

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03626

研究課題名(和文)動物モデルを用いたエンテロウイルスD68による弛緩性麻痺発現機序の解明

研究課題名(英文) Study on pathogenesis of flaccid paralysis caused by enterovirus D68 using animal models

研究代表者

永田 典代(Nagata, Noriyo)

国立感染症研究所・感染病理部・室長

研究者番号：30270648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では実験動物を用いたEV-D68の神経病原性に関する病態病理解析とモデルの確立を行った。具体的には、新生仔マウスで分離後、H1HeLa細胞で継代したEV-D68を用いて、マウスおよびカニクイザルにおけるEV-D68の神経病原性を明らかにした。EV-D68継代株の新生仔マウス脳内接種法、成マウス脊髄内接種法、また、カニクイザルに対する脊髄内接種法によって、いずれの動物に対しても弛緩性麻痺が引き起された。病理組織学的解析により、これらの麻痺はウイルス感染による脊髄前角の神経細胞の消失によるものであることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EV-D68感染症と弛緩性麻痺の関連性が強く疑われているが、詳細は不明である。本研究では実験動物を用いてEV-D68の神経病原性に関する病態病理解析とモデルの確立を行った。これらの動物モデルはEV-D68感染症のための新規治療法、予防法の確立のみならず、その発症機序の理解に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：The neuropathogenicity of EV-D68 in mice and cynomolgus monkeys was examined using a strain of H1HeLa cell-passaged EV-D68. Intracerebral inoculation into neonatal mice, intraspinal inoculation into adult mice, and intraspinal inoculation into monkeys with EV-D68 resulted flaccid paralysis in these animals. Histopathological examination revealed that these paralyzes were due to loss of neurons in the anterior horn of the spinal cord after virus infection.

研究分野：新興・再興感染症ウイルスの病態・病理学

キーワード：エンテロウイルスD68 動物モデル 弛緩性麻痺 神経病原性

## 1. 研究開始当初の背景

エンテロウイルス D68 (EV-D68) は 1962 年に米国で初めて分離され、呼吸器感染症の比較稀な原因ウイルスであったが、近年世界的にその検出数が増加した。本ウイルスは、ピコルナウイルス科の中でも通常のエンテロウイルスよりむしろライノウイルスの性状に類似し、主として呼吸器感染症症例の咽頭由来検体から検出される。最近の疫学的調査結果は呼吸器感染症重症化に関与することを示唆している (Imamura T and Oshitani H. 2015)。一方で、2014 年 8-9 月をピークとして米国で発生した EV-D68 による急性重症呼吸器感染症の大規模流行では、急性弛緩性麻痺・脊髄炎や脳神経障害を発症した患者が多数報告され、新たな神経病原性エンテロウイルスの可能性として注目された (Messacar K *et al.*, 2015)。その後、国内でも 2015 年秋の EV-D68 流行時に急性弛緩性麻痺・脊髄炎患者が急増し、感染症に基づく積極的疫学調査の結果、2015 年 8~12 月に成人を含めて全国から 100 例を超える急性弛緩性脊髄炎症例が報告された。この際、一部症例の咽頭拭い液等から EV-D68 が検出されたことから (Chong PF *et al.*, 2017)、ウイルス感染症と神経病変の関連性が強く疑われているが、因果関係の直接的な確定にはいたっていない。国内では、2018 年 5 月 1 日から 15 歳未満の急性弛緩性麻痺が全数届出疾患となった。2018 年 8 月頃から小児の弛緩性麻痺患者の報告が増加したとの情報があり、EV-D68 の再流行として警戒された。これらのことから、EV-D68 の神経病原性とその発症機序の理解と治療法、予防法の確立は小児感染症学において重要課題の一つとされている。

一方、EV-D68 の宿主レセプターとして現在までにシアル酸と接着分子 intercellular adhesion molecule 5 (ICAM5, 別名 telencephalin) が報告された (Liu Y *et al.*, 2015; Wei W *et al.*, 2016)。これら受容体分子の組織分布から前者は気道、後者は神経系における感染に関与していると考えられているが、まだ不明な点が多い。特に ICAM5 に関しては、EV-D68 受容体としての報告が最近であることもあり論文報告数は非常に少なく、とくに *in vivo* における ICAM5 の関与については、まったく明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

これまでに、感染動物モデルと人体病理の解析結果に基づきポリオウイルスとエンテロウイルス A71 (EV-A71) の神経病原性を明らかにしてきた。EV-D68 患者の脳 MRI 画像が EV-A71 脳幹脳炎に非常に類似している点、また、唯一の剖検報告の脳炎所見から (Kreuter JD *et al.*, 2011)、この感染標的細胞と神経向性はポリオウイルスあるいは EV-A71 の病態病理に類似すると推察される。すでに、EV-D68 患者分離株の一部は新生仔マウス脳内接種後に弛緩性麻痺を引き起こし、病理学的にマウス脳幹と頸髄の神経細胞への感染、増殖とそれによる脊髄前角の大型神経細胞の壊死と消失がマウスにおける麻痺の原因であることが示されている。これらの結果から、次の疑問が生じた。

- ・マウスで認められた中枢神経病変および病態をヒトに外挿できるのか？
- ・経気道感染から中枢神経系への侵入機構は？
- ・最近の流行株は新たに神経病原性を獲得したのか？
- ・治療法、予防法を *in vivo* で評価することは可能か？

そこで、本研究では EV-D68 の神経病原性の解明を最終目標として、(1) 実験動物を用いた神経病原性に関する病態病理解析とモデルの確立、(2) 呼吸器・神経系におけるウイルスレセプター発現と感染の関連性の検討、(3) 治療法、予防法にむけての基礎検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物を用いた神経病原性に関する病態病理解析とモデルの確立

新生仔マウスで分離した後、ヒト由来培養細胞に 7 回継代し馴化に成功した国内分離株の 4 株のうち、新生仔マウスに対する神経病原性を維持した株が一株、得られた。この株は、サル由来腎細胞 LLCMK<sub>2</sub> 細胞においても強い増殖性を示した。本来の宿主域であるヒトにおける EV-D68 ウイルスの感染伝播と病原性発現機構を探る上で、よりヒトに近い非ヒト霊長類を利用した感受性と病原性の検討は必須と考え、小動物モデルおよび非ヒト霊長類モデルを構築し、それぞれのモデルの利点を利用しながら神経病原性発現機構について病態・病理解析を行った。

### (2) 呼吸器・神経系におけるウイルスレセプター発現と感染の関連性の検討

EV-D68 の宿主レセプターとして現在までにシアル酸と ICAM5 が報告されたが、本研究では ICAM5 の感染における役割を検討するため非感受性細胞に ICAM-5 を発現させ *in vitro* 検討を行った。

### (3) 治療法、予防法にむけた基礎検討

EV-D68 に対する免疫獲得の現状を把握するため、国内の免疫グロブリン製剤における抗 EV-D68 中和抗体の含有について検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 実験動物を用いた神経病原性に関する病態病理解析とモデルの確立

###### (1-1) マウスを用いた神経病原性に関する解析

臨床分離株を H1HeLa 細胞で 37 培養条件にて 10 回継代し、より高力価のウイルス液を得た。また、この細胞継代株を脳内接種後に瀕死となった新生仔マウス脳脊髄を採取し、マウス継代株を得た。これらのウイルスの塩基配列について次世代シーケンス法による比較解析を行ったところ、細胞継代株と比較してマウス継代株ではウイルス殻タンパクに 3 カ所のアミノ酸置換を伴う変異がみられた。そこで、これらの株を用いて新生仔マウスと若齢マウスに対する神経毒力の比較を行った。さらに、マウス継代株を用いて経気道感染モデルの作出を試みた。

その結果、成マウスの脊髄内に直接ウイルスを接種することで、マウスの脊髄神経細胞に対する EV-D68 の感染性を直接的に評価することができることがわかった。また、腰髄脊髄内接種後の個体はいずれも後肢から始まる弛緩性麻痺を発症した。未発症個体においては脊髄前角の大型の神経細胞にウイルス抗原が検出され、発症個体では髄膜炎、急性灰白髄炎が観察された(図)。よって、新生仔マウス脳内接種と同様に、成マウス脊髄の成熟神経細胞にも EV-D68 は感染し、ウイルス増殖とそれによる脊髄前角の大型神経細胞の壊死・消失が弛緩性麻痺の原因であることを病理組織学的に明らかにした。

