

図7. SSPEの発病後年数別生活状況-1-日常生活 2010年度
(46例中、入力がなかった者13例) n=33

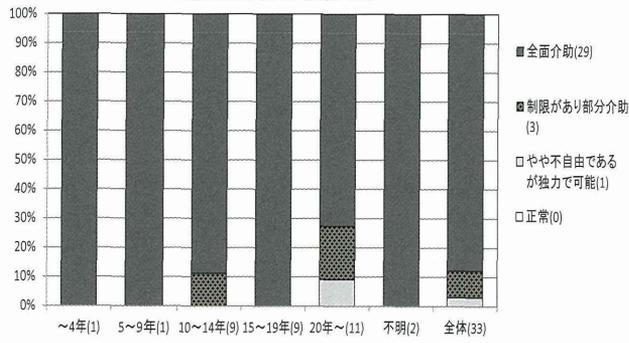


図8. SSPE発病後年数別・受診状況 2010年度
(46例中、入力がなかった者4例) n=42

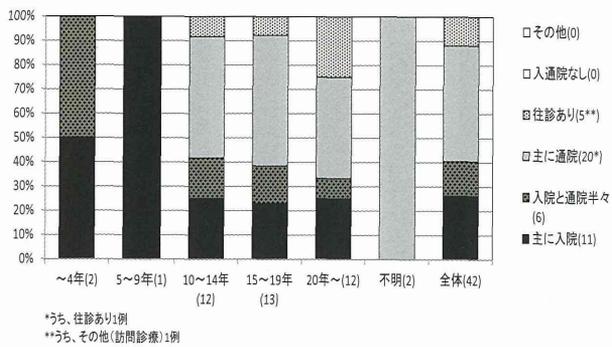


図9-1. SSPEの臨床症状 2010年度
(46例中症状の入力がなかった者3例) n=43

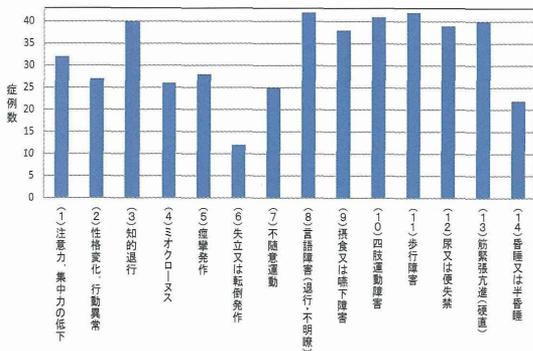


図9-2. SSPEの臨床症状 2010年度
(46例中症状の入力がなかった者3例、うち発病後年数4年以下のもの2例) n=2

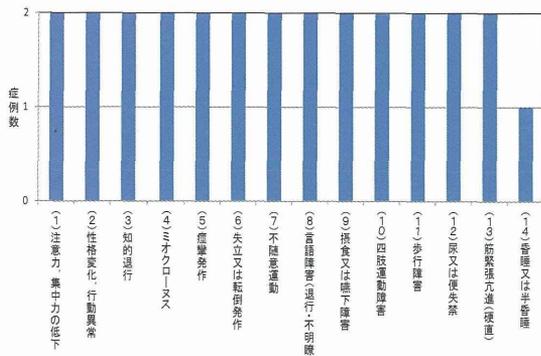


図9-3. SSPEの臨床症状 2010年度
(46例中症状の入力がなかった者3例、うち発病後年数5~9年もの1例) n=1

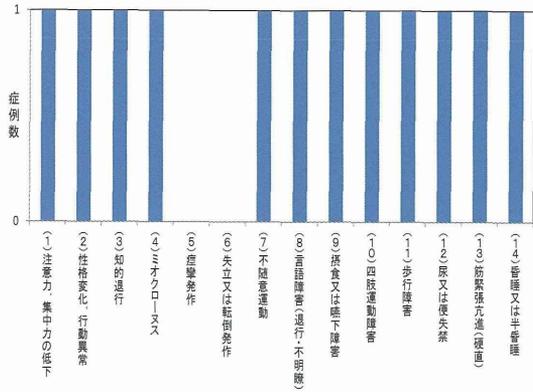


図9-4. SSPEの臨床症状 2010年度
(46例中で症状の入力がなかった者3例、うち発病後年数10~14年もの12例) n=12

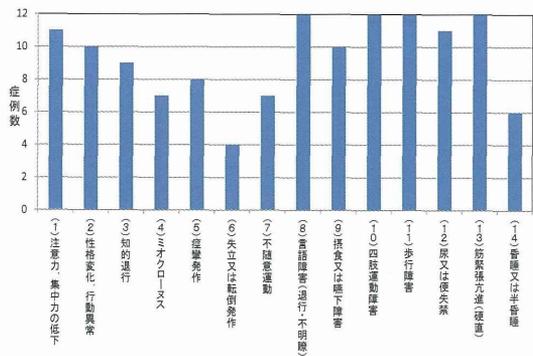


図9-5. SSPEの臨床症状 2010年度
(46例中症状の入力がなかった者3例、うち発病後年数15~19年もの13例) n=13

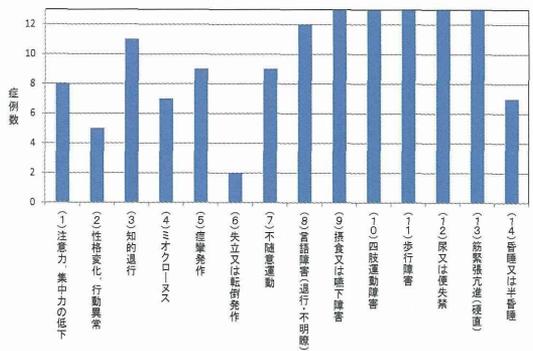


図9-6. SSPEの臨床症状 2010年度
(46例中で症状の入力がなかった者3例、うち発病後年数20年以上のもの12例) n=12

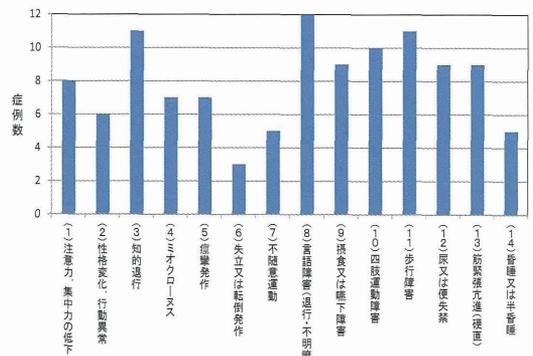


図9-7. SSPEの臨床症状 2011年度
(46例中症状の入力がなかった者3例。うち発病後年数不明のもの3例) n=3

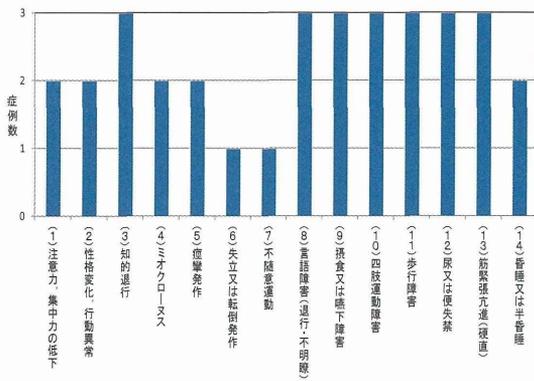


図11-2. SSPEの発病後年数別治療(割合) 2010年度
(46例中、「あり」の入力のあったものを計上) n=46

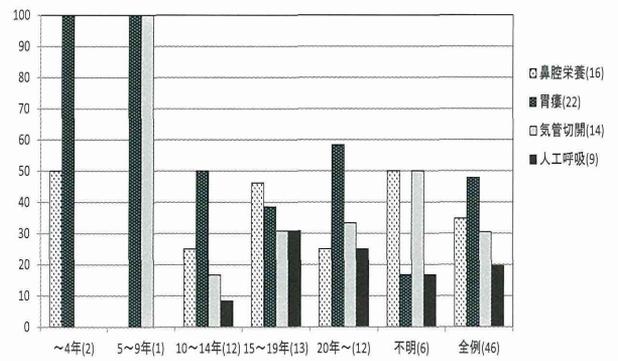


図10-1. SSPEの発病後年数別治療(報告数) 2010年度
(46例中、「あり」の入力のあったものを計上) n=46

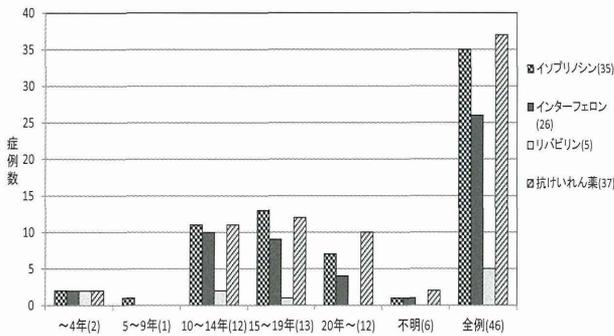


図12. SSPEの発病後年数別現在の療養場所(割合) 2010年度
(46例中、入力がないもの3例) n=43

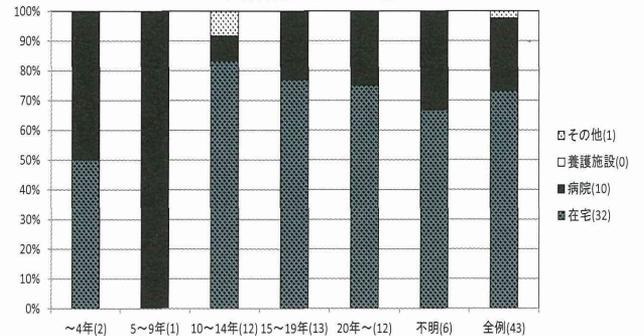


図10-2. SSPEの治療(割合) 2010年度
(46例中、「あり」の入力のあったものを計上) n=46

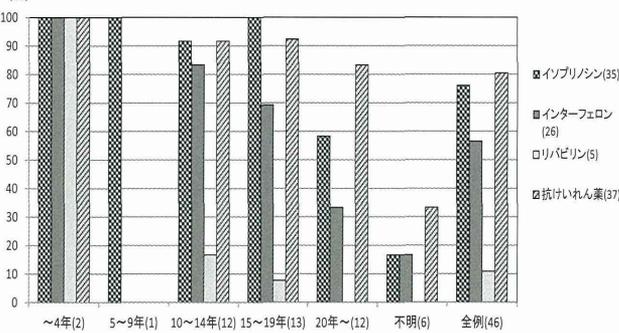


図13. SSPEの発病後年数別病期(割合) 2010年度
(46例中、入力がないもの3例) n=43

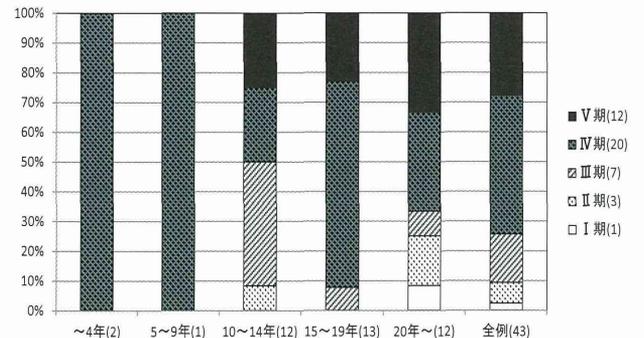
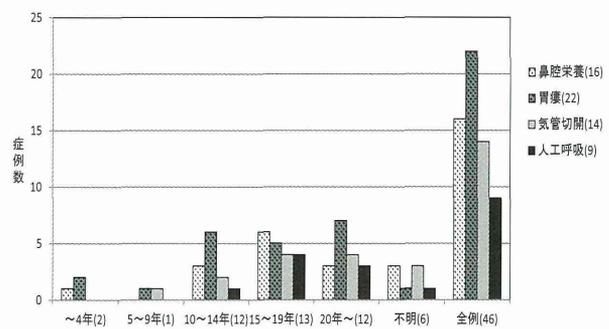


図11-1. SSPEの発病後年数別治療(報告数) 2010年度
(46例中、「あり」の入力のあったものを計上) n=46



厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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、治療開始までの罹病期間によらず、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が保険適用になっている以外、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

21 施設の患者 25 名について検討した。男性 12 名、女性 13 名、平均発症年齢は 8.5 歳、平均潜伏期間は 6.9 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 14 例で、治療を続行しているものは 7 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 5 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。また、倫理委員会で承認されずに、治療開始できなかつた例が 1 例あった。

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スコア 60 以上の例では、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、比較的良好な状態を保っている。

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 12 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つた。

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。MR ワクチンの 2 回接種及び 2012 年で終了となる麻疹ワクチンの 2 回追加接種の導入により、日本における麻疹罹患患者数は著明に減少しているが、国立感染症研究所感染症情報センターによれば、年齢群別麻疹累積報告数割合において、1 歳未満は他の年齢群より割合

が高い現状もある。

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、SSPE について啓発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 25 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。一方で、スコアが 60 以上の例では、著明な改善は認めなかった。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、予防の取り組みが重要と考えられた。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

図 1. 麻疹罹患年齢と調査時臨床症状スコア

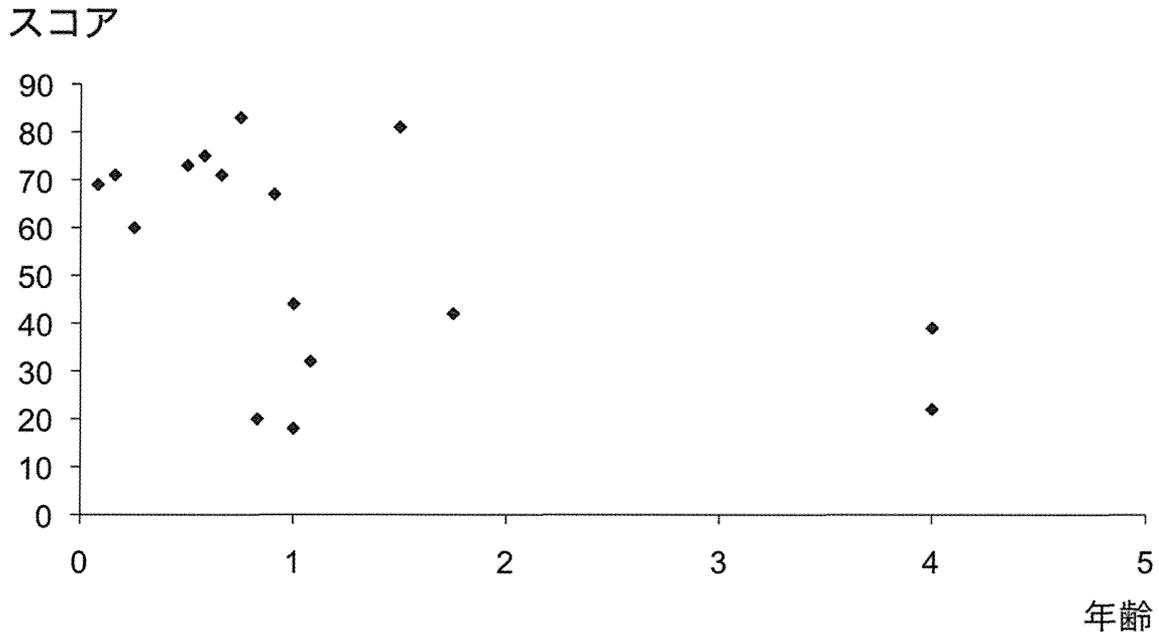
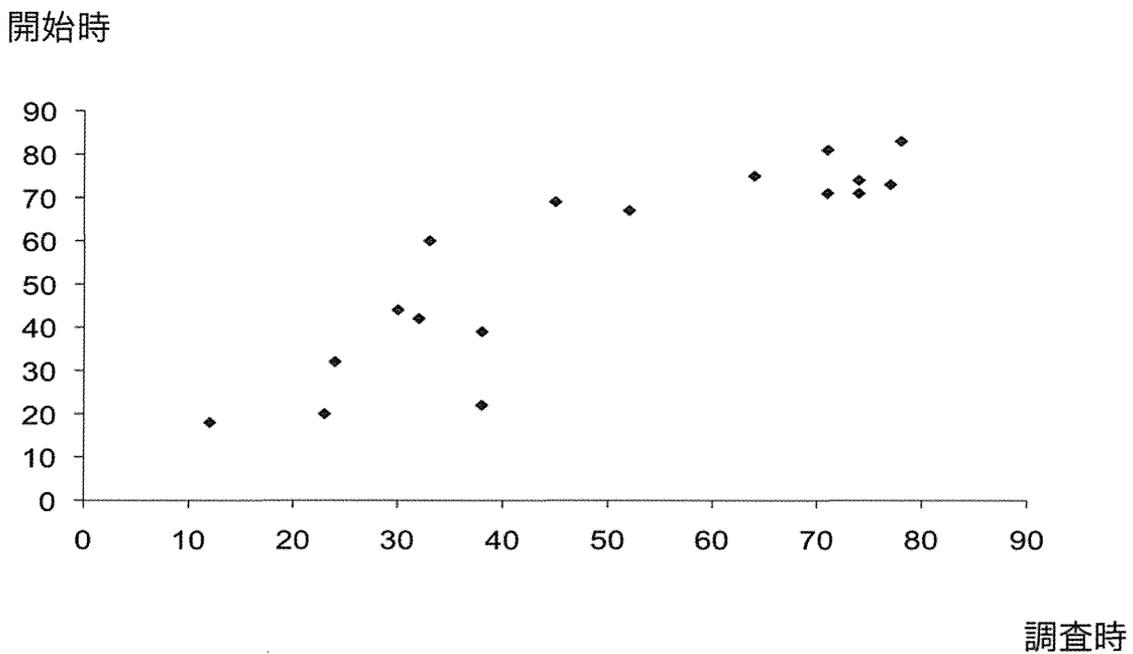


図 2. リバビリン開始時と調査時のスコア



厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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 Apo E 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 山口大学小児科の市山らは、トルコ人の SSPE 患者髄液において Apo E4 が低下および Apo E3 が上昇しており、Tau 蛋白の異常リン酸化および神経原線維濃縮体の形成阻害を介して SSPE の病態に関連する可能性があるとしている。(23 年度本学会議) しかし、genotyping を用いた本研究では、このような差は日本人の SSPE 群と対照群の間にみとめられなかった。これには、日本とトルコという民族の違いが影響している可能性が示唆された。

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。

昨年度の本学会議で、山口大学小児科の市山らは、SSPE 患者の約 20%に神経原線維濃縮体が認められること、神経原線維濃縮体は過剰にリン酸化された Tau 蛋白質から構成されること、Tau 蛋白質の代謝や神経原線維濃縮体の形成は Tau 蛋白と apolipoprotein E (Apo E) の相互作用によって決定されることなどから、トルコ人の SSPE 患者における髄液中 Apo E 濃度を検討し、報告した。その結果、SSPE 患者の髄液中 Apo E および Apo E4 濃度は、対照群に比して有意に低値で、Apo E3 濃度は有意に高値であり、SSPW 患者髄液中の Apo E4 の低下および Apo E3 の上昇は SSPE の病態に関与しているのではないかと推測している。

Apo E2, E3, E4 は、Apo E のアイソフォームであり、Apo E 遺伝子の C112R と R158C という 2 つの SNP で規定されていることが知られている。ハプロタイプでは、Cystein/Cystein が E2、Cystein/Arginine (wild type) が E3、Arginine / Arginine が E4 に対応している (図 1)。

そこで、日本人の SSPE 患者および対照群の

Apo E 遺伝子の SNP genotyping を行い、同様の結果が得られるかを検討した。

B. 研究方法

TaqMan SNP Genotyping Assay を用いて C112R と R158C の genotyping を決定し、関連解析、haplotype 解析、diplotype 解析を行った。統計解析は、フィッシャーの直接確率検定により行った。

(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ので、倫理面の問題は無い。

C. 研究結果

表 1 に SSPE 群と健常対照群における C112R の Genotype および Allele 頻度を示した。Cystein/Cystein の genotype が圧倒的に多く、SSPE 群と対照群で、Genotype および Allele 頻度の差はみられなかった。

