

| CVB2 Strain | Times of one-step growth | Burst size (PFU/cell) |
|------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Ohio-1 (prototype) | 5 hrs | 466.7 |
| NS13-008 (URI, TS,) | 6 hrs | 50.0 |
| NS13-007 (Case 2, CFS) | 7 hrs | 173.3 |
| NS13-005 (Case 1, CSF) | 7 hrs | 33.4 |
| NS13-004 (Case 1, Myc) | 7 hrs | 41.6 |

Table 4. Single cycle replication of coxsackievirus B2 clinical isolates in HeLa cell

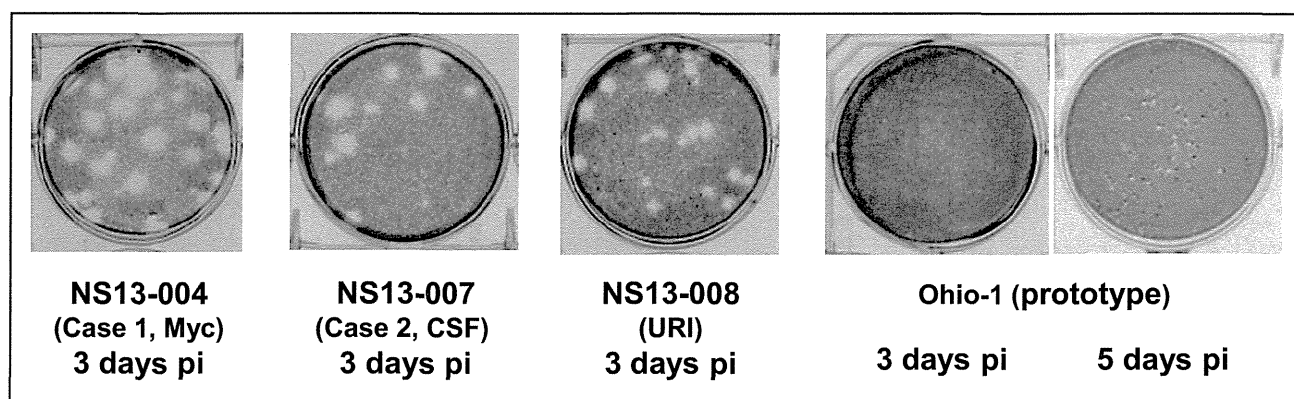


Fig. 3. Plaque formation of coxsackievirus clinical isolates in HeLa cell

ウイルス側の要因によることも否定できない。即ち、CVB2には病原性と臓器特異性を異にする少なくとも2種類のウイルスが存在する可能性も考えられる。

症例1のCVB2による劇症型新生児心筋炎は極めて稀であり、垂直感染を証明し得た数少ない症例でもあることから、HeLa細胞を用いて症例1の心筋組織から分離されたCVB2 NS13-004株及び髄液から分離されたNS13-005株の*in vitro*における増殖性状を症例2の髄液から分離されたNS13-007株、同じシーズンに長崎県の上気道炎患者の咽頭拭い液より

分離されたNS13-008株及び標準株

(Ohio-1)と比較した。その結果をTable 4及びFig. 3に示す。HeLa細胞における一段増殖に要する時間を比較すると、Ohio-1が最も短く5時間であったのに対して上気道炎患者由来のNS13-008株が6時間、無菌性髄膜炎と劇症型新生児心筋炎を併発して死亡した症例1の心筋組織から分離したNS13-004株、髄液から分離したNS13-005株及び重症呼吸器障害と無菌性髄膜炎を併発した症例2の髄液から分離したNS13-007株は何れも7時間であった (Table 4)。細胞1個あたりか

ら産生されるウイルス量、即ち burst size を比較すると一段増殖時間が最短の Ohio-1 株が 467 PFU/cell で最大であったのに対して、NS13-007 株はその約 2/5、NS13-004 株、NS13-005 株及び NS13-004 株は約 1/10 程度であった (Table 4)。一方、HeLa 細胞において形成されるそれぞれの plaque size を比較したところ、症例 1 に由来する NS13-004 株及び NS13-005 株は感染後 3 日には直径 3~5 mm の大型の plaque を形成したのに対し、標準株の Ohio-1 は感染後 3 日では plaque が確認できず、感染後 5 日目になって視覚的に確認できる < 1 mm の pin-hole plaque を形成した。NS13-007 株及び NS13-008 株はそれぞれ 1.5~4 mm、1~2.5 mm 程度の plaque を形成し (Fig. 3)、あたかもそれぞれが由来する症例の病態を反映するかのよう な結果が得られた。以上の結果は、Ohio-1 とこれらの臨床分離株では *in vitro* における増殖性状が明らかに異なることを示すものである。また、Plaque size と一段増殖実験の結果は一見矛盾するが、培養細胞への馴化程度及び細胞死の誘導能を反映している可能性も十分考えられる。現在、全ゲノムの塩基配列の比較解析が進行中であるが、ほぼ解析が完了した NS13-004 株と Ohio-1 を比較すると構造タンパク質におけるアミノ酸置換よりむしろ非構造タンパク質にアミノ酸置換が集積している傾向にあることが解ってきた (吾郷ら、未発表データ)。全ゲノムの比較解析からこの現象を説明するヒントを導き出せる可能性も十分考えられることから、今後の進展が待たれる。