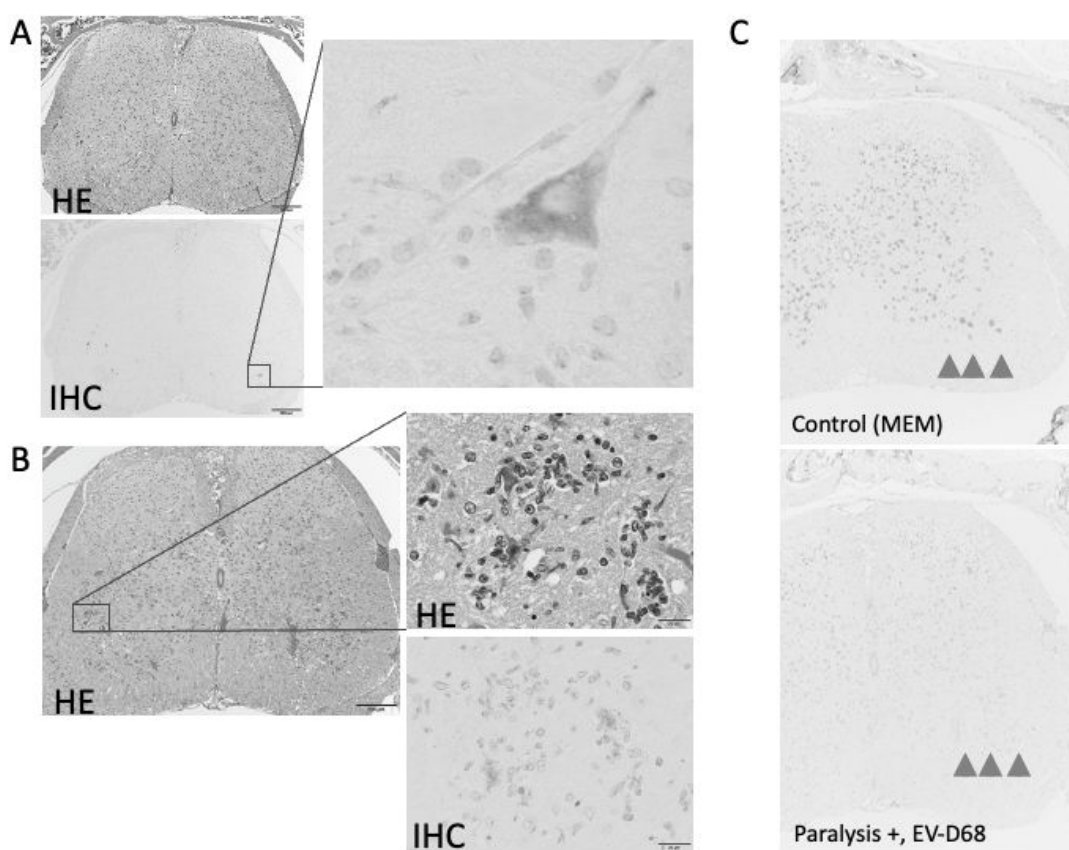


図 H1HeLa細胞10回継代株 脊髄内接種後のマウス脊髄における組織病変。A. 脊髄内接種2日目の腰髄。HE、ヘマトキシリン・エオジン染色。IHC、抗EVD68-VP1抗体を用いた免疫組織化学法。B. 脊髄内接種3日目に発症し進行性麻痺を示した個体の腰髄。5日目に解剖に供した。C. 神経マーカーNeuNを用いた免疫組織化学法。Control, 細胞培養液を脊髄内接種し15日目の個体。Paralysis +, Bと同一個体、Bの連続切片。脊髄前角の大型の神経細胞の消失が観察される。

一方、使用した二つの株は、いずれも若齢マウスに対し脊髄内接種後に弛緩性麻痺を引き起こすことが明らかとなった。ただし、マウス継代株は新生仔マウスに対し比較的強毒であったが若齢マウス脊髄内接種では比較的弱毒であることが判明した。

