

図1 死亡時に施行したクロイツフェルト・ヤコブ病のMRI 拡散強調画像で高信号を呈した部位では、海綿状変性や神経細胞脱落は軽度であった。グリオーススやプリオン蛋白の沈着に明らかな差はなかった。

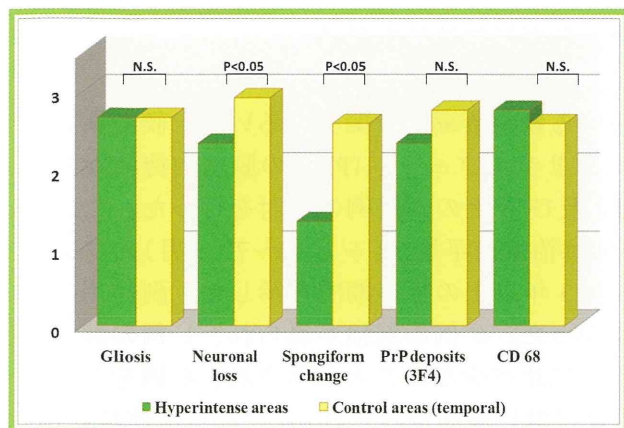


図2 アミロイドPET。GSS P102L-129Mでは、BF-227で皮質の陽性所見を認めるがPIBでは陰性。これは、病理学的にも確認できた。

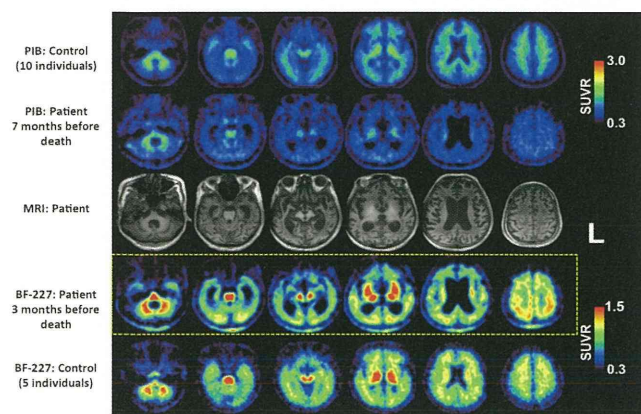


図3 GSS P102L 症例のプリオンアミロイドプラークの周囲にタウ (AT8 抗体) 陽性の沈着を多数認めた (矢印は代表的な部位)。本例も、剖検ではじめてプリオン病であることが明らかになった。

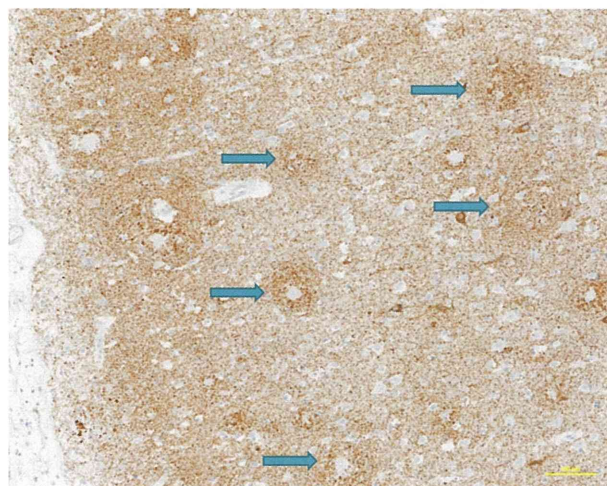
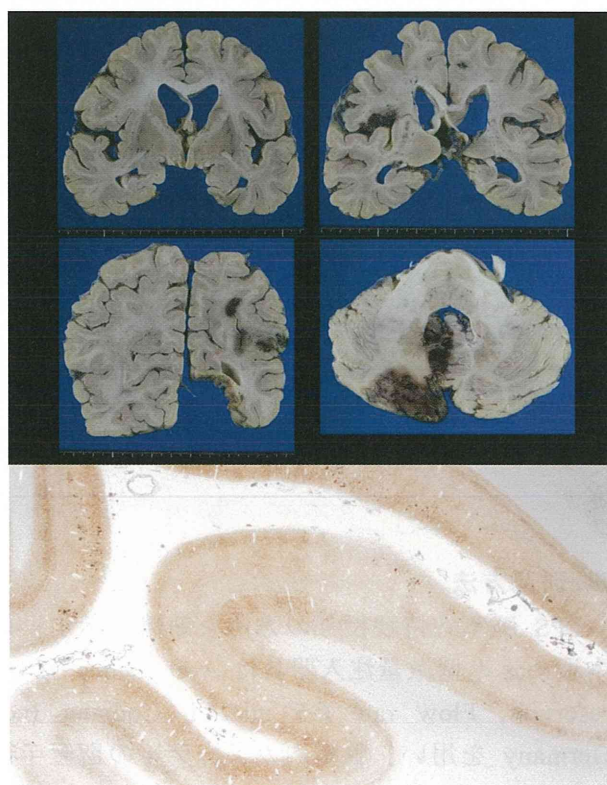


図4 剖検ではじめてクロイツフェルト・ヤコブ病が判明した症例。肉眼的には出血性梗塞、陳旧性梗塞を認めたが、組織学的にはプリオンの沈着も認めた。本例のような症例は、臨床医学的にも感染予防の観点などから重要である。



## プリオン病の新規治療薬に関する臨床研究

研究分担者：坪井義夫 福岡大学医学部神経内科学

**研究要旨** 未だ有効な治療法のない、プリオン病に対する新規治療法の開発あるいは、候補薬の探索が本研究の目的である。継続研究であるペントサンポリサルフェート (PPS) の脳室内持続投与方法は、同治療を行ったプリオン病の 11 例の臨床追跡調査及び 6 例の剖検例の検討を行った。これまでに 10 例が死亡、1 例のみの治療継続となった。11 例は治療後平均 38 ヶ月 (4~77 ヶ月) のフォローを行い、症状は全例進行したが、4 例は治療開始から 3 年以上の生存期間を示した。副作用は周術期、血液データ上、治療に関連する異常は見られなかった。6 例の剖検が得られ、1 例の解析において、不溶性プリオンタンパク量がコントロールの脳に比べ少ないことが示され、4 例をまとめた剖検報告では、不溶性プリオン蛋白/全プリオン蛋白比の低い傾向がみられた。これらは病的に、PPS 脳室内持続投与方法による疾患修飾効果の可能性が示唆されたとともに、安全性においても同治療は、長期継続にも耐えうる治療法であることも確認された。福岡・佐賀地区 GSS 家系の調査では、20 家系がこの地区に集積していることが示され、次世代プリオン病治療に向けて、その発症リスクを有する家族 (at risk) は 30 名を超えることが判明した、今後は予防的治療の候補薬剤の探索、開発が課題である。

### A. 研究目的

プリオン病に対する有効な治療薬は未だ存在しない。この期間はこれら新規治療薬の臨床研究プロトコルの作成と実施、安全性および臨床症状、生命予後における改善効果の評価を目的とする。我々はこれまでの治療薬探索スクリーニングの中で、キナクリン、ペントサンポリサルフェート (PPS) に注目し、臨床研究を施行してきた。また同時に、次世代プリオン病治療研究に向けて疫学研究の一環として福岡・佐賀地区に存在する家族性プリオン病である Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) 病家系の調査およびそのなかから将来発症リスクを有する家族 (at risk) に関する調査と、家族の発症前遺伝子診断への倫理的コンセンサスの確立をめざす。

### B. 研究方法

PPS 脳室内持続投与方法を簡略に示す。体内埋め込み型微量注入器具は Archimedes<sup>®</sup> 20ml reservoir, Flow rate 0.5 ml/24h, Codman Inc., Germany を用い、脳室内カテーテルの留置手術を施行して、皮下を通したチューブで注入ポン

プ接続をする。PPS 投与は低濃度で開始。その後、漸増し維持量 120 $\mu$ g/kg/day に到達させる。その後、4 週間毎に腹部皮下の微量注入器具中に、経皮的に薬液を交換充填する。薬剤効果の評価は神経学的所見、日常生活動作、画像所見および脳波所見のフォローを行った。副作用は血算、生化学、凝固能を定期的に検討した。

福岡、佐賀地区の GSS 病家系の調査は、関連病院の診療およびプリオン病サーベイランス委員からの情報から個々の家系を匿名で調査した。

### (倫理面への配慮)

本研究の対象患者および患者家族に対して十分に説明を行い、理解を得た上で文書による同意が得られた患者にのみ本治療研究は実施された。本治療研究に対して同意を得る場合は人権保護の立場から慎重に検討し、安全の確保に充分配慮し、対象患者のプライバシー保護には十全の配慮を行われた。同意が得られない場合でも何ら差別なく疾患に対して必要な治療を行うことを原則とし、患者の個人情報については慎重に対応した。

## C. 研究結果

PPS 脳室内持続注入療法はこれまでに 11 例のプリオン病患者に行われ、10 例が亡くなり生存患者は 1 例となった。患者の背景、治療経過を表に示す。病型別では、孤発性 CJD が 6 例、硬膜移植後医原性 CJD が 2 例、家族性 CJD/GSS が 3 例であった。11 例の治療開始からの経過は平均 38 ヶ月(4~77 ヶ月)で、治療中も症状の進行は見られたが、緩徐進行型孤発性 CJD 2 例と家族性で V180I 遺伝子変異の 2 例の計 4 例は治療開始から 3 年以上の生存期間を示した。副作用は周術期、血液データ上、治療に関連する異常は見られなかった。6 例で剖検所見の総括的な解析はできていないが、1 例の検討において不溶性プリオンタンパク量がコントロールの脳に比べ少ないことが示され、4 例の剖検報告では不溶性プリオン蛋白/全プリオン蛋白比の低い症例があり、異常プリオン蛋白の定量を含め治療による影響の可能性が示唆された。副作用は周術期において問題はみられなかったが、手術後 3 ヶ月以降、硬膜下水腫が全例に認められた。血液データ上、治療に関連する異常は見られなかった。

福岡・佐賀地区のサーベイランスの結果から全国 GSS 症例の福岡・佐賀地区の患者数は 43.7%と非常に高く、この地区に GSS の集積が確認された。今回 20 家系において臨床疫学的に検討を行った。家系の居住地は佐賀市を中心として、福岡県の佐賀市近隣に居住地の集積がみられた。発端者の発症年齢は 28~68 歳まで多様で、発症者の子供を発症素因(at risk)家族と定義すると、確認されただけで 34 名が該当し、将来の発症が危惧される。代表的な家系を図に示す。このように at risk 家族は GSS 発症者の子供あるいは孫の世代(家系図の◇)に存在する。臨床症状は発症年齢の多様性があるものの、多くは GSS 型であったが、進行が急速で MRI 拡散強調画像で異常信号がみられる CJD 型表現型が少数含まれた。初発症状は歩行時ふらつきが最も多く、その後、認知機能障害、振戦、書字障害、排尿障害、下肢の異常感覚、腱反射の低下が多くみられた。

## D. 考察

プリオン病に対する PPS 脳室内持続投与療法

は、臨床的に機能的改善を示した症例はみられなかったが、生存期間が長く、生命予後の改善が示唆された。病的にも異常プリオン蛋白蓄積に対し疾患修飾効果の可能性を示唆した。

福岡・佐賀に集積する GSS 家系は、臨床的に GSS 型と CJD 型が混在しており、その遺伝的背景の検討が今後の課題である。居住地が比較的近いことから、遺伝学的に創始者効果の可能性があり有無の検討も望まれる。また発症素因(at risk)家族が多く、今後は将来の新規治療介入を念頭に、発症前遺伝子診断の可能性を追求することが望まれる

## E. 結論

プリオン病治療における PPS 脳室内持続投与療法の疾患修飾効果の可能性を示した。生命予後の改善、脳内異常プリオン蛋白の蓄積を抑制する可能性が示唆されたが、治療効果としての機能的改善は示されなかった。今後の治療戦略を再度確立する方向で検討を進めるべきである。

福岡—佐賀地区には強い GSS 家系の集積がある。今後は新たな治療法の確立を模索する上で、基礎と臨床の統合研究で候補薬の新たな切り出しと治療対象の検討を進める必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 坪井義夫. プリオン病の治療:現状と研究の最前線. *臨床神経* 53:1255-1257, 2013.
- 2) 坪井義夫. プリオン病の治療法開発. *Neuroinfection* 18:44-47, 2013.
- 3) 坪井義夫. 獲得性(感染性)プリオン病 変異型 Creutzfeldt-Jakob 病. *Clin Neurosci* 31:1074-1076, 2013.
- 4) 坪井義夫. 家族性 Creutzfeldt-Jakob 病. *日本臨床別冊新領域別症候群シリーズ* 24:788-791, 2013.
- 5) 木村 聡, 坪井義夫. ゲルストマン・シュトライスラー・シャインカー病. *日本臨床別冊新領域別症候群シリーズ* 26:687-691, 2013.

### 2. 学会発表

なし

## G. 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

表. PPS 脳室内持続投与法を施行したプリオン病 11 例の経過と予後

No	Age at surgery	Sex	Diagnosis	Date of Surgery	PPS dose ( $\mu$ g/kg/day)	Survival from the surgery (M)	mRS at Surgery	mRS at Present
1	67	F	sCJD	2004/11/16	120	17*	5	6
2	73	F	sCJD	2005/3/1	120	20*	4	6
3	68	F	sCJD (MM2)	2005/6/2	120	50*	3	6
4	64	F	fCJD (V180I)	2005/6/21	120	65*	3	6
5	64	F	sCJD	2005/11/14	120	26*	5	6
6	55	M	iCJD	2006/3/13	120	4*	4	6
7	66	M	iCJD	2006/6/12	120	9*	4	6
8	69	F	GSS (P102L)	2006/8/2	120	14*	2	6
9	73	F	fCJD (V180I)	2006/10/15	120	77*	2	6
10	68	M	sCJD	2007/3/7	120	18*	2	6
11	39	F	sCJD	2007/4/3	120	77	4	5

\*: dead

図 a.

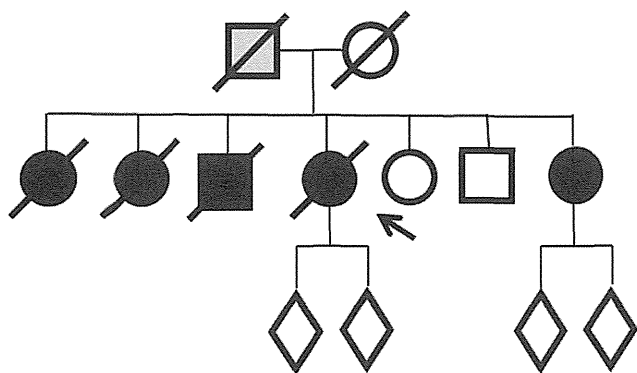


図 b.

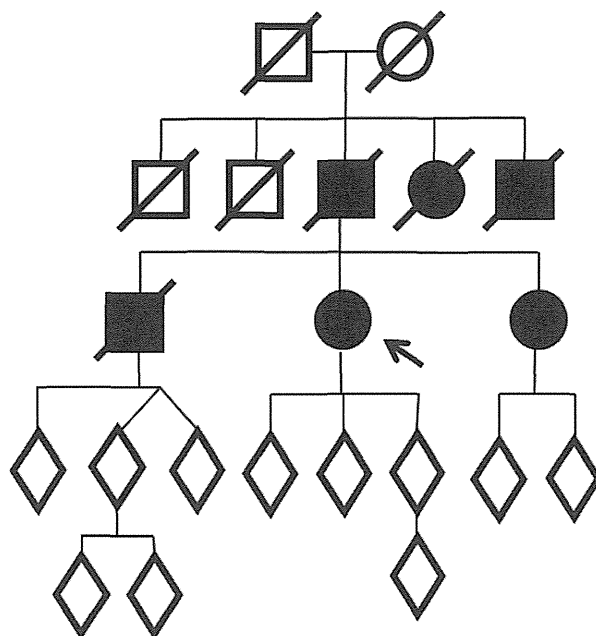


図 a. GSS 佐賀福岡家系①. 図 b. GSS 佐賀福岡家系②. ○は女性、□は男性、斜線はすでに亡くなっていることを意味する。黒塗りは発症者、◇は at risk 家族を示す

## 定型および非定型 BSE に関する解析 一定型および非定型 BSE 解析系の樹立の試みー

研究分担者：桶本優子（中村優子） 国立感染症研究所細胞化学部

**研究要旨** ウシ海綿状脳症(BSE)には従来型 BSE である定型 BSE(C-BSE)、非定型 BSE である H-BSE および L-BSE の少なくとも 3 種類の株が存在する。これらの株間の性状解析に用いることが可能な培養細胞を用いた新規解析系の樹立を目指した。霊長類に伝播させた C-および L-BSE 由来プリオンは、複数のヒト神経細胞株において感染が成立することが明らかとなった。さらに、プリオン蛋白質高発現細胞を用いることで、これら BSE 由来プリオンに対する感受性(感染効率および持続感染性)が向上した。これら感染細胞においては C-/L-BSE 由来プリオンともに二糖鎖優位型の糖鎖プロファイルを示すことが明らかとなった。一方、マウスに伝播させた C-BSE 由来プリオンは、マウス神経細胞株においても持続感染が成立することが確認された。これまでの検討のなかで、L-BSE 由来プリオンの感染効率および持続感染性は C-BSE 由来プリオンに比べ低い傾向にあり、さらなる検討が必要である。しかし、これら細胞株は C-BSE 由来プリオンあるいは L-BSE 由来プリオンの性状解析や薬剤スクリーニング等に有用であると考えられる。

### A. 研究目的

ウシ海綿状脳症(BSE)には(1)従来型 BSE である定型 BSE(C-BSE)、そして近年新たに発見された非定型 BSE である(2)H-BSE と(3)L-BSE の報告があり、少なくとも 3 種類の BSE 株が存在することが明らかとなっている。我が国においても C-BSE とともに L-BSE が摘発されている。今日までに L-BSE は霊長類(カニクイザル)への脳内接種実験において C-BSE より強い感染性を示すことが明らかとなっており<sup>1,4)</sup>、また、L-BSE が変異型 CJD とは異なるヒトプリオン病の原因になる可能性が危惧される。しかし、L-BSE の発生報告数は C-BSE に比べ頻度が低く、その性状についてはまだ明らかになっていない点が多い。そこで、C-BSE および L-BSE の感染性および性状を比較・評価する必要があると考えられる。これまで、C-/L-BSE プリオンの性状については実験動物を用いた系を中心に解析が進められてきた。本研究ではより簡便な解析系として、神経細胞株を用いた BSE プリオン解析系の確立を目指した。また、世界における BSE の発生は沈静化の傾向を示す一方、依然として医療行為等によるヒトへの二次感染のリスクには注意を払う必要がある。本研究で

確立を目指す解析系は、ヒト-ヒト間の感染性に関する知見を得るために有用であり、さらに BSE 由来プリオンに対する薬剤スクリーニングの系としても有用であると期待される。

### B. 研究方法

C-BSE および L-BSE プリオンをカニクイザルに初代伝播して得られた C-、L-BSE 由来プリオン<sup>3,4)</sup>、あるいは C-BSE プリオンを C57BL/6J マウスに伝播して得られた C-BSE 由来プリオンを感染材料とした。ヒト神経細胞株としてニューロブラストーマ細胞 SK-N-SH、SH-SY5Y、SK-N-BE(2)、BE(2)-M17、またマウス神経細胞株としてニューロブラストーマ細胞 N2a および不死化神経細胞株 GT1-7 を用いた。各細胞株の培養上清中に C-、L-BSE 感染サルの脳乳剤(個体 No.7、10、14、15)を添加し、プリオン不含の通常培地に変換後継代を重ねて細胞を回収し、ウェスタンブロッティング法にてプロテアーゼ抵抗性のプリオン蛋白質(PrP<sup>res</sup>)が検出されるか解析を行った。

### (倫理面への配慮)

動物実験等は無く倫理面での配慮は必要と

されないが、プリオンタンパク質 (PrP) の取り扱いや組換え DNA に関する実験においては国立感染症研究所の規定に従った。

### C. 研究結果

ヒト神経細胞株を用いた感染実験により、SK-N-SH、BE(2)-M17、SK-N-BE(2)の3株においてC-BSEおよびL-BSE由来プリオンのPrP<sup>res</sup>が検出され、これらの細胞株では感染が成立すると考えられた。継代を重ねたこれら感染細胞ではC-/L-BSE由来プリオンともに二糖鎖優位型のプロファイルを示すことが示唆された(図2)。しかし、これら細胞株においては感染効率および持続感染の安定性が悪く、BSEプリオンに対しより感受性を高める必要があると思われた。また、各ニューロブラストーマ細胞のPrPの遺伝子配列を調べたところ、コドン129番目のアミノ酸がSK-N-SHではMet/Met、BE(2)-M17およびSK-N-BE(2)ではMet/Valであることが明らかとなった(図3)。そこで、SK-N-SH細胞を用い、PrP高発現細胞を樹立したところ、感染効率および持続感染性の改善が確認された。さらに、これら細胞株を用いた解析においてもC-/L-BSE由来プリオンともに二糖鎖優位型のプロファイルを示すことが明らかとなった(図3)。また、感染SK-N-SH細胞とネオマイシン耐性を付与した非感染細胞とを共培養し、G418選択を行うことでCell to Cellの感染がおきていることを確認した。また、これらの感染細胞に一過性にPrPを過剰発現させるとPrP<sup>res</sup>のシグナルが増強された。これにより、細胞由来のPrP<sup>C</sup>からPrP<sup>res</sup>への変換がおきていることが示唆され、感染材料として用いた脳乳剤中のPrP<sup>res</sup>シグナルのみを検出しているという可能性を否定した。

また、C-BSE由来プリオンはC57BL/6Jへの感染が成立する。マウスに伝播させたC-BSE由来プリオンを感染材料としたところ、GT1-7細胞において持続感染が成立し、C-BSE由来プリオンの性状解析に用いることが可能な解析系が樹立された。

### D. 考察

PrPを過剰発現させたヒト神経細胞株を用いることでより安定に糖鎖プロファイルの比較

が可能となり、内在性のPrP量がBSE由来プリオンへの感受性を左右する要因の一つとして考えられた。これらの細胞株では、C-/L-BSE由来プリオンともに二糖鎖優位型のプロファイルを示すが、C-BSEプリオンに感染したウシでは二糖鎖優位型、L-BSEプリオンに感染したウシでは一糖鎖型優位型を示す(図1)<sup>5)</sup>。一方、カンクイザルへの感染実験において、初代伝播では同様の傾向を示すが、その差異はウシのものに比べ小さい(図1)。ウシやサルにおけるPrP<sup>res</sup>糖鎖型の結果は実験動物の個体レベル、本研究で得られたヒトに関する糖鎖型は細胞レベルという違いがあるものの、C-/L-BSEプリオンが種をこえて感染した場合の現象として興味深い。

また、L-BSE由来プリオンの感染についてはいずれの細胞株においても、感染効率、持続感染性ともにC-BSE由来プリオンに比べ低い傾向にあった。PMCA法を用いたC-/L-BSEプリオンによるヒトPrPの異常化において、L-BSEプリオンによる異常化がおきなかったという報告<sup>6)</sup>もあることから、L-BSE由来プリオンのヒトへの感染性の強さという観点からも、今後検討を重ねる必要があると思われる。

### E. 結論

SK-N-SH、BE(2)-M17、SK-N-BE(2)等複数のヒト神経細胞株でC-/L-BSE由来プリオンの感染が確認された。また、PrP高発現細胞を樹立することでBSE由来プリオンに対する感染効率および持続感染性が向上し、より安定したプリオンの性状解析系とすることが可能であった。また、これらの感染細胞においてBSE由来プリオンによる細胞内在性PrP<sup>C</sup>からPrP<sup>res</sup>への変換、およびCell to Cellの感染が起きていることも確認された。しかしながらL-BSE由来プリオンの感染については感染効率および持続感染性ともに低く、さらなる検討が必要である。さらに、C-BSEについても長期の継代(継代回数20回以上)をへても持続感染が成立しているかなど、その安定性においては経過観察中である。また、C-BSE由来プリオンについてはマウス神経細胞株GT1-7細胞において持続感染が成立し、C-BSE由来プリオンの性状解析に用いることが可能な解析系が樹立された。

## [参考文献]

- 1) Yamakawa Y, Hagiwara K, Nohtomi K, Nakamura Y, Nishijima M, Higuchi Y, Sato Y, Sata T, Expert Committee for BSE Diagnosis, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. Atypical proteinase K-resistant prion protein (PrPres) observed in an apparently healthy 23-month-old Holstein steer. *Jpn J Infect Dis* 56:221-222, 2003.
- 2) Hagiwara K, Yamakawa Y, Sato Y, Nakamura Y, Tobiume M, Shinagawa M, Sata T. Accumulation of mono-glycosylated form-rich, plaque-forming PrP<sup>Sc</sup> in the second atypical bovine spongiform encephalopathy case in Japan. *Jpn J Infect Dis* 60:305-308, 2007.
- 3) Ono F, Terao K, Tase N, Hiyaoka A, Ohyama A, Tezuka Y, Wada N, Kurosawa A, Sato Y, Tobiume M, Hagiwara K, Yamakawa Y, Sata T. Experimental transmission of bovine spongiform encephalopathy (BSE) to cynomolgus macaques, a non-human primate. *Jpn J Infect Dis* 64:50-54, 2011.
- 4) Fukuda S, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Shimizu Y, Matsuura Y, Shu Y, Kurachi M, Kasai K, Murayama Y, Onoe S, Hagiwara K, Sata T, Mohri S, Yokoyama T, Okada H. Intraspecies transmission of L-type-like bovine spongiform encephalopathy detected in Japan. *Microbiol Immunol* 53:704-707, 2009.
- 5) Barria MA, Balachandran A, Morita M, Kitamoto T, Barron R, Manson J, Knight R, Ironside JW, Head MW. Molecular barriers to zoonotic transmission of prions. *Emerg. Infect Dis* 20:88-97, 2014.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hara H, Okemoto-Nakamura Y, Shinkai-Ouchi F, Hanada K, Yamakawa Y, Hagiwara K. Mouse prion protein (PrP) segment 100 to 104 regulates conversion of PrP<sup>C</sup> to PrP<sup>Sc</sup> in

prion-infected neuroblastoma cells. *J Virol* 86:5626-5636, 2012.

- 2) 中村優子, 萩原健一. BSE問題におけるリスク管理とその変遷. *ファルマシア* 49:48-51, 2013.

## 2. 学会発表

- 1) Okemoto-Nakamura Y, Hara H, Shinkai-Ouchi F, Yamakawa Y, Hanada K, Hagiwara K. Analysis of synaptic protein and cyclin-dependent kinase 5 in prion protein-deficient cells. Prion 2011, Montreal, May 16-19, 2011.
- 2) Hara H, Okemoto-Nakamura Y, Shinkai-Ouchi F, Hanada K, Yamakawa Y, Hagiwara K. Mouse prion protein (PrP) segment 100 to 104 regulates conversion of PrP<sup>C</sup> to PrP<sup>Sc</sup> in prion-infected neuroblastoma cells. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.
- 3) Hara H, Okemoto-Nakamura Y, Shinkai-Ouchi F, Yamakawa Y, Hanada K, Hagiwara K. Identification of novel PrP epitope modulating conformational change from PrP<sup>C</sup> to PrP<sup>Sc</sup>. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.

## G. 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



C-BSEおよびL-BSEプリオン C-BSEおよびL-BSEプリオンの糖鎖型パターン

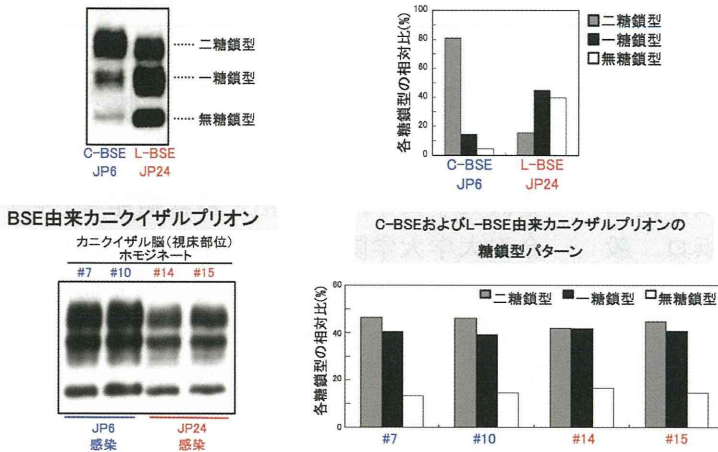


図 1

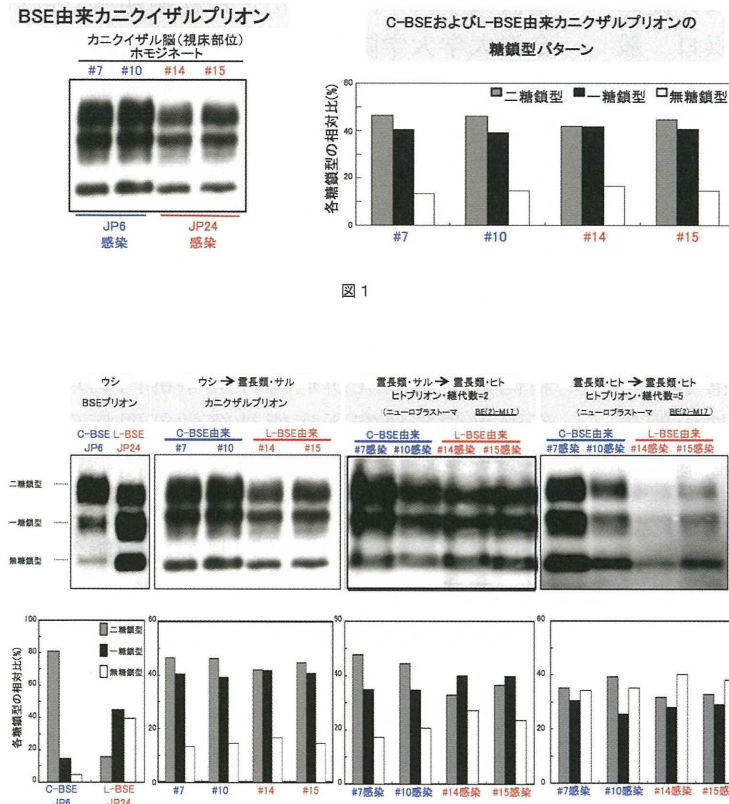
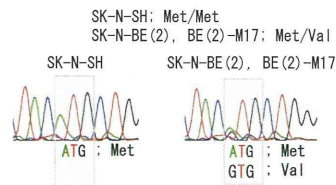


図 2

PRNP コドン129の多型



ヒト神経細胞株を用いた感染実験

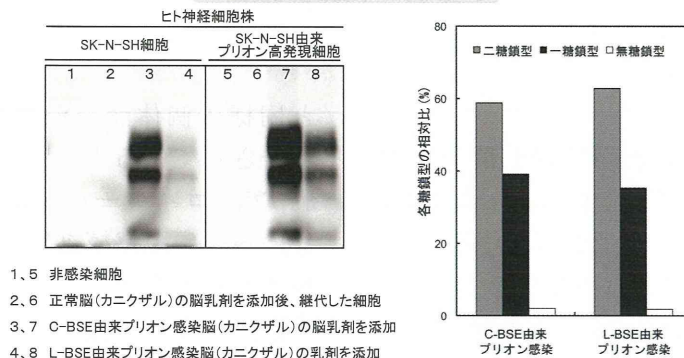


図 3

## 硬膜移植による脳へのアミロイドβ沈着促進についての検討

研究分担者：坂井健二	金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科学)
研究分担者：浜口 毅	金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科学)
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
研究分担者：岩崎 靖	愛知医科大学加齢医科学研究所
研究協力者：吉田眞理	愛知医科大学加齢医科学研究所
研究分担者：高尾昌樹	東京都健康長寿医療センター研究所神経病理学 公益財団法人脳血管研究所美原記念病院
研究協力者：村山繁雄	東京都健康長寿医療センター研究所神経病理学
研究協力者：内木宏延	福井大学医学部病因病態医学講座分子病理学領域
研究協力者：清水 宏	新潟大学脳研究所病態神経学部門病理学分野
研究協力者：柿田明美	新潟大学脳研究所病態神経学部門病理学分野
研究協力者：高橋 均	新潟大学脳研究所病態神経学部門病理学分野
研究協力者：鈴木博義	国立病院機構仙台医療センター
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)
研究分担者：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)
研究代表者：山田正仁	金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科学)

### 研究要旨

[目的]プリオン病での異常プリオン蛋白と同様に、硬膜移植で脳βアミロイドーシスが伝播する可能性を検討する。

[方法]硬膜移植後 CJD と病理学的に診断した 16 症例の剖検脳の前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉、基底核、視床、小脳、橋における、異常プリオン蛋白およびアミロイドβ蛋白(Aβ)の沈着を免疫染色によって検討する。

[結果]16 例の硬膜移植後 CJD 剖検例の死亡時年齢は 63.1±14.1 歳(35-81 歳)であった。硬膜移植から死亡までの期間の平均値は 18.7±6.0 年(9-29 年)であった。16 例中 13 例に脳実質または脳血管に Aβ 沈着を認めた。16 例の中には、50 歳未満に死亡した若年症例が 3 例含まれていたが(35 歳、39 歳、41 歳)、全例で Aβ 沈着を認めた。脳実質より脳血管への Aβ 沈着が目立つ症例が多かった。

[結論]以上の結果からは、硬膜移植によって脳βアミロイドーシスの発症が促進された可能性を否定出来ない。今後、孤発性 CJD や脳外科手術後で硬膜移植歴がなくプリオン病を発症しなかった症例などをコントロールとした検討が必要である。

### A. 研究目的

プリオン病は同種間あるいは異種間で伝播するという特徴を有し、変異型 Creutzfeldt-Jakob 病(CJD)や医原性 CJD といった症例の出現は、しばしば大きな社会問題となっている。近年、Alzheimer 病(AD)の代表的な病理学的所見の 1 つである脳へのアミロイドβ蛋白(Aβ)の沈着(脳βアミロイドーシス)も、異常プリオン蛋白

と同様に個体間を伝播するという動物実験が報告されている<sup>1)</sup>。現時点では、ヒトにおいて脳βアミロイドーシスが伝播したという報告はないが、硬膜移植 21 年後に硬膜移植後 CJD を発症した死亡時 28 歳の症例の脳に Aβ 沈着を多く認めたという報告があり<sup>2)</sup>、硬膜移植によって脳βアミロイドーシスが伝播した可能性が否定出来ない。硬膜移植によって脳βアミロイド

ーシスの発症が促進されるかについて硬膜移植後 CJD 剖検脳を用いて検討する。

## B. 研究方法

硬膜移植後 CJD と病理学的に診断した 16 症例の剖検脳の前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉、基底核、視床、小脳、橋における、異常プリオン蛋白およびアミロイドβの沈着を免疫染色によって検討する。

### (倫理面への配慮)

硬膜移植後 CJD 剖検脳の標本の使用については金沢大学および研究協力者の所属施設の医学倫理委員会の承認を得ている。

## C. 研究結果

今回検討した16例の硬膜移植後CJDを表1に示す。16例の硬膜移植後CJD剖検例の死亡時年齢は63.1±14.1歳(35-81歳)で、9例が女性であった。硬膜移植から死亡までの期間の平均値は18.7±6.0年(9-29年)であった。11例が非プラーク型で、5例がプラーク型の硬膜移植後CJDであった。

16例中13例に脳実質または脳血管にAβ沈着を認めた。16例の中には、50歳未満に死亡した若年症例が3例含まれていたが(35歳、39歳、41歳)、全例でAβ沈着を認めた。脳実質より脳血管へのAβ沈着が目立つ症例が多かった。脳実質および脳血管へのAβ沈着の程度は、硬膜移植から死亡までの期間が長くなるに従って増加している印象があった。軟膜下へのAβ沈着が目立つ症例が複数存在した。

## D. 考察

50歳未満の症例の脳へのAβ沈着やAβの沈着程度が硬膜移植から死亡までの期間が長くなるに従って増加することは、硬膜移植によって脳βアミロイドーシスの発症が促進された可能性を否定出来ない。また、脳血管へのAβ沈着が目立つ印象があり、更に脳血管へのAβ沈着と関連すると報告されている軟膜下へのAβ沈着<sup>3)</sup>を認めた症例が複数存在したことは、硬膜移植に伴う脳βアミロイドーシスの特徴を示している可能性がある。しかし、プリオン病や脳外科手術が脳βアミロイドーシスを促進した可

能性も否定出来ないため、今後、孤発性CJDや脳外科手術後で硬膜移植歴がなくプリオン病を発症しなかった症例などをコントロールとした検討が必要である。また、Aβ沈着について定量的な評価も行えておらず、今後定量的な評価も必要と考える。

## E. 結論

死亡時50歳未満の3例を含めた硬膜移植後CJD16例中13例の剖検脳にAβの沈着を認めた。今後、硬膜移植が脳へのAβ沈着を促進したかを調べるために、孤発性CJDや脳外科手術後で硬膜移植歴がなくプリオン病を発症しなかった症例などをコントロールとした検討を行う予定である。

## [参考文献]

- 1) Meyer-Luehmann M, Coomaraswamy J, Bolmont T, Kaeser S, Schaefer C, Kilger E, Neuenschwander A, Abramowski D, Frey P, Jaton AL, Vigouret JM, Paganetti P, Walsh DM, Mathews PM, Ghiso J, Staufenbiel M, Walker LC, Jucker M. Exogenous induction of cerebral β-amyloidosis is governed by agent and host. *Science* 313:1781-1784, 2006.
- 2) Preusser M, Strobel T, Gelpi E, Eiler M, Broessner G, Schmtzhard E, Budka H. Alzheimer-type neuropathology in a 28 year old patient with iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease after dural grafting. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:413-416, 2006.
- 3) Itoh Y, Yamada M, Hayakawa M, Otomo E, Miyatake T. Subpial beta/A4 peptide deposits are closely associated with amyloid angiopathy in the elderly. *Neurosci Lett* 155:144-147, 1993.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nagoshi K, Sadakane Y, Nakamura Y, Yamada M, Mizusawa H. Illness duration of prion diseases in Japan is longer than that in other countries. *J Epidemiol* 21:255-262, 2011.
- 2) Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Nozaki I, Sakai K, Yamada M. Serum tau protein as a marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease.

- J Neurol* 258:1464-1468, 2011.
- 3) Nozaki I, Sakai K, Kitamoto T, Yamada M. Prion protein gene M232R mutation as a cause of genetic prion disease. (Reply to the Letter to the Editor: Beck et al. Prion protein gene M232R variation is probably uncommon polymorphism rather than a cause of inherited prion disease.) *Brain* 135:e210, 2011.
  - 4) Yoshikawa Y, Horiuchi M, Ishiguro N, Kadohira M, Kai S, Mizusawa H, Nagata C, Onodera T, Sata T, Tsutsui T, Yamada M, Yamamoto S. Alternative BSE risk assessment methodology of imported beef and beef offal to Japan. *J Vet Med Sci* 74:959-968, 2012.
  - 5) Alcalde-Cabero E, Almazán-Isla J, Brandel JP, Breithaupt M, Catarino J, Collins S, Haybäck J, Höftberger R, Kahana E, Kovacs GG, Ladogana A, Mitrova E, Molesworth A, Nakamura Y, Pocchiari M, Popovic M, Ruiz-Tovar M, Taratuto AL, van Duijn C, Yamada M, Will RG, Zerr I, de Pedro-Cuesta J. Health professions and risk of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, 1965 to 2010. *Euro Surveill* 17:pil20144, 2012.
  - 6) Fujita K, Harada M, Sasaki M, Yuasa T, Sakai K, Hamaguchi T, Sanjo N, Shiga Y, Satoh K, Atarashi R, Shirabe S, Nagata K, Maeda T, Murayama S, Izumi Y, Kaji R, Yamada M, Mizusawa H. Multicentre, multiobserver study of diffusion-weighted and fluid-attenuated inversion recovery MRI for the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a reliability and agreement study. *BMJ Open* 2:e000649, 2012.
  - 7) Kobayashi A, Iwasaki Y, Otsuka H, Yamada M, Yoshida M, Matsuura Y, Mohri S, Kitamoto T. Deciphering the pathogenesis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with codon 129 M/V and type 2 abnormal prion protein. *Acta Neuropathol Commun* 1:74, 2013.
  - 8) Sakai K, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Takumi I, Sanjo N, Nakamura Y, Kitamoto T, Saito N, Mizusawa H, Yamada M. Graft-related disease progression in dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: a cross-sectional study. *BMJ Open* 3:e003400, 2013.
  - 9) Hamaguchi T, Sakai K, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Takumi I, Sanjo N, Sadakane A, Nakamura Y, Kitamoto T, Saito N, Mizusawa H, Yamada M. Insight into the frequent occurrence of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease in Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84:1171-1175, 2013.
  - 10) Higuma M, Sanjo N, Satoh K, Shiga Y, Sakai K, Nozaki I, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kitamoto T, Shirabe S, Murayama S, Yamada M, Tateishi J, Mizusawa H. Relationships between clinicopathological features and cerebrospinal fluid biomarkers in Japanese patients with genetic prion diseases. *PLoS One* 8:e60003, 2013.
  - 11) 坂井健二, 山田正仁. プリオン病のサーベイランス. *最新医学* 66:1032-1038, 2011.
  - 12) 坂井健二, 山田正仁. プリオン病のサーベイランスと疫学. *Neuroinfection* 16:50-56, 2011.
  - 13) 野崎一朗, 山田正仁. 認知症学 (下): 致死性家族性不眠症. *日本臨牀* 69:438-441, 2011.
  - 14) 山田正仁. ヒトのプリオン病の実態: 獲得性プリオン病を中心に. *医学のあゆみ* 236:868-876, 2011.
  - 15) 濱口 毅, 山田正仁. プリオン病以外のアミロイドーシスは伝播するか? (2) 脳アミロイドーシス. 山田正仁・編 アミロイドーシス—診療のすべて: ガイドライン完全解説, 医歯薬出版, 東京, pp205-211, 2011.
  - 16) 野崎一朗, 山田正仁. CASE 21. 書字障害を初発として、のちに記憶障害などが出現した症例. 小阪憲司・編 プライマリーケア医の認知症診療入門セミナー, 新興医学出版社, 東京, pp196-206, 2011.
  - 17) 山田正仁. プリオン病. 日本感染症学会・編 感染症専門医テキスト 第 I 部解説編, 南江堂, 東京, pp1146-1154, 2011.
  - 18) 山田正仁. ヒトのプリオン病の実態. 佐藤真澄, 堤 寛・編 知っておきたい動物の感染症 (別冊: 医学のあゆみ), 医歯薬出版, 東京, pp147-155, 2011.
  - 19) 山田正仁. プリオン病. 日本感染症学会・編 感染症専門医テキスト 第 I 部解説編, 南江堂, 東京, pp1146-1154, 2011.
  - 20) 濱口 毅, 山田正仁. 周期性ミオクロームス: Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) 概論. *Clin Neurosci* 30:760-763, 2012.

- 21) 浜口 毅, 山田正仁. 臨床化学的側面からみたプリオン病の診断と病態解析. *臨床化学* 41:35-40, 2012.
- 22) 浜口 毅, 山田正仁.  $\beta$  アミロイドの propagation による進展. *Current Therapy* 30:336-340, 2012.
- 23) 浜口 毅, 山田正仁. 感染性(獲得性)プリオン病. 硬膜移植後 Creutzfeldt-Jakob 病. *日本臨床別冊新領域別症候群シリーズ* 26:703-706, 2013.
- 24) 浜口 毅, 山田正仁. 特発性プリオン病(孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病). MM2 視床型と皮質型. *日本臨床別冊新領域別症候群シリーズ* 26:671-676, 2013.
- 25) 山田正仁. プリオン病. *日本医師会雑誌特別号(2)* 142:S173-S174, 2013.
- 26) 野崎一朗, 浜口 毅, 山田正仁. 古典型孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病. *Clin Neurosci* 31:1048-1051, 2013.
- 27) 浜口 毅, 山田正仁. 硬膜移植後 Creutzfeldt-Jakob 病. *Clin Neurosci* 31:1071-1073, 2013.
- 28) 野崎一朗, 浜口 毅, 山田正仁. プリオン病: 概論. *日本臨床別冊新領域別症候群シリーズ* 24:777-782, 2013.
- 29) 浜口 毅, 山田正仁. 医原性 Creutzfeldt-Jakob 病. *日本臨床別冊新領域別症候群シリーズ* 24:807-811, 2013.
- 30) 山田正仁. 遅発性ウイルス感染症とプリオン病. 小川 聡・総編, 小澤敬也, 祖父江元・部門編 内科学書. 改訂第 8 版. Vol.6 血液・造血器疾患, 神経疾患, 中山書店, 東京, pp284-288, 2013.
- 31) 坂井健二, 山田正仁. 感染症による認知症. 池田 学・編 脳とこころのプライマリケア 2 知能の衰え, (株) シナジー, 東京, pp 346-364, 2013.
- 32) 野崎一朗, 山田正仁. クロイツフェルト・ヤコブ病 (プリオン病). 永井良三, 太田 健・編 今日の治療. 看護. 改訂第 3 版, 南江堂, 東京, pp701-703, 2013.
- Mizusawa H, Sanjo N, Moriwaka F, Shiga Y, Kuroiwa Y, Nishizawa M, Inuzuka T, Takeda M, Abe K, Murai H, Murayama S, Tateishi J, Shirabe S, Takumi I, Harada M, Yamada M. Human prion diseases in Japan: a prospective surveillance from 1999. *Asian Pacific prion Symposium 2011, Karuizawa, July 7-9, 2011.*
- 2) Yamada M, Sakai K, Nozaki I, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nakamura Y, Kitamoto T, Sanjo N, Moriwaka F, Shiga Y, Kuroiwa Y, Nishizawa M, Inuzuka T, Takeda M, Abe K, Murai H, Murayama S, Tateishi J, Shirabe S, Takumi I, Harada M, Mizusawa H. Prion disease in Japan. *Asian Pacific Prion Symposium 2011, Karuizawa, July 10-11, 2011.*
- 3) Yamada M, Sanjo N, Murayama S, Takeda M, Kuzuhara S, Abe K, Noguchi-Shinohara M, Sakai K, Nozaki I, Mizusawa H, Hamaguchi T, Sadakane A, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Moriwaka F, Shiga Y, Kuroiwa Y, Nishizawa M, Inuzuka T, Kuroda S, Murai H, Tateishi J, Takumi I, Shirabe S, Harada M. Human prion disease in Japan: analysis of 1552 patients in a prospective 11-Year surveillance. *Alzheimer's Association International Conference 2011, Paris, July 16-21, 2011.*
- 4) Sakai K, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Sato T, Takumi I, Sanjo N, Nakamura Y, Kitamoto T, Saito N, Mizusawa H, Yamada M. Prion protein propagation in dura mater graft-associated Creutzfeldt-jakob disease. *Prion* 2012, Amsterdam, May 9-12, 2012.
- 5) Sanjo N, Ohara M, Satoh K, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kitamoto T, Yamada M, Mizusawa H. Clinical features of genetic prion disease and cerebrospinal fluid findings in Japanese patients. *Prion* 2012, Amsterdam, May 10-12, 2012.
- 6) Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Nozaki I, Sakai K, Yamada M. Serum tau protein as a marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.*
- 7) Sakai K, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Sato T, Takumi I, Sanjo N, Nakamura Y, Kitamoto T, Saito N, Mizusawa H, Yamada M.

## 2. 学会発表

- 1) Sakai K, Nozaki I, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nakamura Y, Kitamoto T,

- Prion protein propagation in dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease. Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012
- 8) Mizusawa H, Nakamura Y, Takumi I, Yamada M. CJD Surveillance in Japan. European CJD Surveillance Network, Oslo, June 6-7, 2013.
- 9) Fujita K, Harada M, Uyama N, Sasaki M, Iwasaki Y, Satoh K, Sanjo N, Takao M, Hamaguchi T, Mizusawa H, Yamada M. Thin-slice diffusion-weighted imaging and arterial spin labeling for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.
- 10) Hamaguchi T, Sakai K, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Takumi I, Sanjo N, Nakamura Y, Kitamoto T, Saito N, Mizusawa H, Yamada M. Comparison of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease between Japan and other countries. Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, July 21-22, 2013.
- 11) 山田正仁, 中村好一, 北本哲之, 水澤英洋. プリオン病の最近の発症動向. 第 28 回日本医学会総会 2011, 東京, 4.8-10, 2011.
- 12) 坂井健二, 野崎一朗, 濱口 毅, 篠原もえ子, 中村好一, 北本哲之, 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, 犬塚 貴, 阿部康二, 村井弘之, 村山繁雄, 太組一朗, 調 漸, 立石 潤, 原田雅史, 山田正仁. CJD サーベイランスにおけるプリオン病発症と加齢の関連についての検討. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.18-20, 2011.
- 13) 小松潤史, 坂井健二, 岩佐和夫, 杉山 有, 山田正仁. プリオン蛋白遺伝子 V203I ホモ変異を認めた家族性 CJD の 1 例. 第 16 回日本神経感染症学会学術集会, 東京, 11.4-5, 2011.
- 14) 篠原もえ子, 濱口 毅, 野崎一朗, 坂井健二, 山田正仁. 孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病における非浸襲的診断マーカーとしての血清総タウ蛋白. 第 17 回日本神経感染症学会総会学術総会, 京都, 10.19-20, 2012.
- 15) 山田正仁. ヒト・プリオン病 UP DATE. 第 24 回信州脳神経シンポジウム, 松本, 1.12, 2013.
- 16) 山田正仁. プリオン病の臨床と病理. 第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会 第 9 回神経病理コアカリキュラム教育セミナー, 東京, 4.24, 2013.
- 17) 濱口 毅, 山田正仁. プリオン病の臨床像と疫学, 特に硬膜移植後 CJD. 第 54 回日本神経学会学術大会, 東京, 5.29-6.1, 2013.
- 18) 濱口 毅, 坂井健二, 篠原もえ子, 野崎一朗, 太組一朗, 三條伸夫, 中村好一, 北本哲之, 齊藤延人, 水澤英洋, 山田正仁. わが国の硬膜移植後 Creutzfeldt-Jakob 病の特徴: 海外例との比較. 第 54 回日本神経学会学術大会, 東京, 5.29-6.1, 2013.
- 19) 濱口 毅, 坂井健二, 篠原もえ子, 野崎一朗, 太組一朗, 三條伸夫, 中村好一, 北本哲之, 齊藤延人, 水澤英洋, 山田正仁. わが国と海外の硬膜移植後 Creutzfeldt-Jakob 病の比較. 第 18 回日本神経感染症学会総会学術集会, 宮崎, 10.11-12, 2013.

## G. 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

## 亜急性硬化性全脳炎の発症機序の解明と治療法の開発

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
研究分担者：水澤英洋	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経病態学
研究分担者：坪井義夫	福岡大学医学部神経内科学教室
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
研究協力者：阿部優作	福島県立医科大学医学部小児科学講座
研究協力者：渡部真裕	福島県立医科大学医学部小児科学講座
研究協力者：宮崎恭平	福島県立医科大学医学部小児科学講座

**研究要旨** (1)ヌードマウスを用いた亜急性硬化性全脳炎発症機序の解明、(2)新規ペプチドによる亜急性硬化性全脳炎の新たな治療戦略、(3)リバビリン代謝物 1,2,4 triazole-3-carboxamide (T-CONH<sub>2</sub>) の抗麻疹ウイルス作用、(4)リバビリン脳室内持続投与療法について研究した。

- (1) ヌードマウスを用いた亜急性硬化性全脳炎発症機序の解明：麻疹ウイルス株をヌードマウスの脳内に接種することにより、主に M 遺伝子に変異の蓄積があり、遊離能が低下し、強い神経病原性を示す SSPE ウイルスの特徴を有するウイルスを作製することができた。
- (2) 新規ペプチドによる亜急性硬化性全脳炎の新たな治療戦略：麻疹ウイルス F 蛋白をモチーフにした新規ペプチドは、細胞培養、動物実験において抗 SSPE 効果を示した。
- (3) リバビリン代謝物 T-CONH<sub>2</sub> の抗麻疹ウイルス作用：T-CONH<sub>2</sub> はリバビリンと同程度に麻疹ウイルスに対する抗ウイルス効果を示した。
- (4) リバビリン脳室内持続投与療法：2 症例について検討し、穿刺回数の減少やリバビリンによる副作用がみられなかったことなどから、単回投与と比較して有用な治療法であると考えられた。

### A. 研究目的

亜急性硬化性全脳炎 (Subacute sclerosing panencephalitis : SSPE) は麻疹罹患後数年間の持続感染を経て、麻疹ウイルスが変異した SSPE ウイルスにより発症する予後不良の遅発性ウイルス感染症である。現在まで様々な治療法が試みられてきたがいまだ根治的な治療法は確立できていない難治性疾患である。本研究では有効な治療法確立のため発症病態解明、新たな SSPE 治療薬の開発、さらに現在実施されているリバビリン脳室内持続投与療法をより安全に効果的に行うため治療プロトコルの確立を目的とする。

### B. 研究方法

- (1) ヌードマウスを用いた亜急性硬化性全脳炎発症機序の解明

4 週齢のヌードマウスに、麻疹ウイルス実験室株の Edmonston 株  $4.0 \times 10^4$  PFU を麻酔下に頭蓋骨下(脳内)に接種した。実験プロトコールに基づき安楽死の後に脳を摘出し、病理学的、ウイルス学的に検討した。ウイルス学的検討ではウイルスの遺伝子解析、細胞培養でのウイルス遊離能の検討、脳内(変異)ウイルスのマウスへの再感染による病原性の検討を行った。

- (2) 新規ペプチドによる亜急性硬化性全脳炎の新たな治療戦略

麻疹ウイルス F 蛋白の Heptad repeat 2 領域をモチーフにペプチドを合成した。麻疹ウイルス (Edmonston 株) 及び SSPE ウイルス (Yamagata-1 株) を使い、プラーク減少法により 50% 有効濃度を求めた。また、ヌードマウスに SSPE 株の Yamagata-1 株を感染させ新規のペプチドの抗

ウイルス効果を生存率、ウイルス増殖について評価した。

### (3) リバビリン代謝物 T-CONH<sub>2</sub> の抗麻疹ウイルス作用

ウイルスは実験室内株である麻疹 Edmonston 株 (Ed) を用い、細胞は Vero 細胞を用いリバビリンと T-CONH<sub>2</sub> の抗ウイルス効果と細胞毒性について、MTT 法を用いて 50% 有効濃度 (EC<sub>50</sub>) と 50% 細胞毒性濃度 (CC<sub>50</sub>) を算出した。また、培養液中のリバビリンと T-CONH<sub>2</sub> を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定した。

### (4) リバビリン脳室内持続投与療法

埋め込み型持続輸注ポンプは codman 社の archimedes<sup>®</sup> (流速 2ml/day、容量 40ml) を用い、投与リバビリンはリバビリン注射製剤 (100mg/ml) を用いた。右前胸部または腹部に埋め込み術を施行し、術後 5 日からリバビリン注入を開始した。リバビリンの髄液中目標濃度を 50~200µg/ml とし、単回投与の投与スケジュールを参考にして、リバビリン 2.0mg/kg/day 持続投与を 10 日間、その後 10 日間休薬を 1 クールとした。病状の評価には臨床症状スコア (NDI スコア) を用いた。

#### (倫理面への配慮)

SSPE 患者への治療研究は福島県立医科大学倫理委員会の承認をうけ、家族のインフォームドコンセントのもとに実施された。動物感染実験は福島県立医科大学動物実験指針に基づき計画し、同委員会の承認のもとに実施した。また 20% 以上の体重減少がみられた個体は、倫理的エンドポイントとし安楽死させた。

## C. 研究結果

### (1) スードマウスを用いた亜急性硬化性全脳炎発症機序の解明

摘出した脳の病理標本において、神経細胞に免疫染色陽性所見が全脳性にみられ、脳ホモジナイズ液からは、接種量の 4~400 倍のウイルスが検出された。摘出した脳から検出された麻疹ウイルスの N、P、M、F、H 遺伝子の翻訳領域を解析したところ、M 遺伝子において最も多

くアミノ酸に変異がみられ、それらの多くが uridine から cytosine への変異によるものであった。また、遊離能の検討では上清の感染価が脳内接種前の 100 分の 1 程度に低下し、脳内接種では有意にマウスの生存日数が短縮した。

### (2) 新規ペプチドによる亜急性硬化性全脳炎の新たな治療戦略

合成したペプチドの Eomonsto 株、Yamagata-1 株に対する EC<sub>50</sub> は数十 nM であり、CC<sub>50</sub> はすべてのペプチドで 100µM 以上であった。さらに動物実験では 1 つの新規ペプチドの投与群において有意な生存期間の延長と脳内のウイルス量の減少を認めた。

### (3) リバビリン代謝物 T-CONH<sub>2</sub> の抗麻疹ウイルス作用

T-CONH<sub>2</sub> の MV (Ed) に対する EC<sub>50</sub> は 7.1 µg/mL であり、Rib 10.3 µg/mL と同程度の抗ウイルス効果を認めた。また、両薬剤とも Vero 細胞に対する細胞毒性は見られなかった。HPLC による解析では、リバビリンから T-CONH<sub>2</sub> へは 1~4% が、T-CONH<sub>2</sub> からリバビリンへは 10~30% 程度が相互に代謝変化を起こしていることを確認した。

### (4) リバビリン脳室内持続投与療法

実施 2 症例において、一時的な症状の改善がみられたが、病状の進行を停止するまでには至らなかった。リバビリン持続投与による副作用は見られなかったため、両症例とも休薬期間をおかず、持続投与する方針とした。穿刺回数の減少やリバビリンによる副作用がみられなかった。

## D. 考察

### (1) スードマウスを用いた亜急性硬化性全脳炎発症機序の解明

神経細胞への感染機序や、強い神経病原性を持つに至る機序は不明であるが、脳内に持続感染することにより、遺伝子変異を生じ感染が広がりやすいウイルスへと変化すると考えられる。

### (2) 新規ペプチドによる亜急性硬化性全脳炎の



## 新たな治療戦略

麻疹ウイルス、F 蛋白の HR2 領域由来の新規ペプチドが SSPE ウイルスに対して抗ウイルス効果を示した初めての報告である。HIV 感染症においては同様の創薬戦略で臨床薬として使用されている。SSPE においても新たな治療戦略となりうる。

### (3) リバビリン代謝物 T-CONH<sub>2</sub> の抗麻疹ウイルス作用

リバビリンの生体内での代謝経路より T-CONH<sub>2</sub> の抗ウイルス効果は代謝変化したリバビリンが抗ウイルス効果を示しているものと考えられた。T-CONH<sub>2</sub> はリバビリンの代謝物であるが、Rib の前駆物質として働く可能性が考えられた。

### (4) リバビリン脳室内持続投与療法

これまでのリバビリン単回投与では薬剤注入のため体内に埋設したリザーバーを1日2回穿刺するのに対し、持続輸注ポンプでは頻回穿刺による髄膜炎などの有害事象を減少させることができる。また、安定した濃度を保持できるため、単回投与時のような、注入直後に中毒域の濃度まで上昇がなく副作用がみられなかった。さらに、投与量のコントロールも容易である。以上より、持続輸注ポンプを用いることにより、在宅でも治療が可能になる。

## E. 結論

SSPE 発症機序における麻疹ウイルスの遺伝子変異を実験的に証明した。新たな治療候補薬を見出した。また、リバビリン脳室内持続投与療法については2例ではあるが世界で初めて実施できた。基礎研究、臨床研究をさらに進め SSPE の治療法の確立を目指す。

## [参考文献]

- 1) 綾田 稔ら. 亜急性硬化性全脳炎(SSPE)-麻疹ウイルスの変異と神経病原性-. ウイルス 53:15-23, 2003.
- 2) 堀田 博ら. 亜急性硬化性全脳炎(SSPE)-原因ウイルスと発症機構-. 日本臨床 65:1475-80, 2007.
- 3) Lambert DM, et al. Peptides from conserved

regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2186-2191, 1996.

- 4) Zhu J, Zhang C W, Qi Y, Tien P, Gao GF. The fusion protein core of measles virus forms stable coiled-coil trimer. *Biochem Biophys Res Commun* 299:897-902, 2002.

- 5) Oishi, S. et al. Design of a novel HIV-1 fusion inhibitor that displays a minimal interface for binding affinity. *J Med Chem* 51: 388-391, 2008.

- 6) Hosoya M, et al. Pharmacokinetics and effects of ribavirin following intraventricular administration for treatment of subacute sclerosing panencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother* 48:4631-4635, 2004.

- 7) Lin CC, et al. Absorption, metabolism, and excretion of [14C]viramidine in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2368-73, 2006.

- 8) Shigeta S, Targets of anti-influenza chemotherapy other than neuraminidase and proton pump. *Antivir Chem Chemother* 12 Suppl 1:179-188, 2001.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Abe Y, Hashimoto K, Iinuma K, Ohtsuka Y, Ichiyama T, Kusuhara K, Nomura K, Mizuguchi M, Aiba H, Suzuki Y, Mizusawa H, Hosoya M. Survey of subacute sclerosing panencephalitis in Japan. *J Child Neurol* 27:1529-1533, 2012.
- 2) Watanabe M, Suyama K, Hashimoto K, Sato M, Ohara S, Abe Y, Kawasaki Y, Yamaguchi S, Saijo M, Hosoya M. Mumps virus-associated acute encephalopathy: case report and review of the literature. *J Child Neurol* 28:243-245, 2013.
- 3) Abe Y, Hashimoto K, Watanabe M, Ohara S, Sato M, Kawasaki Y, Hashimoto Y, Hosoya M. Characteristics of viruses derived from nude mice with persistent measles virus infection. *J Virol* 87:4170-4175, 2013.
- 4) 細矢光亮. 亜急性硬化性全脳炎に対する治療の動向. *最新医学* 66:86-90, 2011.
- 5) 細矢光亮. 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) に対する新たな治療法の開発を目指して. *Neuroinfection* 16:1-8, 2011.

6) 細矢光亮. 単純ヘルペス脳炎診療ガイドライン. 五十嵐隆, 塩見正司・編 小児科診療ピクシス「急性脳炎・急性脳症」, 中山書店, 東京, pp94-97, 2011.

7) 細矢光亮, 橋本浩一, 川崎幸彦. 感染症. 遠藤文夫・編 最新ガイドライン準拠 小児科 診断・治療指針, 中山書店, 東京, pp427-492, 2012.

## 2. 学会発表

1) Watanabe M, Hashimoto K, Abe Y, Kodama E, Nabika R, Oishi S, Fujii N, Hosoya M. A novel peptide derived from measles virus fusion protein inhibits the replication of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus in vivo and in vitro. The 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research, Seoul, May 17-19, 2012.

2) Abe Y, Hashimoto K, Watanabe M, Ohara S, Sato M, Kawasaki Y, Hashimoto Y, Hosoya M. Characteristics of viruses derived from nude mice with persistent measles infection: an animal model of subacute sclerosing panencephalitis. 2<sup>nd</sup> World Congress on Virology, Las Vegas, August 20-22, 2012.

3) Watanabe M, Hashimoto K, Abe Y, Kodama E, Nabika R, Oishi S, Fujii N, Hosoya M. A novel peptide derived from measles virus fusion protein inhibits the replication of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus in vivo and in vitro. The 25th International Conference on Antiviral Research, Sapporo, April 16-19, 2012.

4) 阿部優作, 橋本浩一, 川崎幸彦, 細矢光亮. ヌードマウス脳内に持続感染した麻疹ウイルスの検討. 第 43 回日本小児感染症学会総会学

術講演会, 岡山, 10.29-30, 2011.

5) 渡部真裕, 阿部優作, 橋本浩一, 川崎幸彦, 細矢光亮. 膜融合蛋白 (F 蛋白) を標的とした新規ペプチドによる亜急性硬化性全脳炎の新たな治療戦略. 第 43 回日本小児感染症学会総会学術講演会, 岡山, 10.29-30, 2011.

6) 阿部優作, 橋本浩一, 細矢光亮. ヌードマウス脳内に持続した麻疹ウイルスの検討. 第 16 日本神経感染症学会総会, 東京, 11.4-5, 2011.

7) 阿部優作, 橋本浩一, 宮崎恭平, 佐藤晶論, 川崎幸彦, 細矢光亮. 亜急性硬化性全脳炎患者に対するリバビリン脳室内投与療法における代謝物の濃度とその抗ウイルス効果. 第 43 回日本小児感染症学会学術集会, 北九州, 11.24-25, 2012.

8) 宮崎恭平, 阿部優作, 橋本浩一, 佐藤晶論, 川崎幸彦, 森修一, 錫谷達夫, 細矢光亮. リバビリン脳室内投与療法中の亜急性硬化性全脳炎患者における髄液中リバビリン代謝物濃度とその抗ウイルス効果. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 11.10-12, 2013.

## G. 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

## 亜急性硬化性全脳炎（SSPE）の診断における麻疹ウイルス抗体価国際単位表示法の普及・啓発および病態解明

研究分担者：市山高志 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野  
研究分担者：長谷川俊史 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野  
研究協力者：松重武志 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野  
研究協力者：Banu Anlar Department of Pediatric Neurology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey

**研究要旨** 本邦およびトルコ共和国 Hacettepe 大学にご協力いただき、これまでに亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) 症例検体を集積している。これらの検体を用いて、麻疹ウイルス抗体価 (IU/mL)、血清および髄液中 apoprotein (Apo) E 濃度、ApoE3 濃度、ApoE4 濃度および microtubule-associated protein 2 (MAP2) 濃度について検討した。①SSPE 患者髄液中の麻疹ウイルス抗体価 (IU/mL) は対照群に比し有意に高値であった。②SSPE 患者髄液中の ApoE および ApoE4 濃度は対照群に比し低値で、ApoE3 濃度は高値であった。③SSPE 患者髄液中 MAP2 濃度は対照群に比し、高値であったが、血清中 MAP2 濃度は有意差を認めなかった。引き続き麻疹ウイルス IgG (IU/ml) の測定を普及・啓発していき、今後 ApoE、ApoE3、ApoE4 および MAP2 が SSPE の病態への関与、病勢把握、治療効果判定の指標としての有用性について検討していく。

### A. 研究目的

トルコ共和国 Hacettepe 大学と協力し、亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) の診断における麻疹ウイルス抗体価国際単位表示法を普及・啓発することと病態解明病勢把握や治療効果の判定のためのバイオマーカーを検討することを目的とする。

### B. 研究方法

本邦およびトルコ共和国 Hacettepe 大学にご協力いただき、SSPE 症例検体を集積している。これまでに血清 66 検体、髄液 85 検体を提供いただいている。これらの検体を用いて、麻疹ウイルス抗体価 (IU/mL)、各種サイトカイン、神経構成蛋白などを測定し、報告してきたが、現時点で SSPE の病勢を把握するのに臨床的に有用なマーカーは見つけられていないため、今後も継続して検討する。

本研究では SSPE 患者血清および髄液中 apoprotein (Apo) E 濃度、ApoE3 濃度、ApoE4 濃度および Microtubule-associated protein 2 (MAP2) 濃度について ELISA 法で測定し、SSPE

におけるそれらのバイオマーカーとしての有用性について検討する。

### （倫理面への配慮）

本研究はトルコ共和国 Hacettepe 大学 Anlar 教授の同意を得てトルコ人の SSPE 患者の血清・髄液試料の提供を受けて実施する。これら試料および本邦患者の試料については個人情報保護し、学会発表や論文報告時にも個人が特定されないよう配慮する。

### C. 研究結果

本研究における研究結果は以下の通りである。

- ①SSPE 患者髄液中の麻疹ウイルス抗体価 (IU/mL) は対照群に比し有意に高値であった (図 1)。
- ②SSPE 患者髄液中の ApoE (図 2) および ApoE4 濃度 (図 3) は対照群に比し低値で、ApoE3 濃度 (図 4) は高値であった。
- ③SSPE 患者髄液中 MAP2 濃度 (図 5) は対照群に比し、高値であったが、血清中 MAP2 濃度 (図

6)は有意差を認めなかった。

引き続き、本測定法(麻疹ウイルスIgG(IU/m))を普及・啓発していく。またApoE、ApoE3、ApoE4およびMAP2がSSPEの病態への関与、病勢把握、治療効果判定の指標としての有用性については今後検討が必要である。

#### D. 考察

本研究ではSSPE患者髄液中のApoEおよびApoE4濃度は対照群に比し低値で、ApoE3濃度は高値であり、Tauタンパク質の異常リン酸化と神経原線維濃縮体の形成を抑制することが推測され、病態への関与が示唆された。またSSPE患者髄液でMAP2濃度の有意な上昇を認め、ニューロンの細胞体および樹状突起の変性・脱落を間接的に示唆するものと推測した。SSPEの病勢把握、治療効果判定の指標としての有用性については今後検討していく。

#### E. 結論

本研究ではSSPE患者髄液でApoE3、MAP2濃度の有意な上昇を認め、病態への関与が示唆された。ApoE3、MAP2がSSPEの病態関与、病勢把握、治療効果判定の指標になりうる可能性があり、今後その有用性については検討が必要である。

#### [参考文献]

- 1) Wisniewski HM, Dymecki J, Wegiel J, Kulczycki J, Sidor B, Grundke-Iqbal I, et al. Neurofibrillary pathology in subacute sclerosing panencephalitis. *Dementia* 2:133-141, 1991.
- 2) Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240:622-630, 1988.
- 3) Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 917:148-161, 1987.
- 4) Dekroon RM, Armati PJ. Synthesis and processing of apolipoprotein E in human brain cultures. *Glia* 33:298-305, 2001.
- 5) Yüksel D, Ichiyama T, Yilmaz D, Anlar B. Cerebrospinal fluid apolipoprotein E levels in

subacute sclerosing panencephalitis. *Brain Dev* 34:298-301, 2012.

6) Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE. Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science* 264:850-852, 1994.

7) Blackman JA, Worley G, Strittmatter WJ. Apolipoprotein E and brain injury: implications for children. *Dev Med Child Neurol* 47: 64-70, 2005.

8) Matsushige T, Ichiyama T, Anlar B, Tohyama J, Nomura K, Yamashita Y, Furukawa S. CSF neurofilament and soluble TNF receptor 1 levels in subacute sclerosing panencephalitis. *J Neuroimmunol* 205:155-159, 2008.

9) Ballough GP, Martin LJ, Cann FJ, Graham JS, Smith CD, Kling CE, Forster JS, Phann S, Filbert MG. Microtubule-associated protein 2 (MAP-2): a sensitive marker of seizure-related brain damage. *J Neurosci Methods* 61:23-32, 1995.

10) Park D, Joo SS, Lee HJ, Choi KC, Kim SU, Kim YB. Microtubule-associated protein 2, an early blood marker of ischemic brain injury. *J Neurosci Res* 90:461-467, 2012.

#### F. 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) Yüksel D, Ichiyama T, Yilmaz D, Anlar B. Cerebrospinal fluid apolipoprotein E levels in subacute sclerosing panencephalitis. *Brain Dev* 34:298-301, 2012.

##### 2. 学会発表

1) 井上裕文, 梶本まどか, 松重武志, 岡 桃子, 市山高志. 亜急性硬化性全脳炎患者における髄液中apolipoprotein E (ApoE) 濃度の検討. 第54回日本小児神経学会, 札幌, 5.17-19, 2012.