

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04226

研究課題名（和文）ヒトパレコウイルス3型に対する有効な治療の検討

研究課題名（英文）Investigations for Effective Therapies for Human Parechovirus Type 3 Infection

研究代表者

齋藤 昭彦（Saitoh, Akihiko）

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30531389

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,000,000円

研究成果の概要（和文）：新生児、早期乳児に重症感染症をきたすパレコウイルスA3（PeV-A3）に対しては、特異的な治療薬が存在しない。我々は、In vitroの実験細胞を用い、抗微生物薬によるPeV-A3への効果の検討を行った。その結果、ヒト免疫グロブリンと幾つかの抗微生物薬にPeV-A3に対する抑制効果が見られた。これらの薬剤は、今後のPeV-A3感染児の治療戦略につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児、早期乳児に重症感染症をきたすパレコウイルスA3（PeV-A3）に対して、効果の期待できる薬剤の候補がIn vitroの実験細胞を用いた実験で見つかったことで、今後のPeV-A3感染症の治療戦略に役立つ可能性がある。今後、PeV-A3の迅速な診断の下、治療薬の投与のタイミングについて検討する必要がある。

研究成果の概要（英文）：There has been no specific treatment for parechovirus-A3 (PeV-A3) infection, which causes severe infection in neonates and young infants. We evaluated the effectiveness of antimicrobials for PeV-A3 using in vitro models. As a results, we found inhibition effects of soem antimicrobials for PeV-A3. These medications could lead to the future treatment strategies for PeV-A3 infection.

研究分野：小児感染症

キーワード：パレコウイルスA3 新生児 乳児 治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パレコウイルス A3 (Parechovirus A3, PeV-A3) は、ピコルナウイルス科のパレコウイルス属に新しく分類されたウイルスで、新生児や早期乳児(通常生後4か月未満)に敗血症や髄膜脳炎をきたし、小児の新興感染症として注目を集めている。その臨床症状の程度によって、循環不全による臓器障害、脳白質障害による重大な神経学的後遺症、更には致死例も報告されている。しかしながら、PeV-A3 に対する特異的治療薬は存在しないため、その治療戦略を検討することが重要である。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、現在治療法の存在しない PeV-A3 感染症に対して、抗 PeV-A3 抗体と抗 PeV-A3 効果が期待される抗微生物薬の2つの側面から、新規治療法を確立するための基礎データを得ることにある。本研究では、PeV-A3 感染症に対して、PeV-A3 特異的抗体と PeV-A3 に効果が期待される抗微生物薬が PeV-A3 のコントロールに重要な役割を果たすという仮説のもと、次の目的を設定した。

(1) 実験細胞を用いたヒト静注免疫グロブリン(IVIG, Intravenous Immunoglobulin)の抗 HPeV3 効果の確認

既に先行研究で確立された実験細胞を用い、異なる IVIG の濃度と IVIG 投与のタイミングで、細胞を治療し、細胞の CPE (Cytopathic Effects)、細胞内外のウイルス量を指標として抗 PeV-A3 効果を確認する。

(2) ヒトリンパ球を用いた PeV-A3 モノクローナル抗体 (mAb, monoclonal antibody) の作成とその効果の検討

より特異的な抗 PeV-A3 抗体の効果を示すため、最近提示されたヒトリンパ球を用いた方法で、PeV-A3 特異的抗体 mAb を作成する。そして、作成された mAb の抗 PeV3 効果を同様の実験細胞を用い確認する。

(3) 実験細胞を用いた新規の抗微生物薬の抗 HPeV-A3 効果の検討

同様の実験系を用い、抗 PeV-A3 効果が期待される候補となる抗微生物薬を異なる濃度と異なる治療のタイミングで投与し、抗 PeV-A3 効果をみる。

(4) PeV-A3 と類似の臨床症状をきたすエンテロウイルス (Enterovirus, EV) との入院時の臨床像の比較

治療薬を開始するかどうかの判定で、類似の臨床像をきたす EV との判別は重要である。発熱を主訴に入院した新生児、早期乳児において、PeV-A3 と EV 感染症の診断のついた症例の入院時の臨床症状を比較し、PeV-A3 感染症を疑う所見を同定する。

