

production in mouse macrophages in response to measles virus infection in the presence of gamma interferon: Dependence on the CD46 cytoplasmic domains. J. Virol., 73:4776-4785, 1999.

2.学会発表

1. Katayama, Y., Hirano, A. and Wong, T. C. : Human receptor for measles virus (CD46) enhances nitric oxide production and restricts virus replication in mouse macrophages by modulating production of type I interferon. 18th Annual Meeting of American Society for Virology, Amherst, 1999.

【知的所有権の取得状況】

なし

Table 1. Summary of 4 cases of MV infection after vaccination.

Patient		Age	Sex	Day of onset after vaccination	Skin eruption	Koplik's spots	MV type
Initial							
1	M.N.	1y2m	F	6th	+	+	D5
2	Y.I.	2y6m	M	11th	+	+	D5
3	M.K.	1y11m	F	9th	+		D3
4	A.O.	1y8m	F	10th	+	-	D5

Fig. 1. N gene analysis of MV from vaccinated patients.

<Nucleotide>

	1339	1342	1343	136	1384
(A)ED/Vac	GAGCTACCGAGATTGGGGGGCAAGGAAGATAGGAGGGTCAAACAGAGTCGAGGAGAAGCC				
(D3)CHICAGO	-----C-----G-----				
(D5)PALAU	----C--AG-----G-----				
(D5)RI2-1993*	----C--AG-----G-----				
(D5)KN1-1996*	----C--AG-----C-----G-----				

	1411	1418	1437	1452
(A)ED/Vac	AGGGAGAGCTACAGAGAAAACCGGGCCAGCAGAGCAAGTGATGCGAGAGCTGCCCATCTT			
(D3)CHICAGO	-----T-----C-			
(D5)PALAU	-----G-----T-----A-----			
(D5)RI2-1993*	-----G-----T-----A-----			
(D5)KN1-1996*	-----G-----T-----A-----			

	1460	1464	1465	1495	1496
(A)ED/Vac	CCAACCGGCACACCCCTAGACATTGACACTGCATCGGAGTCCAGCCAAGATCCGCAGGAC				
(D3)CHICAGO	----A--TG-----AG-----				
(D5)PALAU	----A-----AG-----				
(D5)RI2-1993*	----A-----AG-----				
(D5)KN1-1996*	----A-----AG-----				

	1534	1540	1566
(A)ED/Vac	AGTCGAAGGTCAGCTGACGCCCTGCTTAGGCTGCAAGCCATGGCAGGAATCTCGGAAGA		
(D3)CHICAGO	-----T-----C-----T-----		
(D5)PALAU	-----C-----T-----		
(D5)RI2-1993*	-----C-----T-----		
(D5)KN1-1996*	-----C-----T-----		

<Amino acid>

	431	456	462	467	471	470	482
(A)ED/Vac	ELPRLGGKEDRRVKQSRGEARESYRETGPSRASDARAAHLPTGTPLDIDTASESSQDPQD						
(D3)CHICAGO	---G-----S-----P--SM-----G-----						
(D5)PALAU	---G-----S-----E-----S-----G-----						
(D5)RI2-1993*	---G-----S-----E-----S-----G-----						
(D5)KN1-1996*	---G-----S-----E-----S-----G-----						

	505
(A)ED/Vac	SRRSADALLRLQAMAGISE
(D3)CHICAGO	-----L-
(D5)PALAU	-----L-
(D5)RI2-1993*	-----L-
(D5)KN1-1996*	-----L-

* Obtained from vaccinated patients.

Fig. 2. H gene analysis of MV from vaccinated patients

<Nucleotide>

```

                1169      1179 1184 1189
(A)ED/Vac      ACATGCTTCCAACAGGCGTGTAAAGGGTAAAATCCAAGCACTCTGCGAGAATCCCCGAGTGG
(D3)CHICAGO    -----G-----A-----
(D5)PALAU      -----G-----C-----C-----
(D3)OS714-1997* -----G-----A-----
(D5)mh1213-1999* -----G-----C-----C-----

```

```

                1224      1232                                1266
(A)ED/Vac      GCACCATTGAAGGATAACAGGATTCCCTTCATACGGGGTCTTGCTGTGATCTGAGTCTG
(D3)CHICAGO    -----A-----
(D5)PALAU      -----C-----C-----A-----
(D3)OS714-1997* -----C-----C-----A-----
(D5)mh1213-1999* -----C-----C-----A-----

```

```

                1289                                1307
(A)ED/Vac      ACAGTTGAGCTTAAAATCAAATGCTTCGGGATTCGGGCCATTGATCACACACGGTTCA
(D3)CHICAGO    -----A-----
(D5)PALAU      -----C-----A-----
(D3)OS714-1997* -----C-----A-----
(D5)mh1213-1999* -----C-----A-----

```

```

                1356                                1385
(A)ED/Vac      GGGATGGACCTATACAAATCCAACCACAACAATGTGTATTGGCTGACTATCCCCGCAATG
(D3)CHICAGO    -----A-----
(D5)PALAU      -----C-----
(D3)OS714-1997* -----A-----
(D5)mh1213-1999* -----C-----

```

```

                1430
(A)ED/Vac      AAGAACCTAGCCTTAGGTGTAATCAACACATTGGAGTGGATACCGAGATTCAAGGTTAGT
(D3)CHICAGO    -----A-----
(D5)PALAU      -----A-----
(D3)OS714-1997* -----A-----
(D5)mh1213-1999* -----A-----

```

```

                1475      1481                                1496 1499
(A)ED/Vac      CCCAACCTCTTCACTGTCCAATTAAGGAAGCAGGCGAAGACTGCCATGCCCAACATAC
(D3)CHICAGO    -----T-----C-----G-----
(D5)PALAU      -----T-----C-----G-----
(D3)OS714-1997* -----T-----C-----G-----T-----
(D5)mh1213-1999* -----T-----C-----G-----

```

<Amino acid>

```

                387 390                                416
(A)ED/Vac      TCFQQACKGKIQALCENPEWAPLKDNRIPSYGVLSVDLSLTVELKIKIASGFGPLITHGS
(D3)CHICAGO    -----N-----N-----
(D5)PALAU      -----Q-----N-----
(D3)OS714-1997* -----N-----N-----
(D5)mh1213-1999* -----Q-----N-----

```

```

                446
(A)ED/Vac      GMDLYKSNHNNVYWLTIIPMKNLALGVINTLEWIPRFKVSPLNLFVPIKEAGEDCHAPT
(D3)CHICAGO    -----T-----
(D5)PALAU      -----
(D3)OS714-1997* -----T-----
(D5)mh1213-1999* -----

```

* Obtained from vaccinated patients.

Fig. 3. H gene analysis of MV from non-vaccinated patients.

Strain	Nucleotide sequence of H gene																Type				
	1061	1179	1189	1224	1289	1365	1391	1412	1499		1043	1142	1184	1197	1232	1356	1385	1400	1430	1520	
Ed(Vac)	G	C	C	A	T	T	C	T	T	T	T	A	T	G	G	A	G	C	A	A	
1996 RI30	-	T	-	C	C	-	-	C	C	C	-	-	C	-	-	-	-	-	A	-	D5
1997 OS714*	A	T	T	-	-	A	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	T	D3
pl857	-	T	-	-	-	A	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D3
1998 kr69	A	T	T	-	-	A	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	T	D3
1999 pl215	-	T	T	-	-	A	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	G	-	D3
pl302	-	T	-	-	-	A	-	-	-	-	A	G	-	A	A	-	-	-	-	-	D3
BB506	-	T	-	C	C	-	-	C	C	C	-	-	C	-	-	-	-	-	A	-	D5
BB517	-	T	-	C	C	-	-	C	C	C	-	-	C	-	-	-	-	-	A	-	D5
BB524	-	T	-	C	C	-	-	C	C	C	-	-	C	-	-	-	-	-	A	-	D5
KW803	A	T	T	-	-	A	T	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	T	D3
1.mh736	A	T	T	-	-	A	T	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	T	D3
2.mh1039	-	T	-	C	C	-	-	C	C	C	-	-	C	-	-	-	-	-	A	-	D5
3.mh1212	-	T	-	C	C	-	-	C	C	C	-	-	C	-	-	-	-	-	A	-	D5
3.mh1213*	-	T	-	C	C	-	-	C	C	C	-	-	C	-	-	-	-	-	A	-	D5
3.mh1214	-	T	-	C	C	-	-	C	C	C	-	-	C	-	-	-	-	-	A	-	D5
3.mh1215	-	T	-	C	C	-	-	C	C	C	-	-	C	-	-	-	-	-	A	-	D5

* Obtained from vaccinated patients.

NODscid マウスを用いた麻疹ウイルス中枢神経持続感染系の作出

班 員: 網 康至(国立感染症研究所、動物管理室)
協力研究者: 小船富美夫(国立感染症研究所、ウイルス製剤部)
甲斐知恵子(東京大学医科学研究所)

【研究要旨】

麻疹ウイルス中枢神経持続感染における宿主免疫反応の評価系を想定し、NODscid マウスを用いた病態モデル作出と、flow cytometry を用いた細胞性免疫測定法の開発を行った。マウスに病原性を示す麻疹ウイルス CH2 株を中和抗体存在化でヒトリンパ球系細胞(MoMo-9 細胞)を用いて継代し得られた Ab30 株を、NODscid マウスに脳内接種すると、接種後95日から140日に神経症状を示した。白質を主体とする gliosis が認められたが、ウイルス抗原は検出されなかった。また、F 蛋白発現アデノウイルスベクターを用いた特異的抗原刺激に対する CD8+ 細胞における γ -interferon 産生細胞の検出は、野外株麻疹ウイルス接種カニクイザルで認められ、特異的細胞性免疫を測定する有用な方法であることが示唆された。

Development of SSPE models using NODscid mice

Yasushi AMI¹, Fumio KOBUNE², and Chieko KAI³

¹Division of Experimental Animal, ²Department of Safety Research on Biologics, National Institute of Infectious Disease, ³Institute of medical science, The University of Tokyo

ABSTRACT

We had tried to develop the animal model of SSPE and the methods for evaluation of immunological impairments to cause persistent infection in central nervous system. NODscid mice, severe combined immunodeficient mice with low NK activity, showed neurological signs and died within 95 to 140 days after inoculated with measles virus(MV) Ab30 strain at the age of 4 weeks, but BALB/c mice did not show any clinical sign even after inoculated at 3 days old. Histopathologically sick mice brains had atrophy of cerebral cortex and gliosis in the white matter, especially external capsule. But immunohistopathologically there was no detectable virus antigen in these lesions. To confirm the relation with virus persistency, viral genome detection must be needed. We had developed a rapid method for detection of MV-specific CD8+ T cell frequency by flow cytometry using adenovirus expression system of F protein. After stimulation with F protein expressed autologous PBL with for 4 hours, intracellular accumulation of gamma-interferon was detected by flow cytometry. The peripheral blood lymphocytes from monkeys infected with wild type of MV showed 1.2 to 5.8 %, whereas 0% form naive monkeys.

【はじめに】

マウスに病原性を示す麻疹ウイルス CH2 株を中和抗体存在化でヒトリンパ球系細胞(MoMo-9 細胞)を用いて継代し得られた Ab30 株は、乳のみBALB/c マウス脳内に接種すると軽度の増殖を示すものの、症状を示すことはなかった。麻疹ウイルスが中枢神経内で持続感染する原因については、ウイルス側の要因に加えて、宿主側の要因も重要な位置を占めると考えられる。特にその中でも宿主免疫反応は極めて重要であり、中枢神経組織からのウイルス排除には、細胞性免疫がその主体となると考えられる。したがって、実験レベルにおけるその評価系の確立も、感染モデル作出と同様に考えなければならないことの一つである。

NOD scid マウスは、T cell 欠損の免疫不全動物であり、持続感染が成立する可能性が高いと考えられるとともに、その特質から他の動物由来の細胞の移入と定着に優れており、免疫細胞の移入により、免疫状態を人工的に作出できる利点がある。本年度は、NOD scid マウス脳内に Ab30 株を感染、長期間観察を行った。また、細胞性免疫としての CTL 活性を、Flow cytometry を用いて、特異的抗原刺激に対する CD8+ 細胞における γ -interferon 産生細胞を検出することにより測定する方法の開発を行った。

[材料と方法]

ウイルスは、マウスに対して神経病原性を有する麻疹ウイルス CH2株および、CH2 株ウイルス感染リンパ系細胞 (MoMo-9 細胞)を感染初期サル抗体、回復期サル抗体、高度免疫ウサギ抗体の存在化で30代継代処理し、抗体存在下でも持続感染する CH2-Ab30 (Ab30) 株を用いた。

マウスはNODscid およびBALB/c マウス生後3日齢の新生マウス、および4週齢 NODscid マウスを用い、脳内に CH2 株 $10^3/10\mu\text{l}$ 、Ab30 株 $10^5/10\mu\text{l}$ を接種し、症状、生死を140日間観察した。実験内容は、本研究所の委員会の承認をえており、かつ実験動物の飼育、処置等は、日本実験動物学会の規定に従って行った。症状の出現したものについては、剖検を行い脳を採材し、10%中性緩衝ホルマリンで固定、通常の方法に従って病理切片を作成し、病理組織学的検討を行った。一部の材料については抗 NPウサギ抗体を用いたウイルス抗原をABC法を用いて免疫組織学的染色を行った。また、同様に抗ウシ GFAP (glial fibrillary acid protein) ウサギ抗体を用いた染色も行った。

