

令和元年6月18日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16266

研究課題名(和文) エンテロウイルスD68による小児急性弛緩性麻痺の病態解明と治療法の確立

研究課題名(英文) Pathophysiology and treatment in enterovirus D68-associated acute flaccid myelitis

研究代表者

松重 武志 (MATSUSHIGE, Takeshi)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60528941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：急性弛緩性脊髄炎(AFM)は、健康な小児に永続的な弛緩性麻痺を来すことが問題となっている。AFMの原因の一つとしてエンテロウイルスD68(EV-D68)が想定されているが、病態は十分にわかっていない。本研究では主に以下の2点の成果が得られた。

1) AFM患者において、脳脊髄液中の炎症性サイトカインであるインターフェロン(IFN-)とインターロイキン6(IL-6)が急性期に著明に上昇していることを発見した。2) 遠隔期の神経移行術時に、末梢神経の病理学的解析を行い、神経の萎縮性変化、EV-D68陽性所見を認めた。また、並行してマウスモデルを用いた解析の準備を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトでは脳脊髄液からEV-D68が検出されない。そのため、本病態がウイルスの脊髄への直接感染によるものか、二次的な免疫反応による神経障害なのかが不明であった。脳脊髄液のIFN- 上昇を認めたことは、ウイルスによる直接感染を示唆する。したがって、急性期において過度な免疫抑制療法はマイナスに働く可能性がある。また、長期にわたって神経にEV-D68が感染することは過去に知られていないため、他の手法も含めて慎重に判断されるべきである。持続感染によって神経回復が妨げられているかどうかは現時点で明らかでないものの、抗ウイルス薬の治療適応は急性期だけではない可能性もあり、開発が望まれる。

研究成果の概要(英文)：Acute flaccid myelitis (AFM) is a recent issue that causes permanent flaccid paralysis in healthy children. Although enterovirus D68 (EV-D68) is assumed as one of the causes of AFM, the pathophysiology is not fully understood. The following two main results were obtained in this study.

1) We found that the inflammatory cytokines, interferon-gamma (IFN-) and interleukin 6 (IL-6), in cerebrospinal fluid were markedly elevated in the acute phase. 2) Pathological analysis of peripheral nerves was performed during nerve transfer surgery, and atrophic changes in nerves and EV-D68 positive findings were observed, which will be confirmed in several ways. Also, in parallel, we are preparing for analysis using a mouse model.

研究分野：小児神経学、感染免疫、炎症

キーワード：急性弛緩性麻痺 エンテロウイルスD68 サイトカイン 病理

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2015年に本邦で原因不明の急性弛緩性脊髄炎 (AFM) 症例が多数報告され、一部の症例の咽頭からエンテロウイルス D68 (EV-D68) が検出された。急性発症の弛緩性麻痺を来し、高率に麻痺が残存することが大きな問題となっている。しかし、本疾患の病態は十分解明されておらず、治療法も確立していない。AFM は多くが髄液細胞増多を伴っており、主に脊髄前角細胞から運動神経軸索障害を来すと考えられている。EV-D68 が原因の候補として想定され、動物実験でも EV-D68 感染による麻痺の再現が報告されているものの、ヒトでは脳脊髄液から EV-D68 の感染が直接証明されず、病理組織学的検討が困難であったことから、詳細な病態が不明である。

共同研究施設の小郡第一総合病院 (山口市) では、AFM 罹患後の神経移行術を多数行っており、全国の施設から手術の依頼がある。手術の際に障害神経の一部が摘出されるため、これを用いた病理学的、ウイルス学的解析を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、脳脊髄液や神経組織を用いた解析により、AFM の病態解明と治療法確立を目指す。特に AFM とウイルスとの因果関係や、ウイルスによる直接的な脊髄障害なのか免疫反応による二次的な神経障害なのかを明らかにする。また並行して、in vitro/in vivo 実験を行い、発症の条件や重症度に関わる因子について解析を行う。

3. 研究の方法

(1) AFM 患者由来の急性期血清および脳脊髄液を -80°C で保存し、炎症性サイトカイン解析を行った。解析は cytometric bead array (CBA) 法を用いて、インターロイキン-6 (IL-6)、IL-10、IL-2、IL-4、腫瘍壊死因子 (TNF)、インターフェロン- γ (IFN- γ) を測定した。

