

- 26)2009年版北海道・東北病院情報. 医事日報. 2009
- 27)2010年版関東病院情報. 医事日報. 2010
- 28)2010年版中部病院情報. 医事日報. 2010
- 29)2010年版近畿病院情報. 医事日報. 2010
- 30)2010年版中国・四国病院情報. 医事日報. 2010
- 31)2011年版九州・沖縄病院情報. 医事日報. 2010
- 32)病原微生物検出情報：手足口病患者から分離・検出されたウイルス、2007~2011年. 国立感染症研究所感染症情報センター. 2012年3月1日.
<https://hasseidoko.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data37j.pdf> (2012年03月1日)
- 33) Ooi MH, Wong SC, Lewthwaite P, Cardoso MJ, Solomon T. Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. *Lancet Neurology* 9: 1097-1105, 2010
- 34)Ooi MH, Wong SC, Podin Y, et al. Human enterovirus 71 disease in Sarawak, Malaysia: A prospective clinical, virological, and molecular epidemiological study. *Clinical Infectious Diseases* 44: 646-56, 2007
- 35)Hosoya M, Kawasaki Y, Sato M, et al. Genetic diversity of enterovirus 71 associated with hand, foot and mouth disease epidemics in Japan from 1983 to 2003. *Pediatric Infectious Disease Journal* 25: 691-4, 2006
- 36)Hosoya M, Kawasaki Y, Sato M, et al. Genetic diversity of enterovirus 71 associated with hand, foot and mouth disease epidemics in Japan from 1983 to 2003. *Pediatric Infectious Disease Journal* 25: 691-4, 2006
- 37)Chan KP, Goh KT, Chong CY, Teo ES, Lau GKK, Ling AE. Epidemic hand, foot and mouth disease caused by human enterovirus 71, Singapore. *Emerging Infectious Diseases* 9: 78-85, 2003
- 38)Zeng M, Li YF, Wang XH, et al. Epidemiology of hand, foot, and mouth disease in children in Shanghai 2007-2010. *Epidemiology and Infection* 140: 1122-30, 2012
- 39)Ni H, Yi B, Yin J, et al. Epidemiological and etiological characteristics of hand, foot, and mouth disease in Ningbo, China, 2008-2011. *Journal of Clinical Virology* 54: 342-8, 2012
- 40)Yang T, Huang L, Lu C, et al. Clinical features and factors of unfavorable outcomes for non-polio enterovirus infection of the central nervous system in northern Taiwan, 1994-2003. *Journal of microbiology, immunology, and infection.* 38: 417-24, 2005
- 41)Pan J, Chen M, Zhang X, Chen Y, Liu H, Shen W. High risk factors for severe hand, foot and mouth disease: a multicenter retrospective survey in Anhui Province China, 2008-2009. *Indian J Dermatol* 57: 316-21, 2012
- 42)Ooi MH, Wong SC, Mohan A, et al. Identification and validation of clinical predictors for the risk of neurological involvement in children with hand, foot, and mouth disease in Sarawak. *Bmc Infectious Diseases* 9: 3, 2009
- 43)Tian H, Yang QZ, Liang J, Dong SY, Liu ZJ, Wang LX. Clinical Features and Management Outcomes of Severe Hand, Foot and Mouth Disease. *Medical Principles and Practice* 21: 355-9, 2012
- 44)Lin TY, Chang LY, Huang YC, Hsu KH, Chiu CH, Yang KD. Different proinflammatory reactions in fatal and non-fatal enterovirus 71 infections: implications for early recognition and therapy. *Acta Paediatrica* 91: 632-5, 2002
- 45)Baker E, Wood D, Brennan A, Clark N, Baines D, Philips B. Hyperglycaemia and pulmonary infection. *Proceedings of the Nutrition Society* 65: 227-35, 2006
- 46)Yang KD, Yang MC, Li CC, et al. Altered cellular but not humoral reactions in children with complicated enterovirus 71 infections in Taiwan. *Journal of Infectious Diseases* 183:

850-6, 2001

47)Huang CC, Liu CC, Chang YC, Chen CY, Wang ST, Yeh TF. Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection. New England Journal of Medicine 341: 936-42, 1999

48)Zhang Y, Zhu Z, Yang WZ, et al. An emerging recombinant human enterovirus 71 responsible for the 2008 outbreak of Hand Foot and Mouth Disease in Fuyang city of China. Virology Journal 7: 94, 2010

Proposed clinical case definitions for HFMD/herpangina and associated complications

*Excerpted from "A Guide to Clinical management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD) [in press],
WHO Western Pacific Region and Regional Emerging Disease Intervention Center, 2010.

(日本語訳は裏面参照)

HFMD	Febrile illness with papulovesicular rash on palms and soles, with or without vesicles/ulcers in the mouth. Rash may occasionally be maculopapular without vesicular lesion, and may also involve the buttocks, knees or elbows, particularly in younger children and infants.
Herpangina	Febrile illness with multiple oral ulcers on the posterior parts of the oral cavity
Aseptic meningitis	Febrile illness with headache, vomiting and meningism associated with presence of more than 5 – 10 white cells per cubic millimeter in cerebrospinal (CSF) fluid, and negative results on CSF bacterial culture
Brainstem encephalitis	Myoclonus, ataxia, nystagmus, oculomotor palsies, and bulbar palsy in various combinations, with or without MRI. In resource-limited setting, the diagnosis of brainstem encephalitis can be made in children with frequent myoclonic jerks and CSF pleocytosis.
Encephalitis	Impaired consciousness including lethargy, drowsiness or coma or seizures or myoclonus.
Encephalomyelitis	Acute onset of hyporeflexic flaccid muscle weakness with myoclonus, ataxia, nystagmus, oculomotor palsies, and bulbar palsy in various combinations
Acute flaccid paralysis	Acute onset of flaccid muscle weakness and lack of reflexes
Autonomic nervous system (ANS) dysregulation	Presence of cold sweating, mottled skin, tachycardia, tachypnea, and hypertension
Pulmonary oedema/haemorrhage	Respiratory distress with tachycardia, tachypnea, rales, and pink frothy secretion that develops after ANS dysregulation, together with a chest radiograph that shows bilateral pulmonary infiltrates without cardiomegaly.
Cardiorespiratory failure	Cardiopulmonary failure is defined by the presence of tachycardia, respiratory distress, pulmonary oedema, poor peripheral perfusion requiring inotropes, pulmonary congestion on chest radiography and reduced cardiac contractility on echocardiography.

