

20020727

厚生労働科学研究費補助金  
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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 佐多 徹太郎

平成15(2003)年3月



厚生労働科学研究費補助金  
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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 佐多 徹太郎

平成15(2003)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14年度）

区分	氏名	所 属	職名
班 長	佐多 徹太郎	国立感染症研究所感染病理部	部長
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
	結城 伸泰	独協医科大学神経内科	助教授
	高 昌星	信州大学医学部保健学科	教授
	江石 義信	東京医科歯科大学医学部附属病因・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第2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	助教授
	村田 幸作	京都大学大学院農学研究科	教授
鈴木 和男	国立感染症研究所生物活性物質部	室長	

## 目 次

I. 総括研究報告書（平成14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 佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部長）	
II. 分担研究報告	
1. 神経疾患および消化器疾患の原因ウイルスの究明	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. 特発性拡張型（うっ血型）心筋症に関するウイルスの解明	13
岩崎 琢也（長崎大学熱帯医学研究所宿主病態解析部門）	
3. 神経変性疾患とボルナ病ウイルス感染との関連性に関する研究	17
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. 血液疾患における起因ウイルスの解明に関する研究	21
佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）	
5. 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	24
永武 毅（長崎大学熱帯医学研究所感染症予防治療分野）	
6. 慢性肺気腫あるいは呼吸不全におけるウイルス感染	32
山谷 睦雄（東北大学医学部附属病院老人科）	
7. 慢性肺疾患における細菌の関与とその治療法の開発	36
村田 幸作（京都大学大学院農学研究科）	
8. 難治性血管炎発症に関する真菌由来分子の作用とその新しい評価系	42
鈴木 和男（国立感染症研究所生物活性物質部）	
9. 微生物の慢性感染が関与する特定疾患におけるマイコプラズマの探索	46
荒川 宜親（国立感染症研究所細菌第2部）	
10. 末梢肺と縦隔リンパ節に常在するアクネ菌に関する検討	54
江石 義信（東京医科歯科大学大学院病因・病理学）	
11. 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 ～データマイニングによる培養成績の解析～	61
渡辺 邦友（岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設）	
12. 抗GM1抗体を伴うマイコプラズマ感染後軸索型ギラン・バレー症候群	64
結城 伸泰（独協医科大学神経内科）	
13. <i>Campylobacter jejuni</i> ・ <i>Haemophilus influenzae</i> 感染後 ギラン・バレー症候群におけるT細胞受容体レパトア	67
結城 伸泰（独協医科大学神経内科）	
14. 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	70
高 昌星（信州大学医学部保健学科）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	75

# 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 佐多 徹太郎 国立感染症研究所感染病理部長

**研究要旨** 特定疾患の原因は不明である。当研究班では微生物の感染の関与について原因究明を行い、発症予防あるいは効果的治療法の開発に結びつけることを目的とした。対象課題として、神経変性疾患とボルナ病ウイルス、ギランバレー症候群と微生物感染因子、特発性心筋症とコクサッキーウイルス、サルコイドーシスと *P. acnes*、慢性難治性気道感染性疾患とライノウイルス、好中球機能や緑膿菌バイオフィーム、難治性血管炎と真菌因子、神経疾患や消化器疾患とヘルペスウイルス、そして特発性造血器障害とウイルスとの関連について研究を実施した。本年度の研究結果は下記の通りである。アルツハイマー病脳組織にも BDV が高率に存在していた。ギランバレー症候群における T 細胞レパトアには特定の遺伝子の利用はないことが判明した。特発性心筋症の原因を探る目的で免疫組織化学的検索が可能となった。種々の臓器組織から分離したアクネ菌はそれぞれ異なる遺伝子型を持つことが明らかとなった。ヒト気道培養細胞系にライノウイルスを感染させるとムチンの mRNA 合成が亢進した。びまん性肺疾患患者由来の好中球は IL-8 mRNA を発現しアポトーシスが進行したが、エリスロマイシンで抑制された。アルギン酸リアーゼの大量発現を行い酵素学的性質と活性アミノ酸残基を同定した。*C. albicans* 由来物質でマウスに血管炎を誘導した。クローン病患者の直腸粘膜生検組織で HHV-6 DNA が検出された。マイコプラズマ抗体測定系を作出した。特発性造血器障害患者検体に HHV-8 は検出されなかった。

### 分担研究者

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）  
生田 和良（大阪大学微生物病研究所教授）  
鈴木 和男（国立感染症研究所室長）  
結城 伸泰（独協医科大学助教授）  
高 昌星（信州大学医療短期大学部教授）  
江石 義信（東京医科歯科大学助教授）  
渡辺 邦友（岐阜大学医学部教授）  
荒川 宜親（国立感染症研究所部長）  
永武 毅（長崎大学熱帯医学研究所教授）  
山谷 睦雄（東北大学医学部附属病院助教授）  
村田 幸作（京都大学大学院農学研究科教授）

### 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つけることを目的とする。

期待される成果として具体的に①神経変性疾患におけるウイルスの関与；この研究によりボルナ病等のウイルスとパーキンソン病あるいは他の神経変性疾患との関連性が明らかになる、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* の関与は強く疑われておりサ症における役割が解明される、③神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明：多発性硬化症及びクローン病に着目し、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) 及び HHV-7 が発症原因である可能性について検討する、④ギランバレー症候群 (GBS) の病因・発症機序の解明：*C. jejuni* に起因するとされる GBS の機序を明らかにしうる、⑤慢性肺疾患・呼吸不全と微生物感染：難治化要因としてのバイオフィルムの形成関与が解明されることにより予防策、治療法の選択に道が開かれる、⑥特発性心筋炎の原因が判明することによりワクチン等への道が開かれる、⑦難治性血管炎の発症機序がわかることにより治療法が開ける。

## B. 研究方法

### 1) 神経変性疾患における起因ウイルスの解析

パーキンソン病患者剖検脳でのボルナ病ウイルスの検出とその普遍性について詳細に検討するとともに、このウイルスの p24 蛋白の脳内発現と神経組織への影響について検索する (生田)。

### 2) ギラン・バレー症候群の発症に関わる病原因子、宿主因子の解明

*C. jejuni* 腸炎後ギラン・バレー症候群患者 IgG をラットやマウスに注射し、軸索病変の passive transfer が可能かどうか検討する。また他の病原体 (*H. influenzae* 等) でも *C. jejuni* 同様の分子相同性で症候群が発症するかどうかを証明する (結城)。また *C. jejuni* (Penner 19) を純培養し、菌体を用い成分感作により実験的神経炎を作成し、発症機序を明らかにすると共に、T 及び B 細胞エピトープを決定する。さらに患者血中の *C. jejuni* 抗原反応性の T、B 細胞と役割を明らかにする (高)。

### 3) 特発性心筋症の病因ウイルスの解明

特発性心筋症特に拡張型心筋症の急性期、亜急性期より採取された心内膜下心筋生検組織のウイルスゲノム (PCR、サブトラクション法による) の有無、宿主の反応の変動解析を行う (岩崎)。

### 4) サルコイドーシスの病因解明

*P. acnes* がサルコイドーシスの類上皮細胞に特異的に局在することをふまえ、またこの菌の遺伝子 (427bp) が全長にわたりそっくりヒト遺伝子の中に水平移動していることが江石らの研究から明らかにされ、この疾患の患者側の疾病素因を水平

移動遺伝子の多型と当該蛋白抗原に対する免疫変容の誘導の点から検証する (江石)。また患者、感染症における *P. acnes* の宿主内動態と病原性発現を微生物学的に明らかにする (渡辺)。

### 5) 慢性難治性気道感染症疾患における微生物感染の関与とその除去方法の開発

慢性肺気腫の呼吸不全における気道ウイルス感染 (特にライノウイルス) と細菌感染の関係を明らかにする (山谷)。ムコイド型緑膿菌による慢性持続性気道感染は進行性の気道障害を惹起する。本病態におけるアポトーシス好中球のクレアランス機構の関与を明らかにし、病態改善に向けた制御法を探る (永武)。多数の病原性細菌がバイオフィルムを形成しこれが重篤な呼吸器系疾患を発症する。*Shingomonas* 属細菌がアルギン酸リアーゼを生産し、それが緑膿菌を分解することを明らかにしてきた。それを基盤として宿主にとって無害な機序でバイオフィルムを除去しうる、即ち緑膿菌のバイオフィルム形成に関与するポリリン酸キナーゼ阻害剤の開発を行う (村田)。

### 6) 難治性血管炎と真菌の関与

難治性血管炎の発症機序のひとつとして、好中球機能の活性化と好中球自己抗体であることを明らかにし、カンジダの成分が冠状動脈炎を誘導することを分子的に明らかにしたことを基盤として、真菌の菌側因子と生体側の分子の相互関係を解析して、血管炎の原因究明を行う (鈴木)。

### 7) 神経疾患および消化器疾患の起因ウイルスの解明

多発性硬化症 (MS) 患者の髄液、クローン病患者の腸管リンパ節及び血清中における HHV-6 および HHV-7 DNA の存在を既知の nested PCR 法により検索する。また、ヒトヘルペスウイルスを同時に検出可能な PCR の系を開発し、未知ウイルス DNA の検出を試みる。(山西)。

### 8) 既知のウイルス、細菌を用いた特定疾患との関連の探索

マイコプラズマは細胞壁を持たない細菌で、動物細胞と同じでリン脂質を含む細胞膜のみを持つが、この菌の肺炎マイコプラズマ以外の病原性については知られていない。IgA 腎症、特発性間質性肺炎等の難病につき患者血液、咽頭スワブ、尿等を用い抗体解析、分離等の方法により関連を探索する (荒川)。一方ヒトに潜伏・持続感染するヒトヘルペスウイルスは 6, 7, 8 と近年同定されている。これらはいずれも免疫不全化での再活性については申請者らも明らかにしてきたが、通常ヒト体内でどのような役割を疾患発生への関連で果た



しているかは不明であり、特にヒトヘルペスウイルス 8 は体内での存在場所もよくわからない。それらのウイルスと特定疾患との関わりをウイルス学的に探索する（佐多）。

#### （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. 研究結果及び考察

#### 1) 神経変性疾患における起因ウイルスの解析

アルツハイマー病患者の剖検脳組織を 2 種類の RT-PCR 法で調べたところ 3/6 例でボルナ病ウイルス(BDV)が陽性で、また in situ hybridization 法では 2/7 例が陽性となった。今後さらに症例を重ねて検討する必要がある。スナネズミの脳内に BDV を接種すると、1 日齢では全例神経症状が出現し 30 日で死亡した。脳幹下部でのウイルス亢進と神経症状出現が一致した。7 日齢では 75%、14 日齢では 25%が死亡した。生き残ったスナネズミには神経症状の有無で 2 種類にわけられ、神経症状のある個体では脳幹下部でのウイルスの発現との関連があった。生後 24 時間以内に BDV を接種したラットでは持続感染が成立した。8 週後に LPS を投与すると中脳にアポトーシスが起こった。持続感染状態ではその後のストレス応答を正常に機能することができずに神経症状の出現を起こすことが考えられた（生田）。

#### 2) ギラン・バレー症候群の発症に関わる病原因子、宿主因子の解明

ギランバレー症候群ではその発症に液性免疫が関与していることは明らかであるが、急性期には T 細胞の活性化があることが知られている。この T 細胞の性状について患者の末梢血 T 細胞のレパトアを解析した。健常者に比べ  $V\beta/V\delta$  スペクトラタイプ増幅があったが、*C. jejuni* 感染後例での関連性はなかった。*H. influenzae* 感染後例では 50%で  $V\beta 5.2$  遺伝子利用がみられたが、健常者と比較すると有意差はなかった。疾患に共通して利用される特定の遺伝子はないと考えられた。マイコプラズマ感染後軸索型ギランバレー症候群例を経験しその発症機序について検討したところ分子相同説にもとづく発症機序が示唆された（結城）。ギランバレー症候群の発症機序と関連する GM1 の末梢神経における局在を検討した。末梢神経では GM1 は髄鞘にあり軸索にはみられな

ったので、ギランバレー症候群における軸索障害にはほかの機序も検討する必要があると考えられた（高）。

#### 3) 特発性心筋症の病因ウイルスの解明

コクサッキーウイルス B 群のウイルス構成蛋白抗体の作製、乳のみマウス感染実験、そして人体剖検例の検索をおこなった。ホルマリン固定ウイルス感染マウス組織でウイルス抗原の検出が可能となった。乳のみマウスでは中枢神経組織と横紋筋にウイルス抗原が検出された。しかし心筋組織では炎症性細胞浸潤のある部分に陽性が疑われた程度で今後の検討を要する。剖検例では心筋組織の炎症性細胞浸潤がある部分にウイルス抗原が検出できた。今後、生・剖検例組織でのゲノム解析、血清学的解析等で詳細に検討する。

#### 4) サルコイドーシスの病因解明

末梢肺およびリンパ節に *P. acnes* が常在するかどうかについて、外科的切除された肺、および肺、胃、大腸所属リンパ節組織から直接細菌培養を行った。末梢肺から 56%、肺所属リンパ節から 73%に *P. acnes* が単独で分離され、胃、大腸所属リンパ節では他の腸内細菌も伴っていた。RAPD 法で分離菌について調べたところ、臓器ごとに異なる遺伝子型を持っていることが明かとなった。肺や縦隔リンパ節のサルコイドーシス病変は過敏性免疫反応を背景に局所に常在するアクネ菌の異常増殖が引き金となって形成されている可能性が考えられた（江石）。*Propionibacterium* の分離を容易にするための新規培地を作製し、糞便中の分離を行った。そのデータを解析ツールで検討したところ、罹患年数 1-2 年のサルコイドーシス患者糞便から有意に高率に *Propionibacterium* が分離されるという結果をえた。今後遺伝子解析を行い、菌種の同定を進めていく（渡邊）。

#### 5) 慢性難治性気道感染症疾患における微生物感染の関与とその除去方法の開発

慢性肺気腫や気管支喘息はウイルス感染により急性増悪し呼吸不全をきたす。その原因の一つとして気道の喀痰増加が考えられている。培養ヒト気道上皮および粘膜下腺細胞培養系でライノウイルス感染とムチン産生との関連を調べた。感染早期にムチンの mRNA 産生が増加し、培養液中のムチン量も増加した。これらはエリスロマイシン投与で抑制された。ウイルスとムチン産生機序について詳細な検討を要する（山谷）。びまん性肺疾患などの慢性気道感染症における細菌感染の役割について調べるためにマクロライド系抗菌薬の効果について検討した。活性化好中球の IL-8 mRNA 発現抑制、肺胞マクロファージのアポトーシス好



中球貪食の促進、炎症誘導の抑制が明らかとなった(永武)。緑膿菌バイオフィーム感染症にアルギン酸リアーゼを利用する治療法を検討している。今年度はバイオフィームの合成と分解に関わるポリリン酸キナーゼとアルギン酸リアーゼの大量発現・精製系の確立と酵素学的性質の決定ならびに部位特異的変異による活性アミノ酸残基の同定を行った。阻害剤の探索や治療法の開発につながると考えられる(村田)。

#### 6) 難治性血管炎と真菌の関与

*C. albicans* 由来物質である CAWS と CADS をマウスに投与することにより 100%近い頻度で冠状動脈炎を誘導した。C57BL/6 マウスに CAWS を投与し 3 時間後に anti-mMPO を投与した。さらに 5 日後に fMet-Leu-Phe を投与し、in vivo イメージングで血流状態を観察したところ、腎血流障害が誘導された。CAWS 投与後の脾臓のサイトカインレベルは IFN $\gamma$ 、IL-6、IL-10 が血管炎と連動して発現した。さらに血管内皮細胞障害に関わる MAPK のカスケードを検討したところ、アポトーシスに関わるシグナル伝達は Caspase 8 と連動する p38MAPK の関与があることがわかった。*C. albicans* 由来分子がサイトカインと連動して血管炎を誘導し、腎血流障害を起こすこと、さらに血管内皮細胞のアポトーシスにかかるシグナルの存在が示唆された(鈴木)。

#### 7) 神経疾患および消化器疾患の起因ウイルスの解明

クローン病患者の直腸生検組織から nested PCR 法で HHV-6 DNA は 50%、HHV-7 DNA は 40% に検出された。ウイルス量は少ないが、HHV-6 は健康人からは検出されることが稀であるので、疾患との関連性について今後症例を重ねた検討が必要である(山西)。

#### 8) 既知のウイルス、細菌を用いて特定疾患との関連の探索

ヒトに感染するマイコプラズマの血清診断系の開発を目的に、まずギランバレー症候群患者血清中の抗マイコプラズマ抗体を測定した。ヒトに感染する 3 種のマイコプラズマの全菌体成分を抗原とする ELISA 法で *M. pneumoniae* 抗体と *M. fermentans* 抗体はともにギランバレー症候群患者 117 例中 2 例 (1.7%) で、1 例は寒冷凝集反応が高値を示した。ここの症例での検討が必要と考えられた。また ELISA 法改良を目的としてリコンビナント蛋白を作製し特異性について検討した(荒川)。特発性造血器障害患者の 58 検体について HHV-8 の PCR による検出と HHV-8 抗体測定を行った。Nested PCR 法でも陰性で、血

清抗体も陰性であり、HHV-8 の関与は低いと考えられた(佐多)。

## E. 結論

アルツハイマー病脳組織にも BDV が高率に存在していた。ギランバレー症候群における T 細胞レパトアには特定の遺伝子の利用はないことが判明した。特発性心筋症の原因を探る目的で免疫組織化学的検索が可能となった。種々の臓器組織から分離したアクネ菌はそれぞれ異なる遺伝子型を持つことが明らかとなった。ヒト気道培養細胞系にライノウイルスを感染させるとムチンの mRNA 合成が亢進した。またびまん性肺疾患患者由来の好中球は IL-8 mRNA を発現しアポトーシスが進行した。これらはエリスロマイシンで抑制された。アルギン酸リアーゼの大量発現を行い酵素学的性質と活性アミノ酸残基を同定した。*C. albicans* 由来物質でマウスに血管炎を誘導した。クローン病患者の直腸粘膜生検組織で HHV-6 DNA が検出された。マイコプラズマ抗体測定系を作出した。特発性造血器障害患者検体に HHV-8 は検出されなかった。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

論文発表や学会発表は各分担研究者の報告書に記載した。

## 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『嚢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)

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)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



## II. 分担研究報告書

## 1. 神経疾患および消化器疾患の原因ウイルスの究明

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)

研究協力者 森 康子(大阪大学微生物学)、指原淳志(大阪大学小児科)  
蘆田知史(旭川医科大学)

**研究要旨** ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) およびヒトヘルペスウイルス 7 (HHV-7) は、健常人においては、特に問題がないとされているが、免疫抑制患者においては様々な臓器疾患との関連性が示唆されている。さらに、近年、消化器系組織とこれらのウイルスとの関連性も報告されている。今回、我々は、HHV-6 および HHV-7 の DNA を消化器系の障害に関連する特定疾患 (クローン病) の直腸組織から PCR により検出を試み、クローン病との関連性について検討した。直腸組織より HHV-6 DNA が検出されたが、疾患との直接的な関わりは不明である。今後は実際ウイルスが疾患に関わっているかを検討したいと考える。

### A. 研究目的

$\beta$  ヘルペスウイルスであるヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) およびヒトヘルペスウイルス 7 (HHV-7) は、初感染後体内に潜伏感染し、宿主の免疫能の低下に伴い様々な疾患の原因になることが示唆されているがその詳細は不明である。近年、HHV-7 が、胃粘膜に潜伏感染していることが報告されている。そこで、今回、消化器系の障害に関連する特定疾患 (クローン病) に着目し、それらの検体を用いて、HHV-6 および HHV-7 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

$\beta$  ヘルペスウイルス標準株として、U1102 (HHV-6A)、HST (HHV-6B)、7-KHR (HHV-7) 感染細胞を proteinase K 処理して得た DNA を 100ng、臨床検体はクローン病患者の直腸生検より得た検体を proteinase K 処理を行い、得られた DNA をテンプレートとして用い、HHV-6、HHV-7 および HCMV の特異的な遺伝子に関し、プライマーを作成し、nested PCR を施行した。得られた増幅産物はサザンハイブリダイゼー

ション法によりウイルスを特定した。

(倫理面への配慮)

患者からの検体の採取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

クローン病患者 10 症例 10 検体を対象とし、HHV-6、HHV-7 および HCMV のスクリーニングをおこなった結果、HHV-6 が 5 検体 (50%)、HHV-7 が 4 検体 (40%)、HCMV が 0 検体 (0%) 検出された (表 1)。

### D. 考察

$\beta$  ヘルペスウイルスは乳児期から幼児期にかけて初感染し、成人においては抗体保有率も高い。特に、HHV-6、HHV-7 においてはほとんどの成人が抗体を保有している。健常人においては、特に問題はないとされているが、特に



HHV-6 においては臓器移植や HIV 感染症などの免疫不全状態において再活性化し、様々な疾患の原因になることが知られている。さらに、近年、HHV-7DNA が、消化管組織より検出されたとの報告があり、また、HHV-6 と消化器疾患との関連性も示唆されている。これらの報告より、我々は、クローン病の病態にこれらのウイルスが関わっている可能性を考慮し、今回の検討を行った。

今回の検討により、HHV-6 および HHV-7 の DNA がクローン病患者の腸管組織より高率に検出された。single PCR 法では DNA は検出されず、nested PCR 法にてはじめて DNA が検出されたため、腸管組織にウイルス DNA が多量に存在していた可能性は考えにくい。また、HHV-7 は、健常人においても、nested PCR にて検出されることがあり、疾患との関連性はいいきれない。しかし、HHV-6 においては、健常人から検出されることはまれであるので、疾患との関連性を考慮することはできる。本結果だけでは、ウイルス自体が疾患の引き金となった可能性を証明することは困難であるが、病変部にウイルスが存在していた可能性は考えられる。しかし、病変部に存在するウイルスが、実際、病変の進行に影響を及ぼしているかどうかは今後のさらなる検討が必要である。

## E. 結論

クローン病の直腸組織より、HHV-6 DNA が検出されたが、疾患との直接的な関わりは不明である。今後は、実際、ウイルスが疾患に関わっているかを検討したいと考える。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kondo, K., K. Shimada, J. Sashihara, K. Tanaka-Taya, and K. Yamanishi. 2002. Identification of human herpesvirus 6 latency-associated transcripts. *J Virol* 76:4145-51.

2. Kondo, K., T. Kondo, K. Shimada, K. Amo, H. Miyagawa, and K. Yamanishi. 2002. Strong interaction between human herpesvirus 6 and peripheral blood monocytes/macrophages during acute infection. *J Med Virol* 67:364-9
3. Tanaka, H., T. Nishimura, M. Hakui, H. Sugimoto, K. Tanaka-Taya, and K. Yamanishi. 2002. Human herpesvirus 6 associated hemophagocytic syndrome in a healthy adult. *Emerg Infect Dis* 8:87-8.
4. Dhepakson, P., Y. Mori, Y. B. Jiang, H. L. Huang, P. Akkapaiboon, T. Okuno, and K. Yamanishi. 2002. Human herpesvirus-6 rep/U94 gene product has single-stranded DNA-binding activity. *J Gen Virol* 83:847-54.
5. Mori, Y., T. Seya, H. L. Huang, P. Akkapaiboon, P. Dhepakson, and K. Yamanishi. 2002. Human Herpesvirus 6 Variant A but Not Variant B Induces Fusion from Without in a Variety of Human Cells through a Human Herpesvirus 6 Entry Receptor, CD46. *J Virol* 76:6750-61.
6. Sugimoto, T., K. Tanaka-Taya, J. Ono, H. Miyoshi, S. Okada, and K. Yamanishi. 2002. Human herpesvirus-6 infection in neonates: Not protected by only humoral immunity. *Pediatr Int* 44:281-285.
7. Tokimasa, S., J. Hara, Y. Osugi, H. Ohta, Y. Matsuda, H. Fujisaki, A. Sawada, J. Y. Kim, J. Sashihara, K. Amou, H. Miyagawa, K. Tanaka-Taya, K. Yamanishi, and S. Okada. 2002. Ganciclovir is effective for prophylaxis and treatment of human herpesvirus-6 in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 29:595-8.
8. Sashihara, J., K. Tanaka-Taya, S. Tanaka, K. Amo, H. Miyagawa, G. Hosoi, T. Taniguchi, T. Fukui, N. Kasuga, T. Aono, M. Sako, J. Hara, K. Yamanishi, and S. Okada. 2002. High incidence of human herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. *Blood* 100:2005-11.
9. Ayuthaya, P. I., H. Katano, R. Inagi, W. Auwanit, T. Sata, T. Kurata, and K. Yamanishi. 2002. The seroprevalence of human herpesvirus 8 infection in the Thai population. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 33:297-305.
10. Tokimasa, S., J. Hara, Y. Osugi, H. Ohta, Y. Matsuda, H. Fujisaki, A. Sawada, J. Y.

- Kim, J. Sashihara, K. Amou, H. Miyagawa, K. Tanaka-Taya, K. Yamanishi, and S. Okada. 2002. Ganciclovir is effective for prophylaxis and treatment of human herpesvirus-6 in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 29:595-8.
11. Ueda, K., K. Ishikawa, K. Nishimura, S. Sakakibara, E. Do, and K. Yamanishi. 2002. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) Replication and Transcription Factor Activates the K9 (vIRF) Gene through Two Distinct cis Elements by a Non-DNA-Binding Mechanism. *J Virol* 76:12044-54.
12. Gomi, Y., H. Sunamachi, Y. Mori, K. Nagaike, M. Takahashi, and K. Yamanishi. 2002. Comparison of the complete DNA sequences of the oka varicella vaccine and its parental virus. *J Virol* 76:11447-59.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし



表 1 . HHV-6, HHV-7およびHCMV DNAの直腸生検よりの検出

検体No	HHV-6	HHV-7	HCMV
1	+	-	-
2	+	+	-
3	-	-	-
4	+	-	-
5	-	-	-
6	+	+	-
7	-	-	-
8	+	+	-
9	-	+	-
10	-	-	-

## 2. 特発性拡張型(うっ血型)心筋症に関するウイルスの解明

分担研究者 岩崎琢也 (長崎大学熱帯医学研究所教授・国立感染症研究所感染病理部)

協力研究者 永田典代・佐藤由子・佐多徹太郎 (国立感染症研究所感染病理部)  
小池 智(東京都神経研微生物)

**研究要旨** 特定疾患のうち、特発性拡張型(うっ血型)心筋症の発症・臨床経過に関するウイルスの有無について解析することを目的として研究を開始した。本研究ではこれらの疾患患者の経皮的心内膜下心筋生検組織での解析を主体とするが、本年度は倫理委員会に申請準備中のため、最終的にこの解析には着手していない。そこで、特発性拡張型(うっ血型)心筋症の発症に最も関与していることが考えられている B 群コクサッキーウイルス CVB の免疫組織学的解析に必要な抗 CVB ウイルス構成蛋白抗体ならびに CVB の乳呑みマウス感染実験、さらに人体剖検例の検索を行った。この結果、CVB1 ならびに CVB3 のウイルス構成蛋白を認識するウサギ血清が作製され、この抗体を用いて、CVB1 あるいは CVB3 を感染させたマウス組織内のウイルス抗原の免疫組織化学的検出が可能となった。また、CVB3 が剖検時に分離された新生児ウイルス性心筋例の心筋組織内のウイルス抗原の検出も検出できた。マウス感染実験では CVB1 と CVB3 の病原性に違いが存在していることが明らかにされ、病原性が宿主により異なっていることが示唆された。ウイルス構成蛋白は急性期にのみ陽性となることが予想されるので、今後の解析ではウイルスゲノム検出系を主体とする予定である。

### A. 研究目的

特発性拡張型(うっ血型)心筋症の発症・臨床経過に関するウイルスの有無について解析することを目的として研究を開始した。特発性拡張型心筋症は心不全に陥り、不幸な転帰を示すことの多い疾患であり、本邦では年間千人以上の患者が存在し、心臓移植による根本的治療以外、重篤例を救命する手だてがない。この疾患の発症機転として、ウイルス感染と宿主要因が 2 大因子として挙げられている。また、ウイルス性心筋炎と特発性拡張型心筋症の関連性についても不明の点が多い。したがって、この発症に関するウイルスを同定あるいは発見することができれば、本症の予防方法を確立し、さらに現在本疾患に罹患している宿主の治療に有用な情報となる。これまでに、特発性拡張型心筋症の心内膜下心筋生検組織にコクサッキーウイルスゲノムを検出したとする報告は

多いが、心筋組織内に存在するウイルスゲノム全長を明らかにした報告は殆どない。また、検出されたウイルスに対しての血清学的解析を行った報告も少ない。最近、エンテロウイルスゲノムがコードするプロテアーゼが心筋細胞に破壊的に作用している可能性も指摘されている。

### B. 研究方法

臨床検体の解析：

本研究では、1. このゲノム全長の塩基配列の解析。2. この配列の系統樹解析。3. 得られた塩基配列に基づく infectious clone の作製と、in vivo での感染性ウイルス粒子の産生の有無の検討。4. ウイルス粒子構成蛋白の in vivo 作製と、特発性拡張型心筋症患者の血清学的検討。



5. 特発性拡張型心筋症罹患患者の末梢血中にウイルス粒子と反応する T 細胞クローンの有無の検討。6. ウイルスプロテアーゼの検討。を目的としている。しかし、これらの検討は倫理的承認を得て行う必要があるため、現在申請準備中である。

抗コクサッキーウイルス B 群のウイルス構成蛋白を認識する抗体の作製：

初年度はコクサッキーウイルス B1 ならびに B3 に対する抗体作製と動物モデルでの検討を行った。コクサッキーウイルス B1 ならびに B3 のウイルスゲノムの VP1 領域の一部を pGEX-3X に組み込み、これらの領域の遺伝子産物を GST 融合蛋白として大腸菌で発現させた。発現した蛋白を Glutathione-sepharose カラムで精製後、蛋白濃度を定量し、アジュバントと混和後、New Zealand シロウサギに免疫し、抗血清を作製した。

in vivo のマウス感染実験：

マウスに Coxsackievirus (CV) B3 ならびに B1 を接種し、経時的变化を組織学的ならびに免疫組織学的に解析した。使用したマウスは B6 ならびにヒトポリオウイルスレセプター-human poliovirus receptor (hPVR) を発現させたトランスジェニックマウス TgPVR21 を使用した。ウイルス量をブランク法により定量し、マウス脳内に 2 段針を用いて接種した。接種後、経時的にマウスを深麻酔し、組織を 4%ホルムアルデハイド・リン酸緩衝液中で固定し、EDTA 脱灰後、パラフィン包埋し、薄切切片を作製した。薄切切片はヘマトキシリン・エオシン染色ならびに免疫組織学的にウイルス抗原の局在を検討した。

免疫組織学的解析：

作製した抗 CVB1 ならびに CVB3 抗体について、LSAB-PO 法(DAKO)によりウイルス抗原の検出について検討した。パラフィン切片を脱パラフィンし、内因性ペルオキシダーゼ活性を過酸化水素・メタノール中で失活させ、これらの一次抗体の希釈系列を作製し、SLAB-PO 法にて一次抗体の結合した抗原の有無について検討した。最も SN 比が高い値を有効希釈濃度とし、ウイルスを感染させたマウス組織について検討した。

人体剖検例の免疫組織学的解析：

さらに剖検時 CVB3 が分離された新生児例についての同様に解析した。また、心筋炎の疑いで国立感染症研究所感染病理部にウイルス学的同定の共同研究を行ってきた例についても検討した。

## C. 研究結果

乳呑みマウスに CVB1 ならびに CVB3 を接種し、経時的に経過を観察し、剖検により組織学的解析を行った。その結果、作製した抗 CVB1 ならびに CVB3 抗体は感染マウスのホルマリン固定パラフィン包埋切片上でウイルス抗原を検出することが可能であった。今回の解析では乳呑みマウスでは CVB1 は中枢神経組織ならびに横紋筋を、CVB3 は中枢神経組織を主として標的としていることが判明した(図 1)。期待された心筋組織内のウイルス抗原は確定的な陽性所見を得ることは難しく、一部の CVB1 感染マウスで間質内に炎症性細胞浸潤が生じている部位で陽性所見が窺われた(図 2)。一方、CVB3 が分離された剖検例の免疫組織学的解析ではウイルス抗原が心筋組織内に検出することが可能であった。これらの陽性所見は以前、ウイルス粒子で作製した抗 CVB 抗体を用いた免疫蛍光抗体法とほぼ同一の陽性所見であった。また、これらの陽性部位では間質に炎症性細胞浸潤が伴っていた。

## D. 考察

現在までに拡張型心筋症患者から採取された心内膜下心筋生検組織からはウイルスは分離されていないが、分子生物学的技法を用いて最も高率に検出されているのはコクサッキー B 群ウイルス様のゲノム断片である。その検出頻度は報告により異なるが、おおよそ 25%前後である。

乳呑みマウスでの解析では CVB1 ならびに CVB3 による心筋病変の発生は非常に乏しく、CVB1 を感染させた一部のマウスのみでその存在が窺われた。したがって、同じ CVB でも宿主の違いにより発揮する病原性は異なることが予想される。

## E. 結論

初年度の解析では人体生検例の解析を行うことができず、初期の目的は達することはできなかったが、人体ならびに動物実験材料でのCVB 抗原の検出に有効な抗体を作製し、今後の人体例の解析を行っていくことが可能となった。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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*. 2002; 20: 1050-7.
2. Asahi Y, Yoshikawa T, Watanabe I, Iwasaki T, Hasegawa H, Sato Y, Shimada S, Nanno M, Matsuoka Y, Ohwaki M, Iwakura Y, Suzuki Y, Aizawa C, Sata T, Kurata T, Tamura S. Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. *J Immunol*. 2002;168:2930-8.
3. Yoshikawa T, Asano Y, Akimoto S, Ozaki T, Iwasaki T, Kurata T, Goshima F, Nishiyama Y. Latent infection of human herpesvirus 6 in astrocytoma cell line and alteration of cytokine synthesis. *J Med Virol*. 2002; 66:497-505.
4. Ando Y, Terao K, Narita M, Oguchi Y, Sata T, Iwasaki T: Quantitative analyses of cytomegalovirus genome in aqueous humor of patients with cytomegalovirus retinitis. *Jpn J Ophthalmol* 46: 254-260, 2002
5. Ishikawa K, Ando Y, Narita M, Shinjoh M, Iwasaki T: Cytomegalovirus retinitis during immunotherapy for common variable immunodeficiency. *J Infect* 2002; 44: 55-56
6. 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* 67: 207-216, 2002

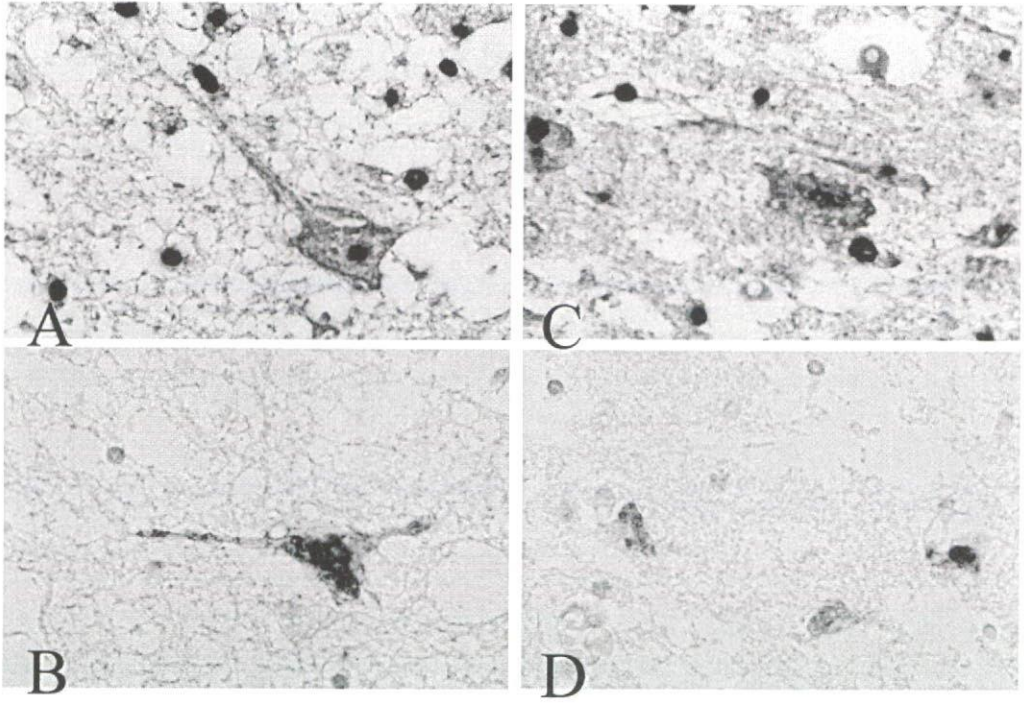
7. Ida-Hosonuma M, Iwasaki T, Taya C, Sato Y, Li J, Nagata N, Yonekawa H, Koike S: Comparison of neuropathogenicity of poliovirus in two transgenic mouse strains expressing human poliovirus receptor with different distribution patterns *J Gen Virol* 83: 1095-1105, 2002
8. Nakamura H, Tamura S, Watanabe I, Iwasaki T, Yodoi J: Enhanced resistancy of thioredoxin-transgenic mice against influenza virus-induced pneumonia. *Immunol Lett* 2002; 82: 165-170

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

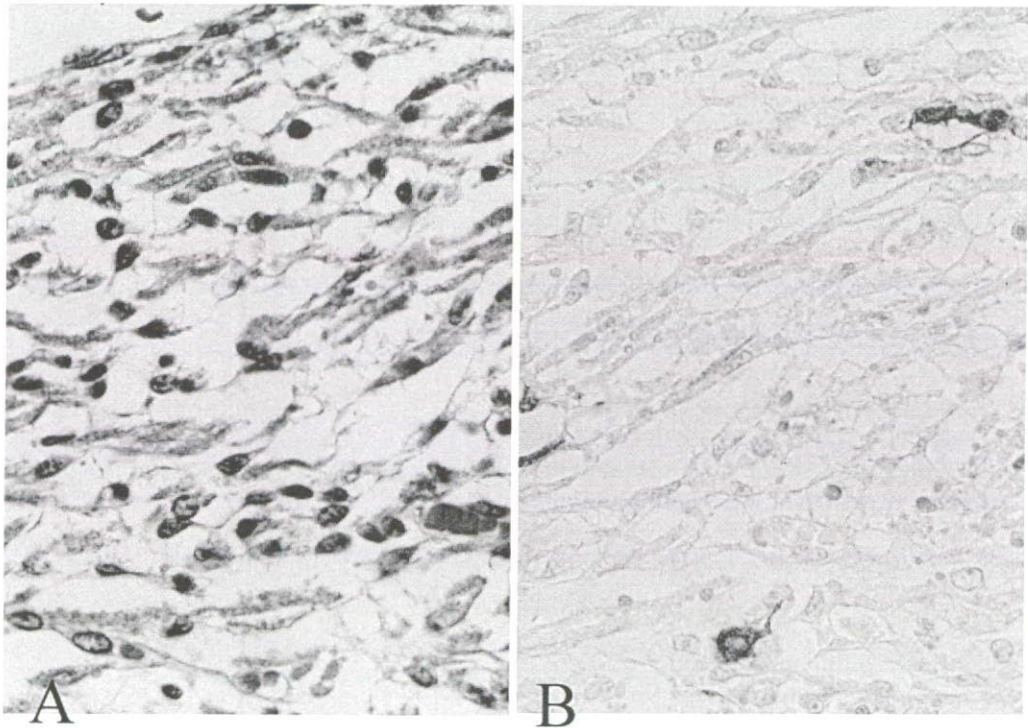


图 1



Immunohistochemical detection of coxsackievirus B antigen in mice inoculated with CVB1 (A & B) and CVB3 (C & D).

图 2



CVB1-Infected murine heart (HE)

Detection of CVB1-VP3 antigen

### 3. 神経変性疾患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与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」であるパーキンソン病とアルツハイマー病について、BDV との関連性の有無を検討している。これまでの結果では、両疾患患者由来剖検脳の一部において BDV 遺伝子が検出できた。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おり、ストレス刺激に弱く、神経細胞のアポトーシスを引き起こし易いこと、また初期の感染時期がその後の病態を左右することが明らかになった。

#### 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、ボルナ病ウイルス (Borna Disease Virus; BDV) の中枢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。一方、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) では、BDV の持続感染により引き起こされる神経細胞の機能障害が原因と考えられる症状の出現も認められることが明らかとなっている。

ヒトにおいても BDV が病原性を持つ可能性が、疫学的研究 (精神疾患患者の脳脊髄液中に BDV に対する抗体を検出) から示唆され、その後も多くの国で、複数の研究グループにより同様の疫学的研究が行われてきた。その多くは精神疾患と BDV との関連性を支持しているが、一部では関連性を認めていない。

私たちは、これまで「神経変性疾患」であるパーキンソン病と BDV との関連性について検討してきた。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 (ISH) を行い、高率に検出できることを確認した (PCR 法により

8/11 ; ISH 法により 2/9)。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; HMGB1) との結合性を示すことを明らかにした。実際、BDV 持続感染細胞は非感染細胞に比べ、神経突起伸長能に明らかな低下を引き起こしていることを報告した。今回、アルツハイマー病患者由来剖検脳についても、BDV が検出できるかどうかを検討した。さらに、モデル動物を用いた BDV 病態解析を、また BDV p24 の及ぼす amphoterin 機能への影響について、昨年度から継続して検討を重ねた。

#### B. 研究方法

##### 1) アルツハイマー病患者剖検脳内 BDV 検索

アルツハイマー病患者剖検脳 7 例は米国ルイジアナ州立大学脳研究所の Larry A. Carver 博士との共同研究として入手した。BDV の検出には、BDV の p40 (Nucleoprotein; N) および p24 (Phosphoprotein; P) 領域の RT-PCR 法、およびこれら領域の全長リボプローブを用いた ISH 法により行った。

##### 2) モデル動物への BDV 脳内感染