

思われた。

E. 結 論

麻疹 Edmonston 株をヌードマウスに脳内接種すると脳内で増殖した。摘出された脳のホモジナイズ液から検出されたウイルスから、M 遺伝子に多くの U から C への変異を持つクローンが検出され、SSPE ウイルスへの変化する過程と関連すると考えられた。

[参考文献]

- 1) 綾田 稔ら. 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE)-麻疹ウイルスの変異と神経病原性-ウイルス 53(1) : 15-23, 2003
- 2) Ohuchi R, et al. Slow development of measles virus (Edmonston strain) infection in the brain of nude mice. Microbiol. Immunol 28(7) : 757-764, 1984
- 3) Cattaneo R, et al. Biased hypermutation and other genetic changes in defective measles viruses in human brain infections. Cell 55(2) : 255-265, 1988

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表(2010/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Katayose M, Hosoya M, Haneda T, Yamaguchi H, Kawasaki Y, Sato M, Wright PF. The effectiveness of trivalent inactivated influenza vaccine in children over six consecutive influenza seasons. Vaccine 2010.12.31, [Epub ahead of print]
- 2) Kawasaki Y, Endo K, Suyama K, Sato M, Ito M, Hashimoto K, Hosoya M. Serum SP-D levels as a biomarker of

lung injury in respiratory syncytial virus bronchiolitis. Pediatr Pulmonol 46 : 18-22, 2011

- 3) Matsumoto A, Hashimoto K, Katayose M, Kato K, Suzuki H, Kawasaki Y, Hosoya M.[Trend of drug-resistant Haemophilus influenzae from the pediatric nasopharynx]. Kansenshogaku Zasshi 84(2) : 171-175, 2010

2. 学会発表

- 1) 阿部優作, 橋本浩一, 川崎幸彦, 細矢光亮. 我が国における亜急性硬化性全脳炎の疫学像. 第 84 回日本感染症学会総会学術講演会, 京都市, 2010.4.5
- 2) 橋本浩一, 阿部優作, 細矢光亮. 亜急性硬化性全脳炎(SSPE)に対する siRNA による治療を目指した基礎的研究 第 20 回 日本抗ウイルス療法研究会, 熊本市, 2010.5.20
- 3) 阿部優作, 橋本浩一, 細矢光亮. ハムスター動物モデルを用いた亜急性硬化性全脳炎(SSPE)感染機序の検討. 第 15 回日本神経感染症学会総会, 福島市, 2010.10.8
- 4) 渡部真裕, 石井希代子, 牛嶋裕美子, 陶山和秀, 橋本浩一, 西條政幸, 細矢光亮. ムンプスウイルス感染に合併した急性脳症の重症例. 第 15 回日本神経感染症学会総会, 福島市, 2010.10.8

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

亜急性硬化性全脳炎におけるインターフェロン濃度の検討

研究分担者：市山 高志 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野

研究協力者：長谷川俊史 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野

研究協力者：堀田 博 神戸大学大学院医学研究科微生物分野

研究要旨

【背景】 これまでに亜急性硬化性全脳炎 (subacute sclerosing panencephalitis : SSPE) 患者における髄液および血清中のサイトカイン濃度を報告してきたが、現在 SSPE の治療に使用されている Type I interferon (IFN) (IFN- α および IFN- β) を含めた IFN の病態への関与についてはまだ明らかではない。【目的】 SSPE ウィルス感染における IFN (Type I : α , β , II : γ , III : $\lambda 1$) 産生について *in vitro* での感染実験で検討するとともに SSPE 患者における血清中の IFN 濃度について正常対照と比較検討する。【方法】 マーモセット B リンパ芽球細胞株、B95a 細胞に mock、麻疹ウィルス野生株 (K 52 株) および麻疹ウィルス変異株 (SSPE ウィルス、Kobe-1 株) をそれぞれ感染させ、培養上清中の IFN- α , β , γ および $\lambda 1$ 濃度について ELISA 法および Cytokine beads array (CBA) 法を用いて測定した。また抗体価検査で確定診断されたトルコの SSPE 患者 23 例の保存血清中の IFN- α および β 濃度についても ELISA 法を用いて測定した。【結果】 SSPE ウィルス感染後の B95a 細胞からは mock あるいは麻疹ウィルス感染細胞に比して有意に多量の IFN- α および IFN- $\lambda 1$ が産生されたが、IFN- β および IFN- γ においては三群間に差はなかった。また SSPE 患者血清中 IFN- α および IFN- β 濃度は正常対照に比して有意に高値であった。【考察】 本研究の結果から IFN- α , β および $\lambda 1$ が SSPE の病態に深く関与している可能性が示唆された。現在 SSPE の治療に使用されている Type I IFN に加え、IFN- $\lambda 1$ の効果の可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまでに SSPE ウィルス感染における血清および髄液中サイトカイン濃度を報告してきたが、治療に使用されている Type I を含めたインターフェロン (IFN) の病態への関与についてはまだ十分解明されていない。本研究において IFN (Type I : α , β , II : γ , III : $\lambda 1$) 産生の差異の有無について *in vitro* での感染実験で検討するとともに SSPE 患者における血清中の IFN 濃度について正常対照と比較検討する。

B. 研究方法

マーモセット B リンパ芽球細胞株、B95a 細胞に mock、麻疹ウィルス野生株 (K52 株) および麻疹ウィルス変異株 (SSPE ウィルス、Kobe-1 株) をそれぞれ感染させ、感染後 1, 2, 3 日の培養上清中の IFN- α , β , γ および $\lambda 1$ 濃度について ELISA 法および Cytokine beads array (CBA) 法を用いて測定した。また抗体価検査で確定診断されたトルコの SSPE 患者 23 例の保存血清中の IFN- α および IFN- β 濃度について ELISA 法を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は培養上清および凍結保存髄液を用いた研究であり、個人名等の個人情報保護され、公表はされないことより倫理面への影響はない。

C. 研究結果

SSPE ウィルスを感染させた B95a 細胞上清では mock あるいは麻疹ウイルス感染細胞に比して感染後 2 日の IFN- α 濃度が有意に高値であった(図 1)。また IFN- λ 1 濃度においても SSPE ウィルス感染では mock あるいは麻疹ウイルス感染に比して感染後 2 および 3 日において有意に高値であったが(図 2)、IFN- β および IFN- γ においては三群間に差はなかった。また SSPE 患者血清中 IFN- α および IFN- β 濃度はそれぞれ 195.6 ± 105.6 pg/ml および 1616.9 ± 627.7 pg/ml で正常対照に比して有意に高値であった(図 3 および 4)。

