

平成 31 年 4 月 15 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08511

研究課題名(和文) 豚・心筋親和性ウイルスの新規持続感染動物モデルの作出と重症・劇症化機序の解明

研究課題名(英文) Development of animal models for study on persistent infection with  
pancreatropic and cardiotropic picornaviruses

研究代表者

永田 典代(Nagata, Noriyo)

国立感染症研究所・感染病理部・室長

研究者番号：30270648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：コクサッキーウイルスB感染症は慢性あるいは急性の糖尿病や心筋炎を引き起こすが、その病態は不明である。われわれは、最近分離されたコクサッキーウイルスB2と免疫不全マウスを利用し、持続感染モデルを作出した。免疫不全マウスにこのウイルスの分離株を静脈内接種したところ、体重減少を示したが3ヶ月以上生存した。免疫不全マウスでは観察期間中、長期にわたって便中と血中に感染性ウイルスが維持されたが、これらの個体は膵炎と心筋炎が遷延していたことが明らかとなった。この動物モデルはコクサッキーウイルスBの持続感染の病原性を理解する上で有用である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コクサッキーウイルスB群は慢性あるいは急性の糖尿病や心筋炎を引き起こすことが知られているが、その病態病理は不明のままである。我々は、最近分離されたコクサッキーウイルスB2と免疫不全マウスを利用し、持続感染モデルを作出した。この動物モデルを応用することにより、これらのウイルスによって引き起こされる慢性疾患や持続感染症の発症メカニズムの理解や治療法を検討することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Coxsackievirus B infection causes acute/chronic diseases such as diabetes and myocarditis; however, the pathogenesis is unclear. Here, we developed an immunodeficient mouse model of persistent infection with recent CVB2 isolates. Immunodeficient mice received CVB2 isolates via the intravenous route and showed transient body weight loss, but survived more than three months. Infectious virus was detected in feces and sera. Histopathological examination revealed that pancreatitis and myocarditis were prolonged in these animals. This animal model will increase our understanding of the pathogenesis of persistent CVB infection.

研究分野：ウイルス学、感染病理学

キーワード：ピコルナウイルス 豚親和ウイルス 筋親和ウイルス 持続感染 動物モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

ピコルナウイルスは殆どが乳幼児期に感染し、消化器症状や上気道炎症状を示す患児から検出されるが、まれに劇症型心筋炎や急性膵炎、あるいは脳脊髄炎の原因となる。一方で、急性炎症後に持続感染し、なんらかの宿主応答によって引き起こされる重症心筋炎や膵炎に起因する糖尿病が知られており、これらの疾患モデル動物は我が国のウイルス感染症研究分野ではほとんど検討されていない。また、申請者らは、実際に心筋炎等の組織材料を病理学的に検討し、その病因病原体検出が困難なことを経験してきた。よって、このウイルス感染症の劇症化・重症化にいたるまでの機序は不明である。先行研究の結果、ピコルナウイルス科のエンテロウイルス属コクサッキーウイルス B 群 2 型(CVB2) とカルジオウイルス属サフォードウイルス(SAFV) は、マウスの中枢神経系の他、心筋、膵にも強い親和性を示し、中和抗体上昇後にも持続感染することが明らかとなった。

#### 2. 研究の目的

本研究では、ピコルナウイルス感染症のうち、心筋炎や膵炎に着眼し、その劇症化・重症化に関わる宿主側、ウイルス側要因を明らかにする事を目的とした。具体的には、マウスの心筋、膵に親和性を示す、CVB2 と SAFV 3 型を利用し、全く新しい持続感染動物モデルを作出し、重症心筋炎・膵炎発症に関与する要因を明らかにすることとした。

#### 3. 研究の方法

国内で分離された CVB2 と SAFV 3 型を使用し、持続感染マウスモデルの作出を試みることにした。

(1) CVB2 患者分離株を選択した。種々の臨床症状を示した患者由来の CVB2(16 株) を新生仔 ddY マウスに脳内あるいは腹腔内接種し、膵、心筋に対する病原性を比較・解析した。本目的に必要な分離株を数株選択し、BALB/c マウスに経粘膜感染(経口あるいは経鼻)し、ウイルス学的、病理学的解析を行い、膵、心筋に親和性を示す株を選択した。次に、選択した CVB2 患者分離株を用いて(必要に応じて NOD/SCID マウスも利用し)、ウイルスの体内動態と膵、心筋のウイルス増殖とそれに伴う病変を検討した。

(2) SAFV 3 を BALB/c マウスと NOD/SCID マウスに経粘膜感染(経口あるいは経鼻)し、ウイルス学的、病理学的解析を行い、ウイルスの体内動態と膵、心筋のウイルス増殖とそれに伴う病変を検討し、持続感染の有無を検討する。また、それぞれの動物の膵、心からウイルス RNA を抽出し、ウイルスゲノム配列を比較解析する。

#### 4. 研究成果

(1) 様々な臨床症状を呈した CVB2 感染患者由来株を複数株用いて、新生仔マウスの脳内あるいは腹腔内接種し各臓器に対する親和性と病原性を比較解析した。病理学的解析の結果、粘膜上皮、膵および心筋に特に強い親和性を発揮した株が認められた。そのうち、上皮感染株と非感染株を選出し、これを成 BALB/c マウスに経粘膜的に接種したところ、株によって異なる病態と感染性を示し、異常行動(闘争に類似)を示すものがみられた。

(2) 上皮感染株を経鼻接種し異常行動を示した成マウスを経時的に病理学的解析したところ、ウイルスは鼻粘膜上皮、嗅上皮に感染伝播し、嗅球の大型神経細胞に感染し嗅球に強い炎症を引き起こしたことが判明した。興味深い事に、これらの個体の大脳皮質や脳幹実質で明らかな炎症所見は見られなかった。一方、これらのマウスでは一定の割合で、膵に病変が認められた(5%程度)が、心筋親和性を示唆する所見は認められなかった。よって、本研究で用いた経粘膜感染モデルは、現状において膵・心筋発症モデルとして不十分であると考えられた。

(3) そこで、ウイルス血症モデルを利用し、CVB2 臨床分離株の成マウスに対する膵・心筋親和性を評価した。具体的には、ヒトに心筋炎を引き起こした CVB2 分離株を免疫不全状態の NOD/SCID および免疫正常である BALB/c 成マウスに対して静脈内接種した。いずれの動物も 8 日前後をピークとして一過性の体重減少を示したが、いずれもいったん回復傾向を示し、接種後 3 ヶ月以上生存した。しかしながら、観察期間中、長期にわたって NOD/SCID マウスの便中と血中に感染性ウイルスが維持されたことがわかり、3 ヶ月以降に徐々に体重が減少していく個体があった。また、観察期間終了時の病理学的解析により、これらの個体は膵炎と心筋炎が遷延していたことが明らかとなった。一方、BALB/c においては膵組織で脂肪浸潤あるいは置換が認められ、感染早期の一過性の急性膵炎が示唆された。接種後の体重はいったんは回復したものの、対照群に比べると比較的低体重であった。心筋に著変は認められなかった。以上のことから、宿主の免疫不全状態は CVB2 の膵、心組織において持続感染を引き起こすことが判明した。

(4) SAFV 3 の上気道炎患者由来株は、免疫不全マウス NOD/SCID において経鼻感染後に

ウイルス血症を発症し、脾、心に強い親和性を示した。しかしながらその後、脾炎や心筋炎を発症することなく、およそ2ヶ月経過してからウイルス感染による全身の骨格筋炎を発症した。病理組織学的には好中球と単球の浸潤が中心であった。

(5) SAFV 3 の病理学的解析に必要な抗ウイルス抗体の作出を試みた。大腸菌タンパク発現系を利用し SAFV 3 の殻タンパク VP1 と GST の融合タンパク質を作製し、これを抗原として高度免疫ウサギ血清を得た。得られた抗体は、感度、特異性共に十分であり、今後、マウスにおける感受性細胞の詳細な検討を行うことが可能となった。

(6) 一方で、SAFV 3 上気道炎患者由来株を新生仔 ddY マウスに脳内接種すると脊髄に脱髄様病変を形成し長期に個体に対して影響することに着眼した。経時間的变化と宿主の免疫背景を検討するために、ddY 系統と BALB/c 系統マウスでの病変形成を比較したところ、BALB/c マウスでは脊髄へのウイルス感染の波及は認められたものの、脱髄病変形成に乏しいことが明らかとなった。よって、脱髄病変形成における宿主側因子の関与が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Nakauchi M, Nagata N, Takayama I, Saito S, Kubo H, Kaida A, Oba K, Odagiri T, Kageyama T. Propagation of Rhinovirus C in Differentiated Immortalized Human Airway HBEC3-KT Epithelial Cells. *Viruses*. 2019 年 3 月 doi: 10.3390/v11030216.

