

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溶液中で、Proteinase Kにより細胞を溶解し、完全に溶解したことを確認して、フェノールを用いた除蛋白を行い、エタノール沈殿により精製した。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、同様にエタノール沈殿を経て精製した。

PCRによる解析：VZV, EBV, HCMV, HHV6, HHV7のヘルペス群ウイルス、B19ウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、のウイルスゲノムを検出するPCR解析を行った。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した。

抗HHV8ウイルス抗体価：国立感染症研究所感染病理部の片野晴隆博士により開発された4種類のHHV8蛋白(K8,1,ORF59, ORF65, ORF73)を抗原として使用するELISA法(Katano et al. 2000)を用いて、血清中の抗HHV8抗体の測定を行った。

抗バベシア抗体の有無：Babesia microtiの感染細胞を用いて、間接蛍光抗体法により血清中の抗Babesia抗体の有無を検討した。血清を20倍に希釈し、37度Cにて30分間反応させ、FITC標識抗ヒト免疫グロブリンと反応させ、蛍光顕微鏡下で観察し、判定した。

C. 研究結果

1. B19 ウイルス

B19ウイルスゲノムの3'端を増幅するsingle PCRを用いた解析の結果、現在までに、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ているが、今年度の新たな陽性例は認められていない。このsingle PCRの検出感度は10-100 copies/tubeである。また、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

T801/T935のプライマーを使用してTTVのウイルスゲノムを検索してきたが、4例のAAならびに2例のPRCA、5例のMDSの末梢血・骨髄組織が陽性となっている。このうち、5例において増幅産物の塩基配列を解析したところ、それぞれの塩基配列は異なっている。ウイルスゲノムの定量で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コピーと非常に高かった。現在、血清抗体を検出するための抗原ならびに、組織内のウイルス抗原を検出するための抗体を準備中である。

3. EBV

EBVのウイルスゲノムは現在までにAAの2例とMDSの2例に検出しており、定量感度以下のコピー数であった。

4. HHV6

HHV6はAAの2例が陽性となっている。定量的PCRでは定量感度以下であった。AAの症例のみに検出されたことより、検体よりRNAを抽出し、前初期遺伝子U90(IEA/exon 3)ならびに後期遺伝子U57(major capsid protein)の転写産物の有無についてRT-PCRを用いて検討した。しかし、陽性例はなかった。

5. HHV7

陽性例は認められなかった。対照においた

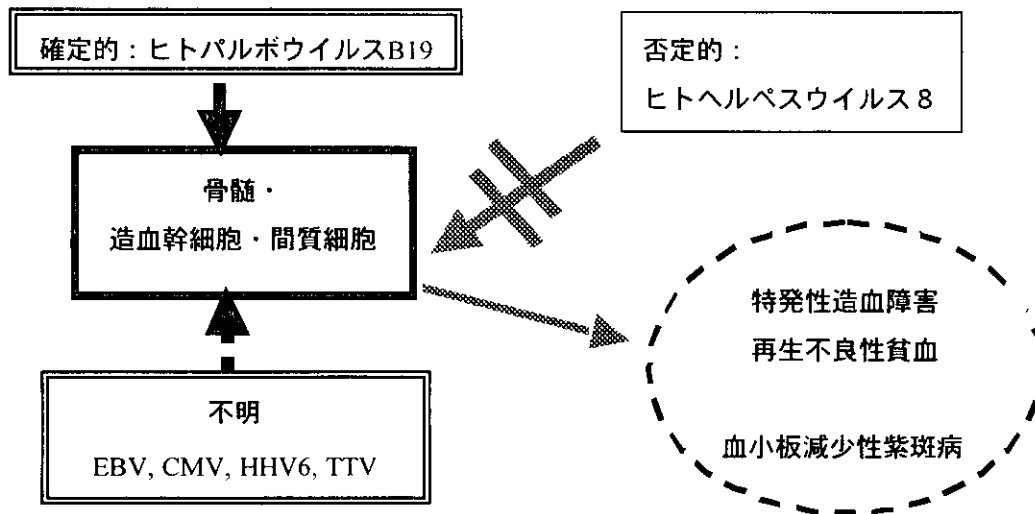


図 特発性造血障害の発症・臨床経過に關与する病原

突発性発疹例の末梢血単核細胞は、一部の例で陽性であった。

6. 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、血清学的に抗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、対照としたKaposi肉腫の患者血清中には有意の抗体価の上昇が確認されている。

7. 未知のウイルス

PCRを利用したサブトラクションでは、ヒトゲノム由来の断片、 β -globin、 γ -globin、 β 2-microglobulin、ribosomal protein等が検出されたが、病原体由来と推定される遺伝子断片は検出できていない。

D. 考察

特発性造血障害の罹患者の臨床検体39例において、B19ウイルスが7例、TTVが13例、EBVが2例、HHV6が2例陽性となっている。また、文献的にはHCMVが検出された報告もある。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%以上の成人がなんならかの型の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ようになる。

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. 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, 109-119, 2001
2. Ando Y, Iwasaki T, Terao K, Nishimura H, Tamura S: Conjunctivitis following accidental exposure to influenza B virus/Shangdong/07/97. *J Infect* 42: 223-224, 2001.
3. 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* 19: 1652-1660, 2001.
4. 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* 19: 2071-2079, 2001
5. 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* 19: 3201-3208, 2001

6. Yoshikawa T, Ihira M, Suzuki K, Suga K, Kito H, Iwasaki T, Kurata T, Tanaka T, Saito Y, Asano Y: Fatal acute myocarditis in an infant with human herpesvirus 6 infection. *J Clin Pathol*. 54(10): 792-5, 2001
7. Inagaki-Ohara K, Iwasaki T, Watanabe D, Kurata T, Nishiyama Y: Effect of the deletion of US2 and US3 from herpes simplex virus type 2 on immune responses in the murine vagina following intravaginal infection. *Vaccine* 20 (1-2): 98-104, 2001
8. Ando Y, Terao K, Narita M, Suzuki S, Oguchi Y, Kojima A, Sata T, Kurata T, Iwasaki T: Quantitation of cytomegalovirus (CMV) genome in aqueous humor of patients with CMVretinitis *Jap J Ophthalmology* (in press)
9. Hasegawa H, Kadowaki S, Watanabe I, Aizawa H, Takahashi H, Iwasaki T, Tamura S, Kurata T, Sata T: Persistent infection of influenza virus in irradiated mice and its prevention by intranasal vaccination. *Vaccine*, 20:1050-7, 2002
10. Nagata N, Shimizu H, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Miyamura T, Sata T, Iwasaki T: Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of cynomolgus monkeys with enterovirus 71. *J Med Virol* (in press)

H. 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との 関連性に関する研究

分担研究者 生田 和良（大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫分野教授）

研究要旨 ボルナ病ウイルス（BDV）は、ウマやヒツジに脳炎を引き起こす。ヒトにおいては、特に精神疾患との関連性が疫学的研究から示唆されている。私たちは、「神経変性疾患」のひとつであるパーキンソン病との関連性について検討を行ってきた。その結果、パーキンソン病患者由来剖検脳内における BDV 遺伝子が高率に検出できること、また、培養細胞やモデル動物への BDV 実験感染により、BDV に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と考えられた。

A. 研究目的

ボルナ病は、ウマに脳膜脳脊髄炎をもたらす疾患である。歩行不全、知覚過敏などの神経症状を呈し、しばしば死に至る。この疾患はボルナ病ウイルス（Borna Disease Virus; BDV）の中樞神経系への感染が原因で引き起こされる。BDV は、ウマの他にヒツジ、ウシ、ネコ、イヌ、ダチョウなどの動物にも自然感染しており、その多くは不顕性感染である。ウマやヒツジにおける脳炎発症の原因は、急激な炎症による神経細胞の破壊であると考えられている。さらに、自然感染例（ウマの運動器障害など）や実験感染例（ラットやスナネズミへの感染）により、BDV の持続感染が原因となって神経細胞の機能障害が引き起こされることが示唆されている。

1985 年にドイツ・ギーゼン大学の Rott らにより、精神分裂病患者の脳脊髄液中に BDV に対する抗体が存在することが報告され、BDV がヒトにも病原性を持つ可能性が初めて示唆された。その後、他のグループによっても、精神分裂病やうつ病患者が高率に抗 BDV 抗体を有するという報告が相次ぎ、BDV と内因性精神疾患との関連性が注目されるようになった。さらに、精神分裂病やその他の神経精神疾患患者の剖検脳における