また、細胞継代株は脳内接種後の新生仔マウスに弛緩性麻痺を引き起こしたが、BALB/c 4週齢マウスに対する経鼻接種では、明らかな神経病原性を発揮しなかった。また、マウス継代株の経鼻接種後においても明らかな臨床症状を示さなかった。

( 1-2 ) カニクイザルを用いた神経毒力試験

前述の H1HeLa 細胞継代株はサル腎細胞由来の LLCMK2 細胞で効率良く増殖した。これを用いて神経毒力試験を行った。経口生ポリオワクチンの神経毒力試験法と同様にサル腰髄内にウイルス液を接種し 10 日間臨床症状を観察した。その結果、3 頭中 2 頭の個体で進行性の弛緩性麻痺の発症が認められた。よって、非ヒト霊長類であるカニクイザルの脊髄に直接 EV-D68 を接種すると神経毒力を発揮する事が判明した。

( 3 ) EV-D68 の受容体に関する検討

EV-D68 の受容体の一つとして Intercellular Adhesion Molecule 5, ICAM-5 が報告されている。ICAM-5 依存的な感染過程を解析するために、EV-D68 に非感受性である Vero 細胞にヒト ICAM-5 遺伝子を導入した細胞 ( Vero-ICAM-5 細胞 ) を作製した。Vero-ICAM-5 細胞を用いて EV-D68 の感染性を検討したが、顕著な細胞変性効果を伴うウイルス感染の増強は観察されなかった。

( 4 ) 国内の免疫グロブリン製剤における抗 EV-D68 中和抗体に関する検討

日本で使用されている免疫グロブリン製剤中の抗 EV-D68 中和抗体価を、日本で分離された複数の遺伝子型の EVD68 臨床分離株を用いて解析した。分離株と製剤の組み合わせで程度は異なるものの、使用したいずれの製剤も EV-D68 中和抗体を含むことが示された。多くの者が早期に感染、免疫を獲得しているとされる知見に一致した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 永田 典代	4. 巻 27
2. 論文標題 エンテロウイルスによる多様な神経感染症：動物モデルから得られた知見	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 神経感染症	6. 最初と最後の頁 90～98
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34397/jsnd.27.1_90	査読の有無 無
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 Shiota Tomoyuki, Matsuda Mami, Zheng Xin, Nagata Noriyo, Ishii Koji, Suzuki Ryosuke, Muramatsu Masamichi, Takimoto Kazuhiro, Hanaki Ken-Ichi, Lemon Stanley M., McGivern David R., Hirai-Yuki Asuka	4. 巻 96
2. 論文標題 Macrophage Depletion Reactivates Fecal Virus Shedding following Resolution of Acute Hepatitis A in <i>Irfnar1</i> <sup>−/−</sup> Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jvi.01496-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Iwata-Yoshikawa Naoko, Shiwa Nozomi, Sekizuka Tsuyoshi, Sano Kaori, Ainai Akira, Hemmi Takuya, Kataoka Michiyo, Kuroda Makoto, Hasegawa Hideki, Suzuki Tadaki, Nagata Noriyo	4. 巻 8
2. 論文標題 A lethal mouse model for evaluating vaccine-associated enhanced respiratory disease during SARS-CoV-2 infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abh3827	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hoa-Tran Thi Nguyen, Dao Anh Thi Hai, Nguyen Anh The, Kataoka Chikako, Takemura Taichiro, Pham Chau Ha, Vu Hung Manh, Hong Ta Thi Thu, Ha Nguyen Thi Viet, Duong Tran Nhu, Thanh Nguyen Thi Hien, Shimizu Hiroyuki	4. 巻 38
2. 論文標題 Coxsackieviruses A6 and A16 associated with hand, foot, and mouth disease in Vietnam, 2008?2017: Essential information for rational vaccine design	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 8273～8285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vaccine.2020.11.031	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 該当する

