

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590554

研究課題名(和文)新規ヒトカルジオウイルスの病原性に関する検討と動物モデル系の確立

研究課題名(英文)Pathogenesis of Saffold virus infection in animal models

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) 4,000,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：サフォードウイルスは2007年に新規同定されたカルジオウイルスで、殆どのヒトが小児期に感染し、下痢症や上気道炎を引き起こす。しかしながら、弛緩性麻痺患者や神経疾患患者から検出されることがあり、神経毒力の可能性が示唆されている。

そこで、SAFVのヒトにおける感染機構と病原性発現機構を明らかにすることを最終目的として、本研究では最初に、病理学的診断に必要なウイルス抗原検出あるいはウイルスゲノム検出法を確立した。次に、SAFVに対する実験動物の感受性について検討し、同時に2つの分離株の病原性を明らかにした。そして、新生仔マウスを用いたSAFV感染後小脳形成不全動物モデルの確立を試みた。

研究成果の概要(英文)：Saffold virus (SAFV) has been isolated and/or detected from human cases of diarrhea and upper respiratory tract inflammation in worldwide since the first report in 2007 and were considered epidemiologically that most people generally infected in early childhood. However, SAFV has been detected in the some cases of non-polio acute flaccid paralysis and a few cases of neuronal disorders. Then SAFV possibly be neurovirulent to human.

To understand the pathogenesis of SAFV, first of all, we established a detection system of virus antigen and virus genome in pathological diagnosis. Next, we evaluated the susceptibility of experimental animals to SAFV using two clinical isolates of SAFV. Then we attempted to generate an animal model of cerebellar hypoplasia after SAFV infection using neonatal mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：感染症 ウイルス 病理学 動物モデル 病原性

## 1. 研究開始当初の背景

2007年に報告された、ヒト由来の新規のピコルナウイルス(1981年から保管されていた発熱患児の便から分離された)は Safford virus(以下 SAFV)と命名された。このウイルスはこれまで齧歯類や豚に心筋炎あるいは脳脊髄炎を引き起こす心筋細胞親和性のピコルナウイルス科のカルジオウイルス属の Theler's Murine Encephalomyelitis Virus あるいは encephalomyocarditis virus と同属に分類されることがその塩基配列から明らかとなった。それまでヒトに感染するカルジオウイルスの報告は無かったが、最初の報告以降、カナダ、中国、ドイツ、ブラジル、パキスタン、日本などの発熱、呼吸器疾患あるいは下痢発症患児の鼻腔咽頭拭い液や便からこのウイルスが分離・検出され、現在では8以上の遺伝子型に分類されている。しかしながら、いずれの報告においても疾患との関連性は明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

SAFV のヒトにおける感染機構と病原性発現機構を明らかにすることを最終目的として、本研究では、動物モデルを用いた評価系を確立することを目標とする。具体的には、(1) 病理学的診断に必要なウイルス抗原検出あるいはウイルスゲノム検出法を確立する。(2) SAFV に対する実験動物の感受性について検討し、同時に2つの分離株の病原性を明らかにする。(3) SAFV 感染後の脳炎、心筋炎あるいは劇症型糖尿病の病態解析のための新しい小動物モデルの確立を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) ウイルス抗原検出あるいはゲノム検出法の確立

髄膜炎患者由来の SAFV3 型 (JPN08-404 株, 高知県衛生研究所 細見卓司先生より分与) を生後1日以内の ddY 新生仔マウス脳内

に  $10^4$  CCID<sub>50</sub> 量脳内接種し、接種3日目に3-4匹を解剖し、採取した脳をホルマリン固定後、パラフィン包埋標本とした。このパラフィン組織切片を用いて、病理組織解析を行い、抗SAFVポリクローナル抗体(高知県衛生研究所 細見卓司先生より分与)を用いた免疫組織化学法(ポリマー法、ニチレイ)によるウイルス抗原陽性細胞の検出を行った。また、One-step RT Real time PCR 法(QIAGEN)によるウイルスゲノム RNA 量の定量と *in situ* hybridization 法(QuantiGene ViewRNA, Affymetrix/Panomics 社)によるウイルスゲノムの検出を試みた。

### (2) 各種実験動物を用いた患者分離株2株の感染実験

#### マウスを用いた感染実験

2つの患者由来分離株(JPN08-404株, 無菌性髄膜炎患者の髄液由来および Gunma/176/2008株, 上気道炎患者の咽頭拭い液由来. 群馬県衛生研究所 塚越博之先生より分与)をそれぞれ ddY 新生仔マウスに対して1匹あたり  $10^4$  CCID<sub>50</sub> 量を脳内あるいは腹腔内、また、BALB/c 成マウスに対して同ウイルス量を脳内、腹腔内、あるいは静脈内に接種し、21日間体重測定と臨床症状を観察した。接種後3, 7, 21日目にそれぞれ3-4匹を解剖し、全臓器を採取し、ウイルス分離と病理組織学的検索を行った。

#### カニクイザルを用いた感染実験

JPN08-404株と Gunma/176/2008株を  $10^6$  CCID<sub>50</sub> 量それぞれカニクイザルの静脈内に接種し、10日間臨床症状を観察した。観察期間終了後に解剖し、全臓器を採取し、ウイルス分離と病理組織学的検索を行った。

### (3) 新生仔マウスを用いた SAFV 小脳継代株の作出とその神経病原性の解析

JPN08-404株を3匹のBALB/c新生仔マウスに脳内接種し、小脳で5代継代した後

LLC-MK<sub>2</sub> 細胞で一代継代し、これを小脳継代株とした。これを低 ( $10^4$  CCID<sub>50</sub> 量)・高ウイルス量 ( $10^6$  CCID<sub>50</sub> 量) で ddY 新生仔マウスの脳内に 10  $\mu$ l 接種し、21 日間臨床症状を観察し、病理学的解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 病理学的診断に必要なウイルス抗原あるいはウイルスゲノム検出法の確立

JPN08-404 株脳内接種 3 日目の視床部に非常に軽微な炎症性細胞浸潤が認められた。この部位に一致して、少数のウイルス抗原陽性細胞がみられ、小脳髄質にもウイルス抗原が検出された (図 1)。

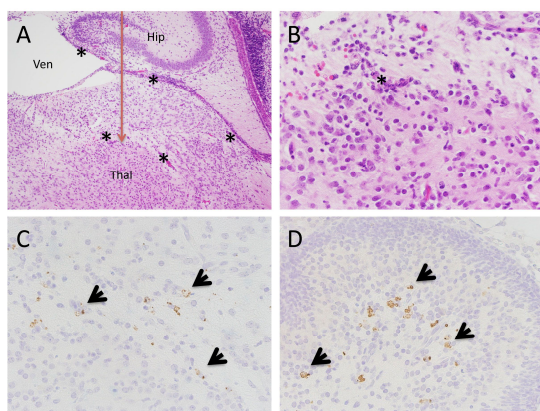


図1 SAFV脳内接種3日目の新生仔マウスの脳。A 接種部位付近の海馬(Hip)、視床(Thal)に接種に伴う物理的損傷がみられた(赤矢印)。脳室(Ven)周囲を中心に軽度の血管周囲性細胞浸潤が見られた(\*)。B 同部位視床部の拡大。血管周囲性細胞浸潤(\*)と軽微な好中球浸潤が見られる。C 同部位、免疫組織化学によるウイルス抗原陽性細胞(矢印)。D 小脳髄質に認められたウイルス抗原陽性細胞(矢印)。