これらの分離ウイルスの *in vivo* における病原性の差異について、現在、比較検討中であるが、preliminary な実験において、分離ウイルス 10^3 CCID₅₀ を乳呑み

ddY マウスに ic 接種して致死効果を検討したところ、劇症型新生児心筋炎で死亡した患者の心筋から分離した NS13-004 株が最も強い病原性を示し、他の分離株も各ウイルスを分離した患者の病態を反映する傾向が認められた (永田ら、未発表データ)。現在、マウスに対する分離 CVB2 の各株の病原性について、さらに検討中である。

これまでに CVB2 による新生児心筋炎に関する詳細な解析報告は殆ど無く、分離ウイルス性状の比較解析及び病原性等について、さらに詳細な検討が必要である。現在、進行中である。

今回、確認できただけでも 2013 年の HEV 流行期に 7 例もの周産期 CVB2 感染による新生児重症例が続発したことは驚くべきことである。生活様式の変化により CVB2 に対する抗体を保有していない成人が確実に増加しているものと推察され、ひとたび CVB2 が流行すれば周産期の CVB2 感染は新生児に重篤な症状をもたらし、しかも重症例が多発する可能性が高いことから、CVB2 を周産期感染ウイルスとして再認識し、早期に感染予防対策を講ずる必要があるものと考えられる。また、産科領域においても HEV 流行期には注意喚起し、危険度の高い周産期感染ウイルスとして CVB2 の認知度を高める必要があると思われる。

D 結論

相次いで発生した周産期垂直感染が強く疑われる新生児重症感染症例より原因ウイルスの検出及び分離・同定を行ったところ、すべての検体から VP1 増幅領域において同一塩基配列の CVB2 遺伝子が検出され、一部の検体から CVB2 も分離された。併せて、CVB2 の周産期垂直感

染を証明した。CVB2 を危険度の高い周産期感染ウイルスとして再認識し、早期に感染予防対策を講ずる必要性があるものとする。

E. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(1) 里龍晴、森内浩幸、吾郷昌信：血球貪食症候群様病態を合併したコクサッキーウイルス B4 髄膜炎の新生児例、第 54 回日本臨床ウイルス学会、2013 年（倉敷）

(2) 吾郷昌信、北川由美香、松本文昭、吉川 亮、陣内久美子、高柳俊光、森内浩幸：垂直感染による新生児重症ウイルス感染症 2 例を惹起したコクサッキーウイルス B2 型、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年（神戸）

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

平成 25 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
「不活化ポリオワクチンの有効性・安全性の検証及び国内外で進められている新規腸管ウ
イルスワクチン開発に関する研究」

研究報告書

ヒトパレコウイルス 3 型に対する感受性細胞の検討

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

HPeV3 受容体解析の基礎実験として HPeV3 分離株樹立に使用された Vero-A 細胞とそのクローン細胞の Vero-E6 細胞、RD-A 細胞とそのクローンである RD-18S 細胞を用いて HPeV3 の感染を検討した。Vero-A 細胞、Vero-E6 細胞と RD-A 細胞は、CPE、蛍光抗体法、ウイルス力価測定で HPeV3 増殖が確認された。RD-18S 細胞では顕微鏡下で明確な CPE は認められず、ウイルス力価の顕著な増加は認められなかったが、蛍光抗体法では感染が確認された。

A. 研究目的

ヒトパレコウイルス(HPeV)は、ピコルナウイルス科に分類され、現在のところ遺伝子型/血清型は 1 型~15 型まで報告されている。主に経口ルートにより感染が成立し、粘膜上特に腸管上皮で増殖し糞便中に排泄される。ほとんどが不顕性感染であり予後良好であるが、臨床症状は多様で胃腸炎、上気道炎、無菌性髄膜炎などを引き起こすが、中でも HPeV3 は生後 6 カ月未満の乳児に重症化することが多く報告されている。

HPeV の感染に係る受容体の解析は HPeV1 とインテグリンファミリーの $\alpha v \beta$ 3integrin が報告されている。HPeV1 の

VP1 領域の C 末端側に見られる RGD モチーフと受容体が結合すると考えられている。HPeV 3 は VP1 領域の RGD モチーフが欠損し他の受容体を介している可能性がある。我々は HPeV3 受容体解析を目的とし、まず今年度は基礎実験として HPeV3 分離に良く用いられる細胞株である Vero-A 細胞とそのクローン細胞の Vero-E6 細胞、RD-A 細胞とそのクローンである RD-18S 細胞を用いて HPeV3 の感染を検討したので報告する。

B. 研究方法

1. 細胞株

アフリカミドリサル腎細胞、Vero-A(ATCC® CCL-81)細胞、アフリカミ

ドリサル腎細胞、Vero-E6(Vero C1008, ATCC® CRL-1586)、ヒト横紋筋肉腫細胞、RD-A細胞(ATCC® CCL-136)は、ATCCから購入し、RD-18S細胞は本細胞を樹立された(栄賢司ら、感染症学雑誌1985)愛知県衛生研究所より分与して頂いた。

2. HPeV3 感染と細胞変性効果(CPE)の観察

HPeV3(愛知県衛生研究所 伊藤雅先生より供与)をMOI 0.01およびMOI 1で細胞に接種しCPEを1週間観察し、CPEが見られなかった場合には2代継代した。

3. 間接蛍光抗体法

HPeV3 高度免疫モルモット血清(愛知県衛生研究所 伊藤雅先生より分与)を一次抗体とし、一次抗体のコントロールとして正常モルモット抗体を使用した。二次抗体はAlexo Fluor®488抗モルモットIgG(H+L)ヤギ血清を用い、蛍光顕微鏡で観察した。

4. HPeV3 力価測定

MOI 0.01でHPeV3を各細胞に接種し、感染後12時間、24時間後の細胞を採取し、凍結融解を3回繰り返し、遠心後その上清を用いて力価を50%CCID法にて測定した。

C. 研究結果

1. HPeV3 CPEの観察

MOI 1でHPeV3を接種するとVero-A細胞、Vero-E6細胞、そしてRD-A細胞では、3日以内にCPEを示したが、RD-18S細胞では一週間後でもCPEを示さなかった。CPEを示さなかった細胞を回収し、凍結融解を3回繰り返し再度RD-18細胞に接種したがCPEは認められなかった。

MOI 0.01でも同様の結果となった。

2. 間接蛍光抗体法でのウイルス感染細胞

の解析

MOI 0.01感染2日後、各細胞を固定し、間接蛍光抗体法を施行した。

各未感染細胞とHPeV3高度免疫モルモット血清の非特異反応は認められなかった。

各感染細胞と一次抗体コントロールであるモルモット血清では蛍光は認められなかった。

HPeV3感染後のHPeV3高度免疫モルモット血清を用いた観察では、Vero-A細胞、Vero-E6細胞、RD-A細胞、そしてRD-18S細胞でも蛍光が認められた。

3. 各細胞のHPeV3力価測定

Vero-A細胞、Vero-E6細胞、RD-A細胞では明らかに感染12時間後と24時間後の力価は増加したが、RD-18S細胞では顕著な増加は認められなかった。

D. 考察

渡辺らの報告(Emerg.Infec.Dis.2007)によると臨床検体からHPeV3分離時の使用細胞は、Vero細胞、アカゲサルの腎臓細胞であるLLC-MK2細胞、アフリカミドリサル腎臓細胞であるBSC-1細胞、そして結腸直腸腺癌細胞であるCaco2細胞であった。サル腎臓細胞で増殖可能であるので今回の結果でのVero-A細胞とそのクローンであるVero-E6細胞のHPeV3の増殖に結果の相違もなく、Vero細胞他サルの腎臓細胞で感染し、ウイルス分離されると考えられ、これらの細胞がもつ受容体が関与していると考えられる。RD-A細胞を用いたHPeV3の分離報告はないが、今回の結果からHPeV3が増殖することが確認された。一方、RD-18SはHPeV1、HPeV4、HPeV6の分離に使用されており、CPEを示すと報告さ

れている。HPeV3 では CPE を示さず、しかし、蛍光抗体で陽性細胞が確認されたが、ウイルス力価測定で顕著な増殖は認められなかった。今後更に解析を進めていく予定である。

E. 結論

HPeV3 は、Vero-A 細胞、Vero-E6 細胞、RD-A 細胞で CPE を示し、蛍光抗体法でも

感染が確認されたが、RD-18 細胞は CPE を示さなかったが、蛍光抗体法では感染が確認された。

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 なし

協力研究報告書

サフォード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

小谷 治 国立感染症研究所 感染病理部 研究生

研究要旨: カルジオウイルス属サフォードウイルス (SAFV) 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、SAFV の他、主要なエンテロウイルス(EV)属の臨床分離株の感染細胞を用いてホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し、当部で作製した抗ウイルスポリクローナル抗体の有用性について検討した。その結果、抗 SAFV3 抗体は SAFV を特異的に検出した。各抗 EV 抗体は EV 属を特異的に検出し、さらに、同じ血清型に属する分離株は同じ検出パターンを示した。抗ピコルナウイルス抗体パネルとして診断に応用することが可能と考えられた。

A. 研究目的

れわれは、2007年に同定されたサフォードウイルス (SAFV)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、髄膜炎や心筋炎の原因として知られている主なピコルナウイルスの患者分離株を用いて感染細胞を準備し、パラフィン包埋切片を作製し、各種抗ウイルス抗体の特異性と交差反応性を免疫組織化学法により確認し、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

ウイルスの調整と参照標本の作製

SAFV 患者由来 3 株はアカゲザル腎上皮細胞(LLC-MK₂細胞)に接種し接種 2-7 日目に細胞変性効果を確認してから回収した。エンテ

ロウイルス 71 (EV71)患者由来 4 株と実験室株 (BrCr) 株、コクサッキーウイルス B3 (CVB3)患者由来 2 株、ポリオウイルス(PV)1 型患者由来 4 株を横紋筋肉腫細胞(RD 細胞)に接種し 1 日目に細胞変性効果を確認してから回収した。これらの細胞を使用し、iPGell® (Geno Staff, Tokyo, Japan)を用いてプロトコール通りに 10%ホルマリン緩衝液固定パラフィン包埋細胞ブロックの切片を作出した。なお、患者分離株はそれぞれ、SAFV の 2 株は高知県衛生研究所 細見卓司先生、1 株は群馬県衛生環境研究所 塚越博之先生、CVB3 の 2 株は愛知県衛生研究所 山下照男先生、EV71 および PV 分離株はすべて国立感染症研究所 清水博之先生から分与いただいた。

