

人のみであった。

1986年以降に年間一定点当たり報告数が40以上あった累積都道府県は60あったが、SSPE患者が当該年に2人以上麻疹に罹患した都道府県は7カ所、1人が12カ所で、41カ所の都道府県は0人であった。年間一定点当たり報告数が40以上の麻疹流行地域でも、その年の麻疹罹患患者からSSPEを発病しない都道府県が3分の2あった。

1990年には一定点当たり報告数が40以上の地域は7県であった(図2)。7県中SSPE患者の麻疹罹患は沖縄県7人と宮崎県2人の2県のみであった。中国地方や滋賀県でも麻疹が流行したが麻疹罹患数は0人であり、沖縄県と九州での罹患が多かった。

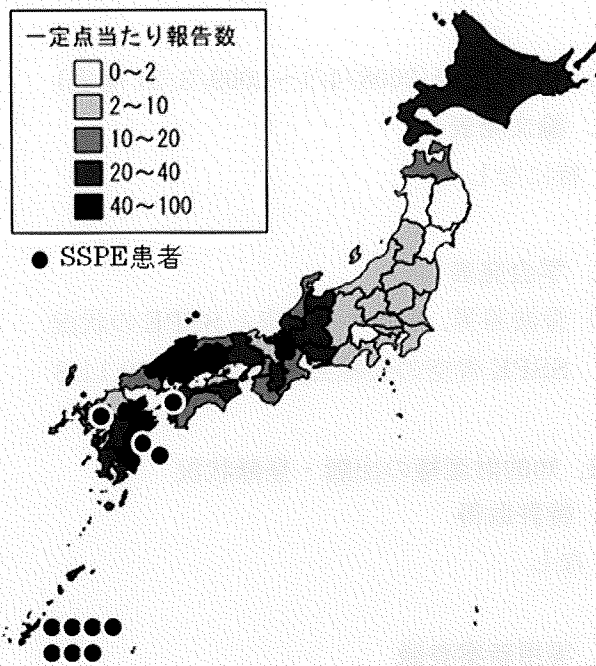


図2 1990年の都道府県別麻疹一定点当たり報告数とSSPE患者の麻疹罹患数
7県で麻疹が大流行した(報告数40以上)が、沖縄県ではこの年の麻疹罹患から7人がSSPEを発病した。

一定点当たりの報告数に比べて麻疹罹患数が多い現象は、年度毎に地域集積性がみられた。1986~1987年には北海道・中部・北九州、1988~1989年には関東、1990~1991年には沖縄・九州、1998~1999年には南関東での罹患数が多かった。1998~1999年の南関東では各都県とも一定点当たりの報告数が7未満であったが、2年間に4都県で6人が麻疹に罹患した。

D. 考察

これまでの全国的なSSPEサーベイランス調査では、おもに年度毎のSSPE発病数を報告している(1,2)。麻疹感染後SSPE発病までの潜伏期間は2~10年と差があるため、麻疹流行とSSPE発病との関連性を調べるためには、SSPE患者が麻疹に感染した年を調べて年度別罹患数を集計し、麻疹の流行状況と比較しなければならない。今回のアンケート調査により、1986年以降に麻疹罹患の可能性のあるSSPE患者の9割で麻疹罹患年、罹患時居住都道府県が明らかになった。

1981年から感染症サーベイランス事業が始まり、毎年18歳未満(2006年4月から15歳未満)の麻疹発症数が報告されている。小児科定点は全国約3000カ所の病院・診療所であるが、毎年定点の数が異なるため累積数ではなく一定点当たりの報告数(全報告数÷定点数)を使用した。定点は都道府県ごとに特徴が異なり、毎年変更が加わるので、一定点当たりの報告数を定量値として扱う事は出来ない。また一つの都道府県での報告数を比較した方が、都道府県間で比較した場合よりも信頼性が高い。定量性はないが、1986~2001年の都道府県別の報告数は95.25~0と大きな差があり、報告数は半定量的な指標として使用できると考えた。

全国における麻疹年間一定点当たりの報告数と、SSPE患者の年間麻疹罹患数は相関がみられた。しかし都道府県別にみると年間一

定点当たりの報告数が 40 以上でも、当該年の麻疹罹患患者から SSPE を発病しない都道府県が 2/3 を占めた。逆に 1987 年の北海道、1990 年の沖縄県、1991 年の福岡県は報告数に比較して罹患数が多かった。さらにその周辺地域も報告数に比較して罹患数が多い県があり、地域集積性を認めた。SSPE の発病には麻疹の流行以外に、他の要因が関与している可能性が示唆された。

SSPE の発病に関与する他の要因として、幼少時の麻疹罹患^{1,2)}、免疫に関する遺伝的な要因³⁾が報告されている。沖縄県では 1990 年、1993 年、1999 年に麻疹が流行したが、麻疹患者のうち 1 歳未満や 2 歳未満が占める割合は上記の年の間で差がなかった⁴⁾。SSPE の発病に幼少時の麻疹罹患が関与していないか、他の都道府県でも検討が必要である。また地域集積性を考えると、SSPE を発病しやすい麻疹ウイルス株があるのか、麻疹感染前後の環境因子が関与しないか、今後の検討が必要である。

E. 結論

全国集計では麻疹が流行すると SSPE の発病数が増加した。しかし都道府県の集計では、麻疹が流行しても SSPE の発病を認めない地域と、SSPE の発病が増加する地域に二分された。麻疹流行以外に、発症を促す他の要因が関与していると考えた。

謝辞：麻疹流行の資料をお送り頂き、ご助言を頂いた国立感染症研究所感染情報センター 多屋馨子先生に深謝致します。

[参考文献]

- 1) 上田重晴, 中尾 亨, 石田名香雄, ほか. 我が国における SSPE の発生状況. 神経研究の進歩. 30: 541-8, 1986
- 2) 中村好一, 飯沼一字, 岡 鉄次, 二瓶健次. 臨床調査個人票からみた亜急性硬化性全脳炎の疫学像. 脳と発達. 35: 316-20, 2003
- 3) 楠原浩一, 鳥巢浩幸, 吉良龍太郎, 原 寿郎. 宿主側の遺伝的要因. 日本臨床. 65: 1467-74, 2007
- 4) 平安京美, 仲田行克, 大城 聡, ほか. 沖縄県における亜急性硬化性全脳炎の発生状況. 脳と発達. 36: 21-5, 2004

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表(2008/4/1~2009/3/31 発表)

