

# マウスモデルにおけるサフォードウイルスの神経病原性

(The neuropathogenicity of the Saffold virus in mouse models)

小谷 治

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

(指導教授：田口 文広)

平成27年3月

## 目次

序論.....	1
第一章 サフォードウイルスの病理学的診断法の確立.....	4
1-1 要旨.....	5
1-2 緒言.....	7
1-3 材料と方法.....	9
1-3-1 ウイルスと細胞.....	9
1-3-2 ウイルス感染細胞を用いたパラフィン組織標本の作製.....	10
1-3-3 ウイルス感染動物を用いたパラフィン組織標本の作製.....	10
1-3-4 抗ウイルス抗体.....	11
1-3-5 ウエスタンブロッティング法.....	12
1-3-6 免疫組織化学法.....	13
1-3-7 RNA <i>in situ</i> hybridization 法.....	14
1-4 結果.....	15
1-4-1 抗 SAFV 抗体は、SAFV 抗原を認識する.....	15
1-4-2 SAFV 感染細胞におけるウイルス RNA の検出.....	15
1-4-3 抗 SAFV 抗体は、パラフィン組織標本上の SAFV 抗原を特異的に検出する.....	15
1-4-4 SAFV 感染マウスにおける SAFV の抗原陽性部位は、組織病変と一致する.....	17
1-5 考察.....	19
1-6 図と表.....	22
第二章 サフォードウイルス臨床分離株はマウスに神経病原性を有する.....	31
2-1 要旨.....	32
2-2 緒言.....	34
2-3 材料と方法.....	36

2-3-1	ウイルスと細胞.....	36
2-3-2	マウスを用いた SAFV 感染実験.....	36
2-3-3	病理組織学および免疫組織化学的検索.....	38
2-3-4	小脳組織上のウイルス抗原陽性細胞数の評価.....	38
2-3-5	蛍光多重染色法.....	38
2-3-6	RNA <i>in situ</i> hybridization.....	39
2-3-7	マウス脳組織中のウイルス量とウイルスゲノム量の測定.....	40
2-3-8	SAFV 中和抗体価測定.....	40
2-3-9	統計処理.....	41
2-4	結果.....	42
2-4-1	臨床分離株の脳内接種によって新生仔マウスは、体重減少と一過性の神経症状を示す.....	42
2-4-2	二つの株は異なるマウス組織親和性を示す.....	42
2-4-3	新生仔マウスにおいて、二つの株は異なる増殖性と宿主の免疫応答を示す.....	44
2-4-4	マウス脳内におけるサフォードウイルス感染細胞はアストログリアと神経前駆細胞である.....	44
2-4-5	サフォードウイルス臨床分離株は新生仔マウスに対して神経侵襲性を発揮する.....	45
2-4-6	AM 株は 6 週齢若齢 BALB/c マウスの小脳に親和性が高い.....	45
2-4-7	AM 株の脳内接種は若齢 BALB/c マウスに小脳炎を引き起こす.....	46
2-4-8	UR 株は若齢マウスに経粘膜感染する.....	46
2-5	考察.....	47
2-6	図と表.....	49
第三章	サフォードウイルスマウス継代株感染は新生仔マウスの小脳皮質形成に影響する.....	65
3-1	要旨.....	66

3-2 緒言.....	68
3-3 材料と方法.....	70
3-3-1 SAFV 小脳継代株の作出.....	70
3-3-2 ウイルスゲノムの塩基配列解析.....	70
3-3-3 ウイルスカプシドタンパク質の立体構造予測.....	71
3-3-4 各種培養細胞における SAFV の増殖性.....	71
3-3-5 新生仔マウスを用いた感染実験.....	72
3-3-6 病理組織学および免疫組織化学的検索.....	72
3-3-7 蛍光多重染色法.....	73
3-3-8 マウス組織乳剤の作製.....	73
3-3-9 リアルタイム RT-PCR 法.....	73
3-3-10 統計処理.....	74
3-4 結果.....	75
3-4-1 マウス小脳の五回継代により 3 カ所のアミノ酸置換が生じた.....	75
3-4-2 五回継代株は、変異によりレセプター結合領域付近に水素結合を生じた.....	75
3-4-3 五回継代は、SAFV 感受性細胞の増殖性に変化を来した.....	76
3-4-4 五回継代により新生仔マウスに対する神経毒力は、増加した.....	76
3-4-5 五回継代は感染性を高めたが、細胞向性は変わらない.....	77
3-4-6 五回継代によって、ウイルス増殖性は高くなり、炎症反応は増悪した.....	77
3-4-7 五回継代株の感染は小脳皮質形成に影響する.....	78
3-5 考察.....	80
3-6 図と表.....	84
結語.....	99
謝辞.....	100
参考文献.....	122
研究業績.....	123

## 序論

サフォードウイルス(Saffold virus、以下SAFV)は、ピコルナウイルス科(Picornaviridae)カルジオウイルス属(Cardiovirus)に属する直径およそ30 nm、エンベロープを持たないプラス鎖RNAウイルスである。このウイルスは、2007年に初めて不明熱患児の糞便(1981年に採取)から分離された(Jones *et al.*, 2007)。SAFVが分離されるまで、カルジオウイルス属は、小型げっ歯類を自然宿主とする脳心筋炎ウイルス(Encephalomyocarditis virus、EMCV)やタイロウイルス(Theilovirus)種のタイラーウイルス(Theiler's mouse encephalomyelitis virus、TMEV)の2種が知られており、これらは主に、小型げっ歯類に心筋炎、脳炎あるいは糖尿病を引き起こす(Dickinson *et al.*, 1966; Craighead *et al.*, 1968; Dal Canto *et al.*, 1977; Yoon *et al.*, 1980; Rodriguez *et al.*, 1987)。このうち、EMCVは、ヒトにインフルエンザ様症状を引き起こし、また、サル等の非ヒト霊長類の劇症型心筋炎の原因となることが報告されており、人獣共通感染症ウイルスである(Hubbard *et al.*, 1992; Reddacliff *et al.*, 1997; Oberste *et al.*, 2009; Canelli *et al.*, 2010; Czechowicz *et al.*, 2011; Masek-Hammerman *et al.*, 2012)。そのためSAFVは、ヒトを自然宿主とする新たなカルジオウイルスとして注目されている。2007年のSAFVの分離報告以降、日本を含めた世界各国で急性胃腸炎や上気道炎を発症した乳幼児の臨床検体から、SAFVの分離・検出が相次いで報告された(Chiu *et al.*, 2008, 2010; Drexler *et al.*, 2008; Blinkova *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2009, 2010; Xu *et al.*, 2009; Zoll *et al.*, 2009; Tsukagoshi *et al.*, 2010; Chua *et al.*, 2009; Dai *et al.*, 2011; Galama *et al.*, 2011; Itagaki *et al.*, 2011)。しかしながら、SAFVの血清学的疫学調査により、各年齢層でのSAFVに対する中和抗体保有率が明らかになると、このウイルスは、幼少期にほとんどのヒトが感染しており、

多くは不顕性感染で終息していると考えられるようになった (Zoll *et al.*, 2009; Chiu *et al.*, 2010; Chua *et al.*, 2009; Galama *et al.*, 2011; Kobayashi *et al.*, 2013; Naeem *et al.*, 2014)。SAFVは、現在のところ、遺伝子型により11型まで分類されており、疫学的研究によって、主に2および3型がヒト-ヒト間で経口的に伝播し続けていることが明らかとなっている (Zoll *et al.*, 2009; Khamrin *et al.*, 2013)。さらに、SAFVは、他のノロウイルス、ロタウイルス、あるいはボカウイルスといった腸管ウイルスやインフルエンザウイルスなどの呼吸器ウイルスと共に検出され、また、健常者からも検出されることから、ヒトに対して強い病原性を発揮しないと考えられている (Chiu *et al.*, 2008; Drexler *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2010; Tsukagoshi *et al.*, 2010; Dai *et al.*, 2011; Itagaki *et al.*, 2011; Khamrin *et al.*, 2011)。

SAFVと同じピコルナウイルス科に属するポリオウイルスは、主に小児期に感染し、多くは不顕性であるが、感染者 200 人に一人の割合で、後遺症となり得る弛緩性麻痺を発症する。1950 年代には世界的な大流行が起きたが、1950 年代に有効な経口生ワクチンが開発されたことにより患者数は大きく減少した。さらに、ポリオウイルスは一過性の急性感染で、持続感染せず、ウイルスコントロールが簡易であること、ウイルス学的診断技術が向上したことから、世界保健機構 (WHO) はポリオ根絶計画を推進した (Miyamura, 2009; Shimizu, 2010)。その根絶計画では、経口生ポリオワクチンの集団接種とポリオウイルスサーベイランス (流行予測調査) が大きな柱となっている。このサーベイランスでは、弛緩性麻痺患者の便検体を用いて、原因ウイルスを調査し、その流行動態から流行を予測するが、非感染性急性弛緩性麻痺と非ポリオウイルスによる感染との鑑別が必要である。このサーベイランス調査の結果、0.3~21%の割合で、SAFV が検出された (Blinkova *et al.*, 2009; Naeem *et al.*, 2014; Victoria *et al.*, 2009)。同様に、無菌性髄膜炎や小脳炎を発症した患児からも SAFV は、検出あるいは分離され

ることがあり、SAFV が神経病原性を有する可能性は否定できない (Nielsen *et al.*, 2012; Himeda *et al.*, 2011) 。

そこで、本論文では、マウスモデルを用いてSAFVの神経病原性を明らかにすることを最終目標とした。まず第一章では、抗SAFV抗体を用いたパラフィン包埋組織標本上のウイルス抗原検出法を確立した。次に、第二章では、マウスにおけるSAFV臨床分離株の病原性を病理学的、ウイルス学的に明らかにした。さらに、第三章では、SAFV の無菌性髄膜炎由来株にみられた小脳親和性に着目し、マウス小脳継代SAFV株を作出し、その神経病原性を明らかにした。

## 第一章

# サフォードウイルスの病理学的診断法の確立



## 1-1 要旨

サフォードウイルス (Saffold virus, SAFV)は、主に乳幼児の下痢症や呼吸器疾患と関連すると考えられているが、まれに無菌性髄膜炎や急性弛緩性麻痺患児からも検出される。しかしながら、SAFVの病原性は、不明な点が多い。

免疫組織化学法によるウイルスタンパクの検出に基づく病理学的解析は、病原体と病態の関係性を直接明らかにすることができる。そこで本章では、抗 SAFV 抗体を用いた免疫組織化学法により、パラフィン組織標本上のウイルス抗原の検出法を検討し、SAFVの病理学的診断法を確立することを目的とした。同時に、無菌性髄膜炎の主な原因となるエンテロウイルス属との鑑別が可能かを調べるために、エンテロウイルス属との交差反応性についても評価した。

抗 SAFV 抗体は、SAFV3 型 JPN08-404 株を高度免疫して得られたウサギ血清を用いた。一方、抗エンテロウイルス抗体は、ドデシル硫酸ナトリウム-熱変性処理後のエンテロウイルス 71 あるいはポリオウイルス粒子、ポリオウイルスあるいはコクサッキーウイルス B 群のカプシドタンパク VP1 の組換えタンパク質、ポリオウイルス非構造蛋白質 2C のペプチドタンパクをそれぞれ免疫原とした、高度免疫ウサギ血清を用いた。

抗 SAFV 抗体の特異性と交差反応性は、SAFV あるいは、主な A 群、B 群と C 群エンテロウイルス感染後の培養細胞と実験的感染マウスのホルマリン固定後パラフィン細胞標本を用いて免疫組織化学法により決定した。ウイルス抗原陽性所見は、SAFV 感染を示唆する変性細胞に認められ、抗 SAFV 抗体の特異性が明らかとなった。各抗エンテロウイルス抗体は同属内で交差反応性を認めたものの、SAFV に対して交差反応性を示さなかった。

以上のように、抗 SAFV 抗体を用いた免疫組織化学法によるウイルス抗原の検出

法を確立した。また、本研究で用いた抗 SAFV 抗体は、特異性が高く、無菌性髄膜炎の主な原因であるエンテロウイルスとの鑑別が可能であった。これらの抗体を利用することは、SAFV 感染症のみならず、ピコルナウイルス感染症の病理学的診断法に有用である。

## 1-2 緒言

サフォードウイルス (Saffold virus, SAFV)は、主に乳幼児の下痢症や呼吸器疾患と関連すると考えられているが、まれに無菌性髄膜炎や急性弛緩性麻痺患児からも検出される。小児の無菌性髄膜炎の主な原因ウイルスとして、SAFV と同じピコルナウイルス科に属するエンテロウイルス (*Enterovirus*) 属が、挙げられる。その中でも特に、A 群エンテロウイルスのkokosakkiウイルス A 群およびエンテロウイルス A71、B 群エンテロウイルスのkokosakkiウイルス B 群、あるいはエコーウイルスは、流行性腸炎、上気道炎、手足口病、あるいはヘルパンギーナの流行を引き起こすとともに、劇症型の糖尿病、心筋炎を発症させ、また、無菌性髄膜炎や髄膜脳炎の主要な原因ウイルスである (Kamei *et al.*, 1990; Zuckerman *et al.*, 1993; Yeung *et al.*, 1997; Lum *et al.*, 1998; Arbustini *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2000; Hsueh *et al.*, 2000; Cree *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012)。また、C 群エンテロウイルスのポリオウイルスは、小児に弛緩性麻痺を引き起こし、かつて世界中で大流行していたが、1988 年から、世界保健機構によるポリオ根絶計画が推進され、患者は激減した。このポリオ根絶計画で実施されているサーベイランス事業では、弛緩性麻痺患者の便検体からのウイルスの検出、分離、同定が行われているが、非ポリオ急性弛緩性麻痺の原因ウイルスを調査したところ、多くは A 群あるいは B 群エンテロウイルスであった (Khetsuriani *et al.*, 2010; Laxmivandana *et al.*, 2013; Apostol *et al.*, 2012; Kargar *et al.*, 2009; Saeed *et al.*, 2007)。しかし、非ポリオ急性弛緩性麻痺患者のうち、40%の割合で原因ウイルスは不明である。一方で、SAFV も同様に非ポリオ急性弛緩性麻痺患者から 0.3-21%の割合で検出、分離されている (Blinkova *et al.*, 2009; Naeem *et al.*, 2014; Victoria *et al.*, 2009)。従って、SAFV の病原性を明らかにする上で、他のエンテロウイルス属との鑑別は、必須である。

病原体を特定し、病態との関係性を証明する手段の一つとして、病理学的解析法がある (Ezyaguirre *et al.*, 2010)。また、免疫組織化学 (IHC) 法や *in situ* hybridization (ISH)法は、パラフィン組織切片上のウイルス抗原やウイルス遺伝子を検出することが可能であるため、ウイルス感染症の診断時に有用である (Kamei *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 2000; Hammnerstand *et al.*, 2013; Bates *et al.*, 1997; Foulis *et al.*, 1990; Wong *et al.*, 2008)。最近は、パラフィン組織標本から直接、核酸を抽出し、ウイルス遺伝子を検出する方法も利用されている (Trabelsi *et al.*, 1995; Oka *et al.*, 2005; Baasner *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2000; Guarner *et al.*, 2007)。しかし、病理学分野で通常用いられているホルマリン固定は、組織中の DNA や RNA を徐々に破壊する。McKinney らは、3 週間ホルマリン固定後のパラフィン組織標本中の RNA 量が生材料内の RNA 量の約 100 分の 1 にまで低下したと報告した (McKinney *et al.*, 2009)。よって、IHC 法は、ホルマリン固定後のパラフィン組織標本を用いたウイルス抗原検出法として最も汎用されている。

そこで本章では、SAFV 感染症の病理学的診断法を確立することを最終目標として、抗 SAFV 抗体を用いたパラフィン組織標本上のウイルス抗原の検出法を検討した。同時に、無菌性髄膜炎の主な原因となるエンテロウイルス属との鑑別が可能かを調べるために、代表的なエンテロウイルス属との交差反応性についても評価した。

## 1-3 材料と方法

### 1-3-1 ウイルスと細胞

SAFVは、2008年に無菌性髄膜炎患児の髄液から分離されたSAFV3型 JPN08-404株 (Himeda *et al.*, 2011) (高知県食肉衛生検査所、細見卓司先生より分与、Aseptic Meningitis 株、以下AM株とする)と上気道炎患児から分離されたGunma/176/2008株 (Tsukagoshi *et al.*, 2010) (群馬県衛生環境研究所、塚越博之先生より分与、Upper Respiratory Tract Inflammation 株、以下UR株とする)を用いた。また、鑑別を目的とした対照ウイルスは、我が国の感染症サーベイランスによって、2007年から2011年に無菌性髄膜炎患者から検出されたエンテロウイルス属の主な血清型の標準株あるいは臨床分離株 (国立感染症研究所、清水博之先生から分与、愛知県衛生研究所、山下照夫先生から分与)を使用した。表1-1に本研究で用いたウイルスの種、血清型、株名、由来患者の疾患名、遺伝子型、登録番号、免疫組織化学的検索に使用した材料を示した。

培養細胞は、アカゲザル腎由来細胞 (Rhesus monkey kidney epithelial cells、LLC-MK<sub>2</sub>細胞)、ヒト横紋筋肉腫由来細胞 (Rhabdomyosarcoma cells、RD細胞)、シリアンハムスター腎由来細胞 (Baby hamster kidney cell, BHK細胞)を使用した (国立感染症研究所、清水博之先生、白戸憲也先生から分与)。培養細胞は、10%牛胎仔血清 (fetal bovine serum、FBS)、5,000ユニット/mlペニシリン-ストレプトマイシン (Gibco、米国) 添加イーグル最小必須培地 (Eagle's minimum essential medium、MEM、Sigma-Aldrich社、米国)を用いて単層培養した。ウイルス保存液は、2%FBS 添加MEMで培養したLLC-MK<sub>2</sub>細胞にウイルスを接種し、細胞変性効果 (cytopathic effect、CPE) が観察された時点で-80°Cに保存し、2~3回凍結融解後、2,000g×15分間遠心し、その上清をウイルス液として分注し、使用するまで-80°Cに保存した。ウイルス力価の測定は、ウイルス液を2%FBS添加MEMで10<sup>-1</sup>~10<sup>-8</sup>に10倍段階希釈し、96

穴培養プレートにそれぞれ加えた。その後、それぞれ $1\sim 2\times 10^4$ 個/100  $\mu\text{l}$ に調整した LLC-MK<sub>2</sub>細胞を巻き込み、5%CO<sub>2</sub>、37°Cの条件下で1~2週間培養した。それぞれのウイルスによって、CPEが十分観察された日を最終判定日として、CPE陽性穴数を数え Behrens-Kärber法による50%細胞培養感染量 (50% cell culture infective doses、CCID<sub>50</sub>) を算出した。

### 1-3-2 ウイルス感染細胞を用いたパラフィン組織標本の作製

ウイルス感染細胞は次のように準備した。単層培養したLLC-MK<sub>2</sub>細胞にSAFV臨床分離株 (AM株およびUR株) をウイルス力価 $10^5$  CCID<sub>50</sub>で接種した。CPEが80%以上観察された時点で、細胞を回収し、細胞浮遊液ゼリー化試薬 (iPGell、Geno Staff社、東京)を用いてプロトコールに従って感染細胞塊を作製した。その後、10%中性緩衝ホルマリン液で24時間固定し、常法に従いパラフィン包埋組織切片を作製し、細胞塊組織標本とした。同様に、対照ウイルスであるA群エンテロウイルス (EV-A群) のエンテロウイルス71 (EV71)、B群エンテロウイルス (EV-B群) のコクサッキーウイルスB3 (CVB3) あるいはエコーウイルス標準株 (Echo6、9、11、25、30)、C群エンテロウイルス (EV-C群) のポリオウイルス (PV) 感染後のRD細胞を用いて細胞塊組織標本を作製した。陰性コントロールとして非感染の培養細胞塊組織標本も作製した。

### 1-3-3 ウイルス感染動物を用いたパラフィン組織標本の作製

ウイルス感染動物は次のように準備した。ddY妊娠14日目のマウスを日本エスエルシー株式会社 (静岡) から購入し、出生後の新生仔マウスを感染実験に使用した。生後24時間以内の新生仔マウスにSAFV3臨床分離株 (AM株とUR株) を右側視床内にISPマイクロシリンジ (株式会社伊藤製作所、静岡) で10  $\mu\text{l}$  脳内接種した。同様にEV-A

群 (EV71、CVA3、A4、A6、A10、A16)、EV-B群 (CVA9とCVB1-5、Echo6、9、11、25、30) あるいはEV-C群 (PV1) を10 µl 脳内接種した。最長21日間臨床症状の観察を行い、感染3日目あるいは重度の神経症状が観察された際は、その都度、安楽殺し材料を採取した。イソフルランによる過麻酔で安楽殺した後、開胸し、29G x 1/2” 0.5 ml インスリン用シリンジ (テルモ株式会社、東京) を用いて10%中性緩衝ホルマリン液を心に直接注入し、灌流固定を行った。その後、浸漬固定し、1週間以内に切り出しを行った。頭部組織は、頸部で切断後に矢状断に二分割し、1週間の再浸漬固定後に30%～50%エタノールで脱脂し、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA4Na、同仁化学研究所、熊本) で脱灰処理を行った。脱灰後に常法に従いパラフィン包埋し、組織切片を作製した。組織切片は脱パラフィン処理し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) で染色した。また、国立感染症研究所感染病理部第二室に保管されていた、マウス感受性PV2を脊髄内接種したICRマウス脊髄組織のパラフィン組織切片を陽性コントロール標本として用いた。全ての動物実験は、国立感染症研究所の実験動物委員会の承認を得ており(承認番号110059、211028)、実験動物は同委員会のガイドラインに沿って取り扱った。

#### 1-3-4 抗ウイルス抗体

抗SAFV抗体は、SAFV3型AM株を高度免疫して得られたウサギ血清を用いた (高知県食肉衛生検査所、細見卓司先生より分与)。

対照ウイルスを検出するための抗EV抗体は、国立感染症研究所感染病理部第二室で作製し、保管されていたEV-A群抗体2種 (抗EV71-C7抗体、抗EV71-1095抗体)、EV-B群抗体 (抗CVB3-VP1抗体)、およびEV-C群抗体 (抗PV1抗体の抗PV1-OM1、抗PV1-VP1、抗PV1-2C抗体) を用いた (Kotani *et al.*, 2014)。抗EV71-C7抗体、抗

EV71-1095抗体、抗PV1-OM1抗体は、それぞれ、ドデシル硫酸ナトリウム-熱変性処理後のEV71のC7/Osaka/Japan 97株、EV71の1095/Japan 97株あるいはPV1のMahoney株ウイルス全粒子を免疫原としてウサギに高度免疫して作製された。抗CVB3-VP1抗体、抗PV1-VP1抗体は、それぞれCVB3とPV1のVP1領域のPCR産物をpGEX-3X vectorに組み込み、大腸菌 (BL21株) にトランスフェクションし培養し、その細胞塊から各VP1の融合タンパクをウサギに高度免疫して作製された。抗PV1-2C抗体はPV1 Mahoney株を鋳型として、エンテロウイルスで保存された非構造タンパクの2C領域の20アミノ酸からなるペプチド領域を選び、Shigma-Genosysの抗体作製サービスを利用し作製された。さらに、一般で汎用されている市販抗EVモノクローナル抗体 (クローン番号5-D8/1、Dako 社、デンマーク) を使用した。

#### 1-3-5 ウェスタンブロッティング法

AM株あるいはUR株をBHK細胞に接種し、48時間後にCPEが80%以上観察されたので、この細胞を回収し、放射性免疫沈降分析用溶解バッファー

(Radio-immunoprecipitation assay, RIPA)を用いてタンパク質を抽出し、抗原とした。なお、対照ウイルス感染細胞として、EMCV感染BHK細胞を用い、非感染対照として、BHK細胞を用いた (EMCVは国立感染症研究所、白戸憲也先生から分与)。各抗原は、総タンパク量を20  $\mu$ gに合わせて、ポリアクリアミドゲル (NuPAGE 12% Bis-Tris Precast Gels、Novex、米国) に添加し、200V、30分の条件下で電気泳動を行った。次に、ゲル中のタンパク質は、ポリフッ化ビニリデン膜 (polyvinylidene difluoride, PVDF) (Merck Millipore、米国) に電氣的に移動・固定化した。タンパク質を固定したPVDF膜をPVDF Blocking Reagent for Can Get Signal® (東洋紡株式会社、大阪) でブロッキングし、抗SAFV抗体をCan Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution (東



洋紡株式会社).で希釈し、これらを12時間、反応した。反応後の膜をトリス塩酸バッファー (TBS) で3回洗浄後、二次抗体として、セイヨウワサビペルオキシダーゼ抱合型二次抗体 (Abcam、米国) と1時間反応した。再度、TBSで3回洗浄後、PVDF膜上のシグナルは、Immobilon western chemiluminescent reagent (Merck Millipore)を用いて化学発光させ、ルミノ・イメージアナライザー (ImageQuant LAS4000 digital imaging system) (GE Healthcare、英国)を用いて検出した。ハウスキーピングタンパク質として、 $\beta$ アクチンポリクローナル抗体 (Abcam) を用いて同様に各抽出サンプルの有効性を検証した。

#### 1-3-6 免疫組織化学法

免疫組織化学法は、培養細胞および動物組織のパラフィン組織標本を用いて次のように行った。組織標本を、キシレンで脱パラフィンした後、エタノールで親水化処理し、水洗した。そして、脱パラ抗原賦活化液pH6.0 (株式会社ニチレイバイオサイエンス、東京) 中でオートクレーブ法 (121°C、10分間) による抗原賦活化処理を行った。リン酸緩衝液(Phosphate buffered saline、PBS、和光純薬工業、大阪)で3回洗浄後、内因性ペルオキシダーゼ活性阻止のため、0.3%過酸化水素水添加メタノールに浸漬 (室温、30分間) した。同様にPBS洗浄後、二次抗体血清に対するブロッキングのため10%正常ヤギ血清 (Dako社) を用いて室温、5分間反応させた。なお、すべての血清抗体の希釈には、1%牛血清アルブミン添加 0.1%アジ化ナトリウム加PBS (以下、抗体希釈液とする) を使用した。それぞれの抗ウイルス抗体は、抗体希釈液で2000倍に希釈し、一次抗体とし、ブロッキング後の組織標本と4°C、12時間以上反応させた。PBS洗浄後、二次抗体として、マウス組織用ウサギ1次抗体用シンプルステインMAX-PO (R) (株式会社ニチレイバイオサイエンス) を使用し、プロトコール通り反応を行った。なお、モノクローナル抗体を一次抗体として使用した場合は、マウスステインキット (株式会

社ニチレイバイオサイエンス)を用いてプロトコールどおり反応を行った。二次抗体反応後、組織はPBS洗浄し、過酸化水素水存在下でジアミノベンチジン

(3,3-diaminobenzidine、DAB、Sigma-Aldrich)を基質として発色させ、抗原局在部位を可視化した。流水洗後、核をヘマトキシリンで対比染色し、常法どおり脱水、透徹、封入を行った。

### 1-3-7 RNA *in situ* hybridization法

培養細胞標本を用い、パラフィン組織標本上のSAFVのRNAを検出するために、QuantiGene ViewRNA ISH Tissue Assay (アフィメトリクス・ジャパン、東京)を用いてRNA *in situ* hybridization法を行った。QuantiGene ViewRNA用のプローブは、SAFV3 AM株 (登録番号: HQ902242) の遺伝子配列情報を元にアフィメトリクス・ジャパンに設計を依頼した。組織標本は、脱パラフィン処理後、プロトコールに従い、反応を行った。概説すると、前処理液を用いて10分間90℃で湯煎し、その後プロテアーゼQFを40℃、10分間酵素反応させ、QuantiGene ViewRNA Probe Setで40℃、2時間ハイブリダイゼーションさせた。その後、シグナルを増幅させるため、Pre Amplifier Mix QTを40℃、25分間、Amplifier Mix QTを40℃、15分間ハイブリダイゼーションした。そして、アルカリフォスタファアーゼ基質が接合したプローブを反応させ、Warp Red Chromogen Kit (Biocare Medical、米国)を用いて発色し、ヘマトキシリンで対比染色した。

## 1-4 結果

### 1-4-1 抗 SAFV 抗体は、SAFV 抗原を認識する

まず、抗 SAFV 抗体が SAFV 抗原を認識することを確認するため、ウエスタンブロッティング法を行った。抗 SAFV 抗体は、BHK 細胞由来のタンパク質と非特異的な反応を示したが、AM 株あるいは UR 株感染細胞を抗原とした時のみ、30-40kDa の特異的なバンドが検出された (図 1-1A 矢印)。なお、対照ウイルスの EMCV 感染細胞由来のタンパク質において、同様なバンドは観察されなかった。よって、抗 SAFV 抗体は、SAFV 由来タンパク質を認識することが確認できた。

### 1-4-2 SAFV 感染細胞におけるウイルス RNA の検出

SAFV の細胞内における感染・増殖を確認するために、RNA ISH 法を行い、SAFV3 型の AM 株あるいは UR 株感染後のパラフィン組織標本上のウイルス遺伝子を検出した。AM 株、UR 株感染細胞は、ともにウイルス RNA シグナルが細胞質内に顆粒状に検出された (図 1-1)。また、一部の UR 株感染細胞では細胞質内に、ウイルス抗原陽性像と同様に、均一なシグナル陽性像として観察された (図 1-1B 矢印)。よって、ウイルスは細胞に感染増殖しており、陽性標本として使用できることが確認できた。

### 1-4-3 抗 SAFV 抗体は、パラフィン組織標本上の SAFV 抗原を特異的に検出する

次に、SAFV3 型の AM 株あるいは UR 株感染後のパラフィン組織標本で抗 SAFV 抗体を用いた免疫組織化学法を行った。AM 株感染細胞は、核が偏在する変性細胞の細胞質内に顆粒状に抗原が陽性で、一方、UR 株は細胞質内に均一に抗原が陽性であった (図 1-2 左列の 1 段目矢印、2 段目矢頭)。非感染細胞標本ではこのような陽性像は全く見られなかった。次に、抗 SAFV 抗体の特異性と交差反応性について評価した。主な A 群、B 群、と C 群 EV

ウイルスの標準株感染後の培養細胞のパラフィン組織標本を評価したところ、交差反応は、認められなかった（図 1-2 左列 3-5 段、表 1-2 左列）。よって、抗 SAFV 抗体は、SAFV 抗原に特異的であることが明らかとなった。また、各抗 EV 抗体の特異性と交差反応性についても検討した。その結果、各抗 EV 抗体は、いずれも SAFV 抗原を検出しなかった（図 1-2、1 および 2 段目）。EV 抗原に対しては、それぞれ免疫原の EV 血清型に対して免疫組織化学法で強陽性を示したが、一部、他の EV 血清型との交差反応性を示した（表 1-2）。EV-A 群の抗 EV71-C7 抗体と抗 EV71-1095 抗体は、EV71 感染細胞の細胞質に強陽性像を示した（図 1-2 左から 2、3 列目、上から 3 段目）。また、抗 EV71-C7 抗体は、CVA6 と A16、CVB2 と B5、PV3 を検出し、抗 EV71-1095 抗体より広範囲のウイルス種に交差反応を示した（表 1-2）。EV-B 群の抗 CVB3-VP1 抗体は、感染細胞の細胞質で強陽性像を示し（図 1-2、左から 4 列目、上から 4 段目）、EV-B 群をすべて検出したが、CVA16 をのぞいてすべてのエンテロウイルス A 群、C 群と交差反応を示さなかった（表 1-2）。抗 PV1-OM1 抗体、抗 PV1-VP1 抗体および抗 PV1-2C 抗体は、すべての血清型の PV を検出した（表 1-2）。しかしながら、これらの抗体は、EV-A あるいは B 群のいくつかの血清型と交差反応した（PV1-OM1 抗体、PV1-VP1 抗体は、CVB5、Echo6、11、25、30；PV1-2C 抗体は、CVA3、4、6、9、10、16、EV71）。さらに、近年の臨床分離株を用いて感染培養細胞パラフィン組織標本を準備し、それぞれの抗体の有用性を検討した。その結果、特異性と交差反応性は、前述の標準株と同様の傾向を示した（表 1-3）。

以上の結果より、抗 SAFV 抗体は、特異性が高く、エンテロウイルス属とは交差反応性を示さないことが判明した。また、抗 EV 抗体は、それぞれの EV の種を検出することが可能であったが、SAFV を全く検出しないことがわかった。

#### 1-4-4 SAFV 感染マウスにおける SAFV の抗原陽性部位は、組織病変と一致する

SAFV および代表的な EV (EV71、CVB3、あるいは PV1) 標準株感染後のマウスのパラフィン組織標本を用いて、免疫組織化学法により、動物組織上の抗 SAFV 抗体と抗 EV 抗体の特異性と交差反応性を検討した。SAFV-AM 株を脳内接種した新生仔マウス小脳皮質では、核が偏在した類円形のグリア様細胞が存在したが、炎症所見はみられなかった (図 1-3A)。この病変部に一致して、ウイルス抗原は、検出された (図 1-3B)。また、抗 SAFV 抗体は、非感染マウス小脳に非特異反応を示さなかった (図 1-3C)。次に、EV71-SK-EV006/Malaysia 97 株を脳内接種した新生仔マウスの骨格筋組織を用いて交差反応性を確認した。この EV71 感染マウスは、ウイルス接種 3 日目に後肢の麻痺を発症し、骨格筋組織には中等度の炎症性細胞浸潤を伴う骨格筋の変性、壊死がみられた (図 1-3D)。この病変部に一致して、EV71 のウイルス抗原が検出された (図 1-3E) が、抗 SAFV 抗体では、陰性であった (図 1-3F)。また、CVB3-Nancy 株を脳内接種した新生仔マウスは、接種 2 日目には痙攣性の麻痺症状を示した。このマウスの海馬は、神経細胞壊死がみられ (図 1-3G)、この病変部に一致して、CVB3 のウイルス抗原が陽性であった (図 1-3H)。しかしながら、抗 SAFV 抗体では陰性であった (図 1-3I)。さらに、PV2-Lansing 株の脊髄内接種 2 日目に弛緩性麻痺を発症した、ICR マウスの脊髄前角の変性した運動神経 (図 1-3J) は、PV ウイルス抗原が検出された (図 1-3K) が、抗 SAFV 抗体では陰性であった (図 1-3L)。

以上の結果から、抗 SAFV 抗体は、SAFV 感染マウスのパラフィン組織標本上のウイルス抗原の特異的な検出が可能であり、EV 抗原と交差反応しないことが明らかとなった。また、骨格筋と脳組織において非特異反応は、みられなかった。

新生仔マウスは、ピコルナウイルスの分離や検出、あるいは病原性の評価に用いられる。そこで次に、ウイルス感染後の新生仔マウス標本を用いた病理学的検索における抗ウイルス抗体の有用性を検討するために、SAFV あるいは主な EV-A および EV-B 群感染マウス組織

上のウイルス抗原の検出を試みた。その結果、脳、脊髄、四肢骨格筋、心筋、および口腔粘膜の組織病変部位に一致して、ウイルス抗原を検出することができた（表 1-4）。よって、これらの抗体を用いた免疫組織化学法によるウイルス抗原検出は、新生仔マウスを用いたピコルナウイルスの分離・検出あるいは病原性の評価においても有用な手段となる。

## 1-5 考察

本研究では、抗 SAFV 抗体を用いて、パラフィン組織標本上のウイルス抗原の検出法の確立を行った。この抗体は、SAFV 抗原を特異的に検出し、無菌性髄膜炎や脳・脊髄炎などの主な原因となるエンテロウイルスとは交差反応性がないことが判明した。従って、抗 SAFV 抗体や本研究で使用した各種の抗 EV 抗体は、ピコルナウイルス感染症の診断のための病理学的検索時に有用であると考えられた。そこで、培養細胞、マウスのパラフィン組織標本を用いた抗 SAFV 抗体および各種抗 EV 抗体の特異性と交差反応性の評価結果に基づき、交差反応性を利用した抗体パネルを作成した（表 1-5）。この抗体パネルは、病理学的診断だけではなく、臨床検体を培養細胞あるいは新生仔マウスに接種し、そのパラフィン組織標本を免疫組織化学的に検索する際に使用することができる。もう一つの利点としては、臨床検体に含まれるピコルナウイルスを網羅的に評価することができることも挙げられる。SAFV は、他の腸管ウイルスや呼吸器ウイルスと共に検出されることが多く、さらに、小児におけるピコルナウイルスの感染症の場合は、流行期には混合感染が容易に起きる可能性があるため、網羅的な評価法は、感染症診断への貢献が多いに期待できる。混合感染した臨床検体からウイルスを検出する際、特異的なプライマーやプローブを使用した PCR 法や培養細胞によるウイルス分離は、複数のウイルスを網羅的に検出することが、比較的難しい。今回作成した抗体パネルでスクリーニングを行い、ウイルスの混合感染を検出できれば、その後のウイルス学的検索や遺伝子解析で血清型や種を同定することが容易になる。

本研究で使用した、抗 EV71-C7 抗体、抗 EV71-1095 抗体、および抗 PV1-OM1 抗体は、SDS・熱変性ウイルス全粒子を免疫原とした（Klump *et al.*, 1990）が、構造蛋白のエピトープ部位や非構造蛋白質が多く含まれており、種を超えた交差反応性が認められたと考えられる。また、ウイルスカプシドタンパクの VP1 は、宿主細胞のウイルス結合部位や中和抗体のエピトープ部位である（Banerjee *et al.*, 2004）。VP1 融合タンパクを免疫原とした抗

CVB3-VP1 抗体と抗 PV1-VP1 抗体は、いずれも種特異性が高く、ウイルス種の抗原検出に有用であろう。一方、PV の非構造タンパクの 2C のうち、エンテロウイルスで保存されたペプチド領域を免疫原とした抗 PV1-2C 抗体は、EV を広く認識する抗体として期待されたが、実際は、ポリオウイルスと EV-A 群抗原のみを認識した。

抗ウイルス抗体を用いて、ヒトや動物の組織標本上の病原体の抗原を検出する際には、様々な問題点に注意する必要がある。まず、組織材料は、培養細胞と比べて非特異的な陽性反応が起きやすい。市販の抗 EV モノクローナル抗体（クローン 5-D8/1）は、EV の VP1 領域を認識し、ほとんどの EV 抗原と交差反応性を示すため、エンテロウイルス感染症の病理学的診断に汎用されている（Trabelsi *et al.*, 1995）。しかしながら、このモノクローナル抗体は、ヒトのミトコンドリア内酵素である、ATP 合成酵素βサブユニット（ATP synthase subunit beta, ATP5B）およびクレアチンキナーゼ B 型（Creatine kinase B-type, CKBB）と非特異に結合することが報告された（Miao *et al.*, 2009）。同様に、ウサギ高度免疫血清を用いた場合にも、組織中のタンパク質に対する非特異反応が見られることがある（Piralla *et al.*, 2012）。これらの非特異反応の対策として、アセトン処理後の組織や培養細胞の乾燥粉末による吸収処理や免疫グロブリン G (IgG) 精製が有効な場合がある（Piralla *et al.*, 2012）。前述の抗 EV モノクローナル抗体（クローン 5-D8/1）の場合は、ATP5B および CKBB と事前に反応させたことで非特異反応が減少した（Miao *et al.*, 2009）。今回使用した、抗 EV71 抗体と抗 PV 抗体は、動物組織の乾燥粉末による吸収処理で、非特異反応を抑えた（Nagata *et al.*, 2002, 2004）。本研究で用いた抗 SAFV 抗体は、IgG 精製し、マウスの組織標本における非特異反応を除去した。診断の精度を上げるためには、非特異反応に注意しながら免疫組織化学法の結果を検討する必要がある。

以上のように、抗 SAFV 抗体を用いて、パラフィン組織標本上のウイルス抗原の検出法を確立した。同時に、無菌性髄膜炎の主な原因となるエンテロウイルス属との鑑別が可能で



あることも明らかにした。第二章ではこれらの病理学的手法と感染マウスモデルを利用し、SAFV3 型の臨床分離株の神経病原性を明らかにする。。

## 1-6 図と表

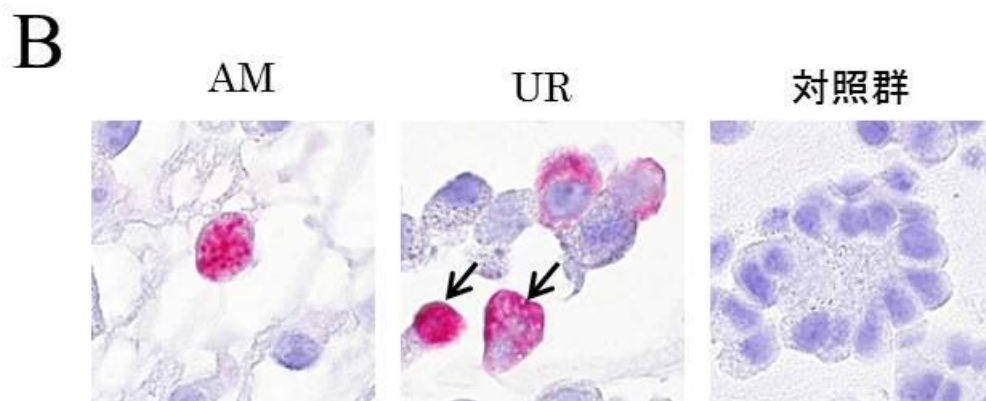
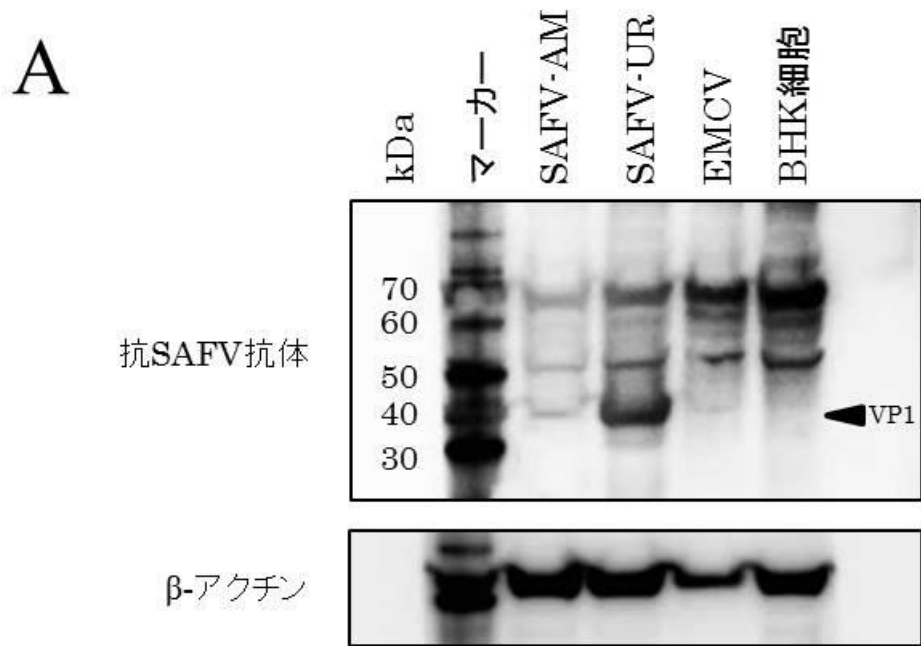


図1-1 ウエスタンブロッティング法を用いたウイルスタンパク質の検出とパラフィン組織標本を用いたRNA *in situ* hybridization法によるウイルス遺伝子の検出

サフォードウイルス (SAFV) 3型AM株あるいはUR株をBHK細胞に接種後、細胞変性効果が観察された細胞を抗原として、ウエスタンブロッティング法を行った (A)。AM株およびUR株感染細胞を抗原とした時、特異的なバンドが30-40kDaの大きさに検出された (矢印)。LLC-MK<sub>2</sub>細胞にSAFVを接種したパラフィン組織標本を用いて、RNA *in situ* hybridization法を行った (B)。Warp Redで赤褐色に染まった箇所がSAFVのプラス鎖RNAを示す。感染細胞の細胞質内が陽性であった。UR株感染細胞では細胞質内に均一なシグナル陽性像も観察された (矢印)。撮影倍率1000倍。

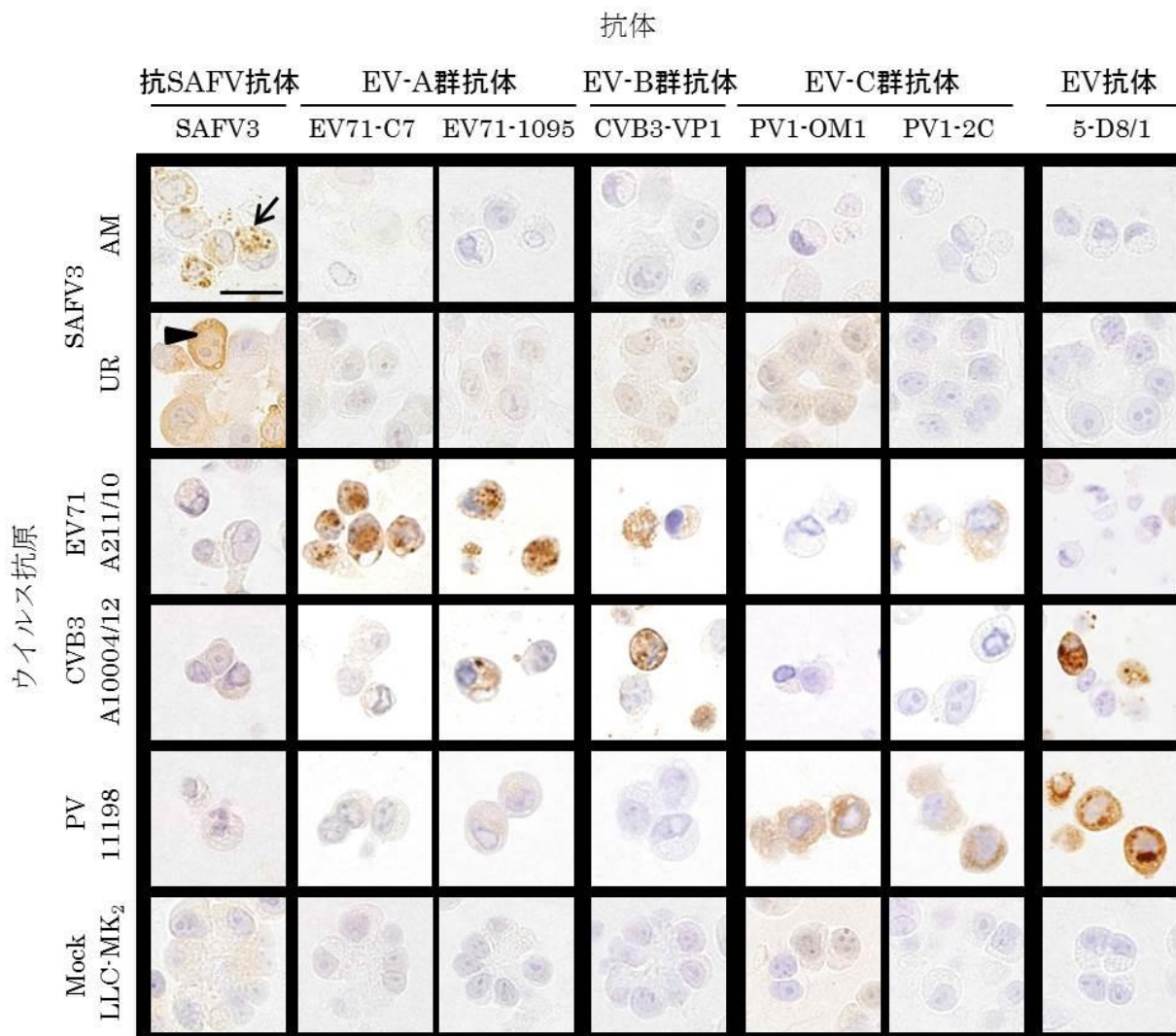


図1-2 ウイルス感染細胞のパラフィン組織標本を用いた免疫組織化学法によるウイルス抗原の検出

サフォードウイルス3型(SAFV3)のAM株、UR株、および対照ウイルスとして、エンテロウイルス71 (EV71、A211/10株)、コクサッキーウイルスB群 (CVB3、A10004/12株)、ポリオウイルス1型 (PV、11198株)をLLC-MK<sub>2</sub>細胞あるいはRD細胞に接種し、細胞変性効果が出現した1~3日目の細胞を使用した。免疫組織化学法を用いて各種抗体と抗原の特異性と交差反応性を評価した。ウイルス抗原陽性部位はいずれも変性した細胞の細胞質内であった。抗SAFV3抗体の染色性は、AM株感染細胞では核が偏在した細胞に多くの抗原陽性がみられ (矢印)、UR株は細胞質に均一に抗原陽性がみられた (矢頭)。撮影倍率1000倍。スケール 20 μm。

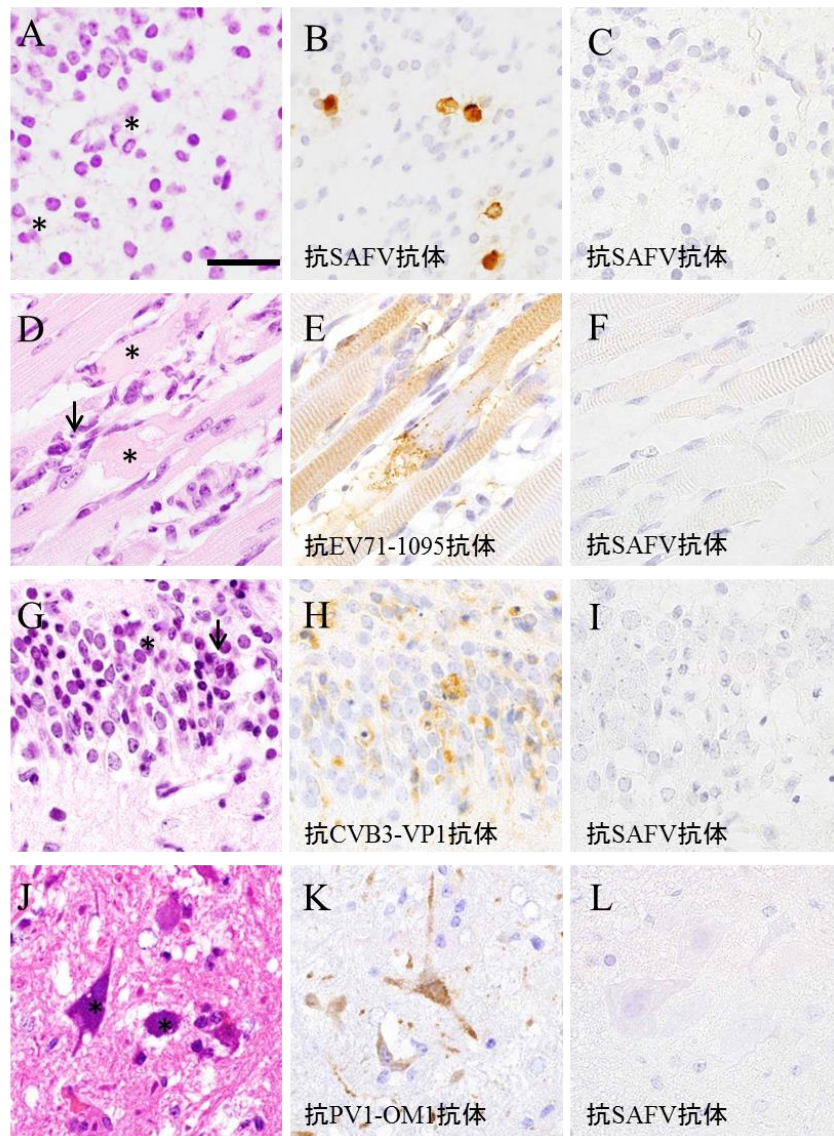


図1-3 ウイルス感染マウスのパラフィン組織標本を用いた免疫組織化学法によるウイルス抗原の検出

サフォードウイルス3型 (SAFV3) AM株感染新生仔マウスの小脳(A, B)、非感染新生仔マウスの小脳(C)、エンテロウイルス71 (EV71、SK-EV006/Malaysia 97) 感染新生仔マウスの骨格筋 (D-F) 、コクサッキーウイルスB3 (CVB3、Nancy) 感染新生仔マウスの海馬(G-I)、ポリオウイルス2型(PV2、Lansing)感染成マウスの脊髄 (J-L) を用いた。いずれの組織においても変性細胞が存在し(A,D,G,J, \*)、炎症性細胞の浸潤を伴うものもある (D, G, 矢印)。変性細胞に一致してそれぞれのウイルス抗原が検出された (B, E, H, K)。非感染マウス小脳で抗SAFV抗体の非特異反応はみられない (C)。EV71, CVB3およびPV2感染組織でも抗SAFV抗体の陽性所見や非特異反応は見られなかった。A、D、G、J：エオジン・ヘマトキシリン染色。B、C、E、F、H、I、K、L：免疫組織化学染色。撮影倍率1000倍。スケール20  $\mu\text{m}$ 。

表1-1 本研究で用いたウイルスの一覧

種	血清型	株名	由来患者の疾患名	遺伝子 型	登録番号	免疫組織化学的検索	
						培養細胞	マウス
SAFV		JPN08-404	無菌性髄膜炎	3型	HQ902242	LLC-MK <sub>2</sub>	+
		Gunma/176/2008	上気道炎	3型	AB983595	LLC-MK <sub>2</sub>	+
<i>Enterovirus</i>	EV71	BrCr-A/39C-1tr	急性灰白髄炎	A	U22521	RD	NE
<i>A (EV-A)</i>		SK-EV006/Malaysia 97	髄膜炎	B3	AB469182.1	NE	+
		C7/Osaka/Japan 97	脳炎	B4	AB550336	RD	NE
		1095/Japan 97	手足口病	C2	AB059817	RD	NE
		A211/10	不明熱	C2	AB935178	RD	NE
		CVA3 Olson	髄膜炎		AY421761.1	NE	+
		CVA4 Shimane/RD1	下水		NE	NE	+
		CVA6 Gdula	髄膜炎		AY421764.1	NE	+
		CVA10 Kowalik	髄膜炎		AY421767.1	NE	+
		CVA16 G-10	無症状		U05876.1	NE	+
	<i>Enterovirus</i>	CVB3	Nancy	微熱		JX312064.1	NE
<i>B (EV-B)</i>		A10004/12	不明熱		AB935177	RD	NE
		A201/11	ヘルパンギーナ		AB934931	RD	NE
	CVA9	Bozek	髄膜炎		AJ295200	NE	+
	CVB1	pMP1.23	胸膜痛		AY186746.1	NE	+
	CVB2	Ohio-1	夏風邪		AF085363	NE	+
	CVB4	J.V.B. Benschoten	胸腹部痛		X05690.1	RD	NE
	CVB5	Faulkner	萎縮を伴う麻痺		AF114383.1	RD	NE
	Echo6	D'Amori	髄膜炎		AY302558.1	RD	-
	Echo9	Hill	無症状		X84981.1	RD	-
	Echo11	Gregory	無症状		X80059.1	RD	-
	Echo25	JV-4	下痢		AY302549.1	RD	-
	Echo30	Bastianni	髄膜炎		AF162711.1	RD	-
<i>Enterovirus</i>	PV1	Mahoney	急性灰白髄炎		NC_002058.	RD	NE
<i>C (EV-C)</i>		Sabin1	強毒化ウイルス		V01150.1	RD	NE
		PJ154 (Mindanao-01-1)	急性弛緩性麻痺		AB180070	NE	RD
	PV2	Lansing	急性弛緩性麻痺		M12197.1	RD	NE
	PV2	11198 (BOS07-02)	急性弛緩性麻痺		JX275052	NE	RD
	PV3	Leon	急性灰白髄炎		K01392	RD	NE

表1-2 免疫組織化学法による抗サフォードウイルス抗体および  
各種抗エンテロウイルス抗体の特異性と交差反応性

種	血清型	免疫組織化学法									
		抗 SAFV 抗体			抗 EV-A 群抗体		抗 EV-B 群抗体		抗 EV-C 群抗体		抗 EV 抗体
		SAFV-3	EV71-C7	EV71-1095	CVB3-VP1	PV1-OM1	PV1-VP1	PV1-2C	5-D8/1		
<i>SAFV</i>	3 型※	+									
<i>EV-A</i>	CVA3	-1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	-1		
	CVA4	-1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	-1		
	CVA6	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1		
	CVA10	-1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	-1		
	CVA16	-1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1		
	EV71	-1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1		
<i>EV-B</i>	CVA9	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1		
	CVB1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1		
	CVB2	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1		
	CVB3	-1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1		
	CVB4	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	-1		
	CVB5	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1		
	Echo6	-	-	+	+	+	-	-	-		
	Echo9	-	-	+	+	-	-	-	-		
	Echo11	-	-	+	+	+	+	-	-		
	Echo25	-	-	+	+	+	+	-	-		
	Echo30	-	-	+	+	-	+	-	-		
<i>EV-C</i>	PV1	-	-	-	-	+	+	+	+		
	PV2	-	-	-	-	+	+	+	+		
	PV3	-	+	+	-	+	+	+	-		

※：遺伝子型、1：EV感染動物組織を使用

表1-3 サフォードウイルスあるいは各種エンテロウイルスの臨床分離株の感染培養細胞標本を用いた免疫組織化学法による各種抗体の特異性と交差反応性

抗原			抗体								
種	血清型	株名	主症状	SAFV	EV-A 群		EV-B	EV-C 群			EV
				SAFV-3	EV71	EV71	CVB3	PV1	PV1	PV1	5-D8/1
					-C7	-1095	-VP1	-OM1	-VP1	-2C	
<i>SAFV</i>	3型※	Gunma/176/2008	上気道炎	+							
<i>EV-A</i>	EV71	A211/10	不明熱	-	+	+	-*	-	-	w	-
		75/Yamagata/Japan 97	手足口病	-	+	+	-*	-	-	w	-
		C7/Osaka/Japan 97	脳炎	-	+	+	-*	-	-	w	-
		1095/Japan 97	手足口病	-	+	+	-*	-	-	w	-
		BrCr-A/39C-1tr	無菌性髄膜炎	-	+	+	-*	-	-	w	-
<i>EV-B</i>	CVB3	A10004/12	不明熱	-	-	-*	+	-	-	-	+
		A201/11	ヘルパンギーナ	-	-	-*	+	-	-	-	+
<i>EV-C</i>	PV	11196 (KTS09-02)	AFP	-	-*	-*	-	+	+	+	+
		11198 (BOS07-02)	AFP	-	-*	-*	-	+	+	+	+
		PJ161 (Luzon-01-1)	AFP	-	-*	-*	-	+	+	+	+
		PJ154 (Mindanao-01-1)	AFP	-	-*	-*	-	+	+	+	+
		Sabin1	ワクチン株	-	-*	-*	-	+	+	+	+

※：遺伝子型、\*：非特異反応を観察、w：弱陽性



表1-4 各種ウイルスを脳内接種後のddY新生仔マウスにおけるウイルス抗原の分布

接種			解剖日 (日目)	個体数	中枢神経系		骨格筋		口腔粘膜
種	血清型	ウイルスカ価			脳	脊髄	四肢	心	
SAFV	3型※	10 <sup>4.0</sup>	3	3	3	3	2	0	0
EV-A	CVA3	10 <sup>6.9</sup>	3	4	0*	0	4	2	0
	CVA4	10 <sup>4.0</sup>	2	4	0	0	4	1	0
	CVA6	10 <sup>6.3</sup>	2	4	0	0	4	2	2
	CVA10	10 <sup>5.5</sup>	3	4	0	0	4	0	4
	CVA16	10 <sup>4.3</sup>	6	4	0	3	4	0	0
	EV71	10 <sup>5.8</sup>	3	4	0	4	4	0	0
EV-B	CVA9	10 <sup>5.5</sup>	4	4	0	0	3	0	1
	CVB1	10 <sup>7.5</sup>	2	3	3	2	1	0	0
	CVB2	10 <sup>5.2</sup>	3	4	4	1	0	0	0
	CVB3	10 <sup>6.1</sup>	2	4	4	2	2	0	0
	CVB4	10 <sup>5.8</sup>	5	3	3	3	1	0	3
	CVB5	10 <sup>7.3</sup>	7	4	4	0	0	0	0

※：遺伝子型、\*：ウイルス抗原陽性のマウス個体数

表1-5 抗サフォードウイルス抗体と各種抗エンテロウイルス抗体を利用した  
ピコルナウイルス感染症診断のための抗体パネル

	抗SAFV抗体	抗EV-A抗体	抗EV-B抗体	抗EV-C抗体	抗EV抗体	判定
1	■					SAFV
2	■	■				EV-A、SAFV の混合感染
3	■	■	■			EV-A、B、SAFV の混合感染
4	■	■	■	■		EV-A、B、C、SAFV の混合感染
5	■	■	■	■	■	EV-A、B、C、SAFV の混合感染
6	■	■		■		EV-A、C、SAFV の混合感染
7	■	■		■	■	EV-A、C、SAFV の混合感染
8	■	■	■		■	EV-B、SAFV の混合感染
9	■		■			EV-B、SAFV の混合感染
10	■		■	■		EV-B、SAFV の混合感染
11	■		■	■	■	EV-B、C、SAFV の混合感染
12	■		■		■	EV-B、SAFV の混合感染
13	■			■		EV-C、SAFV の混合感染
14	■			■	■	EV-C、SAFV の混合感染
15		■				EV-A
16		■	■			EV-A、B の一種または混合感染
17		■	■	■		EV-A、B、C の一種または混合感染
18		■	■	■	■	EV-A、B、C の混合感染
19		■		■		EV-A、C の一種または混合感染
20		■		■	■	EV-A、C の一種または混合感染
21		■	■		■	EV-B
22			■			EV-B
23			■	■		EV-B
24			■	■	■	EV-B、C の一種または混合感染
25			■		■	EV-B
26				■		EV-C
27				■	■	EV-C

抗EV-A抗体：EV71-C7、EV71-1095、抗EV-B抗体：CVB3-VP1、

抗EV-C抗体：PV1-OM1、PV1-VP1、PV1-2C

灰色パネル：陽性、白色パネル：陰性

## 第二章

サフォードウイルス臨床分離株は  
マウスに神経病原性を有する

## 2-1 要旨

SAFV は、稀に急性弛緩性麻痺、髄膜炎や小脳炎を発症した患児から検出あるいは分離される。しかし、このウイルスの神経病原性は、不明な点が多く、その有無すら議論されているところである。そこで本章では、SAFV の神経病原性に着眼し、SAFV の二つの臨床分離株の病原性を、マウスを用いて病理学的、ウイルス学的、免疫学的に比較解析した。まず、神経毒力と神経親和性を評価する目的で、無菌性髄膜炎を発症した患児の髄液から分離された AM 株と上気道炎を発症した患児の咽頭拭い液から分離された UR 株をそれぞれ新生仔 ddY マウスに脳内接種した。その結果、AM 株接種群は、一過性の運動失調を引き起こし、UR 株接種群は、体重増加率が低下したものの、いずれも致死적ではなかった。病理組織像は、共通して、脳室周囲と小脳における少数の変性細胞とそれに伴う弱い炎症反応で、病変に一致してウイルス抗原陽性細胞が存在した。また、AM 株接種群は主に小脳のバークマン グリア細胞、UR 株接種群は主に脳室周囲組織の神経上皮細胞に抗原が検出されたが、他に、口腔粘膜や歯胚組織の上皮細胞にも抗原が検出された。いずれの接種群においても、接種 3-5 日をピークとして血中にウイルスゲノムが検出されたが、UR 株接種群は、有意に高いゲノム量を示した。また、両接種群は、3 日目より脳中のウイルスゲノム量が高くなり、一過性のウイルス増殖が示唆され、また、それに伴う 1 型インターフェロン (IFN) の上昇が確認された。ただし、UR 株接種群は、3、5 日目の大脳・脳幹、AM 株接種群は 5 日目の小脳において高いウイルスゲノム量を示した。ただし、いずれの部位においても 1 型 IFN の発現は、UR 株接種群の方が高く、それは、3 日目の炎症所見と一致した。次に、神経侵襲性を評価するために、新生仔 ddY マウスにそれぞれの分離株を腹腔内接種したところ、マウスはいずれも、接種 3 日目の脳室周囲と小脳にウイルス抗原陽性となり、21 日目には、UR 株接種群で脳実質のみに炎症所見が得られた。さらに、筆者は 6 週齢の BALB/c マウスにおける神経病原性を評価した。その結果、脳内接種後のマウスは、いずれも接種 3 日以内に一過性の体重

減少を示したが、明らかな神経症状は無かった。いずれも脳室周囲にウイルス抗原陽性細胞が、みられたが、AM 株のみ小脳に親和性を示し、1 型 IFN の発現が確認された。さらに、AM 株接種 8 日目には、小脳炎所見を認めた。そこで、6 週齢の BALB/c マウスに対し、腹腔内、静脈内、経鼻、あるいは経口感染を試みたが、いずれも神経侵襲性は、確認されず、UR 株では経粘膜感染が成立した。以上から、本研究で使用した SAFV3 型の臨床分離株は、いずれもマウスの神経細胞に親和性を示すものの、比較的弱い神経毒力を有し、新生仔マウスでは神経侵入性を発揮することが判明した。また、二つの株は、異なる組織親和性と神経病原性を発揮した。以上から、SAFV はマウスに対して神経病原性を有し、特に、他のピコルナウイルスと比べて小脳への親和性が特徴的であることが明らかとなった。

## 2-2 緒言

SAFVは、稀に急性弛緩性麻痺や髄膜炎、小脳炎を発症した患児から分離あるいは検出される (Blinkova *et al.*, 2009; Naeem *et al.*, 2014; Nielsen *et al.*, 2012; Himeda *et al.*, 2011; Victoria *et al.*, 2009)。しかしながら、このウイルスの神経病原性は、未だ不明な点が多く、その有無すら議論されているところである。SAFVの神経病原性を明らかにするためには、SAFV感染モデルを確立することが必要である。そのためには、感受性動物を選択し、その動物における病原性とヒトにおける病原性の相違点を明らかにする必要がある。

SAFVと同じピコルナウイルス科に属するエンテロウイルスのうち、コクサッキーウイルスA群とB群は、新生仔マウスや成マウスに感受性を示すものが多い。よって、新生仔マウスは、ウイルス分離に用いられ、同時に、ウイルスの病原性や毒力の評価に有用とされてきた (Feuer *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; 2012 Wang *et al.*, 2014)。しかし、ピコルナウイルスは、一般的に宿主特異性が高いウイルスで、ヒトにおける病原性を忠実に再現する動物モデルはほとんど無く、動物モデルから得られた結果の解釈には注意を要する。たとえばエンテロウイルス71は、ヒトの神経細胞に感染し、強い脳脊髄炎を引き起こすことがあり、一部の臨床分離株を新生仔マウスに脳内接種すると、麻痺を発症する。しかし、その麻痺の原因は、骨格筋にウイルスが感染したことによる筋炎が主体で、これは、ヒトでは全く確認されていない所見である (Arita *et al.*, 2008; Ong *et al.*, 2010; Zaini *et al.*, 2012; Caine *et al.*, 2013)。よって、今のところヒトにおける神経病原性を再現できる動物モデルは、マカク属サルであり、その場合でも、静脈内接種あるいは脊髄内接種のみ有効で、経粘膜感染モデルは未確立である (Hashimoto & Hagiwara, 1982; Nagata *et al.*, 2004; Arita *et al.*, 2007)。しかしながら、マウスにおける細胞親和性や病原性は、そのウイルスの潜在的な感染性や毒力、病原性を反映していることも多く、ウイルスの病原性研究には欠かせない *in vivo* 評価法の一つである。たとえば、コクサッキーウイルスB群は新生仔マウスの腓、骨格筋と神経に

親和性を有し、これは、ヒトにおける劇症型心筋炎、腓炎あるいは脳炎の病原性と関連している (Feuer *et al.*, 2003; Puccini *et al.*, 2014; Huber SA & Lodge PA, 1984; Benirschke K & Kibrick S, 1956; Hyypiä *et al.*, 1993; Cree *et al.*, 2003)。

SAFVのヒトにおける神経病原性は、いくつかの症例からの分離・検出報告があるのみで、詳細は不明である。一方、SAFVの動物実験の報告は、現在のところ一報のみで、HeLa細胞に馴化したSAFV2型を脳内接種したマウスが、神経症状(弛緩性麻痺)を発症したというものである (Hertzler *et al.*, 2011)。また、第一章で示したように、SAFV3型の二つの臨床分離株は新生仔マウスに感染性を有することが病理学的に明らかになった。そこで、本研究では、SAFVの神経病原性を明らかにすることを目的として、二つの全く由来の異なる臨床分離株を用いてマウスにおける感染性と病原性を明らかにし、その臨床症状との関連性を検討することとした。具体的には、無菌性髄膜炎を発症した患児の髄液から分離されたJPN08-404株 (AM株) と上気道炎を発症した患児からの咽頭拭い液から分離されたGunma/176/2008 (UR株) を新生仔ddYマウスと若齢BALB/cマウスにそれぞれ接種し、その神経病原性を評価した。

## 2-3 材料と方法

### 2-3-1 ウイルスと細胞

ウイルスは、第一章と同様に、無菌性髄膜炎患児由来のAM株と上気道炎患児由来のUR株を準備した。なお、AM株は、LLC-MK<sub>2</sub>細胞から分離され、UR株は、ヒト咽頭癌由来細胞（Hep2細胞）から分離された。ウイルスを分離した施設から供与された保存ウイルス液は、国立感染症研究所感染病理部第二室にてLLC-MK<sub>2</sub>細胞で2回継代し、使用ウイルス液とした。使用液は分注し、使用するまで-80°Cに保存した。ウイルスゲノムは、AM株とUR株間で98.6%の相同性があり、アミノ酸変異は、8箇所みられる。株間で異なる箇所は、VP2領域269番目（AM株、トレオニン；UR株、アスパラギン）、リーダー蛋白質（L）領域31番目（AM株、アスパラギン；UR株、アスパラギン酸）、2A領域113番目（AM株、プロリン；UR株、セリン）、2C領域31番目（AM株、アラニン；UR株、トレオニン）、262番目（AM株、アラニン；UR株、グルタミン酸）、3B領域13番目（AM株、メチオニン；UR株、トレオニン）、3C領域112番目（AM株、アスパラギン；UR株、アスパラギン酸）、3D領域387番目（AM株、ヒスチジン；UR株、チロシン）である。

### 2-3-2 マウスを用いたSAFV感染実験

ddY妊娠マウス（日本SLC株式会社）から出生した、生後24時間以内の新生仔マウスにAM株あるいはUR株を10<sup>4</sup> CCID<sub>50</sub>/10 μlずつ、右側視床内にISPマイクロシリンジ（株式会社伊藤製作所）を用いてそれぞれ脳内接種または腹腔内接種した。対照群には5%FBS加MEMを10 μl 脳内接種した。その後21日間、毎日体重を測定し、臨床症状を観察した。経時間的にそれぞれ3または4匹ずつイソフルランの過麻酔により安楽殺し、病理学的検索用の個体は、第一章に記載した方法と同様にパラフィン組織標本を作製した。生材料用の個体は、開胸し、29G x 1/2” 0.5 mlインスリン用シリンジ（テルモ株式会社）を用いて心



臓採血を行った。採取した血液は、TRIzol® (Ambion社、米国) に懸濁し、解析するまで-80°Cに保存した。その後、無菌的環境下で開頭し、ディッシュ上に脳を回収し、2回PBSで洗浄した後、大脳・脳幹と小脳に分離して採取し、それぞれを解析まで-80°Cに保存した。残りの組織は、病理標本としてホルマリン固定した。

5週齢の雌BALB/cマウス(日本SLC株式会社)を搬入後、1週間の馴化期間を経て、6週齢時にウイルス感染実験に用いた。接種ウイルス液は、1匹あたりのウイルス量が $10^4$  CCID<sub>50</sub>となるように接種経路によって調整した。各接種経路によるウイルス液量は、次の通りである：脳内接種, 50 µl; 腹腔内および静脈内接種, 100 µl; 経口接種, 5%ショ糖液含ウイルス液100 µl; 経鼻接種, 20 µl。対照群には5%FBS加MEMを50 µl 脳内接種した（一群n=6あるいは10）。腹腔内接種と静脈内接種は、無麻酔下で26G ツベルクリン用シリンジ (テルモ株式会社) を用いて行った。脳内接種の際動物は、イソフルラン麻酔下で29G x 1/2” 0.5 mlインスリン用シリンジ (テルモ株式会社) を用いて50 µlのウイルス液を右側視床に注入した。経鼻接種は、塩酸ケタミン3 mg・キシラジン1.5 mg混合液の腹腔内注射による麻酔下で、20 µlのウイルス液をマイクロピペットで左側の鼻腔内に滴下し行った。また、経口接種の場合は、6時間前から飲水を停止し、無麻酔下でウイルス液を動物に飲ませた。いずれの接種群においても、動物は、21日間毎日体重を測定し、臨床症状を観察した。接種3、8または21日目にそれぞれ3あるいは4匹ずつイソフルランの過麻酔により安楽殺した。26G ツベルクリン用シリンジ (テルモ株式会社) で心臓採血を行い、血液から血清を分離し、解析まで-80°Cに保管した。、生材料として、右側の大脳、脳幹、小脳、脊髄、舌、心を採取し、残りは病理用材料とした。再現性を確認するため脳内接種実験は2回行った。

なお、全ての動物実験は、国立感染症研究所の実験動物委員会の承認を得ており(承認番号211028、212031、112075、113090、114102)実験動物は同委員会のガイドラインに沿って取り扱った。

### 2-3-3 病理組織学および免疫組織化学的検索

病理用材料は、10%中性緩衝ホルマリンで2~3日浸漬固定した。ホルマリン固定後は第一章と同様に脱灰し、常法に従いパラフィン組織標本を作製し、病理検索用にHE染色を行った。また、ウイルス抗原の検出のためには、抗SAFV抗体を用いた免疫組織化学法を第一章と同様の方法で行った。

### 2-3-4 小脳組織上のウイルス抗原陽性細胞数の評価

AM株あるいはUR株脳内接種3、7、21日目の新生仔マウスの頭部標本を抗SAFV抗体で免疫染色し、小脳内の全てのウイルス抗原陽性細胞数を顕微鏡下で評価した。観察倍率400倍下で各群の小脳の一葉あたりの抗原陽性細胞数を算出し、比較した。ウイルス接種群ともに3-4匹のマウス組織標本を用いて、左右脳領域のウイルス抗原陽性細胞を評価した。

### 2-3-5 蛍光多重染色法

ウイルス抗原検出用の一次抗体は、抗SAFV抗体を用い、神経細胞マーカー用の抗体は、抗Musashi-1ラットモノクローナル抗体（クローン番号D270-3、株式会社医学生物学研究所、名古屋）、抗グリア細胞線維性酸性タンパク質モノクローナル抗体（Glial Fibrillary Acidic Protein、GFAP）（クローン番号GA5、Merck Millipore）あるいは、抗アストロサイト特異的グルタミン酸トランスポーターモノクローナル抗体（astrocyte

specific L-glutamate/L-aspartate transporter、GLAST) (クローン番号ACSA-1、Miltenyi Biotec社、米国)を用いた。組織切片はキシレンで脱パラフィンし、親水化処理後、脱パラ抗原賦活化液pH6.0 (株式会社ニチレイバイオサイエンス) 中で121°C、10分間のオートクレーブ処理による抗原賦活化を行った。組織切片は、PBS洗浄後、二次抗体血清に対するブロッキングのため10%正常ヤギ血清 (Dako社) を用いて室温、5分間反応させた。その後、抗体希釈液で500倍に希釈したそれぞれの神経マーカー抗体を4°C、12時間以上反応させた。PBS洗浄後、抗SAFV抗体を同様に4°C、12時間以上反応させた。2回PBS洗浄後、蛍光標識二次抗体としてAlexa Fluor® 488 goat anti-rat IgG またはAlexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes社、米国) とAlexa Fluor® 568 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes社) の混合抗体希釈液を加えて、アルミホイルで遮光し、常温で30分以上反応させた。2回PBSで洗浄後、*SlowFade®* Gold antifade reagent with DAPI (Molecular Probes社) で核の染色後封入した。標本は、レーザー走査型共焦点顕微鏡 (FV1000-D、オリンパス社、東京) で観察し、蛍光画像を取得した。

#### 2-3-6 RNA *in situ* hybridization

パラフィン組織標本上のウイルスRNAを検出するために、*QuantiGene ViewRNA* ISH Tissue Assay (アフイメトリクス・ジャパン、東京) を用いた。*in situ* hybridization を実施する前に、パラフィン組織標本中のウイルスRNAの保存性を評価するために、パラフィン組織標本の切片を三枚ずつ準備し、*Pure Link FFPE RNA Isolation Kit* (Invitrogen社、米国)を用いてRNAを抽出した。SAFV3特異的プライマーとプローブを設計し (表2-1) 、*QuantiTect Probe RT-PCR Kits* (Qiagen社、ドイツ) を用いてSAFVウイルスコピー数を定量した。一切片あたりのウイルスRNA量が $10^3$  コピー数以上検出された場合に限り、第一章と同様の方法で、*in situ* hybridizationを実施した。

### 2-3-7 マウス脳組織中のウイルス量とウイルスゲノム量の測定

マウス脳組織中のウイルス量とRNA量を測定するため、新生仔マウスと6ヶ月齢のマウスの大脳、脳幹はLysing Matrix A (MP Biomedicals社、米国) でビーズ破碎し、2%FBS添加MEMで懸濁して10%脳組織乳剤を作製した。同様に小脳は、ビーズ破碎後、1 mlの2%FBS添加MEMで懸濁し脳組織乳剤を作製した。各乳剤は、 $8,000 \times g$ で5分間遠心し、その上清を採取した。ウイルス量の測定は、LLC-MK<sub>2</sub>細胞を用いて次のように行った。上清を2%FBS添加MEMで $10^{-1}$ ~ $10^{-8}$ に10倍段階希釈し、96穴培養プレートにそれぞれ加えた。その後、それぞれ $1 \sim 2 \times 10^4$ 個/100  $\mu$ lに調整したLLC-MK<sub>2</sub>細胞を巻き込み、5%CO<sub>2</sub>、37°Cの条件下で2週間培養した。CPE陽性穴数を数えBehrens-Kärber法によるCCID<sub>50</sub>を算出し、1頭あたりのウイルス量に換算した。検出限界値は、 $10^{1.5}$  CCID<sub>50</sub>/gである。さらに、上記の脳乳剤上清を用いて、RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) によりRNAを抽出した。SAFV3 ウイルスのVP1領域(登録番号: HQ902242)、マウスIFN- $\alpha$ 4、 $\beta$ のプライマー、プローブセットとハウスキーピング遺伝子である $\beta$ -アクチンのプライマー、プローブを設計し(表2-1)、これらを用いてリアルタイムRT-PCRにより、目的のRNA量を定量した。リアルタイムRT-PCRの手技は、片野らが確立した条件の元で実施し、その条件は次の通りである。PCR反応液は、始めに50°C、30分で逆転写反応を行い、次に95°C、15分でHotStarTaq DNA Polymeraseの活性化後、94°C、15秒と60°C、60秒の伸長反応を40サイクル行った (Katano *et al.*, 2011)。

### 2-3-8 SAFV中和抗体価測定

マウス血清は、56°C、30分間の処理で非働化し、中和抗体価の測定に使用した。被験血清をMEMで1:16から1:256まで希釈し、96穴プレート中でそれぞれの希釈液と100

CCID<sub>50</sub>量の攻撃ウイルス（それぞれの感染実験に用いた接種ウイルスと同一の株）を37°C 2時間反応させた。反応後、各穴にLLC-MK<sub>2</sub>細胞を2 × 10<sup>4</sup> 個ずつ加えて、37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。最小希釈した攻撃ウイルスのCPEが50%を超えた時点で、CPEを評価し、50%感染阻止の血清希釈率を中和抗体価とした。

#### 2-3-9 統計処理

統計処理は、Graph Pad Prism 5 software（GraphPad Software、米国）を用いて行った。2群の平均値を比較するために、対応のないttest法を用いた。また、3群間の平均値を比較するために、一元配置分散分析法のTukey法を用いた。p<0.05の場合、有意差ありと判定した。

## 2-4 結果

### 2-4-1 臨床分離株の脳内接種によって新生仔マウスは、体重減少と一過性の神経症状を示す

AM株あるいはUR株を脳内接種したところ、UR接種群は、12日以降対照群と比較して有意な体重増加抑制がみられた(図2-1A)。一方、AM接種群は、7、8日目に急に挙尾のまま走り出し、転倒する個体が4匹中1あるいは2個体、観察された(図2-1B)。このような異常行動は、他群ではみられなかった。同様の感染実験を行ったところ、再現性は確認された。二つの臨床分離株の感染によって症状は、異なるものの、新生仔マウスに対して何らかの病原性を有することが示唆された。そこでまず、感染早期の感染病理像を明らかにすることとした。

### 2-4-2 二つの株は異なるマウス組織親和性を示す

まず、SAFV接種3日目のマウスの病理学的検索を行ったところ、AM株接種群では、脳室周囲と小脳に、変性した小型類円形細胞が散見されたが、炎症性反応を示唆する所見はなかった。抗SAFV抗体をもちいた免疫組織化学法の結果、ウイルス抗原は、変性細胞に一致して、陽性像を示した(図2-2A)。一方、UR株接種群では、主に脳室周囲に変性した小型類円形細胞とそれに伴う軽度の炎症性細胞浸潤がみられた。小脳にもわずかに同様の変性細胞がみられたが、AM株接種群に比べて少数であった。また、歯胚と口腔粘膜に変性上皮細胞が散見された。これらの変性細胞に一致して、ウイルス抗原陽性細胞が観察された(図2-2A)。その他の臓器に、著変は認められなかった。AM株とUR株接種群で、小脳におけるウイルス抗原陽性所見に差がみられたことから、ウイルス抗原陽性細胞数の比較を試みた。その結果、AM株接種群はUR株接種群に比べて、接種後3、7日目の小脳内ウイルス抗原陽性細胞数が有意に多いことが判明した(図2-2B)。また、*in situ hybridization*法により、3日目のUR接種群は、主に脳室周囲に、AM接種群は、主に小脳にウイルスRNAが存在することが明らか

となった(図2-2C)。以上の病理学的解析結果から、SAFV臨床分離株は、いずれも、新生仔マウスの脳に感染、増殖し、神経親和性を有することが示唆された。また、AM株は、主に小脳で増殖し、一方でUR株は脳室周囲で増殖し、さらに、歯胚組織や口腔粘膜の上皮系細胞にも親和性があることが病理学的に明らかとなった。そこで次に、脳における二つの株の増殖性とそれに対する免疫応答の違いをウイルス学的、免疫学的に明らかにすることとした。

#### 2-4-3 新生仔マウスにおいて、二つの株は異なる増殖性と宿主の免疫応答を示す

まず、脳内接種1, 3, 5, 7, 10日目の新生仔マウスの血中のウイルスRNA量を調べたところ、いずれもに血液中にウイルスRNAが存在し、ウイルス血症を発症したことが示唆された(図2-3A)。UR株接種群では、接種1から10日目すべてにウイルスRNAが検出され、3日目に最大値であったことから、ウイルスは、脳内接種後の感染・増殖の結果、容易に血中に侵入し、マウス体内での増殖に伴って、増減したと考えられた。一方、AM株接種群では、接種3, 5, 7日目にウイルスRNAが検出されたものの、低値であった。よって、UR株は、AM株に比べて新生仔マウス体内での増殖能が高いことが推察された。次に、同様に、大脳・脳幹および小脳中のウイルスRNAコピー数を検索した。その結果、いずれも接種1から10日目すべてにウイルスゲノムが検出され、3日目が最大値となりその後、徐々に減少傾向を示したことから、どちらの株も、脳内接種後に脳内で増殖し、その後、減少したことが示唆された(図2-3B)。また、大脳・脳幹のウイルスRNAコピー数は、接種3, 5日目のUR株接種群で有意に高く、小脳のウイルスRNAコピー数は、接種1, 3, 5日目のAM接種群の方が高い傾向にあった。次に、感染早期に上昇する炎症性サイトカインである、1型インターフェロン・ベータ(IFN-β)のmRNAの発現を検索した(図2-3C)。その結果、大脳・脳幹および、小脳いずれの部位においてもウイルス感染・増殖に相関して、IFN-βのmRNA発現量が増加していることが判明した。以上から、この二つの臨床分離株は、脳内の増殖性が異なり、増殖・感染に伴って、局

所にIFN- $\beta$ が誘導されることが判明した。そこで次に、炎症反応について病理学的に解析した。AM株接種群では、3日目と7日目に大脳、脳幹と脊髄の脳室、中心管の周囲と小脳にウイルス抗原陽性細胞が散見されたが、21日まで、いずれの部位に殆ど炎症所見を示さなかった(表2-2)。これに対し、UR株接種群の接種3, 7日目に大脳、脳幹、脊髄の脳室と中心管の周囲と小脳に抗原陽性細胞が存在し、接種3, 7日目には大脳、脳幹を中心に、21日目は脳幹、小脳、脊髄を中心に大小様々な血管周囲に単核系細胞を主体とする炎症性細胞浸潤がみられた。

以上の結果から、UR株は、AM株と比べて新生仔マウス体内でより増殖しやすく、それに伴い、炎症性サイトカインの発現とそれに伴う炎症性細胞浸潤が惹起されやすいと考えられた。

#### 2-4-4 マウス脳内におけるサフォードウイルス感染細胞はアストログリアと神経前駆細胞である

蛍光多重染色法による解析を行ったところ、ウイルス接種群でみられた小脳におけるウイルス抗原陽性細胞は、GLAST強陽性、GFAP一部陽性の放射状グリア(バーグマングリア)、またはMusashi-1一部陽性の神経前駆細胞であることが判明した(図2-5)。一方、脳室周囲組織のウイルス抗原陽性細胞は、GLAST、Musashi-1陽性の神経前駆細胞(神経上皮細胞)であった。ただし、抗原陽性頻度は異なったが、いずれの株も、両細胞において感染像が観察された。今回、これらの臨床分離株が、新生仔マウス脳内のアストログリアと神経前駆細胞に感染することを初めて明らかにした。よって、サフォードウイルスは、新生仔マウスの神経細胞に親和性を有することを病理学的に証明した。



#### 2-4-5 サフォードウイルス臨床分離株は新生仔マウスに対して神経侵襲性を発揮する

次に、新生仔マウスにおける神経親和性を明らかにする目的で、腹腔内接種を行ったところ、両群とも、接種3あるいは7日目の、脳室周囲、小脳に細胞変性を示す類円形細胞がみられ、それは、ウイルス抗原陽性であった（表2-3，図2-6A）。これらの抗原陽性細胞は、脳内接種時にみられたものと同じ種類の細胞であると推察された。また、UR株接種群では、3、7日目の骨格筋細胞と歯胚上皮細胞に少数のウイルス抗原陽性細胞が存在した。接種21日目には、UR株接種群の脳幹、小脳、脊髄で血管周囲に炎症性細胞浸潤が観察された（図2-6B）。以上から、二つの臨床分離株は、ともに新生仔マウスに対して神経侵入性を発揮し、強い神経向性を示すことが明らかとなった。

#### 2-4-6 AM 株は 6 週齢若齢 BALB/c マウスの小脳に親和性が高い

次に、免疫学的に成熟している 6 週齢の BALB/c マウスを用いて同様に神経病原性を比較した。脳内接種の結果、両群とも、対照群に比べ、接種 1 から 3 日目に有意な一過性の体重減少がみられた（図 2-7）。しかしながら、二株の群間で体重変化に有意な差は、認められなかった。また、新生仔マウスの脳内接種後にみられた一過性の異常行動や明らかな臨床症状の異常は、認められなかった。そこで、病理学的検索を行ったところ、両株ともに接種 3 日目に、接種部位付近の脳室周囲にウイルス感染を伴う炎症性細胞浸潤がみられた（図 2-8）。興味深いことに、AM 株接種群のみ、小脳皮質にウイルス感染を伴う軽度の炎症性細胞浸潤がみられた（図 2-8）。これらの結果から、2 つの株は、いずれも若齢 BALB/c マウスに対して神経毒力は弱いものの、感染性とそれに対する炎症反応を惹起することが示された。また、いずれも大脳・脳幹に親和性もつが、新生仔マウスと同様、AM 株は小脳にも親和性を有することが病理学的に示唆された。

#### 2-4-7 AM株の脳内接種は若齢BALB/cマウスに小脳炎を引き起こす

ウイルスRNA量は、二株間で有意な差はなく、若齢マウス脳内のウイルス増殖能に差は認められなかった(図2-9A)。しかしながら、3日目の大脳、小脳における1型インターフェロンの発現量のパターンに株間で相違がみられた。特に、AM株接種3日目の小脳におけるIFN $\alpha$ 4と $\beta$ のmRNA発現量は有意に高値を示した(図2-9B, C)。さらに、病理学的解析を行ったところ、AM株接種8日目の小脳で、皮質分子層と小脳周囲髄膜の一部に炎症細胞浸潤がみられた(図2-10)。UR株の脳幹は、炎症所見を示したものの、小脳に著変はなかった(表2-4)。以上から、いずれの株も脳内接種後の若齢マウスに神経親和性を有するが、AM株は、小脳に親和性が高く、小脳炎を引き起こすことが明らかとなった。

#### 2-4-8 UR株は若齢マウスに経粘膜感染する

さらに、6週齢のBALB/cマウスに対する神経侵入性を検索した。腹腔内、静脈内、経鼻、あるいは経口感染を試みたが、いずれの接種経路においてもマウスは、無症状で耐過した。また、病理学的に中枢神経系に所見はみられず、神経侵入性は確認されなかった。しかしながら、腹腔内、静脈内接種後にいずれの群においても脳内接種群と同等の中和抗体価の上昇が観察され、感染の成立が示唆された(図2-11)。一方、経口接種および経鼻接種後の中和抗体の上昇パターンに株間で違いが認められ、UR株では、経粘膜感染が成立したと考えられた。

## 2-5 考察

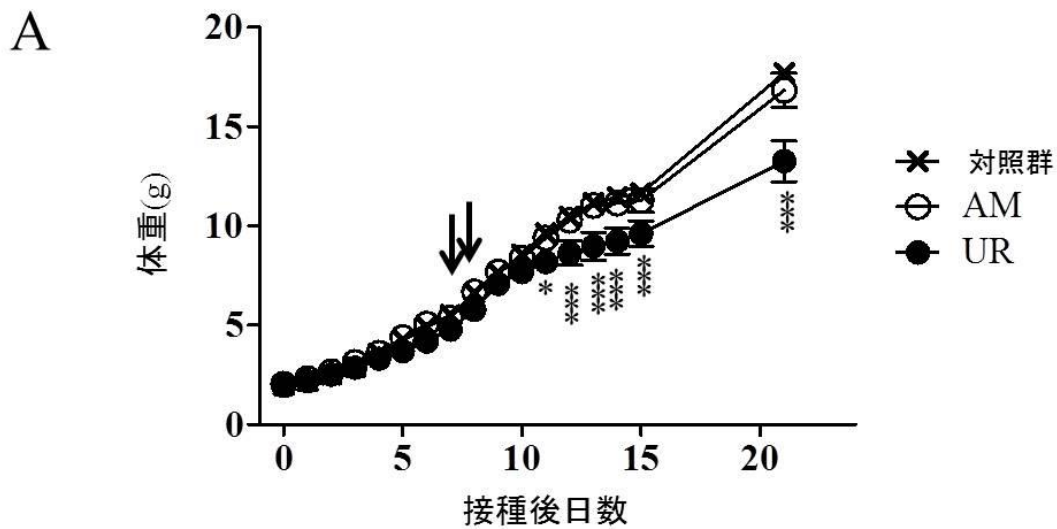
今回の研究によって、SAFV のマウスにおける神経親和性と神経侵襲性、神経病原性を初めて明らかにした。無菌性髄膜炎患児から分離された AM 株と上気道炎患児から分離された UR 株は、いずれも新生仔 ddY マウスと BALB/c 成マウスに比較的弱い神経病原性を発揮した。また、二つの分離株は、新生仔マウスに対して異なる臨床症状を引き起こした。特に、AM 株接種群は、一過性の運動失調を示したことから、小脳に対する病原性が疑われた。また、この行動は一過性で症状も弱いため、症状の有無を判定することは困難であった。いずれの動物においても無菌性髄膜炎に類似する病変が観察され、さらに、AM 株の比較的強い小脳親和性が病理学的に明らかとなった。ウイルス感染により、小脳に関連する運動機能の制御異常が存在したと考えられた。また、腹腔内接種により、新生仔マウスにおける神経侵入性が明らかとなった。よって、SAFV は、潜在的に神経病原性を有する可能性が示された。

今回、SAFV3 型と他のカルジオウイルスのマウスに対する病原性に類似点と相違点がみられた。SAFV と同種に分類されるタイラーウイルスは、その感染によって、マウスにポリオ様急性弛緩性麻痺や脱髄を発症するが、これは、主に大脳皮質、海馬と脊髄の神経細胞とマクロファージに感染するためである (Theiler, 1937; Dal Canto *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2001; Rodriguez & Roos, 1992; Villarreal *et al.*, 2006; Buckwalter *et al.*, 2011)。しかし、SAFV3 型は、脳内接種においても神経細胞には全く感染性を示さず、小脳と脳室周囲のアストログリアと神経上皮細胞に親和性を示した。また、同様に新生仔マウスに神経病原性を発揮する、エンテロウイルスを新生仔マウスに脳内接種すると多くは、神経細胞と神経前駆細胞に感染する (Tsueng *et al.*, 2011; Ruller *et al.*, 2012)。よって、SAFV のアストログリアに対する強い親和性は、他の神経向性ウイルスとの大きな相違点であり、今後、SAFV の神経病原性を解明する上で重要な知見である。さらに、二つの臨床分離株のグリア細胞と上皮細胞に対する感染性は異なったが、これは、レセプター利用あるいはウイルスの複製因子に

起因するのかもしれない。二つの株のアミノ酸を比較したところ、感染細胞のレセプターと結合するカプシドタンパクの VP2 領域にアミノ酸の相違がみられ、この相違が感受性細胞の相違に影響することが示唆された。UR 株は新生仔 ddY マウスの口腔粘膜と歯胚組織の上皮細胞に感染し、さらに、若齢 BALB/c マウスに対する UR 株の経口接種と経鼻接種は、中和抗体価の上昇を引き起こし、経粘膜感染の成立が示唆された。マウス上皮系細胞に感受性を示したことは、上気道炎患児の咽頭拭い液から分離された UR 株の上皮細胞に対する感染性を再現していると考えられた。よって、この感染動物モデルは、SAFV の潜在的な感染性を再現することが可能な動物モデルであり、ヒトでの病原性を評価する上で有用であると考えた。

以上のように、本章では、二つの臨床分離株を用いて、マウスにおける SAFV の神経病原性を明らかにした。次章では、SAFV の小脳親和性に着眼し、特にマウスの小脳に強い親和性を示した AM 株を用いて小脳継代株を作出し、その性状解析を試みることにした。

## 2-6 図と表



B



図2-1 サフォードウイルス臨床分離株を脳内接種した新生仔マウスの体重変化と臨床症状  
 生後24時間以内の新生仔ddYマウスに無菌性髄膜炎患者由来のAM株あるいは上気道炎患者由来のUR株を  $10^4$  CCID<sub>50</sub>/10  $\mu$ l量で脳内接種した。対照群には細胞培養液を用いた。その後、21日間、体重を測定し、臨床症状を観察した (A)。12日目以降、UR株接種群は対照群に比べ、有為に体重の増加が悪くなった。また、AM株接種群では接種後7、8日目に転倒、挙尾などの運動失調が一部の個体で観察された (A矢印、B)。2回感染実験を行い、代表的なデータを示した。\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.001$

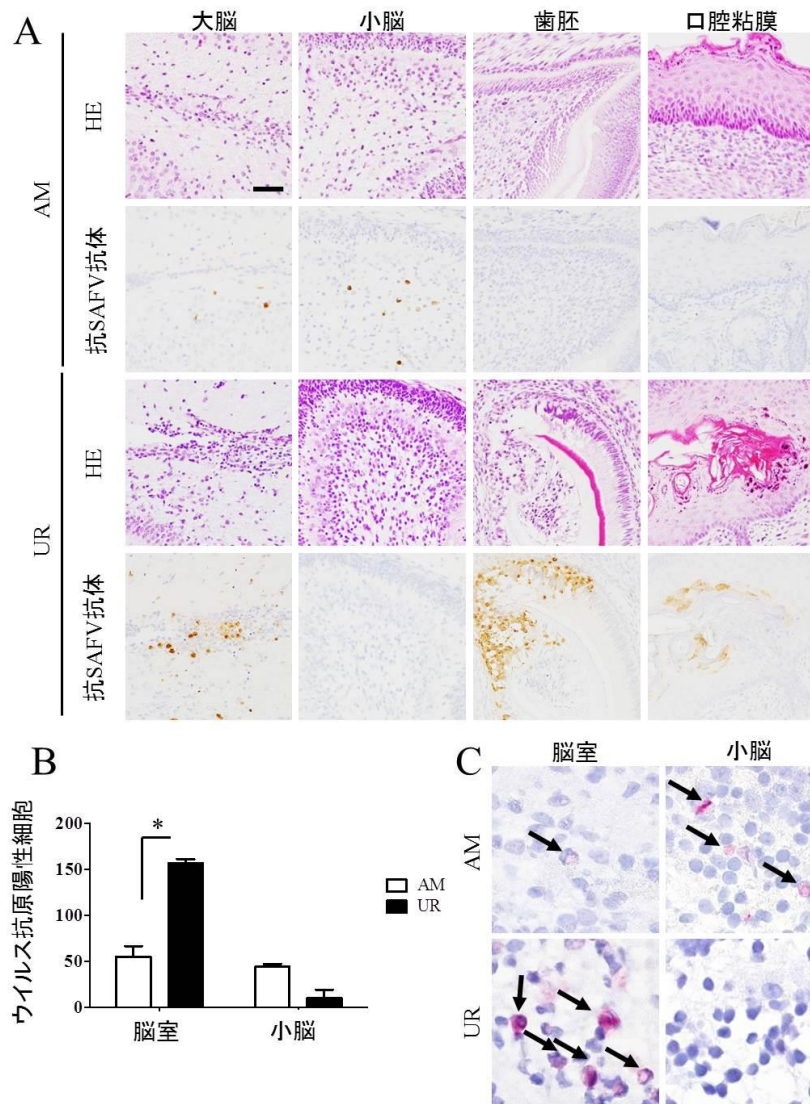
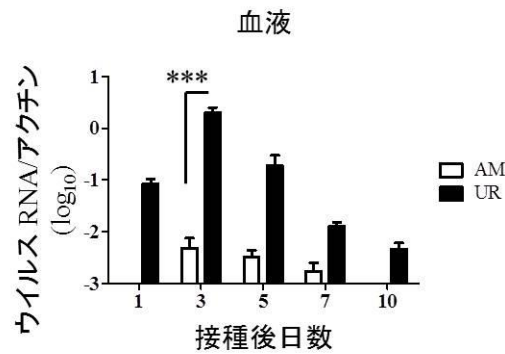


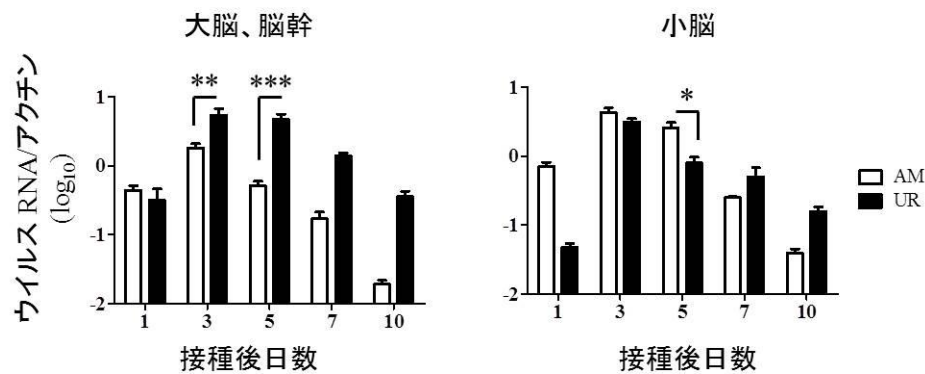
図2-2 サフォードウイルス臨床分離株を脳内接種した新生仔マウスの組織病変とウイルスの局在

生後24時間以内の新生仔ddYマウスにAM株あるいはUR株を  $10^4$  CCID<sub>50</sub>/10  $\mu$ l量で脳内接種した。A. 組織写真はいずれも接種3日目のものを用いた。撮影倍率400倍。スケール: 50  $\mu$ m。AM株接種群では、大脳脳室周囲と小脳に変性した小型類円形細胞が散見され、その他の組織に著変はない (A上から1段目、HE染色)。抗SAFV抗体による免疫組織化学染色では大脳、小脳の変性した細胞にウイルス抗原が陽性であった (A上から2段目、抗SAFV抗体を用いた免疫組織化学)。UR株接種群では大脳脳室周囲、小脳、歯胚組織と口腔粘膜に変性細胞と、炎症性細胞浸潤がみられた (A上から3段目、HE染色)。病変に一致してウイルス抗原陽性細胞が検出された (A最下段、抗SAFV抗体を用いた免疫組織化学)。B. 接種3、7、21日目の小脳における小脳葉あたりのウイルス抗原陽性細胞数。接種3、7日目にAM株接種群の方が有意に多い。\*,  $P < 0.05$ 。C. *in situ* hybridization法によるウイルスRNAの検出。接種3日目の脳室周囲と小脳で、変性細胞と一致してウイルスRNAが陽性であった (矢印)。撮影倍率1000倍。

A



B



C

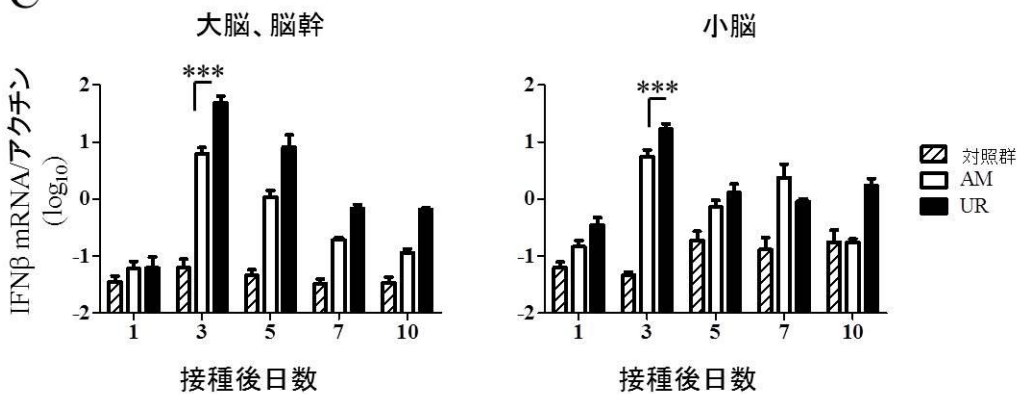


図2-3 サフォードウイルス臨床分離株を脳内接種した新生仔マウスの血液と脳におけるウイルスゲノムと1型インターフェロンのRNA量

生後24時間以内の新生仔ddYマウスにAM株あるいはUR株を  $10^4$  CCID<sub>50</sub>/10  $\mu$ l量で脳内接種した。A, B. 接種1、3、5、7、10日目の血液、大脳・脳幹、小脳におけるウイルスRNAコピー数 (n=4)。3日目のUR株接種群における血液中のウイルスRNAコピー数は有意に高い(A)。また、3,5日目のUR株接種群の大脳・脳幹中ウイルスRNAコピー数は有意に高値を示した(B)。一方、1、3、5日目の小脳中のウイルスRNAコピー数は、AM株接種群の方が高い傾向にあった。C. 接種1、3、5、7、10日目の大脳・脳幹、小脳における1型インターフェロン (IFN $\beta$ ) のmRNAコピー数。接種3日目では、脳・脳幹および小脳中のIFN $\beta$  発現量は、UR株接種群の方が有意に高い。いずれもハウスキーピング遺伝子として $\beta$ アクチンを使用し、補正し比較した。\* :  $P < 0.05$  \*\* :  $P < 0.01$  \*\*\* :  $P < 0.001$



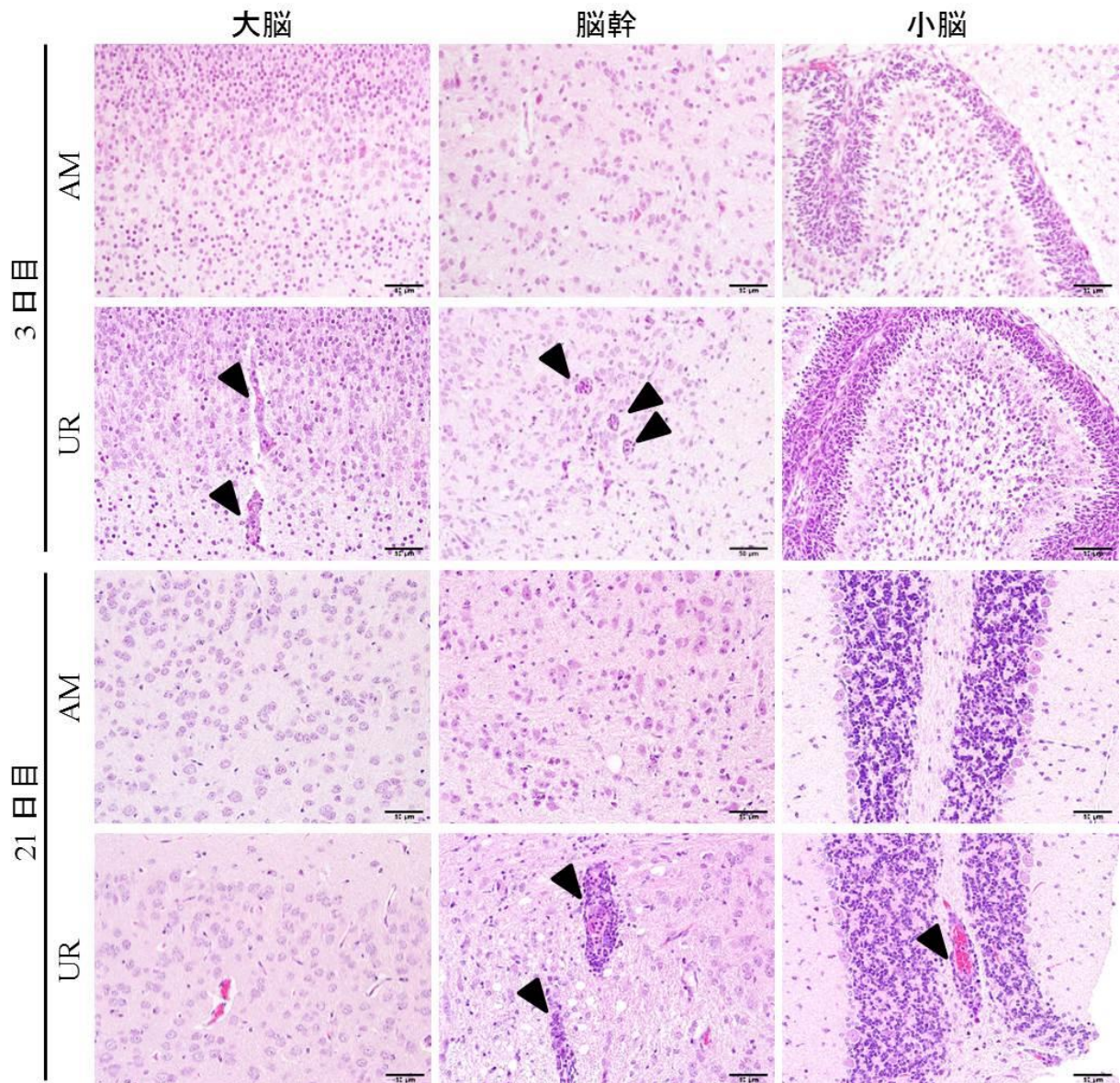


図2-4 サフォードウイルス臨床分離株を脳内接種した新生仔マウスの3日目と21日目の脳組織における炎症像

生後24時間以内の新生仔ddYマウスにAM株あるいはUR株を  $10^4$  CCID<sub>50</sub>/10  $\mu$ l量で脳内接種した。AM株接種マウスでは、接種3、21日目ともに、炎症細胞浸潤はほとんど観察されなかった(上から1段め、3段目)。一方、接種3日目のUR株接種マウスの大脳と脳幹で血管周囲に炎症性細胞浸潤がみられ(上から2段目、矢頭)、接種21日目では、脳幹と小脳の血管周囲に炎症性細胞浸潤が認められた(最下段、矢頭)。撮影倍率400倍。HE染色。スケール: 50  $\mu$ m。

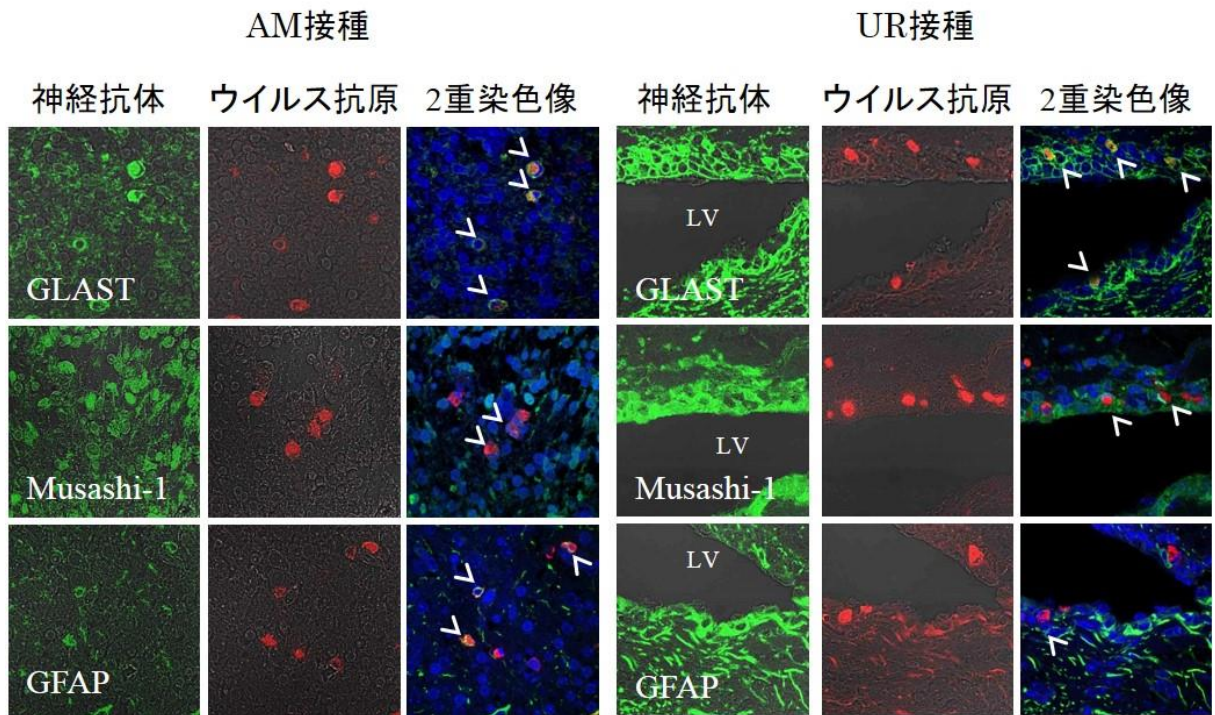


図2-5 サフォードウイルス臨床分離株を脳内接種後3日目の新生仔マウス脳内におけるウイルス感染細胞の同定

生後24時間以内の新生仔ddYマウスにAM株あるいはUR株を  $10^4$  CCID<sub>50</sub>/10  $\mu$ l量で脳内接種した。神経マーカー抗体（緑）とウイルス抗原（赤）との蛍光多重染色を示す。また、DAPI染色により核染色（青）を行った。神経マーカーとして、アストログリアと神経前駆細胞マーカーの抗GLAST抗体、神経幹細胞と神経前駆細胞マーカーの抗Musashi-1抗体およびアストログリアマーカーの抗GFAP抗体を用いた。主に、AM株接種マウス小脳で観察されたウイルス抗原陽性細胞（矢頭）はGLAST、GFAP陽性の放射状グリア（バグマングリア）とMusashi-1陽性の神経前駆細胞であった。一方、主に、UR株接種マウス脳室周囲で観察されたウイルス抗原陽性細胞（矢頭）はGLAST、Musashi-1陽性の神経前駆細胞（神経上皮細胞）であった。600倍。LV：側脳室



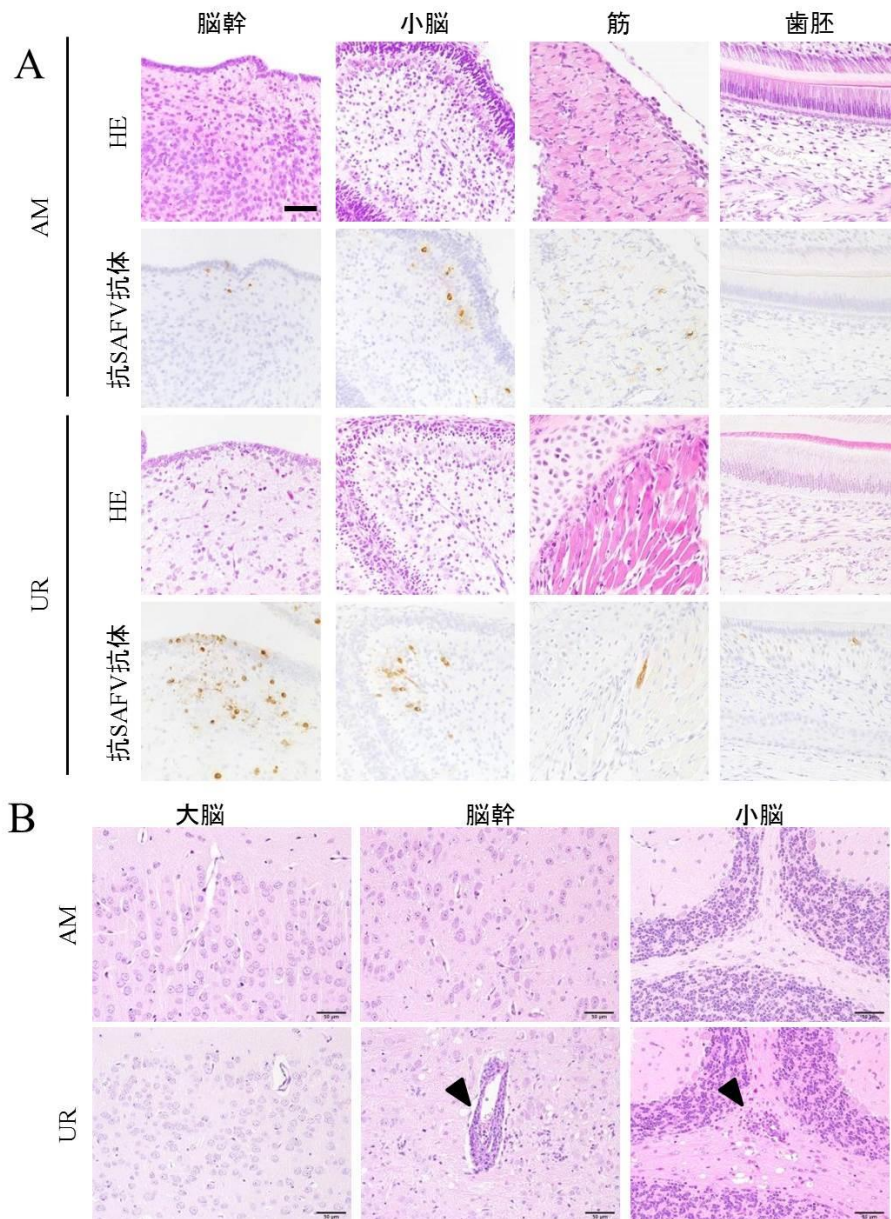


図2-6 サフォードウイルス臨床分離株を腹腔内接種した新生仔マウスの組織学的変化とウイルス抗原の分布

生後24時間以内の新生仔ddYマウスにAM株あるいはUR株を  $10^4$  CCID<sub>50</sub>/10  $\mu$ l量で腹腔内接種した。A. 接種3日目の脳、骨格筋、歯胚組織。B. 接種21日目の脳組織。接種3日目では、AM株、UR株接種群ともに脳幹、小脳、骨格筋に軽度の細胞変性がみられ、病変部位に一致して、ウイルス抗原が検出された (A)。接種21日目では、AM株接種群に変化はなく、UR株接種群の脳幹と小脳で血管周囲の炎症性細胞浸潤 (矢頭) が観察された (B)。A上から1段目、3段目およびB, HE染色。A, 上から2段目、4段目、抗SAFV抗体を用いた免疫組織化学。撮影倍率400倍。スケール : 50  $\mu$ m。

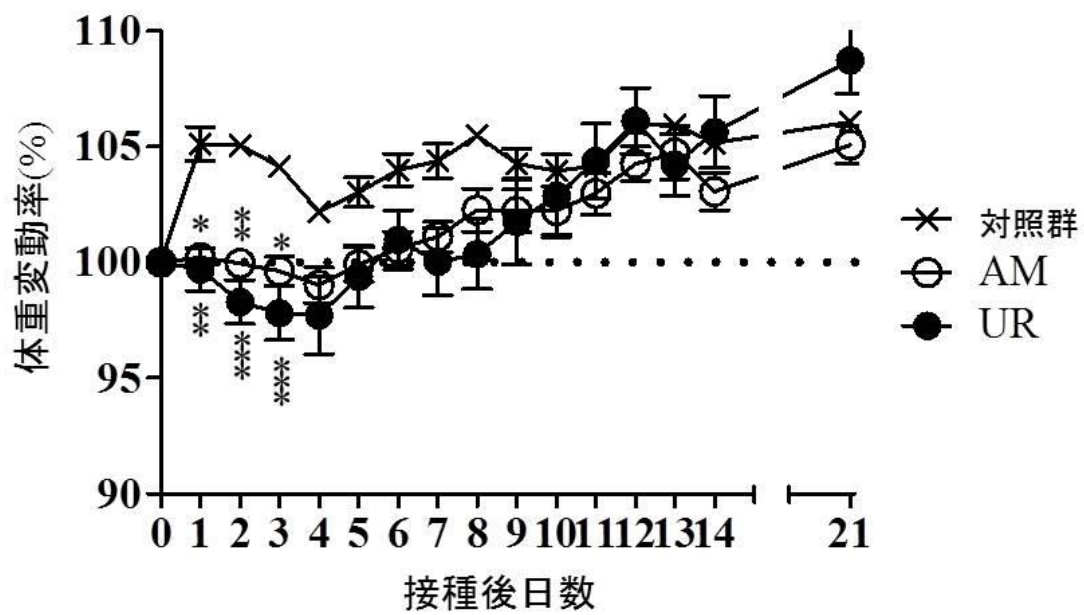


図2-7 サフォードウイルス臨床分離株を脳内接種した6週齢のBALB/c マウスの体重変化  
 6週齢のBALB/c マウスにAM株あるいはUR株を1匹あたり、 $10^4$ CCID<sub>50</sub>量で脳内接種し、21  
 日間体重を測定した。対照群に比べ、ウイルス接種群はともに1-3日目に有意に体重が減少し  
 た。\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

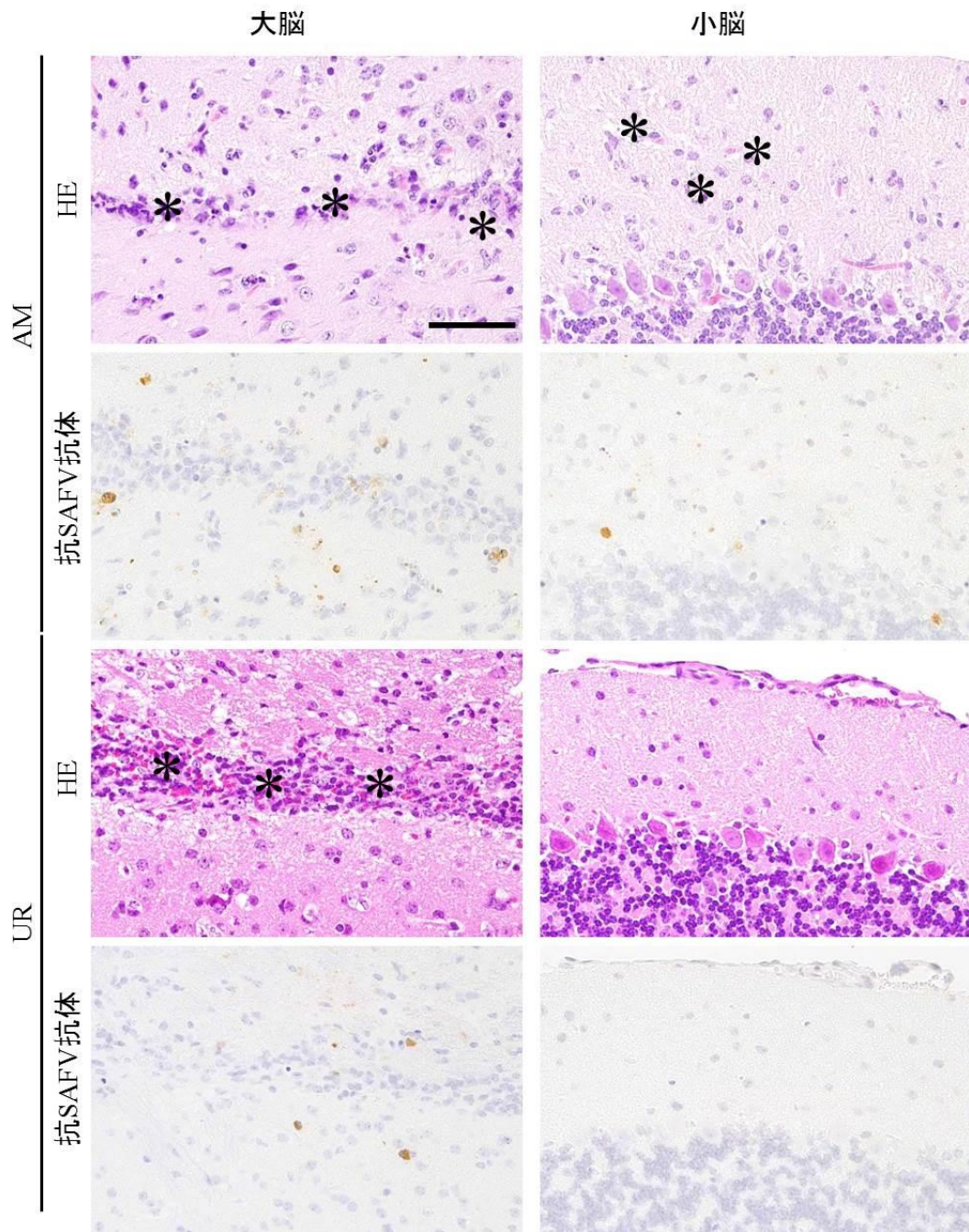


図2-8 サフォードウイルス臨床分離株を脳内接種した6週齢のBALB/c マウスの脳における組織所見。

6週齢のBALB/c マウスにAM株あるいはUR株を1匹あたり、 $10^4$ CCID<sub>50</sub>量で脳内接種した。3日目の大脳と小脳組織を示す。いずれの接種群も、大脳の接種部位付近の神経細胞は変性し、炎症性細胞浸潤を伴った（\*）（1段目、3段目、HE染色）。病変部に一致して、ウイルス抗原陽性細胞が検出された（2段目、4段目、抗SAFV抗体を用いた免疫組織化学法）。一方、小脳では、AM株接種群のみわずかな変性細胞と炎症性細胞浸潤が観察され、病変部に一致して、わずかなウイルス抗原が検出された。撮影倍率400倍。スケール：50  $\mu$ m。



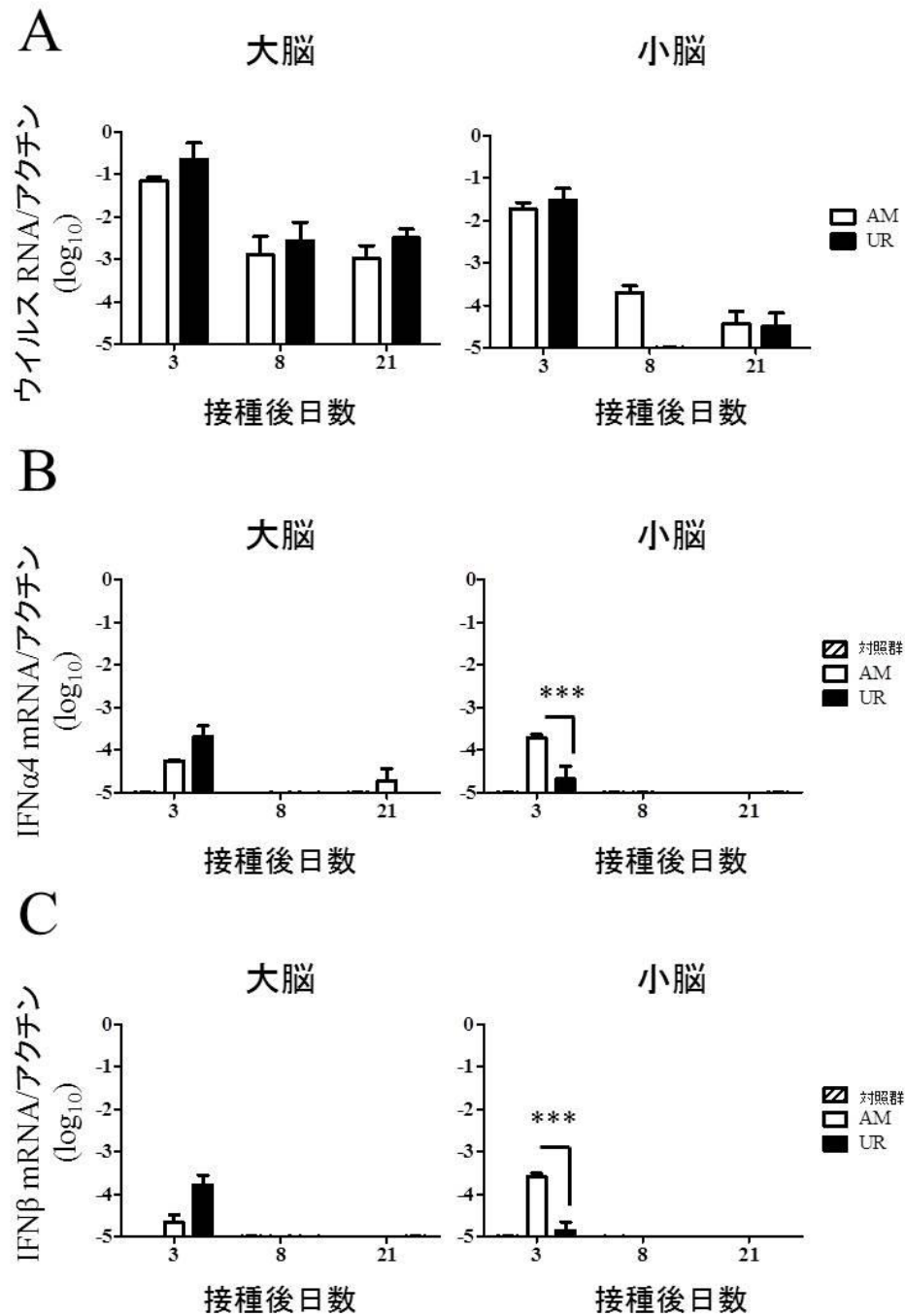


図2-9 サフォードウイルス臨床分離株を脳内接種した6週齢のBALB/c マウスの脳におけるウイルスゲノムおよびI型インターフェロンのRNAの定量。

6週齢のBALB/c マウスにAM株あるいはUR株を1匹あたり、 $10^4$ CCID<sub>50</sub>量で脳内接種した (n=3)。A. 接種3、8、21日目の大脳と小脳組織中のウイルスRNAコピー数。いずれの部位、接種日数においても二株間で有意な差はなかった。B, C. 同じ材料中の1型インターフェロン (IFNα4, B) のmRNAコピー数。接種3日目のAM株接種群の小脳において、1型インターフェロンはいずれも有意に高値を示した。いずれもハウスキーピング遺伝子としてβアクチンを使用し、補正し比較した。\*\*\* :  $P < 0.001$

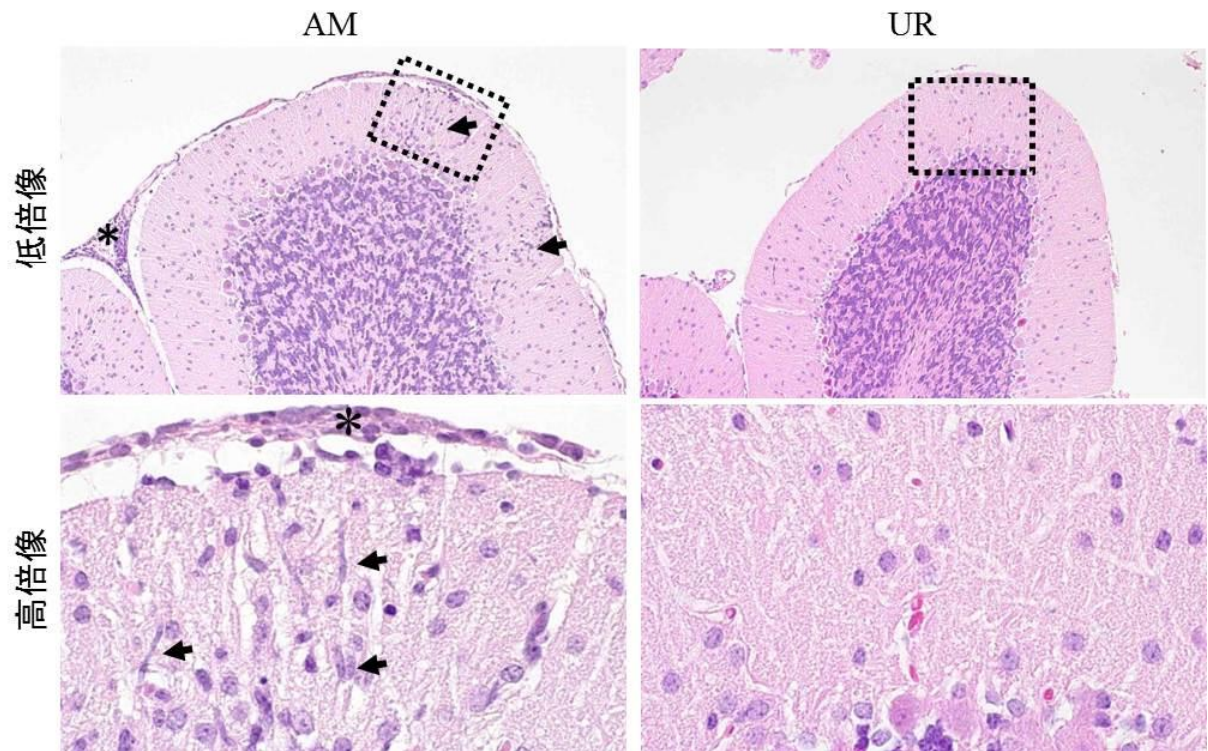


図2-10 サフォードウイルス臨床分離株の脳内接種8日目に採取した6週齢BALB/c マウスの小脳の炎症所見。

6週齢のBALB/c マウスにAM株あるいはUR株を1匹あたり、 $10^4$ CCID<sub>50</sub>量で脳内接種した。AM株接種群の小脳皮質において、実質（矢印）および髄膜（\*）に炎症性細胞浸潤が観察された。一方、UR株接種群では著変は見られなかった。HE染色。上段：撮影倍率200倍 下段：撮影倍率1000倍。

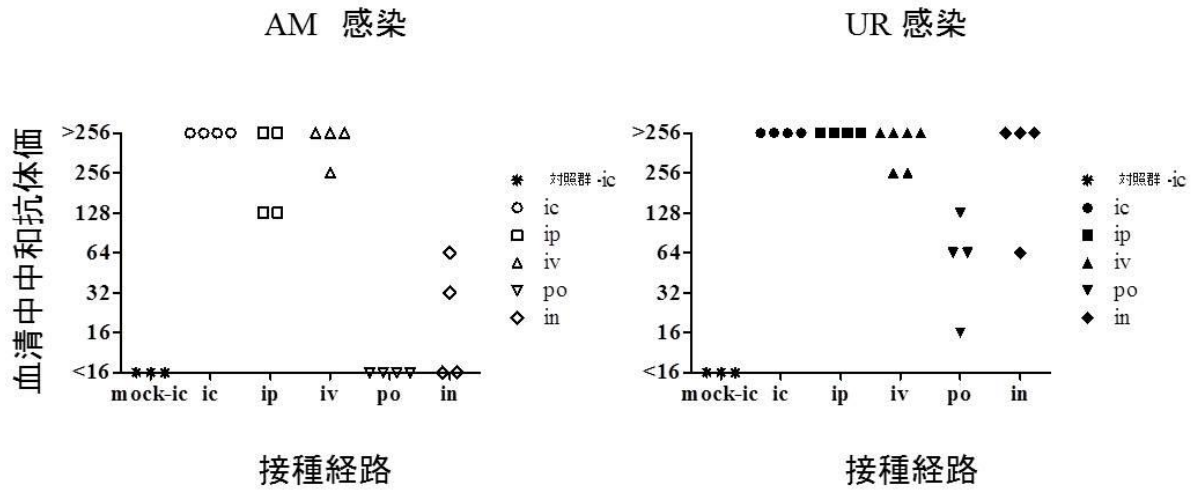


図2-11 種々の接種経路によるサフォードウイルス臨床分離株感染後の BALB/c マウスにおける血清中の中和抗体価

6週齢のBALB/c マウスにAM株あるいはUR株を脳内 (ic)、腹腔内 (ip)、静脈内 (iv)、経口 (po) あるいは経鼻 (in) 的に接種し、接種21日目の血清中の中和抗体価を測定した (n=4 または6)。脳内接種以外の接種経路では、いずれも明らかな臨床症状を示さなかったが、脳内接種、腹腔内接種、静脈内接種後にすべての個体で中和抗体価の上昇が見られた。しかしながら、経口接種と経鼻接種後の中和抗体価の上昇には、株間で差が見られた。



表2-1 本研究で使用したリアルタイムRT-PCRプライマーとプローブの配列

プライマー、プローブ	塩基配列 (5'-3')
サフォードウイルス	
5'プライマー	AAACCATGCCACAAACACCAT
3'プライマー	GCCYTGACCAACTACCCACAT
プローブ (FAM-TAMRA)	CTTGCCGAYACACGTGACCCACA
マウスインターフェロン $\alpha$ 4※	
5'プライマー	CAACTCTACTAGACTCATTCTGCAAT
3'プライマー	AGAGGAGGTTCTGCATCACA
プローブ (FAM-TAMRA)	ACCTCCATCAGCAGCTCAATGACCTCAA
マウスインターフェロン $\beta$ ※	
5'プライマー	GCTCCTGGAGCAGCTGAATG
3'プライマー	TCCGTCATCTCCATAGGGATCT
プローブ (FAM-TAMRA)	TCAACCTCACCTACAGGGCGGACTTC
マウス $\beta$ -アクチン※	
5'プライマー	ACGGCCAGGTCATCACTATTG
3'プライマー	CAAGAAGGAAGGCTGGAAAAGA
プローブ (FAM-TAMRA)	CAACGAGCGGTTCCGATGCCC

※文献より引用 (Iwata-Yoshikawa *et al.*, 2014)

表2-2 サフォードウイルス臨床分離株を脳内接種した新生仔マウスの組織中のウイルス抗原と炎症反応の局在。

株名	解剖日 (日)	個体数	中枢神経系				その他			
			大脳	脳幹	小脳	脊髄	筋	腓	口腔粘膜	歯胚
AM	3	3	3/1*	3/1	3/0	2/0	2/0	0/0	0/0	0/0
	7	3	1/0	0/0	3/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	21.	7	0/1	0/2	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
UR	3	4	4/4	4/3	2/0	3/0	2/0	0/0	2/1	2/2
	7	4	4/1	4/2	2/0	4/1	4/0	0/0	0/0	2/2
	21	4	0/1	2/4	0/3	1/3	0/0	0/0	0/0	0/0

\*ウイルス抗原が検出された個体数/ 炎症反応がみられた個体数.

AM株； 無菌性髄膜炎由来、 UR株； 上気道炎由来

表2-3 サフォードウイルス臨床分離株を腹腔内接種した新生仔マウスにおけるウイルス抗原と炎症反応の局在

株名	解剖日 (日)	個体数	中枢神経系				その他			
			大脳	脳幹	小脳	脊髄	筋	腭	口腔粘膜	歯胚
AM	3	4	0/0*	0/0	3/0	0/0	2/0	0/0	0/0	0/0
	7	4	2/0	0/0	1/0	0/0	3/0	0/0	0/0	0/0
	19	4	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0
UR	3	4	3/0	4/0	3/0	1/0	4/0	0/0	0/0	1/0
	7	3	3/3	2/1	2/0	0/0	2/0	0/0	0/0	2/1
	21	4	0/0	0/3	0/2	0/3	0/0	0/0	0/0	0/0

\*ウイルス抗原が検出された個体数/ 炎症反応がみられた個体数.

AM株； 無菌性髄膜炎由来、 UR株； 上気道炎由来

表2-4 サフォードウイルス臨床分離株を脳内接種した6週齢BALB/cマウスにおけるウイルス抗原と炎症反応の局在

株名	解剖日 (日)	個体数	中枢神経系				その他	
			大脳	脳幹	小脳	脊髄	筋	膝
AM	3	3	2/2*	1/2	3/3	0/0	0/0	NE
	8	3	1/3	0/2	0/2	1/2	0/0	NE
	21	4	0/4	0/2	0/0	0/1	0/0	NE
UR	3	3	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	8	3	1/1	0/3	0/0	1/0	0/0	0/0
	21	4	1/1	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0

\*ウイルス抗原が検出された個体数/ 炎症反応がみられた個体数.

AM株； 無菌性髄膜炎由来、 UR株； 上気道炎由来、 NE； not evaluated

### 第三章

サフォードウイルス小脳継代株感染は  
新生仔マウスの小脳皮質形成に影響する

### 3-1 要旨

SAFVは、新生仔マウスの小脳のバークマングリア細胞に親和性を示した。このような神経親和性は、他のピコルナウイルスでは報告がない。そこで第三章では、無菌性髄膜炎患者の髄液から分離されたAM株に特に強く認められた小脳親和性に着眼し、AM株の新生仔マウス小脳継代株の作出とその性状解析を試みた。

小脳継代株は、次のように作出した。AM株を脳内接種した、新生仔BALB/cの3日目の小脳を採取し、乳剤を作製、その上清をさらに新生仔マウスに脳内接種するという作業を五回繰り返す、最後にLLC-MK<sub>2</sub>細胞で一代継代し、AM-5Cb株とした。AM株は、継代を進めるにつれ、VP2領域に2カ所、VP3領域に1カ所のアミノ酸置換を順次、生じた。立体構造予測により、VP2領域の変異は、レセプター結合領域に隣接した領域であり、置換部分の2カ所間では、新たに水素結合が生じたとされた。一方で、AM-5Cb株は、SAFV感受性のサル腎細胞由来LLC-MK<sub>2</sub>細胞とヒト横紋筋肉腫由来RD細胞での増殖性は、AM株より良い増殖性を示したものの、ハムスター腎細胞由来BHK細胞では、AM株より有意に増殖性が低下し、さらに、SAFV非感受性のマウス線維芽細胞由来L929細胞、マウス神経芽細胞由来Neuro2A細胞およびマウスアストログリア細胞由来KT-5細胞では、増殖性に変化はなかった。そこで、第二章と同様に、ddY新生仔マウスに脳内接種したところ、AM-5Cb株接種群は、感染早期に明らかな運動失調を示し、その後、一部の個体で水頭症を発症した（発症率29%）。よって、継代の結果、AM株は神経毒力が高くなったことが示唆された。病理学的には、大脳皮質、脳幹、小脳、脊髄に高頻度にウイルス抗原陽性細胞が存在し、感染に伴う広範な変性、壊死とミクログリアの強い浸潤が見られた。脳室周囲と小脳における抗原陽性細胞数は、AM株と比較して明らかに多いが、感染細胞の種類に変化は無かった。大脳・脳幹と小脳におけるウイルス量とウイルスRNAコピー数は、有意に高かったことから、生体内における増殖性が増加したことが判明した。これらに相関して、I型炎症性サイトカインの高発現と炎症反応の増

悪が観察され、総じて継代によって神経病原性は、高くなったことが明らかとなった。次に、小脳皮質構造への影響について遺伝子検索したところ、バーグマングリア細胞の維持、促進に関連するGLAST遺伝子とアストロサイトの分化誘導の促進に関連するHes5遺伝子は、接種3日目にAM株、AM-5Cb株の順に高い傾向にあり、接種21日目には、AM-5Cb株接種群でプルキンエ細胞の成長に関連するDNER遺伝子とプルキンエ細胞に関連するCalbindin遺伝子の発現が高かった。実際に、いずれのウイルス接種群においても、いずれも対照群と比較してプルキンエ細胞の神経突起の伸張は、旺盛であり小脳皮質形成時のバーグマングリア細胞とプルキンエ細胞の分化・成長の制御異常が示唆された。そこで、AM-5Cb株を高ウイルス量接種したところ、21日目には小脳皮髄の境界は、不明瞭となり、皮質の三層構造が破綻した。以上から、AM-5Cb株は、新生仔マウスの脳室周囲細胞と小脳皮質グリア細胞への強い親和性を獲得し、大脳皮質壊死と小脳皮質形成異常を引き起こす、強い神経病原性を発揮するようになったと考えられた。したがって、SAFV3の小脳発達時における感染は、小脳皮質形成に少なからず影響をおよぼす可能性があり、今回作出した感染マウスモデルは、SAFV3の小脳における病原性発現機構を解明する上で有用なマウスモデルと期待される。

## 3-2 緒言

第二章では、SAFV臨床分離株のAM株とUR株は、ともにマウスの中枢神経系に感染、増殖し、神経病原性を有することを明らかにした。また、SAFVは、新生仔マウス小脳のパーグマンガリア細胞に親和性を示した。このような神経親和性は、他のピコルナウイルスでは報告がない。また一方で、小脳炎発症患児からのSAFV検出の報告がある (Nielsen *et al.*, 2012)。そこで第三章では、無菌性髄膜炎患者の髄液から分離されたAM株に特に強く認められた小脳親和性に着眼することとした。

あまり明確な病原性を発揮しない(できない)、ウイルスの病原性を明らかにする手段として、培養細胞や動物を用いて継代し、馴化株を作出する方法が用いられてきた

(Smithburn, 1949; Li & Schaeffer, 1953; Zhu *et al.*, 2003; Gabriel *et al.*, 2005; Kotani *et al.*, 2013)。前章でも述べたがエンテロウイルス71は、宿主特異性が高く、ヒトを自然宿主としている。エンテロウイルス71は、主に、アジア圏を中心に、小児の手足口病の大流行の原因となっているが、時に無菌性髄膜炎、急性弛緩性麻痺あるいは、脳幹脳炎を引き起こし、致死的原因となるためワクチン開発が急務となっている (Bible *et al.*, 2007; Shekhar *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 1999)。そのため、動物モデルの開発が試みられているが、EV71の多くの臨床分離株は、新生仔マウスの脳ではなく骨格筋に高い親和性を示すため、ヒトの病態を反映したモデルとはいえない。しかしながら、EV71をマウス脳で継代し、馴化することで、神経細胞に親和性を強くし、ヒトの急性弛緩性麻痺に類似した病態を引き起こすことができるようになった。この馴化株を用いた小型齧歯類の感染モデルはEV71の病原性発現機構の解明や予防治療の開発研究に用いられている。(Khong *et al.*, 2014; Fujii *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2000; Yeh *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012; Chua *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011)

第二章で明らかにしたように、臨床分離株はマウスに対して低い病原性を示した。そこで、第三章では、小脳親和性が比較的高かったAM株を用いて、新生仔マウス小脳継代株の作



出を試み、そのウイルス学的性状と新生仔マウスに対する神経病原性を明らかにすることとした。

### 3-3 材料と方法

#### 3-3-1 SAFV小脳継代株の作出

親株として、無菌性髄膜炎由来のAM株を用いた。BALB/c妊娠マウス（日本SLC株式会社）から出生した、生後24時間以内の新生仔マウスにAM株（ $10^4$  CCID<sub>50</sub>/10  $\mu$ l）を脳内接種し、3日目に、イソフルランの過麻酔下で安楽殺し、開頭後、小脳を採取した。同様に準備した、5匹分の新生仔小脳をまとめて2%FBS添加MEMで懸濁し、10%脳組織乳剤を作製した。この上清をAM-1Cb株とし、回収後、 $2,000\times g$ で10分間遠心後、これを新たに生後24時間以内の新生仔マウスに脳内接種し、同様の作業を合計五回行った。2回目以降の上清をそれぞれ、AM-2Cb, -3Cb, -4Cb株とした。各上清は、残りの液を採取し、解析まで $-80^{\circ}\text{C}$ に保管した。五回継代後、LLC-MK<sub>2</sub>細胞で一回増殖し、二回凍結融解後に上清を回収し、これを小脳五回継代株のAM-5Cb株とした。

#### 3-3-2 ウイルスゲノムの塩基配列解析

前述の、AM-1Cb、-2Cb、-3Cb、-4Cb、-5Cbから、RNeasy Plus Mini Kit（Qiagen,）を用いてRNAを抽出した。RT-PCRは、OneStep RT-PCR Kit（Qiagen）とSAFV特異的プライマー（表2-1）を用いて反応させた。その反応によるPCR産物はDNA精製・抽出キットMonoFasDNA Purification Kit（ジールサイエンス株式会社、東京）を用いて精製した。塩基配列解析装置ABI3130 Genetic Analyzerによりシーケンス配列を取得し、DNA配列解析ソフトウェアSequencher (ver. 4.10.1, Gene Codes、米国)により遺伝子配列を解析した。本研究で解析した全ての遺伝子配列情報は日本DNAデータベース（静岡）に登録した（登録番号：AB983595.1）。

### 3-3-3 ウイルスカプシドタンパク質の立体構造予測

SAFV と同属で、同じタイロウイルス種である、タイラー脳脊髄炎ウイルス(Theiler's murine encephalomyelitis virus)は、SAFV との遺伝子相同性が全体の 68%であったので、このウイルスの DA 株 (PDB コード: 1TME) を鋳型として、AM 株と AM-5Cb 株のホモロジーモデルを構築した。ウイルスカプシドタンパク質の立体構造は統合計算化学システム (Molecular Operating Environment, MOE: 株式会社菱化システム、東京) を用いて予想した。

### 3-3-4 各種培養細胞におけるSAFVの増殖性

培養細胞は、LLC-MK<sub>2</sub>細胞、RD細胞、BHK細胞、マウス線維芽細胞 (L929細胞)、マウス神経芽細胞 (Neuro2A細胞) とマウスアストログリア細胞 (KT-5細胞) を使用した。いずれも、培養細胞は10%FBS、5,000ユニット/mlペニシリン-ストレプトマイシン (Gibco) 添加MEMを用いて単層培養した。BHK細胞は、国立感染症研究所ウイルス第三部、L929細胞は同所ウイルス第二部からそれぞれ分与していただいた。また、Neuro2A細胞とKT-5細胞は独立行政法人医薬基盤研究所JCRB細胞バンクから分譲していただいた。6穴プレートにそれぞれの培養細胞を2%FBS添加MEMで単層培養した後、AM株あるいはAM-5Cb株を感染多重度 (Multiplicity of Infection, MOI) を0.1に調整し、接種した。感染0、1、2、3、5日目に、穴ごとに、細胞培養上清を回収し、そのウイルス量を測定した。また、残った細胞は、PBS洗浄後、2%FBS添加MEMを1 ml加え、凍結融解を三回繰り返す、この細胞懸濁液を2,000×g、温度、15分で遠心し、回収した上清を細胞内ウイルス量として測定した。ウイルス量は、第一章と同様に、CCID<sub>50</sub>を算出した。検出限界値は10<sup>1.5</sup> CCID<sub>50</sub>/mlであった。

### 3-3-5 新生仔マウスを用いた感染実験

第二章と同様に、新生仔ddYマウスを用いた脳内接種法とその検索を行った。AM株とAM-5Cb株は $10^4$  CCID<sub>50</sub>/10  $\mu$ lに調整し、接種に用いた。その後、21日間、毎日臨床症状を観察し、体重を測定した。接種3、5、7あるいは21日目にそれぞれ3または4匹ずつを用いて、ウイルス検索性の脳・脳幹と小脳の生材料と、病理検索性の全身の組織材料を採取した。また、AM-5Cb株を $10^6$  CCID<sub>50</sub>/10  $\mu$ lに調整し、高ウイルス量の脳内接種実験も行い、接種後19日間、臨床症状観察と体重測定を行い、接種3、7あるいは19日目に各4匹ずつを病理検索に供した。全ての動物実験は国立感染症研究所の実験動物委員会の承認を得ており（承認番号：211028、212031、112075、113090）、実験動物は同委員会のガイドラインに従い、実験動物を取り扱った。

### 3-3-6 病理組織学的および免疫組織化学的検索

それぞれの感染実験で採取した病理検索性の組織材料から、第一、第二章と同様の手順でパラフィン組織標本を作製した。また、第二章の手順と同様に、免疫組織化学法によりウイルス抗原の検索を行った。本章では追加の神経マーカーとして、抗ビタミンD依存性カルシウム結合蛋白質ポリクローナル抗体 (Calbindin、クローン番号ab25085、Abcam) を用いた。二次抗体には、一次抗体がモノクローナル抗体の場合は、ヒストファインマウスステインキットを（株式会社ニチレイバイオサイエンス）使用し、ポリクローナル抗体の場合は、マウス組織用ウサギ1次抗体用シンプルステインMAX-PO (R)（株式会社ニチレイバイオサイエンス）を使用した。その後、ジアミノベンチジン (DAB) により発色後、ヘマトキシリンで対比染色した。また、第二章の方法と同様に、免疫組織化学法後の小脳組織切片上のSAFV抗原陽性細胞数を測定した。

### 3-3-7 蛍光多重染色法

第二章の方法と同様に、蛍光多重染色法によりウイルス抗原陽性細胞の同定を行った。なお、ウイルス抗原の検出には、抗SAFV抗体を用い、神経細胞マーカーとしてMusashi-1 (株式会社医学生物学研究所)、GFAP (Merck Millipore)、GLAST (Miltenyi Biotec) を用いた。また、小脳皮質構造を解析するため、プルキンエ細胞マーカーとして抗Calbindin 抗体 (Abcam) とバークマングリア細胞マーカーとして抗GLAST抗体を用いて、同様に蛍光多重染色法を行った。

### 3-3-8 マウス組織乳剤の作製

ウイルス解析用の組織乳剤は、次の様に作製した。新生仔マウスの脳を大脳・脳幹と小脳の2領域に分割し、第一章と同様に組織乳剤の上清を得、これを各種の解析に用いた。なお、脳を採取する際のPBS洗浄は行わなかった。必要に応じて、RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) を用いてRANを抽出した。

### 3-3-9 リアルタイムRT-PCR法

第二章で使用したプライマー、プローブセットを用いて、ウイルスRNA、IFN- $\alpha$ 4、およびIFN- $\beta$ のRNA量を測定した。また、小脳形成に関連する遺伝子である、GLAST、Hairy and enhancer of split 5 (Hes5) Calbindin、Delta/Notch EGF-related Receptor(DNER)のプライマー、プローブセットを設計した (表3-1)。設計に使用した遺伝子情報は、GLAST : AF330257.1、Hes5 : NM-010419、Calbindin : NM-009788.4、DNER : NM-152915を用いた。ハウスキーピング遺伝子として、第二章と同様、 $\beta$ -アクチンを使用した。リアルタイムRT-PCRの手技は片野らが確立した条件の元で実施した (Katano *et al.*, 2011)。

### 3-3-10 統計処理

統計処理は、第二章と同様に、医療統計解析ソフトGraph Pad Prism 5 software (GraphPad Software) を用いて評価した。2群の平均値を比較するために、対応のない $t$ -testを、3群間の平均値の比較には、一元配置分散分析法のTukey法を用いた。 $p < 0.05$ の場合、有意差ありと判定した。

## 3-4 結果

### 3-4-1 マウス小脳の五回継代により 3 カ所のアミノ酸置換が生じた

まず、親株であるAM株と五回継代後のAM-5Cb株の全長の塩基配列を比較した。その結果、塩基配列の変異は、五カ所認められ（VP2領域：2カ所、VP3領域：1カ所、2C領域：1カ所、3C領域：1カ所）、そのうちウイルスカプシドタンパクのVP2とVP3領域において、3カ所のアミノ酸置換を伴う塩基配列の変異が見つかった。そこで、小脳継代の際に保管した、AM-1Cb、-2Cb、-3Cb、-4Cb株のVP2,VP3領域の塩基配列も併せて比較解析したところ、2192番目の塩基配列は、AM株のアデニン（A）からAM-1CbとAM-2Cb株では、グアニン（G）に置換しており、これに伴い、VP2領域の239番目のアミノ酸がグルタミン（Q）からアルギニン（R）に置換した（Q239R）。次に、1950番目の塩基配列は親株のアデニン（A）からAM-3CbとAM-4Cb株ではグアニン（G）に置換しており、これに伴い、VP2領域の160番目のアミノ酸がヒスチジン（H）からアルギニン（R）に置換した（H160R）。さらに、2468番目の塩基配列が親株でアデニン（A）であったものが、AM-5Cb株では、チミン（T）に変異し、この結果、VP3領域の62番目のアミノ酸がリシン（K）からメチオニン（M）に置換した（K62M）（図3-1B）。つまり、マウス小脳で二回継代するごとにアミノ酸置換部位は、一カ所ずつ増えた。また、継代ごとに、小脳から回収されたウイルスRNA量は、アミノ酸置換に順じて有意に増加した（図3-1C）。以上から、AM株は小脳継代によりアミノ酸置換を生じ、これは、マウス小脳における増殖性に関係すると推察された。

### 3-4-2 五回継代株は、変異によりレセプター結合領域付近に水素結合を生じた

AM-5Cb株のアミノ酸変異部位の立体構造に対する影響を明らかにするため、AM-5Cb株のウイルスカプシドタンパク質のVP1, VP2, VP3領域の立体構造予測をホモロジーモデリング法により行った。VP2、VP3のリボンモデル表示により、H160Rは、VP2のループ構造

に位置し、K62MはVP3のknob構造に位置していると予測された（図3-2A）。次に、分子表面構造（図3-2B）およびその五量体構造（図3-2C）を構築したところ、三箇所のアミノ酸変異領域のうち、VP2のH160R部分は、タイラーウイルスのレセプター結合領域に隣接する部位であると予測された。また、ワイヤーモデルによって、AM-5Cb株のVP2ループ構造に生じたH160RとVP3-knob構造に生じたK62Mの間で新たに水素結合が形成されたことが、予測された（図3-2D）。以上から、継代によるアミノ酸置換は、立体構造に変化をもたらし、ウイルスの増殖性になんらかの影響を与えていると推察された。

#### 3-4-3 五回継代は、SAFV感受性細胞の増殖性に変化を来した

種の異なる培養細胞を用いて、AM株とAM-5Cb株の増殖性を比較解析した（図3-3）。もともとAM株に感受性を示した、アカゲザル腎細胞由来のLLC-MK<sub>2</sub>細胞とヒト横紋筋肉腫由来のRD細胞では、感染1日目の細胞上清あるいは細胞内のウイルス量がAM株に比較して高くなり、その後、ウイルス量の差は、見られなくなった。一方で、もともとAM株が高い増殖性をもっていた、シリアンハムスター腎細胞由来のBHK細胞では、継代後に増殖性が低くなった。さらに、もともとAM株に対して感受性のなかったマウス線維芽細胞由来のL929細胞、マウス神経芽細胞由来のNeuro2A細胞およびマウスアストログリア細胞由来のKT-5細胞では、増殖性に変化は生じなかった。よって、新生仔マウスの小脳における継代は、SAFVに感受性のある培養細胞における増殖性になんらかの影響をあたえた。

#### 3-4-4 五回継代により新生仔マウスに対する神経毒力は、増加した

次に、新生仔ddYマウスにAM株あるいはAM-5Cb株を脳内接種し、その病原性を比較検討した。その結果、AM-5Cb株接種群は、接種後2日から4日目に、姿勢が傾き、転びやすい、頭部が左右に揺れるなど、明らかな運動失調を示唆する臨床症状を示した。20日目以降、



AM-5Cb株接種群は、MEMを接種した対照群に比べ、有意に体重の増加率が低下した（図3-4A）。一部の個体では、接種11日目から水頭症様の外貌を示した（発症率29%）。そこで、水頭症様外貌を示した個体の組織像を検討したところ、大脳皮質は、広範に欠損し、菲薄化し、嚢胞状となっていた。残存する大脳皮質実質は、高度の壊死、出血を呈した（図3-4B）。一部、脳室上衣細胞が残存しており、拡張した脳室も含まれることがわかった。一方、脳幹、脊髄は軽度の炎症があるものの、壊死部は認められなかった。（表3-2）

#### 3-4-5 五回継代は感染性を高めたが、細胞向性は変わらない

次に、接種3日目の脳室周囲の大脳・脳幹と小脳を検索したところ、いずれの部位においても、核が偏在し、変性した小形類円形細胞が散見され、周囲に軽度のミクログリア反応がみられた。その変性細胞に一致して、ウイルス抗原は、陽性であった（図3-5A）。ウイルス抗原陽性細胞数を測定したところ、大脳・脳幹と小脳では、いずれもAM-5Cb株接種群で多数認められた（図3-5B）。

そこで次に、感染細胞を同定するため、ウイルス接種3日目の新生仔マウス脳組織標本を用いて、蛍光多重染色を行った（図3-6）。その結果、小脳で観察されたウイルス抗原陽性細胞は、GLAST陽性の放射状グリア（バークマングリア）細胞であった。一方、脳室周囲組織で観察されたウイルス抗原陽性細胞は、GFAP陽性のアストログリアまたはMusashi-1陽性の神経前駆細胞（神経上皮細胞）であった。AM株は同様に、アストログリアと神経上皮細胞に感染し、増殖することを第二章で示した。よって、小脳継代は、細胞指向性を変えなかった。

以上の結果から、AM株は、五回継代によって、新生仔マウス脳内におけるウイルスの感染性を高めたが、細胞指向性に変化はなかったことが判明した。

#### 3-4-6 五回継代によって、ウイルス増殖性は高くなり、炎症反応は増悪した

次に、新生仔マウス脳内でのウイルス増殖性を評価した。AM-5Cb接種群において、接種3日目の大脳・脳幹と小脳のウイルス量は、有意に高値を示した（図3-7A）。また、ウイルスRNA量は、接種3日目に同様に有意に高値を示した（図3-7B）。さらに、IFN $\alpha$ 4とIFN $\beta$ を対象として、1型IFNのmRNAコピー数を調べたところ、いずれも接種3日目で、AM-5Cb接種群において有意に高かった（図3-7C, D）。接種7、21日目ではウイルス量、ウイルスRNAコピー数、およびIFNの発現に有意な差は、なかった。また、接種21日目のAM-5Cb接種群は、大脳・脳幹と小脳の小血管周囲に炎症細胞浸潤を認め、AM株接種群に比べて炎症が増悪し、遅延した（図3-8, 表3-2）。以上の結果より、AM-5Cb株は、AM株に比べ、ウイルス増殖性が高く、これに伴い、1型IFN発現が高くなり、炎症性反応も増悪したと考えられた。

#### 3-4-7 五回継代株の感染は小脳皮質形成に影響する

小脳に存在するバグマングリア細胞は、プルキンエ細胞とNotchシグナルを介して互いの分化と成長を制御し合い、小脳皮質を形成することが知られている。そこで、バグマングリア細胞の維持、促進に関連するGLAST遺伝子とアストロサイトの分化誘導の促進に関連し、Notchシグナルの活性化の指標となる、Hes5遺伝子の発現を調べたところ、二つの遺伝子は、ともに接種3日目にAM株、AM-5Cb株の順に高い傾向にあった（図3-9A）。そして、接種21日目のAM-5Cb株接種群では、プルキンエ細胞の成長に関連するDNER遺伝子とプルキンエ細胞に関連するCalbindin遺伝子の発現が高かった（図3-9B）。実際に、接種21日目の小脳皮質のCalbindin陽性プルキンエ細胞を観察したところ、組織学的には、ウイルス接種群は、いずれも対照群と比較してプルキンエ細胞の神経突起の伸張が旺盛であった（図3-9C）。そこで、小脳皮質のバグマングリア細胞とプルキンエ細胞を多重染色し、画像上の蛍光陽性比率を算出した（図3-9D）。ウイルス接種群は、いずれも対照群と比較して、プルキンエ細胞の面積の比率が高く、特にAM株接種群は、対照群に比べ、有意に高値であった。従って、

SAFV 感染は、小脳皮質形成時のバーグマングリア細胞のGLASTおよびHes5遺伝子の発現に影響し、その結果、ウイルスが感染しないプルキンエ細胞の分化・成長の制御にも異常が引き起こされたと考えられた。そこで次に、高ウイルス量の脳内接種実験をおこない、小脳皮質形成への影響の有無を検討した。

AM-5Cb株を $10^6$  CCID<sub>50</sub>/10  $\mu$ l量、脳内接種したところ、動物は臨床観察期間中、接種3日目から外部刺激に過敏となり、運動失調が徐々に出現し、水頭症様外貌を示した。最終的には動作緩慢となったので、19日目までに人道的エンドポイントに従い、安楽殺とした。病理組織学的検索を行ったところ、対照群の生後21日目のddYマウスは、小脳皮質の分子層、プルキンエ細胞層、顆粒層の三層構造がすでに形成されている（図3-10A、C）。一方、AM-5Cb株接種19日目の発症マウスは、大脳皮質がほぼ欠損し、小脳では皮質構造が不明瞭であった（図3-10B、D）。一部の小脳髄質は、中等度の炎症細胞浸潤および軽度の壊死を呈した。蛍光多重染色により小脳皮質の細胞局在を観察した結果、バーグマングリア細胞とプルキンエ細胞の関係性は、乱れ、明瞭な層の形成はみられなかった（図3-10E、F）。なお、大脳、脳幹と脊髄ではいずれの部位においても炎症性細胞浸潤が、認められた（表3-3）。

### 3-5 考察

本章で作出したマウス小脳五回継代株は、新生仔マウスの脳室周囲細胞と小脳皮質グリア細胞への強い親和性を獲得し、大脳皮質壊死と小脳皮質形成異常を引き起こす、強い神経病原性を発揮するようになったと考えられた。

AM 株の小脳継代の過程で、二回継代するごとに、ウイルスのカプシドタンパク領域に一カ所のアミノ酸置換を生じており、小脳から回収されるウイルス RNA 量が相関して高くなったことから、これは、ウイルスの複製効率に影響していると考えられた。タイラーウイルスを鋳型とした立体構造予測により、継代株でみられた VP2 の 160 番目の変異は、puff B といわれるループ構造内に位置し、VP3 の 62 番目は knob 構造内に位置すると考えられた。エンテロウイルスやタイラーウイルスでは、カプシド蛋白表面に puff B、knob 構造の他に VP1 の loop1、2 構造、VP2 の puff A 構造を持ち、これらの構造がシアル酸あるいは宿主レセプターの結合部位であると考えられているため、これらの構造変化はウイルスの病原性と関連することが知られている (Luo *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 2000)。また、中和抗体からの逃避能が高いコクサッキーウイルス B3 は、puff B と knob に相互構造変化がみられ、この変化により、マウスの病原性が変わる (Stadnick *et al.*, 2004)。したがって、AM 株は小脳に継代することで、感染細胞と結合しやすくなり、その結果マウス小脳内での増殖能が向上したことが考えられた。

また、小脳五回継代株は、VP2-puff B と VP 3-knob に生じたアミノ酸置換同志で新に水素結合を形成したと予測された。ウイルスのレセプター結合部位の水素結合の形成は、宿主細胞への感染性や病原性に影響するとされている。水素結合の形成は、①ウイルス-宿主間で形成する、②ウイルス同士間で形成するの 2 パターンある。①の場合、ウイルス側 (レセプター結合領域) と宿主側 (レセプター) 間に水素結合が形成されることで、宿主への感染効率が上昇し、その結果、感染性・増殖性が上がる (Zhou *et al.*, 2000; Yamada *et al.*, 2006;

Kumar *et al.*, 2003)。一方、②の場合、例えば、タイラーウイルスは、同じウイルス側(VP2-puff B と VP1-loop) 間に水素結合が形成されることで、宿主のレセプター結合効率が上がり、その結果、宿主への感染性が高くなり、マウスへの病原性に影響すると考えられている (Luo *et al.*, 1992; Grant *et al.*, 1992)。同様に、エイズウイルスでは、ウイルス側のレセプター結合領域のループ構造同士が水素結合することで、抗体などの抗ウイルス因子からの逃避能が高くなり、よって宿主細胞への感染性・増殖能の向上に関与している(Miyamoto *et al.*, 2012)。したがって、AM-5Cb 株は、VP2-puff-B のアルギニンと VP 3-knob のメチオニン間で新に水素結合が形成されたことにより、宿主細胞のレセプター結合効率が上がり、小脳への感染性・増殖性が親株と比べて高くなったと思われる。以上より、立体構造予測の結果、今回得られた小脳継代株のアミノ酸置換部位は、感染性または病原性の増悪に関与していると推察された。

SAFV感受性細胞のうち、霊長類由来の培養細胞では、感染早期の感染性あるいは増殖性が高くなったが、結局、細胞内増殖性に殆ど影響はなかった。一方で、もともと高い増殖性をもっていた、シリアンハムスター腎細胞由来のBHK細胞では、継代後に細胞内増殖性が悪くなったことから、同じ齧歯類ではあるものの、宿主細胞におけるレセプター結合領域あるいは細胞内複製に関わる変異が生じ、マウス細胞に馴化したことで、ハムスター細胞での感染性、増殖性が減少した。さらに、SAFV非感受性のマウス線維芽細胞由来のL929細胞、マウス神経芽細胞由来のNeuro2A細胞やマウスアストログリア細胞由来のKT-5細胞では、感染性と増殖性に変化は生じず、レセプター結合領域付近の変化は、L929細胞、Neuro2A細胞またはKT-5細胞への感染性、増殖性になにも影響を与えなかったと考えられた。一方で、小脳五回継代によって、新生仔マウス小脳内のウイルス感染性と増殖性は、上昇した。このような*in vitro*と*in vivo*解析結果の齟齬は、ポリオウイルスのマウス親和性Lansing株でも認め

られており、ウイルス増殖は、ウイルスレセプターの違いや周囲の増殖環境に影響されることがその要因であると考えられている (La Monica *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 1988)。

SAFV を新生仔マウスの小脳に継代した結果、細胞指向性は変化しなかったが、増殖性は増し、神経病原性は強くなった。おそらく、バグマングリア細胞と神経上皮細胞における感染性と増殖性が上昇した結果であると考えられる。一方で、以前筆者は、コロナウイルスの豚流行性下痢ウイルスを新生仔マウス脳で十回継代すると、新生仔マウス脳での感染初期に感染する細胞の種類が増加したことを報告した (Kotani *et al.*, 2013)。この場合は、細胞指向性が拡大し、感受性細胞が多くなったことが、増殖性の変化に起因したと考えられた。

小脳継代株を脳内接種した新生仔マウスは、感染早期に明らかな小脳性の運動失調を発症した。病理学的解析の結果、感染細胞は脳室周囲の神経上皮細胞と小脳のバグマングリア細胞であった。小脳のバグマングリアは放射状グリア細胞であるが、放射状グリア細胞は、神経幹細胞の機能を持つとされている (Malatesta *et al.*, 2000)。また、バグマングリア細胞は、小脳内でのグルタミン酸の取り込みに重要な役割を持つ。今回、次のような発症機序が考えられた (図 3-11)。SAFV 感染により、バグマングリア細胞が変性、壊死した結果、この取り込み力が低下し、取り込まれなかったグルタミン酸は、プルキンエ細胞に働き、興奮性シナプス後電流が発生し、その結果、マウスは、小脳性運動失調を発症した (Takatsuru *et al.*, 2006; Takayasu *et al.*, 2006)。

一方、SAFV は、プルキンエ細胞には感受性を示さなかった。マウスの小脳皮質形成期には、バグマングリア細胞の神経突起上の Notch とプルキンエ細胞の神経突起上のデルタ/ノッチ EGF 様関連レセプターの DNER が直接結合することで、Notch シグナルが活性化され、細胞の分化や増殖に相互作用する (Komine *et al.*, 2007; Stump *et al.*, 2002)。また、Hes5 は塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス型転写因子 (bHLH 因子) の一群に含まれた Hes ファミリーの一種であり、特に Hes5 遺伝子の発現は Delta-Notch シグナルに依存的で

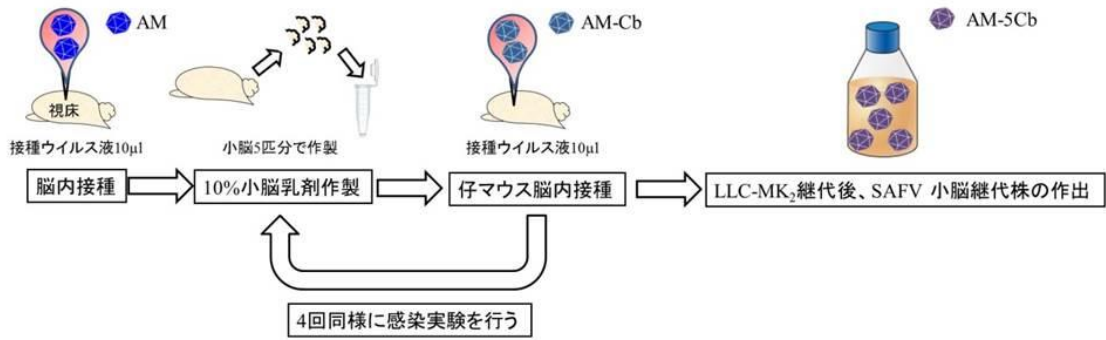
ある (Hatakeyama *et al.*, 2004)。継代株の感染は、バグマングリア細胞を減少させるが、その結果、バグマングリア細胞の前駆細胞である、神経前駆細胞が **Hes5** 遺伝子を発現することで、過剰に **DNER-Notch** シグナルが活性化し、バグマングリア細胞の分化促進とプルキンエ細胞の神経突起の伸張が起きたと推察した。なお、**DNER** やカルシウム結合蛋白質の **Calbindin** 遺伝子発現量の増加とプルキンエ細胞の伸張促進を示唆する組織検索結果は相関した。AM-5Cb 株を  $10^6$  CCID<sub>50</sub> 脳内接種した結果、接種 19 日目には明らかな小脳の皮質形成不全が生じた。これは、大量の SAFV が未成熟期の小脳のバグマングリア細胞に感染した結果、多くのグリア細胞が変性、壊死し、グリア細胞とプルキンエ細胞の数的均衡が崩れた結果によるものと考えた。パルボウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、ボーダー病ウイルスは宿主に感染し、小脳形成不全を起こすことはよく知られている (Toplu *et al.*, 2011; Resibois *et al.*, 2007; Url *et al.*, 2003; Bonthius & Perlman, 2007)。特に猫パルボウイルスの病態発揮機構は、主にウイルスがプルキンエ細胞に感染し、未熟な神経細胞の移動が抑制されるため形成不全が起こると考えられている (Url *et al.*, 2003)。しかし、SAFV はバグマングリア細胞に感染し、非感染細胞のプルキンエ細胞に作用することで小脳形成不全を発症したことはウイルスの病態を解明する上で興味深い事象である。

したがって、SAFV3 の小脳発達時における感染は、小脳皮質形成に少なからず影響をおよぼす可能性があり、今回作出した感染マウスモデルは、SAFV の小脳における病原性発揮機構を解明する上で有用な動物モデルと期待される。

### 3-6 図と表



A



B

ウイルス株	塩基	アミノ酸
	2468 2192 1950	VP3 (62) VP2 (239) VP2 (160)
AM: AAA	HQK	
1Cb: AGA	HRK	
2Cb: AGA	HRK	
3Cb: GGA	RRK	
4Cb: GGA	RRK	
5Cb: GGT	RRM	

C

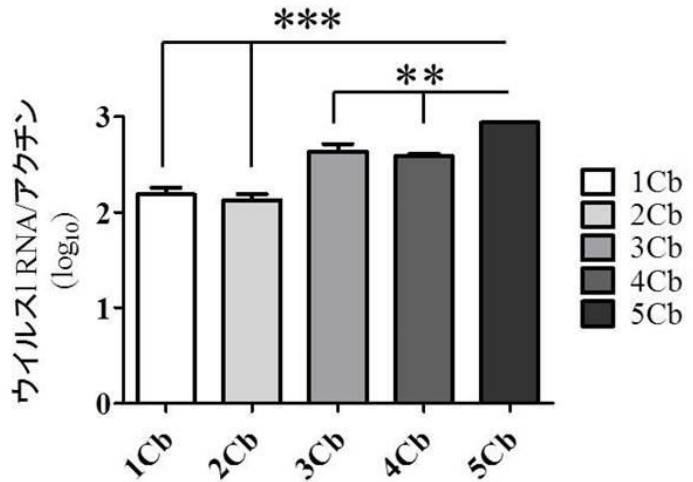


図3-1 小脳継代株の作出法と、各継代によるウイルスの性状の変化

A. 小脳継代法。生後24時間以内の新生仔BALB/cマウスにAM株を1匹あたり、10<sup>4</sup>CCID<sub>50</sub>/10  $\mu$ l 脳内接種し(n=5)、接種3日目に小脳をまとめて回収し、10%小脳組織乳剤を作製した。遠心後、その上清を別の新生仔マウスに脳内接種し、同様の作業をくりかえし五回行った。継代ごとにその残りの上清を-80℃に保管した。五回継代後、LLC-MK<sub>2</sub>細胞で1回増殖し、これを小脳継代株 (AM-5Cb株) とした。B. AM株及び継代ごとのウイルスゲノム配列とアミノ酸変異部位の変化。AM株は、二回継代する度に構造蛋白質のVP2、VP3領域にアミノ酸変異部位を獲得した。C. 継代ごとの上清中に含まれるウイルスRNAコピー数。ハウスキーピング遺伝子の $\beta$ アクチンで補正し、比較した。ウイルスRNAコピー数は、アミノ酸変異の獲得とともに有意に上昇した。\*:  $p < 0.01$ 、\*\*\*:  $p < 0.001$

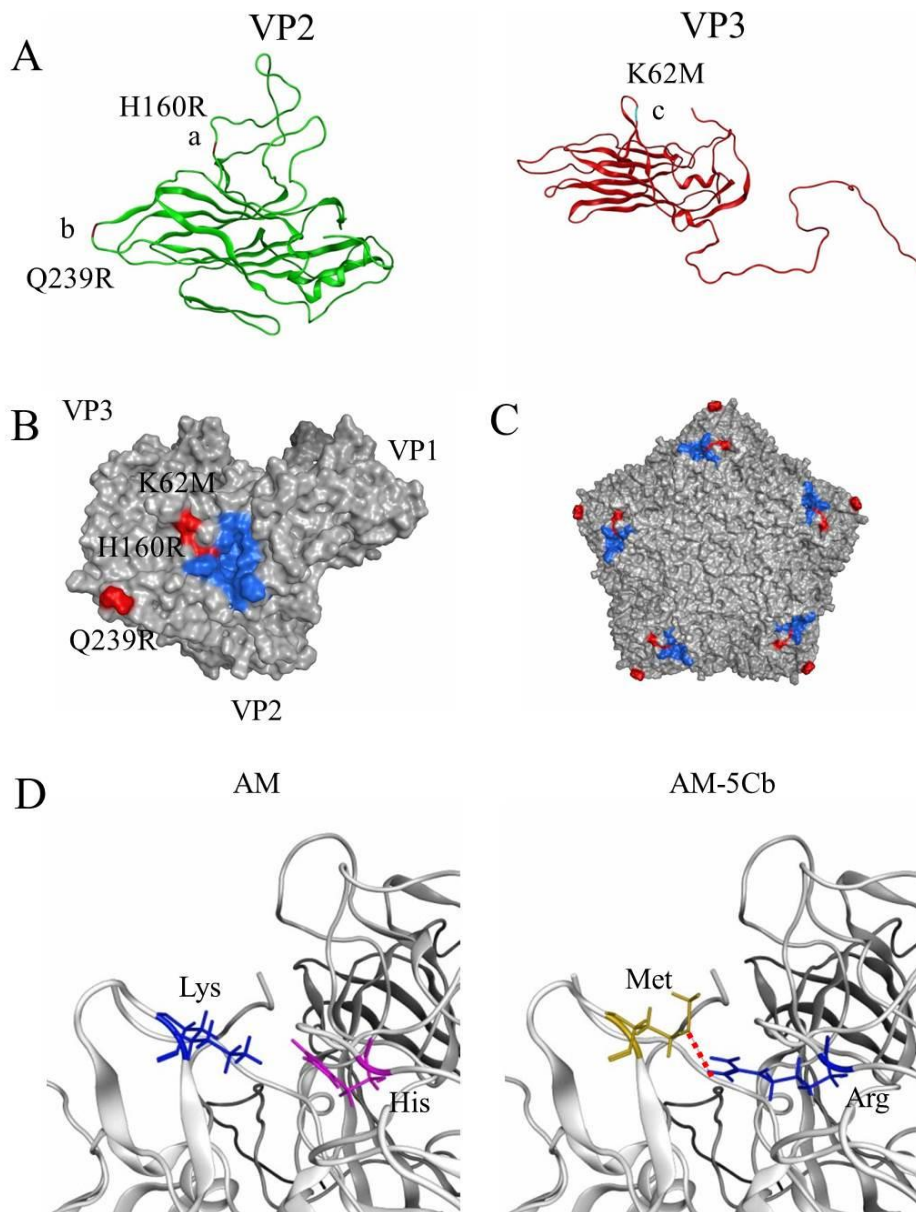


図3-2 小脳継代株の構造タンパク質立体構造予測

同じタイロウイルス種のタイラーウイルスDA株 (PDBコード: 1TME) を鋳型として、AM株とAM-5Cb株のホモロジーモデルを構築し、立体構造を予測した。A. VP2とVP3のリボンモデル。VP2領域のアミノ酸置換部位のQ239R、H160R、また、VP3領域のK62Mを示した。継代により、記載順にアミノ酸置換が生じた。H160RはVP2のループ構造に位置し、K62MはVP3のknob構造に位置していると予測された。B, C. VP1、VP2、VP3を組み合わせた分子表面構造 (B) とその五量体構造モデル (C)。三箇所のアミノ酸変異領域 (赤) のうち、VP2領域のH160Rのアミノ酸置換部位は、タイラーウイルスDA株のレセプター結合領域 (青) に隣接する。D. VP2ループ構造とVP3-knob構造間のワイヤーフレームモデル。主鎖はリボンモデルで示した。AM-5Cb株はアミノ酸置換部位のVP2領域のH160RとVP3領域のK62M間に新たに水素結合を獲得した (赤点線部分)。

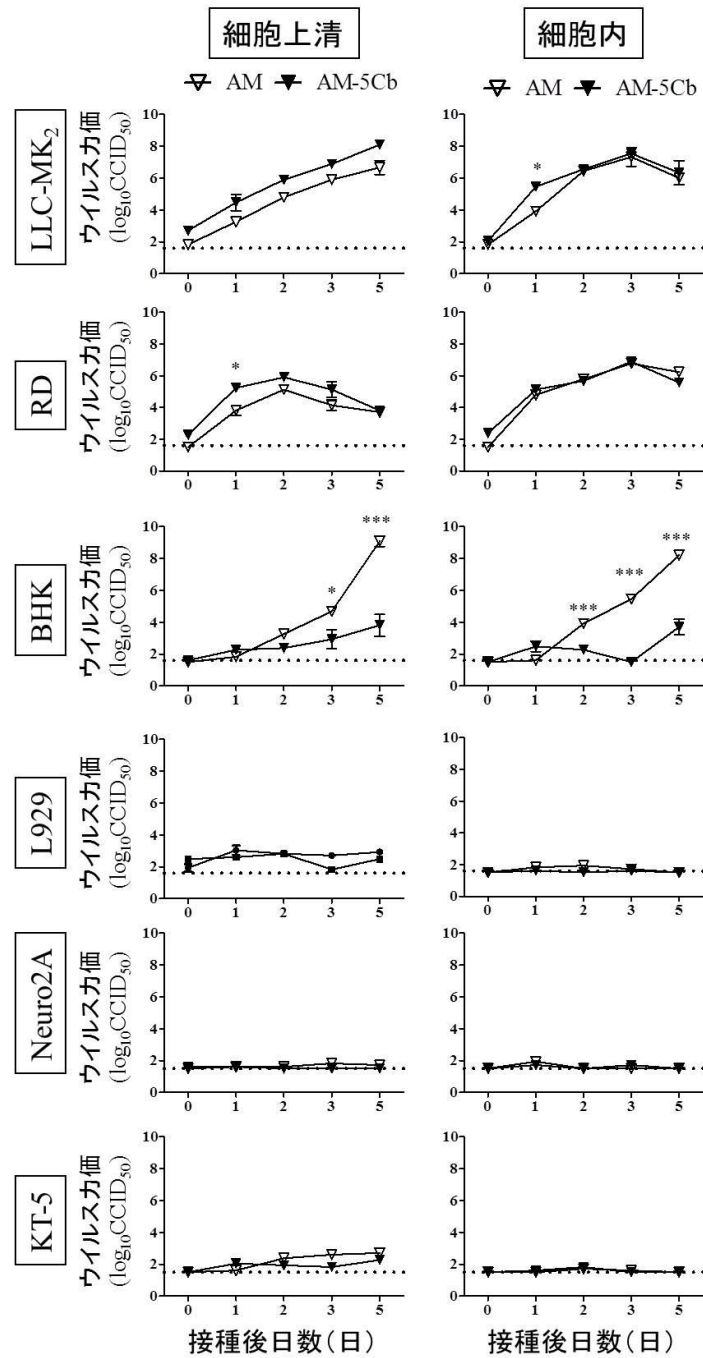


図3-3 小脳継代後のSAFVの培養細胞における増殖性の変化

アカゲザル腎細胞由来のLLC-MK<sub>2</sub>細胞、ヒト横紋筋肉腫由来のRD細胞、シリアンハムスター腎細胞由来のBHK細胞、あるいは、マウス線維芽細胞由来のL929細胞に感染多重度 (MOI) を0.1としてAM株、またはAM-5Cb株を接種し、経時的に細胞上清と細胞中のウイルス量を測定した。LLC-MK<sub>2</sub>細胞とRD細胞のAM-5Cb株の接種1日目目のウイルス量は、AM株に比べて高かったが、BHK細胞では、2日目以降の増殖性が有意に低下した。また、L929細胞、Neuro2A細胞、KT-5細胞ではいずれのウイルス株も増殖性は認められなかった。点線：検出限界=10<sup>1.5</sup>CCID<sub>50</sub>。\* :  $p < 0.05$ 、\*\*\* :  $p < 0.001$

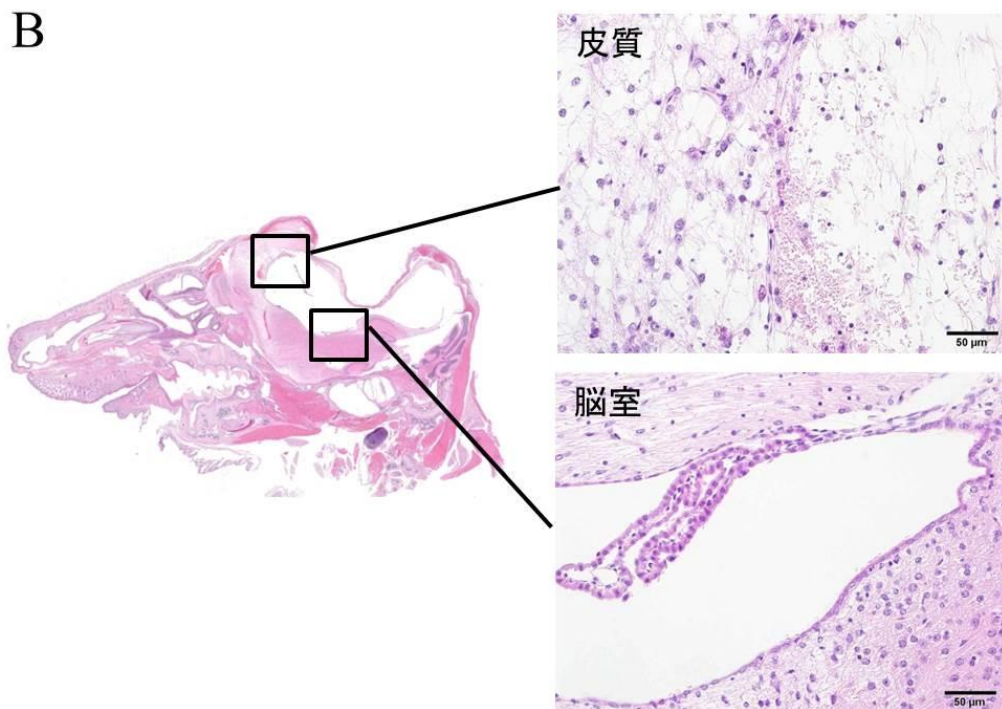
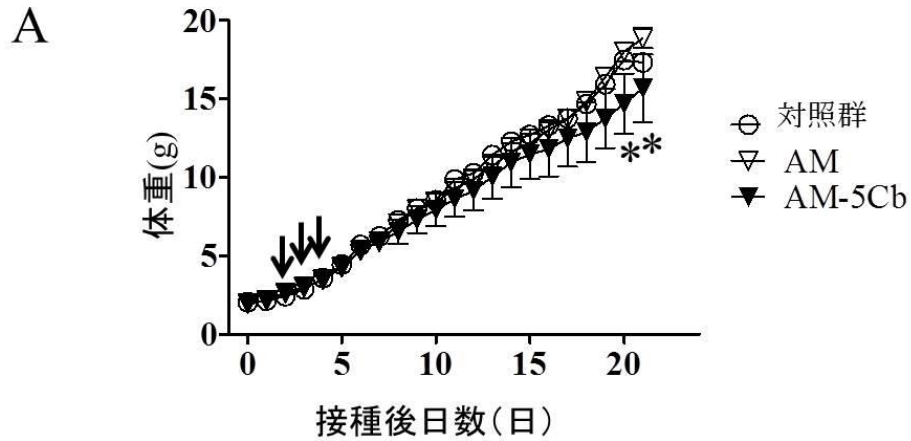


図3-4 小脳継代後の病原性の変化

生後24時間以内の新生仔ddYマウスに、AM株あるいはAM-5Cb株を1匹あたり $10^4$  CCID<sub>50</sub>で脳内接種した。A. 接種後21日間の体重変化。AM-5Cb株接種群は接種2から4日目に運動失調を示唆する異常行動を示し（矢印）、接種20日目以降、有意な体重増加率の低下がみられた（一群4匹）。B. AM-5Cb株接種群の一部の個体は、接種後11日目以降に水頭症様外貌を示した。左図：AM-5Cb株接種21日目のマウス頭部矢状断HE染色像。大脳皮質は菲薄化し、一部欠損し嚢胞状で、髄液を貯留していた。撮影倍率：20倍。右図上：残存する大脳皮質は広範囲にわたり重度の壊死、出血が認められた。下：大脳皮質に形成された嚢胞の一部は、上皮細胞で裏打ちされており、拡張した脳室が含まれていた。撮影倍率400倍。スケールバー：50  $\mu$ m。



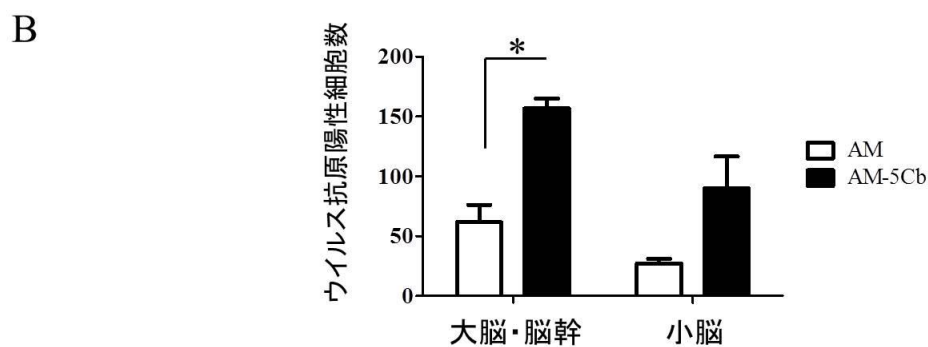
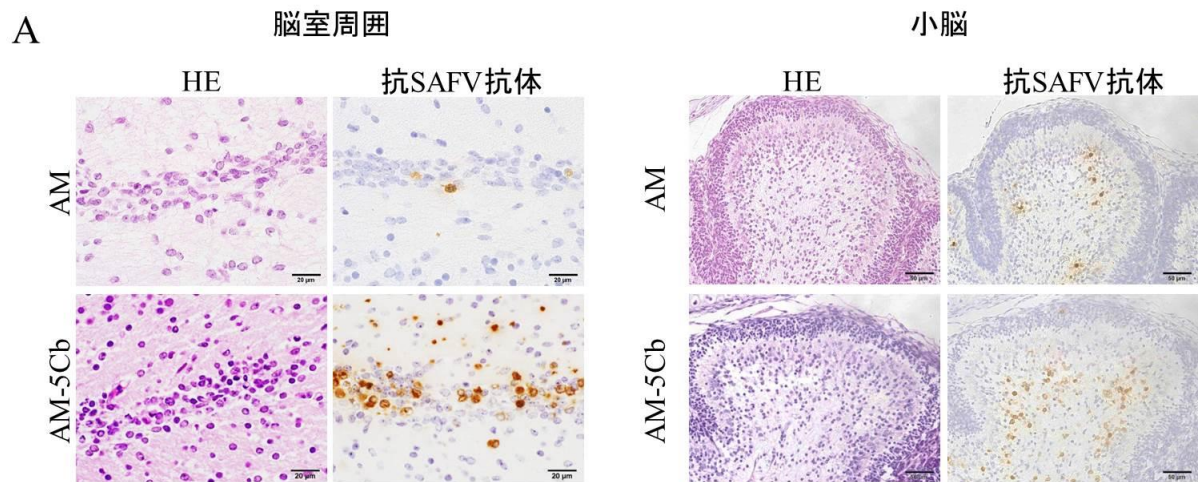


図3-5 小脳継代後の脳室周囲と小脳におけるウイルス抗原陽性細胞数の変化  
 生後24時間以内の新生仔ddYマウスに、AM株あるいはAM-5Cb株を1匹あたり $10^4$  CCID<sub>50</sub>で脳内接種した。AM株あるいはAM-5Cb株接種後3日目のマウス脳組織 (A) と抗原陽性細胞数 (B)。A. いずれのウイルス接種群も、グリア様細胞の軽度の変性がみられ、その部分に一致して、ウイルス抗原陽性であった。左：HE染色、右：抗SAFV抗体を用いた免疫組織化学法。撮影倍率：1000倍（脳室周囲）、400倍（小脳）。スケールバー：脳室周囲20  $\mu$ m、小脳50 $\mu$ m。B. 大脳皮質脳室・脳幹部と小脳のウイルス抗原陽性細胞数は、AM-5Cb株接種群の方が多かった。\*： $p < 0.05$

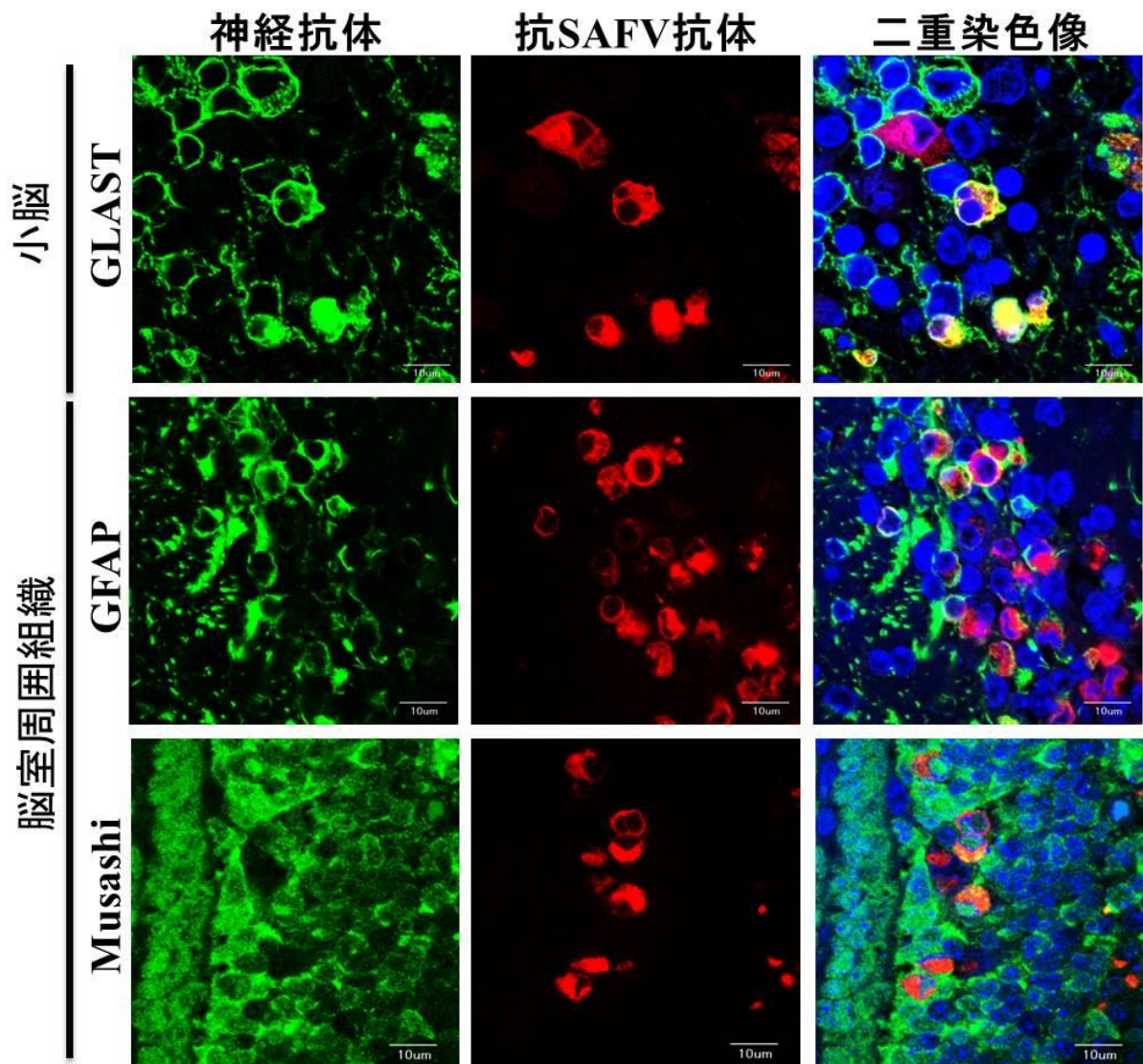


図3-6 ddY新生仔マウスにおける小脳継代株の感染細胞の同定

生後24時間以内の新生仔ddYマウスに、AM-5Cb株を1匹あたり $10^4$  CCID<sub>50</sub>で脳内接種した。AM-5Cb株接種3日目の新生仔マウス脳組織の蛍光多重染色像。小脳で観察されたウイルス抗原陽性細胞はGLAST陽性の放射状グリア（バーグマングリア）であった。一方、脳室周囲で観察されたウイルス抗原陽性細胞はGFAP陽性のアストログリアまたはMusashi-1陽性の神経前駆細胞（神経上皮細胞）であった。撮影倍率：600倍。スケールバー：10 μm。

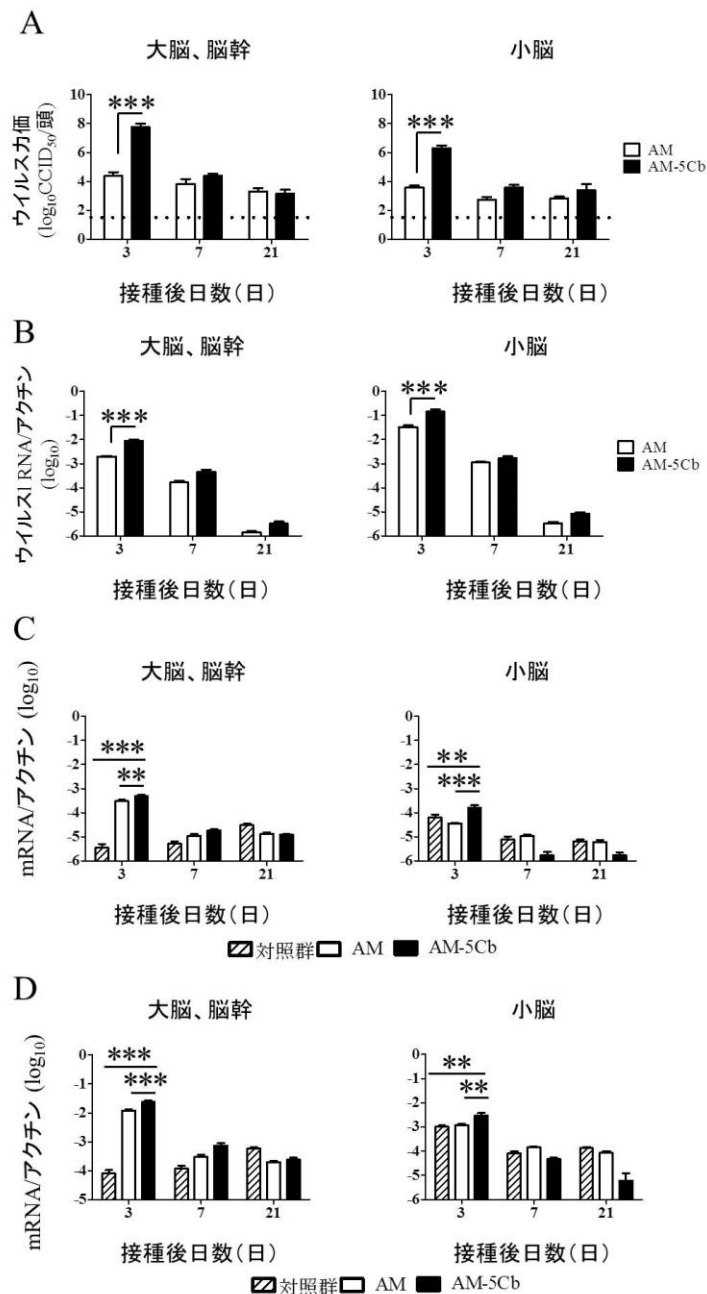


図3-7 小脳継代による新生仔マウス脳内のウイルス増殖性と I 型インターフェロン応答の変化

生後24時間以内の新生仔ddYマウスに、AM株あるいはAM-5Cb株を1匹あたり10<sup>4</sup> CCID<sub>50</sub>で脳内接種した。ウイルス接種後の1匹あたり的大脑・脳幹部と小脳のウイルス量 (A) とウイルスRNAコピー数 (B)。A. AM-5Cb株接種群は、接種3日目の大脑・脳幹と小脳のウイルス量が有意に高かった。B. ウイルスRNA量はウイルス量と同様に、接種3日目に有意に高値を示した。C, D. 1型IFNのIFN-α4(C)とIFN-β(D)のmRNAコピー数。ウイルス量、ウイルスRNAコピー数に相関し、AM-5Cb株接種群では3日目のI型IFNの発現が高い。いずれも、ハウスキーピング遺伝子のアクチンでmRNAを補正し、比較した。\* :  $p < 0.05$ 、\*\* :  $p < 0.01$ 、\*\*\* :  $p < 0.001$



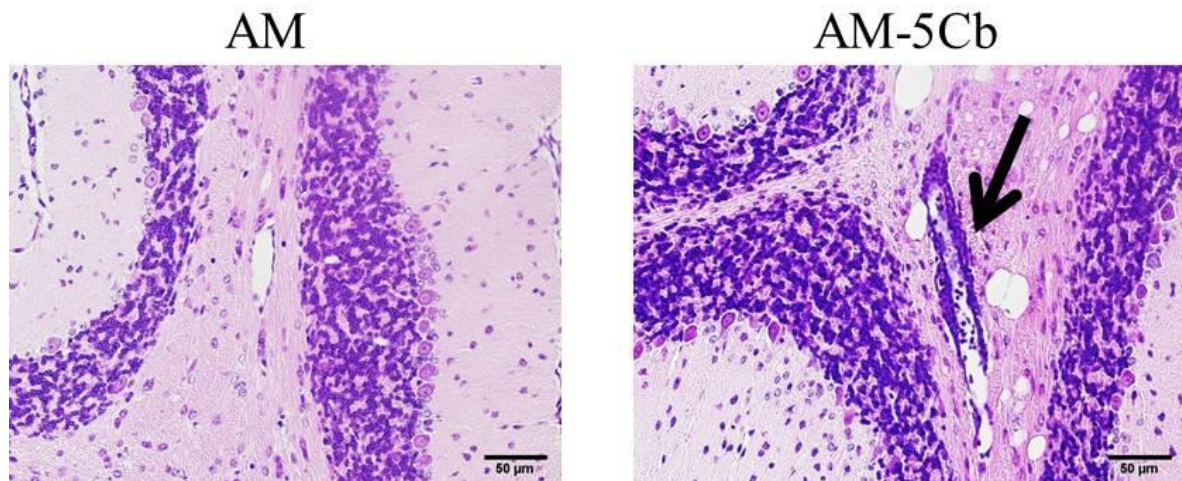


図3-8 小脳継代株SAFV感染21日目の大脳・脳幹、小脳における炎症像

生後24時間以内の新生仔ddYマウスに、AM株あるいはAM-5Cb株を1匹あたり $10^4$  CCID<sub>50</sub>で脳内接種した。接種後21日目の各ウイルス株接種小脳組織像。AM-5Cb株接種群では、小脳髄質の小血管周囲に炎症細胞浸潤がみられた（矢印）。HE染色。撮影倍率：400倍。スケールバー：50 μm。



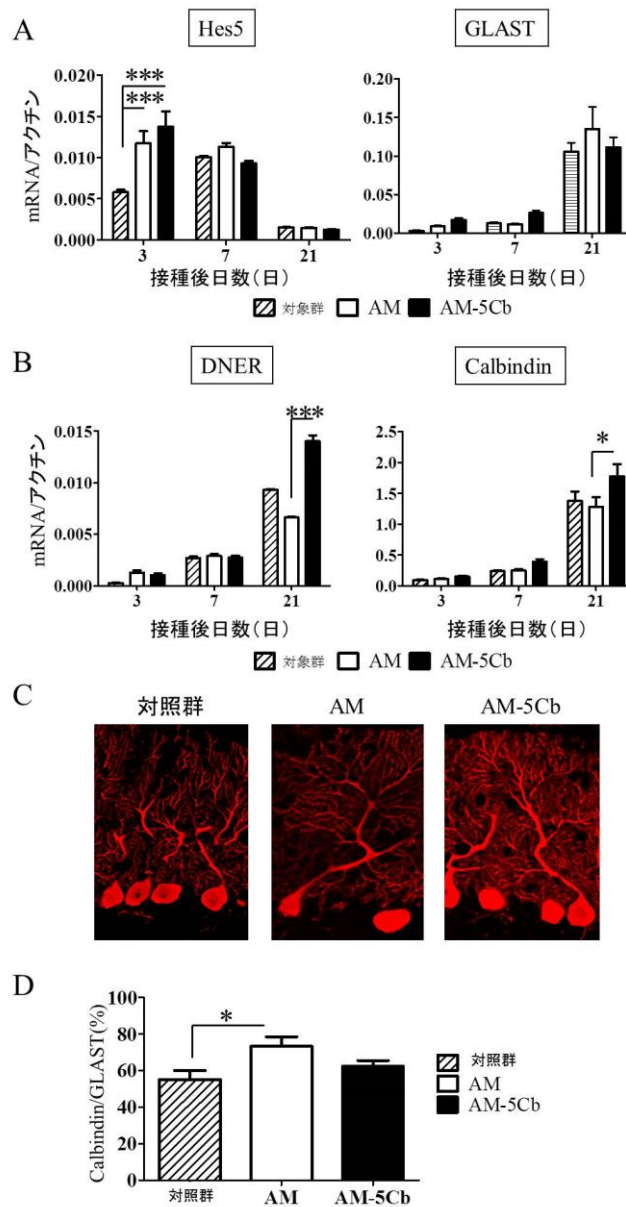


図3-9 小脳継代株脳内接種による小脳皮質形成への影響

生後24時間以内の新生仔ddYマウスに、AM株あるいはAM-5Cb株を1匹あたり $10^4$  CCID<sub>50</sub>で脳内接種した。対照群には、MEMを脳内接種した。A, B. 小脳乳剤上清中の小脳皮質形成時に関与する遺伝子のmRNA量。バークマングリア細胞の維持、促進に関連するGLAST遺伝子とアストロサイトの分化誘導の促進に関連するHes5遺伝子は接種3日目にAM株、AM-5Cb株の順に高い傾向にあった (A)。接種21日目には、AM-5Cb株接種群でプルキンエ細胞の成長に関連するDNER遺伝子とプルキンエ細胞に関連するCalbindin遺伝子の発現が高かった (B)。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ 。C. 抗Calbindin抗体を用いた蛍光免疫染色。ウイルス接種群はいずれも対照群と比較してプルキンエ細胞の神経突起が発達している。D. GLAST抗原陽性細胞に対する、Calbindin抗原陽性細胞の比率ウイルス接種群の方が高い傾向であった。

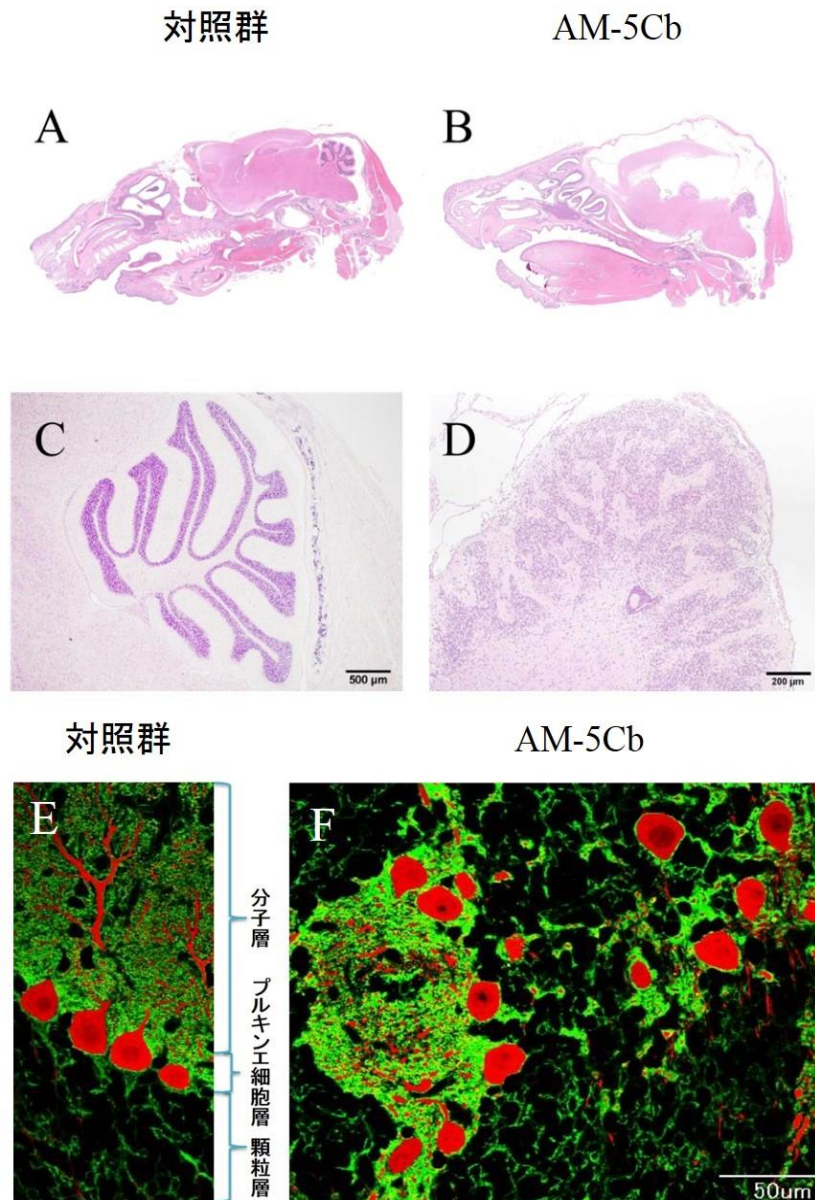


図3-10 小脳継代株脳内接種による新生仔マウスの小脳皮質形成異常  
 生後24時間以内のddY新生仔マウスにAM-5Cb株を $10^6$  CCID<sub>50</sub>で脳内接種した。A, C, E. 生後21日目の正常マウスの頭部矢状断組織像（低倍：A、高倍：C）。小脳の皮髄構造は明瞭で、分子層、プルキンエ細胞層、顆粒層の三層構造が形成されている（C）。整然と並んだ、Calbindin抗原陽性のプルキンエ細胞（赤）の神経突起の周囲にGLAST陽性のバークマングリア細胞の突起（緑）が取り巻くように存在している（E）。B, D, F. AM-5Cb株接種19日目のマウスの頭部矢状断組織像（低倍：B、高倍：D）。大脳皮質は菲薄化し、欠損している（B）。小脳皮質構造は不明瞭となり、形成不全がみられた（D）。プルキンエ細胞（赤）とバークマングリア細胞（緑）の配列は乱れ、バークマングリア細胞の神経突起で形成される明瞭な分子層は観察されなかった（F）。A-D. HE染色、E, F. 蛍光多重染色法。撮影倍率：A, B. 20倍、C. 100倍、D. 200倍、E, F. 400倍。スケールバー：C. 100  $\mu$ m、D. 200  $\mu$ m、E, F. 50  $\mu$ m。

## 正常なプルキンエ細胞とバーグマングリアの関係

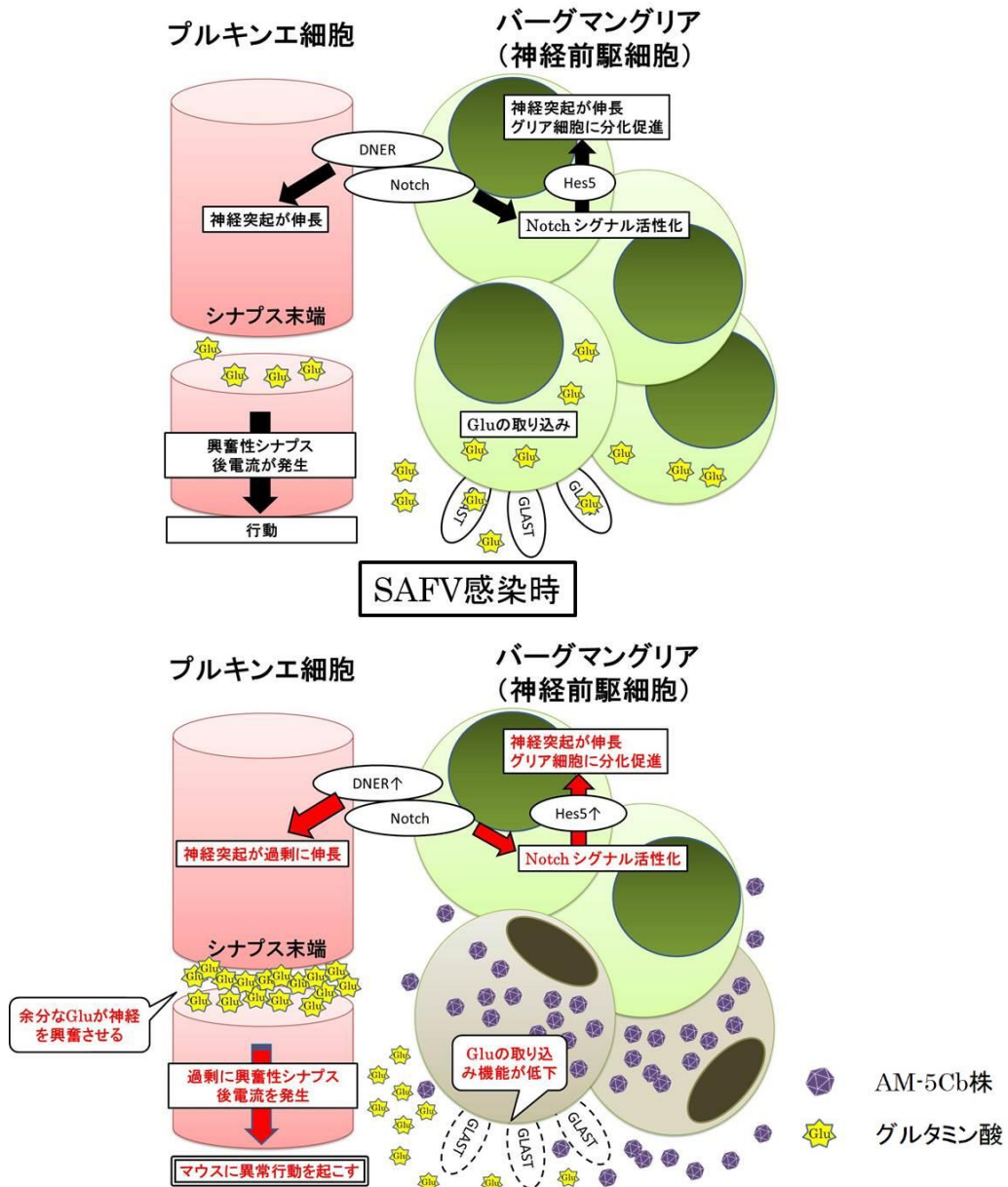


図3-11 小脳継代株感染後のマウスにおける病原性発揮機序

本研究で検索した、小脳形成期の関連遺伝子と感染による影響を示した。小脳皮質形成において、プルキンエ細胞とバーグマングリア細胞の神経突起の分化や伸張は、DNER-Notchシグナルにより相互作用する。また、バーグマングリア細胞は、プルキンエ細胞シナプス末端での神経伝達物質であるグルタミン酸を取り込むことで神経興奮を調節する (A)。しかし、AM-5Cb株が感染したことにより、バーグマングリア細胞は減少し、グルタミン酸調整能が低下し、余分なグルタミン酸がプルキンエ細胞を興奮させ、マウスに異常行動を起こしたことが推察された。また一方で、バーグマングリア細胞の前駆細胞である、神経前駆細胞がHes5遺伝子を発現し、その結果、過剰にDNER-Notchシグナルが活性化し、プルキンエ細胞の神経突起の伸張が起きたと考えられた。

表3-1 本章で使用したリアルタイムRT-PCRのプライマー、プローブの配列

プライマー、プローブ	塩基配列 (5'-3')
<b>Hes5</b>	
5'プライマー	CCTGAAACACAGCAAAGCCTTC
3'プライマー	GGAGTAGCCCTCGCTGTAGTC
プローブ(FAM-TAMRA)	CCGGCCCCAAGAGCCTGCACC
<b>DNER</b>	
5'プライマー	TGTCCTAGACCCATGCAGAAATG
3'プライマー	CAAGCGGAGCCGAAGTACC
プローブ(FAM-TAMRA)	TGAACCCGCTGAGGCTGGACACACA
<b>GLAST</b>	
5'プライマー	GATGCTGCAGATGCTGGTCTT
3'プライマー	TTACTATCTAGGGCCGCATTC
プローブ (FAM-TAMRA)	CCCCTGATCATCTCCAGTCTCGTCACA
<b>Calbindin</b>	
5'プライマー	GCTCCGCGCACTCTCAA
3'プライマー	GAGATGACTGCAGGTGGGATTC
プローブ (FAM-TAMRA)	AGCCGCTGCACCACGATGGC

表3-2 SAFV親株あるいは小脳継代株脳内接種後の新生仔マウスにおける  
ウイルス抗原分布と病理学的変化

株名	接種日 (日)	個体数	中枢神経系				その他	
			大脳	脳幹	小脳	脊髄	筋	末梢神経
AM	3	3	3/0*	3/0	3/1	1/0	2/0	2/0
	5	3	3/0	0/0	3/0	1/0	3/0	3/0
	7	3	1/0	0/0	3/0	1/0	1/0	0/0
	21	7	0/1	0/2	0/0	0/0	0/0	0/0
AM-5Cb	3	3	3/0	3/0	3/0	2/0	3/0	3/0
	5	3	3/2	2/0	3/3	2/0	2/0	3/0
	7	3	3/1	2/1	2/0	3/0	3/0	0/0
	21	7	1/7	0/4	0/3	0/4	0/5	0/0

\*ウイルス抗原が検出された個体数/炎症反応がみられた個体数

表3-3 高ウイルス量の小脳継代株を脳内接種した仔マウスにおける  
ウイルス抗原分布および病理学的変化

株名	接種日 (日)	個体数	中枢神経系				その他	
			大脳	脳幹	小脳	脊髄	筋	末梢神経
AM-5Cb	3	4	4/3*	4/2	4/4	4/0	4/0	4/0
	7	4	4/4	4/4	4/4	4/0	4/0	2/0
	19	4	1/4	1/2	1/4	3/4	0/0	0/0

\*ウイルス抗原が検出された個体数/炎症反応がみられた個体数

## 結語

本論文では、マウスを使用し、SAFV3型の神経病原性をウイルス学的、病理学的、免疫学的に初めて明らかにした。特に、SAFV3型が小脳親和性を示す事は、他のピコルナウイルスでは確認されていない所見であり、大変興味深い。SAFVは、小脳炎を発症した患児からも検出されており、このマウスモデルは、SAFVの神経病原性を解明する上で有用であると期待される。また、この動物モデルを応用は、SAFV感染症の重症化の機序の解明のみならず、非臨床研究時の抗ウイルス因子の検索に基づく新規薬剤、あるいは、新規ワクチンの開発に貢献すると考えられる。

## 謝辞

本博士論文は、筆者が日本獣医生命科学大学大学院 獣医生命科学研究科 獣医学専攻博士課程在学中に獣医感染症学教室に在籍し、国立感染症研究所感染病理部の研究生として行った研究をまとめたものです。

本研究に関して終始あたたかくご指導ご鞭撻を頂いた本学獣医感染症学教室の田口文広教授、国立感染症研究所感染病理部の永田典代第二室長に心より感謝いたします。

本研究の感染マウスモデルの解析にあたり、ご指導ご鞭撻を頂きました国立感染症研究所感染病理部の岩田奈織子主任研究官、鈴木忠樹第四室長、片野晴隆第一室長、中島典子第三室長、長谷川秀樹部長、ウイルス学的解析にあたり、ピコルナウイルスの基本的な取り扱いをご指導ご鞭撻頂きました同研究所ウイルス第二部の清水博之第二室長、Naeem Asif博士、ウイルス遺伝子解析の実験遂行にご協力頂きました片岡周子研究官、中村朋史研究官、李天成主任研究官、ウイルス構造解析にあたり、基礎的なことからご指導ご助言頂きました同研究所病原体ゲノム解析研究センターの横山勝主任研究官、佐藤裕徳第二室長、標本作製にあたりご協力頂きました感染病理部の原嶋綾子氏、藤野美穂子氏、会田萌子氏、佐藤由子主任研究官に心より感謝いたします。また、ウイルス臨床分離株を分与して頂きました高知県食肉衛生検査所の細見卓司先生、群馬県衛生環境研究所の塚越博之先生、愛知県衛生研究所の山下照夫先生に心より感謝しております。本論文を作成するにあたり、ウイルス学的、病理学的、免疫学的見地からご指導、ご助言頂きました国立感染症研究所感染病理部の田村慎一先生、岩崎琢也先生、同研究所インフルエンザウイルス研究センターの浅沼秀樹第六室長、相内章主任研究官、同研究所ウイルス第三部の白戸憲也主任研究官、富山県衛生研究所の佐多徹太郎所長、東京都医学総合研究所の小池智プロジェクトリーダー、日本獣医生命科学大学の氏家誠講師、潮田和佳氏、山田翔平氏ならびに獣医感染症学教室の室員の皆様に心より感謝いたします。



## 参考文献

Apostol LN, Suzuki A, Bautista A, Galang H, Paladin FJ, Fuji N, Lupisan S, Olveda R, Oshitani H. 2012. Detection of non-polio enteroviruses from 17 years of virological surveillance of acute flaccid paralysis in the Philippines. *J Med Virol.* **84**: 624-631.

Arita M, Nagata N, Iwata N, Ami Y, Suzaki Y, Mizuta K, Iwasaki T, Sata T, Wakita T, Shimizu H. 2007. An attenuated strain of enterovirus 71 belonging to genotype a showed a broad spectrum of antigenicity with attenuated neurovirulence in cynomolgus monkeys. *J Virol.* **81**: 9386-9395.

Arita M, Ami Y, Wakita T, Shimizu H. 2008. Cooperative effect of the attenuation determinants derived from poliovirus sabin 1 strain is essential for attenuation of enterovirus 71 in the NOD/SCID mouse infection model. *J Virol.* **82**: 1787-1797.

Arbustini E, Porcu E, Bellini O, Grasso M, Pilotto A, Dal Bello B, Morbini P, Diegoli M, Gavazzi A, Specchia G, Tavazzi L. 2000. Enteroviral infection causing fatal myocarditis and subclinical myopathy. *Heart.* **83**: 86-90.

Baasner A, Dettmeyer R, Graebe M, Rissland J, Madea B. 2003. PCR-based diagnosis of enterovirus and parvovirus B19 in paraffin-embedded heart tissue of children with suspected sudden infant death syndrome. *Lab Invest.* **83**: 1451-1455.

Banerjee R, Weidman MK, Echeverri A, Kundu P, Dasgupta A. 2004. Regulation of

poliovirus 3C protease by the 2C polypeptide. *J Virol.* **78**: 9243-9256.

Bates PJ, Sanderson G, Holgate ST, Johnston SL. 1997. A comparison of RT-PCR, in-situ hybridisation and in-situ RT-PCR for the detection of rhinovirus infection in paraffin sections. *J Virol Methods.* **67**: 153-160.

Benirschke K, Kibrick S. 1956. Acute aseptic myocarditis and meningoencephalitis in the newborn child infected with coxsackie virus group B, type 3. *N Engl J Med.* **255**: 883-889.

Bible JM, Pantelidis P, Chan PK, Tong CY. 2007. Genetic evolution of enterovirus 71: epidemiological and pathological implications. *Rev Med Virol.* **17**: 371-379.

Blinkova O, Kapoor A, Victoria J, Jones M, Wolfe N, Naeem A, Shaukat S, Sharif S, Alam MM, Angez M, Zaidi S, Delwart EL. 2009. Cardioviruses are genetically diverse and cause common enteric infections in South Asian children. *J Virol.* **83**: 4631-4641.

Bonthius DJ, Perlman S. 2007. Congenital viral infections of the brain: lessons learned from lymphocytic choriomeningitis virus in the neonatal rat. *PLoS Pathog.* **3**: e149.

Buckwalter MR, Nga PT, Gouilh MA, Fiette L, Bureau JF, Laird ME, Buchrieser J, Ozden S, Cheval J, Eloit M, Manuguerra JC, Gessain A, Brey PT, Fontanet A, Albert ML. 2011. Identification of a novel neuropathogenic Theiler's murine encephalomyelitis virus. *J Virol.* **85**: 6893-6905.

Caine EA, Partidos CD, Santangelo JD, Osorio JE. 2013. Adaptation of enterovirus 71 to adult interferon deficient mice. *PLoS One*. **8**: e59501.

Canelli E, Luppi A, Lavazza A, Lelli D, Sozzi E, Martin AM, Gelmetti D, Pascotto E, Sandri C, Magnone W, Cordioli P. 2010. Encephalomyocarditis virus infection in an Italian zoo. *Virology*. **7**: 64

Chen YC, Yu CK, Wang YF, Liu CC, Su IJ, Lei HY. 2004. A murine oral enterovirus 71 infection model with central nervous system involvement. *J Gen Virol*. **85**: 69-77.

Chiu CY, Greninger AL, Kanada K, Kwok T, Fischer KF, Runckel C, Louie JK, Glaser CA, Yagi S, Schnurr DP, Haggerty TD, Parsonnet J, Ganem D, DeRisi JL. 2008. Identification of cardioviruses related to Theiler's murine encephalomyelitis virus in human infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**: 14124-14129.

Chiu CY, Greninger AL, Chen EC, Haggerty TD, Parsonnet J, Delwart E, Derisi JL, Ganem D. 2010. Cultivation and serological characterization of a human Theiler's-like cardiovirus associated with diarrheal disease. *J Virol*. **84**: 4407-4414.

Chua BH, Phuektes P, Sanders SA, Nicholls PK, McMinn PC. 2008. The molecular basis of mouse adaptation by human enterovirus 71. *J Gen Virol*. **89**: 1622-1632.

Chua KB, Voon K, Yu M, Ali WN, Kasri AR, Wang LF. 2011. Saffold virus infection in children, Malaysia, 2009. *Emerg Infect Dis.* **17**: 1562-1564.

Craighead JE, McLane MF. 1968. Diabetes mellitus: induction in mice by encephalomyocarditis virus. *Science.* **162**: 913-914.

Cree BC, Bernardini GL, Hays AP, Lowe G. 2003. A fatal case of coxsackievirus B4 meningoencephalitis. *Arch Neurol.* **60**: 107-112.

Czechowicz J, Huaman JL, Forshey BM, Morrison AC, Castillo R, Huaman A, Caceda R, Eza D, Rocha C, Blair PJ, Olson JG, Kochel TJ. 2011. Prevalence and risk factors for encephalomyocarditis virus infection in Peru. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **11**: 367-374.

Dai XQ, Yuan CL, Yu Y, Zhao W, Yang ZB, Cui L, Hua XG. 2011. Molecular detection of Saffold Virus in children in Shanghai, China. *J Clin Virol.* **50**: 186-187.

Dal Canto MC, Lipton HL. 1977. Multiple sclerosis. Animal model: Theiler's virus infection in mice. *Am J Pathol.* **88**: 497-500.

Dal Canto MC, Kim BS, Miller SD, Melvold RW. 1996. Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus (TMEV)-Induced Demyelination: A Model for Human Multiple Sclerosis. *Methods.* **10**: 453-461.

Dickinson L, Griffiths AJ. 1966. The pathogenesis of experimental infections with encephalomyocarditis (EMC) virus. *Br J Exp Pathol.* **47**: 35-44.

Drexler JF, Luna LK, Stocker A, Almeida PS, Ribeiro TC, Petersen N, Herzog P, Pedroso C, Huppertz HI, Ribeiro Hda C, Jr., Baumgarte S, Drosten C. 2008. Circulation of 3 lineages of a novel Saffold cardiovirus in humans. *Emerg Infect Dis.* **14**: 1398-1405.

Ezyaguirre EJ, Walker DH, Zaki SR. 2010. Immunohistory of infectious diseases. In: Dabbs DJ (ed.). *Diagnostic Immunohistochemistry*, 3rd edn. Philadelphia, PA, Elsevier Saunders.

Feuer R, Mena I, Pagarigan RR, Harkins S, Hassett DE, Whitton JL. 2003.

Coxsackievirus B3 and the neonatal CNS: the roles of stem cells, developing neurons, and apoptosis in infection, viral dissemination, and disease. *Am J Pathol.* **163**: 1379-1393.

Foulis AK, Farquharson MA, Cameron SO, McGill M, Schonke H, Kandolf R. 1990. A search for the presence of the enteroviral capsid protein VP1 in pancreases of patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes and pancreases and hearts of infants who died of coxsackieviral myocarditis. *Diabetologia.* **33**: 290-298.

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

Gabriel G, Dauber B, Wolff T, Planz O, Klenk HD, Stech J. 2005. The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**: 18590-18595.

Galama J, Lanke K, Zoll J, Roivainen M, van Kuppeveld F. 2011. Seroepidemiology of Saffold cardiovirus type 2. *Emerg Infect Dis.* **17**: 1572-1573.

Grant RA, Filman DJ, Fujinami RS, Icenogle JP, Hogle JM. 1992. Three-dimensional structure of Theiler virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**: 2061-2065.

Guarner J, Bhatnagar J, Shieh WJ, Nolte KB, Klein D, Gookin MS, Peñaranda S, Oberste MS, Jones T, Smith C, Pallansch MA, Zaki SR. 2007. Histopathologic, immunohistochemical, and polymerase chain reaction assays in the study of cases with fatal sporadic myocarditis. *Hum Pathol.* **38**: 1412-1419.

Hammerstad SS, Tauriainen S, Hyoty H, Paulsen T, Norheim I, Dahl-Jorgensen K. 2013. Detection of enterovirus in the thyroid tissue of patients with graves' disease. *J Med Virol.* **85**: 512-518.

Hashimoto I, Hagiwara A. 1982. Pathogenicity of a poliomyelitis-like disease in monkeys infected orally with enterovirus 71: a model for human infection. *Neuropathol Appl Neurobiol.* **8**: 149-156.

Hatakeyama J, Bessho Y, Katoh K, Ookawara S, Fujioka M, Guillemot F, Kageyama R. 2004. Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development*. **131**: 5539-5550.

Hertzler S, Liang Z, Tresco B, Lipton HL. 2011. Adaptation of Saffold virus 2 for high-titer growth in mammalian cells. *J Virol*. **85**: 7411-7418.

Himeda T, Hosomi T, Asif N, Shimizu H, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y. 2011. The preparation of an infectious full-length cDNA clone of Saffold virus. *Virol J*. **8**: 110.

Ho M, Chen ER, Hsu KH, Twu SJ, Chen KT, Tsai SF, Wang JR, Shih SR. 1999. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group. *N Engl J Med*. **341**: 929-935.

Hsueh C, Jung SM, Shih SR, Kuo TT, Shieh WJ, Zaki S, Lin TY, Chang LY, Ning HC, Yen DC. 2000. Acute encephalomyelitis during an outbreak of enterovirus type 71 infection in Taiwan: report of an autopsy case with pathologic, immunofluorescence, and molecular studies. *Mod Pathol*. **13**: 1200-1205.

Huber SA, Lodge PA. 1984. Coxsackievirus B-3 myocarditis in Balb/c mice. Evidence for autoimmunity to myocyte antigens. *Am J Pathol*. **116**: 21-29.

Huang SW, Wang YF, Yu CK, Su IJ, Wang JR. 2012. Mutations in VP2 and VP1 capsid

proteins increase infectivity and mouse lethality of enterovirus 71 by virus binding and RNA accumulation enhancement. *Virology*. **422**: 132-143.

Hubbard GB, Soike KF, Butler TM, Carey KD, Davis H, Butcher WI, Gauntt CJ. 1992. An encephalomyocarditis virus epizootic in a baboon colony. *Lab Anim Sci*. **42**: 233-239.

Hyypiä T, Kallajoki M, Maaronen M, Stanway G, Kandolf R, Auvinen P, Kalimo H. 1993. Pathogenetic differences between coxsackie A and B virus infections in newborn mice. *Virus Res*. **27**: 71-78.

Iwata-Yoshikawa N, Uda A, Suzuki T, Tsunetsugu-Yokota Y, Sato Y, Morikawa S, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H, Nagata N. 2014. Effects of Toll-like receptor stimulation on eosinophilic infiltration in lungs of BALB/c mice immunized with UV-inactivated severe acute respiratory syndrome-related coronavirus vaccine. *J Virol*. **88**: 8597-8614.

Itagaki T, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Mizuta K, Noda M, Kimura H, Matsuzaki Y. 2011. Saffold cardiovirus infection in children associated with respiratory disease and its similarity to coxsackievirus infection. *Pediatr Infect Dis J*. **30**: 680-683.

Jones MS, Lukashov VV, Ganac RD, Schnurr DP. 2007. Discovery of a novel human picornavirus in a stool sample from a pediatric patient presenting with fever of unknown origin. *J Clin Microbiol*. **45**: 2144-2150.



Kamei S, Hersch SM, Kurata T, Takei Y. 1990. Coxsackie B antigen in the central nervous system of a patient with fatal acute encephalitis: immunohistochemical studies of formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Acta Neuropathol.* **80**: 216-221.

Kargar M, Sadeghipour S, Nategh R. 2009. Environmental surveillance of Non-Polio Enteroviruses in Iran. *Virology*. **6**: 149.

Katano H, Kano M, Nakamura T, Kanno T, Asanuma H, Sata T. 2011. A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses. *J Med Virol.* **83**: 322-330.

Khamrin P, Chaimongkol N, Nantachit N, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. 2011. Saffold cardioviruses in children with diarrhea, Thailand. *Emerg Infect Dis.* **17**: 1150-1152.

Khamrin P, Thongprachum A, Kikuta H, Yamamoto A, Nishimura S, Sugita K, Baba T, Kobayashi M, Okitsu S, Hayakawa S, Shimizu H, Maneekarn N, Ushijima H. 2013. Three clusters of Saffold viruses circulating in children with diarrhea in Japan. *Infect Genet Evol.* **13**:339-343.

Khetsuriani N, Kutateladze T, Zangaladze E, Shutkova T, Peñaranda S, Nix WA, Pallansch MA, Oberste MS. 2010. High degree of genetic diversity of non-polio enteroviruses identified in Georgia by environmental and clinical surveillance, 2002-2005.

J Med Microbiol. **59**: 1340-1347.

Kim BS, Lyman MA, Kang BS, Kang HK, Lee HG, Mohindru M, Palma JP. 2001. Pathogenesis of virus-induced immune-mediated demyelination. Immunol Res. **24**: 121-130.

Klump WM, Bergmann I, Muller BC, Ameis D, Kandolf R. 1990. Complete nucleotide sequence of infectious Coxsackievirus B3 cDNA: two initial 5' uridine residues are regained during plus-strand RNA synthesis. **64**: 1573-1583.

Kobayashi M, Tsukagoshi H, Ishioka T, Mizuta K, Noda M, Morita Y, Ryo A, Kozawa K, Kimura H. 2013. Seroepidemiology of Saffold cardiovirus (SAFV) genotype 3 in Japan. J Infect. **66**: 191-193.

Koike S, Taya C, Kurata T, Abe S, Ise I, Yonekawa H, Nomoto A. 1991. Transgenic mice susceptible to poliovirus. Proc Natl Acad Sci U S A. **88**: 951-955.

Komine O, Nagaoka M, Watase K, Gutmann DH, Tanigaki K, Honjo T, Radtke F, Saito T, Chiba S, Tanaka K. 2007. The monolayer formation of Bergmann glial cells is regulated by Notch/RBP-J signaling. Dev Biol. **311**: 238-250.

Kotani O, Shirato K, Nagata N, Ikeda H, Takahashi K, Taguchi F. 2013. Neuropathogenesis of a mouse-adapted porcine epidemic diarrhea virus infection in

suckling mice. *J Gen Virol.* **94**: 831-836.

Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N. 2014. Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. *Neuropathology.* doi: 10.1111/neup.12171.

Kumar AS, Kallio P, Luo M, Lipton HL. 2003. Amino acid substitutions in VP2 residues contacting sialic acid in low-neurovirulence BeAn virus dramatically reduce viral binding and spread of infection. *J Virol.* **77**: 2709-2716.

La Monica N, Almond JW, Racaniello VR. 1987. A mouse model for poliovirus neurovirulence identifies mutations that attenuate the virus for humans. *J Virol.* **61**: 2917-2920.

Laxmivandana R, Yergolkar P, Gopalkrishna V, Chitambar SD. 2013. Characterization of the non-polio enterovirus infections associated with acute flaccid paralysis in South-Western India. *PLoS One.* **8**: e61650.

Li CP, Schaeffer M. 1953. Adaptation of type I poliomyelitis virus to mice. *Proc Soc Exp Biol Med.* **82**: 477-481.

Li Y, Peng T, Yang Y, Niu C, Archard LC, Zhang H. 2000. High prevalence of enteroviral

genomic sequences in myocardium from cases of endemic cardiomyopathy (Keshan disease) in China. *Heart*. **83**: 696-701.

Lum LC, Wong KT, Lam SK, Chua KB, Goh AY, Lim WL, Ong BB, Paul G, AbuBakar S, Lambert M. 1998. Fatal enterovirus 71 encephalomyelitis. *J Pediatr*. **133**: 795-798.

Luo M, He C, Toth KS, Zhang CX, Lipton HL. 1992. Three-dimensional structure of Theiler murine encephalomyelitis virus (BeAn strain). *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**: 2409-2413.

Luo M, Toth KS, Zhou L, Pritchard A, Lipton HL. 1996. The structure of a highly virulent Theiler's murine encephalomyelitis virus (GDVII) and implications for determinants of viral persistence. *Virology*. **220**: 246-250.

Malatesta P, Hartfuss E, Götz M. 2000. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development*. **127**: 5253-5263.

Martin A, Wychowski C, Couderc T, Crainic R, Hogle J, Girard M. 1988. Engineering a poliovirus type 2 antigenic site on a type 1 capsid results in a chimaeric virus which is neurovirulent for mice. *EMBO J*. **7**: 2839-2847.

Masek-Hammerman K, Miller AD, Lin KC, MacKey J, Weissenbock H, Gierbolini L,

Burgos A, Perez H, Mansfield KG. 2012. Epizootic myocarditis associated with encephalomyocarditis virus in a group of rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Vet Pathol.* **49**: 386-392.

McKinney MD, Moon SJ, Kulesh DA, Larsen T, Schoepp RJ. 2009. Detection of viral RNA from paraffin-embedded tissues after prolonged formalin fixation. *J Clin Virol.* **44**: 39-42.

Miao LY, Pierce C, Gray-Johnson J, DeLotell J, Shaw C, Chapman N, Yeh E, Schnurr D, Huang YT. 2009. Monoclonal antibodies to VP1 recognize a broad range of enteroviruses. *J Clin Microbiol.* **47**: 3108-3113.

Miyamoto T, Nakayama EE, Yokoyama M, Ibe S, Takehara S, Kono K, Yokomaku Y, Pizzato M, Luban J, Sugiura W, Sato H, Shioda T. 2012. The carboxyl-terminus of human immunodeficiency virus type 2 circulating recombinant form 01\_AB capsid protein affects sensitivity to human TRIM5 $\alpha$ . *PLoS One.* **7**: e47757.

Miyamura T. 2009. Global polio eradication program: fundamental lessons for the control of infectious diseases. *Uirusu.* **59**:277-286.

Naeem A, Hosomi T, Nishimura Y, Alam MM, Oka T, Zaidi SS, Shimizu H. 2014. Genetic diversity of circulating Saffold viruses in Pakistan and Afghanistan. *J Gen Virol.* **95**: 1945-1957.

Nagata N, Shimizu H, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Miyamura T, Sata T, Iwasaki T. 2002. Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of cynomolgus monkeys with enterovirus 71. *J Med Virol.* **67**: 207-216.

Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Hasegawa H, Sata T, Miyamura T, Shimizu H. 2004. Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation. *J Gen Virol.* **85**: 2981-2989.

Nielsen AC, Bottiger B, Banner J, Hoffmann T, Nielsen LP. 2012. Serious invasive Saffold virus infections in children, 2009. *Emerg Infect Dis.* **18**: 7-12.

Oberste MS, Gotuzzo E, Blair P, Nix WA, Ksiazek TG, Comer JA, Rollin P, Goldsmith CS, Olson J, Kochel TJ. 2009. Human febrile illness caused by encephalomyocarditis virus infection, Peru. *Emerg Infect Dis.* **15**: 640-646.

Oka K, Oohira K, Yatabe Y, Tanaka T, Kurano K, Kosugi R, Murata M, Hakoziaki H, Nishikawa T, Tsutsumi Y. 2005. Fulminant myocarditis demonstrating uncommon morphology--a report of two autopsy cases. *Virchows Arch.* **446**: 259-264.

Ong KC, Devi S, Cardoso MJ, Wong KT. 2010. Formaldehyde-inactivated whole-virus vaccine protects a murine model of enterovirus 71 encephalomyelitis against disease. *J Virol.* **84**: 661-665.

Piralla A, Furione M, Rovida F, Marchi A, Stronati M, Gerna G, Baldanti F. 2012. Human parechovirus infections in patients admitted to hospital in Northern Italy, 2008-2010. *J Med Virol.* **84**: 686-690.

Puccini JM, Ruller CM, Robinson SM, Knopp KA, Buchmeier MJ, Doran KS, Feuer R. 2014. Distinct neural stem cell tropism, early immune activation, and choroid plexus pathology following coxsackievirus infection in the neonatal central nervous system. *Lab Invest.* **94**: 161-181.

Reddacliff LA, Kirkland PD, Hartley WJ, Reece RL. 1997. Encephalomyocarditis virus infections in an Australian zoo. *J Zoo Wildl Med.* **28**: 153-157.

Ren L, Gonzalez R, Xiao Y, Xu X, Chen L, Vernet G, Paranhos-Baccala G, Jin Q, Wang J. 2009. Saffold cardiovirus in children with acute gastroenteritis, Beijing, China. *Emerg Infect Dis.* **15**: 1509-1511.

Ren L, Gonzalez R, Xie Z, Xiao Y, Li Y, Liu C, Chen L, Yang Q, Vernet G, Paranhos-Baccala G, Jin Q, Shen K, Wang J. 2010. Saffold cardioviruses of 3 lineages in children with respiratory tract infections, Beijing, China. *Emerg Infect Dis.* **16**: 1158-1161.

Ren RB, Costantini F, Gorgacz EJ, Lee JJ, Racaniello VR. 1990. Transgenic mice

expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell*. **63**: 353-362.

Résibois A, Coppens A, Poncelet L. 2007. Naturally occurring parvovirus-associated feline hypogranular cerebellar hypoplasia-- A comparison to experimentally-induced lesions using immunohistology. *Vet Pathol*. **44**: 831-841.

Rodriguez M, Oleszak E, Leibowitz J. 1987. Theiler's murine encephalomyelitis: a model of demyelination and persistence of virus. *Crit Rev Immunol*. **7**: 325-365.

Rodriguez M, Roos RP. 1992. Pathogenesis of early and late disease in mice infected with Theiler's virus, using intratypic recombinant GDVII/DA viruses. *J Virol*. **66**: 217-225.

Ruller CM, Tabor-Godwin JM, Van Deren DA Jr, Robinson SM, Maciejewski S, Gluhm S, Gilbert PE, An N, Gude NA, Sussman MA, Whitton JL, Feuer R. 2012. Neural stem cell depletion and CNS developmental defects after enteroviral infection. *Am J Pathol*. **180**: 1107-1120.

Saeed M, Zaidi SZ, Naeem A, Masroor M, Sharif S, Shaukat S, Angez M, Khan A. 2007. Epidemiology and clinical findings associated with enteroviral acute flaccid paralysis in Pakistan. *BMC Infect Dis*. **7**: 6.

Shekhar K, Lye MS, Norlijah O, Ong F, Looi LM, Khuzaiah R, Marzuki I, Hussein I, Wong SL, Mohan J, Sinniah M, Abu Bakar S. 2005. Deaths in children during an



outbreak of hand, foot and mouth disease in Peninsular Malaysia--clinical and pathological characteristics. *Med J Malaysia*. **60**: 297-304.

Shimizu H. 2010. The lost decade of global polio eradication and moving forward. *Uirusu*. **60**:49-58.

Smithburn KC. 1949. Rift Valley fever: the neurotropic adaptation of the virus and the experimental use of this modified virus as a vaccine. *Br J Exp Pathol*. **30**: 1-16.

Stadnick E, Dan M, Sadeghi A, Chantler JK. 2004. Attenuating mutations in coxsackievirus B3 map to a conformational epitope that comprises the puff region of VP2 and the knob of VP3. *J Virol*. **78**: 13987-14002.

Stump G, Durrer A, Klein AL, Lütolf S, Suter U, Taylor V. 2002. Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain. *Mech Dev*. **114**: 153-159.

Takatsuru Y, Takayasu Y, Iino M, Nikkuni O, Ueda Y, Tanaka K, Ozawa S. 2006. Roles of glial glutamate transporters in shaping EPSCs at the climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neurosci Res*. **54**: 140-148.

Takayasu Y, Iino M, Shimamoto K, Tanaka K, Ozawa S. 2006. Glial glutamate transporters maintain one-to-one relationship at the climbing fiber-Purkinje cell synapse

by preventing glutamate spillover. *J Neurosci.* **26**: 6563-6572.

Theiler M. 1937. Spontaneous Encephalomyelitis of Mice, a New Virus Disease. *J Exp Med.* **65**: 705-719.

Toplu N, Oguzoglu TC, Epikmen ET, Aydogan A. 2011. Neuropathologic study of border disease virus in naturally infected fetal and neonatal small ruminants and its association with apoptosis. *Vet Pathol.* **48**: 576-583.

Trabelsi A, Grattard F, Nejmeddine M, Aouni M, Bourlet T, Pozzetto B. 1995. Evaluation of an enterovirus group-specific anti-VP1 monoclonal antibody, 5-D8/1, in comparison with neutralization and PCR for rapid identification of enteroviruses in cell culture. *J Clin Microbiol.* **33**: 2454-2457.

Tsueng G, Tabor-Godwin JM, Gopal A, Ruller CM, Deline S, An N, Frausto RF, Milner R, Crocker SJ, Whitton JL, Feuer R. 2011. Coxsackievirus preferentially replicates and induces cytopathic effects in undifferentiated neural progenitor cells. *J Virol.* **85**: 5718-5732.

Tsukagoshi H, Masuda Y, Mizutani T, Mizuta K, Saitoh M, Morita Y, Nishina A, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. 2010. Sequencing and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus (SAFV) genotype 3 isolates from children with upper respiratory infection in Gunma, Japan. *Jpn J Infect Dis.* **63**: 378-380.

Url A, Truyen U, Rebel-Bauder B, Weissenböck H, Schmidt P. 2003. Evidence of parvovirus replication in cerebral neurons of cats. *J Clin Microbiol.* **41**: 3801-3805.

Victoria JG, Kapoor A, Li L, Blinkova O, Slikas B, Wang C, Naeem A, Zaidi S, Delwart E. 2009. Metagenomic analyses of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. *J Virol.* **83**: 4642-4651

Villarreal D, Young CR, Storts R, Ting JW, Welsh CJ. 2006. A comparison of the neurotropism of Theiler's virus and poliovirus in CBA mice. *Microb Pathog* **41**: 149-156.

Wang L, Dong C, Chen DE, Song Z. 2014. Coxsackievirus-induced acute neonatal central nervous system disease model. *Int J Clin Exp Pathol.* **7**: 858-869.

Wang W, Duo J, Liu J, Ma C, Zhang L, Wei Q, Qin C. 2011. A mouse muscle-adapted enterovirus 71 strain with increased virulence in mice. *Microbes Infect.* **13**: 862-870.

Wong KT, Munisamy B, Ong KC, Kojima H, Noriyo N, Chua KB, Ong BB, Nagashima K. 2008. The distribution of inflammation and virus in human enterovirus 71 encephalomyelitis suggests possible viral spread by neural pathways. *J Neuropathol Exp Neurol.* **67**: 162-169.

Xu ZQ, Cheng WX, Qi HM, Cui SX, Jin Y, Duan ZJ. 2009. New Saffold cardiovirus in

children, China. *Emerg Infect Dis.* **15**: 993-994.

Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, Le MQ, Nidom CA, Sakai-Tagawa Y, Muramoto Y, Ito M, Kiso M, Horimoto T, Shinya K, Sawada T, Kiso M, Usui T, Murata T, Lin Y, Hay A, Haire LF, Stevens DJ, Russell RJ, Gamblin SJ, Skehel JJ, Kawaoka Y. 2006. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature.* **444**: 378-382.

Yan JJ, Wang JR, Liu CC, Yang HB, Su IJ. 2000. An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan 1998: a comprehensive pathological, virological, and molecular study on a case of fulminant encephalitis. *J Clin Virol.* **17**: 13-22.

Yang Y, Wang H, Gong E, Du J, Zhao X, McNutt MA, Wang S, Zhong Y, Gao Z, Zheng J. 2009. Neuropathology in 2 cases of fatal enterovirus type 71 infection from a recent epidemic in the People's Republic of China: a histopathologic, immunohistochemical, and reverse transcription polymerase chain reaction study. *Hum Pathol.* **40**: 1288-1295.

Yeh MT, Wang SW, Yu CK, Lin KH, Lei HY, Su IJ, Wang JR. 2011. A single nucleotide in stem loop II of 5'-untranslated region contributes to virulence of enterovirus 71 in mice. *PLoS One.* **6**: e27082.

Yeung WL, Ip M, Ng HK, Fok TF. 1997. An infant with encephalitis. *Lancet.* **350**: 1594.

Yoon JW, McClintock PR, Onodera T, Notkins AL. 1980. Virus-induced diabetes mellitus. XVIII. Inhibition by a nondiabetogenic variant of encephalomyocarditis virus. *J Exp Med.* **152**: 878-892.

Yu CK, Chen CC, Chen CL, Wang JR, Liu CC, Yan JJ, Su IJ. 2000. Neutralizing antibody provided protection against enterovirus type 71 lethal challenge in neonatal mice. *J Biomed Sci.* **7**: 523-528.

Zaini Z, Phuektes P, McMinn P. 2012. Mouse adaptation of a sub-genogroup B5 strain of human enterovirus 71 is associated with a novel lysine to glutamic acid substitution at position 244 in protein VP1. *Virus Res.* **167**: 86-96.

Zhang H, Li Y, Peng T, Aasa M, Zhang L, Yang Y, Archard LC. 2000. Localization of enteroviral antigen in myocardium and other tissues from patients with heart muscle disease by an improved immunohistochemical technique. *J Histochem Cytochem.* **48**: 579-584.

Zhang YC, Jiang SW, Gu WZ, Hu AR, Lu CT, Liang XY, Hu YR, Zhu DD, Xie L. 2012. Clinicopathologic features and molecular analysis of enterovirus 71 infection: report of an autopsy case from the epidemic of hand, foot and mouth disease in China. *Pathol Int.* **62**: 565-570.

Zhou L, Luo Y, Wu Y, Tsao J, Luo M. 2000. Sialylation of the host receptor may modulate

entry of demyelinating persistent Theiler's virus. *J Virol.* **74**: 1477-1485.

Zhu Q, Guo JT, Seeger C. 2003. Replication of hepatitis C virus subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells. *J Virol.* **77**: 9204-9210.

Zoll J, Erkens Hulshof S, Lanke K, Verduyn Lunel F, Melchers WJ, Schoondermark-van de Ven E, Roivainen M, Galama JM, van Kuppeveld FJ. 2009. Saffold virus, a human Theiler's-like cardiovirus, is ubiquitous and causes infection early in life. *PLoS Pathog.* **5**: e1000416.

Zuckerman MA, Sheaff M, Martin JE, Gabriel CM. 1993. Fatal case of echovirus type 9 encephalitis. *J Clin Pathol.* **46**: 865-866.

## 研究業績

○Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N. 2014.

Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. *Neuropathology*. doi: 10.1111/neup.12171.

○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. (Manuscript in preparation)

○Kotani O, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Yokoyama M, Nakajima N, Sato H, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Infection with Saffold virus passaged in mouse cerebellum affected cerebellar development in neonatal mice. (Manuscript in preparation)