

わが国では、先に日和見感染症を発症してエイズと診断されるケースが多いと考えられている。そのためHAARTを開始する前に日和見感染症を治療する必要があり、クリプトコッカス髄膜炎の場合はその治療に難渋することも少なくない。そのため、今回得られた研究成果からは、このような症例において抗真菌薬とCpG-ODNとの併用治療が新たな治療オプションとして臨床応用できる可能性が考えられる。実際、悪性疾患やB型肝炎ウイルスワクチンにおいてCpG-ODNを用いた臨床試験が開始されており、その有効性が報告されている。一方、Pappasら¹⁴⁾は、エイズ合併難治性クリプトコッカス髄膜炎患者を対象として、抗真菌薬を用いた標準化学療法におけるIFN- γ のアジュバント効果について臨床試験を実施した。その結果彼らは、IFN- γ が重篤な副作用もなく化学療法の治療効果を増強できたと報告している。我々のこれまでの研究から、CpG-ODNのこのような臨床応用に関してもその有用性が期待できるものと考えている。

これまでの研究結果からは、MPを抗原として用いたクリプトコッカスワクチンの開発を考える上で、CpG-ODNがより効果を高めるためのアジュバントとして有用である可能性を示唆している。しかし、HIV感染者では経過とともにCD4+T細胞数が減少するため、HAART前にワクチンを実施してもその効果が期待できない可能性が高い。一方、HAART後にはCD4+T細胞数の上昇とともにその機能が回復することが示されており、インフルエンザワクチンに対する反応性も増加するとの報告もみられる¹⁵⁾。したがって、HAART後にワクチンを接種することによって、クリプトコッカスに対する感染防御免疫を賦与することで、生涯必要とされる抗真菌薬の投与を中断でき、再燃から免れることができれば意義のあることだと考えられる。図4にHIV感染者に合併する難治性クリプトコッカス感染者におけるCpG-ODNの臨床応用の可能性についてまとめて示している。ただ、CpG-ODNによって免疫系が賦活されることでHAARTにともなう免疫再構築症候群を顕在化してしまう可能性も懸念され、今後より注意深い解析が必要である。

結論

CpG-ODNは単独投与でも致死性クリプトコッ

カス症マウスモデルにおいて感染防御効果を示すが、抗真菌薬であるFLCZと併用することでさらにその効果が増強し、FLCZ単独投与よりも有意に高い治療効果を示した。*in vitro*での検討でも、CpG-ODNはマウス及びヒト樹状細胞からのIL-12産生を誘導するとともに、クリプトコッカス菌体成分刺激による樹状細胞からのIL-12産生をさらに増強した。これらの結果から、CpG-ODNはエイズに合併する難治性クリプトコッカス症に対して抗真菌化学療法におけるアジュバント薬として有用である可能性が考えられた。

参考文献

- 1) Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 6546-49, 1995.
- 2) Arthur M, Krieg AM, Hermann W: Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA. *Immunol Today* 21: 521-26, 2000.
- 3) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S: A toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740-45, 2000.
- 4) Lim TS, Murphy JW: Transfer of immunity to cryptococcosis by T-enriched splenic lymphocytes from *Cryptococcus neoformans* sensitized mice. *Infect Immun* 30: 5-11, 1980.
- 5) Kawakami K, Tohyama M, Teruya K, Kudaken N, Xie Q, Saito A: Contribution of interferon-gamma in protecting mice during pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 13: 123-30, 1996.
- 6) Kawakami K, Tohyama M, Xie Q, Saito A: IL-12 protects mice against pulmonary and disseminated infection caused by *Cryptococcus neoformans*. *Clin Exp Immunol* 104: 208-14, 1996.
- 7) Kawakami K, Qureshi MH, Zhang T, Okamura H, Kurimoto M, Saito A: IL-18 protects mice against pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* by inducing IFN- γ production. *J Immunol* 159: 5528-5534, 1997.
- 8) Kawakami K, Koguchi Y, Qureshi MH, Miyazato A, Yara S, Kinjo Y, Iwakura Y, Takeda K, Akira S, Kurimoto M, Saito A: IL-18 contributes to host resistance against infection with *Cryptococcus neoformans* in mice with defective IL-12 synthesis through induction of IFN- γ production by NK cells. *J Immunol* 165: 941-947, 2000.

- 9) Kawakami K: Interleukin-18 and host defense against infectious pathogens. *J Immunother.* 25:S12-9, 2002.
 - 10) Kawakami K: Promising immunotherapies with Th1-related cytokines against infectious diseases. *J Infect Chemother.* 9: 201-209, 2003.
 - 11) Miyagi K, Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, Kinjo T, Nakamura K, Saito A: CpG-oligodeoxynucleotides promote the host protective response against infection with *Cryptococcus neoformans* through induction of interferon-gamma production by CD⁴⁺ T cells. *Clin Exp Immunol.* 140: 220-229, 2005.
 - 12) Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, Pappas PG, Perfect JR, Powderly WG, Sobel JD, Dismukes WE: Practice guidelines for the management of cryptococcal diseases. *Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis.* 2000; 30: 710-8.
 - 13) Robinson PA, Bauer M, Leal MA, Evans SG, Holtom PD, Diamond DA, Leedom JM, Larsen RA: Early mycological treatment failure in AIDS-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis.* 28: 82-92, 1999.
 - 14) Pappas PG, Bustamante B, Ticona E, Hamill RJ, Johnson PC, Rebolini A, Aberg J, Hasbun R, Hsu HH. Recombinant interferon-gamma 1b as adjunctive therapy for AIDS-related acute cryptococcal meningitis. *J Infect Dis.* 189: 2185-2191, 2004.
 - 15) Kroon FP, Rimmelzwaan GF, Roos MT, Osterhaus AD, Hamann D, Miedema F, van Dissel JT: Restored humoral immune response to influenza vaccination in HIV-infected adults treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 12:F217, 1998.
- 3) Nakamura K, Miyagi K, Koguchi Y, Kinjo Y, Uezu K, Kinjo T, Akamine M, Fujita J, Kawamura I, Mitsuyama M, Adachi Y, Ohno N, Takeda K, Akira S, Miyazato A, Kaku M, Kawakami K: Limited contribution of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 to the host defense response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* in press.

学会発表

- 1) Kawakami K: DC-based host protection from lethal infection with *Cryptococcus neoformans*. *In Symposium: Innate and acquired host immune responses. The 6th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis, Boston, June 2005.*
- 2) 川上和義：クリプトコッカス感染における Th1-Th2 サイトカインバランスと自然免疫リンパ球による協調的制御。シンポジウム「感染症とインターフェロン・サイトカイン」、第 70 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2005 年 7 月。
- 3) 宮里明子、川上和義：生体防御能の制御によるエイズ合併日和見感染症へのアプローチ。シンポジウム「生体防御機能によるエイズ制御」、第 16 回日本生体防御学会学術集会、東京、2005 年 8 月。
- 4) 川上和義：自然免疫リンパ球による真菌感染防御能の協調的制御。シンポジウム「真菌感染と自然免疫」、第 49 回日本医真菌学会総会、千葉、2005 年 10 月。

知的財産権の出願・登録状況

特になし。

健康危険情報

特になし。

研究発表

論文発表

- 1) Miyagi K, Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, Kinjo T, Nakamura K, Saito A: CpG oligodeoxy nucleotides promote the host protective response against infection with *Cryptococcus neoformans* through induction of interferon-gamma production by CD⁴⁺ T cells. *Clin Exp Immunol.* 140: 220-229, 2005.
- 2) Kawakami K: Innate immunity in the lungs to cryptococcal infection. *In: Fungal Immunology: From an organ perspective* (Eds. Fidel, P., and Haffnagle G. B.), Springer, New York, pp. 135-

Cryptococcus neoformans の病原因子探索に関する研究

分担研究者：河野 茂

(長崎大学大学院医学研究科 感染分子病態学講座病態生理制御学分野)

研究協力者：小林 奨¹、泉川 公一¹、宮崎 義継¹、塚本 美鈴²

(¹長崎大学大学院医学研究科 感染分子病態学講座病態生理制御学分野、

²長崎大学医学部歯学部附属病院第二内科)

■研究要旨 クリプトコックスの RNA のうち *in vivo* において発現量が増加している遺伝子を同定し、そのうちの一つである cis-prenyltransferase 遺伝子のノックアウト株 (B4500CISD 株) を作成したところ、このノックアウト株では 37℃ における *in vitro* 発育能が低下したことを報告した。マウスモデルにおける *in vitro* 病原性では、全身感染の場合には病原性が増強し、気道感染症では病原性が低下する傾向が認められた。ヒト感染におけるこの病原因子を検討する目的で、HIV 患者の脳脊髄液から分離された *C. neoformans* 株 5 株と肺クリプトコックス症患者から分離された *C. neoformans* 5 株、環境分離株 5 株における cis-prenyltransferase 遺伝子の発現量を比較したところ、明かな発現の違いは認められなかった。また、他の病原因子として laccase とアルコールデヒドロゲナーゼの発現を比較し、laccase では HIV 患者分離株で発現が低い傾向がみられた。

研究目的

Cryptococcus neoformans は AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) や悪性腫瘍に対する化学療法、免疫抑制剤の使用による免疫抑制状態の患者のみならず、健常者にも感染する病原真菌である。その病原因子として、莢膜 (*CAP59I*)、*CAP60*²)、*CAP64*³)、*MAN1*⁴)、メラニン (*CNLAC1*⁵)、交配型 (*MATα*⁶)、*STE11α*⁷)、*STE12α*⁸)、*STE20α*⁹)、37℃ での発育能 (*CNA1*¹⁰)、*RAS1*¹¹)、ホスホリパーゼ (*PLB1*¹²) などが現在まで明らかにされているが、いずれも真菌血症モデルにおける病原因子である。しかし、*C. neoformans* は先ず経気道的に感染することが知られており、侵入門戸である肺における *C. neoformans* の定着や増殖に関する病原因子の存在が予測される。我々は、本研究班においてマウスの肺クリ

プトコックス症モデルを用い、肺感染時に発現量が増加する *C. neoformans* の病原遺伝子の同定を行い報告した¹³)。これらの病原因子のうち *CNLAC1*、cis-prenyltransferase 遺伝子、また機能が不明の遺伝子 CNPPF10 に関する発現を、HIV 患者から分離された株と非 HIV 患分離株、および環境株において比較を行った。

研究方法

1. 使用菌株

C. neoformans の気道由来株 5 株、HIV 患者の脳脊髄液から分離された株 5 株、環境由来株。対照として、B4500 および B4500 の cis-prenyltransferase 遺伝子破壊株である B4500CISD、YC5 および YC5 のマウス passage によりマウス生存を短縮させる YC5SPF 株。

2. RNA 抽出および cDNA 作成

C. neoformans 株のフローゼンストック (-80 °C) よりサブロー培地を用いて 30 °C で二日間培養。シングルコロニーからクロラムフェニコール 100µg/ml を添加した YPD(Yeast Extract Polypepton D-glucose)液体培地にて over night で培養。さらに新しい培地内で、OD₆₀₀ = 0.2 から 1.0 まで増菌した。集菌し RNA は FastRNA™ Kit-RED (BIO101) を用いて抽出した。逆転写は TaqMan OneStep RT-PCR MasterKit を用いて 2µg の検体 RNA から cDNA の作成を行った。

3. 定量的 real-time PCR

定量的 PCR は 7500Fast Real Time PCRsystem (ABI) を用いて施行した。プライマーは *CNLAC1*、cis-prenyltransferase 遺伝子、また機能が不明の遺伝子 CNPPF10 の配列から作成した。検量線作成のための対照サンプルのコピー数を算出した (測定する各遺伝子のサンプル DNA の量を測定し、当該遺伝子片がサブクローニングされている pCRscript の分子量と各遺伝子の配列から計算されるプラスミドの分子量とからコピー数を求めた)。菌の内因性のコントロールとしては actin を用いた。PCR のプロトコルは、initial denature 95 °C 10 分の後、denature 95 °C 10 秒、annealing はそれぞれ 60 °C (actin と *CNLAC1*)、64 °C (actin と cis-

prenyltransferase 遺伝子、actin と CNPPF10) で 5 秒、extension 72 °C 10 秒を 40 サイクル行った。尚、各遺伝子の同一株における発現は同一条件で 3 ~ 5 回行った。

研究結果

1. 生体内 passage による発現の変化 (YC5 と YC5SPF)

YC5 に対する YC5SPF における cis - prenyltransferase 遺伝子の発現量の比は、 2.9 ± 0.2 であり、YC5SPF が相対的に高値であった。

2. HIV 患者分離株における cis - prenyltransferase 遺伝子の発現量

HIV 患者分離株と非 HIV 患者からの臨床分離株における発現量に有意な差は認められなかった。一方、環境分離株における発現量は臨床分離株と比較して低い傾向にあった。HIV 患者分離株において発現量の高い株が存在していた (図 1)。

3. HIV 患者分離株における laccase、アルコールデヒドロゲナーゼ、機能不明の蛋白に関する発現量

アルコールデヒドロゲナーゼは HIV 患者分離株において発現の高い株が存在したが、全体として非 HIV 患者分離株や環境株と比較してほぼ同等で

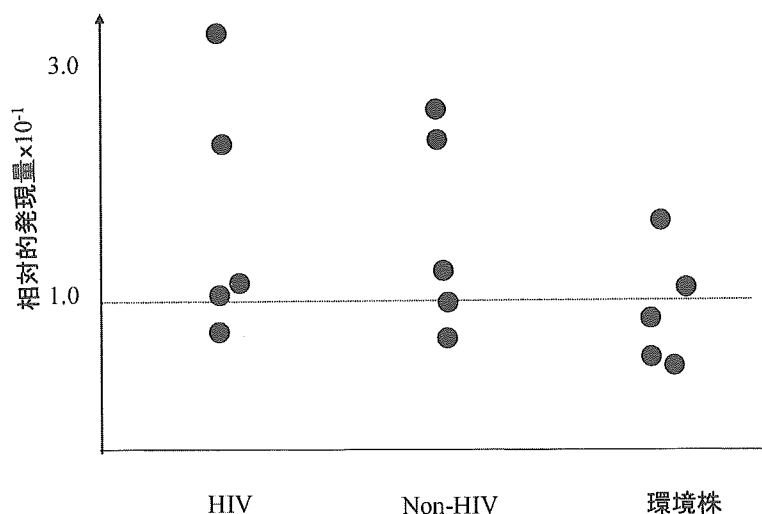


図 1. *Cyptococcus neoformans* における cis-prenyltransferase 遺伝子の発現量

あった。LaccaseはHIV患者分離株は非HIV患者分離株と比較して低い傾向にあったが、環境分離株と比較すると臨床分離株全体が高い傾向であった。CNPPF10は、laccaseやアルコールデヒドロゲナーゼと比較して発現量が一般的に低かったが、臨床分離株と環境株の間で違いは認められなかった。HIV患者分離株と非HIV患者分離株の間でも同様であった(図2)。

結論および展望

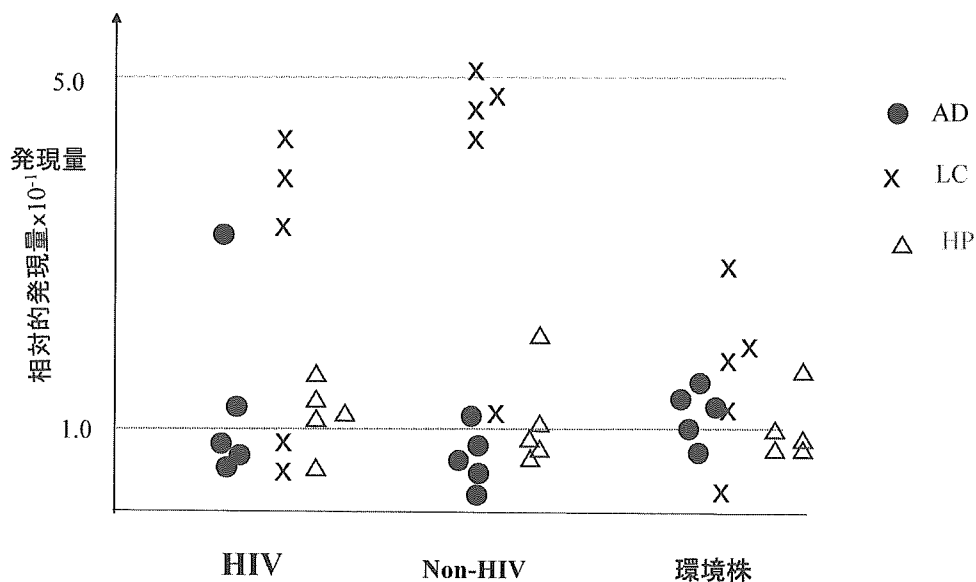
我々はマウスの *in vivo* passage モデルにおいて、一度目の passage では生存期間に有意な差はみられなかったが、二度目の passage で有意な差をもって生存期間を短縮させる *C. neoformans* 株を作成した。YC-5株とYC-5SPF株間での表現形には変化が見られなかったが、マウスの生存期間が変化したのは何らかの病原因子発現が増強したためであると推定し、PCR Subtraction法により発現が増強した因子として、Laccaseやアルコールデヒドロゲナーゼ、*cis*-prenyltransferaseなどの結果をえたが¹³⁾、これらの遺伝子の発現量は数倍に増加していることが今回確認された。

Realtime-PCRを用いた定量的遺伝子測定方法は *C. neoformans* の capsule gene で報告されており¹⁴⁾、我々も actin を相対発現量の対照に用い、報告

に従った。アクチンを対照とした場合には、今回測定した遺伝子の発現量は相対的に低いため誤差が懸念されたが、全く同一の条件で測定した場合には高い再現性が確認された(データ非表示)。このことから、比較的簡便に遺伝子の発現量を測定できる realtime-PCR は有用であった。

Cis-prenyltransferase の遺伝子破壊株では中枢神経系における病原性が高まることが示され¹³⁾、*Cis*-prenyltransferase が中枢神経系における病原性に抑制的に働く可能性も考えられるが、今回の検討では HIV 患者由来株では *Cis*-prenyltransferase の発現が増加している株が認められた。このことは HIV 患者分離株では必ずしも病原性の高い株ばかりでは無く、むしろ低病原性の株があることが示唆された。ただし、HIV 患者の分離株か否かに無関係に臨床分離株は、環境分離株と比較した場合には高い発現量である傾向が示された。

Laccase は *C. neoformans* の病原因子として広く認知されているが、代謝物が宿主免疫からの酸化ストレスに対する還元剤として働くことが病原因子の一つと考えられている。Laccase の発現量が HIV 患者分離株では非 HIV 患者分離株と比較して低い傾向にあった理由の一つとして、HIV 患者では宿主免疫細胞の酸化的殺菌能が低下していることとの関連が示唆された。



AD: aldehyde dehydrogenase, LC; laccase, HP: CNPPF10.

図2. *Cryptococcus neoformans* における各種病原遺伝子の発現量

また、アルコールデヒドロゲナーゼや機能が不明な遺伝子の中には、HIV患者由来である点や環境株であることが、何ら発現に影響しない因子もあることが示唆された。

検討株数が少なく、統計学的に意味のある検証は今後の課題であるが、今回の検討ではHIV患者由来株の*C. neoformans*株は免疫異常の無い患者の肺クリプトコックス症患者の分離株と比較して、laccaseやcis-prenyl transferaseなどの病原因子の発現が必ずしも高くない傾向があることが推察された。

参考文献

- 1) Chang YC, Kwon-Chung KJ.: Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol.* 14: 4912-9 (1994).
- 2) Moore TD, Edman JC.: The alpha-mating type locus of *Cryptococcus neoformans* contains a peptide pheromone gene. *Mol Cell Biol.* 13: 1962-70 (1993).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) Williamson PR.: Biochemical and Molecular Characterization of the Diphenol Oxidase of *Cryptococcus neoformans*: Identification as a Laccase. *Journal of Bacteriology.* 176: 656-664 (1994).
- 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) 河野 茂ほか。経気道感染における *Cryptococcus neoformans* の病原因子探索に関する研究—続報—。HAART時代の日和見合併症に関する研究、平成16年度総括・分担報告書：p58-65。(2005)
- 14) Obayashi et al. Expression of capsule-associated genes of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 160:1-7. 2005.

進行性多巣性白質脳症の PCR 診断と病態解析

分担研究者：北村 唯一（東京大学医学部附属病院・泌尿器科）

研究協力者：鄭 懐穎¹、余郷 嘉明¹、伊東 大介²、前田亜佐子³、小林 康孝³、野山 麻紀⁴、松浦 基夫⁴、白井和佳子⁵、上田 晃弘⁶、針谷 康夫⁷、小澤鉄太郎⁸、荒木 賢介⁹、本多 幸¹⁰、健山 正男¹¹、池谷 健¹²、堀場 昌英¹³、間宮 均人¹⁴、山本 政弘¹⁵、野田 昌昭¹⁶、大野 孝江¹⁷、岸田 修二¹⁸

（¹東京大学医学部附属病院・泌尿器科、²慶應義塾大学病院・神経内科、³福井総合病院・リハビリ科／神経内科、⁴市立堺病院・腎代謝免疫内科、⁵千葉大学医学部附属病院・神経内科、⁶国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター、⁷前橋赤十字病院・神経内科、⁸新潟大学医歯学総合病院・神経内科、⁹京都大学医学部附属病院・神経内科、¹⁰国立病院機構長崎医療センター・血液内科、¹¹琉球大学医学部附属病院・第一内科、¹²藤枝市立総合病院・小児科、¹³国立病院機構東埼玉病院・呼吸器科、¹⁴国立病院機構名古屋医療センター・内科、¹⁵国立病院機構九州医療センター・感染症対策室、¹⁶広島市立広島市民病院・内科、¹⁷東京大学医学部・神経内科、¹⁸東京都立駒込病院・神経内科）

■研究要旨

JC ウイルス(JCV)DNA の調節領域を標的とした nested PCR は進行性多巣性白質脳症(PML)の診断に有用である。この PCR を用いた PML の診断サービスを全国の病院に対して実施した。平成 17 年 2 月から平成 18 年 2 月までに 61 名の患者の髄液と 1 名の脳生検を検査した。これらのうち 8 名の髄液と 1 名の脳生検から JCV 調節領域が検出された。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、9 名の患者は PML と診断された。JCV 調節領域が検出された患者の基礎疾患は、エイズ(5 名)、慢性腎不全(1 名)、サルコイドーシス(1 名)、SLE(1 名)、不明(1 名)であった。エイズ患者の末梢血リンパ球(PBL)からの JCV DNA を検出するプロジェクトを実施した。対象は原則として、CD4 陽性細胞数が 200 個/μl 以下の HIV 陽性患者に限定した。現在までに 19 名のエイズ患者の PBL から JCV 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、コンタミが厳しく排除された施設と検出系を用いれば、PML 未発症のエイズ患者の PBL から、JCV DNA はほとんど検出されないことが示唆された。現時点では、PBL 中の JCV DNA の有無が PML のハイリスク患者の判定に有効であるかどうかは明らかでなかった。

我々は最近、PML 患者の脳病変部や髄液から分離された JCV DNA の主要キャプシド蛋白(VP1)遺伝子にアミノ酸置換を伴う塩基置換が頻発していることを見いだした。この変異は VP1 蛋白の表面ループに集中していることから、VP1 ループ変異と命名された。VP1 ループ変異と PML との関係を解明するため、PML の診断サービスを通して収集された PML 症例を用いて、VP1 ループ変異について解析した。得られた知見から、(1)VP1 変異が生物学的に重要な意義を有すること、(2)VP1 ループ変異は PML の病態進行に関係があること、(3)VP1 ループ変異によって抗原性が変化することが示唆された。

研究目的

PMLはJCVによって惹起される中枢神経系での脱髄疾患である。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が、杉本らによって、脳脊髄液（髄液）からのPCRによるJCV調節領域の検出がPMLの診断に有効であることを明らかにされた（Sugimoto et al.1998）。本研究の第一の目的はSugimotoらの方法を用いて、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。こ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）。初期領域からは初期調節蛋白（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）と後期調節蛋白（アグノ蛋白）が作られる。Oriとアグノ蛋白遺伝子の間に転写調節領域（以下、単に調節領域と呼ぶ）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よく知られているが、その他、PBLやリンパ組織にも潜伏感染している。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。したがって、我々は15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

