

研究協力者：加藤 誠一（ 同 ）  
班 員：二瓶 健次（国立成育医療センター）

〔研究要旨〕

SSPE 発症 6 週間後の患児の脳組織から B95a 細胞を用いて SSPE ウイルスを分離した。この新鮮分離 SSPE ウイルス(SSPE-Kobe-1 株)は、B95a 細胞と Vero/SLAM 細胞において、明瞭な融合巨細胞形成能を有するが感染性遊離ウイルス産生能は欠如しており、これまでに報告されている SSPE ウイルスと同様の性状を有していた。SSPE-Kobe-1 株は、N 及び H 遺伝子の分子系統樹解析より、遺伝子型 D3 に分類された。我が国で分離された遺伝子型 D3 の麻疹ウイルス流行株と比較した場合、SSPE-Kobe-1 株の遺伝子塩基配列の変異率は 0.9~1.6%であり、これまで SSPE ウイルスで特に多いとされていた M 遺伝子の変異率は他の遺伝子と同程度であった。しかし、アミノ酸レベルで 3 カ所の変異のうち 2 カ所が、M 蛋白の立体構造に影響を及ぼすと考えられる Leu→Pro 変異であった。N 蛋白では 1 カ所、P 蛋白で 7 カ所、F 蛋白で 9 カ所、H 蛋白で 2 カ所に、通常の麻疹ウイルスでは全くみられない特有のアミノ酸変異がみられた。他に、F 蛋白と H 蛋白では、他の SSPE ウイルスでもみられるような C 末端領域の付加あるいは欠失が認められた。抗 M 蛋白モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析では、通常の麻疹ウイルス株の 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、細胞溶解液に 0.5% Triton X-100 と 0.5% deoxycholate を併用した場合、通常の麻疹ウイルス株の 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化された。今回の研究を通して、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が、今後、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ウイルス蛋白の性状・機能及びウイルス病原性にどのような影響を及ぼ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につながることを期待される。

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

を見い出した。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 *GPLY* 189G/T および 4214G/C の各多型の遺伝子型頻度とアレル頻度には 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。

## 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)

協力研究者：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 $\gamma$ 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。

## 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。

## HIV-関連PMLの発症と末梢血CD4(+)Tリンパ球数ならびに血漿HIV負荷量との関係

研究協力者：岸田修二（東京都立駒込病院・神経内科）

#### 〔研究要旨〕

神経内科専門医を対象にしたわが国でのPML（進行性多巣性白質脳症）の疫学調査から、HIV（ヒト免疫不全症ウイルス）関連PMLの患者数が漸増していることが明らかになった。今回エイズ治療拠点病院を対象にしたPMLの発症状況と、発症時のCD4(+)Tリンパ球数、血漿HIV負荷量との関連を検討した。2002年～2003年の2年間におけるエイズ患者数987名中PML発症者は17名であった。発症時のCD4(+)Tリンパ球数は多剤併用抗レトロウイルス療法(HAART)未治療者では平均48/ $\mu$ L（4～154）と低値であった。HIV負荷量は平均 $16 \times 10^4$ コピー/mlであった。HAARTを受けている患者でも発症がみられ、CD4(+)Tリンパ球数256/ $\mu$ L（22～579）と高値であり、HIV負荷量は平均6000/mlであった。HAART療法導入前1997年度および後2002年度、2004年度の疫学調査からHIV感染によるPMLの発症者数は増加傾向を認めた。結論：HIV関連PMLの多くは細胞性免疫不全の進行した状態で発症するが、HAARTにより免疫が回復し、血漿HIVが抑制された状態でも発症する。HIV関連PMLはHAARTにより延命するが、神経学的改善を来すかどうかは不明で、重篤な機能障害を来す以前に進行を停止し、改善を来すようなPMLの制御に関連する免疫状態の解明と直接的治療法の開発が必要である。

## PMLの発症に関与するJCウイルスの遺伝学的な変化

研究協力者：余郷 嘉明（東京大学・大学院医・泌尿器科）

研究協力者：鄭 懐穎（東京大学・大学院医・泌尿器科）

研究協力者：北村 唯一（東京大学・大学院医・泌尿器科）

研究協力者：長嶋 和郎（北海道大学・大学院医・分子細胞病理学）

研究協力者：野田 和幸（順天堂大学・医・脳神経内科）

研究協力者：冠木 智之（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) は広くヒト集団に蔓延しており、子供に無症候性感染し、その後、腎やリンパ組織に潜伏または持続感染する。一般に、免疫低下によって再活性化された JCV が進行性多巣性白質脳症 (PML) を惹起すると考えられている。JCV 調節領域は PML 患者の脳や髄液から検出される PML 型 JCV と健常人の腎やリンパ組織から検出される原型 JCV とに分けられる。前者は後者から、塩基配列の再編成によって患者体内で作られる。しかし、調節領域の再編成が PML の発症にどう関わるかという点に関しては、未だ明確な解答は得られていない。本研究は、ウイルス蛋白をコードする領域を解析し、PML の発症に関して有用な情報を得ることを目的とする。そのため、3 名の PML 患者の脳組織から全長 JCV DNA クローンを多数樹立し、それらの全長塩基配列を解析した。全てのクローンにおいてユニークな再編成型の調節領域が検出された。同時に、多くのクローンにおいて、ウイルス蛋白をコードしている領域(コード領域)に 1-2 個の塩基置換が認められた。全ての塩基置換(計 12 個)はアミノ酸置換を伴うことがわかった。これらのうち 7 個のアミノ酸置換は主要キャプシド蛋白 (VP1) の表面でループを形成すると考えられている領域 (VP1 ループ) に存在した。最後に、今までに報告された PML 型 JCV の VP1 配列をゲノム型毎に、原型 JCV 株のコンセンサス配列と比較した。その結果、16 PML 型 JCV 株のうち、13 株の VP1 ループにアミノ酸置換が認められた。しかし、原型 JCV の VP1 ループにはほとんどアミノ酸置換が認められなかった。以上により、PML 型 JCV の VP1 ループにアミノ酸置換が頻繁に起きることが示唆された。

## 進行性多巣性白質脳症における promyelocytic leukemia (PML)蛋白の発現

### JC ウイルスは PML 核体を足場に粒子形成する

班 員： 宍戸 - 原 由紀子 (杏林大学・医・病理)

#### 〔研究要旨〕

進行性多巣性白質脳症 (PML) では、JC ウイルス (JCV) が感染 oligodendroglia の核内封入体として認められる。JCV 粒子外殻(カプシド)を担う major カプシド蛋白 VP1 と minor カプシド蛋白 VP2、VP3 は、細胞質で合成された後、協調して核に移行し、核内構造を足場に粒子形成する。これまでの研究から、細胞質から核への移行には VP2/VP3 共通の C 末端 34 残基が、核内構造への集積には Cluster2 配列 (KRRSRSSRS) が機能することが明らかになった。しかし、ウイルス複製を支持する宿主細胞の核内構造は、未だ明らかにされていない。

