

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。今年度は、髄膜炎の原因として知られている主なピコルナウイルスの参照標本を作製し、免疫組織化学法による各種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における SAFV3 および各種エンテロウイルス抗原を検出するシステムを確立した。パラフィン切片を用いた場合に、これらの抗体を用いて、SAFV とその他のエンテロウイルスの鑑別診断は可能である。

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。発見以降、欧州、アジア、北米、南米から感染例の報告が相次いでいる。これまでに、急性下痢症あるいは胃腸炎患者の便、急性上気道炎患者の咽頭拭い液、髄膜脳炎発症患者の髄液からウイルスゲノムが検出されているが、一般に、ウイルス分離は困難である。血清疫学調査によって、二歳以上で90%以上がSAFV2型あるいは3型に対する血清中和抗体を保有しており、幼児期にほとんどの者が感染していると考えられている。しかしながら、病原性、臨床症状、疫学はまだ不明な点が多い。

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。今年度は、髄膜炎の原因として知られている主なピコルナウイルスの参照標本を作製し、免疫組織化学法による各種抗体の交差反応性を確認し、パラフィン切片を用いたウイルス鑑別診断の可能性について検討した。

B. 研究方法

1. 免疫組織化学染色

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）、抗エンテロウイルス71 (EV71) 抗体、抗ポリオウイルス (PV) 抗体、抗コクサッキーウイルスB3 (CVB3-VP1) 抗体、抗エンテロウイルス2C抗体を一次抗体として、ヒストファイン（ニチレイ）のマウス組織シンプルステインマウス

MAX-PO (ウサギ一次抗体用) を用いて免疫組織化学法によるウイルス抗原の検出を行った。

2. 参照標本の作製

生後1日以内のddY新生仔マウスの脳内に次のウイルス液を10マイクロリットル接種した。カルジオウイルス (SAFV), ヒトエンテロウイルスA型 (CVA3, CVA4, CVA6, CVA10, CVA16, EV71), ヒトエンテロウイルスB型 (CVA9, CVB1, CVB2, CVB3, CVB4, CVB5)。

接種3, 7日目に動物を過麻酔により安楽殺し、心臓からの10%ホルマリン緩衝液の還流固定を行った。引き続き、浸漬固定を行ったが、翌日に脳を矢状断に分割し、さらに浸漬固定を進め、1週間後に常法に従いパラフィン包埋切片を作製した。免疫組織化学法にはこれらのパラフィン切片を用いた。

C. 研究結果

各種抗体の交差反応性について表 1 にまとめた。抗 SAFV 抗体は特異性を示し、エンテロウイルス A 型、B 型に交差反応性は示さなかった。抗 EV71 抗体はエンテロウイルス A 型、B 型に交差反応性を示した。抗 PV 抗体はいずれのウイルスにも交差反応性を示さなかった。抗 CVB3 抗体はエンテロウイルス A, B 型に交差反応性を示した。抗 EV-2C 抗体は SAFV 以外のエンテロウイルス抗原を検出することが可能であった。

次に、新生仔マウス脳内接種法による参照標本における各種ウイルス抗原の検出結果について表 2 にまとめた。いずれの標本も抗

原賦活化方法は pH 6 抗原賦活化剤(ニチレイ)121°C10 分オートクレーブ処理が適切であった。脳内接種 3 日あるいは 7 日目のマウス脳組織あるいは骨格筋にウイルス抗原陽性細胞が存在した (表 2)。

D. 考察

前年度の報告書で報告したことと同様に、マウス組織ホルマリン固定後パラフィン包埋標本を用いても、高度免疫ウサギ血清は非特異反応が壊死細胞や皮膚等に出やすいため、特異反応の評価には適切な判断が必要である。ヒト組織標本を用いる場合にはサル組織のアセトン乾燥パウダーによる吸収あるいは抗体の IgG 精製等の工夫が必要である。なお、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 (前年度報告書)。各種エンテロウイルス A 型、B 型抗体は特異性に欠けるものの、エンテロウイルス感染症における病理学的診断には有用であることがわかった。これらの抗体は、原因不明の心筋炎・脳炎患者組織標本の病原体検索に有用である。

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 および各種エンテロウイルス抗原を検出するシステムを確立した。パラフィン切片を用いた場合に、SAFV とその他のエンテロウイルスの鑑別診断は可能である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kotani O, Shirato K, Nagata N, Ikeda H, Takahashi K, Taguchi F.

