

[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. Taoufik Y, et al. Prognostic value of JC virus load in cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 1998; 178: 1816-1820.
3. Bossolasco et al. Prognostic significance of Cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 738-744.
4. Delbue S, et al. Longitudinal study of two cases of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J NeuroVirol* 2007; 13: 268-273.
5. 岸田修二. PMLの疫学と臨床. *Brain Nerve* 2007; 59: 125-137.
6. Cinque P, et al. The good and evil of HAART in HIV-related progressive multifocal leukoencephalopathy. *J NeuroVirol* 2001; 7: 358-363.
7. Cinque P, et al. The effect of highly active antiretroviral therapy-induced immune reconstitution on development and outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy: Study of 43 cases with review of literature. *J Neuro-Virol* 2003; 9 (1) : 73-80.
8. Du Pasquier RA, et al: Presence of JC virus-specific CTL in the cerebrospinal fluid of PML patients: rationale for immune-based therapeutic strategies. *AIDS* 2005; 19: 2069-2076.
9. 今村栄次 他. 高活性抗レトロウイルス療法により免疫再構築症候群をきたしたAIDSにともなう進行性多巣性白質脳症の1剖検例. *臨床神経* 2007; 47: 650-656.
10. Martinez JV et al: Immune Reconstitution inflammatory syndrome associated with PML in AIDS: A treatable disorder. *Neurology* 2006; 67: 1692-1694.
11. Altschuler EL, al. The atypical anti-psychotic agents ziprasidone [correction of zispraside], risperidone and olanzapine as treatment for and prophylaxis against progressive multifocal leukoencephalopathy. *Med Hypotheses*. 2005; 65: 585-586.
12. Roberts MTM. AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. Current management strategies. *CNS Drugs* 2005; 19: 671-682.
13. Du Pasquier RA, et al: Inflammatory reaction in progressive multifocal leukoencephalopathy: harmful or beneficial? *J NeuroVirol* 2003; 9 (1) : 25-31.
14. Kharfan-Dabaja MA, et al. Two cases of progressive multifocal leukoencephalopathy after allogeneic hematopoietic cell transplantation and a review of the literature. *Bone Mar-row Transplant* 2007; 39: 101-107.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 岸田修二. ウイルス感染症：(4) HIV 脳症・進行性多巣性白質脳症. *Brain Medical* 2007; 19 (3) : 231-237.
2. 岸田修二. 進行性多巣性白質脳症 概念と疫学. *日本臨床* 2007; 65 (8) : 1487-1494.

2. 学会発表

1. 高杉麻利恵, 鎌田憲子, 高木康伸, 松尾周也, 鈴木瑞佳, 児玉麻紀, 高杉昌平, 岸田修二, 菅沼明彦. 免疫再構築症候群のために、急激な再増悪をきたした PML (進行性多巣性白質脳症) の 1 例. 第 431 回日本医学放射線学会関東地方会. 2007.6.23.

2. 松村 崇, 関谷紀貴, 相野田祐介, 舟木万季, 柳澤如樹, 菅沼明彦, 今村顕史, 味澤篤, 岸田修二. 当院で経験した HIV 感染症に合併した進行性多巣性白質脳症 5 症例の臨床的検討. 第 21 回日本エイズ学会総会. 2007.11.30

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

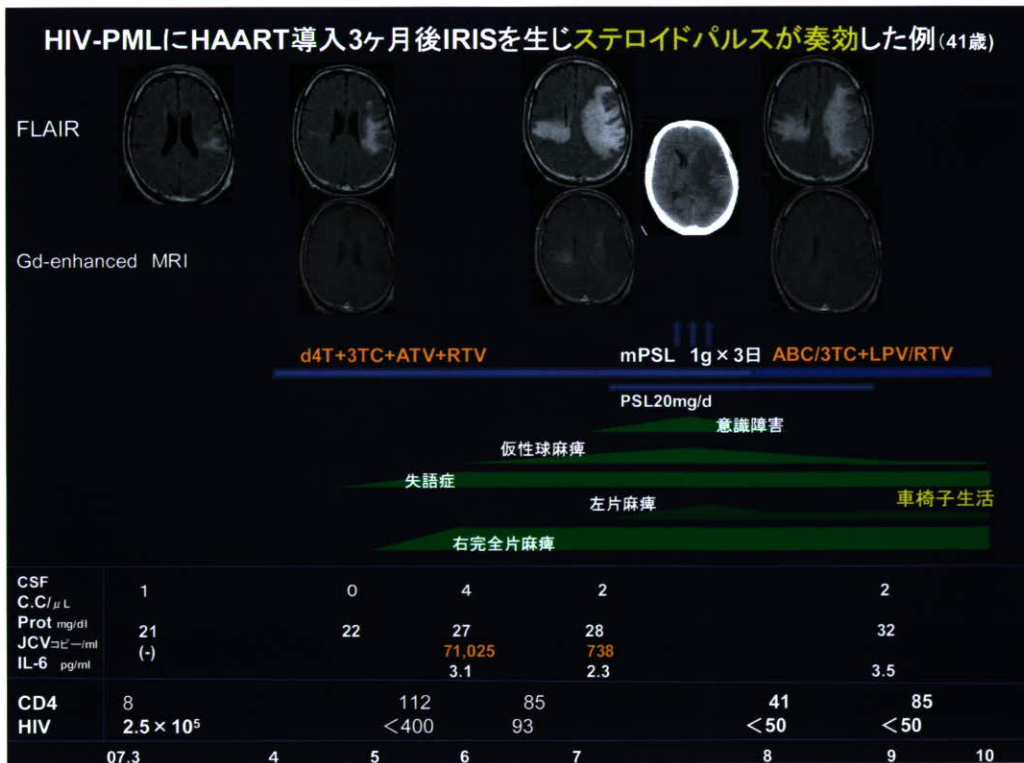
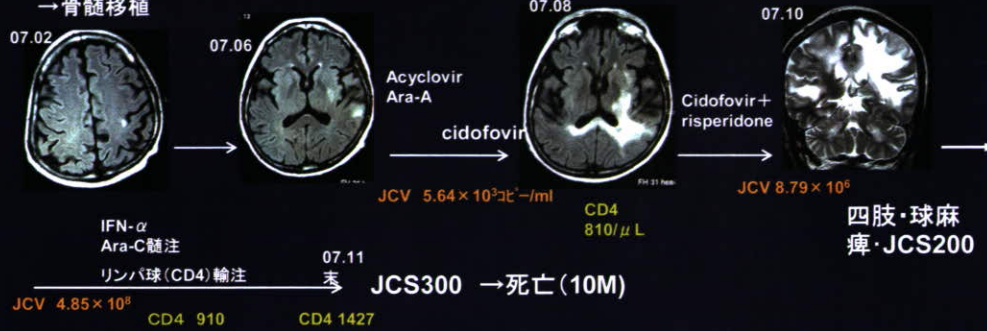


図 1. HAART により免疫再構築を生じ、ステロイドの奏効した例

今年度相談のあった症例に関して

1. HIV関連PML: 24歳男性 治療 HAART+risperidone +steroid pulse
転帰 死亡(5M)
2. HIV関連PML: 43歳男性 治療 HAART →免疫再構築(+)
転帰 改善・生存中(13M) 片麻痺 杖歩行可能
3. HIV関連PML: 49歳男性 治療 HAART
転帰 死亡(6M)
4. 移植関連PML: 44歳男性 治療 acyclovir, ara-A, cidofovir, risperidone
IFN- α 、Ara-A髄注、リンパ球輸注



5. 移植関連PML: 16歳男性 治療 自家骨髄再移植+risperidone
ホジキン病→自家骨髄移植 転帰 死亡(2M)

図 2. 自験例以外の相談に乗った症例

表 1. HIV 関連 PML における HAART 治療成績 (自験例と今年度相談例)

HAART治療患者の発症時/追跡時成績と生存の関係

	12ヶ月以上生存						12ヶ月未満生存		
	24歳 (F) 84ヶ月	35歳 (M) 24ヶ月	36歳 (M) 12ヶ月	41歳 (M) 12ヶ月	42歳 (M) 16ヶ月	43歳 (M) 13ヶ月	24歳 (M) 5ヶ月	49歳 (M) 5ヶ月	
基礎成績	年齢(性) 生存期間								
	HAART治療歴	+	+	-	-	-	-	-	
	AIDS指標疾患として発症	+	-	+	+	+	+	+	
	CD4 /μL	9	1	30	8	31	26	12	
	HIV-RNA コピ-/ml	2.62 × 10 ⁵	2.9 × 10 ⁵	1.0 × 10 ⁶	2.5 × 10 ⁵	5.6 × 10 ⁵	2.9 × 10 ⁵	9.8 × 10 ³	2.0 × 10 ⁵
	JCV-RNA コピ-/ml			±	7.1 × 10 ⁴		1.8 × 10 ⁵		1.49 × 10 ⁸
追跡成績	MRI造影効果	-	-	-	-	-	未施行	-	未施行
	併用薬	-	cidofovir	-	steroid pulse	risperidone	-	risperidone steroid pulse	risperidone
	JCV-RNA コピ-/ml			-	7.3 × 10 ²		0		未施行
	発症～治療開始期間			2M	2M	2M	1M	3M	3M
MRI造影効果	+	+	+	+	+	+	-	未施行	

表 2. HIV 関連 PML の HAART 治療成績
(昨年度から引き続き追跡した例を含む)

HAART治療患者の発症時/追跡時成績と生存の関係

		12ヶ月以上生存							12ヶ月未満生存			
		24 (F)	35 (M)	36 (M)	36 (M)	41 (M)	42 (M)	43 (M)	49 (M)	24 (M)	38 (M)	49 (M)
基礎 成績	年齢 (性)											
	生存期間 (月)	84	24	12	42	12	16	13	24	5	9	5
	HAART治療 歴	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AIDS指標疾 患として発 症	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CD4 / μ L	9	1	30	92	8	31	26	19	12	7	14
	HIV-RNA コピー/ml	2.62×10^5	2.9×10^5	1.0×10^6	4.4×10^4	2.5×10^5	5.6×10^5	2.9×10^5	2.3×10^4	9.8×10^3	5.1×10^4	2.0×10^5
MR 造影効果	-	-	-	-	-	-	未施行	-	-	-	未施行	
追 跡 成 績	併用薬	-	シドフ オヴィ ル	-	リスベ リドン	ステロ イドパ ルス	リスベ リドン	-	-	リスベリ ドン ステロイ ドパルス	インタ ーフェ ロン α 髄注 リスベ リドン	リスベリ ドン
	治療開始期 間(月)			2	4	2	2	1	1	3	5	3
	MR 造影効果	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	未施行

進行性多巣性白質脳症（PML）脳生検の現状

研究協力者：宍戸-原 由紀子 杏林大学医学部病理学教室

研究協力者：長嶋 和郎 札幌東徳洲会病院病理部

研究要旨

進行性多巣性白質脳症（PML）は、進行性の白質病変として画像上頻繁に鑑別に上がり、確定診断のためにしばしば脳生検が行われる。脱髄巣の辺縁で、腫大した核内にウイルス封入体を有するグリア細胞を認めれば診断は確定する。本研究班では、「剖検または生検で脳に特徴的病理所見を証明すること」を Definite PML の診断基準（2004）としているが、生検材料では診断に最も適切な病変部が採取されているとは限らない。ここに、杏林大学医学部病理学教室で JC ウイルスの免疫染色依頼をうけた 3 症例を紹介し、その病理所見を提示する。

A. 研究目的

進行性多巣性白質脳症（PML）は、画像診断では進行性の白質病変を来たす疾患として頻繁に鑑別に上がるにも関わらず、実際にその症例数は極めて少ない。脳脊髄液 PCR での JCV DNA 検出は PML の診断を支持するが、JCV は健常人にも持続感染しているため、確定診断とはならない。JCV 調節領域の遺伝子配列の変異が確認されれば診断は確定されるが、この配列を読むことはしばしば困難である。本研究班では、「剖検または生検で脳に特徴的病理所見を証明すること」を Definite PML の診断基準としている（2004）。しかし、他の検査と比較し脳生検が被検者への侵襲・負担が大きいにも関わらず、剖検脳とは異なり、生検材料では診断に最も適切な病変部が採取されているとは限らない。即ち、PML に特徴的な「JCV 核内封入体を有する核腫大を伴ったグリア細胞」を多数含んだ白質の脱髄病巣辺縁部の組織が採取されない可能性もある。確定診断には、脱髄病変の病理組織学的な確認と、腫大した核内に JC ウイルス封入体を有するグリア細胞の検出が重要であり、

抗 JC ウイルス抗体を用いた免疫組織学的検索が有用である。ここに、脳生検 3 症例の組織所見を紹介する。

B. 研究方法

生検組織はホルマリン固定、パラフィン包埋後、薄切し、HE 染色、KB 染色、JC ウイルスに対する 3 種の抗体（抗 VP1 抗体、抗 VP2/VP3 抗体、抗 agnoprotein 抗体）により免疫組織化学的に解析した。症例提供施設：東京医科歯科大学、東京都立墨東病院、焼津市立総合病院。

（倫理面への配慮）

診断は文書で臨床へ報告した。また患者を特定できる個人情報には公に提示しない。

【症例 1】57 歳、女性。SLE。髄液 PCR で JCV 陽性。病理所見：断片化した組織片約 10 片。皮質領域が大半であるが部分的に白質領域も含まれる。髄鞘が消失した白質には、泡沫細胞が多数充満する。皮質深層には軽度の核腫大を示すグリア細胞が散見され、その幾つかは JCV カプシド蛋白（VP1、VP2/VP3）、

agnoprotein 陽性。白質の泡沫細胞集簇巢内にも極少数の陽性細胞が見られる。脱髄・変性の進行が皮髄境界にまで及び、JCV 陽性細胞がかなり脱落した状態の組織と考えた。進行性多巣性白質脳症 (PML) と診断。

【症例 2】51 歳、男性。AIDS。髄液 PCR で JCV 陰性。病理所見：小脳の断片化した組織片約 10 片。皮質の分子層と顆粒層を見るが、白質組織は含まれていない。プルキンエ細胞は変性、部分的に脱落し、集簇した泡沫細胞の細胞質内には貪食した髓鞘片を KB 染色で見る。顆粒層には JCV カプシド蛋白 (VP1, VP2/VP3)、agnoprotein 陽性の軽度核腫大を示す細胞が僅かに 1 個見られる。泡沫細胞の集塊内にも同様の陽性細胞が 2 個。JCV 陽性細胞が極少数しか認められないため所見診断としたが、PML 脱髄巢辺縁組織の可能性もあると判断。臨床医にはその旨を電話連絡した。患者は HARRT 療法で CD4 値改善し、現在外来通院中。

【症例 3】66 歳、男性。基礎疾患はないが、臨床経過よりアルコール多飲による免疫力低下が疑われる。髄液 PCR で JCV 陰性。病理所見：皮質と白質を含む大脳組織片。白質には斑状の脱髄巢が散在し、血管周囲のリンパ球、形質細胞浸潤が著しい。また広く炎症細胞浸潤が目立つ。軽度核腫大したグリア細胞が見られるものの、明らかなウイルス封入体陽性細胞は認めない。免疫組織化学的にも JCV カプシド蛋白 (VP1, VP2/VP3)、agnoprotein 陰性。PML は否定的と判断。鑑別として、PML 以外の炎症性脱髄性疾患、例えば ADEM (acute disseminated encephalomyelitis) 等を考えた。病理診断は inflammatory demyelinating disease として報告。一時 akinetic mutism となった患者は、現在自宅で呼びかければ何とか瞬きする程度の反応がでるまでに回復。

上記 3 症例の比較から、髄液 PCR で JCV 陰性であった場合、PML 脳生検の病理診断は

より重要性が増すと考えられる。PML 確定診断には少数でも脱髄巢辺縁の JCV 陽性の核内封入体を有するグリア細胞の検出が必須である。例えば白質の脱髄病変部が採取されていなくとも、JCV 封入体陽性のグリア細胞は、大脳皮質の深層や、小脳顆粒層にも存在するし、髓鞘片を貪食した泡沫細胞の集簇は脱髄巢の存在を間接的に支持する。また鑑別として白質病変が主体の他の疾患もよく把握しておかねばならない。

C. 結論

進行性多巣性白質脳症の病理診断では、脱髄巢の直接的・間接的確認と、JCV 核内封入体を有する核腫大を伴ったグリア細胞の検出が重要である。

[参考文献]

1. 村山繁雄, 斉藤祐子. PML の神経病理. *Brain Nerve* 2007; 59 (2) : 119-124.

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Shishido-Hara Y, Higuchi K, Ohara S, Duyckaerts C, Hauw J-J, Uchiyama T. Promyelocytic leukemia nuclear bodies (PML-NBs) provide a scaffold for JC virus progeny production, and are disrupted after development of viral inclusions; the role of PML-NBs in progressive multifocal leukoencephalopathy (PML), *J Neuropathol Exp Neurol.* in press.

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

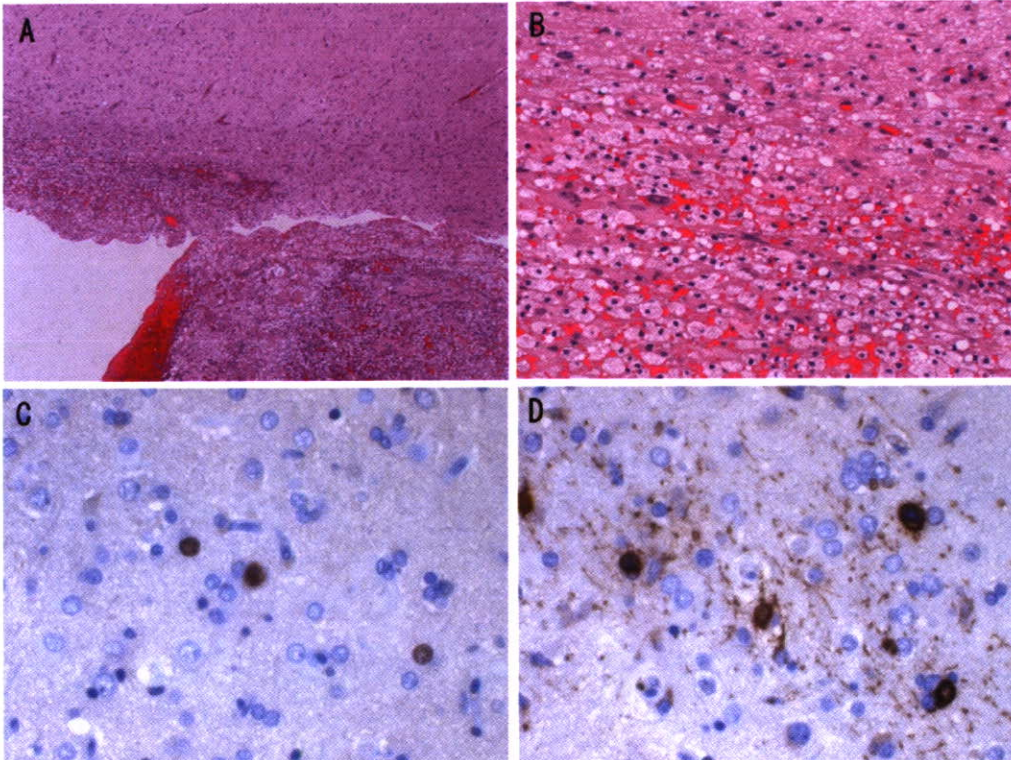
2. 実用新案登録

特になし

3. その他

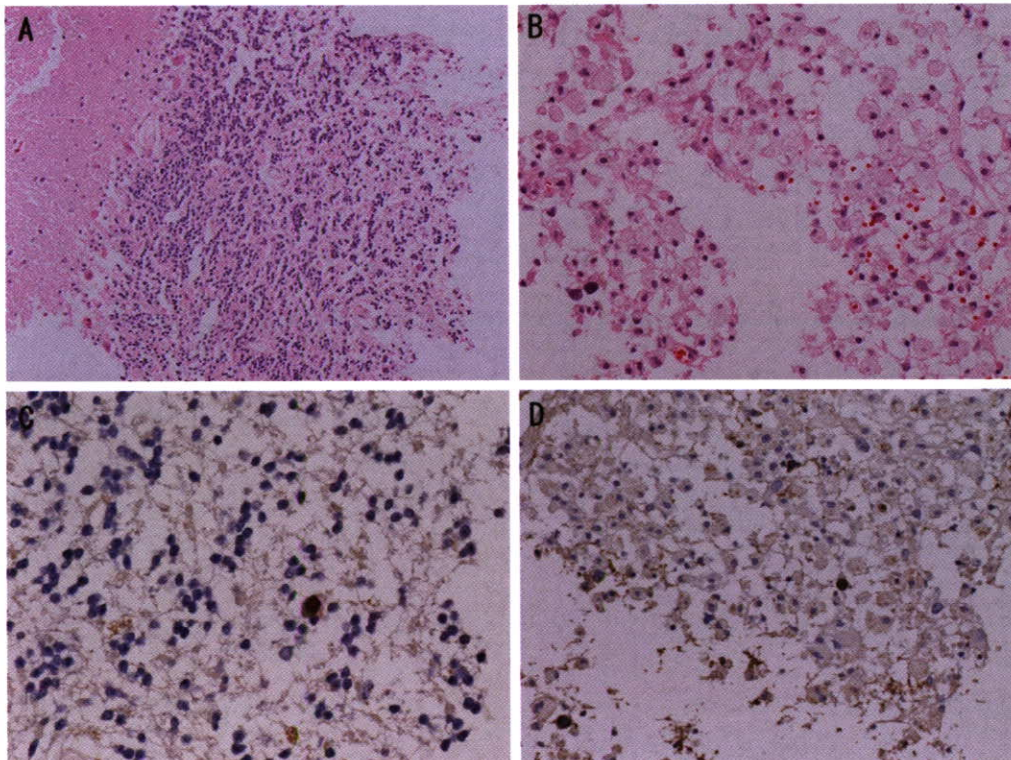
特になし

症例 1



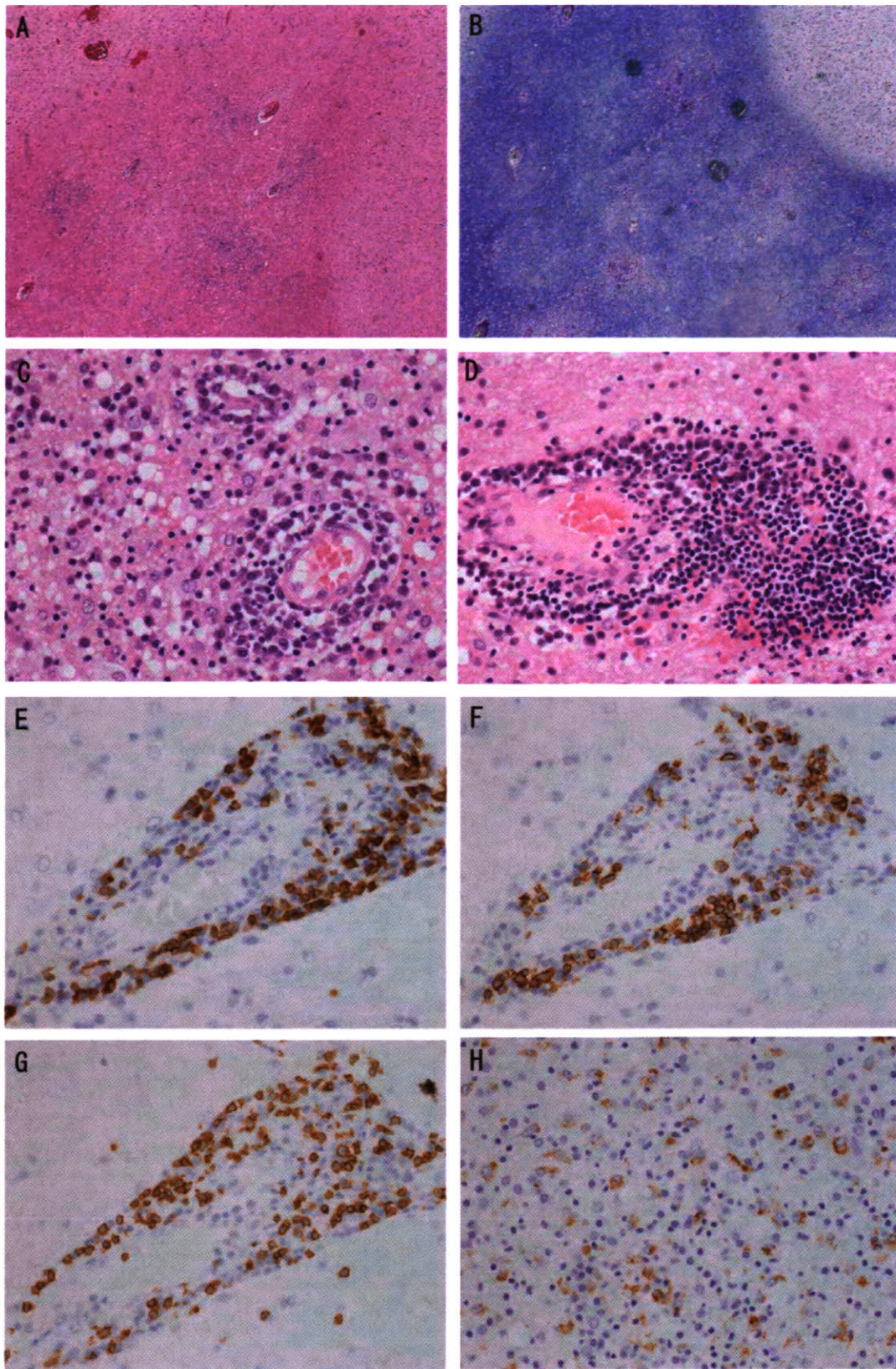
A: HE 大脳皮質と白質を含む組織。 B: 白質に多数見られる泡沫細胞。
C: 抗 JCV VP1 抗体の免疫染色。 D: 抗 JCV agnoprotein の免疫染色。

症例 2



A: HE 小脳皮質の分子層と顆粒層を含む組織。 B: 泡沫細胞の集簇。
C: 顆粒層に見られた JCV VP1 陽性細胞。 D: 泡沫細胞の集簇内の JCV VP1 陽性細胞。

症例 3



A: HE, B: KB 白質に広がる斑状の脱髄病巣。 C, D: 血管周囲に目立つリンパ球や形質細胞の浸潤。 E: CD79a 免疫染色。 F: L26 免疫染色。 G: CD3 免疫染色。 H: CD68 免疫染色。

Roscovitine による *in vitro* での JC ウイルス感染の抑制

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：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：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：長嶋 和郎 北海道大学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：木村 享史 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

研究要旨

Polyomavirus 属である JC ウイルス (JCV) は、早期蛋白である T 抗原 (TAg) がウイルス複製に必須であり、また宿主因子 CDK による TAg のリン酸化が複製開始に重要であることが報告されている。Pharmacological CDK inhibitor である Roscovitine は、抗癌剤としての効果に加えて、宿主細胞内で CDK を利用しているウイルスに対する抗ウイルス効果が報告されている。本研究では、Roscovitine による *in vitro* での JCV に対する感染抑制の効果を検討した。その結果 Roscovitine は宿主細胞の増殖に影響を与えない濃度で、JCV の増殖を抑制し、感染によって引き起こされる細胞死を阻止した。また Roscovitine は *in vitro* の実験系において JCV の複製を低下させ、その増殖を抑制した。JCV によって惹起される進行性多巣性白質脳症に対する治療法は未だ確立していないが、本研究により Roscovitine は JCV に対する抗ウイルス薬の候補として有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

Polyomavirus 属である JC ウイルス (JCV) は、早期蛋白である T 抗原 (TAg) がウイルス複製に必須であり、また宿主因子 CDK による TAg のリン酸化が複製開始に重要であることが報告されている。Pharmacological CDK inhibitor である Roscovitine は、抗癌剤としての効果に加えて、宿主細胞内で CDK を利用しているウイルスに対する抗ウイルス効果が報告されている^{1,2}。本研究では、Roscovitine による *in vitro* での JCV に対する感染抑制の効果を検討した。

B. 研究方法

JCV 感染許容細胞であるヒト神経芽細胞

腫由来 IMR-32 細胞に JCV 感染後 8 日目から Rosco (10 μ M) または、対照として DMSO を培地中に加え、細胞増殖並びに細胞死 [cytopathic effects (CPE)] を検討した。

さらに IMR-32 細胞由来の JCV 持続感染細胞である JCI 細胞に、Roscovitine を 0、5、10 μ M の濃度で培養液中に加え、培養後細胞を回収し、ウイルスの感染価の指標である赤血球凝集能、タンパク質の発現、mRNA 量を測定した。また、Roscovitine 存在下での IMR-32 細胞内での JCV の早期、後期転写活性を Luciferase assay にて測定した。同時にウイルス DNA 複製への影響を調べるため、JCV ori 領域を含むプラスミドならびに TAg 発現プラスミドを同時に IMR-32 細胞に導入

後 Roscovitine 処理を行い、複製した DNA を Southern blotting にて検出した。

(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 [承認番号 17 (12)]。

C. 研究結果

① DMSO 処理を行った IMR-32 細胞では JCV 感染後 20 日前後から cytopathic effects (CPE) が観察され、30 日までに細胞はほぼ死滅した。しかし Roscovitine 処理した細胞は増殖を続け CPE は認められなかった (図 1)。

② Roscovitine 処理後の JCI 細胞において、処理後 12 日で、JCI 細胞のウイルス感染価は、濃度依存性に減少し、Roscovitine (10 μ M) の処理では、対照群の約 10% に低下した (図 2)。また JCV の複製は Roscovitine 処理により 50% 程度低下した。

③ JCV のタンパク質の転写活性は、早期方向では対照に比べて変化を認めなかったが、後期方向の転写活性は 50% 程度に低下した。

④ JCV の各ウイルスタンパク質量は早期、後期タンパク質とも Roscovitine の処理時間および濃度に伴い減少した。

D. 考察

本研究により、Roscovitine は *in vitro* の実験系において JCV の複製を低下させ、その増殖を抑制し、また JCV による cytopathic effect も抑制することが明らかになった。JCV によって惹起される進行性多巣性白質脳症に対する治療法は未だ確立していないが、

本研究により Roscovitine は JCV に対する抗ウイルス薬の候補として有用である可能性が示唆された³。

E. 結論

今後 JCV に対する siRNA⁴ や Roscovitine³ を用いた進行性多巣性白質脳症の治療法への応用が期待される。

[参考文献]

1. Taylor SL, Kinchington PR, Brooks A, Moffat, JF. Roscovitine, a cyclin-dependent kinase inhibitor, prevents replication of varicella-zoster virus. *J Virol* 2004 ; 78: 2853-2862.
2. Wang D, de la Fuente C, Deng L, Wang L, Zilberman I, Eadie C, Healey M, Stein D, Denny T, Harrison LE, Meijer L, Kashanchi F. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transcription by chemical cyclin-dependent kinase inhibitors. *J. Virol* 2001; 75: 7266-7279.
3. Orba Y, Sunden Y, Suzuki T, Nagashima K, Kimura T, Tanaka S, Sawa H*: Pharmacological cdk inhibitor R-Roscovitine suppresses JC virus proliferation. *Virology* 2008; 370: 173-183. (*corresponding author).
4. 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. (*corresponding author) .

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Orba Y, Sunden Y, Suzuki T, Nagashima K, Kimura T, Tanaka S, Sawa H*. Pharmacological cdk inhibitor R-Roscovitin suppresses JC virus proliferation. *Virology* 2008; 370: 173-183. (*corresponding author).
2. Matoba T, Orba Y, Suzuki T, Makino Y, Shichinohe H, Kuroda S, Ochiya T, Itoh H, Tanaka S, Nagashima K, Sawa H*. An siRNA against JC virus (JCV) agnoprotein inhibits JCV infection in JCV-producing cells inoculated in nude mice. *Neuropathology*. (in press) (*corresponding author).
3. 鈴木忠樹, 長嶋和郎, 澤 洋文. 進行性多巣性白質脳症 (PML): 原因ウイルスと発病機構. *日本臨床* 2007; 65: 1495-1500.

2. 学会発表

1. Sawa H, Sunden Y, Semba S, Suzuki T, Okada Y, Orba Y, Kimura T, Nagashima K. Cellular factor DEAD box protein 1 (DDX1) regulates JCV proliferation. IV International Conference on Polyomaviruses and Human Disease, Barcelona, Spain, Sept 30-Oct 3, 2007.
2. Sawa H, Orba Y, Sunden Y, Imamura E, Tokinobu H, Kimura T, Nagashima K: A case of highly active anti-retroviral therapy-induced immune reconstitution inflammatory syndrome in AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy. IV International Conference on Polyomaviruses and Human Disease, Barcelona, Spain, Sept 30-Oct 3, 2007.
3. Orba Y, Sunden Y, Suzuki T, Kimura T,

Tanaka S, Nagashima K, Sawa H: Pharmacological cdk inhibitor suppresses JC virus proliferation. The 8th International Symposium on Neurovirology, San Diego, CA, USA, Oct. 30-Nov. 2, 2007.

4. 石塚範子, 新倉謙一, 鈴木忠樹, 澤 洋文, 居城邦治. ウイルスナノカプセルを用いた基板からの細胞内薬剤導入法の開発. 日本化学会第 87 春季年会. 大阪, 2007.3.25-28.
5. 石塚範子, 新倉謙一, 鈴木忠樹, 澤 洋文, 居城邦治. ウイルス様微粒子の細胞内導入を促進する糖鎖基板の作製. 第 56 回高分子学会年次大会. 京都, 2007.5.29-31.
6. 鈴木忠樹, 岡田由紀, 大場靖子, 寸田祐嗣, 長嶋和郎, 木村享史, 澤 洋文. JCV ウイルス粒子放出機構の解明. 第 11 回日本神経ウイルス研究会. 群馬, 2007.7.5-7.
7. 鈴木忠樹, 大場靖子, 寸田祐嗣, 木村享史, 長嶋和郎, 澤 洋文. JC ウイルス粒子放出機構の解明. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2007.10.21-23.
8. 鈴木忠樹, 大場靖子, 寸田祐嗣, 木村享史, 澤 洋文. JC ウイルス粒子放出の分子機構. 第 30 回日本分子生物学会年会. 第 80 回日本生化学会大会. 横浜, 2007.12.11-15.
9. 澤 洋文. ウイルス感染症の分子病理学的研究. 第 143 回日本獣医学会学術集会. 病理学会シンポジウム. つくば, 2007.4.3-5.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 出願中の特許

1. JC ウイルス agno を対象とした PML の治療 (特願 2001-356836 号)
2. JC ウイルスの粒子形成阻害剤 (特願 2004-165083 号)
3. JC ウイルスの VP-1 に対する siRNA、お

2. 実用新案登録

特になし

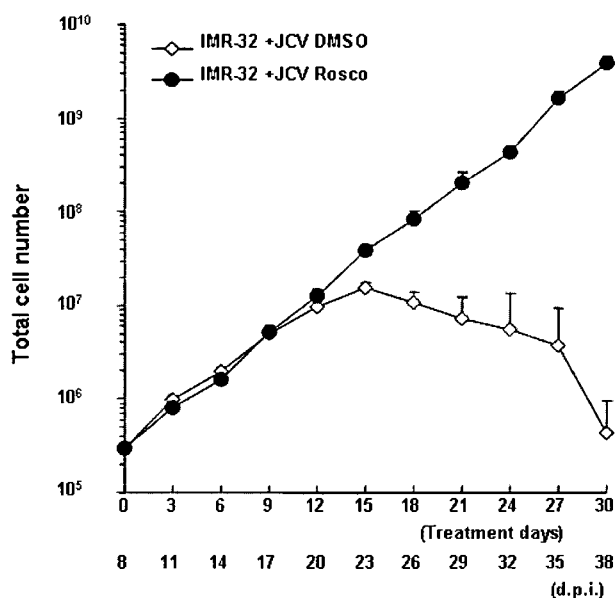


図1

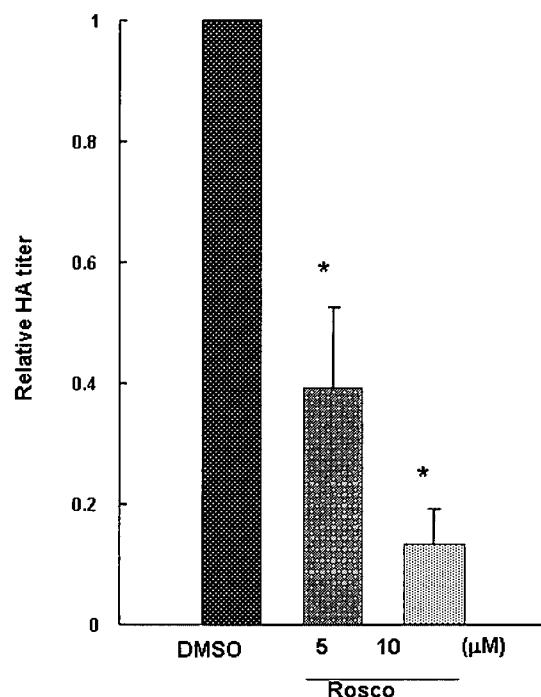


図2

図1：JCV感染による宿主細胞の cytopathic effects (CPE) に対する Roscovitine の抑制効果。JCV 感染許容細胞であるヒト神経芽細胞腫由来 IMR-32 細胞に JCV 感染後 8 日目から Roscovitine (10 μM) または、対照として DMSO を培地中に加え、細胞増殖並びに細胞死を検討した。その結果、DMSO 処理を行った細胞では JCV 感染後 20 日前後から CPE が観察され、30 日までに細胞はほぼ死滅したが、Roscovitine 処理した細胞は増殖を続け CPE は認められなかった。

図2：Roscovitine のウイルス感染価に対する影響。IMR-32 細胞由来の JCV 持続感染細胞である JCI 細胞を用いて、Roscovitine のウイルス感染価に対する影響を赤血球凝集能を測定することにより検討した。Roscovitine 処理後 12 日で、JCI 細胞のウイルス感染価は、対照群の約 10% に低下した。

進行性多巣性白質脳症（PML）の診断・治療を目的とした JC ウイルスの定量的検出系の確立および検査体制の整備

分担研究者：倉根 一郎 国立感染症研究所ウイルス第一部
研究協力者：中道 一生 国立感染症研究所ウイルス第一部
研究協力者：伊藤 睦代 国立感染症研究所ウイルス第一部
研究協力者：西條 政幸 国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨

進行性多巣性白質脳症（PML）は JC ウイルス（JCV）による致死的な脱髄疾患であり、その診断においては髄液を用いた JCV-DNA の PCR 検査が優先される。我々は JCV-DNA を迅速かつ定量的に検出するための TaqMan リアルタイム PCR 検出系を確立した。また、本検出系を基盤として、髄液中の JCV 遺伝子の有無および陽性 DNA の汚染を迅速に調べるための定性的検査系、ならびに髄液中のウイルスゲノム量を測定するための定量的検査系を開発した。さらに、インターネットを介した検査依頼システム、ならびに国連規格容器による検体のシャトル輸送、検査室全体を紫外線照射するための装置等、利便性と安全性、信頼性を考慮した検査体制を整備した。本検査は、PML の診断および国内のサーベイランスにおいて有用なウイルス学的情報を提供する。

A. 研究目的

進行性多巣性白質脳症（Progressive Multifocal Leukoencephalopathy: PML）は、免疫不全患者等の脳において JC ウイルス（JCV）が増殖することで引き起こされる致死的な脱髄疾患である。特異性および侵襲性の点から、PML の診断では髄液を用いた JCV-DNA の PCR 検査が優先される。また、米国ではリアルタイム PCR を用いた髄液検査が導入され始めており、迅速性や定量性において優れた実用性を発揮している。本研究は、リアルタイム PCR を基盤とした JCV 検出系を確立し、国内の医療機関における PML 診断を支援するための検査体制を整備することを目的とする。

B. 研究方法

1) 材料

PCR における陽性対照 DNA として JCV ゲノムを含むプラスミド（pJCV、JCRB より分与）を用いた。BK ウイルス（BKV）のゲノム DNA を含むプラスミドは ATCC より購入した。サーマルサイクラーとしてグラディエント PCR には TaKaRa TP600（TaKaRa）を、リアルタイム PCR には LightCycler（Roche）を用いた。PCR 試薬としてグラディエント PCR には TaKaRa Ex-Taq（TaKaRa）を、リアルタイム PCR には Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG（Invitrogen）および LightCycler 480 Probes Master（Roche）を用いた。髄液検体からの DNA 抽出には QIAamp DNA Blood Mini Kit（QIAGEN）を用いた。

2) リアルタイム PCR 検出系の至適化

pJCV のゲノム DNA 配列を標的とした約 100 種類のプライマー (50 セット、既発表 7 セットを含む) を合成した。各プライマーセットおよび pJCV を用いてグラディエント PCR を行い、12 段階 (0.5°C 間隔) のアニーリング温度条件下における特異性を調べた。幅広いアニーリング条件下においても安定して標的配列を増幅するプライマー候補を選定した後、各サイクルの増幅効率および検出感度を SYBR Green-リアルタイム PCR によって解析した。続いて、高い特異性と検出感度を有し、かつ同一の PCR プログラムにて増幅が可能なプライマーセットを対象として、増幅断片に対する各 3 種類の蛍光プローブ (TaqMan プローブ) を設計した。上記プライマーセットおよび蛍光プローブを用いてリアルタイム PCR を行い、至適条件を調べた。

3) 臨床検体を用いた PCR 検出系の評価

上記の試薬を用いて PML/非 PML 症例の髄液から全 DNA を抽出した後、得られた DNA 抽出液および上記 2) のプライマー、蛍光プローブを用いてリアルタイム PCR を実施し、検出系の信頼度を調べた。

4) 検査体制の整備

JCV 検査を効率的に遂行するために 2 台の LightCycler を配備した。また、DNA 汚染による偽陽性のリスクを排除するため、検査室全体を紫外線照射するための装置を設置した。国立感染症研究所への検体輸送においては、医療関係者の利便性、ならびに万が一の破損や紛失等を考慮し、WHO 輸送ガイドラインに準拠した国連規格 (カテゴリー B : UN3373) の包装容器および冷凍輸送用オーバーパックを医療機関とのシャトル輸送に用いることとした。

(倫理面の配慮)

PML および非 PML 症例の髄液を用いた検査系のバリデーションは、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会において承認された上で実施した (平成 18 年 6 月 21 日 受付番号 97)。

C. 研究結果

1) リアルタイム PCR 検出系の確立

特異性と安定性、増幅感度に関するデータを基盤として、プライマー/プローブ候補の中から、JCV の T 遺伝子および VP1 遺伝子領域を標的とする 2 セットを選定した。また、pJCV の JCV ゲノム DNA のクローニングサイトを挟む部位にプライマー/プローブを設計し、陽性対照 DNA のみを検出するためのセットを設計した。上記 3 種類のプライマー/プローブセット (T 遺伝子、VP1 遺伝子、pJCV 配列) は高い特異性および検出感度 (10E9 から数コピー/反応) を示した。また、プライマーおよびプローブの塩基配列は既報告 (374 種) の分子クローンの配列と約 100% の相同性を有し、ミスプライミングによる検出感度および定量性のエラーを回避できることが分かった。

2) 定性的検査系 (第一段階検査) の確立

PML/非 PML 症例患者の髄液から抽出した DNA を用いて上記 1) のリアルタイム PCR を実施し、定性的検査系の信頼性を評価した。JCV ゲノムの DNA 配列 (2 種類) および pJCV (1 種類、陽性対照 DNA の汚染を検出するため) を標的とした計 3 種類のリアルタイム PCR 検出系は、髄液検体を用いた検査においても高い特異性を有すること、および Nested-PCR と同程度の感度 (2~3 コピー/反応) を有することが示された。また、髄液を採取する際に JCV と近縁なヒトポリオマウイルスである BKV が混入した場合を想定し、本検査系が BKV -DNA と反応するか

否かを調べた。本検査系は高濃度（ $10E8$ コピー以上）の BKV DNA が混入した状況においても非特異的なシグナルを検出しないことがわかった。また、本定性検査は、3 種類の PCR を同一のプログラムによって実施することが可能であり、約 40 分間で検出が完了するため、第一段階の定性的検査において要求される優れた迅速性と特異性を有することが示された。

3) 定量的検査系（第二段階検査）の確立

第一段階の定性的検査において陽性を示した髄液検体を対象として第二段階の定量的検査系の信頼性を評価した。段階希釈した既知濃度の陽性対照 DNA をスタンダードとしてリアルタイム PCR を行った結果、定量的検査では広範囲（ $10E9$ から数コピー）に亘る JCV-DNA のコピー数を安定して測定することが可能であった。また、定性的検査において陽性を示した検体に含まれる JCV-DNA を測定した結果、髄液 1 mL あたり $10E2$ コピーから $10E9$ コピーの範囲内であること、ならびに PML の症状の進行と相関を有することが示された。

D. 考察

本研究では、リアルタイム PCR を基盤とした JCV-DNA の定性的および定量的検査系を確立した。また、医療機関における PML 診断を支援するため、検体輸送を含めた JCV の髄液検査体制を整備した。以上の成果から、今年度における本研究の目的が達成されたと判断する。

近年、多くの病原体検査においてリアルタイム PCR が導入されていることは周知の事実である。リアルタイム PCR は定量性や迅速性、検出感度だけでなく、閉鎖系における増幅産物の検出という利点を有する。この特長によって、DNA 汚染の最大の原因となる増幅産物のキャリーオーバーを防止すること

ができるため、診断目的の使用における信頼性の向上に繋がった。また、増幅断片を特異的に検出するための蛍光プローブが開発されたことを契機として PCR 検査のリスク因子である非特異的な増幅による偽陽性を軽減することが可能となった。

米国では、国立衛生研究所（NIH）の研究グループによって JCV の T 遺伝子を標的とするリアルタイム PCR 検出系が開発され、医療機関における JCV 検査においてすでに実用化されている。加えて、近年、定量解析によって髄液中の JCV 量が PML の進行と相関することが明らかとなり、診断や治療における有用な指標として注目されている。残念ながら、本邦の PML 症例における髄液中の JCV 量については十分な解析がなされておらず、参考となるデータが乏しいため、既報告のデータとの比較検討を行う必要がある。

本研究では PCR 検出系を確立するだけでなく、医師の利便性および検体輸送時の安全性を視野に入れた検査体制を整備した。医療機関から配送される髄液検体には感染性物質が含まれている可能性が極めて高いため、その輸送には強固な容器、ならびに万が一の検体漏洩や紛失にも対処し得る梱包が必要となる。本検査の場合、担当医師が行う作業はシャトル輸送用の国連規格容器に依頼書と髄液、保冷剤を入れることのみであり、感染性物質の輸送経験が少ない医療関係者においても極めて短時間で梱包が完了し、安全に検体を輸送することが可能となる。

今年度における本研究目標は、国内における髄液の JCV 検査体制を整備することであったが、すでに目標が達成されたと判断したため、医療機関における PML の診断支援を開始した。実施に際しては、全国の神経内科や感染症科、血液内科、小児科等の様々な診療科の医師が容易に検査を依頼できるよう、JCV 検査に関する当担当室のホームページ（HP）を開設した。Google 等の検索サイト

において、キーワード（JC ウイルス検査）を入力することで当 HP にアクセスすることができる。平成 19 年 11 月からの 3 ヶ月間においては HP による直接依頼が 50% を超えており、今後も増加することが予想される。

平成 19 年 4 月から平成 20 年 1 月までの 10 ヶ月間において合計 71 件の髄液検査を実施したところ、12 検体から JCV-DNA を検出し、定量的解析を行った。JCV 陽性症例は合計 9 例であり、基礎疾患は HIV 感染症が 5 例、Ph 陽性急性リンパ性白血病（非近縁者間骨髄移植後）、およびホジキン病（自家骨髄移植後）、IgD 型多発性骨髄腫、慢性リンパ性白血病が各 1 例であった。今後は、PML 診断をより積極的に支援するとともに、PML の診断や治療において有用なウイルス学的データベースを構築する必要がある。

E. 結論

リアルタイム PCR を基盤として髄液を用いた JCV-DNA の検査系を確立した。また、国内の医療機関における PML 医療を支援す

るための検査体制を整備した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

我が国における SSPE サーベイランス 2007

- 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
研究協力者：水口 雅 東京大学大学院医学系研究科国際生物医科学講座
発達医科学分野
研究協力者：愛波 秀男 静岡県立こども病院小児神経科
研究協力者：鈴木 保宏 大阪府母子保健総合医療センター神経科
主任研究者：水澤 英洋 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学神経内科学分野

研究要旨

SSPE にのみ適応が認められているイノシンプラノベクス納入医療機関を基に、我が国での亜急性硬化性全脳炎（SSPE）患者 116 例の調査票を回収し、これらを解析した。顕著ではないが、症例は九州に多い印象であった。臨床像の概要は従来の教科書的記載の通りであった。治療は、イノシンプラノベクスが最も多く使用され、全体の 75% に IFN が使用されていた。リバビリンは 19% に使用されていた。在宅での療養が 72 例（62%）と最も多く、そのうち 40 例（56%）が病期Ⅳ（植物状態、寝たきり）であった。経管栄養が 83 例（72%）に施行されていた。本疾患患者の療養および福祉の面での配慮が重要である。

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 年で発症し、亜急性に脳神経症状が進行する。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ので、診断にさほど苦慮しないが、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。根本的治療法のない疾患ではあっても、早期発見と早期の進行停止に向けた治療の開始が望まれる。

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されているが、彼国では医学・医療レベルの問題もあり、臨床像が十分に把握されているとはいえない。

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を目的として、本研究を開始した。

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。これらの施設に調査個人票を送付し、居住地、性、生年月、発病年月、麻疹罹患年月、麻疹ワクチン接種の有無、頭部外傷、血清麻疹抗体価、髄液麻疹抗体、IgG index、脳波周期性同期生放電、治療内容、経管栄養、気管切開、人口呼吸、療養状況、診断時および調査時病期を調査した。

平成18年度に、64例の個人調査票を回収したので、残りの例について、サーベイランス委員で地区ごとに担当を分担し、電話やその他の方法で担当医へ直接依頼するなど、可能な限りデータ回収に努力した。

（倫理面への配慮）

解析結果が個人を特定できるようなものではない。疾患の全体像を示すデータのみ本研究では扱っている。

C. 研究結果

昨年から引き続きデータの収集に努め、2008年12月までに、116（男64、女52）例の個人調査票を回収した。調査時年齢は、4歳から37歳にわたっていた。

昨年同様、患者住所の都道府県については、表に示すとおりである。九州地方にやや多い。疾患概要であるが、発病年齢（平均）：10歳0か月、診断年齢（平均）：10歳5か月、麻疹発症（平均）：1歳4か月、麻疹罹患から発症までの期間（平均）：8年9か月であった。頭部外傷の既往：1例、麻疹ワクチン接種：6例、血清麻疹抗体価は記載100例のうち99例で上昇していた。髄液麻疹抗体価は記載101例のうち、100例に検出され

た。髄液IgG-indexは施行した32例中30例に認められた。脳波の周期性同期性放電は記載99例中90例に認められ、不明との記載が10例であった。

治療は、イノシンプラノベクスが最も多く使用され、75%にインタフェロンが併用されていた。インタフェロンは髄注37例、脳室内投与42例、使用との記載のみが8例であった。リバビリンは22例（19%）に使用されていた。

調査時に在宅は72例（62%）、入院11例、施設入所19例、その他14例であった。在宅の72例のうち40例（56%）が病期Ⅳであった。経管栄養は83例に施され、気管切開29例、人口呼吸が15例に施行されていた。

診断時および調査時の病期分類を図に示すが、Ⅰ期で診断されたのが38例、Ⅱ期が55例で、記載のある108例のうち93例（86%）がⅡ期までに診断されていた。診断時Ⅲ期が11例、Ⅳ期が4例あった。調査時では記載のある114例のうち62例（54%）がⅣ期であり、15例が死亡していた。Ⅰ期を保っているのが6例、Ⅱ期を保っているのが13例、Ⅲ期が18例であった。

D. 考察

我が国でのSSPEは約130例と考えられるが、そのおよそ9割の調査個人票を回収できた。初期の目的はかなり達成できたと思われる。今回の解析はSSPEの概要を俯瞰する程度のものであるが、これらの資料から、たとえば年度ごとの発症数や、麻疹罹患数との関連など更なる解析も可能であると思われる。

昨年までの約半数の集計では、患者の住所別にみると、地域差があるような傾向であったが、症例を増やすことによって、今まで報告されなかった地域からの報告が増え、我が国での地域差が大きいとは言えないようである。しかし、九州地方が背景人口に比して多いような感じがあるが、それぞれの地域の人

表. 都道府県別 SSPE 患者数

北海道	13	青森	1	秋田	1	宮城	2	福島	3
栃木	2	群馬	4	埼玉	2	千葉	1	東京	5
神奈川	4	新潟	4	石川	2	福井	1	山梨	1
長野	1	岐阜	5	静岡	9	愛知	3	三重	1
滋賀	1	大阪	3	兵庫	2	島根	1	岡山	4
広島	1	徳島	1	香川	2	愛媛	1	高知	4
福岡	5	佐賀	1	長崎	5	熊本	3	宮崎	3
鹿児島	2	沖縄	12						

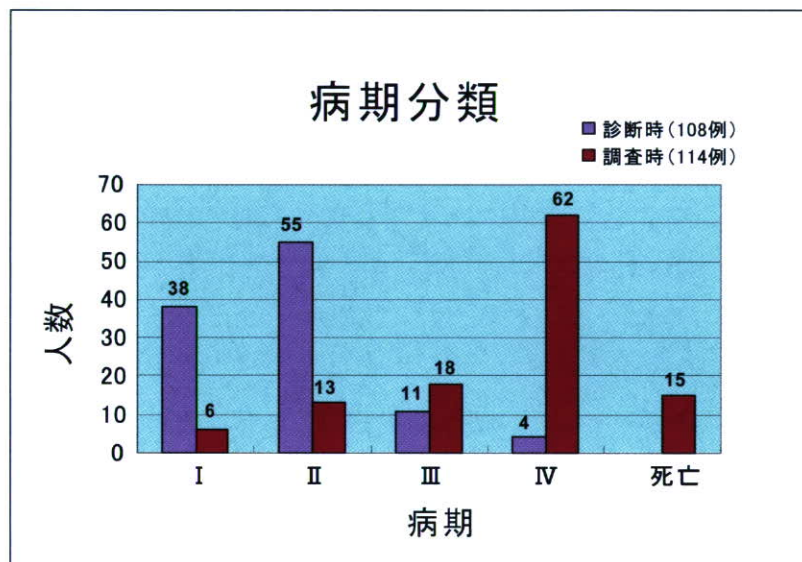


図. 診断時と調査時の病期

口や、麻疹発症数などを勘案した統計を取らないと正確なことはいえない。発症年度の人口や麻疹患者数などとの関係も考慮する必要がある。

臨床像の概要は、従来の教科書記載の通りであった。

性比は、SSPE が注目され始めた 1970 年代の報告では、男女比が 3 : 1 あるいは 4 : 1 と男児に多い疾患と報告されていた¹⁾。我が国では、二瓶による集計で、1981 年以前では 2.1 : 1、1982 年以後では 1.4 : 1 と報告されている。近年になり、男女比が小さくなる傾向がある。2003 年の中村の報告²⁾では、さ

らに 1.1 : 1 となっている。今回の集計では、男女比が 1.2 : 1 であり、二瓶の 1982 年以後の発症より小さいが、中村の報告よりはわずかに大きい。理由は定かでないが、母集団の発症年代の幅が同一ではないので、確実な比較はできない。しかし大きな違いはないので、近年男女比が小さくなっていることは間違いないようである。

診断の根拠となるべきデータである血清麻疹抗体価上昇の有無、あるいは髄液麻疹抗体の検出について調査票へ記入されていないものがそれぞれ 14 および 15 回答あった。実際に SSPE を診療しているであろう報告者（担