

まで明らかにされているが、いずれも真菌血症モデルにおける病原因子である。しかし、*C. neoformans* は先ず経気道的に感染することが知られており、侵入門戸である肺における *C. neoformans* の定着や増殖に関与する病原因子の存在が予測される。しかし、肺感染モデルでは現在まで食能の調節 (APP1³) 以外の検討は行われていない (表 1)。今回我々はマウスの肺クリプトコックス症モデルを用い、肺感染時に発現量が増加する *C. neoformans* の病原遺伝子の同定を試みた。

方法

1. *in vivo* passage モデル (図 1)

C. neoformans YC-5 株のフローゼンストック (-80℃) よりサブロー培地を用いて 30℃ で二日間培養。シングルコロニーからクロラムフェニコール 100µg/ml を添加した YPD (Yeast Extract Polypepton D-glucose) 液体培地にて over night で培養。この菌液を 3000rpm で 20 分遠心分離。上清を捨て、ペレットを PBS (リン酸干渉生理食塩水) で溶解し、菌量を 2×10^6 CFU/ml に調整。調整した菌液 50µl をマウス (CDF1, female) に経気管支的に感染させ、マウスの生存期間を観察した。観察期間中、死亡直前のマウスより肺を摘出し、摘出した肺を YPD 液体培地中に入れ、*C. neoformans* YC-5 を分離培養 (これを YC-5FP 株とした)。その際、一般細菌のコンタミネーションを防ぐためクロラムフェニコール 100µg/ml を YPD 液体培地中に添加した。次に YPD 液体培地で培養した YC-5FP 株を YC-5 株と同様に遠心分離。上清を捨て、PBS にて 2×10^6 CFU/ml に

菌量調整し、マウスに感染させ、マウスの生存期間を観察した。同様の手法を用いてマウス感染を繰り返し、YC-5FP 株感染マウスより分離された株を YC-5SP 株、YC-5SP 株をフローゼンストックした株を YC-5SPF 株と名付けた。親株 YC-5 株、と感染を繰り返すことで得られた YC-5FP 株、YC-5SP 株、YC-5SPF 株のマウス感染モデル間でマウスの生存期間に優位な変化がみられるか否かを検討した。

2. RNA 抽出

C. neoformans YC-5 株、YC-5FP 株、YC-5SP 株、YC-5SPF 株より RNA を BIO101 社の FastRNA™ Kit-RED を用いて抽出した。

3. PCR-Select Subtraction 法 (図 2)

生存期間に有意な変化のみられた *C. neoformans* YC-5SP 株より抽出した RNA と YC-5 株より抽出した RNA を用いて PCR-Select™ Subtraction 法 (CLONTECH: CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit) を用い、発現量に差のある遺伝子のクローニングを行った。

4. 遺伝子解析

クローニングした遺伝子を PERKIN ELMER ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer にてシーケンスを行った。得られた遺伝子配列は NCBI (The National Center for Biotechnology Information) BLAST search、TIGR (The Institute for Genomic Research)、SGTC (Stanford Genome Technology Center) などのデータベースを用いて解析した。

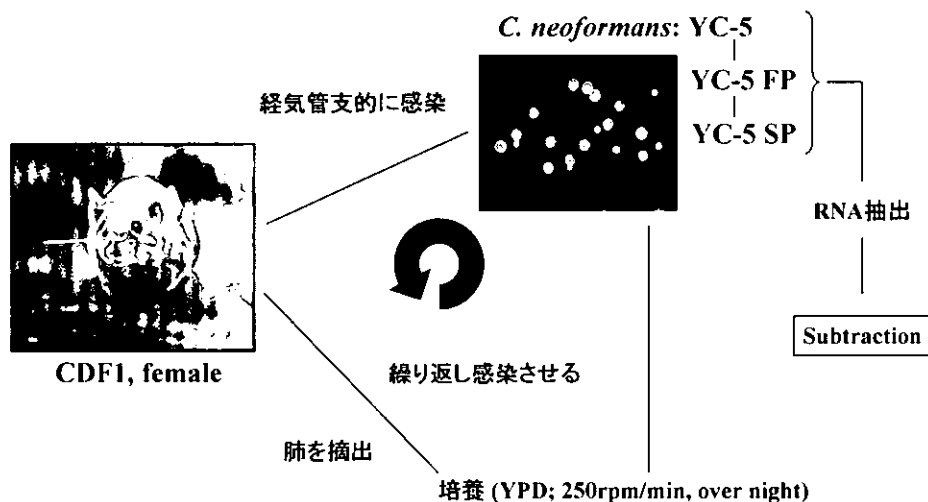


図 1. マウス肺感染モデル

(CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit)

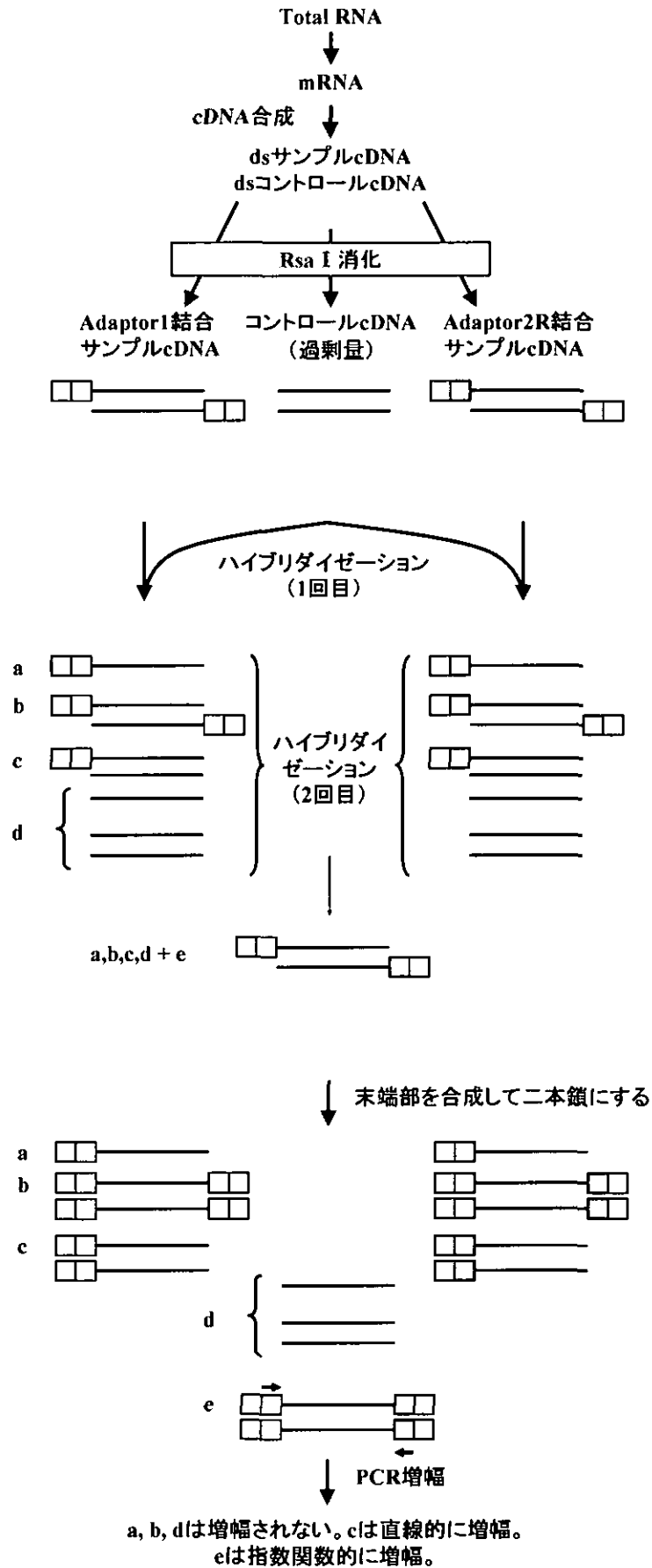


図 2. Subtraction 法

5. *cis*-prenyltransferase 遺伝子の knock out mutant の作成 (図 3)

Subtraction 法によって得られた遺伝子片のうち、*C. neoformans* における *cis*-prenyltransferase と思われる遺伝子の塩基配列をクリプトゲノムプロジェクトの情報とホモロジーサーチを行い、total の *cis*-prenyltransferase 遺伝子を推定した。そして *URA5* をセレクションマーカーとした knock out construct を作成し、*C. neoformans* B4500FOA 株 (*URA5* mutant) を用い、相同組み替えによる置換破壊を行った。菌体内への knock out construct の導入はジーンガンを用いて行った。

6. *cis*-prenyltransferase 遺伝子 knock out mutant (B4500CISD)株のスクリーニング

Minimal 培地を用いて *URA5* が菌体内に導入されたことを確認。培養された菌株のうち、特異的に標的遺伝子の部位で knock out construct が相同組み替えを起こしていることを Southern blot にて確認した。

7. B4500CISD 株の表現形の検討

Minimal 培地を用いてコロニーの形態を観察。墨汁染色にて菌体を観察。Minimal 液体培地にて 37℃での発育速度を検討した。発育速度を検討は菌液を BIO-RAD 社 Semi-Micro Cuvettes に 1μl 注入し、BECKMAN 社 DU®640 SPECTROPHOTOMETER を用い OD600 にて吸光度を測定した。

8. B4500CISD 株の E-test による薬剤感受性の検討

B4500 株と B4500CISD 株の MIC(minimal inhibitory concentration)を、AB BIODISK 社のストリップを用いてアムホテリシン B(AMPH-B)、フルシトシン(5-FC)、イトラコナゾール(ITCZ)、フルコナゾール(FLCZ)について判定した。今回の判定には minimal 培地を用いた。

成績

1. *in vivo* passage による病原性の変化 (図 4)

YC-5 株の感染と YC-5FP 株の感染では、マウスの生存率に有意差はみられなかったが、YC-5SP 株は YC-5 株、YC-5FP 株と比較してマウスの生存期間を有意に減少させた (P<0.0001)。また、YC-5SPF 株は YC-5SP 株ほどではなかったが、YC-5 株と比較して有意な差を持って生存期間を減少させた (P<0.0001)。また YC-5SP 株と YC-5SPF 株にも生存期間に有意差を認めた (P<0.0001)。

2. *in vivo* passage による表現形の変化

YC-5 株と YC-5SP 株の間での、コロニー形態には相違点を認めなかった。また莢膜の厚さ、増殖速度に有意差は無かった。

3. Subtraction 法による病原遺伝子の同定

C. neoformans YC-5 株と YC-5SP 株から抽出した RNA から、PCR-Select Subtraction 法を用い、

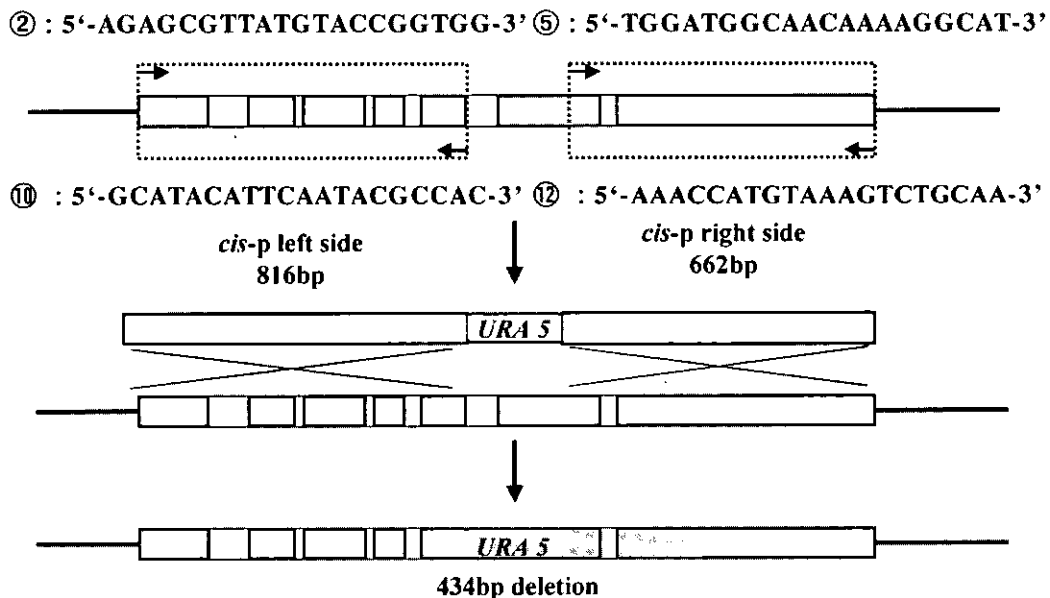


図 3. 相同組み換えによる遺伝子の置換配置

発現量に差のある遺伝子片 41 個をクローニングした。その中には *C. neoformans* の病原因子として検討され、すでに報告されている Laccase 遺伝子 (CNLAC1) が含まれていた。また *Saccharomyces cerevisiae* において 37 °C での発育能に関係するとされている *cis*-prenyltransferase 遺伝子も含まれていた。しかし、そのほとんどが *C. neoformans* では未知の遺伝子であった。

4. B4500CISD 株の表現形の変化

B4500CISD 株は B4500 株と比較して、minimal 培地におけるコロニー形態は B4500 株と大差なかった。墨汁染色による観察では、菌体は B4500 株と比較して大きなものが目立ち、内部の構造物も明瞭化していた。30 °C での発育速度は B4500 株と有意差なかったが、37 °C での発育速度は B4500 株と比較して有意に遅かった (図 5)。

5. B4500CISD 株の E-test による薬剤感受性の結果

B4500CISD 株と B4500 株間で AMPH-B、5-FC、ITCZ の MIC に有意差はみられなかった。唯一 FLCZ においてのみ MIC が B4500 株 8 μg/ml が B4500CISD 株 2 μg と有意に低下した。(表 2)

考察および今後の計画

第一の実験であるマウスの *in vivo* passage モデルでは、一度目の passage では生存期間に有意な差はみられなかったが、二度目の passage で有意な差をもって生存期間を短縮させた。一度目の passage で差がなく、二度目で差が出た理由の詳細は不明だが、mutation を起こす確率の問題や、再感染させる前の *in vitro* での継代によって mutation

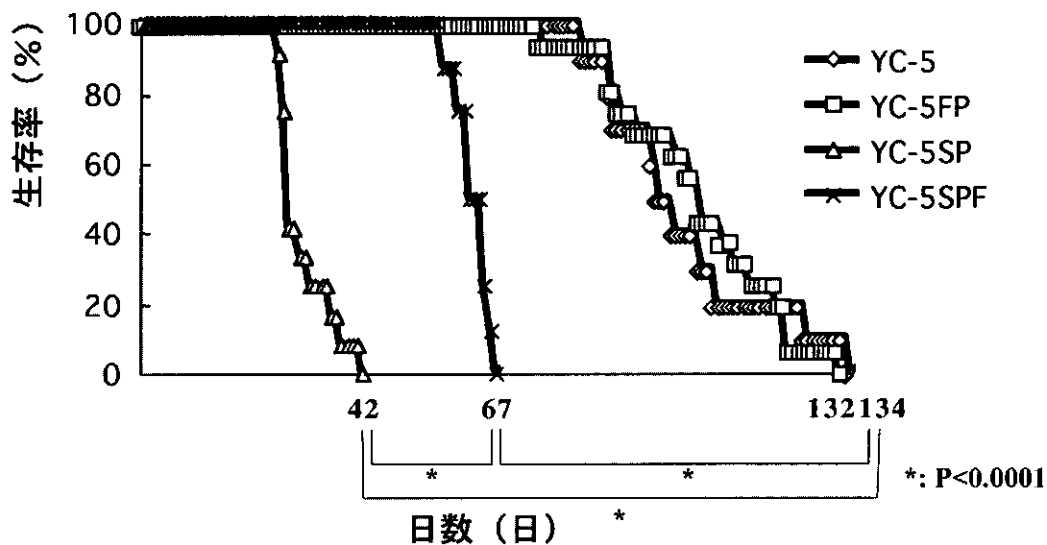


図 4. *C. neoformans* 感染マウス生存曲線

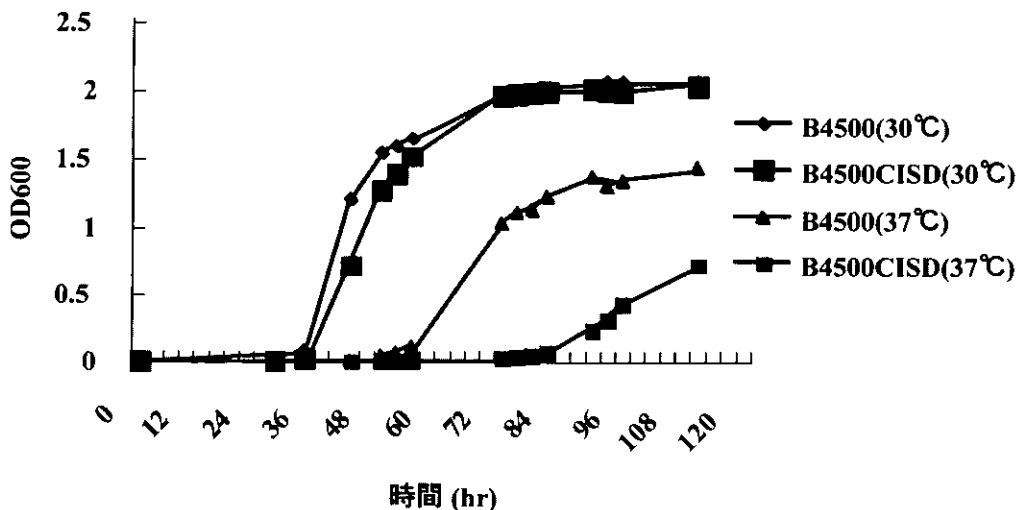


図 5. *cis*-prenyltransferase の液体培地での発育速度

が失われる可能性が考えられる。後者は *C. neoformans* YC-5SPF 株と YC-5SP 株の生存期間の差が有意に違っている ($P < 0.0001$) ことから推察される。YC-5SPF 株と YC-5SP 株では frozen stock したことと、*in vitro* での継代回数が2回違うだけである。このため、病原因子を強く発現したものが、frozen stock したことによって失われたか、もしくは *in vitro* で継代するうちに生態からの刺激を受けないために失われたのではないかと考えられた。

C. neoformans YC-5 株と YC-5SP 株間での表現形には変化が見られなかったが、マウスの生存期間が変化したのは何らかの病原因子発現が増強したためであると推定した。発現が増強した病原因子として、Subtraction 法によって得られた Laccase や *cis*-prenyltransferase などが考えられる。しかし、遺伝子片には未知の遺伝子が多数含まれており、それら遺伝子が複合的に作用していることが予測される。これら遺伝子間の相互関係を解析することは困難であると予測される。このため、今回は単独の遺伝子で病原性を変化させ得る遺伝子の機能解析を優先的に行った。クローニングした遺伝子片のうち *cis*-prenyltransferase 遺伝子は、すでに *S. cerevisiae* において 37℃での発育能に関与していることが示されており¹⁴⁾、*C. neoformans* においても 37℃での発育能に変化がみられるならば病原因子となり得ると考えた。以上の考察を基に *cis*-prenyltransferase 遺伝子の knock out 株(B4500CISD)を作成した。B4500CISD 株の 37℃での発育速度は予想したように低下していた。B4500CISD 株の *in vivo* での病原性については、現在検討中である。

薬剤感受性の変化に関しては、B4500CISD 株がなぜ FLCZ のみ感受性に变化したのかについてはさらに詳細な検討が必要であるが、*S. cerevisiae* における検討で、*cis*-prenyltransferase 遺伝子変異株ではプロテインソーシングの異常やグリコシル化の欠損が報告されており、薬剤の標的酵素やポンプの機能異常が起きている可能性が示唆される。*S. cerevisiae* の *cis*-prenyltransferase 遺伝子変異株はハイグロマイシン B 感受性に变化することが示されている。

今後は、今回 Subtraction 法で得られた未知の遺伝子についても knock out 株を作成し、機能解析を進めていく予定である。

文献

- 1) Williamson PR.: Biochemical and Molecular Characterization of the Diphenol Oxidase of *Cryptococcus neoformans*: Identification as a Laccase. *Journal of Bacteriology*. 176: 656-664 (1994)
- 2) Chang YC, Kwon-Chung KJ.: Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol*. 14: 4912-9 (1994)
- 3) Chang YC, Kwon-Chung KJ.: Isolation of the third capsule-associated gene, CAP60, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 66: 2230-6 (1998)
- 4) Chang YC, Wickes BL, Kwon-Chung KJ.: The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. *Infect Immun*. 64: 1977-83 (1996)

表2. E-TESTの結果

| | B4500 (親株) | B4500CISD(変異株) |
|------|------------|----------------|
| 5-FC | 0.08 | 0.04 |
| AMPH | 0.08 | 0.16 |
| ITCZ | 0.08 | 0.08 |
| FLCZ | 8 | 2 |

- 5) Wills EA, Roberts IS, Del Poeta M.: Identification and characterization of the *Cryptococcus neoformans* phosphomannose isomerase-encoding gene, MAN1, and its impact on pathogenicity. *Mol Microbiol.* 40: 610-20 (2001)
- 6) Moore TD, Edman JC.: The alpha-mating type locus of *Cryptococcus neoformans* contains a peptide pheromone gene. *Mol Cell Biol.* 13: 1962-70 (1993)
- 7) Clarke DL, Woodlee GL, McClelland CM, et al.: The *Cryptococcus neoformans* STE11alpha gene is similar to other fungal mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) gene but is mating type specific. *Mol Microbiol.* 40: 200-13 (2001)
- 8) Wickes BL, Edman U, Edman JC, et al.: The *Cryptococcus neoformans* STE12alpha gene: a putative *Saccharomyces cerevisiae* STE12 homologue that is mating type specific. *Mol Microbiol.* 26: 951-60 (1997)
- 9) Wang P, Nichols CB, Lengeler KB, et al.: Mating-type-specific and nonspecific PAK kinases play shared and divergent roles in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* 1: 257-72 (2002)
- 10) Cruz MC, Sia RA, Olson M, et al.: Comparison of the roles of calcineurin in physiology and virulence in serotype D and serotype A strains of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 68: 982-5 (2000)
- 11) Alspaugh JA, Cavallo LM, Perfect JR, et al.: RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* 36: 352-65 (2000)
- 12) Cox GM, McDade HC, Chen SC, et al.: Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* 39: 166-75 (2001)
- 13) Luberto C, Martinez-Marino B, Taraskiewicz D, et al.: Identification of App1 as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest.* 112: 1080-94 (2003)
- 14) Sato M, Sato K, Nishikawa S, et al.: The yeast RER2 gene, identified by endoplasmic reticulum protein localization mutations, encodes *cis*-prenyltransferase, a key enzyme in dolichol synthesis. *Mol Cell Biol.* 19: 471-83 (1999)

研究発表

学会発表

2004, 1 第5回真菌症フォーラム (東京)

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

その他：なし

健康危機情報

特になし

進行性多巣性白質脳症の PCR 診断と病態解析

分担研究者：北村 唯一（東京大学医学部附属病院・泌尿器科）

研究協力者：鄭 懐穎¹、余郷 嘉明¹、西川 典子²、石橋 誠也³、
中川 広人⁴、大谷 良⁵、冨本 秀和⁵、矢崎 直子⁶、
高橋 洋一⁶、杉原 浩⁶、冠木 智之⁷

(¹東京大学医学部附属病院・泌尿器科、²長野赤十字病院・神経内科、
³群馬大学医学部附属病院・神経内科、⁴福井大学医学部附属病院・第二
内科、⁵京都大学大学院医学研究科・臨床神経学、⁶聖マリアンナ医科大学
大学病院・神経内科、⁷埼玉県立小児医療センター・感染免疫科)

■研究要旨

JC ウイルス (JCV) DNA の調節領域を標的とした nested PCR は進行性多巣性白質脳症 (PML) の診断に有効である。この PCR を用いて髄液から JCV DNA (調節領域) を検出するサービスを全国の病院に対して行った。平成 15 年 3 月から 16 年 1 月末までに、PML が疑われた 47 名の患者の髄液が全国から送られてきた。上記の PCR により、これらの全ての検体から JCV DNA 調節領域の検出を試みた。5 名の患者の髄液から JCV DNA 調節領域が検出された。シークエンシングにより、検出された JCV 調節領域がいずれもユニークな再編成型 (PML 型) であることが確認され、PML の診断が確定した。JCV 調節領域が検出された患者の基礎疾患は、エイズ (2 名)、自己免疫性溶血性貧血 (1 名)、自己免疫性好中球減少症 (1 名)、原発性アルドステロン症 (1 名) であった。

JCV DNA の調節領域は患者体内における JCV の動態を解析する指標となる。本年度においては、以前 PML と診断され、その後約 2 年間生存した患者の剖検脳組織を解析した。その結果、剖検脳組織 (左右頭頂葉、小脳、脳幹) から、構造上互いに関連した 5 種類の PML 型調節領域 (I~V) が検出された。I は最初に作られ、II~V は I から、さらなる再編成により作られたと考えられた。また、I は脳全域に分布したが、II~V は小脳、脳幹に局在した。以上から、本症例では脱髄病巣が最初単一部位で出現し、その後、複数のルートを辿って脳内に拡大したことが示唆された。今後も、同様な手法で、多の PML の剖検症例を解析する予定である。これらの一連の解析によって PML の病態解明に有用な知見が得られると考えられた。

PML の発症機構に関しては、(1) 潜伏感染している JCV が免疫抑制下に再活性化され、(2) 再活性化 JCV は末梢血リンパ球に感染する、(3) 感染リンパ球が中枢神経系に侵入し、PML を発症させるという説が一般に信じられている。この仮説を検証するため、「PML のハイリスク患者であるエイズ患者の末梢血リンパ球から JCV 調節領域を検出し、解析する」プロジェクトを立案し、全国のエイズ拠点病院に対して、共同して同プロジェクトを実施することを呼びかけた。その結果、22 のエイズ拠点病院がこの研究プロジェクトに参加することになった。現在、同プロジェクトは東大医学部と各拠点病院の倫理委員会で審査を受けている。承認が得られ次第、プロジェクトを実施する予定である。

研究目的

進行性多巣性白質脳症 (PML) は中枢神経系での脱髄疾患であり、免疫が低下する疾患を有する患者や免疫抑制剤が投与される患者で主に起きる。PMLの病因ウイルスであるJCウイルス (JCV) はヒト集団で蔓延している。大部分のヒトは子供の時JCVに無症候性感染する。感染したJCVは多分ウイルス血症により腎臓へ運ばれ、そこに生涯寄生する。健常人や非PML患者の尿や腎から検出されるJCV DNAは原型調節領域 (archetypal regulatory region) と命名された一定の調節領域を持つ。最近、扁桃から検出されるJCV DNAも原型調節領域を持つことが明らかになった。一方、PML患者の脳病変部から検出されるJCV DNAは多様に変化した調節領域 (PML型調節領域) を持つ。原型調節領域とPML型調節領域との関係を表すために、以下の5項目からなる archetype conceptが提唱された。(1) 原型調節領域を持つJCVはヒト集団で循環しているウイルスである。(2) 原型調節領域の構造は一定であるが、PML型調節領域は極めて多様である。(3) それぞれのPML型調節領域は原型調節領域から塩基配列の再編成 (欠失と重複または欠失のみ) によって作られる。(4) 原型からPML型への調節領域の変化は患者の体内で起きる。(5) PML型へ変化したJCVはヒト集団へ戻らない。

archetype conceptは、調節領域の変化がPMLの発症にどう関わるかについては何も述べていない。それを説明するのに十分な知見が現在まで得られていないからである。しかし、調節領域の再編成はPMLの診断やPMLの病態解析に利用できる。その理由は以下の通りである。今までに我々は約50名のPML患者の脳または脳脊髄液 (CSF) から検出された調節領域の構造を解析したが、異なる患者から同じ構造が検出されたことは一度もなかった。このことは、調節領域の再編成は不規則的に起きること示している。言い換えれば、調節領域の再編成はJCVに独特な目印を付加する。本研究では、調節領域の再編成を利用して、PMLの診断やPMLの病態解析を行う。

PMLのPCR診断において調節領域を標的とすれば、以下の二つの利点がある。(1) 検出されたJCVがPML型かどうか判断できるので、PMLを診断する上で有効である。(2) 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、このPCR法を用いたPMLの診断サービスを全国の病院に対して行うことである。また、この診断サービスを通して、PMLの発症機構や病態解明の研究に有用な症例を収集することも目指す。

PMLの発症機構に関しては、以下のMajorらの説が一般に信じられている。(1) リンパ組織に潜伏していたJCVが免疫低下により、再活性化される。(2) 末梢血リンパ球 (B細胞) がJCVに感染する。(3) 感染B細胞がBBB (Blood-Brain-Barrier) を通過する (感染リンパ球はBBBを通過できるといふ)。(4) 脳に侵入した感染B細胞からオリゴデンドロサイトへとJCVが伝播する。(5) JCVはオリゴデンドロサイトで活発に増殖し、結果的に脱髄を惹起する。しかし、この説は状況証拠に基づいて考えられたもので、様々な点が証明されないままである。また、中枢神経系で脱髄が原発部位から周囲の脳領域へ拡大する機構については、上記の仮説は触れていない。

患者体内で生まれたPML型JCVは調節領域にユニークな再編成を有するから、これが各PML型JCVの指標になる。例えば、末梢血リンパ球で検出されたJCVが原型調節領域を持つか、PML型調節領域を持つかを解明することによって、検出されたJCVが中枢神経系へ向かう途中のウイルスであるかどうかの検討ができる。また、中枢神経系での脱髄病巣の拡大の解析にも利用できる。本研究では、調節領域を利用してPMLの発症機構や病巣の拡大を解明することをもう一つの目的とする。

研究方法

1. CSFからのDNA抽出

スマイテストEX-R&D (ゲノムサイエンス研究所) を用いて行った。通常、100 µl のCSFを6本のマイクロチューブそれぞれに分注し、以下キットの指示にしたがって処理した。

2. 組織からのDNA抽出

プロテイナーゼK消化、フェノール処理、クロロフォルム処理により行った。

3. nested PCRによる調節領域の増幅

既報の方法 (Sugimoto et al., 1998) を一部改良

して行った。アウター・プライマーとして A1 と A3 を、インナー・プライマーとして B1 と B3 を用いた（各プライマーのゲノム上の位置を図 1 に示した）。A3 以外のプライマーの塩基配列は文献（Sugimoto et al., 1998）に述べた。A3（5' CAT-TACTTACCTATGTAGCTTTTGGTTCAGGC 3'）は以前用いた A2 を改変したプライマーである。耐熱 DNA 合成酵素として HotStar Taq DNA polymerase（QIAGEN 社）を用いた。増幅反応の前に 95 °C、15 分の処理により同酵素を活性化した。その後続けて、通常増幅サイクル（Sugimoto et al., 1998）を行った。ファースト・サイクルは 40 回、セカンド・サイクルは 30 回行った。

4. 標準 PCR による調節領域の増幅

プライマーとして B1 と B3 を、耐熱 DNA 合成酵素として HotStar Taq DNA polymerase（QIAGEN 社）を用いた。増幅反応の前に 95 °C、15 分の処理により同酵素を活性化した。その後、nested PCR と同じ条件で増幅サイクルを 50 回行った。

5. 増幅断片のクローニング

増幅断片を *Hind*III と *Pst*I で消化し、調節領域を切り出した（図 1 参照）。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。増幅断片を含むクローンを *Hind*III、*Pst*I、*Sst*I 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 QIAprep 8 Turbo Miniprep kit（QIAGEN 社）を用いて精製した。

6. 塩基配列の決定

精製した組み換えプラスミド（上述）の塩基配列を蛍光式自動シーケンサー（ABI 373S）を用いて決定した。

研究結果

1. PML の PCR 診断の実績

我々は東大病院泌尿器科内に、nested PCR 法による PML 診断を行う施設を設置し、平成 15 年 3 月から全国の病院に対して PML の診断サービスを開始した。平成 16 年 1 月末までに、47 名の患者の CSF が診断のために送られてきた。これら全ての検体から JCV DNA（調節領域）の検出を試みた。その結果、5 名の CSF から JCV 調節領域が検出された（表 1）。これらの患者に J37 ~ J41 というコードを付けた。なお、J1 ~ J36 は平成 8 年から 14 年に東大医科研ウイルス感染研究部において PCR 診断によって PML と診断された患者である。検出率（陽性回数 / PCR 施行回数）は 4 名（J37 ~ J40）において 6/6 であったが、1 名（J41）

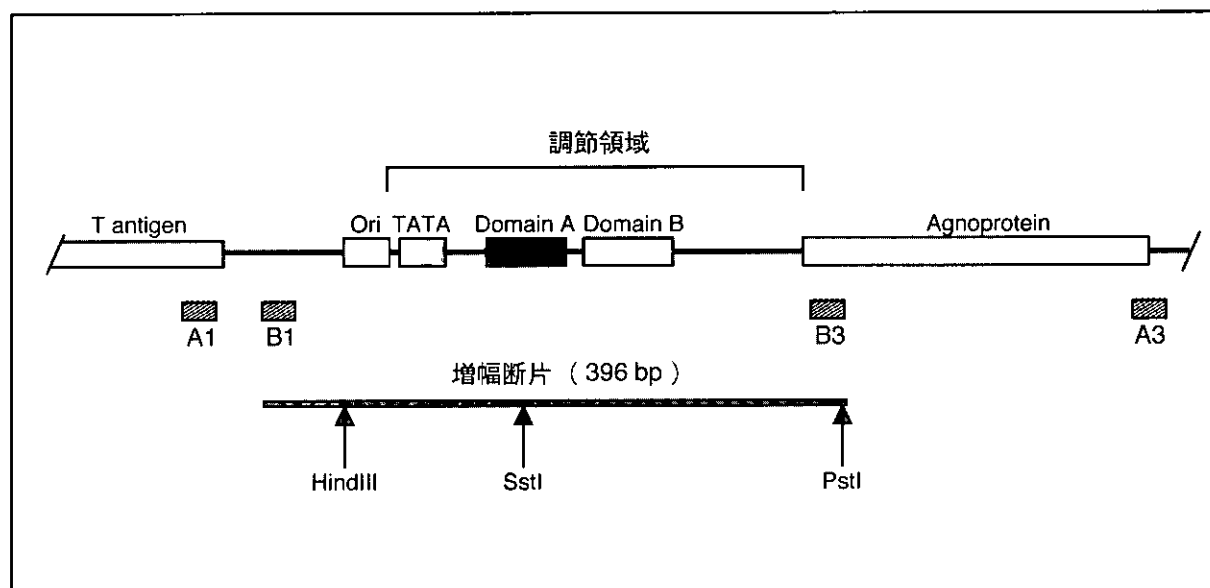


図 1. PCR に使われたプライマーのゲノム上の位置

最上部に原型調節領域とその周辺のゲノムを模式的に示した。また、T 抗原遺伝子（T antigen）、複製開始点（Ori）、アグノ蛋白遺伝子（Agnoprotein）を示した。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。原型調節領域の下にアウター・プライマー（A1、A3）とインナー・プライマー（B1、B3）の部位を示す。その下に、nested PCR によって増幅される断片と同断片に存在する制限酵素切断部位（*Hind*III、*Sst*I、*Pst*I）を示す。

では1/12であった。

JCV 調節領域が検出された5名の患者の基礎疾患の内訳は、エイズ (2名)、自己免疫性溶血性貧血 (1名)、自己免疫性好中球減少症 (1名)、原発性アルドステロン症 (1名) であった (表1)。自己免疫疾患の2名はステロイド・パルス治療を受けた。原発性アルドステロン症の患者は20年前原発性アルドステロン症により右副腎摘出術を受け、その後、生理的な量のステロイド投与を受けた。

図2に、CSFより検出されJCV 調節領域の構造を示した (以下、患者コードによって調節領域を示す)。(1) 全症例から検出された調節領域は、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。(2) 今回検出された調節領域と同じ構造の調節領域は過去に検出されていなかった。(3) J39以外の患者のCSFからは1種類の調節領域が、J39からは2種類のJCV 調節領域 (J39a, J39b) が検出された。(4) J38、J39a、J41は、domain Aが重複し、domain Bが欠失している典型的なPML型調節領域であった。しかし、J37では、domain Aが重複していたが、domain Bは完全には欠失していなかった。J39bはdomain Bが完全に欠失していたが、domain Aは部分的にし

表1. CSF から JCV DNA が検出された患者

| 患者コード | 性別/年齢 | 基礎疾患 | 検出率* |
|-------|-------|-------------|------|
| J37 | 男/46 | エイズ | 6/6 |
| J38 | 女/36 | エイズ | 6/6 |
| J39 | 女/77 | 自己免疫性溶血性貧血 | 6/6 |
| J40 | 女/57 | 原発性アルドステロン症 | 6/6 |
| J41 | 男/33 | 自己免疫性好中球減少症 | 1/12 |

*陽性回数/検査回数

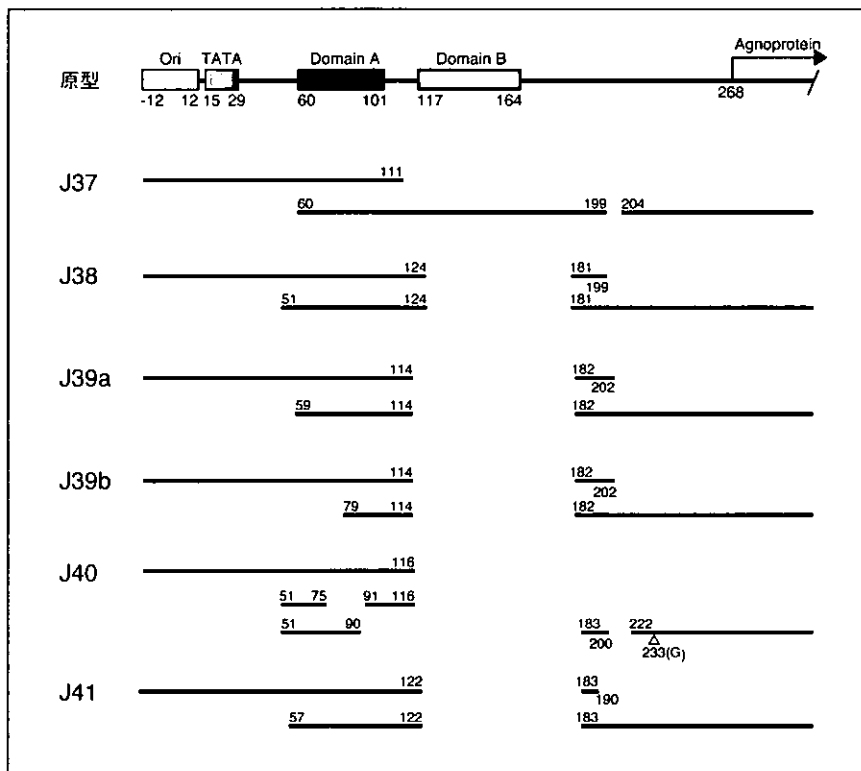


図2. CSF から検出された JCV DNA 調節領域の構造

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 15 年度に CSF から検出され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。△は一塩基 (G) の挿入を示す。

に欠失していたが、domain A が部分的に3回重複していた。

2. CSF から JCV DNA が検出された患者の臨床経過の概要

J37 (男性、46歳)

平成15年1月から10月までに神経症状が亜急性に進行し、10月14日に入院した。入院時の検査により HIV-1 陽性であることが判明した。CD4 リンパ球数は既に 18-22/μl と低値を示した。MRI により橋全体と右小脳に中小脳脚を介して連続性の T1 low、T2 high の病変が示唆された。11月5日に採取された CSF から JCV DNA (PML 型調節領域) が検出され、PML と診断された。11月1日から、HAART 療法を受けた。HAART 療法開始後1ヶ月での検査で、脱髄病巣は橋、中脳、小脳はほぼ全体に広がったことが確認された。12月27日に呼吸不全で死亡した。

J38 (女性、36歳)

平成15年7月に出現した神経症状は、その後亜急性に進行した。10月22日に入院。MRI により、左前と後の中心回およびその内側にかけて皮質下白質を中心に境界明瞭な T1 low、T2 high の病変を観察した。多発性硬化症を疑って、ステロイドパルス療法を施行したが、神経症状が徐々に悪化した。11月28日の精査により、HIV-1 抗体陽性であることが判明。HIV-1 RNA は 89500 copies/ml、CD4 リンパ球数は 41/μl であった。12月9日に採取した CSF から JCV DNA (PML 型調節領域) が検出され、PML と診断された。12月10日に HAART 療法が開始された。HAART 開始後1ヶ月(平成16年1月9日)の時点で CD4 数は 120/μl に上昇し、HIV-1 RNA は 199 copies/ml まで低下した。1月23日の MRI 検査で病変の若干の縮小と造影効果の出現が認められ、症状もわずかず改善し始めた。2月9日採取の CSF から JCV DNA (PML 型調節領域) が検出されたが、検出率は 1/6 に低下した(12月9日採取の CSF からの検出率は 6/6)。

J39 (女性、77歳)

既往歴に慢性甲状腺炎、特発性血小板減少性紫斑病、気管支喘息、自己免疫性溶血性貧血(AIHA)があり、AIHA に対して平成10年からステロイド剤を内服していた。平成12年3月末、左優位の小脳失調が急激に出現し、小脳梗塞として治療をされていたが、5月頃から小脳失調の悪化ならびに球麻痺症状を認め、6月に入院となった。MRI 画

像上、脳幹・小脳を中心に T1 強調画像で低吸収域、T2 強調画像、拡散強調画像で高信号域を呈したが、造影効果は認めなかった。Malignant lymphoma、多発性硬化症などが疑われ、ステロイドパルス療法を2回受けたが、神経症状が徐々に増悪し11月に深部真菌感染症による急性腎不全で死亡した。剖検にて脳組織の多巣性の脱髄所見が得られ、PML が強く示唆された。そのため、保存してあった入院後3日目の CSF から JCV DNA の検出が試みられた。JCV DNA (PML 型調節領域) が検出され、PML の診断が患者の死後に確定した。

J40 (女性、57歳)

20年前に原発性アルドステロン症により右副腎摘出術を受け、その後、PSL 7.5 mg/日を服用した。平成14年末頃左下肢の脱力、平成15年7月「呂律難」出現し、脳神経外科で受診。多発性脳梗塞が疑われたため、7月25日外科に入院となった。脳血管撮影が行われ、未破裂動脈瘤が指摘され、8月13日にクリッピングが施行された。しかし、その後も意識レベルが低下するなど、神経学的所見が悪化したため、内科コンサルトとなった。10月24日施行の MRI により、小脳、橋、中脳等、広範囲に T1 iso ~ low、T2 high の病変を観察。11月19日に採取した CSF から JC DNA (PML 型調節領域) が検出された。さらに、右小脳から採取した生検の病理学的な検査(免疫染色を含む)により PML の診断が確定された(北大の協力による)。ステロイドパルス療法が試みられたが、反応は認められなかった。1月24日呼吸不全で永眠。

J41 (男性、33歳)

平成12年より自己免疫性好中球減少症のために、治療を受けていた。平成15年11月から左上腕の動きが悪くなり、目眩感など神経症状が出現した。11月27日の MRI により左小脳に異常信号を認めた。11月3日に入院したが、自然軽快し、退院した。しかし、神経症状がまた進行したため、平成16年1月8日に再入院。1月13日の MRI 所見：左小脳半球白質から小脳脚、両側橋にかけ T1 low、T2 high の領域を認めた。1月14日に採取した CSF から JCV DNA (調節領域) が検出された。検出率は低かったが(1/12)、シークエンシングによりユニークな PML 型調節領域が確認されたため、PML と診断された。最初の CSF 採取から約1ヶ月经過した時点で CSF を採取し、JCV DNA の

検出を試みた。今度は6回中、4回JCV DNA陽性であった。

3. 剖検脳組織を用いた病態解析

症例の概要

患者(J26)は22歳の男性。乳児期より慢性皮膚粘膜カンジダ症と診断された。平成13年8月から右上肢運動障害など神経症状が出現し、9月に多発性硬化症と診断された。ステロイドパルス治療を受けたが、症状が急速に進行した。同年10月CSFからJCV DNA (PML型調節領域)が検出され、PMLと診断された。14年1月、意識消失が出現。以後人工呼吸となる。平成15年10月29日敗血症により死亡した。剖検が行われ、脳組織(左

右頭頂葉、脳幹、小脳)が採取された。

剖検脳組織から検出された調節領域

脳組織から5種の調節領域(I~V)が検出された(図3)。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。Iは2年前にCSFから検出されたものと同じであった。II~Vは今回脳から始めて検出されたものであった。I~Vは同じ欠失(nt 119-nt 174)と重複(nt 61-nt 88)を持っていた。そのため、II~VはIから、さらなる再編成により作られたと考えられた。

