

「人獣共通感染症国際共同教育研究拠点の創成」

2009年度 事業推進担当者研究成果発表会

# プログラム

- 場所：北大 情報教育会館 3F 多目的中講義室
- 日時：2010年3月4日(木)10:00～17:00

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』  
2009年度 事業推進担当者研究成果発表会

■場所: 北大 情報教育会館 3F多目的中講義室  
■日時: 2010年3月4日(木)10:00~17:00

===== Time schedule & Contents =====

10:00-10:05

開催の挨拶 喜田 宏 (拠点リーダー、獣医学研究科 動物疾病制御学講座 微生物学教室/  
教授、人獣共通感染症リサーチセンター / センター長)

10:05-10:20

1. 「鳥、ブタ、そしてパンデミックインフルエンザの克服に向けて」  
喜田 宏 (拠点リーダー、獣医学研究科 動物疾病制御学講座 微生物学教室 / 教授、  
人獣共通感染症リサーチセンター / センター長)

■人材育成グループ■ 座長 サブリーダー 杉本千尋

10:20-10:35

2. 「アフリカにおける節足動物媒介性人獣共通感染症:分子疫学調査と病原体ゲノム解析」  
杉本 千尋 (人獣共通感染症リサーチセンター 国際協力・教育部門 / 教授)

10:35-10:50

3. 「ウイルス性人獣共通感染症の診断法の開発と疫学調査」  
高島 郁夫 (獣医学研究科 環境獣医科学講座 公衆衛生学教室 / 教授)

10:50-11:05

4. 「げっ歯類における人獣共通感染症病原体に対する感受性/抵抗性因子に関する研究」  
安居院 高志 (獣医学研究科 動物疾病制御学講座 実験動物学教室 / 教授)

11:05-11:20

5. 「寄生虫症の疫学、病態、創薬に関する研究」  
片倉 賢 (獣医学研究科 動物疾病制御学講座 寄生虫学教室/教授)

11:20-11:35

6. 「スリランカにおける狂犬病などの疫学研究」  
玉城 英彦 (医学研究科 予防医学講座 国際保健医学分野 / 教授)

11:35-11:50

7. 「新興感染症とその臨床像」  
有賀 正 (医学研究科 生殖・発達医学講座 小児科学分野 / 教授)

11:50-12:50

昼食

■疫学研究グループ■ 座長 サブリーダー 高田礼人

12:50-13:05

8. 「ウイルス性人獣共通感染症の予防および制御法に関する研究」  
高田 礼人 (人獣共通感染症リサーチセンター 国際疫学部門 / 教授)

13:05-13:20

9. 「野生動物生態と感染症の研究」  
坪田 敏男 (獣医学研究科 環境獣医科学講座 生態学教室 / 教授)

13:20-13:35

10. 「ハンタウイルス感染症の鑑別診断法と疫学に関する研究」  
有川 二郎 (医学研究科 微生物学講座 病原微生物学分野 / 教授)

13:35-13:50

11. 「鳥由来感染症の疫学研究」  
大橋 和彦（獣医学研究科 動物疾病制御学講座 感染症学教室 / 教授）

13:50-14:05

12. 「インフルエンザウイルスの抗原変異予測のための計算機解析」  
伊藤 公人（人獣共通感染症リサーチセンター 国際疫学部門 / 准教授）

■免疫・病態研究グループ■ 座長 サブリーダー 堀内基広

14:05-14:20

13. 「プリオンの増殖機構とプリオン病の病因論に関する研究」  
堀内 基広（獣医学研究科 プリオン病学講座 / 教授）

14:20-14:35

14. 「ウイルスの病原性発現の分子基盤の解明」  
澤 洋文（人獣共通感染症リサーチセンター 分子病態・診断部門 / 教授）

14:35-14:50

15. 「病原体の神経向性機構の解明」  
梅村 孝司（獣医学研究科 診断治療学講座 比較病理学教室 / 教授）

14:50-15:05

16. 「感染症に対する免疫応答の解明」  
岩淵 和也（遺伝子病制御研究所 病態研究部門 免疫生物分野 / 准教授）

15:05-15:20

17. 「感染に関わる細胞膜分子の発現と輸送」  
稲葉 睦（獣医学研究科 診断治療学講座 臨床分子生物学教室 / 教授）

15:20-15:35 休憩

■診断・治療薬開発グループ■ 座長 サブリーダー 鈴木定彦

15:35-15:50

18. 「人獣共通感染症の遺伝子検査法の開発」  
鈴木 定彦（人獣共通感染症リサーチセンター 国際疫学部門 / 教授）

15:50-16:05

19. 「AKTキナーゼを介した新しい細胞内シグナル伝達機構の解明と治療への応用」  
水津 太、野口 昌幸（遺伝子病制御研究所 病態研究部門 癌生物分野 / 助教、教授）

16:05-16:20

20. 「インフルエンザウイルスの感染による病態形成機構の解明」  
宮崎 忠昭（人獣共通感染症リサーチセンター バイオリソース部門 / 教授）

16:20-16:35

21. 「病原体および宿主因子の分子構造解析と治療薬の開発」  
東 秀明（遺伝子病制御研究所 病態研究部門 分子腫瘍分野 / 准教授）

16:35-16:40

- 閉会の挨拶 喜田 宏（拠点リーダー、獣医学研究科 動物疾病制御学講座 微生物学教室 / 教授、人獣共通感染症リサーチセンター / センター長）

# 鳥、ブタ、そしてパンデミックインフルエンザの克服に向けて

喜田 宏（拠点リーダー、獣医学研究科 動物疾病制御学講座  
微生物学教室 / 教授、人獣共通感染症リサーチセンター / センター長）

アジア、中東、ヨーロッパおよびアフリカの62カ国にH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染による家禽と野生水禽の被害が広がっている。これまでに感染と防疫のために死亡した鳥は4億羽を超える。その内15カ国では、6年間に470余名のヒトが感染し、6割が死亡した。中国、ベトナム、インドネシアおよびエジプトで、家禽に不活化ワクチンを接種し、鳥インフルエンザ対策が疎かになり、見えない流行が拡大した結果である。このH5N1ウイルスが家禽に感染を繰り返す間に、多様な抗原変異ウイルスが選択されている。さらに、これら4カ国が、ヒトのH5N1ウイルス感染例数のトップ4であり、総数の85%を占める。

「家禽の感染を早期に摘発、淘汰するとともに、発生農場を中心とする半径3-10kmの同心円内の家禽と生産物の移動を制限することにより、被害を最小限に食い止め、ヒトの健康と食の安全を守る。高病原性鳥インフルエンザウイルスを鳥に封じ込める。」これが鳥インフルエンザ対策の基本である。日本は2004年および2007年に高病原性鳥インフルエンザが発生した際に、発生農場の家禽の淘汰と移動制限を断行し、いずれも清浄化した。2009年11月末に上海で開催されたOIE（世界動物衛生機関）のアジア・オセアニア地域35カ国代表専門家会議において、世界レファレンスラボラトリー長として、鳥インフルエンザを早期に終息、清浄化を図るための対策を提案した。特にワクチンには、効用と限界があり、“摘発・淘汰に加えて”のみ利用すべきことを提言した。参加国の代表全員の賛同を得、OIEの鳥インフルエンザ対策指針にこれを記載することとなった。

昨年4月末に、メキシコで、ブタ由来H1N1インフルエンザウイルスがヒトに伝播して、米国カリフォルニアおよびテキサス州にその感染が拡大していることがわかった。感染はさらに拡大し、WHOはパンデミックの段階に至ったと宣言した。今や、世界209カ国でこのウイルスの感染が確認されており、日本でも3,000万人以上にその感染が拡大しているものと推定される。これを“新型インフルエンザ”と呼び、流行防止を図ろうとしているが、その対策は的確とはいえない。

ヒトの新亜型ウイルスによるパンデミックインフルエンザもまた、ウイルスの自然宿主である野生水禽ならびに家禽、ブタとヒトのインフルエンザの「グローバルサーベイランス」を軸に、予測と予防を図る戦略を執ってはじめてその克服が可能となる。

“鳥インフルエンザ”、“ブタインフルエンザ”および“新型インフルエンザ”は、いずれもヒトの病名として適切ではない。すべて「インフルエンザ」であることを前提に、対策を講ずるべきである。さらに、日本だけで毎年数千名を死亡させ、数百名の小児に脳症を起こしている、季節性インフルエンザの克服こそが、新型ウイルス対策の基盤となることを強調したい。

# アフリカにおける節足動物媒介性人獣共通感染症 分子疫学調査と病原体ゲノム解析

杉本 千尋（人獣共通感染症リサーチセンター国際協力・教育部門 / 教授）

吸血性節足動物に媒介される原虫、リケッチア類のゲノム解析、病態解析、生態解明を通じて、それらによる感染症の制御法を開拓することを目的として研究を遂行している。アフリカに分布するトリパノソーマ、タイレリア、エーリキア、これらを媒介するマダニ、ツェツェバエを研究対象に、ゲノム比較解析、遺伝子データベースの開発を行い、ゲノム情報を基盤として病原体—媒介動物—哺乳動物宿主の3者の相互関係について研究を進めている。

今回は牛心水症原因微生物である*Ehrlichia ruminantium*、東海岸熱原因原虫 *Theileria parva* ゲノムの Resequencing の成果を中心に発表する。これらの病原体はいずれも細胞内寄生性であり、宿主細胞ゲノム混入の少ないゲノムDNAを出発材料とせねばならず、純度の高い目的DNAを得るため、精製法の検討をまず行った。得られたゲノムDNAは次世代シーケンサー (Solexa) により塩基配列の解析を行い、既知のゲノム配列をリファレンスとして配列データをマッピングし、前者では約1.5M、後者では約8.9Mのゲノムの全域をほぼカバーする整列配列を得ることができた。これらの情報を基に株間での遺伝子比較、SNP同定を行った。特に*E. ruminantium*では試験管内継代を繰り返して作出された弱毒株と強毒な親株のゲノム比較を行うことができ、弱毒化の分子機構をゲノムから解析することが可能であった。また、繰り返し配列を基にした遺伝子マーカー開発を行い、アフリカでの分離株の遺伝子型別を行った。

トリパノソーマ感染症に関しては、ザンビアにおいて疫学調査を実施した。前年度に患者発生が確認できた地域(マラウイ国境隣接の自然保護区)で、ツェツェバエの捕獲と家畜(ウシ、ヤギ)の血液採取を行い、遺伝子検査によりトリパノソーマ原虫の検出を行った。その結果、ウシ検体からヒトに感染性を有する *Trypanosoma brucei rhodesiense* が検出され、飼育されている家畜が原虫を保有していることが明らかになった。当該地域にはレイヨウ、バッファローも生息していることから、今後野生動物も含めて原虫保有動物を探索し、動物—ヒト間での伝達を阻止し、同地域でのヒトトリパノソーマ症の発生を防ぐための対策を講じたい。

# ウイルス性人獣共通感染症の 診断法の開発と疫学調査

高島 郁夫（獣医学研究科 環境獣医科学講座 公衆衛生学教室 / 教授）

ウイルス性人獣共通感染症のうちハンタウイルス感染症とダニ媒介性脳炎につき以下の研究を実施した。

## 1. ハンタウイルス感染症

ハンタウイルスによって引き起こされる腎症候性出血熱(HFRS)はげっ歯類媒介性の人獣共通感染症である。極東ロシアにはHFRSを引き起こす複数種のハンタウイルスが存在し、HFRSによる致死率は5.1%にも達する。極東ロシアでは、邦人渡航者が増加傾向にあることなどから、この地域での人におけるウイルス流行状況を詳細に把握することが重要である。そこで本研究では、極東ロシアで捕獲された野鼠からハンタウイルスを分離し、分離株を用いた交差中和試験によりHFRS患者の感染ウイルス型の鑑別を行った。

その結果、沿海地方のウラジオストク市内ではSeoulウイルスによる感染が、ウラジオストク市以外の沿海地方ではAmurウイルスによる感染が最も多発していることが判明した。一方、ハバロフスク地方においてはHantaanウイルスによる感染が最も多発していることが示唆され、極東ロシアの中でも地域ごとで異なった流行パターンを示すことが明らかとなった。

## 2. ダニ媒介性脳炎

ダニ媒介性脳炎(TBE)ウイルスは人に対して重篤な脳炎を引き起こす、人獣共通感染症の原因ウイルスである。日本では1993年に北海道の旧上磯町で患者が発生し、同地域においてTBEウイルスが分離され、TBEウイルスの流行巣の存在が明らかとなった。今回、日本各地のTBEウイルスの分布を調べるため、野鼠を対象とした血清疫学調査を行った。更に、北海道で現在流行しているTBEウイルスの性状を解析することを目的に、道南地域で得られた野鼠の臓器からのウイルス分離を試みた。

その結果、北海道において224検体中17検体、北海道以外では島根県において58検体中2検体の抗TBEウイルス抗体陽性検体が検出された。また、北海道上磯町のアカネズミ脾臓検体から、ダニ媒介性フラビウイルスが分離された。分離されたウイルスは塩基配列の解析によりTBEウイルスと同定され、上磯分離株であるOshima株と非常に近縁である事が示された。以上より北海道においては10年以上に渡ってTBEウイルスの流行巣が存在していることが確認され、北海道以外では島根県において初めてTBEウイルスの流行巣の存在が示唆された。

# げっ歯類における人獣共通感染症病原体に対する 感受性／抵抗性因子に関する研究

安居院 高志（獣医学研究科 動物疾病制御学講座 実験動物学教室 / 教授）

一般に感染症研究に多用されているBALB/c、C57BL/6 (B6)などの実験用近交系マウスはすべてインターフェロンによって誘導されるオルソミキソウイルス特異的抗ウイルス因子Mx、及びフラビウイルス特異的抗ウイルス因子Oas1bが突然変異により欠損している。我々はこれまでの研究において、日本産野生マウス近交系MSM/Msよりこれらの因子を導入したコンジェニックマウスを作成し、このマウスがインフルエンザ感染及びウエストナイルウイルス感染実験においてそれぞれ有用なことを示した。

## 1) Oas1bに関する研究

野生マウスよりOas locusを導入されたコンジェニックマウスC57BL/6.MSM-Oas (B6.M-Oas)に対してダニ媒介性脳炎ウイルス、オムスク出血熱ウイルスなどの他のフラビウイルスを感染させたところ、B6.M-Oasはこれらのウイルスに対しても抵抗性であることが確認された。野外、例えば北海道においてはマウスは野生げっ歯類としてはマイナーで、エゾヤチネズミやアカネズミのポピュレーションの方が多い。北海道ではダニ媒介性脳炎が野生げっ歯類などを宿主として伝播していると考えられており、これらの野生げっ歯類ではどのようなOas遺伝子を有し、その抗フラビウイルス活性はどの程度であるかを調べる必要がある。また、Oas1bの抗フラビウイルス活性は、Oas1bの酵素活性により産生されるオリゴアデニレートがRNase Lを活性化し、活性化したRNase LがフラビウイルスRNAを特異的に分解することで抗ウイルス活性を発揮するとされている。しかしながら、近年Oas1bにはオリゴアデニレート活性がないことが示されており、Oas1bの作用機構が謎となっている。Oas1bの抗ウイルス作用機構を解明することも重要である。

## 2) 感染抵抗性及び感受性系統を用いた遺伝学的解析による新たな感染抵抗性因子の解明

古くからB6マウスはセンダイウイルスに対し抵抗性、DBA/2 (D2)マウスは感受性であることが知られていた。我々は両マウスを用いた遺伝学的QTL解析から抵抗性／感受性を規定している3つの遺伝子座を明らかにすることができた。今後これらの遺伝子座を絞り込み責任遺伝子を同定して行く予定である。B6とD2マウスはエキノコッカス感染に対しても前者は抵抗性、後者は感受性を示す。同様の遺伝学的解析手法を用いて、エキノコッカス感染に対する抵抗性因子を解明する試みを行っている。

以上の研究成果はフラビウイルス、パラミキソウイルス、エキノコッカス感染に対する分子標的治療薬の開発に繋がることが期待される。

# 寄生虫症の疫学、病態、創薬に関する研究

片倉 賢（獣医学研究科 動物疾病制御学講座 寄生虫学教室/教授）

本プログラムにおいては、リーシュマニア症、トリパノソーマ症、バベシア症、エキノコックス症などの人獣共通寄生虫性疾患を中心に、それらの疫学調査、各種診断法の開発と改良ならびに病態の解明を進めるとともに、薬用植物由来の天然化合物を用いた創薬の研究を実施する。

本シンポジウムでは以下の成果について発表する。

## 1. ミャンマーにおける牛の血液原虫の疫学

ミャンマーはインド亜大陸と東アジアを結ぶ要地であるが、これまで人獣共通寄生虫症に関する疫学研究は少ない。そこで、ミャンマー農水省家畜改良・獣医局およびミャンマー獣医科大学との共同研究により、まず反芻動物の血液原虫の調査を開始した。2009年1月にミャンマー中央部で採血したウシ191頭の血液DNAについてPCR検査を実施したところ、*Babesia bovis*が37.7%、*Theileria* spp. が4.2%の陽性率を示し、マダニ媒介性原虫疾患の流行が確認された。なお、*Trypanosoma evansi*については、本調査では検出されなかった。今後、2009年12月にミャンマー南部で採取したサンプルについても解析する予定である。

## 2. 抗トリパノソーマ活性を有するミャンマー産薬用植物の探索

豊富な植物資源を有するミャンマーでは、薬用植物による独自の伝承医薬療法が発達している。今回、ミャンマー産薬用植物の中から抗エバンス・トリパノソーマ活性を有する植物を探索した。60種の薬用植物より得られアルコール粗抽出物を用いて、*in vitro*における原虫の増殖阻害活性を測定した。その結果、9つの植物粗抽出物が高い抗トリパノソーマ活性を示した。これらの薬用植物は現地でマラリア、下痢、腫瘍などの治療に使用されており、今後、活性成分の分離・精製を進める予定である。

## 3. 内臓リーシュマニア症における原虫の存続機構

犬のリーシュマニア症では、内臓のみならず一見正常に見える皮膚にも原虫が存在し、所属リンパ節経由で原虫が皮膚へ移行する可能性が示唆されている。マウスの内臓リーシュマニア症モデルでは、肝臓と脾臓における臓器特異的な免疫機構が原虫の排除と存続に関わることが示されている。本研究では、リンパ節に注目し、リンパ節を欠損する*aly/aly*マウスの内臓リーシュマニア症について解析を進めている。これまでのところ、この免疫不全マウスでは肝臓での原虫排除がおこらず、血液、脾臓、骨髄における原虫の存続が示されている。



# スリランカにおける狂犬病などの疫学研究

玉城 英彦（医学研究科 予防医学講座 国際保健医学分野 / 教授）

スリランカにおける1)狂犬病と2)レプトスピラ症に関する疫学研究の成果を発表する。

## 1) 狂犬病

スリランカにおける狂犬病に関する研究では、野犬対策がその最大の要因となっていることから、フィールド調査や介入実験を実施して一般住民の予防啓発を実施した。フィールド調査では、一般住民の狂犬病に関する知識や態度・行動変容を把握し、地域差やペットの飼い主とそうでない者との差を明らかにした。また、野犬の生態調査も実施することにより、総合的な公衆衛生の観点から狂犬病対策へ向けた環境評価を実施した。

介入実験では、農村部の住民への対策が遅れていることから、選択したモデル地域において自作した啓発パンフレットを利用して介入前後による違いを検討し、現地の住民が自らの手で実施できる予防戦略を提示した。また、狂犬病による犠牲者の多くは子供であることから、地域の公立小学校を利用した介入モデルも提示し、授業を利用した狂犬病予防プログラムを介入の有無により検討して安価で効果的な方策を提案した。

さらに、狂犬病を中心とした人獣共通感染症サーベイランス体制の構築を推進するとともに、国内1ヶ所のみであった狂犬病の疑いのある動物の診断施設の分散化を図り、現地の狂犬病対策の環境整備に努めた。

## 2) レプトスピラ症

2008年にはレプトスピラ症の流行が確認されたため、その対策に貢献するための分子疫学的研究ならびに症例対照研究を実施している。2008年5-12月にペラデニヤ大学病院に入院した疑わしい患者107名の血清のうち、26人(24.3%)が抗体陽性(9/26 = Sejroe & 5/26 = Icterohaemorrhagiae)であった。また、3件はPCR陽性(2 *Leptospira interrogans* & 1 *L. kirschneri*)であった。

また、症例対照研究において、48名の疑わしい症例および対照125人の血清、げっ歯類78例と牛115例のサンプルを収集し現在解析中である。

## 3) 人材育成

これらの研究を実施するために、大学院生3人が現地に長期滞在した。また、国立感染症研究所(東京)において、資料分析のためのトレーニングを受けた。

発表ではこれらの研究の成果を紹介する予定である。

# 新興感染症とその臨床像

有賀 正（医学研究科 生殖・発達医学講座 小児科学分野 / 教授）

## 1. ヒトボカウイルスの各構成蛋白に対する抗体測定系の開発

ヒトボカウイルス (Human bocavirus, HBoV) の構造蛋白質 (VP1、VP2) 及び非構造蛋白質 (NP1、NS1) を産生するバキュロウイルスを遺伝子組み換えにより作成し、これらのウイルスを感染させた Tn5 細胞を抗原とする蛍光抗体間接法による血清中の抗 HBoV IgG 抗体測定法を確立した。鼻咽頭液から HBoV ゲノムが検出された下気道感染症患者のうち、急性期と回復期のペア血清が得られた 4 症例について、血清中の抗 HBoV IgG 抗体価を測定したところ、4 症例全ての回復期血清で抗 HBoV VP1-IgG 及び VP2-IgG 抗体価の上昇が認められた。各年齢層の血清中の HBoV VP1、VP2、NP1 及び NS1 蛋白に対する IgG 抗体を測定したところ、抗 HBoV VP1-IgG 抗体の感度が最も優れており、血清疫学的解析には最適と考えられた。

## 2. 新型インフルエンザ患者の血清中のウイルスゲノム、炎症性サイトカインの検索

新型インフルエンザで入院した小児患者の血清中のウイルスゲノム、炎症性サイトカインを検索中なので、その中間経過を発表する予定である。

# ウイルス性人獣共通感染症の予防および制御法 に関する研究

高田 礼人（人獣共通感染症リサーチセンター 国際疫学部門 / 教授）

インフルエンザ、SARS、エボラ出血熱、ウエストナイル熱、狂犬病等のウイルス性新興・再興感染症の多くは、自然界の野生動物と共生、存続してきたウイルスが、家畜、家禽そしてヒトに侵入、伝播してひきおこす人獣共通感染症である。人口増加および人類の行動・生活範囲のグローバル化、さらに森林破壊および温暖化などによる地球環境の急激な変化によって、野生動物と人間社会の境界が消失した結果、病原体が家畜、家禽およびヒトに伝播する機会が増えたことが原因の一つである。人獣共通感染症の発生を予測し流行を防止する戦略を確立するためには、病原微生物の自然宿主、存続メカニズムと伝播経路、宿主域と病原性、発症と流行に関する諸要因の解明が必要となる。本シンポジウムではインフルエンザウイルスとフィロウイルスについて我々のグループが行っている研究を紹介する。

# 野生動物生態と感染症の研究

坪田 敏男（獣医学研究科 環境獣医科学講座 生態学教室 / 教授）

本課題研究の目的は、野生動物の生態と感染症の関係を明らかにすることである。これまでわれわれはクマやシカの生態について研究を進めてきたことから、これらの野生動物に伝播する感染症の疫学的観点から研究を進める。とくに、北海道における生物多様性とライム病の感染率との関係を明らかにしたい。また、ザンビア・ロッキンバー国立公園に生息するリーチュエ(*Kobus leche*)での結核の感染率や感染ルートなどをリーチュエの生態と関連させて明らかにしたい。さらに、北海道およびその周辺地域において、野鳥の捕獲法とサンプル採取法の技術確立をめざす。各々の課題について本年度の研究成果を以下に報告する。

## 1. 北海道における生物多様性とライム病の感染率との関係

ライム病は種々の野生動物に感染し、家畜や人にも感染を拡げる人獣共通感染症の一つである。本年度は、知床国立公園などで捕殺または生捕りされたヒグマやエゾシカより採取された血液、皮膚およびシュルツェマダニ、さらにフラッキングによって採取されたシュルツェマダニについて *Borrelia spp.* の保有状況をPCR法によって確認した。その結果、およそ3.5%のシュルツェマダニにおいて陽性バンドが検出された。一方、血液および皮膚サンプルではすべて陰性であった。また、犬用の *Borrelia spp.* に対する抗体検出キットを使って抗体検査を行ったところ、エゾシカで64%、ヒグマで7.5%の陽性を示した。

## 2. ロッキンバー国立公園におけるリーチュエの生態と結核症感染

結核菌はヒトのみならず多くの野生動物に感染し、発症すれば死亡率も高い。これまでザンビアの固有種であるリーチュエに結核症が感染していると報告されている。リーチュエは、ザンビアに生息する小型羊蹄類で、比較的生息数が多いため肉食獣のハンティングの対象になっている。本年度は、ロッキンバー国立公園において14頭のリーチュエを捕殺し、剖検後、血液および各種臓器の採材を行った。その結果、数頭のリーチュエより結核菌が分離できた。なお、本研究に関連して、本年1月に大阪府池田市五月山公園で飼育されていたニホンジカに結核が発生した。現在、肺およびリンパ節などの病巣部位や血液を入手し検査を進めている。

## 3. 北海道周辺地域での野鳥の捕獲法および感染症サンプル採取法の確立

高病原性鳥インフルエンザ、西ナイル熱、マレック病、鳥ポックス症など、野鳥が介在して伝播する感染症は数多くある。しかしながら、ガンカモ類、猛禽類、水禽類、小鳥類など野鳥を捕獲し、血液、スワブ、羽毛などの研究材料をサンプリングする手法は必ずしも確立されていない。本年度は、10月に野幌森林公園にて行われている小鳥類(アオジ、シジュウカラ、ゴジュウカラなど)の捕獲に立ち合わせていただき、羽毛のサンプリングを試験的に行った。

# ハンタウイルス感染症の鑑別診断法と疫学に関する研究

有川 二郎（医学研究科 微生物学講座 病原微生物学分野 / 教授）

ハンタウイルスはブニヤウイルス科に分類されるRNAウイルスで、腎症候性出血(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)の原因ウイルスである。両疾患ともに、持続感染したげっ歯類が自然宿主となり、糞尿中に排泄されるウイルスを感染源とする人獣共通感染症である。HFRSはユーラシア大陸全域で、またHPSは南北アメリカ大陸全域で流行が報告されている。近隣の極東アジア諸国はHFRSの流行国であり、また北・南米のHPSでは死亡率40%に達する場合もあり、いずれも輸入感染症として注意を払う必要がある。現在、我が国での流行は報告されていないが、ドブネズミ等に陽性個体が確認されており、未確認症例の存在も危惧されている。

我々はこれまでのハンタウイルス感染症の血清学的診断法および遺伝学的診断法の開発を行い、HFRS流行アジア諸国やHPS流行国アルゼンチンの研究者との共同研究を継続している。以下に、平成21年度に実施した、以下の研究課題について報告する。

**疫学研究:** インドネシア、ベトナム及びタイの共同研究者と野生げっ歯類と不明熱患者血清を中心に血清疫学的研究を実施し、いずれの国で陽性げっ歯類と抗体陽性例を発見している。特に、げっ歯類以外のハンタウイルスの自然宿主として最近注目されているトガリネズミ目(トガリネズミ科とモグラ科の小動物)由来ハンタウイルスの中で、ジャコウネズミ(*Suncus murinus*)由来ハンタウイルス, Thottapalayam virusに対する抗体陽性例を確認し、人疾患との関連に注目している。

**鑑別診断法:** HPS原因、南北アメリカ大陸由来ハンタウイルス(新世界ハンタウイルス)の血清型簡易鑑別ELISA用抗原を開発した。いままでに、アルゼンチンや北米の共同研究者から提供されたげっ歯類血清を用いて、有用性を検討している。また、PCR法によるHPSウイルスのスクリーニングと鑑別のためのプライマーの検討も行っている。

**げっ歯類の病態:** ハノイ近郊の港湾地区を中心に、Seoul型ハンタウイルス感染ドブネズミコロニーの継続調査を行い、血清学的、遺伝学的に詳細な病態解析を行い、持続感染自然宿主げっ歯類の病態を明らかにしようとしている。特に、感染個体の脾臓細胞の培養を通じて免疫学的解析を開始している。

これらの研究を通じて、人獣共通感染症対策における流行国研究者の共同教育研究の発展を目標としている。

# 鳥由来感染症の疫学研究

大橋 和彦（獣医学研究科 動物疾病制御学講座 感染症学教室 / 教授）

ガン・カモ類などの野生水禽を含む鳥類は、高病原性鳥インフルエンザの原因となるインフルエンザウイルスやニューカッスル病ウイルスなど公衆衛生上および家畜衛生上重要な病原体のヒトや家畜への伝播・導入に重要な役割を果たす。この他にも野生鳥類が感染巣（レゼルポア）として疫学的役割を担っている病原体は多く存在しており、その継続的なモニタリングはそれら病原体が引き起こす疾病制御方法の確立のために必須である。我々の研究室では、これまで鳥類が保有する病原体の分子疫学的調査を行っており、その過程で採材が容易な羽材料（羽軸根）を用いたPCRによる遺伝子診断方法を樹立した。そして鶏に悪性リンパ腫を引き起こすマレック病ウイルス（MDV）が野外において強毒化の傾向にあり、さらにガン・カモ類など野生水禽において病原性が高いMDVが維持されており、これらの野鳥が強毒型MDVの感染巣となることを明らかにした。

本研究では、継続して野生鳥類や家禽に分布するウイルス感染症の分子疫学調査を行うため、羽材料を用いた日本脳炎ウイルス（JEV）やウエストナイルウイルス（WNV）ゲノムを特異的に検出するRT-PCR法を検討して分子診断法を樹立した。そしてその有用性を確認するため、JEVあるいはWNV実験感染鶏から経時的に羽材料を採取して、ウイルスゲノムの検出を試みた。その結果、いずれのウイルス感染鶏においても実験期間を通してウイルスゲノムを検出できることが示された。そこで次に、北海道各地において種々の野鳥（ガン・カモ類、ハクチョウ、カラス、スズメ、ムクドリ、ヒヨドリ、猛禽類など）の捕獲個体や傷病個体および養鶏由来の材料を収集して分子疫学調査を行った。収集した材料数の規模は小さいが、全て陰性であった。今後、より多くの材料を収集して調査を継続する予定である。同様に分子疫学調査は、MDVについても継続しており、国内で分離（検出）されたMDVの病原性進化について解析を行った。その結果、MDV発癌遺伝子である $meq$ に多型が認められたものの、アメリカなどで報告されているような強毒化に伴う変化と異なるものであることが示された。現在、野生水禽で検出されたMDVについても詳細を解析している。

前述のとおり、野生水禽などを種々の病原体を媒介することが知られているが、それら野鳥における感染症に対する免疫応答については検討されていない。そこで野鳥における免疫機構を明らかにするため、MDV感染に対するサイトカイン発現について検討した。その結果、マガンやカモではMDV感染に対して鶏とは異なる応答を示す可能性が示唆された。今後、さらに種々の免疫応答関連遺伝子について解析を行う必要がある。

# インフルエンザウイルスの抗原変異予測のための 計算機解析

伊藤 公人（人獣共通感染症リサーチセンター 国際疫学部門 / 准教授）

インフルエンザウイルスのヘマグルチニン(HA)は、人の免疫圧による選択淘汰を受け、抗原性が変化し続ける。インフルエンザの予防にはワクチン接種が有効であるが、HA上にアミノ酸置換を持つ様々な株が毎年分離されるため、翌年のワクチン株の選定が困難である。本研究は、大量のHAの遺伝子情報を利用し、抗原変異に伴うアミノ酸置換の規則性を探索するとともに、過去の変異に見られた規則性に基づいて将来起こりうるアミノ酸置換の予測手法を開発することを目的とする。

A香港型ウイルス(H3N2)の流行におけるHAの継時的変化を把握するために、多次元尺度構成法(MDS)を用いて、過去40年間に人から分離されたウイルスのHAアミノ酸配列を解析した。MDS法とは、対象間の相違度に基づいて対象物を空間上の点に配置する解析手法であり、対象間の相違度を空間上の点の間の距離として視覚化することができる。本法によって、H3N2 亜型ウイルスのHA1領域のアミノ酸配列2450本を解析し、HAの進化を表す三次元地図を構築した。構築した三次元地図に基づき、異なる年代のHA間の相対的な距離に関する規則性を探索した。また、相対的な距離を利用して翌年のアミノ酸置換を予測する試験を行い、予測の精度を検証した。MDS解析の結果、H3N2亜型ウイルスのHAは一定の曲率をもつ曲線上を進化していることが判明した。MDS空間における曲線上の進化は、同じ位置のアミノ酸が複数回置換していることを意味する。また、曲率が一定であることから、異なる年代のHA間の相対的な距離に規則性があることが示唆された。HAアミノ酸配列の各位置における置換頻度がガンマ分布に従うと仮定すると、この相対的な距離をよく回帰できることが判明した。回帰から得られたガンマ分布のパラメータを利用し、過去10年に溯ってそれぞれ翌年のアミノ酸置換を予測する試験を行った。1997年から2007年の各年に対し、HAアミノ酸配列から翌年のアミノ酸置換を予測し、実際に起こったアミノ酸置換と予測結果を比較したところ、本手法は再現率=67%、適合率=46%で翌年のアミノ酸置換を予測することが判明した。この結果、サーベイランスで得られるHAの遺伝子情報から、翌年の抗原変異株が持つアミノ酸置換を比較的高い精度で予測できることが示唆された。

また、パンデミック(H1N1)2009ウイルスのHAの三次元立体構造モデルをホモロジーモデリング法により構築し、抗原領域Sa,Sbの構造を1918年のH1N1ウイルスと比較し、(H1N1)2009ウイルスの将来の抗原変異を予測した。現在、流行中のH1N1ウイルスのアミノ酸置換をデータベースで検索した結果、予測の通りのアミノ酸置換を持つ株が、既に分離され始めていることが判明した(PLoSOne 2010)。

# プリオンの増殖機構とプリオン病の病因論 に関する研究

堀内 基広（獣医学研究科 プリオン病学講座 / 教授）

プリオン病の病原体“プリオン”の主要構成要素は、宿主遺伝子 *PrP* にコードされる正常型プリオン蛋白質 ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) の構造異性体である異常型プリオン蛋白質 ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) である。プリオンの概念が定着してから20年が経ったが、プリオンの細胞内増殖の分子機構、およびプリオン病における神経病態機序は十分には理解されていない。当研究室では、GOCEで推進する研究課題の一つとして、プリオン病の予防・治療法の開発に資することを目標に、プリオンの細胞内増殖の分子機構およびプリオン病における神経病態機序の解析を進めている。今年度は  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  の細胞内局在と骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) によるプリオン病の治療モデルについて報告する。

## 1. 異常型プリオン蛋白質の細胞内局在

当研究室では、 $\text{PrP}$  分子のアミロイド原性の高い領域の近傍を認識する mAb132 を用いることで、プリオン持続感染細胞で  $\text{PrP}^{\text{C}}$  と  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  を信頼性高く識別可能なことを見出した。この方法を用いて、プリオン持続感染細胞での  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  の細胞内局在を解析した結果、 $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  は初期/リサイクリングエンドソーム、後期エンドソーム/多胞体、トランスゴルジネットワーク近傍など、細胞内の膜輸送に関与するオルガネラに局在していた。エンドソーム→トランスゴルジネットワークの輸送系路を障害すると、 $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  の細胞内局在が顕著に変化することから、 $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  は細胞の小胞輸送系路に付随してダイナミックに移動していることが明らかとなった。また、mAb132 を用いると、プリオン持続感染細胞のみならず、プリオン感染動物の凍結切片でも、 $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  を特異的に検出できることから、プリオン感染動物の中樞神経系組織の、どの細胞のどの部位でプリオンが増殖するかを解析することが可能となった。今後、プリオン感染動物の中樞神経組織での  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  の局在の解析を進める予定である。

