

あり、子の CVB2 キメラウイルスが佐賀、長崎の西九州地域に浸淫していることが強く示唆された。

劇症型新生児心筋炎由来株の *in vitro* 増殖性状

経胎盤垂直感染により新生児重症感染を惹起したキメラ CVB2 には臨床症状及び病態の特徴から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ことから、劇症型新生児心筋炎で死亡した 2 名の患者の心筋組織から分離された NS13-004 株および NS13-010 株の *in vitro* における増殖性状を重症呼吸障害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 2 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 2 名の患者の心筋組織からそれぞれ分離した NS13-004 株と NS13-010 株および重症呼吸器障害と無菌性髄膜炎を併発した患者髄液から分離した 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 467.7 PFU/cell で最大であったのに対して、NS13-007 株はその約 3/5、NS13-004 株、NS13-008 株及び NS13-010 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、劇症型新生児心筋炎に由来する NS13-004 株および NS13-010 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 程度の種々のサイズが混在する 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ような結果が得られた。以上の結果は、標準株 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およびアポトーシスの誘導能を反映している可能性も十分考えられる。今回、これら臨床分離株の全塩基配列が明らかになったことからアポトーシスの誘導と plaque size への関与が示唆されている非構造タンパク質 2Apro に着目してアミノ酸配列の比較を行った (Fig. 4)。その結果、臨床分離株間で 22 番目及び 89 番目の 2ヶ所以外のアミノ酸配列はすべて一致した。異なる 2ヶ所のアミノ酸は劇症型新生児心筋炎に由来する NS13-004 および NS13-010 株では何れも 22 番目および 89 番目のアミノ酸がそれぞれ H、R であったのに対し、重症呼吸障害に由来する NS13-007 株では Y、R、通常の上気道炎に由来する NS13-008 株は Y、M であった。この組合せの違いは、これら株間の *in vitro* における増殖性状及びアポトーシス誘導能の差異並びにこれらの株が由来する疾患病態の程度を反映している可能性を示唆する。今後、これらの株の *in vitro* 増殖性状に関する reverse genetics による検証並びにアポトーシス誘導能について検証する必要があるものと思われる。また、劇症型新生児心筋炎由来株の臓器特異性を確認するために心筋細胞における増殖性に関する検証実験が進行中である。

劇症型新生児心筋炎由来株の *in vivo* 病原性

劇症型新生児心筋炎由来 NS13-004 株と NS13-005 株、重症呼吸障害由来 NS13-006 株と NS13-007 株および上気道炎由来 NS13-008 株の *in vivo* における病原性の差異について検討した。即ち、 10^3 CCID₅₀/10 μ l のウイルスを生後 24 時間以内の乳呑み ddY マウスに ic 接種した

ところ、NS13-004 株と NS13-005 株を接種したマウスは感染後 5 日目までにすべて死亡した。これに対して、NS13-006 株と NS13-007 株ではすべてマウスを死亡させるのにそれぞれ 15 日、16 日を要し、NS13-008 株では感染後 24 日が経過しても約 30%のマウスが生存した。また、CVB2 標準株 Ohio-1 では感染後 24 日目までに死亡するマウスは認められなかった(未発表データ)。即ち、劇症型新生児心筋炎由来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。

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性があるものとする。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

劇症型新生児心筋炎患者から分離したウイルスをはじめ重症感染を惹起した CVB2 のゲノム全長の解析を行ったところ、これらの CVB2 は構造タンパク質領域が CVB2、非構造タンパク質領域が他のエンテロウイルス B に属するウイルスとのキメラウイルスである可能性が強く示唆された。Plaque size、アポトーシスへの関与が示唆されている 2Apro にそれぞれのウイルス増殖性状を反映する可能性のあるアミノ酸置換を伴う塩基置換が認められ

た。乳呑みマウスにおいて劇症型心筋炎由ウイルスが最も強い病原性を示した。

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) 吾郷昌信、森内浩幸、清水博之：コクサッキーウイルス B2 型垂直感染による新生児重症感染例、第 55 回日本臨床ウイルス学会、札幌市、2014 年 6 月

(2) 濱口 陽、吾郷昌信、森内浩幸：コクサッキーウイルス B2 による新生児劇症型心筋炎の 1 例、第 55 回日本臨床ウイルス学会、札幌市、2014 年 6 月

(3) 吾郷昌信、北川由美香、松本文昭、吉川 亮、陣内久美子、森内浩幸、永田典代、清水博之、森田公一：劇症型新生児心筋炎を惹起したコクサッキーウイルス B2 型の性状解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜市、2014 年 11 月

(4) 石崎有澄美、市村 宏、吾郷昌信：北部ベトナム地域における手足口病 重症例の臨床及びウイルス学的解析、第 57 回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第 84 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、岡山市、2014 年 11 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

Tissue	Virus yeild (PFU/g tissue)	(1) / (2)
Myocardial tissue (1)	1.1 x 10⁸	
Liver (2)	1.5 x 10³	73,333
Lung	<5.0 x 10³	
Cerebrospinal fluid	<50	

Table 1. Quantitation of coxsackievirus B2 in myocardial tissue and other organs of severe neonatal myocarditis patient

