

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

特定疾患の微生物学的  
原因究明に関する研究

平成 14-16 年度 総合研究報告書

主任研究者 佐多 徹太郎

平成 17(2005)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 14-16 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	荒川 宜親	国立感染症研究所細菌第 2 部	部長
	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
	江石 義信	東京医科歯科大学医学部附属人体病理学	助教授
	高 昌星	信州大学医学部保健学科	教授
	近藤 一博	東京慈恵会医科大学医学部微生物学講座第 1	教授
	鈴木 和男	国立感染症研究所生物活性物質部	室長
	中島 淳	横浜市立大学大学院医学部分子消化管内科学	助教授
	大石 和徳	長崎大学熱帯医学研究所感染症予防治療分野	助教授
	村田 幸作	京都大学大学院農学研究科	教授
	山谷 睦雄	東北大学医学部附属病院老年・呼吸器内科	助教授
	結城 伸泰	独協医科大学神経内科	助教授
	渡辺 邦友	岐阜大学医学部附属生命科学総合実験センター	教授
	(平成 14 年度) 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
	(平成 14 年度) 岩崎 琢也	長崎大学熱帯医学研究所病変発現機序分野	教授
(平成 14 年度) 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	

## 目 次

### I. 総合研究報告書（平成 14-16 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. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 9

# 1. 総合研究報告書

## 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** 特定疾患を引き起こす病原体および発症機序を明らかにすることにより、発症の予防あるいは効果的な治療法の開発に結び付けることを目的として研究を行った。ボルナ病ウイルスと神経変性疾患、ギラン・バレー症候群と *C. jejuni*、サルコイドーシスとプロピオニバクテリア、慢性難治性気道性感染症疾患とインフルエンザ菌のバイオフィーム形成およびライノウイルス、緑膿菌のバイオフィーム形成機序、難治性血管炎とカンジダ、IgA 腎症とマイコプラズマ、クローン病と HHV-6、原発性肺高血圧症と HHV-8 について、難治性疾患と微生物の関連について検討した。それぞれの難治性疾患との関連性あるいは非関連性について明らかにされ、さらに一部では治療に係わる知見が明らかにされた。

### 分担研究者

近藤 一博 (東京慈恵会医科大学医学部教授)  
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 (岐阜大学生命科学総合実験センター教授)  
荒川 宜親 (国立感染症研究所部長)  
大石 和徳 (長崎大学熱帯医学研究所助教授)  
山谷 陸雄 (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)  
中島 淳 (横浜市立大学医学部助教授)

(平成 14 年度の分担研究者) :

山西 弘一 (大阪大学大学院医学系研究科教授)  
岩崎 琢也 (長崎大学熱帯医学研究所教授)  
永武 毅 (長崎大学熱帯医学研究所教授)

### 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、それ故原因療法ができない。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、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付けることを目的とする。

### 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：

パーキンソン病およびアルツハイマー病患者剖検脳でのボルナ病ウイルスの検出を行うとともに、ウイルスの持続感染状態における抗ストレス応答能について検討し、ストレス状態におけるボルナ病ウイルス持続感染細胞に現れる脆弱性について検討した（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：

*C. jejuni* 腸炎後ギラン・バレー症候群患者の T 細胞レパトアを検討した。菌株におけるガングリオシド様 LOS の分布を調べ、GBS 患者における血中自己抗体の反応特異性や神経所見との関連を検討した。GBS やその関連疾患患者の糞便から分離・培養された *C. jejuni* と各症例の臨床データを収集した。ガングリオシドエピトープの分布、*cst-II* 多型 (Thr/Asn 51)、Penner 血清型別、抗ガングリオシド血中 IgG 抗体を測定した（結城）。GM1 の局在を二重染色および免疫電顕法で観察した。

MAP kinase ファミリーに属する3つの細胞内酵素蛋白の発現を実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAN) において検討し、また細胞内シグナルの発現および局在を検討した (高)。

3) 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から、この疾患の疾病素因を検証し、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した。サルコイドーシス病変部リンパ節に認められる細胞内封入体 Hamazaki-Wesenberg (HW) 小体についてその実体に関する検討を行った (江石)。糞便中および口腔のプロピオニバクテリアの生態についての検討を行った (渡辺)。

4) 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:

ムコイド型緑膿菌による慢性持続性気道感染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った (永武)。非莢膜保有インフルエンザ菌 (NTHi) のヒト気道上皮細胞上のバイオフィーム産生について検討した。インフルエンザ菌と感受性菌間でのバイオフィーム形成の違いについて検討した (大石)。慢性肺気腫の呼吸不全における気道ライノウイルス感染と細菌感染の関係を明らかにする目的で、慢性肺気腫患者および慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者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喀痰の細菌や気道ウイルスを同定した。ヒト気管上皮細胞および粘膜下腺細胞にライノウイルス 14 型を感染させ、マクロライド、ランソプラゾールおよび L-カルボシステインを培養液に添加して影響を調べた。慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者における風邪および急性増悪回数を調べた (山谷)。緑膿菌のバイオフィー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。BF 分解に関わる A1gL と PA1167、並びに PPK の各欠損株の性状を解析し、また、各酵素の構造・機能相関を X 線結晶構造解析により明らかにした (村田)。

5) 難治性血管炎を誘発する心筋を主とした感染症:

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、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。血管炎誘発モデルマウスを用い、真菌分子 CADS、CAWS を投与し、血流

に関する定量解析、シグナル伝達機構の解析を行う。さらにサイトカインチップを用いた遺伝子の網羅的解析を行った (鈴木)。

6) 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検索:

マイコプラズマとギラン・バレー症候群、IgA 腎症、特発性間質性肺炎等の難病につき抗体解析、分離等の方法により関連を探索した。IgA 腎症患者の症状悪化との相関等について病態と関連させて、患者血清中の抗マイコプラズマ抗体の測定ならびに組織におけるマイコプラズマ抗原の検出を行った (荒川)。

7) 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 nested PCR 法により検索した (山西)。β ヘルペスウイルスの潜伏感染と再活性化を調べる方法を開発し、β-ヘルペスウイルスが潜伏感染時に特異的に発現している遺伝子および蛋白を同定し、これらの蛋白に対する抗体価をクローン病および多発性硬化症の患者と健常人において検討した。これらのウイルスの遺伝子組み換え体を作成する (近藤)。Crohn 病初期病変および自己免疫性肝炎の発症に関する微生物の関与を遺伝子発現のプロファイリングを行い、疾患に関与の強く疑われる遺伝子およびウイルスを網羅的に検索した (中島)。

8) 造血器疾患等とウイルスの関与:

ヒトに潜伏・持続感染するウイルスと特定疾患との関わりを探索する。原発性肺高血圧症とヒトヘルペスウイルス 8 感染の関連、および小児劇症肝炎について未知あるいは既知のウイルスを検索した (佐多)。

9) 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の有無、宿主の反応の変動解析を行った (岩崎)。

(倫理面への配慮)

ヒト検体を用いる際は、患者のインフォームドコンセントを得ること、実験については必要により各機関の研究倫理審査委員会の承認を得るものとする。また得られた成績から患者個人の特定はしえないように扱うものとする

る。動物実験においては各施設の動物実験委員会、また組換え DNA 実験は同様に各施設の組換え DNA 委員会の承認を得てから行う。研究期間中、上記および関連する医学研究指針を遵守した。

## C. 研究結果

### 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。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、7日齢では75%、14日齢では25%が死亡した。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。BDV持続感染細胞では、各種ストレス負荷によるHSP70の発現量に顕著な低下が認められた。BDV遺伝子改変マウスの脳では、グルタミン酸トランスポーター蛋白質の発現は8週齢ならびに16週齢において特に小脳で顕著に減少していた。一方、GLT-1蛋白質の発現には、顕著な差が認められなかった。P-TgマウスにおけるP蛋白質の発現は、アストロサイトのグルタミン酸の取り込みを阻害して、神経生理学的な異常とそれに引き続く行動異常を誘発する可能性が考えられた。BDV持続感染細胞では、ストレス負荷によるHSP70のmRNAおよび蛋白質の発現量に顕著な低下が認められ、さらに、HSP70 mRNAの安定化に必要なとされるPKRの発現量について検討を行ったところ、BDV持続感染細胞において恒常的なPKRの活性化が認められた(生田)。

### 2) ギラン・バレー症候群(GBS)の発症に関わる病原因子、宿主因子の解明：

ギラン・バレー症候群患者のT細胞の性状について末梢血T細胞のレパトアを解析したが、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。菌株のガングリオシド様LOSは、腸炎患者由来株と比べ、GBS患者株ではGM1やGD1aエピトープを有する頻度が有意に高かった。GM1とGD1aエピトープを有する菌株は血清型がHS:19が多く、四肢麻痺や血中IgG抗GM1・GD1a抗体と密接な関連がみられた。GQ1b/GT1aエピトープはHS:2やHS:4 complexと関連があり、外眼筋麻痺などの脳神経麻痺や運動失調、血中IgG抗GQ1b抗体を高頻度に認めた。GBS分離株のcst-II

遺伝子保有頻度は腸炎株に比べ高頻度であった。Thr 51型の株はGM1(92%)やGD1a(91%)様LOSを有し、患者血中にGM1(88%)やGD1a(52%)に対するIgG抗体を誘導し四肢脱力を来たす傾向があった(98%)。一方、Asn51型の株はGQ1b/GT1a様LOSを有し(83%)、患者血中にIgG抗GQ1b抗体を誘導し(56%)脳神経麻痺来たしやすかった。さらに、Asn 51型の株において、53番目のアミノ酸残基がIleである場合は、 $\alpha$ -2,8シアル酸転移酵素活性が比較的低い結果、GQ1b/GT1a様LOSとGM1様LOSとを併せ持つ傾向にあることが新しく分かった(結城)。末梢神経ではGM1は髄鞘にあり軸索にはみられなかった。EANの経過中に3つのMAP kinaseがリン酸化され、ウェスタンブロットでは、MAP kinaseが坐骨神経で活性化されることを明らかにした。Cjの免疫電顕による観察でGM1局在は確認できなかった。EANラットを用いた検討では、MAP kinaseのいずれもEANの極期で発現が亢進し、回復期には低下した。さらにCjを抗原としてCj誘導によるEANの作成ではLewisラットの尾の麻痺がみられた(高)。

### 3) サルコイドーシスの病因解明：

外科的切除された組織から直接細菌培養を行ったところ、末梢肺や肺所属リンパ節の多くに*P. acnes*が単独で分離されたが、胃、大腸所属リンパ節では他の腸内細菌も伴っていた。RAPD法による分離菌の検討では、臓器ごとに異なる遺伝子型を持っていることが分かった。C57BL/6雌マウスに*P. acnes* trigger factor蛋白の断片であるリコンビナント蛋白(RP35)を完全 Freund adjuvantとともに反復皮下免疫した。*P. acnes*の前投与の有無にかかわらず、RP35または*P. acnes*を感作免疫したマウス群の一部で肺肉芽腫が認められた。24匹の無処置マウスで*P. acnes*の定量培養を試みたところ8匹(33%)の肺組織から本菌が培養可能であった。サルコイドーシス病変部に特徴的なHamazaki-Wesenberg(HW)小体がcell-wall deficient型の*P. acnes*菌体そのものであることを免疫電顕解析にて明らかにした(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。サルコイドーシス患者44名の凍結糞便の解凍検体中から10 cfu/g以上に菌が検出された検体数は33検体で、培養陽性率は

68.2%であった。44 検体中凍結前に培養を行うことができた 24 例中の培養陽性検体数は 16 例で、培養陽性率は 66.7%であった。また、給食部に勤める健康人由来の検体 70 検体中 10 cfu/g 以上に菌が検出された検体数は 29 検体（培養陽性率 41.4%）であった。健康成人の唾液 38 検体で 10 cfu/g 以上にプロピオニバクテリアが検出された検体数は 34 検体（培養陽性率 92.1%）であった（渡辺）。

#### 4) 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関与：

びまん性肺疾患などの慢性気道感染症における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食の促進、炎症誘導の抑制が明らかとなった（永武）。非莢膜保有インフルエンザ菌 (NTHi) は、biofilm growth assay やヒト気道上皮細胞上でもバイオフィーム産生が確認できた。mutant 株ではバイオフィーム産生が低下していた。また、野生株で sialic acid を加えない培養液下では、バイオフィーム産生の明らかな低下が認められた。非莢膜保有インフルエンザ菌株は in vitro でバイオフィーム形成をするのに対し、type b インフルエンザ菌株ではバイオフィーム形成は認められなかった。走査型電子顕微鏡による観察でも、多くの type b インフルエンザ菌ではバイオフィーム形成は観察されなかった。（大石）。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。ライノウイルス感染は気管上皮細胞や気管粘膜下腺細胞におけるムチン mRNA 合成を著明に亢進した。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。NF-kappa B、tyrosine kinase、MAP kinase は細胞内機序として関与する。プロトンポンプ阻害薬を投与したとき、培養液ライノウイルス量、細胞内ライノウイルス RNA 量を減少させた。慢性肺気腫を含む慢性閉塞性肺疾患の急性増悪時の喀痰増加では、ムチン蛋白の内容は MUC5AC で総ムチン量の著明な増加を認めた。また、COPD 急性増悪時においても、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と共に肺炎球菌やインフルエンザ菌が混合感染すること、分泌型ムチンである MUC5AC の合成・分泌を促進すること、また細胞内シグナルについては転写因子の関与および Src-related p44/42 mitogen-activated protein kinase pathway の関与等が明らかとなった。培養ヒト気管上皮細胞および気管粘膜下腺細胞は風邪の主因であるライノウイルス

がムチン合成・分泌促進効果を有することが明らかとなり、マクロライド抗生物質エリスロマイシン、クラリスロマイシン、プロトンポンプ阻害薬ランソプラゾール、L-カルボシステインのムチン合成抑制効果が明らかとなった。12 ヶ月間の観察期間で認められた風邪の累積回数は、明らかにL-カルボシステイン内服群で減少した。さらに、COPD 急性増悪の累積回数も明らかにL-カルボシステイン内服群で減少した（山谷）。緑膿菌バイオフィーム感染症における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。緑膿菌がペリプラズムと細胞質に各々局在するアルギン酸リアーゼ AlgL と PA1167 の協調作用によりアルギン酸バイオフィームを完全分解していることが示唆された。大腸菌を用いて PPK, AlgL 及び PA1167 の大量発現系を構築し精製した。PPK は可溶性でポリリン酸合成活性も保持していた。AlgL はアルギン酸の MM ブロックを良好に分解した。ホモロジーモデリングにより、AlgL は、A1-III と同等の高次構造を示すことが分かった。そして、His202 及び Tyr256 が AlgL の活性残基と同定された。重原子同型置換法により、PA1167 の X 線結晶構造を決定した。PA1167 の分子表面における保存残基は、シート A (SA3,4,5) に集中していた。また、緑膿菌におけるアルギン酸の分解経路並びに分解に関わる酵素 (AlgL, PA1167) とその遺伝子を決定した（村田）。

#### 5) 難治性血管炎を誘発する心筋を主とした感染症：

*C. albicans* 由来物質をマウスに投与することにより冠状動脈炎を誘導した。in vivo イメージングで血流状態を観察したところ、腎血流障害がわかった。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、Caspase 8 と連動する p38MAPK の関与があることがわかった。また、*C. albicans* 由来分子の glycoprotein CADS/CAWS が血管炎を誘導し、マウスの系統差があることを示した。CADS/CAWS 誘導に反応する遺伝子群を特定するため系統差を利用して遺伝子マップ解析をし、CADS/CAWS での誘導には、TNF $\alpha$ 、IL-6 および IL-10 の関与を認めた。また、CAWS 投与初期には、好中球が血中に一過性に動員され活性化状態にあることがわ



かった。真菌膜成分により誘導される血管炎に関与する自己抗体 MPO-ANCA の抗原が好中球 MPO であることを MPO-KO マウスにより証明した。Candida 由来分子(CAWS)が好中球抗体(ANCA)の産生を伴う難治性血管炎の誘発モデルマウスを開発した。活性化好中球が、血管炎誘導の初期過程に関与することを SCG/Kj マウスにより明らかにした(鈴木)。

6) 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検索:

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。*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%) であった。1 例は寒冷凝集反応が高値を示した。またマイコプラズマ 3 種の抗体価測定系を改良し、36 例の IgA 腎症患者血清中の抗体価を測定した。その結果、健常人よりも高い患者例が認められた。扁桃におけるマイコプラズマ DNA 検出を行ったところ、*M. fermentans*, *M. salivarium* ならびに *M. pneumoniae* 遺伝子の陽性例を認めた。マイコプラズマ特異的プライマーを用いた解析においては、IgA 腎症患者の扁桃の 81% から *M. fermentans*/*M. salivarium* (*ftsZ* 遺伝子共通配列)が検出された。5/8 例で陰窩上皮下に IgA 陽性細胞を認めた。IgA 腎症患者群における抗 *M. pneumoniae*/*M. genitalium*-IgA 抗体価が、健常人群に比べ有意に高いことが明らかになった(荒川)

7) 神経疾患及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(山西)。クローン病患者の 8 例中 4 例に HHV-6 の潜伏感染特異的遺伝子蛋白に対する抗体が検出された。HHV-6 の潜伏感染特異的遺伝子蛋白に対する患者の血清抗体の反応を検討したところ、クローン病患者の約 5 割で陽性となることが判明した。また HHV-6 と HHV-7 の組み換えウイルスを世界に先駆けて作成することに成功した(近藤)。クローン病の初期病変における網羅的遺伝子発現解析のデータベースからウイルス特異的な遺伝子発現は認められなかった(中島)。

8) 造血器疾患等とウイルスの関与:

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 法および血清抗体の検

出でも陰性であり、HHV-8 の関与は低いと考えられた。日本人原発性肺高血圧症 (PPH) 症例 10 例から採取した剖検肺組織につき HHV-8 の検索を行った。潜伏感染タンパク LANA を検出する免疫組織化学染色および PCR ではいずれの症例にも陽性シグナルを認めなかった。生体肝移植の適応となった小児劇症肝炎患者 3 例につき摘出肝を材料にウイルスの検索を行った。mRNA を抽出し、cDNA library を構築し、患者血清を用いて免疫スクリーニング法にて血清抗体と反応する抗原の同定を試みたが、微生物抗原は検出されなかった(佐多)。

9) 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。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。心筋組織では陽性が疑われた程度であったが、ヒト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(岩崎)。

D. 考察

アルツハイマー病脳組織にも BDV が高率に存在していた。ボルナ病ウイルス(BDV)の培養細胞での実験により、BDV 持続感染による HSP70 の誘導発現の低下や PKR の恒常的活性化が、ストレス負荷時における神経細胞死へとつながることが考えられた。ギラン・バレー症候群においては、*C. jejuni* 腸炎後ギラン・バレー症候群 (GBS) では *C. jejuni* LOS の構造により、GBS 患者の自己抗体の反応特異性が決定され、神経所見が規定されると考えられた。先行感染病原体 *C. jejuni* の遺伝子多型により、菌体上のガングリオシド様 LOS の構造が決まり、GBS の臨床像の多様性を規定していることが示された。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。また、MAP kinase は末梢神経系炎症性脱髄疾患の発症・制御に重要な役割をもつことが示唆された。軸索型 GBS であるとされる AMAN における抗 GM1 抗体の病因説は否定的であった。サルコイドーシスにおいて、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。*P. acnes* trigger factor のリコンビナント蛋白は、アジュバントとともに感作免疫するだけで、肺にサルコイドーシス類似の肉芽腫性病変を誘導しうる事が判明した。リンパ節病変にみられる Hamazaki-Wesenberg

(HW) 小体が cell-wall deficient 型の *P. acnes* 菌体そのものであることがわかった。また、サルコイドーシス患者の約 70% に糞便からプロピオニバクテリアが分離されることが明らかになった。患者の便から、プロピオニバクテリアの分離率を明らかにした。全国的レベルで過去に実施し報告したサルコイドーシス患者由来の凍結糞便 65 検体で、10 cfu/g 以上に菌が検出された検体数は 25 検体 (陽性率 38.5%) であったが、今回の培養陽性率はそれよりも優位に高い結果であった。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して、感冒の主因であるライノウイルス感染により増加する喀痰の主成分であるムチン合成には NF-kappa B、tyrosine kinase、および MAP kinase を介した細胞内機序の関与を認めた。プロトンポンプ薬はライノウイルス感染抑制効果をも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。ライノウイルス感染抑制効果が COPD の風邪および急性増悪予防効果に関連していると示唆された。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。バイオフィームに関して、非莢膜保有インフルエンザ菌はヒト気道上皮細胞上でもバイオフィームを産生することが確認され、またそれには sialic acid が重要な役割をはたしていることが示唆された。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。緑膿菌バイオフィームはアルギン酸リアーゼによる分解する機序が想定された。緑膿菌は菌体外のアルギン酸を AlgL 次いで PA1167 を作用させて完全に分解することが示唆された。緑膿菌 BF 形成に関わる PPK に関して、その阻害剤の探索と設計を可能とする基盤が確立できた。*C. albicans* 由来物質でマウスに血管炎を誘導した。カンジダ菌由来分子が血管炎を誘導し、難治性血管炎の病態マーカーである好中球自己抗体 ANCA も病態と連動した。*Candida albicans* 由来糖ペプチドが不可欠で、サイトカインと連動する活性化好中球が重要な役割を担っているものと考えられた。IgA 腎症の原因としてマイコプラズマが候補に上げられる可能性を示した。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。クローン病患者の血清に HHV-6 潜伏感染特異的遺伝子蛋白抗体が検出された。またその初期病変においてウイルス特異的な遺伝子発現は認められなかった。 $\beta$ ヘルペスウイルスに対する抗潜伏感染蛋白抗体の存在はクローン病患者において、潜伏感染蛋白を活発に発現する中間状態の潜伏感染細胞が多く、細胞機能が修飾されクローン病の生じる可能性が高くなるのではないかと考

えられる。原発性肺高血圧症においては、日本人症例では HHV-8 の関与はまれであることが推察された。

## E. 結論

ボルナ病ウイルスと神経変性疾患、ギラン・バレー症候群と *C. jejuni*、サルコイドーシスとプロピオニバクテリア、慢性難治性気道感染症疾患とインフルエンザ菌のバイオフィーム形成およびライノウイルス、緑膿菌のバイオフィーム形成機序、難治性血管炎とカンジダ、IgA 腎症とマイコプラズマ、クローン病と HHV-6、原発性肺高血圧症と HHV-8 について、難治性疾患と微生物の関連について検討した。それぞれの難治性疾患との関連性あるいは非関連性について明らかにされ、さらに一部では治療に係わる知見が明らかにされた。

## 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

「HIV 等のウイルス感染の有無、又はプリオン感染の有無を近赤外線分光法により検査・判定する方法、及び同方法に使用する装置」(生田和良)

「酵母の形質転換方法」、特願 2002-54965、平成 14 年 (村田幸作)

「*Sphingomonas* sp. A1 の全ゲノム配列」、出願予定 (村田幸作)

「*Pseudomonas aeruginosa* アルギン酸リアーゼ PA1167 の高次構造」、出願予定 (村田幸作)

「*Bacillus* sp. GL1 の不飽和グルクロニルヒドロラーゼの高次構造」、出願予定 (村田幸作)

「慢性肺気腫の発症リスクを予測する方法」特許第 3491034 号 (山谷睦雄)

「気管支喘息の検査方法 (ムチン合成関連遺伝子の解明)」特願 2002-229312 号 (山谷睦雄)

「ライノウイルス感染予防剤」特願 2004-98995 号 (山谷睦雄)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Moon C, Ahn M, Kim HM, Lee Y, Koh C-S, Matsumoto Y, Shin T	Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in the early and peak of autoimmune neuritis in rat sciatic nerves.	Brain Res	in press		
Moon C, Ahn M, Wie MB, Kim HM, Koh C-S, Hong SC, Kim MD, Tanuma N, Matsumoto Y, Shin T	Phenidone, a dual inhibitor of cyclooxygenases and lipoxygenases, ameliorates rat paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing its target enzymes.	Brain Res	in press		
Watanabe H, Kaji C, Anh DD, Huong PLT, Anh NTH, Huong VT, Phuong HVM, Thi NT, Suu PT, Nguyet NTT, Rusizoka OS, Watanabe K, Nagatake T, Oishi K	A comparative molecular analysis of Haemophilus influenzae among children less than 5 years of age with acute lower respiratory tract infections and meningitis in Hanoi, Vietnam.	J Clin Microbiol	in press		
Miura Y, Eishi Y, Ishige I, Koike M	Quantitative PCR of Propionibacterium acnes DNA in samples aspirated from sebaceous follicles on the normal skin of subjects with or without acne.	J Invest Dermatol	in submission		
T. Oharaseki, Y. Kameoka, F. Kura, A.S. Persad, K. Suzuki, S Naoe	Susceptibility loci to coronary arteritis in animal model of Kawasaki disease induced with Candida albicans-derived substances.	Microbiol Immunol	in press		
Koga M, Gilbert M, Li J, Koike S, Takahashi M, Furukawa K, Hirata K, Yuki N	Antecedent infections in Fisher syndrome: a common pathogenesis of molecular mimicry.	Neurology	in press		
Ishige I, Eishi Y, Takemura T, Kobayashi I, Nakata K, Tanaka I, Nagaoka S, Iwai K, Watanabe K, Takizawa T, Koike M	Propionibacterium acnes as the most common bacterium commensal in peripheral lung tissue and mediastinal lymph nodes from subjects without sarcoidosis.	Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis	in print		

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Hagiwara S, Ohi H, Eishi Y, Kodama F, Tashiro K, Makita Y, Suzuki Y, Maeda K, Fukui M, Horikoshi S, Tomino Y	A case of renal sarcoidosis with complement activation via the lectin pathway.	Am J Kid Dis	in press		2005
Iwasaki T, Mukasa K, Yoneda M, Ito S, Yamada Y, Mori Y, Fujisawa N, Fujisawa T, Wada K, Sekihara H, Nakajima A	Marked Attenuation of Production of Collagen Type I from Cardiac Fibroblasts by Dehydroepiandrosterone.	Am J Physiol Endocrinol Metab	Epub		2005
Hashimoto W, Momma K, Maruyama Y, Yamasaki M, Mikami B, Murata K	Structure and function of bacterial super-biosystem responsible for import and depolymerization of macromolecules.	Biosci Biotechnol Bioeng	in press		2005
Shaefer KL, Wada K, Takahashi H, Matsuhashi N, Ohnishi S, Wolfe MM, Turner JR, Nakajima A, Borkan SC, Saubermann LJ	PPAR $\gamma$ Inhibition Prevents Adhesion to the Extracellular Matrix and Induces Anoikis in Hepatocellular Carcinoma Cells.	Cancer Res	in press		2005
Hashimoto W, Miyake O, Ochiai A, Murata K	Molecular identification of Sphingomonas sp. A1 alginate lyase (A1-IV') as a member of novel polysaccharide lyase family 15 and implications in alginate lyase evolution.	J Biosci Bioeng	in press		2005
Takahashi M, Koga M, Yokoyama K, Yuki N	Epidemiology of Campylobacter jejuni-isolated Guillain-Barré and Fisher syndromes in Japan.	J Clin Microbiol	43	335-339	2005
Katano H, Ito K, Shibuya K, Saji T, Sato Y, Sata T	Lack of Human Herpesvirus 8 Infection in Lungs of Japanese Patients with Primary Pulmonary Hypertension.	J Infect Dis	191	743-745	2005
Nakajima A, Wada K	Nuclear Receptors on Diseases; Nuclear receptors as Targets for Drug Development.	J Pharmacol Sci	97	163	2005
Katayama K, Wada K, Nakajima A, Kamisaki Y, Mayumi T	Nuclear receptors as targets for drug development: the role of nuclear receptors during neural stem cell proliferation and differentiation.	J Pharmacol Sci	97	171-176	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yamashita M, Kamitani W, Yanai H, Ohtaki N, Watanabe Y, Lee BJ, Tsuji S, Kobayashi T, Ikuta K, Tomonaga K	Persistent Borna disease virus infection confers instability of HSP70 mRNA in glial cells during heat stress.	J Virol	79	2033-2041	2005
Yamaya M, Sasaki H	Rhinovirus and airway allergy.	Allergol Inter	53	37-45	2004
Nishiwaki T, Yoneyama H, Eishi Y, Matsuo N, Tatsumi K, Kimura H, Kuriyama T, Matsushima K	Indigenous pulmonary Propionibacterium acnes primes the host in the development of sarcoid-like pulmonary granulomatosis in mice.	Am J Pathol	165	631-639	2004
Wada K, Nakajima A, Takahashi H, Yoneda M, Fujisawa N, Ohsawa E, Kadowaki T, Kubota N, Terauchi Y, Matsuhashi N, Saubermann LJ, Nakajima N, Blumberg RS	Protective effect of endogenous PPAR $\gamma$ against acute gastric mucosal lesions associated with ischemia-reperfusion.	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol	287	G452-G458	2004
Yoshii T, Mizuno K, Hirose T, Nakajima A, Sekihara H, Ohno S	sPAR-3, a splicing variant of PAR-3, shows cellular localization and expression pattern different from that of PAR-3 during enterocyte polarization.	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol	288	G564-G570	2004
Miyake O, Kobayashi E, Nankai H, Hashimoto W, Mikami B, Murata K	Post-translational processing of polysaccharide lyase: maturation route for gellan lyase in Bacillus sp. GL1.	Arch Biochem Biophys	422	211-220	2004
Hoshino A, Hanaki K, Suzuki K, Yamamoto K	Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body.	Biochem Biophys Res Comm	314	46-53	2004
He J, Nankai H, Hashimoto W, Murata K	Molecular identification and characterization of an alginate-binding protein on the cell surface of Sphingomonas sp. A1.	Biochem Biophys Res Commun	322	712-717	2004



発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Nakayama K, Nagase K, Tokutake Y, Koh C-S, Hiratochi M, Ohkawara T, Nakayama N	Multiple POU-binding motifs, recognized by tissue-specific nuclear factors, are important for Dll1 gene expression in neural stem cells.	Biochem Biophys Res Comm	325	991-996	2004
Yoneda M, Wada K, Katayama K, Nakajima N, Iwasaki T, Osawa E, Mukasa K, Yamada Y, Blumberg RS, Sekihara H, Nakajima A	A Novel Therapy for Acute Hepatitis Utilizing Dehydroepiandrosterone in the Murine Model of Hepatitis.	Biochem Pharmacol	68	2283-2289	2004
Uchida K, Nakata K, Trapnell BC, Terakawa T, Hamano E, Mikami A, Matsushita I, Seymour JF, Oh-Eda M, Ishige I, Eishi Y, Kitamura T, Yamada Y, Hanaoka K, Keicho N	High affinity autoantibodies specifically eliminate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activity in the lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis.	Blood	103	1089-109	2004
Shimamura T, Yasuda J, Ino Y, Gotoh M, Tsuchiya A, Nakajima A, Sakamoto M, Kanai Y, Hirohashi S	Dysadherin expression facilitates cell motility and metastatic potential of human pancreatic cancer cells.	Cancer Res	64	6989-6995	2004
Yasuda H, Yamaya M, Ebihara S, Sasaki T, Maruyama M, Ishizawa K, Kanda A, Sasaki H	Increased arteio-venous Hb-CO differences in inflammatory pulmonary diseases.	Chest	125	2160-2168	2004
Furukawa E, Ohru T, Yamaya M, Suzuki T, Nakasato H, Sasaki T, Kanda A, Yasuda H, Nishimura H, Sasaki H	Human airway submucosal glands augment eosinophil chemotaxis during rhinovirus infection.	Clin Exp Allergy	34	704-711	2004
Galassi G, Susuki K, Quaglino D, Yuki N	Post-infectious acute ataxia and facial diplegia associated with anti-GD1a IgG antibody.	Eur J Neurol	11	790-791	2004
Katayama K, Wada K, Miyoshi H, Ohashi K, Tachibana M, Furuki R, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nakajima A, Kadowaki T, Tsutsumi Y, Nakagawa S, Kamisaki Y, Mayumi T	RNA interfering approach for clarifying the PPAR $\gamma$ pathway using lentiviral vector expressing short hairpin RNA.	FEBS Letters	560	178-182	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Ohashi YY, Kameoka Y, Persad AS, Kohi F, Yamagoe S, Hashimoto K, Suzuki K	Novel missense mutation found in Japanese patient with myeloperoxidase deficiency.	Gene	327	195-200	2004
Sakai H, Eishi Y, Li X-L, Akiyama Y, Miyake S, Takizawa T, Konishi N, Tatematsu M, Koike M, Yuasa Y	PDX1 homeobox protein expression in pseudopyloric glands and gastric carcinomas.	Gut	53	323-330	2004
Ovejero C, Cavard C, Perianin A, Hakvoort T, Vermeulen J, Godard C, Fabre M, Chafey P, Suzuki K, Romagnolo B, Yamagoe S, Perret C	Identification of the leukocyte cell-derived chemotaxin2 (LECT2) as a direct target gene of s-catenin in the liver.	Hepatology	40	167-176	2004
Nagai-Miura N, Shingo Y, Adachi Y, Ishida-Okawara A, Oharaseki T, Takahashi K, Naoe S, Suzuki K, Ohno N	Induction of Coronary Arteritis with Administration of CAWS (Candida albicans Water-Soluble Fraction) Depending on Mouse Strains.	Immuno-pharmacol Immunotoxicol	26	527-543	2004
Greiner LL, Watanabe H, Phillips NJ, Shao J, Morgan A, Zaleski A, Gibson BW, Apicella MA	Nontypeable Haemophilus influenzae strain 2019 produces a biofilm containing N-acetylneuraminic acid that may mimic sialylated O-linked glycans.	Infect Immun	72	4249-4260	2004
Li X-L, Eishi Y, Bai Y-Q, Sakai H, Akiyama Y, Tani M, Takizawa T, Koike M, Yuasa Y	Expression of the SRY-related HMG box protein SOX2 in human gastric carcinoma.	Int J Oncol	24	257-263	2004
Yasuda H, Ebihara S, Yamaya M, Mashito Y, Nakamura M, Sasaki H	Increased arterial carboxyhemoglobin concentrations in elderly patients with silicosis.	J Am Geriatr Soc	52	1403-1404	2004
Yasuda H, Yamaya M, Ebihara S, Sasaki T, Inoue D, Kubo H, Suzuki S, Sasaki H	Arterial carboxyhemoglobin concentrations in elderly patients with operable non-small cell lung cancer.	J Am Geriatr Soc	52	1592-1593	2004
Miyake O, Ochiai A, Hashimoto W, Murata K	Origin and diversity of bacterial alginate lyases of families PL-5 and -7 in <i>Sphingomonas</i> sp. strain A1.	J Bacteriol	186	2891-2896	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Itoh T, Akao S, Hashimoto W, Mikami B, Murata K	Crystal structure of unsaturated glucuronyl hydrolase, responsible for the degradation of glycosaminoglycan, from <i>Bacillus</i> sp. GL1 at 1.8Å resolution.	J Biol Chem	279	31804-31812	2004
Yamasaki M, Moriwaki S, Miyake O, Hashimoto W, Murata K, Mikami B	Structure and function of a hypothetical <i>Pseudomonas aeruginosa</i> protein PA1167 classified into family PL-7. A novel alginate lyase with a $\beta$ -sandwich fold.	J Biol Chem	279	31863-31872	2004
Ito M, Nagata N, Yumoto F, Yamagoe S, Suzuki K, Adachi K, Tanokura M	$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ resonance assignments of the cytokine LECT2.	J Biomol NMR	29	543-544	2004
Hashimoto W, Yamasaki M, Takafumi Itoh T, Momma K, Mikami B, Murata K	Super-channel in bacteria: structural and functional aspects of a novel biosystem for the import and depolymerization of macromolecules.	J Biosci Bioeng	98	399-413	2004
Godschalk PCR, Heikema AP, Gilbert M, Komagamine T, Ang CW, Glerum J, Brochu D, Li J, Yuki N, Jacobs BC, van Belkum A, Endtz HPh	The crucial role of <i>Campylobacter jejuni</i> genes in anti-ganglioside antibody induction in the Guillain-Barré syndrome.	J Clin Invest	114	1659-1665	2004
Watanabe H, Hoshino K, Sugita R, Asoh N, Watanabe K, Oishi K, Nagatake T	Possible high rate of transmission of nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i> , including beta-lactamase-negative ampicillin-resistant strains, between children and their parents.	J Clin Microbiol	42	362-365	2004
Iijima H, Neurath MF, Nagaishi T, Glickman JN, Nieuwenhuis EE, Nakajima A, Chen D, Fuss IJ, Utku N, Lewicki DN, Becker C, Gallagher TM, Holmes KV, Blumberg RS	Specific Regulation of T Helper Cell 1-mediated Murine Colitis by CEACAM1.	J Exp Med	199	471-482	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Abe Y, Inamori M, Togawa J, Kikuchi T, Muramatsu K, Chiguchi G, Kawamura H, Kobayashi N, Kirikoshi H, Sakaguchi T, Takamura T, Nakajima A, Ueno N, Sekihara H	The Comparative effects of single intravenous doses of omeprazole and famotidine on intragastric pH.	J Gastro- enterol	39	21-25	2004
Ishizu H, Kumagai J, Eishi Y, Takizawa T, Koike M	Mucin core protein expression by colorectal mucinous carcinomas with or without mucus hyperplasia.	J Gastro- enterol	39	125-13	2004
Matsuhashi N, Nomura S, Nakajima A, Kamisaki M	Inflammatory fibroid polyps of the stomach and Helicobacter pylori.	J Gastro- enterol Hepatol	19	346-347	2004
Takemoto M, Mori Y, Ueda K, Kondo K, Yamanishi K	Productive human herpesvirus 6 infection causes aberrant accumulation of p53 and prevents apoptosis.	J Gen Virol	85	869-879	2004
Amano H, Morimoto K, Senba M, Wang H, Ishida Y, Kumatori A, Yoshimine H, Oishi K, Mukaida N, Nagatake T	Essential contribution of monocyte chemoattractant protein-1/C-C chemokine ligand-2 to resolution and repair processes in acute bacterial pneumonia.	J Immunol	172	398-409	2004
Saito T, Okumura A, Watanabe H, Asano M, Ishida-Okawara A, Sakagami J, Sudo K, Hatano-Yokoe Y, Abo T, Iwakura Y, Suzuki K, Yamagoe S	Increase of Hepatic NKT Cells in LECT2-Deficient Mice Contributes to Severe Concanavalin A-Induced Hepatitis.	J Immunol	173	579-585	2004
Tanabe H, Akashi T, Kawachi H, Andou N, Eishi Y, Takizawa T, Koike M, Ichinose S	Identification of hydroxyapatite deposits in the smooth muscle cells and ganglion cells of autopsied small intestines.	J Med Dent Sci	51	129-138	2004
Tanaka-Taya K, Sashihara J, Kurahashi H, Amo K, Miyagawa H, Kondo K, Shintaro Okada S, Yamanishi K	Human herpesvirus 6 (HHV-6) transmits from parent to child by integration form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA.	J Med Virol	73	465-473	2004