

19980851

厚生省特定疾患
遅発性ウイルス感染調査研究班
平成10年度研究報告書

平成11年3月

Annual Report of the Slow Virus
Infection Research Committee,
The Ministry of Health and Welfare
of Japan

班長 北本 哲之

Chairman: Tetsuyuki Kitamoto, M.D.
Department of Neurological Science
Tohoku University School of Medicine

厚生省特定疾患
遅発性ウイルス感染調査研究班
平成10年度研究報告書

平成11年3月

Annual Report of the Slow Virus
Infection Research Committee,
The Ministry of Health and Welfare
of Japan

班長 北本 哲之

Chairman: Tetsuyuki Kitamoto, M.D.
Department of Neurological Science
Tohoku University School of Medicine

はじめに

平成10年度の遅発性ウイルス感染調査研究班研究報告書を
公表する。

平成11年3月

班長 北本 哲之

遅発性ウイルス感染調査研究班名簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
分 科 会 長	北 本 哲 之	東北大学医学部病態神経学分野	教 授
分 科 会 員	小 船 富 美 夫	国立感染症研究所	室 長
	片 峰 茂	長崎大学医学部細菌学講座	教 授
	堂 浦 克 美	九州大学医学部脳研病理	講 師
	高 須 俊 明	日本大学医学部神経内科	教 授
	品 川 森 一	帯広畜産大学獣医学科公衆衛生学	教 授
	中 村 健 司	東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター	助 手
	中 村 好 一	自治医科大学公衆衛生学教室	助教授
	長 嶋 和 郎	北海道大学医学部分子細胞病理学	教 授
	保 井 孝 太 郎	東京都神経科学総合研究所微生物学免疫学	副所長
(監 事)	毛 利 資 郎	九州大学医学部動物実験施設	教 授
	黒 田 康 夫	佐賀医科大学内科学	教 授
	佐 藤 猛	国立精神・神経センター-国府台病院	名誉院長
	志 賀 裕 正	東北大学医学部附属病院神経内科	助 手
	立 石 潤	老人保健施設 春風	施設長
	田 中 智 之	和歌山県立医科大学微生物教室	教 授
	玉 井 洋 一	北里大学医学部生化学	教 授
	二 瓶 健 次	国立小児病院神経科	医 長
	檜 垣 惠	聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター	助教授
	堀 田 博	神戸大学医学部微生物学教室	教 授
	松 田 治 男	広島大学生物生産学部免疫生物学	教 授
	山 内 一 也	(財) 日本生物科学研究所	主任研究員
(難病特別研究員)	三 好 一 郎	東北大学医学部附属動物実験施設	助 手

目 次

総合研究報告書	1
総括研究報告書	5
重症度基準	9
平成10年度 研究報告会プログラム	13
分担研究報告	
1. 麻疹感染初期におけるサイトカイン動態	19
日本生物科学研究所	山内 一也
2. 麻疹ウイルスの向神経性と持続感染性：マウスモデルでの研究	24
国立感染症研究所	小船富美夫
3. 麻疹ウイルスのマウス神経病原性の多様性について	28
神戸大・医・微生物学	堀田 博
4. パプアニューギニア（PNG）の亜急性硬化性全脳炎（SSPE）－疫学とウイルス解析－	38
日大・医・神経学	高須 俊明
5. 亜急性硬化性全脳炎（SSPE）の生存例の検討	52
国立小児病院・神経	二瓶 健次
6. HTLV-I Tax による JC virus の活性化に関する研究	57
北大・医・分子細胞病理	長嶋 和郎
7. JC ウイルス粒子形成と DNA 免疫	64
東京都神経科学総合研究所・微生物学・免疫学	保井孝太郎
8. 抗プリオン単クローン抗体の作製と性状解析	71
聖マ医大・難治研	檜垣 恵
9. ヒトプリオン蛋白に対するモノクローナル抗体	74
和歌山県立医大・微生物学教室	田中 智之
10. PrP 認識ファージ発現ニワトリモノクローナル抗体の構築	77
広島大・生物生産・免疫生物	松田 治男
11. 実験動物におけるヒト遺伝子発現系の開発	81
東大・医科研・ヒト疾患セ・高次機能	中村 健司

1 2.	プリオン蛋白過剰発現トランスジェニックマウスにおける筋病変	84
	東北大・医・附属動物実験施設	三好 一郎
1 3.	ヒト PrP 遺伝子発現マウスのプリオン感受性試験 (その 2)	87
	九大・医・動物実験施設	毛利 資郎
1 4.	トランスジェニック・マウスの病理	94
	東北大・医・病態神経学	北本 哲之
1 5.	CJD 感染動物脳に沈着するプリオン蛋白斑	96
	老健施設 春風 Brian Research Laboratory	立石 潤
1 6.	CJD の病態発現に iNOS は必要か?	100
	北里大・医・生化学	玉井 洋一
1 7.	プリオン病脳組織特異的発現遺伝子の病態形成における役割解明	107
	長崎大・医・細菌学	片峰 茂
1 8.	感染型プリオン蛋白の産生及び安定性に影響する因子の探索	114
	九大・医・脳研病理	堂浦 克美
1 9.	プリオン蛋白質遺伝子欠損マウス小脳におけるグルタミン酸トランスポーター EAAT4 遺伝子発現の解析	117
	佐賀医科大・医・内科学	黒田 康夫
2 0.	硬膜移植後に発症した CJD : 症状と経過の特徴	122
	国立精神・神経センター国府台病院	佐藤 猛
2 1.	Creutzfeldt-Jakob 病の MRI 所見 - 拡散強調像を中心に -	128
	東北大・医・神経内科	志賀 裕正
2 2.	グロイツフェルト・ヤコブ病の疫学研究	139
	自治医科大・公衆衛生学	中村 好一
2 3.	医療機器汚染プリオンの不活化法の開発	146
	帯広畜産大・獣医公衆衛生	品川 森一
	平成 1 0 年度 研究成果の刊行に関する一覧表	151

総括研究報告

総括研究報告

I. 研究目標

本研究の目的は、プリオン病、SSPE、PML の 3 疾患の病態解明と発症予防である。この目的を達成するために、プリオン病に関しては、診断法の確立、モデル動物の開発と病態解明をめざす基礎的研究を中心に行い、加えてプリオン病の全国調査の解析を行うとともに、今年度からは家族性及び外因性プリオン病の治療に対する取り組みを中心とした重点課題にも開始された。一方、SSPE に関しては、臨床疫学調査に加えて、麻疹ウイルスと宿主の防御機構を中心に発病機構解明への糸口を探り、PML に対しては HTLV-1 の Tax が JC ウイルスの調節領域の転写活性に及ぼす影響を明らかにすることと新しい DNA 免疫法の確立をめざした。

II. 研究成果(本年度)

1. プリオン病

a. イムノアッセイ法の確立

異常プリオン蛋白に対して、高感度なイムノアッセイを確立するための研究を行った。イムノアッセイにとって最も重要な要素は信頼できるモノクローナル抗体を多数保有することである。しかも、できるだけプリオン蛋白の異なるエピトープに対する抗体が必要である。今年度は、免疫原として主にレコンビナント蛋白を使用して抗体作製を行った。ウサギを用いたポリクローナル抗体の実績からヒト・プリオン蛋白 23 - 230 のみとした免疫原が最も高い力価の抗体を産生することが明らかとなり、マウス型の数種類の抗体の作製に成功した(田中智之、桧垣恵)。また、前年度成功したニワトリのモノクローナルはすでにフェージ抗体系を確立しプリオン蛋白を効率よく免疫沈降させる系として今後の発展が期待できるようになった。これらのモノクローナルおよびポリクローナル抗体を駆使してプリオン蛋白の迅速な微量検出系の確立が現実のものとなりつつある。

b. モデル動物の開発

ヒトへの感染性を検討する上でヒト型のプリオン蛋白の遺伝子導入モデルの開発は不可欠である。このモデル動物作製のため、トランスジェニック (Tg) 法(三好一郎、北本哲之)と遺伝子置換法(中村健司、北本哲之)を実施した。今年度特筆すべき成果があがったのがこのモデル動物である。作製したモデル動物の感染実験(毛利資郎、北本哲之)を行ったところ、ヒト型 Tg マウスはマウスのプリオン蛋白が存在すると 300 - 340 日で 100%発病した。これは、野生型のマウスを使用したヒト・プリオンの感染実験が 600 日の潜伏期間の後 20 - 30%の発病率を示すことと比較すると十分な感受性であると考えられた。さらに、ノックアウトマウスと交配した完全ヒト型 Tg マウスの潜伏期間は平均 160 日に短縮し、最短 132 日で発病するマウスの作製に成功した。これは、マウス・プリオンを用いたマウスへの感染実験に匹敵する高い感受性であり、ヒト・プリオンの感受性マウスとしては世界最短の潜伏期を示す。遺伝子置換法に関しても高感受性を示した Tg マウスと同じヒト型プリオン蛋白の発現を中枢神経系で確認しており、現時点で完全なヒト型(ホモ・マウス)の作製にも成功して感染実験中である。

従来のマウス以外に、ラットやハムスターを使った感染実験でもアミロイド斑が出現することを示した(立石潤)。

c.基礎的研究

グルタミン酸トランスポーターのうち小脳プルキンエ細胞で特異的に発現される EAAT4 の発現量をプリオン蛋白のノックアウトマウスと正常マウスで比較したが、その発現量に差異は認められなかった（黒田康夫）。ライソゾーム機能を修飾する薬剤および A Kinase の阻害剤が異常プリオン蛋白の産生に関与していることをスクレピー感染細胞株を用いて明らかにし、マウスプリオン株である福岡 1 株の感染型プリオン蛋白を高塩濃度が不安定にすることを *in vitro* において明らかにした（堂浦克美）。cDNA サブトラクション法で同定した CJD 感染脳に特異的に発現する遺伝子群の発現細胞を同定し組織内での局在を調べ、lysozyme M、hexaminidase、Mpg-1 はミクログリア特異的に発現し、その局在は病理変化と一致することを見出した（片峰茂）。また、CJD 感染脳で発現上昇が認められる iNOS に対してその遺伝子をノックアウトしたマウスに感染実験を行い若干の潜伏期の延長をみたが、対照群同様に発病した（玉井洋一）。また、プリオン感染の滅菌法として、昨年度液化エチレンオキサイドが有効であることを報告したがさらにプリオン蛋白の抗原性を指標に薬剤効果を調べたところ、グリシドールが有望であることが明らかとなった（品川森一）。

d.臨床疫学調査

厚生省が実施している「クロイツフェルト・ヤコブ病及びその類縁疾患調査」に報告された患者を解析し、以下のような特筆すべき結果を得た（中村好一）。79 例の性別内訳は男 32 例、女 47 例であった。出身都道府県、主に生活した都道府県、発病時に居住していた都道府県に特別な集積性はなかった。発症時の年齢は平均 63.3 歳、標準偏差 11.2 歳であった。これらの症例について性・年齢をマッチさせた対照を選び、情報収集を行い、症例・対照研究として解析した。症例 52 例に対して 100 例の対照に関する情報が得られた。職業歴、動物との接触歴は危険因子ではなかった。既往歴ではヒト乾燥硬膜移植の既往を持つ症例が 7 例に対し、対照ではこのような既往を持つ者はおらず、種々の検討の結果、高いオッズ比が観察された。硬膜を使用しない脳神経外科的手術、輸血歴、鍼治療歴などは危険因子とは認められなかった。この調査を引き続き行うことが重要で、現在は危険因子と同定されていないような低い関連因子を今後同定できる可能性が示唆された。

また、硬膜例の解析では、硬膜移植の確認された 52 例全例がアルカリ処理導入前のライオデュラが使用されており、他の製品あるいはアルカリ処理をされた硬膜移植者は 1 例も発見されていない（佐藤猛）。また、硬膜例のなかで新型 CJD と類似のアミロイド斑を持つ症例は今年度新たに 2 例が加わり全部で 5 例となった（長嶋和郎、佐藤 猛、立石 潤、北本哲之）。

臨床的な早期診断として、拡散強調像 MRI の重要性が議論されており、研究班でも検討したが、早期診断として有効であるが必ずしも全例で有用であるわけではないことが明らかとなった（志賀裕正）。

