

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19年度 総括・分担研究報告書

平成20年3月

主任研究者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

平成19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	准教授
中島 淳	横浜市立大学医学部・分子消化管内科	准教授
荒川 宜親	国立感染症研究所・細菌第二部	部長
渡邊 浩	久留米大学医学部・感染医学講座	教授
川端 寛樹	国立感染症研究所・細菌第二部	室長
宮崎 義継	国立感染症研究所・生物活性物質部	部長
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班 総括研究報告書（平成 19 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	17
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	25
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	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. 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	35
分担研究者：荒川 宜親（国立感染症研究所・細菌第二部）	
7. 難治性気道感染症における細菌感染	47
分担研究者：渡邊 浩（久留米大学医学部・感染医学講座）	
8. ライム病ボレリアと不明神経疾患	51
分担研究者：川端 寛樹（国立感染症研究所・細菌第一部）	

9. 難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子	57
分担研究者：宮崎 義継（国立感染症研究所・生物活性物質部）	
10. 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）	
11. 肺炎クラミジアと多発性硬化症に関する研究	67
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	73

# 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。本年度の主な成果として、HHV-6 潜伏感染とクローン病、鬱症状との関連、BDV 感染による神経変性機序の解明、100 種類以上のウイルスを網羅的に検出する定量的 PCR の開発などが挙げられる。さらに慢性肺気腫あるいは呼吸不全とウイルス感染、自己免疫性肝炎の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、*Nontypeable Haemophilus influenzae* が産生したバイオフィルムに対する抗生物質の効果、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との関連、クラミジア・リケッチアと特定疾患の関連につき検討を行い、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准教授  
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长  
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長  
宮崎義継 国立感染症研究所生物活性物質部  
部長  
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

ような微生物、あるいはそれら微生物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、再活性化により疾患が誘発される可能性が考えられる。また、既知の微生物以外にもこれまで同定されていない、未知の病原体が関与する可能性もある。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を同定し、その発症機序を明らかにすることで、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きた。今年度は、特定疾患とウイルスの関与（佐多）、神経変性疾患とボルナ病ウイルス感染（生田）、神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明（近藤）、慢性肺気腫あるいは呼吸不全とウイルス感染（山谷）、自己免疫性肝炎の発症に関する微生物の関与（中島）、マイコプラズマと IgA 腎症、慢性呼吸器疾患など難治性 特定疾患との関連性（荒川）、*Nontypeable Haemophilus influenzae* が産生したバイオフィルムに対する抗生物質の効果（渡辺）、ライム病ボレリアと不明神経疾患（川端）、難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子（宮崎）、真菌感染と特定疾患（渋谷）、クラミジア・

### 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、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の

リケッチアと特定疾患の関連（岸本）につき、検討を行った。

## B. 研究方法

それぞれの研究目的に応じ、臨床検体を用いた研究、実験動物を用いた試験管外実験、および培養細胞等を用いた試験管内実験を行った。詳細は各分担研究報告書を参照。

（倫理面への配慮）

臨床検体を扱う場合は、患者からインフォームドコンセントが得られ、また、採取施設、研究施設の研究倫理委員会の承認を得た上で行われた。検体収集、実験実施などについては研究倫理委員会で承認されたプロトコールに基づいて行われた。臨床検体を用いた場合は研究の過程において患者個人の特定ができないよう取扱い、実験結果は公刊するが個人が識別される情報は一切公表しないよう配慮した。動物実験においては各施設の動物実験委員会の、組換え DNA 実験は各施設の組換え DNA 委員会の承認を得てから行った。また、微生物の感染実験については各施設で定めるバイオセーフティーに関する規則に従い行われた。

## C. 研究結果

特定疾患とウイルスの関与： duplex real time PCR を使用し、96 ウェルプレート上で約 100 種類のウイルスを同時検出する、簡便で高感度なウイルス網羅的定量的 PCR を開発した。小児劇症肝炎例 9 例につきウイルスを網羅的に検索したが原因ウイルスといえるものは同定されなかった。（佐多）

神経変性疾患とボルナ病ウイルス感染： ボルナ病ウイルス(BDV)の神経変性機序を明らかにするために、BDV 持続感染モデル (BDV P 蛋白質発現トランスジェニックマウス：BDV P-Tg)を用いた解析を行った。BDV P-Tg では、小脳のプルキンエ細胞、特に中葉から後葉 (VI-VIII 葉) に顕著な減少が観察された。また、グリア型グルタミン酸トランスポーター (GLAST) とクリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) の発現が低下していることが明らかとなった。また、人におけるボルナ様抗原の探索を行い、ヒトゲノム内に BDV の N 抗原と類似した遺伝子が存在することが明らかとなっ

た。（生田）

神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明：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、この抗体反応の原因となる新規の HHV-6 潜伏感染遺伝子とこれにコードされる蛋白を同定し、動物実験を含む機能解析を行った。この結果、この潜伏感染蛋白を HHV-6 の潜伏感染部位である脳内グリア細胞で発現させたマウスは、躁うつ病様の行動異常を示すことが判り、この潜伏感染蛋白が、躁うつ病、うつ病などの気分障害の原因となっていることを示唆することができた。気分障害は、クローン病患者における重要な合併症であるとともに、その増悪因子でもあるので、今回の成果は、うつ病の発症機序を説明できるだけでなく、クローン病の治療や病因論に対しても重要な影響を持つものであると考えられた。（近藤）