各調節領域の脳内分布

各脳組織における各調節領域の検出数を表2に示した。Iは各剖検組織から検出されたが、II~V

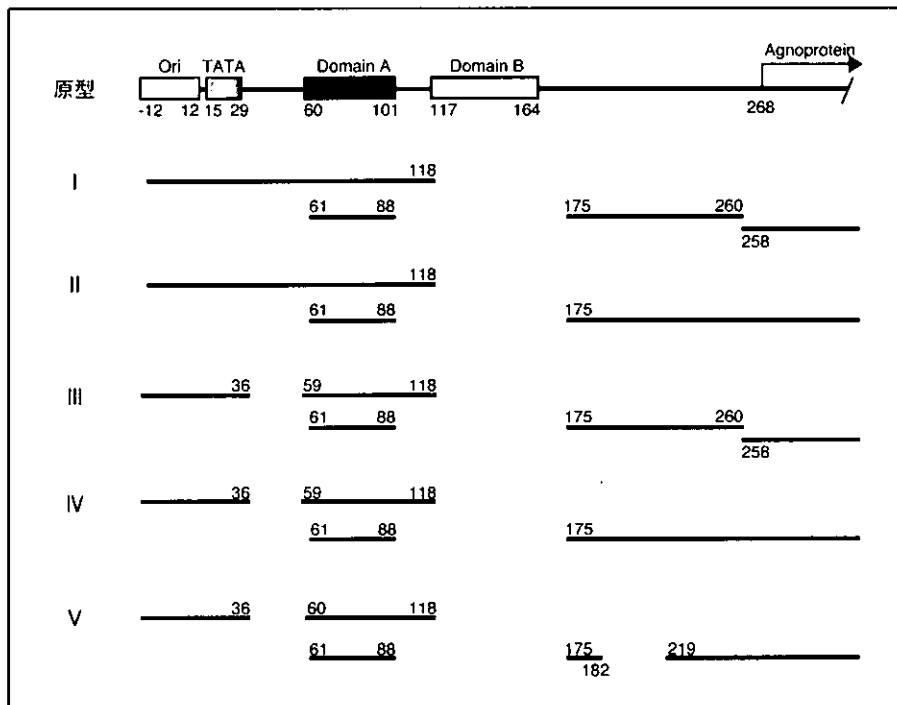


図3. J26の剖検脳組織から検出されたJCV DNA調節領域の構造

最上部に原型調節領域を示す。原型調節領域の下に剖検脳組織から検出された調節領域(I~V)を示す。図の表し方は図2と同じ。

表2. 脳の各領域で分離されたJCV DNAクローン*

| 脳の領域 | 全クローン数 | 各調節領域を持つクローン数 | | | | |
|------|--------|---------------|----|-----|----|---|
| | | I | II | III | IV | V |
| 左頭頂葉 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 右頭頂葉 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 小脳 | 12 | 5 | 1 | 3 | 1 | 2 |
| 脳幹 | 9 | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 |

* 部分配列(調節領域)を持つクローン。

は左右頭頂葉では検出されず、小脳と脳幹でのみ検出された。なお、データを示さないが、小脳からのJCV DNA 検出量は低かった。

4. JCV 調節領域を用いた PML の発症機構の解析

「PML のハイリスク患者であるエイズ患者の末梢血リンパ球から JCV 調節領域を検出し、解析する」プロジェクトを立案し、全国のエイズ拠点病院に対して、共同して同プロジェクトを実施することを呼びかけた。その結果、22 のエイズ拠点病院がこの研究プロジェクトに参加することになった。プロジェクトへの協力が見込まれるエイズ患者数は100名以上である。現在、同プロジェクトは東大医学部と各拠点病院の倫理委員会で審査を受けている。承認が得られ次第、プロジェクトを実施する予定である。

考察

1. CSF を用いた PML の PCR 診断

今年度は5症例から JCV 調節領域が検出された。それらはいずれも原型から再編成により作られた PML 型調節領域であった (図2)。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かった (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、5症例はいずれも PML と「確定診断」された。ここでカギ括弧を付けたわけは以下で述べる。

最近、「進行性多巣性白質脳症 (PML) 診断基準」が厚生労働省のプリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究班により作成された。これによると、PML の確定診断 ("Definite PML") のためには「剖検または生検で脳に特徴的病理所見と JC ウイルス感染を証明」することが必要要件とされている。すなわち、CSF からの JCV DNA の検出は PML の確定診断に不十分であるというのである。我々は、平成9年から CSF を用いた PML の PCR 診断を行ってきた。この間、36名の患者の CSF からユニークな PML 型調節領域が検出された。これらの症例のうち11症例において生検 (2例) または剖検 (9例) が調べられ、病理学的な所見と JCV DNA の検出によって PML の診断が確定された。すなわち、CSF から JCV DNA (ユニークな調節領域) が検出された症例で、生検または剖検が行われた場合には、例外なく、PML の診断が確定した。このように、臨床経過や

MRI 所見で PML が疑われ、その上 CSF からのユニークな PML 型調節領域が検出されれば、PML の確定診断の要件を満たしていると考えられた。

以上は、CSF を用いた PCR 診断が極めて高い特異性 (specificity) を有することを示している。しかし、このことは、同診断法の感度 (sensitivity) も同様に高いことを意味しているわけではない。Weber は、CSF から JCV DNA の検出を試みた世界中の19の報告をまとめたが、それによると、CSF からの JCV DNA 検出の特異性は99%と高いが、感度は81%とかなり低い。このことは、CSF から JCV DNA が検出されにくい PML 症例が少なからず存在することを示している。

CSF 中の JCV DNA が陰性であるが、MRI などにより PML が強く示唆される症例に対しては脳生検が有効な手段である。実際我々は、CSF から JCV DNA が検出されなかったが、生検脳組織からは JCV DNA が検出された症例を3例経験している。しかし、諸事情によって脳生検を施行できない場合も多い。CSF 中 JCV DNA は陰性であるが、PML が強く示唆される症例に対して、どのように対応していくかが今後の課題である。

2. CSF から JCV DNA が検出されない原因

脳で JCV が増殖しているにも関わらず、CSF から JCV DNA が検出されない原因はいくつか考えられる。まず、中枢神経系での JCV 感染が未だ初期である場合、CSF から JCV DNA が検出困難であることが知られている。我々もこれに当てはまる症例を以前から何度か経験している。例えば、症例 J27 (女性、30歳) において、最初に採取された CSF からは JCV DNA は検出されなかったが、3週後に採取された CSF からは JCV DNA が検出されたのである。今回解析した症例 J41 は、これと同じ経過をたどっていると考えられた。この症例に対して、最初、通常通り6回 PCR が施行され、1回のみ陽性であった。同じ CSF 検体を使ってさらに6回 PCR を施行したところ、今度は全て陰性であった。したがって最初の検査で陽性結果を得たのは幸運であったといえる。しかし、最初の CSF 採取から約1ヶ月経過した時点で、CSF からの JCV DNA の検出率は4/6に上昇した。

また、中枢神経系から CSF へ出やすい JCV と出にくい JCV が存在する可能性が考えられる。この可能性は、以前解析した症例、J12 (男、14歳)

とJ19 (男、46歳)によって示唆された。すなわち、J12においては、剖検脳組織から5種類のPML型調節領域 (I~V) が検出されたが、死亡の約1ヶ月前に採取されたCSFからはそのうちの1つ (I) のみが検出された。さらに、J19では発症から死亡直前まで約5ヶ月間、CSF中のJCV DNAがフォローされた。検出率には変動はあったが、同じPML型調節領域 (A) が常に検出された。一方、剖検脳組織からは3種のPML型調節領域 (A、B、C) が検出された。以上の結果は、何らかの理由で脳からCSFへ移行しにくいJCVと移行しやすいJCVがあることを示唆している。

3. PML患者の基礎疾患

PMLは潜伏感染しているJCVが再活性化されることによって起きると一般に考えられている。JCVの再活性化の引き金になる免疫不全状態は、先天性免疫不全症 (Wiskott-Aldrich症候群など)、エイズ、リンパ球系増殖性疾患 (慢性リンパ性白血病、ホジキン病、ATLなど) とならんでSLEなどの自己免疫疾患に伴う免疫不全症も含まれている。しかし、明瞭な基礎疾患が認められないPML症例も知られている。

今年度、PMLと診断された5名の患者のうち2名 (J37とJ38) の基礎疾患はエイズであった。これらの患者は、神経症状が顕著になったため、精査を受けた後に、HIV-1陽性であることが判明した。この時点でCD4数は50を割っていた。今後、他の日和見感染症の場合と同様に、PMLの諸症状が出現してから、精査によりHIV-1陽性であることが判明するケースが増えると考えられた。

2名の基礎疾患は共に自己免疫疾患 (自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性好中球減少症) であった。自己免疫疾患に対して免疫抑制治療が施されるので、この治療がJCVを再活性化させ、一般にPMLを惹起すると考えられている。しかし、自己免疫疾患を有する患者が免疫抑制治療以前にPMLを発症した例も知られている。今後、自己免疫疾患患者において、JCV再活性化機構の解明が必要であると考えられた。

症例J40では、片副腎摘出後約20年間にわたってPSLが投与されていた。しかし投与量は生理的な量であり、免疫不全の根拠にはなりにくいと考えられた。免疫状態の詳しい解析が行われる前に患者が死亡したのは残念であった。

4. PMLの治療

基礎疾患がエイズであった2症例 (J37、J38) において、PMLの診断が確定した頃よりHAART療法が開始された。J38において、HAART開始後1ヶ月目 (1月9日) の時点で、CD4数は $120/\mu\text{l}$ に上昇し、HIV-1 RNAは199 copies/mlまで低下している。1月23日のMRIで、病変の若干の縮小と造影効果の出現が認められ、症状もわずかず改善し始めた。CSFからのJCV DNAの検出率は1/6に低下した。もう一人のHIV陽性患者 (J37) は、脱髄病巣の原発部位が脳幹・小脳であったためか、目立ったHAART療法の効果が現れないうちに、呼吸不全のため死亡した。以上のごとく、以前からいらわれているように、HAART療法がPMLに有効であることが症例J38にて確認された。一方、症例J37では、病巣が現れる中枢神経系の部位によっては、症状が急速に悪化して、HAART療法の効果が見られないことが示唆された。

最近話題になっているsiRNAがJCVの*in vitro*での増殖を抑制することが北大のグループによって報告された。siRNAを臨床的に使用するためには、どのようにしてグリア細胞にsiRNAを取り込ませるかなど、今後いくつかの問題を解決しなければならない。

5. 調節領域を用いた病巣拡大の解析

我々は再編成した調節領域をPML型JCVのマーカーとして、脳内におけるJCV感染、言い換えれば脱髄病巣の拡大を追跡する方法を提唱した。この方法を用いて、2年前にPMLと診断された22歳の男性患者 (J26) の剖検脳組織を詳しく解析した。5種の調節領域 (I~V) が検出された (図3)。Iは2年前にCSFから検出されたものと同じであった。II~VはIから、さらなる再編成により作られたと考えられた。Iは左右頭頂葉だけでなく、小脳、脳幹でも検出された。II~Vは左右頭頂葉では全く検出されず、小脳と脳幹でのみ検出された。検出された5種類のJCV DNA調節領域をマーカーとして、脳内でのJCVの出現と拡大、言い換えれば脱髄病巣の出現と拡大を以下のように推定した。

最初に、調節領域Iを持つJCVによる病巣拡大が起きた。すなわち、左または右頭頂葉で最初の

病巣が出現し、反対側の頭頂葉へ病巣は拡大した。今回調べなかった大脳他の領域へも病巣は拡大した可能性は考えられた。その後、大脳から脳幹と小脳へ病巣は拡大した。その後脳幹において、Iを持つJCVからII～Vを持つJCVが出現した。このウイルスは小脳へも侵入した。このように、J26では脱髄病巣は単一部位で出現し（病巣の「単発生」）、その後、複数のルートを進んで脳内に拡大したことが示唆された。

同じ方法を用いて、今までにいくつかの症例で脱髄病巣の拡大が解析された。ある症例においては、剖検脳組織から全く異なる再編成を有するJCV調節領域が検出され、しかも、各調節領域は脳における異なる分布パターンを示した。この症例においては、脱髄病巣は複数の部位で独立に出現し（病巣の「多発生」）、周囲へ拡大したことが示唆された。このように、脱髄病巣の出現が「単発生」である場合と「多発生」である場合が存在すると考えられた。このような知見は、今後PMLの発症機構を解明する上で有用となるであろう。

結 論

1. PMLの診断サービスを全国の病院に対して行った。5症例においてCSFからユニークなPML型調節領域が検出され、PMLの診断が確定された。
2. 臨床経過やMRI所見でPMLが疑われ、その上CSFからのユニークなPML型調節領域が検出されれば、PMLの確定診断の要件を満たしていると考えられた。
3. 中枢神経系でのJCV感染が未だ初期の場合、CSFからJCV DNAが検出されにくいこと、中枢神経系からCSFへ出ていかないJCVが存在することがCSFからのJCV検出の感度を下げる理由として考えられた。
4. PMLと診断された2名の患者は、神経症状が顕著になったため、精査を受けた後に、エイズ患者であることが判明した。この時点でCD4数は50を割っていた。今後、PMLが発症した後でHIV-1陽性であることが判明するケースが増えると考えられた。
5. エイズ合併PML症例2例ともHAART療法が施行された。そのうち1例では目立ったHAART療法の効果が現れる前に死亡したが、もう一例では、病巣が若干縮小し、症状もわずかず改善し始めるなど、治療効果が認められた。
6. 明瞭な免疫抑制が認められない患者で発症したPMLが1例確認された。
7. 今回および以前の解析結果によると、脳内で病巣の出現が「単発生」である場合と「多発生」である場合とがあることが明らかになった。

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) Ault G. S., Stoner G. L.: Two major types of JC virus defined in progressive multifocal leukoencephalopathy brain by early and late coding region DNA sequences. *J. Gen. Virol.* 73: 2669-2678, 1992.
- 3) 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.
- 4) 大場靖子、澤浩之、長嶋和郎: siRNAを用いたJC virusの感染抑制効果。第51回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集。p 336, 2003.
- 5) Sabath B. F., Major E. O.: Traffic of JC virus from sites of initial infection to the brain: the path to progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.* 186 Suppl 2: S180-186, 2002.
- 6) Sugimoto C., Itoh D., Tanaka K. et al.: Amplification of JC virus regulatory DNA sequences from cerebrospinal fluid: diagnostic value for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch. Virol.* 143: 249-262, 1998.
- 7) Weber T. Laboratory findings in progressive multifocal leukoencephalopathy. In *Human polyomaviruses: molecular and clinical perspectives*, edited by Khalili K. and Stoner G. L. (John Wiley & Sons, New York). pp 337-368, 2001.
- 8) Yasuda Y., Yabe H., Inoue H., et al.: Comparison of PCR-amplified JC virus control region sequences from multiple brain regions in PML.

- Neurology 61: 1617-1619, 2003.
- 9) 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.
 - 10) Yogo Y., Sugimoto C. The archetype concept and regulatory region rearrangement. In *Human polyomaviruses: molecular and clinical perspectives.* edited by Khalili K. and Stoner G. L. (John Wiley & Sons, New York). pp 127-148, 2001.
 - 11) Yogo Y., Matsushima-Ohno T., Hayashi T., et al.: JC virus regulatory region rearrangements in the brain of a long surviving patient with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 71: 397-400, 2001.
 - 12) 余郷嘉明: PMLの発症に関わるJCウイルスの遺伝的変化とそれを用いたPMLの遺伝子診断。厚生科学研究補助金エイズ対策研究事業「エイズと日和見感染症に関する臨床研究」平成6年度研究報告書、pp 94-100, 1995.
 - 13) 余郷嘉明: PMLの病態とJCウイルスのゲノム構造。厚生科学研究補助金エイズ対策研究事業「エイズと日和見感染症に関する臨床研究」平成7年度研究報告書、pp 170-175, 1996.
 - 14) 余郷嘉明、杉本智恵: 髄液を用いた進行性多巣性白質脳症(PML)の診断。厚生科学研究補助金エイズ対策研究事業「エイズと日和見感染症に関する臨床研究」平成8年度研究報告書、pp 140-144, 1997.
 - 15) 余郷嘉明、杉本智恵、斉藤博ら: 髄液からのJCV調節領域の増幅: PMLの簡便で確実な診断法の診断。厚生科学研究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9年度研究報告書、pp 128-132, 1998.
 - 16) 余郷嘉明、杉本智恵、保田由喜治: PMLのDNA診断とその発症機構。「HIV感染症に関する臨床研究」平成10年度研究報告書、pp 105-112, 1999.
 - 17) 余郷嘉明、杉本智恵: PMLのDNA診断と追跡調査。厚生科学研究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年度研究報告書、pp 126-131, 2000.
 - 18) 余郷嘉明、杉本智恵、藤原一男ら: PML患者におけるJCウイルスDNAの動態。厚生科学研究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年度研究報告書、pp 132-138, 2000.
 - 19) 余郷嘉明、井戸田一郎、岸田修二ら: PML患者における病態進行とJCウイルスDNAの動態。厚生労働省「日和見感染症の治療に関する研究」平成12年度研究報告書、pp 55-64, 2001.
 - 20) 余郷嘉明、太田晃一、野田和幸ら: 進行性多巣性白質脳症(PML)のPCR診断とPMLの病態解析。厚生労働省「日和見感染症の治療に関する研究」平成13年度研究報告書、pp 151-159, 2002.
 - 21) 余郷嘉明、高坂友和、鄭懐穎ら: 進行性多巣性白質脳症(PML)のPCR診断とPMLの病態解析。厚生労働省「日和見感染症の治療に関する研究」平成14年度研究報告書、pp 136-144, 2003.

研究発表

論文発表

- 1) H.-Y. Zheng, T. Kitamura, T. Takasaka, Q. Chen, and Y. Yogo. Unambiguous identification of JC polyomavirus strains transmitted from parents to children. *Arch. Virol.* 149:261-273, 2004.
- 2) H.-Y. Zheng, Y. Yasuda, S. Kato, T. Kitamura, and Y. Yogo. Stability of JC virus-coding sequences in a case of progressive multifocal leukoencephalopathy where the viral control region was rearranged markedly. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 128:275-278, 2004.
- 3) Y. Yogo, C. Sugimoto, H.-Y. Zheng, H. Ikegaya, T. Takasaka, T. Kitamura. JC virus genotyping offers a new paradigm in the study of human populations. *Rev. Med. Virol.*, 2004 (in press).

学会発表

- 1) 高坂友和、北村唯一、鄭懐穎、余郷嘉明。日本に分布するBKウイルスの型分類と系統解析。第51回日本ウイルス学会学術集会、2003、京都。
- 2) 鄭懐穎、趙鵬雲、高坂友和、杉本智恵、北村唯一、余郷嘉明。JCウイルスによる東北アジアヒト集団史の解明。第51回日本ウイルス学会学術集会、2003、京都。
- 3) 余郷嘉明、鄭懐穎、杉本智恵、北村唯一。アイヌから検出されたJCV DNAの系統解析: アイヌの起源の解明を目指して。第51回日本ウイルス学会学術集会、2003、京都。
- 4) 池谷博、鄭懐穎、高坂友和、杉本智恵、北村唯一、余郷嘉明。JCウイルスによるサーミ人とフィンランド人の集団史の比較解析。第51回日本ウイルス学会学術集会、2003、京都。

免疫再構築症候群の病態解明と 回避の手段、発症時の対応

分担研究者：中村 哲也（東京大学医科学研究所附属病院 感染免疫内科）

研究協力者：遠藤 宗臣、藤井 毅、山田 晴美、岩本 愛吉

（東京大学医科学研究所附属病院 感染免疫内科）

- 研究要旨
- (1) 非定型抗酸菌症に対する免疫再構築症候群の病態を解析するために、患者末梢血リンパ球の非定型抗酸菌由来抗原に対する特異的細胞性免疫を ELISPOT 法で測定した。反応の大部分は CD4 陽性 T リンパ球分画にあり、CD4 数がもともと低値である本症例では解析が技術的に困難であった。
- (2) 抗 HIV 療法の開始に際し、免疫再構築症候群を回避するためには残存する微生物量の正確な定量が必須である。そのため、カリニの菌量の定量法として血中 S-adenosylmethionine を HPLC を用いて定量する方法を確立した。

研究目的

抗 HIV 療法による免疫力の回復に伴い、残存微生物に対する免疫応答が増強する病態が免疫再構築症候群（IRS）と考えられている。この仮説を検証する目的で、非定型抗酸菌症（MAC）を例にとり MAC 特異的な抗体および細胞性免疫が IRS の発症前後でどのように推移するかを検討した。また、IRS を回避するためには合併する日和見疾患を十分に治療し、残存する微生物量を十分に減少させてから抗 HIV 療法を開始する必要があると考えられる。そのためには残存する微生物量を正確に定量する必要がある。そこで、カリニ肺炎を例にとり、残存するカリニ菌量の指標として血中 S-adenosylmethionine（SAM）の定量系の確立を試みた。

研究方法

(1) MAC 特異的抗体の測定：協和メディックス社のデタミナー TBGL 抗体キットを使用し、使用説明書に従い患者血清中の MAC 特異的抗体を測

定した。

(2) MAC 特異的細胞性免疫の定量（ELISPOT 法）：患者末梢血単核球（PBMC）に、結核菌由来 PPD、MAC 由来 PPD、BCG を抗原として加え、抗 IFN-gamma 抗体結合 96 well プレートに 10^5 単核球/well となるように分注し 16～24 時間培養を行った。各 well を洗浄後、ALP 標識抗 IFN-gamma 抗体、基質を加えて IFN-gamma 産生細胞数を計測した。

(3) 血中 SAM の測定：精製 SAM を陽性コントロールとし、UV 法または蛍光検出法で HPLC を用いて測定系の確立を行った。

研究結果

(1) 過去の保存血清を用いて、細菌学的または臨床的に MAC と診断したエイズ症例の血清 TBGL 抗体を 41 例で測定した。陽性症例は 3 例（7.3%）にすぎなかった。MAC IRS 中の血清を 1 症例で測定したが、測定感度以下であった。

(2) 健常者 PBMC を用いて検討した結果、結核菌および MAC 由来 PPD は 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、BCG は 5

μg/mlで使用できることが明らかになった(図1, 2)。磁気ビーズを用いてPBMCをCD4陽性分画、CD8陽性分画にわけてIFN-gamma産生細胞を計測すると、陽性細胞のほとんどはCD4陽性分画に存在していた(図3)。MACのIRSを発症する症例はCD4数が50未満の症例であるため、IRS患者でELISPOT法によりMAC特異的反応を検出することは困難であった。

(3) UV検出法によるSAMの検出限界は血漿0.5 mLにおいて100 nMであり、カリニ肺炎患者の血漿中SAM濃度(<1 nM)測定には感度が低いと考えられた。そこで、6-aminoquinolyl- N-hydroxy-succinimidyl calbamateを用いてSAMを蛍光誘導体化し、蛍光検出器(RF10A XL, Shimadzu)を使用し、0.5 nMまで測定することが可能となった(図4)。

| 検体番号 | PPD 濃度 (μg/ml) | | | | | |
|------|----------------|-----|-----|------|-------|----|
| | 1.5 | 1.0 | 0.5 | 0.25 | 0.125 | 0 |
| 1 | 117 | 113 | 187 | 167 | ND | 37 |
| 2 | 143 | 193 | 187 | 103 | ND | 53 |
| 3 | ND | ND | 213 | 147 | 47 | 23 |
| 4 | ND | ND | 603 | 363 | 257 | 90 |
| 5 | ND | ND | 173 | 80 | 37 | 33 |
| 6 | ND | ND | 20 | 10 | 33 | 17 |

10⁶ PBMC中のIFN-gamma産生細胞数を示す
ND : not done

図1. 健常者PBMCの結核菌PPDに対する反応(ELISPOT)

| 検体番号 | BCG 濃度 (μg/ml) | | | | |
|------|----------------|-----|-----|-----|----|
| | 10 | 5 | 1.0 | 0.5 | 0 |
| 1 | ND | 300 | 187 | 93 | 37 |
| 2 | ND | 173 | 100 | 77 | 53 |
| 3 | 500 | 367 | ND | ND | 23 |
| 4 | 713 | 450 | ND | ND | 90 |
| 5 | 373 | 297 | ND | ND | 33 |
| 6 | 53 | 70 | ND | ND | 17 |

10⁶ PBMC中のIFN-gamma産生細胞数を示す
ND : not done

図2. 健常者PBMCのBCGに対する反応(ELISPOT)

| 検体番号 | 細胞分画 | | |
|----------------|-----------|-----------|-----------|
| | total | CD8(+) | CD4(+) |
| 健常者 | | | |
| 1 | 65 (20) | 40 (57) | 327 (80) |
| 2 | 337 (327) | 410 (563) | 97 (40) |
| 3 | 107 (30) | 0 (3) | 137 (40) |
| HIV 感染者 | | | |
| 4 | 10 (10) | 10 (0) | 5 (20) |
| 5 | 257 (160) | 160 (110) | 500 (493) |

10⁶ PBMC中のIFN-gamma産生細胞数を示す、()は抗原なしのコントロール
 検体番号4はMAC IRS中の症例 (CD4数1~5)
 検体番号5はMACの既往のある症例 (CD4数200前後、VL<400)

図3. MAC-PPDに対する反応 (ELISPOT)

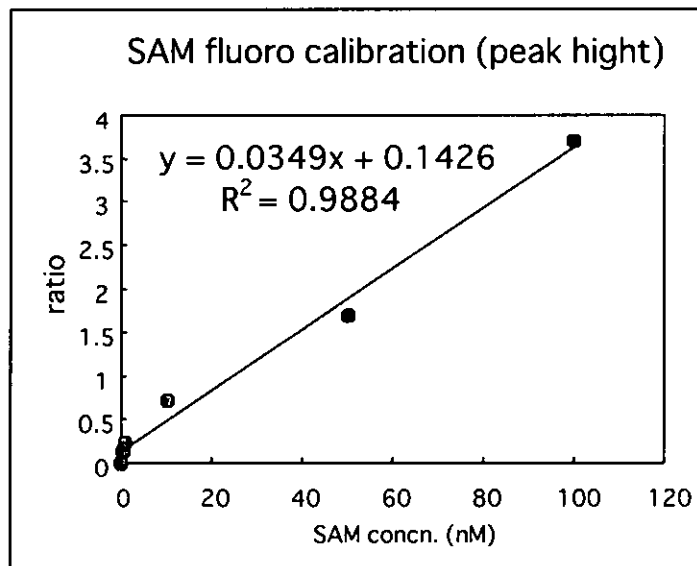


図4. 蛍光検出法によるSAMの測定

考察

病態解析のために例にとったMAC感染症患者ではもともと高度の免疫不全があるため、末梢血を用いてMAC特異的免疫を解析することは困難であった。末梢血を材料とする解析としては、血清中の各種サイトカインやフローサイトメーターを用いたPBMCの活性化マーカーの測定のような非特異的免疫の解析を行う以外に方法はないと考えられる。SAMの定量に関しては、鋭敏なアッセイ系がほぼ完成したので、今後実際のカリニ肺炎患者で測定を行っていく予定である。

結論

末梢血を用いてMACのIRSの免疫学的機序を解析することは困難である。カリニ肺炎のIRSの回避手段として、血中SAMの定量は技術的には可能であるので、今後実際の症例で検討を行いたい。

健康危険情報

特記すべきことなし。

研究発表

論文発表

なし