

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班  
分担研究報告書

亜急性硬化性全脳炎に対するリバビリン治療に関する研究

研究協力者：野村 恵子 熊本大学医学部発達小児科  
研究協力者：木村 昭彦 芦北学園発達医療センター  
研究協力者：矢野 珠巨 秋田大学小児科  
研究協力者：森 健治 徳島大学小児科  
研究協力者：加藤善一郎 岐阜大学小児科  
研究協力者：森鼻 栄治 県立宮崎病院小児科  
研究協力者：遠山 潤 西新潟中央病院  
研究協力者：片野 直之 愛知医科大学小児科  
研究協力者：津留 陽 長崎大学小児科  
研究協力者：玉城 邦人 琉球大学小児科  
研究協力者：遠藤 文香 岡山大学小児神経科  
研究協力者：武下草生子 横浜市立大学市民総合医療センター小児科  
研究協力者：神尾 範子 大阪大学小児科  
研究協力者：鈴木 由香 愛媛医科大学小児科  
研究協力者：小林 一彦 千葉県こども病院神経科  
研究協力者：斉藤 伸治 北海道大学小児科  
研究協力者：長門 雅子 天理よろず相談所病院小児科  
研究協力者：白石 晴士 熊本大学発達小児科

研究要旨

亜急性硬化性全脳炎は、麻疹ウイルスの変異ウイルスを原因とする遅発性ウイルス感染症で、非常に予後不良な疾患であるが、未だ効果的な治療法は確立されていない。近年日本を中心に、抗ウイルス薬であるリバビリンの脳室内投与による治療が試験的に行われ、一部で効果が認められている。そこで、より安全で効果的な治療法を確立させるために、これまでにリバビリン治療を実施した施設に対しアンケート調査を行い、その安全性、効果、有害事象、治療に伴う問題点等について検討した。結果として、7例において何らかの効果を認めたが、著明な改善があったのは4例であった。比較的早期に治療を開始しても、急激に進行して治療に抵抗した例があった。1歳未満で麻疹に罹患している症例では、免疫能の問題によるのか、特に予後不良となっていた。この治療に伴う有害事象として、細菌性髄膜炎と血圧低下に注意する必要があると考えられた。

## A. 研究目的

亜急性硬化性全脳炎(以下 SSPE)は、麻疹ウイルスの変異ウイルスを原因とする遅発性ウイルス感染症で、非常に予後不良な疾患であるが、未だインターフェロンとイノシプレックスの併用以外、効果的な治療法は確立されていない。近年日本を中心に、抗ウイルス薬であるリバビリンの脳室内投与による治療が試験的に行われ、一部で効果が認められている。そこで、より安全で効果的な治療法を確立させるために、これまでにリバビリン治療を実施した施設に対しアンケート調査を行い、その安全性、効果、有害事象、治療に伴う問題点等について検討した。

## B. 研究方法

リバビリン治療を実施した 14 施設(芦北学園発達医療センター、秋田大学小児科、徳島大学小児科、岐阜大学小児科、県立宮崎病院小児科、西新潟中央病院、伊予病院小児科、愛知医科大学小児科、長崎大学小児科、沖縄中部病院小児科、琉球大学小児科、大阪府立母子保健医療センター小児科、岡山大学小児神経科、熊本大学発達小児科)の主治医宛てに調査票を送付し、患者家族から同意の得られた症例について 9 施設より回答を寄せて頂いた。また、これまでに調査に協力して頂いた 6 施設(横浜市立大学市民総合医療センター小児科、大阪大学小児科、愛媛医科大学小児科、千葉県こども病院神経科、北海道大学小児科、天理よろず相談所病院小児科)の回答も合わせて検討した。

調査項目は、転帰、現在の治療状況、麻疹予防接種歴、麻疹罹患歴、SSPE 発症時期と初発症状、診断時期と症状・病期・検査結果、治療開始時期と病期、リバビリン治療を開始した経緯、倫理委員会承認の経緯、リバビリン投与方法、髄液中リバビリン濃度、症状・病期の経過と検査結果の推移、治療効果、治療経過中に見られた有害事象とその経過、有害事象に影響を

及ぼした他の要因、併用薬、その他とした。(倫理面への配慮)

本調査に関する同意書を作成し、患者家族に対し主治医から十分な説明をして頂いた上で、同意が得られた場合に調査票に記入して頂いた。尚、同意書に関しては主治医によりカルテに保管して頂き、当方には患者個人が特定できない様配慮した。

## C. 研究結果

本年度新たに治療を開始したのは 4 例であった。16 施設 18 例について検討した。男性 11 名、女性 7 名、平均発症年齢は 7.8 歳、平均潜伏期間は 5.4 年。転帰は、死亡が 2 例、中止・終了が 7 例で治療を続行しているものは 9 例であった。死亡例の死因は、化膿性髄膜炎による敗血症ショックと外来フォロー中の突然の心肺停止であった。麻疹の予防接種を受けていたものは 1 例(但し麻疹患者との接触後の接種)、麻疹自体の症状が重篤であったものは 1 例であった。治療導入の経緯は、医療側の勧めが 10 例、患者家族が情報を得て希望された例が 2 例、両者からが 4 例であった。倫理委員会の承認については、臨時に開催され 1 週間で承認された所もあれば、承認に 1 カ月かかり、やむなく決定前に治療を開始した施設もあった。

麻疹罹患年齢と調査時の NDI 臨床症状スコア(以下スコアとする)をプロットしたものを図 1 に示す。スコアは 88 点満点で、点数が低い程軽症で、逆に高い程重症であることを意味する。特に麻疹罹患年齢が 1 歳未満の症例では、スコアが高値になっている傾向があった。発症年齢と調査時のスコアをプロットしたものを図 2 に示す。スコアが低い群の平均は 10.7 歳で、スコアが高い群の平均は 6.3 歳であった。診断時の罹病期間と調査時のスコアをプロットしたものを図 3 に示す。2 カ月以内に診断された群と 5 カ月以上かかって診断された群に分かれるが、2 つの群の分布には差がなく、診断

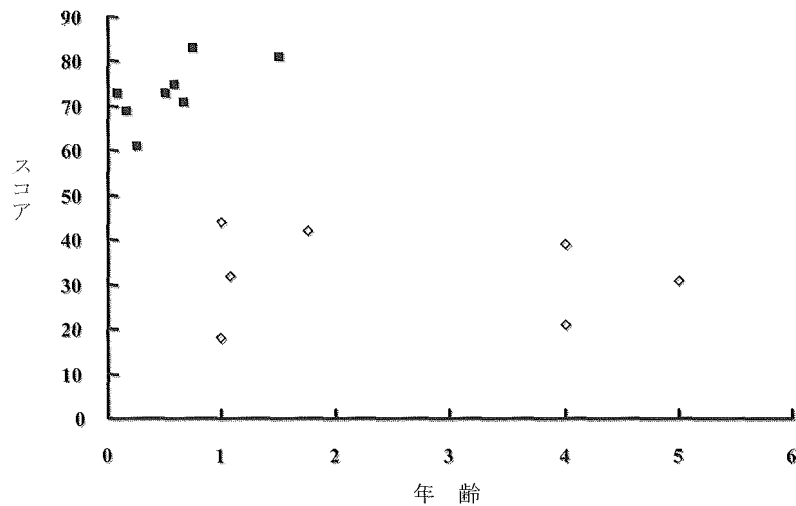


図1 麻疹罹患年齢と調査時 NDI 臨床症状スコア

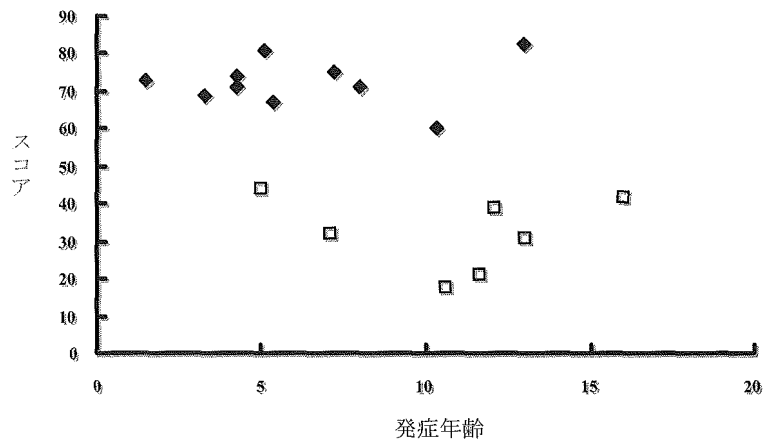


図2 発症年齢と調査時 NDI 臨床症状スコア

が早かったからと言ってスコアが低い訳ではないことが分かる。このことは、発症後急激に進行し、治療に抵抗を示す例があることを示唆している。リバビリン治療を開始した時点と調査時のスコアをプロットしたものを図4に示す。既に臨床症状がかなり進行してしまった例では、リバビリン治療による著明な改善は得られていない。

