

(倫理面への配慮)

麻疹ウイルス、SSPE ウイルス、Vero/SLAM 細胞、B95a 細胞を用いたすべてのウイルス実験は、神戸大学大学院医学研究科微生物学研究室において、遺伝子組換え実験及びバイオセーフティーに関する法令及び指針等に準拠して行った。

C. 研究結果

(1) 薬用植物抽出液の作製：医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターが所有する約 120 種類の薬用植物からメタノール加温抽出液を作製し、乾燥により粗抽出標品を調製した。それらを DMSO にて 30 mg/ml になるよう溶解し、抗ウイルス活性評価実験用のストック液とした。

(2) 抗 MV 活性の検討：上記のストック液を培養液にて 100, 30, 10, 3, 1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に希釈して MV ウイルス液あるいは MV 感染細胞を処理し、ウイルス粒子自体の感染性及び感染細胞のウイルス産生量に及ぼす影響を調べた。

まず、MV ウイルス液と粗抽出エキスを混合したものを Vero/SLAM 細胞に接種し、ウイルス吸着を行った。その後、ウイルス液を洗浄にて除き、粗抽出エキスを含まない培地で培養し、感染 1 日後に融合巨細胞の出現を指標にして MV 感染細胞の数を計測した。その結果、30 (または 25) $\mu\text{g/ml}$ の濃度で MV の宿主細胞へのウイルス吸着を 80% 以上阻害する薬用植物エキスが 3 種類見出された (code no. 3, 10, 33)。

次いで、ウイルス接種中のみならず接種後にも薬用植物エキスで MV 感染細胞を処理した場合には、上記の 3 種類以外にもウイルス増殖を阻害する可能性のある薬用植物エキスが数種類見出された。しかしながら、これらの薬用植物エキスは当該濃度である程度の細胞毒性を示したことから、ウイルス特異的な阻害活性であるか否かについては、更なる検討が必要と考えられた。

(3) 抗 SSPE ウイルス活性の検討：SSPE ウイルス感染細胞と非感染細胞を、薬用植物エキス (30, 10, 3, 1 $\mu\text{g/ml}$) の存在下で共培養し、感染 1~3 日後に融合巨細胞の出現を指標にして SSPE ウイルス感染細胞の数を計測した。その結果、30 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、細胞毒性なしで明らかな SSPE ウイル

ス増殖阻害を示す薬用植物エキスは見出されなかった。

D. 考察

約 120 種類の薬用植物メタノール加温粗抽出エキスのうち、3 種類が MV 吸着阻害活性を示すことがわかった。しかし、MV の宿主細胞内における増殖あるいは SSPE ウイルスの宿主細胞内における増殖を細胞毒性なしで明確に阻害する粗抽出エキスは現時点では見出されていない。現在、一部の粗抽出エキスについてさらなる分画を行い、細胞毒性と抗ウイルス活性を分離できるか否かの実験を進めている。さらに、別途多数の日本産の薬用植物からメタノール加温抽出液を作製し、MV/SSPE ウイルス阻害活性の検討を予定している。また、幅広い生物多様性で知られ未同定の有用資源の存在が期待されながら、これまであまり解析されていないインドネシア原産の薬用植物等の天然資源についても、MV/SSPE ウイルス阻害物質の探索と同定を進めている。

E. 結論

約 120 種類の薬用植物メタノール加温粗抽出エキスをスクリーニングし、MV 吸着阻害活性を示す 3 種類の粗抽出エキスを見出した。抗 SSPE ウイルス活性を有する薬用植物エキスの同定にはさらなるチャレンジが必要である。

[参考文献]

- 1) 堀田 博. 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) : 成因と発症機構. 水澤英洋・編 プリオン病と遅発性ウイルス感染症, 金原出版, 東京, pp261-269, 2010.
- 2) Otaki M, Sada K, Kadoya H, Kato S, Nagano-Fujii M, Hotta H. Inhibition of measles virus and subacute sclerosing panencephalitis virus by RNA interference. *Antiviral Res* 70:105-111, 2006.
- 3) Otaki M, Jiang D-P, Sasayama M, Nagano-Fujii M, Hotta H. Generation of recombinant adenovirus expressing siRNA against the L mRNA of measles virus and subacute sclerosing panencephalitis virus. *Microbiol Immunol* 51:985-991, 2007.
- 4) 堀田 博、姜 大鵬、井出良浩、勝二郁夫.

亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) ウイルスの発症機序の解明及びその知見を応用した SSPE ウイルス増殖抑制戦略の確立の試み. 水澤英洋・編 平成 21 年度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 総括・分担研究報告書, pp182-186, 2010.

5) Jiang D-P, Ide Y-H, Nagano-Fujii M, Shoji I, Hotta H. Single-point mutations of the M protein of a measles virus variant obtained from a patient with subacute sclerosing panencephalitis critically affect solubility and subcellular localization of the M protein and cell-free virus production. *Microbes Infect* 11:467-475, 2009.

6) Ono N, Tatsuo H, Hidaka Y, Aoki T, Minagawa H, Yanagi Y. Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor. *J Virol* 75:4399-4401, 2001.

7) Yanagi Y, Takeda M, Ohno S. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol* 87:2767-2779, 2006.

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

1.論文発表

1) Hasegawa S, Mori N, Satomi M, Jiang DP, Hotta H, Matsushige T, Ichiyama T. Interferon production by cells infected with subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus or measles virus. *Cytokine* 56:676-679, 2011.

2) 堀田 博. 遅発性ウイルス感染症とプリオン病. 東 匡伸, 小熊恵二, 堀田 博・編 シンプル微生物学 第 5 版, 南江堂, 東京, pp334-340, 2011.

2.学会発表

1) 井出良浩、姜 大鵬、勝二郁夫、堀田 博. 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) マウスモデルの作製と神経病変の解析. 第 100 回日本病理学会総会, 横浜, 4.28-30, 2011.

H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

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

脳脊髄液の JC ポリオーマウイルス検査を介した日本国内における 進行性多巣性白質脳症のサーベイランスの現状と課題

研究分担者：西條政幸 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：林 昌宏 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 ポリオーマウイルス（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 PCR 検査系を確立し、国内の医療機関における JCV 検査を支援している。2007 年 4 月から 2011 年 10 月現在までに 486 名（589 件）の検査依頼に対応し、58 名の PML 患者を確認した。また、検査情報を元に構築したデータベースを用いて、本サーベイランスのパフォーマンスを評価した。本調査において確認された PML 患者の年間発生率は、複数年規模の書面調査の場合と同程度であった。また、ウェブサイトによる検査体制の周知によって、国内の幅広い地域および規模の医療機関から情報を収集していることが分かった。これらの医療機関においては、神経内科だけでなく、感染症科や血液内科といったその他の診療科からも検査が依頼されるケースが多く、これらが PML の確認率の向上に貢献していることが分かった。一方、本調査の課題として、検査依頼数が極端に少ない地域が存在していること、および民間機関による JCV 定量検査への新規参入によって、将来的には情報収集力が低下する可能性があることが提示された。以上の結果から、本調査は広範な医療機関を対象とした PML の発生状況の把握において有用であることが明らかとなった。また、サーベイランスのさらなる効率化を目的とした検査体制の改善の必要性が示された。

A. 研究目的

進行性多巣性白質脳症（progressive multifocal leukoencephalopathy : PML）は、免疫不全患者等の脳において JC ポリオーマウイルス（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。PML の検査には、特異性や侵襲性の点から脳脊髄液（CSF）中の JCV ゲノム DNA の PCR による遺伝子増幅検査が優先される。当研究室では、リアルタイム PCR を用いた CSF の JCV 検査体制を確立し、2007 年 4 月から日本全国の医療機関に対して PML の検査を支援している。また、検査を介して得られた患者情報を元に広範なデータベースを構築している。本サーベイランスは現時点で 4 年以上が経過しており、多数の情報が集積している。現段階において、本サーベイランスのパフォーマンスを評価し、さらなる効率化

のための改善策を検討する必要があると考えられた。そこで、本年度の研究では、サーベイランスを継続するとともに、その現状および課題を分析した。

B. 研究方法

2007 年 4 月の開始当初から現在まで検査体制に大幅な変更はない。JCV 検査の受付に関するウェブサイトを開設し、臨床医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システムを構築した。また、検査依頼を受けた際には速やかに国連規格の輸送キットを医療機関に配送し、検体および匿名化された患者情報の提供を受けた。CSF から DNA を抽出し、2 種類の JCV 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR による定性検査を実施し

た。JCV 陽性の CSF については定量検査を実施し、JCV ゲノムのコピー数を測定した。検査結果および患者情報をデータベースに追加登録し、現時点までの検査受付数や患者数、基礎疾患、依頼元施設等を解析した。また、都道府県の人口から PML 陽性者数および発生率を試算する際には、総務省統計局の人口推計値を用いた。

(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) 検査受付およびPML患者の確認状況

2007年4月から2011年10月現在までに589件の検査依頼を受け、89検体のCSFからJCV-DNAが検出された。被検者数は486名で、陽性者数は58名(11.9%)であった。依頼数の内訳は、ウェブサイトを紹介した新規の依頼250件(42.4%)、同一医局からの再依頼298件(50.6%)、研究班員等の紹介41件(7.0%)であった。開始後2年間(2007～2008年度)と比較した場合、直近3年間(2009～2011年度)では、検査依頼数が増加傾向にあった。また、依頼元の医療機関の所在地は44都道府県(93.6%)にわたり、大都市圏からの依頼が多くを占めた。2007年度から2010年度までの4年間における日本国内のPML患者の確認数は年間12人であった。また、本サーベイランスの結果から試算したPMLの発生率は人口1千万人あたり年間0.9人であった。

2) 検査依頼元施設の地域分布の解析

各地域における検査依頼の効率を調べるため、都道府県の人口を元に被検者数を平準化し、単位人口に占める割合を調べた。人口1千万人あたりの年間被検者数は、関東地方と中部地方、中国地方において多く、四国地方および九州地方の一部地域においても同様の高い値を示した。年間被検者数9人以上の検査依頼があった地域は13都道府県であり、上位は福井県、富山県、岐阜県、熊本県、東京都の順であった。一方、これらの地域と

比較した場合、東北地方や北海道、および一部地域を除いた四国地方と九州地方では単位人口あたりの被検者数が少ないことが分かった。また、青森県、高知県、佐賀県、宮崎県、群馬県を含む8都道府県では、被検者数が1名を下回った。

3) 検査依頼元施設の規模の解析

2007年度から2010年度までの4年間において検査依頼のあった医療機関(236施設、延べ486施設)の規模を調べるため、各機関から公表されている医療法上許可病床数を調べた。また、これらのデータと被検者数および陽性者数との関連性を調べた。被検者数および陽性者数は、病床数400以上1500未満の大規模もしくは中規模の施設において幅広く分布した。病床数300未満の施設では被検者数および陽性者数が少ない傾向にあった。また、被検者数に対する陽性者数の割合は、病床数には関連性が認められなかった。

4) 検査依頼元施設の機能区分の解析

依頼元医療機関が国および地方自治体においてどのような役割を担っているかを解析するため、各施設における特定機能病院(以下、特定病院)もしくは地域医療支援病院(以下、地域支援病院)の指定の有無を調べた。特定病院および地域支援病院からの依頼数は、それぞれ全体の42.6%および23.7%であり、全体の66.3%を占めた。しかし、残り33.7%の施設は両者に該当しなかった。被検者数に対する陽性者数の割合は、特定病院と地域支援病院がそれぞれ12.6%および8.7%であった。一方、非該当施設における陽性者の割合は13.4%であり、一部の都立病院では38.5%という高い数値を示した。

5) 検査依頼元施設の診療科等の解析

検査を依頼した担当医の診療科と被検者数もしくは陽性者数との関係を調べた。被検者のうち、63.4%が神経内科からの依頼であった。しかし、残りの36.6%は感染症科(11.1%)や血液内科(8.0%)を中心としたその他の診療科からの依頼であった。また、被検者数に対する陽性者数の割合を調べたところ、神経内科が12.0%、感染症科が約

18.5%、血液内科が12.8%、小児科が8.3%、その他が6.8%であった。調査期間における陽性者の基礎疾患は血液疾患が37.9%、HIV感染症が34.5%、自己免疫疾患が6.9%、その他の疾患が20.7%であった。

D. 考察

医薬品の副作用として発生した際の有害事象等を除いて、医療機関が国や地方自治体に対して PML の発生状況を報告する法的義務はない。その疫学調査では、①医療機関に調査票を配布し協力を要請する書面調査、もしくは、②PML に関して診療経験を有する複数の病院との連携を介した定点調査、③検査支援を介した不特定かつ多施設対象型の調査、が選択肢となる。しかし、①の書面調査では、膨大な数の医療機関に協力を要請する必要があり、年間ベースで実態を把握することは困難である。また、医療機関におけるメリットが少なく協力が得られないことも多い。また、②を実施する際には、その前段階として、拠点病院を設定するための予備データの蓄積が必要となる。そのため、本サーベイランスでは、上記③の方式を採用している。この方法によって情報が集積した場合には、上記②への移行は容易であると考えられる。

本調査研究で得られたデータに基づいて推計したところ、日本国内の PML 患者発生率は人口1千万人あたり年間0.9人であることが分かった。この数値には脳脊髄液 PCR 検査において陰性であったが、脳組織検査において陽性であった PML と診断された患者は含まれていない。ただし、現在までに判明している範囲内では、その割合は全陽性者数の10%未満であり、推定値に大きな相違はないと思われる。これまでの国内外における書面調査等によって報告されている PML 患者の発生率は、ナタリズマブ使用以前の段階で1千万人あたり年間1~10人である。したがって、本調査は複数年を対象とした書面調査に近い量の情報を年毎にモニターしてきた計算になる。また、依頼元の医療機関を解析したところ、幅広い地域および規模の病院から依頼を受けていたことが分かった。これらの成果は、インターネットメディ

アを用いた検査周知の重要性を示唆している。加えて、陽性者の約6割は神経内科からの依頼によって確認されたが、感染症内科や血液内科といったその他の診療科からの依頼においても陽性者が高い割合で認められた。その理由としては、国内における PML 患者の基礎疾患の大部分が HIV 感染症もしくは血液疾患であること、およびこれらの基礎疾患の療養中に PML を発症する患者が多いことが挙げられる。より多くの PML 患者を確認するためには、これらの診療科に対して PML 発生のリスクおよび検査体制に関する情報を積極的に発信する必要がある。

その他の課題としては、検査依頼の地域差が挙げられる。関東地方および中部地方、中国地方においては効率的に調査が進んでいる。その反面、検査依頼数が極端に少ない地域が少なからず存在している。検査開始から5年近い期間が経過していること、および本調査の端緒がウェブサイトであることを考慮した場合、これらの施設では別ルートによって JCV 検査を実施し、PML の診断に繋げるためのシステムがすでに構築されている可能性が高い。したがって、これらの地域の医療機関に対しては、受動的に検査依頼を待つのではなく、本研究班から積極的に協力を求めていく姿勢が重要であると考えられる。

さらに大きな課題として、民間機関による JCV 定量検査への参入がある。2010年を契機に少なくとも3施設が同様の検査の受付を開始した。この状況は、臓器移植法の改正やモノクローナル抗体製剤の使用等による PML 発生リスクの増加、およびそれらに伴う検査の需要の高まりを反映しているものと思われる。コマーシャルベースの検査は、PML の診断や治療をより円滑化する上で有意義であり、医療全体を考えた場合には望ましい傾向である。しかし、これらの民間検査と比較した場合、本調査は営利を目的とせず、検査に充てられる人員および予算は限られている。JCV 検査の多くが民間機関に依頼された場合には、本サーベイランスの機能が低下することが予想される。本検査の開始時からの受付数とその内訳に基づいて類推すると、これらの民間検査は、現時点ですでに医療機関に浸透し始めており、遅

くとも数年以内には医療機関に広く普及すると思われる。そのため、早い段階で対応策を講じる必要がある。民間検査が普及した状況下で確実に PML 患者数およびその背景を調べる際には、多施設型の定点調査が最も適している。これまでの構築したデータベースを用いれば、PML 患者を多く経験している、もしくは PML が発生する可能性の高い患者の診療にあたっている医療機関や診療科を容易に割り出すことができる。これらの拠点候補の大部分はリピーターとして継続的に検査を受け付けており、大幅なシステム変更を要しない。民間検査に併行する形で検査を実施することで情報収集が可能である。

一方、検査に要するリソースの確保を考慮した場合、定点調査の対象外の施設に関しては、初回検査として民間施設を推奨し、その後の検査を要請された場合にのみ対応する方針が望ましい。特筆すべき点として、2011 年度から民間検査において陽性が判明した後で当研究室への再検査が依頼された例が 3 件認められた。年間平均の陽性者確認数が 12 名であること、および民間検査が今後普及し、JCV 検査自体の総実施数が増大することを考慮した場合、これらのケースは無視できない徴候と捉えることができる。依頼理由を各依頼者に尋ねた結果、全てメフロキンの効果判定のための複数回のフォローアップ検査を目的としていることが分かった。確かに、本研究室は、詳細なバリデーションによって信頼性が実証された定量検査系、およびウイルス量の変動に関する専門的なノウハウを有している。したがって、今後はこれらの利点をアピールし、フォローアップに焦点を絞って検査体制を見直すことも重要であると考えられる。膨大な回数の民間検査を間接的に一次スクリーニングとして機能させ、その一部の情報を得ることができれば、より効率的に情報を収集することが可能となる。

E. 結論

脳脊髄液 JCV の検査支援を介して、国内の PML 発生状況を明らかにした。また、検査依頼元の医療機関について解析し、本サーベイランスの現状と課題を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakamichi K, Kurane I, Saijo M. Evaluation of a quantitative real-time PCR assay for the detection of JC polyomavirus DNA in cerebrospinal fluid without nucleic acid extraction. *Jpn J Infect Dis* 64:211-216, 2011.

2. 学会発表

1) Nakamichi K, Kurane I, Saijo M. Detection of JC polyomavirus DNA in cerebrospinal fluids collected from patients suspected as having progressive multifocal leukoencephalopathy in Japan. International Union of Microbiological Societies (IUMS)2011 Congress, Sapporo, September 15, 2011.

2) 中道一生, 林 昌宏, 倉根一郎, 西條政幸. 進行性多巣性白質脳症患者の脳脊髄液中に出現する J C ポリオーマウイルスゲノムの転写調節領域における変異パターンの解析. 第 16 回日本神経感染症学会学術集, 東京, 11.4, 2011.

3) 西條政幸. ヘルペスウイルスによる中枢神経感染症. 第 16 回日本神経感染症学会学術集, 東京, 11.4, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

髄液 JCV-PCR 検査依頼時の調査用紙に基づいた PML の症状、画像、検査、基礎疾患、薬剤誘発因子の検討

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

研究協力者：三浦義治 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 臨床調査用紙を作成し、2010年6月より2011年11月まで国立感染症研究所へ髄液 JCV-PCR 検査依頼のあった17症例（髄液中 JCV-PCR 陽性例）に関して症状、画像、検査、基礎疾患、薬剤誘発因子を中心に検討した。男性10例、女性7例で、平均55.9歳であり、年齢および性別ともこれまでの報告と同様の傾向を示した。臨床症状ではこれまで片麻痺、認知機能障害が多いことが報告されているが、本報告では特に構音障害が多かったこと（58.8%）が特徴であった。また、脳画像も大脳白質両側性病変で左右非対称であることが報告されており、本報告では特に大脳萎縮を示す症例が多かった（29.4%）。また髄液蛋白増加が9例（52.9%）、髄液細胞数増加が5例（29.4%）と髄液検査異常を示した症例が多かった。基礎疾患としては血液系悪性腫瘍が多く（47.1%）、HIV 関連性 PML が少ないこと（23.5%）が特徴であった。薬剤誘発因子に関しては多岐にわたっていたがプレドニゾロン、シクロフォスファミドを使用した症例が目立った。これらの結果から、近年の治療による免疫状態良好な HIV 感染者の増加と、基礎疾患に対する多様な免疫抑制系薬剤の使用増加がその背景にあるものと推定される。本報告からは、従来までの報告とはやや異なる特徴を有する PML が発症してきている可能性が考えられた。

A. 研究目的

進行性多巣性白質脳症の病態解明のために、日本国内における最近の PML 発症者の特徴を明らかにすることを目的として調査を行った。

B. 研究方法

PML 臨床調査用紙を作成し、2010年6月より2011年11月まで国立感染症研究所へ髄液 JCV-PCR 検査依頼のあった17症例（髄液中 JCV-PCR 陽性例）に関して症状、画像、検査、基礎疾患、薬剤誘発因子を中心に検討した。

（倫理面への配慮）

匿名化された情報分析であり、カルテ番号と生年月日などの情報は含まず問題はない。

C. 研究結果

男性10例、女性7例で、平均55.9歳、HIV 陽

性4例、HCV 陽性1例、HTLV-1 陽性1例を含む17例で、症状と脳画像検査、基礎疾患や日和見感染と髄液中 JCV-PCR 陽性から PML と診断した。臨床症状は17例中10例（58.8%）で構音障害、7例（41.2%）で認知機能障害、7例で片麻痺、5例（29.4%）で失語、5例で視力障害、3例（17.6%）で不随意運動、2例（11.8%）で無言無動、2例で小脳症状、2例で精神症状、2例で深部腱反射亢進、1例（6.7%）で、嚥下障害、両下肢筋力低下、筋固縮をそれぞれ認めた（図1）。

また、脳 MRI 上の病変は大脳白質が15例（88.2%）、小脳白質が4例（23.5%）、脳幹部が4例、大脳基底核が1例（5.9%）であり、またその分布は両側左右非対称性が12例（70.6%）、片側性が4例（23.5%）、両側左右対称性が1例（5.9%）であった。さらに大脳萎縮は5例（29.4%）、Gd 増強効果は2例（11.8%）で、mass effect を示した症例はなかった。

髄液検査では、蛋白増加が9例(52.9%) (図2)、細胞数増加が5例(29.4%) (図3)であった。基礎疾患では血液系悪性腫瘍が多く、HIV感染者に合併したPML (HIV関連性PML) は23.5%を占めた(図4)。薬剤誘発因子ではプレドニゾロン使用症例が5例、シクロフォスファミド使用症例が3例、ドキシソルビシン(トポイソメラーゼ2阻害)使用症例が2例、リツキシマブ(抗CD20マウスーヒトキメラ型モノクロナル抗体)使用症例が2例であり、多岐に渡っていたことが特徴であった(図5)。

D. 考察

近年ではHIV関連性PMLの増加が予想されたが、本報告ではむしろ少なくなった(23.5%)ことが特徴であった。これは、近年の治療による免疫状態良好なHIV感染者の増加と、基礎疾患に対する多様な免疫抑制系薬剤の使用増加がその背景にあるものと推定される。また本報告からは、従来までの報告とはやや異なる特徴を有するPMLが発症してきている可能性が考えられた。その特徴は、性別と発症年齢はほぼ従来の報告通りで、構音障害、大脳萎縮、髄液異常の頻度がやや高いということである。

E. 結論

最近の日本国内でのPML発症者の特徴は、症状では構音障害が目立ち、MRI画像では大脳萎縮を呈した症例が多く、髄液異常を呈する頻度が高く、基礎疾患ではHIV関連性PMLが少ない傾向があった。

[参考文献]

- 1) Tavazzi E, White MK, Khalili K. Progressive multifocal leukoencephalopathy: clinical and molecular aspects. *Rev Med Virol*, in press.
- 2) Kishida S. Progressive multifocal leukoencephalopathy-epidemiology, clinical pictures, Diagnosis and Therapy. *Brain and Nerve* 59:125-137, 2007.

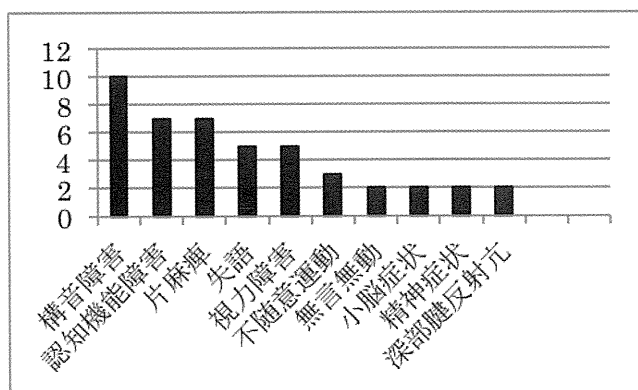


図1 臨床症状

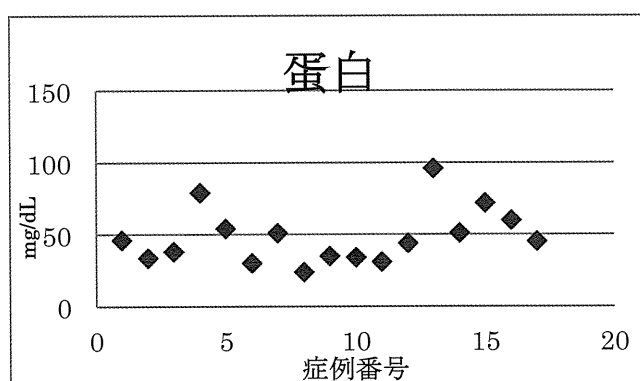


図2 髄液蛋白

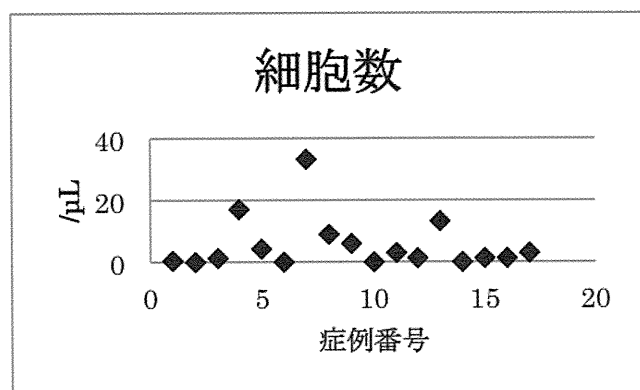


図3 髄液細胞数

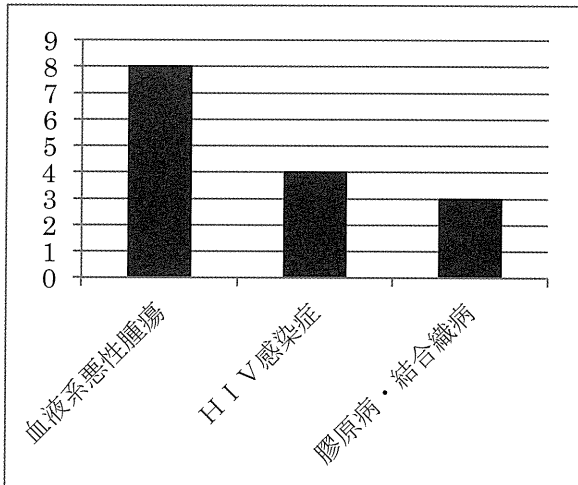


図4 基礎疾患

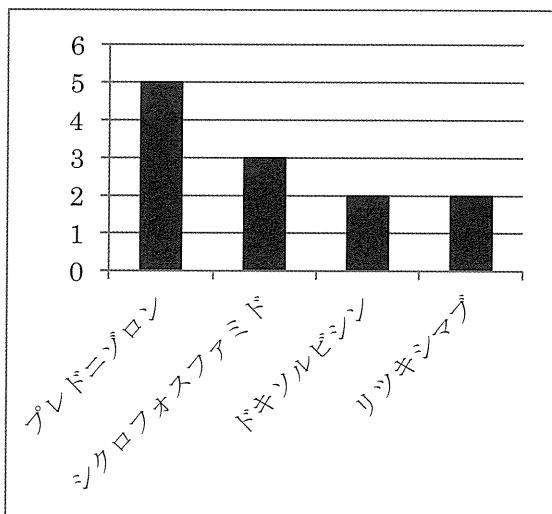


図5 薬剤誘発因子

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 岸田修二. 進行性多巣性白質脳症. 最新医学 66:1695-1703, 2011.

2. 学会発表

- 1) 三木田馨、前田卓也、藤倉雄二、神崎裕二、原 悠、叶宗一郎、岸田修二、西條政幸、中道一生、川奈明彦. cART および塩酸メフロキンはどこまでPMLの予後を改善できるのか? 第25回日本エイズ学会総会, 東京, 11.30, 2011.
- 2) 岸田修二. PMLの治療と臨床試験. 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症に関する調査研究班」SSPE・PMLワークショップ2011, 東京, 8.19, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

進行性多巣性白質脳症（PML）診療，1年間の進歩 - Monoclonal antibody-associated PML への対応， メフロキンなど新規治療薬の話題 -

研究分担者：雪竹基弘 佐賀大学医学部附属病院神経内科

研究要旨 2011年に報告されたPMLの診断・治療に関する論文を中心に検索した。多発性硬化症患者におけるNatalizumab治療によるPMLでは詳細な報告があり，病態の理解が深まっている。メフロキンのPML治療における評価はまだ定まっていない。メフロキン以外の治療報告などもあり，今後の展開に期待する。また，Natalizumab等の生物学的製剤に関連した非HIV-PMLへの対応やメフロキン投与を組み込んだPML診療ガイドラインの改訂に取り組んでいる。

A. 研究目的

PMLは稀な疾患ではあるものの，HIV感染者の増加や免疫抑制剤などの適応拡大による汎用が行われている事や，近年の生物学的製剤投与との関連など日常診療においても留意すべき疾患となってきている。特に生物学的製剤との関連は多発性硬化症治療における副作用という面から認識・知見が急速に高まっている。現在，PML発生の報告がある生物学的製剤はNatalizumab, Rituximab, Infliximab, Etanercept, Basiliximab, Daclizumab, Efalitumab, Alemtuzumab および Muromonab-CD3 と多くのものがある。

治療においてはメフロキン使用例の報告が散見されるが，その効果，位置づけはまだ確定されていない。

本研究では，PMLの現在の診断・治療を把握し，より効率の良い治療法の検討/新規治療法への可能性を模索するため，この1年間に発表されたPMLの診療に関する論文をレビューした。

本年は其中で多発性硬化症におけるNatalizumab使用時のPML発症に対する管理や診断・治療指針，NatalizumabにおけるPML発症機序の研究およびメフロキンその他の治療薬の現状を中心に報告する。

B. 研究方法

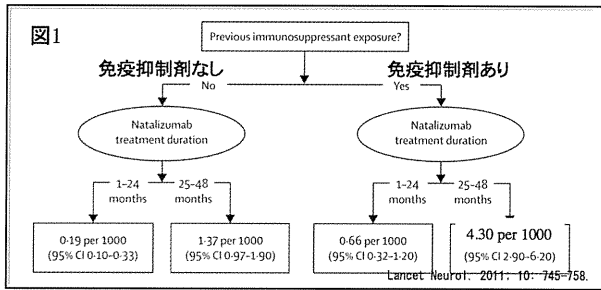
PubMedを利用して，2010年10月から2011年10月に報告されたPMLの診断および治療に関する論文を検索した。

（倫理面への配慮）

文献検索とそのレビューが主体であり，引用論文はすべて執筆者，雑誌名などを提示しており倫理面の問題はないと考える。

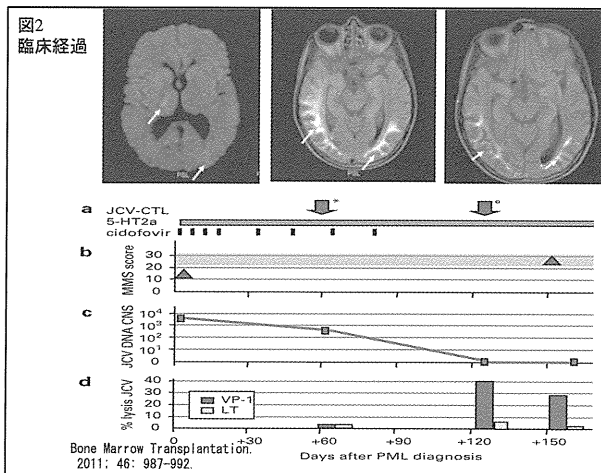
C. 研究結果

多発性硬化症（MS）におけるNatalizumab使用の指針ではNatalizumabによるPMLの特徴，患者選択，治療中のモニタリングおよび発症時の治療などが示されている¹⁾。2011年3月末までに約83,300人のMS患者にNatalizumabは投与。このうち2011年6月1日までに133名のPMLが確認されておりそのリスクは1.51/1000Pt.(95% CI: 1.27-1.79)そのうち24名が死亡しており，死亡率は18%。PML発症リスクとしてはNatalizumabの投与前に免疫抑制剤投与があるもの，血清抗JCVC抗体陽性のものなどが示されている（図1）。



また、NatalizumabによるPML発症機序の解明ではCD34+細胞の関与の有無などが報告されている²⁾。治療においては、メフロキンの使用に着目して評価した論文はまだ少なく、評価は一定しない。MS患者におけるNatalizumab関連PMLとメフロキンに関してはPML28例の検討があり、血漿交換に加え、メフロキンを併用したものが14例、そのうち4例が死亡であった(Lancet Neurol. 2011; 9: 438-446)。

新規治療として、CMX001の報告では通常のcidofovirと比し、in vitroでの有効性・安全性がより増しており、今後の展開が期待される³⁾。JCV特異的細胞障害性T細胞による治療の報告(非HIV-PML, 生物学的製剤使用あり)ではその効果が示された(図2)。



使用したJCV特異的細胞障害性T細胞はJCV-VP1およびLTペプチドにより、IFN- γ を産生と増殖がみられるが、患者PBMC付加では増殖しないことが示されている⁴⁾。

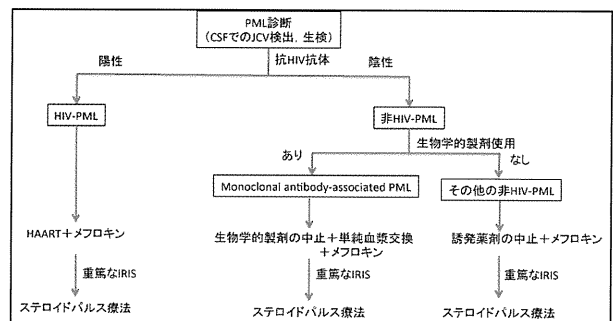
D. 考察

NatalizumabによるMS患者のPMLはその特徴・治療指針など対応が進んできている。メフロキン

の評価は症例報告のレベルであり、まだ一定の見解は出ていないと考える。JCV自体への治療の報告はCMX001やJCV特異的細胞障害性T細胞による治療など今年も散見され、今後の発展が望まれる。

E. 結論

2011年に報告されたPMLの診断・治療に関する論文を中心に検索した。Natalizumab治療におけるMS患者でのPMLはその特徴などが多く報告されている。メフロキンおよびそれ以外の治療報告などもあり、今後の展開に期待する。また、これらの結果を参考にし、Natalizumab等の生物学的製剤に関連した非HIV-PMLへの対応やメフロキン投与を組み込んだPML診療ガイドラインの改訂に取り組んでいる(図3)。



[参考文献]

- 1) Kappos L, Bates D, Edan G, Eraksoy M, et al. Natalizumab treatment for multiplesclerosis: updated recommendations for patient selection and monitoring. *Lancet Neurol* 10:745-758, 2011.
- 2) Warnke C, Smolianov V, Dehmel T, et al. CD34+ progenitor cells mobilized by natalizumab are not a relevant reservoir for JC virus. *Mult Scler* 17:151-156, 2011.
- 3) Gosert R, Rinaldo CH, Wernli M, et al. CMX001 (1-O-hexadecyloxypropyl-cidofovir) inhibits polyomavirus JC replication in human brain progenitor-derived astrocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 55:2129-2136, 2011.
- 4) Balduzzi A, Lucchini G, Hirsch HH, et al. Polyomavirus JC-targeted T-cell therapy for progressive multiple leukoencephalopathy in a hematopoietic cell

transplantation recipient. *Bone Marrow Transplant*
46:987-992, 2011.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 水澤英洋, 岸田修二, 西條政幸, 雪竹基弘,
宍戸-原由紀子, 澤 洋文, 長嶋和郎, 奴久妻聡一,
山田正仁. 進行性多巣性白質脳症(Progressive
multifocal leukoencephalopathy : PML). 第 52 回日
本神経学会学術大会, 名古屋, 5.20, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

肝移植後に発症した進行性多巣性白質脳症の 1 例

研究分担者：雪竹基弘 佐賀大学医学部附属病院神経内科
 研究協力者：中道一生 国立感染症研究所ウイルス第一部第三室
 研究協力者：本田省二 熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学分野
 研究協力者：進藤誠悟 熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学分野
 研究協力者：坂口秀哉 熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学分野
 研究協力者：内野克尚 熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学分野
 研究協力者：平野照之 熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学分野

研究要旨 臓器移植後で自己免疫性疾患を合併する非 HIV-PML 症例を報告した。本例は経時的に頭部 MRI や髄液 JCV DNA の測定が出来ており、臨床的に貴重であると考えられた。髄液 JCV DNA は誘発薬剤中止の効果を示す一方、メフロキンの JCV に対する効果は限定的であった。脳生検では一部炎症細胞浸潤が見られたことが特徴であった。原疾患に伴う GVHD のため、誘発薬剤を一部再開せざるを得ず、陰転化していた髄液 JCV DNA が陽性となり、不帰の転帰となった。非 HIV-PML に対する治療は原疾患再燃などがあり、JCV 自体に作用する薬剤・治療戦略が必要と考え、今後の研究に期待する。

A. 研究目的

PML は稀な疾患ではあるものの、HIV 感染者の増加や免疫抑制剤などの適応拡大による汎用が行われている事や、近年の生物学的製剤投与との関連など日常診療においても留意すべき疾患となってきた。特に生物学的製剤との関連は多発性硬化症治療における副作用という面から認識・知見が急速に高まっている。また、非 HIV、非 Monoclonal antibody-associated PML は治療に伴う原疾患の再燃など多くの問題があり、予後不良な PML の中でも臨床的に最も治療抵抗性であると考えられる。

今回、臓器移植後で自己免疫性疾患を合併する非 HIV-PML 症例を経験。本例は経時的に頭部 MRI や髄液 JCV DNA の測定が出来ており、臨床的に貴重であると考えられた。

B. 研究方法

熊本大学神経内科で治療を行った 28 歳女性例（原因不明の劇症肝炎で 2 度の肝移植、各種免疫抑制剤など内服、合併症として特発性血小板減少

性紫斑病・低 γ グロブリン血症等あり）の症例提示を行った。

(倫理面への配慮)

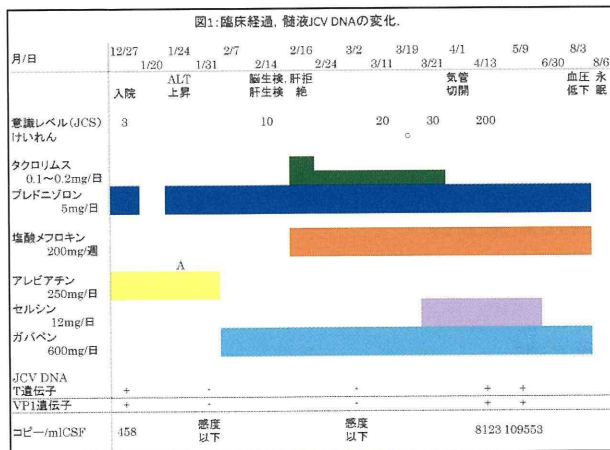
患者は匿名化されて症例報告。

C. 研究結果

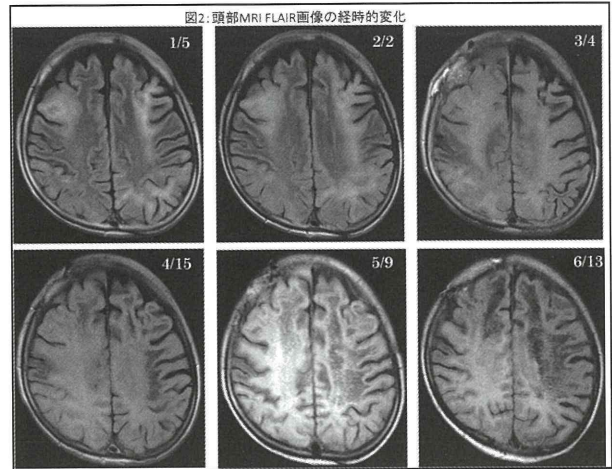
症例は 28 歳女性。主訴は意識障害。既往歴としてアトピー性皮膚炎、薬剤性顆粒球症候群、低 γ グロブリン血症、原因不明の劇症肝炎で生体肝移植（1 回目）がある。また、今回発症の 2 年前にサイトメガロウイルス腸炎・特発性血小板減少性紫斑病・無 γ グロブリン血症・CVID (common variable immunodeficiency) 腸炎で入院加療され、慢性拒絶のため 2 回目の生体肝再移植も受けた。その際インフリキシマブが導入され、発症時プレドニゾロン 5mg/日、タクロリムス 0.2mg/日も内服中であった。X 年 7 月、易怒性や利己的になったことに家族が気付いた。11 月、計算ができなくなり、電車に乗ろうとして切符を買えなかった。12 月 6 日、精査目的で熊本大学移植外科に入院。

頭部 MRI で両側前頭葉，頭頂葉，側頭葉の皮質下を中心に散在する異常像を指摘。一時退院中の 12 月 25 日，けいれん発作を起こし，熊本大学へ緊急入院。脳炎・脳症として，抗生物質，抗ウイルス薬，抗真菌薬投与およびタクロリムス中止で治療を開始，原因の検索を進めた。血清抗 HIV 抗体陰性。髄液細胞数，蛋白正常。1 月下旬，入院時の髄液検査から JCV DNA が陽性であることが判明し，PML の診断に至った。脳生検でも PML として矛盾しない所見であった。

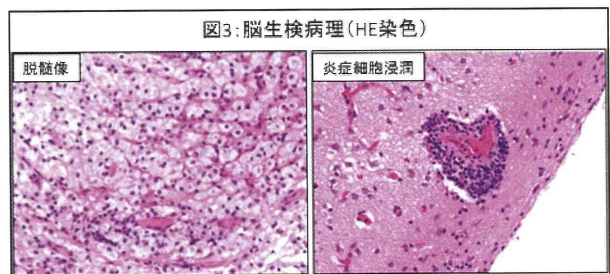
1 月 20 日よりプレドニゾロン中止。2 月 16 日から塩酸メフロキンを投与を開始し，当初は JCS 3 の意識障害，無感情状態で落ち着いていたが，移植肝に対する移植片対宿主病 (GVHD) のため誘発薬剤を再開したことで髄液 JCV DNA は再度陽性となった。その後，次第に意識レベルは低下し，刺激に対する過敏性から除脳硬直様の肢位をとることが増え，最終的に後弓反張のような肢位となった。意識レベルも JCS 200 となった。以降，神経症状の変化はほとんどなくなり，8 月 6 日永眠 (図 1)。



なお，髄液 JCV DNA は誘発薬剤の可能性があったタクロリムスとプレドニゾロン中止で陰転化。メフロキンを投与中も陰性のままであったが，誘発薬剤を再開したことで再度陽性となり最終的には 11 万コピーまで上昇した (図 1)。頭部 MRI は経時的に病巣が拡大し，両側大脳白質に広範な異常像を認め，後半は萎縮を伴った (図 2)。



脳生検の病理では神経線維の変性，脱髄所見の他，リンパ球主体 (CD8>CD4) の炎症細胞浸潤を認めたことが本例の特徴であり，炎症細胞浸潤は特に血管周囲に目立った (図 3)。



D. 考察

非HIV，非Monoclonal antibody-associated PML は治療としてまず原疾患に使用されている免疫抑制剤などの誘発薬剤を中止されるため，原疾患再燃での全身状態悪化や，本例のように誘発薬剤再開がやむを得ない場合も多い。本例では誘発薬剤中止で髄液JCV DNA消失を確認しており，誘発薬剤中止は有効である。メフロキンに関しては，髄液JCV DNA消失の維持が出来てはいたが，誘発薬剤再開でのPML再燃は止めることが出来ず，JCV 排除に関して制限的とも考えられるが，ウイルス除去には宿主の免疫機能 (特に細胞性免疫) が重要であり，患者の免疫能によって効果は差がある可能性がある。

また，本患者の病態としては，病理で炎症細胞浸潤があることなどより古典的PML以外の要素も関与していた可能性がある (図4)。

図4

	古典的PML	PML IRIS	JC virus 脳症
発症	亜急性	免疫回復時	亜急性
画像所見	非対称的で境界明瞭な造影されない皮質下白質病巣	造影効果, 腫脹	皮質病巣
神経徴候	病巣による	病巣と炎症部位による	脳症
診断	髄液中JC virus 同定, 脳生検, 画像所見	髄液中JC virus 同定, 脳生検, 画像所見	脳生検, 髄液中JC virus 同定, 画像所見
組織像	皮髄移行部に多い脱髄, 腫大したオリゴデンドロサイトでのJC virus 同定, bizarre astrocytes	古典的PMLに類似した脱髄と炎症細胞浸潤	皮質錐体ニューロンと皮質アストロサイトへのJC virus 溶解感染
治療	・cART(HIV陽性患者) ・免疫抑制剤の減量中止 (HIV陰性患者) ・血漿交換 (natalizumab治療患者)	・古典的PMLに準ずる ・脳ヘルニアによる症状の増悪があればステロイド剤検討	・古典的PMLに準ずる

※IRIS: immune reconstitution inflammatory syndrome; cART: combination anti-retroviral therapy

非HIV-PMLに対する治療は今回の症例のようにPMLの中で一番予後不良であると考えられ, JCV自体に作用する薬剤・治療戦略が必要であり, 今後の研究に期待する。

E. 結論

臓器移植後で自己免疫性疾患を合併する非HIV-PML症例を報告した。本例は経時的に頭部MRIや髄液JCV DNAの測定が出来ており, 臨床的に貴重であると考えられた。髄液JCV DNAは誘発薬剤中止の効果を示す一方, メフロキンのJCVに対する効果は限定的であった。脳生検では一部炎症細胞浸潤が見られたことが特徴であった。最終的に原疾患に伴うGVHDのため, 誘発薬剤を一部再開せざるを得ず, 陰転化していた髄液JCV DNAが陽性となり, PMLが再燃し不帰の転帰となった。

[参考文献]

- 1) Mateen FJ, Muralidharan R, Carone M, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in transplant recipients. *Ann Neurol* 70:305-322, 2011.
- 2) Marzocchetti A, Tompkins T, Clifford DB, et al. Determinants of survival in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology* 73:1551-1558, 2009.

3) Tan CS, Koranik IJ. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis. *Lancet Neurol* 9:425-437, 2010.

4) Shah R, Bag AK, Chapman PR, et al. Imaging manifestations of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Clin Radiol* 65:431-439, 2010.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 水澤英洋, 岸田修二, 西條政幸, 雪竹基弘, 宍戸-原由紀子, 澤 洋文, 長嶋和郎, 奴久妻聡一, 山田正仁. 進行性多巣性白質脳症(Progressive multifocal leukoencephalopathy : PML). 第52回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.20, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

進行性多巢性白質脳症の核内ウイルス封入体 電子顕微鏡と超解像顕微鏡(SIM)による解析から

研究分担者：宍戸-原 由紀子 杏林大学医学部病理学教室

研究要旨 進行性多巢性白質脳症をきたす JC ポリオーマウイルスは、oligodendroglia 核内の PML-NBs で複製する。そこで、JC ウイルス感染における PML-NBs の病理学的意義を検討した。我々は既に、JC ウイルス後期領域の agnogene、VP1、VP2/VP3 を含むゲノム断片を cDNA 発現ベクターに組み込み、virus-like particle (VLP)を産生する系を樹立している。Full-length agnogene を含む発現ベクター WT/AVP231 と、agnogene の 5'領域 135-bp を欠失させた発現ベクター dl-Mt/VP231 を比較し、抗 VP1 抗体を用いた免疫電顕法で解析した。WT/AVP231 導入細胞では、PML-NBs に限局して集積した VP1 蛋白が、一様な VLP に効率よく会合した。細胞超微形態は著しく変性していた。一方、dl-Mt/VP231 導入細胞では、VP1 蛋白はより広い核内領域に分布し、形態多様な VLP が形成された。細胞超微形態の変性は軽度であった。進行性多巢性白質脳症のヒト脳組織を超解像顕微鏡法(SIM)で解析すると、PML-NBs は直径約 700 nm の球状殻で、VP1 はその外表面に局在していた。これらの結果から、感染性のある子ウイルスは PML-NBs 外表面で産生されると考えられる。また agnogene は異所性の粒子形成を抑制している可能性がある (*Am J Pathol*, in press)。

A. 研究目的

進行性多巢性白質脳症では、JC ウイルスが oligodendroglia の核内ドメイン、PML-NBs で複製し、ドット状の封入体を形成する(文献 1-3)。今年度の研究では、進行性多巢性白質脳症の発症における PML-NBs の病理学的意義を検討する。

B. 研究方法

我々は既に、JC ウイルス後期領域のゲノム断片を cDNA 発現ベクターに組み込み、virus-like particle (VLP)を産生する系を樹立している(文献 4, 5)。Full-length agnogene、VP1、VP2/VP3 を含むゲノム断片を含む発現ベクター WT/AVP231 と、これより agnogene の 5'領域 135-bp を欠失させた発現ベクター dl-Mt/VP231 を各々 COS-7 細胞に導入し、電子顕微鏡法で、VP1 蛋白の核内分布の相違や、ウイルス粒子の形態、細胞超微形態などを比較した。また、進行性多巢性白質脳症のヒト脳組織を超解像顕微鏡法(SIM)で観察し、PML-NBs における VP1 蛋白の局在を解析した。

(倫理面への配慮)

JC ウイルス後期領域の発現実験は、P2 実験室で行った。また、本研究方法による組織提供者への不利益は発生しない。

C. 研究結果

培養細胞における実験系で、WT/AVP231と、agnogene の 5'領域 135-bp を欠失させた発現ベクター dl-Mt/VP231 を導入して比較すると、WT/AVP231 導入細胞では、PML-NBs に限局して集積した VP1 蛋白が、一様な VLP に効率よく会合していた。また、細胞超微形態は著しく変性していた。一方、dl-Mt/VP231 導入細胞では、VP1 蛋白はより広い核内領域に分布し、形態多様な VLP が形成された。尚、細胞超微形態の変性は軽度であった。

進行性多巢性白質脳症のヒト脳組織を超解像顕微鏡法(SIM)で解析すると、PML-NBs は直径約 700 nm の球状殻で、VP1 はその外表面に局在していた。

D. 考察

進行性多巣性白質脳症のヒト脳組織を超解像顕微鏡(SIM)で解析した結果から、oligodendrogliaの核内では、PML-NBsの外表面で子ウイルス粒子が産生されていることが明らかになった。

培養細胞における実験系で、agnogeneの5'領域135-bpを欠失させると、PML-NBs以外の核内領域で不整な形態を示すVLPが多数形成され、細胞変性も軽度であったことから、PML-NBsでの粒子形成は、感染性のある子ウイルス産生に重要であると考えられる。agnogeneは異所性の粒子形成を抑制し、PML-NBsで限局した子ウイルス産生を促進していることが示唆された。

E. 結論

感染細胞の核内ドメイン、PML-NBsは、感染性のある子ウイルス産生の足場を提供している。

[参考文献]

- 1) Shishido-Hara Y. Progressive multifocal leukoencephalopathy and promyelocytic leukemia nuclear bodies: a review of clinical, neuropathological, and virological aspects of JC virus-induced demyelinating disease. *Acta Neuropathol* 120:403-417, 2010.
- 2) Shishido-Hara Y, Higuchi K, Ohara S, Duyckaerts C, Hauw J-J, Uchihara T. Promyelocytic leukemia nuclear bodies provide a scaffold for human polyomavirus JC replication and are disrupted after development of viral inclusions in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:299-308, 2008.
- 3) 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* 78:9890-9903, 2004.
- 4) Shishido-Hara Y, Hara Y, Larson T, Yasui K, Nagashima K, Stoner GL. Analysis of capsid formation of human polyomavirus JC (Tokyo-1 strain) by a eukaryotic expression system: splicing of late RNAs, translation and nuclear transport of major

capsid protein VP1, and capsid assembly. *J Virol* 74:1840-1853, 2000.

5) Shishido Y, Nukuzuma S, Mukaigawa J, Morikawa S, Yasui K, Nagashima K. Assembly of JC virus-like particles in COS7 cells. *J Med Virol* 51:265-272, 1997.

6) Shishido-Hara Y, Nagashima K. Chapter 8: Synthesis and assembly of polyomavirus virions. In *The human polyomaviruses: molecular and clinical perspectives* (Ed) Khalili K, Stoner GL, John Wiley & Sons Inc, New York, pp149-177, 2001.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shishido-Hara Y, Ichinose Y, Uchihara T. JC virus intranuclear inclusions associated with PML nuclear bodies: Analysis by electron microscopy and structured illumination microscopy. *Am J Pathol*, in press.

2. 学会発表

1) Hineno A, Tabata K, Miki J, Shiozawa S, Shishido-Hara Y, Ikeda S, Oyanagi K. An autopsy case report of smoldering progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) in the arteriopathic leukoencephalopathy. The Second Congress of Asian Society of Neuropathology, Beijing, November 5-6, 2011.

2) 木下通亨, 永松清志郎, 宍戸-原由紀子, 池田修一, 小柳清光. 白質に強い組織崩壊を呈し、皮質にも病変が及んだ進行性多巣性白質脳症(PML)の1例. 第37回上信越神経病理談話会, 松本, 10.8, 2011.

3) Shishido-Hara Y. JC polyomavirus capsid assembly at the promyelocytic leukemia nuclear body (PML-NBs). International union of microbiological societies (IUMS) 2011 congress, 第59回日本ウイルス学会学術集会, Sapporo, September 15, 2011.

4) 宍戸-原由紀子, 内原俊記. 進行性多巣性白質

脳症(PML)のドット状核. ウイルス封入体; JC ウイルスは promyelocytic leukemia (PML) ボディを標的に感染する. 第52回日本神経病理学会, 京都, 6.4, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

JC ウイルス agnoprotein の粒子形態に関する影響

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：鈴木忠樹 国立感染症研究所感染病理部
研究協力者：仙葉慎吾 旭川医科大学医学部生化学講座 細胞制御科学分野
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

研究要旨 進行性多巣性白質脳症は JC ウイルスによって惹起される致死性脱髄疾患である。進行性多巣性白質脳症が稀な疾患であり、JC ウイルスの増殖が遅いことから、その発症機構については未だ不明な部分が多い。本研究分担者はこれまでに、JC ウイルスの転写活性、翻訳効率、複製効率等を評価する方法を用いて、JC ウイルスの感染過程における増殖機構について新しい知見を見出し報告してきた。また、JC ウイルスの細胞感染系を用いて、薬剤が JC ウイルスの増殖に及ぼす影響を検索してきた。本分担研究は、JC ウイルスの後期タンパク質である agnoprotein のウイルス粒子の形成への影響について分子生物学的手法を用いて検索した。その結果、1) 外郭タンパク質であり、ウイルス粒子を構成している後期タンパク質である VP1 は agnoprotein と結合すること、2) agnoprotein の非存在下では JC ウイルスの粒子の形状が一様でなくなること、3) agnoprotein は VP1 の多量体形成を促進していることを明らかにした。得られた結果から、JC ウイルスの後期タンパク質である agnoprotein がウイルス粒子形成に寄与することが示唆された。

A. 研究目的

致死性の中樞神経系脱髄疾患である進行性多巣性白質脳症はポリオーマウイルスに属する JC ウイルスによって惹起される。近年、モノクローナル抗体投与中の症例での進行性多巣性白質脳症の発症が報告され、その関係について多くの報告がなされている^{1), 2)}。また、免疫抑制療法の普及や acquired immune deficiency syndrome (AIDS) の流行に伴い、進行性多巣性白質脳症は社会にとって益々問題になっているが、未だ有効な治療法は確立していない。本分担研究では、ウイルス増殖過程における機能が完全には明らかになっていない JC ウイルスの後期タンパク質である agnoprotein のウイルス粒子の形成への影響を検索することを目的とした基礎研究を行った。本分担研究では進行性多巣性白質脳症の発症機序の解明を最終目的とし、現在治療法の確立していない進行性多巣性白質脳症の対策に資することを旨とする。

B. 研究方法

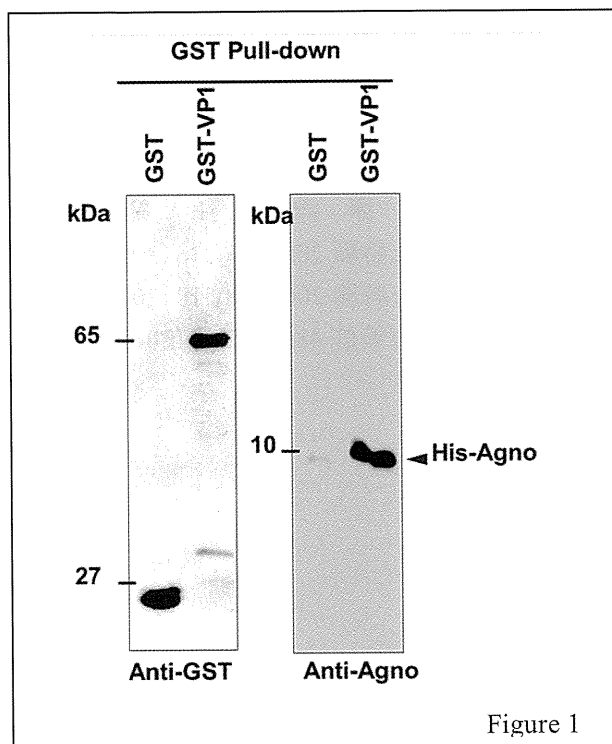
- 1) SV40 が transform したヒト glia 細胞由来の細胞株 SVG-A 細胞、JC ウイルス感受性のヒト由来神経芽細胞腫由来細胞 IMR-32 細胞、および IMR-32 細胞由来の JC ウイルス産生細胞 (JCI 細胞)を用いた³⁾。
- 2) agnoprotein の開始コドンを変更した agnoprotein 欠損 JC ウイルスゲノムは *in vitro* mutagenesis 法で作成し、Bam HI で切断後細胞に導入した。また、JC ウイルス様粒子 (JCV-VLP) および外郭タンパク質 VP1、後期タンパク質 agnoprotein は各々のベクター系を用いて大腸菌もしくは昆虫細胞で発現させた。
- 3) JC ウイルスの粒子形態の観察は、細胞を 2.5% グルタルアルデヒドで 4℃、24 時間固定し、7% sucrose を含んだリン酸緩衝液で洗浄後、1% のオスミウム酸で後固定し、エポンに包埋した。0.1 micrometer の超薄切片作成した後、1.5% の酢酸ウランおよび 0.2% の酢酸鉛で染色し、電子顕微鏡 (Hitachi H-7100, Tokyo, Japan) で観察した。

(倫理面への配慮)

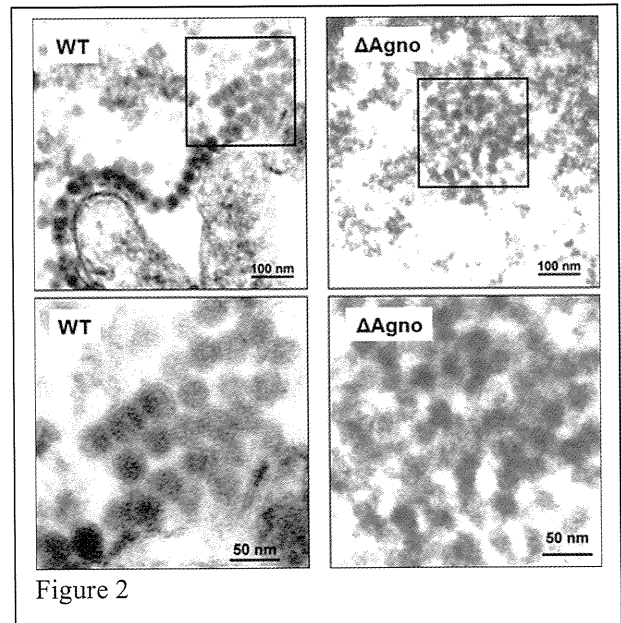
本実験で用いられた JC ウイルスは P2 で扱うべきウイルスであり、本研究は当施設の P2 指定実験室にて安全性に留意して行なわれた。また、本研究の内容は、北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター病原性微生物等安全管理委員会 [実験番号 011 (10)]、北海道大学遺伝子組換え実験等安全委員会 [承認番号 20 (22)] および文部科学大臣から [承認番号 21 学文科審第 6046 号] 承認を得ている。本研究では臨床検体は使用しておらず、動物実験は実施していない。

C. 研究結果

1) GST pull-down 法を用いた結果、VP1 が agnoprotein と結合していることが明らかになった。下記の図は GST で標識した VP1 と His tag を付けた agnoprotein が結合した結果を示している。左のカラムは抗 GST 抗体を用いて VP1 の発現を確認し、右側のカラムは抗 agnoprotein 抗体を用いて VP1 と agnoprotein の結合を確認している (Figure 1)。



2) agnoprotein の非存在下では JC ウイルスの粒子の形状が不均一であった。下記の図に示す様に、野生型 (WT) の JC ウイルスは粒子の形状が均一であるが、agnoprotein を欠損したウイルス (Δ Agno) では粒子の形状が不均一である (Figure 2)。



3) agnoprotein は *in vitro* で VP1 の多量体形成の効率を促進した。下記の図で示す様に、JC ウイルス様粒子 (JCV-VLP) を 10 mM の EGTA および 10 mM DTT の存在下で 4 °C、12 時間透析した後 HiLoad16/60 Superdex 200 pg column chromatography を実施して VP1 の monomer を精製した。その後、精製した monomer を 20 mM CaCl₂ および agnoprotein の存在または非存在下で 120 分反応させた後、Superose 6 3.2/30 column で分画した。Vo は分子量等から粒子、5-mer は VP1 の pentamer、1-mer は VP1 の monomer を表している (Figure 3)。agnoprotein 非存在下では粒子および pentamer の形成が減少していることが明らかになった。

