
厚生省特定疾患対策研究事業

特定疾患の微生物学的原因究明に
関する研究班
平成11年度 研究報告書

平成12年3月

主任研究者 倉田 毅

特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究班（平成 11 年度）

区分	氏名	所 属	職名
班 長	倉田 毅	国立感染症研究所	副所長
班 員	山西 弘一	大阪大学大学院医学系研究科微生物学講座	教授
	岩崎 琢也	国立感染症研究所感染病理部	室長
	生田 和良	大阪大学微生物病研究所免疫生体防御研究部門	教授
	高橋 和郎	福島県立医科大学医学部微生物学講座	助教授
	田代 真人	国立感染症研究所ウイルス製剤部	部長
	結城 伸泰	独協医科大学神経内科	講師
	高 昌星	信州大学医学部第 3 内科	助教授
	江石 義信	東京医科歯科大学医学部附属病院病理部	助教授
	渡辺 邦友	岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設	教授
	荒川 宜親	国立感染症研究所細菌・血液製剤部	部長
	永武 毅	長崎大学熱帯医学研究所感染症予防治療分野	教授
	山谷 睦雄	東北大学医学部附属病院老人科	助手
村田 幸作	京都大学食糧科学研究所	教授	

目 次

I. 総括研究報告（平成 11 年度）	1
班長 倉田 毅（国立感染症研究所 副所長）	
II. 分担研究報告	
1. 骨髄系の障害に関連する特定疾患（再生不良性貧血、特発性血小板減少症）の病因ウイルスに関する研究	11
山西 弘一（大阪大学大学院医学系研究科微生物学講座）	
2. 特発性造血障害におけるウイルス感染の関与に関する研究	13
岩崎 琢也（国立感染症研究所感染病理部）	
3. パーキンソン病とボルナ病ウイルス感染に関する研究	16
生田 和良（大阪大学微生物病研究所免疫生体防御研究部門）	
4. 多発性硬化症の微生物学的原因究明に関する研究	19
高橋 和郎（福島県立医科大学医学部微生物学講座）	
5. パーキンソン病とインフルエンザ感染	21
田代 真人（国立感染症研究所ウイルス製剤部）	
6. ギラン・バレー症候群の亜型フィッシャー症候群と <i>Haemophilus influenzae</i> 感染	23
結城 伸泰（独協医科大学神経内科）	
7. ギラン・バレー症候群の発症機序からみた血液浄化療法（アフエリシス）の有用性と病因因子の解明に関する研究	30
高 昌星（信州大学医学部第 3 内科）	
8. P acnes 由来 trigger factor 抗原に対するサ症患者の免疫反応性について	33
江石 義信（東京医科歯科大学医学部附属病院病理部）	
9. サ症患者におけるプロピオニバクテリアの細菌学的検討 ～Propionibacterium acnes を分離するための選択培地作製の試み～	39
渡辺 邦友（岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設）	
10. IgA 腎症発症に関わる病原体の解明	41
荒川 宜親（国立感染症研究所細菌・血液製剤部）	
11. びまん性肺疾患または呼吸不全における細菌感染	44
永武 毅（長崎大学熱帯医学研究所感染予防治療分野）	
12. 慢性肺気腫あるいは呼吸不全におけるウイルス感染	47
山谷 睦雄（東北大学医学部附属病院老人科）	
13. 慢性肺疾患における細菌の関与とその治療法の開発	49
村田 幸作（京都大学食糧科学研究所）	

I. 総括研究報告

1. 総括研究報告（平成11年度）

特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究班

主任研究者 倉田 毅 国立感染症研究所副所長

研究要旨 特定疾患の起因に関与すると思われる病原微生物を検索し、疾患の発症機序を解明することを目的とし、①起因微生物の分離、②微生物関連蛋白、遺伝子を検索する、③病期と既知病原体に対する抗体の動態、サイトカイン産生等との関連を測定する、④特定疾患の病状悪化と病因性について明らかにする、⑤動物モデルを作成し発症機序を解明する、等々により神経疾患（パーキンソン病、MS、ギラン・バレー症候群、びまん性肺疾患—サルコイドーシス、ウイルスと細菌の関与、バイオフィルムを破壊する薬剤の開発、IgA 腎症、等について研究を実施した。

分担研究者

生田 和良（大阪大学微生物病研究所教授）
山西 弘一（大阪大学医学部教授）
岩崎 琢也（国立感染症研究所室長）
荒川 宜親（国立感染症研究所部長）
高橋 和郎（福島県立医科大学医学部助教授）
高 昌星（信州大学医学部助教授）
田代 真人（国立感染症研究所部長）
山谷 睦雄（東北大学医学部附属病院助手）
永武 毅（長崎大学熱帯医学研究所教授）
江石 義信（東京医科歯科大学医学部付属病院助教授）
渡辺 邦友（岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設教授）
村田 幸作（京都大学食糧科学研究所教授）
結城 伸泰（獨協医科大学講師）

特定疾患は、ウイルスあるいは細菌等の感染が引き金となって自己免疫機序が惹起されたり、あるいは微生物の潜伏・持続感染が疾患と密接な関係があることが示唆されている。そこで、当班としては、各臨床班と密接に連絡し、患者の血液、髄液、血清、体液その他病理材料を用いて、あるいは動物モデルを作成し；

- ① 起因微生物の分離を試みる。
- ② 微生物関連蛋白、遺伝子を検索する。
- ③ 病期と既知病原体に対する抗体の動態及び各種サイトカイン産生等の関連を経時的に測定する。
- ④ 既知病原体の再活性化の機序を PCR 法により把握し、病巣悪化との関連、病因性について明らかにする。
- ⑤ 動物モデル等で起因病原体と発症機序を明らかにする。

A. 研究目的

特定疾患（いわゆる“難病”）と定義される疾患の大部分は原因が不明である。それ故原因療法ができないでいる。特定疾患の原因としてウイルスや細菌あるいはそれらの産物が引き金となり自己免疫疾患が惹起されたり、微生物の潜伏・持続感染、あるいはそれらの再活性化により、さらには未知の病原体の関与が示唆される。当研究班では特定疾患を引き起こす病原体、その発症機序を臨床研究班と密接に連携をとり、明らかにすることにより原因究明を行ない、その結果として発症の予防あるいは効果的な治療法の開発に結び付けることを目標とする。

B. 研究方法

1) 神経変性疾患におけるウイルスの関与：

ボルナ病ウイルスとパーキンソン病の関連についてさらにヒトの脳の症例検索を続け in situ hybridization、免疫染色等により RNA 検出あるいはウイルス抗原検出を行ないウイルスの黒質内局在を解明すると共にヒト由来神経系細胞への伝播を行ないウイルスの遺伝子配列を決める。またこれらのウイルス学的知見を基盤として、他の神経疾患（MS、ALS、ハンチントン病等）との関連も検索する。さらに検索技術開発も試みる（生田、高橋、田代）。

2) びまん性肺疾患—特にサルコイドーシスの病因と発症機序について—：

サルコイドーシス（サ症）は慢性肉芽腫疾患で

ある。前期において *P. acnes* の DNA が極めて高度に QPCR によりサ症組織に検出され、また *P. granulosum* の関与も判明したことから、日本全国の多数の症例を集積し、結果の再現性を検討する。正常者とサ症患者粘膜の *P. acnes* の存在等を明らかにする（江石、渡辺）。

3) 特発性造血器障害におけるウイルスの関与：

臨床班より提供を受けた再生不良性貧血、PRCA、骨髄異形性、等の骨髄や末梢血でバルボウイルス、ヒトヘルペスウイルス 6 等が検出されており、より多数の症例で因果関係を解明し、陽性病原体については臨床において除外診断をする必要がある。一方ヘルペス群ウイルスを横断的に DNA を検出する簡便 PCR 法を開発したので、今後原因不明造血器疾患のウイルス関与のスクリーニングが可能となった（山西、岩崎）。

4) ギラン・バレー症候群の病因・発症機序の解明：

ギラン・バレー症候群（GBS）患者の 30% で *C. jejuni* の先行感染が見られており、原因としての意味付けが重要である。この菌のリボ多糖と GMI ガングリオシドの分子相関性の仮説と今までの成績に基づき *C. jejuni* リボ多糖が真の GBS の発症機序に関与するかどうか、動物モデルを作成し検討すると同時にヒトの *C. jejuni* 感染の有無、血液や骨髄中のサイトカインを定量し、かつ GBS での *C. jejuni* との関連で細胞性及び体液性免疫機序の役割を明らかにする（結城、高）。

5) 慢性肺気腫、呼吸不全と微生物感染：

微生物感染と気道収縮との関係を炎症性物質や気道収縮物質との関連から明らかにする。また難治化要因を病原細菌付着因子の面から解明する。難治性細菌感染症（特に呼吸器系の）の増加は効果的治療法がない状況でバイオフィーム感染症対策は重要な課題であり、今までの成績を基にしてアルギン酸リアーゼ応用による治療法を目指す（山谷、永武、村田）。

6) IgA 腎症の発症機序の解明：

IgA 腎症患者に *Mycoplasma fermentans* に対する IgM 抗体が高度に検出されたこと、この菌がヒト口腔に高率に存在する、またマクロファージやリンパ球を強力に活性化する特殊リボ蛋白を産生するなどの特徴がある。*Mycoplasma* による IgA 腎症の発症機序を明らかにする（荒川）。

C&D. 研究結果と考察

1) 神経変性疾患におけるウイルスの関与：

パーキンソン病患者の剖検脳黒質や前頭葉を検索し、ボルナ病ウイルス（BDV）RNA が検出された。さらに患者黒質乳剤をスナネズミに接種し、BDV の伝播が確認された。さらに BDV 感染スナネズミ及び BDVp24 遺伝子トランスジェニックマウスで黒質を含む中脳脳幹部に BDVp24 遺伝子発現が神経症状発症に関与していることが示唆された（生田）。

またかつてインフルエンザの大流行のあった周期に関連してパーキンソン病の増加がみられたことからインフルエンザウイルス（H3N2）感染ハムスター（A/Hiratsuka/1/99 株）を検索し、肺でのウイルス増殖は確認されたが神経症状等の臨床症状はみられなかった。今後発症に関与すると考えられるサイトカインとの関連も調べる（田代）。

多発性硬化症（MS）と微生物との関連を起因微生物の遺伝子サブトラクション法により同定を試みた。患者髄液及び髄液 RNA より PCR で増幅し、サブトラクション法により cDNA が得られたが、MS の病原と考えられる微生物遺伝子は検出できなかった。今後 cDNA を用い蛋白発現させ患者血清でのスクリーニングも試みる予定である（高橋）。

2) GBS の病因・発症機序の解明：

GBS の亜型の一つであるフィッシャー症候群との関連が証明されている先行感染は *Campylobacter jejuni* 腸炎のみである。さらに上気道炎が先行することが認められることから *H. influenzae* との関連をフィッシャー症候群 70 例で検索したところ、抗体保有は有意に高かった。関連陽性例は 7 例であり今後の詳細な検討が必要である（結城）。

GBS の先行上気道感染が最も多く、下部消化管感染は少なかった。アフエレス治療後 Th2 が優位となっていた（急性期では Th1 系優位）（高）。

3) びまん性肺疾患—特にサ症の原因と発症機序について—

P. acnes とサ症との関連について検索し、*P. acnes* DNA expression library を患者血清にてスクリーニングして得られた recombinant protein (RP35) 抗原は、分子量 79Kda の *P. acnes* trigger factor に由来しており、その全塩基配列を決定した。この抗原を用い末梢血リンパ球の刺激試験を行ったところ、サ症 50 例中 9 例で特異的に高い反応性がみられた。今後この RP35 抗原による皮内反応試験も実施していく必要がある（江石）。

サ症患者のプロピオニバクテリアの細菌学的検討を行うため、*P. acnes* 分離用選択培地の作製（薬剤の配合）を試みた。ゲンタマイシンとア

ジ化ナトリウムを用いることにより、他の菌種の発育を阻止し *P. acnes* 9 株全てが発育しうる条件を確立した（渡辺）。

4) 特発性造血器障害におけるウイルスの関与：
初感染後体内に潜伏感染しているヘルペス群ウイルスは宿主の免疫不全状態で再活性化し骨髄抑制を含む様々な病態をきたすことが知られており、未知のヘルペスウイルスを含む病因ウイルスの検索を目的とし、ヘルペス群ウイルスが共通増幅しうるシステムを開発し応用した。しかし疾患特異的増幅は見られなかった（山西）。再生不良性貧血（17 例）、Myelodysplastic syndrome (MDS)（46 例）等々の疾患の骨髄及び末梢血を得、B19、CMV、HHV6、EBV、HHV8 等のウイルスにつき PCR、in situ hybridization 等により検索した再生不良性貧血（2 例）、MDS（1 例）で EBV ゲノムが PCR で検出されたが、定量感度以下であり起因ウイルスとしての意味付けには検討が必要である（岩崎）。

5) 慢性肺気腫・呼吸不全と微生物感染：
24 例の上気道症状の患者のうがい液、鼻汁、咽頭ぬぐい液を PCR で検索し、5 例でライノウイルスが検出された。またライノウイルス感染例で上皮細胞系でムチン遺伝子の発現が増加していた（山谷）。
細菌の病原性発現と発症機序の重要な要因となる咽頭上皮細胞への細菌付着の細胞例レセプタ

一の検討を行い、ブランハメラの GM2、インフルエンザ菌の GD2、インフルエンザ菌の GD2、バーコリデリアシュードマレイにおける糖鎖の重要性が明らかになった。また S-Carboxymethyl cysteine、N-Acetylcysteine 等が細菌の咽頭上皮細胞への付着性を障害することを明らかにした（永武）。
難治性肺疾患の重要菌のひとつ緑膿菌のバイオフィルム感染症の新しい治療法としてアルギン酸を分解除去する酵素アルギン酸リアーゼの抗原決定基を決めるため 6 種の低分子酵素を調整し、その X 線結晶構造を明らかにした（村田）。

6) IgA 腎症の発症機序の解明：
IgA 腎症患者で、咽頭、末梢血、扁桃からマイコプラズマを分離、PCR 法での DNA 検出を試みた。Mycoplasma orale が分離され、M. fermentans と同サイズの DNA が増幅された。その患者 3 例で T リンパ球の慢性活性化マーカー（HLA-DR 発現細胞）、Mycoplasma のマイトゲン活性の関連が疑われた。今後多数の例での検索が求められる（荒川）。

E 結論

“～関与の可能性あり”をより多数の新鮮な臨床例を用いて多角的に追求して、病因論に迫る必要があると考える。

研究成果の刊行に関する一覧

(主任研究者)

倉田 毅

1. Nakamura Y, Nakaya T, Hagiwara K, Momiyama N, Kagawa Y, Taniyama H, Ishihara C, Sata T, Kurata T, Ikuta K: High susceptibility of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) to Borna disease virus. *Vaccine* 17: 480-489, 1999
2. Lu Y, Nerurkar VR, Dashwood W, Woodward CL, Aban S, Shikuma CM, Grandinetti A, Chang H, Nguyen HT, Wu A, Yamamura Y, Boto WO, Merriwether A, Kurata T, Detels R, Yanagihara R: Genotype and allele frequency of a 32-base pair deletion mutation in the CCR5 gene in various ethnic groups: absence of mutation among asians and pacific islanders. *Int J Inf Dis* 3: 186-191, 1999
3. Osaki M, Matsubara K, Iwasaki T, Kurata T, Nigami H, Harigaya H, Baba K: Severe aplastic anemia associated with human parvovirus B19 infection in a patient without underlying disease. *Ann Hematol* 78: 83-86, 1999
4. Takahashi RH, Nagashima K, Kurata T, Takahashi H: Analysis of human lymphotropic T-cell virus type II-like particle production by recombinant baculovirus-infected insect cells. *Virology* 256: 371-80, 1999
5. Ichiba T, Hashimoto Y, Nakaya M, Kuraishi Y, Tanaka S, Kurata T, Mochizuki N, Matsuda M: Activation of C3G guanine nucleotide exchange factor for Rap1 by phosphorylation of tyrosine 504. *J Biol Chem* 274: 14376-14381, 1999
6. Kositanont U, Wasi C, Wanprapar N, Bowonkiratikachorn P, Chokephaibulkit K, Chearskul S, Chinnabutra K, Suthent R, Foongladda S, Inagi R, Kurata T, Yamanishi K: Primary infection of human herpesvirus 6 in children with vertical infection of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 180: 50-55, 1999
7. Katano H, Sato Y, Kurata T, Mori S, Sata T: High expression of HHV-8-encoded ORF73 protein in spindle-shaped cells of Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol* 155: 47-52, 1999
8. Mochizuki N, Ohba Y, Kiyokawa E, Kurata T, Murakami T, Ozaki T, Kitabatake A, Nagashima K, Matsuda M: Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G alpha. *Nature* 400: 891-894, 1999
9. Katano H, Sata T, Suda T, Nakamura T, Tachikawa N, Nishizumi H, Sakurada S, Hayashi Y, Koike M, Iwamoto A, Kurata T, Mori S: Expression and antigenicity of human herpesvirus 8 encoded ORF59 protein in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *J Med Virol* 59: 346-355, 1999
10. Takahashi H, Iwata T, Kitagawa Y, Takahashi RH, Sato Y, Wakabayashi H, Takashima M, Kido H, Nagashima K, Kenny K, Gibbs CJ Jr, Kurata T: Increased levels of epsilon and gamma isoforms of 14-3-3 proteins in cerebrospinal fluid in patients with creutzfeldt-jakob disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 983-985, 1999
11. Takahashi H, Takahashi RH, Hasegawa H, Horiuchi M, Shinagawa M, Yokoyama T, Kimura K, Haritani M, Kurata T, Nagashima K: Characterization of antibodies raised against bovine-PrP-peptides. *J Neurovirol* 5: 300-307, 1999
12. Sato Y, Asahi Y, Iwasaki T, Matsukura T, Kurata T, Sata T: Detection of adeno-associated virus type 2 in patients with viral infection. *Jpn J Infect Dis* 52: 50-51, 1999
13. Katayama H, Hashimoto Y, Kiyokawa E, Nakaya M, Sakamoto A, Machinami R, Kurata T, Mochizuki N, Matsuda M: Epidermal growth factor-dependent dissociation of Crkl proto-oncogene product from the epidermal growth factor receptor in human glioma cells. *Jpn J Cancer Res* 90: 1096-1103, 1999
14. Yoda K, Sata T, Kurata T, Aramaki H: Oropharyngotonsillitis associated with non-primary Epstein-Barr virus infection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* (in press)
15. Katano H, Sato Y, Kurata T, Mori S, Sata T: Expression and localization of human herpesvirus 8-encoded proteins in primary effusion lymphoma, Kaposi's sarcoma and multicentric Castleman's disease. *Virology* (in press)

(分担研究者)

山西 弘一

1. Isegawa Y, Mukai T, Nakano K, Kagawa M, Chen J, Mori Y, Sunagawa T, Kawanishi K, Sashihara J, Hata A, Zou P, Kosuge H, Yamanishi K: Comparison of the Complete DNA Sequences of Human Herpesvirus 6 Variants A and B. *J Virol* 73(10): 8053-8063, 1999
2. Kositanont U, Wasi C, Wanprapar N, Bowonkiratikachorn P, Chokephaibulkit K, Chearskul S, Chimabuttra K, Sutthent R, Foongladda S, Inagi R, Kurata T, Yamanishi K: Primary infection of human herpesvirus 6 in children with vertical infection of human immunodeficiency virus type 1 [In Process Citation]. *J Infect Dis* 180(1): 50-55, 1999
3. Tanaka-Taya K, Kondo T, Nakagawa N, Inagi R, Miyoshi H, Sunagawa T, Okada S, Yamanishi K: Reactivation of human herpesvirus 6 by infection of human herpesvirus 7. *J Med Virol* 60(3): 284-289, 2000
4. Zou P, Isegawa Y, Nakano K, Haque M, Horiguchi Y, Yamanishi, K: Human herpesvirus 6 open reading frame U83 encodes a functional chemokine [In Process Citation]. *J Virol* 73(7): 5926-33, 1999

岩崎 琢也

1. Yoshikawa T, Suzuki K, Ihira M, Furukawa H, Suga S, Iwaaki T, Kurata T, Asonuma K, Tanaka K, Asano Y: Human herpesvirus 6 latently infects mononuclear cells but not liver tissue. *J Clin Pathol* 52: 65-67, 1999
2. Osaki M, Matsubara K, Iwasaki T, Kurata T, Nigami H, Harigaya H, Baba K: Severe aplastic anemia associated with human parvovirus B19 infection in a patient without underlying disease. *Ann Hematol* 78: 83-86, 1999
3. Sato Y, Asahi Y, Iwasaki T, Matsukura T, Kurata T, Sata T: Detection of adeno-associated virus type 2 in patients with viral infection. *Jpn J Infect Dis* 52: 50-51, 1999

生田 和良

1. Nakamura Y, Takahashi H, Shoya Y, Nakaya T, Watanabe M, Tomonaga K, Iwahashi K, Ameno K, Momiyama N, Taniyama H, Sata T, Kurata T, de la Torres JC, Ikuta K: Isolation of Borna disease virus from human brain. *J Virol* (in press)
2. Hagiwara K, Kamitani W, Takamura S, Taniyama H, Nakaya T, Tanaka H, Kirisawa R, Iwai H, Ikuta K: Detection of Borna disease virus in a pregnant mare and her fetus. *Vet Microbiol* (in press)
3. Nakamura Y, Watanabe M, Kamitani W, Taniyama H, Nakaya T, Nishimura Y, Tsujimoto H, Machida S, Ikuta K: High prevalence of Borna disease virus in domestic cats with neurological disorders in Japan. *Vet Microbiol* 70: 153-169, 1999
4. Nakamura Y, Nakaya T, Hagiwara K, Momiyama N, Kagawa Y, Taniyama H, Ishihara C, Sata T, Kurata T, Ikuta, K: High susceptibility of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) to Borna disease virus. *Vaccine* 17: 480-489, 1999
5. Nakaya T, Takahashi H, Nakamura Y, Kuratsune H, Kitani T, Machii T, Yamanishi K, Ikuta K: Borna disease virus infection in two family clusters of patients with chronic fatigue syndrome. *Microbiol Immunol* 43: 679-689, 1999
6. Kohno T, Goto T, Takasaki T, Morita C, Nakaya T, Ikuta K, Sano K, Kurane I, Nakai M: Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus (BDV). *J Virol* 73: 760-766, 1999

高橋 和郎

1. Shigeta S, Mori S, Kira T, Takahashi K, Kodama E, et. al.: Anti-herpesvirus activities and cytotoxicities of 2-thiopyrimidine nucleoside analogues in vitro. *Antiviral Chemistry & Chemother* 10: 195-209, 1999
2. Yamaguchi K, Sawada T, Naraki T, Igata Y, Takahashi K, et. al.: Detection of Borna

disease virus-reactive antibodies from patients with psychiatric disorders and from horses by electrochemiluminescence immunoassay. *Clin Diag Lab Immunol* 6: 696-700, 1999

結城 伸泰

1. Koga M, Yuki N, Hirata K: Oropharyngeal palsy in Guillain-Barre and Fisher's syndromes is associated with muscle weakness in the neck and arm. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66: 254-255, 1999
2. Koga M, Yuki N, Hirata K: Antiganglioside antibody in patients with Guillain-Barre syndrome who show bulbar palsy as an initial symptom. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66: 513-516, 1999
3. Kuwabara S, Asahina M, Nakajima M, Mori M, Fukutake T, Hattori T, Yuki N: Special sensory ataxia in Miller Fisher syndrome detected by postural body sway analysis. *Ann Neurol* 45: 533-536, 1999
4. Hozumi A, Yuki N, Yamazaki K, Hirata K: Facial diplegia with paraesthesias: Facial nerve enhancement in three dimensional MRI. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66: 688, 1999
5. Tagawa Y, Yuki N, Hirata K: The 301 to 314 amino acid residue of β -tubulin is not a target epitope for serum IgM antibodies in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol Sci* 163: 44-46, 1999
6. Koga M, Yuki N, Takahashi M, Saito K, Hirata K: Are *Campylobacter curvus* and *Campylobacter upsaliensis* antecedent infectious agents in Guillain-Barre and Fisher's syndromes? *J Neurol Sci* 163: 53-57, 1999
7. Koga M, Yuki N, Hirata K: Subclass distribution and the secretory component of serum IgA anti-ganglioside antibodies in Guillain-Barre syndrome after *Campylobacter jejuni* enteritis. *J Neuroimmunol* 96: 245-250, 1999
8. Yuki N, Hirata K: Relation between critical illness polyneuropathy and axonal Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67: 128-129, 1999
9. Koga M, Yuki N, Ariga T, Hirata K: Antibodies to GD3, GT3, and O-acetylated species in Guillain-Barre and Fisher's syndromes: Their association with cranial nerve dysfunction. *J Neurol Sci* 164: 50-55, 1999
10. Yuki N, Ho TW, Tagawa Y, Koga M, Li CY, Hirata K, Griffin JW: Autoantibodies to GM1b and GalNAc-GD1a: Relationship to *Campylobacter jejuni* infection and acute motor axonal neuropathy in China. *Neurol Sci* 164: 134-138, 1999
11. Odaka M, Yuki N, Hirata K: Bilateral ballism in a patient with overlapping Fisher's and Guillain-Barre syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67: 206-208, 1999
12. Kuwabara S, Ogawara K, Koga M, Mori M, Hattori T, Yuki N: Hyperreflexia in Guillain-Barre syndrome: Relation with acute motor axonal neuropathy and anti-GM1 antibody. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67: 180-184, 1999
13. Kuwabara S, Mori M, Ogawara K, Mizobuchi K, Hattori T, Koga M, Yuki N: Axonal involvement at the common entrapment sites in Guillain-Barre syndrome with IgG anti-GM1 antibody. *Muscle Nerve* 22: 840-845, 1999
14. Odaka M, Yuki N, Yoshino H, Kiso M, Ishida S, Hirata K: Antibodies to GD1 β and GQ1 β in Guillain-Barre syndrome and the related disorders. *J Neurol Sci* 165: 126-132, 1999
15. Yuki N: Pathogenesis of Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. *Jpn J Infect Dis* 52: 99-105, 1999
16. Mori M, Kuwabara S, Koga M, Asahina M, Ogawara K, Hattori T, Yuki N: IgG anti-GQ1b positive acute ataxia without ophthalmoplegia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67: 668-670, 1999
17. Yuki N, Kuwabara S, Koga M, Hirata K: Acute motor axonal neuropathy and acute motor-sensory axonal neuropathy share a immunological profile. *J Neurol Sci* 168: 121-126, 1999
18. Ang CW, Yuki N, Jacobs BC, Koga M, van Doorn PA, Schmitz PIM, van der Meche FGA: Rapidly progressive, predominantly motor Guillain-Barre syndrome with anti-GalNAc-

- GD1a antibodies. *Neurology* 53: 2122-2227, 1999
19. Yuki N: Glycotope mimicry between human ganglioside and bacterial lipopolysaccharide induces autoimmune neuropathy. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 11: 45-353, 1999
 20. Kuwabara S, Ogawara K, Mizobuchi K, Koga M, Mori M, Hattori T, Yuki N: Isolated absence of F wave and proximal axonal dysfunction in Guillain-Barre syndrome with antiganglioside antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68: 191-195, 2000
 21. Yuki N: Current cases in which epitope mimicry is considered as a component cause of autoimmune disease: Guillain-Barre syndrome. *Cell Mol Life Sci* (in press)
 22. Yamamoto T, Yuki N: No cytomegalovirus DNA in sera from patients with anti-MAG/SGPG antibody-associated neuropathy: reply. *Ann Neurol* (in press)
 23. Tagawa Y, Yuki N: Bickerstaff's encephalitis associated with shingles. *J Neurol* (in press)
 24. Yuki N, Ang CW, Koga M, Jacobs BC, van Doorn PA, Hirata K, van der Meche FGA: Clinical Features and Response to Treatment in Guillain-Barre Syndrome Associated with Antibodies to GM1b Ganglioside. *Ann Neurol* (in press)
 25. Yuki N, Odaka M, Hirata K: Bickerstaff's Brainstem Encephalitis Subsequent to *Campylobacter jejuni* Enteritis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (in press)
 26. Tagawa Y, Yuki N, Hirata K: Anti-SGPG antibody in CIDP: nosological position of IgM anti-MAG/SGPG-associated neuropathy. *Muscle Nerve* (in press)

高 昌星

1. Ichikawa M, Koh CS, Hata Y, Inaba Y, Inoue A, Itoh M, Ishihara Y, Bernard CCA, Komiyama A: IgG2b antibody is associated with the severity of multiple sclerosis like demyelinating disease in NOD mice injected with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35-55. *Cell Immunol* 191: 97-104, 1999
2. Iwahashi T, Inoue A, Koh CS, Shin TK, Kim BS: Expression and potential role of inducible nitric oxide synthase in the central nervous system of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *Cell Immunol* 194: 186-193, 1999
3. Takashi K, Arai M, Yamamoto M, Koh CS, Fukutake K: Interaction of coagulation factors V and VIII on membranes containing phospholipids: Studies with confocal laser-scanning fluorescence microscopy. *Bioimages* 7: 36, 1999
4. Sakai T, Inoue A, Koh CS, Osame M: Serum levels of apoptosis related molecules in patients with multiple sclerosis and human T-lymphotropic virus type-1 associated myelopathy. *J Interferon Cytokine Res* 19: 999-1004, 1999
5. Inoue A, Koh CS, Iwahashi T: Detection of serum anti-cerebellar antibodies in patients with Miller Fisher syndrome (MFS). *Eur Neurol* 42: 230-234, 1999
6. Inoue A, Koh CS, Yamazaki M, Yagita H: Effect of anti-B7-1, B7-2 mAb on Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *J Immunol* 163: 6180-6186, 1999
7. Inaba Y, Ichikawa M, Koh CS, Inoue A, Itoh M, Kyogashima M, Komiyama A: Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Dermatan Sulfate. *Cell Immunol* 198: 96-102, 1999
8. Ichikawa M, Koh CS, Inoue A, Tsuyusaki J, Yamazaki M, Inaba Y, Sekiguchi Y, Itoh M, Yagita H, Komiyama A: Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of multiple sclerosis like demyelinating disease in NOD mice induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide. *J Neuroimmunol* 102: 56-66, 2000
9. Inoue A, Koh CS, Yamazaki M, Kim BS: High-dose mouse immunoglobulin G administration suppresses Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *J Neuroimmunol* (in press)
10. Kim BS, Palma JP, Inoue A, Koh CS: Pathogenetic immunity in Theiler's virus-induced demyelinating disease: a viral model for multiple sclerosis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (in press)

江石 義信

1. Ishige I, Usui Y, Takemura T, Eishi Y: Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese patients with sarcoidosis. *Lancet* 354: 120-123, 1999
2. Ebe Y, Ikushima S, Yamaguchi T, Kohno K, Azuma A, Sato K, Ishige I, Usui Y, Takemura T, Eishi Y: Immune response to *Propionibacterium acnes* trigger factor in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* (in press)

永武 毅

1. Gori AH, Ahmed K, Martinez G, Masaki H, Watanabe K, Nagatake T: Mediation Of Attachment Of Burkholderia Pseudomallei To Human Pharyngeal Epithelial Cells The Asialoganglioside GM1-GM2 Receptor Complex. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 61(3): 473-475, 1999
2. Tao M, Yamashita H, Watanabe K, Nagatake T: Possible virulence of *Staphylococcus aureus* in a mouse septic model. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 23: 1335-146, 1999
3. Saha SK, Rikitomi N, Ruhulamin M, Masaki H, Hanif M, Islam M, Watanabe K, Ahmed K, Matsumoto K, Sack RB, Nagatake T: Antimicrobial Resistance and Serotype Distribution of *Streptococcus pneumoniae* Strains Causing Childhood Infections in Bangladesh, 1993 to 1997. *Journal of Clinical Microbiology* 37(3): 798-800, 1999
4. Zheng CH, Ahmed K, Rikitomi N, Martinez G, Nagatake T: The effect of S-Carboxymethylcysteine and N-Acetylcysteine on the Adherence of *Moraxella catarrhalis* to Human Pharyngeal Epithelial Cells. *Microbiol Immunol* 43(2): 107-113, 1999

山谷 睦雄

1. Ohrui T, Funayama T, Sekizawa K, Yamaya M, Sasaki H. Effects of inhaled beclomethasone dipropionate on serum IgE levels and clinical symptoms in atopic asthma. *Clin Exp Allergy* 29: 357-361, 1999
2. Sekizawa K, Yanai M, Yamaya M, Arai H, Sasaki H. Amantadine and pneumonia in elderly stroke patients. *Lancet* 353: 2157, 1999
3. Yamaya M, Sekizawa K, Ishizuka S, Monma M, Sasaki H. Exhaled carbon monoxide levels during treatment of acute asthma. *Eur Respir J*: 757-760, 1999
4. Yamaya M, Sekizawa K, Suzuki T, Yamada N, Furukawa M, Ishizuka S, Nakayama K, Terajima M, Numazaki Y, Sasaki H. Infection of human respiratory submucosal glands with rhinovirus: effects on cytokine and ICAM-1 production. *Am J Physiol* 277: L362-L371, 1999
5. Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Lie R, Suzuki T, Nakayama K, Takeda A, Yamaguchi T, Itoyama Y, Sekizawa K, Sasaki H. Protective effects of heme oxygenase-1 against oxidant-induced injury in the cultured human tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21: 428-435, 1999
6. Nakasato H, Ohrui T, Sekizawa K, Matsui T, Yamaya M, Tamura G, Sasaki H. Prevention of severe premenstrual asthma attacks by leukotriene receptor antagonist. *J Allergy Clin Immunol* 104: 585-588, 1999
7. Monma M, Yamaya M, Sekizawa K, Ikeda K, Suzuki N, Kikuchi T, Takasaka T, Sasaki H. Increased carbon monoxide in exhaled air of patients with seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 29: 1537-1541, 1999
8. Masu K, Ohno I, Yamaya M, Kawamura T, Sasaki H, Shirato K. Inhibition of tracheal smooth muscle cell proliferation by phosphodiesterase inhibitors. *Allergology International* 48: 259-264, 1999

村田 幸作

1. Momma K, Okamoto M, Mishima Y, Mori S, Hashimoto W, Murata K: A novel bacterial ATP-binding cassette (ABC) transporter system that allows uptake of macromolecules. Submitted for publication
2. Hashimoto W, Miyake O, Momma K, Kawai S, Murata K: Molecular identification of oligo-alginate lyase of *Sphingomonas* sp. strain A1 as one of the enzymes required for complete depolymerization of alginate. Submitted for publication
3. Sakakibara H, Tamura T, Suzuki T, Mizobe M, Hisano T, Hashimoto W, Murata K: Preparation and properties of alginate lyase modified with polyethylene glycol. Submitted for publication
4. Yoon HJ, Hashimoto W, Miyake O, Okamoto M, Mikami B, Murata K: Overexpression in *Escherichia coli* and characterization of *Sphingomonas* sp. A1 alginate lyases. Protein Expr and Purif 2000 (in press)
5. Yoon HJ, Hashimoto W, Katsuya Y, Mezaki Y, Murata K, Mikami B: Crystallographic analysis of alginate lyase A1-II from *Sphingomonas* species A1. Biochim Biophys Acta 1476(2): 382-385, 2000
6. Yoon HJ, Mikami B, Hashimoto W, Murata K: Crystal structure of alginate lyase A1-III from *Sphingomonas* species A1 at 1.78 Å resolution. J Mol Biol 290: 505-514, 1999
7. Hashimoto W, Momma K, Miki H, Mishima Y, Kobayashi E, Miyake O, Kawai S, Nankai H, Mikami B, Murata K: Enzymatic and Genetic Bases on Assimilation, Depolymerization, and Transport of Heteropolysaccharides in Bacteria. J Biosci Bioeng 87(2): 123-136, 1999
8. Momma K, Hashimoto W, Miyake O, Yoon HJ, Kawai S, Mishima Y, Mikami B, Murata K: Special cell surface structure, and novel macromolecule transport/depolymerization system of *Sphingomonas* sp A1. J Ind Microbiol Biotechnol 23(4/5): 425-435, 1999

II. 分担研究報告

1. 骨髄系の障害に関連する特定疾患（再生不良性貧血、特発性血小板減少症）の病因ウイルスに関する研究

分担研究者 山西 弘一（大阪大学医学部微生物学講座）
宮川 広実（大阪大学医学部微生物学講座）

研究要旨 初感染の後、体内に潜伏しているヘルペスウイルスは宿主の免疫不全状態により再活性化し骨髄抑制を含む様々な病態をひき起こすことが知られている。又 HHV-6 感染後に ITP を発症した症例も報告されており、ヘルペスウイルスの感染が骨髄系の障害に関連する特定疾患の病因である可能性が考えられる。我々は未知のヘルペスウイルスを含む病因ウイルスの検索を目的とし、ヘルペスウイルスが共通増幅できるシステムを開発、応用した。

A. 研究目的

近年分子生物学的技術を応用することにより、新種のウイルスが発見されてきている。我々は特定疾患患者末梢血から未知のヘルペスウイルスも含めた病原ウイルスを検索することを目的として、既知ヘルペスウイルスの遺伝子配列を元にした consensus primer PCR 法の開発、応用を試みた。

B. 研究方法

1) 既知ヘルペスウイルスのうち β,γ ヘルペスに共通して保存性の高い late spliced gene 領域に、共通増幅可能なプライマーを設計した。共通していない部分の配列については、A/C, C/T, G/T, T/T を許容ペアとし、またウイルス間で mismatches に差がでないよう留意した上で、forward 側、reverse 側、各々 2 種、計 4 種のプライマーを設計した。ヘルペスウイルス感染細胞、ウイルス感染が先行したと疑われる疾患患者の末梢血単核球を proteinase K 処理したものを検体とし、PCR を施行した。PCR は総量 50 μ l、核酸試料 5 μ l とし、2 units / test の Taq DNA polymerase を使用した。この時、各プライマーおよび dNTP 濃度は、それぞれ 0.5 mM および 160 mM で実施した。PCR 産物の解析は増幅産物を 2% アガロースゲルを用いて電気泳動し、えられた band を direct sequencing 法によ

り解析し、既知ウイルスとの遺伝子配列の比較を行った。

2) さらに感度を高めるために、 β,γ ヘルペスウイルスそれぞれに、共通増幅プライマーを同様に設計した。ヘルペスウイルスの存在が明らかな臨床検体、哺乳類サイトメガロウイルスの感染細胞を用いてプライマーを評価した。

(倫理面への配慮)

患者にインフォームドコンセントを得た上で 2ml 末梢血を採取した。

C. 結果

1) ウイルス感染細胞、急性期の既知ヘルペスウイルスの感染が明らかな検体については、共通増幅プライマーを用いて増幅が可能であった。しかし、その他の検体では、増幅産物はヒトゲノムからの非特異的増幅であった。

2) β ヘルペスウイルス増幅プライマーは既知の β ヘルペスウイルス (HHV6, HHV7, HCMV, simian CMV) の増幅が可能であった。 β,γ ヘルペスウイルス共通増幅プライマーに比べ感度、特異性共に高く、非特異的増幅は認められなかった。

D. 考察

PCR 法は、微量の核酸を高感度に特異的に増幅することが可能で、試料中の病原体の

検出、同定に有効な技術である。この PCR 法の感度や特異性がプライマーの配列により規定されており、進化的に保存性の高い遺伝子を標的として選択することで、1 組のプライマーで複数の病原体を同時に検出することが可能となる (consensus primer PCR 法)。今回、我々は特定疾患患者の病原体の hunting のために、この consensus primer PCR 法を採用し、標的遺伝子として late spliced gene 領域を選択した。このシステムを用いることにより、既知のウイルスではあるが病態との関連が未解明であった場合や、未知ウイルスが原因である疾患を幅広くスクリーニングすることが可能になると考えられる。今回特に移植後の骨髄抑制の原因として問題となる β ヘルペスウイルスが高感度に検出されるシステムが開発できた。このシステムを用いて、骨髄系の障害に関連する特定疾患患者末梢血でスクリーニングを進める予定である。

D. 結論

consensus primer PCR 法は原因不明の疾患の病因検索に有用な方法であると考えられる。今回、感度特異性と共に優れたシステムを開発できたので、今後は、このシステムを用いて実検体をスクリーニングする予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- a. Isegawa, Y., Mukai, T., Nakano, K., Kagawa, M., Chen, J., Mori, Y., Sunagawa, T., Kawanishi, K., Sashihara, J., Hata, A., Zou, P., Kosuge, H., and Yamanishi, K. (1999) *J Virol*, 73(10): 8053-8063. Comparison of the Complete DNA Sequences of Human Herpesvirus 6 Variants A and B.
- b. Kositanont, U., Wasi, C., Wanprapar, N., Bowonkiratikachorn, P., Chokephaibulkit, K., Chearskul, S., Chinabuttra, K., Suttthent, R., Poongladka, S., Inagi, R., Kurata, T., and Yamanishi, K. (1999) *J Infect Dis*, 180(1): 50-5. Primary infection of human herpesvirus 6 in children with vertical infection of human immunodeficiency

virus type 1 [In Process Citation].

- c. Tanaka-Taya, K., Kondo, T., Nakagawa, N., Inagi, R., Miyoshi, H., Sunagawa, T., Okada, S., and Yamanishi, K. (2000) *J Med Virol*, 60(3): 284-9. Reactivation of human herpesvirus 6 by infection of human herpesvirus 7.
- d. Zou, P., Isegawa, Y., Nakano, K., Haque, M., Horiguchi, Y., and Yamanishi, K. (1999) *J Virol*, 73(7): 5926-33. Human herpesvirus 6 open reading frame U83 encodes a functional chemokine [In Process Citation].

2. 学会発表

日本ウイルス学会

(第 47 回学術集会・総会)

- ヒトメガロウイルス (HHV-6, HHV-7) の潜伏感染遺伝子産物の機能
近藤 一博、嶋田 和也、山西 弘一
- HHV-6 variant A と B の全塩基配列の比較：特に相違する遺伝子の特徴
伊勢川 裕二、向井 徹、中野 和司、Jinguo Chen、森 康子、砂川 富正、指原 淳志、川西 一信、Ping Zou、小菅 治彦、山西 弘一
- HHV-6(HST) の U79/80 遺伝子にコードされる mRNA およびウイルス蛋白質の構造
谷口 友邦、島本 卓也、伊勢川 裕二、近藤 一博、山西 弘一
- Human Herpesvirus6 の樹状細胞における MRC class I の down regulation
平田 裕子、近藤 一博、山西 弘一

2. 特発性造血障害におけるウイルス感染の関与に関する研究

分担研究者 岩崎 琢也 (国立感染研・感染病理部)
協力研究者 倉田 毅・佐藤 由子・片野 晴隆・安藤 靖恭・
旭 泰子・谷口 貴代美 (国立感染研・感染病理部)

研究要旨 特発性造血障害・特発性血小板減少症の発症・臨床経過に関与するウイルスの存在を明らかにする目的で、臨床検体（骨髄・末梢血）中のウイルスゲノムあるいは抗原の有無を PCR ならびに病理組織学的に解析している。今年度の解析では、EB ウイルスゲノムを検出した例が存在したが、定量感度以下であり、その臨床的意義は不明である。また、HHV8 に対する血清抗体を有した例は認められず、このウイルスの関与は否定的である。

A. 研究目的

骨髄の造血機能の障害に由来する特発性造血障害ならびに特発性血小板減少症の発症ならびにその臨床経過に関与するウイルスの解明を目的としている。このため、臨床検体を対象として既知ならびに新規のウイルスについて検討を行っている。ウイルスに対する造血幹細胞の感受性として、赤芽球系には human parvovirus B19 (B19)が感染することが、臨床検体ならびに培養細胞系にて明らかにされ、さらに、骨髄・巨核球系にはヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ヒトヘルペスウイルス 6(HHV6)が感染しうることが末梢血由来の細胞で示されている。さらに、骨髄組織にはリンパ系細胞も存在するが、これらのリンパ系細胞には HTLV/ATL、HIV、麻疹ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、EB ウイルス、HCMV、HHV6、ヒトヘルペスウイルス 7 (HHV7)、ヒトヘルペスウイルス 8 (HHV8)等が感染することが、さらに、最近、骨髄間質細胞に HCMV が感染することも、培養細胞系の解析により明らかにされている。

今年度は既知のウイルスの関与について主として解析した。

B. 研究方法

臨床検体の収集：特発性造血障害の厚生省研究班（主任：昭和大学小峰光博教授）に文書をもって、当該疾患の骨髄ならびに血液標本を依頼し、送付をうけた、またその他の施設からの

臨床医・病理医よりも依頼をうけた検体を解析対象とした。現在までに、再生不良性貧血(17例)、pure red cell anemia (6例)、myelodysplastic syndrome (MDS) (46例)、溶血性貧血 (1例)等の特発性骨髄障害ならびに特発性血小板減少性紫斑病 (3例)の症例の骨髄あるいは末梢血を入手した。

核酸の抽出：いただいた骨髄組織あるいは末梢血からは有核あるいは単核細胞を分離し、DNAならびに RNA を抽出した。具体的には DNA はドデシル硫酸ナトリウムと Proteinase K を含む溶液中で細胞を溶解し、フェノールを用いた脱蛋白により精製した。RNA は Guanidium isothiocyanate とフェノールを含む溶液で細胞を溶解し、クロロフォルムにより有機溶媒層を取り除き、エタノール沈殿を経て精製した。

PCR あるいは RT-PCR による解析：HCMV、HHV6、EBV のヘルペス群ウイルスならびに B19 ウイルスのウイルスゲノムを検出する PCR 解析を行っている。さらに、ウイルスゲノムが陽性となった検体については LightCycler (Roche) を用いた real-time PCR を行い、そのゲノムのコピー数の算定も行った。この定量 PCR は PCR 産物が 2 重鎖 DNA であることを利用し、溶液中に 2 重鎖 DNA 結合色素 SybrGreenI を含ませることにより、溶液中の 2 重鎖 DNA の量を経時的に解析し、既知濃度の鋳型の経時的増加と比較し、検体中のウイルスゲノムのコピー数を推定する。

免疫組織化学： B19 ウイルス構造蛋白に対す

る抗体、HCMV の前初期遺伝子蛋白 IE1・IE2 ならびに構造蛋白を認識する抗体、HHV6B の構造蛋白 P101 蛋白を認識する抗体を使用して、提供をうけたホルマリン固定パラフィン包埋切片において、これらの抗原の有無ならびに組織切片上の局在を検討した。

in situ ハイブリダイゼーション：パラフィン切片上で、high あるいは low stringent の条件にて、B19 ウイルスならびに EBV の EBER の有無について検討した。

ウイルス抗体価：片野が開発した4種類の HHV8 蛋白(K8,1,ORF59, ORF65, ORF73)を抗原として使用する ELISA 法を用いて、血清中の抗 HHV8 抗体の測定を行った。

C. 研究結果

1. B19 ウイルス・CMV・HHV6

今年度、解析を行った検体には B19 ウイルス・CMV・HHV6 のゲノムあるいは抗原が骨髓・末梢血から抽出した核酸検体の PCR による解析、パラフィン切片における *in situ* hybridization による解析により検出された例は認められなかった。

B19 ウイルス感染例は昨年度(倉田)が報告した7例がこの解析で発見されているが、このうち、follow up している免疫能正常で B19 ウイルス感染が関与した例(14才、男児)はその後も造血能の低下を認めている。

2. EBV

2例の再生不良性貧血ならびに1例の MDS の骨髓組織より抽出した核酸検体に EBV のウイルスゲノムを PCR により確認した。この存在を確定するため、さらに EBV の違う領域をターゲットとした PCR を行ったが、同様に増幅産物が確認された。この EBV のゲノムのコピー数を算定するため real time PCR を行ったが、そのコピー数は定量感度(10^3 コピー数/ μ l)以下であった。同時に行った β -globin による細胞数の定量では検体 2 μ l 中の宿主細胞数は 10^4 個前後であった。なお、その検量線の相関係数の error は EBV が 2.8×10^{-3} で、 β -globin が 1.7×10^{-3} であった。

3. HHV8

現在までに検索した範囲では大腸菌で作製した4種類の HHV8 抗原を利用した ELISA 解析において、抗 HHV8 抗体(IgG)の上昇が認められた症例はこれらの造血疾患では認められていない。なお、この ELISA の解析により Kaposi 肉腫の患者ならびに multiple Castleman 病の患者血清

中に有意の抗体価の上昇が確認されている。

4. 未知のウイルス

新規のウイルスはいまだに検出できていない。

D. 考察

特発性造血障害の原因は多岐に及ぶと考えられ、このなかにはウイルス感染が関与している可能性があるかと仮定し、本研究を行っている。冒頭に記したように骨髓のウイルス感染に関する知見は乏しく、また、急性感染時期と血液症状の発症の時期には時差が想定されるため、見落とされている可能性が多い。

今年度解析した症例ではこれらの疾患と検出されたウイルスにはっきりした関連性を認めることはできていない。EBV のウイルスゲノムは現在までに解析した症例で再生不良性貧血の骨髓組織において2例、MDS の症例において1例検出した。EBV は主として B 細胞に感染するが、最近上皮細胞、T 細胞、NK 細胞に感染していることが血液学的、病理学的に明らかにされ、それぞれの細胞系の感染でことなる臨床像を呈することが判明している。今回の解析では骨髓のどの細胞に EBV が感染していたかを確定できていないが、今後、この点について明らかにする必要がある。しかし、EBV のウイルスゲノムの存在は確認し得たが、そのコピー数は定量感度以下であり、silent passenger の可能性もあり、この点も今後検討する予定である。急性期の EBV 感染では virus-associated hemophagocytic syndrome (VAHS) の臨床症状を呈し、骨髓でも貪食像を検出することによりある程度診断可能のはずではあるが、この時期を過ぎた症例の骨髓像ならびに臨床像はそれほど多くは解析されていないため、VAHS の予後を含めてさらに検討したい。

HHV8 に対する血清抗体を有した例は認められず、このウイルスの関与は否定的である。HHV8 は最近発見されたウイルスであり、リンパ好性・血管内皮好性であるが、現在まで検索した症例では抗体陽性例は認められていない。

E. 結論

昨年度までの倉田の結果を含め、現時点での特発性造血障害のウイルス感染の関与に

ついでに総括として、基礎疾患のない再生不良性貧血あるいは特発性血小板減少性紫斑病の原因として B19 ウイルス以外に、EB ウィルスも考慮する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yoshikawa T, Suzuki K, Ihira M, Furukawa H, Suga S, Iwasaki T, Kurata T, Asonuma K, Tanaka K, Asano Y: Human herpesvirus 6 latently infects mononuclear cells but not liver tissue. J Clin Pathol 52: 65-67, 1999

Osaki M, Matsubara K, Iwasaki T, Kurata T, Nigami H, Harigaya H, Baba K: Severe aplastic anemia associated with human parvovirus B19 infection in a patient without underlying disease. Ann Hematol 78: 83-86, 1999

Sato Y, Asahi Y, Iwasaki T, Matsukura T, Kurata T, Sata T: Detection of adeno-associated virus type 2 in patients with viral infection. Jpn J Infect Dis 52: 50-51, 1999

G. 知的所有権の取得状況

なし

3. パーキンソン病とボルナ病ウイルス感染に関する研究

分担研究者 生田 和良 (大阪大学微生物病研究所)

研究要旨 パーキンソン病とボルナ病ウイルス (BDV) 感染の関連性について検討を行った。9 名のパーキンソン病患者の剖検脳由来黒質および前頭葉領域を対象とした検索で、6 名で BDV の RNA が検出された。さらに、患者黒質乳剤をスナネズミに接種したところ BDV の伝播が確認された。また、BDV 感染スナネズミならびに BDV p24 遺伝子トランスジェニックマウスを用いた解析により、黒質を含む中脳ならびに脳幹付近における BDV p24 遺伝子の発現が BDV による神経症状発症と関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究の目的はパーキンソン病とボルナ病ウイルス (BDV) 感染の関連性について検討を行うことにある。BDV に感染したウマは、中枢神経系の異常に起因する運動失調を呈することが知られている。また、BDV を実験感染させたラットでは後肢麻痺などの運動系機能障害が認められ、脳内におけるドーパミン産生の低下、ならびにドーパミンレセプターの発現異常なども報告されている。最近の研究において、ヒトにおける BDV 感染が明らかとなり、その脳内で BDV の持続感染が存在することも証明された。私達はこれまでにパーキンソン病患者剖検脳における高率な BDV 遺伝子の検出を報告してきた。今回、これらパーキンソン病患者における BDV 感染の疫学的検索に加え、BDV の病態発現機序の解明、ならびにパーキンソン病の病因解析モデル動物の確立に向けた BDV 感染スナネズミおよび BDV p24 遺伝子トランスジェニック (Tg) マウスについて検討を行った。

B. 研究方法

1. パーキンソン病患者剖検脳：パーキンソン病患者 9 名の剖検脳由来黒質および前頭葉領域を対象とし、BDV RNA の検出ならびに、その黒質領域の乳剤を新生仔スナネズミに脳内接種し BDV の伝播、ならびにその増殖能について検討を行った。BDV RNA の検出は RT-PCR 法を用いて解析した。また、*in situ* hybridization 法による切片上での BDV 感染の検索も行った。
2. スナネズミへの BDV 感染実験：0.2 から

200 Focus Forming Unit (FFU) の各力価のウイルス量を含む細胞破碎液 (C6BV) を生後 24 時間以内の新生仔スナネズミに脳内接種を行った。コントロールとして非感染の C6 細胞破碎液の接種を行った。スナネズミは接種後、体重の増加、抗 BDV 抗体の上昇、神経症状の発症などが観察された。また、スナネズミは接種後それぞれ 20 日、25 日および 30 日目に解剖され脳組織を含む臓器の採材が行われた。脳組織は固定後、パラフィン切片にし、各部位の病理学的所見、ウイルス遺伝子 (p40 および p24 遺伝子) の発現を、それぞれ HE 染色ならびに *in situ* hybridization を用いて解析を行った。

3. p24 Tg マウスの作成：セロトニン受容体遺伝子、オーエスキー病ウイルス前初期遺伝子、もしくは GFAP 遺伝子由来のプロモーターを用いて BDV p24 遺伝子発現 Tg マウスの作成を行った。確立した Tg マウスについてはその脳内における p24 遺伝子産物の発現ならびにその表現系について解析を行った。

C. 研究結果

1. パーキンソン病患者剖検脳
患者黒質において 9 例中 3 例 (33%) で p40 RNA が、9 例中 4 例 (44%) で p24 RNA が陽性であった。また、前頭葉における検索では、p24 RNA、p40 RNA とともに 9 例中 2 例 (22%) で陽性であった。黒質における p40 および p24 RNA の検出の不均衡は、PCR の検出感度の差とウイルスの感染状態による mRNA 発現量の差によって起こるの