

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）

花岡 希、藤本嗣人（国立感染症研究所 感染症疫学センター）

研究要旨

急性弛緩性麻痺 (AFP)・急性弛緩性脊髄炎 (AFM) 症例の一部に由来する咽頭拭い液等の臨床検体から、エンテロウイルス D68 (EV-D68) 特異的リアルタイム RT-PCR 法により、EV-D68 遺伝子を検出した。2015 年に発生した AFP・AFM の流行時、EV-D68 検出率は必ずしも高くなく、咽頭拭い液を含めた発症期検体を採取する必要があることが示唆された。2015 年の流行時に AFP を含む症例から分離された EV-D68 株は、いずれも EV-D68 遺伝子型 Clade B に属していた。EV-D68 分離株は、乳のみマウスに特徴的な弛緩性麻痺を誘導し、抗 EV-D68 抗血清により中和された。

日本で使用されている 9 種類の国内免疫グロブリン製剤は、いずれも、国内 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。

2015 年に発生した AFP・AFM 症例の多発事例を受け、AFP および AFM 症例の実態把握、病原体検索、将来的な予防治療法の開発等を目的として、感染症法による届出疾患として AFP 全数報告とするための準備を進めた。検査体制も含めた国内外の AFP サーベイランスについて整理し、「急性弛緩性麻痺を認める疾患のサーベイランス・診断・検査・治療に関する手引き」に反映させた。

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として、一般的な呼吸器感染症の原因ウイルスと考えられてきた。しかし、近年の調査・研究により、EV-D68 は、より重篤な呼吸器感染症にも関与する可能性が高く、また、2014 年の米国、2015 年の日本における EV-D68 感染症流行時の急性弛緩性麻痺・急性弛緩性脊髄炎症例の多発により、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。本研究では、急性弛緩性麻痺・急性弛緩性脊髄炎を含む中枢神経疾患症例に由来する臨床検体からの EV-D68 検出・同定法について検討し、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った。また、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

急性弛緩性麻痺・急性弛緩性脊髄炎を含む中枢神経疾患症例に由来する咽頭拭い液、糞便、髄液等を含む様々な臨床検体から、異なる手法を用いたエンテロウイルス遺伝子検出を試み、一部のエンテロウイルス遺伝子陽性検体について塩基配列解析を行った。2015 年の EV-D68 流行時に分離された EV-D68 株について、ウイルス学的性状の解析および次世代シーケンシングによる遺伝子解析を行った。

日本で使用されている代表的免疫グロブリン製剤 9 種類を購入し、2010 年～2015 年に日本で分離された EV-D68 分離株 6 株に対する中和抗体価を測定した。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、各製剤の抗 EV-D68 中和活性を評価した。

AFP は急性灰白髄炎 (ポリオ) の典型的臨床症状であり、AFP 症例に由来する便検体の病原体検査は、WHO を中心として進められている世界ポリオ根絶計画における標準的サーベイランスとして世界的に確立した手法で

ある。そのため、ポリオウイルス検査体制も含め国内外のAFPサーベイランス体制の異同について整理した。

(倫理面への配慮)

急性弛緩性麻痺症例に由来する臨床検体の検査は、2015年10月21日付の厚労省健康局結核感染症課・協力依頼「急性弛緩性麻痺(AFP)を認める症例の実態把握について」に基づく、積極的疫学調査の一環として、地方衛生研究所、あるいは感染症研において実施された。

C. 研究結果

米国CDC等から報告されているEV-D68特異的リアルタイムRT-PCR法、および、すべての型のエンテロウイルス検出が可能なPan-enterovirus real-time PCR法を用いて、EV-D68検出感度を比較したところ、EV-D68特異的RT-PCR(ワシントン大法) > EV-D68特異的RT-PCR(CDC法) > Pan-enterovirus PCRの順に検出感度が高かった。AFP症例に由来する臨床検体の多くは、EV-D68特異的RT-PCRを含む、すべての方法で、EV-D68およびエンテロウイルス遺伝子検出陰性であった。島根県で、2015年のEV-D68流行時に分離されたEV-D68分離株は、次世代シーケンズにより、EV-D68遺伝子型Clade Bに属することが明らかとなった。

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倍より高い希釈倍率で、EV-D68中和活性を示したことから、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、製剤中の中和抗体価および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。

AFP症例に由来する便検体の病原体検査は、WHOを中心として進められている世界ポリオ根絶計画における標準的サーベイランスとして世界的に確立した手法である。ポリオウイルス検査体制も含めた世界的ポリオAFPサーベイランスについて整理し、国内外のAFPサーベイランスに大きな齟齬が無いよう、「急性弛緩性麻痺を認める疾患のサーベイランス・診断・検査・治療に関する手引き」の内容に反映させた。

D. 考察

2014年の米国、2015年の日本におけるAFP・AFMを含む中枢神経疾患症例からのEV-D68を含むエンテロウイルス検出率は必ずしも高くなく、髄液検体からのEV-D68検出事例は稀であった。2015年の日本における急性弛緩性麻痺症例の病原体サーベイランスの結果

を解析すると、検体の種類および検体量が不十分な症例が多く、また、麻痺発症後、時間を経てからの検体が多く認められた。呼吸器症状発症時には、ウイルス検出頻度が高く、その後の麻痺発症後はウイルス検出頻度が大きく低下する可能性が示唆された。また、一部検体については、検体の採取・保存法が不適切であった可能性が否定できない。EV-D68を含むエンテロウイルス検出のためには、明確な症例定義によるAFP症例の報告とともに、呼吸器、糞便、髄液検体を含む、迅速かつ適切な検体採取が重要となる。

