

厚生労働科学研究費補助金
平成17年度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17年度 総括・分担研究報告書

平成18年 3 月

主任研究者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

平成17年度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」班
班員名簿

佐多徹太郎	国立感染症研究所・感染病理部	部長
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
近藤 一博	東京慈恵会医科大学医学部・微生物学講座第一	教授
山谷 睦雄	東北大学医学部附属病院・老人・呼吸器内科	助教授
中島 淳	横浜市立大学医学部・分子消化管内科	準教授
荒川 宜親	国立感染症研究所・細菌第二部	部長
結城 伸泰	独協医科大学・神経内科	助教授
渡辺 浩	長崎大学医学部・歯学部附属病院・感染症内科	講師
川端 寛樹	国立感染症研究所・細菌第二部	室長
鈴木 和男	国立感染症研究所・生物活性物質部	室長
渋谷 和俊	東邦大学医学部附属大森病院・病理学講座	教授
岸本 壽男	国立感染症研究所・ウイルス第一部	室長

目 次

I. 特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究	
総括研究報告書（平成 17 年度）	1
主任研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）	
II. 分担研究報告書	
1. 特定疾患とウイルスの関与	7
分担研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）	
2. 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	13
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）	
3. 神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明	19
分担研究者：近藤 一博（東京慈恵会医科大学医学部・微生物学講座第一）	
4. 慢性肺気腫あるいは呼吸不全とウイルス感染	25
分担研究者：山谷 睦雄（東北大学医学部附属病院・老人・呼吸器内科）	
5. 自己免疫性肝炎の発症に関する微生物の関与	31
分担研究者：中島 淳（横浜市立大学医学部・分子消化管内科）	
6. <i>Mycoplasma amphoriforme</i> 遺伝子診断系の国内導入ならびに 抗リン脂質抗体症候群とマイコプラズマ感染	37
分担研究者：荒川 宜親（国立感染症研究所・細菌第二部）	
7. ギラン・バレー症候群の発症に関わるカンピロバクター遺伝子	47
分担研究者：結城 伸泰（獨協医科大学・神経内科）	

8. Nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i> と <i>H. influenzae</i> type b のバイオフィルム 産生に関する比較研究－莢膜とバイオフィルム発現の関連について－	5 1
分担研究者：渡辺 浩（長崎大学医学部・歯学部附属病院・感染症内科）	
9. ライム病ボレリアと不明神経疾患	5 3
分担研究者：川端 寛樹（国立感染症研究所・細菌第1部）	
10. 難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子	6 1
分担研究者：鈴木 和男（国立感染症研究所・生物活性物質部）	
11. <i>Stachybotrys chartarum</i> 吸入と原発性肺高血圧症との関連について	7 1
分担研究者：渋谷 和俊（東邦大学医学部附属大森病院・病理学講座）	
12. クラミジア・リケッチアと特定疾患についての研究	7 5
分担研究者：岸本 壽男（国立感染症研究所ウイルス第1部）	

I. 総括研究報告書

総括研究報告書

主任研究者 佐多 徹太郎 国立感染症研究所感染病理部 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。特定疾患とウイルスの関与、神経変性疾患とボルナ病ウイルス感染、神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルス、慢性肺気腫ないし呼吸不全とウイルス感染、自己免疫性肝炎のウイルス学的原因の網羅的解析、マイコプラズマと IgA 腎症、ギラン・バレー症候群とカンピロバクター遺伝子、難治性気道細菌感染症とバイオフィルム、不明神経疾患とボレリア感染症、難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子、真菌感染と原発性肺高血圧症、クラミジア・リケッチアと特定疾患について検討した。それぞれの特定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：

佐多徹太郎 国立感染症研究所感染病理部 部長
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
近藤一博 東京慈恵会医科大学医学部微生物学講
座第一教授
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
中島 淳 横浜市立大学医学部消化器内科 助教授
荒川宜親 国立感染症研究所細菌第 2 部 部長
結城伸泰 独協医科大学神経内科学 助教授
渡辺 浩 長崎大学医学部歯学部附属病院感染症
内科 講師
川端寛樹 国立感染症研究所細菌第一部 室長
鈴木和男 国立感染症研究所生物活性物質部 室長
渋谷和俊 東邦大学医学部附属大森病院病理学講
座 教授
岸本壽男 国立感染症研究所ウイルス第一部 室長

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不明であり、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ることや、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。当研究班では臨床研究班と密接に連携をとり、特定疾患を引き起こす病原体、その発

症機序を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) 特定疾患とウイルスの関与：多種類のウイルスを定量的に検出するため、Taqman PCR の系を用いた。また、病理組織切片上で感染細胞数（比率）を知る方法として、免疫組織学的染色と画像解析ソフトを利用した。（佐多）。
- 2) 神経変性疾患とボルナ病ウイルス(BDV)感染：BDV の持続感染が引き起こす脳内病態の機序を明らかにするために、BDV のリン酸化 (P) タンパク質をグリア細胞で発現するトランスジェニックマウス (BDV P-Tg) の解析をおこなった。（生田）。
- 3) 神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明：クローン病患者病理組織における HHV-6 潜伏感染関連蛋白発現を特異抗体を用いて検討した。また、免疫不全マウスである NOD-SCID マウスを用いてヒトの血液幹細胞を再構築した SCID-hu マウスを作成した。（近藤）
- 4) 慢性肺気腫あるいは呼吸不全とウイルス感

- 染:ヒト気管上皮細胞を試験管に培養し、ライノウイルスまたはRSウイルスを感染させた。培養液中のウイルス量はヒト胎児線維芽細胞またはHep-II細胞に対する細胞変性効果(cytopathic effects; CPE)を生じる最大希釈倍率から求めた。(山谷)
- 5) 自己免疫性肝炎の発症に関する微生物の関与:自己免疫性肝炎患者からの肝臓生検組織中の遺伝子発現プロファイリングを比較、自己免疫性肝炎特異的Virus由来の発現遺伝子のリストを作成した。遺伝子発現比較にはアフィメトリックス社Gene Chipを用いた。(中島)
 - 6) *Mycoplasma amphoriforme* 遺伝子診断系の国内導入ならびに抗リン脂質抗体症候群とマイコプラズマ感染:*M. amphoriforme*の分離株を海外から分与を受けた。先天性免疫不全患者の臨床検体からDNAを抽出しPCR後、配列解析を行った。抗カルジオリピン抗体陽性者血清と反応する*M. penetrans*成分のプロテオミクス解析を試みた。(荒川)
 - 7) ギラン・バレー症候群(GBS)の発症に関わるカンピロバクター遺伝子:GBSや類縁疾患患者の糞便より分離された*C. jejuni*138株を用いて、リポオリゴ糖(LOS)合成酵素各遺伝子の有無をPCR法で決定し、遺伝子組成パターンをAからF(Gilbertら)にクラス分けした。
 - 8) Nontypeable *Haemophilus influenzae* と *H. influenzae* type b のバイオフィーム産生に関する比較研究:バイオフィーム産生をマイクロプレートを用いたbiofilm production assayで検索した。このうちバイオフィーム産生株、非産生株の間で走査型電子顕微鏡およびconfocal laser scanning microscopy (CSLM)を用いて経時的なバイオフィーム産生の画像的变化を比較検討した。
 - 9) ライム病ボレリアと不明神経疾患:非組換え型抗原を用いたライム病血清診断キットの感度特異性をしらべ、常法であるWestern blot法と比較検討し、血清疫学調査への適否を検討した。
 - 10) 難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子:*Candida albicans*由来分子CAWSをPBSに懸濁し、C57BL/6Nマウス腹腔内に投与後、経時的に屠殺し、解析した。CAWSの活性中心にかかわるmannan構造解析した。(鈴木)
 - 11) *Stachybotrys chartarum* 吸入と原発性肺高血圧症との関連について:ヒトの居住環境内に存在する真菌である*Stachybotrys chartarum*をマウスに経気管的に反復投与した。マウスは屠殺後に病理組織学的変化を検討した。また、体重および各臓器の重さ、右心室肥大に対する影響を検討した。(渋谷)
 - 12) クラミジア・リケッチアと特定疾患についての研究:orbital MALTリンパ腫症例17例のDNAを用いて、クラミジア遺伝子検出を試み、患者血清については、micro-IF法によってオウム病クラミジアに対する血清抗体を測定した。慢性疲労症候群様疾患(CFS)疑いの患者43名の血清*C. burnetii*抗体の測定と、血液からの遺伝子検出を行った。(岸本)
- (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、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た。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った。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った。
- ### C. 研究結果
- 1) 特定疾患とウイルスの関与:特定疾患とウイルス感染の関与を明らかにする目的で、Taqman PCRを用い、多種類のウイルスを比較的短時間で同時に定量できる方法を開発した。また、画像解析ソフトを利用し、コンピューターに取り込んだ免疫組織染色像から感染細胞数(比率)を算出する系を確立した。この画像データから算出した感染細胞数と定量的PCRで得られたデータから、一細胞あたりのウイルスコピー数を算出することができた。(佐多)。
 - 2) 神経変性疾患とボルナ病ウイルス感染:BDV P-Tg脳内では神経伝達物質であるグルタミン酸の濃度制御に働いているグリブ型グルタミン酸トランスポーター(GLAST)の発現が顕著に低下していることが明らか

- となった。また、D型アミノ酸酸化酵素の発現にも異常が示された。(生田)。
- 3) 神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明：クローン病の腸管の病変部においてヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) の潜伏感染時に発現する蛋白が検出されることを見出し、クローン病の発症・増悪とHHV-6の潜伏感染との関連が示唆された。また、NOD-SCID-huマウスを用いて新規のHHV-6感染モデルを開発した。(近藤)
 - 4) 慢性肺気腫あるいは呼吸不全とウイルス感染： β 2-刺激薬である塩酸プロカテロールを培養ヒト気管上皮細胞に作用させると、培養液ライノウイルス量が減少した。また、RhoA活性化抑制薬 *N-acetyl-S-geranylgeranyl-L-cysteine* (AGGC)、バフィロマイシン、エリスロマイシン、およびクラリスロマイシンを培養ヒト気管上皮細胞に作用させると、培養液RSウイルス量が減少した。(山谷)
 - 5) 自己免疫性肝炎の発症に関する微生物の関与：自己免疫性肝炎患者(AIH)からの肝臓生検5名、慢性C型10例からの肝生検を材料に用いてプロファイリング解析を行った結果、網羅的遺伝子発現解析のデータベースからHTLV-1、HBV(X)、HPV E6、Moloney leukemia virus、MMTV、Myeloblastosis virusなどを検出した。(中島)
 - 6) *Mycoplasma amphoriforme* 遺伝子診断系の国内導入ならびに抗リン脂質抗体症候群とマイコプラズマ感染：*M. amphoriforme* の診断系の国内導入を行ない、PCR診断を検討した。血清診断法については、肺炎マイコプラズマ(*M. pneumoniae*)との抗原交差性が示唆された。慢性呼吸器疾患をもつ先天性免疫不全患者5名では、1名に肺炎マイコプラズマの遺伝子が検出された。抗カルジオリピン抗体陽性者血清が*M. penetrans*と反応したが反応蛋白質の同定には至らなかった。(荒川)
 - 7) ギラン・バレー症候群の発症に関わるカンピロバクター遺伝子：GBS株の68%がクラスAで、腸炎株(103株中17%)と比べ有意に高頻度であった。クラスA遺伝子座にはGM1/GD1a様LOS合成に必要な糖転移酵素がすべて含まれ、クラスA株の多くはGM1様LOS(79%)やGD1a様LOS(76%)を有し、クラスA株が分離された患者血中には抗GM1/GD1a抗体が高頻度に検出された。ロジスティック回帰分析でも、HS:19型とクラスA遺伝子座がGBS発症の危険因子であることが確認された。(結城)
 - 8) Nontypeable *Haemophilus influenzae* と *H. influenzae* type b のバイオフィーム産生に関する比較研究：biofilm production assay、走査型電子顕微鏡およびconfocal laser scanning microscopyによる観察で、多くのHibはNTHiに比べバイオフィーム形成能は乏しいと考えられた。一方、一部のHibはバイオフィーム形成能を有していたが、これらの株の多くで莢膜が脱落していた。Hibにおいては莢膜の脱落がバイオフィーム形成能に関与している可能性が高いものと考えられた。(渡辺)
 - 9) ライム病ボレリアと不明神経疾患：非組換え抗原型ライム病血清診断キットを常法であるWestern blotting法による抗体検査と比較したところ、MarDXライム病診断キットによる感度、特異性ともに常法によるライム病診断法とほぼ同等もしくは優れていることが示された。MS症例を含む原因不明神経疾患におけるライム病抗体の検索を行い、不明神経疾患12症例のうち5—6症例でライム病抗体陽性と判定された。(川端)
 - 10) 難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子：*C. albicans* 由来分子CAWSが血管炎を誘発し、炎症誘導機構に初期好中球機能および炎症性サイトカインの上昇が引きがねになっていることと示した。CAWSの血管炎惹起活性の強度が*Candida mannan*の構造によって制御されていることが強く示唆された。(鈴木)
 - 11) *Stachybotrys chartarum* 吸入と原発性肺高血圧症との関連について：*Stachybotrys chartarum* を経気管的に反復投与したマウスの一部の個体で肺動脈壁の肥厚がびまん性に認められることを明らかにした。肺動脈壁肥厚は組織学的には内膜の対称性細胞線維性肥厚を主とする変化で、しばしば中膜肥厚を伴い内腔の著明な狭窄をきたすこ

と、接種菌数依存性に出現頻度を増すこと、肺動脈の変化に伴い右心室重量が増加することを明らかにした。(渋谷)

- 12) クラミジア・リケッチアと特定疾患についての研究：orbital MALT リンパ腫症例 17 例ではオウム病クラミジアの遺伝子は検出されず、またオウム病クラミジア特異 IgG、IgA、IgM 抗体を保有する症例はなかった。Q 熱コクシエラと慢性疲労症候群様疾患との関連についての検討では、IgM および IgG 抗体価の有意な上昇を認める症例はなく、また *C. burnetii* の DNA が抽出された症例もなかった。(岸本)

D. 考 察

疾患とウイルス感染に関連がある場合には一定のウイルスコピー数が算出されることが予想され、今後、特定疾患と未知、既知のウイルス感染の関連を考える上で本研究で開発された網羅的定量的 PCR は有用なツールになるものと考えられる。神経変性疾患とボルナ病ウイルス感染については、P-Tg の小脳で GLAST の発現が有意に低下しており、P タンパク質による GLAST 発現への影響が強く示唆される。GLAST の発現低下は、シナプス間隙でのグルタミン酸濃度を上昇させ、神経変性を誘導すると考えられ、BDV P タンパク質による細胞機能障害が神経変性を含めた中枢神経系疾患の発症に関与する可能性が示された。クローン病の腸管の病変部においてヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) の潜伏感染時に発現する蛋白が検出されたことは、クローン病の発症・増悪と HHV-6 の潜伏感染との関連をさらに強く示唆するものと考えられた。また、新規の HHV-6 感染モデルでは、通常のヒトにおける場合の数千倍以上の高頻度で潜伏感染細胞が存在することが確認され、HHV-6 潜伏感染の機序や生体に与える影響を、より詳細に検討することが可能になると考えられた。

β2-刺激薬である塩酸プロカテロールは ICAM-1 減少を介して、ライノウイルス感染抑制効果をもたらすことが示唆された。また、炎症性サイトカインも減少することより、塩酸プロカテロールがライノウイルス感染による気道炎症を抑制する可能性が示唆された。また、

AGGC およびマクロライド抗生物質は RS ウイルス感染を抑え、マクロライドでは炎症性サイトカインも減少することより、RS ウイルス感染による気道炎症を抑制する可能性が示唆された。自己免疫性肝炎の遺伝子発現プロファイリング解析では、少ない症例数ながらも可能性のある候補遺伝子が同定された。ひとつでも発症に関与する遺伝子が見つければブレークスルーとなる可能性を示唆するものである。今後はできるだけ発症初期の患者組織を収集し、解析することが重要であると考えられた。

先天性免疫不全患者における慢性呼吸器疾患の起因菌の一つである可能性が示唆される新種の *M. amphoriforme* の診断系の国内導入を行い、血清診断法では、肺炎マイコプラズマとの抗原交差性があることが示唆されたが、報告されたプライマーは臨床検体抽出 DNA を鋳型に用いるには、感度ならび特異性に問題があり、肺炎マイコプラズマと *M. amphoriforme* の鑑別診断系の開発の必要性が示唆された。マイコプラズマ感染による原発性抗リン脂質症候群発症の可能性については自己抗体産生の原因となるカルジオリピン等のリン脂質と結合しているヒト血液凝固因子とマイコプラズマの分子相同性、特に抗原 mimicry についても解析を行う必要性が示唆された。ギラン・バレー症候群の発症に関わるカンビロバクター遺伝子の研究結果から、*C. jejuni* クラス A 遺伝子座により GM1 や GD1a 様 LOS が合成され、抗ガングリオシド抗体産生、GBS 発症が促されると考えられた。

Nontypeable *Haemophilus influenzae* と *H. influenzae* type b のバイオフィーム産生に関する比較研究においては多くの Hib は NTHi に比べてバイオフィーム形成能は乏しいと考えられた。Hib においては莢膜の脱落がバイオフィーム形成能に関与している可能性が高いものと考えられた。ライム病ボレリアの研究ではライム病血清診断キットの有用性が示された。MS とライム病との相関については否定的であるが、我が国の MS 症例におけるライム病ボレリア抗体の保有率など血清疫学調査は行われず、今後本研究により、標準化された方法により、MS とライム病の相関が明らかにすることは極めて重要であると考えられる。難治

性血管炎を誘発する真菌特異的分子の研究では CAWS の炎症誘導機構に初期好中球機能および炎症性サイトカインの上昇が引きがねになっていることと示した。CAWS は mannan 主構成成分として血管炎を惹起しその活性中心にかかわる mannan 構造の変化が培養条件の変動による分子特性と関連することがわかった。

Stachybotrys chartarum 吸入と原発性肺高血圧症との関連については真菌の吸入によって、肺動脈壁のびまん性肥厚を作成した動物モデルの報告はなく、今までに病態が明らかではなかった難治性疾患、特に特発性肺高血圧症との関連を示唆する重要な知見であると考えられた。orbital MALT リンパ腫とオウム病クラミジアや慢性疲労症候群様疾患患者における Q 熱コクシエラの関与についての検討はいずれも、症例数を増やしてさらに検討を続ける必要がある。今後は肺炎クラミジアと中枢神経系疾患との関連性についても、多発性硬化症例の血清の提供を受けて検討する予定である。

E. 結 論

多種類のウイルスを検出する定量的 PCR の系と、免疫組織学的染色を施行した病理組織切片上で感染細胞数（比率）を知る方法を開発した。BDV の病態機序として BDV P タンパク質が神経系細胞に脆弱化を誘導することで、神経変性疾患を含めたさまざまな疾患に関与する可能性が示された。HHV-6 の潜伏感染関連蛋白が、腸管の病変部において検出され、クローン病の発症・増悪と HHV-6 の異常な潜伏感染状態との関連が示唆された。また、HHV-6 の潜伏感染・再活性化を *in vivo* で研究することのできる SCID-hu マウスシステムを開発し、HHV-6 潜伏感染の生体を与える影響をより詳細に検討することを可能とした。

塩酸プロカテロールのライノウイルス感染抑制効果、炎症性サイトカインや ICAM-1 の減少効果が示唆され、また、マクロライドおよび RhoA 活性抑制薬による RS ウイルス感染抑制効果が示唆された。自己免疫性肝炎の遺伝子発現プロファイリング解析では、いくつかの可能性のある候補遺伝子が同定された。

2005 年に同定された新種の *M. amphoriforme* の遺伝子診断系を国内に導入し、新たな遺伝子

診断系ならびに、血清診断系開発の必要性が示唆された。GBS の研究では特定の遺伝子座を有する *C. jejuni* は、菌体上にガングリオシド様 LOS を発現する結果、GBS を惹起しやすくなることがわかった。Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) と *H. influenzae* type b (Hib) のバイオフィーム産生能の違いについて比較検討し多くの Hib は NTHi に比べバイオフィーム形成能は乏しいと考えられた。

国内における MS とライム病との因果関係を検証するための標準化された血清診断方法を確立した。感染症によって誘発される難治性血管炎の原因のうち、真菌関与の菌側因子として *C. albicans* の CAWS が重要な働きをすること示した。血管炎の誘導は CAWS の活性中心における mannan 構造の変化と関連することがわかった。*Stachybotrys chartarum* 吸入マウスはヒト特発性肺高血圧症に極めて近似した病態モデルである可能性が示唆された。orbital MALT リンパ腫とオウム病クラミジアとの関連、ならびに慢性疲労症候群様疾患患者における Q 熱コクシエラの関与ともに積極的に支持する結果は得られなかったが、さらに症例の追加をして検討する必要があると思われた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
各分担研究者の報告書の項を参照。
2. 学会発表
各分担研究者の報告書の項を参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
 - 1) 発明の名称：ライノウイルス感染予防剤
出願者：山谷陸雄、安田浩康、佐々木英忠
出願番号：特願 2004-98995 号(特許申請中)
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

II. 分担研究報告書

1. 特定疾患とウイルスの関与

分担研究者 佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）

研究協力者 片野晴隆、尾崎泰子、菅野隆行、中島典子
（国立感染症研究所感染病理部）

研究要旨 特定疾患とウイルス感染の関与を明らかにする目的で、多種類のウイルスを検出する定量的 PCR の系と、免疫組織学的染色を施行した病理組織切片上で感染細胞数（比率）を知る方法を開発した。定量的 PCR は Taqman PCR を用い、1 型から 8 型までのすべてのヒトヘルペスウイルスや、レトロウイルス、ヒトパルボウイルス等、他種類のウイルスを比較的短時間で同時に定量できる方法を開発し、さらにウイルスの種類を増やしているところである。また、画像解析ソフトを利用し、コンピューターに取り込んだ免疫組織染色像から感染細胞数（比率）を算出する系を確立した。この画像データから算出した感染細胞数と定量的 PCR で得られたデータから、一細胞あたりのウイルスコピー数を算出することができた。疾患とウイルス感染に関連がある場合には一定のウイルスコピー数が算出されることが予想され、今後、特定疾患と未知、既知のウイルス感染の関連を考える上で有用なツールになるものと考えられる。

A. 研究目的

特定疾患（難病）に指定されている疾患はほとんどが原因不明であり、未知の微生物を含めた微生物の何らかの関与が疑われる疾患も少なくないと考えられる。たとえば、小児の劇症肝炎では薬剤性のものを除いては原因不明で、既知のウイルスなどは検出されないこと、肝移植後に起こる再生不良性貧血の頻度に地域差があることなどから、骨髄にも感染する未知の肝炎ウイルスが小児劇症肝炎の病原ウイルスである可能性が示唆されている。劇症肝炎では一時、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) の関与が指摘され、事実、一部の症例では HHV-6 の活性化が劇症肝炎の発症に関与していたことが証明されている。しかし、HHV-6 のような、ほとんどすべての健常人が既感染し、抗体を保有するようなウイルスが、ある特定の疾患の成立に関与しているかどうかを実証することは容易ではない。

微生物の感染が特定の疾患の病因として認められるには、古来よりコッホの三原則、すなわち、(1) 疾患にその病原体が検出されること、(2) 病原体が分離、培養されること、(3) 分離培養された病原体を別の個体に接種すると同一の疾患が生じること、の 3 つを満たす必

要があるとされる。現在でもこの原則の重要性は変わらないが、コッホの時代から比べると科学の格段の進歩により若干のニュアンスの違いが生じている。分離培養ができない微生物の存在が明らかになったことや、検出系が遥かに高感度になっている点はこれらの原則を考え直す上で、見逃すことはできない。特に PCR 法の開発により病原体の検出感度は飛躍的に向上した。PCR 法により多くの疾患と微生物の関連が明らかになったのは事実であるが、その反面、多くの微生物が、擬陽性として様々な疾患から検出されている。したがって、現在の技術を用いては、微生物が検出されることだけでは不十分であり、病因との関わりを示すには、その微生物が病変部に存在し、病因に何らかの役割を果たしていることを証明することが必要である。機能的な解析は現在においても容易なことではないが、病変部内に多くのコピー数の微生物が存在した場合、それはその微生物が病態に関与している可能性を示唆する。すなわち、微生物の増生により、病変部が形成されることが示唆される。逆に、微量の微生物しか検出されない場合は病態との関連も希薄であることが予想される。つまり、微生物のコピー数と病変の局在はある程度は相関するものと考え

えられる。

特定疾患においてウイルスなどの微生物感染が病態と関与しているかどうかを調べるため、本研究では、多くのウイルスを一度に網羅的に、かつ、定量的に検出する系を模索する一方で、免疫組織により病理標本上における感染細胞の比率を測定することにより、病変部、および感染細胞におけるウイルスコピー数を計算上、推定する方法の開発を目的とする。これにより、ある疾患とウイルス感染の関連を数学的に、客観的に評価できる系の構築を目指す。

B. 研究方法

1. 定量的 PCR

検体から QIAamp DNA mini Kit (QIAGEN) にて DNA を、SV total RNA isolation kit (Promega) にて RNA を抽出した。RNA は、特異的プライマーと OmuniScript RT Kit (QIAGEN) を用いて逆転写反応を行った。cDNA あるいは DNA を鋳型として RNA/DNA ウイルス特異的プライマーと Taqman Probe (FAM-TAMRA labeled) により定量的 Taqman PCR (ABI) を行った。PCR の内部標準として GAPDH 遺伝子の増幅を同時に行った。

2. 免疫組織学的染色

生検および剖検病理組織は 10%緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。4 μ m 厚の切片を作製し、シランコートガラススライドに貼付した。脱パラフィン後、クエン酸処理にて抗原賦活化処理を行い、リン酸バッファーで洗浄後、ウサギポリクローナル抗体を一次抗体として反応させた。洗浄後、ビオチン標識抗ウサギイムノグロブリン抗体を二次抗体として、三次抗体にはペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを順次反応させた。抗体の種類により、Catalyzed Signal Amplification kit (DAKO) によりシグナルを増強させた。ジアミノベンチジンで発色後、アルコール脱水、キシレン透徹、封入後、検鏡した。また、免疫染色とは別に各標本はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色で全体の形態変化を観察した。

3. 免疫組織学的染色切片上の感染細胞数の測定

免疫組織学的染色を行ったスライドから 40 倍あるいは 100 倍の倍率で染色した組織を画像としてコンピューターに取り込んだ。取り込んだ画

像は画像解析ソフト ImageJ (version 1.33 u, Bethesda, NIH) を用いて、画像解析を行った。画像解析はまず、得られた画像を red, green, blue の 3 色に分解し、それぞれの分解像から閾値を設定した。Red からは核染色した核がすべてカウントできるように閾値を設定し、全細胞数を描出できるようにした。Green 像からは茶色で染色された感染細胞を描出できるように、閾値を設定し、各切片、疾患ごとに全細胞数と感染細胞を描出させ、自動的にカウントさせた。(図 1) これにより、取り込み画像ごとに全細胞数と感染細胞数をカウントし、その比率を計算した。

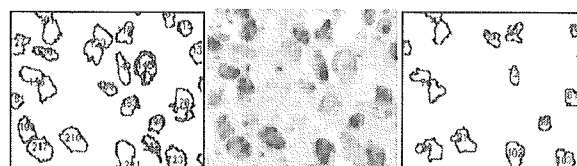


図 1. 免疫組織学的染色切片上の感染細胞数の測定
カポジ肉腫組織に対して HHV-8 潜伏感染タンパク LANA の免疫組織学的染色を行ない (中央)、それを red, blue, green に分割した。分割後、red 像からヘマトキシリン染色像をトレースし、自動的にカウントさせ (左)、同様に green イメージをベースに陽性シグナルをカウントした (右)。左画像は全細胞数を、右画像は陽性細胞数をカウントしている。これにより、全細胞数に対する感染細胞の比率を知ることができる。

C. 研究結果

1. 定量的 PCR 系の確立

既発表の定量的 PCR の系を参考に多くの種類の定量的 PCR 系の確立を試みた。一度に多くのウイルスを検出することを可能にするため、画一化した反応条件の下になるべく多くの PCR 系を施行した。RNA ウイルスと DNA ウイルスに反応系を分け、RNA ウイルスでは RT-PCR の系が動くようにした。RT-PCR では A 型肝炎ウイルス (HAV)、C 型肝炎ウイルス (HCV)、エンテロウイルスを、DNA-PCR では B 型肝炎ウイルス (HBV)、単純ヘルペスウイルス (HSV) I 型、II 型、水痘帯状疱疹ウイルス (VZV)、エプスタイン・バーウイルス (EBV)、サイトメガロウイルス (CMV)、ヒトヘルペスウイルス (HHV) 6, 7, 8, パルボウイルス B19 等について、同時に同一プレート上で検出を試みた。プラスミドを定量性のコントロールに置いたところ、ウイルスごとに若干の感度の差が認められたが、感度の差は 100 倍以内であり、10 コピー以上であれば安定して検出可能である結果を得た。

2. 免疫組織学的染色切片上の感染細胞数の測定

病変部から病原体が検出されたところで、疾患の成立に病原体が関与しているとは必ずしもいえない。微量な病原体の存在は多くの場合、末梢血や周辺組織からの混入であり、病態とは何ら関係がない。病原体がその病因となっているかどうかは病変部に感染細胞が検出されるだけではなく、ある程度の量が存在し、病変局所で何らかの作用を果たしている必要がある。また、疾患との関連が明らかな感染症の場合、感染細胞の局在と病変の局在は一致するだけでなく、病変局所にはある程度高濃度の病原体が蓄積、検出される。したがって、病変部に病原体がどれだけ存在しているか、一細胞あたり、何コピーの病原体があるかを知ることは発症病理とその病原体感染を関連つける上で重要な情報となる。病理組織切片において、ウイルスなどのコピー数を知ることが前述の定量的 PCR を用いて知ることができるが、一方で、病理検体は病変部のみならず、多くの正常組織を含んでおり、定量的 PCR で検出したコピー数は周辺正常組織も含んだ数である。感染細胞一つあたりにウイルスなどの病原体がどれだけのコピー数が存在するかはその切片上に感染細胞がどれだけ含まれているかを知らないと推測することはできない。そこで、我々はコンピューターによる画像解析を利用して、病理組織切片上の感染細胞数の測定を試みた。

モデルに用いたのはヒトヘルペスウイルス 8 (HHV-8) の感染により起こるカポジ肉腫、primary effusion lymphoma (PEL) などのリンパ腫および多巣性キャッスルマン病の組織で、免疫組織で HHV-8 の潜伏感染タンパク LANA を検出した。ImageJ による画像解析により、LANA 陽性細胞を HHV-8 感染細胞と考え、感染細胞数を正確にカウントし、全細胞数との比率を計算した。さらに、定量的 PCR の結果と合わせ、感染細胞あたりのウイルスコピー数を算出した。その結果、カポジ肉腫、リンパ腫といった、HHV-8 が潜伏感染している病変では多くの細胞で HHV-8 感染が認められる反面、ウイルス量は多くなく、カポジ肉腫では感染細胞一つあたりのウイルス量は 3 コピーであった。この量は、ウイルスが細胞内で複製しているというよりも、潜伏持続感染している状況と考えられ、潜伏感染タンパクが発現していることと矛盾しない結果といえる。

Real-time PCR	免疫組織化学における感染細胞数	感染細胞あたりのコピー数	疾患とウイルスの関連
コピー数少ない	少ない	?	関連は薄い
	多い	小	潜伏感染による疾患
コピー数多い	少ない	高	増殖感染による疾患
	多い	高～中	感染による疾患

図2. ウイルスコピー数と感染細胞数

Real time PCR の結果と免疫組織化学における感染細胞数と疾患とウイルスの関連を示す。Real time PCR でコピー数が少なくても潜伏感染による疾患では多くの感染細胞が存在し、疾患との関連も確固たるものとなる。一方、免疫組織で感染細胞が少なくても増殖性感染による疾患では多くのウイルスコピー数が検出されることがある。

D. 考察

定量的 PCR の利便性としてウイルスなどの核酸を非常に短時間に、かつ高感度に検出・定量することが可能である点がある。本研究で開発されている多種類のウイルスを一度に検出できる定量的 PCR の系は、こうした特定疾患と微生物感染との関連を明らかにする上で有用なツールとなろう。

ウイルスが疾患を発症するには様々な機構が考えられている。古典的にはウイルスが病変部で増殖し、ウイルス量が増加するとともにウイルスから様々な因子が放出され病態と関連する。多くのウイルス感染症はこれに相当し、ウイルスの増殖と病態はパラレルな関係にある。ところが、ウイルスの中には病変部においても増殖せず、潜伏感染状態を維持したまま病原性を発揮するものがある。本研究で例として取り上げた HHV-8 や EBV などのガンマヘルペスウイルス感染症はこの典型であり、ウイルスの増殖と病態はパラレルではない。むしろ、感染細胞あたりのウイルス量は一定で、潜伏感染した細胞の増殖そのものが病態と関連する。このような場合、ウイルス感染細胞の数は増加するものの、ウイルスコピー数の増加はさほどでもない。このように、ウイルスの病原性が個々のウイルスによって異なるのにもかかわらず、闇雲にウイルス量だけでその病原性を推測することは危険であり、疾患とウイルス感染の関連を正しくとらえたことにならない。すなわち、ウイルス感染が疾患の発症と関連があるかどうかを明白にするためには感染細胞数とウイルスコピー数の両方を正確に把握する必要が生じる。

これまで、病理標本を用いた核酸の解析は病変部から直接、抽出された核酸として、PCR などの方法に応用されてきた。パラフィンブロックからの核酸抽出は、実際に病変部を目で見確認した場所から核酸を抽出することで、病変部が間違いなく含まれている核酸サンプルを得る方法として珍重されてきた。PCR 法などで微生物の存在の有無を知るだけなら、これらの核酸は十分である。しかし、パラフィンブロックから抽出した核酸を定性的解析だけでなく、定量的な解析をする場合には、相当の注意が必要と考えられる。通常、病理検査目的で標本を採取する場合には正常部を含めて病変部が採取されるため、病理標本には必ずと言っていいほど正常組織が混入する。それは、病変部とって採取した標本に多量の正常組織が含まれていることを意味し、正常細胞と異常細胞（感染細胞）の比率は標本により全く異なる。このため、抽出された核酸には正常部の核酸が多く混入しており、定量的な検索をする際にはこれらの核酸がどれだけ混入しているかを同時に検討しなければならない。これにより初めて、病変部における微生物などの定量的な検索が可能と考えられる。これまで、病理組織切片上で定量的に細胞の数を数える方法は数少ないながら報告されている。いずれも、コンピューターを用いた画像解析を応用したものではあるが、これまで報告されてきたものの多くは特殊なソフトを必要とするものや大がかりな取り込み装置を要するものが主であった。本報告で述べた方法ではフリーウェアである ImageJ を用いており、画像取り込み後はその解析、計算まで非常に速い速度で結果を得ることができる。組織切片上の染色された細胞数を数える方法としては簡便で安価な方法であり、今後普及していくものと予想される。

E. 結 論

特定疾患とウイルス感染の関与を明らかにする目的で、多種類のウイルスを検出する定量的 PCR の系と、免疫組織学的染色を施行した病理組織切片上で感染細胞数（比率）を知る方法を開発した。定量的 PCR は Taqman PCR を用い、1 型から 8 型までのすべてのヒトヘルペスウイルスや、レトロウイルス、ヒトパルボウイルス等、他種類のウイルスを比較的短時間で定量できる方法を目指し、開発した。また、画像解析ソフトを利用し、コンピューターに取り込んだ免疫組織

染色像から感染細胞数（比率）を算出した。この画像データから算出した感染細胞数と定量的 PCR で得られたデータから、一細胞あたりのウイルスコピー数を算出することができた。疾患とウイルス感染に関連がある場合には一定のウイルスコピー数が算出されることが予想され、今後、特定疾患と未知、既知のウイルス感染の関連を考える上で有用なツールになるものと考えられる。

F. 健康危険情報

本研究で得られた成果に関して健康危険情報として報告しなければならない情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Satoh M, Kaneko A, Kokaze A, Katano H, Sata T: Seroprevalence of Human Herpesvirus 8 on Vanuatu islands in eastern Melanesia. *Jpn J Infect Dis* 2006. (in press)
- 2) Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Kanno T, Sata T, Katano H: Quantitative analysis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) in KSHV-associated diseases. *J Infect Dis* 2006. (in press)
- 3) Hishima T, Oyaizu N, Fujii T, Tachikawa N, Ajisawa A, Negishi M, Nakamura T, Iwamoto A, Hayashi Y, Matsubara D, Sasao Y, Kimura S, Kikuchi Y, Teruya K, Yasuoka A, Oka S, Saito K, Mori S, Funata N, Sata T, Katano H: Decrease of Epstein-Barr virus-positive AIDS-related lymphoma in the era of highly active antiretroviral therapy. *Microbes Infect* 2006. (in press)

2. 学会発表

- 1) 片野晴隆、柳澤夕佳、渡辺慎哉、菅野隆行、佐藤由子、佐多徹太郎：Primary effusion lymphoma(PEL)の発症機構に関する研究。第 94 回日本病理学会総会（横浜）2005.4.
- 2) 菅野隆行、佐藤由子、樋口好美、佐多徹太郎、片野晴隆：ヒトヘルペスウイルス 8 (HHV-8)がコードする Interferon regulatory factor (IRF)のホモログ K10, K11 の発現様式とその意義。第 94 回日本病理学会総会（横浜）2005.4.
- 3) 菅野隆行、佐藤由子、佐多徹太郎、片野晴隆：

- HHV-8 のコードする Interferon Regulatory Factor(IRF)ホモログ K10 の細胞内局在と結合蛋白の同定. 第 20 回ヘルペスウイルス研究会 (名古屋) 2005.6.
- 4) 尾崎泰子、佐藤由子、菅野隆行、佐多徹太郎、片野晴隆 : HHV-8 関連疾患におけるウイルス量と感染細胞数. 第20回ヘルペスウイルス研究会 (名古屋) 2005.6.
- 5) 片野晴隆、佐藤由子、菅野隆行、加納基史、佐多徹太郎 : エイズ患者肺における慢性炎症を基盤としたカポジ肉腫発症機構. 第20回ヘルペスウイルス研究会 (名古屋) 2005.6.
- 6) Katano H, Sato Y, Kanno T, Kano M, Sata T: Inflammation increases susceptibility of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in the lung of patients with HIV-1 infection. 30th International Herpesvirus Workshop, Turku, Finland, July, 2005.
- 7) Kanno T, Sato Y, Sata T, Katano H: Expression of HHV-8 (KSHV)-encoded K10 and K11 proteins, homologues of interferon regulatory factors. 30th International Herpesvirus Workshop., Turku, Finland, July, 2005.
- 8) Katano H, Sato Y, Hoshino S, Mori S, Sata T, Weiden MD, Hoshino Y: Integration of HIV-1 caused STAT3-associated B cell lymphoma in an AIDS patient. 2005 Internatioal meeting of the Institute of Human Virology, Baltimore (MD), USA, August, 2005.
- 9) 加納基史、菅野隆行、佐多徹太郎、片野晴隆 : vIL-6 欠損 KSHV 感染リンパ腫細胞株の解析. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2005.11.
- 10) 片野晴隆、佐藤由子、星野聡美、立川夏夫、岡 慎一、森下保幸、William N Rom、森 茂郎、佐多徹太郎、Michael D Weiden、星野仁彦 : HIV のインテグレーションにより発症した STAT3 関連リンパ腫の一例. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2005.11.
- 11) 菅野隆行、佐藤由子、佐多徹太郎、片野晴隆 : KSHV(HHV-8) のコードする Interferon Regulatory Factor (IRF)ホモログK10の細胞内局在と結合蛋白の同定. 第53回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2005.11.
- 12) 尾崎泰子、佐藤由子、菅野隆行、佐多徹太郎、片野晴隆 : KSHV (HHV-8)関連疾患におけるウイルス量と感染細胞数. 第53回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2005.11.
- 13) 片野晴隆、佐藤由子、星野聡美、立川夏夫、岡 慎一、森下保幸、William N Rom、森 茂郎、佐多徹太郎、Michael D Weiden、星野仁彦 : HIV インテグレーションにより発症した STAT3 関連リンパ腫. 第19回日本エイズ学会学術集会 (熊本) 2005.12.

2. 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)

研究協力者 朝長啓造、渡邊洋平、大滝尚広、林 陽平
(大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫分野)

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原因として分離されたマイナス鎖・一本鎖の RNA をゲノムに持つ向神経性ウイルスである。疫学的研究から機能性精神疾患との関連性が示唆されている。私たちは、BDV 持続感染と神経変性疾患との関連性について検討している。これまでに、パーキンソン病やアルツハイマー病患者の剖検脳内に BDV RNA が RT-PCR 法および *in situ* hybridization 法により検出できる例があること、対照剖検脳よりもその陽性率が高いことを報告してきた。本年度は、BDV の持続感染が引き起こす脳内病態の機序を明らかにするために、BDV のリン酸化 (P) タンパク質をグリア細胞で発現するトランスジェニックマウス (BDV P-Tg) を用いた解析をおこなった。その結果、BDV P-Tg 脳内では神経伝達物質であるグルタミン酸の濃度制御に働いているグリア型グルタミン酸トランスポーター (GLAST) の発現が顕著に低下していることが明らかとなった。また、D 型アミノ酸酸化酵素の発現にも異常が示された。以上の結果は、BDV P タンパク質による細胞機能障害が神経変性を含めた中枢神経系疾患の発症に関与する可能性を示している。

A. 研究目的

ボルナ病は、ウマに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が認められている。しかし、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。近年、BDV 感染による神経疾患が、わが国の家畜 (ウマ、ウシ) ならびにペット (イヌ、ネコ) において確認されている。また、機能性精神疾患患者における BDV 感染も証明されている。これまでに、10-20% 近くのウマやウシに抗 BDV 抗体が認められることが判っており、人獣共通感染症としての BDV の病原性ならびに伝播経路の解明は急務と考えられる。動物での自然感染例やげっ菌類を用いた実験感染では、BDV の脳内持続感染により遅発性に神経細胞障害が引き起こされることが明らかとなっており、BDV は中枢神経系 (CNS) での感染部位依存的に多様な神経疾患

を誘発する可能性が示唆されている。

私たちは、「神経変性疾患」であるパーキンソン病、アルツハイマー病と BDV との関連性について検討をおこなってきた。パーキンソン病患者ならびにアルツハイマー病患者由来剖検脳において、BDV RNA が対照群と比較して高率に検出できることをこれまでに確認している。

そこで、BDV 感染が脳内で引き起こす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 リン酸化 (P) タンパク質が、神経突起伸長や神経細胞の生存維持に重要な役割をもつ宿主の多機能因子 (HMGB1) と特異的に結合し、その機能を強く阻害していることを明らかにしてきた。また、モデル動物として BDV P タンパク質を脳内に発現するトランスジェニックマウス (BDV P-Tg) を作成し、BDNF の発現低下、セロトニンレセプターの不均衡と、それに伴う攻撃性の亢進、空間記憶能力の低下が観察されることも報告してきた。本年度は、P タンパク質による CNS 機能障害機序の解明を

目的に、BDV P-Tgにおけるアストロサイトの分子障害の検討をおこなった。

B. 研究方法

1. 生後 8 から 16 週齢の BDV P-Tg を用いて、脳、特に P タンパク質の発現が顕著な小脳領域におけるグリア型グルタミン酸トランスポーター (GLAST および GLT-1) の発現を RT-PCR 法あるいはウェスタンブロット法により解析した。また、BDV P-Tg 小脳より初代グリア細胞を分離し、グルタミン酸トランスポーターの発現を同様に検討した。
2. BDV P-Tg 海馬領域におけるグルタミン酸トランスポーターの発現誘導をカイニン酸 (KA) の投与により試みた。生後 16 週齢の BDV P-Tg 腹腔内に KA を 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で接種した。24 および 48 時間後に剖検をおこない、海馬領域における GLAST と GLT-1 mRNA の発現を検出した。また、脳切片のニッスル染色をおこない、海馬神経層の変性についても観察をおこなった。
3. BDV 持続感染ラット由来グリア系細胞 (C6/BDV) あるいは BDV P-Tg 脳における D 型アミノ酸関連酵素 (D 型アミノ酸酸化酵素 [D-amino acid oxidase: DAAO]; D-セリン合成酵素 [D-serine racemase: SR]) の発現を RT-PCR 法により解析した。

C. 研究結果

BDV P タンパク質は感染細胞での発現が著しく、BDV の主要発現タンパク質と考えられている。これまでの解析より、P タンパク質は細胞内でリン酸化されることがわかっている。リン酸化酵素 (PKC ϵ および CKII) も明らかとなっており、BDV P タンパク質はリン酸化の基質として細胞内リン酸化反応を競合阻害していると考えられている。

CNS 内で PKC のリン酸化を受け、その発現を調節する分子にグルタミン酸トランスポーターがある。グルタミン酸トランスポーターは、神経細胞ならびにグリア細胞の両方に発現しており、シナプス間隙に放出された興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の再吸収を担っている。グルタミン酸はシナプスにおける神経

伝達に必須であるが、神経細胞は長時間グルタミン酸で刺激されると、疲弊してやがて細胞死を起こす。そこで、グルタミン酸トランスポーターによるシナプス間隙からのグルタミン酸の速やかな処理機構は、神経細胞の生存にとって必須である。

今回、私たちは BDV P-Tg を用いて、アストロサイトにおける P タンパク質の発現がグルタミン酸トランスポーターの発現と機能に及ぼす影響について解析した。その結果、生後 8 および 16 週齢の BDV P-Tg 小脳において、グルタミン酸トランスポーターである GLAST の mRNA ならびにタンパク質の発現が顕著に低下していることが明らかとなった (図 1)。一方、GLT-1 の発現には変化は認められなかった。さらに、BDV P-Tg の小脳より分離した初代グリア細胞を用いた解析においても GLAST の発現低下が確認され、P タンパク質の発現により GLAST の発現に異常が誘導されることが明らかとなった。

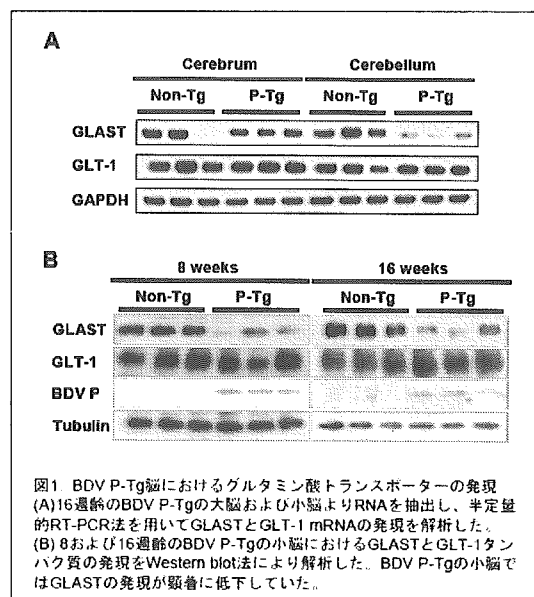


図1 BDV P-Tg脳におけるグルタミン酸トランスポーターの発現 (A)16週齢のBDV P-Tgの大脳および小脳よりRNAを抽出し、半定量的RT-PCR法を用いてGLASTとGLT-1 mRNAの発現を解析した。(B)8および16週齢のBDV P-Tgの小脳におけるGLASTとGLT-1タンパク質の発現をWestern blot法により解析した。BDV P-Tgの小脳ではGLASTの発現が顕著に低下していた。

次に、GLAST の発現を誘導するために、BDV P-Tg 腹腔内に KA の接種をおこなった。その結果、コントロールマウスでは接種 24 時間後の海馬で、GLAST mRNA の発現上昇が観察されたのに対して、BDV P-Tg では GLAST の発現誘導は観察されなかった。さらに、ニッスル染色により海馬領域の病理組織学的解析をおこなった。その結果、KA を接種した BDV P-Tg では海馬 CA3 領域の神経層に軽度の乱れが観察された (図 2)。

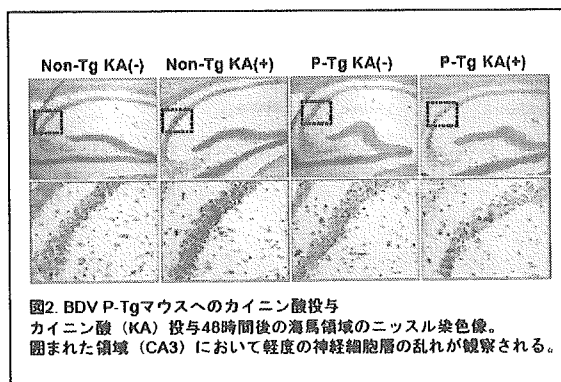


図2. BDV P-Tgマウスへのカイニン酸投与
カイニン酸 (KA) 投与48時間後の海馬領域のニッスル染色像。
囲まれた領域 (CA3) において軽度の神経細胞層の乱れが観察される。

さらに、私たちはBDV P-Tg小脳領域より抽出したシナプトソームを用いてグルタミン酸の取り込みに関する実験をおこなった。抽出したシナプトソーム画分は $[^3\text{H}]$ グルタミン酸とともに培養し、その吸収を測定した。その結果、BDV P-Tg由来シナプトソームでは軽度の $[^3\text{H}]$ グルタミン酸の取り込み量が減少したものの、コントロールマウスと比較して有意差は認められなかった。

一方、私たちはBDV持続感染とD型アミノ酸関連酵素の発現についても解析をおこなった。D型アミノ酸を代表するD型セリンは、NMDA型グルタミン酸受容体のコ・アゴニストであり、NMDA受容体の内在性調節因子として様々な神経細胞機能に影響している。本年度の解析の結果、BDV持続感染グリア(C6)細胞では、D型アミノ酸酸化酵素(DAAO)のmRNA発現が顕著に亢進しているのに対して、BDV P-Tg脳では、コントロールと比較して、DAAO mRNAが大脳皮質領域で有意に低下することが明らかとなった。

D. 考察

GLASTは小脳で優位な発現が観察されるグリア型グルタミン酸トランスポーターである。一方、GLT-1は大脳皮質での発現が顕著である。今回、P-Tgの小脳でGLASTの発現が有意に低下していることが示唆された。P-Tg脳におけるPタンパク質の発現が小脳で強く認められることを考えると、Pタンパク質によるGLAST発現への影響が強く示唆される。

一方、KAはアゴニストとしてグルタミン酸受容体に強く結合し、神経を過剰に興奮させる。KAの接種は脳内のグルタミン酸トランスポーターの発現を上昇させることが知られている。P-Tg海馬において、KA接種によるGLAST発

現に誘導が認められなかったことは、Pタンパク質が積極的にGLAST発現に関与するシグナルを抑制している可能性を示唆していた。GLASTの発現低下は、シナプス間隙でのグルタミン酸濃度を上昇させ、神経変性を誘導すると考えられる。組織学的に認められたCA3領域の神経細胞層の乱れは、P-TgにおけるGLAST発現異常と関連している可能性も考えられる。

シナプトソーム画分を用いた解析では、P-Tg小脳におけるグルタミン酸取り込みに異常は認められなかった。シナプトソーム画分は神経細胞由来の画分も含まれるため、より詳細にグルタミン酸の取り込みを観察するためには、P-Tg小脳部位より分離した初代グリア細胞を用いて解析をおこなう必要があると考えられた。

本年度の解析より、BDV Pタンパク質によりGLAST発現に異常が誘導されることが示された。一方、D型アミノ酸関連酵素の発現にも影響がある可能性が示された。今回認められたアストロサイトの障害は直接的に神経細胞死へとつながることが考えられ、この点における今後の検討が必要である。BDVと神経変性疾患との関連性を解くためには、Pタンパク質が誘導する細胞機能障害の詳細な分子メカニズムの解明が重要であると思われる。

E. 結論

疫学的に神経変性疾患との関連性が認められたBDVについて、その病態機序への関与の可能性を検討するため、モデル系を用いた解析をおこなった。その結果、BDV Pタンパク質は神経系細胞に脆弱化を誘導することで、神経変性疾患を含めたさまざまな疾患に関与する可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yanai H, Hayashi Y, Watanabe Y, Ohtaki N, Kobayashi T, Nozaki Y, Ikuta K, Tomonaga K:

Development of a novel Borna disease virus reverse genetics system using RNA polymerase II promoter and SV40 nuclear import signal. *Microbes Infect.* (in press)

- 2) Yanai H, Kobayashi T, Hayashi Y, Watanabe Y, Ohtaki N, Zhang G, de la Torre JC, Ikuta K, Tomonaga K: A Methionine-rich domain mediates CRM1-dependent nuclear export activity of Borna disease virus phosphoprotein. *J Virol* 2006, 80:1121-1129.
- 3) Watanabe Y, Yanai H, Ohtaki N, Ikuta K, Tomonaga K: Prevalence of Borna disease virus antibodies in healthy Japanese black cattle in Kyushu. *J Vet Med Sci* 2006, 68:171-174.
- 4) Yamashita M, Kamitani W, Yanai H, Ohtaki N, Watanabe Y, Lee B-J, Tsuji S, Ikuta K, Tomonaga K: Persistent Borna disease virus infection confers instability of HSP70 mRNA in glial cells during heat stress. *J Virol* 2005, 79:2033-2041.
- 5) Matsunaga H, Tanaka S, Sasao F, Nishino Y, Takeda M, Tomonaga K, Ikuta K, Amino N: Detection of antibodies against Borna disease virus by a radioligand assay in patients with various psychiatric disorders. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005, 12:671-676.

2. 学会発表

国内学会

- 1) 朝長啓造、矢内英之、林 陽平、大滝尚広、渡邊洋平、生田和良：BDV vRNP の核内維持と複製に関わるクロマチン結合タンパク質の役割. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2005.11.
- 2) 矢内英之、渡邊洋平、大滝尚広、林 陽平、生田和良、朝長啓造：RNA polymerase II プロモーターを用いた BDV ミニゲノムの構築と VLP 作製の試み. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2005.11.
- 3) 渡邊洋平、矢内英之、大滝尚広、林 陽平、生田和良、朝長啓造：ボルナ病ウイルス X/P polycistronic mRNA の翻訳調節機構の解析. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2005.11.
- 4) 大滝尚広、渡邊洋平、矢内英之、林 陽平、神谷 亘、生田和良、朝長啓造：持続感染を生み出す脳内機構：ボルナ病ウイルスによる RAGE 発現抑制と脳炎制御機構の解明. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2005.11.
- 5) 林 陽平、矢内英之、渡邊洋平、大滝尚広、生田和良、朝長啓造：細胞核におけるボルナ病ウイルス vRNP と宿主因子との相互作用の解析. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2005.11.
- 6) 矢内英之、渡邊洋平、大滝尚広、林 陽平、生田和良、朝長啓造：RNA polymerase II プロモーターを用いた BDV ミニゲノムの構築とリバーシ・ジェネティクスへの応用. 第 140 回日本獣医学会 (鹿児島) 2005.9.
- 7) 渡邊洋平、神谷 亘、大滝尚広、矢内英之、林 陽平、萩原克郎、岡本 実、谷山弘行、生田和良、朝長啓造：ウシ由来 BDV 野外分離株の性状解析. 第 140 回日本獣医学会 (鹿児島) 2005.9.
- 8) 大滝尚広、渡邊洋平、矢内英之、林 陽平、生田和良、朝長啓造：RAGE 機能阻害によるウイルス性脳炎の抑制. 第 140 回日本獣医学会 (鹿児島) 2005.9.
- 9) 林 陽平、矢内英之、渡邊洋平、大滝尚広、生田和良、朝長啓造：BDV 複製に関わるウイルスタンパク質-宿主因子の相互作用の解析. 第 140 回日本獣医学会 (鹿児島) 2005.9.

国際学会

- 1) Tomonaga K, Yanai H, Ohtaki N, Watanabe Y, Ikuta K: Efficient Persistence of Borna Disease Virus Is Mediated by Interaction of the Viral Ribonucleoproteins with Cellular Chromosomes. The XIII International Congress of Virology, Sanfrancisco (CA), USA, July, 2005.
- 2) Watanabe Y, Kamitani W, Lee B-J, Ibrahim MS, Yanai H, Ohtaki N, Ikuta K, Tomonaga K: Comparative analysis of two different isolates of Borna disease virus in which viral phosphoprotein exhibits distinct expression and accumulation patterns. The XIII International Congress of Virology, Sanfrancisco (CA), USA,