissibilityを示す値である。興味深いことに、これらの値が比較的大きかった1095株とKED005株はそれぞれ、1997年の日本と1997年のマレーシアでの流行時の分離株である (Cardosa et al, *Emerg Infect Dis*, 2003; Shimizu et al, *Jpn J*

*Infect Dis*, 1999)。それに対しこれらの値が比較的小さかった02363株は、2003年のタイの散発例からの分離株である (Shimizu et al, *Pediatr Int*, 2004)。以上の報告と結果から、今回の解析手法で求められたバーストサイズおよび基本再生産数という値が、その分離ウイルスの流行効率を示唆する値であることが考えられる。実際、インフルエンザウイルスの流行性が、バーストサイズと強い相関があることが報告されている (Mitchell et al, *J Virol*, 2011)。アジア太平洋地域におけるアウトブレイクの頻発が深刻な問題となっているEV71感染症を考える上で、今回の実験科学と数理科学の融合研究に基づいた解析手法は、ひとつの有用なツールとなることが強く示唆された。

#### E. 結論

実験科学と数理科学の融合研究により、EV71の複製ダイナミクスを定量的に解析する実験手法の開発に成功した。これは、ノンエンベロープウイルスの複製ダイナミクスを定量的に解析・検証した世界でも初めての結果である。数理科学を用いた解析手法は日本のウイルス学界ではまだ比較的馴染みの薄い実験方法であるが、世界的にはその有用性が認められており、研究分野も急速に拡大している。本手法を用いることにより、通常の実験科学に基づいた解析では求めることができない動的な定量的パラメーター (例: バーストサイズ、基本再生産数) を推定することができる。さらに、本手法から得られるパラメーターは、アウトブレイクが深刻な問題となっているEV71感染症を考える上で、有益な情報をもたらす可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Sato K, Misawa N, Nie C, Satou Y, Iwakiri D, Matsuoka M, Takahashi R, Kuzushima K, Ito M, Takada K, Koyanagi Y: A novel animal model of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. *Blood* 117:5663-5673, 2011

2) Gee, P., Ando, Y., Kitayama, H., Yamamoto, S.P., Kanemura, Y., Ebina, H., Kawaguchi, Y., and Koyanagi, Y.: APOBEC1-mediated editing and attenuation of herpes simplex virus 1 DNA indicate that neurons have an antiviral role during herpes simplex encephalitis. *J Virol* 85:9726-9736, 2011

##### 2. 学会発表

1) Sato K, Misawa N, Koyanagi Y: Dynamics of human-specific virus infection in humanized mice. T lymphocyte dynamics in acute and chronic viral infection - Infectious Disease Research Network. London, England, 2011年1月

2) Iwami S, Sato K, Misawa N, Kobayashi T, De Boer R, Koyanagi Y: DNA labeling system by peripheral blood of humanized mouse. 1st International Symposium on Innovative Mathematical Modeling. 東京、2011年3月

3) Koyanagi Y: Intracellular anti-HIV factor, International Symposium. Virus, host and diseases. 京都市、2011年3月

4) 小柳義夫、Peter Gee, 川口寧、北山裕子、安藤良徳: APOBEC1によるHSV-1 DNAのeditingと抗ウイルス効果. 第18回ヘルペス感染症フォーラム (JHIF). 札幌市、2011年8月

5) Iwami S, Sato K, Koyanagi Y: Mathematical modeling and in vitro experiments in virology. Korean Society for Mathematical Biology 2011 annual meeting, Ulsan. Korea, 2011年8月

6) Sato K, Misawa N, Ito M, Koyanagi Y: HIV-1 Vpr protein accelerates HIV-1 replication during acute phase in vivo. XV International Congress of Virology. 札幌市, 2011年9月

7) Sato K, Misawa N, Ito M, Koyanagi Y: HIV-1 Vpr protein accelerates HIV-1 replication during acute phase in vivo. 3rd International Workshop on Humanized mice. Pittsburgh, USA, 2011年10月

