

# HHV-6 関連熱性けいれん患者における 血清 MMP-9 および TIMP-1 の検討

氏名 橘高 節明

所属 山口大学大学院医学系研究科  
情報解析医科学専攻（小児科学分野）

平成 25 年 1 月

1. 要旨	1
2. 研究の背景	1
3. 目的	1
4. 方法	2
(1) 対象	2
(2) 方法	2
(3) 解析	3
5. 結果	4
6. 考察	8
7. 結語	9
8. 謝辞	10
9. 参考文献	11

## 1. 要旨

ヒトヘルペスウイルス-6 (HHV-6) は、突発性発疹のほか、時として熱性けいれんの原因になる。しかし、HHV-6 感染に関連する熱性けいれんの発生機序はいまだ不明である。本研究では、マトリックスメタロプロテアーゼ-9 (MMP-9) 及び HHV-6 感染乳幼児における組織性マトリックスメタロプロテイナーゼ-1 阻害因子 (TIMP-1) の血清中濃度を調査した。MMP-9 と TIMP-1 のいずれの血清中濃度も、HHV-6 感染群では対照群に比べて有意に高かった。血清 TIMP-1 濃度は、血清が熱性けいれん非発症群に比べて熱性けいれん発症群で有意に高かった。血清中の MMP-9 と TIMP-1 の濃度比は、熱性けいれん発症群で有意に低かった。HHV-6 感染群では、MMP-9 濃度と白血球 (WBC) 数、並びに血清 TIMP-1 濃度と WBC 数の間に正の相関が認められた。HHV-6 感染群ではまた、HHV-6 DNA 量と MMP-9/TIMP-1 濃度比も正の相関関係にあった。結論として、HHV-6 感染乳幼児では、MMP-9 及び TIMP-1 の血清中濃度が高いことが血液脳関門の機能不全を誘発し、それが熱性けいれんの原因になっていると考えられる。

## 2. 研究の背景

ヒトヘルペスウイルス-6 (HHV-6) は、乳幼児に多発する感染症として知られる突発性発疹の原因病原体の一つである [1, 2]。突発性発疹は、40°C にも達する急な発熱後、2~4 日で急速に下熱するが同時に紅斑性斑状丘疹状皮疹が発現して 1~3 日ほど持続する [3]。

HHV-6 に感染中の乳幼児は、時に熱性けいれん (FS) を発症することがある [4]。しかし、HHV-6 感染と関連する熱性けいれんの発症機序はいまだ不明である。マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) は、細胞外マトリックス蛋白の分解に関与する酵素ファミリーの一つである [5]。MMP は、胚形成、創傷治癒、炎症のほか、関節炎、心血管疾患、肺疾患、及び癌の発生など、正常な過程にも病理過程にも重要な役割を果たすことが報告されている [2]。MMP-9 は、脳微小血管内皮細胞の基底膜の主要成分である。コラーゲン IV を分解し、細胞の組織内遊走や血液脳関門 (BBB) の通過促進する [6]。MMP の活動は、特定の細胞性マトロプロテイナーゼ阻害因子 (TIMP) によって制御される [7]。このような阻害因子の一つである TIMP-1 は、MMP-9 に対して高い結合活性を有する [8-10]。

## 3. 目的

我々は HHV-6 感染に関連する熱性けいれんの発症において MMP-9 と TIMP-1 が果たす役割を検討するために、MMP-9 及び TIMP-1 の血清中濃度を測定し、HHV-6 に感染した熱性けいれん発症児と非発症児の間で比較した。さらに、HHV-6 感染児における MMP-9 及び TIMP-1 の血清中濃度と HHV-6 DNA 量の相関性を検討した。

#### 4. 方法

##### (1) 対象

本研究に登録した乳幼児の親からインフォームド・コンセントを取得した。本研究の実施計画は、山口大学付属病院の施設内審査委員会による承認を得た（承認番号：H22-40）。2008年1月から2010年12月までに突発性発疹を発症して当院又は当院の6つの提携病院の1つを受診した乳幼児29名から血清標本を採取した。突発性発疹の診断規準は、特徴的な臨床症状と血清中HHV-6 DNAの検出とした。被験児は男児16名、女児13名で、年齢は生後6ヵ月から3年まで（平均1.2歳、中央値1.0歳）であった。発熱の症状が現れた日を発病の1日目と見なした。中央値で発病2日目（値域0-5日目）に各被験児から血清標本を採取した。FS発症群では、全ての標本採取をけいれん発症後に行った。

本研究では、HHV-6感染群を熱性けいれん発症群FS(+)（11名）と非発症群（FS(-)）（18名）の2群に分けた。対照群は健康な乳幼児24名（男児12名及び女児12名、生後1-3年、中央値1.5年）とした（表1）。

