

## 進行性多巣性白質脳症の病態解明と治療法の開発

研究分担者：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 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 国立感染症研究所・感染病理

### 研究要旨

致死性の脱髄疾患である進行性多巣性白質脳症の発症機構は未だ不明な部分が多い。進行性多巣性白質脳症を惹起する JC ウイルスは増殖が遅く、進行性多巣性白質脳症のモデル動物も無いことから、未だ治療法が確立していない。本研究分担者はこれまでに、進行性多巣性白質脳症の病態を解明するために基礎的研究を行い、基礎的知見を基に、JC ウイルスのコードするタンパク質に対する siRNA または caffeine が JC ウイルスの増殖を阻害することを報告した。

### A. 研究目的

未だ治療法が確立していない致死性の脱髄疾患である進行性多巣性白質脳症の病態を解明するために基礎的研究を行い、治療法の確立に寄与することを目的とする。

### B. 研究方法

#### 1) JC ウイルスの感染実験

JC ウイルス持続感染細胞を回収し PBS で洗浄後回収し凍結融解を繰り返した後 neuraminidase(0.05 U/ml)を加えて 37℃にて一晩静置。その後 56℃に 30 分間置いた後、遠心し上清をウイルス抽出液として回収、使用直前まで-80℃で保存。調整したウイルスを感受性細胞である神経系細胞(IMR-32または SVG-A 細胞)に接種し感染実験を行った。

#### 2) JC ウイルスの増殖

- ・ JC ウイルスの転写活性：JC ウイルス転写調節領域下流に luciferase を結合させたプラスミドを用いて JC ウイルスの転写活性測定。
- ・ JC ウイルス複製能：JC ウイルス調節領域のみを挿入したプラスミドを細胞に導

入し、酵素処理後 Southern blotting 施行。

- ・ ウイルスタンパク質発現：JC ウイルスの各タンパク質に対する特異抗体によるイムノブロットングおよび免疫組織学的検索施行。
- ・ JC ウイルスの生理活性：JC ウイルスを含感染させた細胞を用いて赤血球凝集活性測定。

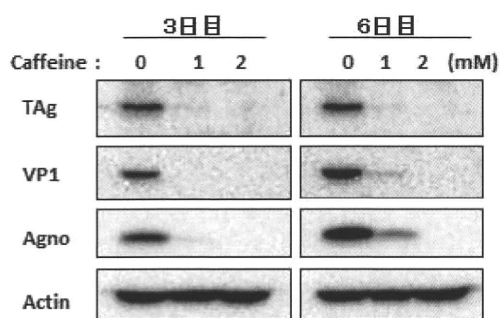
### (倫理面への配慮)

本実験で用いられた JC ウイルスは P2 で扱うべきウイルスであり、本研究は当施設の P2 指定実験室にて安全性に留意して行なわれた。また、本研究の内容は、北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター病原性微生物等安全管理委員会において[実験番号 011(10)]、また、北海道大学遺伝子組換え実験等安全委員会において承認を得ている[承認番号 20(22)]。

### C. 研究結果

平成 20 年から 22 年の 3 年間で、本研究分担者は進行性多巣性白質脳症を惹起する JC ウイルスの各タンパク質の機能を詳細に検討

し、その結果に基づいて、*in vitro*でJCウイルスの増殖を抑制する方法を報告した。具体的にはJCウイルスのコードするタンパク質に対するsiRNA、また下図に示すように薬剤として使用されているcaffeineで細胞を処理することによって(3日間および6日間)JCウイルス感染後10日目および13日目の感染細胞のウイルスタンパク質の発現がほぼ完全に抑制された。



#### D. 考察

本研究により、進行性多巣性白質脳症の病態の一部が解明され、さらに進行性多巣性白質脳症の治療法に対する基礎的知見が得られた。今後はさらに、病態の全貌を解明し、根本的な治療法を開発することを試みる。

#### E. 結論

JCウイルスのコードするタンパク質に対するsiRNAまたはcaffeineによって、細胞でのJCウイルスの増殖を抑制した。

#### [参考文献]

特に無し

#### F. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31 発表)

以下の研究発表の内容の一部は、本厚生労働科学研究費補助金にて援助された。

##### 1. 論文発表

- 1) Shirai S, Takahashi K, Kohsaka S, Tsukamoto T, Isogai H, Kudo S, Sawa H, Nagashima K, Tanaka S. High

expression of MeCP2 in JC virus-infected cells of progressive multifocal leukoencephalopathy brains. *Neuropathology* 31(1) : 38-41, 2011

- 2) Orba Y, Suzuki T, Makino Y, Kubota K, Tanaka S, Kimura T, Sawa H. Large T antigen promotes JC virus replication in G2-arrested cells by inducing ATM- and ATR-mediated G2 checkpoint signaling. *J Biol Chem* 285(2) : 1544-1554, 2010
  - 3) Suzuki T, Orba Y, Okada Y, Sunden Y, Kimura T, Tanaka S, Nagashima K, Hall WW, Sawa H. The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. *PLoS Pathogens* 6(3) : e1000801, 2010
  - 4) Suzuki T, Yamanouchi S, Sunden Y, Orba Y, Kimura T, Sawa H. Natalizumab has no direct biological effect on JC virus infectivity in permissive human neural cell lines. *J Med Virol* 82(7) : 1229-1235, 2010
  - 5) Hayashi Y, Kimura A, Kato S, Koumura A, Sakurai T, Tanaka Y, Hozumi I, Sunden Y, Orba Y, Sawa H, Takahashi H, Inuzuka T. Progressive multifocal leukoencephalopathy and CD4+ T-lymphocytopenia in a patient with Sjögren syndrome. *J Neurol Sci* 268 : (1-2) : 195-198, 2008
  - 6) 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* 28 : 286-294, 2008
- 著書
- 1) 鈴木忠樹、大場靖子、澤 洋文. プリオン病と遅発性ウイルス感染症 : III 進行

- 性多巢性白質脳症(PML)、3. ウイルス検索と発症機序 303-309, 2010 金原出版, 東京, (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編集)
- 2) Kasamatsu H, Nakanishi A, Liddington RC, Sawa H. Structural and Functional Studies of Polyomavirus Late Gene Products. In Yoshida K(ed) Molecular Biology of Tumor Virus Gene Products. Research Signpost, Kerala, India 109-168, 2009
- ## 2. 学会発表
- 1) Sawa H, Makino Y, Suzuki T, Maeda A, Umemura T, Kimura T. Molecular mechanisms of cellular trafficking of neurotropic viruses. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections, Sapporo, Japan, 2008.12.15-16
  - 2) Suzuki T, Orba Y, Sunden Y, Kimura T, Sawa H. Viroporin activity of JCV agnoprotein. The 9th International Symposium in NeuroVirology, Florida, USA, 2009.6.2-6(oral)
  - 3) Suzuki T, Orba Y, Sunden Y, Kimura T, Sawa H. Viroporin activity of JCV agnoprotein. The 1st International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2009, Niseko, Japan, 2009.8.19-21(oral)
  - 4) Orba Y, Suzuki T, Kimura T, Sawa H. Large T antigen of JC virus promotes viral replication by inducing ATM- and ATR-mediated G2 checkpoint signaling. The 1st International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2009, Niseko, Japan, 2009, 8.19-21(posters)
  - 5) Kobayashi S. Cysteine residues of JC virus capsid protein, VP1 play an important role in pentamer formation. The 1st International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2009, Niseko, Japan, 2009.8.19-21(posters)
  - 6) Orba Y, Kobayashi S, Kimura T, Sawa H. Detection of polyomavirus in wild rodents. The 2nd International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2010, Sapporo, Japan, 2010.9.13-14(posters)
  - 7) Dang X, Wuthrich C, Gordon J, Sawa H, Koralknik I. A novel deletion in JC virus agnoprotein causes productive infection of cortical pyramidal neurons. 10th International Symposium on NeuroVirology, Milan, Italy, 2010.10.12-26(posters)
  - 8) Kobayashi S, Suzuki T, Igarashi M, Ohtake N, Nakagawa K, Niikura K, Kimura T, Kasamatsu H, Sawa H. Cys80 of JC virus capsid protein, VP1 is essential for intrapentamer disulfide bond and pentamer formation. 10th International Symposium on Neuro Virology, Milan, Italy, 2010.10.12-26(posters)
  - 9) Orba Y, Suzuki T, Kimura T, Sawa H. Large T antigen promotes JC virus replication in G2 arrest by inducing G2 checkpoint signaling. 10th International Symposium on NeuroVirology, Milan, Italy, 2010.10.12-26(posters)
  - 10) Suzuki T, Orba Y, Makino Y, Okada Y, Sunden Y, Kimura T, Hasegawa H, Sata T, Hall WW, Sawa H. Disruption of intracellular vesicular trafficking by agnoprotein is essential for viroporin activity and JC virus replication. 10th

International Symposium on  
NeuroVirology, Milan Italy, 2010.10.12-26  
(oral)

2010.12.7-10(口頭およびポスター発表)

- 11) 小林進太郎, 鈴木忠樹, 大竹範子, 永川桂大, 新倉謙一, 木村享史, 澤 洋文. ポリオーマウイルスの粒子形成機構の解析. 第 150 回日本獣医学会学術集会, 帯広, 2010.9.16-18(口頭)
- 12) 鈴木忠樹, 山内聡子, 寸田祐嗣, 大場靖子, 木村享史, 佐田徹太郎, 澤 洋文. In vitro における natalizumab の JC virus 感染への影響の検討. 第 58 回日本ウイルス学会総会, あわぎんホール, 徳島, 2010.11.7-9(ポスター)
- 13) 小林進太郎, 鈴木忠樹, 大竹範子, 永川桂大, 新倉謙一, 木村享史, 澤 洋文; JC ウイルスの粒子形成機構の解析. 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010.12.7-10(ポスター)
- 14) 鈴木忠樹, 大場靖子, 牧野吉倫, 岡田由紀, 寸田祐嗣, 木村享史, 長谷川秀樹, 佐田徹太郎, William W. Hall, 澤 洋文. ウイルスタンパク質「Viroporin」の機能制御にかかわる宿主因子とウイルス因子の相互作用. 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸,

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

出願中の特許

- 1) JC ウイルスの VP-1 に対する siRNA、およびそれを含有してなる医薬組成物(特願 2006-513677 号)発明者:長嶋和郎, 澤 洋文, 大場靖子. 出願年月日 平成 17 年 4 月 26 日, 特許査定 平成 23 年 1 月 18 日
- 2) JC ウイルス agno を対象とした PML の治療(特願 2001-356836 号)発明者:長嶋和郎, 澤 洋文, 岡田由紀, 出願年月日 平成 13 年 11 月 22 日
- 3) 抗 JC ウイルス剤及び進行性多巣性白質脳症治療剤(特願 2008-276126)。発明者:大場靖子, 澤 洋文, 出願年月日 平成 20 年 9 月 30 日

### 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(PML)の診断のための脳脊髄液のJCウイルス検査の実施と国内におけるPMLの臨床的・疫学的解析

研究分担者：西條 政幸 国立感染症研究所ウイルス第一部・部長

研究協力者：中道 一生 国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

### 研究要旨

進行性多巣性白質脳症(PML)はJCウイルス(JCV)による致死的な中枢神経脱髄性疾患であり、その診断では脳脊髄液(CSF)を用いたJCVゲノムDNAのPCR検査が有効である。当研究室では、迅速性および定量性、信頼性において優れた定量的リアルタイムPCR検査系を確立し、国内の医療機関におけるJCVの検査を支援するためのシステムを構築した。検査を開始した平成19年4月から平成22年12月までの3年9ヶ月間において43都道府県の医療機関からの延べ456件の検査依頼に対応した。この間の被検者は380名であり、約12%にあたる45名の患者のCSFからJCV-DNAが検出された。また、診断支援を介して医療機関から提供された調査票に基づいて、被検者全員のデータベースを構築し、各基礎疾患や年齢層、地域等におけるPMLの発生状況を多面的に解析した。さらに、近年PMLの治療薬候補として注目されているメフロキンが投与された患者においては、症状や画像の変化よりも早い段階でCSF中のJCV量が減少することが明らかにされ、ウイルス量がPML治療薬の効果判定において有用なマーカーになることが示唆された。本研究において確立されたJCV検査体制は、国内のPMLのサーベイランスだけでなく、臨床におけるPMLの診断および治療においても大きな貢献を果たした。

### A. 研究目的

進行性多巣性白質脳症(Progressive multifocal leukoencephalopathy: PML)は、免疫不全患者等の中枢神経(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性疾患である。PMLの診断には特異性および侵襲性の点から、脳脊髄液(CSF)を用いたJCVゲノムDNA(JCV-DNA)のPCR検査が有効である。また、近年リアルタイムPCRを用いたJCV-DNAのCSF検査が一般的となっており、優れた迅速性および特異性、信頼性を発揮している。本研究は、リアルタイムPCRを基盤としたCSFのJCV検査体制を整備し、医療機関へ

のPMLの診断支援を介して国内のPMLに関する基盤データを構築することを目的とした。平成19年4月から平成22年12月までの検査実績およびデータの解析結果を報告する。

### B. 研究方法

#### 1) 材料および検査系

PCRにおける陽性対照DNAとしてJCV-DNAを含むプラスミド(pJCV、JCRBより分与)を用いた。リアルタイムPCR機器としてLightCycler(Roche)を、PCR試薬としてLightCycler 480 Probes Master(Roche)を用いた。CSFからのDNA抽出にはQIAamp DNA Blood Mini Kit(QIAGEN)を用いた。

また、JCVのT遺伝子とVP1遺伝子を標的とした特異的プライマー及びTaqManプローブを作製しリアルタイムPCRに使用した。

## 2) JCV検査体制の構築と医療機関への支援

検査依頼の効率化を図るため、JCV検査の受付に関するWebサイトを公開し、幅広い診療科の医師が検索サイトにおいてキーワード「JCウイルス検査」を入力するだけで容易にアクセスできる体制を整備した。また、検査依頼を受けた際には速やかに輸送キットを医療機関に配送し、検体及び匿名化患者情報を記載した調査票の提供を受けた。CSFからDNAを抽出し、リアルタイムPCRによる定性検査を実施した。また、JCV-DNA陽性のCSFについては、検体に含まれるJCV-DNAのコピー数を測定した。

### (倫理面への配慮)

本研究は、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の承認のもとに実施された。

## C. 研究結果

### 1) JCV検査の受付状況

検査を開始した平成19年4月より平成22年12月までの3年9ヶ月間において、43都道府県(国内の91.5%)から延べ456件の検査依頼を受けた。依頼経路としてはWebサイトを介した新規依頼が208件(45.6%)、過去に依頼を受けた医療機関からの再依頼(再検査を含む)が214件(46.9%)、本研究班員等からの紹介が35件(7.5%)であった。