D. 考察

マーモセット B リンパ芽球系細胞株 B95a 細胞においては SSPE ウィルスの感染により mock や麻疹ウイルス野生株に比して有意に多量の IFN- α および IFN- λ 1 を産生し、また SSPE 患者血清でも正常群に比して IFN- α および IFN- β 濃度は有意に高値であった。以上のことから IFN- α , β および λ 1 が SSPE の病態に深く関与している可能性が示唆された。その他の免疫担当細胞における IFN 産生の差異については不明であるが、これらの IFN は IFN- γ に比して抗ウイルス作用が強いため、現在 SSPE の治療に使用されている Type I IFN に加え、IFN- λ 1 も効果が期待できる可能性が示唆された。

E. 結論

SSPE ウィルスは麻疹ウイルスに比し、

IFN- α および IFN- λ 1 を多量に産生する可能性が示唆された。

[参考文献]

- 1) Ichiyama T, Siba P, Suarkia D, Reeder J, Takasu T, Miki K, Maeba S, Furukawa S. Analysis of serum and cerebrospinal fluid cytokine levels in subacute sclerosing panencephalitis in Papua New Guinea. *Cytokine* 33 : 17-20, 2006
- 2) Aydin OF, Ichiyama T, Anlar B. Serum and cerebrospinal fluid cytokine concentrations in subacute sclerosing panencephalitis. *Brain Dev* 32 : 463-466, 2010

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(2010/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Hasegawa S, Ichiyama T, Hashimoto K, Suzuki Y, Hirano R, Fukano R, Furukawa S. Functional expression of cysteinyl leukotriene receptors on human platelets. *Platelets* 21 : 253-259, 2010
- 2) Ichiyama T. Acute encephalopathy/encephalitis in childhood : a relatively common and potentially devastating clinical syndrome. *Brain Dev* 32 : 433-434, 2010
- 3) Aydin ÖF, Ichiyama T, Anlar B. Serum and cerebrospinal fluid cytokine concentrations in subacute sclerosing panencephalitis. *Brain Dev* 32 : 463-466, 2010
- 4) Tsuge M, Yasui K, Ichiyama T, Saito Y, Nagaoka Y, Yashiro M, Yamashita N, Morishima T. Increase of tumor

necrosis factor- α in the blood induces early activation of matrix metalloproteinase-9 in the brain. *Microbiol Immunol* 54 : 417-424, 2010

- 5) Hasegawa S, Ichiyama T, Kohno F, Korenaga Y, Ohsaki A, Hirano R, Haneda Y, Fukano R, Furukawa S. Prostaglandin E2 suppresses β 1-integrin expression via E-prostanoid receptor in human monocytes/macrophages. *Cell Immunol* 263 : 161-165, 2010
- 6) Saji N, Ichiyama T, Tadano M, Shimizu H, Kawarai T, Kita Y, Yokono K. Elderly case of prolonged hypoglycemic coma presenting with reversible magnetic resonance imaging changes. *Geriatr Gerontol Int* 10 : 331-333, 2010
- 7) Uchiyama A, Kusuda S, Imashuku S, Sakuma I, Yamasaki C, Ichiyama T, Nishida H. Fatal hemophagocytic lymphohistiocytosis in an extremely-low-birthweight infant. *Pediatr Int* 52 : 661-663, 2010

2. 学会発表

- 1) 市山高志. シンポジウム「急性脳症の診療・研究最前線」. 病態解析と治療戦略. 第 52 回日本小児神経学会, 福岡, 2010.5.20-22

- 2) 市山高志. 特別講演. 脳炎・脳症、髄膜炎トピックス. 第 134 回日本小児科学会徳島地方会, 徳島, 2010.6.12
- 3) 市山高志, 庄司紘史, 高橋幸利. パネルディスカッション. 非ヘルペス性辺縁系脳炎の髄液サイトカイン解析: 単純ヘルペス脳炎との比較検討. 第 17 回ヘルペス感染症フォーラム, 札幌, 2010.8.20-21
- 4) 市山高志. 特別講演. 急性脳症の病態解析と治療戦略. 第 86 回山陰小児科学会, 米子, 2010.9.26
- 5) 市山高志. レクチャー. 病態からみた治療戦略の構築~分子標的療法の可能性~. 第 30 回日本川崎病学会, 京都, 2010.10.10-11
- 6) 市山高志. インフルエンザに伴う小児急性死亡. 第 17 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会, 出雲, 2011.3.4-5

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

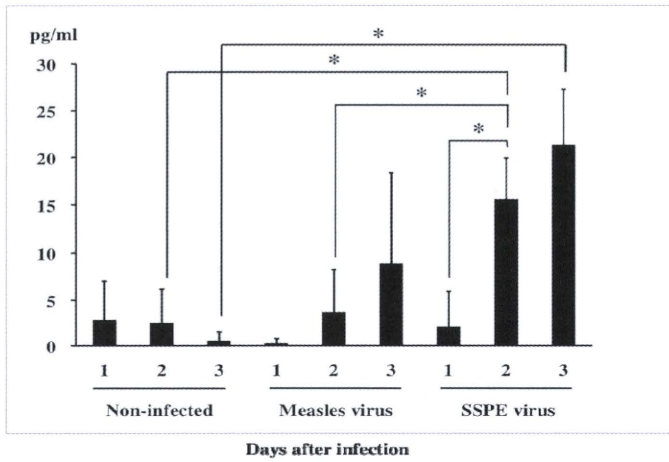


図1 ウィルス感染後の B95a 細胞からの IFN- α 産生

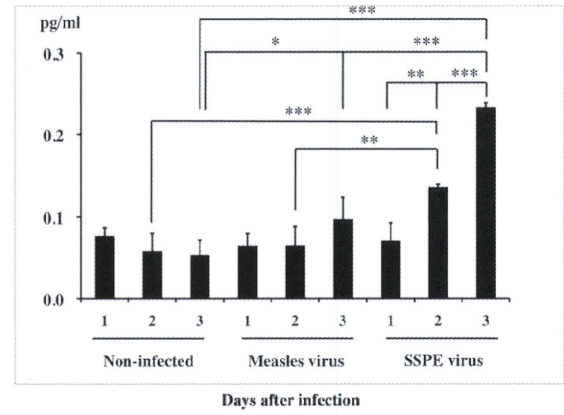


図2 ウィルス感染後の B95a 細胞からの IFN- λ 1 産生

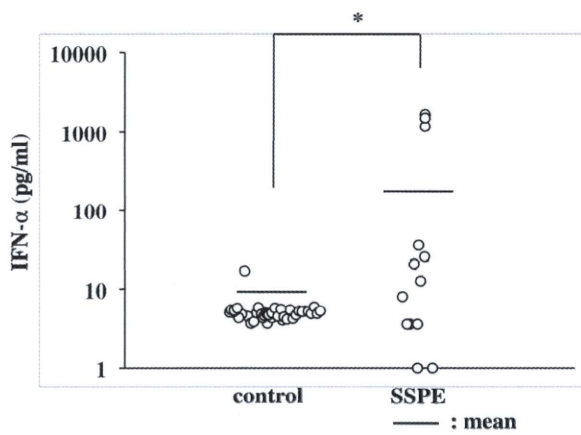


図3 SSPE 患者血清中の IFN- α 濃度

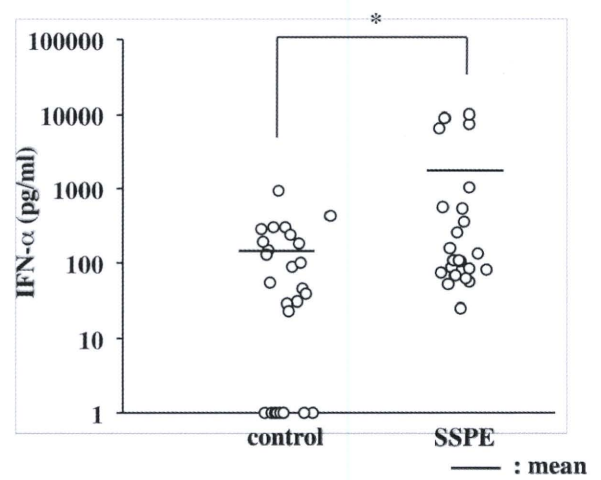


図4 SSPE 患者血清中の IFN- β 濃度

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

SSPE に対するリバビリン脳室内注入療法—フィリピンの単一施設における治療成績—

研究分担者：楠原 浩一 産業医科大学小児科

研究協力者：吉良龍太郎 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野(小児科)

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(小児科)

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(小児科)

研究協力者：Marissa B. Lukban

Departments of Pediatrics and Neurosciences, College of Medicine, University of the Philippines

研究協力者：Aida M. Salonga

Departments of Pediatrics and Neurosciences, College of Medicine, University of the Philippines

研究協力者：Judy P. Deveza

Departments of Pediatrics and Neurosciences, College of Medicine, University of the Philippines

研究協力者：Benilda C. Sanchez

Departments of Pediatrics and Neurosciences, College of Medicine, University of the Philippines

研究協力者：Catherine Lynne Silao

Departments of Pediatrics and Neurosciences, College of Medicine, University of the Philippines

研究協力者：Annabel Chua

Departments of Pediatrics and Neurosciences, College of Medicine, University of the Philippines

研究協力者：細矢 光亮 福島県立医科大学小児科

研究要旨

フィリピンの単一施設で脳室内リバビリン注入療法を受けた SSPE 患者の治療成績を検討した。NDI score に関しては国内での集計より良好な成績が得られた。治療後 1 年程度のスパンでは治療成績が比較的良好である可能性が示唆されたが、病期の改善にはつなげていなかった。一部症例の急速な悪化には、インターフェロンが併用されなかったことも関与していると考えられた。

A. 研究目的

SSPE の新規治療法としてわが国で開発されたリバビリン脳室内注入療法は、これまで国内を中心に 30 例以上に施行されているが、単一の施設で多数例に施行した報告はない。今回、本治療法の有効性と安全性を検討するために、SSPE 国際共同研究の一環として行われたフィリピン大学小児科における同療法の臨床試験の成績を解析した。

B. 研究方法

対象は、2000～2007 年にフィリピン大学小児科で診断された SSPE 患者 16 名。年齢は、3 歳から 26 歳、平均 11.6 歳、中央値は 11 歳であった。男女比は 7 対 9、リバビリン治療開始時の Jabbour 分類は、I 期 1 名、II 期 8 名、III 期 7 名であった。

治療は、Ommaya reservoir からの 12 時間おき 5 日間の注入を 9 日間の休薬期間をおいて 3～6 か月間反復するスケジュールで行っ

た。全例、診断時から Isoprinosine 50～100mg/kg を内服していた。インターフェロンの併用は行われなかった。リバビリンの注入量は、1 コース目 1mg/kg/dose、2 コース目 2mg/kg/dose とし、3 コース目は、2 コース目の髄液中濃度の測定結果に基づいて、一部症例で 3mg/kg/dose に増量した。

臨床的評価は、Ommaya reservoir 留置前 (T0)、リバビリン開始時 (T1)、リバビリン 3 か月投与後 (T3)、6 か月投与後 (T6)、リバビリン終了後 1、3、6、9、12 か月 (それぞれ M1、M3、M6、M9、M12) の各ポイントで行った。評価項目は、Neurological Disability Index (NDI)、Jabbour 病期分類、有害事象とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、本研究はフィリピン大学倫理委員会の承認を受け、被験者または保護者のインフォームドコンセントを得て実施された。

C. 研究結果

リバビリン治療開始までの 16 名の経過を表 1 に示した。麻疹罹患年齢は、12 名 (75%) で 1 歳未満であった。10 名 (63%) が麻疹ワクチンの接種歴を有していたが、この中で麻疹の自然罹患歴がない症例はなかった。麻疹罹患から SSPE 発症までの期間の平均は 7.8 年、中央値は 6.5 年であった。SSPE 発症からリバビリン療法開始までの期間の平均は 2.6 年、中央値は 2.8 年であった。

臨床試験参加から Ommaya reservoir 留置を経てリバビリン治療が開始されるまでの間に病状が進行し、Jabbour 病期分類が変化した患者がみられたため、参加時と治療開始時の Jabbour 病期分類を比較した (図 1)。I 期から II 期に進行した者が 1 名、II 期から III 期に進行した者が 4 名みられた。

16 名中、3 名 (I 期 1 名、III 期 2 名) が、それぞれ Ommaya reservoir 関連感染後の再留

置拒否、肝機能障害、非再診のために 3 か月以上の治療の継続ができなかったため、有効性は主に残る 13 名で検討した。このうち、6 か月間のリバビリン治療を完了した患者が 11 名、3 か月間の治療を受けた患者が 2 名であった。II 期の 1 名 (症例 No. 4) は、治療開始後も症状が進行し、6 か月間の治療を完了してから 2 か月後に肺炎と脳幹機能不全のため死亡した。死亡率は、7.7%であった。