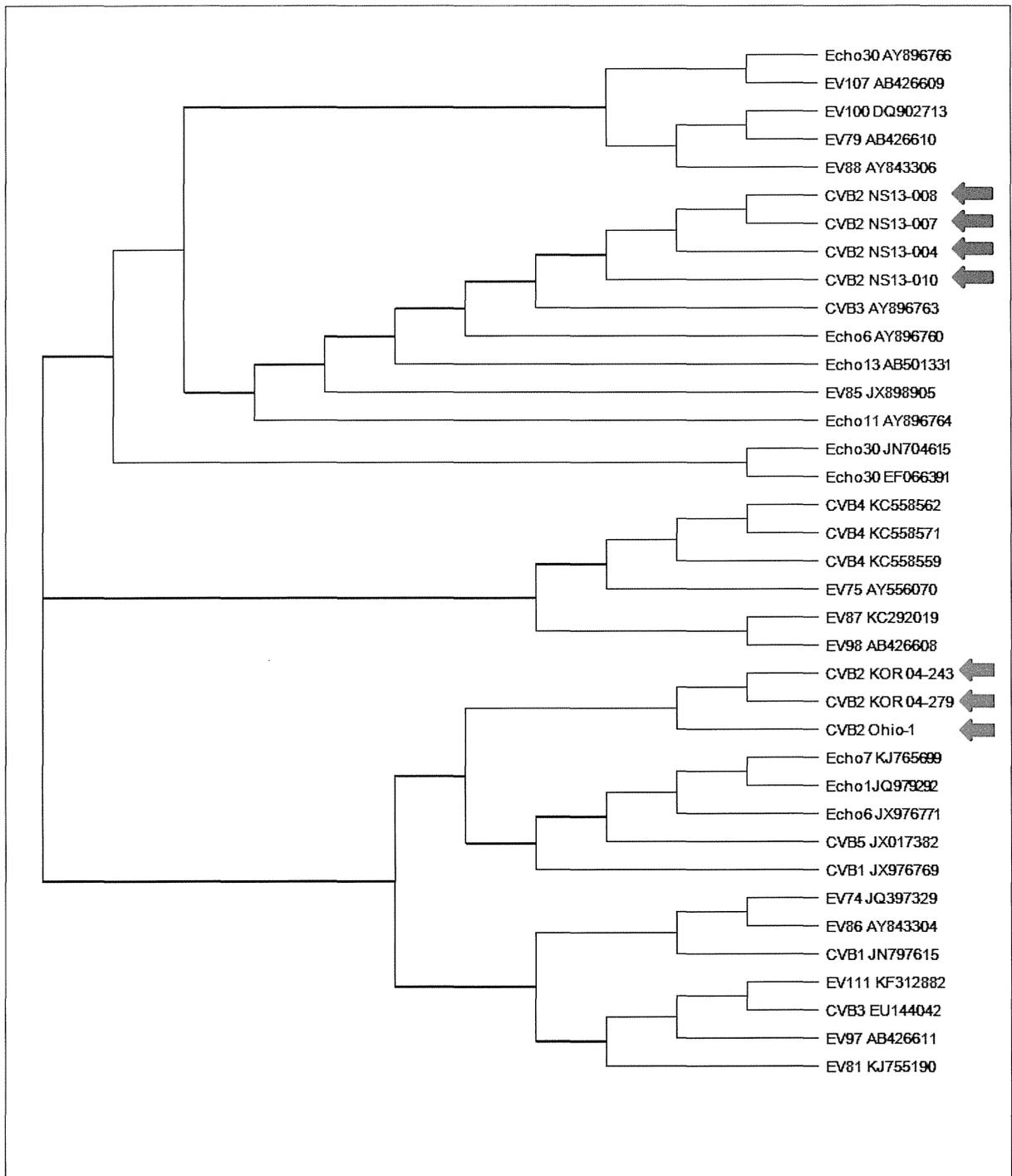


Fig. 1 Phylogenetic analysis of non-structural protein coding region and 3'-UTR

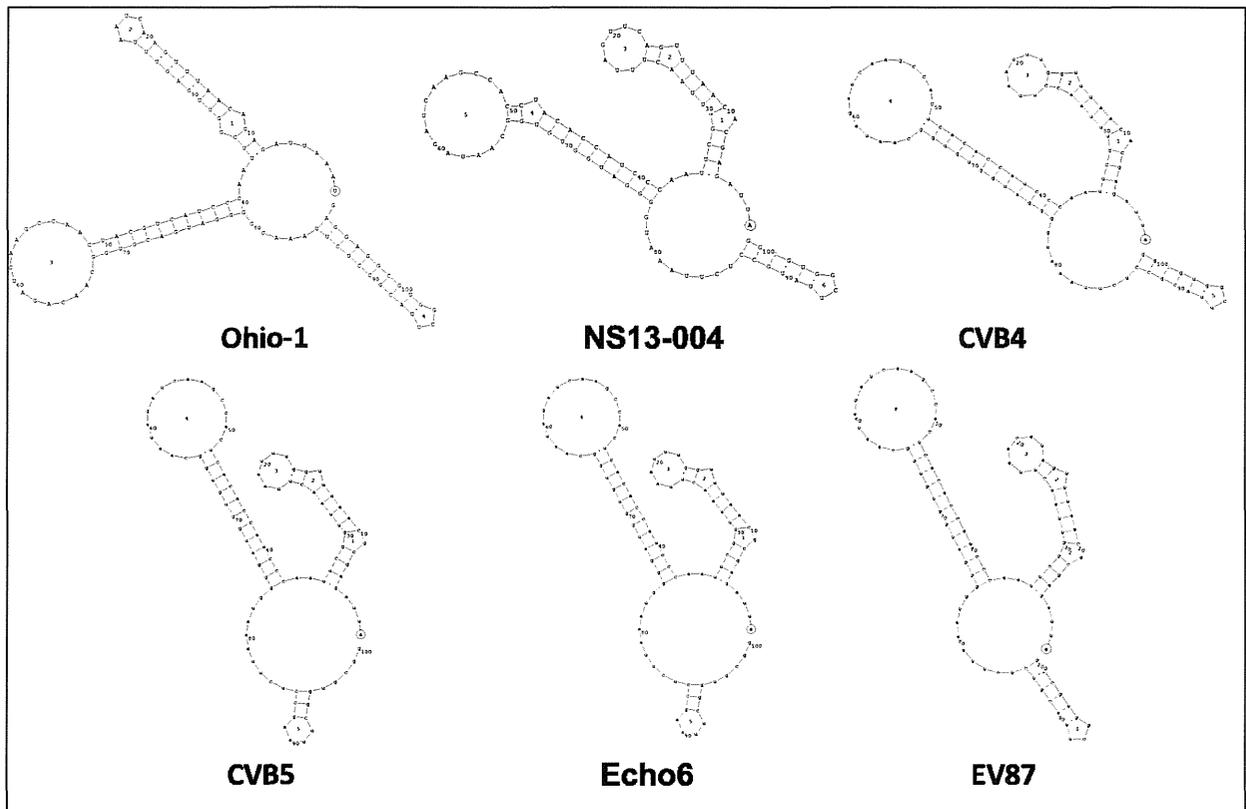


Fig. 2 Predicted RNA secondary structure of 3'-UTR of *Enterovirus B*

CVB2 Strain	Times of one-step growth	Burst size (PFU/cell)
Ohio-1 (prototype)	5 hrs	466.7
NS13-008 (TS)	6 hrs	50.0
NS13-007 (CFS)	7 hrs	173.3
NS13-004 (Myc)	7 hrs	41.6
NS13-010 (Myc)	7 hrs	34.5