BDV の同定ならびに分離も行われている。しかし、健常者の末梢血においても抗 BDV 抗体ならびに BDV 遺伝子が検出されることから、BDV 感染と特定の神経精神疾患との関連性については未だ明らかにされていない。

一方、「神経変性疾患」であるパーキンソン病は原因不明の、典型的な運動器障害を引き起こす神経変性疾患である。中脳黒質内のドパミンニューロンのアポトーシスが原因と考えられている。遺伝的な背景（若年性パーキンソン病など）とともに、環境因子（神経毒 MPTP やウイルス感染、たとえばインフルエンザウイルスや日本脳炎ウイルスなど）との関連性が検討されてきた。しかし、いずれの場合においても、明確な関連性は未だ明らかにされていない。

私たちは、パーキンソン病と BDV との関連性を明らかにするため、パーキンソン病患者の神経変性部位である黒質内の BDV RNA の検出を RT-PCR および in situ hybridization を行い、高率に検出できることを確認した。そこで、この BDV 感染が引き起こす脳内分子病態機序について培養細胞およびモデル動物を用いて明らかにしようとしている。これまでに、BDV p24（リン酸化蛋白）が、神経突起伸長因子（amphoterin; HMG-1）との結合性を示すことを明らかにし、

実際、BDV 持続感染細胞は非感染細胞に比べ、神経突起伸長能が明らかな低下を引き起こしていることを報告した。本年度は、この BDV p24 の及ぼす amphoterin 機能への影響について in vitro および in vivo で検討した。さらに、BDV 感染による神経系細胞のアポトーシス誘導能についても検討した。

B. 研究方法

1) BDV p24 蛋白と amphoterin との結合部位
大腸菌もしくはバキュロウイルスベクターを用いて組換え BDV p24 蛋白および amphoterin を発現させた。それぞれの蛋白の部分欠損体を数種類作成し、それらの結合能を Far-Western blot 法あるいは mammalian two-hybrid 法を用いて同定を行った。

2) BDV p24 蛋白による p53/amphoterin の転写活性化機能の抑制

amphoterin は核内で p53 と結合し、Cyclin G1 や Bax など、プロモーターに p53 結合領域を持つ遺伝子の転写を促進している。そこで、BDV p24 蛋白による、amphoterin と p53 によるプロモーターの転写活性化能への影響を検討するために、Cyclin G1 のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を結合させたりポータープラスミドと p53 欠損細胞である H1299 細胞を用いて解析を行った。

3) BDV 持続感染のストレス応答への影響

BDV が持続感染している C6、ヒト由来オリゴデンドログリオーマ (OL) 細胞ならびにイヌ腎由来 (MDCK) 細胞を用いて、これら細胞の、各種ストレス (温度、UV、血清除去、薬剤など) 条件下における生存率ならびに形態の変化について経時的に観察を行った。また、ラットを用いて、BDV 持続感染後のストレス刺激の影響を検討するために、LPS 投与を行い、amphoterin およびそのレセプターである receptor for advanced glycation end-products (RAGE) の発現程度を検討した。

4) BDV-p24 遺伝子トランスジェニックマウスの解析

BDV の p24 遺伝子をコードしている cDNA をグリア細胞特異的蛋白 (glial fibrillary acidic protein: [GFAP]) をプロモーターとしたベクターに挿入し、定法に従い p24 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作成した。確立された数系統について、その週齢を追って脳内での p24 蛋白、シナプス特異的蛋白 (synaptophysin) ならびに脳由来神経栄養因子 (BDNF) の発現を免疫染色もしくは in situ hybridization により観察した。また、トランスジェニックマウスの神経症状を、オープンフィールド装置を用いた自発運動、モリスの水迷路を用いた学習能力ならびにオスの同居法による攻撃性の解析により判定を行った。

C&D. 研究結果及び考察

1) BDV p24 と amphoterin 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

BDV p24 蛋白の 201 アミノ酸配列中、77 番目から 86 番目までのアミノ酸 (KLVTELAENS) を欠損している変異体で amphoterin と結合能力が欠如していることが明らかとなり、この部位が amphoterin との結合に重要な役割を果たしていると考えられた。また、amphoterin との結合能が欠損している p24 部分欠損体について、その神経突起伸長能の阻害能力を C6 細胞を用いて解析を行った結果、この欠損体では突起伸長阻害能も欠落していることが判明した (図 1A)。一方、amphoterin はその構造上に、アミノ酸配列の機能的モチーフとして A box と B box と呼ばれる部位が存在している。われわれの解析の結果、BDV p24 蛋白は amphoterin 構造の A box の部位と特異的結合をすることが明らかとなった。興味深いことに、amphoterin の A box には癌抑制蛋白である p53 が結合する。p53 は、細胞内でアポトーシス、DNA 修復や細胞周期の調節など様々な役割を果たす蛋白のプロモーターの転写活性化機能を担っているが、

amphoterin と結合することによりさらに促進されることも明らかとなっている。そこで、p24 と amphoterin との結合が p53 のプロモーターへの転写活性化能を競合阻害するかどうかを確認した。その結果、p53 ならびに amphoterin を導入した細胞では Cyclin G1 のプロモーターの活性を、p53 単独の場合に比べ約 10 倍程度までに活性化した。それに対し、p24 を同時に導入した細胞では amphoterin による p53 の転写活性化能の促進が抑制された (図 1B)。この結果より、BDV p24 と amphoterin との結合は、細胞内で p53 と競合を引き起こし、p53 によるプロモーターの転写活性化能が抑制されていると考えられた。このように、BDV p24 が p53 と amphoterin との結合を競合阻害し、p53 による転写活性化能を低下させることは、BDV の持続感染により細胞の様々な活動に影響を与えている可能性を示している。

2) BDV 持続感染のストレス応答への影響

BDV の持続感染が細胞の生存維持能力ならびに形態の変化に与える影響を観察するために、BDV 持続感染細胞ならびに非感染細胞に各種ストレスを与えた。通常の培養条件下ではいずれの持続感染細胞の非感染細胞とその形態ならびに増殖能力は変わらない。このような細胞へ温度 (40℃ から 44℃ で 30 分処理)、UV 処理 1 分、もしくは血清除去などのストレスを与えた。BDV 持続感染細胞では高温処理ならびに UV 処理直後より、非感染細胞と比較して顕著な細胞突起の退縮とそれに伴う円形化が認められた。また、時間経過に伴うアポトーシス誘導率も持続感染細胞で顕著に高く観察された (図 2A、2B)。さらに、血清除去によっても、持続感染細胞では時間の経過に伴い細胞同士の集塊が観察され、アポトーシス誘導率の上昇が認められた。形態的な変化によって、細胞間同士の接着もしくはプレートへの付着の能力が著しく低下している可能性が考えられるが、これら性質は、神経突起伸長能と同様に amphoterin を介する細胞内シグナルによって制御されていることが明らかにされており、BDV 感染による amphoterin の機能阻害の結果であると考えられた。

一方、BDV に持続感染したラットへのストレス刺激 (LPS 投与) の影響を検討した。新生仔ラットへの BDV 感染は、脳内炎症反応が乏しいにもかかわらず、小脳低形成や海馬神経細胞の変性が認められ、行動異常が観察される。amphoterin は、そのレセプターである RAGE へ反応することにより、脳成熟、神経回路網の形成とともに、神経細胞の生存維持に関与していることが報告されている。amphoterin は、生後 3 週目まで脳内での発現が認められ、その後は検出できないレベルにまで低下する。一方、RAGE の発現は 12 週目においても検出でき、大きな低下は認められなかった。そこで、生後 24 時間以内に BDV を接種し、持続感染が成立したラットで検討したところ、8 週目においても amphoterin の発現が高いレベルを維持していること、しかし RAGE の発現は大きく低下していることが明らかになった (図 2C)。そこで、非感染および BDV 持続感染ラットの 8 週目に LPS 投与を行った。非感染では IL-1 β の亢進とともに amphoterin 発現が亢進し、逆に RAGE 発現は低下した。一方、BDV 持続感染では両方が亢進した。LPS 投与により、非感染ラットでは症状が出現しなかったが、BDV 持続感染ラットでは神経症状 (脚麻痺) が出現した。これらの結果は、BDV の持続感染は、神経細胞の生存維持や脆弱性に影響を与えており、この影響は amphoterin-RAGE を介した調節機構の破綻に由来していると考えられた。

3) BDV p24 遺伝子トランスジェニックマウスの解析

BDV の p24 遺伝子の cDNA を GFAP をプロモーターとする導入ベクターにクローニングし、p24 遺伝子を脳内のグリア細胞のみに発現させるトランスジェニックマウスを作成した (図 3A)。確立された幾つかの系統の中で、GFAP20 系統はその胎生期よりグリア細胞の核に p24 蛋白を発現していることが免疫組織染色で確かめられた。一方、GFAP4 系統では、p24 蛋白の発現は高週齢 (生後 3 ヶ月以降) になるまで観察されなかった。さらに、GFAP20 は週齢を追うに従い脳内での p24 蛋白のシグナルが強くなり、特に 30 週齢を超えた

時点より海馬の神経網に p24 蛋白の蓄積した像が現れるようになってきた (図 3B)。これらトランスジェニックマウスの表現系の観察を行ったところ、顕著な自発運動の差は認められなかったが、GFAP20 の系統では明らかな学習能力の低下、顕著な攻撃性の上昇 (攻撃回数、攻撃までの時間) が観察された (図 3C)。以上の結果より、脳内で p24 蛋白を高発現し、海馬の神経網にその蓄積が認められた GFAP20 の系統では明らかな神経症状を示していることが証明された。また、GFAP20 では、脳内での BDNF ならびに synaptophysin の発現が加齢に伴い顕著に低下していた (図 3D、3E、3F)。以上の観察により、BDV p24 蛋白のグリア細胞内での発現のみで神経症状を誘発できることが証明された。また、加齢に伴う神経症状の発現は海馬神経網での p24 の蓄積と相関していると考えられ、グリア細胞における異常蛋白の蓄積が神経細胞の機能にも障害 (シナプス数の減少や BDNF の発現低下) を引き起こす証明でもあると考えられた。また、GFAP20 における神経症状は海馬における BDNF の減少と相関していると思われた。これらの結果は、BDV の持続感染に伴う p24 蛋白の蓄積が、中枢神経系障害性を引き起こすことを示しており、BDV の神経病原性とその詳細なメカニズムを検証する上で極めて有用なモデルになると考えられた。

E 結論

BDV の持続感染によって神経細胞の生存維持能力が明らかに低下していること、また p24 蛋白の脳内での発現のみで神経症状が誘発されることが確認された。

F. 健康危険情報

なし

G 研究発表

1. 論文発表

(原著論文)

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.* 75:3404-3412, 2001.
2. Watanabe, M., Lee, B.J., Kamitani, W., Kobayashi, T., Taniyama, H., Tomonaga, K. and Ikuta, K.: Neurological diseases and viral dynamics in the brains of neonatally Borna disease virus-infected gerbils. *Virology* 282:65-76, 2001.
3. Hagiwara, K., Asakawa, M., Liao, L., Jiang, W., Yan, S., Chai, J., Oku, Y., Ikuta, K. and Ito, M.: Seroprevalence of Borna disease virus in domestic animals in Xinjiang, China. *Vet. Microbiol.* 80:383-389, 2001.
4. Taniyama, H., Okamoto, M., Hirayama, K., Hagiwara, K., Kirisawa, R., Kamitani, W., Tsunoda, N. and Ikuta, K.: Equine Borna disease in Japan. *Vet. Rec.* 148:480-482, 2001.
5. Kamitani, W., Shoya, Y., Kobayashi, T., Watanabe, M., Lee, B.J., Zhang, G., Tomonaga, K. and Ikuta, K.: Borna disease virus phosphoprotein binds a neurite outgrowth factor, amphoterin/HMG-1. *J. Virol.* 75:8742-8751, 2001.
6. Ouchi, A., Kishi, M., Kobayashi, T., Lai, P.K., Malik, T.H., Ikuta, K. and Mochizuki, M.: Prevalence of circulating antibodies to p10, a non-structural protein of the Borna disease virus in cats with ataxia. *J. Vet. Med. Sci.* 63:1279-1285, 2001.
7. 松永秀典、西野佳以、林宏恵、小林剛、朝長啓造、笹尾芙蓉子、生田和良: 抗ボルナ病ウイルス抗体を認めた4例の臨床的検討. *脳と精神の医学.* 12:139-147, 2001.
8. Okamoto, M., Furuoka, H., Hagiwara,

K., Kamitani, W., Kirisawa, R., Ikuta, K. and Taniyama, H.: Borna disease in a cattle in Japan. *Vet. Rec.* in press.

9. Okamoto, M., Kagawa, Y., Hagiwara, K., Kirisawa, R., Kamitani, W., Ikuta, K. and Taniyama, H.: Borna Disease in a Dog in Japan. *J. Comp. Pathol.*, in press.
10. Ibrahim, M.S., Watanabe, M., Palacios, J.A., Kamitani, W., Komoto, S., Kobayashi, T., Tomonaga, K. and Ikuta, K.: Varied persistent life cycles of Borna disease virus in a human oligodendroglioma cell line. *J. Virol.* 76, 3873-3880, 2002.

(レビュー等)

1. 朝長啓造、小林剛、生田和良：中枢神経系におけるボルナ病ウイルス研究の進歩。日本臨床。59：1605-1613, 2001.
2. マディハ S. イブラヒム、小林剛、朝長啓造、生田和良：ウイルス感染と疲労—「疲労の分子科学」眠らない社会への警告—(井上正康、倉恒弘彦、渡邊恭良 編)。講談社。31-36, 2001.
3. 松永秀典、朝長啓造、生田和良。精神神経疾患とボルナ病ウイルス。脳の科学、(印刷中)。
4. Ikuta, K., Ibrahim, M. S., Kobayashi, T. and Tomonaga, K.: Borna disease virus and infection in humans. In P. K. Lai (ed.). *Front. Biosci.* 7:D470-D495, 2002.
5. Tomonaga, K., Kobayashi, T. and Ikuta, K.: Molecular and cell biology of Borna disease virus infection. *Microbes Infect.*, in press.
6. Ikuta, K., Hagiwara, K., Taniyama, H. and Nowotny, N.: Epidemiology and infection of natural animal hosts. In K. M. Carbone (ed.), *Borna disease virus: Role in neurobehavioral disease*. ASM Press, Washington DC., in press.
7. 長啓造、生田和良：スナネズミの加齢に伴うボルナ病ウイルスに対する感受性の変化。第131回日本獣医学会。2001.
8. 松永秀典、西野佳以、笹尾芙蓉子、朝長啓造、小林剛、生田和良：精神疾患における抗ボルナ病ウイルス抗体陽性例の臨床的検討。第97回日本精神神経学会総会。2001.
9. 松永秀典、笹尾芙蓉子、小林剛、呂国棟、朝長啓造、生田和良：精神疾患におけるボルナ病ウイルス感染の臨床的検討。第6回日本神経感染症研究会学術集会。2001.
10. 朝長啓造、渡辺真紀子、山下真紀子、李丙載、神谷亘、生田和良：BDV感染スナネズミの病態における宿主免疫反応の関与。第49回日本ウイルス学会学術集会。2001.
11. 小林剛、張国旗、呂国棟、神谷亘、渡辺真紀子、朝長啓造、生田和良：ボルナ病ウイルスp10蛋白質の核外輸送。第49回日本ウイルス学会学術集会。2001.
12. 張国旗、小林剛、神谷亘、河本聡志、呂国棟、山下真紀子、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長因子amphoterinとの結合領域の同定。第49回日本ウイルス学会学術集会。2001.
13. Madiha S. Ibrahim, Takeshi Kobayashi, Keizo Tomonaga, and Kazuyoshi Ikuta: Varied persistent life cycles for Borna disease virus in a human oligodendroglioma cell line. 第49回日本ウイルス学会学術集会。2001.
14. 李丙載、渡辺真紀子、神谷亘、山下真紀子、小林剛、朝長啓造、生田和良：ラットおよびスナネズミ脳内におけるボルナ病ウイルスの持続感染状態の解析。第49回日本ウイルス学会学術集会。2001.
15. 呂国棟、小林剛、馬場聡子、松永秀典、笹尾芙蓉子、渡辺真紀子、神谷亘、柚木幹弘、朝長啓造、生田和良：ボルナ病ウイルス検出のための高感度single-step RT-PCR ELISA法の確立。第49回日本ウイルス学会学術集会。2001.
16. 山下真紀子、神谷亘、小林剛、朝長啓造、生田和良：ボルナ病ウイルス持続感染：細胞の形態ならびに生存維持能力に与える影響の解析。第49回日本ウイルス学会学術集会。2001.
17. 朝長啓造：ワークショップ：「ボルナ病ウイルス」多様な自然宿主と中枢神経病態。第49回日本ウイルス学会学術集会。2001.

2. 学会発表

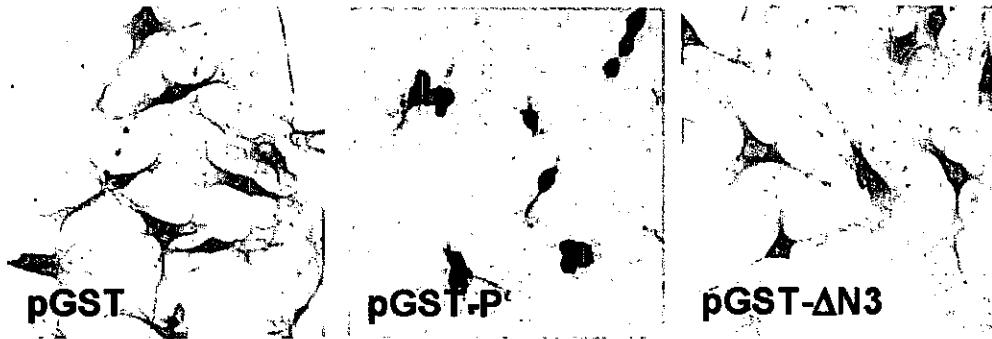
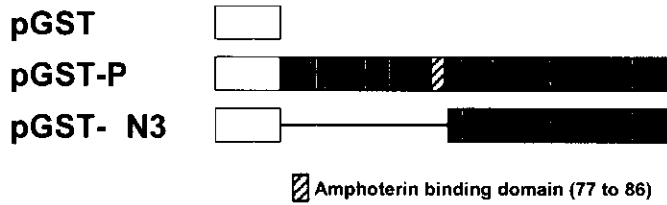
1. 小林剛、張国旗、呂国棟、李丙載、神谷亘、渡辺真紀子、朝長啓造、生田和良：ボルナ病ウイルスp10 (X) タンパク質の核外輸送機構。第131回日本獣医学会。2001.
2. 李丙載、渡辺真紀子、神谷亘、小林剛、朝

13. 生田和良：シンポジウム：ボルナ病ウイルスの持続感染と中枢神経系病態. 第5回日本神経ウイルス研究会集会, 2001.

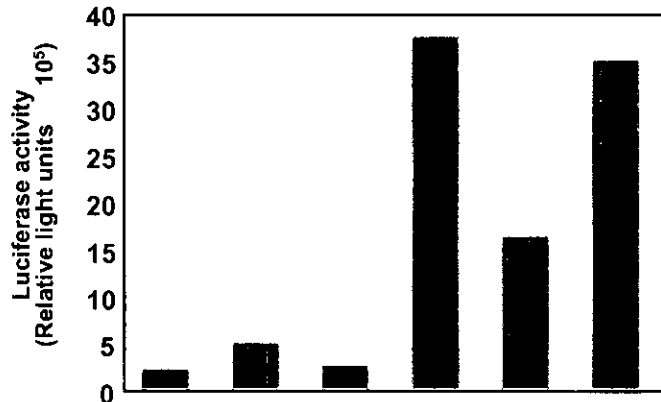
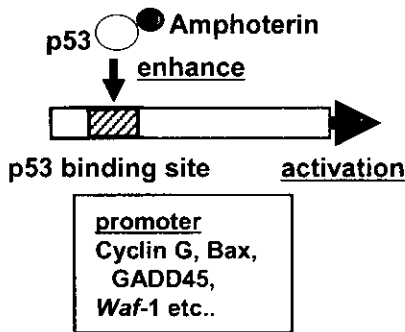
H. 知的所有権の取得状況

なし

A



B



Cyclin G promoter-luc.	+	+	+	+	+	+
p53	-	+	-	+	+	+
Amphoterin	-	-	+	+	+	+
p24	-	-	-	-	+	-
p40	-	-	-	-	-	+

図1 BDV p24とAmphoterinとの結合領域の同定とp24によるAmphoterinを介するp53の転写活性の抑制
 A: ラミニンで処理したC6細胞に、GST蛋白質 (pGST)、GST融合p24蛋白質 (pGST-P) およびAmphoterin結合領域 (アミノ酸領域 77~86アミノ酸残基) を欠損した変異体 (pGST-Δ3) で処理し、3時間後、その神経突起伸長における効果について検討した。その結果、野生型p24は顕著に神経突起伸長を抑制していたのに対し、Amphoterin結合領域欠損変異体はGST蛋白質と同様に神経突起伸長の抑制は認められなかった。
 B: BDV p24蛋白質はAmphoterinおよびp53の結合を競合的に阻害することから、p24蛋白質のp53転写活性に及ぼす影響を検討した。p53結合領域を含むプロモータの下流にルシフェラーゼ遺伝子を含むレポータープラスミド (Cyclin G promoter-luc.)、p53発現プラスミド、Amphoterin発現プラスミド、p24発現プラスミドをp53欠損株化細胞H1299にコトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、p53およびAmphoterinを共発現させた場合はp53単独の発現に比べ、明らかな活性の上昇が認められた。しかし、p24蛋白質の存在下ではAmphoterinを介するp53の転写活性は明らかに抑制された。

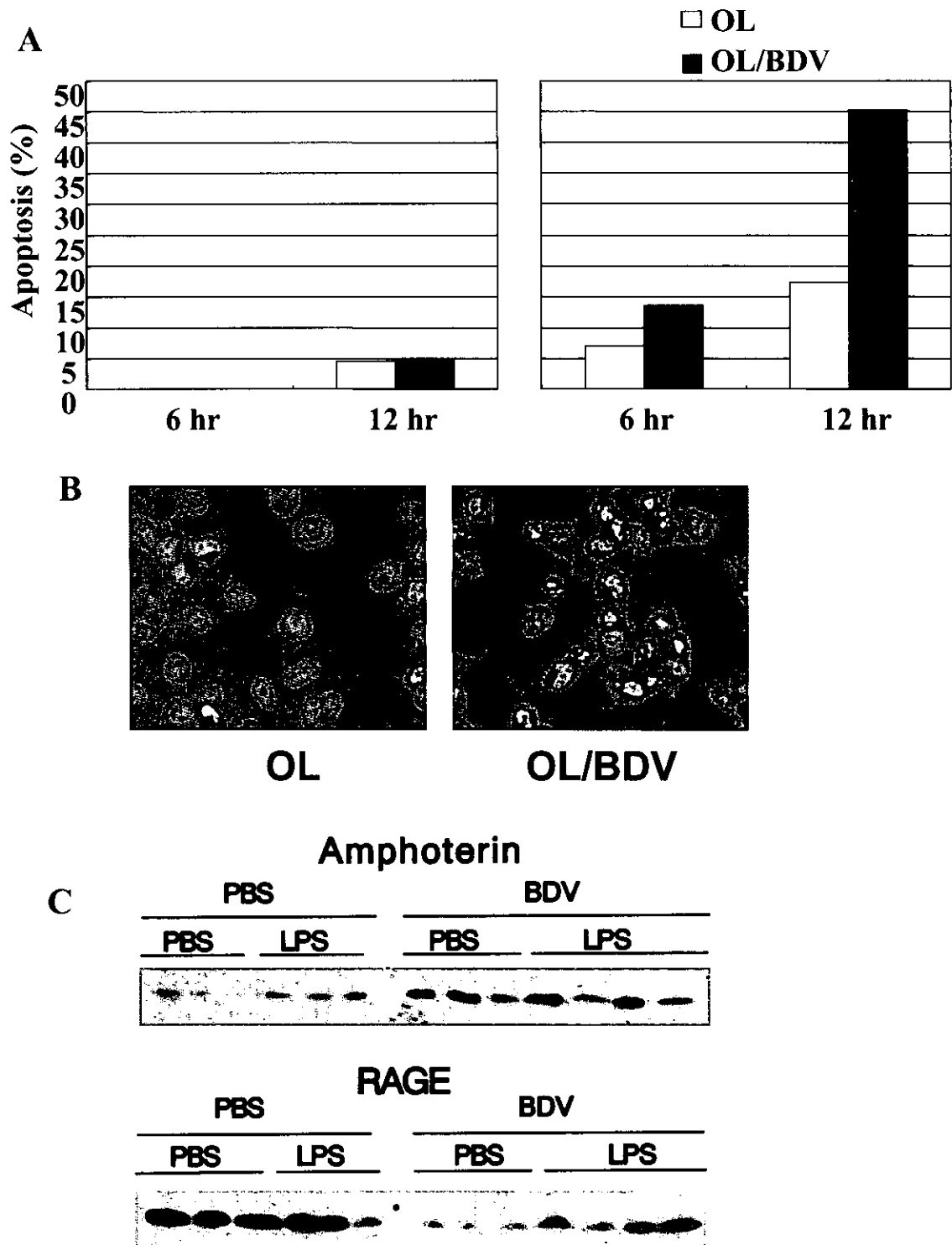


図2 BDV持続感染とストレス応答

A: 非感染OL細胞およびBDV持続感染OL細胞 (OL/BDV)をUVで1分間照射後の6時間および12時間培養した後アポトーシス誘導率を比較した。その結果、BDV持続感染細胞はアポトーシスを高率に誘導した。

B: Aの12時間目の細胞をnuclear dye Hoechst 33342で染色したアポトーシス像。

C: 偽 (PBS) 感染またはBDV感染した新生仔ラット (それぞれ3匹づつ) の8週目にLPS投与 (対照はPBS投与) を行ったところ、BDV接種したラットにおいて神経症状が認められた。偽感染ラットでは8週目ではAmphoterin発現 (Western blot hybridization)は低下しており、LPS投与により亢進した。RAGEの発現 (Western blot hybridization)は高く、LPS投与で大きな変化は認められなかった。一方、BDVに持続感染したラットでは、Amphoterinの発現は8週目においても高いレベルが維持されており、逆にRAGEの発現は低下していた。この状態のラットにLPS投与を行った結果、Amphoterinはやや低下し、RAGEはやや亢進した。

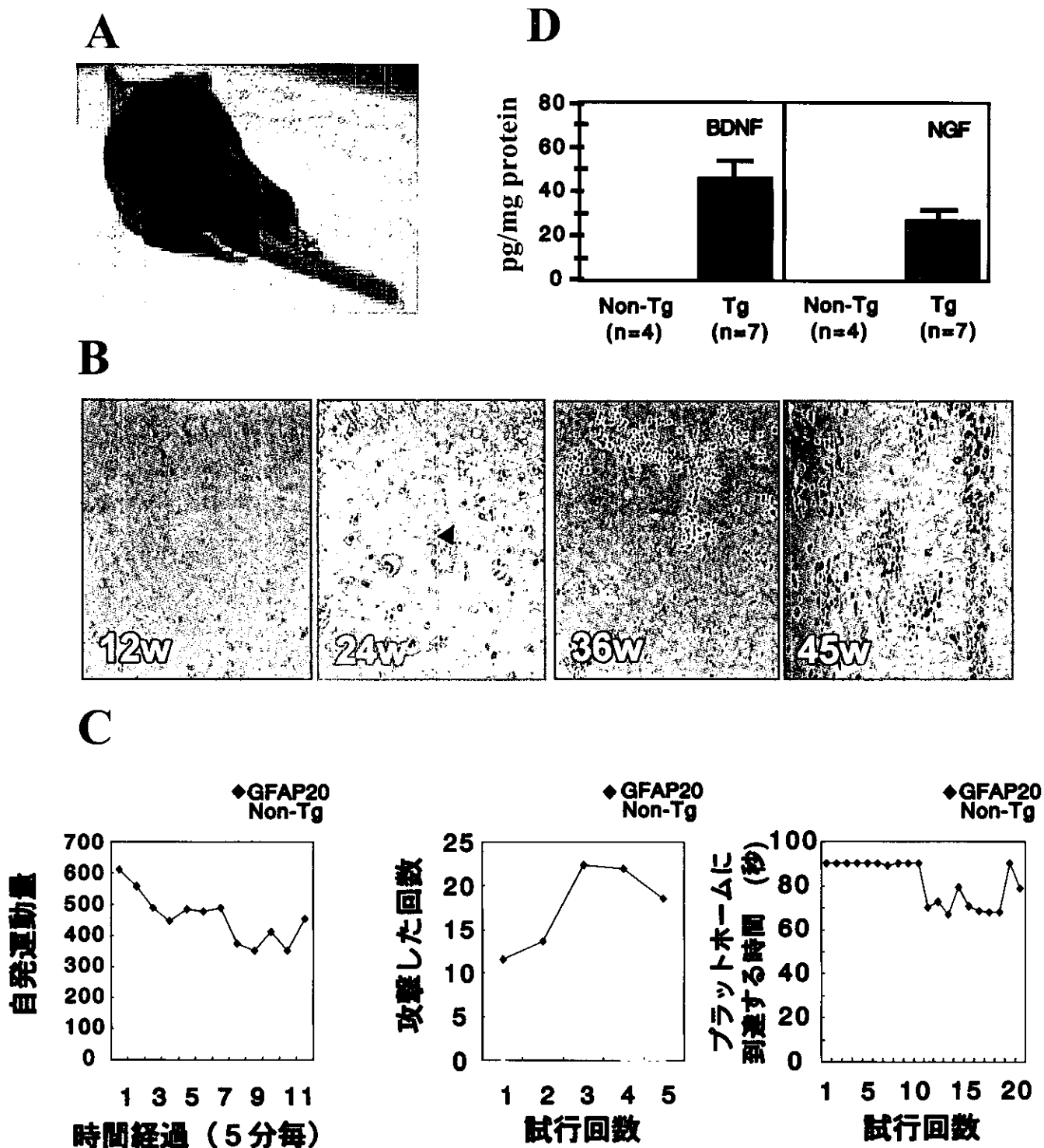


図3 BDV p24リン酸化蛋白を脳内で発現するトランスジェニックマウス

A: 得られたトランスジェニック (GFAP20) は神経症状を示した。

B: GFAP20マウスは30週齢から海馬神経網でp24発現がimmunohistochemistryにより観察された。

C: GFAPマウスは自発運動 (左) には変化が認められず、攻撃性の亢進 (中) や学習能力の低下 (右) が観察された。

D: GFAP20マウスは、BDNFの低下がELISA定量により認められた。

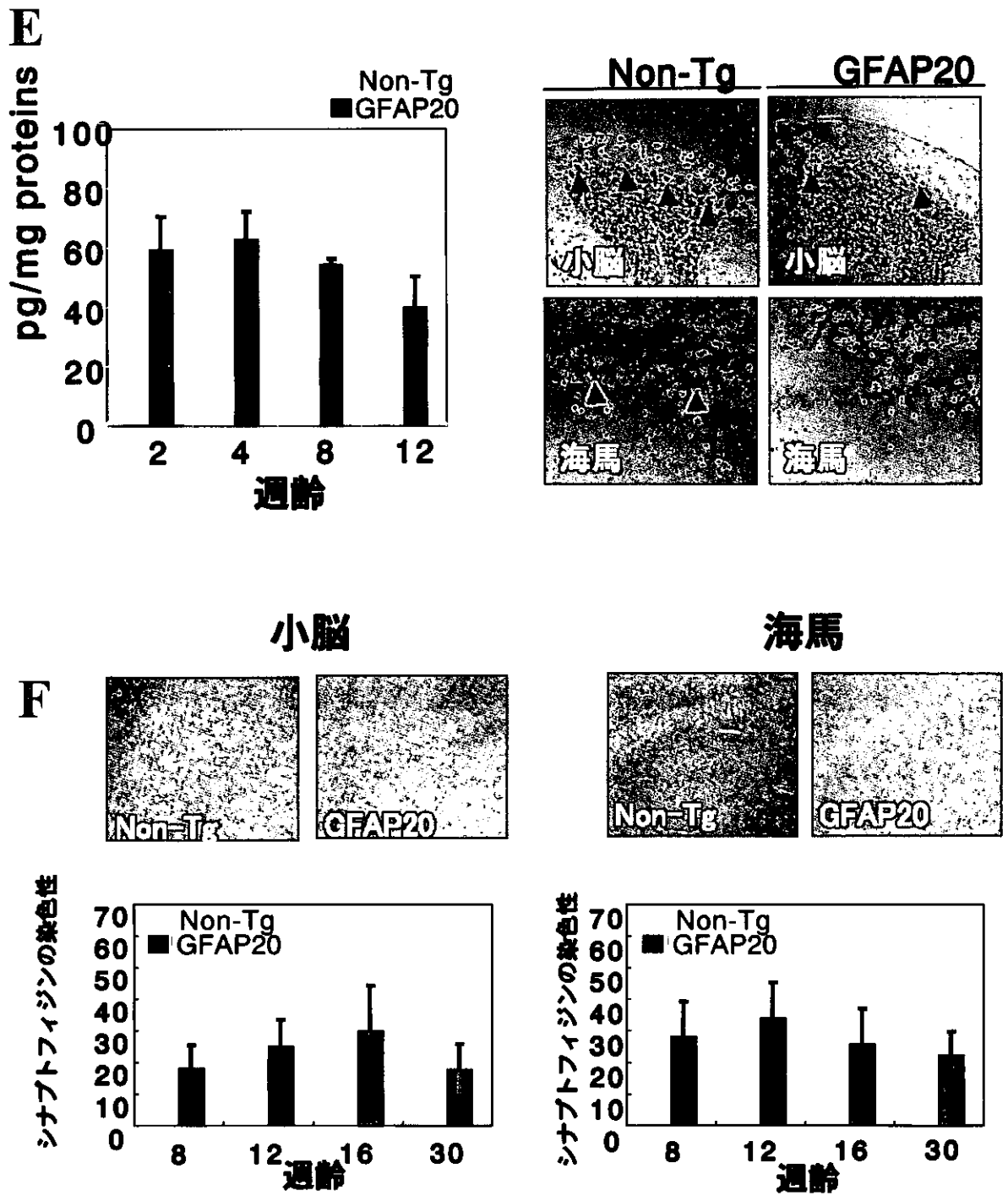


図3 BDV p24リン酸化蛋白を脳内で発現するトランスジェニックマウス

E: Dの低下は、マウスの加齢とともに低下し(左)、Immunohistochemistryにより小脳や海馬での発現においてもBDNFの低下が確認された。

F: GFAP20マウスは、小脳や海馬でのsynaptophysin染色率(上)が顕著に低下しており、加齢とともに徐々に低下すること(下)が明らかになった。

4. 多発性硬化症の微生物学的原因究明に関する研究

分担研究者 高橋 和郎（福島県立医科大学微生物学講座助教授）

研究要旨 多発性硬化症（MS）の発症にヒトヘルペスウイルス 6（HHV-6）あるいは Chlamydia pneumoniae（C.p）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多数検索したが、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。

A. 研究目的

多発性硬化症（MS）の発症に微生物感染が関与するとの作業仮説のもとに、その起因微生物を同定することを目的とする。具体的には、MS の発症に関連すると報告されている HHV-6 と C.p との関連を検討すること、および MS 患者の髄液および脊髄中に起因微生物が存在すると仮定し、サブトラクション法を用いて非ヒト遺伝子の検索、同定を目的とした。

B. 研究方法

1. 検体

MS 患者 14 例の髄液および血液（福島医大神経内科、山本悌二教授、東北大学神経内科、糸山泰人教授および浜松医大、森則夫教授より分与）、MS 患者 2 例の死後の凍結胸髄病変部組織（新潟大学、脳研、高橋均教授より分与）、非 MS 患者 2 例の死後の同部位（拡張型心筋症、心筋梗塞、北大病理 長嶋和郎教授より分与）

（倫理面への配慮）

生存患者検体の採取にあたっては十分な説明による同意を得た。検体採取は通常の検査時に行い、本研究のための新たな採取は行わず、不利益や危険性は増さない。死後の胸髄

の検体採取にあたっては遺族から十分な説明による同意を得た。

2. 方法

(1) Polymerase chain reaction (PCR) 法による髄液と脊髄における HHV-6 と C.p の DNA の検出

MS 患者髄液 1 ml および脊髄約 5 mm 角を Proteinase K で加水分解し、定法通りに全 DNA および RNA を抽出した。PCR に用いたプライマーは、HHV-6 の immediate early 遺伝子および C.p. の主要外膜蛋白遺伝子の配列を用い、nested PCR 法により検索した。（それぞれ、岡本、Sriram らの方法に準拠した。）増幅は 92℃ 1 分、60℃ 1 分、75℃ 1 分のサイクルを 40 回行った。Nested PCR では初回 PCR 産物を 1 μl 用い、同じ増幅条件で PCR を行った。増幅された PCR 産物は特異的遺伝子をプローブとして用い、サザンブロットで特異性を確認した。

(2) MS 患者髄液と血清における HHV-6 と C.p に対する抗体価の測定

HHV-6 に対する抗体価は間接蛍光抗体法により検討した。すなわち、HHV-6 HST 株を MT-4 細胞に感染させ、スライドグラスに固定し抗原とした。段階希釈し

た髄液あるいは血清を反応させた後、蛍光ラベルした抗ヒト IgG 抗体を、IgM の検出には抗ヒト IgM 抗体を反応させ、蛍光顕微鏡で判定した。蛍光陽性シグナルを示す最大希釈倍率の逆数を抗体価とした。IgM の検出には、検体をあらかじめプロテインGで処理し、IgG を吸収して行った。抗 C.p.抗体の測定は、精製された基本小体を抗原に用いて、ELISA 法により行った（感染研、岸本寿男室長に依頼）。

(3) 髄液からの C.p.の分離

髄液からの C.p.の分離を Hep-2 細胞を用いて行った。髄液 0.2ml を 24 ウェルプレートに培養した Hep-2 細胞に 2 時間感染させ、MEM で 48 時間培養の後に細胞を剥がし、新たに Hep-2 細胞へ同様に感染させ、48 時間後細胞を固定し Chlamydia 特異蛍光抗体を用いて染色し、抗原の出現の有無を確認した。

(4) サブトラクション法による髄液および脊髄からの非ヒト遺伝子の検索

MS 患者の髄液より全 DNA, RNA を (1) と同様に抽出し、RNA はランダムプライマーを用いて cDNA に変換した(図 1)。制限酵素 Alu I あるいは Sma I で切断して断端を平滑にした後、アダプター (T-リンカー) を結合させ、リンカーの配列のプライマーを用いて PCR で増幅させた (テストターの増幅)。脊髄に関しては、患者 2 名の胸髄から同様に全 DNA, RNA を抽出し、上記と同様にテストターを準備した。一方、健常人の末梢血単核球および非 MS 患者の正常胸髄より、同様に全 DNA, RNA を抽出、制限酵素で切断後、ピオチンでラベルされたアダプター (D-リンカー) を結合させ、同様に PCR で増幅させた (ドライバーの増幅)。テストターとドライバーを 1:30~100 でハイブリダイズさせ、テストターに含まれるヒト由来遺伝子をドライバーに含まれる同じ遺伝子に結合させ、これをアピジン結合鉄粒子に結合させ除去した。非結合産物を PCR で増幅し、同様にこの操作を 3 回行い、非ヒト遺伝子の濃縮を試みた。得られた PCR 産物を電気泳動し、複数のバンドを回収後、pGEM-T vector にクローニングし、可能

な限りその塩基配列を決定し、遺伝子を同定することを試みた。

C. 研究結果

1. MS 患者における HHV-6 の感染状況

nested PCR 法による HHV-6 の検出感度は 10 コピーを常時検出できるものであった。14 名の患者の髄液および血清、2 例の患者脊髄から、HHV-6 DNA は検出されなかった (表 1)。(検出限界 10 コピー)。血清 HHV-6 IgG 抗体価の平均値は 166 で健常人の 178 と比較して差はなかった。また、特異 IgM 抗体は検出されなかった。髄液中抗 HHV-6 抗体は IgM, IgG とも陰性であった。

2. MS 患者における C.P.の感染状況

nested PCR 法による C.p.の検出感度は 100 コピーを常時検出できるものであった。患者髄液 14 検体および脊髄 2 検体で C.p. DNA は検出されなかった。髄液からのクラミジア分離では、継代を 2 代行ったが全例分離されなかった。血清 C.p.抗体は 14 例中 8 例が感染既往を示し、6 例は陰性であった。既感染を示した 8 例中 1 例 (初発若年発症例) では C.p.IgM 抗体が陽性であった。髄液中では、IgM, IgG 抗体とも陰性であった。

3. サブトラクション法による髄液および脊髄からの非ヒト遺伝子の検索

(1) 初発若年発症患者の髄液からの遺伝子クローニング

表 1 の症例 2 は、11 歳、女兒の初発若年発症患者で、起因微生物の検出の可能性が高いと考え、髄液より遺伝子のクローニングを試みた。上記方法 (4) に準じサブトラクション法を行い、電気泳動すると 400~1300bp に渡り 8 本の主たるバンドを認め、それぞれをゲルから回収し、クローニングした。

78 のクローンの塩基配列を決定し、GeneBank に登録されている遺伝子クローンとの相同性を検討した。その結果、50 のクローンはヒトゲノム由来の遺伝子クローンであり、他の 28 クローンについては、高い相同性のある遺伝子が登録され

ておらず、未知のヒト遺伝子クローンの可能性が高いと考えられ、既知の微生物の遺伝子は検出されなかった。検出されたヒト遺伝子としては

Syntaxin 18 mRNA

Muscle specific enolase 3

Ellis van Creveld syndrome mRNA

CCR2b, CCR2a, CCR5, CCR6 genes

が認められた。

(2) MS 患者の髄液からの非ヒト遺伝子のクローニング

12名のMS患者の髄液より(1)と同様に非ヒト遺伝子のクローニングを試みた。上記方法(4)に準じ、DNAをAlu Iで切断し、同様にサブトラクション法を行い、電気泳動すると約400bpに1本の主たるバンドと500~800bpに2本の細いバンドを認め、それぞれをゲルから回収し、クローニングしたのち塩基配列を決定した。55のクローンの塩基配列を決定し、GeneBankに登録されている遺伝子クローンとの相同性を検討した。その結果、主要な1本のバンドのクローンはヒト染色体由来の1種の塩基配列であった。他の2本からはそれぞれ、5種21クローン、4種16クローンがヒトゲノム由来と判明し、未同定のものは、それぞれ6、2クローン存在した。これらクローンからも既知の微生物の遺伝子は検出されなかった。

(3) MS 患者の脊髄からの非ヒト遺伝子のクローニング

MS患者2名の脊髄からDNAあるいはRNAを抽出し、方法(4)に準じDNAをAlu Iで切断し、同様にサブトラクション法を行い、電気泳動すると約400~800bpに5本のバンドを認め(図1)、それぞれをゲルから回収し、クローニングしたのち、各バンドにつき30~40クローンの塩基配列を決定し、GeneBankに登録されている遺伝子クローンとの相同性を検討した。その結果、各バンドより3~7種の20~30クローンがヒトゲノム由来であり、他のクローンは同定されなかった。これらクローンからも既知の微生物の遺伝子は検出されなかった。

D. 考察

1. HHV-6 と MS との関連性について

Soldan らは36名のMS患者について、血中のHHV-6抗体価および血清中のHHV-6 DNAの有無について検討した。その結果、22名の増悪緩解型の患者の64%で血中抗HHV-6 IgM抗体が陽性であり、健康人や他疾患の患者と比べ有意に陽性率が高いことを示した。慢性型のMS患者ではその陽性率に有意差は認めていない。また、抗IgG抗体価についてはMS群と健康者では差が認められないと報告している。また、MS患者における血清HHV-6 DNAの陽性率は30%で、非MS患者の0%と比べ高率に検出されたとしている。本研究結果では、血清中の抗HHV-6 IgM抗体は全例10倍以下の陰性であり、IgG抗体についても健康人と比べ差は認められなかった。この差の解釈としてIgM測定法の感度の差が考えられるが、一般的に蛍光抗体法の感度は高く、この方法を用いて、突発性発疹の患児でのIgM抗体は全例検出可能であることより、測定法の感度の差は考えにくい。Soldan らはELISA法を用いて測定したが、その測定に当たっては、精製抗原を用いて反応を阻害する特異性の検討を行っておらず、非特異的反応の可能性が考えられる。我々の結果では、血清および髄液中にはHHV-6 DNAは検出されず、Soldan らの結果とは一致しなかった。この理由として、検出方法の違いや測定感度の差が考えられるが、我々のPCR法の感度は10コピーを常に検出できるものであり、測定上十分な感度である。また、検査に用いた血清の量は同じ200 μ lであり、抽出方法にも大きな違いは認められなかった。我々は検出したバンドを特異プローブを用いて、サザンロットで特異性を確認しているが、Soldan らは特異プローブでの確認を行っておらず、非特異的増幅の可能性が残されている。以上より、本研究結果からはHHV-6とMSとの関連性は、血清学的にも、ウイルス学的にも認められないと結論づけられる。

2. C.p.とMSとの関連性について

Sriram らは37名のMS患者について、髄

液中の C.p.DNA の有無について PCR 法で検討した結果、36 名 (97%) とほぼ全例から非常に高率に DNA が検出されたと報告している。また、彼らは 64% の患者の髄液から C.p. が分離され (他の神経疾患では 11%)、86% の患者の髄液中では抗 C.p. 抗体が陽性であることも報告している。同様に、髄液中の C.p.DNA の検出について、Grieffers らは 22% (9/41)、Treib らは 25% (2/8)、Lagh-schimt らは 21% (10/47) と報告している。本邦では、国療宇多野病院の Hao らが、MS 患者での髄液中 C.p.DNA 検出率が 32% (9/28、他神経疾患群 6.7%)、髄液からの C.p. の分離率 3.6% (1/28、他神経疾患群 6.7%)、髄液中抗 C.p. 抗体の陽性率 20% (13/66、他神経疾患群 8%) と、MS と C.p. との有意な関連を示唆している。

本研究では、髄液中の C.p.DNA、分離、抗 C.p.IgG、IgM 抗体ともに全 14 例において陰性であった。この著明な差は地域差や人種差より、検出方法の感度および特異性の差によるものと考えられる。PCR 法についてであるが、本実験で用いたプライマーは Sriram らのものと同じの配列をもつものであり、増幅条件も同一である。本実験での感度は 100 コピーを常に検出できるものであり、微生物の検出には十分な感度であると考えられる。彼らの感度については記載がない。DNA の抽出方法も特に差はなく、この著明な陽性率の差の原因は不明である。

C.p. 分離に関しても、我々は Sriram らの方法に大部分準拠した。検出に用いた抗 C.p. 抗体は異なるが、C.p. を感染させた陽性コントロールでは C.p. 抗原はドット状に鮮明に確認できた。この分離率の差の原因については不明である。Sriram らは、非 MS の神経疾患患者の 11% から C.p. を分離している。これほど高率に真に C.p. が種々の神経疾患患者の髄液に存在するのか疑問である。

髄液中の抗 C.p. 抗体の測定についても、我々と Sriram らの方法には大差はない。彼らは ELISA、western blot 共に精製抗原による吸収試験を行っていないので、非特異的反応が残存している可能性は考えられる。この検討が必要である。Hao らの報告でも 20% が陽性であるとしている。彼らも吸収試験による特異性の検討がなされておらず、

再検討が必要と考える。

以上より、本研究結果からは、C.p. と MS との関連性は、血清学的にも、ウイルス学的にも認められないと結論づけられる。

3. サブトラクション法による髄液および脊髄からの非ヒト遺伝子の検索

MS 患者の髄液および脊髄からサブトラクション法を用いて、約 300 個のクローンの塩基配列を決定して非ヒト遺伝子を検索したが、ほとんどヒトゲノム由来遺伝子が検出され、既知の微生物の遺伝子は検出されなかった。サブトラクション法による検出アプローチはかなり困難と思われた。この原因として 2 点考えられる。第 1 に、ウイルスが検出できるのは発症以前である可能性である。MS の動物モデルである Theiler virus 感染マウスでは、ウイルス感染後脳組織が障害され、ミエリン蛋白(MBP)が露呈し免疫系を刺激して、抗 MBP T 細胞が活性化し、脳組織を障害するという発症病理メカニズムが考えられている。このモデルでは発症時には脳組織には Theiler virus がもはや検出されず、MBP 特異的 T 細胞が検出されるのみである。ヒトの場合も同様なメカニズムで発症するならば、ウイルスはすでに排除されているのであろう。もしこれが真実ならば、微生物の検出は非常に困難である。

第 2 には、微生物は少なからず存在しているが、サブトラクション法の感度が低く検出が困難である可能性が考えられる。改善点としては、ヒトゲノムやヒト細胞 cDNA を完全に含有した、十分な量のドライバーを効率よく作製することなどが考えられる。さらに効率よく感度の高いクローニング法の開発が発見の鍵を握ると考えられる。

E. 結論

既報にあるような MS と HHV-6 あるいは C.pneumoniae との関連はほとんど認められない。もし、MS が微生物と関連するならば、これら以外の微生物である。患者髄液および脊髄中に存在する非ヒト遺伝子を検索したが、ヒトゲノム由来遺伝子断片あるいは未同定の遺伝子断片のみが検出され、特定の微生物遺伝子は検出

されなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kimura, K., Mori, S., Tomita, K., Ohno, K., Takahashi, K., Shigeta, S., and Terada, M. Antiviral activity of NMSO3 against respiratory syncytial virus infection in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 47: 41-51. 2000.
2. Takahashi, K., Matsuda, M., Ohashi, K., Taniguchi, K., Nakagomi, O., Okutani, K., Abe, Y., Mori, S., Sato, N., and Shigeta, S. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. *Antiviral Res.* 49:15-24, 2001.
3. Fukuda, K., Takahashi, K., Iwata, Y., Mori, N., Gonda, K., Horimoto, T., Sawada, T., Tashiro, M., Yamaguchi, K., Niwa, S., and Shigeta, S. Immunological and PCR analyses for Borna disease virus in psychiatric patients and blood donors. *J. Clin. Microbiol.* 39: 419-429, 2001
4. Takahashi, K., Aono, T., Shichinohe, M., Tamura, M., Iwata, Y., Yamanishi, K., Shigeta, S. Herpesvirus DNA in peripheral blood mononuclear cells of some patients with Meniere's disease. *Microbiol. Immunol.* 45: 635-638, 2001.
5. Takahashi, K., Ohashi, K., Abe, Y., Mori, S., Taniguchi, K., Ebina, T., Nakagomi, O., Terada, M., Shigeta, S. Protective efficacy of a sulfated sialyl lipid (NMSO3) against human rotavirus-induced diarrhea in a mouse model. *Antimicro. Agents Chemother.* 46: 420-424, 2002.

H. 知的所有権の取得状況

なし

図1 患者髄液、脊髄からの遺伝子クローニング

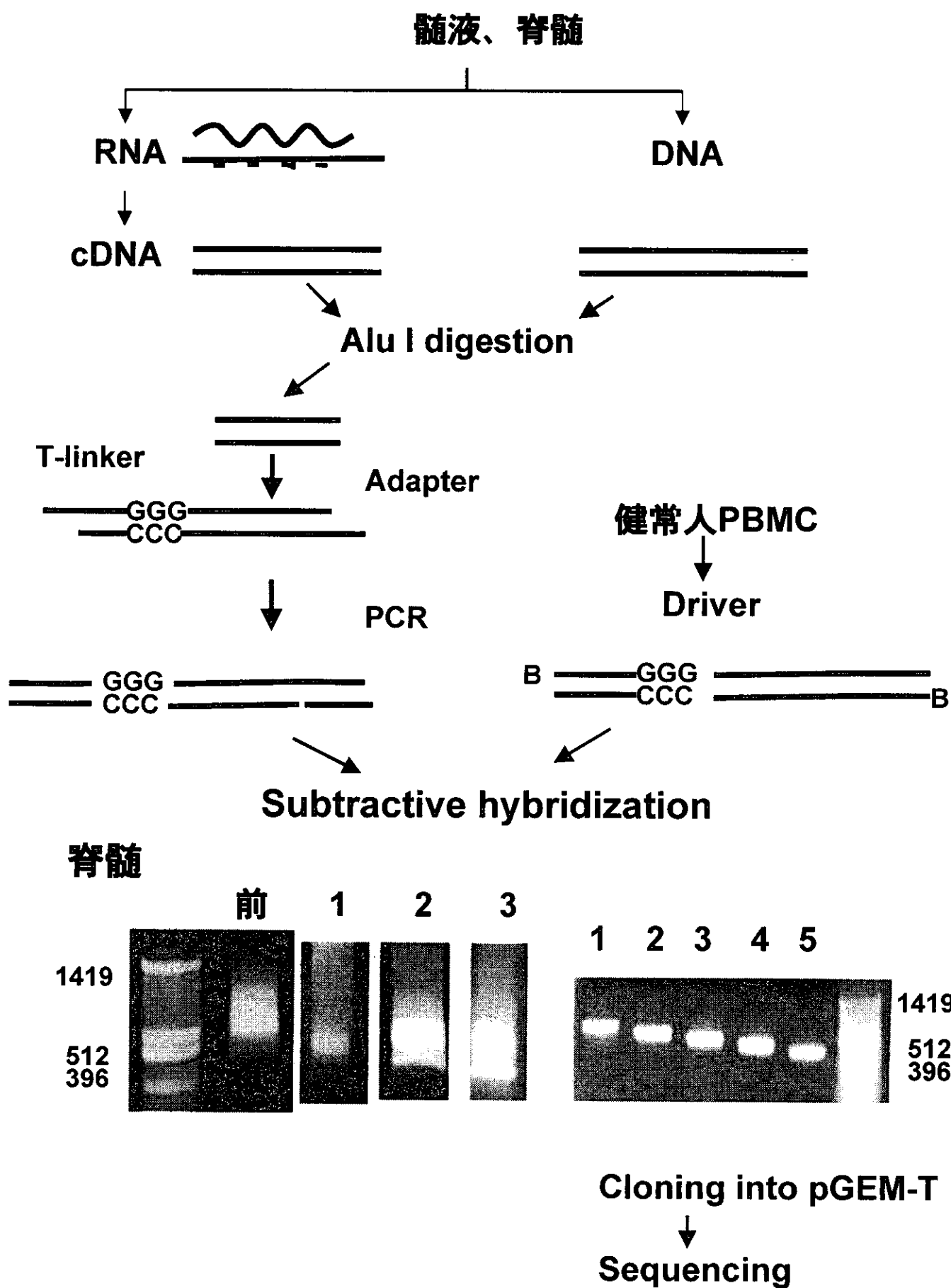


表1 MS患者におけるC. pneumoniaeとHHV-6の感染状況

性	検体	C.pneumoniae						HHV-6	
		DNA PCR	分離	IgG INDEX 判定	IgM INDEX 判定	DNA PCR	IgG		
F	髄液	—	—	0.00	—	0.20	—	—	<10
F	髄液	—	—	0.00	—	0.20	—	—	<10
F	髄液	—	—	0.01	—	0.20	—	—	<10
F	髄液	—	—	0.00	—	0.23	—	—	<10
F	髄液	—	—	0.00	—	0.20	—	—	<10
F	髄液	—	—	0.00	—	0.23	—	—	<10
F	髄液	—	—	0.00	—	0.23	—	—	<10
F	髄液	—	—	0.00	—	0.20	—	—	<10
M	髄液	—	—	0.00	—	0.20	—	—	<10
F	髄液	—	—	0.00	—	0.20	—	—	<10
F	髄液	—	—	0.00	—	0.23	—	—	<10
F	髄液	—	—	0.00	—	0.20	—	—	<10
M	髄液	—	—	0.00	—	0.23	—	—	<10
F	髄液	—	—	0.00	—	0.20	—	—	<10
F	血清			0.42	—	1.01	±	—	320
F	血清			1.69	+	2.15	+	—	160
F	血清			2.17	+	0.66	—	—	160
F	血清			0.71	—	1.02	±	—	80
F	血清			1.54	+	0.90	—	—	160
F	血清			0.59	—	0.61	—	—	80
F	血清			1.54	+	0.91	±	—	80
F	血清			0.63	—	0.72	—	—	160
M	血清			1.92	+	0.53	—	—	160
F	血清			0.51	—	0.97	±	—	80
F	血清			1.37	+	0.46	—	—	320
F	血清			1.74	+	0.58	—	—	160
M	血清			0.48	—	0.41	—	—	80
F	血清			1.75	+	0.49	—	—	320
M	脊髄	—						—	
F	脊髄	—						—	
M	脊髄	—						—	
F	脊髄	—						—	