(2) 倫理審査委員会承認後、小郡第一総合病院で手術を行う患者家族から同意を得て、神経移行術時に摘出される神経を保存し、病理学的、ウイルス学的検討を行った。正常側神経を病変側へ移行する際に摘除される神経断端の一部を凍結およびホルマリン固定により保存した。ホルマリン固定組織をパラフィン包埋し、切片を作成した。ヘマトキシリンエオジン染色、ボディアン染色、クリューバーバレーラ染色を行った。また、ウイルス抗体 (抗 EV-D68 VP1 抗体) を用いて蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡による免疫組織化学的検討を行った。対照として RD-A 細胞を用い、EV-D68 (2015 年分離株) 感染細胞を陽性コントロール、非感染細胞を陰性コントロールとした。凍結組織の一部からウイルス PCR 用に RNA を抽出した。

(3) 山口大学生命科学実験施設マウスを用いた in vivo 実験の申請を行い、EV-D68 感染マウスの麻痺発症条件について検討した。

4. 研究成果

(1) 急性期に咽頭から EV-D68 が検出された 2018 年発症 AFM 患者において、脳脊髄液中の炎症性サイトカインを解析した。脳脊髄液の細胞増多、末梢神経伝導速度で初期に F 波の消失、のちに M 波の振幅低下を認め、MRI では脊髄腫大 (図 1A)、脊髄前角の異常信号 (図 1B) および馬尾の造影効果 (図 1C) を認め、AFM として矛盾しない所見だった。急性期の血清では炎症性サイトカインに大きな変化は認めなかったが、一方で脳脊髄液では IL-6 と IFN- γ が著明に上昇していることがわかった (表 1)。過去の報告と同様、EV-D68 は脳脊髄液では検出されていない。IFN- γ はウイルス感染時における宿主防御に重要な役割を果たしており、中枢神経系への直接的なウイルス侵襲時に上昇する。AFM は EV-D68 が直接神経へ感染することで生じることが示唆された。このことは急性期において、免疫反応を抑制する治療を行うかどうかに関わる重要な所見である。

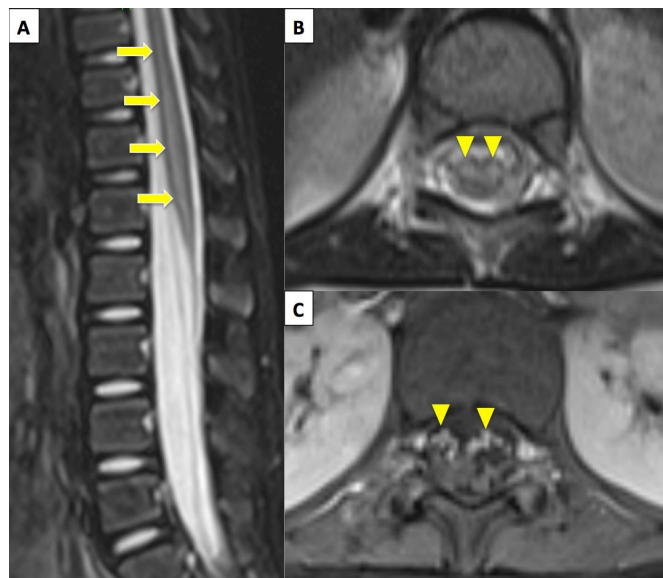


図 1 MRI 所見

表1 急性期血清および脳脊髄液中の炎症性サイトカイン解析

	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IFN- (pg/ml)	TNF (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)
血清	5.8	10.5	<7.1	<2.8	<2.6	3.4
(正常値)	(<9.5)	(<6.8)	(<21.1)	(<3.9)	(<3.9)	(<3.8)
脳脊髄液	1043.0	11.4	165.7	<2.8	3.1	<2.6
(正常値)	(<6.2)	(<2.8)	(<7.1)	(<3.5)	(<2.6)	(<6.6)

(2) 遠隔期に神経移行術を行った AFM 患者について、手術時に得られた末梢神経の病理学的解析、ウイルス検出を試みた。手術症例は報告書作成時点で 9 例(年齢 1~7 歳、中央値 4 歳、男児 6 例、女児 3 例)だった。神経検体が小さく、保存に十分なサイズがない場合は、ホルマリン検体が凍結検体のどちらかの保存を行った。病変神経側はホルマリン固定 6 例、凍結検体 5 例、正常神経側はホルマリン固定 6 例、凍結検体 5 例だった。うち、5 例のホルマリン検体について一般染色および免疫組織化学の検討を行った。

対照

EV-D68 感染 RD-A 細胞 (陽性コントロール、感染後 2 日)および EV-D68 非感染 RD-A 細胞 (陰性コントロール)の蛍光顕微鏡を用いた免疫組織化学の結果を示す(図2)。陰性コントロールでは核のみ染色され、ウイルスは染色されないが、陽性コントロールではウイルスが検出されることを確認した。

神経組織

ヘマトキシリンエオジン染色等では、神経束内での神経の萎縮性変化、軸索の脱落、脱髄所見が示唆された。蛍光免疫染色では、病変側神経組織の一部に EV-D68 陽性所見を認めた。共焦点レーザー顕微鏡所見を示す(図3)。ウイルスの局在について検討中である。長期にわたって神経に EV-D68 が感染することは過去に知られていないため、他の手法も含めて慎重に判断されるべきである。現在、PCR でも神経組織から EV-D68 が検出されるか検討予定である。

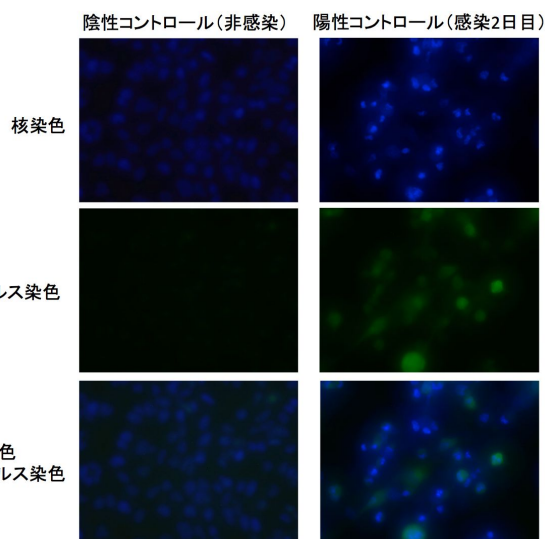


図2 培養細胞の陽性・陰性コントロール

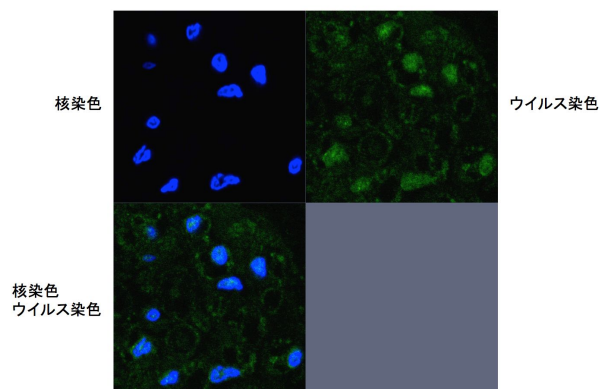


図3 病変側神経組織の免疫染色

(3) マウスモデルを用いた in vivo 実験については現時点で公表できる結果が得られていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hidaka I, Matsushige T, Inoue H, Hoshide M, Shirabe K, Hasegawa S. Cytokine Profile in a Patient With Enterovirus D68-Associated Acute Flaccid Myelitis. *Pediatr Neurol*. 2019 Apr 26.

pii: S0887-8994(19)30325-X. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2019.04.011.

[Epub ahead of print] PubMed PMID: 31178237. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

日高 一平、松重 武志、井上 裕文、星出 まどか、岡 桃子、長谷川 俊史.

エンテロウイルス D68 関連急性弛緩性脊髄炎症例のサイトカイン解析 .
第 30 回日本小児神経学会中国・四国地方会 2019 年

日高 一平、松重 武志、井上 裕文、星出 まどか、岡 桃子、調 恒明、長谷川 俊史 .
髄液サイトカイン解析から直接侵襲の病態が示唆されたエンテロウイルス D68 関連急性弛緩性脊髄炎 .
第 24 回日本神経感染症学会 2019 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：調 恒明

ローマ字氏名：(SHIRABE, Komei)

研究協力者氏名：土井 一輝

ローマ字氏名：(DOI, Kazuteru)

研究協力者氏名：崔 丹

ローマ字氏名：(CUI, Dan)

研究協力者氏名：池田 栄二

ローマ字氏名：(IKEDA, Eiji)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。