8) Sato K, Misawa N, Nie C, Satou Y, Matsuoka M, Ito M, Koyanagi Y: Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. 3rd

International Workshop on Humanized mice, Pittsburgh. USA, 2011年10月

9) 佐藤佳, 三沢尚子, 佐藤賢文, 松岡雅雄, 伊藤守, 小柳義夫: 急性感染期のHIV-1増殖における制御性T細胞とVprの寄与. 第25回日本エイズ学会. 東京, 2011年12月

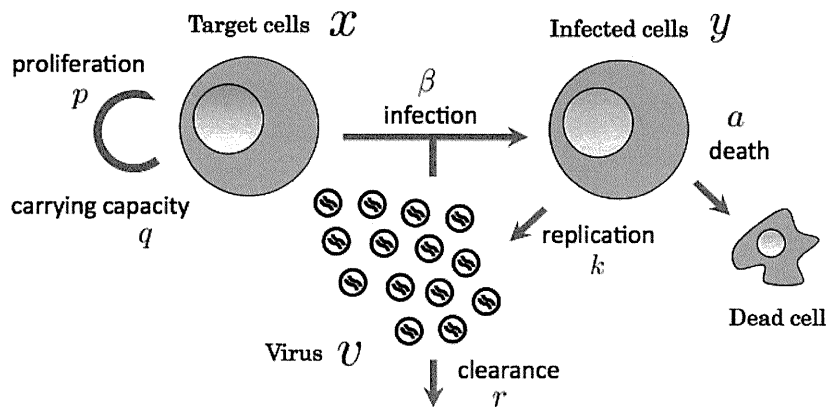
#### H. 知的所有権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし



•Mathematical model:

$$\mathbf{x(t)'} = p\mathbf{x(t)}(1 - \mathbf{x(t)}/q) - \beta\mathbf{x(t)}\mathbf{v(t)}, \mathbf{y(t)'} = \beta\mathbf{x(t)}\mathbf{v(t)} - a\mathbf{y(t)}, \mathbf{v(t)'} = k\mathbf{y(t)} - r\mathbf{v(t)}$$

図1. 数理モデルのスキーム.

図中  $x$ ,  $y$ ,  $v$  はそれぞれ、非感染細胞数 (target cells), 感染細胞数 (infected cells), 放出ウイルス量 (virus) を意味する。また、図中パラメーター  $a$ ,  $\beta$  はそれぞれ、感染細胞の死亡率 (death), 一日あたり1個のウイルスが非感染細胞に感染する効率 (infection) を意味する。また、感染細胞がウイルス粒子を放出する効率 (replication) を  $k$ 、ウイルス粒子が一日あたりウイルス粒子が感染性を失う率 (clearance) を  $r$  とした。なお、非感染細胞の増殖効率 (proliferation)、1well中の増殖許容量 (carrying capacity) をそれぞれと  $p$ ,  $q$  し、研究方法B-1に従って推定した。

