

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：84407

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659333

研究課題名(和文) 不明熱患者から蚊の培養細胞で分離した未知のウイルスの解析と血清疫学

研究課題名(英文) Analysis of the unknown virus isolated from a patient with persistent high fever by using a mosquito cell line.

研究代表者

弓指 孝博(Yumisashi, Takahiro)

大阪府立公衆衛生研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：10250284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高熱が持続した不明熱患者の髄液から蚊の培養細胞で分離したウイルスについて、その性状の解析を試みた。その結果、分離したウイルスは蚊の培養細胞でプラークを形成することが明らかになった。また、マウスの培養細胞においても増殖することが明らかになったが、マウスでの病原性は確認されなかった。患者の血清中には特異的と思われるIgM抗体が検出された。透過型電子顕微鏡による観察では、紡錘形と多面体様の2種類のウイルス粒子が観察された。また、遺伝子解析においては5,263塩基の配列が明らかになったが、BLASTによる検索では、これまでに知られていない未知のウイルスである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried the analysis of the unknown virus isolated from a patient with persistent high fever by using a C6/36 mosquito cell line. As the results, we confirmed the proliferation of viruses in cultured mosquito cells and the capability of forming plaques. We could not confirm the pathogenicity in mice, although the propagation in a mammalian cell line (mouse glioma F10) was observed. An IgM antibody was also detected in the serum of the patient. The observation with the transmission electron microscope revealed two kinds of viral particles (spindle or polyhedron-like shape). In the genetic analysis, we determined 5,263 nt sequences of the viral genome and BLAST analysis suggested the novelty of the isolated virus.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・公衆衛生学・健康科学

キーワード：蚊 ウイルス 不明熱 中和抗体 公衆衛生

## 1. 研究開始当初の背景

蚊によって媒介されるウイルス群は、フラビウイルス科、トガウイルス科、ブニヤウイルス科、レオウイルス科など多くの科にまたがって含まれ、蚊(節足動物)の体内でも温血動物の体内でも増殖することができるという生態学的な特徴からアルボウイルス(arthropod-borne virus)と呼ばれている。デング熱、黄熱、日本脳炎、ウエストナイル熱、チクングニヤ熱などは代表的な蚊媒介性のアルボウイルス感染症であり、世界的に見ると、その患者数の多さと対策の難しさから公衆衛生上の大きな問題となっている。

一方、アルボウイルス全体を見渡すと、これまでに少なくとも500種以上のウイルスが蚊などから分離されているが、人への病原性などが不明であるものが多くを占めている。

私たちは、近年、不明熱患者の髄液から蚊の培養細胞を用いて未知のウイルスを分離した。この患者は高熱のみを主訴とし、パルス・ステロイド療法によって治癒するまで18日間に及ぶ高熱の持続があり、MRI検査画像において中脳黒質に異常な高信号領域が見られていた。一般的なウイルスの検査において人の病原体であるコクサッキーウイルスB2型の遺伝子も検出されており、分離した未知のウイルスと患者の病態との直接的な関連は全く不明であるが、髄液から分離されたことを考えると、何らかの影響を及ぼしていた可能性は否定できないと考えられた。また、このウイルスが蚊の培養細胞で増殖することから、本来蚊が持っているアルボウイルスである可能性も示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究では、高熱が持続した不明熱患者の髄液から蚊の培養細胞で分離したウイルスについて、培養細胞での増殖性の確認、透過型電子顕微鏡による形態観察、遺伝子解析による塩基配列の決定、患者血清中の抗体の確認及びマウスに対する病原性の確認を試みてこのウイルスの全体像を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 患者からのウイルスの分離及び増殖性の確認

高熱が持続していた患者の髄液を蚊の培養細胞(C6/36細胞)へ接種し、培養液を換えながら28で26日間培養してウイルスの分離を試みた。その後分離したウイルスを蚊の培養細胞で継代し、細胞変性効果を指標に感染性及び増殖性を確認した。また、プラーク形成能を調べるため、十分に増殖させたウイルスを様々な濃度に希釈して蚊の培養細胞に接種し、メチルセルロースを含む培養液を重層させて培養した。その他、哺乳類の培養細胞(Vero細胞、マウス神経膠腫細胞F10等)での増殖性について検討した。

### (2) 電子顕微鏡による形態観察

透過型電子顕微鏡を用い、超遠心によって濃縮したウイルスをネガティブ染色法で、また、ウイルスが感染した状態の培養細胞を化学固定による樹脂包埋超薄切片法でそれぞれ観察した。

### (3) 遺伝子解析による塩基配列の決定

まず、分離したウイルスから抽出した核酸(RNA)に対してアルボウイルスを検出するための各種プライマーを非特異的に用いて遺伝子増幅を行い、増幅したバンドについて塩基配列を決定した。そして明らかになった塩基配列を元にゲノムウォーキングを行って未知の塩基配列を決定していった。また、次世代シーケンサーを用いた解析によっても塩基配列の決定を行った。

### (4) 患者血清中の抗体の確認

ウイルスを感染させた蚊の細胞の浮遊液と非感染の細胞浮遊液を調製し、それぞれを同一枠内にスポットしてアセトン固定した抗原スライドを作製した。それに患者の血清を反応させ、蛍光標識二次抗体を用いた間接蛍光抗体法によって特異抗体の有無を調べた。

### (5) マウスに対する病原性

生後3日のICR系の同腹の乳呑みマウスをウイルス接種群、非感染細胞培養液接種群、未接種群の3群に分け、各接種群について蚊の培養細胞で増殖後調製したウイルス液を脳内接種し、その後の症状の有無について観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 患者からのウイルスの分離及び増殖性の確認

患者の髄液を蚊の培養細胞へ接種してからおよそ3週間後に細胞の凝集像が出現し、ウイルスが分離された(図1B)。

このウイルスは蚊の培養細胞でプラークを形成することが明らかになり(図2B)、その感染価はおよそ $10^6$ PFU/mLであった。

また、哺乳類の培養細胞(マウス神経膠腫細胞F10)において増殖することが判明した(図3B)。

### (2) 電子顕微鏡による形態観察

濃縮したウイルスのネガティブ染色では多数の紡錘形の粒子(長径約45nm短径約20nm、図4A)と多面体様の粒子(直径約50nm、図4B)が観察された。

また、樹脂包埋超薄切片法による観察では、細胞内の膜小胞中に多数のウイルスと思われる粒子が充満しているのが観察された(図5)。これらの粒子はほとんどが紡錘形の粒子と考えられたが、多面体様の粒子もわずかが観察された。

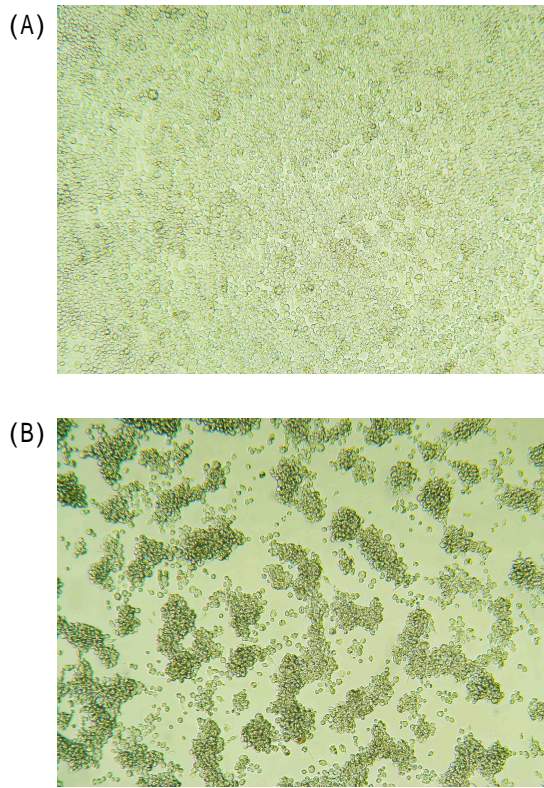


図 1. ウイルスに感染した蚊の培養細胞の細胞変性効果 (A)非感染細胞 (B)感染細胞

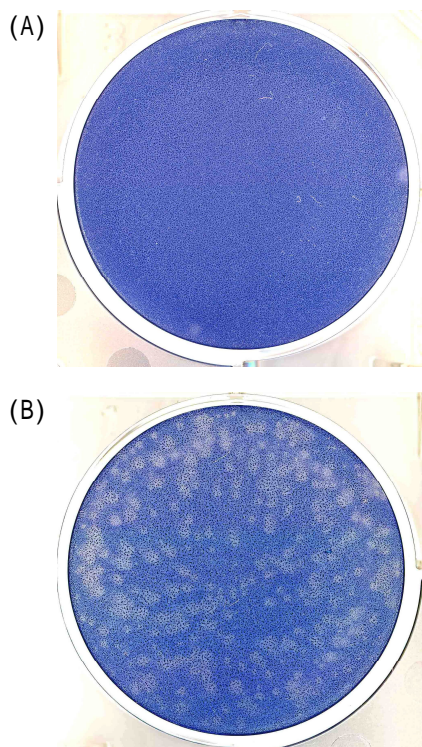


図 2. 蚊の培養細胞に形成されたウイルスのプラーク (A)非感染細胞 (B)感染細胞

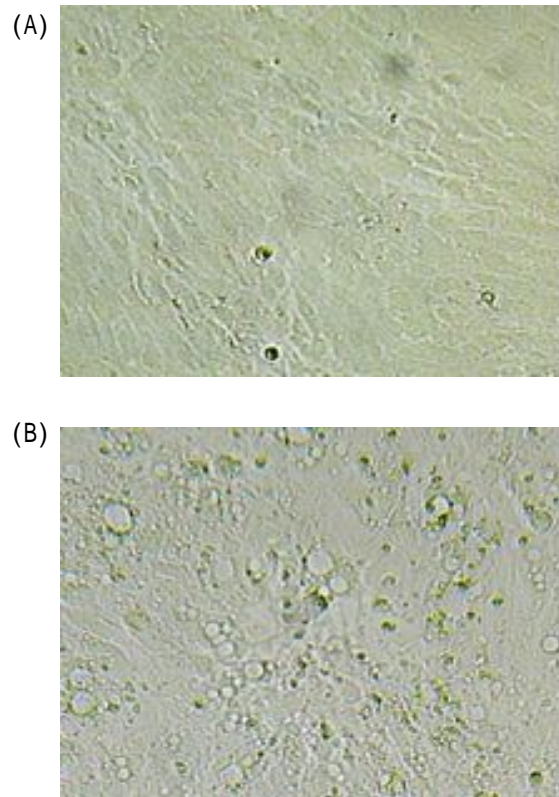


図 3. ウイルスに感染した哺乳類の培養細胞 (マウス神経膠腫細胞 F10)の細胞変性効果 (A)非感染細胞 (B)感染細胞

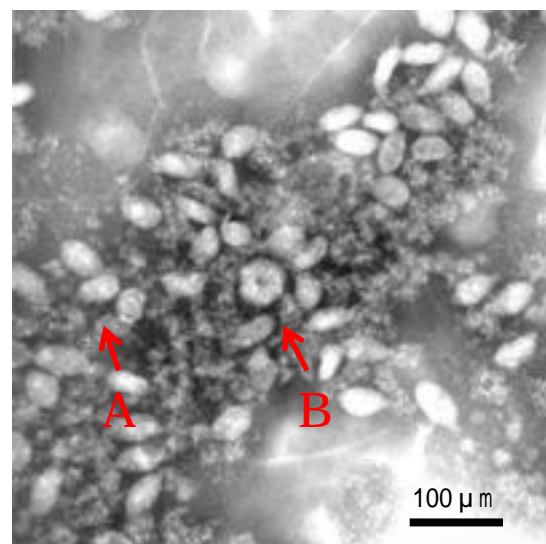


図 4. ネガティブ染色で観察されたウイルス粒子 (A)紡錘形粒子 (B)多面体様粒子

### (3) 遺伝子解析による塩基配列の決定

非特異的なプライマーを用いた遺伝子増幅では 539 塩基の配列が明らかになり、それを元に 5' 及び 3' の両方向へゲノムウォーキングをした結果、2,719 塩基の配列が明らかになった。その後、次世代シーケンサー



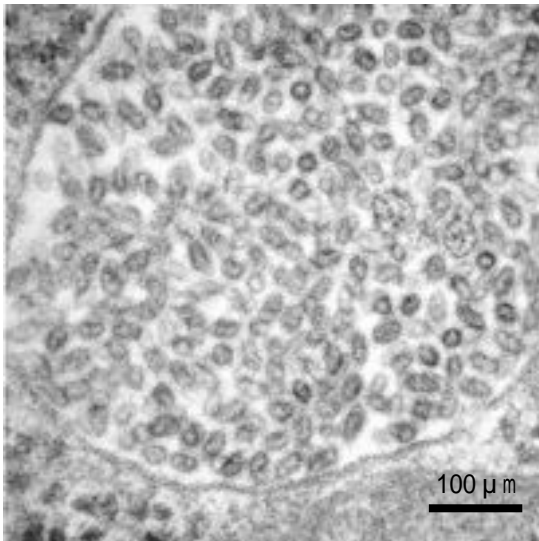


図 5. 樹脂包埋超薄切片法で細胞内の膜小胞中に観察されたウイルス粒子

を用いた解析結果も加えて全長 5,263 塩基の配列が明らかになった。得られた塩基配列について BLAST データベース上の既知の核酸配列との相同性を探索したところ、一致あるいは該当する配列は全く見られなかった。今回得られた塩基配列は新規性が高く、全く未知のものと考えられた。また、推定されるアミノ酸配列を元に、より近縁なウイルス種の検索を行った結果、テトラウイルスなどの非構造タンパクあるいは RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ遺伝子と 35%程度の低い相同性を示した。

#### (4) 患者血清中の抗体の確認

高熱が持続していた患者の 15 病日の血清について特異的 IgG 及び IgM 抗体の測定を行った。IgG 抗体については抗原スライドの非特異的バックグラウンドが強く、明瞭な結果を得ることができなかったが、IgM 抗体の測定では、患者の血清中に特異的と考えられる抗体が検出された(図 6B)。

#### (5) マウスに対する病原性

ウイルス接種群、非感染細胞培養液接種群、未接種群ともに脳炎等の特徴的な症状は見られず死亡する個体も見られなかった。

今回、高熱を主訴とする患者から蚊の培養細胞で分離されたウイルスは、蚊の培養細胞のみならず哺乳類の細胞においても増殖することが明らかになった。患者からはコクサッキーウイルス B2 型の遺伝子が検出されており、また、乳呑みマウスで症状が見られなかったことから、患者の病態とこのウイルスの関わりは弱いかに依然として不明のままである。しかし、患者の血清中に特異的と思われる IgM 抗体が検出されたことは、ウイルスが感染して免疫反応を惹起している可能性が考えられる。また、今回分離されたウイル

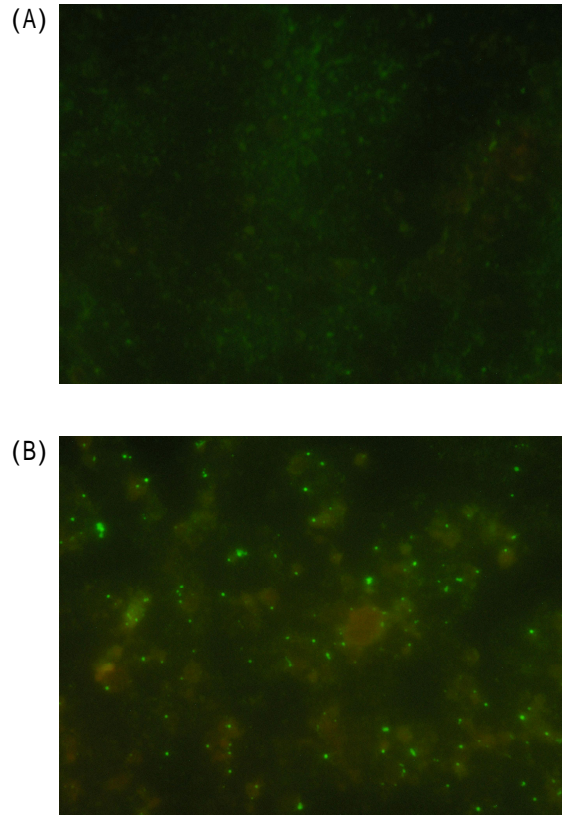


図 6. 間接蛍光抗体法における患者血清(40 倍希釈血清)の反応像 (A)非感染細胞抗原 (B)感染細胞抗原

スはプラーク形成能があることから、中和抗体を測定する系を作製して健常人などの血清疫学に応用できると思われる。電子顕微鏡での観察では 2 種類の粒子が見られた。感染細胞中では紡錘形の粒子が圧倒的に多く見られたことから、細胞変性効果やプラークの形成にはこの粒子が重要な役割をしていると推定される。しかし、多面体様粒子の存在も含め、サテライトウイルスの可能性などについても検討していく必要があると考えられる。また、今回明らかになった 5,263 塩基の配列は新規性が高く、これまでに知られていない未知のウイルスの可能性が高いが、ウイルス粒子の高度精製やウイルスタンパクの分析等を行って、今回観察されたウイルス粒子との関連について検討するのが今後の課題である。

#### 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)

〔学会発表〕(計 1 件)

弓指孝博、青山幾子、駒野淳、加瀬哲男、高橋和郎

不明熱患者から蚊の培養細胞で分離したウイルス様因子の解析

日本ウイルス学会

2013年11月10日

神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

弓指孝博 ( YUMISASHI TAKAHIRO )

研究者番号：10250284

(2) 研究分担者

青山幾子 ( AOYAMA IKUKO )

研究者番号：90332452

(3) 連携研究者

中村昇太 ( NAKAMURA SHOTA )

研究者番号：90432434