

- 進行性核上麻痺脳のghost tanglesと変性神経突起の集塊：Tangles-associated neuritic clustersの研究、第39回日本神経病理学会、福岡、5月28日-30日、1998
- 8) 中村 智、有馬邦正、本井ゆみ子、羽賀誠一、相沢貴子、大塚美恵子、植木 彰、池田和彦
筋萎縮性側索硬化症脊髄における神経芽細胞増殖因子FGF-9の発現—免疫組織化学的検討—、第39回日本神経病理学会、福岡、5月28日-30日、1998
- 9) 本井ゆみ子、相沢貴子、羽賀誠一、中村智、大塚成人、難波吉雄、水野美邦、池田和彦
新LDL受容体ファミリーメンバー(LR11)のラット脳における免疫組織化学的検討、第39回日本神経病理学会、福岡、5月28日-30日、1998
- 10) Motoi, Y., Aizawa, T., Haga, S., Nakamura, S., Mizuno, Y., Iwasaki, T., Hattori, H., Wakabayashi, K., Takahashi, H., Yamamoto, T., and Ikeda, K.
Apolipoprotein E receptor 2 immunoreactivity in Alzheimer's disease and control brains.
6th International Conference on Alzheimer's disease and related disorders. 18-23 July, 1998, Amsterdam
- 11) Ikeda, K., Epidemiology of Borna disease virus infection in Japan. 1998
Bornavirus Meeting, 27-29 September 27-29, 1998, Freiburg, Germany
- 12) Yamaguchi, K., Sawada, T., Yamane, S., Haga, S., Ikeda, K., Igata-Yi, Y., Hori, Y., Nawa, H., Okabe, R., Waltrip, RW. and Carbone, K.M., The detection of antiBDV antibodies in animals and human sera by synthetic peptide-based electrochemiluminescence immunoassay. 1998 Bornavirus Meeting, 27-29 September 27-29, 1998, Freiburg, Germany
- 13) Nakamura, S., Arima, K., Kanda, T., Motoi, Y., Ikeda, K. and Ueki, A.
Fibroblast growth factor-9 immunoreactivity in spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. 28th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Los Angeles, November 7-12, 1998
- 14) Otsuka, N., Goto, N., and Ikeda, K. CD38 is associated with Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. 28th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Los Angeles, November 7-12, 1998
- 15) 沢田高志、榎木 徹、山口一成、池田和彦、井形るり子、堀井洋一郎、ボルナ病ウイルス、ECLIA合成ペプチド、リコンビナント抗原(p40,p24)を用いたECLIA法によるボルナ病ウイルス(BDV)抗体検出系の確立、第46回日本ウイルス学会、東京、1998年10月12-14日
- 16) 山口一成、沢田高志、榎木 徹、井形るり子、堀井洋一郎、内田和幸、池田和彦、BDV抗体、ECLIA、精神疾患ヒト、ウマ（一般、半野生）におけるボルナ病ウイルス(BDV)感染の実態—ECLIA法による血清疫学—、第46回日本ウイルス学会、東京、1998年10月12-14日
- 17) Ikeda, K., Haga, S., Motoi, Y., Aizawa, T., Arima, K., Failure to detect Borna disease virus p24 and p40 mRNA in 60 autopsy brain samples of the Stanley Foundation Brain Collection
The 4th symposium on the neurovirology and neuroimmunology of schizophrenia and bipolar disorder. Bethesda, November 5-7, 1998

ボルナ病ウイルス p40 に存在する抗原部位の解析

分担研究者：堀本泰介（大阪府立大学農学部）

共同研究者：青木智美（大阪府立大学農学部）

研究要旨：ボルナ病ウイルス(BDV)に対する特異抗体検出法として、ヌクレオプロテイン p40 を抗原とするウエスタンイミュノブロット (WIB) 法について検討した。融合蛋白 (GST/p40) を発現する大腸菌ライセートを抗原とした WIB 法を用いて、ウマ野外血清(1:100)を反応させてみると、いくつかで融合蛋白との反応がみられ (GST 対照とは反応がみられない)、抗 p40 抗体の存在が示唆された。しかし、同時に大腸菌由来蛋白との反応もみられたので、反応特異性を確認するために GST/p40 に対する吸収試験を行ったところ、特異的に反応している検体と非特異的に反応している検体が認められた。そこで、p40 に存在する特異抗原部位、あるいは非特異的反應部位を解析するため、制限酵素切断部位を利用して部分欠損融合蛋白を、N 末側 3 種類、C 末側 4 種類構築し大腸菌で発現させ、抗 p40 モノクローナル抗体、BDV 感染ラット血清、ウマ野外血清などとの反応性を WIB 法で調べてみた。その結果、p40 には全領域を通じて抗原部位が認められるが、特に、N 末側のエピトープに対する抗体が感染動物血清中に優位に誘導されることが示唆された。一方、p40 の C 末側に血清と非特異的な反応を引き起こす領域の存在が示唆された。

A. 研究目的

最近の研究により、ボルナ病ウイルス (BDV はヒトにおいてもうつ病などの精神性疾患に関与する可能性が示唆されている。自然感染状態の動物内での BDV の増殖は、その神経組織親和性により制限され、血中に誘導されるウイルス特異抗体は非常に微量である。したがって、一般的な抗体検出法による BDV 抗体の特異的な検出は、低希釈血清に起因する非特異反応の存在により困難であると考えられる。このような背景により、BDV 特異抗体検出法はいまだ標準化されておらず、BDV 感染と病気との関連性を証明するために欠くことのできない系統だった血清疫学的研究の障害となっており、微量な BDV 抗体を特異的に検出する方法の確立が望まれている。本研究では、BDV 株間で高度に保存されている 40kDa のヌクレオプロテイン (p40) を抗原とする特異抗体検出法について検討するため、p40 に存在する特異抗原部位を検索する。

B. 研究方法

BDVp40 を大腸菌 (BL21) で glutathion s-transferase (GST) との融合蛋白 (GST/p40:67kDa) として pGEX ベクターにより発現させ、glutathion sepharose を用いて融合蛋白を精製

した後、Factor Xa 消化により精製 p40 を回収した。まず、これを抗原にした間接法 ELISA により健常ウマ野外血清 140 検体の反応性を調べた。また、GST/p40 発現大腸菌ライセートを抗原とした WIB 法についてもウマ血清の反応性を調べた。反応特異性は GST/p40 に対する吸収試験で確認した。

つぎに、p40 に存在する抗原部位を解析するため、制限酵素切断部位を利用したコード領域内欠損変異遺伝子を 5' 側 3 種類 (pGEX.p40.5 Δ Sal, -5 Δ Eco, -5 Δ Hd)、3' 側 4 種類 (pGEX.p40.3 Δ Nco, -3 Δ Sal, -3 Δ Eco, -3 Δ Hd) 構築し大腸菌で発現させた。発現に成功した N 末側欠損融合蛋白 3 種類 p40.N Δ S (58kDa), -N Δ E (45kDa), -N Δ H (37kDa)、および C 末側欠損融合蛋白 4 種類 p40.C Δ N (58 kDa), -C Δ S (53kDa), -C Δ E (39kDa), -C Δ H (30kDa) と、抗 p40 モノクローナル抗体 (mAb)、BDV 感染参照血清、あるいはウマ野外血清との反応性を WIB 法により検索し、p40 に存在する抗原部位を解析した。

C. 研究結果

間接法 ELISA でいくつかのウマ野外検体で高い反応性がみられ、BDV 抗体の存在が示唆されたが、陽性、陰性のカットオフ値の設定はできな

った。

高い反応性を示した検体を WIB 法で調べたところ GST/p40 との反応性がみられた。しかし、吸収試験により特異的に反応している検体 (EE14) と非特異的に反応している検体 (EE114) が認められ、p40 には非特異的抗体吸着領域が存在しており、特異抗体検出の障害になることが示唆された。

大腸菌での高度発現に成功した p40 欠損融合蛋白を抗原にした WIB 法で、抗 p40mAb の 2 種類はいずれも p40.C Δ N を除く全ての C 末欠損蛋白と反応したが、N 末欠損蛋白 3 種類とは反応しなかった。したがって、これらの mAb の認識エピトープは、p40 の NcoI から SaI 部位にコードされる 9kDa のペプチド領域に存在することが明らかとなった。

BDV 感染ラット抗体は C 末欠損 p40.C Δ N、N 末欠損 p40.N Δ H 以外の欠損蛋白と反応し、p40 の NcoI から HindIII 部位にコードされる領域に抗原部位が存在した。ウマ血清 EE14 は C 末欠損蛋白全てと反応したが、N 末欠損蛋白とは全く反応しなかった。したがって、SaI 部位より上流の 10kDa の N 末側領域に抗原部位の存在が示された。一方、非特異的反応性を示すウマ血清 EE114 は N 末欠損蛋白全てと反応したが C 末欠損蛋白とは全く反応しなかった。この成績は HindIII 部位から下流の C 末側の領域に非特異的抗体吸着領域の存在を示すものである。

D. 考察

BDVp40 には全領域を通じて抗原部位が認められるが、特に N 末端側のエピトープに対する抗体が感染動物血清中に優位に誘導されることが示唆された。一方、p40 の C 末端側に血清と非特異的な反応を引き起こす領域の存在が推定された。この領域を取り除いた p40 欠損蛋白抗原を用いた検査系が、BDV 特異抗体検出法として応用できるものと考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Horimoto, T., and Kawaoka, Y. 1998. A possible mechanism for selection of virulent avian influenza A viruses in 14-day-old embryonated eggs. *J. Vet. Med. Sci.* 60:273-275.
- 2) Maeda, K., Horimoto, T., and Mikami, T. 1998. Molecular biology of feline herpesvirus type 1 glycoproteins. *J. Vet. Med. Sci.* 60:881-888.
- 3) Miyazawa, T., Ikeda, Y., Maeda, K., Horimoto, T., Tohya, Y., Mochizuki, M., Ono, K., Takahashi, E., Vu, D., Vu, G. D., Cu, D. X., and Mikami, T. 1998. Seroepidemiological survey of feline retrovirus infection in domestic and leopard cats in northern Vietnam in 1997. *J. Vet. Med. Sci.* 60:1273-1275.

2. 学会発表

- 1) 堀本泰介 (1998) : 家禽ペストウイルスの病原性に関する研究、第 125 回日本獣医学会 (宇都宮)
- 2) 堀本泰介、青木智美 (1999) : ボルナ病ウイルス p40 に存在する抗原部位、第 4 回ボルナ病ウイルス研究会 (東京)

第5回ボルナ病ウイルス研究会

平成10年度厚生省・新興再興感染症研究事業
ボルナ病ウイルス感染の実態に関する疫学的ウイルス学的研究

平成11年2月8日（月）
10：00～16：00
国立感染症研究所第1共用会議室

事務局 東京都精神医学総合研究所超微形態研究部門
池田 和彦
国立感染症研究所ウイルス製剤部
田代 真人

プログラム

10:00 挨拶

田代 真人 (国立感染研・ウイルス製剤部)

座長： 田代 真人 (国立感染研・ウイルス製剤部)

1) 10:05

ボルナ病ウイルス(BDV)の構造と粒子形成過程

○河野武弘 (1)、後藤俊幸(1)、高崎智彦(2)、森田智津子(1)、中屋隆明(3)、生田和良(3)、倉根一郎(2)、佐野浩一(1)、中井益代(4)

1大阪医大・微生物、2国立感染研・ウイルス一部、3北大・免疫研 4大阪医大

2) 10:20

ボルナ病ウイルスNおよびPタンパク質間の相互作用

○小林剛1、高橋宏和1、渡辺真紀子1、庄谷祐子1、朝長啓造1、岸雅彦2、生田和良1,3

1 (北大・免疫研)、2 (共立商事)、3 (阪大・微研)

3) 10:35

BDV持続感染細胞におけるウイルスの転写と複製の調節

○水谷哲也、稲垣永恵、早坂大輔、荻和宏明、高島郁夫 (北大・獣医・公衆衛生)

特別講演 10:55

Tropism and pathogenesis of Bornavirus infections: animal models for neuropsychiatric diseases

Prof. W. Ian Lipkin (Laboratory for Neurovirology, University of California, Irvine)

昼食 12:00-13:00

座長： 倉根 一郎 (国立感染研・ウイルス一部)

13:00

共同研究：

献血者血球におけるボルナ病ウイルスRNA検出に関する多施設・盲検調査——東京地区100検体および札幌地区100検体

池田和彦、田代真人、西藤岳彦、生田和良、風祭 元、園田俊郎、倉根一郎、○田所憲治、堀本泰介、宇野正威

5) 13:30

ネコにおける新規ボルナ病ウイルス抗体の検出

○大内敦夫1、西野佳以2、望月雅美1、小林剛3、生田和良4、岸雅彦1

1共立商事・中央研、2麻布大・生物研、3北大・免疫研、4阪大・微研

6) 13:45

ネコにおけるボルナ病ウイルス不顕性感染の評価と病態の検討

福島涼子、○西野佳以、田所真弓 (麻布大・生物研)、舟場正幸 (麻布大・獣医)、水谷哲也 (北大・院・獣医)、平見博、飯塚玲子 (ヒラミ動物病院)、高橋俊一 (FAH高橋動物病院)、松田敦志 (星ヶ丘動物病院)

座長： 生田 和良（阪大・微研）

7) 14:00

BDVp40に存在する抗原部位の検索

○堀本泰介、青木智美（大阪府大・獣医微生物）

8) 14:15

合成ペプチド、リコンビナント抗原(p40,p24)を用いたECLIA法によるボルナ病ウイルス抗体検出系の確立

○沢田高志、榎木 徹（エーザイ筑波研）、池田和彦、羽賀誠一（都精神研）、井形るり子（中山記念病院）、堀井洋一郎（宮崎大・農）、名和行文（宮崎医大・寄生虫）、K.Carbone (FDA,USA)、山口一成（熊大・医）

9) 14:30

宮崎県都井岬の日本在来馬（半野生）におけるECLIA法によるBDV抗体調査

○堀井洋一郎、馬場信隆、井上陽一（宮崎大・農・獣医内科）、沢田高志、榎木 徹（エーザイ筑波研）、山口一成（熊大・医）

10) 14:45

ヒトにおけるボルナ病ウイルス(BDV)感染の実態—ECLIA法による血清疫学—

○山口一成、麻生範雄、石井俊徳（熊大・医）、沢田高志、榎木 徹（エーザイ筑波研）、井形るり子（中山記念病院）、白木 洋（福岡日赤血液センター）、池田和彦（都精神研）、望月 學（東京医科歯科大）、山田尚吾（九大・医）、高橋和郎（福島医大）

座長： 田所 憲治（日赤中央血液センター）

11) 15:00

大阪の総合病院精神科におけるBDV感染の調査：58例の検査結果の検討

○松永秀典（大阪府立病院・精神科）、林宏恵（北大・免疫研）、西野佳以（麻布大・生物科学総合研）、生田和良（阪大・微研）

12) 15:15

精神疾患患者における抗BDV抗体の血清疫学——WB法での阻害試験による特異性の検討

○高橋和郎、茂田士郎（福島医大・微生物）、福田耕嗣、岩田素秀、森則夫（浜松医大・神経精神科）、田代真人（国立感染研ウイルス製剤部）丹羽真一（福島医大・精神神経科）

13) 15:30

精神分裂病患者剖検脳サンプルから分離されたボルナ病ウイルスの遺伝子配列

○高橋宏和、中村百合恵、小林剛、渡辺真紀子、林宏恵、庄谷祐子、朝長啓造（北大・免疫研）、生田和良（北大・免疫研、阪大・微研）

14) 15:45

ヒト剖検脳におけるボルナ病ウイルス遺伝子検索の再検討

○羽賀誠一、本井ゆみ子、相沢貴子、有馬邦正、池田和彦（都精神研・超微形態）、田代真人（国立感染研・ウイルス製剤部）、西藤岳彦、堀越香里（国立感染研・ウイルス一部）、堀本泰介（大阪府立大・微生物）、風祭 元、入谷修司、黒木則臣、土谷邦秋（都立松沢病院）、池田研二（都精神研・神経病理）、宇野正威、平井茂夫、川井充（国立精神・神経センター武蔵病院）、吉村正博（京都府立医大・法医）

16:00 挨拶

1)

ボルナ病ウイルス(BDV)粒子の構造と形態形成過程

○河野武弘(1)、後藤俊幸(1)、高崎智彦(2)、森田智津子(1)、中屋隆明(3)、
生田和良(3)、佐野浩一(1)、倉根一朗(4)、中井益代(5)

(1 大阪医大・微生物、2近大・細菌学、3 北大・免疫研・血清学、4国立感染症研
究所、5 大阪医大)

[目的]

ボルナ病ウイルス(BDV)は、一本鎖ネガティブRNAウイルスで、Mononegavirales
に属すると報告されている。本ウイルスの宿主域は幅広く、個体間の伝染にはウイ
ルス粒子が関与していると考えられるが、BDV粒子の形態はいまだ明らかにされて
いない。そこで我々は、BDVの超微細構造や、形態形成過程を明らかにするため、
電子顕微鏡的手法を用いて検討した。

[方法]

BDV持続感染MDCK細胞(MDCK/BDV)を8 mM n-butyrate存在下で培養し、ウイ
ルス産生を誘発した。培養上清中のBDV RNAの構造蛋白p40領域をRT-PCR法にて
増幅し、ウイルス量を測定するとともに、電子顕微鏡ネガティブ染色法で培養上清
中のウイルス様粒子の有無を検討した。培養細胞をEpon樹脂に包埋し、常法に従っ
て超薄切片法にて電子顕微鏡で観察した。免疫電子顕微鏡法にはLowicryl K4M樹
脂包埋試料を用いた。超薄切片上で、抗BDV p40抗体と抗ウサギIgGヤギ血清を用
いた免疫反応を行い、電子顕微鏡で観察したが、画像コントラストが低く、ウイル
ス粒子の同定は出来なかった。そこでコントラストを増強するために既知ウイルス
であるHIV-2のLowicryl K4M樹脂包埋試料を用いて、ルテニウムレッドとオスミ
ウム酸の混合液(RR/OsO4)による処理法を検討した。得られた至適なコントラ
スト増強法を、MDCK/BDV試料の免疫反応後に施して電顕観察を行った。

[結果と考察]

n-butyrateを用いた誘発細胞培養上清からは非誘発細胞培養上清よりも多くの
BDV p40遺伝子が検出され、ネガティブ染色法でも多くのウイルス様粒子が観察さ
れ。そこで、この細胞をEpon樹脂包埋し、超薄切片法で観察したところ、エンペ
ロップを持ち、内部に糸状のヌクレオカプシドを有する球状のウイルス様粒子が観
察された。粒子の大きさは100から130 nmで、エンペロップには、長さ約7.0 nmの
スパイクが明瞭に認められた。粒子内部には、幅が約4.0 nmと細いヌクレオカ
プシドが認められた。粒子の形態形成過程については、感染細胞膜表面から出芽
する像が観察された。0.01% RR/0.5% OsO4処理によるコントラスト増強法を用
いた免疫電顕法にて、ウイルス様粒子は抗BDV p40抗体と反応したため、BDV粒
子であると考えた。BDVは形態学的には、球状形態と細い幅のヌクレオカプシ
ドを有する点で、他の一本鎖ネガティブRNAウイルスと異なっていた。

2)

ボルナ病ウイルスNおよびPタンパク質間の相互作用

○小林剛¹、高橋宏和¹、渡辺真紀子¹、庄谷祐子¹、朝長啓造¹、岸雅彦²、
生田和良^{1,3}

1 (北大・免疫研) 2 (共立商事)、3 (阪大・微研)

[目的]

ボルナ病ウイルス (BDV) は、ウマやヒツジに進行性脊髄膜炎を起こす非分節型、マイナス鎖のRNAウイルスである。BDVの特徴として他の動物モノネガウイルスと異なり感染細胞の核内で複製を行うことが知られている。しかし、この複製機構についてはほとんど解明が進んでいない。本研究は、複製の必須因子と予想されるp40 (p40-N) およびp24 (P) に加えて最近になって報告されたp40-Nのアミノ末端領域が欠損しているp38 (p38-N) とのタンパク質間相互作用について解析を行った。

[方法]

各タンパク質間の相互作用は、BDV持続感染細胞および各種組換えタンパク質を用いて解析を行った。各種組換え発現プラスミドはBDV持続感染MDCK細胞由来のRNAを鋳型に逆転写PCRでp40-N、p38-NおよびP cDNA断片を増幅し、ヒスチジンタグもしくはインフルエンザのHAタグとの融合タンパク質として発現させた。これらのプラスミドをT7ポリメラーゼ発現ワクシニアウイルスを感染させたHela細胞にトランスフェクションし、各タンパク質間の発現および相互作用をウェスタンブロット法、免疫沈降法および蛍光抗体法を用いて解析を行った。

[結果および考察]

BDV持続感染細胞においてウサギ抗P抗体を用いて免疫沈降法を行い、共沈してくるウイルスタンパク質について解析を行ったところ、p40-Nおよびp38-Nの両方がPタンパク質と複合体を形成している可能性が示唆された。さらに詳細な解析を行うために各種組換えタンパク質を細胞内で共発現させ解析を行った結果、p40-Nおよびp38-Nの両方がPタンパク質にそれぞれ結合することが明らかとなった。また、Nタンパク質のself assemblyについても解析を行った結果、p40-N-p40-Nおよびp40-N-p38-Nの結合が明らかとなった。これらのことより、p40-Nに加えてp38-NもPもしくはp40-Nに結合して複製の場である核に移行し、複製に大きく関与する可能性が示唆された。

3)

BDV持続感染細胞におけるウイルスの転写と複製の調節

○水谷哲也、稲垣永恵、早坂大輔、荻和宏明、高島郁夫（北大・院・獣医・公衆衛生）

[目的]

ボルナ病ウイルス（Borna disease virus; BDV）はウマに進行性脳炎をもたらす向神経性ウイルスであり、ヒトにおいても精神病患者からウイルスゲノムが検出されることから、ズーノーシスの原因ウイルスとしての可能性について議論されている。しかしながらBDVに対する有効な治療薬は未だなく、治療薬の開発やBDVの病態の解明のために、BDVウイルスの転写・複製の調節機構を明らかにすることは重要である。そこで種々の薬剤や培養条件を用いてBDVの転写量の変化について検討した。

[方法]

50% confluentのBDV持続感染MDCK細胞(MDCK/BDV)を用いて、mRNAのcap合成阻害剤であるRibavirin（ヤマサ醤油から分与）、細胞のmRNA合成阻害剤であるActinomycin Dを添加した細胞や、血清を除いた培地で培養したMDCK/BDV細胞よりRNAを抽出し、DIGラベルしたリボプローブでノーザンハイブリダイゼーションを行った。また、50% confluentの細胞と100% confluentになってから十数日経過したMDCK/BDV細胞におけるウイルス転写量の変化についても同様に解析した。

[結果と考察]

1~100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度のRibavirinを添加したところBDVの転写量やゲノム量が減少していた。また、一度減少したBDVの転写と複製はその培地からRibavirinを除くことによって再び増加することがわかった。一方、MDCK/BDV細胞を100% confluentになってからも培養を続けるとBDVの転写量やゲノム量はさらに増加することがわかった。これと同様の結果が血清を除いた培地で細胞の増殖を抑制した実験からも得られたことから、細胞側の転写活性因子等がウイルスの転写に影響を及ぼしていると考えられた。そこで、Actinomycin Dを添加したところ予想どおりBDVの転写量やゲノム量は増加するという結果が得られた。今回得られた結果から、RibavirinはBDVの転写や複製を抑制し、Actinomycin Dは促進させることがわかった。今後はこれらの薬剤を用いて、BDVの増殖メカニズムの解明と新しい抗BDV薬の開発を検討中である。

5)

ネコにおける新規ボルナ病ウイルス抗体の検出

○大内敦夫1、西野佳以2、小林剛3、生田和良4、望月雅美1、岸雅彦(1共立商事・つくば中研、2麻布大・生物研、3北大・免疫研、4阪大・微研)

[目的]

ボルナ病ウイルス (BDV) は、ウマやヒツジの脳脊髄膜炎の原因ウイルスであるが、ヒトへの感染の結果として、特に精神疾患との関連が疑われている。一方、伴侶動物として生活環境を共有するネコにも、抗p40 (N) 抗体や抗p24 (P) 抗体が検出され、BDVとネコの非化膿性脳脊髄膜炎 (staggering disease)との関連が報告されている。本研究では、新たに見出されたBDVタンパク (p10、あるいはXタンパク質) に対する抗体の検出をネコに試み、その意義について考察した。

[方法]

神経症状を伴わない一見健康な飼ネコ68頭と、主要なネコ感染性ウイルスに対して清浄なネコ30頭の血清について、GSTタンパクで吸収した後にGST-p10融合タンパクを抗原としたWestern blot法を行ない、抗p10抗体を検出した。抗p40抗体の検出も同様に試みた。

[結果と考察]

飼ネコ68頭の血清のうち7例 (10.3%)に抗p10抗体が検出された。しかしながら、抗p40抗体はすべてのネコで陰性であった。また、清浄ネコでは抗p10抗体および抗p40抗体のどちらも検出されなかった。検出された抗p10抗体は、GST-p10タンパクによる吸収操作で検出されなくなることから特異的であると考えられた。一方、抗BDV抗体の力価は一般的に低いことが知られているが、抗p10抗体の力価は1:200~1:800と比較的高い傾向が認められた。

以上の結果、本研究で初めて用いたBDV p10抗原は、動物やヒトにおけるBDV血清疫学に有用であると考えられた。さらに、ネコがBDVキャリアーとなっている可能性も改めて指摘され、ヒトや動物由来のBDV遺伝子の高い保存性から考えられているBDVの異種動物間伝播の可能性について、さらに検討することの重要性が示された。

6)

ネコにおけるボルナ病ウイルス不顕性感染の評価と病態の検討

福島涼子、○西野佳以、田所真弓（麻布大・生物研）、舟場正幸（麻布大・獣医）、水谷哲也（北大・院・獣医）、平見博、飯塚玲子（ヒラミ動物病院）、高橋俊一（FAH高橋動物病院）、松田敦志（星ヶ丘動物病院）

[目的]

ボルナ病ウイルス（BDV）は、近年の疫学的調査によりヒトを含む多くの動物種に自然感染することが明らかにされている。自然感染する宿主の一つであるネコでは、BDV感染はstaggering diseaseと呼ばれる神経疾患の一因となることが強く示唆されているが、発症前の病態の情報は十分ではない。我々は、今回、不顕性感染しているネコにおけるBDV感染の病態を探ることを目的としてBDV感染調査を行った。

[材料と方法]

1996年から1998年にかけて東京都と神奈川県動物病院に来院した神経症状を示していないネコを対象に、血中の抗BDV抗体とBDV遺伝子を調査した。血漿中の抗BDV抗体は、BDV-p24あるいは-p40蛋白質とGSTとの融合蛋白質（阪大、生田和良博士より分与）を抗原としたウエスタンブロット法により検出した。抗原に用いる各融合蛋白質は、常法に従い精製した後さらに不純物を除き、GST1ug〔マイクログラム〕に相当する分子数を膜に転写しGST吸収済み血漿と反応した。BDV遺伝子は、末梢血単核球分画から抽出したRNAを鋳型としてBDV-p24領域におけるnested RT-PCR法により検出した。

[結果と考察]

調査したイエネコ133検体中、70検体がBDV遺伝子あるいは抗BDV抗体を保有していた。13検体はBDV遺伝子陽性、61検体は抗BDV抗体陽性、遺伝子と抗体の両方が陽性の検体は4例であった。また、BDV-p24抗体陽性検体と-p40抗体陽性検体はほぼ同数存在したが、必ずしも一致しなかった。性別による陽性率の相違は認められなかったが、年齢別では1歳未満のネコにおいてすでにBDV遺伝子陽性検体が認められた。以上の結果より、関東地方には、これまで考えられていた以上にBDV感染歴のあるネコが存在することが示され、遺伝子陽性検体と抗体陽性検体は、多くの場合一致しない傾向が確認された。また、血清学的診断には少なくとも抗BDV-p24及び-p40抗体の両方を調べる重要性が示唆された。

7)

BDVp40に存在する抗原部位の検索

○堀本泰介、青木智美（大阪府立大・獣医微生物）

[目的]

BDVヌクレオプロテインp40を抗原とする特異抗体検出法について検討した。

[結果]

融合蛋白(GST/p40)を発現する大腸菌ライセートを抗原としたウエスタンイムノブロット (WIB) 法を用いて、健常ウマ野外血清 (1:100) を反応させてみると、いくつかでGST/p40との反応性がみられ (GST対照とは反応が見られない) BDV抗体の存在が示唆された。しかし、同時に大腸菌由来蛋白との反応もみられたので、反応特異性を確認するためにGST/p40に対する吸収試験を行ったところ、特異的に反応している検体と非特異的に反応している検体が認められ、p40の非特異的抗体吸着性が示唆された。つぎに、p40に存在する抗原部位を解析するため、制限酵素切断部位を利用して部分欠損融合蛋白を、N末側3種類、C末側4種類大腸菌で発現させ、抗p40モノクローナル抗体、BDV感染参照血清、ウマ野外血清との反応性をWIB法で調べてみた。その結果、p40には全領域を通じて抗原部位が認められるが、特に、N末端側のエピトープに対する抗体が感染動物血清中に優位に誘導されることが示唆された。一方、p40のC末端側に血清と非特異的な反応を引き起こす領域の存在が推定された。

[結論]

したがって、この領域を取り除いたp40抗原がBDV特異抗体の検出に応用できると考えられた。

8)

合成ペプチド、リコンビナント抗原(p40,p24)を用いたECLIA法によるボルナ病ウイルス抗体検出系の確立

沢田高志、榎木 徹（エーザイ筑波研）、池田和彦、羽賀誠一（都精神研）、井形るり子（中山記念病院）、堀井洋一郎（宮崎大・農）、名和行文（宮崎医大・寄生虫）、K.Carbone (FDA,USA)、山口一成（熊大・医）

[目的]

BDVに感染した動物（ウマ、ヒツジ、ネコなど）では致死性脳髄膜炎から軽度の行動異常まで幅広い症状を示し、無症候性キャリアも多く存在することが知られている。感染動物での結果からBDVはヒトの精神疾患における病因ウイルスの候補のひとつとなっている。また動物でのデータは自然感染の場合も実験的に感染させた場合も抗BDV抗体は極めて低いことを示している。最近、ヒトのサンプルからBDVあるいはBDV類似遺伝子が分離されたという報告があるが、抗体検出とRT-PCR検出との間に大きな解離がみられる。特異性と感度に優れたBDV抗体検出系を早急に確立することがBDV研究にとり急務である。

[方法]

BDVのp40とp24に対応するペプチドを13種類合成し、リコンビナントp40,p24 (full length)蛋白で免疫したウサギ抗血清でスクリーニングを行い、反応したペプチドをelectrochemiluminescence immunoassay (ECLIA)法に組みこんだ。同様にリコンビナント蛋白 (p40,p24)をECLIA法に組み込んだ系も作成した。このECLIA法を用い20匹のラット、39頭のウマ血清中の抗BDV抗体を測定した。これらのラット、ウマ血清には実験的に感染させたものを含み、抗体測定は全てdouble blindで行った。

[結果]

ラット；FDAで施行された間接蛍光抗体法、WB法での結果とECLIAでの結果とはよく一致した。感染ラット血清はECLIAで全て陽性であった。

ウマ；3頭の実験的に感染させたアメリカウマ全てがECLIAで陽性を示し、抗体の経時的変化で3頭ともに抗体価の上昇が見られた。これら陽性の血清はsoluble p40,p24ペプチド、リコンビナント蛋白での吸収試験でも確認された。

[考察]

ヒトにおけるBDV感染の研究は蛍光抗体法、WB法などのSerologyを基本として進められてきた。最近では血液細胞、脳組織からBDV-RNAが直接証明されるようになってきている。しかしながらいずれのassay系でも一致した結果は得られていない。我々は実験的にBDVを感染させたラットとウマの血清を用いて、p40とp24の合成ペプチド、p40,p24のリコンビナント蛋白を組み込んだECLIA法にて、高感度で特異性の高い抗体assay系を確立することができた。これを用いることで大量の血清を迅速かつ安価に測定することができ、BDV感染の疫学、病態研究を進めることができる。

9)

宮崎県都井岬の日本在来馬（半野生）におけるECLIA法による抗BDV抗体調査

堀井洋一郎、馬場信隆、井上陽一（宮崎大・農）、沢田高志、楢木 徹（エーザイ筑波研）、山口一成（熊大・医）

[目的]

我が国の競走馬においてもBDV感染が報告されているが、伝播の様式などの詳細は良くわかっていない。また競走馬はその移動が人為的かつ頻繁に行われるため、これらを対象とした調査のみでは伝播様式を知ることはなかなか困難である。そこで我々は、宮崎県の都井岬に半野生状態で生息する御崎馬の抗BDV抗体調査を行い、自然の社会生活を営む馬の集団における諸要因と、抗体陽性率との関連について検討した。この調査を通してBDVの感染様式の理解が進む可能性が大きいと考えられる。

[方法]

1998年6月時点で生息する御崎馬全98頭中90頭から採血し、血漿を採取した。BDVのp40とp24に対応するリコンビナントp40, p24 (full length)蛋白を組み込んだelectrochemiluminescence immunoassay (ECLIA)法で、ウマ血漿中の抗BDV抗体を測定した。高カウントのものはsoluble p40,p24リコンビナント蛋白での吸収試験を行い、50%以上inhibitしたものを陽性と判定した。

[結果]

検査できた90頭中15頭が陽性で、陽性率は16.7%であり、陽性率に性差はみられなかった。年齢での相関をみると、2歳以下の34個体では全く陽性馬がみられず、3歳以上ではほぼ同率で推移していた。家系的にみると、明らかに陽性率の高い系統が1つ認められた。親子での陽性率では、母子ともに陽性であるものは1組、そうでないもの6組であった。

[考察]

ECLIA法による抗BDV抗体調査により、御崎馬においてもBDV陽性馬が存在することが判明したが、陽性率は国内の競走馬のそれと比較してかなり低いものであった。この原因は現時点でははっきりしないが、御崎馬においては2歳以下に陽性個体が見られないこと、また3歳以降に新たな感染が起こっている可能性が少ないことなどから、極めて限局された期間に感染（伝播）が成立している可能性が示唆された。また母子間の垂直感染は、この集団でのBDVの主要な伝播経路ではないと考えられる。今後、このような信頼性の高い抗体測定法による継続的な調査がなされれば、自然集団における馬のBDV伝播の様式がより明らかになることが期待される。

10)

ヒトにおけるボルナ病ウイルス(BDV)感染の実態—ECLIA法による血清疫学—

山口一成、麻生範雄、石井俊徳（熊大・医）、沢田高志、榎木 徹（エーザイ筑波研）、井形るり子（中山記念病院）、白木 洋（福岡日赤血液センター）、池田和彦（都精神研）、望月 學（東京医科歯科大）、山田尚吾（九大・医）、高橋和郎（福島医大）

[目的]

BDVはヒトの精神疾患における病因ウイルスの候補のひとつである。ヒトの末梢血からのBDVあるいはBDV類似遺伝子の検出が方法論的に混沌としている現在、確実な感染を示す抗体検出系を確立する必要がある。その上でヒトでの感染の有無、疾患との関係、輸血による感染の可能性などがあらためて検討されなければならない。

[方法]

BDVのp40とp24に対応するリコンビナントp40, p24 (full length)蛋白を組み込んだelectrochemiluminescence immunoassay (ECLIA)法で、ヒト血清中の抗BDV抗体を測定した。陽性の血清はsoluble p40,p24リコンビナント蛋白での吸収試験を行い50%以上inhibitしたものを陽性と判定した。抗体測定は全てdouble blindで行った。精神疾患、脳炎、神経変性疾患、HIV感染者、慢性疲労症候群、献血者、頻回輸血、自己免疫疾患、眼科病院受診者、レブラなど約4,000症例

[結果]

三カ所の日本人献血者ではECLIAで0.5-1.5%の陽性率であった。精神疾患（感情障害、Schizophrenia）の患者では献血者に比べて高い陽性率を示した（2.9-6.8%）。HIV感染者（エイズ発症を含めて42例）はすべて陰性であった。

[考察]

ヒトにおいて精神疾患患者の一部で献血者よりも高いBDV抗体陽性率を示したことはこれまでの報告を支持するものであるが、エイズを含むHIV感染者、慢性疲労症候群で陽性者が見られなかったのはこれまでと相反する結果である。BDV陽性精神疾患患者の詳細な臨床検討は今後の課題である。血友病を含むHIV感染者に陽性がみられなかったことから血漿成分での感染はきわめて低いものと考えられるが、献血者に1%にBDV抗体陽性者が見つかった。BDVの感染ルートは依然として不明であるがBDV抗体陽性者はBDVキャリアーの可能性があり、今後輸血による感染が起こりうるのかどうかを含め、献血時におけるスクリーニングに関して幅広く検討がなされるべきであろう。

11)

大阪の総合病院精神科におけるBDV感染の調査：58例の検査結果の検討

○松永秀典（大阪府立病院・精神科）、林宏恵（北大・免疫研）、西野佳以（麻布大・生物科学総合研）、生田和良（阪大・微研）

[目的]

総合病院の精神科患者について、BDV感染の状況および陽性者の臨床的特徴を調べる。動物飼育歴との関連についても検討する。

[対象]

大阪府立病院精神科で治療中の患者58例（17～73歳、平均47±16歳、男：女 = 18：40）に対してBDV感染の有無を調べた。診断は、分裂病圏：26例、躁うつ病圏：22例、強迫神経症：2例、器質性精神障害：3例、慢性疲労症候群：5例であった。

[方法]

BDVのp24、p40、p18蛋白に対する抗体は、大腸菌で発現したGSTとの融合蛋白に対して、Western blot法により検出した。抗p24抗体については、GSTを切断したp24蛋白のみに対する抗体の検出も試みた。さらに、末梢血単核球分画におけるp24およびp40領域のウイルスRNAを、nested RT-PCRによって検出した。

[結果]

GSTとの融合蛋白に対する抗体が陽性となった場合は、同時に測定したGSTに対する抗体が陰性の場合に限り、抗体陽性と判断した（ただし、GSTに対する抗体が偽陽性でGST-p24に対しては強陽性だった1例は陽性と判断した）。その結果、抗体は、GST-p24に対しては12例、p24では2例、GST-p40およびGST-p18では各1例で陽性であった。また、RNAは、p24は2例で陽性であったが、p40は全例陰性であった。いずれかの検査で陽性と判定された症例は、58例中14例（24%）であった。陽性例に疾患特異性はなく、分裂病圏：26例中4例、躁うつ病圏：22例中6例、強迫神経症：2例中1例、慢性疲労症候群：5例中3例であった。検査時の年齢が若い患者、初発または急性増悪から1年未満の患者では陽性率が高く、初発または急性増悪から5年以上経過して残遺期・寛解期にある患者では陽性率が低い傾向を認めた。他方、初発や再発による重症期から11年以上経過していても4例で陽性であったが、これらの症例では症状が持続していた。猫および犬の飼育歴の有無とBDV陽性率との間に差は認めなかった。ただし、幼少期には猫の飼育歴がなく、発病前の3年間に猫の飼育歴のある患者では13例中7例と高率にBDV陽性を認めた。

[結論]

精神疾患におけるBDVの調査を行うにあたっては、精神疾患の経過、および、動物との接触歴との関連についても、検討する価値があると考えられた。

12)

精神疾患患者における抗BDV抗体の血清疫学—WB法での阻害試験による特異性の検討

○高橋和郎、茂田士郎（福島医大、微生物）、福田耕嗣、岩田泰秀、森則夫（浜松医大、神経精神科）、田代真人（国立感染研ウイルス製剤部）、丹羽真一（福島医大、精神神経科）

[目的と意義]

精神疾患患者におけるボルナ病ウイルス抗体の保有率については、抗体の検出方法の感度や特異性に差異があるため報告により違いが大きい（0～50%）。ウェスタンブロット（WB）法を用いた過去の大部分の報告では、精製抗原を用いた阻害試験による特異性の検討がなされておらず、擬陽性を含む可能性がある。唯一阻害試験で確認している報告では、精神疾患患者でのp40抗体の保有率が40%と非常に高い率を報告している。本研究では、阻害試験で特異性を検討して、精神疾患患者における抗体保有率を明らかにすることを目的とした。

[材料と方法]

大腸菌で産生させたGST融合ボルナ病ウイルス蛋白p24,p40はグルタチオン—セファロースで精製し、GSTを切断して、さらにmono-Qカラムで精製し純度99%以上を得た。WB法は常法に従い、抗原蛋白0.3 μ g/スリップで行った。陽性検体は抗体価を求め、阻害試験では陽性を示す最大希釈の血清に精製抗原が20 μ g/mlとなるように加え、1時間反応させた後抗原と反応させた。阻害が認められた場合を抗体陽性と判定した。

[結果]

一次スクリーニングでの抗体陽性率は、p24抗体では気分障害患者8%(4/50)、分裂病患者9%(4/46)、献血者2%(1/54)であり、阻害試験後の陽性率はそれぞれ2%(1/50)、4%(2/46)、0%(0/54)であった。阻害試験陽性となるのは0～25%であり残り75～100%擬陽性であった。3群間の抗体陽性率に有意差は認められなかった。P40抗体の一次スクリーニングでは、それぞれ20%(10/50)、26%(12/46)、6%(3/54)であり、阻害試験後に陽性を示した検体は認めなかった。

[考察]

(1) 本研究において、精神疾患患者、献血者におけるp24,p40抗体の陽性率は既報の結果より低値であった。既報のWB法では一報を除いて阻害試験がなされておらず、これらの結果には擬陽性が含まれている可能性が高いと考えられる。唯一阻害試験で確認している報告では、精神疾患患者でp40抗体の保有率が30%と非常に高く、この差の原因は不明である。

(2) 精神疾患患者3名にp24抗体が認められたが、p24抗体の保有がBDV感染を意味するか、未知抗原との交差反応によるものか結論することは困難であり、他のウイルス抗原での検討やさらに多数例での検討が必要である。

13)

精神分裂病患者剖検脳サンプルから分離されたボルナ病ウイルスの遺伝子配列

○高橋宏和1、中村百合恵1、小林剛1、渡辺真紀子1、林宏恵1、庄谷祐子1、朝長啓造1、生田和良1,2

1 (北大・免疫研) 2 (阪大・微研)

精神分裂病患者剖検脳サンプルより分離したBorna disease virus (BDV) の遺伝子全長配列の決定を試みたので報告する。

[方法]

精神分裂病患者由来BDVが持続感染するオリゴデンドログリオーマ細胞を作成し、その細胞もしくは細胞培養上清よりRNAを抽出し、BDV特異的プライマーを用いて逆転写PCRを行った。PCR産物はプラスミドベクターにクローニング後シークエンスを行った。

[結果]

今回ヒトから分離されたBDVの全塩基配列は、8906 baseでありコントロールとしたウマ由来分離株であるstrain Vと比較して5'末端側の非翻訳領域が数塩基が短く、全配列の核酸レベルでの相同性は98.1%であった。また、ウマ由来分離株と同様にその遺伝子内には6個のオープンリーディングフレーム(ORF)をコードしていた。strain Vとの比較では、ORF 2 (p24)、ORF 3 (gp18)、ORF 4 (gp56)およびORF 5 (L)におけるアミノ酸レベルでの相同性はそれぞれ98.5%、99.3%、98.0%、98.8%であったが、ORF1(p40)ではアミノ酸レベルでの違いは認められなかった。また、そのmRNAがORF 2と重複して存在するpX ORFのアミノ酸レベルでの相同性は95.4%であった。その他の領域では、p24、pXのmRNAの発現量を調節していると考えられているS2領域に2塩基の置換が確認された。また、転写終結シグナルと考えられるT3領域においては他の分離株と比べUが一つ多く付加されているのが確認された。ゲノムの複製に関与していると思われる3'、及び5'の末端配列には大きな変化は見られなかったが、数塩基の置換と5'末端の4塩基欠損が認められた。また、p40及びp24の塩基配列を用い遺伝子系統樹を作製したところ、ヒト由来BDVは代表的なウマ由来分離株であるHe80よりもstrain Vに近いという結果が得られた。

[考察]

今回分離されたヒト精神疾患患者由来BDVは、現在までに報告のあるウマ由来分離株及びその他のBDVの遺伝子配列と大きな変化は見られなかった。また、塩基配列の置換の多くはアミノ酸配列に影響しないサイレントミューテーションであった。しかし、系統樹による解析によりウマ由来分離株とは異なることが示された。エンペロプタンパク質であると考えられているgp56に数個のアミノ酸置換が見られたが、これがヒト特有のものなのか、抗体の中和活性等に影響を与えるのかどうか、今後さらに検討していく必要があるものと思われる。

14)

ヒト剖検脳におけるボルナ病ウイルス (BDV) 遺伝子検索の再検討

○羽賀誠一、本井ゆみ子、相沢貴子、有馬邦正、池田和彦（精神研・超微形態）、田代真人（国立感染研・ウイルス製剤部）、西藤岳彦、堀越香里（国立感染研・ウイルス一部）、堀本泰介（大阪府立大・獣医微生物）、風祭元、入谷修司、黒木則臣、土谷邦秋（都立松沢病院）、池田研二（精神研・神経病理）、宇野正威、平井茂夫、川井充（国立精神・神経センター武蔵病院）、吉村正博（京都府立医大・法医）

〔目的〕

BDVの精神疾患への関与を明らかにするため、これまでヒト剖検脳を用いてBDVゲノムの有無をnested RT-PCR法で検索してきた。今回、米国Stanley財団より精神疾患症例および正常対照例60例の剖検脳の提供を受けたので、新規に検索した。また、これまでに報告した日本人剖検脳94例について、再検討する目的から、3施設での盲検検索を行った。

〔材料と方法〕

1) Stanley財団症例は、精神分裂病群、双極性障害群、精神症状を伴わないうつ病群、正常対照群4群についてそれぞれ15例で、各例前頭葉、側頭葉について検討した。Total RNAは凍結剖検脳よりRNeasy Midi Kit (Qiagen社)により抽出した。RT反応のprimerはrandom hexamerあるいはBDVp24、p40の特異primerを用いた。2) 3施設（国立感染研、大阪府立大、都精神研）・盲検検索に使用した症例は、既報の精神分裂病群44例、正常対照群50例である。前頭葉、側頭葉から抽出したtotal RNAを対象とした。BDV p24、p40の検索は、各施設独自の方法で行った。陽性コントロールは、試験管内で転写させたRNA (p24 + Δおよびp40 + Δ)である。一部のPCR産物について、DNA塩基配列解析を行った。

〔結果〕

1) Stanley財団より提供された脳組織は、全120検体でBDVp24、p40について陰性であった。
2) 3施設・盲検検索の結果を集約すると、3施設すべてでp24、p40が前頭葉あるいは側頭葉で陽性であった症例は5例、2施設でp24、p40が共に陽性の症例は2例、1施設でp24、p40が陽性の症例は2例であった。また、3施設でp24、p40のいずれかが陽性の症例は2例、2施設で同様にいずれかが陽性の症例は4例であった。その他に、8例が1施設でどちらかが陽性であった。疾患と対照で、陽性率の偏りは認めなかった。p24 PCR産物について3例、p40について6例についてDNA塩基配列解析を行った。He/80-1のDNA配列と同一かほぼ同一であった（2例のp40 PCR産物で1カ所に塩基置換がみられた）。

〔考察〕

新規に行ったアメリカ人の剖検脳組織の検索では、BDVp24、p40は検出されなかった。これは最近のドイツのネガティブデータ（剖検脳）と同様である。既報の日本人脳の3施設・盲検検索では陽性所見がよく一致したが、これは脳組織からRNAを抽出するさいに実験室内汚染がおこっていたことによるものとおもわれた。血球や脳組織などの対象組織とは無関係に、ボルナ病ウイルスのnested RT-PCR検索では実験室内汚染の問題に充分留意しなければならないと考えられる。