

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）
総括研究報告書

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

研究代表者 山田正仁 金沢大学医薬保健研究域医学系 脳老化・神経病態学（神経内科学） 教授

研究要旨 プリオン病、亜急性硬化性全脳炎(SSPE)、進行性多巣性白質脳症(PML)について、感染及び発症メカニズム、疫学、臨床病態を解明し、早期診断法、治療法、感染及び発症予防法を開発、確立することを目的に調査研究を実施し以下の成果を得た：(1) プリオン病：疫学、臨床病態では、サーベイランス 1894 例のデータを解析し、硬膜移植後 Creutzfeldt-Jakob 病(CJD)例におけるプリオンの脳内進展様式、硬膜移植後 CJD の若年例にみられるアミロイド β 蛋白沈着等を報告した。診断法開発では、脳脊髄液中の感染型プリオン蛋白(PrP^{Sc})を検出する画期的診断法として開発した RT-QuIC の国際共同研究による有用性検証、MRI 経時変化の自動検出プログラム開発等を報告した。基礎研究では、正常型(PrP^C)及び PrP^{Sc}の機能、細胞毒性、神経障害機序を解析し、プリオンのアミロイド構造形成のメカニズム、非定型 BSE プリオンのヒト神経系細胞への感染成立等を解明した。治療法開発では、プリオン病患者に対するペントサンポリ硫酸(PPS)脳室内投与による臨床試験を継続評価し、新たな臨床試験のためのプリオン病コンソーシアム(JACOP)設立に貢献し、抗プリオン化合物として PrP^C構造を選択的に安定化するメディカルシャペロン等の開発で成果を得た。(2) SSPE：2012 年全国調査による 88 名の患者同定と臨床的特徴の解析、トルコ共和国との共同研究による検体収集を含む臨床病態の解析、皮下埋め込み型持続輸注ポンプによるリバビリン脳室内持続投与療法の臨床試験を継続した。SSPE ウイルスに認められる膜融合を促進させる F 蛋白質変異を解析し、F 蛋白質をモチーフとする新規ペプチドの SSPE 増殖抑制効果、モデル動物治療効果を解明した。(3) PML：JC ウイルス(JCV)ゲノム検査を介した全国サーベイランスで 6 年間に 76 名の患者を確認し、最近の PML 発症の背景や臨床的特徴を明らかにした。JCV の増殖・封入体形成機構を解明し、JCV の TAg の機能、PARP-1 阻害剤の JCV 増殖抑制効果を解析し、これらの治療薬開発上の有用性を示した。(4) 診療ガイドラインの整備等：3 対象疾患それぞれの分科会において診療ガイドライン作成等を推進し、『PML 診療ガイドライン 2013』を平成 25 年 1 月に発刊した(<http://prion.umin.jp/>)。

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（神経内科学） 教授	病研究センター センター長
金子清俊	東京医科大学神経生理学講座 主任教授	横山 隆 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所プリオン病研究センター 上席研究員
八谷如美	東京医科大学神経生理学講座 教授	竹内敦子 東北大学大学院医学系研究科病態神経学講座 助教
作道章一	琉球大学医学部保健学科生体代謝学 准教授	堂浦克美 東北大学大学院医学系研究科神経化学分野 教授
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 教授	大橋祐美子 独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センター 研究員
毛利資郎	独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所プリオン	桑田一夫 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科医療情報学専攻 教授
		堀内浩幸 広島大学大学院生物圏科学研究科

	免疫生物学 教授	堀田 博	神戸大学大学院医学研究科微生物学 分野 教授
西田教行	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染分子解析学分野 教授	柳 雄介	九州大学大学院医学研究院ウイルス学 教授
長谷部理絵	北海道大学大学院獣医学研究科獣医 衛生学教室 講師	野村恵子	熊本大学医学部附属病院発達小児科 助教
佐々木真理	岩手医科大学医歯薬総合研究所 超高磁場 MRI 診断・病態研究部門 教授	岡 明	杏林大学医学部小児科 教授
齊藤延人	東京大学医学部附属病院脳神経外科 教授	吉永治美	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 発達神経病態学 准教授
岩崎 靖	愛知医科大学加齢医科学研究所 講師	愛波秀男	静岡県立こども病院地域医療連携室 兼 神経科 室長 兼 医長
高尾昌樹	東京都健康長寿医療センター研究所 専門研究部長	鈴木保宏	大阪府立母子保健総合医療センター 小児神経科 主任部長
坪井義夫	福岡大学医学部神経内科学教室 教授	多田有希	国立感染症研究所感染症情報センター 室長
桶本優子	国立感染症研究所細胞化学部 主任研究官	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 教授
濱口 毅	金沢大学附属病院神経内科 助教	西條政幸	国立感染症研究所ウイルス第一部 部長
細矢光亮	福島県立医科大学医学部小児科学講 座 教授	三浦義治	東京都立駒込病院脳神経内科 医長
市山高志	山口大学大学院医学系研究科小児科 学分野 教授	宍戸-原 由紀子	杏林大学医学部病理学教室 講師
長谷川俊史	山口大学大学院医学系研究科小児科 学分野 准教授	長嶋和郎	北海道大学大学院医学研究科腫瘍病 理学分野 名誉教授
楠原浩一	産業医科大学医学部小児科学講座 教授	雪竹基弘	佐賀大学医学部内科（神経内科） 講師
		奴久妻聡一	神戸市環境保健研究所微生物部 副部長

A. 研究目的

プリオン病、亜急性硬化性全脳炎 (SSPE)、進行性多巣性白質脳症 (PML) について、感染及び発症メカニズム、疫学・実態を解明し、早期診断法、治療法、感染及び発症予防法を開発、確立することを目的とする。

対象の 3 疾患は共に進行性で致死的な感染症であり、感染や発症のメカニズムの解明は極めて不十分であり治療法が確立していない。本研究により、これらの致死性感染症の感染や発症機序の解明を進展させ、早期診断法、治療法や発症・感染予防法の開発・確立に貢献する。

プリオン病は人獣共通感染症であり、牛海綿状脳症からの感染である変異型 Creutzfeldt-Jakob 病

(CJD) や医原性の硬膜移植後 CJD 等が社会的問題になっている。有効な治療法や感染・発症予防法はなく、平均 18 ヶ月で死亡する。わが国では、2005 年に初めて変異型 CJD が同定され (Yamada *et al. Lancet* 2006)、また、硬膜移植後 CJD の症例数が全世界の半数以上を占め現在も発症が続いている (Nozaki, Yamada *et al. Brain* 2010)。1980 年代に硬膜移植を受けリスクが高い約 20 万人にも及ぶ患者が潜在する。プリオン病は動物からヒト、ヒトからヒトへ感染し、感染因子プリオンの不活化が困難なため、BSE 汚染食品からの変異型 CJD 感染や硬膜移植後 CJD のような医原性感染について国民の不安も大きい。本研究により感染および発症メカニズムを解明し、発症前及び早期診断

法、治療法、感染・発症予防法を開発・確立することによって、感染リスク評価法や予防策の改善、国民の不安の軽減にも貢献する。

SSPE については、わが国は先進国中で唯一の麻疹流行国であり SSPE の発症が持続している。欧米では SSPE 発症がほとんどないため、治療研究は行われていない。SSPE の発症動態を解明し麻疹感染・流行が本症発症に与える影響を明らかにすることはわが国の麻疹予防接種施策に貢献する。また、神経細胞における麻疹ウイルス(MV)の持続感染機序は未だ不明であり、分子病態解明に基づく新たな治療法の開発、リバビリン脳室内持続投与療法等の治療法の臨床試験の実施により本症患者の予後改善を図る。

PML は HIV 感染者の漸増、血液疾患、自己免疫疾患、それらに対する強力な免疫治療薬の使用に伴い増加している。PML の発症動向を把握し、原因となる JC ウイルス(JCV)の脳への感染・増殖機構を解明することによって、早期診断法、最適な治療を確立・普及させる。

B. 研究方法

本領域のエキスパートの臨床医、基礎研究者、獣医学者等を結集した融合的研究組織を構築し、対象となる3疾患ごとに分科会を設置し、研究者間の緊密な連携をとりながら研究を推進した。プリオン病の疫学、2次感染については「プリオン病のサーベイランスと感染予防に関する調査研究」の指定研究班(研究代表者：水澤英洋)と密接に連携し、さらに全国の CJD 担当専門医の協力を得ながら研究を推進した。プリオン病の治療に関しては「プリオン病予防の実用化に関する研究」班(研究代表者：堂浦克美)と協力して研究を推進した。また、国際共同研究、国際協力(プリオン病に関する EuroCJD グループとの共同研究、SSPE 多発地であるトルコ共和国との共同研究ほか)を継続した。

1) プリオン病

① プリオン病のサーベイランスと臨床病態：1999年4月より実施されている CJD サーベイランスの結果を用いて、我が国のプリオン病の状況を調査した(水澤、山田、浜口他)。プリオン病の約3/4を占める孤発性 CJD の中で典型的な病像を

呈する MM1 型について、大脳皮質病変の評価法を確立するために、病変の進展と臨床経過との関連を検討した(岩崎)。遺伝性プリオン病については、Gerstmann-Sträussler-Scheinker 病(GSS) A117V 変異の米国大家系について臨床的、神経病理学的検討を行った(高尾)。硬膜移植後 CJD について、プリオン病のサーベイランスで硬膜例と判定された 84 例を対象に、移植部位と臨床症状との関連について病理学的サブタイプを加味して解析し、プリオンの脳内進展様式を検討した(山田)。硬膜移植例で移植硬膜によりプリオンのみならず、アミロイド β 蛋白(Aβ)が伝播している可能性を検討した(浜口)。プリオン病は感染性の問題等から、剖検率が低いことが問題となっているが、関東地域における剖検拠点になっている美原記念病院における取り組みを検討した(高尾)。

② プリオン病の診断法の開発：画像診断については、MRI 拡散強調画像(DWI)の表示条件標準化によってプリオン病の早期病変診断能が向上することを明らかにしてきたが、その経時的変化の客観的判定法は存在しない。そこで経時的変化の評価法を検討した(佐々木)。脳脊髄液(CSF)検査については、ヒト孤発性プリオン病のバイオマーカー(総タウ蛋白、14-3-3 蛋白)と異常プリオン蛋白(PrP^{Sc})試験管内増幅法(RT-QuIC 法)の診断精度を、国際共同研究によるプリオン病確実例 92 例、非プリオン病 240 例を用いて検討した(西田)。CSF マーカーとして心臓型脂肪酸結合タンパク質(H-FABP)に注目し、プリオン病および各種認知症患者の CSF、血清中の H-FABP を高感度検出系で検討した(堀内)。リコンビナント正常プリオン蛋白(PrP^C)を用いて CJD 患者脳から、protein misfolding cyclic amplification(以下 PMCA)法によってヒトプリオンの高効率な増幅を試みた(竹内)。

③ プリオン病の分子病態解明：遺伝性プリオン病である GSS の Y145STOP 変異では、分泌系を経由して細胞膜上に局在する PrP が誤ってミトコンドリアに移行し、ミトコンドリアの核近傍への凝集を引き起こし、神経細胞死が起こる原因となるため、マウス神経芽細胞腫由来 N2a 細胞を用い、ミトコンドリア凝集をおこすことが可能な EGFP 融合のトランケート PrP を発現させ、ミトコンド

リア凝集機構を解析した(八谷、金子)。酵母プリオン Sup35-NM をモデル蛋白質とした凝集機構の解析では、これまで特殊な揺らぎを持つ 2 領域が凝集体形成の開始点であることを示唆する結果を得てきたが、今回、常磁性緩和促進法を用い、天然変性蛋白質と考えられている Sup35-NM の部分構造を調べた(大橋)。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ために、PrP^{Sc} の細分化を目的として、PK 以外の蛋白質分解酵素処理によって出現する PrP^{Sc}断片のバンド型別を行った(横山)。プリオン病の神経細胞死のメカニズムを解明する目的で、プリオン感染によるインスリンシグナルの影響及びそのメカニズムについて解析した(坂口)。プリオン感染動物の脳内では酸化ストレス増大が起きているが、本研究では、抗酸化ストレス活性に変化を起こすことが知られているボルナ病ウイルス(BDV)の持続感染状態下における PrP^C の変化を解析した(作道)。伝達性海綿状脳症に広い感受性を有することが知られている bank vole (*Myodes glareolus*) の PrP 遺伝子(BVPrP)を発現するトランスジェニック(TgBV)マウスとノックイン(KiBV)マウスを作成し、CJD 脳の接種試験を行った(毛利)。非定型 BSE プリオンは従来型の BSE(定型 BSE)プリオンに比べ、ウシや霊長類(サル)に対しより強い感染性を示すことが知られているが、ヒトへの感染性を含め未だ明らかになっていないため、非定型 BSE のヒトへの感染性の有無あるいは感染性の強さなどに関する知見を得ることを目的に、ヒト神経細胞株(ニューロblastoma)を用いた解析系の樹立を行った(楠本)。

④ プリオン病の治療・予防法の開発：プリオン病に対するペントサンポリサルフェート(PPS)の脳室内持続投与による臨床試験を継続し、臨床評価および副作用の検討を行った(坪井)。さらに次世代のプリオン病治療の開発に向けた取り組みとして、GSS 家系の調査を行い(坪井)、さらに臨床試験のための枠組み作りのための全国的な組織づくりを行った(山田、水澤ほか)。抗プリオン物質について、PrP に対する相互作用に基づいて

分類し、NMR により PrP との結合部位の同定を行い、SPR により結合の特異性を調べた(桑田)。プリオン病の治療予防開発研究として、昨年度発見した抗プリオン活性や治療効果をもつ化合物・生物因子(メラニン、GM-CSF)について作用機構や実用化可能性を検討した(堂浦)。発症後にプリオン病を治療するためには、PrP^{Sc}の増殖を阻害することに加え神経保護や変性した組織の修復が必要である。不死化ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSCs)をプリオン感染マウスに移植すると hMSCs は病変部に走化して神経栄養因子を産生しマウスの生存期間が延長することを報告したが、同種移植の実験系でより詳細な解析を行った(長谷部)。脳神経外科手術機器を介したプリオン病の発症に関して、リスク保有者のフォローアップデータを用いて調査を行った(齊藤)。

2) SSPE

① SSPE のサーベイランスと臨床病態・治療：わが国の SSPE の実態については、2007 年に行われたサーベイランス以降の患者動向の状況が不明である。今回、5 年ぶりに SSPE 患者の実態について一次調査および二次調査をサーベイランス調査として行い、その途中集計結果を報告した(岡、愛波、鈴木、吉永)。また、特定疾患治療研究事業データを用いて、SSPE の発生状況を解析した(多田)。神経のカルシウム依存性のシグナル伝達に關与する visinin like protein(VILIP)-1 の血清および髄液中濃度について、トルコ共和国から提供された SSPE 患者の検体(血清 18 検体、髄液 20 検体)と対照群(血清 26 検体、髄液 15 検体)について ELISA 法で検討した(長谷川、市山)。SSPE 脳にみられるタウ凝集体の形成にタウ蛋白と apolipoprotein E(Apo E)の相互作用が關与する可能性があることから、日本人の SSPE 患者および対照群の Apo E 遺伝子の SNP genotyping を行った(楠原)。安全で効果的なりバビリン治療法を確立させるために、これまでにりバビリン治療を実施した施設に対しアンケート調査を行い、その安全性、効果、有害事象、治療に伴う問題点等について検討した(野村)。

② SSPE の分子病態解明と治療法開発：神経細胞への感染や病原性における SSPE ウイルス株の F

蛋白質変異の意義を明らかにするために、発現ベクターに組み込んだヘマグルチニン(H)遺伝子、F遺伝子を培養細胞に導入し、細胞融合を顕微鏡で観察し、融合能が亢進したF蛋白質をコードするF遺伝子を持つ組換えMVを作成し、培養細胞および生後10日のハムスターに脳内接種、培養細胞における細胞融合能と感染能、動物に対する病原性を評価した(柳)。SSPEウイルスの細胞融合活性と神経病原性の関連性が示唆されているが、それを規定する個々のアミノ酸変異については未だ不明な点も多いため、SSPEウイルスKobe-1株由来のFタンパク質のアミノ酸変異を麻疹ウイルス野生株のFタンパク質に導入し、それぞれの変異ウイルス株の細胞融合活性、さらに、それらの変異Fタンパク質とHタンパク質との相互作用について検討した(堀田)。MV F蛋白をモチーフに新規ペプチドを合成し、MV及びSSPEウイルスに対する増殖抑制効果についてMV(Edmonston株)およびSSPEウイルス(Yamagata-1株)、ヌードマウスにYamagata-1株を感染させた動物実験モデルを用いて評価した(細矢)。

3) PML

① PMLのサーベイランスと臨床病態・治療 : PMLの診断においてはCSFを用いたJCVゲノムDNAのPCR検査が有用である。国立感染症研究所において迅速性および定量性、信頼性において優れた定量的リアルタイムPCR検査系を確立し、JCV検査を介したわが国のPMLのサーベイランスを行った(西條)。2011年11月から2012年8月までに、国立感染研究所へCSF JCV-PCR検査依頼のあった7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(三浦)。2011年11月から2012年10月までに報告されたPMLの診断・治療に関する論文を検索した(雪竹)。

② PMLの分子病態解明と治療法開発 : PMLはJCVが乏突起膠細胞に感染し、髄鞘崩壊を誘導して発症する。感染した乏突起膠細胞の腫大核には、核全体を占めるJCV封入体、感染初期にはドット状の封入体(dot-shaped inclusions)も存在し、ドット状封入体はJCVがPML-NBs(promyelocytic

leukemia nuclear bodies)に集積し形成される。そこで、JCV封入体形成過程におけるPML-NBsの形態変化を観察した(宍戸-原)。JCVのLarge T抗原(TAg)はウイルスの複製、転写調節を行う早期タンパク質であり、p53やpRbなどの癌抑制遺伝子タンパク質と結合し、細胞増殖を誘導する。JCVのTAgに特異的なC末端領域の機能を明らかにするため、C末端領域の変異体を作成しTAgの機能を解析した(澤)。Methyl CpG binding protein 2(MeCP2)はDNAプロモーター領域の転写を制御する分子であり、PML脳ではTAgが発現している乏突起膠細胞においてMeCP2が発現が認められる。MeCP2が発現がJCV感染に関与する可能性があり、*in vitro*の系でJCV TAgによるMeCP2のプロモーター活性およびMeCP2発現の影響を検討した(長嶋)。細胞内酵素Poly(ADP-ribose) polymerase 1(PARP-1)阻害剤である3-aminobenzamide3-(AB)のJCV増殖抑制効果を神経芽細胞腫由来のIMR-32細胞とJCV持続感染細胞であるJCI細胞を用いて検討した(奴久妻)。

4) 診療ガイドラインの整備等

3対象疾患それぞれの分科会において診療ガイドラインの整備に向けた取り組み等を行った。

(倫理面への配慮)

患者を対象とする臨床研究(診断、治療、遺伝子解析等)、疫学研究等については各施設の倫理審査委員会の承認、それに基づく説明と同意を得て研究を実施した。遺伝子組み換え動物を含む動物実験に関しては、各施設の指針に基づき動物実験委員会等の承認を得た上で研究を実施した。

C. 研究結果

1) プリオン病

① プリオン病のサーベイランスと臨床病態 : 2012年9月までに全3664件を調査し、1894人(男:810人、女:1084人)をプリオン病と認定した。近年は年間150-160例の発症がある。登録患者の内訳は孤発性CJD:1452人(77%)、遺伝性CJD(genetic CJD):270人(14%)、硬膜移植歴を有するCJD:81人(4%)、変異型CJD(vCJD):1人

(0.05%)、GSS : 79 人 (4%)、FFI : 4 人 (0.2%) であった。追跡の結果、患者の 44% が発病後 1 年以内に死亡していた。硬膜移植歴を有する CJD 患者に関しては、平成 24 年度に新たに 2 例の発症があり、わが国の硬膜例の総計は 144 例となった。

MM1 型孤発性 CJD 28 例における大脳皮質病変を検討し、病変の進展は、ステージ 1 : 海綿状変化、ステージ 2 : 肥胖性アストロサイトの増生、ステージ 3 : neuropil の粗鬆化、ステージ 4 : 神経細胞脱落、ステージ 5 : 海綿状態 (status spongiosus)、ステージ 6 : 大型の空洞形成の 6 段階にステージ分類が可能であった。各症例の大脳新皮質ステージの平均と全経過および脳重には統計学的に有意な相関が認められた。

GSS A117V 変異家系は、臨床的に、構音障害、失調、錐体外路徴候、認知症を呈し、神経病理学的には、前頭葉、側頭葉、海馬傍回、基底核にアミロイド斑を多数認め、神経細胞脱落は軽度から中等度で、大脳皮質、皮質直下白質、基底核の神経線維に沿った PrP 陽性所見を認めた。

硬膜移植後 CJD 84 例の移植部位と臨床症状との関連を検討した。84 例全体での検討では、初発症状として vertigo ($p < 0.01$)、diplopia ($p < 0.05$) がテント下移植群で有意に多く認められた。経過中に認められた症状では、小脳症状がテント下移植群で有意に多く認められた ($p < 0.05$)。典型例 (非プラーク型) 群のみでの検討では、vertigo が初発症状としてテント下群で有意に多く認められ ($p < 0.05$)、経過中に小脳症状が認められた割合が有意に多かった ($p < 0.05$)。一方、非典型例 (プラーク) 群の検討では、移植部位間による有意な差は認められなかった。

19 歳時に頭部外傷に対して脳外科手術を受け、右前頭蓋窩にヒト屍体由来硬膜 (Lyodura®) が移植され、37 歳時に硬膜移植後 CJD を発症し、39 歳時に死亡し、剖検にて非プラーク型 CJD と確定診断された例で、右前頭葉皮質を中心に A β 沈着を認めた。

関東のプリオン病剖検拠点である美原記念病院は外部のプリオン病症例の剖検を受け入れている。平成 24 年には 9 例 (自施設 5 例、他施設 4 例) の剖検を行い、内訳は孤発性 5 例、遺伝性 3 例、硬膜例 1 例であった。

② プリオン病の診断法の開発 : 早期病変診断能に優れた MRI DWI の経時的変化の解析に画像統計解析手法を応用し、経時的変化の自動検出プログラムを新たに開発し、差分画像では、新たな病変の出現域は高信号として、病変の消退域は低信号として明瞭に描出することができた。

CSF マーカーについて、総タウ蛋白、14-3-3 蛋白、RT-QuIC 法の診断精度を、プリオン病確実例を用いて検討したところ、14-3-3 蛋白の感度・特異度は 90.8%、81.2%、総タウ蛋白の感度・特異度は 87.6%、86.8%、RT-QuIC 法の感度・特異度は 82.5%、98.7% であった。さらに 14-3-3 蛋白と総タウ蛋白と RT-QuIC 法の組み合わせにて 95.6% 検出可能であった。RT-QuIC 法の偽陽性 2 例はいずれも症候性けいれん患者であった。

CSF 中の H-FABP の検討では、総タウ蛋白陰性、14-3-3 蛋白陰性、H-FABP 陽性の患者は全て Val180Ile (V180I) 変異例であること、CJD の臨床経過中 H-FABP 濃度は総 tau 濃度と近似した変動を示すこと、レビー小体型認知症 (DLB) では血清 H-FABP が高値を示すことなどを見出した。

リコンビナント PrP^C を用いて CJD 患者脳から PMCA 法で PrP^{Sc} を増幅する試みでは、孤発性 CJD-MV2、VV2 プリオンは、基質 PrP^C が 129V の時、プロテアーゼ抵抗性 PrP (PrP^{Res}) の顕著な産生を認めた。また、プラークタイプの PrP^{Sc} の沈着を示すプラーク型硬膜移植後 CJD 脳を seed とした場合、seed の遺伝子型は 129M/M であるにも関わらず、MV2、VV2 と同様に基質として 129V の PrP^C を用いた場合に PrP^{Sc} の顕著な増幅が認められた。

③ プリオン病の分子病態解明 :

マウス神経芽細胞腫由来 Neuro2a 細胞を用いた PrP によるミトコンドリア凝集機構の解析では、細胞質 14-3-3 タンパク質のアイソフォームの一つである ζ が、プリオンタンパク質が異常局在しているミトコンドリアにリクルートされ、ミトコンドリア外膜上の Miro1 と複合体を形成した。これにより、ミトコンドリアの正常な細胞内分布が阻害された。

酵母プリオン Sup35-NM をモデル蛋白質とした凝集機構については、常磁性緩和促進法を用いた Sup35-NM の部分構造を解析したところ、N 末端

領域の一部に、二次構造を持たないが比較的コンパクトな領域があること、ワイルドタイプの凝集形成において凝集開始点 2 領域のうち、片方が有利となる理由はもう一方がコンパクトな構造の中に取り込まれていることが原因であるということが判明した。

PK 以外の蛋白質分解酵素処理によって出現する PrP^{Sc} 断片のバンド型別の検討では、プリオン感染動物の脳乳剤を 2 種類のエンドプロテイナーゼ Lys-C または Arg-C で消化した後の PrP のバンド型により、スクレイピー Chandler 株、Obihiro 株、およびマウス馴化 BSE 株由来 PrP が区別できた。10 µg/ml のサーモライシン処理により PrP^C を除去し、PrP^{Sc} のみのフラグメント断片の解析が可能となった。

プリオン病の神経細胞死のメカニズムを解明する目的で、プリオン感染によるインスリンシグナルの影響及びそのメカニズムについて解析した結果、プリオンが感染すると PrP^{Sc} がリサイクリング・エンドソームに蓄積し、ゴルジ装置から細胞膜への小胞輸送を障害し、その結果インスリン受容体は細胞膜まで運ばれず、インスリンシグナルが抑制されることが分かった。

プリオン病脳で増大していると考えられる酸化ストレスに関する検討では、BDV の持続感染は PrP の N 型糖鎖構造を変化させ、PrP の N 型糖鎖構造変化が SOD 活性に影響していることが示された。

TgBV マウスと KiBV マウスによる CJD の接種試験では、TgBV マウスは自発性にプリオン病様症状を呈したが、pK 抵抗性 PrP (PrP^{res}) は検出できず、野生型マウスならびに KiBV マウスへの伝達も成立しなかった。KiBV マウスは CJD-MM1、vCJD などのプリオン病が伝達可能であった。特筆すべきは、これまで伝達できなかった孤発性 CJD-MM2 皮質型の伝達が初めて成立した。

ヒト神経細胞株を用いた非定型 BSE 感染の解析系の検討では、定型 BSE とともに非定型 BSE 由来プリオンの感染が成立すると考えられる細胞株を見いだした。持続感染細胞株を得る目的で (1) PrP 産生量の多い細胞をソーティングにより選別した後に感染実験を行う (2) BSE 由来プリオン感染後にクローニングを行う等の検討を

試みたが、樹立にはいたらなかった。

④ プリオン病の治療・予防法の開発：患者における PPS 臨床試験評価を継続した。対象は 11 例 (孤発性 CJD 6 例、硬膜移植後 CJD 2 例、家族性 CJD (GSS 1 例含む) 3 例) であり、9 例が死亡、2 例が治療継続中である。11 例の治療開始からの経過は平均 34 か月 (4~77 ヶ月) で、治療前の modified Rankin Scale (mRS) は 2-5 で、現在は全例 5-6 である。副作用は硬膜下水腫が全例に認められ、薬剤に関連する血液検査値の異常はみられず、埋め込みポンプ機能も正常であった。PPS 脳室内持続投与は、安全で長期治療にも耐えうる治療法であると考えられる。

新たな臨床試験の準備のために、全国多施設による臨床研究プリオン病コンソーシアム (Japanese Consortium of Prion Disease: JACOP) が設立され貢献した。臨床試験の対象として、進行が比較的緩やかな GSS に注目し、これまでに福岡・佐賀地区に集積する GSS 20 家系の存在を確認した。

抗プリオン物質の NMR、SPR による解析では、近年桑田らが見出した GN8 類縁体は、PrP^C のホットスポットに特異的に結合し、プリオンの正常構造を選択的に安定化する作用があった。このような作用を有する分子をメディカルシャペロンと名付け、それ以外の抗プリオン化合物と区別した。一方、これまでに報告されているキナクリンやペントサンは、PrP 分子の表面全体に非特異的に結合した。さらにコンゴレッドは、PrP を沈殿させ、見かけの PrP 濃度を減少させた。

プリオン持続感染細胞で抗プリオン活性を発揮する新たな化合物であるメラニンは、プリオン蛋白代謝やコレステロール代謝に影響せず、プリオン株に依存せずに抗プリオン活性を発揮した。一方、プリオン脳内感染マウスにおいて感染後期の末梢投与でも有効なサイトカインである GM-CSF は、Tg7-263K 疾患モデル動物では有効であったが、Tga20-22L 疾患モデル動物では無効か、あるいは逆に生命予後を短縮する傾向が見られ、GM-CSF の効果は疾患モデルに依存していることが明らかとなった。

MSCs を用いた感染マウスの治療実験では、マウス骨髄 (BM)、緻密骨 (CB)、脂肪組織 (AT) より

MSCs を分離し、スクレイパー Chandler 株感染マウスの臨床期に脳内移植したところ、BM 由来 MSCs 移植群は非移植対照群と比較して 10 日程度生存期間が延長したが ($p < 0.05$)、CB 由来と AT 由来 MSCs 移植群の生存期間は対照群と有意差がなかった。MSCs で報告されている表面抗原の発現をフローサイトメトリーにより解析したところ、AT 由来 MSCs では CD105 が、CB 由来 MSCs では CD105、CD90.2、CD73、CD106 が二峰性を示し、分離した MSCs には複数の細胞集団が含まれることが示唆されたため、CD105 陽性細胞を分離した。PrP^{Sc} 増殖抑制効果を持つ抗マウス PrP モノクローナル抗体 (mAb) 44B1 の scFv を恒常的に発現、産生する hMSCs を作製したところ、44B1scFv 産生 hMSCs はプリオン感染マウス脳乳剤に対する走化能を有していた。

脳神経外科手術機器を介したプリオン病の発症に関するリスク保有者のフォローアップデータを用いて調査では、平成 24 年度は、インシデント発生時の説明書類、フォローアップのための書類を整備した。また、過去の事案のうち、フォローアップ終期に近づいている 4 機関の現地調査を行いその結果を集計した。新規インシデント可能性事案のうち 4 件を現地調査の対象とし、この内 3 件はインシデント事例となり、フォローアップの依頼を行った。

2) SSPE

① SSPE のサーベイランスと臨床病態・検査・治療：サーベイランスの結果は以下のとおりである：(1) 一次調査結果：①回答率：発送数 1471 施設に対し回答率は 60%、②患者数、平均年齢：88 名、10 歳から 48 歳で平均年齢 24 歳 10 か月、③新規発症患者数：2007 年調査以降 15 名の新規発症、(2) 二次調査結果 (中間報告)：①調査対象数：36 名 (中間)、②患者発症年齢、罹病期間：平均発症年齢は 10 歳 1 か月で、15 歳以降の発症が 4 例、うち 1 例は成人期に発症、罹病期間は 15 年以上が約半数、③発病年毎発症患者数：2000 年以降年間 3 名程度の発症患者が認められている傾向が見られ、特に発症数が減少している傾向は認められない、④重症度 (Jabbour 分類による病期)：II 期 2 名、III 期 1 名を除き全員が IV 期以

上の進行例、⑤身体障害者障害等級：2 級の 1 名 1 と不明の 1 名を除く全員が最重度である 1 級の認定、⑥摂食・呼吸状態：約 3 分の 2 で経管栄養を行い、約 3 分の 1 で気管切開を施行され、6 分の 1 で人工呼吸管理、⑦最近の経過：多くの患者で慢性緩徐進行性、⑧療養状況：ほとんどの患者が在宅療養中、⑨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使用例が限られていた。

特定疾患治療研究事業データを用いた SSPE の発生状況の解析では、医療受給者証所持者数は 2000～2011 年度において 84～104 例の範囲であった。所持者のうち、2001～2011 年度に各自治体で入力された症例の臨床調査個人票データによると、1980 年以降は毎年発病者が認められ、1990 年代～2000 年代初頭には 8～9 例の発病者がみられた年があった。発病年齢の中央値は 11 歳、麻疹罹患年齢は全例が 6 歳以下で、麻疹罹患から SSPE 発病までは平均 11.4 年 (2～26 年) であった。41% は全面介助の必要な状態での在宅療養であった。言語障害、四肢運動障害、歩行障害、知的退行、尿又は便失禁、筋緊張亢進などが 90% 以上の高率に認められ、鼻腔栄養あるいは胃瘻ありの者は 67%、人工呼吸器を用いている者 20% であった。

VILIP-1 の SSPE 血清および髄液中濃度の解析では、SSPE 患者の血清および髄液中の VILIP-1 濃度において対照群との間に有意差を認めなかった。

Apo E の遺伝子型の検討では、ApoE の各 allele および genotype 頻度に SSPE 患者および対照群間で違いを認めなかった。

SSPE に対するリバビリン治療のアンケート調査で回答が得られた 21 施設の患者 25 名について検討した。リバビリンによる平均治療期間は 3.5 年、転帰は死亡が 4 例、中止・終了が 14 例、治療を続行中が 7 例であった。10 例において何らかの効果が認められた。罹病期間によらず、スコアが低い内にリバビリン治療を開始できると、比較的予後が良い傾向にあった。1 歳未満で麻疹に罹患している症例では、治療開始までの罹病期間によらず、特に予後不良となっていた。この治療に

伴う有害事象として、細菌性髄膜炎、血圧低下がみられた。

② **SSPE の分子病態解明と治療法開発**：神経細胞への感染や病原性における SSPE ウイルス株の F 蛋白質変異の意義の検討では、SSPE 患者由来の麻疹ウイルス (MV) 株にしばしば認められる F 蛋白質の変異は、F 蛋白質の膜融合能を亢進させることが示された。これらの変異をもつ F 蛋白質を有する組換え MV は、ヒト神経細胞株を含む受容体陰性細胞に感染して細胞融合を起こすとともに、哺乳ハムスターに神経病原性を示した。

SSPE ウイルス Kobe-1 株由来の変異ウイルス株の細胞融合活性、さらに、変異 F タンパク質と H タンパク質との相互作用について検討したところ、SSPE ウイルスの F タンパク質は麻疹ウイルスのそれに比べてより強い細胞融合活性を示すこと、及び F タンパク質の G301W 変異麻疹ウイルスは、SSPE ウイルス F タンパク質を発現する組換えウイルスと同程度の強い細胞融合活性の増強を示すこと、Y398H 変異、I62T 変異及び特有の frameshift 変異を有する組換え麻疹ウイルスも中等度の細胞融合活性の増強を示すこと、一方、F タンパク質の G401E 変異により細胞融合活性は著しく減弱し、G301W 変異や Y398H 変異による細胞融合活性の増強は G401E 変異の共存によりキャンセルされること、細胞表面の F₁ タンパク質一定量あたりの細胞融合能の比活性は G401E 変異では低く、逆に、G401E+G301W ダブル変異や G401E+G301W+Y398H トリプル変異では SSPE ウイルス F タンパク質とほぼ同程度に増加していることなどを認めた。

MV F 蛋白をモチーフに新規ペプチドを合成し、MV 及び SSPE ウイルスに対する増殖抑制効果について評価した。合成したペプチドのうち Eomonston 株に対する EC₅₀ は M1、M1EK、M2、M2EK でそれぞれ 0.03±0.01、0.10±0.02、0.12±0.04、0.10±0.07 (µM; mean±S.D.) とほぼ同等であった。Yamagata-1 株に対する EC₅₀ は M1、M1EK、M2、M2EK で Vero 細胞および Vero/SLAM 細胞をそれぞれにおいて 0.01±0.01、0.12±0.05、0.26±0.17、0.05±0.03 および 0.01±0.01、0.17±0.02、0.48±0.22、0.02±0.01 (µM; mean±S.D.) であった。CC₅₀ はすべてのペプチドで 100µM 以上であった。動物実験

では M2EK 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) PML

① **PML のサーベイランスと臨床病態・治療**：JCV の PCR 検査を介したサーベイランスでは、2012 年 10 月現在までに合計 809 件の検査を実施し、76 名の PML 患者を確認した。2007 年度からの 4 年間では、PML は血液疾患および HIV 感染症を有する患者を中心として発生していたが、一方、直近 1 年 7 ヶ月 (2011 年 4 月から 2012 年 10 月) における調査結果では、自己免疫疾患もしくは臓器移植歴を有する患者における PML が増加傾向にあることが明らかになった。また、様々な種類の基礎疾患を有する PML 患者において、女性の割合が増加していた。

2011 年 11 月から 2012 年 8 月までに発症した 7 例は男性 3 例、女性 4 例で、平均 50.7 歳、症状は 7 例中 5 例 (71.3%) で意識認知障害、4 例 (57.1%) で片麻痺、3 例 (42.8%) で失語、2 例 (28.6%) で構音障害・深部腱反射亢進・振動・小脳症状を認め、脳 MRI 上の病変分布は、全例左右非対称性で、大脳白質が 7 例 (100%)、小脳白質が 3 例 (42.8%)、脳幹部が 2 例 (28.6%) であり、CSF 検査では蛋白増加を 5 例 (71.3%)、細胞増加を 1 例 (14.3%) に認めた。基礎疾患は AIDS 3 例、シェーグレン症候群、SLE、チャージスト劳斯症候群、原発性マクログロブリン血症各 1 例であり、日和見感染症としてサイトメガロウイルス合併を 4 例 (57.1%)、真菌感染症合併を 1 例 (14.3%) に認めた。誘発薬剤では、プレドニン使用 3 例、エンドキサン使用 2 例であった。

最近 1 年間の PML に関する報告では、多発性硬化症に対する natalizumab 治療に合併する PML について詳細な報告が数多く出版され、病態の理解が深まった。メフロキンによる PML 治療の有効性の評価はまだ定まっていないが、P 糖蛋白質の遺伝子多型による反応性の違いの可能性を示唆するデータが出て、今後の展開が注目される。また、新たに brentuximab によるモノクローナル抗体 PML の報告があった。

② **PML の分子病態解明と治療法開発**：PML 脳では、乏突起膠細胞の核腫大は脱髄・変性の進行に

伴い顕著化すること、細胞周期関連蛋白の発現は核面積に応じて変化すること、分裂細胞 S 期に発現する PCNA は、JCV 感染細胞の比較的小型核(核面積約 30 μm^2)に陽性となり、S 期～G2 期に発現が増加する cyclin A は大型核(核面積約 70 μm^2)に陽性となること、JCV VP1 蛋白陽性細胞は、PCNA・cyclin A と一致した二峰性の核面積ピークを示すこと、PML-NBs は、小型核(核面積約 30 μm^2)では直径約 0.2 μm の顆粒状で、大型核(核面積約 70 μm^2)では直径約 1.0 μm 以上の二次元でリング状、三次元で球状の構造を示すこと、超解像顕微鏡(SIM)で観察すると、JCV VP1 蛋白は、大型 PML-NBs の外側に集積しており、電子顕微鏡でも、これに相当する JCV 粒子のリング状配列を示すことが確認された。

JCV の TAg の機能を C 末端領域の変異体を作成し解析した結果、JCV の TAg の C 末端領域は同族のポリオマウイルスである SV40 の TAg と異なり、p53 のタンパク質修飾を顕著に抑制することが判明した。また、この領域は JCV ゲノム複製を促進することが明らかとなった。

JCV Tag が MeCP2 のプロモーター活性および MeCP2 発現に及ぼす影響を検討したところ、JCV TAg により MeCP2 プロモーター活性は上昇するにも関わらず、mRNA およびタンパク質発現の亢進は認めず、プロモーター活性と mRNA およびタンパク質発現に乖離が認められた。

PARP-1 阻害剤である 3-AB の JCV 増殖抑制効果を神経芽細胞腫由来の IMR-32 細胞と JCV 持続感染細胞である JCI 細胞を用いて検討したところ、DNA replication assay と JCI 細胞を用いた長期間培養の結果から、3-AB により JCV の複製が抑制されることでウイルス産生が低下すること、IMR-32 細胞内の PARP-1 活性が低下していることが明らかとなった。

4) 診療ガイドラインの整備等

3 対象疾患それぞれ分科会で、診療ガイドラインの整備等に向けた取り組みを行った。『PML 診療ガイドライン 2013』が完成し、平成 25 年 1 月に小冊子として発刊し、さらに研究班ホームページ (<http://prion.umin.jp/>) 上で公表した。プリオン病については、『プリオン病診療ガイドライン

2013』の編集作業が進行し、編集委員会における討議の上、改訂作業を行い、平成 25 年度中に発刊の予定となった。アジア太平洋プリオンシンポジウム(平成 24 年 7 月 29-30 日、横浜)を後援した。SSPE については、診療ガイドラインの改訂作業が進行した。

D. 考察

1) プリオン病

① プリオン病のサーベイランスと臨床病態：

わが国ではプリオン病の患者数として年間ほぼ 150-160 例が報告されている。BSE 関連の変異型 CJD は 2005 年に診断された英国滞在歴のある一例のみである(Yamada *et al.* Lancet 2006)。一方、硬膜移植後 CJD は、近年、年間 5 例以下で推移しているものの発生が続いており、わが国の硬膜例 144 例は世界全体の 217 例の 2/3 にあたる。1980 年代半ばの手術が最もハイリスクであり、潜伏期間が 30 年の例があることを考えると、少なくとも 2010 年代は、今後も硬膜移植後 CJD の患者が継続して発生することが予想される。

MM1 型孤発性 CJD の大脳皮質病変の検討では、H・E 染色のみで判定可能な 6 段階の大脳皮質病変のステージを提案した。大脳新皮質のステージから発症時期や全経過、死亡時の臨床所見、脳重をある程度推定可能であると思われた。抗プリオン蛋白免疫染色の染色性はホルマリン固定期間や濃度、ギ酸処理の有無や処理時間、前処置の塩酸濃度、一次抗体の種類等による影響が大きく、各症例間での比較が難しいと考えられ、この簡便なステージング方法は病理学的評価の標準化のために有用である。

GSS A117V 家系の検討では、多彩な臨床症候に加え、PrP アミロイド斑の形、大脳皮質の神経線維に沿った PrP 陽性所見が明らかになった。神経線維に沿った PrP 陽性所見は大脳皮質の apical dendrite に接続するシナプスにおける PrP 蓄積と考えられ、これまで報告がなく、A117V 変異やアミロイド斑形成との関係等について今後の検討を要する。

硬膜移植後 CJD は古典的な CJD の病像を示す典型例(非プラーク型)と比較的緩徐な進行を示す非典型例(プラーク型)に分けられる。硬膜移植

部位と臨床症状との関連をみると、典型例(非ブランク型)群において、テント下移植群で脳幹や小脳障害を示唆する症状が多く認められ、PrP^{Sc}が移植片より中枢神経系に直接的に進展したことが示唆される。一方、非典型例(ブランク型)においては、このような関連は見いだされなかった。この結果は非典型例(ブランク型)では移植部位に関わらず進行性の運動失調症状を呈する例が多いという臨床的経験に合致する。プリオンの株によって、プリオンの伝播の形式が異なり、その結果、臨床症候にも違いが生じる可能性が考えられる。動物実験モデルでは、一般にはプリオンが脳内接種された部位から病変が進展していくことが記載されているが、今後、種々のプリオン株で比較検討する必要がある。

硬膜移植後 CJD の 39 歳例の脳に PrP^{Sc}ばかりでなく、A β 沈着を認めた。通常、30 歳代での脳への A β 沈着は極めて稀である。本例の脳への A β 沈着は、稀ではあるが自然経過による可能性、PrP 凝集が A β 凝集を促進した可能性(cross seeding)の可能性もあるが、硬膜移植による A β 凝集の伝播の可能性を否定出来ない。20 歳台で顕著な A β 沈着を認めた硬膜移植後 CJD 例がオーストリアから報告されている(Preusser *et al.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 2006)。蛋白 misfolding 病全体についてプリオン病類似の伝播がおりうる可能性("prionoid")が指摘されている。今後、研究班では、硬膜移植後 CJD 多数例において、A β 凝集の伝播の可能性について、孤発性 CJD 等の対照群を設定し全国規模の研究を行う。

わが国ではプリオン病の剖検率が低く、その向上が重要な課題となっている。美原記念病院における取り組みをみると、半数が他施設からの剖検例であり、同院が関東地方におけるプリオン病剖検の拠点施設として機能していることがわかる。同院ではプリオン病剖検後のご遺族や関係者へのご遺体に対する医学的注意事項も含めて専属のスタッフが対応するなど、同院の職員が積極的にプリオン病剖検に取り組んでいる。プリオン病の剖検を推進するためには、剖検施設の拠点化を推進し、当該地域の剖検を積極的に受け入れる拠点施設に対し、手厚いサポートや遠距離のご遺体の搬送に関わる費用負担等を可能にする必要が

ある。

② プリオン病の診断法の開発：画像診断では、MRI DWI の経時的変化の経時的変化の自動検出プログラムの開発に成功した。本方法によって、プリオン病の早期病変の経時的変化を客観的に評価することが可能になった。今後、さらなる精度向上を加え、本手法が薬効評価指標などに応用されるようになることが期待される。

CSF マーカーについては、14-3-3 蛋白と総タウ蛋白と RT-QuIC 法の 3 者を組み合わせると、95.6%という高い検出率を示すことが明らかになった。異常 PrP を検出する RT-QuIC 法は特異度 98.7%を示したが、ごく少数ではあるが、偽陽性を示す例(症候性けいれん)があり、臨床的な鑑別診断の重要性が明らかになった。

CSF 中の H-FABP の検討では、本研究で構築した H-FABP 検出系は、高感度かつ高い安定性を示すことが明らかになった。CSF 中の H-FABP は総タウと同様の動態を示すようである。DLB でみられた血清 H-FABP 高値については、さらに多数例で検討する必要がある。

リコンビナント PrP^C を用い PMCA 法により PrP^{Sc} を増幅する方法の開発では、129VPrP^C を基質に用いた Cell-PMCA 法は、MV2 や VV2 の生前診断法として応用できる可能性だけでなく、ブランク型硬膜移植後 CJD のような感染由来の CJD に関しては、増幅の基質特異性の違いを利用することで、1 つの診断法として応用できる可能性がある。今後、CSF などの体液検体を用いた検討が必要である。

③ プリオン病の分子病態解明：PrP によるミトコンドリア凝集機構の解析では、分泌系を經由して細胞膜上に局在する PrP が誤ってミトコンドリアに移行すると、ミトコンドリア外膜上に 14-3-3 ζ が集積し、そこに Miro1 が結合することで GRIF1 との複合体形成が阻害され、キネシンとの相互作用の障害がおり、ミトコンドリア凝集を起こしてしまい、神経細胞内の正常なエネルギー供給が絶たれ、神経細胞死をもたらすものと考えられた。

酵母プリオン Sup35-NM をモデル蛋白質とした凝集機序の解析では、1 つの分子内に凝集体の形成開始点が 2 つ以上存在し、分子の状態、周辺環境に依存して、一番有利な開始点が選択される

機構が明らかになった。これが凝集体多形を作るメカニズムの1つであるならば、低分子化合物等の薬剤投与により、人為的に毒性の少ない凝集構造を誘導する治療法も可能になることが期待できる。この結果は、他の凝集蛋白質への応用も期待できるものである。

PK 以外の蛋白質分解酵素処理によって出現する PrP^{Sc} 断片のバンド型別の検討では、サーモライシン処理によって、試料中から PrP^C を除去することが可能となり、PrP^{Sc} のみのフラグメント断片の解析が可能となった。今後、この方法は各種蛋白質分解酵素による PrP^{Sc} のタイピングに応用できる。

プリオン感染のインスリンシグナルへの影響及びそのメカニズムの解析では、プリオンが感染する PrP^{Sc} がリサイクリング・エンドソームに蓄積し、ゴルジ装置から細胞膜への小胞輸送を障害する可能性が考えられた。このため、インスリン受容体は細胞膜まで運ばれず、その結果インスリンシグナルが抑制されると考えられた。この機序はプリオン病による神経細胞死の過程に関与し、治療の標的になる可能性がある。

プリオン病脳における酸化ストレスに関する検討では、BDV の持続感染は PrP の N 型糖鎖構造を変化させ、PrP の N 型糖鎖構造変化が酸化ストレス活性に影響を与えている可能性があることが明らかになった。

TgBV マウスと KiBV マウスによる CJD の接種試験では、TgBV マウスは自発性にプリオン病様症状を呈したが、PrP^{res} は検出できず、野生型マウスならびに KiBV マウスへの伝達も成立しなかったことから、過剰発現によるいわゆる over-expression syndrome と考えられた。KiBV マウスは CJD-MM1、vCJD などのプリオン病が伝達可能であった。特記すべきことは、これまで伝達できなかった孤発性 CJD-MM2 皮質型の伝達に初めて成功したことであり、その感染性が証明された。

複数のヒトニューロblastoma 細胞株において L-BSE 由来プリオン感染群で PrP^{res} が検出されたことにより、L-BSE 由来プリオンはヒトの神経細胞に対し感染性を有することが示唆された。感染成立初期では PrP^{res} 糖鎖型プロファイルはオ

リジナルのウシ L-BSE および C-BSE プリオンの特徴に各々類似していたが、継代を重ねた細胞群ではそのプロファイルが変化する可能性があり、持続感染細胞株の樹立を含め、引き続き詳細な検討が必要である。非定型 BSE は、ヒトにおける孤発性 CJD と同様に、BSE 対策にも関わらず、ウシにおいて散発的に発症することが推定されており、ヒトへの感染性に関する研究は、食品安全上、極めて重要である。

④ プリオン病の治療・予防法の開発：PPS の臨床試験では、PPS 脳室内持続投与療法は安全で長期治療にも耐えうる治療法であると考えられた。有効性に関しては、機能的な改善は示さないものの、生命予後の改善および病的に修飾する可能性が示唆される。英国で同治療を受けた変異型 CJD の生存期間は、その平均をはるかに上回っているという報告もある。

新たな臨床試験の準備のために、全国規模の臨床研究のためのプリオン病コンソーシアム (JACOP) が設立され、臨床プロトコールなどの作成が進んだ。プリオン病の中で、古典的な CJD は進行が速く、臨床試験で試験薬が開始される頃には無動性無言に陥っている場合が多く、試験薬の臨床効果を判定するには不適切な状態である場合が多い。そこで、まず、プリオン病の自然歴を把握し、臨床試験の対象として適切なプリオン病のサブセットを見出し、適切な評価のためのプロトコールを作成していく予定である。たとえば、GSS のような比較的進行が緩やかな病型を対象に、治療あるいは予防を計画するプランなども考えられる。JACOP において今後蓄積されるデータが、新しいプリオン病臨床試験のあり方を策定するにあたり、重要な役割を果たすことになる。

抗プリオン物質の NMR、SPR による解析では、これまで報告されてきた多くの化合物は PrP に非特異的に吸着したり、凝集を促進したりするが、GN8 のようなメディカルシャペロンは PrP のホットスポットに特異的に結合し、正常型立体構造を安定化させる作用があり、他のタンパク質に結合しにくい。臨床応用に際しての安全性という観点から、メディカルシャペロンを実用化することが望ましいと考えられた。

昨年度、抗プリオン活性を発見したメラニン及

び GM-CSF については、メラニンは、その基質の由来(チロシン、L-ドーパ)に関わらず、抗プリオン活性を有しており、PrP^C代謝・脂質ラフト・コレステロール代謝への影響は観察されなかったことから、メラニンの作用機序解明は新たなプリオン産生・分解に関わる分子メカニズムの解明と創薬標的の発見につながる可能性がある。一方、Tg7-263K 疾患モデルにおいて感染後期の末梢投与でも有効であった GM-CSF は、発症時期が観察しやすい Tga20-22L 疾患モデルでは無効かあるいは逆に生命予後を短縮させる結果となった。GM-CSF は海外では既製薬として臨床で使われていることより、早期に患者への実用化が可能であるが、プリオン病患者への応用には慎重であるべきことが示唆された。

MSCs を用いたプリオン病治療実験において、神経保護・修復作用と PrP^{Sc} 増殖抑制効果を併せた治療法の開発を目指して、44B1scFv を恒常的に発現する hMSCs を作製することに成功した。scFv を用いることで分子の小型化による脳組織への浸透率の向上すること、hMSCs の病変部への走化性を利用し、ベクターとして用いることで、scFv が病変部に広範囲に分泌されることが期待される。hMSCs はプリオン感染マウスの静脈内に投与した場合でも、脳の病変部に走化することから、44B1scFv-hMSCs が同様に末梢から脳の病変部への走化性を有している場合、末梢からの MSCs の移植による治療法の開発が可能になることが期待される。

脳神経外科手術機器を介したプリオン病の二次感染予防に関する調査研究では、インシデント対応やフォローアップの体制の整備がなされ、順調に対応が始まっている。インシデント事例の調査で判明してきたことは、手術器具の洗浄・滅菌方法について、概ねプリオン対応が計られているが、バイポーラーピンセットなど、一部の器具がプリオン対応となっていないことが問題となった。これらの事例を踏まえ、個別の手術器具に対応しうるプリオン不活化方法を確立していくことが今後の課題である。

2) SSPE

① SSPE のサーベイランスと臨床病態・検査・治

療：2007 年から 5 年後の 2012 年に行われた今回の調査では、1 次調査で合計 88 名の患者について把握した。前回の 2007 年の時点では 118 名の患者数が確認されている。死亡などにより患者数が減少傾向にある可能性があるが、前回調査票との照合を今後行っていく必要がある。患者の年齢分布は 10 歳から 48 歳で平均年齢 24 歳 10 か月であり、前回 2007 年調査時の 4~39 歳(平均 21 歳 8 か月)と比較し、高齢化の傾向を認めた。2007 年の前回調査以降の新規発症患者数は 15 名であり、少なくとも年間 3 名程度の発症があるものと考えられる。乳幼児での麻疹患者発生の推移と、発症者の年齢が平均で 10 歳前後であることを考えると、まだ今後少なくとも 10 年間程度は新規の SSPE 患者が発生することが予測される。2 次調査は未だ中間報告の段階であるが、罹病期間 15 年以上が約半数であり、非常に長期にわたり療養が必要な状態が続いており、介護者の高齢化の問題も指摘された。Jabbour 分類での重症度では、II 期の患者 3 名を除き全員が要介助である III 期以上のあり、特に今回の調査では IV 期の患者が最も多く、身体障害者等級では 2 名を除いて 1 級であり、経管栄養、気管切開、人工呼吸などの医療的ケアの必要度も高く、臨床的に重症で医療的な介護度も高い状態で長年療養を在宅でしている実態がわかった。治療については、イソプリノシン以外に、インターフェロンあるいはリバビリンの治療を現在も受けている患者は少なかった。

特定疾患治療研究事業データを用いた SSPE の発生状況の解析では、医療受給者証所持者数、発症数、症状、介護状況など、本疾患の実態の把握に有用な情報が得られた。しかし、情報は本事業対象者、さらにそのうちデータ入力された者に限られたデータに基づくものであり、実態を正確に把握できてはいない。現在わが国が目指している麻疹排除が達成されれば SSPE の発生はなくなることが予想されるが、発生数の正確な把握が必要である。本疾患の発症から経過を長期的に把握する一貫したシステムを構築するなど、SSPE の診療や療養支援、麻疹対策の推進に役立てられる情報収集の充実が必要である。

トルコ共和国との国際共同研究を推進し、本症患者の血清および CSF 検体を収集した。VILIP-1

の SSPE 血清および CSF 中濃度の解析では、SSPE 患者の血清および CSF 中の VILIP-1 濃度において対照群との間に有意差を認めなかった。VILIP-1 は主に中枢神経に存在し、神経細胞の破壊後に CSF 中に遊離される。本研究の結果から SSPE 患者における神経細胞傷害による病像や病期進行について VILIP-1 では把握できないことが示唆された。今後他のバイオマーカーについても検討していく必要がある。

Apo E の遺伝子型の検討では、ApoE の各 allele および genotype 頻度に日本人 SSPE 患者および対照群間で違いを認めなかった。一方、市山らは、トルコ人の SSPE 患者 CSF 中の Apo E4 の低下および Apo E3 の上昇を見出し、タウ蛋白の異常リン酸化および神経原線維濃縮体の形成阻害を介して SSPE の病態に関連する可能性があると述べている。今後、民族差の問題も含め、さらに詳細な検討を要する。

SSPE に対するリバビリン治療のアンケート調査の検討結果から、治療効果を上げるためには、早期発見、早期治療が重要であることが明らかになった。そのためには、臨床医が初発症状を見落とさないよう、SSPE について啓発することが必要と考えられる。さらに、リバビリンの有効濃度を安全域でなるべく長時間維持させるという目標を達成すること、感染の危険を伴う頻回の穿刺を避けることが重要と考えられ、本研究班が実施中の皮下埋め込み型持続輸注ポンプを用いたリバビリン脳室内持続投与療法の臨床試験の成果、及びそれに基づく治療法の普及が待たれる。

② SSPE の分子病態解明と治療法開発：SSPE 患者由来の MV 株にしばしば認められる F 蛋白質の変異はヒト神経細胞株を含む受容体陰性細胞に感染して細胞融合を起こすと同時に、哺乳ハムスターに神経病原性を示したことから、中枢神経系での MV の広がりには、M 蛋白質の欠失よりも、F 蛋白質の変異による膜融合能の促進が重要であると考えられた。SSPE 株の F 蛋白質に様々な変異が認められることは、SSPE の発症にウイルスの膜融合能の亢進が関わっていることを強く示唆する。F 蛋白質による融合を標的にした抗ウイルス薬の有用性が示唆される。

SSPE ウイルス Kobe-1 株由来の変異ウイルス株

の細胞融合活性、さらに、変異 F タンパク質と H タンパク質との相互作用について検討した結果から、SSPE ウイルス F タンパク質の細胞融合活性には G401E+G301W+Y398H トリプル変異と H タンパク質との相互作用が重要であると考えられた。今後、この作用機序を解明することは新たな薬剤の開発の寄与するものと考えられる。

麻疹ウイルス F 蛋白をモチーフとした新規ペプチドの麻疹ウイルス及び SSPE ウイルスに対する増殖抑制効果を検討したところ、F 蛋白の HR2 領域由来のペプチド M2EK が SSPE ウイルスに対して *in vitro* および *in vivo* にて抗ウイルス効果を示した。この結果から EK 配列を導入することで薬物代謝に影響を及ぼし *in vitro* でほぼ同等の効果のあった M1 と比較し、より高いウイルス増殖抑制効果が得られた可能性が示唆された。この結果から EK 配列を導入することで薬物代謝に影響を及ぼし、*in vitro* でほぼ同等の効果のあった M1 と比較し、より高いウイルス増殖抑制効果が得られた可能性が示唆される。新規ペプチドである M2EK は SSPE の新たな治療薬となりうる。

3) PML

① PMLのサーベイランスと臨床病態・治療：JCV の PCR 検査を介したサーベイランスでは、6年にわたる国内の PML の発症や背景疾患の変化を解析したところ、直近では自己免疫疾患や臓器移植歴を有する患者の発症が増加傾向にあることが明らかになった。これらの動向について今後も注視していく必要がある。自己免疫疾患を有する PML 患者の多くは SLE に罹患していたが、他の稀少疾患においても発生例が認められた。国内では 2010 年より多発性硬化症患者に対する natalizumab の治験が始まっているが、現時点では本サーベイランスにおいて PML 発生は確認されていない。臓器移植歴を有する PML 患者に関しては、その多くが腎移植を受け、PML の発症は移植から 3 年から 8 年が経過しており、長期間の免疫抑制によって JCV の増殖が活性化した可能性が推察された。移植件数の推移を考慮した場合、PML 患者の増加は移植患者数の増大によるものではなく、近年において移植患者に対する免疫抑制療法に変化があるか否かを検討する必要がある。

最近発症しているPMLの臨床的特徴を解析した。症状では従来の報告同様に片麻痺、認知機能障害が多かった。また、画像も従来の報告同様に大脳白質両側性病変で左右非対称性を示す症例が多く、また大脳萎縮を示す症例があった。CSF異常を示した症例が多かった。基礎疾患としてはHIV感染症3例、膠原病・結合織病3例と非HIV-PMLがやや増加傾向にあった。また誘発薬剤では昨年同様にステロイド使用症例とエンドキサン使用症例が重要であった。また日和見感染ではサイトメガロウイルス感染合併が目立った。今後、モノクローナル抗体関連PMLの出現を含め、本邦のPMLの臨床的特徴の変化を注視していく必要がある。

最近1年間のPMLに関する文献レビューでは、多発性硬化症患者にみられるnatalizumab関連PMLは発症のリスクファクターの解析が進んでおり、日本への導入の際には留意すべきである。抗JCウイルス抗体は本邦においてはコマーシャルベースでの測定はされておらず、natalizumab導入の際には整備されることが必要である。メフロキンの治療効果については、海外でのHIV-PML患者では有意な治療効果は報告されていないが、非HIV-PMLや薬物動態の人種差の問題などもあり、まだ一定の見解は出ていない。本研究班においても、今後も治療研究を継続する。新たにbrentuximabによるモノクローナル抗体関連PMLの報告があり、今後も生物学的製剤の副作用としてPMLに注目していく必要がある。PMLの基礎疾患は多様化してきており、神経疾患、感染症、自己免疫疾患、腫瘍、膠原病、移植等に関わる広範囲の領域の医師が留意すべき疾患となっている。

② PMLの分子病態解明と治療法開発：ウイルス封入体形成過程の検討結果から、JCVに感染した乏突起膠細胞は、DNAウイルス複製に有利なS期類似の核内環境を提供し、その後G2類似の状態では活発にウイルス増殖を支持すると考えられた。PML-NBsも、細胞核内環境の変化に応じて腫大化し、ウイルス増殖の足場を提供後、崩壊・消失すると考えられる。

JCVのTAgの機能をC末端領域の変異体を作成し解析したところ、JCVTAgではp53のタンパ

ク質修飾が上流酵素に非依存的に阻害されていたことから、立体構造上C末端領域がp53の修飾に影響している可能性が示唆された。p53のリン酸化およびアセチル化状態と、ゲノム複製量に逆相関が見られたことから、JCVTAgC末端領域は、p53の過剰な修飾を抑制し、ゲノム複製効率を上げている可能性が示唆された。今後、p53が関連する宿主細胞内機構への影響について検討する。今後、得られた知見を基にして、PMLに対する新規抗ウイルス薬開発への応用を行う。

JCV TagがMeCP2のプロモーター活性およびMeCP2発現に及ぼす影響を検討したところ、MeCP2プロモーター活性は上昇するにも関わらず、mRNAおよびタンパク質発現の亢進は認めなかった。この乖離の原因として、マイクロRNAによる転写後修飾や、エピジェネティックな制御機構が関与する可能性が考えられた。

PARP-1阻害剤である3-ABのJCV増殖抑制効果の検討では、3-ABの添加によりIMR-32細胞内のPARP-1活性が低下し、二次的にJCVの複製が抑制された可能性が示唆された。3-ABの細胞毒性は極めて少ないことを考えれば、PARP-1をターゲットにした抗JCV薬の開発の新しいアプローチが考えられる。

4) 診療ガイドラインの整備等

『PML診療ガイドライン2013』を平成25年1月に刊行した。『プリオン病診療ガイドライン2013』の編集作業が進行し、『SSPE診療ガイドライン』の改訂作業が進行した。

PMLは稀少疾患であるためエビデンスレベルの高い治療研究に乏しいという問題があるが、新しいガイドラインでは治療の推奨グレードを根拠となる研究のエビデンスと共に示し、さらに研究班による新しいPML診断基準(2013)、研究班が推進しているメフロキンの臨床試験などの研究班による診療支援情報を掲載した。生物学的製剤の使用増加等に伴いPMLは増加しており、本ガイドラインにより、わが国における本症の診療水準の向上が期待される。

E. 結論

1) プリオン病：サーベイランス1894例のデータ

解析結果、硬膜移植例の発生の持続、硬膜例におけるプリオンの脳内進展過程、硬膜移植後 CJD 若年例における A β 沈着、CJD 大脳皮質病変のステージングの標準化、プリオン病の MRI DWI の経時変化解析用の自動検出プログラム作成、CSF 中の PrP^{Sc} を検出する RT-QuIC 法ほかの CSF マーカーの診断的意義の検証、PMCA 法によるヒト MV2、VV2 プリオン検出成功等を報告した。PrP^C によるミトコンドリア凝集機構、酵母プリオン Sup35-NM をモデル蛋白質とした凝集機序、各種蛋白分解酵素による PrP^{Sc} タイピング法、プリオン病脳におけるインスリンシグナル抑制および酸化ストレス増大の機序、KiBV マウスによる孤発性 CJD-MM2 皮質型の伝達の成立、ヒト神経細胞株における非定型 BSE 由来プリオンの感染成立等を報告した。プリオン病患者に対する PPS 脳室内投与による臨床試験を継続評価し、新たな臨床試験準備のための臨床研究コンソーシアム (JACOP) 設立に貢献し、PrP^C 構造を選択的に安定化するメディカルシャペロン (GN8 類縁体)、メラニンの抗プリオン活性、PrP 抗体を産生する MSCs を用いた治療法開発等を報告した。

2) **SSPE**: 2012 年全国調査による 88 名の患者同定と臨床的特徴の解析、特定疾患治療研究事業データを用いた発生状況の解析、トルコ共和国との国際共同研究を含む臨床病態および治療実態の解析を行い、皮下埋め込み型持続輸注ポンプによるリバビリン脳室内持続投与療法の臨床試験を継続した。SSPE ウイルスに認められる膜融合を促進させる F 蛋白質変異の意義を解析し、F 蛋白をモチーフとする新規ペプチドの SSPE 治療効果を明らかにした。

3) **PML**: JCV の PCR 検査を介したサーベイランスで 6 年間に 76 名の患者を確認し、最近の PML 発症の背景や臨床的特徴を明らかにした。PML 脳の乏突起膠細胞における JCV の増殖・封入体形成機構を解明し、JCV の TAg の機能、PARP-1 阻害剤の JCV 増殖抑制効果を解析し、これらの治療薬開発上の有用性を示した。

4) **診療ガイドラインの整備等**: 3 対象疾患それぞれ

の分科会において診療ガイドライン整備等を推進した。『PML 診療ガイドライン 2013』を平成 25 年 1 月に発刊した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(主要原著論文のみを下に示す。発表の詳細は分担研究報告を参照のこと)

1) Hamaguchi T, Eisele YS, Varvel NH, Lamb BT, Walker LC, Jucker M. The presence of A β seeds, and not age per se, is critical to the initiation of A β deposition in the brain. *Acta Neuropathol* 123:31-37, 2012.

2) Mashima T, Nishikawa F, Kamatari Y, Fujiwara H, Saimura M, Nagata T, Kodaki T, Nishiwaka S, Kuwata K, Katahira M. Anti-prion activity of an RNA aptamer and its structural basis. *Nucleic Acids Res*, in press.

3) Shirogane Y, Watanabe S, Yanagi Y. Cooperation between different RNA virus genomes produces a new phenotype. *Nat Commun* 3:1235, 2012.

4) Ishikawa T, Kuwata K. RI-MP2 gradient calculation of large molecules using the fragment molecular orbital method. *J Phys Chem Lett* 3:375-379, 2012.

5) Okada H, Murayama Y, Shimozaki N, Yoshioka M, Masujin K, Imamura M, Iwamaru Y, Matsuura Y, Miyazawa K, Fukuda S, Yokoyama T, Mohri S. Prion in saliva of bovine spongiform encephalopathy-infected cattle. *Emerg Infect Dis* 18:2091-2092, 2012.

6) 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:pii:20144, 2012.

7) Nakato G, Hase K, Suzuki M, Kimura M, Ato M,

- Hanazato M, Tobiume M, Horiuchi M, Atarashi R, Nishida N, Watarai M, Imaoka K, Ohno H. Cutting Edge: Brucella abortus exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. *J Immunol* 189:1540-1544, 2012.
- 8) Ishibashi D, Atarashi R, Fuse T, Nakagaki T, Yamaguchi N, Satoh K, Honda K, Nishida N. Protective role of interferon regulatory factor 3-mediated signaling against prion infection. *J Virol* 86:4947-4955, 2012.
- 9) 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^C to PrP^{Sc} in prion-infected neuroblastoma cells. *J Virol* 86:5626-5636, 2012.
- 10) 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. *J Virol*, in press.
- 11) Watanabe S, Shirogane Y, Suzuki SO, Ikegame S, Koga R, Yanagi Y. Mutant fusion proteins with enhanced fusion activity promote measles virus spread in human neuronal cells and brains of suckling hamsters. *J Virol*, in press.
- 12) Kubota T, Hamazoe Y, Hashiguchi S, Ishibashi D, Akasaka K, Nishida N, Katamine S, Sakaguchi S, Kuroki R, Nakashima T, Sugimura K. Direct evidence of generation and accumulation of β -sheet-rich prion protein in scrapie-infected neuroblastoma cells with human IgG1 antibody specific for β -form prion protein. *J Biol Chem* 287:14023-14039, 2012.
- 13) Sano K, Satoh K, Atarashi R, Takashima H, Iwasaki Y, Yoshida M, Sanjo N, Murai H, Mizusawa H, Schmitz M, Zerr I, Kim YS, Nishida N. Early detection of abnormal prion protein in genetic human prion diseases now possible using real-time QUIC Assay. *PLoS One* 8:e54915, 2013.
- 14) Xue G, Aida Y, Onodera T, Sakudo A. The 5' flanking region and intron1 of the bovine prion protein gene (PRNP) are responsible for negative feedback regulation of the prion protein. *PLoS One* 7:e32870, 2012.
- 15) Yamaguchi Y, Miyata H, Uchiyama K, Ootsuyama A, Inubushi S, Mori T, Muramatsu N, Katamine S, Sakaguchi S. Biological and biochemical characterization of mice expressing prion protein devoid of the octapeptide repeat region after infection with prions. *PLoS One* 7:e43540, 2012.
- 16) Dang X, Wüthrich C, Gordon J, Sawa H, Korolnik IJ. JC virus encephalopathy is associated with a novel agnoprotein-deletion JCV variant. *PLoS One* 7:e35793, 2012.
- 17) Kasai K, Hirata A, Ohyama T, Nokihara K, Yokoyama T, Mohri S. Novel assay with fluorescence-labelled PrP peptides for differentiating L-type atypical and classical BSEs, and scrapie. *FEBS Lett* 586:325-329, 2012.
- 18) Hasegawa K, Mohri S, Yokoyama T. Comparison of the local structural stabilities of mammalian prion protein (PrP) by fragment molecular orbital calculations. *Prion* 7:1-7, 2013.
- 19) Masujin K, Miwa R, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. Comparative analysis of Japanese and foreign L-type BSE prions. *Prion* 6:89-93, 2012.
- 20) Ishibashi D, Atarashi R, Nishida N. Protective role of MyD88-independent innate immune responses against prion infection. *Prion* 6:443-446, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

1) 発明の名称：タンパク質の可溶化活性を有する多量体タンパク質およびその用途

出願人：東京医科大学

発明者：八谷如美, 西島佳奈

出願番号(出願日)：特願2012-270532(2012/12/11)

2) 発明の名称：Treatment of PML targeting JC virus agno (JC ウイルス agno を対象とした PML の治療)

出願国：カナダ

出願人：Japan Science and Technology Agency (独立行政法人科学技術振興機構)

発明者：Kazuo Nagashima(長嶋和郎), Hirofumi Sawa(澤 洋文), Yuki Okada(岡田由紀)

出願番号(出願日)：2467930(2002/6/5)

公報番号(公報日)：2467930(2003/5/30)

特許許可通知発行日：2012/10/5

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし