

1996年の全国調査、1997-99年の類縁疾患調査により硬膜移植歴を有するCJDと認定された症例を合わせた合計133例のdCJD患者についても検討を行った。

C. 研究結果

これまでに認定されているプリオン病1129例のうち、869例(77%)は弧発性CJD(sCJD)、146例(13%)は家族性CJD(fCJD)、70例(6%)は硬膜移植歴を有するCJD(dCJD)、1例は変異型CJD(vCJD)、3例が病態未決定のCJD、37例(3%)がゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病(GSS)、3例が致死性家族性不眠症(FFI)であった。図1に発病年ごとの報告患者数を示す。患者数は2002年以降増加傾向であり、2006年が138例と最も多かった。図に示した人口動態統計による死亡数と比較すると、2002年以降は20-40例の乖離が見られている。発病時の平均年齢は対象者全体で66.5歳、病態毎ではdCJD(57.4歳)とGSS(51.7歳)でより低い年齢で発病する傾向が見られた。全ての症例が臨床的には確実なCJDであるが、WHOの診断基準により「確実例」と診断された割合はsCJDの11%、fCJDの17%、dCJDの41%であった。確実例と診断するには病理所見が必須となっており、全体の剖検率が21%と低い現状では確実例の割合が低く留まることは避けられない。病態毎の死亡者に占める剖検率はsCJD17%、fCJD32%、dCJD40%とsCJDで低くdCJDで高い傾向であった。追跡調査の結果、2008年9月現在には対象者の76.4%が死亡しており、18.9%が入院中であった。通院や在宅で加療されている対象者はそれぞれ1.9%、1.4%であった。死亡した対象者全体の発病から死亡までの期間は18.3月であり、経過はsCJDで15.9月と短く、GSSで66.7月と長くなっていた。dCJD患者133例についての検討結果を以下に述べる。硬膜移植を受ける原因となった病態は、

脳腫瘍が45%と最も多く、次いで脳出血の16%であった。図2にdCJDの報告数の分布を示す。1985年以降の発病年ごとの患者数は1995年の15名をピークとし、近年は減少傾向である。2007年に発病した患者の報告はなかったが、2008年には1例の報告がみられた。図3に示す通り、患者が硬膜移植を受けた時期は、83-87年が83%を占めていた。88年以降に硬膜移植を受けていた対象者は年間0-2名に減少し、93年の1名が最後となっている。硬膜移植から発病までの期間は平均143月、最短14月、最長298月(24年10月)であった。

D. 考察

2002年以降目立っている報告患者数と人口動態統計による死亡数との乖離については、サーベイランス委員会への報告の漏れや遅れなど、調査の悉皆性を脅かす要因が存在している可能性があり、今後検討していく必要がある。また、診断の確実性を向上させるためには、臨床医や行政と一体となった剖検が積極的に行われるシステムを構築しなければならない。現在は厚生労働省による各都道府県を通じた剖検の援助策が開始されている。1987年以降死体乾燥硬膜に水酸化ナトリウムの処理が行われるようになり、1997年に死体乾燥硬膜の使用が禁止された。このような我が国での死体乾燥硬膜をめぐる状況と、これまでの調査から得られた硬膜移植から発病までの期間の知見を合わせて考えると、今後もdCJDの患者が発生することが予測される。

E. 結論

1999年4月から2008年9月までのCJDサーベイランスにより1129例のプリオン病が報告された。このうちvCJDは1例であった。dCJDはサーベイランス以前の調査を含めて133例が確認された。1997年に死体乾燥硬膜の使用が禁止されて10年以上が経過

しているが、今後も患者が出現することが本研究からうかがわれた。

[参考文献]

1) Nakamura Y. Uehara R. Watanabe M. Sadakane A. Yamada M. Mizusawa H. Maddox R. Sejvar J. Belay E. Schonberger L. Update : Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts-Japan, 1978-2008. MMWR. 57 : 1152-1154, 2008

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(2008/4/1~2009/3/31 発表)

1. 論文発表

1) Nakamura Y. Uehara R. Watanabe M. Sadakane A. Yamada M. Mizusawa H. Maddox R. Sejvar J. Belay E.

Schonberger L. Update : Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts-Japan, 1978-2008. MMWR. 57 : 1152-1154, 2008

2. 学会発表

1) 中村好一, 定金敦子, 名越 究, 山田正仁, 水澤英洋. 我が国におけるプリオン病の状況. 日本疫学会学術総会. 金沢, 2009.1.23

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

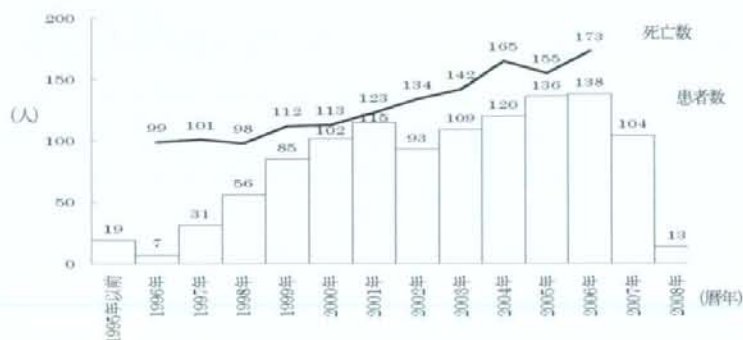


図1 発病年別報告患者数および人口動態統計による死亡数

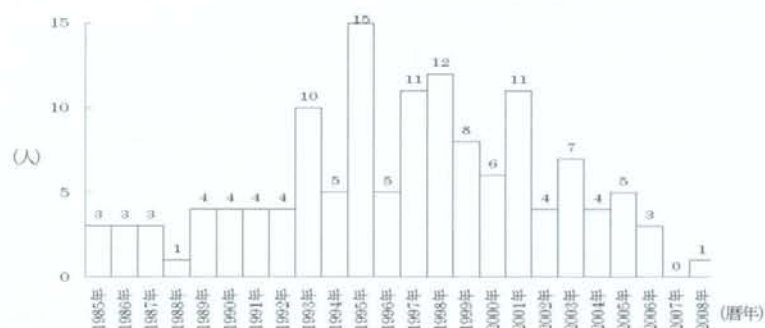


図2 硬膜移植歴を有するCJDの報告数

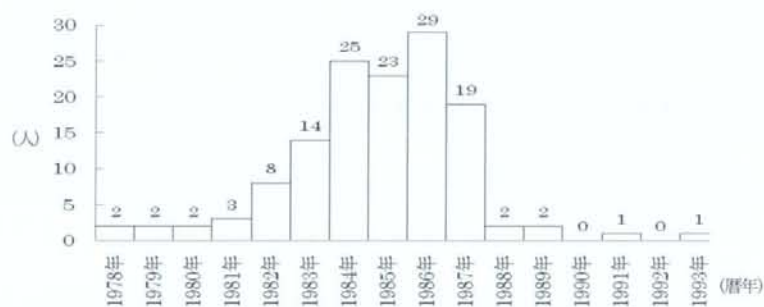


図3 硬膜移植歴を有するCJDの患者が硬膜移植を受けた時期

硬膜移植を伴わない脳外科手術歴のある孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病の特徴

研究分担者：山田 正仁 金沢大学大学院医学系研究科脳老化・神経病態学(神経内科)
研究協力者：浜口 毅 金沢大学大学院医学系研究科脳老化・神経病態学(神経内科)
研究協力者：野崎 一郎 金沢大学大学院医学系研究科脳老化・神経病態学(神経内科)
研究協力者：篠原もえ子 金沢大学大学院医学系研究科脳老化・神経病態学(神経内科)
研究協力者：中村 好一 自治医科大学地域医療学センター公衆衛生学
研究協力者：北本 哲之 東北大学大学院プリオン蛋白研究部門 CJD 早期診断・治療法開発分野
研究協力者：佐藤 猛 東大和病院神経内科
研究代表者：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)

研究要旨

[背景] 医原性 Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) は大きな問題である。脳外科手術歴のある孤発性 CJD (sCJD) が、医原性 CJD でないという確認は出来ていない。

[目的] 脳外科手術を受けた後に CJD を発症した症例で、屍体由来の乾燥硬膜を移植されていない例の臨床的特徴を明らかにし、それらの症例の中に脳外科手術による 2 次感染によるものが含まれていないかを検討する。

[方法] わが国の CJD サーベイランス委員会でプリオン病と診断された症例の中で、プリオン病発症前に脳外科手術を受けているが硬膜移植を受けていないことが確認できた 14 例の sCJD (sCJD with neurosurgery) の臨床病理学的特徴を、dCJD (75 例) および脳外科手術の既往のない sCJD (sCJD without neurosurgery) (861 例) と比較した。

[結果] sCJD with neurosurgery 群と sCJD without neurosurgery 群の間で臨床症候に差は認めなかった。dCJD 群 (57.0 ± 15.8 歳) は sCJD with neurosurgery 群 (69.8 ± 8.6 歳) と比較して、発症年齢が有意に若く ($p < 0.05$)、脳波上の PSD の出現頻度も dCJD 群 (66.2%) で sCJD 群 (85.7%) と比較して有意に少なかった ($p < 0.0001$)。脳外科手術を受けた年齢は、dCJD 群 (42.1 ± 15.9 歳) が sCJD with neurosurgery 群 (60.1 ± 13.9 歳) より有意に若く ($p < 0.0001$)、脳外科手術から CJD 発症までの期間は dCJD 群 (14.8 ± 3.7 年) が sCJD with neurosurgery 群 (9.4 ± 6.9 年) より有意に長かった ($p < 0.05$)。14 例の sCJD with neurosurgery 群中 11 例は発症後 4 か月以内に無動性無言となり脳波上周期性同期性放電 (PSD) を認めるなど典型的な sCJD の経過を示した。非典型的な経過の 3 例中 2 例は剖検されており、1 例は MM2 皮質型で 1 例は MM1 型であるがプラーク形成を認める非典型例で dCJD プラーク型に類似していた。

[考察] 脳外科手術歴のある sCJD は、発症年齢や脳外科手術から CJD 発症までの期間などが dCJD とは異なり、脳外科手術歴のない sCJD の特徴に近かった。しかし、病理学的に dCJD のプラーク型と似た症例が含まれており、今後も十分な監視が必要である。

A. 研究目的

クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)に代表されるプリオン病は、脳病理における海綿状変化と異常プリオン蛋白蓄積を特徴とする感染症で、同種間あるいは異種間で伝播しうる。現在までに、ヒト乾燥硬膜移植や角膜移植、成長ホルモン製剤、脳外科手術、輸血(変異型CJD)といった医療行為によるプリオン病の伝播が世界中で400例以上報告されている¹⁾。わが国でも、硬膜移植後CJD(dCJD)が現在までに132例確認されており²⁾、大きな社会問題となっている。昨年我々は、わが国におけるsCJD発症に対する発症前の医療行為の影響を調査したが、sCJD発症前の医療行為はsCJD発症の有意な危険因子ではなかった³⁾。しかし、4.5%のsCJD症例がsCJD発症後に何らかの外科手術を受け、特に0.8%のsCJD症例は感染の危険が高い脳外科手術を受けており、医原性プリオン病は今後も注意深く調査を続ける必要がある³⁾。

現在、dCJDの診断はCJD発症以前の脳外科手術で屍体由来の乾燥硬膜の移植が行われたかによってなされており、硬膜移植のない症例は孤発性CJDに分類されている。しかし、これらの症例が医原性CJDでないという確認は出来ていない。そこで、脳外科手術を受けた後にCJDを発症した症例で、屍体由来の乾燥硬膜を移植されていない例の臨床病理学的特徴を明らかにし、脳外科手術歴のないsCJDやdCJDの臨床病理学的特徴との違いを検討した。

B. 研究方法

1999年4月から2008年9月までにわが国のCJDサーベイランス委員会でsCJDと診断された症例で、sCJD発症以前に脳外科手術を受けているが硬膜移植を受けていないことが確認できた14例のsCJD(sCJD with neurosurgery)の性別、発症年齢、罹病期間(sCJD発症から無言無動まで、あるいは無言

無動とならなかった場合は死亡まで)、脳波上の周期性同期性放電(PSD)の有無、脳脊髄液14-3-3蛋白、プリオン蛋白遺伝子コドン129多型を、脳外科手術歴のないsCJD(sCJD without neurosurgery)(861例)とdCJD(75例)と比較した。

また、sCJD with neurosurgeryとdCJDの間では、上記の項目に加えて脳外科手術を行った時期、脳外科手術を受けた年齢、脳外科手術からCJD発症までの期間も比較した。その際、dCJD群は、その病理学的特徴から非ブランク型とブランク型に分けられ、それらは発症1年以内の脳波上のPSD出現の有無で分けられることから⁴⁾、病理学的に非ブランク型と確認されたあるいはPSDが1年以内に出現した群(非ブランク型确实あるいはほぼ确实例)(47例)と病理学的にブランク型と確認されたあるいはPSDが1年以内に出現しなかった群(ブランク型确实あるいはほぼ确实)(23例)とに分類した。

更に、sCJD with neurosurgery群では病理検索が行われている例について、病理学的特徴についても検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は金沢大学医学倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

各病型間の臨床症候の比較を表1に示す。dCJD群(57.0±15.8歳)はsCJD with neurosurgery群(69.8±8.6歳)と比較して、発症年齢が有意に若く($p < 0.05$)、脳波上のPSDの出現頻度もdCJD群(66.2%)でsCJD群(85.7%)と比較して有意に少なかった($p < 0.0001$)。sCJD with neurosurgery群とsCJD without neurosurgery群は、検討した臨床症候全てで有意な差を認めなかった。性別や罹病期間、脳脊髄液14-3-3蛋白陽性率、プリオン蛋白遺伝子コドン129多型は、3群

間で有意差はなかった。

脳外科手術歴のある CJD (sCJD with neurosurgery 群と dCJD 群) の臨床症候の比較を表 2 に示す。脳外科手術を受けた時期は、dCJD は 1978 年-1993 年であったが、sCJD with neurosurgery 群では、1981 年-2005 年とより最近の手術が含まれていた。脳外科手術を受けた年齢は、dCJD 群 (42.1 ± 15.9 歳) が sCJD with neurosurgery 群 (60.1 ± 13.9 歳) より有意に若く ($p < 0.0001$)、脳外科手術から CJD 発症までの期間は dCJD 群 (14.8 ± 3.7 年) が sCJD with neurosurgery 群 (9.4 ± 6.9 年) より有意に長かった ($p < 0.05$)。dCJD を非ブランク型とブランク型に分けた検討でも、同様の結果であったが、ブランク型では PSD 陽性率が 8.7% と有意に低かった。

sCJD with neurosurgery 群の詳細を表 3 に示す。sCJD with neurosurgery 群は、全例が 50 歳以降の発症で、2 例 (症例 8, 11) を除いた全例で脳波上の PSD を認めた。罹病期間も 3 例 (症例 8, 9, 11) を除いた全例が 4 か月以内であり、ほとんどが sCJD の典型例の経過を呈していた。非典型的な経過を呈した 3 例中 2 例 (症例 8, 11) で剖検がなされており、症例 8 は sCJD の MM2 皮質型で⁵⁾、症例 11 は MM1 型だがブランクを有するという非典型例であった⁶⁾。