FS発症児のうち3名にMRIを施行したが、異常所見は無かった。脳波検査やSPECTは行わなかった。

**Table 1**  
Clinical data for subjects.

	Infants with HHV-6 infection	Infants with FS during HHV-6 infection	Infants without FS during HHV-6 infection	Controls
Number	29	11	18	24
Age (year, median, range)	1.08, 0.50-3.13	1.40, 0.69-2.19	0.87, 0.50-3.13	1.41, 0.35-3.28
Gender (male:female)	16:13	8:3	8:11	12:12
Sampling day (median, range)	2, 0-5	1, 0-3	2, 0-5	-
Day of onset of FS (median, range)	-	1, 0-3	-	-
WBC (/ $\mu$ l, median, range)	6360, 2100-15,100	8600, 4600-15,000	6150, 2100-15,100	-
CRP (mg/dl, mean, range)	0.72, 0.03-4.71	0.33, 0.03-1.54	0.37, 0.04-4.71	-

The day of onset fever was considered to be day 1 of illness. HHV-6 = human herpesvirus-6; FS = febrile seizures.

##### (2) 方法

###### MMP-9 及び TIMP-1 の血清中濃度の測定

MMP-9 及び TIMP-1 の血清中濃度の測定は、ELISA キット (MMP-9 ELISA キットは Amersham 社製、TIMP-1 ELISA キットは米国 R&D システムズ社製) を使用し、それぞれメーカーの指示に従って行った。この MMP-9 測定法では、MMP-9 の潜在型及び活性型のいずれの MMP-9 も認識できた。測定限界値は、MMP-9 で 2.5 ng/mL、TIMP-1 で 2.4 ng/mL であった。

###### HHV-6 DNA の定量化

HHV-6 DNA を定量化するために、Quanti-Tect 多重 PCR キット (ドイツ Qiagen 社) 及び Mx3000P qPCR 装置 (米国 Stratagene 社) を使用してリアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) アッセイを行った [11-13]。ウイルス DNA 量を血清 1 mL あたりのウイルス

コピー数として計算した。最低検出量は1反応あたり2コピーであった。

### (3) 解析

突発性発疹発症群と対照群の有意差をマン・ホイットニーのU検定により分析した。相関の計算にはスピアマンの順位相関係数検定を採用した。有意水準は $P<0.05$ とした。分析及び計算にはSPSS-12.0（米国SPSS社）を使用した。

## 5. 結果

HHV-6に関連する熱性けいれんの発生に果たすMMP-9及びTIMP-1の役割を検討するために、まず、HHV-6感染乳幼児と対照乳幼児でMMP-9及びTIMP-1の血清中濃度を測定した（図1）。血清MMP-9濃度は対照群（中央値81.8 ng/mL、値域32.1-211.9 ng/mL）に比べてHHV-6感染群（中央値232.4 ng/mL、値域144.6-342.9 ng/mL）有意に高かった（ $P<0.05$ ）。血清TIMP-1濃度は、対照群（中央値248.7 ng/mL、値域164.6-321.6 ng/mL）に比べてHHV-6感染群（中央値633.3 ng/mL、値域135.9-1669.7 ng/mL）で有意に高かった（ $P<0.05$ ）。MMP-9/TIMP-1濃度比については、HHV-6感染群（中央値0.36、値域0.09-1.47）と対照群（中央値0.33、値域0.10-0.78）の間に有意差が認められなかった（ $P=0.118$ ）。

また、HHV-6に感染し熱性けいれん（FS）を発症した乳幼児と発症していない乳幼児でMMP-9及びTIMP-1の血清中濃度を比較した（図2）。血清TIMP-1濃度は、FS非発症群（中央値404.5 ng/mL、値域135.9-1293.4 ng/mL）に比べてFS発症群（中央値942.6 ng/mL、値域403.7-1669.7 ng/mL）で有意に高かった（ $P<0.05$ ）。MMP-9/TIMP-1濃度比は、FS非発症群（中央値0.52、値域0.22-1.47）に比べてFS発症群（中央値0.29、値域0.22-1.47）で有意に低かった（ $P<0.05$ ）。他方、血清MMP-9濃度についてはFS発症群（中央値232.4 ng/mL、値域155.6-294.8 ng/mL）とFS非発症群（中央値232.8 ng/mL、値域144.7-342.9 ng/mL）の間に有意差は無かった（ $P=0.774$ ）。

最後に、HHV-6感染群の中で、年齢、白血球（WBC）数、C反応性タンパク質（CRP）、HHV-6 DNA量、MMP-9及びTIMP-1の血清中濃度、及びMMP-9/TIMP-1濃度比の相関を検討した。その結果、血清MMP-9濃度と白血球数の間に有意な相関が認められた（図3）。又、血清TIMP-1濃度と白血球数も有意に相関していた（図4）。さらに、HHV-6感染乳幼児におけるHHV-6 DNA量とMMP-9/TIMP-1濃度比の間にも有意な相関が観察された（図5）。HHV-6 DNA量とMMP-9濃度やTIMP-1濃度との間に有意な相関は認められなかった（データ不詳）。熱性けいれんの発症群と非発症群のいずれにおいても、発症日と白血球数やウイルスコピー数との間に有意な相関は認められなかった（図6及び7）。

