

4月中旬より HAART 療法

(3TC+AZT+LPV/RTV)を開始。8日目より発熱と意識障害出現。5月中旬意識障害の増悪、発熱後脳浮腫を生じ死亡。PML 発症後 7 ヶ月、HAART 開始後 36 日目。

3. 剖検所見: 大脳皮質下白質に多巣性あるいはびまん性の脱髄とグリオシスを認める。脱髄巣およびその周囲の血管周囲リンパ球浸潤が著明。局所的に JC virus 抗 VP1 抗体および Agno 抗体で陽性に染まる細胞が多数認められ、PML に合致。浸潤リンパ球はほとんど CD8 陽性細胞であった。他の日和見感染や HIV 脳症は否定された。

D. 考察

PML で血管周囲に炎症細胞反応が見られる場合があるが、通常あっても軽度である。HAART 治療後の脳症の悪化、びまん性脱髄病巣、著明な血管周囲リンパ球浸潤などから本例には IRIS が生じた事が示唆された。免疫不全が改善される中で大脳の髄鞘をターゲットとする自己免疫的異常が発症する機構として、使用薬剤の関与も含めた検討が重要であろうと思われた。

E. 結論

PML の HAART 治療後に生じた IRIS の症例を報告し、早期診断と治療法の確立に関する考察を行なった。

[参考文献]

1. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet* 1: 1971;1257-1260.
2. Dworkin MS. A review of progressive multifocal leukoencephalopathy in persons with and without AIDS. *Curr*

Clin Top Infect Dis 2002;22:181-195.

3. Gray F, Bazille C, Adle-Biassette H, Mikol J, Moulignier A, Scaravilli F. Central nervous system immune reconstitution disease in acquired immunodeficiency syndrome patients receiving highly active antiretroviral treatment. *J Neurovirol* 2005;11 Suppl 3:16-22.
4. Okada Y, Endo S, Takahashi H, Sawa H, Umemura T, Nagashima K. Distribution and function of JCV agnoprotein. *J Neurovirol* 2001;7:302-6.
5. Endo S, Okada Y, Orba Y, Nishihara H, Tanaka S, Nagashima K, Sawa H. JC virus (JCV) agnoprotein colocalizes with tubulin. *J Neurovirol* 2003;9 Suppl 1:10-14.
6. Okada Y, Sawa H, Endo S, Orba Y, Umemura T, Nishihara H, Stan AC, Tanaka S, Takahashi H, Nagashima K: Expression of JC virus agnoprotein in progressive multifocal leukoencephalopathy brain. *Acta Neuropathol (Berl)*2002;104:130-6.
7. Sugimoto C, Ito D, Tanaka K, Matsuda H, Saito H, Sakai H, Fujihara K, Itoyama Y, Yamada T, Kira J, Matsumoto R, Mori M, Nagashima K, Yogo Y. Amplification of JC virus regulatory DNA sequence from cerebrospinal fluid: diagnostic value for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch Virol* 1998;143:249-262.
8. 余郷嘉明, 杉本智恵. PML の PCR 診断. *神経研究の進歩* 1999;43,1:128-137.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Khalili K, White MK, Sawa H, Nagashima K, Safak M. The agnoprotein of polyomaviruses: A multifunctional auxiliary protein. *J Cell Physiol* 2006;204:1-7.
2. Okada Y, Suzuki T, Sunden Y, Orba Y, Kose S, Imamoto N, Takahashi H, Tanaka S, Hall WW, Nagashima K, Sawa H. Dissociation of heterochromatin protein 1 from lamin B receptor induced by human polyomavirus agnoprotein: role in nuclear egress of viral particles. *EMBO Rep* 2005;6:452-457.
3. Suzuki T, Okada Y, Semba S, Orba Y, Yamanouchi S, Endo S, Tanaka S, Fujita T, Kuroda S, Nagashima K, Sawa H. Identification of FEZ1 as a protein that interacts with JC virus agnoprotein and microtubules: role of agnoprotein-induced dissociation of FEZ1 from microtubules in viral propagation. *J Biol Chem* 2005;280,24948-24956.
4. Sunden Y, Suzuki T, Orba Y, Umemura T, Asamoto M, Nagashima K, Tanaka S, Sawa H. Characterization and application of polyclonal antibodies that specifically recognize JC virus large T antigen. *Acta Neuropathol* 2006;111:379-387.
5. Sunden Y, Semba S, Suzuki T, Okada Y, Orba Y, Nagashima K, Umemura T, Sawa H. Identification of DDX1 as a JC virus (JCV) transcriptional control region-binding protein. *Microbiol Immuno* 2007; 51: 327-337.
6. Sunden Y, Semba S, Suzuki T, Okada Y, Orba Y, Nagashima K, Umemura T, Sawa H. DDX1 promotes proliferation of JC virus (JCV) through transactivation of the JCV promoter. *Microbiol Immunol* 2007;51:339-347.
7. 澤 洋文、鈴木 忠樹、大場 靖子、寸田 祐嗣、長嶋 和郎. JC ウイルスの最近の基礎的知見. *BRAIN and NERVE* 2007; 59: 101-108.
8. Makino Y, Tsuda M, Ichihara S, Watanabe T, Sakai M, Sawa H, Nagashima K, Hatakeyama S, Tanaka S. Elmo1 inhibits ubiquitylation of Dock180. *2006;119:923-932.*
9. Hasegawa H, Sawa H, Lewis MJ, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katano H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima K, Hall WW. Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat Med* 2006;12: 466-472.

2. 学会発表

1. Nagashima K, Semba S, Sawa H. Identification of factors involving JC virus neurotropism. the 8th European Congress of Neuropathology, Amsterdam, The Netherlands, June 25-28, 2005.
2. Sawa H, Suzuki T, Okada Y, Orba Y, Sunden Y, Semba S, Nagashima K. Agnoprotein plays a role in intracellular trafficking of JC virus. 3rd International Conference Polyomaviruses and Human Diseases: Basic and Clinical Perspectives, Providence, RI, USA, Sep 11-14,2005.
3. 久保田佳奈子,鈴木忠樹,牧野吉倫,大場靖子,澤洋文,長嶋和郎. JC virus 感染と replication protein A (RPA)のリン酸化に関する検討. 第 46 回日本神経病理学会,宇都宮,2005.5.12-14.
4. 的場智子,鈴木忠樹,大場靖子,澤洋文,七戸秀

- 夫,黒田敏,落谷孝弘,長嶋和郎. JC virus 感染症のモデル動物の作成とその治療法に関する検討.第 46 回日本神経病理学会,宇都宮,2005.5.12-14.
5. 鈴木忠樹,岡田由紀,大場靖子,仙葉慎吾,遠藤秀一,藤田敏次,黒田俊一,長嶋和郎,澤 洋文. JC ウイルス感染におけるウイルス蛋白 agnoprotein と神経軸索成長因子 FEZ1 の相互作用の研究. 第 9 回日本神経ウイルス研究会,浜松,2005.6.9-11.
 6. 寸田祐嗣,鈴木忠樹,大場靖子,仙葉慎吾,梅村孝司,田中伸哉,長嶋和郎,澤洋文. JC ウイルス初期蛋白質 large T antigen の機能解析および特異抗体の作製.第 9 回日本神経ウイルス研究会,浜松,2005.6.9-11.
 7. 鈴木忠樹,岡田由紀,大場靖子,仙葉慎吾,遠藤秀一,長嶋和郎,田中伸哉,澤洋文. JC ウイルス agnoprotein と神経軸索成長因子 FEZ1 の相互作用.第 85 回北海道医学大会病理分科会,札幌,2005.9.10.
 8. 寸田祐嗣,鈴木忠樹,大場靖子,梅村隆司,田中伸哉,長嶋和郎,澤洋文. JC ウイルス初期蛋白質 large T antigen の機能解析および特異抗体の作成. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会、横浜,2005.11.20-22.
 9. 鈴木忠樹,岡田由紀,大場靖子,長嶋和郎,田中伸哉,澤洋文. JC ウイルス agnoprotein と神経軸索伸張因子 FEZ1 の相互作用. (ワークショップ) 第 53 回日本ウイルス学会学術集会,横浜,2005.11.20-22.
 10. Suzuki T, Okada Y, Orba Y, Sunden Y, Kimura T, Sawa H: Analysis of JC virus agnoprotein function. Asian Research Forum on Emerging and Reemerging Infections-2007, Nagasaki, Japan, 2007.1.14-16.
 11. 大場 靖子、寸田 祐嗣、鈴木 忠樹、澤洋文 : Roscovitine (Pharmacological CDK inhibitor)によるJCV増殖抑制効果の検討。第 54 回日本ウイルス学会学術集会,名古屋 2006.11.19-21.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