PML 核体は、真核細胞に広く見られる核内構造で、promyelocytic leukemia (PML)蛋白がその主要構成蛋白として知られている。進行性多巣性白質脳症の腫大した oligodendroglia の核内で、PML 蛋白は約 2.5 $\mu$ m までのドット状の染色パターンを核膜近傍に示した。また二重染色の結果、ウイルスカプシド蛋白が PML 陽性の核体構造に集積することも明らかになった。さらに、PML 核体におけるウイルスカプシド蛋白の動態を明らかにするため、JCV カプシド蛋白を強制発現した COS-7 細胞を共焦点顕微鏡と電子顕微鏡で解析すると、PML 核体に集積したカプシド蛋白は、これを足場に効率よく粒子形成することが明らかになった。またヒト脳組織においても、JCV が核膜近傍にクラスターを形成して集積する像が確認された。これらの結果は、PML 核体がウイルス粒子形成の足場となることを示して

いる。PML 核体の oligodendroglia 変性における役割を解明することが、今後の課題と考えられた。

## JC virus 感染における細胞特異性を規定する因子の解析

班 員：長嶋 和郎 (北海道大学・医・分子細胞病理)  
研究協力者：仙葉 慎吾 (北海道大学・医・分子細胞病理)  
研究協力者：澤 洋文 (北海道大学・医・分子細胞病理)

### 〔研究要旨〕

JC ウイルス (JCV) は、ヒトの脱髄性疾患である進行性多巣性白質脳症 (PML) の原因ウイルスである。JCV が感染する宿主領域は狭く、特に PML の発症にはヒト中枢神経系のグリア細胞に限られている。JCV 遺伝子の発現は宿主細胞の様々な DNA 結合蛋白質が JCV の転写調節領域 (TCR) に結合することにより調節されており、これが宿主特異性を決定する大きな要因と考えられている。そこで、本研究では JCV の TCR に特異的に結合するタンパク質複合体 (TCR-BP) を単離、同定することを目的とした。JCV 感受性の神経芽細胞腫由来 IMR-32 細胞、および JCV 非感受性の HeLa、A549、SW480、HepG2 各細胞から調製した核タンパク質と、TCR 領域を 40bp 前後に断片化した合成オリゴヌクレオチドをプローブとして用いたゲルシフトアッセイの結果、この結合蛋白質は TCR の特定の配列に結合することが明らかとなった。IMR-32 細胞から調製した核タンパク質から TCR-BP を精製したところ、この蛋白質は分子量 70 kDa と 40 kDa のサブユニットからなるヘテロダイマーであることが明らかとなった。部分アミノ酸配列分析の結果、両サブユニットともそれぞれ、cleavage stimulation factor (CstF) の 77 kDa、50 kDa サブユニットであることが判明した。しかし CstF は種々の細胞に普遍的に発現していることから、IMR-32 と HeLa 細胞を用いて subtracted cDNA library を作製し、CstF 77 kDa サブユニットを bait とした Yeast two hybrid assay を施行した結果、CstF に結合している蛋白を同定し fCI.35 と仮称した。この蛋白質は JCV 感受性神経芽細胞種由来の cell line (IMR-32 細胞) で過剰発現しており、このことから、CstF/ fCI.35 の蛋白質複合体が TCR に結合し、JC ウイルス遺伝子の転写、複製を活性化しているものと推察された。

以上

# 平成15年度分担研究報告

## クロイツフェルト・ヤコブ病サーベイランス結果

班 員：中村 好一（自治医大・医・公衆衛生学）  
研究協力者：渡邊 至（自治医大・医・公衆衛生学）  
研究協力者：佐藤 猛（国立精神神経センター国府台病院）  
研究協力者：北本 哲之（東北大・大学院医・病態神経学）  
班 員：山田 正仁（金沢大・大学院医・脳老化・神経病態学）  
班 長：水澤 英洋（東京医歯大・大学院医歯・脳神経機能病態学）

### 〔研究要旨〕

（1）わが国におけるクロイツフェルト・ヤコブ病等のプリオン病の疫学像を明らかにする、（2）変異型クロイツフェルト・ヤコブ病発生の有無を監視する、の2つの目的で、1999年より研究班でサーベイランスを実施している。サーベイランス委員会でプリオン病と認められた440例の疫学像を明らかにした。硬膜移植によるクロイツフェルト・ヤコブ病が102例報告されており、その疫学像を明らかにすると共に、今後ともこのような患者が発生する可能性を指摘した。

### CJD サーベイランスにおける問題例：

#### わが国における変異型 CJD 疑い例および孤発性 CJD MM2 型の検討

班 員：山田 正仁（金沢大学・大学院医・脳老化・神経病態（神経内科））  
研究協力者：浜口 毅（金沢大学・大学院医・脳老化・神経病態（神経内科））  
研究協力者：野口もえ子（金沢大学・大学院医・脳老化・神経病態（神経内科））  
研究協力者：石田 千穂（金沢大学・大学院医・脳老化・神経病態（神経内科））  
研究協力者：三谷 和子（東京都老人医療センター・神経内科）  
研究協力者：村山 繁雄（東京都老人総合研究所・神経病理部門）  
研究協力者：郡山 達男（広島大学・大学院医歯薬・第3内科）  
研究協力者：片山 禎夫（広島大学・大学院医歯薬・第3内科）  
研究協力者：山下真理子（大阪府済生会中津病院・神経内科）  
研究協力者：宇高不可思（住友病院・神経内科）  
研究協力者：川上 明男（下越病院・神経内科）  
研究協力者：井原 雄悦（国立南岡山病院・臨床研究部）  
研究協力者：西中 哲也（国立南岡山病院・臨床研究部）  
研究協力者：黒田 重利（岡山大学・大学院医歯・精神神経病態）  
研究協力者：鈴木 直輝（東北大学・大学院医・神経内科）  
研究協力者：志賀 裕正（東北大学・大学院医・神経内科）  
班 員：中村 好一（自治医科大学・疫学・地域保健部門）

研究協力者：佐藤 猛（国立精神・神経センター国府台病院）  
研究協力者：北本 哲之（東北大学・大学院医・病態神経）  
研究協力者：袖山 信幸（東京医科歯科大学・脳神経機能病態（神経内科））  
班 長：水澤 英洋（東京医科歯科大学・脳神経機能病態（神経内科））