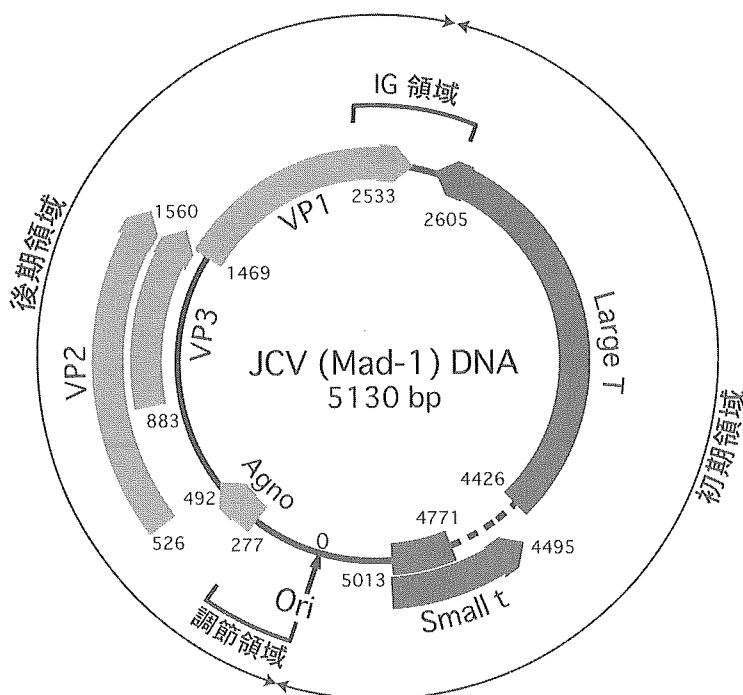


図1. JCVゲノムの遺伝子地図

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。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。

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。その結果、19 拠点病院から賛同が得られた。同プロジェクトは東大病院と拠点病院、双方の倫理委員会で承認され、平成 16 年 6 月から実施に移された。平成 16 年度において 16 名のエイズ患者の PBL が検査され、平成 17 年度には 3 名のエイズ患者の PBL が検査された。以上の検査結果をまとめて報告する。

PML の発症には、患者の免疫学的な状態に加えて、JCV の遺伝学的な変化が関与していると考えられる。最近我々は、PML 患者の脳組織から分離された JCV DNA (PML 型 JCV DNA) の主要キャプシド蛋白 (VP1) 遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異が多発していることを見いだした (Zheng et al., 2005)。この変異は VP1 蛋白の表面ループ (Liddington et al., 1991) に存在することから、VP1 ループ変異と命名された。この変異は非 PML 患者の尿から分離された JCV DNA からは検出されない。VP1 ループには、細胞レセプターへの結合部位や抗体が認識するエピトープが存在するから、VP1 ループ変異は PML の発症や PML の進行と関連があると考えられた。VP1 ループ変異は 3 つのループ (BC、DE、HI) に存在する 8 つの部位で見いだされた。本研究の目的は、これらの変異が全て生物学的な意義を有するかどうかを明ら

かにすることである。そのために、26 名の PML 患者の脳組織または髄液から分離した JCV DNA に VP1 ループ変異が存在するかどうかを調べた。また、VP1 ループ変異のアミノ酸特異性についても解析した。さらに、PML の病態進行と VP1 ループ変異との関係も解析した。

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、実験操作を JCV DNA のレベルに応じて 3 つの実験室 (1 ~ 3) で行った。髄液からの DNA 抽出と、nPCR および semi-nested PCR (snPCR) の 1st round の反応液の調製を実験室 1 で行った。nPCR および snPCR の 2nd round の反応液の調製と PCR 反応を実験室 2 で行った。実験室 3 では PCR の最終生成物の解析 (アガロースゲル電気泳動、クローニング、シーケンシング) を行った。

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 μ 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。

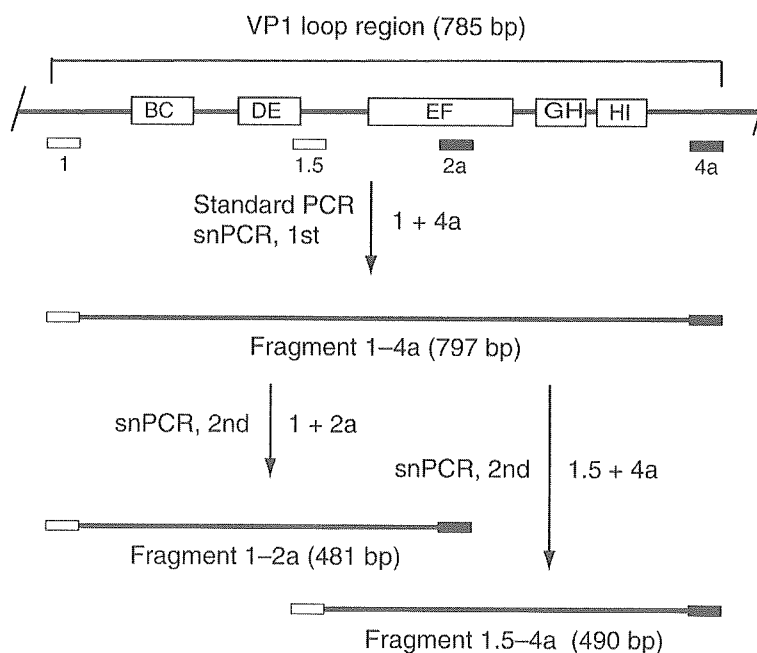


図 2. 標準 PCR または snPCR による VP1 ループ領域の増幅

脳組織 DNA からの VP1 ループの増幅には標準 PCR を、髄液 DNA からの VP1 ループ領域の増幅には snPCR を用いた。標準 PCR にはプライマー 1 と 4a を用いた。snPCR の 1st round の PCR にはプライマー 1 と 4a を用い、2nd round にはプライマー 1 と 2a または 1.5 と 4a を用いた。

3. 脳組織からのDNA抽出

組織を鋏で切断して細片にし、SDSの存在下、56℃、1時間プロテイナーゼ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とsnPCR

増幅ターゲットとプライマー（outer primerとinner primer）は本研究班平成16年度の総括・分担報告書で述べた。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）を用いた。同酵素を活性化するため、反応混合液を95℃、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回ずつ行った（snPCRに関しては後述）。

5. 標準PCR

プライマーとしてB1とB3を、耐熱DNA合成酵素としてHotStar Taq DNA polymerase（QIAGEN）を用いた。B1とB3の配列は本研究班平成16年度の総括・分担報告書で述べた。増幅反応の前に95℃、15分の処理により同酵素を活性化した。その後、nested PCRと同じ条件で増幅サイクルを50回行った。

6. PCR増幅断片のクローニングとシークエンシング

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

した。得られたクローン（通常24クローン）をHindIII、PstI、SstI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）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）を用いて精製した。精製クローンを自動シークエンサー（Applied Biosystems 3130）を用いてシークエンシングした。

7. VP1ループ変異の解析

脳組織DNAからのVP1領域の増幅には標準PCRを、髄液DNAからのVP1領域の増幅にはsnPCRを用いた（図2）。pBluescriptを用いて増幅断片をクローニングし、得られたクローンをシークエンシングした。得られた塩基配列をアミノ酸に翻訳し、原型JCV（健常人の尿から検出されたJCV）のVP1アミノ酸配列と比較した。なお、PCRのエラーによる変異を除外するために、検体当たり2回のPCRを行い、各PCR産物当たり2個のクローン（検体当たり4クローン）をシークエンシングした。4クローンに共通して認められた変異をVP1ループ変異とみなした。

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17年2月から平成18年2月までに61名の患者の髄液と1名の患者の脳生検からJCV調節領域の検出を試みた。その結果、8名（J48～J53、J55、J56）の髄液と1名（J54）の脳生検からJCV調節領域が検出された（表1）。JCV調節領域が検出された8名の患者の基礎疾患はエイズ（5名）、

表1. JCV DNAが検出された患者の基礎疾患

基礎疾患	患者数	患者コード
エイズ	5	J48、J50、J51、J52、J56
腎不全	1	J49
サルコイドーシス	1	J53
SLE	1	J54 ^a
不明	1	J55

^a脳生検からJCV DNAが検出された（他は髄液から検出された）。

腎不全 (1 名)、SLE (1 名)、サルコイドーシス (1 名)、不明 (1 名) であった。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

髄液または脳生検より検出され JCV 調節領域 (図 3) は全て原型調節領域から欠失と重複または欠失のみ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。J48 と J52 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。J48 からは 2 種類 (J48a, J48b) が検出されたが、これらの調節領域は互いに関連していた。同様に、J52 からは 3 種類 (J52a, J52b, J52c) が検出されたが、これらの調節領域は互いに関連していた。

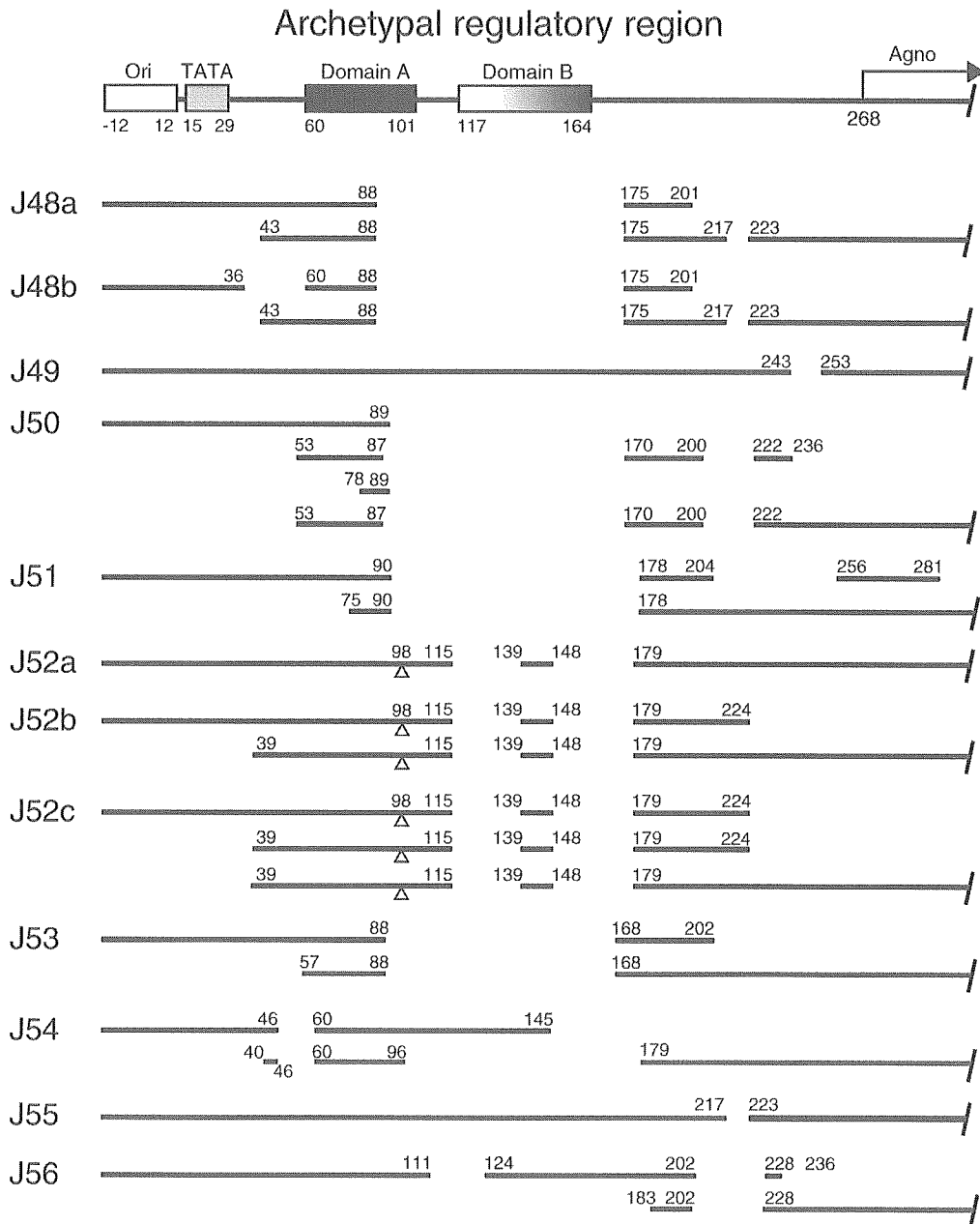


図 3. 髄液から検出された JCV DNA 調節領域の構造

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、アグノ蛋白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 17 年度に髄液または脳生検から検出された再編成型調節領域を示す。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は、患者コードにアルファベットを付して区別した。再編成型調節領域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、欠失に出会ったらブランクにし、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。△は塩基置換 (C → T) を表す。

髄液から JCV DNA が検出された患者の臨床経過 J48 (60 歳台、男性)

2004 年 11 月頃より、構音障害、歩行時のふらつきを自覚するようになった。その後、神経症状は徐々に進行し、2005 年 4 月構音障害の増悪と右上肢脱力を認め、頭部 CT にて脳出血と診断され、入院となった。入院後の検査で HIV 陽性と判明。5 月 9 日 MRI で右側頭葉、右小脳～小脳脚に T2 高信号領域を認めた。5 月 10 日で採取された髄液からユニークな再編成型の JCV 調節領域が検出され、PML と診断された。5 月 23 日、CD4 陽性細胞は 64 個/ μl 、HIV RNA は 1.2×10^5 コピー/ml であった。5 月 25 日より HAART 療法を開始した。6 月 11 日に、緑膿菌による敗血症ショックを発症した。蘇生はできたが意識障害は回復できなかった。意識障害は重篤で、四肢は著明に固縮。現在は、気管切開、植物状態である。植物状態になってからは、HAART 療法を中断した。その後は月に 1、2 回、呼吸器感染症を起こすのみで、通常の抗生剤のみで加療した。重篤な感染症もなく AIDS 自体の病勢も安定状態と考えられた。植物状態になってから MRI で脳病巣変化は以下の通りであった。9 月 21 日、病巣は大脳白質、脳幹、小脳脚に拡大。10 月 31 日に大脳白質、脳幹、小脳脚に病巣が多発したが、右側頭葉の病巣の縮小を認めた。12 月 27 日に小脳脚病巣の縮小を認めた。以上より、PML の画像所見は、現在やや改善傾向が見られた。

J49 (70 歳台、男性)

2005 年 3 月頃より頻尿、歩行困難を生じた。4 月 8 日尿閉のため受診。検査で CRE 4.4 mg/dl、BUN 47.7 mg/dl であり、腎後性腎不全と認めた。また PSA 34 ng/ml であり、前立腺生検で中分化型腺癌と診断された。その後、歩行困難の増強、発語減少、意識レベルの低下、左手、左足の痺れ感を認めた。入院後 MRI で橋白質に軽度の病変を認めた。4 月末にステロイドパルス療法を行ったが、全く効果は認めなかった。5 月 7 日に採取された髄液から、ユニークな再編成型の JCV 調節領域が検出され、PML と診断された。その後は頭 MRI で白質病変が左右対称に次第に進行し、萎縮が進んだ。平成 18 年 1 月の時点で発語は全く認めなくなったが、痛み刺激に反応あり、脳幹反射は保たれた。四肢は屈曲位で拘縮が進行した。ここ数ヶ月はあまり著変のない状態であった。

J50 (50 歳台、男性)

2004 年 12 月より労作性呼吸困難、微熱。2005 年 2 月末より食欲低下・体重減少。3 月自宅近隣の病院に入院、HIV 陽性が判明した (CD4 陽性細胞、89 個/ μl 。HIV RNA、 6.7×10^4 コピー/ml)。カリニ肺炎のため、ST 合剤にて 3 週間の治療を受けた。5 月の始めよりしゃべりにくい・字が書きにくいとの症状があった。5 月 10 日、CD4 陽性細胞は 52 個/ μl 、HIV RNA は 3.7×10^5 コピー/ml であった。5 月 20 日 HAART 治療 (TDF/FTC/EFV) を開始。6 月 3 日の検査で CD4 陽性細胞は 411 個/ μl 、HIV RNA は 2.5×10^3 コピー/ml となったが、神経症状が悪化したため、入院。6 月 6 日、髄液よりユニークな再編成型の JCV 調節領域が検出され、PML と診断された。入院後も神経症状は進行し、6 月 27 日には歩行不能。7 月 1 日の検査で CD4 陽性細胞は 385 個/ μl 、HIV RNA は 2.8×10^2 コピー/ml であった。HAART の著効は明らかであったにもかかわらず、PML が増悪した原因として、免疫再構築が考えられた。7 月 6 日意識レベル低下、7 月 8 日両上肢の伸展位硬直に続き呼吸状態が悪化して永眠。

J51 (40 歳台、男性)

2004 年夏ごろから両上肢・体幹・顔面に掻痒を伴う発赤小丘疹が断続的に出現した。2005 年 4 月下旬左顔面下半を含む左半身の痺れ感が出現。しばらくして左上肢の脱力感、呂律不良も加わった。痺れがすこしずつ増強し、5 月 16 日 CT で上右前頭葉から頭長ように低吸収域があり、脳血管障害を疑いで治療を受けた。左の痺れの進行は停止したが、数日後から発語の低下を認めた。MRI では右大脳白質に血管領域と一致しない不整形の T2 高信号を認めた。HIV を疑い、簡易検査を実施したところ、陽性であり、5 月 30 日 PML、HIV 疑いで入院。入院時の CD4 陽性細胞は 7 個/ μl で、HIV RNA 負荷は 2400 コピー/ml であった。5 月 30 日採取した髄液からユニークな再編成型の JCV 調節領域が検出され、PML と診断された。6 月より HAART 治療を開始したが、その後症状は進み、MRI 検査で、脳の 2/3 ほどが脱髄病変を示した。寝たきりとなり、食事は経管、意識障害も指示動作にやっと応じられる程度であった。しかし、9 月の初旬より症状が改善し始め、食事摂取可能、伝い歩き可能となり、11 月 2 日退院となった。1 月 16 日検査で CD4 陽性細胞は 50 個/ μl で、HIV

RNAは陰性であった。

J52 (20歳台、女性)

2004年4月、肺結核を指摘された際、HIV陽性が判明。2005年6月14日より左上下の脱力を自覚し、CTで右頭頂部に低吸収域を認めた。6月20日入院し、加療を受けたが、左不全麻痺が進行。7月22日MRIで右前頭葉中心前回、上前頭回白質、右頭頂葉上部白質、左前頭葉中心前回上部白質に病変を認めた(異常増強なし。Mass effectなし)。7月20日採取の髄液から再編成型JCV調節領域が検出され、HIV合併PMLと診断された。この頃のCD4陽性細胞は19個/ μ lで、HIV RNA負荷は 4.3×10^4 コピー/mlであった。7月21日よりHAART治療(d4T/3TC/LPV/r)を開始。3週間後、MRIでは病変の拡大と神経症状の著明な増悪を認めた。HIVの免疫再構築症候群によるPMLの増悪と考へて、8月26日よりTDF/3TC/ATV/RTVに変更した。その後、画像所見と神経症状の改善を認め、免疫再構築が落ち着いたと考えられた。11月18日、CD4陽性細胞は97個/ μ lであった。12月1日退院、現在は近医にて経過観察中である。

J53 (20歳台、男性)

2002年サルコイドーシスと診断された。2005年9月よりまっすぐに歩けなくなり、左眼の視野障害と構音障害を認め、当院入院した。入院後の検査で、体幹失調、四肢失調、構音障害、眼振、腱反射亢進を認めた。頭部MRIでは両側中小脳を中心に小脳半球白質に広がる高信号域を認めた。10月31日で採取した髄液から、ユニークな再編成型のJCV調節領域が検出され、PMLと診断された。入院後、サルコイドーシスの治療としてステロイドを投与した。しかし、その後も病変は進展していた。ステロイドが病巣を進展させた可能性はあったと考えた。11月21日と2006年1月12日に採取された髄液から、10月31日に検出されたものと同じJCV調節領域が検出され、PMLが引き続き増悪していることが示唆された。

J54 (50歳台、男性)

2005年6月初めより声のかすれが出現、その後言葉が出にくい症状があり、同時に右下肢の脱力、歩行障害が出現した。脳梗塞と診断され、治療を受けたが、神経症状が進行し、CT、MRIにて多発性

の病変を認めた。7月22日入院。SLE/Sjogren症候群によるvasculopathyを背景とした脳病変を疑い、ステロイドパルス療法を施行した。8月10日のMRIでは病巣は拡大傾向であった。画像所見からはT2WI/FLAIR/DWIにて高信号域を検出(CE陰性、mass effect陰性)、PMLの可能性が考えられた。8月19日に脳外科にて左前頭葉の病変の生検を施行、(1)肥大したオリゴデンドログリアが著増し、(2)JCVに対する免疫染色で陽性であり、(3)ユニークな再編成型JCV調節領域が検出されたことより、PMLと診断された。Ara-Cを投与した結果、MRIで病巣がやや縮小したが、副作用が出たため3回目の途中で中止した。その後のMRI所見は変化がなく、やはりAra-Cが有効であったと考えられた。当院での治療は終了とし、他院へ転院となった。

J55 (50歳台、男性)

2005年3月頃より食欲低下があり、5月より歩行時にふらつきが出現。その後、神経症状が徐々に悪化した。MRIで脳幹部から右側頭葉白質に病変を認めた。地元の病院でステロイドパルス療法を受けた後、症状が改善。しかし、11月再びふらつきが増強したため入院。11月24日MRIで脳内病巣の拡大を認めた。右前頭葉では造影後T1強調画像で明瞭な造影効果を示した。放射線治療により画像所見、臨床症状ともに改善したことから、悪性リンパ腫が疑われた。しかし、12月15日に施行した脳生検では悪性リンパ腫を示唆する所見は得られず、血管周囲性にリンパ球浸潤が認められた。12月28日採取した髄液からユニークな再編成型のJCV調節領域が検出され、PMLと診断された。

J56 (40歳台、男性)

生来の血友病のために投与された血液製剤によりHIV、HCV感染。HAART治療を受けていたが、有害事象(悪夢)が強かったので、3年前から中止。2005年9月頃より左前腕の違和感(しびれ、冷感)が出現し、次いで右前腕の違和感も出現。11月頃より右手第一指と第二指の筋力低下を自覚。12月末頃より、物を見る際、焦点が合わせづらいことを自覚。2006年1月20日の定期検診時に、MRIで右後頭側頭葉、左前頭頭頂葉の皮質下白質から深部白質にかけてT2WI、Flairで高信号、T1WIで低信号、ガドリニウムで増強されな

表2. PBL からポリオーマウイルス DNA の検出を試みた患者^a

年齢	CD4陽性細胞(個/ μ l)			HIV RNA(コピー/ml)			末梢血採取時のHAART治療		合計
	≥ 200	100~200	≤ 100	$\geq 10^5$	$10^3\sim 10^5$	≤ 50	未治療	治療中	
20歳台	0	1	1	0	2	0	2	0	2
30歳台	0	2	3	1	3	1	3	2	5
40歳台	1	3	2	2	3	1	3	3	6
50歳台	1	1	4	2	2	2	3	3	6
合計	2	7	10	5	10	4	11	8	19

^a表中の数字は患者数を示す。

表3. 各部位でのVP1ループ変異の頻度^a

アミノ酸残基 (ループ)	L55 (BC)	K60 (BC)	S61 (BC)	D66 (BC)	S123 (DE)	N265 (HI)	S267 (HI)	S269 (HI)	計
検出数	7	4	2	4	3	4	6	10	40

^a今回検出された件数と以前検出された件数(Zheng et al., 2005)とを合計した(以下同様)。

い病変を検出。1月27日に神経症状が増悪し、1月30日に精査目的で入院。2月7日採取の髄液よりユニークな再編成型のJCV調節領域が検出され、PMLと診断された。最新のCD4陽性細胞は約200個/ μ lで、HIV RNAは 1×10^5 コピー/mlであった。

2. エイズ患者のPBLからのポリオーマウイルスDNAの検出

平成18年2月までに6つのエイズ拠点病院で19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18名、女性が1名であった。年齢に関しては、20歳台が2名、30歳台が5名、40歳台が6名、50歳台が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2にまとめた。

19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19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。

3. PMLに関与するJCVの遺伝学的な変化

VP1ループ変異の検出率：脳組織と髄液の比較

以下では、以前報告されたデータ(Zheng et al., 2005)と本研究で得たデータを合わせて述べる。24検体の脳組織を調べ、19(79%)の検体からVP1ループ変異が検出された。一方、21検体の髄液を調べ、17(81%)の検体からVP1ループ変異が検出された。脳組織と髄液の間でのVP1ループ変異の検出率の違いは有意な差がなかった。

VP1ループ変異が起きるアミノ酸残基

検出されたVP1ループ変異を表3にまとめた。VP1ループ変異が起きるアミノ酸残基は、BCループ内の4残基(L55、K60、S61、D66)、DEル

表4. 塩基置換によって起きうるアミノ酸置換と実際に起きたアミノ酸置換

アミノ酸残基 (VP1ループ)	コドン (アミノ酸)	1塩基置換により起きる アミノ酸置換の数	実際に検出された コドン(アミノ酸)	各アミノ酸置換が 検出された株の数
L55 (BC)	CUU (L)	6	UUU (F)	7
K60 (BC)	AAG (K)	7	AUG (M)	2
			AAC (N)	1
			GAG (E)	1
S61 (BC)	UCA (S)	4	UUA (L)	2
D66 (BC)	GAU (D)	8	CAU (H) ^a	3
			AAU (N)	1
S123 (DE)	UCU (S)	7	UGU (C)	3
N265 (HI)	AAC (N)	8	GAC (D)	3
			ACC (T)	1
S267 (BC)	UCU (S)	8	UUU (F)	4
			GCU (A)	1
			UUA (L) ^b	1
S269 (BC)	UCC (S)	6	UUC (F)	7
			UAC (Y)	2
			UGC (C)	1

^a抗原性変異株 (Mad-11) (Padgett and Walker, 1983) から検出された。

^b2回の塩基置換により生じた。

表5. 各アミノ酸置換の発生頻度^a

置換されたアミノ酸	発生頻度
F	18
C	4
H	3
D	3
M	2
N	2
L	3
Y	2
E	1
A	1
T	1
計	40

^a各部位で起きたアミノ酸置換(表3)をまとめた。

ープ内の1残基 (S123)、HIループ内の3残基 (N265、S267、S269) であった。変異は各残基で複数回 (2回～10回) 起きた。最も変異が起きやすい部位はS269であった (10回)。L55 (7回)、S267 (6回) がそれに続いた。なお、D66での変異 (D66H) は、抗原性変異株として知られるPML型JCV (Mad-11) (Padgett & Walker, 1983) で認められた変異である。

アミノ酸特異性

一般に、コドンの1つの塩基が別の塩基に置換されると、対応するアミノ酸も別のアミノ酸に置換されることがある。特に1番目と2番目の塩基が置換されると、別のアミノ酸に置換されることが多い。ループ変異が認められたアミノ酸残基に対応するコドンにおいて、任意の塩基置換が起きると、4～8通りのアミノ酸置換が起きる。しかし、実際には1～3種類のアミノ酸置換しか検出されなかった (表4)。アミノ酸残基を無視して、置換されたアミノ酸を集計したところ (表5)、フェニルアラニンへの置換が最も多かった。このように、VP1ループ変異にはアミノ酸特異性があることがわかった。

PMLの病態進行とVP1ループ変異との関係

長期生存したが、病巣が脳全域に拡大した患者 (患者1) では、全ての脳領域において1～3種類のループ変異が検出された。一方、PMLが安定化し、病巣の拡大も停止した長期生存患者 (患者2) では、多くの脳領域で変異は検出されず、一部の脳領域でのみ1種類の変異が検出された (表6)。

考察

1. PMLのPCR診断：平成17年度の実績

本年度も、JCV DNAの調節領域を標的としたnested PCRを用いたPMLの診断サービスを全国の病院に対して実施した。平成17年2月から平成18年2月までに61名の患者の髄液と1名の脳生検を検査し、9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否定された)。以上により、9症例はいずれもPMLと確定診断された。

2. 髄液を用いたPCR診断の問題点

今年度検査した患者 (n=61) のうち、髄液からJCV DNAが検出された患者 (n=8) の割合は13%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の一つと考えられた。しかし、国外の研究者たちは、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20～30%の髄液からJCV DNAが検出されなかったと報告している (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患者でPMLであった患者が2、3名程度はいたであろうという推定ができる。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

表6. 病態進行とVP1ループ変異との関連

患者	基礎疾患	生存期間 ^a	神経症状	病巣拡大	各領域で検出されたVP1ループ変異					
					前頭葉	頭頂葉	側頭葉	後頭葉	橋	小脳
1	WAS ^b	4年	進行	あり	D66H	D66N	D66H	D66H	D66H + K60E	D66H
2	AIDS	2年	安定化	停止	Proto ^c	Proto	Proto + S267F	Proto	Proto	Proto + S267F

^aPML発症後の生存期間。

^bWAS、Wiskott-Aldrich syndrome

^cProto、変異を持たないVP1ループ

に対しては脳生検を検討すべきである。

3. 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、増悪する症例もあった。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よ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 5 症例 (J48、J50、J51、J52、J56) のエイズ関連 PML と同定された。これらのうち J56 を除く 4 症例において、PML の診断後に HAART 治療が施行された J51 と J52 では HAART により PML は増悪したが、その後神経症状と画像所見の改善を認めた。J48 では HAART 施行後、敗血症ショックを発症し、植物状態となった。その後 HAART を中断したが、PML の画像所見はやや改善傾向にあった。J50 では HAART 開始後、CD4 陽性細胞の増加と HIV RNA の減少を認めたが、神経症状が増悪し、呼吸状態が悪化したことにより死亡した。以上から、エイズ関連 PML に対して HAART 治療が行われた場合、免疫再構築症をいかにコントロールするかが今後の課題であると思われた。

4. エイズ患者 PBL からのポリオーマウイルス DNA の検出

これまでに、19 名のエイズ患者の PBL から JCV DNA と BKV DNA の検出を試みたが、両 DNA は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 (Tornatore *et al.*, 1992; Dubois *et al.*, 1997; Ciappi *et al.*, 1999; Andreoletti *et al.*, 2002)。検出率は 20-40% (Tornatore *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を示唆された。

5. PML に関与する JCV の遺伝学的な変化

VP1 ループ変異の特徴は、変異が VP1 ループ内の複数の部位で起き、また、置換されるアミノ酸も多様であることである。今回、(1) 変異が起きる部位は 8ヶ所存在すること、(2) これらのいずれの部位でも変異が繰り返り起きていること、(3) 各部位において特定のアミノ酸に置換される傾向があることが明らかになった。以上から、8ヶ所での変異は全てが生物学的に重要な意義を有すると考えられた。

本研究において同変異の生物学的な意義を示唆する断片的な知見が得られた。(1) 脳と髄液における VP1 ループ変異の発生率は約 80% と高率ではあったが、100%ではなかった。(2) 長期生存した 2 名の PML 患者の解析した結果から、PML の進行に伴って、VP1 ループ変異を有する JCV が増え、VP1 ループ変異の種類も増えることが示された。以上から、VP1 ループ変異は PML の発生とは関係ないが、PML の病態進行に関係することが示唆された。

JCV は単一の血清型からなるが、例外的に抗原性変異を有する PML 型株 (Mad-11) が古くから知られていた (Padgett and Walker, 1983)。この株の VP1 には D66H というループ変異が存在するが、これと同じ変異が別の 2 株の PML 型 JCV から検出された。以上から、VP1 ループ変異は抗原性を変化させる変異であり、抗 JCV 抗体の存在下で JCV の持続的な増殖を可能にするという可能性が考えられた。

結論

平成17年2月から平成18年2月までに61名の患者の髄液と1名の脳生検を検査した。これらのうち8名の患者の髄液と1名の脳生検からJCV調節領域が検出された。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、9名の患者はPMLと診断された。

19名のエイズ患者のPBLからJCV 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、PML未発症のエイズ患者のPBLから、JCV DNAはほとんど検出されないことが示唆された。現時点では検査した患者はいずれもPMLを発症していないが、観察期間が短いので、PBL中のJCV DNAの有無がPMLのハイリスク患者の判定に有効であるかどうかは明らかでなかった。

PML型JCV VP1ループ領域の8ヶ所から検出された変異（VP1ループ変異）は全てが生物学的に重要な意義を有すると考えられた。VP1ループ変異はPMLの発生とは関係ないが、PMLの病態進行に関係があることが示唆された。VP1ループ変異は抗原性を変化させる変異であると考えられた。

参考文献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Clifford D.B., Yiannoutsos C., Glicksman M., et al. HAART improves prognosis in HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology* 52, 623-625, 1999.
- 5) de Bruyn G., Limaye A.P. BK virus-associated nephropathy in kidney transplant recipients. *Rev. Med. Virol.* 14, 193-205, 2004.
- 6) De Luca A., Giancola M.L., Ammassari A., et al. Cidofovir added to HAART improves virological and clinical outcome in AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *AIDS* 14, F117-121, 2000.
- 7) 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.
- 8) Dworkin M.S., Wan P.C., Hanson D.L., et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy: improved survival of human immunodeficiency virus-infected patients in the protease inhibitor era. *J. Infect. Dis.* 180, 621-625, 1999.
- 9) Frisque R.J., Bream G.L., Cannella M.T. Human polyomavirus JC virus genome. *J. Virol.* 51, 458-469, 1984.
- 10) Liddington R.C., Yan Y., Moulai J., et al. Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* 354, 278-284, 1991.
- 11) Major E.O., Amemiya K., Tornatore C.S., et al. Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin. Microbiol. Rev.* 5, 49-73, 1992.
- 12) Padgett B.L., Walker L. Virologic and serologic studies of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Prog. Clin. Biol. Res.* 105, 107-117, 1983.
- 13) Sugimoto C., Itoh D., Tanaka K., et al. Amplification of JC virus regulatory DNA sequences from cerebrospinal fluid: diagnostic value for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch. Virol.* 143, 249-262, 1998.
- 14) Tassie J.M., Gasnault J., Bentata M., et al. Survival improvement of AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy in the era of protease inhibitors. *Clinical Epidemiology Group. French Hospital Database on HIV. AIDS* 13, 1881-1887, 1999.
- 15) Yogo Y., Sugimoto C. The archetype concept and regulatory region rearrangement. In *Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspectives*. Edited by Khalili K, Stoner GL (John Wiley & Sons, New York). pp 127-148, 2001.
- 16) Zheng H.-Y., Takasaka T., Noda K., et al. New sequence polymorphisms in the outer loops of the JC polyomavirus major capsid protein (VP1) possibly associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Gen. Virol.* 86, 2035-2045, 2005.

研究発表

発表論文

- 1) Zheng H.-Y., Takasaka T., Noda K., Kanazawa A., Mori H., Kabuki T., Joh K., Oh-ishi T., Ikegaya H., Nagashima K., Hall W.W., Kitamura T., Yogo Y. New sequence polymorphisms in the outer loops of the JC polyomavirus major capsid protein (VP1) possibly associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Gen. Virol.* 86, 2035-2045, 2005.
- 2) Zheng H.-Y., Ikegaya H., Takasaka T., Matsushima-Ohno T., Sakurai M., Kanazawa I., Kishida S., Nagashima K., Kitamura T., Yogo Y. Characterization of the VP1 loop mutations widespread among JC polyomavirus isolates associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 996-1002, 2005.
- 3) Zheng H.-Y., Ikegaya H., Nakajima M., Sakurada K., Takasaka T., Kitamura T., Yogo Y. Two distinct genotypes (MY-x and MX) of JC virus previously identified in Hokkaido Ainu. *Anthropol. Sci.* 113, 225-231, 2005.
- 4) Zheng H.-Y., Kojima K., Ikegaya H., Takasaka T., Kitamura T., Yogo Y. JC virus genotyping suggests a close contact or affinity between Greenland Inuit and other circumarctic populations. *Anthropol. Sci.* 113, 291-293, 2005.
- 5) Ikegaya H., Zheng H.-Y., Saukko P.J., Varesmaa-Korhonen L., Hovi T., Vesikari T., Suganami H., Takasaka T., Sugimoto C., Ohasi Y., Kitamura T., Yogo Y. Genetic diversity of JC virus in the Saami and the Finns: implications for their population history. *Am. J. Phys. Anthropol.* 128, 185-193, 2005.
- 6) Ikegaya H., Iwase H., Zheng H.-Y., Nakajima M., Sakurada K., Takatori T., Fukayama M., Kitamura T., Yogo Y. JC virus genotyping using formalin-fixed, paraffin-embedded renal tissues. *J. Virol. Meth.* 126, 37-43, 2005.
- 7) Takasaka T., Goya N., Ishida H., Tanabe K., Toma H., Fujioka T., Omori S., Zheng H.-Y., Chen Q., Nukuzuma S., Kitamura T., Yogo Y. Stability of the BK polyomavirus genome in renal transplant patients without nephropathy. *J. Gen. Virol.* 87, 303-306, 2006.
- 8) Takasaka T., Kitamura T., Sugimoto C., Guo J., Zheng H.-Y., Yogo Y. Phylogenetic analysis of the major African genotype (Af2) of JC virus: Implications for the origin and dispersals of modern Africans. *Am. J. Phys. Anthropol.* 129, 465-472, 2006.
- 9) Takasaka T., Ohta N., Zheng H.-Y., Ikegaya H., Sakurada K., Kitamura T., Yogo Y. JC polyomavirus lineages common among Kiribati Islanders: implications for human dispersal in the Pacific. *Anthropol. Sci.* in press.
- 10) Saruwatari L., Zheng H.-Y., Ikegaya H., Takasaka T., Guo J., Kitamura T., Yogo Y., Ohno N.. Dispersal of Southeastern Asians based on a global phylogenetic analysis of JC polyomavirus isolates of genotype SC. *Anthropol. Sci.* in press.

学会発表

- 1) 金田大太、鷺田和夫、安井直子、鈴木聡、加藤智信、有馬靖佳、鄭懷穎、余郷嘉明、北村唯一。Inflammatory PML の 1 例。第 10 回日本神経感染症学会、2005、東京。
- 2) 前田亜佐子、小林康孝、中川広人、井川正道、鄭懷穎、余郷嘉明、北村唯一、出雲周二、米田城、栗山勝。髄液にて JCV 調節領域遺伝子の再編成を認めた脳幹・小脳型の進行性多巣性白質脳症 (PML) の 2 症例。第 10 回日本神経感染症学会、2005、東京。
- 3) 鄭懷穎、池谷博、高坂友和、長嶋和郎、北村唯一、余郷嘉明。PML 型 JC ウイルスに頻発する VP1 ループ変異の解析。第 53 回日本ウイルス学会学術集会、2005、横浜。
- 4) 高坂友和、池谷博、鄭懷穎、北村唯一、余郷嘉明。中央ミクロネシア (キリバス) 島民から検出された JC ウイルスゲノム型。第 53 回日本ウイルス学会学術集会、2005、横浜。
- 5) 鐘山、鄭懷穎、陳沁、池谷博、高坂友和、北村唯一、余郷嘉明。アジアにおける、型 BK ウイルスの蔓延。第 53 回日本ウイルス学会学術集会、2005、横浜。
- 6) 陳沁、鄭懷穎、鐘山、池谷博、高坂友和、北村唯一、余郷嘉明。BK ウイルス DNA の塩基配列の多様性とヒト集団との関連：世界的な規模での解析。第 53 回日本ウイルス学会学術集会、2005、横浜。

免疫再構築症候群に関する調査と冊子作成

分担研究者：古西 満¹、源河いくみ²、中村 哲也³

(¹奈良県立医科大学感染症センター、²国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター、³東京大学医科学研究所感染免疫内科)

研究協力者：善本英一郎¹、今村 顕史²、山元 泰之³、上平 朝子⁴、
濱口 元洋⁵、山中 克郎⁶、永井 英明⁷

(¹奈良県立医科大学感染症センター、²東京都立駒込病院感染症科、³東京医科大学臨床検査医学科、⁴国立病院機構大阪医療センター免疫感染症科、⁵国立病院機構名古屋医療センター血液内科、⁶国立病院機構名古屋医療センター総合内科、⁷国立病院機構東京病院呼吸器科)

■研究要旨

HIV 感染症診療を積極的に行なっている 7 医療機関に対して、免疫再構築症候群 (immune reconstitution inflammatory syndrome : IRIS) の診断に関するアンケート調査を実施した。IRIS の臨床病状として多かった帯状疱疹 58 例、非結核性抗酸菌 (NTM) 症 40 例、サイトメガロウイルス (CMV) 感染症 31 例、ニューモシスチス (PC) 肺炎 13 例、結核症 10 例の情報を得ることができた。帯状疱疹は、大半の症例が皮疹などからの臨床診断であった。NTM 症は、培養や PCR 法で抗酸菌を証明することが多く、生検組織所見も診断根拠とすることもあった。CMV 感染症は、眼底所見などの臨床診断が多く、CMV アンチゲネミアも用いられていた。PC 肺炎は、胸部画像所見などからの臨床診断が多く、気管支肺泡洗浄をしても病原体を検出できないこともあることが指摘された。結核症は、NTM 症と同様に培養・PCR 法が多く、他にツベルクリン反応を実施していることもあった。

IRIS の回避を考慮した場合、日和見合併症の発症後いつから強力な抗 HIV 治療 (highly active antiretroviral therapy : HAART) を開始するか医師の考え方について調査するため、東京・近畿の HIV 診療経験が豊富な医師 31 名にアンケートを実施した。CD4 陽性細胞数が 100/μl 未満の患者で、NTM 症、CMV 感染症、PC 肺炎、結核症、クリプトコッカス症を発症した場合には、約 6 割の医師はその疾患が治癒 (安定) 後に HAART を開始すると回答した。一方、カポジ肉腫では、約 6 割の医師が早期から HAART を開始するとした。

3 年間の IRIS 実態調査の結果、文献的情報および実際の IRIS 症例経験をまとめた「免疫再構築症候群 診療のポイント」という冊子を作成した。作成した冊子は、全国のエイズ拠点病院の診療担当者に送付した。