

129 genotypes. *J Biol Chem* 288:21659-21666, 2013.

2. 学会発表

1) Matsuura Y, Ishikawa Y, Bo X, Murayama Y, Yokoyama T, Somerville RA, Kitamoto T, Mohri S. Quantitative analysis of wet-heat inactivation in bovine spongiform encephalopathy. *Prion* 2013, Banff, May 26-29, 2013.

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 難治性疾患等克服研究事業（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

プリオン感染による細胞膜蛋白質の輸送障害は 選択的であり、発症前に起こる

研究分担者：坂口末廣 徳島大学疾患酵素学研究センター神経変性疾患研究部門
 研究協力者：内山圭司 徳島大学疾患酵素学研究センター神経変性疾患研究部門
 研究協力者：宮田博規 産業医科大学教育研究支援施設動物研究センター

研究要旨 プリオン病の神経変性のメカニズムは不明である。我々は、プリオン感染細胞ではポストゴルジ小胞輸送が障害され、正常プリオン蛋白質(PrP^C)、インスリン受容体、アトラクチンなどの細胞膜蛋白質がゴルジ装置に蓄積し、細胞膜発現が低下することを見出した。また、この細胞膜発現の低下はマウスがプリオン病を発症する以前から起こっていることも見出した。しかし、グルタミン酸受容体のサブユニットである GluR3 や NR1 の細胞膜発現は低下していなかった。PrP^{Sc}は小胞輸送に重要なエンドソーム分画、特にリサイクリングエンドソームに蓄積していた。以上の結果は、プリオンが感染すると、ポストゴルジ小胞輸送が障害され、それによって神経障害がおこる可能性を示した。

A. 研究目的

我々は、プリオン蛋白質遺伝子欠損マウスへのプリオン感染実験から、正常プリオン蛋白質(PrP^C)から異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})への変換がプリオン病の病態に重要であることを報告した¹⁾。しかし、プリオン病の神経変性のメカニズムは不明である。プリオン病の治療法開発には、神経変性のメカニズムを解明することが重要である。本年度は、前回我々が発見したプリオン感染によるポストゴルジ小胞輸送障害について、さらに解析を進めた。

B. 研究方法

マウスへのプリオン感染：ICR マウスの脳内にマウス馴化 RML 及び 22L プリオンを接種した。

細胞膜蛋白質のビオチン化：マウス脳をスライスし、ビオチンを含む PBS 溶液の中で 4℃、一晚反応させた。その後、乳剤化し、アビジンビーズでビオチン化蛋白質を精製しウェスタンブロッティング(WB)に供した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、動物実験委員会の指針の範囲内で行なわれた。

C. 研究結果

PrP^Cと同様に GPI-アンカー蛋白質である Thy-1 も細胞膜発現が低下する：我々は、PrP^Cと同様に GPI-アンカー蛋白質である Thy-1 の細胞膜発現について解析した。プリオン感染マウス脳の細胞膜蛋白質をビオチン化し、アビジンビーズで精製した後、抗Thy-1抗体を用いてWBを行なった。ビオチン化されたThy-1の量は、PBSを接種したコントロールマウスの脳と比べて、RML及び22L感染マウス脳で有意に低下していた(図1)。このことは、プリオン感染脳内におけるThy-1の細胞膜発現が低下していることを示した。

グルタミン酸受容体のサブユニットである GluR3 や NR1 の細胞膜発現は低下しない：我々は、複数回膜貫通型蛋白質であるグルタミン酸受容体のサブユニットである GluR3 や NR1 の細胞膜発現についても解析した。その結果、GluR3 や NR1 の細胞膜発現は、RML 及び 22L 感染マウス脳で低下していなかった(図1)。この結果は、プリオンによるポストゴルジ小胞輸送障害が選択的であることを示唆した。

細胞膜蛋白質の細胞膜発現の低下は、マウスがプリオン病を発症する前から起こっている：RMLプリオン感染後、2日、62-68日、80-87

日、及び末期にマウス脳を摘出し、PrP^Cとインスリン受容体の細胞膜発現を解析した。コントロールとして、PBSを接種したマウス脳を使用した。脳内のPrP^{Sc}は感染後68日から検出でき、病気の進行とともに増加した(図2A)。PrP^Cとインスリン受容体の細胞膜発現は感染後62-68日から低下が始まり、病気が進行するとともに、その低下の割合は増加した(図2B, C)。これらの結果は、PrP^{Sc}の蓄積により、ポストゴルジ小胞輸送障害が引き起こされ、神経変性が起こっている可能性を示唆した。

D. 考察

前回我々は、プリオン感染細胞ではポストゴルジ小胞輸送が障害され、PrP^C、インスリン受容体、アトラクチンなどの細胞膜蛋白質がゴルジ装置に蓄積し、細胞膜発現が低下することを報告した²⁾。また、PrP^{Sc}はエンドソーム分画、特にリサイクリングエンドソームに蓄積することも報告した²⁾。今回我々は、PrP^Cと同様にGPI-アンカー蛋白質であるThy-1も細胞膜発現が低下することを明らかにした²⁾。しかし、グルタミン酸受容体のサブユニットであるGluR3やNR1は低下しないことも見出した²⁾。さらに、PrP^Cやインスリン受容体の細胞膜発現が、マウスがプリオン病を発症する前から起こっていることも明らかにした²⁾。以上の結果は、プリオン感染による細胞膜蛋白質の細胞膜発現低下がプリオン病の病態に關与する可能性を示した。

E. 結論

プリオンは感染すると、ポストゴルジ小胞輸送障害を引き起こし、それによって神経障害をきたす可能性が考えられた。

[参考文献]

1) Sakaguchi S, Katamine S, Shigematsu K, Nakatani A, Moriuchi R, Nishida N, Kurokawa K, Nakaoka R, Sato H, Jishage K, Kuno J, Noda T, Miyamoto T. Accumulation of proteinase K-resistant prion protein (PrP) is restricted by the expression level of normal PrP in mice inoculated with a mouse-adapted strain of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *J Virol*

69:7586-7592, 1995.

2) Uchiyama K, Muramatsu N, Yano M, Usui T, Miyata H, Sakaguchi S. Prions disturb post-Golgi trafficking of membrane proteins. *Nat Commun* 4:1846, 2013.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Uchiyama K, Miyata H, Sakaguchi S. Disturbed vesicular trafficking of membrane proteins in prion disease. *Prion* 7:1-5, 2013.

2) Kimura T, Sako T, Siqin, Hosokawa-Muto J, Cui YL, Wada Y, Kataoka Y, Doi H, Sakaguchi S, Suzuki M, Watanabe Y, Kuwata K. Synthesis of an (11) C-labeled antiprion GN8 derivative and evaluation of its brain uptake by positron emission tomography. *Chem Med Chem* 8:1035-1039, 2013.

3) Uchiyama K, Muramatsu N, Yano M, Usui T, Miyata H, Sakaguchi S. Prions disturb post-Golgi trafficking of membrane proteins. *Nat Commun* 4:1846, 2013.

4) Kishimoto Y, Hirono M, Atarashi R, Sakaguchi S, Yoshioka T, Katamine S, Kirino Y. Age-dependent impairment of eyeblink conditioning in prion protein-deficient mice. *PLoS One* 8:e60627, 2013.

5) 内山圭司, 坂口末廣. プリオン病における神経変性のメカニズム. *Clin Neurosci* 31:1022-1024, 2013.

6) Uchiyama K, Sakaguchi S. Immunological strategies for the prevention and treatment of prion diseases. In: Sakudo A, Onodera T eds. Prions: Current Progress in Advanced Research, Caister Academic Press, Norfolk, pp75-92, 2013.

2. 学会発表

1) 内山圭司, 臼井 健, 矢野雅司, 坂口末廣. プリオン感染はポストゴルジ小胞輸送を抑制する. 第28回中国四国ウイルス研究会, 広島, 6.22-23, 2013.

2) Sakaguchi S, Uchiyama K. Prions impair post-Golgi trafficking of membrane proteins.

Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.

3) 内山圭司, 坂口末廣. プリオン感染はポストゴルジ小胞輸送を抑制する. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 11.10-12, 2013.

4) 内山圭司, 坂口末廣. プリオン感染はポストゴルジ小胞輸送障害を引き起こす. 第86回日本生化学会大会, 横浜, 9.11-13, 2013.

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

図 1: プリオン感染によるポストゴルジ小胞輸送障害は選択的である。RML 及び 22L プリオン感染マウス脳とコントロールとして PBS を接種したマウス脳の Thy-1, GluR3, NR1 の細胞膜発現を解析した。Thy-1 は感染マウスで低下していたが、GluR3 と NR1 は低下していなかった。

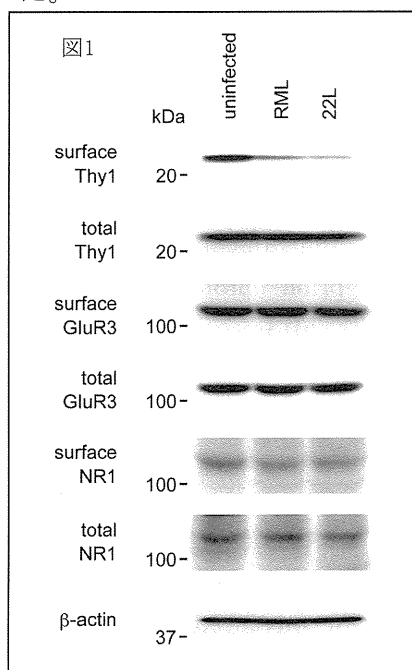
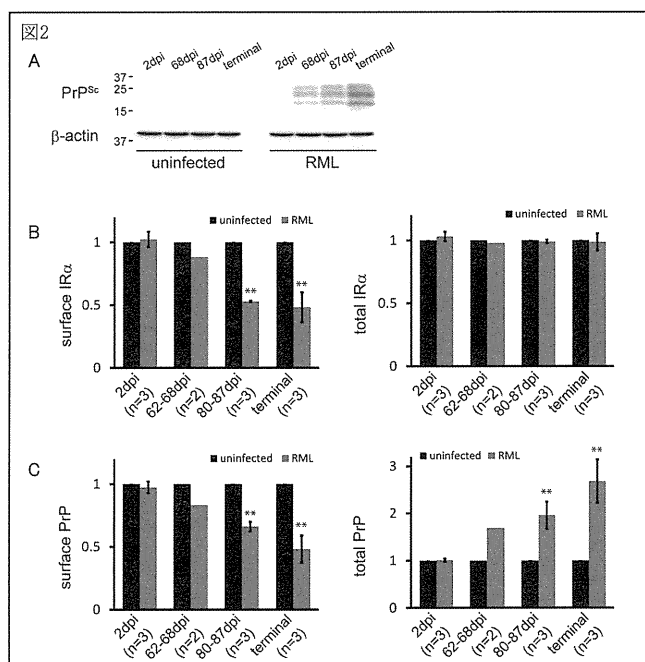


図 2: プリオン感染によるポストゴルジ小胞輸送障害は発症前から起こる。(A) 脳内の PrP^{Sc} も感染後 68 日から検出でき、病気の進行とともに増加した。RML プリオン感染後、2 日、62-68 日、80-87 日、及び末期にマウス脳を摘出し、PrP^C とインスリン受容体の細胞膜発現を解析した。コントロールとして、PBS を接種したマウス脳を使用した。インスリン受容体 (B) と PrP^C (C) との細胞膜発現は感染後 62-68 日から低下が始まり、病気が進行するとともに、その低下の割合は増加した。



厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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

異常プリオン蛋白質の性状解析に関する研究

研究分担者：横山 隆	動物衛生研究所インフルエンザ・プリオン病研究センター
研究協力者：宮澤光太郎	動物衛生研究所インフルエンザ・プリオン病研究センター
研究協力者：舩甚賢太郎	動物衛生研究所インフルエンザ・プリオン病研究センター
研究協力者：多辺田奈保子	動物衛生研究所インフルエンザ・プリオン病研究センター
研究協力者：三輪律子	動物衛生研究所インフルエンザ・プリオン病研究センター
研究協力者：岡田洋之	動物衛生研究所インフルエンザ・プリオン病研究センター

研究要旨 2頭のスクレイピー実験感染羊の脳および脾臓に存在するプリオンの性状を明らかにするために、野生型マウスおよび羊型プリオン蛋白質過発現マウスへの伝達試験と蓄積する異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})のバンド型を解析した。脳に蓄積した PrP^{Sc} 型とプリオンの生物学的性状は一致していたが、脾臓からは複数のプリオン株が検出され、末梢組織の PrP^{Sc} 型別はプリオンの株、種類と一致しないことが示された。スクレイピーでは、末梢から中枢神経への伝播の際にプリオン株の選択が生じていると考えられた。

A. 研究目的

プリオンの主要構成成分である異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})は、プリオン株によって分子量、糖鎖型に違いが認められる例も知られている。牛海綿状脳症(BSE)由来 PrP^{Sc} とスクレイピー由来 PrP^{Sc} では、プロテイナーゼ K(PK)消化後の分子量、糖鎖型に明瞭な差が認められるが、多くのスクレイピー株では、生物学的性状の異なる株でも PK 消化後のバンドに違いは認められない。一方、スクレイピー感染動物の脳内に蓄積する PrP^{Sc} が、不均一な集合体であることが示唆されており、プリオン株の性状解明には、PrP^{Sc} をさらに分類する手法が必要である。プリオン株の選択・変異の機構を明らかにすることを目指して、各種蛋白質分解酵素に対する抵抗性とその際に出現する断片を指標とした、PrP^{Sc} の性状解析ならびにプリオン株の分類を行う。

B. 研究方法

PrP^{Sc} のバンド型とプリオンの生物学的性状を比較するため、スクレイピー実験感染羊の脳と脾臓からの PrP^{Sc} の検出ならびに野生型マウス、羊型 PrP 過発現マウスへの伝達試験を行った。

(倫理面への配慮)

プリオン感染動物および材料の取り扱いには動物衛生研究所内のバイオセーフティレベル(BSL)2(スクレイピープリオン)または3(その他のプリオン)実験施設にて行い、汚染物は135℃、30分間のオートクレーブ処理等により不活化した。すべての実験は動物衛生研究所バイオセーフティ委員会、実験動物委員会の許可を受けて実施した。

C. 研究結果

2種類のスクレイピー実験感染羊の脾臓を羊型 PrP 過発現マウスおよび野生型マウスを用いて伝達試験を行った。野生型マウスに定型スクレイピーは伝達するが、CH1641 様スクレイピーは伝達しない。また羊型 PrP 過発現マウスは CH1641 様スクレイピーに高感受性を示す。この両マウスの選択性を利用して存在するプリオンを推定した。脳からは1種類のプリオンが検出されたが、脾臓には複数のプリオン株が混在していることが示された。脾臓では、主に存在するプリオンが組織での PrP^{Sc} の型別に影響していた。しかし、伝達試験では、使用したマウスに感受性のプリオンが分離された。

D. 考察

スクレイパーの末梢から中枢神経への伝播の際に株の選択が生じていると考えられた。株の選択または変異に伴う、新興プリオン病の出現の一端を示すものと考えられる。

E. 結論

脳に蓄積したプリオンの PrP^{Sc} 型と生物学的性状は一致していたが、脾臓からは複数のプリオン株が検出され、末梢組織の PrP^{Sc} 型別はプリオンの株、種類と一致しないことが示された。スクレイパーでは、末梢から中枢神経への伝播の際にプリオン株の選択が生じていると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ushiki-Kaku Y, Shimizu Y, Tabet N, Iwamaru Y, Ogawa-Goto K, Hattori S, Yokoyama T. Heterogeneity of abnormal prion protein (PrP^{Sc}) in murine scrapie prions determined by PrP^{Sc}-specific monoclonal antibodies. *J Vet Med Sci* 76:285-288, 2014.
- 2) Ushiki-Kaku Y, Iwamaru Y, Masujin K, Imamura M, Itohara S, Ogawa-Goto K, Hattori S, Yokoyama T. Different antigenicities of the N-terminal region of cellular and scrapie prion proteins. *Microbiol Immunol* 57:792-796, 2013.
- 3) Okada H, Miyazawa K, Fukuda S, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Matsuura Y, Fujii T, Fujii K, Kageyama S, Yoshioka M, Murayama Y, Yokoyama T. The presence of disease-associated prion protein in skeletal muscle of cattle infected with classical bovine spongiform encephalopathy. *J Vet Med Sci* 76:103-107, 2013.
- 4) Yoshioka M, Matsuura Y, Okada H, Shimozaki N, Yamamura T, Murayama Y, Yokoyama T, Mohri S. Rapid assessment of bovine spongiform encephalopathy prion inactivation by heat treatment in yellow grease produced in the industrial manufacturing process of meat and bone meals. *BMC Vet Res* 9:134, 2013.
- 5) Iwamaru Y, Takenouchi T, Imamura M, Shimizu Y, Miyazawa K, Mohri S, Yokoyama T, Kitani H. Prion replication elicits cytopathic changes in differentiated neurosphere cultures. *J Virol* 87:8745-8755, 2013.
- 6) Yamamoto T, Ushiki-Kaku Y, Yokoyama T, Hattori S. Sensitivity and specificity of a commercial BSE kit for the detection of ovine scrapie. *Anim Sci J* 84:508-512, 2013.
- 7) Kasai K, Iwamaru Y, Masujin K, Imamura M, Mohri S, Yokoyama T. Heterogeneity of the abnormal prion protein (PrP^{Sc}) of the Chandler scrapie strain. *Pathogens* 2:92-104, 2013.
- 8) Masujin K, Kaku-Ushiki Y, Miwa R, Okada H, Shimizu Y, Kasai K, Matsuura Y, Yokoyama T. The N-terminal sequence of prion protein consists an epitope specific to the abnormal isoform of prion protein (PrP^{Sc}). *PLoS One* 8:e58013, 2013.
- 9) Matsuura Y, Ishikawa Y, Bo X, Murayama Y, Yokoyama T, Somerville RA, Kitamoto T, Mohri S. Quantitative analysis of wet-heat inactivation in bovine spongiform encephalopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 432:86-91, 2013.
- 10) Matsuura Y, Iwamaru Y, Masujin K, Imamura M, Mohri S, Yokoyama T, Okada H. Distribution of abnormal prion protein in a sheep affected with L-type bovine spongiform encephalopathy. *J Comp Pathol* 149:113-118, 2013.
- 11) Okada H, Iwamaru Y, Yokoyama T, Mohri S. Immunohistochemical detection of disease-associated prion protein in the peripheral nervous system in experimental H-type bovine spongiform encephalopathy. *Vet Pathol* 50:659-663, 2013.
- 12) Hasegawa K, Mohri S, Yokoyama T. Comparison of the local structural stabilities of mammalian prion protein (PrP) by fragment molecular orbital calculations. *Prion* 7:185-191, 2013.
- 13) 横山 隆. 牛海綿状脳症(BSE). *Clin Neurosci* 31:1029-1031, 2013.
- 14) Yokoyama T. Bovine spongiform encephalopathy and scrapie. In: Sakudo A, Onodera T, Eds. Prions: Current Progress in

Advanced Research, Casiter Academic Press, Norfolk, pp93-110, 2013.

2. 学会発表

1) Yokoyama T, Masujin K, Miyazawa K, Matsuura Y, Iwamaru Y, Imamura M, Fukuda S, Okada H, Murayama Y. Inter- and intra-species transmission of atypical BSEs. Animals TSEs workshop, Banff, May 26, 2013.

2) Yokoyama T, Kasai K, Iwamaru Y, Masujin K, Imamura M, Mohri S. Heterogeneity of the abnormal prion protein (PrP^{Sc}) of the Chandler scrapie strain. Prion 2013, Banff, May 27-29, 2013.

3) An SS, Lim K, Youn YC, Bagyinszky E, Segarra C, Kang S, Yokoyama T, Coste J, Kim SY. Blood detection of scrapie sheep at pre-clinical stages: blinded study by using multimer detection system. Prion 2013, Banff, May 27-29, 2013.

4) Masujin K, Tabeta N, Miwa R, Miyazawa K, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. The emergence of novel BSE prions by serial passages of H-type BSE in bovinized mice. Prion 2013, Banff, May 27-29, 2013.

5) Miyazawa K, Okada H, Masujin K, Yokoyama T. Characterization of Japanese field scrapie isolates by GT1-7 cells. Prion 2013, Banff, May 27-29, 2013.

6) Fukuda S, Fujii T, Kageyama S, Okada H, Yokoyama T, Murayama Y. Detection specificity of salivary BSE PrP^{Sc} by PMCA. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.

7) Masujin K, Tabeta N, Miwa R, Miyazawa K, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. The emergence of novel BSE prions by the serial transmission of H-type BSE in bovinized mice. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.

8) Miyazawa K, Okada H, Masujin K, Iwamaru Y, Yokoyama T. Transmissible properties of field scrapie isolates to GT1-7 cells. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.

9) Yokoyama T, Sohn HJ. Bovine spongiform encephalopathy (BSE) and other transmissible spongiform encephalopathies (TSEs): Current status and research topics. 1st International Interscience Conference on Infection and Chemotherapy, Seoul, November 7, 2013.

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 難治性疾患等克服研究事業（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

プリオン病の治療予防に関する基礎研究

研究分担者：堂浦克美 東北大学大学院医学系研究科・神経化学分野
 研究協力者：小熊 歩 東北大学大学院医学系研究科・神経化学分野
 研究協力者：西澤桂子 東北大学大学院医学系研究科・神経化学分野
 研究協力者：逆瀬川裕二 東北大学大学院医学系研究科・神経化学分野
 研究協力者：倉橋洋史 東北大学大学院医学系研究科・神経化学分野

研究要旨 プリオン病の治療予防開発に役立つ基礎研究として、糖誘導体の作用機序に関する研究を行った。プリオン病は希少疾患で疾患感受性に関する宿主因子は全く不明であるが、日常的に経口摂取している糖誘導体の効果は動物の系統により明瞭な違いが見られることより、糖誘導体の効果を左右する要因はプリオン病の疾患感受性に関係する可能性がある。ある低感受性マウスではTリンパ球の成熟分化に関する因子に異常があることから、各種免疫異常動物を用いた検討を行ったところ、マクロファージ機能や胸腺細胞が糖誘導体の効果を左右する要因となっていることが明らかとなった。

A. 研究目的

プリオン病の治療予防開発に役立つ基礎研究として、発病抑制効果をもつ糖誘導体について、作用機序の解明研究を実施した。

B. 研究方法

プリオン感染早発系マウスや各種免疫異常マウスにおける発病抑制に関する評価・解析は、すでに報告している方法(参考文献 1、2)に基づき実施した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験及び動物実験は、所属機関の許可を受けた後に、関連法令等を遵守して実施した。

C. 研究結果

感染ルート(脳内感染、腹腔内感染)や投与ルート(脳室内投与、皮下投与、腹腔内投与)に関係なく糖誘導体の発病抑制効果にはマウスの系統による違いが観察された。代表的には、早発系マウスではTg7マウスで長期にわたる効果が発現するのに対して、頻用される早発系マウスであるTga20マウスでは効果の発現は極めて乏しかった。プリオン株による効果の違いは、

マウス系統による効果の違いほどは、明らかではなかった。極めて低感受性であるTga20マウスの遺伝子異常を調べたところ、トランスジェンがpre-T cell receptor alpha遺伝子の第一イントロンに挿入されているため、同遺伝子の発現が胸腺で検出されないことが判明した。文献的に検討したところ、そのためTga20マウスでは $\alpha\beta$ TCR(T cell receptor)陽性T細胞が少なく、逆に $\gamma\delta$ TCR陽性T細胞が増加している免疫異常があることが報告されていた(参考文献3)。そこで、Tga20マウスで見られる何らかの免疫異常が糖誘導体の低感受性に関与していると考え、各種免疫異常動物を用いて検討したところ、CD4陽性T細胞異常動物、CD8陽性T細胞異常動物、 $\alpha\beta$ TCR陽性T細胞異常動物さらには $\gamma\delta$ TCR陽性T細胞異常動物では糖誘導体の効果は影響をうけなかった。しかしながら、マクロファージ機能を修飾するチオグリコレート投与やシリカ投与の処置では糖誘導体の効果に影響が見られた。また、新生児期に胸腺摘出を行った場合にも糖誘導体の効果に顕著な影響が見られた。

D. 考察

プリオン病は、患者の約 8 割は感染源が不明な致死性神経難病であり、高齢化社会が進むにつれ

患者数は年々増加している。発病が稀であり、特定の宿主因子や外的因子との関連が考えられているが、これまでの疫学的調査では医療的行為を受けたこと(参考文献 4)がリスクファクターとして挙げられているものの、疾患感受性に関わる因子群の解析については、日本人の孤発性 CJD の多くが共通のクラス II 主要組織適合性抗原 (HLA-DQw3) を有していることが以前に報告(参考文献 4)されているのみである。

今回の研究では、糖誘導体のプリオン病発病抑制効果にマウス系統差があり、免疫系因子が効果の差異に関与していることが判明した。具体的には、マクロファージ機能が影響した。また、T 細胞機能も関係していると考えられた。 $\alpha\beta$ TCR 陽性 T 細胞が糖誘導体の効果を増強、あるいは $\gamma\delta$ TCR 陽性 T 細胞が糖誘導体の効果を抑制しているのではないかと考えたが、これらの T 細胞と糖誘導体効果の関連は認められなかった。しかし、胸腺細胞の除去は、糖誘導体の効果を顕著に増強したため、糖誘導体の作用機序に胸腺は関与している。糖誘導体の作用機序解明は、プリオン病に対する疾患感受性機構の解明につながる可能性があり、引き続き解明研究を続ける必要がある。

E. 結論

糖誘導体のプリオン病発病抑制効果にマクロファージ機能や胸腺細胞が関与しており、糖誘導体の効果発現は疾患感受性とも関連しているものと考えられる。

[参考文献]

- 1) Hamanaka T, Sakasegawa Y, Omoto A, Kimura T, Ando T, Doh-ura K. Anti-prion activity of protein-bound polysaccharide K in prion-infected cells and animals. *Biochem Biophys Res Commun* 405:285-290, 2011.
- 2) Kawasaki Y, Kawagoe K, Chen CJ, Teruya K, Sakasegawa Y, Doh-ura K. Orally administered amyloidophilic compound is effective in prolonging the incubation periods of animals cerebrally infected with prion diseases in a prion strain-dependent manner. *J Virol* 81:12889-12898, 2007.
- 3) Zabel M, Greenwood C, Thackray AM, Pulford B, Rens W, Bujdosó R. Perturbation of

T-cell development by insertional mutation of a PrP transgene. *Immunology* 127:226-236, 2009.

- 4) 黒田康夫. クロイツフェルト・ヤコブ病(2) 疫学. 山内一也・立石潤・監修 スローウイルス感染とプリオン, 近代出版, 東京, pp186-196, 1995.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishizawa K, Oguma A, Kawata M, Sakasegawa Y, Teruya K, Doh-ura K. Efficacy and mechanism of a glycoside compound inhibiting abnormal prion protein formation in prion-infected cells: implications of interferon and phosphodiesterase 4D interacting protein. *J Virol*, in press.
- 2) Teruya K, Doh-ura K. Amyloid-binding compounds and their anti-prion potency. *Curr Top Med Chem* 132:522-2532, 2013.
- 3) 倉橋洋史, 堂浦克美. プリオン病の診断と治療. プリオン病治療の現状と展望. *Clin Neurosci* 31:1093-1095, 2013.

2. 学会発表

- 1) Doh-ura K. Drug discovery for prion diseases: dream and reality. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.
- 2) Sakai E, Sakasegawa Y, Doh-ura K. Glycerol enhances the PrPres production via a PI3K signaling pathway in prion-infected neuroblastoma cells. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.
- 3) Kurahashi H, Oishi K, Arai C, Ishiwata M, Chan-Gi Pack, Sako Y, Doh-ura K, Nakamura Y. Mechanisms of anti-prion factors in yeast. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.
- 4) 逆瀬川裕二, 西澤桂子, 堂浦克美. プリオン複製に関わる宿主因子の細胞生物学的および生化学的な探索アプローチ. 第 86 回日本生化学会大会, 横浜, 9.11-13, 2013.

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 難治性疾患等克服研究事業（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

抗プリオン活性を有する薬剤の 新規ハイスルーブットスクリーニング系の構築

研究分担者：堀内基広 北海道大学大学院獣医学研究科獣医衛生学教室
研究協力者：山崎剛士 北海道大学大学院獣医学研究科獣医衛生学教室
研究協力者：単 智夫 北海道大学大学院獣医学研究科獣医衛生学教室

研究要旨 プリオン持続感染細胞から、タンパク分解酵素処理を用いずに異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) を検出可能な Cell ELISA を構築した。96 ウェルプレートに細胞を播種して薬剤処理後、WST 試験により薬剤の細胞毒性を評価する。続いて、ウェル内で細胞を固定、グアニジンチオシアン酸処理を行った後、抗 PrP モノクローナル抗体 mAb132 を用いて ELISA に準じて PrP^{Sc} を検出することで、タンパク分解酵素処理を行わずに、すべての工程を同一プレート内で完結させることが可能となった。この方法は、1 log 程度のダイナミックレンジを有することから、抗プリオン活性を有する薬剤のハイスルーブット一次スクリーニング系として有用と考えられる。

A. 研究目的

プリオン持続感染細胞は、異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の産生を指標として、プリオン増殖阻害活性を有する薬剤のスクリーニング系として使用されてきた。殆どの場合、PrP^{Sc} を検出する際に正常型プリオンタンパク質 (PrP^C) を除去する目的でタンパク分解酵素を使用しているが、PrP^{Sc} はタンパク分解酵素感受性と抵抗性の画分が存在し、タンパク分解酵素感受性の PrP^{Sc} に、より高い感染性および PrP^C を構造転換させる活性が付随している。しかし、タンパク分解酵素処理工程を含むスクリーニング系では、タンパク分解酵素感受性の PrP^{Sc} は検出されない。また、これまで使用されてきたプリオン持続感染細胞を用いるスクリーニング系では、細胞溶解液を作製してフィルターに移す操作、あるいは細胞溶解液を遠心により濃縮してから、ELISA 用プレートに移す操作など、煩雑な操作を伴う (1, 2)。当教室で作製した抗 PrP モノクローナル抗体 mAb132 は、細胞や組織切片をグアニジンチオシアンサン塩 (GdnSCN) などのカオトロピック試薬により前処理する必要はあるが、タンパク分解酵素の処理なしに、PrP^{Sc} を検出可能である (3, 4)。そこで、mAb132 を用いて、プリオン持続感染細胞から、タンパク分解酵素処理を必要としない

PrP^{Sc} 検出系の構築を試みた。

B. 研究方法

プリオン持続感染細胞 (ScN2a3-22L) および悲感染細胞 (N2a3) を 96 ウェルプレートに 1×10^4 /well で播種した。72-96 時間培養後、細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 10 分間固定した。細胞を 0.1M glycine-0.1% Triton X-100 を含む PBS で 10 分間処理した後、5M GdnSCN で 10 分間処理した。続いて細胞を 5% 牛胎児血清を含む PBS でブロッキングした後、一次抗体として mAb132、二次抗体として HRP 標識抗マウス免疫グロブリンヤギ抗体を用いて抗体反応を行った。TMB を加えて発色反応を行い、硫酸を加えて発色反応を停止した後、プレートリーダーにて吸光度 (OD450 nm) を測定した。

薬剤による細胞毒性を評価するために、薬剤処理後、細胞を固定する前に、WST 試薬 (Cell counting kit 8) を加え、450nm の吸光度を測定した後、ウェルを PBS で洗浄、PrP^{Sc} 検出用の操作を行った。

(倫理面への配慮)

プリオンを取り扱う実験は、北海道大学病原体安全管理委員会により承認を受け、北海道大学病原体安全管理取扱いマニュアルに従って

実施した。

C. 研究結果

予想通り、mAb132を用いた場合、GdnSCNの前処理を行ったプリオン持続感染細胞 ScN2a3-22LからPrP^{Sc}の検出が可能であった。GdnSCN前処理を行わない場合、および非感染細胞は陰性であった(図1)。以降、この検出系をCell ELISAと呼ぶ。

Cell ELISAの検出感度を調べるために、ScN2a3-22Lの播種数を2倍段階希釈により減らしたところ、ScN2a3-22L数が1/8では陽性となるが1/16で陰性となったことから、Cell ELISAによるPrP^{Sc}検出は、約1 Logのダイナミックレンジを有することが判明した(図2)。

PrP^{Sc}の産生を阻害することが知られている硫酸ペントサン(PPS)でScN2a3-22Lを処理した場合、PPS濃度依存的にScN2a3-22Lから検出されるシグナルが減少することが確認された(図3)。

抗プリオン活性を有する薬剤のハイスループット一次スクリーニングを考えた場合、PrP^{Sc}検出の際に、同じ細胞で細胞毒性を評価できることが望ましい。そこで、PrP^{Sc}検出のために細胞をパラホルムアルデヒドで固定する前に、WST試験により、細胞の活性を評価するステップを加えることを検討した。WST試験の結果から、U18666Aは2.5 μ M以上の濃度で細胞毒性を示すことが判明したが、WST試験を実施した場合と実施しなかった場合ともに、2.5 μ M未満の濃度で、PrP^{Sc}の減少が確認できた(図4)。従って、PrP^{Sc}検出工程の前にWST試験を実施することで、PrP^{Sc}の検出に影響せずに、細胞毒性を評価できることが確認できた。

D. 考察

mAb132を用いることで、プリオン持続感染細胞からELISAによりPrP^{Sc}が検出できた(Cell ELISA)。このCell ELISAは、タンパク分解酵素処理を必要としないことから、タンパク分解酵素感受性のPrP^{Sc}も検出可能な点で、従来のスクリーニング系とは異なる。また、細胞を96ウェルプレートに播種後、ウェルの移し変えをすることなく、細胞毒性の評価とPrP^{Sc}量の変化を測定できることから、抗プリオン活

性を有する薬剤の簡便なハイスループットスクリーニング系として有用と思われる。

E. 結論

タンパク分解酵素処理を用いずに、プリオン持続感染細胞からPrP^{Sc}を検出する、抗プリオン活性を有する薬剤のハイスループット一次スクリーニング系であるCell ELISAを構築した。

[参考文献]

- 1) Kocisko DA, Baron GS, Rubenstein R, Chen J, Kuizon S, Caughey B. New inhibitors of scrapie-associated prion protein formation in a library of 2,000 drugs and natural products. *J Virol* 77:10288-10294, 2003.
- 2) Ghaemmaghami S, May BCH, Adam R, Renslo AR, Prusiner SB. Discovery of 2-aminothiazoles as potent anti-prion compounds. *J Virol* 84:3408-3412, 2010.
- 3) Yamasaki T, Suzuki A, Shimizu T, Watarai M, Hasebe R, Horiuchi M. Characterization of intracellular localization of PrP(Sc) in prion-infected cells using a mAb that recognizes the region consisting of aa 119-127 of mouse PrP. *J Gen Virol* 93:668-680, 2012.
- 4) Sakai K, Hasebe R, Takahashi Y, Song CH, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Absence of CD14 delays progression of prion diseases accompanied by increased microglial activation. *J Virol* 87:13433-13445, 2013.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohsawa N, Song CH, Suzuki A, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Therapeutic effect of peripheral administration of an anti-prion protein antibody on mice infected with prions. *Microbiol Immunol* 57: 288-297, 2013.
- 2) Sakai K, Hasebe R, Takahashi Y, Song CH, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Absence of CD14 delays progression of prion diseases

accompanied by increased microglial activation. *J Virol* 87:13433-13445, 2013.

3) Yamasaki T, Baron GS, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Characterization of intracellular dynamics of inoculated PrP-res and newly generated PrPSc during early stage prion infection in Neuro2a cells. *Virology* 450-451:324-335, 2014.

2. 学会発表

1) Horiuchi M, Kabuki H, Hasebe R. Analysis of microglial activation state in brains of prion-infected mice. Prion 2013, Banff, May 26-29, 2013.

2) Hasebe R, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Reaction of complement factors on scrapie-infected primary-cultured neurons temporarily increases permeability of plasma membrane. Asia Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.

3) Kabuki H, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Analysis of microglial activation state in brains of prion-infected mice. Asia Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.

4) Sakai K, Hasebe R, Takahashi Y, Song CH, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Absence of CD14 delays progression of prion diseases accompanied by increased microglial activation. Expanding Prion Horizon 2013, Fort Collins, October 16-18, 2013.

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

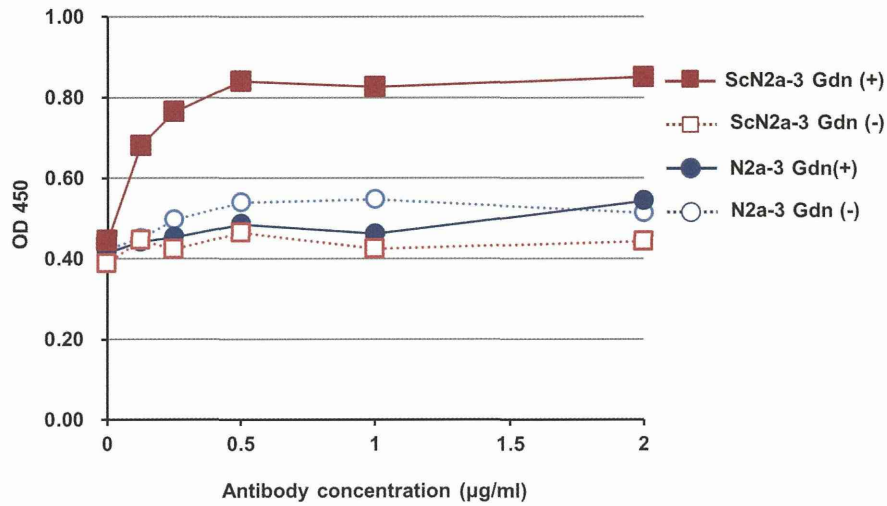


図 1. プリオン持続感染細胞から ELISA による PrP^{Sc} の検出 (Cell ELISA)。

mAb132 を検出用抗体として用いた場合、持続感染細胞を GdnSCN で前処理した場合 (Gdn(+))に、プリオン持続感染細胞 (ScN2a-3) から PrP^{Sc} のシグナルが検出された。

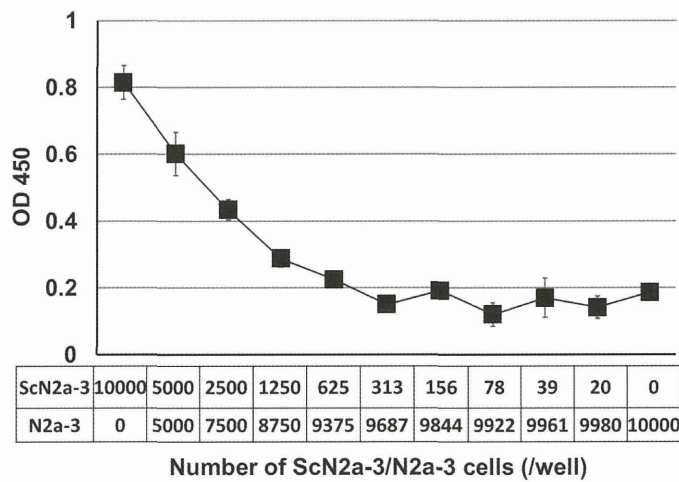


図 2. Cell ELISA の検出感度。

下に 1 ウェルあたりのプリオン持続感染細胞 (ScN2a-3) と非感染細胞 (N2a-3) の播種数を示した。ScN2a-3 の播種数が 1 ウェルあたり 1,250 細胞まで陽性となった。

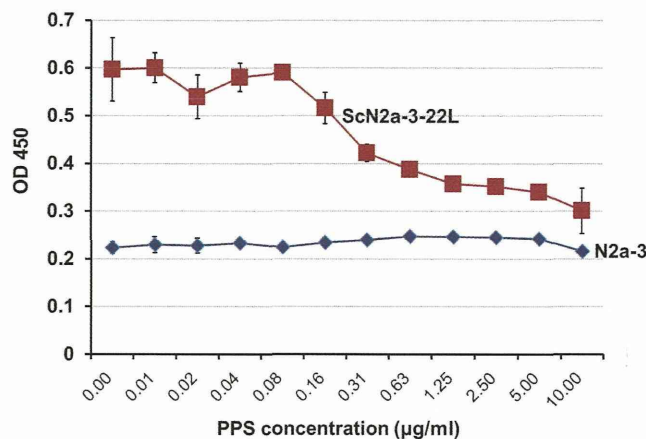


図 3. PPS 処理による PrP^{Sc} の産生阻害。

Cell ELISA により PPS 濃度に依存した PrP^{Sc} 産生阻害が確認できた。

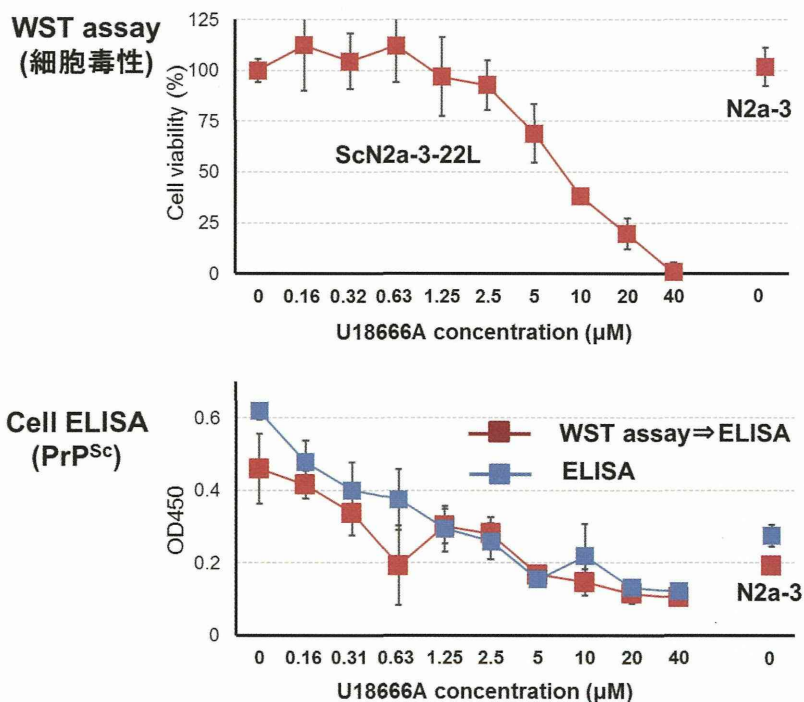


図 4. 細胞毒性評価系を加えた Cell ELISA の構築

U18666A で処理した細胞を PrP^{Sc} 検出直前に WST 試験で細胞の活性を調べた (上図)。WST 試験の追加が、Cell ELISA による PrP^{Sc} の検出に影響するかを調べた (下図)。WST 試験を追加しても、PrP^{Sc} が検出できることが確認できた。

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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

亜急性硬化性全脳炎の全国サーベイランス調査

研究分担者：岡 明 東京大学医学部小児科
研究分担者：鈴木保宏 大阪府立母子保健総合医療センター
研究分担者：吉永治美 岡山大学大学院発達神経病態学
研究協力者：中村由紀子 杏林大学医学部小児科

研究要旨 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) の患者実態を明らかにする目的で全国調査を行ったので報告する。【方法】全国の小児神経医療機関 709 施設，神経内科医療機関 761 施設に郵送による一次調査を行った。SSPE 症例のある施設で家族に同意を得られた症例につき，二次調査票を回収し，結果を検討した。【結果】一次調査は 891/1470 施設 (回収率 60.6%) で 88 症例が集積された。2007 年の全国サーベイランス調査以降の発症者は 15 名であった。二次調査は 33/64 施設 (回収率 51.5%) で 40 症例について解析を行った。性別は男性 20 例，女性 20 例，発症年は 1972 年から 2008 年で，調査時年齢は 13 歳から 49 歳 (平均 26.9 歳) であり，罹病期間 15 年以上は半数以上であった。平均発症年齢は 10 歳 2 か月 (2 歳 6 か月から 22 歳 4 か月) で，15 歳以降の発病が 5 例，うち 1 例は成人期に発病していた。初発症状は知的退行が最も多く，歩行障害や失立発作等の Jabbour 分類による病期 II 期の症状を初期から認める例も多かった。発症後は多くの症例 (31 例中 19 例) で 1 年以内に急速に進行しており，15 歳以降の発病者について同様の傾向であった。現在の治療はイノシンプラノベクス内服が最も多く，インターフェロン脳室内・髄腔内投与 15 例，リバビリン投与 4 例であり，インターフェロンやリバビリン治療を現在も継続して行なっている患者は限られていた。現在の病気分類では Jabbour IV 期 19 例，V 期 15 例と進行例が 85% であり，医療的ケアも 32 例 (80%) で行われていた。最近の病状は不変あるいは悪化傾向にある患者がほとんどで，多くの患者では罹病期間が長期化する中で，現在の治療法では慢性緩徐進行性にあると考えられた。【結論】今回の調査では，患者総数としてはやや漸減傾向にあることが示唆されたが，新規発症例は 2007 年の前回調査以降も認められており，今後は現在行われている麻疹対策により SSPE 発病数の減少が認められるかどうかを明らかにすることが重要である。今回の調査では，ほとんど患者は重症で医療的ケアを必要としながら在宅療養をしていることが明らかになった。こうした成人期で長期療養にある患者の生活環境についての調査は今後重要であり，臨床像に合わせ治療や介護，在宅支援などの方法を検討する必要がある。

A. 研究目的

我が国はこれまで先進国の中で唯一の麻疹流行国とされてきており，平成 19 年に国は麻疹排除計画を策定することにより平成 21 年以降は麻疹の総数は激減し，現在ではほぼ国内での水平感染による新規発症は抑制されている。しかし，麻疹は急性期に重篤な全身症状を来すだけでなく，最も重篤な神経後遺症は慢性期に発症する SSPE である。SSPE は麻疹罹患した後，約 10 年間潜伏後に発症することから，麻疹がほぼ撲滅された我が国では，今後も当分の間は

SSPE の発症は続くものと想定される。

SSPE の患者数などの実態調査は，1990 年から 2001 年までに 3 回の全国規模での調査が行われている。これによれば我が国での患者総数は約 100～200 名程度と推測がされてきた。

①1990 年二瓶健次等は，当時のイノシプレックス-SSPE 研究会での症例データをもとに調査を行い，151 名 (男 66 名，女 59 名) と報告している。

②2003 年に中村好一，飯沼一字等は特定疾患治療研究事業の臨床個人調査票を用いた調査を

行い患者数は125名(男66名、女59名)と報告している(脳と発達 35:316, 2003)。

③2007年に本研究班による全国調査サーベイランス 2007では、SSPE 特異的な抗ウイルス薬であるイノシンプラノベクス処方医療機関を対象に全国調査を行い118名(男65名、女53名)と報告をしている。(飯沼一宇・細矢光亮等、平成21年度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報告書)。サーベイランス 2007 調査時点での患者さんの年齢は4~39歳(平均21歳8か月)で成人が多く経過の慢性化が指摘されていた。この調査結果からは、本疾患の深刻な経過予後と厳しい実態であることが明らかとされ、現在進められているリハビリ治療など、より有効な治療法の必要性が示された。

現在、我が国の麻疹撲滅の一環として麻疹については全数調査対象となり、発症数が把握されている。一方で、重症であるSSPEについては報告体制が不十分であり、小児慢性特定疾患事業や特定疾患治療事業を通じて報告される情報のみとなっている。この2つの事業は対象年齢が異なっており、また小児慢性特定疾患事業では年齢によって制度の利用率が変化するため、必ずしも現状では実態を把握するには最適であるとは言えない。さらに、臨床情報を記載した調査票の記載内容などは、不十分な記載であったり、また中央への入力が十分でないなど、SSPEの患者情報等について全国的なデータを得られる環境にない。

本研究班によるサーベイランス 2007以降のSSPE患者の実態については不明であり、厚生労働行政などに役立つ基礎資料もなく、例えば麻疹自体が減少している今日、新規発症数も不明である。こうしたことから、医学的および医療政策の基礎となる資料を得ることを目的に、本研究班ではSSPEの実態調査を2012年に行った。

昨年度、一次調査結果および二次調査の途中経過を報告したが、今年度は二次調査結果について解析し報告する。

B. 研究方法

サーベイランス調査として回答率を上げるために、患者数と新規発症患者を把握すること

を目的として一次調査と、詳細な二次調査とに分けて調査を行った。

【一次調査】

一次調査では、診療中の患者数、性別、生年月日、年齢、2007年以降の発症者数を調査した。また、二次調査についても、過去の調査内容を含め検討し、調査内容の整理を行い、調査票を作成した(図1)。

【調査対象】

全国の小児科小児神経科医療機関710施設(療育施設含む)および神経内科医療機関761施設の合計1471施設に一次調査票を送付した。

【二次調査】

一次調査にて現在診療中の患者ありと回答した医療施設の中で、二次調査可能との回答を得た医療機関に対し二次調査票を送付した(図2)。

前回のサーベイランス時にある程度詳細な情報を報告すみのケースについては、簡便なその後の変化についての記載のみを求めるとし、また、各サーベイランス委員を介して直接医療機関に二次調査への協力を依頼するなどして協力数を確保するよう努力した。

(倫理面への配慮)

本調査については杏林大学倫理委員会に申請し平成23年11月28日承認を受けた。

C. 研究結果

1) 二次調査結果

①調査対象数

一次調査で現在患者を診療しているほぼすべての医療機関が二次調査への協力が可能との回答が得られたため、64医療機関に二次調査票を送付した。患者家族の書面による同意が得られ回答を得ることができたのは、64施設中回答が得られたのは33施設で回収率は51.5%であった。患者数としては40名分の調査票を回収することができた。

②患者発症年齢、罹病期間

平均発症年齢は10歳2か月で、15歳以降の発症が5例、うち1例は成人期に発症していた(図3 発病年齢と二次調査時患者年齢)。

また、罹病期間については15年以上が約半

数と長期化していた(図 4 罹病期間と年齢)。

③麻疹の罹患時期と潜伏期間

32 名では、麻疹の発症時年齢と SSEP の発症年齢が明らかであり、潜伏期間が推測可能であった(図 5 麻疹罹患年齢と潜伏期間、図 6 麻疹罹患と発病年齢)。麻疹の罹患時期は全例 6 歳未満であり、特に 2 歳未満に集中していた。5 歳台が麻疹罹患後の SSPE 発症の臨界時期である可能性がある。罹患年齢と潜伏期間の関係は特に認められなかったが、2~5 歳で発症した早期例は全例が 1 歳未満の発症であった。

麻疹を罹患した年が明らかな 31 例について傾向を見ると、2002 年以降に罹患して発症した例はいなかった。潜伏期間の平均が約 10 年であり、今後も発症の動向を注意して観察する必要がある(図 7 麻疹を罹患した年)。

④発症年毎患者数

一次調査の結果から、2000 年以降も年間 3 名程度の発症患者が認められていた。2007 年の調査の段階で、1995 年以前が 5~10 例/年と想定され、1995 年以降は 1~5 例/年程度と考えられていた。従って 2007 年以降もほぼ同様の新規発症例を年間認めている。

二次調査回答のあった 40 名の中でも、現時点では、特に発症数が減少している傾向は認められなかった(図 8 発病年毎患者数(人))。

⑤初発症状(図 9)

初発症状として記載の中では、知的退行が最も多く、次いで歩行障害であった。Jabbour 分類による病期分類(図 10)では、I 期に性格変化や知的退行があり、その後 II 期以降に失立発作や歩行障害などの運動症状を呈すると示されている。初発症状の記載としては II 期の症状の記載も多かった。

⑥発症後の疾患の進行

発症後の経過や進行についての記載より、発病後の経過を医療的ケアなどの必要となるまでの時期によって分類した(図 11 発病後の経過)。ほとんどの症例(31 例中 19 例)が 1 年以内に急激に進行しており、発病時の進行度が強い傾向が認められた。特に麻疹罹患年齢との関連

は認められなかった。

⑦重症度

(Jabbour 分類による病期分類)

SSPE による進行度の分類として一般的な Jabbour 分類にて現在の重症度を評価した。III 期以上はほぼ全介助が必要であり、特に IV 期は筋緊張亢進やミオクローヌスなどの神経症状が強く患者の苦痛度も高い時期と考えられる。実際に、IV 期以降の筋緊張コントロールの困難さに言及する記載が散見された。また、症状の進行に伴い、医療ケアや看護負担についての記載も多くみられた。

これまでに回答のあった 40 人中、比較的軽症であったのは、病前まで回復した 1 名、II 期 3 名の 4 名であった。特に IV 期以上の進行例が 34 名であり、重症者が多いことが分かった。特に前回 2007 年の調査と比較して、IV 期の患者が多い傾向が認められた(図 12 現在の重症度、図 13 重症度(2007 年調査との比較))。

罹病期間と重症度との関連を見ると、発症後 5 年を越えた患者については 1 例を除き III 期以上の進行例であった(図 14 罹病期間重症度(Jabbour 分類))。病期 II または III のものは 1 例を除き罹病期間が比較的短い傾向を認める。10 年を越えるとほとんどでの例が病期 IV 以上である。

⑧身体障害者障害等級

身体障害者として不明を除くほぼ全員が最重度である 1 級の認定だった(図 15 重症度 身体者障害等級)。

⑨摂食・呼吸状態

多くの神経疾患の進行例では摂食困難から経管栄養となり、また慢性呼吸不全から気管切開および人工呼吸が必要となる場合がある。重症度および介助度を評価するために、経管栄養(胃瘻を含む)および気管切開、人工呼吸についても質問した。40 名中 32 名が何らかの医療ケアを受けていた。

約 3 分の 2 で経管栄養を行い、約 4 分の 1 で気管切開を施行され、6 分の 1 で人工呼吸管理下であった(図 16 医療的ケアの現状)。

⑩最近の臨床経過

担当医から見た患者の最近の変化について、軽快、不変、徐々に悪化、急速に悪化、改善・悪化を繰り返す、の5つの選択肢から選択し回答する形式とした。不変あるいは悪化傾向にある患者がほとんどであり、多くの患者では現在の治療法では慢性緩徐進行性にあると考えられた(図 17 最近の臨床経過)。

⑪療養状況

在宅、病院、養護施設、その他の中から、主な療養場所を選択し回答する形式とした(図 18 現在の療養場所)。

在宅療養中の患者が多かった。自由記載の中では、介護者の高齢化と在宅療養を支援などの問題の記載が見られた。

表 1 現在の療養場所 2007 年調査との比較

	在宅	病院	施設
2007 年調査	68%	13%	18%
2012 年調査	62%	22%	14%

2007 年調査と比較してやや病院入院中のケースの増加傾向が認められたが、呼吸器感染の悪化と、持続的な筋緊張緩和治療の必要な場合などが主な問題と考えられた。

⑫治療法

SSPE に対する特異的治療法としては、イソプリノシンの内服、インターフェロンの髄注あるいは脳室内注入、リバビリンの髄注あるいは脳室内注入があり、それについて過去に行ったものも含めて回答を求めた。また、SSPE は慢性進行性であるためにこうした治療法は長期間必要な場合が多いため、現在も行っている治療法についても選択し回答をする形式とした(図 19 特異的な治療法)。

多くの患者はイソプリノシンおよびインターフェロンの治療を過去に行っていたが、リバビリンについてはまだ治療法として新しいこともあり使用例は限られていた。また、インターフェロンおよびリバビリンについては現在も使用している患者数は少なかった。

⑬非典型例の検討 思春期以降の発病例

今回の調査では、15 歳以上に発病した高年齢での発病例が 5 例認められた。4 例が初発症状は II 期の症状であった。1 例は I 期の症状で精神症状で発病をしていた。比較的高い年齢で発症した 5 例の全てで発病後の進行が速く、医療的ケアの導入も早期に必用となっていた。長期の潜伏期間後の発病でも、その後の経過は急速であると考えられた。

表 2 思春期以降発症例

	発症年齢	麻疹罹患年齢	発病後の進行	医療的ケアを要するまでの期間	現在の重症度*
1	18 歳 7 月	4 歳	7 か月	2 年 6 か月	IV
2	19 歳 代	不明	1 年 以内	1 年	V
3	18 歳 9 月	2 歳 1 月	7 か月	7 か月	V
4	19 歳 9 月	不明	3 か月	3 か月	V
5	22 歳 4 月	9 月	6 か月	1 年 7 か月	IV

* Jabbour 分類病期

D. 考察

①二次調査の回収率等：昨年度に引き続いて、2012 年に行った全国調査の二次調査について報告した。一次調査では 891 / 1470 施設(回収率 60.6%)で 84 症例が集積された。二次調査は調査に同意が得られた 64 施設中 33 施設から回答が得られ(回収率 51.5%)で 40 症例についての情報が得られた。この回収率については、文書による説明と書面による同意書が必要なことが大きく影響しているものと考えられ、実際に同意が得られなかった旨の連絡もあった。

②患者発症年齢、罹病期間、麻疹罹患時期：年齢分布としては 10 歳から 48 歳で平均年齢 24 歳 10 か月であった。前回 2007 年調査時の 4～39 歳(平均 21 歳 8 か月)と比較して、高齢化の傾向はさらに明らかであった。また 2007 年の

前回調査以降の新規発症患者数は、年間で少なくとも3名程度の発症があるものと考えられた。

今回の調査では SSPE を発病した児の麻疹を罹患した最後は 2001 年であり、麻疹罹患から SSPE 発病までの潜伏期間が 10 年前後であることを考えると、これからも 10 年間程度は新規の SSPE 患者発病は予測され調査を継続する必要がある。幸い、ワクチンの 2 回接種やキャンペーンなどの麻疹撲滅に向けた施策が奏功して麻疹の罹患が減少している今日、本症の発生率は低下することが予測される。なお、今回の二次調査で 1 例は麻疹の罹患歴がなくワクチンのみの接種歴があった。これは以前から指摘されていることではあるが、今後もその点を含めて注意深く経過を見ることが必要である。

罹病期間については、15 年以上が約半数と非常に長期化しており、そうした患者は介護者の高齢化が問題化しており、その点を問題点として指摘するコメントが記載されていた。

③重症度、医療的ケア、療養状況、最近の臨床経過：SSPE で一般的に使用されている Jabbour 分類での重症度では、ほとんどの患者が重症で進行した病気であった。ほぼ全員が要介助である III 期以上であり、特に IV 期の患者が最も多かった。また、IV 期は筋緊張亢進やミオクロヌス等の全身状態が悪化しやすい時期であり、特に医療的な対応を含め支援が必要である。また身体障害者等級でも、ほとんどが 1 級であった。

こうした重症度を反映して経管栄養、気管切開、人工呼吸をはじめとした医療的ケアの必要度は高く、2007 年の調査と単純には比較できないが、どの医療的ケアについても比率が上昇していた。このことは医療的な対応の必要性から、調査時には 22% が入院を要していることにも反映されていると考えられる。

最近の変化として不変あるいは徐々に悪化という回答であり、罹病期間が長期化し、病状が進行した病期 IV 期以上の重症例で、現在も慢性緩徐進行性にある例が多いと考えられた。

④治療法：SSPE に対する特異的治療法としては、より効果が高いと考えられるインターフェロンおよびリバビリンを現在も投与されてい

る患者数は少なく、髄膜炎などの合併症により治療の継続が難しい状況があると示唆された。また最近の傾向として TRH を使用していると回答がでてきており、今後、この点についての調査がさらに必要と考えられた。

⑤典型例の検討 思春期以降の発病例：40 例中 5 例が 15 歳以上での発病であり、こうした非典型例の存在が明らかとなった。発病後の経過は、全例が急速に進行をしており、早期の診断と対応が今後の課題であると考えられた。1 例は成人後の発症であり、こうした実態を広く認識されることが早期診断には重要であると考えられた。

E. 結論

①今回の調査では、患者総数としてはやや漸減傾向にあることが示唆されたが、新規発症例は 2007 年の調査以降も認められている。現在、麻疹撲滅に向けて対策が行われ麻疹の流行は見られなくなっているが、今後も調査を継続して、SSPE 発病数の減少が認められるかどうかを明らかにすることが重要である。

②今回の調査でもほとんど患者は病期の進行した重症であり、医療的ケアを行いながら在宅療養をしていることが明らかになった。こうした成人期で長期療養にある患者の生活環境についての調査と、必要な対策についての調査が今後は重要であると思われた。

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

なし

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