

1P-12

演者：山田達夫 1、○坪井義夫 1、福島武雄 2、堂浦克美 3(兼堂浦班)

所属：1) 福岡大学第5内科、 2) 同脳神経外科、 3) 東北大学・プリオン蛋白研究部門

演題名：プリオン病に対するペントサンポリサルフェート脳室内持続投与法の効果と安全性の検討

抄録：【目的】プリオン病に対するペントサンポリサルフェート(PPS)脳室内持続投与法の効果と安全性の検討。【背景】プリオン病は致死性の海綿状脳症であり、異常型プリオン蛋白(PrP<sup>sc</sup>)の脳内蓄積が共通の病理学的特長である。基礎研究において、PrP<sup>sc</sup>形成を抑制する作用を有する薬物が知られており、治療への応用が期待される。ヘパリン類似の活性を持つPPSは動物感染実験において、発症遅延効果が認められている。PPSは血液脳関門を通過しないために直接脳室内に投与する必要がある。新しい治療戦略として、腹部皮下体内埋め込み型微量注入器具の留置及び脳室内カテーテルの留置手術によるPPS脳室内持続投与が注目されている。英国で2003年に変異型CJDの患者に行われた。【対象・方法】2004年11月より現在まで福岡大学病院で行われたPPS脳室内持続投与法を行った5例の検討(平均年齢68歳、すべて女性)。方法は右の側脳室前角脳室カテーテル留置および右腹壁に微量持続注入ポンプを埋め込み、腹部カテーテルは皮下を通じて留置したポンプに接続した。1週間後のCTにて出血等の合併症がないことを確認後、低濃度から投与を開始し、漸増、維持量は60 $\mu$ g/kg/dayとした。【結果】現在までに症状は安定あるいは悪化しており明らかな改善は認めない。1例に部分てんかんと硬膜下水腫を認めた。血算、凝固、生化学などの全身性の副作用は認めない。【結論】PPS脳室内持続投与法は血小板減少や凝固系の異常などがみられず全身への影響はきわめて少ないと考えられる。現在PPSの濃度は60mg/kg/dayで設定しているが至適濃度は今後の課題である。

文献：1) Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I, Sasaki K, Mohri S, Race R, Iwaki T. Treatment of trans-missible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J Virol* 2004;78:4999-5006  
2) Todd NV, Morrow J, Doh-ura K, Dealler S, O'Hare S, Farling P, Duddy M, Rainov NG. Cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate in human variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Infect Dis* 2005; 50: 394-396  
3) Rainov NG, Whittle IR, Doh-ura K. Treatment options in patients with Prion Disease-the role of long term cerebroventricular infusion of pentosan polysalphate. In: PRIONS. Edt. By Kitamoto T. Springer-Verlag Tokyo 2005: 41-66.

1P-13

演者：○福島武雄

所属：福岡大学医学部脳神経外科

演題名：プリオン病に対するペントサンポリサルフェート脳室内投与の実際

抄録：ペントサンポリサルフェート(PPS)を用いたマウスの感染実験においては、PPSの脳室内投与によりその発症遅延効果が確認されている。本研究ではPPSの脳室内投与に必要な脳室内カテーテルおよび腹部埋め込み型注入ポンプ留置術をプリオン病患者に実際に施行し、外科的処置に関わる周術期の合併症や安全性について検討し、最終的なPPS脳室内投与療法の有効性を明らかにすることを目的とする。具体的には当院神経内科にてプリオン病臨床診断基準に従い、強くプリオン病が疑われた症例の中で、治療研究への参加の同意が得られた5症例に対して、脳室内カテーテル留置ならびに腹部埋め込み型注入ポンプ留置術を行った。その後 PPS 脳室内投与を実施計画に従い開始した。外科的処置（手術）に先立っては、実際の実務に直接携わるスタッフ全てに適切な教育を行い、手術器具の取り扱い／保管／洗浄／消毒または廃棄の具体的な計画を立て、その上で手術シュミレーション（看護師／麻酔科医／脳神経外科医）を十分行った。具体的には右前頭部から前角穿刺で脳室カテーテルを留置し、耳介後方を通して側頸部、前胸部、上腹部までカテーテルを誘導し腹部皮下に埋め込み型持続注入ポンプ(Archimedes infuson pump)に留置した。術直後および第7病日に頭部CTで出血性病変のcheckを行い、第8病日からPPSの脳室内投与療法を開始した。全症例において周術期合併症の併発はなく、計画通り第8病日から脳室内投与が開始された。現在 PPS 脳室内投与療法の安全性および有効性を評価中である。

文献：

1P-14
演者：堂浦克美 1、〇片岡泰文 1、首藤英樹 1
所属：1) 福岡大学薬学部、2) 東北大学大学院医学系研究科
演題名：ヒト生体試料中および細胞培養液中におけるペントサン硫酸濃度の測定法
抄録： ペントサン硫酸 (PPS) の細胞培養液中および生体試料中の濃度測定法に関する検討を行った。 ①細胞培養液中 PPS 濃度に関しては、市販の Blyscan Glycosaminoglycan Assay Kit (Biocolor, Ltd) を用いて測定可能であることが確認できた。本測定法を利用して PPS 原末および低分子化 PPS (ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて分取した PPS フラクション) の血液脳関門透過性について、in vitro 血液脳関門モデルを用いて評価した結果、低分子化処理によって PPS の血液脳関門透過性が向上することが判った。本測定は PPS の in vitro 系での動態評価に有用と考えられる。 ②生体試料中 (髄液中および血漿中) PPS 濃度に関しては、前処理として除蛋白操作を加えた sGAG Alcian Blue Binding Assay Kit (Wieslab AB) を用いて検討を行った。各種神経疾患を有する患者髄液試料に PPS を添加し、本測定法の利用可能性を評価した結果、いずれの試料においても添加濃度と同等の測定値が得られた。本測定法はヒトにおける生体試料中の PPS 動態の評価に応用可能と考えられる。
文献：

1P-15

演者：堂浦克美 1、○川崎ゆり 1、鈴木伸之 2

所属：1) 東北大学プリオン蛋白分子解析分野、2) 第一製薬株式会社

演題名：経口投与型プリオン病治療予防薬の開発に関する研究

抄録：ペントサンポリサルフェート脳室内投与療法は、臨床研究が現在進行しているところであり、その有効性についての結論が得られるまでにはまだかなりの時間を要すると考えられる。キナクリン経口投与療法に関する臨床研究に比べて、この治療法では持続注入装置の体内埋め込みやカテーテル脳室内留置のための外科的処置を必要とすることから、臨床研究実施へのハードルが高く、複数の施設で実施されるには至っていない。やはり、通常の薬剤投与方法である経口、静注、経皮、皮下投与で有効な治療薬を開発する必要がある。

昨年度までに、我々はアミロイドメージング剤やアミロイド阻害剤にプリオン病治療効果のあることを報告しているが、これらは静脈内投与により脳移行性があり脳内に沈着した異常プリオン蛋白に結合して治療効果が観察されたものであった。今回、経口投与でも脳移行性がありプリオン病治療効果のあるものが見つかったので、その効果についてこれまでの実験データを紹介する。

Comp B と呼んでいる本化合物は、 $A\beta$  等のアミロイド凝集の阻害および凝集アミロイドによる神経細胞傷害の抑制を指標に開発された化合物であり、プリオン持続感染細胞を用いた実験では、RML 株感染細胞において異常型プリオン蛋白の産生を阻害した。特に ScN2a 細胞ではピコグラムのオーダーで効果が見られた。しかし、Fukuoka1 株感染細胞や 22L 株感染細胞では異常型プリオン蛋白産生阻害効果は明らかではなかった。一方、脳内感染マウスを用い粉末餌に Comp B を混ぜて投与した実験では、RML 株感染マウスで顕著な発症遅延効果が観察された。この治療効果は化合物濃度に依存しており、高濃度投与群では発症までの期間が 2.5 倍にまで遅延した。22L 株感染マウスにおいても有意な発症遅延効果が観察されたが、263K 株感染マウスでは発症遅延効果は明らかではなかった。Fukuoka1 株感染マウスは現在解析中である。また、感染中期以降の投与開始での治療効果についても解析中である。今後、治療効果について異常プリオン蛋白沈着や神経変性との関連について解析を進める予定である。

ヒトへの応用には Comp B の毒性や物性などを改善する必要があり、まだまだ遠い道のりであるものの、これまでに経口投与でプリオン病の予防や治療が行える化合物や薬剤は発見されていなかったことから、Comp B の発見はプリオン病の化学療法剤開発において大きな励みとなるものである。

文献：なし

1P-16
<p>演者：○西田教行 1、高倉由佳 2,3、古川ひさ子 3、山口尚宏 3、片峰茂 3、調漸 4、佐藤克也 4、丹羽正美 5</p>
<p>所属：1) 岐阜大学人獣感染防御研究センター、2) 九州大学神経内科学、3) 長崎大学感染分子解析学、4) 同大学神経内科学、5) 同大学薬理学</p>
<p>演題名：画期的治療法の開発のための基礎的研究：初代培養骨髄間質細胞細胞を用いた神経再生療法の可能性検討</p>
<p>抄録： 細胞移植による CJD の神経再生療法の開発に向けて、今回初代培養骨髄間質細胞（以下 MSC と略）を用いて神経への分化能とプリオン病原体感染に対する感受性について検討を行った。ウイスターラット（3 週齢オス）の大腿骨より骨髄を採取し、Dezawa らの方法に従い初代培養を行った (Dezawa, 2004)。分離培養された MSC は Dezawa らの報告にあるように growth factor による刺激によって in vitro にて神経様の細胞へと分化した。また Niwa らが開発した in vitro Blood Brain Barrier (BBBmodel, Deli, MA 2005) の培養上清を用いると効率に神経様に分化することを見いだした。さらにこの細胞が正常 PrP を発現していることを確認した。ラットのほか、マウス、ハムスター、ウシ、およびヒトの MSC でもやはり PrP の発現を認めた。ラット MSC を用いて GSS 由来の感染因子が ex vivo にて持続感染しうることを見いだした。さらに感染マウスモデル (福岡 1 株および BSE—UK 株感染) の骨髄間質細胞を分離培養したところ、異常 PrP をウェスタンブロッティングにて検出できた。これらの基礎データをふまえ現在 CJD 患者骨髄細胞について検討中である。</p>
<p>まとめ</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) 骨髄間質細胞は容易に分離継代培養可能で、神経への分化能を有していた。</li> <li>(2) 正常 PrP は脳内の発現と遜色のないレベルで発現していた。</li> <li>(3) プリオン病原体の持続感染が可能であり、また感染個体から得た骨髄間質細胞にも感染が認められた。</li> <li>(4) 移植療法に用いるには PrP の発現を抑制するなど遺伝子操作が必要と思われる。</li> <li>(5) 感染個体からの骨髄生検・細胞培養増幅は CJD の生前確定診断法として有効である可能性が示唆された。</li> </ul> <p>次年度は MSC 細胞を用いて実際に感染動物モデルへの移植を試み、平行して感染個体から分離した MSC の感染価の評価を行う計画である。</p> <p>なお、昨年度本会議にて発表した株間の干渉現象 (Nishida, et al) についてはそのメカニズムに関して Yale 大学 Manuelidis らと共同研究を進めている。</p>
<p>文献：</p> <p>Nishdia, N., Katamine, S. and Manuelidis, L. Science 2005, 310:493-496</p> <p>参考文献：</p> <p>Dezawa, M., et al. J Clin Invest 2004, 113:1701-1710</p> <p>Deli, M., et al. Cell Mol Neurobiol 2005, 25: 59-127</p>

2A-1

演者：○二瓶健次 1、白川公子 2

所属：1) 身体障害者療護施設横浜らいず、2) 国立成育医療センター心の診療部

演題名：亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) の知的評価と就学、就労

抄録：SSPE は麻疹ウイルスによる遅発性ウイルス感染の代表的な疾患である。発病後は精神運動面で類型的な進行性の経過をとる場合が多い。その臨床経過は Jabbour の 4 期の分類が用いられている。

目的：SSPE の臨床経過での知的評価の推移を検討し、その就学、就労についての適応について考える。

対象：Jabbour の分類で主にⅡ期における SSPE の症例の知的評価とその後の経過について検討する。知的評価については田中—ビネー式を用いた。

結果：知能検査は田中ビネーを用いた。検査は症状の経過とともに 2 回以上で最大 5 回の検査を行った。全 IQ 値とその差うぶグループ(識別、記憶、視覚運動、模写、構成、表象、合理性、名称、名称、属性、記憶、類推、言語表象)について検討した。

結果：3 例の SSPE の臨床経過 (Ⅱ期での経過) でトータルの IQ は進行とともに低下する。1 例に臨床的に一時改善を示したが、この時期に IQ も一時的に改善を示したが、臨床症状の進行とともに IQ は低下した。

Jabbour Ⅱ期の 4 例の患者の IQ とその IQ の要素についてみると、総 IQ は 9 から 77 であった (平均 43.5)。IQ の要素別に見ると、模写、属性、記憶に関する要素は比較的保たれているが、早期に記憶、表象、合理性が障害されていることがわかる。

通常、SSPE は性格変化、知的低下などにより気づかれるが、実際に診断がつけられるのはミオクローヌスが始まるⅡ期であることが多い。今回の例もいずれもⅡ期であった。4 例についての IQ はⅡ期においても差が見られるが、障害される部位も異なるためとも考えられる。また、Ⅱ期とされるステージも幅があるためと考えられる。

経時的に IQ を測定した例では、Ⅱ期の経過の中で次第に低下していくのがわかる。その知能構成要素別の低下の様子を見ると、いずれの場合でも、模写、模倣などの要素は長く保たれているが、視覚運動、属性、記憶などの面はかなり早期に低下する傾向がある。Ⅰ期ではかなり知能は保たれているので、就学、就労は可能であるが、Ⅱ期では早期では障害される知的要素を考慮することにより可能であるが、Ⅱ期中期以降では困難となる。Ⅲ期ではほぼ知能検査は不能となる。

文献：

2A-2

演者：○高須俊明 1、三木健司 2、東郷将希 2、水谷智彦 2、田村正人 1、田宮崇 3、中村好一 4

所属：1) 長岡西病院神経内科、2) 日本大学内科神経内科部門、3) 長岡西病院精神科、4) 自治医大公衆衛生

演題名：SSPE の発病リスクとしての乳児期麻疹罹患

抄録：乳児期麻疹罹患がSSPEの発病リスクとなることは、これまでに行なわれた症例 - 対照研究のいくつか(1~4)によって明らかになっている。ただしオッズ比の値は報告によってかなり大きく異なっている。パプアニューギニア国東部高地で行なった研究ではオッズ比が非常に高い(6)。交絡因子の影響を検討中であるが、これまでに得られた結果を報告する。

- 文献：1. Detels R et al. Lancet 2:1-14, 1973  
2. Halsey NA et al. Am J Epidemiol 111:415-424, 1980  
3. Kondo K et al. Neuroepidemiology 7:66-80, 1988  
4. 近藤喜代太郎ほか. 総合臨床 39:574-578, 1990  
5. 近藤喜代太郎. スローウイルス感染とプリオン、山内一也・立石 潤監修、近代出版、1995、pp31-45  
6. 高須俊明ほか. プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究班(班長水澤英洋)平成16年度研究報告書、2005

2A-3

演者：二瓶健次 1、○山下純正 2、赤城邦彦 3

所属：1) 身体障害者療護施設横浜らいず、2) 神奈川県立子ども医療センター神経内科、3) 同感染科

演題名：亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) 発症前の麻疹抗体価

抄録：[目的] 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) は麻疹による遅発性ウイルス感染であり、血清麻疹抗体価の高値が診断に有用である。しかし、これまで、発症前の麻疹抗体価が測定された報告はない。発症前の抗体を知ることは発症の機序を知る上にも重要である。SSPE と診断された症例の発症前の保存血清を用い麻疹抗体価の測定を行った。

[症例] SSPE 発症時 6 歳の男児 (現在は 20 歳)

既往歴：妊娠・分娩には異常は認めなかった。生後 10 ヶ月に若年性関節リュウマチ (全身型) に罹患した。1 歳 5 ヶ月にステロイド治療中に重症の麻疹に罹患した。1 歳 8 ヶ月に転居のために当院感染免疫科を受診し継続治療されていた。3 歳 2 ヶ月時にステロイド治療が終了し以後再発なく経過した。

現病歴：6 歳に食事の時を主に脱力発作およびミオクロニー発作がみられるようになり、当科初診した。神経学的には構音障害・緩徐言語・変換運動障害・小脳症状および尿失禁がみられた。意識は清明であり、錐体路症状も認めなかった。血清麻疹抗体価は (CF) 512 倍・(HI) 512 倍と高値を示し、髄液中でも (CF) 4 倍・(HI) 8 倍と陽性であったため、SSPE と診断した。

臨床経過：inosiplex 内服とインターフェロン  $\alpha$  2b の髄注を開始し、4 ヶ月後に Ommaya Reserver を挿入し脳室内投与に移行した。9 歳より interferon  $\alpha$  に変更し脳室内投与を継続した。17 歳まで自力での車いす移動や会話が可能であるなど比較的良好な経過を示したが、その後急激な悪化を来し現在は寝たきりで言語理解もできなくなっている。

[発症前血清抗体価] 2 歳 0 ヶ月 (CF) 32 倍・(HI) 512 倍、2 歳 11 ヶ月 (CF) 32 倍・(HI) 512 倍、3 歳 11 ヶ月 (CF) 64 倍・(HI) 512 倍。その他にも血清免疫グロブリン IgA および IgM の持続的高値、CD4/CD8 比の低値がみられた。

[結論] SSPE 発症のかなり以前より麻疹抗体価の上昇を示し、臨床症状発現前の診断の可能性示唆された。1 歳未満の麻疹罹患後の SSPE 発症率が高いことから、このような例の麻疹抗体の推移を見ることは重要である。

文献：



2A-4

演者：○市山高志1、上野佳子1、高須俊明2、三木健司2、吉良龍太郎3、楠原浩一3、遠山潤4、古川漸1

所属：1) 山口大学生殖・発達・感染医科学/小児科、2) 日本大学神経内科、3) 九州大学大学院医学研究院成長発達医学、4) 西新潟中央病院小児科

演題名：亜急性硬化性全脳炎における blood-brain-barrier 機能

抄録：

【目的】亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) における blood-brain-barrier (BBB) 機能を血清 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) および tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) の面から解析する。

【方法】対象は SSPE 33 例。Papua New Guinea (PNG) 症例 24 例、日本症例 9 例。正常コントロール 33 例。方法は保存凍結血清を用いて ELISA キットにて MMP-9、TIMP-1 値を測定し、Mann-Whitney 検定で解析した。

【成績】血清 MMP-9 値は PNG 群 ( $120.1 \pm 76.1$  ng/ml)、日本群 ( $164.4 \pm 68.9$  ng/ml) とも正常コントロール群 ( $81.0 \pm 54.9$  ng/ml) に比し、有意に高値だった ( $p = 0.0450$ 、 $p = 0.0023$ )。血清 TIMP-1 値は PNG 群 ( $120.1 \pm 61.7$  ng/ml)、日本群 ( $93.9 \pm 23.2$  ng/ml) とも正常コントロール群 ( $146.0 \pm 85.4$  ng/ml) と有意差を認めなかった。MMP-9/TIMP-1 比は PNG 群 ( $1.31 \pm 1.01$ )、日本群 ( $1.83 \pm 0.90$ ) とも正常コントロール群 ( $0.75 \pm 0.61$ ) に比し、有意に高値だった ( $p = 0.0345$ 、 $p = 0.0009$ )。また血清 MMP-9 と MMP-9/TIMP-1 は Jabbour 分類 II 期 ( $n = 18$ ) に比し、III 期 ( $n = 13$ ) で有意に高値だった (MMP-9,  $p = 0.0030$ ; MMP-9/TIMP-1,  $p = 0.0412$ )。

【考察】MMP-9 は脳の血管基底膜の主要構成成分であるコラーゲン IV を分解する。一方、TIMP-1 は MMP-9 活性を阻害する。SSPE において MMP-9 上昇、TIMP-1 正常、MMP-9/TIMP-1 比上昇は BBB 機能の低下を示唆した。この傾向は病期の進行に従って顕著だった。

【結論】SSPE の炎症病態過程において MMP-9、TIMP-1 の関与が示唆された。

文献：

- 1) Ichiyama T, Kajimoto M, Suenaga N, Maeba S, Matsubara T, Furukawa S. Serum levels of matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor (TIMP-1) in acute disseminated encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* in press
- 2) Lukes A, Mun-Bryce S, Lukes M, Rosenberg GA. Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases. *Mol Neurobiol* 1999; 19: 267-284.
- 3) Murphy G, Knäuper V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol* 1997; 15: 511-518.
- 4) Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1995; 96: 2304-2310.

2A-5

演者：○楠原浩一、武本環美、吉良龍太郎、鳥巢浩幸、酒井康成、原寿郎

所属：九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野（小児科）

演題名：SSPE における dsRNA 認識関連分子の遺伝子多型解析

抄録：

【はじめに】SSPE の病態は正確には解明されていない。我々はこれまで SSPE の発症に IL-4 遺伝子多型(-589C/T) および MxA 遺伝子多型 (-88G/T) が関連することを明らかにしてきた。今回、自然免疫における dsRNA の認識分子である toll-like receptor 3 (TLR3) および近年同定された RIG-I、RIG-I のファミリー分子である MDA5、LGP2 と SSPE 発症との関連を一塩基多型 (SNP) を用いて解析した。

【対象と方法】それぞれの遺伝子について HapMap (The International HapMap Consortium, Nature 426, 789-796) を参考に検出力の高い SNP を選択し、SSPE 患者 40 名、血縁関係のない正常学童 87 名について TaqMan® SNP Genotyping Assay を用いて遺伝子型を決定し、カイニ乗検定により関連解析を行った。SSPE 罹患感受性に関連が認められた場合は近傍の SNP も解析した。

【結果】TLR3 遺伝子にある L412F (rs3775291) において、L アリルの頻度が有意に SSPE 群で低かった ( $p=0.028$ )。TLR3 遺伝子の他の SNP (-7C/A, IVS3+71C/A, 1377C/T) は単独の解析では SSPE との関連は認めなかったが、L412F と 1377C/T は完全な連鎖不平衡にあり ( $D' =1$ )、両 SNP によるハプロタイプの頻度でも有意差 ( $P=0.028$ ) を認めた。RIG-I、MDA5、LGP2 については SSPE との関連を認めなかった。

【考察】L412F は TLR3 の細胞外ドメインの特徴的構造である Leucine rich repeat を構成する L の 1 つを置換する。したがって dsRNA との結合もしくは関連蛋白との結合に際し機能に変化を与え、SSPE の疾患感受性に関与する可能性が示唆される。

文献：

2A-6

演者：○野村恵子

所属：熊本大学医学部発達小児科

演題名：亜急性硬化性全脳炎に対するリバビリン治療に関する全国調査

抄録： 亜急性硬化性全脳炎は、麻疹ウイルスの変異ウイルスを原因とする遅発性ウイルス感染症で、非常に予後不良な疾患であるが、未だ効果的な治療法は確立されていない。近年日本を中心に、抗ウイルス薬であるリバビリンの脳室内投与による治療が試験的に行われ、一部で効果が認められている。そこで、より安全で効果的な治療法を確立させるために、これまでにリバビリン治療を実施した施設に対し、アンケート調査を行い、その安全性、効果、有害事象、治療に伴う問題点等について検討したので報告する。尚、この調査にあたっては、患者家族に対し、各主治医より十分な説明を行った上で同意書を取得し、同意書は主治医が保管して、研究者には患者個人が特定できない様に配慮した。

文献：Tomoda A, Nomura K, Miike T: Trial of Intraventricular Ribavirin and Interferon- $\alpha$  Combination Therapy for Subacute Sclerosing Panencephalitis (SSPE) in Japan. No To Hattatsu 2003;35 : 321-326

Tomoda A, Nomura K, Miike T: Trial of intraventricular ribavirin therapy for subacute sclerosing panencephalitis in Japan. Brain and Development 2003;27 : 514-517

2A-7

演者：細矢光亮 1、○橋本浩一 2

所属：1) 福島県立医科大学小児科、2) 同微生物

演題名：RSVに対する siRNA の *in vitro*、*in vivo*における検討

抄録：

目的：Respiratory syncytial virus (RSV) は、麻疹ウイルスと同じパラミクソウイルスに属するウイルスである。我々は RSV の遺伝子に対する siRNA を作成し、*in vitro* およびマウス RSV 感染モデルを用いた *in vivo*において、RSV 感染症への影響について検討した。

方法：1) RNAi 社の siRNA 設計ソフトを用い、RSV の fusion 蛋白をコードする F 遺伝子に対する siRNA を作成した。2) 遺伝子導入試薬を用い siRNA を HEP-2 細胞に導入し、24 時間後に RSV-A2 株を moi:1 で感染させ、1 時間吸着の後、細胞を洗浄し、再び 24 時間培養の後、上清中のウイルス量をプラーク法で評価した。また、細胞中の RSV 各遺伝子 (F, G, N, L) の発現をリアルタイム PCR 法で定量した。3) BALB/c マウスを用いた RSV 感染モデルで siRNA の効果を検討した。マウスに siRNA (4nmol) と遺伝子導入試薬との混合液を麻酔下で経鼻より投与し、4 時間後に RSV-A2 株を 107pfu 経鼻から感染させた。感染後連日、体重、呼吸数、および気道抵抗を測定し重症度を評価した。さらに RSV 感染 1 ヶ月後の血中抗 RSV 中和抗体価を測定した。

結果：*in vitro*において、F 遺伝子に対する siRNA の RSV 増殖への 50%抑制濃度は数 nM であった。siRNA は F 遺伝子の発現を特異的、濃度依存的に抑制し、遺伝子発現抑制に依存して RSV 増殖の減少も認められた。マウス RSV 感染モデルを用いた検討では、siRNA を投与したマウスはコントロールに比べ有意に体重減少、気道抵抗の上昇が軽度であった。また、RSV への中和抗体価は siRNA 投与の有無に関わらず同レベルであった。

結論：*in vitro* および *in vivo*において、siRNA が RSV の遺伝子発現を抑制することが示された。現在、麻疹ウイルスに対する siRNA を作成し、麻疹および SSPE ウイルスに対する増殖抑制効果を検討中である。

文献：なし

2A-8

演者：○堀田博

所属：神戸大学大学院医学系研究科微生物学研究分野

演題名：RNA interference を応用した SSPE ウイルス増殖抑制法開発の基礎的検討

抄録：

【目的】亜急性硬化性全脳炎(SSPE)は麻疹ウイルス(MV)変異株(SSPE ウイルス)が中枢神経系に持続感染することによって起こる。現在行われている SSPE の治療法は、臨床的にある程度の有効性は認められているが未だ十分なものではなく、より効果的な抗ウイルス治療法の開発が望まれている。一方、siRNA による RNA interference はウイルス増殖を効率よく抑制することが知られている。本研究では、siRNA による MV/SSPE ウイルスの増殖抑制について検討した。

【材料と方法】(1)ウイルス：MV 新鮮分離株(K-52; genotype D3 及び T-8; genotype D5)、MV 実験室継代株 (Edmonston; genotype A)、SSPE ウイルス新鮮分離株 (SSPE-Kobe-1; genotype D3)、および MV/SSPE ウイルスとは無関係の脳心筋炎ウイルス (EMCV) を用いた。ウイルスの培養には Vero/SLAM 細胞、B95a 細胞を用い、感染価の測定はプラク法によった。(2) siRNA：MV Ich-B 株 (genotype D3) の L mRNA の塩基配列をもとに、それぞれ 21 塩基からなる標的配列を 8 ヶ所選び、siRNA を合成した。また、それぞれの siRNA を発現するプラスミド (pcPUR+U6i 由来) を作製した。合成 siRNA あるいは発現プラスミドは Lipofectamine 2000 または FuGene 6 を用いて細胞にトランスフェクトした。

【結果】(1) 解析した 8 種類の合成 siRNA のうち 4 種類 (L2、L4、L5、L32) が 20 nM の濃度で MV K-52 株の増殖を効率よく抑制した。なお、それら 4 種類のうち L2 siRNA の標的配列が MV/SSPE ウイルスの異なる genotype 間で最も高度に保存されていることをデータベース解析で確認した。(2) L2 siRNA の MV 増殖抑制効果は 2~200 nM の範囲で用量依存性に認められた。L2 siRNA の MV 増殖抑制効果は、siRNA をウイルス感染前にトランスフェクトした場合のみならず、感染 12 時間後にトランスフェクトした場合にも強く認められた。しかし、感染 24 時間後にトランスフェクトした場合には、L2 siRNA のウイルス増殖抑制効果はほとんど認められなかった。(3) L2 siRNA による非特異的細胞障害作用や、無関係のウイルス (EMCV) に対する増殖抑制作用は認められなかった。(4) 発現プラスミドを用いた場合にも、上記 4 種類の siRNA は MV K-52 株のウイルス増殖を強く抑制した。genotype の異なる Edmonston 株に対しても L2 siRNA 発現プラスミドはウイルス増殖を強く抑制したが、標的配列が 1~2 塩基異なる L4 あるいは L5 siRNA は抑制効果を示さなかった。(5) L2 siRNA 発現プラスミドを SSPE ウイルス感染細胞および非感染細胞にトランスフェクトしてから両細胞を共培養した場合、SSPE ウイルスの増殖が著しく抑制された。SSPE ウイルス感染細胞の培養開始 6 時間後に siRNA をトランスフェクトした場合にもウイルス増殖は強く抑制されたが、共培養開始前に siRNA をトランスフェクトした場合に比べると、その抑制効果はやや弱かった。

【考察】MV/SSPE ウイルス L mRNA 配列のうち高度に保存された配列を標的とする合成 siRNA およびその発現プラスミドを作製し、それらを用いて MV/SSPE ウイルスの増殖を効率よく抑制できることが明らかになった。今後、この siRNA を発現する組換えアデノウイルスの作製や導入効率のよいリポソーム法等と組み合わせることにより、SSPE に対する新規の治療薬として臨床応用できる可能性が示唆された。

文献：

2A-9

演者：○網康至

所属：国立感染症研究所 動物管理室

演題名：カニクイザル中枢神経への麻疹ウイルス持続感染

抄録：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。末梢から脳内へのウイルス伝播には、cell to cell の感染が主体であると考え、麻疹ウイルスに対し感受性があることが知られるカニクイザルに、麻疹ウイルス野外分離株 HL 株を経鼻接種後、ウイルス血症時に、感染自己末梢血単核球を大脳視床に接種する感染実験を行った。接種後、コントロール 1 頭を含む 3 頭を、長期間、脳脊髄液中の麻疹ウイルス中和抗体の出現を指標として、観察を行ったところ、感染 40 週後の感染単核球接種群の 1 頭が、脳脊髄液の中和抗体価 4 倍を示した。この個体は、現在約 3 年を経過しているが、持続的に脳脊髄液中にウイルス中和抗体を認め、かつ高い血清中の中和抗体価を維持し、またウイルス特異抗原刺激に対する T 細胞内サイトカイン産生も高値を示しており、中枢神経への持続感染成立を強く示唆される。現在、臨床症状は特に観察されていない。

SSPE においては、脳脊髄液中の IgG 量の増加が認められることから、これらのカニクイザルについても検討を行ったところ、持続感染の疑われる個体においては、アルブミンについては変化がないが、他の個体と異なり、IgG 量は時間を追って上昇していた。このように、この個体は臨床病理学的に SSPE と同様であることが示唆されることから、ウイルス学的にも同じ病態を示していることが期待される。

文献：

2P-1

演者：○岸田修二

所属：東京都立駒込病院神経内科

演題名：PMLの第二次全国疫学調査結果

抄録： 目的：PMLの統一した診断基準に基づく第一次全国疫学調査では、definite20例、probable18例、possible14例、経2例を得た。今回臨床の詳細を明らかにする目的で第二次調査を行った。

方法：神経内科専門医を対象に1999年～2004年度のPML発症例の臨床を郵送による質問様式で調査した。

結果：二次調査での回答はdefinite13例、probable15例、possible4例であった。①基礎疾患として非HIVが21名(66%)、HIVが11名(34%)であった。②年齢は25歳から77歳であり、平均53歳であった。③調査期間内での発病からの生存日数は1ヶ月から75ヶ月におよび、非HIV患者では18名、HIV患者では4名死亡し、多くは1年以内に死亡していた。④死因はPMLが36%、その他が41%であった。⑤経過では84%の患者で進行性経過をとり、16%で停止～改善を見た。⑥初発は84%で大脳半球、16%で小脳であった。⑦初発症状は運動麻痺、認知機能障害、失語症、視力障害が代表的であり、経過中に言語・嚥下障害、脳神経麻痺、無動無言状態が多くの症例で加わってくる。⑧画像検査ではMRIが全例行われており、definite、probable例に限ると初診時の病変は単一病巣が20例、多発例が8例あった。小脳発症は5例のみで、その他は大脳に初発していた。造影剤増強効果は2例に見たのみで、ほとんどは造影剤増強効果は見られなかった。⑨髄液検査では細胞数は平均 $6.3/\mu\text{L}$ であるが殆どの例で増加はなく、蛋白は $24\text{mg}\sim 108\text{mg}$ (平均 $44\text{mg/dl}$ )であり軽度上昇するものが1/3例にみられた。⑩definite例の8例は脳生検によるものであり、5例は剖検診断によるものであった。⑪HIV症例では発症時のCD4リンパ球数は平均 $66.3/\mu\text{L}$ と低値であった。⑫治療面では、HIVを基礎に持つPMLではHAARTが有効であったが、インターフェロン、Ara-C使用、その他に関しては全く有効例を見なかった。⑬1年以上の長期生存例は非HIV患者で5例、HIV患者で7例見られたが、非HIV患者では小脳初発、HIV患者ではHAART療法患者で延命が見られた。

文献：

2P-2

演者：○黒田康夫、岸田修二、余郷、宍戸—原由紀子、長嶋和郎、水澤英洋

所属：本研究班・PML 分科会

演題名：PML の治療ガイドライン

抄録： PML は数年にも一度も出会わない極めて稀な疾患である。したがって、PML の患者が入院した場合、治療方針を直ちに決定することは困難のように思われる。かかることから、当研究班 PML 分科会では、これまでの PML の治療に関する論文報告をレビューして治療ガイドラインの作成を試みた。

PML が稀な疾患であることから、大規模の RCT はなされておらず、エイズ患者の PML における HAART (highly active anti-retroviral therapy) を除けば、PML の治療で科学的根拠を有するものはない。したがって、治療ガイドラインのまとめは以下のようになった。

まとめ

基礎的な研究において PML の治療に応用できる新知見が発見されているが、PML の動物モデルが存在しないために臨床応用が遅れているのが現状である。現時点では、HIV 関連 PML では HAART 療法を施行し、それ以外の PML では抗がん剤あるいは免疫抑制剤などの誘因薬剤を速やかに中止することが大事である。抗ウイルス薬では cytarabine と cidofovir が有効との報告があるが、効果を否定する多数例解析もあり、また重篤な副作用もあることから投与の有無は慎重に判断すべきである。抗ウイルス薬の治療成績の不一致は、効果判定の方法が異なっていることが一因であり、今後投与した場合には延命だけでなく、神経学的所見、JC ウイルス価、MRI 所見など多因子に渡る解析で効果を判定する必要がある。

文献：



2P-3

演者：○余郷嘉明 1、鄭懷穎 1、北村唯一 1、長嶋和郎 2、岸田修二 3、大野孝江 4

所属：1) 東京大学医学部泌尿器科、2) 北海道大学医学部分子細胞病理、3) 都立駒込病院神経内科、4) 東京大学医学部神経内科

演題名：PML 型 JC ウイルスに頻発する VP1 ループ変異の解析

抄録：

我々は最近、PML 患者の脳病変部や脳脊髄液から検出された JC ウイルス (JCV) DNA (PML 型 JCV DNA) の 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 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 ループには細胞リ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ことから、VP1 ループ変異は PML の発症や病態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 つのアミノ酸残基で見いだされた。本研究では、これら全ての変異が生物学的な意義を有するかどうかを検討した。また、PML の病態進行と VP1 ループ変異との関係も解析した。

PML 患者の剖検または生検脳組織 (n = 10) および脳脊髄液 (n = 16) から抽出された DNA を用いて、VP1 遺伝子領域を標準 PCR または nested PCR で増幅した。増幅断片をシーケンシングし、得られた塩基配列をアミノ酸配列に翻訳し、原型 JCV (健康人の尿、腎、リンパ組織などから検出される JCV) の VP1 アミノ酸配列と比較した。また、PML が進行したが、長期生存した患者と PML が安定化し、長期生存した患者の剖検脳のいろいろな部分から VP1 遺伝子領域を PCR で増幅し、同様に解析した。

(1) 脳組織での VP1 ループ変異の検出率は脳脊髄液での VP1 ループ変異の検出率とほぼ同じであった (約 80%)。 (2) VP1 ループ変異は BC ループ内の 4 ヶ所、DE ループ内の 1 ヶ所、HI ループ内の 3 ヶ所で繰り返し起きていた。 (3) VP1 ループ変異が検出されたアミノ酸残基は、特定のアミノ酸に置換される傾向があった。 (4) PML が進行したが、長期生存した患者において、VP1 ループ変異は全ての脳領域に検出された。一方、PML が安定化し、長期生存した患者では、一部の脳領域でのみ VP1 ループ変異が検出された。 (5) 抗原性変異株として知られている Mad-11 株では D66H というループ変異が検出されたが、これと同じ変異が他の 2 株の PML 型 JCV でも検出された。

以上から、(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 の発症とは関係なく、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。

文献：

Zheng HY, Ikegaya H, Takasaka T, et al. 2005. New sequence polymorphisms in the outer loops of the JC virus major capsid protein (VP1) possibly associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Gen. Virol.* 86: 2035-2045.

Zheng HY, Takasaka T, Noda K, et al. 2005. Characterization of the VP1 loop mutations widespread among JC polyomavirus isolates associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333: 996-1002.

Padgett BL, Walker DL, 1983. Virologic and serologic studies of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Prog. Clin. Biol. Res.* 105: 107-117.

2P-4

演者：長嶋和郎 1、○鈴木忠樹 2、岡田由紀 2、大場靖子 2、田中伸哉 2、澤洋文 3

所属：1) 札幌東徳洲会病院病理、2) 北大・院医・分子細胞病理学、3) 北大・人獣共通感染症リサーチセンター

演題名：JC ウイルス感染におけるウイルスタンパク質 agnoprotein と神経軸索伸長因子 FEZ1 の相互作用の機能解析

抄録：[背景と目的] 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 のゲノムは約 5kb の二本鎖環状 DNA で、6 つの遺伝子を code している。このうち後期転写領域に存在する agnoprotein のウイルス感染における機能は未だ明らかではない。

[方法] 本研究では、JCV agnoprotein のウイルス感染における機能とその分子機構を明らかにするために、Yeast two-hybrid 法を行ない、agnoprotein 結合タンパク質を検索し、ウイルス感染過程における agnoprotein と結合タンパク質の相互作用を分子生物学的手法を用いて解析した。

[結果] 1) Yeast two-hybrid 法により、神経軸索伸長因子である Fasciculation and elongation protein zeta ( $\xi$ )-1 (FEZ1) を agnoprotein 結合タンパク質として同定した。FEZ1 は、Caenorhabditis elegans UNC-76 のホモログとしてクローニングされた分子で、PKC $\xi$  の下流で神経突起の伸長に関わっている。FEZ1 の発現は中枢神経で高く、特に神経細胞で発現が見られるが、JCV 感受性細胞であるグリア細胞では FEZ1 の発現は低いことが報告されている。

2) agnoprotein が核周囲領域で微小管と結合することは報告されている (J Neurovirol 9: 10, 2003) が、agnoprotein と FEZ1 も、核周囲領域で共局在していた。agnoprotein と FEZ1 は、いずれも微小管に直接結合し、その結合は競合的であった。3) agnoprotein は PC12 細胞における FEZ1 の神経突起伸長作用を阻害した。4) FEZ1 過剰発現細胞ではウイルス粒子は核内に限局し、細胞質の点状局在が消失した。さらに、ウイルス接種 7 日後の感染後期におけるウイルス感染細胞数の増大が抑制された。5) ウイルス粒子と Agnoprotein の関係についてウイルス様粒子の microinjection により検討したところ、Agnoprotein はウイルス粒子の核外輸送に促進していた。

[結論] FEZ1 と agnoprotein の相互作用は、ウイルス粒子の伝播に関与することが推測され、FEZ1 が神経細胞とグリア細胞の JCV 感受性の差を決定する一因子であることが示唆された。

文献：Suzuki T, Okada Y, Semba S, Orba Y, Yamanouchi S, Endo S, Tanaka S, Fujita T, Kuroda S, Nagashima K, Sawa H: J Biol Chem 280(26): 24948-56 (2005).

2P-5

演者：○宍戸-原 由紀子

所属：杏林大学医学部病理学教室

演題名：進行性多巣性白質脳症における oligodendroglia 変性機序の解析  
- PML、SUMO、ユビキチンなど PML 核体関連蛋白の発現解析から -

抄録：【はじめに】進行性多巣性白質脳症は JC ウイルス (JCV) 感染による脱髄疾患で、oligodendroglia の腫大した核内にウイルス封入体が認められる。近年我々は、JCV 粒子の外殻 (カプシド) 蛋白が PML 核体とよばれるドット状の核内構造に集積し、これを足場にウイルス粒子が形成される事を報告した (J. Virol. 2004 78: 9890-9903)。PML 核体は、DNA 複製、転写、アポトーシスなど高次核機能と関連した核内構造である。SCA1 などのポリグルタミン病では、異常ポリグルタミン鎖をもつ疾患蛋白が SUMO-1 による修飾を受けて神経細胞の PML 核体に蓄積するとともに、ユビキチン陽性の核内封入体が形成されることが知られている。また、単純ヘルペスウイルス (HSV-1) やサイトメガロウイルス (CMV) 感染では、SUMO-1 の修飾を受けたウイルス初期蛋白が PML 核体に局在し、ユビキチンをリクルートして核体構造を崩壊する。これより、ウイルス増殖に適した細胞環境が形成されると考えられている。しかし、進行性多巣性白質脳症において、核内ウイルス封入体形成に伴う oligodendroglia の変性や、その後の脱髄のメカニズムは明らかではない。そこで我々は、進行性多巣性白質脳症における PML、SUMO-1、ユビキチンなど PML 核体関連蛋白の発現を解析し、SCA1 や他のウイルス感染症と比較検討した。

【対象と方法】進行性多巣性白質脳症の脳組織は、HE 染色、KB 染色、さらに抗 JCV カプシド蛋白抗体、抗 PML 抗体、抗 SUMO-1 抗体、抗ユビキチン抗体を用いた免疫染色、蛍光抗体法により解析した。

【結果】脱髄巣辺縁ではウイルス感染の進行に伴い oligodendroglia の核が腫大し、核膜内側に PML 核体の出現が認められた。JCV カプシド蛋白は、感染初期には PML 核体に集積し、感染と脱髄が進行すると核内全体にウイルスが充満した full inclusion を形成した。Full inclusion 形成細胞では、PML 核体のドット構造は不明瞭となった。SUMO-1 蛋白は、少数の感染初期細胞でドット状の染色性を示したが、full inclusion 形成細胞では染色性を示さなかった。ユビキチンの染色性は、感染初期の細胞では核内に見られたが、full inclusion 形成細胞では細胞質に認められた。

【考察・結論】進行性多巣性白質脳症では、核内ウイルス封入体の形成・細胞変性の過程で PML、SUMO-1、ユビキチンが関与はするものの、その動態はポリグルタミン病や、HSV-1、CMV 感染とは異なると考えられる。

文献：

1.

Shishido-Hara, Y., Ichinose S, Higuchi K, Hara Y, Yasui K : Major and minor capsid proteins of human polyomavirus JC cooperatively accumulate to nuclear domain 10 for assembly into virions. J. Virol. (2004) : 78 : 9890-9903

2.

Shishido-Hara, Y. and Nagashima, K: Synthesis and Assembly of Polyomavirus Virions. (Review) In Khalili, K. and Stoner, G. L. eds., The Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspectives John Wiley & Sons Inc. New York (2001)

# 分担研究報告