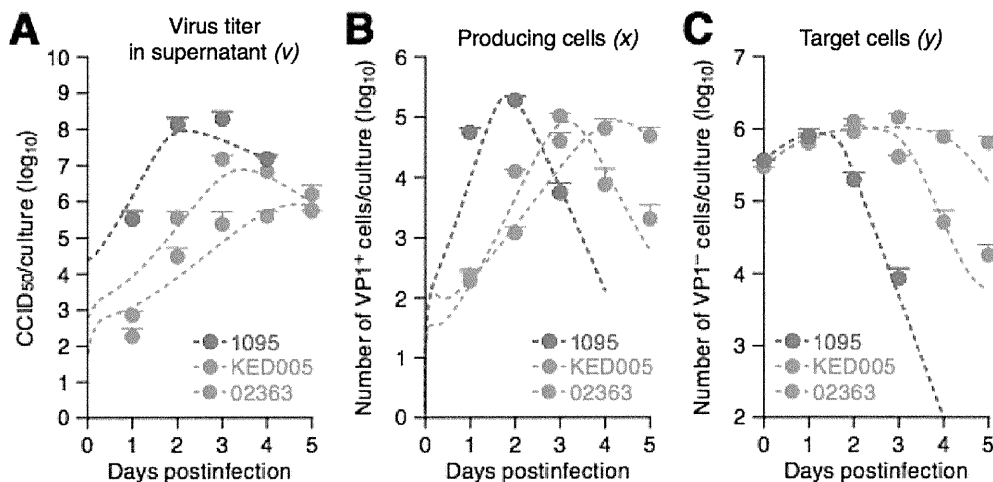


図2. 感染実験と数理科学解析によるEV71感染ダイナミクス.

培養上清中の感染性ウイルス量 (A), 感染細胞数 (B), 非感染細胞数 (C) をそれぞれ示す. 図中点は感染実験による実測値 (n=3) を、図中点線は実験データに基づく数理科学解析結果を示す。

表1. 数理科学解析によって得られたパラメーター

パラメーター	Symbol	単位	1095 株	KED005 株	02363 株
感染細胞の寿命	Log2/a	hour	2.69±0.06	0.99±0.17	1.48±0.20
バーストサイズ	k/a	CCID50	153.2±32.1	11.86±0.72	1.48±0.36
基本再生産数	$R_0$	-	32.47±7.55	7.22±0.80	4.76±0.13

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

受容体 PSGL-1 結合性を規定する EV71 キャプシドアミノ酸の同定

研究分担者 西村順裕 国立感染症研究所 主任研究官

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のひとつである。手足口病の症状は一般に軽く、予後も良好であるが、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不明な部分が多く、EV71 が細胞に感染する際に使用する受容体も長年にわたり未知であった。近年我々は EV71 受容体のひとつとして、P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) 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 分離株には、PSGL-1 に結合する株と結合しない株が存在することを明らかにしている。本研究では、PSGL-1 結合性を規定する、EV71 キャプシドアミノ酸を解析した。その結果、VP1 領域のアミノ酸わずか2つにより PSGL-1 結合性が決定することを明らかにした。PSGL-1 依存性、非依存性 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属す、小型 RNA ウイルスである。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。一般に手足口病の症状は軽く、通常数日で回復し、予後も良好である。しかし、EV71 感染では時として無菌性髄膜炎、急性弛緩性麻痺などの重篤な中枢神経疾患

を伴うことがある。1997 年のマレーシア、1998 年の台湾以降、EV71 による手足口病の大規模な流行は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 2008～2010 年には、中国各地で大規模な手足口病流行が発生し、毎年数十万人が感染し、数百名の死亡例が報告されている。また 2010 年には国内においても EV71 による手足口病が流行した。幸いにも我が国では重症例の大規模



な発生は認められていないが、散発的には報告されている。

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は、特異的ウイルス受容体の同定が重要である。たとえば、EV71 と同じエンテロウイルス属に分類されるポリオウイルスの例がある。ポリオウイルス受容体の同定後、ヒトポリオウイルスレセプター発現トランスジェニックマウスモデルが樹立された。このマウスはポリオウイルス感染によりポリオ様麻痺を起すことから、重要な実験動物モデルとなっている。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。またヒトポリオウイルスレセプター発現マウス L929 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きた。EV71 や CVA16 を含む A 群ヒトエンテロウイルスの受容体は長年にわたり未知であった。2009 年に 2 種類の全く異なる EV71 受容体が同定された。一つは我々が Jurkat 細胞から同定した P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)、もう一つは小池らが RD 細胞から同定した Scavenger receptor class B, member 2 (SCARB2) である。これらの分子はそれぞれ全く異なるファミリーに属すにもかかわらず、

ともに EV71 の受容体として機能する。

PSGL-1 はシアロムチンファミリーに属す膜蛋白質である。主に骨髄系・リンパ球系細胞および血小板に発現している。細胞外に位置する PSGL-1 のアミノ末端領域には、セレクトインやケモカインが結合する。この結合が、炎症初期過程における白血球の遊走・接着・浸潤に重要なシグナルとなっている。これらの相互作用には、PSGL-1 の翻訳後修飾が重要である。例えば、PSGL-1 と P セレクトインの相互作用には、PSGL-1 のチロシン (Y46、Y48、Y51) の硫酸化に加え、トレオニン (T57) の O 型糖鎖付加が重要である。一方、PSGL-1 とケモカイン CCL27 の相互作用には、チロシンの硫酸化のみが必須である。

また、EV71 分離株には PSGL-1 結合性 EV71 (PSGL-1-binding EV71; EV71-PB) と PSGL-1 非結合性 EV71 (PSGL-1-nonbinding EV71; EV71-nonPB) がある。昨年度は、EV71-PB と PSGL-1 との相互作用における、PSGL-1 翻訳後修飾の役割を詳細に解析した。EV71-PB 結合にはチロシン硫酸化が必須であり、O 型糖鎖付加は不要であることを明らかにした。

本研究においては、EV71-PB と EV71-non-PB を規定する、EV71 キャプシドアミノ酸の同定を目指した。

EV71 の PSGL-1 結合性は、わずか2 アミノ酸で規定されていることを明らかにした。

## B. 研究方法

### 1. 細胞

ヒトリンパ球由来 Jurkat 細胞 (PSGL-1 陽性) を用いた。またウイルスの力価測定にはヒト横紋筋種由来 RD 細胞を用いた。

### 2. ウイルス

EV71-PB 株 (SK-EV006, C7/Osaka, KED005, 1095, 75-Yamagata) および EV71-nonPB 株 (Nagoya, 02363) を用いた。

### 3. 抗体および組換え蛋白質

ウエスタンブロッティングには抗 EV71 抗体 MA105 を用いた。EV71 感染阻止実験には抗 PSGL-1 抗体 KPL1 を用いた。また、可溶性 PSGL-1-Fc (R&D System)を用いた。

### 4. cDNA 由来ウイルスの作製

EV71-1095 および EV71-02363 を基に作製した。ゲノム全長を RT-PCR により増幅し、pBR322 由来プラスミドにクローニングした。アミノ酸変異は PCR による site-directed mutagenesis により導入した。In vitro transcription により RNA を合成し、RD 細胞にトランスフェクションした。24 時間後に組換えウイルスを含む培養液を回収した。高タイターウイルスを得るために、も

う一度 RD 細胞に感染させた。強い細胞変性効果が出現した時点でウイルス液を回収し、実験に用いた。

### 5. 免疫沈降法による EV71-PSGL-1 結合の検出

Protein G ビーズと PSGL-1-Fc を反応後、洗浄し、EV71 を加えた、1 時間後洗浄し、共枕した EV71 をウエスタンブロッティングで検出した。

### 6. ウイルス感染実験

Jurkat 細胞 ( $4 \times 10^4$ ) を 1 CCID<sub>50</sub>/cell のウイルスで 1 h 感染させ、洗浄後、34°C で培養した。抗 PSGL-1 抗体での感染阻害実験では、Jurkat 細胞を 10 ug/ml 抗体で on ice, 1 時間反応後、EV71 を感染させた。

## C. 結果

### 1. PSGL-1 結合性を規定するアミノ酸の推測

Subgenogroup C1 に属する EV71-02363 と EV71-KED005 のキャプシドアミノ酸を比較した。862 アミノ酸のうち、わずか4アミノ酸がことなるのみであった。次にこれらのアミノ酸について、EV71-PB 4 株、EV71-non-PB 2 株の合計 6 株で比較した。その結果、PSGL-1 結合性の違いは、VP1-98 および VP1-145 のアミノ酸の違いに相関することが明らかとなった。この二つのアミノ酸に焦点を絞り、PSGL-1 結合性への関与を検討することにした。