免疫組織化学法

ウイルス抗原の検出を目的としてポリマー法による免疫組織化学を行った。一次抗体に

はSAFV3型高度免疫ウサギ血清(SAFV3) (高知県衛生研究所 細見卓司先生より分与)、抗EV71抗体(EV71-C7およびEV-1095)、抗PV抗体(PV1)、抗CVB3抗体(CVB3-VP1)、抗PV 2C抗体(PV-2C)、および対照として市販の抗汎エンテロウイルス(EV) モノクローナル抗体 (Clone 5-D8/1; Dako) を用いた。必要に応じて、Melon gel 抗体精製 (Melon Gel IgG Spin Purification Kit: Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA) や細胞のアセトンパウダーを用いた非特異反応除去を行った。抗原賦活化にはpH6.0抗原賦活化液 (ニチレイバイオサイエンス株式会社, Tokyo, Japan) を用い、121°C10分オートクレーブ処理を行った。また、0.3%過酸化水素水メタノール液を用いた室温30分の反応により内因性ペルオキシダーゼ反応を阻止した。ポリマー法は、Envision+システム (ウサギ一次抗体用あるいはマウス一次抗体用) (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark)を用いてプロトコール通りに行った。酵素基質の発色には3, 3'-ジアミノベンジジンを用い、マイヤーのヘマトキシリンで核染色を行った。

C. 研究結果

免疫組織化学法の検討結果は表に示した。抗SAFV3抗体は遺伝子型2型、3型のSAFV分離株のウイルス抗原を検出することが可能であった。また、SAFV特異的であり、EV属の抗原は検出しなかった。各抗EV抗体は血清型特異的ではないものの、EV属を特異的に検出した。また、同じ血清型に属する分離株は同じ検出パターンを示した。

D. 考察

今年度は、実際に患者から分離された株を用いて鑑別診断のための交差反応生の検討を行った。今回用いた、抗ウイルスポリクローナル抗体は、抗ピコルナウイルス抗体パネルとして診断に応用することができると考えられた。原因不明の心筋炎・脳炎患者組織標本の病原体スクリーニングにも有用であろう。

E. 結論

抗SAFVポリクローナル抗体および各種抗EV属ポリクローナル抗体の免疫組織化学法における特異性と交差反応性を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Fujii K, Nagata N, Sato Y, Ong KC, Wong KT, Yamayoshi S, Shimanuki M, Shitara H, Taya C, Koike S. Transgenic mouse model for the study of enterovirus 71 neuropathogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013. 110:14753-14758

2. 学会発表

1. 永田典代、岩田奈織子、鈴木忠樹、佐藤由子、中島典子、片野晴隆、長谷川秀樹：脳炎・髄膜炎関連ウイルスの病理学的検索のための参照標本の作製と抗体の検討。第102回日本病

理学会（札幌）2013年4月

2. 潮田和佳、小谷治、岩田奈織子、鈴木忠樹、中島典子、長谷川秀樹、清水博之、永田典代：コクサッキーウイルス B2 実験室株脳内接種後のマウスにおける水頭症の発症機序。第61回日本ウイルス学会学術集会（神戸）2013年11月

3. 藤井健、永田典代、小池智：hSCARB2-Tgマウスを用いたEV71標的組織決定機構の解析。第61回日本ウイルス学会学術集会（神戸）2013年11月

4. 片岡周子、西村順裕、鈴木忠樹、小谷治、岩田奈織子、永田典代、網康至、清水博之：エンテロウイルス71のカニクイザルにおける病原性の解析。第61回日本ウイルス学会学術集会（神戸）2013年11月

5. 小谷治、Naeem Asif、鈴木忠樹、岩田奈織子、中島典子、片野晴隆、長谷川秀樹、田口文広、清水博之、永田典代。新生仔マウスを用いた Saffold virus 小脳継代株の作出とその病原性の解析。第61回日本ウイルス学会学術集会（神戸）2013年11月

6. Kotani O, Asif N, Suzuki T, Iwata N, Nakajima N, Katano H, Hosomi T, Tsukagoshi H, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Comparative analyses of the pathogenicity of two isolates of Saffold virus in neonatal mouse. *Europic 2014 (Belgium) 2014*. 3.

7. Nagata N, Kotani O, Iwata N, Suzuki T, Sato Y, Koike S, Iwasaki T, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H. A comparison of human enterovirus detection in experimentally infected neonatal mice using immunohistochemistry. *Europic 2014, (Belgium) 2014*. 3.

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし。

表 1 各種の抗ウイルスポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学法によるウイルス抗原検出結果

| 抗原 | | | | 抗ウイルス抗体 | | | | | | |
|------|---------------|---------|------|---------|-------|-------|-------|-----|----|--------|
| ウイルス | 患者分離 | 主症状 | 年 | SAFV3 | EV71- | EC71- | CVB3- | PV1 | PV | 5-D8/1 |
| | 株名 | | | | C7 | 1095 | VP1 | | 2C | (Dako) |
| SAFV | JPN08-404 | 髄膜炎 | 2008 | + | - | - | - | - | - | - |
| | 176/2008 | 上気道炎 | 2008 | + | - | - | - | - | - | - |
| | Kouchi 10-534 | ヘルパンギーナ | 2010 | + | - | - | - | - | - | - |
| EV71 | A211/10 | 不明熱 | 2010 | - | + | + | -w | - | -w | + |
| | 75-Yamagata | 手足口病 | 2003 | - | + | + | -w | - | -w | - |
| | C7-Osaka | 脳炎 | 1997 | - | + | + | -w | - | -w | + |
| | 1095-Shiga | 手足口病 | 1997 | - | + | + | -w | - | -w | + |
| | BrCr | 無菌性髄膜炎 | 1970 | - | + | + | -w | - | -w | - |
| CVB3 | A10004/12 | 不明熱 | 2012 | - | - | -w | + | - | - | + |
| | A201/11 | ヘルパンギーナ | 2011 | - | - | -w | + | - | - | + |
| PV1 | 11196 | 弛緩性麻痺 | 2005 | - | -w | -w | - | + | + | + |
| | 11198 | 弛緩性麻痺 | 2005 | - | -w | -w | - | + | + | + |
| | PJ161 | 弛緩性麻痺 | 2001 | - | -w | -w | - | + | + | + |
| | PJ154 | 弛緩性麻痺 | 2001 | - | -w | -w | - | + | + | + |
| | Sabin1 | 弱毒株 | | - | -w | -w | - | + | + | + |