#### 〔研究要旨〕

CJD サーベイランスにおいて変異型 CJD (vCJD) の疑いにて緊急調査された症例の特徴をまとめ、さらに、時に vCJD との鑑別が問題となる孤発性 CJD (sCJD) MM2 型の臨床診断法を確立することを目的とした。平成 15 年 10 月までにサーベイランスを行った 501 例のうち、vCJD 疑いとの連絡にて緊急調査を行った例は 7 例（男 4/女 3、年齢 3-34 歳）で、若年発症の精神神経症状や MRI 上の視床異常信号にて vCJD が疑われたが、調査により全例 vCJD は否定された。調査後の診断は、他のプリオン病 3 例（うち GSS102 ほぼ確実 1 例、sCJD MM2 型（視床型）の疑い 2 例）、Wernicke 脳症 1 例、脳幹脳炎の疑い 1 例、てんかん+悪性症候群 1 例、未確定 1 例であった。次に、プリオン蛋白遺伝子解析、脳の病理および Western ブロットにて sCJD MM2 型と確定診断された 8 例（男 4/女 4、年齢 30-75 歳）について、臨床的特徴を検討した。2 例は皮質型、5 例は視床型、1 例は皮質視床型に分類された。皮質型 2 例は共に痴呆を呈し、いずれも早期より MRI 拡散強調画像にて大脳皮質に高信号を認め CJD が疑われた。視床型 5 例は、発症 30-71 歳、死亡までの期間 13-73（平均 38.8）ヶ月で、死亡あるいは死亡直前まで無動無言にはならなかった。痴呆・精神症状、小脳失調、錐体路・錐体外路症候、ミオクローヌス等の症候がみられ、不眠と自律神経症候を示したのは 1 例のみであった。PSD は 1 例のみに発症 3 年後にみられ、頭部 MRI では、経過につれて萎縮が出現したが、拡散強調画像を含め視床や大脳皮質に異常信号を認めた例はなかった。脳血流 SPECT が行われた 4 例では、全例比較的早期より視床に血流低下を認めた。皮質視床型 1 例は痴呆、錐体外路・錐体路症候、ミオクローヌスなどを呈し、早期より MRI 拡散強調画像における大脳皮質の高信号と PET における視床と大脳皮質の糖代謝低下を示した。以上より、sCJD MM2 型の早期診断では、皮質型では MRI 拡散強調画像が、視床型では脳血流 SPECT や PET が有用であり、vCJD と異なり MRI 上視床領域に異常を認めないと考えられる。

## 血清麻疹抗体価が持続高値を示したクロイツフェルトヤコブ病 を通じてのプリオン病全身剖検指針の提言

研究協力者：文村優一（東京都老人総合研究所・老化臨床神経科学）  
研究協力者：齊藤祐子（東京都老人総合研究所・老化臨床神経科学）  
班 員：村山繁雄（東京都老人総合研究所・老化臨床神経科学）

#### 〔研究要旨〕

今回われわれは、血清麻疹抗体価が持続高値を示したクロイツフェルトヤコブ病 (CJD) 疑いの院外症例剖検依頼に対し、ご家族の同意のもとに、当院神経内科に転入院しプリオン病診断を確認、死亡時当施設プリオン病剖検プロトコールに従い剖検を行った。本例は type I M/M の典型的 CJD で、subacute sclerosing panencephalitis や麻疹脳炎の所見はなく、凍結脳 RT-PCR でも麻疹ゲノムは検出されなかった。しかし当施設プロトコールは脳のみを検索としており、麻疹の全身持続感染の可能性は除外できなかった。本例を通じ、一般の剖検室体制下で可能なプリオン病全身剖検指針として、以下のものを策定した。1. 脳は厳密なコントロールのもとに開頭採取、2. 脊髄は頭蓋内より高位頸

髓を採取、3. 神経・筋は腓腹神経・短腓骨筋を生検の手法で採取、4. 口蓋扁桃は口腔内から採取、5. 骨髄は胸髄穿刺針で採取、6. 虫垂については右腹部からの皮切で採取、7. 脾臓は生検針を用い採取。この指針を次症例から適用する予定である。

## プリオン病の神経病理 海馬病変について

天野 直二（信州大学医学部精神医学教室）

### 【研究要旨】

プリオン病は孤発性、家族性、感染性に分類され、孤発性の Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) の神経病理の基本像は、神経網の海綿状変化、神経細胞の変性脱落、星形グリアの反応であり、プリオンの免疫組織による染色性が診断に大きく寄与する。また、家族性のうちで P102L と P105L に代表される Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease (GSS) ではクル斑に似た特異なアミロイド斑が出現する。このような基本的な病理像も脳の部位によってその病変に軽重がみられ、海馬では極めて軽い変性にとどまることが指摘されてきた。従って、この海馬における病変を検討することは、プリオン病における変性の過程、とくに初期的な過程を推測するには適切な検討対象であると考えた。

今回は孤発性 18 例、家族性 8 例、感染性 1 例の剖検例で、海馬を含む切片で神経病理学的に詳細な比較検討を加えた。CJD の基本病変は大脳皮質では高度に進行していても subiculum、cornu Ammonis (CA)、さらに dentate gyrus の神経網は保存されている傾向にあった。神経細胞の脱落は subiculum、CA 4 にみられる症例が多かったが、海馬病変の進行例では CA 1、2、3 にほぼ同程度に及んでいた。異常グリアの反応は神経細胞の変性に比して海馬全体に及ぶ傾向がみられたが、CA 4 では生理的、非特異的な反応であり、海馬構造の一部を占め、殆どが軸索線維によって構成されている stratum radiatum、stratum lacunosum、stratum moleculare、vestigial hippocampal sulcus の層状構造には線維性グリオシスを認めた。また、異常プリオンの沈着も海馬には他の灰白質と同様に多く沈着する傾向にあり、さらに大きな特徴として、その沈着は stratum moleculare を中心に帯状に沈着する症例が多く認められた点である。

プリオン病における海馬病変は他の部位に比較すれば明らかに軽度であるが、プリオンの沈着、異常グリアの反応、そして海綿状変化と進行し、また海馬の中でも部位により病変が多彩であることが強く示唆された。今回は全体に脳病変の進行した例で検討しており、今後においては、プリオンの沈着が早期から脳内でどのように分布するかという経時的な変化と海馬病変の進行との相関を検索することが極めて重要な課題であると考えられた。

## 尿中プリオン蛋白検出によるプリオン病診断の問題点

班 員：古川 ひさ子（長崎大学・大学院医・神経感覚薬理学）  
研究協力者：堂浦 克美（東北大学・大学院・プリオン蛋白分子解析分野）  
研究協力者：奥脇 龍、片峰 茂（長崎大学・大学院医・感染分子解析学）  
研究協力者：調 漸（長崎大学大学院・医歯薬学総合・神経病態制御）  
研究協力者：山本 一男（長崎大学・大学院医・感染防御因子解析学）



研究協力者：鶴殿平一郎（理化学研究所・免疫シャペロン分子機能研究チーム）

研究協力者：伊藤 敬（長崎大学・大学院医・生化学）

研究協力者：丹羽 正美（長崎大学・大学院医・神経感覚薬理学）

#### 〔研究要旨〕

プリオン病の確定診断には異常型プリオン蛋白(PrP<sup>Sc</sup>)の存在を証明することが必須とされている。このため、生前早期に確定診断をするための検査方法開発が急がれている。我々は尿中プロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白検出の診断的有用性、信頼性についてウエスタン・ブロット法、質量分析、およびアミノ酸配列解析法を用いて詳細に検討した。Shaked らが報告した 32kDa のシグナル(U PrP<sup>Sc</sup>)は検出されず、37kDa のプロテナーゼ K(PK)抵抗性蛋白シグナルが多くのプリオン病患者尿から検出された。このシグナルは 4 種類の異なる抗プリオン特異抗体によるウエスタン・ブロット法で検出されたが 2 次抗体のみでも検出され、非特異的な反応と判断された。質量分析および N 末端アミノ酸配列解析の結果、この 37kDa のシグナルは Enterobacteria の細胞外膜蛋白(OMP)であることがわかった。プリオン蛋白を含めてヒト由来の蛋白は検出されなかった。実験的に肺炎桿菌から抽出した OMP は PK 抵抗性を示し、複数種類の 2 次抗体と反応して約 37kDa のシグナルを生じることから、ウエスタン・ブロットなどの免疫学的手法でプリオン蛋白と誤認される可能性が示された。また SPF 条件で感染マウス尿からの UPrP<sup>Sc</sup> 検出を試みたところ、やはり緑膿菌由来の OMP がヒト同様に検出された。UPrP<sup>Sc</sup> 検出による診断には尿路感染による細菌性蛋白の混入が大きく影響するため、検出方法の改善が必要であると考えられた。

## 硬膜移植後 CJD：移植部位から進展した初発症状と DWI 異常像

研究協力者：佐藤 猛（東大和病院神経内科）

研究協力者：小林佐千夫（東大和病院神経内科）

研究協力者：増田眞之（東京医大第三内科）

#### 〔研究要旨〕

硬膜移植後 CJD の患者では移植部位に関連した症状で発症する患者の存在が指摘されているが、明確な関連性は不明であった。われわれは硬膜移植部位から DWI の異常所見が始まった CJD 例を経験した。この症例を契機として移植部位と初発症状との関連性を明らかにするため、従来の硬膜 CJD 症例 107 例についてカルテ、手術記録等の全記録の再調査を開始した。硬膜移植部位を小脳天幕上群(47 例)と天幕下群(60 例)とに分けて検討中であるが、天幕上群では移植部位を反映した反対側の片麻痺や同名半盲で初発したものが 11 例(22.4%)みられたのに、天幕下群では 0 であった。逆に脳幹症状で初発したものは天幕下群では 19 例(31.7%)、天幕上群では 2 例(4.3%)( $P=0.004$ )であった。硬膜 CJD では移植部位と初発症状との間に関連を示す症例が存在することを明らかにした。

## Creutzfeldt-Jakob 病における MRI 拡散強調画像の経時的変化

班 員：黒岩 義之（横浜市立大学・神経内科）

研究協力者：児矢野 繁（横浜市立大学・神経内科）

研究協力者：鈴木 瑞枝（横浜市立大学・神経内科）

#### 〔研究要旨〕

Creutzfeldt-Jakob 病（以下 CJD）において MRI 拡散強調画像（以下 DWI）は、CJD の早期診断に有効との見解が確立されてきた。今回、我々は CJD における病変がどのように拡がっていくのかを調べるために発症早期の臨床症候と DWI 信号強度との関連性から経時的变化を検討した。対称は当院および関連施設にて臨床的に probable CJD と診断された 7 症例（男性 3 人、女性 4 人、対象年齢 58～77 歳）。各症例で臨床症候と DWI 信号強度の経時的变化を同時に検討した。その結果、DWI の高信号域は皮質から始まり、同側基底核に出現し、その後対側の皮質、基底核に出現した。片側優位のミオクローヌスは、ミオクローヌス反対側の皮質、基底核がともに DWI で高信号を認める時期に出現し、病変が対側に移るときと同時期に反対側に出現した。以上より、プリオンによる脳の病変は片側から始まり対側へ伝播していく可能性が考えられた。ミオクローヌスは皮質、基底核がともに DWI で高信号を認める時期に出現していたが、DWI 上、病変が移行するときと同時期に反対側に出現したため、DWI はミオクローヌスの片側から対側への移行および消失までの経過を鮮明に捉えることができ、CJD の臨床症候の経時的变化をとらえる上で有用であった。

## GSS の画像診断について

班 員：湯浅 龍彦（国立精神神経センター国府台病院・神経内科）  
研究協力者：本田 聡（国立精神神経センター国府台病院・放射線科）  
研究協力者：西宮 仁（国立精神神経センター国府台病院・神経内科）  
研究協力者：根本 英明（国立精神神経センター国府台病院・神経内科）  
研究協力者：飛田 宗重（国立療養所宮城病院・神経内科）  
研究協力者：鈴木 博義（国立仙台病院・臨床検査科）

#### 〔研究要旨〕

GSS の画像診断について臨床経過との対応、variation について明らかにする。

## クロイツフェルト・ヤコブ病診断における拡散強調 MRI の優位性

研究協力者：志賀 裕正（東北大学・附属病院・神経内科）

#### 〔研究要旨〕

クロイツフェルト・ヤコブ(CJD)患者 26 名を対象に CJD 診断における拡散強調 MRI(DWI)の有用性を T2 強調画像(T2I), FLAIR-MRI(FLAIR)と比較検討した。DWI, T2I, FLAIR をそれぞれ 26 名, 22 名, 17 名に実施し、患者情報を知らせずに 2 名の神経放射線科医が独自に評価した。また非 CJD 進行性痴呆患者 32 名の DWI を同様に 2 名の神経放射線科医が評価し、CJD 診断における DWI の sensitivity と specificity を求めた。DWI の陽性率、一致率は T2I, FLAIR と比較して有意に高かった。DWI の

sensitivity, specificity はそれぞれ 92.3%, 93.3%であった。DWI は CJD 診断に有用な検査である。CJD 診断目的の MRI 検査として T2I, FLAIR のみでは不十分である。

## クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白(定性)と Tau 蛋白(定量)の診断における有用性

研究協力者：佐藤克也 (長崎大学・大学院医・神経病態制御学)  
研究協力者：調 漸 (長崎大学・大学院医・神経病態制御学)  
研究協力者：江口勝美 (長崎大学・大学院医・神経病態制御学)  
研究協力者：片峰 茂 (長崎大学・大学院医・感染分子病態学)  
研究協力者：西田教行 (長崎大学・大学院医・感染分子病態学)  
研究協力者：丹羽正美 (長崎大学・大学院医・神経感覚医学解析学)

### 〔研究要旨〕

CJD 患者における脳脊髄液を用いた生化学的補助診断法として 14-3-3 蛋白などの幾つかのマーカーの意義が報告されている。Otto らは 14-3-3 蛋白陰性例で Tau 蛋白の意義が高いと報告したが、我々は CJD 患者髄液中の 14-3-3 蛋白、Tau 蛋白(定量)とリン酸化 Tau 蛋白(定量)を測定し診断的意義を検討した。(方法) 対照群 (N=86) と CJD 患者(N=15)において髄液中の 14-3-3 蛋白(定性)と Tau 蛋白(定量)の診断の有効性について検討した。(結果) 脳脊髄液中 14-3-3 蛋白(定性)は対照群では 2 例のみ陽性、CJD 患者では全例陽性。脳脊髄液中 Tau 蛋白(定量)でも対照群(N=86)に比べ CJD 患者すべての症例で有意に高値であった。以上より CJD 患者脊髄液中の 14-3-3 蛋白の定性と Tau 蛋白(定量)の 2 つ診断のマーカーの利用は CJD 患者の有用であると考えられる。

## 日本のクロイツフェルト・ヤコブ病の診断における脳波、脳 MRI、14-3-3 蛋白の意義

研究協力者：袖山信幸 (東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学)  
班 長：水澤英洋 (東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学)  
班 員：山田正仁 (金沢大大学院脳老化・神経病態学)  
研究協力者：佐藤猛 (東大和病院神経内科)  
研究協力者：北本哲之 (東北大大学院病態神経学)  
班 員：中村好一 (自治医科大疫学・地域保健部門)  
研究協力者：黒岩義之 (横浜市立大神経内科)  
研究協力者：森若文雄 (北海道医療大学心理学部言語聴覚療法学科)  
研究協力者：志賀裕正 (東北大神経内科)  
研究協力者：武田雅俊 (大阪大大学院神経機能医学)  
研究協力者：西澤正豊 (新潟大脳研究所神経内科)

研究協力者：葛原茂樹（三重大神経内科）  
研究協力者：黒田重利（岡山大学院精神神経病態学）  
研究協力者：村井弘之（九州大学院脳神経病研究施設神経内科）  
研究協力者：村山繁雄（東京都老人総合研究所神経病理部門）  
研究協力者：立石潤（老人保健施設春風）  
班 員：堂浦克美（東北大学大学院プリオン蛋白分子解析分野）

#### 〔研究要旨〕

日本のサーベイランス調査での脳波(EEG)上の周期性同期性放電、脳MRI、脳脊髄液中の14-3-3蛋白のクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)の診断における意義と、診断基準に脳MRIまたは14-3-3蛋白を導入する妥当性について検討した。3検査のdefinite群における感度は71%から75%で類似していたが、全例群での施行率はEEG:99%、脳MRI:76%、14-3-3蛋白:36%と大きく異なっていた。Probableの診断基準に脳MRIか14-3-3蛋白を採用した場合、definite群で生前にprobableと診断される比率は脳MRIの場合90%、14-3-3蛋白の場合88%でほぼ同じであったが、possible群の症例のうち診断基準の変更によりprobableと診断される比率は脳MRIは49%、14-3-3蛋白は28%と脳MRIの方が影響が大きかった。文献的には14-3-3蛋白はCJD診断における感度・特異度はともに高いが、陽性予測率が低いとする報告があり、また、脳MRI拡散強調画像はその極めて高い有用性が少数例の検討ではあるが報告されている。偽陽性を生じる疾患は脳MRIの方が14-3-3蛋白より鑑別が容易と思われ、脳MRIが早期よりCJDに特徴的な所見を検出可能であることと考え合わせると、脳MRIの診断基準への採用を視野に入れる必要がある。

## 既存薬剤とその改変によるプリオン病治療法開発の試み-第二報-

研究協力者：調 漸（長崎大学・大学院医・神経病態制御学）  
研究協力者：佐藤克也（長崎大学・大学院医・神経病態制御学）  
研究協力者：江口勝美（長崎大学・大学院医・神経病態制御学）  
研究協力者：片峰 茂（長崎大学・大学院医・感染分子病態学）  
研究協力者：西田教行（長崎大学・大学院医・感染分子病態学）  
研究協力者：丹羽正美（長崎大学・大学院医・神経感覚医学解析学）  
研究協力者：片岡泰文（福岡大学・薬学部・薬学疾患管理学）

#### 〔研究要旨〕

我々はプリオン病の治療方策の開発を目指して 既存薬剤として quinacrine (キナクリン) と pentosan polysulfate (PPS) を選択し患者へ投与し治療効果の検討を行なっている。既に投与を終了したキナクリン使用例では覚醒度の向上、ミオクローヌスの頻度の減少、驚愕反応の一過性の軽快、脳波所見の一過性の軽快がみられたが、病勢の進行を遅延させることはできなかった。 既存薬剤の効果的投与法の改良として薬剤の血液脳関門機能を修飾することで脳移行性を高める目的でベラパミルの併用を行い髄液中のキナクリン濃度を検討した。 PPS の脳移行性を高める目的で PPS を酸加水分解処理しグリコシド結合を開裂させ低重合化した低分子量PPSを作成する試みを行ない、低分子PPSで抗プリオン作用を有する分画が分取でき、in vitro 血液脳関門モデルで一部脳に移行すると思われる分画を見出した。

## 遺伝性プリオン病 (P102L) に対するキナクリンとクロルプロマジンの併用療法

班 員：黒原和博 (佐賀大学・医・内科)  
班 員：山口加奈子  
班 員：黒田康夫

### 〔研究要旨〕

【目的】 遺伝性プリオン病に対するキナクリンとクロルプロマジンの併用療法の効果と安全性を検討する。

【対象】 65才、女性、遺伝子変異 P102L を有する Gerstmann-Strussler-Scheinker 病の患者。治療前には中等度痴呆、起立歩行不能の状態。【方法】 キナクリンとクロルプロマジン 1日量それぞれ 100mg、75mg を 3 カ月間経口投与した。神経学的所見、Mini-Mental State (MMS)、GBS 痴呆評価尺度 (GBSS)、脳波、頭部 MRI、脳血流シンチ、血液、脳脊髄液を経時的に観察して治療効果を評価した。【成績】 運動機能と知的機能の悪化はわずかであった。MMS は 15 から 11 に、GBSS は 74 から 92 に変化した。頭部 MRI、脳波、脳脊髄液所見に変化はなく、脳血流は軽度低下した。副作用として軽度の肝機能障害と高度の皮膚黄染が生じた。【結論】 キナクリンとクロルプロマジンの併用療法は遺伝性プリオン病の進行を抑制する可能性がある。

## クロイツフェルト・ヤコブ病に対する Quinacrine 治療

### — 31 症例における効果、副作用の分析 —

班 員：山田 達夫 (福岡大学内科学第 5 教室)  
班 員：堂浦 克美 (東北大学プリオン蛋白研究部門)  
研究協力者：坪井 義夫 (福岡大学内科学第 5 教室)  
研究協力者：中島 雅士 (福岡大学内科学第 5 教室)  
研究協力者：藤木 富士夫 (福岡大学内科学第 5 教室)  
研究協力者：山内 淳史 (福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室)  
研究協力者：片岡 泰文 (福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室)

### 〔研究要旨〕

クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) に対するキナクリンの効果および副作用の検討を行った。孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 22 例、医原性(硬膜移植後発症)CJD 5 例、及び遺伝性プリオン病 4 例の計 31 症例に、キナクリン 300 mg/日を経口または経管投与を行い、副作用出現により中止・中断されない限り原則として 12 週間連日投与とした。

臨床症状に部分的改善を認めた症例は 12 例 (39%) で、効果の平均持続期間は  $3.2 \pm 3.5$  週 (1~12 週) であった。効果はキナクリン投与が継続されていたにもかかわらず消退した。効果の内容は覚醒度

の改善、自発語の増加、固視反応の改善などであった。孤発性 CJD 症例においては、治療開始時に自発語や聴覚・視覚刺激に反応を認めた 10 例中の 8 例 (80%) に部分的改善を認めたが、無動性無言状態で治療を開始した 12 例では 1 例 (8%) にのみ効果を認めた。一方、医原性 CJD 症例では 5 例中 2 例 (40%) に覚醒度の改善を認めた。遺伝性プリオン病症例では 4 例のうち長期経過の 1 例 (GSS<sup>102</sup>) において効果を認めたが、他の 3 例(いずれも CJD<sup>200</sup>)では無効であった。

治療中止を余儀なくされた副作用として、肝機能障害を 16 例(52%)に、溶血性貧血、発熱、誤嚥、偽膜性大腸炎、および皮疹をそれぞれ 1 例に認めた。副作用症状はキナクリン投与中止後に全例で改善した。キナクリン投与中の死亡例として、投与開始 10 日目に誤嚥・窒息が疑われ死亡した 1 例と、12 週間を過ぎて継続投与中に突然死した 1 例を認めた。前者はキナクリン投与前から認めていた出血性胃潰瘍と嘔吐が死因に関与したと考えられた。後者は突然死の原因は不明であった。

今回の多施設における調査で、キナクリン治療がプリオン病患者において臨床的に短期間の部分的改善を示すことが明らかにされた。肝機能障害による中止例が多かった。早期例での治療効果の発現率が高いことより、キナクリン治療の適応症例を絞込む必要がある。今回認められた効果は、キナクリンの血中濃度が比較的低い治療早期であったことから、低用量での使用を検討する必要がある。

## ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与症例の経過報告

班 員：堂浦 克美 (東北大学・大学院医・プリオン蛋白分子解析)

研究協力者：坪井 義夫 (福岡大学・医学部・第 5 内科)

山本 正昭 (福岡大学・医学部・脳外科)

### 〔研究要旨〕

動物実験での脳室内ペントサンポリサルフェート持続注入療法の効果と安全性を踏まえ、英国の変異型ヤコブ病患者で臨床試験が行われた。進行期での治療開始であったが、ある程度の効果が観察された。これまでにこの治療法による副作用はまったく出現していない。患者で最大効果が期待できる安全投与量を如何に見つけるかが課題である。

## 抗 PrP 抗体を用いたプリオン感染動物摘発法の高度化

班 員：堀内 基広 (北海道大学・大学院獣医学研究科・プリオン病学講座)

研究協力者：小門 善正 (帯広畜産大学・獣医公衆衛生、(株)ベネシス)

### 〔研究要旨〕

PrP<sup>Sc</sup> 検出を指標としたプリオン感染動物スクリーニング法の高感度化を目的として、我々が確立した PrP<sup>Sc</sup> 検出用 captured-ELISA (OFR-ELISA) の改変を試みた。発色法による検出を、高感度化が期待できる化学発光法、あるいは時間分解蛍光法 (TRF) に変更して、プリオン感染動物脳組織から PrP<sup>Sc</sup> 検出の高感度化が可能か否かについて検討した。西洋わさびペルオキシダーゼの発光基質として Supersignal femto (PIERCE)、アルカリフォスファターゼの発光基質として CSPD/EM (TROPICX) を用いた。また、TRF にはヨーロピウム標識抗体を用いて、発色基質 TMB を使用する OFR-ELISA との検出感

度の比較を行った。スクレイピー感染マウス脳を非感染マウスで希釈した試料から PrP<sup>Sc</sup> 分画を調整して、それぞれの検出系における検出限界を調べた。その結果、TMB を使用する OFR-ELISA では 4<sup>-7</sup> 希釈、Supersignal femto で 4<sup>-7</sup> 希釈、CSPD/EM では 4<sup>-8</sup> 希釈、TRF で 4<sup>-8</sup> 希釈まで PrP<sup>Sc</sup> が検出可能であった。化学発光基質 CSPD/EM の導入により、PrP<sup>Sc</sup> の検出感度が 4 倍程度上昇することが判明した。使用したスクレイピー感染脳組織は 5 x 10<sup>5</sup> LD<sub>50</sub>/mg の感染価を有していることから、約 7LD<sub>50</sub>/mg 以上のプリオンを含む脳組織を摘発可能である。さらに、試料調製法にリンタングステン酸法を使用すると、4 倍感度が上昇し、4<sup>-9</sup> 希釈まで PrP<sup>Sc</sup> を検出可能であった。BSE 感染牛脳からの PrP<sup>Sc</sup> 検出に於ても、CSPD/EM を使用した化学発光法が OFR-ELISA よりも 4 倍程度高感度であった。

## ヒト異常プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体作製の試み

研究協力者: 田中智之(堺市衛生研究所)

研究協力者: 北元憲利(姫路工業大学環境人間学部)

班 員: 毛利資郎(九州大学大学院動物実験施設実験動物学)

研究協力者: 北本哲之(東北大学大学院医学系研究科病態神経学分野)

### 〔研究要旨〕

sCJD 患者剖検脳から抽出したヒト型異常プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体の作製を試みた。剖検小脳凍結切片陽性、パラフィン切片陰性あるいは染色性低下をスクリーニング判定条件とした。

#5KT および #131KT クローンが条件を満たした。クロンの腹水化とともに Western blotting を含めたさらなる解析が進行中である。

## プリオン病モデルマウスとヒト・プリオン伝達試験 (2)

班 員: 毛利資郎(九州大学・大学院医・実験動物学)

班 員: 三好一郎(名古屋市立大学・大学院医・実験動物研究教育センター)

研究協力者: 松浦裕一(九州大学・大学院医・実験動物学)

研究協力者: 北本哲之(東北大学・大学院医・創生応用医学・プリオン蛋白研究部門)

### 〔研究要旨〕

われわれの開発したヒト/マウスキメラ型遺伝子ノックインプリオン病モデルマウス(Ki-ChM)はヒト・プリオンに対して高い感受性を示し、濾胞樹状細胞(FDC)における異常プリオン蛋白の早期沈着を検出することによる新しいバイオアッセイ法を提供した。しかしながら、硬膜移植によるとされているにもかかわらずクロイツフェルト・ヤコブ病のブランク型など、このマウスでは検出できないプリオンの存在も明らかになった。本年度は、感染性検出のさらなる向上を目指して作られたヒト型プリオン蛋白を産生するノックインマウス(Ki-Hu129M-)に対して、硬膜移植後CJDブランク型プリオン接種をおこなった。その結果、FDCに異常なプリオン蛋白沈着が認められ、脳内接種による伝達も確認され、Ki-ChMマウスでは検出できなかった硬膜移植後CJDブランク型プリオンも検出できるよう

になった。このことにより、硬膜移植後 CJD は 2 タイプとも感染性のプリオン病であることが明らかになった。

## 分泌型プリオン蛋白発現トランスジェニックマウスにおけるプリオン病の解析

班 員：村本 環（東北大学・大学院医・CJD 早期診断・治療法開発分野）  
班 員：三好 一郎（名古屋市立大学・大学院医・実験動物研究教育センター）  
班 員：毛利 資郎（九州大学・大学院医・実験動物学講座）  
研究協力者：北本 哲之（東北大学・大学院医・CJD 早期診断・治療法開発分野）

### 〔研究要旨〕

Glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカーを欠く分泌型変異プリオン蛋白 (PrP) を発現するトランスジェニックマウスを作製した。同マウスを PrP ノックアウトマウスと交配することにより野性型 PrP の発現を除いた後、プリオン接種実験を行った。プリオンを接種されたマウスの脳組織内には蛋白分解酵素耐性の分泌型 PrP の蓄積、多数の PrP アミロイド沈着、およびプリオンの増殖が認められた。一方、プリオン病の典型的所見である灰白質へのびまん性異常 PrP 沈着や海綿状変性には乏しく、マウスは接種後 400-500 日以上、典型的な神経障害症候を呈することなく生存可能であった。正常マウス脳を接種されたトランスジェニックマウスの脳組織には異常型 PrP の蓄積や PrP アミロイド沈着は検出されなかった。本研究のデータから、PrP の異常化、PrP によるプリオン形成・アミロイド形成には GPI アンカーは必要ないことが明らかとなった。一方、異常型 PrP による神経変性惹起には GPI アンカーが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

## マイクロドメイン (マイクロドメイン) とプリオン感受性

班 員：三好 一郎（名古屋市立大学・大学院医・実験動物研究教育センター）  
班 員：毛利 資郎（九州大学・大学院医・実験動物学）  
研究協力者：宮本 智美（名古屋市立大学・大学院医・実験動物研究教育センター）  
研究協力者：岡村 匡史（東北大学・大学院医・動物実験施設）  
研究協力者：北本 哲之（東北大学・大学院医・創生応用研・プリオン蛋白）  
研究協力者：平林 義雄（理研・脳科学・神経回路）

### 〔研究要旨〕

ヒトグルコシルセラミド合成酵素 (Ugcs) を高発現するトランスジェニックマウスを用い、スフィンゴ糖脂質合成系の活性化が、プリオンタンパク (PrP) の局在する生体膜のマイクロドメインの構造や機能に変化を導き、結果としてプリオンに対する感受性を修飾することが出来るか感染実験を行い検討した。期待に反して、対照群と顕著な相違は見られず、PrP の伝播の過程に影響が出る程度までマイクロドメインの構造を変化させるには発現する酵素活性が不十分と考えられた。また、プリオンの感



染によって異常感染型プリオンタンパク (PrP<sup>Sc</sup>) が検出される臓器を中心に (脳および脾臓, 血液細胞), 特に感染初期にマイクロアレイを用いてマイクロドメインに関連する遺伝子の発現プロファイリングを行った。遺伝子の発現は脾臓, 脳の順に経時的に変動し類似性が見られた。

## 正常プリオン蛋白質のアポトーシス抑制機能に関する研究

班 員：佐伯 圭一 (東京大学・大学院農・応用免疫)

研究協力者：作道 章一 (東京大学・大学院農・応用免疫)

研究協力者：小野寺 節 (東京大学・大学院農・応用免疫)

### [研究要旨]

我々は、これまでにプリオン蛋白質 (PrP) の機能解析により PrP は神経細胞の生存維持に関わっていることを明らかにしてきた。本年度は PrP のアポトーシス抑制機能部位について解析検討した。PrP 遺伝子欠損不死化神経細胞株に N 末端のオクタリピート領域欠損 PrP cDNA (PrP $\Delta$ 53-94 cDNA) もしくは疎水性領域欠損 PrP cDNA (PrP $\Delta$ 95-132 cDNA) を導入したところ、PrP cDNA を再導入した細胞株で認められる無血清培地培養下でのアポトーシス抑制が認められなかった。一方、PrP $\Delta$ 124-146 にはアポトーシス抑制効果が確認された。また、PrP 様蛋白質 (PrPLP/Dpl) にはアポトーシス抑制効果が認められなかった。PrPLP/Dpl に PrP オクタリピート領域もしくはオクタリピート領域+疎水性領域を融合させた蛋白質 (PrP(1-95)-PrPLP/Dpl および PrP(1-124)-PrPLP/Dpl) を発現するそれぞれのキメラ cDNA を作成し、これらの蛋白質のアポトーシス抑制効果を調べた。その結果、PrP(1-124)-PrPLP/Dpl にはアポトーシス抑制効果が認められたが、PrP(1-95)-PrPLP/Dpl には、アポトーシス抑制効果が観察されなかった。これらの結果から PrP のアポトーシス抑制効果にはオクタリピート領域だけでなく疎水性領域も重要であることが示唆された。

## 変異 PrP によるプリオン株の生物学的性質の解析

班 員：坂口 末廣 (長崎大学・大学院医歯薬・感染分子病態)

研究協力者：新 竜一郎 (長崎大学・大学院医歯薬・感染分子病態)

研究協力者：西田 教行 (長崎大学・大学院医歯薬・感染分子病態)

研究協力者：片峰 茂 (長崎大学・大学院医歯薬・感染分子病態)

### [研究要旨]

我々は、2 種類のマウス順応プリオン株である Chandler 株及び 22L 株の持続感染細胞を用いて、プリオン株の分子生物学的性質の違いを見出すことを試みた。具体的には、異種 (ハムスター, ヒト) のプリオン蛋白質 (PrP) 及び単一アミノ酸変異を有するマウス PrP を感染細胞に遺伝子導入し、それらの異常型 PrP (PrP<sup>Sc</sup>) への変換とマウス PrP に対する変換抑制効果について検討した。その結果、興味深いことに、Q185R と Q218K マウス変異 PrP は、それぞれの感染細胞にて、異なる変換効率及び抑制効果を示した。この結果は、プリオン株特異的な変換機構が存在することを示唆した。

## 動物におけるアミロイドーシス：その伝播の可能性に関する研究

班 長：水澤英洋（東京医科歯科大・大学院・脳神経機能病態学）  
研究協力者：池田修一（信州大学・医学部・第三内科）  
研究協力者：樋口京一（信州大学・医学部加齢適応研究センター・脈管病態分野）  
研究協力者：松井高峯（帯広畜産大学・獣医学部・家畜病理学）  
研究協力者：石原得博（山口大学・医学部・構造制御病態学）

### 〔研究要旨〕

老化促進マウスアミロイドーシス(SAM)の研究から、アミロイド細線維の経静脈的または経口的投与により本疾患のアミロイドーシスが個体間で伝播することが明らかとなった。またその機序はプリオン病に類似していると推測されている。仮にこうした現象が家畜のアミロイドーシスでも当てはまるとすると、食肉を介して動物のアミロイドーシスが人にも影響しかねないことが懸念される。そこでアミロイドーシスに関する二つの研究班ではアミロイドーシスが個体間で伝播する機序の詳細を解明するとともに、わが国における家畜、特に高齢牛における全身性アミロイドーシスの実態を把握することを目指している。

## 正常プリオン蛋白質関連因子に関する研究

班 員：金子 清俊（国立精神・神経センター 神経研究所・疾病研究第七部）  
研究協力者：逆瀬川裕二、八谷 如美（同・疾病研究第七部）

### 〔研究要旨〕

正常型プリオン蛋白質の生理的切断部位は、感染型プリオン蛋白質立体構造の鍵となる  $\beta$  シート領域と重なり、しかも極めて疎水性の高い部分に位置するため、正常プリオン蛋白質分解酵素がアクセスする際及び感染型プリオン蛋白質への変換の際に、何らかの分子シャペロン様分子の関与が示唆される。

さらに、この分子は通常分子シャペロンとは異なり、misfold された分子ではなく正常に folding された分子を認識するという概念が大きく異なる。我々は、正常に folding された分子を認識し、それを unfold する活性を検出する系を出芽酵母を用いて確立した結果、新しい概念に属するシャペロン様分子を同定し、“Unfoldin” と命名した。本分子の *in vitro* 及び *in vivo* における詳細な機能解析の結果、新規クラスの分子シャペロンとしての特徴を備えていることが示唆された。

## 亜急性硬化性全脳炎（SSPE）のインターフェロン療法の経過

班 員：二瓶健次（国立成育医療センター神経）  
研究協力者：飯沼一字（東北大学・大学院医・小児科）

研究協力者：岡 鉄次（岡山大学・大学院医・発達神経病態）

#### 〔研究要旨〕

亜急性硬化性全脳炎（SSPE）の治療法はいまだ確立されていないが、免疫賦活作用があるとされているイノシンプラノベクス（INP）の経口投与と抗ウイルス作用があるとされているインターフェロンの髄腔内投与が現在もっとも有用な治療とされている。本邦でこれらの治療が認可されて以来4年が経過した。そこでこれらの治療の長期的な経過を知る目的で、SSPEと診断され上記の治療を行った39例について検討した。評価は22個の臨床症状を5段階評価（0から4点）しその合計により点数化し、治療後の点数の経過を調べた。

治療後改善を示した例が7例（18%）、一時悪化した但其の後改善を示した例が3例（7.7%）、一時改善したがその後悪化した例が4例（10.3%）、ほとんど変化が見られなかった例が7例（18%）、治療にもかかわらず悪化した例が18例（46%）であった。長期的に見ても改善を示す例が25.7%に見られ、有用な治療法と考えられた。しかし一方で一時的に改善を示すがその後悪化する例や全く治療に反応しない例があわせて56.3%に見られ、今後の治療法の開発が望まれる。

## 亜急性硬化性全脳炎（SSPE）に対するリバビリン併用療法に関する全国調査（第3回報告）

班 員：二瓶 健次（国立成育医療センター・小児神経科）  
班 員：細矢 光亮（福島県立医科大学・医・小児科）  
研究協力者：野村 恵子（熊本大学・医・発達小児科）  
研究協力者：田中 美保（熊本大学・医・発達小児科）  
研究協力者：大村 孝文（熊本大学医学部附属病院・臨床薬剤部）  
研究協力者：澤石 由起夫（秋田大学・医・小児科）  
研究協力者：白石 晴士（公立多良木病院・小児科）  
研究協力者：森 健治（徳島大学・医・小児科）  
研究協力者：加藤 善一郎（岐阜大学・医・小児病態科）  
研究協力者：西尾 寿乗（県立宮崎病院・小児科）  
研究協力者：武下 草生子（横浜市立大学市民総合医療センター・小児科）  
研究協力者：遠山 潤（国立療養所西新潟中央病院・小児科）  
研究協力者：神尾 範子（大阪大学・医・小児科）  
研究協力者：鈴木 由香（愛媛大学・医・小児科）  
研究協力者：三池 輝久（熊本大学・医・発達小児科）

#### 〔研究要旨〕

亜急性硬化性全脳炎（SSPE）に対するインターフェロン（IFN）とリバビリンの併用療法に関して、臨床改善度や治療中に認められた有害事象を中心に、全国10施設の11症例に対して臨床調査を行った。その結果、NDI臨床症状スコア上改善7名、不変2名、増悪2名であり、女性の方が改善している印象にあった。今回の調査では、リバビリン治療を開始するまでの罹病期間と治療効果には明らかな相関はなかった。このことは、例え早期に治療開始できたとしても症状が急速に進行してしまい、効果を得られない症例があることを示唆している。治療効果の有無とは別に、12ヶ月未満で麻疹に罹

患している症例は、最終的な臨床症状スコアが高い傾向にあった。治療効果判定については、NDI 臨床症状スコアの変化と主治医の印象は必ずしも一致しておらず、より客観的な指標の必要性を感じた。この治療で見られる有害事象は、傾眠傾向、発熱、口唇腫脹、全身倦怠感等があったが、いずれも一過性で、重篤なものではなかった。しかし、リバビリンが安全域が非常に狭いという特徴を持つ以上、髄液中濃度のモニタリングや有害事象の把握に努め、より安全で有効な治療の確立を目指す必要があると考えられた。

## SSPE に対するリバビリン脳室内投与療法

班 員：細矢 光亮（福島県立医科大学・医・小児科）

### 〔研究要旨〕

これまでリバビリン脳室内投与療法を行った施設の担当医が集まり詳細な症例検討を行い、本療法の有効性と問題点を検討した。その結果、Jabbour の分類でⅡ期に治療を開始した場合には臨床症状に明らかな改善が認められたが、Ⅲ期に治療を開始した場合には髄液中麻疹抗体価が低下しても病期が改善するほどの効果は見られなかった。また、治療開始前に急速に症状が進行した症例ではその進行を阻止することができず、臨床的な効果は認められなかった。リバビリン脳室内投与療法には重大な副作用はなく、特に病期の早い時期に治療を開始した症例では臨床的有効性が確認された。従って、SSPE を早期に診断し可塑性のある時期に治療を開始することが、予後の改善につながると思われた。

## SSPE における宿主側遺伝要因の解析

研究協力者：楠原 浩一（九州大学・大学院医・成長発達医学）

研究協力者：吉良 龍太郎（九州大学・大学院医・成長発達医学）

研究協力者：原 寿郎（九州大学・大学院医・成長発達医学）

### 〔研究要旨〕

SSPE は麻疹ウイルス(MV)による進行性の中枢神経感染症である。その発症機序には不明な点が多いが、ウイルス側要因と宿主側要因の双方が関与していると考えられる。我々は、SSPE の宿主側遺伝要因を明らかにするために、(1) MV の細胞レセプター [CD46, signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)]、(2) 抗ウイルス蛋白 [MxA]、(3) T helper (Th)1 および Th2 サイトカインとそれらに関連した分子 [IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$  receptor1 (INF- $\gamma$  R1), IFN- $\gamma$  R2, interferon regulatory factor-1 (IRF-1), IL-12R $\beta$ 1, IL-4, IL-4R, IL-10]、の各遺伝子の多型と日本人の SSPE との関連を association study により検討した。MV receptor の遺伝子と SSPE との関連はみとめられなかったが、MV に対する免疫に関わる遺伝子の中に SSPE と関連しているものが見出された。innate immunity については、MxA promoter 88G/T 多型の解析にて、T allele と T/T homozygote の頻度が SSPE 群で有意に高く、また、機能解析では 88 T allele が G allele より高い転写活性を示した。この結果より、88G/T 多型が MxA の発現制御を介して SSPE の発症に寄与している可能性が示唆された。adaptive immunity については、IL-4 590 C/T 多型の T allele と少なくとも一つの interferon regulatory factor-1