## 2. cDNA 由来ウイルスの作製

EV71-1095 株および EV71-02363 株の分離株よりゲノム RNA を回収した。逆転写後、PCR によりゲノム全長を増幅し、pBR322 由来プラスミド組み込むことができた。このプラスミド上において、VP1-98 および VP1-145 にアミノ酸変異を導入した。

In vitro で合成した EV71 ゲノム RNA を RD 細胞にトランスフェクションしたところ、24 時間後の培養上清中に組換え EV71 を検出できた。しかし、十分に高いウイルス力価を得ることができなかった。そこでこのウイルスをもう一度 RD 細胞に感染させ、ウイルスを増幅した。このウイルスを以降の実験に用いることとした。

PB 株である 1095 株に non-PB 型アミノ酸を導入した組換え EV71 を EV71-1095KE、non-PB 株である 02363 株に PB 型アミノ酸を導入した組換え EV71 を EV71-02363EG と呼ぶこととした。

## 3. PSGL-1 結合性への VP1-98 および VP1-145 の関与

cDNA 由来ウイルスの PSGL-1 結合性を、PSGL-1-Fc との共沈により検討した。PB 型アミノ酸をもつ、EV71-1095 分離株、cDNA 由来 EV71-1095 株および EV71-02363EG 株は、PSGL-1-Fc と共沈した。つまり、non-PB 株に PB 型アミノ酸二つを導入

することにより、non-PB→PB へと表現形が変わることが示された。

Non-PB 型アミノ酸をもつ、EV71-02363 分離株、cDNA 由来 EV71-02363 株および EV71-1095KE 株は、PSGL-1-Fc と共沈しなかった。つまり、PB 株に non-PB 型アミノ酸二つを導入することにより、PB→non-PB へと表現形が変わることが示された。

以上の結果より、PB 型と non-PB 型の PSGL-1 結合性の違いは、VP1-98 と VP1-145 のわずか 2 アミノ酸で決定されることが明らかとなった。

## 3. PSGL-1 依存性 EV71 複製への影響

次にアミノ変異と PSGL-1 依存性 EV71 増殖の関連を検討した。

PB 型アミノ酸をもつ、EV71-1095 分離株、cDNA 由来 EV71-1095 株および EV71-02363EG 株は、Jurkat 細胞で増殖し、その増殖は抗 PSGL-1 抗体での感染前処理により阻害された。つまり、non-PB 株に PB 型アミノ酸二つを導入することにより、non-PB 株が PSGL-1 依存性増殖を示すようになった。

Non-PB 型アミノ酸をもつ、EV71-02363 分離株、cDNA 由来 EV71-02363 株および EV71-1095KE 株は、Jurkat 細胞でほとんど増殖せず、その増殖も抗 PSGL-1 抗体での感染前処理に影響されなかった。つまり、PB 株に non-PB 型アミノ酸二つを導入することにより、PB 株のもつ PSGL-1

依存性増殖が阻害された。

#### D. 考察

以上のように、EV71 の PSGL-1 結合性および Jurkat 細胞における PSGL-1 依存性増殖は、VP1 のわずか2 アミノ酸 (VP1-98、VP1-145) で規定されることが明らかとまった。VP1-145 はポジティブ・セレクションを受けるアミノ酸であることが知られている。EV71 はこのアミノ酸を変化させることにより、環境に応じてより増殖しやすいウイルスへと変化していることが推察された。

また、VP1-145 は EV71 のマウスアダプトにも重要なアミノ酸である。つまり、マウス細胞上に存在する未同定の受容体への結合性にも関与していることが考えられた。

#### E. 結論

EV71-PB と EV71-non-PB との違いを決定するのは、キャプシド上のわずか2アミノ酸であることを明らかにした。このわずかな違いが、EV71 病原性のどのように関与しているのか、今後解明する必要がある。本研究結果は、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。

#### 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

1) Nishimura Y, Wakita T, Shimizu H: Analysis of amino acid determinants of enterovirus 71 responsible for the PSGL-1-binding phenotype. IUMS 2011 Sapporo. 札幌市、2011年9月

#### 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