Neuropathogenesis of a mouse-adapted porcine epidemic diarrhea virus infection in suckling mice. J Gen Virol. 2012 in press

2. 学会発表

1. Nagata N. : Pathological study of enterovirus 71 in animal models。第 16 回日本神経ウイルス研究会シンポジウム Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia - Pacific Region (東京) 2012 年 8 月

2. 小谷 治、鈴木 忠樹、Naeem Asif、岩田 奈織子、中島 典子、片野 晴隆、田口 文広、長谷川 秀樹、清水 博之、永田 典代：新生仔マウスにおける新規ヒトカルジオウイルス

(Saffold virus) の神経病原性の解析。第 60 回日本ウイルス学会 (大阪) 2012 年 11 月

3. 藤井 健、永田 典代、山吉 誠也、島貫 碧、設楽 浩志、多屋 長治、小池 智：E V 7 1 感受性マウスモデルの作出と解析。第 60 回日本ウイルス学会 (大阪) 2012 年 11 月

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし。

表 1 各種抗体の交差反応性

ウイルス	SAFV	EV71	CVA3, CVA4, CVA6, CVA10	CVA16	PV	CVA9 CVB1 CVB2 CVB3 CVB4 CVB5
抗 SAFV	+	-	-	-	NE	-
抗 EV71 1095	-	+	+	+	NE	+
抗 PV	NE	-	-	-	+	-
抗 CVB3 (VP1)	NE	-	+	-	-	+
抗 EV-2C	-	+	+	+	+	+

表 2 ddY 新生仔マウス脳内接種法による参照標本の作製

分類	接種ウイルス	株名	ウイルス抗原局在
カルジオウイルス	SAFV	JPN08-404	小脳、脳室周辺
ヒトエンテロウイルス	CVA3	Olson	骨格筋
A 型	CVA4	島根分離株	骨格筋
	CVA6	Gdula	骨格筋
	CVA10	Kowalik	口腔粘膜、骨格筋
	CVA16	G10	骨格筋
	EV71	SK006	脊髄、骨格筋
ヒトエンテロウイルス	CVA9	CV13-827	骨格筋
B 型	CVB1	Tucson	大脳皮質、海馬、脳室 周囲
	CVB2	Ohaio-1	大脳皮質、海馬
	CVB3	Nancy	海馬
	CVB4	JVB	大脳皮質、海馬
	CVB5	Faulkner	大脳皮質、海馬、救急

厚生労働科学研究費補助金
平成 24 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

エンテロウイルス71(EV71)の新規迅速診断系を開発した。

A. 研究方法

手足口病もしくはヘルパンギーナ患者の臨床検体（咽頭拭い液）から EV71 を同定するための Transcription-Reverse transcription Concerted Reaction (TRCR) 法を開発した。

B. 研究結果

- 1) 手足口病もしくはヘルパンギーナ患者の咽頭拭い液から抽出したRNAには、およそ 10^5 コピーのウイルスゲノムが含まれていることを明らかにした（中央値 $10^{5.5}$ コピー，最小値 $10^{3.7}$ コピー，最大値 $10^{7.7}$ コピー）。
- 2) 10^3 コピー以下の検出限界でEV71の既知の全てのジェノタイプの代表株を検出できる新規TRCR法を開発した。
- 3) 新規TRCR法を用いて、手足口病もしくはヘルパンギーナ患者の咽頭拭い液から抽出したRNAから、EV71を特異的に検出することができることを示した（sensitivityおよびspecificityともに100%，58検体）。

C. 考察

- 1) EV71 感染手足口病患者では、入院後 12 時間以内に死に至る重篤な症例が多く報告されている。手足口病の流行は規模が大きいため、EV71 以外の弱神経毒性の手足口病原ウイルス（CA10, 16 等）による感染患者と EV71 感染患者を迅速に区別できる本診断系は、EV71 感染患者のトリアージに有効であると期待される。

D. 健康危機情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakajima N, Kitamori Y, Ohnaka S, Mitoma Y, Mizuta K, Wakita T, Shimizu H, and Arita M. 2012. Development of a Transcription-Reverse Transcription Concerted Reaction Method for Specific Detection of Human Enterovirus 71 from Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **50**: 1764-1768

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 24 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

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(AiV)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。我々はこれ迄に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 III β (PI4KB)を同定し、ウイルスゲノム複製部位にウイルスタンパク質/ACBD3/PI4KB 複合体が形成され、PI4KB のキナーゼ産物である phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P)が産生されることがウイルスゲノム複製に重要な役割を果たしていることを明らかにした。今年度は、AiV 複製複合体形成における PI4KB のキナーゼ活性の必要性を検証した。その結果、PI4KB 活性が複製複合体形成に重要な働きをしていることが示唆された。

A. 研究目的

アイチウイルス(AiV)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、AiV 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。我々はこれ迄に、本ウイルスゲノム複製部位にウイルスタンパク質/ACBD3/PI4KB 複合体が形成され、PI4KB のキナーゼ産物である PI4P が産生されることがウイルスゲノム複製に重要な役割を果たしていることを明らかにした。今年度は、AiV 複製複合体形成における PI4KB のキナーゼ活性の必要性を検証した。

B. 研究方法

CMV プロモーター制御下で AiV ポリプロテインを発現するプラスミドを構築し、Vero 細胞へトランスフェクトした後、AiV タンパク質、ACBD3、PI4KB、PI4P の細胞内局在を観察し、レプリコン RNA 導入細胞における場合と比較した。続いて、PI4KB のキナーゼ活性を特異的に阻害する薬剤 T00127-HEV1 で処理した細胞で同様の観察を行なった。また、レプリコン RNA 導入 Vero 細胞から PI4P を抽出した後、市販の PI4P Mass Strip Kit を用いて PI4P を検出し、mock 細胞との比較を行った。

