

亜急性硬化性全脳炎の発症機序の解明と治療法の開発

研究分担者：細矢 光亮 福島県立医科大学・医学部・小児科学講座

研究協力者：橋本 浩一 福島県立医科大学・医学部・小児科学講座

研究協力者：阿部 優作 福島県立医科大学・医学部・小児科学講座

研究要旨

(1)サーベイランス 2007 の検討、(2)SiRNA による治療を目指した基礎的研究、(3)SSPE ハムスターモデルの再構築、(4)ヌードマウス脳内に持続感染した麻疹ウイルスの検討について研究を進めた。

(1) 2007 年に行われた SSPE 患者に対する全国規模のサーベイランスで、118 例の調査表を解析した。2 歳未満で麻疹に罹患した場合、SSPE 発症率が高く、さらに 6 ヶ月以下で麻疹に罹患した場合、早期に SSPE を発症した。麻疹の流行規模と SSPE 発症数には正の相関があり、近年麻疹罹患患者の減少とともに、SSPE 発症数も減少傾向であった。

(2) 麻疹ウイルス遺伝子を標的にした siRNA を、麻疹ウイルス臨床分離株・SSPE ウイルスについて in vivo で評価した。特に N 遺伝子に対する siRNA が最も有効であり、ribavirin、IFN α -2b との併用効果も認められた。

(3) ハムスターモデルを再構築した。本モデルは、神経症状や病理像がヒト SSPE と類似しており、SSPE ウイルスによる病理学的変化の再現モデルと考えられた。

(4) 麻疹 Edmonston 株を脳内に接種したところ 14 週までには全て死亡または瀕死となり屠殺した。脳ホモジナイズ液から得られたウイルスゲノムの M 蛋白 coding 部分のシーケンスでは uridine から cytosine への変異のあるクローンが多数検出された。

A. 研究目的

亜急性硬化性全脳炎(Subacute Sclerosing Panencephalitis ; SSPE)の発症機序を明らかにし、新しい治療法を開発する。また、SSPE 患者の現状を把握する。

B. 研究方法

(1) サーベイランス 2007 の検討

SSPE にのみ適応のイノシンプラノベクスが処方されている SSPE 症例を対象に、本剤納入医療機関 98 施設に調査個人票を送付した。麻疹の流行状況に関しては厚生労働省の感染症サーベイランスを参照した。倫理面へ

の配慮として、協力医療機関の担当医が患者あるいは保護者へ本調査の概要を説明し、本研究への協力の承諾を確認した。また、個人を特定可能な解析結果は掲載していない。

(2) siRNA による治療を目指した基礎的研究
SSPE ウイルス臨床分離株(Yamagata-1 株)、麻疹ウイルス臨床分離株を用い、Vero/SLAM 細胞(九州大学柳雄介教授より分与)を用いた。麻疹ウイルス遺伝子それぞれに siRNA を作成した。Vero/SLAM 細胞に siRNA を導入し、その後、麻疹ウイルス、SSPE ウイルス感染させウイルス増殖をプラーク法で定量した。さらに siRNA と、ribavirin ま

たは IFN α -2b との併用効果を検討した。

(3) SSPE ハムスターモデルの再構築

SSPE ウイルスを 4 週齢のゴールデン・シリアン・ハムスターに脳内接種した。接種後、連日体重を測定し、神経症状(食欲不振、性格変化、歩行異常、ミオクローヌス、けいれん、唾液分泌の亢進、筋肉の硬直)の出現について観察した。発症したハムスターの脳を摘出し、プラーク法によりウイルス量を定量した。また、病理標本を作製し、HE 染色、抗麻疹ウイルス N 蛋白抗体による免疫染色を行った。

(4) ノードマウス脳内に持続感染した麻疹ウイルスの検討

4 週齢のノードマウスに、SSPE ウイルス、Edmonston 株をそれぞれ脳内に接種した。連日体重を測定し 20%以上の体重減少がみられた個体を屠殺し、脳摘出後、病理標本を作製した。また、脳ホモジナイズ液中の麻疹ウイルスをプラーク法で定量し、さらに M 蛋白 coding 部分のシーケンスを行い、接種前の Edmonston 株と比較した。

C. 研究結果

(1) サーベイランス 2007 の検討

SSPE 患者 118 例(男 65 : 女 53=1.2 : 1)で、SSPE 発症年齢は学童期が約 70%を占めていた。麻疹罹患から SSPE 発症までの期間は、6 ヶ月以下は他の年齢と比較して有意に短かった ($P<0.05$)。2 歳未満で麻疹に罹患した場合、SSPE を発症するリスクが高く (OR : 11.2 ; 95%CI : 4.4-28.4)、1 歳未満と 1 歳~2 歳未満で比較では、1 歳未満のリスクが高かった (OR : 3.0 ; 95%CI : 1.6-5.5)。麻疹患者定点報告数と SSPE 患者数には正の相関 ($r=0.68$; $P<0.001$) がみられた。SSPE の年間発症数は 1995 年以降は減少傾向であった。

(2) siRNA による治療を目指した基礎的研究

各 siRNA のウイルス増殖への影響は、それぞれが麻疹ウイルス臨床分離株・SSPE ウイルスの増殖を抑制したが、特に N 遺伝子に

対する siRNA (si-N) が最も有効であった。さらに rivabirin、IFN α -2b の濃度依存的に抑制され、併用効果が認められた。

(3) SSPE ハムスターモデルの再構築

ヒト SSPE 患者での神経症状は SSPE ウイルス接種後 10 日~25 日に本モデルでも認められた。発症したハムスターの脳から、接種した 100~500 倍のウイルス量が検出された。脳の病理標本では、脳室の拡大がみられ、脳の萎縮が示唆された。HE 染色では空胞変性、炎症細胞の浸潤がみられた。免疫染色では神経細胞の細胞体、樹状突起、軸索全てに陽性所見がみられ、一部アストロサイトにも所見がみられた。