3. 研究の方法

1) 実験細胞を用いたヒト IVIG の HPeV3 に対する抗 HPeV3 効果の確認

異なる複数の実験細胞 (LLCMK2、Vero 細胞) に PeV-A3 を Multiplicity of Infection (MOI) 10 で感染させ、IVIG を3つの異なるタイミング(感染直後、感染12、24時間後)3つの異なる投与量で投与する。投与後、細胞の細胞変性効果 (CPE, Cytopathic Effects) を連日観察、記録しながら、投与後1、3、7日後に細胞と上清をそれぞれ採取し、RNA を抽出する。そして、細胞内(細胞)と細胞外(上清)の PeV-A3 RNA 量を、リアルタイム PCR 法にて定量する。そして、IVIG 投与のないコントロールと比較し、IVIG の抗 PeV-A3 効果を確認する。

(2) ヒトリンパ球を用いた PeV-A3 特異的 mAb の作成

ヒトリンパ球を用い、PeV-A3 に対する mAb を作成する。まずは、PeV-A3 mAb を産生するメモリーB細胞の作製と単離を行う。次いで、AIMSelect 法で培養し、特異的抗体を産生している細胞は、PeV-A3 との中和試験で、LLC-MK2 細胞の CPE が見られないものとして同定される。同定されたリンパ球の Heavy Chain (H鎖)、Light Chain (L鎖) の RNA を抽出し、それをレンチウイルスベクターに入れて、293T 細胞(レンチウイルスパッケージング用細胞株)に感染させ、H鎖、L鎖の蛋白を作成する。精製された蛋白は、精製後、Fc部分と結合し、mAb を作成する。

(3) PeV-A3 の効果が期待される微生物薬の PeV-A3 抑制効果の検討

本研究では、これらの抗 PeV-A3 効果が期待される薬剤を(1)と同様に投与する。

PeV-A3 に感染した異なる複数の実験細胞 (LLC-MK2、Vero、THP1 細胞) に、異なるタイミング、異なる投与量で薬剤を投与する。治療した細胞の CPE を連日観察しながら、投与後1、3、7日後に細胞と上清を採取し、それぞれの RNA を抽出する。そして、上述したとおり、細胞内外の PeV-A3 量をリアルタイム PCR 法を用い定量する。そして、治療のないコントロールと比較し、それぞれの薬剤の抗 PeV-A3 効果を検討する。

