

KY株 (分離直後)

KY-CK9株 (MDCK細胞で9代継代後)

図 4. 分離直後のウイルスと実験室継代後のウイルスとの MDCK 細胞におけるブラック形成能の違い

	1	20	40	
OS株	QKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITNDQIEVTNATELVQSSSTGRICDSPHQ			
OS-CK9株	QKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITNDQIEVTNATELVQSSSTGRICDSPHQ			
KY株	QKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITNDQIEVTNATELVQSSSTGGICDSPHQ			
KY-CK9株	QKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITNDQIEVTNATELVQSSSTGGICDSPHQ			
KY-A9株	QKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITNDQIEVTNATELVQSSSTGGICDSPHQ			
	60	80	100	120
	ILDGENCTLIDALLGDPHCDGFQNKEDLFFVERSKAYSNCYPYDVQDYASLRSLVASSGTLEFNN			
	ILDGENCTLIDALLGDPHCDGFQNKEDLFFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNN			
	ILDGENCTLIDALLGDPHCDGFQNKEDLFFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNN			
	ILDGENCTLIDALLGDPHCDGFQNKEDLFFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNN			
	ILDGENCTLIDALLGDPHCDGFQNKEDLFFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNN			
	140	160	180	
	ESFNWTGVAQNGTSYACKRRSISFFSRLNWLHQLKYRYPALNVTMPNNDKFDKLYIWGVHHPST			
	ESFNWTGVAQDGTSSACKRRSISFFSRLNWLHQLKYRYPALNVTMPNNDKFDKLYIWGVHHPST			
	ESFNWTGVAQNGTSSACKRRSNKSFFSRLNWLHQLKYKYPALNVTMPNNEKFDKLYIWGVHHPST			
	ESFNWTGVAQDGTSSACKRRSNKSFFSRLNWLHQLKYKYPALNVTMPNNEKFDKLYIWGVHHPST			
	ESFNWTGVAQNGTSSACKRRSNKSFFSRLNWLHQLNYKYPALNVTMPNNEKFDKLYIWGVHHPST			

図 5 (その 1). 分離直後のウイルスと MDCK 細胞で継代後、感染増殖効率の上昇したウイルスの HA アミノ酸配列の比較  
網掛け部は糖鎖付加部位を表している。

200 220 240  
 DSDQTSLYAQASGRVTVSTKRSQQTVIPNIGSRPWVVRGISSRISIIYWTIVKPGDILLINSTGNLI  
 DSDQTSLYAQASGRVTVSTKRSQQTVIPNIGSRHWVVRGISSRISIIYWTIVKPGDILLINSTGNLI  
 DSDQISLYAQAPGRVTVSTKRSQQTVIPNIGSRPWVVRGVSSGISIIYWTIVKPGDILLINCTGNLI  
 DSDQISLYAQAPGRVTVSTKRSQQTVIPNIGSRPWVVRGVSSIIYWTIVKPGDILLINCTGNLI  
 DSDQISLYAQAPGRVTVSTKRSQQTVIPNIGSRPWVVRGVSSGISIIYWTIVKPGDILLINCTGNLI

260 280 300  
 APRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLA  
 APRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLA  
 APRGYFKIRSGKSSIMRSDASIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLA  
 APRGYFKIRSGKSSIMRSDASIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLA  
 APRGYFKIRSGKSSIMRSDASIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLA

320 340 360 380  
 TGMARNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMMDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAINQINGKLN  
 TGMARNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMMDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAATNQINGKLN  
 TGMARNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAINQINGKLN  
 TGMARNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAINQINGKLN  
 TGMARNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAINQINGKLN

400 420 440  
 RLIEKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNL  
 RLIEKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNL  
 RLIEKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNL  
 RLIEKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNL  
 RLIEKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNL

460 480 500  
 FERTRKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYK  
 FERTRKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYK  
 FERTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYK  
 FERTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYK  
 FERTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDRDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYK

520 540  
 DWILWISFAISCFLLCVLLGFIMWACQKGNIRCNICI\*  
 DWILWISFAISCFLLCVLLGFIMWACQKGNIRCNICI\*  
 DWILWISFAISCFLLCVLLGFIMWACQKGNIRCNICI\*  
 DWILWISFAISCFLLCVLLGFIMWACQKGNIRCNICI\*  
 DWILWISFAISCFLLCVLLGFIMWACQKGNIRCNICI\*

図 5 (その 2) . 分離直後のウイルスと MDCK 細胞で継代後、感染増殖効率の上昇したウイルスの HA アミノ酸配列の比較  
 網掛け部は糖鎖付加部位を表している。

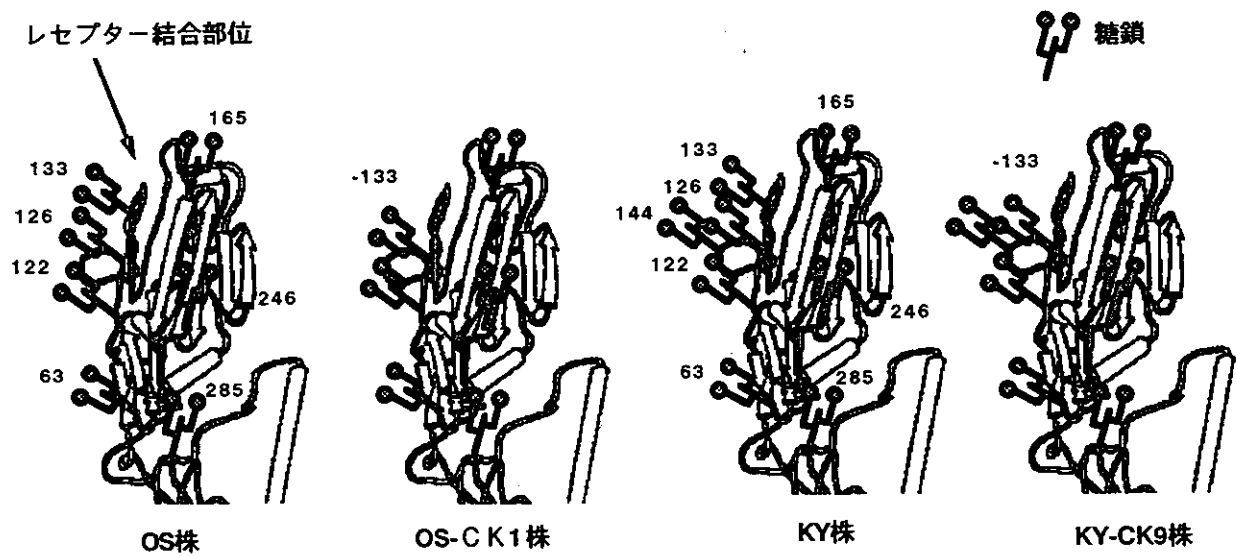


図 6. 分離直後のウイルスと MDCK 細胞で継代後、感染増殖効率の上昇したウイルスの HA 頭部の糖鎖付加部位の比較  
 数字は糖鎖付加アミノ酸の位置を表している。-133 は 133 番目のアミノ酸にあった糖鎖付加モチーフが消失したことを表している。

平成 14 年度厚生科学研究（脳科学研究事業）  
分担研究報告書  
インフルエンザ脳炎・脳症の発症機序の解析と治療の開発  
小児の上気道におけるウイルスと細菌のかかわり—日本と海外との比較研究を通じて  
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

インフルエンザ脳炎・脳症は小児、特に 5 歳以下の小児に数多く発症しており（80%）、そのピークが 2～3 歳にある。これらの年齢分布が急性呼吸器感染症（ARI）の発症年齢に一致している点に私共は着目してきた。小児ではインフルエンザウイルス、RSウイルスなどのウイルス感染をくり返すばかりでなく、呼吸器親和性病原細菌の肺炎球菌、インフルエンザ菌、モラキセラ・カタラーリスなどの上気道炎・下気道炎がくり返されており、かつこれらの病原細菌を非感染時にも高率に上気道粘膜に付着させていることを明らかにした。一方、木戸らの研究により、インフルエンザウイルスの活性化（HA の開裂）には多種類の細菌が産生するプロテアーゼの働きが重要であるが、感染の刺激によって気道上皮細胞からもプロテアーゼが産生されていることが指摘されている。本研究を通して、出生直後無菌である新生児から成長の課程で種々の病原体と出会い、粘膜付着や感染を通して免疫学的に鍛えあげられてゆく小児で、ウイルスと細菌とのかかわりが重症のインフルエンザ脳炎・脳症などの病態とどのように関連するのかを明らかにすることを目的に研究をすすめている。結果としては、ARI の起炎菌である肺炎球菌、インフルエンザ菌、モラキセラ・カタラーリスのすべてにおいてペニシリンをはじめとする抗菌薬の耐性化が特に 3 歳以下の小児において最近の 10 年間で激増していることが明らかとなった。途上国を含む海外においても同様の傾向があり、これらの抗菌薬耐性による ARI の難治化がすでに指摘されつつある。今後、これらがインフルエンザの病態の重症化と直接、間接にどのようにかかわるかを検証する必要がある。

A. 研究目的

小児が高率に上気道粘膜に病原細菌を付着させていることがこれまでの検討で明らかである。しかるに、ウイルスと細菌とのかかわりにおいてインフルエンザウイルスの活性化に働くと考えられている呼吸器親和性病原細菌が小児の上気道・下気道でいかなる病態の重症化への関与を示すものであるかは不明の部分が多い。そこで、今回はタイ国チェンマイ大学およびベトナム国立公衆衛生院との間で小児の ARI の起炎病原体についてウイルス性と細菌性の両者が起炎病原体として検出可能となったことから、まず、インフルエンザウイルスの分離と呼吸器親和性病原細菌の分離について小児での ARI を場としていかなる重症病態に関与しているかを明らかにすることを目的に実態調査することとした。また、同時にインフルエンザ脳炎・脳症がこれらの国で

どのように認識されているかの調査も引き続き行うことを目的として共同研究を行った。

B. 研究方法

日本国内においてはすでに幼稚園、小学校などの小児について全くの健康時と急性上気道炎（かぜ症候群）の時での咽頭粘膜への付着病原細菌を調査し、健康時にも小児の咽頭には呼吸器親和性病原細菌が高率に付着していることを明らかにしてきた。今回、ベトナム国では小児の ARI 起炎菌について肺炎群、気管支炎群、正常コントロール群の 3 群について起炎菌診断の為の上咽頭ぬぐい液の定量培養法と塗沫のグラム染色を用いた炎症細胞診によっていかなる呼吸器病原細菌が有意に検出されるかの検討を行った。また、同時期の小児を含むインフルエンザ分離の年間を通じた調査も併行して行った。さらに、今年度は

タイ国チェンマイ大学医学部と共同で北部タイにおける小児の咽頭付着病原細菌について調査を開始した。来年度にはインフルエンザの病原診断システムをタイ国内でも可能にすべく準備を開始した。

### C. 研究結果

小児におけるインフルエンザ脳炎・脳症患者の症例が得られず、インフルエンザウイルスと細菌プロテアーゼの関連については今年度は検討出来なかった。しかるに、高齢者、慢性心・肺疾患患者などには積極的にインフルエンザワクチン接種を行っている。今年度はワクチン接種者の絶対数が増加している中で、ワクチン接種者でのインフルエンザ発症者もみられ、ワクチン無効例の解析で高いインフルエンザ抗体価であっても細菌感染の合併症例でのワクチン無効例の存在などが明らかとなりつつある。さらに、今回のタイ国、チェンマイ大学での3~5歳小児の咽頭付着呼吸器病原細菌の検討では肺炎球菌、インフルエンザ菌、モラキセラ・カタラーリスの3菌の付着率はきわめて高いこと、ベトナムでの肺炎、気管支炎、コントロール群の主に3歳以下小児での成績では上記3大起炎菌、特に肺炎球菌とインフルエンザ菌の肺炎における起炎菌としての重要性が示された。ベトナム小児のコントロール群においても、日本、タイと同様に高率に呼吸器親和性病原細菌付着がみとめられた。

一方、ベトナムでは今年度インフルエンザのサーベイランス事業が展開され、5歳以下の小児で患者数のピークを有することが明らかとなった。また、ベトナムではほぼ一年間を通してインフルエンザウイルスが患者から分離されており、日本や欧米のように1~3月に集中的に流行がみとめられるものではない特有の流行パターンがみられる。さらに、アジアの途上国ではインフルエンザ脳炎・脳症の有無について必ずしも明確には十分認知されていないことも明らかとなった。

### D. 考察

インフルエンザ脳炎・脳症は日本で5歳以下と、とりわけ幼児に集中的に発症している。いわゆる免疫学的に未熟で、あらゆる種類の病原体感染の

危険にさらされている低年齢層での発症である。これまでの所、脳炎・脳症の発症の要因として、ライ症候群と同様に解熱剤の使用をあげている報告もみられるが、まだ十分な解析がなされているとは言えない。一方、インフルエンザ脳炎・脳症で死亡した小児で必ずしもウイルスが脳・脊髄へ移行したという成績が得られている訳ではない。サイトカイン血症が直接の重症化の要因とも考えられているが、マウスモデルや剖検所見での血管病変などについてもまだ十分な説明が得られていない状況にある。いずれにしても、本症発症のメカニズムの中で、ウイルス感染に細菌などの出す種々の酵素が活性化・重症化の要因としていかなる役割をはたしているのかの研究を、今後さらに進めていく必要がある。

### E. 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) 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.
- 4) Ahmed K, Suzuki Y, Miyamoto D, Nagatake T. Asialo-GM1 and Asialo-GM2 are putative adhesion molecules for *Moraxella*

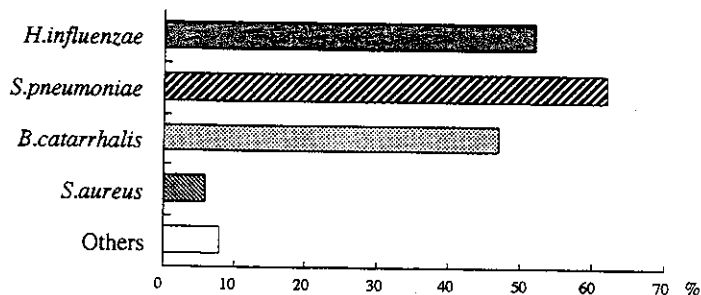
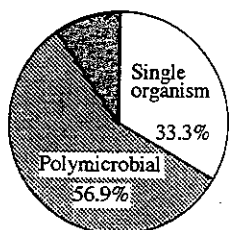
- catarrhalis*. Microbiol Immunol. 191: 5-10, 2002.
- 5) Nagatke T, Ahmed K, Oishi K. Prevention of respiratory infections by povidone-iodine gargle. Dermatology. 204(Supp) 32-36, 2002.
- 6) CT Ndour, K Ahmed, T. Nakagawa. Y. Nakano, A. Ichinose, G. Tarhran, M. Aikawa, T. Nagatake. Modulating effects of mucoregulating drugs on the attachment of *Haemophilus influenzae*. Microb. Pathog. 30:121-127, 2001.
- 7) H. Yoshimine, K. Oishi, F. Mubiru, H. Nalwoga, H. Takahashi, H. Amano, P. Ombasi, K. Watanabe, M. Joloba, T. Aisu, K. Ahmed, M. Shimada, R. Mugerwa, T. Nagatake. Community-acquired pneumonia in Ugandan adults: short-term parenteral ampicillin therapy for bacterial pneumonia. Am J Trop Med Hyg. 64:172-177, 2001.
- 8) K. Morimoto, H. Amano, F. Sonoda, M. Baba, M. Senba, H. Yoshimine, H. Yamamoto, T. Ii, K. Oishi, T. Nagatake. Alveolar macrophages that phagocytose apoptotic neutrophils produce hepatocyte growth factor during bacterial pneumonia in mice. Am J Resp Cell Mol Biol. 24: 608-615, 2001.
- 9) 土橋佳子、永武 毅. インフルエンザ発症のメカニズム. 臨床検査. 46 (2) :139, 2002
- 10) 永武 毅. 呼吸器感染症の分子医学 4. インフルエンザ感染と予防薬: 新しい病態解析と予防法. 日本胸部臨床. 60(S):18-23, 2001
- Antimicrobials: Vol.5 Suppl. 1, 52-54, 2002
- 3) Tsuyoshi Nagatake, Kamrudin Ahmed, Kazunori Oishi: Prevention of Respiratory Infections by Povidone-Iodine Gargle: Fourth Asian Pacific Congress on Antisepsis, Vancouver, Canada, July 18-20, 2001

## 2. 学会発表

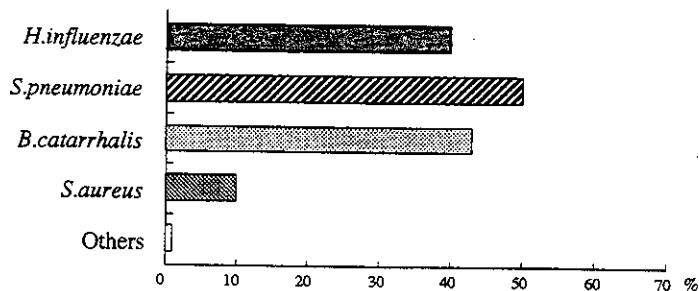
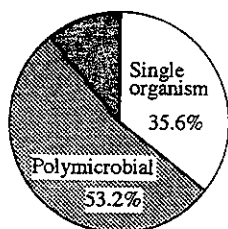
- 1) 永武 毅: ワクチンの現状と将来への展望—呼吸器感染症を中心に—. 第99回日本内科学会講演会、教育講演、2002年3月28日～30日、名古屋
- 2) 永武 毅: かぜ症候群のサイエンス～ウイルスと細菌のかかわり～、Infection and

## 小児の上咽頭炎の起炎菌

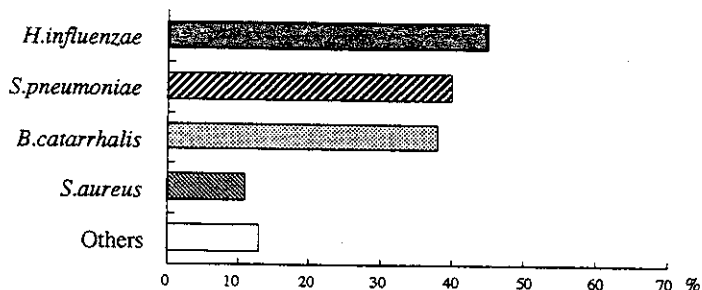
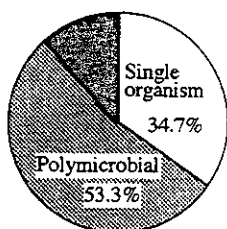
Age : 0-2 y.o. 72 patients



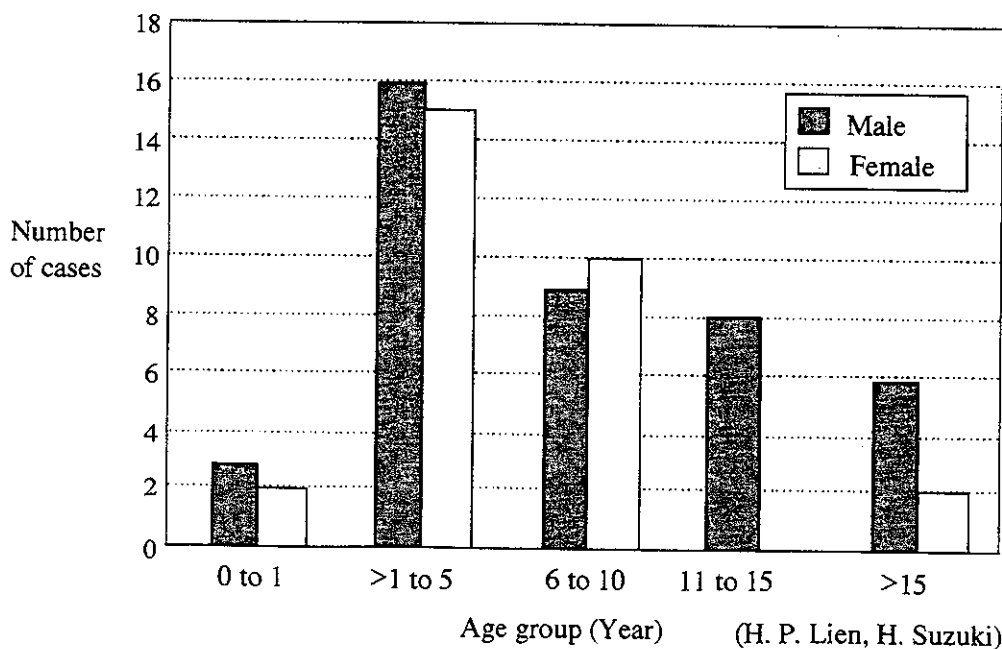
Age : 3-5 y.o. 94 patients



Age : 6-10 y.o. 75 patients



## Distribution of Influenza in Hanoi by age and sex, 2001



## 平成 14 年度厚生科学研究（脳科学研究事業）

### 分担研究報告書

インフルエンザ脳炎・脳症発症機序の代謝異常解析と治療法の開発に関する研究

分担研究者：黒田泰弘 徳島大学医学部小児科教授

#### 研究要旨

インフルエンザ脳炎・脳症患者 22 例の尿、血清及び乾燥血液濾紙の有機酸、脂肪酸アシルカルニチン、アミノ酸を定量分析した。カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ（CPT）II 欠損症 1 例、CPT II 欠損症などカルニチンサイクル異常が疑われる脂肪酸代謝異常 4 例、グルタル酸尿症 2 型 1 例、バルプロ酸ナトリウム服用 1 例が見出された。これらの症例に共通する代謝異常は、脂質からのエネルギー産生に不可欠なカルニチンの欠乏である。インフルエンザ脳炎・脳症患者の血中遊離カルニチン値の低下はみられなかったが、組織のカルニチン欠乏がインフルエンザ脳炎・脳症の発症因子の一つあることが推測される。今後、インフルエンザ罹患時の糖質とカルニチンの補給による脳炎・脳症発症の予防・治療効果に関する評価研究が望まれる。インフルエンザ脳炎・脳症で血中に増加する TNF- $\alpha$  は、内皮で産生される NO を介して正常ラット血管を単独で拡張することが明らかになった。インフルエンザ感染後、高サイトカイン血症により、NO を介して脳血管が拡張し、更に強度の血管炎と組織のエネルギー不足によって血管透過性が亢進して脳浮腫による脳症を発症することが推測される。インフルエンザ脳炎・脳症の NO 阻害薬による新しい予防・治療法の検討も望まれる。

#### 研究協力者：

山口清次（島根医科大学小児科教授）  
吉田一郎（久留米大学小児科教授）  
重松陽介（福井医科大学基礎看護学教授）  
内藤悦雄（徳島大学小児科助教授）  
森 一博（徳島大学小児科講師）  
松田純子（徳島大学小児科助手）

#### A. 研究目的

近年、小児を中心にインフルエンザに伴う中枢神経系の障害、すなわちインフルエンザ脳炎・脳症の報告が増加し問題になっている。本症は、高熱と痙攣とを伴い急速に意識障害が進行し、半数の患者は数日で死に至るか、生存しても中枢神経障害を残す。インフルエンザ脳炎・脳症では、発症から中枢神経症状の発現までの日数が大多数例で 0-1 日と短く、病理学的には、著明な脳浮腫、脳及び全身の血管の障害、血球貪食症候群などがみられる。また、TNF- $\alpha$ 、IL-6 などのサイトカインや血管内皮細胞のみで発現し、白血球の rolling の過程に機能する E-selectin が血中に増加する。

これらのことから、インフルエンザ脳炎・脳症の本体は、脳の血管炎と脳浮腫であり、次のような発症機序が考えられる。インフルエンザウイルス感染時に血中に増加する

サイトカイン、白血球からの inducible NO、中間代謝産物等の分子が、血管内皮細胞の代謝を直接的あるいは間接的に障害して内皮機能は一時亢進状態となり血管は拡張する。しかし、その後、内皮細胞機能自体が血管炎、エネルギー不足等により障害されて血管は拡張状態のままそのトーンスを維持できなくなり間質に水分が多量に流出して脳浮腫をきたす。

この考えのもとに昨年度に引き続き、インフルエンザ脳炎・脳症の発症機序を代謝異常の面から研究する。1) インフルエンザ脳炎・脳症の基礎疾患としての先天代謝異常の有無及びインフルエンザ脳炎・脳症に特有な代謝異常の有無を検索するために本症患者の尿及び血液中の有機酸、アシルカルニチン、アミノ酸など中間代謝産物を定量分析する。2) ラットの血管を用いて *in vitro* で血管拡張機能に及ぼす TNF- $\alpha$  単独の作用を解析する。

#### B. 研究方法

##### 1) 検体採取法：

全国の大学小児科教授 42 名と徳島大学小児科の関連病院の小児科部長・医長 26 名宛てに検体〔咽頭ぬぐい液、尿、乾燥血液濾紙、血清、髄液〕採取用容器、インフルエ



ンザ脳炎・脳症チェックリスト及び説明・同意書を送付し、関連病院も含めて患者発生時の検体採取と提供とを依頼する。

2) 有機酸、脂肪酸アシルカルニチン、遊離カルニチン、アミノ酸等中間代謝産物の定量分析法:

全国の医療施設から送付されてきた尿、血清、髄液及び乾燥血液濾紙は、直ちに島根医科大学小児科、久留米大学小児科及び福井医科大学小児科に送付し、gas chromatography / mass spectrometry (GC/MS)法及び tandem mass spectrometry (MS/MS)法で中間代謝産物を定量分析する。

3) 血管拡張機能測定法:

SD ラット (6 週齢, 雄) の内頸動脈を摘出し、正常な血管リングと血管内皮を剥離した血管リングとを作成する。血管リングに1gの張力を加え、フェニレフリン (Phe)  $5 \times 10^{-7} M$  で血管を収縮させた後、アセチルコリン (Ach) は、 $1 \times 10^{-9} M$  から  $1 \times 10^{-5} M$  までの血管弛緩率を、ニトログリセリン (NTG) は、 $1 \times 10^{-8} M$  から  $1 \times 10^{-5} M$  までの血管弛緩率を張カトランスデューサーを用いて測定する。この測定系に TNF- $\alpha$  (1ng/ml)を加えて血管弛緩率に及ぼす作用を評価する。

### C. 研究結果

1) インフルエンザ脳炎・脳症 22 例の臨床的特徴: 全国の医療施設から検体を送付されてきた 32 例について分析した臨床的特徴を示す。

#### 1. 病歴

発症時年齢は、0 歳 3 例、1 歳 2 例、2 歳 5 例、3 歳 3 例、4 歳 2 例、6 歳 1 例、7 歳 2 例、9 歳 1 例、11 歳 2 例、17 歳 1 例であった (表 1)。性別は、男児 14 例、女児 8 例であった (表 1)。発熱から脳炎・脳症発症までの期間は、0 日 6 例、1 日 9 例、2 日 1 例、3 日 1 例、5 日 1 例、7 日 1 例、12 日 1 例であった。後遺症は、有 3 例、無 7 例であった。家族内に同様な症状の人がいるは、いる 0 例、いない 18 例であった。

#### 2. 臨床症状

発熱 19 例、けいれん 16 例、意識障害 18 例、咳嗽 16 例、嘔吐 10 例、鼻汁 18 例、下痢 3 例であった。

#### 3. 臨床検査

肝機能異常 5 例、血液凝固能異常 4 例、高血糖 7 例、高アンモニア血症 1 例、髄液細胞数増加 2 例、髄液蛋白増加 1 例、脳 CT 異常 7 例であった。

#### 4. ウイルス学的検査 (表 1)

迅速診断は、陽性 19 例、陰性 1 例であった。ウイルス分離、HI 抗体、RT-PCR 法は、殆どの症例で未実施であり、ウイルス分離陽性者は 2 例であった。

#### 5. 解熱剤の使用

ジクロフェナクナトリウム単独使用 1 例、アセトアミノフェン単独使用 10 例であった。

2) 検体の採取と中間代謝産物の定量分析 (表 1):

インフルエンザ脳炎・脳症 21 例の血清中 5 例で長鎖 (C16 - C18) アシルカルニチンあるいは長鎖 (C14 - C18) アシルカルニチンの極軽度増加ないし増加がみられた。また、遊離カルニチン、アセチルカルニチンおよび C 5 アシルカルニチンの増加が 1 例のみみられた。分析された 20 例の尿検体では、バルプロ酸代謝産物 1 例、グリセロール 8 例、グルタル酸 1 例、不明ピーク 3 例などが見出された。アシルカルニチンの増加がみられた 6 例中 1 例は CPT II 欠損症と酵素診断された。もう 1 例はグルタル酸尿症 2 型が疑われる。他の 4 例の病因検索はまだ、なされていない。

3) 正常ラット血管の拡張機能に及ぼす TNF- $\alpha$  の作用 (図 1, 2):

内皮を有する正常ラット血管と内皮を剥離したラット血管とを Phe で収縮させた後、TNF- $\alpha$ を添加してサイトカイン自身の血管弛緩能を測定した。その後、さらに Ach (内皮依存性弛緩物質)と NTG (内皮非依存性弛緩物質)とを添加して測定に用いた血管の弛緩能を確認した。TNF- $\alpha$ は、内皮を有するラット血管を単独で弛緩させたが、内皮を剥離した血管を弛緩させることはできなかった。

### D. 考察

インフルエンザ脳炎・脳症はわが国の小児に多くみられ、厚生省インフルエンザ脳炎・脳症研究班の報告によれば、91 例全体の予後については、死亡が 27 例 (30%)、重度後遺症 7 例 (8%)、軽度後遺症 15 例 (16%)と非常に悪く、後遺症なく治癒した症例は 42 例 (46%)に過ぎなかった。この報告が示すようにインフルエンザ脳

炎・脳症の予防・治療法の開発は一刻も早くなされなくてはならない重要な研究課題である。本研究班は、代謝異常の視点から本症の病態を解析し、予防・治療法開発への展開を試みた。研究対象の 22 例の臨床的な特徴は、従来の報告と同様であった。

有機酸代謝異常症、尿素サイクル異常症等先天代謝異常症は、稀な疾患ではあるが、感冒等の感染症により生体に負荷がかかると重篤なアシドーシスや高アンモニア血症発作が誘発されて脳症をしばしば発症する。そこで、インフルエンザ脳炎・脳症児の基礎疾患としての先天代謝異常症の有無及びインフルエンザ脳炎・脳症に特有な代謝異常の有無を検索するために、尿および血液中の中間代謝産物を定量分析する GC/MS 法と MS/MS 法を確立し、検体の提供を全国の大学病院小児科及びその関連病院に依頼した。

各病院の協力により 22 例の検体が提供された。有機酸、アシルカルニチン等が分析された 21 例中 6 例では血清アシルカルニチンが増加しており CPT II 欠損症などカルニチンサイクル異常症が疑われた。この 6 例中 1 例は CPT II 欠損症と酵素診断された。もう 1 例はグルタル酸尿症 2 型が疑われている。他の 4 例はまだ検索されていないが、カルニチンサイクル異常症が考えられる。また、バルプロ酸代謝産物も 1 例で検出された。バルプロ酸ナトリウムは、抗けいれん薬として広く使用されており、ライ症候群を発症することが知られている。バルプロ酸ナトリウムが、インフルエンザ脳症の発症を助長することも考えられる。

本研究でインフルエンザ脳炎・脳症のわずか 22 例の中に極めて稀な CPT II 欠損症 1 例、グルタル酸尿症 2 型が疑われる 1 例、カルニチンサイクル異常症が疑われる 4 例、バルプロ酸ナトリウム服用 1 例が見出された。このことは本症の病因を解明する上で大きな意味をもつ。CPT II 欠損症などカルニチンサイクル異常症、グルタル酸尿症 2 型でもバルプロ酸ナトリウム服用でも共通してカルニチン欠乏をきたすことが知られている。

カルニチンは、生体が脂質からエネルギーを産生するために不可欠な物質である。本研究ではインフルエンザ脳炎・脳症患児の大部分で血清遊離カルニチン値は低下していなかった。しかし、インフルエンザに罹患して全身状態が悪化するとエネルギー源である糖質、脂質、蛋白質とともにカルニチンも十分に摂取できず、また、カルニチンの異化も亢進する。さらにカルニチン

サイクル異常やバルプロ酸ナトリウム服用によってカルニチン欠乏状態が助長されることが十分に考えられる。組織のカルニチン欠乏は、脂質からのエネルギー産生を障害して脳血管あるいは脳組織の機能を破綻させて脳症を発症することが推測される。今後、本研究結果からインフルエンザ脳炎・脳症の予防・治療法としてインフルエンザ罹患時の糖質とカルニチンの補給の有効性を評価研究することが望まれる。

インフルエンザ脳炎・脳症では脳血管のみならず全身の血管の内皮機能が障害されることが知られている。しかし、その程度や内皮障害と中枢神経障害や多臓器不全との関係に関しては不明な点が多い。我々は、インフルエンザ脳症の本体は、1) 発症後、短時間で脳症を発症する、2) 血管炎がみられる、3) 血中に TNF- $\alpha$ 、IL-6 などのサイトカインが増加する等今までに報告された知見から、脳血管内皮細胞における何らかの代謝障害に起因する脳浮腫と考えて *in vitro* の研究も進めてきた。

本研究で行った正常ラット頸動脈を用いた張力実験で、インフルエンザ脳炎・脳症患児で検出される血中レベルの TNF- $\alpha$  や IL-6 が血管内皮を介して血管の弛緩反応を増強すること、TNF- $\alpha$  は単独でも血管を弛緩させることが明らかになった。したがって、インフルエンザ発症の初期には、血管がサイトカインにより過度に拡張され、さらに強度の炎症とエネルギー不足により内皮が傷害されて血管透過性が亢進して脳浮腫をきたし脳症を発症することが十分考えられる。この仮説が正しければ血漿交換により高サイトカイン血症を是正することは治療法として理にかなっている。また、TNF- $\alpha$  の血管拡張作用は、血管内皮細胞で産生され、強力な血管拡張作用を有する NO に由来することが推測される。今後、NO 阻害薬によるインフルエンザ脳炎・脳症の新しい薬物療法の開発への展開も望まれる。

## E. 結論

インフルエンザ脳炎・脳症患児 22 例の中に CPT II 欠損症 1 例、カルニチンサイクル異常症疑い 4 例、グルタル酸尿症 2 型 1 例およびバルプロ酸ナトリウム投与 1 例、合計 7 例が見出された。いずれもカルニチン欠乏状態をきたすことが知られている。カルニチン欠乏状態は、インフルエンザ脳炎・脳症の発症因子の一つである可能性が示唆された。糖質とカルニチンの補給の脳症予防・治療効果を評価することが望まれ

る。インフルエンザ脳炎・脳症で血中に増加する TNF- $\alpha$ は、単独で NO を介する血管拡張作用を有することが明らかになった。NO 阻害薬の投与は本症の治療法として検討する価値がある

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Naito E., Ito M., Yokota I., Saijo T., Matsuda J., Ogawa Y., Kitamura S., Takada E., Horii Y., Kuroda Y. (2002) Thiamine-responsive pyruvate dehydrogenase deficiency in two patients caused by a point mutation (F205L and L216F) within the thiamine pyrophosphate binding region. *Biochim Biophys Acta.* 1588:79-84.
- 2) Naito E., Ito M., Yokota I., Saijo T., Ogawa Y., Kuroda Y. (2002) Diagnosis and molecular analysis of three male patients with thiamine-responsive pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *J Neurol Sci.* 201:33-7.
- 3) Naito E., Ito M., Matsuura S., Yokota I., Saijo T., Ogawa Y., Kitamura S., Kobayashi K., Saheki T., Nishimura Y., Sakura N., Kuroda Y. (2002) Type II citrullinaemia (citrin deficiency) in a neonate with hypergalactosaemia detected by mass screening. *J Inherit Metab Dis.* 25:71-6.
- 4) Ogawa Y., Naito E., Ito M., Yokota I., Saijo T., Shinahara K., Kuroda Y. (2002) Three novel SURF-1 mutations in Japanese patients with Leigh syndrome. *Pediatric Neurology* 26:196-200.
- 5) Naito E., Ito M., Yokota I., Saijo T., Ogawa Y., Shinahara K., Kuroda Y. (2001) Gender-specific occurrence of West syndrome in patients with pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *Neuropediatrics* 32: 295-298.
- 6) 内藤悦雄、小川由紀子 複合体 IV 欠損症—SURF1 遺伝子変異 平成 14 年 4 月

発行 日本臨床第 60 巻増刊号 4:445-449。

7) 内藤悦雄、伊藤道徳、横田一郎、西條隆彦、松田純子、小川由紀子、品原久美、山本聖子、黒田泰弘 West 症候群を発症したピルビン酸脱水素酵素複合体異常症の臨床・生化学所見 平成 12 年 3 月発行 日本小児科学会雑誌第 104 巻第 3 号 341~345 ページ。

8) Yamaguchi S., Iga M., Kimura M., Suzuki Y., Shimozaawa N., Fukao T., Kondo N., Tazawa Y., Orii T. (2001) Urinary organic acids in peroxisomal disorders: a simple screening method. *J. Chromatogr. B* 758: 81-86.

表1 インフルエンザ脳炎・脳症患児における代謝異常

番号	氏名	性別	年齢	迅速診断	血中アシルカルニチン	尿中有機酸
21	CN	女	9	陽性	長鎖 (C16-C18) 増加 〔血清・濾紙血〕	乳酸・ビルビン酸増加, グリセロール増加, HVA, VMA増加, チロシン代謝産物軽度増加
22	AS	男	2	陽性	長鎖 (C16-C18) 軽度増加 〔血清・濾紙血〕	乳酸・ビルビン酸増加, 3OH酪酸軽度増加, グリセロール増加
23	HN	男	1	陽性	長鎖 (C16-C18) 極軽度増加 〔血清・濾紙血〕	乳酸・ビルビン酸著増, 3OH酪酸増加, グリセロール増加, グリセリン酸増加
24	NY	男	7		長鎖 (C16-C18) 軽度増加, 不明ピークあり 〔血清〕	乳酸・ビルビン酸増加, 3OH酪酸増加, グリセロール増加
25	KY	男	4	陽性		3OH酪酸増加
26	TR	女	17		不明ピークあり 〔血清・濾紙血〕	異常なし
27	HI	男	4	陽性	不明ピークあり 〔血清・濾紙血〕	3OH酪酸・アセト酢酸増加
28	FM	女	2	陽性	不明ピークあり 〔血清・濾紙血〕	乳酸軽度増加, 3OH酪酸・アセト酢酸増加
29	CY	女	2	陽性	長鎖 (C14-C18) 軽度増加 〔血清〕	3OH酪酸・アセト酢酸増加, 分枝鎖ケト酸軽度増加
30	KK	女	7	陽性	病的変化なし〔血清・濾紙血〕	グリセロール増加
31	TI	男	2	陽性	病的変化なし〔濾紙血〕	乳酸・ビルビン酸軽度増加, 3OH酪酸・アセト酢酸増加
32	AR	女	3	陽性	病的変化なし〔血清・濾紙血〕	乳酸・ビルビン酸増加, 3OH酪酸増加, 不明ピークあり
33	TH	男	1	陽性	病的変化なし〔血清・濾紙血〕	乳酸軽度増加, 3OH酪酸増加, 分枝鎖アミノ酸代謝産物僅か増加
34	RO	男	11	陰性	病的変化なし〔血清・濾紙血〕	乳酸軽度増加, グリセロール増加, 不明ピークあり (FMOX等の抗生剤か)
35	TS	男	2	陽性	病的変化なし〔血清・濾紙血〕	3OH酪酸・アセト酢酸著増
36	RO	女	3	陽性	病的変化なし〔血清・濾紙血〕	
37	MM	女	0	陽性	遊離カルニチン・アセチルカルニチン増加, C5アシルカルニチン軽度増加 〔血清・濾紙血〕	乳酸・ビルビン酸増加, 3OH酪酸軽度増加, ジカルボン酸増加, 2OHアジピン酸・2ケトアジピン酸・グルタル酸増加
38	TA	男	6	陽性	病的変化なし〔血清・濾紙血〕	3OH酪酸・アセト酢酸増加, グリセロール増加
39	AK	男	3	陽性	病的変化なし〔血清・濾紙血〕	VPA増加
40	YY	男	11	陽性	病的変化なし〔血清・濾紙血〕	異常なし
41	YS	男	0	陽性	病的変化なし〔血清・濾紙血〕	グリセロール増加
42	TH	男	0	陽性	病的変化なし〔血清・濾紙血〕	

図 1

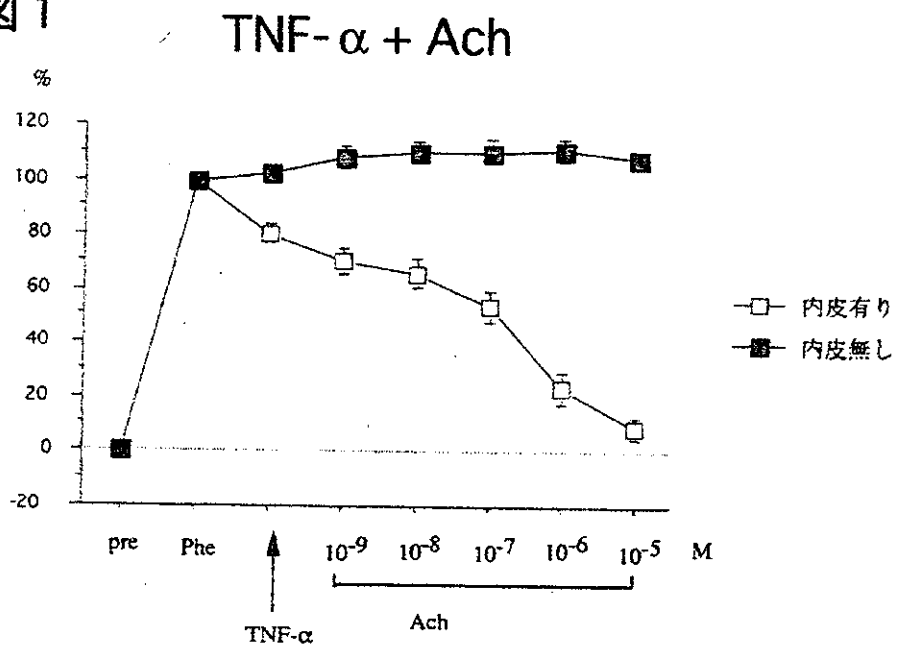
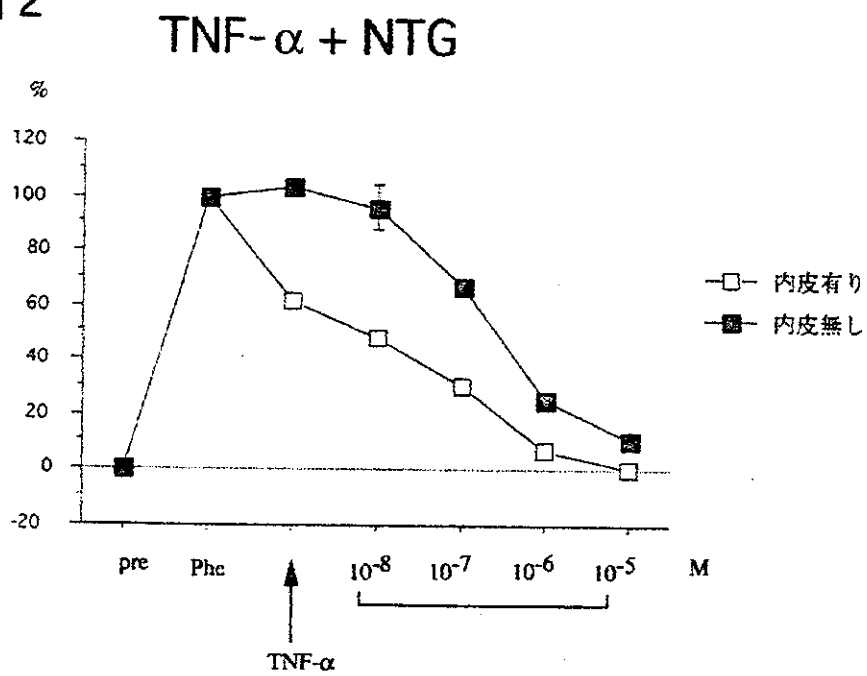


図 2



## 平成 14 年度厚生科学研究 (脳科学研究事業)

### 分担研究報告書

ウイルス性脳症におけるウイルスの神経親和性: JC virus での解析

分担研究者: 長嶋和郎 (北海道大学医学部脳科学専攻分子細胞病理)

研究協力者: 澤 洋文 (北海道大学医学部脳科学専攻分子細胞病理)

仙葉慎吾 (北海道大学医学部脳科学専攻分子細胞病)

### 研究要旨

ウイルス性脳症の発症機序には大きく分けて直接脳内でウイルス増殖が関連する direct effect とウイルスが間接的に脳障害を発症する remote or indirect effect に分けることができよう。我々は direct effect としてウイルスが脱髄性脳症を発症する JC virus に関して研究し、ウイルスの神経親和性を規定する因子の同定を試みた。神経系由来細胞と非神経系由来細胞の培養細胞を用いたエントリーアッセイの結果 JC virus は種々の細胞に発現している因子によりエントリーしていることが判明し、その因子としてシアル酸を有する oligosaccharide であることを明らかにした。次いで、核に入ったウイルスが増殖するためには JC virus の遺伝子発現調節配列(transcriptional control region: TCR)に作用する核内転写因子が重要と考えられたので、その同定を試みた。JC virus の TCR を 9 個のサブユニットに細分し、これらを probe として electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を行い結合している分子を種々の column chromatography にて精製した。その結果神経系細胞の核抽出液にのみ反応し、他の細胞核抽出液とは反応しない分子が検出された。この分子は 670 kDa からなる大きな複合体を形成していることが判明した。次に最終的に精製した蛋白を切り出しトリプシンを用いたゲル内消化を行い、得られたペプチド断片の配列を決定し、その構成サブユニットに cleavage stimulating factor (CstF)があることを明らかにした。CstF は mRNA の cleavage および polyadenylation を制御する heterotrimer であり、我々の結果では p75 が DNA に結合しているという知見が得られた。

### 〔緒言〕

インフルエンザウイルスでの脳症は未だウイルスが脳内で増殖しているという確固とした証明はなされていない。一方、JC ウイルス (JC virus: JCV) は進行性多巣性白質脳症の原因ウイルスであり、ヒト大脳白質のオリゴデンドログリアに感染し、その核内で増殖することが判明しており、脱髄性脳症を惹起する。ウイルスはサル SV40 と同属のポリオマウイルスで、2 本鎖環状のゲノム構造を有する DNA ウイルスである。調節領域を基点に反時計回り方向に大型 T (Large-T) 抗原と小型 t (small-t) 抗原、時計回り方向に agnoprotein (agno)、VP2、VP3、VP1 の合計 6 種類の蛋白をコードしている。JCV はヒト神経系細胞に選択的に感染し、脱髄を生ずる。培養細胞を用いたエントリーアッセイの

結果 JCV は種々の細胞にエントリーし、早期に核に達していることが判明し、その本体は糖脂質および糖蛋白質を構成する糖鎖である事が明らかになった<sup>1,2</sup>。

これらの結果から神経親和性を規定する因子は核内に存在することが予想される。核に入ったウイルスが増殖するためには JCV の遺伝子発現調節配列(transcriptional control region: TCR)に作用する核内転写因子が重要であると考えられたので、JCV の TCR に作用する特異的核内因子の存在が推定される。

### 〔目的〕

本研究では JCV の TCR に特異的に結合する蛋白を単離、同定することを目的として、まず TCR 断片をプローブとしたゲルシフトアッセイ

を行い、DNA 結合蛋白質の有無を検討した。次いで、各種カラムクロマトグラフィーで DNA 結合蛋白質を単離することを試みた。

#### 〔材料と方法〕

##### 1) 細胞株：

培養細胞株として、核に入った後の JCV 増殖を許容するヒト神経芽細胞腫由来 IMR-32 細胞と JCV 増殖ができない非許容細胞としてヒト子宮頸部類上皮癌由来 HeLa, ヒト肺腺癌由来 A549, ヒト大腸腺癌由来 SW480, ヒト肝臓癌由来 HepG2 細胞を用いた。細胞株は 10% FBS および抗生物質を含んだ DMEM 培地で培養を行った。

##### 2) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)：

我々はこれまでに TCR 配列が最小である JCV を JCV 持続感染細胞である JCI 細胞から単離し<sup>3</sup>、その配列を決定した (TCRs)。この TCRs (約 290 bp) を互いに重なるように長さ 40 bp の 9 個のユニットに細分し、一本鎖 DNA を合成して、RI 標識した後 annealing を行い二重鎖 DNA probe とした。前述した種々の培養細胞からの核抽出液と JCV DNA との結合を検索するために EMSA を行った。許容細胞である IMR-32 細胞に認められ、非許容細胞 (HeLa, A549, SW480, HepG2 細胞) では認められない分子、即ち IMR-32 細胞の核抽出液に特異的に結合している分子を確認した (図 1)。

最終的に Probe の特異性の確認を以下の方法で行った。IMR-32 細胞の核抽出液を各一本鎖 DNA probe (sense, antisense) と混和し、その際に、RI label を行っていない一本鎖 DNA を competitor として種々の濃度で混和し、反応させて EMSA を行った。得られた Band の強さを LAS image analyzer (Fuji film, Tokyo, Japan) で数値化して比較した。

##### 3) UV crosslinking：

EMSA で認められた band の分子量を推定するために、UV crosslinking 法を行った。DNA probe と核抽出物を poly (dI<sub>12</sub>dC) と混和し、その後 UV lamp (254 nm) のもとで 4°C で 30 分 incubate した。Sample は SDS-PAGE 後、autoradiography で band を確認する。

##### 3) 蛋白質の精製：

種々のカラムを用いた分画法を用いて精製した。

a) Hitrap Q (volume 5 ml)、溶出条件：20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1-1.0 M NaCl, 50 ml linear gradient。

b) EconoPak CHT-II (hydroxyapatite, volume 1ml)、溶出条件：50-400 mM Kpi (pH 7.2), 10 ml linear gradient。

c) Mono S PC 1.6/5、溶出条件：20 mM MES-NaOH (pH 6.0), 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1-0.5 M NaCl, 1 ml linear gradient。

d) Superose 6 PC3.2/30、溶出条件：20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.15 M NaCl, 0.04 ml/min, 0.05 ml/fraction で分画。この際に standard protein の分子量と比較して転写結合因子複合体の分子量を推定した。

e) 最終的に精製した蛋白を SDS-PAGE で泳動して、Coomassie Brilliant Blue (CBB) で gel を染色して目的の位置の band を切り出しトリプシンを用いたゲル内消化を行い得られたペプチド断片の配列を protein sequensor によって決定した。

f) 得られたアミノ酸配列をもとに Blast を用いた data base 検索を行い精製した蛋白質の同定を行った。

#### 〔倫理面の配慮〕

本研究では、JCV の感染機構の解析を目的とした。本実験で用いられた JCV は P2 で扱うべきウイルスであり、本研究は当研究室の P2 指定実験室にて安全性に留意して行なわれた。また本実験で用いた大腸菌の系については人体に対する安全性は認められており、北海道大学の組換え DNA 申請し承認を得ている。

#### 〔結 果〕

感染許容細胞の核分画から JCV TCR に結合する蛋白質を単離した。

1) 9 個の fragment に分けた JCV TCRs に結合する蛋白を精製・単離した (図 1)。単離した蛋白は分子量 75 kDa の DNA 結合サブユニットと 45 kDa のサブユニットからなるものと考えられた。アミノ酸配列分析の結果、この蛋白は RNA の生成過程で poly (A) signal の 3' 側に結合し、RNA loop を形成し、poly (A) site の 3' 側で RNA を切断する cleavage stimulating factor (CstF)<sup>4</sup> の 77kDa、50kDa のサブユニッ

トからなる蛋白質であることが判明した(図2)。  
2) CstF は JCV TCRs において塩基配列特異的に、また sense 鎖により強く結合する事が判明した。

#### 〔考 察〕

今回、我々は感染許容細胞の核分画から JCV TCR に結合する蛋白質として CstF を同定した。CstF は m-RNA の poly (A) 付加に關与する蛋白質であり、転写活性や転写活性化因子としての機能は持っていない<sup>5, 6</sup>。ゲルろ過で求められた CstF を含む結合蛋白質複合体の未変性条件下での分子量が 670kDa と、p75、p45 のアミノ酸組成から予想される分子量よりもはるかに大きかったことから、結合蛋白質複合体には何らかの蛋白質が結合していることが予想される。これらのことから、p75 に何らかの転写、もしくは DNA 複製活性化因子、Factor X が結合する。p75 が JC ウイルスの転写調節領域の#3 領域に結合することによって、この Factor X がその下流の JC ウイルス遺伝子の転写、複製を活性化する、というものである(図3)。以前から JCV に関する転写調節因子に関しては種々の報告が有るが、神経特異性を決定している因子は未だ明らかになっていない<sup>7, 8, 9, 10, 11, 12, 13</sup>。現在、この可能性を検討するために、yeast two-hybrid 法や pull-down 法を用いて p75 結合蛋白質の検索を行っており、それらの結合蛋白質が JC ウイルス遺伝子の増殖、発現にどのような影響を与えているのかを検討する予定である。

#### 〔結 論〕

感染許容細胞特異的に JCV TCR に結合する蛋白質として CstF を含む蛋白質複合体を同定した。

#### 〔参考文献〕

- 1) Komagome R, Sawa H, Suzuki T, Suzuki Y, Tanaka S, Atwood WJ and Nagashima K: Oligosaccharides as receptors for JC virus. *J Virol* 76: 12992-3000., 2002.
- 2) Suzuki S, Sawa H, Komagome R, Orba Y, Yamada M, Okada Y, Ishida Y,

Nishihara H, Tanaka S and Nagashima K: Broad distribution of the JC virus receptor contrasts with a marked cellular restriction of virus replication. *Virology* 286: 100-112, 2001.

- 3) Nukuzuma S, Yogo Y, Guo J, Nukuzuma C, Itoh S, Shinohara T and Nagashima K: Establishment and characterization of a carrier cell culture producing high titres of polyoma JC virus. *J Med Virol* 47: 370-377, 1995.
- 4) Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D and Darnell J: *Molecular Cell Biology*. New York, W.H. Freeman and Company, 1999, pp 404-426.
- 5) Kleiman FE and Manley JL: Functional interaction of BRCA1-associated BARD1 with polyadenylation factor CstF-50. *Science* 285: 1576-1579, 1999.
- 6) Wallace AM, Dass B, Ravnik SE, Tonk V, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG and MacDonald CC: Two distinct forms of the 64,000 Mr protein of the cleavage stimulation factor are expressed in mouse male germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6763-6768, 1999.
- 7) Amemiya K, Traub R, Durham L and Major EO: Interaction of a nuclear factor-1-like protein with the regulatory region of the human polyomavirus JC virus. *J Biol Chem* 264: 7025-7032, 1989.
- 8) Wegner M, Drolet DW and Rosenfeld MG: Regulation of JC virus by the POU-domain transcription factor Tst-1: implications for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4743-4747, 1993.
- 9) Chen NN, Chang CF, Gallia GL, Kerr DA,



- Johnson EM, Krachmarov CP, Barr SM, Frisque RJ, Bollag B and Khalili K: Cooperative action of cellular proteins YB-1 and Pur alpha with the tumor antigen of the human JC polyomavirus determines their interaction with the viral lytic control element. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1087-1091, 1995.
- 10) Devireddy LR, Kumar KU, Pater MM and Pater A: BAG-1, a novel Bcl-2-interacting protein, activates expression of human JC virus. *J Gen Virol* 81: 351-357, 2000.
- 11) Monaco MC, Sabath BF, Durham LC and Major EO: JC virus multiplication in human hematopoietic progenitor cells requires the NF-1 class D transcription factor. *J Virol* 75: 9687-9695, 2001.
- 12) Chen NN, Kerr D, Chang CF, Honjo T and Khalili K: Evidence for regulation of transcription and replication of the human neurotropic virus JCV genome by the human S(mu)bp-2 protein in glial cells. *Gene* 185: 55-62, 1997.
- 13) Shinohara T, Nagashima K and Major EO: Propagation of the human polyomavirus, JCV in human neuroblastoma cell lines. *Virology* 228: 269-277, 1997.
- protein in human neuronal cell lines. *J Biol Chem* 275: 17016-17023, 2000.
- 3) Suzuki S, Tobiume M, Kameoka M, Sato K, Takahashi TA, Mukai T, Ikuta K. Exposure of normal monocyte-derived dendritic cells to human immunodeficiency virus type-1 particles leads to the induction of apoptosis in co-cultured CD4+ as well as CD8+ T cells. *Microbiol Immunol* 44: 111-121, 2000.
- 4) Shishido-Hara Y, Hara Y, Larson T, Yasui K, Nagashima K, Stoner G. Analysis of capsid formation of human polyomavirus JC (Tokyo-1 strain) by a eukaryotic expression system: splicing of late RNAs, translation and nuclear transport of major capsid protein VP1, and capsid assembly. *J Virol* 74: 1840-1853, 2000.
- 5) Kawano N, Ohba Y, Nagashima K. Eosinophilic inclusions in ependymoma represent microlumina: a light and electron microscopic study. *Acta Neuropathol* 99:214-218, 2000.
- 6) Nagashima T, Kato H, Kase M, Maguchi S, Mizutani Y, Matsuda K, Chuma T, Mano Y, Goto Y, Nonaka I, Nagashima K. Oculopharyngeal muscular dystrophy in a Japanese family with a short GCG expansion (GCG)<sub>11</sub> in *PABP2* gene. *Neuromuscul Disord* 2000; 10: 173-177.
- 7) Okada Y, Sawa H, Tanaka S, Takada A, Suzuki S, Hasegawa H, Umemura T, Fujisawa J, Tanaka Y, Hall WW, Nagashima K. Transcriptional activation of JC virus by human T-lymphotropic virus type I tax protein in human neuronal cell lines. *J Biol Chem* 275: 17016-17023, 2000.
- 8) Furuta Y, Ohtani F, Fukuda S, Inuyama Y, Nagashima K. Reactivation of varicella-zoster virus in delayed facial palsy after dental treatment and oro-facial surgery. *J Med Virol*. 62: 42-45, 2000.
- 9) Yamashita S, Mochizuki N, Ohba Y, Tobiume M, Okada Y, Sawa H, Nagashima K, Matsuda M. CalDAG-GEFIII activation of Ras, R-Ras, and Rap1. *J Biol Chem* 275: 25488-

〔研究発表〕

1. 論文発表

- 1) Shintaku M, Matsumoto R, Sawa H, Nagashima K: Infection with JC virus and possible dysplastic ganglion-like transformation of the cerebral cortical neurons in a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 59: 921-929, 2000.
- 2) Okada Y, Sawa H, Tanaka S, Takada A, Suzuki S, Hasegawa H, Umemura T, Fujisawa J, Tanaka Y, Hall WW, Nagashima K: Transcriptional activation of JC virus by human T-lymphotropic virus type I Tax

25493, 2000

- 10) Ohba Y, Mochizuki N, Yamashita S, Chan AM, Schrader JW, Hattori S, Nagashima K, Matsuda M. Regulatory Proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. *J Biol Chem* 275: 20020-20026, 2000.
- 11) Miyazaki H, Ono T, Okuma Y, Nagashima K, Nomura Y. Glial cell line-derived neurotrophic factor modulates ischemia-induced tyrosine hydroxylase expression in rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 12: 2032-2038, 2000.
- 12) Hiroi Y, Chen R, Sawa H, Hosoda T, Kudoh S, Kobayashi Y, Aburatani H, Nagashima K, Nagai R, Yazaki Y, Medof ME, Komuro I. Cloning of murine glycosyl phosphatidylinositol anchor attachment protein, GPAA1. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C201-C212, 2000.
- 13) Ohba Y, Mochizuki N, Matsuo K, Yamashita S, Nakaya M, Hashimoto Y, Hamaguchi M, Kurata T, Nagashima K, Matsuda M. Rap2 as a slowly responding molecular switch in the Rap1 signaling cascade. *Mol Cell Biol* 20: 6074-6083, 2000.
- 14) Takahashi H, Iwata T, Kitagawa Y, Shoya Y, Takahashi RH, Nagashima K, Kurata T. Monoclonal antibodies against topoisomerase I suppressed DNA relaxation and HIV-1 cDNA synthesis. *Hybridoma* 2000;19(4):331-334.
- 15) Suzuki T, Ogata A, Tashiro K, Nagashima K, Tamura M, Yasui K, Nishihira J. Japanese encephalitis virus up-regulated expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) mRNA in the mouse brain. *Biochim Biophys Acta* 93481: 1-7, 2000.
- 16) Shintaku M, Matsumoto R, Sawa H, Nagashima K. Infection with JC virus and possible dysplastic ganglion-like transformation of the cerebral cortical neurons in a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 59: 921-929, 2000.
- 17) Nagashima T, Miyanoshita A, Sakiyama Y, Ozaki Y, Stan AC, Nagashima K. Cerebral vasculitis in chronic mucocutaneous candidiasis: autopsy case report. *Neuropathology* 20: 309-314, 2000.
- 18) Okada Y, Endo S, Takahashi H, Sawa H, Umemura T, Nagashima K: Distribution and function of JCV agnoprotein. *J Neurovirol* 7: 302-306, 2001.
- 19) Suzuki S, Sawa H, Komagome R, Orba Y, Yamada M, Okada Y, Ishida Y, Nishihara H, Tanaka S, Nagashima K: Broad distribution of the JC virus receptor contrasts with a marked cellular restriction of virus replication. *Virology* 286: 100-112, 2001.
- 20) Hayashi H, Endo S, Suzuki S, Tanaka S, Sawa H, Ozaki Y, Sawamura Y, Nagashima K: JC virus large T protein transforms rodent cells but is not involved in human medulloblastoma. *Neuropathology*. 21: 129-137, 2001.
- 21) Safak M, Barrucco R, Darbinyan A, Okada Y, Nagashima K, Khalili K: Interaction of JC virus agno protein with T antigen modulates transcription and replication of the viral genome in glial cells. *J Virol* 75: 1476-1486, 2001.
- 22) Nagai, M., Tanaka, S., Tsuda, M., Endo, S., Kato, H., Sonobe, H., Minami, A., Hiraga, H., Nishihara, H., Sawa, H., Nagashima, K.: Analysis of transforming activity of human synovial sarcoma-associated chimeric protein SYT-SSX1 bound to chromatin remodeling factor hBRM/hSNF2 a. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98: 3843-3848, 2001
- 23) Miyasaka, T., Morishima-Kawashima, M., Ravid, R., Heutink, P., van Swieten. J.C., Nagashima, K., Ihara, Y.: Molecular analysis of mutant and wild-type tau deposited in the brain affected by the FTDP-17 R406W mutation. *Am J Pathol*, 158: 373-379, 2001
- 24) Ohnishi, J., Ohnishi, E., Jin, M., Hirano,

- W., Nakane, D., Matsui, H., Kimura, A., Sawa, H., Nakayama, K., Shibuya, H., Nagashima, K., Takahashi, T.: Cloning and characterization of a rat ortholog of MMP-23 (matrix metalloproteinase and conditioned switching of its expression during the ovarian follicular development). *Mol Endocrinol* 15: 747-764, 2001
- 25) Ishii, N., Hiraga, H., Sawamura, Y., Shinohe, Y., Nagashima, K.: Alternative EWS-FLI1 fusion gene and MIC2 expression in peripheral and central primitive neuroectodermal tumors. *Neuropathology*, 21: 40-44, 2001
- 26) Ohba Y, Ikuta K, Ogura A, Matsuda J, Mochizuki N, Nagashima K, Kurokawa K, Mayer BJ, Maki K, Miyazaki J, Matsuda M. Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis. *EMBO J* 20:3333-3341, 2001
- 27) Kamimura E, Ueno Y, Tanaka S, Sawa H, Yoshioka M, Ueno K I, Inoue T, Li X, Koyama T, Ishikawa R, Nagashima K. New rat model for attention deficit hyperactive disorder (ADHD). *Comp Med* 51:2245-251, 2001
- 28) Shirane M, Sawa H, Kobayashi Y, Nakano T, Kitajima K, Shinkai Y, Nagashima K, Negishi I. Deficiency of phospholipase C-gamma1 impairs renal development and hematopoiesis. *Development* 128: 5173-80, 2001
- 29) Miyazaki H, Nagashima K, Okuma Y, Nomura Y. Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor induced by transient forebrain ischemia in rats. *Brain Res* 922: 165-172, 2001
- 30) Sodeyama N, Orimo S, Oka T, Nagashima K, Ozawa E, Mizusawa H. A novel form of reversible subacute spongiform leukoencephalopathy. *Eur Neurol* 46: 223-224, 2001
- 31) Nagashima T, Kato H, Maguchi S, Chuma T, Mano Y, Goto Y, Nonaka I, Nagashima K. A mitochondrial encephalo-myoneuropathy with a nucleotide position 3271 (T-C) point mutation in the mitochondrial DNA. *Neuromuscul Disord* 11: 470-476, 2001
- 32) Nakamura K, Jeong SY, Uchihara T, Anno M, Nagashima K, Nagashima T, Ikeda S, Tsuji S, Kanazawa I. SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum Mol Genet* 10:1441-1448, 2001
- 33) Miyasaka T, Morishima-Kawashima M, Ravid R, Kamphorst W, Nagashima K, Ihara Y. Selective deposition of mutant tau in the FTDP-17 brain affected by the P301L mutation. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 872-884, 2001
- 34) Itoh T, Shimizu M, Kitami K, Kamata K, Mitsumori K, Fujita M, Ohnishi A, Nagashima K. Primary extranodal marginal zone B-cell lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue type in the CNS. *Neuropathology* 21: 174-180, 2001
- 35) Fujioka Y, Taira T, Maeda Y, Tanaka S, Nishihara H, Iguchi-Ariga SM, Nagashima K, Ariga H. MM-1, a c-Myc-binding protein, is a candidate for a tumor suppressor in leukemia/lymphoma and tongue cancer. *J Biol Chem* 276: 45137-45144, 2001
- 36) Miyazaki H, Nagashima K, Okuma Y, Nomura Y. Expression of Ret receptor tyrosine kinase after transient forebrain ischemia is modulated by glial cell line-derived neurotrophic factor in rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 2002 Jan 18;318(1):1-4.
- 37) Tsuda M, Tanaka S, Sawa H, Hanafusa H, Nagashima K. Signaling adaptor protein v-Crk activates Rho and regulates cell motility in 3Y1 rat fibroblast cell line. *Cell Growth Differ.* 2002 Mar;13(3):131-9.
- 38) Kobayashi Y, Watanabe M, Okada Y, Sawa H, Takai H, Nakanishi M, Kawase Y, Suzuki H, Nagashima K, Ikeda K, Motoyama N. Hydrocephalus, situs inversus, chronic sinusitis, and male infertility in DNA polymerase lambda-deficient Mice: possible implication for the pathogenesis

- of immotile cilia syndrome. *Mol Cell Biol.* 2002 Apr;22(8):2769-76.
- 39) Lyons MJ, Nagashima K, Zabriskie JB. Animal models of postinfectious obesity: hypothesis and review. *J Neurovirol* 2002; 8: 1-5.
- 40) Nagashima T, Sato F, Chuma T, Mano Y, Sasaki I, Mori M, Higa T, Masauji N, Kasai M, Orba Y, Shinohara T, Nagashima K. Chronic demyelinating polyneuropathy in graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Neuropathology* 2002; 22:1-8.
- 41) Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Sata T, Hall WW, Nagashima K, Kurata T. Reconstitution of cleavage of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) RNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293:1084-1091.
- 42) Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Shoya Y, Sata T, Hall WW, Nagashima K, Kurata T. Topoisomerase I and ATP activate cDNA synthesis of human immunodeficiency virus type 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jun 7;294(2):509-17.
- 43) Nakamura K, Ariyoshi N, Yokoi T, Oghiga S, Chida M, Nagashima K, Inoue K, Kodama T, Shimada N, Kamataki T. CYP2D6.10 present in human liver microsomes shows low catalytic activity and thermal stability. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 969-973.
- 44) Okada Y, Sawa H, Endo S, Orba Y, Umemura T, Nishihara H, Stan AC, Tanaka S, Takahashi H, Nagashima K. Expression of JC virus agnoprotein in progressive multifocal leukoencephalopathy brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 2002;104(2):130-6
- 45) Nishihara H, Maeda M, Tsuda M, Makino Y, Sawa H, Nagashima K, Tanaka S. DOCK2 mediates T cell receptor-induced activation of Rac2 and IL-2 transcription. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Aug 23;296(3):716-20.
- 47) Takai H, Naka K, Okada Y, Watanabe M, Harada N, Saito S, Anderson CW, Appella E, Nakanishi M, Suzuki H, Nagashima K, Sawa H, Ikeda K, Motoyama N. Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *EMBO J.* 21: 5195-5205, 2002.
- 48) Nishihara H, Maeda M, Oda A, Tsuda M, Sawa H, Nagashima K, Tanaka S. DOCK2 associates with CrkL and regulates Rac1 in human leukemia cell lines. *Blood.* 2002;100:3968-3974.
- 49) Matsumoto K, Sawa H, Sato M, Orba Y, Nagashima K, Ariga H. Distribution of extracellular matrix tenascin-X in sciatic nerves. *Acta Neuropathol (Berl).* 2002 Nov;104(5):448-54.
- 50) Yoshida H, Okada Y, Kinoshita N, Hara H, Sasaki M, Sawa H, Nagashima K, Mak TW, Ikeda K, Motoyama N. Differential requirement for Apaf1 and Bcl-X(L) in the regulation of programmed cell death during development. *Cell Death Differ.* 2002 Nov;9(11):1273-1276.
- 51) Komagome R, Sawa H, Suzuki T, Suzuki Y, Tanaka S, Walter J, Atwood WJ, Nagashima K. Oligosaccharides as Receptors for JC Virus J. *Virology.* 2002. 76: 12992-13000.
- 52) Yoshida H, Okada Y, Kinoshita N, Hara H, Sasaki M, Sawa H, Nagashima K, Mak TW, Ikeda K, Motoyama N: Differential requirement for Apaf1 and Bcl-X-L in the regulation of programmed cell death during development *Cell Death Differ* 9: 1273-76, 2002
- 53) Eto K, Tokunaga H, Nagashima K, Takeuchi T. An autopsy case of Minamata disease (methylmercury poisoning) – Pathological viewpoints of peripheral nerves. *Toxicol Pathol* 30: 714-722, 2002.
- 54) Arai Y, Tsutsui Y, Nagashima K, Shinmura Y, Kosugi T, Wakai M, Nishikage H, Yamamoto J: Autopsy case of the cerebellar form of progressive multifocal leukoencephalopathy without