

＜シンポジウム 20—4＞難治性神経感染症 update

進行性多巣性白質脳症

水澤 英洋¹⁾ 岸田 修二²⁾ 西條 政幸³⁾ 雪下 基弘⁴⁾ 穴戸-原由紀子⁵⁾
 澤 洋文⁶⁾ 長嶋 和郎⁷⁾ 奴久妻聡一⁸⁾ 山田 正仁⁹⁾

(臨床神経 2011;51:1051-1057)

Key words : 進行性核上性麻痺, JCウイルス, ヒト免疫不全ウイルス, ナタリツマブ, メフロキン

はじめに

進行性多巣性白質脳症 (Progressive multifocal leukoencephalopathy : PML) とは, ヒトポリオーマウイルス属二重鎖環状 DNA ウイルスである JC ウイルス (JCV) による中枢神経感染症の 1 つで名前の通り進行性の多巣性脱髄病変を生じる¹⁾²⁾. JCV による中枢神経障害には, PML の他には JCV 髄膜炎, JCV 脳症, JCV 小脳顆粒細胞障害が知られている³⁾⁴⁾. ふつう小児期に呼吸器からの吸入, 食物, 飲料水を介して初期感染後, ほとんどは無症候で腎臓や骨髄などに潜伏感染しており (原型 JCV), 成人の多くが JCV に対する抗体 (日本人では 70% 以上) をもっている. 細胞性免疫の低下した人に発症しやすく, 我が国での原因疾患は, HIV 感染 (30~40%), 血液系悪性腫瘍 (30~40%), 膠原病 (約 10%) など⁵⁾, 80% 以上を HIV 感染者が占める米国と対照的である⁶⁾. PML 患者から分離される JCV は転写調節領域の配列が原型 JCV とはことなっており, PML 型 JCV と呼ばれる. その発症機序の詳細はまだ充分には解明されていないが⁷⁾, 研究班では JCV 受容体に関する研究⁸⁾⁹⁾, JCV の調節領域を介した増殖機構¹⁰⁾¹¹⁾, JCV ビリオンの核移行機序¹²⁾, agnoprotein の感染細胞での局在およびその機能^{13)~15)}, JCV 遺伝子に対する siRNA の影響¹⁶⁾¹⁷⁾, JCV の増殖に対する薬剤の影響¹⁸⁾ などについて多くの貢献をしている. PML の発症頻度は, ふつう 100 万人に 1 名以下のまれな疾患であるが, HIV 感染者では 1,000 人に 1~3 名, Natalizumab 治療では 1,000 人に 1 名, Rituximab 治療でも数千名に 1 名などと背景によっては決してまれではなく注意が肝心である.

臨床症候と検査所見

PML の初発症候としては, 片麻痺, 四肢麻痺, 認知機能障害, 失語, 視力障害, 脳神経麻痺, 小脳症状などであり, 経過中に出現する徴候としては, これらに加えて錐体路徴候, 球麻痺, 膀胱直腸障害, 感覚障害, 不随意運動, 痙攣, パーキンソニズムなどがみられる⁵⁾.

PML の検査所見としては, 一般血液検査で炎症所見はみられない. 前述のように JCV は不顕性感染しており, 末梢血単核細胞では健常者でも JCV-DNA が検出されることがある. 髄液では, 細胞増加なく, 蛋白や MBP がやや上昇することがあるも IgG は増加しない. 髄液の JCV-DNA に対する PCR 検査は感度約 80%, 特異度 99% で, 脳生検に匹敵する有用性を示しており診断的価値が非常に高い. ただし, HIV 感染者で HAART 開始後や Natalizumab 関連 PML では JCV 量が少なく検出しにくいため注意が必要である. 脳 MRI も非常に重要な検査で, FLAIR 像, T₂強調像, 拡散強調像にて大小不同の融合性脱髄病巣が大脳皮質下白質にみられる¹⁹⁾. ふつう脳浮腫と Gd 造影効果はみられないが, 免疫再構築症候群 (Immune reconstructive inflammatory syndrome : IRIS) や炎症反応の強い PML では造影効果や腫脹がみられることがある (Fig. 1).

神経病理所見

PML の病理所見は, 肉眼的には MRI に対応して, 皮髄境界~皮質下白質を中心に大小様々な脱髄斑が多数, 融合性にみられることが多い. しかし近年では, PML の背景にある様々な基礎疾患や, その治療の影響, 臨床病期などにもな

¹⁾ 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学 [〒113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45]

²⁾ 都立駒込病院神経内科

³⁾ 国立感染症研究所ウイルス第一部第三室

⁴⁾ 佐賀大学医学部内科 (神経内科)

⁵⁾ 杏林大学医学部病理学教室

⁶⁾ 北大人獣共通感染症分子病態・診断部門

⁷⁾ 札幌東徳州会病院病理部

⁸⁾ 神戸市環境保健研究者微生物部

⁹⁾ 金沢大学大学院脳老化・神経病態学

(受付日 : 2011 年 5 月 20 日)

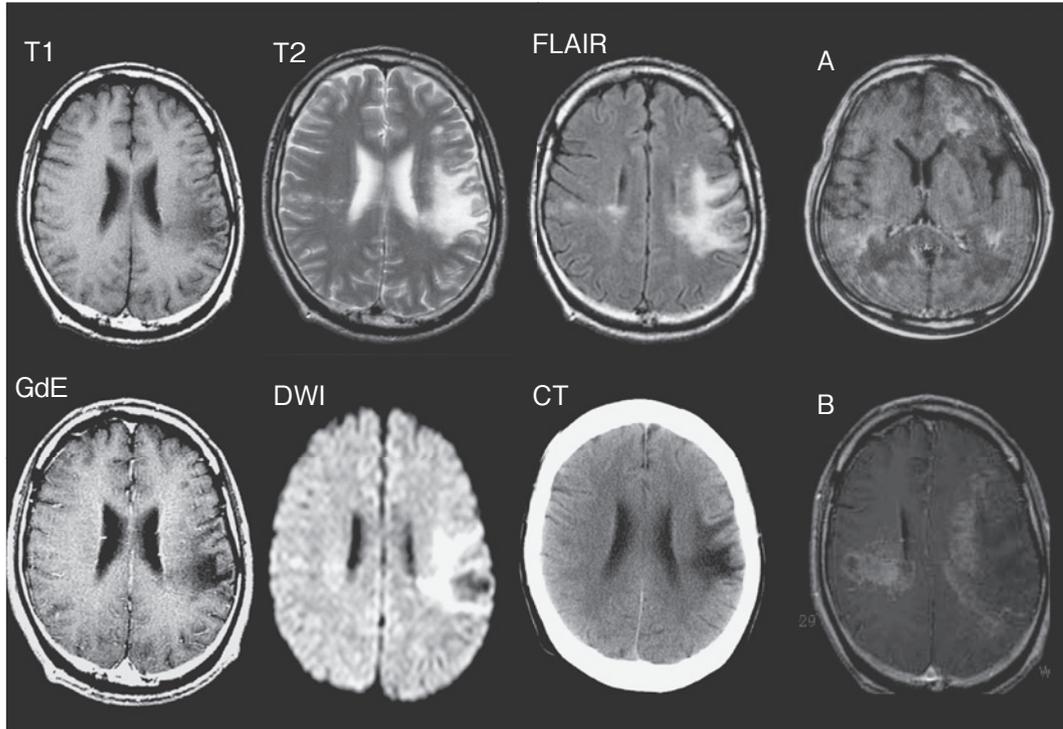


Fig. 1 PMLの画像所見

皮質下白質を中心とした拡散強調像, FLAIR像, T₂強調像で高信号, T₁強調像, CTにて低信号あるいは低密度を呈する地図状～不規則な病変が多い。よくみるとU線維はもちろん皮質も障害されている。ふつうガドリニウム造影検査では陰性である。AとBは各々別の症例のMRI T₁強調ガドリニウム造影陽性所見で、免疫再構築症候群や炎症反応の強いPMLではこのように造影効果や腫瘍効果を示すことがある。

い、病変の広がりにはかなりの多様性があることが知られている。髄鞘の淡明化が広範囲にみられる症例や、皮質を主体に脱髄斑がみられる症例もある。

組織学的に、HE染色では、JCVの封入体を意味する両染色性の腫大核を持つオリゴデンドログリア細胞が特徴的で (full inclusion)、PML病理診断の指標となる (Fig. 2A 淡青の矢印)。抗JCV抗体をもちいた免疫組織化学でも、腫大核全体に染色性がみとめられる (Fig. 2B)。一方、核腫大を示しているにもかかわらず、HE染色では明瞭な封入体を有していないグリア細胞も多数ある (Fig. 2A 紺の矢印)。近年、こうした細胞の中には、腫大核内にドット状の封入体 (dot-shaped inclusion) を有するものが存在することが、免疫組織化学や in situ hybridization 法により証明された (Fig. 2C)²⁰⁾²¹⁾。こうした封入体は、JCVのカプシド蛋白が、promyelocytic leukemia nuclear body (PML-NBs) とよばれる細胞核内のドット状構造に集積するためにみとめられるもので²²⁾、PML-NBsで産生された子ウイルスが、やがては核全体に広がり full inclusion を形成すると考えられる。すなわち、ドット状ウイルス封入体は、病変形成の初期や、主病変の辺縁部、JCV増殖が抑制された病態においてより頻繁に検出される可能性があり、PML早期診断を可能にすると考えられる。電子顕微鏡において、JCVは、球状または線維状の形態を示し、核膜直下にクラスターを

形成していることが多い。電顕でみとめられるJCVの核内分布は、ドット状の封入体のあるグリア細胞の光顕所見ともよく一致している (Fig. 2D~F)。

診 断

厚生労働省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の2003年度の診断基準では、1. 成人発症の数カ月で無動性無言症の状態にいたる亜急性進行性の脳症、2. 脳MRI/CTで、白質に脳浮腫をとみなわない大小不同、融合性の病変が散在、3. 白質脳症をきたす他疾患を臨床的に除外できる、4. 脳脊髄液からPCRでJCウイルスDNAが検出、5. 剖検または生検で脳に特異的病理所見とJCウイルス感染を証明、の5項目のうち#5を満たせば definite PML、#1, 2, 3, および4を満たせば probable PML、#1, 2, および3を満たせば possible PMLと判定する。HIV感染、Natalizumab治療中、血液系悪性腫瘍、膠原病などの患者が、前述のような神経症候を呈したら、PMLを考慮してまずMRI検査をおこなう。可能性のある白質病変がみられたら、髄液検査をおこない国立感染症研究所に送付してJCVゲノムを測定する。初期には、画像所見があっても髄液検査では陰性になることがあり、必要に応じてくりかえし検査をおこなう。

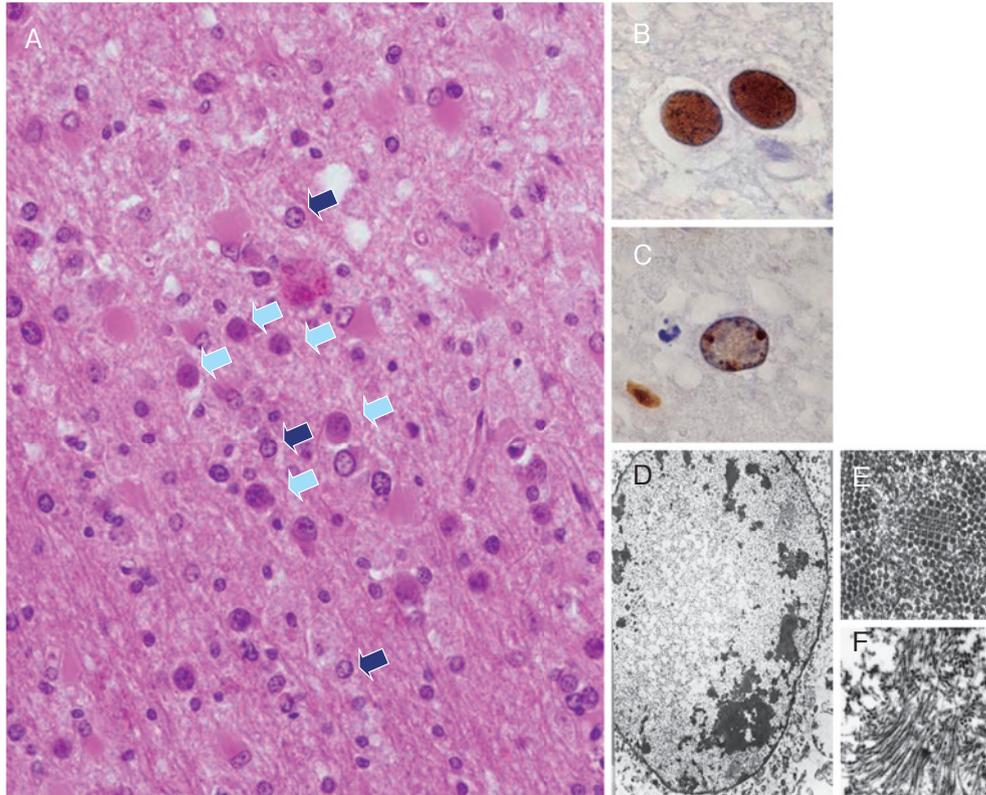


Fig. 2 PMLの神経病理：組織所見

A：ほぼ正常な領域（左下）と、脱髄斑（右上）の境界部を示す。腫大核全体に両染色性封入体を有するオリゴデンドログリアの所見（淡青の矢印）は、PML病理診断の指標となる。また、淡明な腫大核を有する細胞や（紺の矢印）、反応性的アストログリア、髓鞘片を貪食した泡沫組織球なども認められる（HE染色）。B：核全体を占めるJCウイルス封入体（Full inclusion）（抗JCウイルス抗体による免疫組織化学）。C：淡明な腫大核を有するグリア細胞には、しばしば核膜直下にドット状の封入体を有するものがある（Dot-shaped inclusion）（抗JCウイルス抗体による免疫組織化学）。D：JCウイルス感染細胞の電顕像。JCウイルスは球状または線維状の形態を示し、核膜直下に集簇して分布する傾向がある。E：球状のJCウイルス。F：線維状のJCウイルス。

治療

まずは免疫能の回復であり、HIV感染者ではHAART療法をおこない²³⁾²⁴⁾、HIV非感染者では免疫抑制療法の中止を計る（Fig. 3）。抗ウイルス療法としては、これまでCytarabine（Ara-C）、Cydofovirがin vitroでJCウイルスの増殖を抑制するとされ、臨床的にも有効例の症例報告はあるが、多数例の解析では効果は否定的である^{25)~27)}。IFN- α もPMLに対する効果は確立されていない²⁸⁾。リスペリドン、ミルタザピンなどの5-HT_{2A}セロトニン受容体阻害薬は、JCウイルスのオリゴデンドログリアへの侵入を抑制するとされている²⁹⁾。最近、抗マラリア薬のMefloquine（メフロキン）がin vitroでJCウイルスの増殖を抑制し³⁰⁾臨床的にもPMLの症状を抑制するとされ³¹⁾³²⁾、米国で治験が進行中であるが、我が国でも有効性を示す症例報告が続き、われわれも臨床研究を開始した。Natalizumab関連PMLについては後で詳述するが、血漿交換や免疫吸着にて残存している抗体を除去すると共にメフロキンを開始す

る³²⁾³³⁾。HAART療法やメフロキン治療などで免疫力が回復してくると炎症反応が惹起され、いわゆる免疫再構築症候群が生じやすく、重症では高容量の副腎皮質ステロイドが必要となる。

現在、研究班では全国からの要望に応じて国立感染症研究所での髄液中JCウイルス検査を無料で提供している（Fig. 4）。研究班としては、全国のできるだけ多くの症例でメフロキンを中心とする最善の治療をおこなっていただき、その内容を分析してメフロキン治療の有用性や副作用などを明らかにすることを目的に臨床研究を開始している。PML症例を担当しておられる先生には、是非、この髄液検査を活用していただき、研究班の臨床研究に参加していただくよう患者の同意を取得し、診療を研究班と協議しながら進めていただきたい。

予後

probable PML AIDS 7例、非AIDS 13例（2007年～2010年）の解析から、死亡率はAIDS例で3/7例（43%）、非AIDS

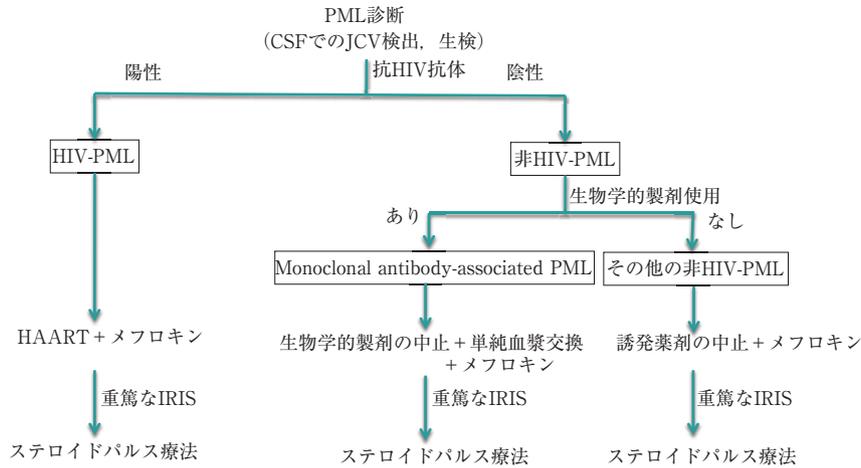


Fig. 3 PML 治療ガイドライン

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のガイドラインを示す。その他の薬剤として、5HT_{2A} セロトニン受容体拮抗薬（クロルプロマジン、ミルタザピン、リスベリドン、オランザピンなど）はメフロキンと作用機序が違っており併用が可能である。抗ウイルス薬（シタラビン、cidofovir など）あるいはインターフェロン α はメフロキン投与ができない場合に考慮する。

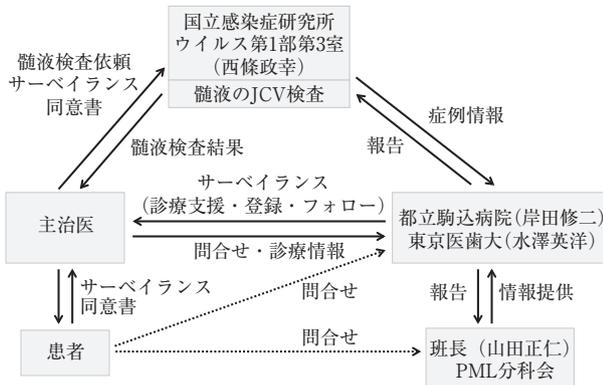


Fig. 4 PML サーベイランス体制

現在のサーベイランス体制を示す。研究班では国立感染症研究所での髄液中 JCV 検査を無料で提供しており、その折に主治医を介して研究班の進めるメフロキンをもちいた治療研究に関する同意を患者あるいはその家族から取得してもらい、以降の診療を研究班と協議しながら進め、研究班では診療情報を分析するという体制である。

例で 12/13 例 (92%)、死亡原因は AIDS 例で PML 死 1 例、肝不全 1 例、腎不全 1 例、非 AIDS 例で PML 死 7 例、原病悪化 2 例、肺炎 1 例、消化管出血 1 例、不明 1 例であった。発症から診断にいたる期間の中央値は 3 カ月 (1~12 カ月) であるが、死亡例では 3.5 カ月 (1~12 カ月) と長く、生存/停止例では 2 カ月 (1~4 カ月) と短い。診断時の Karnofsky performance score (KS) は中央値 40 (20~90) であった。診断から死亡までの期間は全体で中央値 2 カ月 (0~18 カ月)、AIDS 例で 3 カ月 (2~8 カ月)、非 AIDS 例で 2 カ月 (0~18 カ月) であった。AIDS 例はいずれも HAART 治療を受けており 4/7 例が停止、生存している。ただし、進行停止例も KS40 (中央値)

と高度な機能障害が残存していることに留意する必要がある。

Natalizumab 関連 PML

Natalizumab はリンパ球が血管内に入るときに必須の α -integrin に対する抗体であり、多発性硬化症の治療薬として欧米で使用されているが、治験段階から PML を発症しやすいことが指摘されており、最初に述べたように約 1,000 人に 1 名と非常に頻度が高い。その特徴は、治療開始 8 カ月以降に発生し、行動変化、人格変化、片麻痺、言語障害、視交叉後、視覚障害、発作などを呈する³⁴⁾。MRI では、通常の脱髄巣に加えて浮腫や造影など炎症所見も高頻度に見とめられる。髄液では JCV 量が少ないことが多く検査には注意が必要である。治療は薬剤中止、血漿交換・免疫吸着、IRIS の治療、メフロキン投与をおこなう。転帰として、約 80% は生存しており、一般的な PML より予後がよい。

おわりに

PML は、非常にまれながら一旦発症すれば必ず死にいたる不治の難病として恐れられてきた。HIV 感染により多発するようになったものの、HAART 治療により PML そのものも改善することが知られるようになり、Natalizumab 関連 PML の多発からまた研究が進みメフロキン治療の有効性に期待がもたれている。我が国の研究者も PML 研究に様々な貢献をしてきており、今後、世界の研究者が力を合わせて、近い将来その完全な克服を成し遂げることが望まれる。

謝辞：本総説は、第 52 回日本神経学会学術大会企画シンポジウム 20：難治性感染症の update.#4 進行性多巣性白質脳症を元にし

たものであり、著者らは厚生労働省「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」班にてPMLを担当する研究者であり、ふだんPML分科会を構成して研究を進めている。研究班の他のメンバーにも日頃のご協力に感謝する次第である。