Cell; HeLa MOI=7-10 PFU/cell

Table 2. Single cycle replication of coxsackievirus B2 clinical isolates in HeLa cell

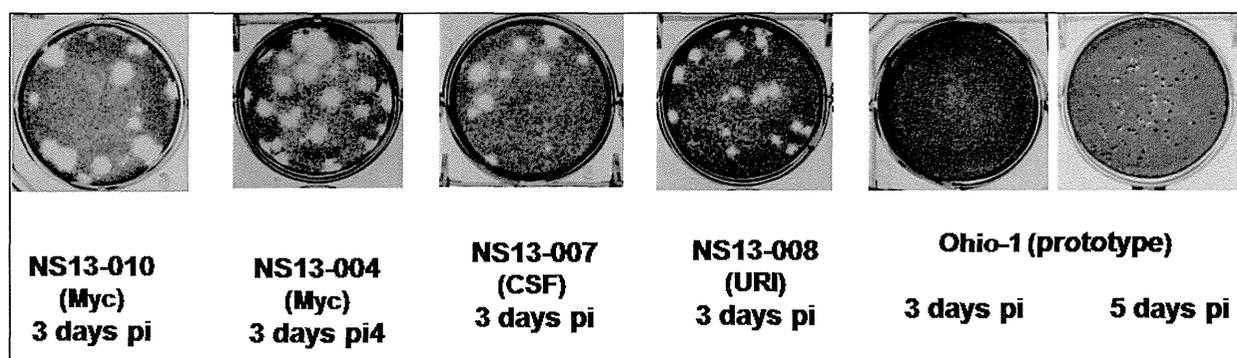


Fig. 3. Plaque formation of coxsackievirus clinical isolates in HeLa cell

NS13-004	1	GQQSGAIYVGNYRVVNRHLAT ^H NDWQNCVWEDYNRDLLVSTTTAHCDDVIARCQCATGVY	60
NS13-010	1	GQQSGAIYVGNYRVVNRHLAT ^H NDWQNCVWEDYNRDLLVSTTTAHCDDVIARCQCATGVY	60
NS13-008	1	GQQSGAIYVGNYRVVNRHLAT ^H NDWQNCVWEDYNRDLLVSTTTAHCDDVIARCQCATGVY	60
NS13-007	1	GQQSGAIYVGNYRVVNRHLAT ^H NDWQNCVWEDYNRDLLVSTTTAHCDDVIARCQCATGVY	60
NS13-004	61	FCASRNKHYPVSFEGPGLAEVQSESEYYP ^R RYQSHVLLAAGFSEPGDCGGILRCEHGVIGL	120
NS13-010	61	FCASRNKHYPVSFEGPGLAEVQSESEYYP ^R RYQSHVLLAAGFSEPGDCGGILRCEHGVIGL	120
NS13-008	61	FCASRNKHYPVSFEGPGLAEVQSESEYYP ^R RYQSHVLLAAGFSEPGDCGGILRCEHGVIGL	120
NS13-007	61	FCASRNKHYPVSFEGPGLAEVQSESEYYP ^R RYQSHVLLAAGFSEPGDCGGILRCEHGVIGL	120
NS13-004	121	VTMGGEGIVGFADVRDLLWLEDDAMEQ	147
NS13-010	121	VTMGGEGIVGFADVRDLLWLEDDAMEQ	147
NS13-008	121	VTMGGEGIVGFADVRDLLWLEDDAMEQ	147
NS13-007	121	VTMGGEGIVGFADVRDLLWLEDDAMEQ	147

