

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2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が、スコアが低い状態で治療開始できた例では、比較的良い状態を保っている。

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、それ以外を不変とすると、改善は3例、不変は3例、増悪は11例であった。但しスコアの変化とは別に、調査時スコアが44以下であったのは4例であった。SSPEの常に進行して行く病態を考えると、改善例と不変例にこの4例を加え重複例を除いた8例に、何らかの効果があったと考えられる。進行した例でも、リバビリン投与により緊張の軽減が認められた。

治療経過中に認められた有害事象としては、傾眠傾向13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5例、皮膚症状4例、眼球結膜充血4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、神経因性膀胱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、頻回の穿刺が誘因となっている可能性がある。また血圧低下が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、ミオクロームスがあった。

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、ミオクロームス、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、SSPEを発症した場合、免疫能の問題からか、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、当班で作成した『亜急性硬化性全脳炎診療ガイドライン』が活用されることが期待される。今後は、リバビリンの有効濃度を安全域でなるべく長時間維持させ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21症例について、アンケート調査の結果をまとめた。8例で何らかの効果を認めた。罹病期間によらず、スコアが低い内にリバビリン

治療を開始できると、比較的予後が良い傾向にあった。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おり、今後、麻疹予防接種の早期実施も検討する必要があると思われた。リハビリ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

特になし

G. 研究発表（2007/4/1～2008/3/31 発表）

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

1. 細矢光亮, 野村恵子. SSPE に対するリハビリ脳室内注入療法. 第12回日本神経感染症学会. 福岡, 2007.10.12.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

スコア

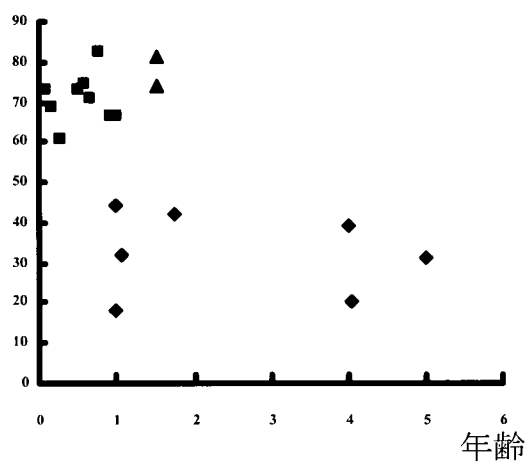


図 1. 麻疹罹患年齢と調査時スコア

調査時

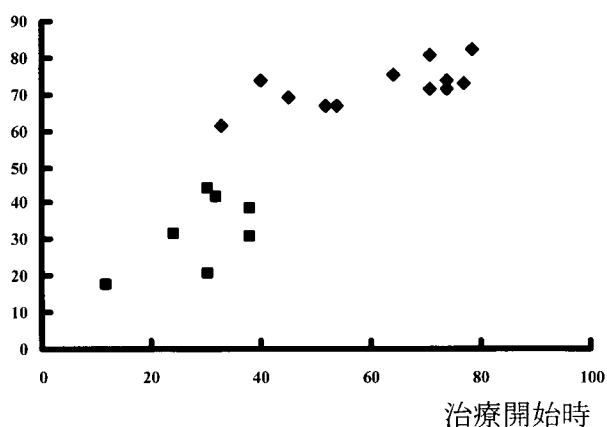


図 2. 治療開始時と調査時のスコア

亜急性硬化性全脳炎（SSPE）に対するリバビリン脳室内投与療法

分担研究者：細矢 光亮 福島県立医科大学・小児科

研究要旨

SSPE に対する新たな治療法としてリバビリン投与療法を試み、その効果と安全性を検討しているところである。リバビリン脳室内投与療法は髄液中リバビリン濃度を有効濃度に維持すれば効果が期待できるが、目標濃度に早期に到達させること、再燃に注意すること、リザーバー穿刺による細菌性髄膜炎に注意することなどが重要であると考えられた。

Intraventricular ribavirin administration for treatment of subacute sclerosing panencephalitis

Mitsuaki HOSOYA

ABSTRACT

We are proposing ribavirin intraventricular administration as the novel treatment for subacute sclerosing panencephalitis (SSPE), and investigating the efficacy and problems of the therapy. Significant improvements in clinical symptoms might be observed when the ribavirin concentration in CSF was kept at effective level. It is important to gain enough concentration in CSF immediately, to attend to the recurrence of SSPE and bacterial meningitis due to frequent reservoir punctures.

はじめに

亜急性硬化性全脳炎（subacute sclerosing panencephalitis, SSPE）は、変異麻疹ウイルス、いわゆる SSPE ウイルスによる中枢神経系スローウイルス感染症である。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。確実な治療法のない SSPE に対し、我々は RNA ウイルスに対し広く抗ウイルス効果を示すリバビリンの脳室内投与療法を試みている。

A. 研究目的

われわれは、SSPE に対する新たな治療法としてリバビリン投与療法を試み、その効果と安全性を検討しているところである。本療法の有効性と問題点を検証し、問題点の解決策と今後の展望を示した。

B. 研究方法

リバビリン経静脈投与および脳室内投与を施行した症例を対象に、臨床症状、NDI スコア、病期、髄液中麻疹抗体価、髄液中リバビリン濃度、副反応、再燃などを調査し、本療

法の有効性と問題点を明らかにした。

C. 研究結果

1. リバビリンの経静脈投与では、最大許容量の投与により、髄液中リバビリン濃度が最小有効濃度に達し、投与期間中は症状の改善が得られたが、投与中止後間もなく再燃した。この投与量にて貧血と口唇腫脹の副反応がみられたが一過性であり、投与中止により軽快した。
2. リバビリン脳室内投与による髄液中リバビリン濃度の動態は症例ごとにさまざまであり、目標濃度を維持するには1回投与量と1日投与回数を調整する必要があった。リバビリン濃度が目標濃度に維持された症例においては、臨床的効果（臨床症状の改善あるいは髄液麻疹抗体価の低下）が認められた。副反応としては、リバビリンに起因する傾眠傾向、頭痛、全身倦怠、口唇腫脹、嘔気・嘔吐がみられたが、一過性であった。重篤な副反応として、リザーバーの頻回穿刺に起因する細菌性髄膜炎がみられた。
3. リバビリン療法開始後2年以上経過した症例を検討すると、病期の比較的早い時期に治療を開始した症例で臨床的有効性が多いこと、治療開始初期に病勢を抑えられない症例があること、治療を中止すると数年を経過して再燃がみられることが明らかになった(図)。

D. 考察

上述の課題を克服するには、1) リバビリン療法の効果を確実にするために、治療開始後早期に髄液中リバビリン濃度を目的濃度に到達させること、2) リバビリン療法終了後は、臨床症状や髄液麻疹抗体価を刑事的にモニターし、再燃と判断される場合には早急にリバビリン療法を再開すること、3) リザーバーの穿刺に起因する細菌性髄膜炎の発生を減少させるために、各施設のリザーバー穿刺手技を統一させること、などが必要と考えら

れた。

E. 結論

リバビリン脳室内投与療法は髄液中リバビリン濃度を有効濃度に維持すれば効果が期待できるが、目標濃度に早期に到達させること、再燃に注意すること、リザーバー穿刺による細菌性髄膜炎に注意することなどが重要であると考えられた。

[参考文献]

1. Hosoya M, Sigeta S, Nakamura K, Clercq ED. Inhibitory effect of selected antiviral compounds on measles (SSPE) virus replication in vitro. *Antiviral Research* 1989; 12: 87-98.
2. Honda Y, Hosoya M, Ishii T, Shigeta S, Suzuki H. Effect of ribavirin on subacute sclerosing panencephalitis virus infections in hamsters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1994; 38 (4) : 653-655.
3. Ishii T, Hosoya M, Mori S, Shigeta S, Suzuki H. Effective ribavirin concentration in hamster brains for antiviral chemotherapy for subacute sclerosing panencephalitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996; 40 (1) : 241-243.
4. Takahashi T, Hosoya M, Kimura K, Ohno K, Mori S, Takahashi K, Shigeta S. The cooperative effect of interferon- α and ribavirin on subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus infections, in vitro and in vivo. *Antiviral Research* 1998; 37: 29-35.
5. Tomoda A, Shiraishi S, Hosoya M, Hamada A, Miike T. Combined treatment with interferon- α and ribavirin for subacute sclerosing

- panencephalitis. *Pediatric Neurology* 2000; 24 (1) : 54-59.
6. Hosoya H, Shigeta S, Mori S, Tomoda A, Shiraishi S, Miike T, Suzuki H. High-dose intravenous ribavirin therapy for subacute sclerosing panencephalitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; 45 (3) : 943-945.
 7. Hosoya M. Ribavirin therapy for subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). *Recent Res. Devel Antimicrob. Agents & Chemother* 2002; 5: 45-60.
 8. Hara S, Kimura H, Hoshino Y, Hayashi N, Negoro T, Okumura A, Kajita Y, Takashi Sakuma, Tersuo Nakayama, Hosoya M, Tomoda A, Morishima T. Combination therapy with intraventricular interferon- α and ribavirin for subacute sclerosing panencephalitis and monitoring measles virus RNA by quantitative PCR assay. *Brain & Development* 2003 ; 25: 367-369.
 9. Tomoda A, Nomura K, Shiraishi S, Hamada A, Ohmura T, Hosoya M, Miike T, Sawaishi Y, Kimura H, Takashima H, Tohda Y, Mroi K, Kato Z, Fukushima A, Nishio H, Nezu A, Nihei K. Trial of intraventricular ribavirin therapy for subacute sclerosing panencephalitis in Japan. *Brain & Development* 2008; 27: 514-517.
- F. 健康危険情報
特になし
- G. 研究発表
1. 論文発表
 1. Hosoya M, Kawasaki Y, Sato M, et al. Genetic diversity of coxsackievirus A16 associated with hand, foot, and mouth disease epidemics in Japan from 1983 to 2003. *J Clin Microbiol* 2007; 45 : 112-120.
 2. 細矢光亮. 亜急性硬化性全脳炎. *小児内科* 2006; 38: 698-699.
 3. 細矢光亮. 抗ウイルス薬, 感染と抗菌薬 2007; 10: 19-24.
 4. 細矢光亮. プリオン病と遅発性ウイルス感染症, 治療・予後. *日本臨床* 2007; 65: 1483-1486.
 2. 学会発表
 1. 細矢光亮, 野村恵子. SSPE に対するリバビリン脳室内注入療法. 第 12 回日本神経感染症学会 (福岡), 2007.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
特になし
 2. 実用新案登録
特になし
 3. その他
特になし

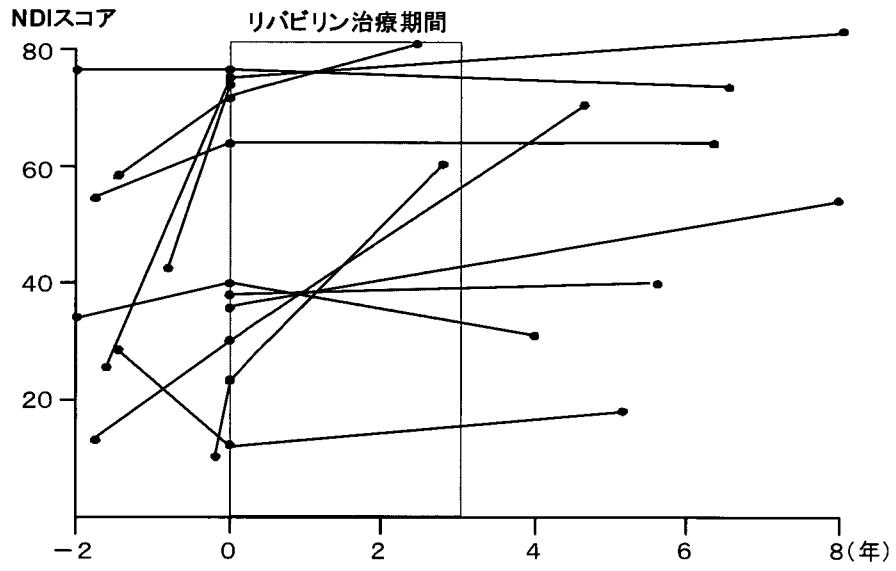


図. リバビリン脳室内投与療法の長期予後

SSPE ウイルスの M タンパク質のアミノ酸点変異と F タンパク質 C 末端領域の欠失変異により感染性ウイルス粒子産生能がほぼ完全に消失する

分担研究者：堀田 博 神戸大学大学院医学系研究科微生物学分野

研究要旨

亜急性硬化性全脳炎（SSPE）の病原体である麻疹ウイルス（MV）変異株（SSPE ウイルスともよぶ）の特徴は感染性ウイルス粒子（ビリオン）を産生しないこと及び神経親和性・神経病原性を有することである。しかし、これらの性質を規定するウイルス遺伝子の変異は、明らかに同定されていない。我々は昨年の本研究で、M タンパク質の変異により感染性ウイルス粒子の産生が約 1/1,000 に低下することを報告した。本研究では、M タンパク質以外の他のウイルスタンパク質の変異が感染性ウイルス粒子非産生性にどのように影響しているかについて検証した。

野生型 MV の M タンパク質に特定の点変異（L165P、L250P、Y282H）を導入した遺伝子組換え MV に、さらに SSPE ウイルスでしばしばみられる F タンパク質 C 末端領域の欠失変異を加えると、感染性ウイルス粒子の産生がほぼ完全に消失した。一方、感染細胞内のウイルス遺伝子複製やウイルスタンパク質合成は野生型 MV と同程度であった。また、野生型 MV に F タンパク質 C 末端領域の欠失変異のみを導入した場合には、感染性ウイルス粒子の産生は約 1/10 に低下した。以上の成績より、M タンパク質の変異と F タンパク質の変異が共同して、SSPE ウイルスの感染性ウイルス粒子非産生性を規定していると考えられた。

A. 研究目的

亜急性硬化性全脳炎（SSPE）の原因ウイルス（SSPE ウイルス）は麻疹ウイルス（MV）の変異株であり、感染性ウイルス粒子（ビリオン）を産生せず、神経親和性・神経病原性を有するという特徴を有している。しかし、これらの SSPE ウイルス特有の性質を規定する遺伝子変異は明らかに同定されていない。

我々は昨年の本研究で、SSPE ウイルス M タンパク質が有する特定アミノ酸の点変異を野生型 MV に導入することにより、感染性ウイルス粒子の産生が約 1/1,000 に低下するものの、完全には消失しないことを報告した¹⁾。一方、ウイルス粒子の形成・放出にウイルスエンベロープタンパク質が関与する可能性も指摘されている。本研究では、SSPE ウイル

スでしばしばみられる F タンパク質 C 末端領域の欠失変異^{2,3)} が感染性ウイルス粒子非産生性に影響しているか否かについて検証することを目的とした。また、M タンパク質や F タンパク質の変異により、ウイルスタンパク質の性状や機能がどのように変化するかについても検討した。

B. 研究方法

1) 遺伝子組換え MV の作製

遺伝子組換え MV 野生株（MV-IchB；九州大学・柳雄介教授より分与）⁴⁾ の M 遺伝子に様々な点変異を導入した変異 M タンパク質発現 MV 変異株は昨年報告したものをを用いた¹⁾。

F 遺伝子については、我々が最近分離した

SSPE ウイルス (Kobe-1 株)³⁾に見られた 1 塩基欠失によるフレームシフト変異を導入して、MV 変異株を作製した。

2) M タンパク質発現プラスミド

我々が最近分離した SSPE ウイルス (Kobe-1 株)³⁾ 及び MV 野外株 (MV-IchB) ならびにそれらを組み合わせた点変異を持つ M タンパク質を発現プラスミドにクローニングし、培養細胞に発現させた。

3) M タンパク質の性状解析

M タンパク質の細胞内局在は、細胞内小器官特異マーカーを用いた蛍光抗体法により行った。細胞内小器官マーカーとして ER-Tracker Red dye (小胞体)、BODIPY TR セラミド (ゴルジ体)、MitoTracker Red CMXRos (ミトコンドリア)、Texas Red-X phalloidin (F-actin) (いずれも Molecular Probes 社) を用いた。

4) 感染性遊離ウイルスの測定

B95a 細胞あるいは Vero/SLAM 細胞を用いたプラク法によった。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え MV の作製及び使用は神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認及び文部科学大臣の確認を得た。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) SSPE-Kobe-1 株に見られる F タンパク質 C 末端近傍領域の欠失変異を導入した遺伝子組換え MV 株の作製

親株である麻疹ウイルス野生株 (MV-Ich 株) の F 遺伝子 1571 位の A 残基を欠失させ、F タンパク質 C 末端近傍領域に変異を有する MV 変異株 (MV323-F (Δ 1571A)) を作製した。また、M タンパク質に点変異を有する MV 変異株¹⁾にも同様の F 遺伝子変異を導入し、M/F 変異 MV 株

(MV323L165P/L250P/Y282H-F (Δ 1571A)) も作製した。

F タンパク質の変異のみを持つ変異株 (MV323-F (Δ 1571A)) の感染性遊離ウイルス産生能は、親株 (MV-Ich) 株に比べて、約 1/10 に低下した。M タンパク質のみの変異株 (MV323L165P/L250P/Y282H) の感染性遊離ウイルス産生能は、MV-Ich 株に比べて、約 1/1,000 に低下したが、若干の感染性遊離ウイルス産生能が保持されていた。一方、M タンパク質と F タンパク質の変異を併せ持つ変異株 (MV323L165P/L250P/Y282H-F (Δ 1571A)) の感染性遊離ウイルス産生能は、ほぼ完全に消失した。なお、これらの変異 MV のウイルス遺伝子複製やウイルスタンパク質合成は、MV-Ich 株と同程度であった。これらの成績より、SSPE ウイルスが感染性遊離ウイルスを産生しないという性質は、M タンパク質と F タンパク質の両方の変異により規定されていることが示唆された。

2) MV 変異株の融合巨細胞形成能

M タンパク質の点変異と F タンパク質の欠失変異を併せ持つ MV 変異株は、B95a 細胞において、MV-Ich 株より強い融合巨細胞形成能を示した。一方、Vero/SLAM 細胞においては、MV 変異株と MV-Ich 株は同程度の融合巨細胞形成能を示した。

3) プラスミドにより単独発現させた M タンパク質の細胞内局在

我々は、昨年度の本研究で、MV-IchB 株の M タンパク質に点変異を導入すると、SSPE ウイルスの M タンパク質と類似の細胞内局在を示すことを報告した¹⁾。そこで、本年度は、より詳細に M タンパク質の細胞内局在について検討した。その結果、MV-IchB 株の M タンパク質は細胞膜に限局性に局在したが、1~3 ヶ所 (L165P、L250P、Y282H) あるいは、L165P/L250P/Y282H) に点変異を導入した M タンパク質はいずれも細胞質内と核 (核小体を除く) に一様に分布し、細

胞膜には認められなかった。ゴルジ体と一部共局在を示したが、ER、ミトコンドリアとはほとんど共局在を示さなかった。

3) ウイルス感染により発現した M タンパク質の細胞内局在

M タンパク質変異 MV 株、F タンパク質変異 MV 株、M/F 両タンパク質変異 MV 株、SSPE-Kobe-1 株及び MV-Ich 株のそれぞれについて、ウイルス感染により発現した M タンパク質の細胞内局在を調べた。F タンパク質のみ変異した MV 株では、MV-Ich 株の場合と同様の分布を示した。一方、M タンパク質変異 MV 株及び M/F 両タンパク質変異 MV 株では、SSPE-Kobe-1 株と同様に、M タンパク質は細胞膜には集積せず、核小体を除く核内に主として局在することがわかった。

D. 考察

本研究成績より、SSPE ウイルスが感染性遊離ウイルスを産生しないという性質は、M タンパク質と F タンパク質の両方の変異により規定されていることが示唆された。今回検討した M タンパク質の変異は特定の点変異であり、同タンパク質の可溶性を低下させ、通常見られる細胞膜への局在を阻害するものである。一方、F タンパク質の変異は、SSPE ウイルスでしばしば観察される C 末端近傍領域のフレームシフトに伴う欠失変異である。

M タンパク質の単一点変異のみでも、変異ウイルスの B95a 細胞における融合巨細胞形成能は、MV 野生株 (MV-Ich) に比べて増強した。このことは、SSPE ウイルスは M タンパク質の特定の点変異により感染性遊離ウイルス粒子産生能を低下させる一方で、細胞融合による感染伝播能を亢進させることを意味している。この M タンパク質の変異に F タンパク質の C 末端近傍領域欠失変異が加わると、さらに遊離ウイルス粒子産生能が低下し、しかも強い融合巨細胞形成能は保持されていることがわかった。このようなウイルス伝播

性状の変化が、中和抗体を有する宿主体内における長期間の持続感染を容易にしている可能性が考えられた。

また、SSPE-Kobe-1 株では、もう一つのエンベロープタンパク質である H タンパク質にも特有の変異が見られる^{2,3)}。今後は、H タンパク質にも変異を導入して、神経病原性を規定する遺伝子変異についても、さらに解析を進める予定である。

E. 結論

野生型 MV の M タンパク質の特定の点変異と F タンパク質 C 末端近傍領域の欠失変異により、感染性遊離ウイルス粒子の産生がほぼ完全に消失した。これらの変異が、SSPE ウイルスの感染性遊離ウイルス粒子非産生性を規定している可能性が示唆された。一方、上記の M タンパク質の点変異は、細胞間のウイルス伝播を促進することによって、中和抗体存在下に生体における持続感染を容易にしている可能性が示唆された。

[参考文献]

1. 堀田博. SSPE ウイルスの特徴である感染性遊離ウイルス粒子非産生性を規定する M タンパク質の単一アミノ酸点変異の同定. 平成 18 年度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 2007: 247-254.
2. 堀田 博, 姜 大鵬, 長野基子. プリオン病と遅発性ウイルス感染症: 原因ウイルスと発症機構. 日本臨床 2007; 65: 1475-1480.
3. Hotta H, Nihei K, Abe Y, Kato S, Jiang D-P, Nagano-Fujii M, Sada K. Full-length sequence analysis of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus, a mutant of measles virus, isolated from brain tissues of a patient shortly after onset of SSPE.

Microbiol Immunol 2006; 50: 525-534.

4. Takeda M, Ohno S, Seki F, Hashimoto K, Miyajima N, Takeuchi K, Yanagi Y. Efficient rescue of measles virus from cloned cDNA using SLAM-expressing Chinese hamster ovary cells. Virus Res 2005; 108: 161-165.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Otaki M, Jiang DP, Sasayama M, Nagano-Fujii M, Hotta H. Generation of recombinant adenovirus expressing siRNA against the L mRNA of measles virus and subacute sclerosing panencephalitis virus. Microbiol Immunol 2007; 51: 985-991.
2. 堀田 博, 姜 大鵬, 長野基子. プリオン

病と遅発性ウイルス感染症：原因ウイルスと発症機構. 日本臨床 2007; 65: 1475-1480.

2. 学会発表

1. 姜 大鵬, 長野基子, 堀田 博. SSPE ウイルス M 蛋白のアミノ酸変異による M 蛋白の可溶性と細胞内局在及び遊離ウイルス粒子産生への影響の解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2007.10.21.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

麻疹ウイルスの中樞神経系持続感染成立のメカニズム

分担研究者：柳 雄介 九州大学大学院医学研究院ウイルス学分野

研究要旨

麻疹ウイルス感染の小動物モデルとして受容体 SLAM 発現マウスを開発した。1 型インターフェロン受容体欠損マウスと交配することにより、麻疹ウイルスのトロピズム、免疫抑制能、毒力の違いを再現することができた。しかし、野生型麻疹ウイルスを用いた実験で、中樞神経系における *in vivo* および *in vitro* の感染は認められなかった。今後、ウイルス感染細胞の脳内接種や SSPE ウイルスの使用など実験法の改良が必要と考えられる。

A. 研究目的

SSPE の発症機構を明らかにするために、中樞神経系へのウイルス侵入および持続感染を再現できる小動物モデルを開発する。また、麻疹ウイルスと受容体の相互作用の構造基盤を解明することにより、ウイルスの感染阻止の方法を開発する。

B. 研究方法

麻疹ウイルス受容体である SLAM を発現するノックインマウスを作製した。様々なルート（経鼻、腹腔内、脳内）から、野生型麻疹ウイルスあるいは GFP（緑色蛍光色素）発現組換え野生型麻疹ウイルスを感染させ、長期に渡ってマウスを観察し、持続感染の有無を調べた。感染の有無は蛍光顕微鏡による GFP の検出ないしはウイルス力価の測定により行った。麻疹ウイルスと細胞受容体の相互作用を明らかにするために、麻疹ウイルスの受容体結合蛋白質である H 蛋白質を大量精製後、結晶化し、その X 線構造解析を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験については、必要な許可（遺伝子組換え実験に関する大臣確認および学内の動

物委員会）を受けている。

C. 研究結果

麻疹ウイルスは免疫系の細胞に発現しているヒト SLAM (CD150) を受容体として細胞に感染する。麻疹ウイルス感染の小動物モデルを開発するために、ヒト型 SLAM を発現している遺伝子改変マウス (SLAM ノックインマウス) を作製した。SLAM ノックインマウスは期待された通り、免疫系の細胞にヒト型 SLAM を発現していた。また、免疫機能に明らかな異常を認めなかった。*in vitro* の実験で野生型マウスの脾臓細胞に麻疹ウイルスは全く感染しなかったが、SLAM ノックインマウス由来の脾臓細胞には感染し、ウイルス増殖を認めた。しかし、*in vivo* では、腹腔内、経鼻、静脈内のいずれの経路からの接種でも感染が成立しなかった。そこで、ウイルス抵抗性に重要な役割をしているインターフェロン系に欠陥のある 1 型インターフェロン受容体欠損マウスと交配し、麻疹ウイルスを感染させた。その結果、全身のリンパ組織で麻疹ウイルスの感染、増殖を認めた。また、感染マウスから得られた脾臓細胞はマイトジェン刺激に対する反応が低下し、ヒトで見られる

免疫抑制を再現できた。さらに、*in vitro*、*in vivo* いずれの実験でも、病原性のある麻疹ウイルス野生株は **SLAM** ノックインマウスの免疫細胞でよく増殖したが、弱毒ワクチン株はほとんど増殖しなかった。すなわち、ウイルスの毒力の違いをマウスモデルで再現することができた。

そこで、次にこの **SLAM** ノックインマウスを用いて、中枢神経系で麻疹ウイルス感染が成立するか検討した。新生仔および成熟マウスに麻疹ウイルス野生株を脳内接種後 16 週観察したが、神経症状は認められず、脳からウイルスも回収できなかった。また、**GFP** 発現組換え野生型麻疹ウイルスを感染することにより、中枢神経系の細胞における感染細胞を検索したが、*in vivo*、*in vitro* いずれでも観察できなかった。

一方、麻疹ウイルス H 蛋白質の構造に関しては、X 線結晶構造解析の結果、その受容体結合ドメインは、6 つの羽根を持つプロペラ状の構造をしていることが分かった。これは、既に構造が解明されている他のパラミクソウイルス（シアル酸を受容体とする）の受容体結合蛋白質やインフルエンザウイルスのニューラミニダーゼ（やはりシアル酸と結合する）と同じ基本骨格である。しかし、その表面構造は立方体状であり、上記の他のウイルス蛋白質が示す球状構造とは異なっていた。

H 蛋白質上の **SLAM** 結合部位は単量体上では分子の側面に位置し、受容体との結合には不都合であるように見える。しかし、H 蛋白質は二量体構造をとり、それぞれの単量体が互いに水平面方向に大きく傾くことによって受容体結合部位がウイルス粒子の頂点にくるような配向をとる。この **SLAM** 結合部位の構造を基にした抗ウイルス薬の開発が今後期待される。

D. 考察

SSPE の発症機構の解明には小動物モデル

が不可欠であり、受容体 **SLAM** 発現マウスはその樹立へ向けた第一歩となった。しかし、**SLAM** 発現マウスでは、野生型麻疹ウイルスの持続感染の再現には至らなかった。今後、ウイルス感染細胞の脳内接種や **SSPE** ウイルスの使用など実験法の改良が必要と考えられる。

SSPE における主要なウイルス感染細胞であるニューロンには **SLAM** の発現は認められていない。これまでに報告されているマウスの脳感染モデルは、麻疹ウイルス野生株ではなく、齧歯類の脳に馴化したウイルス株（未知の分子を受容体としてニューロンに感染していると考えられる）が主に用いられている。また、別の受容体発現マウスモデルである **CD46** トランスジェニックマウスの場合、ニューロンに **CD46** が発現しており、**CD46** を受容体として使うワクチン株が実験に使われている。ヒトの **SSPE** では、受容体として **SLAM** を使う麻疹ウイルス野生株が、**SLAM** を発現していないニューロンに何らかのメカニズムで持続感染を起こしていると考えられる。ニューロンへの麻疹ウイルス侵入・伝播に関してこれまでに分かっている受容体とは異なる未知の分子を介したメカニズムも検討する必要がある。

E. 結論

麻疹ウイルスの受容体を発現するマウスを作製することにより、麻疹ウイルスの免疫細胞へのトロピズムや免疫抑制能を再現する動物モデルを樹立することに成功した。しかし、現時点では、本マウスと麻疹ウイルス野生株を用いて中枢神経系の持続感染を再現することはできていない。今後さらに実験系の改良が必要である。一方、麻疹ウイルスの受容体結合蛋白質の構造解析に関しては、結晶構造の解明に成功し、受容体結合領域の詳細な構造が明らかになった。今後、抗ウイルス薬の開発などにつながることを期待できる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 柳 雄介, 竹田 誠, 大野真治. 麻疹ウイルスの細胞侵入と受容体. 蛋白質 核酸 酵素. 2007; 52; 1088 -1094.
2. Takeda M, Tahara M, Hashiguchi T, Sato TA, Jinnouchi F, Ueki S, Ohno S, Yanagi Y. A human lung carcinoma cell line supports efficient measles virus growth and syncytium formation via a SLAM- and CD46-independent mechanism. J Virol 2007; 81 (21) : 12091-12096.
3. Hashiguchi T, Kajikawa M, Maita N, Takeda M, Kuroki K, Sasaki K, Kohda D, Yanagi Y, Maenaka K. Crystal structure of measles virus

hemagglutinin provides insight into effective vaccines. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104 (49) : 19535-19540.

2. 学会発表

1. 橋口隆生, 竹田 誠, 柳 雄介. X線結晶構造解析による麻疹ウイルス H タンパク質のレセプター認識の構造基盤. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2007.10.22.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

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。感染後約 250 週においても、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、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、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、これは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。しかし、麻疹ウイルス特異的刺激における細胞内 γ IFN の産生 T 細胞反応は、対照サルとともに検出できなくなった。麻疹ウイルス感染細胞抽出タンパクに対する抗体の反応性を検討したところ、持続感染サル抗体は、対照サルに比較してウイルスタンパク HA、M に対する反応性が低い傾向が見られたが特異的ではなかった。

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。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っている。その 1 頭においては、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。

SSPE 患者の血清中の麻疹ウイルスに対する抗体には、1970 年代後半にウイルス構成タンパクの一つである M タンパクに対する抗体が欠如しているとの報告があり、中枢神経に持続感染する麻疹ウイルスいわゆる SSPE ウイルスが、M タンパクをわずかにしかあるいは全く産生していないことが知られる契機

となった。その後、このような現象は SSPE に特異的なものではなく、他の麻疹ウイルス感染時に比較して弱いことが明らかとなっている。

本年度は、引き続き麻疹ウイルス特異的液性・細胞性免疫反応を測定するとともに、血中の抗体の麻疹ウイルス感染細胞に対する反応性を明らかに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 TCID₅₀ 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。

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

麻疹ウイルス特異的なT細胞反応は、Nanan Rらの方法を改良した方法を用いた。採取した末梢血単核球 10^6 個にmoi 0.1で麻疹ウイルスIC-B株を37°C、30分吸着感染させ、10% FCS RPMI1640培地中で、37°C 5%CO₂存在下で45時間培養後、通常の方法で、細胞表面抗原CD8,CD4,細胞内 γ IFNを標識抗体で染色し、Flowcytometer (EPICS elite)で測定、リンパ球中におけるそれぞれの細胞比率をwinMDIver2.8で解析した。産生細胞率は、ウイルス未接種PBMCの同時期間培養における値との差により算出した。

麻疹ウイルス感染細胞に対する血中抗体の反応性については、IC-B株感染B95a細胞をNP-40融解緩衝液で抽出したタンパクを抗原とし、5~12%Bis-Trisポリアクリルアミドゲルにて電気泳動後、ウエスタンブロッティングにより行った。感染後3週、1年、3年、5年後の血漿を用いて経時的な反応性の違いについても解析を行った。

(倫理面への配慮)

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、感染後約250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図1に示した。対照群の1頭(no.4561)および実験群の1頭(no.4564)では、脳脊髄液中に中和抗体価を認めることはなく、血漿中の中和抗体価は、減少傾向あるいは変動傾向を示した。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。

麻疹ウイルス特異的刺激におけるCD8陽性細胞内 γ IFNの産生については、持続感染していると考えられる個体(no.4565)を含むすべての個体で有意な産生は認められなくなった。これまでの経時的な変化を図2に示す。

カニクイザル(no.4565)における血中の抗麻疹ウイルス抗体の性状を明らかにする目的で、ウエスタンブロッティング法で解析を行った(図3)。対照個体も含めて、解析を行った3個体の血中抗体は、麻疹ウイルスの、HA、P、N、F、Mタンパクを認識していた。感染細胞を脳内接種していない対照サルでは、反応が弱い傾向を示したが、脳内接種を行った2頭では、その反応性の強度に特別な違いは認められなかった。持続感染の疑われる個体では、単量体HAおよびMタンパクに対する反応性が低い傾向が認められたが、同時期に麻疹ウイルスを2回経鼻感染させた個体にもそれらのタンパクに対して低反応性の個体が存在し、持続感染に特異的ではないものと考えられた。経時的な反応性の変化では、特にMタンパクに対する反応性が他のウイルスタンパクに対する反応に比較して低下傾向が著しい傾向が認められた。その他に特徴的なのは、感染3週後では認められないが、1年後の血中抗体から反応して出現する分子量16~18kDのバンドがこの個体のみを観察された。現在この反応するタンパクについて解析中である。

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が賦活化されている状態を約5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。

他の2頭においては、血漿中のウイルス中

和抗体は、減少傾向または変動傾向にあり、持続的な麻疹ウイルスの抗原刺激は無いものと考えられる。一方、no.4565では高い中和抗体価を維持しており、明らかにその傾向は他の2頭とは異なっており、持続感染を裏付ける結果と考えられる。

感染後約5年で、麻疹ウイルス特異的的刺激に対する γ IFN産生T細胞が認められなくなった。SSPEでは、その発症期に多くのウイルス感染で報告されている様なTh1細胞系のサイトカインの産生が認められないことが知られており、これに一致する。このような細胞性免疫の低下が発症要因の一つかもしれない。

SSPEのウイルス学的要因の一つは、持続感染する麻疹ウイルスが変異することも重要なことが知られており、HAタンパクに変異やMタンパクの欠損が起こることも知られている。また、SSPE患者血中抗体が、これらのタンパクに対して麻疹罹患歴がありSSPEを示さない人の血中抗体とは、異なった反応性を示すことも知られている。持続感染が疑われる個体(no.4565)では、対照および非持続感染個体とは、これらのタンパクに対する反応性が異なり、持続感染ウイルスの変異を強く疑わせるが、特異性は認められなかった。

観察期間を通じて臨床症状も観察されず、発症には至っていない。しかしながら、これまでの疫学的調査結果から、麻疹罹患からSSPE発症までに、平均6年を要することから、引き続き観察する必要があるものと考えられる。感染後250週において麻疹ウイルス特異的的刺激におけるCD8(+), γ IFN(+)細胞頻度が認められなくなったのは発症が近いことを期待させる。

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250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。抗麻疹ウイルス抗体は、持続感染を示さない個体に比べて、単量体HAおよびMタンパクに対する反応性が低い傾向が認められたが、その特異性は認められなかった。

[参考文献]

1. Dhib-Jalbut S, Jacobson S, McFarlin DE, McFarland HF. Impaired human leukocyte antigen-restricted measles virus-specific cytotoxic T-cell response in subacute sclerosing panencephalitis. *Ann Neurol* 1989; 25: 272-280.
2. Hall WW, Lamb RA, Choppin PW. Measles and subacute sclerosing panencephalitis virus proteins: Lack of antibodies to the M protein in patients with subacute sclerosing panencephalitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 2047-2051.

F. 健康管理情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sato H, Kobune F, Ami Y, Yoneda M, Kai C. Immune responses against measles virus in cynomolgus monkeys. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2008 31: 25-35.
2. Kobune F, Ami Y, Katayama M, Takahashi M, Tuul R, Korukluoglu G, Kiyohara T, Miura R, Sato H, Yoneda M, Kai C. A novel monolayer cell line derived from human umbilical cord blood cells shows high sensitivity to measles virus. *J Gen Virol* 2007; 88:

1565-1567.

2. 実用新案登録

特になし

2. 学会発表

特になし

3. その他

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

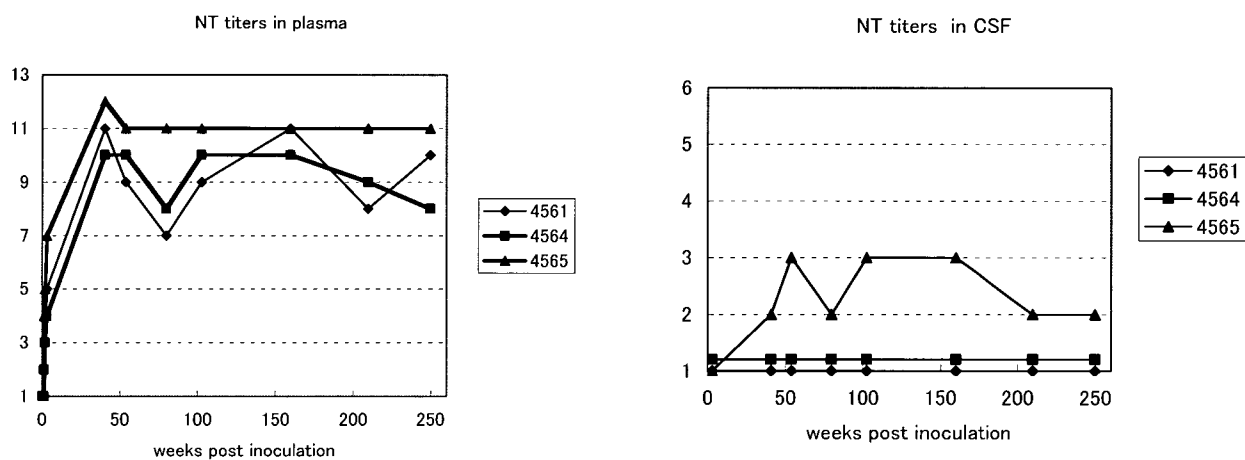


図 1. 血漿中および脳脊髄液中の抗麻疹ウイルス中和抗体価

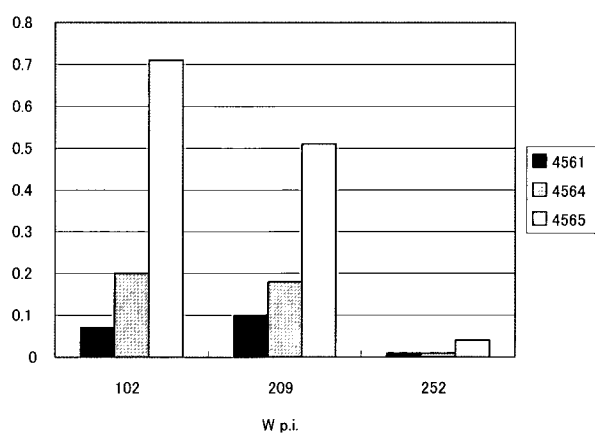


図 2. 麻疹ウイルス特異的抗原刺激に対する CD8 (+) γ IFN (+) 細胞頻度の経時的変化

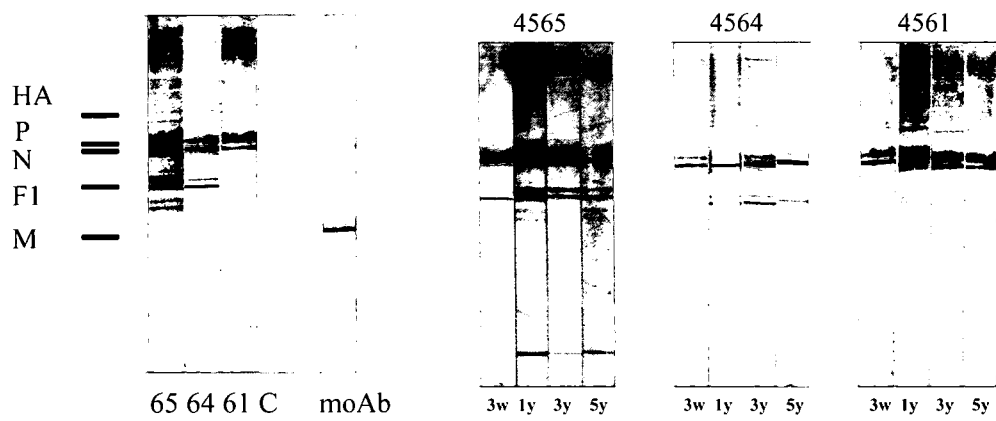


図 3. 血中抗麻疹ウイルス抗体のウイルスタンパクに対する反応性と経時的変化

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kobayashi A, Asano M, Mohri S, Kitamoto T.	Cross-sequence transmission of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease creates a new prion strain.	J Biol Chem	282(41)	30022-8	2006
Cairns NJ, Bigio EH, Mackenzie IR, Neumann M, Lee VM, Hatanpaa KJ, White CL 3rd, Schneider JA, Grinberg LT, Halliday G, Duyckaerts C, Lowe JS, Holm IE, Tolnay M, Okamoto K, Yokoo H, Murayama S, Woulfe J, Munoz DG, Dickson DW, Ince PG, Trojanowski JQ, Mann DM.	Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration.	Acta Neuropathol (Berl)	114	5- 22	2007
Doh-Ura K, Kuge T, Uomoto M, Nishizawa K, Kawasaki Y, Iha M.	Prophylactic effect of dietary seaweed Fucoidian against enteral prion infection.	Antimicrob Agents Chemother	51(6)	2274-2277	2007
Doh-ura K, Tamura K, Karube Y, Naito M, Tsuruo T, Kataoka Y.	Chelating compound, chrysoidine, is more effective in both antiprion activity and brain endothelial permeability than quinacrine.	Cell Mol Neurobiol	27(3)	303-316	2007
Dong J, Li A, Yamaguchi N, Sakaguchi S, Harris DA.	Doppel induces degeneration of cerebellar Purkinje cells independently of Bax.	Am J Pathology	171(2)	599-607	2007