JC virus agnoprotein と細胞側因子の相互作用

分担研究者：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：鈴木 忠樹 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：寸田 祐嗣 北海道大学大学院獣医学研究科比較病理学
研究協力者：大場 靖子 北海道大学大学院医学研究科分子細胞病理学

研究要旨

JCV の 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、agnoprotein を bait とした 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 と細胞側因子の相互作用を分子生物学的手法を用いて解析した。その結果 agnoprotein 結合タンパク質として、核膜に存在する heterochromatin protein 1 alpha (HP1α) および Clathrin adaptor protein を同定した。agnoprotein は HP1α と細胞の核膜の裏打ちを行うタンパク質である lamin B receptor (LBR) の結合と競合し、HP1α を LBR から乖離し、その結果として、核膜の安定性を変化させることを見出した。さらに JCV の capsid protein である VP1 を用いて作製した virus-like particle (VLP) を用いて、agnoprotein 存在下の細胞では、核内に存在する VLP 粒子の核外への輸送が促進していることを見出した。また、agnoprotein と Clathrin adaptor protein との相互作用により、JCV の細胞内輸送が制御されているという事実も見出しており、JCV の感染様式機構に関して新たな知見を得た。

A. 研究目的

human polyomavirus である JC virus (JCV) は致死性中枢神経系脱髄疾患である進行性多巣性白質脳症 (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 が益々問題になって来ている^{1,2}。JCV は Polyomavirus family に属する二重鎖環状 DNA ウイルスである。その構造は直径 42 から 45nm の 72 個の五量体の capsid から成る。JCV ゲノムは 5,130 塩基から成り、三つの領域に分けられ、調節領域を基点に反時計回り方向に大型 T (Large-T) 抗原と小型 t (small-t) 抗原、時計回り方向に agnoprotein、VP2、VP3、VP1 の合計 6 種類の蛋白をコードしている³。

調節領域は早期と後期蛋白転写領域の間にあり、複製の開始起点及び転写調節領域を含む。Polyomavirus family には Simian virus 40 (SV40) と BK virus (BKV) があり、これら 3 種類のウイルスが発現する蛋白のアミノ酸配列は 78-90% という非常に高い相同性を有するが、後期蛋白のひとつである agno のみが、55%前後と際立って低い値を示す。しかしながらそのアミノ末端側 1-49 番のアミノ酸配列は、これらのウイルス間で非常に良く保存されていることから、Polyomavirus に共通する機能はこの部分にコードされていると推察される。

JCV の agnoprotein は後期蛋白転写領域の最上流に位置し、調節領域の直後にコードされている、71 アミノ酸、分子量約 8,000 の蛋白である。agnoprotein 以外の後期蛋白は、VP1 が主

要外殻蛋白、VP2、VP3 は SV40 では VP1 を裏打ちする構造蛋白と考えられているが、これまでに agnoprotein が構造蛋白であるとする報告はない。SV40 や BKV の agnoprotein はウイルス感染細胞において主に細胞質に局在し、核内で複製・増殖するウイルス粒子とは局在が異なることから、agnoprotein が構造蛋白である可能性は低いと考えられる。しかしながら、過去に agnoprotein に関する報告は比較的少なく、例えば SV40 では、agnogene に変異を有するために agnoprotein を発現できない agnoprotein 欠損ウイルスは、野生型に比較してウイルスの増殖が著明に抑制されるという報告がなされているが⁴、未だ不明な点が多い。一方、JCV の agnoprotein について、我々は最近 JCV agnoprotein が感染細胞の細胞質、特に核周囲に局在し、核内にも少量存在していることを確認した⁵。しかし JCV agnoprotein の細胞内での機能については依然として不明な点が多い。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 と宿主側のタンパク質の相互作用について分子生物学的、生化学的手法を用いて解析を行うことを目的とした。さらに agnoprotein 結合タンパク質として Clathrin adaptor protein も単離しており、JCV の細胞内輸送機構における、JCV と細胞因子であるこれらのタンパク質との相互作用を解明することを試みている。

B. 研究方法

1) 細胞株：

培養細胞株としてヒト胎児腎臓上皮細胞由来の細胞株 HEK293 細胞由来で JCV agnoprotein を Tet promoter の制御下で発現させる 293AG 細胞を用いた。細胞株は 10% FBS および抗生物質を含んだ DMEM 培地で培養を行った。293AG 細胞は Invitrogen 社の T-Rex system を

用いて作製し、Doxycycline の培地への添加によって JCV Agnoprotein を誘導できることを確認した(図 1)。

2) Yeast two-hybrid assay：

Yeast two-hybrid assay は human brain cDNA library および Matchmaker System 3 を用いて行った。酵母 AH109 細胞に human brain cDNA library および shuttle vector である pGBKT7 に JCV agnoprotein の N 末 24 残基を code する cDNA を subcloning したものを導入し、陽性クローンを大腸菌 DH5α に形質転換し、sequence を行い、得られた配列は NCBI database の BLAST program を用いて検索を行った。

3) plasmid の作成：

HP1α および LBR の cDNA は HEK293 細胞由来の cDNA library から PCR で増幅し、それぞれ、Clontech 社の pCMV-myc また pEGFP-N1 に subcloning した。JCV agnoprotein は cDNA を Invitrogen 社の pGST-EGFP、pcDNA4HisMax、または pcDNA4/TO/myc-His vector に組み込んだ。

4) 一次抗体：

抗 HP1α mouse monoclonal 抗体は Chemicon から購入、抗 EGFP polyclonal 抗体は望月博士(国立循環器病センター)から供与して頂いた。Horseradish peroxidase を conjugate した抗 Myc mouse monoclonal 抗体は Invitrogen、から抗 Lamin a/c 抗体は Santa Cruz Biotechnology 社から購入した。抗 JCV さらに agnoprotein、抗 JCV VP1 抗体は当研究室で作成したものを用いた^{6,7,8}。

5) 細胞への plasmid の導入と immunoblotting

細胞への遺伝子導入は Invitrogen 社の lipofectamine 2000 を用いて行った。遺伝子導入後 24-48 時間後に細胞を回収して Immunoblotting に用いた。細胞は RIPA buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1%

