

エンテロウイルスに関連した急性弛緩性麻痺、急性脳炎・脳症に関する研究

研究分担者 清水博之

国立感染症研究所 ウイルス第二部 第二室 室長

研究協力者 吉田和央（国立感染症研究所ウイルス第二部）

研究要旨

エンテロウイルス D68 (EV-D68) 感染症の予防治療への応用の可能性を検討するため、日本で使用されている免疫グロブリン製剤の国内 EV-D68 分離株に対する中和抗体価を測定した。今回使用した 9 種類の国内免疫グロブリン製剤は、いずれも、日本の EV-D68 分離株に対する中和抗体を有していた。すべての製剤が高い EV-D68 中和活性を示したことから、各製剤は、高力価の EV-D68 中和抗体を含むことが明らかとなった。

A．研究目的

エンテロウイルスD68 (Enterovirus D68; EV-D68) は、ライノウイルスに類似したウイルス学的性状を有するエンテロウイルス(*Enterovirus D species*)として、一般的な呼吸器感染症の原因ウイルスのひとつと考えられているが、より重篤な呼吸器疾患にも関与する。また、2014年の北米、2015年の日本におけるEV-D68感染症大規模流行時の急性弛緩性麻痺(acute flaccid paralysis; AFP)および急性弛緩性脊髄炎(acute flaccid myelitis; AFM)の流行以来、EV-D68感染と中枢神経疾患との関連について注目が集まっている。日本国内で分離されたEV-D68株のウイルス学的性状解析を行い、EV-D68感染症予防・治療法開発の可能性を検討した。本年度は、日本で使用されている免疫グロブリン製剤中の、国内EV-D68分離株に対する中和抗体価を測定した。

B．研究方法

日本で使用されている代表的免疫グロブリン製剤9種類を入手した(次ページ)。そのうち、1製剤は米国非献血血液由来、1製剤はドイツの献血に由来する製剤で、その他7製剤は、日本の献血血液に由来する製剤であった。中和試験の接種ウイルスは、2010～2015年に日本で分離された、3種類の異なる遺伝子型(Clade A～C) に属するEV-D68分離株、各遺伝子型2株、計6株を用いた(次ページ)。免疫グロブリン製剤希釈液とEV-D68ウイルス液(約100 CCID₅₀/well)を混合し、37℃ 1時間反応した後、あらかじめRD細胞を単層培養した96 wellプレートに添加した。35℃で、6日間培養後、CPE発現の有無を検鏡により観察し、CPE発現を抑制するのに必要な免疫グロブリン製剤希釈倍率により、各製剤中の抗EV-D68中

和活性を評価した。

C．研究結果

今回使用した9種類の免疫グロブリン製剤は、いずれも、日本のEV-D68分離株6株に対する中和抗体を有していた。すべての製剤は、1024倍以上の希釈倍率で、EV-D68中和活性を示したことから、各製剤は、高力価のEV-D68中和抗体を含むことが明らかとなった。EV-D68分離株6株に対する中和抗体価は、製剤とウイルス株の組み合わせにより違いが認められ、ウイルス株では、2150株(Clade C)および2076株(Clade A)は多くの製剤により中和されにくく、1576株(Clade B)と2192株(Clade C)は中和されやすい傾向が認められた。EV-D68遺伝子型と中和活性に顕著な相関は認められなかった。また、海外および国内の血液に由来する免疫グロブリン製剤間で、中和抗体価、および、EV-D68株間の中和活性の傾向に顕著な違いは認められなかった。

D．考察

現在、ポリオウイルス以外のエンテロウイルスワクチン(中国におけるEV-A71ワクチンを除く)、およびエンテロウイルス感染症に対する抗ウイルス剤は実用化されておらず、重症例を含むEV-D68感染症に対する予防治療法は開発されていない。ポリオウイルスおよびエンテロウイルス感染症の発症予防における血中中和抗体の役割が知られていることから、発症期における免疫グロブリン製剤投与が、重症EV-D68感染症に対して治療効果を有する可能性について、臨床疫学的および実験室における検討が進められている。今年度の研究では、国内で用いられている免疫グロブリン製剤中の抗EV-D68中和抗体価を測定し、使用したすべての免疫グロブリ

ン製剤が、高力価の抗EV-D68中和抗体を含むことを明らかにした。

今回使用したEV-D68株は、2010～2015年に国内で分離された、3種類の異なる遺伝子型(Clade A～C)のEV-D68分離株で、近年、日本および世界各地で伝播しているEV-D68株の遺伝子型・抗原性を、ある程度反映しているものと考えられる。同じ遺伝子型に属するEV-D68分離株でも、同一免疫グロブリン製剤中による中和活性が異なる結果が得られたが、EV-D68遺伝子型と中和活性の相関関係は認められなかった。同じ遺伝子型に属するEV-D68分離株は、高いアミノ酸の相同性を有することから、異なる抗原性を規定するアミノ酸部位の同定が期待できる。

今回の結果と同様、米国の複数の免疫グロブリン製剤は、高力価の抗EV-D68中和抗体を含むことが報告されている。EV-D68に対する血清疫学的解析の報告は、いまのところ限られており、異なる地域におけるEV-D68抗体保有率は明らかではない。しかし、中国や米国での血清疫学的解析の結果や、本研究における日本国内輸血血液に由来する免疫グロブリン製剤中の抗EV-D68中和抗体の存在から、異なる地域においても、多くの成人が抗EV-D68中和抗体を保有する可能

性が示唆された。EV-D68感染マウスモデルを用いた実験により、抗EV-D68中和抗体が神経症状の発症予防に寄与する結果が報告されている。一方、EV-D68感染症発症期における免疫グロブリン製剤のヒトにおける有効性は明確ではない。本研究により、国内で使用されている免疫グロブリン製剤が、抗EV-D68中和抗体を含むことが確認されたが、EV-D68感染症に対する免疫グロブリン製剤の有効性については、今後の検討が必要とされる。

E. 結論

今回使用した9種類の国内免疫グロブリン製剤は、いずれも、日本のEV-D68分離株に対する中和抗体を有していた。すべての製剤が高いEV-D68中和活性を示したことから、各製剤は、高力価のEV-D68中和抗体を含むことが明らかとなった。本研究により、国内で使用されている免疫グロブリン製剤が、抗EV-D68中和抗体を含むことが確認されたが、EV-D68感染症に対する免疫グロブリン製剤の有効性については、今後の検討が必要とされる。

実験方法

・使用したEV-D68株

CladeA: 2076-Yamagata-2010, 2006-Yamagata-2013

CladeB: 1975-Yamagata-2010, 1576-Yamagata-2015

CladeC: 2150-Yamagata-2010, 2192-Yamagata-2010

・使用したIVIG製剤

ベニロン- I (化血研)

グロベニン- I (日本製薬)

ヴェノグロブリンIH5 (日本血液製剤機構)

ヴェノグロブリンIH10 (日本血液製剤機構)

グロブリン (化血研)

ポリグロビンN5 (日本血液製剤機構)

ポリグロビンN10 (日本血液製剤機構)

サングロポール (CSLベーリング)

ガンマガード (バクスアルタ)

採血国: 日本、献血

採血国: ドイツ、献血

採血国: アメリカ、非献血

プロトコル

↓ seed RD-A cells in 96 well plates

Next day

↓ dilute EV-D68 (100CCID₅₀/well)

↓ dilute IVIG with virus solution

↓ incubate for 1h at 37°C

↓ exchange medium of RD-A cells

↓ incubate for 6 days at 35°C

↓ observation of CPE

F . 研究発表

1. 論文発表

1. Chong PF, Kira R, Mori H, Okumura A, Torisu H, Yasumoto S, Shimizu H, Fujimoto T, Hanaoka N, Kusunoki S, Takahashi T, Oishi K, Tanaka-Taya K. Clinical Features of Acute Flaccid Myelitis Temporally Associated With an Enterovirus D68 Outbreak: Results of a Nationwide Survey of Acute Flaccid Paralysis in Japan, August-December 2015. Clin Infect Dis 66: 653-664, 2018
2. Funakoshi Y, Ito K, Morino S, Kinoshita K, Morikawa Y, Kono T, Doan HY, Shimizu H, Hanaoka N, Konagaya M, Fujimoto T, Suzuki A, Chiba T, Akiba T, Tomaru Y, Watanabe K, Shimizu N. Enterovirus D68 respiratory infection in a children's hospital in Japan in 2015, Pediatrics International (in press) 2019
3. Okumura A, Mori H, Fee Chong P, Kira R, Torisu H, Yasumoto S, Shimizu H, Fujimoto T, Tanaka-Taya K. Acute Flaccid Myelitis Collaborative Study I. Serial MRI findings of acute flaccid myelitis during an outbreak of enterovirus D68 infection in Japan. Brain & development 2019 (in press)
4. 清水博之. エンテロウイルスD68感染症. 小児科診療「小児感染症のいまを読み解く」, 2019 (印刷中)
5. 清水博之. 感染症治療学規則の一部改正 急性弛緩性麻痺 (AFP; ポリオを除く) が五類感染症に追加. フォルマシア 55, 341, 2019
6. 藤本嗣人, 小長谷昌未, 花岡希, 清水博之. エンテロウイルス実験室診断の現状と課題. 病原微生物検出情報 39: 98-99, 2018
7. 清水博之. エンテロウイルスD68のウイルス学的性状. 神経感染症学雑誌 23, 62-66, 2018
8. 清水博之. 「エンテロウイルス (ポリオウイルスを含む)」の項を担当, 147-156, ウイルス検査法, 日本臨床ウイルス学会, 2018

9. 清水博之: エンテロウイルス. 今日の疾患辞典～検査処方例つき～ 2019 (印刷中)

2. 学会発表

- 1) Shimizu H. A cluster of cases with acute flaccid myelitis coincident with an enterovirus D68 outbreak in Japan, 2015 A respiratory “neurovirulent”? enterovirus. International Workshop on Laboratory Diagnosis for Enterovirus, Taipei, Taiwan, 23 April, 2018
- 2) Miyazaki M, Saito H, Shibata C, Yen DH, Arao Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N. Development of a flaccid paralysis mouse model after infection with enterovirus D68. Europic 2018, Egmond aan Zee, The Netherlands, 3-7 June, 2018
- 3) Shimizu H. An Outbreak of Enterovirus D68 in August–December 2015 in Japan as an emerging “neurovirulent” enterovirus infection, Lessons Learned since 1998 Enterovirus A71 Epidemic in Taiwan Contributions and Implications. Taipei, Taiwan, 29 September, 2018
- 4) Saito H, Akino W, Sato H, Fujiya Y, Shibata C, Sato R, Shimizu H. Isolation of enterovirus D68 using suckling mice and the background. 乳飲みマウスによるエンテロウイルス D68 型の分離とその背景 (ポスター). 第 66 回日本ウイルス学会学術集会, 2018 年 10 月 28 日～30 日, 京都
- 5) 斎藤博之, 柴田ちひろ, 佐藤寛子, 清水博之. エンテロウイルス D68 型の乳飲みマウスでの分離例. 第 59 回日本臨床ウイルス学会, 2018 年 6 月 10 日, 大宮

G . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

とくに無し

H . 謝辞

中和試験に用いたEV-D68分離株を分与いただいた山形県衛生研究所の水田克己先生に深謝いたします。