

溶解液の detergent として 0.5% Triton X-100 のみを含むもの、あるいはそれに 0.5% deoxycholate (DOC)を加えたものの2種類を用いた。培養液中の感染性遊離ウイルスの測定は B95a 細胞あるいは Vero/SLAM 細胞を用いたプラク法によった。

3) SSPE ウイルスの遺伝子解析: SSPE ウイルス感染細胞の RNA を RT-PCR 法で増幅し、得られた cDNA の塩基配列を常法により決定し、アミノ酸配列を推定した。分子系統樹解析は Neighbor-Joining 法を用いて行った。

(倫理面への配慮)

SSPE ウイルス新鮮分離株は、インターフェロン髄腔内持続注入を行うためのオンマイヤリザーバー設置時に、診断確定のため脳から分離したものを解析に供した。従って、研究材料の収集にあたって倫理的問題点はない。なお、ウイルス感染実験は微生物学研究室においてバイオセーフティー指針に準拠して行った。

【結 果】

1) SSPE ウイルスの分離とウイルス学的解析: 生検脳組織を B95a 細胞と共培養することにより、明らかな融合巨細胞の形成が認められた(図1)。この融合巨細胞は Vero/SLAM 細胞に継代可能であった。このようにして分離した SSPE ウイルスを SSPE-Kobe-1 株と名付けた。

一般に SSPE ウイルスは培養液中への感染性ウイルス粒子の放出がない、または極めて少ないことが知られているので、SSPE-Kobe-1 株についても同様の解析を行った。その結果、SSPE-Kobe-1 感染細胞の培養液中には感染性ウイルス粒子が全く放出されていないことが確認された(図2)。

2) SSPE-Kobe-1 株のゲノム塩基配列の解析: 上記で分離された SSPE-Kobe-1 株のウイルス遺伝子を RT-PCR で増幅し、その塩基配列を決定した。我が国では現在、主として遺伝子型 D3 と D5 の麻疹ウイルスが流行しているが、SSPE-Kobe-1 株がどの遺伝子型のウイルスに由来しているかを推定するために、N 遺伝子の分子系統樹解析を行った。その結果、SSPE-Kobe-1 株は麻疹ウイルス遺伝子型 D3 に分類された(図3)。H 遺伝子の分子系統樹解析でも同様の結果が得られた。

通常麻疹ウイルス野外株(Ichinose-B 株)と比較した場合の SSPE-Kobe-1 株の遺伝子塩基配列の変異率は 0.9~1.6%であった(表2)。これまで SSPE ウイルスに特有とされていた M 遺伝子の変異は少なく、12 塩基(1.2%)にみられるのみであった。しかし、そのうち 9 ヶ所(変異塩基の 75%)は U→C 変異であった。この M 遺伝子の U→C biased hypermutation は SSPE ウイルスの特徴と考えられた³⁾。

3) SSPE-Kobe-1 株の推定アミノ酸配列の解析: ①N 蛋白では 1 ヶ所(Glu-455)のみ、通常麻疹ウイルスでは全くみられないアミノ酸変異がみられた(図4)。②P 蛋白では 7 ヶ所に通常麻疹ウイルスでは全くみられないアミノ酸変異がみられた(図5)。N 蛋白に比べて P 蛋白の変異が多いことがわかった。③M 蛋白の変異は 3 ヶ所のみであった(図6)。しかし、そのうちの 2 ヶ所は蛋白の立体構造に大きな影響を与えると考えられる Leu→Pro 変異であった。④F 蛋白では 9 ヶ所の特有のアミノ酸点変異に加えて、C 末端近傍で 1 塩基欠失によるフレームシフトがあり、C 末端領域の 27 アミノ酸残基が大きく異なっていた(図7)。このような C 末端領域の付加あるいは欠失は他の SSPE ウイルスでもしばしば観察されている⁴⁾。なお、SSPE-Kobe-1 株では Phe-8 点変異のため、本来あるべき糖鎖付加部位が 1 ヶ所欠失していた。⑤H 蛋白では 2 ヶ所に通常麻疹ウイルスでは全くみられないアミノ酸変異がみられた(図8)。また、U→C 変異のため終止コドン(UAG)が CAG(Gln)に変異し、C 末端に 4 アミノ酸残基の付加がみられたが、同様の変異は遺伝子型 F のレファレンス株である sMa94 株にもみられた⁵⁾。⑥L 遺伝子は現在解析中。

4) M 蛋白のウェスタンブロット解析: 通常麻疹ウイルス株の M 蛋白は 0.5% Triton X-100 に部分的可溶性かつ 1% SDS 可溶性であるが、SSPE-Kobe-1 株の M 蛋白は 0.5% Triton X-100 不溶性かつ 1% SDS 不溶性であった。一方、0.5% Triton X-100 と 0.5% DOC を混合して用いた場合、通常麻疹ウイルス株の M 蛋白の可溶性はほとんど変化しなかったが、SSPE-Kobe-1 株の M 蛋白は部分的に可溶性化された(図9)。このような SSPE-Kobe-1 株の M 蛋白の可溶性の変化が上記の 3 ヶ所のアミノ酸変異

のいずれに起因するかは今後の検討課題である。

【考 察】

今回分離した SSPE ウイルス株は、融合巨細胞を形成するが、感染性ウイルス粒子の放出は全く認められず、典型的な SSPE ウイルスの性状を有していた。しかし、通常の SSPE ウイルスで見られる M 蛋白のアミノ酸変異は 3 カ所のみであった。この変異数の少なさは、発症後 6 週間という短期間でウイルス分離がなされたため、神経細胞でおこると考えられる M 遺伝子の U→C biased hypermutation の蓄積が少なかったためと考えられた。一方、本 SSPE ウイルスの M 蛋白の変異は Leu→Pro 変異という構造変化をきたす可能性のあるもので、M 蛋白の可溶性や細胞内動態、さらには感染性ウイルス粒子の産生等に及ぼす影響について、リバーシジェネティックスの手法を用いて解析する予定である。また、同様の観点から、神経病原性を規定するウイルス遺伝子やウイルス蛋白の変異についても検討したい。

【結 論】

SSPE 発症 6 週間後の患児の脳組織から B95a 細胞を用いて SSPE ウイルスを分離し、そのゲノム塩基配列をほぼ全長にわたって決定した。今回の研究を通して、他の SSPE 臨床例由来のウイルスの分離法及びゲノム構造解析法を確立した。今後は、SSPE ウイルスと通常の麻疹ウイルスにおけるゲノム構造上の差異が、どのような機能の差異をひきおこしているのかを明確にする必要がある。このような SSPE ウイルスのゲノム構造とそれに基づくウイルス諸機能の詳細な解明を通して、SSPE ウイルスに対する特異的かつ効果的な治療法の開発が期待される。

【参考文献】

- 1) Okuno Y., Nakao T., Ishida N., Konno T., Mizutani H., Fukuyama Y., Sato T., Isomura S., Ueda S., Kitamura I., et al.: Incidence of subacute sclerosing panencephalitis following measles and measles vaccination in Japan. *Int. J. Epidemiol.* 18:684-689, 1989
- 2) 中村好一、二瓶健次、飯沼一字、岡英次、北本哲之：臨床調査個人票からみた亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) の疫学像。厚生省特定疾患「遅発性ウイルス感染」調査研究班、(班長 北本哲之) 平成 13 年度研究報告書:59-64, 2002
- 3) Wong T.C., Ayata M., Hirano A., Yoshikawa Y., Tsuruoka H., and Yamanouchi K.: Generalized and localized biased hypermutation affecting the matrix gene of a measles virus strain that causes subacute sclerosing panencephalitis. *J. Virol.* 63:5464-5468, 1989
- 4) Ning X., Ayata M., Kimura M., Komase K., Furukawa K., Seto T., Ito N., Shingai M., Matsunaga I., Yamano T., and Ogura H.: Alterations and diversity in the cytoplasmic tail of the fusion protein of subacute sclerosing panencephalitis virus strains isolated in Osaka, Japan. *Virus Res.* 86:123-131, 2002
- 5) World Health Organization. Update of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses: new genotypes and reference strains. *Weekly Epidemiol. Record.* 78:229-240, 2003

【研究発表】

1. 論文発表
 - 1) Kato S., Nagano-Fujii M., Sada K., Nihei K., and Hotta H.: Analysis of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus isolated from a 5-year-old boy shortly after the onset of SSPE. (in preparation)
 - 2) Kato S., Nagano-Fujii M., Sada K., and Hotta H.: Inhibition of SSPE virus replication by siRNA directed against the L gene transcript. (in preparation)
 - 3) Ohgimoto S., Ohgimoto K., Itoh M., Ihara T., and Hotta H.: Viral assembly and/or release of vaccine

strains, but not field isolates, of measles virus is impaired in cultured human dendritic cells. (in preparation)

2. 学会発表
該当なし

表 1. 患児の病歴・臨床経過と検査成績（抜粋）

患者：I. K. 男児 5歳1ヵ月	
病歴と臨床経過：	
1998.11.10	出生
1999.04 頃	麻疹罹患（生後5ヵ月）
2003.11.27	ポリオ予防接種
12.13	歩行時ふらつき出現
12.22	筋力低下
12.26	傾眠傾向
12.27	意識障害遷延、自発的体動ほとんどなく、疼痛刺激で少し動かす程度 ミオクローヌスなし(?) 精査加療目的に入院（国立成育医療センター）
2004.01.22	オンマイヤリザーバー設置 診断確定のため脳生検
検査成績：	
麻疹抗体価	髄液(12.26及び1.6) CF, HIともに128倍 血清(12.31) CF 512倍 HI 1024倍 IgG-EIA 5700, IgM-EIA 0.27(-)
ポリオ抗体価	髄液(12.26) ポリオC1 <4; ポリオC2 4; ポリオC3 <4
脳波 10秒前後で周期性に出現する500mV前後の高振幅徐波（周期性同期性放電）	

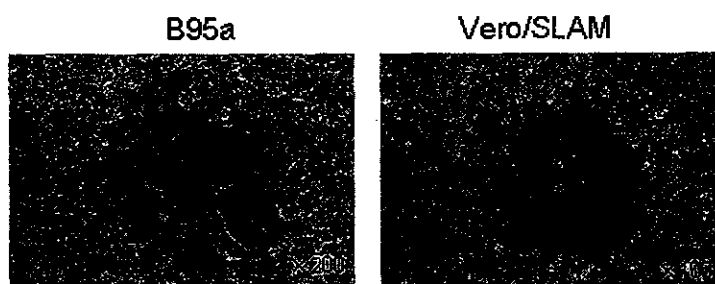


図1. SSPE-Kobe-1株による融合巨細胞形成

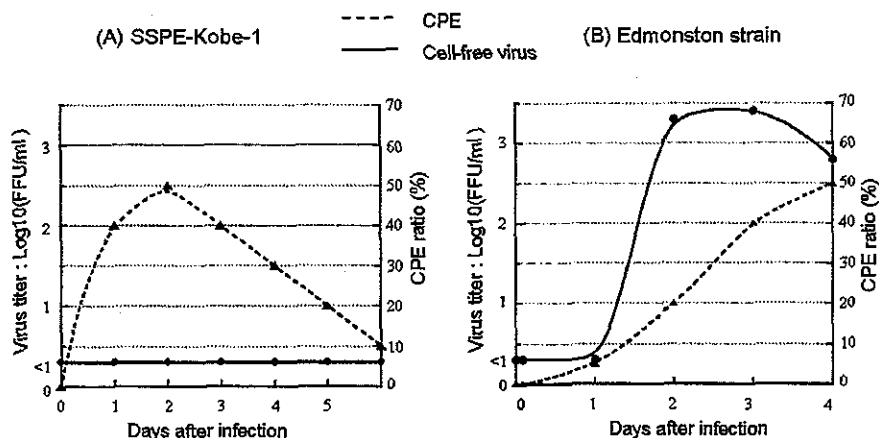


図2. SSPE-Kobe-1株のウイルス増殖：麻疹ウイルスとの比較

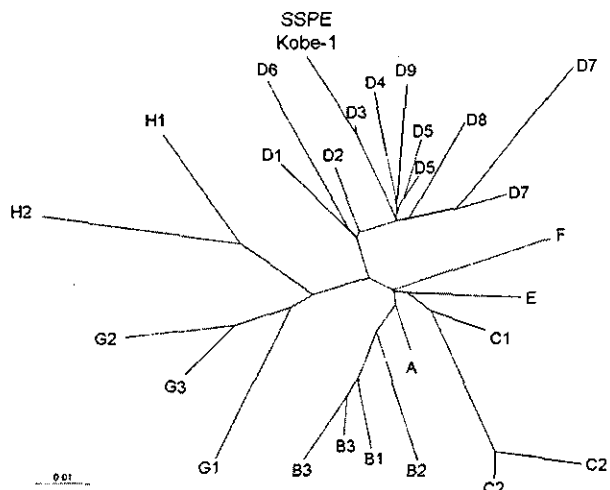


図3. SSPE-Kobe-1株の分子系統樹 (N遺伝子)

表2. SSPE-Kobe-1株の遺伝子塩基配列の変異

Gene	No. of nucleotide mutator ^(a) (%) ^b	No. of U→C mutation (%) ^c
N	21 (1.3%)	6 (29%)
P	13 (0.9%)	2 (15%)
M	12 (1.2%)	9 (75%)
F	21 (1.3%)	8 (38%)
H	29 (1.6%)	5 (17%)

(a) Compared with Ichinose-B95a strain (type D3:AB016162)

(b) No. of total mutation / No. of total nucleotide.

(c) No. of U→C mutation / No. of total mutation.

Ichinose-B	1	MATLLRSLALFKRNKDKPPTSGSGGAIRGIKHIIIIVIPGDSSITTRSRLLDRLVRLIG	60
SSPE-Kobe-1	1	-----	60
	61	NPDVSGPKLTGALIGILSLFVESPQQLIQRITDDPDVSIRLLEVVQSDQSQSGLTFASRG	120
	61	-----	120
	121	TNMEDEADQYFSHDDPSSSDQSRSGWFENKEISDIEVQDPEGFNMILGTILAQIWVLLAK	180
	121	-----	180
	181	AVTAPDTAADSELRRWIKYIQRRVVGEFRLERKWL DVVRNRIAEDLSLRRFMVALILDI	240
	181	-----	240
	241	KRTPGNKPRIAEOMICDIDTYIVEAGLASFILTIKFGIETMYPALGLHEFAGELSTLESIM	300
	241	-----	300
	301	NLYQQMGETAPYMVILENSIQNKFSAGSYPLLWSYAMGVGVELENSMCGGLNFRGSYFDPA	360
	301	-----	360
	361	YFRLGQEMVRRSAGKVSSTLASELGTAEARLVSEIPMHTTEDRISRAGVPRQAQVSFL	420
	361	-----	420
	421	HGDQSENELPGLGKEDRRVKQGRGEARES YRETGSSRASDARAHPPTSMPLDIDTASE	480
	421	-----S-----E-----	480
	481	SGQDPQDSRRSADALLRLQAMAGILEEQGSDTDTPRVYNDROLLD	525
	481	-----I-----	525

図4. SSPE-Kobe-1株と麻疹ウイルスIchinose-B株のNタンパク質の比較

Ser-443はgenotype D3の他の株を含め多くの麻疹ウイルス野外株に見られる。

Leu-485はgenotype D6(L46750), D7(AY037020)の野外株で報告されている。

Ichinose-B	1	MAEQARHVKNGL	ECIRALKAEPI	IGSLAVEEAMA	AWSEISDNPGQ	DRATCKEEEAG	SSGL	60
SSPE-Kobe-1	1	-----						60
	61	SKPCLSAIGS	TEGGAPRI	RQGSGESDD	DAETLGIPSR	NLQASSTGL	QCYHVYDHS	GEAV
	61	--S-----	-----C-----				-----	120
	121	KGIQDADSI	MQSGLDGD	STLGGDDE	SENSDVID	IGEPDTEG	YAITDRGS	SAPISMGRAS
	121	-----A-----I-----						180
	181	DVETAE	EGGETHELL	KLQSRGN	NFPKLGK	TLNVPPP	NPSRAST	SETPTKKGT
	181	-----						240
	241	TEIASLL	TGGATQ	CARKSP	SEPSGPG	APAGNV	PECVSNA	ALIQEWTP
	241	-----D-----						300
	301	EEGDY	YDDEL	FSDVQ	DIKTAL	AKIHED	NQKIISK	LESLLLK
	301	-----P-----						360
	361	STLE	GHLSS	IMIAI	PGLKDP	NDPTAD	VELNPD	LKPIIGR
	361	-----						420
	421	GMPNG	RSSRG	QLLKE	FQLKPI	GKKVSS	AVGFVP	DTGPAS
	421	-----						480
	481	LMTLL	DDIKG	ANDL	AKFHQ	MLMKI	IMK	
	481	-----L-----						507

