

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：83907

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K10038

研究課題名(和文) 神経症状を伴うヒトパレコウイルス3型臨床分離株の特徴と病原性解析

研究課題名(英文) Characterization and virulence analysis of human parechovirus type 3 clinical isolates with neurological symptoms.

研究代表者

伊藤 雅 (ITO, Miyabi)

愛知県衛生研究所・生物学部ウイルス研究室・室長

研究者番号：00446650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：パレコウイルス3型(PeV-A3)は新生児、早期乳児の敗血症や髄膜脳炎など神経症状を伴う重症例から検出される。本研究では92例中、14例に運動機能障害を含む神経症状が認められた。患者の神経症状の有無によるウイルス株の特徴を解析する目的でウイルス遺伝子の塩基配列を解析し、増殖性を比較する目的でヒトや動物由来の培養細胞に接種し、経時変化を検索した。ウイルス株に遺伝子の特徴は認められなかったが、培養細胞への指向性や増殖性が異なることが観察された。乳のみマウスへの接種実験では発症例はなかった。

人獣共通感染症の可能性を推測し約300件の動物糞便からPeV遺伝子の検出を試みたが、全て陰性であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パレコウイルス3型(HPeV-3)は特に新生児において敗血症や脳炎など重症例や死亡例が世界各地から報告されている。また、成人の流行性筋痛症との関連性も報告されている。国内では民間検査機関ではPeV検査は行われておらず、主に地方衛生研究所が検査解析を担っている。本研究の継続、発展により臨床検出株が集積され、HPeV-3の生体内動態が解明されることにより、特に新生児・乳幼児のHPeV-3感染症に対する感染防御や治療法に関わる新たな知見が得られると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Parechovirus type 3 (PeV-A3) is detected in severe cases with neurological symptoms such as sepsis and meningoencephalitis in neonates and infants. In this study, 14 of 92 (PeV-positive) patients had neurological symptoms, including movement disorders. For the purpose of analyzing the characteristics of the virus with and without neurological symptoms, the viral gene sequence was characterized and inoculated into cultured cells of human and animal origin and examined for changes over time for the purpose of comparing proliferative capacity. No genetic characteristics were observed, but it was inferred that the cellular tropism and proliferative potential of the cultured cells differed. In the experiment of inoculating suckling mice, there were no cases of the disease.

In order to investigate the possibility of zoonosis, PeV gene was detected in about 300 animal feces, but all of them were negative.

研究分野：ウイルス学

キーワード：パレコウイルス 新生児感染症 ピコルナウイルス 神経症状

1. 研究開始当初の背景

パレコウイルスはピコルナウイルス科に属し、ヒトパレコウイルス (HPeV) は世界中の乳幼児から、コンガンウイルス (LV) はげっ歯類から検出され、いずれも人獣共通感染症の可能性が示唆されている。研究代表者らが発見した HPeV-3 は、髄膜炎や敗血症様症状を呈する新生児、さらに近年成人の筋痛症との関連が先進国から多く報告されており、わが国の感染症発生動向調査や小児感染症において注目される病原ウイルスとなっている。その発症病理解明が待たれる。われわれは感染症発生動向調査や流入下水サーベイランス等を通じて、長年にわたり多様な診断名のもとに提出された検体由来の HPeV-3 分離株を多数収集している。本研究においてヒト分離株に加え各種動物検体からもウイルス検出を行い、遺伝子配列解析や細胞株等への病原性を指標に感染様式や発症病理に関わるウイルス側・宿主側因子の解明を進める。

