

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

## 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** 神経細胞にも発現しており中枢神経系において麻疹ウイルス(MeV)のレセプターとして機能している可能性がある CD147、MeV の RNA 合成に関与しており中枢神経系内外において MeV の増殖に必要な因子と考えられる PRDX1、IL-7 からのシグナルの修飾によって MeV の慢性感染を促進している可能性がある IL-7 receptor、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 *PDI* 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、神経細胞にも発現しており中枢神経系において麻疹ウイルス(MeV)のレセプターとして機能している可能性がある CD147<sup>1)</sup>、MeV の RNA 合成に関与しており中枢神経系内外において MeV の増殖に必要な因子と考えられる PRDX1<sup>2)</sup>、IL-7 からのシグナルの修飾によって MeV の慢性感染を促進している可能性がある IL-7 receptor<sup>3)4)</sup>、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 50 名を対象とした。3 遺伝子 (*CD147*, *PRDX1*, *IL7R*) の各 1 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。

*CD147* 遺伝子については、3 つの tag SNPs があったが、遺伝子全体が単一の LD block を形成していることから、その中で既製のプライマー/プローブが利用可能であった c.32+738G>C (rs4919859)を選択した。

*PRDX1* 遺伝子については、唯一の tag SNP である c.106+1530C>T (rs11211129)を選択した。

*IL7R* 遺伝子については、多発性硬化症と関連する SNPs として、rs6897932, rs11567705, rs13188960 があり、これらは強い連鎖不平衡にあった。この中の rs6897932 c.731 C>T は、244 番目のスレオニンがイソロイシンに置換する non-synonymous SNP であり、多発性硬化症発症と最も強く関連することが報告されている<sup>4)</sup>。また、この SNP は、*IL7R* 遺伝子の 3 つの tag SNP のうちの 1 つでもある。このような理由から、c. 731 C>T 多型を解析対象として選択した。

### (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 *CD147* c.32+738G>C 多型の genotype および allele 頻度の比較を示した。genotype 頻度は両群間で有意差がなく、allele 頻度はほぼ同じであった。

表 2 は *PRDX1* c.106+1530C>T 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。頻度は両群の間に近似しており、差は認められなかった。

表 3 は SSPE 群と健常対照群における *IL7R* c.731 C>T 多型の genotype および Allele 頻度を比較したものである。genotype 頻度は両群間で有意差がなく、allele 頻度はほぼ同じであった。

### D. 考察

CD147 (extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN) は、分子量 50-60kDa の膜貫通型タンパクであり、上皮細胞、内皮細胞、神経細胞など種々の細胞で発現している。細胞外の cyclophilin A (CypA), CypB に対する signaling receptor として機能し、リンパ球の反応を制御している。CypA と CD147 の相互作用によって、HIV は gp120 と CD4 の結合とは独立に標的細胞に感染できることが報告されている<sup>5)</sup>。SARS-Corona virus も HIV と同様に CypA と CD147 を使用していることが知られている<sup>6)</sup>。麻疹ウイルスは、CypB を virion に取り込み、CypB と CD147 の結合を利用して上皮細胞に侵入することが、最近、渡辺らにより報告された<sup>1)</sup>。

peroxiredoxin 1 (PRDX1)は、最近発見された peroxiredoxin family の蛋白であり、thioredoxin や他の peroxiredoxin を用いて、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、alkyl hydroperoxides および peroxinitrite を減少させる thiol-specific antioxidant enzyme の 1 つである。c-Abl などの癌遺伝子産物の活性を押さえ、抗腫瘍因子としても機能している。MeV の N 蛋白の C 末端(N<sub>TAIL</sub>)に結合し、ウイルス RNA の転写や MeV の複製に関与することが、最近渡辺らにより報告された<sup>2)</sup>。

IL-7 は、LCMV を用いた慢性ウイルス感染の系において、1)cytokine signaling の重要な抑制因子である Socs3 を downregulate し、cytokine 産生を

増強させることによって、T 細胞の effector 機能の充進と T 細胞の増加をおこし、ウイルスの排除に結びつける、2)thymic output を増強し、ナイーブ T 細胞プールを増大させる、3)細胞保護作用を有する IL-22 の産生を促進するなどの作用を持つことが明らかにされ、ウイルス慢性感染症の治療薬となる可能性が示唆されている<sup>3)</sup>。一方、IL-7 receptor では、non-synonymous SNP の 1 つが多発性硬化症と関連していることが報告されている<sup>4)</sup>。この報告の中で、感受性 allele では IL-7 のシグナルが低下することが示されているので、その結果として慢性感染が促進される可能性がある。

以上のような考察に基づいて *CD147*、*PRDX1*、*IL7R* 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

*CD147*、*PRDX1*、*IL7R* 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) Watanabe A, Yoneda M, Ikeda F, et al. CD147/EMMPRIN acts as a functional entry receptor for measles virus on epithelial cells. *J Virol* 84:4183-4193, 2010.
- 2) Watanabe A, Yoneda M, Ikeda F, et al. Peroxiredoxin 1 is required for efficient transcription and replication of measles virus. *J Virol* 85:2247-2253, 2011.
- 3) Pellegrini M, Calzascia T, Toe JG, et al. IL-7 engages multiple mechanisms to overcome chronic viral infection and limit organ pathology. *Cell* 144:601-613, 2011.
- 4) Gregory SG, Schmidt S, Seth P, et al. Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet* 39:1083-1091, 2007.
- 5) Pushkarsky T, Zybarth G, Dubrovsky L, et al.

CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6360-6365, 2001.

6) Chen Z, Mi L, Xu J, et al. Function of HAb18G/CD147 in invasion of host cells by severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Infect Dis* 191:755-760, 2005.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 楠原浩一. 神経感染症における宿主側遺伝的要因. 第 16 回日本神経感染症学会, 東京, 11.5, 2011.

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

表1 CD147 c.32+738G>C多型のGenotypeおよびAllele頻度

	Control群	SSPE群	P値
<b>Genotype頻度</b>			
CC	20 (40%)	22 (55%)	
CG	23 (46%)	13 (33%)	
GG	7 (14%)	5 (13%)	
Total	50	40	n.s.
<b>Allele頻度</b>			
C	63 (63%)	57 (71%)	
G	37 (37%)	23 (29%)	
			n.s.

表2 PRDX1 c.106+1530C>T多型のGenotypeおよびAllele頻度

	Control群	SSPE群	P値
<b>Genotype頻度</b>			
CC	25 (50%)	22 (55%)	
CT	20 (40%)	15 (38%)	
TT	5 (10%)	3 (8%)	
Total	50	40	n.s.
<b>Allele頻度</b>			
A (Arg)	70 (70%)	59 (74%)	
G (Lys)	30 (30%)	21 (26%)	
			n.s.

表3 IL7R c.731 C>T (Thr244Ile)多型のGenotypeおよびAllele頻度

	Control群	SSPE群	P値
<b>Genotype頻度</b>			
CC	30 (60%)	16 (40%)	
CT	16 (32%)	22 (55%)	
TT	4 (8%)	2 (5%)	
Total	50	40	n.s.
<b>Allele頻度</b>			
C (Thr)	76 (76%)	54 (68%)	
T (Ile)	24 (24%)	26 (33%)	
			n.s.

