

200834050A

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20年度 総括・分担研究報告書

平成21年 3月

研究代表者

宮 崎 義 継

(国立感染症研究所)

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 20 年度 総括・分担研究報告書

平成 21 年 3 月

研究代表者

宮 崎 義 継

(国立感染症研究所)

平成20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

氏 名	所 属	職 名
宮崎 義継	国立感染症研究所・生物活性物質部	部長
佐多 徹太郎	国立感染症研究所・感染病理部	部長
朝長 啓造	大阪大学微生物病研究所・ウイルス免疫分野	准教授
近藤 一博	東京慈恵会医科大学医学部・ウイルス学講座	教授
山谷 睦雄	東北大学大学院医学系研究科・先進感染症予防学講座	教授
荒川 宜親	国立感染症研究所・細菌第二部	部長
和田 昭仁	国立感染症研究所・細菌第一部	室長
渋谷 和俊	東邦大学医学部・病院病理学講座	教授
竹末 芳生	兵庫医科大学・感染制御学講座	教授
河野 茂	長崎大学大学院・感染免疫学講座	教授

## 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 20 年度）・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1  
研究代表者：宮崎 義継（国立感染症研究所・生物活性物質部）
- II. 分担研究報告書
1. 難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子・・・・・・・・・・・・ 7  
研究分担者：宮崎 義継（国立感染症研究所・生物活性物質部）
2. 劇症肝炎とウイルスの関与・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 11  
研究分担者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）
3. 神経変性疾患と遅発性ウイルス感染との関連性・・・・・・・・ 15  
研究分担者：朝長 啓造（大阪大学微生物病研究所・ウイルス免疫分野）
4. 神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明・・・・・・・・ 19  
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）
5. 慢性肺気腫ないし呼吸不全とウイルス感染・・・・・・・・・・ 26  
研究分担者：山谷 睦雄（東北大学大学院医学系研究科・  
先進感染症予防学寄附講座）
6. マイコプラズマ感染と特定疾患の関連性についての研究・・・・ 36  
研究分担者：荒川 宜親（国立感染症研究所・細菌第二部）
7. 腸管スピロヘータが炎症性腸炎に及ぼす影響に関する研究・・・・ 43  
研究分担者：和田 昭仁（国立感染症研究所・細菌第一部）

8. 糸状菌吸入による肺高血圧および血管構築改変の機序に関する解析・・・・・・・・・・ 46

研究分担者：渋谷 和俊（東邦大学医学部・病院病理学講座）

9. 特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 54

研究分担者：竹末 芳生（兵庫医科大学感染制御学）

10. IgA 腎症と感染症・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 57

分担研究者：河野 茂（長崎大学大学院・感染免疫学講座）

# I. 総括研究報告書

総括研究報告書

研究代表者 宮崎義継 国立感染症研究所 生物活性物質部 部長

研究要旨： 特定疾患の原因として病原性微生物の直接的関与、または、それが引き金となる自己免疫異常を明らかにし、難病の発症予防あるいは効果的な治療法の開発に寄与することを目的として研究を行った。難治性血管炎と真菌感染、劇症肝炎とウイルスの関与、神経変性疾患と遅発性ウイルス感染との関連性、神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明、慢性肺気腫ないし呼吸不全とウイルス感染、マイコプラズマ感染と特定疾患の関連、炎症性腸炎に腸管スピロヘータ症が及ぼす影響、糸状菌吸入による肺高血圧および血管構築改変の機序、炎症性腸疾患に対する病原微生物の関与、IgA腎症など進行性腎障害と感染症、に関する研究を行った。いくつかの特定疾患に関して病原微生物との関連性が示され、一部の疾患では治療に関する知見がえられた。

A. 研究目的

特定疾患と定義される疾患の多くは原因が不明である。感染が引き金となり自己免疫疾患が惹起されたり、微生物の潜伏・持続感染、あるいはそれらの再活性化が原因となる可能性、さらには未知の病原体の関与も想定される。当研究班では臨床研究班と連携を図り、特定疾患を引き起こす病原体と発症機序を解明し、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寄与することを目的とする。

B. 研究方法

それぞれの研究目的に応じて、下記に示すように遺伝子組み換え病原体や培養細胞、動物感染モデル、臨床検体などを使用した。

1) 難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子。マウス血管炎を惹起する *Candida albicans* のマンノース転移酵素遺伝子を網羅的に破壊したマンノース構造変異株を作成した。変異株のマンノプロテインを精製し、炎症性サイトカイン誘導能を測定した。また、病

原性の指標として薬剤感受性、菌糸形成能、温度感受性を測定した。（宮崎）

2) 劇症肝炎とウイルスの関与。ウイルスを検出する目的で、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、次世代シーケンサーを用いて解析を行った。コントロールとして、メルケルポリオーマウイルス (MPV) の定量系を構築した。（佐多）

3) 神経変性疾患と遅発性ウイルス感染との関連性。ボルナウイルス (BDV) 科に属する近縁ウイルスを広く検出する技術を構築することを目的に、すべてのボルナウイルスを検出可能なPCR縮重プライマーを作製した。作製した縮重プライマーを用いて、神経疾患が疑われる動物におけるボルナウイルスの感染について検討を行った。また、BDVの病原性遺伝子であるリン酸化 (P) 蛋白質をグリア細胞で発現するトランスジェニックマウス (P-Tg) を用いてBDVが神経変性を誘導する機序の検討を行った。（朝

長)

4) 神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明。うつ病患者やクローン病患者で特異的に発現が検出される HHV-6 潜伏感染特異的遺伝子タンパク SITH-1 をマウスの脳内で発現させ影響を検討した。発現には、アデノウイルスペクターと、レンチウイルスペクター、アストロサイト特異的なプロモーターである GFAP プロモーターを用い、SITH-1 および、c-Fos 遺伝子の発現量を検討した。マウスの異常行動の指標として尾懸垂テスト、Prepulse Inhibition テスト、Wheel running テストを行った。(近藤)

5) 慢性肺気腫ないし呼吸不全とウイルス感染。肺気腫患者 54 名を対象とし、増悪時および 2 週間後の RS ウイルス血清抗体価、動脈血酸素飽和度、血中 IL-6 および可溶性 ICAM-1 を測定した。また、マクロライドの効果を、培養液ウイルス放出量および細胞内 RS ウイルス RNA、細胞側の受容体である活性化 RhoA の測定により検討した。また in vitro の実験系で、 $\beta 2$  刺激薬の抗 NF- $\kappa$ B 活性、HMG-CoA 還元酵素阻害薬がライノウイルス 14 型感染時にヒト気管上皮細胞に与える影響、マクロライドおよび喀痰調整薬によるシアラル酸の発現抑制に関して検討した。(山谷)

6) マイコプラズマ感染と特定疾患の関連。Mycoplasma fermentans 生菌のウサギ経後脚膝蓋関節腔内投与によるリウマチ性疾患モデルを開発し評価を行った。また、抗リン脂質抗体症候群における自己抗体産生へのマイコプラズマの関与を検討するため、ヒト  $\beta 2$ -GP1 ならびにプロトロンビン (PT) 抗体に反応するマイコプラズマ属の成分について解析を行なった。(荒川)

7) 腸管スピロヘータが炎症性腸炎に及ぼす影響。培養は、Tryptone Soya Agar (Oxoid) に 5-10% のウシ血清を加えた平板を用いた。臨床検体からの培養には選択剤と

して 400 mcg/mL spectinomycin, 12.5 mcg/mL rifampicin を上記の平板培地に加えたものを用いた。分離された菌の同定のため、生化学的性状測定、16S rDNA 配列決定、必要に応じ走査電子顕微鏡による形態の観察を行った。(和田)

8) 糸状菌吸入による肺高血圧および血管構築改変の機序に関する解析。Stachybotrys chartarum の肺動脈病変形成に関する、マウス系統の相違について検討するため、病理組織学的変化を検討し、右室/(左室+中隔) ((RV/(LV+S)) 重量比を算出した。肺動脈病変形成の原因物質を探索する目的で S. chartarum 菌体成分の抽出と二次代謝産物の分析を行った。臨床検体を用いた検討では、原発性肺高血圧症剖検肺からの真菌に関連する遺伝子の検出も行った。(渋谷)

9) 炎症性腸疾患に対する病原微生物の関与。2006 年 3 月から 2007 年 12 月までに手術を行った炎症性腸疾患 (IBD) 手術 389 例 (潰瘍性大腸炎 (UC) 173 例、クローン病 (CD) 122 例、大腸癌手術 267 例患者を対象とし、IBD が術後感染の危険因子か否かを検証した。汚染創 (contaminated wound)、感染創 (dirty/infected wound)、結腸・直腸切除を伴わない手術は除外とした。手術巣感染 (SSI) の診断は National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) system を用い、術後 30 日目まで経過観察した。(竹末)

10) IgA 腎症など進行性腎障害と感染症。自然発症の IgA 腎症様病態を呈するヒト IgA 腎症モデルマウスである若年好発性高 IgA 血症マウス (HIGA マウス) に対して、TLR9 リガンドである CpG-ODN (10 $\mu$ g) を経鼻投与し、尿蛋白量および腎組織障害を検討し、病態解明のため生体分子の分布を質量顕微鏡を用いて比較検討した。

(河野)

(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



員会の承認を得たプロトコールにしたがって行われた。インフォームドコンセントは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。また、遺伝子組換え実験は当該施設の承認の後、遺伝子組換え実験ガイドラインに沿って行われた。

### C. 研究成果

1) 難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子、薬剤感受性に関してはミカファンギン感受性に変化は認められなかった。菌糸形成能は phosphomannan が欠損している株は、菌糸の形成能が低下している傾向が観察された。特に、 $\alpha$ -1,3 構造の欠損が加わるとその傾向が明らかであった。温度感受性は phosphomannan 欠損株で 4 2℃における発育能が低下していた。サイトカイン誘導能は phosphomannan と  $\beta$ -1,2 構造が破壊されていると推定される株のみサイトカイン誘導能が有意に高かった。(宮崎)

2) 劇症肝炎とウイルスの関与、小児劇症肝炎例 2 例につき mRNA から作成した cDNA を用いて遺伝子の網羅的検索を行ったところ、ほぼ全てがヒト由来の配列であり、病原体を示唆する配列は検出されなかった。MCV 特異的定量的 PCR の結果、劇症肝炎 9 例はすべて陰性であったが、メルケル細胞癌とカポジ肉腫で陽性例をみいだした。(佐多)

3) 神経変性疾患と遅発性ウイルス感染との関連性、毛引症と呼ばれるストレス発症性の神経疾患を呈しているオウムから、これまでわが国では感染が報告されていない鳥ボルナ病ウイルス (ABV) を同定し、これは遺伝的に最も哺乳類 BDV に近い ABV5 型であることが判明した。病原性解析では、C6 グリオーマ細胞において BDV P 遺伝子の発現により有意な発現変化を示した遺伝子を見だし、神経疾患との関連性が示唆されているものを Glial gene affected by BDV P (GABP) と命名した。リアルタイム

PCR を用いた解析の結果、BDV P-Tg 脳由来グリア細胞においても GABP mRNA の発現増加を示した。(朝長)

4) 神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明、尾懸垂テストや Prepulse Inhibition テスト、Wheel running テストなどの異常行動指標と、SITH-1 の発現には関連が認められ、SITH-1 が躁症状を引き起こすことを示唆するものであった。また、アデノウイルスベクターで SITH-1 を発現した場合は躁状態となり、レンチウイルスベクターで SITH-1 を発現した場合はうつ状態になることが示唆される結果をえた。脳の活動の指標となる脳内 c-Fos 遺伝子の発現も SITH-1 導入により上昇していた。(近藤)

5) 慢性肺気腫ないし呼吸不全とウイルス感染、臨床研究の結果、風邪症状後に増悪を来した 18 例において、2 週間後の回復期において 4 倍以上の上昇を示したのは 3 例で、血中 IL-6 および可溶性 ICAM-1 (sICAM-1) が増悪時に上昇し、回復時に低下した。in vitro においては、clarithromycin で処理で活性化 RhoA の発現は減少し、 $\beta$ 2 刺激薬はライノウイルス感染に伴う NF- $\kappa$ B 活性は抑制し、HMG-CoA 還元酵素阻害薬はライノウイルス 14 型感染時にヒト気管上皮細胞からのウイルス放出を抑制した。(山谷)

6) マイコプラズマ感染と特定疾患の関連、

*M. fermentans* 生菌投与により関節内リンパ球浸潤やリンパ濾胞形成、滑膜細胞の多層化やフィブリンの沈着を認め、ヒトの関節リウマチにおける慢性期への移行を疑わせる所見と考えた。*M. fermentans* 菌体成分と反応する抗体も検出された。膜に転写したマイコプラズマ菌体成分の、LC-MS/MS 解析の結果では一部の菌種については、抗体に反応したバンドを含む領域に存在する特定蛋白候補が推定された。

(荒川)

7) 腸管スピロヘータが炎症性腸炎に及ぼす影響、*Brachyspira pilosicoli* の報告例

12 症例中 11 例が男性であり、アメーバやジアルジア、HIV との混合感染で、炎症性腸炎(潰瘍性大腸炎)と診断されていた例は症例は 2 例だけであった。*B. aalborgi* に関しては、他施設からの 2556 例の生検材料、手術材料からの検索結果の報告によれば *B. aalborgi* 陽性例は 20 例であった。(和田)

8) 糸状菌吸入による肺高血圧および血管構築改変の機序に関する解析。 ddY、C57BL/6J では効率に病変を形成し、BALB/c マウスではこのような肺動脈病変の形成は認められなかった。各臓器湿重量、RV/(LV+S) 重量比に有意な変化はなかった。Rho kinase 阻害薬投与による本病変形成への影響が確認された。

また *S. chartarum* 株より trichothecene 類が検出された。原発性肺高血圧症剖検肺からの真菌遺伝子の検出が可能であった。(渋谷)

9) 炎症性腸疾患に対する病原微生物の関与。全体の SSI 率は大腸癌手術と IBD 手術では有意差を認めず、切開創 SSI は大腸癌と比較して有意に IBD で高率であった ( $p < 0.01$ )。直腸手術に限定すると、クローン病で有意に SSI が高率であった。多変量解析に選択した全因子の検討では、切開創と臓器・体腔を合わせた全体の SSI 並びに切開創 SSI において IBD は独立した危険因子ではなかったが、交絡の影響を除いた検討では切開創 SSI の独立した危険因子であった。(竹末)

10) IgA 腎症など進行性腎障害と感染症。IgA 腎症モデルマウスとして使用した HIGA マウスに CpG-ODN を投与したところ、無投与マウス群と比較し、尿蛋白の増加傾向と腎組織における糸球体メサンギウム細胞の増殖と基質の増加、尿細管の萎縮を認めた。コントロールマウスと HIGA 腎組織を質量顕微鏡で検討した結果では、質量電荷比 868.7, 665.4, 856.8 など 20 ほどのピークが認められ、腎組織内分布に差があることが確認された。(河野)

#### D. 考察および今後の予定

真菌が関与する可能性のある難病として、血管炎と原発性肺高血圧症との関連について研究を行った。最も頻度の高い深在性真菌症の原因菌である *C. albicans* の細胞壁表層のマンノース構造が菌糸形成能や高温における耐熱性、さらに病原因子の一つと考えられる炎症誘導能に関連することが示された。今後は、炎症誘導能が高かったマンノース構造と血管炎発症の関連づけを免疫学的手法を用いて行う。原発性肺高血圧症との関連性が示された *S.*

*chartarum* による肺動脈病変の形成に関しては、今回、宿主因子や菌株によって相違があることを確認した。*S. chartarum* は多様な二次代謝産物を産生し、その中には trichothecene 類のような細胞傷害性を持つトキシンなどが含まれていたことも明らかになったが、このような二次代謝産物と肺動脈病変形成との関連については更に検討を進める必要がある。また、肺動脈病変の形成には Rho kinase の関与も示され、本モデルがヒトの肺高血圧と同様の機序によって成立している可能性が考えられた。

難病におけるウイルスの網羅的な検出法の一つとして次世代シーケンサーを用いた遺伝子の解析行をなした。小児劇症肝炎 2 例については原因病原体を示唆するデータは得られず、むしろ、既知の病原体の関与は否定的であった。MCV のデータと合わせて、小児劇症肝炎は検索した範囲では共通の病原体は発見されなかった。今回の検索した 2 例についてはいずれも細菌、ウイルスを含む微生物の配列と同じ配列を持つ核酸の同定には至らず、この 2 例については病変部における病原微生物の存在は否定的である。未知のウイルス、病原体を検出するために数多くの短いリードを解析していく手法に関しては今後、十分に検討する必要がある。MCV はメルケル細胞癌から発見され、他のポリオーマウイルスと同様の遺伝子構造を持ち、発癌ウイルスの可能

性もあることから、2008年2月に発見された当初は大きな注目を浴びた。本研究でわれわれが検索した結果、日本では55%のメルケル細胞癌症例からMCVが検出され、欧米各国のレポートと合わせ、MCVが世界に広く分布しているウイルスであることが分かった。しかし、本研究の結果から免疫不全患者における検索では陽性例が得られなかったことや、他のサンプルでも陽性例がほとんどなかったことを考慮すると、わが国の健常者におけるMCV陽性率はかなり低いことが予想される。さらに多くの特定疾患を含む様々な疾患との関連を精査する必要がある。

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で、今回みいだしたBDV由来GABPの神経初代培養への添加により神経細胞脱落が増強され現象は、これまでに明らかにしてきたP-Tg脳における神経細胞の脱落と一致した結果であった。このことから、GABPには神経細胞脱落を誘導する活性があることが明らかとなり、BDVの病原性発現の一要因としてGABPの発現上昇があると考えられた。今後はさらに、GABPの機能的関与を探るとともに、神経疾患患者脳におけるGABPの発現についても明らかにしていきたい。さらに、簡便な診断法構築を可能にするボルナウイルス属を広く検出できるPCR縮重プライマーの作製や組換え抗原を作成したので、今後はヒト血清におけるボルナウイルス関連抗体の検出も行う予定である。

HHV-6と神経疾患に関する研究では、これまで、うつ症状を呈する患者において特異的にHHV-6潜伏感染蛋白SITH-1に対する抗体が検出され、この様な患者において、潜伏感染細胞数または潜伏感染蛋白の発現の増加が生じていることを示してきた。今回は、このSITH-1蛋白をマウスの脳内アストロサイトで発現させ、マウスの行動異常と関連することを示した。予防や治療への応用のために、SITH-1遺伝子の発現量に

よる可能性の他、週齢など宿主因子の違いや、発現期間の違いによる可能性を考慮した検証を行う必要がある。

呼吸不全とウイルス感染症の研究では治療応用可能な方法論や病態解析を検討している。今回の結果から、RSウイルス感染は気道炎症を惹起し肺気腫を増悪させ呼吸不全をもたらすことが示唆され、臨床病態はライノウイルス感染時と類似することが明らかになった。また、パフィロマイシンやクラリスロマイシンが細胞側感染受容体を抑制することを示し、予防あるいは治療に応用可能であることを示した。さらに $\beta 2$ 刺激薬は、ヒト気管上皮細胞においてp50やc-Relなどを介してNF- $\kappa$ Bの活性化を抑制し、抗炎症作用を示すことを確認した。ライノウイルス感染に関しても、HMG-CoA還元酵素阻害薬が炎症性サイトカインや感染受容体ICAM-1 mRNA発現、培養液sICAM-1量を減少させる効果を有していることを示し、呼吸不全に対する治療応用の可能性を示した。今後、細胞表面におけるインフルエンザ活性化に対する作用などを検討する予定である。

関節リウマチと*M. fermentans*の関連では、生菌投与動物モデルを作製した。本モデルにおける関節リウマチ所見との比較からスコア化が可能であり、今後、本モデルにおける関節病変の予防・治療法評価の際に有用であることが示唆された。

炎症性腸疾患と感染症の関連について行った研究では、準清潔手術において、IBD手術は切開創SSIの独立した危険因子であったことから、今後、回腸囊炎の細菌学的な検討、特に手術標本から硫化水素発生性の細菌を標的としてIBDとの関連性を検証する予定である。一方、*B. pilosicoli*ならびに*B. aalborgi*感染症の関連を明らかにするためには、特異的な血清診断系の開発が有効であると考えられた。

E. 健康器危険情報  
なし

F. 研究発表

1. 論文発表. 各研究分担者の項を参照。
2. 学会発表. 各研究分担者の項を参照。

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

a) 出願中；

- 1) 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

2) HHV-6 潜伏感染に関連する気分障害を治療又は予防する方法

出願者：近藤一博、小林伸行  
米国出願番号 No.61/102,441

b) 取得：

HHV-6 潜伏感染に関連する気分障害を治療又は予防する方法

発明者：近藤一博

米国出願番号 No.61/102,441 出願日  
2008 年

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

## II. 分担研究報告書

# 1. 難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子

研究分担者：宮崎義継（国立感染症研究所 生物活性物質部）

研究協力者：大川原明子、山越 智、大野秀明  
（国立感染症研究所 生物活性物質部）

研究要旨：*Candida albicans* の細胞壁可溶成分であるマンノプロテイン・ $\beta$  グルカン複合体がマウス血管炎誘発に関与することが報告されている。その成分であるマンノースの多様性に着目し、血管炎誘発と関連性を有するマンノース構造の有無を検証することを目的として、様々な putative mannosyl transferase 遺伝子の破壊株を作成した。マンノース構造変化による micafungin に対する薬剤感受性、菌糸形成や温度感受性、IL-6 と TNF $\alpha$  誘導能について検討した。薬剤感受性は不変であったが、菌糸の形成能に関しては phosphomannan が欠損している株は、菌糸の形成能が低下している傾向があり、特に、 $\alpha$ -1,3 構造の欠損が加わるとその傾向が明らかであった。温度感受性に関しても、phosphomannan 欠損株で、野生型や  $\alpha$ -1,3 単独の欠損と比較して、42℃における発育能が低下していた。サイトカイン誘導能に関して、phosphomannan と  $\beta$ -1,2 構造が破壊されていると推定される株で IL-6 や TNF- $\alpha$  の誘導能が高い傾向が認められた。

## A. 研究目的

*Candida albicans* の細胞壁可溶成分であるマンノプロテイン・ $\beta$  グルカン複合体（以下 CAWS）がマウス血管炎誘発に関与することが報告されている。血管炎の発症の宿主側要因としては、活性化した好中球の関与について鈴木らが検証している(Arimura et al. Clin Nephrol 40:256-264,1993, L.Harper et al, Arthritis Rheumatism 44:921-930,2001)。菌側因子としては CAWS が mannose-protein-1,3- $\beta$ -glucan であり、主成分であるマンノースには複数の異性体が混在していることが示唆されているが、炎症惹起の原因分子は不明である。

*C. albicans* 細胞壁のマンノース構造として、 $\beta$ -1,2-linked mannose が定常状態における表層部の主要な構造と推定され、一方、深層（細胞膜側）は  $\alpha$  1,2-linked mannose 鎖と考えられる。しかし、増殖期や特殊な栄養状態では細胞壁構造が定常期と異なっており、その際に生成

される特殊なマンノース構造が炎症を誘導するという仮説をたてた。

これを検証するために、定常状態と異なるマンノース構造を材料として安定的に得るため、マンノース転移酵素の遺伝子と推定される遺伝子について網羅的に破壊株を作成した。マンノース構造の変異に関する直接的な検証は困難であるため、破壊株について、菌糸形成能や発育速度、温度感受性などの表現型について検討を行った。

## B. 研究方法

1. *C. albicans* の mannosyl-transferase 候補遺伝子：*Saccharomyces cerevisiae* において mannosyl-transferase 活性が確認されている遺伝子に相同性を有する *C. albicans* 遺伝子をデータベースから検索した。

2. *C. albicans* 遺伝子の破壊：*C. albicans* CAUR4000 株 ( $\Delta$ ura3,  $\Delta$ arg4) を用いて、そ

それぞれの標的遺伝子 ORF の 5'末端と 3'末端を増幅し URA3 遺伝子に ligation した遺伝子片により形質転換に使用した。URA3 マーカーを用いて一方の locus を破壊した後に、同様な手順で ARG4 マーカーにより他の locus を破壊し欠損株を得た。作成した株を表 1 に示す。

3. CAWS の抽出とマンナン精製: *C. albicans* IFO 1385 を完全合成培地 (1L あたり sucrose 10g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 50 mg, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 50 mg, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1 mg, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 1mg, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10 mg, biotin 25 mg) で 27°C、48h 培養した。その培養液に等量のエタノールを加えて静置した。生成した沈殿に蒸留水を加え得られた可溶性画分に 4 倍量のエタノールを加えて生成した沈殿を CAWS とした。アセトンで洗浄し、アセトンを完全に除去し室温にて乾燥した。マンノースの精製は (Methods Enzymology, 1990, 185, 440-70) に準じた。培養液を遠心して菌体を集めて洗った後、20 mM の citrate buffer を加え、125°C で 90 分オートクレープしマンノプロテインを抽出した。抽出物に 3 倍量のメタノールを加えて overnight 攪拌したものを遠心し、その沈殿に水を加えて溶解した。水溶液を透析した後、遠心エバポレーターで乾燥した。

#### 4. 薬剤感受性.

uridine 添加 YPD 培地において 30°C 18 時間の前培養を行い、RPMI (#6504; Bicarbonate minus, glucose plus \*) で 4x10<sup>4</sup> cells/ml に菌液を調整した。96 穴 plate に micafungin (MCFG) の 2 fold-dilution を作成し、100 ul の菌液を加えた。30°C 48 時間培養し、OD<sub>595</sub> を測定し IC<sub>80</sub> を求めて比較した。

5. 菌糸形成能と温度感受性. 上記と同様にして 10<sup>6</sup>~10<sup>3</sup> の 10 倍希釈菌液を作成した。uridine 添加 YPD 培地に、菌液をスポットして 42°C で 48 時間培養し、形成されたコロニーを観察した。

#### 6. in vitro におけるサイトカイン誘導. J774

細胞を各々の変異株由来マンナンにより刺激し、培養液中のサイトカイン量を 8 時間後と 24 時間後に測定した。また、マウス投与初期免疫応答との相関を確認するため、PBS に懸濁したマンナンを、C57BL/6N マウス(♂, 6w)腹腔内に投与後、8 時間後と 24 時間後に屠殺して、腹腔マクロファージのサイトカイン産生能を測定した。

(倫理面への配慮)動物実験にあたっては、国立感染症実験動物計画委員会の承認を得て、動物愛護の指針にもとづいて行った。

### C. 研究結果

1. putative mannosyl-transferase 遺伝子破壊株の確認. CAUR4000 あるいは MNN41217 あるいは MNN00036 を親株として遺伝子破壊を行った。目的とした native gene を増幅するプライマーにより増幅されない株をスクリーニングした。更に、異所性に遺伝子片が導入されていないことを確認し、一候補遺伝子あたり 4 株以上の破壊株をえた。MNN41217 から候補遺伝子を破壊した株として CAMN1101~CAMN1105 をえた。CAUR4000 からマンノース転移酵素をコードすると推定される遺伝子を破壊し、CAMN1001~CAMN1014 をえた。(表 1)

表 1 本研究で作成した遺伝子破壊株

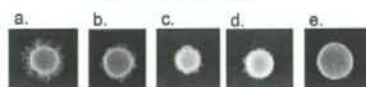
株番号	欠損が推定されるマンナン構造	作成
MNN41217	Phosphomannan	本研究
MNN00036	Phosphomannan	本研究
CAUR4000	No defect	文献 a
CAMN1101	Phosphomannan, α-1,2	本研究
CAMN1102	Phosphomannan, α-1,2	本研究
CAMN1103	Phosphomannan, α-1,3	本研究
CAMN1104	Phosphomannan, α-1,6	本研究
CAMN1105	Phosphomannan, β-1,2	本研究
CAMN1001	α-1,2	本研究
CAMN1002	α-1,2	本研究
CAMN1003	α-1,2	本研究

CAMN1004	$\alpha$ -1,2	本研究
CAMN1005	$\alpha$ -1,2	本研究
CAMN1006	$\alpha$ -1,3	本研究
CAMN1007	$\alpha$ -1,3	本研究
CAMN1008	$\alpha$ -1,3	本研究
CAMN1009	$\alpha$ -1,3	本研究
CAMN1010	$\alpha$ -1,3	本研究
CAMN1011	$\alpha$ -1,3	本研究
CAMN1012	$\alpha$ -1,6	本研究
CAMN1013	$\alpha$ -1,6	本研究
CAMN1014	$\alpha$ -1,6	本研究

文献 a ; Kaneko A et al. *Yeast* 21:1025-33, 2004

2. 薬剤感受性. 検討した全ての変異株と親株の間でMCFG感受性に変化は認められなかった。
3. 菌糸形成能. phosphomannan が欠損している株は、菌糸の形成能が低下している傾向が観察された。特に、 $\alpha$ -1,3 構造の欠損が加わるとその傾向が明らかであった。(図1)

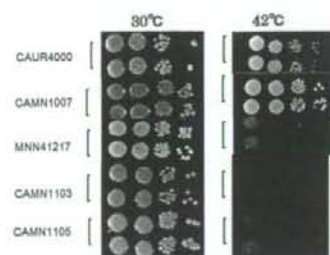
図1. 菌糸形成能



- CAUR4000; マンノース構造に関してwild type.
- CAMN1007;  $\Delta$   $\alpha$ -1,3変異。
- MNN41217;  $\Delta$  phosphomannan変異。
- CAMN1105;  $\Delta$  phosphomannan 且つ、 $\Delta$   $\beta$ -1,2変異。
- CAMN1103;  $\Delta$  phosphomannan 且つ、 $\Delta$   $\alpha$ -1,3変異。

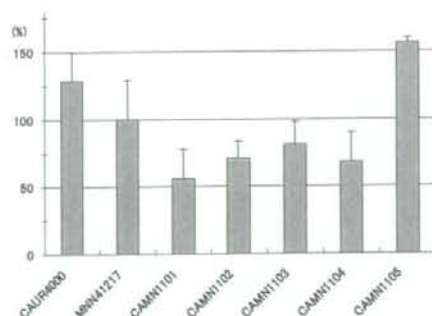
4. 温度感受性.  $\alpha$ -1,3 単独の欠損では wild と比較して温度感受性に関して差が観察されなかった。phosphomannan 欠損株は、野生型や  $\alpha$ -1,3 単独の欠損と比較して、42℃における発育能が低下していた(図2)。42℃において stationary phase に到達する時間に関しても、phosphomannan 欠損株は、野生株の約 1.5 倍の延長が認められた。

図2. 温度感受性



5. サイトカイン誘導能. J774 細胞における TNF- $\alpha$ 、IL-6 の産生は、8 時間後ならびに 24 時間後において、親株と CAMN1001~CAMN1014 の遺伝子破壊株の間で有意な差は認められなかった。マウス腹腔マクロファージにおいても同様の結果であった。一方、phosphomannan と  $\beta$ -1,2 構造が破壊されていると推定される CAMN1105 株のみ IL-6 や TNF- $\alpha$  の誘導能が親株やその他の遺伝子破壊株と比較して高い傾向が認められた(図3)。

図3. *C. albicans* におけるサイトカイン誘導



#### D. 結果および今後の予定

*C. albicans* の putative mannosyl-transferase 遺伝子を破壊し、細胞壁表層のマンノース構造が異なると推定される遺伝子破壊株をえた。

今回の検討では、phosphomannan と  $\alpha$ -1,3 や  $\beta$ -1,2 構造の欠損が予測される株においては、菌糸形成能や 42℃における耐熱性が低下することが示された。*C. albicans* において菌糸発



育はヒト組織での病原因子の一つであり、マンノース構造が *C. albicans* の病原性にも影響することが示唆された。遺伝子欠損による耐熱性の低下（温度感受性の上昇）は、菌の生体内における増殖の抑制を意味しており、野生型で見られる正常のマンナン構造は、増殖能の観点から *C. albicans* の病原性の一つと考えることができた。

炎症の誘導に関しては、 $\beta$ -1,2 の欠損により炎症反応が亢進する可能性が示された。これまでえられた結果から、 $\beta$ -1,2 構造の欠損により得られたマンノース構造が、炎症を惹起する可能性について今後は検証を進めるべきことが示唆された。

**E. 健康危機情報：**特になし。

#### **F. 研究発表**

論文発表.

1) Mahmoud M. Ramadan, Hitoshi Tachikawa, Makoto Kodama, Akiko Okawara, Wataru Mitsuma, Masahiro Ito, Takeshi Kashimura, Taruna Ikrar, Satoru Hirono, Yuji Okura, Kazuo Suzuki and Yoshifusa Aizawa A pilot-controlled study of

myeloperoxidase-specific anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody (MPO-ANCA) in the coronary circulation. *International Journal of Cardiology*, 128: 114-6, 2008

2) Suppressive Role of Leukocyte Cell-Derived Chemotaxin 2 in Mouse Anti-Type II Collagen Antibody-Induced Arthritis. Okumura, A, Saito, T., Otani, I., Kojima, K., Yamada, Y., Ishida-Okawara, A., Nakazato, K., Asano, M., Kanayama, K., Iwakura, Y., Suzuki, K., Yamagoe, S. *Arthritis Rheum.* 58(2): 413-21, 2008

学会発表.

1) 大川原明子、山越 智、橋本ゆき、大野秀明、新見昌一、宮崎義継 *C. albicans* 細胞壁表層のマンナン構造の違いによる初期免疫応答の解析 第 52 回日本医真菌学会総会（長崎）2008 年 9 月

2) 奥村彰規、大谷功、大川原明子、岩倉洋一郎、鈴木和男、山越智 Suppressive Role of LECT2 in Mouse Anti-Type-II Collagen Antibody-Induced Arthritis 第 38 回 日本免疫学会、(京都) 2008 年 12 月

## 2. 劇症肝炎とウイルスの関与

研究分担者：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、中村智之（国立感染症研究所感染病理部）

黒田 誠（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター）

研究要旨：小児劇症肝炎は多くは原因が不明で、一部の症例ではウイルスなどの微生物の関与が疑われる。未知のウイルスを含む原因微生物の同定を目指し、小児劇症肝炎例から抽出したRNAからcDNAを作成し、次世代シーケンサーを用いて遺伝子の網羅的解析を行った。2症例につき計20,000本以上の連結された塩基配列(contig)を解読したが、特定の病原体を示唆する配列は見あたらなかった。また、2008年に発見されたメルケル細胞ポリオーマウイルスについて、劇症肝炎サンプルにおける検索を行ったが、関連は否定された。

### A. 研究目的

劇症肝炎は急激な肝細胞壊死により、進行性の黄疸、肝性脳症など、急性肝不全の症状を呈する疾患である。原因としてウイルス、薬剤などが考えられているが、とくに小児に発症する劇症肝炎では、多くの症例でウイルスは検出されず、薬剤性など、他の原因も考えられない、原因不明の症例が多い。これまで、劇症肝炎とウイルス感染に関しては様々な知見が報告されている。特に肝炎ウイルスや一部のヘルペスウイルスと劇症肝炎の発症の関連を示唆する報告が散見される。しかし、これらの報告はウイルス性劇症肝炎と考えられる症例の解析であり、ある特定のウイルスが劇症肝炎にいつも検出されるわけではない。われわれは生体肝移植の症例で摘出された肝組織の一部を用い、100種類を超える数多くのウイルスをスクリーニングするシステムを用いてウイルスの検索を行ったが、特定の病原体を同定することはできなかった。したがって、既知のウイルスがこれらの劇症肝炎の原因である可能性は低く、病原微生物の同定には未知のウイルスを含め、広く病原微生物をスクリーニングする系が必要である。

最近開発された次世代型シーケンサーはマイクロアレイとPCRの技術を応用することにより、サンプル内に含まれるDNA断片の配列を短時間に、網羅的に解読することが可能であること

から、次世代シーケンサーは、原因不明の疾患における病原体の検出に有力なツールになることが期待されている。本年度は次世代シーケンサーIllumina Genome Analyser II（イルミナ社）を用い、劇症肝炎サンプルの核酸から病原微生物の断片を検索し、原因病原体の同定を試みた。

また、本年度はこれとは別に、2008年2月に米国で発見されたメルケル細胞ポリオーマウイルス(MCV)の劇症肝炎サンプルにおける検索を行った。MCVはメルケル細胞癌から発見された新しいヒトポリオーマウイルスで、他のポリオーマウイルスと同様にlarge T, VP1, VP2などの遺伝子を持っている。一般に、ポリオーマウイルスは脳炎や腎炎、腫瘍など様々な病態と関連することが知られている。また、MCVは新規に発見されてからの日が浅く、メルケル細胞癌の発症との関連や、その病態との関連、健常者における疫学などはいまだに明らかでない。本年度は定量的PCRを用い、MCVを検出する系を立ち上げ、MCV感染と劇症肝炎や他の特定疾患との関連を検索した。

### B. 研究方法

#### 1. 検体と核酸抽出

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℃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. 次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析

Total RNA から Fast Track Kit 2.0 (Invitrogen) を用いて mRNA を抽出した。OligodT をプライマーに用いた逆転写反応により First strand cDNA を作成し、後に DNA ポリメラーゼを用いて second strand DNA を合成した。次世代シーケンサーは Illumina (Solexa): Genome Analyser II (イルミナ社) を使用した。サンプル調整、及び配列の解読はイルミナ社のプロトコルに従って行った。解読した配列は Short reads assembler Velvet 0.7.23 を使い、assemble を行い、得られた contig(連結した塩基配列)につき、blastn-nt (cut off:  $e^{-10}$ )、blastx-nr (cut off:  $e^{-5}$ )により相同性の解析を行った。

## 3. MCV の検出

MCV の検出は定量的 PCR で行った。GenBank に登録されている MCV の配列から large T antigen を標的に Primer Express (アプライド・バイオシステムズ社)を用いてプローブ及びプライマーを下記の通り設計した。

Merkel PV Forward: 5' -TTT GGG CAG GAG AAA ACT GTT T-3'

Merkel PV Reverse: CCT GCT GAT TAC TTT GGA ATG TTA CT

Merkel PV HEXProbe: HEX- CCC AAA GCC CTC TGT TGC CCC A-BHQ1

(3230-3302 in NC\_010277, 73bp)。陽性コントロ

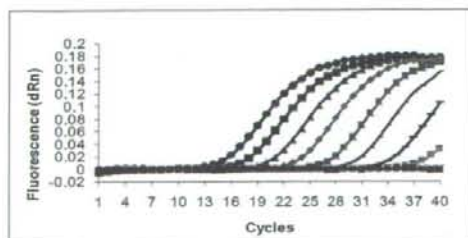


図1 MCV 特異的定量的 PCR の amplification plot. 左から  $10^8$ - $10^1$  コピー数を増幅した際の amplification plot.

ールとして MCV の large T 遺伝子をクローニングしたプラスミドを用い、10 コピーからの検出を確認した(図 1)。サンプルの定量と同時に hGAPDH 遺伝子を内因性コントロールとして定量した。定量的 PCR は Quantitect probe PCR kit (キアゲン社) を使用し、ABI Prism 7900HT (アプライド・バイオシステムズ社)により行った。

## (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および平成20年7月17日 承認番号149)を得たプロトコルにしたがって行われた。インフォームドコンセントは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。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. 劇症肝炎サンプルにおける遺伝子の網羅的検索

小児劇症肝炎例2例につき mRNA から作成した cDNA を用いて次世代シーケンサーイルミナによる遺伝子の網羅的検索を行った。1リードあたり 72 mer のリードを、検体1では 2,942,299 本の検体2では 3,688,487 本の解読を行い、それぞれ 15,374 本、8,739 本の contig を得た。これらにつき、核酸については blastn-nt、タンパクについて blastx-nr によりデータベースに登録されている配列との相同性の解析を行ったところ、ほぼ全てがヒト由来の配列であり、病原体を示唆する配列は検出されなかった。

### 2. メルケル細胞ポリオーマウイルス (MCV) の検索

劇症肝炎例において、MCV の検出を試みた。MCV を特異的に検出する定量的 PCR は MCV の large T 遺伝子をすくなくとも 10 コピーを安定して検出し、JCV や BKV とは交差反応性を持たないことを確認した。この MCV 特異的定量的 PCR を行った結果、劇症肝炎9例はすべて陰性であった。なお、同時に行ったメルケル細胞癌のサン

ルでは 11 例中 6 例が陽性であり、また、カポジ肉腫 49 例では 3 例が陽性となった。他に原発性肺高血圧症、壊死性リンパ節炎、エイズ剖検例の各臓器から抽出した DNA など合計 192 サンプルではすべて陰性であった(表 1)。

#### D. 考察

次世代シーケンサーを用いた遺伝子の網羅的解析の結果から、小児劇症肝炎 2 例では原因病原体を示唆するデータは得られず、むしろ、既知の病原体の関与は否定的であった。MCV のデータと合わせて、小児劇症肝炎は検索した範囲では共通の病原体は発見されなかった。

次世代シーケンサーは高速でサンプル中に含まれるほとんどすべての DNA の配列を解読する装置である。イルミナ社の次世代シーケンサーは、これまでのシーケンサーとは全く異なり、個々の遺伝子のクローニングが不要で、両端にアダプターライゲーションした DNA 断片をフローセル上で増幅し、そのうちの 35-72 mer につき、同じフローセル上で遺伝子配列を決定する、画期的な方法が採用されている。解読された 72 mer の断片はコンピューターでアッセンブルされ、連結された塩基配列(contig)がデータベースに登録されている遺伝子との相同性が検索される。ヒト遺伝子の全塩基配列が明らかになっている現在、ヒト遺伝子を除いたうえで、ウイルス、細菌など、ヒト遺伝子以外の遺伝子とのホモロジーサーチが可能であり、病原微生物が含まれていれば、高い確率で検出が可能ははずである。

今回の検索した 2 例についてはいずれも細菌、ウイルスを含む微生物の配列と同じ配列を持つ核酸の同定には至らず、この 2 例については病変部における病原微生物の存在は否定的である。しかし、これで小児劇症肝炎の原因が細菌、ウイルスなどの微生物である可能性が完全に否定されたわけではない。遺伝子解析の結果が既知のデータベースとの比較の上で出されている以上、未知のウイルス、細菌などデータベースに登録されていない配列は相同性のある遺伝子として挙がらない。本検索で未知のウイルスなどが検出される可能性としては、データベースと相同性のない長い Contig が現れたときのみである。短い断片であれば contig としてリストされないリードとし

Sample	Positive/All	Percentage
MCC	6/11	54.5%
KS	3/49	6.1%
AIDS-related lymphoma	0/11	0%
Fulminant hepatitis	0/9	0%
Encephalitis	0/12	0%
[Including PML (JCV+)]	0/4	0%
BKV-positive nephritis	0/1	0%
Primary effusion lymphoma	0/4	0%
PPH	0/10	0%
Necrotizing lymphadenitis	0/2	0%
FDC sarcoma	0/1	0%
AIDS autopsy		
Brain	0/15	0%
Tongue	0/5	0%
Submandibular gland	0/5	0%
Lung	0/15	0%
Lymph node	0/12	0%
Heart	0/9	0%
GI tract	0/13	0%
Liver	0/16	0%
Spleen	0/19	0%
Pancreas	0/12	0%
Kidney	0/14	0%
Adrenal	0/7	0%

表 1 各疾患のサンプルにおける MCV 特異的定量的 PCR の結果。

サンプル数と陽性数、陽性率を示す。MCC: Merkel cell carcinoma, KS: Kaposi's sarcoma, PML: progressive multifocal leukoencephalopathy, PPH: primary pulmonary hypertension, FDC: follicular dendritic cell, GI: gastrointestinal.

て見落とす可能性があり、すべてのリードにつき、詳細な検討が必要となる。また、GenBank などのデータベースではウイルス遺伝子以外の遺伝子についても類似遺伝子、相同遺伝子などで、名前にウイルスの文字が含まれる遺伝子が多数存在し、こうしたデータベースの不完全性にも注意が必要である。未知のウイルス、病原体を検出するために数多くの短いリードを解析していく手法に関しては今後、十分に検討する必要がある。

MCV はメルケル細胞癌から発見され、他のポリオマウイルスと同様の遺伝子構造を持ち、発癌ウイルスの可能性もあることから、2008 年 2 月に発見された当初は大きな注目を浴びた。本研究でわれわれが検索した結果、日本では 55% のメルケル細胞癌症例から MCV が検出され、欧米各国のレポートと合わせ、MCV が世界に広く分布しているウイルスであることが分かる。しかし、本研究の結果から免疫不全患者における検索では陽性例が得られなかったことや、他のサンプルでも陽性例がほとんどなかったことを考えると、日本の健常者における MCV の陽性率はかなり低いことが予想される。一方、米国では健常者皮膚のサ