

- human IL-6 secretion. J. Med. Virol. 61:332-335, 2000.
- 3) 中原英子、西本憲弘、松本智成、吉崎和幸：感染とIL-6. 臨床と微生物 27:17-23, 2000.
 - 4) 西本憲弘、吉崎和幸：ウイルス感染とサイトカイン. 新臨床医のための分子医学シリーズ・疾患とのかかわりを探るサイトカインの最前線；羊土社（東京）p.146-159, 2000.
 - 5) 西本憲弘、吉崎和幸：Castlman's病とMCD-IL-6シグナル阻害による治療- 悪性リンパ腫-疾患単位の確立と層別化治療- (平井久丸編);医歯薬出版（東京）p.74-80, 2000.
 - 6) 西本憲弘、王鞍孝子、宋健、稲城玲子、森康子、山西弘一、吉崎和幸：HIV感染病態におけるIL-6を介したKSHVとHHV-8のウイルス間クロストーク. 日本臨床免疫学会誌 23:586-590, 2000.
 - 7) 杉村和久、御手洗睦和、新村靖彦、橋口周平、吉永圭介、吉満正明、伊東祐二、中島秀喜、吉崎和幸：HIV-1：エントリーインヒビターとスキン免疫. 日本臨床免疫学会誌 23: 592-596, 2000.
 - 8) 西本憲弘、中原英子、吉崎和幸：ヒト型化抗IL-6レセプター抗体によるCastleman病の治療. Annual Review血液2001（高久史磨、溝口秀昭、小宮山淳、坂田洋一、金倉讓編）；中外医学社（東京）p.158-164, 2001.
 - 9) 西本憲弘：リンパ腫と反応性病変との境界- Castleman病の新たな知見. 血液フロンティア 11: 197-204, 2001.
 - 10) 菅又泰博、西本憲弘、吉崎和幸：ヒト型化IL-6レセプター抗体によるCastleman病治療. 血液・腫瘍科 42, 2001 (in press).
 - 11) 王鞍孝子、西本憲弘、松本智成、山西弘一、吉崎和幸：KSHV/HHV-8由来vIL-6によるHIV複製の増強. Minophagen Medical Review 46, 2001 (in press).

(2) 学会発表

- 1) 王鞍孝子、西本憲弘、松本智成、山西弘一、吉崎和幸：KSHV/HHV-8由来vIL-6によるHIV複製の増強. 2000年5月，第14回近畿エイズ研究会学術集会（大阪）.
- 2) 中原英子、西本憲弘、松本智成、吉崎和幸：慢性炎症病態におけるサイトカイン依存性血管新生-IL-6はVEGFを介しCastleman病の血管新生を引き起こす-. 2000年7月，第21回日本炎症学会（東京）.
- 3) 西本憲弘、王鞍孝子、宋健、稲城玲子、森康子、山西弘一、吉崎和幸：HIV感染病態におけるIL-6を介したKSHV/HHV-8とのウイルス

間クロストーク. 2000年9月，第28回日本臨床免疫学会総会（東京）.

- 4) 中原英子、吉崎和幸、松本智成、西本憲弘：Interleukin-6 may cause angiogenesis through VEGF induction in Castleman's disease. 2000年12月，第42回米国血液学会（サンフランシスコ）.

知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし



PML患者における病態進行とJCウイルスDNAの動態

余郷 嘉明¹⁾、井戸田 一郎²⁾、岸田 修二³⁾、安富 大祐⁴⁾、太田 晃一⁵⁾

1) 東京大学医科学研究所・感染免疫大部門・ウイルス感染分野

2) 東京女子医科大学・感染対策科

3) 都立駒込病院・神経内科

4) 慶應義塾大学医学部・神経内科

5) 水戸赤十字病院・神経内科

研究要旨

我々はJCウイルス (JCV) の調節領域をターゲットとする nested PCR 系を開発した。この系を用いて平成12年には、PMLが疑われた25名の患者のうち、5名の髄液 (cerebrospinal fluid, CSF) からJCV、DNA (調節領域) を検出した。また、PMLの確定診断がつかぬまま、1年前に亡くなった患者1名の剖検脳組織からもJCV、DNAを検出した。JCV DNAが検出された患者の基礎疾患はエイズ(2名)、SLE(2名)、膠原病(1名)、特になし(1名)であった。検出されたJCV調節領域はいずれもユニークな再編成型の調節領域であった。一部の症例に対して follow-up、study を行い、(1) PMLの初期はCSFからJCV、DNAが検出されにくい、(2) 脳におけるJCV感染の終焉によりCSFからJCV、DNAが検出されなくなる、などの知見を得た。また、CSFからのJCV、DNAの検出と末梢血リンパ球 (PBL) からのJCV、DNAの検出との関連について検討し、(1)、CSFとPBLから同じ再編成型の調節領域が検出される、(2) PBLよりもCSFの方が長期間にわたって検出される、(3) JCV、DNAがCSFから検出されても、PBLから検出されない例がある、などを明らかにした。2名のPML患者において剖検組織中のJCV、DNAを検索した結果、脳における分布域が異なる様々なJCV調節領域が検出された。CSFから検出されたJCV調節領域は初期病巣から検出ず、後期病巣から検出された。このことは、PMLの初期においてはCSFからJCV、DNAが検出されにくいという上述の知見と矛盾がない。また、JCV調節領域の変化と中枢神経系における病巣の拡大との関連も示唆された。

分担研究者：余郷嘉明

研究協力者：井戸田一郎、岸田修二、安富大祐、太田晃一

Progression of progressive multifocal leukoencephalopathy and dynamics of JC virus DNA

Yoshiaki Yogo¹⁾, Ichiro Itoda²⁾, Shuji Kishida³⁾, Daisuke Yasutomi⁴⁾, Kouichi Ohta⁵⁾

¹⁾Laboratory of Viral Infection, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, ²⁾Department of Infectious Diseases, Tokyo Women's Medical University, ³⁾Department of Neurology, Tokyo Metropolitan Komagome Hospital, ⁴⁾Department of Neurology, Keio University Hospital, ⁵⁾Department of Neurology, Mito Redcross Hospital

目 的

PMLのPCR診断においては、一般にJCV DNAの蛋白コード領域が増幅される。それに対して、我々の系では、遺伝子発現を調節する非コード領域(調節領域と略す)が増幅される。その理由は以下の通りである。PML患者の脳病変部で検出されるJCV (PML型JCV)の調節領域は、腎や尿で検出されるJCVの調節領域(原型調節領域)から塩基配列の再構成(欠失と重複)により作られる。調節領域をターゲットとする我々の系は、検出されたJCVがPML型かどうか判断できるので、PMLの診断をする上で有効である。また、PML型調節領域は各患者にユニークであるから、増幅された調節領域の塩基配列を決定することにより、偽陽性の可能性を排除できる。本研究の第一の目的は、「日和見感染症の治療に関する研究」班の分担課題の一つとしてPMLの診断サービスを全国の病院、医療施設に対して行うことである。また、診断を実際に行いながら、診断法の改善も図る。

PMLの発症や病態進行に関して以下の諸問題が解明されていない。(1) Majorらは「免疫が低下すると、リンパ球あるいはリンパ組織に潜伏感染しているJCVが活性化され、中枢神経系に侵入し、PMLを発症させる」という説を提唱した。しかし、この説は未だ証明されたわけではない。(2) PMLは中枢神経系での脱髄疾患であり、ミエリンを形成する細胞(オリゴデンドロサイト)がJCVに感染するために脱髄が起きる。病態の進行に伴って、病巣は原発部位から他の部位へ拡大する。病巣の拡大がどのように起きるかは明らかになっていない。(3) 上述のように、PML患者の脳病変部で検出されるJCVの調節領域は原型調節領域から塩基配列の再構成(欠失と重複)により作られる。この塩基配列の再構成とPMLの発症との関係は未だ解明されていない。(4) PMLは免疫不全を伴う疾患を有する患者や免疫抑制剤が投与されている移植患者などに主として発生する。免疫低下とJCV調節領域の再編成がどう関わるかも明らかになっていない。本研究は、以上列挙した諸問題を解明する糸口を得るために、PML患者におけるJCウイルスDNAの動態を解析することを第二の目的とする。

方 法

1. 組織からのDNA抽出

CSFからはスマイテスト EX-R&D (ゲノムサイエンス研究所)を用いてDNAを抽出した。PBLからはGENOMIX (Talent社)を用いて抽出した。脳組織からはプロテイナーースK消化、フェノール処理、クロロフォルム処理によりDNAを抽出した。

2. nested PCR

outer primerとしてA1とA3を、inner primerとしてB1とB3を用いた。A3以外のprimerの配列とゲノム上の位置は文献(Sugimoto et al., 1998)に述べた。A3(5'CATTACTTACCTATGTAGCTTTTGGTTCAGGC3'は以前用いたA2を改変したプライマーである。また、今まで用いたTaq DNA polymeraseに代わって、HotStar Taq DNA polymerase (QIAGEN社)を用いた。反応する際、最初に95度C、15分の処理によりHotStar Taq DNA polymeraseを活性化し、その後続けて、通常の増幅サイクル(Sugimoto et al., 1998)を行った。

3. 標準PCR

B1とB3をprimerとして用いて、40サイクル増幅した(Sugimoto et al., 1998)。

4. 増幅断片のクローニング

増幅断片をHindIIIとPstIで消化し、調節領域を切り出した。切り出された調節領域をpBluescript II SK(+)を用いてクローニングした。

5. 制限酵素解析

増幅断片を含むクローンをHindIII、PstI、SstIにより消化した。消化液を3%のNuSieveアガロースゲルで電気泳動した。得られた切断パターンからクローンをグループに分けた。各グループの代表クローン2または3個をシーケンシングした。

6. 塩基配列の決定

クローンをQIAprep 8 Turbo Miniprep kit (QIAGEN社)を用いて精製した。精製クローンを蛍光式自動シーケンサーを用いてシーケンシングした。

結 果

1. nested PCRの改良

我々は微量のJCV調節領域を増幅する nested PCRを開発し (Sugimoto et al., 1998)、この系を用いたPMLの診断サービスを全国の病院に対して行ってきた。その過程でこの方法の問題点が浮かび上がってきた。陽性コントロール (25コピーのJCV DNAクローン) から増幅断片が時々得られなかったことである。原因は二つあった。一つは凍結融解の繰り返しによる陽性コントロールの劣化であり、もう一つはTaq DNA polymeraseが十分な活性を持っていないことであった。前者の解決法として、陽性コントロールを小分けして保存し、10回程度使用した陽性コントロールは廃棄した。後者に対処するために、最初Taq DNA polymeraseを2倍量用いた。ところが、増幅断片は得られるものの、非特異的な増幅が目立つようになった。非特異的な増幅を防ぐために、いわゆる Hot Start のTaq DNA polymeraseの一つであるQIAGEN社のHotStar Taq DNA polymeraseを使ってみた。その結果、通常の酵素量でも十分なJCV DNA断片の増幅が得られ、かつ非特異的な増幅は抑えられた。ロッシュ・ダイアグノスティック社のFastStart Taq DNA polymeraseでも同様な結果が得られた。活性化に要する時間はFastStart Taqの方が短い、購入価格が安い HotStar Taqを用いることとした。

2. PMLのPCR診断の実績

検査した患者数は26名であった。CSFを検査した患者は25名で、そのうち、5名のCSFからJCV DNAが検出された。CSFと共に脳生検も調べた症例は1例では、CSF、脳生検いずれも陰性であった。剖検脳を調べた1例は、PMLの確定診断がつかぬまま、死後1年経過した症例であった。この剖検脳からJCV DNAが検出された。

表1は、CSFまたは脳組織よりJCV DNAが検出され6名の患者を示している。これらの陽性患者の基礎疾患はエイズ (2名)、SLE (2名)、膠原病 (1名)、特になし (1名) であった。

図1に、CSFまたは脳組織より検出されJCV調節領域の構造を示す。いずれも原型調節領域から欠失と重複により作られた再編成型の調節領域であった。同じ構造の調節領域は過去に検出されていなかった。

典型的なPML型調節領域では原型調節領域内のdomain Aが重複し、domain Bが欠失している。J21、J22、J23で検出された調節領域がこれに当てはまった。しかし、症例J19、J20で検出された調節領域はdomain Aが部分的にしか重複していなかった。症例J18で検出された調節領域はdomain Aが重複しておらず、domain Bは欠失していなかった。このように、平成12年は非典型的なPML型調節領域が目立った。

表1 JCV DNAが検出された患者

症例	性別 (年齢)	基礎疾患	検体
J18	女 (43)	SLE	CSF
J19	男 (46)	AIDS	CSF
J20	女 (40)	SLE	CSF
J21	女 (77)	None	剖検脳組織
J22	男 (35)	AIDS	CSF
J23	女 (59)	MCTD ¹⁾	CSF

¹⁾膠原病に伴う血管障害性の血栓症

3. 剖検脳組織が詳細に調べられた症例 (J6)

33歳の男性。平成10年2月にエイズと診断された。2月末にサイトメガロウイルスによる髄膜炎とウイルス血症を発症。3月10日よりガンシクロビルを開始。髄膜炎のための末梢神経炎によると思われる運動障害が出現。3月16日より抗HIV剤の投与を開始。その後CSF所見に改善がみられ、運動機能の改善が見られた。

4月10日MRIにて左後頭葉にT1WIでlow intensity、T2WIでhigh intensity、Gdでenhanceされない径20mm程の脱髄病変がみられ、PMLが疑われた。しかし、4月15日採取のCSFからJCV DNAは検出されなかった。5月初旬より痴呆、健忘が目立つようになった。5月27日MRIにて左後頭葉に限局した脱髄病巣はさらに拡大し、また対側への広がりも認められた。5月28日採取のCSFからJCV DNAを検出。

以上の経過は、MRIで白質の病変が確認されるが、病巣が余り目立たないPMLの初期においては、CSFからJCV DNAが検出されにくいことを示

している。

患者はその後2年近く、片麻痺の状態で生存したが、平成12年2月死亡した。解剖が行われ、脳のいろいろな領域に存在するJCV DNAが解析された。図2に患者の脳から検出された6種類の調節領域の構造を示した。Koma-1AはCSFからも検出された構造で、Koma-1B～1Fは脳組織からのみ検出された。図2に示した構造を眺めると、6種の調節領域は共通の欠失と共通の重複を持っていることがわかる。詳細は省略するが、Koma-1A～1Eはいずれも、Koma-1Fから異なる重複により作られたことが確認された。

次に、これらの調節領域の脳における分布を調べた。調べた脳の領域は頭頂葉、側頭葉、後頭葉であった。各領域で検出された各調節領域の比率を表2に示した。後頭葉は画像診断でPMLの病巣が最初に検出された部位であったが、CSFから検出されたKoma-1Aは後頭葉では少ないことがわかった。このことから、Koma-1AはPMLが進んだ時期に出現した調節領域であると考えられた。

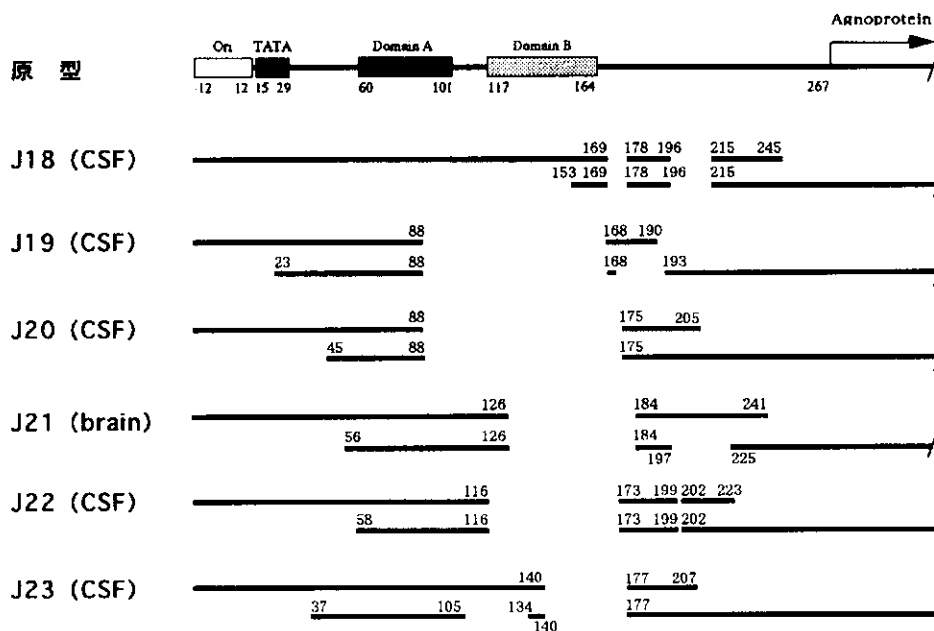


図1. 患者CSFと剖検脳組織から検出されたJCV調節領域の構造

最上部に原型調節領域を示す。OriはDNA複製の開始点、TATAはTATA配列を表す。また、agnoproteinの翻訳開始部位を示す。domain Aは多くのPML型調節領域で重複し、domain Bは欠失している。数字はヌクレオチド番号を示す。原型調節領域の下に、平成12年1月から12月に我々が患者CSFと剖検脳組織から検出した調節領域の構造を示す。図の表し方は以下の通りである。原型調節領域と同じ配列なら、左から右へ線を引き、欠失に出会ったら空白にし、重複に遭遇したら、一段下の、重複配列が開始する位置へ戻り、再び右へ線を引く。

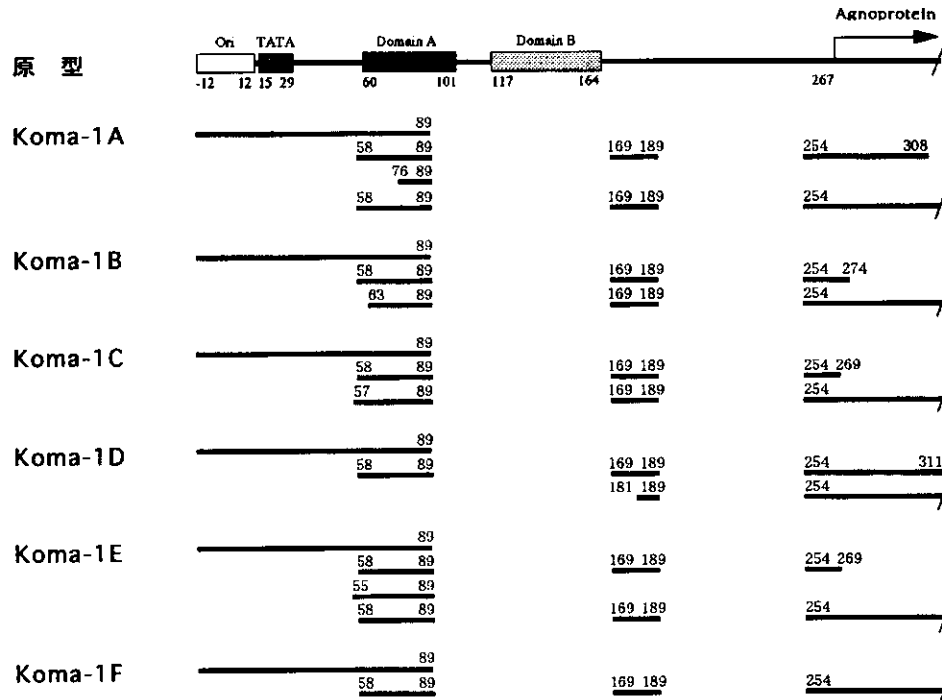


図2. 症例J6の剖検脳組織から検出されたJCV調節領域の構造

最上部に原型調節領域を示す。原型調節領域の下に、いろいろな組織から検出された調節領域 (Koma-1A ~ 1F) の構造を示す。Koma-1Fは他の構造 (Koma-1A ~ 1E) の前駆体と考えられる。図の表し方は図1と同じ。

表2 脳の各領域における各JCV調節領域の比率(%) (症例J6)

調節領域 ¹⁾	頭頂葉	側頭葉	後頭葉
Koma-1A	79	60	7
Koma-1B	15	0	0
Koma-1C	0	20	0
Koma-1D	0	20	0
Koma-1E	0	0	41
Koma-1F ²⁾	0	0	52
Others	6	0	0

¹⁾シーケンシングとRFLP解析により同定した。各調節領域の構造は図2に示した。

²⁾他の調節領域 (Koma-1A ~ 1E) の前駆体に当たる。

4. 剖検脳組織が詳細に調べられた症例 (J19)

患者は43歳の女性。平成12年4月26日発症の脳出血(右被殻)で入院となる。

入院後、微熱、体部白鮮、白血球減少によりHIV感染症を疑い精査。5月11日HIV感染症と判明。6月29日痙攣、意識障害を認め、頭部CT上、広範な脳出血の再発を左被殻(前回と反対側)に認めた。そのため、植物状態に陥った。

入院時、頭部CTにて出血の他に、左小脳にlow density areaを認めていた。MRI上でT2WIでhigh intensity、CTでlow densityであった。脳梗塞との区別は困難であったが、入院時より日を追って病変が明瞭になってきた。病巣は単一であった。7月25日採取のCSFからJCV DNAが検出された。10月4日死亡。

症例J19で最初にJCV DNAが検出されたのは、7月25日採取のCSFであった。それ以前とそれ以降に採取したCSFからJCV DNAの検出を試みた。5月18日には1/6の検出率で検出されたが、6月25日には検出されなかった。7月25日以降では、9月5日と10月4日に高い率で検出された。このように、本例においても、PMLの初期においてCSFからJCV DNAの検出が困難であった。

この症例ではPBLからJCV DNAを検出することも試みた。しかし、CSFから高率に検出された時期に当たる8月9日に採取したPBLからJCV DNAは検出されなかった。(PBLからのJCV DNAの検出に関しては次の症例で詳しく述べる。)

剖検の許可得られ、脳のいろいろな領域においてJCV DNAを検索した。図3はこの患者の脳から検出された調節領域の構造を示している。Keio-2AはCSFからも脳からも検出された構造で、2Bは死亡直前のCSFからはわずかに検出されたが、2Cは脳組織からのみ検出された。

Keio-2A、2B、2Cは共通の欠失を持っていたことから、これら3つの構造は欠失のみを有する中間体から異なる重複により作られたことがわかった。また、Keio-2Aには短い欠失が起きていた。

これらの調節領域の脳における分布を調べた(表3)。調べた脳の領域は左小脳、右小脳、右後頭葉、右頭頂葉、左側頭葉、右前頭葉であった。画像上、PMLの病巣が最初に検出された左小脳ではCSFから検出されたKeio-2Aが少ないことがわかった。このことは、CSF中のJCV DNAがPMLの初期には検出されず、PMLが進んだ時期には検出されたことと一致する。

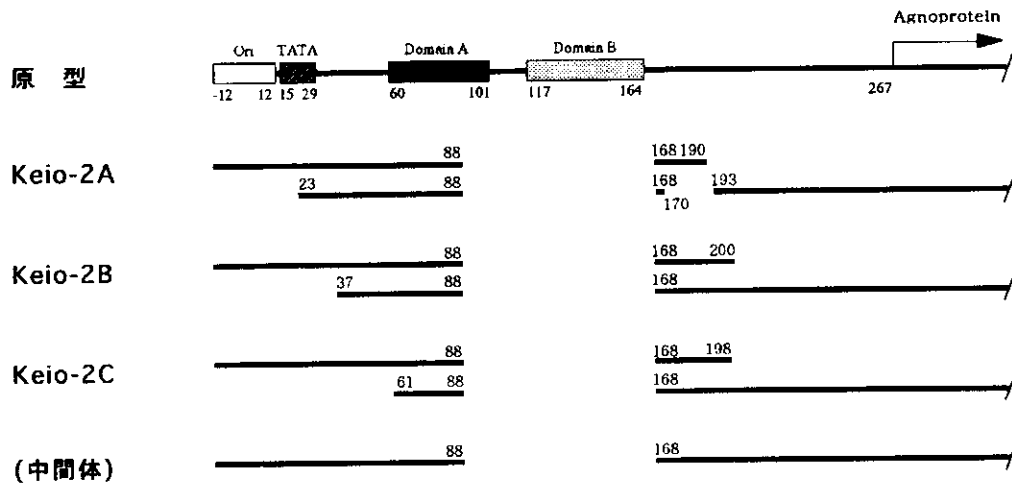


図3. 症例J19の剖検脳組織から検出されたJCV調節領域の構造

最上部に原型調節領域を示す。原型調節領域の下に、いろいろな組織から検出された調節領域(Keio-2A~2C)の構造を示す。Keio-2A~2Cは中間体から異なる重複により形成されたと考えられる(但し、中間体は検出されていない)。図の表し方は図1と同じ。

5. CSFとPBL中のJCV DNAがfollow-upされた症例 (J18)

患者は43歳の女性。25歳のときSLEと診断され、免疫抑制剤で、病状は比較的安定。平成11年10月、頭重感、右上肢脱力感、構音障害、体幹失調が出現。11月2日、両側小脳白質にT2WIでhigh signal領域あり。12月27日、水戸赤十字病院、神経内科に入院。頭部MRIで、両側小脳半球から中小脳脚にかけて、Diffusion-weighted image、Flair、T2WIでhigh intensity、T1WIでlow intensity、Gd-enhanceを示さないdiffuseな病巣を認めた。1月23日採取のCSFからPCRによりJCV DNAを検出し

た。その後、月1回の頻度でMRIを観察し、病変の拡大を認めた。

この症例では、1ヶ月から1ヶ月半の間隔で、CSFからJCV DNAの検出を試みた(表4)。1月から5月までは高い率で検出されたが、6月末頃から検出率が低下し、10月3日採取のCSFからは検出されなくなった。

この症例ではPBLからもJCV DNAの検出を試みた(表4)。3月、4月、5月と検出されたが、6月末からは検出されなくなった。

CSFとPBLから一貫して同じ調節領域(図1、J18)が検出された。

表3 脳の各領域における各JCV調節領域の比率(%) (症例J19)

調節領域 ¹⁾	左小脳	右小脳	右後頭葉	右頭頂葉	左側頭葉	右前頭葉
Keio-2A	5	14	76	67	43	29
Keio-2B	71	81	14	19	48	43
Keio-2C	10	0	5	10	5	24
Others	14	5	5	5	5	5

¹⁾シーケンシングとRFLP解析により同定した。各調節領域の構造は図3に示した。

表4 CSFおよびPBLからのJCV DNAの検出

検体採取日	JCV DNAの検出回数 / nested PCR施行回数	
	CSF	PBL
平成12年1月23日	6/6	- ¹⁾
平成12年3月13日	6/6	6/6
平成12年4月13日	3/6	4/6
平成12年5月23日	4/6	2/6
平成12年6月27日	2/6	0/6
平成12年8月9日	1/6	0/6
平成12年10月3日	0/6	0/6

¹⁾検査せず。

考 察

1. CSFを用いたPMLのPCR診断の限界

今回CSF(5症例)および剖検脳組織(1症例)から検出されたJCV調節領域はいずれも、原型から欠失と重複により作られたPML型調節領域であった(図1)。検出された調節領域と同じPML型調節領域は過去に検出されていない(即ち、コンタミネーションの可能性は除去された)。以上により、6症例はいずれもPMLと確定診断された。

しかし一方、CSFを用いたPMLのPCR診断の限界が明らかになった。すなわち、症例J6やJ19で示されたように、PMLの初期に採取されたCSFからJCV DNAが検出されなかったり、検出率が極端に低いことがあった。剖検脳の詳しい解析からも、PMLの初期に採取されたCSFからJCV DNAが検出されにくいことを裏付ける証拠が得られた。

CSFを用いたPMLのPCR診断の限界に対する当面の対応策として以下を提案する。

(1) 初回陰性でも1ヶ月おきくらいにCSFを採取し、JCV DNAの検出を試みる。(2) 検出感度を上げるために、DNA抽出とPCRの施行回数を増やす。(3) 脳生検を採取し、病理学的な検索とPCRによるJCV DNAの検出を行う。

2. CSFからのJCV DNAの消失

エイズに合併したPMLに対してHAART療法を行うとエイズのみならずPMLの病態も改善または安定化し、患者は長期生存し、CSF中のJCV DNAは検出されなくなると報じられている。実際、我々もエイズ患者においてHAART療法に伴うCSF中のJCV DNAの消失を確認した。また、エイズ以外の基礎疾患を有するPML患者においても、CSF中のJCV DNAの消失と患者の長期生存と関連があることを認めた(厚生省科学研究費補助金エイズ対策研究事業、HIV感染症に関する臨床研究、平成11年度報告書。以下平成11年度報告書と略す)。

本研究において、病態進行とCSF中のJCV DNAの消長に関してさらなる知見が得られた。すなわち、症例J18では、MRIによる病巣の観察とCSFおよびPBL中のJCV DNAの検索が平成12年1月

から同年末まで行われた。小脳で始まった白質の脱髄性病変は8月頃には大脳半球の全域に拡大し、大脳、小脳、脳幹の白質は完全に脱髄に陥った。その間、CSF中のJCV DNAは検出され続けたが、脳における脱髄が終焉した頃からCSFからのJCV DNAの検出率は低下し、10月に採取のCSFからは検出されなくなった。このように、JCVが感染できる細胞すべてがJCVによって食い尽くされた場合も、CSFからJCV DNAが検出されなくなることが示唆された。

3. PML患者においてPBLに感染しているJCVの意義

我々は最近、CSFからJCV DNAが検出された場合、PBLからもJCV DNAを検索することを努めている。現在までのところ、5症例を検討した。CSFとPBL両方からJCV DNAが検出されたケースが2例、CSFからは検出されたが、PBLから検出されなかったケースが3例であった。例数が少ないので未だ最終的な結論は出せないが、すくなくとも一部のPML患者においてPBLからJCV DNAが検出されることは間違いない。PML患者のPBLに感染しているJCVをどのように位置づけるか。三通りの可能性が考えられる。(1) 感染リンパ球が中枢神経系に侵入し、PMLを発症させるといわれているが、PMLが発症した後でも感染PBLは中枢神経系へ侵入し、感染源となるJCVを補給する。(2) 中枢神経系に浸出したPBLがJCVに感染し、末梢血へ流出する。末梢血で二次的な感染が起き、感染が拡大する。(3) 末梢血での感染と中枢神経系での感染は独立していて、互いに関係はない。PBLおよび中枢神経系から検出されるJCV調節領域の構造を比較することによって、これらのうちどれが正しいか明らかになるであろう。

平成12年およびそれ以前に、計6例のPML患者において剖検脳に存在するJCV DNAが詳しく解析された(本報告および平成11年度報告書)。これらすべての症例において、中枢神経系には多様な再編成型JCV調節領域が存在することが確認された。一方、PML患者のPBLから検出されるJCV調節領域は再編成型であり、ほぼ単一であった。PBLから検出された調節領域は同じ患者の中枢神経系で見つかった。以上から、脳に存在する多様

な調節領域のうち、ある調節領域を持つJCVが末梢血へ流出したと考えるのが一番合理的である。中枢神経系から末梢血へのJCVの流れはPMLが発症した後での話である。「リンパ球あるいはリンパ組織に潜伏感染しているJCVが免疫低下した患者で活性化され、中枢神経系に侵入し、PMLを発症させる」というMajorらの説が否定されたわけではない。

以上の説明が正しいかどうかを明らかにするために、もっと多くの症例の解析が求められる。

4. 中枢神経系におけるJCV感染の拡大とJCV調節領域の再編成

我々は以前、あるPML症例(K2)において剖検脳のいろいろな領域に存在するJCV調節領域を解析した(平成11年度報告書)。その結果、PMLの後期においては、前頭葉で最初に現れた病巣が中枢全体に拡がっただけでなく、起源が異なる新たな病巣が小脳に出現し、一部後頭葉まで病巣は拡がったことが示唆された。

本研究においては、2つのPML症例(J6とJ19)において剖検脳組織中のJCV DNAが検索された。症例J6では、頭頂葉、側頭葉、後頭葉が調べられ、6種の再編成型調節領域(Koma-1A~1F)が検出された(図2)。先に述べたように、Koma-1Fが前駆体で、これから他の全ての調節領域(Koma-1A~1E)が作られたことが示唆された。Koma-1Fは初期病巣である後頭葉からのみ検出された。以上の知見から、「Koma-1Fを持つJCVが後頭葉で最初に出現した。このウイルスがそこから脳の他の領域に拡がる過程で、他の調節領域を持つJCVが作られた」と推定された。これらのJCVはKoma-1Fを持つJCVよりもオリゴデンドロサイトでの増殖力が強かったと考えられる。

症例J19では6つの脳の領域が調べられ、主に3種の再編成型調節領域(Keio-2A~2C)が検出された。最初の病巣である左小脳と隣接する右小脳からは主にKeio-2Bが検出され、後期の病巣と考えられる領域ではKeio-2A、2B、2Cが検出された(図3)。このように、PMLの進行によりJCV調節領域の多様性が増した。Keio-2A、2B、2Cは共通の中間体から作られたと考えられた(ただし、この中

間体は検出されていない)。中間体からKeio-2A、2B、2Cが作られる過程が中枢神経系で起きたのか、他の組織(リンパ球やリンパ組織)で起きたのか、明らかではない。

今後多くの剖検脳を同様に解析することによって、JCV調節領域の動態とJCV感染の拡大との関連を解明したい。

結 論

1. 「日見感染症の治療に関する臨床研究班」の分担課題の一つとしてPMLの診断サービスを全国の病院に対して行い、平成12年には5症例のCSFと1症例の剖検脳組織からユニークなPML型JCV調節領域を検出し、PMLの診断に貢献した。
2. PMLが進んだ段階ではCSFからJCV DNAが検出されたが、初期においてはJCV DNAの検出が困難であった症例が2例あった。このような、CSFを用いたPMLのPCR診断の限界に対して、当面以下の対策が考えられる。(1) 初回陰性でも1ヶ月おきくらいにCSFを採取し、JCV DNAの検出を試みる。(2) 検出感度を上げるために、DNA抽出とPCRの施行回数を増やす。(3) 脳生検を採取し、病理学的な検索とPCRによるJCV DNAの検出を行う。
3. 従来、CSF中のJCVの消失が中枢神経系におけるJCV感染の停止を意味し、患者の長期生存の可能性を示唆すると考えられた。症例J18は、JCVが感染できる細胞すべてがJCVによって食い尽くされた場合も、CSFからJCV DNAが検出されなくなることを示唆した。
4. PML患者の諸組織におけるJCV調節領域の解析によって、JCVの動態を推定する知見が集積しつつある。今後も、同様な解析を行い、PMLの発症前と後におけるJCVの動態を解明したい。

研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato, A., Sugimoto, C., Zheng, H.-Y., Kitamura, T., Yogo, Y. Lack of disease-specific amino acid chang-

- es in the viral proteins of JC virus isolates from the brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch. Virol.* 145: 2173-2182, 2000.
- 2) 清水優子、太田宏平、竹内恵、岩田誠、余郷嘉明. 高活性抗レトロウイルス療法が有効であった後天性免疫不全症候群に伴う進行性多巣性白質脳症一例. *臨床神経学.* 40: 821-826, 2000.
 - 3) 余郷嘉明、杉本智慧. JCウイルスの遺伝的変化と潜伏感染：進行性多巣性白質脳症との関連. *Annual Review 神経2001*, p. 135-144. 中外医学社, 2001.
 - 4) Yogo, Y., Sugimoto, C. The archetype concept and regulatory region rearrangement. *Human polyomaviruses: molecular and clinical perspectives*, John Wiley & Sons, in press.
 - 5) Miralles, P., Berenguer, J., Garcia de Viedma, et al.: Treatment of AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy with highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* 12:2467-2472, 1998
 - 6) Padgett, B. L., Walker, D. L.: New human papovaviruses. *Prog. Med. Virol.* 22: 1-35, 1976
 - 7) Sugimoto, C., Kitamura, T., Guo, J., et al.: Amplification of JC virus regulatory DNA sequences from cerebrospinal fluid: diagnostic value for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch. Virol.* 143: 249-262, 1998
 - 8) Yogo, Y., Kitamura, T., Sugimoto, C., et al.: Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals. *J. Virol.* 64: 3139-3143, 1990

2. 学会発表

- 1) 余郷嘉明、藤原一男、古沢義人、杉本智慧、佐藤滋、武田篤、北本哲之、糸山泰人：PML剖検例におけるJCV調節領域の構造と組織との関連. *日本神経感染研究会.* 名古屋, 2000.
- 2) 杉本智慧、余郷嘉明：ヒトポリオーマウイルスJCウイルスのT抗原の機能. 第23回日本分子生物学会年会. 神戸, 2000.
- 3) 鄭懷穎、杉本智慧、北村唯一、余郷嘉明：日系アメリカ人におけるJCウイルスの垂直感染. 第48回日本ウイルス学会学術集会. 津, 2000.

参考文献

- 1) Agostini, H. T., Ryschkewitsch, C. F., Singer, E. J., et al.: JC virus regulatory region rearrangements and genotypes in progressive multifocal leukoencephalopathy: two independent aspects of virus variation. *J. Gen. Virol.* 78: 659-664, 1997
- 2) Frisque, R. J., Bream, G. L., Cannella, M. T.: Human polyomavirus JC virus genome. *J. Virol.* 51: 458-469, 1984
- 3) Gallia, G. L., Houff, S. A., Major, E. O., et al: Review: JC virus infection of lymphocytes-revisited. *J. Infect. Dis.* 176:1603-1609, 1997
- 4) Iida, T., Kitamura, T., Guo, J., et al.: Origin of JC virus variants associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 5062-5065, 1993
- 5) Major, E. O., Amemiya, K., Tornatore, C. S., et al.: Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin Microbiol Rev.* 5: 49-73, 1992.



HIV感染者における血中Pc抗原測定の意味

増田 剛太¹⁾、藤野 隆志²⁾、辻 守康²⁾

¹⁾ 東京都立駒込病院感染症科

²⁾ 杏林大学医学部感染症学(寄生虫学)教室

研究要旨

純化Pcで感作した家兎血清(ラット肺組織と真菌抗原を用い、これらに対する抗体を吸収してある)を抗体とし、寒天二重拡散法を用いて患者血清との間に形成される沈降線の有無を以て患者血液の(循環)Pc抗原の陽性、陰性を判定した。今回の研究はHIV感染症例を対象とし、採取後-80℃に保存されていた検体を用いたレトロスペクティブスタディーである。症例数は54であり、その内訳はPCP発症者20、非発症者34であった。PCP発症例ではPc抗原陽性10、陰性10であり(陽性率50%)、非発症例ではPc抗原陽性1、陰性33(陽性率2.9%)で偽陽性は少なかった。

今回検討した-80℃保存検体と同時に採取され、新鮮血清としてPc抗原が測定されその成績が陽性であることが判明していた症例16例(PCP発症12、非発症4)の検体で検討すると、-80℃凍結保存後のPCP発症者検体12のうちPc抗原は陽性、陰性各6例(凍結保存による陰性化率50%)であり、今回測定した血清Pc抗原が凍結保存に安定でないことが示された。従って、今後の研究は新鮮血清を用いたプロスペクティブスタディーによる成績の集積・検討を中心とする必要がある。

分担研究者：増田剛太

研究協力者：藤野隆志、辻 守康

Circulating *Pneumocystis carinii* (Pc) antigens in HIV-infected individuals

Gohta Masuda¹⁾, Takashi Fujino²⁾, Moriyasu Tsuji²⁾

¹⁾ Department of Infectious Diseases, Tokyo Metropolitan Komagome Hospital and ²⁾ Department of Infectious Diseases, School of Medicine, Kyorin University

目 的

免疫不全状態にあるHIV感染宿主はニューモシスチス・カリニ肺炎(PCP)を発症する頻度が高く、その診断には喀痰やBAL、TBLBなどによる患者検体を対象とした細胞・組織学的診断やPCRによるニューモシスチス・カリニ(Pc)の証明が実用化されている。しかし、これらの方法では検体確保が必ずしも容易ではないことがあり(喀痰は必ず喀出されるとは限らない)、また、検体採取手段によっては侵襲性が高く危険を伴うことがある。これらの方法を駆使してもPcの証明によるPCPの診断率は現時点では満足すべき水準に到達していない。また、PCPは免疫不全宿主に発症するため、AIDSを初めとする抗体産生能が傷害されている生体では抗体系による感染・発症証明は困難である。そこで、検体が確実に採取でき、患者にとっても侵襲度が極めて低い血液を検体として、流血中に存在するとされる(循環)Pc抗原を免疫血清学的に検出する手法を用い、HIV感染者(PCP発症者・非発症者)の血清からのPc抗原検出を試み、その成績と臨床との関連を検討した。さらに、Pc抗原をPcの感染・発症・治療の判定に用いる可能性についても言及する。

方 法

1. 研究対象症例

対象となった検体は東京都立駒込病院感染症科で1985～2000年に診療したHIV感染者のうち54症例の血清である。これら患者のHIV感染の有無、CD4+リンパ球数、PCP発症の有無とその診断根拠となった臨床検査成績などはいずれも診療録の記録を根拠とした。

本年度の検討は主として採取後-80℃に凍結保存されていた検体を用いたレトロスペクティブスタディーである。凍結保存されていた患者血清は

凍結されたまま杏林大学感染症学(寄生虫学)教室に搬送され、Pc抗原の測定が行なわれた。なお、本研究の実施については駒込病院倫理委員会の承認が得られている。

2. 血液中Pc抗原の検出法

①血清検査に用いるPc抗体の作製(表1)

ステロイドをラットに処置してPCPを発症させ、このラット肺から集シスト法を用いてPcのシストを採取する。このPcからシスト純化法によりPc純化抗原を作製し、この純化抗原とアジュバントを用い家兔を感作して感作血清を作製する。この感作血清から正常ラット肺組織抗原と真菌抗原を用いて吸収した血清をPC抗体とした。

②検体血清との反応

検体血清を凍結乾燥により3倍に濃縮する。この3倍濃縮血清及び原血清とPc抗体を寒天二重拡散法により反応させ、沈降線形成の有無によりPc抗原の陽性・陰性を判定した。

結 果

1. HIV感染症例間でのPc抗原(表2)

-80℃保存検体54症例の内訳はPCP発症例20、非発症例34であった。発症例20例での成績ではPc抗原陽性10例、陰性10例と偽陰性が50%を占めていた。一方、PCP非発症34例からの検体にあつてはPc抗原陽性(偽陽性)は1例(2.9%)のみであり、33例(97.1%)は陰性で臨床症状と合致していた。

2. PCP発症・非発症者間のCD4+陽性細胞数の比較(表3)

PCP発症例20例にあつてはPc抗原陽性・陰性の如何に拘らず、全検体でCD4+細胞数は100/μlと著しい免疫不全を示した。これに対し、PCP非発症例検体34ではCD4+細胞数 \geq 200/μlで免疫

表1 血清検査に用いるPc抗体の作製

1. ラットをステロイドで処理し、ラットにPc肺炎を発症させる。
2. このPc感染ラット肺から集シスト法によりPcのシストを採取。
3. ラットPcシストをシスト純化法により処理し、Pc純化抗原を作製。
4. このPc純化抗原とアジュバントを用い、家兔を感作して感作血清を作製。
5. この感作血清から正常ラット肺組織抗原と真菌抗原を用いて吸収してPc抗体を作製。

能が保たれている症例が26と多くを占めた。

3. PCPの診断根拠 (表4)

PCP発症20例での診断根拠を示す。Pc抗原陽性例と陰性例に分けて集計したが、陽性例では6例で細胞診、PCR、剖検などによるPcの確認が行なわれており、陰性例でのPc証明3例に比べやや高

表2 HIV感染症例間での循環Pc抗原 (-80℃保存検体を用いた成績)

(n=54)		
PCP Pc抗原	発症例 (n=20)	非発症例 (n=34)
陽性	10	1
陰性	10	33

表4 PCPの診断

方法	Pc抗原*	
	(+) 例	(-) 例
細胞診・PCR・剖検	6	3
治療的診断	2	6
不明	2	1

*-80℃保存検体での成績

率である傾向が見られた。しかし、症例数が少ないため、その意味については今後慎重に成績を集積し検討する必要がある。

4. 新鮮血清・-80℃保存血清でのPc抗原に関する成績の比較 (表5)

-80℃凍結保存血清でPc抗原陽性であった検体と同一年月日に採取され、新鮮血清としてPc抗原が測定され、その成績が陽性であることが判明

表3 PCP発症・非発症例間のCD4陽性細胞数の比較 (-80℃保存検体を用いた成績)

CD4+細胞 /μl	PCP発症例 (n=20)		PCP非発症例 (n=34)
	Pc抗原 (+)	Pc抗原 (-)	
≥200	0	0	26
100~199	0	0	0
<100	10	10	8

表5 新鮮血清・-80℃保存血清間でのPc抗原に関する成績の比較

症例 番号	略号	検体採取年	PCP発症 の有無	Pc抗原	
				新鮮検体	-80℃保存検体
1	IS	1993	+	+	+
2	TA	1994	+	+	+
3	KF	1994	+	+	+
4	TT	1995	+	+	-
5	AY	1996	+	+	+
6	NM	1996	+	+	-
7	TS	1997	+	+	+
8	TF	1999	+	+	+
9	OT	1999	+	+	-
10	SN	1999	+	+	-
11	TS	1999	+	+	-
12	AY	2000	+	+	-
13	HM	1996	-	弱+	-
14	KS	2000	-	+	-
15	NK	2000	-	+	-
16	HS	2000	-	弱+	-

していた症例16例(PCP発症12、非発症4例)と-80℃保存検体での成績を比較した。PCPを発症し新鮮血清のPc抗原陽性であった12症例(表中の症例1-12)のうち、-80℃保存血清でもなおPc抗原陽性であった症例は6例、陰性化した症例も6例であり、凍結保存によりPc抗原が陰性化する症例が多いことが知られた。PCP非発症例4例(症例13-16)の-80℃保存検体を用いた場合の抗原は全例で陰性であった。

血清保存状況によるPc循環抗原の推移(表6)
PCP症例からのPc抗原陽性検体についてさまざま

な条件下(保存温度4℃、-20℃、-80℃の3段階。同一容器中に検体を保存して使用時に融解、凍結を繰り返す群と小容器中に検体を分注して凍結保存し、各容器内の検体は使用時まで融解しない群の2群)に保存した時点での測定成績を示す。全体として凍結・融解を繰り返した検体では分注保存した検体に比してPc力価の低下がより明らかであった。今回の保存検体の保存条件と同一である-80℃、分注保存にあっても保存期間が1年を超過するとPc力価が急速に減衰することが証明された。

表6 血清保存状況によるPc循環抗原の推移

	同一容器保存(使用時に融解・凍結を反復)			分注保存(使用時のみ融解)		
	++	+	-	++	+	-
	(4℃・5検体)			(4℃・5検体)		
2週間	5	0	0	5	0	0
1ヶ月	1	2	2	4	1	0
3ヶ月	0	1	4	1	1	3
6ヶ月	0	0	5	0	1	4
9ヶ月	0	0	5	0	0	5
	(-20℃・21検体)			(-20℃・21検体)		
2週間	21	0	0	21	0	0
1ヶ月	15	5	1	19	2	0
3ヶ月	8	7	6	18	2	1
6ヶ月	1	5	15	11	7	3
9ヶ月	0	2	19	0	7	14
1年	0	0	21	0	1	20
1年半	0	0	21	0	0	21
	(-80℃・7検体)			(-80℃・7検体)		
2週間	7	0	0	7	0	0
1ヶ月	7	0	0	7	0	0
3ヶ月	5	1	1	7	0	0
6ヶ月	3	2	2	5	1	1
9ヶ月	0	2	5	5	1	1
1年	0	2	5	1	4	2
1年半	0	0	7	0	1	6
2年	0	0	7	0	0	7

(註) ++ ----- 原血清・3倍濃縮血清とも陽性
+ ----- 3倍濃縮血清のみ陽性
- ----- 血清中の循環抗原陰性

6. 臨床経過とPc抗原 (図1)

56歳、男。1999年3月PCPを発症して駒込病院に入院した。CD4+細胞数は80/μl、HIVRNAコピー数は 3.0×10^5 /mlであった。ST合剤による治療を開始したが、薬剤アレルギーが出現したためペンタミジン投与に変更し、合計3週間で投与を終了してPCPは治癒した。治癒後の一定期間は低容量ST合剤によるPCPの予防投与が続けられた。PCP治癒後、ddI、d4T、NFVによるHAARTが開始され、HIVRNA値の減少とCD4+細胞数の増加に関し順調な経過が得られた。本症例では不規則にはあるが経時的にPc抗原測定が行なわれており、新鮮血清によるものと-80℃保存血清での成績を図中に比較した。両者の採血時点が必ずしも一致していないため比較が困難であり、さらに凍結保存血清でPCP治癒後に一時期陰性化したPc抗原が1999年末に一時的に陽性になるなど必ずしも臨床と合致しない成績も見られる。この症例は現在でも治療継続中であり、今後さらにその経過に注目して行きたい。

考 察

AIDSに合併するPCP診断のための検査方法として喀痰や気管・気管支や肺組織を検体とする細

胞診、組織診やPCR法などが行なわれる。しかし、これらの検査方法では現実問題としてPc陰性例があり、また、PCPが重症感染症であるため検査結果が判明する以前にエンピリック・セラピーが開始される症例が多い。実際には臨床症状、低酸素血症、胸部レントゲン写真、胸部CT像、肺病巣部位へのガリウム集積の証明などによる臨床診断が多く行なわれ、投薬に対する反応によりPCPの診断がなされることが多い。

今回検討した循環血液中のPc抗原は理論的には極めて合理的な測定系と考えられる。今年度の課題としては、当初、臨床経過とPc抗原の動向が相関するか否かを選択し、症例数を確保するために凍結血清を用い、臨床経過との関連を検討するために同一症例での経時的に採取された多くの検体での測定が行なわれた。しかし、最初に予想したよりも保存検体ではPc力価の減衰が大きく、データとして示さなかったが、保存血清を用いた経時的Pc力価変動の測定は不成功に終わった。PCP発症20症例にあっても10例のPc偽陰性成績が報告された。今回の実験成績を踏まえた検討からは、今後新たな症例での新鮮血清を用いた成績の集積が必要となることが証明されたことになる。

さまざまな保存条件を設定した試験管内成績からPc抗原力価は保存に不安定である。さらに、新

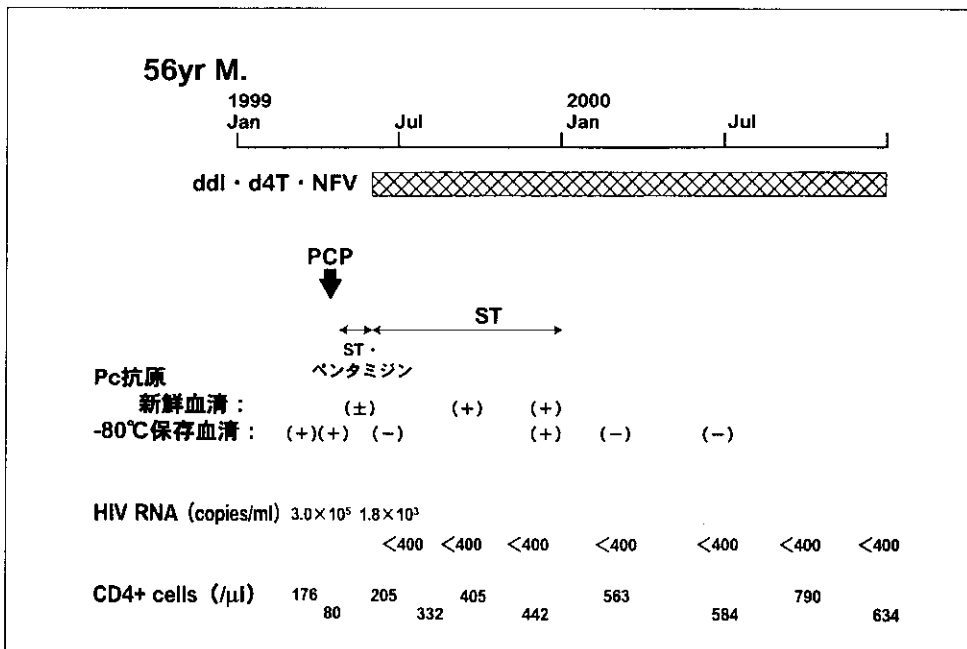


図 1

鮮血清と-80℃凍結保存血清での成績の対比から知られるように、長期間保存した血清を用いた場合のPc抗原は陰性化するため偽陰性が多い。一方、新鮮検体を用いた場合には、逆に、Pc抗原偽陽性が問題となろう。偽陽性成績の理由としてPCP非発症例にあっても実際に宿主体内にPcの感染増殖(コロナイゼーション)が存在するためなのか、あるいは使用される抗体にPc以外の非特異的抗体が残存ためなのかなどを慎重に解析してゆく必要がある。

結 論

AIDSを初めとする免疫不全宿主にあつてPCPは高頻度に遭遇する感染症であるが、確実な診断方法は未確立である。血液を用いた今回の(循環)Pc抗原の測定はきわめて簡便な方法と考えられるが、検体である血清中のPcの保存安定性の欠如、さらに少数の検討検体間で見られた新鮮血清でのPc偽陽性成績(臨床診断が正しいとして)など、未解決事項が多い。しかし、測定方法開発の方向性としては正しいと考えられ、今後は保存血清を用いた場合の感度の改善、さらに新鮮血液での偽陽性成績の成因の解明とその除去技術の開発などが実現化されればPCPの診断、さらにPc感染の有無による発症予知と予防に関する有用な測定系へと進歩する可能性を秘めていると考える。

健康危険情報

特になし

研究発表

発表論文

- 1) 辻 守康、藤野隆志、春木宏介、松井利博、小林富美恵、横田夏紀、増田剛太：当教室における過去9年間のニューモシスチス・カリニ循環抗原陽性症例について、*Clinical Parasitology* 11: 84-86, 2000

学会発表

- 1) 辻 守康、藤野隆志、春木宏介、松井利博、小林富美恵、横田夏紀、増田剛太：当教室における過去9年間のニューモシスチス・カリニ

循環抗原陽性症例について、第11回日本臨床寄生虫学会、2000.6.17日、東京

知的財産権の出願・登録状況

なし



日和見原虫感染症の治療に関する研究 — *Entamoeba dispar* の確実な 無菌培養法の確立 —

竹内 勤、小林 正規、今井 栄子

慶應義塾大学医学部熱帯医学・寄生虫学教室

研究要旨

本研究では初年度よりヒトに対して病原性を示さない *Entamoeba dispar* 栄養型の無菌培養系の確立を試みてきた。昨年度までの成果として独自に考案した YIGADHA-S 培地を用い増殖の安定した *E. dispar* 2株の無菌培養株を樹立し、植物葉肉細胞抽出物を培地に加えることで5株を確実に無菌的に増殖させることに成功している。今年度はこの植物(ツユクサ等)の抽出物からの増殖促進物質(フェレドキシン関連物質)の精製を試みた。精製の過程でその物質は超音波処理してはじめて増殖活性がみられること、そしてフェレドキシン自体は超音波処理により活性を失いその構造も変化するらしいことが判明した。そして超音波処理した植物(ホウレンソウ)や細菌(*Clostridium pasteurianum*)のフェレドキシンに増殖促進活性を認めたことから、*E. dispar* 近縁種の *Entamoeba histolytica* のフェレドキシンの精製を試み、同様に *E. dispar* の増殖への効果をみた。その結果部分精製されたフェレドキシンにも増殖促進効果があること明らかになった。本研究の成果は *E. dispar* の免疫不全状態での virulence の検討に有用で、またフェレドキシンはアメーバ症の治療薬の選択的標的としても有望と思われることからその役割を解析することで *E. histolytica* / *E. dispar* の治療薬開発に役立てたいと考えている。

分担研究者：竹内 勤

研究協力者：小林正規、今井栄子

Studies of chemotherapy of opportunistic protozoan infections: Establishment of a practical axenic cultivation of *Entamoeba dispar*

Tsutomu Takeuchi, Seiki Kobayashi, and Eiko Imai

Department of Tropical Medicine and Parasitology, School of Medicine, Keio University

目 的

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*, Schaudinn, 1903) と病原性以外では形態的にも遺伝子の相同性においても類似点の多い *Entamoeba dispar*, Brumpt, 1925 は一般に熱帯地方のアメーバの流行地では *E. histolytica* に比べ約 10 倍の感染者がいることが疫学的に知られ、感染頻度に優位性がみられていることや欧米の同性愛者由来の HIV 感染者ではその多くが *E. dispar* 感染であることが知られている。そして理由は不明ながら同一宿主からこれら 2 種のアメーバが同時に分離培養されることが殆どないことも知られている。また他の先進諸国に対し我が国の同性愛者間には *E. histolytica* が高い頻度で見出されることも判っている。本研究は *E. histolytica* と *E. dispar* の生物学的性状の差異を明らかとし、その成果を薬剤開発に役立てること及び *E. dispar* の免疫不全時での virulence の有無を解明しようと計画した。この目的のため無菌培養が困難な *E. dispar* の確実な無菌培養法の確立を試みた。

方 法

実験材料

1) *E. dispar* (5 株): ① SAW1734RcloneAR ② AS21R ③ AS161R ④ CYNO09:TPC ⑤ CYNO16:TPC の 5 株を昨年の実験と同様使用した。これらの株は昨年度の成果として新たに見いだした *E. dispar* の増殖促進因子であるツクサの葉肉細胞抽出液を加えることで無菌的に培養維持されており、増殖促進因子の検定にはこの葉肉細胞の抽出液を除いて培養したアメーバを用いた。

2) 培地: 我々が考案した YIGADHA-S 培地にコンドロイチン硫酸を加えると *E. dispar* 栄養型の細胞が壊れ難くなることで安定した増殖がみられた。またその構成成分でもありグラム陰性菌などの膜成分にもみられるグルクロン酸や同じウロン酸のガラクトロン酸にも同様の効果を認めたため、これらの中からガラクトロン酸 (0.02%) を選択し新たに培地組成に加えた。

3) フェレドキシシン精製標品: ①細菌; *Clostridium pasteurianum* フェレドキシシン (SIGMA F-7629) ②ホ

ウレンソウ; Spinach フェレドキシシン (SIGMA F-5875) を使用した。

4) 赤痢アメーバ栄養型: BI-S-33 培地 (Diamond *et al.*, 1978) で培養された HM-1:IMSS clone 6 無菌培養株をフェレドキシシンの抽出・精製に使用した。

方 法

1) 植物 (ツクサ、サクラ) の葉からのフェレドキシシンの精製: ①ツクサ、サクラの葉を破碎して得られた葉肉細胞/Dulbecco's PBS, pH 7.4 懸濁液を同 PBS で 2 回遠沈洗浄し上清を除き凍結乾燥した。②乾燥重量の 120 倍の 0.1 M Tris-HCl, pH 7.6 を加えマグネチック・スターラーで攪拌・抽出 (4℃, 120 分) した後 16,000 rpm, 10 分遠沈しその上清を 0.2 μm pore size のメンブラン・フィルターで濾過して得られた分画を出発材料とした。この操作により超音波処理による機械的傷害を受けることなく葉肉細胞からフェレドキシシン分画を抽出することができた。③上記抽出液を Mayhew (1971) の方法に従い 55% 硫安遠析後その上清を DEAE-トヨパール 650 を充填したカラムに吸着させ、40% 硫安/0.1M Tris-HCl, pH 7.6 で洗浄後 30% 硫安/0.1M Tris-HCl, pH 7.6 で溶出した。溶出して得られたフェレドキシシン分画を透析後培地に加えその増殖促進効果を検討した。

2) 赤痢アメーバ栄養型からのフェレドキシシンの精製: BI-S-33 培地で無菌的に 35.5℃ で培養した 3 日目の HM-1:IMSS clone 6 株栄養型を水中で冷却後 1,750 rpm, 6 分遠沈し回収し、上記の Mayhew (1971) の方法に従い、或いは Reeves *et al.* (1980) の方法に従いトヨパール HW-55S (Sephadex G-100 の代わりに使用) 充填カラムと DEAE-トヨパール 650 (DEAE-cellulose の代わりに使用) を充填したカラムを使用して精製を試みた。

3) 植物フェレドキシシン活性の測定: Buchanan and Aron (1971) の方法により得られたフェレドキシシン分画のサクラ葉緑体による NADP⁺ の光還元を触媒する活性を分光光学的に測定した。

4) *E. dispar* 栄養型の増殖促進効果の判定: YIGADHA-S 培地で何も growth associate を加えないで無菌培養した AS21R 株栄養型に増殖促進活性

が期待される物質を加え、その増殖曲線と試験物質を加えないコントロールの増殖曲線とを比較することでその効果を判定した。判定に用いたこのAS2IR株はツユクサの葉肉細胞抽出液を加え無菌的に培養継代する過程でYIGADHA-S培地への適応が進み増殖ピークのアメーバ数は抽出液を加えた場合の1/10程度と少ないながら継代培養が可能となっており、増殖促進効果の判定に適した無菌培養条件への適応過程にある株である。

結果

当初フェレドキシンの精製のための出発材料として ultrasonic processor (GE 50, Sonics and Materials, Inc.)による超音波処理(4℃,30分)により葉肉細胞を破壊して得られた抽出液を用いた。その結果は80%硫酸塩析分画上清にも増殖活性が認められたが、カラムクロマトグラフィーの精製過程でフェレドキシンの回収は極端に低下した。そこで超音波処理の代わりに凍結乾燥処理した葉肉細胞分画を乳鉢で細かくすり潰すことで細胞を壊した。この方法によりフェレドキシンの精製は進みフェレ

ドキシンの活性も確認された。しかしながら精製の過程を通してAS2IR株に対する増殖促進活性はコントロールの2倍程度と低いものであった。そこで改めて超音波処理の効果について検討した結果、増殖促進効果が効率よく発現するためには超音波処理が不可欠な過程であることが判明した。そしてフェレドキシンの超音波処理により何らかの構造の変化を受けてはじめて*E. dispar*栄養型に利用されるという仮説のもとに細菌とホウレンソウの精製されたフェレドキシンの(Sigma Chem. Co., USA. 製)を血清を含まないRPMI細胞培養液に2μg/mlの蛋白濃度に調製し、超音波処理10分を行って培地に添加してAS2IR株に対する増殖促進効果をみた。その結果0.067μg/mlの濃度で増殖ピーク時においてコントロールの約5-6倍まで増殖ピーク時のアメーバ数の増加がみられた(図-1)。また超音波処理を行った*Clostridium pasteurianum*のフェレドキシンの処理しなかったものとの吸収スペクトルを比較してみると280nmの蛋白と390nm近傍のフェレドキシンのiron-sulfur proteinに特徴的な吸収域の低下がみられることがわかった(図-2)。サクラの葉から抽出・部分精製された

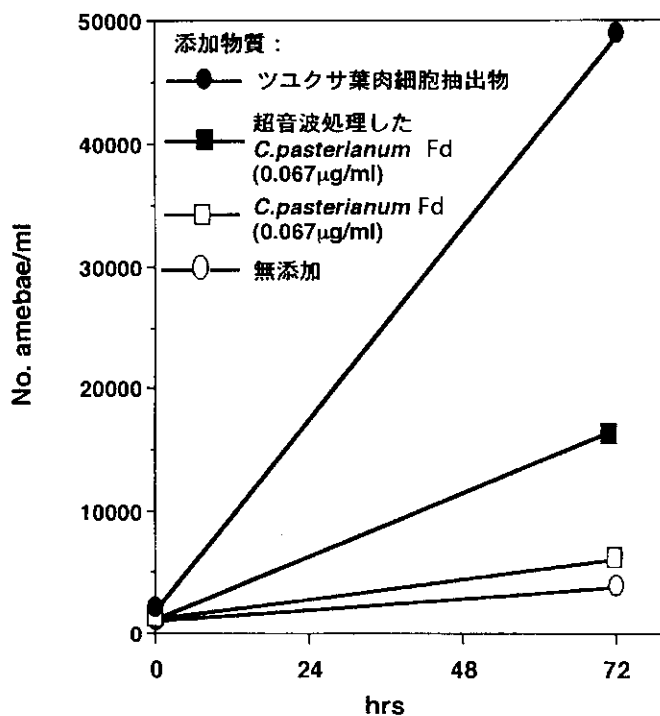


図1 超音波処理された*C.pasteurianum* フェレドキシンの(*Fd*)の*E. dispar*(AS21R株)に対する増殖促進効果
培地: YIGADHA-S 培地