特異的抗原刺激に対する CD8+ 細胞における γ -interferon 産生細胞を検出については、naive カニクイサル2頭、ワクチン株および野生株接種後およそ2年経過しているカニクイサルそれぞれ2頭を用いた。末梢血リンパ球は常法にしたがって分離し、10%FCS RPMI1640 培地を用いて、5% CO₂, 37°Cで培養した。10⁵個のリンパ球については、麻疹ウイルス F蛋白を発現するように組み換えたアデノウイルス Adex1EFHLBF をm.o.i. 1で感染させ、同様に培養した。36から48時間後、F 蛋白発現リンパ球を加えたものと、加えないものを、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Brefeldin A 存在下で4から6時間培養し、CD8 および γ -interferon を蛍光色素ラベルマウスモノクローナル抗体で染色し、EPICS elite を用いて解析を行った。特異的抗原刺激に対する CD8+ 細胞における γ -interferon 産生細胞率は、非刺激の陽性率との差で示した。

[結果と考察]

Ab30 株接種 NODscid マウスでは、接種95日以降、順次、消瘦、振戦、知覚過敏を呈する個体が観察され、ときに死亡した。接種140日では、ほぼ全例で観察された。乳のみ BALB/c 接種群では症状は観察されなかった(表1)。病理組織学的には、発症個体では、大脳皮質の萎縮、白質では外包および中脳脊髓路の空胞形成、gliosis が認められたが、ウイルス抗原は検出できなかった。また、CH2 株乳のみ BALB/c マウス接種群では、9 匹中 1 例に同様の症状、病変が認められた。病変が麻疹ウイルスの持続感染によるものかは、PCRあるいは、in situ ハイブリダイゼーションによるウイルス遺伝子の検出を試みる予定である。

麻疹ウイルス感染後1年以上経過しているカニクイサルにおける、F 蛋白に対するCTL活性を、flow cytometry による特異的抗原刺激による CD8+ 細胞中の γ -interferon 産生細胞の比率で測定する方法の検討を行った。末梢血リンパ球への、用いたアデノウイルスベクターによる F 蛋白の十分な発現には36時間から48時間の培養が必要であった。

麻疹抗体陰性の2頭のサルでは、いずれも 0 % 以下であった。麻疹ウイルス野外株を接種した2頭のサルでは、5.8% と 1.2% で検出が可能であった。ワクチン株を接種した2頭では、1頭で 0.3% 検出されたが、1頭では検出できなかった(表2)。これらの結果から、この方法を用いて細胞性免疫の評価が可能であることを示すものと考えられた。現在、特異的刺激における CD8+ 細胞中の γ -interferon 産生細胞率は、CTL 活性に相関すると言われており、細胞性免疫の評価となりうると考えられている。しかしながら、これだけの例数では、この系における活性の有無に関する cut off 値を得るためには不十分であり、例数を増やす必要があると考えられる。また、従来の CTL 活性測定法は、target cell の作製が煩雑であるが、この方法では、1回の採血で可能であり、しかも 2×10^6 個のリンパ球があれば測定が可能である。動物実験はもとより、ヒ

トでの患者にも、負担をかけることなく測定が可能であると考えられる。

[参考文献]

1) Kuzushima, K. et al.: Rapid determination of Epstein-Barr virus -specific CD8+ T cell frequencies by flow cytometry. Blood 94:3094-3100, 1999.

[研究発表]

1. 論文発表

1) Yoshino N., Ami Y., Terao K., Tashiro F., and Honda M.: Upgrading of flow cytometric analysis for absolute counts, cytokines and other antigenic molecules of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) using anti-human cross-reactive antibodies. Exp.Anim. 49: in press.

Incidence of pathological changes in mouse brain
infected with measles virus

	NODscid 4W	BALB/c 3d
CH2	nd	1/9
Ab30	7/8	0/32

表 1

Gamma-interferon producing CD8+ T cells (%)

monkey no.		unstimulated	stimulated	specific
4092	naive	4	3.7	-0.3
4102	naive	4.9	4	-0.9
3790	vaccine strain	4.9	4.7	-0.2
3791	vaccine strain	2.7	3	0.3
3730	wild strain	4.5	10.3	5.8
3731	wild strain	2.5	3.6	1.2

表 2

レポーター遺伝子をゲノムに持つ偽 J C ウイルスの作成

班 員：保井孝太郎（東京都神経科学総合研究所・微生物学・免疫学）

研究協力者：向川 純（東京都神経科学総合研究所・微生物学・免疫学）

宮本 道子（東京都神経科学総合研究所・微生物学・免疫学）

【研究要旨】

J C ウイルスは、進行性多巣性白質脳症（PML）の病因ウイルスであるが、その発症機序については不明であり、ウイルスの効果的培養系が不足しているため J C ウイルスの持つ特異的増殖機構の解明が遅れており、発症防止法開発の障害となっている。そこで我々は、J C ウイルス由来の粒子蛋白を持ちゲノムにレポーター遺伝子を持つ偽 J C ウイルスを作成して、ウイルス学的研究を可能にする系の構築を試みた。

J C ウイルス遺伝子の BamHI 部位に EGFP 遺伝子を挿入し、COS7 細胞に導入したところ、EGFP の良好な発現と遺伝子の複製が見られた。この細胞へ J C ウイルスの構造蛋白を発現する組み換えアデノウイルスを感染させ培養後、細胞を融解してウイルス粒子を精製したところ、DNase I 抵抗性の EGFP 遺伝子がウイルス粒子画分に検出され、偽 J C ウイルス粒子が形成された。この偽 J C ウイルス粒子は、COS7 細胞への感染性を示した。

J C ウイルスに対する中和抗体の測定系を開発した。J C ウイルスに対する抗体を保有する健康人血清中には、比較的高い中和抗体活性が認められた。しかし J C ウイルスで免疫したウサギ血清は、高い J C ウイルスに対する抗体を保有しているにも関わらず、低い中和活性を示した。

Production of pseudo JC virus particle with reporter gene

Kotaro YASUI, Jun MUKAIGAWA, Michiko MIYAMOTO

Department of Microbiology and Immunology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience

ABSTRACT

To analyze virological characteristics and host immune response of JC virus, we developed a production system of pseudo JC virus particle which had JC virus virion proteins and appropriate reporter genes. When the construct DNA which had EGFP reporter genes under a CAG promoter was transfected in Cos 7 cells and then recombinant adenoviruses which expressed JC virus structural proteins was infected, JC virus like-particles were synthesized in the Cos 7 cells. The JC virus like-particles were isolated and purified by sucrose-CsCl gradient centrifugation. The purified JC virus like-particle was composed of JC virion proteins and EGFP/CAG reporter plasmid DNA. When these purified JC like particles were infected in Cos 7 cells, EGFP protein was expressed and detected in the Cos 7 cells.

We developed anti JC virus neutralizing antibody assay system. Healthy human sera which had anti JC virus antibodies, were contained significant amount of neutralizing antibody against JC virus. However, rabbit sera which had high titer anti JC virus antibodies showed only low activity of neutralizing antibody.

【はじめに】

J C ウイルスは、中長期的に脱髄が進行性に起こる疾患である進行性多巣性白質脳症（PML）の病因ウイルスであると考えられている。日本人の 7.0% を越える成人に J C ウイルスの感染が認められ、1) その多くが持続感染状態にあり断続的に J C ウイルスを排出している可能性が報告されているが、持続感染機構

等は不明のままである。またPML類似脳疾患にJCウイルスの増殖が関与している可能性が予測されているが、確証は得られていない。さらにAIDS患者には、数%とHIV非感染者と比較してきわめて高率にPMLが発症することが報告されている。したがってJCウイルスは容易に脳内に侵入し、増殖することが予想される。PML患者脳内でのJCウイルスは、もっぱらオリゴデンドログリア細胞で増殖し、神経細胞では増殖しないと考えられている。我々は、JCウイルスの遺伝子発現調節領域が、JCウイルスの宿主域を決める要因の一部になっていることを明らかにした。2) しかし、オリゴデンドログリア細胞と神経細胞でのJCウイルスの増殖性の違いを、その遺伝子発現調節領域の活性によって説明出来ていない。

JCウイルスの有効なin vitro 増殖系は、ヒト脳初代培養細胞 (PHFG) に限られている。またJCウイルスをin vitroで培養すると、その遺伝子発現調節領域の構造が容易に変異することも明らかになっている。2, 3) これらの点が、JCウイルスのウイルス学的研究を遅らせ、持続感染とPML発症機構の解明を困難にしている。

【目的】

JCウイルスに対する宿主の免疫状態の解析と持続感染機構の解明、特異な宿主域を規定する因子の同定、PML発症機構の解明などを可能にするため、組み換えDNA技術を用いて、レポーター遺伝子と種々な遺伝子発現調節領域を内部に持ち、JCウイルスの外郭蛋白で出来たpseudo JCウイルス粒子の形成を試みた。今回組み換えアデノウイルスを用いて、レポーター遺伝子をゲノムに持つ偽JCウイルスの作成に成功した。また、JCウイルスに対する中和抗体測定系を開発した。その結果をあわせて報告する。

【材料と方法】

1, 発現ベクターの構築

JCウイルス遺伝子は、我々がクローニングしたTokyo-1株を用いた。3) JCウイルス構造蛋白は、後期遺伝子領域にコードされている。そこでJCウイルスTokyo-1株後期蛋白をコードしている遺伝子領域を、強力なプロモータCAGを持つ組み換えアデノウイルス発現ベクターに組み込み、pAdexJC231/CAGおよびpAdexJCLP/CAGを構築した。また同様に、レポーター遺伝子としてEGFPとJC V全遺伝子領域またはJC V調節領域遺伝子を持つベクター、pCAG/EGFP-JCVとpCAG/EGFP-RRをそれぞれ構築した。

2, 発現蛋白およびJCウイルス粒子の検出

発現体DNAおよび偽JCウイルス産生するJCウイルス構造蛋白VP1は、抗JCウイルスウサギ抗体を用いた免疫染色によって検出した。また同様に発現されたEGFPは、蛍光顕微鏡観察によって検出した。

JCウイルス様粒子の形成は、生化学的方法によって確認した。pCAG/EGFP-JCVまたはpCAG/EGFP-RRをCos7細胞にトランスフェクションした後、pAdexJCLP/CAGまたはpAdexJC231/CAGを感染して2日間培養し、細胞を破壊してsucrose-CsCl gradient遠心法を用いてJCウイルス粒子を精製する方法によった。25%と33%CsClのinterface画分に遠心沈降される粒子を集め、DNaseI処理後抗JCウイルス抗体で免疫沈降し、VP1またはEGFP遺伝子のプライマーを用いたPCR法により、JCウイルス様粒子内に遺伝子DNAが入っていることを確認した。

3, レポータ遺伝子を持つ偽JCウイルスの感染性の確認

精製したレポータ遺伝子を粒子内に持つ偽JCウイルスをCos7細胞に感染させ培養した後、発現されたEGFPを蛍光顕微鏡で観察した。

4, JCウイルスに対する中和抗体の検出

健常人尿から分離したJCウイルスをCos7細胞に感染させ培養すると、やがてJCウイルスが増殖してくる。この系を用いて、JCウイルスに対する中和抗体を測定した。4 x 10⁶ PCR titerのJCウイルスとヒトなどの血清を37度C 120分反応させた後、Cos7細胞に感染させ2~3日および7~13日培養後、JCウイルス遺伝子を検出するプライマーを用いてJCウイルスの増殖を調査して、検体血清中にJCウイルスの感染増殖を抑制する中和抗体が存在するか否かを測定した。

(倫理面への配慮)

今年度行ったこの研究については、動物実験は行っていない。また健常人血清については、JCウイルスに対する抗体の測定に用いることを説明し同意を得て用いた。

【結果と考察】

1, JCウイルス構造蛋白の発現

これまでの我々の研究によりJCウイルスの粒子形成を効率よく行わせるためには、以下の条件が必要であることが明らかになっている。a, ヒトポリオーマーウイルスのDNA replication origin を持つプラスミドが存在すること。 b, T抗原の発現があること。 c, 哺乳動物細胞内で発現できるプロモータを持ったバキュロウイルス発現系を用いた研究により、VP1,VP2,VP3蛋白の発現のみでは粒子形成は起こらないこと、等である。今回組み換えアデノウイルスを用いてJCウイルス後期構造蛋白を大量発現させた結果、ポリオーマウイルスのDNA replication origin を持たないプラスミドDNAも偽JCウイルス粒子中に取り込まれることが明らかになった。(図1)したがってJCウイルスの後期構造蛋白は、適当な大きさのDNAを内部に取り込んで粒子を形成する活性を持つことが明らかになった。

2, レポータ遺伝子を持つプラスミドDNAのCos7細胞内での増殖

レポータ遺伝子を持つプラスミドDNAが、T抗原を産生しているCos7細胞内で増殖するかどうかを調査した。pCAG/EGFP-JCVまたはpCAG/EGFP-RRまたはpCAG/EGFP-DNAをCos7細胞にトランスフェクションし、継日的に細胞からDNAを抽出してプラスミドDNAが増殖しているかどうかをPCR法を用いて調査した。その結果は表1に示すように、JCウイルスVP1遺伝子領域は長期にわたって増殖しているが、レポータ遺伝子であるEGFP遺伝子領域はやがて消滅していく結果となった。(表1)

この結果は、T抗原の発現しているCos7細胞に導入したプラスミドDNAの増殖過程で、JCウイルス遺伝子と比較してHGFP遺伝子のほうが脱落していきやすい傾向を持つことを示している。JCウイルス調節領域遺伝子の活性を測定できるプラスミドの構築に際しては、この点を考慮する必要があるものと考えられる。

3, JCウイルス様粒子の生化学的確認

pCAG/EGFP-JCVまたはpCAG/EGFP-RR-DNAをCos7細胞にトランスフェクションした後、JCウイルス構造蛋白を発現する組み換えアデノウイルスを感染し2日間培養後、細胞を破碎しsucrose-CsCl gradient 遠心法を用いて、JCウイルス様粒子を精製した。JCウイルス粒子は、この方法で精製した場合、25%と33%のCsCl gradientの中間に遠心沈降される。そこでこの画分を採取しDNaseI処理後、JCウイルスVP1およびEGFP遺伝子のプライマーを用いPCR法を行うことにより、この画分にJCウイルスおよびEGFP遺伝子を持つDNAが沈降してきているかどうかを調査した。その結果、JCウイルス構造蛋白を発現する組み換えアデノウイルスを感染した場合、DNaseI処理後でもこの画分に、JCウイルスVP1およびEGFP遺伝子DNAが検出された。この結果はプラスミドDNAが、JCウイルス構造蛋白で包まれたJCウイルス様粒子内に存在していることを示すものである。

4, 偽JCウイルス粒子の感染性

上記方法により精製した偽JCウイルス粒子を、Cos7細胞に感染した。感染細胞を蛍光顕微鏡で観察した結果、感染2~3日後には図1に示すようにEGFPの示す蛍光が観察された。(図1)これらの結果から、目的のレポータ遺伝子とその内部を持った偽JCウイルス粒子を作成することが可能になったといえる。

5, JCウイルスに対する中和抗体の測定

JCウイルスに感染して抗体を保有している成人は、我々の調査では70%を越えており、これらの感染者は多くの場合持続感染状態にある。PMLは、JCウイルスが脳内のオリゴデンドログリア細胞で増殖することによって発症すると考えられている。JCウイルスがどのようにして脳内に侵入するかを明らかにすることは、PMLの発症を予防する上でも重要である。そこでJCウイルスに対する中和抗体を、簡便に測

定できる方法の開発を試みた。まず健常人尿から分離したJCウイルスとCos 7細胞培養系を用いて測定した。その結果表2に示すように、健常人のJCウイルス抗体保有者血清中には、中和抗体が産生されていることが明らかになった。(表2)各人の中和抗体の活性は、蛍光抗体法で測定したVP1に対する抗体価とほぼ比例していた。しかし、ウサギに精製JCウイルスを免疫して作成した抗体の場合には、VP1に対する抗体価に比較して中和活性は低かった。PML患者の場合、多くの例でVP1に対する抗体は検出されている。したがってPML患者において、中和抗体が産生されているかどうかを測定する必要がある。現在レポータ遺伝子を持った偽JCウイルスを用いて、より簡便で定量が容易な中和抗体測定法を開発中である。

【結論】

1, JCウイルス構造蛋白発現組み換えアデノウイルスをT抗原発現細胞に感染させることにより、目的EGFPレポーター遺伝子を内部に持ちJCウイルスピリオン蛋白で包まれた、感染性偽JCウイルス粒子を形成させることが出来た。 2, JCウイルスに対する中和抗体を測定できる方法を開発し、健常人血清中には中和抗体が産生されていることを明らかにした。

【文献】

- 1) 益子仁、中村健、篠崎正彦、荒木和子、藤井良知、保井孝太郎、荻原博：JCウイルスの血清疫学的研究-1 東京地方における年齢別抗体保有状況ならびに地域抗体保有状況について。帝京医学雑誌。5：299。(1982)
- 2) Shinohara, T., Matsuda, M., Yasui, K., Yoshiike, K., : Host range bias of the JC virus mutant enhancer with DNA rearrangement. *Virology*. 170: 261-263 (1989)
- 3) Matsuda, M., Jona, M., Yasui, K., Nagashima, K.,: Genetic characterization of JC virus Tokyo 1 strain, a variant oncogenic in rodents. *Virus Res*. 7: 159-168 (1987)
- 4) Shishido, Y., Nukuzuma, S., Mukaigawa, J., Morikawa, S., Yasui, K., Nagashima, K.,: Assembly of JC virus like particle in Cos 7 cells. *J. Med. Virol*. 51: 265-272 (1997)
- 5) Shishido-Hara, Y., Hara, Y., Larson, T., Yasui, K., Nagashima, K., Stoner, G.L.,: Analysis of capsid formation of human polyomavirus JC (Tokyo-1 strain) by a eukariotic expression system: Splicing of late RNAs, translation and nuclear transport of major capsid protein VP1, and capsid assembly. *J. Virol*. in press

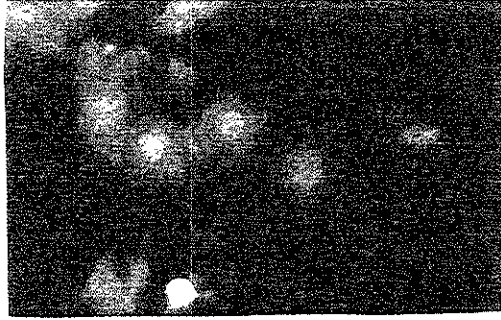
【研究発表】

1. 論文発表

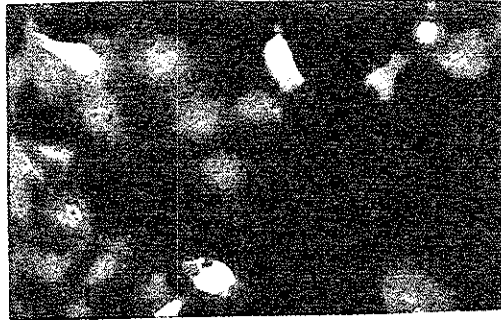
- 1) Shishido-Hara, Y., Hara, Y., Larson, T., Yasui, K., Nagashima, K., Stoner, G.L.,: Analysis of capsid formation of human polyomavirus JC (Tokyo-1 strain) by a eukariotic expression system: Splicing of late RNAs, translation and nuclear transport of major capsid protein VP1, and capsid assembly. *J. Virol*. in press
 - 2) 保井孝太郎：DNAワクチン。感染・炎症・免疫。29 86-92 (1999)
- #### 2. 学会発表
- 1) 向川純、宮本道子、保井孝太郎：レポータ遺伝子をゲノムに持つ偽JCウイルスの作製。第 回日本分子生物学会総会 (1999)

図1 J Cウイルス構造蛋白発現組み換えアデノウイルスを用いて作製した、EGFPレポータ遺伝子を内部に持つ偽J Cウイルスの感染（発現EGFPの蛍光を観察した。）

pCAG/EGFP



pCAG/EGFP-RR



pCAG/EGFP-JCV

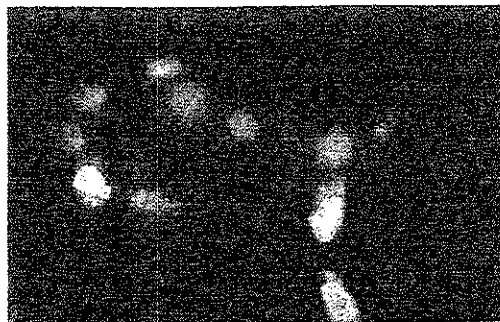


表 1,

Replication of JCV-EGFP chimera DNA in Cos7 cells

Exp. 1

PCR titer(\log_{10}) of EGFP

DNA	Days after DNA transfection				
	3	7	10	13	20
pCAG/EGFP	3	nd	nd	nd	nd
pCAG/EGFP-JCV-RR-1	3	1	nd	nd	nd
pCAG/EGFP-JCV-RR-2	3	1	nd	nd	nd

Exp. 2

PCR titer (\log_{10}) of EGFP

DNA	Days after DNA transfection				
	3	7	10	13	20
pCAG/EGFP	3	1	nd	nd	nd
pCAG/EGFP-JCV-1	3	2	0	nd	nd
pCAG/EGFP-JCV-2	3	2	0	nd	nd

PCR titer (\log_{10}) of JCV-VP1

DNA	Days after DNA transfection				
	3	7	10	13	20
JCV-DNA	4	4	5	5	6
pCAG/EGFP-JCV-1	5	5	5	6	6
pCAG/EGFP-JCV-2	5	5	5	6	6

表2,

J C ウイルスに対する中和抗体の測定

血清	蛍光抗体法による J C V-VP 1 に対する抗体価
ウサギ抗 J C V 血清 (JCV-RS)	1 2 8 0
健常人血清 A (NHS-A)	1 6 0
健常人血清 B (NHS-B)	8 0
健常人血清 C (NHS-C)	< 1 0
健常人血清 D (NHS-D)	2 0

中和抗体

血清	PCR titer (log ₁₀)			
	Exp 1		Exp 2	
	Days after infection		Days after infection	
	3	7	2	13
JCV-RS	3	3	3	4
NHS-A	2	2	2	3
NHS-B	2	3	2	3
NHS-C	-	-	4	6
NHS-D	3	4	3	5
No serum	4	5	4	6

JC virus agnoprotein に関する研究

班 員：長嶋 和郎 (北海道大学・医・分子細胞病理)
研究協力者：澤 洋文 (北海道大学・医・分子細胞病理)
：遠藤 秀一 (北海道大学・医・分子細胞病理)
：大場 靖子 (北海道大学・医・分子細胞病理)
：田中 伸哉 (北海道大学・医・分子細胞病理)

〔研究要旨〕

agnoprotein (Agno)は JC virus (JCV) genome の後期発現領域に code されている 71 アミノ酸からなる蛋白質である。我々は以前に pseudovirus 形成において Agno が particle 形成の効率を抑制している事を報告したが、JCV での Agno の機能、局在等は未だ不明である。

今回我々は JCV Agno の親水性部分をペプチド抗原とした polyclonal 抗体を作成して、JCV 持続感染細胞、および PML 患者の脳での局在を観察した。その結果 Agno は SV40 virus (SV40)、BK virus (BKV)と同様に感染細胞では主に cytoplasm に局在しており、また PML 脳では核が JCV VP1 および large T に陽性に染まる細胞の周囲に樹枝状に分布しており、この分布は oligodendrocyte の胞体に相当していた。

さらに Agno の結合蛋白を調べる目的で、ヒト 293T 細胞に GST-Agno を強制発現させ、³⁵S-Met の metabolic labeling を行なった後に GST-Agno fusion protein (JCV, SV40)で pulldown assay を行った。その結果、約 50、75、100kD の位置に binding proteins が存在することが判明し、これらは BKV で報告されている分子と同じ位置に相当していた。

Analysis of agnoprotein of JC virus

Hirofumi Sawa, Shuichi Endo, Yasuko Ohba, Shinya Tanaka, Kazuo Nagashima

Laboratory of Molecular & Cellular Pathology, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, Japan

ABSTRACT

The agnoprotein (Agno) of JCV is composed of a 71-amino-acid which is encoded between nucleotides 277 and 492 of viral genome, and expressed as a late protein (2). We have previously reported that Agno decreased an expression level of JCV capsid protein, VP1(3), however, the function and localization of Agno in JCV infected cells are still unknown. In order to address these questions, we have generated a polyclonal antibody against Agno using a polypeptide containing its hydrophilic residues. Immunohistochemical study with the antibody has proved that Agno was mainly expressed in the cytoplasm of the JCV infected cells. Moreover, in PML brain a dendritic or arborizing staining was recognized surrounding areas of VP1 and large T positive cells, which were accordance with the cytoplasm of the oligodendrocytes. To investigate Agno binding cellular proteins, GST-Agno was overexpressed in 293T cells and proteins were labelled by ³⁵S-Met, and a pulldown assay was performed with the GST-Agno fusion protein. Three radioactive bands, 50, 75, and 100 kDa were recognized which was consistent with previous reports about BKV Agno (6).

〔はじめに〕

進行性多巣性白質脳症(PML)は、免疫不全状態において発症する脱髄性脳症であり JCV の感染に起因している。JCV は SV40、BKV と共に DNA virus である Polyomavirus に属しており、JCV genome は 6 種類の蛋白質を code している。初期転写産物は非構造蛋白である large T 抗原、small t 抗原、後期転写産物は構造蛋白 VP1、VP2、VP3 および agnoprotein (Agno)である。SV40 と BKV の Agno に関しては感染後期に産生され、cytoplasm もしくは perinuclear zone に局在するという報告がされているが(1)、JCV に関してはその発現、機能に関しては未だ明らかになっておらず、pseudovirus 形成において Agno が particle 形成の効率を抑制している事が報告されているに過ぎない(3)。

〔目 的〕

我々は Agno の局在・機能を調べるために以下の実験を行った。1) Agno に対する抗体を作成してヒト PML brain および感染細胞 JCI cell (5)での Agno の局在を検索した。2) GST-Agno fusion protein を用いた pull down assay 法を用いて Agno binding protein を検索した。

〔材料と方法〕

1) JCV Agno の親水性領域に属する peptide を合成して家兎に免疫し、精製を行ない抗 Agno ポリクローナル抗体を作成した。抗体の特異性は avidin-biotin peroxidase 法を用いた Western blotting 法、免疫染色法を用いて確認を行った。PML 症例の剖検時に採集した PML 脳および JCV 感染細胞である JCI 細胞 (5)を用いて Agno の組織内及び細胞内での局在を検索した。更に JCV 外殻蛋白であり Agno と同様に後期蛋白である VP1 の抗体および JCV 初期蛋白である large T に対する抗体 (SV40 T Ag (Ab-2), Calbiochem)と二重染色法を行ない、細胞内での JCV 各蛋白の局在の差異を検討した。また連続切片を用いて、neuron のマーカーとして Neuronspecific enolase (NSE)、astrocyte のマーカーとして glial fibrillary acidic protein (GFAP)、脳の microglia/macrophage を認識する CD68 (NSE, GFAP, CD68 はいずれも DAKO 社製 monoclonal 抗体) を用いた免疫染色を行うことによる細胞の characterization および、Myelin basic protein (MBP, DAKO) の免疫染色または Klüver-Barrea (KB)髄鞘染色と Agno の免疫染色を同時に行うことにより、脱髄巣と Agno 陽性細胞との局在の相関を検索した。

2) Agno の coding region を eukaryotic expression vector である pEBG (N 末に GST tag を持つ)に subcloning した後 sequence を確認後、293T 細胞に transfection した。その後 ³⁵S で metabolic labeling を行い、Glutathione Sepharose column で pulldown を行ない polyacrylamide gel で泳動した。

〔倫理面の配慮〕

本研究では、JCV の agnoprotein の局在・機能を検索することを目的とした。本実験で用いられた agnoprotein は感染性は持たずその安全性は確認済みである。また本実験で用いた大腸菌の系についても同様に人体に対する安全性は既に認められており、北海道大学の組換え DNA 申請においても承認を得ている。

〔結 果〕

1) 作成した抗 Agno ポリクローナル抗体の特異性を確認するために、JCV 持続感染細胞である JCI 細胞の lysates を用いて Western blot を行った。分子量約 8 kDa の Agno の相当する位置に single band の signal を認めた。また JCV 外殻蛋白である VP1 に対する抗体を用いて既に陽性であることが示されている PML 症例の免疫染色を行ったところ、陽性所見を認めた。これらの免疫反応は抗原吸収試験にて陽性反応が消えることを確認しており、Agno に対する抗体の特異性および Western blot また免疫染色法への有用性が確認できた。

2) PML 症例を用いた免疫染色の結果 Agno は感染細胞の細胞質に樹枝状に発現を認めた。Agno 陽性細胞を同定するために連続切片を用いて NSE、GFAP、CD68 に対する抗体による免疫染色を行なった。Agno 陽性細胞はいずれの抗体においても反応性が認められず、neuron、astrocyte、microglia/macrophage 細胞ではないことが判明し形態的な所見と合わせて oligodendrocyte であることが示唆された。

3) KB 染色と Agno の二重染色、また連続切片での MBP の免疫染色法を用いた結果、Agno 陽性の oligodendrocyte は脱髄が生じていない部分にも存在していた。また完全に脱髄が起きている部位でも Agno 陽性の細胞は存在しており、Agno は同様に細胞質に樹枝状に発現していた。このことから JCV 感染による脱髄を生じる前に oligodendrocyte の細胞質に Agno が分布していることが判明した。また本研究により oligodendrocyte では、感染後も胞体が樹枝状に伸展していることが示された。

4) PML 脳を用いて JCV 初期蛋白である T 抗原および Agno と同様の後期蛋白である外殻蛋白 VP1 と Agno の二重免疫染色を行なったところ、それぞれの細胞内局在は、T 抗原および VP1 は主に細胞の核で陽性であり、逆に Agno は核には殆ど認められず、細胞質での陽性反応が主であった。Agno は T 抗原または VP1 と同時に陽性となった。また T 抗原のみ核に陽性となり、VP1 や Agno が陰性の細胞も認められた。

5) GST-Agno を用いた pulldown assay では従来 BKV で報告されていたのと同様に JCV で 50、75、100 kDa の band が認められた。また陽性 band は SV40 にも認められ polyoma virus の Agno に共通して結合する細胞蛋白の存在が示唆された。

〔考 察〕

Polyoma virus genome の late region 5' end に位置する agnogene は viral capsid protein を code する ORF の上流に位置する。agnogene は JCV では 71 アミノ酸残基、SV40 では 62 残基（相同性 58 %）、BKV では 66 残基（相同性 54 %）、からなる agnoprotein を code している。

SV40 の Agno に関しては感染後期に capsid protein の発現に続いて産生され、cytoplasm あるいは perinuclear area に局在し、VP1 の cytoplasm から nucleus への translocation の促進、核内での capsid protein の assembly、virion の生成・細胞外への萌出、single および double strand DNA への結合、late viral protein の転写の調節に影響を与える可能性が示唆されているが未だ明らかな consensus は得られていない(1, 4)。

BKV でも Agno は感染後期に発現し、VP1 の発現にやや遅れて cytoplasm、perinuclear zone に局在すると報告されている。BKV に関しては Agno と結合する細胞由来の蛋白の存在が示唆されている(6)。

今回我々は Agno に対するポリクローナル抗体を作成し、JCV 感染細胞、および PML 脳における局在を観察したところ、SV40、BKV と同様に細胞内での局在は細胞質が主体であった。同時に行なった T 抗原、VP1 の局在は核が主体であり、JCV 構成蛋白の中でも Agno の細胞内局在における特異性が判明した。また PML 脳での Agno 陽性細胞は、oligodendrocyte が主体であること、脱髄の進行程度に関わらず Agno 陽性 oligodendrocyte がその形態を保持しながら存在していることから、髄鞘の崩壊は oligodendrocyte の消失に伴うものではなく、JCV 感染による核内でのウイルスの増殖と、細胞質での Agno の蓄積に随伴する機能不全であろうと考えられた。これまでに PML 脳での JCV 感染細胞の局在については T 抗原もしくは VP1 を指標としており、これらの蛋白は今回示したように核に局在するために oligodendrocyte の形態（特に細胞質の形態）については全く情報が無かった。本報告により oligodendrocyte が脱髄進行期においてもその形態を維持していることは神経病理学的に重要であると考えられた。更に JCV 感染により oligodendrocyte がどのような機能異常を生じるのかを解析することが可能となった。

また Agno に対する細胞側の binding protein に対しては GST-pull down assay 法にてその存在を確認

しているが、今後 yeast two hybrid 法を用いて結合蛋白を同定し、JCV 感染時の Agno の機能を明らかにすることによりウイルス粒子形成の阻害や PML 治療に結びつく基礎 data が得られるものと思われる。

【結 論】

JCV Agno に対するポリクローナル抗体を作成し、JCV 感染細胞における細胞内の局在を明らかにしたが、このことは JCV 感染による脱髄機構の解明に向かう新たな知見と考えられた。今後 JCV 感染により Agno が oligodendrocyte のどの蛋白に結合し脱髄を生じるのかを分子レベルでの解析を進めることが可能と考えられた。

【参考文献】

- 1) Carswell, S., and J. C. Alwine. Simian virus 40 agnoprotein facilitates perinuclear-nuclear localization of VP1, the major capsid protein. *J Virol* 60: 1055-61, 1986.
- 2) Frisque, R. J., G. L. Bream, and M. T. Cannella. Human polyomavirus JC virus genome. *J Virol* 51: 458-69, 1984.
- 3) Hara, S. Y., Y. Hara, T. Larson, K. Yasui, K. Nagashima, and G. L. Stoner. Analysis of capsid formation of human polyomavirus JCV (Tokyo-1 strain) by a eukaryotic expression system: Splicing of late RNAs, transcription and nuclear transport of major capsid protein VP1, and capsid assembly. *J Virol* in print, 2000.
- 4) Hay, N., H. Skolnik-David, and Y. Aloni. Attenuation in the control of SV40 gene expression. *Cell* 29: 183-93, 1982.
- 5) Nukuzuma, S., Y. Yogo, J. Guo, C. Nukuzuma, S. Itoh, T. Shinohara, and K. Nagashima. Establishment and characterization of a carrier cell culture producing high titres of polyoma JC virus. *J Med Virol* 47: 370-7, 1995.
- 6) Rinaldo, C. H., T. Traavik, and A. Hey. The agnogene of the human polyomavirus BK is expressed. *J Virol* 72: 6233-6, 1998.

【研究発表】

1. 論文発表

- 1) Nagashima, T., M. Okawa, T. Kitamoto, H. Takahashi, Y. Ishihara, Y. Ozaki, and K. Nagashima. Wernicke encephalopathy-like symptoms as an early manifestation of Creutzfeldt-Jakob disease in a chronic alcoholic. *J Neurol Sci* 163: 192-8, 1999.
- 2) Takahashi, H., T. Iwata, Y. Kitagawa, R. H. Takahashi, Y. Sato, H. Wakabayashi, M. Takashima, H. Kido, K. Nagashima, K. Kenney, C. J. Gibbs, Jr., and T. Kurata. Increased levels of β and β isoforms of 14-3-3 proteins in cerebrospinal fluid in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 983-5, 1999.
- 3) Takahashi, H., R. H. Takahashi, H. Hasegawa, M. Horiuchi, M. Shinagawa, T. Yokoyama, K. Kimura, M. Haritani, T. Kurata, and K. Nagashima. Characterization of antibodies raised against bovine-PrP-peptides. *J Neurovirol* 5: 300-7, 1999.

2. 学会発表

- 1) Okada Y, Sawa H, Tanaka S, Hasegawa H, .Hall WW, Nagashima K: Transcriptional activation of JC virus by HTLV-I Tax protein in human cells. Gordon Research Conference on Neurovirology, 1999 in New London, NH, USA
- 2) Nagashima K, Okada Y, Tanaka S, Sawa H, Nagashima T: Correlation of clinicopathological features of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) with molecular findings of JC virus regulatory region. 6th European Congress of Neuropathology, 1999 in Barcelona, Spain

- 3) Nagashima K, Okada Y, Tanaka S, Sawa H: Neuropathology of JC virus Infection. 83th Vortragsanmeldung, 1999 in Jena, Germany
- 4) 長嶋和郎：宿題報告 I; ウイルス性脳症の発生機序。第 88 回 日本病理学会総会、1999 年、東京
- 5) 伊藤智雄、岡田由紀、澤洋文、田中伸哉、長嶋和郎：尿路系における JC ウイルス感染細胞の組織学的局在およびウイルス株の検討。第 88 回 日本病理学会総会、1999 年、東京
- 6) 渡邊環、田中伸哉、大場靖子、川瀬義明、岡田由紀、澤洋文、長嶋和郎：ヒト JC ウイルス agnoprotein 結合蛋白質の検索。第 88 回 日本病理学会総会、1999 年、東京
- 7) 岡田由紀、澤洋文、長谷川秀樹、田中伸哉、長嶋和郎：HTLV-I Tax による JC ウイルス (JCV) 転写活性の亢進。第 88 回 日本病理学会総会、1999 年、東京
- 8) 篠原敏也、田中伸哉、澤洋文、長嶋和郎：腎由来 archetype 型 JC ウイルスの調節領域の解析。第 88 回 日本病理学会総会、1999 年、東京
- 9) 西原広史、小林希、佐藤真実、宍戸由紀子、岡田由紀、田中伸哉、澤洋文、古林与志安、長嶋和郎：JC ウイルス capsid protein の機能的領域に対する抗体を用いた免疫組織学的検索と感染抑制実験。第 88 回 日本病理学会総会、1999 年、東京
- 10) 岡田由紀、澤洋文、田中伸哉、伊藤智雄、長谷川秀樹、長嶋和郎：HTLV-I Tax による JC virus の活性化に関する研究。第 40 回 日本神経病理学会総会学術研究会、1999 年、横浜
- 11) 山本晋、高丸勇司、森田伸行、安田素次、岡田由紀、澤洋文、長嶋和郎：長期の経過をとり Synaptic type と plaque type の両方のプリオン沈着パターンを呈した sporadic CJD の一症例。第 40 回 日本神経病理学会総会学術研究会、1999 年、横浜
- 12) 岡田 由紀、澤洋文、田中伸哉、長谷川秀樹、William W. Hall、長嶋和郎：HTLV-I Tax による JC virus(JCV) 活性化に関する研究。第 47 回 日本ウイルス学会、1999 年、横浜
- 13) 岡田 由紀、澤洋文、田中伸哉、長嶋 和郎：HTLV-I Tax による JC virus(JCV) 活性化に関する研究。第 3 回神経ウイルス研究会・第 4 回神経感染症研究会 合同学術集会、1999 年、仙台

〔知的所有権の取得状況〕

1. 特許取得： なし
2. 実用新案登録： なし
3. その他： なし