手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症例の疾病定義 (WHO 提唱原文は表面参考)

手足口病	手のひらと足裏の丘疹小水疱性皮疹を伴う熱性疾患で、口腔内の水疱または潰瘍は伴う場合も伴わない場合もある。 発疹は水疱ではなく斑状丘疹を形成することもある 特に若年小児や乳児では臀部やひざ、ひじに見られることもある。
ヘルパンギーナ	口腔後部にみられる複数の潰瘍を伴う熱性疾患
無菌性髄膜炎	頭痛、嘔吐、脳脊髄液中に 5-10/mm ³ より多い白血球数増多を認める髄膜炎を伴う熱性疾患で、脳脊髄液の細菌培養は陰性
脳幹脳炎	ミオクローヌス、運動失調、眼振、眼球運動障害（麻痺）、その他延髄麻痺（球麻痺） MRI による画像診断はあってもなくてもよい *診断の手法や手段が限られている場合は、ミオクローヌスの頻発と髄液細胞増多による診断
脳炎	嗜眠・傾眠・昏睡などの意識障害、または、けいれん、またはミオクローヌス
脳脊髄炎	ミオクローヌス・運動失調・眼振・眼球運動障害（麻痺）・その他の延髄麻痺（球麻痺）を伴う、急性に発症する弛緩性の筋力低下で深部腱反射は低下
急性弛緩性麻痺	急性に発症する弛緩性の筋力低下で深部腱反射は低下
自律神経失調	冷汗、斑状皮膚、頻脈、頻呼吸、高血圧
肺水腫・肺出血	頻脈、頻呼吸、ラ音、自律神経失調症状後に排出されるピンクの泡状分泌物（喀痰）を伴う呼吸窮迫で、胸部レントゲンで心肥大のない両肺浸潤
心臓機能不全	頻脈、呼吸窮迫、肺水腫、昇圧剤を要する末梢循環低下、胸部レントゲンで肺うっ血、心エコーで心収縮能の低下

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)
研究協力者報告書 (平成 24 年度)

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
～エンテロウイルス感染症の制御に関する臨床医学的研究

研究協力者：中野貴司 (川崎医科大学 小児科)
研究協力者：福島慎二 (東京医科大学病院 渡航者医療センター)
共同研究者：濱田篤郎 (東京医科大学病院 渡航者医療センター)
共同研究者：水野泰孝 (東京医科大学病院 感染制御部)
研究代表者：清水博之 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)

研究要旨

わが国においても、平成 24 年 9 月から不活化ポリオワクチン (inactivated polio vaccine, IPV) が導入された。まずは、乳児期の定期接種が経口生ポリオワクチン (oral polio vaccine, OPV) から IPV に移行されたが、IPV の年齢対象は小児に限定されたものではない。わが国では、1975-77 年生まれの世代はポリオウイルス 1 型に対する血清中和抗体保有率が他の世代より低く、彼らがポリオ流行地に渡航するなどポリオ感染のリスクが高いことが予想される場合は、OPV の追加接種を勧奨する機会であるとされてきた。また、ポリオワクチン未接種者や接種歴が不明の者に対する対応が必要な場合も想定される。したがって今後は、成人に対しても IPV の追加接種を行う機会があると考えられ、成人での免疫原性と安全性の検討を行う分担研究を実施した。健康成人 32 名を登録し、IPV を 2 回接種した結果、過去に接種歴がある場合はほとんど全例で、IPV1 回接種後に良好な抗体価の上昇が確認された。中和抗体価は、Sabin 株と野生株標準株で大きな違いは認められなかった。3 型に対する抗体誘導は、他の型よりも少し弱い傾向があった。その理由については、IPV 接種前の抗体価が、3 型では出生世代に関係なく陰性者が目立つことが影響していると考えられた。1975-77 年生まれとその他の世代を比較するには、OPV 接種歴の確認ができた症例数が十分ではなかった。安全性については、接種後認められた有害事象は主に接種局所の疼痛であり、重篤なものはなかった。

A. 研究目的

わが国においても 2012 年 9 月から不活化ポリオワクチン (inactivated polio vaccine, IPV) が導入された。本研究では、成人に対して IPV 接種を行い、免疫原性と

安全性の検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

研究概略：

(1) 研究期間：

IPV 接種臨床研究は、東京医科大学倫理委員会承認日(2011年6月1日)から2013年5月末まで実施されるが、本分担研究では平成24年度中の研究成果について報告する。

(2) 対象：20歳以上の成人。

(3) 除外基準：被接種者が次のいずれかに該当すると認められる場合には、除外した。

- ・明らかな発熱を呈している者
- ・重篤な急性疾患にかかっていることが明らかな者
- ・本研究で用いるIPVの成分に対して過敏症を呈したことがある者
- ・上記に掲げる者のほか、予防接種を行うことが不適当な状態にある者

(4) 接種方法：IPVを4週間間隔で2回接種した。

(5) 抗体価測定：1, 2, 3型のポリオウイルスに対する血清中和抗体価を計3回測定した。採血時期は、1回目のワクチン接種前、2回目のワクチン接種前(1回目接種の4週間後に相当)、2回目接種の4週間後とした。中和抗体価は、OPVのワクチン株(Sabin1型, Sabin2型, Sabin3型)とIPV抗原として用いられている野生株標準株(Mahoney, MEF-1, Saukett)、さらにベトナムとナイジェリアで近年分離された2型ワクチン由来ポリオウイルス(vaccine-derived poliovirus; VDPV)4株(SV3128, SV3130, 11196, 11198)について測定した。

実施手順：

下記の手順で実施した。なお、IPVの輸入手続きと接種、採血については東京医科大学病院渡航者医療センターで、血清中和抗体価の測定は国立感染症研究所ウイルス第二部で行った。

- (1) IPVを手続きに従って海外から輸入。
- (2) IPVの追加接種を希望する成人を募集。
- (3) 対象者の過去の接種歴を母子手帳で確

認。

(4) IPV接種前に約5ml採血(第1回目採血)し、その後ワクチン1回目を接種。

(5) 4週間後に、IPV接種前に約5ml採血(第2回目採血)し、ワクチン2回目を接種。

(6) 2回目接種4週間後に約5ml採血(第3回目採血)。

(7) 安全性については、IPV接種後4週間の健康状態を観察し自ら記入する調査用紙を用いて、全身症状や局所症状(接種部位の変化)を調査。

(8) 1, 2, 3型の各種ポリオウイルス(OPV株、野生株、VDPV株、計10株)に対する血清中和抗体価を測定。

(9) データの解析。

使用するIPV：

Sanofi Pasteur社のImovax Polio®を、手続きに従って海外から輸入して使用した。本IPVは海外では1982年に発売され、現在は92カ国で承認を受けている。

Imovax Polio®の海外での治験における副反応調査では、全身性の副反応は稀であり、局所反応は発赤(0.7~2.4%)、疼痛(0.7~34%)、腫脹(0.4%)などが報告されている。海外市販後の調査でも、副反応は稀であると報告されている。