Fig. 4. Amino acid sequence alignments of 2Apro of CVB2 clinical isolate

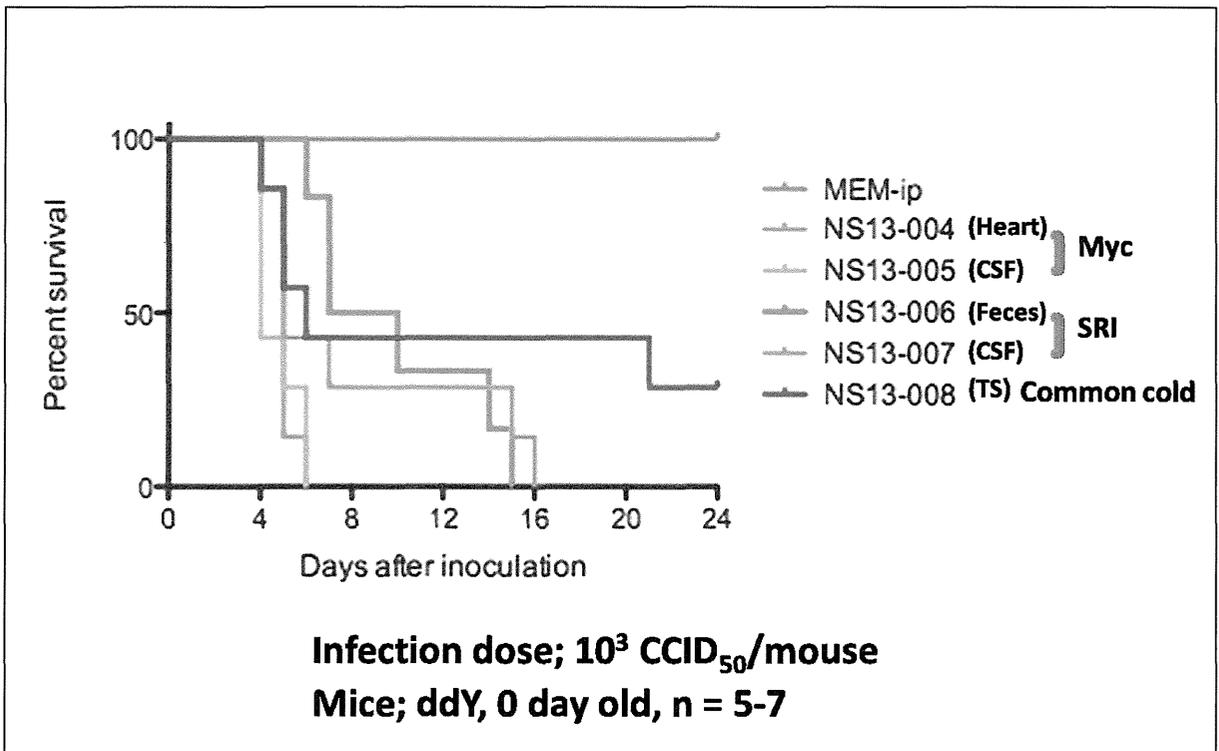


Fig. 5. Pathogenicity of CVB2 clinical isolates in suckling mice

平成 26 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 H25-振興一般-012」

研究報告書

埼玉県西部地域で 2014 年に検出されたヒトパレコウイルス 3 型

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

2014 年日本各地でヒトパレコウイルス (Human Parechovirus, HPeV) 3 型の流行が報告された。埼玉県西部地域においても例外でなく、特に新生児で HPeV 感染を疑う重症例が多く入院となった。疑い症例の髄液、咽頭拭い液、血清、および直腸拭い液から HPeV 5'UTR 領域および VP1 領域の RT-PCR 法を施行し、5'UTR PCR 法陽性検体のウイルス分離を試みた。疑い症例 6 名のうち 4 名の検体で 5'UTR 領域 PCR 法陽性となり、うち 3 名の検体の VP1 領域塩基配列から HPeV3 と同定した。2 名の咽頭拭い液、直腸拭い液から HPeV3 が分離された。VP1 領域 650bp の系統樹解析では 2008 年山形で分離された株と近縁であることが判明した。

A. 研究目的

HPeV は HPeV1~16 の遺伝子型に分類され (<http://www.picornaviridae.com>)、HPeV1~8 および 14 が報告されている。本邦では HPeV1,2,3,4,6 の検出報告があり、主に春から秋に感染する傾向がある。臨床症状は上気道炎、下痢などの消化器症状から HPeV が検出されているが、大半は不顕性感染である。しかし、HPeV3 は脳炎などを起こし重症例が多く報告されている。2014 年は日本で HPeV3 の流行が多く報告されているが、疑い患者からウイルス遺伝子解析とウイルス分離を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 対象と検体

2014 年 5 月～9 月末までの期間に埼玉医科大学小児科を受診した小児患者を対象とした。対象条件として細菌性髄膜炎を否定、インフルエンザウイルス簡易キット陰性、無菌性髄膜炎、ウイルス性脳炎の疑い患者とした。患者のうち家族の同意を得られた患者 6 名から検体が提出され、髄液 4 検体、咽頭拭い液 8 検体、血清 6 検体、直腸拭い液 8 件の計 26 検体を解析に用いた。

2. RT-PCR 法

(1) RNA 抽出

検体から QIAamp Viral RNA mini kit(QIAGEN)を用いて RNA を抽出した。

(2) cDNA 合成と RT-PCR 法

PrimeScriptII High Fidelity RT-PCR kit(TAKARA)の random 6mer を用いて cDNA 合成した。5' UTR 領域の遺伝子検出は Van der Sanden らの方法を引用し、260bp バンドが検出された検体を陽性とした。また、M Itoら (J Clin Virol 2010) の VP1 領域検出法に従い、Semi-nested PCR を行い、約 830bp のバンドが検出された検体を陽性とし、PCR 増幅産物を精製し、ダイレクトシーケンシングを行い、塩基配列を確認した。塩基配列の同定には NCBI Blast 検索を行い、genotype を推定した。

3. ウイルス分離

Vero 細胞を用いて 5'UTR PCR 法陽性検体についてウイルス分離を試みた。細胞変性効果 (CPE) を示したウイルス上清を用いて RT-PCR を施行し塩基配列を決定した。

4. 分離ウイルスの塩基配列同定

NCBI Blast 検索にて近縁のウイルス株配列を元に primer を作成し、RT-PCR を施行した。

PCR 産物を約 500~700bp に設定した primer を用いてダイレクトシーケンシング法で塩基配列を決定した。

5. 系統樹作成

系統樹作成は NCBI に登録されている配列と判読した配列 ClustalX ソフトウェアを用い近隣結合法 (NJ 法) により系統樹を作成した。

(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, 014-101-1)。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

5'UTR PCR 法または VP1 領域 PCR 法で陽性となった患者の年齢と各サンプルでの結果を表に示した。HPeV 遺伝子が検出された患者年齢は生後 1 カ月~1 歳 1 カ月で、うち 3 名が生後 1 カ月であった。4 症例のうち 3 症例で VP1 塩基配列の相同性解析から HPeV3 が同定された。

患者から同定した VP1 領域の塩基配列を系統樹解析するといずれも 2008 年山形で分離された株と近縁であることが判明した (図)。

D. 考察

HPeV3 は愛知県衛生研究所で 1999 年採取の便検体から分離され、その後 2004 年に公表された。病原体検出情報 (ISAR) 平成 27 年 2 月 10 日報告によると 2014 年の HPeV3 の報告数は 308 例で本州、四国および九州で感染が報告された。ISAR の 2005 年から 2014 年の報告件数で 2006 年 52 例、2008 年 81 例、2011 年 225 例であり、2014 年が 308 例と最多であり、この検出件数からみると数年に一度の流行が見られる。2014 年 ISAR の報告患者年齢は月例 1 ヶ月が多く、今回の症例と合致していた。

我々が同定した VP1 領域の塩基配列を系統樹解析すると 2008 年に山形で分離された Yamagata1565/2008 株と 2014 年埼玉で検出した HPeV3 Saitama728/2014 と HPeV3 Saitama907/2014 は近縁であった。水谷ら (J Clin Virol, 2013) は、

Yamagata1565/2008 は筋痛症の成人から分離された1株であることが報告されている。水谷らがこの報告で HPeV3 と筋痛症の関連を示唆したが、筋痛症は B 群エンテロウイルスで起こることが知られている。B 群エンテロウイルスは新生児の無菌性髄膜炎や脳症を起こし、髄液からもウイルス遺伝子が検出される。HPeV3 も脳炎などの症状や髄液からのウイルス遺伝子が検出されることも類似していることから、HPeV3 の重症化等を検討する上で注視したい。

E. 結論

2014 年埼玉でウイルス脳症を起こした

患者から同定された HPeV3 は、2008 年山形で筋肉症の成人から分離された株に近縁であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 町田早苗、清水博之：ヒトパレコウイルス(HPeV)の増殖機構の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜市、2014 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

NO	年齢	性別	入院日	検体採取日	検体	5'UTR PCR法	VP1PCR法	ウイルス分離
1	1歳1ヵ月	M	5月25日	6月6日	咽頭拭い液	+	-	
					便	+	+(HPeV3)	
2	0歳1ヵ月11日	M	7月1日	7月2日	髄液	+	-	
					咽頭拭い液	+	-	
					血清	+	-	
					直腸拭い液	+	-	
3	0歳1ヵ月8日	M	7月25日	7月25日	咽頭拭い液	+	+(HPeV3)	+
					血清	+	+(HPeV3)	
					直腸拭い液	+	+(HPeV3)	+
4	0歳1ヵ月0日	F	9月7日	9月7日	髄液	+	-	
					咽頭拭い液	-	-	
					血清	+	+(HPeV3)	
				9月11日	直腸拭い液	+	-	
					咽頭拭い液	+	+(HPeV3)	
					直腸拭い液	+	+(HPeV3)	+

表 HPeV 遺伝子検出例

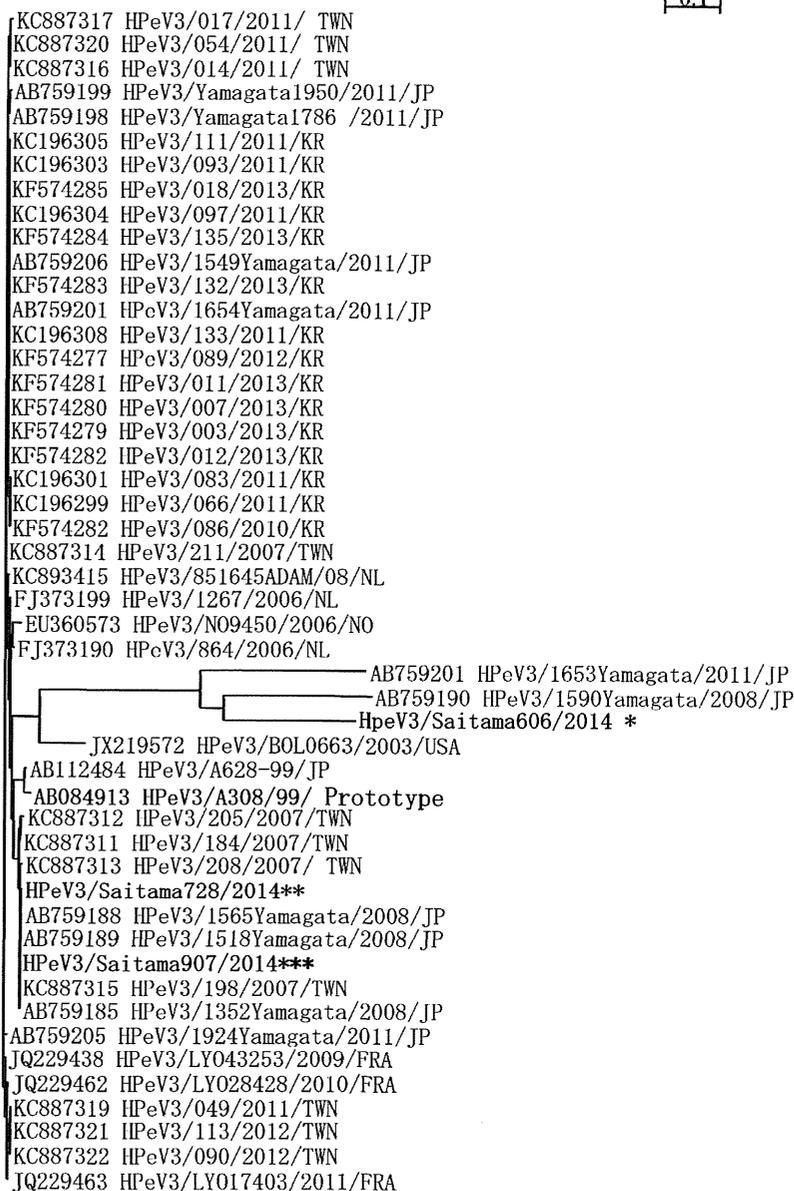


図 HPeV3 VP1 領域の塩基配列に基づく系統樹 (650bp)

*, **, ***; 2014 年埼玉で検出した配列

サフォードウイルスの病理学的診断法に関する研究

-カニクイザルを用いた Saffold virus の神経病原性の病理学的解析-

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

岩田奈織子 国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官

鈴木忠樹 国立感染症研究所 感染病理部 第四室長

研究要旨

Saffold virus はまれに髄膜炎や急性弛緩性麻痺患児から検出される。我々はこのウイルスの病原性を明らかにすることを目的として、無菌性髄膜炎由来あるいは上気道炎由来の分離株を非ヒト霊長類であるカニクイザルに対し静脈内接種し、その病態・病理像を検討した。その結果、いずれの分離株接種群においても中和抗体価の上昇を示した。また、上気道炎由来株接種群では、接種後の血液、咽頭・直腸拭い液でウイルスゲノムが陽性となり、一過性の後肢の握力低下を示した。これらの個体の接種 10 日目の病理解析では、一部の個体で軽度の髄膜炎所見が観察され、弱い神経病原性を有すると考えられた。しかしながら、ウイルス増殖による病態発現の直接的な証明には至らなかった。

A. 研究目的

ヒトカルジオウイルス Saffold virus (SAFV) は主に上気道炎や下痢症状の小児から検出され、まれに髄膜炎や急性弛緩性麻痺患児から検出される。しかし、SAFV の神経病原性の有無については未だ不明である。今年度は、非ヒト霊長類のカニクイザルを用いて SAFV の神経病原性を検討した。

B. 研究方法

ウイルスの調整と動物実験

SAFV の臨床分離株である JPN08-404 株（無菌性髄膜炎患者の髄液由来、以下髄膜炎株）および Gunma/176/2008 株（上気道炎患者の咽頭拭い液由来、以下上気道炎株）を用

