

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 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 倉 田 毅

平成 14 (2002) 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13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	長崎大学熱帯医学研究所宿主病態解析部門	教授
	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
	結城 伸泰	独協医科大学神経内科	助教授
	高 昌星	信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科	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
鈴木 亨	福井医科大学医学部臨床検査医学講座	助教授	

目 次

I. 総括研究報告書（平成13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……………	9
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……………	17
岩崎 琢也（長崎大学熱帯医学研究所）	
3. パーキンソン病とボルナ病ウイルス感染との関連性に関する研究……………	21
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……………	31
高橋 和郎（福島県立医科大学医学部微生物学講座）	
5. <i>Campylobacter jejuni</i> リポ多糖感作によるギラン・バレー症候群疾患モデル……………	38
結城 伸泰（独協医科大学神経内科）	
6. ギラン・バレー症候群の病因因子の解明とその予防に関する研究……………	44
高 昌星（信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科）	
7. サルコイドーシスリンパ節における <i>P. acnes</i> DNA の組織内分布……………	49
江石 義信（東京医科歯科大学大学院病因・病理学）	
8. 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 ～サルコイドーシス患者糞便での検討～……………	60
渡辺 邦友（岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設）	
9. 微生物の感染とIgA腎症の関連に関する研究……………	65
荒川 宜親（国立感染症研究所細菌・血液製剤部）	
10. IgA腎症の発症における <i>Haemophilus parainfluenzae</i> 菌の関与に関する研究……………	73
鈴木 亨（福井医科大学医学部臨床検査医学講座）	
11. びまん性肺疾患または呼吸不全における細菌感染に関する研究……………	77
永武 毅（長崎大学熱帯医学研究所）	
12. 慢性肺気腫あるいは呼吸不全におけるウイルス感染に関する研究……………	82
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……………	95
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……………	107

1. 総括研究報告

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 いわゆる特定疾患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。治療面ではあくまでも対症療法的しかなく、原因療法ができない状況にある。原因として微生物の関与は大きく疑われる。即ち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、あるいはまだそれと認められてはいない病原体等が関与していることが示唆されている。当班では各臨床班と密接に連携し、患者検体を用い①発症時のできるだけ早い時期の、あるいは再発時の病巣検体等を用いて関与病原体の分離を試みる、②疾患への関与が疑われる微生物の抗体とその動態から検索する、③遺伝子の検出、④疾患の発生、増悪の機序と潜伏・持続する感染微生物の再活性化との関連を明らかにする、⑤分子生物学的技術により特定の科に属するウイルス群に存在する遺伝子配列を検出する系を確立する。対象課題は①神経変性疾患とウイルスの関与、②サルコイドーシス発症における *P. acnes* の関与について、③特発性造血器障害におけるウイルス関与の証明、④ギランバレー症候群の病因・発症機序の解明、⑤呼吸器不全における微生物感染とその難治化要因、及びバイオフィルム除去法の開発、⑥IgA 腎症発症機序の解明に関する研究を実施した。

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（長崎大学熱帯医学研究所教授）
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（信州大学医療技術短期大学部教授）
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（獨協医科大学助教授）
鈴木 亨（福井医科大学医学部助教授）

A. 研究目的

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。本研究班では過去 2 年間の班研究において興味ある成果がみられた疾患について一部班員を入れ換えてさらに原因究明を行なう。

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、特に *P. acnes* の関与について、③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（GBS）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である。

B. 研究方法

I. 造血臓器疾患の起因ウイルスの解明

1. 患者末血より DNA を抽出しヘルペスウイルス共通増幅 PCR で確認されれば direct sequencing で塩基配列を調べる（山西）。
2. 特発性造血障害患者の骨髓と末梢血を用い、ウイルスゲノムをターゲットとした PCR、RT-PCR による解析と、ウイルス蛋白を利用した ELISA による解析を行う（岩崎）。

II. 神経変性疾患における起因ウイルスの解析

3. パーキンソン病患者剖検脳での BDV の検出とこの普遍性について検討する。また BDVp24 遺伝子トランスジェニックマウスの脳内発現部位とその病態について検討する。さらにこの p24 蛋白と結合する神経突起伸張因子について宿主細胞機能異常とそのアポトーシス誘導へ関わる宿主因子について検索する（生田）。
4. MS 患者剖検脳組織、及び患者生前の髄液及び血液から DNA を抽出し PCR 法により HHV-6 の前初期遺伝子と *C. pneumoniae* 53KD 蛋白遺伝子を検出する。また患者髄液を HL 細胞に感染させ、クラミジア抗原を検出する。また血中、髄液中の両病原体に対する抗体価測定をする（高橋）。

III. GBS の発症に関わる病因因子の解明

5. GBS 及びフィッシャー症候群患者から分離された *C. jejuni* (PEN19、PEN2) 菌株を大量培養し、リポ多糖を抽出しモノクローナル抗体を用い GM1 ないし GQ1b 株構造のリポ多糖を選び出す。これをウサギに免疫し神経症状と血中ガングリオシド抗体を指標として病変を検索

する（結城）。

6. GBS 血液から DNA 抽出し、遺伝子多型を検討し、NADH デヒドロゲナーゼを含む酸化ストレスに関与する遺伝子の多型性の解析を行い、病態を鑑別し、個別治療法の確立を目指す（高）。

IV. サルコイドーシスの発症に関わる病因の解明

7. 種々の方法で *P. acnes* がサ症肉芽腫の類上皮細胞に特異的に局在することをふまえ、この菌の疾患惹起との関連につき検討する（江石）。
8. *Propionibacterium* 選択分離培地を用い、サルコイドーシスの患者と健常者の糞便から分離同定を試みる（渡辺）。