治療効果の判定については、スコアが2点以上減少したものを改善、逆に2点以上増加したものを増悪、それ以外を不変とした。改善は4例、不変は3例、増悪は11例であった。SSPEの常に進行して行く病体を考えると、不変を含めた7例に何らかの効果があったと考えられた。

治療経過中に認められた有害事象としては、傾眠傾向11例、発熱10例、口唇腫脹7例、全身倦怠感6例、肝機能障害5例、嘔気・嘔吐5例、細菌性髄膜炎4例、皮膚症状4例、眼球結膜充血3例、頭痛3例、尿路感染3例、白血球減少2例、貧血2例、血圧低下2例、末梢神経障害1例、歯肉出血1例、眼痛1例であった。傾眠傾向や発熱、口唇腫脹は高い頻度で認められたが、発熱の原因としては併用するインターフェロンの影響が考えられた。全身倦怠感も比較的高頻度に認められ、意識レベルによっては有害事象と判定されていない例もある可能性がある。細菌性髄膜炎は、リバビリンの直接的な影響とは考えられないとのことであったが、頻回

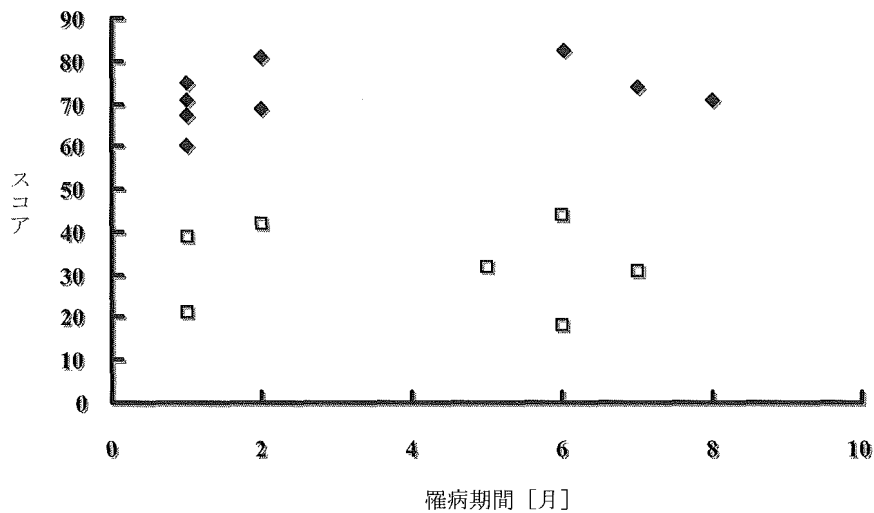


図3 診断時罹病期間と調査時 NDI 臨床症状スコア

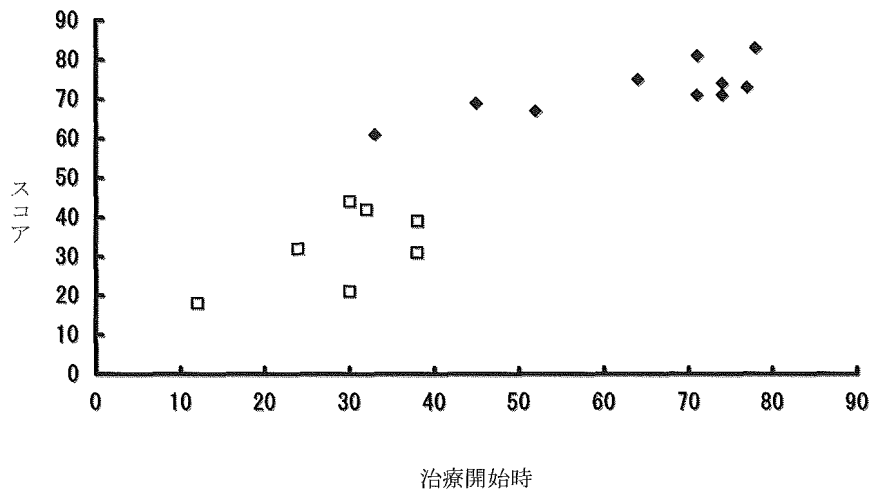


図4 リバビリン治療開始時と調査時の NDI 臨床症状スコア

の穿刺が誘因と考えられる。また今回血圧低下が2例あり、ショックへの配慮も必要と考えられた。それ以外はいずれも重篤なものではなく、休薬と関連して改善している。

初発症状としては、友人とのトラブル、性格変化、活気低下、全身倦怠感、意識レベル低下、動作の鈍化、書字の乱れ、集中力低下、計算間違いの増加、学力低下、退行、脱力発作、転びやすい、歩行困難、流涎、構音障害、発語減少、尿失禁、錐体外路徴候、ミオクローヌスがあった。

診断時の症状としては、脱力発作、座位不安定、転倒、動揺性歩行、歩行困難、起立不能、不随意運動、ミオクローヌス、構音障害、発語

減少・消失、食欲低下、嚥下不良、流涎、尿失禁、不全麻痺、理解・記憶力低下、退行、意識混濁、傾眠傾向、痙攣発作があり、これらの内いくつかは認められた時点でSSPEと診断されている。それまで多くはてんかんとして治療されている。

#### D. 考察

SSPEの予防は麻疹の予防接種にかかっているが、予防接種の実施されていない1歳未満で麻疹に罹患した際に、免疫能の問題からか、SSPEを発症した場合、リバビリン治療を行っても、特に予後不良となっていることは問題で

あると考えられる。

少しでも治療効果を上げるためには、早期発見、早期治療が望まれる。そのためには、初発症状を見落とさない様、周知・教育して行くことが必要と考えられる。今後は、リバビリンの有効濃度をなるべく長時間維持するという治療的意義と、感染の危険を伴う頻回の穿刺を避ける意味から、リバビリンの持続注入による治療法の開発が待たれる。

#### E. 結論

SSPE に対するリバビリン治療を実施した16施設を対象に、アンケート調査を行った。7例で何らかの効果を認めたが、著明な改善があったのは4例であった。比較的早期に治療を

開始しても、急激に進行して治療に抵抗した例があった。1歳未満で麻疹に罹患している症例では、免疫能の問題によるのか、特に予後不良となっていた。リバビリン治療に伴う有害事象として、細菌性髄膜炎と血圧低下に注意する必要があると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班  
分担研究報告書

RSV に対する siRNA の *in vitro*、*in vivo* における検討  
(新たな SSPE 治療法への応用)

分担研究者：細矢 光亮 福島県立医科大学  
研究協力者：橋本 浩一 福島県立医科大学

### 研究要旨

【目的】 Respiratory syncytial virus (RSV) は、麻疹ウイルス (MV) と同じパラミクソウイルスに属するウイルスである。我々は RSV の遺伝子に対する siRNA を作成し、*in vitro* およびマウス RSV 感染モデルを用いた *in vivo* において、RSV 感染症への影響について検討した。【方法】 1) RNAi 社の siRNA 設計ソフトを用い、RSV 全ゲノムより 10 個の siRNA を作成した。2) 遺伝子導入試薬を用い siRNA を HEp-2 細胞に導入し、24 時間後に RSV-A2 株を moi : 1 で感染させ、1 時間吸着の後、細胞を洗浄し、再び 24 時間培養の後、上清中のウイルス量をプラーク法で評価した。また、細胞中の RSV 各遺伝子 (F, G, N, L) の発現をリアルタイム PCR 法で定量した。3) BALB/c マウスを用いた RSV 感染モデルで siRNA の効果を検討した。マウスに siRNA (4nmol) と遺伝子導入試薬との混合液を麻酔下で経鼻より投与し、4 時間後に RSV-A2 株を 107pfu 経鼻から感染させた。感染後連日、体重、呼吸数、および気道抵抗を測定し重症度を評価した。さらに RSV 感染 1 ヶ月後の血中抗 RSV 中和抗体価を測定した。4) 麻疹ウイルスに対しても P 遺伝子に対して 5 個の siRNA を作製し、遺伝子導入試薬を用い siRNA を B95a 細胞に導入し、24 時間後に麻疹臨床分離株を moi : 1 で感染させ、24 時間培養の後、上清中の P 遺伝子の量をリアルタイム PCR で評価した。【結果】 *in vitro* において、10 個の siRNA の RSV 増殖への 50% 抑制濃度は数 nM ~ 数 100pM であった。F 遺伝子に対する siRNA は F 遺伝子の発現を特異的、濃度依存的に抑制し、遺伝子発現抑制に依存して RSV 増殖の減少も認められた。マウス RSV 感染モデルを用いた検討では、F 遺伝子に対する siRNA を投与したマウスはコントロールに比べ体重減少、気道抵抗の上昇が軽度であった。また、RSV への中和抗体価は siRNA 投与の有無に関わらず同レベルであった。MV に対しては 100nM の濃度で 90% 以上、上清の P 遺伝子の発現量が抑制された。【結論】 RSV F 遺伝子に対して設計された siRNA が、*in vitro*、*in vivo* で効果があることが確認できた。MV に対しては更なる siRNA の検討が必要である。

### A. 研究目的

亜急性硬化性全脳炎 (subacute sclerosing

panencephalitis ; SSPE) は麻疹罹患後おおよそ 2~10 年の潜伏期間の後に中枢神経症状を呈

し、一旦発症後は進行性に増悪し、高度の認知障害、植物状態となり死に至るスローウイルス感染症である。現在まで SSPE に対し amantadine、inosiplex、interferon (IFN)、cimetidine などが試みられてきたが、有効性が証明されているのは inosiplex と IFN である。ごく最近、SSPE 発症初期の患者において ribavirin の脳室内投与により臨床症状の改善がみられる症例が増加している。しかし、ribavirin 投与を中止すると症状の再燃がみられるため、継続的な ribavirin 治療を余儀なくされている。SSPE ウイルスを神経組織から排除するため、単独、あるいは既存の薬剤との併用可能な新規の薬剤開発が切望されている。

MV と同じパラミクソウイルスに属する、Respiratory syncytial virus (RSV) は乳幼児における下気道炎の病因の 1 つであり、急性呼吸不全を引き起こし、さらに喘息発症との関連も報告されている。しかし RSV 感染症への有用な予防薬、治療薬がなく、新規薬剤の開発が望まれている。

二本鎖 RNA (dsRNA) によってその配列特徴的に mRNA が分解され、その結果遺伝子の発現が抑制される現象を RNAi (RNA interference) という。近年、ウイルス性疾患や癌、遺伝性疾患などの疾患遺伝子を標的とし、RNAi 活性を有する siRNA (short interfering RNA) を核酸医薬として応用する研究が進んでいる。

有効な治療法のない RSV 感染症や SSPE に対する siRNA による治療法の開発を目指し、RSV および MV の遺伝子情報をもとに siRNA をデザインし、*in vitro* と *in vivo* (マウス RSV 感染モデル) にて抗 RSV 効果を評価し、さらに SSPE の治療法への応用について検討した。

## B. 研究方法

### ① 細胞、培地

咽頭癌由来株化細胞 (HEp-2 細胞) と Epstein-Barr ウイルス持続感染マーマセット

B 細胞 (B95a) を用いた。培地は HEp-2 細胞では 10%FCS 加 MEM 培地、B95a 細胞は増殖培地として 10%FCS 加 RPMI 培地、維持培地として 10%FCS 加 DMEM 培地を用いた。

### ② siRNA

RNAi 社 (Tokyo, Japan, <http://design.rnai.jp/sidirect/index.php>) の siRNA 設計ソフトを用い、RSV では全シークエンスより RS1~RS10 の計 10 個 (RS1, RS2, RS3, RS4, RS5, RS6, RS7, RS8, RS9, RS10) 作成した (図 1)。MV では SSPE ウイルスにおいて、野生株と比較し、多型の報告がない P 遺伝子に注目し 5 個作製した。また、陰性コントロールの siRNA (RNAi 社) も用意した (図 2)。

### ③ 遺伝子導入および siRNA の評価

遺伝子導入試薬 (Lipofectamin 2000<sup>®</sup>, Invitrogen) を用い、RSV では HEp-2 細胞、MV では B95a 細胞に siRNA を導入し、24 時間後に RSV-A2 株、麻疹臨床分離株をそれぞれ moi : 1 で感染させ、1 時間吸着の後、細胞を洗浄し、再び 24 時間培養の後、上清中のウイルス量をプラーク法、あるいはゲノム発現量をリアルタイム PCR で評価した。さらに、siRNA の遺伝特異性を RSV 各遺伝子 (F, G, N, L) の発現を SYBR Green 法によるリアルタイム PCR で定量、評価した。また siRNA のインターフェロン関連遺伝子 (STAT-1、2',5'-OAS1) 誘導の有無について、IFN Response Watcher kit<sup>®</sup> (TaKaRa) を用いて検討した。

### ④ RSV 感染モデルでの siRNA の効果評価

10 週齢 (♀)、Balb/c マウスに遺伝子導入試薬 (Trans IT-TKO<sup>®</sup>, Mirus) を用い、siRNA (4nmol) を麻酔下で経鼻より投与し、4 時間後に RSV-A2 株を 10<sup>7</sup>pfu 経鼻から感染させた。感染後、連日、体重、呼吸数、および気道抵抗を無拘束呼吸機能解析装置<sup>®</sup> (BUXCO) を用いて測定し、重症度を評価した。さらに RSV 感染 1 ヶ月後の血中抗 RSV 中和抗体価を測定した。

### C. 研究結果

RSV に対して、*in vitro* の系で RSV に対する siRNA は作製した 10 個 (RS1-RS10) すべて RSV 増殖抑制効果を示し、50%抑制濃度は数 nM から数 100pM であった(表 1)。これらの siRNA (RS1-RS10) のマウス RSV 感染モデルでの評価では RS8 のみ抗 RSV 感染症効果を示し、コントロール siRNA に比べ有意に体重減少(図 3)、気道抵抗の上昇が軽度であった(図 4)。また RSV への中和抗体価は siRNA 投与の有無に関わらず同レベルであった(表 2)。動物実験で効果のあった RS8 は 100nM においても IFN 関連遺伝子 (STAT-1、2',5'-OAS1) を誘導せず(図 5)、他の RSV 各遺伝子 (G、N、L) へも影響せず(図 6)、F 遺伝子の発現を特異的、濃度依存的に抑制し(図 6)、RSV 増殖を抑制した(図 7)。MV に対しては、100nM の濃度で上清の P 遺伝子の発現量が 90%以上抑制された(図 8)。

### D. 考察

今回の実験で RSV 遺伝子に対して設計された siRNA が、*in vitro*、*in vivo* で効果があることが確認できた。*in vitro* での実験では、RSV に対する各 siRNA の IC50 は数 100pM~数 nM であった(表 1)。マウスでの RSV 感染実験に用いた siRNA RS8 の STAT-1、OAS-1 の遺伝子発現量は siRNA で処理していない基底状態とほぼ同程度であった(図 3)。MV においては作製した 5 個の siRNA のうち、1 つのみ効果が認められた。

マウスでの RSV 感染実験 (*in vivo*) では、F 遺伝子に対する siRNA RS8 のみが、コントロール群 (遺伝子導入薬のみ、siRNA 非投与マウス) と比較してマウスの体重減少と気道抵抗の上昇を有意に軽減した(図 7, 8, 9)。RS8 は RSV F 遺伝子を標的とする。F 遺伝子はウイルスの膜融合蛋白をコードし、細胞へウイルス吸着後のウイルスと細胞の膜融合、また、ウイルス粒子を介さない、細胞同士の感染に関与している。

動物実験の結果は、RSV の cell to cell 感染が病態形成に深く関わっていることを示唆するものである。SSPE ウイルスを通常の麻疹ウイルスと比較すると、M 遺伝子、F 遺伝子、H 遺伝子など構造蛋白をコードする遺伝子に普遍的に変異がみられる。特に M 遺伝子の変異が病態に深く関与し、結果として成熟ウイルス粒子が作製されず、感染細胞からの感染ウイルス粒子が放出されないと考えられている。さらに、動物実験では、SSPE 感染脳のパラメタマウスでのみ感受性動物への感染が成立する。従って、SSPE におけるウイルスの細胞同士の感染は cell to cell 感染によると予想される。F 遺伝子は SSPE ウイルスにおいて遺伝子多型が認められるが、感染病理を考慮すると標的遺伝子として再考する必要がある。また、SSPE ウイルスにおいて M、F、H 以外の遺伝子の N、P、L 遺伝子には変異の報告が少なく、当然、標的遺伝子の候補になる。RSV での実験から示される様に、効果を判定するには動物を用いた *in vivo* での検討が必要である。

また、SSPE の siRNA での治療を考慮した場合、ドラッグデリバリーが問題となる。神経細胞は遺伝子導入が困難な細胞の一つである。ヒト免疫不全ウイルスで報告されている様な、プロタミン結合抗体を用いた特定細胞への siRNA 導入や、ウイルスベクターの利用、さらにナノ粒子による siRNA の導入法も同時に検討しなければならない。

以上の結果より、現在有効な治療法のない RSV に対して、核酸医薬としての siRNA の応用が期待できると考えられ、さらに SSPE においてもドラッグデリバリーが問題を克服することにより新たな治療法となりうると考えられる。

### E. 結論

siRNA は RSV 感染症や SSPE の新たな治療薬となる可能性があると考えられた。



F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 橋本浩一, 石橋 啓, 金子久俊, 細矢光亮,  
錫谷達夫:SV に対する siRNA の *in vitro*, *in vivo* における検討. 第 53 回日本ウイルス学会, 横浜, 平成 17 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## RNA interference による麻疹ウイルス/亜急性硬化性全脳炎(SSPE)ウイルスの 増殖抑制に関する研究

分担研究者：堀田 博 神戸大学大学院医学系研究科

### 研究要旨

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長期持続感染することによっておこる極めて予後不良の遅発性ウイルス感染症である。現在、SSPE 患児に対してインターフェロンとイノシプレックス或いはリバビリンの併用療法が行われており、一時的な症状の改善や生存期間の若干の延長が一部の症例で認められているが、生命予後の観点からみると満足すべき治療法とはいえない。そのため、SSPE に対するより有効な新たな治療法の開発が求められている。本研究では、RNA interference の原理に基づく small interfering RNA (siRNA) を用いた麻疹ウイルス/SSPE ウイルス増殖抑制法の開発について検討した。その結果、麻疹ウイルス/SSPE ウイルスの L mRNA を標的とした複数の合成 siRNA 及びその発現プラスミド(pcPUR+U6i 由来)は、効果的かつ特異的に、細胞障害性を呈することなく、同ウイルスの増殖を抑制することを明らかにした。麻疹ウイルス/SSPE ウイルス L タンパク質は RNA 依存性 RNA 合成酵素であり、ウイルスの複製に不可欠なものである。今回我々が開発した siRNA は、現在有効な治療法のない致死性疾患である SSPE に対する新規の治療法の一つとなり得ると考えられる。

### A. 研究目的

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長期持続感染することによっておこる極めて予後不良の遅発性ウイルス感染症である。現在、SSPE 患児に対してインターフェロンとイノシプレックス或いはリバビリンの併用療法が行われており、一時的な症状の改善や生存期間の若干の延長が一部の症例で認められている。しかし、現行のSSPE 治療法は未だ満足すべきものではなく、より有効な新規治療法の開発が求められている。

21～23bp の二本鎖 RNA からなる small interfering RNA (siRNA)による RNA interference

(RNAi)は、宿主の生体防御機構の一つとして重要な役割を持つことが明らかになってきており、多くの種類のウイルス増殖を抑制することも報告されている。しかし現在まで、SSPE ウイルスや麻疹ウイルスに対する siRNA の効果については全く調べられていない。

本研究ではSSPE ウイルスの増殖を効果的に抑制する siRNA を用いた治療法開発のための基礎データを得ることを目的とした。

### B. 研究方法

1) 合成 siRNA と siRNA 発現プラスミド  
種々の genotype に属する麻疹ウイルスの L

mRNA 塩基配列の alignment 解析により、siRNA の標的としての条件に適合し、かつ、genotype 間で可及的高度に保存されている配列を 8 ヶ所選定した。

上記の塩基配列に対応するセンス及びアンチセンスの合成 RNA オリゴヌクレオチドを作製し、両者を常法によりアニーリングさせて合成 siRNA を作製した。なお、siRNA の安定性を高めるため、3'末端の配列は UU のかわりに TT にした。

siRNA 発現プラスミドの構築は既報の方法に基づいた。すなわち、センス及びアンチセンスの合成 DNA オリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、siRNA 発現ベクター pcPUR+U6i (東京大学大学院工学系研究科・多比良和誠教授より分与) の U6i プロモーター下流にクローニングした。

合成 siRNA 及び siRNA 発現プラスミドは、FuGene 6 を用いて常法により培養細胞にトランスフェクトした。

## 2) ウイルスと細胞培養

SSPE ウイルスは最近我々が分離した SSPE-Kobe-1 株(genotype D3)を用いた。麻疹ウイルスは新鮮分離株 K52(genotype D3)と T8(genotype D5)、及び実験室継代株 Edmonston(genotype A)を用いた。麻疹ウイルスに無関係のウイルスとして脳心筋炎ウイルス

(EMCV ; DK-27 株)を用いた。

SSPE ウイルス及び麻疹ウイルスの培養には B95a 細胞及び Vero/SLAM 細胞(九州大学大学院医学研究科・柳雄介教授より分与)を用いた。B95a 細胞は 10%ウシ胎児血清含有 RPMI1640 培地で、また、Vero/SLAM 細胞は 10%ウシ胎児血清と G418(400  $\mu$ g/ml) 含有 Dulbecco Eagle 培地で培養した。

それぞれのウイルスの感染力価は Vero/SLAM 細胞を用いたプラークアッセイにより測定した。(倫理面への配慮)

SSPE ウイルス新鮮分離株は、インターフェロン髄腔内持続注入を行うためのオンマヤリザバー設置時に、十分なインフォームドコンセントを得た上で診断確定のため脳から分離したものをを用いた。従って本ウイルスの使用に関して倫理的問題点はない。なお、すべての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ー指針に準拠して行った。

## C. 研究結果

### 1) 合成 siRNA による麻疹ウイルス増殖の抑制

SSPE ウイルスの親株である麻疹ウイルスを用いて、合成 siRNA のウイルス増殖抑制効果を調べた。用いた siRNA の標的配列とウイルスゲノム上における位置を図示する(図 1)。陰性対照として C 型肝炎ウイルスの NS3 を標的

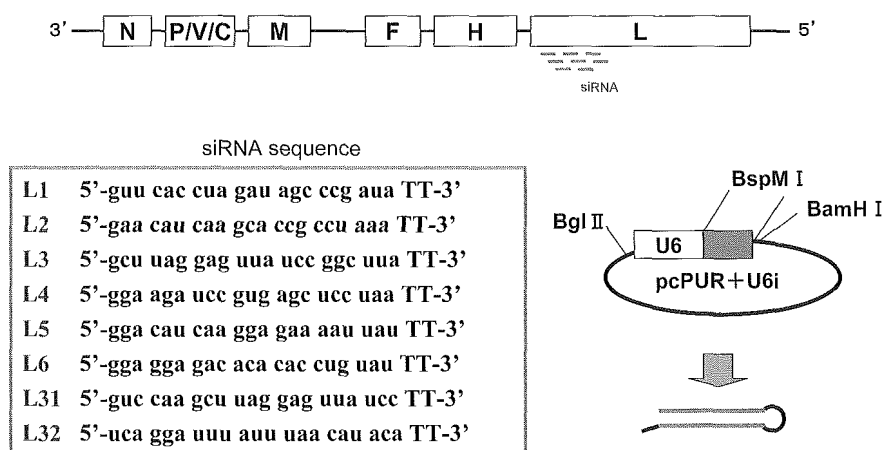


図 1 麻疹ウイルス/SSPE ウイルスの遺伝子構造と siRNA 配列

とする NS3-2 siRNA を用いた。

まず最初の実験では、Vero/SLAM 細胞に siRNA をトランスフェクトして 5 時間後に麻疹ウイルス K52 株を感染させ、48 時間後に培養上清を採取して、そのウイルス力価を比較測定した。図 2 に示すように、麻疹ウイルス K52 株の増殖は、siRNAs MV-L2、-L4 及び -L5 によって著しく抑制された。MV-L1、-L3、-L31 及び -L32 による抑制は中等度であり、一方、MV-L6 ではほとんど抑制されなかった。なお、麻疹ウイルス K52 株の L mRNA 上の標的配列は本実験で用いた 8 種類の siRNA 配列と同一である。

次の実験では、麻疹ウイルス K52 株を先に感染させてから、一定時間後に MV-L2 siRNA をトランスフェクトし、そのウイルス増殖抑制効果を調べた。ウイルス感染 1、6 あるいは 12 時

間後に MV-L2 siRNAs を添加した場合には、ウイルス感染前に添加した場合と同程度に、麻疹ウイルス K52 株の増殖を効果的に抑制した (図 3)。しかしながら、感染 24 時間後に MV-L2 siRNA を投与した場合には、そのウイルス増殖抑制効果はほとんど認められなかった。MV-L2 siRNA の抑制効果は濃度依存性であり、50% 抑制濃度は 3nM であった (図 4)。

## 2) 発現プラスミド由来 siRNA による麻疹ウイルス増殖の抑制

MV-L1~L5 及び -L32 を発現する pcPUR+U6i 由来発現プラスミドを構築し、麻疹ウイルス K52 株に対する増殖抑制効果について調べた。陰性対照として pcPUR+U6i 空ベクターと NS3-2 siRNA 発現プラスミドを用いた。その結果、pcPUR+U6i 由来 siRNA のうち 4 種

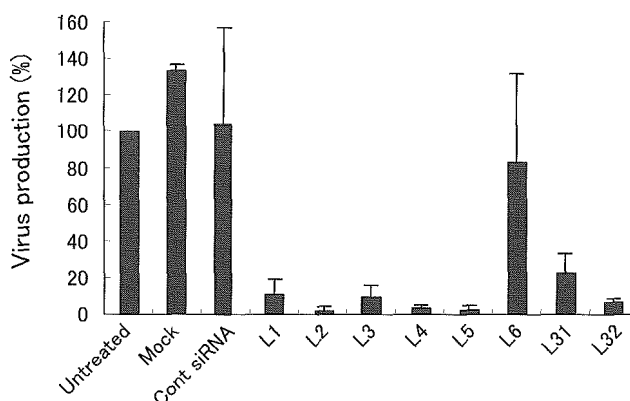


図 2 合成 siRNA の麻疹ウイルス K52 株 (D3) 増殖抑制効果

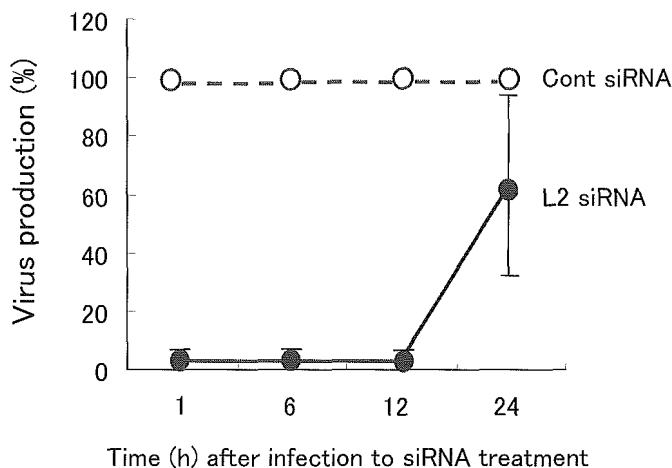


図 3 合成 siRNA 投与時期と麻疹ウイルス増殖抑制効果

類(MV-L2、-L4 及び-L5)はいずれも、麻疹ウイルス K52 株の複製を著しく抑制した(図 5)。MV-L1、-L3 及び-L32 の抑制効果は上記 4 種類の siRNA より弱かった。発現プラスミド由来の siRNA MV-L2、-L4 及び-L5 は、genotype の異なる麻疹ウイルス T8 株(genotype D5)の増殖も著しく抑制した(図なし)。なお T8 株の遺伝子配列は上記 4 種類の siRNA の標的配列

と同じである。一方、麻疹ウイルス Edmonston 株(genotype A)に対しては、MV-L2 siRNA がウイルス増殖を効果的に抑制したが、MV-L4 と-L5 による抑制効果は認められなかった(図 6A)。なお、MV-L4 及び-L5 の標的配列は、genotype D3 と genotype A の間でそれぞれ 1 カ所及び 2 カ所の塩基置換があり、他方、MV-L2 の標的配列は双方の genotype で完全に一致し

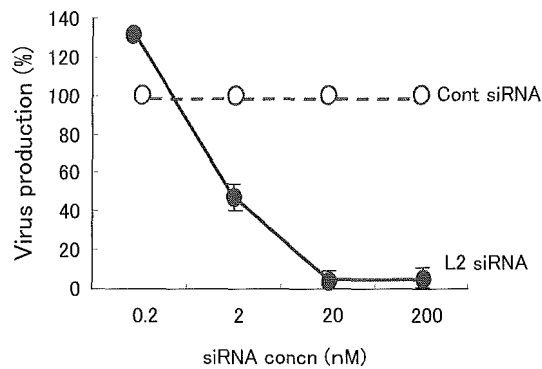


図 4 合成 siRNA の濃度依存的麻疹ウイルス増殖抑制効果

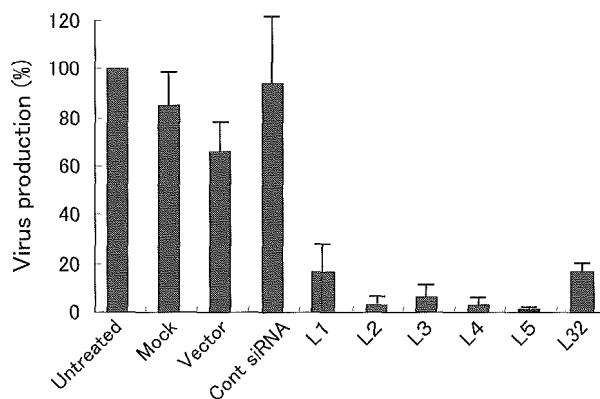


図 5 pcPUR 由来 siRNA の麻疹ウイルス K52 株(D3)増殖抑制効果

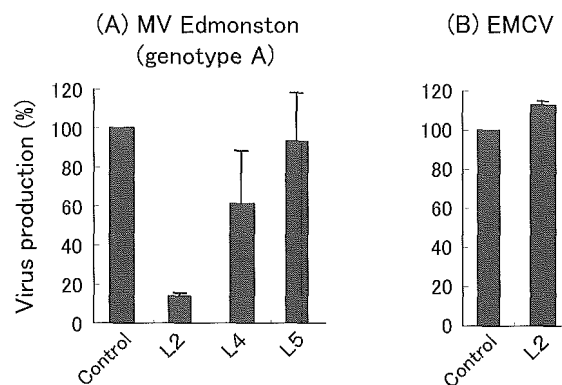


図 6 pcPUR 由来 siRNA の配列特異的ウイルス増殖抑制効果

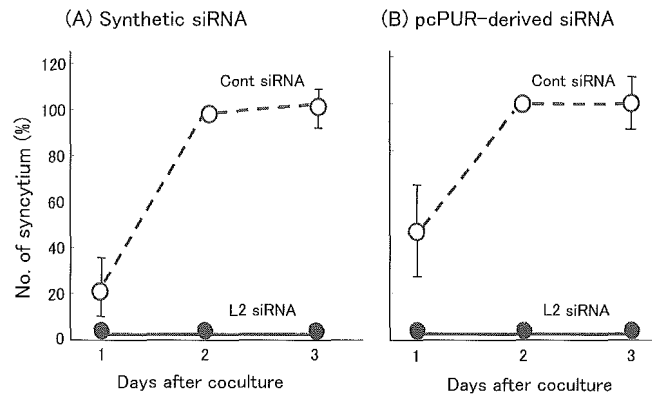


図7 合成 siRNA 及び pcPUR 由来 siRNA の SSPE ウイルス増殖抑制効果

ている。また予測通り、麻疹ウイルスとは無関係の EMCV の増殖については、MV-L2 siRNA による影響は全くみられなかった(図 6B)。これらのことから、今回用いた MV-L2 siRNA の抑制効果は麻疹ウイルス特異的であることが示された。

### 3) 合成 siRNA と発現プラスミド由来 siRNA による SSPE ウイルス増殖の抑制

最後に、SSPE ウイルスの増殖が上記の合成 siRNA 及び発現プラスミド由来 siRNA により抑制されるか否かについて検討した。

まず、SSPE-Kobe-1 株が持続感染している Vero/SLAM 細胞及び共培養用の非感染 Vero/SLAM 細胞に、合成 MV-L2 siRNA をトランスフェクトした。一晚経過後、これらの SSPE 感染細胞と非感染細胞を共培養し、24、48 及び 72 時間後に単層細胞上に出現する融合巨細胞数をカウントした。この実験により細胞内ウイルス増殖と細胞間ウイルス伝播の双方に対する siRNA の効果を調べることができる。その結果、合成 MV-L2 siRNA は SSPE ウイルスの細胞内増殖/細胞間伝播を著しく抑制することが分かった(図 7A)。同様に、発現プラスミド由来 MV-L2 siRNA も SSPE ウイルスの細胞内増殖/細胞間伝播を著しく抑制した(図 7B)。

更に、SSPE-Kobe-1 持続感染 Vero/SLAM 細胞の共培養開始から 6 時間後に合成 siRNA あるいは siRNA 発現プラスミドをトランスフェクトし、一晚培養後、培養液交換により siRNA を

除去して、その後の融合巨細胞の形成を経時的に観察した。このような条件下でも、合成 MV-L2 siRNA あるいは発現プラスミド由来 MV-L2 siRNA によって、SSPE ウイルスの増殖は顕著に抑制された(図なし)。

### D. 考察

麻疹ウイルス/SSPE ウイルスの L タンパク質は RNA 依存性 RNA 合成酵素で、ウイルス RNA 合成に不可欠であり、しかも全ての麻疹ウイルスタンパク質の中で最も発現量が少ない。従って、L タンパク質をコードする L mRNA は、SSPE ウイルス増殖抑制のための RNAi 戦略において最適の標的といえることができる。本研究において我々は、ウイルス L mRNA を標的とする合成及び発現プラスミド由来 siRNAs(特に MV-L2、-L4、-L5)が麻疹ウイルス/SSPE ウイルスの増殖を顕著に抑制することを明らかにした。

我々の実験系において、siRNA 発現プラスミドのトランスフェクション効率は約 50%であった。このことは、残る約半数の細胞には siRNA 発現プラスミドが導入されていないことを意味している。このような条件下でも、麻疹ウイルス/SSPE ウイルスの増殖は対照に比べて 90%以上抑制された。このような強力な抑制効果は次のように説明できる。すなわち、ウイルス感染細胞は融合巨細胞を形成する際に隣接する非感染細胞と融合するが、その細胞融合を

介して、予め非感染細胞内で産生されていた siRNA が感染細胞に入り、それ以降のウイルス増殖を効果的に抑制するものと考えられる。このことは、siRNA 治療により SSPE ウイルス感染の拡大を阻止し得ることを示唆している。

いくつかの siRNA はインターフェロン (IFN) 系を活性化すると報告されているが、今回我々が作製した siRNA は IFN 高感受性ウイルスである EMCV の増殖を全く抑制しなかった。この成績は、本研究で用いた siRNA によるウイルス増殖の抑制は IFN 系を介していないことを意味している。また、IFN 介在性、非介在性を問わず、本研究で用いた siRNA による直接の細胞障害はほとんどみられなかった。これらのことは、本 siRNA を生体に投与した時の非特異的副反応のリスクは比較的小さいということを示唆しているものと思われる。

これまで、SSPE に対して満足のいく治療法は確立されておらず、その予後は極めて不良である。それ故、この siRNA を用いた治療法は SSPE の新規治療法の有力候補の一つと考えられる。MV-L2 siRNA の標的配列は、genotype の異なるほとんどの麻疹ウイルスと SSPE ウイルスにおいてよく保存されている。しかしながら、一般にウイルスは、遺伝子変異により巧妙に siRNA の抗ウイルス効果を回避する能力を備えている。とくに RNA ウイルスはその特性として遺伝子変異をおこしやすく、なかでも、SSPE ウイルスは患者体内で長期間持続感染するので遺伝子変異の確率もより大きくなる。従って、siRNA による SSPE の治療を考える時、標的配列が異なる複数の siRNA を組み合わせて用いることが望ましい。さらに、SSPE ウイルスの標的である中枢神経細胞に siRNA を効率よく導入する方法を確立することも重要な課題である。現在、組換えアデノウイルスあるいは特殊なシリカ粒子やカチオンリポソームを用いた drug delivery 法を応用して、より効率的に標的細胞に siRNA を発現させる方法の確立を目指している。

## E. 結論

麻疹ウイルス/SSPE ウイルスの増殖を顕著に抑制する合成 siRNA とその発現プラスミドを開発した。これらの siRNA は、中枢神経組織への有効な drug delivery 法と組み合わせることにより、現在有効な治療法がなく極めて予後不良の疾患である SSPE に対する新規の治療法の一つとなり得ると考えられる。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Otaki M, Sada K, Kadoya H, Kato S, Nagano-Fujii M, Hotta H : Inhibition of measles virus and subacute sclerosing panencephalitis virus by RNA interference. Antiviral Res. (in press)

### 2. 学会発表

- 1) 大瀧桃子, 長野基子, 角矢博保, 加藤誠一, 野村有紀, 定清 直, 堀田 博 : siRNA による SSPE ウイルス増殖抑制法開発の基礎的検討. 第53回日本ウイルス学会学術集会, 2005 (横浜)
- 2) 加藤誠一, 長野基子, 大瀧桃子, 扇本真治, 定清 直, 堀田 博 : 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) 発症後早期に分離された SSPE ウイルスのゲノム構造とウイルス性状の解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会, 2005 (横浜)
- 3) 大瀧桃子, 長野基子, 角矢博保, 加藤誠一, 瀧川有紀, 定清 直, 堀田 博 : siRNA による麻疹ウイルス/SSPE ウイルスの増殖抑制. 第58回日本細菌学会関西支部総会, 2005 (神戸)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班  
分担研究報告書

カニクイザル中枢神経における麻疹ウイルス持続感染

分担研究者：網 康至 国立感染症研究所・動物管理室  
協力研究者：須崎百合子 国立感染症研究所・動物管理室  
協力研究者：小船富美夫 東京大学医科学研究所・実験動物研究施設

研究要旨

麻疹ウイルスの脳内侵入経路を明らかにする目的で、麻疹ウイルスを経鼻接種後、ウイルス血症の極期である感染 7 日後に、末梢血より単核細胞を分離し、同一個体の視床に接種したカニクイザル 2 頭について、脳内における麻疹ウイルスの持続感染について検討を行っている。そのうちの 1 頭においては、高力価の血清中麻疹ウイルス中和抗体、抗麻疹ウイルス IgM 抗体、脳脊髄液中の麻疹ウイルス中和抗体が持続して検出され、また、麻疹ウイルス特異的刺激における細胞内  $\gamma$  IFN の産生 T 細胞反応も高値を示した。これらの結果は、この個体において麻疹ウイルス特異的抗原刺激が持続しているものと考えられ、中枢神経内に麻疹ウイルスが持続感染していることを示唆するものと考えられる。この個体は、感染後約 160 週においても、同様の状態を持続するとともに、脳脊髄液中の IgG index に変化は認められないものの、IgG 量は、増加傾向を示し、その他の結果とともに SSPE の病態と類似することから、ウイルス学的にも同じ病態を示していることが期待される。

A. 研究目的

麻疹ウイルスの脳内における持続感染が SSPE 発症要因のひとつであると考えられている。昨年度、中枢神経への持続感染成立を目的として、感染自己末梢血単核球を同一個体の視床に接種した 2 頭のカニクイザルについて長期間にわたる観察を行い、その 1 頭において抗麻疹ウイルス液性免疫・細胞性免疫の持続的な賦活化を呈し、かつ、脳脊髄液中に中和抗体を有し、中枢神経に持続感染していると考えられる個体について報告した。

SSPE では脳脊髄液中の IgG の性状について報告があり、多くの場合、IgG 量の増加、および IgG index の増加が、報告されている。また、

その IgG は、oligoclonal であることも報告されており、持続感染していると考えられる個体についてこれらを検討することが必要と考えられる。中枢神経に麻疹ウイルスが持続感染していると考えられる個体を含む 3 頭のカニクイザルについて、脳脊髄液中の IgG およびアルブミン量の変化を測定し、また、同時に脳脊髄液中の IgG の性状を、SSPE の病態と比較検討することを目的とする。

B. 研究方法

麻疹ウイルス HL-MoBr3 株  $10^5$ TCID<sub>50</sub> を経鼻接種し、感染 7 日後に末梢血より分離した単核球  $10^6$  個を、同一個体の大脳視床に接種した



3頭のうち2頭、対照として培養液を接種した2頭のうち1頭、合計3頭のカニクイザルについて臨床症状の観察を行った。また、経時的に末梢血液、脳脊髄液を採材し、抗麻疹ウイルス中和抗体価を測定した。

抗体価の測定は、血漿あるいは脳脊髄液を4倍希釈から2倍段階希釈し、攻撃ウイルスおよびFA抗原作成には、麻疹ウイルス野外分離株IC-B株、B95a細胞を用いて行った。

IgGおよびアルブミン量の測定は、ヒトIgGおよびアルブミン測定ELISAキットを用いて行い、標準品として、IgGは、protein Aアフィニティーカラムを用いて精製したカニクイザル血清中のIgGを、Bradford法でタンパク量を測定したものを、アルブミンは、カニクイザル血清を富士ドライケムを用いてブロムクレゾールグリーン法で測定して作成したものを、4頭のカニクイザルから採取した脳脊髄液中のIgGおよびアルブミン量を測定し

正常値として用いた。また、感染160週の脳脊髄液については等電点電気泳動を行った。

本実験は、国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て行った。

### C. 研究結果

実験群2頭および対照1頭の、感染後160週までの脳脊髄液中の中和抗体価、血漿中の中和抗体価の推移を表1に示した。感染細胞を視床に接種した1頭のカニクイザル(no.4565)については、いずれの値についても他の2頭に比べ高値でありかつその値を持続的に維持した。その他の2頭に脳脊髄液中の中和抗体価を観察期間中に認めることはなかった。

カニクイザル(no.4565)における脳脊髄液の性状を明らかにする目的で、IgGおよびアルブミン量の測定を行い、IgG index(=(IgG in CSF/IgG in serum)/(albumin in CSF/albumin in serum))を求めた(図1)。カニクイザル脳脊髄液中IgG

表1 脳脊髄液および血漿中の抗麻疹ウイルス中和抗体価

	Neutralizing titers											
	plasma						CSF					
	3W	41W	53W	80W	103W	160W	3W	41W	53W	80W	103W	160W
4561	32	2048	512	128	512	2048	<4	<4	(4)	<4	<4	<4
4564	64	1024	1024	256	1024	1024	<4	<4	<4	<4	<4	<4
4565	128	4056	2048	2048	2048	2048	<4	4	8	4	8	8

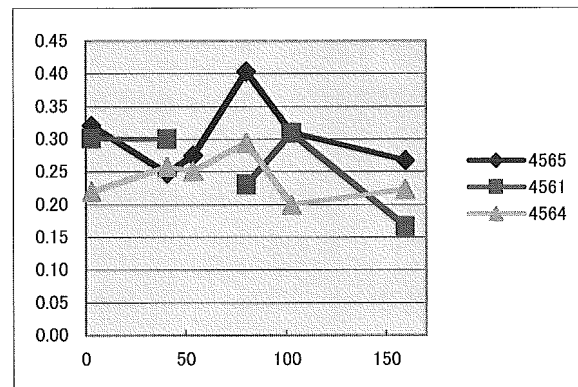
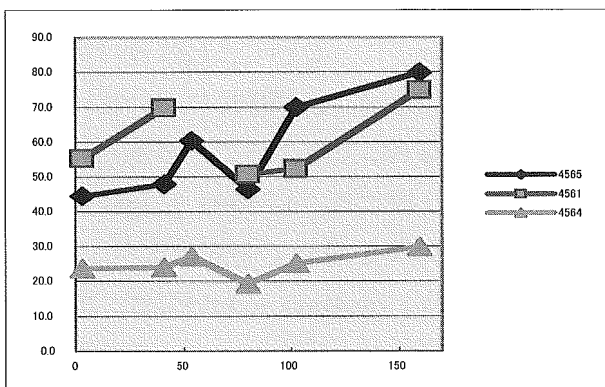


図1 脳脊髄液中のIgG量(10<sup>-2</sup>mg/dl)(左)とIgG index

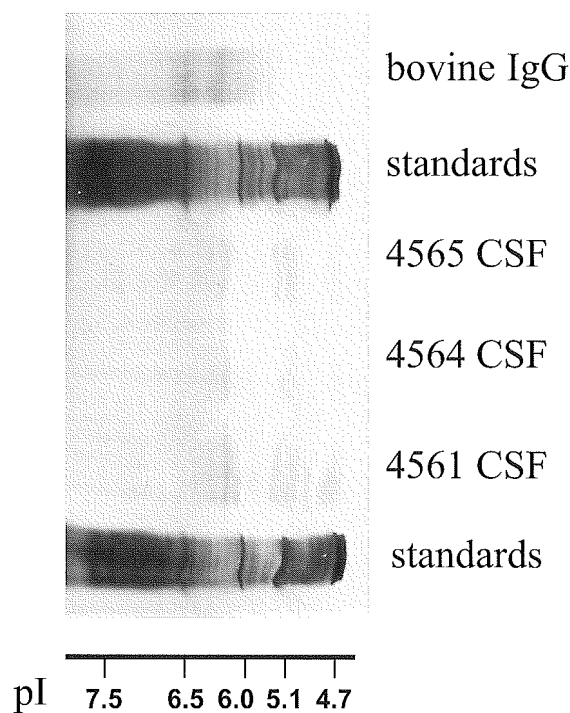


図2 脳脊髄液の等電点電気泳動像

量の正常値は、2.7mg(1.2～4.5mg)であり、no.4564 は、この範囲を観察期間にわたって示したが、no.4561 と no.4565 は、期間を通じて、高値を示してありた。特に、no.4565 は、その増加傾向を示し、感染 160 週では、約 80mg であった。

IgG index を求めると、no.4561 と no.4564 では減少傾向を示したが、no.4565 では、正常値範囲上限の 0.3 を期間を通じて維持し、減少することはなかった。カニクイザルの正常値は、0.25(0.16～0.33)であった。

感染 160 週の脳脊髄液の等電点電気泳動像を図 2 に示す。カニクイザル IgG は、pI 6.0～6.5 の範囲に分布するが、3 頭において、特異的なバンドは検出されず、oligoclonal IgG バンドは検出されなかった。

観察期間を通じて、臨床症状は実験群、対照群ともに観察されなかった。また、カニクイザル(no.4565)PBMC から麻疹ウイルスが分離されることはなかった。

#### D. 考察

カニクイザル(no.4565)は、脳脊髄液中に抗麻疹ウイルス中和抗体価を示し、かつ麻疹ウイルス特異的液性免疫および細胞性免疫が賦活化されている状態を約 3 年にわたり維持しており、中枢神経内における麻疹ウイルスの持続感染を示唆しているものと考えられた。

脳脊髄液中の麻疹ウイルス中和抗体の存在は、SSPE の臨床症状の一つとして重要であり、カニクイザル(no.4565)が同様の臨床所見を示すことは、これが SSPE のモデルになりうる可能性を示唆するものと考えられるが、SSPE に特徴的な臨床所見である脳脊髄液中の oligoclonal IgG の存在、IgG index の上昇は、認められなかった。しかし、IgG 量は期間を通じて上昇傾向を示し、SSPE においては、脳脊髄液中の IgG は、上昇することが知られており、この病態と一致する。no.4561 も IgG 量は高値を示すが、期間を通じての変化は少なかった。このことから、no.4565 においては、SSPE の病態との類似性が示唆され、ウイルス学的にも同様の病態が中枢神経内で起こっていると考えられた。

実験群の2頭の差異については、接種ウイルスに有為な差がないにもかかわらず、個体(no.4564)では持続感染が起きている可能性が示唆されない。今年度の脳脊髄液中のIgG量、IgG indexの推移からの結果も同様であり、持続感染が成立するには、中枢神経に到達するウイルス量よりはむしろ宿主側の要因が重要なのかも知れない。再現性の実験で明らかにする予定である。

また、今後、持続感染が認められた個体の発症の有無についてさらに観察をつづける必要があるものと考えられる。今までのところ、IgG indexが高値であるものの、正常範囲を超えていない。発症と症状の進行には、IgG indexの上昇が伴うこと知られており、このサルが発症していないことはヒトでの臨床学的経験と一致しているかもしれない。IgG indexのさらなる上昇と、発症とに相関が見られるか否かについても、今後さらなる観察により明らかにされるものと期待される。

持続感染から発症に至るためには、もう1段階の別の要因があるかもしれない。感染160週においても、no.4565の麻疹ウイルス特異的刺激におけるCD8(+),  $\gamma$ IFN(+)細胞頻度は、高値を示しており、ヒトのSSPE患者では、麻疹ウイルス特異的細胞性免疫はむしろ低下しているという報告の結果と異なる。

## E. 結論

感染自己末梢血単核球の脳内接種したカニクイザルの1頭で、感染約160週後においても脳脊髄液中に麻疹ウイルス中和抗体が検出され、血漿中には抗麻疹ウイルス中和抗体が持続して検出された。また、この時期中一貫して、脳脊髄液中のIgG量は上昇し、SSPEの病態との類似性が示唆され、ウイルス学的にも同様の病態が中枢神経内で起こっていると考えられた。これらの結果は、この個体において麻疹ウイルスが中枢神経に持続感染していることを示唆するものと考えられた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Takeuchi K, Takeda M, Miyajima N, Ami Y, Nagata N, Suzaki Y, Shahnewaz J, Kadota S, Nagata K : Stringent requirement for the C protein of wild-type measles virus for growth both *in vitro* and in macaques. *J Virol.* **79**(12) : 7838-44. 2005

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。) なし

## 進行性多巣性白質脳症の病態と治療法の解明 PML の第二次全国疫学調査結果

分担研究者：岸田 修二 東京都立駒込病院神経内科

### 研究要旨

PML の統一した診断基準に基づく第一次全国疫学調査結果を踏まえ、臨床の詳細を明らかにする目的で第二次調査を神経内科専門医を対象に行った。回答は definite 13 例、probable 15 例、possible 4 例であった。①基礎疾患として非 HIV が 21 名(66%)、HIV が 11 名(34%)であった。②年齢は平均 53 歳であった。③調査期間内での発病からの生存日数は 1 ヶ月から 75 ヶ月におよび、非 HIV 患者では 18 名、HIV 患者では 4 名死亡し、多くは 1 年以内に死亡していた。④死因は PML が 36%、その他が 41%であった。⑤経過では 84%の患者で進行性経過をとり、16%で停止～改善を見た。⑥初発は 84%で大脳半球、16%で小脳であった。⑦初発症状は運動麻痺、認知機能障害、失語症、視力障害が代表的であり、経過中に言語・嚥下障害、脳神経麻痺、無動無言状態が多くの症例で加わっていた。⑧画像検査では初診時の病変は単一病巣が 20 例、多発例が 8 例あった。小脳発症は 5 例のみでその他は大脳に初発していた。⑨髄液検査では細胞数は殆どの例で増加はなく、蛋白は軽度上昇するものが 1/3 例にみられた。⑩definite 例の 8 例は脳生検によるものであり、5 例は剖検診断によるものであった。⑪HIV 症例では発症時の CD4 リンパ球数は平均 66.3/ $\mu$ L と低値であった。⑫治療面では、HIV 関連 PML では HAART が有効であったが、その他に関しては全く有効例を見なかった。

### A. 研究目的

進行性多巣性白質脳(以下 PML)は AIDS(後天性免疫不全症候群)の出現以来しばしばみられる日和見性神経疾患の一つとなった。本症は polyomavirus の JC ウイルスが原因となる中枢神経脱髄疾患であり、一旦発症すると、ほとんどの症例で進行性し、数ヶ月で死亡する転機をとる非常に重篤な疾患とみられている。従来診断は病理診断をもって行われていたが、近年画像や分子遺伝学進歩により本症の早期診断が可能となった。これらの知見をもとに予後不良な本症の診断の助力となるべく諸外国に先立ち統一した診断

基準を作成し、さらにそれを基にわが国における 1999 年～2003 年の実態調査を神経内科専門医を対象に行った。その結果、definite 例 20 例、probable 例 18 例、possible 例 14 例の計 52 例が認められた。本症はヒトにのみ発症する疾患であるために、発病や病状進行のメカニズム、さらに有効な治療法の解明には個々の症例の解析が必要であり、その臨床像と予後、治療歴などを明らかにする目的で第二次調査を行った。

### B. 研究方法

わが国の神経内科専門医 3,920 名を対象に、