ピコルナウイルス科のパレコウイルス属 (Parechovirus) は、ウイルス学的特徴からエンテロウイルス属から分かれる形で 1999 年に創設され、小児夏季下痢症病原体のエコーウイルス 22 型及び 23 型がヒトパレコウイルス 1 型 (HPeV-1) 及び 2 型 (HPeV-2) と改名された。研究代表者らは 1999 年に当所で分離したエンテロウイルス様株がヒトパレコウイルスの新しい血清型 HPeV-3 であることを 2004 年に報告した (Ito et al. J. Gen. Virol. 85:391, 2004) 現在パレコウイルス属は、ヒトパレコウイルス Human parechovirus (HPeV) とコンガンウイルス Ljungan virus (LV) を含む Parechovirus A~D の 4 つの種から成り、A 種はヒト、B~D 種はサル、げっ歯類、野鳥、フェレットから検出報告がある。HPeV には 19 血清型/遺伝子型が存在し、世界各国から検出報告がなされている。我が国からは HPeV-1 と HPeV-3 の報告が多いが、その病態は無症候感染から重症致死の感染まで幅広く、発症病理は明らかでない。1999 年に野ネズミ bank vole から検出された LV は、2007 年に子宮内死亡胎児 (IUFD) の脳と胎盤から免疫組織化学手法によりウイルス抗原が、2013 年にはヒトの血清疫学的調査で LV に対する抗体保有が、報告されている。一方、2010 年には下痢症状のサルから HPeV-6 検出の報告があり、パレコウイルスは人獣共通感染症の病原体となっている可能性が示唆されている。

研究代表者が最初に報告した HPeV-3 分離株 (A308/99 株) は 1999 年 8 月に愛知県内で一過性の下肢麻痺症状を示した 1 歳小児の糞便検体より得られ、患者ペア血清の抗体価検査の結果から発症の原因病原体と考えられた。さらにウイルス学的解析及び疫学調査研究を進め、以下の知見を報告した。

1. 分離ウイルスの遺伝子及び血清学的解析から HPeV-3 のウイルス分類学上の位置 (Ito et al. J. Gen. Virol. 85:391, 2004)
2. 愛知県における年齢階層別 HPeV-3 に対する抗体保有状況調査を行い、1 歳未満では 15%、1~3 歳では 45%、4~9 歳では 77%、10~19 歳では 83%、20 歳以上では 73% が陽性であった (Ito et al. J. Gen. Virol. 85:391, 2004)
3. HPeV の分離と RT-PCR 法を比較し、後者の方が検出感度が優れていた (Ito et al. J. Clin. Microbiol. 48:2683, 2010)
4. RT-PCR 法による HPeV の全 VP1 領域 (約 700bp) 同定法を確立した。 (Ito et al. J. Clin. Microbiol. 48:2683, 2010)
5. 細胞培養法と RT-PCR 法を併用して糞便検体 (4,976 件) から HPeV110 例 (HPeV-1; 63 例、HPeV-3; 44 例、HPeV-4; 2 例、HPeV-6; 1 例) を検出した。HPeV-1 及び 3 は 3 歳以下の幼児からの検出が約 9 割を占め、発症月は 3, 4 月を除くほぼ年間を通じて検出された。疾病別では、感染性胃腸炎 (49)、呼吸器感染症 (25)、不明熱 (14)、発疹症 (10)、手足口病 (7)、無菌性髄膜炎 (4)、ヘルパンギーナ (1) 等の患者から検出され、HPeV-1 は冬季の胃腸炎患者から、HPeV-3 は初夏から晩秋の胃腸炎患者および夏季の呼吸器感染症患者から検出される傾向がある (Ito et al. J. Clin. Microbiol. 48:2683, 2010)。

上記 5. の検討において、無菌性髄膜炎以外に中枢神経症状 (一過性下肢麻痺) を伴う患者 2 例の糞便から HPeV-3 を検出した。この他、脳脊髄液や血液 (血清) からも分離株を得ており、HPeV-3 はウイルス血症を伴う全身感染症の病原体となりうることに以前より注目していた。国内では他の地衛研からも次第に報告されるようになり、2~3 年周期で流行を繰り返すこともわかってきた。2011 年には国内において HPeV-3 の流行が認められ、愛知県内では軽症例に加え、意識障害や歩行障害等の症状を示す乳幼児 16 名から HPeV-3 を検出している。胃腸炎、呼吸器症状に加え、中枢神経症状を伴う不明熱疾患の新生児や乳幼児からの検出報告があり、HPeV-3 による神経病原性がさらに注目されている。

HPeV-3 は海外では、胃腸炎、呼吸器疾患に加えて、中枢神経感染症 (無菌性髄膜炎、脳炎、髄膜脳炎) 心筋炎、肝炎、敗血症症候群 (sepsis-like illnesses) や乳幼児突然死症候群 (sudden infant death syndrome: SIDS) 等との関連も報告されている。

HPeV-3 は HPeV-1 や HPeV-6 等と比べ、新生児を含む低年齢層患者からの検出報告が目立ち、細胞向性や細胞毒性が異なっていることが推測される。

2. 研究の目的

研究期間内に神経症状の有無が明らかな患者検体からの HPeV-3 検出を集積し、海外から報告

検体より High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いてウイルス RNA を抽出し、Joki-Korpela らが報告した PeV-A 検出用プライマー (Clin. Infect. Dis. 27:129, 1998) を用いて RT-PCR 法で遺伝子検出を試みた。結果は全て陰性であった。そのため分離培養に供する検体はなかった。検索した動物糞便からは PeV-A 遺伝子の検出は認められず、ヒトから検出されるウイルスは A 種に分類されている事を裏付ける結果であった。PeV-A はサル由来細胞株での分離が可能なおそらく、各種動物由来細胞についても増殖性、感染性を検討することとした。

(3) 各種ヒト及び動物由来細胞株における HPeV-3 の増殖性を検討するため、ヒト由来培養細胞株 4 種類、HeLa (子宮頸がん)、RD-A (横紋筋肉腫)、SH-SY5Y (神経芽細胞腫)、CaCo2 (結腸癌)、サル由来培養細胞株 4 種類、LLC-MK2, Vero, BGM, BSC-1 (以上腎臓上皮細胞)、マウス由来培養細胞株 1 種類 Neuro2A (神経芽細胞腫) の計 9 種類の細胞に HeLa 細胞で分離培養された神経症状有りの分離株 4 株 (A-D 株)、神経症状無しでの分離株 2 株 (E, F 株) の計 6 株を MOI (multiplicity of infection) 0.001 に調整し、24 穴プレートに準備した各細胞に接種した。37 °C で 2 時間吸着後、回収洗浄し、新しい培養液 1mL を加え、接種後 2 週間の経時的変化を細胞変性効果 (CPE) を観察するとともに培養上清を回収し、上清中の HPeV 遺伝子量をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。HeLa, LLC-MK2, CaCo2 細胞では 6 株とも CPE が観察され経時的にウイルスの増殖が認められた。CaCo2 細胞では CPE が最も顕著に認められた。神経芽細胞腫由来の Neuro2A, SH-SY5Y 細胞において神経症状有りの分離株 1 株 (B 株) で、感染及び増殖が認められず、アフリカミドリザル由来培養細胞株の Vero, BGM, BSC-1 細胞では増殖が弱かった。マウス神経細胞由来培養細胞株である Neuro2A 細胞では神経症状無しでの 2 株 (E, F 株) でわずかに増殖が認められた。特に B 株については培養細胞のウイルス受容体に注目してさらに解析を進めたいと考えている。宿主の神経症状発症につながる新たな知見を得ることはできなかったが、神経症状の有無で検討した HPeV-3 株間でも細胞指向性が異なる株が存在していることが明らかとなった。

各種培養細胞への接種実験に供した株を含む 9 株 (神経症状有 5 株、無 4 株) について、マウスに対する病原性の有無を比較検討する目的で、4-6 日齢乳のみマウスに対して皮下若しくは脳内接種を実施した。接種後最長 28 日間の研究期間内に、体重増加停止若しくは減少、麻痺、死亡等の発症はみられなかった。

生体内の HPeV-3 動態を検討する目的で、脳内接種後 3-10 日に摘出した脳、肝臓、心臓、肺をホモジナイズ後、TriZol を用いてウイルス RNA を抽出し、上記培養上清検体と同じリアルタイム RT-PCR 法にて、HPeV-3 遺伝子検出及び定量を試みた。接種マウス臓器からは、100 コピー/臓器を超えるウイルス遺伝子は検出されなかった。

