

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18年度 総括・分担研究報告書

平成19年 3 月

主任研究者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

平成18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	東北大学病院・老年科	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
渡邊 浩	久留米大学医学部・感染医学講座・臨床感染医学部門	教授
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 18 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	5
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	9
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	13
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. 慢性肺気腫ないし呼吸不全とウイルス感染	19
分担研究者：山谷 睦雄（東北大学病院・老年科）	
5. 自己免疫性肝炎の発症に関する微生物の関与	27
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. マイコプラズマ感染と特定疾患との関連性についての研究	33
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	41
分担研究者：結城 伸泰（獨協医科大学・神経内科）	

8. 難治性気道感染症における細菌感染	43
分担研究者：渡邊 浩（久留米大学医学部・感染医学講座・臨床感染医学部門）	
9. ライム病ボレリアと不明神経疾患	47
分担研究者：川端 寛樹（国立感染症研究所・細菌第一部）	
10. 難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子	55
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. 真菌感染と特定疾患	61
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	65
分担研究者：岸本 壽男（国立感染症研究所・ウイルス第一部）	
III. 研究成果に関する刊行一覧表	69

I. 総括研究報告書

平成 18 年度 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
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。今年度の主な成果として、多種類のウイルスを検出する網羅的定量的 PCR の系を開発したこと、BDV 感染による神経系細胞の脆弱化、抗 HHV-6 抗体と鬱症状の発現との関連について明らかにしたことなどが挙げられる。さらに、慢性肺気腫あるいは呼吸不全とウイルス感染について治療に関わる知見があったこと、マイコプラズマ感染者血清ならびに免疫動物血清において、 β 2-GP1 依存性抗カルジオリピン抗体の存在を示唆するデータが得られたこと、ギランバレー症候群の研究では各亜型の発症機序に関する知見が得られた。このほかにも新規ウイルス断片 NV-F と自己免疫肝疾患、抗生物質と NTHi 産生バイオフィルムの抑制効果、多発性硬化症とライム病、肺炎クラミジアとの因果関係、真菌分子 CAWS とサイトカイン産生、*S. chartarum* と原発性肺高血圧症の関連を検討し、特定疾患と微生物感染に関するいくつかの重要な知見が得られた。

分担研究者：

生田和良（大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫分野教授）
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（東北大学病院老年科助教授）
中島 淳（横浜市立大学医学部消化器内科准教授）
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学助教授）
渡邊 浩（久留米大学医学部感染医学講座臨床感染医学部門教授）
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

各分担研究者の報告書を参照のこと。

C. 研究結果

特定疾患とウイルスの関与：計 104 種類のウイルスについて個々に定量的 PCR を確立した。384 穴プレートにこれらのプローブ、プライマーセットを配し、多くのウイルスを網羅的に検出できる系を確立した。特定疾患を含む臨床検体数例で病因ウイルスの検出を試みたところ、原因不明の脳炎例で、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) が検出された。この症例については臨床的にもヘルペス脳炎として矛盾がなく、ヘルペス脳炎が確定した。（佐多）

神経変性疾患とボルナ病ウイルス感染：BDV 感染モデル動物脳では、神経細胞の生存維持に関与しているグリア型グルタミン酸トランスポーター (GLAST) もしくは S100B の発現が低下していることが明らかとなり、個体へのストレス負荷により顕著な神経細胞死が誘導されることが示された。(生田)

神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明：慢性疲労症候群患者で鬱症状を呈する患者のほか、鬱症状のために精神科を受診している患者においても、高率に抗 HHV-6 潜伏感染蛋白抗体が陽性であることが判った。HHV-6 潜伏感染蛋白を発現したグリア細胞 (アストロサイト) 細胞株化細胞の機能を検討した結果、HHV-6 陽性グリアは、HHV-6 陰性グリアに対し顕著な細胞内カルシウム濃度の上昇を示した。(近藤)

慢性肺気腫あるいは呼吸不全とウイルス感染：メサコリン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や可溶性細胞接着分子 ICAM-1 量は変化しなかった。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臍帯静脈内皮細胞に作用させると、LPS (lysophosphatidic acid) による RhoA 活性化を抑制した。マクロライドのバフィロマイシン、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のランソプラゾール、オメプラゾール、およびアマンタジンはインフルエンザウイルス感受性細胞である MDCK 細胞において、A 香港型インフルエンザウイルスの培養液放出量を減少した。さらに、バフィロマイシン、エリスロマイシン、クラリスロマイシン、喀痰調整薬の L-カルボシステイン、およびアマンタジンはヒト気管上皮細胞において、培養液 A 香港型インフルエンザウイルス放出量とインターロイキン(IL)-6 放出量を減少した。吸入ステロイドは中等症の慢性閉塞性肺疾患における急性増悪回数を減少した。L-カルボシステインは慢性閉塞性肺疾患における風邪回数および急性増悪回数を減少した。(山谷)

自己免疫性肝炎 (AIH) の発症に関する微生物の関与：新規ウイルス断片 NF-V の検出を試みたところ、AIH では 4 名が陽性 (22.2%)、

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) では 4 名が陽性 (25%)、肝疾患のない患者では 1 名の陽性 (1.4%) であった。NV-F の有無と病態の相関は認められなかった。(中島)

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：抗カリジオリピン抗体陽性を示す APS 診断基準に重要なアポリポ蛋白 H、別名 β 2-GP1 依存性について、マイコプラズマ感染者血清ならびに免疫動物血清における IgG 抗体価測定を行った。結果、これらの血清においては、抗体価は低～中程度であるものの β 2-GP1 依存性抗カリジオリピン抗体の存在が示唆された。ヒトの下気道に感染する *M. amphoriforme* についての診断用特異抗原の解析を行い 4 個の候補蛋白を得た。リウマチ疾患と *M. fermentans* の関連についての過去に報告された疫学調査における陽性報告を受けて、ウサギにおける感染動物モデル作成を試み、投与部位における肺炎ならびに関節炎形成を観察した。(荒川)

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：ギラン・バレー症候群 (GBS) の各臨床亜型から分離された株の多くは、血清型 HS:2/HS:4-complex で、クラス A/B LOS 合成酵素遺伝子座と *cst-II* (Asn51) を有していた。抗体プローブ法で LOS 上に GQ1b エピトープを検出した。質量分析で、ピッカースタッフ脳幹脳炎および急性外眼筋麻痺患者からの分離株に、GD1c 様 LOS を検出した。これら亜型症例において、分離菌株 LOS はそれぞれの患者血清 IgG と強い反応性を示したのに対し、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー (CIDP) 症例においては、菌体 LOS と患者血中 IgG/IgM との反応性はみられなかった。(結城)

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：Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) が産生したバイオフィームに対する各種抗生物質の抑制効果について β -lactamase-negative ampicillin-susceptible (BLNAS) 株 及び β -lactamase-negative ampicillin-resistant (BLNAR) 株の間で比較検討し、BLNAR 株では BLNAS 株に比べ、いずれ

においても低濃度の ampicillin, cefaclor 及び clarithromycin などの抗生物質の存在下でバイオフィルムの産生が高まる傾向がみられた。erythromycin や levofloxacin ではいずれの株においても濃度依存性のバイオフィルムの抑制効果が認められた。(渡辺)

ライム病ボレリアと不明神経疾患:多発性硬化症 (MS) 患者における抗ライム病抗体検索をおこなった。近畿大学より分与頂いた MS 患者 21 例中、抗ライム病 IgG 抗体陽性例は 2 例 (9.5%) であった。ペア血清による調査では顕著な抗体変動は見られなかった (川端)

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、活性化好中球や好中球自己抗体 (anti-neutrophilcytoplasmic antibodies: ANCA) と関連する。CAWS 投与初期の生体の炎症誘導機構を、myeloperoxidase (MPO) 抗体の移動と、本抗体とともに変動する血漿中の 17 種類のサイトカインレベルを解析した。とりわけ、顕著な変動があった IL-12 の p40 を共有する IL-23 と、その作用の下流にあるとされる IL-17 の発現を解析した。その結果、*in vivo* での解析から、本抗体は、早期に、肺および腎糸球体に好中球とともに集積し、IL-23 と IL-17 レベルは増加した。また、*in vitro* で好中球の IL-23 と IL-17 の mRNA 発現を解析した。腹腔好中球を CAWS および抗体で刺激することで、IL-23 と IL-17 の mRNA 発現が増加した。(鈴木)

Stachybotrys chartarum 吸入と原発性肺高血圧症との関連について:マイコトキシン産生能の異なる *Stachybotrys chartarum* をマウスに経気管的に計 18 回 (12 週間) 反復投与した場合、右室収縮期圧の上昇を伴うことを明らかにした。また、肺動脈病変の形成には trichothecene 産生株が産生する物質が関与する可能性が示された。(渋谷)

クラミジア・リケッチアと特定疾患についての研究: MS 症例血清 26 検体を用いて、肺炎クラミジア抗体価測定を行い、MS との関連を検討した。IgG 抗体保有は MS 症例対健常者ではそれぞれ、65.4%:49.5%、IgG 高値は 4.7%:0.8%、IgM 抗体陽性 15.4%:4.8% であり、MS 症例の方がいずれも高率であった。しかし、呼吸器感染

症例、ならびに肺炎クラミジア急性呼吸器感染症例の IgG 抗体保有はそれぞれ 51.6%:87.2%、IgG 高値は 7.7%:57.4%、IgM 抗体陽性 18.5%:27.2% であり、MS 症例よりもさらに高率であった。(岸本)

D. 考 察

本研究で開発された多くのウイルスを網羅的に検出する定量的 PCR は他に類を見ないのであり、特定疾患の微生物検出に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、モデル動物において BDV P 蛋白質の発現や BDV 感染によるグリア細胞の機能異常が神経系細胞に脆弱化を引き起こすことが明らかとなった。脆弱化の原因としては、GLAST や S100B の発現異常が考えられた。今回見出された鬱症状をもつ患者において抗 HHV-6 潜伏感染蛋白抗体が高率に陽性となるという現象は、クローン病患者における鬱症状の発症機序を説明できるだけでなく、その他の鬱症状および鬱病の病因論に対しても波及するものであると考えられた。

慢性肺気腫あるいは呼吸不全とウイルス感染の研究ではマクロライドによる RhoA 抑制効果が明らかにされ、RS ウイルス感染抑制作用の機序が示唆されたこと、バフィロマイシン、エリスロマイシン、クラリスロマイシンはヒト気管上皮細胞の培養液 IL-6 放出を減少させることにより、気道炎症効果が示唆されたこと、吸入ステロイドの慢性閉塞性肺疾患における急性増悪予防効果、および喀痰調整薬 L-カルボシステインの風邪および急性増悪予防効果、QOL 改善効果が示唆された。

自己免疫性肝炎 (AIH) の発症に関する微生物の関与の研究では、現段階では NV-F の存在は肝炎の発症の前であるか、後であるかは不明である。しかし C 型肝炎の合併よりも高率であり NV-F が AIH, PBC の両疾患に関与していることが示唆される。マイコプラズマ感染者血清中ならびに免疫動物血清中の β 2-GP1 依存性抗カルジオリピン抗体価が、APS 患者で低~中抗体価ではあるものの陽性で、交叉抗原の存在が疑われた。

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において今回検討した GBS

亜型分離菌株は、従来から報告されているフィッシャー症候群分離株と同様の特徴を示した。先行感染の観点からは、これら GBS 亜型の発症機序はフィッシャー症候群と同様である。CIDP 患者からも本菌が分離培養されたが、少なくとも LOS における分子相同性の観点からは、これらの症例における本菌の関与は否定的と考えられた。バイオフィーム産生に関する比較研究ではペニシリン剤やセフェム剤などには NTHi が産生するバイオフィームの抑制効果はみられず、マクロライド剤やキノロン剤には薬剤耐性、感受性に関係なく NTHi が産生するバイオフィームの抑制効果があることが示唆された。

多発性硬化症 (MS) 患者における研究が 2 つ行われた。抗ライム病抗体検索の結果は 1993 年に米国で行われた血清疫学調査結果 (陽性率=6.7%) に近似し、欧州での調査結果 (陽性率=14.2-38.5%) より低値であった。本法による偽陽性は、抗体検査法の事前評価によってほぼ否定されている一方、ペア血清による調査では顕著な抗体変動は見られなかったことから、MS 患者ではライム病ボレリアに交差性のある何らかの抗原に対して持続的に抗体産生がなされている可能性が考えられた。また、現時点では MS と肺炎クラミジアの関連の有無について判断することは困難であり、今後、検体数の追加と髄液での PCR などの検討をさらに進める予定である。

難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子の研究では CAWS 投与により産生される MPO 抗体と CAWS が連動して、好中球から IL-23 と IL-17 が放出され、さらに好中球の活性化を亢進し、血管炎への進展が示唆される。また、*Stachybotrys chartarum* 吸入と原発性肺高血圧症との関連について、今年度の研究により、*S. chartarum* の反復投与によって PAH の発症が確認された。*S. chartarum* は種々のトキシンを産生するが、肺動脈病変の形成には trichothecene 産生株が産生する物質が関与している可能性が示された。*S. chartarum* はわが国の居住環境内にも生育している真菌であり、ヒト原発性肺高血圧症が本菌との関連がある可能性もある。

E. 結 論

特定疾患を引き起こす病原体および発症機序の解明と治療法の開発を目的とし、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、自己免疫性肝炎発症に関する微生物の関与、*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、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、Nontypeable *Haemophilus influenzae* と *H. influenzae* type b のバイオフィーム産生、ライム病ボレリアと不明神経疾患、難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子、*Stachybotrys chartarum* 吸入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。

F. 健康危険情報

とくになし。

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：山谷睦雄、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 部長

研究協力者 片野晴隆、加納基史 (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の関与を明らかにする目的で、多種類のウイルスを同時に、かつ高感度に検出できる定量的 PCR法の開発を行った。TaqMan PCRシステムを用い、DNAウイルス35種類、RNAウイルス69種類、計104種類のウイルスを検出する定量的(RT-)PCRを個々に立ち上げた。これを384穴プレートに配し、多数のウイルスを同時に検出できるキットを確立した。各ウイルスの感染細胞またはウイルス液を検体として反応を行ったところ、交差反応なく、各ウイルスを特異的に検出することができた。本キットを用い、劇症肝炎や原因不明脳炎を含む6検体を検索した結果、一例でヘルペス脳炎を確定することができた。今後、さらに多くの臨床検体を用い、特定疾患の原因ウイルスの解明につとめる。

A. 研究目的

ヒトに疾患を起こすウイルスは教科書の記載では100種類以上が存在する。特定疾患はいずれも原因微生物が同定されていないものがほとんどであり、ウイルスが直接、間接的に原因となるものも存在する可能性がある。こうした原因不明疾患の病因に関連するウイルスを検索するためには、なるべく多くのウイルスを一度に、しかも高感度に検出できるような系の開発が望まれる。定量的 polymerase chain reaction (PCR) 法はウイルス核酸を検出する方法としては最も感度の高い方法として定着しつつあり、これまでに多くのウイルスの検出に使用されてきている。昨年度の本研究班では定量的 PCR を用いて多くのウイルスを同時検出する系の開発を目指し、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のウイルスを検出できる定量的 PCR 法の開発を行った。今年度は、さらに数十種類のウイルスを加え、計100種類以上のウイルスを網羅するよう、定量的 PCR の開発を行った。

B. 研究方法

1) ウイルスの選択

Fields Virology など代表的なウイルス学の教科書をあたり、ヒトに疾患を起こす可能性のあるウイルスを選定した。さらに、新感染症法に

記載されている第1-4種病原体に挙げられたウイルス26種類を加えた。

2) 定量的 PCR

定量的 PCR の詳細は前年度の報告書に記載済みである。標的遺伝子の選定は、これまでの報告を参考に、ウイルス株間により変異の少ない部位を選定した。また、報告がないものに関してはGenBank等のデータから独自に標的遺伝子を定め、Primer Express (アプライド・バイオシステムズ社) を用いて、プライマー・プローブを選定した。TaqMan Probe (FAM-TAMRA 標識) を用い、定量的 PCR を施行した (ABI Prism 7900HT, アプライド・バイオシステムズ社)。検体からの DNA, RNA の抽出は DNA mini Kit (QIAGEN) または Isogen (ニッポンジーン社) にて抽出した。PCR の内部標準としてヒト GAPDH 遺伝子の増幅を同時に行った。

C. 研究結果

1) 定量的 PCR の確立

前年度に確立した定量的 PCR に加え、JC ウイルス、BK ウイルス、インフルエンザウイルス、コロナウイルスなどに対する定量的 PCR を立ち上げ、最終的に DNA ウイルス 35 種類、RNA ウイルス 69 種類の合計 104 種類のウイルスについて個々に定量的 PCR を確立した (表)。これらのウイルスは基本的にはヒトに病原性を持つ

ウイルスとして報告のあるものだが、近年の人畜共通感染症の重要性を鑑み、動物感染症に関連するウイルスでヒトに病原性を持つ可能性のあるものがいくつか含まれている。また、変異の多いウイルスに関しては複数の標的遺伝子を選択し、複数のプローブ、プライマーセットを作成した。それぞれのプローブ、プライマーセットに陽性コントロールプラスミドを 10^1 - 10^8 コピーまで段階希釈したサンプルを反応させ、標準曲線を作成した。いずれのプローブ、プライマーセットも 10 コピーの遺伝子を安定して検出することが確認された。

次に、これらのプローブ、プライマーセットを使って、網羅的なウイルス検出を試みた。384 穴プレートにこれらのプローブ、プライマーセットを配し、定量コントロールとして、GAPDH 遺伝子を検出するプローブ、プライマーセットを置き、陽性コントロールプラスミドを段階希釈して反応させることにより、GAPDH のコピー数からウイルスの大まかなコピー数が予測できるように設計した。

それぞれのプローブ、プライマーセットが該当ウイルスを特異的に検出することを確認するため、各ウイルスの感染細胞、またはウイルス液から抽出した DNA または RNA を用いて、定量的 PCR を行った。結果、各ウイルスが特異的に検出され、非特異的な反応は見られなかった。

2) 臨床検体への応用

本キットを用いて、特定疾患を含む臨床検体で病因ウイルスの検出を試みた。サンプルは劇症肝炎 2 例、Epstein-Barr virus, ヒトヘルペスウイルス 8 陰性の primary effusion lymphoma 1 例、原因不明の脳炎 2 例、原因不明の心筋炎 1 例の合計 6 検体で、いずれも病変部の生検組織、または剖検時摘出組織であった。DNA および RNA を通法により抽出し、定量的 PCR を行った。複数の検体でヒトヘルペスウイルス 6 と TTV が検出されたがいずれも低いコピー数であり、病因とは関与しないものと考えた。原因不明の脳炎例で、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) が検出された。確認のため、再度、HSV-1 のみの定量的 PCR を行うとともに、通常

表: 標的ウイルス一覧。左側に DNA ウイルス、右側に RNA ウイルスを列挙した。

DNAウイルス

パポウイルス科
JCウイルス
BKウイルス
Simian virus 40
ヒトパピローマウイルス16,18,31,33,52,58
パルボウイルス科
アデノ随伴ウイルス1,2,3,5
パルボウイルスB19
ヒトポカウイルス
アデノウイルス科
アデノウイルス A,B,C,D,E,F型
ヘルペスウイルス科
単純ヘルペスウイルスI型
単純ヘルペスウイルスII型
水痘帯状疱疹ウイルス
エプスタイン・バーウイルス
サイトメガロウイルス
ヒトヘルペスウイルス6,7,8
Bウイルス
ポックスウイルス科
痘瘡ウイルス
サル痘ウイルス
伝染性軟属腫ウイルス
ヘパドナウイルス科
B型肝炎ウイルス
アネロウイルス科
TTV

RNAウイルス

フィロウイルス科
エボラウイルス
マールブルグウイルス
ブニヤウイルス科
クリミア・コンゴ出血熱ウイルス
腎症候性出血熱ウイルス
(ハンタール, ドブラバ, ブーメラ, ソウル)
リフトバレーウイルス
ハンタウイルス肺症候群ウイルス(Sin Nombre)
アレナウイルス科
ラッサウイルス
南米出血熱ウイルス
(フニン, ガナリト, マチュポ, サビア)
トガウイルス科
ベネズエラ馬脳炎ウイルス
東部馬脳炎ウイルス
西部馬脳炎ウイルス
シンドビスウイルス
マヤーロウイルス
ゲタウイルス
チクングンヤウイルス
風疹
ピコルナウイルス科
エンテロウイルス
ポリオウイルス
コクサッキーA16, B3
エコーウイルス6
ライノウイルス A, B
ロタウイルス
コロラドダニ熱ウイルス

フラビウイルス科

デングウイルス1, 2
日本脳炎ウイルス
マレー-溪谷脳炎ウイルス
セントルイス脳炎ウイルス
ウエストナイルウイルス
クンジンウイルス
ダニ媒介性脳炎ウイルス群
黄熱ウイルス
オルソミクソウイルス科
インフルエンザA, B
鳥インフルエンザウイルス
パラミクソウイルス科
パラインフルエンザ1, 2, 3
ヘンドラウイルス
ムンプスウイルス
麻疹
RSウイルスA, B
メタニューモウイルス
ニパウイルス
ラブドウイルス科
狂犬病ウイルス
リッサウイルス5, 6
チャンドイプーラウイルス
デュベンヘージウイルス
コロナウイルス科
コロナウイルス
SARSコロナウイルス*
肝炎ウイルス科
A型, C型, D型, E型 肝炎ウイルス
GBウイルス
レンチウイルス科
ヒト免疫不全ウイルス
HTLV-1,2

の PCR をおこなったところ、高いコピー数の HSV-1 が検出され、病因ウイルスとして有力であった。この症例については臨床的にもヘルペス脳炎として矛盾がなく、ヘルペス脳炎が確定した。

D. 考 察

今年度は、昨年度に引き続き、ウイルスを網羅的に検出する定量的 PCR の開発を行い、100 種類を超えるウイルスを同時に検出可能な、実用に耐えうるキットの作成を行った。このような多種類のウイルスを一度に網羅的に検出できる系はこれまで報告がなく、病因の不明なウイルス疾患の原因ウイルス解明に有力なツールになるものと期待される。ウイルス疾患は通常、局所でウイルスが増殖することによって、その病原性が発揮されることが多いが、中には潜伏感染状態のウイルスが、宿主細胞、ないしは宿主に何らかの機序により障害を与え、疾患を起こす場合がある。また、特定疾患の中にはウイルスが直接的な原因になっているものはむしろ少なく、間接的な原因としてウイルスが考えられるケースが多いと思われる。このようにウイルスが潜伏感染時に病原性を発揮する疾患、またはウイルスが疾患の間接的な病因となっているような場合にはウイルス量は少ないことが考えられる。定量的 PCR はウイルス分離や通常の PCR 法と比べ感度が高く、定量も可能なことから、低コピーのウイルスでも検出が可能である。反面、網羅的に多くのウイルスを検出することのデメリットも顕在化してきた。ウイルスの種類を増やせば増やすほど、検査に必要な核酸量が増え、104 種類すべてのウイルスの検出を行うには 10 ug ほどの RNA が必要である。この量は血液であれば 5-10 ml に相当するが、各臓器や病変組織などではそれだけの核酸量が確保できるサンプルが摘出されることは多くない。また、髄液や体液など、核酸量が多すぎると少ないサンプルには不向きであろう。さらに、人に病気を起こすウイルスは他にも存在し、ここに上げた 104 種類のウイルスでも十分とは言えない。スクリーニングとして機能はするものの、確定に至るまでは、通常の PCR 法やウイルス分離などのこれまでの技術が必要である。

いずれにせよ、こうした多くのウイルスを網羅的にとらえる定量的 PCR はこれまで例がないことから、今後、試行錯誤を重ね、効率よく、原因ウイルスを探せるような方法を模索していく。

(謝辞)

下記の先生方から各ウイルスの陽性コントロールを提供いただきました。深謝いたします。国立感染症研究所：神田忠仁、森 清一郎（ゲノムセンター）、小田切孝人、加藤 篤、駒瀬勝啓、田口文広、沼崎 啓（ウイルス 3 部）、森川 茂、高崎智彦、井上直樹（ウイルス 1 部）、鈴木哲朗、武田直和、米山徹夫、清水博之、白土東子、（ウイルス 2 部）、井上 智（獣医科学部）、小島朝人、高橋秀宗、徳永研三、田中道子、後藤希代子、尾崎泰子、松倉俊彦（感染病理部）

E. 結 論

特定疾患とウイルスの関与を明らかにする目的で、104 種類のウイルスを網羅的に検出する定量的 PCR を開発した。数例の臨床検体を検索した結果、1 例でヘルペス脳炎を確定することができた。今後、さらに多くの臨床検体を用い、特定疾患の発症と関連のあるウイルスの解明につとめる。

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無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yanagisawa Y, Sato Y, Asahi-Ozaki Y, Ito E, Honma R, Imai J, Kanno T, Kano M, Akiyama H, Sata T, Shinkai-Ouchi F, Yamakawa Y, Watanabe S, Katano H: Effusion and solid lymphomas have distinctive gene and protein expression profiles in an animal model of primary effusion lymphoma. *J Pathol* 209: 464-473, 2006.
- 2) Kanno T, Sato Y, Sata T, Katano H: Expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded K10/10.1 protein in tissues and its interaction with

poly(A)-binding protein. *Virology* 352: 100-109, 2006.

- 3) Abe Y, Matsubara D, Gatanaga H, Oka S, Kimura S, Sasao Y, Saitoh K, Fujii T, Sato Y, Sata T, Katano H: Distinct expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded proteins in Kaposi's sarcoma and multicentric Castleman's disease. *Pathol Int* 56: 617-624, 2006.

2. 学会発表

- 1) 加納基史、佐多徹太郎、片野晴隆: Real-time PCR を用いたウイルスの網羅的検出法の確立. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (名古屋) 2006.11.

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、マイナス鎖一本鎖の RNA をゲノムを持つ神経性ウイルスである。BDV の宿主域は広く、人獣共通感染症としての危険性が指摘されている。これまでの疫学調査から BDV と様々な神経疾患との関連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やアルツハイマー病患者の剖検脳において BDV 遺伝子が検出されることを報告してきた。本年度は、以下の2点について研究を推進した。1) BDV 感染が神経変性を誘導する機序を明らかにするために、BDV 感染モデル (BDV 関連トランスジェニックマウスならびに BDV 持続感染ラット) を用いた解析を行った。BDV 感染モデル動物脳では、神経細胞の生存維持に関与しているグリア型グルタミン酸トランスポーター (GLAST) もしくは S100B の発現が低下していることが明らかとなり、個体へのストレス負荷により顕著な神経細胞死が誘導されることが示された。2) ボルナ様ウイルスの同定を試みるために、広くボルナ様遺伝子を検出する PCR プライマーの作製を行った。

A. 研究目的

ボルナ病ウイルス (Borna Disease virus; BDV) はウマに脳脊髄炎を引き起こす地方病 (ボルナ病) の原因ウイルスとしてヨーロッパで同定された。BDV の感染は、ウマの他にヒツジ、ウシ、ネコ、イヌ、鳥類にも確認されている。近年、わが国でも BDV 感染に起因すると思われる神経疾患が、家畜 (ウマ、ウシ) とペット (イヌ、ネコ) で発見されている。また、人においても機能性神経疾患や神経変性疾患患者で高率に BDV に対する特異抗体が見つかるとの報告もなされている。これまでに私たちは、「神経変性疾患」である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 遺伝子が対照群と比較して高率に検出できることを報告してきた。しかしながら、脳内に持続感染するウイルスを高感度に検出する技術が無いことに加え、人における BDV 感染の確認の難しさなどから、現在までに BDV 感染と特定疾患との関連性に関しては明らかにされていない。

一方、実験動物を用いた解析では、BDV が

容易に脳内に持続感染を成立させ、遅発性に神経機能を障害することが明らかとなっている。神経機能障害を引き起こした動物では、行動異常や運動器障害など多様な神経症状を呈することが確かめられている。また、感染動物はストレスに対する神経細胞の脆弱性が認められ、ストレス負荷時において高い割合で神経変性を引き起こすことも報告されている。

そこで本研究では、神経変性疾患と BDV 感染との関連性を明らかにすることを目的に、BDV 感染が神経変性を誘導する分子機序をモデル動物を用いて解析を行っている。また、BDV の感染実態を調査するために、BDV ならびにボルナ様ウイルスの同定と分離を試みている。

本年度は、BDV P 蛋白質をグリア細胞特異的に発現するトランスジェニックマウス (BDV P-Tg) の小脳におけるグルタミン酸トランスポーターの発現低下の意義について検討を行うとともに、BDV 持続感染ラット脳を用いた神経細胞脆弱性の検討を行った。さらに、BDV に類似したウイルスを同定するために、BDV

関連遺伝子を広く検出できる PCR プライマーの構築を行った。

B. 研究方法

1) 生後 8-16 週齢の BDV P-Tg を用いて、グルタミン酸ストレスとなるカイニン酸 (KA) の投与を試みた。腹腔内に KA (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を接種して 48 時間後に剖検を行い、小脳領域におけるプルキンエ細胞の数をカルビンジン染色により観察した。

2) BDV 持続感染ラット脳における S100B 蛋白質の発現をウェスタンブロット法により検出した。LPS の腹腔内接種により脳内ストレスを惹起し、持続感染ラット脳における神経変性効果を観察した。

3) 報告されている BDV に関連した遺伝子配列を用いて BLAST サーチを行い、類似した cDNA 配列の同定を行った。同定された配列に基づいて BDV 関連遺伝子を広く検出できる PCR プライマーの設計を行った。

C. 研究結果

1) BDV 感染の神経変性への関与：前年度までに私たちは、生後 8 および 16 週齢の BDV P-Tg 小脳では、グリア型グルタミン酸トランスポーターである GLAST の発現が mRNA ならびに蛋白質の両レベルで顕著に低下していることを報告した。GLAST は小脳で多く発現しており、興奮性伝達物質であるグルタミン酸のシナプス間隙での濃度を制御している。グルタミン酸は神経毒性があることから、GLAST の発現低下は小脳におけるグルタミン酸濃度の異常を促し、シナプスを介して神経細胞死を誘導する可能性が考えられた。そこで、グルタミン酸受容体のアゴニストである KA を P-Tg の腹腔内に投与し、P-Tg 小脳における GLAST 発現低下についてその意義を検討した。その結果、KA 投与後 48 時間の P-Tg 小脳では、対照群マウスと比較して、カルビンジンに特異的に染まるプルキンエ細胞の数が顕著に低下していることが明らかとなった (図 1)。また、BDV P 蛋白質は、プルキンエ細胞の生存維持に関与しているベルグマングリア細胞で強く発現していることも確かめられた。

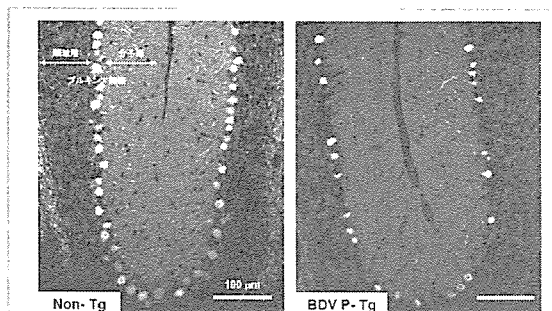


図 1. カイニン酸を投与した P-Tg 小脳におけるプルキンエ細胞の欠落
BDV P-Tg ではコントロール (Non-Tg) と比較してカルビンジンで染色されるプルキンエ細胞の数が顕著に減少している。

次に、BDV 持続感染ラット脳における S100B の機能について検討を行った。BDV 感染ラットの脳では、接種後 5 週目に S100B の発現が大脳皮質と小脳で顕著に低下していることが明らかとなった (図 2)。S100B は、アストロサイト特異的なカルシウム結合蛋白質であり、様々な神経疾患 (脳梗塞、ポリグルタミン病、アルツハイマー病、統合失調症など) 患者の脳で発現異常が観察されている。その機能としては、炎症の増幅に加え、神経細胞保護や細胞死抑制も知られており、S100B 発現低下による神経細胞の脆弱化が示唆された。そこで、BDV 持続感染ラットの腹腔に LPS を接種し、脳内における炎症ストレスの上昇を促した。その結果、BDV 持続感染ラットでは、特に小脳領域において、TUNEL で染色されるアポトーシス細胞が多く出現することが明らかとなった。

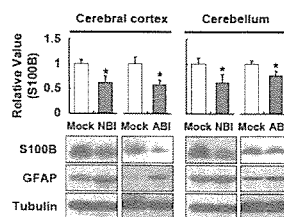


図 2. BDV 持続感染ラット脳における S100B の発現低下
BDV を感染させた新生仔ラット (NBI) ならびに成ラット (ABI) の大脳皮質と小脳において顕著な S100B の発現低下が観察された。S100B と同様なアストロサイトマーカーである GFAP の発現には変化がないことがわかる。

2) ボルナ様ウイルスの同定：報告されている BDV 遺伝子を用いて BLAST サーチを行い、類似した cDNA 配列の同定を行った。その結果、BDV P 蛋白質とアミノ酸レベルで相同性 41%、類似性が 63% である Bitis gabonica hypothetical protein 3 mRNA (ガブーンバイパーの毒腺由来

の cDNA : BGHP3) が同定された。BGHP3 (202 アミノ酸) はその大きさも P 蛋白質 (201 アミノ酸) と同じであり、塩基レベルでも高い相同性を示した。また、P 遺伝子上に存在する X 蛋白質をコードするオープンリーディングフレームも BGHP3 遺伝子上にコードされており、BGHP3 遺伝子はボルナ様ウイルスの配列であると考えられた。そこで、BDV P と BGHP3 間に保存されているアミノ酸領域から、広くその配列を検出できる degenerative (混合) PCR プライマーを設計した。現在、そのプライマーを用いて検体からのボルナ様ウイルスの検出を試みている。

D. 考 察

1) BDV 感染の神経変性への関与 : 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。週齢が進んだ P-Tg の小脳では GLAST の発現が有意に低下しており、KA 投与によりプルキンエ細胞の欠落が観察された。また、P-Tg 脳における P 蛋白質の発現は小脳のベルグマングリア細胞で強く認められた。

小脳プルキンエ細胞のシナプスはベルグマングリア細胞に被われ、そこには GLAST が豊富に発現していることが知られている。すなわち、プルキンエ細胞の形態分化と機能発現には、接触するベルグマングリア細胞の機能が必須であると考えられている。今回、KA 投与により観察された P-Tg におけるプルキンエ細胞の欠落はベルグマン細胞における GLAST の発現低下の影響が強く考えられる。P-Tg では GLAST 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が行われずに、プルキンエ細胞の変性が誘導された可能性が示唆される。今後、GLAST の発現レベルとプルキンエ細胞の欠落との関連性について、週齢が異なる P-Tg を用いることで解析を進める予定である。

一方、BDV 持続感染ラットの脳において S100B の発現低下が観察された。S100B はアストロサイト特異的蛋白質であり、細胞外に放出される。放出された S100B は受容体である RAGE と結合してその機能を発揮している。BDV 感染細胞脳における S100B の発現低下の機序に関しては明らかではないが、LPS 接種に

よっても上昇が認められないことから、BDV 持続感染脳では恒常的に S100B の発現を抑制する機構が存在すると考えられた。また、LPS の接種により、脳内の炎症ストレスを上昇させた結果、BDV 持続感染ラットにおいてのみ顕著な細胞死が観察された。今回観察された細胞死と S100B の発現低下との直接的な関連性は不明であるが、S100B と RAGE の結合が細胞の生存維持反応を誘導することを考えると、S100B の発現低下が脳神経細胞のストレス脆弱性を誘導した可能性も考えられる。S100B と神経変性との関連性についても今後詳細な検討が必要であると思われる。

2) ボルナ様ウイルスの同定 : これまでに同定された BDV の遺伝子配列は 97%以上ときわめて高く、コンタミの可能性を含め、その信頼性が疑問視されている。また、人を含め、抗体は高率に検出されるがゲノムの検出は困難であるという事実も存在する。さらに、ボルナウイルス属には、現在、BDV の 1 種のみしか同定されておらず、近縁のウイルスの存在は強く考えられる。以上の問題を解決するために、ボルナ様の配列を広く検出できるプライマーを作製した。今後、作製したプライマーを用いて、近縁のウイルスを同定する試みを進めていきたい。

E. 結 論

神経変性疾患との関連性が疑われる BDV について、モデル動物を用いた神経変性機序の検討を行った。その結果、BDV P 蛋白質の発現や BDV 感染によるグリア細胞の機能異常が神経系細胞に脆弱化を引き起こすことが明らかとなった。脆弱化の原因としては、GLAST や S100B の発現異常が考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yanai H, 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* 80: 1121-1129, 2006.
- 2) 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* 68: 171-174, 2006.
 - 3) 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* 8: 1522-1529, 2006.
 - 4) Chase G, Mayer D, Hildebrand A, Frank R, Hayashi Y, Tomonaga K, Schwemmle M: Borna disease virus matrix protein is an integral component of the viral ribonucleoprotein complex that does not interfere with polymerase activity. *J Virol* 81: 743-749, 2007.
 - 5) Watanabe Y, Ibrahim MS, Hagiwara K, Okamoto M, Kamitani W, Yanai H, Ohtaki N, Hayashi Y, Taniyama H, Ikuta K, Tomonaga K: Characterization of a Borna disease virus field isolate which shows efficient viral propagation and transmissibility. *Microbes Infect*, 2007. (in press)
 - 6) 朝長啓造, 生田和良: ボルナ病ウイルス. *Virus Report* 3: 97-107, 2006.

2. 学会発表

国内発表

- 1) 林 陽平、矢内英之、渡邊洋平、大滝尚広、生田和良、朝長啓造: ボルナ病ウイルス vRNPの核内動態の解析. 第142回日本獣医学学会学術集会 (山口) 2006年9月
- 2) 松永秀典、田口智己、福森亮雄、原元 燈、上間 武、武田雅俊、朝長啓造、生田和良: ボルナ病ウイルス抗体陽性の難治例に対する ribavirin 治療: 9例の経験. 第11回日本神経感染症学会学術集会 (伊勢) 2006年10月
- 3) 渡邊洋平、林 陽平、大滝尚広、生田和良、朝長啓造: BDV polycistronic mRNAの翻訳制御に関与する核内因子群の同定. 第54回日本ウイルス学会学術集会 (名古屋) 2006年11月
- 4) 林 陽平、矢内英之、渡邊洋平、大滝尚広、生田和良、朝長啓造: クロマチン環境に依存したボルナ病ウイルスの転写調節機構の解明. 第54回日本ウイルス学会学術集会 (名古屋) 2006年11月
- 5) 大滝尚広、渡邊洋平、林 陽平、神谷 亘、生田和良、朝長啓造: ボルナ病ウイルス持続感染によるS100Bの発現低下とアストロサイト機能への影響. 第54回日本ウイルス学会学術集会 (名古屋) 2006年11月
- 6) Ohtaki N, Kamitani W, Watanabe Y, Hayashi Y, Lee B-J, Ikuta K, Tomonaga K: Downregulation of S100B and astrocyte functions in viral persistently infected rat brain. The 8th International Congress of Neuroimmunology, October 2006, Nagoya, Japan.

海外発表

- 1) Hayashi Y, Yanai H, Ohtaki N, Watanabe Y, Koike M, Ikuta K, Tomonaga K: Mechanism of efficient persistence of Bornavirus ribonucleoprotein within the mammalian cell nucleus. Thirteenth International Conference Negative Strand Viruses 2006, June 2006, Salamanca, Spain.
- 2) Watanabe Y, Hayashi Y, Yanai H, Ohtaki H, Ikuta K, Tomonaga K: Translational regulation of a polycistronic transcript encoding Borna disease virus x/p proteins through the 5' untranslated region. Thirteenth International Conference Negative Strand Viruses 2006, June 2006, Salamanca, Spain.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

3. 神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明

分担研究者 近藤 一博 東京慈恵会医科大学微生物学講座第一 教授

研究協力者 小林 伸行 (東京慈恵会医科大学精神医学講座)
鎌田美乃里 (東京慈恵会医科大学微生物学講座第1)
伊藤 裕章 (大阪大学大学院医学系研究科消化器内科)
山西 弘一 (独立行政法人医薬基盤研究所)

研究要旨 我々はこれまでに、クローン病患者において、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質に対する、異常な抗体反応が見られることを示して来た。今年度は、クローン病患者に高頻度に見られる合併症である鬱症状と HHV-6 との関係を検討するために、鬱症状を示す様々な疾患の患者の HHV-6 潜伏感染蛋白質に対する抗体反応を検討した。この結果、慢性疲労症候群患者で鬱症状を呈する患者の他、鬱症状のために精神科を受診している患者においても、高率に抗 HHV-6 潜伏感染蛋白質抗体が陽性であることが判った。また、HHV-6 が鬱症状を生じさせるメカニズムを検討するために、HHV-6 潜伏感染蛋白質を発現したグリア細胞 (アストロサイト) 細胞株化細胞の機能を検討した。この結果、HHV-6 陽性グリアは、HHV-6 陰性グリアに対し顕著な細胞内カルシウム濃度の上昇を示した。グリア細胞内カルシウム濃度の上昇は、鬱病の発症機構として重要視されているメカニズムである。このため、今回見出された鬱症状をもつ患者において抗 HHV-6 潜伏感染蛋白質抗体が高率に陽性となるという現象は、クローン病患者における鬱症状の発症機序を説明できるだけでなく、その他の鬱症状および鬱病の病因論に対しても波及するものであると考えられた。

A. 研究目的

ヒトヘルペスウイルスはこれまでに 8 種類が同定され、感染細胞の種類がことなる α 、 β 、 γ の 3 種類に分類されている。 β -ヘルペスウイルスは、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6)、ヒトヘルペスウイルス 7 (HHV-7) からなり、マクロファージや T 細胞といった免疫細胞において増殖感染や潜伏感染することを特色とする。また、HHV-6 は脳内のグリア細胞で潜伏感染・再活性化を生じ、反復性の熱性痙攣の原因となる事が知られている。

β -ヘルペスウイルスは多くの慢性難治性疾患患者で、ウイルスの再活性化が生じることが観察されている。しかし、このウイルスの再活性化は、疾患の結果として生じたのか、再活性化を生じることが疾患の原因や増悪因子となっているのかは、現在の技術では調べることができない。

本研究は、この問題を解決するために、

1) β -ヘルペスウイルスの潜伏感染・再活性化に関係するウイルス遺伝子産物を利用することにより、潜伏感染と再活性化を直接検査できる方法を開発する。

2) この検査法を用いて、 β -ヘルペスウイルスの関与が疑われる疾患と潜伏感染・再活性化の関係を再検討することにより、 β -ヘルペスウイルスと難病との関係の疫学的証拠を確定する。

3) 上記の疫学的研究で得られた事実を確定するために、 β -ヘルペスウイルス、特に β -ヘルペスウイルスの潜伏感染・再活性化による慢性難治性疾患の発症機序を解明して行くことを目的とする。

昨年度までに、クローン病患者において HHV-6 の活性化された潜伏感染状態である「中間状態」で発現される HHV-6 潜伏感染関連蛋白質に対する抗体が検出され、健常人ではこの抗

体が検出されない事を見出した。また、この中間状態を形成するもととなる HHV-6 の再活性化への誘導が、現代社会における仕事のストレス・疲労によって生じることを示した。

昨年度は、HHV-6 の潜伏感染・再活性化と疾患の発症との関係を検討するために、HHV-6 潜伏感染関連蛋白の病理組織による発現を検討し、腸管病巣部の相当数の細胞が、HHV-6 潜伏感染関連蛋白質を発現していることを示した。同様の染色像は、他の病巣部や他の症例でも観察され、HHV-6 の潜伏感染関連蛋白を発現する細胞が広範囲の病巣で発現することが判った。

また、ヒト以外の動物にはほとんど感染しない HHV-6 の潜伏感染・再活性化を *in vivo* で研究することを可能にするために、NOD-SCID-hu マウスを用いた、新規の HHV-6 感染モデルを開発した。このモデルでは、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。

今年度は、クローン病患者に高頻度に見られる合併症であり、なおかつクローン病の治療に対する抵抗性とも関係すると考えられている、鬱症状と HHV-6 との関係を検討するために、鬱症状を示す様々な疾患の患者の HHV-6 潜伏感染蛋白に対する抗体反応を検討した。また、鬱症状の発生機序を解明するために、HHV-6 潜伏感染蛋白の機能解析も行なった。

B. 研究方法

1) 鬱症状を呈する患者の HHV-6 潜伏感染蛋白に対する免疫反応

HHV-6 は、マクロファージと脳内のグリア細胞で潜伏感染を成立させる。このため、潜伏感染によって疾患が誘導される場合、免疫疾患と中枢神経系疾患が最も疑われる。昨年までに免疫疾患としてクローン病の原因または増悪因子として、HHV-6 の潜伏感染の異常が強く疑われることを示して来た。

またその一方で、クローン病には鬱症状または鬱病が合併することが多く、鬱症状を合併する患者は治療に抵抗性で難治性であることが知られている。そこで、HHV-6 潜伏感染の中枢神経系への影響を検討するために、様々な疾

患において鬱症状を呈する患者の HHV-6 潜伏感染蛋白に対する抗体価を検討した。患者としては、精神科に通院または入院中の患者で鬱症状を呈する患者の他、HHV-6 との関係がしばしば指摘される慢性疲労症候群 (CFS) 患者を対象とした。

2) HHV-6 潜伏感染蛋白の機能解析

昨年までの研究では、HHV-6 潜伏感染蛋白の機能が不明であったため、この蛋白に対する抗体が陽性であることが疾患の原因であるのか結果であるのかが判らなかつた。本年度は、この問題を解決するために潜伏感染蛋白の機能解析を行った。

鬱病または鬱症状の発生の分子的なメカニズムはほとんど不明であるが、ある程度の意見の一致を見ている事実として、グリア細胞、特にアストロサイトにおけるカルシウム濃度の異常が挙げられる。従来グリア細胞は、神経細胞の支持や栄養補給に重要であると考えられて来たが、最近は多くの神経伝達物質の代謝などに影響を与え、高次の中枢神経機能の中心を担っていると考えられている。また、その調整には、カルシウム濃度の変化が極めて重要であると考えられており、鬱病などの高次中枢神経疾患では、比較的軽度のカルシウム濃度の異常でも大きな影響を持つと考えられている。

HHV-6 はグリア細胞株において潜伏感染を成立させる。この潜伏感染蛋白を発現したアストロサイト細胞株 U373 細胞におけるカルシウム濃度の異常を検討するために、潜伏感染蛋白を発現した細胞とそうでない細胞における刺激物質 Thapsigargin に対する影響を検討した。カルシウム濃度の測定は、蛍光物質 Fura2 を用い、340nm と 380nm の 2 種類の励起光における蛍光の比率を計測することにより解析した。(倫理面への配慮)

インフォームドコンセントを取るに当たり、厚生労働省のガイドラインに準拠した同意書を作成し、これに患者またはこれに代わる親権者の同意を得た。全ての研究の過程は東京慈恵会医科大学・倫理委員会の承認を得たプロトコールにしたがって行われた。また、遺伝子組換え実験は東京慈恵会医科大学・遺伝子組み換え委員会の承認の後、遺伝子組換え実験ガイドラインに沿って行われた。