

図3 薬剤添加・除去のタイミングの検討による 146F7 及び 133G4 の作用点の検討

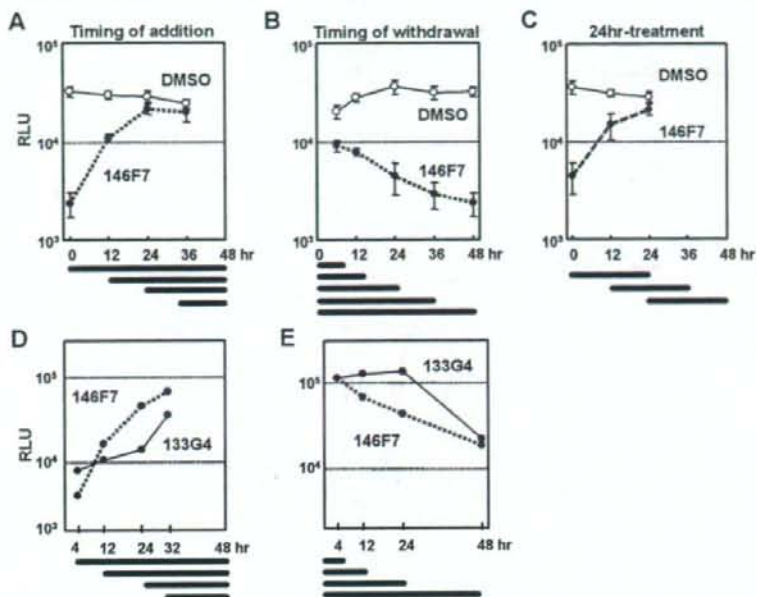


図4 抗 CMV 化合物による遺伝子発現阻害のリアルタイム RT-PCR を用いた解析

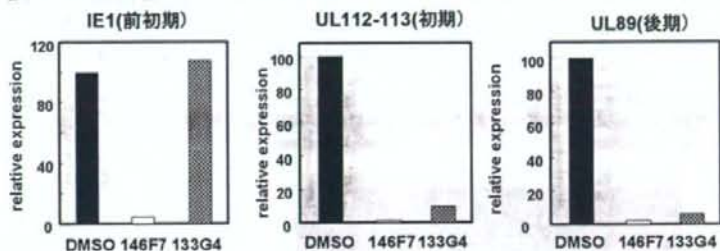


図5 GAL4 融合蛋白を用いた遺伝子活性化阻害機序の解析

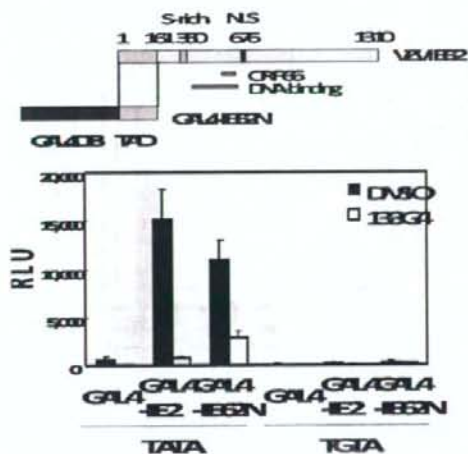


図6 ChIP アッセイによるプロモーターへのポリメラーゼ II 結合量の解析

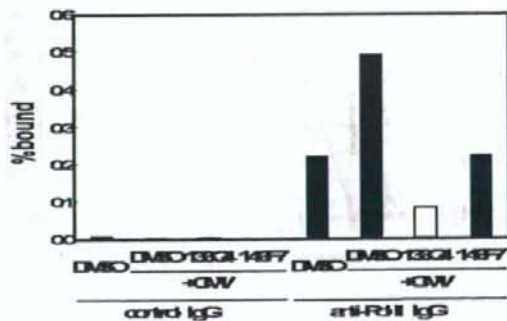


図7 抗 CMV 化合物の作用点のまとめ

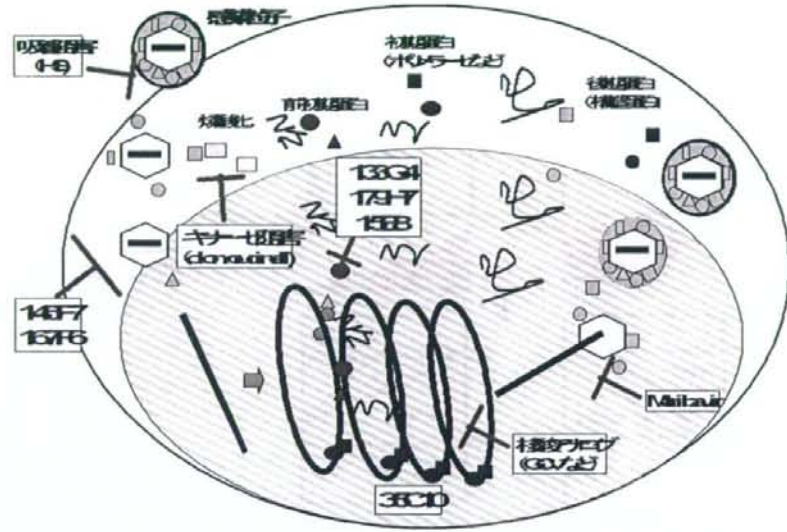
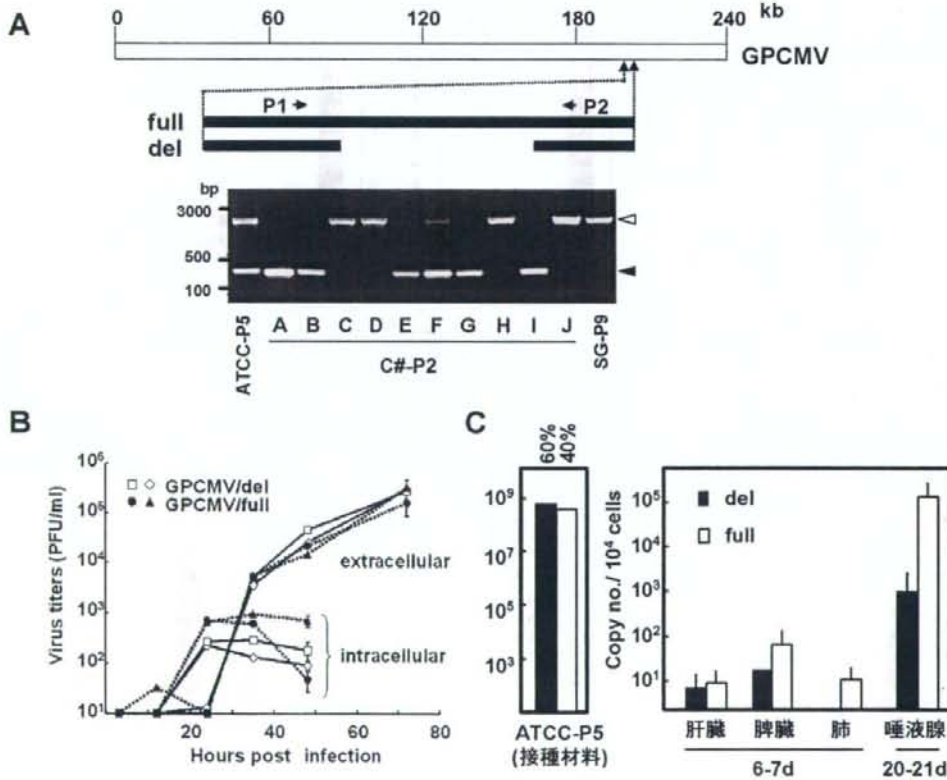


図8 GPCMV の動物個体での増殖に必要な遺伝子領域の同定



臓器移植や悪性腫瘍による免疫低下状態で発生するウイルス感染症の予防と治療に関する研究

研究分担者 吉川哲史 藤田保健衛生大学医学部、准教授

研究要旨：造血幹細胞移植患者、肝移植患者共に HHV-6 の再活性化は移植後 2 週間から 4 週間にかけて約半数の患者で認められた。患者をそれぞれ HHV-6 感染群、非感染群に分け両群間でのサイトカイン濃度を比較した。その結果、2 週目から 4 週目にかけて、HHV-6 再活性化群において TNF- α 、IL-6 の濃度が高かった。よって、これら移植患者における HHV-6 再活性化に炎症性サイトカインが重要な役割を果たしていることが示唆された。また、このようなサイトカイン合成の亢進が患者の臨床像の形成にも関連している可能性が考えられる。造血幹細胞移植後の HHV-6 再活性化機序を明らかにするとともに、他の二つの主要なウイルス（CMV、EBV）感染との関連性も明らかにするため、各ウイルス感染状況と種々のバックグラウンドとの関連性について解析した。造血幹細胞移植患者での HHV-6 の再活性化は移植後 2 週間から 4 週間にかけて約半数の患者で認められた。CMV や EBV の再活性化とは異なる感染パターンであり、再活性化にかかわる宿主側因子も異なっている可能性が示唆された。患者背景との関連性を解析した結果、性別には関連はなく、原疾患（悪性腫瘍 vs 非悪性腫瘍）は EBV と HHV-6 感染に関連性があった。ドナーソースは HHV-6 感染と関連が認められ、HLA マッチングについては EBV 感染との関連性が確認された。

A. 研究目的

移植後の HHV-6 感染について、これまでの研究成績から移植後 2 週間から 4 週間に約半数の患者でウイルスの再活性化が認められ、発熱、発疹、肝機能障害、骨髄抑制、脳炎など様々な臨床像への関与が示唆されている。特に最近では、臓器移植患者における HHV-6 脳炎が辺縁系脳炎の臨床経過を示す場合が多く注目されている。しかしながら、このような患者における HHV-6 再活性化のメカニズムは不明であり、初年度の研究では特にサイトカインとの関連性を明らかにすることを目的とした。さらに、2 年目以降は初年度の研究成績を踏まえ、HHV-6 以外の移植後ヘルペスウイルス感染症として重要な、CMV、EBV についても同様の解析を行うこと、さらにその様な解析には微量の臨床検体（血清）で多数のサイトカインを包括的に測定することが必要となるため、フローサイトメーターを用いた Cytometric Beads Array (CBA) 法によるサイトカイン測定系の確立を目指した。最終年度は、種々の宿主側要因（拒絶反応、GVHD、他の感染症など）が

サイトカイン合成にも関与すると考えられ、HHV-6 再活性化のメカニズム解明においても総合的な解析が必要と考えられたため、CMV、EBV、HHV-6 の再活性化とこれら宿主側要因との関連性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 平成 18 年度研究

小児造血幹細胞移植（名古屋大学小児科）、成人肝移植（京都大学移植外科）患者から、移植後 1 週間間隔で末梢血を採取。ウイルス分離、抗体測定、リアルタイム PCR 法による血漿中ウイルス DNA 検索を実施。HHV-6 再活性化の頻度、時期を決定した。さらに経時的（造血幹細胞移植は移植後 1 週、2 週、3 週、4 週；肝移植は移植後 2 週、4 週、8 週）に採取した血漿を用いて、血漿中サイトカイン（IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ ）濃度を ELISA 法により測定した。尚、保護者あるいは患者に対するインフォームドコンセントの後、これらの検体採取を実施した。

2) 平成 19、20 年度研究

対象は名古屋大学小児科、名古屋第一赤十字病院小児科にて造血幹細胞移植を受けた小児51名(男児:28例、女児:23例、平均年齢:8±5.4歳)。患児の背景(原疾患、ドナーグラフト種類、HLAタイピング)についてはカルテを基に後方視的に調べた。全血200μlからDNAを抽出し、リアルタイムPCR法にてEBV、CMV、HHV-6 DNA量を測定。HHV-6についてはウイルス分離、抗体測定も行った。EBVは1000コピー/μg DNA、CMVは100コピー/μg DNA、HHV-6は10コピー/μg DNAを感染ありと規定しウイルス再活性化状況を解析。血清中サイトカインについては6種類(IL-8, IL-18, IL-6, IL-10, TNF-α, IL-12p70)をCytometric Beads Arrayにて測定した。

評価項目は、①移植後ウイルスDNA量の推移、感染頻度の比較、②性別、③原疾患(悪性腫瘍 vs 非悪性腫瘍)、④移植種類(臍帯血移植 vs 血縁者間骨髄移植 vs 非血縁者間骨髄移植)、⑤HLAマッチング(HLAマッチ vs HLA mismatch)。統計学的解析はMann-Whitney U検定、あるいはKruskal-Wallis検定を用いて行い、累積感染率比較はLogrank検定で行った。

尚、保護者あるいは患者に対するインフォームドコンセントの後、これらの検体採取を実施した。

C. 研究結果

1) 平成18年度研究

a) 造血幹細胞移植: 24例の造血幹細胞移植患者中14例でHHV-6の再活性化が確認された。再活性化例の中で9例では、移植後2~3週間頃に血中からHHV-6が分離された。移植後1週、2週、4週の3つの時期において、HHV-6再活性化群の血漿中IL-6濃度が有意に高かった(Figure 1)。また、移植後2週間後において、HHV-6再活性化群のTNF-α値が有意に高値を示した(Figure 2)。IL-1β、IFN-γは検出例が少なく有意差は認められなかった。

b) 生体肝移植: 67例中HHV-6分離例は4例、血漿中HHV-6 DNA陽性例は15例、有意な抗体上昇が確認された症例が19例で、いずれか一項目が陽性でHHV-6再活性化と認められたのは26例だった。HHV-6再活性化のリスクファクターとしては、HBVあるいはHCVキャリアーであることが挙げられた。基礎疾患、血液型適合性については関連がなかった。さらに、HHV-6再活性化群と非再活性化群間で生存曲線を比較すると、HHV-6再活性化群で有意に生存率が低かった。血漿中サイトカイン濃度を解析した結果、HHV-6ウイルス血症を認めた症例(ウイルス分離陽性例)において、移

植後4週間目のIL-6、TNF-α濃度が有意に高かった(Figure 3)。また、HHV-6再活性化群と非再活性化群との比較では、移植後4週間目のTNF-α濃度が有意に高値を示した(Figure 4)。

2) 平成19、20年度研究

ウイルスDNA量を基準として各ウイルス再活性化状況を解析した結果、HHV-6についてはこれまで同様移植後2週から3週に再活性化のピークを認めたが(ウイルスDNA量とウイルス感染頻度共に)、EBV、CMVについては明らかなピークは認められなかった。3種類のウイルスとも、移植後約2ヶ月間にほぼ半数の患児で再活性化が認められた(Figure 5)。性別により各ウイルスの再活性化頻度に差はなかった。原疾患と再活性化の頻度について解析した結果、EBVは非悪性腫瘍群で有意に再活性化の頻度が高く(Figure 6)、HHV-6については悪性腫瘍群で有意に高頻度だった(Figure 7)。ドナーソースとの種類については、HHV-6感染のみが臍帯血移植群、非血縁群、血縁群の順に高頻度であったが(Figure 8)、他の2種類のウイルスではそのような傾向は認められなかった。HLAタイピングについての解析では、EBV感染が mismatch 群で有意に高頻度(Figure 9)、CMVとHHV-6については有意な相関はなかった。

これらの成績を総合すると、①性別は3種類のウイルス再活性化には関連なし。②基礎疾患はEBV再活性化とHHV-6再活性化に関連があり、EBV再活性化は非悪性腫瘍群で再活性化頻度が高かったのに対し、HHV-6は悪性腫瘍群で再活性化の頻度が高く、この二つのウイルスで全く逆の結果となった。③ドナーソースについては、HHV-6再活性化のみに関連性があり、臍帯血移植患者で有意に高値を示した。④HLAマッチングはEBV再活性化にのみ関連性があり、 mismatch 患者で有意に高値を示した。

Figure 1. 造血幹細胞移植後IL-6濃度の推移(pg/ml) 実線: 感染あり、破線: 感染なし

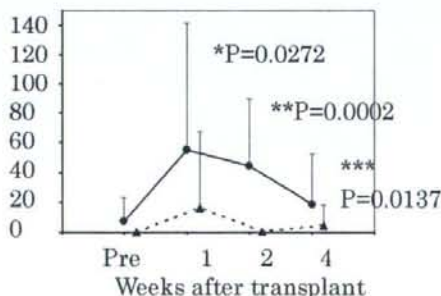


Figure 2.造血幹細胞移植後 TNF- α の推移 (pg/ml) 実線：感染あり、破線：感染なし

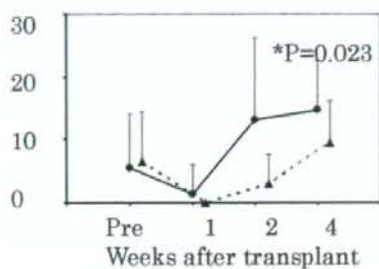


Figure 3.成人肝移植後 IL-6 の推移 (pg/ml) 実線：感染あり、破線：感染なし

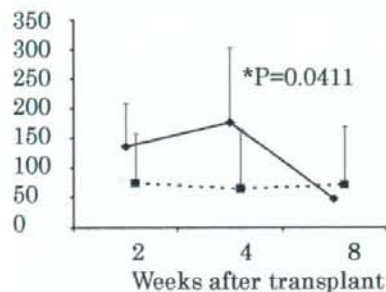


Figure 4.成人肝移植後 TNF- α の推移 (pg/ml) 実線：感染あり、破線：感染なし

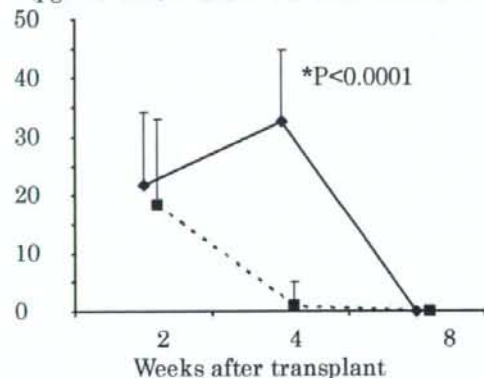


Figure 5.造血幹細胞移植後の累積感染率の推移 (緑：EBV、青：CMV、赤：HHV-6) (%)

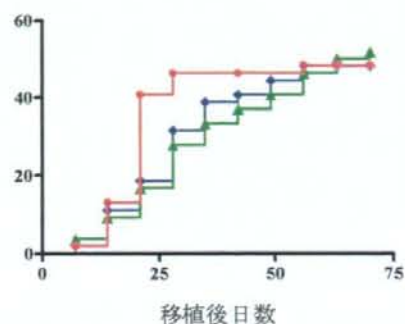


Figure 6.原疾患による EBV 累積感染率の比較 (青：悪性腫瘍群、赤：非悪性腫瘍群) (%)

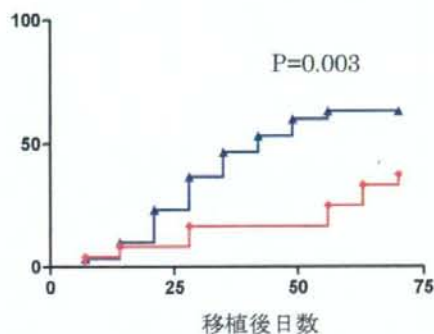


Figure 7.原疾患による HHV-6 感染率の比較 (青：悪性腫瘍群、赤：非悪性腫瘍群) (%)

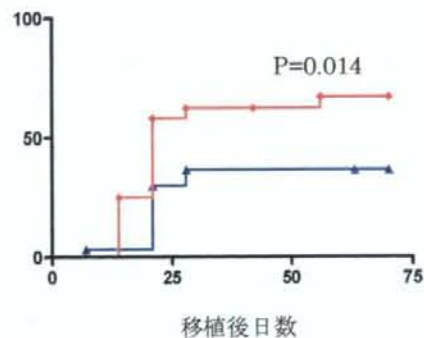


Figure 8.ドナーソースによる HHV-6 感染の比較 (緑:臍帯血移植、赤:非血縁、青:血縁) (%)

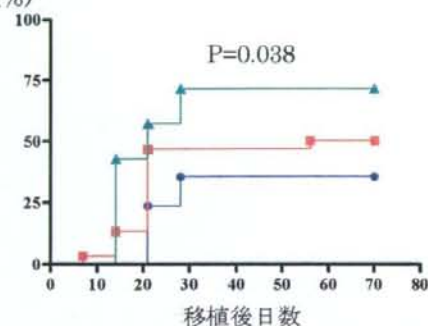
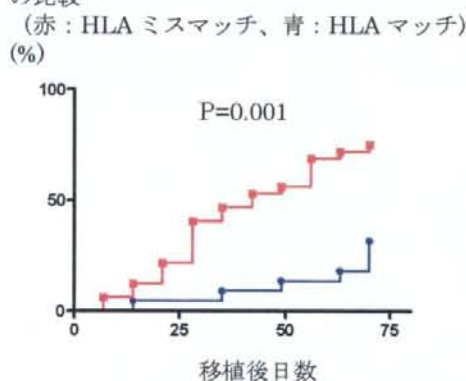


Figure 9.HLA マッチングによる EBV 感染率の比較 (赤:HLA ミスマッチ、青:HLA マッチ) (%)



D. 考察

平成 18 年度の研究結果から、HHV-6 の再活性化時期、あるいはその前の血漿中炎症性サイトカイン濃度 (IL-6、TNF- α) がウイルス再活性化群で有意に高かったことから、これらサイトカインが臓器移植患者における HHV-6 再活性化に重要な役割を果たしていることが示唆された。炎症性サイトカイン合成亢進が、宿主に潜伏感染している HHV-6 を再活性化する可能性、さらには再活性化した HHV-6 によりこれらのサイトカイン合成が促進され、それが宿主側の様々な病態形成 (acute GVHD や拒絶反応の助長など) に関与している可能性が考えられる。

引き続いて行った 19 年、20 年度の研究結果からは、同じヘルペスウイルスでもそれぞれのウイルスで再活性化にかかわる因子が異なることが示唆された。臍帯血移植は、ドナーグラフトが免疫学的にナイーブなため感染の頻度が増すと考えられていたが、今回の解析では EBV、CMV 感染のリスク因子とはならなかつ

た。各ウイルス間で、感染制御にかかわる宿主免疫機構が微妙に異なる可能性が考えられる。

今回の解析は単変量解析であり、今後有意な関連性が認められた因子間の相互関係を考慮し多変量解析を進める必要がある。EBV 感染が HLA ミスマッチ群で有意に高値を示したが、これには前処置方法の相違が影響している可能性が考えられる。そのためには今後さらなる症例の蓄積を進めるとともに、今回解析した因子以外に ATG 使用歴 (T 細胞機能抑制) や放射線照射歴などの他の因子についても解析を進めてゆきたい。

E. 結論

1) 平成 18 年度研究

造血幹細胞移植患者、肝移植患者共に HHV-6 の再活性化は移植後 2 週間から 4 週間にかけて約半数の患者で認められた。患者をそれぞれ HHV-6 感染群、非感染群に分け両群間でサイトカイン濃度を比較した。その結果、2 週目から 4 週目にかけて、HHV-6 再活性化群において TNF- α 、IL-6 の濃度が高かった。よって、これら移植患者における HHV-6 再活性化に炎症性サイトカインが重要な役割を果たしていることが示唆された。また、このようなサイトカイン合成の亢進が患者の臨床像の形成にも関連している可能性が考えられる。

2) 平成 19 年度、20 年度研究

造血幹細胞移植患者での HHV-6 の再活性化は移植後 2 週間から 4 週間にかけて約半数の患者で認められた。CMV や EBV の再活性化とは異なる感染パターンであり、再活性化にかかわる宿主側因子も異なっている可能性が示唆された。患者背景との関連性を解析した結果、性別には関連はなく、原疾患 (悪性腫瘍 vs 非悪性腫瘍) は EBV と HHV-6 感染と関連性があった。ドナーソースは HHV-6 感染と関連が認められ、HLA マッチングについては EBV 感染との関連性が確認された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Human herpesvirus 6 infection in adult living related liver transplant recipients. Ohashi M, Sugata K, Ihira M, Asano Y, Egawa H, Takada Y, Uemoto S, Yoshikawa T. Liver Transplant 2008 14:100-9.
- Elevated serum cytokine levels are associated with human herpesvirus 6 reactivation in hematopoietic stem cell transplantation recipients. Fujita A, Ihira M, Suzuki R, Enomoto Y, Sugiyama H, Suga S, Asano Y, Yagasaki H, Kojima S,

Matsumoto K, Kato K, Yoshikawa T. J Infect. 2008 ; 57:241-8.

2.学会発表

5th International Conference on HHV-6 and 7 (Barcelona, Spain) ならびに 31st International Herpesvirus Workshop にて発表

45th Annual Meeting of the IDSA, San Diego, CA にて発表

H.知的財産権の出願・登録状況
該当せず

臓器移植や悪性腫瘍による免疫低下状態で発生するウイルス感染症の予防と
治療に関する研究

研究分担者：長谷川秀樹（国立感染症研究所、感染病理部）

研究協力者：荒尾雄二郎（岡山大学）、相内章（国立感染症研究所）

研究要旨：臓器移植や悪性腫瘍に伴った免疫低下状態においては健常な状態では問題にならない病原微生物により重篤な感染症を発症する事がある。特に健常な宿主に感染し潜伏するウイルスは悪性腫瘍による免疫低下に伴って再活性化し致死的な感染症を起こすことがある。本研究において悪性腫瘍にともなう免疫低下を起こす成人 T 細胞性白血病マウスモデルを構築し、白血病発症に伴う免疫低下時に HSV-1 の再活性化をモニターし、免疫応答の変化を解析することを目的とした。その結果、HSV-1 潜伏感染状態で白血病を発症することでマウスの生存率は著しく低下し、HSV-1 に対する血清 IgG 応答が低下していることが明らかになった。

A. 研究目的

悪性腫瘍に伴った免疫低下状態におけるウイルス感染症の発症メカニズム及び研究する為には動物を用いた *in vivo* での実験が必須である。本実験においてヒトでの病態を反映したモデル動物の作製とそのウイルス感染実験への応用を目的とし免疫低下を伴う事が広く知られている成人 T 細胞白血病のモデル動物の作製を行った。悪性腫瘍に伴う免疫低下状態での HSV の再活性化を、より臨床像に近い形で再現できる可能性がある。このモデルマウスを使用した HSV-1 潜伏感染状態での ATLL 発症に伴う HSV-1 の再活性化と免疫応答の変化を解析することを目的とした。

B. 研究方法

1. 動物実験

すべての動物実験は国立感染症研究所実験動物委員会の承認の元に行われた。C57BL/6 マウス（オリエンタル酵母）を用いてトランスジェニックマウスを作製した。白血病の自然発症までに一年以上を有するが、発症したマウスから精製した白血病細胞（mATL 細胞）を移植することで早期に発症させることができる。

2. プラスミドとトランスジェニックマウスの作製

トランスジェニックマウスは C57BL/6 を用い標準の方法に従い作製した。挿入遺伝子で

ある *plck-Tax* は HTLV-I Tax の配列を PCR 法により増幅し *lck* 近位プロモーターにより挿入遺伝子を発現するベクター-p1017 の制限酵素 *Bam*HI サイトに挿入した。 *plck-Tax* プラスミドを *Not* I で直鎖化し 6.3 kb の遺伝子断片を挿入した。遺伝子挿入の前には Qiaex gel extraction kit (Qiagen, CA) を用いて精製した。

3. 病理組織学的解析と免疫組織染色

遺伝子挿入が確認されたマウスを経時的に病理組織学的に解析した。検体は緩衝ホルマリンで固定後パラフィンで包埋し薄切後、H&E 染色及グルコット染色を行った。また、抗 CD3 抗体を用いて免疫組織染色を行った。末梢血の塗抹標本はギムザ染色を行った。

4. ウイルスと細胞

単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) は Glasgow 17Syn をブランク精製法にて精製した後用いた。ブランク精製法及びウイルス価測定には Vero 細胞をもちいた。mATL 細胞は、自然発症した Tax Tg マウスの脾臓から精製したのちに、NOD-SCID マウスの腹腔内へ移植することで増殖後、再度精製し使用時まで凍結保存した。

5. ウイルス感染と mATL 細胞の投与

一匹あたり 5×10^6 pfu の Glasgow 17Syn を経鼻ルートで感染させた。片鼻 2μ l で両穴から感染を行った。約一ヵ月後に mATL 細胞を一匹あたり 10^6 細胞で腹腔内に接種した。その後観察を続け生存曲線を作成した。明らかに瀕

死の場合は、安楽殺後に血清、鼻腔洗浄液、および病理切片作製のため各臓器を採取した。mATL 細胞接種後二ヵ月後に、観察を打ち切り全マウスに関して安楽殺を行い、サンプルを回収した。

6. 鼻腔洗浄液中 HSV-1 ウイルス価の測定

マウスから回収した鼻腔洗浄液中のウイルス価は、Vero 細胞を用いたブランクアッセイにて測定した。鼻腔洗浄液の Vero 細胞への吸着操作を一時間行い、その後寒天含有培地を重層し培養した。二日後に形成されるブランク数をカウントした。

7. HSV-1 に対する抗体応答

HSV-1 に対する鼻腔洗浄液中 IgA、および血清中 IgG 抗体応答を ELISA にて測定した。抗原として、Glasgow 17Syn を感染させた Vero 細胞を界面活性剤添加緩衝溶液で破碎したライゼートを用いた。

C. 結果

1. HTLV-1 tax 遺伝子トランスジェニックマウス

HTLV-1Tax 遺伝子を発達中の胸腺細胞及び T 細胞で発現させる目的で *lck* 近位プロモーターにより発現する発現ベクター-p1017 を用いた。マウスへの遺伝子の挿入は尻尾から得られたゲノム DNA を用いたサザンブロットにより確認された。挿入遺伝子の組み込まれた位置はゲノムウオーキングにより同定された。それによると遺伝子は 4 番染色体の A2 領域に組み込まれた事が確認された。マウスゲノム

のデータベース解析によりこの領域には既知の遺伝子は存在しなかった。得られた tax トランスジェニックマウスは生後10ヶ月～23ヶ月経過した後に肝脾腫、リンパ節腫脹、腸間膜腫瘍を発症し、更には白血病を発症した。組織学的には盛んな分裂像を伴う diffuse large-cell lymphoma の像を呈し腫瘍細胞は肝臓、脾臓、肺、腎臓、皮膚への浸潤がみられた。白血化した個体の末梢血中に見られる白血病細胞は核に深い切り込みのくびれを持つ ATLL に特徴的ないわゆる "flower cell" 様の細胞であった。

2、白血病発症に伴う免疫低下

HTLV-1 tax トランスジェニックマウスのうち白血病を発症した個体では肺に泡沫状の物質を入れる像が H&E 染色でみられた。本病態はグルコト染色により免疫能の低下により肺に発症した *P. jiroveci* (カリニ) による日和見感染であることが判明した。マウスにおける本病態はヒトでの ATLL 発症時の免疫不全状態を反映している。白血病発症に伴う免疫低下のメカニズムを理解する為 tax の遺伝子導入で発症する白血病の細胞学的特長を各種細胞表面マーカーを使ってフローサイトメトリーで解析を行った。その結果トランスジェニックマウスに発症した白血病リンパ腫細胞は細胞質内 CD3 陽性、CD4、CD8 共に陰性の Pre-T 細胞由来の腫瘍であった。その他、ATLL で強発現している IL-2 receptor α 鎖 (CD25) や活性化マーカーの CD69 も陽性である。

3、HSV-1 特異的抗体応答の検討

採取した鼻腔洗浄液および血清中の HSV-1 (Glasgow 17Syn 株) 特異的 IgA、IgG の産生を ELISA 法にて、鼻腔洗浄液中のウイルス価に関して Vero 細胞を用いたブランクアッセイにより測定した。ATL 細胞投与群 (A 群)・非投与両群 (B 群) とともに、鼻腔洗浄液および血清中の IgA 産生は全く認められなかった。また血清中 IgG の産生は、B 群では非常に高いのに対し、A 群では低く抑えられていた。これは ATLL 発症に伴う免疫系の破綻に伴うものと考えられる。感染ルートである鼻腔の洗浄液を用いたブランクアッセイでは再活性化 HSV-1 を検出することができなかった。

4、病理切片の解析

ATL 細胞投与群 (A 群) および非投与両群 (B 群) に関して、H&E 染色と抗 HSV 抗体を用いた免疫組織染色を行った。A 群では脾臓に ATLL 特有の花弁型の核構造を持った白血病細胞の浸潤が見られたのに対し、B 群の脾臓は正常であった。また、HSV-1 が潜伏感染する三叉神経節を比較したところ、マウス A では萎縮した神経細胞がみられるのに対し、マウス Y では正常であった。しかしながら、A 群 B 群共に HSV-1 抗原の検出はできず、HSV-1 が再活性化を検出することはできなかった。

D. 考察

臓器移植及び悪性腫瘍に伴う免疫低下状態になる患者の数は移植医療および悪性腫瘍に対する医療の発達と共に今後ますます増える事が予想される。それらの状態では健常状態

では問題にならない病原微生物による感染症が時として致死的な感染症をもたらす事になる。白血病に伴う免疫低下は白血病自身の一つの症状の表れであると同時に治療としての骨髄移植を行う際、放射線照射や免疫抑制剤による治療でも起こり、日和見感染症、潜伏ウイルスの再活性化のコントロールが予後を大きく左右する。今回 HTLV-1 の tax 遺伝子を T 細胞特異的に発現させる事によりヒトでの成人 T 細胞性白血病 (ATL) の病態を反映したモデル動物の作製に成功した。成人 T 細胞性白血病 (ATL) においては多くの場合発症と共に免疫低下をきたし、致死的な日和見感染症を起こすことが知られている。その状況下での潜伏感染した HSV-1 は再活性化により症状が重症化し、アシクロビルによる治療を繰り返す過程でウイルス性チミジンリン酸化酵素活性の欠損による薬剤耐性 HSV の出現が問題とされている。この薬剤耐性 HSV の出現メカニズムを明らかにし、予防法・治療法を開発することが求められている。我々は、HSV-1 の再活性化の *in vivo* 実験モデルとして ATLL 発症 Tg マウスの利用を考えた。ATLL 発症に伴い HSV-1 特異的な IgG 抗体応答は低下することが明らかになり、最終的にマウスの生存率も低下することが示された。本モデルでは発症までは正常な免疫細胞が存在することから、HSV-1 の再活性化時に低下する免疫系の細胞の同定が期待できる。

E. 結論

HTLV-1 がコードする発癌に関与する tax 遺伝子をマウスの T 細胞のみで発現するプロ

モーター下に挿入し、トランスジェニックマウスを作製する事でヒトの病態を反映した成人 T 細胞性白血病のマウスモデルを作製し、白血病発症に伴った免疫低下状態について解析を行った。本モデルマウスの白血病発症に伴った免疫低下状態はモデル動物として悪性腫瘍発症時のウイルス感染症の予防法開発のためモデル動物となると考えられる。またこの動物を用い ATLL 発症に伴う HSV-1 の再活性化と免疫応答の変化に関する解析を行った。ATLL 発症に伴い、潜伏感染している HSV-1 に対する抗体応答が低下することが明らかになった。ATLL 発症モデルマウスの利用は、HSV-1 再活性化メカニズム解明に関して有用なツールになり得る可能性を見出した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Hasegawa H, Sawa H, Lewis M, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katano H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima K, Hall WW. Development of Thymus-Derived T-cell Leukemia/Lymphoma in Mice Transgenic for the Tax gene of Human T-Lymphotropic Virus Type-1 (HTLV-I). *Nature Medicine* 2006 Apr;12(4):466-472.
2. Saijo M., Ami Y., Suzaki Y., Nagata N.,

- Iwata N., Hasegawa H., Ogata M., Fukushi S., Mizutani T., Sata T, Kurata T., Kurane I, Morikawa S. Monkeypox Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, that lacks expression of *B5R* membrane protein protects monkeys from monkeypox *J.Virol* 2006 Jun;80(11):5179-88.
3. Maeda M, Sawa H, Tobiume M, Tokunaga K, Hasegawa H, Ichinohe T, Sata T, Moriyama M, Hall WW, Kurata T, Takahashi H. Tristetraprolin inhibits HIV-1 production by binding to genomic RNA. *Microbes and Infection*. 2006 Sep;8(11):2647-56.
 4. Hasegawa H*, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T Development of a mucosal vaccine for influenza viruses: preparation for a potential influenza pandemic. *Expert Review of Vaccines*, April 2007, Vol. 6, No. 2, Pages 193-201.
 5. Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura SI, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H*. Prophylactic effects of chitin microparticles (CMP) on highly pathogenic H5N1 influenza virus. *J Med Virol*. 2007 Jun;79(6):811-819
 6. Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T and Hasegawa H* Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes and Infection* 2007 Sep;9(11):1333-40.
 7. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H., Fukushi S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F, Morikawa S, Sata T. Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. *Am J Pathol*. 2008 Jun;172(6):1625-37.
 8. Kamijuku H, Nagata Y, Jiang X, Ichinohe T, Tashiro T, Mori K, Taniguchi M, Hase K, Ohno H, Shimaoka T, Yonehara S, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H*, Seino KI. Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses *Mucosal Immunol*. 2008 May;1(3):208-18. Epub 2008 Mar 5.
 9. Ichinohe T, Iwasaki A, Hasegawa H. Innate sensors of influenza virus: clues to developing better intranasal vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2008 Nov;7(9):1435-45.
 10. Hasegawa H. Ichinohe T, Aina A, Tamura S, Kurata T. Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus. *Therapeutic and*

Clinical Risk Management 2009 in press

11. Takahashi Y, Hasegawa H, Hara Y, Ato M, Ninomiya A, Takagi H, Odagiri T, Sata T, Tashiro M, Kobayashi K. Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14)-inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J Infect Dis.* *in press*

学会発表

1. 長谷川秀樹、澤洋文、大場靖子、片野晴隆、佐多徹太郎、倉田毅、長嶋和郎 成人T細胞白血病(ATL)モデルマウスの解析 第95回日本病理学会学術集会 平成18年4月30日-5月2日 東京
2. 川口晶、一戸猛史、澤洋文、岡田義昭、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、William W. Hall、長谷川 秀樹成人T細胞白血病リンパ腫(ATLL)モデルマウスにおけるケモカインの発現とその機能解析 第54回日本ウイルス学会学術集会 平成18年11月19日-21日 名古屋
3. Kawaguchi A, Orba Y, Sawa H, Sata T, Hall WW, Hasegawa H, Adult T cell leukemia/lymphoma(ATLL): Exploitation of transgenic mouse model to understand disease pathogenesis and for the development of rational

therapeutics. 13th International Conference on Human Retrovirology 21th-25th May 2008 Hakone

4. 長谷川秀樹、一戸猛志、相内章、田村慎一、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 キノコ類菌糸体抽出物を用いた経鼻粘膜ワクチンによる粘膜免疫増強作用とインフルエンザウイルスの感染防御 第56回日本ウイルス学会総会(2008年10月岡山)。
5. 相内章、一戸猛志、田村慎一、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 経鼻ワクチンにおけるDectin-1リガンドによるアジュバント効果の亢進 第56回日本ウイルス学会総会(2008年10月岡山)。
6. 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、富士秀悦、西條政幸、森川茂、佐藤由子、佐多徹太郎 SARS-CoV感染動物モデルを用いたSARS発症機序の解明と治療法の検討第56回日本ウイルス学会総会(2008年10月岡山)。
7. 長谷川秀樹、一戸猛志、網康至、永田典代、田村慎一、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンのカニクイザルを用いた効果検討第12回日本ワクチン学会学術集会(2008年11月熊)
- H. 知的財産権の出願、登録状況
なし

臓器移植や悪性腫瘍による免疫低下状態で発生するウイルス感染症の予防と治療に関する研究:ウイルス感染症の発生機序の解明と、効果的な予防策に関する研究「ヒトヘルペスウイルス 6、7とサイトメガロウイルスの潜伏感染・再活性化による疾患の発症機序の解明と予防」

研究分担者 近藤 一博 (東京慈恵会医科大学ウイルス学講座 教授)

研究協力者: 伊藤 寿記 (大阪大学大学院医学系研究科・補完代替医学講座 教授)

研究要旨 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)からなる β -ヘルペスウイルスの再活性化を予防する方法を開発するために、i) 再活性化によって唾液中に放出されるウイルス DNA を Real-time PCR 法で定量する方法を開発し、再活性化と生体の状態との関係を詳細に把握した。この結果、ii) 再活性化には、労働や抗癌剤の投与によるストレス・疲労が重要な因子であることを見出し、疲労現象の中核をなす分子である疲労因子を同定した。

また、HHV-6 の中枢神経病原性遺伝子 SITH-1 を同定し、HHV-6 脳症の発症機構の一端を明らかにした。治療法の開発では、iii) 抗癌剤の投与による HHV-6 再活性化が、Active Hexose Correlated Compound (AHCC)などの補完・代替医療薬によって予防できることを見出した。また、この分子機構も明らかにし、 β -ヘルペスウイルス再活性化予防法の開発に向けての基盤的知見を得ることができた。

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。

特に、HCMV の免疫低下状態の患者における再活性化は、重篤な間質性肺炎や網膜炎などを生じ、時には致死性である。また、HHV-6 の再活性化は、脳炎・脳症を生じ、精神疾患様の重篤な後遺症を残すことが最近注目されている。

3 種類の β -ヘルペスウイルスは、ほぼ同時期に再活性化を生じ、共通のメカニズムによって再活性化すると考えられている。

しかし、 β -ヘルペスウイルスのみならずへ

ルペスウイルスの潜伏感染と再活性化のメカニズムは未だ充分に明らかにされておらず、再活性化を予防する手段も開発されていない。

本研究では、このような問題点を解決し、 β -ヘルペスウイルス再活性化を予防する方法を開発するために、i) 再活性化の新しい診断法を開発すること、ii) 再活性化の機序の解明と再活性化促進因子の同定を行うこと、及びこれらの成果をもとに、iii) 再活性化を予防する方法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

1. β -ヘルペスウイルス再活性化の診断法の開発(唾液中におけるウイルス DNA の定量法の確立)

これらのウイルスの再活性化では、唾液中にウイルスが放出されることを利用し、臓器移植や悪性腫瘍の患者の、唾液を用いた再活性化診断法の開発を行った。また、様々な負荷による

患者および健常人における再活性化の検討を行い、再活性化を促進する宿主側の要因を解明した。

方法としては、多数の唾液検体中の再活性化ウイルスの定量を行うために、自動 DNA 精製装置 EZ1(QIAGEN 社製)を用いた、唾液検体からのウイルス DNA 精製条件を調整し、多数の検体からのウイルス DNA 精製を可能とした。

再活性化ウイルスの定量のためには、各種 β -ヘルペスウイルスに対する Real-time PCR 法による測定を行った。このために、Real-time PCR 法のプライマー・プローブの改良を行なった。コントロール実験として、健常人における唾液中への HHV-6 と HHV-7 の放出量の測定を行ない、感度の確認を行なった。

我々は、これまでに疲労が HHV-6 や HHV-7 の再活性化の大きな要因となることを、半定量的な PCR 法によって見出している。Real-time PCR 法による定量的な測定により、疲労がどの程度 β -ヘルペスウイルス再活性化に寄与するかの検討も行った。また、悪性腫瘍患者などの検討を加えることにより、より詳細に患者側の因子の検討もおこなった。

2. β -ヘルペスウイルス再活性化の分子機構の解明と誘導分子およびシグナル伝達経路の同定

上記の研究により、HHV-6 の再活性化を強く誘導する原因として、労働や抗癌剤の投与など、疲労を誘導する因子が重要であることを見出した(図 1)。この現象をもとに HHV-6 や CMV の再活性化を誘導するシグナル伝達経路や分子の同定を目標とした。再活性化が疲労や抗癌剤の投与といった、ストレスに関係する現象によって誘導されることから、候補となるシグナル伝達経路は、ストレス応答経路に属するものと考えられた。しかし、ストレス応答経路は、非常に種類が多いため、これをしらみ潰しに検討することは無理であった。我々はこれまでに、HHV-6 と CMV が潜伏感染時に発現する遺伝子(潜伏感染遺伝子)が、前初期遺伝子 IE1 と IE2 の open reading frame と、その前に存在する small upstream open reading frame (suORF) を持つことを見出した。また、我々は HHV-6 の再活性化の初期には、前初期遺伝子 IE1/IE2 の mRNA が発現するのではなく、潜伏感染遺伝子の IE1/IE2 の ORF から IE1/IE2 のタンパクが合成され、

ウイルス増殖が開始されることも見出した(図 2)。

この知見をヒントに、このような現象に関係する分子の mRNA の量的変化を鋭敏に測定できる Real-time PCR プライマーおよび TaqMan プローブを作成した。また、疲労による分子の変化を様々な臓器で捉えるために、マウスモデルを利用し、様々な臓器における候補分子の検討を行なった。

マウスに疲労を与える方法は、2 時間程度の水泳、または、ケージに薄く水を張ることによって 1 夜程度の睡眠不足を誘導することによって行なった(図 3)。

これらはいずれも、ヒトが通常の労働において、しばしば経験する程度の疲労負荷であり、研究が動物を虐待せずに行なえるとともに、ヒトの自然な生理的状態を把握できるものと考えられた。

3. HHV-6 の中枢神経毒性遺伝子の同定

HHV-6 は、臓器移植患者での再活性化が生じた際に、重篤な脳炎を生じる。さらに、脳炎が収束し、髄液中にウイルス産生が確認されなくなった後も、精神症状などの重篤な後遺症を残す。我々は、この精神疾患様の後遺症が HHV-6 の増加した潜伏感染細胞によるのではないかと考え、中枢神経毒性をもつ潜伏感染遺伝子の検索を行った。

さらに、この潜伏感染遺伝子の機能を検討するために、HHV-6 の潜伏感染細胞であるグリア細胞で潜伏感染遺伝子を発現させ、細胞機能に対する影響を観察した。さらに、この潜伏感染遺伝子を、アデノウイルスベクターを用いてマウスのグリア細胞に発現させ、マウスの行動異常を観察した。

4. HHV-6、HCMV 再活性化予防法の開発

近年、様々な疾患の予防や疾患治療時の QOL の改善のために、補完・代替医療薬が用いられている。本研究では、大阪大学医学系研究科・補完代替医学講座の伊藤寿記教授と共同で、抗癌剤の投与を受けている患者における β -ヘルペスウイルス再活性化と、補完・代替医療薬の投与との関係について検討した。 β -ヘルペスウイルスの再活性化は、唾液中におけるウイルス DNA の Real-time PCR 法による定量的な測定によって行った。

また、この研究によって Active Hexose Correlated Compound (AHCC) が、抗癌剤投

与によるHHV-6再活性化を抑制することが判ったので、この抑制の分子機構も検討した。

方法としては、これが実際に再活性化誘導因子の抑制によって、効果を発揮しているかどうかを検討するために、AHCCと類似の働きをもつと考えられる物質をマウスに投与し、疲労付加後の疲労因子の増加に対する影響を検討した。

AHCCは、マウスに投与するのに適当な製剤が入手できなかったので、類似の機能を有すると考えられる他の補完医療薬成分を使用した。

補完医療薬成分は、マウスに事前に腹腔内投与し、疲労負荷(不眠疲労)による、疲労因子の増加に対する影響を検討した。

(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。研究に使用する血液や臍帯血は、東京慈恵会医科大学・倫理委員会の承認を得、提供者のインフォームドコンセントを得た上で採取した。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。動物実験は、東京慈恵会医科大学・実験動物委員会の承認を得て行なった。

C. 研究結果

1. β -ヘルペスウイルス再活性化の診断法の開発(唾液中におけるウイルス DNA の定量法の確立)

HCMV, HHV-6, HHV-7はいずれも β -ヘルペスウイルス亜科に属し、共通の潜伏感染・再活性化メカニズムをもつと考えられている。我々は、再活性化時に唾液中に放出されるウイルスを Real-time PCR 法によって測定し、これらのウイルスの再活性化に必要な現象を検討した。

この結果、1週間程度の労働(残業)によるストレス・疲労の蓄積によって、HHV-6の再活性化が誘導され、休息によってこの再活性化が解

消されることが判った。臓器移植では、通常再活性化までに2~4週間を要することより、ストレス・疲労は、より直積的な再活性化因子であると考えられた(図1)。

また、これらのウイルスの再活性化機構の分子生物学的検討から、HHV-6やHCMVの再活性化には、upper open reading frame regulation (uORF regulation)が関係していることが示唆された。uORF regulationは、以前から酵母では、アミノ酸飢餓などのストレスに対する応答機構であることが知られていた機能であるが、最近、哺乳類などでもストレス応答との関係が指摘されている遺伝子発現機能である。このことから、 β -ヘルペスウイルスの再活性化は、ストレスの蓄積した疲労状態によって、直接的に誘導されることが示唆された(図2)。

図1 HHV-6再活性化の定量(労働負荷)

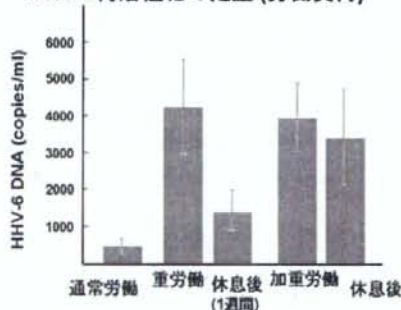


図2 HHV-6の再活性化の第一段階

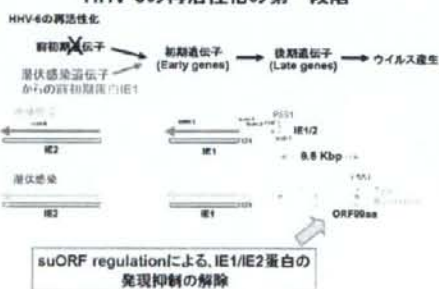


図1 労働負荷によるHHV-6の再活性化:

唾液中のHHV-6 DNA量を Real-time PCR 法で測定することによって再活性化を定量化し、ストレスの蓄積状態(疲労)との関係を検討した。通

常労働は、残業のない勤務を、重労働は、1日平均5時間程度の残業を伴う労働を、過重労働はこれにさらに当直勤務による慢性的睡眠不足が加わる勤務状態を示す。

図2 HHV-6の再活性化機構

発現を検討した結果、再活性化は、潜伏感染特異的遺伝子にコードされる IE1/IE2 の蛋白が、uORF 制御の解除によって開始されることが判った。

2. β -ヘルペスウイルス再活性化の分子機構の解明と誘導分子およびシグナル伝達経路の同定

HHV-6 や HCMV の再活性化を誘導するシグナル伝達経路や、誘導分子を同定するために、疲労マウスで増加する mRNA を検討した。HHV-6 の潜伏感染遺伝子の活性化に関わる分子を候補として、Real-time PCR 法を用いて、スクリーニングを行なった。

これまでの研究成果から、HHV-6 の再活性化の初期には、前初期遺伝子 IE1/IE2 の mRNA が発現するのではなく、潜伏感染遺伝子の IE1/IE2 の ORF から IE1/IE2 のタンパクが合成され、ウイルス増殖が開始される。このことから HHV-6 と HCMV は、uORF のストレス応答機構を利用して、前初期遺伝子タンパク IE1/IE2 を翻訳し、再活性化を生じると考えられる。この様な情報から、無数にあるストレス応答遺伝子の中の候補分子の数を、ある程度減少させることが可能であった。

スクリーニングの結果、脳、心臓、脾臓、肝臓など、過労による疾患や、過労死の原因であることが知られている臓器中で、不眠による疲労によって mRNA 量が増加する分子(疲労因子)を同定することができた。また、この分子は、HHV-6 や HCMV の潜伏感染部位である骨髄や末梢血液中においても、疲労によって増加することが判った(図4)。また、この分子は、不眠による疲労だけでなく、水泳による疲労によっても増加することが判った(図5)。

この分子は、マウスだけでなく、ヒトでもその相同分子が存在する。ヒトの疲労因子を、発現ベクターにクローニングし、ハイドロダイナミック法を用いてマウスに静中し、*in vivo* の肝臓で発現させた。この結果、コントロールとして、用いた EGFP 遺伝子ではマウスの自発運動量に変化がないのに対し、疲労因子では、顕著な自発運動量の低下が見られた(図6)。

この結果、この因子は疲労の原因や疲労感の

伝達に機能する分子であることが明らかとなった。また、この分子の機能から、HHV-6 や HCMV の再活性化因子としても機能することが判った。

図3

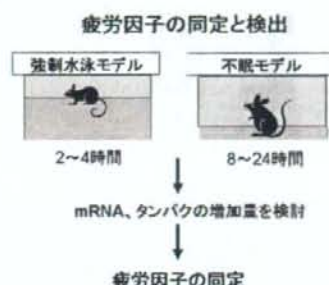


図4

不眠疲労による疲労因子の増加(マウス)

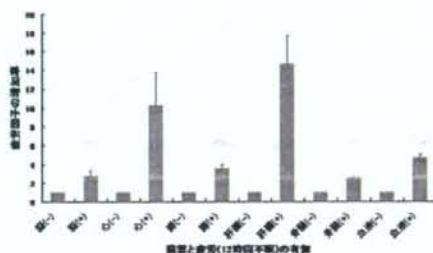


図5

疲労による疲労因子の増加(マウス)

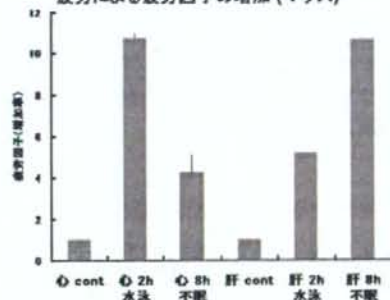


図 6

疲労因子のin vivoトランスフェクションによる自発運動の抑制

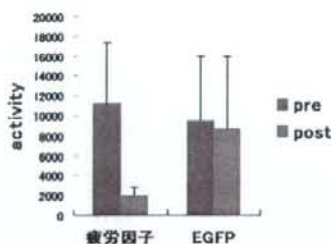


図3 疲労因子を同定するために用いた疲労動物マウスに、ヒトが通常の労働で付加される程度の疲労を与える方法。2時間程度の水泳、または、ケージに薄く水を張ることによって1夜程度の睡眠不足を誘導した。

図4 不眠疲労による各臓器における疲労因子 mRNA 量の変化

脳、心臓、膵臓、肝臓など、過労による疾患や、過労死の原因であることが知られている臓器中での、不眠疲労による疲労因子 mRNA 量の増加を検討した。

図5 不眠疲労と水泳疲労による疲労因子 mRNA 量の変化

不眠および水泳による疲労での疲労因子 mRNA 量の増加を示す。

図6 疲労因子の導入による自発運動の低下

ヒトの疲労因子とEGFPを、発現ベクターにクローニングし、ハイドロダイナミック法を用いてマウスに静中し、in vivoの肝臓で発現させた。自発運動量は、wheel running testで測定した。

3. HHV-6 の中枢神経毒性遺伝子の同定

HHV-6 脳炎・脳症の発症と関係する新規潜伏感染遺伝子タンパク Small protein encoded by the Intermediate stage Transcript of HHV-6 (SITH) -1 を同定した。このタンパクの発現は、HHV-6 の潜伏感染から再活性化に至る過程で発生する、中間状態で誘導された(図7)。

この潜伏感染タンパクは、HHV-6 の潜伏感染部位であるグリア細胞に導入すると、刺激に過敏に反応し、細胞内カルシウム濃度が異常に上昇した(図8)。グリア細胞内カルシウム濃度の異常は、様々な中枢神経疾患の原因と考えられており、この遺伝子がHHV-6 脳炎・脳症の病原遺伝子である可能性が示唆された。

また、この遺伝子を、アデノウイルスベクターを利用してマウス脳内グリア細胞で発現させると、尾懸垂テスト時の無動時間が短縮し、興奮状態になっていることが判った(図9)。尾懸垂テストは、マウスを尾で10分間つるした時にマウスの動作が停止する時間を計るもので、マウスの気分障害(うつ病、躁鬱病)の実験に使用される。

さらに、この遺伝子の mRNA は、HHV-6 脳炎で死亡した患者(2例中2例)の側頭葉から検出され、HHV-6 脳炎・脳症に特徴的な情動障害や記憶障害と関係することが示唆された。

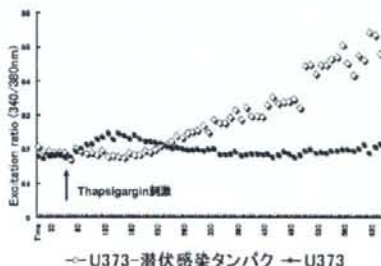
図 7

HHV-6の潜伏感染・再活性化機構



図 8

HHV-6潜伏感染タンパクによるグリア細胞内カルシウム濃度の上昇



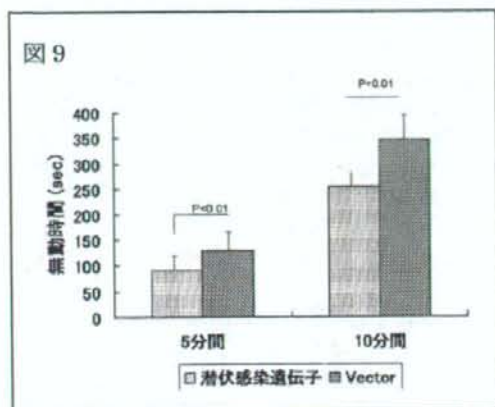


図7 HHV-6 の中枢神経病原性遺伝子 SITH-1 の誘導

HHV-6 の中枢神経毒性を生じさせる潜伏感染遺伝子タンパク Small protein encoded by the Intermediate stage Transcript of HHV-6 (SITH)・1 の発現は、HHV-6 の潜伏感染から再活性化に至る過程で発生する、中間状態で誘導される

図8 HHV-6 潜伏感染遺伝子 SITH-1 導入によるアストロサイト細胞内カルシウム濃度の上昇

HHV-6 潜伏感染遺伝子 SITH-1 をレトロウイルスベクターを用いてアストロサイト細胞株 U373 に導入し、タブシガルギン刺激による細胞内カルシウム濃度の変化を測定した。

図9 HHV-6 潜伏感染遺伝子 SITH-1 導入によるマウスの行動変化

HHV-6 潜伏感染遺伝子 SITH-1 をアデノウイルスベクターを利用してマウス脳内グリア細胞で発現させ、尾懸垂テストによって自発運動量を測定した。縦軸は、微懸垂時におけるマウスの無動時間を示す。

4. HHV-6、HCMV 再活性化予防法の開発：再活性化誘導の抑制

肺癌、膀胱癌、卵巣癌の治療のために抗癌剤の投与を受けている患者における HHV-6 の再活性化と、補完・代替医療薬 Active Hexose Correlated Compound (AHCC) による再活性化予防が可能かどうかを検討した。AHCC を投与しない場合は、抗癌剤治療の回数が増えるに連れて、HHV-6 の再活性化量の増加が観察

された。

これに対し、AHCC の投与を開始すると、再活性化を生じていた HHV-6 の放出量が次第に現象し、約3週間後には、抗癌剤の投与にも関わらず、HHV-6 の再活性化が検出されなくなる例も見られた(図10)。

患者数を14名に増やして行った検討の結果、抗癌剤の投与によって、HHV-6 は著しく再活性化することが判った。また、AHCC を抗癌剤と同時に投与すると、3~4週間後には、HHV-6 再活性化が著しく減少することが判明した(図11)。また、この結果は統計学的にも有意であった。上述したように、HCMV も HHV-6 と同様の再活性化機構を有するので、HHV-6 と同様に AHCC による再活性化予防が可能であると考えられる。

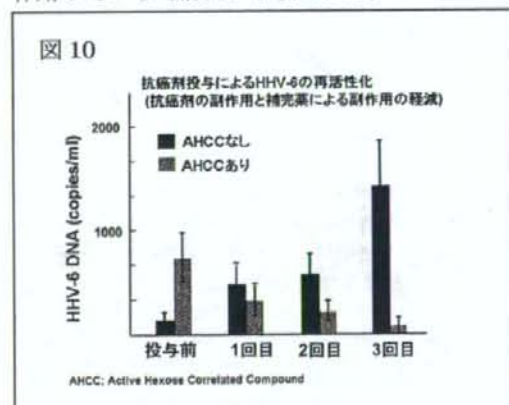
さらに、この経過中に患者の免疫学的な検査結果に変動はなく、この再活性化抑制効果は免疫以外の機構で生じていると考えられた。

その後我々は、HHV-6 や HCMV の再活性化を誘導に重要な機能を演じる、疲労因子の同定に成功したので、補完医療薬成分による疲労因子の抑制効果を検討した。

AHCC は、マウスに投与するのに適当な製剤が入手できなかったので、類似の機能を有すると考えられる他の補完医療薬成分を使用した。

補完医療薬成分は、マウスに事前に腹腔内投与し、疲労負荷(不眠疲労)による、疲労因子の増加に対する影響を検討した。

この結果、補完医療薬成分を投与したマウスでは、心臓においても、肝臓においても、不眠疲労による疲労因子の増加が抑制されていることが判明した(図12)。このことは、補完医療薬による HHV-6 再活性化の抑制効果は、補完医療薬成分による疲労因子の抑制を介して作用している可能性が示唆された。



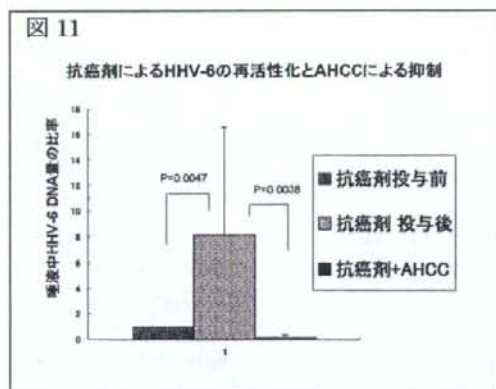


図 10 抗癌剤投与によるHHV-6の再活性化の誘導と補完・代替医療薬の投与による再活性化予防効果:

抗癌剤治療は、1クール(1週間)の投与をもって、1回の治療とカウントしている。HHV-6 DNA量は、7名の患者における平均値と標準偏差を示す。

図 11 抗癌剤投与によるHHV-6の再活性化の誘導とAHCCによる再活性化予防

14名の患者における抗癌剤投与の影響AHCCの効果をもとめた。

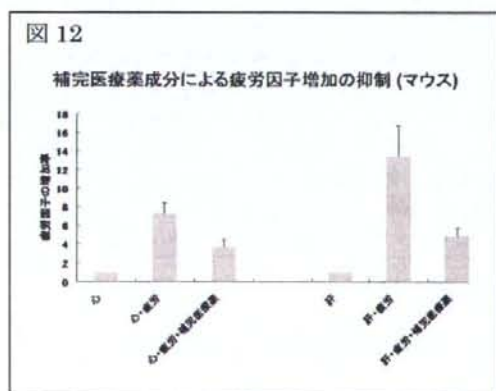


図 12 補完医療薬成分による疲労因子の抑制
補完医療薬成分をマウスに事前に投与し、疲労負荷(不眠疲労)による、疲労因子の増加に対する影響を検討した。

D. 考察

我々の「ヒトヘルペスウイルス6、7とサイトメガロウイルスの潜伏感染・再活性化による疾患の発症機序の解明と予防」という研究課題の解決のために設定した研究目標は、i) 再活性化の新しい診断法を開発すること、ii) 再活性化の機序の解明と再活性化促進因子の同定を行うこと、及びこれらの成果をもとに、iii) 再活性化を予防する方法を開発すること、であった。

i) 再活性化の新しい診断法を開発においては、HHV-6およびHHV-7の再活性化を、患者に対する侵襲性がない唾液サンプルを用いて、Real-time PCR法で定量的に測定することに成功した。また、この侵襲性がないという長所を生かして、多くの健常成人ボランティアの唾液サンプルにおいてHHV-6とHHV-7の再活性化とサンプル提供者の生活状態を検討することができた。

この結果として、HHV-6やHHV-7の再活性化には、免疫抑制よりも連続的なストレスの蓄積、即ち「疲労」がより大きな再活性化誘導因子となっていることが判明した。

また、この研究を押し進めることにより、疲労因子を同定することに成功し、これによって、これまで現象しか明らかにできていなかった、HHV-6などのβ-ヘルペスウイルスの再活性化が疲労刺激によって生じるという知見や、補完医療薬によるHHV-6再活性化の防止効果などの、メカニズムの解明を進めることができた。

また、HHV-6脳症の原因と考えられるHHV-6潜伏感染遺伝子SITH-1を同定し、この発現にも疲労や疲労因子が関係することを見出した。この結果は、実際にHHV-6再活性化による疾患を抑制する上でも有用な知見であると思われる。

今後は、疲労因子に関する研究をさらに進展させることで、β-ヘルペスウイルスの再活性化機構がさらに解明できるものと考えられる。

再活性化を予防する方法においては、補完医療薬AHCCによって抗癌剤によるHHV-6再活性化が抑制できることを見出した。さらに、補完医療薬成分が疲労因子の発現を抑制していることも見出し、補完医療薬成分が、疲労因子の抑制を介して、HHV-6再活性化を抑制していることを示した。

抗癌剤投与や移植の拒絶反応など、β-ヘルペスウイルスの再活性化を誘導する因子が、D