C. 研究結果

AiV タンパク質を一過性に発現させた細胞内では、レプリコン RNA 導入細胞と同様に ACBD3、PI4KB、PI4P の特徴的な斑点様構造が観察され、それぞれウイルスタンパク質 2B、2C、3A との共局在が認められた。この細胞を T00127-HEV1 で処理すると、ACBD3、PI4KB、PI4P が共局在する斑点様構造は消失し、AiV タンパク質は不規則な大きさの点状構造として観察された一方、ACBD3 と

PI4KB は細胞質に拡散していた。また、レプリコン RNA 導入細胞では、mock 細胞と比べて PI4P 量の増加が認められた。

D. 考察

ポリプロテイン発現細胞において、ウイルスタンパク質、ACBD3、PI4KB および PI4P が共局在する細胞内構造の形態が、PI4KB のキナーゼ活性阻害剤により変化したことから、PI4KB 活性が複製複合体形成に重要な働きをしていることが示唆された。また PI4KB のキナーゼ産物である PI4P は、AiV RNA の複製により細胞内での産生量が上昇することが分かった。C 型肝炎ウイルスでは、ウイルスタンパク質 NS5A が PI4KA に結合し、その活性を亢進することが明らかにされている。AiV では、ウイルスタンパク質

/ACBD3/PI4KB 複合体形成が PI4KB を活性化することにより PI4P の産生を増加させている可能性が考えられ、さらに検討を加える必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 佐々木球美子、佐々木潤、前野芳正、守口匡子、河本聡志、富田万祐子、谷口孝喜: アイチウイルスゲノム RNA 複製における PI4KB のキナーゼ活性の役割. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪市、2012 年 11 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

数理モデル解析によるエンテロウイルス71分離株の特性解明

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 京都大学生命科学研究科

研究要旨：本研究は、数理モデルを起点とした解析法により、Enterovirus 71 (EV71)の増殖複製を定量的に把握する実験手法の開発を目的とした。解析の結果、EV71の3つの分離株のウイルス複製におけるパラメーターを算出することができた。この解析からEV71分離株毎のウイルス産生率と伝播効率が推定され、その株間で異なることがあること、一方その細胞死滅効率には差異は見られないことがわかった。ウイルス産生率と伝播効率の違いは、そのウイルス株の流行性との関連があると考えられる。

A. 研究目的

ピコルナウイルス科の一本鎖RNAウイルスのひとつであるEnterovirus 71 (EV71)は、手足口病の起因病原体であり、無菌性髄膜炎・脳炎の合併例も少なくはない。そして、この流行は、90代以降アジア太平洋地域で頻発しており、公衆衛生上の問題ともなっている。

ウイルスの細胞への侵入からその遺伝子の複製と蛋白質の合成、そして、ウイルスの粒子の産生にいたる一連のウイルスの増殖過程は、細胞集団内における連続的事象から構成されている。すなわち、この動的現象の理解には、時系列要因を包含した定量的解析がきめて重要である。そこで、これらの一連の過程に影響を与える種々の要因を考慮した数理モデルを構築し、実験データによる補正を加えた研究手法を考えた。本手法により、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)の算出が可能となる。本研究の目的は、EV71の感染増殖過程を定量生物学的に理解する手法の開発であり、以下の実験を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮)

1) 細胞培養と倍加時間測定

ウイルス標的細胞として使用したヒト横紋筋肉腫由来のRD細胞は、10%FCS含DMEMにて培養した。その倍加時間を、細胞数を各時点(継代後0,1,2,3,4,5日目)において下記の図1のように測定し、下記の式(図2)に代入し、算出した。

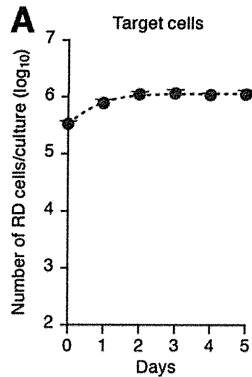


図1 RD細胞の倍加時間測定

$$\frac{dT(t)}{dt} = gT(t) \left(1 - \frac{T(t)}{T_{max}} \right)$$

図2.

2) EV71感染実験

EV71 1095株 (Cardosa et al, *Emerg Infect Dis*, 2003), KED005株 (Shimizu et al, *Jpn J Infect Dis*, 1999), 02363株 (Shimizu et al, *Pediatr Int.*, 2004) のウイルス液をMOI 0.01で感染させた。EV71感染実験は、EV71をRD細胞に37°C1時間暴露後、細胞を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、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ウイルス感染価 (cell culture infective dose 50% [CCID₅₀])、ii) iii) Alexa488標識抗VP1抗体を用いたflow cytometry法および細胞数測定により算出した。各実験はそれぞれ triplicateで行った。

3) ウイルス感染増殖数理モデル構築

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、以下の式(図3)に代入した。

$$\begin{aligned} \frac{dT(t)}{dt} &= gT(t) \left(1 - \frac{T(t)}{T_{max}} \right) - \beta T(t)V(t) \\ \frac{dI_1(t)}{dt} &= \beta T(t)V(t) - \kappa I_1(t) \\ \frac{dI_2(t)}{dt} &= \kappa I_1(t) - \delta I_2(t) \\ \frac{dV(t)}{dt} &= pI_2(t) - cV(t) \end{aligned}$$

図3. ウイルス感染増殖数理モデル

図3の説明： $T(t)$:標的細胞数/ml、 $I_1(t)$:エクリプス細胞数/ml、 $I_2(t)$:ウイルス産生細胞数/ml、 $V(t)$:ウイルス感染価/mlとなる。 κ :VP1発現率/日、 δ :感染細胞死滅率/日、 β :感染率/日となる。 p :ウイルス粒子産生率/日、 c :ウイルス減衰率/日となる。

4) (倫理面への配慮)

本研究においては培養細胞株を用いており、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) 感染標的細胞 (RD細胞) の倍加時間の推定
図1の結果を図2の式に代入し、RD細胞の倍加時間を算出した。その結果、 10.58 ± 0.11 時間 / 日であった。
- 2) EV71分離株のウイルス減衰率 (c)
分離株ごとの半減期は、1095株： 16.53 ± 1.71 時間、02363株： 16.81 ± 2.98 時間、KED005株： 11.52 ± 1.34 時間とKED005株はその安定性が低いことがわかった。
- 3) EV71感染増殖数理モデルの構築
図3の数式をもとに、ウイルス感染増殖数理モデルを構築した。図4は、今回のEV71増殖

モデルを図式化したものである。 $T(t)$ は標的細胞数/ml、 $I_1(t)$ はエクリプス細胞数/ml、 $I_2(t)$ はウイルス産生細胞数/ml、 $V(t)$ はウイルス感染価/mlとなる。パラメーターである κ はVP1発現率/日、 δ は感染細胞死滅率/日、 β は感染率/日となる。 P はウイルス粒子産生率/日、 c はウイルス減衰率/日となる。このモデルをもとに、実際のEV71感染実験を行い、50% [CCID₅₀]を算出した感染性ウイルス量、抗VP1抗体を用いたflow cytometry法による感染率と細胞数測定により算出した感染細胞数と非感染細胞数の各時系列データを取得し、これらを非線形最小二乗法による目的関数を最小化するパラメーター解析をおこない近似化した(図5A-C)。なお、本解析では感染後ウイルス抗原を発現する前のエクリプス期は6時間と固定し、計算をおこない、標的細胞数とエクリプス期の増減を算出した(図5D-E)。そして、1095株、KED005株、02363株の感染率/日である β 、ウイルス粒子産生率/日である P 、感染細胞死滅率/日である δ 、ウイルス減衰率/日である c のそれぞれは、表1に示すように算出された。

これらの解析値をもとに、ウイルス感染細胞の半減期 (Log_2/δ : half-life)、バーストサイズ (p/δ : 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 (R_0 : 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)が、算出された(表1右)。1095株、KED005株、02363株に感染した細胞の半減期 (Log_2/δ)に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では、1095株とKED005株では、02363株のそれ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半減率からわかる寿命にはほとんど差異

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。

EV71感染症の病態は、ウイルス感染による細胞毒性に加え、抗ウイルス免疫応答などさまざまな要素によって構成される。無菌性髄膜炎などの重篤化は、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産生・伝播効率を示す値である。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年のタイの散发例の分離株である(Shimizu et al, *Pediatr Int*, 2004)。以上の結果から、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、今回の数理科学手法を取り入れた研究手法は、ひとつの有用なツールとなると考えている。

E. 結論

数理科学モデル構築し、実験を行いパラメーターの補正を行う研究手法により、EV71の複製ダイナミクスを定量的に解析する実験手法を開発した。数理科学を用いた解析手法は本邦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

EV71感染実験とウイルスの保管は全て京都大学ウイルス研究所で定める感染微生物取り扱い安全管理委員会の規定に基づき、P3実験施設で行われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K, Koyanagi Y: Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation. *J Virol.* 87: 701-705, 2013

2. 学会発表

1) Koyanagi Y: Overview of infection model of humanized mice. 1st Samsung Humanized Mice Symposium. Seoul, 2012年4月

2) 佐藤佳: ヒト化マウスモデルを用いたHIV複製定量系とその応用. 第22回日本数理生物学会大会. 岡山市, 2012年9月

3) 小柳義夫: レトロウイルス感染におけるエフェクター分子, 北海道大学遺伝子制御研究所研究集会「感染と癌 -感染癌のエフェクター分子とその標的-」. 札幌市, 2012年9月

4) 福原充子、岩見真吾、佐藤佳、小柳義夫: 数理モデルを用いたエンテロウイルス71複製ダイナミクスの解析. 第35回日本分子生物学会年会. 福岡市, 2012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

