

# 2008 年度 GCOE 博士研究員 RA 研究発表会 プログラム

日時 平成 21 年 3 月 10 日(火曜) 13:00~16:15

場所 北大獣医学研究科動物病院講義室 1F

北海道大学グローバル COE プログラム

『人獣共通感染症国際共同教育研究拠点の創成』

Global COE (Center of Excellence) Program

“Establishment of International Collaboration Centers for  
Zoonosis Control”

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/gcoe/>

問い合わせ先 北海道大学 獣医学研究科グローバル COE 推進室 011-706-5294

13:00-13:05 開催の挨拶 拠点リーダー 喜田 宏教授

■座長■ 原田種展

13:05-13:15

1. インフルエンザウイルス A/duck/Siberia/272/1998 (H13N6) の MDCK 細胞におけるプラーク形成に係る因子

津田祥美 (獣医学研究科 動物疾病制御学講座 微生物学教室)

13:15-13:25

2. 齧歯類におけるハンタウイルス型鑑別法の開発

安田俊平 (医学研究科 微生物学講座 病原微生物学分野)

13:25-13:35

3. 個体レベルにおける *Helicobacter pylori* CagA 構造多型と病態との関連解析

大西なおみ (遺伝子病制御研究所 病態研究部門 分子腫瘍分野)

13:35-13:45

4. タイレリア感染細胞における MDM2 の異常発現と p53 経路の不活化について

林田京子 (人獣共通感染症リサーチセンター 国際協力・教育部門)

■座長■ 安田俊平

13:45-13:55

5. サブサハラ諸国における心水症の分子疫学的研究

中尾 亮 (人獣共通感染症リサーチセンター 国際協力・教育部門)

13:55-14:05

6. ウエストナイルウイルスの疫学および自然界における存続様式に関する研究

村田 亮 (獣医学研究科 環境獣医科学講座 公衆衛生学教室)

14:05-14:15

7. 新たに発見されたポリオーマウイルス (KI ウイルス、WU ウイルス) のヒトにおける感染状況に関する検討

寺本 忍 (医学研究科 生殖・発達医学講座 小児科学分野)

14:15-14:25

8. マールブルグウイルスの抗体依存性感染増強現象の解析

マールブルグウイルス特異抗体検出法の開発

中山絵里 (人獣共通感染症リサーチセンター 国際疫学部門)

■座長■ 林田京子

14:25-14:35

9. インフルエンザウイルスの垂型間交差感染防御能をもつ抗体による新規インフルエンザ感染予防法の確立

苫米地大輔 (人獣共通感染症リサーチセンター 国際疫学部門)

14:35-14:45

10. 鶏およびマガン由来マレック病ウイルスの遺伝子解析とその比較

盧 虎琳 (獣医学研究科 動物疾病制御学講座 感染症学教室)

14:45-15:00 ===== 休憩 =====

■座長■ 津田祥美

15:00-15:10

11. プリオン感染マウス脳における骨髄由来間葉系幹細胞の動態

宋 昌鉉 (獣医学研究科 プリオン病学講座)

15:10-15:20

12. HTLV-I Tax transformed cell の走化性における CXCR4 を介したシグナル経路の解析

川口 晶 (人獣共通感染症リサーチセンター 分子病態・診断部門)

15:20-15:30

13. ウマヘルペスウイルス 1 型レセプターのクローニングと機能解析

佐々木道仁 (人獣共通感染症リサーチセンター 分子病態・診断部門)

15:30-15:40

14. 小児インフルエンザ脳症の実験的再現と発症機序の解明

田中智久 (獣医学研究科 診断治療学講座 比較病理学教室)

■座長■ 大西なおみ

15:40-15:50

15. DNA 免疫法を用いたマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) に対する高抗体価誘導法の研究

岩田大樹 (遺伝子病制御研究所 病態研究部門 免疫生物分野)

15:50-16:00

16. インフルエンザの予防・治療薬の開発

原田種展 (人獣共通感染症リサーチセンター バイオリソース部門)

16:00-16:10

17. Helicobacter pylori CagA は PAR1 キナーゼ活性を抑制し上皮細胞の細胞極性を破壊する

齊藤康弘 (遺伝子病制御研究所 病態研究部門 分子腫瘍分野)

欠席

18. マウス Oas1b のフラビウイルス抵抗性機構の解析

森藤 可南子 (獣医学研究科 動物疾病制御学講座 実験動物学教室)

19. ペラデニヤ大学狂犬病対策室における効率的なデータ管理システム等の構築

神田浩路 (医学研究科 予防医学講座 国際保健医学分野)

16:10-16:15 閉会の挨拶

# インフルエンザウイルス A/duck/Siberia/272/1998 (H13N6) の MDCK 細胞におけるプラーク形成に係る因子

津田祥美 (獣医学研究科 動物疾病制御学講座 微生物学教室)

多くのインフルエンザウイルスはトリプシン存在下において MDCK 細胞で効率よく増殖し、プラークを形成する。1998 年にシベリアでカモから分離した A/duck/Siberia/272/1998 (H13N6) (272 株) は MDCK 細胞でプラークを形成しなかった。272 株を MDCK 細胞で継代することにより得たプラークを形成する株 A/duck/Siberia/272PF/1998 (H13N6) (272PF 株) の遺伝子の塩基配列を 272 株のそれと比較した。両者は表面糖タンパク質 HA 分子上に 1 ヶ所およびポリメラーゼ蛋白質 PB1 分子上に 2 ヶ所のアミノ酸が異なることがわかった。そこで 272PF 株の HA および PB1 の分子上にアミノ酸置換を導入したウイルスをリバースジェネティクス法により作出し、その性状を比較した。

リバースジェネティクス法により作出したウイルス (Rg) の MDCK 細胞における増殖を比較するため、細胞上清中のウイルス価を経時的に測定した。その結果、Rg-272 は感染 36 時間後のウイルス価が  $10^{2.7}$  EID<sub>50</sub>/mL であった。一方、Rg-272PF は接種 9 時間後から細胞上清中に検出され、感染 36 時間後には  $10^{6.8}$  EID<sub>50</sub>/mL まで達した。また、HA のみ 272PF 株と同じ Rg-272/HA は Rg-272PF と比べて 48 時間後のウイルス価に差はないが、ウイルスの増殖が遅いことがわかった。HA のアミノ酸置換は Fusion peptide 上に認められた。そこで HA の膜融合活性を比較したところ、Rg-272PF は Rg-272 よりも膜融合活性が高いことが確認された。次に、ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイにより各 PB1 の RNA ポリメラーゼ活性を比較した。その結果、PB1 の 379 番目アミノ酸がリジンであるとスレオニンよりポリメラーゼ活性が高いことがわかった。感染細胞からウイルス RNA を抽出し、Real-time PCR により感染初期のウイルス RNA 量を比較したところ、Rg-272PF は感染初期における RNA 量が Rg-272 より明らかに高いことが示された。

これらの結果より、A/duck/Siberia/272PF/1998 (H13N6) は、A/duck/Siberia/272/1998 (H13N6) よりも膜融合活性と RNA ポリメラーゼ活性が共に高いため、MDCK 細胞でのウイルス増殖が促進され、プラークを形成したと考えられる。

# 齧歯類におけるハンタウイルス型鑑別法の開発

安田俊平（医学研究科 微生物学講座 病原微生物学分野）

ハンタウイルスはブニヤウイルス科に属し、腎症候性出血熱（HFRS）およびハンタウイルス肺症候群（HPS）の原因となるウイルスである。自然宿主は齧歯目およびトガリネズミ目に分類される小型哺乳類であり、抗原性や遺伝的な相違から現在22の型（species）に分類されている。その自然宿主は各型固有とされていたが、近年、1種類のハンタウイルス型が複数の宿主において検出されたり、1種類の宿主に複数のハンタウイルス型が感染することが報告された（Zeier *et al.* 2005 など）。これを受けて、疫学的視点から、野生哺乳類から検出されたハンタウイルスの型を迅速にかつ正確に鑑別する必要性が生じた。

発表者の所属する研究室では、これまで HFRS や HPS 患者の罹患ウイルス型を鑑別するために、中和試験の代替法として各ウイルスのヌクレオカプシドプロテイン（NP）の可変領域を抗原とした組換え NP (trNP) 抗原を用いた ELISA を開発してきた。この方法を野生哺乳類に応用し、流行ウイルス型の基盤情報を収集することを目的に、実験動物であるラット (*Rattus norvegicus*) に Seoul virus (SEOV) および Thailand virus (THAIV) を感染させ、鑑別 ELISA の評価を試みた。

ラット WKAH 系統の6週メス2個体に SEOV (SR-11) を感染させ、定期的に採血を行い、各ハンタウイルス型の NP 抗原と trNP 抗原を用いた ELISA により、血清中の IgM と IgG 抗体価の変動を計測した。結果、NP 抗原を使った IgM の ELISA では、6日目と9日目にそれぞれの個体で抗体価が急激に増加し、その後減少に転じ、24日目には非感染レベル近くまで抗体価が低下することが判明した。また、trNP を使用した場合、SEOV、Hantaan virus (HTNV)、および THAIV の3型の抗原いずれを使用しても抗体を検出することができず、IgM を使用した型鑑別は不可能であることが示唆された。IgG の抗体価は6日目と9日目にそれぞれの個体で上昇を始め、19日目以降は上昇が緩やかになった。また、SEOV と HTNV の NP 抗原を使用し比較検討した結果、抗体価の差は検出されなかった。逆に、HTNV、SEOV、および THAIV の trNP 抗原を使用した場合は、感染2週目以降において抗体価に差が検出され、その大きさは SEOV > HTNV > THAIV となった。よって、trNP を使用した ELISA を用いれば、感染直後の時期を除き SEOV を他のウイルス型から鑑別することが可能であることが明らかとなった。現在 THAIV 感染ラットにおいても同様の検討を進めている。さらに実際に野生の自然感染ラット血清を用いて本鑑別法の有用性を検討する準備を進めている。

# 個体レベルにおける *Helicobacter pylori* CagA 構造多型と病態との関連解析

大西なおみ （遺伝子病制御研究所 病態研究部門 分子腫瘍分野）

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 持続感染は胃炎や消化性潰瘍、さらには胃 MALT リンパ腫や胃癌等の悪性病変の発症に深く関与する。中でも、病原因子 CagA を産生する *H. pylori* 感染は胃癌発症と強い相関を示すことが知られ、CagA は *H. pylori* の重要な病原因子、特に胃癌発症を決定づける細菌側因子として注目されてきた。我々は現在までに、全身性に CagA を発現するトランスジェニックマウス (*cagA<sup>fls</sup>-Tg*) の解析から、マウス胃における CagA の構成的発現は胃上皮細胞の増殖能亢進を誘導することを見出し、さらに CagA が、マウス消化管上皮（胃および小腸）ならびに血液系細胞に腫瘍を発症する癌タンパク質として機能することを明らかにした。加えて、生体内における CagA の発癌活性には CagA のチロシンリン酸化を介した生物活性が必須であることを見出し、CagA による発癌過程進行において CagA のチロシンリン酸化依存的標的分子であるヒト癌タンパク質 SHP-2 の機能的脱制御が重要な役割を担う可能性が示唆された。

興味深いことに、CagA は単離される *H. pylori* 菌株ごとに SHP-2 との結合に直接関わる領域に著しい構造多型性を示し、その分子構造の違いに依存して胃癌発症率の高い東アジアで単離された *H. pylori* が保有する CagA（東アジア型 CagA）は、欧米株由来の CagA（欧米型 CagA）より強い SHP-2 結合親和性を示す。そこで本研究では、*H. pylori* CagA の構造多型と病原性・発癌活性との関連を解明することを目的とし、これまでの研究に用いてきた東アジア型 *cagA<sup>fls</sup>-Tg* に加えて欧米型 *cagA<sup>fls</sup>-Tg* を新たに樹立し、構造の異なる CagA 分子種間の生体内における病変発症率、病変の悪性度について比較・解析を行った。組織学的な解析の結果、欧米型 *cagA<sup>fls</sup>-Tg* においても胃上皮細胞の増殖能亢進所見が認められ、胃粘膜厚は東アジア型 *cagA<sup>fls</sup>-Tg* と同程度まで肥厚することを見出した。さらに 72 週齢までの長期観察の結果、欧米型 *cagA<sup>fls</sup>-Tg* は胃ならび小腸に過形成性ポリープ、腺腫、さらには腺癌を発症し、血液系腫瘍の発症も認められた。

本研究より、欧米型 CagA は東アジア型 CagA と同様に生体内で細胞増殖を亢進し、さらには発癌活性を有することが明らかになった。興味深いことに、現在までの解析結果から欧米型 *cagA<sup>fls</sup>-Tg* における病変発症率は、東アジア型 *cagA<sup>fls</sup>-Tg* と比較して低い可能性が示唆された。本研究のさらなる遂行により、分子構造の違いに依存した CagA 病原性・発癌活性の差異が生体における *cagA* 陽性 *H. pylori* 感染から胃癌発症に至る分子機構に与える影響を明らかにできるものと考えられる。

# タイレリア感染細胞における MDM2 の異常発現と p53 経路の不活化について

林田京子 (人獣共通感染症リサーチセンター 国際協力・教育部門)

## [背景]

*Theileria parva* はマダニ媒介性原虫であり、牛に東海岸熱と呼ばれる高致死性の疾患を引き起こす。本疾患の特徴は、タイレリア原虫のシゾン時期虫体がリンパ球内に寄生することにより宿主細胞を不死化・無限増殖を引き起こすことである。しかし本原虫感染によるリンパ球不死化の分子機序は完全には解明されておらず、この不死化機序の解明および原因分子の同定により未だ有効な手段が見いだされていないタイレリア症の予防・治療薬の開発が期待される。

## [方法]

タイレリア原虫による宿主細胞の増殖過程に、既知の腫瘍関連分子が関与しているのではないかと考え、約 190 種類の抗癌作用を有する化合物がタイレリア感染リンパ球の増殖に与える影響についてスクリーニングを行った。抑制活性が認められた薬剤から、特に注目すべき薬剤 (TIBL) を選んで、標的分子の細胞内での動態を解析した。

## [結果]

MDM2 に対する阻害剤である TIBL が *T. parva* 感染リンパ球の増殖阻害、およびアポトーシスを起こすことを明らかにした。また、*T. parva* 感染細胞および同様に宿主細胞トランスフォームを引き起こす *T. annulata* の感染細胞における MDM2 分子の蛋白量をウェスタンブロット法により検出したところ、MDM2 蛋白の発現が増大している事が確認された。この MDM2 蛋白の発現量の増大は遺伝子の転写レベル亢進によるものである事が Real-time RT-PCR による mRNA 転写量の測定により推測された。さらに *T. parva* 感染細胞では MDM2 異常スプライシング転写産物も確認された。次に、*T. parva* 感染細胞に DNA 損傷刺激を与えたところ、本来誘導されてくるべき p53 は低濃度のままで推移し、正常な p53 経路が障害されている事が示された。

## [考察]

MDM2 は癌抑制蛋白質である p53 のユビキチンリガーゼとして働き、p53 をプロテアソーム依存性の分解へと導く分子である。今回の実験により、タイレリア感染細胞では MDM2 の異常発現により p53 によるアポトーシス経路が障害され、感染細胞が不死化していることが示唆された。

# サブサハラ諸国における心水症の分子疫学的研究

中尾 亮 (人獣共通感染症リサーチセンター 国際協力・教育部門)

心水症はリケッチアの一種である *Ehrlichia ruminantium* によって引き起こされるダニ媒介性人獣共通感染症である。サハラ砂漠以南のアフリカ諸国とカリブ諸島で発生が見られ、主に反芻動物に感染し高い致死率を示すことから畜産上極めて重要な疾病である。また、近年相次いで人への感染、死亡が疑われる複数の報告があり、人獣共通感染症としての重要性も認識されつつある。

反芻家畜に対する高い致死率から、アフリカ諸国で甚大な経済的損失をもたらしていると予想されるが、サブサハラ諸国における流行状況を把握する上での有用な疫学的データは少ない。また、現地における心水症の診断には脳スミア鏡検による死後診断が主流であり、簡便な生前診断法の確立が求められている。そこで、本研究では迅速かつ簡便な診断法として *E. ruminantium* を特異的に検出する Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を開発し、サブサハラ諸国由来のフィールドサンプルを用いた心水症疫学調査を行った。

*E. ruminantium* 分離株 (12 株) 間のハウスキーピング遺伝子の配列比較から、株間で最も保存された Superoxide dismutase B (sodB) 遺伝子領域をターゲットとした LAMP 用プライマーを設計した。アフリカ各地に由来する *E. ruminantium* 分離株 (16 株) と近縁なエーリキア種 (*E. canis*, *E. shaffeensis*, *E. ewingii*, *PM Ehrlichia*) との特異性試験を行った結果、全ての *E. ruminantium* 分離株で陽性反応が見られた。また、他のエーリヒア種との交差反応も見られなかったことから、その高い特異性を確認した。さらに、増幅領域を組み込んだプラスミド DNA を用いて検出感度を検討したところ、一反応中 10 コピー以上の遺伝子を検出することが出来たことから、極めて感度の高い試験としてフィールドでの応用が期待できる。

現在、ザンビア、タンザニア、ウガンダの各地で収集されたウシの血液由来 DNA サンプルと、ウガンダで採集されたマダニ由来 DNA サンプルを用いた解析を行っており、本法の野外株における反応性を検証し、あわせて心水症の流行状況を調査したい。



# ウエストナイルウイルスの疫学および自然界における存続様式に関する研究

村田 亮 (獣医学研究科 環境獣医科学講座 公衆衛生学教室)

1999年、ニューヨーク(NY)市で北米では初めてウエストナイル熱が確認され、その後わずか数年でアメリカ合衆国全域に流行が広がった。原因となるウエストナイルウイルス(WNV)は'90年代前半までは病原性の低いウイルスと考えられてきた。しかし、近年北米で流行している株は、終末宿主であるヒトやウマだけでなく、自然宿主である鳥類に対しても高い致死率を示す病原性の高いものである。病原性の低い株の多くがエンベロープ(E)蛋白質上のN型糖鎖付加部位を持たず、近年の病原性の高い株はこの糖鎖付加部位を持つことから、WNVの強毒化には糖鎖付加部位の遺伝的変異が関っている可能性がある。現在WNVの分布域は北米大陸だけでなく、南米大陸およびロシアにおいても拡大を続けており、物流や渡り鳥を介した日本へのWNV侵入が危惧されている。未だ日本国内での感染例は報告されていないが、日本にはWNVを媒介可能な蚊と増幅動物となる鳥類が多く生息し、またWNVに近縁で血清学的に交差反応性を示す日本脳炎ウイルス(JEV)が存在する。そこでWNVが侵入した際にヒトや鳥類においてウイルス感染を迅速に鑑別できる診断系の確立が緊急の課題となっている。これらの背景から以下の点について研究を行っている。

## 1. ウエストナイルウイルスのE蛋白質上糖鎖付加がウイルス増殖に与える影響

WNV NY株からE蛋白質上にN型糖鎖付加部位を持つLP株と糖鎖付加部位を持たないSP株を単離し、各ウイルスの増殖性を調べた。哺乳類および鳥類由来細胞において、高温条件でLP株はSP株より高い増殖性を示した。また、鶏雛においてLP株はSP株に比べてウイルス血症のレベルが高く、高致死率や重度の壊死性心筋炎といった高い病原性を示した。一方で、蚊由来細胞およびアカイエカにおいてはLP株とSP株の増殖性に差が見られないことが明らかとなった。これらの結果から、WNVのE蛋白質上糖鎖付加は鳥類宿主内でウイルス血症を増強し、自然界の感染環におけるウイルスの効果的な伝播に寄与している可能性が示唆された。

## 2. ウエストナイル熱の血清診断法の評価と極東ロシアにおける疫学調査

迅速なWNV鑑別診断法として、フォーカス減少法を基盤とした中和試験を構築した。これをWNVまたはJEVを実験感染させた鶏雛血清に用いたところ、両者を特異的に鑑別することが可能であった。また、この方法を極東ロシアにおいて採取した野鳥血清に用いたところ、91検体中15検体(約16%)でWNVに対する中和抗体が検出され、極東ロシアの野鳥間においてWNVが浸淫していることが示唆された。

# 新たに発見されたポリオーマウイルス (KI ウイルス、WU ウイルス) のヒトにおける感染状況に関する検討

寺本 忍 (医学研究科 生殖・発達医学講座 小児科学分野)

【背景と目的】従来、ヒトに感染するポリオーマウイルスとして、JC ウイルス (JCV) と BK ウイルス (BKV) が知られてきたが、2007 年、呼吸器感染症に罹患した小児の鼻咽頭拭い液からヒトにとって第 3、4 番目のポリオーマウイルスとなる KI ウイルス (KIPyV) と WU ウイルス (WUPyV) が発見された。KIPyV 及び WUPyV とヒトの疾患との関連の有無を調査することを本研究の目的とした。

【方法】(1) 生後 0-60 か月の呼吸器感染症患者の鼻咽頭拭い液 206 検体中の KIPyV 及び WUPyV を PCR 法にて検索した。(2) 鼻咽頭拭い液から WUPyV が検出された患者の血清中ウイルスを real-time PCR 法にて検索した。(3) KIPyV あるいは WUPyV が検出された鼻咽頭拭い液検体中に存在する他の呼吸器ウイルス計 12 種のゲノムの有無を検索した。(4) 正常肺組織 30 検体中の KIPyV 及び WUPyV を real-time PCR 法にて検索した。(5) 肺癌組織 112 検体 (大細胞癌 14, 小細胞癌 15, 腺癌 30, 扁平上皮癌 19, その他の肺癌 34) 中の KIPyV 及び WUPyV を real-time PCR 法にて検索した。(6) WUPyV の外殻蛋白 VP1 蛋白を抗原とする抗体測定系を作成して、鼻咽頭拭い液から WUPyV が検出された患者のペア血清中の抗 WUPyV VP1-IgG 抗体価を測定した。

【結果】(1) KIPyV は 206 検体中 5 検体 (2.4%)、WUPyV は 206 検体中 14 検体 (6.8%) から検出された。そのなかの 1 検体からは KIPyV と WUPyV が同時に検出された。(2) 咽頭拭い液から WUPyV が検出された 14 名のうち 2 名の急性期血清が得られ、うち 1 名の血清から WUPyV が検出された。(3) KIPyV あるいは WUPyV が検出された咽頭拭い液検体 18 検体中 10 検体から他の呼吸器ウイルスゲノムが検出された。その内訳は、hMPV が 4 検体、HRV が 3 検体、RSV が 2 検体、PIV1 が 1 検体、HBoV が 1 検体であった。(4) KIPyV は正常肺組織 30 検体中 2 検体 (6.7%) から、WUPyV は 30 検体中 1 検体 (3.3%) から検出された。(5) 肺癌組織からは KIPyV と WUPyV は検出されなかった。(6) 鼻咽頭拭い液から WUPyV が検出された患者のうち 2 名からペア血清が得られ、共に血清中の抗 WUPyV VP1-IgG 抗体価は上昇していた (1 名は <1:10 から 1:40、1 名は <1:10 から 1:10)。

【考案】呼吸器感染症患者の鼻咽頭拭い液から KIPyV 及び WUPyV が検出された。WUPyV は急性期患者の血液中からも検出され、血清中の抗 WUPyV 抗体価の上昇を認めることから、全身性の液性免疫反応を起こすことが示されたが、正常血清中には抗 WUPyV 抗体を認めないことから、抗 WUPyV 抗体価の上昇は一過性と考えられた。また、両ウイルスは正常肺組織からも検出されたので、肺に潜伏感染している可能性があるかと推定された。

# マールブルグウイルスの抗体依存性感染増強現象の解析 マールブルグウイルス特異抗体検出法の開発

中山絵里 （人獣共通感染症リサーチセンター 国際疫学部門）

## マールブルグウイルスの抗体依存性感染増強現象の解析

**【背景・目的】** マールブルグウイルスはエボラウイルスとともにフィロウイルス科に属し、霊長類に重篤な出血熱を引き起こす。フィロウイルスの表面糖蛋白質に対する抗体の中には中和抗体だけでなく、ウイルスの感染を増強する抗体が存在する。この抗体依存性感染増強現象と病原性との関係を解明するために、病原性の異なるマールブルグウイルス Angola 株と Musoke 株の糖蛋白質に対するモノクローナル抗体を作出し、誘導される抗体の性状を比較する。

**【材料・方法】** それぞれの株の糖蛋白質に結合するモノクローナル抗体を ELISA 法でスクリーニングした。得られた抗体について、豚水胞性口炎ウイルスの G 蛋白質をマールブルグウイルスの Angola 株および Musoke 株の GP に置換したシュードタイプウイルスを用いた中和試験および抗体依存性感染増強試験を行った。

**【結果・考察】** Musoke 株に比べ、病原性の強い Angola 株の糖蛋白質は感染増強抗体クローンをより多く誘導した。感染増強抗体が認識するエピトープはマールブルグウイルス株間で異なり、病原性の違いに関与する一つの因子であることが示唆された。今後、得られた感染増強抗体の認識するエピトープを同定する。

## マールブルグウイルス特異抗体検出法の開発

**【背景・目的】** これまでのフィロウイルスの抗体検出法は、ウイルス種間で抗原性が類似していると考えられる核蛋白質を抗原としたため、各ウイルスに対する特異的な抗体を検出する事ができなかった。そこで本研究では、ウイルス種によって抗原性が異なる表面糖蛋白質を抗原として用い、各ウイルスに対する特異抗体の検出法を確立することを目的とする。

**【材料・方法】** 表面糖蛋白質の膜貫通領域と細胞質内領域を欠失させ、ヒスチジンタグを付加した分泌型糖蛋白質を発現するプラスミドを構築し、これを導入した培養細胞の上清からニッケルビーズカラムで分泌型組換え糖蛋白質を精製する。精製した組換え糖蛋白質を抗原とする ELISA 法によって、マウス免疫血清中の特異抗体を検出することで感度と特異性を確認後、野外で採取したサルおよびコウモリ血清中のフィロウイルス特異抗体を検出する。

**【結果・考察】** エボラウイルスの分泌型組換え糖蛋白質は培養上清中からニッケルビーズカラムで精製することができた。しかし、マールブルグウイルスの組換え糖蛋白質は培養上清中に検出できなかった。マールブルグウイルスの表面糖蛋白質の膜貫通領域と細胞内領域を欠失させると、細胞内での糖蛋白質の発現・修飾が正常に行われなことが疑われた。現在、マールブルグウイルスの糖蛋白質に付加するヒスチジンタグの位置を検討しているところである。

# インフルエンザウイルスの亜型間交差感染防御能をもつ抗体による新規インフルエンザ感染予防法の確立

苫米地大輔 （人獣共通感染症リサーチセンター 国際疫学部門）

20世紀、ヒトに大流行をおこしたインフルエンザウイルスの血清亜型は、H1N1、H2N2 および H3N2 亜型であった。しかし、近年 H5N1 亜型や H7N7 亜型など鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染が確認され、それらの亜型のウイルスによる新型インフルエンザの大流行が危惧されている。よって、様々な亜型のインフルエンザウイルスに対しての対応策が望まれている。

日本ではインフルエンザの予防策として、主に不活化ワクチンの皮下接種が行われている。しかし、不活化ワクチンの皮下接種では、ワクチンに用いたウイルスと同じ亜型の HA をもつウイルスを中和する抗体しか誘導されない。一方、不活化ウイルスの経鼻投与によりインフルエンザウイルス亜型間交差感染防御が成立することが報告され、交差反応性抗体が重要な役割を担っていることが示唆されている。そこで本研究では、亜型間交差反応性モノクローナル抗体を作出し、抗体による交差感染防御免疫を解析する。また、不活化ワクチンの経鼻投与と皮下接種で、インフルエンザウイルス亜型間交差反応性抗体の誘導能を比較し、抗体の性状解析を行う。

これまでに、ホルマリンで不活化したインフルエンザウイルス、A/Aichi/2/68 (H3N2) 経鼻投与したマウスを用いて、A/Aichi/2/68 のみならず様々な HA 亜型のインフルエンザウイルスに対しても結合能を持ち、一部のウイルスに対しては中和活性も示すモノクローナル抗体 (S139/1) を作出した。S139/1 をより詳細に解析するため、現在知られている全 16HA 亜型のインフルエンザウイルスに対して ELISA 法と中和試験を行った。S139/1 は全ての HA 亜型のウイルスに対して結合能が認められた。また、HA 亜型が H1、2、3、13 および 16 のインフルエンザウイルスに対する HI 活性を示した。現在、HI 活性は示さない A/PR/8/32 (H1N1; PR8) と A/Viet Nam/1194/2004 (H5N1; VN1194) を用い、マウスに対する受動免疫実験を行い、同抗体の感染防御能を調べている。

HA 亜型が H5 と H9 のインフルエンザウイルスに対する交差感染防御に注目して、以下のことを行っている。開裂部位を弱毒型に改変した VN1194 の HA 遺伝子を持ち、その他の遺伝子は PR8 由来の遺伝子のリアソータントウイルス A/rg Viet Nam/1194 $\Delta$ HA/2004 (H5N1 ; rg VN1194) を作出した。作出した rg VN1194、および、A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) をホルマリンで不活化し、マウスの鼻腔内または皮下に 3 回免疫した。免疫したマウスから血清、肺洗浄液および、鼻腔洗浄液を採取した。

ELISA 法の抗原として全 16 HA 亜型のインフルエンザウイルスの HA 遺伝子をクローニングし、細胞に発現させ抽出したものを作製する。同抗原を用い、免疫したマウスから採取した検体中の特異的 Ig G および Ig A 抗体を定量することにより、免疫法の違いによる亜型間交差反応性抗体量の差を明らかにする。その後、インフルエンザウイルス亜型間交差中和活性をもつモノクローナル抗体を作出し、同抗体の交差反応性、感染防御能、エピトープ決定等を行う。

# 鶏およびマガン由来マレック病ウイルスの遺伝子解析とその比較

盧 虎琳 (獣医学研究科 動物疾病制御学講座 感染症学教室)

マレック病ウイルス (MDV) は、鶏に悪性リンパ腫や末梢神経の麻痺などを主徴とするマレック病 (MD) を引き起こすが、非病原性 MDV を用いたワクチンによりほぼ完全に制御されている。しかし野外から分離される MDV の病原性は増強する傾向にあり、現在では、強毒 MDV よりもさらに高病原性株が分離されており、vv+MDV という分類も加えられている。さらに 2001 年には北海道において世界で初めてマガン (*Anser albifrons*、天然記念物) に MD 発症が確認され、さらにその後実施した極東地区における分子疫学調査により、強毒型と思われる MDV がガン・カモ類に広く分布していることが判明した。またこれら野鳥由来 MDV や国内で近年分離した MDV では MDV の病原性に重要な *meq* 遺伝子に病原性の増強に伴う多型が検出された。以上よりマガンなど渡り鳥による家禽への強毒 MDV の伝播 (あるいは鶏から野鳥への伝播) も懸念されている。そこで、日本各地でワクチン接種鶏群に発生した MD について MDV の遺伝子解析や、野鳥由来 MDV との遺伝子的性状の比較を行った。

MD 発症鶏の末梢血、各種臓器、腫瘍病変等や野鳥の羽材料から、全細胞ゲノム DNA 抽出して、PCR あるいは nested PCR 法により、種々の MDV 遺伝子の増幅および塩基配列の決定、他の MDV 株との比較を行った。特異的 PCR を行い、得られた遺伝子断片の塩基配列を決定して比較した。MDV の初期の細胞溶解性感染や免疫抑制に重要と考えられている *v/L-8* 遺伝子について解析したところ、従来報告されている MDV 株や国内で分離された MDV 株間 (岐阜株、三重株、福島株、沖縄株) で遺伝子構造の相違や変異などは検出されなかった。現在他の国内分離株や野鳥由来 MDV の *v/L-8* 遺伝子について比較しており、さらに多くの材料を採集する予定である。また今後、病原性に関与する他の MDV 遺伝子 (*vTR* や *gL* 領域など) の解析を行い、さらに野鳥に存在する MDV の病原性を検討するために、BAC を用いた MDV 感染性クローンを構築して感染実験により解析する予定である。

# プリオン感染マウス脳における骨髄由来間葉系幹細胞の動態

宋 昌鉉 (獣医学研究科 プリオン病学講座)

骨髄由来間葉系幹細胞 (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells; MSCs) は、脳虚血、脳腫瘍、あるいは神経変性疾患の病変部位に移行し、病状の改善に寄与することが知られている。そこで、MSCs がプリオン病の治療に応用可能であるかを検討した。ヒトテロメラーゼ遺伝子により不死化したヒト MSCs (hMSCs) を用いた。hMSCs は lacZ 遺伝子を発現しているため、抗  $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体を用いた蛍光抗体法により hMSCs の動態を解析した。まず、hMSCs がプリオン病の潜伏期に及ぼす影響を調べるため、Chandler 株感染マウスの海馬に hMSCs を移植し、生存期間を調べた。プリオン Chandler 株接種後 90 日のマウスの海馬に hMSCs を移植して経過を観察したところ、陰性対照群にくらべ、平均潜伏期が 8 日程度有意に延長した ( $p < 0.05$ )。そこで、左側海馬に移植した hMSCs の脳内分布を調べたところ、非感染マウスでは投与側の海馬だけに hMSCs が観察されたが、プリオン感染マウスでは 2 日後から 3 週間まで非投与側の海馬でも hMSCs の分布が認められた。また、移植した hMSCs から神経病変部で BDNF や NT-3 などの神経栄養因子を産生が認められた。以上の結果は hMSCs がプリオン増殖抑制活性を有する遺伝子のベクターとして機能すること、および、神経組織の修復に寄与する可能性を示唆した。

# HTLV-I Tax transformed cell の走化性における CXCR4 を介したシグナル経路の解析

川口 晶 (人獣共通感染症リサーチセンター 分子病態・診断部門)

## <研究活動>

(背景)ATL (Adult T cell leukemia)は T 細胞性の悪性腫瘍であり、HTLV-I (Human T lymphotropic virus type-I)感染者の内1~5%程度が感染から40~50年後に発症する。本疾患では多臓器への腫瘍細胞の著しい浸潤が認められ、消化器症状、皮膚症状、リンパ節腫脹などの症状を示す。その為、腫瘍細胞の浸潤のメカニズムを解明し、抑制することがATLの治療において重要である。我々はHTLV-Iの調節遺伝子であるTaxをIckプロモーター下で胸腺細胞に発現させたTaxトランスジェニックマウスを作成した。(Nat Med 12; 466, 2006)このマウスはヒトATLと同様に白血病を発症し、多くの臓器で血管周囲性の著しい浸潤を示した。また腫瘍化した細胞はCD4、CD8共に陰性でありpre-T cell由来の細胞であった。

(目的)腫瘍細胞の浸潤のメカニズムを明らかにする為に、Taxトランスジェニックマウス由来腫瘍細胞(pML細胞)のケモカインに対する応答性を検討し、更にその応答を抑制すると期待される薬剤の効果を判定し、ATLに対する新しい治療法の候補を見つける事を目的とする。

(方法と結果) pML細胞の種々のケモカインへの応答性を検討した結果、SDF-1 $\alpha$ に対して強い走化性を示す事が分かった。更にpML細胞の細胞表面にはSDF-1 $\alpha$ の受容体であるCXCR4が発現しており、CXCR4の拮抗剤であるAMD3100で処理する事により走化性が抑制された。またAMD3100は腫瘍細胞内でSDF-1 $\alpha$ によって誘導されるERK1/2のリン酸化も抑制した。これらと同様の現象がヒトATL症例由来の細胞においても認められた。更に免疫染色によりATL症例及びTaxトランスジェニックマウスいずれの肝臓においても腫瘍細胞の浸潤が見られる部分の胆管上皮周囲にSDF-1 $\alpha$ に対する陽性反応が認められた。

(考察)ヒトATL症例由来細胞及びpML細胞、いずれの走化性にもSDF-1 $\alpha$ -CXCR4経路が関与する事と、この走化性がCXCR4の拮抗剤の使用により抑制される事が明らかとなった。更に肝臓において腫瘍細胞浸潤部周囲にSDF-1 $\alpha$ 陽性反応が認められた事からSDF-1 $\alpha$ の局所での発現が腫瘍細胞の浸潤に関与する可能性が示唆される。またSDF-1 $\alpha$ に対する腫瘍細胞の走化性を抑制するAMD3100は未だ治療法が確立されていないATLの新しい治療法の候補となることが期待される。

## <疫学研究活動>

12月にはザンビア共和国での疫学調査に同行し、フィロウイルス等の出血熱ウイルス等の自然宿主の同定のためにフルーツバットのサンプリングを行った。11月30日~12月1日と12月6日~7日の2回、群生地であるカサンカ国立公園においてフルーツバットを捕獲し、各組織のサンプリング、血清の採集、各臓器からの核酸の抽出を行った。また12月9日にチャミヌカロッジにて病原微生物のベクターとなり得るダニの採集も行った。

# ウマヘルペスウイルス 1 型レセプターのクローニングと機能解析

佐々木道仁 (人獣共通感染症リサーチセンター 分子病態・診断部門)

【背景と目的】ウマヘルペスウイルス 1 型 (EHV-1) はヘルペスウイルス科アルファヘルペスウイルス亜科に属し、馬に鼻肺炎、流産、脳脊髄炎を惹き起こす。EHV-1 感染症で临床上特に問題となる流産と脳脊髄炎では、妊娠子宮、中枢神経系の血管内皮細胞へウイルス感染が生じ、これが病態発生に大きな役割を果たす。しかしながら、EHV-1 の血管内皮向性を規定する宿主因子に関しては不明な点が多い。本研究では、ウマ脳血管内皮細胞より作製した cDNA ライブラリーを用いて EHV-1 レセプターのクローニングを行い、同定されたレセプター分子の機能と EHV-1 感染症における病態との関係を明らかにすることを目的とした。

【方法】ウマ脳血管内皮細胞由来 cDNA 発現ライブラリーを EHV-1 非感受性である NIH3T3 細胞にトランスフェクションした後、GFP 発現組換えウイルスを接種し、感染細胞の GFP 発現を指標にライブラリーのスクリーニングを行った。得られた遺伝子クローンを過剰発現させた NIH3T3 細胞と、ノックダウンしたウマ真皮由来 E. Derm 細胞を作製し、EHV-1 感染に対する遺伝子発現の影響を解析した。成馬における遺伝子発現組織、または細胞の分布、局在を Northern hybridization と *in situ* hybridization により解析した。

【結果】スクリーニングにより単離された陽性クローンは 1 つの ORF を持っており、この ORF がコードしている膜貫通型タンパク質を EHVR と命名した。EHVR は既知の分子群に属していることが予想されたので、そのファミリー分子を RT-PCR 法にて E. Derm 細胞からクローニングし、NIH3T3 細胞に発現させると、細胞は EHV-1 感受性を示した。EHVR を過剰発現させた NIH3T3 細胞 (3T3-EHVR 細胞) に EHV-1 を接種すると、上清中に子孫ウイルスの産生が認められた。EHVR ファミリーを特異的に認識するモノクローナル抗体で 3T3-EHVR 細胞、E. Derm 細胞を前処理することにより、EHV-1 感染は阻害された。また、EHVR ファミリー分子をノックダウンした E. Derm 細胞は、EHV-1 感受性を消失した。Northern hybridization では、検索したすべての臓器において EHVR のシグナルが検出された。脳、肺を *in situ* hybridization により解析した結果、脳血管内皮細胞と細気管支上皮細胞に EHVR のシグナルが検出された。

【考察】EHVR とそのファミリー分子は、EHV-1 の細胞内侵入に関与するレセプターであることが明らかになった。また、EHV-1 の標的細胞に EHVR 遺伝子の発現が認められたことから、EHVR とそのファミリー分子が EHV-1 感染症の病態に関与している可能性が示唆された。

【疫学研究活動】アフリカのザンビア共和国における人獣共通感染症のサーベイランスを行うため、2008 年 11 月から 12 月にかけて、同国のカサンカ国立公園にてフルーツバットを捕獲し、血清の採取、各臓器の採材、臓器から核酸の抽出を行った。また、チャミヌカサファリパークにてダニの採取を行った。



# 小児インフルエンザ脳症の実験的再現と発症機序の解明

田中智久（獣医学研究科 診断治療学講座 比較病理学教室）

【背景と目的】インフルエンザ脳症はインフルエンザに罹患した子供が高熱を発した後、短時間のうちに重篤な脳浮腫、播種性血管内凝固、多臓器不全などを起こす致死的な神経疾患の一つである。本脳症の死亡率は約 15%と高く、重篤な後遺症を伴うことも多いため、病態の全容解明と効果的な治療法の確立が急務となっている。本脳症では特徴所見として、i) 脳実質や脳脊髄液中からインフルエンザウイルス (IFV) が検出されない、ii) 脳脊髄液および血中のサイトカインが著増する、iii) 病理組織学的に脳血管内皮細胞の損傷、星状膠細胞の活性化が見られる。このことから本脳症の発生機序として、過剰に産生されたサイトカインが脳血管内皮細胞の障害を起こし、脳浮腫を引き起こすという可能性が指摘されているが、これまで実験的に検証されたことはない。そこで本研究では IFV 感染マウスにサイトカイン産生のインデューサーとして LPS を投与することで同疾患を再現できるか検討した。

【結果】IFV・LPS の両者を接種したマウスでは、それぞれを単独で接種したマウスに比べて大きな生存率の低下が見られ、脳の微小出血、好中球浸潤および星状膠細胞の腫大などの形態学的変化がより顕著に観察された。また、エバンスブルー漏出試験により同マウスで脳血管透過性が亢進しており、さらに血漿中の IL-6、TNF- $\alpha$  の濃度が有意に高いことが分かった。

【考察】脳血管透過性の亢進や血中サイトカインの上昇はインフルエンザ脳症患者の特徴と一致することから、本実験のマウスは同脳症に近い病態を示していると考えられた。LPS はマクロファージや血管内皮細胞などに作用し、サイトカイン産生を介して発熱、血液凝固の亢進、血管内皮細胞の障害などを起こすことが知られている。本実験での LPS の役割は不明だが、検索したいずれの臓器にも血栓の形成が見られなかったことから、本実験の脳病変は血液凝固系の異常に起因するのではなく、脳血管タイトジャンクションの機能低下などの血管内皮細胞への直接的影響によるものではないかと推測した。現在、IL-6、TNF- $\alpha$  の産生源や脳病変との因果関係を調べるとともに、脳血管透過性亢進の機序を調べている。

# DNA 免疫法を用いたマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) に対する高抗体価誘導法の研究

岩田大樹 (遺伝子病制御研究所 病態研究部門 免疫生物分野)

【目的】プラスミドを用いた DNA 免疫法は、ポリペプチド抗原を用意する必要がないなど、いくつかの点で優れた面を持っており、感染に対するワクチンとしての応用などが期待される。我々はこれまで、MIF (macrophage migration inhibitory factor) をターゲットとして抗 MIF 抗体を *in vivo* に誘導する実験を行ってきた。MIF は本来自己成分であるため、MIF 配列に異物である破傷風毒素 (TTX) のヘルパー T (Th) エピトープ配列を組み込んだ変異 MIF に対する抗体応答を惹起し、抗 MIF (自己) 抗体産生も同時に誘導する方法を用いている (*Arthritis Rheum* 56: 521-30, 2007)。しかし、この手法で近交系マウスを免疫した場合も、高い抗体価を誘導出来る群と低力価に留まる群が生じる。本研究では、安定に高抗体価を誘導する目的で NKT 細胞の抗体応答増強作用を応用した方法を開発し、その効果を解析した。すなわち、コンストラクトの構造を変更せず、アジュバントとして NKT 細胞リガンドである  $\alpha$ -galactosylceramide (以下  $\alpha$ -GC) を同時に投与し (*Eur J Immunol* 38: 706-19, 2008)、その効果を検討した。

【対象と方法】B10.BR (H-2<sup>k</sup>) マウス♀4 週齢に、MIF DNA ワクチン 50  $\mu$ g とともに  $\alpha$ -GC 2  $\mu$ g、もしくは vehicle のみを筋肉内注射により投与した。6 週後に血清抗 MIF 抗体価のレベルを ELISA で測定した。抗体価を確認した後、抗 MIF 抗体の生体内効果を解析するため、自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) モデルにおける影響を検討した。我々は既に EAU が抗 MIF 抗体によって敬称化することを報告している。具体的には、抗体価の高い群、低い群、コントロールワクチン投与群の 3 群について、ヒト視細胞間レチノイド結合蛋白由来ペプチド K2 100 nmole を結核死菌 *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra を含む完全フロインドアジュバンドのエマルジョンとして皮下注射し、同時に百日咳菌毒素 *Bordetella pertussis* toxin 0.1  $\mu$ g を腹腔内注射した。抗 MIF 抗体の生物活性を検討するモデルとして自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) を誘導した。誘導後 7 日目から臨床的重症度を観察し、また 21 日目に眼球を摘出して組織学的重症度を判定し、各群間で比較した。

【結果】 $\alpha$ -GC をアジュバントとして用いることで、抗体価の平均値は  $0.56 \pm 0.28$  となり、 $\alpha$ -GC を併用しなかった群の抗体価  $0.39 \pm 0.23$  と比べ上昇した。抗体価についても、OD<sub>450</sub> の値が 0.45 以上であるマウスは、 $\alpha$ -GC を併用しなかった群の 3/11 に比べ、5/11 と増加した。さらに抗 MIF 抗体誘導の生物学的効果を調べる目的で誘導された自己免疫性 EAU の 21 日目の臨床的重症度は、抗 MIF 抗体価の高い群で  $2.5 \pm 0.86$  で、抗体価の低い群の  $3.05 \pm 0.62$  ( $P < 0.05$ ) とコントロールワクチン投与群の  $3.11 \pm 0.32$  に比べ有意に軽症化した ( $P < 0.01$ )。

【結論】MIF DNA ワクチンに  $\alpha$ -GC を併用することで、抗体価の平均値の上昇と上昇個体の割合増加が観察され、アジュバント効果が認められた。また、抗 MIF 抗体価の高い群では、有意な EAU の軽症化が認められたことから、DNA ワクチンと  $\alpha$ -GC アジュバントの同時投与による抗体誘導の生物学的効果が確認された。

【意義】今回、DNA ワクチンの免疫増強法を開発した。また、MIF は West Nile virus の脳移行に対して促進的に作用し、その中和によりウイルスの致死活性を減弱せしめることが報告されており (*J Clin Invest* 117: 3059-66, 2007)、このワクチンを直接感染免疫に応用することも可能と考えられた。

# インフルエンザの予防・治療薬の開発

原田種展 （人獣共通感染症リサーチセンター バイオリソース部門）

インフルエンザウイルスは宿主細胞への吸着・侵入後、ゲノムおよび粒子構成分子の複製と再集合により宿主細胞から出芽する。今回、インフルエンザの予防・治療薬の開発を目指して、我々は、ウイルス粒子の宿主細胞への吸着・侵入するステップを阻害する化合物に着目した。ウイルスの吸着・侵入を阻害するためには、まず、インフルエンザウイルスの HA と宿主細胞側の受容体との結合を特異的に阻害することが必要と考えられる。

現在、宿主側受容体とウイルスの HA の結合部位を特異的に阻害すると予想されるシアル酸含有糖鎖、ウイルス HA 分子との親和性が高い合成ペプチド等の化合物について、*in vitro* でウイルスの感染・増殖阻害効果について検討を行っており、今回の報告ではこれらの化合物の効果について紹介する。

また、インフルエンザウイルスの感染に伴い、ウイルスに対する宿主の生体防御因子の発現量に変化し、生体防御に働くことが知られている。現在、本研究室においてインフルエンザウイルスの感染・増殖を阻害する生体分子の候補として解析されている、レクチンの一種であるガレクチンファミリー分子についてウイルス感染後の発現について検討した。宿主細胞にウイルスを感染させた 48 時間後、このファミリー分子の有意な発現上昇が認められたので、その結果についても紹介する。

# *Helicobacter pylori* CagA は PAR1 キナーゼ活性を抑制し上皮細胞の細胞極性を破壊する

齊藤康弘（遺伝子病制御研究所 病態研究部門 分子腫瘍分野）

*cagA* 陽性 *Helicobacter pylori* (ピロリ菌) は胃がんなどの胃粘膜病変発症に深く関わっている。ピロリ菌体内で産生された CagA タンパク質はピロリ菌が保有する IV 型分泌機構を介してヒト胃上皮細胞内へ直接注入される。胃上皮細胞は整然と並んだ単層細胞層を形成しており、個々の細胞は極性と呼ばれる構造的および機能的な非対称性を持つ。細胞極性の形成により細胞膜は細胞間を強力に接着するタイトジャンクションを境に頂端側、側基底側と明確に区分されている。注入された CagA はヒト胃上皮細胞においてタイトジャンクションおよび細胞極性を破壊する。我々はこれまでに CagA が上皮細胞極性制御分子であるセリン・スレオニンキナーゼ PAR1/MARK と複合体を形成し、PAR1 のキナーゼ活性を抑制することを明らかにした。また、単層培養された MDCK 細胞を用いた実験結果から、CagA がタイトジャンクションならびに細胞極性を破壊することを見いだした。そこで、本研究では CagA により誘導される細胞極性異常ならびにタイトジャンクションの破壊において CagA-PAR1 相互作用が果たす役割を調べることを目的に実験を行った。極性化 MDCK 細胞において脱極性化した CagA 発現細胞は単層上皮細胞層から逸脱する。そこで、CagA による細胞極性の破壊が細胞内 PAR1 キナーゼ活性の低下によるものかを調べるため、CagA 単独もしくは CagA および PAR1b を共発現させた極性化 MDCK 細胞群において単層細胞層から逸脱する細胞数を比較した。CagA 単独発現では単層細胞層から逸脱する細胞数が著しく増加したのに対し、CagA および PAR1b を共発現させた細胞群では、単層上皮細胞層から逸脱する細胞数が著しく減少した。よって、CagA による細胞極性の破壊は細胞内 PAR1 キナーゼ活性の低下により誘導されることが示唆された。また、極性化上皮細胞におけるタイトジャンクションの機能を評価する方法として電気抵抗値を用いた transepithelial electrical resistance (TER) がある。次に、この評価法を用いて CagA によるタイトジャンクション機能の破壊が細胞内 PAR1 キナーゼ活性の低下に依存するのか検討した。その結果、CagA を単独発現させた細胞群では TER 値は著しく減少し、細胞間のタイトジャンクション機能が破壊されていることが示された。一方、CagA および PAR1b を細胞に共発現させた場合は TER 値に大きな変化は見られず、CagA によるタイトジャンクションの破壊もまた細胞内 PAR1 キナーゼ活性の低下によるものと考えられた。以上の結果より、CagA による細胞極性および機能的タイトジャンクション構造の破壊は CagA が PAR1 との相互作用を介して細胞内 PAR1 キナーゼの活性を低下させることにより誘導されることが明らかとなった。

# マウス *Oas1b* のフラビウイルス抵抗性機構の解析

森藤可南子（獣医学研究科 動物疾病制御学講座 実験動物学教室）

2' -5' -oligoadenylate synthetase (Oas) は、ウイルス感染初期の自然免疫機構においてウイルスの増殖を押さえるのに重要な役割を示すことが知られている。ウイルス感染細胞において Oas 蛋白は、2' -5' oligoadenylate (2' -5' A) を合成し、RNaseL を活性化させ、活性型 RNaseL は、ウイルス RNA を分解し宿主細胞の抗ウイルス状態を引き起こす。

マウス *Oas1b* は、フラビウイルス感染抵抗性遺伝子として知られている。*Oas1b* は一般的な実験用近交系マウスにおいては、正常な蛋白が合成されずこれらのマウスはフラビウイルスに対して感受性を示すことが知られているが、多くの野生由来近交系マウスにおいても、系統間に *Oas1b* のアミノ酸配列には多型が多く存在し、フラビウイルスに対する感受性に差があることが報告されている。

本研究室で作製した MSM/Ms (MSM) 由来の *Oas* 遺伝子座を導入したコンジェニックマウスはウエストナイルウイルス感染に対して抵抗性を示した。その一方で、インフルエンザウイルス感染、センダイウイルス感染に対してはコントロール群と差が見られなかったことから、*Oas1b* はウイルス全般に効果があるのではなくフラビウイルスに対して特異的に作用していること、及び MSM 由来の *Oas1b* はウエストナイルウイルスの複製を抑制していることが示唆された。

*Oas1b* には、2' -5' A 合成酵素としての機能がないこと、RNaseL を欠質させてもウイルスの増殖にあまり影響がないことから *Oas1b* には他の *Oas* にはない特別な機構がある可能性が示唆されているが、*Oas1b* がどのようにしてフラビウイルスの複製を抑制しているのかはほとんど知られていない。

*Oas1b* には、RNA に結合するだけでなく、アミノ酸配列からタンパク質にも結合する可能性があるとされているフラビウイルスのゲノムやタンパク質に直接的にもしくは間接的に結合し機能を阻害している可能性がある。

その可能性を検討するため MSM 由来 *Oas1b* をクローニングし発現ベクターを作製し、ウエストナイルウイルスのレプリコンやタンパクをコードするベクターなどを用いて MSM 由来 *Oas1b* を用いてウエストナイルウイルスの複製抑制の機構を明らかにしていきたい。

# ペラデニヤ大学狂犬病対策室における効率的なデータ管理システム等の構築

神田浩路 （医学研究科 予防医学講座 国際保健医学分野）

【目的】スリランカ・ペラデニヤ大学獣医学部に設置されている狂犬病対策室では、狂犬病の疑いがあると思われる動物の検査を実施しているが、狂犬病撲滅に向けたさらなる対策室の研究調査体制強化が望まれており、特にデータ管理やサーベイランスに関するシステム作りが遅れている。そこで、今年度はこれまでに得られたデータおよび今後のデータを効率的に一括管理し、情報の検索と蓄積、および統計解析を可能にするため、無料で活用できる疫学データ解析ソフト EpiInfo Version 3.5.1（米国 CDC、2008年8月13日）を用いて、データ入力フォームおよびデータベースを作成し、現在までの検査結果を入力・分析した。

【方法】入力フォームは3ページからなり、1ページ目は来訪者の情報を、2-3ページ目は運ばれた動物の情報および各種検査結果を入力できるようにした。4ページ以後は今後追加で実施される検査の結果などの情報を入力できるように準備をし、対策室設置のコンピュータで担当者と来訪者が画面上で情報を共有できるよう整備した。また、記録の残っている2007年下半期からの情報を整理した上で入力し、検査状況を分析した。

【結果】2009年2月現在で177件の検査が実施されていた。動物を持参した来訪者は対策室のある中央州からの訪問がほとんどであるが、まれに中央州と隣接する北西州や Sabaragamura 州からの持ち込みもあった。各地域の保健所の狂犬病対策担当である公衆衛生監察官 (PHI) による動物の持参は20件 (11.3%) であった。検査動物は犬 (71.2%) と猫 (17.5%) で全体の9割弱を占めており、そのうち直接蛍光抗体法 (FAT) の実施記録がある146件中、抗原が検出されたのは51件 (34.9%) であり、そのうち43件 (84.3%) が犬から検出された。

【考察】途上国でも広く活用されている EpiInfo を用いて、操作が容易なデータ入力ツールを開発しデータベースを構築したことにより、対策室における現在の狂犬病診断状況を把握することができた。特に、PHI の対策室訪問が少数であるため、政府機関に狂犬病対策室の活動をより広く宣伝する必要があると同時に、今回開発したデータ管理システムをより適切に運用する手段を構築することが求められる。さらに、これを有効活用かつ持続可能にするためには、対策室のスタッフを増加しトレーニング等を実施していくことが必要である。