この新生仔頭部 (検索個体数=4)のパラフィン包埋切片を用いて、RNA を抽出し、VP1 領域を標的とした RT-PCR を行ったところ、平均約 100 ウイルスゲノムコピー数 1 ng / 総 RNA 量が検出された。5'末端~VP1 領域 (91~3660 番目の塩基)のうち 20 カ所を標的として設計したプローブを用いた *in situ* hybridization により、ウイルス抗原が検出された部位と一致して、ウイルスゲノム陽性細胞が検出された。

以上により、病理学的診断法で用いるパラフィン包埋切片を対象とした SAFV ウイルス抗原、ゲノム検出系を確立した。

##### (2) 各種実験動物における患者分離株 2 株の

## 感染性と病原性の比較

### マウスを用いた感染実験

いずれも致死的ではなかった。しかしながら、脳内接種新生仔マウスにおいて、JPN08-404 株接種 7 日目に一過性の小脳障害を示唆する異常行動を示し、Gunma/176/2008 株脳内接種群は対照群に比べて発育障害があった(21 日目体重、 $p = 0.01$ )。組織学的には、JPN08-404 株接種後小脳でウイルス抗原陽性細胞が観察され (図 1) これは、多重免疫染色により抗 GLAST 抗体陽性のバークマングリア細胞であることが判明した。一方、Gunma/176/2008 株脳内接種群は脳室周囲、脳幹及び脊髄の神経細胞の他、歯牙組織、骨格筋、口腔粘膜上皮にウイルス抗原陽性細胞が観察され、広範な感染性を示した。また、成マウスの腹腔内接種群では、両株とも脾臓に感染・増殖性を示しており、Gunma/176/2008 株のみ腹腔内接種後に神経侵入性 (neuroinvasive) を発揮した。

### カニクイザルを用いた感染実験

JPN08-404 株接種群では 2 頭とも一過性の下痢を発症し、血清中和抗体価の上昇が認められた。一方、Gunma/176/2008 株接種群では 2 頭とも一過性の握力低下とリンパ球の減少、さらに咽頭拭い液、便でウイルスの排泄、血清中和抗体価の上昇がみられた。いずれの個体も観察期間中に重症化はしなかった。ウイルスゲノムは JPN08-404 株接種群で脾のみで検出され、Gunma/176/2008 株接種群では脾、脾、扁桃でウイルスが検出され、かつ、1 頭のみ中枢神経系でウイルスが検出された。組織学的には Gunma/176/2008 株接種群のみ軽微な髄膜炎を示し、その他の臓器に有意な所見は認められなかった。以上の結果から、カニクイザルにおいて Gunma/176/2008 株は静脈内接種後に神経侵入性 (neuroinvasive) であり、神経毒力 (neurovirulence) を発揮することが判明した。神経向性 (neurotropism) に関して、今回は確認出来なかった。また、いず

れの株もリンパ系組織に対して親和性を有することが判明した。本研究で得られた結果はSAFVの神経病原性を解明する上で重要な知見である。

以上のように、マウス、サルはSAFVに対し感受性を示すことが判明した。また、2つの分離株は感染性と病原性が異なることがわかった。

### (3) 新生仔マウスを用いたSAFV小脳継代株の作出とその神経病原性の解析

親株を接種すると、9-11日目に一過性の運動失調症状を呈し、その後回復する。一方、小脳継代株を接種すると3-9日目に明らかな運動失調症状を示し、21日間の観察期間中に水頭症を発症した(発症率:低ウイルス量群29%、高ウイルス量群100%)。なお、接種2週間目以降、高ウイルス量群の体重増加率は他群と比較して有意に低かった。組織学的には、親株接種群は炎症性反応に乏しく、感染細胞は主に脳室周囲と小脳皮質に限局した。一方、小脳継代株接種群では、脳に広範な感染を示し、ウイルス抗原陽性細胞数は親株群と比較し有意に多かった。さらに、接種21日目には高ウイルス量群の小脳皮質の二層2層構造は破綻した(図2)。