(4) ノードマウス脳内に持続感染した麻疹ウイルスの検討

SSPE 群は 2 週間で全て死亡または屠殺した。Edmonston 群は 14 週までには全て死亡または屠殺した。HE 染色では、両群共に、明らかな空胞変性、グリオーシスは認められなかったが、免疫染色では、両群共に神経細胞(神経細胞体・軸索)に陽性所見が全脳性にみられた。Edmonston 接種群において、初期投与量の 0.4~400 倍のウイルスが検出された。Edmonston 脳内接種群のマウス脳の麻疹ウイルスゲノムシーケンスでは、uridine から cytosine への変異が多くみられ、10 クローン中、開始コドンの欠失、終始コドンの欠失がそれぞれ 4 クローン、早期終始コドンが出現したものが 1 クローンあった。

D. 考察

(1) サーベイランス 2007 の検討

これまで、2 歳未満の麻疹罹患は SSPE 発症のリスクを高くするとされており、今回の結果もそれを裏付けるものとなった。低年齢での SSPE 発症には免疫系や中枢神経系の未熟性が考えられる。麻疹の流行と SSPE の発症数に正の相関がみられ、麻疹罹患患者の減少とともに、SSPE 発症数も減少傾向である。

これらのことから、1歳以降は早期にワクチン接種を勧め、1歳未満では、感染予防に徹する必要があると考えられた。

(2) siRNAによる治療を目指した基礎的研究
si-Nが最も有効であることが示された。既存のSSPE薬との併用効果も確認でき、安全で効果的な併用療法が可能になると思われた。神経細胞は遺伝子導入が困難な細胞の一つであり、ドラッグデリバリーの問題を克服する必要があると考えられる。

(3) SSPE ハムスターモデルの再構築

本モデルは神経症状や組織病理所見はヒトSSPEに類似していた。神経細胞、アストロサイトを中心に麻疹抗原陽性が認められており、本モデルはSSPEウイルスによる病理学的変化の再現モデルと考えられる。

(4) ノードマウス脳内に持続感染した麻疹ウイルスの検討

SSPEウイルスを含め、ヒト脳から分離された麻疹ウイルスのM遺伝子にはuridineからcytosineへの変異が多く認められるという報告があり、我々の研究においても、このような変異が認められた。変異の出現と神経病原性について今後詳細な検討が必要であると考えられた。

E. 結論

我々が作成したsi-RNAはin vitroでの評価は有効であり、SSPEハムスターモデルを用いて評価していく予定である。Edmonston株を脳内接種することにより、SSPEで報告されているような変異が生じることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表(2008/4/1～2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Hashimoto K, Ishibashi K, Ishioka K, et al. RSV replication is attenuated by counteracting expression of the suppressor of cytokine signaling (SOCS) molecules. *Virology* 391 : 162-170, 2009
- 2) Sato M, Hosoya M, Wright PF. Differences in serum cytokine levels between influenza virus A and B infections in children. *Cytokine* 47 : 65-68, 2009

2. 学会発表

- 1) 橋本浩一, 阿部優作, 川崎幸彦, 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14回日本神経感染症学会, 宇都宮市, 2009.10.16
- 2) 阿部優作, 細矢光亮, 飯沼一字, 大塚頌子, 市山高志, 楠原浩一, 野村恵子, 水口 雅, 愛波秀男, 鈴木保宏, 水澤英洋. わが国におけるSSPEサーベイランス2007. 第14回日本神経感染症学会, 宇都宮市, 2009.10.16
- 3) 阿部優作. 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58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島市, 2010.11.8

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麻疹抗体価検査法の標準化に向けて

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

研究要旨

【目的】亜急性硬化性全脳炎(subacute sclerosing panencephalitis: SSPE)の診断に最も重要である髄液麻疹抗体価に最適な検査方法を決定し、標準化を目指す。

【方法】対象は髄液麻疹抗体価検査で確定診断されたトルコの SSPE 患者。方法は保存凍結髄液を用いて各種麻疹抗体価検査法を測定し、文献検索を加えて検討した。

【結果】髄液麻疹抗体価検査法では、感度、定量性、検査の簡便性、国内統一性、国際的頻用度等の面から酵素抗体法(EIA)が最適と思われるが、本邦の検査会社による EIA 法は単位が抗体指数値であり、国際的に頻用される IU/mL 値ではない。また SSPE 患者の抗体指数値が検査会社の報告する上限値 12.8 未満だったのは 44 例中 1 例のみだった。デンカ生研キットによる抗体指数値とエンザイグノストキットによる IU/mL 値は $r = 0.634, p < 0.001$ と有意な相関を認めた。

【考察】現状の検査会社任せでは、EIA 法の長所である感度、定量性が生かされない。エンザイグノストキットによる IU/mL 値での測定を確立する体制作りが重要と考えた。

A. 研究目的

亜急性硬化性全脳炎(subacute sclerosing panencephalitis: SSPE)の診断には血清および髄液麻疹抗体価上昇が必須であるが、麻疹抗体価検査方法は数種類存在する。SSPE における麻疹抗体価に最適な検査方法を決定し、標準化を目指す。

B. 研究方法

赤血球凝集抑制反応(HI)、中和反応(NT)、2 種類の酵素抗体反応(EIA)(デンカ生研キット(抗体指数値)、エンザイグノストキット(IU/mL 値))による麻疹抗体価検査法の比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は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

EIA が HI、NT に比し、定量性に優れていた。デンカ生研キットによる抗体指数値およびエンザイグノストキットによる IU/mL 値は $r = 0.634, p < 0.001$ と有意な相関を認めた(図 1)。またデンカ生研キットによる抗体指数値の最終値は中央値 78.26, 最小値 7.40, 最大値 453.06 だった。さらに抗体指数値が本邦検査会社の報告する上限値 12.8 未満だったのは 44 例中 1 例のみだった。

D. 考察

SSPE における髄液麻疹抗体価検査法において感度、定量性、検査の簡便性、国内統一性、国際的頻用度等の面から EIA が最適と判断し、EIA キットの相関関係を検討した。本邦検査会社が使用するデンカ生研キットによる抗体指数値とエンザイグノストキットによる IU/mL 値は有意な相関を認めた。SSPE 患

者において髄液麻疹 EIA 抗体価は高値であることが多く、今回の検討でも本邦検査会社の報告する抗体指数上限値 12.8 を 44 例中 43 例が越えた。現状の検査会社任せでは、EIA 法の長所である感度、定量性が生かされない。またサーベイランスや国際的な比較検討する上でも IU/mL での EIA 値の普及が重要であり、最終値および国際単位を求める体制確立が重要と考えた。

E. 結 論

SSPE での髄液麻疹抗体価検査において IU/mL 値を求めるエンザイグノストキットによる EIA 法が最適と判断した。本測定法を普及、確立する体制作りが重要と考えた。

[参考文献]

なし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Honda R, Ichiyama T, Maeba S, Sunagawa S, Furukawa S. Male siblings with tibia-metacarpal type of chondrodysplasia punctata without maternal factors. *Brain Dev* 30 : 301-304, 2008
- 2) Asada K, Ichiyama T, Okuda Y, Okino F, Hashimoto K, Nishikawa M, Furukawa S. Cytokine levels in sputum of patients with tracheostomy and profound multiple disabilities. *Cytokine* 42 : 71-76, 2008
- 3) Ichiyama T, Matsushige T, Siba P, Suarkia D, Takasu T, Miki K, Furukawa S. Cerebrospinal fluid levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in subacute sclerosing panencephalitis. *J Infect* 56 : 376-380, 2008
- 4) Shiraishi M, Ichiyama T, Matsushige T, Iwaki T, Iyoda K, Fukuda K, Makata H, Matsubara T, Furukawa S. Soluble tumor necrosis factor receptor 1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hemolytic uremic syndrome with encephalopathy. *J Neuroimmunol* 196 : 147-152, 2008
- 5) Nagao T, Morishima T, Kimura H, Yokota S, Yamashita N, Ichiyama T, Kurihara M, Miyazaki C, Okabe N. Prognostic factors in influenza-associated encephalopathy. *Pediatr Infect Dis J* 27 : 384-389, 2008
- 6) Ichiyama T, Hasegawa M, Hashimoto K, Matsushige T, Hirano R, Furukawa S. Cysteinyl leukotrienes induce macrophage inflammatory protein-1 in human monocytes/macrophages. *Int Arch Allergy Immunol* 148 : 147-153, 2008
- 7) Ichiyama T, Suenaga N, Kajimoto M, Tohyama J, Isumi H, Kubota M, Mori M, Furukawa S. Serum and CSF levels of cytokines in acute encephalopathy following prolonged febrile seizures. *Brain Dev* 30 : 47-52, 2008
- 8) Ichiyama T, Shoji H, Takahashi Y, Matsushige T, Kajimoto M, Inuzuka T, Furukawa S. Cerebrospinal fluid levels of cytokines in non-herpetic acute limbic encephalitis : comparison with herpes simplex encephalitis. *Cytokine* 44 : 149-153, 2008
- 9) Fukano R, Matsubara T, Inoue T, Gondo T, Ichiyama T, Furukawa S. Time lag between the increase of IL-6 with fever and NF- κ B activation in the peripheral

- blood in inflammatory myofibroblastic tumor. *Cytokine* 44 : 293-297, 2008
- 10) Matsushige T, Ichiyama T, Anlar B, Tohyama J, Nomura K, Yamashita Y, Furukawa S. CSF neurofilament and soluble TNF receptor 1 levels in subacute sclerosing panencephalitis. *J Neuroimmunol* 205 : 155-159, 2008
 - 11) Honda R, Ichiyama T, Sunagawa S, Maeba S, Hasegawa K, Furukawa S. Inhaled corticosteroid therapy reduces cytokine levels in sputum from very preterm infants with chronic lung disease. *Acta Paediatr* 98 : 118-122, 2009
 - 12) Kajimoto M, Ichiyama T, Ueno Y, Shiraishi M, Hasegawa M, Furukawa S. Enhancement of activated β_1 -integrin expression by prostaglandin E₂ via EP receptors in isolated human coronary arterial endothelial cells : implication for the treatment of Kawasaki disease. *Inflamm Res* 58 : 224-228, 2009
 - 13) Matsushige T, Ichiyama T, Kajimoto M, Okuda M, Fukunaga S, Furukawa S. Serial cerebrospinal fluid neurofilament concentrations in bacterial meningitis. *J Neurol Sci* 280 : 59-61, 2009
 - 14) Motoyama M, Ichiyama T, Matsushige T, Kajimoto M, Shiraishi M, Furukawa S. Clinical characteristics of benign convulsions with rotavirus gastroenteritis. *J Child Neurol* 24 : 557-561, 2009
 - 15) Takayanagi M, Nishimura H, Matsuzaki Y, Ichiyama T, Umehara N, Watanabe H, Kitamura T, Ohtake M. Acute encephalopathy associated with influenza C virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 28 : 554, 2009
 - 16) Mimaki M, Hatakeyama H, Ichiyama T, Isumi H, Furukawa S, Akasaka M, Kamei A, Komaki H, Nishino I, Nonaka I, Goto Y. Different effects of novel mtDNA G3242A and G3244A base changes adjacent to a common A3243G mutation in patients with mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 9 : 115-122, 2009
 - 17) Sunagawa S, Ichiyama T, Honda R, Fukunaga S, Maeba S, Furukawa S. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in perinatal asphyxia. *Brain Dev* 31 : 588-593, 2009
 - 18) Tomochika K, Ichiyama T, Shimogori H, Sugahara K, Yamashita H, Furukawa S. Clinical characteristics of respiratory syncytial virus infection-associated acute otitis media. *Pediatr Int* 51 : 484-487, 2009
 - 19) Ichiyama T, Ito Y, Kubota M, Yamazaki T, Nakamura K, Furukawa S. Serum and cerebrospinal fluid levels of cytokines in human herpesvirus-6 encephalopathy. *Brain Dev* 31 : 731-738, 2009
 - 20) Ichiyama T, Takahashi Y, Matsushige T, Kajimoto M, Fukunaga S, Furukawa S. Serum matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels in non-herpetic acute limbic encephalitis. *J Neurol* 256 : 1846-1850, 2009
 - 21) Kawahara N, Hasegawa S, Hashimoto K, Matsubara T, Ichiyama T, Furukawa S. Characteristics of asthma attack with long-term management for bronchial asthma. *Pediatr Int* 51 : 657-660, 2009
 - 22) 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
- 23) Ichiyama T. Acute encephalopathy/encephalitis in childhood : a relatively common and potentially devastating clinical syndrome. *Brain Dev* 32 : 433-434, 2010
- 24) Aydin ÖF, Ichiyama T, Anlar B. Serum and cerebrospinal fluid cytokine concentrations in subacute sclerosing panencephalitis. *Brain Dev* 32 : 463-466, 2010
- 25) 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
- 26) 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
- 27) 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
- 28) 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) Ichiyama T, Makata M, Uchi R, Takekawa T, Matsubara T, Furukawa S. Anti-inflammatory effect of intravenous immunoglobulin in comparison with dexamethasone in vitro : implication for treatment of Kawasaki disease. The 9th International Kawasaki Disease Symposium, Taipei, Taiwan, 2008.4.10-12
- 2) 市山高志, 久保田雅也, 伊藤嘉規, 梶本まどか, 松重武志, 古川 漸. Human herpesvirus-6 脳症における血清および髄液サイトカイン解析. 第 111 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2008.4.25-27
- 3) 市山高志, 松重武志, 梶本まどか, 伊予田邦昭, 古川 漸. 溶血性尿毒症症候群 (HUS) 脳症におけるサイトカインおよび MMP-9、TIMP-1 解析. 第 50 回日本小児神経学会, 東京, 2008.5.28-31
- 4) 市山高志, 庄司紘史, 高橋幸利, 松重武志, 梶本まどか, 古川 漸. 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 13 回日本神経感染症学会, 東京, 2008.10.10-11
- 5) 市山高志, 松重武志, 梶本まどか, 友近喜代子, 白石昌弘, 古川 漸. 細菌性髄膜炎における髄液および血液中単核球サブセットの解析. 第 40 回日本小児感染症学会, 名古屋, 2008.11.15-16
- 6) 市山高志. 特別講演. 感染症に伴う小児神経疾患トピックス. 第 113 回日本小児科学会山口地方会, 宇部, 2008.12.7
- 7) 市山高志, 橋本邦生, 長谷川真成, 平野玲司, 長谷川俊史, 古川 漸. シンポジウム. 単球/マクロファージにおける cysteinyl leukotriene による MIP-1 α 、MIP-1 β

産生とその制御. 第 45 回日本小児アレルギー学会, 横浜, 2008.12.13-14

- 8) 市山高志, 松重武志, 梶本まどか, 友近喜代子, 白石昌弘, 古川 漸. 細菌性髄膜炎における髄液および血液中単核球サブセットの解析. 第 112 回日本小児科学会学術集会, 奈良, 2009.4.17-19
- 9) 市山高志, 高橋幸利, 松重武志, 梶本まどか, 古川 漸. 非ヘルペス性急性辺縁系脳炎における血清 metalloproteinase-9 と tissue inhibitor of metalloproteinase-1 の動態. 第 51 回日本小児神経学会, 米子, 2009.5.28-30
- 10) 市山高志. シンポジウム. MMP-9 と TIMP-1 からみた脳炎・脳症. 第 14 回日本神経感染症学会, 宇都宮, 2009.10.16-17
- 11) 市山高志. 特別講演. 感染症に伴うけいれん性疾患. 第 79 回日本小児科学会大分地方会, 大分, 2009.12.6
- 12) 市山高志. 特別講演. 感染症に伴う小児神経疾患トピックス. 第 85 回日本小児科学会香川地方会, 高松, 2009.12.12
- 13) 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
- 14) 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

- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

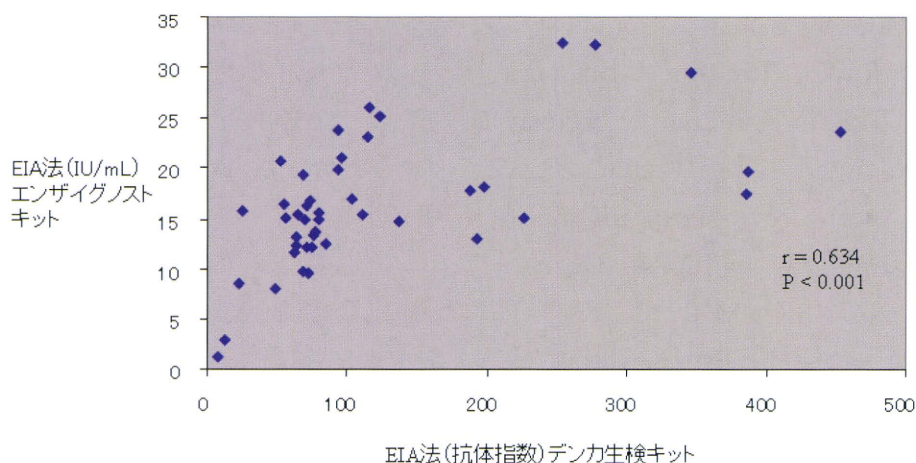


図1 2種類のEIA法によるSSPE患児の髄液麻疹抗体価

SSPE の宿主遺伝要因および SSPE に対するリバビリン脳室内注入療法に関する研究

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(小児科)

研究協力者：由茅 直子 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：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

PD1 promoter -606G/A 多型の機能解析では、SSPE の発症に関連するハプロタイプ (GCGC と GCG) は、高いプロモーター活性による PD-1 の発現亢進を介して SSPE の発症と関連している可能性が示唆された。フィリピンの単一施設における SSPE に対するリバビリン脳室内注入療法の検討では、NDI score に関しては国内での実施症例の集計と比較して良好な成績が得られた。

A. 研究目的

本研究の目的は、SSPE 発症の宿主側要因を明らかにすることおよび SSPE の新規治療法であるリバビリン脳室内注入治療法の有効性と安全性を検討することである。

B. 研究方法

1. SSPE の発症と関連する *PD1 promoter*-

606G/A 多型の機能解析

-606G または -606A のアリルを持つ *PD1* 遺伝子のプロモーター部分を、firefly luciferase 発現ベクターに組み込み、このベクターを *Renilla luciferase* を発現するコントロールベクターとともに HEK293 細胞に導入し、両 luciferase 活性の比をもとめた。

2. SSPE の新規疾患感受性候補遺伝子の検討

SSPE 患者 40 名と健常対照 170 名を対象として、TaqMan SNP Genotyping Assay を用いて、*DCSIGN*, *IL27*, *ADAR* の 5 つの 1 塩基多型 (SNP) の遺伝子型を決定し、関連解析を行った。

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

フィリピン大学小児科で診断された SSPE 患者 16 名 (3 歳~26 歳; 男女比 7 : 9; I 期 1 名、II 期 8 名、III 期 7 名) を対象とした。

(倫理面への配慮)

本研究は各参加施設の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した。

C. 研究結果

1. SSPE の発症と関連する *PD1* promoter-606G/A 多型の機能解析

-606G アリルを持つベクターの相対的 luciferase 活性は 7.75 ± 0.93 であり、-606A アリルの活性 (4.93 ± 0.38) より有意に高値であった (図 1)。したがって、日本人の SSPE 患者に多い GCGC ハプロタイプ、フィリピン人の SSPE 患者に多い GCG ハプロタイプでは、高い *PD1* 転写活性をもつことが示された。

また、SSPE 患者の末梢血単核球における *PD1* mRNA の発現を検討したところ、G allele を持つ GG および GA genotype は G allele を持たない AA genotype よりも平均して高い発現を示す傾向がみられた。

2. SSPE の新規疾患感受性候補遺伝子の検討

SSPE 群と健常対照群における *DCSIGN*-871A/G 多型、*IL27* の -964A/G、2905T/G、4730T/C 多型および *ADAR* 1152A/G 多型の genotype 頻度および allele 頻度には有意差がみられなかった。

3. フィリピンの単一施設における SSPE に

対するリバビリン脳室内注入療法の治療成績

治療を完了できた 13 名のうち、NDI score の改善、不変、悪化はそれぞれ 6 名 (46%)、3 名 (23%)、4 名 (30%) であった (図 2)。改善例 6 名、不変例 3 名の治療中止後 12 か月間の病勢は安定していた。病期の改善に至った例はなかった。治療開始時の病期別の改善率は、II 期では 25% (2/8)、III 期では 80% (4/5) であった。III 期の改善例 4 名のうち 3 名は、治療準備期間中に II 期から進行した症例であった。II 期での治療開始後に悪化がみられた 1 名が治療終了 2 か月後に肺炎と脳幹機能不全のため死亡した。それ以外の有害事象としては、発熱 (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)、頭痛 (1 名)、けいれん (1 名)、傾眠 (1 名)、尿閉 (1 名) がみられた。

D. 考 察

1. SSPE の発症と関連する *PD1* promoter-606G/A 多型の機能解析

PD1 遺伝子のプロモーター領域の SNP の 2 つのアリルのうち、SSPE 患者で頻度が有意に高いハプロタイプを構成する G アリルが、A アリルよりも有意に高いプロモーター活性を持つことが明らかになった。PD-1 は、ウイルス特異的 T リンパ球の増殖能やサイトカイン産生能の低下に関与していることが報告されている。*PD1* 遺伝子の GCGC および GCG ハプロタイプは、高いプロモーター活性による PD-1 の発現亢進を介して麻疹ウイルス特異的免疫応答を抑制することによって SSPE の発症と関連している可能性が示唆された。

2. SSPE の新規疾患感受性候補遺伝子の検討

麻疹ウイルス (MV) 感染の初期過程である 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)、脳内における MV ゲノムの hypermutation に関与している可能性があ

る酵素(ADAR)、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)の各遺伝子のSNPを用いて関連解析を行ったが、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。

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

短期間での検討ではあるが、NDI scoreに関しては国内での実施症例の集計と比較して良好な成績が得られた。合併症ではreservoir関連感染の頻度が31%(5/16)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

1. PD1 遺伝子の SSPE の発症に関連するハプロタイプ(GCGC と GCG)は、高いプロモーター活性による PD-1 の発現亢進を介して麻疹ウイルス特異的免疫応答を抑制することによって SSPE の発症と関連している可能性が示唆された。
2. 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た。
3. フィリピンの単一施設における SSPE に対するリバビリン脳室内注入療法の検討では、短期間での検討ではあるが、NDI score に関しては国内での実施症例の集計と比較して良好な成績が得られた。

[参考文献]

- 1) Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. Nature 443 : 350-354, 2006
- 2) Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV

infection. J Exp Med 203 : 2281-2292, 2006

- 3) Penna A, Pilli M, Zerbini A, et al. Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. Hepatology 45 : 588-601, 2007
- 4) Golden-Mason L, Palmer B, Klarquist J, Mengshol JA, Castelblanco N, Rosen HR. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction. J Virol 81 : 9249-9258, 2007
- 5) 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 : 14053-14056, 2004
- 6) Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casadémont I, et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. Nat Genet 37 : 507-513, 2005
- 7) 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
- 8) 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 : 355-361, 2007
- 9) 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 : 605-616, 2007
- 10) de Witte L, Abt M, Schneider-Schaulies S, et al. Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection. *J Virol* 80 : 3477-3486, 2006
 - 11) Hara T, Yamashita S, Aiba H, et al. Measles virus-specific T helper 1/T helper 2-cytokine production in subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurovirol* 6 : 121-126, 2000
 - 12) Bass BL, Weintraub H, Cattaneo R, et al. *Curr Top Microbiol Immunol* 176 : 63-74, 1992
 - 13) 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
 - 14) 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 : 29350-29356, 2009
 - 15) Tomoda A, Nomura K, Shiraishi S, et al. Trial of intraventricular ribavirin therapy for subacute sclerosing panencephalitis in Japan. *Brain Dev* 27 : 507-513, 2003
 - 16) 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
- F. 健康危険情報
なし
- G. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31 発表)
1. 論文発表
 - 1) Ishizaki Y, Takemoto M, Kira R, Kusuhara K, Torisu H, Sakai Y, Sanefuji M, Yukaya N, Hara T. Association of toll-like receptor 3 gene polymorphism with subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurovirol* 14 : 486-491, 2008
 - 2) 楠原浩一, 吉良龍太郎, 鳥巢浩幸, 原 寿郎. SSPEの発症要因 -宿主遺伝要因の解析-. *Neuroinfection* 13 ; 118-124, 2008
 - 3) 楠原浩一: 亜急性硬化性全脳炎(SSPE)の宿主側遺伝要因. *福岡医学雑誌* 99 : 159-168, 2008
 - 4) 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* 127 : 411-419, 2010
 - 5) 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
 - 6) 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. プリオン病と遅発性ウイルス感染症, 東京, 金原出版 274-277, 2010

2. 学会発表

- 1) 石崎義人, 木村直子, 吉良龍太郎, ほか. PD1 遺伝子は亜急性硬化性全脳炎発症に関連する 日本-フィリピン研究. 第 51 回日本小児神経学会, 米子, 2009.5.28-30
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

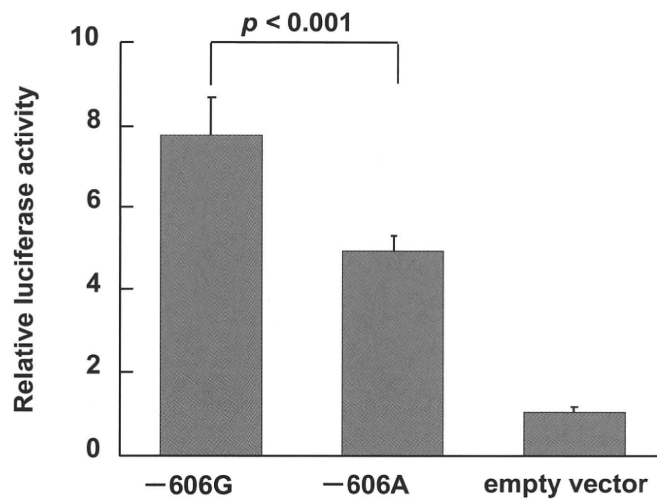


図1 PD1遺伝子の-606 G および-606 A アリルのプロモーター活性

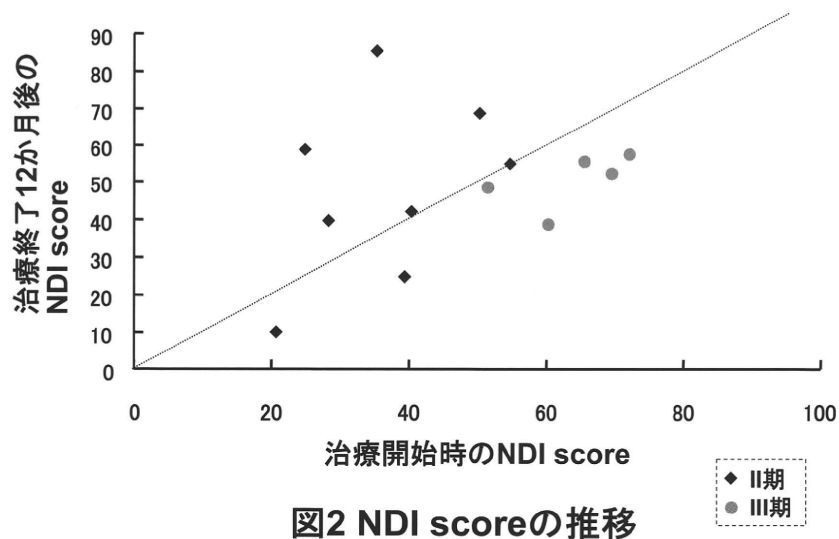


図2 NDI scoreの推移

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

研究要旨

遺伝子組換え麻疹ウイルス作製法とマウス脳内接種実験法を用いて、SSPEウイルスの神経病原性発現にはM、F、H遺伝子の変異のみでは不十分で、それ以外のウイルス複製に必須の遺伝子(N、P、L)の関与が必要なこと、ウイルス感染神経細胞はJNK活性化を介したミトコンドリア介在性アポトーシスにより細胞死に至ること、ウイルス感染脳組織では感染細胞の周囲の非感染神経細胞にもバスタンダー機序により上記のアポトーシス誘導経路が活性化されること、並びにウイルス特異的 siRNA の脳内投与によりSSPEウイルス感染が抑制できることを示した。

A. 研究目的

1)SSPEウイルスの神経病原性を規定する遺伝子変異の同定、2)SSPEウイルス感染による神経細胞障害誘導機序の解明、3)SSPEウイルス増殖抑制戦略の開発を目的とした

B. 研究方法

- 1) 遺伝子組換え麻疹ウイルス(Ich-B株)にSSPE-Kobe-1株の様々な変異を導入した。
- 2) マウス脳内接種により神経病原性を判定した。また、脳組織をアポトーシス関連分子に対する抗体で免疫組織染色した。
- 3) ウイルス特異的 siRNA の感染防御・治療効果を判定した。