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

## 皮下埋め込み型持続輸注ポンプを用いて リバビリン脳室内持続投与療法を行った 2 症例

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  
 研究分担者：水澤英洋 東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科・脳神経病態学  
 研究分担者：坪井義夫 福岡大学・医学部・神経内科学教室  
 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

**研究要旨** Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) は、麻疹罹患後長期の潜伏期を経て発症する、いわゆる遅発性ウイルス感染症である。SSPE に対する有効な治療法はこれまで無く、我々はオンマヤリザーバー<sup>®</sup>によるリバビリン脳室内投与療法を試みてきたが、臨床的有效例みられる一方で、副作用やリバビリン治療中止後の症状増悪などもみられた。今回、本症の 2 例に対し、皮下埋め込み型持続輸注ポンプを用いたリバビリン脳室内持続投与療法を行った。2 例において、一時的な症状の改善がみられたが、病状の進行を停止するまでには至らなかった。リバビリン持続投与による副作用は見られなかったため、両症例とも休薬期間をおかず、持続投与する方針とした。穿刺回数の減少やリバビリンによる副作用がみられなかったことなどから、単回投与と比較して有用な治療法であると考えられた。

### A. 研究目的

Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) は、麻疹罹患後長期の潜伏期を経て発症する、いわゆる遅発性ウイルス感染症である。我々は、SSPE 患者の脳より分離されたウイルス (SSPE ウイルス) の増殖を抑制する薬剤により SSPE を治療できると考え、リバビリンを含む核酸誘導体に優れた抗 SSPE ウイルス効果を見出した。これまでにオンマヤリザーバー<sup>®</sup>を用いたリバビリン脳室内投与療法を試み、その有効性と安全性を検証してきた(1)。しかし、臨床的有效例 (改善例) がみられる一方で、リバビリン治療中止後に症状の増悪する例や頻回穿刺により細菌性髄膜炎を合併する例もみられた。そこで、本症の 2 例に対し、皮下埋め込み型持続輸注ポンプを用いたリバビリン脳室内持続投与療法を行った。

### B. 研究方法

【対象】 福島県立医科大学附属病院に入院した

SSPE 患者 2 名。

【方法】 埋め込み型持続輸注ポンプは codman 社の archimedes<sup>®</sup> (流速 2ml/day、容量 40ml) を使い、投与リバビリンはリバビリン注射製剤 (100mg/ml) を用いた。脳外科医により、右前胸部または腹部に埋め込み術を施行し、術後 5 日からリバビリン注入を開始した。リバビリンの髄液中目標濃度を 50~200 $\mu$ g/ml とし、単回投与の投与スケジュールを参考にして、リバビリン 2.0mg/kg/day 持続投与を 10 日間、その後 10 日間休薬を 1クールとした。病状の評価には臨床症状スコア (NDI スコア) を用いた。

#### (倫理面への配慮)

本治療は福島県立医科大学倫理委員会の承認を受け、家族のインフォームドコンセントのもとに実施された。

## C. 研究結果

### 【症例 1】18 歳男性

既往歴：1 歳 6 ヶ月時に麻疹に罹患

現病歴：2010 年 9 月頃から左上肢のびくつきを自覚した。その後脱力、不随意運動の出現、動作緩慢、会話の減少などがみられ、2011 年 4 月近医を受診、左半身の脱力、不随意運動の増悪等神経症状が進行したため、同年 6 月に大学病院神経内科を紹介され、精査目的に入院した。血清および髄液麻疹抗体価の高値、脳波で周期性同期性高振幅徐波、臨床症状などから SSPE と診断され、同月リバビリン脳室内投与療法目的に当院紹介され、入院した。

入院時現症：身長 172cm、59.5kg。上肢の強いミオクローヌスが認められ、Jabbour 分類は II 期、臨床症状スコアは 29 点であった。血清麻疹 IgG(EIA 法) 838、髄液麻疹 IgG(EIA 法) 38、麻疹 HI 抗体 256 倍、IgG Index 2.54 であった。頭部 MRI では、脳表全体の萎縮がみられ、脳波では、周期性同期性高振幅徐波が認められた。

臨床経過：当院入院時よりイノシンプラノベクス内服を開始した。入院 7 日目に持続輸注ポンプ埋め込み術を施行し、術後 5 日後からリバビリン持続注入 (2.0mg/kg/day) 開始した。開始 3 日後に腰椎穿刺により採取した髄液のリバビリン濃度は 36 $\mu$ g/ml であった。そのため、リバビリン注射製剤を希釈せずに用い 4.0mg/kg/day に増量し、同時にインターフェロン  $\alpha$ (IFN- $\alpha$ ) 1 IU/kg/day も併用した。リバビリン投与開始後より、ミオクローヌスの軽減や反応性の向上などがみられた。2 クール終了時の髄液中リバビリン濃度は 52 $\mu$ g/ml であり、病状の増悪等みられなかったため、3 クール終了後退院した。しかし、その数日後急激に症状が進行し、歩行や経口摂取が不可能となり、III 期に移行した。持続輸注ポンプの流速が固定であり、さらに高濃度のリバビリン注射液の調整ができないため、リバビリン投与量をさらに増加することができず、同量で加療を続けた。リバビリンによる明らかな副作用は認められなかったため、7 クール目より休薬期間をおかず持続とした。

### 【症例 2】13 歳女性

既往歴：1 歳 5 ヶ月時に麻疹に罹患

現病歴：2011 年 4 月頃から健忘症状が出現し、徐々に学力の低下がみられた。同年 11 月初旬に前医を受診し精神疾患を疑われ加療されていた。しかし、同月中旬ごろより全身強直性痙攣が出現するようになり、精査にて麻疹髄液抗体価高値、脳波にて周期性同期性高振幅徐波を認めたため、SSPE と診断された。その後間もなく、リバビリン脳室内投与療法目的に当院紹介され、入院した。入院時現症：158cm、43kg。Jabbour 分類は I ~ II 期、臨床症状スコアは 7 点であった。血清麻疹 IgG(EIA 法) 668、髄液麻疹 IgG(EIA 法) 27 であった。

臨床経過：当院入院時よりイノシンプラノベクスを開始した。入院 3 日目に持続輸注ポンプ埋め込み術を施行し、術後 5 日後からリバビリン (2.0mg/kg/day) と IFN- $\alpha$  (0.7 IU/kg/day) の髄腔への持続注入療法を開始しより倦怠感や嘔気・嘔吐がみられた。しかし、薬剤注入開始から 7 日目の髄液中のリバビリン濃度は 63  $\mu$ g/ml であり、IFN- $\alpha$  による副作用が疑われたため、IFN- $\alpha$  投与を中止し、リバビリンの単剤投与 (3.0mg/kg/day) とした。その後、副作用症状は消失した。IFN- $\alpha$  投与を約半量 (0.4IU/kg/day) で再開したところ、軽度食欲の低下がみられたが、間もなく副作用はみられなかった。リバビリン (3.0mg/kg/day) 注入中のリバビリン髄液中濃度は 94 $\mu$ g/ml であった。本症例では、症例 1 においてリバビリンの副作用が出現せず、また、保護者の強い要望から休薬期間を設けず、リバビリンを持続注入することとした。反応性の向上などがみられ、全身状態も安定していたため、入院から約 1 ヶ月半で退院した。しかし退院直後、症状が進行し、臨床症状スコアは 29 点であったため、現在は 4mg/kg/day に増量し経過観察している。

## D. 考察

これまでのオンマヤリザーバー<sup>®</sup>を用いたリバビリン単回投与では薬剤注入のため体内に埋設したリザーバーを 1 日 2 回穿刺するのに対し、持続輸注ポンプでは 10 日に 1 回、休薬期間をもう

