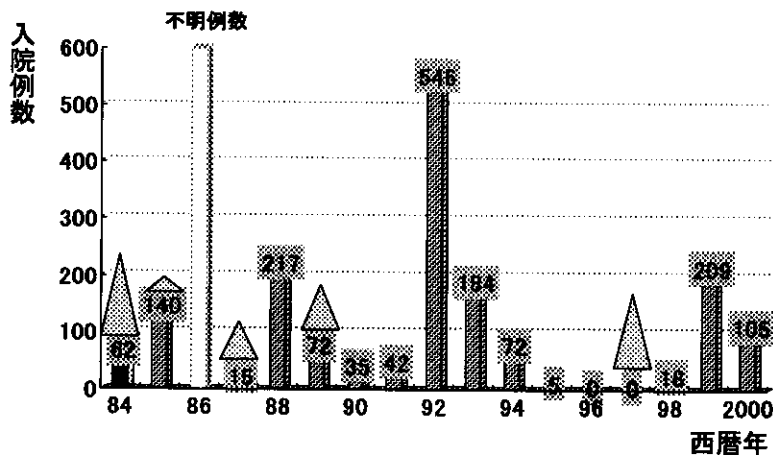
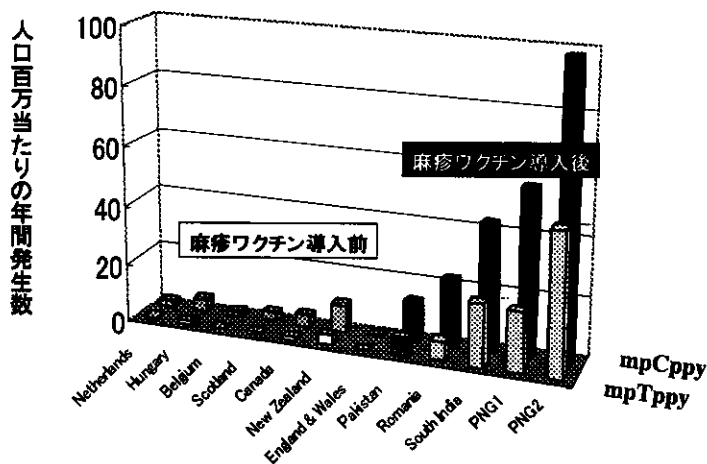


図4 ゴロカ基地病院小児科の麻疹入院例数



(高須俊明原図. 2003年1月23日)

図5 各国SSPEの年間発生率



(高須俊明原図. 2003年1月3日)

亜急性硬化性全脳炎多発地域パプアニューギニアにおける 急性麻疹の血清中サイトカインー日本との比較ー

班 員：市山 高志（山口大学・医学部・小児科）

〔研究要旨〕

パプアニューギニア東部高地州では亜急性硬化性全脳炎（subacute sclerosing panencephalitis: SSPE）が多発し、高須らの調査では日本の約100倍の頻度で発生している。そこで急性麻疹時の免疫応答にパプアニューギニアと日本の患児に差異がないか血清中サイトカインの面から検討した。対象はパプアニューギニアの急性麻疹6例と日本の急性麻疹7例。疾患コントロールとしてインフルエンザ12例。正常対照児17例。急性期の血清を用いて、soluble IL-2 receptor α (sIL2R α)とinterferon- γ (IFN γ)をELISAキットを用いて測定した。sIL2R α はパプアニューギニアの急性麻疹、日本の急性麻疹、インフルエンザ、正常対照それぞれ1148 \pm 833 pg/ml (0-1912)、3631 \pm 983 pg/ml (2439-5241)、1719 \pm 632 pg/ml (1146-3508)、688 \pm 236 pg/ml (307-1071)だった。IFN γ はパプアニューギニアの急性麻疹で6例中1例、日本の急性麻疹で7例中7例、インフルエンザで12例中5例で上昇がみられた。sIL2R α はT細胞活性の指標となり、IFN γ は抗ウイルス作用を有するサイトカインである。少数例の検討であるが、日本の急性麻疹に比し、パプアニューギニアの急性麻疹では血清中sIL2R α とIFN γ が低値だった。今後多数例での検討が必要であるが、パプアニューギニア東部高地州の小児は麻疹ウイルス感染に対する免疫応答が弱く、ウイルスが持続感染しやすい素因が示唆された。

Serum cytokines of acute measles in Papua New Guinea
which is a SSPE frequent occurrence area: compared with Japan

Takashi ICHIYAMA

Department of Pediatrics, Yamaguchi University School of Medicine

ABSTRACT

In the eastern highlands of Papua New Guinea, subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) occurred frequently, and the incidence of SSPE in this area is about 100 times higher than that in Japan, according to investigation of Takasu et al. I examined whether or not there is no difference in children of Papua New Guinea and Japan to the immune response of the acute measles, from the field of serum cytokines. Subject are the six acute measles in Papua New Guinea, the seven acute measles in Japan, 12 influenzas in Japan as disease control, and 17 normal children. Soluble IL-2 receptor α (sIL2R α) and interferon- γ (IFN γ) were measured using the ELISA kit. Serum sIL2R α levels were 1148 \pm 833 pg/ml (0-1912) of the acute measles in Papua New Guinea, 3631 \pm 983 pg/ml (2439-5241) of the acute measles in Japan, 1719 \pm 632 pg/ml (1146-3508) of influenza in Japan, and 688 \pm 236 pg/ml (307-1071) of controls. Serum IFN γ levels were elevated 1 of 6 of the acute measles in Papua New Guinea, 7 of 7 of the acute measles in Japan, and 5 of 12 of influenza in Japan. sIL2R α is an index of T-lymphocyte activity, and IFN γ has an antiviral action. Although it was examination of a small number, serum sIL2R α and IFN γ were low levels in the acute measles of Papua New Guinea, compared with of Japan. Although much examination is required from now on, the children of the eastern highlands of Papua New Guinea may have the weak immunune response to measles virus infection, and the virus may tend to be infected with them for the long time.

〔はじめに〕

亜急性硬化性全脳炎 (subacute sclerosing panencephalitis: SSPE)は麻疹ウイルスの持続感染後に発症する遅発性脳炎である。パプアニューギニア東部高地州では亜急性硬化性全脳炎が日本の約100倍の頻度で発生し、世界的にみても、SSPEの多発地域となっている(1)。

〔目的〕

パプアニューギニアと日本の急性麻疹時の免疫応答を血清中サイトカインの面から解析し、パプアニューギニアにおけるSSPE多発の要因がないかを検討した。

〔方法〕

対象はパプアニューギニアの急性麻疹6例(男児4例、女児2例、平均4.4歳、4ヵ月～7歳)と日本の急性麻疹7例(男児4例、女児3例、平均1.2歳、9ヵ月～1歳9ヵ月)。疾患コントロールとしてインフルエンザA型12例(男児7例、女児5例、平均4.4歳、1歳4ヵ月～12歳)。正常対照児17例(男児7例、女児10例、平均5.9歳、3ヵ月～13歳)。

方法は急性期の血清を用いて、soluble IL-2 receptor α (sIL2R α)とinterferon- γ (IFN γ)をELISAキット(R & D Systems社)を用いて測定した。

〔倫理面への配慮〕

対象患児については本研究の主旨を説明し、保護者の同意を得た者とした。末梢血の検査なので検査結果からは個人を特定できない。また、研究成果を発表する際には氏名は公表しない。以上のことより、本研究の対象患者の人権は擁護されるものと考えた。

〔結果〕

血清中sIL2R α はパプアニューギニアの急性麻疹、日本の急性麻疹、インフルエンザ、正常対照それぞれ1148 \pm 833 pg/ml (0-1912)、3631 \pm 983 pg/ml (2439-5241)、1719 \pm 632 pg/ml (1146-3508)、688 \pm 236 pg/ml (307-1071)だった。血清中IFN γ は正常対照は全例検出感度8 pg/ml未満だった。パプアニューギニアの急性麻疹で6例中1例、日本の急性麻疹で7例全例、インフルエンザで12例中5例で上昇がみられた。

〔考察〕

sIL2R α はT細胞活性の指標となり(2)、IFN γ は抗ウイルス作用を有するサイトカインである(3)。少数例の検討であるが、パプアニューギニアの急性麻疹では日本の急性麻疹に比し、血清中sIL2R α とIFN γ が低値だったことが明らかになった。今後多数例での検討が必要であるが、パプアニューギニア東部高地州の小児は麻疹ウイルス感染に対する免疫応答が弱く、ウイルスが持続感染しやすい素因が示唆された。このことがSSPE多発の要因のひとつである可能性が示唆された。

〔結論〕

日本の急性麻疹に比し、パプアニューギニアの急性麻疹では、血清中sIL2R α とIFN γ が低値だった。今後多数例での検討が必要であるが、パプアニューギニア東部高地州の小児は麻疹ウイルス感染に対する免疫応答が弱く、ウイルスが持続感染しやすい素因が示唆された。

〔参考文献〕

1) Takasu T, Mgone JM, Mgone CS, Miki K, Komase K, Kokubun H, Nishimura T, Kawanishi R, Markus TJ, Kono J, Asuo PG, Alpers MP: A continuing high incidence of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) in the Eastern Highlands of Papua New Guinea. (Manuscript submitted)

- 2) Waldmann TA: The IL-2/IL-2 receptor system: a target for rational immune intervention. *Immunol Today* 14: 264-270, 1993
- 3) Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC: Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15: 749-795, 1997

[研究発表]

1.論文発表

- 1) Tashiro N, Matsubara T, Uchida M, Katayama K, Ichiyama T, Furukawa S: Ultrasonographic evaluation of cervical lymph nodes in Kawasaki disease. *Pediatrics* 109: e77, 2002
- 2) Umeda S, Ichiyama T, Hasagawa S, Matsubara T, Furukawa S: Theophylline inhibits NF- κ B activation in human peripheral blood mononuclear cells. *Int Arch Allergy Immunol* 128: 130-135, 2002
- 3) Ichiyama T, Isumi H, Yoshitomi T, Nishikawa M, Matsubara T, Furukawa S: NF- κ B activation in cerebrospinal fluid cells from patients with meningitis. *Neurol Res* 24: 709-712, 2002
- 4) Kawashima H, Watanabe Y, Ichiyama T, Mizuguchi M, Yamada N, Kashiwagi Y, Takekuma K, Hoshika A, Mori T: High concentration of serum nitrite/nitrate obtained from patients with influenza-associated encephalopathy. *Pediatr Int* 44: 705-707, 2002
- 5) Kimura M, Tasaka M, Sejima H, Takusa Y, Ichiyama T, Yamaguchi S: Hemiconvulsion-hemiplegia syndrome and elevated interleukin-6: case report. *J Child Neurol* 17: 705-707, 2002
- 6) Ichiyama T, Hayashi T, Isumi H, Furukawa S. Inhibitory effect of valproate on cytokine production. *Epilepsia* 43 (suppl. 9): 69-70, 2002
- 7) Yoneshima Y, Ichiyama T, Ayukawa H, Matsubara, Furukawa S. Fosfomycin Inhibits NF- κ B activation in human peripheral blood mononuclear cells. *Int J Antimicrob Agents* in press
- 8) Nishikawa M, Ichiyama T, Hasegawa M, Kawasaki K, Matsubara T, Furukawa S. The safety for thromboembolism of intravenous immunoglobulin therapy in Kawasaki disease: the study of whole blood viscosity. *Pediatr Int* in press
- 9) Ichiyama T, Isumi H, Ozawa H, Matsubara T, Morishima T, Furukawa S. Cerebrospinal fluid and serum levels of cytokines and soluble tumor necrosis factor receptor in influenza virus-associated encephalopathy. *Scand J Infect Dis* in press
- 10) Hasegawa K, Ichiyama T, Isumi H, Nakata M, Sase M, Furukawa S. NF- κ B Activation in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Neonatal Asphyxia. *Clin Exp Immunol* in press
- 11) 市山高志、松原知代、古川 漸. 小児疾患における転写因子NF- κ Bの役割. *小児科* 43: 1454-1460, 2002
- 12) 市山高志. 中枢神経系炎症性疾患のサイトカイン動態. *日児誌* 106: 1391-1395, 2002
- 13) 市山高志、松原知代、伊住浩史、長谷川恵子、榎田真史、古川 漸. 末梢血単核球NF- κ Bの解析. *小児感染免疫* 14: 364-370, 2002
- 14) 松原知代、鮎川浩志、古賀まゆみ、市山高志. 小児感染症におけるサイトカインの役割-末梢血IFN- γ 産生Tリンパ球を中心に-. *小児感染免疫* 14: 371-376, 2002
- 15) 市山高志、伊住浩史、松藤博紀、林 隆. 乳児良性部分てんかんの一家系. *臨床脳波* 45: 65-68, 2003

2.学会発表

- 1) 市山高志: シンポジウム. 中枢神経系炎症性疾患におけるサイトカイン動態. 第105回日本小児科学会学術集会. 名古屋. 2002.4.19-21.
- 2) 市山高志、伊住浩史、加藤光広、小沢 浩、沢石由記夫、古川 漸: 急性散在性脳脊髄炎における髄液中サイトカインの検討. 第44回日本小児神経学会. 仙台. 2002.6.27-29.
- 3) 市山高志、伊住浩史、藤原元紀、松原知代、古川 漸: 免疫グロブリン製剤の抗炎症作用-NF- κ B活

性化抑制作用-. 第22回日本川崎病研究会. 北九州. 2002.9.27-28.

4) 市山高志、伊住浩史、庄司紘史、加藤光広、小沢 浩、沢石由記夫、古川 漸: 急性散在性脳脊髄炎における髄液中サイトカインの検討. 第7回日本神経感染症研究会. 東京. 2002.10.4-5.

5) 市山高志、長谷川俊史、松原知代、古川 漸: 末梢血免疫担当細胞におけるプラニルカスト水和物の抗炎症作用. 第39回日本小児アレルギー学会. 盛岡. 2002.11.1-2.

6) 市山高志、伊住浩史、藤原元紀、松原知代、古川 漸: 免疫グロブリン製剤の抗炎症作用-NF- κ B活性化抑制作用-. 第34回日本小児感染症学会. 札幌. 2002.11.8-9.

7) 市山高志、長谷川俊史、松原知代、古川 漸: ヒト単球系細胞におけるモンテルカストの抗炎症作用-NF- κ B活性化抑制作用-. 第52回日本アレルギー学会. 横浜. 2002.11.28-30.

图1. 血清中sIL2R α 值

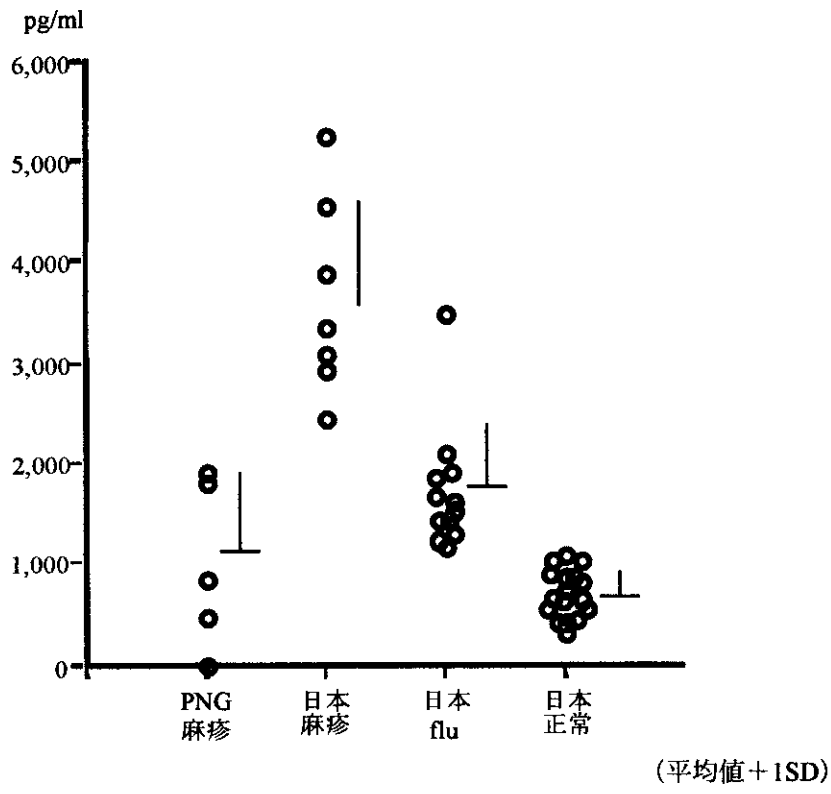
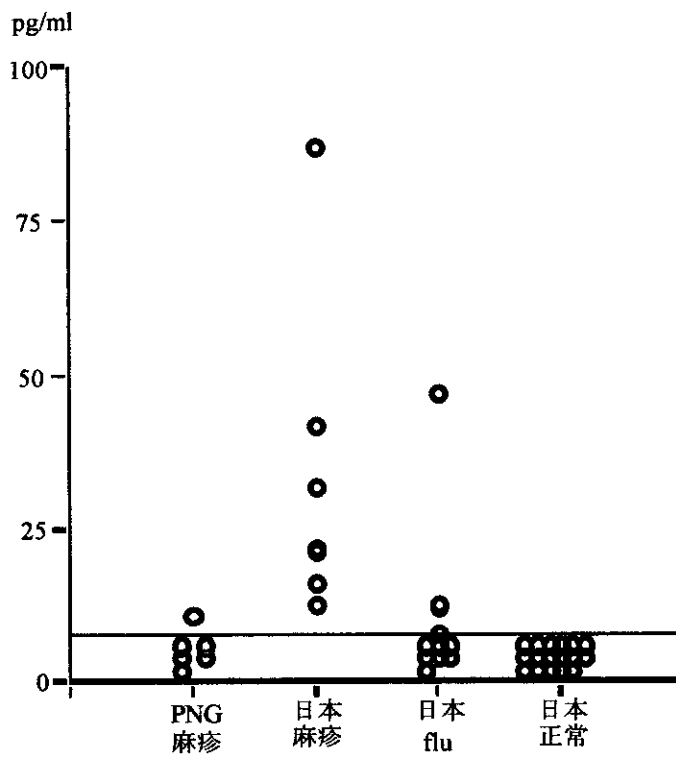


图2. 血清中IFN γ 值



亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) 患者髄液中のサイトカインの検討

班 員：二瓶 健次 (国立成育医療センター・神経内科)
清水 透子 (久留米大・小児科)
山崎 裕子 (BD Bioscience, 横浜市大・医学部・免疫学)
藤巻 春香 (横浜市大・医学部・免疫学)
南 陸彦 (横浜市大・医学部・免疫学)
成相 昭吉 (横浜南共済病院・小児科)

【研究要旨】

亜急性全脳炎 (SSPE) の病態・進行の評価を目的とし、SSPE 患者髄液中の炎症性サイトカインおよび Th1/Th2 サイトカインの測定を、サイトカイン特異的に結合する抗体でコーティングされた蛍光強度の異なる 6 種類のビーズを用いた Cytometric Bead Array (CBA) Kit (BD PharMingen) によりフローサイトメトリーにて行った。その結果、炎症性サイトカイン IL-1 β 、IL-8、IL-6 および IFN- γ が上昇している例がみられたが、他の Th1 および Th2 サイトカインの上昇はみられなかった。経時的に髄液が採取された 1 症例において、IL-6 と IL-8 は、同調して上昇、下降を繰り返していることが観察された。このことは、SSPE 病態の進行において免疫応答は、活性化と沈静化を繰り返していることが考えられる。

Measurement of inflammatory and Th1 or Th2 cytokines in cerebrospinal fluids from the SSPE patients

Kenji NIHEI, Touko SHIMIZU, Hiroko YAMAZAKI, Haruka FUJIMAKI, Mutsuhiko MINAMI, Syoukichi NARIAI

Department of Neurology, National Center for Child health and Development; Department of pediatrics and Child Health Kurume University School of medicine; BD Bioscience; Department of immunology, Yokohama City University, School of medicine; Department of Pediatrics Yokohama Minami Kyousai Hospital

ABSTRACT

To assess the inflammatory status in each phase of subacute sclerosing panencephalitis(SSPE) we examined IL-2, IL-4, ----, TNF-a levels of cerebrospinal fluid of SSPE patients, using cytometric bead array assay system (BD). We examined 42 samples of the cerebrospinal fluid from 14 SSPE patients. We used the samples of cerebrospinal fluid of 11 patients with other diseases, bacterial or aseptic meningitis and epilepsy as a neurological disease control and lymphadenitis, urinary tract infection and enterocolitis as a non-neurological disease control. IL-1b, IL-6, IL-8 and IFN-g levels of the cerebrospinal fluids of some of SSPE patients were high as well as other disease controls. IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF-a and IL-12p in the samples of SSPE patients were not detected. 24 samples from a patients were examined. During disease progression sometimes IL-8 and IL-6 levels in cerebrospinal fluid of the samples synchronously increased and then decreased to the low level.

Thus, inflammatory exacerbation and improvement were repeated in SSPE.

〔はじめに〕

亜急性全脳炎（SSPE）は、小児期に発症し、緩徐進行性に神経学的退行を示し、麻疹ウイルスの脳内持続感染による遅発性ウイルス感染症に属するものである¹⁾。近年 SSPE の病態生理に関与するウイルス側、宿主側の因子の研究がなされ、Th1/Th2 バランスを左右する IL-4 遺伝子の多様性や、抗ウイルス蛋白 MxA が SSPE の発症に関与しているのではないかとの報告がなされている²⁾、両者ともに麻疹ウイルス排除において重要と考えられるものである。また、SSPE 患者の剖検脳では、中枢神経系のあらゆる部分でアポトーシスが認められたことが報告されている³⁾。以上のことから、SSPE では脳全体の種々の細胞で、ウイルスの直接浸潤やサイトカインの放出をともなう免疫応答が生じながら脳炎という病態が進行していくことが考えられる。今回われわれは、患者髄液中サイトカイン濃度の上昇下降が SSPE の脳内における免疫炎症反応の指標となる可能性を検討するため、少量のサンプルで短時間で測定可能な Cytometric Bead Array (CBA) Kit (BD PharMingen)⁴⁾を用いて、経時的に採取された同一症例を含む 14 症例から得られた髄液 43 検体につき Th1/Th2 サイトカインおよび炎症性サイトカインを測定した。

〔目的〕

亜急性全脳炎（SSPE）亜急性硬化性全脳炎の病態・進行の評価を目的とする。特に、SSPE 患者髄液中の炎症性サイトカインおよび Th1/Th2 サイトカインの動態と病状の進行との関連を解析する。

〔材料と方法〕

SSPE と診断された 14 症例から採取された髄液 43 検体を測定した。また症例コントロールとして細菌性髄膜炎、ウイルス性髄膜炎患者などから採取された髄液 11 検体も同時に測定した。サイトカイン特異的に結合する抗体でコーティングされた蛍光強度の異なる 6 種類のビーズを用いた CBA Kit (BD PharMingen) によりフローサイトメトリーにて IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IFN- γ 、IL-12p70、TNF- α 、IL-6、IL-1b、IL-8 の 10 種類のサイトカインを測定した。

〔倫理面での配慮〕

各々の患者検体採取にあたり、書類によるインフォームドコンセントを得ている。

〔結果〕

CBA Kit を用いて 100ul の髄液中の 10 種類のサイトカインを短時間で測定することができた。経時的に髄液が採取された 1 症例では IL-6 と IL-8 は、同調して上昇、下降を繰り返していた (図 1)。SSPE 患者において、髄液中炎症性サイトカイン IL-1 β 、IL-8、IL-6 および IFN- γ が上昇している例がみられたが、他の Th1 および Th2 サイトカインの上昇はみられなかった (図 2-5)。

〔考察〕

これまで SSPE 患者髄液中のサイトカインについての報告は少なく、IL-1RA が検出されたという報告があるのみである⁵⁾。また、髄液中のサイトカインは血清中の値との相関があきらかではないことから、SSPE の病態進行と免疫応答の関連を考える上で、髄液中のサイトカインを測定することは重要と考えられる。今回我々が、検討を行った症例では、IL-8 および IL-6 が、また低値であるが IFN- γ および IL-1 β が上昇している例がみられた。また 1 症例において経時的なサイトカインの変動が観察された。このことは、SSPE 病態の進行において免疫応答は、活性化と沈静化を繰り返していることが考えられる。

〔結論〕

今回我々が検出したサイトカインの中でも IL-8 は、好中球走化性のみならず、⁶⁾。IFN- α の抗ウイルス作用を抑制するという報告⁷⁾もあり、SSPE の治療も含め、IL-8 の上昇下降が中枢内でのどういった変化を反映しているのか解明することにより、病態の進行および治療の指標となる可能性が考えられる。

[参考文献]

- 1) 永石彰子ほか:遅発性ウイルス感染症.日本臨床.59 巻:119-122,2001
- 2) Inoue T, et al.: Contribution of the interleukin-4 gene to susceptibility to subacute sclerosing panencephalitis.Arch Neurol..59:822-827,2002
- 3) McQuaid S, et al.: Apoptosis in measles virus-infected human central nervous system tissues. Neuropathol Appl Neurobiol..23(3): 218-224,1997
- 4) Chen R.,et al.: Simultaneous quantitation of six human cytokines in a single sample using microparticle-based flow cytometric technology. Clin.Chem.. 9:1693-1694,1999
- 5) Hospolat S, et al.: Interleukin-1beta,interleukin-1 receptor antagonist levels in patients with subacute sclerosing panencephalitis and the effects of different treatment protocols. J Child Neurol..16(6):417-420,2006
- 6) Harada A, et al.: Interleukin 8 as a novel target for intervention therapy in acute inflammatory diseases. Mol.Med.Today.2:482-489,1996
- 7) Khabar K.S, et al.: The α Chemokine, Interleukin 8, Inhibits the Antiviral Action of Interferon α . J.Exp.Med..186:1077-1085, 1997

图1 IL-6 and IL-8 levels in cerebrospinal fluid from an SSPE patient, Case 1

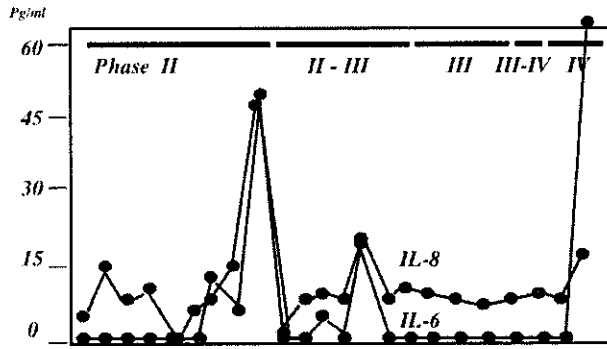


图2 IL-1 β levels in SSPE cerebrospinal fluids : All samples

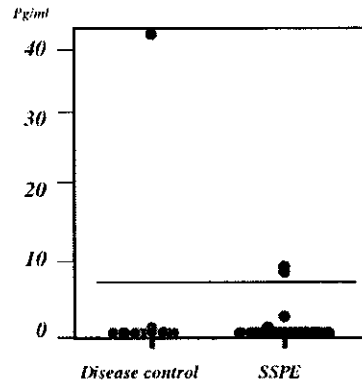


图3 IL-8 levels in SSPE cerebrospinal fluids: All samples

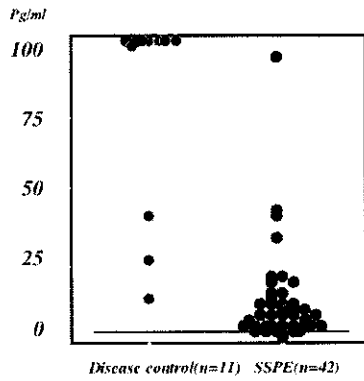


图4 IL-6 levels in SSPE cerebrospinal fluids : All samples

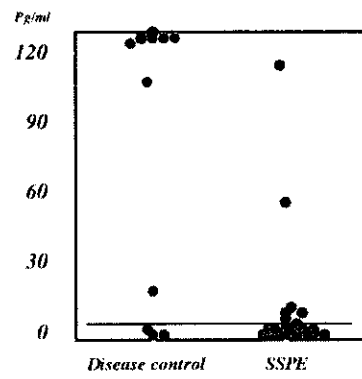
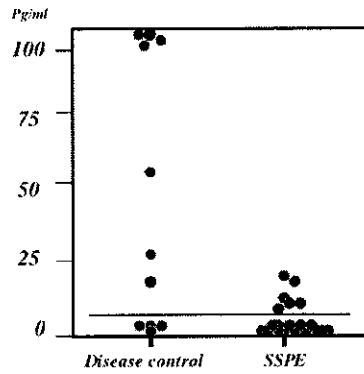


图5 IFN- γ levels in SSPE cerebrospinal fluids : All samples



亜急性硬化性全脳炎における髄液中抗 CD9 抗体の病的意義の検討

班 員: 二瓶建次(国立成育医療センター 神経科)

研究協力者: 清水透子(久留米大学小児科)

松石豊次郎(久留米大学小児科)

「研究要旨」

亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) は麻疹ウイルスによる遅発性ウイルス感染症であるが、その発症機序は十分に解明されていない。本研究では、ミエリン、神経組織に存在するされている CD9 抗原が傷害されているかを知る目的で、SSPE を含む種々の脱髄性疾患における髄液中の CD9 に対する抗体の有無を検索した。その結果、他の脱髄性疾患に比し SSPE において多くの例で、高い CD9 抗体が認められた。また、SSPE の進行とも関連していた。これらのことは、本現象が SSPE の障害発症の機序に関連している可能性が示唆された。

Elevated Cerebrospinal Fluid Levels of Anti-CD9 Antibodies in Patients with Subacute Sclerosing Panencephalitis.

Toko Shimizu,¹ Toyojiro Matsuishi,¹ Kenji Nihei²

1) Department of Pediatrics, School of Medicine, Kurume University,

2) Department of Neurology, National Center for Child Health and Development

Abstract

Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) is a slowly progressive and highly lethal disease of the central nervous system. Although the primary cause of SSPE is persistent infection of neuron and glial cells by a measles virus, the precise mechanism of the progression of this disease has not yet been elucidated. CD9, a member of the tetraspanin family, is expressed in myelin and other nervous tissues. This study showed that significant amounts of anti-CD9 antibodies were detected in the cerebrospinal fluid (CSF) of all SSPE patients. Anti-CD9 antibodies were also detected in the CSF of some cases of other neurological disorders including aseptic meningitis, progressive multifocal leukoencephalopathy and HIV encephalopathy, but these patients' levels were lower than patients with SSPE. The level of anti-CD9 antibodies was elevated and reached a peak coincidental with the appearance of brain atrophy. Present findings may give a new aspect for the etiology and progression of this disease.

[目的]

CD9 は膜 4 回貫通型の glycoprotein で血球系や非血球系の細胞に広く発現しており、細胞や細胞接着、細胞の遊走性に関与し、癌細胞の転移等に関係している。神経系では胎生期に交感神経に発現し、神経細胞の突起伸長を促し、出生後は中枢、末梢ともに主要な髄鞘蛋白の構成成分となる。そこで、脱髄を来す神経疾患に於いて CD9 の障害の有無を検討するため、髄液中の抗 CD9 抗体を測定した。

[対象、方法]

以下に示すような疾患群例 136 例でいずれもインフォームドコンセントの得られて髄液について検討した。抗原として、GST-CD9 と back ground 用に GST を用いた ELISA 法により検討した。陽性患者はすべて、Western blot 法により髄液中の抗 CD9 抗体を再確認した。神経感染症として、亜急性硬化性全脳炎 14 例、無菌性髄膜炎 25 例、サイトメガロウイルス脳炎 3 例、進行性多巣性白質脳症 4 例、HIV 脳症 7 例、日本脳炎 4 例、HTLV-1 associated myelopathy 3 例、脱髄性疾患として MS 14 例 (8 例 acute exacerbation phase, 6 chronic remitting condition) CIDP 4 例、ADEM 3 例、その他の神経変性疾患として Machado Joseph disease 3 例、ALS 7 例、先天性髄鞘形成不全症 3 例、脳腫瘍 3 例について検討した。さらに、CD9 が血球系の細胞にも発現していることから、血液疾患 21 例、についても検討した。また、自己抗体検出のため、自己免疫性疾患 18 例についても検討した。さらに、陽性であった疾患の剖検脳を免疫組織化学染色し、CD9 の発現を検討した。

[結果]

- 1) 患者髄液中の抗 CD9 抗体は SSPE 患者全例で上昇していた。これに対し、他の神経感染症や神経変性症では殆ど検出されなかった。さらに、脱髄性疾患でもその病期にかかわらず、髄液中の抗 CD9 抗体は殆ど検出されず、血液疾患や自己免疫疾患も髄液中抗 CD9 抗体は殆ど検出されなかった。Fig1
- 2) SSPE 患者髄液中の抗 CD9 抗体は SSPE 発症早期よりすでに高値をとっており、Jabbour の分類で stage 2-3 の脳萎縮が画像的に確認される以前か同時期にピークとなり、stage 4 の末期では減少してくることがわかった。Fig 2
- 3) SSPE の剖検脳において CD9 と MBP を免疫染色したところ、CD9 は脱髄巣のみならず、MBP が温存されているような比較的髄鞘が保たれている非脱髄巣でもその染色性が減少していた。さらに、CD9 に対しその染色性が低下している領域は麻疹ウィルスの存在領域と一致していた。

[考察]

SSPE は麻疹ウィルスによって起る slow virus infection で、致命的な疾患である。しかし、その発症機構や病態については殆ど分っていない。以前、SSPE の発症は麻疹ウィルスの構成成分である M 蛋白が変異した変異ウィルスによる感染であるといわれていたが、近年、一般の麻疹症状のみを呈した患者からもこの種の変異ウィルスが数多く分離され、SSPE の発症をウィルス側の因子だけで説明するのは困難になってきている。一方で麻疹ウィルスレセプターの一つである CD46 と CD9 が血球系の培養細胞において associate しており、互いに complex を形成しているとの報告がある。抗 CD9 抗体が SSPE 患者の髄液中に産生されるのは、麻疹レセプターである CD46 に結合した麻疹ウィルスと CD9 が近接しているために CD9 も抗原として認識されている可能性がある。

一方、T-cell 系の培養細胞に抗 CD9 抗体を投与したところ、アポトーシスをひきおこしたとの報告もあり、現在、我々は、神経系の培養細胞にて抗 CD9 抗体によるアポトーシスの誘導実験および、マウスに CD9 抗原を免疫し、それに対して、産生された抗 CD9 抗体の中樞神経系への影響を調べる実験を行なっている。

[結論]

SSPE の 14 例の髄液について CD9 抗体を検索した。他の脱髄生疾患に比し、SSPE では CD9 抗体が陽性に見られ、かつ高値であった。また、症状の進行とも関連していた。CD9 抗体は SSPE の症状発現と関連することが示唆された。

[参考文献]

- 1) 飛田里子、二瓶健次: 亜急性硬化性全脳炎 小児内科 vol. 28 No. 7, 1996-7
- 2) Schmidt C. et al. CD9 of mouse brain is implicated in neurite outgrowth and cell migration in vitro and is associated with the alpha6/ beta 1 integrin and the neural adhesion molecule L1. J. Neurosci. Res. 1996; 43: 12-31
- 3) Anton ES. et al. CD9 plays a role in Schwann cell migration in vitro. J. Neurosci. 1995; 15: 584-95
- 4) Nakamura Y. et al. Expression of CD9 in myelin of the central and peripheral nervous systems. Am.J. Pathol. 1996; 149:573-83
- 5) Lozahic S. et al. CD46 associates with multiple beta 1 integrins and tetraspans. Eur J. immunol. 2000; 30:900-7

[研究発表]

1 論文発表

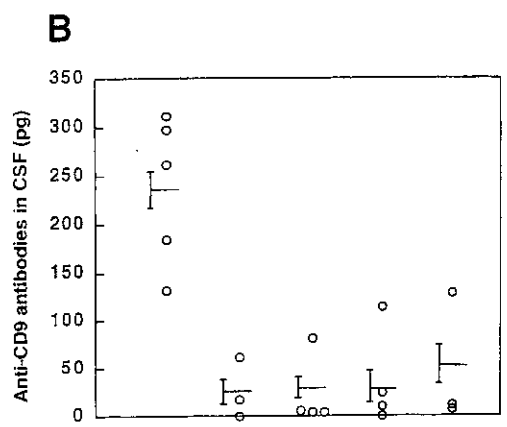
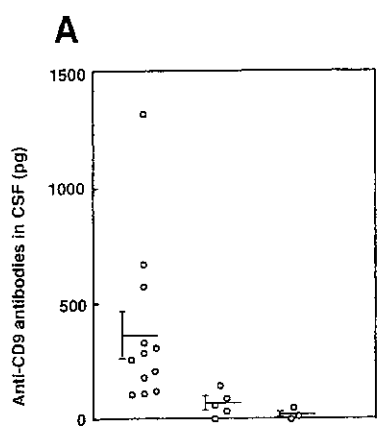
T.Shimizu et al: Elevated levels of anti-Cd9 antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with Subacute Sclerosing Panencephalitis. The Journal of Infectious Diseases. 185: 1346-50, 2002

2 学会発表

- 1) 清水透子他、SSPE 患者における髄液中抗 CD9 抗体の推移。第14回日本神経免疫学会総会 2002. March 東京
- 2) 清水透子他、髄液中抗 CD9 抗体の病的意義の検討。第43回日本神経学会総会 2002 May 札幌
- 3) T.Shimizu et al: Elevated levels of anti-Cd9 antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with Subacute Sclerosing Panencephalitis. The 7th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology. 2002 Sep. Beijing, China

[知的所有権の取得状況]

とくになし。



ヒト樹状細胞における麻疹ウイルスの増殖

野外流行株とワクチン株の質的差異

班 員：堀田 博（神戸大学・院医・微生物）
研究協力者：扇本 真治（ 同 ）
研究協力者：扇本 かおり（ 同 ）
研究協力者：伊藤 正恵（大阪府立公衆衛生研究所・ウイルス）

〔研究要旨〕

ヒト単球由来樹状細胞(Mo-DC)は麻疹ウイルスの主要な標的細胞であり、麻疹罹患に伴う免疫機能の低下や亜急性硬化性全脳炎(SSPE)の成立に関与している可能性が考えられている。今年度は、Mo-DC 及び末梢血リンパ球(PBL)における種々の麻疹ウイルス野外流行株とワクチン株の増殖を比較検討した。PHA 処理 PBL では、ワクチン株は野外流行株と同程度に増殖した。これに対して Mo-DC では、野外流行株は良好に増殖するが、ワクチン株ではウイルス蛋白の発現やウイルスゲノムの複製は野外流行株に比べて2～5倍強いにもかかわらず、感染性ウイルス粒子の産生・放出はほとんど認められなかった。すなわち、Mo-DC におけるワクチン株の感染は、ある段階までは野外流行株と同程度に進行するが、感染性ウイルス粒子の産生・放出の段階で阻害されていることが明らかになった。一方、野外流行株の Vero 細胞馴化株は PHA 処理 PBL と Mo-DC の両方で良好に増殖した。この Mo-DC における野外流行株とワクチン株の感染動態の質的差異が、両者の病原性の差異（麻疹症状、SSPE 発症）を規定している可能性が考えられた。

Measles virus replication in human dendritic cells

– Qualitative difference between field isolates and vaccine strains of measles virus –

Hak HOTTA¹, Shinji OHGIMOTO¹, Kaori OHGIMOTO¹, Masae ITOH²

Department of Microbiology, Kobe University Graduate School of Medicine¹

Division of Virology, Osaka Prefectural Institute of Public Health²

ABSTRACT

Human monocyte-derived dendritic cells (Mo-DC) are considered to be an important target for measles virus (MV) and infection of Mo-DC with MV is likely responsible for measles-associated immunosuppression and, possibly, establishment of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). In the present study we analyzed replication of various field isolates and vaccine strains of MV in Mo-DC and peripheral blood lymphocytes (PBL). In phytohemagglutinin (PHA)-treated PBL, both field isolates and vaccine strains replicated equally well to produce infectious progeny virus. In Mo-DC, however, the vaccine strains did not produce a detectable amount of infectious progeny virus although the field isolates, either fresh isolates or a Vero cell-adapted variant, clearly did. On the other hand, viral protein synthesis and viral genome replication of the vaccine strains in Mo-DC was approximately two- to five-times higher than that of the field isolates. These results collectively suggest that assembly and/or release of the virion of the vaccine strains is impaired in Mo-DC. The observed difference between the vaccine strains and field isolates might account for the difference

in the pathogenicity of MV, such as severity of the symptoms and immunosuppression, and development of SSPE.

【はじめに】

遅発性ウイルス感染症の一種である亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) は、麻疹ウイルスの変異株が中枢神経系に持続感染することによって引き起こされる。SSPE は麻疹罹患者 7~8 万人に 1 人程度の割合で¹⁾、平均約 7~9 年の潜伏期の後に発症する^{1,2)}。一方、麻疹ワクチン接種者が SSPE を発症する割合は自然感染の場合の約 1/10 程度であり、現行の弱毒生ワクチンの安全性の根拠のひとつになっている¹⁾。しかし、ワクチンに用いられるウイルス株がなぜ SSPE を引き起こしにくいのかについての明確な説明はなされていない。また、少数ながらワクチン接種後に SSPE を発症した場合には、その潜伏期は自然麻疹感染後の SSPE 発症に比べて有意に短縮されることが最近報告された³⁾。この潜伏期短縮の機序は不明であるが、麻疹ワクチン接種の安全性をより確実なものにするために、ワクチン株の性状とその弱毒化機序を明らかにしておく必要がある。

一方、近年、宿主の免疫応答における樹状細胞の重要性が注目されている。麻疹ウイルス感染においても明らかな免疫抑制のおこることが知られているが、この免疫抑制に樹状細胞が重要な役割を果たしている可能性が指摘されている⁴⁻⁶⁾。また、樹状細胞は、個体レベルでの麻疹ウイルス感染の初期段階における増殖の場としても重要な細胞である^{4,5)}。このような細胞でのウイルス増殖は、麻疹ウイルス感染の重症化、免疫機能の低下やそれに伴う感染の遷延化、ひいては SSPE の成立に関与している可能性が考えられる。従って、樹状細胞あるいはその他の免疫担当細胞におけるウイルス感染を解析することは、麻疹の発症病理を解明するうえで意義がある。

【目 的】

本研究では、種々の麻疹ウイルス野外流行株とワクチン株の、ヒト単球由来樹状細胞 (Mo-DC) 及び末梢血リンパ球 (PBL) での増殖を比較検討し、ワクチン株の弱毒化の機構の一端を解明することを目的とした。

【材料と方法】

1) 麻疹ウイルス：(1) 現行認可ワクチン (AIK-C、FF8) のワクチンバイアルのウイルスを、B95a 細胞で 1~2 回増殖させたものをワクチン株として用いた。野外流行株として、麻疹患者から B95a 細胞を用いて分離、継代したウイルス株 3 株 (Yonekawa、Fu/B、Ito) を用いた。野外流行株のうち Fu/B 株については Vero 細胞で 25 回継代し Vero 細胞馴化株 (Fu/Vero25) とした。用いたウイルス株を表 1 に示す。

2) 樹状細胞とリンパ球：Ficoll-Paque を用いて常法により、ヒト静脈血から末梢血単核球 (PBMC) を採取し、抗 CD3 抗体、抗 CD19 抗体及び抗 CD56 抗体で標識された磁気ビーズで T 細胞、B 細胞と NK 細胞を除去して、単球分画とした。この単球を GM-CSF (100 ng/ml) と IL-4 (100 ng/ml) 存在下で 1 週間培養し、樹状細胞 (Mo-DC) に分化させた (図 1)。また、PBMC から単球を主とするプラスチックデイッシュ付着細胞を除いたものを、末梢血リンパ球 (PBL) として用いた。

3) ウイルス感染実験：Mo-DC または PBL に種々の麻疹ウイルス株を感染させ、経日的に培養液及び細胞を回収し、以下の方法でウイルス感染の程度を解析した。PBL を用いた実験では、ウイルス吸着後に phytohemagglutinin (PHA) 存在下で培養した。ウイルス感染の測定は以下の 3 つの指標を用いて行った。感染性ウイルス粒子の産生は、B95a 細胞を用いた感染価 (TCID₅₀) により測定し⁷⁾、感染細胞及び培養液それぞれについて測定した。ウイルス蛋白合成は、麻疹ウイルス H 蛋白特異的単クローン抗体を用いた感染細胞の免疫蛍光法、フローサイトメトリー及び細胞抽出液のウエスタンブロット法により解析した。ウイルスゲノムの複製は、ウイルスゲノム RNA の 3' 末端リーダー配列を特異的に増幅する reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) により、半定量的に測定した。RT-PCR に用いたプライマーの塩基配列は 5'-ACCAAACAAAGTTGGGTAAG-3' (nt 1~20) と 5'-

GGTACCTCTTGATGCGAAGG-3' (nt 470~451)である。

(倫理面への配慮)

麻疹ウイルス野外流行株は以前に患児の保護者の同意のうえで得られたものを用いており、倫理的な問題点はない。樹状細胞とリンパ球は協力研究者あるいは当研究室の研究者から同意を得て採取しており、倫理的問題点はない。なお、ウイルス感染実験は微生物学研究室においてバイオセーフティ一指針に準拠して行った。

【結 果】

1) PHA 処理 PBL では、野外流行株、ワクチン株とも同程度に、良好なウイルス増殖がみられ、感染性ウイルスの産生・放出が認められた (図 2)。

2) Mo-DC では、野外流行株は良好に増殖し、感染性ウイルス粒子の産生が認められた。一方、ワクチン株では、感染性ウイルス粒子の産生・放出はほとんど認められなかった (図 3)。しかしながら、ワクチン株による Mo-DC の細胞変性効果は感染 2 日後には顕著に認められ、野外流行株による細胞変性効果の誘導より 1 日程度早かった (図 4)。また、Mo-DC におけるウイルス H 蛋白の発現及びウイルスゲノムの複製は、ワクチン株のほうが野外流行株より 2~5 倍程度高かった (図 5)

3) 野外流行株の Vero 細胞馴化株は、PHA 処理 PBL と Mo-DC の両方で良好に増殖し、感染性ウイルスの産生・放出が認められた (図 6)。

【考 察】

Mo-DC における麻疹ウイルスワクチン株の感染は、ある段階までは野外流行株と同程度に進行するが、感染性ウイルス粒子の産生・放出には至らないことが明らかになった。この Mo-DC における野外流行株とワクチン株の感染動態の質的差異が、両者の病原性の差異 (麻疹症状、免疫抑制、SSPE 発症) を規定している可能性が考えられる。私達が知る限り麻疹ウイルス野外流行株が良好に増殖しワクチン株が野外流行株に比較して非常に増殖が悪い細胞培養系は今まで報告されていない。樹状細胞でのワクチン株と野外流行株の増殖の違いと病原性の違いの関係は非常に興味深い。この感染動態の差異を分子レベル、遺伝子レベルで明らかにすることが今後の検討課題である。一方、B95a 細胞で分離した野外流行株の Vero 細胞への馴化は、Mo-DC 及び PBL での増殖に影響を与えないと考えられた。ワクチン株はニワトリ線維芽細胞で継代・馴化されており、その過程で、Vero 細胞への馴化とは異なる変異が導入されたものと思われる。

【結 論】

Mo-DC における麻疹ウイルスワクチン株の感染は、ある段階までは野外流行株と同程度に進行するが、感染性ウイルス粒子の産生・放出の段階で阻害されていることがわかった。この Mo-DC における野外流行株とワクチン株の感染動態の質的差異が、両者の病原性の差異 (麻疹症状、SSPE 発症) を規定している可能性が考えられた。

【参考文献】

- 1) Okuno, Y., Nakao, T., Ishida, N., Konno, T., Mizutani, H., Fukuyama, Y., Sato, T., Isomura, S., Ueda, S., Kitamura, I., et al.: Incidence of subacute sclerosing panencephalitis following measles and measles vaccination in Japan. *Int. J. Epidemiol.* 18:684-689, 1989
- 2) 中村好一、二瓶健次、飯沼一字、岡英次、北本哲之：臨床調査個人票からみた亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) の疫学像。厚生省特定疾患「遅発性ウイルス感染」調査研究班、(班長 北本哲之) 平成 13 年度研究報告書：59-64, 2002
- 3) 二瓶健次、越智友子：亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) の生存例の検討。厚生省特定疾患「遅発性ウ

イルス感染」調査研究班、(班長 北本哲之)平成10年度研究報告書:52-56,1999

- 4) Grosjean, I., Caux, C., Bella, C., Berger, I., Wild, F., Banchereau, J., and Kaiserlian, D.: Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 186:801-812, 1997
- 5) Fugier-Vivier, I., Servet-Delprat, C., Rivaller, P., Rissoan, M. C., Liu, Y.-J., and Rabourdin-Combe, C.: Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J. Exp. Med.* 186:813-823, 1997
- 6) Dubois, B., Lamy, P. J., Chemin, K., Lachaux, A., and Kaiserlian, D.: Measles virus exploits dendritic cells to suppress CD4+ T-cell proliferation via expression of surface viral glycoproteins independently of T-cell trans-infection. *Cell. Immunol.* 214:173-183, 2001
- 7) Shibahara, K., Hotta, H., Katayama, Y., and Homma, M.: Increased binding activity of measles virus to monkey red blood cells after long-term passage in Vero cell cultures. *J. Gen. Virol.* 75:3511-3516, 1994

〔研究発表〕

1. 論文発表

- 1) Itoh, M., Okuno, Y., and Hotta, H.: Comparative analysis of serum antibody titers against measles virus in vaccinated and naturally infected Japanese individuals of different age groups. *J. Clin. Microbiol.* 40:1733-1738, 2002
- 2) Anlar, B., Ayhan, A., Hotta, H., Itoh, M., Engin, D., Barun, S., and Koseoglu, O.: Measles virus RNA in tonsils of asymptomatic children. *J. Paediatr. Child Health*, 38:424-425, 2002
- 3) Ohgimoto, S., Ohgimoto, K., Itoh, M., Ihara, T., and Hotta, H.: Viral assembly and/or release of vaccine strains, but not field isolates, of measles virus is impaired in cultured human dendritic cells. (in preparation)

2. 学会発表

- 1) 扇本真治、扇本かおり、庵原俊昭、堀田博:麻疹ウイルスワクチン株と野生株の免疫担当細胞での増殖の比較、第50回日本ウイルス学会学術集会(札幌)、2002年

表1 実験に用いた麻疹ウイルス株

ワクチン株	野外流行株	Vero馴化株
AIK-C FF-8	Yonekawa Fu/B Ito	Fu/Vero25

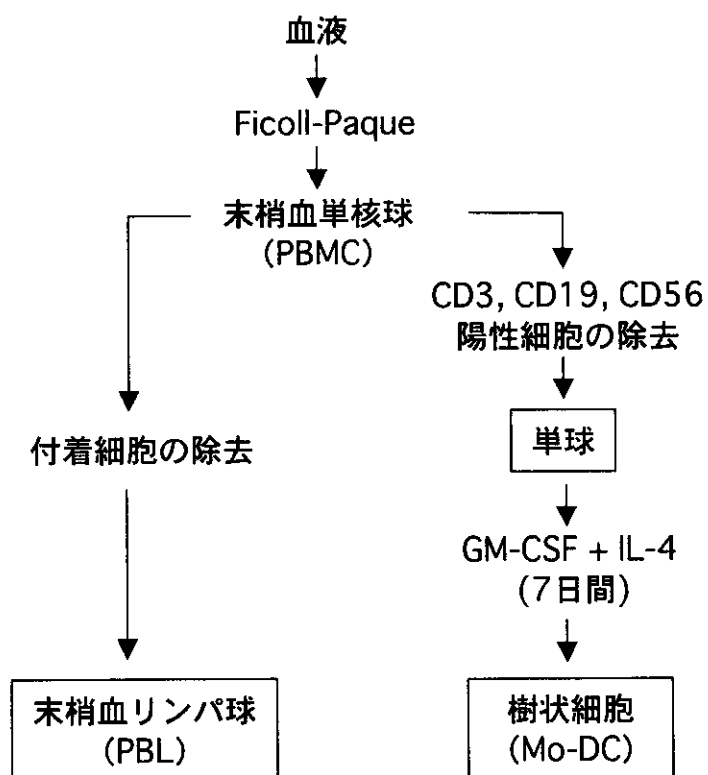


図1 ヒト末梢血リンパ球および樹状細胞の採取

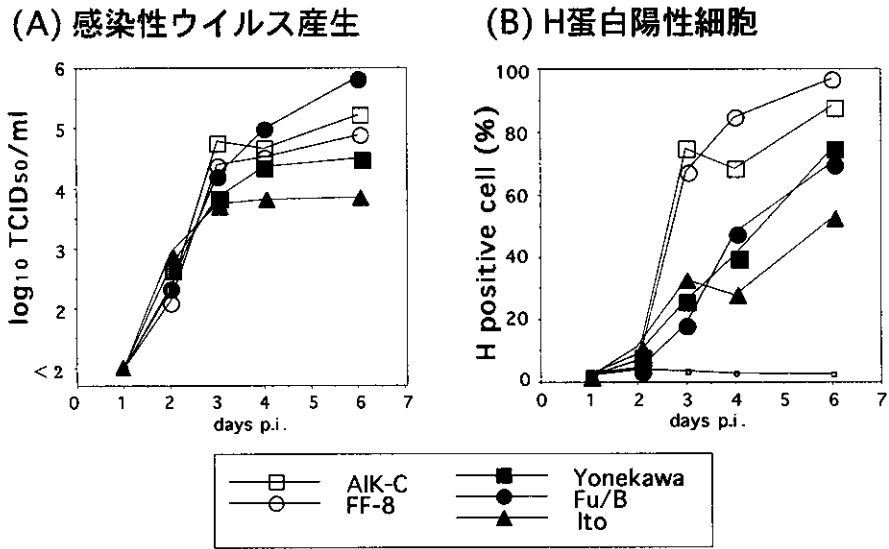


図2 PBLにおいてはワクチン株、野外株共に良好に増殖する

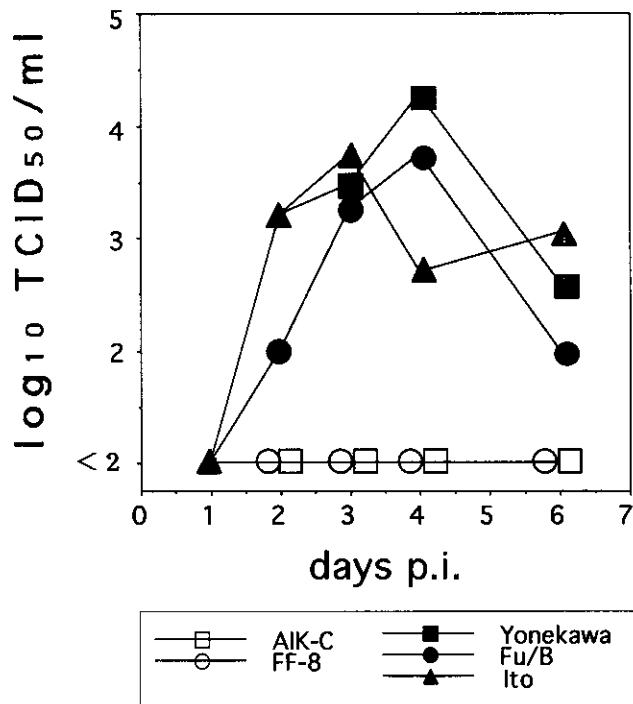


図3 Mo-DCにおけるワクチン株と野外株の感染性ウイルス産生

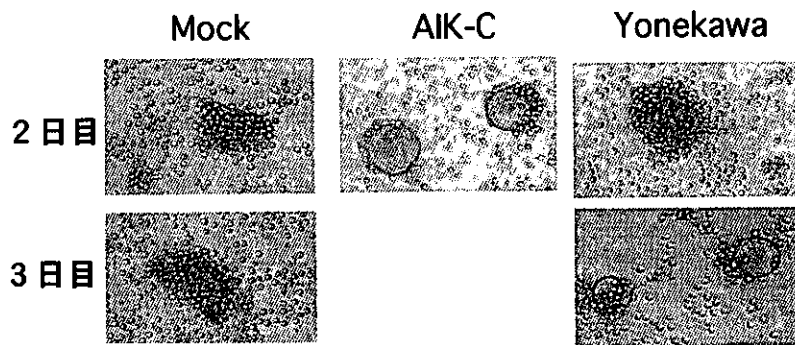
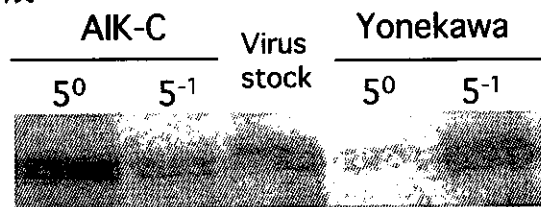


図4 ワクチン株と野外株によるMo-DCの細胞変性効果

(A) H蛋白合成



(B) ウイルスゲノム複製

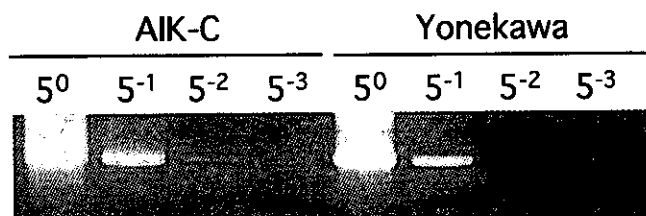


図5 Mo-DCにおけるウイルス蛋白合成とウイルスゲノム複製