(倫理面への配慮)

神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会及び動物実験委員会の承認並びに文部科学大臣の確認を得た。

C. 研究結果

- 1) SSPE-Kobe-1株はマウス脳内接種により神経病原性を示した。しかし、その変異

M、F、H遺伝子を持つ遺伝子組換えIch-B株は神経病原性を示さなかった。

- 2) SSPE-Kobe-1株感染細胞は接種側の大脳皮質、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。感染細胞の大多数は神経細胞であった。感染細胞及び周囲の非感染神経細胞において、c-Jun、リン酸化c-Jun、cytochrome c、活性型caspase-3の増加が認められた。
- 3) ウイルス特異的 siRNA の脳内投与により感染マウスの死亡率が低下した。

D. 考察

- 1) SSPE-Kobe-1株の神経病原性発現には、ウイルス複製に必須の遺伝子(N、P、L)のいずれかの変異が必要である。
- 2) SSPEウイルス感染による神経細胞障害はアポトーシスによる。周囲の非感染神経細胞にもバスタンダー機序によりアポトーシス誘導分子の活性化がみられる。
- 3) ウイルス特異的 siRNA の脳内投与はSSPEの治療に有望である。

E. 結 論

- 1) SSPE-Kobe-1 株のマウス神経病原性には、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。
- 2) 感染細胞は大多数が神経細胞である。
- 3) 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 JNK 活性化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る。
- 4) ウイルス特異的 siRNA の脳内投与は SSPE の治療に有望である。

F. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Jiang DP, Ide YH, 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) 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
- 3) Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Yamashita R, Ichimura T, Wakita T, Hotta H, Miyamura T, Suzuki T, Satoh T, Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. *J Cell Biochem* 111(3) : 676-685, 2010
- 4) An C, Ide Y-H, Nagano-Fujii M, Kitazawa S, Shoji I, Hotta H. A transgenic mouse line with a 58-kb fragment deletion in chromosome 11E1 that encompasses part of the Fam20a

gene and its upstream region shows growth disorder. *Kobe J Med Sci* 55(4) : E82-92, 2010

- 5) Shimoji T, Murakami K, Sugiyama Y, Matsuda M, Inubushi S, Nasu J, Shirakura M, Suzuki T, Wakita T, Kishino T, Hotta H, Miyamura T, Shoji I. Identification of annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation. *J Cell Biochem* 106(6) : 1123-1135, 2009

2. 学会発表

- 1) Jiang DP, Ide YH, Nagano-Fujii M, Shoji I, Hotta H. Virological significance of the M and F protein mutations of a measles virus variant obtained from a patient with subacute sclerosing panencephalitis. 8th Asia-Pacific Congress of Medical Virology, Hong Kong, 2009.2.25
- 2) 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. ワークショップ, 横浜, 2009.10.27
- 3) 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, 2010.11.8

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

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

SSPE 動物モデルの作成を目的として、カニクイザルに麻疹ウイルスを経鼻接種後、感染末梢血単核細胞を、同一個体の視床に接種することにより、脳内における麻疹ウイルスの持続感染の誘導を試みた。実験群の一個体で、脳脊髄液中に抗麻疹ウイルス中和抗体が認められると共に、持続的に血清中に高い中和抗体価が認められ、脳波についても周期的な徐波が観察され、麻疹ウイルスの持続感染を疑う個体の作出に成功した。この個体の中枢神経からは、麻疹ウイルスが分離され、従来から知られている SSPE 患者から分離される麻疹ウイルスとは異なる特徴を有していた。この結果は、ヒトにおける臨床症状と極めて類似する SSPE 動物モデルを、カニクイザルを用いて作出できる可能性を示唆し、持続感染から発症までに感染ウイルスの変異が必要であることを意味するものと考えられる。

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。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。

この個体について、中枢神経における麻疹ウイルスの持続感染によるものかの検討を行い、SSPE 動物モデルとして評価することを目的とする。

B. 研究方法

麻疹ウイルス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。

脳波測定は、キシラジン-塩酸ケタミン麻酔下で、TEAC BA1008(8 チャンネル生体アンプ)を用い、増幅感度 20pV/0.5V、時定数 0.3 sec で行い、TEAC es8(A/D デジタルレコーダー)で記録し解析を行った。

剖検後、中枢神経(前頭、頭頂、基底核、視床、小脳、頸髄)から、Vero 細胞との共培養法によりウイルス分離を行った。

分離麻疹ウイルスの解析には、抗麻疹ウイルス Edmonston 株ウサギ抗体を用いた、ウエスタンブロッティング法により行った。

(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

この個体では、血中麻疹ウイルス中和抗体価は、高値でありかつその値を持続的に維持し、脳脊髄液中でも持続的に検出された。特異的な臨床症状は認められないが、脳波では、前頭部から頭頂部に、200~240 μ Vの周期的な徐波が観察された(図1)。

中枢神経からの、Vero細胞によるウイルス分離では、CPEを示さない麻疹ウイルスが分離された。RT-PCR法を用いて、麻疹ウイルスH遺伝子の検出を試みたところ、視床組織と共培養したVero細胞に検出された。

分離ウイルスの蛋白解析のためのウェスタンブロット法で解析したところ、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(図2)。

D. 考察

麻疹ウイルスが持続感染していると考えられていた個体からin vitroで細胞変性を示すことなく、ウイルス蛋白の発現が極めて弱い、持続感染する麻疹ウイルスが分離された。このことから、これまで得られていたSSPEで得られるものと酷似する臨床結果は、麻疹ウイルスの持続感染に由来するものと考えられた。

視床への感染細胞の接種により、持続感染が成立したことは、麻疹ウイルスの中枢神経への感染経路として、感染末梢血単核細胞が脳血液関門を通過して、神経細胞に到達、感染が成立する可能性を示唆するものと考えられる。

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ず、接種ウイルスとも異なっていたことは、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。

この持続感染個体が、SSPEのモデル動物として可能性を有しているものと考えられるとともに、この感染系は、SSPEの病理発生の解析に有用であると考えられる。

E. 結論

カニクイザルを用いて中枢神経において麻疹ウイルスが持続感染する動物の作成が可能であること、持続感染麻疹ウイルスとSSPEウイルスとは異なる可能性があることが示唆された。

[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* 25 : 272-280, 1989
- 2) Martinovic Z. Periodic generalized burst of fast waves in subacute sclerosing panencephalitis: Electroencephalograph *Clin Neurophysiol* 63 : 236-238, 1986
- 3) Burnstein T, Jacobson LB, Zeman W, Chen TT. Persistent infection of BSC-1 cells by defective measles virus derived from subacute sclerosing panencephalitis. *Infect.Immun* 1378-1382, 1974

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31発表)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

2. 実用新案登録

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

3. その他

なし

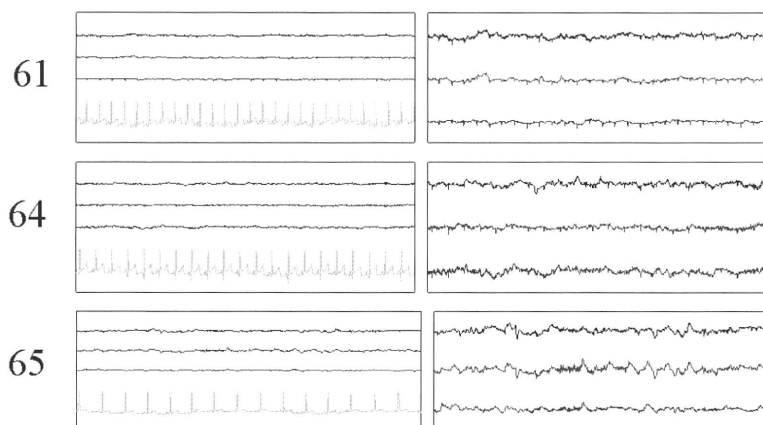


図1 持続感染カニクイザルにおける脳波(#65)

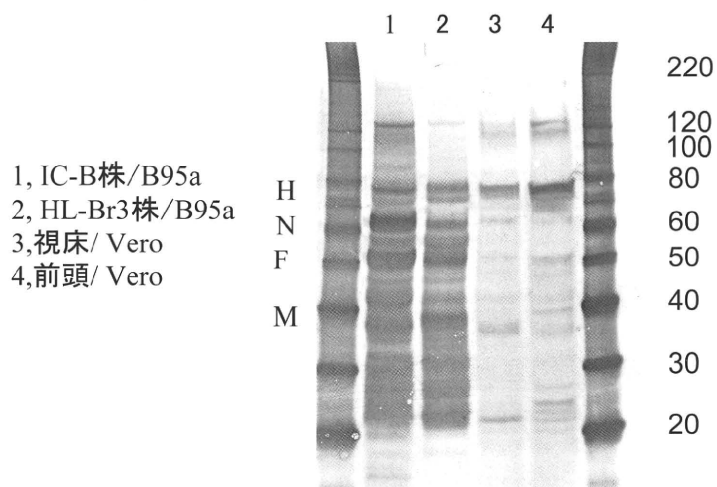


図2 持続感染麻疹ウイルスの蛋白解析(ウエスタンブロッティング法)

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、ヌードマウスへの脳内接種によりニューロンに持続感染した。初代培養を用いた実験では、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、マイクログリアにヒト SLAM 依存性に感染した。

A. 研究目的

SSPE における麻疹ウイルスの神経系細胞への感染機構を理解し、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野生株を脳内接種し、経時的に観察した。接種 3 ヶ月後にマウスを解剖し、脳を蛍光顕微鏡で観察した。二重染色により GFP 発現細胞の細胞種を同定した。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した。

(倫理面への配慮)

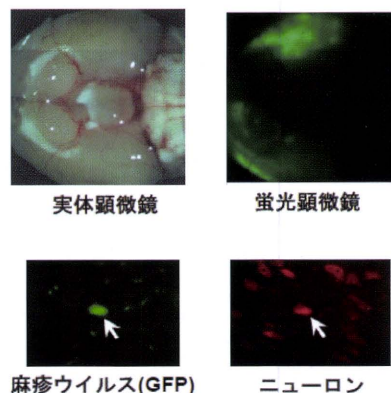
動物実験には、遺伝子組換え実験に関する大臣確認および学内の動物委員会の許可を受けた。

C. 研究結果

T細胞が欠損しているヌードマウスに GFP 発現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 ヶ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であっ

た。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。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に感染が認められた。

GFP発現組換え麻疹ウイルスのヌードマウスへの感染
(脳内接種3ヵ月後)



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排除されてしまうためと考えられる。

E. 結 論

麻疹ウイルス野生株はニューロンとマイクログリアに感染できると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Maita N, Kamishikiryo J, Maenaka K, Yanagi Y. Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM. *Nat Struct. Mol. Biol* 10.1038/nsmb. 1969
- 2) Shirogane Y, Takeda M, Tahara M, Ikegame S, Nakamura T, Yanagi Y. Epithelial-mesenchymal transition abolishes the susceptibility of polarized epithelial cell lines to measles virus. *J Biol Chem* 285 : 20882-20890, 2010
- 3) Yanagi Y, Takeda M, Ohno S, Hashiguchi T. Measles virus receptors. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 329 : 13-30, 2009
- 4) Tahara M, Takeda M, Shirogane Y, Hashiguchi T, Ohno S, Yanagi Y. Measles virus infects both polarized epithelial and immune cells using

distinctive receptor-binding sites on its hemagglutinin. *J Virol* 82 : 4630-4637, 2008

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, 2009.4.1
- 2) Yanagi Y. Measles virus tropism and pathogenesis. The 4th Nagasaki Symposium on tropical and emerging infectious diseases, Nagasaki, Japan, 2009.11.26

H. 知的所有権の出願・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