本研究で使用した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。

E. 結論

AFP・AFM症例の一部に由来する咽頭拭い液等の臨床検体から、EV-D68特異的リアルタイムRT-PCR法により、EV-D68遺伝子を検出した。2015年に発生したAFP流行時、EV-D68検出率は必ずしも高くなく、咽頭拭い液を含めた急性期検体採取の必要性が示唆された。2015年の流行時にAFPを含む症例から分離されたEV-D68株について、ウイルス学および遺伝子解析を進めた。島根県および秋田県で2015年に分離されたEV-D68分離株は、いずれもEV-D68遺伝子型Clade Bに属していた。乳のみマウスEV-D68分離株は、特徴的な弛緩性麻痺を誘導し、抗EV-D68抗血清により中和された。

本研究で使用した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。

2015年に発生したAFP症例の多発を受け、AFP症例の実態把握、病原体検索、将来的な予防治療法の開発等のため、感染症法による届出疾患としてAFP症例を全数報告とするための準備を進めた。ポリオウイルス検査体制も含めた世界的ポリオAFPサーベイランスについて整理し、「急性弛緩性麻痺を認める疾患のサーベイランス・診断・検査・治療に関する手引き」に反映した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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
2. Okumura A, Mori H, Chong PF, 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* (in press) 2019
 3. 清水博之. 感染症対策指針の一部改正 急性弛緩性麻痺(AFP; ポリオを除く)が五類感染症に追加. *ファルマシア* 55, 341, 2019
 4. 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
 5. 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
 6. 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
 7. 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
 8. Pham NTK, Thongprachum A, Baba T, Okitsu S, Trinh QD, Komine-Aizawa S, Shimizu H, Hayakawa S, Ushijima H. A 3-month-old child of acute gastroenteritis with enterovirus D68 detected from stool specimen. *Clin. Lab* 63: 1269-1272, 2017
 9. 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、藤谷陽子、柴田ちひろ、佐藤了悦、清水博之. 乳飲みマウスによるエンテロウイルス D68 型の分離 - 秋田県. *病原微生物検出情報* 38: 10-11, 2017
 10. 清水博之. エンテロウイルスD68感染症の大規模流行、その後. *臨床とウイルス* 45: 256-263, 2017
 11. 清水博之. エンテロウイルスと子どもの麻痺. *小児保健研究* 76, 208-217, 2017
 12. 清水博之. エンテロウイルス感染症. *医師会雑誌* 146, 259-263, 2017
 13. Kimura K, Fukushima T, Katada N, Shimizu H, Nakamura T, Fujimoto T, Hanaoka N, Tanaka-Taya K, Makino K. Adult Case of Acute Flaccid Paralysis with Enterovirus D68 Detected in the CSF. *Neurology: Clinical Practice* Published online before print November 4, 2016
 14. Kotani O, Suzuki T, Yokoyama M, Iwata-Yoshikawa N, Nakajima N, Sato H, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Intracerebral inoculation of mouse-passaged Saffold virus type 3 affects cerebellar development in neonatal mice. *J Virol* 90: 10007-10021, 2016
 15. 国立感染症研究所 感染症疫学センター、ウイルス第二部. エンテロウイルス D68 型 (EV-D68) に関する国内の疫学情報のまとめ (更新) (2016 年 1 月 20 日現在) *病原微生物検出情報* 37: 33-35, 2016
 16. 中村朋史、清水博之. エンテロウイルス D68 と関連疾患 エンテロウイルス D68 のウイルス学的特徴. *臨床とウイルス* 44 : 72-78, 2016
 17. 藤本嗣人、花岡 希、多屋馨子、清水博之. エンテロウイルス D68 と関連疾患 エンテロウイルス (D68 を含む) の検査方法. *臨床とウイルス* 44 : 84-89, 2016
 18. 清水博之. エンテロウイルス D68 型. *感染と消毒* 23 : 133-137, 2016
 19. 清水博之. 【話題の疾患と治療】エンテロウイルス D68. *感染炎症免疫* 46 : 51-54, 2016
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
6. Shimizu H. Nationwide survey of acute flaccid paralysis in August–December 2015 during an enterovirus D68 outbreak in Japan. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program Viral Diseases Panel Meeting, Shenzhen, China, 8 January, 2018
7. Shimizu H. Enterovirus D68 outbreak in Japan during autumn 2015, The 3rd Symposium on Research and Quality Control of Vaccines. Beijing, China, 8 May, 2017
8. 宮崎誠、斎藤博之、柴田ちひろ、YEN HAI DOAN、荒尾雄二郎、岩田奈織子、長谷川秀樹、清水博之、永田典代. エンテロウイルス D68 型感染後の弛緩性麻痺発現マウスモデルの構築. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2017 年 10 月 24 日~26 日
9. 清水博之. エンテロウイルス D68 のウイルス学的性状, シンポジウム 2 急性弛緩性脊髄炎. 第 22 回日本神経感染症学会学

術大会、北九州、2017 年 10 月 14 日

10. Kinoshita H, Arima Y, Sunagawa T, Tanaka-Taya K, Hanaoka N, Fujimoto T, Oishi K, Shimizu H. Detections of enterovirus D68 based on the National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases system in Japan, 2005-2015 Meetings of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses (EUROPIC 2016), les Diablerets, 3-10 September, 2016
11. 木下一美、有馬雄三、砂川富正、多屋馨子、大石和徳、清水博之. 我が国のサーベイランスデータからみるエンテロウイルス D68 型検出症例. 感染症学会 2016 年 4 月

G . 知的財産権の出願・登録状況

特になし