慢性肺気腫あるいは呼吸不全とウイルス感染：

1) 培養ヒト気管上皮細胞におけるインフルエンザウイルス感染および RS ウイルスに対する喀痰調整薬 L-カルボシステインの効果を調べた。L-カルボシステインを培養ヒト気管上皮細胞に作用させると、培養液インフルエンザウイルス量および RS ウイルス量が減少した。さらに、気道炎症に関与する炎症性サイトカイン、インターロイキン(IL)-1 $\beta$ や IL-8 がウイルス感染後に増加し、L-カルボシステインで減少した。L-カルボシステインのインフルエンザウイルス感染抑制効果、RS ウイルス感染抑制効果と気道炎症抑制効果が示唆された。

2) プロトンポンプ阻害薬の慢性肺気腫における風邪罹患および呼吸不全に対する抑制効果を調査した。プロトンポンプ阻害薬は慢性肺気腫における風邪罹患回数および増悪回数を減少させた。慢性肺気腫増悪の長期管理におけるプロトンポンプ阻害薬の有用性が示唆された。

（山谷）

自己免疫性肝炎の発症に関する微生物の関与：自己免疫性肝炎の発症に関するウイルスの関与を近年急速に進歩してきた遺伝子発現の網羅的解析により同定することを行ってきた。今年度は網羅的手法にてウイルスの関与を検

討するために、multiplex multivirus real time PCR を用いて自己免疫性肝炎や原発性胆汁性肝硬変に関与すると思われるウイルス感染の有無を検討した。現段階では、原因微生物の同定は達成されておらず検索中である。しかし最適な方法の検討は整理されつつあると思われる。(中島)

マイコプラズマと IgA 腎症、慢性呼吸器疾患など難治性 特定疾患との関連性 : *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について検索を行った。マイコプラズマ感染者における抗リン脂質抗体価を測定したところ、健常人との比較において、*M. pneumoniae* 感染者においては抗カルジオリピン抗体価の上昇ならびに抗フォスファチジルセリン抗体価の上昇が、また *M. hominis* 感染者群においては抗フォスファチジルセリン抗体価の上昇が認められた。経後脚膝蓋関節腔内 *M. fermentans* 生菌投与ウサギ 13 羽中 1 羽において、滑膜上皮細胞の多層化、上皮直下への形質細胞浸潤、リンパ球集ぞくが病理学的に認められた。抗ガラクトース欠損 IgG 抗体の一過性上昇も認められた。(荒川)

難治性気道細菌感染症とバイオフィーム : 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検討した。 $\beta$ -lactamase-negative ampicillin (ABPC)-susceptible (BLNAS) 株 及び  $\beta$ -lactamase-negative ABPC-resistant (BLNAR) 株を 48 時間培養後、ABPC, cefotaxime (CTX), erythromycin (EM), clarithromycin (CAM), levofloxacin (LVFX), gatifloxacin (GFLX) を加え、バイオフィームに対する効果を比較検討した。Microtiter biofilm assay では BLNAR 株に対し、ABPC, CTX, EM, CAM では 10 MIC でもバイオフィームの抑制効果はみられなかったが、LVFX は 1 MIC 以上、GFLX は 0.1 MIC 以上で抑制効果がみられた。continuous flow cell chamber を用いた検討ではバイオフィームの性状には抗生物質間の違いはみられなかったが、GFLX は 1 MIC で優位な菌量の減少がみられ、10 MIC では菌の生育は認めなかった。LVFX, GFLX は NTHi が産生するバイオフィームの中に浸透し、バイオフィル

ム内の菌を殺菌する効果が高いことが示唆された。(渡辺)

ライム病ボレリアと不明神経疾患 : 多発性硬化症 (MS) における微生物感染の有無を明らかにするために、ライム病ボレリア組換抗原を用いた Western blotting 法による MS 患者における抗ライム病抗体検索、および髄液中の病原体 DNA 検索をおこなった。MS 患者 27 例中、抗ライム病 IgG 抗体陽性例は 3 例 (11.1%) であった。ペア血清が得られた 5 例において抗体調査では顕著な抗体変動は見られなかった。さらに、血清診断では反応抗原の特異性に応じた判定のための point 制を導入し、健常者、ライム病患者、および MS 患者における、各群間での point 数を比較した場合、MS-健常者間における point 数での有意差は見出されなかった。以上の結果から、我が国の MS 患者において、ライム病ボレリアの慢性感染を疑わせる積極的な知見は得られなかった。(川端)

難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子 : 難治性血管炎の真菌関与の菌側因子ならびに生体との相互関係を明らかにすることを目的とし、*Candida albicans* 由来 CAWS (*C. albicans* water-soluble mannan complex) が誘発する血管炎が、活性化好中球や好中球自己抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: ANCA) と関連すること、サイトカインの動態について前年度までに報告した。更に、血管炎を惹起する特異的なマンナン構造を特定することを目的として、*C. albicans* の mannosyl-transferase をコードすると予測される遺伝子を破壊した *C. albicans* 変異株を作成し、それぞれの変異株由来 CAWS によるサイトカイン誘導能を検討した。*C. albicans* 親株と 14 の候補遺伝子破壊 *C. albicans* 株由来の CAWS による刺激で、TNF- $\alpha$  と IL-6 産生能に差は認められなかった。(宮崎)

真菌感染と特定疾患 : これまで *Stachybotrys chartarum* をマウスに経気管的に投与することによって肺高血圧症が惹起されることを示してきたが、今回さらに本症の発生に関わる要因について検討した。1) 肺動脈病変の形成における投与回数の影響では、単回投与でもマウスに頻度は低いながら肺動脈病変が形成された。2) 投与した胞子の生死に関しては、病変形成



に影響が認められなかった。一方、3) 胞子をメタノールで処理すると肺動脈病変の形成は認められなくなり、本病変の形成にはメタノールにより除去または不活性化などの影響を受ける物質が関与している可能性が示唆された。4) 環境内に多く存在する *Cladosporium* 属および *Penicillium* 属の真菌をマウスに反復投与したところ、同様の実験条件では、両菌種ともマウスに肺動脈病変形成を惹起しなかった。さらに原発性肺高血圧症の発症に真菌が関与する可能性を探索する端緒として、剖検肺からの真菌関連遺伝子の検索を行ったところ、高い頻度で目標とする PCR 産物を得た。(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 と肺炎クラミジアの関連について患者血清と髄液を用いて検討した。MS 症例、5 例の血清と髄液での肺炎クラミジアの PCR ではすべて検出限界以下であった。2 例で IgG と IgM 陽性例があり、ウェスタンブロット (WB) でも肺炎クラミジアに対する特異抗体が確認された。このことから、この 2 例はいずれも肺炎クラミジアの初感染、あるいは急性感染が示唆された。しかし、MS の経過からは、肺炎クラミジアの感染が MS の発症に関与したものではなく、MS にたまたま肺炎クラミジア感染が起こった可能性が高いと推察された。前年度の成績とあわせて考えると、肺炎クラミジア感染は一部の MS の急性増悪の要因となる可能性はあるが、MS 発症への直接的な関与を積極的に疑う証拠は認められなかった。(岸本)

#### D. 考察

特定疾患に分類される疾患の多くは原因不明であり、微生物が関与する疾患がどれだけ含まれるかは知られていない。これまでの内外の研究から特定疾患がウイルスや細菌、真菌の急性感染症である可能性は低く、微生物が関与する可能性としてはウイルスの潜伏感染が関与するか、あるいは微生物の産生するタンパク、毒素が間接的に疾患を引き起こす可能性が考えられる。当研究班では特定疾患にこうした微生物の直接、間接的な関与があるかどうかを検索してきたが、本年度の成果では微生物の潜伏持続感染と特定疾患の関与を示唆するデータ

が得られている。すなわち、神経、精神疾患と HHV-6 および BDV の感染の関与を指摘した点が、今年度の成果として特筆される。HHV-6 はほとんどのヒトが感染している常在ウイルスであり、その潜伏感染と疾患との関連はこれまで明らかにされていない。HHV-6 の潜伏感染遺伝子、タンパクが同定されたことで、今後、様々な疾患との関連、特にクローン病、鬱症状との関連が明らかにされていくことに期待したい。また、BDV 感染による神経変性機序が分子レベル、動物実験レベルで明らかになった点は注目に値する。ヒトにおける検索が十分でないウイルスであるので、今後の研究成果に期待したい。

一方、慢性肺気腫あるいは呼吸不全とウイルス感染、Nontypeable *Haemophilus influenzae* が産生したバイオフィルムに対する抗生物質の効果の研究では臨床的な成果が得られており、現場での応用が期待される。また、ウイルスを検出する網羅的定量的 PCR が開発されたことで、多くの特定疾患とウイルスの関連が、関連性を否定する点も含めて、今後明らかになっていくことが期待される。自己免疫性肝炎、劇症肝炎、MS などでは特定の微生物の関連を否定する結果が得られているが、こうしたデータを積み上げることも本研究の重要な役割の一つであると考えられる。

#### E. 結論

特定疾患と微生物感染につき、HHV-6 潜伏感染とクローン病、鬱症状との関連が示唆されるデータを得たこと、BDV 感染による神経変性機序の解明を行ったこと、100 種類以上のウイルスを網羅的に検出する定量的 PCR を開発したことなどの成果を得た。さらに慢性肺気腫、自己免疫性肝炎、抗リン脂質抗体症候群、難治性気道細菌感染症とバイオフィルム、難治性血管炎、原発性肺高血圧症、MS などと微生物感染の関連につき検討を行い、いくつかの重要な知見が得られた。

#### F. 健康危険情報

各分担者の報告書参照。

#### G. 研究発表

1. 論文発表

各分担者の報告書参照。

2. 学会発表

各分担者の報告書参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

各分担者の報告書参照。

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

## 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、佐藤由子 (国立感染症研究所感染病理部)

研究要旨 小児劇症肝炎サンプルにつき昨年度に開発した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(multivirus real time PCR)を行い、原因ウイルスの検出を試みた。生体肝移植の適応となった 9 例の劇症肝炎の摘出肝について検索を行った結果、4 例で HHV-6 が、2 例で B19、1 例で HBV が検出された。しかし、ウイルスのコピー数は低く、これらのサンプルの病理組織標本を免疫組織化学で検索したところ、当該ウイルスは検出されなかったことから、病原ウイルスとしては否定的であることが分かった。小児劇症肝炎では既知のウイルスが直接に病因に関与している可能性は低く、未知のウイルスか、ウイルス以外の要因が関与する症例が多いものと思われる。今後、様々な特定疾患のサンプルにつき、multivirus real time PCR によりウイルスの検出を試みる予定である。

## A. 研究目的

劇症肝炎は急激に起こる肝細胞の広範な壊死により、肝の萎縮、進行性の黄疸、出血傾向及び精神神経症状(肝性脳症)などの種々の肝不全症状が出現する肝炎と定義される。「肝炎のうち症状発現後 8 週以内に高度の肝機能異常に基づいて昏睡 II 度以上の肝性脳症をきたし、プロトロンビン時間が 40%以下を示す」ことが診断基準であり、初発症状から 10 日間以内に発症する急性型と 8 週間以内に起こる亜急性型の 2 つが知られている。本邦では毎年 100 例ほどの症例があり、小児から成人まで、幅広い年齢層に発症する。肝炎ウイルスやヘルペスウイルスにより起こるウイルス性、ハロセン、サルファ剤、パラアミノサリチル酸などが原因で起こる薬剤性などの原因が考えられているが、小児に発症する劇症肝炎ではウイルスが検出されず、他の原因も考えられないことから原因不明の症例が多い。小児劇症肝炎は予後が悪く、生体肝移植の適応となる。われわれは、これまでも生体肝移植の症例で摘出された肝組織の一部を用い、ウイルス学的検索を行ってきた。主な肝炎ウイルスやヘルペスウイルスなどの関与を PCR により検討し、3 例という少数例の解析ではいずれの検体でも有意な病原体の