図5. SSPE-Kobe-1株と麻疹ウイルスIchinose-B株のPタンパク質の比較

SSPE-Kobe-1株では他の麻疹ウイルス野外株に見られない7つの特有なアミノ酸変異が見られる。

Ichinose-B	1	MPEIYDFDK	SAWDIKGS	IAPIQPT	TYSDGRL	VQVRVIDP	GLGDRK	DECFMYM	FLLGVVE	60								
SSPE-Kobe-1	1	-----									60							
	61	DSDPLG	PPIGRAF	GSPLPL	GVGRST	AKPEEL	LKEATE	LDIVVR	RRTAGL	NEKLVFY	NNTP	PLT	120					
	61	-----										120						
	121	LLTPWR	KVLT	TG	SVFNA	NQVCNA	VNLIPL	DTPQR	FRVVM	SITRL	SDNG	YTVPR	RMLEF	180				
	121	-----P-----										180						
	181	RSVNA	VAFN	LLVT	LRIDK	AIGPG	KIIDNA	EQLPE	AFM	VHIGN	FRRK	KSEV	YSADY	CKMK	240			
	181	-----										240						
	241	IEKM	GLVF	ALGG	IGGT	SLH	IRST	GKMS	KTLHA	QLG	FKKT	LCYP	IMD	INED	LNRL	LWRS	SRC	300
	241	-----P-----H-----										300						
	301	KIVR	IQAVL	QPSV	PQEF	RIYD	DVI	INDD	QGL	FKVL								335
	301	-----										335						

図6. SSPE-Kobe-1株と麻疹ウイルスIchinose-B株のMタンパク質の比較

SSPE-Kobe-1株では他の麻疹ウイルス野外株に見られない3つの特有なアミノ酸変異が見られる。

		★		
Ichinose-B	1	MGLKVNVS	AI	FMVLLT
SSPE-Kobe-1	1	-D-----	-F-T-----	
				60
	61	NITFLNN	CI	RVE IAE
	61	-T-----		
				120
	121	AALGVAT	AAQIT	AGIALH
	121	-----		
				180
	181	YINNELI	P	SMNQL
	181	-----		
				240
	241	DINKVLE	K	LGYS
	241	-----		
				300
	301	GVSYNIG	S	QEWY
	301	W-----		
				360
	361	GSTKSC	A	RTL
	361	-----		
				420
	421	PVVEV	N	GV
	421	-----		
				480
	481	DQILR	S	MKGL
	481	-----		
				540
	541	GTSKSY	V	RSL
				550

図7. SSPE-Kobe-1株と麻疹ウイルスIchinose-B株のFタンパク質の比較

SSPE-Kobe-1株では他の麻疹ウイルス野外株に見られない9つの特有なアミノ酸変異とC末端の変異が見られる。

		★		
Ichinose-B	1	MSPQRDR	I	NAFY
SSPE-Kobe-1	1	---H---	---	R-----
				60
				60
	61	HRAAI	Y	TAE
	61	-----		
				120
	121	KIKFL	N	DRE
	121	-----		
				180
	181	LAVSK	G	NC
	181	-----		
				240
	241	SKGSEL	S	QL
	241	-----		
				300
				300
	301	HREDS	I	T
	301	---V---		Q-----
				360
				360
	361	NQAKW	A	V
	361	-----		
				420
				420
	421	VELKIK	I	A
	421	-----		
				480
				480
	481	NLFTV	P	I
	481	-----		
				540
				540
	541	YVYSP	S	R
	541	-----		
				600
				600
	601	GMCV	S	C
	601	-----		
				618
				622

図8. SSPE-Kobe-1株と麻疹ウイルスIchinose-B株のHタンパク質の比較

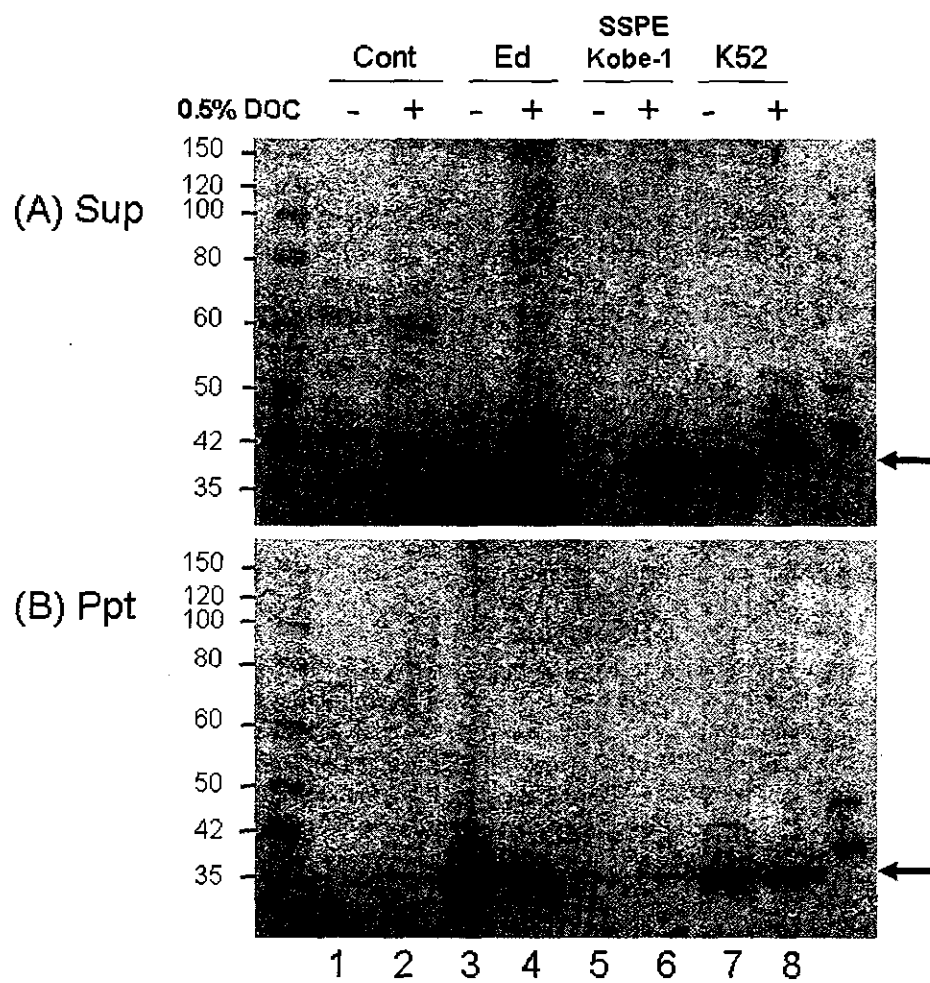


図9. SSPE-Kobe-1株のMタンパク質のウエスタンブロット解析

SSPE における遺伝子発現プロファイルと Granulysin 遺伝子-189G/T 多型解析

研究協力者： 楠原 浩一 (九州大学・大学院医・成長発達医学)
吉良 龍太郎 (九州大学・大学院医・成長発達医学)
武本 環美 (九州大学・大学院医・成長発達医学)
鳥巢 浩幸 (九州大学・大学院医・成長発達医学)
原 寿郎 (九州大学・大学院医・成長発達医学)

〔研究要旨〕

SSPE は緩徐進行性の麻疹の中枢神経合併症である。麻疹ウイルス(MV)の中枢神経系および免疫系における持続感染のメカニズムはまだ明らかにされていない。我々は、免疫系における MV の持続感染の分子メカニズムを検討するために、約 3 万個の遺伝子に対応した高密度オリゴ DNA マイクロアレイを用いて、SSPE 患者と正常対照の末梢血単核球(PBMCs)における遺伝子発現パターンを比較検討した。その結果、患者における発現が正常対照より有意に低い遺伝子として granulysin 遺伝子(*GNLY*)を見出した。定量的 RT-PCR では、SSPE 患者において、PBMCs における granulysin の 2 つの isoform である 519 と 520 の各 mRNA の発現レベルが正常対照より低い傾向がみられた(それぞれ $P=0.025$ 、 $P=0.038$)。一方、麻疹患者ではこれらの mRNA の発現レベルが正常対照より上昇していた(それぞれ $P=0.039$ 、 $P=0.0006$)。相関解析では *GNLY*-189G/T および 4214G/C の各多型の遺伝子型頻度とアリル頻度には SSPE 患者 40 例と正常対照 124 名の間で有意差はみられなかった。以上の結果は、granulysin が MV に対する宿主免疫の一部を担っており、SSPE の発症病理や病態生理に関与している可能性があることを示唆している。

The gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) using oligonucleotide microarrays and an association study between *GNLY*-189G/T polymorphism and SSPE

Koichi KUSUHARA, Ryutaro KIRA, Megumi TAKEMOTO, Hiroyuki TORISU, Toshiro HARA

Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

ABSTRACT

Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) is a slowly progressive central nervous system complication of measles. The mechanism of measles virus (MV) persistence in the CNS as well as in the immune system remains to be clarified. To investigate the molecular basis for MV persistence in the immune system, we analyzed the differences in the gene expression of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) between SSPE patients and controls using a high-density oligonucleotide microarray containing approximately 30,000 human genes. We found that the expression of granulysin gene (*GNLY*) was significantly lower in PBMCs from SSPE patients than in those from the controls by microarrays. By a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, the mRNA levels of two granulysin isoforms, 519 and 520, in PBMCs tended to be decreased in 30 SSPE patients ($P=0.025$ and 0.038 , respectively), and were increased in measles patients ($P=0.039$ and 0.0006 , respectively), as compared to the 23 normal controls. There were no significant differences in the genotype and allele frequencies of the *GNLY*-189G/T and 4214 G/C polymorphisms between the 40 SSPE patients and the 124 normal controls. These results imply that granulysin might play a role in the host defense against MV and possibly be involved in the pathogenesis or pathophysiology of SSPE.

〔はじめに〕

SSPEの病因は正確には解明されていないが、ウイルス側と宿主側の要因があると考えられる。我々は宿主側の要因として、SSPE患者末梢血単核球(PBMCs)で麻疹ウイルス(MV)特異的IFN- γ 産生能が低下していることを明らかにした¹⁾。また、ウイルスレセプター遺伝子解析では異常を認めなかったが²⁾、IL-4遺伝子³⁾、MxA遺伝子(Torisu H et al. *Neurology* 2004)が発症に関連することを示し、宿主の遺伝的要因が脳および免疫系における麻疹ウイルスの持続感染に関わっていることを明らかにした。近年、オリゴDNAマイクロアレイを用いて様々な疾患の病因に関わる遺伝子の発現が解明されるようになってきた。本研究ではSSPEの病因を明らかにするために、約3万個の遺伝子に対応した高密度オリゴDNAマイクロアレイを用いて患者PBMCsにおける遺伝子発現を網羅的に解析し、得られた結果をもとにSSPEの発症に関与する候補遺伝子の検討を行った。

〔目 的〕

免疫系における MV の持続感染の分子メカニズムを検討するために、オリゴ DNA マイクロアレイを用いて SSPE 患者の末梢血において発現が低下している遺伝子を網羅的に検索する。

〔材料と方法〕

1. 対象

- 1) オリゴDNA マイクロアレイ解析：SSPE患者2例、正常対照2名
- 2) 定量的RT-PCR：SSPE患者30例、正常対照23名、麻疹急性期患者7例
- 3) 関連解析：SSPE患者40例および正常対照124名

文書による同意を得た上でPBMCsよりgenomic DNA、mRNAを抽出した。SSPE患者の一部では検体採取に際してSSPE青空の会（親の会）の協力を得た。

2. 方法

1) オリゴDNA マイクロアレイを用いた網羅的解析

末梢血単核球から抽出したtotal RNAをAmino Alkyl Message Amp aRNA kit (Ambion, Austin, TX)を用いて1段階増幅した後、cDNAに変換した。Cy3, Cy5でラベルしたcDNAをAceGene Human Oligo 30K (Hitachi Software Engineering)とそれぞれハイブリダイズさせ、洗滌後シグナルを蛍光イメージ解析装置(FLA-8000, Fuji Film)で検出した。イメージデータの解析はArrayvision version 6.0 (Imaging Research, Ontario, Canada)およびGenespring version 5.0 (Silicon Genetics, Redwood City, CA)を用いて行った。

2) 定量的RT-PCR

PBMCsから抽出したmRNAをcDNAに変換したものを鋳型として、granulysin遺伝子(*GPLY*)の2つのisoform、519と520に対して設定したPCR primerとTaqMan^R probeを用いた定量的PCRを行った。PCR反応と解析にはABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いた。

3) 関連解析

末梢血から採取したgenomic DNAについてTaqMan^R Assays-on-DemandTM SNP Genotyping Products (Assay ID: C_3227280, C_3227296)を用いて*GPLY*の2つの多型(-189G/T、4214G/C)の遺伝子型を決定し、遺伝子型頻度とアレル頻度をSSPE群と正常対照群との間で比較した。

〔倫理面への配慮〕

本研究における遺伝子解析は患者あるいは保護者の文書による同意を得て行い、また、九州大学遺伝子解析倫理委員会の承認を受けている。

〔結果〕

1) オリゴDNA マイクロアレイを用いた網羅的解析

オリゴDNAマイクロアレイに搭載された3万個の遺伝子のうち、十分な発現レベルが得られ解析可能であったのは12,121遺伝子であった。この中でWelchのt-testによりSSPEと正常対照の発現に有意差が見られた27遺伝子のうち、SSPEで発現が低下していた主な遺伝子を表1に示した。一方、各群の発現比の平均を単純に比較した場合、細胞障害性分子であるgranulysin (*GPLY*)を含む2つの遺伝子の発現がSSPEにおいて正常対照の1/2以下であった。*GPLY*は両方に含まれる唯一の遺伝子であり、SSPE群の正常対照に対する発現比は0.46であった。*GPLY*以外の免疫に関連する遺伝子は上記の基準で抽出した遺伝子には含まれていなかった。

2) 定量的RT-PCR

オリゴDNAマイクロアレイの解析結果を多数検体で確認するために、SSPE患者30例、正常対照23名、麻疹急性期患者7例における*GPLY* mRNAの2つのisoform、519と520のPBMCsでの発現を比較した。図1は519と520の相対発現レベルを示したものである。両アイソフォームの発現は3群間で有意に異なっていた($P < 0.001$)。SSPE群における両アイソフォームの発現は正常対照群より低い傾向にあった(それぞれ $P = 0.025$ 、 $P = 0.038$)。また519の麻疹急性期患者における発現レベルは正常対照群より低い傾向にあった($P = 0.039$)。しかし、これらのP値はBonferroniの補正後は0.05以上となり有意ではなかった。一方、520の麻疹急性期患者における発現レベルは正常対照群より有意に高値であった($P = 0.006$)。SSPE患者をStage I/IIとStage III/IVに分けて両アイソフォームの発現レベルを比較したところ、統計学的に有意ではないが後者が低値であった(図2)。

3) 関連解析

*GPLY*とSSPE発症との関連を調べるために、これまでに登録されている*GPLY*の25のSNPsのうちAssays on DemandTMの系が利用可能であった-189G/Tおよび4212G/Cの2つの多型について関連解析を行った。2つの多型は完全な連鎖不平衡にあり、その遺伝子型およびアレルの頻度には、SSPE群と正常対象群との間には有意差がみられなかった(表2)。

〔考察〕

今回、約3万個の遺伝子に対応したオリゴDNAマイクロアレイを用いてSSPE患者と正常対照のPBMCsにおける遺伝子発現を解析し、*GPLY*の発現がSSPE患者で有意に低下していることを見出した。定量的RT-PCRでは、PBMCsにおける*GPLY*の発現レベルはSSPE患者では正常対照に比較して低い傾向にあり、麻疹急性期の患者では有意に高かった。

granulysinは、近年同定された分子で、細胞障害性T細胞(CTL)やNK細胞の細胞傷害性顆粒に含まれている。膜の透過性を亢進させることにより、細菌や真菌、寄生虫などの種々の細胞外微生物や、perforinと共同で結核菌などの細胞内細菌寄生菌のkillingに働く⁴⁾⁻⁶⁾。また、アポトーシスの誘導により、感染細胞を溶解することも知