2. SSPE

臨床研究として、284 例の SSPE のうちアンケートに回答された 178 例の SSPE について 1972 年から 1996 年までに死亡した 78 例について検討したが、死亡率は無治療群では 94.4%、イノシブレックス使用群で 50%、イノシブレックスと IFN 使用群では 31.3%と低下し、平均生存期間も延長しており治療の効果が示唆されている（二瓶健次）。海外での SSPE の多発地での検討では、SSPE 患者の麻疹罹患年齢に 1 歳未満の者が非常に多いことが明らかとなった（高須俊明）。

基礎的研究では、サルモデルを用いた麻疹ウイルスの感染初期のウイルス排除機構に関わる免疫機構の解析を行い IL-8 の感染初期の上昇が確認された（山内一也）。また前年度に確立した脱髄病変を引き起こす麻疹ウイルス感染マウス・モデルを用いてさらに向神経性と持続感染性を検討した（小船

富美夫)。麻疹ウイルスの同一親株に由来する継代株で向神経性の異なるウイルス株 3 組の M、F、H 遺伝子解析を行い継代に伴う点突然変異を M 遺伝子と H 遺伝子に見出した (堀田博)。

3. PML

いままで、JC ウイルスの有効な培養系が開発されていないため、ウイルスの持続感染機構の解析が遅れていたが、JC ウイルスの構造蛋白を T 抗原持続産生細胞内で発現させることにより、偽 JC ウイルス粒子をついに作製することができた。これにより、新しい手法で JC ウイルスの感染増殖機構、感染者の免疫応答などの研究の発展の期待ができる。また、JC ウイルスの構造蛋白を発現する発現体 DNA を用いて、動物に効率よく免疫応答を誘導させる新しい DNA 免疫法の開発も行った。この手法は、単に PML に限らず、SSPE やプリオン病の新しいワクチン治療法として期待できる (保井孝太郎)。PML の発症には、免疫不全状態が関わっていることは広く知られているが、最近 HTLV-1 患者に PML を発症した症例と、HTLV-1 の重感染のため高度の脳病変を生じた症例の経験から HTLV-1 の Tax が JC ウイルスの調節領域に働き転写活性を直接亢進させている可能性を検討した。その結果予想通り、HTLV-1 Tax が JC ウイルスの初期と後期の両蛋白を著明に発現亢進させることを明らかとした。よって HTLV-1 感染患者は免疫不全状態がなくても PML 発症の危険があることを指摘した。

重症度基準

クローン病・ヤコブ病の重症度基準

病期	神経症候	脳波および CT, MRI 所見	日常生活自立度
I	抑うつ、不眠、物忘れ、頭痛、視覚・眼球運動障害、書字障害、歩行障害などの自覚症状が出現する	非特異的徐波化、PSD は認めない 画像上にて病巣を確認できず	自立
II	急速に痴呆が進行し、錐体路症状、錐体外路症状、小脳症状、視覚障害などの他覚症状が出現する ミオクロームヌスが出現し始める	背景脳波の徐波化が進行 不完全 PSD が見られることがある MRI で大脳皮質および基底核、視床、脳幹などに T2 高信号域が認められることがある	介助が必要
III	ミオクロームヌスが出現し、痴呆症状が前景に立つようになる	典型的な PSD が見られることがある 軽度の脳萎縮が見られることがある	日常生活の多くに介助が必要 意志の疎通が困難
IV	自発運動も乏しくなり、無動性無言状態に近くなる ミオクロームヌスは消退し始める	PSD の背景脳波が低振幅となり次第に平坦化する 進行性の脳萎縮が認められる	全介助 意志の疎通が困難
V	ミオクロームヌスは消失し、刺激に対して無反応で、無動性無言状態になる	PSD は消失する 画像上、高度の脳萎縮が認められる	完全臥床生活

注) 家族性プリオン病のなかには、臨床経過が異なるものも存在する

亜急性硬化性全脳炎の重症度基準

病期	神経症候	CT, MRI 所見	日常生活自立度
I	<p>精神状態の変化（注意力や集中力の低下、無口、自閉、拍動過多、活動過剰、性格変化、行動異常、学業成績低下、記憶力低下、知能低下、言語緩慢、傾眠）が現れる。</p> <p>I期の症状が進行すると共にI期→II期へ移動。運動刺激（痙攣発作、大発作、転倒発作、運動失立発作、ミオクローヌス）、言語障害、運動麻痺が少く、歩行障害、四肢運動障害、摂食嚥下障害が現れる。</p>	異常なし	自立
II	<p>I期の症状が進行すると共にI期→II期へ移動。運動刺激（痙攣発作、大発作、転倒発作、運動失立発作、ミオクローヌス）、言語障害、運動麻痺が少く、歩行障害、四肢運動障害、摂食嚥下障害が現れる。</p>	異常なし または、あっても軽度	ほぼ自立
III	<p>精神活動がさらに低下し、ミオクローヌスは強く、言語障害、運動麻痺が現れる。日立ってくる。</p>	CTで低吸収域 MRIでT ₂ 強調で高信号域。	介助が必要
IV	<p>強い刺激に反応する程度、意識状態となる。ミオクローヌスは強くなり、歩行は困難、立位を取ることができず、歩行は不可能。坐位を取ることも困難。除皮質（硬直）、除脳肢位を示し、筋緊張がみられる。高熱、流涎、進行発汗、昏睡、筋痙攣がみられる。</p>	脳萎縮、側脳室拡大が現れる。	ほぼ全介助が必要 鼻腔栄養を要する
V	<p>昏睡、筋痙攣がみられる。完全な臥床状態。</p>	脳萎縮が高度となり、小脳、脳幹も萎縮する。	全介助が必要

進行性多巣性白質脳症の重症度基準

病期	神経症候	CT, MRI 所見	日常生活自立度
I	記憶、記銘力障害、書字障害、歩行障害、しびれなどの自覚症状が出現する	病巣を確認できず	自立
II	高次機能障害、視力、視野障害、運動麻痺、感覚障害、小脳症状などの神経候のうち一つの神経症候を他覚的に認める	大脳白質、あるいはまれに小脳に限局した小病巣を認める	ほぼ自立
III	高度な一つの神経症候の存在、または二つ以上の神経症候を認める	大脳白質に一葉領域を超える病巣を認める	介助が必要
IV	意識障害が出現し、臥床生活となる	両側性大脳白質に多巣性の病巣を認める	全介助または臥床生活、意志の疎通が困難
V	高度の意識障害を示し、外界からの刺激に無反応になる	大脳白質に広範な病巣を認める	完全臥床生活、意志の疎通は不可能

平成10年度研究報告会
プログラム

厚生省特定疾患 遅発性ウイルス感染調査研究班

平成10年度班会議プログラム (班長 北本哲之)

日時：平成11年1月18日(月) 9:00～17:15
会場：全共連ビル・本館1階 No.1 会議室
●東京都千代田区平河町2-7-9 全共連ビル
●電話 0120-888-694 フリダイヤル

連絡先：東北大学医学部 病態神経学講座
〒980-8575 仙台市青葉区星陵町2-1

TEL (022) 717-8147
FAX (022) 717-8148
(経理事務連絡担当 北本哲之)

〈 午前の部 〉

開会挨拶

9:00~9:10

班 長 北本 哲之

研究発表

9:10~11:45

座 長 北本 哲之

【9:10~9:25】

1. 麻疹感染初期におけるサイトカイン動態

日本生物科学研究所

山内 一也
○甲斐知恵子
三浦 竜一
佐藤 宏樹
網 康至
小船 富美夫

【9:25~9:40】

2. 麻疹ウイルスの向神経性と持続感染性：マウスモデルでの研究

国立感染症研究所

○小船 富美夫
網 康至
山内 一也
甲斐知恵子

【9:40~9:55】

3. 麻疹ウイルスのマウス神経病原性の多様性について

神戸大・医・微生物学講座

○堀田 博
片山 友子

【9:55~10:15】

4. パプアニューギニアの SSPE -疫学とウイルス解析-

日大・医・神経学

○高須 俊明
駒瀬 勝啓
三木 健樹
西村 敏樹
國分 裕司
河西 隆太

【10:15~10:30】

5. 1. 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) の生存例についての検討
2. 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) 患者の実態についてのアンケート調査