## 2. MSCの移植によるプリオン病の治療モデル

プリオン病の治療には、プリオンの増殖阻害に加えて、神経組織の保護作用あるいは変性した神経組織の再生が必要である。我々は、神経組織の保護作用を期待して、MSCの移植によるプリオン病の細胞治療の可能性を検討してきた。プリオン感染マウスの脳内あるいは末梢から不死化ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) を移植した場合、マウスの生存期間が有意に延長した。栄養因子の産生や神経系細胞への分化を調べた結果、hMSCによる延命効果は bystander effect によるものと考えられた。hMSCはマウス組織内で長期間生存しないことから、よりよい治療モデルを確立するためには、マウスMSCを使用する必要がある。マウスの緻密骨、骨髄、脂肪組織からMSCの分離方法が確立できたことから、今後はマウスMSCの移植実験を進める予定である。



# ウイルスの病原性発現の分子基盤の解明

澤 洋文（人獣共通感染症リサーチセンター 分子病態・診断部門 / 教授）

## ○ウイルス感染と宿主因子

ウイルス感染によって細胞に生じる細胞内応答について、ウイルスタンパク質と細胞のタンパク質との相互作用に着眼して研究を行い、新しい知見を見出してきた。2009年度はウイルスの核外放出機構について、ウイルスタンパク質がviroporinとして機能してウイルス粒子を細胞外に放出する機構を報告した。またウイルスタンパク質が宿主細胞の細胞周期をG2 arrestに留めて、ウイルス自身の複製を亢進させる機構を解明し、G2 checkpoint阻害剤がウイルス感染を抑制することを報告した。

## ○ウイルス様粒子を用いた研究

ウイルス様粒子を作製し、蛍光標識して、粒子の細胞内での動態をlive imageとしてタイムラプス顕微鏡、共焦点顕微鏡を用いて検討した。さらに北大電子研との共同研究として、ウイルス粒子のドラッグ・デリバリーシステムへの応用への展開の研究を行っており、2009年度には、ウイルス様粒子の表面に金属ナノ粒子を配列することに成功し、この原理を用いてウイルスの検出に利用することを報告した。

## ○ウイルス感染症に対する治療法の開発

これまでに得られた、ウイルス感染に対する宿主因子の応答およびウイルスの細胞内動態に関する基礎的知見を基にして、ウイルス感染症の治療法を開発している。2009年度には前述したようにG2 checkpoint阻害剤がウイルス感染を抑制することを報告した。またHuman T-cell lymphotropic virus type-I により発症するAdult T-cell leukemiaの腫瘍細胞の臓器への浸潤機構を解明し、その知見を基にしてCXCR4 antagonistが腫瘍細胞の臓器への浸潤を阻害することを報告した。

## ○人獣共通感染症の自然宿主の探索

これまでに、アフリカのザンビア共和国を17回訪問し、野生動物（食果コウモリ、サル、ラット、げっ歯類等）の捕獲・採集を行い、それらの組織・血液から核酸を抽出し、病原体の存在を確認している。またグローバルCOEの目標である「人獣共通感染症の予防・制圧に貢献できる人材」の育成の一環として、2009年度には10月29-11月8日および11月26日-12月15日にかけて若手研究者と共にザンビア共和国を訪問し、国立公園内での食果コウモリ、サル、げっ歯類の捕獲・採集を行った。現在採集したサルのサンプルから新たなretrovirusを検出し、その単離を試みている。またサル、げっ歯類のサンプルを用いてpolyomavirusの検索を行っている。

# 病原体の神経向性機構の解明

梅村 孝司（獣医学研究科 診断治療学講座 比較病理学教室 / 教授）

経神経伝播ウイルスの多くは末梢神経系から中枢神経系へと神経を伝播し、致死的な脳炎・脳症を惹起する。これらのウイルスの神経細胞内での感染および増殖機構を明らかにすることは、ウイルスの性状を理解する上でも、これらのウイルス感染による疾患の予防・治療法を開発する上でも重要である。本研究では、豚血球凝集性脳脊髄炎ウイルス(HEV)、オーエスキー病ウイルス(PRV)、狂犬病ウイルス(RV)を選択し、これらの感染および増殖について新生マウスDRG細胞を用いて検索した。

初めにHEVの神経細胞における感染および増殖と細胞骨格との関連について、微小管依存性に細胞内輸送をされることが証明されているPRVと比較検討した。その結果、PRVと比較してHEVの感染はより強い神経細胞特異性を有すること、および神経細胞での感染はPRVと同様に微小管と中間径フィラメントに依存することが明らかとなった。

次に、非常に強い神経親和性を有するRVに関して、nucleoprotein(N蛋白)に対するモノクローナル抗体を抗原検出に用いて同様の実験を行った。その結果、RV抗原は神経細胞と非神経細胞のいずれにおいても検出されたが、神経細胞の抗原陽性細胞数はHEVやPRVと比較して低値を示し、細胞骨格の選択的阻害においてはRV抗原陽性細胞数に有意な変化は認められなかった。これらの成績から、RV抗原陽性細胞数の低値は神経細胞内での増殖速度もしくは伝達速度の遅さによるものと推察され、これが動物およびヒトの狂犬病における潜伏期間の長さに関連している可能性が考えられた。また、ウイルス粒子の輸送およびパッケージングには細胞骨格が関与するが、ウイルスN蛋白はこれらとは独立した機構により合成される可能性が推察された。非神経細胞への感染が認められたことから、これらの細胞がRVの神経細胞内での感染および増殖の支持細胞として関与する可能性と、シュワン細胞における感染がRVの神経伝播に関与する可能性が考えられた。

本研究成果は、神経伝播ウイルスの伝播および感染様式の多様性を示唆しており、これらのウイルス感染症の予防・治療法を開発する上で重要な知見であると考えられた。

# 感染症に対する免疫応答の解明

岩淵 和也 (遺伝子病制御研究所 病態研究部門 免疫生物分野 / 准教授)

## 高脂肪食によるNKT細胞を介した免疫偏倚

H1N1 swine fluに関し、リスクファクターの一つとして肥満が掲げられていた。「肥満」には、呼吸機能に対する障害の他、代謝特性や免疫応答などに起因するいくつかの要因が推定される。免疫応答について考えた場合、肥満者では特定の傾向を生じるのであろうか？高脂肪食を摂食させたマウスをモデルに、普通食給餌のマウスと比較して抗原特異的免疫応答がどのように変化するか、またその背景に脂質抗原を認識するNKT細胞がどのような関連性を有するかを解析した。C57BL/6(B6)マウスに高脂肪食(High fat diet; HFD), あるいは普通食(Standard fat diet; SFD)を給餌する群に分け、経時的に体重測定、臨床化学的パラメーターを測定した。3週後には有意なHFD>SFDの体重変化を生じ、HFD給餌で肝NKT細胞数は有意に減少し、肝NKT細胞の活性化を示唆する結果と考えられた。この時点で、 $\alpha$ -galactosylceramide 2  $\mu$ gを投与し、経時的に血中IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13の濃度を測定したところ、IFN- $\gamma$ 産生は低下、IL-4産生については変化なく、IL-13の産生は増強していた。HFD給餌による獲得免疫系への影響を調べる目的で、同じ給餌スケジュールで飼育した野生型(B6), あるいはCD1d ノックアウト(KO)マウスを完全フロイントアジュバントとともにニワトリ卵白アルブミン(cOVA)で免疫した。9日後所属リンパ節よりT細胞を分離し、抗原特異的増殖反応・培養上清中に産生されたサイトカイン濃度を測定した。その結果、HFD給餌野生型マウスでは、SFD給餌野生型マウスに比して、cOVA特異的増殖反応が有意に低下し、また培養上清中のIFN- $\gamma$ 産生も抑制されていた。一方、同様にcOVAで免疫したHFD給餌CD1d KOマウスでは、SFD給餌CD1d KOマウスと比較して、増殖反応の抑制や、IFN- $\gamma$ 産生抑制は認められなかった。以上から、高脂肪食の給餌による免疫応答の偏倚(Th1抑制)は、NKT細胞/CD1d系を介する経路、すなわちNKT細胞の産生するサイトカインに依ることが判明した。このTh1抑制(Th2方向への傾斜)は、多くの感染症に対して感受性が上昇する理由になり得ると考えられた。一方、CD1d KOではこのTh1抑制が生じないものの、NKT細胞が欠損するため、高脂肪食の給餌をせざとも、感染症に対する感受性が高くなる場合がある。因にCD1dの欠損は、HFDの長期給餌による肥満の進行に対しても有意に抑制的である。

## MR1拘束性NKT細胞 vs CD1d拘束性NKT細胞

通常NKT細胞というとCD1d拘束性NKT細胞を指すが、class Ibの1種であるMR1拘束性自然T細胞はB6背景でNK1.1を発現するので、NKT細胞亜群と考えることが可能である。すなわち、NKT細胞は拘束分子で大きく2つに分けられることになる。MR1拘束性NKT細胞は、invariant V $\alpha$ 鎖を発現する細胞として腸管で粘膜固有層内リンパ球(Lamina propria Lymphocyte; LPL)として最初に記述したLantz博士(仏)によりMAIT(mucosa-associated invariant T)と呼ばれているが、IL-10産生能が高く炎症制御的に機能する。感染症における関与について未だ検証されていないが、ユニークな機能を発揮するものと期待される。

# 感染に関わる細胞膜分子の発現と輸送

稲葉 睦（獣医学研究科 診断治療学講座 臨床分子生物学教室 / 教授）

ウイルスや原虫などの微生物の感染は宿主細胞とのコンタクトによって始まる。これに関わる宿主とエンベロープウイルスの細胞表面分子はいずれも宿主細胞内で作られ、細胞膜に輸送される。即ち細胞内小胞輸送は、宿主細胞とウイルス双方の性状を左右する因子である。また宿主細胞表面分子の遺伝的多様性は原虫やウイルスとの出会いの場で、その程度を規定し得る。私たちの関連する研究は、BDV膜構築を左右すると思われるG、Mタンパク質(BDV-G, M)の細胞内輸送制御の機序、ならびに細胞表面糖タンパク質の構築・遺伝的多様性と原虫易感染性関連の解明である。BDVタンパク質の実験は組換え体を作成し、ようやく開始点に立ったところであるので、今回、これについては関連する分子内細胞内輸送シグナル、ERにおけるシャペロンとの相互作用や exosome 経路による細胞外への輸送などについて私たちの最近の研究知見を紹介する。また、赤血球寄生原虫との関連を念頭においた細胞表面分子について、牛赤血球におけるGlycophorin A (glycophorin BとCも含まれる?)とCD58とで形成する高分子複合体の複雑な多型、ABCC遺伝子多型と血液型Bシステムなどに関する知見に触れる。

# 人獣共通感染症の遺伝子検査法の開発

鈴木 定彦（人獣共通感染症リサーチセンター 国際疫学部門 / 教授）

我々はヒト由来検体や動物由来検体を対象として細菌由来人獣共通感染症の簡易遺伝子検査法を開発することを目指して研究を進めている。

結核菌をはじめとする抗酸菌は発展途上国を中心として世界人口の3分の1に感染し、その引き起こす病気（抗酸菌症）により毎年約1,000万人の新規患者と約170万人の死者を出している人獣共通感染症病原体であり、これを制圧する事は数多くの人類を救う事に繋がる。抗酸菌症の制圧には、早期診断、迅速な薬剤感受性試験、伝播経路の解明、有効なワクチンの開発、新規抗結核薬の開発および衛生環境の改善が重要と考えられている。発表者は新規検査法の開発とその応用という見地からの抗酸菌症制圧への貢献を目指して研究を進めている。

ヒトに病原性を有する抗酸菌は数多く知られているが、実際にヒトの抗酸菌症においては結核菌群菌による発症が大半を占めている。結核菌群菌のうち結核菌は元来全ての抗結核剤に対して感受性であるが、結核菌の次に頻繁にヒトから分離され、人獣共通感染症起因病原体としても重要な結核菌群菌である*M. bovis*には結核標準治療薬の一つであるピラジナミドが無効である。したがって、*M. bovis*に罹患した場合にはその治療法は自ずと異なってくる。すなわち、リファンピシン、イソニコチン酸ヒドラジド、エタンブトールおよびピラジナミドによる6ヶ月間の結核標準治療をリファンピシン、イソニコチン酸ヒドラジド、エタンブトールによる18ヶ月間の治療に変えざるを得ない。また、3剤療法は4剤による標準治療法に比べて耐性結核菌出現のリスクが高いとも考えられている。最近の研究により合成抗菌薬であるニューキノロン剤が*M. bovis*にも有効であることがわかっているため、*M. bovis*感染症という診断がつけばリファンピシン、イソニコチン酸ヒドラジド、エタンブトールにニューキノロン剤を加える事により6ヶ月治療が可能となり、耐性結核菌出現のリスクを減少させることもできる。したがって、結核菌群菌を更に結核菌と*M. bovis*に鑑別する事は重要である。抗酸菌症の細菌学的検査は通常は塗抹試験と培養試験により実施される。しかしながら、塗抹試験では抗酸菌の診断はできるが、菌種の同定はできないため治療方針は決定できない。一方、同定のためには2〜4週間という長期間の培養と、同定のための煩雑な生化学試験も必用となる。

われわれは、ヒト由来検体や動物由来検体から直接に結核菌群菌の検出と同定ができる方法の確立を目指して研究を進めている。結核菌群菌の遺伝子を比較するとRegion of Difference (RD)と呼ばれる菌種により欠失が見られる遺伝子領域が見いだされる。結核菌群菌においては遺伝子の水平伝播は報告されておらず、従って祖先菌種において一度欠失した遺伝子領域はその子孫菌種において再び見られることはないのが一般的である。結核菌は*M. bovis*に比べて遺伝学的には上流に位置していることが知られている。また、*M. bovis*は、結核菌が保有するRD9およびRD12のどちらをも失っていることが明らかになっている。本研究ではマルチプレックスPCR法を基盤とした安価、迅速で高感度な結核菌群菌鑑別法を開発した。更に、この方法により、様々な臨床分離菌株の鑑別が可能であることを証明した。

# AKTキナーゼを介した新しい細胞内シグナル伝達機構の解明と治療への応用

水津 太、野口 昌幸

(遺伝子病制御研究所 病態研究部門 癌生物分野 / 助教、教授)

セリンスレオニンキナーゼAKTはProtein kinase Bとも総称される。AKTは細胞内における細胞死(アポトーシス)制御の要のセリンスレオニンキナーゼである。AKT活性化の異常は癌ウイルス感染、糖尿病、統合失調症、自己免疫疾患をはじめ様々なヒト疾病の原因となっている。このためPI3K (Phosphoinositide 3 Kinase) -AKTシグナル伝達系はこれらの関連するヒト疾病に対する薬剤開発における重要なシグナル伝達系標的として知られている。このAKTは細胞外からの様々な増殖因子からの刺激により細胞膜へ移行し、PI3K の働きにより、AKTのPHドメインに膜リン脂質(PIP<sub>3</sub>)が結合し、PDK1 (Phosphoinositide Dependent Kinase1)により活性化されることが知られている。

しかしながら、これまで、AKTの活性化の制御は、数ある蛋白翻訳後修飾機構の中でリン酸化、脱リン酸化のみが特に注目されて研究が進んできた経緯があり、リン酸化、脱リン酸化以外のその他の蛋白翻訳後修飾機構によるAKTの活性化の制御の仕組みは不明であった。

最近、我々は細胞内における細胞死制御の要の分子であるAKTの活性化型AKTを特異的に認識し、結合する新規結合分子として新しいAKT特異的ユビキチンリガーゼTTC3(tetratricopeptide repeat domain 3)を同定した。

TTC3 遺伝子はユビキチン酵素として特徴的なRINGドメインを持つ2025個のアミノ酸からなり、ヒト21染色体上のダウン症発症の責任遺伝子領域に存在する。我々はTTC3が、活性化型AKTに特異的に結合し、AKTのユビキチン化とプロテアソームによる蛋白分解を促進するAKT特異的なE3ユビキチンリガーゼであることを示し、ダウン症細胞においてTTC3が活性化、細胞周期と細胞増殖を抑制し、ダウン症の多彩な病態発現に重要な役割を担っていることを示した(Suizu et al., *Developmental Cell* 2009)。

ダウン症はヒトクロモソーム21のトリソミーに基づく人類最多の遺伝子の異常であり、特徴的な顔貌、知能発達障害、複合心臓奇形、白血病の合併、神経学的には、早期に発症するAlzheimer病の合併症を伴う。これまでの研究によれば、その発症にはクロモソーム21のダウン症責任遺伝子領域(DSCR)に存在する遺伝子のdosage imbalance が関与することが推測されているが、その分子学的な発症機序は不明であった。我々の研究成果によって、TTC3-AKTの機能的な異常がダウン症に合併する様々な病態の背景に関与していることが示唆された。

今後、TTC3の活性化により、細胞死の要であるAKTの活性化を直接コントロールすることが可能で、感染症、癌などAKTの活性化がその病態に関与している疾病の治療への新たな道標となることが期待できる。

# インフルエンザウイルスの感染による 病態形成機構の解明

宮崎 忠昭（人獣共通感染症リサーチセンター バイオリソース部門 / 教授）

インフルエンザウイルスA/Puerto Rico/8 (A/PR/8) (H1N1)をマウスに感染させた結果、A/Aichi/2/68 (H3N2)を感染させた場合に比べて重篤な症状が誘起され死亡例も認められた。そこで、ウイルス感染後のマウス血清中のサイトカイン濃度を測定したところ、IL-6、OPN(オステオポンチン)及びTNF-alpha がA/PR/8を感染させたマウスの血中において顕著に増加していた。これらのサイトカインに対する抗体および遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析の結果、これらの中でOPNの発現量変化と病態の重篤度に相関が認められた。また、A/PR/8とA/Aichi/2/68の感染後では、マウス肺中のインターフェロンとケモカインの発現誘導に時間的なずれが認められ、そのずれが病態形成に関与することが示唆された。

インフルエンザAウイルスを感染させたマウスの肺組織中の炎症細胞浸潤に関与する宿主因子の発現量を解析した。炎症細胞浸潤過程は、細胞-細胞外マトリックス(ECM)相互作用や、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)等のECM分解酵素による血管透過性の変化等により厳密に調節されていると考えられている。そこで、細胞外マトリックス関連分子群及びマトリックス分解酵素群の遺伝子発現変化をリアルタイムPCR法により網羅的に解析した結果、A/PR/8感染群において、著名に遺伝子発現が亢進する分子、MMPやtissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)を見出した。MMPsとその内因性阻害因子であるTIMPsは炎症反応に続いて生じる組織傷害、線維化等、様々な病態への関与が報告されている。また、最近、敗血症患者の血中におけるMMPsやTIMP-1の発現レベルと症状の重篤度が相関することが報告されており、ウイルス感染後の症状の重篤度を評価するためのバイオマーカーに利用できる可能性がある。

新規インフルエンザ治療薬の開発を目的として、数種類の生薬や天然物に着目し、インフルエンザウイルスA/PR/8、A/Aichi/2/68、A/Kadoma/2/2006(H3N2)およびA/Narita/1/2009(H1N1)のプラーク形成に対する阻害効果を評価した。また、インフルエンザ予防のための新規ワクチンアジュバントや機能性食品の開発に繋げるため、自然免疫系を制御する微生物由来物質による予防効果を評価したので紹介する。

# 病原体および宿主因子の分子構造解析と 治療薬の開発

## ～ヘリコバクター・ピロリCagAの分子構造解析～

東 秀明（遺伝子病制御研究所 病態研究部門 分子腫瘍分野 / 准教授）

ヘリコバクター・ピロリ菌CagAタンパク質は感染成立後宿主細胞内に注入され、Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA)配列が繰り返し存在する領域を介して増殖シグナル伝達分子SHP-2及び細胞極性制御分子PAR1と相互作用する。その分子間相互作用を通し、CagAは標的分子を脱制御し細胞内シグナル伝達系の攪乱及び細胞極性の崩壊を引き起こす。さらに、*cagA*遺伝子導入マウスを用いた解析から、CagAが微生物に由来する癌タンパク質であることが明らかとなった。本研究は、CagA分子構造生物活性相関の解明を通して、抗CagA活性物質の探索、設計を行い*cagA*陽性ピロリ菌感染により発症する胃粘膜傷害に対する治療薬の開発を目的とする。

1. 全長CagAのプロテアーゼ限定分解解析の結果から、CagAはN末端側およびC末端側それぞれにドメイン構造を有しており、CagAのC末端側フラグメントは<sup>1</sup>H NMR 及びCD スペクトル解析から高次構造を形成しない内因性不規則構造タンパク質であることが示唆されている。そこで、CagAと標的分子間の分子相互作用機構を解明するため、PAR1との結合に十分なCagA C末側34アミノ酸残基の同定を行い、<sup>15</sup>N標識ペプチドを用いたPAR1共存下HSQCスペクトル解析を行った。その結果、PAR1結合に関わるCagAのアミノ酸残基による化学シフトの観測に成功し、現在、<sup>15</sup>N-<sup>13</sup>C二重標識体を用いた三次元NMRによるシグナルの帰属を行いCagA/PAR1分子間における相互作用点の解明を進めている。
2. これまでの構造解析から、CagAのN末側領域及びC末側領域は分子内で相互作用することを明らかにした。CagA分子内相互作用に関わる構造基盤の解明を目的として、相互作用に関わる結合責任領域の同定をおこなった。その結果、CagAはN末側領域における2つの領域（アミノ酸配列554-617及び708-821）が近接した立体構造をとり、この部位に対してアミノ酸977-1077で構成されるC末側領域が分子内相互作用することが明らかとなった。また、CagAのC末側フラグメントを単独発現させた場合に比べ、N末側及びC末側フラグメントを共発現させた胃上皮AGS細胞において、より顕著な細胞形態変化が確認されるとともに形態変化を示した細胞数の増加が見られた。

以上のことより、CagAは、C末側の自由度の高い領域を介すことで多様な分子群との相互作用を獲得し、その際、N末側領域は分子内相互作用を通してEPIYA配列近傍の構造に影響を与え、宿主細胞のシグナル伝達系の脱制御に関わるCagA生物活性を増強していることが予想された。







〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目  
北海道大学大学院獣医学研究科 213号室 グローバルCOE推進室  
Tel/fax 011-706-5294, [gcoe@vetmed.hokudai.ac.jp](mailto:gcoe@vetmed.hokudai.ac.jp)  
<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/gcoe/>