

## 第 44 回日本小児感染症学会教育講演

## 新しいピコルナウイルス感染症

## —ヒトカルジオウイルスを中心に—

大原 義朗\* 姫田 敏樹\*

**要旨** Saffold ウイルスは、2007 年に同定された新しいヒトカルジオウイルスである。Saffold ウイルスの病原性は依然不明であるが、神経疾患との関係が疑われる。本稿では、マウスカルジオウイルスの病原性と比較しながら、Saffold ウイルスの病原性について考察する。

## I. ヒトカルジオウイルスとは

カルジオウイルスは、ピコルナウイルス科に属するウイルスである。ピコルナウイルス科は、他にエンテロウイルス属、ライノウイルス属、ヘパトウイルス属、パレコウイルス属など多くのウイルスが属しており、ヒトに多種多様の疾患を引き起こす。

カルジオウイルスは、これまでげっ歯類を自然宿主とするウイルスとして知られており、マウス脳心筋炎ウイルス (encephalomyocarditis virus : EMCV) 種とタイロウイルス (Theilovirus) 種が含まれている。EMCV は、マウスに心筋炎、脳炎、膵炎を引き起こし、糖尿病モデルとしても利用されることで有名である。Theilovirus は、マウスに脳脊髄炎や脱髄を引き起こすタイラー脳脊髄炎ウイルス (Theiler's murine encephalomyelitis virus : TMEV) とラットに不顕性感染するタイラー様ラットウイルス (Theiler's-like rat virus : TRV) の亜種に分類され、TMEV は多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) のマウスモデル作製に利用されている。欧米を中心とする基礎研究者の間では有名

なウイルスであるが、国内の臨床現場では馴染みの薄いウイルスであった。しかし、1981 年に採取された不明熱の生後 8 カ月の女児の便から分離された不明ウイルスが、2007 年になりカルジオウイルスとして同定され、初めてヒトに感染するウイルスがカルジオウイルス属に分類された。このヒトカルジオウイルスは、報告者のミドルネームから Saffold ウイルス (SAFV) と呼ばれるようになった<sup>1)</sup>。

## II. Saffold ウイルス (SAFV)

SAFV は、マウスに脱髄を引き起こす TMEV と極めて高い遺伝的相同性を示す (全体として 67~68%) ことから、現在はカルジオウイルス属タイロウイルス種に分類されている (表)。その後 SAFV は、主に上気道炎の咽頭拭い液や胃腸炎の便から検出され、また、SAFV に対する抗体の保有率調査から、日本国内においても 8 歳以上の小児の 75% 以上が SAFV に対する抗体を保持しており、ヒトは幼少期に SAFV の初感染を受け、そのほとんどが不顕性感染で経過し、まれに上気道炎や胃腸炎を起こすと考えられている<sup>2)</sup>。しかし、

**Key words** : カルジオウイルス, Saffold ウイルス, 病原性

\* 金沢医科大学医学部微生物学講座

[〒 920-0293 石川県河北郡内灘町大学 1-1]

表 カルジオウイルスの分類

カルジオウイルス属のウイルス種	宿主	病原性
脳心筋炎ウイルス (EMCV)	主にげっ歯類	脳炎 心筋炎 膵炎
タイロウイルス タイラー脳脊髄炎ウイルス (TMEV) タイラー様ラットウイルス (TRV) Saffold ウイルス (SAFV)	マウス ラット ヒト	脳脊髄炎・脱髄 不顕性感染 不明

便および咽頭拭い液からの検出例では、その大部分に他のウイルスの共感染が検出されており、いまだ各疾患と SAFV 感染の因果関係は明らかにされていない。

SAFV は、無菌性髄膜炎の髄液からも分離されており<sup>3)</sup>、加えて死亡例を含む脳炎の髄液<sup>4)</sup>、さらには、急性膵炎の便からも SAFV は検出されている<sup>5)</sup>。さらに、マウス腹腔内に SAFV を接種すると、膵臓、心臓、脳の順でウイルス抗原が検出されるという報告もある<sup>6)</sup>。これらの報告例は、マウスカルジオウイルスの病原性 (EMCV: 脳炎, 心筋炎, 膵炎, TMEV: 脳脊髄炎, 脱髄) と一致しているとも考えられ、SAFV の神経病原性および膵臓病原性が強く疑われる。

### III. マウスカルジオウイルスの病原性

MS が免疫性疾患であることはほぼ確立されているが、その一連の免疫現象を引き起こす因子はまだ不明であり、古くからウイルス感染の関与が疑われてきた。しかし、原因ウイルスはいまだ同定されていない<sup>7)</sup>。

TMEV は、マウスに感染し MS と似た症状を呈することから、MS のマウスモデルとして利用されている。TMEV はその生物学的性状の違いから 2 つの亜群に分けられる。急性亜群 (GDVII 株) は強毒株であり、致死性の急性灰白脳脊髄炎を起こす。一方、慢性亜群 (TO 株) は弱毒株であり、脳内接種により軽い急性灰白脳脊髄炎を起こすが、マウスは回復し、その数カ月後に再び軽い歩行障害で発症する。この時期に病理組織学的に検索すると、脊髄に著明な脱髄が認められる<sup>8)</sup>。さらに血清・髄液に高値の中和抗体価が存在するに

もかわらず、ウイルスの持続感染が認められる。通常、免疫能が正常な場合、ピコルナウイルスは溶解感染するウイルスであることから、持続感染は TMEV の特筆すべき特徴であるといえる。この TMEV 持続感染の場合は、浸潤マクロファージにウイルス抗原などが検出できること<sup>9-11)</sup>、浸潤マクロファージからウイルスが分離できること<sup>12)</sup>、マクロファージ初代培養細胞にウイルスが感染すること<sup>13)</sup>、そしてマクロファージを枯渇させたマウスでは、ウイルスの持続感染も脱髄も起こらないこと<sup>14)</sup>から、マクロファージであると考えられている。この TMEV 持続感染細胞から感染性ウイルス粒子が生体内でわずかながら産生され続け、その感染性ウイルスがオリゴデンドロサイトに溶解感染してオリゴデンドロサイト由来の細胞成分が漏出する。この繰り返しにより、オリゴデンドロサイト由来の細胞成分に対して免疫反応が惹き起され (いわゆる epitope spreading)、自己免疫疾患が引き起こされると考えられている<sup>15)</sup>。

### IV. TMEV の持続感染

ここで、一つの疑問が生じる。なぜ TMEV は持続感染するのか? 筆者らはこの疑問を解明すべく、*in vitro* において TMEV 持続感染細胞を作出し、持続感染機序を解析した。型通りウイルスを感染させた後に培養を継続し、感染後も生存し続ける細胞集団として分離培養することで TMEV 持続感染細胞を作出した。ウイルス抗原陽性率、細胞生存率、および感染性ウイルス粒子産生量を測定することで持続感染の成立を確認した。ウイルス抗原陽性率は約 35~45%、細胞生存率は約 40~60% に維持され、感染細胞と非感染細胞が適

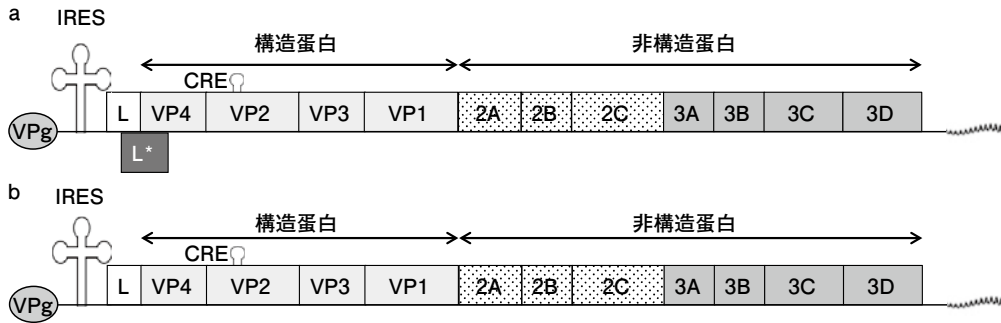


図 TMEV ゲノム構造の模式図

a: TMEV-DA b: TMEV-GDVII

TMEV-DA: タイラーウイルス慢性亜群 DA 株, TMEV-GDVII: タイラーウイルス急性亜群 GDVII 株,

IRES: internal ribosome entry site, CRE: *cis*-acting replication element

度に混在している系であることが確認された。また、感染性ウイルス粒子は、およそ 5 pfu/cell のレベルで産生され続けていることも確認された<sup>16)</sup>。この細胞を用いて、TMEV 持続感染時のインターフェロン (interferon: IFN) 産生を RT-PCR にて調べたところ、IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  の発現が TMEV 急性感染期と比較して、有意に抑制されていることが示された。しかし IFN- $\beta$  の発現は完全に阻害されてはならず、わずかに産生されていた。そこで、この TMEV 持続感染細胞に抗 IFN- $\beta$  抗体を添加すると、ウイルス量は 1,000 倍以上に増加し、TMEV の持続感染は破綻した。すなわち、わずかな IFN- $\beta$  の発現がウイルスの急激な増殖を抑え、ウイルスと宿主細胞のバランスを保っていることが示唆された。以上から、TMEV 持続感染モデル細胞は、感染細胞と非感染細胞がバランスよく維持された感染様式であり、'IFN 依存性の維持型持続感染' であることが示された<sup>16)</sup>。

## V. TMEV 持続感染において重要な役割を担うウイルス非構造蛋白

カルジオウイルスでは、ウイルスポリ蛋白の N 末端に Leader と呼ばれる小さなウイルス非構造蛋白が存在する (図)。この Leader 蛋白は、エンテロウイルスなどの他のピコルナウイルスには存在しない蛋白である。また、TMEV の持続感染する慢性株と持続感染しない急性株のゲノム構造における最大の相違は、慢性株ではポリ蛋白の読み

枠とは異なった読み枠で L\* と呼ばれるもう一つのウイルス非構造蛋白がコードされている点である (図)。筆者らは、これら 2 つのウイルス非構造蛋白に着目し、TMEV 持続感染における役割を解析した。

Leader 蛋白は、5' 端より Zinc-finger domain, Acidic domain, S/T-rich domain と呼ばれる領域に分けられる。このうち Zinc-finger domain は、IFN 産生の抑制に重要な領域であることが種々の報告から示唆されている<sup>8)</sup>。そこで、筆者らは、Zinc-finger domain に変異を導入した変異株をリバースジェネティクスにより作製し、RT-PCR を用いて IFN の mRNA 発現を解析した。その結果、Zinc-finger motif 変異株では、野生株と比較して有意な IFN の発現増加が認められ、Leader 蛋白の Zinc-finger domain が I 型 IFN の発現抑制に寄与していることが示された。この Leader 蛋白の機能をより詳細に解析する目的で、Leader 蛋白発現系の構築を試みたところ、Leader 蛋白の発現により細胞は速やかに細胞死を起こすことが明らかとなった。この原因を明らかにするために、活性型 caspase-3 の検出、開裂型 Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) の検出、fluorescence activated cell sorting (FACS) によるアポトーシス細胞の検出を行ったところ、Leader 蛋白の発現によりアポトーシスが誘導されていることが証明された<sup>17)</sup>。

Leader 蛋白が IFN 産生抑制により抗ウイルス状態を回避したとしても、宿主細胞にアポトーシ

スが起こるとウイルスは増殖できない。このことから、アポトーシスの誘導を抑えるウイルス蛋白が別に存在するのではないかと考えられた。そこで筆者らは、もう一つの非構造蛋白 L\* に注目した。L\* 蛋白を恒常的に発現させた細胞株に Leader 蛋白を一過性に発現させ、アポトーシスの動向を観察した。その結果、L\* 蛋白発現細胞では、Leader 蛋白発現後の細胞生存率の低下は抑制された。また caspase 3 の活性化、および PARP の開裂も抑制された。さらに、FACS による解析でも、アポトーシス細胞が減少していることが示された。以上の結果から、L\* 蛋白が Leader 蛋白により誘導されるアポトーシスを抑制していることが示唆された<sup>17)</sup>。

これらの結果から、Leader 蛋白は IFN 産生を抑制し、宿主の感染免疫応答を回避する方向に働くが、同時に宿主細胞にアポトーシスを誘導してしまう。しかし、慢性株ではカウンター蛋白として L\* 蛋白が産生され、このアポトーシスをブロックし持続感染を成立させていると考えられた。この結果を既知の情報に当てはめると、ウイルス感染後、dsRNA の検知により種々の反応、すなわち RIG-I/MDA-5 (RIG-I: retinoic acid-inducible protein I, MDA-5: melanoma-differentiation-associated gene 5) を経由して MAVS (mitochondrial antiviral signaling) により interferon regulatory transcription factor (IRF)-3 が活性化されるが、Leader 蛋白によりその核内移行が阻害され、IFN の産生誘導が抑制される。このとき、細胞質に残った活性化 IRF-3 は Bcl-2-associated X protein (Bax) と結合してミトコンドリアへ向かうと考えられる。しかし、ミトコンドリア上では、もう一つのウイルス非構造蛋白である L\* が存在しており<sup>18)</sup>、IRF-3/Bax によるアポトーシス経路の活性化を抑制していると考えられた。このように、2つのウイルス非構造蛋白が、感染後の IFN 産生およびアポトーシス誘導を協調的に抑制することで、持続感染の成立において重要な役割を担っていることが示唆された<sup>8)</sup>。

## VI. SAFV の持続感染

TMEV と SAFV のゲノム構造は、高い相同性を

示すが、SAFV では L\* 蛋白の開始コドンに相当する AUG が ACG となっており、さらに数個の終始コドンがその下流に存在しているため、L\* 蛋白は合成されない。しかし、同じカルジオウイルスに分類されている EMCV の Leader 蛋白は、TMEV の Leader 蛋白と L\* 蛋白の両方の機能を併せもつと考えられていることから、SAFV は L\* 蛋白を産生できなくても持続感染する可能性が考えられた。そこで、同様に SAFV の持続感染細胞の作出を試みた。異なった培養条件〔具体的には fetal calf serum (FCS) vs. calf serum (CS)〕で培養した HeLa 細胞では、SAFV に対する感受性が異なることを筆者らは見出した。SAFV 低感受性細胞を HeLa-R、高感受性細胞を HeLa-N と呼ぶ。HeLa-N では SAFV 感染後、細胞変性効果 (cytopathic effect: CPE) が激しく出現し持続感染細胞の作出が期待できないため、HeLa-R を用いて前述と同様に SAFV 持続感染細胞の作出を試みた。その結果、生存細胞では Western blotting で抗原の発現が認められ、培養上清および細胞内にもウイルスが 2 pfu/cell のレベルで存在していることが確認された。TMEV の場合、IFN 依存性の維持型持続感染であったことから、同様に抗 IFN 抗体の処理によりその動向を観察したが、抗 IFN- $\alpha$  抗体および抗 IFN- $\beta$  抗体のどちらの処理によっても、持続感染は維持されたままであった。すなわち、SAFV の持続感染は IFN 非依存性であることが示された。一方、CS で維持している SAFV 持続感染細胞の培養を、HeLa 細胞を SAFV 高感受性にする FCS での培養に変更したところ、CPE が明らかに増加し、すべての細胞がウイルス抗原陽性へと変化した後に SAFV の持続感染は破綻した。ここで、コクサッキーウイルスは感染受容体の発現密度の低下により、持続感染が成立するという報告<sup>19)</sup>から、HeLa 細胞における SAFV 感染受容体の発現が血清の違いにより変化している可能性が考えられた。しかし、SAFV の感染受容体はいまだ同定されていないことから、それに代わる方法として、ウイルス結合解析により細胞表面の SAFV 結合分子の発現密度を比較したところ、SAFV 高感受性細胞と低感受性細胞では、明らかに細胞表面における SAFV 結合分子の発現

密度は異なっていることが示された。以上の結果から、SAFVは持続感染するウイルスであることが証明され、それは、感染受容体の細胞表面における発現密度に依存していることが示唆された<sup>20)</sup>。

## Ⅶ. SAFVの病原性

SAFVは、上気道炎の咽頭拭い液および胃腸炎の便から最も多く検出され、まれに脳髄膜炎の髄液および血液<sup>4)</sup>、さらには膀胱炎の便から検出されている<sup>5)</sup>。筆者らは、マウスカルジオウイルスの病原性と一致する神経疾患について、疫学的な調査を開始している。その一例を示す。

50例の神経疾患の成人髄液検体でSAFVゲノムのスクリーニングを行ったが、SAFVゲノムは検出されなかった。そこで、SAFVの検出例は小児に多いこと、さらにTMEVの持続感染細胞はマクロファージであることを考慮し、小児の髄液および血清、さらに成人の末梢血単核球を対象として、SAFV感染をRT-PCRにより探索した。その結果、小児MS(5例)からSAFV遺伝子は検出されなかった。しかし、成人MS患者23例、視神経脊髄炎(neuromyelitis optica : NMO)を含むその他の神経疾患7例、健康成人5例の末梢血単核球を対象にSAFV遺伝子の検出を行ったところ、MS患者1例からSAFV遺伝子が検出された。さらに1年後にも同一症例から同じ配列のSAFV遺伝子が検出された。

この結果は、末梢血単核球がSAFVのリザーバーであり、少なくとも1年以上にわたり持続感染している可能性を示唆している。しかしながら、両検体ともSAFV感染の流行期に採取されていることから急性感染の可能性は否定できないため、本結果のみから結論を導き出すことはできない。今後の詳細な追跡調査が必要である。

## ま と め

ヒトカルジオウイルスとして同定・分類されたSAFVは、マウスカルジオウイルスと同様、持続感染し得るウイルスであることが示された。SAFVはその検出例から不顕性感染、上気道炎、胃腸炎などが主な病原性と考えられているが、ま

れな検出例に加え、マウスカルジオウイルスTMEVの病原性から神経病原性を発揮する可能性が強く示唆されている。筆者らの蓄積した解析結果はSAFV神経病原性の可能性を強く支持するものであり、さらには持続感染を経た自己免疫疾患との関連も疑わせるものであった。SAFVの病原性について結論を得るためには、より詳細かつ大規模な疫学的調査が必要であるといえる。本稿がSAFVに対する読者の興味を引くことを期待する。

本稿は、第44回小児感染症学会学術集会教育講演の発表内容をまとめたものであり、本稿に示したデータの多くは、各学術雑誌に掲載済みのものである。

## 文 献

- 1) Jones MS, Lukashov VV, Ganac RD, et al : 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, 2007
- 2) Himeda T, Ohara Y : Saffold virus, a novel human cardiovirus with unknown pathogenicity. *J Virol* 86 : 1292-1296, 2012
- 3) Himeda T, Hosomi T, Asif N, et al : The preparation of an infectious full-length cDNA clone of Saffold virus. *Virol J* 8 : 110, 2011
- 4) Nielsen AC, Böttiger B, Banner J, et al : Serious invasive Saffold virus infections in children, 2009. *Emerg Infect Dis* 18 : 7-12, 2012
- 5) 宮垣知史, 伊藤陽里, 阪上智俊, 他 : Saffold virusが検出された重症急性膀胱炎の2歳男児例. *日本小児感染症学会総会・学術集会プログラム・抄録集* 44 : 307, 2012
- 6) Sorgeloos F, van Kuppeveld F, Michiels T : Saffold virus infection of the mouse. *Abstr Europic* 2010, abstr. F-17, 2010, 104
- 7) Ohara Y : Multiple sclerosis and measles virus. *Jpn J Infect Dis* 52 : 198-200, 1999
- 8) Himeda T, Ohara Y : Roles of two non-structural viral proteins in virus-induced demyelination. *J Clinic Exp Neuroimmunol* 2 : 49-58, 2011
- 9) Dal Canto MC, Lipton HL : Ultrastructural immunohistochemical localization of virus in acute and

- chronic demyelinating Theiler's virus infection. *Am J Pathol* 106 : 20-29, 1982
- 10) Aubert C, Chamorro M, Brahic M : Identification of Theiler's virus infected cells in the central nervous system of the mouse during demyelinating disease. *Microb Pathog* 3 : 319-326, 1987
  - 11) Jelachich ML, Bandyopadhyay P, Blum K, et al : Theiler's virus growth in murine macrophage cell lines depends on the state of differentiation. *Virology* 209 : 437-444, 1995
  - 12) Clatch RJ, Miller SD, Metzner R, et al : Monocytes/macrophages isolated from the mouse central nervous system contain infectious Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV). *Virology* 176 : 244-254, 1990
  - 13) Levy M, Aubert C, Brahic M : Theiler's virus replication in brain macrophages cultured in vitro. *J Virol* 66 : 3188-3193, 1992
  - 14) Rossi CP, Delcroix M, Huitinga I, et al : Role of macrophages during Theiler's virus infection. *J Virol* 71 : 3336-3340, 1997
  - 15) Miller SD, Vanderlugt CL, Begolka WS, et al : Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat Med* 3 : 1133-1136, 1997
  - 16) Himeda T, Okuwa T, Muraki Y, et al : Cytokine/chemokine profile in J774 macrophage cells persistently infected with DA strain of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV). *J Neurovirol* 16 : 219-229, 2010
  - 17) Okuwa T, Taniura N, Saito M, et al : Opposite effects of two nonstructural proteins of Theiler's murine encephalomyelitis virus regulates apoptotic cell death in BHK-21 cells. *Microbiol Immunol* 54 : 639-643, 2010
  - 18) Himeda T, Okuwa T, Nojiri M, et al : The anti-apoptotic protein L\* of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) contains a mitochondrial targeting signal. *Virus Res* 155 : 381-388, 2011
  - 19) Pinkert S, Klingel K, Lindig V, et al : Virus-host coevolution in a persistently coxsackievirus B3-infected cardiomyocyte cell line. *J Virol* 85 : 13409-13419, 2011
  - 20) Himeda T, Hosomi T, Okuwa T, et al : Saffold virus type 3 (SAFV-3) persists in HeLa cells. *PLoS ONE* 8 : e53194, 2013

### Topics of human cardioviruses

Yoshiro OHARA, Toshiki HIMEDA

*Department of Microbiology, Kanazawa Medical University School of Medicine*

Saffold virus is a novel human cardiovirus identified in 2007. Although the pathogenicity of Saffold virus is still unknown, its relation with diseases of the central nervous system is suspected. In this paper, the pathogenicity of Saffold virus will be discussed, comparing with that of murine cardioviruses.

\*            \*            \*