また、このImovax Polio®という製品は2012年9月に国内でも承認された。

IPVの輸入手続き：

ワクチンの輸入手続きについては、下記の手順を医薬品輸入取扱商社に依頼した。

- (1) 医薬品輸入取扱商社へ発注
- (2) 厚生労働省・経済産業省へ輸入承認申請書を提出
- (3) 厚生労働省へ輸入申請の書類を提出し、薬監証明書を取得
- (4) 通関
- (5) 納品

倫理面への配慮：

研究の参加は、受診者の自由意思による

ものであり、受診者は研究への参加を随時拒否または撤回することができる。また拒否・撤回によって受診者が不利な扱いを受けることはない。なお、本研究は東京医科大学倫理委員会において承認済みである。また血清中和抗体価の測定に関して、国立感染症研究所の倫理委員会においても承認済みである。

C. 研究結果

成人に対する IPV 接種に関する臨床研究プロトコールを作成し、倫理委員会での承認を経て、海外から IPV を輸入し、被験者を募集し接種を開始した。本報告書作成時点で、42 例が登録され、研究を継続中である。現在のところ、32 例の抗体価測定が完了した。

32 例の属性を示す。性別は、男性 14 例、女性 18 例であった。年齢群は、20 歳代 6 例、30 歳代 21 例、40 歳代 2 例、50 歳代 3 例であり、そのうち 1975-77 年生まれの者は 11 例であった。OPV 接種歴は、2 回接種している者が 16 例、1 回接種している者が 2 例、不明が 14 例であった。

有効性の指標として、血清中の各種ポリオウイルス計 10 株に対する中和抗体価を測定した。(表)

今回の対象者 32 例のうち 1 例のみが、IPV 接種前に 3 つの型すべてのポリオウイルスに対する抗体価が陰性であった。

IPV 初回接種前に中和抗体価 8 倍以上を保有する者は、OPV 株の Sabin1 型で 29 名 (90.6%)、Sabin2 型で 30 名 (93.8%)、Sabin3 型で 19 名 (59.4%) であった。また強毒株ポリオウイルス標準株(IPV 抗原)の Mahoney で 25 名 (78.1%)、MEF-1 で 29 名 (90.6%)、Saukett で 13 名 (40.6%) であった。2 型 VDPV 株の SV3128 では 30 名 (93.8%)、SV3130 で 29 名 (90.6%)、11196 で 29 名 (90.6%)、11198 で 29 名

(90.6%) であった。

接種後の中和抗体価については、ほとんどの被験者で IPV を 1 回接種するだけで強い抗体誘導が認められ、接種前に 3 つの型すべての抗体価が陰性であった 1 例を除いて、全例で中和抗体価は 8 倍以上に上昇した。2 回接種後は、全ての株に対して、全例が中和抗体価 8 倍以上となった。また、接種前の抗体価が陽性であった型に対してはほとんど全例で、抗体価が陰性の場合でも一部の例では、IPV 1 回接種後に 1024 倍以上という非常に高い抗体価が獲得され、強いブースター効果が認められた。

接種前に 3 つの型すべての抗体価が陰性であった 1 例では、IPV の 1 回接種では抗体価の上昇は不良で、2 回目接種後に有意な抗体上昇が確認された。

安全性に関しては、報告書作成時点での調査用紙回収 (回収率 92.2%) による副反応調査では、接種局所の症状では、疼痛 18 名 (31.6%)、発赤 5 名 (8.8%)、腫脹 5 名 (8.8%)、全身症状では、全身倦怠感 4 名 (7.0%)、頭痛 2 名 (3.5%) であった。アナフィラキシーなど重篤な副反応は認めなかった。

D. 考察

ポリオウイルス感染症を予防するためのワクチンには、経口生ポリオワクチン (oral polio vaccine, OPV) と不活化ポリオワクチン (inactivated polio vaccine, IPV) の 2 種類が存在する。まずは、乳児期の定期接種が経口生ポリオワクチン (oral polio vaccine, OPV) から IPV に移行されたが、IPV の年齢対象は小児に限定されたものではない。したがって今後は、成人に対しても IPV の接種を行う機会があると想定される。

米国では、乳児期に接種をすませた成人は、通常はポリオワクチンの追加接種は不

要とされている。しかし、感染リスクのある一部の対象（流行地への渡航者、実験室で野生株ポリオウイルスを扱う者、野生株ポリオウイルスと濃厚接触する医療従事者）についてはIPVを用いて追加接種を行うことが推奨されている。

わが国においては、国の感染症サーベイランス事業である血清疫学調査の結果より、1975-77年生まれの世代はポリオウイルス1型に対する血清中和抗体保有率が他の世代より低いことが判明している。厚生労働省からの通達（平成8年）によれば、これらの者において「ポリオ感染のリスクが高いことが予想される場合」はOPVの追加接種を勧奨する機会であるとされている。特に1975-77年生まれの者がポリオ流行地へ渡航する場合などがこれに該当し、IPVが導入された日本国内では成人に対するIPV接種が現実的となっている。また、3型ポリオウイルスに対する中和抗体保有率は、他の血清型に比べると低いことが明らかとなっている。さらには、過去の接種歴が無い者、あるいは不明な者に対するIPVの接種についても出生年にかかわらず検討しておく必要がある。

1型と2型は、もともと抗体陽性者の占める割合が高く、IPV追加免疫により、ほとんどの例で強い抗体上昇が認められた。接種歴不明者も含め、被験者の多くは、OPV接種による基礎免疫を有していることが示唆される。抗体価測定値から考察すると、1型は、Sabin 1型とMahoneyで、多少の抗原性の差異が認められたが、2型はワクチン株、野生株、VDPV株で、抗原性の差異はほとんどなかった。3型はIPV接種前の抗体価陰性者が目立ったが、OPV2回接種による抗体陽性者の割合は、一貫して、1型および2型と比較すると低い傾向が知られている。抗体陰性者も含め、IPV接種により抗体誘導が認められ、ほとんどの場合

1回の接種で良好な抗体上昇を認め、2回目の抗体上乘せ効果はそれほどではなかった。

接種前に3つの型すべての抗体価が陰性であった1例では、母子手帳が確認できずに過去の接種歴は不明であった。本例のみで1回接種後の抗体獲得が不十分であり、本例はOPVの接種歴がないことが推察された。2回目の接種後に、有意な抗体価上昇が認められた。さらに確実な免疫付与のためには、おおむね1年後の追加接種が必要と考えられる。

1975-77年生まれで接種前にSabin 1型に対する抗体価が陰性の者は3例であり、1例は接種前に3つの型すべての抗体価が陰性であったOPV歴不明の者で、他の2例は1例がOPV歴2回、1例は接種歴不明であった。OPV歴2回の者では、1回接種で抗体価は1024倍以上に上昇した。OPV歴不明の者では、1回目接種後、2回目接種後とも抗体価は64倍であった。これだけの例数で結論的なことは言えないが、過去の接種歴があれば1回接種で十分な抗体価上昇が得られる可能性は高いと考えられた。

1型に対する中和抗体価は、これまでの報告にもあるように、Sabin 1株とMahoney株で、多少の違いが認められたが、抗体価の大きな差は認められなかった。2型については、Sabin 2株と強毒株(MEF-1)、あるいは、4株のVDPV株で、中和抗体価に、ほとんど差は無く、血清中和抗体価に反映するような抗原性の違いは認められなかった。3型についても、Sabin 3株と強毒株(Saukett)のあいだには、抗原性の違いは認められなかった。少なくとも2型と3型については、Sabin 株に対する中和抗体価を測定すれば他の株に対する中和活性も同程度であることが示唆される。

安全性については、海外の報告より副反応の出現頻度が高かったが、本研究で使用したIPVが国内では未承認薬剤であったこ

ともあり、接種者、医療者ともに慎重に情報を収集した結果と考えた。重篤な副作用は観察されなかった。

E. 結論

成人に対する IPV 接種の臨床研究を策定し、有効性と安全性を検討した。現在、32名に対してプロトコールを完了した。接種後認められた有害事象は、主に接種局所の疼痛であり重篤なものは認めなかった。免疫獲得による有効性の検討については、32例で接種前後の血清を採取し抗体価を測定した。成人を対象とした本研究では、1回の IPV 接種により、おおむね良好な抗体価の上昇が確認された。ただし、過去の接種歴が無く、中和抗体を保有しない場合、1回の IPV 接種では免疫獲得は不十分な場合があるものと考えられた。

F. 研究発表

(論文発表)

(1)中野貴司：ポリオワクチン～生と不活化どちらがよいか. 小児科診療 75 (4) : 624-630, 2012.

(2) 中野貴司：序 (ミニ特集：不活化ポリオワクチン). 小児科臨床 65(11):2277-2280, 2012.

(3) 中野貴司：ポリオワクチン. 化学療法の領域 29 (2) : 219-227, 2013.

(学会発表)

(1) 中野貴司：シンポジウム 11 “わが国における感染症対策の動向と課題”「ポリオとそのワクチンの動向」. 第 82 回日本衛生学会学術総会. 京都市, 2012 年 3 月.

(2) 中野貴司：シンポジウム 3 “乳幼児期に接種するワクチンの現状と展望”「ポリオワクチン」. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会. 長崎市, 2012 年 4 月.

(3)中野貴司：シンポジウム “ポリオワクチンの臨床”「2つのポリオワクチン～生と不

活化、光と影」. 第 16 回日本ワクチン学会学術集会. 横浜市, 2012 年 11 月.

(4) 中野貴司：シンポジウム “International Symposium ; Vaccine Preventable Diseases”「先進国での不活化ポリオワクチン導入」. 第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会. 北九州市, 2012 年 11 月.

G. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

	出生年	接種履歴	①Sabin 1	②Sabin 2	③Sabin 3	④Mahoney	⑤MEF-1	⑥Saukett	⑦SV3128	⑧SV3130	⑨11196	⑩11198
1-1	1966	2	8	4	<4	4	4	<4	8	4	4	<4
1-2			>1024	>1024	16	>1024	>1024	8	>1024	>1024	>1024	>1024
1-3			>1024	>1024	16	>1024	>1024	8	>1024	>1024	>1024	>1024
2-1	1977	2	64	128	32	128	256	32	256	256	256	128
2-2			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
2-3			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
3-1	1976	2	512	256	128	64	256	64	256	128	256	128
3-2			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
3-3			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
4-1	1975	2	<4	32	<4	<4	32	<4	128	32	32	16
4-2			>1024	>1024	>1024	512	>1024	1024	>1024	>1024	>1024	>1024
4-3			>1024	>1024	>1024	512	>1024	1024	>1024	>1024	>1024	>1024
5-1	1977	2	32	16	128	16	16	32	32	16	8	16
5-2			>1024	>1024	>1024	1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
5-3			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	1024	>1024
6-1	1979	不明	512	128	<4	256	64	<4	128	128	64	128
6-2			>1024	>1024	1024	>1024	>1024	256	>1024	>1024	>1024	>1024
6-3			1024	>1024	512	>1024	>1024	128	>1024	>1024	>1024	>1024
7-1	1974	不明	128	>1024	1024	64	512	128	512	512	512	512
7-2			>1024	>1024	>1024	1024	>1024	>1024	>1024	512	512	1024
7-3			>1024	>1024	>1024	512	>1024	>1024	>1024	1024	>1024	512
8-1	1975	1	128	128	<4	8	64	<4	64	64	64	64
8-2			>1024	>1024	64	>1024	>1024	64	>1024	>1024	>1024	>1024
8-3			>1024	>1024	128	>1024	>1024	256	>1024	>1024	>1024	>1024
9-1	1975	不明	32	128	8	16	64	8	128	128	64	32
9-2			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
9-3			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
10-1	1978	2	8	64	<4	8	32	<4	64	32	64	16
10-2			>1024	>1024	64	>1024	>1024	256	>1024	>1024	>1024	>1024
10-3			>1024	>1024	64	>1024	>1024	128	>1024	>1024	>1024	>1024
11-1	1976	不明	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4
11-2			<4	32	<4	4	64	<4	32	32	32	32
11-3			16	32	128	128	128	64	64	32	32	32
12-1	1979	1	8	8	8	4	4	4	4	4	4	<4
12-2			>1024	512	>1024	1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	512
12-3			>1024	512	>1024	1024	>1024	>1024	>1024	>1024	1024	512
13-1	1991	2	128	32	16	32	64	4	32	32	16	16
13-2			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
13-3			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
14-1	1955	不明	64	32	32	16	64	32	32	32	32	16
14-2			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
14-3			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	1024
15-1	1975	2	256	16	16	16	16	4	32	32	16	16
15-2			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
15-3			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
16-1	1963	不明	64	64	32	32	64	8	128	64	64	64
16-2			>1024	>1024	>1024	512	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
16-3			>1024	>1024	>1024	512	1024	1024	>1024	>1024	>1024	>1024
17-1	1985	2	>1024	32	<4	64	32	<4	64	32	16	16
17-2			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
17-3			>1024	>1024	1024	>1024	>1024	1024	>1024	>1024	>1024	>1024
18-1	1982	不明	32	64	<4	8	64	4	64	64	64	16
18-2			>1024	>1024	256	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
18-3			>1024	1024	256	>1024	512	>1024	>1024	>1024	>1024	1024
19-1	1983	不明	256	64	32	32	64	8	64	32	128	64
19-2			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
19-3			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
20-1	1980	2	256	32	<4	16	16	<4	32	16	32	8
20-2			1024	>1024	64	256	>1024	64	>1024	>1024	>1024	>1024
20-3			>1024	>1024	64	512	>1024	128	>1024	1024	>1024	1024
21-1	1980	2	32	32	<4	8	32	<4	32	16	16	8
21-2			>1024	>1024	512	>1024	>1024	256	>1024	>1024	>1024	>1024
21-3			>1024	>1024	256	>1024	>1024	128	>1024	>1024	>1024	>1024

22-1	1972	不明	128	128	<4	64	64	<4	128	64	64	128
22-2			>1024	>1024	512	>1024	>1024	128	>1024	>1024	>1024	>1024
22-3			>1024	>1024	256	>1024	>1024	32	>1024	>1024	>1024	>1024
23-1	1972	不明	32	64	<4	32	128	<4	128	64	64	32
23-2			>1024	>1024	32	>1024	>1024	32	>1024	>1024	>1024	>1024
23-3			>1024	>1024	16	>1024	>1024	32	>1024	1024	>1024	>1024
24-1	1976	2	32	256	64	8	128	32	256	256	256	256
24-2			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
24-3			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
25-1	1976	2	32	32	32	8	32	16	32	32	16	16
25-2			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
25-3			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
26-1	1973	不明	8	32	<4	4	32	<4	32	32	64	16
26-2			>1024	>1024	128	>1024	>1024	32	>1024	>1024	>1024	>1024
26-3			512	>1024	64	512	>1024	32	>1024	>1024	>1024	>1024
27-1	1979	2	128	32	32	32	32	32	32	16	32	8
27-2			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
27-3			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
28-1	1983	2	64	64	[16]	4	128	<4	64	64	128	64
28-2			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
28-3			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
29-1	1983	2	128	32	8	16	64	4	64	64	64	32
29-2			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
29-3			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	512	>1024	>1024	>1024	>1024
30-1	1976	不明	<4	32	16	<4	64	4	64	32	32	32
30-2			64	>1024	>1024	64	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
30-3			64	>1024	>1024	64	>1024	1024	>1024	>1024	>1024	>1024
31-1	1955	不明	64	16	32	128	32	32	16	16	32	16
31-2			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
31-3			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
32-1	1956	不明	256	64	32	256	128	16	64	64	128	64
32-2			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	1024	>1024	>1024	>1024
32-3			>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	1024	>1024	>1024

	8倍以上の割合									
	①Sabin 1	②Sabin 2	③Sabin 3	④Mahoney	⑤MEF-1	⑥Saukett	⑦SV3128	⑧SV3130	⑨11196	⑩11198
前	29/32	30/32	19/32	25/32	29/32	13/32	30/32	29/32	29/32	29/32
1回接種後	31/32	32/32	31/32	31/32	32/32	31/32	32/32	32/32	32/32	32/32
2回接種後	32/32	32/32	32/32	32/32	32/32	32/32	32/32	32/32	32/32	32/32

平成 23 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

2011 年小児無菌性髄膜炎患者髄液から分離されたエコー6 型の分子疫学的解析

研究協力者 町田早苗 埼玉医科大学 医学部 医学研究センター

主任研究者 清水博之 国立感染症研究所 ウイルス二部

研究要旨

我々は 2008 年から無菌性髄膜炎を疑う小児患者の髄液、咽頭拭い液、便から CODEHOP PCR 法によりエンテロウイルスの解析を継続的に施行しているが、2011 年 8 月と 9 月の患者髄液 2 検体からエコー6 型を分離した。その分離株の 5'NTR~3D 領域 (6670bp) の塩基配列について解析し、データベース上で検索したところ同時期に北海道で分離されたエコーウイルス 6 型と近縁であることが判明した。

A. 研究目的

B 群および A 群エンテロウイルス起因の無菌性髄膜炎は、地域によっても流行型に差がみられることが多い。エコー6 型ウイルスは無菌性髄膜炎の起因ウイルスとして本邦で毎年報告されているが、2011 年埼玉、東京で報告数が多く、我々の検討施設でも 6 月~10 月の無菌性髄膜炎患者のサンプルから CODEHOP 法で解析すると 90% の検出率であった。CODEHOP 陽性の髄液から分離されたエコー6 型の塩基配列解析同定を行い、データベース上の解析を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. エコー6 型分離

CODEHOP 法でエンテロウイルスバンドを検出し VP1 領域でエコー6 型と判明した髄液 5 検体を Vero 細胞、RD-A 細胞、HEp-2 細胞を用いてウイルス分離を試みた。

2 検体から RD-A 細胞に細胞変性効果 (CPE) を示し、その細胞上清を用いて CODEHOP PCR 法を施行しエコー6 型と決定したウイルスについて今回解析した。

2. 5'UTR 領域~3D 領域までの塩基配列の解析

山下らの論文 (J.Gen. Virol,2010) を参考に primer を設定し、塩基配列をダイレクトシーケンシングにて同定し、Blast 検索を行い、データベースに報告された塩基配列との系統樹解析を行った。

(倫理面の配慮)

本研究を遂行するのに当たり埼玉医科大学病院 IRB で継続承認を受けた (承認 No.08-011)。臨床材料採取については「疫学研究における倫理指針」に基づき、材料提供者及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。検体提供に関しては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

分離エコー6型ウイルス R9 および R10 について VP1 領域 867bp の塩基配列を系統樹解析すると 2011 年北海道で分離されたウイルスに近縁であることが判明した (図 1)。

R9 および R10 の 5'UTR~3D 領域 6670bp をデータベース上に報告された塩基配列と系統樹解析すると VP1 と同様 2011 年北海道で分離されたウイルスに近縁であった (図 2)。

D. 考察

病原体検出情報によると 2011 年 1 月 1 日~12 月 28 日までに無菌性髄膜炎起因エコーウイルス 6 型は本邦で 112 例あり、東京、埼玉では 11 例以上の報告があった。次いで青森、新潟、大阪では 6 例~10 例、北海道、神奈川、千葉、群馬、茨城、兵庫、奈良、高知で 2 例~5 例、福島、岐阜、愛知、宮崎、沖縄で 1 例の報告であった。埼玉で髄液から分離されたエコー6型の VP1 領域を解析すると北海道で検出されたエコー6型と近縁であったことが判明し、5'UTR~3D 領域 6670bp でも同様の結果となった。三好らの報告 (Arch Virol, 2012 年) によると系統樹解析で我々の分離株と近縁となった北海道のエコーウイルス 6 型は、8 月後半に提出された便と髄液から分

離された株であり、昨年我々が CODEHOP 法での解析で報告した結果と同様に 2010 年中国で同定された株と近縁であると報告している。我々の解析でも北海道での分離株とは最も近縁であるが、その由来は中国で 2010 年同定されたものと推定された。

病原体検出情報によるとエコーウイルスの各型は毎年検出される型と数年~数十年の間隔を空けて流行する型がある。エコー6型は毎年報告されている型であるが我々の解析施設では 2008 年からエンテロウイルス検出を行っているが 2011 年のみ検出されており 2012 年も検出されていない。このことから同地域での流行は継続しない可能性があることが示唆された。

E. 結論

2011 年無菌性髄膜炎患者髄液から分離されたエコーウイルス 6 型は北海道で髄液と便から分離されたエコーウイルス 6 型と近縁であった。

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、清水博之：小児無菌性髄膜炎患者から検出されたエンテロウイルスの分子疫学的解析、第 60 回日本ウイルス学会 学術集会、2012 年 11 月、大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

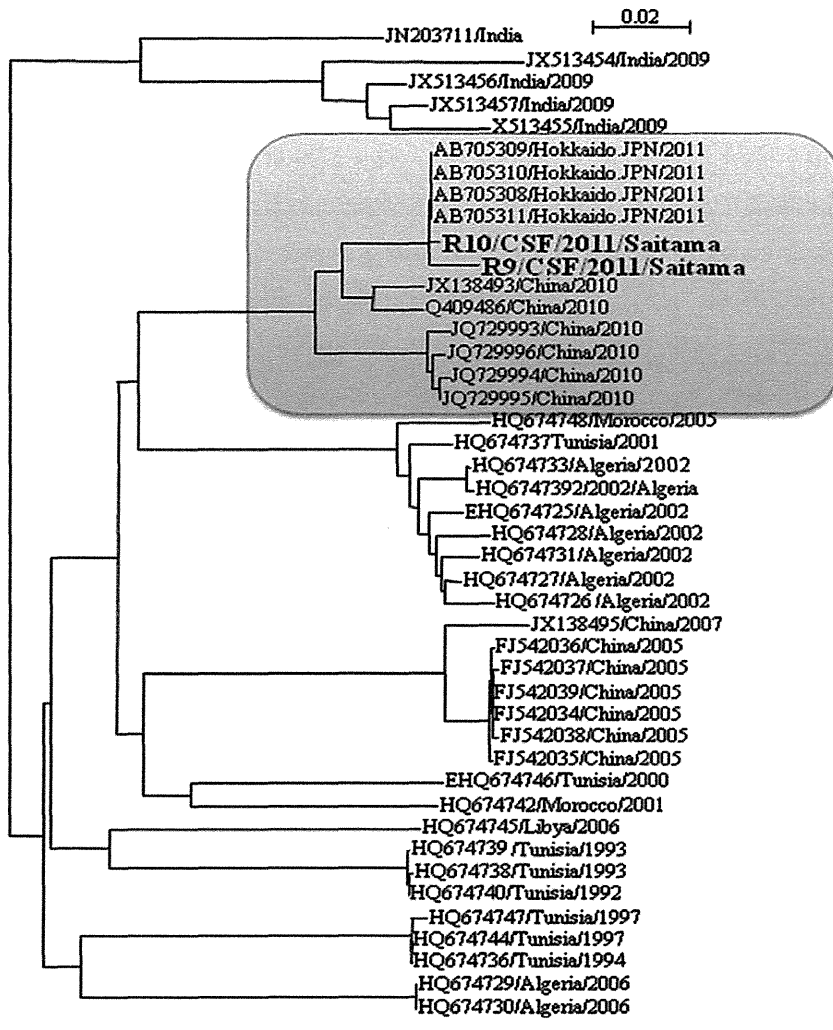


図1 エコーウイルス6型 R9,R10 VP1 領域での系統樹解析

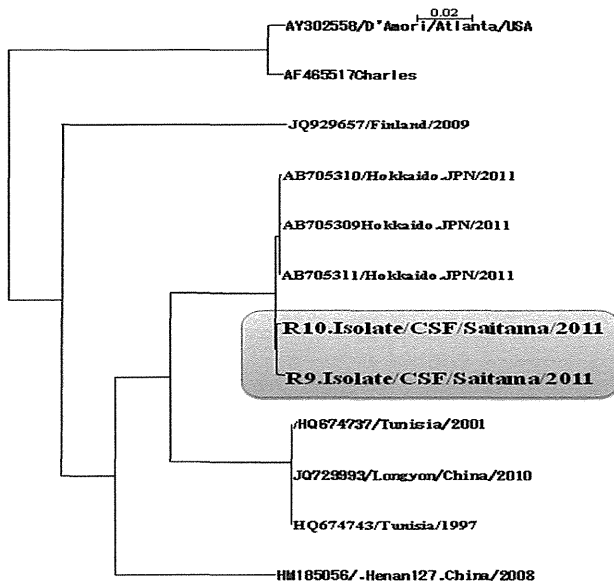


図2 エコーウイルス6型 R9,R10 5'UTR~3D 領域 (6670bp) の系統樹解析

Saffold ウイルスの神経・膵臓に対する病原性の解析と持続感染機序の解明

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

ヒトカルジオウイルス (Saffold ウイルス, SAFV) は、上気道炎や胃腸炎等からの検出に加え、無菌性髄膜炎および脳炎からの検出も報告されているが、依然そのヒトに対する病原性の詳細は明らかではない。一方、SAFV をマウス腹腔内に接種した場合、ウイルス抗原は、膵臓、脳、心臓において検出される。このことから、SAFV の病原性として、マウスカルジオウイルス (タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス: TMEV および 脳心筋炎ウイルス: EMCV) の場合と同様、I 型糖尿病 (T1D)、脳脊髄炎、心筋炎との関係が疑われている。

本研究では、SAFV の神経および膵臓に対する病原性に注目し、神経疾患患者の末梢血単核球を対象にしたウイルス遺伝子の検出、および、T1D 診断剖検例のパラフィン包埋膵臓組織切片を用いたウイルス抗原の検出を行った。その結果、それぞれ SAFV の遺伝子・抗原が検出され、さらにウイルス持続感染の可能性が示された。この結果を踏まえて、SAFV 持続感染細胞の樹立を試み、SAFV の持続感染は感染受容体発現密度に依存した維持型持続感染であることを明らかにした。以上の結果より、SAFV は急性感染により、上気道炎、胃腸炎、または不顕性感染を起こすが、その一部は持続感染へと移行し、神経および膵臓に対して病原性を発揮する可能性が示唆された。