D. 考 察

本研究では、sCJD with neurosurgery 群と sCJD without neurosurgery 群では臨床症候に差を認めず、dCJD 群は sCJD with neurosurgery 群と比較して若年発症で、脳波上の PSD 出現頻度が少なく、脳外科手術を受けた年齢が若く、脳外科手術から CJD 発症までの期間が長かった。これらの結果は、sCJD with neurosurgery 群は dCJD 群とは異なる病型で、sCJD without neurosurgery 群に近い病型であることを示しており、

sCJD with neurosurgery 群が医療行為によって伝播した可能性は低いと考えられた。しかし、その中でも sCJD として非典型的な経過を呈するものがあり、特に dCJD ブランク型と同様の病理所見を呈する症例が含まれていたことから、今後も十分な監視が必要と考えられた。

E. 結 論

脳外科手術歴のある sCJD 症例の多くは、dCJD より脳外科手術歴のない sCJD に近い臨床症候を示した。しかし、脳外科手術歴のある sCJD 症例に、ブランク型 dCJD と同様の病理所見を呈する症例が存在し、今後も注意深い監視を継続する必要がある。

[参考文献]

[雑誌]

- 1) Brown P, Brandel JP, Preece M, et al. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. The waning of an era. *Neurology* 67 : 389-393, 2006
- 2) Nakamura Y, Uehara R, Watanabe M, et al. Update : Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts-Japan, 1978-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 57 : 1152-1154, 2008
- 3) Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, et al. Medical procedures and risk for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, Japan, 1999-2008. *Emerg Infect Dis*, in press.
- 4) Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Kitamoto T, et al. Clinical features and diagnosis of dura mater graft associated Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*. 69 ; 360-367, 2007
- 5) Nozaki I, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, et al. The MM2-cortical

form of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease presenting with visual disturbance. *Neurology* 67 : 531-533, 2006

- 6) Ishida C, Kakishima A, Okino S, et al. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with MM1-type prion protein and plaques. *Neurology* 60 : 514-517, 2003

[書籍]

なし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Mizusawa H, Yamada M. Medical procedures and risk for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, Japan, 1999-2008. *Emerg Infect Dis*, in press.
- 2) Yamada M, Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Nozaki I, Kitamoto T, Sato T, Nakamura Y, Mizusawa H. Dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease in Japan : clinicopathological and molecular characterization of the two distinct subtypes. *Neuropathology*, in press.
- 3) Nakamura Y, Uehara R, Watanabe M, Sadakane A, Yamada M, Mizusawa H, Maddox R, Sejvar J, Belay E, Schonberger L. Update : Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts-Japan, 1979-2008. *MMWR* 57 : 1152-1154, 2008
- 4) 浜口 毅, 野崎一朗, 篠原もえ子, 山田正

仁. 孤発性 CJD MM2 皮質型と視床型. *神経内科* 69 : 323-328, 2008

- 5) 佐村木美晴, 森永章義, 野崎一朗, 篠原もえ子, 浜口 毅, 石田千穂, 山田正仁. 硬膜移植後クロイツフェルト・ヤコブ病の1剖検例 : 二次感染予防の観点から. *治療学* 42 : 106-108, 2008
- 6) 浜口 毅, 野崎一朗, 篠原もえ子, 山田正仁. クロイツフェルト・ヤコブ病. *臨床精神医学* 37 : 537-539, 2008
- 7) 浜口 毅, 野崎一朗, 篠原もえ子, 山田正仁. 医原性プリオン病. *神経内科* 68 : 17-22, 2008
- 8) 浜口 毅, 山田正仁. 亜急性に認知機能が低下した 65 歳女性(クロイツフェルト・ヤコブ病. 鈴木則宏(編)専門医を目指すケース・メソッド・アプローチ 6 神経疾患. 日本医事新報社, 東京, 136-145, 2008
- 9) 浜口 毅, 山田正仁. クロイツフェルト・ヤコブ病. 永井良三(監修)看護に役立つ疾患・症候事典. メジカルフレンド社, 東京, 572-574, 2008
2. 学会発表
- 1) Yamada M, Nakamura Y. CJD surveillance in Japan. European and Associated Countries Collaborative CJD Surveillance Group. Riga, 2008.5.29-31
- 2) Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Mizusawa H, Yamada M. Medical procedures and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease : analyses with the Japanese CJD surveillance. *PRION* 2008. Madrid, 2008.10.8-10
- 3) 浜口 毅, 篠原もえ子, 野崎一朗, 中村好一, 北本哲之, 佐藤 猛, 水澤英洋, 山田正仁. 孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病における医療行為の実態. 第 49 回日本神

経学会総会 2008. 横浜, 2008.5.15-17

- 4) 野崎一朗, 浜口 毅, 篠原もえ子, 佐藤 猛, 水澤英洋, 中村好一, 森若文雄, 志賀裕正, 三條伸夫, 黒岩義之, 西澤正豊, 武田雅俊, 葛原茂樹, 黒田重利, 村井弘之, 村上繁雄, 立石 潤, 山田正仁. わが国におけるプリオン病の発症状況. 第 49 回日本神経学会総会. 横浜, 2008.5.15-17
- 5) 浜口 毅, 篠原もえ子, 野崎一朗, 中村好一, 北本哲之, 佐藤 猛, 水澤英洋, 山田正仁. シンポジウムII プリオン病: 最近のトピックス: 医療行為に伴う医原性 CJD の危険性. 第 49 回神経病理学会総会学術研究会. 東京, 2008.5.20-22
- 6) 山田正仁, 篠原もえ子, 浜口 毅, 野崎一朗, 北本哲之, 佐藤 猛, 中村好一, 水澤英洋. シンポジウムII プリオン病: 硬膜移植後 Creutzfeldt-Jakob 病の疫学, 臨床, 病理. 第 49 回日本神経病理学会総会学術研究会. 東京, 2008.5.20-22
- 7) 野崎一朗, 浜口 毅, 篠原もえ子, 中村好一, 北本哲之, 佐藤 猛, 水澤英洋, 森若

文雄, 志賀裕正, 三條伸夫, 黒岩義之, 西澤正豊, 武田雅俊, 葛原茂樹, 黒田重利, 村井弘之, 村山繁雄, 立石 潤, 山田正仁. わが国におけるヒトのプリオン病の発症状況: 最近 9 年間のサーベイランスデータ. Prion Symposium 2008. 北海道, 2008.8.29-30

- 8) 志賀裕正, 久永欣哉, 中村好一, 山田正仁, 水澤英洋. 東北地方の Creutzfeldt-Jakob 病の発症状況について. Prion Symposium 2008. 北海道, 2008.8.29-30

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

表 1 各病型間の臨床症候の比較

	sCJD with neurosurgery, n=14	sCJD without neurosurgery, n=861	dCJD, n=75
Sex, Female (%)	10 (71.4%)	504 (58.5%)	46 (61.3%)
Age at onset, y	69.8±8.6	67.5±9.7	57.0±15.8*
Disease duration§, m	6.6±11.7	6.0±10.3	7.6±13.8
PSD on EEG	85.7%	90.6%	66.2%**
CSF 14-3-3	81.8%	75.8%	76.2%
Codon129			
MM	9 (90.0%)	498 (95.6%)	47 (95.9%)
MV	1 (10.0%)	19 (3.6%)	2 (4.1%)
VV	0 (0%)	4 (0.8%)	0 (0%)

§ Disease duration : the duration from onset to akinetic mutism state or death if the patients never displayed akinetic mutism.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$

表2 脳外科手術歴があるCJD各病型間の臨床症候の比較

	sCJD with neurosurgery, n=14	dCJD, n=75	dCJD without plaque or PSD (+) ¶, n=47	dCJD with plaque or PSD (-) ¶¶, n=23
Sex, Female (%)	10 (71.4%)	46 (61.3%)	28 (59.6%)	14 (60.9%)
Age at onset, y	69.8±8.6	57.0±15.8**	57.9±15.6*	54.1±16.6**
Disease duration§, m	6.6±11.7	7.6±13.8	6.3±16.9	10.2±3.3
PSD on EEG	85.7%	66.2%	100.0%	8.7%***
CSF 14-3-3	81.8%	76.2%	92.3%	50.0%
Codon129				
MM	9 (90.0%)	47 (95.9%)	29 (93.5%)	16 (100%)
MV	1 (10.0%)	2 (4.1%)	2 (6.5%)	0 (0%)
VV	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
The year of neurosurgery	1981-2005	1978-1993	1978-1993	1982-1988
Age at neurosurgery, y	60.1±13.9	42.1±15.9***	43.0±15.6**	39.0±17.0***
Incubation period§§, y	9.4±6.9	14.8±3.7*	14.7±4.2***	14.8±2.5**

§ Disease duration : duration from onset to akinetic mutism state or death if the patients never displayed akinetic mutism.

§§ Incubation period : duration between neurosurgery and onset of CJD.

¶ dCJD without plaque or PSD (+) : pathologically confirmed non-plaque type dCJD or PSD on EEG positive within 12 months after onset of CJD

¶¶ dCJD with plaque or PSD (-) : pathologically confirmed plaque type dCJD or PSD on EEG negative within 12 months after onset of CJD

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$

表3 sCJD with neurosurgery

Pt	Sex	Age at neurosurgery	The year of neurosurgery	Incubation period, y	Age at onset CJD	Disease duration, m	PSD on EEG	CSF 14-3-3 protein	Codon 129	Pathology
1	M	75	2002	1	75	1	(+)	(+)	MM	NE
2	M	63	2005	3	65	1	(+)	(+)	MM	NE
3	F	74	1999	3	76	2	(+)	(+)	NE	NE
4	F	73	1999	3	75	1	(+)	(-)	MM	NE
5	F	67	1994	4	71	3	(+)	NE	NE	NE
6	M	55	1995	5	59	4	(+)	NE	NE	NE
7	F	77	1994	7	84	3	(+)	(+)	MM	NE
8	F	55	1993	10	64	21	(-)	(-)	MM	MM2-C
9	F	61	1985	12	74	43	(+)	NE	NE	NE
10	F	62	1991	12	74	3	(+)	(+)	MM	NE
11	F	61	1985	14	75	6	(-)	(+)	MM	MM1 with plaque
12	F	27	1981	14	51	1	(+)	(+)	MM	NE
13	F	42	1982	21	62	2	(+)	(+)	MV	NE
14	M	50	1981	23	72	1	(+)	(+)	MM	NE

Pt : Patient, M : Male, F : Female, y : year, m : month, NE : not examined, MM2-C : MM2 cortical type sCJD, MM1 with plaque : MM1 type sCJD with PrP Plaque.

CJD サーベイランスにおけるプリオン病若年発症例の検討

研究分担者:	山田 正仁	金沢大学大学院医学系研究科脳老化・神経病態学(神経内科)
研究協力者:	野崎 一朗	金沢大学大学院医学系研究科脳老化・神経病態学(神経内科)
研究協力者:	浜口 毅	金沢大学大学院医学系研究科脳老化・神経病態学(神経内科)
研究協力者:	森若 文雄	北海道医療大学心理科学部言語聴覚療法学科
研究協力者:	志賀 裕正	あおば脳神経外科病院神経内科
研究協力者:	三條 伸夫	東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科学)
研究協力者:	村山 繁雄	東京都老人総合研究所高齢者脳ゲノム(神経病理学)
研究協力者:	黒岩 義之	横浜市立大学大学院医学研究科 神経内科学
研究協力者:	西澤 正豊	新潟大学脳研究所神経内科
研究協力者:	犬塚 貴	岐阜大学大学院神経内科・老年学分野
研究協力者:	武田 雅俊	大阪大学大学院医学系研究科 精神医学
研究協力者:	黒田 重利	岡山大学大学院医歯学総合研究科精神神経病態学
研究協力者:	村井 弘之	飯塚病院神経内科
研究協力者:	北本 哲之	東北大学大学院プリオン蛋白研究部門 CJD 早期診断・治療法開発分野
研究分担者:	中村 好一	自治医科大学地域医療学センター公衆衛生学
研究協力者:	太組 一朗	日本医科大学武蔵小杉病院脳神経外科
研究分担者:	調 漸	長崎大学保健・医療推進センター
研究協力者:	立石 潤	老人保健施設春風
研究協力者:	佐藤 猛	東大和病院神経内科
研究代表者:	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)

研究要旨

プリオン病の若年発症例は、しばしば変異型 CJD (vCJD) との鑑別が問題となる。1999 年 4 月から 2008 年 9 月までに CJD サーベイランス委員会によりプリオン病と判定された症例を対象に、49 歳以下の発症を若年発症例として、その病型別頻度、臨床的特徴を 50 歳以上で発症した症例(50 歳以上群)と比較検討した。プリオン病 1147 例のうち、若年発症例は 78 例(6.8%)であった。病型別では孤発性 CJD (sCJD) 34 例(43.6%)、遺伝性プリオン病 24 例(30.8%)、硬膜移植後 CJD (dCJD) 18 例(23.1%)、vCJD 1 例(1.3%)、分類不能 1 例(1.3%)であり、50 歳以上群と分布に有意差が見られた。若年発症 sCJD では、50 歳以上群と比較して PSD 出現率が低く、全罹病期間が長いといった vCJD 類似の特徴は見られたが、精神症状の出現時期については有意差がなかった。dCJD 若年発症例は全経過が長い以外には 50 歳以上群と差がなかった。遺伝性プリオン病の変異別頻度は、若年発症例と 50 歳以上群とで頻度は著しく異なっていた。

A. 研究目的

プリオン病の若年発症例は、しばしば変異型 CJD (vCJD) との鑑別が問題となる。CJD サーベイランスにおけるプリオン病若年発症例の特徴を明らかにする。

B. 研究方法

1999年4月から2008年9月までに「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」・CJD サーベイランス委員会による検討の結果、プリオン病と判定された症例について、49歳以下の発症を若年発症群として病型別頻度、臨床的特徴などを50歳以上で発症した症例(50歳以上群)と比較検討した。

(倫理面への配慮)

金沢大学・医の倫理審査委員会の審査・承認を受けた。サーベイランスの実施に際しては、各主治医が患者(家族)から文書で同意を得た後に行った。

C. 研究成果

プリオン病と診断された1147例のうち、若年発症例は78例(6.8%)であり、50歳以上群は1068例(93.2%)であった。病型別では、若年発症群は孤発性CJD (sCJD) 34例(43.6%)、遺伝性プリオン病24例(30.8%)、硬膜移植後CJD (dCJD) 18例(23.1%)、vCJD 1例(1.3%)、分類不能1例(1.3%)であり、一方、50歳以上群はsCJD 843例(78.9%)、遺伝性プリオン病166例(15.5%)、dCJD 57例(5.3%)、分類不能2例(0.2%)であり、両群間に有意差が見られた($p < 0.05$)。