V. IgA 腎症の病因の解明

9. 患者組織、特に腎臓の血管内皮における細胞障害とマイコプラズマ（抗原）の存在との関連を検証する（荒川）。
10. IgA 腎症患者組織等を用い発症機序を明らかにする（鈴木）。

VI. びまん性肺疾患または呼吸不全における微生物感染

11. 上皮細胞側付着因子として精鎖の重要性とそのブロックで感染発症防止につながる薬物を見出し、細菌と細胞表面荷電研究を行い細菌感染の機序の解明を試みる（永武）。
12. ウイルス感染による肺末梢血管の血流障害と呼吸不全との関係を明らかにするために、急性増悪時の慢性肺気腫において微小血栓発生を鋭敏に反映する D-D ダイマーを測定する（山谷）。
13. 酵素アルギン酸リアーゼを無抗原化するため抗原性エピトープ部位を同定し、部位特異的変異によりエピトープ部位の構造を改変した変異酵素を作成しそれをラットの系で評価する。また X 線結晶構造解析結果から、抗原性エピトープ大幅に削除することによる無抗原化しそれを大量生産し臨床実験に進める（村田）。

(倫理面への配慮)

人体検体を研究に用いる際には、主治医が患者の同意を機関毎に得ている。動物実験については機関毎に得ている。動物実験については機関毎に委員会の承認のもとに実施されている。ヒト由来遺伝子の解析については必要に応じ各機関の委員会で研究承認を得てもらう。

C&D. 研究結果と考察

1. 造血臓器疾患の起因ウイルスの解明:

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 とその発症原因の可能性について検討した。βヘルペスウイルス標準株から作成した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、血漿、末血等) で、骨髄から HHV6 (60%)、末血単核球から HHV6 が 10 検体 (62.5%)、HCMV が 1 検体、血漿から HHV6 が 1 検体検出された。この方法は患者検体のスクリーニングには有効であり、ITP 患者での高率の HHV6 検出については検討中である (山西)。

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:

特定疾患のうち、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病原体、とくにウイルス感染の関与を明らかにする目的で、臨床検体 (骨髄・末梢血) を対象として解析してきた。検体より核酸を抽出し、ウイルスゲノムの有無について PCR/ RT-PCR を用いて解析した。また、血清学的にヒトヘルペスウイルス 8 (HHV8) ならびにパペシアに対する抗体の有無を検討した。最終年度までの解析では、38 例中 B19 のウイルスゲノム陽性例は 7 例、TT ウイルス陽性例は 12 例、EB ウイルス陽性例は 4 例、ヒトヘルペスウイルス 6 陽性例が 2 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、TTV が検出された再生不良性貧血 (AA) の 2 例、pure red cell aplasia (PRCA) の 1 例であった。のこりの陽性例は定量感度以下であった。HHV8 抗体ならびにパペシア抗体陽性例は認められなかった。また、PCR を用いた subtraction 法ではヒトゲノム由来のバンドが検出されたが、新規のゲノムは検出できていない。以上の結果より、これらの対象疾患では B19 ウイルスの感染あるいは複合感染を診断する必要があること、現在、病原性がはっきりしていない TTV については今後の検討が必要であることが示唆された (岩崎)。

3. 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—サルコイドーシス患者糞便での

検討—:

サルコイドーシス患者の腸管における Propionibacterium spp. を検索するため、これまでの検討から考案した選択分離培地を用いてサルコイドーシス患者の糞便内における Propionibacterium spp. の検索を行った。協力施設*で収集された由来の明らかな患者糞便 65 検体における Propionibacterium spp. の保有率は、38.5% であった。これは、先の検討で行った健康成人の糞便 70 検体における Propionibacterium spp. の保有率 (41.4%) と同等であった。菌量の平均も 4.26×10^2 cfu/g と健康成人の結果 (2×10^2 cfu/g) と同等のレベルであった。また、20 歳代~70 歳代の各年代における保有率は 33.3%~50% であった。男女別では、男性 47.1%、女性 35.4% であった。その他、罹患年数、疾患部位についても、Propionibacterium spp. の保有率に特徴的な差は認められなかった。今回の検討では、少なくとも糞便中の Propionibacterium spp. の保有率、保有菌量に関しては、健康成人との違いは認められなかった (渡辺)。

4. サルコイドーシスにおけるプロピオニバクテリア:

P.acnes とサ症肉芽腫形成との病因的関連を検証するために、本菌 DNA の組織内分布を ISH 法を用いて解析した。サ症 9 例、結核症 9 例、正常対照 9 例のリンパ節・パラフィン切片を用いた。ISH 法では、Digoxigenin を 3'-tailing 標識した 26 mer のオリゴプローブ (16S rRNA 由来) を使い、CSA 増感法を併用して DAB 発色系および FITC 蛍光系にて検出した。サ症肉芽腫内のシグナル密度は、サ症肉芽腫外のシグナル密度よりも有意 ($p < 0.001$) に高かった。サ症におけるシグナル密度は、肉芽腫内 ($p < 0.001$) および肉芽腫外 ($p < 0.007$)、いずれにおいても結核症および正常対照リンパ節に比べて有意に高かった。また、ISH 陽性シグナル密度は、同一検体における定量系 PCR 法による P.acnes ゲノム数と高い相関 ($r = 0.86, p < 0.001$) を示した。P.acnes DNA は肉芽腫内に集積しており本菌がサ症の原因である可能性が高い (江石)。

5. パーキンソン病とボルナ病ウイルス感染との関連性に関する研究:

ボルナ病ウイルス (BDV) はウマやヒツジに脳炎を起こす。ヒトでは神経変性疾患の 1 つであるパーキンソン病との関連について検討し、患者由来剖検脳内に BDV 遺伝子が高率

に検出できること、培養細胞やモデル動物へのBDV実験感染によりBDVの持続感染した神経細胞は生存維持能力の低下を引き起こしていることが明らかになった。特にBDV感染により発現するp24リン酸化蛋白が主な病態誘導因子として機能していることが推測された。これらの事実は①BDVp24とアンフォテリンとの結合部位の同定とp24によるp53の転写活性化機能の抑制、②BDV持続感染のストレス応答への影響、③BDVp24遺伝子トランスジェニックマウスでの解析等により明らかにされた(生田)。

6. 多発性硬化症の微生物学的要因究明に関する研究:

多発性硬化症(MS)の発症にHHV-6あるいはC.pneumoniaeが関与するという既報の研究結果を追試したが、MS患者14例において、その関連はほとんど認められなかった。MS患者12例の髄液およびMS患者2例の脊髄の病変部位に存在する非ヒト遺伝子をサブトラクション法を用いて検索したが、ヒトゲノム由来遺伝子のみが検出され、微生物由来の遺伝子は検出されなかった(高橋)。

7. Campylobacter jejuni リポ多糖感作によるGBS疾患モデル

GBSにおける分子相同性仮説を立証する。対象と方法: *Campylobacter jejuni* (CF 90-26)からリポ多糖を精製した。ウサギ23羽にC. jejuni リポ多糖を2.5 mg (n=15) もしくは10 mg (n=8) とアジュバントを3週毎に皮下注した。その結果IgG抗GM1抗体産生が誘導された。リポ多糖を2.5 mg ずつ感作した群では3羽(20%)に、10 mg ずつ感作した群では全例に運動麻痺が生じた。脊髄前根の軸索にIgGが沈着していた。坐骨神経にWaller様の変性像がみられた。脱髄像やリンパ球の浸潤はみられなかった。これに対して、アジュバント対照群やE. coli K12、Salmonella minnesota R595のリポ多糖を感作したウサギでは、抗GM1抗体の誘導や運動麻痺はみられず、病理組織学的にも異常なかった。以上からC. jejuniのリポ多糖を感作して、軸索型GBSの疾患モデルを樹立できたが、その状態は末梢神経病変は脱髄ではなく、軸索変性を主体としてC. jejuni腸炎後GBSの剖検例と同様の所見を呈した。発症率はLPSの量と比較した(結城)。

8. GBSの病因因子の解明とその予防に関する研究

GBSは現在、上気道感染を先行感染とする急性炎症性脱髄性polyneuropathy (AIDP)と下痢等の下部消化管清浄を先行感染とする急性運動軸索型神経炎(AMAN)などいくつかに分類されるようになってきているが、これまでの研究からは細胞性免疫がGBSの発症に重要であるとの証拠が蓄積されている。GBSに関わるC.jの血清型別ではPennerの19が多いとするもの、26が多いとするもの他、他の型もGBS患者から分離されている。本研究では季節におけるC.jの分離菌株の血清型を鑑別し、異なる血清型における共通抗原のGBS惹起性T-cell epitopeを決定し、GBSの発症機序の解明とその予防に役立てようとした。その結果、A群(1, 44型)を除くその他の菌株に関しては、2000年(8~11月)と2001-2002年では、分離菌株の型別された血清型に違いがみられた。今回の結果は、既報(Pennerら、Karmaliら、Sjögrenら)とは必ずしも一致していない。O群(19型)に関しては、まれに存在する血清型ではなく、2001-2002年では10.2%の分離率であり、2年間を通して2番目に多い分離菌株であった。今後、GBSを惹起する可能性のある菌株を培養し、異なる血清型における共通抗原のGBS惹起性T-cell epitopeを決定し、GBSの発症機序の解明とその予防に役立てる(高)。

9. IgA腎症の発症におけるHaemophilus parainfluenzae 菌の関与に関する研究

IgA腎症は免疫複合体病型糸球体腎炎と考えられているが、病因抗原は依然として不明のままである。IgA腎症患者の咽頭・扁桃粘膜からのHaemophilus parainfluenzae (H.parainfluenzae)の分離頻度が高率であることに注目し、IgA腎症患者の糸球体内および血清中に、H.parainfluenzaeの菌体外膜成分とIgA型抗H.parainfluenzae抗体の存在を世界に先駆けて証明してきた(Lancet 1994)。本研究では、以上の研究成果を踏まえて、IgA腎症患者の扁桃組織リンパ球のH.parainfluenzae外膜抗原に対する特異的免疫応答を検討した。その結果、IgA腎症患者の扁桃組織リンパ球はH.parainfluenzae菌体外膜抗原刺激によりT細胞系およびB細胞系が活性化されており、H.parainfluenzae外膜抗原に対してpolyclonal activationを伴うIgA class switchによる抗体産生系が活性化され、特異的IgA(IgA1)型抗H.parainfluenzae抗体の産生亢進およびサイトカインのIL-10、TGF-βとIFN-γの産生亢進が明らかとなった。今回の検討から、IgA腎症の発症機序において、H.parainfluenzae

