

Creutzfeldt-Jakob 病の治療：体内埋め込み型微量注入器具を用いたペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法の効果、および安全性に関する検討

分担研究者：山田 達夫 福岡大学医学部内科学第五教室

研究協力者：坪井 義夫 福岡大学医学部内科学第五教室

研究要旨

プリオン病はいったん発症するとその病型にかかわらず、進行性、致死性の経過を示す。その主な病理所見は、中枢神経の海綿状脳症で、不溶性の異常プリオン蛋白の蓄積を特徴とする。プリオン病に対する治療薬はなく、実験的には、異常プリオン蛋白の蓄積を防ぐ可能性のある効果的な薬剤の検討が行われている。ペントサンポリサルフェートの脳室内持続投与は、スクレイピー感染マウスモデルで著しい発病の遅延を認めた。2003年に英国で、はじめて人プリオン病に対してペントサンポリサルフェート脳室内持続投与が行われ、本邦でも2004年11月から、これまでに9例に対して同治療の経過を見ている。これまでに、明らかな臨床症状の改善がみられた症例はない。症状の進行や生存期間の延長は解析中だが、欧州で同治療を受けた変異型CJDの生存期間は、その平均をはるかに上回っている。ペントサンポリサルフェートの脳室内持続投与が効果的な治療法であるかどうかの検討は今後の症例経過の解析と、剖検例における病理所見の検討を必要とする。

A. 研究目的

クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）などのプリオン病は治療法が確立されていない致死性の神経難病である。本邦において今なお発生が続いている、ヒト乾燥硬膜の移植が原因の医原性プリオン病や、欧州に多い、ウシ海綿状脳症（BSE）に関連した変異型CJD（vCJD）も、その広がりや危惧されている。ペントサンポリサルフェート（PPS）はマウスを用いたプリオン蛋白感染実験において、脳室内投与により発症遅延効果が確認された薬剤である。PPSは欧米で、血栓症や膀胱炎に臨床利用されている薬剤で、血液脳関門を通過しない。プリオン病に応用する際は、脳室内に直接投与する必要がある。本研究では、体内埋め込み型微量注入器具を用いたPPS脳室内投与療法のプロトコルを確立し、本邦のプリオン病患者に応用して同治療の安全性と患者の生命予後改善への効果を明らかにす

ることを目的とする。

B. 研究方法

PPS脳室内持続投与法のプロトコルの作成を行った。プリオン病の診断は、WHOの診断基準に従った。体内埋め込み型微量注入器具（Archimedes[®]）および脳室内カテーテルの留置手術は福岡大学脳神経外科により、福岡大学手術室にて行われた。PPS薬剤注入、薬剤効果の評価、副作用の有無は福岡大学病院第5内科病棟にて行われた。PPS脳室内投与用の製剤化と、PPS髄液中濃度測定は福岡大学薬学部疾患管理学教室で行われた。

（倫理面への配慮）

本研究の対象患者および患者家族に対して十分に説明を行い、理解を得た上で同意された患者にのみ本治療研究は実施された。本治療研究

に対して同意を得る場合は人権保護の立場から慎重に検討し、安全の確保に充分配慮し、対象患者のプライバシー保護には十全の配慮が行われた。同意が得られない場合でも何ら差別なく疾患に対して必要な治療を行うことを原則とし、患者の個人情報については慎重に対応した。

C. 研究結果

作成されたプロトコールは、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を行い、手術後1週間はポンプに生食を満たし、頭部CTで出血がないことを確認する。出血等の合併症がなければ術後8日目よりPPS投与を低濃度で開始する。その後、

漸増し維持量に到達させる。維持濃度は120 μ g/kg/dayとして、4週間毎に腹部皮下の微量注入器具中の薬液を新しい薬液に交換充填する。これまでに9例のプリオン病患者に対して施行された(表)。これまでのところ、経過中に臨床上の進行がみられたのは5例で、うち3例が死亡した。2例は治療開始後、安定あるいは若干の進行が見られている。2例はまだ治療開始後6ヶ月未満なので判定が不能である。治療に関連した合併症としてはCT上硬膜下水腫が6例に、痙攣が1例に、少量の脳室内出血が2例に認められた。血算、生化学、凝固検査に異常は認められなかった。

図. PPS脳質内持続投与法を施行した9例

No	Age	Gender	Diagnosis	Date of Surgery	Duration from the onset (M)	PPS dose Initial/Final (μ g/kg/day)	Survival (M after Tx*)
1	67	F	sCJD	2004/11/16	9	1/120	17 (died)
2	73	F	sCJD	2005/3/1	3	2/120	21 (died)
3	68	F	sCJD (MM2)	2005/6/2	6	10/120	19
4	64	F	fCJD (V180I)	2005/6/21	4	10/120	19
5	64	F	sCJD	2005/11/14	3	10/120	14
6	55	M	iCJD	2006/3/13	10	10/120	4 (died)
7	66	M	iCJD	2006/6/12	3	20/120	7
8	69	F	GSS (P102L)	2006/8/2	6	20/120	5
9	73	F	fCJD (V180I)	2006/10/15	7	20/120	3

D. 考察

CJDは稀な神経難病でその発病率は年間100万人に約1人であるが、不幸にも本邦では多数のヒト由来乾燥硬膜移植後のCJD患者がいま

だ発生しており、潜在的に発症の危険を有する硬膜移植患者も存在する。欧州にて多発したvCJDの脅威は、本邦にもおよび、このような状況下で本研究の目的であるプリオン病の治療

法の確立は、患者や保因者個人にとっての利益となるだけでなく、新たな医原性疾患発生の可能性を抑えることに寄与し、広く社会の利益となる。我々のプロトコールによる PPS 脳室内持続投与法は、全例比較的安全に行われており、プリオン病に対して最も期待できる治療法であることに変わりはない。国際学会での報告や、欧州との共同研究も進んでおり、今後も経過の注意深い観察と解析を継続することで、生命予後改善効果を明らかにすることと、副作用の問題点を解決する方法を検討する必要がある。

PPS は、動物実験において抗プリオン効果が確認されており、副作用もよく検討されている薬剤である。しかし、これまでにプリオン病患者に対して脳室内持続投与は、初の試みであり、脳血液関門を通過しない薬剤の中枢内への投与方法としての意味と、プリオン病に対する臨床効果の 2 つの意味がある。本研究の成果はプリオン病患者の生命予後改善だけでなく、プリオン蛋白遺伝子変異キャリアーやヒト由来硬膜移植歴のある者のような危険因子の保因者がプリオン病を発症するのを予防する医療手段としても発展することが期待される。

E. 結論

現在福岡大学で作成した PPS 脳室内持続投与方法プロトコールは、長期の治療にも耐えうる安全性が確認された。また PPS の濃度が 120 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ としているが、この濃度で、血算、生化学、凝固検査上の異常は認められない。今後は安全域を考えた治療濃度設定をさらに検討する必要がある。プリオン病治療法の開発において、PPS 脳室内持続投与法は脳血液関門を通過しない薬剤の中枢内への投与方法として有用であることが確認された。

またプリオン病に対する臨床効果に関して、今後も神経所見や ADL 等の評価法を用いて検討する必要がある。この証明は症例数が少なく、未治療例を対照とする点で統計学的に有意差を出すことが難しい。しかし、患者の生存期間や、

無動無言になるまでの期間などを指標に、今後解析が必要である。また同時に、剖検例における、異常プリオン蛋白の蓄積が抑制されているかどうかの評価も重要と思われる。

[参考文献]

1. Doh-ura K, Ishikawa K. et al. Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal model. *J Virol* 2004;78:4999-5006.
2. Todd NV, Morrow J, et al. Cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate in human variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Infect Dis* 2005;50:394-396.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 田中美紀,坪井義夫,山田達夫. Quinacrine. *Clin Neurosci* 2006;24(3):333-335.
2. 坪井義夫,山田達夫. Pentosan polysulphate(PPS). *Clin Neurosci* 2006;24(3):336-339.
3. 山田達夫. Flupirtine. *Clin Neurosci* 2006;24(3):340.
4. 坪井義夫. プリオン病に対する PPS 治療-全身性の影響はきわめて少ない-. *Medical Tribune* 2006;39(22):11.
5. 坪井義夫. クロイツフェルト・ヤコブ病—新しいペントサン・ポリサルフェート脳室内投与法の現状. *ヤコブ・ネット NEWS*. 11, 2006.

2. 学会発表

1. 堂浦克美,坪井義夫,山田達夫. 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, 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 2006. 5.11-13.
2. 坪井義夫, 堂浦克美, 山田達夫. 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の試み (続報). 2006 年プリオン研究会 文部科学省人獣共通感染症研究会クラスター支援事業, 安比高原, 2006.9.2-3.
 3. Rainov N.G, Doh-ura K, Tsuboi Y, Krolak-Salmon P, Heidecke V. Experimental treatments for human Prion diseases. Neuro Prion 2006. Torino. 2006,10.3-6.
 4. 荒木保清, 石神紀子, 坪井義夫, 山田達夫, 北本哲之, 佐藤克也, 中川正法. Codon180 変異をしめす CJD へのペントサンポリサルフェート脳室内持続投与. 第 11 回日本神経感染症学会. 伊勢市観光文化会館. 2006.10.13-14.
 5. 坪井義夫. プリオン病治療戦略の展望-臨床試験-. 第 28 回日本薬学会九州支部コロキウム. 福岡大学薬学部. 2006.10.21.
 6. Tsuboi Y, Doh-ura K, Yamada T. Experimental treatment with intraventricular pentosan polysulphate injection in Prion disease. Therapriion Meeting. Paris . 2006.11.21
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし

末梢投与型プリオン病治療予防薬の開発に関する研究

分担研究者：堂浦 克美 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：川崎 ゆり 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：伊藤由美子 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：山田 有希 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者：川越 敬一 第一製薬東京研究開発センター
研究協力者：陳 忠正 第一製薬東京研究開発センター

研究要旨

脳内感染マウスにおいて経口投与で治療効果を認めたアミロイド親和性化合物について、その効果についてさらに解析を進めた。本化合物は正常型プリオン蛋白の発現に影響せず、異常型プリオン蛋白の産生を阻害し、感染因子の蓄積を抑制した。脳移行に優れていたが、当初想定していた以上に脳からのクリアランスが迅速であった。また、治療効果は投与時期に大きく影響されることが明らかとなった

A. 研究目的

昨年度、我々は経口投与で治療効果を発揮するアミロイド親和性化合物（以下、ア化合物）を発見したことを報告した。今年度はこの化合物の治療効果と作用機序について、さらに *in vitro* と *in vivo* での解析を進めた。

B. 研究方法

作用機序解析： プリオンが持続感染しているマウス神経芽細胞腫細胞の培養上清中に、ア化合物を加えて培養を続け、細胞がコンフルエントになった時点で細胞を回収し、細胞に含まれるトータルのプリオン蛋白をウエスタンブロット法で、細胞膜上に発現しているプリオン蛋白をフローサイトメーターで解析した。

動態解析： ICR マウスの尾静脈にア化合物を投与し、投与後 2 分および 30 分に血漿及び脳を採材した。血漿中及び脳中よりア化合物を抽出し、HPLC で分析した。移動層には AcCN / 20 mM NaH₂PO₄ = 350 / 650 を、HPLC のカラムには Inertsil 5 μm 4.6×250 mm を用い、

流速 1.5 ml/min で溶出し、UV 285 nm、蛍光 Ex 285 nm、Em 311 nm で検出した。標準濃度のア化合物を加えたサンプルを測定して検量線を引き、脳内および血漿中濃度を求めた。

治療効果解析： RML 株プリオンを脳内感染させた Tga20 マウスにおいて、ア化合物の経口投与開始時期と生命予後改善効果、経口投与期間と生命予後改善効果を調べた。化合物は毒性が出ない高用量を粉末餌に混ぜて投与した。

治療個体の感染力価解析： ア化合物投与を行った RML スクレイパー脳内感染 Tga20 マウスの脳中の感染力価をバイオアッセイで解析した。対照群として未治療群のマウス脳をア化合物投与非感染マウス脳ホモジネートで希釈した材料を用いた。

（倫理面への配慮）

動物実験は東北大学医学系研究科動物実験委員会の許可を受け、東北大学動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

作用機序解析： ウェスタンブロット法及びフローサイトメーターで解析した限りでは、ア化合物は正常型プリオン蛋白のトータルの発現量や細胞膜上での発現量に影響しないことが明らかとなった。

動態解析： ア化合物は尾静脈より静注後 2 分では高率に脳実質内に移行した。脳・血漿比は 2.7 と、脳移行性に極めて優れていることが明らかとなった。しかし、静注後 30 分では脳内でも血漿中でも検出感度以下にまで低下した。

治療効果解析： 昨年度まだ結果が出ていなかった Fukuoka 1 株感染マウスにおいても発症遅延効果があることが判明した。また、RML 株脳内感染マウスを用いた実験で、投与時期と治療効果との関係を解析したところ、投与開始時期が遅れば遅れるほど治療効果が劣ることが明らかとなった。さらに、投与期間と発症遅延効果との関係を解析したところでは、投与期間が長いほど発症が遅延すること、投与中止後の生存期間は非投与群の生存期間よりも長くなること、投与期間が長くなれば投与中止後の生存期間はやや短くなることが判明した。

治療個体の感染力価解析： 脳内感染マウスにおいてア化合物投与マウスの脳中の感染力価を対照マウスの脳中の感染力価と比較したところ、ともに発症末期であってもア化合物投与マウス脳中の感染力価は非投与マウス脳中の感染力価よりも低いことが判明した。

D. 考察

本年度の結果から、ア化合物は正常型プリオン蛋白の発現に影響して、間接的に異常型プリオン蛋白の産生を抑制している可能性は考えにくい。アミロイドに親和性である性質からア化合物は異常型に結合し、正常型が異常型へ変換されるのを阻害している可能性が考えられる。

一方、ア化合物は脳移行性に優れているばかりでなく、アミロイド・イメージングプローブ化合物と比較して脳からのクリアランスが遅れる

ことで優れた治療効果を発揮していると当初は想定していた。しかし、本年度の動態解析の結果から、この化合物は脳への移行性に優れているものの脳や血液中から短時間でクリアランスされることが判明した。より一層優れた治療効果を発揮させるためには長時間にわたり脳内で一定以上の化合物濃度を保つことが必要であると考えられるため、徐放的にア化合物を作用させるような投与方策が開発できれば、治療効果が上がることを期待できる。

また、治療効果の解析結果から、より長期間にわたる発症遅延効果を期待するには、できるだけ感染早期より投与を開始することが絶対条件であることが明らかとなったが、それ以外にも長期間投与による薬効低下を抑えることが必要で、薬効低下をきたす前に休薬期間を置く間歇的投与方法なども検討してみる必要があるかもしれない。

さらに、感染力価の解析より発症末期であってもア化合物投与マウス脳中の感染力価は非投与マウス脳中の感染力価よりも低いことが判明したが、脳中の異常型プリオン蛋白量と感染力価が平行であるかどうかを明らかにするため、ウェスタンブロット法と免疫組織化学法で解析を進めているところであり、病態と感染力価との関係を含め来年度には明らかにしたいと考えている。

E. 結論

経口投与で有効なアミロイド親和性化合物の作用機序と治療効果についてさらに解析を進め、治療効果をより一層高める方策について考察した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Doh-ura K, Tamura K, Karube Y, Naito M,

- Tsuruo T, Kataoka Y. Chelating compound, chrysoidine, is more effective in both anti-prion activity and brain endothelial permeability than quinacrine. *Cell Mol Neurobiol*. (in press)
2. Fukuuchi T, Doh-ura K, Yoshihara S, Ohta S. Metal complexes with superoxide dismutase-like activity as candidates for anti-prion drug. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16:5982-5987.
 3. Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, Suemoto T, Sawada T, Iwaki T, Doh-ura K. Styrylbenzoazole derivatives for imaging of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J Neurochem* 2006;99:198-205.
 4. Sasaki K, Doh-ura k, Ironside J, Mabbott N, Iwaki T. Clusterin expression in follicular dendritic cells associated with prion protein accumulation. *J Pathol* 2006; 209(4):484-91.
 5. Wakisaka Y, Santa N, Doh-ura K, Kitamoto T, Ibayashi S, Iida M, Iwaki T. Increased asymmetrical pulvinar magnetic resonance imaging signals in Creutzfeldt-Jakob disease with florid plaques following a cadaveric dura mater graft. *Neuropathology* 2006; 26:82-88.
 6. Shintaku M, Yutani C, Doh-ura K. Brain stem lesions in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: A histopathological and immunohistochemical study. *Neuropathology* 2006; 26:43-49.
 7. Kawatake S, Nishimura Y, Sakaguchi S, Iwaki T, Doh-ura K. Surface plasmon resonance analysis for the screening of anti-prion compounds. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(5):927-932.
 8. 逆瀬川裕二, 堂浦克美. プリオン病の治療—その現状と展望—. *Brain Medical*, 2006;18(4):356-370.
 9. 逆瀬川裕二, 堂浦克美. 孤発性クロイツフェルトーヤコブ病と6種類のサブタイプ. *Medical Briefs in Brain & Nerve* 2006;15(4):5-6.
 10. 石川謙介, 堂浦克美. プリオンイメージングの試み. *Clin Neurosci (臨床神経科学)*, 2006;24(3):313-316.
2. 学会発表
1. Doh-ura K. Therapeutic strategies for prion diseases. SFB-596 Meeting for Molecular Mechanisms of Neurodegeneration, Munich, Oct 16,2006.
 2. Tsuboi Y, Doh-ura K, Yamada T. Experimental treatment with intraventricular pentosan polysulphate injection in prion disease. *TheraPrion* 2006, Paris, Nov 21,2006.
 3. Doh-ura K, Rainov N, Ishikawa K, Kawasaki Y, Tsuboi Y. Pentosan polysulfate and amyloidophilic chemicals for prion diseases. *NeuroPrion* 2006, Torino, Oct 3-6,2006.
 4. Sakasegawa Y, Doh-ura K. Aggregation and degradation of cellular prion protein by Novobiocin. *NeuroPrion* 2006, Torino, Oct 3-6,2006.
 5. Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, Iwaki T, Doh-ura K. Styrylbenzoazole derivatives for imaging of prion plaques and treatment of prion diseases. *NeuroPrion* 2006, Torino, Oct 3-6,2006.
 6. Kawasaki Y, Kawagoe K, Chen C.J, Doh-ura K. Effectiveness of an orally administered anti-prion chemical. *NeuroPrion* 2006, Torino, Oct 3-6,2006.

7. Rainov N.G, Doh-ura K, Tsuboi Y, Krolak-Salmon P, Heidecke V. Experimental treatments for human prion diseases. NeuroPrion 2006, Torino, Oct 3-6,2006.
 8. Sakasegawa Y, Doh-ura K. A coumarin antibiotic Novobiocin directly induces aggregation of the cellular prion protein. The 20th IUBMB Congress and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, June 18-23, 2006.
 9. 堂浦克美. プリオン病の治療戦略を展望するー即戦力的方略ー. 第 28 回日本薬学会九州支部コロキウム, 福岡, 2006.10.21.
 10. 堂浦克美. プリオン病の治療開発. 第 64 回慶應神経病理カンファレンス, 東京,2006.9.9.
 11. 照屋健太, 魚本幸, 堂浦克美. プリオン感染細胞からの迅速かつ効率的な PrPres 回収法. 2006 年プリオン研究会, 安比高原, 2006.9.2-3.
 12. 川崎ゆり, 川越敬一, 陳忠正, 堂浦克美. 経口投与型プリオン病治療予防薬の開発に関する研究. 2006 年プリオン研究会, 安比高原, 2006.9.2-3.
 13. 堂浦克美, 魚本幸, 西澤桂子, 川崎ゆり, 伊波真彦. Prophylactic effect of dietary seaweed fucoidan against enteral prion infection. 2006 年プリオン研究会, 安比高原, 2006.9.2-3.
 14. 坪井義夫, 堂浦克美, 山田達夫. 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の試み(続報). 2006 年プリオン研究会, 安比高原, 2006.9.2-3.
 15. 石川謙介, 木村朋寛, 工藤幸司, 西田教行, 岩城徹, 堂浦克美. Styrylbenzazole 誘導体を用いたプリオンアミロイド斑のイメージングおよび伝達性海綿状脳症の治療. 2006 年プリオン研究会, 安比高原, 2006.9.2-3.
 16. Sakasegawa Y, Hachiya NS, Doh-ura K, Kaneko K. Heat shock protein 90 kDa unfolds the copper loaded full length recombinant prion protein in a nucleotide dependent manner. 2006 年プリオン研究会, 安比高原, 2006.9.2-3.
 17. 照屋健太, 堂浦克美. 蛋白質ライゲーションを利用したカルボキシ末端選択的に修飾を施したプリオン蛋白質の調製. 東北大学バイオサイエンスシンポジウム, 仙台, 2006.5.29.
 18. 山口恭史, 三浦隆史, 照屋健太, 堂浦克美, 竹内英夫. 銅イオンによるプリオンタンパク質のコンホメーション変化. 東北大学バイオサイエンスシンポジウム, 仙台, 2006.5.29.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 堂浦克美. コンフォメーション病医薬組成物. 特願 2006-117294, 2006.4.20.
 2. 堂浦克美, 照屋健太, 竹中繁織, 大塚圭一. 異常型プリオン蛋白質濃縮方法、および除去方法. 特願 2006-071881, 2006.3.15.
 3. 竹中繁織, 大塚圭一, 堂浦克美, 照屋健太. 電気化学的抗原検出法とそのための装置並びに検出チップ. 特願 2006-65744, 2006.3.10.

2006年・PMLの診療の進歩

研究協力者：黒田 康夫 佐賀大学医学部内科学講座

研究要旨

2006年度に報告されたPMLの診断、治療に関する論文をレビューした。本年度には大規模の治験の報告はなく、エビデンスを有する治療法は開発されなかった。しかし、PMLの有効な治療法になる可能性があるものがいくつか報告された。中でも、抗セロトニン5HT_{2A}受容体拮抗薬はJCウイルスのoligodendrocyteへの感染を阻止する作用があり、PML患者への投与が強く推奨される。

A. 研究目的

progressive multifocal leukoencephalopathy (PML)は、HIV患者の増加、免疫抑制剤、抗がん剤などの使用増加につれてわが国でも今後その患者数は増加していくことが予想される。しかしながら、PML患者を担当する医師のほとんどが恐らく過去PMLの診療経験がないと思われる。かかる理由で、当研究班のPML分科会は「PML診療ガイドライン」を作成して公表した。PMLの診断、治療は毎年向上していくと考えられ、PMLの診療ガイドラインは必要に応じて改訂し、最新、最善の診断、治療の情報を掲載する義務がある。かかることから、2006年度に報告されたPMLに関する診断、治療についてレビューしたので報告する。

B. 研究方法

PubMedを利用して、2005年から2006年にかけて報告されたPMLに関する論文を検索した。

C. 研究結果

(1) 非HIV-PML

非HIV-PMLの治療において、PML誘因薬剤の中止だけで長期間症状が改善し、生存した腎移植患者の報告があった。¹この論文では13例

の腎移植患者のPML発症をレビューし、免疫抑制剤を中止しなかった8例は死に至り、中止した5例中4例が長期生存したことを明らかにした。同様の報告として、Bcellリンパ腫のPML患者でCHOP療法を中止し、cidofovirを投与して長期生存が得られた報告があった。²さらに、SLEのPML患者で、免疫抑制剤の中止とAraCの髄腔内投与とcidofovirの全身投与で長期間改善した報告があった。³これらは、PML誘因薬剤の速やかな中止だけでPMLの改善が期待できることを示している。

また、PMLの新たな治療法として抗セロトニン5HT_{2A}受容体遮断薬の投与が有効である可能性が示唆された。これは、皮膚筋炎のPML患者でAraCを5日間、Mirtarazine 30mgを連日投与したところ、神経症状が改善し、MRIでも病巣の縮小を認めたとの報告である。⁴PML惹起ウイルスのJCウイルスは4HT_{2A}受容体を介してoligodendrocyteに感染することが報告されており、抗5HT_{2A}受容体拮抗薬がPMLの有効な治療薬になる可能性を初めて示された。

(2) HIV-PML

PMLはHIV感染者に発症することが最も多いが、2006年に多数例に基づく治験結果の報告はなかった。PMLではHAART療法 (highly

active anti-retroviral therapy)の施行で有意な延命が得られることがすでに明らかになっているが、治療中に発症する免疫再構築炎症候群 (immune reconstitution inflammatory syndrome, IRIS)に対する対処法は未解決である。IRISはHAART施行後3ヶ月以内に約20%に起き、時に死に至ることもある。IRISでは、神経症状の増悪、MRIでPML病巣にガドリウム造影効果が出現、末梢血でCD4細胞の増加とHIV量の低下を認めることが特徴である。⁵2006年には無処置、ステロイド投与、HAARTを中止してステロイド投与、抗ウイルス薬のcidofovirの投与のいずれもがIRISに有効であったことが報告された。⁶したがって、IRISに対する対処法は未解決のままである。治療としては、抗ウイルス薬の脳への移行を高めることを目的にして、抗ウイルス薬の投与前に低線量の全脳照射を行ったところ、2年間PMLが非進行性であった症例の報告があった。⁷また、HAART療法によりPCRによる脳脊髄液のJCウイルスゲノムの検出率が有意に低下していることが報告された。⁸PCRによる髄液JCウイルスゲノム検出は脳生検に代わる診断確定法であったが、その精度が低下していることが懸念される。

D. 考察

2006年には多数例に基づくPMLの診断、治療の解析結果の報告はなく、エビデンスを有する新たな診断と治療は開発されなかった。しかし、非HIV-PMLでは、PML誘因薬剤の速やかな中止がPMLの治療の第1歩になることが改めて示された。誘引薬剤はその患者において最も重要な治療薬であるが、PMLを発症すると約半年で植物人間状態に至って死亡することが多く、QOLを考慮すればPML誘起薬剤の中止はやむをえない措置と思われる。本年にはPMLの有効な治療法になる可能性があるものがいくつか報告された。とくに抗セロトニン5-HT_{2A}受容体拮抗薬は理論的根拠を有し、すでに日常

診療上使用されている抗精神薬であることから、今後PML患者への投与が強く推奨される。5-HT_{2A}遮断作用を有する薬剤としてchlorpromazine, clozapine, risperidone, olanzapine, ripiprazoleが利用できる。また、これまで抗ウイルス薬の脳への移行が不良であることが問題視されていたが、それを高める方法としてAraCの髄腔内投与や投与前に低線量の全脳照射が有効であったとの報告が注目された。

HIV-PMLではHAARTがベストの治療法であるが、HAARTに加えて抗ウイルス薬の併用が増加しており、考慮すべきと思われる。HAARTで問題になるのがIRISの発症である。2006年度にはその対処法は結論が出なかったが、症状が重篤であればステロイドを投与すべきと思われる。また、HAARTの開発により、PCRによる髄液JCウイルスゲノムの検出率が有意に低下していることが報告された。PMLが強く疑われる症例では、PCRで髄液JCウイルスゲノムが陰性の場合、PCRを再度施行するか脳生検をすべきと思われる。

E. 結論

2006年にはエビデンスが得られた治療の報告はなかった。しかし、PMLの有効な治療になりえる新しい治療法の報告があった。

[参考文献]

1. Croder CD, et al. Successful outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy in a renal transplant patient. *Am J transplant.* 2005;5:1151-8.
2. Reilmann R, et al. Remission of progressive multifocal leukoencephalopathy in SLE after treatment with cidofovir: a 4 year follow up. *J Neurol Neurosur Psychiatry* 2005;76:1304-5.
3. Aure K, et al. Dramatic improvement in non-AIDS related progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurol Neuro-*

- surg Psychiatry 2005;76:1305-6.
4. Vulliamoz S et al: Favorable outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy in two patients with dermatomyositis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2006;77:1079-82.
5. Venkataramana A, et al. Immune reconstitution inflammatory syndrome in the CNS of HIV-infected patients. Neurology 2006;67:383-388.
6. Martinez JV, et al. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with PML in AIDS: A treatable disorder. Neurology 2006;67:1692-4.
7. Torgovnick J et al. Remission of AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy with combined cidofovir and radiotherapy. AIDS 2006;20:1569-70.
8. Marzocchetti A, et al. Reduced rate of diagnostic positive detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid in cases of suspected progressive multifocal leukoencephalopathy in the era of potent antiretroviral therapy. J Clin Microbiol 2005;43:4175-77.
- F. 健康危険情報
なし
- G. 研究発表
1. 論文発表
1. 尾上祐行、黒田康夫：脳炎・脳症・診断と治療の進歩. ウイルス性髄膜炎・脳炎。日本内科学会雑誌 2006;95:1232-1237.
2. 学会発表
1. 黒田康夫. 新興感染症. 3. プリオン病. 日本耳鼻科学会 第 20 回専門医講習会, 福岡, 2006.11.18.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

進行性多巣性白質脳症の病態と治療法の解明 PML の活動性評価による追跡調査

分担研究者：岸田 修二 東京都立駒込病院神経内科
研究協力者：船田 信顕 東京都立駒込病院病理科
研究協力者：鎌田 憲子 東京都立駒込病院放射線科

研究要旨

PML の転帰は治療評価を行う上で、生命予後、薬剤反応性の有無などでされるのではなく、臨床症状、髄液 JC ウイルスの動態、脳 MRI 所見などを含めた活動性をもって評価すべきであるとの立場から、治療開始前状態と開始後状態における評価の定義を作成し、この定義に沿って個々の症例の追跡調査を行った。その結果エントリー時にはすべて活動性の症例で、HIV 関連 PML 7 例、SLE に合併した PML 1 例、計 8 例が解析出来た。HIV 関連 PML では 2 例、無治療では 3 ヶ月、HAART 無効例は 5 ヶ月でそれぞれ死亡した。SLE 例では PML に特異的治療なく 10 ヶ月活動性のまま生存していた。HIV 関連では HAART により 41 ヶ月の現在停止状態を維持、4 ヶ月で停止後 9 ヶ月維持、3 ヶ月で改善後 69 ヶ月維持、3 ヶ月で停止後 23 ヶ月維持、1 例は HAART 開始 1 ヶ月後から免疫再構築反応を生じ 2 ヶ月現在活動性の症例がみられた。IFN- α の試用例が 1 例あるが無効、cidofovir に関しても効果なし、risperidone は 3 例試用中、1 例無効、2 例は不明との報告である。しかし各薬剤の評価は少数例では論じることが出来ない。HIV 関連 PML では HAART による停止・改善が 4/5 例、無効 1/5 例あり、HIV 関連 PML に対して HAART は活動性評価の点からも有効な治療法である。HAART で免疫再構築症候群を発症した症例での副腎ステロイドホルモンの試用の是非および至適量をコメントするには症例数が少ないし、まだ指針もない。少数例の解析から PML の有効な治療法、ケアシステムを見いだすためには、今後症例の登録システムの開発が必要である。

A. 研究目的

進行性多巣性白質脳症（以下 PML）の診断基準を設定し、疫学調査を行った結果、基礎疾患として非 HIV 感染では 86% の患者が進行性経過の後死亡しているのに比べ、HIV 感染では 36% の死亡率であり¹⁾、HIV 関連 PML は抗レトロウイルス療法により延命効果が示され、非 HIV 関連 PML より生命予後が良かった。しかし本症の転帰は治療

評価を行う上で、生命予後、薬剤反応性の有無で判定されるのではなく、臨床症状、髄液 JC ウイルスの動態、MRI 所見などを含め総合的な活動性を評価すべきである。そこで PML の活動性評価基準を Cinque らの提唱した基準²⁾を参考に作成し、個々の症例に関し、試用された治療法の有効性を検討する。

B. 研究方法

1. 治療開始前状態の評価定義の作成
2. 治療開始後状態の評価定義の作成
3. 上記の定義を用いて追跡を行い、治療効果判定を行う

(倫理面への配慮)

調査方法は個人を特定せず、基礎疾患と治療歴などを検討したもので、問題はないと考えられる。

C. 研究結果

1. 治療開始前状態の評価定義：活動性：病歴から推察し、臨床症状の増悪あるいは経過観察中に MRI 所見の増悪をみるもの、髄液 JCV の検出などを認めるもの（但し髄液 JCV は必ずしも検出されない事もある）。停止：病歴から推察し、臨床症状の変化および経過観察中に MRI 所見の変化をみないもの（髄液中の JCV 検出を認めないもの）。
2. 治療開始後状態の評価定義：活動性：3ヶ月の定期観察中、臨床症状の増悪あるいは MRI 所見の増悪を認めたもの（MRI での萎縮性変化は増悪ととらない）。停止：3ヶ月の定期観察中、臨床症状の変化および MRI 所見の変化をみないもの（髄液中の JCV 検出を認めないもの）。改善：3ヶ月の定期観察中、臨床症状と MRI 所見の改善をみたもの。
3. 症例追跡調査結果（表）：①エントリー一時はすべて活動性の症例で HIV 関連 PML 7例、SLE に合併した PML 1例、計 8例が症例解析できた。②HIV 関連 2例、無治療では 3ヶ月で、HAART 無効例は 5ヶ月で各 1例死亡。③SLE 例は無治療で 10ヶ月活動性の状態で生存。④HIV 関連では HAART により 41ヶ月の現在停止状態を維持、4ヶ月で停止後 9ヶ月維持、3ヶ月で改善後 69ヶ月維持、3ヶ月で停止後 23ヶ月維持、1例は HAART 開始 1ヶ月後から免疫

再構築を生じ治療開始 2ヶ月現在活動性である（図 1）。⑤IFN- α の試用例が 1例あるが無効、cidofovir も無効、risperidone は 3例あり、1例無効、2例は不明である。⑥HIV 関連では HAART による停止/改善が 4/5例、無効が 1/5例あった。⑦免疫再構築による発症例や HAART 治療で免疫再構築を起こした例のステロイドの使用の是非および至適投与量はコメントするには症例数がすくない。

D. 考察

PML は膠原病、悪性腫瘍、臓器移植などの治療薬による免疫不全、特に HIV (human immunodeficiency virus) 感染による高度免疫不全を背景に発症してくる中枢神経脱髄性疾患である。HIV 関連 PML では一旦発症すると多くは半年以内に致死的となり、また非 HIV 関連 PML でも基礎疾患のコントロールで生存期間が HIV 関連に比べ若干長くなるが、概ね 1年以内に死亡の転帰をとり極めて予後は不良である³⁾。HIV 感染治療に HAART (highly active antiretroviral therapy) が導入され、HIV/AIDS 患者は免疫能の改善から日和見感染症の発症率低下、死亡率の低下ならびに延命がもたらされたものの、PML の発症率には殆ど影響が見られていないとの報告⁴⁾がある。わが国では HIV/AIDS 患者が漸増傾向にあり、それに平行して PML 患者が増加している¹⁾。

PML は HAART 治療が導入される以前には全く有効な治療法がなかった。しかしながら、HAART 導入以前には HIV 関連 PML 患者の 1年以上の生存は 10%以下と極めて生命予後不良の疾患であったが、HAART の登場により HIV-関連 PML の予後は著しく改善し、HAART により長期延命するのみならず、症状が停止あるいは改善する症例のあることが認められてきた。しかし HAART

によりウイルス学的、免疫学的に改善しても PML は進行し、また HAART による免疫再構築で逆に神経症状の悪化を来し、時には致死的状态となることも報告²⁾されており、約 50% の患者は HAART による効果がなく、全ての PML 症例が抗ウイルス療法で予後が改善してはいないし、ましてや生存者の 80% は重篤な後遺症の状態にあると言われている。とくに非 HIV 関連 PML は特異的治療法がなく、基礎にある免疫不全の是正が主な治療法となっている。

これまで有効な治療法がなかった背景には、HIV 感染が流行する以前には重度な免疫不全を背景として稀にしか発症しなかったため、病理組織学的診断に頼った診断方法から retrospective に解析するしかなかった。しかし HIV 感染の流行により、本症患者数が飛躍的に増加することにより、JC ウイルスの生物学診断法や画像所見が蓄積し、生前診断にこれらを用いることの有用性が判明した。そこで今後の臨床研究のために臨床症状、画像検査、髄液検査、組織検査を加味した統一した診断基準の作成が必要と考えられ²⁾、わが国でも厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班（班長：水澤英洋）のもとに PML の診断基準をまず作成した⁶⁾。これまで本症の治療成績に関しては、非 HIV 感染関連 PML では免疫抑制剤の減量や中止、あるいは、インターフェロン α 、cytarabine、vidarabine、Interleukin 2、免疫グロブリン、cidofovir などの治療剤により症状の改善や延命が少数例でみられるものの、retrospective な解析からはどの治療薬も一定した効果は見られていない。唯一本症で有効と判断されたものは HIV-関連 PML に対する HAART 治療のみである³⁾。薬効の評価に関して、これまでの治療判定は延命効果だけで判断したものが多い。本症はときに自然経過で症状が停止する

ことも知られており、また高度機能障害を残し植物状態化した延命では意味がなく、延命を目的とした評価より PML が活動しているかどうかの評価が薬効判定には大事であるとの Cinque らの提言²⁾から、彼らの評価基準を参考に評価方法を作成し検討してみた。

今回 7 例の HIV-関連 PML、1 例の SLE-関連 PML を対象に評価基準にそった追跡調査を行ったところ、これまでの報告通り HIV-関連 PML では無治療では早期に致死性的になり、HAART により延命効果があることが示されたのみならず、HAART は PML の活動性を臨床、画像上停止し、時に改善する例もあることが判明、現在 HIV-関連 PML では唯一有効な治療法であることが明らかになった。効果発現は HAART 開始後 3 ヶ月頃からみられ、その後長いものでは 69 ヶ月も症状の再発なく維持できている。しかし PML は HAART 開始により免疫再構築の結果として発症したり、臨床症状の悪化を来す例のあることが報告⁷⁾されてきている。今回調査した例にも免疫再構築症候群を発症した症例が 2 例あり、その対処法として 1 例は少量全身投与が行なわれたものの、別の症例ではステロイドホルモン投与を必要とせず順調に改善した症例も存在した。免疫再構築によりステロイドホルモン投与にかかわらず致死経過を辿った症例報告⁸⁾や逆に効果的であった症例報告⁹⁾も存在する。免疫再構築症候群は軽症から致死的なものまで様々である。従って免疫再構築に対し必ずしもステロイドが必要どうか¹⁰⁾、どのような症例にどれだけ必要かに関しては今後の症例の積み重ねから判断する必要性があるものと思われる。

症例の中には以前試用されたインターフェロン α の髄液腔内投与や HAART と cidofovir の併用例が存在した。後者の例は長期生存しているが、少数例からはいずれの薬剤もその効果を単純に論じることはできな

い。今回抗精神薬 risperidone の試用例がみられた。JC ウイルスはオリゴデンドログリアに侵入する際に serotonine 5-HT_{2A} 受容体を介することから、serotonine 拮抗作用を有する抗精神薬が PML の発症防止ないし病態進展阻止に有効性があるのではないかと期待をもたれている¹¹⁾。まだ少数例であり、今後の試用経験例の解析が必要である。SLE-関連 PML では現在活動性のまま特異的な治療を行うことなく経過している。原疾患のコントロールで延命改善例の報告^{12,13)}があるが、多くは致死性である。

PML は延命しても高度な機能障害を有するままの延命である。HIV 関連、非 HIV 関連 PML とも PML は出来るだけ早期に診断し、重篤な機能障害を来すまで進展する前に治療を開始することが重要である。いずれにしても PML は人にしか発症せず、動物モデルが作成されていないし、発症患者数も少ないことから大規模な無作為臨床試験を行うことは不可能である。このことから本症に有効な治療法を見いだすためには、PML の基礎的研究のほかに、症例の登録システムを開発し、その解析から有効と思われる治療法を見いだすことしか現在方策がない。

E. 結論

HIV 関連 PML では HAART の有効性は活動性評価の面からも高く、治療開始後 3 ヶ月～で進行の停止、その後改善ないし維持状態となる。インターフェロン α あるいは cidofovir、risperidone が試用され、その効果はなし或いは不明とあるが少数例ではその効果を一般的に論じることは出来ない。HIV 関連でも HAART が必ずしも全例に有効ではなく、非 HIV 関連 PML に関しては停止あるいは改善効果を積極的にもたらす治療法がない。PML は早期診断と高度な機能障害になる前に免疫回復と同時に積極的治療開始の併用が必要であり開発が望まれる。HIV

関連 PML の免疫再構築反応に対する治療法に関しては現在コメントするほどの成績はないし指針もない。少数例の解析から有効な治療法、ケアシステムを見いだすためには、今後症例の登録システムの開発が必要である。

[参考文献]

1. 岸田修二：進行性多巣性白質脳症の病態と治療法の解明．PML の第二次全国疫学調査結果．厚生労働科学研究費補助金、難治性疾患克服研究事業．プリオン病および遅発性ウイルス感染に関する調査研究、平成 17 年度総括・分担研究報告書 2006;212-218.
2. Cinque P, et al. The evolving face of human immunodeficiency virus-related progressive multifocal leukoencephalopathy: Defining a consensus terminology. *J Neurovirol* 2003;9(suppl. 11):88-92.
3. Roberts MT. AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. Current management strategies. *CNS Drugs* 2005;19:671-682.
4. Antinori A, et al. Epidemiology and prognosis of AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in the HAART era. *J Neurovirol* 2001;3:23-8.
5. Gray F, et al. Central nervous system immune reconstitution disease in acquired immunodeficiency syndrome patients receiving highly active anti-retroviral treatment. *J Neurovirol* 2005;11 Suppl3:16-22.
6. 岸田修二,他．進行性多巣性白質脳症の診断基準に基づいた全国疫学調査結果．厚生労働科学研究費補助金、難治性疾患克服研究事業．プリオン病および遅発性ウイルス感染に関する調査研究、平成 15

年度研究報告 2004:227-232.

7. French MA, et al. Immune restoration disease after antiretroviral therapy. AIDS 2004;18:1615-1627.
8. Vendrely A, et al. Fulminant inflammatory leukoencephalopathy associated with HAART-induced immune restoration in AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy. Acta Neuropathol (Berl) 2005;109:449-455.
9. Martinez JV, et al. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with PML in AIDS: A treatable disorder. Neurology 2006;67:1692-1694.
10. Du Pasquier RA, et al. Inflammatory reaction in progressive multifocal leuko-encephalopathy: harmful or beneficial? J Neurovirol. 2003;9 Suppl 1:25-31.
11. Alschuler EL, et al. The atypical antipsychotic agents ziprasidone [correction of ziprasidone], risperidone and olanzapine as treatment for and prophylaxis against progressive multifocal

leukoencephalopathy. Med Hypotheses. 2005;65:585-586.

12. Shitrit D, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in transplant recipients. Transpl Int. 2005 ;17:658-665.
13. Crowder CD, et al. Successful outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy in a renal transplant patient. Am J Transplant 2005;5:1151-1158.

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

1. 岸田修二 : PML の疫学と臨床. Brain and Nerve 2007;59(2).(in press)

2.学会発表

なし

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

表. 活動性評価から追跡調査した 8 症例

年齢	治療開始時活動性	基礎疾患	発症時 CD4 数 / μ L	HAAART 効果	他の治療法の効果(+/-)	効果発現時期 (月)	追跡期間 (月)	最終 CD4 数 / μ L	現在の活動性
38	活動性	HIV	7	施行なし	IFN- α 隠注(-) risperidone(-)		3	136	死亡
41	活動性	HIV	44	-			5	422	死亡
40	活動性	HIV	41	+	cidofovir(-)		45		停止
25	活動性	HIV	23	+	免疫再構成にステロイド使用なし	3 (改善)	69	488	改善
36	活動性	HIV	92	+	risperidone(?)	3 (停止)	23	339	改善
49	活動性	HIV	19	+		9 (停止)	9	258	停止
42	活動性	HIV	31	開始直後のため不明	免疫再構成に対してステロイド併用 risperidone併用		2		活動性
57	活動性	SLE					10		活動性

HAARTにより免疫再構築現象と思われる反応を示したPML

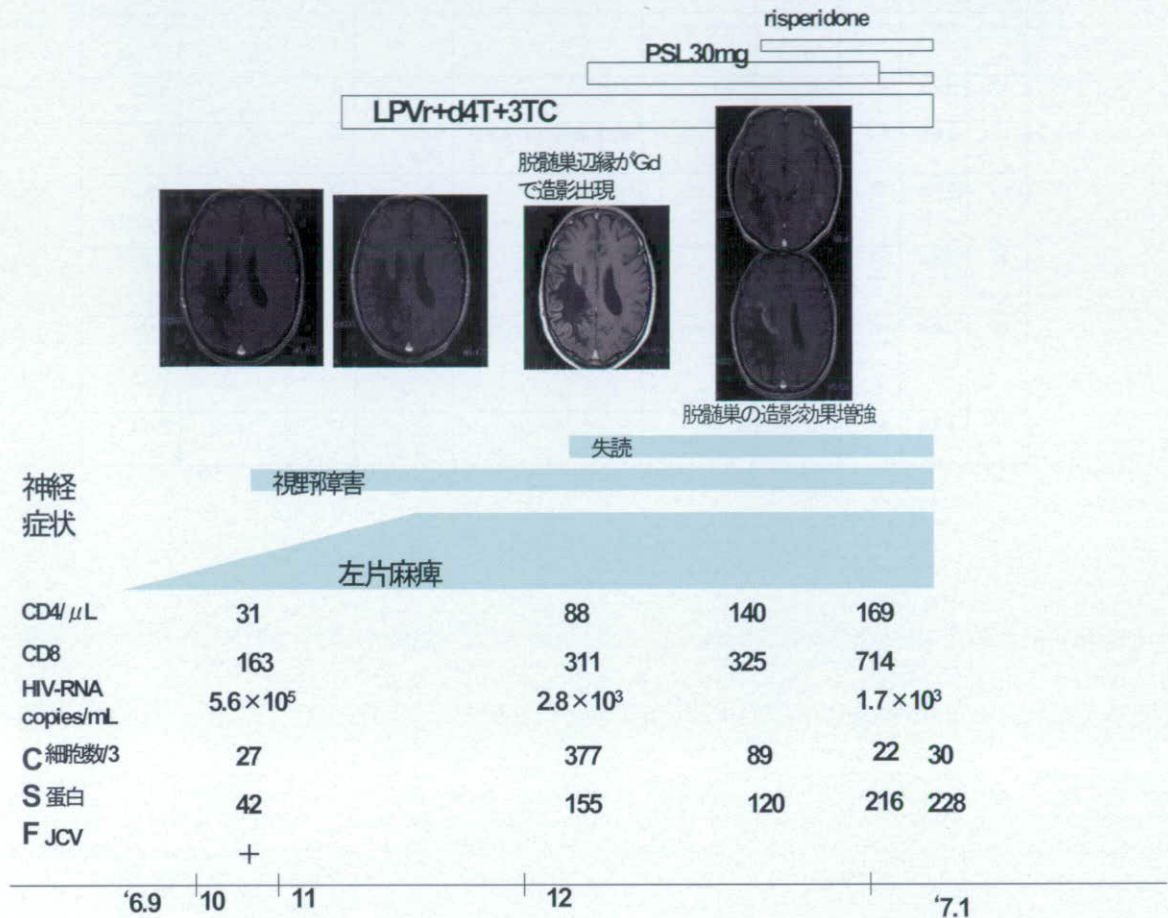


図. PML に対して HAART 開始後免疫再構築反応を示した HIV 関連 PML 例

視野障害、右片麻痺で発症。髄液所見、画像所見から PML の診断後 HAART 開始した。1 ヶ月後左後頭葉の病巣を示唆する失読症の発症と画像では脱髄巣周囲にガドリニウム増強効果が出現し始め、脳脊髄液検査では細胞数と蛋白が上昇、明らかに炎症反応が生じたこと、即ち免疫再構築反応が生じたことを示唆した。その後の追跡画像検査では更に造影効果病巣が拡大を見せた。そのため炎症反応を抑えるために少量の副腎皮質ホルモンを投与する一方、JC ウイルスの細胞内取り込みを阻止する目的で risperidone を併用して観察中であるが、臨床的には増悪傾向は現在無し。

HAART 療法後の PML の 1 例：IRIS を示唆する症例の解析

研究協力者：長嶋 和郎 北海道大学大学院医学研究科分子細胞病理学・札幌東徳洲会病院
病理

研究協力者：澤 洋文 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター分子病態・診断部門

研究協力者：今村 栄次 県立広島病院神経内科

研究協力者：時信 弘 県立広島病院神経内科

研究協力者：福原 敏行 県立広島病院臨床検査研究科

研究協力者：桑原 正雄 県立広島病院呼吸器内科

研究要旨

神経症状で発症した AIDS に合併した進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy: PML) の症例で、highly active antiretroviral therapy (HAART) 療法後に意識障害の出現と進展がみられた症例の剖検例を検索し、immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) の関与が推察されたので、臨床所見、病理所見、ウイルス学的所見を提示して、IRIS の発症機構を考察した。

A. 研究目的

JC virus (JCV) は致死性中枢神経系脱髄疾患である (Progressive multifocal leukoencephalopathy, PML) を惹起する。近年免疫抑制療法の普及や acquired immune deficiency syndrome (AIDS) の流行に伴って PML が問題になって来ている^{1,2}。最近 highly active antiretroviral therapy (HAART) 療法の導入により AIDS の治療効果の飛躍的な改善が見られる一方、AIDS に伴う日和見感染脳障害などの想定外の病像悪化が報告されてきている。この稀な病態は immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS: 免疫再構築症候群) と呼ばれ、注目を浴びている³。我々は神経症状で発症した AIDS に合併した PML の症例で、HAART 療法後に意識障害の出現と進展がみられた症例の剖検例を検索し、本症例が IRIS に合致していると考えられたので、臨床所見、病理所見、ウイルス学的検索を行い、IRIS の発症機構の検索を行うことを試みた。

B. 研究方法

1) 免疫染色法：

i) 一次抗体：抗 JCV agnoprotein、抗 JCV VP1 抗体は当研究室で作成したものをを用いた^{4,5,6}。抗 HIV-1 p24 抗体は感染研究所より供与されたものを使用し、抗 cytomegalovirus 抗体は DAKO 社製を用いた。

ii) 抗原賦活化：抗原を賦活化するために切片は 10mM sodium citrate pH6.0 に浸した上で圧力釜で 3 分加熱し、その後水によって冷やした。

iii) 内因性 peroxidase 除去：0.02% Tween20/PBS で洗浄後 0.3% H₂O₂ で 15 分処理し再度 0.02% Tween20/PBS で洗浄した。

iv) 免疫反応：10% goat normal serum に 30 分反応させた後、一次抗体を 4°C overnight で反応させた。反応後 0.02% Tween20/PBS で洗浄した後に Biotinylated goat anti-rabbit IgG で 37°C、30 分間反応させた。0.02% Tween20/PBS で洗浄後、peroxidase-labeled

streptavidin で 30 分間反応させ、3, 3'-diaminobenzidine で発色させた。

v) 観察：免疫染色を行った slide は顕微鏡 (Nikon 社) で観察の後、画像 file を作製した。

2) JC virus のゲノムの検索：

髄液からの DNA 抽出はスマイテスト EX-R&D (ゲノムサイエンス研究所) を使用し、メーカーのプロトコールに従って行った。また brain sample からの DNA 抽出は Qiagen 社の QIAamp DNA mini Kit を用いて行った。その後、抽出した DNA を用いて nested PCR 法を行った。Primer sets は Outer primer set として A1, A3 を用いて [A1 : (+) (nt 4979-5009/Mad-1):

5'TCCATGGATTCCTCCCTATTCAGCACTTTGT 3'、A3 : (-) (nt 471-502/Mad-1):

5'CATTACTTACCTATGTAGCTTTTGGTTCA GGC 3']

以下のように sample を調整した。

Sample DNA	2.5 µl
10X Buffer	5
dNTPs (10 mM)	1
A1 (10 µM)	2.5
A3 (10 µM)	2.5
H ₂ O	36.25
HotStar (5 U/µl)	0.25

その後

PCR Activation 95°C, 15 分を行なった後、

Denaturation 94°C, 1 分

Annealing 56°C, 1 分

Extension 72°C, 2 分

の反応を 40 cycle 行い、

Final extension は 72°C, 4 分間行った。

その後 agarose gel で泳動を行った後に、2 回目の PCR を行った。

2 回目の PCR は Inner primer set として B1、B3 を用いた [B1 ; (+) (nt 5041-5062/Mad-1)

5'GCAAAAAGGGAAAACAAGGG 3'

B3 : (-) (nt 310-288/Mad-1)

5'CACTGCAGAAGCCTTACGTGACAGCTGG

3']。反応液の組成は

1 回目の reaction mixture	2.5 µl
10X Buffer	5
dNTPs (10 mM)	1
B1 (10 µM)	2.5
B3 (10 µM)	2.5
H ₂ O	36.25

HotStar (5 U/µl) 0.25

であり、この検体を

PCR Activation 95°C, 15 分を行なった後、

Denaturation 94°C, 1 分

Annealing 56°C, 1 分

Extension 72°C, 2 分

の反応を 30 cycle 行い、

Final extension は 72°C, 4 分間行った。

予想される増幅断片のサイズは原型の場合は 396 bp であるが、再編成型の場合、断片サイズは異なる。

これらの方法は余郷博士 (東京大学 医科学研究所) の protocol に従って行った^{7,8}。

(倫理面への配慮)

本研究では、JC ウイルス感染症による進行性多発性白質脳症の病理組織切片を用いる。病理解剖とその検索は日本病理学会が提唱している倫理指針に則って行なわれている。

C. 研究結果

1. HAART 療法後に意識障害の出現と進展がみられた 44 歳男性の症例の剖検例を検索し以下の所見を得た。

2. 生活歴：同性愛者、輸血歴なし。現病歴：

H17 年秋頃に運動中左手の動きが悪いという症状で発症。H18 年 3 月頭部 MRI で多発性白質病変が認められ入院。左上肢の協調運動拙劣。左下肢の引き摺り歩行。主な検査所見：HIV 抗体陽性、HIV RNA virus 量：2.4 x 10⁵ copy/ml.

CD4 10³/µl。髄液：細胞 1/µl (リンパ球)、蛋白 42 mg/dl, オリゴクローナルバンド陰性、JC

virus PCR (-)。