SDS, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)] と Complete protease inhibitor cocktail を混和した buffer で溶解し、15,000 x g、4°C 15 分間遠心後、上清を回収して細胞抽出液とした。細胞抽出液は Protein assay にてタンパク質濃度を測定し、20 µg のタンパクを含有する細胞抽出液を SDS-PAGE にて泳動後、blotting buffer (12.5 mM Tris-HCl, 96 mM glycine, 20% methanol) を用いて Immobilon-P Transfer Membrane [polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane] に転写した。その後 PVDF 膜は、5% non-fat dry milk 添加 TBS-T buffer にて 30 分間ブロッキングした後一次抗体を反応させた。その後 TBS-T buffer で洗浄し、二次抗体である Goat anti-Mouse Immunoglobulin または Goat anti-Rabbit Immunoglobulin を室温で 1 時間反応させた。反応後、再度 TBS-T buffer で洗浄し、ECL Western blotting detection reagents (Amersham 社) を用いて発色させ Luminoimage analyzer (Fujifilm 社) で検出した^{9,10}。

6) 免疫蛍光染色

細胞は 4% paraformaldehyde/PBS で固定した後 0.1% Triton X-100 in PBS で permeabilize し、5% skim milk/PBS 存在下で室温にて incubate した。その後一次抗体と incubate した後、二次抗体 (Alexa 488- or Alexa 594-labeled goat antibodies to rabbit immunoglobulin G もしくは Alexa 594-labeled goat antibodies to mouse immunoglobulin G) と反応させ、propidium iodide (0.2 µg/ml) で核染を行い、オリンパス社の confocal laser-scanning microscope で観察した¹¹。

7) Immunoprecipitation (IP) assay

IP assay は核分画と ER 分画、他の膜分画に分けた後に行なった。2 · 10⁶ 個の細胞を氷冷した sucrose buffer I (0.32 M sucrose, 3 mM calcium chloride, 2 mM magnesium acetate,

0.1 mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM DTT, 0.5% Nonidet P-40) で回収し、その後 sucrose buffer II (1.8 M sucrose, 5 mM magnesium acetate, 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM DTT) を加えた。その後静かに遠心管に入っている sucrose buffer II の上に重層し、discontinuous sucrose gradients を作製した。この検体を 30,000 g で 45 分 4°C で遠心しペレットを PBS containing 0.5% Triton X-100 で洗浄し、nuclear lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 300 mM of sodium chloride, 0.5% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate) で溶解して、1 時間 4°C で攪拌した。その後さらに 20,000 g、30 分 4°C で遠心し上清を immunoblotting と IP assay に用いた。IP assay はこれらの検体を protein A-Sepharose FF beads (Amersham Pharmacia 社) で 1 時間、その後 antibody-coupled protein A beads で 4 時間 4°C で反応させ、6 回 RIPA buffer もしくは wash buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM sodium chloride, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.02% BSA, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) で洗浄した後に SDS-PAGE に泳動して、解析した。

8) Microinjection of VLPs

Virus-like particle (VLP) は VP1 を code した plasmid を competent 細胞 BL21(DE3)/pLys (Stratagene 社) に transform した。VP1 の発現は 30°C で 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) によって 4 時間誘導した。4,000g、10 分間遠心し沈殿した大腸菌を reassociation buffer (1 × TBS, 20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM CaCl₂) に懸濁し、終濃度 1 mg/ml の lysozyme を添加し、氷上に 30 分間放置した。終濃度 2 mg/ml になるように sodium deoxycholate を添加し、更に氷上に 10 分間放置した。サンプルは 15 秒 5 回の超音波で処理した後順次に DNase I と PMSF と aprotinin を添加して 20% sucrose 存在下で

100,000 x g、2 時間超遠心した。沈殿を 4 ml の reassociation buffer に懸濁してから、更に CsCl を用いて 100,000g、15°C で 16 時間超遠心した。上清を上から 500 μ l ずつ回収して赤血球凝集能 (hemagglutination、HA) を測定し、一番高い HA を持つ fraction を集め reassociation buffer 1,000 ml で 24 時間透析した。作成した VLP は HA 価を測定後電子顕微鏡にて形態を観察した^{12, 13}。作製した VLP を microinjection する 24 時間前に、293AG 細胞を Dox が含まれた培養液に交換して Agno の発現を惹起した。VLP (1.8 mg/ml) と microinjection の marker である色素 Cy3 (1 mg/ml) をガラス製の毛細管を用いてこれらの細胞の核に microinjection した。その後 37°C で 60 分間 incubate した後に PBS で洗浄し 3.7% formaldehyde で固定した。固定後の細胞を用いて microinjection した VLP は抗 VP1 抗体と FITC 標識した二次抗体で検出し、シグナルを CCD カメラシステム(Olympus 社)を用いて画像を解析した。

9) Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis

LBR-EGFP を発現させた 293AG 細胞を用いた FRAP analysis は Olympus FV300 confocal microscope 60 x oil-immersion objective (numerical aperture, 1.25) の条件で行った。2 x 10⁵ 個の細胞を type I collagen で coat した 35-mm dishes に撒き、Dox を含んだ培地で 24 時間処理を行った。蛍光部位を消すために 2 by 2 μ m の区域を設定して laser light (100% power) を 30 秒間照射した。蛍光の回復は 30 秒間隔で 10 分間にわたり弱い laser light (488 nm at 3% power) で画像を記録した。これらの program および得られた結果の解析は FV300 software (Olympus 社) を用いて行った。各 time point での蛍光強度は background area の蛍光を差し引いて計算した。relative recovery of fluorescence intensity は 100% x [(intensity at the recovery plateau) -

(intensity at 1 min postbleaching)] / [(average intensity of the bleached region before bleaching) - (intensity at 1 min postbleaching)] の計算式を用いて計算した。さらに我々はこの assay に原口博士 (独立行政法人情報通信機構) から供与された pEGFP vector も用いた¹⁴。

10) Yeast two-hybrid assay によって得られた agnoprotein 結合タンパク質である Clathrin adaptor protein は哺乳類細胞用発現ベクターにサブクローニングを行い、哺乳類細胞で発現させ、細胞内での機能・局在等を分子生物学的手法を用いて検索を行なった。

(倫理面への配慮)

本研究では、JCV の感染機構の解析を目的とした。本実験で用いられた JCV は P2 で扱うべきウイルスであり、本研究は当研究室の P2 指定実験室にて安全性に留意して行なわれた。また本実験で用いた大腸菌の系については人体に対する安全性は認められており、北海道大学の組換え DNA 申請においても承認を得ている。

C. 研究結果

1. Human adult brain cDNA library から Yeast two-hybrid 法を用いて、heterochromatin protein 1 alpha (HP1 α) を JCV agnoprotein 結合タンパク質として同定した。

2. Agno と HP1 α の結合を、免疫沈降法により確認した(図 2)。

3. 野生型の agnoprotein は細胞質および核膜に局在するが、HP1 α 結合領域を欠損した agnoprotein は細胞質のみに局在し、核膜には局在しないことを immunocytochemical analysis 法を用いて確認した。

4. Immunoprecipitation 法を用いて agnoprotein が用量依存性に HP1 α を lamin B receptor (LBR) から乖離させることを見出した。

5. agnoprotein によってもたらされた HP1 α と LBR の乖離が、核膜での LBR の lateral

mobility を亢進させることを Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) assay 法により確認した。

6. JCV の capsid protein である VP1 を用いて作製した Virus-like particle (VLP) を細胞核に micoinjection する実験を行って、agnoprotein は核内の JCV VP1-VLP の核外への輸送を亢進させることを見出した (図 3)。

7. Yeast two-hybrid 法を用いて、JCV agnoprotein 結合タンパク質として Clathrin adaptor protein を同定した。

8. 細胞側因子である Clathrin adaptor protein は JCV agnoprotein と結合して、核外から細胞質に出た JCV の細胞膜への輸送を制御していることを明らかにした。

D. 考察

JC virus タンパク質 agnoprotein と Yeast two-hybrid 法により同定された HP1 α の相互作用は、HP1 α と LBR との結合を解離することにより LBR の核膜における lateral mobility を亢進させた。またその結果として、JCV VP1-VLP の核内から核外への輸送が亢進していることが示された。また agnoprotein は細胞側因子である Clathrin adaptor protein とも結合して、核外から細胞質に出た JCV の細胞膜への輸送を制御していることを見出した。JCV agnoprotein はこれらの機構を介して JC virus の細胞内輸送を制御していることが予想された。

E. 結論

JCV の agnoprotein は宿主因子である HP1 α および Clathrin adaptor protein に結合することにより、その機能を修飾して、その結果としてウイルスの細胞内輸送を制御していることが示唆された。

[参考文献]

1. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of

papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet* 1971;1: 1257-1260.

2. Dworkin MS. A review of progressive multifocal leukoencephalopathy in persons with and without AIDS. *Curr Clin Top Infect Dis* 2002;22:181-195.

3. Frisque RJ, Bream GL, Cannella MT. Human polyomavirus JC virus genome. *J Virol* 1984;51:458-469.

4. Ng SC, Mertz JE, Sanden-Will S, Bina M: Simian virus 40 maturation in cells harboring mutants deleted in the agnogene. *J Biol Chem* 1985;260:1127-32.

5. Okada Y, Endo S, Takahashi H, Sawa H, Umemura T, Nagashima K: Distribution and function of JCV agnoprotein. *J Neurovirol* 2001;7:302-6.

6. Suzuki S, Sawa H, Komagome R, Orba Y, Yamada M, Okada Y, Ishida Y, Nishihara H, Tanaka S, Nagashima K. Broad distribution of the JC virus receptor contrasts with a marked cellular restriction of virus replication. *Virology* 2001;286:100-112.

7. Endo S, Okada Y, Orba Y, Nishihara H, Tanaka S, Nagashima K, Sawa H: JC virus (JCV) agnoprotein colocalizes with tubulin. *J Neurovirol* 9 (Suppl 1): 10-14, 2003.

8. Okada Y, Sawa H, Endo S, Orba Y, Umemura T, Nishihara H, Stan AC, Tanaka S, Takahashi H and Nagashima K: Expression of JC virus agnoprotein in progressive multifocal leukoencephalopathy brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 2002;104:130-136.

9. Okada Y, Sawa H, Tanaka S, Takada A, Suzuki S, Hasegawa H, Umemura T,

- Fujisawa J, Tanaka Y, Hall WW, Nagashima K. Transcriptional activation of JC virus by human T-lymphotropic virus type I Tax protein in human neuronal cell lines. *J Biol Chem* 200;275:17016-17023.
10. Orba Y, Sawa H, Iwata H, Tanaka S, Nagashima K. Inhibition of virus production in JC virus-infected cells by postinfection RNA interference. *J Virol* 2004;78:7270-7273.
11. Henmi C, Sawa H, Iwata H, Orba Y, Tanaka S, Nagashima K: Isolation of a monoclonal antibody recognizing a cell-surface molecule as a receptor for JC virus. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327:242-251.
12. Komagome R, Sawa H, Suzuki T, Suzuki Y, Tanaka S, Atwood WJ, Nagashima K. Oligosaccharides as receptors for JC virus. *J Virol* 2002;76:12992-13000.
13. Qu Q, Sawa H, Suzuki T, Semba S, Henmi C, Okada Y, Tsuda M, Tanaka S, Nagashima K. Nuclear entry mechanism of the human polyomavirus JC virus like particle: role of importins and the nuclear pore complex. *J Biol Chem* 2004;279:27735-27742.
14. Haraguchi T, Koujin T, Hayakawa T, Kaneda T, Tsutsumi C, Imamoto N, Akazawa C, Sukegawa J, Yoneda Y, Hiraoka, Y. Live fluorescence imaging reveals early recruitment of emerin, LBR, RanBP2, and Nup153 to reforming functional nuclear envelopes. *J Cell Sci* 2000;113:779-794.
- G. 研究発表
1. 論文発表
1. Sunden Y, Semba S, Suzuki T, Okada Y, Orba Y, Nagashima K, Umemura T, Sawa H*: Identification of DDX1 as a JC virus (JCV) transcriptional control region-binding protein. *Microbiol Immunol* 2007;51:327-337. (* corresponding author).
2. Sunden Y, Semba S, Suzuki T, Okada Y, Orba Y, Nagashima K, Umemura T, Sawa H*: DDX1 promotes proliferation of JC virus (JCV) through transactivation of the JCV promoter. *Microbiol Immunol* 2007;51:339-347. (* corresponding author).
3. 澤 洋文、鈴木 忠樹、大場 靖子、寸田 祐嗣、長嶋 和郎：JC ウイルスの最近の基礎的知見。 *BRAIN and NERVE* 2007;59:101-108
2. 学会発表
1. Suzuki T, Okada Y, Orba Y, Sunden Y, Kimura T, Sawa H: Analysis of JC virus agnoprotein function. *Asian Research Forum on Emerging and Reemerging Infections-2007*, Nagasaki, Japan, 2007.1.14-16.
2. 大場 靖子、寸田 祐嗣、鈴木 忠樹、澤 洋文：Roscovitine (Pharmacological CDK inhibitor)によるJCV増殖抑制効果の検討。第54回日本ウイルス学会学術集会,名古屋 2006.11.19-21.
- H. 知的所有権の出願・取得状況
- なし

F. 健康危険情報

なし

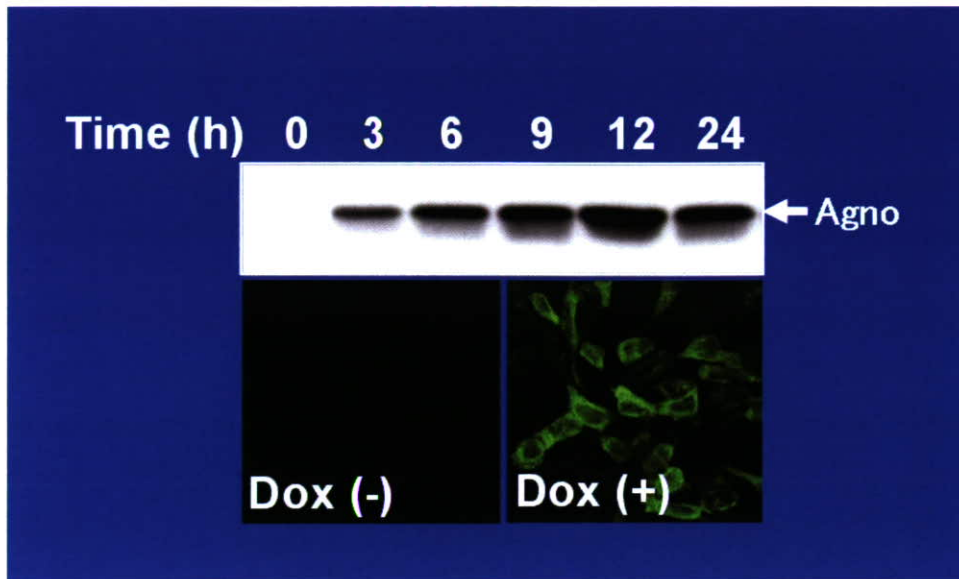


図 1

Invitrogen 社の T-Rex system を用いて、Tet promoter の制御下で Doxycycline(Dox) の培地への添加によって JCV Agnoprotein (Agno) を誘導できるヒト胎児腎臓上皮細胞由来の細胞株 HEK293 細胞由来の 293AG 細胞を作製した。Dox 添加後の Agno の発現を immunoblotting 法で確認し、さらに 24 時間後の細胞での発現を immunocytochemical analysis にて確認した。

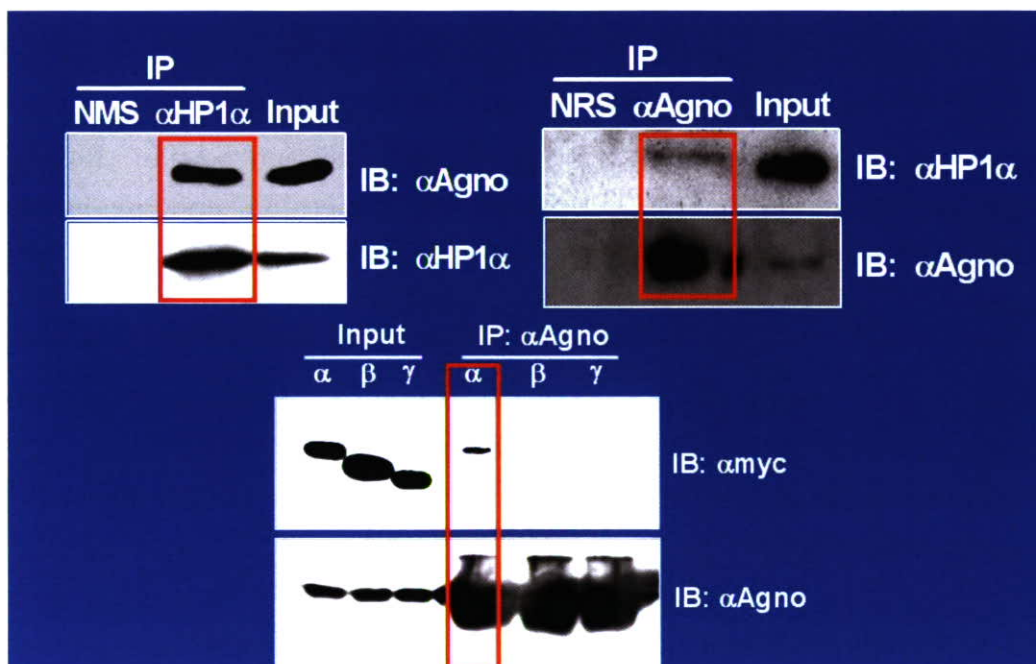


図 2

Dox で 24 時間処理して Agno を誘導した 293AG 細胞に Myc tag を付けた HP1 α , β , γ を発現させて Agno と HP1 α の結合を Immunoprecipitation で確認した。Agno は HP1 α に特異的に結合することが明らかになった。

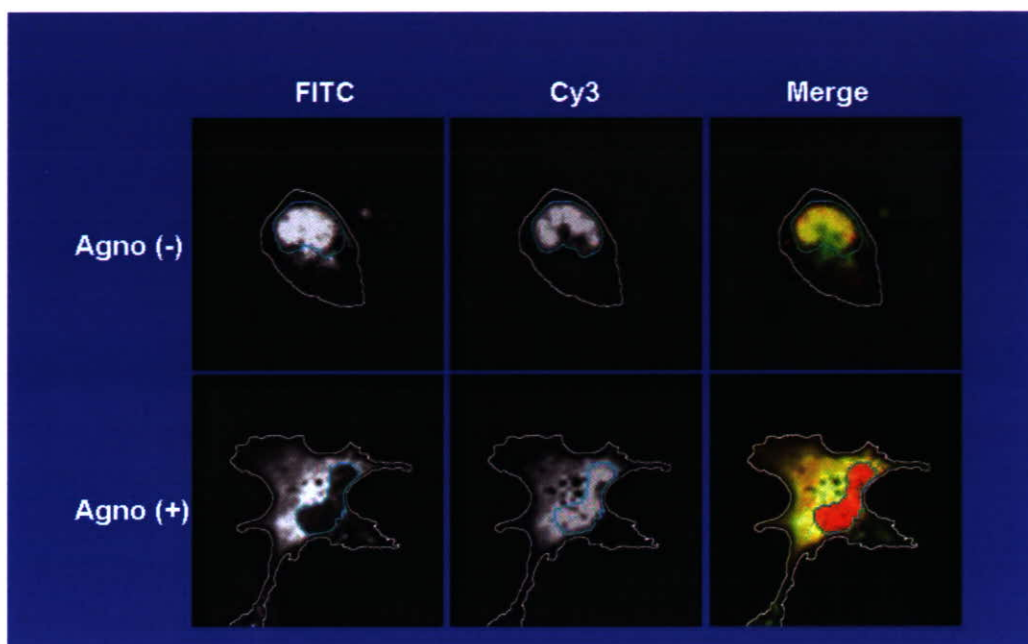


図 3

Dox で処理した 293AG 細胞の核に Virus-like particle (VLP) を microinjection し、VLP の細胞内での局在を抗 VP1 抗体、および FITC 標識した二次抗体を用いて確認した。Microinjection の site marker として Cy3 も同時に injection した。Agno 存在下では核に injection された VLP が核外に移動していることが確認された。

進行性多巣性白質脳症における PML 核体の役割 —細胞周期関連蛋白の発現との関係から—

分担研究者：宍戸-原 由紀子 杏林大学医学部病理学教室

研究要旨

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* の核内にウイルス封入体が認められる。今回我々は、ウイルス封入体の形成と細胞変性機序を明らかにするため、PML 核体の細胞周期依存性の変化に着目した。具体的には JCV が感染した *oligodendroglia* における細胞周期関連因子 (MIB-1, PCNA, p53) の発現を比較検討した。その結果、ウイルスがこれらの細胞周期関連蛋白と PML 核体との関係を巧みに利用して自己複製していることが明らかになった。JCV 感染におけるこうした PML 核体の役割は、他のウイルス感染症やポリグルタミン病などの神経変性疾患とはかなり異なると考えられる。

A. 研究目的

JC ウイルス外殻を構成するカプシド蛋白は PML 核体と呼ばれるドット状の核内構造に集積してウイルス粒子を形成し、その後核全体へと分布を広げていく¹。PML 核体は重要な核機能を担う核内構造で、その機能の破綻は数々の疾患に関与している。急性前骨髄性白血病や癌、ポリグルタミン病等の神経変性疾患では、疾患関連蛋白が PML 核体に集積し、細胞の癌化や変性を招いている事が示唆されている。しかし、PML 核体が進行性多巣性白質脳症の発症過程にどう関与しているかはまだ明らかでない。

PML 核体は、細胞周期の進行に伴いその形態が変化する²。G0 期ではその構造は最も小さく、S 期で最大となる。M 期には PML 核体は消失し、細胞分裂後再び出現する。PML 核体へ局在する蛋白は SUMO-1 と呼ばれるユビキチン様の蛋白により細胞周期依存性に修飾 (SUMO 化) される事が多い。PML 核体を形成する PML 蛋白自身も細胞周期依存性に

SUMO 化、脱 SUMO 化され、これにより細胞周期に依存した PML 核体の変化 (形成と崩壊) が可能となる。

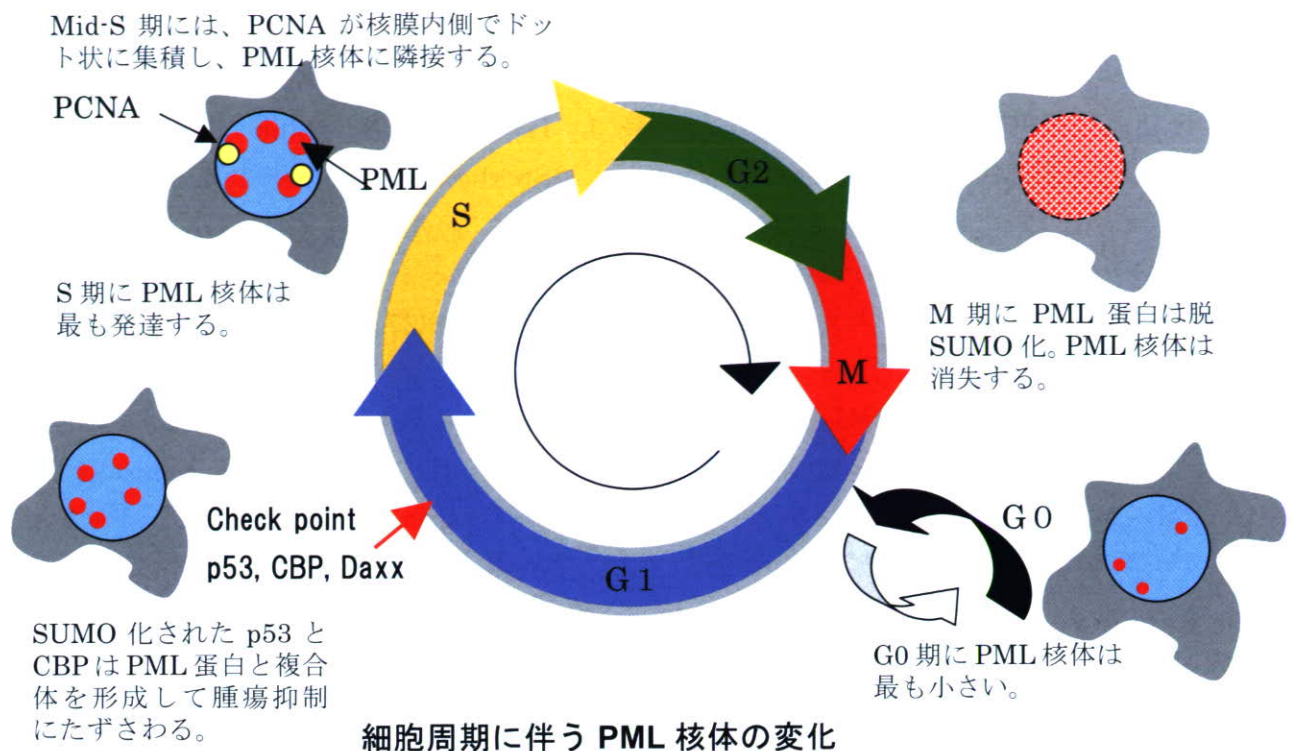
本研究では、進行性多巣性白質脳症における *oligodendroglia* の核内ウイルス封入体の形成と細胞変性機序を、PML 核体の細胞周期依存性の変化に着目して明らかにすることを目的とする。さらに、脱髄脳症の発症機序の解明へと発展させることを目標とする。

B. 研究方法

剖検で得られた 5 症の進行性多巣性白質脳症のヒト脳組織を、HE 染色、KB 染色、免疫染色、蛍光抗体法、in situ hybridization、電子顕微鏡法等を用いて、組織形態学的ならびに免疫組織化学的に解析した。

(倫理面への配慮)

本研究において、患者の個人を特定できる個人情報扱っていない。



C. 研究結果と D. 考察

G0 期以外の細胞周期 (G、S、G2、M 期) に発現する細胞増殖マーカー MIB-1 の発現を、進行性多巣性白質脳症のヒト脳組織において検討した。約 90% 以上のウイルス感染細胞が MIB-1 の陽性であった。一方、非感染細胞には MIB-1 の発現は認めなかった。この結果は、JCV 感染が oligodendroglia の細胞周期の活性化を誘導することを示している。

S 期の指標である PCNA は、mid-S 期に核膜直下でドット状に集積し、PML 核体と隣接することが報告されている^{3,4}。PCNA の発現を、進行性多巣性白質脳症のヒト脳組織において検討した。脱髄巣辺縁にみられる JCV 感染細胞は PCNA に強陽性であり、PCNA が核膜内側でドット状に PML 核体に局在する像が高頻度に認められた。in situ hybridization で JCV DNA の局在を検討すると、JCV DNA は核内にドット状のシグナルとして観察された。また電子顕微鏡でもウイルスが核膜内側にクラスターを形成して分布する像が得られた。以上から JCV は核膜内側にドット状に配列した PCNA および PML 核体で複製され、ここで JCV ゲノム DNA

の複製と粒子形成が連動して行われているのではないかと推測される。脱髄巣辺縁において多くの感染細胞が PCNA を発現し S 期様の細胞環境を提供していることは、ウイルス DNA の増幅に合理的と考えられる。

PML 核体では SUMO 化された p53 や CBP が PML 蛋白と複合体を形成し、p21 や BAX などの転写抑制すること、すなわち PML 蛋白が一種の腫瘍抑制因子として働くことが報告されている^{5,6}。進行性多巣性白質脳症の脳組織にける p53 と PML 蛋白の発現、局在を検討すると、p53 は少数の JCV 感染細胞で PML 核体への局在を示したに過ぎず、大部分の細胞で p53 は核全体にびまん性に分布した。腫瘍抑制に関わる PML 核体の機能が JCV 感染細胞では低下し、より多くの細胞が S 期様の細胞環境を提供しているのではないかと推測される。

今後の課題

JCV カプシド蛋白が PML 核体に集積する機序はまだ完全にはわかっていない。PML 核体に局在する蛋白は大概 SUMO 化されるか、そうでなければ SUMO 化された蛋白と複合体を

形成している。ポリグルタミン病ではポリグルタミン鎖をもつ疾患蛋白が、HSV 感染では制御蛋白 ICP0 が、HPV 感染ではマイナーカプシド蛋白 L2 が各々 SUMO 化されているが、JCV 蛋白の SUMO 化は未だ同定されていない。

JCV は子ウイルス複製後、PML 核体を崩壊して宿主細胞の変性を促すと考えられるが、PML 核体の崩壊機序は未だよく分かっていない。HSV 感染では、SUMO 化 PML 蛋白がユビキチン-プロテアソーム系で分解されることにより、PML 核体が崩壊すると報告されている。ポリグルタミン病の核内封入体もユビキチン陽性である。しかし、JCV 感染でユビキチンは一過性に核内にドット状の染色されるものの、PML 核体に蓄積されることはなかった。JCV が核内ウイルス封入体形成後、どんなメカニズムで PML 核体を崩壊するかは興味深い。

E. 結論

進行性多巣性白質脳症では、JCV に感染した oligodendroglia の細胞周期が活性化され、多くの細胞が S 期様の細胞環境を提供している。この環境下に核膜内側の PML 核体で、JCV ゲノム複製と粒子形成が連動して行われ、子ウイルスが産生される。しかし細胞周期が活性化された細胞が分裂せず、なぜ変性への道をたどるのか分からない。ウイルス複製後の PML 核体の崩壊機序を分子レベルで解明することが重要と考えられる。

[参考文献]

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. Terris B, Baldin V, Dubois S, Degott C, Flejou JF, Henin D, Dejean A: PML nuclear bodies are general targets for

inflammation and cell proliferation. *Cancer Res* 1995;55:1590-1597.

3. Leonhardt H, Rahn HP, Weinzierl P, Sporbert A, Cremer T, Zink D, Cardoso MC: Dynamics of DNA replication factories in living cells. *J Cell Biol* 2000;149:271-280.
4. Grande MA, van der Kraan I, van Steensel B, Schul W, de The H, van der Voort HT, de Jong L, van Driel R: PML-containing nuclear bodies: their spatial distribution in relation to other nuclear components. *J Cell Biochem* 1996;63:280-291.
5. Salomoni P, Pandolfi PP: The role of PML in tumor suppression. *Cell* 2002, 108:165-170
6. Guo A, Salomoni P, Luo J, Shih A, Zhong S, Gu W, Paolo Pandolfi P: The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 2000;2:730-736.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 宍戸-原由紀子：ヒトポリオーマウイルス JC の核内封入体形成機序—カプシド蛋白は PML 核体でウイルス粒子を形成する。ウイルス 2006;56(1):17-26.

2. 学会発表

1. 宍戸-原由紀子, 内原俊樹, 藤岡保範, 菅間博: 進行性多巣性白質脳症における PML 核体の役割—増殖関連因子の発現との関係—。第 95 回日本病理学会, 東京, 2006.4.

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

我が国における SSPE の現状—全例のサーベイランスを目指して—

研究協力者：飯沼 一字 石巻赤十字病院院長
研究協力者：細矢 光亮 福島県立医科大学医学部小児科学講座
研究協力者：大塚 頌子 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科発達神経病態学講座
研究協力者：市山 高志 山口大学大学院医学系研究科小児科学
研究協力者：楠原 浩一 九州大学大学院医学研究科成長発達医学（小児科）
研究協力者：野村 恵子 熊本大学医学部附属病院小児科

研究要旨

亜急性硬化性全脳炎（SSPE）の我が国の現状を把握すべく、全例のサーベイランスを試みた。初年度として以下の手順で集計を試みた。イノシンプラノベクス（イソプリノシン）は SSPE にのみ適応が認められている薬剤であるので、本剤の販売業者からの情報を基に、本剤納入医療機関 109 施設に協力を依頼した。98 施設から協力許諾の返答があり、これらの施設に 115 例の患者が存在していることが判明した。これらの施設に SSPE 調査個人票を送付し、2005 年 10 月 14 日までに 64 例の回答を回収した。これらの都道府県別患者数では、沖縄を含め九州地方に多く分布していた。我が国の推定症例数の約半数の回収に留まっているので、今後全例の回収に尽力する。そのためサーベイランス委員の空白区である関東、中部、近畿の委員を加えるべく、本研究班への参加を依頼した。

A. 研究目的

亜急性硬化性全脳炎（SSPE）は小児期の麻疹罹患から 2—10 年で発症に亜急性に進行する。しかも根本的治療法のない予後不良な疾患である。学力低下、性格変化などで発症し、次第にミオクロニー発作を呈するなどの特徴的臨床像を有するが、我が国において本疾患が十分知れ渡っているとは限らず、症状が進行してから初めて診断される症例も散見される。

我が国は先進諸外国に比較して、麻疹ワクチンの接種率が低く、先進諸国では既に発症がきわめて少なくなっているにも拘わらず、現在でも年間数例の発症がある。過去に二瓶（1990）および中村ら（2003）による全国的な調査があるが、その後も新鮮例が発症している可能性もある。また、東南アジア諸国では、日本の百倍もの発症率があると言われているが、彼国では医学・医療レベル

の問題もあり、臨床像や病態が十分に解明されているとはいえない。

我が国の SSPE の現状をサーベイすることは、我が国の状況を知るだけでなく、国際的にも有益であると考えられる。我々は、日本の SSPE の現状を把握し、本疾患のプロファイルを明らかにし、啓蒙することにより、早期診断や早期治療の試みの一助になると考え、全症例をサーベイし、その臨床像を明らかにすることが本研究の目的である。

B. 研究方法

イノシンプラノベクス（イソプリノシン）は SSPE にのみ適応が認められている薬剤であるので、本剤の販売業者からの情報を基に、本剤納入医療機関 109 施設に協力を依頼した。98 施設から協力許諾と患者の存否の回答が得られ、115 例

の患者の存在が明らかとなった。これらの施設に亜急性硬化性全脳炎調査個人票(簡易版)(図1)を送付した。

なお個人票には、個人を特定することのできる情報は盛られていない。

C. 研究結果

2005年10月14日現在、64例の調査票を回収した。推定患者の約半数の回収であるので、今回は、調査票記載による患者住所の都道府県について検討した。その結果を表1に示す。

その結果、沖縄県が12例と最も多く、北海道7、福岡5、東京5、岐阜4、長崎3、神奈川3などとなっている。東京、神奈川は首都圏であり、我が国の人口比率から考えても当然と思われるが、沖縄を含めて、九州地方で25例と、今回集計数の39%に当たる。このように我が国では地域分布の特徴がある可能性がある。

D. 考察

とりあえず得られた中間集計であるが、我が国SSPE64例の39%が九州地方に居住していることが明らかになった。しかし、この数は主治医からの回答数であり、この地域の背景が大きく関わっているとは必ずしもいえない。

一方バングラデシュ、パキスタン、パプアニューギニアなど東南アジアの国々で、SSPEが多いことはよく知られていることを考え合わせると、我が国でも沖縄を始めとする南の地域で症例数が多いのかもしれない。このことはSSPEの発症に気候が関与するのかもしれない。しかし、今回のデータは患者の居住地がどの都道府県であるかをみているのであり、患者の移動がきわめて盛んであれば、SSPE発症との関連性を考慮することは無意味となる。

中村ら¹⁾が2001年3月までの我が国のSSPEの疫学像を報告している。これによると、125(男66、女59)例のSSPEを集計している。一方、今回イソプリノシン納入医療機関からの調査で115例が確認されたが、中村らの報告よりも数が

減少しているのは、この間の死亡を反映しているのかもしれない。我が国では年におよそ4-5例のSSPEの新たな発症があると考えられているので、2005年までとしても10-20例の新鮮例がある可能性がある。

サーベイランス委員としては、とりあえず、イソプリノシン納入医療機関からの調査の115例、全例の調査を目指すつもりである。現サーベイランス委員の顔ぶれを見ると、関東、中部、近畿に委員がいないので、この地域の研究者を委員に加えて、調査の完全を期したい。

さらに、新鮮例の発掘に努力したい。リハビリ治療をしている患者が現在30症例あり、これらの中から新鮮例を抽出することと、SSPEの患者・親の会である「青空の会」を通じて我々のデータとの重複をチェックすると共に、新鮮例の発掘に努めたい。現在までのデータは推定数の約半数であり、残り半数の調査完了を目指していく。

E. 結論

我が国のSSPE推定患者数が約135例と考えられた。これらの約半数の64例について、調査個人票が集計された。これによると、患者の都道府県別患者数では九州地方にその39%が居住していることが明らかになった。患者発生に地域が関与している可能性が考えられたが、今後更なる集計の完了を待って結論を出すべきと思われる。

残り半数の調査のために、委員の空白地区である、関東、中部、近畿の委員を更に加えて我が国SSPEの全例の調査を目指す。

[参考文献]

中村好一,飯沼一字,岡 鋈次,二瓶健次. 臨床調査個人票からみた亜急性硬化性全脳炎(SSPE)の疫学像 脳と発達 2003;35:316-326.

F. 健康危険情報

なし

図1

亜急性硬化症全脳炎臨床調査個人票（簡易版）

（新規）

イニシャル 氏名		性別	1男、2女	生年月	1. 明、2. 大、3昭、4平 年 月
現在の住所 の都道府県					
発病年月	1. 昭和 2. 平成 年 月	初診年月	1. 昭和 2. 平成 年 月		
	療養状況	現在の状況（通院・入院・入所）、就労（一般就労あり、作業所、なし）			
既往歴	1、麻疹（ 歳 ヲ月、罹患時居住都道府県 ）、 麻疹予防接種歴：1. あり 2. なし 接種歴ある場合：接種時年齢： 歳 ヲ月 発病前頭部外傷歴（1、あり 2、なし）、受傷年（ 歳）				
症状及び所見	1 経過 ① 進行性 ② 停止 ③ 改善 ④ 改善、悪化を示す ⑤不明 2、診断時の臨床検査所見 (1) 血清麻疹抗体価の上昇 1. あり 2. なし（施行年月：平成 年 月） 3. 未施行 (HL: ____倍 CF: ____倍 NT: ____倍) (2) 髄液麻疹抗体の上昇 1. あり 2. なし（施行年月：平成 年 月） 3. 未施行 (HL: ____倍 CF: ____倍 NT: ____倍) (3) 髄液 IgG-index 又は%IgGの上昇 1. あり 2. なし 3. 未施行 (髄液 IgG-index : ____% IgG ____%) (4) 脳波の周期性同期性放電 1. あり 2. なし 3. 不明				

治療	(1) イソプリノシン 1、あり 2、なし (2) インターフェロン 1、あり（1、髄注 2、脳室内） 2、なし 3、不明 (3) リバビリソ 1、あり 2、なし 3不明 (5) その他 1、あり（ ） 2、なし 3、不明					
ケア	(1) 鼻腔栄養 1、施行（平成 年 月 から） 2、未施行 (2) 気管切開 1、施行（平成 年 月 から） 2、未施行 (3) 人工呼吸器 1、施行（平成 年 月 から） 2、未施行					
病期分類	診断時	1、I期	2、II期	3、III期	4、IV期	5、V期
	現在	1、I期	2、II期	3、III期	4、IV期	5、V期 6、死亡

現在の施設：	電話：
主治医：	メール：

表1 患者の住所別人数

北海道	7	青森	1	秋田	1	宮城	2
福島	2	埼玉	2	千葉	1	東京	5
神奈川	3	山梨	1	長野	1	新潟	1
石川	1	岐阜	4	愛知	1	三重	1
大阪	1	兵庫	1	岡山	1	広島	1
福岡	5	佐賀	1	長崎	3	熊本	2
鹿児島	2	沖縄	12	不明	1	合計	64

G. 研究発表

1. 論文発表

- Hino-Fukuyo N, Haginoya K, Hayashi YK, Nishino I, Murakami T, Nonaka I, Togashi K, Tanaka S, Takayanagi M, Yokoyama H, Sakamoto O, Abe T, Toda T, Inuma K. A case of Fukuya-type congenital muscular dystrophy with a very mild mental deficit. *Neuromuscular Disorders* 2006;16:274-276.
- Munakata M, Onuma A, Takeo K, Oishi T, Haginoya K, Inuma K. Morphofunctional organization in three patients with unilateral polymicrogyria: combined use of diffusion tensor imaging and functional magnetic resonance imaging. *Brain Dev* 2006;28(6):405-9.
- Munakata M, Onuma A, Kobayashi Y, Haginoya K, Yokoyama H, Fujiwara I, Yasuda H, Tsutsui T, Inuma K. A preliminary analysis of trace elements in the scalp hair of patients with severe motor disabilities receiving enteral nutrition. *Brain Dev* 2006;28:521-525.
- Kakisaka Y, Haginoya K, Yokoyama H, Ishitobi M, Wakusawa K, Sato I, Togashi N, Kitamura T, Fukuyo N, Yasushi Y, Inuma K. Successful treatment of a 2-year-old girl with intractable myasthenia gravis using tacrolimus. *Brain Dev* 2006;28: 534-536.
- Munakata M, Onuma A, Haginoya K, Kobayashi Y, Yokoyama H, Fujiwara I, Yasuda H, Tsutsui T, Inuma K, Tsuchiya S. Reduced exposure to mercury in patients receiving enteral nutrition. *Tohoku J Exp Med* 2006;210:209-212.
- 福與なおみ,萩野谷和裕,富樫紀子,北村太郎,植松貢,柿坂庸介,石飛真美子,涌澤圭介,中里信和,社本博,飯沼一字. 遺伝子診断により診断を確認した重症ミオクロニーてんかん (SME) の2家系3症例. *小児科臨床* 2006;59:1931-1937.
- 飯沼一字. 臨床脳波判読の実際—小児の脳波について— *臨床脳波* 2006;48:752-759.
- 飯沼一字. てんかんの診断、てんかんおよびてんかん発作型の分類 *小児科診療* 2007;70: 13-17.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

SSPE の発病リスクとしての乳児期麻疹罹患、文書記載情報に依拠した場合

研究協力者：高須 俊明 日本大学大学院総合科学研究所生命科学専攻
医療法人崇徳会長岡西病院神経内科

研究協力者：中村 好一 自治医科大学公衆衛生学

研究協力者：三木 健司 日本大学医学部内科学講座神経内科部門

研究協力者：東郷 将希 日本大学医学部内科学講座神経内科部門

研究協力者：水谷 智彦 日本大学医学部内科学講座神経内科部門

研究協力者：田村 正人 医療法人崇徳会長岡西病院神経内科

研究協力者：田宮 崇 医療法人崇徳会長岡西病院精神科

研究要旨

乳児期麻疹罹患が SSPE の発病リスクとなることは、これまでに報告された 5 つのケースコントロールスタディによって明らかとなっている。ただしオッズ比の値は報告によって大きく異なっている。

昨年度、パプアニューギニア国東部高地州におけるケースコントロールスタディ資料の単変量解析により 18 個の有意差のある要因を抽出したこと、1 歳未満麻疹罹患のオッズ比が 17.11、 $p < 0.05$ 、2 歳未満麻疹罹患のオッズ比が 66.0、 $p < 0.001$ であったこと、交絡因子の影響を除外した後の 2 歳未満麻疹罹患の調整オッズ比が 19.7 以上、 $p < 0.05$ であったことを報告した。

本年度、文書記載情報に依拠した場合を検討した。単変量解析で 21 個の有意差のある要因を抽出した。1 歳未満麻疹罹患のオッズ比は 21.5、 $p < 0.01$ 、2 歳未満麻疹罹患のオッズ比は 26.4、 $p < 0.01$ であった。Mantel-Haenzel 法で交絡因子の影響を除外した後の 2 歳未満麻疹罹患の調整オッズ比は 0.0~192.0、有意性を示すものと示さないものがあつた。層別解析の結果から 5 つの要因を今後の多変量解析における検討対象として挙げた。

単変量解析結果から乳児期麻疹罹患はパプアニューギニア国東部高地州の SSPE においてはとくに強力な発病リスクであると考えられるが、文書記載情報に依拠した場合には交絡因子の影響を完全に除外することはできなかった。おそらく症例数が限定されたためと考えた。

A. 研究目的

SSPE 多発地域において発病リスクとしての乳児期麻疹罹患のオッズ比と有意性を文書記載情報に依拠して明らかにすることを目的とし、パプアニューギニア国東部高地州で実施したケ

ースコントロールスタディ資料の文書記載情報を用いて（1）単変量解析により有意差のある要因を抽出し、（2）要因を層別解析して有意差の所在を明らかにし、（3）要因のうち 2 歳未満麻疹罹患に対して Mantel-Haenzel 法によって