Fujii K, Sudaka Y, Takashino A, Kobayashi K, Kataoka C, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Kotani O, Ami Y, Shimizu H, Nagata N, Mizuta K, Matsuzaki Y, Koike S. VP1 amino acid residue 145 of enterovirus 71 is a key residue for its receptor attachment and resistance to neutralizing antibody during cynomolgus monkey infection. *Journal of Virology* 2018 年 5 月

Kotani O, Suzuki T, Yokoyama M, Iwata-Yoshikawa N, Nakajima N, Sato H, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Intracerebral inoculation of mouse-passaged Saffold virus type 3 affects cerebellar development in neonatal mice. *Journal of Virology* 2016 年 8 月

Kotani O, Naeem A, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Nakajima N, Hosomi T, Tsukagoshi H, Kozawa K, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Neuropathogenicity of Two Saffold Virus Type 3 Isolates in Mouse Models. *PloS one* 11(2) e0148184 2016 年

Koike S, Nagata N. A Transgenic Mouse Model of Poliomyelitis. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1387 129-144 2016 年

Kataoka C, Suzuki T, Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Nagata N, Ami Y, Wakita T, Nishimura Y, Shimizu H. The Role of VP1 Amino Acid Residue 145 of Enterovirus 71 in Viral Fitness and Pathogenesis in a Cynomolgus Monkey Model. *PLoS pathogens* 11(7) e1005033 2015 年 7 月

[学会発表](計11件)

Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Doan YH, Shimizu H, Hasegawa H. Pathogenicity of recent Coxsackievirus B2 isolates in adult mice. EUROPIC 2018, 20th International conference on picornaviruses. 2018 年 6 月。オランダ

Miyazaki M, Saito H, Shibata C, Doan YH, Arao Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N. Development of a flaccid paralysis mouse model after infection with Enterovirus D68. EUROPIC 2018, 20th International conference on picornaviruses. 2018 年 6 月。オランダ

Kotani O, Yokoyama M, Fujii K, Kobayashi K, Nagata N, Shimizu H, Koike S, Sato H. Cis-allosteric regulation of the interaction surfaces of Enterovirus A71 capsid protein by the VP1 single amino acid residue at position 145. EUROPIC 2018, 20th International conference on picornaviruses. 2018 年 6 月。オランダ

Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Doan YH, Shimizu H, Hasegawa H. Murine models of persistent infection by coxsackievirus B2 isolates. 第66回 日本ウイルス学会学術集会。2018 年 10 月。京都。

萩原圭、小谷治、岩田奈織子、長谷川秀樹、清水博之、永田典代. 感染マウスモデルを用いたサフォードウイルスの脱髄病変形成メカニズムの解明. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 2017 年. 10 月. 大阪。

宮崎誠、斎藤博之、柴田ちひろ、YEN HAI DOAN、荒尾雄二郎、岩田奈織子、長谷川秀樹、清水博之、永田典代. エンテロウイルス D68 型感染後の弛緩性麻痺発現マウスモデルの構築. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 2017 年. 10 月. 大阪。

Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Iizuka S, Agoh M, Shimizu H, Hasegawa H. Pathogenicity of recent Coxsackievirus B2 isolates in adult mice inoculated via the mucosal route. 第 64 回日本ウイルス学会 2016 年 10 月. 札幌。

Nagata N, Ushioda W, Nakamura T, Agoh M, Iizuka S, Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Shimizu H, Hasegawa H. Virulence of recent coxsackievirus B2 isolates in a neonatal mouse model. 19th International Picornavirus meeting. 2016 年 09 月. スイス。

Nagata N, Ushioda W, Nakamura T, Iizuka S, Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Shimizu H, Hasegawa H. Utility of a neonatal mouse model for studying coxsackievirus B2. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 2015 年 11 月. 福岡。

Yamada S, Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N. The pathogenesis of a Saffold virus isolate from upper respiratory inflammation in a mouse model. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 2015 年 11 月. 福岡。

Kotani O, Yokoyama M, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Shimizu H, Sato H, Nagata N. A molecular mechanism of adaptive evolution of Saffold virus type 3 in cerebellum of mouse. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 2015 年 11 月. 福岡。

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

該当なし

取得状況(計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：山田祥平

ローマ字氏名：Yamada S.

研究協力者氏名：萩原 圭

ローマ字氏名：Hagiwara K.

研究協力者氏名：宮崎 誠

ローマ字氏名：Miyazaki M.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。