A. 研究目的

Saffold ウイルス (SAFV) は、2007 年に原因不明の発熱患者の便から初めて分離されて以降、主に上気道炎や胃腸炎から検出され、一部、無菌性髄膜炎および脳炎からも検出されている。また、抗体保有率の調査からは、そのほとんどが不顕性感染であることも示唆され、SAFV のヒトに対する病原性の詳細は依然不明である。2010 年、ベルギーの Michiels らのグループは、SAFV をマウス腹腔内に接種するとウイルス抗原は、膵臓、中枢神経、心臓において検出さ

れることを報告した。これにより、エンテロウイルスやマウスカルジオウイルス (タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス: TMEV および 脳心筋炎ウイルス: EMCV) と同様、SAFV は、膵臓、中枢神経、心臓に対して病原性を発揮する疑いが強く持たれるようになった。

そこで本研究では、SAFV の神経および膵臓に対する病原性を明らかにすることを目的とし、神経疾患および I 型糖尿病 (T1D) を対象として疫学的に調査するとともに、ウイルスの持続感染について解析した。

B. 研究方法

1. SAFV の神経に対する病原性の解析

多発性硬化症 (MS) 23 例および視神経脊髄炎 (NMO) 7 例の末梢血を材料として、血清および単核球から全 RNA を抽出し、RT-PCR により SAFV 感染の有無を解析した。対照として、健常者末梢血 5 例を用いた。さらに、SAFV 陽性例については、1 年後に再度同様にウイルスゲノムの検出を行い、持続感染の可能性を検討した。

(倫理面への配慮)

対象となる血液検体は、検体提供施設である東北大学の規定に従いインフォームド・コンセントを行った上で採取した。また、被験者への説明および同意の署名は、当該施設に一任した。実験の実施にあたっては、検体提供施設において連結可能匿名化を行った上で、検体のみの提供を受けた。連結可能匿名化の対応表は、検体提供施設において管理され、解析後、氏名等を除く診断名等の情報提供を受け、疾患とウイルス感染の関連を解析した。この間、被験者を特定できる氏名等の情報は一切提供を受けてない。

2. SAFV の膵臓に対する病原性の解析

T1D と診断された剖検例 (1 例) のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 膵臓組織切片をウサギ抗 SAFV-3 抗血清 (高知県衛生研究所 細見卓司 先生より分与) を用いて免疫染色し、ウイルス抗原の検出を試みた。対照として、糖尿病と診断されていない剖検例の FFPE 膵臓組織切片を用いた。さらに、同検体 FFPE より全 RNA を抽出し、RT-PCR によりウイルス遺伝子の検出を試みた。

(倫理面への配慮)

金沢医科大学臨床病理学において連結可能匿名化を行った上で、検体のみの提供を受けた。連結可能匿名化の対応表は、検体提供施設において管理され、解析後、氏名等を除く診断名等の情報提供を受け、疾患とウイルス感染の関連を解析した。この間、被験者を特定できる氏名等の情報は一切提供を受けていない。また、既存の資料のみを用いた研究であるため、当該倫理指針に則り必ずしもインフォームド・コンセントを必要としない。

3. SAFV の持続感染機序の解明

子ウシ血清 (CS) で維持培養された SAFV 低感受性の HeLa 細胞 (理研より購入、HeLa-R) を用いて、SAFV 持続感染 HeLa-R を作出した。この SAFV 持続感染 HeLa-R に、抗 IFN 抗体を添加することで、SAFV 持続感染が IFN 依存性維持型持続感染であるか否かを解析した。また、ウシ胎児血清 (FCS) で維持培養された持続感染の成立しない SAFV 高感受性 HeLa 細胞 (金沢医科大学生化学 西川克三先生より分与、HeLa-N) と HeLa-R および FCS で 2 週間以上維持培養した HeLa-R を用いて、virus binding assay を行い、感染受容体発現密度を比較した。さらに、SAFV 感染性 RNA を HeLa-N および HeLa-R にトランスフェクトし、産生されるウイルス量をプラークアッセイにより定量比較することで、感染受容体発現密度の違いが両細胞における SAFV 感受性および SAFV 持続感染成立の相違の原因であるか否かを解析した。

C. 研究結果

1. SAFV の神経に対する病原性の解析

MS 23 例、NMO 7 例および健常者 5 例を対象とした RT-PCR において、MS 1 例の単核球から SAFV 遺伝子の 5' UTR 領域が検出された。しかし、VP1 領域は検出されなかった。また、血清からは、ウイルス遺伝子は検出されなかった。この単核球からのウイルス遺伝子検出が、季節性の急性不顕性感染、もしくは慢性の持続感染のどちらを示唆しているのかを明らかにする目的で、1 年後に同一患者の末梢血単核球を再調査したところ、前回同様、単核球のみから SAFV の 5' UTR 領域が検出された。1 回目および 2 回目に検出された 5' UTR 領域の配列は 97% 一致しており、さらに SAFV-3 と 97% の相同性を示した。しかし、再び VP1 領域は検出されず、正確なジェノタイプの決定には至らなかった。

2. SAFV の膵臓に対する病原性の解析

T1D 剖検例の FFPE 膵臓組織切片において、抗 SAFV-3 抗体反応性細胞が検出された。抗 SAFV-3 抗体反応性細胞は、リンパ節に最も多くみられ、また、浸潤した組織球様の形態を示す抗 SAFV-3 抗体反応性細胞が膵頭部、膵体部、膵尾部のすべてにおいて認められた。この抗 SAFV-3 抗体反応性細胞の分布は、CD68 陽性細胞の分布と大部分が一致していた。さらに、萎縮したランゲルハンス氏島の細胞も抗 SAFV-3 抗体により染色された。

また、T1D 剖検例における SAFV の存在をさらに確認するために、この FFPE 膵臓組織切片を用いて、RT-PCR によりウイルス遺伝子の検出を試みた。しかし、ウイル

ス遺伝子のみならず、陽性対照とした β アクチンすらも検出することができなかった。

3. SAFV の持続感染機序の解明

SAFV 低感受性 HeLa 細胞に SAFV を感染させ、CS 添加 DMEM 培地を用いて培養を継続することにより、SAFV 持続感染細胞が作出された。一方、SAFV 高感受性 HeLa 細胞を用いた場合は、SAFV の溶解感染が激しく現れ、持続感染細胞を分離することはできなかった。

TMEV の持続感染は、抗 IFN 抗体の添加で持続感染が破綻する IFN 依存性維持型持続感染である。そこで、SAFV 持続感染 HeLa-R 細胞に抗 IFN 抗体を添加し解析したところ、SAFV の持続感染は TMEV 持続感染とは異なり、抗 IFN 抗体の影響を受けず、そのまま維持されることが観察された。次に、SAFV 感受性が異なる HeLa-N と HeLa-R の培養条件の差異のひとつである血清の違いに注目し、SAFV 持続感染 HeLa-R 細胞を FCS 添加 DMEM 培地で 2 週間維持培養したところ、溶解感染が強く現れ始め、持続感染は破綻した。なお、CS 中に SAFV に対する抗体および阻害物質は含まれていないことが、ウイルス中和試験で確認された。以上の結果は、SAFV 持続感染が、FCS を用いた培養により誘導される宿主因子の発現変化に依存していることを示唆している。