検出には至らなかった(平成 16 年度厚生労働科学研究費特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究班分担研究報告書)。この検索では通常の PCR を用いたため、検索するウイルスの数は限られ、また、コピー数などの情報も得られていない。

昨年度の本研究班で開発した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(multivirus real time PCR)はこうした原因不明の疾患の原因微生物の検索に有用な手段の一つである。Real time PCR は通常の PCR と比べ、感度が高く、かつ、コピー数の定量ができる点で、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。Multivirus real time PCR は各ウイルスを検出する real time PCR のプローブ・プライマーセットを一つのプレート上に配し、さらに同一プレート上に標準曲線のコントロールを置くことにより、ヒトに疾患を起こすと考えられている 100 種類以上のウイルスを一度の run で網羅的に測定できるよう設計されたものである。これにより、微量な検体から多種類のウイルスのコピー数を短時間で測定することができることから、特定疾患の原因究明に役立つことが期待されている。

本年度は multivirus real time PCR を用いて小児に発症した劇症肝炎のサンプルにつき、平成 16 年度よりも症例数を増やし、原因ウイルスの検索を行った。

## B. 研究方法

### 1) 検体と核酸抽

生体肝移植の適応となった患者 9 名からインフォームドコンセントを得た上で生体肝移植時の摘出肝の一部を採取し、すぐに -80°C にて凍結保存した。凍結保存後はサンプルを 2 分し、一つは ISOGEN (ニッポンジーン社) 中に融解し、ポリトロンホモジナイザー (キネマティカ社) にて組織を破碎後、RNA 抽出を行った。もう一つは組織破碎後にフェノールクロロホルム法にて DNA を抽出した。

### 2) 定量的 PCR

multivirus real time PCR の詳細は前年度の報告書に記載した。ヒトに病原性を持つ可能性のある 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 probe, primer を設計し、real time PCR を立ち上げた。各ウイルスにおける標的遺伝子は、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。それぞれのプローブ (FAM-TAMRA または HEX-BHQ1 標識 TaqMan Probe)、プライマーの混合液を 384 ウェルプレートまたは 96 ウェルプレート上に配し、一つのウェルで一つのウイルスを検出できるよう設計した。また、同一プレート上に内因性のコントロールとして GAPDH 遺伝子のプライマー・プローブを置いた。さらに、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同一プレート上に反応させ、標準曲線を作成することにより、各ウイルスの大まかなコピー数が定量できるようにした。定量的 PCR は ABI Prism 7900HT (アプライド・バイオシステムズ社) を用いて行った。

### 3) 免疫組織化学

No.	年齢	性別	検出ウイルス
1	3	女	HHV-6, TTV
2	1	女	HHV-6, TTV
3	0	男	なし
4	1	男	TTV
5	2	男	TTV
6	3	女	TTV
7	5	男	B19, HHV-6, TTV
8	3	男	HHV-6, HBV, TTV
9	5	男	B19, TTV

表: 小児劇症肝炎例における multivirus real time PCR の結果

いずれも生体肝移植時の摘出肝から抽出した DNA, RNA を用いた。患者の平均年齢は 2.6 歳、男女比は 6:3 である。検出ウイルスを右側に示す。TTV は他の正常検体にも検出されることから有意な結果とはいえない。HHV-6, parvovirus B19, HBV も 1 細胞あたり 1 コピー以下の低いコピー数であった。

摘出肝組織は 10% 緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。4µm 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、各ウイルスに対する抗体を一次抗体として反応させた。一次抗体は抗ヒトヘルペスウイルス 6 抗体として HHV-6 P101 (Chemicon MAB8535), P41 (ABI 13-216-100), GP116 (ABI 13-218-100) を、抗ヒトパルボウイルス B19 抗体として抗 human parvovirus B19-VP-1 (Novocastra NCL-PARVO), 抗 B 型肝炎ウイルス抗体として抗 HBV (DAKO) を用いた。スライドを PBS で洗浄後、ビオチン標識抗ウサギまたはマウス IgM 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) 染色で全体の形態を観察した。

(倫理面への配慮)

全ての研究は国立感染症研究所研究倫理委員会の承認(平成 16 年 10 月 21 日 承認番号 41)を得たプロトコールにしたが行われた。インフォームドコンセントは厚生労働省の

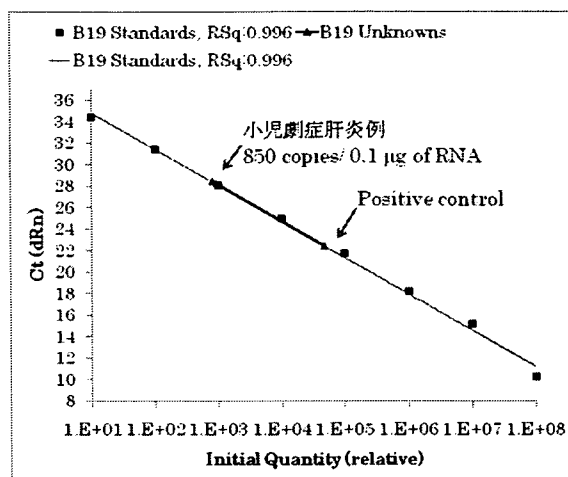


図1. ヒトパルボウイルス B19 の real time PCR. 標準曲線上に小児劇症肝炎例および陽性コントロールを矢印で示す。本症例では同量の DNA で約 2500 コピーの GAPDH 遺伝子が検出され、これから計算すると1細胞あたり約 0.7 コピーのウイルスが検出されたことになる。