(4) PeV-A3 と類似の臨床症状をきたす EV との入院時の臨床像の比較

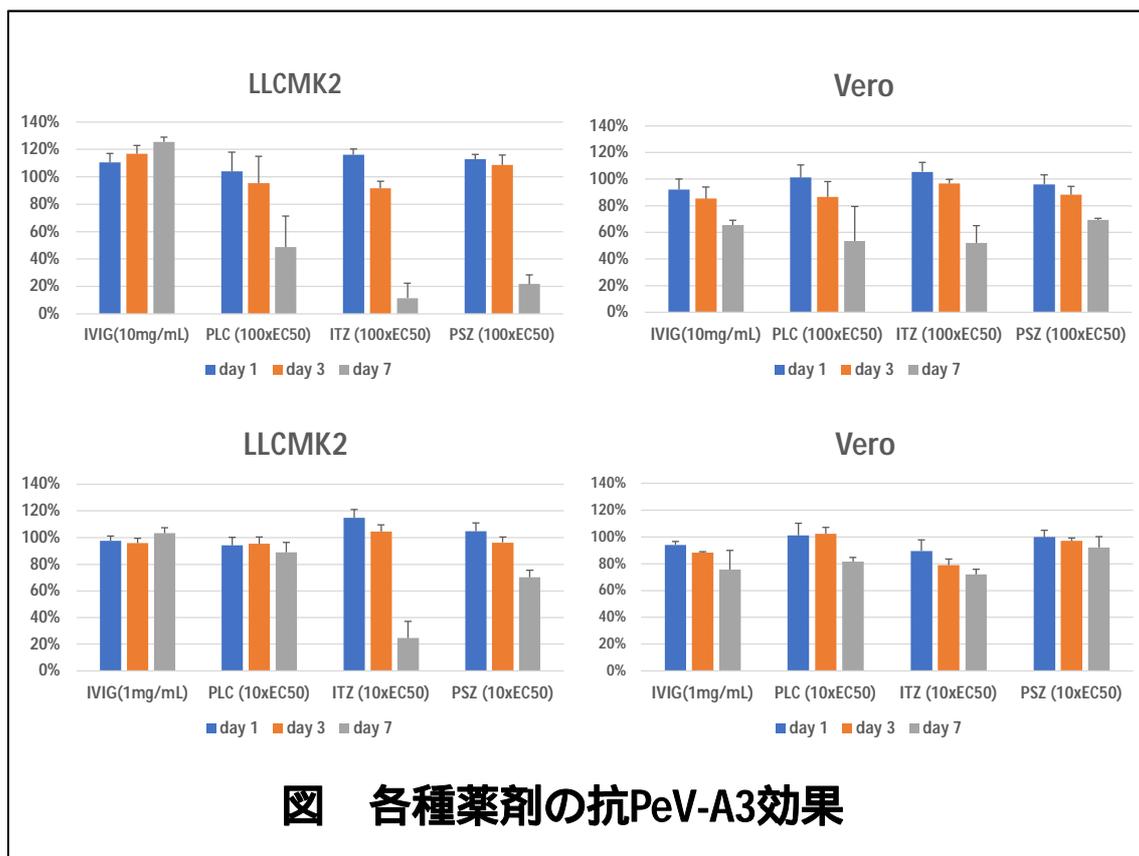
発熱を主訴に新潟大学病院とその関連施設に入院した新生児、早期乳児において、PeV-A3 と EV

感染症の診断のついた症例の入院時の臨床症状を比較し、PeV-A3 感染症を疑う所見を同定する。

4 . 研究成果

(1) 実験細胞を用いたヒト IVIG の HPeV3 に対する抗 HPeV3 効果の確認

本研究では、LLCMK2 細胞、Vero 細胞を用い、異なる濃度の IVIG の抗 PeV-3 効果を経時的に測定した。その結果、(図)に示すように、LLCMK2 細胞では、その効果は見られなかったが、Vero 細胞では、濃度依存的、時間依存的に抗 PeV-A3 効果が見られた。



(2) ヒトリンパ球を用いた PeV-A3 特異的 mAb の作成

ヒトリンパ球を用いた PeV-A3 mAb の作成は、レンチウイルスベクターを導入した不死化したヒト B 細胞の作成には成功したが、PeV-A3 に感染した患者からの検体の採取に難渋し、PeV-A3 に感染したヒトメモリーB 細胞の増殖に至っていない。複数の成人の感染者からの感染後の検体を採取し、ヒトメモリーB 細胞の増殖を試みたが、その数は少なく、増殖させることができなかった。今後、新生児、乳児の感染者からの検体採取を試み、実験を継続する予定である。

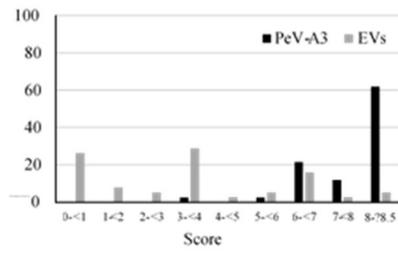
(3) PeV-A3 の効果が期待される微生物薬の PeV-A3 抑制効果の検討

本研究では、LLCMK2 細胞、Vero 細胞を用い、異なる濃度の抗ウイルス薬であるプレコナリル、抗真菌薬であるボザコナゾール、イトラコナゾールの抗 PeV-3 効果を経時的に測定した。その結果、(図)に示すように、LLCMK2 細胞では、濃度依存的、時間依存的にプレコナリル、ボザコナゾール、イトラコナゾールの抗 PeV-A3 効果が見られた。また、Vero 細胞では、その抑制効果は LLCMK2 細胞に比べると小さかったが、同様に濃度依存的、時間依存的に 3 剤の抗 PeV-A3 効果が見られた。

(4) PeV-A3 と類似の臨床症状をきたす EV との入院時の臨床像の比較

PeV-A3 と EV の臨床像を比較したところ、以下の差が明確となった。PeV-A3 感染者は、EV 感染者に比べ、1) 発熱の程度が高い、2) 末梢循環不全の程度が強い、3) 白血球数が低い、4) 髄液細胞数の増多がない ことが分かった。これらを 1) 発熱 (38.5C 1 点)、2) 末梢循環不全あり (2 点)、3) 白血球数 (8000、2.5 点)、4) 髄液細胞数の増多がない (2.5 点) とスコア化したところ、スコア 6 点以上で、PeV-A3 の可能性が高くなることが分かった (図)。

A.



B.

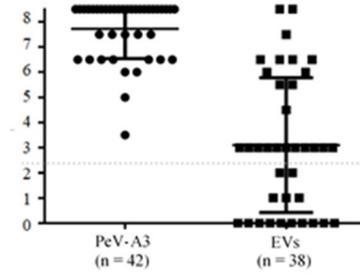


図 PeV-A3とEVの臨床像の違いによるスコア化による区別

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Izumita R, Deuchi K, Aizawa Y, Habuka R, Watanabe K, Otsuka T, Saitoh A. | 4. 巻 in press |
| 2. 論文標題 Intrafamilial Transmission of Parechovirus A and Enteroviruses in Neonates and Young Infants. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 J Pediatric Infect Dis Soc. | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jpids/piy079. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Izumita R, Aizawa Y, Watanabe K, Saitoh A. | 4. 巻 in press |
| 2. 論文標題 Persistence of High Neutralizing Antibody Titers after Neonatal and Early Infantile Infection with Parechovirus-A3. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Pediatr Infect Dis J. | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/INF.0000000000002245. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Aizawa Y, Izumita R, Saitoh A | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Human parechovirus type 3 infection: An emerging infection in neonates and young infants | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 J Infect Chemother | 6. 最初と最後の頁 419-426 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2017.04.009 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件／うち国際学会 5件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Izumita R, Aizawa Y, Watanabe K, Saitoh A. |
| 2. 発表標題 Neutralizing Antibody Titers against Parechovirus-A3 (PeV-A3) and Long-term Neurological Outcome in Children who Suffered from PeV-A3-Related Diseases in Neonatal and Infantile Periods. |
| 3. 学会等名 Infectious Disease Society of America, 56th Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Saitoh A. |
| 2. 発表標題 Parechovirus-A3 Infection; Emerging Infection in Neonates and Young Infants |
| 3. 学会等名 The 9th Asian Congress of Pediatric Infectious Diseases (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Izumita R, Aizawa Y, Habuka R, Watanabe K, Otsuka T, Saitoh A. |
| 2. 発表標題 Can We Distinguish between Human Parechovirus Type 3 and Enteroviruses Infection in Neonates and Young Infants Based on their Clinical and Laboratory Findings? |
| 3. 学会等名 Infectious Disease Society of America, 55th Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Izumita R, Aizawa Y, Watanabe K, Saitoh A. |
| 2. 発表標題 Asymptomatic Adults and Children Can Transmit Human Parechoviruses and Enteroviruses to Neonates and Young Infants. |
| 3. 学会等名 Infectious Disease Society of America, 55th Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 齋藤昭彦 |
| 2. 発表標題 小児と成人におけるパレコウイルス感染症 |
| 3. 学会等名 第66回日本感染症学会 東日本地方会学術集会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Saitoh A |
| 2. 発表標題 Human Parechovirus Type 3 Infection; Emerging Infection in Neonates and Young Infants |
| 3. 学会等名 Pediatric Academic Societies 2017 Meeting (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|------------------------------|----|
| 研究分担者 | 渡邊 香奈子 (Watanabe Kanako) (80626094) | 新潟大学・医歯学系・准教授 (13101) | |
| 研究分担者 | 今井 千速 (Imai Chihaya) (90419284) | 新潟大学・医歯学系・准教授 (13101) | |