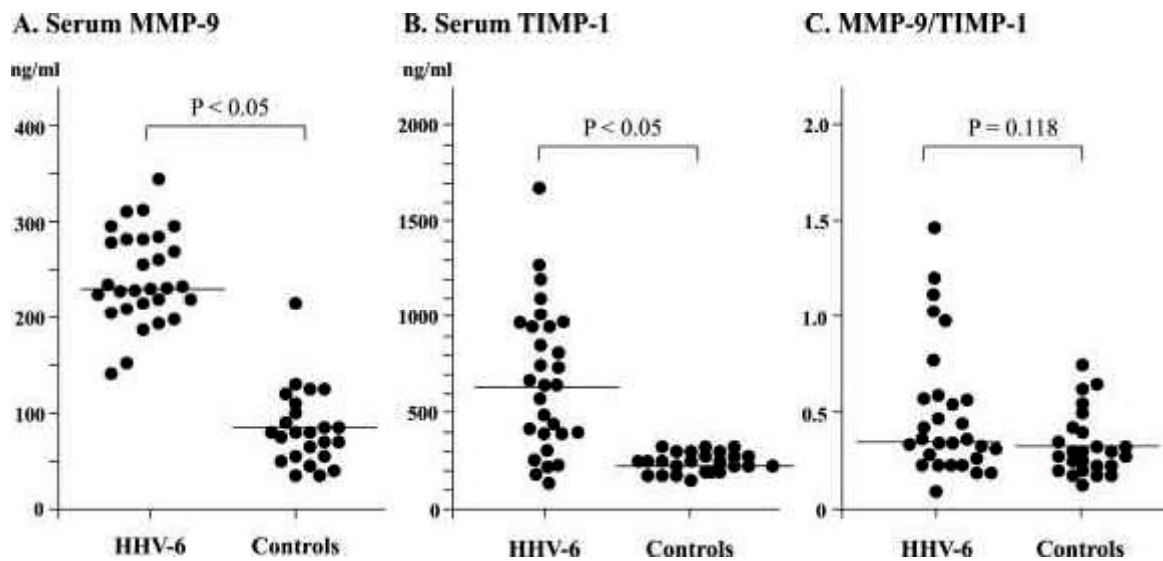


図 1. HHV-6 感染群 (29 名) と対照群における血清中の MMP-9 濃度 (A)、TIMP-1 濃度 (B)、MMP-9/TIMP-1 濃度比。水平線は中央値。

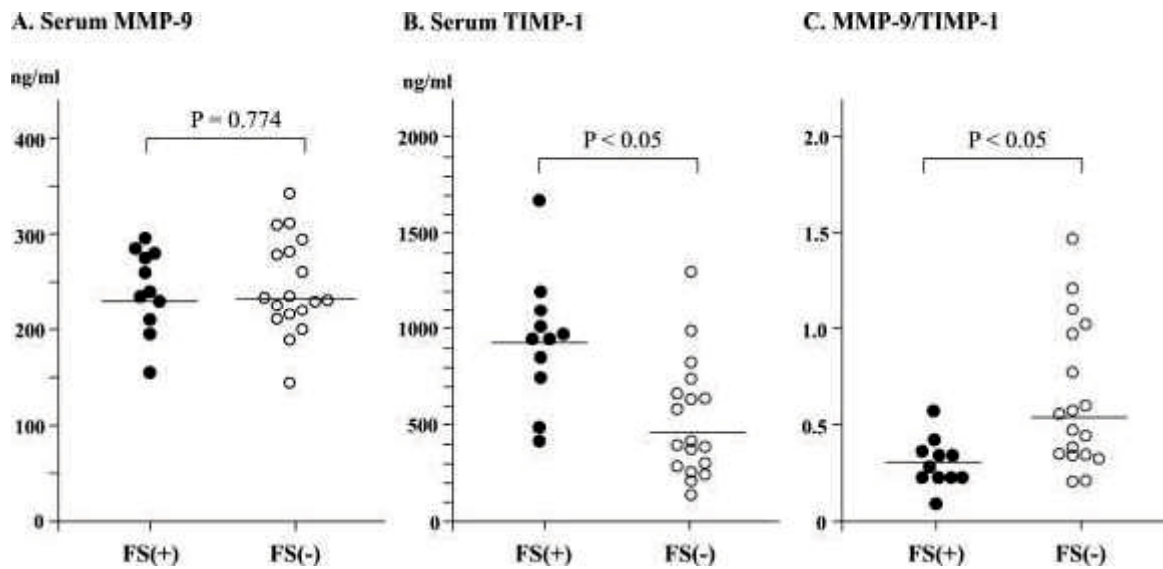


図 2. HHV-6 感染による FS 発症群 (FS(+)) と非発症群 (FS(-)) における MMP-9 (A)、TIMP-1 (B)、MMP-9/TIMP-1 濃度比 (C)。FS(+)は、熱性けいれんを発症した HHV-6 感染乳幼児 (11 名)、FS(-)は熱性けいれんを発症していない HHV-6 感染乳幼児 (18 名)。水平線は中央値。