られている。CTLやNK細胞によるウイルス感染細胞の排除がperforinやgranzymeを含む細胞傷害性顆粒を介して行われていることを考慮すると⁷⁾、同じく細胞傷害性顆粒に含まれるgranulysinも抗ウイルス作用を有していると推測される。実際、最近OgawaらはパルボウイルスB19感染症やEBウイルス感染症などの急性ウイルス感染症の患者で血清中のgranulysin濃度が一過性に上昇することを報告した⁸⁾。また、granulysinはin vitroでウイルス感染細胞のアポトーシスを誘導することによりウイルスの増殖を抑制することも報告されている⁹⁾。今回の研究では、GNLYが麻疹急性期患者のPBMCsで高発現していることを明らかにした。MV感染は、一過性ではあるが非常に強いリンパ球減少(CD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞の減少を伴う)を引き起こす¹⁰⁾。さらに、麻疹の急性期ではNK活性の低下も報告されている¹¹⁾。MV特異的なCD8陽性CTLは麻疹急性期におけるMV感染細胞の排除に主要な役割を果たしていることから¹²⁾、PBMCsにおけるGNLYの発現増加はCD8陽性T細胞の減少とNK活性の低下の代償機構としてのCD8陽性T細胞の著明な活性化を反映しているものと考えられ、このことはCTLからの細胞傷害性顆粒を介したgranulysinの放出がMV感染に対する宿主免疫に関与していることを示唆している。

対照的に、SSPE患者、とくにStageII/IVの患者ではPBMCsにおけるGNLYの発現は、統計学的に有意ではないものの、低い傾向にあった。麻疹急性期ではGNLYの発現が亢進していたことから、CTL反応の低下を示唆するGNLYの発現低下はMVの持続感染の成立や維持に有利に働くと考えられた。この仮説は、SSPE患者ではMVに対するCTLが低下しているという報告¹³⁾を支持しているおり、また、MVに感染したニューロンは末梢血から中枢神経系に侵入したCTLの標的であることを考えると¹⁴⁾、SSPEの中枢神経病変の形成にもあてはまる可能性がある。しかし、GNLYの多型の分布はSSPE群と正常対照群で差が認められなかったことから、GNLYそのものがSSPEの宿主側遺伝的要因であるとは結論づけることができなかつた。このことについては、GNLYの発現低下が持続感染の原因ではなく結果である可能性も否定できないが、今後、GNLYの発現を制御する遺伝子がSSPEの発症に関与している可能性について検討してゆく予定である。

〔結 論〕

granulysin は MV に対する宿主反応において重要な役割を果たしており、SSPE の発症病理や病態生理に関与している可能性がある。

〔参考文献〕

- 1) Hara T, Yamashita S, Aiba H, et al: Measles virus-specific T helper 1/T helper 2-cytokine production in subacute sclerosing panencephalitis. J Neurovirol. 6:121-6, 2000
- 2) Kusuhara K, Sasaki Y, Nakao F, et al: Analysis of measles virus binding sites of the CD46 gene in patients with subacute sclerosing panencephalitis. J Infect Dis. 181:1447-9, 2000
- 3) Inoue T, Kira R, Nakao F, et al: Contribution of the interleukin 4 gene to susceptibility to subacute sclerosing panencephalitis. Arch Neurol. 59:822-7, 2002
- 4) Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al: An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. Science. 282:121-5, 1998
- 5) Kaspar AA, Okada S, Kumar J, et al: A distinct pathway of cell-mediated apoptosis initiated by granulysin. Journal of Immunology. 167:350-6, 2001
- 6) Anderson DH, Sawaya MR, Cascio D, et al: Granulysin crystal structure and a structure-derived lytic mechanism. J Mol Biol. 325:355-65, 2003
- 7) Trapani JA, Sutton VR and Smyth MJ: CTL granules: evolution of vesicles essential for combating virus infections. Immunol Today. 20:351-6, 1999
- 8) Ogawa K, Takamori Y, Suzuki K, et al: Granulysin in human serum as a marker of cell-mediated immunity. European J Immunol. 33:1925-33, 2003
- 9) Hata A, Zerboni L, Sommer M, et al: Granulysin blocks replication of varicella-zoster virus and triggers apoptosis of infected cells. Viral Immunol. 14:125-33, 2001
- 10) Arneborn P, Biberfeld G, Forsgren M et al: Specific and non-specific B cell activation in measles and varicella. Clin Exp Immunol. 51:165-72, 1983
- 11) Griffin DE, Ward BJ, Jauregui E, Johnson RT et al: Natural killer cell activity during measles. Clin Exp Immunol. 81:218-24, 1990
- 12) Griffin DE, Ward BJ and Esolen LM: Pathogenesis of measles virus infection: an hypothesis for altered immune responses. J Infect Dis. 170(Suppl 1):S24-31, 1994
- 13) Dhib-Jalbut S, Jacobson S, McFarlin DE et al: Impaired human leukocyte antigen-restricted measles virus-specific cytotoxic T-cell response in subacute sclerosing panencephalitis. Ann Neurol. 25:272-80, 1989;
- 14) Ransohoff RM, Kivisakk P and Kidd G: Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. Nat Rev Immunol. 3:569-81, 2003

〔研究発表〕

1.論文発表

- 1) Torisu H, Kusuhara K, Kira R, Bassuny WM, Sakai Y, Sanefuji M, Takemoto M, Hara T: Functional MxA promoter polymorphism associated with subacute sclerosing panencephalitis in Japan. Neurology. 62:457-60, 2004

- 2) 楠原浩一、吉良龍太郎、原寿郎: SSPE における宿主側遺伝要因の解析. *Neuroinfection*. 9: 66-71, 2004
 - 3) Takemoto M, Kira R, Kusuhara K, Torisu H, Sakai Y, Hara T: The gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with subacute sclerosing panencephalitis using oligonucleotide microarrays. *J Neurovirol.* (in revision)
- 2.学会発表
- 1) Hara T, Kusuhara K and Kira R: The immunology and genetics of SSPE. Child Neurology Society Philippines, 4th Scientific Convention. November 15, 2004, Manila, Philippines.

〔知的所有権の取得状況〕
該当なし

表 1. SSPE において発現が低下している遺伝子

Oligo ID	遺伝子	発現比	機能
AGhsA020814	<i>GNLY</i>	0.46	Cellular defense response
AGhsA051623	<i>SNX6</i>	0.59	Negative regulation of EGF
AGhsA020403	<i>BIN2</i>	0.64	Endocytosis; synaptic
AGhsA130712	<i>ATP5E</i>	0.74	
AGhsA210415	<i>TCTEL1</i>	0.76	
AGhsB221623	<i>KIAA1265</i>	0.8	Metal ion transport
AGhsC140322		0.83	
AGhsC060107	<i>OR1A1</i>	0.83	G-protein coupled receptor
AGhsB211414		0.83	
AGhsC141207		0.83	
AGhsB210411	<i>RNF29</i>	0.83	Signal transduction
AGhsB120923	<i>COTL1</i>	0.84	Actin-binding proteins
AGhsA091105	<i>CA12</i>	0.85	One-carbon compound
AGhsB190806		0.86	
AGhsC160710		0.87	