途中で drop out した 3 名を含む 16 名の NDI スコアの経過を図 2 に示した。一部に悪化例もみられたが、全体としてやや改善している傾向がみられた。図 3 は、3～6 か月の治療を完了した 13 名について、治療開始時の NDI スコアを横軸に、治療終了後 1 か月の NDI スコアを縦軸にプロットしたものである。6 名が $Y=X$ を表す中央の破線より下にあり改善、4 名が上にあり悪化、3 名が破線付近にあり不変と判断された。次に治療開始時の Jabbour 病期ごとの治療効果を比較した。II 期 (角点) では 8 名中 2 名 (25%) で改善がみられ、これに対して III 期 (丸点) では 5 名中 4 名 80% が改善していた。

図 4 に治療開始時と治療終了後 12 か月の Jabbour 病期の比較を示した。II 期から I 期に改善した症例が 1 名あったが、II 期から III 期に進行した症例が 5 名あり、うち 1 名は、上述のように治療終了から 2 か月後に死亡した。III 期の症例は、NDI スコアでは 5 名中 4 名で改善していたが、病期の改善にはつながっていなかった。全体として、病期としてはやや進行している印象であった。

有害事象としては、死亡した 1 名以外では、発熱が 6 名、Ommaya reservoir 関連感染 5 名、発疹 3 名、口内痛 2 名、肝機能障害 2 名、けいれん 1 名、傾眠+尿閉 1 名がみられた。わが国における治療例で目立つ副作用である傾眠はあまりみられなかった。

D. 考 察

図 5 に 2006 年に熊本大学の野村らがまとめた国内症例の治療前後の NDI スコアの変化を示した。今回のデータは、国内のデータと比較して NDI score の改善が良好であった。国内のデータは調査時点でのスコアであり、治療後長期間経過した症例も含まれているため、単純な比較はできないが、今回のデータは、治療後 1 年程度のスパンでは治療成績が比較的良好である可能性を示唆している。しかし、一方で、一部に $Y=X$ の破線から大きく離れて悪化している症例がみられた。国内ではリバビリン療法には保険適応があるインターフェロンの脳室内注入が併用されているが、フィリピンでは経済的な理由からインターフェロン注入の併用は行われなかった。フィリピンのリバビリン無効例では、インターフェロンによる抑制効果がないために、急激に悪化している可能性が考えられた。国内では、一般にリバビリン脳室内注入療法は早い病期に導入したほうが効果が得られやすいとされている。しかし、今回の検討ではⅢ期の症例のほうがⅡ期の症例よりも良好な改善率を示し、治療開始時の病期では必ずしも治療効果を予測できないと考えられた。

有害事象に関しては、Ommaya reservoir 関連感染の頻度は、16 名中 5 名 (31%) と高く、途上国で本治療法を導入する上での課題と思われた。

E. 結 論

フィリピンの単一施設で脳室内リバビリン注入療法を受けた SSPE 患者の治療成績を検討した。NDI score に関しては国内での集計より良好な成績が得られた。治療後 1 年程度のスパンでは治療成績が比較的良好である可能性が示唆されたが、病期の改善にはつながっていなかった。一部症例の急速な悪化には、インターフェロンが併用されなかったことも関与していると考えられた。

[参考文献]

- 1) Hosoya M, Mori S, Tomoda A, Mori K, Sawaishi Y. Pharmacokinetics and Effects of Ribavirin following intraventricular administration for treatment of Subacute Sclerosing Panencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother* 48 : 4631-4635, 2004
- 2) Pipo-Deveza JR, Kusuhara K, Silao CL, Lukban MB, Salonga AM, Sanchez BC, Kira R, Takemoto M, Torisu H, Hara T. Analysis of MxA, IL-4, and IRF-1 genes in Filipino patients with subacute sclerosing panencephalitis. *Neuropediatrics* 37 : 222-228, 2006

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表(2010/4/1~2011/3/31 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. *PD1* as a common candidate susceptibility gene of subacute sclerosing panencephalitis. *Hum Genet* 127 : 411-419, 2010
- 2) 楠原浩一, 吉良龍太郎, 鳥巢浩幸, 原 寿郎. 感染症の宿主遺伝要因 —抗酸菌感染症と亜急性硬化性全脳炎に対する免疫遺伝学的アプローチ—. *J UOEH* 32(2) : 177-193, 2010
- 3) 楠原浩一. 遅発性ウイルス感染症 亜急性硬化性全脳炎(SSPE) 病理. In : 厚生労働省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」編. プリオ

2. 学会発表

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

表1 リバビリン治療開始までの経過

No	現在の年齢	性別	麻疹罹患年齢	麻疹ワクチン接種年齢	SSPE発症年齢	麻疹罹患～SSPE発症まで	発症～診断まで	発症～リバビリン治療まで
1	7Y	M	7M	9M	6Y	6Y	<1 M	7M
2	11Y	F	2Y	9M	10Y	9Y	4M	11M
3	18Y	F	1Y	なし	13Y	12Y	8M	6Y
4	15Y	F	6M	なし	8Y	7Y	< 1M	7Y
5	10Y	M	6M	なし	8Y	8Y	2M	11M
6	3Y	M	10M	9M	3Y	2Y	2M	2M
7	15Y	F	11M	9M	12Y	11Y	1M	3Y
8	17Y	M	6M	なし	6Y	6Y	2Y6M	7Y
9	11Y	F	8M	なし	4Y	4Y	1M	7Y
10	18Y	F	7M	1Y	11Y	10Y	1M	7Y
11	5Y	F	4M	9M	4Y	4Y	1M	6M
12	5Y	F	4M	9M	5Y	5Y	1M	3M
13	6Y	M	8M	9M	6Y	5Y	1M	3M
14	25Y	M	3Y	9M	25Y	21Y	<1M	10M
15	6Y	M	9M	なし	5Y	5Y	3M	3M
16	13Y	F	2Y	9M	12Y	10Y	3M	7M

図1 参加時と治療開始時のJabbour病期の比較 (n=16)

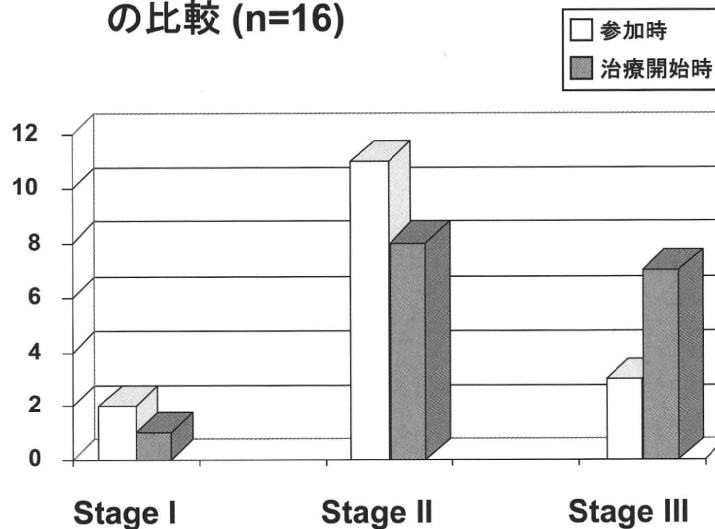


図2 NDIスコアの推移 (n=16)

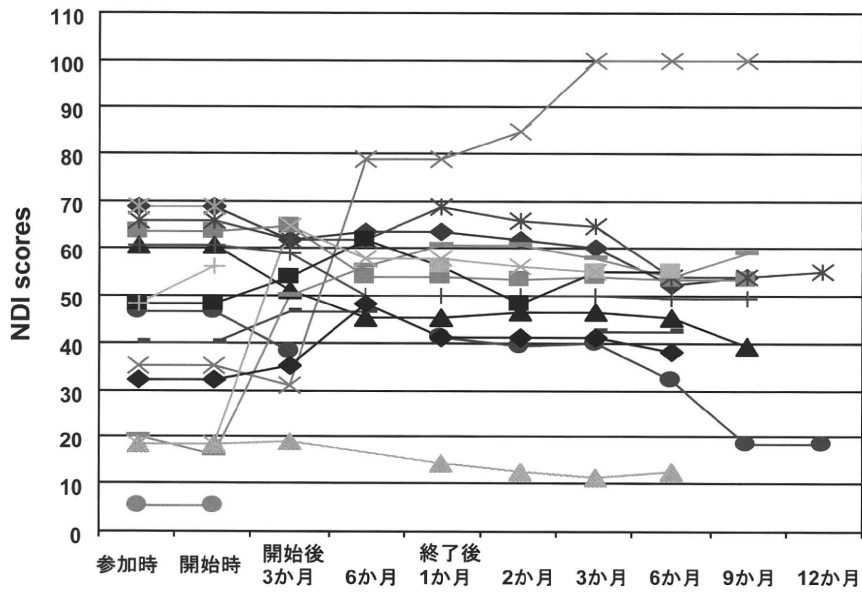


図3 治療開始時と終了後12か月のNDIスコアの推移 (n=13)

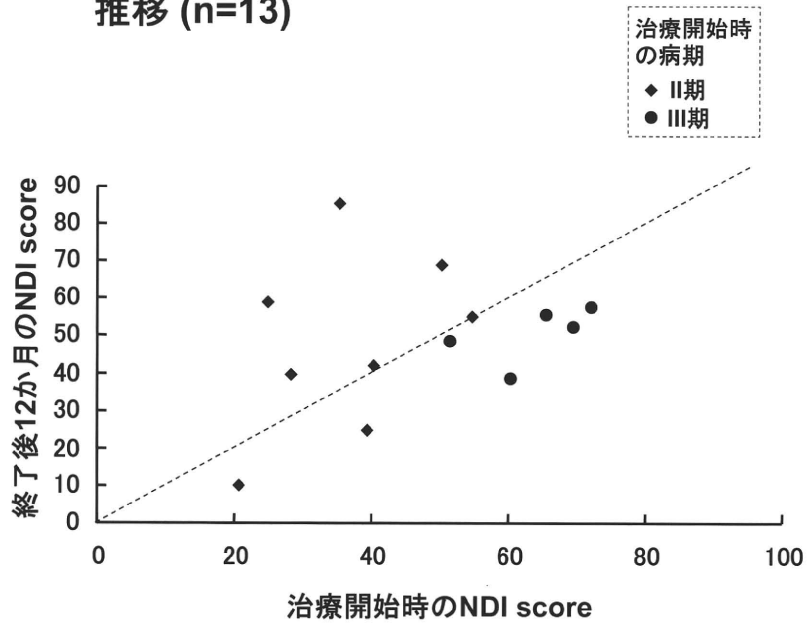


図4 治療開始時と終了後12か月のJabbour病期の比較 (n=13)

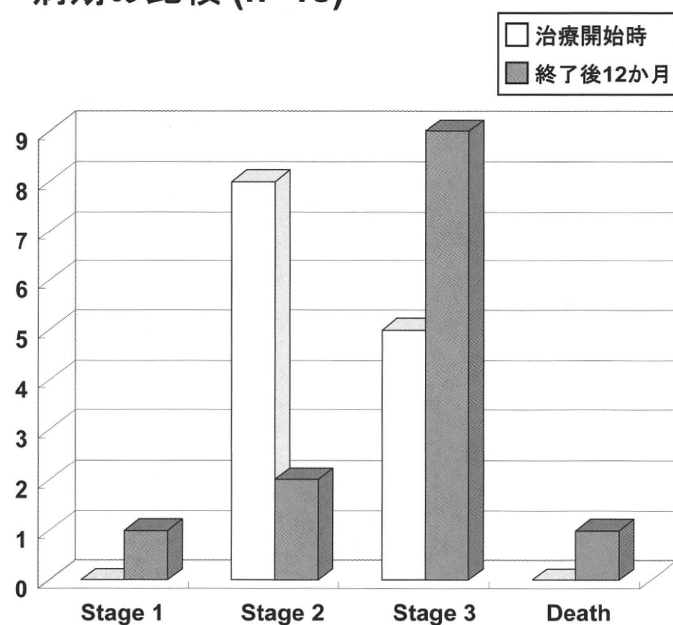
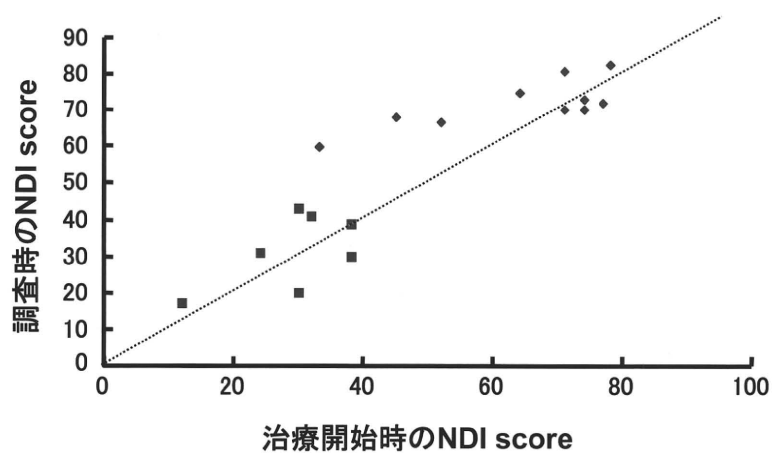


図5 国内症例の集計(熊本大学野村ら, 2006)



亜急性硬化性全脳炎(SSPE) マウスモデルを用いた神経病原性の研究

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：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：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：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)は麻疹ウイルスの変異株によっておこる遅発性・致死性の脳炎である。SSPE ウイルスが通常の麻疹ウイルスと大きく異なる特徴の一つとして、神経親和性・神経病原性を有することがあげられる。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同定されていないが、その背景にはSSPE ウイルスの簡便な小動物感染実験系がないことも一因としてあげられる。本研究では、マウス脳内接種を用いたSSPE ウイルス(SSPE Kobe-1 株)感染実験系を確立し、神経病原性に係わる細胞死のメカニズムについて解析した。さらに、組換え麻疹ウイルス遺伝子に変異を導入し、M、F 及び H 遺伝子にSSPE Kobe-1 株と同じ変異を有する組換えウイルスを作製し、これら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。

まず、本マウス実験系において、SSPE Kobe-1 株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、それらはリン酸化(活性化)c-Jun 陽性、cytochrome c 陽性、活性型 caspase-3 陽性であることを明らかにした。これらの結果から、SSPE ウイルス感染では、何らかの機序により 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が誘導されていると考えられた。一方、ウイルス感染脳組織では、一部の非感染神経細胞でも上記のアポトーシス関連分子の染色陽性像が観察され、細胞障害性サイトカイン等の脳内における過剰産生による細胞死誘導の可能性も示唆された。

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全長 M 蛋白、C 末端変異 F 蛋白、及び全長 H 蛋白の変異を有するウイルス株にさらに変異を追加し、SSPE Kobe-1 株由来の全長 F 蛋白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SSPE Kobe-1 株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、SSPE Kobe-1 株の神経親和性・神経病原性の発現には、ウイルス複製に必須の遺伝子(N、P、L)の変異が必要であると考えられた。

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によっておこる遅発性・致死性の

脳炎である。SSPE ウイルスが通常の麻疹ウイルスと大きく異なる特徴は、宿主の免疫監視システムから逃れて長期間にわたって潜

伏・持続感染すること、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、神経親和性・神経病原性を有すること等があげられる¹⁾。我々はこれまでに、SSPE 患児から分離した SSPE-Kobe-1 株を用いて、M 蛋白及び F 蛋白の特有の変異が本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ことを明らかにした²⁾。しかし、SSPE-Kobe-1 株の神経親和性・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や結合特性の違い、及び、ウイルス複製に關与する宿主細胞因子の有無やウイルス蛋白との相互作用特性の違いにより規定されている。麻疹ウイルス臨床分離株のレセプターは CD150/SLAM である³⁾。CD150/SLAM は樹状細胞、単球/マクロファージ、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、上皮細胞では発現していない¹⁾。一方、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)}。麻疹ウイルス臨床分離は 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 は発現していないので、SSPE ウイルスはそれら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 M、F、H の各蛋白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。

我々はこれまでに、麻疹ウイルス野生株(臨床分離株と実験室継代株)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を作製した⁴⁾。そして、この系を用いて SSPE ウイルスの神経細胞障害機序について解析しているが、これまでに責任ウイルス蛋白の同定には至っていない。

本研究では、ウイルス吸着・侵入を担う H 及び F 蛋白の全長を SSPE-Kobe-1 株由来のものに置換した組換え麻疹ウイルスを作製し、マウス神経病原性について検討した。さらに、SSPE-Kobe-1 株が神経細胞障害をおこす分子機序について解析した。

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既報の方法により行った⁴⁾。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、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 細胞と共培養した。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 蛋白(Millipore MAB8910)、神経細胞特異的 NeuN (neuronal nuclei ; Fox-3, Millipore MAB377)、活性型 caspase-3(Promega G7481)、cytochrome c(Cell Signaling Technology #4280)、c-Jun(Cell Signaling Technology #9165)、リン酸化 c-Jun(Cell Signaling Technology #9164)など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 M、F、H 遺伝子に、SSPE Kobe-1 株⁶⁾の特有の変異を導入した変異株(MV323-mtM/F/H)を作製した。このウイルスをマウスに脳内接種し、神経親和性・神経病原性を判定した。

3) 培養細胞における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。感染細胞内におけるウイルス複製は、ウイルス蛋白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測定した。

(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 ウイルス感染脳組織における感染細胞の分布と同定

SSPE Kobe-1 株を脳内接種したマウスの脳組織では、ウイルス M 蛋白陽性の感染細胞は接種側の脳皮質、アンモン角、歯状回に拡がっており、少数ながら対側のアンモン角、歯状回にも観察された。

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 蛋白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。

2) SSPE ウイルス感染脳組織における神経細胞のミトコンドリア介在性アポトーシス誘導経路の活性化

ウイルス感染脳組織では、核内 c-Jun や核内リン酸化 c-Jun の増加、細胞質内 cytochrome c の増加、活性型 caspase-3 の増加を示す神経細胞が多数観察された。これらのウイルス感染脳組織では、感染細胞のみならず周囲の非感染神経細胞にも上記のアポトーシス関連蛋白の増加が観察された。

3) SSPE ウイルス由来の全長 M、F、H 蛋白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

全長 M、H、F 蛋白に SSPE-Kobe-1 株⁶⁾由来の変異を有する遺伝子組換え麻疹ウイルス (MV323-mtM/F/H) 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蛋白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。

MV323-mtM/F/H をマウスに脳内接種したが、神経病原性はまったく認められなかった。

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ることが明らかになった。感染脳組織では核内 c-Jun の増加と核内リン酸化 c-Jun の増加、細胞質内 cytochrome c の増加、活性化 caspase-3 の増加を示す神経細胞が多数認められた。これらの結果から、SSPE ウイルス感染では、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⁷⁾が神経細胞障害の一因である可能性が示唆された。

全長 M、H、F 蛋白に SSPE-Kobe-1 株由来の変異を有する MV323-mtM/F/H は、マウスに脳内接種しても神経病原性をまったく示さなかった。今回の我々の結果は、SSPE-Kobe-1 株の神経病原性はウイルス吸着・侵入のレベルのみで規定されているのではなく、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 細胞を用いた実験により、細胞内の MV323-mtM/F/H の遺伝子複製及びウイルス蛋白合成は、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蛋白合成に係わる神経細胞特異的な宿主因子と変異ウイルス蛋白の相互作用により規定されている可能性があると推察された。今後、N、P あるいは L 蛋白等、ウイルス複製に必須のウイルス蛋白に変異を導入した組換えウイルスを作製し、その神経親和性・神経病原性について検討する。さらに、脳スライス器官培養あるいは神経系培養細胞を用いて、SSPE ウイルスによる神経細胞死の分子メカニズムを詳細に解析する予定である。

E. 結論

- 1) SSPE-Kobe-1 株のマウス脳内感染実験系において、脳組織内の感染細胞のほとんどすべてが神経細胞であった。
- 2) 上記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た。
- 3) SSPE ウイルス感染脳組織では、バイスタンダー機序により、非感染神経細胞においても JNK 活性化とミトコンドリア介在性アポトーシス誘導経路の活性化が認められた。
- 4) SSPE-Kobe-1 株のマウス神経病原性の発現には、神経細胞特異的な宿主因子と相互作用し、ウイルス複製に必須の遺伝子(N、P、L)の変異が必要であると考えられた。

[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, 姜 大鵬, 井出良浩, 勝二郁夫 : 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. 平成 21 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総括・分担研究報告書 182-186, 2010
- 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) 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) 堀田 博. 亜急性硬化性全脳炎(SSPE) : 成因と発症機構. プリオン病と遅発性ウ

イルス感染症. 金原出版, 印刷中

- 2) 堀田 博. 遅発性ウイルス感染症とプリオン病: シンプル微生物学 第5版. 南江堂, 印刷中

2. 学会発表

- 1) 井出良浩, 姜 大鵬, 勝二郁夫, 堀田 博.

SSPE Kobe-1 マウスモデルの神経病変にはアポトーシスが関与する. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010.11

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

カニクイザルを用いた SSPE 動物モデルの開発

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：須崎百合子 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

研究要旨

臨床症状から麻疹ウイルスが持続感染していると考えられたカニクイザル中枢神経から分離された麻疹ウイルスの性状を解析した。分離ウイルス感染 Vero 細胞におけるウイルス蛋白の発現は、野外株と比較して H 蛋白の発現は同等であったが、著しく N,F 蛋白の発現が低かった。この分離ウイルスをハムスター、免疫不全マウスに脳内接種したが、感染は成立するものの、病原性を示さなかった。これらの結果から、中枢神経内に持続感染する麻疹ウイルスは、SSPE から分離される従来の麻疹ウイルスとは性状の異なることが示唆された。

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ところ、その 1 頭においては、約 6 年半にわたり、持続的な抗麻疹ウイルス液性免疫・感染初期における細胞性免疫の賦活化を呈し、かつ、脳脊髄液中に中和抗体を有していた。この個体は、中枢神経に持続感染していると考えられ、この個体から麻疹ウイルスを分離した。

分離ウイルスの性状を解析し、持続感染から SSPE 発症にいたる要因を、ウイルス学的に解明することを目的とする。

B. 研究方法

個体からの分離ウイルスは、大脳視床及び前頭皮質から Vero 細胞で分離し、持続感染しているウイルスを用いた。対照としては、B95a 細胞で増殖させた、接種ウイルスである麻疹ウイルス野外株 HL-MoBr3 株および

野外株 IC-B 株を用いた。感染細胞内におけるウイルス蛋白の解析には、分離ウイルスでは、細胞継代後 1 週間の Vero 細胞を 1%NP-40 を含む lysis buffer で融解し抽出したものをを用いた。野外株は、B95a 細胞に MOI 0.1 で感染後 2 日後の細胞を、同様に処理したものをを用いた。2~12% Bis-Tris ゲルで MES SDS buffer を用いて電気泳動し、PVDF メンブレンに転写後、抗麻疹ウイルス Edmonston 株ウサギ抗体を用いて、Western blotting を行った。

分離ウイルスの、病原性の解析には、3 週齢のハムスター (Slc : Syrian) および NODscid マウスの脳内に、mytomycin 処理した視床及び前頭から分離した持続感染細胞 $10^6/\text{ml}$ 浮遊液を $20\mu\text{l}$ 、 $10\mu\text{l}$ 脳内接種を行い、臨床症状および体重の変化を経時的に観察した。接種後 3.5 週にそれぞれ 2 匹を解剖し、中枢神経の病変およびウイルス抗原を病理組織学的に検索した。

(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

分離継代は、継代後 **confluent** になった細胞を 2% FCS メディウムで数週間維持した後、次の継代を行うことにより行い、継代 8 代では検出できなかったウイルス蛋白をおよそ 20 代で検出できるようになった。ウエスタンブローディングの結果を図 1 に示す。B95a 細胞増殖麻疹ウイルス野外株では、H, N, F 蛋白が比較的濃いバンドとして検出されるのに対して、分離ウイルスでは、H 蛋白は同等に検出されるが、N, F 蛋白が極めてわずかに認められるバンドとして検出された。P, M 蛋白については、差は認められなかった。

ハムスター、免疫不全マウスに対する病原性試験では、接種後 4 週まででは、体重の変化、症状は観察されなかった(図 2)。しかし、病理組織学的には、接種後 3.5 週のそれぞれの脳において、神経細胞にわずかな抗原が検出された。

D. 考 察

感染細胞内でのウイルス蛋白の発現が、持続感染カニクイザル脳から分離したウイルスと麻疹ウイルス野外株とでは、ウエスタンブローディング法で解析すると異なっていた。バンドの濃さ等は、蛋白量とは異なり、用いた抗体に対する反応性が異なっている可能性も考えられる。しかしながら、感染細胞における N, F 蛋白の低い産生は、ウイルス粒子を産生せず、細胞融合等の CPE を示さない分離ウイルスの性状と一致していると考えられる。

分離ウイルスは、ハムスター、免疫不全マウスに病原性を示さなかった。マウスに対する病原性は、一部のワクチン株でもその性状を有することから、SSPE から分離される麻疹ウイルスの性状というより、麻疹ウイルス

株での一性状を表すものに過ぎないが、ハムスターにおける病原性は、多くの SSPE から分離される麻疹ウイルスに特徴的な性状の 1 つと考えられている。分離ウイルスは、SSPE から分離される麻疹ウイルスがハムスターに対して、通常病原性を示す期間では、少なくとも病原性を示さないと考えられる。

従来、SSPE から分離される麻疹ウイルスは、M 蛋白の産生が低いこと、ハムスターに対して病原性を有することがその特徴として知られているが、今回分離されたウイルスでは、その性状が認められないことは、持続感染から SSPE 発症には、さらなるウイルス変異が感染脳内で必要であることを示唆するものと考えられる。現在、分離ウイルスの遺伝子解析を進めている。

E. 結 論

中枢神経内持続感染するカニクイザルから分離された麻疹ウイルスは、感染細胞でのウイルス蛋白の発現、ハムスターに対する病原性の違いから、従来知られている SSPE ウイルスとは性状が異なっていると考えられる。

[参考文献]

- 1) Enami M, Sato T, Sugiura A. Matrix protein of cell-associated subacute sclerosing panencephalitis viruses. *J.gen.Virol* 70 ; 2191-2196, 1989
- 2) Wong TC, Hirano A. Structure and function of bicistronic RNA encoding the phosphoprotein and matrix protein of measles virus. *J.Virol* 61 ; 584-589, 1987

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(2010/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

1, IC-B株/B95a
2, HL-Br3株/B95a
3, 視床/ Vero
4, 前頭/ Vero

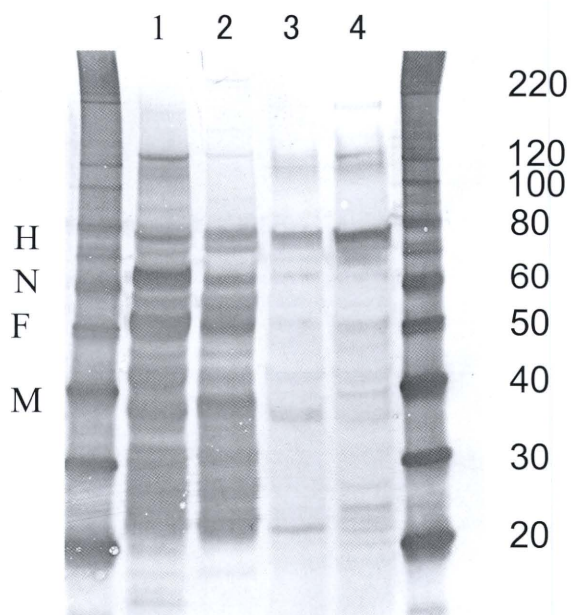


図1 感染細胞におけるウイルス蛋白の解析

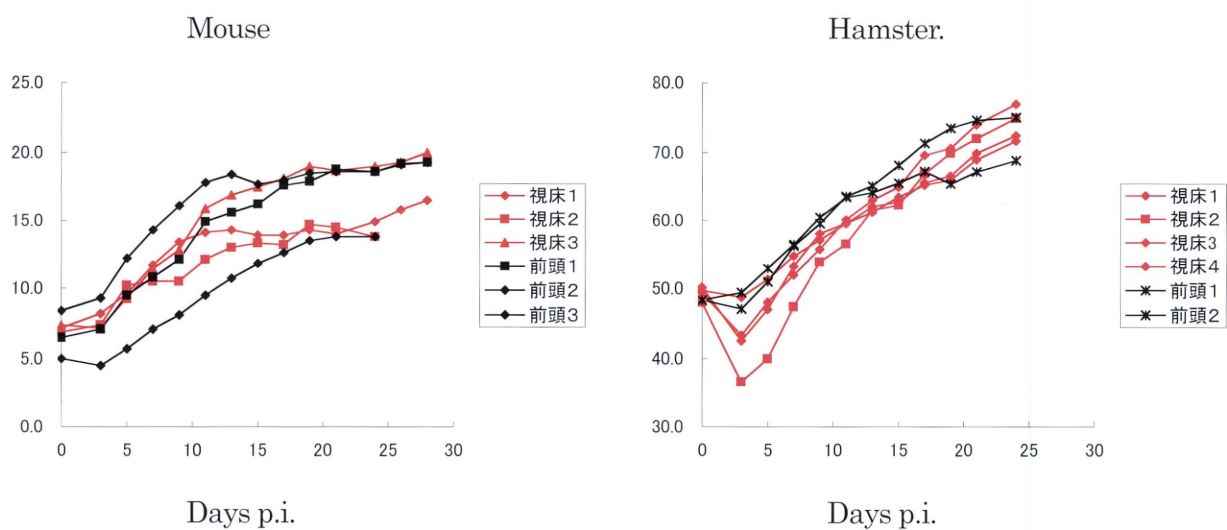


図2 分離麻疹ウイルス脳内接種動物の体重変化

麻疹ウイルスの神経系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

神経系細胞の初代培養を用いた実験で、麻疹ウイルス野生株はマウスおよびヒトのニューロンに SLAM (CD150) 非依存性に感染した。ニューロンへの感染は、麻疹ウイルスに対する抗体および fusion block peptide で阻止された。また、ヒト SLAM ノックインマウス由来のマイクログリアにヒト SLAM 依存性に感染した。アストロサイトには感染しなかった。

A. 研究目的

麻疹ウイルスは SLAM(CD150)を受容体として免疫細胞に感染する。しかし、神経系の細胞への感染機構はよくわかっていない。本研究では、SSPE の治療法を開発するために、麻疹ウイルスの神経系細胞への感染機構を理解することを目的とする。

B. 研究方法

マウス脳から、ニューロン、アストロサイト、マイクログリアの初代培養を調製し、GFP 発現組換え麻疹ウイルス野生株を感染させた。

(倫理面への配慮)

動物実験には、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の許可を受けた。

C. 研究結果

C57Bl/6 マウスから調製したニューロン初代培養に GFP 発現組換え麻疹ウイルス野生株を感染させると、GFP の発現が認められ、時間の経過とともに感染が広がった(図 1)。予め、麻疹ウイルスに対する抗体あるいは fusion block peptide を培養液に加えておくと、感染は完全に阻止された。また、感染 6

時間後に抗体あるいは fusion block peptide を加えても感染の広がりには抑えられた。一方、マウスのニューロンにおける麻疹ウイルス伝播に関与していると報告されている neurokinin 1 のリガンドである Substance P は感染に全く影響を及ぼさなかった。市販のヒトニューロン初代培養でも、マウスニューロン同様麻疹ウイルス野生株の感染を認めた。

次に、マイクログリアにおける感染を検討した。C57Bl/6 マウスから調製したマイクログリアでは、全く感染を認めなかったが、ヒト型 SLAM 分子を発現する SLAM ノックインマウスから調製したマイクログリアでは感染が認められた(図 2)。マイクログリアにおける SLAM の発現は高くなかったが、麻疹ウイルスを投与後 SLAM の発現は上昇した。これは、ヒト単球で見られるのと同様の所見である。アストロサイト初代培養には麻疹ウイルスの感染は観察されなかった(図 3)。

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