文 献

- 1) 水澤英洋, 編. 厚生労働省「プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究」班, 編. プリオン病と遅発性ウイルス感染症. 東京: 金原出版; 2010. p. 1-333.
- 2) Koranik IJ. Progressive multifocal leukoencephalopathy: Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis. UpToDate, Sept. 29, 2011.
- 3) Tan CS, Koranik IJ. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis. *Lancet Neurol* 2010;9: 425-437.
- 4) Brew BJ, Davis NWS, Cinque P, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other forms of JC virus disease. *Nat Rev Neurol* 2010;6:667-679.
- 5) 岸田 修二. PMLの疫学と臨床. *BRAIN NERVE* 2007;52: 125-137.
- 6) Molloy ES, Calabrese LH. Progressive multifocal leukoencephalopathy: A national estimate of frequency in systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *Arthritis & Rheumatism* 2009;60:3761-3765.
- 7) White MK, Khalili K. Pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy—revisited. *J Infect Dis* 2011;203: 578-586.
- 8) Komagome R, Sawa H, Suzuki T, et al. Oligosaccharides as receptors for JC virus. *J Virol* 2002;76:12992-13000.
- 9) Henmi C, Sawa H, Iwata H, et al. Isolation of a monoclonal antibody recognizing a cell-surface molecule as a receptor for JC virus. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327: 242-251.
- 10) Sunden Y, Semba S, Suzuki T, et al. Identification of DDX1 as a JC virus (JCV) transcriptional control region-binding protein. *Microbiol Immunol* 2007;51:327-337.
- 11) Sunden Y, Semba S, Suzuki T, et al. DDX1 promotes proliferation of JC virus (JCV) through transactivation of the JCV promoter. *Microbiol Immunol* 2007;51:339-347.
- 12) Qu Q, Sawa H, Suzuki T, et al. Nuclear entry mechanism of the human polyomavirus JC virus like particle: role of importins and the nuclear pore complex. *J Biol Chem* 2004;279:27735-27742.
- 13) Okada Y, Endo S, Takahashi H, et al. Distribution and function of JCV agnoprotein. *J Neurovirol* 2001;7:302-306.
- 14) Okada Y, Sawa H, Endo S, et al. Expression of JC virus (JCV) agnoprotein in progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) brain. *Acta Neuropathol* 2002;104: 130-136.
- 15) Suzuki T, Okada Y, Semba S, et al. Identification of FEZ1 as a protein that interacts with JC virus agnoprotein and microtubules: role of agnoprotein-induced dissociation of FEZ1 from microtubules in viral propagation. *J Biol Chem* 2005;280:24948-24956.
- 16) Orba Y, Sawa H, Iwata H, et al. Inhibition of virus production in JC virus-infected cells by postinfection RNA interference. *J Virol* 2004;78:7270-7273.
- 17) Matoba T, Orba Y, Suzuki T, et al. An siRNA against JC virus (JCV) agnoprotein inhibits JCV infection in JCV-producing cells inoculated in nude mice. *Neuropathology* 2008;28:286-294.
- 18) Suzuki T, Yamanouchi S, Sunden Y, et al. Natalizumab has no direct biological effect on JC virus infectivity in permissive human neural cell lines. *J Med Virol* 2010;82: 1229-1235.
- 19) Shah R, Bag AK, Chapman PR, et al. Imaging manifestations of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Clin Radiol* 2010;65:431-439.
- 20) Shishido-Hara Y, Higuchi K, Ohara S, et al. Promyelocytic leukemia nuclear bodies provide a scaffold for human polyomavirus JC replication and are disrupted after development of viral inclusions in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008;67: 299-308.
- 21) Shishido-Hara Y. Progressive multifocal leukoencephalopathy and promyelocytic leukemia nuclear bodies: a review of clinical, neuropathological, and virological aspects of JC virus-induced demyelinating disease. *Acta Neuropathol* 2010;120:403-417.
- 22) Shishido-Hara Y, Ichinose S, Higuchi K, et al. Major and minor capsid proteins of human polyomavirus JC cooperatively accumulate to nuclear domain 10 for assembly into virions. *J Virol* 2004;78:9890-9903.
- 23) Albrecht H, Hoffmann C, Degen O, et al. Highly active antiretroviral therapy significantly improves the prognosis of patients with HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *AIDS* 1998;12:1149-1154.
- 24) Hernández B, Dronda F, Moreno S. Treatment options for AIDS patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Expert Opin Pharmacother* 2009;10:403-416.
- 25) Hall CD, Dafni U, Simpson D, et al. Failure of cytarabine in progressive multifocal leukoencephalopathy associated with human immunodeficiency virus infection. *AIDS Clinical Trials Group 243 Team. N Engl J Med* 1998;338: 1345-1351.
- 26) Kraemer C, Evers S, Nolting T, et al. Cidofovir in combination with HAART and survival in AIDS-associated

- progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurol* 2008;255:526-531.
- 27) De Luca A, Ammassari A, Pezzotti P, et al. Cidofovir in addition to antiretroviral treatment is not effective for AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy: a multicohort analysis. *AIDS* 2008;22:1759-1767.
- 28) Counihan T, Venna N, Craven D, et al. Alpha Interferon in AIDS-Related Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *J NeuroAIDS* 1996;1:79-88.
- 29) Elphick GF, Querbes W, Jordan JA, et al. The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science* 2004;306:1380-1383.
- 30) Brickelmaier M, Lugovskoy A, Kartikeyan R, et al. Identification and characterization of mefloquine efficacy against JC virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:1840-1849.
- 31) Kishida S, Tanaka K. Mefloquine treatment in a patient suffering from progressive multifocal leukoencephalopathy after umbilical cord blood transplant. *Intern Med* 2010;49:2509-2513.
- 32) Schröder A, Lee DH, Hellwig K, et al. Successful management of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy and immune reconstitution syndrome in a patient with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2010;67:1391-1394.
- 33) Khatri BO, Man S, Giovannoni G, et al. Effect of plasma exchange in accelerating natalizumab clearance and restoring leukocyte function. *Neurology* 2009;72:402-409.
- 34) Warnke C, Menge T, Hartung HP, et al. Natalizumab and progressive multifocal leukoencephalopathy: what are the causal factors and can it be avoided? *Arch Neurol* 2010; 67:923-930.

Abstract**Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML)**

Hidehiro Mizusawa, M.D., Ph.D.¹⁾, Shuji Kishida, M.D., Ph.D.²⁾, Masayuki Saijo, M.D., Ph.D.³⁾,
Motohiro Yukishita, M.D., Ph.D.⁴⁾, Yukiko Shishido-Hara, M.D., Ph.D.⁵⁾, Hirohumi Sawa, M.D., Ph.D.⁶⁾,
Kazuo Nagashima, M.D., Ph.D.⁷⁾, Souichi Nukuzuma, Ph.D.⁸⁾ and Masahito Yamada, M.D., Ph.D.⁹⁾

¹⁾Department of Neurology and Neurological Science, Tokyo Medical and Dental University,
Graduate School of Medical and Dental Sciences

²⁾Department of Neurology, Tokyo Metropolitan Cancer and Infectious Diseases Center Komagome Hospital

³⁾Department of Virology, National Institute of Infectious Diseases

⁴⁾Division of Neurology, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Saga University

⁵⁾Department of Pathology, Kyorin University School of Medicine

⁶⁾Division of Molecular Pathobiology, Research Center for Zoonosis Control, Global COE Program, Hokkaido University

⁷⁾Department of Pathology, Sapporo Higashi-Tokushukai Hospital

⁸⁾Department of Microbiology, Kobe Institute of Health

⁹⁾Department of Neurology and Neurobiology of Aging, Kanazawa University Graduate School of Medical Science

Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) is caused by reactivation of latently infected JCV when hosts' immune system is impaired by HIV infection, hematologic diseases, collagen diseases, immunomodulatory therapy and so on. PML was rare but HIV infection and Natalizumab have made it much more common while the prognosis is much better than other PML. PML patients present with various signs and symptoms including hemiparesis, dementia, aphasia, visual disturbance, cranial nerve paresis, cerebellar signs and bladder bowel disturbance. Brain MRI reveals characteristic demyelinating lesions in the CNS white matter and CSF mild increase of protein with or without mild mononuclear pleocytosis. Detection of JCV genome from CSF is crucial for the clinical diagnosis of PML. PML was once thought to be fatal but some HIV infected PML patients showed halting progression or even recovery after introduction of HAART. In addition, anti-malarial drug mefloquine was found to be effective. Recovery of immunity may provoke some inflammatory responses known as immune reconstruction inflammatory syndrome (IRIS) which requires high dose corticosteroid. In Japan, we are providing free test of CSF-JCV genome and organized a unique system for surveillance and clinical research of PML. Using this system we hope to improve diagnosis and therapy of PML in Japan.

(Clin Neurol 2011;51:1051-1057)

Key words: Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML), JC virus (JCV), Human immunodeficiency virus (HIV), Natalizumab, Mefloquine