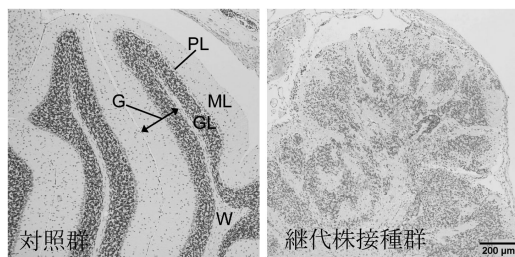


図2 馴化株脳内接種による小脳形成不全(左)細胞培養液脳内接種による対照群。右)SAFV小脳継代株脳内接種群。いずれも生後24時間以内に接種し、組織像は接種後21日目。G, gray matter; W, white matter; PL, purkinje cell layer; ML, molecular layer; GL, granular layer

新生仔マウス小脳を用いたSAFVマウス脳内継代によって、小脳皮質細胞と脳室周囲細胞への親和性が増加し、神経病原性が増加したことが病理学的に明らかとなった。今後は、ウイルス遺伝子のどの部位が神経病原性に関与するかを究明する必要がある。

以上から、SAFVを用いてウイルス感染による小脳形成不全動物モデルを新しく作出した。脳発達時のウイルス感染の影響を理解するために有用と考える。

### 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。)

[雑誌論文](計9件)

Fujii K, Nagata N, Sato Y, Ong KC, Wong KT, Yamayoshi S, Shimanuki M, Shitara H, Taya C, Koike S. Transgenic mouse model for the study of enterovirus 71 neuropathogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013. 110:14753-14758. doi: 10.1073/pnas.1217563110.

Hayasaka D, Shirai K, Aoki K, Nagata N, Simantini DS, Kitaura K, Takamatsu Y, Gould E, Suzuki R, Morita K. TNF- acts as an immunoregulator in the mouse brain by reducing the incidence of severe disease following Japanese encephalitis virus infection. PLoS One. 2013. e71643. doi: 10.1371/journal.pone.0071643.

Nishimura Y, Lee H, Hafenstein S, Kataoka C, Wakita T, Bergelson JM, Shimizu H. Enterovirus 71 binding to PSGL-1 on leukocytes: VP1-145 acts as a molecular switch to control receptor interaction. PLoS Pathog. 2013. e1003511. doi: 10.1371/journal.ppat.1003511.

Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzuki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushima S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. J Virol. 2013. 87:1105-1114. doi: 10.1128/JVI.02419-12.

Yoshii K, Moritoh K, Nagata N, Yokozawa

K, Sakai M, Sasaki N, Kariwa H, Agui T, Takashima. I. Susceptibility to flavivirus-specific antiviral response of Oas1b affects the neurovirulence of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus. Arch Virol. 2013, 158:1039-1046. doi: 10.1007/s00705-012-1579-1.

Kotani O, Shirato K, Nagata N, Ikeda H, Takahashi K, Taguchi F. Neuropathogenesis of a mouse-adapted porcine epidemic diarrhea virus infection in suckling mice. J Gen Virol. 2012. 94:831-836. doi: 10.1099/vir.0.047787-0.

Takeuchi K, Nagata N, Kato SI, Ami Y, Suzuki Y, Suzuki T, Sato Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Mori K, Van Nguyen N, Kimura H, Nagata K. Wild-type measles virus with the hemagglutinin protein of the edmonston vaccine strain retains wild-type tropism in macaques. J Virol. 2012. 86:3027-3037. doi: 10.1128/JVI.06517-11.

Abe Y, Fujii K, Nagata N, Takeuchi O, Akira S, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T, Koike S. The toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. J Virol. 2012. 86:185-94. doi: 10.1128/JVI.05245-11.

Takeda M, Tahara M, Nagata N, Seki F. Wild-Type Measles Virus is Intrinsically Dual-Tropic. Front Microbiol. 2012. 2:279. doi: 10.3389/fmicb.2011.00279.

〔学会発表〕(計 12 件)

Kotani O, Asif N, Suzuki T, Iwata N, Nakajima N, Katano H, Hosomi T, Tsukagoshi H, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Comparative

analyses of the pathogenicity of two isolates of Saffold virus in neonatal mouse. Europic 2014 (Belgium) 2014. 3.

Nagata N, Kotani O, Iwata N, Suzuki T, Sato Y, Koike S, Iwasaki T, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H. A comparison of human enterovirus detection in experimentally infected neonatal mice using immunohistochemistry. Europic 2014, (Belgium) 2014. 3.

潮田和佳、小谷治、岩田奈織子、鈴木忠樹、中島典子、長谷川秀樹、清水博之、永田典代：コクサッキーウイルス B2 実験室株脳内接種後のマウスにおける水頭症の発症機序。第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013 年 11 月

藤井健、永田典代、小池智：hSCARB2-Tg マウスを用いた EV71 標的組織決定機構の解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013 年 11 月

片岡周子、西村順裕、鈴木忠樹、小谷治、岩田奈織子、永田典代、網康至、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解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013 年 11 月

小谷治、Naeem Asif、鈴木忠樹、岩田奈織子、中島典子、片野晴隆、長谷川秀樹、田口文広、清水博之、永田典代。新生仔マウスを用いた Saffold virus 小脳継代株の作出とその病原性の解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013 年 11 月

永田典代、岩田奈織子、鈴木忠樹、佐藤由子、中島典子、片野晴隆、長谷川秀樹：脳炎・髄膜炎関連ウイルスの病理学的検索のための参照標本の作製と抗体の検討。第 102 回日本病理学会(札幌)2013 年 4 月

小谷治、鈴木忠樹、Naeem Asif、岩田奈

織子、中島典子、片野晴隆、田口文広、長谷川秀樹、清水博之、永田典代：ヒトカルジオウイルス(Saffold virus)の新生仔マウス小脳における病理学的解析。感染症若手フォーラム 2013(北海道)2013年2月

小谷 治、鈴木 忠樹、Naeem Asif、岩田奈織子、中島 典子、片野 晴隆、田口 文広、長谷川 秀樹、清水 博之、永田 典代：新生仔マウスにおける新規ヒトカルジオウイルス ( Saffold virus ) の神経病原性の解析。第 60 回日本ウイルス学会 ( 大阪 ) 2012 年 11 月

藤井 健、永田 典代、山吉 誠也、島貫 碧、設楽 浩志、多屋 長治、小池 智：EV71 感受性マウスモデルの作出と解析。第 60 回日本ウイルス学会 ( 大阪 ) 2012 年 11 月

Nagata N. : Pathological study of enterovirus 71 in animal models。第 16 回日本神経ウイルス研究会シンポジウム Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia - Pacific Region ( 東京 ) 2012 年 8 月

Kotani O, Shirato K, Nagata N, Miyazaki A, Ikeda H, Taguchi F, Takahashi K: Neuropathogenesis of mouse-adapted porcine epidemic virus infection in suckling mouse. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September 2011, Sapporo.

〔図書〕(計2件)

永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎：田代真人、牛島廣治編 第 11 章電子顕微鏡/病理組織学的検査、ウイルス感染症の検査・診断スタンダード、410-439、羊土社

永田典代、長谷川秀樹：田代真人、牛島廣治編 第 2 章ウイルス分離培養 第 3

項 実験動物、等。ウイルス感染症の検査・診断スタンダード、257-268、羊土社

6 . 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

清水 博之 ( SHIMIZU, Hiroyuki )  
国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長  
研究者番号：90270644

(3)連携研究者

岩田 奈織子 ( IWATA-YOSHIKAWA, Naoko )  
国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官  
研究者番号：10360695

鈴木 忠樹 ( SUZUKI, Tadaki )

国立感染症研究所・感染病理部・室長  
研究者番号：30527180

(4)研究協力者

小谷 治 ( KOTANI, Osamu )  
国立感染症研究所・感染病理部・研究生