いた。SAFV 患者由来 2 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接種液として回収した。なお、患者分離株はそれぞれ、高知県衛生研究所の細見卓司先生、群馬県衛生環境研究所の塚越博之先生から分与いただいた。カニクイザルを計 9 頭（3-4 年齢、オス 4 頭、メス 5 頭、フィリピンより輸入）用い、実験は、3 回に分けて行った。実験 1 として、まず 4 頭を準備し、2 頭に髄膜炎株を静脈内接種し（1 頭あたり 10⁶ CCID₅₀）、残り 2 頭に細胞培養液を接種し対照群とした。10 日間の臨床症状観察後、髄膜炎株接種群のみ解剖を行った。対照群は 4 ヶ月間維持した後、上気道炎株を用いて同様の感染実験を行った（実験

2)。実験3として、5頭を準備し、2頭に上気道炎株を接種し、3頭を対照群として、細胞培養液を接種した。いずれも経時的に採血し、咽頭・直腸拭い液を採取し、ウイルスゲノムの検出に用いた。ウイルス接種群は、いずれも、接種10日目に、過麻酔下で心臓採血により安楽殺し、病理解剖に供した。脳・脊髄を病理学的解析した。

ウイルスゲノムの検出

採取した全血はTRIzol® Plus RNA Purification Kit (Ambion, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA)を用い、各拭い液はRNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いてそれぞれRNAを抽出した。抽出したRNAから、ウイルスゲノムを検出するために、SAFVのウイルスタンパク質1 (VP1) 領域 (Accession No. HQ902242) でプライマーを設計したリアルタイムRT-PCR法を行った。

中和抗体価の測定

経時的に採取した血清を用いて、それぞれの接種ウイルスに対する血清中の中和抗体価をLLC-MK₂細胞を用いて測定した。

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)を用いた。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) (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。(倫理面への配慮)

なお、本動物実験は、国立感染症研究所の動物実験委員会に承認された実験計画に従って実施した。

C. 研究結果

髄膜炎株接種後、2頭とも一過性の水溶性軟便を呈し、接種3日目以降に中和抗体価の上昇が観察されたが、各拭い液と血液においてウイルスゲノムは検出されなかった。また、10日目の病理組織像に著変はなかった。一方、上気道炎株接種群では接種3日以降の各拭い液からウイルスゲノムが検出された。さらに、全頭において、接種3~6日に後肢の握力低下がみられ、接種1週間以降に中和抗体価は明らかに上昇した。また、上気道炎株接種群のうち2頭の中樞神経系の血管周囲あるいは髄膜に軽度の細胞浸潤がみられ(図)、髄膜炎と判断した。しかしながら、いずれの部位においてもウイルス抗原は検出されなかった。以上の結果を表にまとめた。

D. 考察

SAFV分離株を接種したサルはいずれも中和抗体の上昇がみられたことから、カニクイザルに対して感染性を有すると考えられた。上気道炎株は、髄膜炎株に比べてサル由来培

養細胞での増殖率が良く、今回の結果は、*in vitro*での結果と相関した(データは示さない)。上気道炎株は、静脈内接種後、各拭い液、血中にウイルスゲノムが検出され、解剖時のリンパ節、扁桃、脾、腸管、中枢神経系からウイルスゲノムが検出されたことから(データは示さない)、リンパ系組織でウイルスが増殖し、その後、中枢神経系に侵入したと推察した。後肢の握力低下と髄膜炎は中枢神経系に侵入したウイルスに起因すると考えられるが、明らかな神経向性を証明するには至らなかった。また、咽頭拭い液および直腸拭い液からウイルスゲノムが検出されたことは、ヒトのSAFV排泄経路に類似すると考えられ、今回の結果は本ウイルスのヒトにおける病態・病理を解明する上で重要な知見である。

E. 結論

SAFVはサルに対し感染性を有し、上気道炎患者由来株は、弱い神経病原性を発揮した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N: Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis

of enterovirus infections. *Neuropathology* doi: 10.1111/neup.12171, 2014

2. 学会発表

1. 片岡 周子、西村 順裕、小谷 治、鈴木 忠樹、岩田 奈織子、網 康至、永田 典代、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免疫学的解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市、2014 年 11 月

2. 小池 智、藤井 健、Tanel Mahlakoiiv、Peter Staeheli、永田 典代：Role of type III Interferon in intranasal infection of poliovirus in PVR transgenic mice. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市、2014 年 11 月

3. 吾郷 昌信、北川 由美香、松本 文昭、吉川 亮、陣内 久美子、森内 浩幸、永田 典代、清水 博之、森田 公一：新生児重症感染を惹起したコクサッキーウイルス B2 型の性状解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市、2014 年 11 月

4. 小谷 治、藤井 健、鈴木 忠樹、岩田 奈織子、網 康至、須崎 百合子、長谷川 秀樹、田口 文広、清水 博之、永田 典代：カニクイザルを用いた Saffold virus の神経病原性の病理学的解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市、2014 年 11 月

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし。

表 サフォードウイルス静脈内接種後の臨床症状とウイルスゲノムの検出結果

接種ウイルス	細胞培養液	上気道炎株	髄膜炎株			
動物番号	5172, 5173, 5200, 5201, 5202	5170, 5171	5172	5173	5203	5204
臨床症状 (発症日)	無症状	水溶性下痢 (2日目)	後肢 握力低下 (3-6日目)	後肢 握力低下 (4日目)	後肢 握力低下 (3-5日目)	後肢 握力低下 (3-6日目)
ウイルスゲノムの検出						
血液 (検出陽性日)	-	-	-	+	+	+
咽頭拭い液 (検出陽性日)	-	-	+	+	+	+
直腸拭い液 (検出陽性日)	-	-	+	+	+	+
中和抗体価	8倍以下	32倍	256倍以上	128倍	未検査	未検査
髄膜炎組織所見	未検査	なし	あり	あり	未検査	未検査