1. 著者名 永田典代、長谷川秀樹、清水博之、斎藤博之	4. 巻 41
2. 論文標題 エンテロウイルス感染による急性弛緩性麻痺の病理	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 病原微生物検出情報	6. 最初と最後の頁 25-27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ushioda Waka, Kotani Osamu, Kawachi Kengo, Iwata-Yoshikawa Naoko, Suzuki Tadaki, Hasegawa Hideki, Shimizu Hiroyuki, Takahashi Kimimasa, Nagata Noriyo	4. 巻 79
2. 論文標題 Neuropathology in Neonatal Mice After Experimental Coxsackievirus B2 Infection Using a Prototype Strain, Ohio-1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuropathology & Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 209 ~ 225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jnen/nlz124	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 Imura Ayumi, Sudaka Yui, Takashino Ayako, Tamura Kanami, Kobayashi Kyousuke, Nagata Noriyo, Nishimura Hidekazu, Mizuta Katsumi, Koike Satoshi	4. 巻 94
2. 論文標題 Development of an Enterovirus 71 Vaccine Efficacy Test Using Human Scavenger Receptor B2 Transgenic Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01921-19	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 Funakoshi Yu, Ito Kenta, Morino Saeko, Kinoshita Kazue, Morikawa Yoshihiko, Kono Tatsuo, Doan Yen Hai, Shimizu Hiroyuki, Hanaoka Nozomu, Konagaya Masami, Fujimoto Tsuguto, Suzuki Ai, Chiba Takashi, Akiba Tetsuya, Tomaru Yasuhiro, Watanabe Ken, Shimizu Norio, Horikoshi Yuho	4. 巻 61
2. 論文標題 Enterovirus D68 respiratory infection in a children's hospital in Japan in 2015	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 768 ~ 776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.13903	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 Okumura Akihisa, Mori Harushi, Fee Chong Pin, Kira Ryutaro, Torisu Hiroyuki, Yasumoto Sawa, Shimizu Hiroyuki, Fujimoto Tsuguto, Tanaka-Taya Keiko	4. 巻 41
2. 論文標題 Serial MRI findings of acute flaccid myelitis during an outbreak of enterovirus D68 infection in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 443 ~ 451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2018.12.001	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3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 永田 典代
2. 発表標題 エンテロウイルスによる多様な神経感染症：動物モデルから得られた知見.
3. 学会等名 第25回日本神経感染症学会総会・学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永田 典代
2. 発表標題 急性弛緩性脊髄炎とエンテロウイルス：動物モデルから得られた知見
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永田 典代、宮崎 誠、斎藤 博之、柴田 ちひろ、ドゥアン イェンハイ、荒尾 雄二郎、岩田 (吉河) 奈織子、清水 博之、長谷川 秀樹
2. 発表標題 Neuropathogenesis of enterovirus D68 in mouse models: マウスモデルにおけるエンテロウイルスD 6 8の神経病原性
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019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	西村 順裕 (Nishimura Yorihiro) (00392316)	国立感染症研究所・ウイルス第二部・主任研究官  (82603)	
研究分担者	清水 博之 (Shimizu Hiroyuki) (90270644)	国立感染症研究所・ウイルス第二部・主任研究官  (82603)	

	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
研究協力者	志和(須藤) 希 (Shiwa-Sudo Nozomi) (40902416)	国立感染症研究所・感染病理部・研究員  (82603)	
研究協力者	米満 研三 (Yonemitsu Kenzo) (60902997)	国立感染症研究所・安全実験管理部・研究員  (82603)	
研究協力者	坂井 祐介 (Sakai Yusuke) (60615722)	国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官  (82603)	
研究協力者	岩田(吉河) 奈織子 (Iwata-Yoshikawa Naoko) (10360695)	国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官  (82603)	



6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	網 康至  (Ami Yasuhi)  (10202699)	国立感染症研究所・安全実験管理部・主任研究官    (82603)	
研究協力者	鈴木 忠樹  (Suzuki Tadaki)  (30527180)	国立感染症研究所・感染病理部・部長    (82603)	
研究協力者	齋藤 博之  (Saito Hiroyuki)	秋田県健康環境センター	
研究協力者	柴田 ちひろ  (Shibata Chihiro)	秋田県健康環境センター	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関