

ンプルからも一定の割合でMCVがPCRで検出されていること、メルケル細胞癌が欧米の白人に多く、日本ではごくまれであることから、MCVの分布は人種と関連する可能性もある。MCVは発見されたばかりでまだその病原性やメルケル細胞癌における発癌メカニズムが明らかでない。今回の検索で劇症肝炎や原発性肺高血圧症との関連は否定的であるが、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。

#### (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2例につき、次世代シーケンサーイルミナを用いて遺伝子の網羅的解析を行った。結果、解読した配列はほぼ全てヒト由来配列であり、病原体を示唆する配列はなかった。小児劇症肝炎例及び他の特定疾患におけるメルケル細胞ポリオーマウイルスの検出を試み、全例で陰性であった。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Liem, NT, Nakajima, N, Phat, LP, Sato, Y, Thach, HN, Hung, PV, San, LT, Katano, H, Kumasaka, T, Oka, T, Kawachi, S, Matsushita, T, Sata, T, Kudo, K, and Suzuki, K. H5N1-Infected Cells in Lung with Diffuse Alveolar Damage in Exudative Phase from a Fatal Case in Vietnam. *Jpn J Infect Dis.* 61, 157-160, 2008.

##### 2. 学会発表

(国内学会)

- 1) 片野晴隆、菅野隆行、佐多徹太郎、定量的PCRによる網羅的ウイルス検出法の開発とエイズ剖検例の各臓器におけるウイルス感染プロファイル 第97回日本病理学会総会 2008.4 金沢
- 2) 片野晴隆、伊東秀記、鈴木良夫、中村智之、佐藤由子、辻隆裕、松尾光馬、中川秀巳、佐多徹太郎、メルケル細胞癌におけるメルケル細胞ポリオーマウイルスの検出 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008年11月、岡山。
- 3) 片野晴隆、加納基史、中村智之、菅野隆行、浅沼秀樹、佐多徹太郎、定量的PCRによる網羅的ウイルス検出法の開発とエイズ剖検例の各臓器におけるウイルス感染プロファイルの解析。第56回日本ウイルス学会学術集会 2008年11月、岡山。
- 4) 中村智之、浅沼秀樹、佐多徹太郎、片野晴隆。メルケル細胞ポリオーマウイルスのクローニング。第56回日本ウイルス学会学術集会 2008年11月、岡山。
- 5) 片野晴隆、佐多徹太郎、エイズ関連リンパ腫およびエイズ剖検例の各臓器における多種類ウイルスの定量。第22回日本エイズ学会学術集会 2008年12月、大阪。

#### H. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

### 3. 神経変性疾患と遅発性ウイルス感染との関連性

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）

研究協力者： 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、人を含む多くの哺乳動物で感染が確認されている中枢神経系への持続感染を特徴とする RNA ウイルスである。これまでの疫学調査は、BDV 感染と神経疾患との関連性を示唆しているが、いまだ確証的な証拠は得られていない。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。本研究の目的は、難治性疾患である神経変性疾患の発症に関わる BDV あるいはボルナウイルス科に属する近縁ウイルスの役割を明らかにすることである。平成 20 年度は、以下の 2 点について研究を推進した。(1) BDV とボルナウイルス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として、これまでに同定されている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、有用性を確認した。また、それぞれのウイルスに特異的な組換え抗原を作製した。(2) BDV の病原性遺伝子（P 遺伝子）の発現により影響を受ける宿主遺伝子を同定し、BDV の神経病原性機序を解析した。本年度の成果により、神経変性疾患とボルナウイルス感染との関連性について、今後より詳細な追究が可能になると考えられる。

#### A. 研究目的

ボルナウイルス科に属するボルナ病ウイルス（Borna Disease Virus: BDV）は、中枢神経系に強い感染性を示すマイナス鎖一本鎖の RNA ウイルスである。これまでの疫学研究により、人を含むさまざまな種の哺乳動物で BDV 感染が確認されている。感染動物を用いた解析から、BDV は神経細胞に持続感染し、遅発性に神経疾患を誘導すると考えられている。わが国でも BDV の感染に起因すると思われる神経疾患が生産動物と伴侶動物で発見されている。また、神経疾患患者が BDV に対する特異抗体を持つことも報告されている。これまでに、パーキンソン病や統合失調症患者の剖検脳からの BDV 遺伝子の検出もなされており、BDV 感染が人の神経疾患の発症に及ぼす影響も示唆されている。しかしながら、中枢神経系に持続感染する BDV を検出することの難しさに加え、抗体検査の信頼性の問題などにより、現在までに BDV 感染と特定の神経疾患との関連性について

は確証的な結論は得られていない。

本研究は、難治性疾患である神経変性疾患（パーキンソン病、多発性硬化症など）の発症に関与する BDV あるいはボルナウイルス科に属する近縁ウイルスの存在を明らかにすることを目的としている。

#### B. 研究方法

##### 1. ボルナウイルスの疫学調査：

BDV とボルナウイルス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、これまでに同定された BDV とその類似ウイルス（鳥ボルナウイルス[ABV]、爬虫類ボルナウイルス[RBV]、内在性ボルナ様エレメント[EBLN]）の遺伝子配列情報より、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、さまざまなボルナウイル

スの主要ウイルス抗原を発現するプラスミドを作成し、疫学調査の実施に向けた材料の調整を行った。

## 2. BDV の病原性解析：

ボルナウイルスの神経病原性を明らかにすることを目的に、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。今年度は、BDV P 遺伝子発現によるグリア細胞内での宿主遺伝子発現の変化について解析を行った。BDV P 遺伝子を発現させた C6 グリオーマ細胞と GFP を発現させたコントロール細胞を作製し、これら細胞間の遺伝子発現の違いをアジレント社の cDNA マイクロアレイ (約 4 万個遺伝子) を用いて検討した。変化が認められた遺伝子については、BDV P-Tg 由来アストロサイトを用いてリアルタイム RT-PCR 法にて発現を解析した。

## C. 研究結果

### 1. ボルナウイルスの疫学調査：

ボルナウイルスを広く検出できる縮重プライマーを用いて、神経疾患を発症した動物検体における検索を行った。その結果、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 ABV が同定された (図 1)。遺伝子解析の結果、同定された ABV は遺伝的に最も哺乳類 BDV に近い ABV5 型 (図 2) であることが判明した。また、得られた ABV の遺伝子領域を用いることで、現在までに同定されているすべてのボルナウイルス (BDV, ABV, RBV, EBLN) の主要ウイルス遺伝子のクローニングと発現プラスミドの作製に成功した。

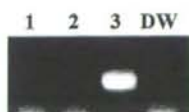


図1. 縮重プライマーを用いたボルナウイルスの検出。神経症状を呈した鳥サンプル (レーン3) から ABV が検出された。

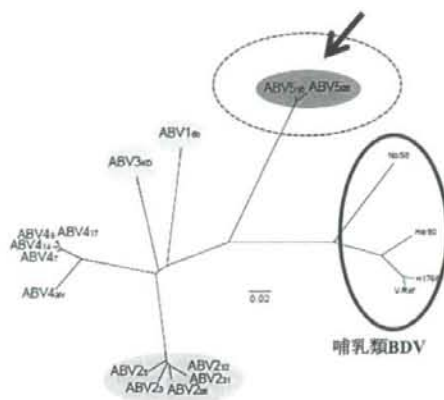


図2. 哺乳類由来BDVと鳥由来ABVの系統樹。矢印は今回検出された ABV5 を示す。鳥由来ボルナウイルスの中では哺乳類ボルナウイルスに一番近い。図は Virology Journal 5:88 (2008) を改変。

### 2. BDV の病原性解析

C6 グリオーマ細胞において BDV P 遺伝子の発現により 68 個の宿主遺伝子が有意な発現変化を示した。これらの遺伝子には、細胞外で機能する蛋白質をコードするものが多く含まれていた。一方、機能面ではその多くが組織の発生・再生に関与する遺伝子群に分類された。同定された遺伝子の中で、発現量の上昇が大きく、また過去に神経疾患との関連性が示唆されているものを見出し、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 の発現が顕著に増加していることが確認された (図 3)。そこで、GABP の発現亢進の意義をマ

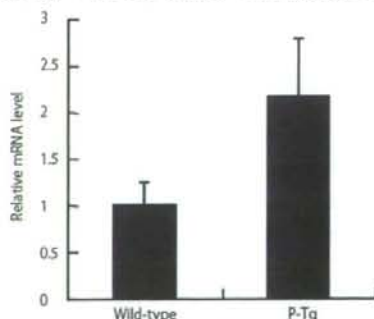


図3. BDV P-TgにおけるGABP mRNAの発現上昇。BDV P-Tg由来アストロサイトにおけるGABPの mRNA量をリアルタイムPCRにて定量した。BDV P-Tg脳ではGABPの発現が顕著に増加していた。

ウス由来神経初代培養を用いて解析した。野生型マウスより分離した神経初代培養に適量のGABPを添加し、抗カルビンジン抗体で染色される神経細胞の生存数について経時的な観察を行った。その結果、GABPを添加した神経細胞では培養10日目において生存数が顕著に減少していることが明らかとなった。

#### D. 考察

ボルナウイルス属に属するウイルスを広く検出できるPCR縮重プライマーの作製に成功した。縮重プライマーは、アミノ酸配列の相同性より予想されるすべての塩基配列の組み合わせを考慮したプライマーであり、塩基配列に多様性が認められるウイルス遺伝子の検出には有効であると考えられている。今回、神経症状を呈した鳥由来のサンプルを用いてBDVの亜型と考えられるABVの検出に成功した。今後は、人由来のサンプルを用いて縮重プライマーの有効性とボルナウイルスの検出を行いたいと考えている。ボルナウイルス遺伝子の検出に加え、特異的抗体を検出する系を構築するために、これまでに同定されたボルナウイルスの組換え主要抗原を発現するプラスミドを作製した。今後は、発現された組換え抗原を用いて、ヒト血清におけるボルナウイルス関連抗体の検出も行いたいと考えている。特に、これまでに人で検出されている抗BDV抗体が、近縁ウイルスに対する抗体である可能性も検討し、人でみられる抗BDV抗体の低い抗原抗体親和性に関与するかについても明らかにしたいと考えている。

BDVの病原性機序を明らかにするために、BDV P遺伝子の発現によりその発現量が大きく変化し、かつ神経疾患との関連が示唆される遺伝子の探索を行った。その結果、GABPが候補遺伝子として同定された。GABPの顕著な上昇はBDV P-Tg由来のグリア細胞でも確認された。また、神経初代培養へのGABPの添加により神経細胞脱落が増強された。この現象は、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る。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。実際に、特定の神経疾患患者においておGABPあるいはGAPB関連シグナルの異常が観察されており、GABPの発現と神経障害性の関連性が示唆される。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と考えている。

#### E. 結論

ボルナウイルスの感染を広く検出する系の構築に成功した。また、BDVの神経病原性に関与すると考えられる分子の同定に成功した。本年度の成果を基に、今後は人のサンプルを用いて、難治性神経疾患、特に神経変性疾患とボルナウイルス感染との関連性の追求を行いたいと考えている。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1) 学会発表

1. Hayashi, Y., Daito, T., Horie, M., Honda, T., Ikuta, K. and Tomonaga, K.: Interaction of Borna disease virus X with Hsc70 modulates viral polymerase activity in the nucleus. The 8<sup>th</sup> Awaji international forum on infection and immunity 2008, Awaji Island, Japan.
2. Honda, T., Ohtaki, N., Hayashi, Y., Daito, T., Horie, M., Ikuta, K. and Tomonaga, K.: Glial dysfunction in the cerebellum of transgenic mice expressing Borna disease virus phosphoprotein. The 8<sup>th</sup> Awaji international forum on infection and immunity 2008, Awaji Island, Japan.
3. 河村知世, 宇根有美, 笛木敬祐, 町田晴一, 朝長啓造, 野村靖夫: ボルナ病と臨床診断された猫の脳におけるボルナ病ウイルスの分布と病理像. 第146回日本獣医学会学術集会 2008年, 宮崎
4. 堀江真行, 本田知之, 鈴木善幸, 小林由紀, 押田龍夫, 大東卓史, 林陽平, 五條堀孝, 生田和良, 朝長啓造: 内在性ボルナウイルスエレメントの発見とその進化に関する研

- 究. 第 146 回日本獣医学会学術集会 2008 年, 宮崎
5. 朝長啓造, 堀江真行, 大東卓二, 本田知之, 林 陽平, 生田和良. BDV サブタイプの同定と縮重プライマーによる検出の試み. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年, 岡山
  6. 本田知之, 大滝尚広, 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 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年, 岡山
  7. 本田知之, 大東卓二, 林 陽平, 堀江真行, 生田和良, 朝長啓造. マウス高病原性株を用いたボルナ病発症要因の解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年, 岡山
  8. 大東卓史, 林 陽平, 本田知之, 堀江真行, 生田和良, 朝長啓造. BDV リバースジェネティクスの確立と BDV ベクターの開発に向けた検討. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年, 岡山
  9. 林 陽平, 大東卓史, 堀江真之, 本田知之, 生田和良, 朝長啓造. BDV X 蛋白質と相互作用する宿主因子の同定と複製への影響. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年, 岡山
  10. 堀江真行, 本田知之, 鈴木善幸, 小林由紀, 押田龍夫, 大東卓史, 林 陽平, 五條堀 孝, 生田和良, 朝長啓造. 内在性ボルナウイルスエレメントの発見と BDV 内在化プロセスに関する解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年, 岡山
  11. 渡邊洋平, 林 陽平, 生田和良, 朝長啓造. BDV の複製と持続感染を制御する polycistronic mRNA の新規翻訳調節機構の解明. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年, 岡山
- 2) 原著論文による発表
1. Matsunaga H, Tanaka S, Fukumori A, Tomonaga K, Ikuta K, Amino N, Takeda M. Isotype analysis of human anti-Borna disease virus antibodies in Japanese psychiatric and general population. *J. Clin. Virol.* **43**:317-322 (2008)
  2. Lee B-J, Matsunaga H, Ikuta K and Tomonaga K. Ribavirin inhibits Borna disease virus proliferation and fatal neurological diseases in neonatally infected gerbils. *Antiviral Res.* **80**:380-384 (2008)
  3. Hayashi Y, Horie M, Daito T, Honda T, Ikuta K and Tomonaga K. Heat shock cognate protein 70 controls Borna disease virus replication via interaction with the viral non-structural protein X. *Microbes Infect.* in press.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 特になし

## 4. 神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明

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：小林 伸行 (東京慈恵会医科大学精神医学講座)  
中島 淳 (横浜市立大学・消化器内科教授)

研究要旨：我々は、これまでの研究で、クローン病患者や、うつ病患者において、異常な抗体反応を示す、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) の潜伏感染特異的遺伝子タンパク SITH-1 を見出した。今年度は、この HHV-6 潜伏感染遺伝子をマウス脳内アストロサイトに導入し SITH-1 タンパクが、うつ病や躁うつ病などの気分障害を生じさせることを示した。このことは、この SITH-1 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ものであった。また、SITH-1 導入マウスは、ヒトの躁うつ病に非常に類似した病態を示すため、この研究成果は、ウイルス以外の原因によってもたらされる躁うつ病や、うつ病の予防法・治療法の開発にもつながるものであると考えられた。

### A. 研究目的

難治性疾患は、慢性疾患であると同時に、寛解と増悪を繰り返すものが多い。この現象は、ヘルペスウイルスの特徴である、潜伏感染と再活性化の反復と似ているため、ヘルペスウイルスと難治性疾患との関係は、古くから疑われてきた。

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  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の 3 種類に分類されている。 $\beta$ -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。

$\beta$ -ヘルペスウイルスは多くの慢性難治性疾患患者で、再活性化したウイルスが検出されている。しかし、ウイルスの検出だけでは、このウイルスの再活性化が、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ということはできない。

我々は、この問題を解決するために、主とし

て HHV-6 の潜伏感染・再活性化機構と、潜伏感染特異的遺伝子産物に関する研究を行なって来た。これまでの研究で、難治性疾患、特に中枢神経疾患である「うつ病」や、消化器疾患であるクローン病と関係すると考えられる、潜伏感染特異的遺伝子タンパク Small protein encoded by the Intermediate stage Transcript of HHV-6 (SITH)-1 を見出した(図 1)。

HHV-6 潜伏感染蛋白 SITH-1 は、クローン病患者において、異常な抗体反応が見られた。また、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 SITH-1 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 SITH-1 抗体が陽性であることが判った(図 2、3)。

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 SITH-1 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 SITH-1 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発症メカニズムの研究にも有用な材料を提供するものと考えられた。

本年度は、SITH-1 がうつ病やうつ症状などを引き起こす原因となることを示すために、SITH-1 発現マウスを作成し、主としてマウスの行動実験によって、SITH-1 がうつ病やうつ症状を引き起こすことを示した。

## B. 研究方法

### 1. SITH-1 遺伝子の導入

昨年度までの難治性疾患・斑研究によって同定した、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た。HHV-6 は、脳内ではアストロサイトにおいて潜伏感染すると考えられており、SITH-1 も主としてアストロサイトにおいて発現する(図 1)。そこで、SITH-1 発現をヒトの状態にできるだけ近づけるため、発現は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て行なった。

また、遺伝子導入は、発現期間はあまり長くないが、高発現が期待できるアデノウイルスベクターと、発現量は低いが長期間の発現が期待できるレンチウイルスベクターの両者を用いて行なった。HHV-6 は生後 1 年以内の乳児期に感染するため、両ウイルスとも、生後 48 時間以内にマウス脳内に接種した。

### 2. マウスの異常行動の観察

SITH-1 に対する抗体が、精神疾患やクローン病のうつ症状を多く伴う患者から検出されることから、うつ病などの精神疾患である、気分障害を観察するために用いられる行動実験を SITH-1 導入マウスに対して行なった。

行なった行動実験は、以下のものである。

#### i. 尾懸垂テスト

尾懸垂テストは、主として抗うつ薬や覚醒物質などの効果を検討するために用いられる試験で、尾を固定して吊るした動物が、どの程度の時間静止しているかを観察する。懸垂は 10 分程度行い、静止時間が短縮していれば、興奮状態になっていることを表す。

#### ii. Prepulse Inhibition テスト

これは、音刺激に対する驚愕反応の強さを定量化する検査で、人に対しても躁鬱病や統合失調症の検査目的で行なわれるものである。Prepulse Inhibition テストは、強い音刺激の前に、少し小さめの音を聞かせると、音刺激に対する反応が弱まるという現象(Prepulse Inhibition)を利用したもので、躁鬱病や統合失調症の患者では、この Prepulse Inhibition の効果が減少する。

#### iii. Wheel running テスト

これは、マウスが自発的に運動した量を、滑車を回す回数によって計測する試験である。48 時間にわたりマウスが車輪を回転させた回数を記録した。自発運動は、マウスが夜行性であることを考慮して夜間の運動量において評価した。

### 3. マウス脳内の遺伝子発現の検討

SITH-1 によるマウスの行動異常のメカニズムを検討するために、SITH-1 および、c-Fos 遺伝子の発現量を検討した。c-Fos 遺伝子は、脳の神経細胞の活動量の指標として用いられる遺伝子である。両者とも、mRNA 特異的なプライマーおよび TaqMan プロンプを作成し、Real-time PCR 法による測定を行なった。

#### (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。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

### SITH-1 によるマウスの行動異常

#### i. 尾懸垂テスト

アデノウイルスベクターを用いて SITH-1 遺伝子を導入し、導入 3 週後に 10 分間尾懸垂テストを行った。前半 5 分、後半 5 分間、total 10 分間の無動時間の合計を測定した。赤が SITH-1 発現マウスでは、後半 5 分間の無動時間の有意な短縮を認めた。この現象は、SITH-1 が躁症状を引き起こすこと示唆するものであった。これまでは、尾懸垂テストにおいて無動時間が短縮するとする報告は、抗うつ薬や覚醒剤などの薬剤投与時に限られていた。このことから、SITH-1 が脳機能に直接的に、非常に大きな影響を与え、気分障害を生じさせていることが示唆された(図 4)。

#### ii. Prepulse Inhibition テスト

アデノウイルスベクターを用いて SITH-1 遺伝子を導入し、導入 3 週後に Prepulse Inhibition (PPI) を測定した。prepulse として 86dB, pulse として 110dB の音を与えたもの、prepulse として 86dB, pulse として 120dB の音を与えたものを検討した(図 5)。グラフの高さが低いほど、驚愕反応の抑制が弱くより驚き易くなっている、つまり PPI が障害されていることを示している。図 5 に示すように SITH-1 発現マウスでは PPI 障害が生じていることが観察された。このことは、マウスが気分障害(躁状態)になっていることを示すものと考えられた。

#### iii. Wheel running テスト

レンチウイルスベクターにより SITH-1 を導入し、導入 8 週後の自発運動を、Wheel running テストによって検討した(図 6、7)。図

7 のグラフに示します通り、SITH-1 発現マウスでは自発運動量の低下が観察された。このことは、マウスがうつ状態になっていることを示している。なお、アデノウイルスベクターを用いた SITH-1 遺伝子の導入では、アデノウイルスベクターによる遺伝子発現期間が短いため、導入 3 週後、すなわち 3 週齢のマウスまでしか SITH-1 遺伝子の効果を検討できない。今回用いた滑車では、3 週齢のマウスでは、滑車を回す力が弱く、自発運動を観察できなかった。尾懸垂テストおよび Prepulse Inhibition テストと、wheel running テストによって観察される躁状態とうつ状態の違いは、SITH-1 遺伝子の発現量によるところが大きいと考えられた。つまり、SITH-1 遺伝子が多量に発現されると躁状態となり、少量の発現が持続すると、うつ状態になるのではないかと考えられた。

#### iv. 遺伝子発現量の検討

アデノウイルスベクターとレンチウイルスベクターによる SITH-1 発現量の違いを検討した(図 8)。アデノウイルスベクターで導入した方が SITH-1 発現量が多く、レンチウイルスベクターでは SITH-1 発現量が少ないことがわかった。今回の動物実験の結果では、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たが、これは、SITH-1 遺伝子の発現量による可能性の他、週齢による違いや、発現期間の違いによる可能性も考えられるので、さらに今後の検討が必要である。

脳の活動の指標となる脳内 c-Fos 遺伝子の発現も検討した(図 9)。c-Fos は神経興奮のマーカーとして利用され、躁うつ病での発現変化の報告もあります。図 9 に示す様に、アデノウイルスベクターを用いて SITH-1 を導入した 3 週齢マウスにおいて、SITH-1 発現により c-Fos の上昇を認めた。SITH-1 は GFAP プロモーターを用いて、アストロサイト特異的に発現させているため、この結果は、グリアの異常によりニューロ



ンの活動が影響されていることを示唆している。また、この実験では、マウス全脳より RNA を精製しているため、結果的に SITH-1 の効果が、過少評価されている可能性がある。今後、SITH-1 の効果を正しく評価するためには、海馬など部位別に c-Fos 遺伝子の発現を検討する必要があると考えられた。

(図 1)  
ヒトヘルペスウイルス6の潜伏感染

潜伏感染特異的遺伝子産物

sense: HHV-6 latent transcripts (H6LT1, H6LT2)

anti-sense: Small protein encoded by the intermediate stage Transcript of HHV-6 (SITH)-1

	マクロファージ	アストロサイト
H6LT	+++	±
SITH-1	+	++

→SITH-1は中枢神経系・高次脳機能へ影響？

(図 2)

HHV-6潜伏感染蛋白に対する血清抗体価



(図 3)

HHV-6潜伏感染蛋白に対する血清抗体価

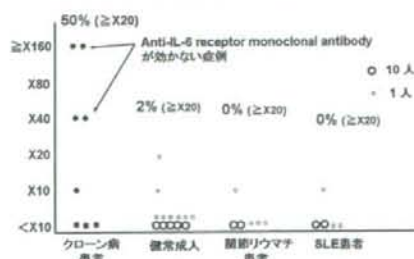


図 1: 新規 HHV-6 潜伏感染蛋白 SITH-1 の性質

潜伏感染特異的遺伝子産物 H6LT1,2 およびアンチセンス側に存在する small protein encoded by the intermediate stage transcripts of HHV-6(SITH-1) の発現の特徴を示す。

図 2: 鬱症状を呈する患者における抗体価

HHV-6 潜伏感染蛋白 SITH-1 に対する抗体価を検査した。抗体価は、潜伏感染細胞に対する抗体を蛍光抗体法にて検出した。健康人や臓器移植によって HHV-6 の再活性化を生じた患者では潜伏感染蛋白に対する抗体がほとんど検出されないのに対し、慢性疲労症候群(CFS)患者や引きこもりとも呼ばれる小児の CFS 患者において抗体陽性者が存在することが判った。CFS 患者の中でも特に鬱症状を呈する患者と、精神科に受診している患者の中で鬱症状を呈する患者における抗体価を示す。ここで示す小児の CFS 患者のほとんどは、何らかの鬱症状を示している。

図 3: 炎症性腸疾患を呈する患者における抗体価と治療抵抗性との関係

クローン病患者における抗 HHV-6 潜伏感染蛋白抗体価と、免疫抑制療法である抗 IL-6 受容体抗体治療に対する抵抗性を検討した。この結果、抗 HHV-6 潜伏感染蛋白抗体を保有する患者では、免疫抑制治療に対する抵抗性があることが判った。また、関節リウマチや SLE などの他の自己免疫疾患の患者では、抗 HHV-6 潜伏感染蛋白抗体は検出されなかった。

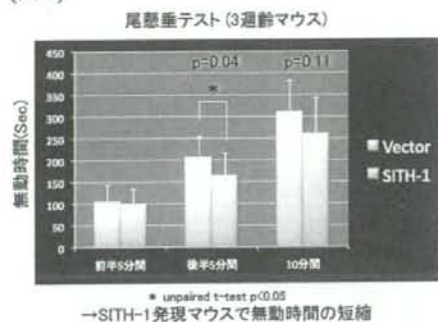
図 4: 尾懸垂テストによるマウスの行動の観察

アデノウイルスベクターを用いて SITH-1 導入 3 週後に 10 分間尾懸垂テストを行った。前半 5 分、後半 5 分間、total 10 分間の無動時間の合計を棒グラフに示す。右のカラムが SITH-1 発現マウス、左のカラムはアデノウイルスベクターのみを接種したことを示す。

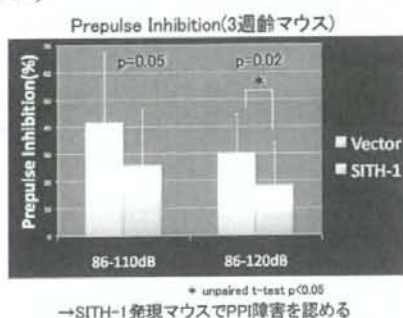
図 5: Prepulse Inhibition テストによるマウスの驚愕反応の観察

マウスの脳の抑制機能を、その指標である pre-pulse inhibition (PPI) によって測定した。測定は、アデノウイルスベクターを用いて SITH-1 導入 3 週後に行なった。prepulse として 86dB, pulse として 110dB の音を与えたもの、prepulse として 86dB, pulse として 120dB の音を与えたものを示す。右のカラムが SITH-1 発現マウス、左のカラムはアデノウイルスベクターのみを接種したことを示す。

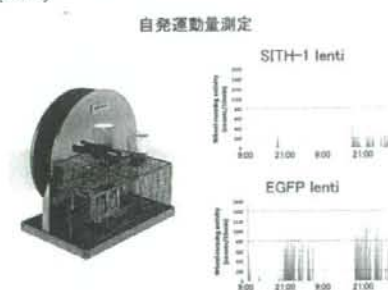
(図 4)



(図 5)



(図 6)



(図 7)

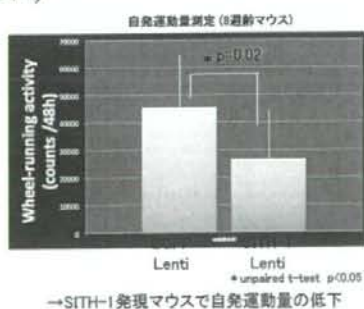


図 6: 回転ケージを用いた自発運動量の測定

48時間にわたりマウスが車輪を回転させた回数を記録した。車輪の回転数が棒グラフに示されている。SITH-1は、レンチウイルスベクターを用いて導入した。マウスは夜行性なので夜に車輪を多く回している。このグラフにおいて、SITH-1発現マウスでは自発運動量が少ないことが判る。

図 7: 回転ケージを用いた自発運動量の測定

48時間にわたるマウスの車輪を回転させた回数の結果を示す。SITH-1は、レンチウイルスベクターを用いて導入した。

図 8: ウイルスベクターによる SITH-1 発現量の比較

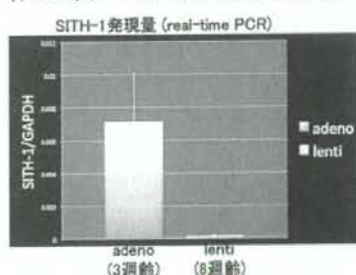
アデノウイルスベクターとレンチウイルスベクターによる SITH-1 発現量の違いを示す。発現量は、Real-time PCR 法による mRNA 量の測定によって計測した。

図 9: 脳内 c-fos 遺伝子の発現量の比較

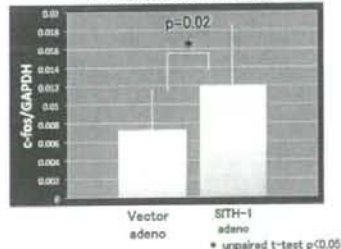
SITH-1 が脳に与える影響を調べるために、脳内の c-fos 発現を検討した。発現量は、Real-time PCR 法による mRNA 量の測定によって計測した。

(図 8)

ウイルスベクターによるSITH-1発現量の比較



(図 9)

脳内mRNAの変化  
c-fos発現量 (real-time PCR)

\* unpaired t-test  $p < 0.05$   
→SITH-1発現マウスではc-fosの上昇を認めた

## D. 考察

HHV-6 は脳内で潜伏感染・再活性化を生じる数少ないウイルスの一つである。その潜伏感染細胞は、アストロサイトなどを中心とするグリア細胞であると考えられている。また、潜伏感染部位には偏りがあり、事故死体などにおける検討では、主として前頭葉や海馬領域に多くの HHV-6 DNA が検出される。

これまでの検討から、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。また、SITH-1 がアストロサイト細胞中のカルシウム濃度を異常に上昇させることも示して来た。

近年、脳の機能に関するグリア細胞の重要性が非常に注目されている。特に、アストロサイトにおけるカルシウム濃度の変化は、神経細胞のシナプス伝達の調整に極めて重要であると考えられている。また、アストロサイトの支配するシナプスは非常に数が多いため、フォーカス状に潜伏感染している HHV-6 の影響は計り知れない。また、HHV-6 が潜伏感染している部位が、前頭葉や海馬領域であることより、HHV-6 による中枢神経機能異常は、思考や情動に関係するものであると予測される。

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、マウスの行動異常を観察した。この結果、尾懸垂テスト、Prepulse Inhibition テスト、Wheel running テストといった代表的な気分障害に関する検討において、SITH-1 導入マウスが気分障害様の異常行動を示した。特に、SITH-1 の発現量が多いと考えられるアデノウイルスベクターによる SITH-1 導入マウスでは、躁うつ病様の症状が観察された。躁うつ病は、うつ病を含む感情障害の中でも、特に身体的な原因によって生じると考えられるものである。アデノウイルスベクターによる遺伝子導入で躁状態が見られるのに対し、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については、SITH-1 遺伝子の発現量による可能性の他、週

齢による違いや、発現期間の違いによる可能性も考えられるので、さらに今後の検討が必要である。

今回、SITH-1 蛋白をマウスの脳内アストロサイトで発現させることによって、マウスに気分障害(躁うつ病様の)症状を生じさせることができた。このことは、気分障害患者に高率に観察される抗 SITH-1 抗体が、気分障害の結果として観察されるものではなく、HHV-6 の潜伏感染遺伝子 SITH-1 の発現によって、気分障害が誘導されることを示すものと考えられた。

## E. 結論

クローン病患者やうつ病患者で特異的に発現亢進が見られる HHV-6 潜伏感染遺伝子 SITH-1 をマウス脳内アストロサイトに発現させ、躁うつ病様の気分障害を誘導することに成功した。このことは、HHV-6 の潜伏感染遺伝子 SITH-1 が、気分障害の原因となることを示すものと考えられた。

また、躁うつ病や、うつ病の原因はほとんど明らかにされておらず、良いモデル動物も存在しない。本研究によって作成された SITH-1 導入マウスは、ヒトの躁うつ病に非常に類似した病態を示すため、ウイルス以外の原因によってもたらされる躁うつ病や、うつ病の予防法・治療法の開発にもつながるものであると考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1. K. Kondo, N. Kobayashi, K. Shimada, H. Kuratsune, H. Matsunaga.

Identification of novel HHV-6 latent protein

associated with mood disorders in CFS, depressive disorder, bipolar disorder and HHV-6 encephalopathy.

International Symposium on Viruses in Chronic Fatigue Syndrome  
(June 22, Baltimore 2008)

2. 小林伸行、嶋田和也、清水昭宏、近藤一博  
ヒトヘルペスウイルス(HHV)-6 潜伏感染  
中間状態特異的タンパクによる気分障害の  
発症機序  
(第56回日本ウイルス学会、2008年10月 岡  
山)
3. 鎌田美乃里、近藤一博  
HHV-6 感染 SCID-hu マウスを用いた HHV-6  
潜伏感染細胞の同定  
(第56回日本ウイルス学会、2008年10月 岡  
山)
4. 清水昭宏、小林伸行、近藤一博  
遺伝子治療を目的としたヒトヘルペスウイ  
ルス 6 ペクターの性状解析  
(第56回日本ウイルス学会、2008年10月 岡  
山)
5. 嶋田和也、近藤一博  
スプライシング関連因子 SART3 のアンチセ  
センスによるヒトヘルペスウイルス 6(HHV-6)  
ie1/ie2 mRNA の選択的スプライシングに対  
する影響  
(第56回日本ウイルス学会、2008年10月 岡  
山)
3. 書籍等
1. K. Kondo. Chronic Fatigue Syndrome and  
Herpesvirus Infection. In: Fatigue Science for

Human Health. Springer Press, 2008. pp.  
137-152.

2. ガイドライン  
渡辺恭良、平山佳伸、近藤一博、倉恒弘彦  
日本疲労学会 抗疲労臨床評価ガイドライ  
ン (2008年2月16日)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

1. 近藤一博 (発明人)  
HHV-6 再活性化を用いた疲労度評価方法およ  
びその利用  
特許番号: 2008年11月21日 (特許第4218842  
号)

特許出願

2. 近藤一博、小林伸行 (発明人)  
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  
米国出願番号 No. 61/102, 441 出願日 2008年  
10月3日
3. 近藤一博、清水昭宏、高倉由光、市川雅子  
(発明人)  
HHV-6 再活性化検出のためのウイルス濃縮  
法 特願 2008-092816  
出願日 2008年3月31日
4. 近藤一博、清水昭宏、高倉由光、市川雅子  
(発明人)  
HHV-6 再活性化測定のためのウイルス定量  
法 特願 2008-093288  
出願日 2008年3月31日

## 5. 慢性肺気腫ないし呼吸不全とウイルス感染

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 教授)

研究協力者：吉田元樹、浅田成紀（東北大学病院老年科）

久保裕司（東北大学先進感染症予防学寄附講座）

佐々木陽彦（東北大学病院呼吸器内科）

中山勝敏（東京慈恵会医科大学呼吸器内科）

新矢恭子（神戸大学医学部人畜共通感染症講座）

研究要旨 1) 肺気腫増悪患者 18 例中 3 例で RS ウイルス血清抗体価上昇を認め、日本人肺気腫増悪における RS ウイルス感染の関与が示唆された。2) ヒト気道上皮における RS ウイルス感染受容体 RhoA 活性化抑制および Rho kinase 抑制を介した、マクロライドの RS ウイルス感染抑制効果を認めた。3)  $\beta 2$  刺激薬による気道上皮 NF- $\kappa$ B 活性化抑制を認め、ライノウイルス感染受容体 ICAM-1 発現抑制の機序が示唆された。4) HMG-CoA 還元酵素阻害薬（スタチン）によるヒト気道上皮における、感染受容体 ICAM-1 発現抑制を介したライノウイルス感染抑制効果が認められた。5) ヒト型インフルエンザ感染受容体であるシアル酸(SA $\alpha$ 2,6Gal)のマクロライドおよび喀痰調整薬による発現抑制を認めた。ヒト気道上皮におけるこれらの医薬品のインフルエンザ感染抑制効果の 1 つの機序と示唆された。

### A. 研究目的

1) RS ウイルスは乳幼児の細気管支炎の原因ウイルスであると従来から報告がなされ、乳幼児にのみ関係があると認識されてきた。しかし、インフルエンザウイルス、ライノウイルスと共に、慢性肺気腫の増悪による呼吸不全の原因ウイルスになると、欧米から報告が近年なされている。本研究班において、私たちはライノウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルスが慢性肺気腫の増悪を惹起すると報告してきた。本年度は RS ウイルス感染の慢性肺気腫増悪における役割を調査した。

2) RS ウイルスは感染を抑制する医薬品が実用化されていない。RS ウイルスの細胞側受容体として活性化 RhoA が細胞融合、ウイルス進入に関係すると報告されている。昨年度までパフ

イロマイシンやエリスロマイシン、クラリスロマイシンなどのマクロライドの RS ウイルス感染抑制作用を報告した。また、薬品が血管内皮細胞や気道上皮細胞における RhoA 活性化抑制効果を報告した。本年度は気道上皮細胞における活性化 RhoA に対するマクロライドの抑制効果を検討した。

3)  $\beta 2$  刺激薬は肺気腫治療において抗コリン薬とともに中心的な役割を持っている。 $\beta 2$  刺激薬は気道拡張効果とともに肺気腫増悪抑制作用も有している。本研究班において私たちは、これまで $\beta 2$  刺激薬プロカテロールが感染受容体発現抑制を介したライノウイルス感染抑制作用を報告してきた。また、炎症性サイトカイン放出抑制が気道炎症抑制効果をもたらすと報告してきた。本年度はライノウイルス感染受容体

ICAM-1 および炎症性サイトカイン合成に関与する NF- $\kappa$ B 活性に対する $\beta$ 2 刺激薬プロカテロールの抑制作用を検討した。

4) HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン) はコレステロール減少を介した動脈硬化関連疾患、虚血性心疾患などの予防効果を有している。一方で血管の炎症抑制作用も有している。HMG-CoA 還元酵素阻害薬は血管以外の細胞においてもライノウイルス感染受容体 ICAM-1 発現抑制作用や炎症性サイトカイン放出抑制作用、慢性閉塞性肺疾患 (肺気腫) のインフルエンザ感染・肺炎による死亡減少効果が報告されている。この背景より、ライノウイルス感染抑制作用を有するかどうか、気道上皮細胞で検討した。

5) 昨年度までの研究で、ヒト気道上皮細胞におけるマクロライドや喀痰調整薬のインフルエンザウイルス感染抑制作用を報告した。作用機序の1つとして、ウイルス RNA 移動経路にあたる酸性エンドゾームの機能抑制効果をこれまで報告してきた。本年度はヒト型インフルエンザ感染受容体の細胞表面における発現が抑制されるかどうか検討した。

#### (倫理面への配慮)

ヒト気管上皮細胞培養、および慢性肺気腫における風邪罹患および呼吸不全に対する調査は東北大学医学部倫理委員会の承認を得て行なった。

## B.研究方法

1) 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を中和試験法で測定した。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。風邪罹患後の増悪を生じた患者は 18 名 (平均年齢 73 歳、すべて男性) であった。性 48 名、女性 2 名) に

分けた。風邪罹患は Jackson らの基準、増悪は Anthonisen の基準に従って判定した。

2) RS ウイルスの細胞側受容体である活性化 RhoA はウエスタンブロット法にて測定した。実験上で使用されるマクロライドであるバフィロマイシン(bafilomycin A1, 10 nM)および臨床で使用されるマクロライドであるクラリスロマイシン(clarithromycin, 10  $\mu$ M)を3日間ヒト気管上皮細胞処理し、LPA(lysophosphatidic acid, 5  $\mu$ M, 5 分間)にて刺激した。さらに、RhoA 活性化阻害薬 *N-acetyl-S-granlylgranyl-L-cysteine* (AGGC)および Rho kinase 抑制薬 fasudil (10  $\mu$ M, HA1077)で細胞を処理してRS ウイルスを感染させ、培養液ウイルス放出量および細胞内 RS ウイルス RNA を測定した。

3) NF- $\kappa$ B 活性に対する $\beta$ 2 刺激薬プロカテロールの抑制作用を検討するため、プロカテロール(0.1  $\mu$ M)を3日間ヒト気管上皮細胞に作用させた。細胞蛋白を抽出し、NF- $\kappa$ B 活性を ELISA 法 (TransFactor Kits<sup>®</sup>) で測定した。

4) HMG-CoA 還元酵素阻害薬 Pitavastatin (リパロ<sup>®</sup>) (10  $\mu$ M)および Lovastatin(10  $\mu$ M)をヒト気管上皮細胞に3日間作用させ、ライノウイルス 14 型 (以下 RV14) 10<sup>5</sup> TCID50 units/ml (TCID50; tissue culture infective dose 50)を1時間感染させた。培養液 RV14、培養液 Interleukin(IL)-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 および可溶性 ICAM-1 を測定した。

5) ヒト気管上皮におけるヒト型インフルエンザ感染受容体であるシアル酸(SA $\alpha$ 2,6Gal)のマクロライドおよび喀痰調整薬による発現抑制を調べた。クラリスロマイシン(10  $\mu$ M)あるいは L-カルボシステイン(10  $\mu$ M)を24時間処理したヒト気管上皮を、FITC ラベルした *Sambucus nigra* (SNA) lectin (Vector Laboratories, Burlingame, CA) および Alexa Fluor 594 に結

合した streptavidin, (1:250, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) で培養した。その後、4',6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI; Dojindo Molecular Technologies, Inc., Kumamoto) で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

### C. 研究結果

1) 風邪症状後に増悪を来した 18 例において、血清 RS ウイルス抗体価は増悪時に種々の値を示した。そのうち、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 例であった (図 1)。

図 1

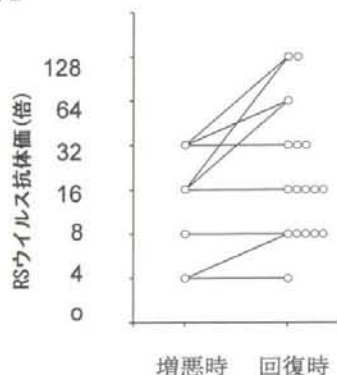


図 1. 増悪を示した患者における RS ウイルス抗体価の変化. 3 例において、回復期の 4 倍以上の有意の上昇を認めた。

さらに、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 (図 2)。上昇の程度は以前に本研究班で報告した、ライノウイルス感染時と同等であった。また、動脈血酸素分圧は増悪時に低下し、回復時に回復した (図 3)。

図 2a

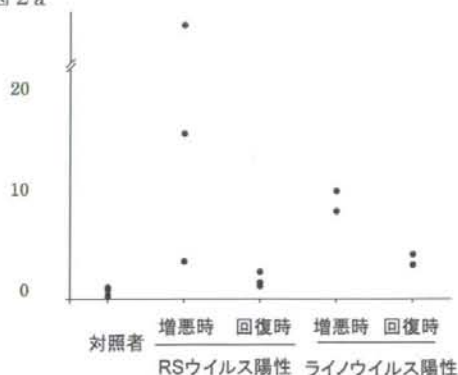


図 2a. 増悪時および回復時の血中 IL-6 濃度 (pg/mL). 対照者に比較して増悪時に上昇、ライノウイルス陽性と比較して同等。

図 2b

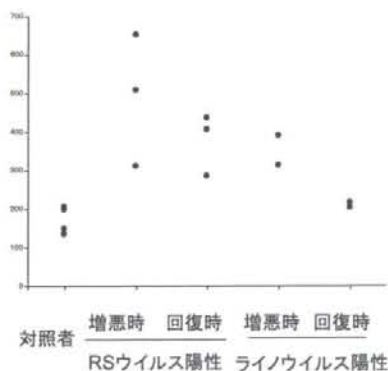


図 2b. 増悪時および回復時の血中可溶性 ICAM-1 濃度 (ng/mL). 対照者に比較して増悪時に上昇、ライノウイルス陽性と比較して同等。

2) ヒト気管上皮細胞は活性化 RhoA を定常状態で発現した。この細胞を LPA で刺激すると活性化 RhoA は増加した。さらに、bafilomycin A1 および clarithromycin で処理すると活性化 RhoA の発現は減少した (図 4)。また、RhoA 阻害薬である AGGC および Rho kinase 阻害薬

図 3

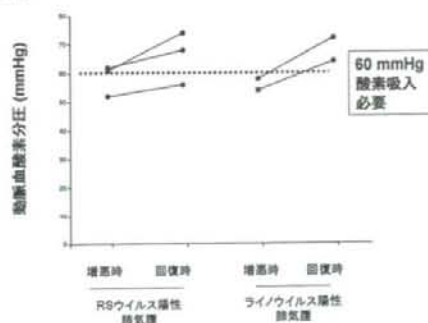
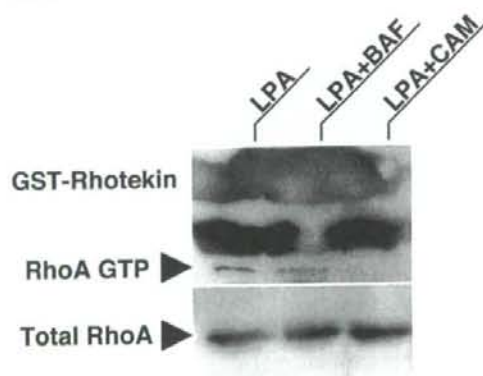


図 3. RS ウイルス感染増悪時前後の動脈血酸素分圧. RS ウイルス感染増悪時、動脈血酸素分圧が低下し、回復時に上昇する。動脈血酸素分圧の低下の程度はライノウイルス感染増悪時と同等。

図 4



である fasudil で細胞を処理すると培養液 RS ウイルス放出量は減少した (図 5)。

図 5

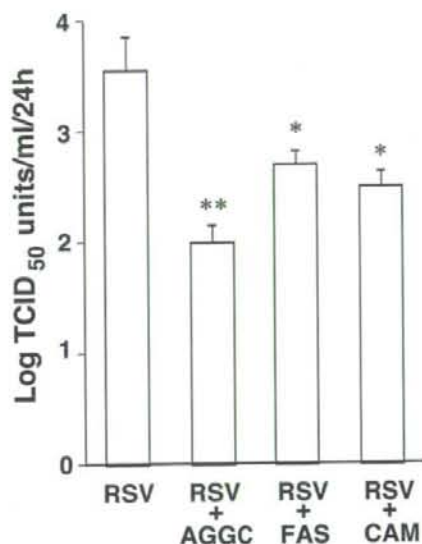


図 5. 培養液 RS ウイルス放出に対する AGGC、ファスジル(Fasudil; FAS)およびクラリスロマイシン(CAM)の抑制効果。

図 4. パフィロマイシンおよびクラリスロマイシンによる RhoA 抑制効果. LPA 刺激で増加した活性化 RhoA(RhoA GTP)はパフィロマイシン(BAF)およびクラリスロマイシン(CAM)で減少する。

図 6

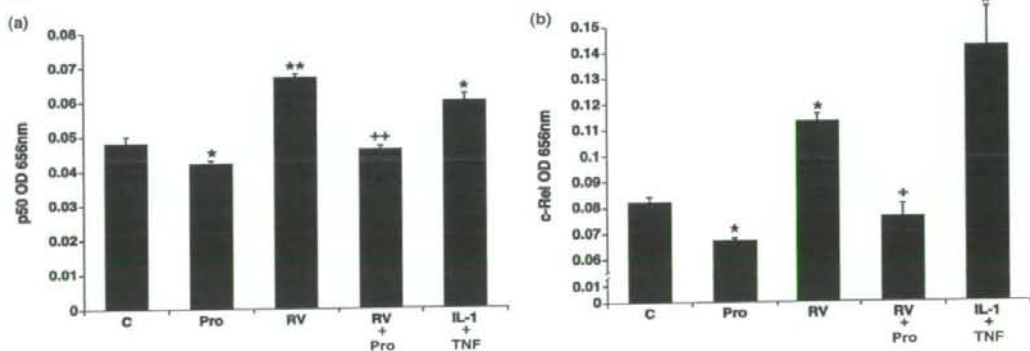


図 6. プロカテロールの NF- $\kappa$ B 抑制作用。



(図6説明続き) プロカテロール(Pro)はライノウイルス感染前の細胞において、P50、c-Rel 活性を抑制した。さらに、ライノウイルス(RV)感染後 P50、c-Rel 活性は増加するが、プロカテロール(0.1  $\mu\text{M}$ )にライノウイルス感染によって増加した活性を抑制した。さらに、P50、c-Rel 活性は IL-1 (10 ng/mL) + tumor necrosis factor (TNF, 10 ng/mL) 刺激で増加する。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; コントロール(C)に対する有意差。+ $P < 0.05$ , ++ $P < 0.01$ ; ライノウイルス感染(RV)に対する有意差。

3) NF- $\kappa\text{B}$  活性に対する $\beta 2$  刺激薬プロカテロールの抑制作用を検討するため、プロカテ

テロール(0.1  $\mu\text{M}$ )を3日間ヒト気管上皮細胞に作用させた。P50、P65、c-Rel 等の NF- $\kappa\text{B}$  活性を抑制した(図6)。さらに、ライノウイルス(RV)感染後 NF- $\kappa\text{B}$  活性は増加するが、プロカテロール(0.1  $\mu\text{M}$ )により活性は抑制された(図6)。

4) HMG-CoA 還元酵素阻害薬 Pitavastatin (リバロ®) (10  $\mu\text{M}$ )および Lovastatin(10  $\mu\text{M}$ )はヒト気管上皮細胞における培養液ライノウイルス放出量を濃度依存性に減少した(図7、図8)。

図7

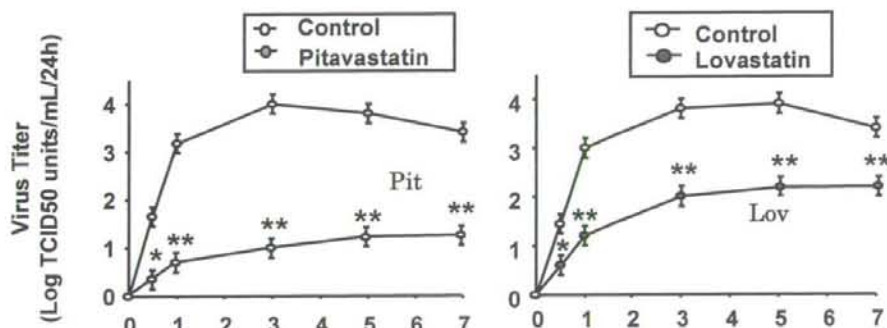


図7. HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン) Pitavastatin (リバロ®, Pit) (10  $\mu\text{M}$ )および Lovastatin(10  $\mu\text{M}$ , Lov)のライノウイルス培養液放出減少作用。ウイルス放出量は時間で増加する。スタチンは放出量を減少する。\* $P < 0.05$ \*\*、 $P < 0.01$ : コントロールに対する有意差。

図8

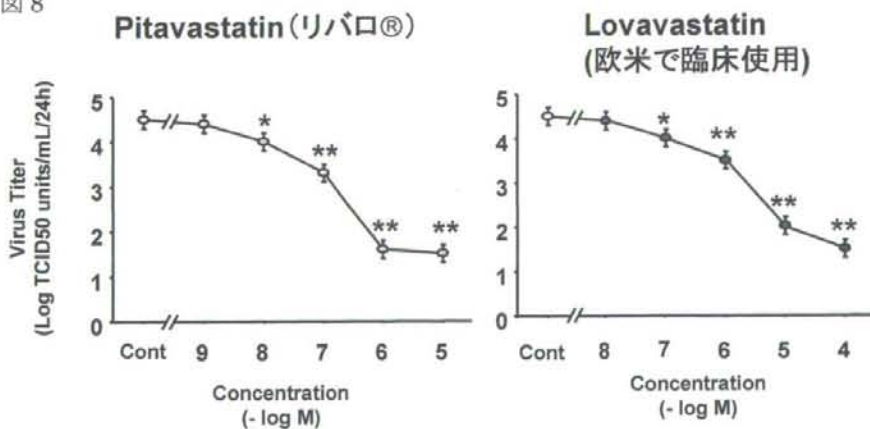


図8. HMG-CoA還元酵素阻害薬 Pitavastatin (リパロ®) (10 μM)および Lovastatin(10 μM)のライノウイルス培養液放出減少作用:濃度依存性. スタチンは放出量を濃度依存性に減少する。\*P<0.05, \*\*P<0.01:コントロールに対する有意差。

ライノウイルス感染は細胞内 ICAM-1mRNA および培養液可溶性 ICAM-1 (sICAM-1)濃度を上昇した。 Pitavastatin (10 μM) および Lovastatin(10μM)はライノウイルス感染前に ICAM-1mRNA および sICAM-1 を減少

させた。また、ライノウイルス感染で増加した ICAM-1mRNA および sICAM-1 を減少させた (図9)。

さらに、ライノウイルス感染は培養液 IL-1β、IL-6、IL-8 を増加した。 Pitavastatin (10 μM) および Lovastatin(10 μM)はライノウイルス感染で増加したこれらの炎症性サイトカインを減少させた (図10)。

5) 前年度までの研究で報告の通り、マクロライドおよび喀痰調整薬はヒト気管上皮細胞に

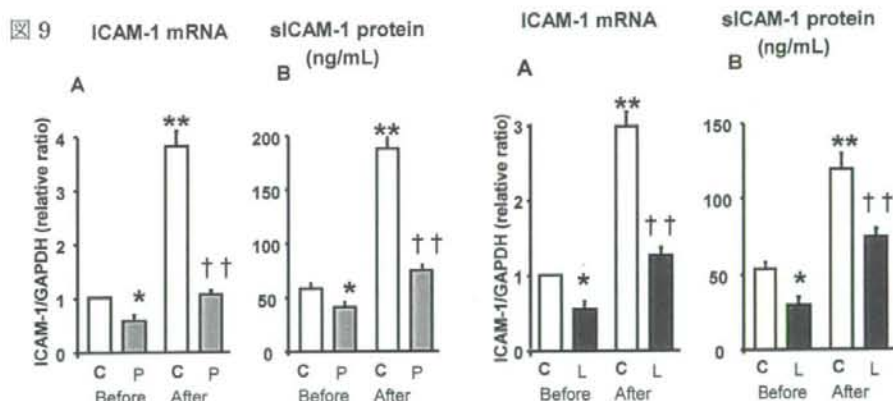


図9. 細胞内 ICAM-1mRNA 合成および可溶性 ICAM-1(sICAM-1)培養液濃度に対する HMG-CoA還元酵素阻害薬 Pitavastatin (P; 10 μM)および Lovastatin (L; 10 μM)の抑制作用。\*P<0.05, \*\*P<0.01: 感染前に対する有意差、††P<0.01: ウイルス感染に対する有意差。

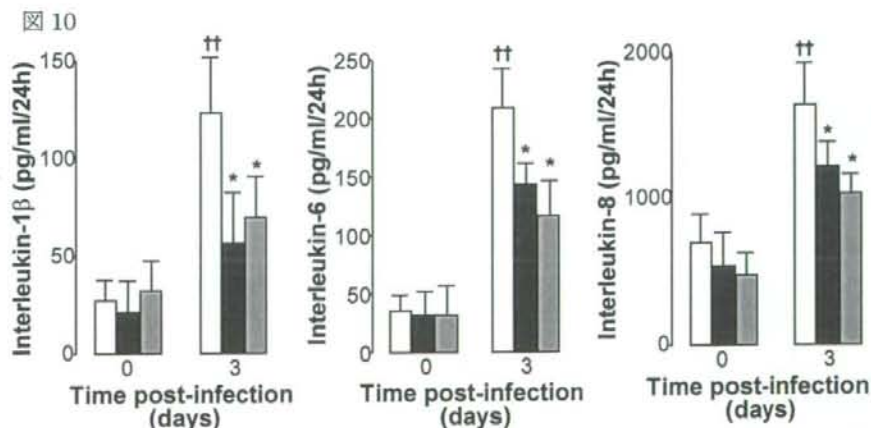


図10. ライノウイルス感染前および3日後の IL-1β、IL-6、IL-8 培養液放出に対する Pitavastatin (中パー; 10 μM)および Lovastatin (右パー; 10 μM)の抑制作用。††P<0.01: 感染前に対する有意差、\*P<0.01: ウイルス感染に対する有意差。

においてインフルエンザ A 型ウイルス感染後、培養液ウイルス放出量を減少させた。これに加えて、本年度、クラリスロマイシン(10  $\mu$ M)および L-カルボシステイン(10  $\mu$ M)処理による細胞内ウイルス RNA 減少を認めた (図 11)。

図 11

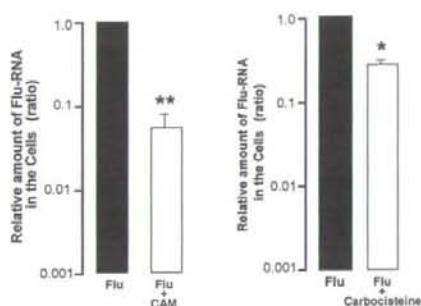


図 11. ヒト気管上皮細胞において、細胞内 A 型インフルエンザウイルス RNA 再合成はクラリスロマイシン(CAM)および L-カルボシステイン(Carbocisteine)処理にて減少した。結果は感染 5 日後の成績。ウイルスのみを 1.0 として比較。  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ : ウイルスのみに対する有意差。

図 12

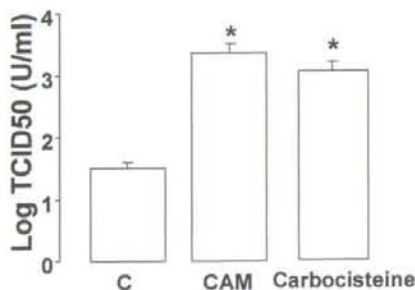


図 12. ヒト気管上皮細胞において感染成立に必要な A 型インフルエンザウイルス量は培養液のみのコントロール(C)に比較してクラリスロマイシン(CAM)および L-カルボシステイン(Carbocisteine)で増加した。  
\* $P < 0.05$ : コントロールに対する有意差。

さらに、ウイルス感染に必要なインフルエンザウイルス必要濃度を測定した。その結果、ク

ラリスロマイシン(10  $\mu$ M)および L-カルボシステイン(10  $\mu$ M)を処理した細胞における感染成立ウイルス量の増加を認めた (図 12)。したがって、クラリスロマイシン(10  $\mu$ M)および L-カルボシステイン(10  $\mu$ M)は A 型インフルエンザ感染に対する抵抗性をもたらしたことになる。

また、ヒト型インフルエンザ感染受容体であるシアル酸(SA $\alpha$ 2,6Gal)はヒト気管上皮において発現した。また、マクロライドであるクラリスロマイシン(10  $\mu$ M)および喀痰調整薬 L-カルボシステイン(10  $\mu$ M)は発現を抑制した (図 13)。

#### D. 考察

1) RS ウイルス感染は従来から乳幼児感染が多く、高齢者で発症する肺気腫の増悪としては重要視されてこなかった。しかし、今世紀になって、高齢者のインフルエンザ様発熱や肺気腫を含む慢性閉塞性肺疾患増悪の原因ウイルスと報告されてきた。しかし、本邦における研究はなされてこなかった。私たちは本研究班で以前に鼻咽頭ぬぐい液を用いてライノウイルスやインフルエンザウイルスの感染を証明したが、細胞接種法による RS ウイルス分離では RS ウイルス感染を証明できなかった。そのため、今回は風邪症状による肺気腫増悪時および治療 2 週間後の回復時に血清抗体価を測定して RS ウイルス感染を調査した。18 例が風邪症状による肺気腫増悪を生じた。増悪時の抗体価は抗体価 4 倍あるいは 32 倍等、症例によって様々であった。これは増悪を発症する風邪の以前にすでに何回か RS ウイルスに感染していた可能性がある。さらに、3 症例では回復時に 4 倍以上の抗体価上昇を認めた。すなわち、RS ウイルス感染を示唆する。本研究結果は日本人の肺気腫増悪を RS ウイルス感染が発症しうることを示した。この

図 13

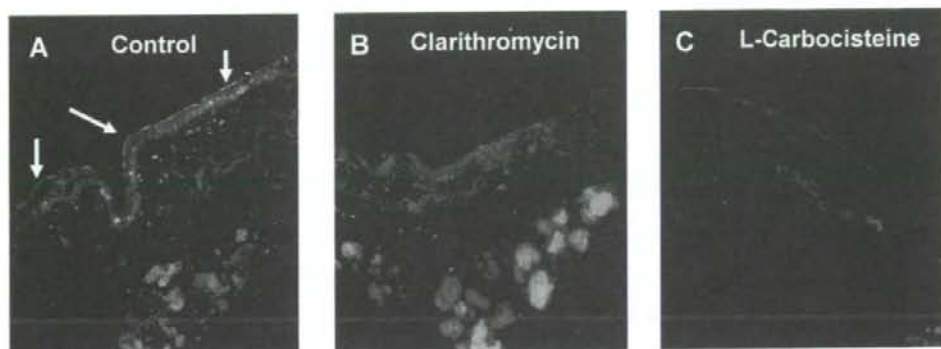


図 13. ヒト型インフルエンザ感染受容体シアル酸(SA $\alpha$ 2,6Gal)のヒト気管上皮における発現. コントロールでは細胞粘膜側に緑色のラインを描くように染色される(矢印)。クラリスロマイシン(Clarithromycin)カルボシステイン(L-Carbocisteine)によって発現は抑制する。

3 症例において、血中 IL-6 や可溶性 ICAM-1 が上昇した。しかも、以前に報告したライノウイルス感染症例と比較しても同等の上昇を認めた。増悪時の動脈血酸素分圧低下もライノウイルス感染症例と同様であった。RS ウイルス感染によるヒト気管上皮細胞からの炎症性物質放出を以前に本研究班で報告したように、RS ウイルス感染が気道炎症を惹起して肺気腫増悪と呼吸不全をもたらしたと示唆された。

2) マクロライドであるパフィロマイシン、エリスロマイシン、クラリスロマイシンによるヒト気管上皮細胞における RS ウイルス感染抑制作用を本研究班で以前に報告した。感染抑制の機序を本年度は検討した。その結果、パフィロマイシンおよびクラリスロマイシンが LPA 刺激によるヒト気管上皮細胞の RhoA 活性化を抑制した。すなわち、RS ウイルス F 蛋白の細胞側感染受容体発現をパフィロマイシンおよびクラリスロマイシンが抑制することが示唆された。さらに、RhoA 阻害剤 AGGC が RS ウイルス培養液放出量を減少した。また、RhoA 活性化の下流にある Rho kinase の阻害薬ファスジル

(Fasudil)も RS ウイルス培養液放出量を減少させた。この結果は RhoA を構成するペプチドを阻害させて RS ウイルス感染を抑制した報告と一致する。RhoA はこれまでの報告の通り、RS ウイルスの感染受容体として作用することが再確認された。また、Rho kinase がヒト気道上皮において RS ウイルス感染・増殖に関与することが示唆された。本研究において臨床的にしようされているマクロライドであるクラリスロマイシンが RS ウイルス感染を抑制することが明らかにされた。RS ウイルス感染で悪化する乳幼児喘息様細気管支炎、気管支喘息あるいは高齢者肺気腫増悪の治療・予防にとって画期的な医薬品になると考えられる。

3) 気管支拡張薬である $\beta$ 2 刺激薬プロカテロールにライノウイルス感染抑制効果のあることは以前に本研究班で報告した。プロカテロールはライノウイルス感染受容体 ICAM-1 の発現抑制を介して感染抑制効果を発揮する。また、ライノウイルス感染による IL-1 などの炎症性サイトカイン放出も抑制した。ICAM-1 および炎症性サイトカイン合成に転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化が関与するため、本年度は培養ヒト気管上皮細胞において NF- $\kappa$ B の活性化を検討した。結果、プロカテロールは p50 や c-Rel など、NF- $\kappa$ B 構成物質の活性化を抑制した。最近になって $\beta$ 2