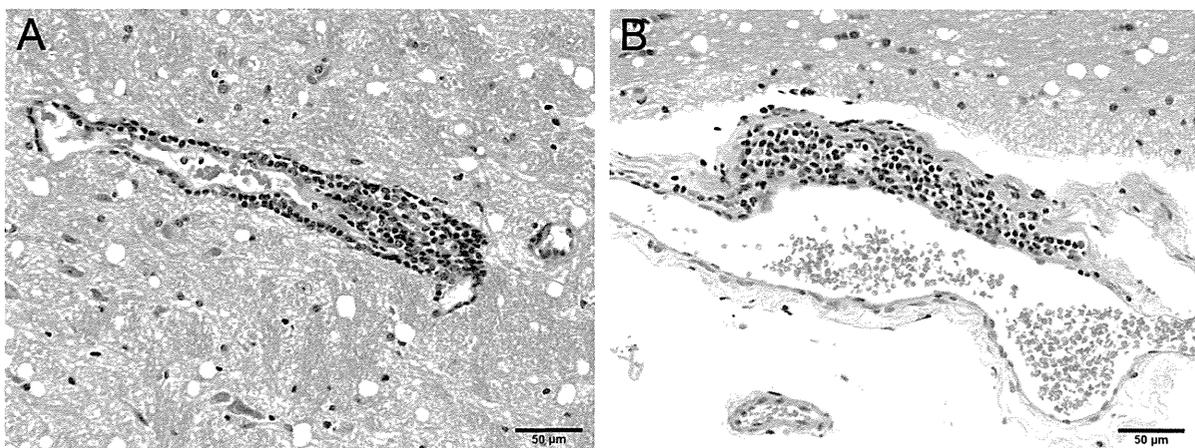


図 UR株接種10日目の脳組織像。A. 動物番号5172、中脳実質の中静脈周囲に単核系細胞浸潤が認められる。B. 動物番号5173、延髄の髄膜の動脈周囲に単核系細胞浸潤がみられる。

Saffold ウイルス感染受容体同定の試み

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である Saffold ウイルス (SAFV) は、エンテロウイルス等と同様、主に胃腸炎の便から検出されるが、稀に無菌性髄膜炎や脳炎さらには膵炎からも検出されており、多発性硬化症モデルや糖尿病モデル作出に用いられるマウスカルジオウイルスと同様の病原性を持つことが懸念される。しかし、そのヒトに対する具体的な病原性は、依然不明のままである。これまでに筆者らは、SAFV の神経および膵臓に対する病原性の可能性を提唱し疫学的な調査を行ってきたが、検体収集の困難さ等が律速となり、解析に限界が出始めている。そこで本年度は、組織別の感染受容体発現解析から SAFV の臓器親和性を明らかにすること、ならびに SAFV 感染モデル動物の作出を目的として、SAFV の感染受容体の同定を試みた。同定には至っていないが、種々の解析手法から候補となる分子が複数挙がっており、個々の分子についての詳細な解析を継続中である。

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、具体的なヒト病原性の同定には至っていない。その一方で、無菌性髄膜炎患者の髄液からの SAFV 分離や、死亡例を含む脳炎患者の髄液からの SAFV 遺伝子の検出、重症急性膵炎患者の便からの SAFV 分離など、マウスカルジオウイルス（マウスに脳炎や膵炎を引き起こす）と同様の病原性を示唆する例が、少数ではあるが報告されている。そこで私たちはこれまでに、多発性硬化症を主とした神経疾患ならびに 1 型糖尿病を対象とした疫学的な解析を実施し、多発性硬化症および 1 型糖

尿病患者の末梢血単核球における SAFV 持続感染の可能性を報告してきたが、残念ながら解析規模が小さく断定するには至っていない。また、これ以上の大規模な疫学的解析は困難な状況である。

そこで本年度は、感染受容体の臓器別分布を解析することから SAFV の臓器親和性（標的臓器）を解明すること、ならびに、SAFV 感染動物（マウス）モデルを作出し SAFV の病原性を詳細に解析することを目的とし、感染受容体の同定を試みた。

B. 研究方法

SAFV 感染受容体を同定するために 3 種の手法で候補分子をスクリーニングした。

1) SAFV 感受性細胞 (HeLa 細胞) から

作製した cDNA ライブラリーを、SAFV 非感受性細胞である BHK 細胞に一過性にトランスフェクトした。その後、SAFV-GFP キメラウイルス(感染後に GFP を発現する)を接種し、翌日 GFP を発現している細胞を SAFV 感受性獲得細胞として蛍光顕微鏡下で観察しながら、手動で回収単離した。この細胞に導入されている HeLa 細胞由来 cDNA を RT-PCR により同定し、SAFV 感染受容体としての候補分子を選出した。次に、選出された候補分子に対する抗体で SAFV 感受性 HeLa 細胞を処理することにより、SAFV 感染が抑制されるか否かを解析し、受容体としての可能性を個別に解析した。

2) 私たちは、HeLa 細胞の SAFV 感受性が培養時の血清の違いにより変化し、さらに、その感受性の違いは、細胞表面での感染受容体発現量の違いに起因していることをウイルス結合アッセイにより明らかにし、報告した。そこで、この性質に着目し、SAFV 低感受性 HeLa 細胞(仔ウシ血清で培養)と SAFV 高感受性 HeLa 細胞(胎児ウシ血清で培養)における膜タンパクの発現差異を DNA マイクロアレイにより解析した。得られた遺伝子情報を基に、各遺伝子(55 遺伝子)をサブクローニングし、ランダムにグループ分けして SAFV 非感受性である BHK 細胞に共発現させることで、感受性獲得の有無を解析した。

3) エンテロウイルス 71 の受容体同定に用いられた手法に倣い、SAFV 高感受性 HeLa 細胞の genomic DNA を SAFV 非感受性 BHK 細胞に導入した安定発現株を作製し、SAFV-GFP を接種することで GFP の発現を指標に、感受性を獲得したクローンを 290,000 クローンからスクリーニングした。

C. 研究結果

1) SAFV-GFP 接種後、GFP 陽性を示した 50 個の細胞について、各々を単離し導入されている cDNA を決定した。その結果、beta-2-microglobulin (8 クローンから検出)をはじめとする 20 種の候補遺伝子が同定された。そこで、これらの分子に対する抗体で SAFV 感受性 HeLa 細胞を処理した後に SAFV を接種して、SAFV 感染に対する抑制効果を解析した(ブロックアッセイ)が、いずれにおいても SAFV の感染は抑制されず、SAFV 感染受容体の同定には至らなかった。