若年発症sCJDは、50歳以上群に比べ、男性がやや多かったが有意差は認められなかった(男/女はそれぞれ15/19、348/495)。プリオン蛋白遺伝子コドン129多型は検索された症例すべてMMであった。若年発症例における脳波検査でのPSD陽性率は76.4%で、50歳以上群(89.9%)と比較して有意に低率で

あった($p < 0.05$)。無動性無言に至るまでの期間は両群間に有意差はなかったが(若年発症群 17.0 ± 34.4 月;50歳以上群 4.0 ± 4.2 月)、全経過は若年発症群(37.2 ± 41.5 月)で50歳以上群(15.2 ± 13.0 月)に比べ有意に長かった($p < 0.01$)。また各臨床症状/症候について、錐体路症候の頻度は若年発症群(88.2%)で50歳以上群(71.7%)より有意に高く($p < 0.05$)、逆に錐体外路症候は若年発症群(60.6%)が50歳以上群(71.2%)より有意に少なかった($p < 0.05$)。臨床症状の出現時期は両群で有意差は見られなかった。

dCJDでは、無動性無言に至るまでの期間(若年発症群 5.9 ± 4.4 月;50歳以上群 5.1 ± 3.8 月)、移植されてから発症するまでの期間(若年発症群 14.8 ± 4.4 年;50歳以上群 14.7 ± 3.8 年)において、若年発症群と50歳以上群との間で有意差は見られなかったが、全経過は若年発症群(35.7 ± 31.0 月)で50歳以上群(18.2 ± 14.2 月)に比較し有意に長かった($p < 0.05$)。

遺伝性プリオン病の変異別頻度は、若年発症群ではP102L(9例、37.5%)、E200K(6例、25.0%)、P105L(3例、12.5%)他の順であり、半数がGSSであった。50歳以上群ではV180I(74例、44.6%)がもっとも多く、M232R(27例、16.3%)、E200K(26例、15.7%)、P102L(24例、14.5%)他の順であり、分布に若年発症群との間で有意差が見られた($p < 0.05$)。50歳以上群で最多のV180I、次いで多いM232Rは、若年発症群ではそれぞれ1例、2例と少数であった。

D. 考察

49歳以下で発症したsCJDについて、Boesenbergら¹⁾は、罹病期間が長く、PSDの出現率が低く、発症時に認知症、精神症状が見られやすいと報告している。今回の研究では、罹病期間、PSDの陽性率についてはBoesenbergら¹⁾と一致した結果が得られ、こ

の点は vCJD と類似する。しかし、認知症、精神症状については 50 歳以上群と比較した場合に、全経過を通じての出現頻度、出現時期について両群間で有意差は認められず、特徴は見いだせなかった。

dCJD でも sCJD 同様、罹病期間が若年発症群で長いという特徴は見られたものの、それ以外に特徴的な項目は見いだせなかった。

遺伝性プリオン病に関しては、若年発症群で GSS が半数を占め、50 歳以上群で過半数を占める V180I、M232R がごく少数という点の特徴的と考えられた。

E. 結 論

プリオン病の病型別頻度、遺伝性プリオン病の変異別頻度は若年例と非若年例では有意差があった。若年発症 sCJD は、PSD 出現率、罹病期間で vCJD に類似したが、精神症状の出現時期では非若年例と同様であり、vCJD とは異なっていた。

[参考文献]

- 1) Boesenberg C, Schulz-Schaeffer WJ, Meissner B, Kallenberg K, Bartl M, Heinemann U, Krasnianski A, Stoeck K, Varges D, Windl O, Kretzschmar HA, Zerr I. Clinical course in young patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 58 : 533-543, 2005

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Mizusawa H, Yamada M. Medical procedures and risk for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease,

Japan, 1999-2008. *Emerg Infect Dis*, in press.

- 2) Yamada M, Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Nozaki I, Kitamoto T, Sato T, Nakamura Y, Mizusawa H. Dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease in Japan : clinicopathological and molecular characterization of the two distinct subtypes. *Neuropathology*, in press.
- 3) Nakamura Y, Uehara R, Watanabe M, Sadakane A, Yamada M, Mizusawa H, Maddox R, Sejvar J, Belay E, Schonberger L. Update : Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts—Japan, 1979-2008. *MMWR*. 57 : 1152-1154, 2008
- 4) 浜口 毅, 野崎一朗, 篠原もえ子, 山田正仁. 孤発性 CJD MM2 皮質型と視床型. *神経内科*. 69 : 323-328, 2008
- 5) 佐村木美晴, 森永章義, 野崎一朗, 篠原もえ子, 浜口 毅, 石田千穂, 山田正仁. 硬膜移植後クロイツフェルト・ヤコブ病の 1 剖検例 : 二次感染予防の観点から. *治療学*. 42 : 106-108, 2008
- 6) 浜口 毅, 野崎一朗, 篠原もえ子, 山田正仁. クロイツフェルト・ヤコブ病. *臨床精神医学*. 37 : 537-539, 2008
- 7) 浜口 毅, 野崎一朗, 篠原もえ子, 山田正仁. 医原性プリオン病. *神経内科*. 68 : 17-22, 2008
- 8) 浜口 毅, 山田正仁. 亜急性に認知機能が低下した 65 歳女性(クロイツフェルト・ヤコブ病). 鈴木則宏(編)専門医を目指すケース・メソッド・アプローチ 6 神経疾患. 日本医事新報社, 東京, 136-145, 2008
- 9) 浜口 毅, 山田正仁. クロイツフェルト・ヤコブ病. 永井良三(監修)看護に役立つ疾患・症候事典. メジカルフレンド社, 東京, 572-574, 2008

2. 学会発表

- 1) Yamada M, Nakamura Y. CJD surveillance in Japan. European and Associated Countries Collaborative CJD Surveillance Group. Riga, 2008.5.29-31
- 2) Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Mizusawa H, Yamada M. Medical procedures and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease : analyses with the Japanese CJD surveillance. PRION 2008. Madrid, 2008.10.8-10
- 3) 野崎一郎, 浜口 毅, 篠原もえ子, 北本哲之, 佐藤 猛, 水澤英洋, 中村好一, 森若文雄, 志賀裕正, 三條伸夫, 黒岩義之, 西澤正豊, 武田雅俊, 葛原茂樹, 黒田重利, 村井弘之, 村山繁雄, 立石 潤, 山田正仁. わが国におけるプリオン病の発症状況. 第 49 回日本神経学会総会. 横浜, 2008.5.15-17
- 4) 浜口 毅, 篠原もえ子, 野崎一郎, 中村好一, 北本哲之, 佐藤 猛, 水澤英洋, 山田正仁. 孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病における医療行為の実態. 第 49 回日本神経学会総会 2008. 横浜, 2008.5.15-17
- 5) 浜口 毅, 篠原もえ子, 野崎一郎, 中村好一, 北本哲之, 佐藤 猛, 水澤英洋, 山田正仁. シンポジウムⅡ プリオン病: 最近のトピックス, 3. 医療行為に伴う医原性 CJD の危険性. 第 49 回神経病理学会総会 学術研究会. 東京, 2008.5.20-22
- 6) 山田正仁, 篠原もえ子, 浜口 毅, 野崎一郎, 北本哲之, 佐藤 猛, 中村好一, 水澤英洋. シンポジウムⅡ プリオン病: 硬膜移植後 Creutzfeldt-Jakob 病の疫学, 臨床, 病理. 第 49 回日本神経病理学会総会 学術研究会. 東京, 2008.5.20-22
- 7) 野崎一郎, 浜口 毅, 篠原もえ子, 北本哲之, 佐藤 猛, 水澤英洋, 中村好一, 森若文雄, 志賀裕正, 三條伸夫, 黒岩義之, 西澤正豊, 武田雅俊, 葛原茂樹, 黒田重利, 村井弘之, 村山繁雄, 立石 潤, 山田正仁. わが国におけるヒトのプリオン病の発症状況: 最近 9 年間のサーベイランスデータ. Prion Symposium 2008. 北海道, 2008.8. 29-30
- 8) 志賀裕正, 久永欣哉, 中村好一, 山田正仁, 水澤英洋. 東北地方の Creutzfeldt-Jakob 病の発症状況について. Prion Symposium 2008. 北海道, 2008.8.29-30

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

クロイツフェルト・ヤコブ病 2 次感染リスク保有可能性者の訴え、 検査所見の変化とフォロー状況

研究分担者：三條 伸夫 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学
研究代表者：水澤 英洋 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学
研究協力者：北本 哲之 東北大学大学院病態神経学
研究分担者：山田 正仁 金沢大学大学院脳老化・神経病態学
研究分担者：中村 好一 自治医科大学公衆衛生学・地域保健部門
研究協力者：児玉南海雄 福島県立医科大学脳神経外科

研究要旨

平成 16 年に脳外科手術が行われた後に、その患者がクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) に罹患していたことが判明し、その手術に使用した器具で手術を受けた「CJD 2 次感染リスク保有可能性者」への説明がなされている。昨年厚生労働省から発表された「クロイツフェルト・ヤコブ病リスク保有可能性者に関する医療機関の当面の対応について」の内容に基づき、「CJD 2 次感染リスク保有可能性者」が適切にフォローされているかを確認すると同時に、これらの「CJD 2 次感染リスク保有可能性者」の訴えに対する対応とその際の検査所見を確認した。定期的な通院をしている方のうち 2 名に自覚的訴えとしてめまいと頭痛があったが、脳 MRI で異常を認めなかった。1 名で脳室の拡大の所見を認めたが認知機能の低下は認めなかった。定期的なフォローを受けていない方のうち 1 名に認知機能低下を認めたが、当該病院への問い合わせが無く、電話による問い合わせでそのことが判明した。診察の結果、アルツハイマー病と診断した。他の 1 名は視力障害があり、他院で白内障の手術を受けていたが、その際自分が「CJD 2 次感染リスク保有可能性者」であることは告げていなかった。以上より、定期的なフォローを受けていない人はガイドラインに基づいたフォローが困難であることが明らかとなった。

A. 研究目的

平成 16 年に脳外科手術における「CJD 2 次感染リスク保有可能性者」(我が国第 1 事例)に関し、昨年厚生労働省から発表された「クロイツフェルト・ヤコブ病リスク保有可能性者に関する医療機関の当面の対応について」の内容に基づいて行われていると思われるフォローアップの状況と「CJD 2 次感染リスク保有可能性者」の訴えに対する医療機関での対応や検査所見に関して報告する。

B. 研究方法

[対象]

患者の内訳は男性 6 名、女性 3 名の合計 9 名全員 (2 名は既に死亡) とした。

[方法]

現在当該病院通院中の症例に関してはカルテを確認し、外来受診時における訴えとそれに対する医療機関の対応を確認した。既に他院にて経過観察を受けている症例に関しては症例宅に電話し、現状までの訴えとそれに伴って受けている検査を問い合わせ、必要と思われた人は診察をした。

C. 研究結果

当該病院通院患者に関しては、死亡した1名を除いて3名に自覚的、あるいは他覚的な訴えがあった。自覚的な訴えは2名で、頭痛とふらつきの訴えがあり、他覚的所見として脳MRI上の脳室の拡大を認めていた。自覚的訴えの2名に関しては脳MRIで異常が無いことが確認されており、脳室拡大例ではMMSEの悪化がないことが確認されていた。その他に複視の訴えが1名にあったが、これは術後からのものであり悪化が認められていないことから定期的なMRI検査によるフォローとなっていた。定期的な通院が行われていない4名のうち1名はCJD以外の死因で死亡していた。残りの3名のうち1名ずつもの忘れの悪化と目の見えにくさを訴えていた。

物忘れが悪化した方は2年前に面接をしていたが、その際には物忘れの訴えがなかったことより、この2年間に物忘れが出現したものと考えられた。診察時MMSE 19/30で低下を認めた。脳MRIでは白質の動脈硬化性病変が認められるものの、両側海馬回、海馬傍回、側頭葉皮質、頭頂葉皮質に軽度から中等度の萎縮を認め、拡散強調画像では異常信号は認めなかった。脳血流シンチでは特徴的な血流低下は認めなかったが臨床症状と画像所見からアルツハイマー病と診断した。一方、見えにくいという訴えの方は、他院眼科で白内障にて手術を受けていた。手術を受ける際に、自分が「CJD 2次感染リスク保有可能性者」であることは告げておらず、当該病院への問い合わせはなかった。術後に視力の回復があり、白内障の所見があったため、CJDに特異的な視覚異常ではなかったものと思われる。

D. 考察

これまでと同様に病院側と症例の信頼関係は良好に保たれており、電話による問い合わせに対しても協力的であった。定期的な当該病院への受診に関しては、術後の経過がよい

例では必ずしも行われていなかったため、こちらからの問い合わせが必要であった。そのうちの一人はもの忘れの悪化を自覚していたが、当該病院への問い合わせはなく、こちらから連絡するまで診療を受けていなかった。白内障の手術を受けた例においては、眼科医にリスク保因者であることを話してはおらず、眼科医からの問い合わせもなかった。このことより、新たに今回明らかになった問題点として、外科的にフォローアップが必要なくなった方は「CJD 2次感染リスク保有可能性者」としてのフォローが困難であることと、他院での手術を受ける際に自分が「CJD 2次感染リスク保有可能性者」であることを申し出ることができていない事があげられる。

E. 結論

現状では「CJD 2次感染予防」に関するガイドラインの遵守は困難であり、対策を考慮する必要があると思われる。具体的にこれまで判明している問題点として、死亡例に対する剖検システムが無いこと、他の疾患であることが判明した場合などを含めて、異常が疑われる場合の検査費用を誰がどこまで負担するべきか明確でないこと、異常が認められた場合には誰(どこの医療機関)が精査や経過のフォローをするべきか明確でないこと、フォロー期間として定められている10年は適切であるかがわからないこと、そして今回新たに、外科的にフォローアップが不要になった場合に「CJD 2次感染リスク保有可能性者」としてのフォローが十分でなくなる可能性がある事が明らかになった。早急に2次感染予防対策の修正が必要である。(※本研究は当該病院担当者との共同研究である)

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 町田 明, 三條伸夫, 水澤英洋, 湯浅龍彦.

- プリオン病と鑑別すべき疾患の画像. 神経内科 69(4) : 329-335, 2008
- 2) 堀 匠, 三條伸夫, 水澤英洋. プリオン病. アレルギー・免疫 15 : 72-82, 2008
- 3) 三條伸夫. 変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD). プリオン病と遅発性ウイルス感染症. 水澤英洋編. 金原出版 2009 (in press)
2. 学会発表
- 1) 三條伸夫. 医療行為によるプリオン病感染の危険性. 平成 19 年度プリオン病のサーベイランスと対策に関する全国担当者会議. 東京, 2008.2.8
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

亜急性硬化性全脳炎(SSPE)に対する siRNA による治療を目指した基礎的研究 (SSPE ウイルスを用いた in vitro での評価)

研究分担者: 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: 橋本 浩一 福島県立医科大学・医学部・小児科学講座

研究要旨

【目的】亜急性硬化性全脳炎(SSPE)は、麻疹ウイルス変異株(SSPE ウイルス)の中枢神経への持続感染により、高度の認知障害、植物状態となり死に至る遅発性ウイルス感染症である。近年、ribavirin の脳室内投与が試みられ、臨床症状が改善した症例が散見されている。しかし、治療中止により症状の再燃がみられ、最終的に SSPE ウイルスを神経組織から排除するためには、単独投与、あるいは既存の薬剤との併用が可能な新規薬剤の開発が望まれる。我々は一昨年、麻疹ウイルスの N、F、L、P 遺伝子を標的に作製した siRNA の、麻疹ウイルス臨床分離株の増殖抑制、ribavirin、IFN α -2b との併用効果を報告した。今回、siRNA 単独、および ribavirin、IFN α -2b との併用による SSPE ウイルスによるプラーク形成の抑制効果を検討した。

【方法】①東京大学西郷教授、程准教授らが開発した siRNA 設計法に基づいた設計プログラム(RNAi 社)を用い、SSPE ウイルスの N、F、L、P 遺伝子それぞれに siRNA (si-N、si-F、si-L、si-P) を作成した。②遺伝子導入試薬を用い VERO/SLAM 細胞(九州大学柳教授より分与)に siRNA を導入した。24 時間後に SSPE ウイルス(YH-1 株)感染 VERO/SLAM 細胞を重層し、プラーク形成抑制効果を検討した。③VERO/SLAM 細胞に si-N を導入し、ribavirin、IFN α -2b の麻疹ウイルス増殖への併用効果を同様にプラーク法で検討した。

【結果・結論】SSPE ウイルスの N、F、L、P 遺伝子それぞれを標的に作製した siRNA は、SSPE ウイルス感染 VERO/SLAM 細胞のプラーク形成を抑制した。特に、N 遺伝子に対する siRNA は抑制効果が最も強く、更に、ribavirin、IFN α -2b との併用効果も観察された。

A. 研究目的

亜急性硬化性全脳炎(subacute sclerosing panencephalitis; SSPE)は麻疹罹患後およそ2~10年の潜伏期間の後に中枢神経症状を呈し、一旦発症後は進行性に増悪し、高度の認知障害、植物状態となり死に至るスローウイルス感染症である¹⁾。現在まで SSPE に対し amantadine、inosiplex、interferon (IFN)、cimetidine などが試みられてきたが、有効性

が証明されているのは inosiplex と IFN である。ごく最近、SSPE 発症初期の患者において ribavirin の脳室内投与により臨床症状の改善がみられると報告がある²⁾。しかし、ribavirin 投与中止後、6ヶ月以内に髄液中の抗 MV 抗体上昇、SSPE 症状の再燃がみられ、強化療法としての継続的な ribavirin 投与を余儀なくされている。従って、最終的には SSPE ウイルスの神経組織からの排除を目標

に、単独、あるいは既存の薬剤との併用可能な薬剤治療法の確立が切望されている。

二本鎖 RNA(dsRNA)によってその配列特徴的に mRNA が分解され、その結果遺伝子の発現が抑制される現象を RNAi(RNA interference)という。近年、ウイルス性疾患や癌、遺伝性疾患などの疾患遺伝子を標的とし、RNAi 活性を有する siRNA(short interfering RNA)を核酸医薬として応用する研究が進んでいる。

我々は一昨年、麻疹ウイルス臨床分離株への siRNA 単独での効果、あるいは Ribavirin、IFN との併用効果について報告した。今回、siRNA の SSPE ウイルスに対する増殖抑制効果について検討した。

B. 研究方法

① ウイルス、細胞、培地

SSPE ウイルス(SSPE-V)は SSPE 臨床分離株(YH-1 株)を用いた。細胞は VERO/SLAM 細胞(九州大学 柳雄介教授より分与)を用い、増殖培地として 8%NBS、G418(0.4mg/ml)加 DMEM 培地、維持培地として 2%NBS、G418 加 DMEM 培地を用いた。

② siRNA

NCBI に登録されている SSPE ウイルス株のゲノム情報(Bellini 株:M10456、) 、Baczko 株:89920、Takeuchi 株:NC001498)を基に、東京大学西郷教授、程助教授等が開発した siRNA 設計法⁴⁾による設計プログラム(RNAi 社 Tokyo, Japan, <http://design.rnai.jp/sidirect/index.php>)を用い麻疹ウイルス N、F、L、P 遺伝子それぞれに siRNA(si-N、si-F、si-L、si-P)を作成した。また、陰性コントロールは siRNA(si-NC) (RNAi 社)を用いた。

③ 遺伝子導入および siRNA の評価

12-wells プレートに VERO/SLAM 細胞を 1×10^5 well 個巻き、2 日後に遺伝子導入試薬

(Lipofectamin 2000®, Invitrogen)を用い、VERO/SLAM 細胞に siRNA を導入し、24 時間後に 0.75%メチルセルロース加維持培地に浮遊した SSPE-V 感染 VERO/SLAM 細胞を 50pfu 重層し、48 時間後にブランク数をカウントし効果判定した。

また、細胞中の麻疹ウイルス各遺伝子(N、F、L、P)の発現をリアルタイム PCR 法で定量した。si-N を遺伝子導入した VERO/SLAM 細胞に Cell-free の SSPE-V を VERO/SLAM 細胞に moi : 0.04 で 1 時間吸着させ、洗浄後再び培養し、24 時間後に細胞中の麻疹ウイルス各遺伝子(N、F、L、P)の発現をリアルタイム PCR 法で定量した。

④ siRNA と ribavirin、IFN α -2b との併用効果

VERO/SLAM 細胞に si-N(4nM、20nM) を導入し、24 時間後に ribavirin あるいは IFN α -2b を含む 0.75%メチルセルロース加維持培地に浮遊した SSPE-V 感染 VERO/SLAM 細胞を重層し、48 時間後にブランク数をカウントし効果判定した。

⑤ リアルタイム PCR 法

Isogen(NipponGen)を用い RNA を精製し、ExScript RT reagent Kit(TaKaRa, Tokyo)を用い逆転写反応(RT)を行い、その RT 反応物を SYBR-Green 法、あるいは TaqMan 法で ABI 7000(Applied Bio Systems)を用い遺伝子の発現を定量した。L 遺伝子、インターナルコントロールとして用いた 18S ribosomal RNA の発現は SYBR-Green 法で定量し、各 N、F、P 遺伝子の発現は TaqMan 法で定量した。L 遺伝子、インターナルコントロールとして用いた 18S ribosomal RNA の発現は SYBR-Green 法で定量し、各プライマー最終濃度はそれぞれ 500nM、200nM とし、初めに 95°C-10 秒を 1 サイクル、その後 95°C-5 秒、56°C-10 秒、

72°C-31 秒を 40 サイクルの反応を行った。各 N、F、P 遺伝子の発現は TaqMan 法で定量し、プライマー最終濃度は 200nM、プローブ最終濃度を 100nM とし、初めに 95°C-10 秒を 1 サイクル、その後 95°C-5 秒、60°C-31 秒を 40 サイクルの反応を行った。用いたプライマー、プローブ配列を表 1 に示す。N、F 遺伝子のためのプライマーとプローブは Uhlmann らの塩基配列⁵⁾を参考にし、L、18S 遺伝子のためのプライマーは Plumet⁶⁾らの塩基配列を参考にした。また、P 遺伝子のためのプライマーとプローブは SSPE ウイルス Takeuchi 株 (GeneBank 登録番号 NC001498) 塩基配列を参考にし、PrimerExpress (Applied Bio Systems) を用いて設計した。TaqMan 法に用いたプローブには 5' 端には 6-FAM を 3' 端には TAMRA の蛍光標識をした。

C. 研究結果

① 各 siRNA、4nM、20nM での SSPE-V 感染後 24、48 時間におけるブランク形成抑制効果 (図 1)

感染細胞重層 24 時間後、コントロール (si-NC) に対して、各 si-RNA は 4nM、20nM 何れの濃度でもブランク形成抑制効果が認められたが、si-N で最も効果が強かった。感染 48 時間後でも、si-N が最も効果的であった。従って以降の実験は、si-N を用いて検討した。

② N 遺伝子に対する siRNA の各遺伝子発現への影響 (図 2)

N 遺伝子に対する siRNA (si-N) は、N 遺伝子だけでなく、他の P 遺伝子、F 遺伝子、L 遺伝子の発現を 10-20% 位までに抑制した。

③ N 遺伝子に対する siRNA と ribavirin との併用効果 (図 3)

si-NC (4nM、20nM) で前処理した VERO/SLAM 細胞において、SSPE-V 感染

VERO/SLAM 細胞によるブランク形成は Rivabirin で抑制されなかった。しかし、si-N (4nM、20nM) で前処理においてブランク形成は、Rivabirin の濃度依存的に抑制され、併用効果が認められた。

④ N 遺伝子に対する siRNA と IFN α -2b との併用効果 (図 4)

si-NC で前処理した VERO/SLAM 細胞において、SSPE-V 感染 VERO/SLAM 細胞によるブランク形成は IFN α -2b により濃度依存的に抑制された。さらに、si-N (4nM、20nM) で前処理においてブランク形成は IFN α -2b の濃度依存的に抑制され、併用効果が認められた。

D. 考察

本研究では SSPE ウイルス遺伝子に対して設計した siRNA の SSPE-V 感染 VERO/SLAM 細胞による非感染 VERO/SLAM 細胞でのブランク形成抑制効果を示した。各 siRNA 20nM で処理した VERO/SLAM 細胞での SSPE-V 感染 VERO/SLAM 細胞重層後 24、48 時間におけるブランク形成抑制効果の結果より N 遺伝子に対する siRNA (si-N) が最も効果的であり (図 1)、ribavirin、IFN α -2b との併用についても si-N の併用効果が認められた (図 3、4)。また、cell-free SSPE ウイルスを用いた検討では、si-N は N 遺伝子発現のみならず、他の遺伝子の発現を 10-20% 位までに抑制した (図 2)。

麻疹ウイルスはパラミクソウイルス科モルビリウイルス属のウイルスで、そのゲノムはマイナス鎖の非分節型一本鎖 RNA である。ゲノムの 3' 末端から順に N、P、M、F、H、L の 6 つの遺伝子が並んでいる。パラミクソウイルスの遺伝子発現は、各遺伝子の両端に位置する転写開始、介在、転写終結配列により制御されている。それぞれの遺伝子は N、P、M、F、H、L 蛋白質をコードし、さらに

P 遺伝子だけが P 蛋白以外に V、C 蛋白質をコードしている。N 蛋白質はゲノム RNA に結合しヌクレオカプシドを形成し、ポリメラーゼを構成する L、P 蛋白質とともに RNP 複合体を形成する。M 蛋白はエンベロープを裏打ちしウイルスの粒子形成に、H 蛋白、F 蛋白はエンベロープ上で、それぞれ受容体との結合、膜融合に関与する。V、C 蛋白は非構造蛋白質で抗 IFN 活性に関与すると考えられている。またウイルスを構成する蛋白としては N 蛋白が最も多く、一方 L 蛋白が最も少ない。これまで SSPE ウイルスには M、F、H 蛋白をコードする遺伝子の変異が報告されている¹⁾。また、我々が既に行った同じパラミクソウイルス科のウイルスである Respiratory Syncytial virus の *in vitro*、*in vivo* での siRNA の効果検討より、ウイルスの膜融合蛋白をコードする F 遺伝子に対する siRNA が最も効果的であった。以上のことより、報告されている SSPE ウイルスの Bellini 株 (GeneBank 登録番号: M10456)、Baczko 株 (89920)、Takeuchi 株 (NC001498) のゲノム情報をもとに麻疹ウイルス N、P、F、L 遺伝子を標的遺伝子として siRNA を設計した。

設計した siRNA は何れも SSPE 感染 VERO/SLAM 細胞の重層 24 時間での非感染 VERO/SLAM 細胞でのプラーク形成抑制効果は認められたが、48 時間では抑制効果が認められたのは N 遺伝子に対する siRNA (si-N) のみであった。さらに si-N は N 遺伝子の発現を強力に濃度依存的に抑制したが、他の P、F、L 遺伝子の発現も濃度依存的に抑制していた。ヌクレオカプシド形成に関与する N 遺伝子の発現低下が、ウイルス粒子内でのウイルスゲノムの存在を不安定にさせたことが、P、F、L 遺伝子の発現抑制の一因であると考えられる。Hotta らは麻疹ウイルスの L 遺伝子に対する siRNA を作製し、麻疹ウイルス、SSPE ウイルスの増殖抑制を示している^{7,8)}。L 遺伝子は麻疹ゲノム発現に

おいて最も発現量が少なく、siRNA の標的としての候補の 1 つと考えられる。一方、今回の我々の検討で最も効果の認められた siRNA は N 遺伝子を標的とするものであるが、N 遺伝子は麻疹ウイルスゲノム発現では最も発現量の多い遺伝子である。何れの遺伝子を siRNA の標的にすべきかは明らかではないが、麻疹ウイルスと同じパラミクソウイルス科の Respiratory Syncytial Virus (RSV) に対する siRNA は N 遺伝子を標的とした siRNA の臨床治験が進んでいる⁹⁾。

現在まで SSPE に対し有効性が証明されているのは inosiplex と IFN であり、さらに SSPE 発症初期の患者において ribavirin の脳室内投与により臨床症状改善の報告がある。ribavirin の経口薬、あるいは静脈よりの全身投与による治療では、その強い骨髄抑制作用のために治療中止を余儀なくされていたが、ribavirin の脳室内投与により、全身性の副作用を来すことなく髄液中の ribavirin の有効濃度を保つことが可能になった²⁾。今回、si-N と IFN α -2b、ribavirin との併用効果が認められたことにより、さらに効果的な IFN α -2b、ribavirin との併用療法が可能になると思われる。

SSPE の siRNA での治療を考慮した場合、ドラッグデリバリーが問題となる。神経細胞は遺伝子導入が困難な細胞の一つである。狂犬病ウイルス糖タンパク質由来のペプチドを結合した siRNA を用い、経血管的送達で神経系細胞への siRNA 導入の報告や¹⁰⁾、siRNA 結合プロタミン-特異的抗体融合蛋白を用いた特定細胞への siRNA 導入も報告もある^{11,12)}。またレンチウイルスをベクターとして用い、マウスでのプリオン病での症状軽減効果も報告されている¹³⁾。

今回の結果より、SSPE ウイルスゲノム情報をもとに作製した siRNA が SSPE ウイルスのプラーク形成を抑制することが示された。さらに、既存の SSPE 薬の IFN α -2b、