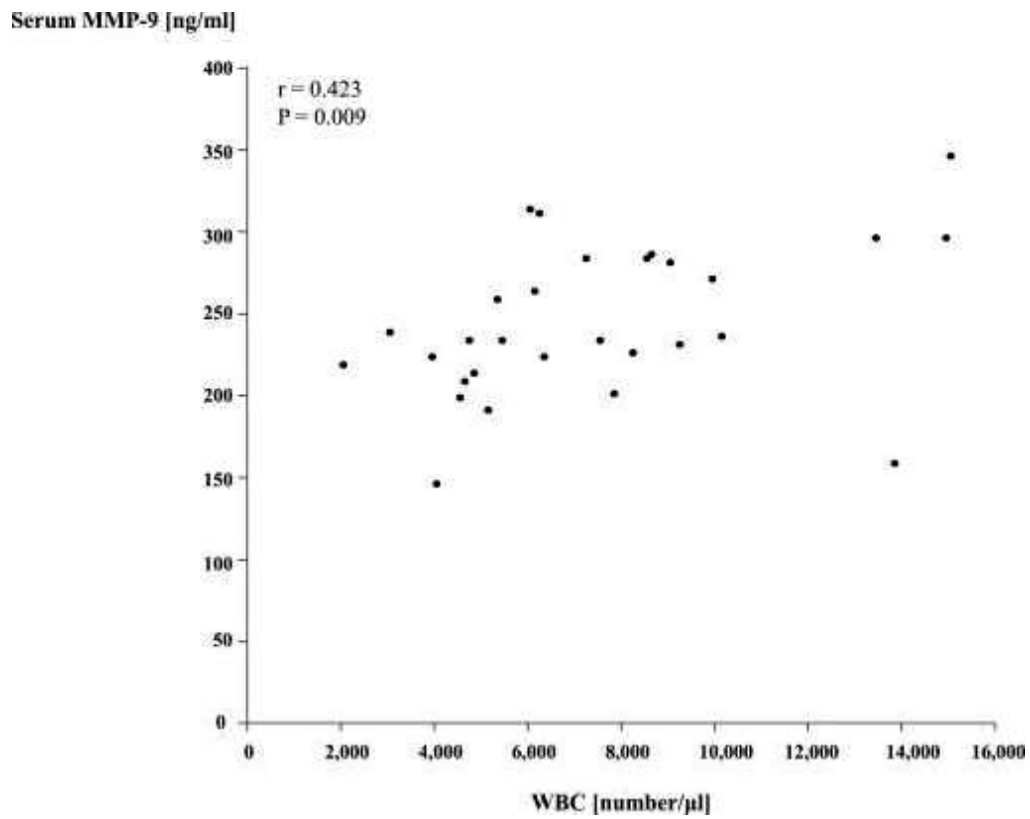


図 3. HHV-6 感染乳幼児における血清 MMP-9 濃度と白血球数の相関。”r” はスピアマン係数

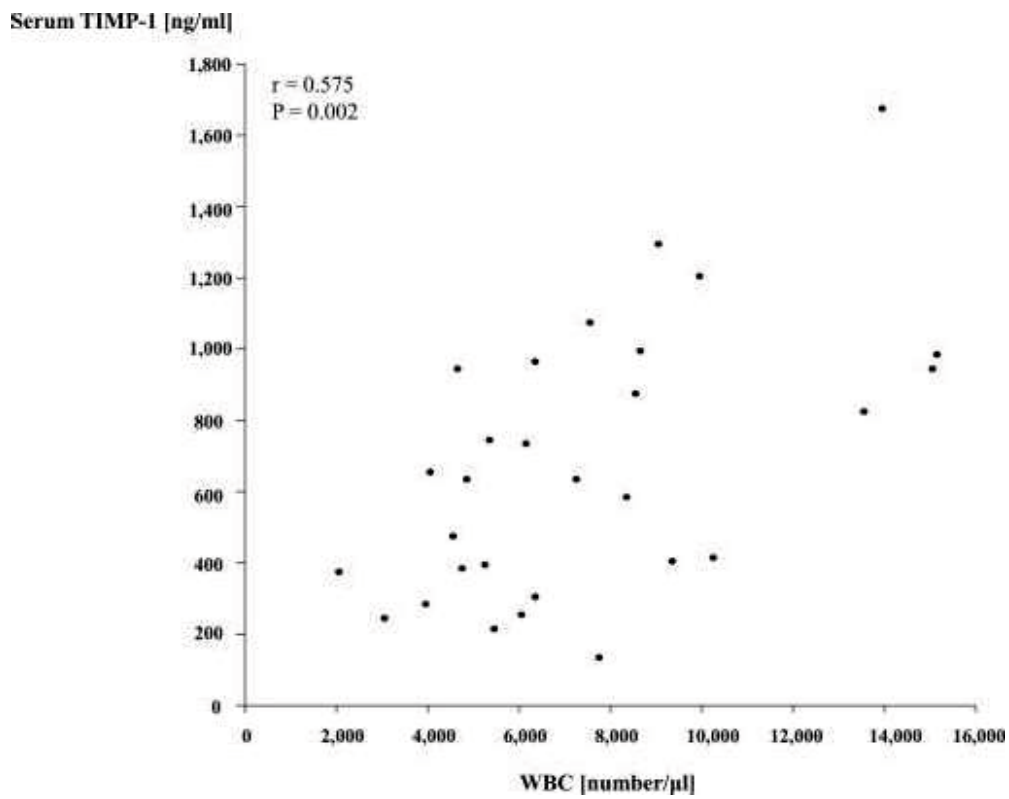


図 4. HHV-6 感染乳幼児における血清 TIMP-1 濃度と白血球数の相関。”r” はスピアマン係数

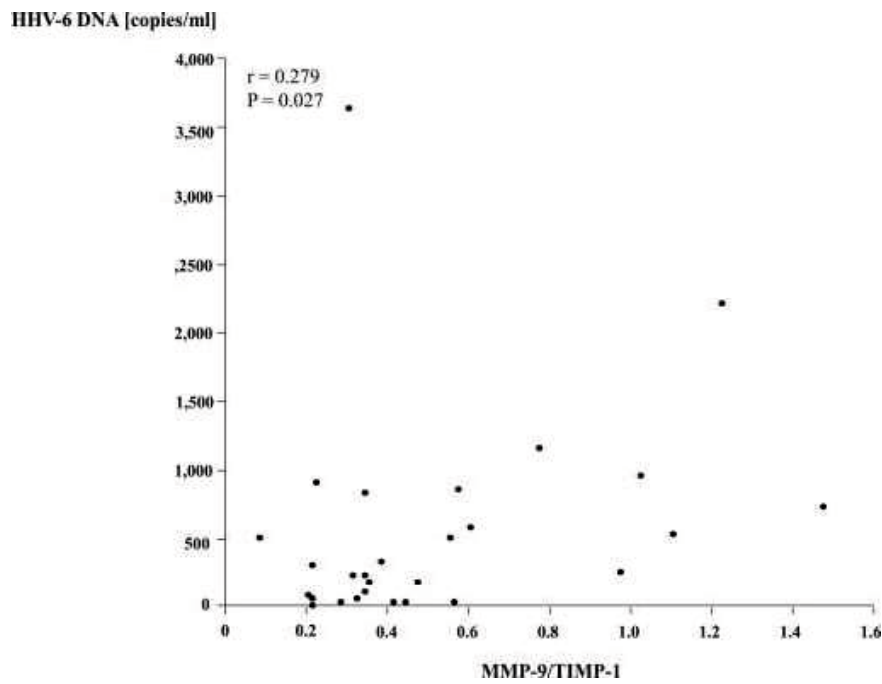


図 5. HHV-6 感染乳幼児における HHV-6 DNA 量と MMP-9/TIMP-1 濃度比の相関。”r” はスピアマン係数

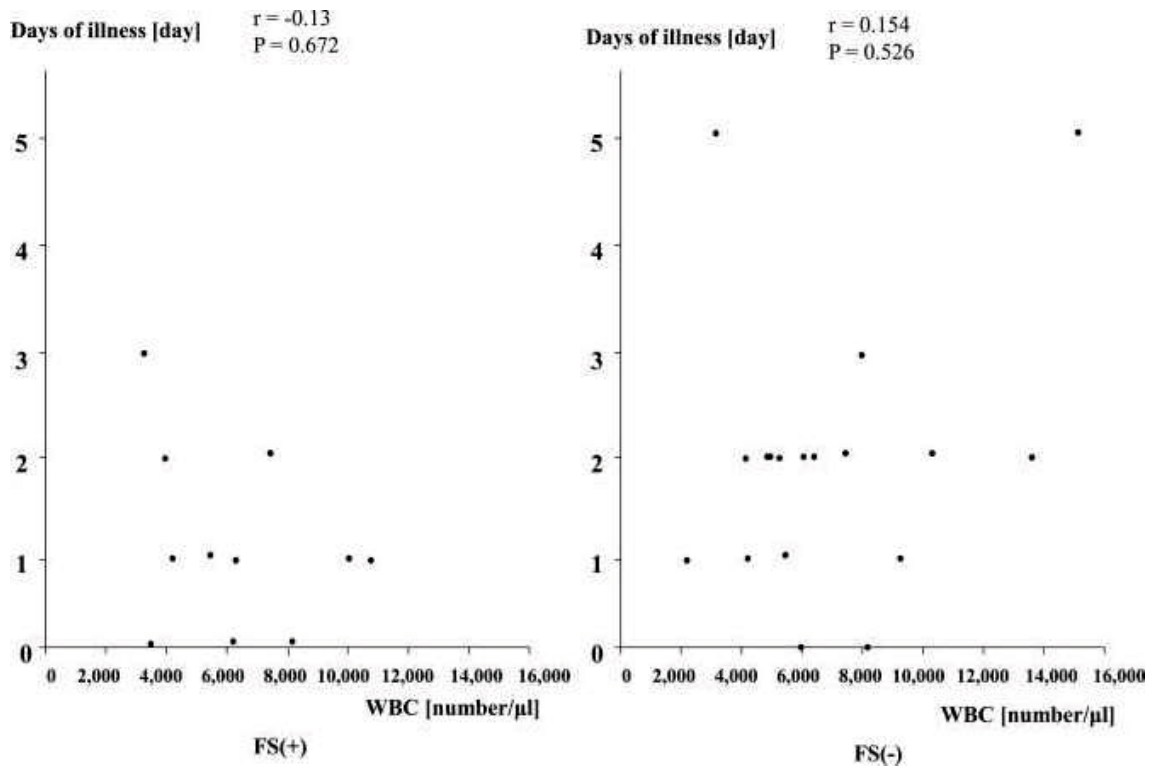


図 6. HHV-6 感染乳幼児の熱性けいれん発症群と非発症群における発症日と白血球数の相関。”r” はスピアマン係数



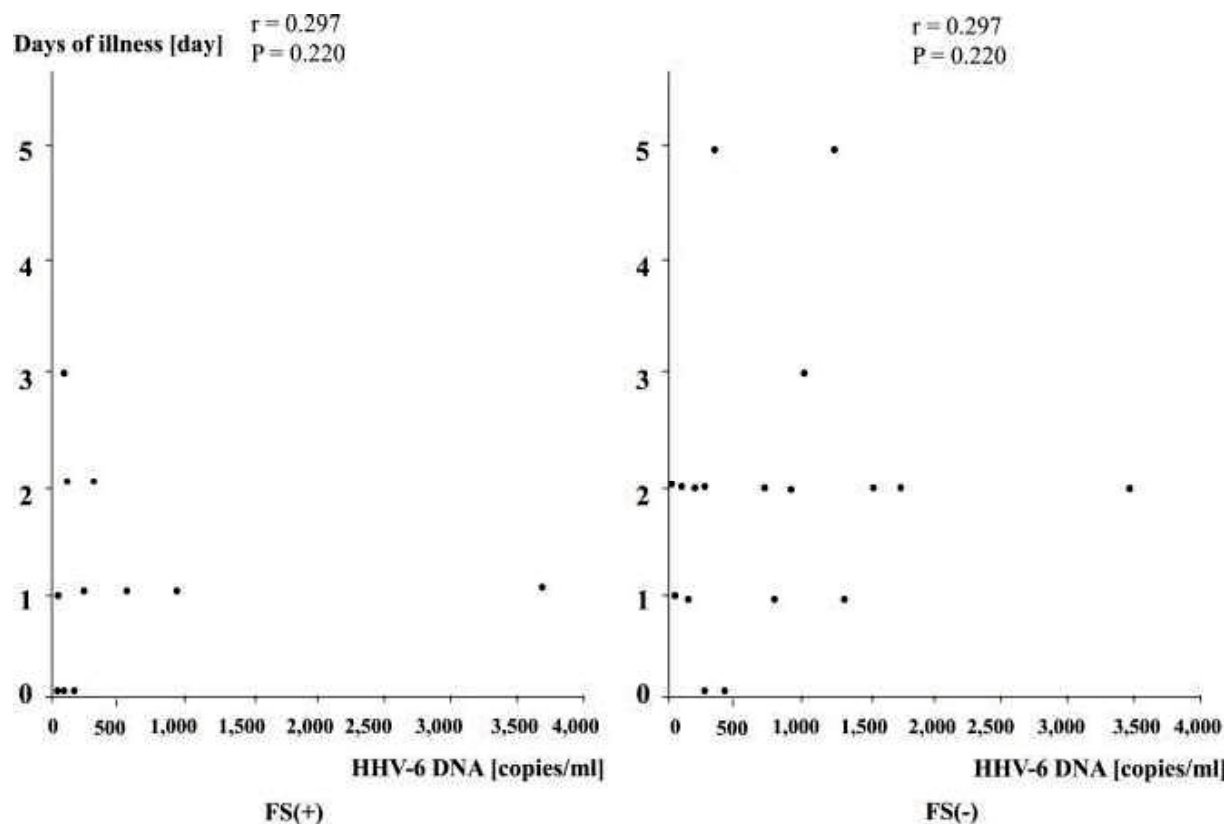


図7. HHV-6感染乳幼児の熱性けいれん発症群と非発症群における発症日とHHV-6 DNA量の相関。”  
r” はスピアマン係数

## 6. 考察

HHV-6 に関連する神経系の合併症の病因はいまだ不明である。本研究の結果、HHV-6 感染症における熱性けいれんの発生機序に細胞外マトリックス制御因子 MMP-9 及び TIMP-1 が関与しているであろうことを、我々は示した。

BBB による脳の防御機能にとって MMP-9 と TIMP-1 のバランスが重要であると考えられ[9, 14]、MMP-9/TIMP-1 濃度比の上昇は BBB の機能不全を誘発する可能性がある。既に我々は、急性播種性脳脊髄炎 (ADEM) [15]、亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) [16, 17]、インフルエンザ関連脳症[18]、及び遷延性熱性けいれん後の急性脳症、脳症を伴う溶血性尿毒症症候群[20]、新生児仮死[21]、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎[22]など、他の神経疾患患者における MMP-9 及び TIMP-1 の血清濃度を報告している。我々は過去の研究で、MMP-9 と TIMP-1 の不均衡がそうしたさまざまな神経疾患の発生病理やその転帰に影響する可能性を指摘した。これまでのところ、HHV-6 感染に関連する熱性けいれんと血清中の MMP-9 及び TIMP-1 の濃度の関連性を分析する研究は行われていない。

本研究の結果、HHV-6 感染乳幼児では MMP-9 及び TIMP-1 の血清中濃度が上昇することが明らかになった。おそらく、HHV-6 感染が多少なりとも BBB のダメージを誘発しているのではないかと考えられる。他の研究では、HHV-6 脳症患者で正常対照群に比べては血清 MMP-9 濃度が高いが、一方で、脳脊髄液 (CSF) では MMP-9 が検出されなかった[28]。本研究のデータによれば、血清 TIMP-1 濃度は FS 非発症群に比べて FS 発症群で有意に高かった。又、FS 発症乳幼児では、非発症児に比べて MMP-9/TIMP-1 濃度比が低かった。過去の研究レビューによれば、TIMP-1 は MMP を阻害するだけでなく、中枢神経系の損傷や炎症から神経を保護する役割も果たしている[23]。本研究の結果によると、HHV-6 感染中に熱性けいれんを発症し、血清 TIMP-1 濃度の低下及び MMP-9/TIMP-1 濃度比の低下を来している乳幼児では、熱性けいれんを発症していない乳幼児に比べて BBB 及び神経細胞の損傷が著しいと言える。

本研究では、白血球数と MMP-9 又は TIMP-1 の血清中濃度との間に正相関が認められた。白血球は、MMP-9 [24, 25] 及び TIMP-1 [26] を産生する。さらに、血清 MMP-9 濃度の上昇が血清 TIMP-1 濃度の上昇を誘発することが報告されている[27]。また、HHV-6 DNA 量と MMP-9/TIMP-1 濃度比も正相関していた。血液中の HHV-6 が BBB の機能不全と関連していると可能性は考えられるが、その機序は不明である。

本研究にはいくつかの限界がある。HHV-6 感染乳幼児の脳脊髄液 (CSF) における MMP-9 及び TIMP-1 の濃度は測定しなかった。これは、突発性発疹を発症した乳幼児から CSF の標本を採取することは倫理的に問題があるからである。本研究では、患児から 1 検体しか採取できなかった。今後は、連続標本を使用した研究を行って HHV-6 感染児における熱性けいれんの発生機序を確認するために有用であると考えられる。

## 7. 結語

本研究の結果は、MMP-9 及び TIMP-1 の血清中濃度は HHV-6 感染中における熱性けいれんの発生に重要な役割を果たしていることを示唆している。HHV-6 感染は BBB の機能不全を誘発し、ひいては熱性けいれんの原因となる。

## 8. 謝辞

終始熱心なご指導を頂いた小児科学分野 准教授の長谷川俊治先生、鼓ヶ浦こども医療福祉センターの市山高志先生に感謝の意を表します。

ウイルス定量分析にあたり、名古屋大学小児科の伊藤嘉規先生にはひとかたならぬお世話になりました。ありがとうございました。

症例の検体採取にご協力頂いた、山口赤十字病院の大淵典子先生、下関市民病院の河野祥二先生、長門総合病院の青木宜治先生、下関市立済生会豊浦病院の中司謙二先生、鈴木小児科医院の鈴木英太郎先生には貴重な検体をご提供いただき心より感謝いたします。

## 9. 参考文献

1. Asaoka, K., Shoji, H., Nishizaka, S., Ayabe, M., Abe, T., Ohori, N. et al. Non-herpetic acute limbic encephalitis: cerebrospinal fluid cytokines and magnetic resonance imaging findings. *Intern Med.* 2004; 43: 42-48
2. Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., and Chakraborti, T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem.* 2003; 253: 269-285
3. Yoshikawa, T. and Asano, Y. Central nervous system complications in human herpesvirus-6 infection. *Brain Dev.* 2000; 22: 307-314
4. Millichap, J.G. and Millichap, J.J. Role of viral infections in the etiology of febrile seizures. *Pediatr Neurol.* 2006; 35:165-172
5. Chandler, S., Miller, K.M., Clements, J.M., Lury, J., Corkill, D., Anthony, D.C. et al. Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J Neuroimmunol.* 1997; 72: 155-161
6. Lukes, A., Mun-Bryce, S., Lukes, M., and Rosenberg, G.A. Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases. *Mol Neurobiol.* 1999; 19: 267-284
7. Murphy, G. and Knäuper, V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the “hemopexin” domain?. *Matrix Biol.* 1997; 15: 511-518
8. Krizanac-Bengez, L., Hossain, M., Fazio, V., Mayberg, M., and Janigro, D. Loss of flow induces leukocyte-mediated MMP/TIMP imbalance in dynamic in vitro blood-brain barrier model: role of proinflammatory cytokines. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006; 291: 740-749
9. Sellner, J. and Leib, S.L. In bacterial meningitis cortical brain damage is associated with changes in parenchymal MMP-9/TIMP-1 ratio and increased collagen type IV degradation. *Neurobiol Dis.* 2006; 21: 647-656
10. Forster, C., Kahles, T., Kietz, S., and Drenckhahn, D. Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral vascular endothelial cell line cEND. *J Physiol.* 2007; 580: 937-949
11. Kimura, H., Hoshino, Y., Hara, S., Sugaya, N., Kawada, J., Shibata, Y. et al. Differences between T cell-type and natural killer cell-type chronic active Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis.* 2005; 191: 531-539
12. Wada, K., Kubota, N., Ito, Y., Yagasaki, H., Kato, K., Yoshikawa, T. et al. Simultaneous quantification of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and human herpes virus 6 DNA in samples from transplant recipients by multiplex real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 1426-1432
13. Wada, K., Mizoguchi, S., Ito, Y., Kawada, J., Yamauchi, Y., Morishima, T. et al. Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of herpes simplex virus,

- human herpesvirus 6, and human herpesvirus 7. *Microbiol Immunol.* 2009; 53: 22-29
14. Yamamoto, S. and Nguyen, J.H. TIMP-1/MMP-9 imbalance in brain edema in rats with fulminant hepatic failure. *J Surg Res.* 2006; 134: 307-314
  15. Ichiyama, T., Kajimoto, M., Suenaga, N., Maeba, S., Matsubara, T., and Furukawa, S. Serum levels of matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor (TIMP-1) in acute disseminated encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2006; 172: 182-186
  16. Ichiyama, T., Siba, P., Suarkia, D., Takasu, T., Miki, K., Kira, R. et al. Serum levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 in subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurol Sci.* 2007; 252: 45-48
  17. Ichiyama, T., Matsushige, T., Siba, P., Suarkia, D., Takasu, T., Miki, K. et al. Cerebrospinal fluid levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in subacute sclerosing panencephalitis. *J Infect.* 2008; 56: 376-380
  18. Ichiyama, T., Morishima, T., Kajimoto, M., Matsushige, T., Matsubara, T., and Furukawa, S. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 in influenza-associated encephalopathy. *Pediatr Infect Dis J.* 2007; 26: 542-544
  19. Suenaga, N., Ichiyama, T., Kubota, M., Isumi, H., Tohyama, J., and Furukawa, S. Roles of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 in acute encephalopathy following prolonged febrile seizures. *J Neurol Sci.* 2008; 266: 126-130
  20. Shiraishi, M., Ichiyama, T., Matsushige, T., Iwaki, T., Iyoda, K., Fukuda, K. et al. Soluble tumor necrosis factor receptor 1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hemolytic uremic syndrome with encephalopathy. *J Neuroimmunol.* 2008; 196: 147-152
  21. Sunagawa, S., Ichiyama, T., Honda, R., Fukunaga, S., Maeba, S., and Furukawa, S. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in perinatal asphyxia. *Brain Dev.* 2009; 31: 588-593
  22. Ichiyama, T., Takahashi, Y., Matsushige, T., Kajimoto, M., Fukunaga, S., and Furukawa, S. Serum matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels in non-herpetic acute limbic encephalitis. *J Neurol.* 2009; 256: 1846-1850
  23. Chao, C. and Ghorpade, A. Production and roles of glial tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in human immunodeficiency virus-1-associated dementia neuroinflammation: a review. *Am J Infect Dis.* 2009; 5: 314-320
  24. Coussens, L.M., Tinkle, C.L., Hanahan, D., and Werb, Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell.* 2000; 103: 481-490
  25. Kelly, E.A.B., Busse, W.W., and Jarjour, N.N. Increased matrix metalloproteinase-9 in the airway after allergen challenge. *Am J Respir Crit Care*

- Med. 2000; 162: 1157-1161
26. Johnatty, R.N., Taub, D.D., Reeder, S.P., Turcovski-Corrales, S.M., Cottam, D.W., Stephenson, T.J. et al. Cytokine and chemokine regulation of proMMP-9 and TIMP-1 production by human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol.* 1997; 158: 2327-2333
27. Brew, K., Dinakarpandian, D., and Nagase, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1477: 267-283
28. Shinji, K., Yoshinori, I., Rieko, O., Ayako, S., Kensei, G., Tsuneo, M. et al. Comparison of the levels of human herpesvirus 6 (HHV-6) DNA and cytokines in the cerebrospinal fluid and serum of children with HHV-6 encephalopathy. *J Med Virol.* 2010; 82: 1410-1415