国立小児病院神経科

○越智 友子
二瓶 健次

【10:30~10:45】

6. HTLV-I tax による JC virus 転写因子活性の影響

北大・医・分子細胞病理

長嶋 和郎
澤 洋文
伊藤 智雄
○岡田 由紀
田中 伸哉

【10:45~11:00】

7. JCウイルス粒子形成とDNA免疫

東京都神経科学総合研究所

○保井 孝太郎
向川 純
趙 子江
宮本 道子

【11:00~11:15】

8. 抗プリオン単クローン抗体の性状

聖マリアンナ医大・難治研センター

○小平 浩代
峰 りさ
檜 垣 惠裕
水 島

【11:15~11:30】

9. ヒト・プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体

和歌山県立医科大・微生物学教室

○田中 智之
北元 憲利

【11:30~11:45】

10. PrP認識ニワトリモノクローナル抗体の有用性とファージ発現抗体の構築

広島大・生物生産学 免疫生物学

○松田 治男
中村 尚登
青木 悠里
堀内 浩幸
古澤 修一
北本 哲之

11:45

11:45~12:45

午前の部終了

昼食・休憩

〈 午後の部 〉

挨拶

12:45~13:00

厚生省保険医療局エイズ疾病対策課

研究発表

13:00~16:40

座長 北本 哲之

【13:00~13:15】

11. 実験動物におけるヒト遺伝子発現系の開発

東大・医科研 高次機能研究分野

○中村 健司
北本 哲之
中尾 和貴
勝木 元也

【13:15~13:30】

12. プリオン蛋白過剰発現トランスジェニックマウスにおける筋病変

東北大・医・付属動物実験施設

○三好 一郎
笠井 憲雪
北本 哲之
埜中 征哉

【13:30~13:50】

13. ヒト PrP 遺伝子発現マウスのプリオン感受性試験 (その2)

九大・医・動物実験施設

○毛利 資郎
北本 哲之
三好 一郎

【13:50~14:10】

14. ヒト型動物モデルの病理

東北大・医・病態神経学

○北本 哲之
毛利 資郎
三好 一郎

【14:10~14:25】

15. CJD 感染動物脳に沈着するプリオン蛋白斑

老健施設 春風

○立石 潤
北本 哲之
毛利 資郎

【14:25~14:40】

16. CJD の病態発現に iNOS は必要か？

北里大・医・生化

○笹原 武士
玉井 洋一
小嶋 久子
中村 和生
中瀧 龍文
田口 義夫
大谷 義夫
三浦 貞則

【14:40~14:55】

17. プリオン病脳組織特異的発現遺伝子の病態形成における役割解明

長崎大・医・細菌学

○片峰 茂
坂口 末廣

【14:55~15:15】

18. 感染型プリオン蛋白の産生及び安定性に影響する因子

九大・医・脳研病理

○堂浦 克美
田代 博史
川島 敏郎
岩城 徹

【15:15~15:30】

19. プリオン蛋白質遺伝子欠損マウス小脳におけるグルタミン酸トランスポーター EAAT4 遺伝子発現の解析

佐賀大・医・内科

○佐藤 準一
雪竹 基弘
黒原 和博
黒田 康夫
片峰 茂
宮本 勉

【15:30~15:45】

20. 硬膜移植後に発症した CJD : 症状と経過の特徴

国立精神・神経センター国府台病院

○佐藤 猛
増田 真之
内海 裕也

【15:45~16:00】

21. Creutzfeldt-Jakob 病の MRI 所見 - 拡散強調像を中心に -

東北大・医・神経内科

○志賀 裕正
黒田 宙
山川 一夫
山田 泰人
糸山 美子
関口 すみれ
沖田 直

【16:00~16:15】

22. クロイツフェルト・ヤコブ病の疫学研究

自治医科大・公衆衛生学

○中村 好一
大木 いづみ
谷原 真一
尾島 俊之
柳川 洋之
北本 哲之

【16:15～16:40】
23. 医療機器汚染プリオンの不活化法の開発

帯広畜産大・獣医・公衆衛生

○品川 森一
山本 真健
金子 宇人
松尾 拓己
白藤 庸生
梶原 直
石黒

重点課題中間報告
16:40～17:00

片峰 茂

補足説明
17:00～17:10

北本 哲之

閉会挨拶
17:10～17:15

班 長 北本 哲之