

スナネズミ（1日、7日、14日齢）およびラット（7日、14日齢）の脳内（眼と耳の間の硬膜下腔）に、BDVを200 FFU接種した。経時的に症状の出現を観察し、必要に応じて剖検脳の病理学的検討（炎症像、BDV RNA および抗原発現など）を行った。

3) BDV 持続感染後のストレス刺激への影響

ラット（1日齢）へのBDV脳内接種を行い、BDVの脳内持続感染状態にした後に、LPS腹腔内投与を行った。BDV持続感染へのLPSストレス刺激の影響を検討するため、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。

C. & D. 研究結果および考察

1) アルツハイマー病患者剖検脳内BDV検索

RT-PCR法により、N領域において3/6例、P領域において3/6例に陽性反応が認められた。一方、ISH法により、N領域において2/7例、P領域において2/7例に陽性反応が認められた。今後、これらの陽性反応が認められたサンプルにおけるBDVの遺伝子配列などを明らかにし、実験室株などによるコンタミネーションの可能性排除について検討する必要があるが、今回ISH法によっても検出されたことから、BDVが神経変性疾患剖検脳内に高率に存在すると考えられ、今後さらに症例数を増やして検討する必要がある。

2) モデル動物へのBDV脳内感染

ラット（7日、14日齢）へのBDV脳内接種では海馬における神経変性が認められたが、いずれも無症状に経過した。一方、スナネズミへのBDV脳内接種では、1日齢では全例に神経症状が出現し、30日前後で死亡した。下部脳幹部でのBDV抗原やRNAの検出率が徐々に高くなり、この脳領域でのウイルス量の亢進時期が神経症状の出現時期と相関していた。一方、7日齢接種では約75%が、14日齢接種では約25%が死亡した。生き残ったスナネズミは、神経症状陽性のものと陰性のものに分けられた。神経症状陽性スナネズミは、神経症状陰性スナネズミよりも、脳内の特定領域（下部脳幹部な

ど）でのBDV抗原やRNAのレベルが高い傾向が観察された。一方、神経症状陽性、陰性スナネズミともに海馬領域や中脳でのBDVレベルに顕著な違いは認められなかった。このように、スナネズミを用いた場合には、脳内の特定部位におけるウイルス複製量と神経症状の程度との相関性があると思われた。

3) BDV 持続感染後のストレス応答への影響

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4日目をピークに3週目まで脳内での発現が認められる。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。BDVを脳内接種したラットにおけるamphoterin の発現を調べたところ、8週目においても高いレベルを維持していた。このようなラット8週目にLPS投与を行ったところ、非感染状態ではLPSに対する応答としてamphoterin 発現の亢進が認められたが、BDV持続感染状態ではそもそも高いamphoterin 発現レベルでありLPS投与による亢進は認められなかった。一方、RAGE 発現においては、BDV持続感染により大きく発現低下が起っていた。これは、LPS投与によっても発現レベルに大きな変化は観察されなかった。上述のように、BDVが脳内持続感染したラットにおいて、後にLPS投与を行うと、中脳にアポトーシスが出現した。このように、生後早期にBDVに感染し、脳内に持続感染状態が成立していると、その後のストレス応答を正常に機能することができず、脳内アポトーシス出現、神経症状の出現へと経過すると考えられた。

E. 結論

パーキンソン病と同様に、アルツハイマー病においても、BDVが一部の患者剖検脳サンプルから検出できることが明らかとなった。さらに、モデル動物を用いることにより、BDVの脳内局在部位と神経症状出現との関連性、また神経細胞の生存維持能力はBDV持続感染により低

下を招いていることが明らかとなった。今後は、患者剖検脳におけるBDV病態機序を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

(原著論文)

1. Okamoto, M., Kamitani, W., Hagiwara, K., Kirisawa, R., Iwai, H., Nakamura, Y., Kobayashi, T., Tomonaga, K., Ikuta, K., and Taniyama, H.: Detection of Borna Disease virus (BDV) in brain and placenta of equine fetuses and mothers positive for serum BDV-antibodies and BDV RNAs in PBMCs. *J. Clin. Microbiol.*, in press.
2. 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 oligodendrogloma cell line. *J. Virol.* 76, 3873-3880, 2002.
3. Okamoto, M., Furuoka, H., Hagiwara, K., Kamitani, W., Kirisawa, R., Ikuta, K. and Taniyama, H.: Borna disease in a heifer in Japan. *Vet. Rec.*, 150, 16-18, 2002.
4. Okamoto, M., Kagawa, Y., Kamitani, W., Hagiwara, K., Kirisawa, R., Iwai, H., Ikuta, K. and Taniyama, H.: Borna disease in a dog in Japan. *J. Comp. Pathol.* 126, 312-317, 2002.
5. Hagiwara, K., Okamoto, M., Kamitani, W., Takamura, S., Taniyama, H., Tsunoda, N., Tanaka, H., Iwai, H., and Ikuta, K.: Nosological study of Borna disease virus infection in race horses. *Vet. Microbiol.* 84, 367-374, 2002.

(レビュー等)

1. 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。脳科学 24, 297-304, 2002.
2. 生田和良：感染症「ボルナ病ウイルス」。小児内科 増刊号「小児疾患診療のための病態生理 I」、1062-1066, 2002.
3. 神谷亘、朝長啓造、生田和良：ボルナ病

ウイルス感染。日本臨床 「新世紀の感染症学 上」、印刷中。

4. 山下真紀子、馬場聡子、生田和良：ボルナ病ウイルスと慢性疲労症候群。医学のあゆみ、印刷中。
 5. 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.
 6. Tomonaga, K., Kobayashi, T. and Ikuta, K.: Molecular and cell biology of Borna disease virus infection. *Microbes Infect.* 4, 491-500, 2002.
 7. 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., pp87-123.
- ### 2. 学会発表
1. 神谷亘、小野悦郎、小林剛、朝長啓造、生田和良：リン酸蛋白質の神経細胞障害性と中枢神経系病原性への関与。第6回日本神経ウイルス研究会。2002.
 2. 小林剛、張国旗、李丙載、山下真紀子、馬場聡子、神谷亘、矢内英之、朝長啓造、生田和良：ボルナ病ウイルス主要抗原の細胞内局在調節機構の解明。第134回獣医学会。2002.
 3. 小林剛、張国旗、李丙載、山下真紀子、馬場聡子、神谷亘、矢内英之、朝長啓造、生田和良：ボルナ病ウイルスリン酸蛋白質(P)の細胞内局在調節機構の解明。第50回日本ウイルス学会学術集会。2002.
 4. 山下真紀子、神谷亘、李丙載、馬場聡子、小林剛、辻祥太郎、朝長啓造、生田和良：BDV持続感染による細胞間接着能の低下とその分子機序の解明。第50回日本ウイルス学会学術集会。2002.
 5. 神谷亘、李丙載、小林剛、朝長啓造、生田和良：BDV持続感染ラットにおけるHMGB1-RAGEを介したストレス応答能の低下。第50回日本ウイルス学会学術集会。2002.
 6. 李丙載、渡辺真紀子、神谷亘、山下真紀子、馬場聡子、小林剛、朝長啓造、生田和良：スナネズの発育に伴うボルナ病ウイルスの病原性変化の解析。第50回日

- 本ウイルス学会学術集会. 2002.
7. 馬場聡子、笹尾芙蓉子、山下真紀子、張国旗、李丙載、神谷亘、小林剛、辻祥太郎、松田治男、倉恒弘彦、朝長啓造、生田和良：慢性疲労症候群におけるポルナ病ウイルス関連自己抗体の検出. 第 50 回 日本ウイルス学会学術集会. 2002.
 8. 生田和良：ワークショップ「基礎ウイルス学と臨床ウイルス学の融合」ウイルスが精神疾患を引き起こす？第 50 回 日本ウイルス学会学術集会. 2002.
 9. Ikuta, K., Kamitani, W., Ono, E., Kobayashi, T., Taniyama, H., and Tomonaga, K.: Neurobehavioral disorders in transgenic mice with the CNS expression of Borna disease virus phosphoprotein as an animal model for chronic fatigue syndrome. International Conference on Fatigue Science, Sweden, 2002.
 10. Ikuta, K., Kamitani, W., Ono, E., Kobayashi, T., Taniyama, H., and Tomonaga, K.: Workshop [Borna virus] : Neuropsychiatric-like disorders in transgenic mice expressing Borna disease virus phosphoprotein in the CNS. 4th International Symposium on NeuroVirology, Germany, 2002.
 11. Ikuta, K., Watanabe, M., Lee, B-J., Yamashita, M., Kamitani, W., Kobayashi, T., and Tomonaga, K.: [Poster] : Borna disease virus induces fatal neurological disorders in Cyclosporine A-treated, immunosuppressed neonatal gerbils. 4th International Symposium on NeuroVirology, Germany, 2002.
 12. Ikuta, K., Zhang, G., Kobayashi, T., Kamitani, W., Yamashita, M., Baba, S., Komoto, S., and Tomonaga, K.: [Poster] : Borna disease virus phosphoprotein interference with amphoterin inhibits p53 activity. 4th International Symposium on NeuroVirology, Germany, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

4. 血液疾患における起因ウイルスの解明に関する研究

分担研究者 佐多 徹太郎 (国立感染症研究所感染病理部長)

研究協力者 尾崎泰子、中島典子、片野晴隆 (同感染病理部)

研究要旨 特発性造血障害研究班(主任:小峰班長)から提供され、収集した臨床検体、計58検体についてHHV-8 DNAをPCR法で検索し、さらにわれわれの開発したmixed ELISA法とHHV-8持続感染細胞株TY-1を用いた蛍光抗体法でも検討した。その結果、HHV-8 DNAは検出されず、また血漿中のウイルス抗体価も検出されなかった。特発性造血障害疾患におけるHHV-8の関与は低いと考えられた。

A. 研究目的

骨髄の造血機能障害に由来する特発性造血障害(再生不良性貧血、赤芽球癆、溶血性貧血)ならびに特発性血小板減少症の発症と経過に関与するウイルス性病原体の存在について検討することを目的とする。本年度はこれらの特定血液疾患におけるヒトヘルペスウイルス8(HHV-8)の関与について検討した。

B. 研究方法

昨年度までに特発性造血障害研究班(主任:小峰班長)から提供され、収集した臨床検体を対象とした。46例の血液疾患(再生不良性貧血、骨髄腫等)患者由来の骨髄液ないし末梢血検体が特発性造血器障害研究班(小峰班長)班員から提供された。15例は細胞成分と血漿成分の2検体があり、31例は血漿検体のみである。各検体(200 μ lの血漿ないし10 μ lの末梢血単核球)からQIAGEN QIAamp DNA blood kitを使用し、DNAを抽出した。HHV-8 DNAの検出はsingleないしnested PCR法により試みた。プライマーはHHV-8のminor capsid 遺伝子を増幅するもので、233 bpと内部にプライマーを設定した153 bpの増幅産物を得るものである。いずれも35サイクルで増幅した。同時に、内部対照として β グロビンのPCRを行った。血漿検体で β グロビンのPCRが陰性であったも

のが3例あったため、29例の血漿検体と15例の細胞検体、14例血漿検体の計58検体についてHHV-8 DNAをPCR法で検索した。また血清ないし血漿検体についてはHHV-8抗体の有無について、われわれの開発したmixed ELISA法とHHV-8持続感染細胞株TY-1をTPAで刺激し、48時間後の細胞をスライドガラスにスポットしアセトンで10分間固定した細胞スミアを用いた蛍光抗体法でも検討した。

(倫理面への配慮)

特発性造血器障害研究班(小峰班長)班員が各自インフォームドコンセントをとっている。各検体には受付番号をつけた。送付時に患者名はなく臨床診断名のみ添付されており、到着後受付番号により血球成分と血漿成分の分離作業を行ったので、個人名が特定できない。またDNA性状の検討として β グロビンPCRを行った以外は、ウイルス病原体のPCRを行ったのみである。

C. 研究結果

いずれも1st PCRでは陽性産物は得られなかった。Nested PCR法は計3回行ったが、3回とも陽性になった検体はなく、2回陽性となったものが1例、1回陽性となったものが4例あった。その結果からこれらの検体においてHHV-8 DNAはすべて陰性と考えた。確認する意味で、

血漿中の HHV-8 抗体の有無について、前述した ELISA 法および間接蛍光抗体法で検討したが、いずれも陰性であった (図 1)。

D. 研究結果

再生不良性貧血や骨髄腫等の特発性造血器障害研究班由来の血液疾患患者検体を用いた HHV-8 の検索ではウイルス DNA および血清抗体、いずれも陰性であった。今回検討した臨床班から提供された検体にはいくつかの疾患があり、また経過中の 1 時点のみの検討であり結論を出すには不十分であるが、血液疾患と HHV-8 の関連性については低いと考えられた。今後は臨床班との連携により、特発性造血器障害疾患の臨床経過と関連した検体を用い、ほかのウイルスも含めて検討を行う予定である。HHV-8 は 1994 年に初めて報告された新しいヘルペスウイルスで、 γ ヘルペスウイルスに分類されている。関連疾患としてカポジ肉腫、原発性体液性リンパ腫、固形リンパ腫、そして多巣性キャッスルマン病が知られているので、腫瘍関連ヘルペスウイルスとされている。ウイルスは preB 細胞に持続感染し、マクロファージや血管内皮細胞に感染し、上記病変を起こすとされている。感染細胞ではほとんどが潜伏感染状態で、ごく一部にウイルスが増殖する融解感染がおこる。

以前、一般人の血清 (感染研血清バンク) 1,004 例について血清 HHV-8 抗体の検索を行った。その結果、14 例の陽性検体が検出され、わが国の抗体保有率は 1.4% と結論した。種々のウイルス感染症例について検討したが、カポジ肉腫のない HIV 感染者では 64% と高く、しかし血友病の HIV 感染者では 65 例中 1 例も抗体陽性者はみつからなかった。また多発性骨髄腫、悪性リンパ腫、白血病、MDS、再生不良性貧血、赤芽球癆、マクログロブリン血症、特発性血小板減少性紫斑病の計 56 検体でも、HHV-8 抗体陽性者はみつからなかった。しかしいずれも検索数は結論をだすには十分とはいえなかった。今回、あらたに 58 検体について検討したが、病原体の核酸も抗体も認められなかったことから、特発性造血器障害関連疾患との関連性は高いとはいえないと考えられた。ごく少量のウイルス核酸を検出する nested PCR 法でときに検出されるが、繰り返すと検出できない検体については、十分注意したつもりであるが持ち

込みの可能性もあり、一方、ごく少量のウイルス核酸が検出されても、HHV-8 関連疾患とされている疾患での陽性率と比較して相当の差異があることから、関連性は低いと考えられた。特発性造血器障害関連疾患には再生不良性貧血がある。その中で、特殊型とされる肝炎後再生不良性貧血は成人で 5% 程度、小児でも 24% 程度の原因不明の肝炎が先行しているとの報告がある。一般に若年者に多いが、わが国の小児再生不良性貧血登録患者での原因ウイルスの検索でも不明なことが多い。これは肝炎症状後 1-2 ヶ月後に再生不良性貧血が発症するということからして、検索時期が不適切な可能性も考えられる。一方、肝炎に関係すると考えられるウイルスには、骨髄や末梢血からはヘルペス群ウイルスや肝炎ウイルス、そして肝炎関連ウイルス等が検出できることが知られている。しかし、A 型、D 型、E 型、G 型肝炎ウイルスは骨髄や末梢血には検出されなくても、肝臓組織には比較的長く検出されることがある。われわれはこれらのウイルスの検出について多くの経験があるので、多角的に検出を試みるのが可能である。適切な時期に採取された検体あるいはもし生検肝組織がえられれば、臨床班の班員の方々と協力して、これを用いた検討を行っていきたいと考えている。

E. 結論

特発性造血器障害研究班の提供検体を用いて HHV-8 の関与について PCR 法で検討したが、DNA 陽性例はなく、また血液抗体価の検討でも陰性であった。検討数は十分とはいえないが、現時点では HHV-8 の関与は低いと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

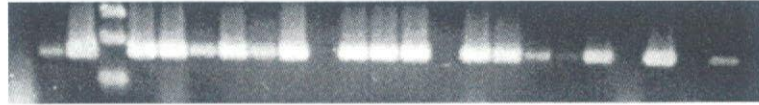
特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

N P P M

β -globin
167 bp

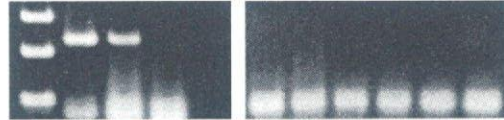


HHV-8
Nested PCR
153 bp



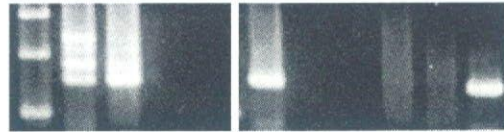
M P P N

HHV-8
1st PCR



233 bp

HHV-8
2nd PCR



153 bp

3 times: 0
2 times: 1
1 time : 4

血清抗体価は全例陰性

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

分担研究者 永武 毅 (長崎大学熱帯医学研究所教授)

研究要旨 びまん性肺疾患または呼吸不全の代表的疾患であるびまん性汎細気管支炎(Diffuse panbronchiolitis; DPB)をはじめとする慢性気道感染症の気道における炎症誘導・炎症終息過程に及ぼす14員環および15員環マクロライド系薬の効果について検討した。14員環マクロライド系薬は活性化好中球のIL-8mRNA発現抑制を介してIL-8産生誘導を抑制することを示した。また、14員環、15員環マクロライド系薬はヒト肺胞マクロファージによるアポトーシス好中球貪食を促進し、とくにエリスロマイシンによる作用はフォスファチジルセリンレセプター依存的で、非催炎性貪食であった。これらの14員環、15員環マクロライド系薬は気道における活性化好中球による炎症誘導を抑制し、さらに炎症終息を促進し、結果的にDPBをはじめとする慢性気道感染症の病態を改善に導くものと考えられた。今後、びまん性肺疾患または呼吸不全に細菌感染の及ぼす影響を14員環、15員環マクロライド系薬がいかに制御可能かなど、治療・予防への新戦略の展開が可能となるものと期待される。

A. 研究目的

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細菌や非病原性の常在細菌がいかに関与しているかの研究を行う。特に、びまん性汎細気管支炎(DPB)をはじめとする慢性気道感染症においては、しばしば持続性緑膿菌感染が合併し、その病態を難治性にする。一方、このDPBをはじめとする慢性気道感染症においては14員環マクロライド系薬、15員環マクロライド系薬による少量持続投与の有効性が知られている。そこで、今回は慢性気道感染症における炎症誘導・炎症終息過程に及ぼすこれらの薬剤の効果について検討した。

B. 研究方法

1. 緑膿菌持続感染を伴うDPB患者の膿性喀痰をDNase処理を加えて、喀痰中の好中球を分離した。この喀痰由来好中球を試験管内で、gentamicin添加のもとに培養した。また、健常

人由来の末梢血好中球もflexible plateで培養した。

2. これらの培養好中球のアポトーシスをフローサイトメトリー法により評価し、さらに培養上清中のIL-8産生誘導についてはELISA法で測定した。

3. 末梢血好中球のIL-8 mRNA発現をノザンプロット法で検討した。

4. 健常者から肺胞マクロファージ(AM)をBAL法により回収し培養した。培養後のAMにアポトーシス好中球(アポトーシス85%)を添加し、洗浄後にMPO染色によりAMのアポトーシス好中球貪食を定量した。このアポトーシス好中球貪食に与える14員環マクロライド系薬などの影響を検討した。また、AM側のPhosphatidylserine (PS) receptorなどのアポトーシス細胞認識機構の阻害剤を添加し、貪食能に及ぼす効果を検討した。

C. 研究結果

DPB 患者喀痰由来の好中球は IL-8 mRNA を強く発現し、分離直後の好中球の約 50% が apoptosis に陥っており、さらに経時的に spontaneous apoptosis が進行した。14 員環マクロライドは末梢血好中球のアポトーシスには、LPS の存在の有無にかかわらず、影響を与えなかった。一方、エリスロマイシン (EM) やクラリスロマイシン (CAM) をはじめとする 14 員環マクロライドは軽度ながら LPS 刺激後の好中球由来の IL-8 産生を有意に抑制した (図 1)。これらの薬剤の好中球由来 IL-8 産生抑制機序はノーザンブロットの結果 (図 2) から、IL-8 mRNA の発現抑制によると推察された。AM によるアポトーシス好中球は血清濃度依存的に増加し、血清の非働化血清により貪食は低下することから補体濃度依存的効果であると考えられた (図 3)。さらに、EM、CAM をはじめとする 14 員環マクロライド薬、15 員環マクロライド薬のアジスロマイシンは AM によるアポトーシス好中球クリアランスを有意に促進した (図 4)。この促進効果には血清因子は必須ではなかった。PS リポゾームによる PS receptor のブロック実験から、EM による貪食促進効果は PS receptor 依存的であることが示唆された (図 5)。また、dexamethason の AM によるアポトーシス好中球貪食促進効果についても確認され、この効果は部分的に PS receptor 依存性であることが示された。さらに、AM のアポトーシス好中球貪食の LPS 刺激後の AM による IL-8、TNF α 産生誘導についても検討したが、EM の存在にかかわらずこれら炎症性サイトカイン産生には影響しなかった。したがって、この AM のアポトーシス好中球貪食は非催炎性貪食と考えられた。

D & E. 考察と結論

今回、DPB をはじめとする慢性気道感染症の炎症誘導・炎症終息過程の解析と、これらにおよぼすマクロライド系薬をはじめとする薬剤の効果について検討した。14 員環マクロライド薬はこれまで、気道上皮細胞の転写調節因子の活性化を抑制し、IL-8 mRNA 発現を抑制することが報告されている。今回、気道上皮細胞と同様に活性化好中球においても 14 員環マクロライド薬による IL-8 mRNA 発現抑制が示され

た。しかしながら、活性化好中球については 14 員環マクロライド薬は全く影響しないことが明らかとなった。また、これまでに副腎皮質ステロイド薬においてマクロファージによるアポトーシス好中球貪食クリアランスが報告されている。今回、我々は 14 員環マクロライド薬、15 員環マクロライド系薬が同様にアポトーシス好中球クリアランスを促進することを明らかにした。この効果は、PS receptor 依存性であり、非催炎性貪食であった。これらの 14 員環、15 員環マクロライド系薬の効果は気道における活性化好中球による炎症誘導を抑制し、さらに炎症終息を促進し、結果的に DPB をはじめとする慢性気道感染症の病態を改善に導くものと考えられる (図 5)。

今後、びまん性肺疾患または呼吸不全に細菌感染の及ぼす悪影響を 14 員環、15 員環マクロライド系薬によりいかに制御できるかについてさらなる検討が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

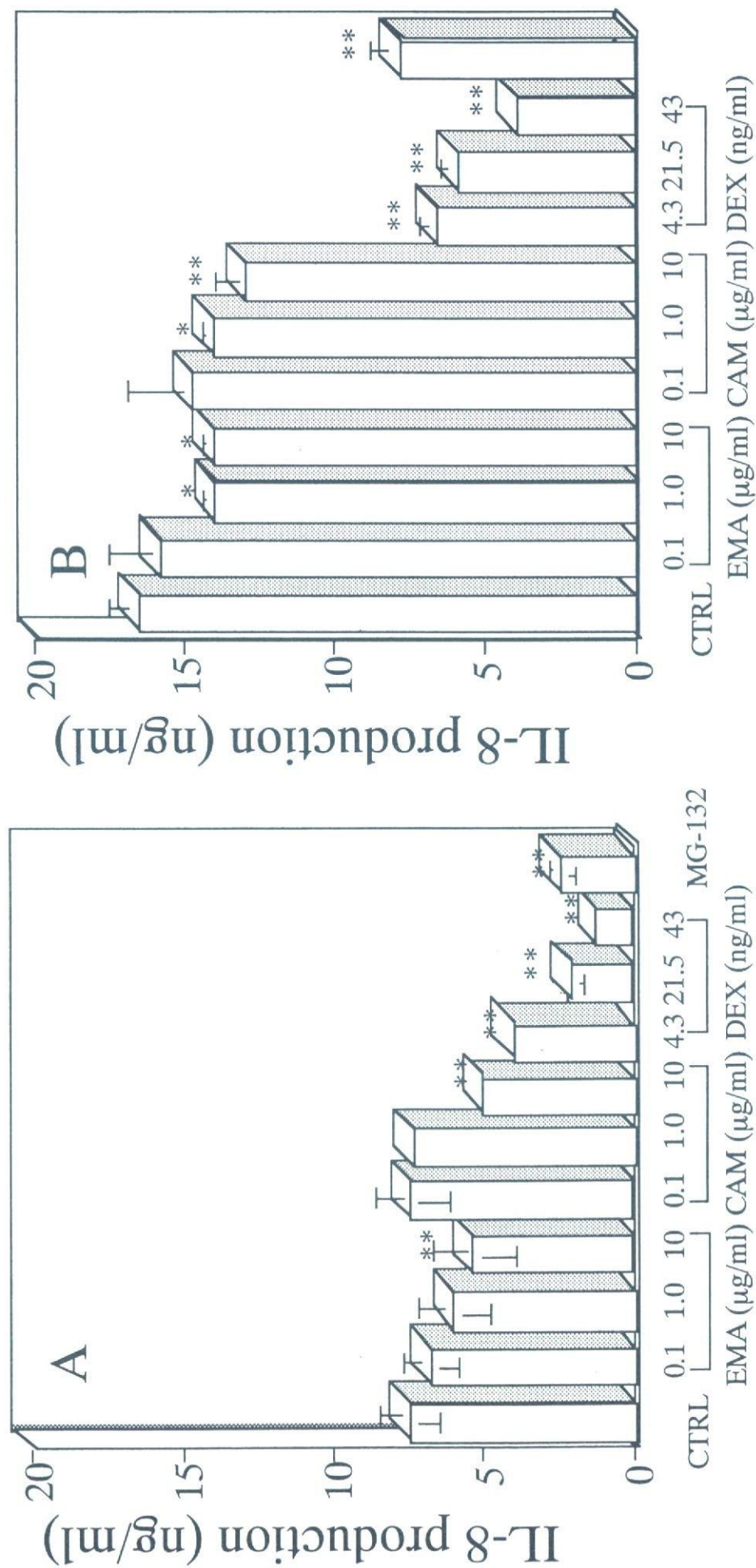
1. Yamaryo T, Oishi K, Yoshimine H, Tsuchihashi Y, Matsushima K, Nagatake T. Fourteen-member macrolides promote the phosphatidylserine receptor-dependent phagocytosis of apoptotic neutrophils by alveolar macrophages. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47(1), 48-53, 2003.
2. Tsuchihashi Y, Oishi K, Yoshimine H, Suzuki S, Kumatori A, T Sunazuka, Omura S, Matsushima K, Nagatake T. Fourteen-member macrolide suppress interleukin-8 production but not promote apoptosis of activated neutrophils. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46: 1101-1104, 2002.
3. Mitsushima H, Oishi K, Nagao T, Ichinose A, Senba M, Iwasaki T, Nagatake T. Acid aspiration induces bacterial pneumonia by enhanced bacterial adherence in mice. *Microb Pathog.* 33: 203-210, 2002.
4. Hoshino K, Watanabe H, Sugita R, Asoh N, Angelo S, Watanabe K, Oishi K, Nagatake T.

- High rate of transmission of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* between parents and children. *J Clin Microb.* 40: 4357-4359, 2002.
5. Ahmed K, Suzuki Y, Miyamoto D, Nagatake T. Asialo-GM1 and Asialo-GM2 are putative adhesion molecules for *Moraxella catarrhalis*. *Med Microbiol Immunol.* 191: 5-10,2002.
 6. Nagatake T, Ahmed K, Oishi K. Prevention of respiratory infections by povidone-iodine gargle. *Dermatology.* 204(Supp) 32-36, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

Fig.1 Effects of 14-member macrolides, DEX, or MG-132 (10^{-6} M) on IL-8 production by human neutrophils in the presence of LPS after 24 h (A) or 48 h (B) of incubation



** , $P < 0.01$; * $P < 0.05$ (compared with control in the presence of LPS)
 MG-132; NF- κ B inhibitor

Fig. 2 Effects of EM (10 $\mu\text{g/ml}$), CAM (10 $\mu\text{g/ml}$) or DEX (10^{-7}M ; 43 ng/ml) on IL-8 gene expression of LPS-stimulated neutrophils

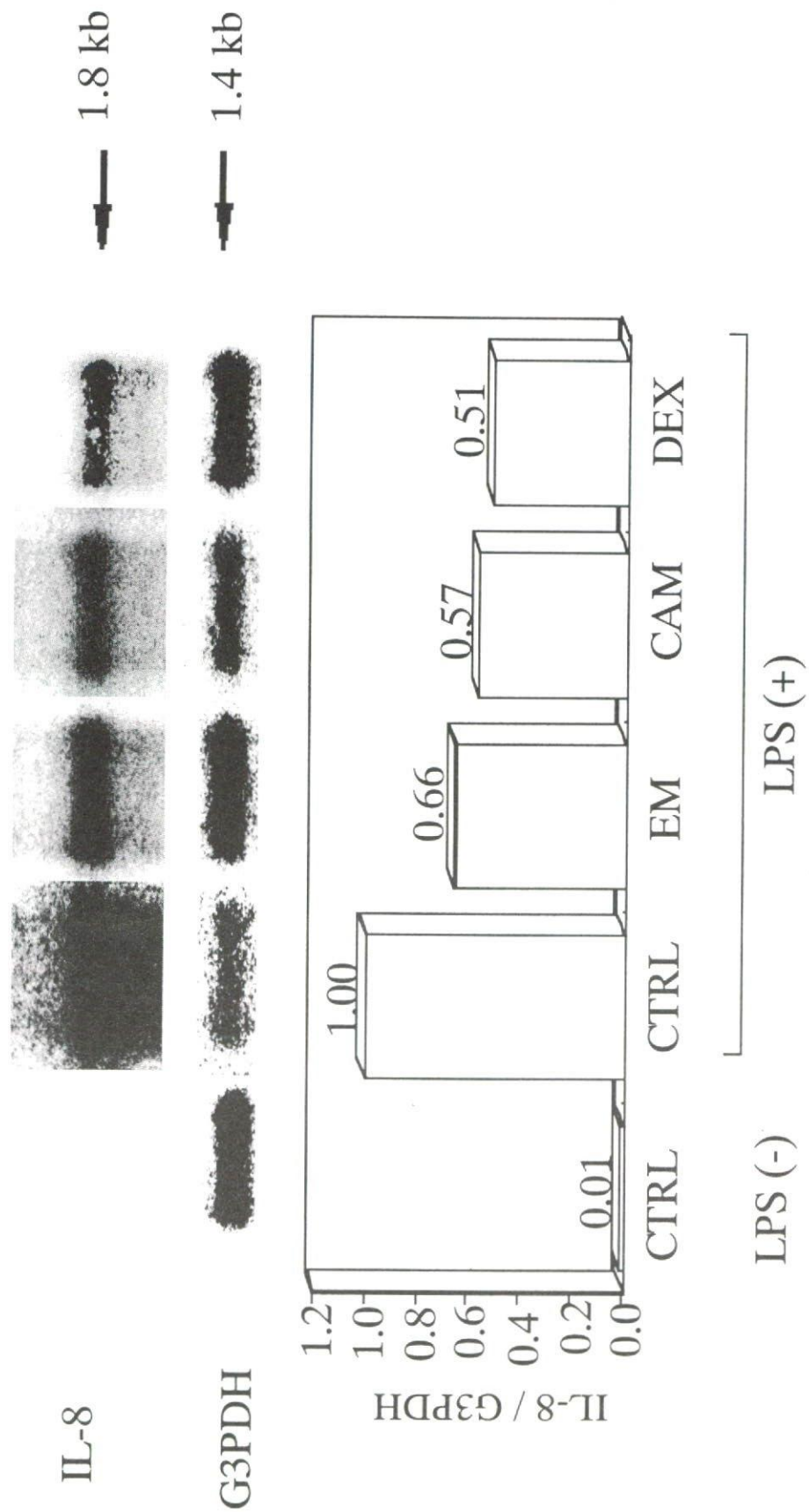


Fig.3 . (A) Photomicrograph of human AM that contain phagocytosed apoptotic neutrophils
(B) Complement-dependent phagocytosis of apoptotic neutrophils by AM

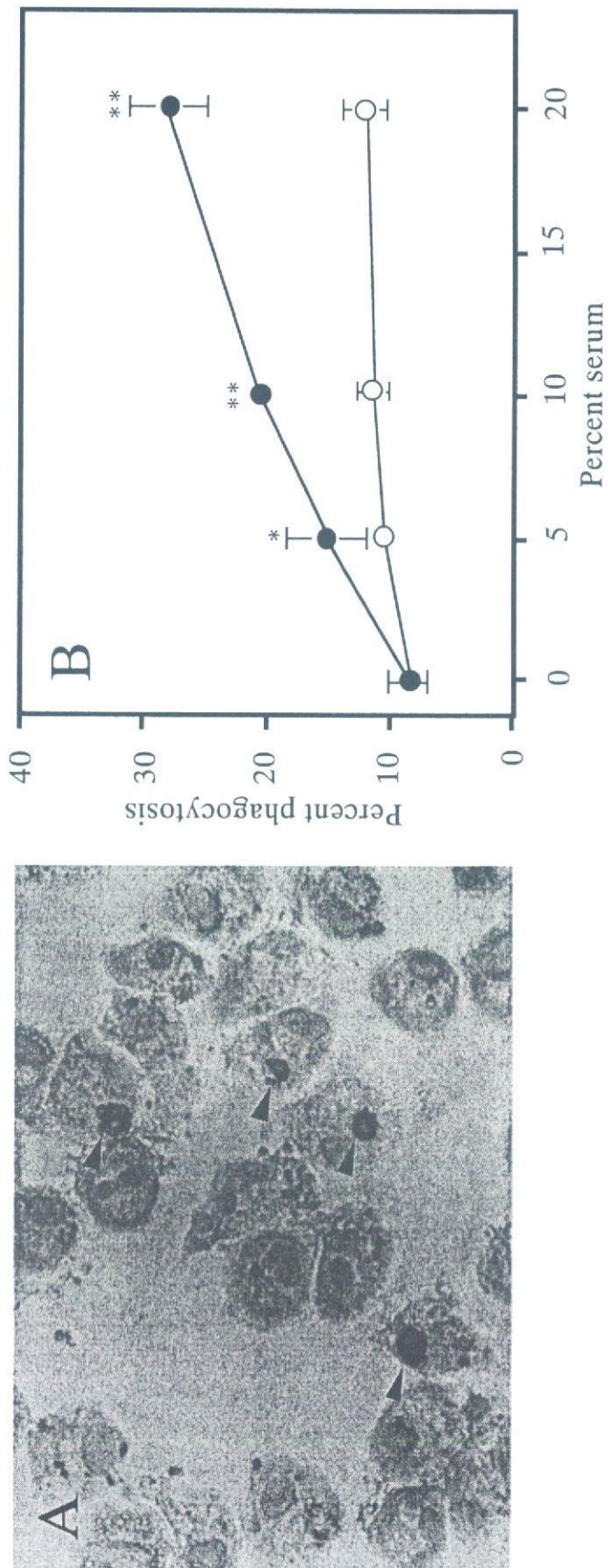


Fig.4. Effects of 14-member macrolides on the phagocytosis of apoptotic neutrophils by human alveolar macrophages in the presence of 10% fresh serum (A) or medium alone (B)

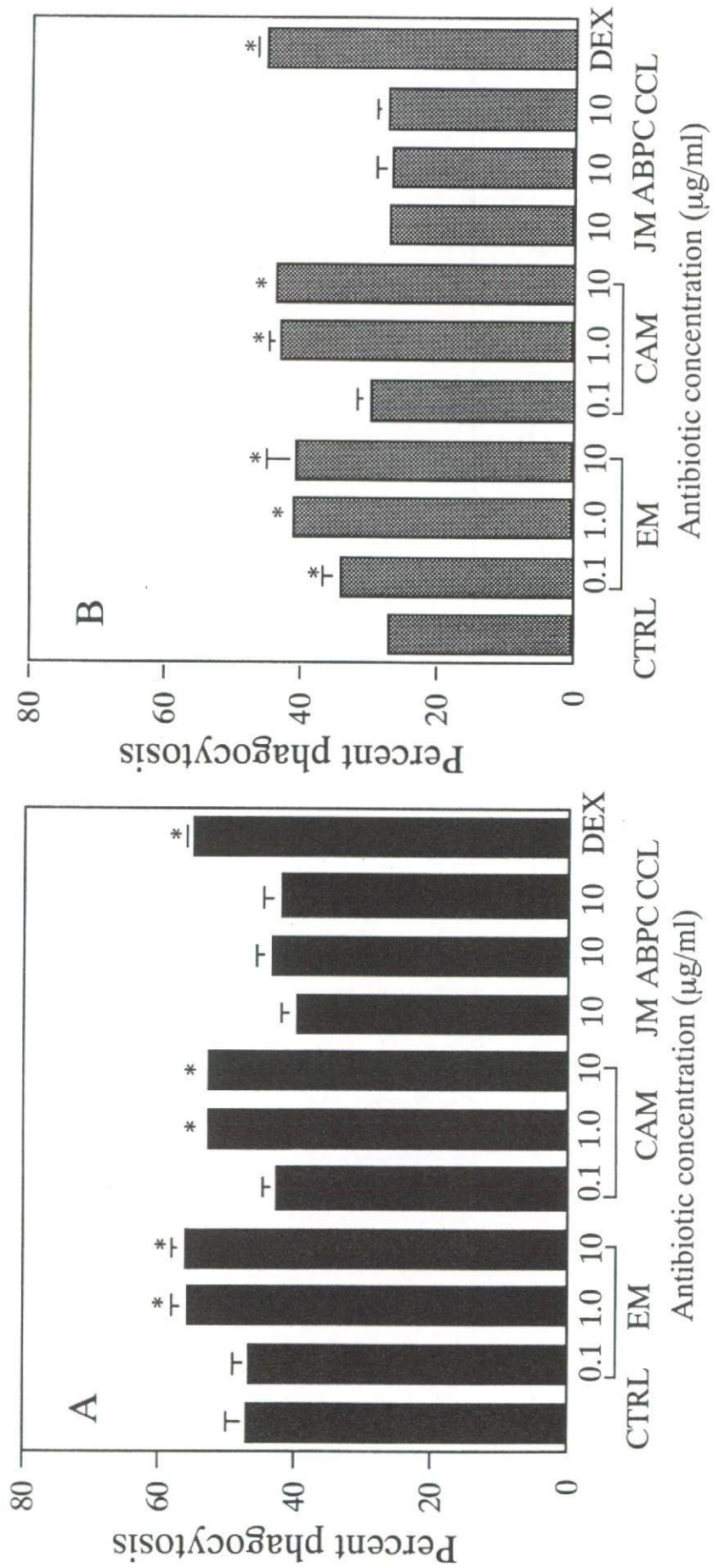
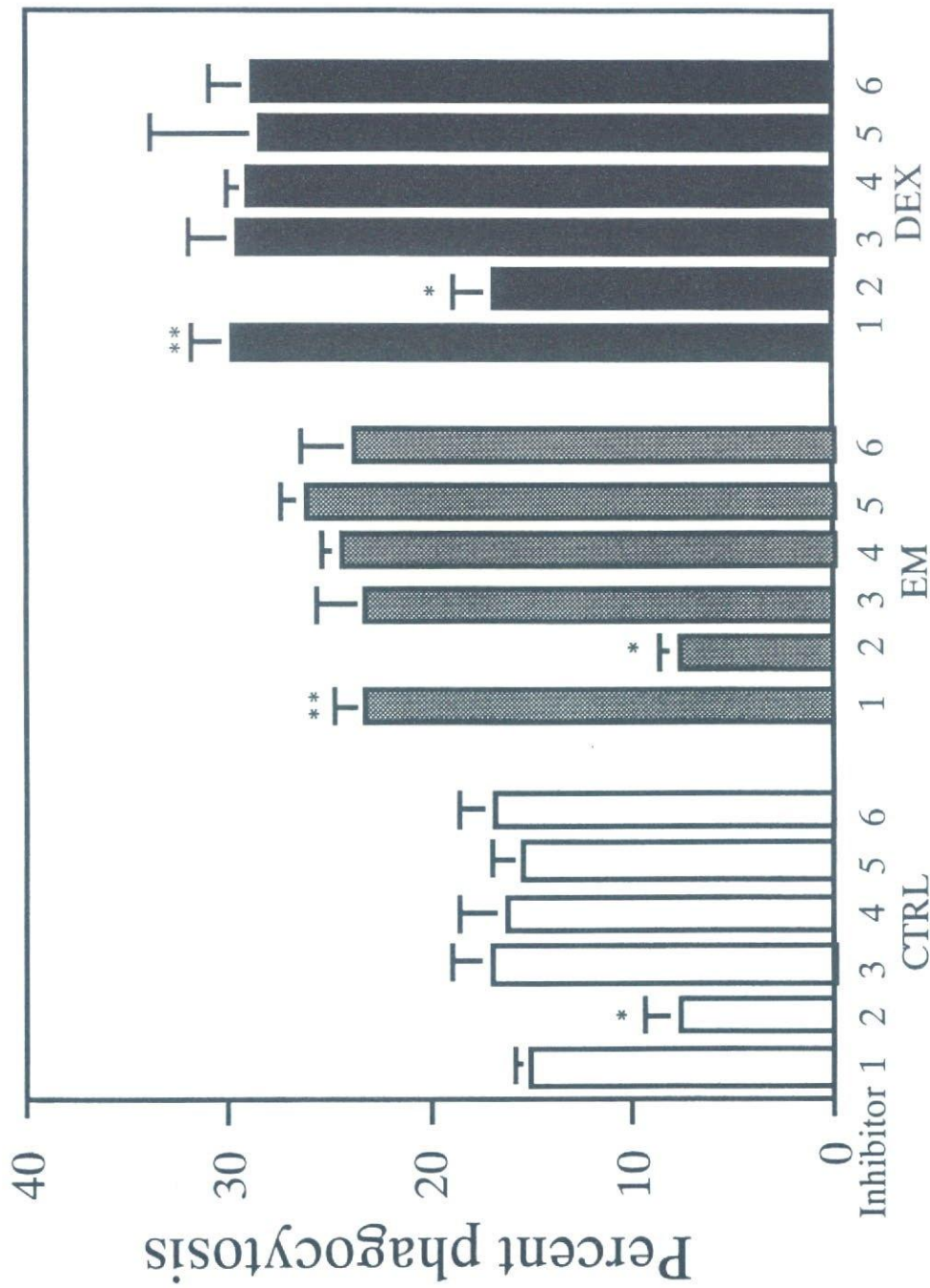


Fig.5. Phosphatidylserine receptors are predominantly responsible for erythromycin-induced phagocytosis of apoptotic neutrophils by human alveolar macrophages



Inhibitors: 1. PC liposome, 2. PS liposome, 3. MAb 217, 4. Control MAb, 5. RGDS, 6. RGES.
 * $P < 0.01$ (Vs PC liposomes in each treatment), ** $P < 0.01$ (Vs PC liposomes in CTRL)

6. 慢性肺気腫あるいは呼吸不全におけるウイルス感染

分担研究者 山谷 睦雄 (東北大学医学部附属病院老人科助教授)

研究要旨 (1) 培養ヒト気管上皮細胞および粘膜下腺細胞のムチン合成に対するライノウイルス感染の作用を調べた。培養ヒト気管上皮細胞および粘膜下腺細胞はそれぞれ MUC1-3、MUC5AC、MUC5B、MUC6 6種類および MUC7 を加えた7種類のムチン mRNA を合成した。ライノウイルス感染は気管上皮細胞の発現する6種類すべてのムチン mRNA 合成と、気管粘膜下腺細胞における MUC5AC mRNA を含む4種類のムチン mRNA 合成を亢進した。培養液ムチン量もライノウイルス感染で増加した。マクロライド抗生物質エリスロマイシンが気管上皮細胞のムチン分泌を抑制した。(2) 慢性閉塞性肺疾患急性増悪時の気道ウイルスと細菌同時感染について検討を開始した。慢性肺気腫4症例においてインフルエンザ感染およびライノウイルス感染と細菌感染の同時感染を認めた。

A. 研究目的

(1) 気管支喘息や慢性肺気腫はウイルス感染が引き金になって急性増悪し、呼吸不全をきたすことが多い。ライノウイルス、インフルエンザウイルス、RSウイルスなどが同定され、二次性の細菌感染が更に症状を悪化させる。ウイルス感染は気道上皮の剥離脱落や気道壁の浮腫を介して気道内腔を狭窄すると言われている。また、炎症性サイトカイン、ヒスタミンやキニンが気道炎症や気管支平滑筋収縮、喀痰分泌を生じて気流障害を促すと考えられている。ムチンは MUC2、MUC5AC、MUC5B、MUC6 などの分泌型ムチンと、細胞内および細胞膜内ドメインからなる MUC1、MUC3、MUC4、MUC12 などの細胞貫通型ムチンに分類される。このうち、分泌型ムチンは気道粘液の主成分として、喀痰の主なゲル成分を構成する。ムチン合成は気道炎症で増加し、ライノウイルス感染時の増加が指摘されている。また、杯細胞などの分泌細胞の過形成や肥大との関係も指摘されている。慢性肺気腫や気管支喘息患者に生ずる呼吸不全増悪においては喀痰増加が原因の1つであり、慢性呼吸器疾患患者の急性増悪の原因に気道ウイルス感染が考えられている。しかし、ムチンは分子生物学的構造の複雑さもあって、これまで研究が進んでいなかった。

(2) インフルエンザやライノウイルスなどの気道ウイルス感染時に肺炎球菌やインフルエンザ菌が混合感染することは急性気管支炎や肺炎の

患者で報告されている。しかし、慢性肺気腫や気管支喘息の急性増悪時に気道ウイルス感染と二次性細菌感染を生ずるかどうかは明確でなかった。

このような背景をもとに、本年度は1. ムチン合成に対するライノウイルス感染の作用とマクロライド抗生物質の抑制作用について、培養ヒト気管上皮細胞および気管粘膜下腺細胞を用いて検討した。また、2. 慢性肺気腫急性増悪時のウイルス感染と細菌感染について検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト気管上皮細胞培養について東北大学医学部倫理委員会の承認を得て行なった。臨床研究は患者に研究内容を説明し、同意を得て行なった。

B. 研究方法

1. ヒト気管上皮細胞および粘膜下腺細胞を試験管に培養し、細胞接着分子 ICAM-1 を感染受容体とするライノウイルス14型を感染させた。ライノウイルス感染前、感染後2、4、8、12時間、あるいは24時間の時点でRNAを抽出し、また、培養液を回収した。ムチン蛋白遺伝子 MUC1-MUC3、MUC5AC、MUC5B、MUC6、MUC7、MUC8 について mRNA 発現量を定量的 RT-PCR 法で測定した。培養液ムチン量については MUC5AC および MUC17Q2 について市販の抗体

を用いて ELISA 法で測定した。エリスロマイシン 10 μ M をライノウイルス感染前から培養液に加え MUC mRNA および培養液ムチン量を測定した。

2. 慢性肺気腫患者 8 症例および慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者 2 症例の風邪による急性増悪時の際に、咽頭ぬぐい液と喀痰を採取した。喀痰の細菌は通常の方法で培養・同定した。気道ウイルスは咽頭ぬぐい液あるいは鼻汁を用いて、細胞培養法あるいはライノウイルスにおいては RT-PCR 法を用いて同定した。風邪の評価は、Jackson の方法に従って、発熱、咽頭痛などの症状をスコア一化して 5 点以上とした。急性増悪は Rodrigues-Roisin の方法に従って、判定した。

C. 研究結果

1. 試験管に培養したヒト気管上皮細胞は MUC1-MUC3、MUC5AC、MUC5B、MUC6 の 6 種類のムチン遺伝子を発現した。MUC5ACmRNA は感染後 2 時間、4 時間、および 8 時間で増加し、24 時間後にはコントロール値に戻った。培養液 MUC5AC 蛋白分泌量はライノウイルス感染 4 時間、8 時間、および 12 時間後に増加し、24 時間後に感染前値に戻った。このため、他のムチン蛋白 mRNA についてもライノウイルス感染 4 時間後でコントロール値と比較した。また、培養液ムチン放出量を感染 24 時間後に比較した。ライノウイルス感染後 4 時間で、培養ヒト気管上皮細胞は MUC1-MUC3、MUC5AC、MUC5B、MUC6 の 6 種類のムチン遺伝子発現が増加した。24 時間後にはライノウイルス感染前の発現量に戻った。培養ヒト気管上皮細胞の培養液中のムチン分泌量はライノウイルス 24 時間後において MUC5AC、MUC17Q2 とともに増加した。上皮細胞にエリスロマイシン 10 μ M を感染 3 日前から作用させると、ライノウイルス感染後 24 時間後の培養液 MUC5AC、および MUC17Q2 量はともに減少した。また、培養ヒト気管粘膜下腺細胞は MUC1-MUC3、MUC5AC、MUC5B、MUC6 および MUC7 の 7 種類のムチン遺伝子を発現した。ライノウイルス感染 4 時間後に、ヒト気管粘膜下腺細胞においては MUC2、MUC3、MUC5AC および MUC5B の mRNA 発現が増加した。とりわけ MUC5AC および MUC5BmRNA が著明に増加した。さらに、ライノウイルス感染による MUC 遺伝子増加がライノウイルス感染によることを確定するために、ライノウイルス 14 型感染受容体である細胞接着分子 ICAM-1 に対する抗体、抗

ICAM-1 抗体で前処理した。MUC5ACmRNA 発現は抗 ICAM-1 抗体で明らかに減少した (コントロール 1.0、ライノウイルス 3.8 \pm 0.4、ライノウイルス+抗 ICAM-1 抗体 1.1 \pm 0.2、n=5) (p<0.05)。また、MUC5AC 蛋白合成も抗 ICAM-1 抗体で明らかに減少した (コントロール 100%、ライノウイルス 126 \pm 2%、ライノウイルス+抗 ICAM-1 抗体 104 \pm 4%、n=5) (p<0.05)。さらに、培養液に放出される炎症性サイトカインの影響を調べるために、インターロイキン(IL)-1 β 及び IL-6 に対する抗体を培養液に添加して、MUC5AC 蛋白合成を調べた。その結果、IL-1 β および IL-6 抗体いずれも、ライノウイルス感染による MUC5AC 合成を変化させなかった (コントロール 100%、ライノウイルス 126 \pm 2%、ライノウイルス+抗 IL-1 β 抗体 125 \pm 4%、ライノウイルス+抗 IL-6 抗体 119 \pm 2%、n=5) (p>0.20)。

2. 慢性肺気腫 8 例および COPD2 症例の急性増悪のうち、A 型インフルエンザが 3 症例、ライノウイルスが 2 症例、およびアデノウイルスが 1 例に同定された。また、喀痰中に H.influenzae が 2 例に、S. pneumoniae が 2 例に、また、Serratia、S.aureus、M. Catarrharis、P. aeruginosa が各 1 例に同定された。このうち、ウイルスと細菌が同じ症例に検出されたのは 4 例で、そのうち、インフルエンザ A 型が同定された 1 症例で S. pneumoniae が検出され、もう 1 症例で S. pneumoniae 検出された。ライノウイルスが同定された 1 症例で H. influenzae が、もう 1 症例で Serratia が検出された。

D. 考察

1. ムチンは全身の粘膜面において合成・分泌されている。ムチンには MUC2、MUC5AC、MUC5B、MUC6 などの分泌型ムチンと、細胞内および細胞膜内ドメインからなる MUC1、MUC3、MUC4、MUC12 などの細胞貫通型ムチンに分類される。このうち、MUC2、MUC5AC、MUC5B、特に MUC5AC および MUC5B は気道粘液の主成分として、喀痰の主なゲル成分を構成する。ムチン合成は気道炎症で増加し、ライノウイルス感染時の増加が指摘されている。また、杯細胞などの分泌細胞の過形成や肥大との関係も指摘されている。ムチンの構成成分の 7-8 割は炭化水素、2 割が蛋白質、1-2%は糖鎖である。分泌型ムチンはジスルフィド結合でモノマーが重合し、3 次元構造をとったオリゴマーで、ゲル状になって強い粘着性を示す。気道粘膜では少なくとも 8 種類のムチ

ンが合成され、そのうち、MUC5AC と MUC5B が主なゲルの成分である。ムチンは分子生物学的構造の複雑さもあって、これまで研究が進んでいなかった。しかし、慢性肺気腫や気管支喘息患者に生ずる呼吸不全増悪においては喀痰増加が原因の1つであり、慢性呼吸器疾患患者の急性増悪の原因に気道ウイルス感染が考えられている。したがって、気道ウイルス感染によるムチン合成亢進の病態解明は治療法に繋がるため、重要な意味を持つ。

本研究において、培養ヒト気管上皮細胞および気管粘膜下腺細胞は数種類の分泌型および細胞貫通型ムチンを合成することが明らかとなった。さらに、風邪の主因であるライノウイルス感染が mRNA および蛋白いずれのレベルでも、ムチン合成を亢進した。培養ヒト気管上皮細胞は MUC1-MUC3、MUC5AC、MUC5B、および MUC6 の6種類のムチンを合成し、そのすべてのムチンをライノウイルス感染が増加した。培養ヒト気管粘膜下腺細胞は MUC1-MUC3、MUC5AC、MUC6、および MUC7mRNA を合成し、MUC2、MUC3、MUC5AC、および MUC5B がライノウイルス感染で増加した。いずれのムチン遺伝子もライノウイルス感染 4 時間前後で発現のピークを示し、24 時間後には感染前の発現量に戻った。

本研究において、ムチン mRNA 発現が 4 時間でピークを示したことは、ライノウイルス感染の短時間の超急性期に既にムチン遺伝子が増加したことを意味している。これまでの私たちの研究で、培養液ライノウイルスは感染 12 時間で増加が認められている。したがって、24 時間以降に増加を認めるインターロイキン (IL) -1 β 、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカイン合成に比べて、短時間で増加する傾向があると認められる。風邪を引いてまもなく喀痰増加が惹起されることを意味している。また、抗 IL-1 β 抗体や抗 IL-6 抗体が MUC5AC 合成に影響を与えなかったことから、気道上皮細胞から感染 1-3 日後に放出されるこれらの炎症性サイトカインが 24 時間以内のムチン合成には関与しないことが示唆される。実験的にライノウイルス感染をおこして気道分泌を測定した研究では、ライノウイルス感染後 2-5 日において鼻腔洗浄液ムチン分泌増加が報告されている。したがって、ライノウイルスによる喀痰合成は比較的長時間継続する。本研究においても、炎症性サイトカイン合成増加を認める 24 時間以降のムチン合成の変化について、今後研究課題として残っている。さらに、今回の研究において、抗 ICAM-1 抗体の前処理によって MUC5AC の mRNA および蛋白合成が抑制された。このことは、ライノウイルス感染後のムチン合成にライノ

ウイルス感染そのものが刺激になっていることを示唆している。しかし、ライノウイルス感染後数時間以内に起こるムチン合成が受容体 ICAM-1 刺激で起こるのか、ライノウイルス増殖が必要なのか、紫外線で増殖能力を消滅したライノウイルスを用いて、今後明らかにする必要がある。

昨年度報告した通り、エリスロマイシンにはライノウイルス感染抑制作用があり、慢性肺気腫患者における風邪および急性増悪予防効果がある。今年度研究、エリスロマイシンにはこのほかにムチン合成抑制作用があることが明らかになった。エリスロマイシンはライノウイルス感染・増殖抑制効果や NF- κ B 抑制効果があり、これが細胞接着分子 ICAM-1 や炎症性サイトカイン減少に関連している。ムチン合成抑制も同様の機序の関与が想定される。MUC2 ムチン合成の細胞内シグナルについては NO や cGMP あるいは Sp1 などが報告されているが、ライノウイルス感染で増加する MUC5AC や MUC5B 合成についても、細胞内シグナルを明らかにする必要があり、今後の研究課題である。

2. インフルエンザやライノウイルスなどの気道ウイルス感染時に肺炎球菌やインフルエンザ菌が混合感染することは急性気管支炎や肺炎の患者で報告されている。気道ウイルス感染時に二次性細菌感染を生ずるかどうかは抗生物質の使用の是非に関係するため、临床上問題となる。本年度は数例しか調査該当者がなかったため、今後症例を増加して、継続調査する予定である。

E. 結論

感冒の主因であるライノウイルス感染により気道上皮細胞および粘膜下腺細胞の喀痰の主成分であるムチン合成が増加する。慢性肺気腫急性増悪時において、気道ウイルス感染と気道細菌感染の同時感染を認めることがある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki T, Yamaya M, Sekizawa K, Hosoda M, Yamada N, Ishizuka S, Yoshino A, Yasuda H,

- Takahashi H, Nishimura H, Sasaki H :
Erythromycin inhibits rhinovirus infection in
cultured human tracheal epithelial cells. *Am J
Respir Crit Care Med* 165: 1113-1118, 2002.
2. Hosoda H, Yamaya M, Suzuki T, Yamada N,
Kamanaka M, Sekizawa K, Butterfield JH,
Watanabe T, Nishimura H, Sasaki H :
Effects of rhinovirus infection on histamine
and cytokine production by cell lines from
human mast cells and basophils. *J Immunol*
169: 1482-1491, 2002.
 3. Yasuda H, Yamaya M, Yanai M, Ohrui T,
Sasaki H : Increased blood
carboxyhaemoglobin concentrations in
inflammatory pulmonary diseases. *Thorax*
57: 779-783, 2002.
 4. Yamaya M : Pathogenesis and management
of virus infection-induced exacerbation of
senile bronchial asthma and chronic
pulmonary emphysema. *Tohoku J Exp Med*
197: 67-80, 2002.
 5. Yamaya M, Hosoda M, Suzuki T, Yamada N,
Sasaki H. Human airway epithelial cell
culture. *Methods in Molecular Biology* 9-26,
2002.
 6. Nakayama K, Jia YX, Hirai H, Shinkawa M,
Yamaya M, Sekizawa K, Sasaki H : Acid
stimulation reduces bactericidal activity of
surface liquid in cultured human airway
epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol.
Biol.* 26: 105-113, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

7. 慢性肺疾患における細菌の関与とその治療法の開発

分担研究者 村田 幸作 (京都大学大学院農学研究科教授)

協力研究者 橋本 渉、河井 重幸 (京都大学大学院農学研究科)

研究要旨 緑膿菌バイオフィーム感染症に関して、*Sphingomonas* 属細菌由来の酵素アルギン酸リアーゼ (A1-III) を利用する治療法を提案している。この治療法を確立するためには、緑膿菌のバイオフィームが関わるエコシステムの理解が必要である。そこで、本年度は緑膿菌のバイオフィーム合成と分解に各々関与するポリリン酸キナーゼ (PPK) とアルギン酸リアーゼ (AlgL) の大量発現・精製系の確立、酵素学的諸性質の決定、並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。

A. 研究目的

緑膿菌はヒトに対して日和見的に感染し、体内でアルギン酸を主成分とするバイオフィームを形成すると重篤な呼吸器疾患を発症する。鞭毛と線毛を持ち活発な運動性を示す緑膿菌は、環境条件に応じて菌体外に多糖アルギン酸を分泌し、これをバイオフィームとして周囲から隔離された生存様式 (エコシステム) を示す。このバイオフィームは抗生物質などの効果を低減させるため、バイオフィーム感染症は難治性となる。従って、バイオフィーム感染症の効果的な治療法は確立されていない。

これまでに、細菌由来の酵素アルギン酸リアーゼ (A1-III) が効率よく緑膿菌バイオフィームを分解することを見出し、A1-III をバイオフィーム感染症の治療に応用することを提案してきた (図1)。現在、本酵素の無抗原化を行っている。そこで本研究は、バイオフィームが関わる緑膿菌エコシステムを解析することにより、本治療法をより効果的にすることを目的とする。

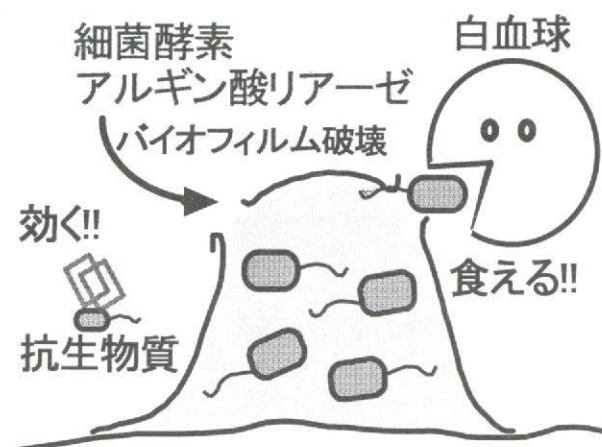


図1 バイオフィーム感染症の新規治療法

活発な運動性を示す緑膿菌はある種の界面に固着した後、ポリリン酸キナーゼ (PPK) が生産するポリリン酸に依存した運動性により集合し、マイクロコロニーを形成する。その後、アルギン酸の合成により、バイオフィームが成熟し、マイクロビアルシティが形成される。この状態で、緑膿菌感染症が誘発される。バイオフィーム内の環境が悪化すると、緑膿菌はアルギン酸リアーゼ (AlgL) でバイオフィームを分解・遊離することにより、新たな感染部位へ移動する (図2)。

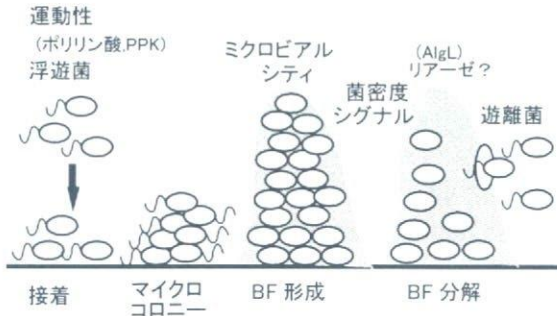


図2 緑膿菌バイオフィーム形成過程

従って、PPKとAlgLが関わるバイオフィームの合成と分解制御機構を解析することは、緑膿菌エコシステムの理解に繋がる。本研究では、緑膿菌のバイオフィーム合成と分解に各々関与すると報告されているPPKとAlgLの大量発現・精製系の確立、酵素学的諸性質の決定、並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。

B. 研究方法

PPK及びAlgL遺伝子を緑膿菌PAO1株よりPCR法によりクローニングした。PPK及びAlgL遺伝子を大腸菌高発現ベクターに各々サブクローニングし、PPK及びAlgLの大腸菌大量発現株を育種した。PPK活性測定は、塩化マグネシウム存在下、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を基質として生じる ^{32}P ポリリン酸を酸不溶物として回収し、シンチレーションカウンターで定量することにより行った。AlgL活性測定は、塩化ナトリウム存在下、アルギン酸を基質として生じる不飽和アルギン酸オリゴ糖由来の紫外吸光度を測定することにより行った。合成オリゴヌクレオチド及び変異体調製キット (Stratagene社製) を用いて、AlgL遺伝子に変異を導入し、AlgL部位特異的変異体を発現・精製した。変異の確認は、塩基配列の解析により行った。

(倫理面への配慮)

組み換えDNA実験は、文部科学省の組み換えDNA実験の指針に則って行った。

C. 研究結果

(i) PPK:ゲノム構造既知の緑膿菌PAO1株より抽出したゲノムDNAを鋳型とするPCR反応により、本遺伝子(2.2kb)をクローニングした。発現ベクターpET-21bのT7プロモーターとヒスチジンタグ配列の間にPPK遺伝子を挿入したプラスミドで、大腸菌BL21(DE3)株を形質転換した。形質転換株におけるPPK発現レベルは全タンパク質の約10%であり、可溶性の細胞抽出画分におけるPPK活性は非形質転換株のそれと比較すると顕著(6倍)に増大した。細胞抽出画分よりキレート及び陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて、PPKを精製した。得られたPPKは、SDS-PAGEで分子量80kDaの単一バンドを示し、ポリリン酸合成活性も保持していた。

(ii) AlgL:ゲノム構造既知の緑膿菌PAO1株より抽出したゲノムDNAを鋳型とするPCR反応により、AlgL遺伝子(1.1kb)をクローニングした。発現ベクターpET-3aのT7プロモーターとターミネーターの間にAlgL遺伝子を挿入したプラスミドで、大腸菌BL21(DE3)pLysS株を形質転換した。形質転換株におけるAlgL発現レベルは、全タンパク質の約30%であった。細胞抽出画分より、硫酸分画、イオン交換並びにゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いて、40kDaのAlgLを精製した。AlgLは、これまでに当研究室で構造機能相関を明らかにしている*Spingomonas*属細菌由来の酵素A1-IIIと有意な相同性(30%)を示した(図3)。

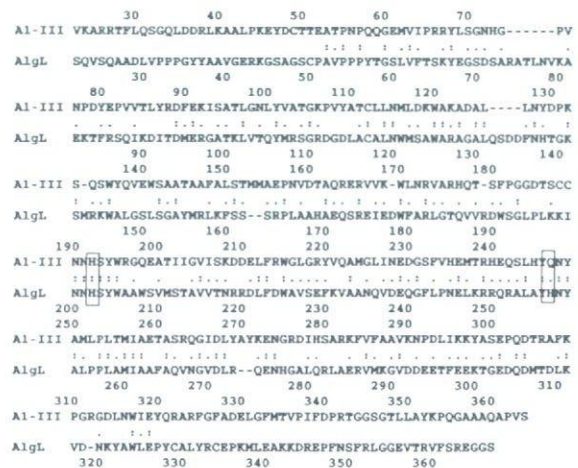


図3 A-IIIとAlgLとのアラインメント