2) DNA マイクロアレイ解析の結果、SAFV 高感受性 HeLa 細胞で 3 倍以上高発現している膜タンパクとして 57 の分子が挙げられた。これらの分子の各 cDNA を各々サブクローニングし、ランダムにグループ分けして SAFV 非感受性細胞に共発現させたところ、7 つの遺伝子の組み合わせ【Ras association domain family member 5 (RalGDS/AF-6), IL-27 receptor alpha (IL27RA), receptor activator of NF-kB (TNFRSF11A), desmocollin 2 (DSC2), platelet/endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1), odd Oz/ten-m homolog 3, chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4)】で発現させた細胞において、SAFV-GFP の感染が確認された。しかしながら、各々個別の発現系では、SAFV の感染は認められなかった。

3) SAFV 高感受性 HeLa 細胞の genomic DNA を導入した BHK 細胞 290,000 クローンに、各々個別に SAFV を接種したところ、2 つのクローンにおいて細胞変性効果様の変化が認められた。この変化が本当にウイ

ルス感染によるものなのか否かを解析するためにウイルス増殖の解析を試みたが、細胞の継代培養により細胞変性効果は見られなくなった。凍結保存細胞から再度の検討を行う予定である。

D. 考 察

SAFV 感染受容体の同定を目指し、3つの方法でその同定を試みたが、残念ながら同定には至らなかった。抗体によるブロッキングアッセイでは、ウイルス結合部位への市販抗体の結合は不明であるため、RNAiを用いたノックダウン等による再検討も必要である。また、DNA マイクロアレイによるスクリーニング系からは、SAFV 感染が単一分子を介したものではない可能性も示唆され、より綿密な検討が必要であると考えられた。さらに、genomic DNA を用いた解析においても感受性獲得を示唆する細胞変性効果が確認されたことから、SAFV 感染受容体の同定は不可能なものではないと期待される。しかしながら、これらすべての結果から、SAFV 感染受容体は、単一分子ではなく複合体として存在している可能性も考えられ、また、非感受性細胞への安定発現も困難である可能性が考えられるため、今後はより綿密かつ慎重にスクリーニング系を進めていく必要がある。

E. 結 論

本研究により、SAFV 感染受容体として考えられる候補分子がいくつか挙げられたが、その同定には至らなかった。引き続きこれらの候補分子を中心に解析を進め、SAFV 感染受容体の同定を目指したい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

A.Shimizu, T.Himeda, T.Okuwa, Y.Muraki, Y.Ohara : Role(s) of Leader protein of Saffold virus., Clin. Exp. Neuroimmunol., 5: 362-366, 2014.

大原義朗, 森田明彦 : 医学と医療の最前線 脳髄膜炎の遺伝子診断, 日内会誌, 103: 1942-1947, 2014.

Y.Ohara : Cell-to-cell- transmission in the pathogenesis of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, Clin. Exp. Neuroimmunol., 5: 117-119, 2014.

Y.Ohara : Fingolimod effects as a neuroprotectant as well as an immunosuppressant., Clin. Exp. Neuroimmunol., 5: 281-282, 2014.

2. 学会発表

大原義朗 : 忘れ去られていく風土病－野兔病の過去と現在－, 第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会・第 26 回日本神経免疫学会学術集会合同学術集会, 金沢, 2014 年 9 月

姫田敏樹 : Saffold virus の病原性解明～ウイルス学的及び疫学的解析～, 第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会・第 26 回日本神経免疫学会学術集会合同学術集会, 金沢, 2014 年 9 月

大原義朗, 今野秀彦, 野島孝之, 姫田敏樹, 大桑孝子, 村木 靖: 1型糖尿病患者の脳内に認められた抗 Saffold ウイルス抗体染色性, 第55回日本神経病理学会学術集会, 東京, 2014年6月

姫田敏樹, 齊藤峰輝, 大桑孝子, 村木 靖, 谷浦直子, 大原義朗: タイラーウイルス非構成蛋白の機能解析から示唆される細胞死制御機構, 第18回日本神経ウイルス研究会, 浜松, 2014年6月

武田和也, 姫田敏樹, 大原義朗, 中村晃: タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス感染における形質細胞様樹状細胞の役割, 第19回日本神経感染症学会総会学術集会・第26回日本神経免疫学会学術集会合同学術集会, 金沢, 2014年9月

清水愛, 炭谷要子, 川村沙由美, 姫田敏樹, 大原義朗, 山田正仁: Saffold ウイルス L 蛋白の機能解析, 第19回日本神経感染症学会総会学術集会・第26回日本神経免疫学会学術集会合同学術集会, 金沢, 2014年9月

姫田敏樹, 大桑孝子, 村木 靖, 大原義朗: 1型糖尿病剖検における抗 Saffold ウイルス抗体染色性, 第62回日本ウイルス学会, 横浜, 2014年11月

塩浜康雄, 姫田敏樹, 大桑孝子, 村木 靖, 谷浦直子, 大原義朗, 齊藤峰輝: タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス非構成蛋白 L および L*による細胞死制御機構, 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014年11月

姫田敏樹, 大桑孝子, 村木 靖, 大原義朗: 1型糖尿病を対象とした Saffold ウイルス感染の検索, 第68回日本細菌学会東北支部総会, 仙台, 2014年8月

姫田敏樹, 大桑孝子, 朝倉邦彦, 大原義朗: Saffold ウイルス L 蛋白の役割, 第51回日本細菌学会中部支部会, 金沢, 2014年10月

姫田敏樹, 大原義朗: SAFV 感染受容体同定の試み, 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班会議, 東京, 2014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

平成 26 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 phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P)が産生されることが AiV ゲノム複製に重要であ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 により、コレステロール輸送タンパク質 oxysterol-binding protein がリクルートされ、ウイルス複製部位にコレステロールを蓄積させていることを明らかにした。

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複製部位に産生された PI4P により、コレステ

ロール輸送タンパク質 oxysterol-binding protein (OSBP)がリクルートされ、ウイルス複製部位にコレステロールを蓄積させていることを明らかにした。

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の一つ、OSBP の AiV ゲノム複製への関与の有無を調査するために、small interfering RNA 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。また、OSBP やウイルスタンパク質、dsRNA の細胞内局在を免疫染色により解析した。細胞内のコレステロールは、蛍光性のコレステロール結合抗生物質、filipin III により染色した。さらに、OSBP によるコレステロール輸送の阻害剤である