

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究・スタートアップ
 研究期間：2008 年度-2009 年度
 課題番号：20890290
 研究課題名（和文） 重度の急性呼吸器症状を呈する新型レオウイルスのコントロール法の確立に関する研究
 研究課題名（英文） Study about establishment of control method of novel reovirus presenting a serious acute respiratory symptom
 研究代表者 国立感染症研究所・動物管理室・研究員
 酒井 宏治
 研究者番号：70515535

研究成果の概要（和文）：

高熱と急性の呼吸器症状を伴うインフルエンザ様症状を呈し入院した海外渡航者からウイルスが分離された。そのウイルスは、過去 3 例のみ論文報告のある極めて稀なオルソレオウイルスのネルソンベイウイルスに属する新型レオウイルスであった。本研究では、その分離株の性状解析を実施すると共に、インフルエンザや SARS との類症鑑別を視野にいれたウイルス遺伝子検出系および血清学的診断系の開発、動物感染実験を行い、新興感染症としての新型レオウイルスのコントロール法の確立を試みた。

1. 分離株の塩基配列決定：分離株の 4 つの S セグメントの全塩基配列決定を行った。特に、同時期に分離された Kampar ウイルス、HK23629/07 株と非常に近縁であることがわかった。
 2. ウイルス遺伝子検出系の開発：S セグメントの配列情報から、(1) 保存性が高く、(2) 哺乳類レオウイルス及び鳥類レオウイルスに反応せず、(3) ネルソンベイウイルス群特異的なプライマーセットを作製し、RT-PCR での迅速かつ高感度な遺伝子検出システムを構築した。
 3. 血清学的診断系の確立：(1) ウイルス中和試験、(2) 間接蛍光抗体法、(3) 不活化濃縮精製ウイルスを抗原とした ELISA のシステムを確立した。
 4. 動物感染実験：マウス感染実験では致死性の呼吸症状が認められた。カニクイザル感染実験では、急性の呼吸器症状は認められたが、顕著な高熱、致死性は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

We isolated a previously unknown reovirus (named "Miyazaki virus") isolated from a male patient in Japan, who was suffering from high fever and acute respiratory disease at the time of virus isolation. Phylogenetic analysis of the S segment indicated that the isolate belonged to Nelson Bay virus group and was closely related to HK23629/07, isolated from high fever and acute respiratory patient at same time. We developed RT-PCR and quantitative RT-PCR for detection Miyazaki virus, and virus neutralization test and IFA, ELISA for detection of antibodies against Miyazaki virus. In experimental infection, we demonstrated that Miyazaki virus caused pathogenesis of viral pneumonia in the lungs.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|------|-----------|
| 2008 年度 | 1,340,000 | 0 | 1,340,000 |
| 2009 年度 | 1,200,000 | 0 | 1,200,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,540,000 | | 2,540,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：感染症内科学

キーワード：ウイルス、感染症、社会医学、獣医学、動物

1. 研究開始当初の背景

2007年11月に、インドネシアからの渡航者が、帰国後、高熱と急性の呼吸器症状を伴うインフルエンザ様症状を呈し、入院した。高病原性インフルエンザ (HPAI) 及び重症急性呼吸器症候群 (SARS)、インフルエンザ (A型、B型、H1亜型、H3亜型、H5亜型、H7亜型) の遺伝子検査は全て陰性であった。ウイルス分離検査において、患者咽頭拭い液を用いて感染させた Vero E6 細胞において融合性の CEP が認められたため、rapid determination system of viral RNA sequence (RDV 法) を CPE の認められた培養上清に適用した。その結果、ウイルス遺伝子の部分配列情報が得られ、過去 1 例のみ論文報告のある極めて稀なオルソレオウイルスのネルソンベイウイルスに属する Melaka ウイルス (Proc Natl Acad Sci U S A. 104: 11424-11429. 2007.) と類似のウイルスであると同定することができた。その後の、電子顕微鏡による鏡検、RNA 電気泳動においてもレオウイルスの性状を示した。また、患者急性期血清と回復期血清を用いた本分離株 (以下、宮崎株) のウイルス中和試験においても抗体価の有意な上昇を確認できた。以上より、当該患者はオルソレオウイルスのネルソンベイウイルスグループに属するウイルスに感染していたことが明らかとなった

2. 研究の目的

本研究では、咽頭拭い液より分離した新型レオウイルス (以下、宮崎株) を用いて、その性状解析を実施すると共に、ウイルス遺伝子検出系および血清学的診断系の開発を行い、インフルエンザや SARS との類症鑑別が重要であり、新興感染症としての新型レオウイルスのコントロール法の確立を試みた。

3. 研究の方法

(1) 宮崎分離株の全配列決定

同定のときに用いた RDV 法により、いくつかの部分配列情報が得られた。これらの情報や既知の類似のネルソンベイウイルスグループの配列をもとにプライマーを作成し、ダイレクトシーケンスにより配列を決定する。配列情報が少ないために、適切なプライマーセットが作成できず、目的とする遺伝子

増幅が得られなければ、同定のときに実施した RDV 法のプライマーセットを異なるプライマーセットに変更して実施し、さらなる部分配列情報を得ることで対応する。

(2) ウイルス遺伝子検出系の確立

これまでに得られた S セグメントの配列情報から、i) 保存性が高い領域、ii) 哺乳類レオウイルス及び鳥類レオウイルスと配列が重複しない領域をいくつか検索し、ネルソンベイウイルスグループ特異的なプライマーセットを作成し、RT-PCR、quantitative RT-PCR でのシステム確立を試みた。

(3) 血清学的診断系の確立

我々はこれまでに、患者急性期血清と回復期血清を用いて、i) 宮崎分離株を用いた 50% 減少ウイルス中和試験、ii) 宮崎分離株感染 Vero E6 細胞を抗原とした間接蛍光抗体法の 2 つのシステムを確立した。多検体の処理が可能なシステムの開発のために、不活化した濃縮精製ウイルスを抗原とした ELISA のシステムを確立する。また、モノクローナル抗体の作出を試みた。

(4) 動物感染実験

(i) マウス感染実験：宮崎株のマウス

(BALB/c) での病原性の有無、感染経路および水平伝播の有無を明らかにするために、経鼻接種もしくは静脈内接種、経口接種により感染を行う。また、対照として非感染群をおく。これらマウスから継時的に採材し、気道粘膜スワブ、糞便スワブおよび臓器からのウイルス分離ならびに血清中の抗体価の推移を調べる。ウイルス感染死亡個体もしくは安楽殺個体については、各臓器からのウイルス分離も行う。

(ii) カニクザル感染実験：宮崎分離株のよりヒトでの再現性が得られやすい霊長類であるサル (カニクイサル) での病原性の有無、感染経路および水平伝播の有無を明らかにする。本実験では、経鼻接種もしくは経肺接種により感染を行う。

4. 研究成果

(1) 宮崎分離株の全塩基配列決定

分離株の S1、S2、S3、S4 セグメントの全塩基配列決定及び系統学的解析を行っ

た。特に、同時期に分離された **Kampar** ウイルス、**HK23629/07** 株と非常に近縁であることがわかった。分離株の **L1、L2、L3、M1、M2、M3** セグメントのいくつかの部分遺伝子配列情報は得られたが、全配列決定には至っていない。既知の哺乳類レオウイルスや鳥類レオウイルスの配列から予測した遺伝子増幅では、増幅産物が得られなかった。更なる部分配列情報を得るために、**RDV** 法により解析を行い、**L1、L2、L3** 及び **M1** 遺伝子の複数のセグメントの部分遺伝子を得ることはできた。

(2) ウイルス遺伝子検出系の確立

ネルソンベイウイルス群特異的なプライマーセットを作製し、**RT-PCR、quantitative RT-PCR** での迅速かつ高感度な遺伝子検出システムを構築した。

(3) 血清学的診断系の確立

①ウイルス中和試験、②間接蛍光抗体法、③不活化濃縮精製ウイルスを抗原とした **ELISA** のシステムを確立した。ウサギ免疫抗血清と **SPF** 動物血清、健常ヒト血清、患者血清を用いて、血清学的診断系の基礎は確立できた。また、モノクローナル抗体も4クローン作製し、それら抗原反応性も良好であることも確認した。

(4) 動物感染実験

(i) マウス感染実験：分離株のマウスでの病原性の有無を明らかにするために、感染実験を行った。感染後、体重の顕著な減少と肺の肝変化を伴う呼吸器症状が認められた。感染臓器からのウイルス分離では、呼吸器系ならびに消化器系においてウイルスが分離された。ネルソンベイウイルス群の動物感染実験報告はこれまでになく、本分離株がマウスにおいて実験的に急性呼吸器症状を示すことを明らかにした。

(ii) カニクザル感染実験：急性の呼吸器症状は認められたが、顕著な高熱、致死性は認められなかった。気管及び肺からウイルスが分離され、肺水腫が認められた。これまで、本ウイルスにヒトでの病原性について致死の報告がなく、急性の呼吸器症状と一致した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

酒井宏治・網康至・水谷哲也・岩切章・山本正悟・平井明香・須崎百合子・滝本一広・田

原口元子・飯塚愛恵・福士秀悦・西條政幸・永田典代・片山紀代・長谷川秀樹・山田靖子・倉根一郎・森川茂、「急性呼吸器患者から分離された新型レオウイルスの性状解析及びマウスでの感染実験」、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、3C18、2008 年 10 月、岡山 酒井宏治、網康至、水谷哲也、岩切章、山本正悟、平井明香、須崎百合子、福士秀悦、西條政幸、永田典代、長谷川秀樹、山田靖子、倉根一郎、森川茂「急性呼吸器感染症患者からの新型レオウイルス分離とマウス感染モデルの作製」、第 148 回日本獣医学会学術集会、K-09、鳥取、2009 年 9 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

東南アジアからの帰国時に急性呼吸器症状を呈した患者から分離されたオルソレオウイルス

<http://idsc.nih.gov/iasr/29/345/dj3454.html>

前島賞 (日本実験動物医学会、平成 21 年度)

「急性呼吸器感染症患者からの新型レオウイルス分離とマウス感染モデルの作製」

http://plaza.umin.ac.jp/~JALAM/maejimas_hou_list.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 宏治 (さかい こうじ)

国立感染症研究所・動物管理室・研究員

研究者番号：70515535

(2) 研究分担者 該当無し

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 該当無し

()

研究者番号：