### 2) JCV検査の結果

上記の期間において、計456検体(再検査を含む)のCSF中JCV-DNAの定性検査を実施し、61検体(13.4%)からJCVのT遺伝子およびVP1遺伝子が検出された。また、JCV-DNA陽性のCSFを用いた定量検査を実施した結果、検体中のウイルスDNAは、1 mLあたり $10E2$ コピーから $10E9$ コピーの範囲に分布し

た。また、同一患者において継続的に複数回の検査を行った場合には、症状の悪化に伴うJCV-DNA量の増加(白血病患者等)、およびJCV-DNA量の減少(HAART、抗JCV作用を有するメフロキンの投与)が観察された。

### 3) JCV-DNA陽性者の基礎疾患と年齢

上記期間における被検者は380名であり、うち45名(約11.8%)の患者のCSF液からJCV-DNAが検出された。JCV陽性者の年齢層としては、0~20歳代が2名(4.4%)、30~40歳代が16名(35.6%)、50~60歳代が18名(40.0%)、70~80歳代が9名(20.0%)であった。JCV陽性者の基礎疾患としては、血液疾患が17名(37.8%)、HIV感染症が16名(35.6%)、自己免疫疾患が3名(6.7%)、その他の疾患が8名(17.8%)、不明が1名(2.2%)であった。

### 4) 血液疾患を有するJCV陽性者の解析

血液疾患を有する被検者(73名)におけるJCV陽性者の割合は23.3%(17名)であった。内訳は白血病が5名、悪性リンパ腫が6名、再生不良性貧血が2名、多発性骨髄腫が2名、その他が2名であった。また、血液疾患を有するJCV陽性者のうち8名は造血幹細胞移植歴を有した。

### 5) 血液疾患以外の基礎疾患を有するJCV陽性者の解析

HIV感染症を基礎疾患とする被検者(75名)におけるJCV陽性者の割合は21.3%(16名)であった。また、上記以外の基礎疾患としては、サルコイドーシスや肝硬変、肝炎、間質性肺炎、肺結核を有する患者においてもJCV陽性者が認められた。また、1名の基礎疾患は不明であった。

## D. 考 察

本研究は、CSFを用いたJCV検査によって医療機関におけるPMLの診断を支援し、国内のPMLの発生状況を解析することを目的としている。検査の開始時から現在までに、国内の90%以上の都道府県の医療機関から依頼

を受けており、依頼数はさらに増加傾向にある。新規依頼のほとんどはインターネット上のウェブサイトを経由していることから、地域や診療科を問わないフリーアクセスを可能にしたことが依頼数の増加に繋がったと考える。また、平成22年までの累計において、過去に依頼を受けた医療機関からの再依頼が新規の依頼を上回っていた。これは4年近くにおいて着実にルーティーンを重ね、依頼検査に対して適切に対応した結果であると考えられる。

国内のPMLの発生動向や背景を把握するためには、JCV陽性者の情報だけでは不十分であり、陰性者を含めた対象者全体のデータを俯瞰するためのプラットフォームが必要となる。被検者全体の広範なデータベースは、基礎疾患や治療歴、症状、脳画像所見といった様々な角度から解析する上で極めて有用である。本研究では、このデータベースを基盤として様々な基礎疾患を有する患者におけるPMLの発生数やその頻度、年齢層や治療歴といった詳細な背景を明らかにした。とりわけ、血液疾患を有する患者においてはHIV感染症の場合と同程度の高い頻度でPMLが生じていることから、移植歴や化学療法等を含めてさらに解析していく必要がある。

本研究における特記すべき成果として、PMLの治療薬候補による抗JCV効果を評価するための研究に、私たちのJCV検査が用いられたことが挙げられる。平成21年にJCVの増殖に対するメフロキンの抑制効果が発表されたことを契機として、国内でも臨床研究が開始された。本研究では、投与患者のフォローアップ検査を担当し、治療に伴うCSF中のJCV-DNA量を解析した。さらに、JCV-DNA量の減少は症状や画像の変化よりも先行して生じることを示され、CSF中JCV-DNA量がメフロキンの効果判定における有用なマーカーとなることが示唆された。したがって、本研究によって確立された

JCV-DNAの定量検査系はPMLの新規治療法の評価において重要な役割を担うことが期待される。今後もJCV検査を介した国内のPMLサーベイランスを継続するとともに、得られた結果を臨床に還元することが重要である。

## E. 結 論

リアルタイム PCR を基盤とした JCV ゲノム DNA の検査に基づいて PML の診断支援を実施し、本邦における PML の臨床的・疫学的特徴が明らかにされた。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表(2008/4/1～2011/3/31 発表)

### 1. 論文発表

- 1) Saijo M, Morikawa S, Kurane I. Real-time quantitative polymerase chain reaction for virus infection diagnostics. *Expert Opinion on Medical Diagnostics* 2 : 1155-1171, 2008
- 2) Yagi T, Hattori H, Ohira M, Nakamichi K, Takayama-Ito M, Saijo M, Shimizu T, Ito D, Takahashi K, Suzuki N. Progressive multifocal leukoencephalopathy developed in incomplete Heerfordt syndrome, a rare manifestation of sarcoidosis, without steroid therapy responding to cidofovir. *Clin. Neurol. Neurosurg* 112 : 153-156, 2010
- 3) Nakamichi K, Kitani H, Takayama-Ito M, Morimoto K, Kurane I, Saijo M. Celestrol suppresses morphological and transcriptional responses in microglial cells upon stimulation with double-stranded RNA. *Int. J. Neurosci* 120 : 252-257, 2010
- 4) Nakamichi K, Takayama-Ito M, Nukuzuma S, Kurane I, Saijo M.

Long-term infection of adult mice with murine polyomavirus following stereotaxic inoculation into the brain. *Microbiol. Immunol* 54 : 475-482, 2010

## 2. 学会発表

- 1) 中道一生, 伊藤睦代, 奴久妻聡一, 森本金次郎, 倉根一郎, 西條政幸. 脳脊髄液中の JC ポリオーマウイルスを検出するためのリアルタイム PCR 検査系の確立と進行性多巣性白質脳症 (PML) の診断支援. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.10
- 2) 中道一生, 伊藤睦代, 奴久妻聡一, 森本金次郎, 倉根一郎, 西條政幸. 定位微量投与系を用いたマウスポリオーマウイルスの脳における持続感染様式の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.10
- 3) 中道一生, 伊藤睦代, 奴久妻聡一, 森本金次郎, 倉根一郎, 西條政幸. 脳脊髄液を用いた JC ポリオーマウイルス遺伝子のリアルタイム PCR 検査体制の整備と進行性多巣性白質脳症 (PML) の診断支援. 第 14 回日本神経感染症学会学術集会, 栃木, 2009.10
- 4) 中道一生, 伊藤睦代, 倉根一郎, 西條政幸. 定量的リアルタイム PCR による脳脊髄液中 JC ウイルスゲノムの検出に基づく進行性多巣性白質脳症の診断支援. 第 84 回日本感染症学会総会学術集会, 京都, 2010.4
- 5) 中道一生, 伊藤(高山)睦代, 倉根一郎, 西條政幸. 脳脊髄液中の JC ポリオーマウイルスの検査支援を介した日本国内における進行性多巣性白質脳症 (PML) の発生状況の解析. 第 15 回日本神経感染症学会, 福島, 2010.10
- 6) 岸田修二, 水澤英洋, 中道一生, 西條政幸. 予後調査からみた PML. 第 15 回日本神経感染症学会, 福島, 2010.10
- 7) 中道一生, 伊藤(高山)睦代, 倉根一郎, 西條政幸. 進行性多巣性白質脳症が疑われた血液疾患患者の脳脊髄液における JC ポリオーマウイルスゲノム DNA の検出. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010.11
- 8) 中道一生, 井上直樹, 伊藤(高山)睦代, 倉根一郎, 西條政幸. 進行性多巣性白質脳症が疑われた患者の脳脊髄液におけるヘルペスウイルスの出現頻度の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010.11

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



## 進行性多巣性白質脳症の病態と治療法の解明

研究分担者：岸田 修二 がん・感染症センター都立駒込病院脳神経内科

### 研究要旨

PML のほぼ確診例を対象にした疫学調査では、わが国での進行性多巣性白質脳症(PML)は依然として HIV 関連は約 35%、非 HIV 関連が約 65%を占めている。特に後者では血液関連が 45%で、移植に関連したものがそのうちの約 56%を占めており、諸外国に比べ特異である。HIV 関連 PML の死亡率は 43%と強力な抗レトロウイルス剤(HAART)導入により諸外国と同様減少した。しかし非 HIV 感染関連 PML の死亡率は 92%と依然として高く血液疾患、特に移植が背景にある PML の生命予後は極めて不良である。死亡の転帰例は HIV 感染も非 HIV 感染も 2 ヶ月で死亡している。さらに HIV 関連、非 HIV 関連ともに本症診断までに高度な機能障害を示すまで進行し、進行が停止しても常に介護が必要な著しい機能障害を後遺症として残しており PML は未だ予後不良疾患である。HIV 感染は PML 診断後の HAART 使用が、非 HIV 感染は軽度な免疫不全が長期生存に関与したが、メフロキンに関しては症例数が少なく評価出来なかった。髄液中 JCV 負荷量は陽性から陰性化は延命の予測因子と思われる。診断確定までに 3 ヶ月も要していることは機能障害残存に関与していると考えられる。症例検討の中でメフロキンが治療薬として有望と考えられたので、多数例でのメフロキンの有効性を確認するために治療プロトコルを作成した。今後早期に診断し、早期に免疫を回復させる手段と JCV 特異療法の併用が生命・機能予後を改善させることは疑いない。メフロキンが特異治療薬として使用できるかどうか今後の調査が待たれる。

### A. 研究目的

わが国での進行性多巣性白質脳症(PML)の疫学調査を継続し、PML の実態を明らかとするとともに、PML の治療に有効と思われる治療方法を模索する。まず①我が国では PML の基礎疾患として HIV 感染症に次いで多いが、まとまった報告数の少ない血液系悪性腫瘍、特にそれに関連した移植関連 PML の臨床的検討を行い、②臨床研究から治療薬として有望と思われた抗マラリア薬メフロキンのパイロット的使用効果を検討する。③我が国での PML の予後を HIV 関連と非 HIV 関連の異動を検討し、生命・機能予後の因子を探る。さらにメフロキンの効果を多数例で

検証するためのプロトコルを作成する。

### B. 研究方法

- ① 諸施設から相談のある症例、国立感染症研究所で髄液 JCV 陽性と判明した症例、自施設の症例を中心とした予後調査。
- ② 自施設で有効と思われた抗マラリア薬メフロキンの有効性を確認する目的で数施設において試験投与。
- ③ 多数例でのメフロキンの有効性を確認するためのプロトコルを作成。

### (倫理面への配慮)

適応外使用のメフロキンは、各施設での倫

理委員会と患者家族の同意を得て投与した。

## C. 研究結果と考察

### ① 血液疾患及び移植関連 PML の検討

患者背景は血液系悪性疾患に対して行われた骨髄移植後に発症した PML5 例(同種骨髄移植 3 例、自家骨髄移植 1 例、臍帯血移植 1 例と多発性骨髄腫治療に関連した PML1 例であった。経過観察中の死亡例は 4 例(67%)であり、診断後中央値 4 ヶ月で死亡した。免疫抑制剤を中止できた症例とメフロキンを投与した症例に関しては、臨床経過は良好であり、特に後者は髄液中 JCV 負荷量も減少を認めた。自験例の HIV 関連 PML13 例で HAART 導入前症例 7 例が全例(100%)死亡しているのに比べ、HAART 導入例は 6 例中 1 例(17%)の死亡であった。HIV 関連 PML の HAART 導入後の生命予後は極めて良好であるに比べ、現在のところ血液関連 PML の生命予後は不良である。PML の治療薬としてメフロキンは有望かもしれない。

### ② 抗マラリア薬メフロキンの使用経験 5 例

パイロット的に非 HIV 関連 PML3 例(SLE 1 例、臍帯血移植例 1 例、基礎疾患不明 1 例)と、HIV 関連 PML2 例に対しては HAART 療法に併用してメフロキンを投与し臨床、画像、髄液 JCV の推移を観察した。

非 HIV 関連 PML ではいずれもメフロキン投与後症状と画像所見の停止/改善がみられ、特に髄液で JCV の経過を追えた症例(図)は、メフロキン投与に時間的に一致し、髄液 JCV 負荷量も陰性化を認めた。HIV 関連 PML2 例では、アウトカムを在院日数で HAART 単独使用例 6 例と比べたところ HAART 単独療法群 256 日に比べ、メフロキン併用群は 72 日と短縮傾向が伺われた。すなわち今回行った少数例でのメフロキン投与試験は非 HIV、HIV 関連 PML 全例に有効であると思われた。

### ③ 予後調査からみた PML ならびに治療薬としてのメフロキンの投与方法と観察項目

の作成。

ほぼ確実な PML の基礎疾患(2007~2010 年)は HIV 関連 35%、血液関連 45%(移植関連 56%)、その他 20%であった。予後調査からは HIV 関連 PML の死亡率は 43%であるのに比べ非 HIV 関連では 92%である。基礎疾患に HIV 感染の有無にかかわらず、発症から診断に至るまでに 3 ヶ月、その間に高度に進行を示している。死亡例は HIV 関連も非 HIV 関連も診断から平均 2 ヶ月で死亡をしている上、両者とも長期生存例は高度な機能障害を残している(表)。

初回髄液の JCV-PCR 検出率は 90%、特異性は 100%であった。HIV 関連 PML の延命には HAART が関与しているのは明らかである。非 HIV 感染例で延命・停止に関与したのは軽度な免疫不全とメフロキン投与例であった。

この 3 年間少数例でのメフロキンの投与結果を踏まえ、多数例で検証するために、メフロキン 275mg/日、3 日連続、その後週 1 回 275mg 内服 6 ヶ月のメフロキン投与プロトコルを作成した。

## D. 考察

わが国の PML は諸外国に比べ血液関連の移植に絡んだ発症が高い比率を示している点が特異である<sup>1)</sup>。我が国では HIV 感染者数が諸外国に比べまだ少ないことと、HIV 感染治療に HAART が導入され日和見感染症の発症が抑制されてきていること、もともと血液系悪性疾患や膠原病は PML 発症危険性が高く、そのうえ新しい生物製剤の使用と骨髄移植が増加していることに起因していると思われる<sup>1,2,3)</sup>。HIV 関連 PML の死亡率がわが国でも改善しているのに比べ、HIV 感染以外の基礎疾患に伴う PML の死亡率は極めて高い。前者は抗レトロウイルス剤が効を奏している結果である。しかし機能予後はいずれも悪い。長期フォローした成績から PML の予後を検討した報告は極めて少ないが、それによると

5年以上経過を迫えている症例 24 例のうち 23 例が HIV 関連であり、非 HIV 感染によるものは 1 例しかない。さらに神経学的に改善を示した症例は 17%にすぎないといった成績であり<sup>4)</sup>、HIV 感染に関連した PML に比べ非 HIV 関連 PML の生命予後は極めて悪く、また機能的には HIV 関連といえども回復する例は少ない。

この対策として、早期診断はもちろん、背景にある免疫異常を早期に回復させてやると同時に、JCV の増殖を特異的に抑制する薬剤の併用が必要である。前者に対しては HIV 関連であれば早期に HAART を施行し HIV 負荷量を抑えることであり、あるいは非 HIV 関連であれば免疫不全を来している薬剤の中止や養子免疫で免疫を回復する手段が必要であろう。後者に関しては、これまでシタラピンが唯一 in vitro で増殖抑制作用が示されていたが、中枢神経移行が不良で、かつ血液学的有害作用が多い。そのうえ HIV 関連 PML を対象にした多数例での試験で効果が証明されなかった。

その後 JCV が細胞感染する際にセロトニン受容体 5-HT<sub>2A</sub> 受容体を介することが判明し、受容体拮抗作用をもつミルタザピンが使用され、有功例の報告もあるが少数例にすぎない。したがって、現在 PML に有効な治療薬は HIV 関連 PML に対する HAART 以外にはない。Biogen Idec 社の研究者により、既存の薬剤 200 種類をスクリーニングした結果、抗マラリア薬メフロキンが細胞内で JCV 増殖抑制作用を示すことを見いだした<sup>5)</sup>。その後 HIV 関連 PML を対象に HAART 単独とメフロキン併用との比較対象試験が行われたが、途中で中止となった。我々は HIV 関連以外の基礎疾患による PML を含めメフロキンの投与を行ったところ、改善ないし停止効果を認め、そのうち髄液をモニターした症例では明らかに JCV 増殖抑制効果がみられ、いち早く報告した<sup>6,7)</sup>。同様な報告が最近みられ<sup>8)</sup>、治療薬

として抗マラリア薬メフロキンが有望視される。

## E. 結 論

PML は HIV 感染関連、非 HIV 感染関連両者ともに生命・機能予後不良疾患である。PML は HIV 感染や血液系悪性腫瘍、骨髄移植、SLE などに発症しやすい上、近年新しい生物学的製剤に発症頻度が増加してきている。今後増加が見込まれる疾患である。免疫不全を背景に発症するので、まず早期に本症を診断し、出来るだけ早く免疫を回復する手段をとるとともに JCV 特異療法との併用を行う必要が有る。メフロキンは治療薬として有望かも知れない。

## [参考文献]

- 1) Amend KL, Turnbull B, Foskett N, Napalkov P, Kurth T, Seeger J. Incidence of progressive multifocal leukoencephalopathy in patients without HIV. *Neurology* 75 : 1326-1332, 2010
- 2) Pelosini M, Focosi D, Rita F, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy : report of three cases in HIV-negative hematological patients and review of literature. *Ann Hematol* 87 : 405-412, 2008
- 3) Molloy ES, Calabrese LH. Progressive multifocal leukoencephalopathy : a national estimate of frequency in systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 60 : 3761-3765, 2009
- 4) Lima MA, Bernal-Cano F, Clifford DB, et al. Clinical outcome of long-term survivors of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81 : 1288-1289, 2010

- 5) Brickelmaier M, Lugovskoy A, Kartikeyan R, et al. Identification and characterization of mefloquine efficacy against JC virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 53 : 1840-1849, 2009
- 6) 岸田修二, 田中こずえ, 味澤 篤, ほか. PML の治療としてメフロキンの使用経験 5 例. 平成 21 年度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 分担研究報告書 125-132, 2010
- 7) Kishida S, Tanaka K. Mefloquine treatment in a patient suffering from progressive multifocal leukoencephalopathy after umbilical cord blood transplant. *Inter Med* 49 : 2509-2513, 2010
- 8) Gofton TE, Al-Khotani A, O'Farrell B, et al. Mefloquine in the treatment of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010.6.20

#### F. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31 発表)

##### 1. 論文発表

- 1) 岸田修二. 癌分子標的治療薬による中枢神経合併症. *JPN J Cancer Chemother* 35 : 1659-1664, 2008
- 2) 岸田修二. HAART 療法導入後の HIV 関連 PML6 自験例の臨床的検討. *神経内科* 69 : 568-576, 2008
- 3) 岸田修二. 進行性多巣性白質脳症. *化学療法の領域* 25 : 1289-1295, 2009
- 4) 岸田修二. 進行性多巣性白質脳症. *Clin Neurosci* 27 : 1276-1278, 2009
- 5) 岸田修二. 進行性多巣性白質脳症. *Clin Neurosci* 28 : 286-288, 2010
- 6) 岸田修二. 進行性多巣性白質脳症. 臨床症状と検査, 診断・治療, 予防・予後. プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する

調査研究班編集「プリオン病と遅発性ウイルス感染症」, 金原出版, 東京, 310-328, 2010

- 7) 岸田修二. 進行性多巣性白質脳症 progressive multifocal leukoencephalopathy(PML). 金沢一郎, 永井良三, 編集「今日の診断指針 第 6 版」医学書院, 東京, 679-681, 2010
- 8) Kishida S, Tanaka K. Mefloquine Treatment in a Patient Suffering from Progressive Multifocal Leukoencephalopathy after Umbilical Cord Blood Transplant. *Inter Med* 49 : 2509-2513, 2010

##### 2. 学会発表

- 1) 岸田修二. PML の診断、治療、予後について. HAART 導入後自験 HIV 関連 PML5 例と 2007 度のコンサルテーション例から. 第 13 回日本神経感染症学会総会, 東京, 2008.10
- 2) 岸田修二. 神経免疫再構築症候群とエイズ脳症. 第 22 回日本エイズ学会総会, 大阪, 2008.11
- 3) 田中こずえ, 岸田修二. 血液疾患治療中に発症した PML6 例の検討. 第 14 回日本神経感染症学会総会, 宇都宮, 2009.10
- 4) 稲垣里奈, 柳沢如樹, 菅沼明彦, 今村顕史, 味澤 篤, 岸田修二. HAART 導入後に免疫再構築症候群として進行性多巣性白質脳症の増悪が疑われ、脳生検を施行した一例. 第 23 回日本エイズ学会総会, 名古屋, 2009.11
- 5) 岸田修二, 水澤英洋, 中道一生, 西條政幸. 予後調査からみた PML. 第 15 回日本神経感染症学会学術集会, 福島, 2010.10

#### G. 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

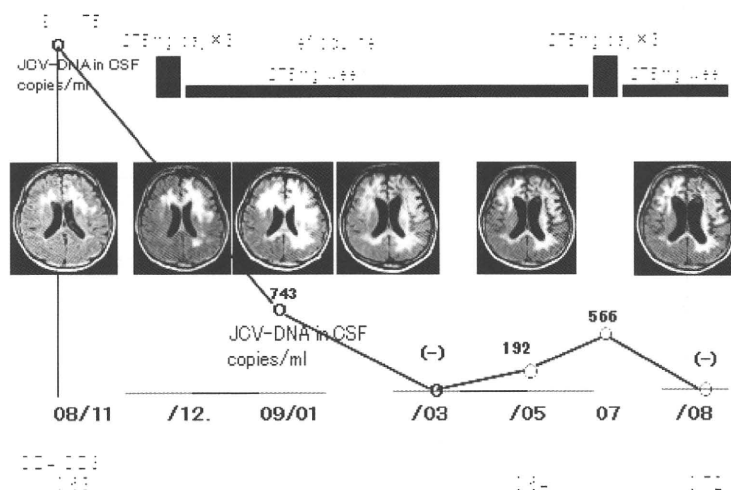


図 臍帯血移植患者のメフロキン投与とその経過を示す。

基礎疾患	死亡率	発症～診断期間月(中央値)	診断時Karnofsky performance score	診断～死亡期間月(中央値)	生存/停止例のKarnofsky performance score
AIDS 7例	43%	3	40	3	40
非AIDS 13例	92%	3	40	2	40

## 亜急性硬化性全脳炎サーベイランスの方法に関する検討

研究分担者/研究協力者：岡 明 杏林大学医学部小児科

### 研究要旨

我が国は先進国で唯一の麻疹発生国であり、今後も亜急性硬化性全脳炎(SSPE)の発生状況および実態の把握は重要な問題である。SSPEのサーベイランスを進めるにあたっては、特定疾患治療事業、小児慢性特定疾患、DPCなどの利用可能なデータベースと、過去の本研究班でのサーベイランス2007の結果を照合し、統一的なデータベースを作成することが必要となる。患者総数の把握をするとともに、特に新規発症数について調査を継続することが重要である。さらに現在行われている治療についての評価に向けての詳細な二次調査も並行して行う必要である。

### A. 研究目的

麻疹は2008年より全数把握疾患となり対策が立てられているが依然として発生が継続している。現在も発症している児の約1/3は2歳未満であり、数年の後にSSPEを発症するリスクの高い年齢層となっている。こうした麻疹感染の現状から、今後も本疾患が発生することが想定され、今後も注意してSSPEの発生の状況を把握する必要があるとともに、治療法の開発および対策行政上に必要な情報を継続的に収集する必要がある。

発症を把握するにあたり、SSPE診断時の検査は一般検査の組み合わせであり、特化した検査室における特異的な検査が必ずしも必要ではない。このため、診断時にエントリーすることは不可能であることも、調査を難しくしている。

本研究班では、平成18年に全国の患者についてサーベイランス調査(サーベイランス2007)を行い116症例を把握した。ただし、調査にあたり協力を得ることが困難なケースも少なくなかった。個人情報意識の高まりの中で、今後、個々の協力を求めることについてはさらに困難になることが予測される。

今後は、SSPEの公的なデータベースを利用して調査を進める視点が必要である。そこで、現在、本疾患に関連する公的なデータベースの状況を調べるとともに、今後のサーベイランスへの適用について検討した。

### B. 研究方法

SSPEに対する公的なデータベースについて検討をした。SSPEに対する公的な医療費の補助については、成人も対象となる特定疾患治療事業に加えて、18歳未満のみを対象とした小児慢性特定疾患の制度がある。このうち小児慢性特定疾患について、サーベイランスへの適用の可能性を調査した。国立成育医療研究センター政策科学研究部加藤忠明部長に協力をいただいた。また、新たに導入されたDPC(Diagnosis Procedure Combination: 診断群分類包括評価)データは、入院患者の医療について登録されている。このデータのサーベイランスへの適用の可能性について検討した。東京大学医学部医療経営政策学康永秀生先生に協力をいただいた。

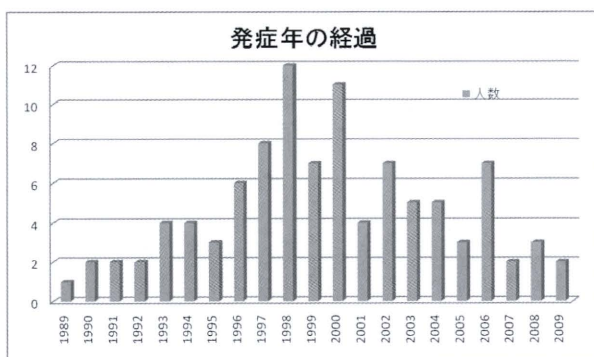
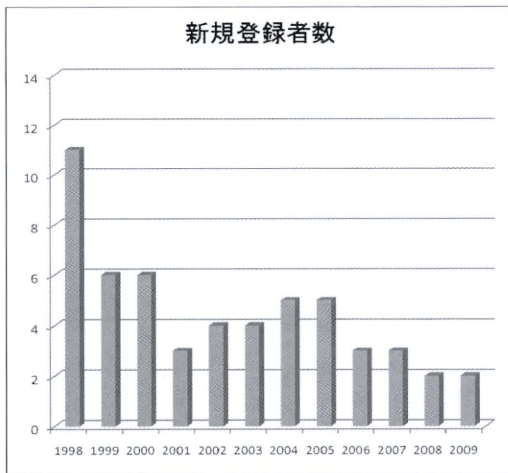
## (倫理面への配慮)

今後、本調査を施行する際には、所属施設の倫理委員会と相談の上で必要な承認を得る。

## C. 研究結果

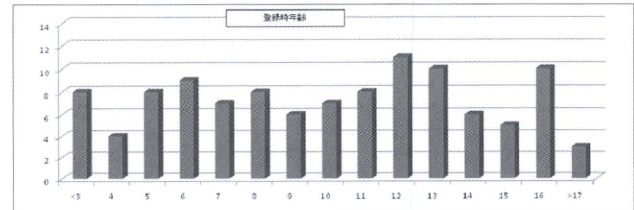
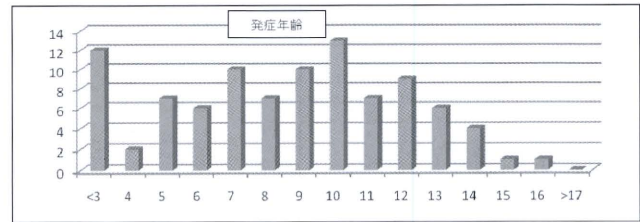
### 1) 小児慢性特定疾患事業での SSPE に関するデータ

- ① 対象は 18 歳未満の患者であるが、小児期には、乳幼児医療費補助があるために登録をしない場合も多いと考えられ、把握されない例もあることが想定される。また、医療意見書は、中央のデータベースに入力されていない場合もあり、別途の調査を加えることで補完する方法を組み合わせる必要がある。



- ② 平成 10 年より把握されている患者数は 114 名で、男子 75 名、女子 34 名、未記入 5 名あった。その内 49 名については施設名も記入されていた。
- ③ 発症年による経過では、最近の 3 年間は約 2 名程度の発症が記録され、平成 10 年、平成 12 年、平成 14 年、平成 18 年などの

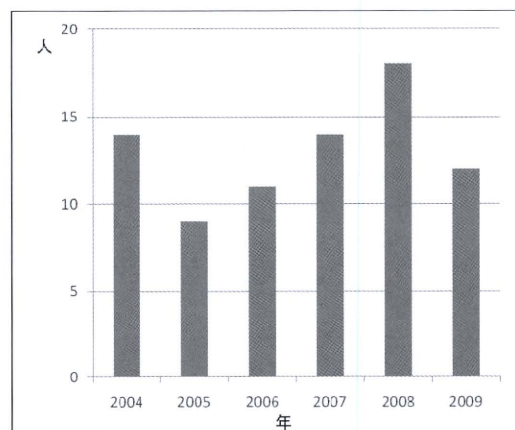
様に、やや多い傾向を示す年度があり、先行する麻疹流行との関連が示唆された。

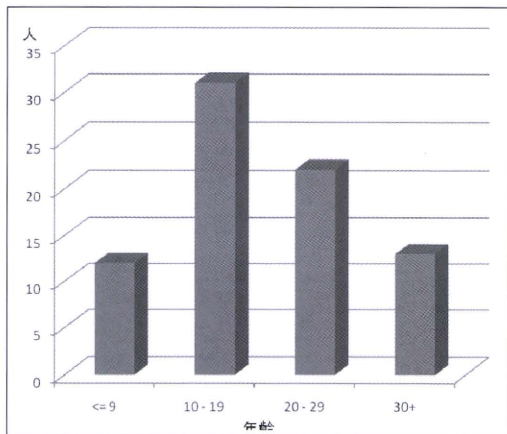


- ④ 発症年齢と登録時年齢の比較をすると、公的な乳幼児医療補助の適応が終了する時期以降の 10 代に登録される数が多い傾向があった。今後、小児慢性特定疾患のデータを使用するにあたりサーベイランス上の問題と考えられた。

### 2) DPC での SSPE に関するデータ

- ① DPC では入院患者のみが対象で、退院の際に登録されるために、外来患者や入院継続中の患者についての把握はできない。また、現在の調査は、年間 6 カ月間のみである。現在、研究目的で使用できる DPC データは、その旨を別途契約した約 80% 医療機関の分のみである。こうした点で、DPC での調査には限界があるが、今後通年となる予定であり改善が期待される。





② 把握されている患者数:2004年から2009年の間DPCデータ上でSSPEの病名がついていたのは78名であった。

年齢分布を見てみると年齢20歳未満が多く、発症して比較的経年経過の短い患者が主であった。

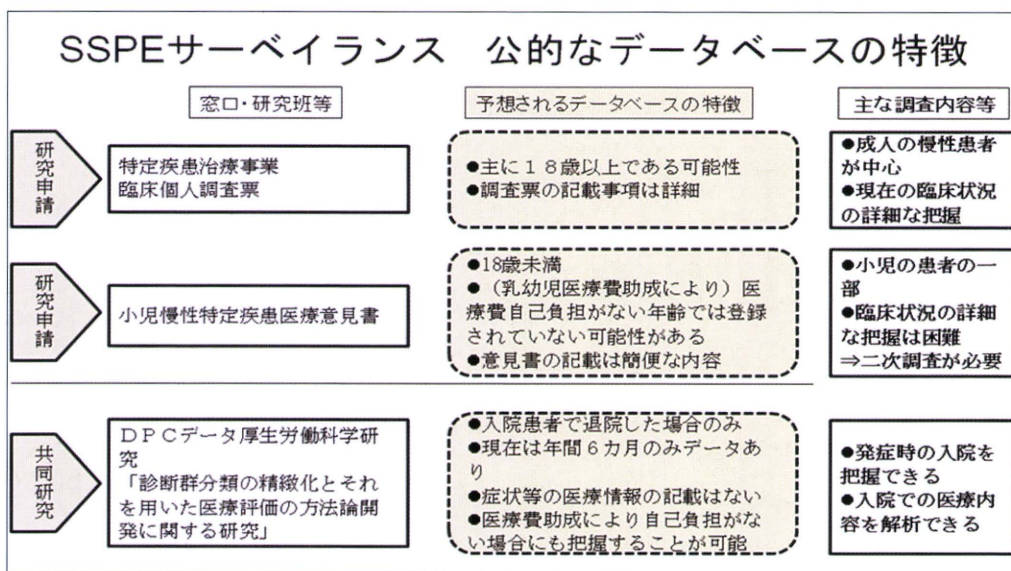
#### D. 考察

麻疹が依然として発生している我が国では、今後もSSPEの発生状況を把握するとともに、治療なども含めた実態について調査を継続していく必要がある。

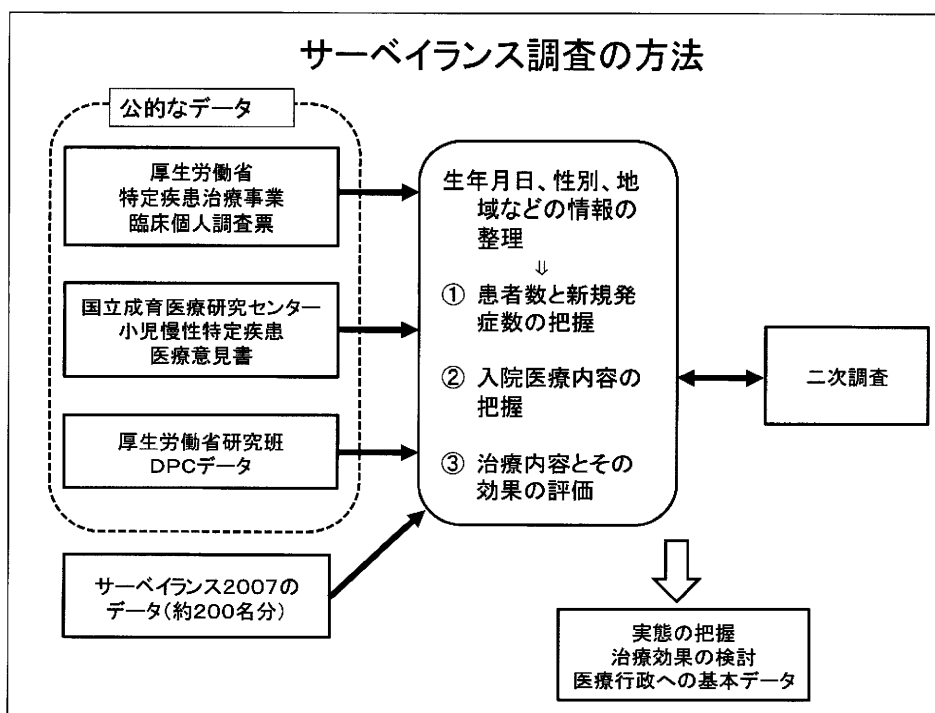
SSPEについては、包括的な公的なデータベースは存在していないために、個々の特性を利用して調査を行う必要がある。

特定疾患治療事業については、成人の患者が中心と考えられ、臨床個人調査票にて臨床情報が詳細に記載されている特徴がある。小児慢性特定疾患では、乳幼児医療補助との兼ね合いで申請をしていない例もあると考えられ、意見書が簡便である点では、二次調査を行う必要がある。DPCデータは、今後、調査が通年になることになっており、もしもそのデータが実態調査に使用可能であれば、サーベイランスを行う上で非常に有用であると思われる。新規発症例については、ほぼ全例が対象となる可能性が高い。

また、サーベイランスの一つの目的としては、現在行われている治療による効果について評価することが必要である。詳細な臨床情報の評価が必要であり、協力を得られる医療機関に呼び掛けて二次調査を行う必要がある。従来行われてきたイソプリノシン、インターフェロンに加えてリバビリンによる治療の効果を評価するためにも、中核的な医療機関に協力を呼び掛けて、Stage分類に基づいた現時点でのSSPEの経過と、リバビリン治療群との比較が必要である。







## E. 結 論

今後、SSPE のサーベイランスを進めるにあたっては、利用可能なデータベースと、本研究班でのサーベイランス 2007 の結果を照合し、統一的なデータベースを作成することが必要となる。患者総数の把握と、特に新規発症数について調査を継続するとともに、現在行われている治療について評価に向けた二次調査も並行して行う必要である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表(2008/4/1～2011/3/31 発表)

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## 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

## 髄液中 14-3-3 タンパク質濃度測定系の維持及び精度向上に資する研究

研究協力者：佐多徹太郎 国立感染症研究所・感染病理部

### 研究要旨

感染性を有するプリオン病の早期診断は水平感染等を防止するうえで必要であり、その診断の補助としての髄液中 14-3-3 タンパク質濃度測定は有用である。国内での濃度測定誤差を補正するため、リコンビナント 14-3-3 タンパク質を作成し、測定機関に配布する。

### A. 研究目的

CJD における髄液中 14-3-3 タンパク質濃度上昇は確認されており、診断補助として有効であることが示されている。CJD 疑いとする髄液中の濃度基準は測定系、測定機関において乖離があり、これを補正するため濃度測定用スタンダードを作成し、配布することで国内での濃度基準設定に寄与する。

### B. 研究方法

これまでに用いてきた 14-3-3 タンパク質標準標品を大腸菌発現系から哺乳動物細胞発現系へ変更する。この際、精製用タグを GST から His へ変更し、実際の 14-3-3 タンパク質の分子量に近づける。これにより濃度測定時の測定誤差を少なくできる。また、発現細胞をヒト腎像由来 293T を用いることで大量発現・精製が可能な系とした。

### (倫理面への配慮)

特記事項なし

### C. 研究結果

His 融合タンパク質として発現させるため 14-3-3 タンパク質 cDNA を哺乳動物細胞発現ベクター pCDNA6 His-MAX (invitrogen 社) に挿入した。発現細胞としてヒト腎由来

293T 細胞を用いた。作成した pCDNA-His-14-3-3 を 293T 細胞にトランスフェクションし 48 時間後に細胞を回収した。回収した細胞は 1% トライトン含有細胞溶解液で破碎後、Ni-アガロースカラムを用いて His 融合 14-3-3 タンパク質を回収した。精製したタンパク質は抗 14-3-3 タンパク質抗体を用いたウエスタンブロット法にて、反応性の確認を行った(図 1)。結果、精製したタンパク質は抗 14-3-3γ アイソフォーム抗体特異的に反応し、大腸菌発現タンパク質に比べ良好な反応性を有していた。また、各濃度における反応性の再現性にも優れていた。

### D. 考察

哺乳動物細胞を用いたタンパク質精製では大腸菌発現系に比べ回収量が低い欠点がある。今回用いた 293T 細胞は遺伝子導入効率に優れ、タンパク質発現も高度であり、標準標品として使用するのに十分量のタンパク質を回収出来た。また、14-3-3 タンパク質濃度測定系に用いる抗体との反応性についても問題なく、分子量も 14-3-3 タンパク質と近いことから、正確な濃度測定に有効であることが示唆された。

### E. 結論

今回作製した哺乳動物発現 His 融合 14-3-3

タンパク質は、髄液検査に用いる抗体との反応性も良好であった。融合する His エピトープは非常に分子量が小さく、標準標品として使用した場合、測定誤差を最小に抑えることが可能と考えられる。また、精製したタンパク質はエライザ系に対しても用いることが可能なため、検査法を問わず 14-3-3 タンパク質濃度測定に用いることが可能である。

#### [参考文献]

- 1) Satoh K, Tobiume M, Matsui Y, Mutsukura K, Nishida N, Shiga Y, Eguchi K, Shirabe S, Sata T. Establishment of a standard 14-3-3 protein assay of cerebrospinal fluid as a diagnostic tool for Creutzfeldt-Jakob disease. *Lab Invest* 90(11) : 1637-1644, 2010.11

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31 発表)

##### 1. 論文発表

- 1) Shinkai-Ouchi F, Yamakawa Y, Hara H, Tobiume M, Nishijima M, Hanada K, Hagiwara K. Identification and structural analysis of C-terminally truncated collapsin response mediator

protein-2 in a murine model of prion diseases. *Proteome Sci* 8:53, 2010.10.20

- 2) Takahashi RH, Tobiume M, Sato Y, Sata T, Gouras GK, Takahashi H. Accumulation of cellular prion protein within dystrophic neurites of amyloid plaques in the Alzheimer's disease brain. *Neuropathology*. 2010 Nov 9. doi : 10.1111/j.1440-1789.2010.01158.x. [Epub ahead of print]

##### 2. 学会発表

- 1) 飛梅 実. プリオン感染に関わる生体側因子の探索. 日本ウイルス学会総会, 徳島市あわぎんホール, 2010.11.7
- 2) Tobiume M. Proteomic analysis of N2a neuroblastoma cell suclons. *Prion2010*, Salzburg, 2010.9.9-11

#### 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

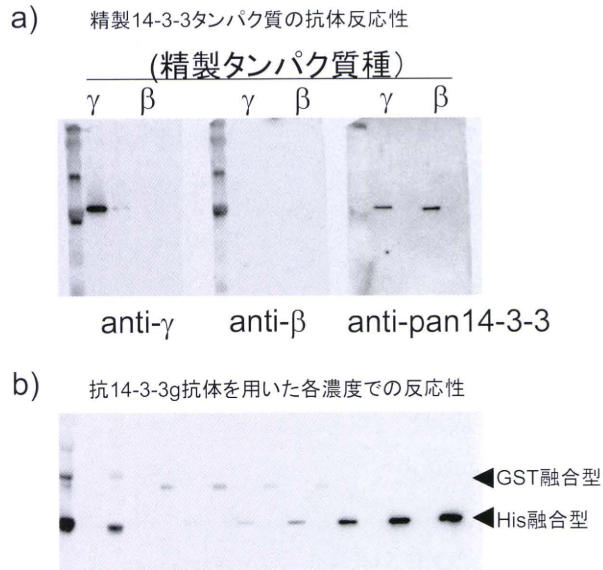


図1

図 1a) : 精製した His 融合 14-3-3g および b アイソフォームを SDS-page 後  $\gamma$ 、 $\beta$  および両アイソフォームを認識する抗体を用いてウエスタンブロット法にて解析した。

図 1b) : GST 融合型および His 融合型 14-3-3  $\gamma$  の各濃度での抗  $\gamma$  特異的抗体反応性をウエスタンブロット法にて検討した。

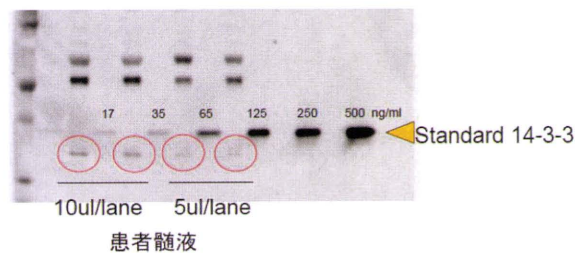


図2 His 融合型 14-3-3 タンパク質を用いた患者髄液中 14-3-3 濃度測定

14-3-3 タンパク質N末に His を融合する発現ベクターを構築し 293T 細胞へ導入した。細胞を溶解後、Ni カラムを用いて精製した。

階段希釈した His 融合 14-3-3 タンパク質のウエスタンブロットによる検出では抗体との反応性も良好で、患者髄液中の 14-3-3 タンパク質濃度測定に有用であった。