コクサッキーウイルスの場合、感染受容体発現密度の変化が、持続感染に関与していることが知られている。そこで次に、未知の SAFV 感染受容体の発現密度を解析するために、virus binding assay を行った。その結果、持続感染が成立する HeLa-R と比較して、持続感染の成立しない HeLa-N およ

び FCS で維持培養した HeLa-R におけるウイルス結合量は著しく多く、感染受容体の発現密度が顕著に高いことが示された。さらに、感染後のウイルス複製のステップに対する両細胞の影響を確かめるために、SAFV 感染性 RNA を HeLa-R および HeLa-N にトランスフェクトし産生ウイルス量を比較したところ、両細胞から産生されるウイルス量に有意な差はみられなかった。以上の結果より、HeLa-R および HeLa-N における SAFV の感染様式の違いは、感染受容体の発現密度に依存していることが示された。

D. 考 察

MS 23 例および NMO 7 例の末梢血を対象とした RT-PCR において、MS 1 例の単核球から SAFV 遺伝子が検出されたが、血清からウイルス遺伝子は検出されず、ウイルス血症は確認されなかった。1 年後においても同様に単核球からのみ SAFV 遺伝子が検出され、それらの配列は 97% と高い一致を示した。以上より、SAFV は単核球に持続感染している可能性が強く示唆された。また、ウイルス血症が認められなかったことから、SAFV は検出限界以下のレベルで子ウイルスを産生しているか、もしくは、cell-to-cell 感染で細胞外に出ることなく維持されている可能性が示唆された。ただし、これらの結果は、SAFV の持続感染を示唆しているものの、検体採取時期がいずれも SAFV 感染流行期と考えられる 9~11 月に一致しているため、二期連続の季節性感染の可能性を完全には否定できない。また、MS からの SAFV 検出例は、SAFV の神経病原性を疑わせるものであるが、末梢血を対象とした検出であり、ウイルス血症も認

められないことから、SAFV 感染と神経疾患の因果関係は依然不明である。本件については、引き続き、更なる大規模かつ詳細な解析が必要である。

T1D 剖検例の FFPE 膵臓組織切片における抗 SAFV-3 抗体反応性細胞の検出、特にランゲルハンス氏島におけるウイルス抗原の検出は、膵臓における直接的な SAFV 感染の証拠として非常に興味深い。SAFV 感染と T1D の関係をより明らかにするために、II 型糖尿病を含め、症例数を増やした更なる解析が必要である。また、本剖検例は、19 歳時に T1D と診断され、44 歳で亡くなっていることから、本剖検例におけるウイルス抗原検出も、SAFV の持続感染を疑わせる結果である。さらに、抗 SAFV-3 抗体反応性細胞の大部分が局所リンパ節にみられ、かつ、その大部分が CD68 陽性細胞の分布と一致することも、前述の末梢血を対象とした RT-PCR 解析の結果と一致している。これらの結果は、TMEV がマクロファージに持続感染するのと同様に、SAFV もマクロファージに持続感染する可能性を強く示唆しており、非常に興味深い。

HeLa 細胞を用いた *in vitro* における持続感染細胞の作出は、SAFV の持続感染能を証明しており、疫学的解析から示唆された *in vivo* における SAFV 持続感染の可能性を強く支持する結果である。さらに、異なる培養条件に依存した感染受容体発現密度の発現変化により、持続感染成立が可逆的に規定されることの証明は、多くの場合が不顕性感染で経過し、その一部が何らかの症状を呈するという、これまでの疫学調査からの推察を支持するものであると考えられる。

以上すべての結果を踏まえると、SAFV は、急性感染により上気道炎、胃腸炎、または不顕性感染を起こすが、その一部は、マクロファージに持続感染し、神経および膵臓に対して病原性を発揮する可能性が考えられる。

E. 結論

本研究より、SAFV はマクロファージに持続感染し、全身に伝播される可能性が示唆された。特に SAFV は、膵臓のランゲルハンス氏島の細胞に対しても親和性を示し、T1D に関与している可能性が示された。また、SAFV の持続感染は、感染受容体の発現密度に依存して起こることが証明された。

今後、T1D あるいは神経疾患と SAFV 感染の関係が証明されれば、今回の結果は、採取した血液（単核球）における SAFV または SAFV 感染受容体の検出・定量により、各疾患の発症リスクの予測を可能にし、さらには、新薬・治療法開発の糸口に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, Hosomi T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Saffold virus type 3 (SAFV-3) persists in HeLa cells. PLoS ONE, 2012 (in press).

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

2. 学会発表

Himeda T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Reverse genetics of Saffold virus. 17th Europic 2012, サン・ラファエル, 2012年6月

Himeda T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Persistens infection of SAFV-3 *in vitro*, エンテロウイルス 71 国際シンポジウム、東京、2012年8月

大原義朗、姫田敏樹、村木 靖、大桑孝子、西山修平、高橋利幸、藤盛寿一、三須建郎、中島一郎、藤原一男、糸山泰人、青木正志、中村龍文：末梢血を対象とした MS における Saffold ウイルス感染の解析、第 53 回日本神経学会、東京、2012年5月

清水 愛、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 (Saffold ウイルス) Leader 蛋白の機能解析、金沢医科大学医学会総会、金沢、2012年7月

姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖、大原義朗：カルジオウイルスの持続感染と IFN 応答、第 24 回日本神経免疫学会、軽井沢、2012年9月

大原義朗、姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖、西山修平、高橋利幸、藤盛寿一、三須建郎、中島一郎、藤原一男、糸山泰人、青木正志、石崎義人、原 寿郎、中村龍文：Saffold virus 感染と神経疾患の関係、第 17 回日本神経感染症学会、京都、2012年10月

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の *in vitro* における持続感染、第 49 回細菌学会中部支部総会、金沢、2012年10月

大原義朗：新しいピコルナウイルス感染症

ーヒトカルジオウイルスを中心にー

第 44 回日本小児感染症学会、北九州、

2012 年 11 月

姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖、大原義朗：

*In vitro*における Saffold ウイルスの持続

感染、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、

2012 年 11 月

大原義朗、姫田敏樹：Saffold ウイルス持続

感染機序の解析と自然感染における標的

ヒト臓器の検討、平成 24 年度エンテロウ

イルス班会議、東京、2012 年 12 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