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。また、遺伝子組換え実験は当該施設（国立感染症研究所）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。

### C. 研究結果

#### 1) 定量的 PCR

劇症肝炎の摘出肝組織から DNA, RNA を抽出し、これらを前年度に確立した multivirus real time PCR を用いてヒトに疾患を起こす可能性のある 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ウイルス量を測定した。その結果、検出限界である 10 コピー以上の量が検出されたウイルスは HHV-6, parvovirus B19 および TTV, HBV のみであった（表）。なお、いずれの検体においても GAPDH 遺伝子は DNA, RNA とともに十分量が検出された。検出されたウイルスのうち TTV は比較的高コピー数であったが、他の多くの正常検体からも検出されていることから、疾患との関連はないものと考えられる。HHV-6, parvovirus B19 および HBV はいずれもコピー数は多くなく、GAPDH の量と比較すると多くて 1 細胞あたり 1 コピー以下の量であった。これらのウイルスは個別に real time PCR を施行し、いずれの検体でも陽性が確認されたが、コピー数は multivirus real time PCR で検出された

量とほぼ同じで、比較的低コピーであった（図 1）

#### 2) 免疫組織化学

Multivirus real time PCR で陽性となった HHV-6, parvovirus B19 および HBV について、その陽性検体につきホルマリン固定パラフィン標本を用いて免疫組織化学により当該ウイルスの検出を試みた。サンプルはいずれも激しい炎症と肝組織の破壊を伴う組織で、広範な壊死が認められる（図 2）。

免疫組織化学ではこれらの肝組織にいずれのウイルスも検出されなかった。Real time PCR ではいずれのウイルスも低コピーであったことを考えると、矛盾しない結果であると思われる。

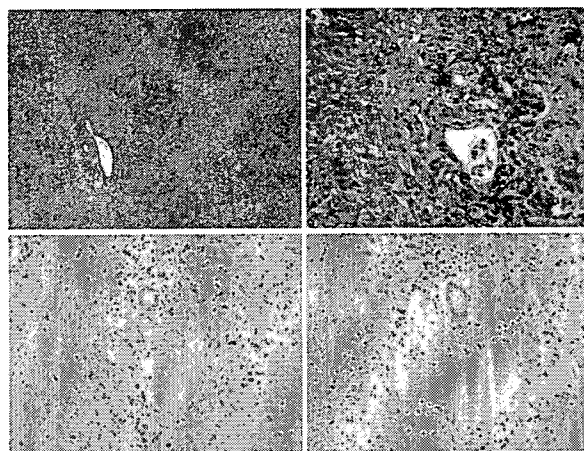


図2: 劇症肝炎組織における免疫組織化学 (左上) HE 染色。弱拡大。門脈域を中心に激しい炎症性細胞浸潤と広範な壊死が認められる。(右上) HE 染色。門脈域の強拡大。胆管および血管周囲にはリンパ球を主体とした高度な炎症性細胞浸潤が見られ、限界板は破壊され、壊死は肝細胞にまで及んでいる。(左下) human parvovirus B19 VP-1 に対する抗体を用いた免疫組織化学。炎症の激しいグリソン鞘を拡大しているが、陽性細胞は見られない。(右下) 抗ヒトヘルペスウイルス6抗体による免疫組織化学。陽性細胞は認められない。

#### D. 考察

小児劇症肝炎は成人に発症する劇症肝炎と比べ、ウイルスや薬剤など、他の原因が同定されることが少なく、原因不明な症例が多い。今回の検索ではヒトに病原性のあるとされる多数のウイルスの検出を試みたが、いずれの症例においても病因と関連するウイルスの同定には至らなかった。少なくとも、今回検索したウイルスが、肝炎の直接の原因になっている可能性はきわめて低いことが示唆される。しかし、小児劇症肝炎の原因がウイルスである

可能性は依然として残されている。今回の検索から、既知のウイルスが原因ウイルスとして患部で増殖して肝炎が起こる可能性は低い、ウイルスが肝組織に特異的なタンパクと類似する抗原タンパクを発現し、免疫が結果的に肝細胞を攻撃して肝炎に至る自己免疫性肝炎のような機序により、間接的にウイルスが原因となる可能性がある。この場合は、ウイルスは患部で増殖することではなく、肝臓とは離れたところでウイルスタンパクを発現し、免疫がそれを認識する。もう一つの可能性は未知のウイルスが発症に関わっている可能性である。未知のウイルスが小児劇症肝炎の発症に関与していることを示唆する事実としては、小児劇症肝炎症例の半数以上がいずれの肝炎ウイルスも検出されず、他のウイルスも検出されない症例であること、劇症肝炎の肝移植後、約3割に再生不良性貧血が起こること、肝移植後の再生不良性貧血はアジアで多く米国内では中西部に多いなど、疫学的な特徴があること、再生不良性貧血患者で肝炎を既往に持つものが多いことなどが挙げられ、再生不良性貧血との関連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。残念ながら今回の検索に用いた方法では未知のウイルスは検出できない。未知のウイルスを検出する方法としては我々が平成16年度の研究で行った、cDNA library を作成して血清でスクリーニングする方法や、健常部と患部から抽出したRNAを比較するサブトラクション法など、いくつかの方法が考えられる。しかし、いずれも容易な方法ではなく、未知のウイルスの検出は今後の課題であろう。

本研究で用いた Multivirus real time PCR はウイルスを網羅的に検出する系としてはきわめて有効な方法であるといえる。昨年度から改良を重ね、現在では FAM-TAMRA および HEX-BHQ1 の2つのプローブを同時に使用し、multiplex real time PCR としてさらに簡便に操作が可能となった。96 ウェルプレート上で100種類以上のウイルスを同時検出することができ、症例を重ねたことにより、ルーチンワークとして耐えうる安定性が確保されたものと考えている。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、今後も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。

(謝辞)

下記の先生方から検体の提供をいただきました。深謝いたします。

名古屋大学医学部ウイルス学：木村宏

国立成育医療センター：伊藤玲子、肥沼幸子

## E. 結論

小児劇症肝炎9例につき、昨年度に開発した multivirus real time PCR を用いて多種類のウイルスを網羅的に検索した。数症例から HHV-6, B19, HBV が検出されたが、これらのサンプルの病理組織標本を免疫組織化学で検索したところ、当該ウイルスは検出されず、病原ウイルスとしては否定的であった。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

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Katano H, Sato Y, Hoshino S, Tachikawa N, Oka S, Morishita Y, Ishida T, Watanabe T, Rom WN, Mori S, Sata T, Weiden MD, Hoshino Y. Integration of HIV-1 caused STAT3-associated B cell lymphoma in an AIDS patient. *Microbes Infect.* 2007 9:1581-9.
- 2) Katano H, Sato Y, Tsutsui Y, Sata T, Maeda A, Nozawa N, Inoue N, Nomura Y, Kurata T. Pathogenesis of cytomegalovirus-associated labyrinthitis in a guinea pig model. *Microbes Infect.* 2007 9:183-91.
- 3) Ueno T, Mitsuishi T, Kimura Y, Kato T, Hasegawa H, Katano H, Sata T, Kurane S, Kawana S. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with Kaposi's sarcoma: successful treatment with interferon-alpha. *Eur J Dermatol.* 2007 17:539-40.

## 2. 学会発表

- 1) 片野晴隆、加納基史、菅野隆行、佐多徹太郎. エイズ剖検例の各臓器におけるヒトヘルペスウイルスの定量。第 22 回 第 2 2 回ヘルペスウイルス研究会。2007.5. 福岡市。
- 2) 片野晴隆、加納基史、菅野隆行、佐多徹太郎. エイズ剖検例の各臓器における DNA ウイルスの感染プロファイル。第 55 回日本ウイルス学会学術集会。2007.11. 札幌市。

## H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし



## 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、本田 知之、堀江 真行  
(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、ヒトを含む多くの温血動物への感染が確認されている神経親和性の RNA ウイルスである。疫学調査の結果、BDV の神経疾患への関与が示唆されてきたが、その詳細は明らかになっていない。私たちはこれまでに、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。平成 19 年度は、以下の 2 点について研究を推進した。(1) BDV の神経変性機序を明らかにするために、BDV 持続感染モデル (BDV P 蛋白質発現トランスジェニックマウス: BDV P-Tg) を用いた解析を行った。BDV P-Tg では、小脳のプルキンエ細胞、特に中葉から後葉 (VI-VIII 葉) に顕著な減少が観察された。また、グリア型グルタミン酸トランスporter (GLAST) とクリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) の発現が低下していることが明らかとなった。(2) 人におけるボルナ様抗原の探索を行った。その結果、ヒトゲノム内に BDV の N 抗原と類似した遺伝子が存在することが明らかとなった。

### A. 研究目的

ボルナ病ウイルス (Borna Disease virus; BDV) はウマに急性の脳脊髄炎 (ボルナ病) を引き起こす原因ウイルスとしてヨーロッパで同定された。BDV の感染はこれまでに、世界中で確認されている。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、神経疾患患者が高率に BDV に対する特異抗体を持つことが各国より報告されている。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 感染と特定の神経変性疾患との関連性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にされている。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彩な神経症状を発症する。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、ストレスの負かにより高率に神経変性を引き起こすことも報告されている。

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の解析を行った。また、人における抗 BDV 抗体の実態を明らかにするために、抗 BDV 抗体の BDV 抗原への親和性ならびにボルナ様抗原の探索を行っている。

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) について詳細な解析を行うとと

もに、人におけるボルナ様抗原の存在について探索を行った。

## B. 研究方法

### 1) BDV P-Tg を用いた神経変性機序の解析

生後 8-16 週齢の BDV P-Tg を用いて、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。また、リアルタイム RT-PCR 法を用いて、小脳におけるグルタミン酸トランスポーターと神経栄養因子の発現を定量解析した。

### 2) ボルナ様抗原の同定

BDV の N ならびに P 蛋白質のアミノ酸配列を用いて BLAST サーチを行い、ヒトゲノムに存在する類似遺伝子の同定を行った。

## C. 研究結果

### 1) BDV P-Tg を用いた神経変性機序の解析

前年度までに私たちは、生後 16 週齢の BDV P-Tg 小脳において、プルキンエ細胞の減少が認められることを明らかにしてきた。小脳は解剖学的に、溝で隔てられた幾つかの小葉に分けられている。マウス小脳は、I から X の小葉に分けられている。私たちは今年度、各小葉におけるプルキンエ細胞の数について定量的な解析を行った。その結果、生後 16 週齢の BDV P-Tg 小脳において、第 VI から VIII 葉のプルキンエ細胞が顕著に減少していることが明らかとなった。その他の小葉についても減少傾向は認められたが、顕著な違いは観察されなかった。私たちは次に、リアルタイム RT-PCR を用いて、小脳におけるグルタミン酸トランスポーター (GLT-1、GLAST、EAAT4) と神経栄養因子 (IGF-1、GDNF) の発現について定量解析を行った。その結果、生後 16 週齢の BDV P-Tg ではグリア型グルタミン酸トランスポーターである GLAST とグリア細胞由来神経因子である GDNF 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)。

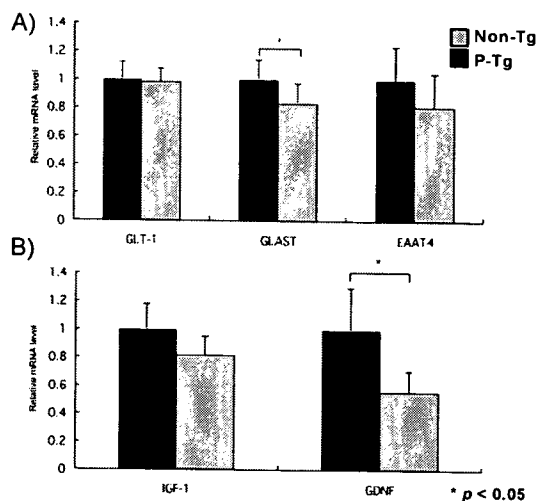


図 1 リアルタイム RT-PCR を用いた BDV P-Tg 小脳での (A) グルタミン酸トランスポーターと (B) 神経栄養因子発現の定量解析。生後 16 週齢の P-Tg 小脳では GLAST と GDNF mRNA の顕著な低下が観察された。

### 2) ボルナ様抗原の同定

BDV N ならびに P のアミノ酸配列を用いて BLAST サーチを行った。その結果、BDV N 蛋白質とアミノ酸レベルで相同性 41%、類似性が 58% である hypothetical protein がヒトゲノム内に同定され、human endogenous Borna-like N element (hEBLN-1) と名づけた (図 2)。hEBLN-1 と相同性を持つ hEBLN-2 も同定され、ヒトゲノム内には BDV 遺伝子に類似した配列が存在することが明らかとなった。解析の結果、hEBLN-2 をコードする mRNA は、ヒト由来株化細胞で発現していることが確認された。さらに、hEBLN-1 ならびに -2 をクローニングして、その発現局在を解析した結果、核周囲への蓄積に加え、核内においてドット状の局在を示すことが明らかとなった。

BDV N	28	KLPGRFLQITVGGSDPHPGIQRHEDINQSAVALDQSGRDMRHTVTPSLVFLCLLI
hEBLN-1	31	+LGR QI +P PGIQ K I ++ ++LD ++R P+ VTPSLVFLC +
		ELSGESHQYPADALEPQPGICQNTVIEATKSLDPAQKSHFVTPSLVFLCIPFDGLH
BDV N	88	AAFVGGVFRSTYLSFVTRGQTVVTKAKFYGEKTRQDRLELEISSIFSBCCI
hEBLN-1	91	A + GV + S + + E + +KF T T LE+SSI BCC I
		KALLSVGVEKREINIVIGNENKGTGLYASKFEDVLP T ---FTALESSILRBCDI
BDV N	148	VIGSSKIKAGAEQIKKRFEDQALGRPESGEGTATLLQMPFHEAIDWINGQFW
hEBLN-1	147	SS I + Q+++PK NM ++ RP H E+A LL +N AIDWIN +YF
		AARSDPFCYNSLQVQRFQNMGI SIGRPLSESBADLLI STRAGPAIDWINSRWF
BDV N	208	LSLLTDFVPSFGKPFMDQIKLVASTAQMTITTTIKYLAEGDQATLTFPVVAYEY
hEBLN-1	207	+ L +FSEF E +DQ+K+VAG AQETTY TN++ +L +C+D + +F V EI
		FYFLPGEFESFACELLDQVAVVASKAQMTITTYRFDLQCVGDS TALFAVLEIY
BDV N	268	VSAKLEEEHALLFPFLGRIHPDAIKLAPRFPFLASAAFTWKKENPDRGTRAS
hEBLN-1	267	K+ D F F G +RSP L+P+ FFKLA+AA YW+K+ M T +G+ A
		KKPLANKVLGDFPFGVLRKRFVIGVLSQGFVFLATAAATWAKRRTYSGFLAI
BDV N	328	GASVKEVQLARTYRKELEKGGD
hEBLN-1	327	Q+++ L ++IERS D
		GSTITFPVLRQASAGKIERGGD

図 2 ヒトゲノム内に発見された BDV 類似抗原 hEBLN-1 と BDV N アミノ酸配列の相同性比較

## D. 考察

### 1) BDV P-Tg を用いた神経変性機序の解析

前年度ならびに今年度の解析により、BDV P 蛋白質のグリア細胞での発現により、小脳プルキンエ細胞の脱落が誘導されることが示された。プルキンエ細胞の脱落は生後 16 週齢で確認されたことより、P 蛋白質の蓄積によるグリア細胞の機能異常が遅発性にプルキンエ細胞の変性を促したものと考えられた。一方、P 蛋白質の発現は小脳にほぼ均等に観察されたにもかかわらず、小脳小葉では、特に第 VI から VIII 葉のプルキンエ細胞に顕著な減少が観察された。このことは、小葉依存的に P 蛋白質の細胞傷害性に違いがあることを示唆している。これまでに、自閉症患者の剖検脳において第 VI から VII 葉のプルキンエ細胞が特異的に減少しているとの報告もある。BDV P-Tg は攻撃性の上昇や空間記憶能力の減少などの行動異常を示すことが知られている。今後は、局所特異的に認められたプルキンエ細胞の減少と行動異常の相関性についても明らかにしていく必要があると考えられる。さらに、私たちはプルキンエ細胞の減少が認められた小脳での GLAST と GDNF の顕著な発現低下を明らかにした。GLAST は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 の発現低下はシナプスにおけるグルタミン酸濃度の異常を促し、神経細胞死を誘導すると考えられる。一方、GDNF はグリア細胞由来の神経栄養因子であり、ドーパミン作動性神経細胞の生存と形態的分化を増強することで、ドーパミンの取り込みを増加させている。GDNF は、神経毒 MPTP から神経細胞を保護する作用も有している。今回の解析から、GLAST と GDNF の発現低下は P 蛋白質を高発現しているバグマングリア細胞で起こっていると示唆された。プルキンエ細胞シナプスはバグマングリア細胞に被われており、そこには GLAST や GDNF が豊富に発現していると考えられている。すなわち、バグマングリア細胞におけるこれら分子の発現低下は、プルキンエ細胞の変性と関連している可能性が考えられた。今後は、P 蛋白質が GLAST と GDNF の発現低下を誘導する機序について解析を進

める予定である。

### 2) ボルナ様抗原の同定

これまでに、ヒトで確認された抗 BDV 抗体は BDV 抗原との親和性が極めて弱いことが報告されている。この事実は、以下の 3 つの可能性を示唆している。1) 抗 BDV 抗体の成熟異常、2) BDV 類似の自己抗原の存在、3) ボルナ様ウイルスの存在。私たちは今回、2) BDV 類似の自己抗原の存在の可能性を明らかにするために、BDV に類似したヒト抗原の検索を行った。その結果、2 種類の BDV N 蛋白質類似配列を発見した。現在、発見した類似遺伝子 (hEBLN-1 および-2) の細胞における発現と機能の検索を行っている。また、これまでに人で検出されている抗 BDV 抗体がこれらの自己抗原を認識しているかの検討も行い、ヒト抗 BDV 抗体の低い抗原抗体親和性の謎について明らかにしていく予定である。

## E. 結論

BDV の神経変性機序を明らかにするために、BDV 感染モデル動物を用いて検討した。その結果、BDV P 蛋白質の持続的な発現が細胞傷害性を誘導し、神経細胞変性を引き起こす可能性を見出した。また、ヒトゲノム内には BDV に類似した遺伝子が存在することを明らかにした。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 国内発表

- 1) 渡邊洋平, 林 陽平, 本田知之, 生田和良, 朝長啓造: 宿主因子による 5' 非翻訳領域の二次構造変化を介した BDV polycistronic mRNA の翻訳制御機構. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 2007 年, 札幌
- 2) 本田知之, 大滝尚広, 渡邊洋平, 林 陽平, 生田和良, 朝長啓造: ボルナ病ウイルス P 遺伝子トランスジェニックマウスにおけるグリア機能異常の解析. 第 55 回日本

- ウイルス学会学術集会 2007年, 札幌
- 3) 林 陽平, 堀江真行, 矢内英之, 渡邊洋平, 大滝尚広, 本田知之, 大東卓史, 生田和良, 朝長啓造 : BDV vRNP のクロマチンターゲット機構の解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 2007年, 札幌
  - 4) Watanabe, Y., Hayashi, Y., Honda, T., Ikuta K. and Tomonaga, K. : An RNA-binding protein complex regulates translation of a BDV polycistronic mRNA through topological alteration of stem-loop structure in the 5'UTR. The 7<sup>th</sup> Awaji international forum on infection and immunity 2007, Awaji Island, Japan
  - 5) Honda, T., Ohtaki, N., Watanabe, Y., Hayashi, Y., Ikuta K. and Tomonaga, K. : Glial dysfunction in the cerebellum of transgenic mice expressing Borna disease virus phosphoprotein. The 7<sup>th</sup> Awaji international forum on infection and immunity 2007, Awaji Island, Japan
  - 6) Hayashi, Y., Horie, M., Watanabe, Y., Honda, T., Daito, T., Ikuta K. and Tomonaga, K. : Efficient persistence of a negative-strand RNA virus, BDV, using chromosome dynamics. The 7<sup>th</sup> Awaji international forum on infection and immunity 2007, Awaji Island, Japan
- 海外発表
- 1) Hayashi, Y., Yanai, H., Watanabe, Y., Ohtaki, N., Ikuta, K. and Tomonaga, K. : Mechanism of efficient persistent infection of Borna disease virus within mammalian cells nucleus. The 1st Thailand-Japan Joint Forum on Infectious Diseases. Bangkok, Thailand.
  - 2) Watanabe, Y. and Tomonaga, K : RNA helicase complex regulates translational efficiency of a Borna disease virus polycistronic mRNA through the binding to the stem-loop structure in the 5' untranslated region. Viruses and Cells: Gordon Research Conference. Tilton, New Hampshire.  
原著論文による発表
  - 1) Chase G, Mayer D, Hildebrand A, Frank R, Hayashi Y, Tomonaga K and Schwemmler 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)
  - 2) Watanabe Y, Ibrahim MS, Hagiwara K, Okamoto M, Kamitani W, Yanai H, Ohtaki N, Hayashi Y, Taniyama H, Ikuta K and Tomonaga K. Characterization of a Borna disease virus field isolate which shows efficient viral propagation and transmissibility. Microbes Infect. 9:417-427 (2007)
  - 3) Ohtaki N, Kamitani W, Watanabe Y, Hayashi Y, Yanai H, Ikuta K and Tomonaga K. Downregulation of an astrocyte-derived inflammatory protein, S100B, reduces vascular inflammatory responses in brains persistently infected with Borna disease virus. J. Virol. 81:5940-5948 (2007)
- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし