

10. B4500CISD 株の液体培地中でのクラスタ一形成に関する検討

B4500 株と B4500CISD 株をそれぞれ Minimal media 液体培地にて 48 時間培養し、細胞数計算板を用いて 6 個以上の細胞にて形成されているクラスタの数を計測した。

成績

1. *in vivo* passage による病原性の変化 (図 3)

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、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。

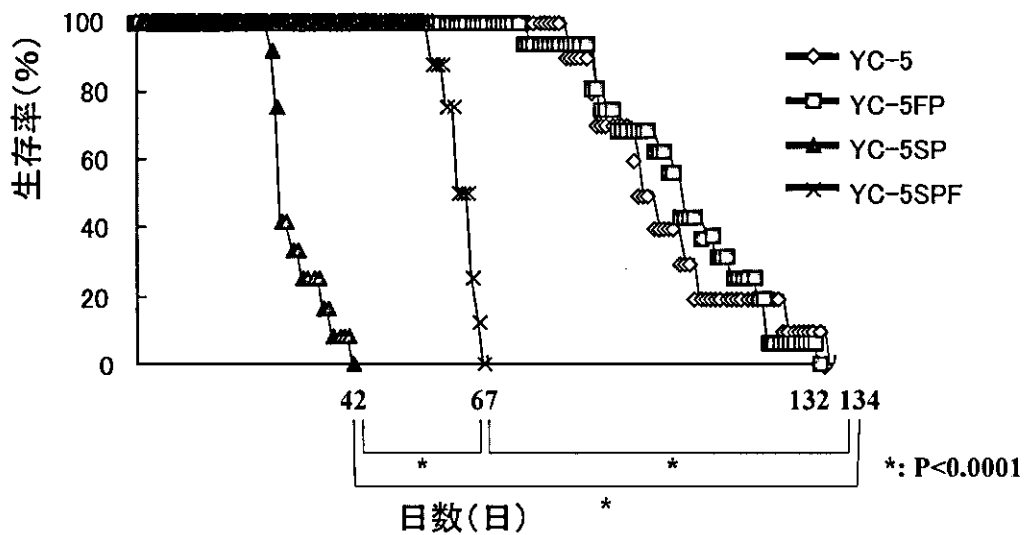


図 3. *C. neoformans* 感染マウス生存曲線

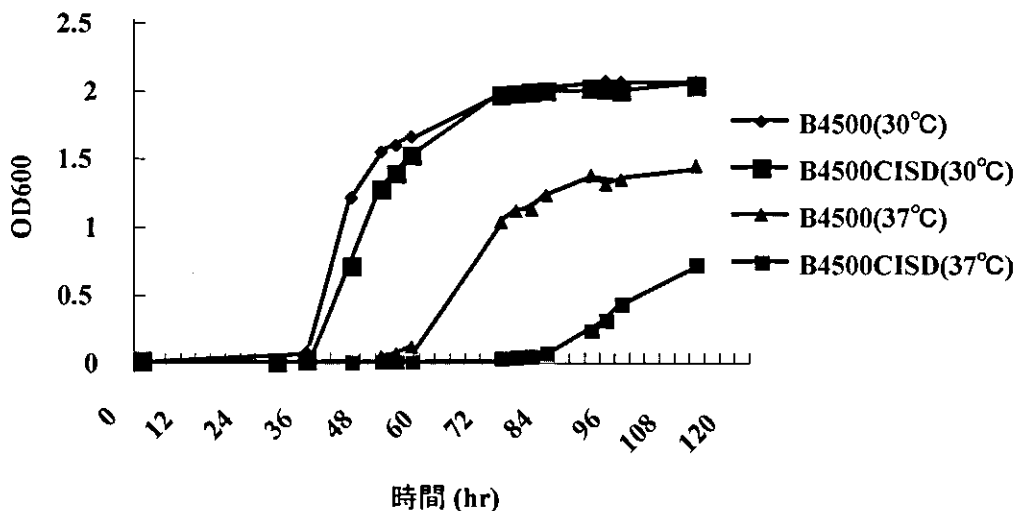


図 4. *cis*-prenyltransferase の液体培地での発育速度

## 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℃での発育速度は B4500 株と有意差なかったが、37℃での発育速度有意に B4500 株と比較して有意に遅かった (図4)。

## 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  $\mu$  g/ml が B4500CISD 株 2  $\mu$  g と有意に低下した。(表2)

## 6. B4500CISD 株のマウスに対する病原性の検討の結果

1) *Cryptococcus neoformans* 全身感染モデル

B4500 株と B4500CISD 株の生存期間はそれぞれ 55 ~ 141 日と 29 ~ 39 日であり有意に減少していた ( $P < 0.0001$ ) (図5)。また、接種より4週間後に各群 10 匹ずつ屠殺して計測した脳内菌数はそれぞれ平均 Log6.3CFU/ml と Log7.3CFU/ml で有意に B4500CISD 株が多かった (図6)。同時に顕微鏡的に観察した脳組織で B4500CISD 株接種群が B4500 接種群より組織破壊が強かった。

2) *Cryptococcus neoformans* 経気道感染モデル

B4500 株と B4500CISD 株の生存期間はそれぞれ 4 ~ 35 日と 9 ~ 日であり有意に延長していた ( $P < 0.0001$ ) (図7)。

## 7. B4500CISD 株の液体培地中でのクラスタ一形成数

B4500 株と B4500CISD 株における6個以上の細胞にて形成されているクラスタ一数はそれぞれ 9.75 個と 19.75 個と有意に B4500CISD 株が多かった ( $P < 0.01$ ) (図8)。

## 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 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。

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              |

*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<sup>14)</sup>、*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、全身感染モデルではB4500CISD株がB4500株よりも病原性が有意に強いという結果となった。予想に反する結果であるため追加実験としてクラスター形成に関する検討を行った。ここでB4500CISD株が有意にB4500株よりもクラスター形成数が多いことが確認された。これはglycosylationの欠如した菌株では液体培地内でクラスターを形成しやすいという報告と一致している。このクラスター形成が血液中でも起き、細動脈に塞栓し膿瘍を形成しやすいのではないかと推測した。組織学的検討にてB4500CISD株がB4500株と比較して膿瘍形成が多い事が、この推測を裏付ける傍証であると考えている。

薬剤感受性の変化に関しては、B4500CISD株がなぜFLCZのみ感受性に変化したのかについては

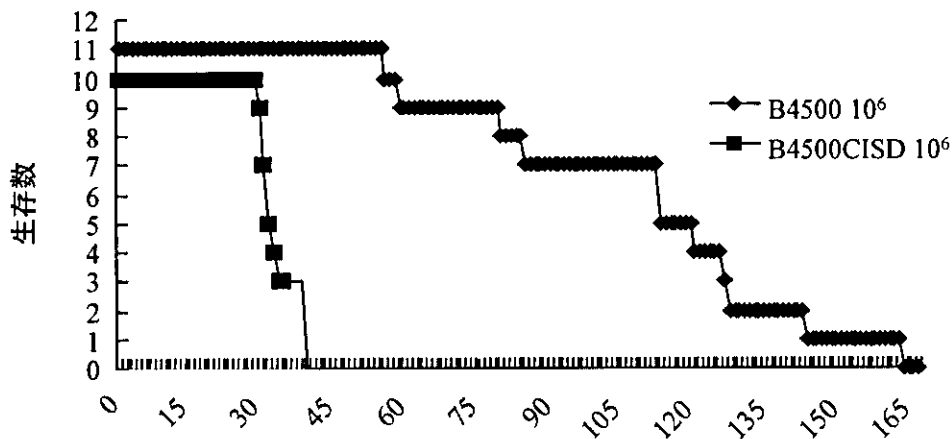


図5. クリプト経静脈感染モデル

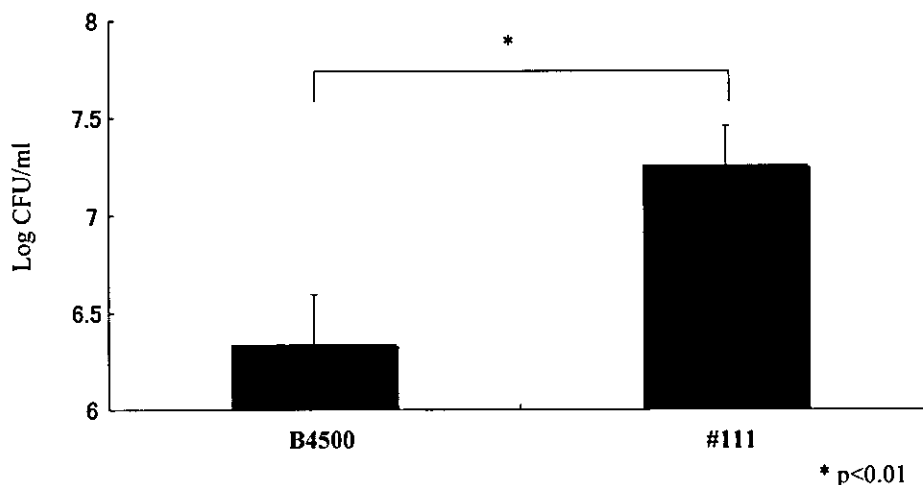


図6. 脳内菌数

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。

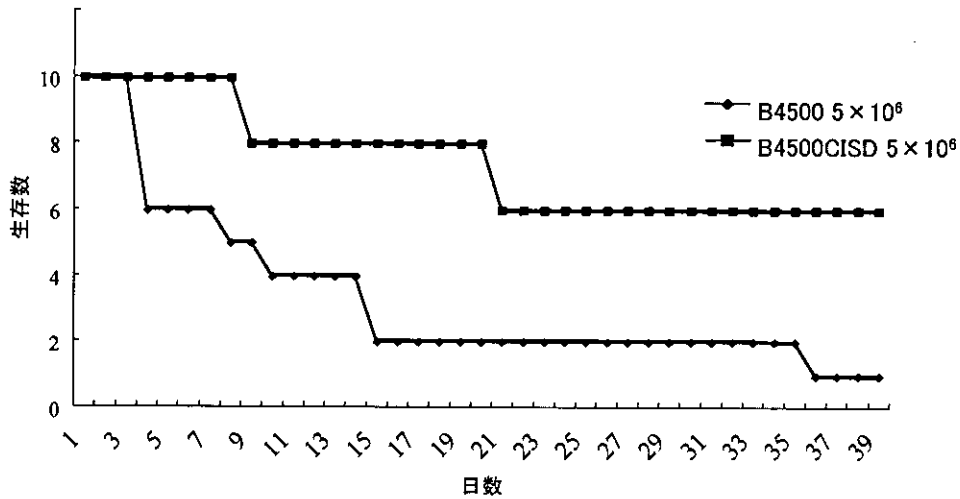
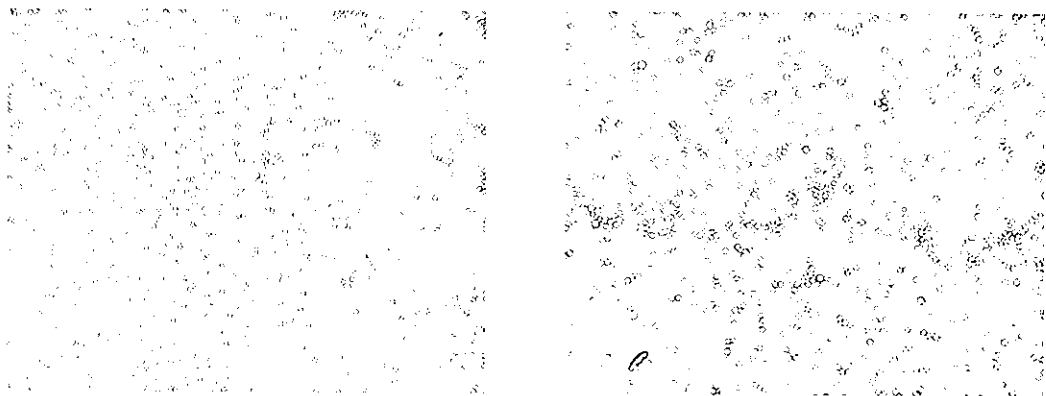


図7. 免疫抑制マウス クリプト経気道感染モデル



B4500

B4500CISD

図8. 液体培地における菌塊形成能

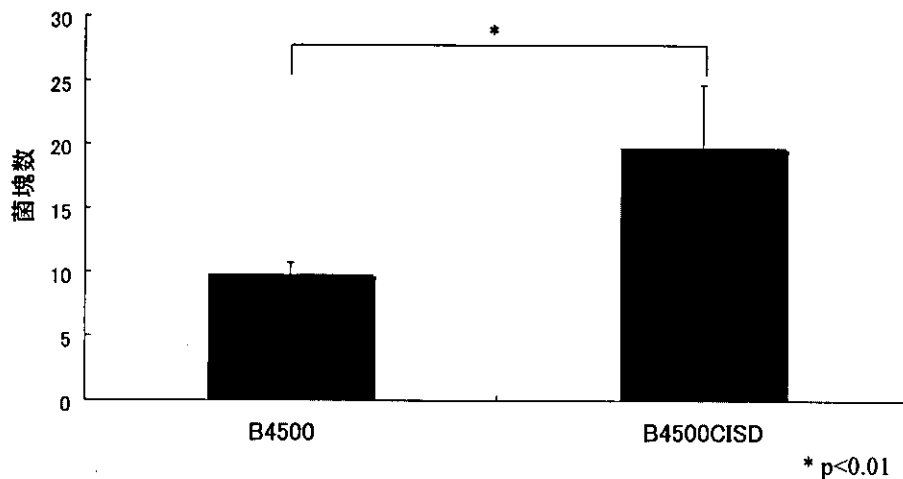


図9. 液体培地における菌塊形成数

今後は、今回 Subtraction 法で得られた未知の遺伝子に関しても 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)
- 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-prenyl-transferase, a key enzyme in dolichol synthesis. *Mol Cell Biol*. 19: 471-83 (1999)

## 健康危惧情報

特になし

## 研究発表

### 学会発表

- 2004, 1 第5回真菌症フォーラム (東京)  
 2004, 4 第78回日本感染症学会総会  
 2004, 6 第52回日本化学療法学会総会  
 2004, 11 44th. Interscience Conference on Antimicrobial Agent and Chemotherapy.

## 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

## HAART時代の日和見合併症に関する研究 分担研究報告書

## 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<sup>1</sup>、余郷 嘉明<sup>1</sup>、坂本いずみ<sup>2</sup>、國枝 武伸<sup>3</sup>、  
大庭 拓<sup>4</sup>、金田 大太<sup>5</sup>、有馬 靖佳<sup>5</sup>、岡本 光生<sup>6</sup>、  
松尾 崇<sup>7</sup>、健山 正男<sup>8</sup>、池谷 健<sup>9</sup>、堀場 昌英<sup>10</sup>、  
間宮 均人<sup>11</sup>、山本 政弘<sup>12</sup>、野田 昌昭<sup>13</sup>、長嶋 和郎<sup>14</sup>、  
野田 和幸<sup>15</sup>、冠木 智之<sup>16</sup>

（<sup>1</sup>東京大学医学部附属病院・泌尿器科、<sup>2</sup>国立病院機構名古屋医療センター・総合内科、<sup>3</sup>天理よろづ相談所病院・神経内科、<sup>4</sup>名古屋第一赤十字・第4内科、<sup>5</sup>大阪赤十字病院・神経内科、<sup>6</sup>横浜市立大学医学部附属病院・神経内科、<sup>7</sup>宮崎大学医学部附属病院・第3内科、<sup>8</sup>琉球大学医学部附属病院・第一内科、<sup>9</sup>藤枝市立総合病院・小児科、<sup>10</sup>国立病院機構東埼玉病院・呼吸器科、<sup>11</sup>国立病院機構名古屋医療センター・内科、<sup>12</sup>国立病院機構九州医療センター・感染症対策室、<sup>13</sup>広島市立広島市民病院・内科、<sup>14</sup>北海道大学医学部・分子細胞病理学、<sup>15</sup>順天堂大学医学部附属順天堂医院・神経内科、<sup>16</sup>埼玉県立小児医療センター・感染免疫アレルギー科）

■研究要旨 JCウイルス（JCV）DNAの調節領域を標的としたnested PCR（nPCR）を用いて、進行性多巣性白質脳症（PML）の診断サービスを全国の病院に対して実施した。平成16年2月から平成17年1月までに48名の患者の髄液を検査し、6名の髄液からJCV調節領域を検出した。検出された調節領域はいずれもユニークな再編成型であったことから、6名はPMLと診断された。これらの患者の基礎疾患はエイズ（3名）、慢性腎不全（1名）、成人T細胞白血病（1名）、真性多血症（1名）であった。JCV DNAの変化とPMLの発症との関係を解明するために、PML患者（3名）の剖検脳組織から多数のJCV DNAクローンを樹立し、それらの全長塩基配列を決定した。その結果、アミノ酸置換を伴う塩基置換（変異）が患者当たり2-7個、合計で12個検出された。これらの変異のうち、VP1遺伝子での変異が最も多く（7個）検出された。興味深いことに、これらは全て表面ループで起きていた（VP1ループ変異と命名）。次に、今までにVP1配列が報告された非PML型JCV（原型JCV）とPML型JCVにおいて、VP1ループ変異が起きているかどうかを調べた。原型JCVでは全くVP1ループ変異は検出されなかったが、PML型JCVにおいては高い率（13/16）で検出された。VP1ループ変異はPMLに関連した新しい多型として有用である。「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19のエイズ拠点病院と共に立ち上げた。現在までに16名のエイズ患者（2名を除き、CD4陽性細胞数は200個/ $\mu$ l以下）の末梢血リンパ球（PBL）を用いて、nPCRによるJCV DNAの検出を試みたが、いずれも陰性であった。今回の結果から、免疫が顕著に低下したエイズ患者の末梢血リンパ球において、JCVは再活性化されていないことが示唆された。

## 研究目的

PMLはヒトポリオマウイルス (JCV) によって惹起される中枢神経系での脱髄疾患である。従来PMLの確定診断には、生検または剖検脳組織の病理学的な検査によるJCV感染の証明が必要とされていた。しかし近年において、脳脊髄液 (髄液) からのPCRによるJCV DNAの検出が、PMLの診断に有効であることが明らかにされた (Weber, 2001)。この方法の特異性は非常に高いが、偽陰性の率 (20 ~ 30%) が比較的高いという問題点がある。しかし、この方法は脳生検と比べて非侵襲性であるため、PMLの診断に汎用されている。本研究の第一の目的は、Sugimotoら (1998) が開発したnPCRを用いて、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。Sugimotoらの方法は増幅の標的として調節領域を用いるが、以下でその理由を簡単に述べる。

JCVゲノムは約5100 bpの環状二本鎖DNAで、DNA複製開始点 (Ori) を境に初期領域と後期領域に分けられる (図1参照)。初期領域からは調節蛋白 (large T, small t) が作られ、後期領域からはキャプシド蛋白 (VP1, VP2, VP3) とアグノ蛋白 (Agno) が作られる。Oriとアグノ蛋白 (翻訳開始部位) の間に転写調節領域 (以下、単に調節領域と呼ぶ) がある。調節領域の向かい側にIG領域 (ゲノム型間での塩基の違いが多い領域) がある。健常人や非PML患者の尿、腎や扁桃から検出されるJCV DNAは一定の調節領域 (原型調節領域) を持つ。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。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) によって患者の体内で作られる。この再編成は不規則的に起きるため、PML型調節領域は患者ごとに異なる (Yogo & Sugimoto, 2001)。したがって、PMLのPCR診断において調節領域を標的とすれば、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。さらに、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。

JCVはヒトの腎組織に寄生していることは古くから知られているが、その他、PBLやリンパ組織にも潜伏感染していると考えられている。そして、

潜伏感染しているJCVが免疫低下によって再活性化され、中枢神経系に侵入し、脱髄病巣を作るという説 (Major et al., 1992) が一般に信じられているが、この説は未だ証明されたわけではない。PMLの動物モデルは存在しないので、PML患者 (およびPMLのハイリスク患者) を解析することがPMLの発症機構を解明するための唯一の方法である。我々の手によって診断されたPML患者が死亡し、剖検が施行された場合、剖検組織中のJCV DNAの解析が我々に対して要請されることが多い。このようにして得られた剖検脳組織を解析し、PMLの発症機構を解明することが、本研究の第二の目的である。今年度においては、調節領域に加えて、蛋白質コード領域 (コード領域) も解析のターゲットとした。その目的は、PMLの発症や病態進行に関わる変異を検出することである。

我々は昨年度、「PMLのハイリスク患者であるエイズ患者のPBL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共同で施行することを呼びかけた。幸い、19拠点病院から賛同が得られた。同プロジェクトは本年度始めまでに東大病院と拠点病院、双方の倫理委員会承認され、6月から実施に移された。未だ例数 (16例) が少ないが、今年度において得られた結果を報告する。

## 研究方法

### 1. PCR診断施設

コンタミネーションを最大限防ぐために、JCV DNAのレベルに応じて、実験操作を3つの実験室で行った (図2参照)。

### 2. 髄液からの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。髄液を100  $\mu$  lずつ6本のマイクロチューブに分注し、以下キットの指示にしたがって処理した。

### 3. 脳組織からのDNA抽出

組織を鉏で切断して細片にし、SDSの存在下、56  $^{\circ}$ C、1時間プロテイナーースKで消化した。その後、フェノール抽出、クロロフォルム抽出を行い、最後にエタノール沈殿によりDNAを回収した。

#### 4. nPCRによる増幅

増幅ターゲットとプライマー (outer primer と inner primer) を表1に示した。増幅条件は既報の方法 (Sugimoto et al., 1998) に準じた。ただし、耐熱 DNA 合成酵素は HotStar Taq DNA polymerase (QIAGEN 社) を用いた。同酵素を活性化するため、反応混合液を 95 °C、15 分処理し、その後続けて、通常の増幅サイクル (Sugimoto et al., 1998) を行った。検出感度は、どの領域をとターゲットとした場合でも 1~数コピーであった。nPCR は各検体に対して 6 回ずつ試みた。

#### 5. PCR 増幅断片のクローニング

JCV 調節領域の増幅断片を *Hind*III と *Pst*I 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。得られたクローン (通常 24 クローン) を *Hind*III、*Pst*I、*Sst*I により消化した [詳しくは文献 (Sugimoto et al., 1998) を参照]。消化液を 3% の NuSieve アガロース・ゲル (Takara Shuzo 社) で電気泳動した。得られた泳動パターンによって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. 全長 JCV DNA のクローニング

全長 JCV DNA を pUC19 の *Bam*HI の切断部位に挿入し、クローニングした (Yogo et al., 1991)。Plasmid Midi kit (QIAGEN 社) を用いて、全長 JCV DNA クローンを精製した。

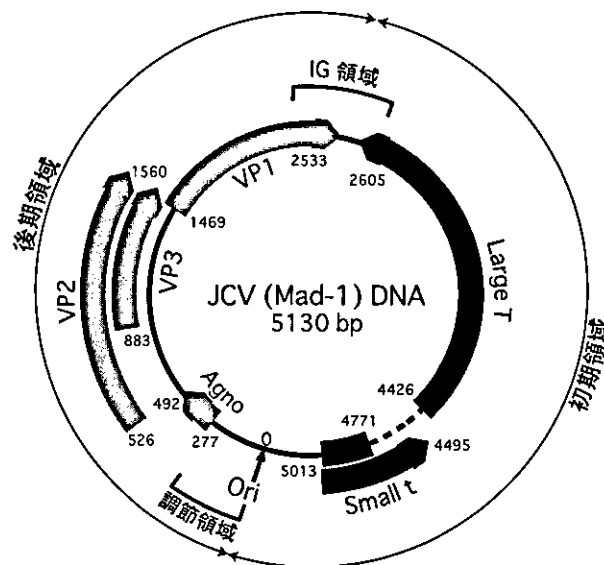


図1. JCV ゲノムの遺伝子地図

JCV ゲノムは約 5100bp の環状二本鎖 DNA で、DNA 複製開始点 (Ori) を境に初期領域と後期領域に分けられる。初期領域からは調節蛋白 (large T、small t) が作られ、後期領域からは capsid 蛋白 (VP1、VP2、VP3) とアグノ蛋白 (Agno) が作られる。Ori とアグノ蛋白 (翻訳開始部位) の間に転写調節領域 (以下、単に調節領域と呼ぶ) がある。調節領域の向かい側に IG 領域 (ゲノム型間での塩基の違いが多い領域) がある。数字は Mad-1 株 (Frisque et al., 1984) のヌクレオチド番号である。

|        |  |        |        |
|--------|--|--------|--------|
| Room 1 |  | Room 2 | Room 3 |
|--------|--|--------|--------|

Room 1: DNA extraction from CSF samples; Preparation of 1st-round reaction mixtures for nPCR.  
 Room 2: Preparation of 2nd-round reaction mixtures for nPCR; Amplification on a thermocycler.  
 Room 3: Analysis of PCR products (agarose gel electrophoresis, cloning, sequencing).

図2. PCR 診断施設



## 7. 塩基配列の決定

蛍光式自動シーケンサー (ABI 373S) を用いてシーケンシングした。サイクルシーケンス反応は DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing kit (Amersham Bioscience 社) を用いて行った。

## 8. 系統解析

アラインメントした DNA 配列を用いて、近隣結合法 (Saitou & Nei, 1987) により系統樹を作成した [CLUSTAL W プログラム (Thompson et al., 1994) を使用]。多重置換に対する補正を Kimura (1980) の 2 パラメーター法で行った。系統樹の再

現性を検討するために、1,000 回の bootstrap (Felsenstein, 1985) を施行した。系統樹の画像化には TREEVIEW プログラム (Page, 1996) を用いた。

## 研究結果

## 1. 髄液を用いた PML 診断サービス

## 本年度 PML 診断実績

平成 16 年 2 月から平成 17 年 1 月までに 48 名の患者の髄液から JCV 調節領域の検出を試みた。その結果、6 名の患者の髄液からユニークな再編成型調節領域が検出された。これらの患者に J42 ~

表 1. nPCR に用いたプライマー

| 増幅領域      | プライマー <sup>a</sup> | 塩基配列 (5'-3') <sup>b</sup>              | 位置                        |
|-----------|--------------------|--|---------------------------|
| JCV 調節領域  | A1 (O)             | TCCATGGATTCCCTCCTATTCAGCACTTTGT        | nt 4979-5009 <sup>c</sup> |
|           | A3 (O)             | CATTACTIACCTATGTAGCTTTTGGTTCAGGC       | nt 502-471 <sup>c</sup>   |
|           | B1 (I)             | GCAAAAAAGGGAAAAACAAGGG                 | nt 5041-5062 <sup>c</sup> |
|           | B3 (I)             | <u>CACTGC</u> GAGAAGCCTTACGTGACAGCTGG  | nt 310-288 <sup>c</sup>   |
| JCV IG 領域 | P5 (O)             | TGAACACAGAGCACAAAGGCGTACCTAGATA        | nt 2013-2042 <sup>c</sup> |
|           | P6 (O)             | TGGAAAAGAAAGGCTGGATTTAGAAATAAGC        | nt 2872-2843 <sup>c</sup> |
|           | P1 (I)             | <u>CACAAGCTTT</u> TTTGGGACACTAACAGGAGG | nt 2107-2127 <sup>c</sup> |
|           | P2 (I)             | <u>GATICTGC</u> AGAAGACTCTGGACATGG     | nt 2761-2742 <sup>c</sup> |
| BKV 調節領域  | BKTT1 (O)          | AAGGTCCATGAGCTCCATGGATTCTTCC           | nt 5106-5133 <sup>d</sup> |
|           | BKTT2 (O)          | CTAGGTCCCCAAAAGTGCTAGAGCAGC            | nt 657-630 <sup>d</sup>   |
|           | RR-1PST (I)        | <u>GCCTGC</u> AGGCCTCAGAAAAAGCCTCCACAC | nt 49-72 <sup>d</sup>     |
|           | RR-2HIN (I)        | <u>CGAAGCTT</u> GTCTGACAGCTGGCGCAGAAC  | nt 419-391 <sup>d</sup>   |
| BKV VP1   | VP1-a1 (O)         | GGCCTGTACGGGACTGTAACACCTGCTCTT         | nt 1521-1550 <sup>d</sup> |
|           | VP1-a2 (O)         | TCAACTGGATAAGCATTGTTTTGTCCAA           | nt 2183-2155 <sup>d</sup> |
|           | 327-1PST (I)       | <u>GCCTGC</u> AGCAAGTGCCAAAATACTAAT    | nt 1629-1649 <sup>d</sup> |
|           | 327-2HIN (I)       | <u>GCAAGCTT</u> GCATGAAGGTTAAGCATGC    | nt 1956-1937 <sup>d</sup> |

<sup>a</sup> 括弧内に outer primer (O) か inner primer (I) を示す。

<sup>b</sup> ウイルス DNA の塩基配列にない配列を下線で示した (主として制限酵素切断部位を挿入するために付加した)。

<sup>c</sup> JCV Mad-1 ゲノムのヌクレオチド番号 (Frisque et al., 1984)。

<sup>d</sup> BKV Dun ゲノムのヌクレオチド番号 (Seif et al., 1979)。

表 2. 髄液から 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 <sup>a</sup> |
|-------|-------|------------|------------------|
| J42   | 男/55  | エイズ        | 6/6              |
| J43   | 男/73  | 真性多血症      | 6/6              |
| J44   | 男/62  | エイズ        | 2/12             |
| J45   | 男/37  | エイズ        | 4/6              |
| J46   | 男/68  | 慢性腎不全      | 6/6              |
| J47   | 男/54  | 成人 T 細胞白血病 | 6/6              |

<sup>a</sup> 陽性回数/検査回数

J47 というコードを付けた。検出率（陽性回数／PCR 施行回数）は 4 名（J42、J43、J46、J47）において 6/6 であったが、1 名（J44）では 2/12 であり、1 名（J45）では 4/6 であった（表 2）。JCV 調節領域が検出された 6 名の患者の基礎疾患はエイズ（3 名）、慢性腎不全（1 名）、成人 T 細胞白血病（1 名）、真性多血症（1 名）であった（表 2）。各患者の臨床経過は後で述べる。

### 検出された調節領域の構造

髄液より検出され全ての JCV 調節領域（図 3）は原型調節領域から欠失と重複により作られた再編成型であった。いずれもユニークな構造を有しており、過去に検出された調節領域とは一致しな

かった。J42 と J47 以外の患者の髄液からは 1 種類の調節領域が検出された。J42 からは 2 種類（J42a、J42b）、J47 からは 3 種類の調節領域（J47a、J47b、J47c）が検出された。

髄液から JCV DNA が検出された患者の臨床経過 J42（50 歳代、男性）

2003 年夏頃、カンジダ口内炎を発症。2004 年 1 月 11 日、発熱のため前医救急外来を受診するも、急速な呼吸状態の悪化のため、人工呼吸管理となった。精査の結果、エイズに伴うカリニ肺炎と診断され、バクタ 8T を 3 週間投与。呼吸状態が改善。2004 年 2 月 6 日、HAART を開始。2 月 12 日より発熱、血球減少、下痢を認めたため、薬剤性

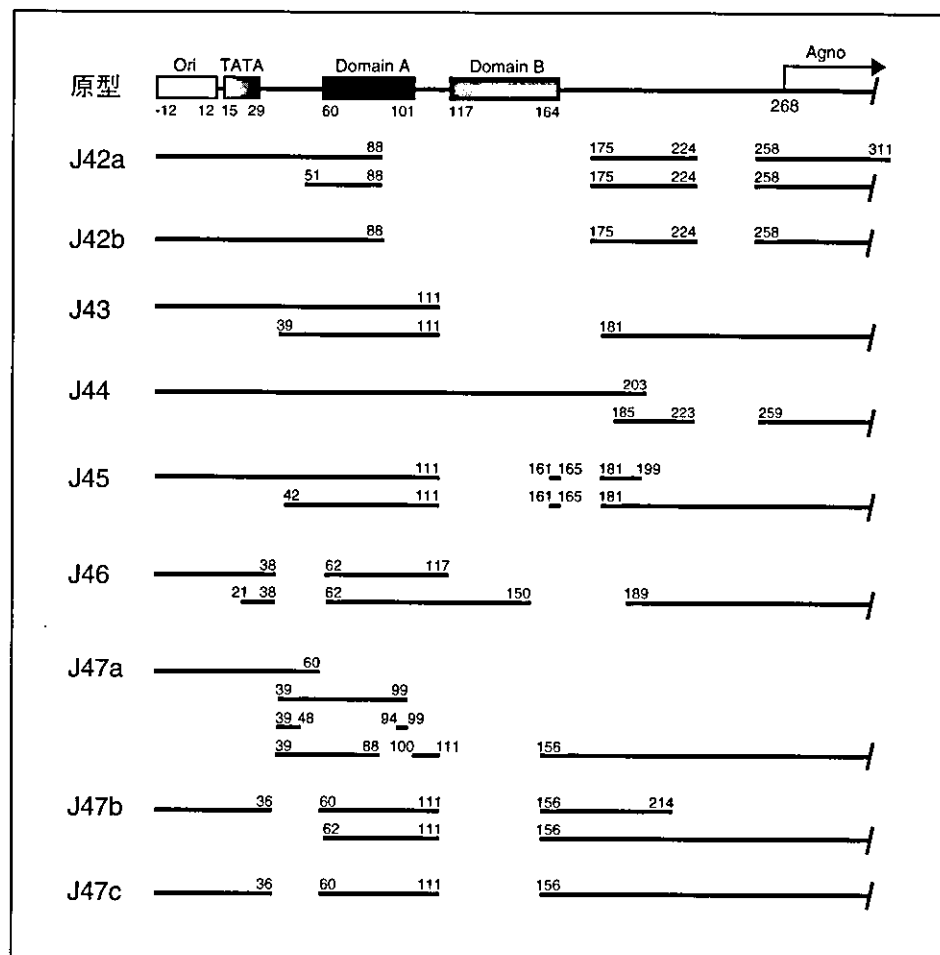


図 3. 髄液から検出された JCV DNA 調節領域の構造

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 16 年度に髄液から検出された調節領域の構造を示す。各調節領域が検出された患者のコードを各調節領域の左に記した。ただし、一人の患者から複数の調節領域が検出された場合（J42 と J47）には、患者コードに a、b、c を付した。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、重複が開始する位置へ戻り、再び右へ線を引く。

腎障害が疑われ、HAARTを中止した。同時期より、意識障害が現れたため、当科に入院。2月19日、右半側空間無視が出現。MRI検査によりT1WIで低信号、T2WIで高信号の領域を認めた（造影効果のなし）。トキソプラズマ脳症を疑い、サルファジアジンとダラプリムを投与。意識状態の改善をみるも、右半側空間無視は不変。2月19日採取の髄液から再編成型のJCV調節領域が検出され、PMLと診断された。3月中旬、HAARTを再開。CD4 155/ $\mu$ l、ウイルス量18コピー/ml。他の日和見感染症もなく、汎血球減少や急性腎不全の状態から脱し、CD4数の増加を認めるものの、意識障害は進行し経管栄養管理となった。8月中旬、HAARTを打ち切った。11月施行のMRI検査により、白質病変が脳全体に拡大を認めた。

#### J43 (70歳代、男性)

真性多血症にて当院血液内科でフォロー中の患者。2003年12月10日頃から、喋りにくさを自覚。12月24日右手足が動かしにくくなり書字困難にて他院受診。右小脳梗塞の診断をされた。症状の軽快を認めず、2004年1月19日に当院血液内科を受診。構音障害と軽度の右上下肢の失調を認め、CT上右小脳半球内の淡いLDAを認めたために脳梗塞と診断した。2月10日頃から次第に飲み込みにくさや歩行困難、箸の使いにくさを認め、当院血液内科に入院。2月16日、頭部MRIを施行。右小脳白質と脳幹にT2WIにて高信号の病変を認めた。その後も病状が増悪し、病変の拡大をみたため、3月22日、精査のため神経内科転科となる。3月27日、頭部MRIを施行。T2WIで高信号域が左小脳白質にも出現。臨床経過、画像所見から感染（PMLなど）と腫瘍（グリオーマなど）が考えられたが、その後全身状態が思わしくなく、ステロイドを投与。4月5日には舌根沈下が認められ、4月7日より人工呼吸器管理となった。4月9日、髄液（3月15日採取）から再編型JCV調節領域が検出された。6月7日より除脳硬直肢位を認めるようになった。感染症状は4月以降軽快なく、血圧低下等も認めた。6月20日よりチェーンストークス様呼吸となり、6月末からは痙縮が著明となり、他動的にも下肢の屈曲が不能となった。7月22日に永眠。

#### J44 (60歳代、男性)

2001年頃、他院にてHIV陽性が判明。自覚症

状はなかった。2003年頃、発熱、口腔内白苔形成を来し、近医で抗真菌剤の処方を受け、寛解増悪を繰り返した。2004年3月、発熱により他院に入院するも、当院の受診を勧められた。2004年3月25日、当院初診。HIV陽性を確認（CD4陽性細胞数、31/ $\mu$ l、HIV RNA量、 $2.6 \times 10^4$ コピー/ml）。2004年5月6日、当院入院。5月末より、病棟で転倒を繰り返し、動作緩慢が顕著になった。6月7日、頭部MRIを施行。両側にT2WIにて高信号域を認めた。6月16日採取の髄液から再編成型のJCV調節領域が検出され、PMLと診断された。その後、HAART療法を開始したが、目立った効果は現れず。その後カレトラ+コンビピルの内服を開始したが、神経症状の進行（無動など）あり、十分に内服できず、さらには骨髄抑制も出現した。PMLの進行と肺炎の合併にて10月22日死亡。

#### J45 (30歳代、男性)

2003年11月より咳嗽と発熱が次第に増悪。2月23日、当院呼吸器科初診、カリニ肺炎（食道カンジダ、帯状疱疹を合併）と診断された。検査の結果、HIV感染が確認された（CD4陽性細胞、219/ $\mu$ l；HIV RNA、 $5.1 \times 10^4$ コピー/ml）。カリニ肺炎に対して加療を受けたが、3月25日の検査でエイズの増悪を確認（CD4陽性細胞、82/ $\mu$ l；HIV RNA、 $1.3 \times 10^5$ コピー/ml）。HAARTの開始を予定し、3月26日に血液内科転科するも、そのまま自己退院。その後の通院も中断。5月中旬より眼がぼやける、呂律が回らない、などの症状が現れた。6月3日のMRI検査により、白質脳症が指摘された。健忘症状、発語低下も認められ、6月4日、入院。6月10日採取の髄液から再編成型のJCV調節領域が検出され、PMLと診断された。HAART導入後、画像上増悪と共に造影効果を伴うようになった。その後の臨床症状は、軽度の高次機能障害のみで、失語・失行・失認とも著明に改善。発症7ヶ月目の現在、HAARTのみ継続。自力で通院中・独居可能。

#### J46 (60歳代、男性)

1986年、会社の健康診断で蛋白尿を指摘されたが、放置。1991年7月より人工透析を導入。2004年4月上旬から、歩行時にふらふらと左右に揺れて歩きにくい、潤舌が悪い、などの症状が出現し、徐々に増悪。5月26日、当科受診。6月21日、精

査のため入院。神経学的な所見：小脳性運動失調（構音障害、強調運動障害）、両側錐体路徴候（左優位）（両側四肢筋力低下、深部腱反射軽度亢進、病的反射陽性）。頭部MRI：側脳室周囲白質にT1WIで低信号、T2WIで高信号の病変あり。6月23日採取の髄液から再編成型のJCV調節領域が検出され、PMLと診断された。免疫不全状態の原因検索を行ったが、長期透析以外には腫瘍性病変などは否定的であった。経過中に肺結核を発症し、抗結核薬の内服を行ったが、他には積極的な治療はせず。脳MRIでは小脳半球、小脳脚、中脳、橋にT2高信号領域が広がったが、大脳半球の病変は不変で、延髄以下には病変はなし。症状の進行は緩徐で、発症後7ヶ月現在で、著明な構音障害、体幹失調、錐体路徴候はあるが、意識は清明で、自力での経口摂取も可能。

#### J47 (50歳代、男性)

2002年6月、県立日南病院で胸部腫瘍切除された際、異常リンパ球の末梢血中出現およびHTLV-1抗体陽性が指摘され、最終的に成人T細胞白血病 (smoldering type) と診断され、同院で外来加療された。2003年2月、ニューモシスティスカリニ肺炎を発症したが、バクタ投与で軽快した。2004年2月から左不全麻痺、左同名半盲が出現し、その後も麻痺の進行、筋力低下、視力低下を認めた。同院で頭部MRIを施行され、両側後頭葉、右側頭葉、右視床、脳幹にFLAIR高信号を認めた。同時期に多発性に血管の支配領域を超える範囲で発症しており、白質に限定することからPMLが疑われた。7月同院に入院。SRLにより、髄液中のJCV DNAが検出され、病歴・頭部MRI所見と併せPMLが強く疑われ、8月25日精査目的にて当科第1回入院となった。9月8日採取の髄液から、再編成型のJCV調節領域が検出され、PMLと確定診断された（東大泌尿器科による）。頭部MRI上、前医でのMRI（2004年7月）と比較し、白質の脱髄は左後頭葉、右頭頂葉で病変が進行し、また左側頭葉の萎縮の進行を認めた。さらに、入院後、発語が徐々に低下し、PMLの進行の結果と考えられた。9月21日再度頭部MRI施行。右側の白質脱髄病変はわずかな拡大にとどまっていた。しかし、左側脳全体に皮質を主体とした腫脹とT2高信号が新たに認められ、脳炎を疑う所見であった。同日よりデカドロン16 mg/day

を開始した。10月24日に施行した脳波で後頭葉領域にSPDを認めた。さらに11月11日の脳波では、全領域に脳波の消失を認めた。

## 2. PMLに関するJCVの遺伝学的な変化 症例のPML患者脳剖検組織中JCV DNAの解析 症例の概要

症例1：33歳、男性。基礎疾患はエイズであった。神経症状出現1ヶ月後に死亡した。剖検脳組織の病理学所見とin situ hybridizationによるJCV DNAの検出により、PMLと診断された。症例2：59歳、女性。基礎疾患は混合性結合組織病であった。神経症状、頭部MRI、髄液からのJCV DNAの検出によって、PMLと診断された。神経症状出現後、3ヶ月で死亡した。症例3：20歳、男性。基礎疾患は慢性皮膚粘膜カンジタ症であった。神経症状、頭部MRI、髄液からのJCV DNAの検出によって、PMLと診断された。神経症状出現後、2年2ヶ月で死亡。

症例1、2、3からそれぞれ12、14、14個の全長JCV DNAクローンを樹立し、その全長塩基配列を決定した。得られた塩基配列を調節領域とコード領域に分けて解析した。

### 調節領域の構造

各症例から複数の調節領域が検出された（図4）。いずれも、原型から作られた再編成型調節領域であった。症例1からは、全く異なる2つの調節領域（1A、1B）が検出された。症例2からは、3つの調節領域（2A、2B、2C）が検出された。2Aと2Bは関連していたが、2Cは全く異なる構造を示した。症例3からは、お互いに関連した3つの調節領域（3A、3B、3C）が検出された。

### コード領域の塩基配列（コード配列）

症例1から3種類の配列（1-1、1-2、1-3）、症例2から3種類の配列（2-1、2-2、2-3）、症例3から5種類の配列（3-1～3-5）が検出された。これらの配列は2～5カ所の塩基置換と1ヶ所の重複（症例3）によりに区別された（表3）。

各症例で検出されたJCV DNAのゲノム型を決定するために、検出されたJCV DNAの全長配列と各ゲノム型を代表するJCV株の全長配列（Ikegaya et al., 2004；Zheng et al., 2003；Zheng et

al., 2004) とからNJ法による分子系統樹を作成した。その結果、症例1、2、3で検出されたJCV DNAはそれぞれEU-a2、CY-a、MY-bに属することがわかった。

各症例で検出されたゲノム型 (EU-a2、CY-a、MY-b) に属する多数のJCV株のコード配列 (Ikegaya et al., 2004 ; Zheng et al., 2003 ; Zheng et al., 2004) をアラインメントし、各ゲノム型のコンセンサス配列 (親配列) を得た。各症例で得られた配列を親配列と比較することによって、検出された各配列が親配列であるか、変異を有する配列 (変異配列) であるかを決定した。症例1では、1-1が親配列で、1-2と1-3が変異配列であった。症例2では、2-1が親配列で、2-2と2-3が変異配列であった。症例3では、3-1が親配列で、3-2～3-5が変異配列であった。以上の知見はNJ法による系統解析によっても確認された (データ示さず)。なお、親配列は再編成型調節領域1A、1B、2B、2C、3Cを持つクローンで検出された (表4)。

3症例で検出された塩基置換は全てアミノ酸置

換を伴った。以下では、アミノ酸置換を伴う塩基置換を変異という。ウイルスゲノムにおける変異の分布を表5に示す。3症例で検出された変異の合計数は12個であった。遺伝子別に見ると、VP1遺伝子での変異が一番多く検出された (7個)。VP1で検出された変異は全て表面ループ領域にあった。2個がBCループに、2個がDEループに、3個がHIループにあった (表6)。VP1ループ内で検出されたアミノ酸置換 (VP1ループ変異) を有するクローンの比率は、症例1と2では25%、14%と低く、症例3では86%と高いことがわかった (表7)。

報告されたPML型JCVにおけるVP1ループ変異

既に報告されているPML型JCV (すなわち、PML患者の脳や髄液から分離され、再編成型の調節領域を持つJCV) に、VP1ループ変異が多発しているかどうか調べた。今までに16株のPML型JCVに対してVP1塩基配列が報告されている。そのうち11株はPML患者の脳から分離され、5株

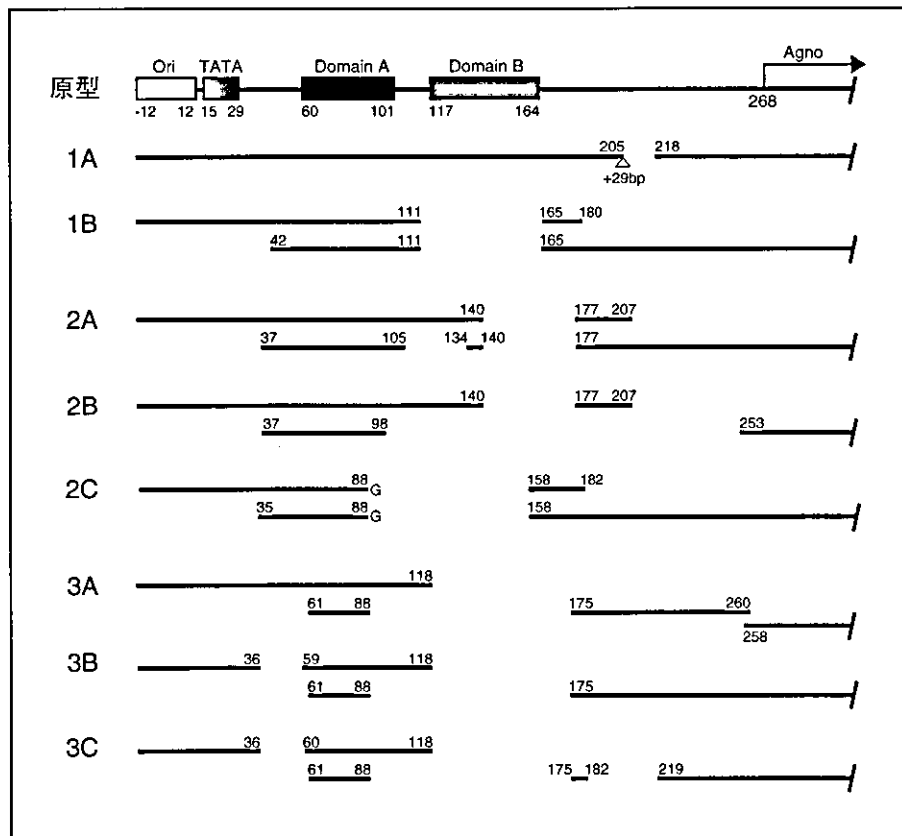


図4. 症例1～3の剖検脳組織から検出されたJCV DNA調節領域の構造

最上部に原型調節領域を示す。原型調節領域の下に症例1～3の剖検脳組織から検出された調節領域 (1A～3C) を示す。1Aと1Bは症例1から、2A～2Cは症例2から、3A～3Cは症例3から検出された。図の表し方は図3と同じ。△は29塩基の挿入を、“G”は1塩基 (G) の挿入を示す。

は髄液から分離された(表8)。これらのPML型JCVは10のゲノム型に属した。ゲノム型ごとに、PML型JCVのVP1配列(アミノ酸配列)と原型JCVのVP1配列をアラインメントした。一例として、Af1に属するPML型JCVである#601株の解析結果について説明する。4原型Af1株(GH-1、GH-2、GH-3、GH-4)のVP1配列が知られている。これらの原型JCVのVP1配列と#601株のVP1配列とをアラインメントした結果、原型JCV4株のVP1配列は完全に一致した。このコンセンサス配列と比較すると、#601株では、BCループに含まれる55番のアミノ酸(ロイシン)がフ

ェニルアラニンに変化していた。同様な解析をほかのPML株でも行い、得られた解析結果を表8にまとめた。

要約すると、調べた16株のPML型JCVのうち、13株において、VP1ループ変異が検出された。これらのアミノ酸変化はBCまたはHIループで起きていた。HIループ内のアミノ酸269番で変異が最も多く認められ、BCループ内のアミノ酸55番で次に多く認められた。一方、原型JCVでは、VP1ループ変異は認められなかった(データ示さず)。

表3. 各症例で検出されたコード配列間のヌクレオチド(アミノ酸)置換

| 症例 1             |                               |                               | 症例 2             |                  |                                  |
|------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|----------------------------------|
| コード配列            | nt 2274 <sup>a</sup><br>(VP1) | nt 3329<br>(LT <sup>b</sup> ) | コード配列            | nt 1650<br>(VP1) | nt 4778<br>(LT/ST <sup>c</sup> ) |
| 1-1              | C (S)                         | C (K)                         | 2-1              | C (S)            | C (S)                            |
| 1-2              | T (F)                         | G (N)                         | 2-2              | T (L)            | C (S)                            |
| 1-3              | T (F)                         | C (K)                         | 2-3              | C (S)            | G (T)                            |
| 親配列              | C (S)                         | C (K)                         | 親配列              | C (S)            | C (S)                            |
| 症例 3             |                               |                               |                  |                  |                                  |
| コード配列            | nt 599<br>(VP2)               | nt 840<br>(VP2)               | nt 1647<br>(VP1) | nt 1836<br>(VP1) | nt 2274<br>(VP1)                 |
| 3-1              | C (S)                         | G (W)                         | A (K)            | C (S)            | C (S)                            |
| 3-2              | C (S)                         | G (W)                         | A (K)            | C (S)            | A (Y)                            |
| 3-3              | C (S)                         | C (C)                         | T (M)            | C (S)            | C (S)                            |
| 3-4              | T (L)                         | G (W)                         | A (K)            | G (C)            | C (S)                            |
| 3-5 <sup>d</sup> | T (L)                         | G (W)                         | A (K)            | G (C)            | C (S)                            |
| 親配列              | C (S)                         | G (W)                         | A (K)            | C (S)            | C (S)                            |

<sup>a</sup>JCV Mad-1 ゲノムのヌクレオチド番号 (Frisque et al., 1984)。

<sup>b</sup> large T

<sup>c</sup> small t

<sup>d</sup> 1カ所(nt2744 - nt2749)の重複があった。

表4. 各調節領域とコード領域を持つクローンの数

| 症例 | 調節領域 | コード領域            | クローン数 |
|----|------|------------------|-------|
| 1  | 1A   | 1-1 <sup>a</sup> | 5     |
| 1  | 1A   | 1-2              | 1     |
| 1  | 1B   | 1-1              | 4     |
| 1  | 1B   | 1-3              | 2     |
| 2  | 2A   | 2-2              | 2     |
| 2  | 2B   | 2-1 <sup>a</sup> | 6     |
| 2  | 2C   | 2-1              | 1     |
| 2  | 2C   | 2-3              | 5     |
| 3  | 3A   | 3-2              | 8     |
| 3  | 3A   | 3-3              | 1     |
| 3  | 3B   | 3-4              | 2     |
| 3  | 3B   | 3-5              | 1     |
| 3  | 3C   | 3-1 <sup>a</sup> | 2     |

<sup>a</sup> 親配列

表5. 各遺伝子において検出された塩基置換数

| 症例 | VP1 | VP2 | VP3 | アグノ<br>蛋白 | large T +<br>small t | 計  |
|----|-----|-----|-----|-----------|----------------------|----|
| 1  | 2   | 0   | 0   | 0         | 1                    | 3  |
| 2  | 1   | 0   | 0   | 0         | 1                    | 2  |
| 3  | 4   | 3   | 0   | 0         | 0                    | 7  |
| 計  | 7   | 3   | 0   | 0         | 2                    | 12 |

表6. VP1 ループにおけるアミノ酸多型<sup>a</sup>

| コード配列     | ループ名と VP1 アミノ酸残基 |    |     |     |
|-----------|------------------|----|-----|-----|
|           | BC               |    | DE  | HI  |
|           | 60               | 61 | 123 | 269 |
| Ancestral | K                | S  | S   | S   |
| 1-1       | K                | S  | S   | S   |
| 1-2       | K                | S  | S   | F   |
| 1-3       | K                | S  | S   | F   |
| 2-1       | K                | S  | S   | S   |
| 2-2       | K                | L  | S   | S   |
| 2-3       | K                | S  | S   | S   |
| 3-1       | K                | S  | S   | S   |
| 3-2       | K                | S  | S   | Y   |
| 3-3       | M                | S  | S   | S   |
| 3-4       | K                | S  | C   | S   |
| 3-5       | K                | S  | C   | S   |

<sup>a</sup> 各症例で得られた JCV DNA クローン間で比較した。

表 7. VP1 ループ変異を持つクローン数

| 症例 | VP1 ループ<br>変異の有無 | クローン数<br>(%) |
|----|------------------|--------------|
| 1  | +                | 3 (25)       |
|    | -                | 9 (75)       |
|    | 計                | 12           |
| 2  | +                | 2 (14)       |
|    | -                | 12 (86)      |
|    | 計                | 14           |
| 3  | +                | 12 (86)      |
|    | -                | 2 (14)       |
|    | 計                | 14           |

表 8. PML 型 JCV に多発する VP1 ループ変異

| ゲノム型      | 株        | 由来 | VP1 アミノ酸残基 |    |    |        |     |     | 文献 |
|-----------|----------|----|------------|----|----|--------|-----|-----|----|
|           |          |    | BC ループ     |    |    | HI ループ |     |     |    |
|           |          |    | 55         | 60 | 66 | 265    | 267 | 269 |    |
| Ancestral |          |    | L          | K  | D  | N      | S   | S   |    |
| Af1       | #601     | 脳  | F          | K  | D  | N      | S   | S   | 1  |
| Af2-a     | SA84-00  | 髄液 | L          | K  | D  | N      | F   | S   | 2  |
| Af2-a     | SA296-02 | 髄液 | F          | K  | D  | N      | S   | S   | 2  |
| Af2-b     | SA28-03  | 髄液 | L          | N  | D  | N      | S   | S   | 2  |
| EU-a1     | Her-1    | 脳  | L          | K  | D  | N      | S   | L   | 3  |
| EU-a1     | Mad-1    | 脳  | L          | K  | D  | N      | S   | S   | 4  |
| EU-a1     | Mad-11   | 脳  | L          | K  | H  | N      | S   | S   | 3  |
| B1-b1     | SA27-03  | 髄液 | L          | K  | D  | N      | S   | C   | 2  |
| B1-c      | Mad-8    | 脳  | L          | K  | D  | N      | S   | F   | 3  |
| B1-c      | GS/B     | 脳  | F          | K  | D  | N      | S   | S   | 5  |
| CY-a      | Tky-2a   | 脳  | L          | K  | D  | N      | S   | Y   | 6  |
| MY-a      | Aic-1a   | 脳  | L          | K  | D  | N      | S   | S   | 7  |
| MY-b      | Tokyo-1  | 脳  | L          | K  | D  | N      | S   | S   | 8  |
| MY-b      | Tky-1    | 脳  | L          | K  | D  | N      | S   | F   | 6  |
| MY-b      | Sap-1    | 脳  | L          | K  | D  | N      | S   | F   | 3  |
| SC-f      | SA21-01  | 髄液 | L          | K  | D  | T      | S   | S   | 2  |

1, Agostini et al., 1998a; 2, Venter et al., 2004; 3, Iida et al., 1993; 4, Frisque et al., 1984; 5, Loeber & Dörries, 1988; 6, Kato et al., 2000; 7, Zheng et al., 2003; 8, Agostini et al., 1998b.



### 3. エイズ患者のPBLからのポリオーマウイルスDNAの検出

昨年度においてプロジェクト「エイズ患者末梢血リンパ球からのJCV-DNAの検出とその構造解析」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。最終的には19の拠点病院がプロジェクトに参加した。本年度の始め、プロジェクトは東大病院と各拠点病院の倫理審査委員会で承認された。本年度6月から共通のプロトコール(表9)を基にプロジェクトは開始された。

現在までに6つのエイズ拠点病院で16名のエイズ患者の末梢血が採取された。SRLでDNAが抽出され、東大泌尿器科に送られた。これらの患者の性別は、男性が15名、女性が1名であった。年齢に関しては、20歳代が2名、30歳代が5名、40歳代が3名、50歳代が6名であった。末梢血を採取した時点におけるHAART治療の有無、CD4陽性細胞数、血液中のHIV量を表10にまとめた。

16名のエイズ患者のPBLから抽出されたDNAを用いて、JCV DNAの調節領域とIG領域をnPCR法により6回ずつ試みたが、いずれも陰性であった。

BKV腎症は腎移植患者で比較的頻繁に起きる(de Bruyn & Limaye, 2004)。エイズ患者でもまれに腎症が起きることが報告されている。そして、末梢血からのBKV DNA負荷が腎症のモニタリングに有効であると報告されている。そこで、エイズ患者16名のPBL DNAからBKV DNAの検出をnPCRによって試みた。調節領域をターゲットした場合も、VP1領域の増幅をターゲットした場合も全て陰性であった。

### 考察

#### 1. 髄液を用いたPMLのPCR診断

##### 平成16年の診断実績

今年度は6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3)。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、6症例はいずれもPMLと確定診断された。

表9. PBLからのJCV DNA検出プロトコール<sup>a</sup>

|    |  |
|----|--|
| 1) | 患者に研究の目的と意義、患者の権利について説明し、同意を得る。  |
| 2) | 患者から末梢血をEDTA-2Na容器に採血(5ml)。  |
| 3) | 連結可能匿名化後、PBL DNAの抽出をSRLに依頼。  |
| 4) | 抽出されたDNAをSRLから東大泌尿器科に配送。   |
| 5) | 同科でJCV DNAとBKV DNAの検出を行う(nPCR)。  |
| 6) | JCV DNAが検出されたら、その調節領域の構造を解明する。BKV DNAが検出されたら、ウイルス負荷をreal-time PCRにて測定する。 |
| 7) | 検査結果を迅速に拠点病院の担当医に通知する。   |
| 8) | 費用は東大泌尿器科が負担する。  |

<sup>a</sup>原則的には、CD4数が200以下のエイズ患者を対象とした。

表10 PBLからポリオーマウイルスDNAの検出を試みた患者<sup>a</sup>

| HAART | 患者<br>総数 | CD4陽性細胞数(個/μl) |         |         | HIV量(コピー/ml) |                    |                                  |                  |
|-------|----------|----------------|---------|---------|--------------|--------------------|----------------------------------|------------------|
|       |          | <100           | 100-199 | 200-400 | <50          | 50-10 <sup>4</sup> | 10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup> | >10 <sup>5</sup> |
| 治療中   | 8        | 4              | 3       | 1       | 4            | 1                  | 1                                | 2                |
| 中断中   | 2        | 0              | 1       | 1       | 0            | 0                  | 2                                | 0                |
| 無治療   | 6        | 5              | 1       | 0       | 0            | 0                  | 4                                | 2                |
| 計     | 16       | 9              | 5       | 2       | 4            | 1                  | 7                                | 4                |

<sup>a</sup>表中の数字は患者数を示す。

### 髄液を用いた PCR 診断の問題点

今年度検査した患者 (n = 48) のうち、髄液から JCV DNA が検出された患者 (n = 6) の割合は 12.5% と低かった。我々は、PML の可能性が低いと考えられた患者の検体を排除せず、検査依頼のあった全ての検体を検査した。このことが陽性率を著しく低下させた理由と考えられた。しかし、生検または剖検脳組織の組織学的な検査で証明された PML 症例のうち 20 ~ 30% の髄液から JCV DNA が検出されなかったと報告されている (Gibson et al., 1993; Fong et al., 1995; Cinque et al., 1997)。本年度における我々の診断においても、これと同じ率で偽陰性があったと仮定すれば、髄液から JCV DNA が検出されなかったにもかかわらず PML であった患者が 2、3 名程度はいたと推定される。基礎疾患、臨床経過、MRI 所見などにより PML が強く示唆されたが、髄液中の JCV DNA が陰性であった症例に対しては脳生検が現時点においては最終的な手段である。

脳生検が侵襲的であるため、施行が困難な場合にどう対応するかという問題が残る。髄液の PCR 検査に代わる方法として、髄液からの intrathecal な抗 JCV 抗体を検出する方法が提案されている (Knowles et al., 1995; Sindic et al., 1997; Weber et al., 1997)。この抗体は中枢神経系において形質細胞に作られる抗体である。PCR で JCV DNA が検出されない PML 患者の髄液から intrathecal な抗 JCV 抗体が検出可能かどうか将来検討する必要がある。

### エイズ関連 PML に対する HAART 療法

いくつかのコホート研究によると、HAART で治療したエイズ関連 PML 群では、HAART 治療を受けなかった群に比べて有意に生存日数が延びた (Clifford et al., 1999; Dworkin et al., 1999; Tassie et al., 1999; De Luca et al., 2000)。しかし一方、約半数のエイズ関連 PML 症例においては HAART の効果が認められず、神経症状や MRI 画像は増悪した。PML の増悪は免疫再構築に関連して起きると考えられる。Cinque らは、急速な免疫再構築は PML の進行に悪い影響があり、逆に穏やかな免疫再構築は良い結果をもたらすのではないかと考えている (Cinque et al., 2001)。

本年度に同定された 3 例のエイズ関連 PML のうち、2 症例 (J44, J45) では HAART 治療の前に

PML が発症し、PML の診断後に HAART が施行された。1 例 (J42) では HAART 治療を中断していたが、PML の診断後、HAART が再開された。2 症例 (J42, J44) では HAART 開始後、神経症状の改善は見られなかった。しかし、1 症例 (J45) では HAART による免疫再構築症 (画像状の増悪と造影効果の出現) が現れた後、臨床症状の著しい改善が認められた。エイズ関連 PML に対して HAART が功を奏するかどうかに関しては、さらに検討が必要であると考えられた。

## 2. PML に関与する JCV の遺伝学的な変化

### 患者脳における JCV の変異と動態

剖検脳組織中の JCV DNA が解析された各症例において、調節領域が再編成型であり、コード領域が親配列であるクローンが検出された (表 4)。このことは、調節領域の再編成が起きた後に、コード領域の変異 (VP1 ループ変異を含む) が起きたことを示唆している。

上記の 3 症例の間で比較すると、患者の存命期間が著しく長かった症例 3 で、最も多様な VP1 ループ変異が観察された。また、VP1 ループ変異を有するクローンの出現率 (表 7) は症例 3 で最も高かった。このことは病態進行に伴い、患者の中枢神経系において、(1) 複数のループ (BC, DE, HI) を巻き込んだ様々な VP1 ループ変異がおきること、(2) 親配列を有するウイルスが少数になり、VP1 ループ変異有するウイルスが主流になることが示唆された。

### PML に関連した VP1 ループ変異

既に報告されている PML 型 JCV 16 株を調べた結果、13 株において VP1 ループ変異が検出された。しかし、非 PML 型 JCV (原型 JCV) では VP1 ループ変異は検出されなかった。以上のことから、VP1 ループ変異は PML に関連して高率に起きることが明らかになった。また、VP1 ループ変異は少数のアミノ酸残基で起きることが示唆された。269 Ser での変異が最も多く、次いで 55 Leu での変異が多かった。このように、VP1 ループ変異は PML に関連した新しい遺伝学的なマーカーであることが明らかになった。

### VP1 ループ変異と PML の病態進行

SV40 の VP1 の立体構造は 1991 年に明らかにさ

れた (Liddington et al., 1991)。JCVのVP1はSV40のVP1と相同性が高いので、JCV VP1の立体構造をSV40 VP1のそれとほとんど同じであると考えられる (Chang et al., 1995)。すなわち、多くの $\beta$ シートといくつかの $\alpha$ ヘリックスによって立体構造が保たれ、その表面にはいくつかのループが存在すると推定される。ループは細胞表面のレセプターへの結合に関与すると考えられ (Gee et al., 2004)、また、抗体によって認識される部位 (エピトープ) を含むことが示唆されている (Shishido-Hara, 2001)。したがって、VP1ループ変異を持つJCVは (1) 細胞の受容体への結合が効率よく行われるため、増殖力が高まったウイルスである可能性と、(2) PML患者の免疫から逃がれる escape mutant である可能性とが考えられた。

最近SV40において、VP1蛋白へのカルシウム・イオンの結合がウイルスの粒子形成や細胞や核への侵入に必要であることが示唆された (Li et al., 2003)。VP1へのカルシウム・イオンの結合に関与するアミノ酸残基は、VP1ループ変異が起きるアミノ酸残基と一致しない。JCVが細胞に侵入する際にまず細胞表面のリセプター (シアル酸を含む糖蛋白) へ結合する。シアル酸とJCV VP1との結合モデルが最近提唱された (Gee et al., 2004)。シアル酸との結合に関与するとされるアミノ酸残基は、VP1ループ変異が起きるアミノ酸残基と異なった。したがって、最終的な結論は未だ得られていないものの、VP1ループ変異はウイルス粒子の細胞リセプターへの結合に関わっていないと考えられた。

感染宿主での escape mutant の出現はエイズウイルスなどで良く知られている現象であり、宿主の生体防御に逆らってウイルスが増え続けるためのウイルスの戦略であると考えられる。実際、PML患者の中枢神経系で抗JCV抗体が、病態進行に伴って活発に産生されることが報告されている (Guillaume et al., 2000)。このことは、PML患者の中枢神経系において、JCVに対する免疫反応がPMLの進行に伴って活発化することを示している。したがって、VP1ループ変異を有するウイルスが escape mutant である可能性は十分に考えられる。

### 3. エイズ患者PBLからのポリオーマウイルスDNAの検出

エイズ患者16名のPBLからJCV DNAとBKV DNAの検出を試みたが、両DNA共全く検出されなかった。検査時点において、これらの患者のCD4陽性細胞数は著しく低下していた。したがって、免疫が顕著に低下したエイズ患者のPBLにおいて、JCVとBKVは再活性化されていないことが示唆された。また、これらの患者に関しては、少なくとも検査時点においてPMLや腎症が発症するリスクは低いと考えられた。

欧米の研究グループは、エイズ患者でPMLを発症していない患者のPBLからJCV DNAが検出されたという報告している (Tiratore et al., 1992; Dubois et al., 1997; Ciappi et al., 1999; Andreoletti et al., 2002)。検出率は20-40% (Tiratore et al., 1992; Dubois et al., 1997; Andreoletti et al., 2002) または100% (Ciappi et al., 1999) であった。しかし、これらの研究において偽陽性の可能性が排除されているとは言いがたい。したがって、この問題に関しては未だ結論が出ていないと考えられた。嚴重にコンタミネーションが防止されている条件下で、この点を検討するのが本プロジェクトの目的の一つでもあった。現在までに得られたデータからは、PMLを発症していないエイズ患者のPBLからJCV DNAが検出されないことが示唆された。

エイズに対する治療法としてHAART治療が定着した今日、エイズ患者を対象とした調査においては、この治療の調査への影響を考慮しなければならない。実際、表10に示されているように、末梢血が採取された時点においてHAART治療を受けていた者が半数いた。HAART治療の影響を検討するためにも、本プロジェクトを来年度も継続したい。

### 結論

1. 全国の病院から送られてきた48検体の髄液からnPCRによるJCV調節領域の検出を試みた。6名の患者の髄液から調節領域が検出された。シークエンシングの結果、検出された調節領域はいずれもユニークな再編成型であったため、コンタミネーションによる偽陽性は否定され、6名の患者はPMLと確定診断された。
2. 今年度検査した患者 (n=48) のうち、髄液からJCV DNAが検出された患者 (n=6) の割合

- は12.5%と低かった。PMLの可能性が低い検体を含めて、全ての検体を検査したため、陽性率が低下したと考えられた。しかし、他のグループは、組織学的に証明されたPML症例のうち、20-30%の症例では髄液からJCV DNAが検出されなかったと報告している。したがって、本年度において、髄液からJCV DNAが検出されなかった患者のうち、2、3名程度はPMLであった可能性が考えられた。
3. PML症例(3症例)の剖検脳組織から樹立された全長JCV DNA クローンを多数解析し、以下の知見を得た。(1)アミノ酸置換を伴う塩基置換(変異)が一部のクローンで起きた。(2)主要キャプシド蛋白であるVP1で最も多く変異が起きた。(3)VP1の変異は表面ループに集中した。(4)生存期間が長かった患者では変異が多様化し、また、変異を持つクローンの割合が増えた。(5)調節領域の再編成が起きてから、コード領域に変異が起きたと考えられた。
  4. 全長塩基配列またはVP1遺伝子の配列が既に報告された原型JCVとPML型JCVにおいて、VP1ループ変異が起きているかどうか調べた。VP1ループ変異は原型JCVでは検出されず、PML型JCVにおいて高率(13/16)に検出された。したがって、VP1ループ変異はPMLに関連した新しいマーカーであることが明らかになった。
  5. PML未発症のエイズ患者(16名)のPBLからJCV DNAとBKV DNAの検出を試みたが、いずれも陰性であった。この結果から、検査した患者に関しては、少なくとも検査時点においてPMLや腎症が発症するリスクは低いと考えられた。
  6. 欧米の研究グループは、PMLを発症していないエイズ患者のPBLからJCV DNAが検出されたと報告している。しかし、これらの研究において、DNA抽出やPCRの際に混入したJCV DNAが検出されたという可能性は排除されていない。現在までに得られた我々のデータからは、PMLを発症していないエイズ患者のPBLからJCV DNAは検出されないことが示唆された。
- 6 from the brain of an African American with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Hum. Virol.* 1:267-272, 1998a.
- 2) Agostini H.T., Shishido-Hara Y., Baumhufner R.W., et al.: JC virus Type 2: definition of subtypes based on DNA sequence analysis of ten complete genomes. *J. Gen. Virol.* 79:1143-1151, 1998b.
  - 3) Andreoletti L., Lescieux A., Lambert V., et al.: Semiquantitative detection of JCV-DNA in peripheral blood leukocytes from HIV-1-infected patients with or without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Med. Virol.* 66:1-7, 2002.
  - 4) Chang D., Liou Z.M., Ou W.C., et al.: Production of the antigen and the antibody of the JC virus major capsid protein VP1. *J. Virol. Methods* 59:177-187, 1996.
  - 5) Ciappi S., Azzi A., De Santis R., et al.: Archetypal and rearranged sequences of human polyomavirus JC transcription control region in peripheral blood leukocytes and in cerebrospinal fluid. *J. Gen. Virol.* 80:1017-1023, 1999.
  - 6) Cinque P., Scarpellini P., Vago L., et al.: Diagnosis of central nervous system complications in HIV-infected patients: cerebrospinal fluid analysis by the polymerase chain reaction. *AIDS* 11:1-17, 1997.
  - 7) Cinque P., Pierotti C., Vigano M.G., et al.: The good and evil of HAART in HIV-related progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Neurovirol.* 7:358-363, 2001.
  - 8) Clifford D.B., Yiannoutsos C., Glicksman M., et al.: HAART improves prognosis in HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology* 52: 623-625, 1999.
  - 9) de Bruyn G., & Limaye A.P.: BK virus-associated nephropathy in kidney transplant recipients. *Rev. Med. Virol.* 14:193-205, 2004.
  - 10) De Luca A., Giancola M.L., Ammassari A., et al.: The effect of potent antiretroviral therapy and JC virus load in cerebrospinal fluid on clinical outcome of patients with AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.* 182:1077-1083, 2000.
  - 11) Dubois V., Dutronc H., Lafon M.E., et al.: Latency and reactivation of JC virus in peripheral blood of human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J. Clin. Microbiol.* 35:2288-2292, 1997.
  - 12) Dworkin M.S., Wan P.C., Hanson D.L., et al.: Progressive multifocal leukoencephalopathy: improved survival of human immunodeficiency

#### 参考文献

- 1) Agostini H.T., Ryschkewitsch C.F., & Stoner G. L.: Complete genome of a JC virus genotype Type