菌体外膜抗原が扁桃組織リンパ球を中心とした局所免疫機構と共に、重要な役割を果たしていることが示唆された（鈴木）。

10. IgA 腎症の発症にかかわる病原体の解明

IgA 腎症の発病や慢性化に粘膜免疫系の異常が関与している事は、一般的な認識となりつつある。今回、粘膜免疫組織の一つである扁桃への感染微生物、特にマイコプラズマの慢性的定着あるいは感染と病態成立への関与について検討した。IgA 腎症患者の扁桃付近の咽頭スワブ 42%から何らかのマイコプラズマが培養にて分離され、PCR では、扁桃の 9/11(81%)、アデノイド 2/3 (66%)で *M. fermentans* と *M. salivarium* 共通 *ftsZ* プライマーが陽性であり、*M. fermentans* 特異的プライマーでの陽性率は、扁桃 3/11 (27%)、アデノイド 1/3 (33%)であった。血清中の抗マイコプラズマ抗体価陽性者は少なかったが、高い抗 *M. fermentans* 抗体価を有する例で、リンパ球活性化マーカーの発現が亢進しており、マイトゲンとしてのマイコプラズマの関与が疑われた。しかし、IgA 腎症患者の腎組織へのマイコプラズマ抗原の沈着は確認できなかった。カニクイザルへの *M. fermentans* の経静脈感染実験では、感染 7 日目をピークに、末梢血単核細胞 (PBMC) の 80%が 1 日培養後にアポトーシスによる細胞死を起こし、感染 29 日目の剖検時に、プラズマ細胞浸潤を伴う脾臓の静脈炎ならびに腎臓、糸球体のメサンギウム領域の増生という IgA 腎症類似の病変を軽度ながら形成し、病変部位に *M. fermentans* 抗原が沈着していた。観察期間が短く腎臓に IgA を含む複合体の沈着が確認できなかったことから完全な動物モデルとは言えない。以上より、*M. fermentans* の扁桃組織などへの定着や感染と血流中への断続的侵入がリンパ球異常を誘発し血管炎としての IgA 腎症の腎臓病変を出現させるという、我々の仮説を否定する事もできなかった（荒川）。

11. 慢性肺疾患における細菌の関与とその治療法の開発

バイオフィーム感染症の治療法として、細菌が産生する酵素アルギン酸リアーゼ (A1-III) を利用するためには、その抗原性の除去が不可欠である。本酵素の N 末端側に特定された抗原エピトープに含まれるアミノ酸を、部位特異的変異によって他のアミノ酸に置換した変異酵素、及びそのポリエチレングリコール (PEG) 修飾体の抗原性を検討した。A1-III と同様の機能を持つアルギン酸リアーゼ (A1-

II) についても検討したがこれには比較的強い抗原性が認められた酵素の反応機構を詳細に解析した結果、活性中心とは離れた部位にあるループ (N) 末端側 64~84 番までのアミノ酸残基よりなるループ) が柔軟に運動し、基質アルギン酸の触媒中心への固定に重要な機能を有していることを明らかにした。また、A-III の抗原性エピトープの削除範囲を確定するため、本酵素の活性発現におけるタンパク質構造の寄与を詳細に検討した（村田）。

12. びまん性肺疾患又は呼吸不全における細菌感染

難治の細菌性呼吸器感染症の代表的病原菌である緑膿菌を用いて、高齢化社会の中で難治宿主要因の一つと考える誤嚥によるびまん性肺疾患や呼吸不全のメカニズムを解明すべく、マウス誤嚥性肺炎モデルを作成した。胃内容物（塩酸）吸引が緑膿菌による肺炎を増悪させるか否かについてマウス肺炎モデルを場に検討した。塩酸 (0.1N) あるいは緑膿菌 (6×10^6 cfu/mouse) 単独の気管内接種では 100% のマウスが生存したが、両者の接種により肺内の菌増加を認め、生存率は 28.6% まで有意に低下した。塩酸吸引後のマウス気管上皮を用いた緑膿菌付着実験では有意な菌付着の増加を認めた。肺塩酸吸引は気道上皮障害に伴う菌付着の増加により肺炎増悪を招来することが示唆された（永武）。

13. 慢性肺気腫あるいは呼吸不全におけるウイルス感染

本年度は 1.マクロライド抗生物質のライノウイルス感染抑制作用について、培養ヒト気管上皮細胞を用いて検討した。また、2.エリスロマイシンを内服した COPD 患者の風邪の回数と急性増悪の回数について検討した。

- 1) ヒト気管上皮細胞にライノウイルスを感染させると培養液ライノウイルス量は時間と共に増加し、3 日後にピーク値になる。この上皮細胞にエリスロマイシン $1 \mu\text{M}$ を感染 3 日前から作用させると、細胞内ライノウイルス RNA 量、培養液中のウイルス量は 10% 以下に減少する。
- 2) 風邪を引く回数はエリスロマイシン内服群の COPD 患者で平均 1.2 回/年、非内服群の COPD 患者で平均 4.5 回/年と明らかに前者で減少していた。また風邪が元で急性増悪した患者もエリスロマイシン内服群の COPD 患者で平均 6 名/年 (11%)、非内服群で平均 30 名 (56%) と明らかに前者で減少がみられた。ライ

ノウイルスには有効なワクチンがな現状でマクロライド系、抗生物質のウノノウイルス感染抑制効果からみて COPD 患者への投与が有効であると考えられる（山谷）。

E. 結論

サ症において P. acnes の関与が強く疑われる従来の結果がより確認された。ボルナ病ウイルスがヒトの神経系への障害作用を疑わせる成績が得られた。GBS では起因の一つに C. jejuni の関与に加え、発症機序には酸化ストレスの関与が示唆された。慢性呼吸器疾患でバイオフィルムを酵素を応用して除去する試みが実用化寸前までできた。その他特発性造血器疾患、IgA 腎症等と病原体の関与について示唆が得られた。

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. 特許出願

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. 国際特許 PCT/JP93/00227 『囊胞性線維症の治療薬』（出願人：大塚化学株式会社、グンゼ株式会社）
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）
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）

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）の原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 既知のヒトヘルペスウイルス（HHV）の塩基配列を基に 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

ヒトヘルペスウイルス（HHV）は初感染の後体内に潜伏感染し、宿主が免疫不全状態に陥ると再活性化し様々な病態を引き起こす。現在までに発見されている HHV は 8 種類あり α 、 β 、 γ の 3 亜科に分類されているが、 β ヘルペスウイルスに属するものは、サイトメガロウイルス（HCMV）、HHV-6、HHV-7 の 3 種である。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。このことから、HHV が骨髄系の障害に関連する疾患の原因ウイルスである可能性があると考えられる。これらの HHV を同時に検出可能な PCR 系を開発し、特発性血小板減少症（ITP）、再生不良性貧血（AA）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（HCMV）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、 10^6 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。

また未知ウイルスの検出の可能性を検討する為に simian CMV、guinea pig の CMV 感染細胞を proteinase K 処理して得た DNA を用いた。

2) [β ヘルペスウイルス DNA の検出]

β ヘルペスウイルスに最も保存性の高い領域を報告されている塩基配列から検索し、late spliced gene 領域にプライマーを設定した。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、またウイルス間でプライマーの塩基配列との 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 (Fig. 1)。外側の 1 組 (β F11, β R11) を first PCR、内側のもう 1 組 (β F12, β R12) を nested PCR に用いた。PCR サイクルはアニーリング温度を 45°C~50°C、サイクル数は 20 から 50 サイクルにて検討し至適条件を決定した。増幅産物を 2% アガロースゲルを用いて電気泳動し、メンブレン (Hybond-N⁺ Amersham Pharmacia Biotech.) にブロッティングした。増幅される領域の中で、HHV-6、HHV-7、CMV にそれぞれ特異的な塩基配列に基づいてプローブを設計し

(Fig. 2)、サザンハイブリダイゼーションをおこなった。

[β ヘルペスウイルス DNA の塩基配列との比較]
PCR により得られた産物から QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出し、ABI PRIZM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems) を用い direct sequencing 法にて塩基配列を調べた。プライマーは前述の β R12 を用いた。得られた塩基配列と既知ウイルスの遺伝子配列との比較を行った。

β F11 : AGTTCTTGTGATGCTTTGATCTT
 β R11 : TTCGATCTTTTTTCGT
 β F12 : GCTTTGATGTTTCCTGAGTTAAAA
 β R12 : GCTGAGTGTGCTCCCCACATGAT

Fig.1 Consensus primers used for PCR

CMV: CGATGCGCAGTTCGTCCAGG
HHV-6: GCTATCTGATTCTGGTCTGGGG
HHV-7: GCAATTTGGCTCTGATCTAAAG

Fig.2 Specific probes for β herpesvirus detection

(倫理面への配慮)

患者からの検体の採取 (末梢血 2 ml、骨髓血 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 はヘルペス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

[至適条件の決定]

PCR 条件は検討の結果 first PCR, nested PCR ともに 95°C30 秒、45°C1 分、72°C1 分を 1 サイクルとして 20 サイクル施行した後、95°C 30 秒、55°C1 分、72°C1 分を 1 サイクルとして 20 サイクル行ったものが、非特異的増幅が抑制され、増幅も良好であることがわかった。

めこの条件を用いた。

[β ヘルペスウイルス標準株からの増幅]

すべてのウイルス標準株で single PCR、nested PCR による増幅が認められた。それぞれの特異的プローブでのサザンハイブリダイゼーションも陽性であり、非特異的なハイブリダイゼーションは見られなかった。(Fig. 3、4) direct sequencing 法にて得られた塩基配列は CMV、HHV-6、HHV-7 とも既知の HHV の塩基配列と一致した。

[ウイルスの存在が明らかな臨床検体での増幅]

1 検体当たり、ウイルス DNA が 10 コピー以上存在していることが既に判明している検体において consensus primer を用いた PCR 法により DNA の増幅が確認された。サザンハイブリダイゼーションを用いることで HCMV、HHV-6、HHV-7 の判別が可能であった (Fig. 5)。direct sequencing 法にて得られた塩基配列は CMV、HHV-6、HHV-7 とも既知の HHV の塩基配列と一致した。

また 2 種類以上のヘルペスウイルスが含まれている臨床検体においても、同様に増幅が可能で、サザンハイブリダイゼーションによって 2 種類以上のウイルス DNA が同時に増幅されていることが確認できた。

[未知ウイルスの検出の可能性の検討]

このプライマーを用いた PCR 法を simian CMV DNA, guinea Pig CMV DNA に対して応用したところ、simian CMV DNA をテンプレートとして用いた場合に特異的増幅が認められ、得られた増幅産物を用いて塩基配列を調べた。この結果得られた配列は慢性疲労症候群患者から分離された HCMV と相同性の高いウイルスの DNA と一致した。

[特定疾患患者検体への応用]

ITP 患者 18 症例 23 検体 (骨髓 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、骨髓から 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 1 検体 (6.3%)、血漿から HHV6 が 1 検体 (50%) 検出された。(Fig. 6)

検出された HHV6 についてその DNA 量を半定量的に調べた結果、調べた末梢血 8 検体中

1000 copies/sample 以上のものが 3 検体、100~1000 copies/sample のものが 2 検体、10~100 copies/sample のものが 3 検体であった。骨髄 2 検体中 1000 copies/sample 以上のものが 1 検体、10~100 copies/sample のものが 1 検体であった。血漿 1 検体中では 1~10 copies/sample のものが 1 検体であった。一方 AA 患者においては、末梢血 9 検体中、HHV-7 が 1 検体 (11.1%) で検出されたが HHV-6 が検出されたものはなかった。AA 患者の症例中、2 症例が肝炎症状後に AA を発症し、ウイルス感染が発症の契機として疑われていたが、2 症例ともに β ヘルペスウイルスは検出されなかった。このうちの 1 症例は骨髄移植が施行され、移植後経時的にヘルペスウイルスについて調べたところ、移植後第 9 週に HHV-6 が 100~1000 copies/sample 検出された。

また今回中国福建医科大学の沈教授の協力を得て、不明ウイルス疾患が疑われる患者検体を用いてこの系を応用した。提供をうけた検体は血小板数 $10 \text{ 万}/\mu\text{l}$ 以下の 14 症例を含む 21 症例 26 検体であった。これらの検体から既知の β ヘルペスウイルス (HHV-6 が 3 検体、HHV-7 が 5 検体、HCMV が 2 検体) は検出されたが、未知のヘルペスウイルスの検出には至らなかった。

D. 考察

β ヘルペスウイルスは非常にありふれたウイルスで抗体保有率も高く、小児期に感染をおこしても重症化することはまれで、不顕性感染であることも多い。しかしなかには、脳炎や肺炎、肝機能障害など重篤な症状を呈するものもある。また骨髄移植や HIV 感染症などの免疫不全状態においては再活性化し、さまざまな疾患の原因になることが良く知られている。特に 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。このことから我々は、特に小児における ITP、AA の原因にこれらのウイルスが関わっている可能性を考え、まずウイルスの効果的なスクリーニング方法の確立を目的とした。この方法の基本的戦略は既知のヘルペスウイルスの遺伝子配列を基に、複数のヘルペスウイルスの同時増幅が可能な PCR の系を用いることで、

簡便にスクリーニングを行うことである。また同時に既知のヘルペスウイルスと相同性が高いものであれば、未知のヘルペスウイルスも検出が可能なので、より幅広い病因検索が行えるということである。この研究の初期には β ヘルペスウイルスのみならず、 γ ヘルペスウイルスの同時検出を目的として、DNA ポリメラーゼ領域と late splicing 領域にプライマーを設計したが非特異的増幅の抑制が困難であった。このため、骨髄系の疾患の原因としてより疑わしい β ヘルペスウイルスに標的を絞った。増幅サイクルを工夫することにより、非特異的増幅が抑制でき、スクリーニングが可能となった。

この方法を用いると既知のヒトヘルペスウイルスのみならず、サル CMV の検出も可能であった。このサル CMV の増幅産物から得られた塩基配列をデータベースを用いて検索したところ興味深いことに慢性疲労症候群の患者から分離された HCMV と相同性の高いウイルスの塩基配列と一致した。このことはヒト以外の動物を宿主とするヘルペスウイルスが、ヒトに感染して疾患原因になるという可能性を示唆するものと考えられる。我々の確立した方法を用いることでそれらのウイルスも既知ヘルペスウイルス DNA と相同性が高ければその検出が可能であり、より広い意味でのウイルススクリーニングが可能であると言える。

現在までに症例を集めてスクリーニングを施行した結果、ITP 患者の末梢血、骨髄から HHV-6 が高率に検出された。ヘルペスウイルスは潜伏感染をするウイルスである為に、検出されることが直ちに病因であると結論付けることはできない。そのため、まず半定量的にウイルス量を調べることで、ウイルスの存在が有意であるかどうかを調べた。我々の以前の検討では初感染の後数年間にわたって、 10^5 細胞当たり 10~100 copies 程度のウイルス DNA が検出される。これに比較して複数の症例から潜伏感染で認められる以上のウイルス DNA が検出され、疾患原因である可能性を示唆するものであった。今後はウイルスの局在を骨髄において調べる為に in situ hybridization を用いた検討を行う予定である。

また今回検討した AA 患者の中に肝炎症状後に AA を発症し、ウイルス感染が契機として疑われていた症例があったが、スクリーニングにおいてヘルペスウイルスは検出されず、発症へのヘルペスウイルスの関与は否定的であった。この症例で移植後に HHV-6 が一時期検出されたも

の、特に症状を呈することはなく、潜伏感染ウイルスの単なる再活性化であると考えられた。また未知のヘルペスウイルスの検出を目的として、中国からの検体を用いたスクリーニングも同時に施行したが、既知ウイルスのみ検出され、未知ヘルペスウイルスの検出には至らなかった。

Journal of Medical Virology 2001 (65)
576-583

H. 知的所有権の取得状況

なし

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高感度で行なえ、スクリーニングに有効であった。

この方法を用いることで未知ウイルスの検出の可能性もあり、既知ウイルスの検出のみならず、未知ヘルペスウイルスが疾患原因である場合でも検出が可能である。

ITP 患者検体から、高率に HHV-6 が検出され、特に小児の ITP の発症要因として HHV-6 の関与の可能性が示唆されたが、単なる潜伏感染を反映している可能性もあり、今後その意義については検討をすすめると同時にスクリーニング数を増やす予定である。

F. 健康危険情報

なし

G 研究発表

1. 論文発表

1. Inverse relationship between human herpesvirus-6 and -7 detection after allogeneic and autologous stem cell transplantation. H. Miyoshi et al. Bone Marrow Transplantation 2001 (27) 1065-1070
2. The R3 region, one of three major repetitive regions of human herpesvirus 6, is a strong enhancer of immediate-early gene U95. M. Takemoto et al. Journal of Virology 2001 (75) 10149-10160
3. Human herpesvirus 6 downregulates major histocompatibility complex class I in dendritic cells. Y. Hirata et al.

Fig.3 Amplification from standard viral strain by consensus single PCR

Standard viral strains used as the template: lane1 U1102 (HHV-6A), lane2 HST (HHV-6B), lane3 7-KHR (HHV-7), lane4 Towne (CMV)

Amplified 501bp DNA (A) hybridized with HHV-6 specific probe(B), HHV-7 specific probe (C), CMV specific probe(D)

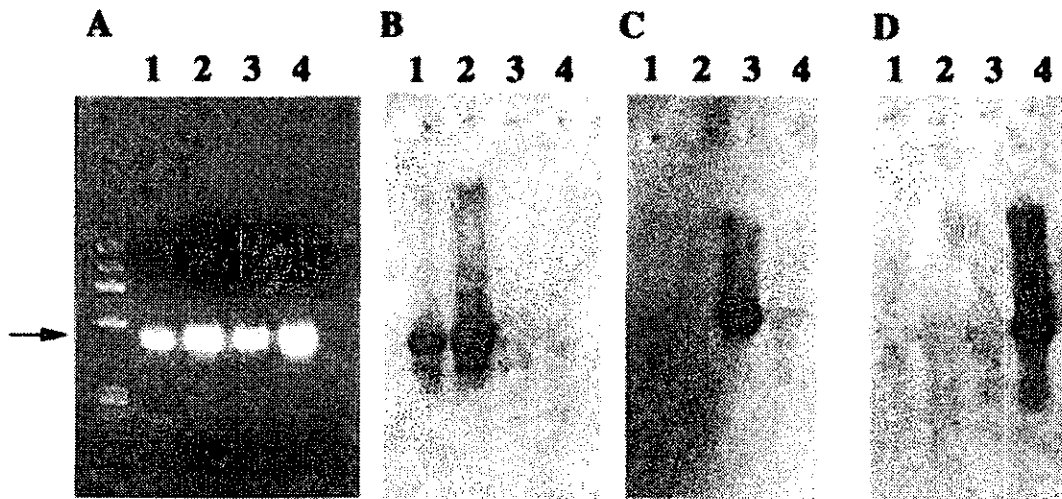


Fig.4 Amplification from standard viral strains by consensus nested PCR

Standard viral strains used as the template ; lane1 U1102 (HHV-6A), lane2 HST (HHV-6B), lane3 7-KHR (HHV-7), lane4 Towne (CMV)

Amplified 277bpDNA(A) hybridized with HHV-6 specific probe(B), HHV-7 specific probe (C), CMV specific probe(D)

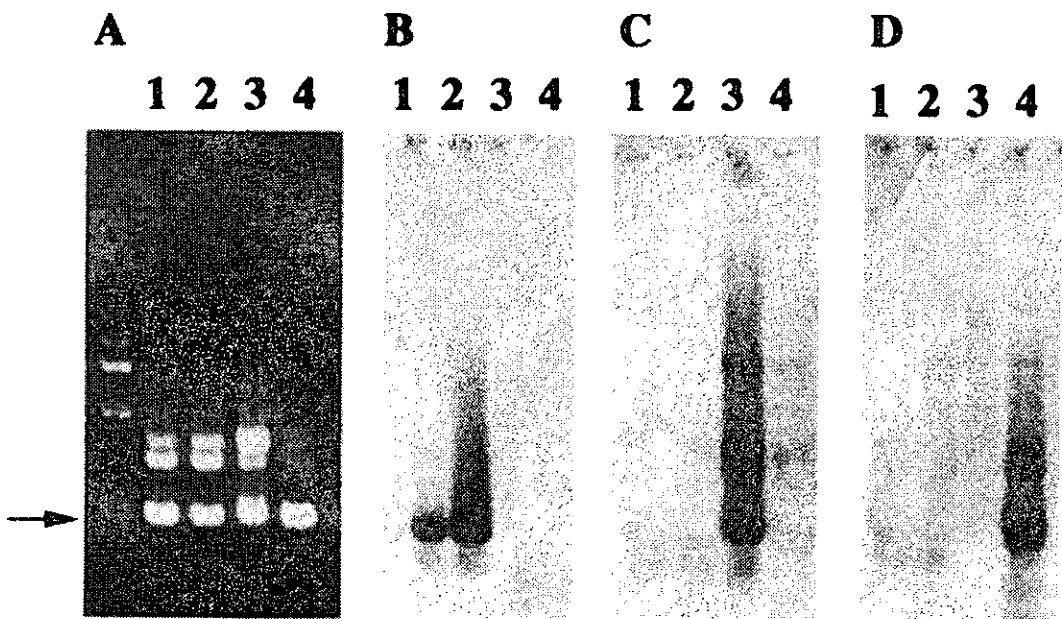


Fig.5 Amplification from clinical samples by consensus nested PCR

Lane1 amplification from PBMCs which contains HHV-6DNA(10-100copies/sample)

Lane2 amplification from PBMCs which contains HHV-7DNA(10-100copies/sample)

Lane3 amplification from PBMCs which contains CMV DNA(10-100copies/sample)

Amplified 277bp DNA (A) hybridized with HHV-6 specific probe(B), HHV-7 specific probe (C),
CMV specific probe(D)

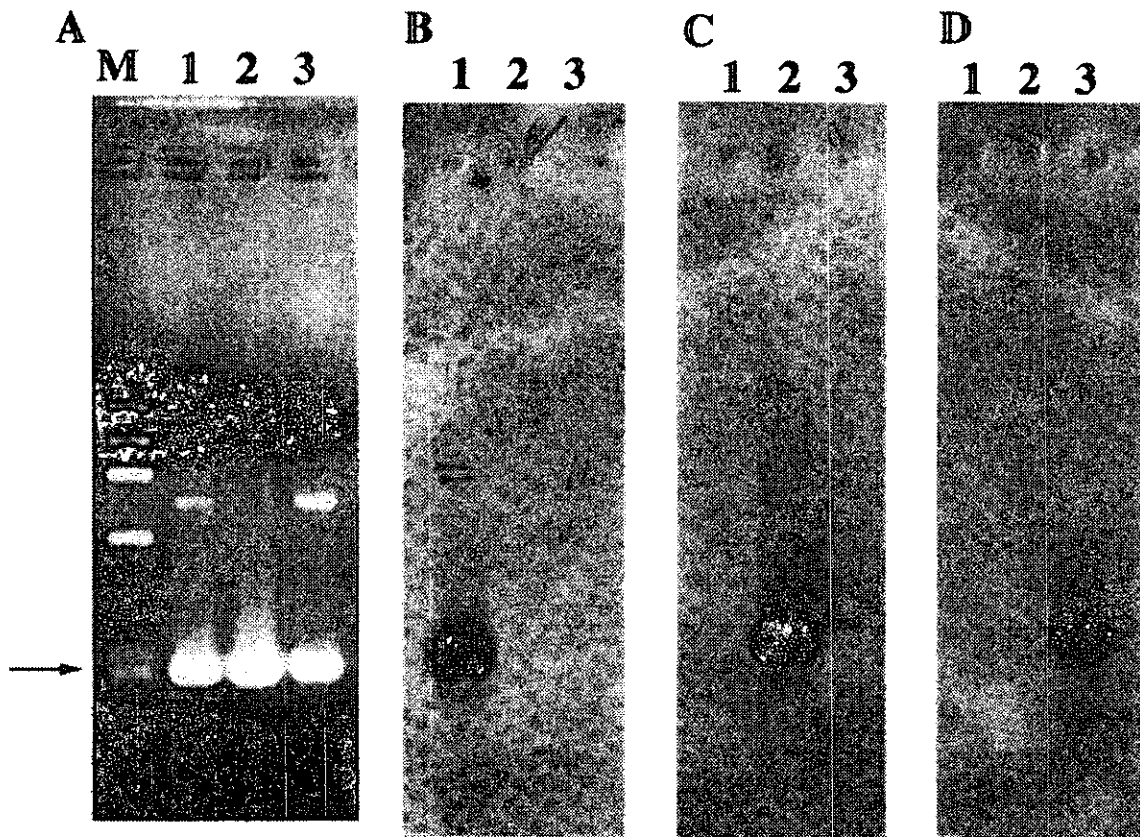
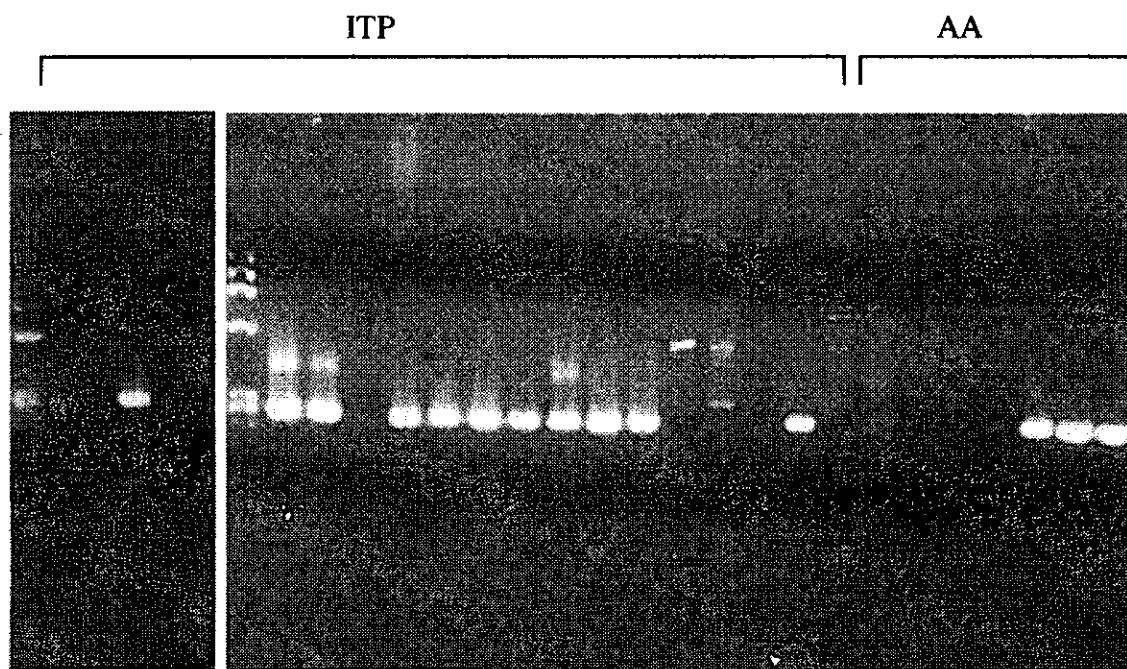


Fig.6 β ヘルペス共通増幅プライマーによるスクリーニング



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（長崎大学熱帯医学研究所教授）

協力研究者 片野 晴隆・長谷川 秀樹・佐藤 由子・佐多 徹太郎・倉田 毅
新井 智（国立感染研・感染病理部・感染症情報センター）

研究要旨 特定疾患のうち、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病原体、とくにウイルス感染の関与を明らかにする目的で、臨床検体（骨髄・末梢血）を対象として解析してきた。検体より核酸を抽出し、ウイルスゲノムの有無についてを PCR/RT-PCR を用いて解析している。また、血清学的にヒトヘルペスウイルス 8 (HHV8)ならびにバベシアに対する抗体の有無を検討した。最終年度までの解析では、38 例中 B19 のウイルスゲノム陽性例は 7 例、TT ウイルス陽性例は 12 例、EB ウイルス陽性例は 4 例、ヒトヘルペスウイルス 6 陽性例が 2 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、TTV が検出された再生不良性貧血(AA)の 2 例、pure red cell aplasia (PRCA)の 1 例であった。のこりの陽性例は定量感度以下であった。HHV8 抗体ならびにバベシア抗体陽性例は認められなかった。また、PCR を用いた subtraction 法ではヒトゲノム由来のバンドが検出されたが、新規のゲノムは検出できていない。以上の結果より、これらの対象疾患では B19 ウイルスの感染あるいは複合感染を診断する必要があること、現在、病原性がはっきりしていない TTV については今後の検討が必要であることが示唆された。

A. 研究目的

骨髄の障害に由来すると考えられてい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病原体の有無、さらに病原体の感染によりもたらされる影響を把握することを目的とし研究を行ってきた。

臨床検体の解析においては、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た。

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だされている。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。

B. 研究方法

臨床検体の収集：特発性造血障害の厚生労働省研究班（主任：昭和大学内科小峰光博教授）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。これまでに、再生不良性貧血(17 例)、pure red cell anemia (6 例)、myelodysplastic syndrome (MDS) (46 例)、溶