

G. 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

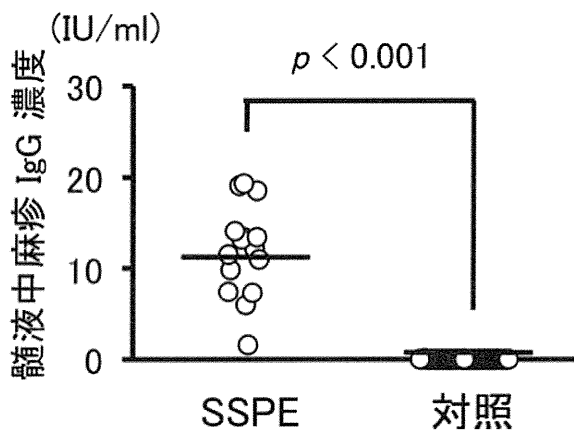


图 1 髓液中麻疹 IgG 浓度

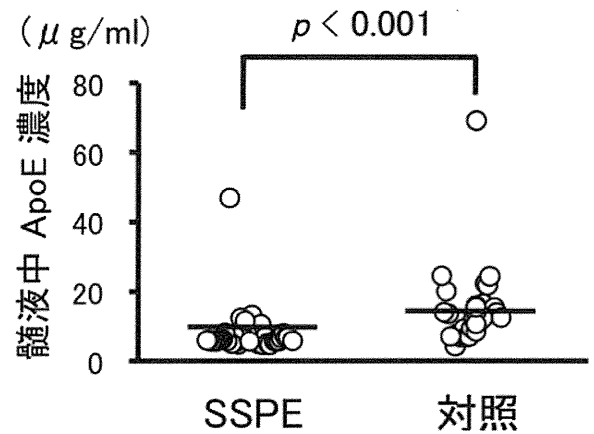


图 2 髓液中 ApoE 浓度

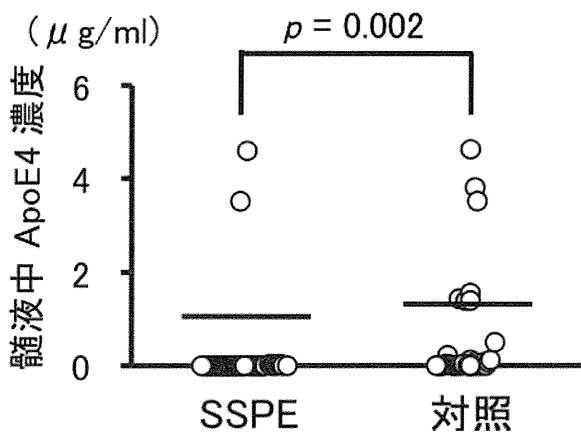


图 3 髓液中 ApoE4 浓度

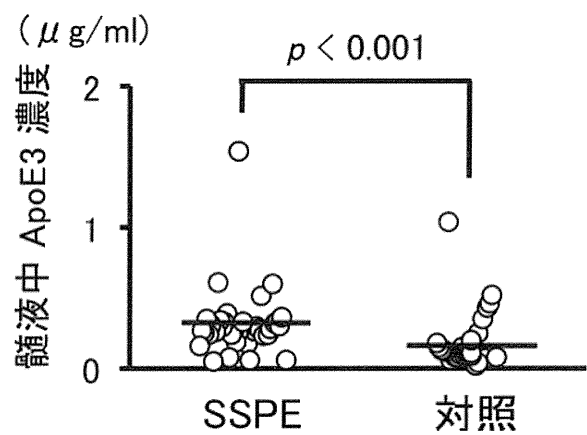


图 4 髓液中 ApoE3 浓度

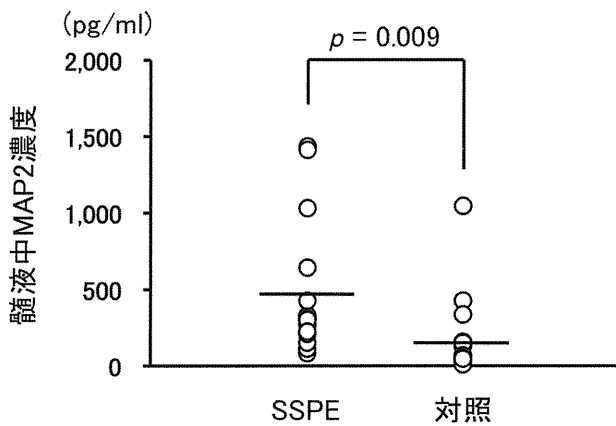


图 5 髓液中 MAP2 浓度

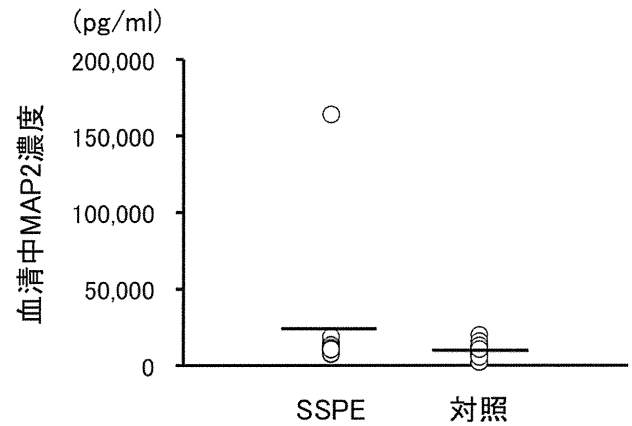


图 6 血清中 MAP2 浓度

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：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、麻疹ウイルスの上皮レセプターであることが最近明らかになった Nectin-4/PVRL4、Tau 蛋白質の代謝や神経原線維濃縮体の形成に関与している apolipoprotein E (Apo E) を SSPE の疾患感受性に関わる候補遺伝子として、各遺伝子の 1 塩基多型を用いて SSPE 患者と健常対照を対象とした関連解析を行った。SSPE 群と健常対照群との間に allele および genotype 頻度の差をみとめず、これらの遺伝子のバリエーションと SSPE に対する疾患感受性との関連は否定的であった。

A. 研究目的

SSPE の発症機序は正確には解明されていない。私たちは、これまで、遺伝子多型を用いた関連解析により、自然免疫に関わる遺伝子の中で *MxA* と *TLR3*、獲得免疫に関わる遺伝子の中で *IL4* と *PD1* のバリエーションが SSPE の発症に関与していることを報告してきた。今回、SSPE の発症に関わる宿主側遺伝要因をさらに解明するために、CD147、PRDX1、IL-7 receptor、Nectin-4/PVRL4、apolipoprotein E (Apo E) を疾患感受性候補遺伝子として関連解析を行った。

B. 研究方法

SSPE 患者 40 名と健常対照 50 名を対象とした。

CD147 遺伝子については、3 つの tag SNPs があつたが、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

あつた。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¹⁾。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。

nectin-4/PVRL4 遺伝子は、全体が 2 つの LD block を形成しており、それぞれのブロックを代表する tag SNP として、rs12401309 と rs12410477 を選択した。

以上の SNPs 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。*Nectin-4/PVRL4* 遺伝子については、haplotype 解析も行った。

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²⁾。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。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 *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。頻度は両群の間で近似しており、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。

表 4 に SSPE 群と健常対照群における *Nectin-4/PVRL4* 遺伝子 rs12401309 多型の genotype および allele 頻度の比較を示した。頻度は両群の間で近似しており、差は認められなかった。

表 5 は *Nectin-4/PVRL4* 遺伝子 rs12401309 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。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 6 は *Nectin-4/PVRL4* 遺伝子の haplotype 解析の結果を示したものである。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 7 に SSPE 群と健常対照群における *Apo E* 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 8 は *Apo E* 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 9 に *Apo E* の haplotype 解析の結果を示した。*Apo E*3 のハプロタイプが圧倒的に多く、*Apo E*4 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 10 に *Apo E* の 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

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³⁾。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⁴⁾。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⁵⁾。

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_2O_2 、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_{TAIL}) 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⁶⁾。

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 機能の亢進と 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⁷⁾。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¹⁾。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 頻度の差をみとめなかった。

Nectin-4/PVRL4 は麻疹ウイルスの上皮レセプターであるが⁸⁾⁹⁾、マウスの脳にも発現しており¹⁰⁾、中枢神経系においても麻疹ウイルスのレセプターとして機能している可能性がある。そこで、本遺伝子の2つの tag SNP を用いて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 頻度の差をみとめなかった。

市山らは、トルコ人の SSPE 患者の髄液で Apo E4 が低下し Apo E3 が上昇していることを報告し、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を示唆した。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

CD147、PRDX1、IL-7 receptor、Nectin-4/PVRL4 の各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る。また、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) 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.
- 2) Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification

and cleavage with *HhaI*. *J Lipid Res* 31:545-548, 1990.

- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Noyce RS, Bondre DG, Ha MN, et al. Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog* 7:e1002240, 2011.
- 9) Mühlebach MD, Mateo M, Sinn PL, et al. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* 480:530-533, 2011.
- 10) Noyce RS, Richardson CD. Nectin 4 is the epithelial cell receptor for measles virus. *Trends Microbiol* 20:429-439, 2012.

F. 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

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, 11.4-5, 2011.

G. 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
Genotype頻度			
CC	20 (40%)	22 (55%)	n.s.
CG	23 (46%)	13 (33%)	
GG	7 (14%)	5 (13%)	
Total	50	40	
Allele頻度			
C	63 (63%)	57 (71%)	n.s.
G	37 (37%)	23 (29%)	

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

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

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

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

表4 *Nectin-4/PVRL4*遺伝子のtag SNP rs12401309のGenotypeおよびAllele頻度

	Control群	SSPE群	P値
Genotype頻度			
TT	23 (46%)	10 (25%)	0.12
CT	23 (46%)	26 (65%)	
CC	4 (8%)	4 (10%)	
Total	40	50	
Allele頻度			
T	69 (69%)	46 (63%)	0.11
C	31 (31%)	34 (37%)	

表5 Nectin-4/PVRL4遺伝子のtag SNP rs12410477のGenotypeおよびAllele頻度

	Control群	SSPE群	P値
Genotype頻度			
GG	20 (40%)	17 (43%)	0.72
CG	27 (54%)	22 (55%)	
CC	3 (6%)	1 (3%)	
Total	50	40	
Allele頻度			
G	67 (67%)	56 (70%)	0.67
C	33 (33%)	24 (30%)	

表6 Nectin-4/PVRL4遺伝子のhaplotype解析

	Control群	SSPE群	P値
haplotype頻度			
CG	29 (29%)	34 (43%)	0.073
TC	31 (31%)	24 (30%)	0.817
TG	38 (38%)	22 (28%)	0.112

表7 Apo E 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%)	n.s.
Cys/Arg	1 (2%)	0 (0%)	
Arg/Arg	0 (0%)	0 (0%)	
Total	50	40	
Allele頻度			
Cys	99 (99%)	80 (100%)	n.s.
Arg	1 (1%)	0 (0%)	

表8 Apo E 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%)	n.s.
Arg/Cys	8 (16%)	10 (25%)	
Cys/Cys	1 (2%)	0 (0%)	
Total	50	40	
Allele頻度			
Arg	90 (90%)	70 (88%)	n.s.
Cys	10 (10%)	10 (13%)	

表9 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%)	n.s.
E3 (Cys/Arg)	91 (91%)	70 (88%)	
E4 (Arg/Arg)	1 (1%)	0 (0%)	
Total	100	80	

表10 Apo E 遺伝子diplotype解析

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

麻疹ウイルス変異株による亜急性硬化性全脳炎（SSPE）の発症機序の解明 と SSPE 治療に向けてのウイルス抑制戦略の確立

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 亜急性硬化性全脳炎(SSPE)は、麻疹ウイルス(MV)変異株の持続感染によって引き起こされる予後不良の疾患である。MV が神経病原性を獲得する機序として、細胞融合能を担う F タンパク質の変異が重要性であると報告されているが、他の MV タンパク質の関与については未だ不明な点も多い。本研究では、SSPE ウイルス(SSPE-Kobe-1 株)の神経細胞への感染に関わると考えられる遺伝子(とくに M、F 及び H 遺伝子)を MV 野生株の遺伝子と置換し、培養神経細胞に対する感染性及び細胞融合能、並びにマウス神経病原性に及ぼす影響について解析した。その結果、SSPE-Kobe-1 株と MV 野生株の組換えウイルスを用いた本実験系においては、変異 F タンパク質のみでは神経細胞感染性/細胞融合能及びマウス神経病原性の発現には不十分であることがわかった。また、変異 F タンパク質及び変異 H タンパク質の共存により、神経細胞への感染性はわずかに見られたが、細胞融合能及びマウス神経病原性の発現にはまだ不十分であった。一方、変異 F タンパク質、変異 H タンパク質及び変異 M タンパク質の共存により、神経細胞感染性/細胞融合能及びマウス神経病原性は著しく増強され、とくにマウス神経病原性に関しては臨床分離 SSPE ウイルス株(SSPE-Kobe-1)より有意に強いことが明らかになった。本研究により、SSPE-Kobe-1 株の神経病原性は変異 M タンパク質、変異 F タンパク質及び変異 H タンパク質が担う強い細胞融合能と相関することが明らかになった。また、SSPE-Kobe-1 株の変異 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの活性は MV 野生株のそれに比べて減弱している可能性が示唆された。

また、SSPE-Kobe-1 株の F タンパク質は MV 野生株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-Kobe-1 株と同じ Trp に変異(G301W)させた組換え MV 変異株は、SSPE-Kobe-1 株 F タンパク質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 MV 変異株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-Kobe-1 株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。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

亜急性硬化性全脳炎(SSPE)は、麻疹罹患後平均 10 年を経て数万人に 1 人の割合で発症する致死的疾患である。長期間にわたる持続感染に

より、麻疹ウイルス(MV)は患者体内で変異を蓄積し、SSPE ウイルスへと変貌する^{1,2)}。MV が神経病原性を獲得する機序として、細胞融合能を担う F タンパク質の変異が重要であると報

告されているが^{3,4)}、他の MV タンパク質の関与については未だ明らかにされていない。MV の H タンパク質は宿主細胞のウイルス受容体への結合を担うこと及び M タンパク質は感染性遊離ウイルス粒子の産生に関与していることが知られており^{1,2)}、また、我々は、SSPE ウイルスに特有の M タンパク質の単一アミノ酸点変異により感染性遊離ウイルス粒子の形成が著しく阻害されることを報告した^{5,6)}。一方、M タンパク質を欠失した変異 MV は著しく強い細胞融合能を示すことも報告されている⁷⁾。本研究では、SSPE 発症 6 週間後の 5 歳患児から分離した SSPE ウイルス (SSPE-Kobe-1 株) の神経細胞への感染に関わると考えられる遺伝子、とくに M、F 及び H 遺伝子を、MV 野生株の遺伝子と置換し、変異 M、F 及び H タンパク質の培養神経細胞に対する感染性及び細胞融合能並びにマウスに対する神経病原性に及ぼす影響について解析した。

また、F タンパク質の担う融合能は H タンパク質との相互作用により活性調節されることが知られている。本研究では、SSPE-Kobe-1 株の 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 MV 野生株 (Ichinose 株) の F タンパク質に個別または組み合わせ導入し、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 MV の作製

MV 野生株 (Ichinose-B 株) の全長ゲノムの cDNA と EGFP cDNA をコードするプラスミド (p(+)-MV323 及び p(+)-MV323-EGFP ; 九州大学・柳雄介教授より分与)^{8,9)} 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、遺伝子組換え MV を作製した。作製した変異 MV は Vero/SLAM 細胞により継代した。

また、MV 野生株の F タンパク質の配列のうち、SSPE-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 を伴う欠失変異及びそれらの組合せを持つ組換え MV 変異株を作製した。

2) 遺伝子組換え MV の神経細胞への感染性及び細胞融合活性の解析

作製した変異 MV を Vero/SLAM 細胞において増殖させ、ヒト神経芽細胞腫由来培養細胞 (SH-SY5Y 細胞) に感染させた。感染 2 日後に細胞を固定し、蛍光抗体法により感染の成立 (単一細胞レベル) 及び細胞融合能 (多核巨細胞形成) を調べた。

3) 遺伝子組換え MV のマウス神経病原性の解析

作製した組換え変異 MV を既報の方法により乳呑みマウスに脳内接種し、発病または死亡した個体数を指標にして神経病原性の強さを調べた⁶⁾。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え MV の作製及び使用は、神戸大学及び長浜バイオ大学の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て、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遺伝子生命科学研究室において、遺伝子組換え実験に関する法令に準拠して行った。

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て、大学院医学研究科附属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) 感染性ウイルス粒子形成能を規定する MV 遺伝子の同定

SSPE-Kobe-1 株の H 遺伝子を持つ組換え MV の感染性ウイルス粒子形成能は野生株 (Ichinose-B 株) と同じであった。一方、SSPE-Kobe-1 株の F 遺伝子を持つ組換え MV の感染性ウイルス粒子形成能は、野生株の 50% 程度に減弱した。ところが、SSPE-Kobe-1 株の H 遺伝子と F 遺伝子を併せ持つ組換え MV の感染性ウイルス粒子形成能は、SSPE-Kobe-1 株と同様にほぼ完全に消失した。これらの結果より、H 遺伝子と F 遺伝子が共同して感染性ウイルス粒子

形成能を規定していると考えられた。

2) 細胞融合能を規定する MV 遺伝子の同定及び F タンパク質アミノ酸変異の推定

SSPE-Kobe-1株のH遺伝子を持つ組換えMVの細胞融合能は野生株とほぼ同じか若干減弱した。一方、SSPE-Kobe-1株のF遺伝子を持つ組換えMVの細胞融合能は著しく増強し、ここにSSPE-Kobe-1株のH遺伝子が加わると細胞融合能はさらに増強した。

また、SSPE-Kobe-1株のFタンパク質はMV野生株に比べてより強い細胞融合能を示すこと、及びSSPE-Kobe-1株由来のG301W変異はSSPE-Kobe-1株Fタンパク質と同程度の強い細胞融合能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MV変異株も、G301W変異の場合より軽度ではあるが中等度の細胞融合能の増強が見られた。一方、G401E変異を有する組換えMV変異株では細胞融合能は著しく低下した。

さらに、上記の細胞融合能の増強が見られた組換えMV変異株のHタンパク質をMV野生株(chinose-B株)由来のものからSSPE-Kobe-1株由来のものに置換した場合、細胞融合能の増強の程度が減弱した。一方、Fタンパク質全体がSSPE-Kobe-1株由来である組換えMV変異株では、Hタンパク質もSSPE-Kobe-1株由来のものに置換すると、細胞融合能の更なる増強が認められた。

細胞融合能を著しく減弱させるG401E変異と細胞融合能を増強させる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MV変異株では、Hタンパク質がMV野生株由来の場合は細胞融合能の増強が全く認められなかった。一方、Hタンパク質がSSPE-Kobe-1株由来の場合は、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-Kobe-1株由来の場合には、Hタンパク質がMV野生株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能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MV変異株はSSPE-Kobe-1株Fタンパク質と同程度の強い細胞融合能を示し、Hタンパク質をSSPE-Kobe-1株由来のものに置換すると細胞融合能はさらに増強した。

3) 培養ヒト神経細胞への感染・伝播能を規定する MV 遺伝子の同定

MV野生株はヒト神経芽細胞腫由来培養細胞(SH-SY5Y細胞)に全く感染しないが、SSPE-Kobe-1株のH遺伝子あるいはF遺伝子のみを持つ組換えMVはSH-SY5Y細胞にわずかではあるが感染・増殖することがわかった。しかしながら、感染後10日間にわたり経過観察しても、それらの組換えMVの細胞融合・多核巨細胞形成を介した周囲の細胞への感染の拡大はほとんど認められなかった。一方、SSPE-Kobe-1株のH遺伝子とF遺伝子を併せ持つ組換えMVは周囲の細胞に感染伝播し、明瞭な多核巨細胞を形成した。しかしSSPE-Kobe-1株に比べると、細胞融合による多核巨細胞の形成は限定的なものであった。興味深いことに、SSPE-Kobe-1株のM遺伝子を併せ持つ組換えMV(rMV-sspeMFH)は、SSPE-Kobe-1株と同様に、効率良く周囲の細胞に感染伝播し、大きな多核巨細胞を形成した。

4) マウス神経病原性を規定する MV 遺伝子の同定

乳呑みマウスへの脳内感染実験により神経病原性の強さを検討したところ、MV野生株はマウス神経病原性を示さず、また、SSPE-Kobe-1株のM遺伝子、F遺伝子、あるいはH遺伝子のみを持つ組換えMVもマウス神経病原性を示さなかった。さらに、今回の実験条件下ではSSPE-Kobe-1株のF及びH遺伝子を併せ持つ組換えMVも明らかなマウス神経病原性を示さなかった。しかしながら、SSPE-Kobe-1株のM、F及びH遺伝子の3遺伝子を併せ持つ組換えMVは、SSPE-Kobe-1株よりさらに強いマウス神経病原性を有することが明らかになった。

D. 考察

本研究により、SSPE ウイルスの F タンパク質は細胞融合能を担い、SSPE ウイルスの H タンパク質と共同で、標的細胞への感染成立に重要な役割を果たしていることが確認された。これまで、細胞融合能のみならずマウス神経病原

性に関与する変異 F タンパク質の重要性が報告^{3,4)}されており、我々も変異 F タンパク質の重要性を確認したといえる。しかしながら、本研究においては、F タンパク質の変異あるいはそれに加えて H タンパク質の変異だけでは SSPE ウイルスと同等の細胞融合能及びマウス神経病原性は観察されず、そこに M タンパク質の変異が加わることによって、その変異 MV (rMV-sspeMFH) は、SSPE ウイルスと同等あるいはそれ以上の強い細胞融合能及びマウス神経病原性を発現することが明らかになった。今後は変異 F タンパク質、変異 H タンパク質、変異 M タンパク質の中で、どのアミノ酸変異が神経細胞感染/融合能及びマウス神経病原性に関与しているかが重要な検討課題である。

一方、上記のように、rMV-sspeMFH は SSPE-Kobe-1 株より強いマウス神経病原性を示したが、この実験結果から、SSPE-Kobe-1 株の変異 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの活性は MV 野生株のそれに比べて減弱している可能性が示唆された。この現象を規定している L タンパク質 (及び N タンパク質、P タンパク質) のアミノ酸変異をも明らかにする必要がある。

近年 SSPE ウイルスの細胞融合能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-Kobe-1 株由来の F タンパク質のアミノ酸変異を MV 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能について検討した。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-Kobe-1 株の F タンパク質は MV 野生株に比べてより強い細胞融合能を示すこと、及び MV 野生株 F タンパク質の G301W 変異は SSPE-Kobe-1 株の F タンパク質と同程度の強い細胞融合能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能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能の増強は、H タンパク質を SSPE-Kobe-1 株由来のものに置換した場合にはわずかしか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能は著しく減弱し、G301W 変異や Y398H 変異による

細胞融合能の増強も 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かかわらず、SSPE-Kobe-1 株 F タンパク質と同程度の強い細胞融合能の増強をもたらした。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

SSPE-Kobe-1 株のマウス神経病原性は、変異 M タンパク質、変異 F タンパク質及び変異 H タンパク質が担う強い細胞融合能と相関することが明らかになった。また、SSPE-Kobe-1 株の変異 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの活性は MV 野生株のそれに比べて減弱している可能性が示唆された。

SSPE-Kobe-1 株の F タンパク質は MV 野生株に比べてより強い細胞融合能を示した。一方、MV 野生株 F タンパク質の G301W 変異は SSPE-Kobe-1 株の F タンパク質と同程度の強い細胞融合能の増強をもたらした。Y398H 変異は中等度の細胞融合能をもたらした。しかし、G301W 変異や Y398H 変異による細胞融合能の増強は SSPE-Kobe-1 株の 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 変異は細胞融合能を著しく減弱させた。G401E+G301W+Y398H トリプル変異では H タンパク質の由来にかかわらず、SSPE-Kobe-1 株 F タンパク質と同程度の強い細胞融合能の増強をもたらした。以上の結果より、SSPE-Kobe-1 株 F タンパク質の細胞融合能には、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。

[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* 87:2648-2659, 2013.

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) Cathomen T, Mrkic B, Spehner D, Drillien R, Naef R, Pavlovic J, Aguzzi A, Billeter MA, Cattaneo R. A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain, *EMBO J* 17:899-3908, 1998.

8) Hashimoto K, Ono N, Tatsuo H, Minagawa H, Takeda M, Takeuchi K, Yanagi Y. SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *J Virol* 76:6743-6749, 2002.

9) 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. 研究発表

1. 論文発表

1) Hasegawa S, Mori N, Satomi M, Jiang DP, Hotta H, Matsushige T, Ichiyama T. Interferon production by cells infected with subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus or measles virus. *Cytokine* 56:676-679, 2011.

2) 堀田 博. 遅発性ウイルス感染症とプリオン病. 東 匡伸, 小熊恵二, 堀田 博・編 シンブル微生物学 第5版, 南江堂, 東京, pp334-340, 2011.

2. 学会発表

1) 井出良浩, 姜 大鵬, 勝二郁夫, 堀田 博. 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) マウスモデルの作製と神経病変の解析. 第100回日本病理学会総会, 横浜, 4.28-30, 2011.

2) 樋口 遥, 姜 大鵬, 脇本浩史, 佐藤友人, 堀田 博, 伊藤正恵. SSPEウイルスKobe-1株F蛋白の細胞融合に関わる変異の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 11.10-12, 2013.

G. 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

麻疹ウイルスの膜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株にしばしば認められる fusion(F)蛋白質の変異は、F蛋白質の構造を不安定化し、膜融合能を亢進させる。これらの変異をもつF蛋白質を有する組換え麻疹ウイルスは野生型ウイルスと異なり、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、ヒト神経細胞初代培養で効率よく伝播した。また、哺乳ハムスターに神経病原性を示した。これらの知見より、麻疹ウイルスの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重要な役割を果たしていると考えられた。

A. 研究目的

SSPEの原因である麻疹ウイルスの神経細胞感染および神経病原性の分子基盤を明らかにすることにより、神経細胞でのウイルス伝播を阻害する抗ウイルス薬を開発し、SSPEの治療に貢献する。

B. 研究方法

SSPE患者から分離された麻疹ウイルスに特徴的な変異をもつヘマグルチニン(H)とF蛋白質を培養細胞に発現させ、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。組換えウイルスは緑色蛍光色素(GFP)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

SSPE患者由来麻疹ウイルス株でしばしば見られるF遺伝子変異はF蛋白質の膜融合能を亢進させた。膜融合能が亢進したF蛋白質を持つ組換え麻疹ウイルスは、野生型ウイルスと異なり、SLAMやnectin 4受容体を発現していない培養細胞(ヒト神経細胞株を含む)でも細胞融合による効率よい伝播を起こした。さらに、膜融合能が亢進したF蛋白質を持つ組換え麻疹ウイルスは、ハムスターに神経病原性を示した。一方、膜融合能の亢進は末梢組織では強い細胞傷害性を示し、ウイルスの増殖に不利に働いた。

D. 考察

SSPEの発症には、麻疹ウイルスマトリックス(M)蛋白質の変異によるウイルス粒子形成不全が重要であると従来考えられていた。しかし、SLAMやnectin 4を発現していない神経細胞では、膜融合能の亢進による神経細胞での効率良いウイルス伝播には、M蛋白質欠損よりもF蛋白質の細胞外領域の変異がより重要であることがわかった。一方、末梢組織では膜融合能の亢進は強い細胞傷害性を示すため、ウイルス増殖が阻害された。それが、普通の麻疹ウイルス臨床分離株においてF遺伝子が高度に保存されている理由だと考えられる。

E. 結論

SSPEの発症には、麻疹ウイルスのM蛋白質

の変異によるウイルス粒子形成不全よりも、F 蛋白質の細胞外領域の変異による膜融合能の亢進とそれに伴うウイルスの効率良い神経細胞間伝播がより重要である。したがって、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る。

[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* 6th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp1042-1069, 2013.

F. 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) Shirogane Y, Watanabe S, Yanagi Y. Cooperation between different RNA virus genomes produces a new phenotype. *Nat Commun* 3:1235, 2012.
- 3) Watanabe S, Shirogane Y, Suzuki SO, Ikegame S, Koga R, Yanagi Y. Mutant fusion proteins with enhanced fusion activity promote measles virus spread in both human neuronal cells and brains of suckling hamsters. *J Virol* 87:2648-2659, 2013.
- 4) Shirogane Y, Watanabe S, Yanagi Y. Cooperation: another mechanism of viral evolution. *Trends Microbiol* 21: 320-324, 2013.

2. 学会発表

- 1) 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.

2) Yanagi Y. Paramyxovirus entry and fusion. The 34th Naito Conference on “Infection, Immunity and their Control for Health: Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine”, Sapporo, October 18, 2012.

3) Watanabe S, Shirogane Y, Suzuki SO, Ikegame S, Koga R, Yanagi Y. Enhanced fusion activity is critical for measles virus spread in the central nervous system. The 2nd Meeting on RNA and Biofunctions-ASIA Study “RNA Biofunctions and Viruses”, Fukuoka, January 11, 2013.

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 the central nervous system. The Third Measles Virus Minisymposium, Les Pensieres-Annecy, September 9-10, 2013.

5) 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.

6) 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, 11.13-15, 2012.

7) 渡辺俊平, 白銀勇太, 大野真治, 柳 雄介. 膜融合能が亢進した麻疹ウイルスは IFN beta を強く誘導する. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 11.10-12, 2013.

G. 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

亜急性硬化性全脳炎に対するリバビリン治療に関する研究

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

亜急性硬化性全脳炎患者に対し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)

本調査に関する説明書・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同意書を作成の上、主治医に調査票へ記入して頂いた。尚、同意書に関しては、主治医により当該施設の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、治療開始できなかった例が1例あった。

SSPEの臨床症状の評価として、NDI臨床症状スコア(以下スコアとする)がある。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。麻疹罹患年齢と調査時のスコアをプロットすると、特に麻疹罹患年齢が1歳未満の症例で、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すると、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ことが分かった。

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、何らかの効果があったと考えられる。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。中には、実際にてんかんの既往があり、SSPEの発症を発作型を変えての再発と捉えて診断に時間がかかった例もあった。

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、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年まで実施された麻疹

ワクチンの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。また、近年予防接種の種類が増えている中、MR ワクチンの接種順位を上げる指導も必要と考えられる。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 に対するリバビルン治療を実施した 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ル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、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。リバビル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. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 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

亜急性硬化性全脳炎の全国サーベイランス調査（サーベイランス 2012）

研究分担者：岡 明 東京大学医学部小児科・杏林大学医学部小児科
研究分担者：愛波秀男 静岡県立こども病院
研究分担者：鈴木保宏 大阪府立母子保健総合医療センター
研究分担者：吉永治美 岡山大学大学院発達神経病態学
研究協力者：中村由紀子 杏林大学医学部小児科

研究要旨 我が国の亜急性硬化性全脳炎（SSPE）の実態については、2007年に行われたサーベイランス2007以降の患者動向の状況が不明であったので、今回サーベイランス2012として5年ぶりにSSPE患者の実態について一次調査および二次調査を行い、現状について評価を行った。【方法】全国の小児神経医療機関709施設、神経内科医療機関761施設に郵送による一次調査を行った。SSPE症例のある64施設に二次調査票を送付し、家族に同意を得られた症例につき二次調査票を回収し結果を検討した。【結果】一次調査は891施設より回答が得られ、回収率60.6%であった。一次調査により全国で88症例の患者が報告され、年齢は10歳から48歳で平均年齢24歳10か月であった。このうち、2007年の全国サーベイランス調査以降の発症者は15名であり、現状では毎年3名程度の発病者があると考えられた。二次調査は33施設より回答が得られ、40症例について臨床情報を得ることができた。性別は男性20例、女性20例、発症年は1972年から2008年で、調査時年齢は13歳から49歳（平均26.9歳）であり、罹病期間15年以上は半数以上であった。平均発病年齢は10歳2か月（2歳6か月から22歳4か月）で、15歳以降の発病が5例、うち1例は成人期に発病していた。初発症状は知的退行が最も多く、歩行障害や失立発作等のJabbour分類による病期Ⅱ期の症状を初期から認める例も多かった。発症後は多くの症例（31例中19例）で1年以内に急速に進行しており、15歳以降の発病者について同様の傾向であった。現在の治療はイノシンプラノベクス内服が最も多く、インターフェロン脳室内・髄腔内投与15例、リバビリン投与4例であり、インターフェロンやリバビリン治療を現在も継続して行なっている患者は限られていた。現在の病気分類ではJabbourⅣ期19例、Ⅴ期15例と進行例が85%であり、医療的ケアも32例（80%）で行われていた。最近の病状は不変あるいは悪化傾向にある患者がほとんどで、多くの患者では罹病期間が長期化する中で、現在の治療法では慢性緩徐進行性にあると考えられた。【結論】今回の調査では、患者総数としてはやや漸減傾向にあることが示唆されたが、新規発症例は2007年の前回調査以降も年間3名程度認められており、今後は現在行われている麻疹対策によりSSPE発病数の減少が認められるかどうかを明らかにすることが重要である。今回の調査では、ほとんど患者は重症で医療的ケアを必要としながら在宅療養をしていることが明らかになった。こうした成人期で長期療養にある患者の生活環境についての調査は今後重要であり、臨床像に合わせ治療や介護、在宅支援などの方法を検討する必要性がある。

A. 研究目的

我が国はこれまで先進国の中で唯一の麻疹流行国とされてきており、平成19年に国は麻疹排除計画を策定することにより平成21年以降は麻疹の総数は激減し、現在ではほぼ国内での水平感染による新規発症は抑制されている。

しかし、麻疹は急性期に重篤な全身症状を来すだけでなく、最も重篤な神経後遺症は慢性期に発症するSSPEである。SSPEは麻疹罹患した後、約10年間潜伏後に発症することから、麻疹がほぼ撲滅された我が国では、今後も当分の間はSSPEの発症は続くものと想定される。

SSPE の患者数などの実態調査は、1990 年から 2007 年までに 3 回の全国規模での調査が行われている。これによれば我が国での患者総数は約 100~200 名程度と推測がされてきた。

①1990 年二瓶健次等は、当時のイノシプレックス-SSPE 研究会での症例データをもとに調査を行い、151 名(男 66 名、女 59 名)と報告している。

②2003 年に中村好一、飯沼一字等は特定疾患治療研究事業の臨床個人調査票を用いた調査を行い患者数は 125 名(男 66 名、女 59 名)と報告している(脳と発達 35:316, 2003)。

③2007 年に本研究班による全国調査サーベイランス 2007 では、SSPE 特異的な抗ウイルス薬であるイノシプラノベクス処方医療機関を対象全国調査を行い 118 名(男 65 名、女 53 名)と報告をしている。(飯沼一字・細矢光亮等、平成 21 年度プリオン病および遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班報告書)。サーベイランス 2007 調査時点での患者さんの年齢は 4~39 歳(平均 21 歳 8 か月)で成人が多く経過の慢性化が指摘されていた。この調査結果からは、本疾患の深刻な経過予後と厳しい実態であることが明らかとされ、現在進められているリハビリ治療など、より有効な治療法の必要性が示された。

現在、我が国の麻疹撲滅の一環として麻疹については全数調査対象となり、発症数が把握されている。一方で、重症である SSPE については報告体制が不十分であり、小児慢性特定疾患事業や特定疾患治療事業を通じて報告される情報のみとなっている。この 2 つの事業は対象年齢が異なっており、また小児慢性特定疾患事業では年齢によって制度の利用率が変化するため、必ずしも現状では実態を把握するには最適であるとは言えない。さらに、臨床情報を記載した調査票の記載内容などは、不十分な記載であったり、また中央への入力十分でないなど、SSPE の患者情報等について全国的なデータを得られる環境にない。

本研究班によるサーベイランス 2007 以降の SSPE 患者の実態については不明であり、厚生労働行政などに役立てる基礎資料もなく、例え

ば麻疹自体が減少している今日、新規発症数も不明である。こうしたことから、医学的および医療政策の基礎なる資料を得ることを目的に、本研究班では SSPE の実態調査を 2012 年に行った。

B. 研究方法

サーベイランス調査として回答率を上げるために、患者数と新規発症患者を把握することを目的として一次調査と、詳細な二次調査とに分けて調査を行った。

【一次調査】

一次調査では、診療中の患者数、性別、生年月日、年齢、2007 年以降の発症者数を調査した。また、二次調査についても、過去の調査内容を含め検討し、調査内容の整理を行い、調査票を作成した(図 1 a)。

【調査対象】

全国の小児科小児神経科医療機関 710 施設(療育施設含む)および神経内科医療機関 761 施設の合計 1471 施設に一次調査票を送付した。

【二次調査】

一次調査にて現在診療中の患者ありと回答した医療施設の中で、二次調査可能との回答を得た医療機関に対し二次調査票を送付した(図 1 b, c)。

前回のサーベイランス時にある程度詳細な情報を報告すみのケースについては、簡便なその後の変化についての記載のみを求めることとし、また、各サーベイランス委員を介して直接医療機関に二次調査への協力を依頼するなどして協力数を確保するよう努力した。

(倫理面への配慮)

本調査については杏林大学倫理委員会に申請し平成 23 年 11 月 28 日承認を受けた。

C. 研究結果

1) 一次調査結果

①回答率

小児科小児神経科関連施設(療育施設を含む)492 施設、神経内科 404 施設の合計 896 施設から回答があり、発送数 1471 施設に対し回答率は 60%であった。なお、当初回答がなかったが前回調査で患者を診療していた一部の医療

機関には再度郵送にて依頼を行い協力を要請した。

②患者数、平均年齢

一次調査では合計 88 名の患者について把握することができた。年齢分布としては 10 歳から 48 歳で平均年齢 24 歳 10 か月であった(図 2 一次調査患者年齢分布)

③新規発症患者数

2007 年の前回調査以降の新規発症患者数も記載からは、前回調査以降 15 名の新規発症の記載があった。このことから依然として年間 3 名程度の発症があるものと考えられる。

2) 二次調査結果

①調査対象数

一次調査で現在患者を診療しているほぼすべての医療機関が二次調査への協力が可能との回答が得られたため、64 医療機関に二次調査票を送付した。患者家族の書面による同意が得られ回答を得ることができたのは、64 施設中回答が得られたのは 33 施設で回収率は 51.5%であった。患者数としては 40 名分の調査票を回収することができた。

②患者発症年齢、罹病期間

平均発症年齢は 10 歳 2 か月で、15 歳以降の発症が 5 例、うち 1 例は成人期に発症していた(図 3 発病年齢と二次調査時患者年齢)。

また、罹病期間については 15 年以上が約半数と長期化していた。(図 4 罹病期間と年齢)。

③麻疹の罹患時期と潜伏期間

32 名では、麻疹の発症時年齢と SSEP の発症年齢が明かであり、潜伏期間が推測可能であった(図 5 麻疹罹患年齢と潜伏期間 図 6 麻疹罹患と発病年齢)。麻疹の罹患時期は全例 6 歳未満であり、特に 2 歳未満に集中していた。5 歳台が麻疹罹患後の SSPE 発症の臨界時期である可能性がある。罹患年齢と潜伏期間の関係は特に認められなかったが、2~5 歳で発症した早期例は全例が 1 歳未満の発症であった。

麻疹を罹患した年が明らかな 31 例について傾向を見ると、2002 年以降に罹患して発症した

例はいなかった。潜伏期間の平均が約 10 年であり、今後も発症の動向を注意して観察する必要がある。(図 7 麻疹を罹患した年)

④発症年毎患者数

一次調査の結果から、2000 年以降も年間 3 名程度の発症患者が認められていた。2007 年の調査の段階で、1995 年以前が 5~10 例/年と想定され、1995 年以降は 1~5 例/年程度と考えられていた。従って 2007 年以降もほぼ同様の新規発症例を年間認めている。

二次調査回答のあった 40 名の中でも、現時点では、特に発症数が減少している傾向は認められなかった(図 8 発病年毎患者数(人))。

⑤初発症状(図 9)

初発症状として記載の中では、知的退行が最も多く、次いで歩行障害であった。Jabbour 分類による病期分類(図 10)では、I 期に性格変化や知的退行があり、その後 II 期以降に失立発作や歩行障害などの運動症状を呈すると示されている。初発症状の記載としては II 期の症状の記載も多かった。

⑥発症後の疾患の進行

発症後の経過や進行についての記載より、発病後の経過を医療的ケアなどの必要となるまでの時期によって分類した(図 11 発病後の経過)。ほとんどの症例(31 例中 19 例)が 1 年以内に急激に進行しており、発病時の進行度が強い傾向が認められた。特に麻疹罹患年齢との関連は認められなかった。

⑦重症度(Jabbour 分類による病期分類)

SSPE による進行度の分類として一般的な Jabbour 分類にて現在の重症度を評価した。III 期以上はほぼ全介助が必要であり、特に IV 期は筋緊張亢進やミオクローヌスなどの神経症状が強く患者の苦痛度も高い時期と考えられる。実際に、IV 期以降の筋緊張コントロールの困難さに言及する記載が散見された。また、症状の進行に伴い、医療ケアや看護負担についての記載も多くみられた。

これまでに回答のあった 40 人中、比較的軽症であったのは、病前まで回復した 1 名、II 期 3 名