図 1. *GNLY* の疾患群別定量的 RT-PCR

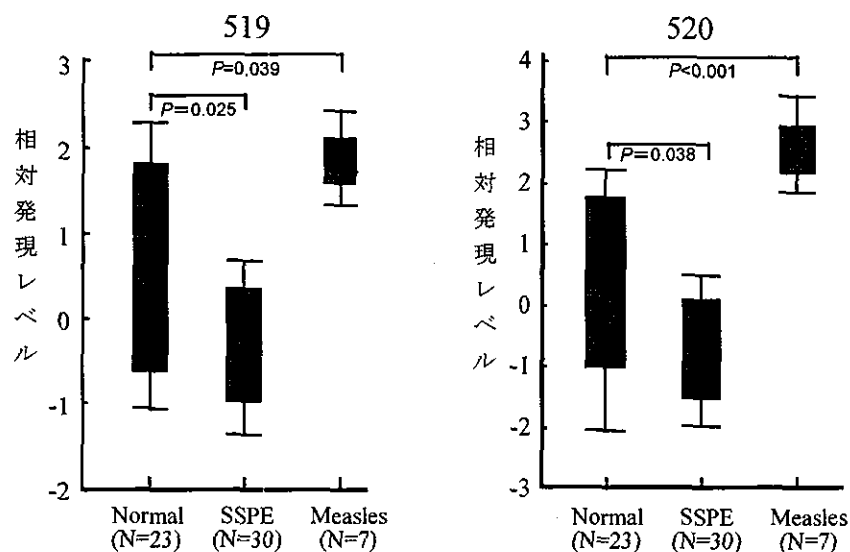


図 2. *GNLY* の SSPE 病期別定量的 RT-PCR

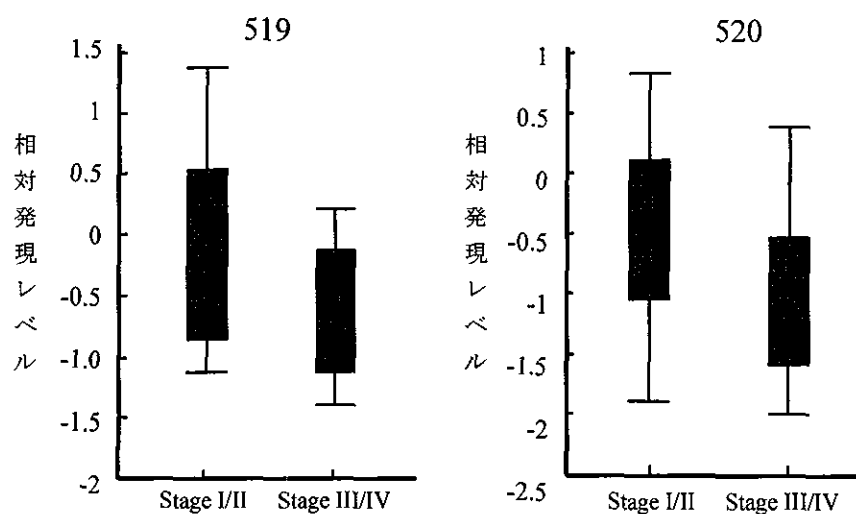


表 2. *GNLY*-189G/T 多型と SSPE の相関解析

<i>GNLY</i> -189G/T	正常対照 124名 n (%)	SSPE 40例 n (%)	<i>P</i> -value
遺伝子型頻度			
TT	45 (36)	14 (35)	NS
GT	52 (42)	20 (50)	NS
GG	27 (22)	6 (15)	NS
アリル頻度			
T	142 (57)	48 (60)	NS
G	106 (43)	32 (40)	NS

カニクイザル中枢神経における麻疹ウイルス持続感染

班 員：網 康至 (国立感染症研究所・動物管理室)

協力研究者：須崎百合子、小長谷昌功 (国立感染症研究所・動物管理室、ウイルス第3部)

小船 富美夫 (東京大学医科学研究所・実験動物研究施設)

[研究要旨]

麻疹ウイルスの脳内侵入経路を明らかにする目的で、麻疹ウイルスを経鼻接種後、ウイルス血症の極期である感染7日後に、末梢血より単核細胞を分離し、同一個体の視床に接種したカニクイザル2頭について、脳内における麻疹ウイルスの持続感染について検討を行った。そのうちの1頭において、感染41週後に、脳脊髄液中に麻疹ウイルス中和抗体を検出した。さらにこの個体は、感染約100週後においても、高力価の血清中麻疹ウイルス中和抗体、抗麻疹ウイルス IgM 抗体、脳脊髄液中の麻疹ウイルス中和抗体が持続して検出された。脳脊髄液中の中和抗体の特異性を明らかにする目的で、麻疹ウイルス経鼻感染後、高力価の血中抗麻疹ウイルス中和抗体を有するカニクイザルの脳脊髄液中の中和抗体を測定したが、検出できなかった。また、麻疹ウイルスに対するT細胞反応を、特異的刺激における細胞内 γ IFNの産生頻度で検出したところ、中枢神経に持続感染していると考えられる個体では、高値を示した。これらの結果は、この個体において液性免疫および細胞性免疫が麻疹ウイルス特異的に持続的に賦活化しているものと考えられ、中枢神経内に麻疹ウイルスが持続感染していることを示唆するものと考えられる。しかしながら、期間中、臨床症状は観察されず、これらの結果とSSPEとの関係についてはさらなる継続的に観察が必要であると考えられた。

New evidence of persistent infection of measles virus in central nervous system of the cynomolgous monkey intracerebrally inoculated with autochthonous infected peripheral blood mononuclear cells

Yasushi AMI¹, Yuriko SUZAKI¹ and Fumio KOBUNE²

1, Division of Experimental Animal Research, National Institute of Infectious Disease, 2, Laboratory Animal Research Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo.

ABSTRACT

One of the cynomolgous monkeys, intracerebrally inoculated with the autochthonous peripheral blood mononuclear cells containing measles virus (MV) infected cells after intranasal challenge, had the virus specific neutralizing antibody in CSF and the virus specific IgM fluorescence assay antibody in the plasma during about 100 weeks post inoculation. Moreover this monkey had high frequency of MV-specific T cell response detected with intra-cellular gamma interferon production. These results suggested that MV persistently infected to the central nervous systems of this monkey. No clinical signs were observed, but further observation was needed to clarify the relation between the persistent infection of MV and SSPE.

[はじめに]

麻疹ウイルスの脳内における持続感染が SSPE 発症要因のひとつであると考えられている。昨年度、中枢神経への持続感染成立を目的として、感染自己末梢血単核球を同一個体の視床に接種した2頭のカニクイザルについて長期間にわたる観察を行い、その1頭において抗麻疹ウイルス液性免疫の持続的な賦活化を呈し、かつ、脳脊髄液中に中和抗体を有し、中枢神経に持続感染していると考えられる個体について報告した。中枢神経への持続感染の直接的な証明は、同組織からのウイルス分離あるいはウイルス遺伝子の検出によると考えられるが、持続感染とSSPEの関連について明らかにするため、この個体の長期にわたる観察は不可欠なものと考えられる。通常、SSPEの臨床においても上記のようなウイルス学的な麻疹ウイルスの証明は、脳のバイオプシー以外は剖検時に得られる組織材料から行われるのが一般的であり、残念ながら発症までは間接的な証明にならざるを得ない。

他のウイルスで潜伏感染あるいは持続感染する、EBウイルスやサイトメガロウイルスに対するT細胞の反応は報告があり、多くの場合、急性のウイルス感染発症後のそれらの反応より高いことが知られており、ウイルスの持続感染の間接的な証拠になりうると考えられる。

[目的]

昨年度報告した中枢神経に持続感染していると考えられる個体について、脳脊髄液中に検出される中和抗体の特異性を明らかにする。また、麻疹ウイルス特異的な細胞性免疫のこの個体における状態について、ウイルス抗原特異的的刺激に対する T 細胞による γ IFN 産生細胞数を指標とする方法で明らかにし、対照群との比較において、中枢神経における持続感染について明らかにすることを目的とする。

[材料と方法]

麻疹ウイルス HL-MoBr3 株 10^5 TCID₅₀ を経鼻接種し、感染 7 日後に末梢血より分離した単核球 10^6 個を、同一個体の大脳視床に接種した 3 頭のうち 2 頭、対照として培養液を接種した 2 頭のうち 1 頭、合計 3 頭のカニクイザルについて臨床症状の観察を行った。また、経時的に末梢血液、脳脊髄液を採材し、抗麻疹ウイルス中和抗体価、および IgG, IgM 蛍光抗体価を測定した。

抗体価の測定は、血漿あるいは脳脊髄液を 4 倍希釈から 2 倍段階希釈し、攻撃ウイルスおよび FA 抗原作成には、麻疹ウイルス野外分離株 IC-B 株、B95a 細胞を用いて行った。

麻疹ウイルス特異的な T 細胞反応は、Nanan R らの方法を改良した方法を用いた。採取した末梢血単核球 10^6 個に moi 0.1 で麻疹ウイルス IC-B 株を 37°C、30 分吸着感染させ、10% FCS RPMI1640 培地中で、37°C 5%CO₂ 存在下で 45 時間あるいは 77 時間培養後、通常の方法で、細胞表面抗原 CD8, CD4, 細胞内 γ IFN を標識抗体で染色し、Flowcytometer (EPICS elite) で測定、リンパ球中におけるそれぞれの細胞比率を winMDI ver.2.8 で解析した。産生細胞率は、ウイルス未接種 PBMC の同時間培養における値との差により算出した。

それぞれの測定についての非脳内接種対照群として、約 4 年前に野外麻疹ウイルスを 2 回経鼻感染させた 2 頭、1 回の 1 頭、および naïve 2 頭、合計 5 頭のカニクイザルを用いた。

本実験は、国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て行った。

[結果]

実験群 2 頭および対照 1 頭の、感染後 103 週までの脳脊髄液中の中和抗体価、血漿中の中和抗体価、抗麻疹ウイルス IgG 蛍光抗体、抗麻疹ウイルス IgM 蛍光抗体価の推移を図 1, 2 に示した。感染細胞を視床に接種した 1 頭のカニクイザル (no.4565) については、いずれの値についても他の 2 頭に比べ高値でありかつその値を持続的に維持した。抗麻疹ウイルス IgM 蛍光抗体価は、漸次減少し 4 倍となったが、感染 103 週後において他の 2 頭は検出されなかった。また、これらの 2 頭に脳脊髄液中の中和抗体価を観察期間中に認めることはなかった。(表 1)

カニクイザル (no.4565) における脳脊髄液中の中和抗体価の特異性を明らかにする目的で、非脳内接種群について脳脊髄液中の中和抗体価の測定を行った (表 2)。病原性麻疹ウイルス 1 回経鼻接種サル (no.3932) においては、血漿中の中和抗体価は、感染後 4 年で 3 2 倍であり、本実験の他の 2 頭における減少傾向が通常の感染におけるものと同様であることが示唆された。カニクイザル (no.4565) 血漿中の中和抗体価 2048 倍は、病原性麻疹ウイルス 2 回経鼻接種サル (no.4200,4201,4364) において、約 4 年後でも維持されていることが明らかとなった。しかし、脳脊髄液中にそれらの個体で中和抗体が検出されることはなく、明らかにこれを有するカニクイザル (no.4565) の病態が特異的であることが示唆された。

麻疹ウイルス特異的な T 細胞反応については、ウイルス感染後 24 時間におけるウイルス抗原発現率を抗麻疹ウイルスウサギ抗体を用いて測定したところ、24.4% の細胞に発現が認められ、ウイルス抗原を提示する細胞が確実に存在していた。また、刺激後の培養時間 45 時間が検討した時間のうち最大値が得られ、以後すべての実験はこの条件で測定を行った。本実験 3 頭の感染後 103 週の麻疹ウイルス特異的的刺激における CD8(+), γ IFN(+) 細胞頻度は図 3 に示す。カニクイザル (no.4565) は、0.71% と非常に高値を示した (図 3)。同様に、CD4(+), γ IFN(+) 細胞頻度についても解析し、非脳内接種対照群における値と比較すると、naïve 個体では 0.0~0.1%、麻疹ウイルス感染歴のある個体については、0.1~0.4% をそれぞれ示したのに対し、カニクイザル (no.4565) は突出して高い値を示した。(表 3, 図 4)

観察期間を通じて、臨床症状は実験群、対照群ともに観察されなかった。また、カニクイザル (no.4565) PBMC から麻疹ウイルスが分離されることはなかった。

[考察]

カニクイザル (no.4565) は、脳脊髄液中に抗麻疹ウイルス中和抗体価を示し、かつ麻疹ウイルス特異的液性免疫および細胞性免疫が賦活化されている状態を約 2 年にわたり維持しており、中枢神経内における麻疹ウイルスの持続感染を示唆しているものと考えられた。血漿中の中和抗体価については、病原性麻疹ウイルスを 2 回にわたり接種したサル群において、感染約 4 年後においても認められることから、その特異性については強く意味されないが、このような個体においても、脳脊髄液中に中和抗体を認めることはなく、か

つ突出して高い値を示す麻疹ウイルス特異的刺激における T 細胞 γ IFN(+)細胞頻度は、カニクイザル (no.4565) の特異な病態を強く示唆するものと考えられる。

脳脊髄液中の麻疹ウイルス中和抗体の存在は、SSPE の臨床症状の一つとして重要であり、カニクイザル (no.4565) が同様の臨床所見を示すことは、これが SSPE のモデルになりうる可能性を示唆するものと考えられるが、その他の SSPE に特徴的な臨床所見、例えば脳脊髄液中の oligoclonal IgG の存在、IgG index などについてさらに検討する必要があると考えられる。

ウイルス特異的刺激における T 細胞 γ IFN(+)細胞頻度については、ヒトにおいて麻疹ウイルスを始め他のウイルス疾患においても解析されている。麻疹罹患歴のあるヒトにおいて、その頻度の平均は、CD4 細胞 γ IFN(+)細胞頻度で 0.35%、CD8 細胞 γ IFN(+)細胞頻度で 0.24% であるとの報告がある。これは、今回のカニクイザルにおける結果とほぼ一致する。ヒトにおける値は、持続感染する他のウイルス、EBV あるいは CMV と同様の値であるが、このことが麻疹ウイルスの持続感染を意味するかは不明である。このような結果から考えて、カニクイザル (no.4565) の高値は麻疹ウイルスの持続感染を示唆すると考えられる。

SSPE 患者の麻疹ウイルス刺激によるリンパ球からの γ IFN 産生については、Hara T らの報告があり、症状の進行の早いグループにおいては、産生能が低いとしている。測定方法が異なるため一概に論ずることはできないが、SSPE の発症要因として、麻疹ウイルスの持続感染だけでなく、その後何らかの原因による特異的細胞性免疫能の低下が重要なものかもしれない。

実験群の 2 頭の差異については、接種ウイルスに有意な差がないにもかかわらず、個体 (no.4564) では持続感染が認められておらず、持続感染が成立するには、中枢神経に到達するウイルス量よりはむしろ宿主側の要因が重要なものかも知れない。再現性の実験で明らかにする予定である。また、今後、持続感染が認められた個体の発症の有無についてさらに観察をつづける必要があるものと考えられる。

[結論]

感染自己末梢血単核球の脳内接種したカニクイザルの 1 頭で、感染約 100 週後においても脳脊髄液中に麻疹ウイルス中和抗体が検出され、血漿中には抗麻疹ウイルス IgM 抗体が持続して検出された。また、この時期でも、麻疹ウイルス特異的刺激における T 細胞 γ IFN(+)細胞頻度が他の個体に比べ高く、この個体において麻疹ウイルスが持続感染していることを示唆するものと考えられた。

[参考文献]

- 1) Schumacher, H.P., Albrecht, P., Clark R.G., Kirschstein R., and Tauraso N.M. Intracerebral inoculation of rhesus monkeys with a strain of measles virus isolated from a case of subacute sclerosing panencephalitis. *Infect.Immun.*4:419-424.1971
- 2) Nanan R, Rauch A, Kampgen E, Niewiesk S, Kreth HW. A novel sensitive approach for frequency analysis of measles virus-specific memory T-lymphocytes in healthy adults with a childhood history of natural measles. *J Gen Virol.* 81:1313-9.2000
- 3) Hara T, Yamashita S, Aiba H, Nihei K, Koide N, Good RA, Takeshita K. Measles virus-specific T helper 1/T helper 2-cytokine production in subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurovirol.* 6:121-6.2000

[研究発表]

- 1) 網 康至、麻疹ウイルスによる動物脳炎モデル作成の試み *NEUROINFECTION* 9:75-78.2004

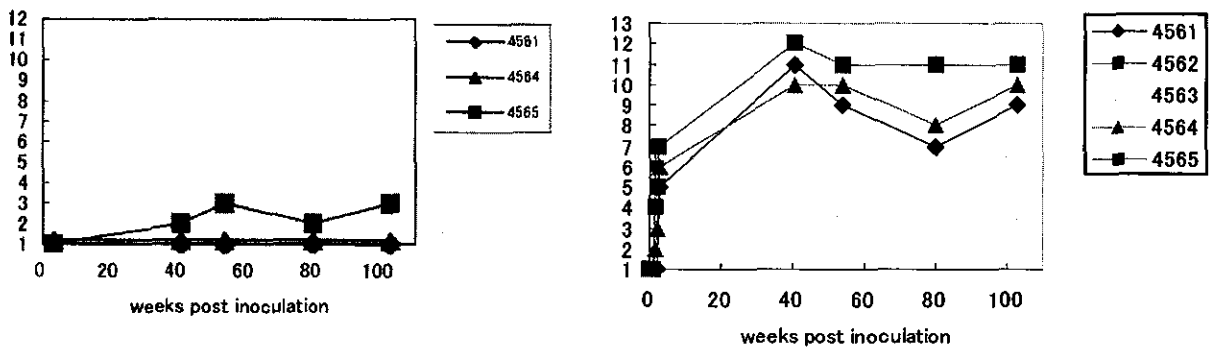


図1 脳脊髄液中（左）血漿中（右）抗麻疹ウイルス中和抗体価

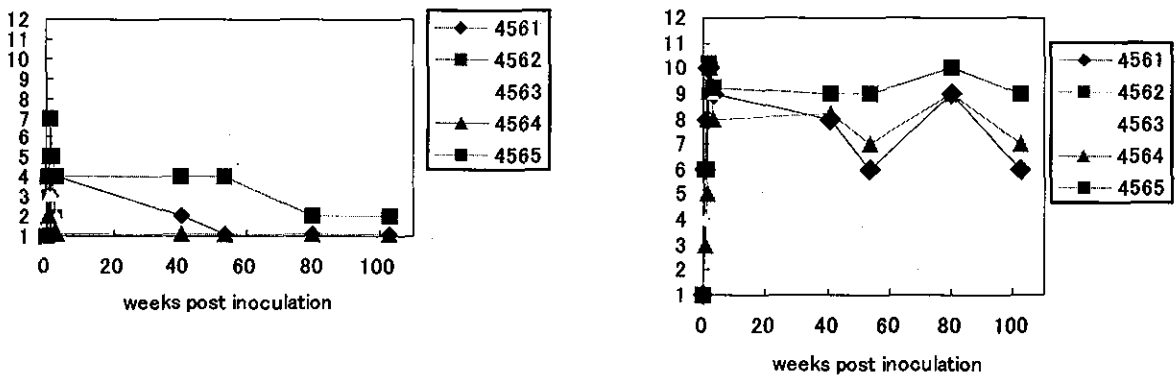


図2 血漿中抗麻疹ウイルス FA 抗体価 (IgM:左、IgG:右)

Virus specific FA titers in plasma										
	IgG					IgM				
	3W	41W	53W	80W	103W	3W	41W	53W	80W	103W
4561	512	256	128	512	64	16	4	<4	<4	<4
4564	512	256	256	512	128	4	<4	<4	<4	<4
4565	512	512	1024	1024	512	16	16	16	4	4

Neutralizing titers										
	plasma					CSF				
	3W	41W	53W	80W	103W	3W	41W	53W	80W	103W
4561	32	2048	512	128	512	<4	<4	(4)	<4	<4
4564	64	1024	1024	256	1024	<4	<4	<4	<4	<4
4565	128	4056	2048	2048	2048	<4	4	8	4	8

表1 抗体価の推移まとめ

	Test group			Control group					
	4561	4564	4565	4200	4201	4364	3923	4418	4369
Rechallenge	-	±	±	+	+	+	-	-	-
NT:plasma	512	1024	2048	2048	2048	2048	32	<4	<4
:CSF	<4	<4	8	<4	<4	<4	<4	<4	<4

表2 脳脊髄液中における抗麻疹ウイルス中和抗体価の特異性

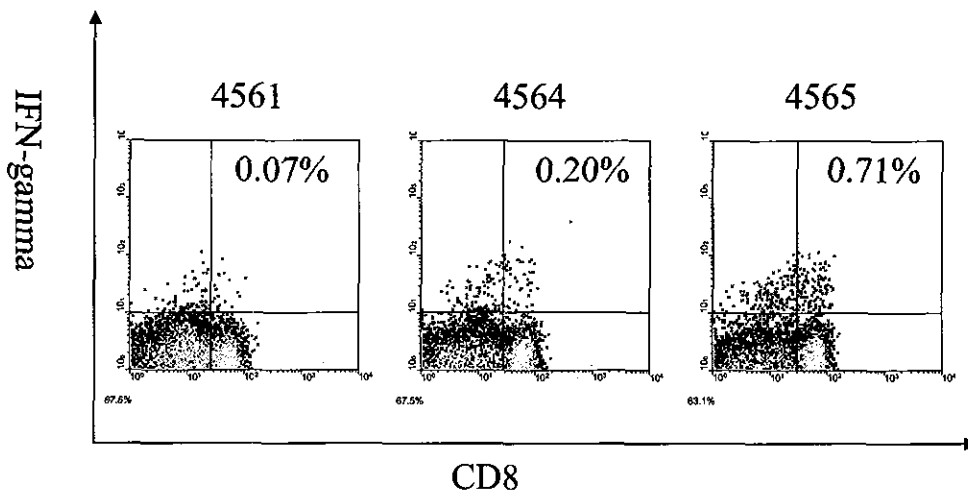


図3 麻疹ウイルス抗原特異的の刺激における T 細胞反応

	Test group			Control group					
	4561	4564	4565	4200	4201	4364	3923	4418	4369
Rechallenge	-	+	+	+	+	+	-	-	-
NT	512	1024	2048	2048	2048	2048	32	<4	<4
CD4+ γ IFN(%)	0.22	0.39	0.79	0.3	0.4	0.4	0.1	0.1	0.0
CD8+ γ IFN(%)	0.07	0.20	0.71	0.2	0.3	0.2	0.1	0.1	0.0

表3 各実験群における麻疹ウイルス抗原特異的の刺激における T 細胞反応

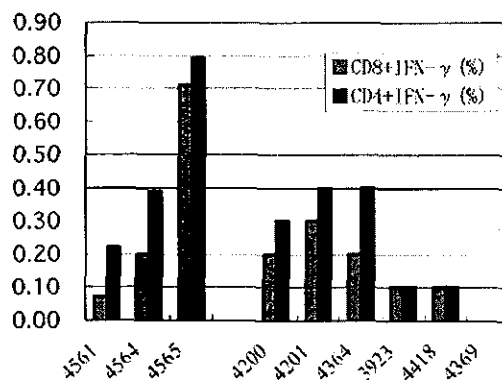


図4 各実験群における麻疹ウイルス抗原特異的の刺激における T 細胞反応

進行性多巣性白質脳症（PML）の治療ガイド ラインの作成（予報）

研究協力者：黒田 康夫（佐賀大学内科）

研究協力者：岸田 修二（都立駒込病院神経内科）

班 員：長嶋 和郎（北海道大学・大学院医・分子細胞病理）

研究協力者：余郷 嘉明（東京大学・大学院医・泌尿器科）

班 員：宍戸一原 由紀子（杏林大学病理学）

班 員：水澤 英洋（東京医科歯科大学・大学院医・神経内科）

{研究要旨}

昨年度、当 PML 分科会は PML の診断基準を作成し、それを用いてわが国の PML の一次実態調査を行った。その結果、わが国にも症状の著明な改善が認められた患者が少数ではあるが存在することが確認された。わが国では HIV 感染者が増加傾向にあり、今後 PML 患者は増加していくと予測される。しかしながら、現時点では一部の施設を除けば PML は非常に稀な疾患であるため、患者が入院した場合どのような診療計画を立てたらよいか、最善の治療は何なのか直ちに見当がつかないのが現状と思われる。実際、PML の治療に関しては、エイズに合併した PML では Standard Treatment が提唱されているが、エイズ以外の疾患に合併した PML では明確な治療ガイドラインは提唱されていない。

かかる理由から、平成17年度中に本研究班で治療ガイドラインを作成する必要があると判断した。とくに非定型 PML 症例の診断方法および少数であっても効果が認められた治療についてもガイドラインを作成する予定である。

Establishment of Japanese Guidelines for the Management of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy

Yasuo KURODA¹, Shuji KISHIDA², Kazuo NAGASHIMA³, Yoshiaki YOGO⁴, Yukiko SHISHIDO-HARA⁵
and Hidehiro MIZUSAWA⁶

1, Department of Medicine, Saga University; 2, Department of Neurology, Tokyo Metropolitan Komagome Hospital; 3, Laboratory of Molecular and Cellular Pathology, Hokkaido University Graduate School of Medicine; 4, Department of Urology, Graduate School of Medicine and Faculty of Medicine, University of Tokyo; 5, Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience; 6, Department of Neurology, Tokyo Medical and Dental University Graduate School of Medical and Dental Sciences.

Last year the subcommittee of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) made the diagnostic criteria of PML and conducted the first nationwide survey of the disease. This nationwide survey has revealed that, although a few cases, there were PML patients who had showed marked improvement. It is generally believed that patients with