けない場合は最大で 20 日に 1 回で穿刺が済み、頻回穿刺による髄膜炎などの有害事象を減少させることができる。また、安定して一定の濃度を供給できるため、単回投与時にみられたような、注入直後に中毒域の濃度まで上昇することがなく、本症例においても副作用がみられなかった。さらに、髄液中濃度のコントロールも、注入する濃度を変更することによって可能であるため、単回投与と比較して容易である。以上より、持続輸注ポンプを用いることにより、在宅でも治療が可能になる。

問題点として、使用した持続輸注ポンプでは流量は固定されており変更ができないため、注入するリバビリンの濃度でリバビリン量を調節していた。そのため、症例 1 のように体格が大きい場合、使用しているリバビリンを希釈せずに原液で注入しても有効髄液中濃度下限にとどまり、それ以上濃度を上げることができなかった。今後、他の持続輸注ポンプやリバビリン製剤を使用することを考慮する必要がある。また、リバビリン持続投与療法は前例がないため、リバビリンを長期間持続投与の副作用が不明であり、注意深く加療していく必要があると考えられた。

## E. 結論

皮下埋め込み型持続輸注ポンプを用いたリバビリン脳室内持続投与療法は、単回投与よりも利点が多く、今後さらに検討していく必要がある。

## [参考文献]

1) Hosoya M, et al. 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

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Abe Y, Hashimoto K, Iinuma K, Ohtsuka Y,

Ichiiyama T, Kusahara K, Nomura K, Mizuguchi M, Ainami H, Suzuki Y, Mizusawa H, Hosoya M. Survey of subacute sclerosing panencephalitis in Japan. *J Child Neurol*, in press.

2) 細矢光亮. 亜急性硬化性全脳炎に対する治療の動向. *最新医学* 66:86-90, 2011.

3) 細矢光亮. 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) に対する新たな治療法の開発を目指して. *Neuroinfection* 16:1-8, 2011.

4) 細矢光亮. 単純ヘルペス脳炎診療ガイドライン. In: 五十嵐隆/塩見正司・編 小児科診療ピクシス「急性脳炎・急性脳症」, 中山書店, 東京, pp94-97, 2011.

## 2. 学会発表

1) 阿部優作, 橋本浩一, 川崎幸彦, 細矢光亮. ノードマウス脳内に持続感染した麻疹ウイルスの検討. 第 43 回日本小児感染症学会総会学術講演会, 岡山市, 10.30, 2011.

2) 渡部真裕, 阿部優作, 橋本浩一, 川崎幸彦, 細矢光亮. 膜融合蛋白 (F 蛋白) を標的とした新規ペプチドによる亜急性硬化性全脳炎の新たな治療戦略. 第 43 回日本小児感染症学会総会学術講演会, 岡山市, 10.30, 2011.

3) 阿部優作, 橋本浩一, 細矢光亮. ノードマウス脳内に持続した麻疹ウイルスの検討. 第 16 日本神経感染症学会総会, 東京, 11.4, 2011.

## 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

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

## SSPE におけるインターフェロンの治療期間と中止後の経過

研究分担者：愛波秀男 静岡県立こども病院神経科

**研究要旨** SSPE におけるインターフェロン（IFN）長期投与の指針を作成するため、アンケート調査を行った。IFN を投与した 59 名中、3 分の 1 が 1 年以内、6 割が 5 年以内に投与を中止した。IFN 投与で一時的にでも症状が改善したのは 13 名、やや改善が 10 名、不変または悪化が 26 名であった。IFN 中止後一時的にでも症状が改善したのは 8 名で、すべて 4 年以内に中止した例であった。IFN 中止後症状が急激に悪化したのは 5 名と少なかったが、15 年継続して中止した症例でも悪化を認めた。また急激に悪化した原因が IFN の中止と関係するか、判断するのが難しかった。IFN を中止しても SSPE が進行しないと判断するためには、IFN の投与期間のみでなく、麻疹抗体価の変化など、他の要因を含めて検討する必要がある。

### A. 研究目的

インターフェロン（IFN）とイソプリノシンの併用により、SSPE の生存率が改善すると報告されている<sup>1)</sup>。しかし IFN をどれ位継続すれば良いという指針がなく、患児によって投与期間が大きく異なる。中止後に症状が急激に悪化した症例の IFN 投与期間を調べ、IFN 中止の指標が得られないか検討した。

### B. 研究方法

対象は SSPE 患者家族の会である「青空の会」の会員のうち、1985 年以降に SSPE を発症した患児 79 名である。2009 年 12 月に両親にアンケート用紙を郵送し、62 名から回答を得られた（回答率 78%）。アンケートでは SSPE の発病年月、診断年月、IFN 治療の有無と開始時期、IFN の投与期間と効果、IFN 中止後に一時的な症状の改善や急激な悪化がなかったかを質問した。

#### （倫理面への配慮）

「青空の会」総会でアンケート調査について説明し、実施の許可を頂いた。またアンケートにはイニシャルのみを記載し、個人が特定できないようにした。

### C. 研究結果

SSPE の発症は 1986～2009 年で、発症からアンケート回答時または死亡時までの観察期間は平均 10.3 + 5.9 年であった。回答時は死亡 16 名、寝たきり 40 名、座位保持可能 3 名、歩行可能 3 名であった。IFN は 59 名、イソプリノシンは 60 名（不明 2 名）、リバビリンは 19 名で投与された。

#### 1) IFN の投与状況

IFN を投与した 59 名の SSPE 発症から IFN を開始するまでの期間は、1 ヶ月以内が 7 名、6 ヶ月以内が 42 名、1 年以内が 52 名（88%）であった。SSPE と診断されてから IFN を開始するまでの期間は、1 ヶ月以内が 36 名、6 ヶ月以内が 54 名（92%）、1 年以内が 55 名であった。ほとんどの症例が SSPE 発症から 1 年以内、SSPE の診断から 6 ヶ月以内に IFN の投与を開始した。

IFN の投与期間は 2 ヶ月以内 5 名、2 ヶ月～1 年 16 名、1～3 年 9 名、3～5 年 10 名、5～10 年 6 名、10 年以上 12 名、不明 1 名であった（図 1）。現在投与中の症例を除いても、20 名（34%）が 1 年以内、35 名（59%）が 5 年以内に IFN を中止した。また 12 名が 10 年以上 IFN を投与し、8 名は現在も継続中である。

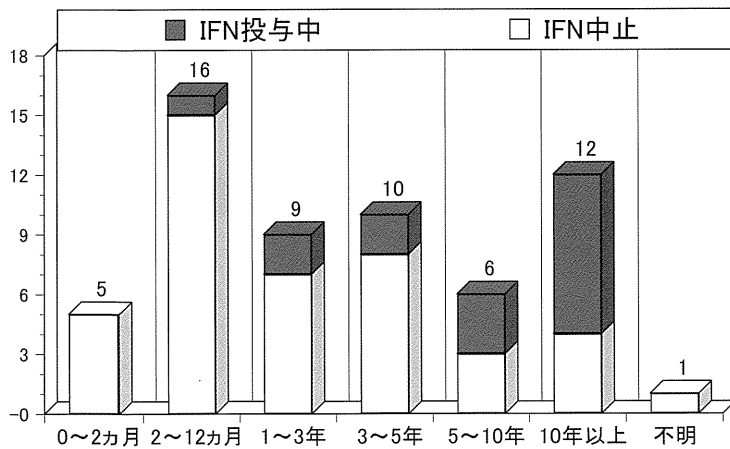


図1 IFNを投与した期間

2) IFNの効果と投与期間

「IFN投与で一時的にでも症状が改善しましたか。」の質問に対して、明らかに改善したのは13名、やや改善が10名、不変が18名、悪化が8名、わからないが10名であった。悪化した具体的な症状は、高熱や筋緊張の亢進、ADL (Activities of daily living) の悪化などであった。