一方、同じピコルナウイルス科エンテロウイルス属に分類されウイルスの変異に伴いヘルパンギーナから手足口病に病型が変化した A 群コクサッキーウイルス 6 型 (CV-A6) を 6 日齢乳のマウスに皮下接種したところ、四肢麻痺を発症後死亡するマウスがみられ、50% 細胞感染量 (TCID50) を指標として 50% 致死量 (LD50) を決定できた。2007 年から 2022 年に本県医療機関で採取された患者検体より当所において分離した 5 株の LD50 を検討したところ、株間に最大 100 倍の差がみられたため、全ゲノム解析機器を活用して分離株の全遺伝子配列を検討中である。皮下接種後 2-6 日に摘出した脳、肝臓、骨格筋からエンテロウイルス遺伝子検出用リアルタイム RT-PCR 法にて CV-A6 遺伝子検出及び定量を実施したところ、筋、脳、肝臓から CV-A6 遺伝子が検出され、これらの臓器でウイルスが増殖したと考えられた。

(4) まとめ

研究期間の 3 年目は新型コロナウイルス感染症の影響を受け連日の検査対応で研究業務が不可能となり研究期間をやむを得ず 2 年間延長した。2020 年からの 3 年間は新型コロナウイルス感染症の流行を受け、その他の小児感染症検体は激減し、研究対象とした HPeV-3 の流行は認められなかった。研究期間内に検出した 10 株と当所において過去に分離保存してきた研究に供することが可能であった HPeV-3 株、計 92 株のうち 14 株が運動機能障害を含む神経症状を有した患者から検出されていた。本研究ではウイルス構造蛋白質の塩基配列及びアミノ酸配列について解析したが、新たな知見は得られなかった。2017 年にはオーストラリアで小児の重症例から初めて HPeV-3 組換え株が報告されている (Nelson et al. Sci. Rep. 7:44423, 2017)。ピコルナウイルス科の他のウイルスでも組換えウイルスの出現に伴う病態の変化は多く報告されており、病原体定地点由来検体から検出されるウイルスの発生動向調査の継続が重要と考える。今後は保有株について組換え株探索の目的で全ゲノム解析を実施し、ウイルス側の探索を継続していきたい。

人獣共通感染症の可能性を示唆する所見は得られなかったが、霊長類ではないマウス由来培養細胞で増殖が認められた。培養細胞のウイルス受容体発現 (量) に比例して感染が成立するのであれば Neuro2A 細胞の受容体解析も HPeV-3 感染のメカニズムを解明することにつながる。また、HPeV-3 が未分化癌細胞由来の CaCo2 細胞で増殖が顕著である理由が解明されれば、未成熟な新生児での症例が多い理由を明らかにできるかもしれない。また、HPeV-3 が血管平滑筋細胞

に感染することによる中枢神経の変化が神経症状を引き起こしているとの報告もある (Bissel SJ, et al. J Neuropathol Exp Neurol. 2015)。小児の運動機能障害や神経症状、成人の流行性筋痛症との関連は宿主の感染細胞が明らかになることで説明できるかもしれない。

本研究の成果、発展により HPeV-3 の受容体解析が進み、特に新生児・乳幼児の HPeV-3 感染症に対する感染防御の新たな知見が得られると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 伊藤雅、皆川洋子、廣瀬絵美、佐藤克彦	4. 巻 49
2. 論文標題 エンテロウイルス感染症、アデノウイルス感染症の発生動向の変化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床と微生物	6. 最初と最後の頁 127-136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤雅、皆川洋子、安達啓一、廣瀬絵美、安井善宏
2. 発表標題 愛知県で検出されたパレコウイルスA3型の解析
3. 学会等名 第61回日本臨床ウイルス学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤雅、皆川洋子、廣瀬絵美、安達啓一、齋藤典子
2. 発表標題 新型コロナウイルス感染症流行の小児感染症発生状況とウイルスサーベイランスへの影響-ピコルナウイルスおよびアデノウイルス感染症を中心に-
3. 学会等名 第63回日本臨床ウイルス学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 皆川洋子、伊藤雅、安達啓一、齋藤典子、山下照夫、安井善宏
2. 発表標題 手足口病患者由来 A 群コクサッキーウイルス 6 型(CA6)分離株のマウスにおける病原性検討
3. 学会等名 第 60 回日本臨床ウイルス学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	皆川 洋子 (MINAGAWA Hi roko) (70209823)	愛知県衛生研究所・生物学部ウイルス研究室・主任 (83907)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------