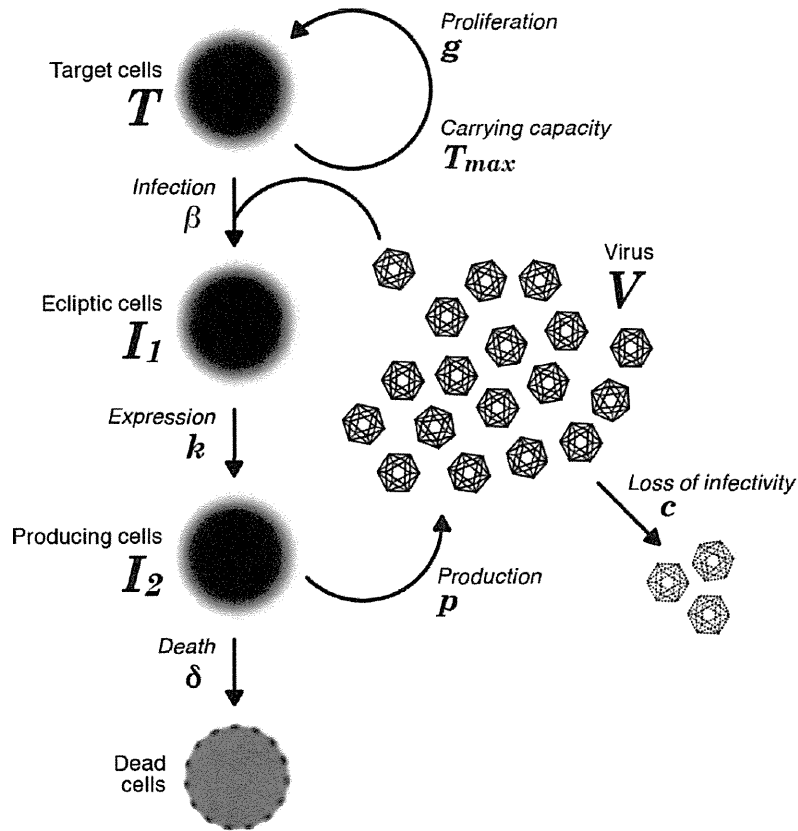


図4. EV71感染の数理モデル.

図中 T, I_1, I_2, 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 δ, β はそれぞれ、感染細胞の死滅率 (death), 一日あたりに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 (expression)を k 、ウイルス粒子が一日あたりにウイルス粒子が感染性を失う率 (clearance)を c 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 g, T_{max} し、研究方法に従って算出した。

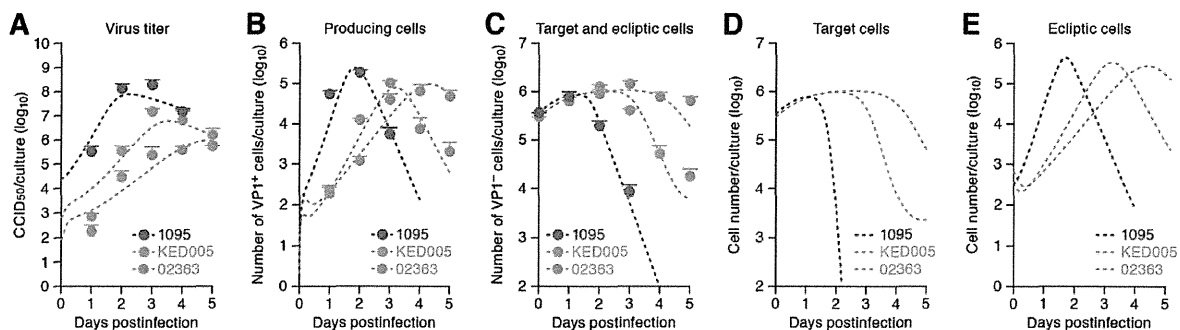


図5. 感染実験と数理科学解析によるEV71感染ダイナミクス.

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), 標的細胞数 (D), エクリプス細胞数 (E) をそれぞれ示す. 図中点は感染実験による実測値 (n=3) を、点線は実験データ非線形最小二乗法による目的関数を最小化するパラメーター解析による近似値を示す.

表1. 数理科学解析によって得られたパラメーター

Strain	Parameters				Derived quantities		
	β (10^{-6} CCID ₅₀ /ml · day ⁻¹)	p (CCID ₅₀ /day)	δ (day ⁻¹)	c (day ⁻¹)	Log ₂ / δ (days)	p/δ (CCID ₅₀)	R_0
1095	0.30 ± 0.11 ^a	738.9 ± 153.3	6.22 ± 0.13	0.99 ± 0.08	2.67 ± 0.06	118.82 ± 25.1	37.35 ± 8.99
KED005	1.41 ± 0.15	146.8 ± 28.2	19.8 ± 3.90	1.46 ± 0.16	0.86 ± 0.16	7.43 ± 0.38	8.37 ± 0.82
02363	5.14 ± 1.02	13.4 ± 5.0	11.41 ± 1.50	1.01 ± 0.16	1.47 ± 0.19	1.16 ± 0.27	6.75 ± 0.16

^a Values are averages and standard deviations.

RD-A 細胞を用いた Human enterovirus A の分離

研究協力者 飯塚 節子 (島根県保健環境科学研究所)
共同研究者 滝元 大和、木内 郁代 (島根県保健環境科学研究所)
研究代表者 清水 博之 (国立感染症研究所)

研究要旨

手足口病やヘルパンギーナの主な原因ウイルスである Human enterovirus A (HEV-A) の分離に RD-A 細胞を使用することが可能かどうかを臨床検体を用いて検討した。従来の分離法である、乳のみマウス (SM) および Vero 細胞を用いた分離と比較した結果、コクサッキーウイルス A2 (CVA2)、3、4、5、8、10 は SM とほぼ同じ分離率であり、CVA6、12、16、エンテロウイルス 71 (EV71) は分離可能であるが、従来法の 1/2 程度の分離率であった。CVA14 は検討した例数が少ないが、RD-A 細胞では分離されなかった。

これらの結果から、RD-A 細胞は国内で手足口病やヘルパンギーナの原因ウイルスとなっているほとんどの血清型の HEV-A の分離に有用な培養細胞と考えられた。

A. 研究目的

手足口病、ヘルパンギーナは小児を中心に毎年流行し、多くの場合、合併症を引き起こすことなく一過性に経過するが、EV71 にみられるように血清型によっては脳炎などの重篤な合併症を引き起こす場合がある。これらの疾患の原因ウイルスである HEV-A の多くの血清型は培養細胞での分離が困難で、SM を用いて分離可能である。また、近年は PCR 法等の遺伝子検査による検出が広く行われている。しかし、SM を用いる方法は手技が煩雑であり、多数検体の検査には対応が難しい。

また、遺伝子検出法は感度は高いものの塩基配列の決定等コストがかかる上、流行株の抗原性等の情報が得られない。

2011 年に発生した CVA6 による手足口病の大流行に際し、我々は RD-A 細胞を用いて手足口病患者検体から CVA6 を複数分離した。そこで、他の血清型を含めた HEV-A サーベイランスへの RD-A 細胞の導入の可能性を検討することを目的に、HEV-A の分離効率を従来の分離法と比較した。

B. 研究方法

1. 材料

RD-A 細胞は東京都臨床医学総合研究所小池智先生から分与された。

研究に用いた検体は 2005 年～2011 年に SM および Vero 細胞等で HEV-A が分離され -20℃ 保存されていた臨床検体 157 検体と 2012 年に島根県発生動向調査病原体定点で採取された臨床検体 730 検体である。

2. 方法

培養 4～5 日目の RD-A 細胞に検体 100 μ l/well を接種し 1 週間観察、CPE が出現したら抗血清で中和後、RD-A 細胞上でブラック減少法により型別同定を行った。2 代継代し CPE が認められなかった場合“分離陰性(-)”とした。

SM の発症の有無は検体 (50 μ l/匹) を 1 検体当たり 2 匹に接種し 10 日間観察、2 匹とも発症した場合“分離陽性(+)”、1 匹のみの発症(±)、2 匹とも発症しなかった場合を陰性(-)と判定した。

C. 研究結果

1. CVA 陽性検体の RD-A 細胞によるウイルス分離状況(表. 1)

RD-A 細胞での分離を SM あるいは Vero 細胞等での分離と比較すると、CVA2、3、4、5、8、10 は SM とほぼ同等、CVA6、12、16、EV71 は分離可能であったが、分離率は従来の方法より低く 1/5～1/2 の分離率であった。CVA14 は 2012 年の手足口病検体から RT-PCR 法でのみ 2 例検出されているが、RD-A 細胞では分離されなかった。

血清型毎の分離率は検体採取年に関係はなく、ほぼ一定の傾向が認められた。

2. RD-A 細胞での分離と SM の発症を指標

とした検体中のウイルス量(表. 2)

検体中のウイルス量と RD-A 細胞での分離の成否の関係をみるために、SM で分離陽性で、RD-A 細胞で分離陽性あるいは陰性となった検体を 10 段階希釈した液を SM に接種し、分離陽性となる最高希釈倍数を求めた。

RD-A 細胞は CVA2、3、5、8 に対して SM の検出感度の 1/10 程度、CVA6、12 は 1/100 程度であった。CVA10 は同程度であった。

3. HEV-A 以外のウイルスの分離状況

2012 年に島根県発生動向調査病原体定点で採取された臨床検体から RD-A 細胞を用い分離同定されたエンテロウイルスは表 3 のとおりであり、コクサッキーウイルス B5 以外のエンテロウイルスは他の細胞と同程度の分離率であった。

D. 考察

手足口病、ヘルパンギーナの主要原因ウイルスである HEV-A は培養細胞による分離が困難であり、ウイルス分離には SM が用いられてきた。榮らによって RD 細胞からクローニングされた RD-18S 細胞は A 群コクサッキーウイルスの多くの株やエコーウイルスに感受性があることから感染症発生動向調査の病原体検査に広く使用されている。しかし、SM と比較すると血清型にもよるが分離率は 25～55%程度劣ると報告されている¹⁾。さらに 2011 年に大流行した CVA6 は RD-18S 細胞ではほとんど分離できなかった。^{2),3)}

今回検討した RD-A 細胞は CVA2、3、4、5、8、10 に対しては SM とほぼ同等、CVA6、12 では SM の 1/5～1/2 の分離率を示し、検体採取年による違いもほとんど認めら

れなかった。また、Vero 細胞でよく分離される CA16、EV71 も Vero 細胞には劣るが分離可能であった。そして、RD-A 細胞の分離感度は CVA2、3、5、8 に対して SM の 1/10 程度、CVA6、12 は 1/100 程度であり、ふん便や発病初期のウイルス量の多い検体では分離率は高くなることが示唆された。

さらに、感染症発生動向調査の検体を用いた結果から、CB5 の分離率は劣ったがエコーウイルス (6、7、9、18 型) は従来法と同様によく分離されており、RD-A 細胞を用いることにより、多様なエンテロウイルスの分離が可能であると推察された。

E. 結論

RD-A 細胞を用いることにより HEV-A のみならず、エコーウイルスを含めたエンテロウイルスのサーベイランスが可能であることが示唆された。

F. 文献

- 1) 榮賢司、石原佑弉、森下高行、西尾治、鷺見順子、井上裕正：RD 細胞からのクローン株、RD-18S のコクサッキーA 群とエコーウイルスに対する感受性。感染症学雑誌。59：664, 1985
- 2) 飯塚節子、木内郁代、日野英輝：2011 年に流行した手足口病及びヘルパンギーナからのウイルス検出 島根県、2012 年 3 月。病原微生物検出情報. 33：58, 2012
- 3) 榎本美貴、高井伝仕、近平雅嗣、花岡

希、岡部信彦、谷口清洲、清水博之、藤本嗣人、岡藤輝夫、岡藤隆夫、飯尾潤、田中一宏：2010～2011 年の手足口病患者からのコクサッキーウイルス A6 型の検出状況 兵庫県、2011 年 7 月。病原微生物検出情報. 32：196, 2011

G. 健康危機情報

特になし

H. 研究発表

1. 論文発表

(1) 飯塚節子、木内郁代、日野英輝：2011 年に流行した手足口病及びヘルパンギーナからのウイルス検出 島根県、2012 年 3 月。病原微生物検出情報. 33：58, 2012

(2) Yamayashi S, Iizuka S, Yamashita T, Managawa H, Mizuta K, Okamoto M, Nishimura H, Sanjoh K, Katsushima N, Itagaki T, Nagai Y, Fujii K and Koike S. Human SCARB2-dependent infection by coxsackievirus A7, A14, and A16 and Enterovirus 71, J. Virol 86:5686, 2012

2. 学会発表

木内郁代、飯塚節子：島根県における手足口病の原因ウイルス。第 53 回日本臨床ウイルス学会、大阪市、2012 年 6 月

I. 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

表.1 CVA陽性検体のRD-A細胞によるウイルス分離状況

	2012年	2011年	2010年	2009年	2008年	2007年	2005年
CVA2	3/4		6/8		6/6		2/2
CVA3						9/10	
CVA4	18/20		5/5		7/7		
CVA5	4/4		8/9			2/2	
CVA6		8/29				17/23	0/1
CVA10	1/0	5/5		9/9	1/2	0/1	1/1
CVA12	1/4						0/1
CVA16		3/6			4/7	0/2	4/5
EV71			2/9				1/6
CVA8	2						
CVA14	0/2*						

RD-A(+)/SM or other cells(+)

*:RT-PCRのみで検出

表.2RD-A細胞での分離と検体中のウイルス量 (SMの発症を指標)

血清型	検体No.	検体名	RD-Aでの分離	SMの発症			
				検体の希釈倍率			
				1	10	100	1000
CVA2	499-10	咽頭拭い液	-	+	-	-	-
	456-10	咽頭拭い液	+	NT	+	-	-
	500-10	咽頭拭い液	+	NT	+	-	-
	503-10	咽頭拭い液	±	NT	±	±	-
CVA3	465-07	鼻汁	-	+	-	-	-
	513-07	咽頭拭い液	-	+	±	-	-
	470-07	咽頭拭い液	+	NT	+	+	+
	509-07	咽頭拭い液	±	NT	±	-	-
CVA4	588-08	咽頭拭い液	+	NT	+	+	-
	381-12	咽頭拭い液	±	NT	±	±	±
CVA5	91-10	咽頭拭い液	-	+	±	-	NT
	545-07	咽頭拭い液	+	NT	+	-	NT
	536-12	咽頭拭い液	±	NT	±	-	NT
CVA6	431-07	咽頭拭い液	-	+	+	-	NT
	824-09	咽頭拭い液	-	+	-	-	NT
	462-11	ふん便	-	+	+	-	NT
	514-07	咽頭拭い液	±	±	±	±	-
CVA10	580-07	咽頭拭い液	-	-	-	NT	NT
	722-08	咽頭拭い液	-	-	-	NT	NT
	513-09	咽頭拭い液	+	+	-	NT	NT
	724-11	咽頭拭い液	±	±	-	NT	NT
CVA12	414-12	咽頭拭い液	-	+	±	-	NT
	503-12	咽頭拭い液	-	+	±	-	NT
	529-12	咽頭拭い液	-	+	-	NT	NT
	513-12	ふん便	+	+	+	+	NT

表3. 2012年発生動向調査検体 (730検体)からのウイルス分離状況

	RD- A	SM	他の培養細胞 ^{*1}
CVA2	6	4(1) ^{*3}	0
CVA4	25(1) ^{*2}	20(2) ^{*3}	0
CVA5	6	4	0
CVA8	2	NT	0
CVA10	1(1) ^{*2}	0	0
CVA12	1	4(3) ^{*3}	0
CVA14	0	0	(2) ^{*4}
CA9	6		6
CB5	2		9
Echo6	4		2
Echo7	7		7
Echo9	11		12
Echo18	10		8

*1 :RD、FL、Vero、AG- 1、A549

*2 :SMで分離陰性を再掲

*3 :RD- A細胞で分離陰性を再掲

*4 :RT-PCRでのみ検出

平成 24 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」
分担研究報告書

エンテロウイルス 71 受容体 SCARB2 の機能解析 ならびにエンテロウイルス 71 感染モデルマウスの開発

研究分担者

小池智 (公財) 東京都医学総合研究所・副参事研究員

研究協力者

山吉誠也、大岡静衣、藤井健 (東京都医学総合研究所・ウイルス感染プロジェクト)

永田典代 (国立感染症研究所・感染病理部)

多屋長治、設楽浩志、島貫碧 (東京都医学総合研究所・遺伝子改変動物室)

Kien Chai Ong、Kum Thong Wong (マラヤ大学・マレーシア)

研究要旨

手足口病の原因ウイルスであるエンテロウイルス 71 (EV71) は、近年、アジア太平洋地域で大規模な流行が起こっており、稀に中枢神経合併症による死亡例が報告されている。我々は重要エンテロウイルス感染症の制御に必要な以下の 2 つの項目について研究を行った。

1. 我々は EV71 の受容体である Scavenger receptor B2 (SCARB2) を同定し、さらに SCARB2 は EV71 だけでなくカプシド配列を用いて作成した分子系統樹上で最も近縁のコクサッキーウイルス (CV)、(CA7、CVA14、CVA16) の受容体としても働いていることを報告した。しかし、感染初期過程への SCARB2 の寄与は詳細には解明されていない。我々はウイルスの細胞表面への結合、細胞内侵入、脱殻過程における受容体としての機能を SCARB2、同じく EV71 の受容体であると報告されている PSGL1 とを比較しながら検討した。SCARB2 はウイルスの結合だけでなく、侵入、脱殻過程も効率よく引き起こす受容体であることが明らかになった。
2. EV71 の神経病原性を試験可能でかつ操作性の容易なモデル動物はまだ樹立されておらず、EV71 神経病原性試験やワクチン検定法は確立されていないことが大きな問題である。昨年度までにヒト SCARB2 を発現するトランスジェニック (tg) マウスを作製し、tg マウスは EV71 感受性となり、ヒトと同様に急性の中枢神経

系に病変を生じ、弛緩性麻痺または運動失調などの神経症状を呈することを報告した。本年度は乳のみマウスに対して病原性を示さない EV71 分離株に対しても感受性であること、これらの株に対して成獣マウスにおいても感受性を維持していることを確認した。また、SCARB2 発現量に依存して感受性も強くなる可能性があることを見出した。これらの知見は SCARB2-tg マウスが EV71 神経病原性試験やワクチン検定法の確立のためのモデル動物として有用であることを示している。

1. エンテロウイルス 71 受容体 SCARB2 の機能解析

A. 研究背景と目的

EV71 の受容体として我々は Scavenger Receptor B2 (SCARB2) を同定したが、他の受容体の候補として PSGL1, Annexin II, Sialylated glycan などが報告されている。これらの分子が EV71 の感染においてどのような役割を果たすのかその分子メカニズムは詳細に明らかにされていない。そこで、その中でも EV71 非感受性であるマウス細胞に単独で発現するだけで感受性を与えることができると報告されている SCARB2 と PSGL1 を比較し、ウイルス感染効率、ウイルス結合、細胞内侵入、脱殻の過程が効率よく起こるか否かを検討した。

B. 研究方法

(1) ウイルス感染効率

ヒト SCARB2, ヒト PSGL1 を発現するマウス L 細胞 (L-SCARB2, L-PSGL1) に GFP を発現する EV71 (EV71-GFP) を感染させ、

GFP 陽性細胞をカウントし、感染効率を測定した。あるいは L-SCARB2, L-PSGL1 に EV71 を感染させ、経時的にウイルス力価を測定した。

(2) ウイルスと受容体の結合

³⁵S-Methioine, Cystein を含む培地で EV71 を増殖させ、F-particle のみを CsCl 密度勾配遠心などで精製した。このウイルス粒子を L-SCARB2, L-PSGL1 と混和し、結合したウイルス量を測定した。もしくは SCARB2 あるいは PSGL1 の細胞外ドメインを免疫グロブリン Fc 部分と融合したタンパク (SCARB2-Fc, PSGL1-Fc) との pull down を行い、結合したウイルスのカプシドタンパクを検出して結合量を測定した。

(3) 細胞内侵入

L-SCARB2, L-PSGL1 に 4°C で EV71 F-particle を結合させ、37°C にシフトした後細胞を固定し、コンフォーカルレーザー顕微鏡を用いた間接蛍光抗体法により細胞内に侵入したウイルス粒子を検出した。

(4) 脱殻反応