現在IFN投与中の患児のうち投与期間5年以内の5名と、投与期間不明の1名を除外した53名について、IFNの効果によってIFNの投与期間が異なるかを調べた(図2)。1年以内に投与中止した例は、IFNで変化なしか悪化した例が多かった。また5年以上IFNを投与した例は、IFNで一時的にでも改善した例が多かった。

3) IFN中止後の改善または悪化

IFNを中止した43名中、中止後一時的にでも症状が改善したのは8名であった。IFN投与期間別に

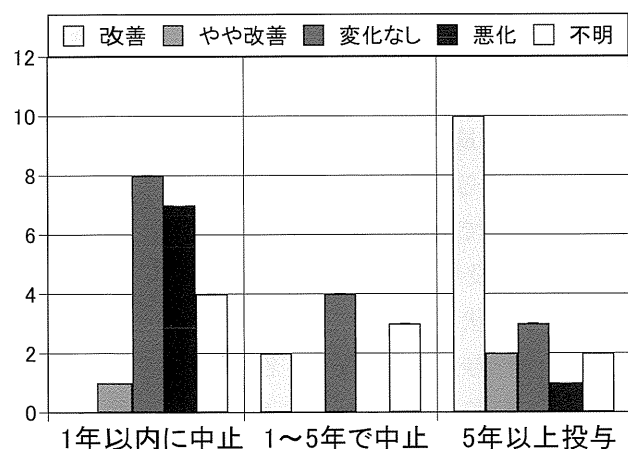


図2 IFN投与期間とIFN効果との関係

みると、IFNを1年以内に中止した20名中5名、1~5年以内に中止した15名中3名であった。IFNを5年以上継続した例では、IFN中止後に改善する事はなかった。2年以内に中止した例では歩行、有意語や経口摂取が可能となる、表情が豊かになる等、ADLの改善を認めた。4年で中止した症例は、下肢の筋緊張亢進が改善した。

IFN中止後に運動や知的な面で症状が急激に悪化したのは5名であった。IFN投与期間別にみると、IFNを1年以内に中止した20名中2名、1~5年以内に中止した15名中2名、5年以上継続した8名中1名であった。IFNを2年以内に中止した3名は中止直後、中止3ヵ月後と1年後に悪化した。IFN中止とは関係なくSSPEによって症状が悪化した可能性も考えられた。髄膜炎のためIFNを3年で中止した症例は、それ以前病状が安定していたが、中止後1ヵ月以内に神経症状が急激に悪化し、IFN中止による病状悪化の可能性があった。IFNを15年間続けて中止した症例は、1年後神経症状が悪化、IFNを再開して症状がもとに戻った。現在具体的な症状の悪化を調査中である。

4) 25年間IFNを投与して終了した症例

本院で25年間IFN- $\alpha$ 治療を行い、中止した症例を報告する。患児は日本で始めてIFN- $\alpha$ 髄注を長期的に使用した。患児は1981年9月に学力低下と性格変化で発症、12月から転びやすくなり、ミオクロニーや痙攣が出現し本院に入院、脳波所見、血清・髄液の麻疹抗体価からSSPEと診断した。イソプリノシンと抗けいれん薬を内服したが、症状は徐々に悪化し歩行が困難となった。京都府立医大でIFNによる治療が始まる事を聞き、治療に同意して転院した。IFN髄注により症状は改善し、歩行時のふらつきがなくなり、字も書けるようになった。その後週1回100万単位のIFN髄注を続けたが、2年後に歩行できなくなり、3年後に寝たきりの状態となった。6年後からは寝たきりだが、経口でミキサ-食を食べられる状態で、ADLは横ばいの状態が続いた。麻疹抗体価(CF)は髄液8~256倍、血清128~1024倍の間を変動したが、発症15年後からは髄液4~8倍、血清16



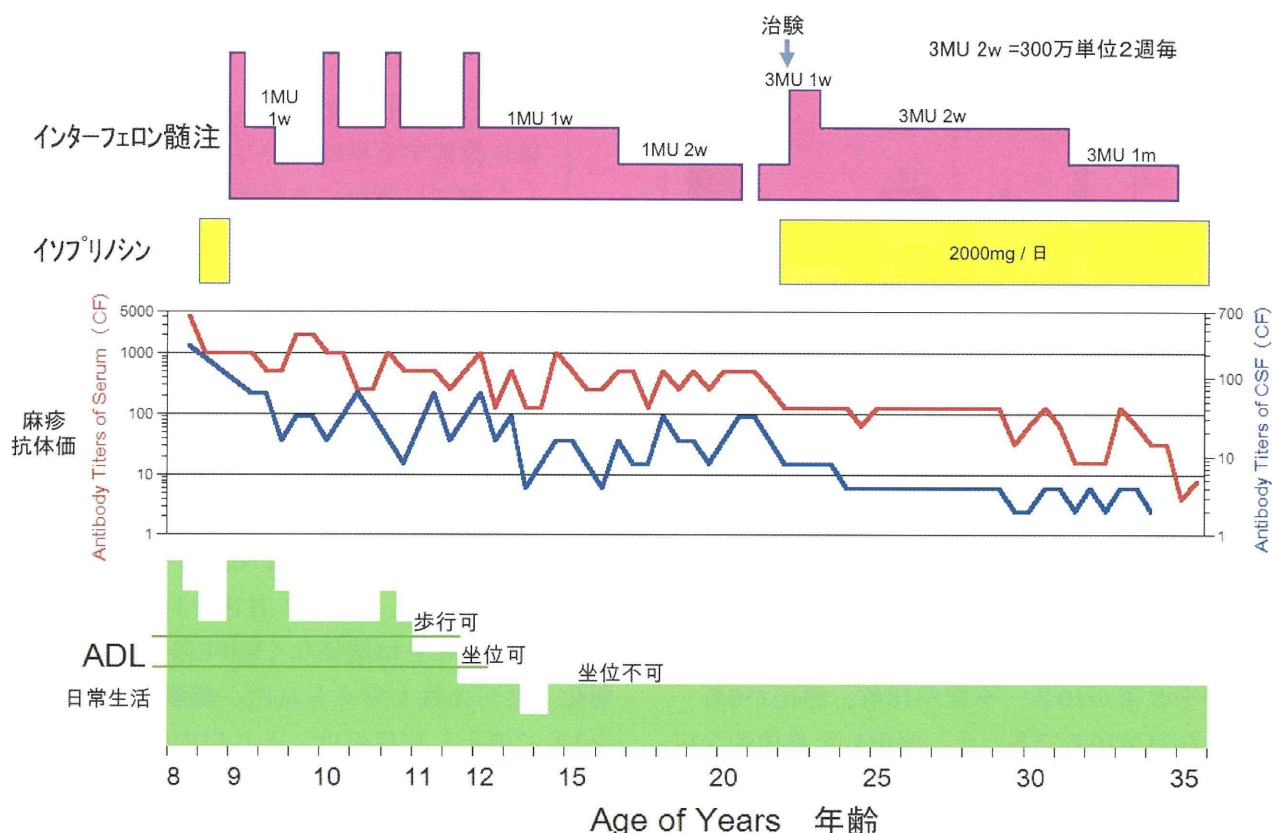


図3 25年間IFNを投与して終了した症例の経過

～128 倍に低下した。発症 25 年後には体幹の拘縮が強くなり、髄注を行う事ができなくなった。両親とリザーバーを留置して IFN を継続するか話し合ったが、そこまでは希望しないと話され、IFN を中止した。その後 4 年経つが、ADL は横ばいで、血清麻疹抗体価の上昇はなく、頭部 MRI も変化がない。

#### D. 考察

SSPE を治癒させる治療法はないが、IFN 脳室内投与とイソプリノシンを併用すると、生命予後が改善する<sup>1)</sup>。トルコでは IFN を週 5 日 6 週間の脳室内投与を 1 クールとし、2～6 ヶ月毎に 6 クール投与して IFN を終了する治療を行っている<sup>2)</sup>。治療後 8 年間は IFN を投与した群が投与しない群より生存率が高いが、8 年を超えると過去の IFN 治療の有無による生存率の差がなくなってくる。そのため、さらに長期の IFN 使用を考えている。また IFN で劇的に神経症状が改善した症例でも、8 年以上経って寝たきりの状態になる場合がある<sup>3)</sup>。

日本では IFN を 5 年以上継続する症例が多いが、いつまで IFN を続けたらよいか検討した論文はない。今回、日本での IFN 治療の期間と中止後の症状を調べ、IFN 長期投与の指針が作成できないか検討した。

副作用や IFN の効果を感じないため、3 分の 1 が IFN を 1 年以内で中止した。また 2 年以内に中止した例では、中止後一時的に歩行や経口摂取が可能となる場合があった。IFN が効果ないと考えられたが、SSPE では患児ごとに進行が異なるため、症状の悪化を軽減しなかったとは言えない。IFN の投与量や投与期間を患児ごとに調整して副作用を減らす事ができれば、さらに長い期間 IFN を投与できたかもしれない。

5 年以上投与を続けている場合は、過去に一時的にでも症状が改善した患児が多かった。10 年以上 IFN を投与した 12 名中 8 名が現在も継続中で、いつまで投与を続けるかは、両親と主治医の相談による所が大きい。IFN を中止しても SSPE ウイルスによる悪化が起きない基準を示す事ができ

れば、IFN を中止する時の参考になる。最も難しい点は、IFN 中止後に急激に悪化した場合、それが IFN 中止と関係するか判断しづらい点である。IFN 中止後急激な悪化を認めたのは 43 例中 5 例と少ないが、中止時期は開始 1 年以内から 15 年後に及んだ。中止前後の状況をさらに詳細に調べる必要があるが、現時点では何年投与すれば IFN 中止が可能と判断する事はできなかった。麻疹抗体価の変化など、他の要因を含めて検討する必要がある。

#### E. 結論

IFN 投与期間と中止後の症状の悪化を調べたが、長期投与した INF を安全に終了できる時期を示す事はできなかった。

#### [参考文献]

- 1) Yalaz K, Anlar B, Oktem F, et al. Intraventricular interferon and oral inosiplex in the treatment of subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology* 42:488-491, 1992.
- 2) Anlar B, Yalaz K, Oktem F, Köse G. Long-term follow-up of patients with subacute sclerosing panencephalitis treated with intraventricular alpha-interferon. *Neurology* 48:526-528, 1997.

- 3) Miyazaki M, Nishimura M, Toda Y, et al. Long-term follow-up of a patient with subacute sclerosing panencephalitis successfully treated with intrathecal interferon alpha. *Brain Dev* 27:301-303, 2005.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### 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

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

## 亜急性硬化性全脳炎に対するリバビリン治療に関する全国調査

研究分担者：野村恵子 熊本大学医学部附属病院発達小児科

**研究要旨** 亜急性硬化性全脳炎は、麻疹ウイルスの変異ウイルスを原因とする遅発性ウイルス感染症で、非常に予後不良な疾患であるが、未だ効果的な治療法は確立されていない。1999年以降日本を中心に、抗ウイルス薬であるリバビリンの脳室内投与による治療が試験的に行われ、一部で効果が認められている。そこで、より安全で効果的な治療法を確立させるために、これまでにリバビリン治療を実施した施設に対しアンケート調査を行い、その安全性、効果、有害事象、治療に伴う問題点等について検討した。結果として10例において何らかの効果が認められた。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いた。この治療に伴う有害事象として、細菌性髄膜炎と血圧低下に注意する必要があると考えられた。

### A. 研究目的

亜急性硬化性全脳炎（subacute sclerosing panencephalitis 以下 SSPE）は、麻疹ウイルスの変異ウイルスを原因とする遅発性ウイルス感染症で、非常に予後不良な疾患であるが、インターフェロンとイノシプレックスの併用以外、未だ効果的な治療法は確立されていない。1999年以降日本を中心に、核酸誘導体で抗ウイルス作用を持つリバビリンの脳室内投与による治療が試験的に行われ、一部で効果が認められている。そこで、より安全で効果的な治療法を確立させるために、これまでにリバビリン治療を実施した施設に対しアンケート調査を行い、その安全性、効果、有害事象、治療に伴う問題点等について検討した。

### B. 研究方法

リバビリン治療を実施した施設の主治医宛てに調査票を送付し、患者家族から同意の得られた症例について回答を寄せて頂いた。

調査項目は、転帰、現在の治療状況、麻疹予防接種歴、麻疹罹患歴、SSPE 発症時期と初発症状、診断時期と症状・病期・検査結果、治療開始時期と病期、リバビリン治療を開始した経緯、倫理委員会承認の経緯、リバビリン投与方法、髄液中リ

バビリン濃度、症状・病期の経過と検査結果の推移、治療効果、治療経過中に見られた有害事象とその経過、有害事象に影響を及ぼした他の要因、併用薬、その他とした。

### （倫理面への配慮）

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

### C. 研究結果

6施設より回答があり、これまでに調査に協力して頂いた14施設の回答も合わせて23名について検討した。男性10名、女性13名、平均発症年齢は9.1歳、平均潜伏期間は6.2年。リバビリンによる平均治療期間は3.5年。転帰は、死亡が4例、中止・終了が13例で、治療を続行しているものは6例であった。中には著明な改善がないために一旦中止して、症状が増悪したために治療を再開した例もあった。また寧ろ症状が安定して、治療による有害事象としての傾眠傾向が強いた

めに、家族との話し合いの上、治療を中止した例もあった。死亡例の死因は、化膿性髄膜炎による敗血症ショックと、リバビリン中止後全身状態の悪化に加え肺炎併発、外来フォロー中の突然の心肺停止、リバビリン中止後の呼吸状態悪化であった。麻疹の予防接種を受けていたものは2例（但し、内1例は麻疹患者との接触後の接種）、麻疹自体の症状が重篤であったものは2例であった。治療導入の経緯は、医療側の勧めが15例、患者家族が情報を得て希望された例が3例、両者からが5例であった。倫理委員会の承認については、臨時に開催され1日で承認された所もあれば、承認に1カ月かかり、やむなく決定前に治療を開始した施設もあった。

麻疹罹患年齢と調査時のNDI臨床症状スコア（以下スコアとする）をプロットしたものを図1に示す。スコアは88点満点で、点数が低い程軽症で、逆に高い程重症であることを意味する。特に麻疹罹患年齢が1歳未満の症例では、調査時スコアが高値になっている傾向があった。発症年齢と調査時スコアをプロットすると2群に分かれ、スコアが低い群の平均は10.7歳、スコアが高い群の平均は6.3歳であった。診断時の罹病期間と調査時のスコアをプロットすると、2カ月以内に診断された群と5カ月以上かかって診断された群に分かれるが、2つの群の分布には差がなく、診断が早かったからと言ってスコアが低い訳ではないことが分かった。このことは、発症後急激に進行し、治療に抵抗を示す例があることを示唆している。リバビリン治療を開始した時点と調査時のスコアをプロットしたものを図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5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8例であった。SSPEの常に進行して行く病態を考えると、改善例にこの8例を加え重複例を除いた10

例に、何らかの効果があつたと考えられる。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15例、発熱12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、ミオクローヌスがあった。

診断時の症状としては、脱力発作、座位不安定、転倒、動揺性歩行、歩行困難、起立不能、不随意運動、ミオクローヌス、構音障害、発語減少・消失、食欲低下、嚥下不良、流涎、尿失禁、不全麻痺、理解・記憶力低下、退行、意識混濁、傾眠傾向、痙攣発作があり、これらの内いくつかは認められた時点でSSPEと診断されている。それまで多くはてんかんとして治療されている。

#### D. 考察

SSPEの予防は麻疹の予防接種にかかっているが、予防接種の実施されていない1歳未満で麻疹に罹患した際に、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普及が待たれる。

### E. 結論

SSPE に対するリバビリン治療を実施した 23 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。リバビリン治療に伴う有害事象として、細菌性髄膜炎と血圧低下に注意する必要があると考えられた。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 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(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

調査時スコア

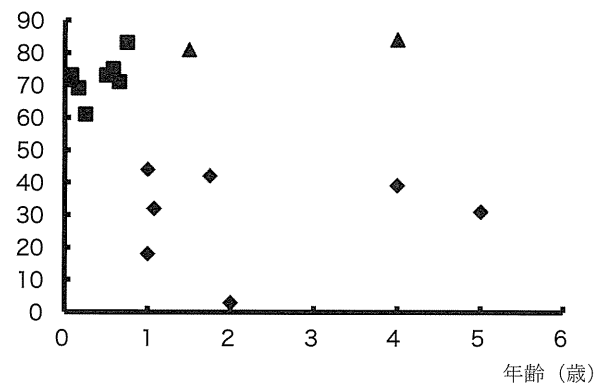


図1 麻疹罹患年齢と調査時スコア

調査時スコア

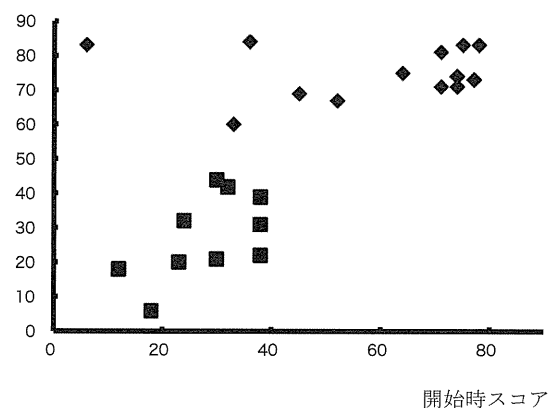


図2 リバビリン開始時と調査時のスコア

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班 分担研究報告書

## 麻疹ウイルス脳内持続感染ヌードマウスモデルを用いた 亜急性硬化性全脳炎発症機序の解明

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：阿部優作 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

**研究要旨** 亜急性硬化性全脳炎（SSPE）は、麻疹ウイルス変異株（SSPE ウイルス）の中枢神経への持続感染により引き起こされるが、麻疹ウイルスが SSPE ウイルスへと変化する機序に関しては未だ明らかではない。我々は機序解明のため、マウスモデルにおいて SSPE ウイルスを作製することを試みた。ヌードマウスに麻疹 Edmonston 株を脳内に接種し、体重減少がみられたマウスを安楽死させ脳を摘出した。摘出した脳の病理標本において、神経細胞に免疫染色陽性所見が全脳性にみられ、脳ホモジナイズ液からは、接種量の 4~400 倍のウイルスが検出された。摘出した脳から検出された麻疹ウイルスの N、P、M、F、H 遺伝子の翻訳領域を解析したところ、M 遺伝子において最も多くアミノ酸に変異がみられ、それらの多くが uridine から cytosine への変異によるものであった。また、遊離能の検討では上清の感染価が脳内接種前の 100 分の 1 程度に低下し、脳内接種では有意にマウスの生存日数が短縮した。すなわち、麻疹ウイルス株をヌードマウスの脳内に接種することにより、主に M 遺伝子に変異の蓄積があり、遊離能が低下し、強い神経病原性を有するといった SSPE ウイルスの特徴を有するウイルスを作製することができた。

### A. 研究目的

亜急性硬化性全脳炎（Subacute Sclerosing Panencephalitis；SSPE）は麻疹ウイルス変異株（SSPE ウイルス）の中枢神経への持続感染により、高度の認知障害、植物状態を呈し、死に至る遅発性ウイルス感染症である。SSPE ウイルスには、M 遺伝子に多くの変異が認められ（1）、ウイルス粒子形成能が低下する、強い神経病原性を有するなどの特徴を持つため、SSPE ウイルスの出現が SSPE の発症に関与していると考えられている。しかし、変異ウイルスの発生過程については不明である。本研究では、ヌードマウスに麻疹ウイルスを感染させ、脳内に持続感染した麻疹ウイルスの遺伝子変異およびそのウイルス学的性状を検討した。

### B. 研究方法

#### ①ウイルス、細胞

ウイルスは実験室内株である麻疹 Edmonston 株、SSPE 患者から分離された Yamagata-1 (Ya-1) 株を用いた。

細胞は九州大学柳雄介教授から分与を受けたヒト SLAM 発現 Vero 細胞（Vero/SLAM 細胞）を用いた。

#### ②動物、感染

4 週齢のヌードマウスに、Edmonston 株  $4.0 \times 10^4$  PFU/30 $\mu$ L を、2 段針を用いてイソフルラン吸入麻酔下に頭蓋骨下（脳内）に接種し、連日体重を測定した。実験プロトコールに基づき安楽死の後に脳を摘出した。

#### ③病理学的検討

採取した脳を 10%ホルマリンで固定後、パラフィンブロックを作成した。5 $\mu$ m 薄切切片をヘマトキシリン・エオジン（HE）染色、及び抗麻疹ウ

イルス N 蛋白ポリクロナール抗体 (Covalab, pab0035) による免疫染色にて病理学的に検討した。

#### ④ウイルス学的検討

##### 1) ウイルス定量

採取した脳のホモジナイズ液を作製し、Vero/SLAM 細胞を用いプラーク法にてウイルスの定量を行った。

##### 2) ウイルスの遺伝子解析

麻疹ウイルス N、P、M、F、H 遺伝子の翻訳領域を PCR で増幅し、発現ベクターにサブクローニングの後、遺伝子塩基配列を決定した。

##### 3) ウイルス遊離能の検討

M 遺伝子に最も多くの変異がみられたウイルス (M3) を用い、脳内接種前の Edmonston 株をコントロールとして、12well プレートに単層形成した Vero/SLAM 細胞に感染多重度 (moi) 0.001 になるように 50 $\mu$ l ずつ接種した。1 時間震盪静置後に 1ml の培養液を重層し、接種後 24 時間、48 時間の上清を採取し、細胞はトリプシン処理にて剥離した後に培養液を加え遠心し、上清を捨て、500 $\mu$ l の培養液にて懸濁させ、細胞浮遊液とした。それぞれをプラーク法にてウイルスを定量した。

##### 4) 変異ウイルスのマウスによる病原性の検討

M3 200PFU、また Edmonston 株 200PFU をそれぞれヌードマウス脳内に接種しその生存期間を比較した。

#### (倫理面への配慮)

本動物感染実験は福島県立医科大学動物実験指針に基づき計画し、同委員会の承認のもとに実施した。また 20%以上の体重減少がみられた個体は、倫理的エンドポイントとし安楽死させた。

#### C. 研究結果

##### ①摘出した脳の病理像

HE 染色の強拡大において、コントロールと比較して血管周囲に浮腫所見とみられる間隙がみ

られ、神経細胞の萎縮によるものと考えられる空胞が散見された。免疫染色では、大脳皮質、海馬、小脳など脳全体に陽性所見が認められ、強拡大では神経細胞の細胞体から軸索に至るまで陽性所見が認められた。

##### ②脳ホモジナイズ液のウイルス量

初期投与量の 4~400 倍のウイルスが検出された。

##### ③遺伝子解析

N、P、M、F、H 遺伝子の翻訳領域を 10 クローンずつ解析し、その変異によって起こったアミノ酸変異を算定した。N、P、M、F、H 蛋白はそれぞれ 525、507、335、553、617 のアミノ酸で構成されているが、変異数はそれぞれ 5、5、57、11、12 であり、最も多く M 遺伝子のアミノ酸に変異がみられた。また、開始コドンや終止コドンの欠失は M 遺伝子においてのみみられた。塩基の変異においては uridine (U) から cytosine (C) への変異が多く、塩基変異の 90%以上が U から C への変異である個体もみられた。

##### ④脳内に持続感染したウイルスの遊離能

接種 24 時間後の上清中のウイルス価は Edmonston 株、M3 共にプラークが検出されず、細胞浮遊液では、それぞれ 320PFU/well、50PFU/well であった。接種 48 時間後では、上清では Edmonston 株が  $1.3 \times 10^4$  PFU/well であったのに対し、M3 では  $2.3 \times 10^2$  PFU/well であった。細胞浮遊液ではそれぞれ  $3.0 \times 10^5$  PFU/well、 $4.5 \times 10^5$  PFU/well であった。接種 48 時間後の Edmonston 株の細胞のウイルス量と上清のウイルス量の比は 22:1 であったのに対し、M3 では 1900:1 と約 100 倍の差がみられた。

##### ⑤脳内に持続感染したウイルスのヌードマウス脳内接種

M3 の脳内接種では、平均生存日数は 34.7 日であり、Edmonston 株  $4 \times 10^4$  PFU の脳内接種時 (平均生存日数 73.2 日) と比較すると、有意に生存日数の短縮が認められた ( $P < 0.01$ )。Edmonston 株

200PFU は 100 日観察後も全て生存していた。

#### D. 考察

病理標本の免疫染色において、脳全体の神経細胞に陽性所見が認められたことや、脳ホモジナイズ液のウイルスの定量により、接種量よりも多いウイルスが検出されていることから、本モデルにおいて、接種した麻疹 Edmonston 株が脳内で増殖していると考えられる。

SSPE 患者から採取されたウイルスは、M 遺伝子に多くの U から C への偏った変異 (biased hypermutation) がみられ、これらにより異常な M 蛋白が形成されると、cell free の感染性ウイルス粒子が形成されず、cell to cell に感染すると理解されている(2)。本研究においても、N、P、M、F、H の 5 つの遺伝子解析において M 遺伝子に最も多くの変異がみられ、その塩基変異の多くが U から C への変異であった。さらに、そのウイルスは上清の感染価が接種前のウイルスと比較して、約 100 分の 1 程度であった。これらのことから、ヌードマウスに持続感染したウイルスは開始コドンや終止コドンの変異により、正常な M 蛋白が形成されず、ウイルス粒子形成能を失い遊離能の低下したウイルスへと変化したと考えられた。また、M3 のウイルスを再度ヌードマウスに脳内接種すると、脳内接種前の Edmonston 株と比較して有意に平均生存日数の短縮が認められた。神経細胞への感染機序や、強い神経病原性を持つに至る遺伝子変異などは不明であるが、脳内に持続感染することにより、感染が広がりやすいウイルスへと変化したと考えられる。

#### E. 結論

M 遺伝子に多くの変異を持ち、遊離能が低く、強い神経病原性を持つという SSPE ウイルスの特徴を有するウイルスがこのヌードマウスモデルにおいて作製された。

#### [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 53:15-23, 2003.

2) 堀田 博ら. 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) -原因ウイルスと発症機構-. 日本臨床 65:1475-1480, 2007.

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Abe Y, Hashimoto K, Inuma K, Ohtsuka Y, Ichiiyama T, Kusuhara K, Nomura K, Mizuguchi M, Ainami H, Suzuki Y, Mizusawa H, Hosoya M. Survey of subacute sclerosing panencephalitis in Japan. *J Child Neurol*, in press.

2) 細矢光亮. 亜急性硬化性全脳炎に対する治療の動向. *最新医学* 66:86-90, 2011.

3) 細矢光亮. 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) に対する新たな治療法の開発を目指して. *Neuroinfection* 16:1-8, 2011.

4) 細矢光亮. 単純ヘルペス脳炎診療ガイドライン. 五十嵐隆, 塩見正司・編 小児科診療ピクシス「急性脳炎・急性脳症」, 中山書店, 東京, pp94-97, 2011.

##### 2. 学会発表

1) 阿部優作, 橋本浩一, 川崎幸彦, 細矢光亮. ヌードマウス脳内に持続感染した麻疹ウイルスの検討. 第 43 回日本小児感染症学会総会学術講演会, 岡山, 10.30, 2011.

2) 渡部真裕, 阿部優作, 橋本浩一, 川崎幸彦, 細矢光亮. 膜融合蛋白 (F 蛋白) を標的とした新規ペプチドによる亜急性硬化性全脳炎の新たな治療戦略. 第 43 回日本小児感染症学会総会学術講演会, 岡山, 10.30, 2011.

3) 阿部優作, 橋本浩一, 細矢光亮. ヌードマウス脳内に持続した麻疹ウイルスの検討. 第 16 日本神経感染症学会総会, 東京, 11.4, 2011.

#### 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

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

## 麻疹ウイルスの細胞融合能と神経病原性

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

**研究要旨** F 蛋白質の変異により膜融合能が亢進した麻疹ウイルスは、ヒト神経細胞株を含む受容体陰性細胞に感染して細胞融合を起こすとともに、ヌードマウスやハムスターに神経病原性を示した。このような F 蛋白質の変異は SSPE 由来のウイルス株にもしばしば認められる。F 蛋白質変異による融合能亢進が、麻疹ウイルスの中樞神経系の病原性に関与していると考えられる。

### A. 研究目的

亜急性硬化性全脳炎（SSPE）の原因である麻疹ウイルスのエンベロープには、hemagglutinin（H）蛋白質、fusion（F）蛋白質の 2 種類の糖蛋白質が存在する。H 蛋白質が細胞上の受容体に結合すると、隣に存在する F 蛋白質に、膜融合能の活性化につながるような構造変化が起こり、その働きによりウイルスエンベロープと細胞膜が融合する。その結果、ウイルスは細胞内へと侵入する。麻疹ウイルスの受容体として、免疫細胞に発現する SLAM と上皮細胞に発現する nectin-4 が同定されているが、神経細胞上の受容体は不明である。本研究では、麻疹ウイルスがどのようにして神経細胞に感染し、SSPE などの中枢神経系病変を起こすかを解明し、それに基づいて治療法を開発することを目的とする。

### B. 研究方法

膜融合能が亢進した麻疹ウイルス変異株をブランク分離した後、それらの H、F、M 遺伝子（膜融合に関与するウイルス蛋白質をコードする）の塩基配列を決定した。発現ベクターに組み込んだ H 遺伝子、F 遺伝子を培養細胞に導入し、細胞融合を顕微鏡で観察した。融合能が亢進した F 蛋白質をコードする F 遺伝子を持つ組換え麻疹ウイルスを作成し、培養細胞およびヌードマウス、生後 10 日のハムスターに脳内接種した。組換えウイルスは GFP（緑色蛍光色素）を発現するように作製し、蛍光顕微鏡を用いて培養細

胞における細胞融合能と感染能を評価した。動物に対する病原性は、ウイルス接種後の動物の変化と生死および安楽死後の脳標本の蛍光実体顕微鏡による観察により行った。

### （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。実験は学内の動物実験ガイドラインに従い、実験動物に対する動物愛護上の配慮を十分行った。

### C. 研究結果

エピトープタグを付加した H 蛋白質を持つ組換え麻疹ウイルスの作製過程において、細胞融合能が亢進したウイルス変異体を見出し、それらのシーケンス解析から、F 蛋白質の 1 アミノ酸変異を複数個同定した（融合能が亢進した個々の変異ウイルスは異なる F 蛋白質変異を持っていた）。膜融合能を促進することが知られている既知の F 蛋白質変異に加え、われわれが新たに同定した変異から、膜融合能を促進するのに重要な F 蛋白質の領域を推定した。次に、臨床ウイルス株の F 蛋白質配列を検討したところ、SSPE 患者由来のウイルス株の多くに膜融合能を促進すると予想される F 蛋白質変異が存在することが分かった。そこで複数の SSPE ウイルス株に導入されている変異を選択し、融合能を評価したところ、実際に融合能が促進していることが確認された。変異ウイルスで認められた F 蛋白質の変異の中で特に融

合能が高い F 蛋白質および SSPE 株由来の F 蛋白質を持つ GFP 発現組換え麻疹ウイルスを作製して、ヒトの神経細胞株にウイルスを感染させた。野生型麻疹ウイルスが SLAM あるいは nectin-4 を発現していない細胞に感染した場合に、通常は巨細胞形成を起こさないが、これらの組換え麻疹ウイルスはヒト神経細胞株において巨細胞を形成した。また、ヌードマウスや幼若ハムスターを用いた感染実験でも高い細胞融合能を持つ組換え麻疹ウイルスは高い致死率を示した。

#### D. 考察

麻疹ウイルスの細胞融合能の亢進は、SLAM や nectin-4 のような効率の良い受容体を持たない細胞で膜融合を起こし、また、動物での神経病原性を高めることが明らかになった。SSPE ウイルス株の多くに、膜融合を促進させる F 蛋白質変異が認められることは、SSPE の病態にこのような F 蛋白質の変異が関与していることを強く示唆する。

#### E. 結論

F 蛋白質変異による融合能亢進が、麻疹ウイルスの中枢神経系の病原性に関与していると考えられる。

#### [参考文献]

- 1) Rima BK, Duprex WP. Morbilliviruses and human disease. *J Pathol* 208:199-214, 2006.
- 2) Ayata M *et al.* The F gene of the Osaka-2 strain of measles virus derived from a case of subacute sclerosing panencephalitis is a major determinant of neurovirulence. *J Virol* 84:11189-11199, 2010.
- 3) Griffin D.E. Measles virus. In: Knipe DM *et al.* (eds.) *Fields Virology*, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, pp1551-1585, 2007.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Seki F, Yamada K, Nakatsu Y, Okamura K, Yanagi Y, Nakayama T, Komase K, Takeda M. The SI strain of measles virus derived from an SSPE patient possesses typical genome alterations and unique amino acid changes that modulate receptor specificity and reduce membrane fusion activity. *J Virol* 85:11871-11882, 2011.

##### 2. 学会発表

4) 渡辺俊平, 白銀勇太, 池亀 聡, 古賀律子, 柳 雄介. 細胞融合能を促進させる麻疹ウイルス F 蛋白質の新規アミノ酸変異の同定. 第 48 回日本ウイルス学会九州支部総会, 北九州, 8.27, 2011.

5) Watanabe S, Shirogane Y, Ikegame S, Koga R, Nakashima M, Yanagi Y. Novel mutations in the measles virus fusion protein that enhance its fusion activity. 15th International Congress of Virology, Sapporo, September 13, 2011.

#### 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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班 分担研究報告書

## 薬用植物等に含まれる SSPE ウイルス増殖阻害物質の探索

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：Suratno Lulut Ratnoglik 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：青木千恵 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野

研究協力者：澁野裕之 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

研究協力者：川原信夫 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

**研究要旨** 約 120 種類の薬用植物から得たメタノール加温粗抽出エキスのうち、30 µg/ml の濃度で MV の宿主細胞へのウイルス吸着を 80%以上阻害する薬用植物エキスを 3 種類見出した。一方、同濃度で、細胞毒性なしで明らかな MV 増殖阻害または SSPE ウイルス増殖阻害を示す薬用植物エキスは今回の粗抽出エキスの中には見出されなかった。現在、一部の粗抽出エキスについてさらなる分画を行い、細胞毒性と抗ウイルス活性を分離できるか否かの実験を進めている。さらに、別途、日本産及びインドネシア原産の薬用植物からメタノール加温抽出液を作製し、抗 MV/SSPE ウイルス活性の検討を進めている。

### A. 研究目的

亜急性硬化性全脳炎（SSPE）は麻疹ウイルス（MV）変異株（SSPE ウイルス）による中枢神経系遅発性感染症である<sup>1)</sup>。インターフェロンとリバビリンの脳内持続注入法がある程度の有効性を示すものの未だ十分ではなく、より効果的な抗ウイルス治療法の開発が求められている。我々はこれまでに RNA interference 法によるウイルス抑制を試み、siRNA 発現プラスミドや組換えアデノウイルスが SSPE ウイルスの増殖を効率よく抑制することを報告してきた<sup>2-4)</sup>。しかし、これらの遺伝子組換え技術を用いた方法は脳腫瘍発症の危険性も指摘されており、直ちに臨床応用できるわけではない。

一方、近年、薬用植物を含む天然資源の活用があらためて見直されており、最先端技術を応用した抗腫瘍物質や抗ウイルス物質の探索が再び注目されている。本研究では、多数の薬用植物等由来抽出エキス及びそれらの分画の MV/SSPE ウイルス阻害活性について調べ、新たな抗ウイルス物質を同定することを目的とした。

### B. 研究方法

- (1) ウイルス：MV 新鮮分離株（K-52）及び SSPE ウイルス新鮮分離株（SSPE-Kobe-1）<sup>5)</sup>を用いた。ウイルスの培養には Vero/SLAM 細胞（九州大学・柳雄介博士から分与）<sup>6),7)</sup>と B95a 細胞を用い、感染価の測定はプラク法によった。
- (2) 薬用植物エキス：常法によりそれぞれの薬用植物からメタノール加温抽出エキスを得た。さらにヘキサソ、酢酸エチル、ブタノール、水による分配や各種クロマトグラフィーによる分離を行った。
- (3) 抗ウイルス活性の測定：ウイルス接種中及び接種後に薬用植物エキスでウイルス液あるいは感染細胞を処理し、融合巨細胞の出現を指標にして、感染 1 日後及び 2 日後のウイルス産生を測定した。また、MV の実験においては、薬用植物エキス処理はウイルス接種中のみとし、ウイルス接種後は処理を行わないという条件での実験も行った。
- (4) 細胞障害活性の測定：薬用植物エキスで細胞を処理後、WST-1 法により細胞障害活性を測定した。