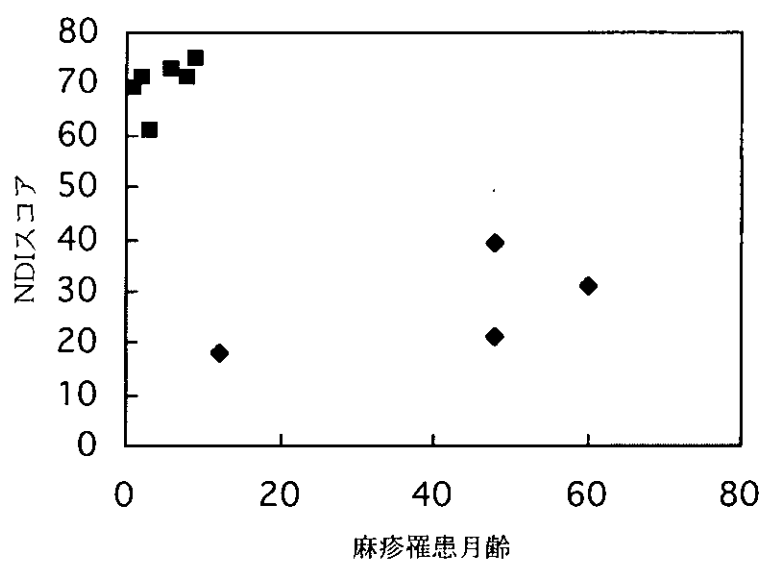


表 1. 各患者のプロフィールと病期・NDI スコアの変化

症例 No.	性別	発症年齢	診断時			リハビリ開始時			調査時		
			罹病期間	病期	NDI スコア	罹病期間	病期	NDI スコア	罹病期間	病期	NDI スコア
1	女	11y9m	1m	I		1y8m	II	36	5y	I	21
2	男	12y11m	6m	II	25	1y9m	III~IV	75	5y3m	III~IV	75
3	女	4y1m	7m	III		1y11m	III	79	4y8m	III	74
4	男	1y6m	4y	III	77	5y10m	III		6y9m	III	73
5	女	13y	7m	II	34	2y7m	II	38	4y2m	II	31
6	女	10y8m	6m	II	12	1y6m	II	25	2y1m	I	18
7	男	3y4m	2m	II	22	5m	II	45	1y11m	III	69
8	女	4y4m	1m	II	49	2m	III	71	4m	III	71
9	男	10y4m	1m	II	10	2m	II	33	8m	II	61
10	女	8y0m	8m	II	42	8m	III	74	1y3m	III	71
11	男	12y2m	1m	II		5y7m	II	38	5y9m	II	39

図 1. 臨床症状スコアと麻疹罹患月齢



SSPE に対するリバビリン脳室内投与療法

班 員：細矢 光亮（福島県立医科大学・医・小児科）

【研究要旨】

これまでリバビリン脳室内投与療法を行った施設の担当医が集まり詳細な症例検討を行い、本療法の有効性と問題点を検討した。その結果、Jabbour の分類でⅡ期に治療を開始した場合には臨床症状に明らかな改善が認められたが、Ⅲ期に治療を開始した場合には髄液中麻疹抗体価が低下しても病期が改善するほどの効果は見られなかった。また、治療開始前に急速に症状が進行した症例ではその進行を阻止することができず、臨床的な効果は認められなかった。リバビリン脳室内投与療法には重大な副作用はなく、特に病期の早い時期に治療を開始した症例では臨床の有効性が確認された。従って、SSPE を早期に診断し可塑性のある時期に治療を開始することが、予後の改善につながると思われる。

Intraventricular ribavirin therapy for subacute sclerosing panencephalitis (SSPE)

Mitsuaki HOSOYA

Department of Pediatrics, Fukushima Medical University School of Medicine

ABSTRACT

In order to investigate the efficacy and problems of intraventricular ribavirin therapy for subacute sclerosing panencephalitis (SSPE), physicians in charge of those SSPE patients gathered and discussed on the therapy. Significant improvements in clinical symptoms were observed when the therapy was started at an early stage of the illness (stage II SSPE under Jabbours classification). Although anti-measles antibody titers inCSF decreased, significant efficacy was not observed when the therapy was started at stage III SSPE or later. The therapy could not modify the clinical course of SSPE patients whose condition deteriorated rapidly before starting intraventricular ribavirin therapy. We observed no serious side effects attributed to the therapy and significant efficacy when the therapy was started at an early stage of the illness. Definite diagnosis of SSPE and start of intraventricular ribavirin therapy at an early stage may improve the prognosis.

【はじめに】

亜急性硬化性全脳炎（SSPE）は、麻疹ウイルス変異株、いわゆる SSPE ウイルスによる中枢神経系のスローウイルス感染症である。麻疹感染後おおよそ 2-10 年の潜伏期の後に発症し、いったん発症後は進行性に増悪し、高度の痴呆、植物状態となり死に至る。これまで各種の薬剤が試みられているが、有効性が証明されているのは inosiplex と IFN のみである。しかし、その効果も確実とはいえず、全く無反応の例も少なからず存在し、また有効と思われた例においても、長期的予後は思わしくない。リバビリンは、組織培養¹⁾ やハムスターを用いた動物実験^{2), 3)} において、麻疹ウイルスや SSPE ウイルスの増殖を抑制する。静注療法では髄液中リバビリン濃度が 50%有効濃度 (5-10 μ g/ml) に達し、これを繰り返すことで臨床的効果が観察される^{4), 5)} が、治療を中止すると再燃する。脳室内投与では髄液中リバビリン濃度は容易に目標濃度 (50-200 μ g/ml) に達し、急性の重篤な副反応は認めず⁶⁾、少数例ではあるが臨床の有効性が報告されている。これまでのところ確実な治療法のない SSPE に対し、リバビリン脳室内投与療法は新たな治療法として期待される。しかし、その投与方法は確立していない。

【目的】

亜急性硬化性全脳炎（SSPE）に対して、広く RNA ウイルスに有効なリバビリンの脳室内投与療法を全国の施設において試みている。これまで、その有効性や副反応をアンケートにより調査してきたが、詳細な検討は困難であった。そこで、同療法を行った施設の担当医が集まり詳細な症例検討を行い、リバビリン脳室内投与療法の有効性と問題点を検討し、有効な治療法の確立を目指して、新たな治療プロトコールを作成することを目的とした。

【材料と方法】

これまでリバビリン脳室内投与療法を行った施設および症例は、12 施設における 13 症例である。いずれも各所属施設の倫理委員会の承認を得た後に、患者及び家族の同意を得て治療を開始した。そのうちの 9 施設、10 症例の担当医が集まり、各症例に関する詳細な検討を行った。

検討した主な課題は、1) 安全性および副反応、2) 有効性とその評価方法、3) 治療上の問題点とその対策、である。

その結果を基に、プロトコールの改定案を作成した。

（倫理面への配慮）

リバビリン脳室内投与療法は試験的な治療方法であるため、実施するにあたってはそれぞれの施設における倫理委員会の承認を得た。また、患者家族に対しては、リバビリンは組織培養や動物実験では SSPE に対する増殖抑制効果が証明されているが、ヒトの SSPE に対する治療薬としては承認されていないこと、リバビリン脳室内投与療法は試験的な治療方法であること、期待される効果は病状の進行を止めるものであり、病期が改善するほどの効果は望めないこと、急性の重篤な副作用は今のところ報告されていないが、長期的な副反応は不明であること、などに関し十分に説明した。その上で紙面による承諾書を得て、治療を開始した。

【結果】（表 1, 2）

臨床症状から有効性を検討した場合、Jabbour の分類でⅡ期に開始したものとⅢ期で開始したもので大きく異なった。すなわち、Ⅱ期で開始した場合（症例 1-3）には、臨床症状に明らかな改善が認められた。Ⅲ期に治療を開始した場合（症例 4-6）には、症状に何らかの改善が見られ、髄液中麻疹抗体価が低下したが、病期が改善するほどの効果は見られなかった。治療開始前に急速に症状が進行した症例（症例 7-10）では、その進行を阻止することができず、臨床的な効果は無いと判断された。

問題点としては、1) SSPE の発症から診断にいたるまでに数ヶ月を要した例があること、2) 倫理委員会の承認を得るまでに時間を要する例があること、3) リバビリンの入手が不安定なこと、4) リバビリン濃度測定に時間と費用を要すること、5) 有効性の評価に客観的な指標が少ないこと、などが挙げられた。

【考察】

リバビリン脳室内投与療法には重大な副作用はなく、少なくとも一部の症例において、特に病期の早い時期に治療を開始した症例では、臨床的有効性が確認された。リバビリンはウイルスの増殖を抑制する薬剤であり、症状の進行を阻止するが、神経の再生を促す薬剤ではない。従って、SSPE を早期に診断し、可塑性のある時期に治療を開始することが、予後の改善につながると思われた。

以上の結果を基に、倫理委員会の早期承認、リバビリンの安定的入手、治療開始後早期の有効濃度への到達を目指し、プロトコールを改定した。今後は、SSPE の早期診断と治療効果の客観的判定方法の検討が必要と思われた。

【結論】

リバビリン脳室内投与療法は重篤な副作用はなく、早期に治療を開始した場合には SSPE に対し臨床的効果が期待される。今後は、早期に SSPE を診断し、早期に治療を開始することによって、リバビリン療法

の有効性を検討する必要がある。

[参考文献]

- 1) Mitsuaki Hosoya, Shiro Shigeta, Kiyoto Nakamura, and Erik De Clercq : Inhibitory effect of selected antiviral compounds on measles (SSPE) virus replication in vitro. *Antiviral Research*. 12 : 87-98, 1989.
- 2) Yoshinobu Honda, Mitsuaki Hosoya, Shuichi Mori, Shiro Shigeta, and Hitoshi Suzuki : Effect of Ribavirin on Subacute Sclerosing Panencephalitis Virus Infections in Hamsters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 38(4) : 653-655, 1994.
- 3) Takanori Ishii, Mitsuaki Hosoya, Shuichi Mori, Shiro Shigeta, and Hitoshi Suzuki : Effective Ribavirin Concentration in Hamster Brains for Antiviral Chemotherapy for Subacute Sclerosing Panencephalitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40(1) : 241-243, 1996.
- 4) Akemi Tomoda, Seiji Shiraishi, Mitsuaki Hosoya, Akinobu Hamada, and Teruhisa Miike : Combined Treatment with Interferon-Alpha and Ribavirin for Subacute Sclerosing Panencephalitis. *Pediatric Neurology*. 24(1) : 54-59, 2001.
- 5) Mitsuaki Hosoya, Shiro Shigeta, Shuichi Mori, Akemi Tomoda, Seiji Shiraishi, Teruhisa Miike, and Hitoshi Suzuki : High-Dose Intravenous Ribavirin Therapy for Subacute Sclerosing Panencephalitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45(3) : 943-945, 2001.

[研究発表]

1. 論文発表

- 1) Mitsuaki Hosoya : Ribavirin therapy for subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). *Recent. Res.Devel Antimicrob. Agents & Chemother*. 5 : 45-60, 2002.
- 2) Akemi Tomoda, Keiko Nomura, Seiji Shiraishi, Akinobu Hamada, Takafumi Ohmura, Mitsuaki Hosoya, Teruhisa Miike, Yukio Sawaishi, Hiroshi Kimura, Hiroshi Takashima, Yoshihiro Tohda, Kenji Mori, Zenichiro Kato, Ai Fukushima, Hisanori Nishio, Akio Nezu, and Kenji Nihei : Trial of intraventricular ribavirin therapy for subacute sclerosing panencephalitis in Japan. *Brain & Development*. 27 : 514-517, 2003.
- 3) Shinya Hara, Hiroshi Kimura, Yo Hoshino, Naomi Hayashi, Tamiko Negoro, Akihisa Okumura, Yasuichi Kajita, Takashi Sakuma, Tersuo Nakayama, Mitsuaki Hosoya, Akemi Tomoda, Tsuneo Morishima : Combination therapy with intraventricular interferon- α and ribavirin for subacute sclerosing panencephalitis and monitoring measles virus RNA by quantitative PCR assay. *Brain & Development*. 25 : 367-369, 2003.
- 4) 友田明美, 野村恵子, 白石晴士, 三池輝久, 濱田哲暢, 細矢光亮 : 亜急性硬化性全脳炎に対する ribavirin 併用療法に関する全国調査. *脳と発達*. 35(4) : 321-326, 2003.
- 5) 細矢光亮 : 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) に対する新しい治療. *Medical Briefs in Virus Infection*. 16(1) : 12-13, 2003.
- 6) 細矢光亮 : 亜急性硬化性全脳炎の発症要因. *日本医事新報*. 4107 : 126-127, 2003.

2. 学会発表

- 1) 細矢光亮 : 亜急性硬化性全脳炎に対するリバビリン脳室内投与療法. 第 8 回日本神経感染症学会 学術集会 (宇部市), 2003.

[知的所有権の取得状況]

なし

図 1. SSPE 10 症例のプロフィール

症例	施設	性別	出生	麻疹罹患	初発時			SSPE 診断時				
					症状	時期	診断	診断時期	発症から 診断まで	麻疹抗体 髄液HI	病期 Jabbour	症状スコア NDI
1	熊本	F	1987年	1991年 (3歳)	動作遅慢	1998年11月 (11歳)	てんかん	1998年12月	1ヶ月	16倍	II期	
2	岐阜	F	1986年	1991年 (5歳)	物を落とす	1999年11月 (13歳)	てんかん	2000年2月	3ヶ月	16倍	II期	30
3	宮崎	F	1991年	1992年 (1歳)	脱力、上肢の振るえ	2001年10月 (10歳)	てんかん	2002年4月	6ヶ月	64倍	I期	12
4	熊本	M	1985年	1986年 (9ヶ月)	計算違い	1998年 8月 (13歳)	てんかん	1999年2月	6ヶ月	8倍	II期	
5	秋田	F	1995年		脱力発作	1994年 4月 (4歳)		1999年9月	5ヶ月	16倍	III期	
6	愛媛	M	1985年	1989年 (4歳)	尿失禁、構音障害	1998年 3月 (12歳)		1998年4月	1ヶ月	4倍	II期	
7	名古屋		1990年	1991年 (1歳)	学力低下	2000年12月 (11歳)		2001年6月	6ヶ月	8倍	II期	
8	神奈川	M	1998年	1998年 (2ヶ月)	脱力発作	2001年12月 (3歳)		2002年2月	2ヶ月	16倍	I期	22
9	大阪	F	1994年	1995年 (8ヶ月)	学力低下、性格変化	2002年 8月 (8歳)	てんかん	2003年4月	8ヶ月	32倍	I期	16
10	新潟	M	1992年	1993年 (3ヶ月)	脱力発作	2003年 2月 (10歳)	てんかん	2003年4月	2ヶ月	16倍	I期	10

図 2. リバピリン脳室内投与療法の効果

症例	IFN療法開始時				リバピリン治療開始時					リバピリン治療後				有効性			
	時期	麻疹抗体 髄液HI	病期 Jabbour	症状スコア NDI	時期	麻疹抗体 髄液HI	病期 Jabbour	症状スコア NDI	診断からリバ ピリン治療まで	時期	麻疹抗体 髄液HI	病期 Jabbour	症状スコア NDI	麻疹抗体	病期	症状スコア	主治医
1	1998年12月	16倍	II期	34	1999年8月	16倍	II期	30	8ヶ月	2002年2月	<4倍	I期	21	あり	あり	あり	あり
2	2000年10月	32倍	II期	32	2002年4月	32倍	II期	41	2ヶ月	2003年11月	8倍	II期	31	あり	なし	あり	あり
3	2002年5月	128倍	II期	32	2002年5月	128倍	II期	32	1ヶ月	2003年11月	64倍	I期	18	なし	あり	あり	あり
4	1998年3月	32倍	II期		1999年8月	124倍	III-IV期	79	6ヶ月	2003年2月	8倍	III-IV期	75	あり	なし	あり	あり
5	1999年11月	16倍	III期		2000年12月	16倍	III-IV期		15ヶ月	2003年10月	<1倍	III-IV期		あり	なし	なし	あり
6	1998年5月	16倍	II期		2003年9月	128倍	II期	38	65ヶ月	2003年12月	32倍	II期	39	あり	なし	なし	あり
7	2001年7月		III期	64	2001年8月	1倍	III期	68	2ヶ月	2001年12月	8倍	III-IV期	76	なし	なし	なし	なし
8	2002年2月	16倍	II期	45	2002年5月	16倍	III期	69	3ヶ月	2003年7月	4-8倍	III期	69	なし	なし	なし	なし
9	2002年4月		III期	49	2002年5月		III期	74	1ヶ月	2003年10月		III期	69	不明	なし	あり	なし
10	2003年4月	16倍	II期	33	2003年6月	16倍	II期	45	2ヶ月	2003年6月	4倍	III期	61	あり	なし	なし	なし

SSPE における宿主側遺伝要因の解析

班研究協力者： 楠原 浩一（九州大学・大学院医・成長発達医学）
吉良 龍太郎（九州大学・大学院医・成長発達医学）
原 寿郎（九州大学・大学院医・成長発達医学）

〔研究要旨〕

SSPE は麻疹ウイルス(MV)による進行性の中枢神経感染症である。その発症機序には不明な点が多いが、ウイルス側要因と宿主側要因の双方が関与していると考えられる。我々は、SSPE の宿主側遺伝要因を明らかにするために、(1) MV の細胞レセプター [CD46, signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)]、(2) 抗ウイルス蛋白 [MxA]、(3) T helper (Th)1 および Th2 サイトカインとそれらに関連した分子 [IFN- γ , IFN- γ receptor1 (INF- γ R1), IFN- γ R2, interferon regulatory factor-1 (IRF-1), IL-12R β 1, IL-4, IL-4R, IL-10]、の各遺伝子の多型と日本人の SSPE との関連を association study により検討した。MV receptor の遺伝子と SSPE との関連はみとめられなかったが、MV に対する免疫に関わる遺伝子の中に SSPE と関連しているものが見出された。innate immunity については、*MxA* promoter -88G/T 多型の解析にて、T allele と T/T homozygote の頻度が SSPE 群で有意に高く、また、機能解析では -88 T allele が G allele より高い転写活性を示した。この結果より、-88G/T 多型が *MxA* の発現制御を介して SSPE の発症に寄与している可能性が示唆された。adaptive immunity については、*IL-4* -590 C/T 多型の T allele と少なくとも一つの interferon regulatory factor-1 (*IRF-1*) (GT)_n repeat 多型 allele 1 を持つ頻度は SSPE 群で有意に高く、Th2 優位に関連するこの 2 つの機能的多型が SSPE の発症に寄与している可能性が示唆された。以上の結果は、これらの機能的多型が、日本人における SSPE の疾患感受性を規定する宿主側遺伝要因であることを示唆している。

Genetic analyses of SSPE patients

Koichi KUSUHARA, Ryutaro KIRA, Toshiro HARA

Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

ABSTRACT

Although the exact pathogenesis of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) remains to be determined, both viral and host factors seem to be involved. To identify host genetic factors involved in the development of SSPE, we investigated the association of polymorphisms in the following candidate genes with SSPE in Japanese subjects: measles virus receptor genes (CD46 and signaling lymphocyte activation molecule [SLAM]), gene of an anti-viral protein, *MxA*, T helper (Th)1 and Th2 cytokine and related genes (interferon [IFN]-gamma, IFN-gamma receptor 1 [IFN-gamma R1], IFN-gamma R2, interferon regulatory factor-1 [IRF-1], interleukin 12 receptor beta 1 [IL-12Rbeta1], IL-4, IL-4R and IL-10 genes). Among the polymorphisms tested, the -88T allele and the T/T homozygote of the promoter region of *MxA* and the -589 T allele of the promoter region of *IL-4* showed significant association with SSPE. The frequency of the genotype combination of *IL-4* promoter -589 T and *IRF-1* allele 1 (at least 1 allele) in patients with SSPE was much higher than that in the controls. A dual luciferase assay demonstrated that the interferon-induced upregulation of *MxA* promoter activity of the sequence with -88T and -123C was significantly higher than that of the sequence with -88G and -123C. These results suggested that the functional polymorphism at *MxA* promoter -88 and *IL-4* promoter -589 T gene polymorphism with increased IL-4 synthesis in combination with *IRF-1* allele 1 confer host genetic susceptibility to SSPE in Japanese.

〔はじめに〕

SSPE は麻疹ウイルス(MV)による中枢神経感染症の 1 つであり、麻疹罹患時に体内に侵入した MV が免疫系からの排除を逃れ、中枢神経系で持続感染を起こすことによって発症する。その正確な病因は未だ解明されていないが、発症要因としてウイルス側因子と宿主側因子が知られている(図 1)。

SSPE の発症に宿主側要因が関与していることを示唆する事実として、まず、2 歳未満での麻疹罹患では SSPE の発症リスクが高いことが知られている¹⁾。これは MV 初感染時の免疫系および中枢神経系の未熟性が SSPE の発症につながりやすいことを意味していると考えられる。また、SSPE の発症率に性差がみられること²⁾ や、自然寛解例の存在、治療薬として IFN- α 、 β などの免疫調節物質が有効な症例があることなども宿主側要因の関与を支持している。一方、SSPE 患者の免疫学的検討では、血清および髄液中の抗 MV 抗体価が高値であることや、中枢神経系だけでなく末梢血単核球にも持続感染が成立することが報告されている^{3,4)}。しかし、これまでに種々の免疫異常が報告されているものの、普遍的異常は未だ確立されていない。

〔目 的〕

SSPE 発症の宿主側要因を解明するために、1)MV 感染の初期段階に関与する MV の細胞レセプター、2)MV

に対する innate immunity に関わる分子、3)MV に対する adaptive immunity に関わる分子について遺伝子解析を行った。

〔材料と方法〕

1. 対象

SSPE 青空の会（親の会）の協力により採血可能であった日本人の SSPE 患者 40 例および正常な日本人 100 例を対象とした。文書により同意を得た上で末梢血より genomic DNA、mRNA を抽出した。

2. 方法

1)MV の細胞レセプターの多型解析

末梢血単核球から抽出した mRNA を鋳型にして cDNA を合成した後、CD46 および SLAM のウイルス結合部位とその 5'側の翻訳領域を semi-nested PCR により増幅し、direct sequencing によって塩基配列を決定した。SLAM exon 1 33C/A の頻度は genomic DNA を鋳型にして exon 1 内に設定した primer と制限酵素 *DdeI* を用いた PCR-RFLP を行って決定した。

2)抗ウイルス蛋白 MxA の多型解析と機能解析

NCBI Nucleotide より得た塩基配列情報(X55639)をもとに、プライマーを設定し、MxA のプロモーター領域を PCR 法で増幅した。Direct sequence 法によりその塩基配列上の一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP) を検索し、その SNP に対し、制限酵素断片長多型 (restriction fragment length polymorphism: RFLP) 法を用いて、SSPE 群および対照群の遺伝子型を決定した。MxA-88G/T 多型及び-123C/A 多型の遺伝子型を決定した対照群から -88TT と-123AA を有する者、-88GG と-123CC を有する者、-88TT と-123CC を有する者を選び、それぞれ末梢血から抽出した DNA を用いて、両多型を含む 540bp の MxA プロモーター領域を PCR 法でクローニングした。そして、この 3 種類のハプロタイプを有する遺伝子断片 (-88T&-123A, -88G&-123C, -88T&-123C) をそれぞれホタルルシフェラーゼ発現プラスミド (pGL3-Basic Vector, Promega) に組み込み、ウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミド (pRL-TK, Promega) とともに HeLa 細胞に LipofectAMINE PLUS Reagent (GIBCO-BRL) を用いて遺伝子導入を行った。導入後、IFN- α を 1000IU/ml となるように培養液に加え、24 時間後、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて、細胞内に発現しているルシフェラーゼの酵素活性を測定した。

3)Th1 および Th2 サイトカインとそれらに関連した分子の多型解析

Th1 サイトカイン関連遺伝子多型として IFN- γ CA repeat、IFN- γ receptor 1 (IFNGR1) codon 14 Val/Met、IFN- γ receptor 2 (IFNGR2) codon 64 Gln/Arg、IFN regulatory factor (IRF)-1 GT repeat、Th2 サイトカイン関連遺伝子多型として IL-4 promoter -589 C/T、IL-4 receptor α chain (IL-4R) codon 50 Ile/Val、IL-10 promoter -627 C/A、さらに Th1 誘導サイトカイン多型として IL-12 receptor β 1 chain (IL-12RB1) codon 214 Gln/Arg, 365 Met/Thr, 378 Gln/Arg について、PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP)法、PCR- single-strand conformation polymorphism (SSCP)、allele-specific PCR (ASPCR)法、allele-specific amplification method with TaqMan fluorogenic probe (TaqMan-ASA)法などを用いて遺伝子型を決定した。

（倫理面への配慮）

本研究における遺伝子解析は患者あるいは保護者の文書による同意を得て行い、また、九州大学遺伝子解析倫理委員会の承認を受けている。

〔結 果〕

1)MV の細胞レセプターの多型解析

CD46 の MV 結合部位である SCR-1,2 をコードする exon2 から 4 を含む翻訳領域を解析し、3 つの 1 塩基多型 (C/T38, G/A176, C/T453)を見出した。前 2 者はアミノ酸置換を伴っていたが、MV 結合部位に存在するものは G/A176 のみであった。この 3 つの多型の頻度を SSPE 群と正常対照群で比較したが、両群間で特に差はみられなかった。SLAM については、MV 結合部位である V domain を含む細胞外領域をコードする exon1-3 を direct sequencing で解析した。exon 1 の多型については、*DdeI* による RFLP で多数検体を調べた。SSPE20 例の direct sequencing では、leader sequence の 33C/A 多型を認めたのみで、細胞外領域をコードする領域には塩基の変化をみとめなかった。また、33C/T 多型の頻度を SSPE 群と正常対照群で比較したが、両群間で特に差はみとめられなかった。

2)抗ウイルス蛋白 MxA の多型解析と機能解析

i) 多型解析

MxA プロモーター領域に、既に報告されている SNP に加えて、新たに-123C/A 多型を確認した。MxA プロモーター領域における-88G/T において SSPE 群では T allele の頻度が対照群に比べて有意に高く ($p=0.008$)、TT のホモ接合者の割合が有意に高い ($P=0.003$) ことが示された(表 1)。-123C/A と-88G/T の間で連鎖不平衡を認めたが、-123C/A 多型の解析では両群の間に有意な差は認められなかった。正常対照者において-123C/A と-88G/T の多型のハプロタイプで頻度を推定したところ、C-G が common なハプロタイプで 7 割近くを占め、A-T は 2 割、A-G は 1 割を占めていた。Hardy-Weinberg 平衡との比較から、この二つの多型は連鎖不平衡にあることが判明した。-123C/A と-88G/T のハプロタイプで正常対照群と SSPE 群の推定頻度を比較したところ、-123A &-88T が SSPE 群に多くみられた (31.2% vs. 19.8%)。-123A 単独では両群間の有意差が認められないことから、

-88T が両群の差の主たる原因と考えられた。

ii) 機能解析

相対的ルシフェラーゼ活性はIFN- α 投与後、全てのハプロタイプで上昇し、-88T&-123A, -88T&-123C, -88G&-123Cの順に有意に高かった(図2)。これはインターフェロン α 投与下において、-88Tを有するハプロタイプが、-88G&-123Cよりも有意にMxAプロモーター活性が高いことを示す。

3)Th1 および Th2 サイトカインとそれらに関連した分子の多型解析

IL-4 promoter -589 T allele の頻度が正常コントロールに比べ SSPE で有意に高く ($P=0.031$)、その他の多型では SSPE とコントロール間に有意差は認めなかった(表 2、3)。ロジスティック回帰分析により *IL-4* promoter -589 多型および他の多型との交互作用を解析したところ、*IRF-1* allele 1 が *IL-4* promoter -589TT と相互作用をもつ傾向 ($P=0.0593$) が見られた。*IL-4* promoter -589TT と *IRF-1* allele 1 (ヘテロまたはホモ) との遺伝子型の組み合わせの頻度はコントロール(22.0%)に比べ SSPE 患者(47.7%)ではさらに有意に高かった ($P=0.003$)。

〔考 察〕

1)MV の細胞レセプターの多型解析

MV レセプターとして、これまで、実験室/ワクチン株のレセプターである CD46 と野生株、実験室/ワクチン株 双方のレセプターである SLAM が知られている。CD46 が、赤血球を除く全ての体細胞に発現しているのに対して、SLAM はリンパ球の一部と、単球、樹状細胞にのみ発現している。SSPE の病変部において CD46 がレセプターとして使用されていることを示唆するデータが報告されたが⁵⁾、最近では、それを否定する報告もみられる⁶⁾。今回、MV の細胞レセプターの遺伝子変化が SSPE の感受性に関与している可能性を検討したが、CD46、SLAM とともに SSPE の発症には関連していないと考えられた。

2)抗ウイルス蛋白 MxA の多型解析と機能解析

MxA は、I 型 IFN である IFN α , β によって誘導される抗ウイルス蛋白であり、ウイルスに対する innate immunity において重要な役割を果たしていると考えられている⁷⁾。MxA は、ヒト単球細胞株において MV の増殖を抑制することが知られているが⁸⁾、このような MV の増殖抑制は神経系の細胞においても観察され、その機序はウイルス遺伝子の転写抑制であると報告されている⁹⁾。本研究で得られた、SSPE 患者で抗ウイルス蛋白 MxA の発現が高いという結果は逆説的に思われるが、我々は以下のようなメカニズムを想定している。MxA が強く発現すれば感染細胞内でのウイルス遺伝子の転写は強く抑制され、ウイルス蛋白の合成がより低下し、感染細胞表面への発現はより低下する。このため、免疫系による排除を免れやすくなり、持続感染をおこしやすくなることが考えられる。このような仮説は ter Meulen らのグループも提唱しており¹⁰⁾、本研究で得られた、SSPE 患者で -88 T allele 頻度が高いという結果は妥当と考えられた。

3)Th1 および Th2 サイトカインとそれらに関連した分子の多型解析

我々はこれまでに、SSPE 患者における末梢血単核球の MV 特異的 Th1/Th2 サイトカイン産生測定を行い、大部分の SSPE 患者において Th1 サイトカインのひとつである IFN- γ 産生能が低下し、Th2 サイトカインの産生は保たれていることを示した¹¹⁾。これは、SSPE 患者では麻疹回復期にみられる相対的 Th2 優位¹²⁾¹³⁾が罹患後も長期間にわたって持続している可能性を示唆している。今回有意差がみられた 2 つの多型の機能については、まず *IL-4* promoter -589 T allele が、C allele より高い promoter 活性を示すことは既に報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。また、我々は、*IRF-1* の allele 1 が、Th2 優位の疾患であるアトピー性皮膚炎と関連していることを報告した¹⁶⁾。以上を考え併せると、SSPE 患者に多くみられる *IL-4* promoter -589 T allele と *IRF-1* の allele 1 の組み合わせは、Th2 反応の促進と Th1 反応の抑制を通じて、SSPE の発症にかかわっていることが示唆された。

〔結 論〕

MxA promoter -88G/T 多型の解析にて、T allele と T/T homozygote の頻度が SSPE 群で有意に高く、また、機能解析では -88 T allele が G allele より高い転写活性を示した。この結果より、-88G/T 多型が MxA の発現制御を介して SSPE の発症に寄与している可能性が示唆された。また、*IL-4* -590 C/T 多型の T allele と少なくとも一つの interferon regulatory factor-1 (*IRF-1*) (GT)_n repeat 多型 allele 1 を持つ頻度は SSPE 群で有意に高く、Th2 優位に関連するこの 2 つの機能的多型が SSPE の発症に寄与している可能性が示唆された。以上の結果は、これらの機能的多型が、日本人における SSPE の疾患感受性を規定する宿主側遺伝要因であることを示唆している。

〔参考文献〕

- 1) Gascon GG: Subacute sclerosing panencephalitis. *Semin Pediatr Neurol* 3: 260-269, 1996.
- 2) Britt JB: Slow viruses. In: *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. Feigin RD, Cherry JD, (eds) WB Saunders, Philadelphia, pp. 1646-1665, 1998.
- 3) Dyken PR: Subacute sclerosing panencephalitis: current status. *Neurol Clin* 3: 179-196, 1985.
- 4) Fournier JG, Tardieu M, Lebon P, et al: Detection of measles virus RNA in lymphocytes from peripheral-blood and brain perivascular infiltrates of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *N Engl J Med* 313:910-915, 1985.
- 5) Ogata A, Czuba S, Ogata S, et al: Absence of measles virus receptor (CD46) in lesions of subacute sclerosing panencephalitis brains. *Acta Neuropathol (Berl)* 94: 444-449, 1997.

- 6) Shingai M, Ayata M, Ishida H, et al: Receptor use by vesicular stomatitis virus pseudotypes with glycoproteins of defective variants of measles virus isolated from brains of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J Gen Virol* 84: 2133-2143, 2003.
- 7) Horisberger MA: Interferons, Mx genes, and resistance to influenza virus. *Am J Respir Crit Care Med* 152: S67-71, 1995.
- 8) Schnorr JJ, Schneider-Schaulies S, Simon-Jodicke A, et al. MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. *J Virol* 67: 4760-4768, 1993.
- 9) Schneider-Schaulies S, Schneider-Schaulies J, Schuster A, et al: Cell type-specific MxA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *J Virol* 68: 6910-6917, 1994.
- 10) Schneider-Schaulies J, Niewiesk S, Schneider-Schaulies S, et al: Measles virus in the CNS: the role of viral and host factors for the establishment and maintenance of a persistent infection. *J Neurovirol* 5: 613-622, 1999.
- 11) Hara T, Yamashita S, Aiba H, et al: Measles virus-specific T helper 1/T helper 2- cytokine production in subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurovirol* 6: 121-126, 2000.
- 12) Griffin DE, Ward BJ: Differential CD4 T cell activation in measles. *J Infect Dis* 168: 275-281, 1993.
- 13) Griffin DE, Ward BJ, Esolen LM: Pathogenesis of measles virus infection: a hypothesis for altered immune responses. *J Infect Dis* 170(Suppl 1):S24-31, 1994.
- 14) Rosenwasser LJ, Klemm DJ, Dresback JK, et al: Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin Exp Allergy* 25(Suppl 2):74-78, 1995.
- 15) Kawashima T, Noguchi E, Arinami T, et al: Linkage and association of an interleukin 4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families. *J Med Genet* 35: 502-504, 1998.
- 16) Nakao F, Ihara K, Kusuhara K, et al: Association of IFN-gamma and IFN regulatory factor 1 polymorphisms with childhood atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 107: 499-504, 2001.

〔研究発表〕

1. 論文発表

- 1) Kusuhara K, Sasaki Y, Nakao F, Ihara K, Hattori H, Yamashita S, Nihei K, Koide N, Aiba H, Takeshita K, Hara T: Analysis of measles virus binding sites of the CD46 gene in patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J Infect Dis* 181: 1447-1449, 2000.
- 2) Inoue T, Kira R, Nakao F, Ihara K, Bassuny WM, Kusuhara K, Nihei K, Takeshita K, Hara T: Contribution of the interleukin 4 gene to susceptibility to subacute sclerosing panencephalitis. *Arch Neurol* 59: 822-827, 2002.
- 3) Torisu H, Kusuhara K, Kira R, Bassuny WM, Sakai Y, Sanefuji M, Takemoto M, Hara T: Functional MxA promoter polymorphism associated with subacute sclerosing panencephalitis in Japan. *Neurol* 2004 (in press).

2. 学会発表

- 1) 楠原浩一、吉良龍太郎、原寿郎：SSPEにおける宿主側遺伝要因の解析。第8回日本神経感染症学会シンポジウム「亜急性硬化性全脳炎(SSPE)-現状と展望-」, 2003, 宇部。

〔知的所有権の取得状況〕

該当なし

図 1. SSPE の発症病理

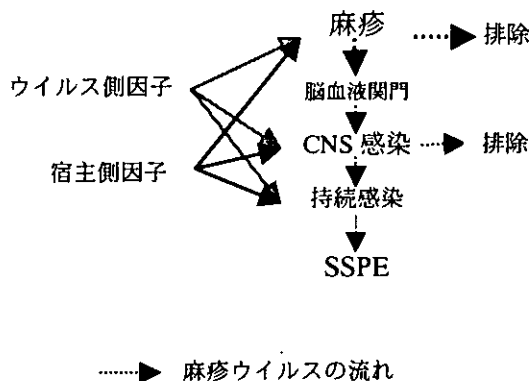


表 1. SSPE 群および正常対照群における *MxA* promoter-88G/T 多型の頻度

	Controls(%) (n=90)	SSPE(%) (n=40)	P-value
genotype			
G/G	43 (48)	16 (40)	NS
G/T	41 (46)	14 (35)	NS
T/T	6 (6)	10 (25)	0.003
allele			
G	127(71)	46 (58)	0.040
T	53 (29)	34 (42)	NS

P values were calculated using 2×2 chi square test.
NS: not significant (P>0.05)

図 2. *MxA* -88/-123 haplotype と *MxA* promoter 活性

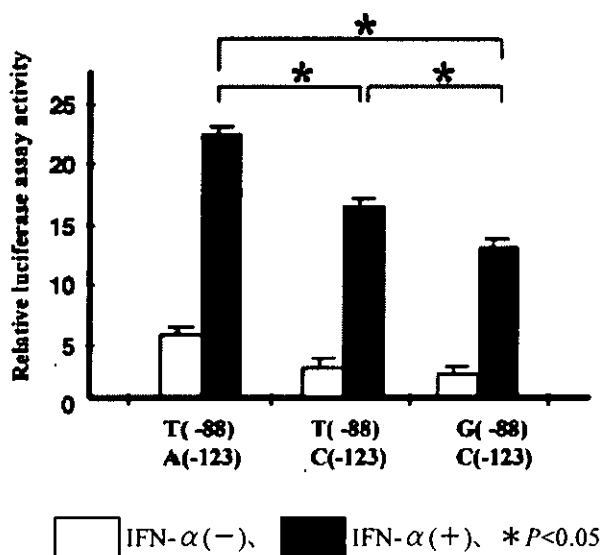


表 2. SSPE 群および正常対照群における Th1/Th2 サイトカイン関連遺伝子多型の allele 頻度

		Controls (total = 200) n (%)	SSPE (total = 76) n (%)	P-value
<i>IL-4 promoter</i> -589	C	69 (34.5)	16 (21.1)	0.031
	T	131 (65.5)	60 (78.9)	
<i>IL-4R</i> codon 50	Ile	76 (38.0)	33 (43.4)	0.411
	Val	124 (62.0)	43 (56.6)	
<i>IL-10 promoter</i> -627	C	76 (38.0)	29 (38.2)	0.981
	A	124 (62.0)	47 (61.8)	
<i>IL-12RB1</i> codon 214	Gln	122 (61.0)	48 (63.2)	0.742
	Arg	78 (39.0)	28 (36.8)	
<i>IL-12RB1</i> codon 365	Met	122 (61.0)	42 (55.3)	0.386
	Thr	78 (39.5)	34 (44.7)	
<i>IL-12RB1</i> codon 378	Gln	121 (60.5)	48 (63.2)	0.686
	Arg	79 (39.5)	28 (36.8)	
<i>IFNGR1</i> codon 14	Val	195 (97.5)	73 (96.1)	0.522
	Met	5 (2.5)	3 (3.9)	
<i>IFNGR2</i> codon 64	Gln	103 (51.5)	34 (44.7)	0.315
	Arg	97 (48.5)	42 (55.3)	

P values were calculated using 2×2 chi square test.

表 3. SSPE 群および正常対照群における IFN-γ 遺伝子 CA リピート および IRF-1 遺伝子 GT リピート 多型の allele 頻度

	Controls (total = 200) n (%)	SSPE (total = 76) n (%)	P-value
<i>IFNG</i>			
Allele 1	14 (7.0)	10 (13.2)	0.149
Allele 2	117 (58.5)	38 (50.0)	0.223
Allele 3	1 (0.5)	1 (1.3)	0.476
Allele 4	56 (28.0)	24 (31.6)	0.556
Allele 5	10 (5.0)	1 (1.3)	0.299
Allele 6	0 (0.0)	0 (0.0)	
Allele 7	2 (1.0)	2 (2.6)	0.305
Whole distribution			0.175
<i>IRF-1</i>			
Allele 1	49 (24.5)	23 (30.3)	0.359
Allele 2	81 (40.5)	32 (42.1)	0.891
Allele 3	2 (1.0)	0 (0.0)	1.000
Allele 4	0 (0.0)	0 (0.0)	
Allele 5	12 (6.1)	5 (6.6)	0.787
Allele 6	42 (21.2)	12 (15.8)	0.397
Allele 7	14 (7.0)	4 (5.3)	0.787
Whole distribution			0.843

The whole distributions of alleles between patients and controls were evaluated by two-sided Fisher's exact test for 2x7 table.

亜急性硬化性全脳炎における血清及び髄液中 インターロイキン6とインターフェロン γ の関係

班 員：市山 高志（山口大学・医学部・小児科）

〔研究要旨〕

亜急性硬化性全脳炎（SSPE）患者の血清および髄液で炎症の鋭敏なマーカーであるインターロイキン6（IL-6）と抗ウイルス作用を有するインターフェロン γ （IFN γ ）の関係を検討し、免疫病態を解析した。血清：急性麻疹では7例全例ともIL-6、IFN γ の上昇を認めた。インフルエンザでは12例中7例でIL-6の上昇を認め、この7例中4例でIFN γ の上昇を認めた。SSPEでは6検体中4検体でIL-6上昇を認めたが、IFN γ の上昇はなかった。髄液：ムンプス髄膜炎では16例中15例でIL-6上昇を認め、この15例では14例でIFN γ も上昇していた。単純ヘルペス脳炎では5例全例でIL-6の上昇を認め、4例でIFN γ も上昇していた。SSPEでは3検体中1検体でIL-6の上昇を認めたが、IFN γ の上昇は3検体とも認めなかった。ウイルス感染症の疾患コントロールではIL-6上昇とIFN γ 上昇を高率に認めた。一方、SSPE患者では、症例数は少ないが、IL-6上昇時でもIFN γ の上昇は認めなかった。IFN γ 低値はウイルス持続感染にとって好条件と示唆された。

The levels of interleukin-6 and interferon-gamma of serum and cerebrospinal fluid
in patients with subacute sclerosing panencephalitis

Takashi ICHIYAMA

Department of Pediatrics, Yamaguchi University School of Medicine

ABSTRACT

I determined serum and cerebrospinal fluid (CSF) interleukin-6 (IL-6) and interferon-gamma (IFN γ) in patients with subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) and analyzed immunological pathogenesis. Serum; IL-6 and IFN γ were elevated in all 7 patients with acute measles. IL-6 was elevated in 7 of 12 patients with influenza, and IFN γ was elevated in 4 of the 7 patients. IL-6 was elevated in 4 of 6 samples in SSPE, but IFN γ was not elevated in all samples. CSF; IL-6 was elevated in 15 of 16 patients with mumps meningitis, and IFN γ was elevated in 14 of the 15 patients. IL-6 was elevated in all 5 patients with herpes simplex encephalitis, and IFN γ was elevated in 4 of the 5 patients. IL-6 was elevated in 1 of 3 samples in SSPE, but IFN γ was not elevated in all samples. The patients with other viral infection as disease control often had the elevated IL-6 and IFN γ in the serum and CSF. However, the patients with

SSPE who had elevated IL-6 in the serum and CSF did not have elevated IFN γ . Low level of IFN γ is suggested that SSPE virus tends to survive for a long time.

【はじめに】

インターフェロン γ (IFN γ) は抗ウイルス作用を有するサイトカインでウイルス感染症患者の血清や髄液で上昇することが知られている。一方、亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) 患者の一部では麻疹ウイルス刺激による末梢血単核球からのインターフェロン γ 産生能が低いことが報告されている [1]。SSPE では病状の変化により、血清、髄液でのサイトカイン値の変動がある [2]。炎症の鋭敏なマーカーであるインターロイキン6 (IL-6) と IFN γ の関係を検討し、免疫病態を解析した。

【目 的】

SSPE 患者の血清及び髄液において炎症の鋭敏なマーカーであるインターロイキン6 (IL-6) と IFN γ の関係を検討し、SSPE の免疫病態を解析した。

【方 法】

対象：血清は SSPE のべ6検体、急性麻疹7検体、インフルエンザ12検体。髄液は SSPE のべ3検体、ムンプス髄膜炎16検体、単純ヘルペス脳炎5検体。方法：血清、髄液とも ELISA キット (R&D Systems 社) を用いて IL-6 と IFN γ を測定した。

(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。末梢血および髄液の検査など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 (図1)：急性麻疹では7例全例とも IL-6、IFN γ の上昇を認めた。インフルエンザでは12例中7例で IL-6 の上昇を認め、この7例中4例で IFN γ の上昇を認めた。さらに IL-6 の上昇のなかった5例中1例で IFN γ の上昇を認めた。SSPE では6検体中3検体で IL-6 上昇を認めたが、IFN γ の上昇はなかった。特に IL-6 が 5,000pg/ml 以上の異常高値例でも IFN γ の上昇はみられなかった。髄液 (図2)：ムンプス髄膜炎では16例中15例で IL-6 上昇を認め、この15例では全て IFN γ も上昇していた。単純ヘルペス脳炎では5例全例で IL-6 の上昇を認め、4例で IFN γ も上昇していた。SSPE では3検体中1検体で IL-6 の上昇を認めたが、IFN γ の上昇は3検体とも認めなかった。

【考 察】

ウイルス感染症の疾患コントロールとして血清では急性麻疹、インフルエンザを髄液ではムンプス髄膜炎、

単純ヘルペス脳炎を検討したが、IL-6 上昇と IFN γ 上昇を高率に認めた。一方、SSPE 患者では、症例数は少ないが、IL-6 上昇時でも IFN γ の上昇は認めなかった。原因として宿主の IFN γ 産生能の低下もしくは SSPE ウイルスによる IFN γ 産生抑制作用等が考えられた。いずれにせよ IFN γ 低値はウイルス持続感染にとって好条件と示唆された。今後多数例での検討が必要と考えた。

〔結 論〕

少数例での検討だが、SSPE 患者では血清、髄液とも IL-6 上昇時にも関わらず、IFN γ の上昇は認めなかった。

〔参考文献〕

- 1) Hara T, Yamashita S, Aiba H, Nihei K, Koide N, Good RA, Takeshita K: Measles virus-specific T helper 1/T helper 2-cytokine production in subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurovirol.* 6: 121-126, 2000
- 2) Ichiyama T, Hayashi T, Furukawa S: Subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology* 48: 1142-1143, 1997

〔研究発表〕

1. 論文発表

- 1) Matsubara T, Anwar R, Fujiwara M, Ichiyama T, Furukawa S: CTLA-4 (CD152) expression in peripheral blood T cells in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol.* 132: 169-173, 2003
- 2) 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.* 35: 59-61, 2003
- 3) 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.* 132: 261-264, 2003
- 4) 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.* 45: 156-158, 2003
- 5) Yoneshima Y, Ichiyama T, Ayukawa H, Matsubara, Furukawa S: Fosfomycin inhibits NF- κ B activation in U-937 and Jurkat cells. *Int J Antimicrob Agents.* 21: 589-592, 2003
- 6) Ichiyama T, Hasegawa S, Umeda M, Terai K, Matsubara T, Furukawa S: Pranlukast inhibits NF- κ B activation in human monocytes/macrophages and T cells. *Clin Exp Allergy.* 33: 802-807, 2003
- 7) Ichiyama T, Endo S, Kaneko M, Isumi H, Matsubara T, Furukawa S: Serum cytokine concentrations of influenza-associated acute necrotizing encephalopathy. *Pediatr Int.* 45: 734-736, 2003
- 8) Matsubara T, Yoshitomi T, Kaneko M, Ichiyama T, Furukawa S: Ketotic hypoglycemia in patients with allergic diseases. *Pediatr Int.* 45: 653-655, 2003
- 9) Ichiyama T, Ueno Y, Isumi H, Niimi A, Matsubara T, Furukawa S: An immunoglobulin agent (IVIG) inhibits NF- κ B

activation in cultured endothelial cells of coronary arteries *in vitro*. *Inflamm Res* in press.

- 10) Hasegawa S, Ichiyama T, Matsubara T, Tokuda O, Furukawa S: Caffey disease in a 6-month-old girl. *Eur J Pediatr* in press.
- 11) 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
- 12) 西河美希、市山高志: 乳児良性ミオクロニーてんかんの1例. *臨床小児医学* 50: 99-101, 2003
- 13) 堀江昭好、内山温、安田謙二、渡部浩、木村正彦、羽根田紀幸、市山高志、山口清次: 川崎病様症状を呈したエコー11型ウイルスによる無菌性髄膜炎の乳児例. *小児科* 44: 1299-1301, 2003

2. 学会発表

- 1) 市山高志、伊住浩史、松藤博紀、長谷川恵子、井上 保、古川 漸. 敗血症における末梢血単核球のNF- κ B活性化について. 第106回日本小児科学会. 福岡. 2003. 4. 25-27
- 2) 市山高志. シンポジウム. テオフィリンによる転写因子NF- κ B活性化の抑制. 第15回日本アレルギー学会春季臨床大会. 横浜. 2003. 5. 12-14
- 3) 市山高志、伊住浩史、松藤博紀、古川 漸. 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-日本との比較-. 第45回日本小児神経学会. 福岡. 2003. 5. 22-24
- 4) 市山高志、伊住浩史、藤原元紀、松原知代、古川 漸. Fc γ 受容体発現に対するヒト免疫グロブリン製剤(IVIG)の影響. 第23回日本川崎病研究会. 名古屋. 2003. 9. 26-27
- 5) 市山高志. シンポジウム. 喘息治療薬の抗炎症作用-NF- κ B活性化の抑制-. 第40回日本小児アレルギー学会. 岐阜. 2003. 10. 3-4
- 6) 市山高志. シンポジウム. 髄膜炎へのアプローチ. 第8回日本神経感染症学会. 宇部. 2003. 10. 10-11
- 7) 市山高志. ワークショップ. 単純ヘルペス脳炎治療ガイドラインの作成に向けて. 第8回日本神経感染症学会. 宇部. 2003. 10. 10-11
- 8) 市山高志、松藤博紀、伊住浩史、石川雄一、古川 漸. 軽症胃腸炎に伴うけいれんに対するカルバマゼンの効果. 第37回日本てんかん学会. 仙台. 2003. 10. 30-31
- 9) 市山高志、伊住浩史、松藤博紀、古川 漸. インフルエンザ脳症における血清および髄液中サイトカイン解析と末梢血単核球NF- κ B活性化の検討. 第35回日本小児感染症学会. 富山. 2003. 11. 7-8

図1. SSPE、急性麻疹、インフルエンザ患者の血清 IL-6 および IFN γ

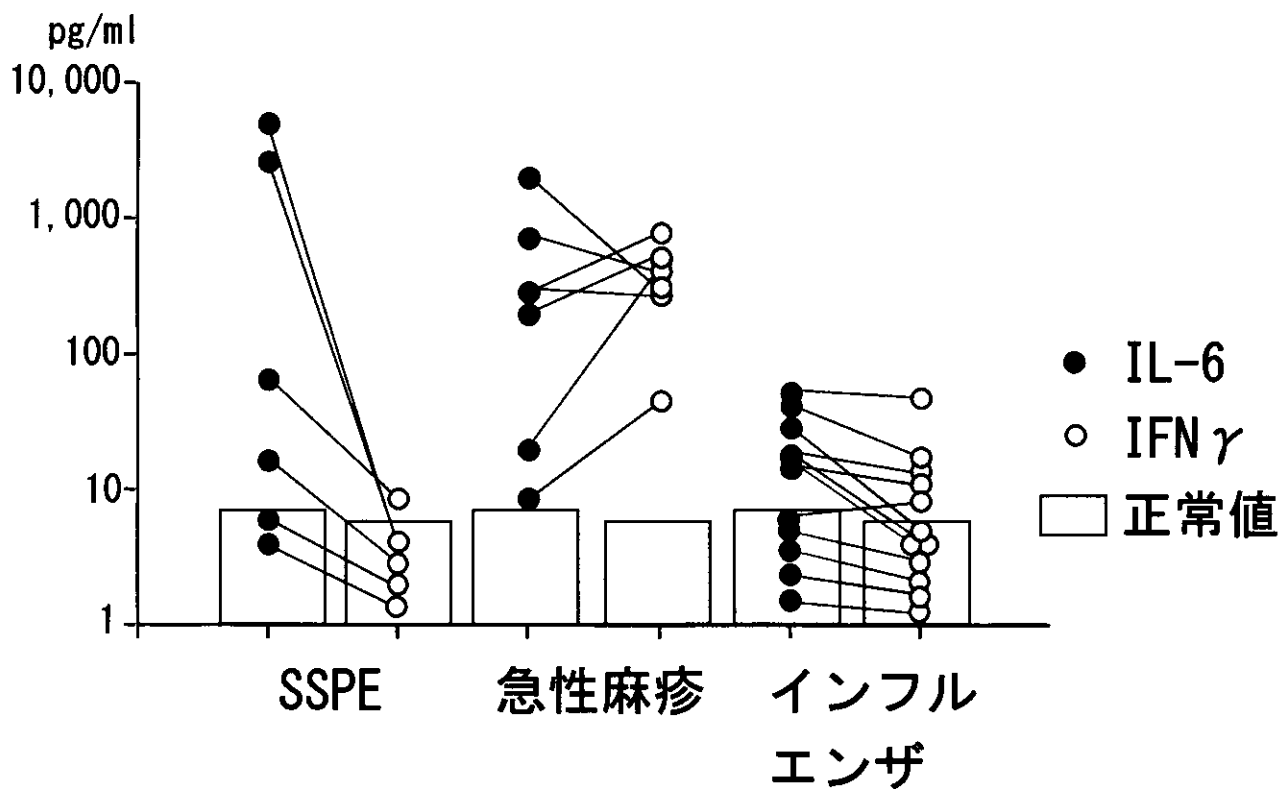
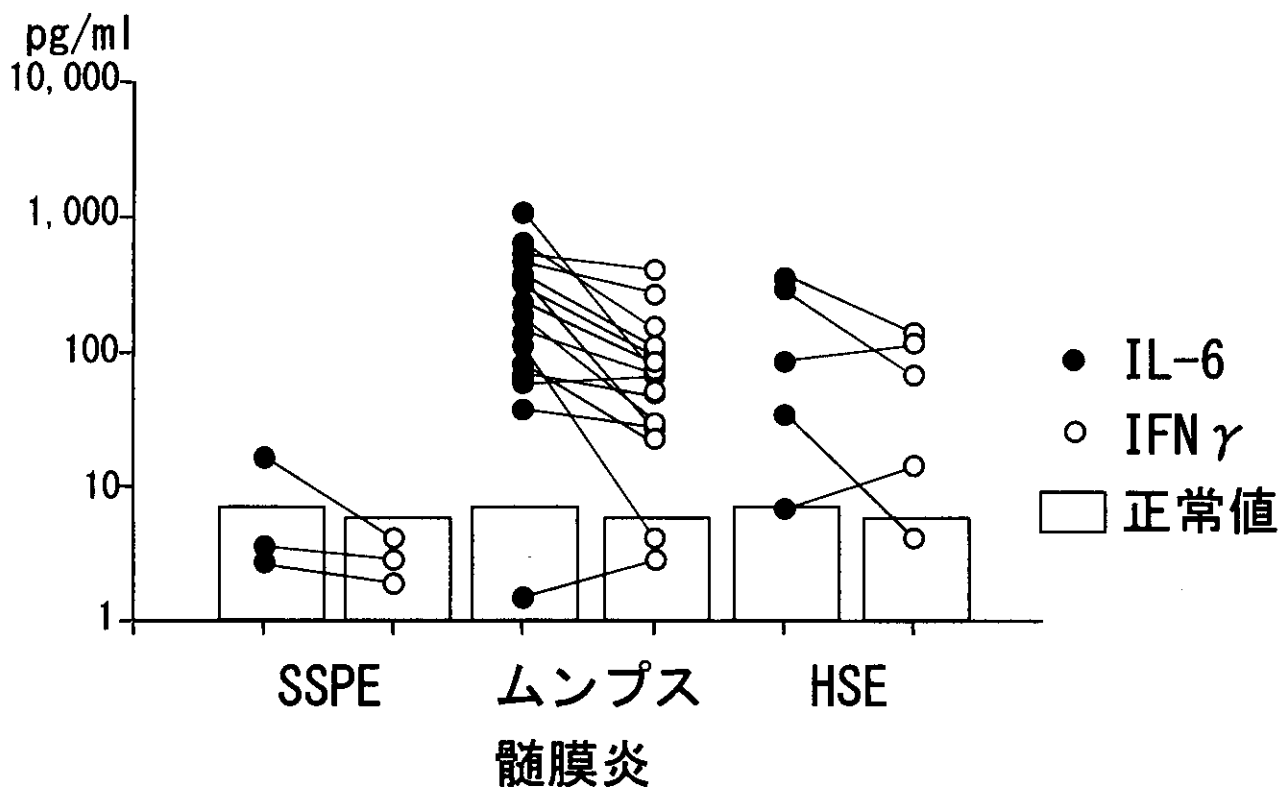


図2. SSPE、ムンプス髄膜炎、単純ヘルペス脳炎患者の髄液 IL-6 および IFN γ



亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) 患者髄液中のケモカインの検討

班 員：二瓶 健次 (国立成育医療センター・神経内科)
研究協力者：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 5 種類のケモカイン量を、Cytometric Bead Array (CBA) Kit (BD PharMingen) によりフローサイトメトリーにて測定した。その結果一部のサンプルで、CXCL-10/IP-10、CCL-2/MCP-1、CXCL-9/Mig および CCL-5/RANTES が上昇している例がみられた。また、経時的に髄液が採取された 1 症例において、検出されたケモカインが、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、サイトカイン・ケモカインの測定が病態・進行の評価に有用であることが示唆された。

Measurement of chemokines 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 Kyouusai Hospital

ABSTRACT

To assess the inflammatory and immunological status in each phase of subacute sclerosing panencephalitis(SSPE), we examined chemokines of cerebrospinal fluid of SSPE patients, using cytometric bead array assay system (BD). We examined 32 samples of the cerebrospinal fluid from 8 SSPE patients. We used the samples of cerebrospinal fluid of 9 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. CXCL-10/IP10, CCL-2/MCP-1, CXCL-9/Mig and CXCL-8/IL-8 levels of the cerebrospinal fluid of some of SSPE patients were high as well as other disease controls. 24 samples from a patients were examined. During disease progression levels of the four chemokines in cerebrospinal fluid synchronously increased and decreased.

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⁾。SSPE 患者の脳組織で炎症所見、血管周囲への単核球の浸潤が見られる。このことは、ウイルスの再燃にともなう免疫系細胞の浸潤、それに引き続くサイトカインの放出をと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。昨年われわれは、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示した。今回、免疫系細胞の浸潤に関与しているケモカインを中心に、Cytometric Bead Array (CBA) Kit (BD PharMingen)²⁾を用いて、経時的に採取された同一症例を含む 8 症例から得られた 32 髄液検体につき 5 種類のケモカインを測定した。

【目的】

亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) の病態・進行の評価を目的とする。特に、SSPE 患者髄液中のケモ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 8 症例から採取された髄液 32 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、てんかん患者などから採取された髄液 9 検体も同時に測定した。ケモ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 5 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 CXCL-10/IP10、CCL-2/MCP-1、CXCL-9/Mig、CCL-5/RANTES、CXCL-8/IL-8 の 5 種類のケモカインを測定した。

(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 50ul の髄液で 5 種類のケモカインを短時間で測定することができた。SSPE 患者において、髄液中 CXCL-10/IP-10、CCL-2/MCP-1、CXCL-9/Mig および CCL-5/RANTES が上昇している例がみられた。(図 1-4) 経時的に髄液が採取された 1 症例において、検出されたケモカインが、同調して上昇、下降を繰り返していることが観察された。(図 5)

【考察】

昨年我々は、SSPE 患者例の一部の髄液サンプルで、IL-6、IL-8 の上昇を見いだしている。また経時的に 24 サンプルを測定した 1 症例では、phase II-IV にかけて IL-8 の上昇と下降の繰り返しが認められ、脳内の炎症の再燃、沈静化の状態を反映していることが推察された。これまで SSPE 患者髄液中のケモカインについての報告はなく、また、髄液中のサイトカインも血清中の値との相関があきらかではない。ケモカインは、好中球、単球、リンパ球などの白血球に対して 走化活性を有し、炎症反応において重要な役割を果たしている一群の生理活性タンパク質である³⁾。近年、ケモカインは、神経系の発生に関与し、また多発性硬化症などの脳実質への細胞浸潤が観察される疾患においては、疾患の各段階において異なったケモカインが異なったタイプのリンパ球を動員し、病態形成に重要な役割をはたしていることが推測されている⁴⁾。今回我々が検出した、CCL-2/MCP-1 や CXCL-8/IL-8 および CXCL-10/IP-10 は、脳内の炎症反応に際してミクログリアにより産生され、細胞浸潤を誘導することが報告されている⁵⁻⁷⁾。これらのケモカインおよびサイトカインの上昇下降が中枢神経系でのこういった変化を反映しているのか解明することにより、SSPE の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。

[結論]

今回我々が、検討を行った症例では、CXCL-10/IP-10、CCL-2/MCP-1、CXCL-9/Mig および CCL-5/RANTES 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ケモカインの上昇下降が同調して観察された。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およびケモカインを測定することは重要と考えられる。

[参考文献]

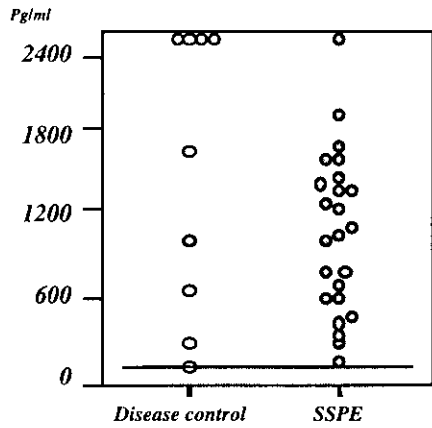
- 1) 永石彰子ほか:遅発性ウイルス感染症.日本臨床.59 巻:119-122,2001
- 2) Chen R., et al.: Simultaneous quantitation of six human cytokines in a single sample using microparticle-based flow cytometric technology. Clin.Chem.. 9:1693-1694,1999
- 3) Zlotnik A. & Yoshie O.: Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity. 12:121,2000
- 4) Karpus W. J., et al.: MIP-1alpha and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation. J. Leukocyte Biol. 62:681-687,1997
- 5) Chen Y., et al.: Over expression of monocyte chemoattractant protein 1 in the brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells. J. Cereb. Blood Flow Metab. 6:748-755,2003
- 6) Cheeran MC., et al.: CXCL-10 production from cytomegalovirus-stimulated microglia is regulated by both human and viral interleukin-10. J. Virol. 8:4502-4515,2003
- 7) Eugenin E. A., et al.: Chemokine-dependent mechanisms of leukocyte trafficking across a model of the blood-brain barrier. Methods. 4:351-361,2003

[学会発表]

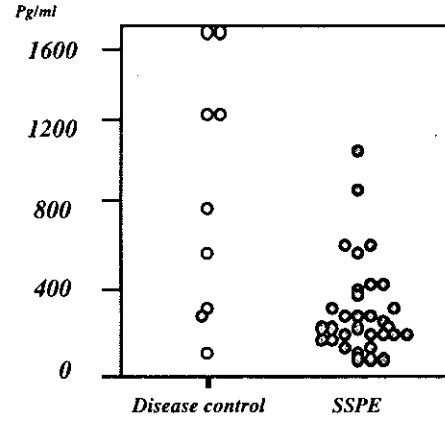
1. 学会発表

- 1) 山崎裕子、藤巻春香、高阪勉、小川恵津子、豊田裕夫、成相昭吉、清水透子、二瓶健次、南陸彦 (横浜市大・医学部・免疫、BD Biosciences, Tokyo, Japan、東京薬科大、横浜南共済病院、久留米大・小児科、国立成育医療センター・神経科) フローサイトメトリーによる亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) 患者髄液中のサイトカインおよびケモカインの検討: 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会

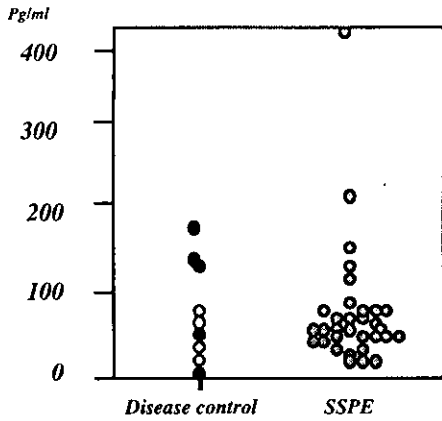
☒1 CXCL-10 levels in SSPE cerebrospinal fluids :
All samples



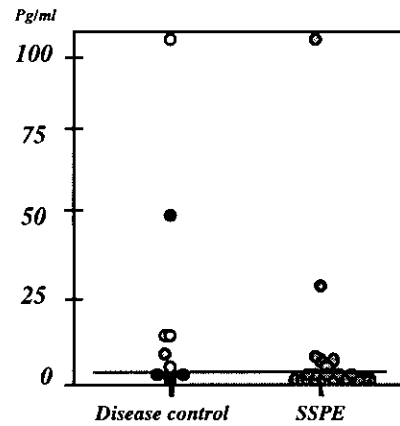
☒2 CCL-2 levels in SSPE cerebrospinal fluids :
All samples



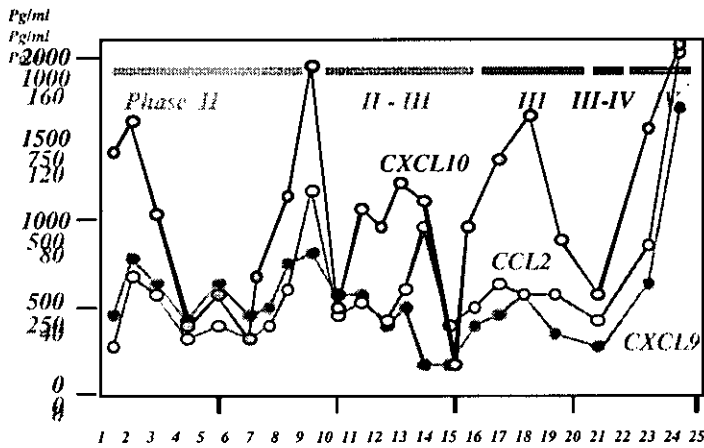
☒3 CXCL-9 levels in SSPE cerebrospinal fluids :
All samples



☒4 CCL-5 levels in SSPE cerebrospinal fluids :
All samples



☒5 CXCL-10, CCL-2 and CXCL-9 levels in cerebrospinal fluid from a SSPE patient, Case 1



ヒト樹状細胞における麻疹ウイルス野外株とワクチン株の感染動態の差異

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 ）

〔研究要旨〕

マクロファージ及び樹状細胞は気道に存在し、麻疹ウイルス感染初期の標的細胞であると考えられている。また、麻疹患者の末梢血液では主に単球にウイルスが感染している。これらの細胞でのウイルス増殖は、亜急性硬化性全脳炎(SSPE)を含む麻疹の病態成立に重要な役割を担っている可能性がある。昨年度は、単球由来樹状細胞(Mo-DC)においては、野外株は良好に感染性ウイルス粒子を産生するが、ワクチン株の増殖は顕著に悪いことを報告した。今年度は、野外株とワクチン株の Mo-DC における感染をさらに詳細に比較検討するとともに、単球及びマクロファージでの増殖についても検討した。Mo-DCでの麻疹ウイルスゲノムの複製は、ワクチン株と野外株の間で同程度だった。感染 Mo-DCでのウイルス蛋白の経時的蓄積について調べたところ、ワクチン株では、H、F、N は野外株と同程度に増加したが、M蛋白の蓄積が著しく抑制されていることがわかった。このM蛋白の蓄積低下が、ワクチン株の感染性ウイルス粒子の形成・放出の低下の要因ではないかと思われる。単球とマクロファージでは、野外株とワクチン株ともに増殖が悪く、両者の間で明らかな差は認めなかった。これらのことから、Mo-DCにおける野外株とワクチン株の感染動態の差異が、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た。

Difference in growth kinetics between field isolates and vaccine strains of measles virus
in human dendritic cells

Hak HOTTA, Shinji OHGIMOTO, Kaori OHGIMOTO

Department of Microbiology, Kobe University Graduate School of Medicine

ABSTRACT

Macrophages and dendritic cells reside in the respiratory tract and are considered to be the target for measles virus (MV) in the early stage of infection. It has also been reported that monocytes are the target for MV in the blood. Viral growth in these cells are likely associated with the severity of measles and related complications, including subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). Last year, we reported that field isolates, but not vaccine strains, of MV efficiently produced infectious progeny virus in monocyte-derived dendritic cells (Mo-DC). This year, we analyzed infection of Mo-DC with MV in more detail. We also studied MV growth in monocytes and macrophages. Replication of the viral genome in Mo-DC was comparable between the vaccine strains and the field isolates. Interestingly, accumulation of the M protein of vaccine strains was markedly impaired in Mo-DC although the other viral proteins, such as H, F and N, accumulated to similar extents as those of the field isolates. This impaired accumulation of the M protein of the vaccine strains would result in impaired assembly and/or release of the virion in Mo-DC. In monocytes and macrophages, viral growth of both field isolates and vaccine strains was at low levels and there was no