表 2 は R158C 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。Arginine/Arginine の genotype が圧倒的に多く、SSPE 群と対照群で、Genotype および Allele 頻度の差はみられなかった。

表 3 に haplotype 解析の結果を示した。Apo E3

のハプロタイプが圧倒的に多く、Apo E4 のハプロタイプはほとんどみられなかった。各ハプロタイプの頻度に SSPE 群と対照群で、差はみられなかった。

表 4 に diplotype 解析の結果を示した。E3/E3 のディプロタイプが圧倒的に多く、E2/E3 がそれに次ぎ、E2/E2、E2/E4 はほとんどみられなかった。各ディプロタイプの頻度に SSPE 群と対照群で、差はみられなかった。

D. 考察

市山らは、トルコ人の SSPE 患者髄液中の Apo E4 の低下および Apo E3 の上昇は、Tau 蛋白の異常リン酸化および神経原線維濃縮体の形成阻害を介して SSPE の病態に関連する可能性があるとしている。しかし、genotyping を用いた本研究では、日本人の SSPE 群と対照群の間にこのような差はみとめられなかった。これには、日本とトルコという民族の違いが影響している可能性が示唆される。

E. 結論

日本人の SSPE 患者において、Genotyping に基づく Apo E3 と Apo E4 のレベルには、対照群と差がみられなかった。

[参考文献]

1) Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *HhaI*. *J Lipid Res* 31:55-548, 1990.

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Abe Y, Hashimoto K, Iinuma K, Ohtsuka Y, Ichiyama T, Kusuhara K, Nomura K, Mizuguchi M, Aiba H, Suzuki Y, Mizusawa H, Hosoya M. Survey of subacute sclerosing panencephalitis in Japan. *J Child Neurol* 27:1529-1533, 2012.

2) 楠原浩一. 神経感染症における宿主側遺伝的要因. *Neuroinfection* 17:11-19, 2012.

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

図1 Apo E の isoform

(<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/Neurosci/ApoE%20Isoforms.JPG>)

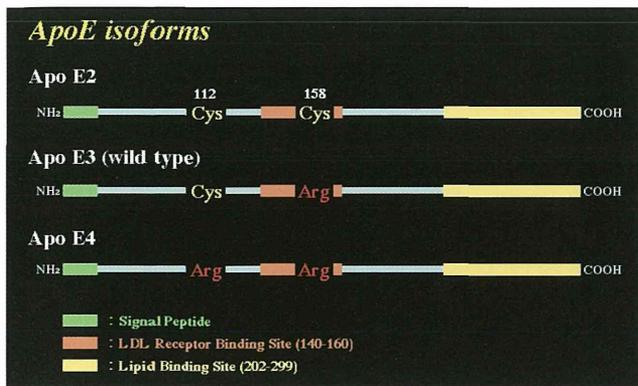


表1 rs429358 TGC ⇒ CGC 112Cys ⇒ Arg のGenotypeおよびAllele頻度

	Control群	SSPE群	P値
Genotype頻度			
Cys/Cys	49 (98%)	40 (100%)	
Cys/Arg	1 (2%)	0 (0%)	
Arg/Arg	0 (0%)	0 (0%)	
Total	50	40	n.s.
Allele頻度			
Cys	99 (99%)	80 (100%)	
Arg	1 (1%)	0 (0%)	
			n.s.

表2 rs7412 CGC ⇒ TGC 158Arg ⇒ Cys のGenotypeおよびAllele頻度

	Control群	SSPE群	P値
Genotype頻度			
Arg/Arg	41 (82%)	30 (75%)	
Arg/Cys	8 (16%)	10 (25%)	
Cys/Cys	1 (2%)	0 (0%)	
Total	50	40	n.s.
Allele頻度			
Arg	90 (90%)	70 (88%)	
Cys	10 (10%)	10 (13%)	
			n.s.

表3 Apo E 遺伝子のhaplotype解析

	Control群	SSPE群	P値
haplotype頻度			
E2 (Cys/Cys)	8 (8%)	10 (13%)	
E3 (Cys/Arg)	91 (91%)	70 (88%)	
E4 (Arg/Arg)	1 (1%)	0 (0%)	
Total	100	80	n.s.

表4 Apo E 遺伝子diplotype解析

	Control群	SSPE群	P値
diplotype頻度			
E2/E2	1 (2%)	0 (0%)	
E2/E3	7 (14%)	10 (13%)	
E3/E3	41 (82%)	30 (88%)	
E2/E4	1 (2%)	0 (0%)	
Total	50	40	n.s.

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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患者における血清および髄液中 Visinin like protein (VILIP)-1 濃度の検討

研究分担者：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：松重武志 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野
 研究協力者：梶本まどか 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野
 研究協力者：井上裕文 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野
 研究協力者：百中 宏 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野
 研究協力者：Banu Anler Department of Pediatric Neurology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey

研究要旨

【背景】 Visinin like protein (VILIP)-1 は神経のカルシウム依存性のシグナル伝達に関与すると考えられている。これまでに髄液中 VILIP-1 濃度が脳損傷、アルツハイマー病などの疾患のバイオマーカーとしての報告があるが、亜急性硬化性全脳炎 (subacute sclerosing panencephalitis: SSPE) 患者における VILIP-1 の血清および髄液中濃度についての報告はまだない。

【目的】 本研究では SSPE 患者における血清および髄液中 VILIP-1 濃度について検討する。

【方法】 平成 24 年 3 月にトルコ共和国を訪問し、提供された SSPE 患者の検体 (血清 18 検体、髄液 20 検体) と対照群 (血清 26 検体、髄液 15 検体) において各 VILIP-1 濃度を ELISA 法を用いて測定し、比較検討した。

【結果】 SSPE 患者の血清および髄液中の VILIP-1 濃度において対照群との間に有意差を認めなかった。

【考察】 VILIP-1 は主に中枢神経に存在し、神経細胞の破壊後に髄液中に遊離されると報告されている。本研究の結果から SSPE 患者における神経細胞傷害による病像や病期進行について VILIP-1 では把握できないことが示唆された。

A. 研究目的

亜急性硬化性全脳炎 (subacute sclerosing panencephalitis: SSPE) には病勢を把握するのに有用なバイオマーカーがまだ報告されていない。

Visinin like protein (VILIP)-1 は約 22kD の低分子量細胞内蛋白で、神経特異的カルシウム結合蛋白質 (neuronal calcium-sensor protein) に属し、神経のカルシウム依存性のシグナル伝達に関与すると考えられている [1]。これまでに髄液中 VILIP-1 濃度が脳損傷、アルツハイマー病などの疾患のバイオマーカーとしての報告があるが [2-4]、SSPE 患者における VILIP-1 の血清および髄液濃度についての報告はまだない。本研

究では SSPE 患者における血清および髄液中 VILIP-1 濃度について検討し、病勢を把握する上でのバイオマーカーになりうるか検討する。

B. 研究方法

平成 24 年 3 月にトルコ共和国アンカラ市 Hacettepe 大学小児病院小児神経科 Banu Anlar 教授を訪問し、提供された SSPE 患者の検体 (血清 18 検体、髄液 20 検体) と対照群 (血清 26 検体、髄液 15 検体) において各 VILIP-1 濃度を ELISA 法を用いて測定し、比較検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は凍結保存血清および髄液を用いた

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 患者の血清および髄液検体のうち VILIP-1 濃度の有意な上昇を認めたものはなく、対照群との間に有意差を認めなかった。

D. 考察

VILIP-1 は主に中枢神経に存在し、神経細胞の破壊後に髄液中に遊離されると報告されている [5]。本研究の結果から SSPE 患者における神経細胞傷害による病像や病期進行について VILIP-1 では把握できないことが示唆された。

E. 結論

本研究の結果から SSPE 患者において VILIP-1 は病勢などを把握するバイオマーカーにはなりえなかった。今後他のバイオマーカーについても検討していく。

[参考文献]

- 1) Spilker C, Richter K, Smalla KH, Manahan-Vaughan D, Gundelfinger ED, Braunewell KH. The neuronal EF-hand calcium-binding protein visinin-like protein-3 is expressed in cerebellar Purkinje cells and shows a calcium-dependent membrane association. *Neuroscience* 96:121-129, 2000.
- 2) Tarawneh R, D'Angelo G, Macy E, Xiong C, Carter D, Cairns NJ, Fagan AM, Head D, Mintun MA, Ladenson JH, Lee JM, Morris JC, Holtzman DM. Visinin-like protein-1: diagnostic and prognostic biomarker in Alzheimer disease. *Ann Neurol* 70:274-285, 2011.
- 3) Stejskal D, Sporova L, Svestak M, Karpisek M. Determination of serum visinin like protein-1 and its potential for the diagnosis of brain injury due to the stroke: a pilot study. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 155:263-268, 2011.

4) Tarawneh R, Lee JM, Ladenson JH, Morris JC, Holtzman DM. CSF VILIP-1 predicts rates of cognitive decline in early Alzheimer disease. *Neurology* 78:709-719, 2012.

5) Saenger AK, Christenson RH. Stroke biomarkers: progress and challenges for diagnosis, prognosis, differentiation, and treatment. *Clin Chem* 56:21-33, 2010.

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yüksel D, Ichiyama T, Yilmaz D, Anlar B. Cerebrospinal fluid apolipoprotein E levels in subacute sclerosing panencephalitis. *Brain Dev* 34:298-301, 2012.

2. 学会発表

1) 井上裕文, 梶本まどか, 松重武志, 岡 桃子, 市山高志. 亜急性硬化性全脳炎患者における髄液中 apolipoprotein E (ApoE) 濃度の検討. 第 54 回日本小児神経学会, 札幌, 5.17-19, 2012.

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

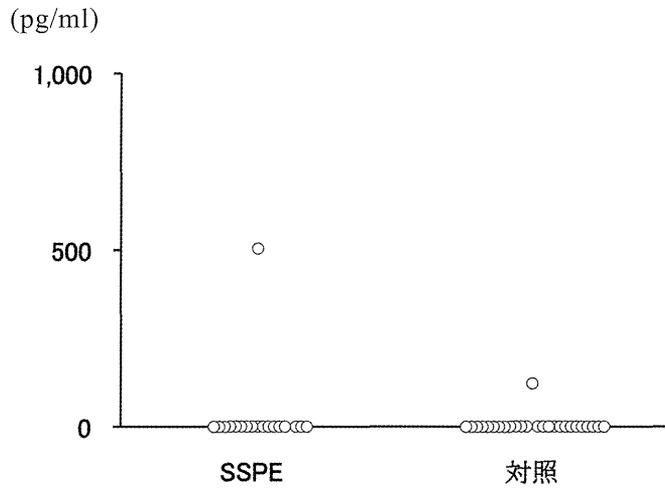


図 1 SSPE 患者における血清中 VILIP-1 濃度

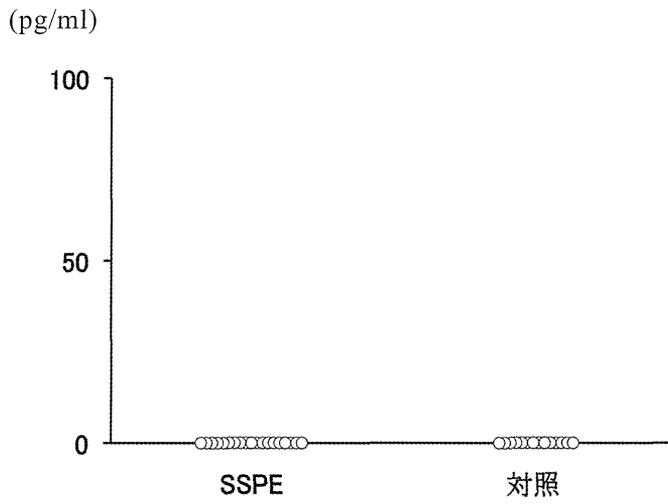


図 2 SSPE 患者における髄液中 VILIP-1 濃度

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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 ウイルス Kobe-1 株 F タンパク質の 細胞融合に関わる変異の解析

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：伊藤正恵 長浜バイオ大学バイオサイエンス学部

研究要旨 遅発性・致死性のウイルス脳炎である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引き起こされる。近年、SSPE ウイルスの細胞融合活性と神経病原性の関連性が示唆されているが、それを規定する個々のアミノ酸変異については未だ不明な点も多い。本研究では、SSPE ウイルス Kobe-1 株由来の F タンパク質のアミノ酸変異を麻疹ウイルス野生株の F タンパク質に導入し、それぞれの変異ウイルス株の細胞融合活性について検討した。さらに、それらの変異 F タンパク質と H タンパク質との相互作用についても検討した。その結果、SSPE ウイルスの F タンパク質は麻疹ウイルスのそれに比べてより強い細胞融合活性を示すこと、及び F タンパク質の 301 位のアミノ酸を Gly から SSPE ウイルス型の Trp に変異 (G301W) させた組換え麻疹ウイルスは、SSPE ウイルス F タンパク質を発現する組換えウイルスと同程度の強い細胞融合活性の増強を示すこと、また、Y398H 変異、I62T 変異及び特有の frameshift 変異を有する組換え麻疹ウイルスも中等度の細胞融合活性の増強を示すことがわかった。しかし、G301W 変異や Y398H 変異による細胞融合活性の増強は、H タンパク質を SSPE ウイルス由来のものに置換した場合にはほとんど認められなくなった。一方、F タンパク質の G401E 変異により細胞融合活性は著しく減弱した。また、G301W 変異や Y398H 変異による細胞融合活性の増強は G401E 変異の共存によりキャンセルされた。しかしながら、G401E 変異があっても G401E+G301W+Y398H トリプル変異では H タンパク質の由来に拘わらず、SSPE ウイルス F タンパク質と同程度の強い細胞融合活性を示した。G301W 変異あるいは Y398H 変異では F₀ 前駆体タンパク質の発現量及び F₀ から F₁、F₂ への開裂は麻疹ウイルス野生株と同程度であった。一方、G401E 変異あるいは G401E+G301W ダブル変異では F₀ 前駆体及び F₁ タンパク質の量はいずれも著しく減少していた。しかし、G401E+Y398H ダブル変異や G401E+G301W+Y398H トリプル変異では F₀ 前駆体及び F₁ タンパク質の量は麻疹ウイルス野生株とほぼ同程度であった。細胞表面の F₁ タンパク質一定量あたりの細胞融合能の比活性は G401E 変異では低く、逆に、G401E+G301W ダブル変異や G401E+G301W+Y398H トリプル変異では SSPE ウイルス F タンパク質とほぼ同程度に増加していた。Y398H 変異の比活性は麻疹ウイルス野生株とほぼ同程度であった。以上の結果より、SSPE ウイルス F タンパク質の細胞融合活性には G401E+G301W+Y398H トリプル変異及び H タンパク質との相互作用が重要であると考えられた。

A. 研究目的

遅発性・致死性のウイルス脳炎である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引き起こされる^{1,2)}。SSPE ウイルス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。麻疹ウイルスは本来、膜融合活性によって細胞融合を引き起こし、神経細胞以外の細胞に感染した場合は多

核の融合巨細胞を形成するが、SSPE においては融合した神経細胞は観察されない^{1,2)}。近年、SSPE ウイルスの細胞融合活性と神経病原性の関連性が示唆されているが^{3,4)}、それを規定する個々のアミノ酸変異については未だ不明な点も少なからず残されている。

麻疹ウイルスの細胞融合活性を担う F タンパク質は、前駆体タンパク質である F₀ が宿主細胞

のプロテアーゼである Furin により F₁ と F₂ に開裂されて、融合活性を発現する。さらに、標的細胞表面のウイルスレセプターと結合する H タンパク質との相互作用により、F タンパク質の融合活性が調節されることも知られている。

本研究では、これまでに我々が分離した SSPE ウイルス Kobe-1 株^{5,6)}の F タンパク質のアミノ酸変異を、その親株とほぼ同一であると考えられる麻疹ウイルス野生株 (Ichinose 株) の F タンパク質に個別または組み合わせて導入し、それぞれの変異ウイルス株の細胞融合活性について検討した。さらに、それらの変異 F タンパク質と H タンパク質との相互作用についても検討した。

B. 研究方法

1) 遺伝子組換え麻疹ウイルスの作製

麻疹ウイルス野生株 (Ichinose-B 株) の全長ゲノムの cDNA をコードするプラスミド (p(+))MV323; 九州大学・柳雄介教授より分与⁷⁾の F 遺伝子領域に、SSPE ウイルス Kobe-1 株^{5,6)}の特有の変異を導入した変異株を作製した。この変異プラスミドを用いて、既報の方法の変法により、CHO/SLAM 細胞において遺伝子組換え麻疹ウイルスを作製した。作製した変異ウイルスは Vero/SLAM 細胞により継代した。

2) 遺伝子組換え麻疹ウイルスの細胞融合活性の解析

作製した変異麻疹ウイルスを Vero/SLAM 細胞において増殖させ、以下の解析を行った。ウイルス感染価は多核融合細胞の数を指標にし、細胞融合活性は [融合細胞の数] x [融合細胞当たりの平均核数] を指標とした。

3) 遺伝子組換え麻疹ウイルスの F タンパク質の開裂の解析

ウイルス感染 Vero/SLAM 細胞膜を回収後 lysis buffer で溶解し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により展開し、PVDF メンブレンフィルターに転写後、抗 F タンパク質抗体を用いた免疫ブロット法により解析した。

(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及び長浜バイオ大学遺伝子組換え実験安全委員会

の承認及び文部科学大臣の確認を得た。

すべてのウイルス作製実験は神戸大学大学院医学研究科微生物学研究室あるいは長浜バイオ大学バイオサイエンス学部において、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) 遺伝子組換え麻疹ウイルスの作製

麻疹ウイルス Ichinose-B 株由来の F タンパク質の配列のうち、SSPE ウイルス Kobe-1 株の変異に相当する第 2 位の G から D への変異 (G2D)、S8F、I10T、I62T、G301W、Y398H、G401E、I446T、R456K、特有の frameshift を伴う deletion 変異及びそれらの組み合わせを持つ組換え麻疹ウイルス変異株を作製した。それらの変異ウイルスはいずれも継代可能であることを確認した。

2) 遺伝子組換え麻疹ウイルス変異株の細胞融合活性の解析

ウイルスを細胞に感染させ、[融合細胞数] x [融合細胞当たりの平均核数] を指標として、様々な遺伝子組換え麻疹ウイルス変異株の細胞融合活性を比較解析した。その結果、SSPE ウイルスの F タンパク質は麻疹ウイルスのそれに比べてより強い細胞融合活性を示すこと、及び SSPE ウイルス型の G301W 変異を持つ組換え麻疹ウイルスでは SSPE ウイルス F タンパク質と同程度の強い細胞融合活性の増強が認められた。次いで、Y398H 変異、I62T 変異及び特有の frameshift 変異を有する組換え麻疹ウイルスも、G301W 変異の場合より軽度ではあるが中等度の細胞融合活性の増強が見られた。一方、G401E 変異を有する組換え麻疹ウイルスでは細胞融合活性は著しく低下した。

また、上記の細胞融合活性の増強が見られた組換え麻疹ウイルス変異株の H タンパク質を麻疹ウイルス Ichinose-B 株由来のものから SSPE ウイルス由来のものに置き換えた場合、細胞融合活性の増強の程度が減弱した。一方、F タンパク質全体が SSPE ウイルス由来である組換え麻疹ウイルス変異株では、H タンパク質も SSPE ウイルス由来のものに置換すると、細胞融合活性の更なる増強が認められた。

3) 個々の F タンパク質変異を組み合わせた場合の細胞融合活性の変化の解析

細胞融合活性を著しく減弱させる G401E 変異と細胞融合活性を増強させる G301W 変異が共存 (G401E+G301W ダブル変異) あるいは Y398H 変異が共存 (G401E+Y398H ダブル変異) する組換え麻疹ウイルスでは、H タンパク質が麻疹ウイルス由来の場合は細胞融合活性の増強が全く認められなかった。一方、H タンパク質が SSPE ウイルス由来の場合は、G401E+G301W ダブル変異や G401E+Y398H ダブル変異にすると G401E 単独変異による細胞融合阻害効果がキャンセルされるのみならず、わずかではあるが増強効果が認められた。また、H タンパク質が SSPE ウイルス由来の場合には、H タンパク質が麻疹ウイルス由来の場合に比べて、F タンパク質の G301W あるいは Y398H 単独変異による細胞融合活性の増強はわずかに認められるのみであった。

G401E+Y398H+G301W トリプル変異を有する組換え麻疹ウイルスは SSPE ウイルス F タンパク質と同程度の強い細胞融合活性を示し、H タンパク質を SSPE ウイルス由来のものに置換すると細胞融合活性はさらに増強した。

4) 遺伝子組換え麻疹ウイルス変異株の F タンパク質の開裂に関する解析

ウイルス感染細胞の細胞膜を回収し、抗 F タンパク質抗体を用いた免疫ブロット法により F₀ 前駆体タンパク質の発現量及び F₀ から F₁、F₂ への開裂の程度について解析した。その結果、G301W 変異あるいは Y398H 変異のみを持つ組換え麻疹ウイルスでは F₀ 前駆体タンパク質の発現量及び F₀ から F₁、F₂ への開裂は麻疹ウイルス野生株と同程度であることが確認された。一方、G401E 単独変異あるいは G401E+G301W ダブル変異を持つ組換え麻疹ウイルスでは F₀ 前駆体タンパク質の発現量及び開裂した F₁ タンパク質の量はいずれも著しく低下していることが明らかになった。しかし、G401E+Y398H ダブル変異や G401E+G301W+Y398H トリプル変異を持つ組換え麻疹ウイルスでは F₀ 前駆体タンパク質の発現量及び開裂した F₁ タンパク質の量は麻疹ウイルス野生株とほぼ同程度であった。

細胞表面の F₁ タンパク質の一定量あたりの細胞融合能の比活性を測定すると、G401E 単独変異ではその比活性は低く、一方、

G401E+G301W ダブル変異や G401E+G301W+Y398H トリプル変異では SSPE ウイルス F タンパク質の場合と同程度に比活性が増加していた。Y398H では麻疹ウイルス野生株の比活性とほぼ同程度であった。

D. 考察

近年 SSPE ウイルスの細胞融合活性と神経病原性の関連性が示唆されているが、それを規定する個々のアミノ酸変異については未だ不明な点も多い。本研究では、SSPE ウイルス Kobe-1 株由来の F タンパク質のアミノ酸変異を麻疹ウイルス野生株の F タンパク質に導入し、それぞれの変異ウイルス株の細胞融合活性について検討した。さらに、それらの変異 F タンパク質と H タンパク質との相互作用についても検討した。その結果、SSPE ウイルスの F タンパク質は麻疹ウイルスのそれに比べてより強い細胞融合活性を示すこと、及び麻疹ウイルス F タンパク質の G301W 変異は SSPE ウイルスの F タンパク質と同程度の強い細胞融合活性の増強をもたらすこと、また、Y398H 変異、I62T 変異及び特有の frameshift 変異も中等度の細胞融合活性の増強をもたらすことがわかった。しかし、G301W 変異や Y398H 変異による細胞融合活性の増強は、H タンパク質を SSPE ウイルス由来のものに置換した場合にはわずかしこ認められなくなった。一方、F タンパク質の G401E 変異により細胞融合活性は著しく減弱し、G301W 変異や Y398H 変異による細胞融合活性の増強も G401E 変異の共存によりキャンセルされた。しかしながら、G401E 変異があっても G401E+G301W+Y398H トリプル変異では H タンパク質の由来に拘わらず、SSPE ウイルス F タンパク質と同程度の強い細胞融合活性の増強をもたらした。G301W 変異あるいは Y398H 変異では F₀ 前駆体タンパク質の発現量及び F₀ から F₁、F₂ への開裂は麻疹ウイルス野生株と同程度であったが、G401E 変異あるいは G401E+G301W ダブル変異では F₀ 前駆体及び F₁ タンパク質の量はいずれも著しく減少していた。G401E+Y398H ダブル変異や G401E+G301W+Y398H トリプル変異では F₀ 前駆体及び F₁ タンパク質の量は麻疹ウイルス野生株とほぼ同程度であった。細胞表面の F₁ タン

パク質一定量あたりの細胞融合能の比活性は G401E 変異では低く、G401E+G301W ダブル変異や G401E+G301W +Y398H トリプル変異では逆に SSPE ウイルス F タンパク質と同程度に増加していた。以上の結果より、SSPE ウイルス F タンパク質の細胞融合活性には G401E+G301W+Y398H トリプル変異と H タンパク質との相互作用が重要であると考えられた。

E. 結論

1) SSPE ウイルスの F タンパク質は麻疹ウイルスのそれに比べてより強い細胞融合活性を示すことが確認された。

2) 麻疹ウイルス F タンパク質の G301W 変異は SSPE ウイルスの F タンパク質と同程度の強い細胞融合活性の増強をもたらした。Y398H 変異は中等度の細胞融合活性をもたらした。しかし、G301W 変異や Y398H 変異による細胞融合活性の増強は SSPE ウイルスの H タンパク質の共存下ではわずかしか認められなかった。一方、F タンパク質 G401E 変異は細胞融合活性を著しく減弱させた。

3) G401E+G301W+Y398H トリプル変異では H タンパク質の由来に拘わらず、SSPE ウイルス F タンパク質と同程度の強い細胞融合活性の増強をもたらした。

4) G401E 変異あるいは G401E+G301W ダブル変異では、F₀ 前駆体及び F₁ タンパク質の量は麻疹ウイルス野生株に比べて著しく減少していた。一方、G301W 変異、Y398H 変異、G401E+Y398H ダブル変異、G401E+G301W+Y398H トリプル変異では F₀ 前駆体及び F₁ タンパク質の量は麻疹ウイルス野生株とほぼ同程度であった。細胞表面の F₁ タンパク質一定量あたりの細胞融合能の比活性は G401E 変異では低く、一方、G401E+G301W ダブル変異や G401E+G301W+Y398H トリプル変異では SSPE ウイルス F タンパク質の比活性とほぼ同程度に増加していた。

5) SSPE ウイルス F タンパク質の細胞融合活性には G401E+G301W+Y398H トリプル変異と H タンパク質との相互作用が重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) Yanagi Y, Takeda M, Ohno S. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol* 87:2767-2779, 2006.
- 3) Ayata M, Takeuchi K, Takeda M, Ohgimoto S, Kato S, Sharma LB, Tanaka M, Kuwamura M, Ishida H, Ogura H. 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.
- 4) Watanabe S, Shirogane Y, Suzuki SO, Ikegame S, Koga R, Yanagi Y. Mutant fusion proteins with enhanced fusion activity promote measles virus spread in human neuronal cells and brains of suckling hamsters. *J Virol*, in press.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.

F. 健康危険情報

該当なし。

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 難治性疾患等克服研究事業（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亢進と神経病原性

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

研究協力者：渡辺俊平 九州大学大学院医学研究院ウイルス学

研究要旨 亜急性硬化性全脳炎(SSPE)患者由来の麻疹ウイルス(measles virus, MV)株にしばしば認められるF蛋白質の変異は、F蛋白質の膜融合能を亢進させることが示された。これらの変異をもつF蛋白質を有する組換えMV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、哺乳ハムスターに神経病原性を示した。MVのF蛋白質変異による融合能亢進が、SSPEにおける神経病原性に関与していると考えられる。

A. 研究目的

SSPEは、MVが中枢神経系で持続感染することにより発症する。MVは、SLAM(CD150)、nectin 4を受容体としてそれぞれ免疫細胞、上皮細胞に感染する。しかし、SLAM(CD150)およびnectin 4を発現していない神経細胞への感染や脳内伝播の機構は明らかではない。

SSPE患者から分離されたウイルス株は、特徴的にマトリックス(M)遺伝子に変異が蓄積しており、M蛋白質を欠失するため一般に粒子形成能を欠いている。そのことが、ウイルスが宿主の免疫応答から回避して持続感染を起こすのに重要だと考えられている。また、受容体を介した感染において、M蛋白質の欠失はウイルスの膜融合能を促進するため、中枢神経系でのウイルスの広がりにも寄与すると考えられている。

われわれは、これまでSLAMおよびnectin 4を発現していない細胞で膜融合を促進する融合(F)蛋白質の1アミノ酸変異を複数個同定し、それらの変異がF蛋白質の特定の領域に集中することを見出した。MV野生株のF蛋白質は高度に保存されている一方で、SSPE株の多くで、F蛋白質に様々な変異が認められる。

本研究は、神経細胞への感染や病原性におけるSSPEウイルス株のF蛋白質変異の意義を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

発現ベクターに組み込んだヘマグルチニン

(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MVを作成し、培養細胞および生後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

われわれが同定したF蛋白質の1アミノ酸変異、または複数のSSPE株に存在するF蛋白質変異を持つ組換えMVは、SLAMまたはnectin 4発現細胞で巨細胞形成能が野生株に比べて亢進していた。さらに、SLAMとnectin 4を発現していない神経細胞株やVero細胞において、野生株が巨細胞を形成しないのとは対照的に、これらの膜融合能が亢進したF蛋白質をもつ組換えMVは巨細胞を形成した。哺乳ハムスターにウイルスを脳内投与したところ、膜融合能が亢進

したF蛋白質をもつ組換えMV投与群でのみ脳内において広範なウイルスの広がりが観察され、ウイルスの病原性は培養細胞における融合能と相関していた。これに対し、M蛋白質欠失ウイルスは、SLAMとnectin 4を発現していない神経細胞株やVero細胞において巨細胞を形成しなかった。

D. 考察

中枢神経系でのMVの広がりには、M蛋白質の欠失よりも、F蛋白質の変異による膜融合能の促進が重要であると考えられた。SSPE株のF蛋白質に様々な変異が認められることは、SSPEの発症にウイルスの膜融合能の亢進が関わっていることを強く示唆する(図1)。

E. 結論

SSPEの発症にF蛋白質の膜融合能の亢進が重要な役割を持つことが予想され、F蛋白質による融合を標的にした抗ウイルス薬の有用性が示唆された。

[参考文献]

- 1) Rima BK, Duprex WP. Morbilliviruses and human disease. *J Pathol* 208:199-214, 2006.
- 2) Griffin DE. Measles virus. In: Knipe DM *et al.* (eds.) *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp1551-1585, 2007.

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe S, Shirogane Y, Suzuki SO, Ikegame S, Koga R, Yanagi Y. Mutant fusion proteins with enhanced fusion activity promote measles virus spread in human neuronal cells and brains of suckling hamsters. *J Virol*, in press.
- 2) Shirogane Y, Watanabe S, Yanagi Y. Cooperation between different RNA virus genomes produces a new phenotype. *Nat Commun* 3:1235, 2012.

2. 学会発表

- 1) 渡辺俊平, 白銀勇太, 鈴木 諭, 池亀 聡, 古賀律子, 柳 雄介. 麻疹ウイルスの神経病原性はウイルスの膜融合能によって規定される. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 11.15, 2012.

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

SSPEの多段階発症モデル

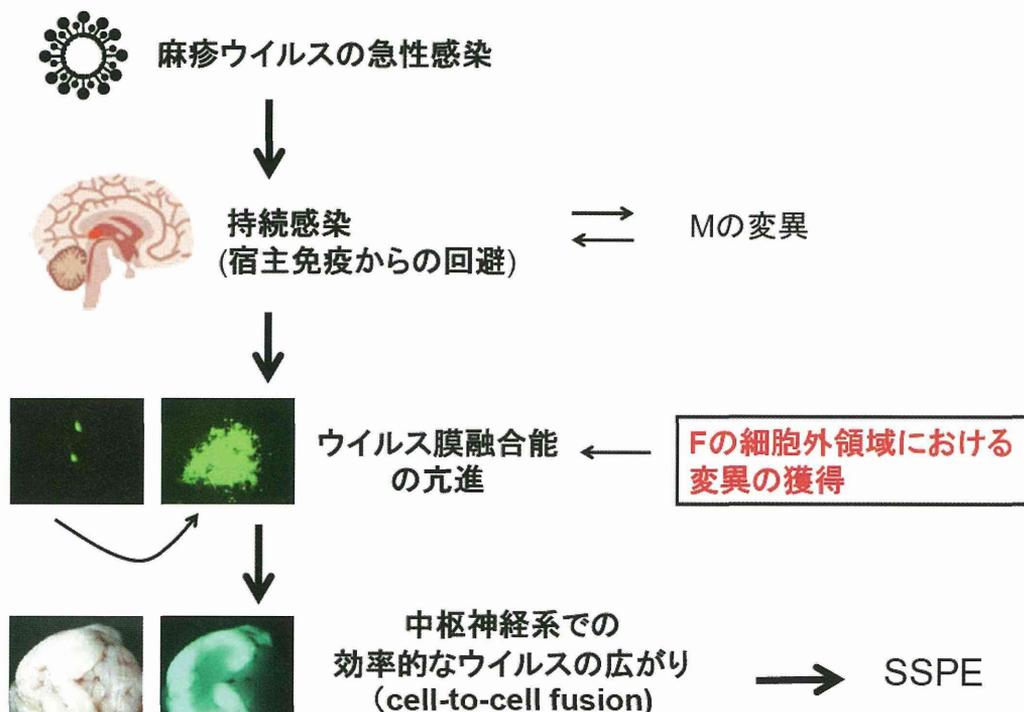


図1 SSPE 発症モデル

中枢神経系でMVのM遺伝子、F遺伝子などに変異が蓄積することにより最終的にSSPEが発症する。この過程で、F蛋白質の膜融合能亢進がウイルスの神経系での伝播に重要な役割をしている。