Saffold ウイルスの膵臓に対する病原性の解析

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

研究要旨

ヒトカルジオウイルス (Saffold ウイルス, SAFV) は、エンテロウイルス等と同様に、主に胃腸炎等の便から検出されるが、稀に無菌性髄膜炎や脳炎等の髄液からも検出されている。しかし、依然そのヒトに対する病原性の詳細は明らかではない。SAFV はマウス腹腔内に接種した場合、膵臓、脳、心臓においてウイルス抗原が検出され、さらに、マウスカルジオウイルスにおいても、膵臓へのウイルス親和性および病原性が知られている。このことから筆者らは、SAFV の神経病原性に加え、膵臓に対する病原性の可能性を提唱してきたが、近年、SAFV が急性膵炎患者の便から検出・分離されたことから、SAFV の膵臓に対する病原性はより可能性を帯びてきた。

そこで本年度の研究では、SAFV の膵臓に対する病原性に注目し、I 型糖尿病の剖検例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、膵臓の浸潤組織球において強い染色性が認められ、ランゲルハンス氏島において淡い染色性が認められた。この特徴的な染色性は、II 型糖尿病や非糖尿病の剖検例では観察されなかった。以上の結果より、SAFV の膵臓病原性が示唆され、かつそれは、I 型糖尿病に特異的である可能性が示唆された。

A. 研究目的

Saffold ウイルス (SAFV) は、2007 年に初めて同定されて以降、主に胃腸炎や上気道炎から検出されているが、他のウイルスとの重複感染も多く、具体的な関連疾患の同定には至っていない。

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可能性が示唆された。さらに、2012 年には、重症急性膵炎患者の便から SAFV が検出および分離され、同症例からコクサッキーウイルスやエンテロウイルスの共感染は検出されないことが報告された。これらの報告は、SAFV の膵臓病原性を示唆するものであった。

そこで本研究では、SAFV の膵臓に対する病原性を明らかにすることを目的とし、糖尿病患者の剖検例を対象として、疫学的に調査

解析した。

B. 研究方法

I 型糖尿病（1 例）および緩徐進行型 I 型糖尿病（1 例）と診断された剖検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 2 例および II 型糖尿病 18 例の FFPE 膵臓組織切片を用いた。

（倫理面への配慮）

金沢医科大学医学部臨床病理学および仙台市立病院・病理診断科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。

C. 研究結果

I 型糖尿病および緩徐進行型 I 型糖尿病の剖検例 FFPE 膵臓組織切片において、強い抗 SAFV-3 抗体染色性を示す細胞が検出された。抗 SAFV-3 抗体に強い染色性を示す細胞はリンパ節に最も多くみられ、また、染色性は浸潤した組織球様細胞においても認められた。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

氏島の細胞にも抗 SAFV-3 抗体による淡い染色性が認められた。対照として用いた II 型糖尿病 18 例および非糖尿病 2 例の剖検例においては、これらの特徴的な染色性は全く認められなかった。

D. 考 察

I 型糖尿病剖検例（2 例）の FFPE 膵臓組織切片における浸潤組織球および、ランゲルハンス氏島における抗 SAFV-3 抗体染色性の検出は、ウイルス抗原の存在を強く示唆しており、膵臓に対する SAFV 親和性の証拠として非常に興味深い。さらに、II 型糖尿病 18 例および非糖尿病 2 例においては、全く染色性が認められなかったことから、SAFV は I 型糖尿病と密接に関連している可能性が示唆された。I 型糖尿病剖検例は、19 歳時に I 型糖尿病と診断されており、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は、*in vivo* における SAFV 持続感染の可能性を示唆するものであり、molecular mimicry や、あるいは epitope spreading 等の自己免疫疾患のトリガーとなっている可能性も考えられる。

E. 結 論

本研究より、SAFV は組織球に感染しており、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すことが示唆され、さらに SAFV 感染は、I 型糖尿病と密接に関連している可能性が示された。

今後、I 型糖尿病疾患の末梢血単核球における SAFV 感染を広くスクリーニングすることにより、SAFV 感染と I 型糖尿病の関係をより詳細に解明していきたい。

F. 健康危険情報

該当なし

該当なし

3. その他

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 8: e53194, 2013

大原義朗, 長山成美: 5. 感染症疾患「ウイルス性脳炎」今日の神経疾患治療指針第2版(水澤英洋他編), 医学書院, p388-390, 2013

大原義朗, 姫田敏樹: 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. 小児感染免疫 25: 446-451, 2013

2. 学会発表

大原義朗, 姫田敏樹, 大桑孝子, 村木靖: 小児脳炎への関与が疑われるSaffoldウイルスの*in vitro* 持続感染. 第54回日本神経学会. 東京都, 2013年5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 ウイルスの持続感染と神経病原性の可能性. 第18回日本神経感染症学会. 宮崎市, 2013年10月

姫田敏樹, 大桑孝子, 村木靖, 大原義朗: Saffoldウイルス (SAFV) Leader 蛋白のIFN産生抑制能の解析. 第25回日本神経免疫学会. 下関, 2013年11月

齊藤峰輝, 塩浜康雄, 後川潤, 高嶋博, 大原義朗: HTLV-1標的遺伝子CCL1のHAM発症における病因的意義. 第25回日本神経免疫学会. 下関, 2013年11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

平成 25 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
不活化ポリオワクチンの有効性・安全性の検証及び
国内外で進められている新規腸管ウイルスワクチン開発に関する研究
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。我々はこれまで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、このタンパク質複合体形成を通じてウイルス複製部位に産生された PI4P の、AiV ゲノム複製における役割を明らかにすることを目的として、研究を行った。

A. 研究目的

アイチウイルス(AiV)は、1989 年にカキ関連の胃腸炎集団発生事例から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。これまでにアジア各国、ヨーロッパ、南米、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。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。我々はこれまでに、AiV 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、このタンパク質複合体形成を通じてウイルスゲノム複製部位に産生された PI4P の、AiV ゲノム複製における役割を明らかにすることを目的とした研究を行った。

B. 研究方法

PI4P に結合することがすでに報告されている宿主タンパク質について、AiV ゲノム複製への関与の有無を調査するために、small interfering RNA (siRNA)を用いて Vero 細胞での発現をノックダウンした後、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を有する AiV のレプリコン RNA をトランスフェクトし、経時的に細胞

溶解液を調製し、ルシフェラーゼアッセイを行った。

C. 研究結果

実験の結果、AiV のゲノム複製に影響を与える複数の PI4P 結合タンパク質を見出した。

D. 考察

今回見出された PI4P 結合タンパク質について、今後、細胞内局在や、ウイルスタンパク質や ACBD3、PI4KB との相互作用の有無などを調査し、ウイルス複製への関与をさらに明らかにしていく予定である。PI4P は、特定のタンパク質を膜上にリクルートすることにより、脂質輸送や膜小胞輸送に関わっ

ていることが明らかにされている。今回見出されたタンパク質を介して、細胞内の輸送システムがどのようにウイルス複製に利用されているのかも明らかにしていきたいと考えている。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

エンテロウイルス 71 のカニクイザルにおける病原性の解析

協力研究者 片岡 周子 国立感染症研究所 ウイルス第二部第二室 研究員

研究要旨：近年、東アジア地域の小児において死亡例を伴うエンテロウイルス 71 (EV71) 感染症流行が問題になっている。しかし、EV71 感染症における詳細な病原性発現機構はまだ分かっていない。我々は EV71 特異的受容体として PSGL-1 を同定し (Nishimura et al. 2009)、EV71-PSGL-1 結合の分子的基盤の研究を進めている。本研究では、in vivo での PSGL-1 依存的 EV71 感染増殖・病原性発現機構を明らかにすることを目的とし、PSGL-1 結合 (PB) および PSGL-1 非結合 (non-PB) EV71 とカニクイザルを用いた感染実験を行った。

A. 研究目的

エンテロウイルス 71 (EV71) は糞口感染や経口飛沫感染で、感染しても不顕性もしくは軽度な症状で完治することが多いが、近年では無菌性髄膜炎や急性脳炎、神経原性肺水腫などの中枢神経合併症を引き起こし特に東アジア地域の小児において死亡例を伴う EV71 感染症の流行が大きな問題になっている。しかし、EV71 感染重症化の詳細な病原性発現機構はまだ分かっていない。我々は EV71 特異的受容体として PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) を同定し (Nishimura et al. 2009) EV71-PSGL-1 結合の分子的基盤の研究を進めている。PSGL-1 は主に白血球細胞膜に発現しており血管内皮細胞に発現する P-セレクチンおよび E-セレクチンのリガンドとして機能し白血球ローリングに深く関わっている。

本研究では、PSGL-1 結合 (PB) および PSGL-1 非結合 (non-PB) EV71 とカニクイザルを用いた感染実験を行うことで in vivo での PSGL-1 依存的 EV71 感染増殖・病原性発現機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

EV71-02363 株感染性クローン (non-PB 型; 02363-KE)、および、PSGL-1 結合性を規定する VP1 アミノ酸 (VP1-98 および VP1-145) に変異を導入した感染性クローン (PB 型; 02363-EG) を作製した。感染性クローン由来ウイルスストックをヒト横紋筋肉腫由来 RD 細胞で調整し、PSGL-1 結合性と Jurkat 細胞における PSGL-1 依存性ウイルス増殖を確認した。10^{6.3}CCID₅₀ の PB および non-PB ウイルスを、それぞれ 4 頭のカニクイザルに静脈内接種し、中枢神経症状を含む臨床症状の発現を観察した。感染後 0・3・7・10 日目に臨床検体 (末梢血、直腸拭い液、咽頭拭い液、髄液) を採取した。両群とも重篤な神経症状は認められず、感染 10 日目に解剖し、心臓・肝臓・脾臓などの主要臓

器や脳・脊髄などの中枢神経系組織を採取した。採取した末梢血中のリンパ球数をフローサイトメトリーにより解析した。また臨床検体及び採取した臓器などからのウイルス分離とウイルス RNA の検出及び VP1 遺伝子配列の解析を行なった。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立感染症研究所の動物実験委員会の承認を経て、動物実験指針に基づいて行なった。「動物の愛護及び保管に関する法律」「実験動物の飼養及び保管に関する基準」、霊長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」を遵守し実験動物の使用を最小限にするるとともに、取扱や処理には動物愛護の精神をもって臨んだ。

C. 研究結果

non-PB 接種群は感染初期に末梢血中のリンパ球が減少したが、その後回復した。またこの感染群は振戦などの神経症状を示し、直腸拭い液、咽頭拭い液及び血清から高頻度にウイルス及びウイルス遺伝子が検出された。PB 接種群では明らかな神経症状を示さなかったが、感染後期の血清や末梢血単核球 (PBMC)、剖検時の中枢神経系組織からウイルス及びウイルス遺伝子が検出された。どちらの接種群においても、拭い液や血清および中枢神経系を含む各種組織から検出されたウイルスの多くは VP1-98 あるいは VP1-145 にアミノ酸変異を有しており、non-PB 型 (02363-EE) が高頻度に検出された。

D. 考察

PSGL-1 結合性の異なる 2 種類の感染性クローン由来 EV71 を感染動物モデルであるカニクイザルに感染させ、ウイルスの in vivo における病原性や増殖性などの違いを比較した。その結果、non-PB が in vivo において効率良く増殖し、中枢

神経系におけるウイルス増殖と病原性発現に関与することが示唆された。PB(02363-EG)は感染後早い段階で145番目のGがEに変異した non-PB 変異体 (EE) となり PSGL-1 非依存的に CNS まで到達したと考えられる。145番目のアミノ酸の変異/選択のメカニズムは未解明であるが、非ヒト霊長類モデルにおいてウイルスの複製と病原性に関わる決定因子であることが分かった。

E. 結論

- 1 Non-PB 接種カニクイザルは、感染初期にリンパ球減少症が見られ、髄膜炎を発症し、また振戦などの神経症状を示した。
- 2 Non-PB 接種カニクイザルから採取した咽頭拭い液、直腸拭い液及び血清から高頻度にウイルスが検出され、その検出されたウイルスは全て 98 番目のアミノ酸が E に変異した non-PB 型 (EE) であった。
- 3 PB 接種カニクイザルは明らかな臨床症状は示さなかった。
- 4 PB 接種カニクイザルから感染後期に採取した血清や PBMC、また剖検時の中枢神経組織からウイルスが検出された。そのウイルスも non-PB 接種サルから検出されたのと同じ VP1 配列を持ち 145 番目のアミノ酸が E に変異した non-PB 型 (EE) であった。
- 5 両感染群から検出できたウイルスの VP1 配列内で 98 番目と 145 番目のアミノ酸以外に共通して変異を起こしている箇所は無かった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Enterovirus 71 binding to PSGL-1 on leukocytes: VP1-145 acts as a molecular switch to control receptor interaction. Nishimura Y, Lee H, Hafenstein S, Kataoka C, Wakita T, Bergelson JM, Shimizu H. PLoS Pathog, 9(7), (2013).

2. 学会発表

- 1 片岡周子、西村順裕、鈴木忠樹、小谷 治、岩田奈織子、永田典代、網康至、清水博之：エンテロウイルス 71 のカニクイザルにおける病原性の解析：第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸、11 月 10 日-12 日、2013.
- 2 西村順裕、Lee Hyunwook、Hafenstein Susan、片岡周子、脇田隆宇、Bergelson Jeffrey M.、清水博之：エンテロウイルス 71 の受容体 PSGL-1 との結合：VP1-145 は受容体特異性を制御する分子スイッチである、同上。

H. 知的所有権の出願・登録状況 特になし。

平成 25 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）

「不活化ポリオワクチンの有効性・安全性の検証及び国内外で進められている新規腸管
ウイルスワクチン開発に関する研究」

分担研究報告書

ヒト SCARB2 発現マウスを利用した EV71 毒力検定系の構築

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

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）

清水博之（国立感染症研究所・ウイルス第二部）

網康至（国立感染症研究所・動物管理室）

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）

研究要旨

ポリオウイルスと近縁のエンテロウイルス 71 (EV71) は、手足口病の原因ウイルスであるが、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。そのため日本においても重篤な神経症状を伴う EV71 の流行が危惧されている。しかしながら、EV71 毒力検定系やワクチン検定法に必要な不可欠な EV71 感染動物モデルは確立されていない。我々は昨年度までの厚生労働科学研究費補助金の支援を受け、EV71 感染に必要な受容体であるヒト SCARB2 (hSCARB2) を単離同定し、EV71 感染初期過程における役割を明らかにしてきた。また、hSCARB2 をマウスに発現させたトランスジェニックマウス (hSCARB2-Tg マウス) は、ヒトと同様、急性神経症状を呈することから hSCARB2 発現マウスは EV71 神経発症マウスモデルとして有用であること報告した。そこで本研究課題では、hSCARB2 発現マウスを EV71 毒力検定系やワクチン検定法に適用すべく、以下の 2 点に着目し解析を行った。

1) EV71 毒力のマウスモデルとサルモデルとでの比較

これまでの解析で、hSCARB2-Tg マウスにおいて数種の EV71 株間で毒力に違いがみられていた。しかしながら、ヒトでの毒力を hSCARB2-Tg マウスで反映しているかどうか

は不明である。そこで hSCARB2-Tg マウスで毒力の異なる Isehara/Japan/99 株と BrCr/USA/70 株のカニクイザルでの毒力を比較した。全ての感染個体で神経症状を観察できたがその強弱に違いは見いだされなかった。また感染 10 日目の中枢神経系でウイルス増殖を検出できたもののウイルスカ価や検出範囲に明らかな違いは見いだされていない。現在、サイトカインの定量解析と病理解析中であり、サイトカイン量の違い、ウイルス抗原検出部位や病変部位の範囲に違いがあれば毒力比較の知見と成り得ると考えられる。

2) EV71 により高い感受性を示す遺伝子組換えマウス作製

hSCARB2-tg マウスは有用な EV71 感染動物モデルであることが示されたが、感受性が弱いためモデルとしてはまだ充分ではない。hSCARB2 遺伝子のコピー数を増やせば発現量も上昇し、EV71 に感受性が高くなると考えられる。そこで、これまで作製した hSCARB2-Tg マウス 3 系統を用いて多重交配を行い、より高い hSCARB2 遺伝子コピー数を有する Tg マウスの作製を行った。この多重交配により得られた hSCARB2-Tg マウスは EV71 に対して高い感受性を示すと考えられる。

1. EV71 毒力のマウスモデルとサルモデル

との比較

A. 研究背景と目的

これまでの解析で、3 週齢の hSCARB2-Tg マウス (Tg10 系統) に BrCr/USA/70 (BrCr) 株、SK-EV006/Malaysia/97 株、C7/Japan/97 株ならびに Isehara/Japan/99 (Isehara) 株を $1 \times 10^6 \text{TCID}_{50}$ 脳内接種し、病態を観察したところ、試験した全てのウイルス株の感染により、神経症状を示し、毒力に違いがみられていた。しかしながら、ヒトでの毒力を Tg10 マウスで反映しているかどうかは不明である。そこで、EV71 の神経毒力がヒトと hSCARB2 発現マウスモデルで相関性がみられるか解析するため、ヒトにより近い動物モデルであるカニクイザルとの毒力比較を開始した。

B. 研究方法

Tg10 マウスにおいて最も強い毒力を示した Isehara 株と弱い毒力を示した BrCr 株のクローン由来のウイルスを準備し、6 週令の Tg10 マウスに $1 \times 10^6 \text{TCID}_{50}$ 、 $1 \times 10^5 \text{TCID}_{50}$ 脳内接種し、病態観察した。マウスでの毒力との相関性を調べるため、同じクローン由来のウイルスをそれぞれ 3 年令のカニクイザル 2 頭ずつに $1 \times 10^6 \text{TCID}_{50}$ 静脈内接種し、10 日間病態観察を行った。また観察期間中、ウイルス学的解析もしくは免疫細胞動態解析を行うため、咽頭拭い液、直腸拭い液、血液を採取した (0、1、3、7、10 日目)。またウイルス学的解析及び病理解析のため、感染 10 日目に中枢神経系および一般臓器の採取を行った。

C. 研究結果

6 週令の Tg10 マウスに 1×10^6 TCID₅₀、 1×10^5 TCID₅₀ 脳内接種した結果、クローン由来株でも同様に BrCr 株よりも Isehara 株の方が神経症状発症個体数および死亡個体数が多かった (図 1)。カニクイザルモデルにおいては全ての個体で神経症状を示した (図 2)。Isehara 株接種群では個体番号 5174、BrCr 株接種群では個体番号 5176 で後肢が弱い、振戦などの神経症状が比較的強く現れていた。全ての個体で、接種後 3 日目で血中の T 細胞 (CD4+、CD8+)、NK 細胞 (CD16+)、B 細胞 (CD20+) が減少しその後、回復するという動態を示した。特に明確な神経症状を示した個体 (5174 と 5176) ではこれら免疫細胞の動態に大きな変動がおこっていた (図 3)。血中の中和抗体価はどの個体も上昇しており、Isehara 株接種群が高い中和抗体価を示していた (表 1)。ウイルス学的解析を行ったところ、中枢神経系でウイルス力価を検出した (図 4) が、その他の一般臓器、咽頭拭い液、直腸拭い液、血清ではウイルス力価は検出限界以下であった。

D. 考察

クローン由来の BrCr 株と Isehara 株の毒力はマウスにおいて異なっており、Isehara 株の方が強い毒力を示した。この結果は分離株を用いた結果と相関しており、このクローンを比較することにより毒力に関与するウイルス因子を同定でき

る可能性がある。カニクイザルモデルにおいては、血中に中和抗体価を検出したこと、免疫細胞の動態が変化したことから全ての感染サル個体でもウイルス感染は成立していたと結論された。しかし、マウスで明確に見られていた BrCr 株と Isehara 株の毒力の違いは、カニクイザルモデルにおいては、病態、ウイルス増殖では明確な違いは見いだされていない。現在、血中サイトカインの定量と病理解析を行っているところである。接種ウイルス株によりサイトカイン量の変化の違い、ウイルス感染部位および病変部位などに違いが生じれば毒力の相関性について 1 つの知見が得られると考えられる。

E. 結論

ウイルス増殖が未検出であった臓器などは PCR を行い、ウイルスゲノムの検出することでウイルス感染部位を解析する必要がある。また、より明確な毒力の違いを見るためには、サルの頭数を増やす、接種経路を変更する、接種ウイルス量を増やすなどの検討が必要だと考えられる。

2. EV71 により高い感受性を示す遺伝子組換えマウス作製

A. 研究目的

EV71 感受性マウスの性状解析から、hSCARB2-tg マウスは有用な EV71 感染動物モデルであることが示された。ただし、感受性が弱いためモデルとしてはまだ充分ではない。Tg マウス系統間の比較から