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

- 1) 愛波秀男. トルコの麻疹と SSPE の状況. SSPE 青空の会総会. 東京, 2009.11.8

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

パプアニューギニア東部高地州における亜急性硬化性全脳炎(SSPE)の ケース・コントロールスタディー ー病院コントロールによる研究

研究協力者：高須 俊明 日本大学、医療法人崇徳会長岡西病院 神経内科

研究分担者：中村 好一 自治医科大学地域医療センター 公衆衛生学

研究協力者：三木 健司 川口市立医療センター 内科

研究協力者：東郷 将希 日本大学医学部 内科学系神経内科学分野

研究協力者：水谷 智彦 日本大学医学部 内科学系神経内科学分野

研究協力者：田村 正人 医療法人崇徳会長岡西病院 神経内科

研究協力者：田宮 崇 医療法人崇徳会長岡西病院 精神科

研究要旨

SSPE多発であるパプアニューギニア(PNG)国東部高地州におけるSSPE発生リスクをよりよく明らかにするために、今回、病院コントロールによるケース・コントロールスタディの結果を分析し、地域コントロールスタディの結果(既報)と比較した。その結果、(1)病院コントロールによるHadM、AM<1y、AM<2y、DMD92、DMB/D92およびVAM&NoVBMのオッズ比値は、地域コントロールによるオッズ比値に比べて小さかった。(2)集団としての病院コントロールは集団としての地域コントロールよりもHadMの頻度が高く、2Vacの頻度が低く、AM-in-yearsの平均値が低かった。(3)病院コントロールによるHadMオッズ比値が地域コントロールによるHadMオッズ比値より小さかったのは、病院コントロール集団における麻疹罹患頻度が地域コントロール集団における麻疹罹患頻度より高かったためと考えた。(4)病院コントロールと地域コントロールによるAM<1y、AM<2yのオッズ比高値、地域コントロールによるDMB/D92、VAM&NoVBMのオッズ比高値は、コントロール集団において要因有無によるAM-in-yearsの平均値の差幅が大であるおよびt値が大であることと関連していた。今回報告分と既報分を併せて考察すると、次の3点が暫定結論として考えられる。1. 乳児期麻疹が、PNG国東部高地州における最大のSSPE発生リスクであった。2. 麻疹予防に有効なワクチン受種は、PNG国東部高地州におけるSSPE予防にも有効であった。3. PNG国東部高地州の患者集団である病院コントロールは、健常小児集団である地域コントロールに比べ、SSPE患者集団に近い麻疹罹患上の特性(麻疹罹患頻度が、麻疹罹患年齢が低い)を有していた。

A. 研究目的

SSPE多発地域であるパプアニューギニア(PNG)国東部高地¹⁾⁾におけるSSPE発生リスクをよりよく明らかにするために、今回、病院コントロールによるケース・コントロー

ルスタディの結果を分析し、地域コントロールスタディの結果(既報)と比較した。

B. 研究方法

1997年、1998年に東部高地州 Goroka 地

区所在の Goroka Base Hospital で SSPE と診断した 71 名(ケース)と、性、生年の一致する、他疾患で同病院外来通院中または病棟入院中の 121 名(病院コントロール)によるケース・コントロールスタディを行ない、本研究で想定した各要因の有無によるオッズ比(odds ratio=OR)を求めて、OR の値から SSPE 発生リスクを推測した。

ゴロカの SSPE 診断基準は既報⁷⁾と同一であり、公表しているものを用いたので詳細は省略する。

調査項目は、生別、生年月日、ワクチン受種年月日、ワクチン受種年齢、麻疹罹患年月日、麻疹罹患年齢、およびケースでは SSPE と診断した理由、病院コントロールおよび地域コントロールでは SSPE を除外した理由とした。

統計解析としては、今回は、カイ自乗検定、Fisher 直接確率法、平均値、独立性のあるグループ間での t - 検定を用いた。

略語：

HadM：麻疹罹患

AM<1y：1 歳未満での麻疹罹患

AM<2y：2 歳未満での麻疹罹患

DMD92：1992 年中の麻疹罹患

DMB/D92：1992 年前または中の麻疹罹患

1Vac：ワクチンを初回受種

1Vac&HadNoM：ワクチンを初回受種・麻疹未罹患

1Vac&HadM：ワクチンを初回受種・麻疹罹患

VBM&NoVAM：ワクチンを麻疹罹患前に受種・麻疹罹患後には未受種

VBM&VAM：ワクチンを、麻疹罹患前に受種・麻疹罹患後にも受種

VAM&NoVBM：ワクチンを、麻疹罹患後に受種・麻疹罹患前には非受種

(倫理面への配慮)

本研究の個人情報データは、すべて患者お

よび健常小児の保護者から、その承諾の下に得られたものである。発表内容に個人を特定できるものは含まれていない。

C. 研究結果

1. オッズ比についての結果

(1) 病院コントロールによるオッズ比

有意な正のリスクは AM<1y、AM<2y、DMD92、DMB/D92 および VAM&NoVBM に、有意な負のリスクを 1Vac および 1Vac&HadNoM に認めた。(図 1)

【図1】病院コントロールによるオッズ比

要因	71 ケースのうち 要因有り	121 コントロールのうち 要因有り	有意確率	オッズ比	オッズ比下 限	オッズ比上 限
HadM	24	32	0.188	1.55	0.82	2.94
AM<1y	15	2	0.000	15.94	3.52	72.09
AM<2y	20	8	0.000	7.52	2.85	19.83
DMD92	12	2	0.000	12.10	2.62	55.84
DMB/D92	19	6	0.000	7.00	2.64	18.56
1Vac	41	99	0.000	0.30	0.16	0.59
1Vac&HadNoM	17	75	0.000	0.19	0.10	0.37
1Vac&HadM	17	22	0.357	1.42	0.69	2.90
VBM&NoVAM	1	2	1.000	0.85	0.08	9.55
VBM&VAM	2	1	0.556	3.48	0.31	39.06
VAM&NoVBM	9	2	0.002	8.64	1.81	41.2

アンダーラインのある1より大なオッズ比は有意であった正のリスク、アンダーラインのある1より小なオッズ比は有意であった負のリスク、アンダーラインのないオッズ比は有意なリスクでなかったことを示す。

(2) 病院コントロールによるオッズ比の、地域コントロールによるオッズ比(当班既報)との比較

病院コントロールスタディで有意な正のリスクを示した要因である AM<1y、AM<2y、DMD92、DMB/D92 および VAM&NoVBM のオッズ比の値は、すべて地域コントロールスタディにおける同じ要因のオッズ比の値より小さかった。病院コントロールスタディで有意な負のリスクを示した要因である 1Vac および 1Va&HadNoM のオッズ比の値は、すべて地域コントロールスタディにおける同じ要因のオッズ比の値より大きかった。(図 2)

HadM および 1Vac&HadM は、病院コントロールスタディでは有意でなかったが、地域コントロールスタディでは有意な正のリスクを示した。(図 2)

【図2】病院コントロールによるオッズ比と地域コントロールによるオッズ比の比較

病院コントロールによるオッズ比		地域コントロールによるオッズ比	
要因	オッズ比	要因	オッズ比
HadM	1.55	HadM	4.57
AM<1y	15.94	AM<1y@	@21.40
AM<2y	7.52	AM<2y@	@34.27
DMD92	12.10	DMD92	18.32
DMB/D92	7.00	DMB/D92	13.7
1Vac	0.30	1Vac	0.19
1Vac&HadNoM	0.19	1Vac&HadNoM	0.15
1Vac&HadM	1.42	1Vac&HadM	3.10
VBM&NoVAM	0.85	VBM&NoVAM	0.96
VBM&VAM	3.48	VBM&VAM	1.93
VAM&NoVBM	8.64	VAM&NoVBM@	@13.20

アンダーラインのある1より大きなオッズ比は有意であった正のリスク、アンダーラインのない1より小さなオッズ比は有意であった負のリスク、アンダーラインのないオッズ比は有意なリスクでなかったことを示す。
 @: 分母をゼロとする度数に1を代入して得た値。

きな差がなかった。(図4)

【図4】病院コントロールにおけるHadMの頻度比率(0.25)と地域コントロールにおけるHadMの頻度比率(0.11)、および両コントロールにおけるHadMのオッズ比(OR)

病院コントロール			地域コントロール				
要因	有無	SSPEケース	コントロール	有無	SSPEケース	コントロール	
HadM	+	A1=24 (0.34)	B1=30 (0.25)	HadM	+	A1=17 (0.37)	B1=10 (0.11)
	-	A0=47 (0.66)	B0=91 (0.75)		-	A0=29 (0.63)	B0=88 (0.89)
計		A1+A0=71 (1.00)	B1+B0=121 (1.00)	計		A1+A0=46 (1.00)	B1+B0=88 (1.00)

$$OR = (0.34/0.66) / (0.25/0.75) = 1.55$$

$$OR = (0.37/0.63) / (0.11/0.89) = 4.57$$

$$p1, p0$$

$p1, p0$ を要因有、無の場合の発症率とすると、 $OR = (p1/(1-p1)) / (p0/(1-p0))$
 $= \frac{[A1/(A1+B1)]/[B1/(A1+B1)]}{[A0/(A0+B0)]/[B0/(A0+B0)]} = \frac{[A1/B1]/[A0/B0]}{[A1/(A1+A0)]/[A0/(A1+A0)]} = \frac{[B1/(B1+B0)]/[B0/(B1+B0)]}{[A1/A0]/[B1/B0]}$

2. 病院コントロールの、集団としての特性について

(3) 病院コントロールの、地域コントロールと比べての、集団としての特性について

HadMの頻度比率は、病院コントロール集団においては0.25で、地域コントロール集団における0.11より大であった($p < 0.01$)。2Vacの頻度比率は、病院コントロール集団においては0.37で、地域コントロール集団における0.51より小であった。AM in yearsの平均値は、病院コントロール集団においては 3.26 ± 3.56 で、地域コントロール集団における 4.57 ± 1.46 より小であった。(図3)

【図3】病院コントロールと地域コントロール、SSPEの、集団特性の比較

病院コントロール		SSPE		地域コントロール	
要因	頻度比率	頻度比率	頻度比率	頻度比率	要因
HadM	0.25	0.34	0.37	0.11	HadM
1Vac	0.82	0.58	0.65	0.91	1Vac
2Vac	0.17	0.44	0.46	0.51	2Vac
要因	平均値±SD	平均値	平均値	平均値±SD	要因
AM in years	3.26±3.56	1.12	1.36	4.57±1.46	AM in years
DM in year A.D.	93.56±4.88	91.93	91.76	94.48±2.98	DM in year A.D.
A1V in years	1.41±1.48	1.50	1.71	1.32±1.70	A1V in years
D1V in year A.D.	93.45±2.39	92.13	91.84	91.63±2.72	D1V in year A.D.
A2V in years	2.20±2.03	2.18	2.72	3.14±2.98	A2V in years
D2V in year A.D.	95.32±2.11	94.08	93.62	94.79±2.13	D2V in year A.D.

A.D.: anno Domini

HadMのオッズ比算出式をなす4つの項のうち分母の1項であるコントロール集団におけるHadMの頻度比率は、病院コントロール集団においては0.25で、地域コントロール集団における0.11より大であった。これに対し他の3項では両コントロール集団の間に大

3. オッズ比と、AM-in-yearsの関係

(4) 病院コントロールにスタディにおけるオッズ比と、集団としてのAM-in-yearsの、要因の有無による平均値の差およびt値の関係

ケース・コントロールスタディでオッズ比が有意な正のリスクを示し、集団としてのAM-in-yearsの、要因の有無による平均値の差とt値が有意であったのが、病院コントロールスタディではAM<1y、AM<2yであったのに対し、地域コントロールスタディでは(データ提示は省略)、AM<1y、AM<2y、DMB/D92およびVAM&NoVBMであった。(図5)

【図5】病院コントロールスタディにおけるオッズ比、対、要因有無によるAM-in-yearsの平均値の差とt値

要因	有意確率	オッズ比	有意確率	AM-in-yearsの 要因有無による 平均値の差 (±SE)	AM-in- yearsの、 要因有無 によるt値
HadM	0.188	1.55	推計不能	推計不能	推計不能
AM<1y	0.000	15.94	0.006	2.43±0.75	3.24
AM<2y	0.000	7.52	0.006	5.07±1.12	4.54
DMD92	0.000	12.10	0.139	1.13±0.73	1.53
DMB/D92	0.000	7.00	0.091	3.04±1.52	2.00
1Vac	0.000	0.30	0.043	-0.96±0.47	-2.04
1Vac&HadNoM	0.000	0.19	推計不能	推計不能	推計不能
1Vac&HadM	0.357	1.42	0.211	0.66±0.52	1.26
VBM&NoVAM	1.000	0.85	0.300	1.78±1.70	1.05
VBM&VAM	0.556	3.48	0.679	-0.71±1.71	-0.41
VAM&NoVBM	0.002	8.64	0.371	0.81±0.91	0.90

推計不能であったのは、コントロールにおける要因有りの度数がゼロであったため。
SE: 標準誤差

D. 考察

今回の病院コントロールスタディの分析結果は、乳児期麻疹(AM<1y、AM<2y)がPNG国東部高地における最大のSSPE発生リスク

であったという地域コントロールスタディの結果(当班既報)を再確認させた。また、地域コントロールスタディでワクチン受種、とくに麻疹予防に有効であったワクチン受種(1Vac&HadnoM)がSSPE発生に強い予防的効果があったことをも今回の病院コントロールスタディの結果で再確認した。

ただし、病院コントロールスタディで有意な正のリスクを示した要因(AM<1y、AM<2y、DMD92、DMB/D92、VAM&NoVBM)のオッズ比の値は、地域コントロールスタディによって得られた値よりも小さかった(図1、図2)。その理由を明らかにするために、両コントロールの集団としての特性を包括的に検討し比較したところ、両者の間にいくつかの差を認めた(図3)。

その中で、病院コントロールにおける麻疹罹患頻度(HadMの頻度比率)が地域コントロールにおける麻疹罹患頻度より高かったことは、病院コントロールによるHadMのオッズ比値が地域コントロールによるHadMのオッズ比値より小さかったことを説明すると考えた(図4)。また、AM-in-yearsの平均値にも差を認め、病院コントロールでは地域コントロールよりAm-in-yearsの平均値が小であった(図3)。麻疹罹患頻度が高く、麻疹罹患年齢が低いという点において、病院コントロール集団は地域コントロール集団よりもSSPE集団に近い麻疹罹患上の特性をもっていると考えた。

E. 結論

今回報告分と既報分を併せて考察すると、次の3点が暫定結論として考えられる。

1. 乳児期麻疹が、PNG国東部高地州における最大のSSPE発生リスクであった。
2. 麻疹予防に有効なワクチン受種は、PNG国東部高地におけるSSPE発生予防にも有効であった。
3. PNG国東部高地州の患者集団である病院

コントロールは、健常小児集団である地域コントロールと比べ、SSPE患者集団に近い麻疹罹患上の特性を有していた。

[参考文献]

- 1) Lucas KM, Sanders RC, Rongap A, Rongap T, Pinai S, Alpers MP. Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) in Papua New Guinea: a high incidence in young children. *Epidemiol Infect* 108: 547-553, 1992
- 2) Bass AG. Vaccines in the National Immunization Programme. *PNG Med J* 36: 141-157, 1993
- 3) 高須俊明, 国分裕司, 西村敏樹, 三木健司, 河西竜太, 駒瀬勝啓, 吉川泰弘. パプアニューギニアの亜急性硬化性全脳炎、麻疹、および麻疹予防接種—学術調査、共同研究、およびNGO活動—(その1). *熱帯* 31: 251-258, 1998
- 4) 高須俊明, 国分裕司, 西村敏樹, 三木健司, 河西竜太, 駒瀬勝啓, 吉川泰弘. パプアニューギニアの亜急性硬化性全脳炎、麻疹、および麻疹予防接種—学術調査、共同研究、およびNGO活動—(その2). *熱帯* 32: 149-161, 1999
- 5) Miki K, Komase K, Mgone CS, Kawanishi R, Iijima M, Mgone JM, Asuo PG, Alpers MP, Takasu T, Mizutani T. Molecular analysis of measles virus genome derived from SSPE and acute measles patients in Papua New Guinea. *J Me virol* 68: 105-112, 2002
- 6) Mgone CS, Mgone JM, Takasu T, Miki K, Kawanishi R, Asuo PG, Kono J, Komase K, Alpers MP. *Trop Med Intern Health* 8: 219-227, 2003
- 7) Takasu T, Mgone JM, Mgone CS, Miki K, Komase K, Namae H, Saito Y,

Kokubunn Y, Nishimura T, Kawanishi R, Mizutani T, Markus TJ, Kono J, Asuo PG, Alpers MP. *Epidemiol Infect* 131: 887-898, 2003

- 8) Duke T, Mgone CS. Measles: not just another viral exanthema. *Lancet* 361: 763-773, 2003

F. 健康危険情報

PNG 国の東部高地州は山間にあり高度 1500m 前後であるため蚊の発生は少なく比較的マラリアの感染リスクが小さいが、沿海地域は熱帯気候であり蚊の発生が多く、マラリア感染のリスクが大きい。われわれの現地調査期間(1996 年～2001 年)においては、PNG 国全体としてはマラリアが最大の公衆衛生上の問題であった。当地のマラリアは、クロロキン耐性、メフロキン感受性の熱帯熱マラリアであるとされていた。

G. 研究発表(2009/4/1～2010/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) 高須俊明. 神経感染症と国際協力-カラチとゴロカ(パプアニューギニア)の SSPE. *Neuroinfection* 14(1): 13-24, 2009

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

SSPE における疾患感受性候補遺伝子の検討

研究分担者：楠原 浩一 産業医科大学小児科

研究協力者：石崎 義人 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野

研究協力者：鳥巢 浩幸 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野

研究協力者：原 寿郎 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野

研究要旨

麻疹ウイルス(MV)感染の初期過程である樹状細胞(DC)への感染に重要な役割を果たしていることが報告されているパターン認識受容体(DC-SIGN)、MV感染に対する免疫応答を修飾している可能性があるサイトカイン(IL-27)、脳内におけるSSPEウイルスの成立や存続に関与している可能性がある酵素(ADAR1)、の各遺伝子の1塩基多型を用いてSSPE患者と健常対照を対象とした関連解析を行った。SSPE群と健常対照群との間にalleleおよびgenotype頻度の差をみとめず、これらの遺伝子のバリエーションとSSPEに対する疾患感受性との関連は否定的であった。

A. 研究目的

SSPEの発症機序は正確には解明されていない。私たちは、これまで、遺伝子多型を用いた関連解析により、自然免疫に関わる遺伝子の中で*MxA*と*TLR3*、獲得免疫に関わる遺伝子の中で*IL4*と*PD1*のバリエーションがSSPEの発症に関与していることを報告してきた。今回、SSPEの発症に関わる宿主側遺伝要因をさらに解明するために、樹状細胞(DC)に強く発現するパターン認識受容体であるdendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin(DC-SIGN, CD209)、Th1分化を誘導する機能を持つサイトカインであるIL-27、RNA editingの作用を持つ宿主側酵素であるadenosine deaminase acting on RNA 1(ADAR1)の各分子をコードする遺伝子をSSPEにおける疾患感受性の候補遺伝子として解析を行った。

B. 研究方法

SSPE患者40名と健常対照170名(検体数

はアッセイにより異なる)を対象とした。3遺伝子(*DCSIGN*, *IL27*, *ADAR*)の5つの1塩基多型(SNP)について、TaqMan SNP Genotyping Assayを用いて遺伝子型を決定し、関連解析を行った。

*DCSIGN*遺伝子については、プロモーター領域の3つのSNPとHIV、デング熱、結核との関連が報告されている¹⁾²⁾³⁾。プロモーター領域は単一のLinkage disequilibrium(LD) blockを形成していることから、この領域のSNPの中でHapMapのtag SNPに選ばれている-871A/Gを選択した。

*IL27*遺伝子については、喘息と本遺伝子の多型との関連を報告したChaeらの論文⁴⁾を参考に、プロモーター領域の-964A/Gと、アミノ酸置換を伴うcoding SNP(cSNP)である2905T/G、4730T/Cを選択した。

*ADAR1*をコードする*ADAR*遺伝子については、全体が単一のLD blockであり、アミノ酸置換を伴うcSNPである1152A/Gを選択した。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子解析は所属施設の遺伝子解析倫理委員会の承認を受けており、被検者あるいは保護者の文書による同意を得て行った。

C. 研究結果

表 1 に SSPE 群と健常対照群における *DCSIGN*-871A/G 多型の genotype および allele 頻度の比較を示した。頻度は両群の間で近似しており、差は認められなかった。

表 2 は *IL27* の 3 つの多型の genotype 頻度と allele 頻度を SSPE 群と健常対照群で比較したものである。minor allele の頻度、minor allele ホモ接合およびヘテロ接合 genotype 頻度に両群間で若干の差がみられたが、健常対照群の検体数を SSPE 群の 3 倍以上に増やしても、有意差はみとめられなかった。

表 3 は *ADAR* 1152A/G 多型における比較である。genotype 頻度は両群間で有意差がなく、allele 頻度はほぼ同等であった。

D. 考察

DC-SIGN は、分子量 44kDa の II 型膜貫通型タンパクで、糖鎖認識部位を持つ C 型レクチンであり、パターン認識受容体として機能している。HIV-1、HCV、結核菌、ピロリ菌などの多様な病原体と反応することが報告されている。DC に強く発現し、T 細胞に対する抗原提示において重要な役割を持ち、また toll-like receptor の下流のシグナル伝達を調節している⁵⁾。さらに DC-SIGN は、麻疹ウイルス(MV)の DC への感染を増強することが報告されており⁶⁾、MV 感染の初期過程において重要な役割を果たしていると考えられる。

IL-27 は、STAT-1 と T-bet を介して Th1 分化を誘導するサイトカインである。以前我々は、SSPE 患者の半数以上において麻疹生ワクチンに対する末梢血単核球の IFN- γ

産生能が低下しており、Th2 優位の状態となっていることを報告した⁷⁾。*IL27* の遺伝子多型は MV 感染に対する免疫応答を修飾することにより、SSPE 患者でみられる、この Th1/Th2 アンバランスに影響している可能性がある。

ADAR は、アデニンからイノシンへの RNA editing の作用を持つ宿主側酵素の 1 つである。SSPE ウイルスの遺伝子(とくに M 遺伝子)における変異は U \rightarrow C(A \rightarrow G)変異に偏っており、biased hypermutation と呼ばれている。ADAR はこの biased hypermutation に関与しているものと推定されている⁸⁾。ADAR には、脳を含む全身臓器に発現している ADAR1 および ADAR2 と、主に脳に発現している ADAR3 の 3 種類がある。これらの中で、ヒトの脳内で最も広範に最も強く発現しているのは ADAR1 である⁹⁾。また、ADAR1 は、MV で誘導される apoptosis を抑制することが報告されている¹⁰⁾。したがって、ADAR1 をコードする *ADAR* の遺伝子多型は、SSPE ウイルスの成立や存続に関与している可能性がある。

以上のような考察に基づいて *DCSIGN*、*IL27*、*ADAR* の各遺伝子の SNP を用いた関連解析を行ったが、SSPE 群と健常対照群との間に allele および genotype 頻度の差をみとめず、これらの遺伝子のバリエーションと SSPE に対する疾患感受性との関連は否定的であった。

E. 結論

DCSIGN、*IL27*、*ADAR* の遺伝子多型は SSPE に対する疾患感受性に関与していないと考えられる。

[参考文献]

- 1) Martin MP, Lederman MM, Hutcheson HB, et al. Association of DC-SIGN promoter polymorphism with increased

- risk for parenteral, but not mucosal, acquisition of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 78: 14053-6, 2004
- 2) Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casadémont I, et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet.* 37: 507-13, 2005
- 3) Barreiro LB, Neyrolles O, Babb CL, et al. Promoter variation in the DC-SIGN-encoding gene CD209 is associated with tuberculosis. *PLoS Med.* 3: e20, 2006
- 4) Chae SC, Li CS, Kim KM, et al. Identification of polymorphisms in human interleukin-27 and their association with asthma in a Korean population. *J Hum Genet.* 52: 355-61, 2007
- 5) Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, et al. C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity.* 26: 605-16, 2007
- 6) de Witte L, Abt M, Schneider-Schaulies S, et al. Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection. *J Virol.* 80: 3477-86, 2006
- 7) 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: 121-6, 2000
- 8) Bass BL, Weintraub H, Cattaneo R, et al. *Curr Top Microbiol Immunol.* 176: 63-74, 1992
- 9) Kawahara Y, Ito K, Sun H, et al. Low editing efficiency of GluR2 mRNA is associated with a low relative abundance of ADAR2 mRNA in white matter of normal human brain. *Eur J Neurosci.* 18: 23-33, 2003
- 10) Toth AM, Li Z, Cattaneo R, et al. RNA-specific adenosine deaminase ADAR1 suppresses measles virus-induced apoptosis and activation of protein kinase PKR. *J Biol Chem.* 284: 29350-6, 2009
- F. 健康危険情報
なし
- G. 研究発表(2009/4/1~2010/3/31 発表)
1. 論文発表
- 1) Ishizaki Y, Yukaya N, Kusuhara K, Kira R, Torisu H, Ihara K, Sakai Y, Sanefuji M, Pipo-Deveza JR, Silao CL, Sanchez BC, Lukban MB, Salonga AM, Hara T. *PDI* as a common candidate susceptibility gene of subacute sclerosing panencephalitis. *Hum Genet.* (in press)
2. 学会発表
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1 DCSIGN -871A/G多型のGenotypeおよびAllele頻度

	Control群	SSPE群	P値
Genotype頻度			
AA	40 (75%)	29 (73%)	n.s.
AG	11 (21%)	10 (25%)	
GG	2 (4%)	1 (3%)	
Total	53	40	
Allele頻度			
A	91 (86%)	68 (85%)	n.s.
G	15 (14%)	12 (15%)	

図2 IL27 -964A/G、2905T/G (Ser59Ala)、4730T/C (Leu119Pro)多型のGenotype頻度

SNP	Control群	SSPE群	P値
-964A/G			
AA	71 (48%)	15 (38%)	n.s.
AG	60 (41%)	22 (55%)	
GG	16 (1%)	3 (8%)	
2905T/G			
TT (Ser/Ser)	110 (81%)	31 (78%)	n.s.
TG (Ser/Ala)	22 (16%)	9 (23%)	
GG (Ala/Ala)	4 (3%)	0 (0%)	
4730T/C			
TT (Leu/Leu)	134 (79%)	30 (75%)	n.s.
TC (Leu/Pro)	34 (20%)	9 (8%)	
CC (Pro/Pro)	2 (1%)	1 (3%)	

図3 ADAR 1152A/G (Arg89Lys)多型のGenotypeおよびAllele頻度

	Control群	SSPE群	P値
Genotype頻度			
AA	26 (53%)	20 (50%)	n.s.
AG	19 (39%)	20 (50%)	
GG	4 (8%)	0 (0%)	
Total	49	40	
Allele頻度			
A (Arg)	71 (72%)	60 (75%)	n.s.
G (Lys)	27 (28%)	20 (25%)	

亜急性硬化性全脳炎(SSPE)ウイルスの発症機序の解明及び その知見を応用したSSPEウイルス増殖抑制戦略の確立の試み

研究分担者：堀田 博 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野
研究協力者：姜 大鵬 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野
研究協力者：井出 良浩 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野
研究協力者：勝二 郁夫 神戸大学大学院医学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(SSPEウイルス)は麻疹ウイルスの変異株である。SSPEウイルスの2大特徴のひとつである神経親和性・神経病原性を規定するウイルス遺伝子の変異は、未だ詳細には同定されていない。ウイルスの神経病原性を研究するためにマウス等の小動物実験系が便利であり、確立が望まれている。本研究では、昨年度に引き続き、マウス脳内接種を用いたSSPEウイルス感染実験系を確立し、神経病原性に係わる分子細胞レベルの事象を明らかにするとともに、この動物実験系を用いて、宿主細胞のウイルスレセプターへの吸着に重要な役割を果たしているHタンパク質の変異が本ウイルスの神経親和性・神経病原性に関与しているか否かについて明らかにした。さらに、本マウス感染実験系を用いて、ウイルス特異的siRNAの生体内での感染防御効果についても検討した。

まず、本マウス実験系において、SSPEウイルスに感染している細胞はほとんどすべてが神経細胞であること、そして、それらは活性型caspase-3陽性、リン酸化(活性化)c-Jun陽性であることを明らかにした。これらの結果から、SSPEウイルス感染神経細胞では、c-Jun N-terminal kinase(JNK)が活性化され、それを介したミトコンドリア介在性アポトーシス誘導経路が活性化されている可能性が示唆された。

次に、組換え麻疹ウイルス作製系を用いて、昨年の本研究で作製したM及びFタンパク質の変異を有するウイルス株にさらに変異を追加し、SSPEウイルス由来の全長Hタンパク質を発現する遺伝子組換え麻疹ウイルスを新たに作製した。この変異ウイルスは、B95a培養細胞内ウイルス複製能は患者から分離されたSSPEウイルスと同程度に保持されているが、上記のマウス感染実験系において、神経親和性・神経病原性を全く示さなかった。すなわち、本SSPEウイルス株の神経親和性・神経病原性は、Hタンパク質による細胞吸着能・侵入能に規定されているのではなく、他のウイルスタンパク質(N、PあるいはLタンパク質等)の変異に基づく神経細胞特異的宿主因子を介した細胞内増殖能により規定されている可能性が示唆された。

さらに、本マウス感染実験系を用いて、SSPEウイルスに特異的なsiRNAを脳内投与し、SSPEウイルス脳炎の阻害効果について検討した。その結果、我々が開発したSSPEウイルスL遺伝子mRNA特異的siRNA(MV-L2-siRNA)が生体レベルでも有意の感染防御効果を示すことを実証した。

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) は麻疹ウイルスの変異株であり、感染性遊離ウイルス粒子の産生がほとんどあるいは全く見られないこと、及び、神経親和性・神経病原性を有するという2つの特徴を有している¹⁾。我々はこれまでに、Mタンパク質及びFタンパク質の特有の変異がSSPEウイルスの感染性遊離ウイルス粒子非産生性に大きく関与していることを明らかにした²⁾。しかし、神経親和性・神経病原性を規定する遺伝子変異は未だ明らかではない。

一般に、ウイルスの細胞親和性は、標的細胞表面のウイルスレセプターの有無あるいはその結合特性の違い、及びウイルス複製に関与する宿主細胞因子の有無あるいはウイルスタンパク質との相互作用の違いにより規定されている。麻疹ウイルス野生株のレセプターはCD150/SLAMとよばれる分子である³⁾。CD150/SLAMは樹状細胞、単球/マクロファージ、メモリーT細胞、活性化T細胞、B細胞等の免疫担当細胞で発現しているが、神経細胞、血管内皮細胞、上皮細胞にはCD150/SLAMは発現していない¹⁾。一方、Vero細胞等の上皮系細胞で増殖する実験室継代麻疹ウイルス株のレセプターはCD46である^{1,3)}。しかし、麻疹ウイルス野生株はCD46をレセプターとして用いない。

SSPEウイルスは神経細胞に感染するが、神経細胞にはCD150/SLAMやCD46は発現していない。従って、SSPEウイルスはCD150/SLAMやCD46以外の未同定のウイルスレセプターを利用していると考えられる。しかし、SSPEウイルスの神経親和性・神経病原性がHタンパク質の変異によって規定されているか否かは、未解明の課題として残されている。

我々は昨年度の本研究で、麻疹ウイルス野生株とSSPEウイルスの神経病原性を識別できるマウス感染実験系について報告した⁴⁾。

本研究では、このマウス感染実験系を用いてSSPEウイルスの神経細胞障害機序について解析するとともに、神経病原性を担うウイルスタンパク質の変異について検討した。また、このマウス感染実験系を用いて、siRNAによるSSPEウイルス感染の阻害の可能性についても検討した。

B. 研究方法

1) マウス脳内接種による神経病原性の検討

神経病原性の検討は昨年⁴⁾の報告と同様に行った⁴⁾。要約すると、1~3週齢のBALB/cAJclに麻疹ウイルスまたはSSPEウイルス感染B95a細胞(100~1,000融合細胞/マウス)を脳内接種し、神経症状あるいは死亡を指標として脳炎の発症とし、神経親和性・神経病原性の有無を判定した。脳炎発症マウス及び無症状マウスの脳を無菌的に摘出し、細切した後、B95a細胞と共培養して、脳内のウイルス増殖の有無を調べた。脳組織からのウイルス分離の判定は、B95a融合多核巨細胞の出現及び麻疹ウイルス特異抗体を用いた蛍光抗体法によった。マウス脳組織の病理学的解析は、HE染色及び麻疹ウイルスM及びNタンパク質、神経細胞特異的NeuN(neuronal nuclei; Fox-3)、活性型caspase-3、c-Junあるいはリン酸化c-Junに対する特異抗体を用いた免疫染色によった。

2) 遺伝子組換え麻疹ウイルスの作製と神経親和性・神経病原性の解析

遺伝子組換え麻疹ウイルス野生株(Ichinose-B株;九州大学・柳雄介教授より分与)⁵⁾の全長M、F、全長H遺伝子に、SSPEウイルスKobe-1株⁶⁾の特有の変異を導入した遺伝子組換え麻疹ウイルス変異株を作製した。この変異ウイルスをマウスに脳内接種し、脳炎による神経症状の発症または死亡の有無で、神経親和性・神経病原性を判定した。

3) ウイルス増殖能の測定

感染性遊離ウイルスの測定はB95a細胞を

用いたプラク法によった。脳内の感染細胞数は B95a 細胞との共培養により出現する融合巨細胞数により測定した。感染細胞内におけるウイルス複製の測定は、ウイルスタンパク質の合成量を特異抗体を用いたウエスタンブロット法により半定量的に行った。

4) SSPE ウイルス特異的 siRNA による SSPE ウイルス脳炎の阻害効果の検討

SSPE ウイルスを脳内接種したマウスに、SSPE ウイルス特異的 siRNA を発現するプラスミド⁷⁾を脳内投与した。継日的に観察し、脳炎による神経症状の発症または死亡の有無で、阻害効果を判定した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え麻疹ウイルス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。感染動物実験は神戸大学動物実験委員会及び感染動物実験小委員会の承認を得た。すべてのウイルス作製実験及び感染動物実験は、微生物学研究室あるいは動物実験施設感染動物実験室において、遺伝子組換え実験及びバイオセーフティーに関する法令及び指針等に準拠して行った。

C. 研究結果

1) SSPE ウイルス感染神経細胞におけるミトコンドリア介在性アポトーシス誘導経路の活性化

SSPE ウイルスを脳内接種したマウスの脳組織では、感染細胞はほとんどすべてが神経細胞であることが、抗 NeuN 抗体及び麻疹ウイルス M タンパク質に対する抗体を用いた二重免疫染色により明らかになった。また、活性型 caspase-3 に対する抗体を用いた免疫染色により、caspase-3 陽性細胞が多数散見された。一方、非感染対照脳組織では、陽性細胞は観察されなかった。さらに、SSPE ウイルス感染脳組織では、リン酸化(活性

化)c-Jun に対する抗体で染色される細胞が多数観察された。

2) SSPE ウイルス由来の全長 H タンパク質を発現する遺伝子組換え麻疹ウイルスの作製と神経親和性・神経病原性の検討

SSPE-Kobe-1 株⁶⁾由来の特有の変異を有する全長 H タンパク質、C 末端領域のフレームシフトを有する変異 F タンパク質及び変異 M タンパク質を発現する遺伝子組換え麻疹ウイルスは、親株(MV323; 麻疹ウイルス野生株)に比べて、培養細胞(B95a 細胞)内のウイルス遺伝子複製及びウイルスタンパク質合成は同程度であるが、感染性ウイルス粒子の産生は 1/100~1/1,000 に低下しており、SSPE-Kobe-1 株に類似した性質を有していることを確認した。

この変異ウイルスは全長 H タンパク質が SSPE-Kobe-1 株と同じであるにもかかわらず、マウスに脳内接種した場合に、神経親和性・神経病原性はまったく認められなかった。

3) SSPE ウイルス特異的 siRNA による SSPE ウイルス脳炎の阻害効果の検討

我々はこれまでに、SSPE ウイルス L 遺伝子 mRNA に特異的な siRNA 及びそれを発現するプラスミドは、麻疹ウイルス及び SSPE ウイルスの増殖を効果的に抑制することを報告している⁷⁾。そのうちの 1 種類の siRNA (MV-L2-siRNA) を発現するプラスミドを、SSPE ウイルス脳内接種マウスに脳内投与(感染 0, 1, 3 日後)すると、ウイルス感染による死亡率が有意に低下した(83% vs. 33%; $P<0.05$)。

D. 考察

本研究により、SSPE ウイルスを脳内接種したマウスの脳組織において、感染細胞はほとんどすべてが神経細胞であり、それらは活性型 caspase-3 陽性、リン酸化(活性化)c-Jun 陽性であることが明らかになった。これらの結果から、SSPE ウイルス感染神経

細胞では、c-Jun N-terminal kinase (JNK) が活性化され、それを介したミトコンドリア介在性アポトーシス誘導経路⁸⁾が活性化されている可能性が示唆された。

SSPE-Kobe-1 株由来の特有の変異を有する全長 H タンパク質を発現する遺伝子組換え麻疹ウイルスは、マウスに脳内接種しても神経親和性・神経病原性をまったく示さなかった。H タンパク質はウイルスレセプターに吸着し、宿主細胞に侵入する機能を担っている。今回の我々の結果は、SSPE-Kobe-1 株の神経親和性・神経病原性はウイルス吸着・侵入のレベルではなく、神経細胞内でのウイルス複製のレベルで規定されている可能性を示唆している。B95a 細胞等の培養細胞を用いた実験により、細胞内の SSPE ウイルスの遺伝子複製及びウイルスタンパク質合成は、麻疹ウイルス野生株と同程度であることを確認している。これらの実験結果より、SSPE-Kobe-1 株の神経親和性・神経病原性は、ウイルス遺伝子複製及びウイルスタンパク質合成に係わる神経細胞特異的な宿主因子とウイルスタンパク質の相互作用により規定されている可能性があるかと推察された。

我々がこれまでに培養細胞系で確認した SSPE ウイルス L 遺伝子 mRNA に特異的な siRNA の *in vitro* ウイルス増殖抑制作用は、*in vivo* の SSPE ウイルス感染においても有効に機能することが、マウス脳内接種・脳内投与の実験により証明された。今後、SSPE ウイルス特異的 siRNA による SSPE の新規治療法の開発に繋がることが期待される。

E. 結論

SSPE ウイルスのマウス脳内感染実験系についてさらに検証を行い、脳組織内の感染細胞はほとんどすべてが神経細胞であり、それらの感染神経細胞では、JNK 活性化を介したミトコンドリア介在性アポトーシス誘導経路が活性化されている可能性を明らかにした。

また、同マウス感染実験系を用いて、SSPE-Kobe-1 株の神経親和性・神経病原性は、ウイルス吸着・侵入のレベルではなく、神経細胞特異的宿主因子とウイルスタンパク質の相互作用を介した細胞内ウイルス複製のレベルで規定されている可能性を提示した。さらに、同マウス感染実験系を用いて、SSPE ウイルス L 遺伝子 mRNA 特異的 siRNA のウイルス増殖抑制作用が生体内においても有効に機能することを実証した。

[参考文献]

- 1) 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 65: 1475-1480, 2007
- 2) Jiang D-P, Ide Y-H, Nagano-Fujii M, Shoji I, Hotta H. Single-point mutations of the M protein of a measles virus variant obtained from a patient with subacute sclerosing panencephalitis critically affect solubility and subcellular localization of the M protein and cell-free virus production. *Microbes Infect.* 11: 467-475, 2009
- 3) Yanagi Y, Takeda M, Ohno S: Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol.* 87: 2767-2779, 2006
- 4) 堀田博. SSPE ウイルスの神経病原性と M、F、H タンパク質の変異の意義について. 平成 20 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, 124-127, 2009
- 5) 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.* 108: 161-165, 2005
- 6) 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*, 50: 525-534, 2006

7) Otaki M, Jiang D-P, 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*. 51: 985-991, 2007

8) Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407: 802-809, 2000

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Jiang DP, Ide Y, Nagano-Fujii M, Shoji I, Hotta H. Single-point mutations of the M protein of a measles virus variant obtained from a patient with subacute

sclerosing panencephalitis critically affect solubility and subcellular localization of the M protein and cell-free virus production. *Microbes Infect.* 11: 467-475, 2009

2. 学会発表

1) 姜 大鵬, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田 博. ウイルス脳内接種による SSPE マウスモデルの作製および新規 SSPE 治療法開発への応用. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.10

2) 姜 大鵬, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田 博. SSPE マウスモデルの作製および新規 SSPE 治療法開発への応用. 第 62 回日本細菌学会関西支部総会, 大阪, 2009.11

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

麻疹ウイルスの神経細胞感染のメカニズム

研究分担者：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

麻疹ウイルス野生株は主に SLAM (CD150) を受容体として免疫系の細胞に感染する。しかし、SLAM を発現していない神経系の細胞に麻疹ウイルスがどのようにして持続感染し、SSPE を引き起こすかは分かっていない。本研究では、ヌードマウスへの脳内接種により、麻疹ウイルス野生株がマウスの脳に持続感染し得ることを明らかにした。持続感染している細胞は二重染色の結果から主にニューロンであることが示された。神経系細胞の初代培養を用いた実験でも、マウスおよびヒトのニューロンに麻疹ウイルス野生株が感染した。極性上皮細胞上の未知の受容体を使えなくなるような H 蛋白質の変異を持つ組換え麻疹ウイルスは、上皮細胞だけでなく、ニューロンにも感染できなくなった。以上の結果より、麻疹ウイルス野生株は、極性上皮細胞上の未同定受容体と同一あるいは類似の分子を使ってニューロンに感染できると考えられる。

A. 研究目的

麻疹ウイルス野生株は主に SLAM (CD150) を受容体として免疫系の細胞に感染する。しかし、SLAM を発現していない神経系の細胞に麻疹ウイルスがどのようにして持続感染し、SSPE を引き起こすかは分かっていない。本研究では、神経細胞への麻疹ウイルスの感染機構を解明することにより、SSPE における麻疹ウイルスの中樞神経系への侵入および伝播機構を理解し、それに基づいて治療法を開発する。

B. 研究方法

4 週齢のヌードマウスに緑色蛍光色素 (GFP) 発現組換え麻疹ウイルスを脳内接種し、神経症状など何らかの異常が認められないか経時的に観察した。接種 3 ヶ月後にマウスを解剖し、脳を取り出して蛍光顕微鏡で GFP の発現を観察した。GFP を発現している部分の標本を作製し、GFP に対する抗体と神経系の細胞 (ニューロン、アストロサイト、

オリゴデンドロサイト) に特異的な抗体で二重染色を行った。

神経系細胞の初代培養は次のように行った。胎生 16-18 日のマウス胎仔脳を neurobasal medium+B27 サプリメントで 4 日間培養して神経細胞を得た。生後 1-3 日齢マウス脳を 20%血清を含む培養液で 10 日間培養後、トリプシンで処理し、さらに 10%血清を含む培養液で 3 日間培養することによりアストロサイトを得た。また、生後 1-3 日齢マウス脳を 20%血清を含む培養液で 14 日間培養後、dish を 1 時間振とうして浮遊してくる細胞を集め、37°C で 2 時間 dish に吸着させることによりミクログリアを得た。細胞の感染には GFP を発現する組換え麻疹ウイルス野生株、あるいはその変異ウイルスを用い、蛍光顕微鏡による観察でウイルス感染を確認した。

(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

T細胞が欠損しているヌードマウスにリポーターとして GFP を発現する組換え麻疹ウイルス野生株を脳内接種すると、麻痺などの症状は認められなかったが、感染3ヵ月後のマウスの脳に GFP 発現を認めた。組織病理学的解析から、麻疹ウイルスが感染している細胞は主にニューロンと考えられた。神経系の細胞には一般に SLAM は発現していない。また、マウスの SLAM はヒト SLAM と異なり、麻疹ウイルスに対する受容体として機能しない。そこで、神経系の細胞に麻疹ウイルス野生株が感染するメカニズムを明らかにするために、C57/BL6 マウスの神経系細胞の初代培養に GFP を発現する麻疹ウイルス野生株を感染させた。その結果、ニューロン初代培養で GFP の発現が観察されたが、アストロサイト初代培養では観察されなかった。最近、我々は麻疹ウイルスが SLAM 陽性免疫細胞に加えて、極性上皮細胞にも未知の受容体を介して感染することを明らかにした。麻疹ウイルスの受容体結合蛋白質である H 蛋白質の特定のアミノ酸1残基を変異させることにより、SLAM 陽性細胞には感染できるが、極性上皮細胞にはもはや感染できないウイルスを作製することができる。このウイルスをマウスのニューロン初代培養に接種したところ感染は起こらなかった。したがって、麻疹ウイルスは、同一あるいは類似の受容体分子を使って極性上皮細胞とニューロンに感染すると考えられる。ヒトニューロン初代培養でも同様の結果が得られた。また、ヒト型 SLAM 分子を発現する SLAM ノックインマウスからマイクログリアを調整し、GFP 発現麻疹ウイルス野生株を用いて感染実験を行ったところ、感染が認められた。

D. 考察

ヒト神経系ではニューロンとマイクログリアが麻疹ウイルス野生株に感受性があり、前者は未知の受容体を介して、後者は SLAM を介して感染すると考えられる。ニューロン上の受容体はおそらくヒトとマウスで共通であるが、一般に麻疹ウイルス野生株の脳内接種でマウスにウイルス増殖を認めないのは、免疫応答によりウイルスが認識されて排除されてしまうためと考えられる。ヌードマウスでは麻疹ウイルスの排除に必要な免疫応答が起こらないため、持続感染が起こると考えられる。

E. 結論

麻疹ウイルス野生株は、マウスのニューロン初代培養に SLAM 非依存性に感染できることがわかった。この感染に関与している分子は、極性上皮細胞の感染に関わっている未同定の分子と同一あるいは類似のものであることが示唆された。今後、この分子の本体を明らかにするとともに、神経系でウイルスが感染・伝播する機構を明らかにすることを目指す。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yanagi Y, Takeda M, Ohno S, Hashiguchi T. Measles virus receptors. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 329: 13-30, 2009

2. 学会発表

- 1) Yanagi Y. Structure of the measles virus attachment protein provides insights into its interactions with receptors and antibodies. Symposium "Structural

insights into virus biology” Society for
General Microbiology Spring Meeting,
Harrogate, UK, April 1, 2009

2) Yanagi Y. Measles virus tropism and
pathogenesis. The 4th Nagasaki
Symposium on tropical and emerging
infectious diseases, Nagasaki, Japan,
November 26, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

研究分担者：網 康至 国立感染症研究所 動物管理室

研究協力者：染谷 健二 国立感染症研究所 ウイルス第3部

研究協力者：須崎百合子 国立感染症研究所 動物管理室

研究要旨

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。臨床検査結果から麻疹ウイルスの持続感染が疑われた個体の死亡に伴って、中枢神経の組織病理学的に病変・ウイルス抗原の局在について検討を行ったが、有意な病変、ウイルス抗原は認められなかった。しかし、感受性細胞との共培養により、ウイルス分離を試みたところ、細胞変性効果をほとんど示さない麻疹ウイルスが分離された。

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、約6年半にわたり、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。

この個体の死亡にともない、中枢神経における組織学的な病変あるいは麻疹ウイルスの局在の検索、ウイルス分離を試み、接種後観察された臨床検査結果が麻疹ウイルスの持続感染によるものかの検討を行った。

B. 研究方法

カニクイザル(No.4565)は、急性鼓腸症を発症し、呼吸・循環不全により死亡した。死亡直後に、剖検を行い、ウイルス分離用に中枢神経およびリンパ組織の一部を採材すると

ともに、中枢神経を含む主要臓器については、中性緩衝ホルマリンにその一部を固定、保存を行い、通常の方法に従って、病理学的検査を行った。

中枢神経組織については、HE染色、LFB-HE染色、抗GFAPウサギ抗体、抗麻疹ウイルスEdmonston株ウサギ抗体を用いた免疫染色を行った。

解剖時に採材した新鮮脳組織(前頭、頭頂、基底核、視床、小脳、頸髄)は、細切し、メッシュ上で単細胞にした後、B95a細胞、Vero細胞と10%FCSを加えたMEM培地を用いて共培養を行った。13代目までは、3から7日おきに1:3の比率で継代し、細胞変性の有無を顕微鏡下で観察を行った。14代目から2%FCSを加えたMEM培地を用いて2から3日おきに培地を交換し、1ヶ月間継代することなく、細胞を維持した。

また、場合により、抗麻疹ウイルスEdmonston株ウサギ抗体、FITC標識抗ウサギIgGを用い生細胞を染色し、蛍光顕微鏡による観察、あるいはFlow-cytometryによる