
厚生科学研究費補助金
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

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 倉田 毅

平成13(2001)年3月

特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究班（平成12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. 総括研究報告書（平成 12 年度）

- 特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究…………… 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……………5
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…………… 7
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…………… 12
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…………… 16
高橋 和郎（福島県立医科大学医学部微生物学講座）
5. 神経変性疾患におけるウイルス感染の検索…………… 19
田代 真人（国立感染症研究所ウイルス製剤部）
6. 本州と欧州における *Campylobacter jejuni* 腸炎後 Guillain-Barré 症候群の比較…………… 24
結城 伸泰（独協医科大学神経内科）
7. ギラン・バレー症候群と *Haemophilus influenzae* 感染 - 症例対照試験 -…………… 29
結城 伸泰（独協医科大学神経内科）
8. ギラン・バレー症候群の病因因子の解明とその制御に関する研究…………… 33
高 昌星（信州大学医学部第 3 内科）
9. 諸外国サルコイドーシス患者からの生検リンパ節における細菌 DNA の検出と定量解析…………… 36
江石 義信（東京医科歯科大学医学部附属病院病理部）
10. 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）
11. 微生物の感染と IgA 腎症発症の関連に関する研究…………… 42
荒川 宜親（国立感染症研究所細菌・血液製剤部）
12. びまん性肺疾患または呼吸不全における細菌感染…………… 47
永武 毅（長崎大学熱帯医学研究所）
13. 慢性肺気腫あるいは呼吸不全におけるウイルス感染…………… 50
山谷 睦雄（東北大学医学部附属病院老人科）
14. 慢性肺疾患における細菌の関与とその治療法の開発…………… 53
村田 幸作（京都大学食糧科学研究所）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 56

1. 総括研究報告書

特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究

主任研究者 倉田 毅 国立感染症研究所副所長

研究要旨 厚生省で特定疾患（いわゆる難病）として定義されている疾患の大部分は原因が不明である。治療面においても対症療法的であり、原因に対する療法ができないでいる。特定疾患の原因として、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、微生物の潜伏・持続感染とその再活性化、あるいはまだ認知されていない病原体等が関与してい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携し、患者の髄液、血液、血清、体液、生・剖検検体を用いて①発症時のできるだけ早い時期のあるいは再発等の病巣検体等を用いて関与病原体の分離を試みる②疾患に関与しているかもしれない微生物との関連を抗体とその動態から検索する③遺伝子レベルで検索する④ウイルス、細菌等微生物の蛋白の認識と自己免疫機構との関連を明らかにする⑤微生物による免疫担当細胞の破壊の機序とその結果としての疾患の惹起について検討する⑥疾患の発生、増悪の機序と潜伏・持続感染微生物の再活性化との関連を明らかにする⑦分子生物学的技術により特定の科のウイルス群に存在する遺伝子配列を検出する系を確立し応用する。対象課題は①神経変性疾患（パーキンソン病等）とウイルスの関与②サルコイドーシスの病因と発症機序の解明③特に *P. acnes* の関与について④特発性造血器障害におけるウイルスの関与④ギランバレー症候群の病因・発症機序の解明⑤慢性肺気腫・呼吸不全における微生物感染とその難治化要因を明らかにする⑥IgA 腎症発症機序を解明する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附属病院助教授）
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）

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

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. サイトカイン産生等の関連を経時的に測定する。
4. 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。

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 BDV P 遺伝子トランスジェニックマウスが BDV 感染類似の症状を呈したことをもとにパーキンソン病の主因である。黒質内ドーパミンニューロンへの影響をみる（生田）。脳症児から分離されたインフルエンザウイルスを用い、宿主免疫系の関与について検討する（田代）。前年度得られたコロニーよりプラスミドを精製し、挿入遺伝子の塩基配列を決め、疾患（MS）との関連遺伝子を検索する（高橋）。

2) びまん性肺疾患、特にサルコイドーシス（サ症）の病因と発症機序について；

P. acnes の recombinant 蛋白を用い皮内反応を試みる。（実施については大学倫理委員会の承認得る。）また新鮮凍結リンパ節組織で P. acnes 菌体成分を検出する。それとともにサ症病変内の P. acnes 関連抗原検出と局在検索を徹底する。その他定量系 PCR 法による P. acnes および P. granulatum 検出結果につき追試を行なう（江石）。またサ症患者における P. acnes の細菌学的検討と消化管における生態学について検討する（渡辺）。

3) 特発性造血器障害におけるウイルスの関与；

開発した CMV、HHV6、HHV7 の DNA 共通増幅可能システムを用い退症疾患の病因検索を行なう（山西）。また発症直後の対象疾

患の骨髓と末梢血を用いウイルスゲノムの検出を試みる（岩崎）。

4) ギラン・バレー症候群（GBS）の病因・発症機序の解明

患者から分離された C. jejuni から GM1 ガングリオシド様構造を有するリポ多糖を感染する（結城）。また C. jejuni の T 細胞性及び B 細胞エピトープを決定する（高）。

5) 慢性肺気腫、呼吸不全と微生物感染症；

代表的起炎菌であるインフルエンザ菌に関して、上皮細胞の付着因子として解明した GD2 に対して去痰薬の上皮細胞付着防止作用があるか否かの解明を行なう（永武）。また対象疾患の急性憎悪におけるライノウイルス RNA 検出を行なうとともに感染後の呼吸不全における IL-6、可溶性 ICAM-1、ECP 等の炎症性血中因子との関連を明らかにする（山谷）。さらに細菌感染の治療法の開発を目指して細菌アルギン酸リアーゼの 1 次元及び 3 次元での構造的分子改変を試みる（村田）。

6) IgA 腎症の発症機序の解明；

IgA 腎症患者の扁桃、咽頭から常在細菌（Mycoplasma 属等）の分離と解析を行う（荒川）。

倫理面への配慮

人体検体を用いる場合は、主治医が患者の同意を機関毎に得ている。動物実験も機関毎に委員会の承認のもとに実施されている。

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；

パーキンソン病とボルナ病ウイルス（BDV）感染の関連性について、これまでのヒトの脳 9 例に新しい 4 例を加え検索し、新たな 2 例に BDV RNA が検出された。BDV p24 タンパク質は神経突起伸長因子である Amphoterin と結合し、神経系細胞の神経突起伸長を特異的に抑制していることが明らかとなった。また BDV p24 遺伝子トランスジェニックマウスでの解析で神経網における p24 タンパク質の蓄積が BDV の中枢神経病原性と関連していることが示唆された（生田）。インフルエンザウイルス（臨床分離株）をハムスターに経鼻感染させサイトカインを投与する系でパーキンソン病を示唆する症状は認められなかった。また筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病患者血清でコクサ

ツキ-1B4 及びエコー-7 型等に対する有意な抗体上昇は認められず、また PCR でも意味のある成績は得られなかった (田代)。

多発性硬化症に、HHV-6 あるいは *C. pneumoniae* が関与するという既報の研究結果を髄液を用い PCR 法、ELISA 法等により検索したが有意な結果は得られなかった (高橋)。

2) GBS の病因・発症機序の解明:

GBS 発症の先行感染病原体として急性腸炎の起炎菌 (*Campylobacter jejuni*) が最も高頻度を占めている (約 30%位)。しかし残りの 6~70%の GBS の症例では呼吸器感染症の先行が知られてはいるが因果関係は不明である。今回は GBS52 例と同数の対照例を用い、血清中の抗 *H. influenzae* 抗体 (IgG, IgM, IgA) を測定したが有意差は証明できなかった (結城)。

一方本邦とオランダの GBS 患者より治療前の急性期血清を採取し (全患者は診断基準—Ashury と Comblata による—を満たしていた) 検討した結果、2 国のいずれの GBS 群も他の神経疾患や対照健常者に比べ抗 *C. jejuni* 抗体陽性頻度が高かった。また本邦の GBS 群と健常者対照群の間では有意差を認めた ($p=0.0001$) (結城)。

GBS は先行感染の 1~2 週後に免疫学的機序により発症する炎症性末梢神経炎である。GBS における感染因子の役割を細胞内ストレスの観点から検討した結果、GBS 患者ではミトコンドリア DNA 上の NADH 第 2 サブユニット遺伝子 5178 塩基は Mt5178A が 33%、Mt5178C が 6.7%と健康集団 (45%) に比して高かった。GBS 患者では Mt5178C を有する者が多く、Mt5178C を有する者は GBS に対し疾患感受性が高いことが示唆された。この Mt5178C は酸化ストレスに関与するものであり GBS の疾患感受性に酸化ストレスが関与していることが示唆された (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—:

サ症の原因病原体は不明であるが日本では *Propionibacterium* (*P. acnes*) がリンパ節病基から分離され、定量的 PCR 法により全てのサ症リンパ節組織から多量の *P. acnes* あるいは *P. granulosum* DNA が検出された。今回東京、熊本、ドイツ、イギリス、イタリアの 4ヶ国 5 施設のサ症患者から生検リンパ節を収集し定量的 PCR 法により組織内細菌ゲノム数を解析したところ、5 施設の計 108 例中 106 例 (98%) の検体で *P. acnes* あるいは

P. granulosum が高濃度に検出された。*P. acnes* とサ症を関連づけるきわめて重要な意義ある成績といえる (江石)。

選択培地に添加する薬剤の一部と、基礎培地の変更を行い薬剤配合を検討し腸管常在菌 11 種 40 株を試験し、20~60 代の健常人 70 人の糞便中の *Propionibacterium* spp を検索したところ良好な選択性がみられた。また成人の約 40%の腸管内には少ない菌量の *Propionibacterium* が存在することが示された (渡辺)。

4) 特発性造血器障害におけるウイルスの関与:

特発性造血器障害の発症機序については不明な点が多い。発症初期でのウイルス感染の関与を明らかにするためヒトヘルペスウイルス (HHV) を同時に検出可能な PCR 系を開発し骨髄系の障害に関連する特定疾患 (特発性血小板減少性、再生不良性貧血) の患者検体に応用し、認知呼び未知の HHV がその発症原因である可能性を検討した。その結果共通増幅プライマーにより ITP 患者 8 例の 23 検体中骨髄で HHV6 が 3 検体、末梢血単球で HHV6 が 10 検体、HCMV が 1 検体、血漿で HHV6 が 1 検体で検出された (山西)。また特発性造血障害、特発性血小板減少症の発症例で、37 例中 7 例でヒトバルボウイルス B19 のウイルスゲノムが検出された (溶血性貧血 4 例、再生不良性貧血 2 例、PRCA の 1 例)。TTV も 4 疾患 12 例に検出されたが、病原性意味付けには今後の検討を要する (岩崎)。

5) 慢性肺気腫・呼吸不全と微生物感染:

細菌感染: びまん性肺疾患あるいは呼吸不全の原因となる慢性疾患の中で難治化要因として病原性細菌や非病原性常在菌の関与を調べた。特に病原性発現と発症メカニズムの重要々因とする咽頭上皮細胞への細菌付着の際の宿主側レセプターについて検討し、プランハマラでは GM₂ に加えて他の糖鎖の関与が示唆され、またインフルエンザ菌については GD₂ が付着に関与する糖鎖であることを明らかにした (永武)。

ウイルス感染: 慢性肺気腫患者 40 名、気管支喘息 120 名を対象とし気道感染症状の急性憎悪期に咽頭ぬぐい液を用いて細胞培養、PCR 法等でインフルエンザ、ライノウイルス RNA の存在を調べた。慢性肺気腫と気管支喘息で夫々 2 例と 9 例で A 型インフルエンザウイルス、夫々 2 例と 7 例でライノウイルス RNA が検出された。気管支喘息の急性憎悪時には 30 例で尿中 LTEA と血中ヒスタミン濃度の上昇がみられた (山谷)。

バイオフィーム依存性細菌感染症の治療として細菌酵素（アルギン酸リアーゼ）を応用する方法を開発する中でバイオフィーム除去の有効性は in vitro と in vivo で確認できたが、この酵素の抗原性に若干問題がありその部位の特定と除去方法を検討した。問題の抗原性を有する部分のアミノ酸を他のものに置換し変異酵素で動物実験を行い確認している（村田）。

6) IgA 腎症の発症機序の解明：

IgA 腎症の発症機構として Mycoplasma が扁桃等への感染後血流へ移行し末梢血リンパ球を活性化しリンパ球障害を惹起することに着目し、①患者扁桃からの分離、②カニクイザルへの感染実験を試みた。患者扁桃スワブからは 49 検体中 42% で分離された。カニクイザルではリンパ球の活性化、PBMC のアポトーシス亢進がみられた。この所見は IgA 腎症患者で解析した結果に共通点が見られる。今後この機序についてさらに詳細に検討する必要がある（荒川）。

E. 結論

サ症における P. acnes の関与、パーキンソン病におけるボルナ病ウイルスの関与、特発性造血器疾患における B19、ヒトヘルペス群ウイルス等の関与が濃厚に疑われあるいは示唆されている。GBS の起因に C. jejuni が関与していることに加え、その発症機序には酸化ストレスの関与も示唆される成績が得られた。またバイオフィーム除去への酵素の応用等新しい試みが実用化寸前にまで発展してきた。今後さらに病因論、発症機序論につき他臨床研究班と共同して多数の臨床例を用いて多角的に迫る必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

別紙参照

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む。）

1. 特許取得

- (1) 特願平 8-307250『PEG 修飾アルギン酸リアーゼ及びその用途』（出願人：田辺製薬株式会社 グンゼ株式会社）
- (2) 特願平 5-113149『アルギン酸リアーゼ発現遺伝子及びアルギン酸リアーゼの製造法』（出願人：大塚化学株式会社 グンゼ株式会社）
- (3) PCT/JP93/00227『嚢胞性線維症の治療薬』出願国：米国、出願人：全発明者、特許登録 1996/12/10 出願国：西欧、出願人：大塚化学株式会社 グンゼ株式会社 坂口健二）特許登録済み
- (4) 特願平 4-348465『アルギン酸リアーゼ』（出願人：大塚化学株式会社 グンゼ株式会社）；審査請求 1999/01/28
- (5) 特願平 3-164899『細菌によるアルギン酸分解法』（出願人：大塚化学株式会社 グンゼ株式会社）

II. 分担研究報告

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

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 大阪大学大学院医学系研究科微生物学講座教授

研究要旨 ヒトヘルペスウイルス（HHV）を同時に検出可能な PCR 系を開発し、骨髄系の障害に関連する特定疾患（特発性血小板減少症、再生不良性貧血）の患者検体に応用し既知及び未知の HHV がその発症原因である可能性について検討した。

A. 研究目的

HHV は初感染後体内に潜伏感染し、宿主の免疫力の低下に伴い様々な疾患の原因になることが知られている。これらの HHV を同時に検出可能な PCR 系を開発し、骨髄系の障害に関連する特定疾患（特発性血小板減少症、再生不良性貧血）の患者検体に応用し既知及び未知の HHV がその発症原因である可能性について検討することを目的とした。

B. 研究方法

- 1) β ヘルペスウイルス標準株として、U1102(HHV-6A), HST(HHV-6B), 7-KHR(HHV-7), Towne(CMV) 感染細胞を proteinase K 処理して得た DNA を 100ng、臨床検体は患者末梢血または骨髄血より単核球を分離して proteinase K 処理を行い、 10^5 個細胞から得られた DNA をテンプレートとして用いた。血漿は 20 μ l から抽出した DNA をテンプレートとして用いた。
- 2) 共通増幅プライマーは、 β ヘルペスウイルスに保存性の高い late spliced gene 領域に forward 側 2 種、reverse 側 2 種の 2 組を設定し、nested PCR 法を施行した。得られた増幅産物は direct sequencing 法を用いて塩基配列を調べた。

倫理面への配慮

患者からの検体の採取（末梢血 2ml、骨髄血 1 ml）はインフォームドコンセントをとった上で行った。検体から抽出した DNA はウイルスの

検出以外の目的には使用せず、患者に不利益を生じることはないと判断した。

C. 研究結果

共通増幅プライマーは感染細胞、臨床検体において既知の β ヘルペスウイルスを特異的に共通増幅することが可能であった。ITP 患者 18 症例 23 検体（骨髄 5 検体、血漿 2 検体、末梢血単核球 16 検体）でのヘルペスウイルスのスクリーニング結果は、骨髄から HHV-6 が 3 検体（60%）、末梢血単核球から HHV-6 が 10 検体（62.5%）、HCMV が（6.3%）、血漿から HHV6 が 1 検体（50%）検出された。

D. 考察

ヘルペスウイルスの中でも β ヘルペスウイルスに属する HHV-6、HCMV は再活性化時に骨髄抑制を認める症例や、初感染時に血小板減少症を発症する症例が報告されている。今回の我々のスクリーニングの結果、これらのウイルスが ITP 患者の末梢血、骨髄から高率に検出された。しかしヘルペスウイルスは単に潜伏感染しているウイルス DNA を検出している可能性があるため、発症の原因であるかについては現在検討中である。

E. 結論

我々の開発した HHV 共通増幅システムは患者

検体からのウイルスの検出が簡便に行なえた。
ITP 患者検体から、高率に HHV-6 が検出され
たがその意義については現在検討中である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H. Kosuge, K. Tanaka-Taya, H. Miyoshi, K. Amo, R. Harada, T. Ebihara, Y. Kawahara, K. Yamanishi and T. Nishikawa: Epidemiological study of human herpesvirus-6 and human herpesvirus-7 in pityriasis rosea. British

Journal of Dermatology 143. 795-798, 2000

- 2) K. Tanaka-Taya, T. Kondo, N. Nakagawa, R. Inagi, H. Miyoshi, T. Sunagawa, S. Okada and K. Yamanishi: Reactivation of human herpesvirus 6 by infection of human herpesvirus 7. Journal of Medical Virology 60, 284-289, 2000
- 3) Consensus primer PCR 法を用いたヒトヘルペスウイルスの共通増幅とその臨床応用の検討 宮川広実 大阪大学医学雑誌 52:203-210,2000

H. 知的財産権の出願、登録状況（予定を含む）

特記すべきことなし

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 国立感染症研究所感染病理部室長
協力研究者 片野 晴隆・谷口 貴代美・佐多 徹太郎・倉田 毅
(国立感染症研究所感染病理部)

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・抗原の有無についてを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、ヒトパルボウイルス B19 ならびに TTV について検討し、その陽性例はさらにウイルスゲノムのコピー数の測定も行った。現在までに検討した 37 例中 B19 のウイルスゲノム陽性例は 7 例、TTV のゲノム陽性例は 12 例認められた。B19 が検出された例は溶血性貧血(HA)に aplastic crisis を併発した 4 例と、再生不良性貧血(AA)の 2 例、pure red cell aplasia (PRCA)の 1 例であった。これらのうち、定量感度以上の B19 ウイルスゲノムが検出されたのは aplastic crisis の例のみであった。一方、TTV は AA 4 例、PRCA 2 例、HA 1 例、MDS 5 例に検出され、定量感度以上の例は 2 例であり、そのうち 1 例の AA では 1 細胞あたり約 10^2 コピー数検出された。今後、TTV の多様性について検討する必要がある。なお、HIV 8 に対する血清抗体を有した例は依然認められておらず、このウイルスの関与は否定的である。

A. 研究目的

特発性造血障害ならびに特発性血小板減少症の多くは骨髄の障害に由来し、本研究ではそ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。具体的には、臨床検体を対象とし、特発性造血障害班に文書にて提案を行い、これらの疾患の罹患者の骨髄・末梢血について、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)が感染す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、HIV 6、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。今年度は主として B19 ウイルスと TTV 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 (4 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。うち、今年度の解析は血液ならびに骨髄の生検体 (パラフィン包埋組織を含まない) をいただいた例について検討した。

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 解析を行った。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。

抗 HHV8 ウイルス抗体価： 4 種類の HHV8 蛋白 (K8, 1, ORF59, ORF65, ORF73) を抗原として使用する ELISA 法 (Katano et al. 2000) 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

末梢血ならびに骨髄の検体より抽出した核酸検体において B19 ウイルスのウイルスゲノムの有無について PCR を用いて検索した。この結果、再生不良性貧血 (AA) の 2 例、pure red cell aplasia (PRCA) の 1 例、溶血性貧血 (HA) に aplastic crisis (AC) を併発した 4 例にウイルスゲノムを検出することが出来た (表)。このうち、定量感度 (10^3 コピー数) 以上のウイルスゲノムが検出され

たのは HA with AC のみで、AA 例では検出感度以下であった。

2. TTV

4 例の AA ならびに 2 例の PRCA, 5 例の MDS の末梢血・骨髄組織より抽出した核酸検体に TTV のウイルスゲノムを T801/T935 のプライマーを使用し、検出した。このうち、5 例において増幅産物の塩基配列を pGEM-T に分子クローニングし、解析したところ、それぞれの塩基配列は異なり、一方、同一検体では 1 例を除き一様であった。のこりの 1 例では多様性が認められた。

さらに、LightCycler を用いた定量を行ったところ、検出されたウイルスゲノムは大部分の例では定量感度以下であったが、1 例において 1 細胞あたり 100 コピーと非常に高く、今後、そのウイルスゲノムを分子クローニングする予定である。

3. EBV & HHV6

今年度の解析では新たな陽性例は認められなかった。

4. HHV8

本研究においては最近、感染による骨髄抑制例が報告されているヒトヘルペスウイルス 8 human herpesvirus 8 (HHV8) についての血清疫学的解析を行っている。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認められていない。なお、この解析により 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。

5. 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

現在までに供与された特発性造血障害の罹患者の臨床検体 38 例において、B19 ウイルスが 7 例、TTV が 13 例、EB が 2 例、HHV6 が 1 例陽性となっている。このうち、B19 ウイルス

以外は宿主体内で持続性あるいは潜伏感染することが知られており、ゲノムのみが陽性である場合、その病的意義は不明である。

B19 ウイルスは骨髄造血細胞を標的とし、障害をもたらすことが明らかとされているウイルスであり、臨床的に HA の経過観察中に aplastic crisis と診断される場合に関与していることは明らかであるが、原因不明の貧血症状を呈してきた場合、その診断は疫学的背景あるいは骨髄標本中の特徴のある細胞 so-called giant proerythroblast を検出出来ない場合、困難であると考えられる。PRCA 並びに AA の症例に B19 ウイルスゲノムを検出している例があるが、B19 ウイルスが造血機能障害をもたらしたことは確実であるが、PRCA 並びに AA の発症の原因となっているかどうかについては不明である。

TTV は肝炎患者の血清中に発見されたウイルスであるが、非常に多様性に富み、かつ 60% 以上の成人がなんらかの型の TTV を有していることが明らかにされている。従って、骨髄あるいは末梢血に偶発的に検出されてもその疾病の成因と判断することは現時点では非常に危険であり、ここの遺伝子型を明らかにし、その転写産物を解析することにより疾病との関連性が明らかに出来るを考える。

E 結論

特発性造血障害の診断時には臨床的に aplastic crisis がはっきりしなくても B19 ウイルスの検索が必要である。

TTV は高頻度に検出されるが、その臨床的意義を明らかにするためには、検出された TTV の遺伝子型、転写産物等の解析が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G 研究発表

1. 論文発表

1. Kashiwase M, Sata T, Yamauchi Y, Minoda H, Usui N, Iwasaki T, Kurata T, Usui M: Progressive outer retinal necrosis caused by herpes simplex

virus type 1 in a patient with acquired immunodeficiency syndrome.

Ophthalmology 107: 790-794, 2000

2. Matsuo K, Iwasaki T, Asanuma H, Yoshikawa T, Chen Z, Tsujimoto H, Kurata T, Tamura S: Cytokine mRNAs in the nasal-associated lymphoid tissue during influenza virus infection and nasal vaccination. Vaccine 18: 1344-1350, 2000
3. Iwasaki T, Nagata N, Hatano I, Harashima A, Horiuchi A, Konishi K, Koike S, Nomoto A, Kurata T: Transgenic mice bearing human poliovirus receptor for quality control. Pharmeuropa, Special Issue: 59-68, 2000
4. Hasegawa H, Kadowaki S, Takahashi H, Iwasaki T, Tamura S, Kurata T: Protection against influenza virus infection by nasal vaccination in advance of sublethal irradiation. Vaccine 18: 2560-2565, 2000
5. Matuso K, Yoshikawa T, Asanuma H, Iwasaki T, Hagiwara Y, Chen Z, Kadowaki S, Tsujimoto H, Kurata T, Tamura S: Induction of innate immunity by nasal influenza vaccine administered in combination with an adjuvant (cholera toxin). Vaccine 18: 2713-2722, 2000
6. Katano H, Iwasaki T, Baba N, Terai M, Mori S, Iwamoto A, Kurata T, Sata T: Identification of antigenic proteins encoded by human herpesvirus 8 and seroprevalence in the general population and among patients with and without Kaposi's sarcoma. J Virol 74: 3478-3485, 2000
7. Nishimura H, Itamura S, Iwasaki T, Kurata T, Tashiro M: Characterization of human influenza A (H5N1) virus infection in mice: neuro-, pneumo- and adipotropic infection. J Gen Virol 81:2503-2510, 2000
8. Iwasaki T, Muraki R, Kasahara T, Sato Y, Sata T, Kurata T: Pathway of viral spread in herpes zoster: distribution of the protein encoded by the open

- reading frame 63 of varicella-zoster virus in biopsy specimens. Arch Virol 17: suppl, in press
9. Ando Y, Iwasaki T, Terao K, Nishimura H, Tamura S: Conjunctivitis following accidental exposure to influenza B virus/Shangdong/07/97. J Infect in press.
10. Hagiwara Y, Iwasaki T, Asanuma H, Sato Y, Sata T, Aizawa C, Kurata T, Tamura S: Effects of intranasal administration of cholera toxin (or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin) B subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin on the brain. Vaccine in press.
11. Hagiwara Y, Tsuji T, Iwasaki T, Kadowaki S, Asanuma H, Chen Z, Komase K, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T, Tamura S: Effectiveness and safety of mutant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT H44A) as an adjuvant for nasal influenza vaccine. Vaccine in press
12. Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Harashima A, Hatano I, Suzuki Y, Yoshii K, Yoshii T, Nomoto A, Kurata T: Comparison of neuropathogenicity of poliovirus type 3 in transgenic mice bearing the poliovirus receptor gene and cynomolgus monkeys. Vaccine in press

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

表1. 末梢血・骨髓より抽出した核酸検体についてのウイルスゲノム検出

	臨床診断	検体	none	B19	TTV	EB	HHV6
38			18	7	13	2	4
1	AA	BM	none				
2	AA	BM	none				
3	AA	BM	none				
4	AA	BM	none				
5	AA	PB	none				
6	AA	BM	none				
7	AA	BM	none				
8	AA		none				
9	AA	PB		B19			
10	AA	BM		B19	TTV		
11	AA	BM			TTV		
12	AA	PB/BM			TTV		
13	AA	BM			TTV	EB	
14	AA	PB				EB	
15	AA	BM					HHV6
1	PRCA	BM	none				
2	PRCA	BM	none				
3	PRCA	BM	none				
4	PRCA	BM		B19			
5	PRCA	BM			TTV		
6	PRCA	BM			TTV		
1	HA	BM		B19			
2	HA	BM		B19			
3	HA	PB		B19			
4	HA	PB		B19	TTV		
1	MDS	PB	none				
2	MDS	PB	none				
3	MDS	PB	none				
4	MDS	PB	none				
5	MDS	PB/BM	none				
6	MDS		none				
7	MDS	PB	none				
8	MDS	PB			TTV		
9	MDS	PB			TTV		
10	MDS	PB/BM			TTV		
11	MDS	PB			TTV	EB	
12	MDS	BM			TTV	EB	

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教授

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。これまでに報告した 9 例の患者に加え、今回新たに 4 名の剖検脳（ブラインド患者サンプル）を用いた検索で、2 名で BDV RNA が検出された。また、BDV p24 タンパク質に相互作用する宿主因子を探索した結果、p24 タンパク質は神経突起伸張因子である Amphoterin と結合し、神経系細胞の神経突起伸張を特異的に抑制していることが明らかとなった。さらに、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、神経網における p24 タンパク質の蓄積が BDV の中枢神経病原性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）感染との関連性について検討を行うことにある。これまでに BDV 実験感染動物では、脳内のドーパミン産生量の低下、ドーパミンレセプターの発現異常などが報告されている。これらの知見から、BDV が引き起こす神経症状はパーキンソン病患者で認められる神経変性疾患に類似した神経変性異常が認められる可能性がある。最近の研究において、ヒト脳内に BDV が持続感染していることが明らかにされたこと、パーキンソン病患者剖検脳における高率な BDV 遺伝子の検出が認められたことから、パーキンソン病と BDV との関連性が強く疑われる。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 BDV p24 タンパク質に相互作用する宿主因子の同定とその意義について解析を行った。さら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 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：これまでに報告した 9 名の患者に加えて、新たに 4 名の剖検脳を対象とし、BDV RNA の検出ならびに、*in situ* hybridization 法による切片

上での BDV 感染の検索を行った。

2. p24 タンパク質に相互作用する宿主因子の解析：大腸菌発現 GST-p24 タンパク質をプローブとし、様々な培養細胞株のライセートを抗原とした Far-Western Blot 法により、相互作用するタンパク質の探索を行った。相互作用が認められたタンパク質は精製し、ペプチドシーケンスにより N 末端のアミノ酸配列を同定した。また、*in vivo* での同定したタンパク質と p24 タンパク質との特異的結合は mammalian Two-hybrid system により検討した。
3. Amphoterin と p24 タンパク質の相互作用：p24 タンパク質および相互作用が認められた神経成長因子 Amphoterin との結合意義について解析を行った。laminin をコートしたプレート上での BDV 感染の神経突起伸張能および細胞遊走能について検討した。また、BDV 感染細胞における Amphoterin および RAGE（Amphoterin のレセプター）の発現について蛍光抗体法、Western blot 法および Northern blot 法を用いて解析を行った。
4. 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 BDVp24 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型および行動性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

パーキンソン病患者を含む 4 名の剖検脳患者の黒質または線条体領域で RT-PCR および *in situ* hybridization により BDV RNA の検出を試みた。RT-PCR では、p40 RNA の陽性が 1 名、p24 RNA の陽性が 1 名であった。*in situ* hybridization では、BDV RNA の検出は認められなかった。現在、RT-PCR で陽性が認められた 2 名の剖検脳から乳剤を作成し、スナネズミに脳内接種し、ウイルスの伝播ならびに分離を行っている。

2. p24 タンパク質および Amphoterin の相互作用

p24 タンパク質に相互作用する宿主因子を探索した結果、分子量 30 kDa のタンパク質が Far-Western blot 法により検出された。さらにこのタンパク質を精製し、ペプチドシークエンスを行った結果、このタンパク質は神経突起伸張に関わる Amphoterin であることが判明した。さらに *in vivo* での p24 タンパク質と Amphoterin との結合を確認するため、mammalian Two-hybrid assay により解析を行ったところ、p24 タンパク質と Amphoterin は特異的に結合することが示された。Amphoterin は神経細胞の神経突起伸張ならびに生存維持に重要な役割を示していると考えられる。そこで、BDV 感染による Amphoterin の神経突起伸張能および細胞遊走能への影響を検討した。BDV 感染細胞では、非感染細胞と比較して有意に神経突起伸張能および遊走能が低下していることが示された。さらに BDV 感染細胞では p24 タンパク質と Amphoterin は共局在を示し、Amphoterin およびそのレセプターである RAGE の活性が低下していた。

3. BDV p24 遺伝子 Tg マウス

GFAP をプロモーターとする Tg マウスの 2 系統について詳細に解析した結果、胎生期から p24 タンパク質の発現が強く認められる系統 (GFAP-20) では、攻撃性の上昇とともに、数匹のマウスにおいて生後 40 日目から激しい首振り、歩行不全などの神経症状が認められた。また、GFAP-20 系統の Tg マウスでは加齢に伴い、海馬の神経網に p24 タ

ンパク質の蓄積が認められ、脳内栄養因子の一つである BDNF の低下が観察された。

D. 考察

今回の検索より、パーキンソン病患者を含む剖検脳から BDV RNA の存在が認められた。RT-PCR および *in situ* hybridization による p40 および p24 RNA の検出の不均衡は、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ではないかと推測された。また、p24 タンパク質は神経突起伸張因子である Amphoterin と結合することが確かめられた。このことは、p24 タンパク質の発現により Amphoterin の機能が阻害されることが BDV の病原性に関与している可能性を示している。さらに、p24 遺伝子 Tg マウスの解析により、p24 タンパク質の脳内発現およびその蓄積が BDV の病原性に深く関与することが示された。加えて、BDV 感染動物、p24 遺伝子 Tg マウスでは脳内栄養因子 (BDNF) の発現低下が認められることから、BDV の持続感染がドーパミン産生ニューロンの変性にも関与している可能性が示唆された。

E. 結論

Amphoterin は、胎生期から成長期の脳で強く発現し、成熟期の中枢神経回路網の形成に重要な役割を果たしているタンパク質である。また、成熟した脳では、さまざまなストレス下においてその発現が増強され、神経細胞の生存の維持に関わっていると考えられている。このことは、中枢神経系における BDV の持続感染が神経細胞の脆弱化を引き起こしている可能性を強く示唆する。Tg マウスを用いた解析において、p24 タンパク質の神経網における局所的な BDV の発現が神経症状の発症と関与していることが示唆された。さらに、p24 遺伝子 Tg マウスで認められた脳内 BDNF の低下も、神経細胞の脆弱化を示す所見である。事実、パーキンソン病患者においても BDNF の低下が観察されており、この低下がドーパミン産生ニューロンの細胞死と関係していると考えられている。加えて、BDV 感染ラットにおいてドーパミン、ドーパミンレセプターあるいは代謝酵素の異常が報告されていることを考慮に入れると、BDV の感染、特に p24 タンパク質の脳内での蓄積がパーキンソン病の発病に関連している可能性が考えられる。今後、p24 遺伝子 Tg マウス、BDV 持続感染動

物などを用いて、パーキンソン病の病態であるドーパミン作用経路の異常に BDV がどのように関与しているかを詳細に探る必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kobayashi T., Kamitani W., Zhang G., Watanabe M., Tomonaga K. and Ikuta K. Borna disease virus nucleoprotein requires both nuclear localization and export activities for viral nucleocytoplasmic shuttling. *J. Virol.*, in press
2. Watanabe M., Lee B J., Kamitani W., Kobayashi T., Tomonaga K. and Ikuta k. Neurological disease and viral dynamics in the brains of neonatally Borna disease virus-infected gerbils. *Virology*, in press
3. Kobayashi T., Watanabe M., Kamitani W., Tomonaga K. and Ikuta K. Translation initiation of a bicistronic mRNA of Borna disease virus: A 16-kDa phosphoprotein is initiated at an internal start codon. *Virology* 277, 296-305, 2000.
4. Tomonaga, K., Kobayashi, T., Lee, B-J., Watanabe, M., Kamitani, W. and Ikuta, K.: Identification of alternative splicing and negative splicing activity of a nonsegmented negative strand RNA virus, Borna disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 12788-12793, 2000
5. Watanabe, M., Zhong, Q., Kobayashi, T., Kamitani, W., Tomonaga, k. and Ikuta, K.: Molecular ratio between Borna disease viral-p40 and p24 proteins in infected cells determined by quantitative antigen capture ELISA. *Microbiol. Immunol.* 44, 765-772,

2000.

6. Watanabe, M., Kobayashi, T., Tomonaga, K. and Ikuta, k.: Antibodies to Borna disease virus in infected adult rats: An early appearance of anti-p10 antibody and recognition of novel virus-specific proteins in infected animal brain cells. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 775-778, 2000.
 7. Nakamura, Y., Takahashi, H., Shoya, Y., Nakaya, T., Watanabe, M., Tomonaga, K., Iwahashi, K., Armeno, K., Momiyama, N., Taniyama, H., Sata, T., Kurata, T., de la Torres, J. C., and Ikuta, K.: Isolation of Borna disease virus from human brain. *J. Virol.* 74, 4601-4611, 2000.
 8. Hagiwara, K., Kamitani, W., Takamura, S., Taniyama, H., Nakaya, T., Tanaka, H., Kirisawa, R., Iwai, H. and Ikuta, K.: Detection of Borna disease virus in a pregnant mare and her fetus. *Vet. Microbiol.* 72, 207-216, 2000.
- ### 2. 学会発表
1. 神谷亘、田原口智士、小林努、吉野さおり、岡本実、渡辺真紀子、小林剛、谷山弘行、小野悦郎、朝長啓造、生田和良。ボルナ病ウイルス p24 遺伝子トランスジェニックマウスの病態解析。第 48 回日本ウイルス学会学術集会。10 月 津
 2. Madiha S.Ibrahim、渡辺真紀子、小林剛、神谷亘、朝長啓造、生田和良。Borna Disease Virus Shows Aberrant Patterns of Persistency Among Oligodendroglia Derived Biological Cell Clones。第 48 回日本ウイルス学会学術集会。10 月 津
 3. 渡辺真紀子、神谷亘、小林剛、谷山弘行、朝長啓造、生田和良。スナネズミ脳におけるボルナ病ウイルスの主要抗原発現の分布。第 48 回日本ウイルス学会学術集会。10 月 津
 4. 小林剛、渡辺真紀子、神谷亘、張国旗、朝長啓造、生田和良。ボルナ病ウイルス N タンパク質の核内外輸送。第 48 回日本ウイルス学会学術集会。10 月 津

5. 庄谷祐子、小林剛、渡辺真紀子、神谷亘、李丙載、朝長啓造、生田和良。ボルナ病ウイルス p24 蛋白質と神経突起伸張因子 Amphoterin との結合。第 48 回日本ウイルス学会学術集会。10 月 津
6. 小林 剛、張国旗、渡辺真紀子、神谷亘、朝長啓造、生田和良。ボルナ病ウイルスミニレプリコンの構築の試み。第 130 回日本獣医学会学術集会。10 月大阪
7. 神谷亘、生田和良。ボルナ病ウイルス p24 タンパク質と神経突起伸張因子 Amphoterin との結合とその意義について。第 130 回日本獣医学会学術集会。10 月大阪
8. 渡辺真紀子、李丙載、神谷亘、谷山弘行、小林剛、朝長啓造、生田和良。ボルナ病ウイルス感染スナネズミにおける脳内のウイルス分布と病態との相関性。第 130 回日本獣医学会学術集会。10 月大阪
9. 神谷亘、田原口智士、小林努、吉野さおり、岡本実、渡辺真紀子、小林剛、谷山弘行、小野悦郎、朝長啓造、生田和良。ボルナ病ウイルス p24 遺伝子トランスジェニックマウスを用いた BDV の病態の解析。第 4 回神経ウイルス研究会。7 月名古屋
10. 渡辺真紀子、李丙載、神谷亘、小林剛、谷山弘行、朝長啓造、生田和良。スナネズミ脳におけるボルナ病ウイルス抗原発現分布の解析。第 4 回神経ウイルス研究会。7 月名古屋
11. 朝長啓造、小林剛、李丙載、渡辺真紀子、神谷亘、生田和良。ボルナ病ウイルスの選択的スプライシング調節機構。第 4 回神経ウイルス研究会。7 月名古屋
12. 神谷亘、田原口智士、小林努、吉野さおり、岡本実、渡辺真紀子、小林剛、谷山弘行、小野悦郎、朝長啓造、生田和良。ボルナ病ウイルス p24 遺伝子トランスジェニックマウスの解析。第 129 回日本獣医学会学術集会。4 月筑波
13. Madiha S. Ibrahim、渡辺真紀子、小林剛、神谷亘、朝長啓造、生田和良。Characterization of biological clones of Borna disease virus. 第 129 回日本獣医学会学術集会。4 月筑波
14. 渡辺真紀子、神谷亘、小林剛、谷山弘行、朝長啓造、生田和良。スナネズミ脳におけるボルナ病ウイルスの主要抗原の発現様式。第 129 回日本獣医学会学術集会。4 月筑波
15. 小林剛、渡辺真紀子、神谷亘、朝長啓造、岸雅彦、生田和良。ボルナ病ウイルス N タンパク質の発現様式および核移行。第 129 回日本獣医学会学術集会。4 月筑波

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし