

1. 慢性疲労症候群等の病的疲労の研究

1.1. 慢性疲労症候群原因ウイルスとサイトカイン異常に関する研究

1.1.2. ボルナ病ウイルスと慢性疲労症候群との関連

大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫分野 生田和良

(1) 要 約

ボルナ病ウイルス (BDV) は向神経性のマイナス鎖一本鎖の RNA ウイルスである。私たちは、脳内における BDV 持続感染と慢性疲労との関連性ならびに BDV による疲労発症の分子メカニズムを解明することを目的に研究を行ってきた。まず、慢性疲労症候群 (CFS) 患者に BDV 抗体陽性者が見つかることを確認した。そこで、BDV の中枢神経系障害性の機序を明らかにする試みとして、BDV の p24 リン酸化蛋白質とアンフォテリンの結合様式の解析、BDV 持続感染細胞のストレス応答の解析ならびに p24 遺伝子トランスジェニックマウス脳の詳細な病理組織学的解析を行った。その結果、BDV の中枢神経系障害性には、p24 蛋白質の発現を原因とするアンフォテリンの機能障害とそれに伴う感染細胞のストレスへの脆弱性が関与している可能性が示された。

(2) 研究目的

ボルナ病は、ヨーロッパ中東部において 250 年以上前より知られていたウマに脳膜脳脊髄炎をもたらす疾患である。その名前は、1895 年にウマに大流行が見られた旧東ドイツ・サクソニー地方のボルナという町の名前に由来している。ボルナ病を発症したウマは、歩行不全、知覚過敏などの神経症状を呈し、しばしば死に至る。その後、この疾患はボルナ病ウイルス (Borna Disease Virus; BDV) の中枢神経系への感染が原因で引き起こされることが明らかとなった。BDV は、ウマの他にヒツジ、ウシ、ネコ、イヌ、ダチョウなどの動物にも自然感染していることが現在までにわかっている。また、世界中の多くの動物で不顕性感染が確認されている。BDV は実験感染において鳥類から齧歯類さらには霊長類までの幅広い動物に感染し、病原性を発揮することがわかっている。ボルナ病発症の原因は、急激な炎症による神経細胞の破壊であると考えられている。しかし一方で、持続感染による神経細胞の直接的な機能障害も BDV の中枢神経系病原性には深く関与していることが自然感染例ならびに実験感染により明らかとなっている。

1985 年にドイツ・ギーゼン大学の Rott らにより、精神分裂病患者の脳脊髄液中に BDV に対する抗体が存在することが報告され [1]、BDV がヒトにも病原性を持つ可能性が初めて示唆された。その後、他のグループによっても、精神分裂病やうつ病患者が高率に抗 BDV 抗体を有するという報告が相次ぎ、BDV と内因性精神疾患との関連性が注目されるようになった。さらに、精神分裂病やその他の神経精神疾患患者の剖検脳における BDV の同定ならびに分離も行われており [2]、BDV がヒトに感染

していることは明らかな事実であるといえる。しかし、健常者の末梢血においても抗 BDV 抗体ならびに BDV 遺伝子が検出されることから、BDV 感染と特定の神経精神疾患との関連性については現在までのところ明らかにされていない。

一方、慢性疲労症候群 (Chronic Fatigue Syndrome: CFS) は、時として集団発生が認められ、その発症時に咽頭痛、発熱、呼吸器症状などの感冒様症状が多くの症例に認められることなどから、ウイルス感染症をその病因として想定し、原因ウイルスを同定する試みが世界中でなされてきた。現在までに、コクサッキー B 型ウイルス、Epstein-Barr ウイルス、ヒトヘルペスウイルス 6 型および 7 型およびヒト T 細胞白血病ウイルス II 型などが CFS の病因として挙げられているが、CFS との明確な関連性はいまだ明らかにされていない。われわれはこれまでに健常者を含め、様々な疾患患者における BDV の血清学的および分子疫学的検査を行ってきた。その中で、BDV の遺伝子および抗体保有率が精神疾患患者で有意に高いことを報告した。さらに、うつ病症状などの病状が多くの患者に認められる CFS 患者においても BDV 感染との関連性を示唆する結果を得ている。また、家族性の CFS 患者における BDV の感染も報告し、BDV 感染と CFS 発症との関連性に新たな知見を与えてきた。

そこで本研究では、CFS 患者において BDV 感染の疫学調査を行い、BDV 感染と CFS 発症の関連性を追究することを目的としている。また同時に、BDV の中枢神経系病原性のメカニズムを動物レベル、細胞レベルならびに分子レベルで解析し、BDV 持続感染による疲労病態の発症機序を明らかにすることも目的としている。

(3) 研究方法

1) CFS 患者血液サンプル： 計 77 名の CFS 患者由来血液サンプルは大阪大学大学院血液・腫瘍内科学教室の倉恒弘彦先生よりご供与して頂いた。患者血液サンプルは、即日中に血漿および末梢血単核球 (PBMC) の分離を行った。血漿については、BDV の主要蛋白質である p40 ならびに p24 蛋白質に対する抗体の存在を大腸菌由来組換え蛋白質を用いたウエスタンブロット法にて検出を行った。

2) CFS 患者血漿中の抗 BDV 抗体の検出： BDV の p40 および p24 蛋白質は、その遺伝子領域を含む cDNA を大腸菌の発現ベクターである pGEX に組込んだ後、グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白質として発現、精製した。発現した組換え p40 および p24 蛋白質は SDS-PAGE にて解析後、メンブレンに転写、100 倍希釈の CFS 患者由来血清と反応させ、血清中の抗 p40 ならびに p24 抗体の存在をコニカイムノステイン HRP-1000 により検出を行った。今回は、前回まで行っていた GST 融合組換え蛋白質を抗原とする方法に加え、検出の特異性を上げるために GST を Factor Xa で切断して目的蛋白質のみを抗原としてメンブレンに転写させ解析を行った。

3) BDV p24 蛋白質とアンフォテリンとの結合部位の同定： 大腸菌もしくはバキュロウイルスベク

ターを用いて組換え BDV p24 蛋白質およびアンフォテリンを発現させた。それぞれの蛋白質の部分欠損体を数種類作成し、それらの結合能を Far-Western blot 法あるいは mammalian two-hybrid 法を用いて同定を行った。また、アンフォテリンとの結合能が欠損していることが確認された p24 部分欠損体については、その神経突起伸長能の阻害効果をラット由来グリオーマ (C6) 細胞を用いて確認を行った。

4) BDV p24 蛋白質による p53 / アンフォテリンの転写活性化機能の抑制: アンフォテリンは核内で p53 と結合し、Cycline G1 や Bax など、プロモーターに p53 結合領域を持つ遺伝子の転写を促進していることが明らかとなっている [3]。そこで、BDV p24 蛋白質の存在が、アンフォテリンと p53 によるプロモーターの転写活性化能に影響を及ぼしているかを検討するために、Cycline G1 のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を結合させたリポータープラスミドと p53 欠損細胞である H1299 細胞を用いて解析を行った。

5) BDV 持続感染細胞のストレスへの応答: BDV が持続感染している C6、ヒト由来オリゴデンドログリオーマ (OL) 細胞ならびにイヌ腎由来 (MDCK) 細胞を用いて、これら細胞の各種ストレス (温度、UV、血清除去、薬剤など) 条件下における生存率ならびに形態の変化について経時的に観察を行った。

6) BDV-p24 遺伝子トランスジェニックマウスの解析: BDV の p24 遺伝子をコードしている cDNA をグリア細胞特異的蛋白質 (glial fibrillary acidic protein: [GFAP]) をプロモーターとしたベクターに挿入し、定法に従い p24 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作成した。確立された数系統はその週齢を追って脳内での p24 蛋白質、シナプス特異的蛋白質 (synaptophysin) ならびに脳由来神経栄養因子 (BDNF)、セロトニンリセプター (5-HTR_{1A} と 5HTR_{1b}) の発現を免疫染色もしくは in situ hybridization、または RT-PCR により観察を行った。また、トランスジェニックマウスの神経症状を、オープンフィールド装置を用いた自発運動、モリスの水迷路を用いた学習能力ならびにオスの同居法による攻撃性の解析により判定を行った。

(4) 研究成果

1) CFS 患者における BDV 感染調査

上述した方法により、大阪大学医学部に来院した CFS 患者計 77 名の血液より得た血漿を用いた血清学的診断を行った。CFS の診断はアメリカ合衆国 Center for Disease Control (CDC) から 1988 年および 1994 年に提出されたガイドラインに従って行われた。今回は、検出の抗原として GST を取り除いた組換え蛋白質を用いており、前年度まで行ったサンプルについても再検討を行った。ウエスタンブロット法により確認された抗 BDV 抗体の保有状況の結果を表 1 に示す。77 名中、p24 抗原のみに反応

した血清は 0 例、p40 抗原のみに反応したものは 21 例、また p24 および p40 抗原両方に反応性を示したものは 1 例であった。従って、p40 もしくは p24 抗原のどちらかに反応した血清は 77 名中 22 名 (28.5%) と診断された。

以前にわれわれの研究室において行った日本国内 25 名の CFS 患者 (男性 15 名、女性 10 名) における同様の解析においては、BDV 抗体陽性者が 25 名中 6 名 (24%) となっており、同様の抗体陽性率であった。同様にわれわれが行った献血者 100 名の BDV 検査では、抗体陽性率が 1% であった結果を考えあわせると、CFS 患者における BDV 陽性率は有意に高いと考えられた [4, 5, 6]。さらに、これらの結果は 1991 年 3 月から 1995 年 4 月にかけて行われた検査においても確認されている [7]。

今回の検索では、前回までのウエスタンブロット法と異なり、反応の特異性をあげる試みを行っている。その結果、これまでの調査と比較して p24 抗体の陽性率の減少が確認された (前回: 17.7%、今回: 1.3%)。この p24 抗体陽性率の減少の結果が、これまでの調査が非特異的な反応を観察していたことによるものなのか、あるいは、今回の調査が極めて微弱な抗体の反応を見落してしまっていることによるものなのかについては、今後さらに検討を行わなくてはならない点である。また、抗原より GST を削ることにより蛋白質の親水性などが変化する可能性も考えられ、合わせて解析を進める必要がある。しかし、全体の BDV 抗体陽性率としては前回とほぼ同様の結果がでており (前回: 25.8%)、CFS 患者において、有意に高い値を示していることは明らかである。今後の調査においては、さらに幾つかの特異抗体検出法 (感染細胞を抗原として用いる ELISA 法、補体を使用した補体間接蛍光抗体法など) を用いて解析を行うことを検討しており、その方法の確立を行っている。これら異なる検出の方法を用いて総合的に解析を進め、その結果を比較検討することにより、検査結果をより信頼性の高い方向に進めていく必要があると思われる。今回検索を行った CFS 患者 77 名中、抗 BDV 抗体が p40 および p24 とともに陽性であった症例は 1 例であった。これまでの検索において、抗 BDV 抗体が p40 および p24 とともに陽性である症例では PBMC 中の BDV 遺伝子も陽性と確認される例があった。今回、この症例については PBMC 中の BDV 遺伝子の調査を行っていないが、今後注意深く確認していかなくてはならない症例である。また、これまでに経時的にサンプルを解析できた症例が数例存在している。その中の 1 例はいずれの採材時期においても p40 抗体が陽性と確認されており、非常に興味深い症例である。今回検索を行った CFS 患者の詳細な病歴などは不明であるが、陽性例においては抗体価の上昇ならびにウイルス遺伝子の検出などの追跡調査を行う必要があると考えられる。

2) BDV p24 蛋白質とアンフォテリンとの結合部位の同定と p24 蛋白質による p53 の転写活性化機能の抑制

これまでの研究で、われわれは BDV p24 蛋白質が神経突起伸長因子であるアンフォテリンと細胞内で特異的に結合することを証明している [8]。そこで、BDV p24 蛋白質とアンフォテリンとの結合部位の同定を行うために、大腸菌もしくはバキュロウイルスベクターを用いて組換え BDV p24 蛋白質およ

びアンフォテリンを発現させた。それぞれの蛋白質の部分欠損体を数種類作成し、それらの結合能を Far-Western blot 法あるいは mammalian two-hybrid 法を用いて同定を行った。その結果、BDV p24 蛋白質の 201 アミノ酸配列中、77 番目から 86 番目までのアミノ酸 (KLVTELAENS) を欠損している変異体でアンフォテリンと結合能力が欠如していることが明らかとなり、この部位がアンフォテリンとの結合に重要な役割を果たしていると考えられた(図 1)。また、アンフォテリンとの結合能が欠損している p24 部分欠損体について、その神経突起伸長能の阻害能力を C6 細胞を用いて解析を行った結果、この欠損体では突起伸長阻害能も欠落していることが判明した。このことより、p24 蛋白質のアミノ酸 77 番目から 86 番目までが神経突起伸長能の阻害にも重要であると確認された。一方、アンフォテリンはその構造上に、アミノ酸配列の機能的モチーフとして A box と B box と呼ばれる部位が存在している。われわれの解析の結果、BDV p24 蛋白質はアンフォテリン構造の A box の部位と特異的結合をすることが明らかとなった。興味深いことに、アンフォテリンの A box には癌抑制蛋白質である p53 蛋白質が結合して、その結合が p53 の転写活性化能の促進に働いていることが判っている。そこで、p24 蛋白質とアンフォテリンとの結合が p53 蛋白質のプロモーターへの転写活性化能を競合阻害するかどうかを確かめるために、Cyclin G1 のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を結合させたリポータープラスミドと p53 欠損細胞である H1299 細胞を用いて解析を行った。リポータープラスミド、アンフォテリン発現プラスミド、p24 蛋白質発現プラスミドならびに p53 発現プラスミドを H1299 細胞に導入して 48 時間後に細胞中のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、p53 ならびにアンフォテリンを導入した細胞では Cyclin G1 のプロモーターの活性を、p53 単独の場合に比べ約 10 倍程度までに活性化した。それに対し、p24 蛋白質を同時に導入した細胞ではアンフォテリンによる p53 の転写活性化能の促進がほぼコントロールレベルまでに抑制されることが判明した。この結果より、BDV p24 蛋白質のアンフォテリンとの結合は、細胞内で p53 蛋白質と競合していることが明らかとなり、p24 蛋白質の存在下では、p53 によるプロモーターの転写活性化能が抑制されていると考えられた。p53 は、細胞内でアポトーシス、DNA 修復や細胞周期の調節など様々な役割を果たす蛋白質のプロモーターの転写活性化機能を担っている。またそれは、アンフォテリンと結合することによりさらに促進されることも明らかとなっている。BDV p24 蛋白質が p53 とアンフォテリンとの結合を競合阻害し、p53 による転写活性化能を低下させることは、BDV の持続感染性より細胞の様々な活動に影響を与えている可能性を示すものである。今後、BDV 感染細胞における p53 の動態とその働きも詳細に観察する必要があると考えられる。

3) BDV 持続感染細胞のストレスへの応答

BDV の持続感染が細胞の生存維持能力ならびに形態の変化に与える影響を観察するために、BDV が持続感染している C6、OL 細胞ならびに MDCK 細胞に各種ストレスを与え観察を行った。通常の培養条件下ではいずれの持続感染細胞の非感染細胞とその形態ならびに増殖能力は変わらなかった。そこ

で、これら細胞のストレスによる変化を、温度(40 から 44 で 30 分処理)、UV 処理 1 分、もしくは血清除去を行い、時間経過を追って観察した。その結果、BDV 持続感染細胞では高温処理ならびに UV 処理直後より、非感染細胞と比較して顕著な細胞突起の退縮とそれに伴う円形化が認められた。また、時間経過に伴う死細胞率も持続感染細胞で顕著に高く観察された(図 2)。高温度処理において時間の経過とともに細胞形態の回復が認められたが、持続感染細胞ではその回復時間の遅延も観察された。さらに、血清除去によるストレスにおいても、持続感染細胞では時間の経過に伴い細胞同士の集簇が観察され、死細胞率の上昇が認められた。以上の結果より、BDV 持続感染細胞では通常の状態では非感染細胞とほとんど変わらない性状を示すにもかかわらず、ストレス負荷により形態の維持能力、そしてそれに伴う生存維持能力が顕著に減少していることが明らかとなった。形態的な変化より、BDV 持続感染細胞では細胞間同士の接着もしくはプレートへの付着の能力が著しく低下している可能性が考えられた。細胞のこれら性質は、神経突起能伸長と同様にアンフォテリンを介する細胞内シグナルによって制御されていることがわかっており、BDV 感染によるアンフォテリンの機能阻害の結果であると考察された。今後さらに持続感染細胞内での細胞内シグナルの解析を行い、その分子レベルでの証明を行う必要があると考えられる。

4) BDV-p24 遺伝子トランスジェニックマウスの解析

BDV の p24 遺伝子の cDNA を、GFAP をプロモーターする導入ベクターにクローニングし、p24 遺伝子を脳内のグリア細胞のみに発現させるトランスジェニックマウスを作成した。確立された幾つかの系統の中で、GFAP20 系統はその胎生期よりグリア細胞の核に p24 蛋白質を発現していることが免疫組織染色で確かめられた。一方、GFAP4 系統では、p24 蛋白質の発現は高週齢(生後 3 ヶ月以降)になるまで観察されなかった。さらに、GFAP20 は週齢を追うに従い脳内での p24 蛋白質のシグナルが強く観察されるようになり、特に週齢で 30 週を超えた時点より海馬の神経網に p24 蛋白質の蓄積した像が現れるようになってきた。そこで次に、これらトランスジェニックマウスの表現系の観察を行った。まず、オープンフィールド装置を用いた自発運動の解析では、コントロールマウス、GFAP20、GFAP4 とともに顕著な自発運動の差は認められなかった。モリスの水迷路を用いた学習能力の検査では、コントロールマウスならびに GFAP4 系統で試行の回数を重ねるに伴う迷路の学習が観察されたが、GFAP20 の系統では明らかな学習能力の低下が認められ、試行を重ねても迷路の学習が成立しなかった(図 3A)。その異常は、加齢に伴い顕著に観察されるようになった。さらに、オスの同居法による攻撃性の解析では、GFAP20 の系統で顕著な攻撃性の上昇(攻撃回数、攻撃までの時間)も観察された(図 3B)。以上の結果より、脳内で p24 蛋白質を高発現し、海馬の神経網にその蓄積が認められた GFAP20 の系統では明らかな神経症状を示していることが証明された。また、GFAP20 では、海馬での synaptophysin ならびに BDNF の発現が加齢に伴い顕著に低下することが免疫染色、in situ hybridization、あるいは ELISA 法により確認された。さらに、海馬におけるセロトニンリセプター(5-HTR_{1A} および 5-HTR_{1b}) mRNA

量が大きく低下していることが判明した。以上の観察により、BDV p24 蛋白質のグリア細胞内での発現のみで神経症状を誘発できることが証明された。また、加齢に伴う神経症状の発現は海馬神経網での p24 の蓄積と関連していると考えられ、グリア細胞における異常蛋白質の蓄積が神経細胞の機能にも障害（シナプス数の現象や BDNF、さらにセロトニンリセプターの発現低下）を引き起こす証明でもあると考えられた。また、GFAP20 における神経症状は海馬における BDNF やセロトニンリセプターの減少と関連していると思われた。これらの結果は、BDV の持続感染に伴う p24 蛋白質の蓄積が、中枢神経系障害性を引き起こすことを直接に証明しており、BDV の神経病原性とその詳細なメカニズムを検証する上で極めて有用なモデルであると考えられた。トランスジェニックマウスでは、グリア細胞内のみ（特に海馬や小脳など）で p24 蛋白質が高発現していることを考えると、BDV の脳内での感染部位あるいは感染細胞種によっては今回認められた神経症状とは病態が異なる可能性も十分に考えられた。

（５）考察

BDV がヒトに感染することは最近のさまざまな研究により明確となってきた。CFS と BDV の関連については、最近の報告においてもその関連性を認めるもの、または認めないものとその結果は様々である。しかしながら、われわれの調査においては、CFS 患者に BDV の感染が認められるのは間違いない事実と思われる。しかし、その陽性率に関してはいまだはっきりとした答えが得られておらず、今後、手法ならびに材料の異なる様々な方法を用いて比較検討を行い明らかにしていかななくてはならないと考えられる。

また、今回の研究により、BDV の感染によって神経細胞の生存維持能力が明らかに低下していること、また p24 蛋白質の脳内での発現のみで神経症状が誘発されることが確認された。今後、さらに実験動物レベル、細胞レベルそして分子レベルでの詳細な解析を行い、BDV の中枢神経病原性のメカニズムを明らかにすることが重要であると考えられる。

（６）引用文献

- [1] Rott R et al.: Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. *Science* 288, 755-756, 1985.
- [2] Nakamura Y et al.: Isolation of Borna disease virus from human brain tissue. *J. Virol.* 74, 4601-4611, 2000.
- [3] Jayaraman et al.: High mobility group protein-1 (HMG-1) is a unique activator of p53. *Genes Dev.* 12, 462-472, 1998
- [4] Kitani T et al.: High mobility group protein-1 (HMG-1) is a unique activator of p53. *Microbiol. Immunol.* 40, 459-462, 1996.

- [5] Nakaya T et al.: Borna disease virus infection in two family clusters of patients with chronic fatigue syndrome. *Microbiol. Immunol.* 43, 679-689, 1999.
- [6] 中屋隆明他：ボルナ病ウイルス（BDV）と慢性疲労症候群（CFS）－抗BDV抗体とBDV・RNAの検出－ *日本臨床* 55, 3064-3071, 1997.
- [7] 朝長啓造他：パーキンソン病をめぐる最近の話題：パーキンソン病とボルナ病ウイルス *カレントセラピー* 17, 26-30, 1999.
- [8] Kamitani W et al.: Borna disease virus phosphoprotein binds a neurite outgrowth factor, amphoterin/HMG-1. *J. Virol.* 75, 8742-8751, 2001.

（7）成果の発表

1）原著論文による発表

ア）国内誌（国内英文誌を含む）

- 1 . 岩橋和彦、吉原英児、中村和彦、福西勇夫、伊藤正裕、飴野清、西野佳以、生田和良：精神分裂病におけるボルナ病ウイルス感染とセロトニンレセプター5-HTR2. *最新精神医学* 4, 611-614, 1999.
- 2 . 松永秀典、西野佳以、林宏恵、小林剛、朝長啓造、笹尾芙蓉子、生田和良：抗ボルナ病ウイルス抗体を認めた4例の臨床的検討．*脳と精神の医学* 12, 139-147, 2001.
- 3 . 7.1.1.2. Ouchi, A., Kishi, M., Kobayashi, T., Lai, P.K., Malik, T.H., Ikuta, K., and Mochizuki, M.: Prevalence of circulating antibodies to p10, a non-structural protein of the Borna disease virus in cats with ataxia. *J. Vet. Med. Sci.* 63, 1279-1285, 2001.

イ）国外誌

- 1 . Kohno, T., Goto, T., Takasaki, T., Morita, C., Nakaya, T., Ikuta, K., Sano, K., Kurane, I., and Nakai, M.: Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus (BDV). *J. Virol.* 73, 760-766, 1999.
- 2 . Nakaya, T., Takahashi, H., Nakamura, Y., Kuratsune, H., Kitani, T., Machii, T., Yamanishi, K., and Ikuta, K.: Borna disease virus infection in two family clusters of patients with chronic fatigue syndrome. *Microbiol. Immunol.* 43, 679-789, 1999.
- 3 . Nakamura, Y., Nakaya, T., Hagiwara, K., Momiyama, N., Kagawa, Y., Taniyama, H., Ishihara, C., Sata, T., Kurata, T., and Ikuta, K.: High susceptibility of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) to Borna disease virus. *Vaccine* 17, 480-489, 1999.
- 4 . Nakamura, Y., Watanabe, M., Kamitani, W., Taniyama, H., Nakaya, T., Nishimura, Y., Tsujimoto, H., Machida, S., and Ikuta, K.: High prevalence of Borna disease virus in domestic cats with neurological disorders in Japan. *Vet. Microbiol.* 70, 153-169, 1999.
- 5 . Hagiwara, K., Kamitani, W., Takamura, S., Taniyama, H., Nakaya, T., Tanaka, H., Kirisawa, R., Iwai, H., and Ikuta, K.: Detection of Borna disease virus in a pregnant mare and her fetus. *Vet. Microbiol.* 72, 207-216, 2000.
- 6 . Nakamura, Y., Takahashi, H., Shoya, Y., Nakaya, T., Watanabe, M., Tomonaga, K., Iwahashi, K., Ameno, K., Momiyama, N., Taniyama, H., Sata, T., Kurata, T., de la Torre, J. C., and Ikuta, K.: Isolation of Borna disease virus from human brain. *J. Virol.* 74, 4601-4611, 2000.

- 7 . Watanabe, M., Kobayashi, T., Tomonaga, K., and Ikuta, K.: Antibodies to Borna disease virus in infected adult rats: An early appearance of anti-p10 antibody and recognition of novel virus-specific proteins in infected animal brain cells. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 775-778, 2000.
- 8 . Watanabe, M., Zhong, Q., Kobayashi, T., Kamitani, W., Tomonaga, K., and Ikuta, K.: Molecular ratio between Borna disease viral-p40 and p24 proteins in infected cells determined by quantitative antigen capture ELISA. *Microbiol. Immunol.* 44, 765-772, 2000.
- 9 . Satoh, T., Furuta, K., Tomokiyo k., Nakatsuka, D., Tanikawa, M., Nakanishi, M., Miura, M., Tanaka, S., Koike, T., Hatanaka, H., Ikuta, K., Suzuki, M., and Watanabe, Y.: Facilitatory roles of novel compounds designed from cyclopentenone prostaglandins on neurite outgrowth-promoting activities of nerve growth factor. *J. Neurochem.* 75, 1092-1102, 2000.
- 1 0 . Tomonaga, K., Kobayashi, T., Lee, B-J., Watanabe, M., Kamitani, W., and Ikuta, K.: Identification of alternative splicing and negative splicing activity of a nonsegmented negativestrand RNA virus, Borna disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 12788-12793, 2000.
- 1 1 . Kobayashi, T., Watanabe, M., Kamitani, W., Tomonaga, K., and Ikuta, K.: Translation initiation of a bicistronic mRNA of Borna disease virus: A 16-kDaphosphoprotein is initiated at an internal start codon. *Virology* 277, 296-305, 2000.
- 1 2 . Kobayashi, T., Kamitani, W., Zhang, G., Watanabe, M., Tomonaga, K., and Ikuta, K.: Borna disease virus nucleoprotein requires both nuclear localization and export activities for viral nucleocytoplasmic shuttling. *J. Virol.* 75, 3404-3412, 2001.
- 1 3 . Watanabe, M., Lee, B.J., Kamitani, W., Kobayashi, T., Taniyama, H., Tomonaga, K., and Ikuta, K.: Neurological diseases and viral dynamics in the brains of neonatally Borna disease virus-infected gerbils. *Virology* 282, 65-76, 2001.
- 1 4 . Hagiwara, K., Asakawa, M., Liao, L., Jiang, W., Yan, S., Chai, J., Oku, Y., Ikuta, K., and Ito, M.: Seroprevalence of Borna disease virus in domestic animals in Xinjiang, China. *Vet. Microbiol.* 80, 383-389, 2001.
- 1 5 . Taniyama, H., Okamoto, M., Hirayama, K., Hagiwara, K., Kirisawa, R., Kamitani, W., Tsunoda, N., and Ikuta, K.: Equine Borna disease in Japan. *Vet. Rec.* 148, 480-482, 2001.
- 1 6 . Kamitani, W., Shoya, Y., Kobayashi, T., Watanabe, M., Lee, B.J., Zhang, G., Tomonaga, K., and Ikuta, K.: Borna disease virus phosphoprotein binds a neurite outgrowth factor, amphoterin/HMG-1. *J. Virol.* 75, 8742-8751, 2001.
- 1 7 . Hagiwara, K., Okamoto, M., Kamitani, W., Takamura, S., Taniyama, H., Tsunoda, N., Tanaka, H., Iwai, H., and Ikuta, K.: Nosological study of Borna disease virus infection in race horses. *Vet. Microbiol.* 84, 367-374, 2002.
- 1 8 . Ibrahim, M.S., Watanabe, M., Palacios, J.A., Kamitani, W., Komoto, S., Kobayashi, T., Tomonaga, K., and Ikuta, K.: Varied persistent life cycles of Borna disease virus in a human oligodendrogloma cell line. *J. Virol.* 76, 3873-3880, 2002.
- 1 9 . Okamoto, M., Furuoka, H., Hagiwara, K., Kamitani, W., Kirisawa, R., Ikuta, K., and Taniyama, H.: Borna disease in a cattle in Japan. *Vet. Rec.* in press.
- 2 0 . Okamoto, M., Kagawa, Y., Hagiwara, K., Kirisawa, R., Kamitani, W., Ikuta, K., and Taniyama, H.: Borna Disease in a Dog in Japan. *J. Comp. Pathol.*, in press.

2) 原著論文以外による発表 (レビュー等)

ア) 国内誌 (国内英文誌を含む)

- 1 . 朝長啓造、生田和良：特集・「マーズ」 ウイルス感染症：ヒトの神経を冒す新しいウイルス感染症 - ボルナ病ウイルス感染症 - . 遺伝 53, 37-41, 1999.
- 2 . 庄谷裕子、萩原克郎、朝長啓造、生田和良：特集・動物起源ウイルス感染症—動物ウイルスの自然生態 - : ボルナ病ウイルス. 化学療法の領域 15, 35-41, 1999.
- 3 . 朝長啓造、渡辺真紀子、生田和良：パーキンソン病をめぐる最近の話題：パーキンソン病とボルナ病ウイルス. カレントセラピー 17, 1160-1164, 1999.
- 4 . 渡辺真紀子、神谷亘、朝長啓造、生田和良：Parkinson 病とボルナ病ウイルス，神経内科 52 374-379，2000
- 5 . 朝長啓造、渡辺真紀子、神谷亘、生田和良：パーキンソン病とボルナ病ウイルス感染，遺伝子医学 14, 347-349，2000.
- 6 . 生田和良：ボルナ病(病原)，日本獣医病理学会会報特集号 11-15，2000.
- 7 . 朝長啓造、小林剛、生田和良：中枢神経系におけるボルナ病ウイルス研究の進歩、日本臨床 59, 1605-1613, 2001.
- 8 . マディハ S. イブラヒム、小林 剛、朝長 啓造、生田 和良 . ウイルス感染と疲労 - 「疲労の分子科学」眠らない社会への警告 - , p31 - 36 . 講談社. 2001.
- 9 . 松永 秀典、朝長 啓造、生田 和良 . 精神神経疾患とボルナ病ウイルス . 脳の科学 24, 297-304, 2002.

イ) 国外誌

- 1 . Tomonaga, K., Kobayashi, T., and Ikuta, K.: Molecular and cell biology of Borna disease virus infection. *Microbes Infect.* 4, 491-500, 2002.
- 2 . Ikuta, K., Ibrahim, M. S., Kobayashi, T., and Tomonaga, K.: Borna disease virus and infection in humans. *Front. Biosci.* 7, D470-D495, 2002.
- 3 . Ikuta, K., Hagiwara, K., Taniyama, H., and Nowotny, N: Epidemiology and infection of natural animal hosts. *In* K. M. Carbone (ed.), *Borna disease virus: Role in neurobehavioral disease.* ASM Press, Washington DC. (In press).
- 4 . Tomonaga, K, and Carbone, K. M.: BDV: Spanning a century of science. *In* K. M. Carbone (ed.), *Borna disease virus: Role in neurobehavioral disease.* ASM Press, Washington DC. (In press).
- 5 . Kishi, M., Tomonaga, K., Lai, P., and de la Torre, J. C.: Borna disease virus: Molecular virology. *In* K. M. Carbone (ed.), *Borna disease virus: Role in neurobehavioral disease.* ASM Press, Washington DC. (In press).

3) 口頭発表

ア) 招待講演

- 1 . 生田和良：特別講演 神経系へのウイルス持続感染 第12回免疫・感染・炎症研究会 2000年6月 愛媛
- 2 . 生田和良：ボルナ病ウイルスの持続感染と中枢神経系病態 第5回日本神経ウイルス研究会集会 2001年11月 大阪

- 3 . 朝長啓造 : 「ボルナ病ウイルス」多様な自然宿主と中枢神経病態 . 第 49 回日本ウイルス学会学術集会 2001 年 11 月 大阪

イ) 応募・主催講演等

- 1 . 大内敦夫、西野佳以、小林剛、生田和良、望月雅美、岸雅彦 : ネコにおける新ボルナ病ウイルス抗体の検出 第 2 回ボルナ病ウイルス研究会 1999 年 2 月 東京
- 2 . 高橋宏和、中村百合恵、小林剛、渡辺真紀子、林宏恵、庄屋裕子、生田和良 : 精神分裂病患者剖検脳サンプルから分離されたボルナ病ウイルスの遺伝子配列 第 2 回ボルナ病ウイルス研究会 1999 年 2 月 東京
- 3 . 小林剛、高橋宏和、渡辺真紀子、庄屋裕子、朝長啓造、岸雅彦、生田和良 : ボルナ病ウイルス N および P タンパク質間の相互作用 第 2 回ボルナ病ウイルス研究会 1999 年 2 月 東京
- 4 . 河野武弘、後藤俊幸、高橋智彦、森田智津子、中屋隆明、生田和良、倉根一郎、左藤浩一、中井益代 : ボルナ病ウイルス(BDV)の構造と粒子形成過程 第 2 回ボルナ病ウイルス研究会 1999 年 2 月 東京
- 5 . 松永秀典、林宏恵、西野佳以、生田和良 : 大阪の総合病院精神科における BDV 感染の調査 : 58 例の検査結果の検討 第 2 回ボルナ病ウイルス研究会 1999 年 2 月 東京
- 6 . 小林剛、渡辺真紀子、朝長啓造、生田和良 : ボルナ病ウイルス 0.8kb(X/P)mRNA の翻訳様式 第 47 回日本ウイルス学会学術集会 1999 年 10 月 横浜
- 7 . 朝長啓造、小林剛、渡辺真紀子、生田和良 : ボルナ病ウイルスの選択的スプライシングとその発現調節 第 47 回日本ウイルス学会学術集会 1999 年 10 月 横浜
- 8 . 渡辺真紀子、小林剛、神谷亘、谷山弘行、朝長啓造、生田和良 : 新生仔スナネズミにおけるボルナ病ウイルスの病態解析 第 47 回日本ウイルス学会学術集会 1999 年 10 月 横浜
- 9 . 朝長啓造、小林剛、渡辺真紀子、生田和良 : ボルナ病ウイルスの選択的スプライシング機構の解明 第 128 回日本獣医学会学術集会 1999 年 10 月 熊本
- 10 . 小林剛、渡辺真紀子、朝長啓造、岸雅彦、生田和良 : ボルナ病ウイルスの翻訳様式および相互作用 第 128 回日本獣医学会学術集会 1999 年 10 月 熊本
- 11 . 渡辺真紀子、小林剛、朝長啓造、生田和良 : 抗原検出 ELISA を用いた培養細胞およびスナネズミ脳における BDV 抗原の定量 第 128 回日本獣医学会学術集会 1999 年 10 月 熊本
- 12 . 朝長啓造、笹尾芙蓉子、渡辺真紀子、小林剛、生田和良、倉恒弘彦 : CFS 患者におけるボルナ病ウイルス(BVD)感染の疫学的検索 第 5 回慢性疲労症候群(CFS)研究会 2000 年 2 月 大阪
- 13 . 小林剛、神谷亘、渡辺真紀子、朝長啓造、生田和良、小野悦郎 : 実験動物を用いたボルナ病ウイルス(BDV)の病態の解析 第 5 回慢性疲労症候群(CFS)研究会 2000 年 2 月 大阪
- 14 . 渡辺真紀子、神谷亘、小林剛、谷山弘行、朝長啓造、生田和良 : スナネズミ脳におけるボルナ病ウイルスの主要抗原の発現様式 第 6 回ボルナ病ウイルス研究会 2000 年 2 月 東京
- 15 . 小林剛、渡辺真紀子、朝長啓造、生田和良 : ボルナ病ウイルス 0.8 k b (X / P) mRNA の翻訳様式 第 6 回ボルナ病ウイルス研究会 2000 年 2 月 東京
- 16 . 朝長啓造、小林剛、渡辺真紀子、生田和良 : ボルナ病ウイルスの選択的遺伝子発現とその調節機構 第 6 回ボルナ病ウイルス研究会 2000 年 2 月 東京
- 17 . 小林剛、渡辺真紀子、神谷亘、朝長啓造、岸雅彦、生田和良 : ボルナ病ウイルス N タンパク質の発現様式および核移行 第 129 回日本獣医学会学術集会 2000 年 4 月 筑波

- 18 . 渡辺真紀子、神谷亘、小林剛、谷山弘行、朝長啓造、生田和良：スナネズミ脳におけるボルナ病ウイルスの主要抗原の発現様式 第129回日本獣医学会学術集会 2000年4月 筑波
- 19 . Madiha S. Ibrahim、渡辺真紀子、小林剛、神谷亘、朝長啓造、生田和良：Characterization of biological clones of Borna disease virus. 第129回日本獣医学会学術集会 2000年4月 筑波
- 20 . 神谷亘、田原口智士、小林努、吉野さおり、岡本実、渡辺真紀子、小林剛、谷山弘行、小野悦郎、朝長啓造、生田和良：ボルナ病ウイルス p24 遺伝子トランスジェニックマウスの解析 第129回日本獣医学会学術集会 2000年4月 筑波
- 21 . 朝長啓造、小林剛、李丙載、渡辺真紀子、神谷亘、生田和良：ボルナ病ウイルスの選択的スプライシング調節機構 第4回神経ウイルス研究会 2000年7月 名古屋
- 22 . 渡辺真紀子、李丙載、神谷亘、小林剛、谷山弘行、朝長啓造、生田和良：スナネズミ脳におけるボルナ病ウイルス抗原発現分布の解析 第4回神経ウイルス研究会 2000年7月 名古屋
- 23 . 神谷亘、田原口智士、小林努、吉野さおり、岡本実、渡辺真紀子、小林剛、谷山弘行、小野悦郎、朝長啓造、生田和良：ボルナ病ウイルス p24 遺伝子トランスジェニックマウスを用いたBDVの病態の解析 第4回神経ウイルス研究会 2000年7月 名古屋
- 24 . 渡辺真紀子、李丙載、神谷亘、谷山弘行、小林剛、朝長啓造、生田和良：ボルナ病ウイルス感染スナネズミにおける脳内のウイルス分布と病態との相関性 第130回日本獣医学会学術集会 2000年10月 大阪
- 25 . 神谷亘、生田和良：ボルナ病ウイルス p24 タンパク質と神経突起伸長因子 Amphoterin との結合とその意義について．第130回日本獣医学会学術集会 2000年10月 大阪
- 26 . 小林 剛、張国旗、渡辺真紀子、神谷亘、朝長啓造、生田和良：ボルナ病ウイルスミニレプリコンの構築の試み 第130回日本獣医学会学術集会 2000年10月 大阪
- 27 . 庄谷祐子、小林剛、渡辺真紀子、神谷亘、李丙載、朝長啓造、生田和良：ボルナ病ウイルス p24 たんぱく質と神経突起伸長因子 Amphoterin との結合 第48回日本ウイルス学会学術集会 2000年10月 津
- 28 . 小林剛、渡辺真紀子、神谷亘、張国旗、朝長啓造、生田和良：ボルナ病ウイルス N タンパク質の核内外輸送 第48回日本ウイルス学会学術集会 2000年10月 津
- 29 . 渡辺真紀子、神谷亘、小林剛、谷山弘行、朝長啓造、生田和良：スナネズミ脳におけるボルナ病ウイルスの主要抗原発現の分布 第48回日本ウイルス学会学術集会 2000年10月 津
- 30 . Madiha S.Ibrahim、渡辺真紀子、小林剛、神谷亘、朝長啓造、生田和良 Borna disease virus shows aberrant patterns of persistency among oligodendrogloma derived biological cell clones 第48回日本ウイルス学会学術集会 2000年10月 津
- 31 . 神谷亘、田原口智士、小林努、吉野さおり、岡本実、渡辺真紀子、小林剛、谷山弘行、小野悦郎、朝長啓造、生田和良：ボルナ病ウイルス p24 遺伝子トランスジェニックマウスの病態解析 第48回日本ウイルス学会学術集会 2000年10月 津
- 32 . 松永秀典、西野佳以、笹尾芙蓉子、朝長啓造、小林剛、生田和良：総合病院精神科における抗ボルナ病ウイルス抗体陽性例の臨床的検討 第6回 慢性疲労症候群(CFS)研究会 2001年2月 熊本
- 33 . 小林剛、張国旗、呂国棟、李丙載、神谷亘、渡辺真紀子、朝長啓造、生田和良：ボルナ病ウイルス p10 (X) タンパク質の核外輸送機構 第131回日本獣医学会 2001年4月 東京
- 34 . 李丙載、渡辺真紀子、神谷亘、小林剛、朝長啓造、生田和良：スナネズミの加齢に伴うボルナ病ウイルスに対する感受性の変化 第131回日本獣医学会 2001年4月 東京

- 35 . 松永秀典、西野佳以、笹尾芙蓉子、朝長啓造、小林剛、生田和良：精神疾患における抗ボルナ病ウイルス抗体陽性例の臨床的検討 第97回日本精神神経学会総会 2001年5月 大阪
- 36 . 松永秀典、笹尾芙蓉子、小林剛、呂国棟、朝長啓造、生田和良：精神疾患におけるボルナ病ウイルス感染の臨床的検討 第6回日本神経感染症研究会学術集会 2001年7月 札幌
- 37 . 朝長啓造、渡辺真紀子、山下真紀子、李丙載、神谷亘、生田和良：BDV 感染スナネズミの病態における宿主免疫反応の関与 第49回日本ウイルス学会学術集会 2001年11月 大阪
- 38 . 小林剛、張国旗、呂国棟、神谷亘、渡辺真紀子、朝長啓造、生田和良：ボルナ病ウイルス p10 蛋白質の核外輸送 第49回日本ウイルス学会学術集会 2001年11月 大阪
- 39 . 張国旗、小林剛、神谷亘、河本聡志、呂国棟、山下真紀子、朝長啓造、生田和良：ボルナ病ウイルス p24 蛋白質と神経突起伸長因子 amphoterin との結合領域の同定 第49回日本ウイルス学会学術集会 2001年11月 大阪
- 40 . Madiha S. Ibrahim, Takeshi Kobayasi, Keizo Tomonaga, and Kazuyoshi Ikuta : Varied persistent life cycles for Borna disease virus in a human oligodendrogloma cell line. 第49回日本ウイルス学会学術集会 2001年11月 大阪
- 41 . 李丙載、渡辺真紀子、神谷亘、山下真紀子、小林剛、朝長啓造、生田和良：ラットおよびスナネズミ脳内におけるボルナ病ウイルスの持続感染状態の解析 第49回日本ウイルス学会学術集会 2001年11月 大阪
- 42 . 呂国棟、小林剛、馬場聡子、松永秀典、笹尾芙蓉子、渡辺真紀子、神谷亘、柚木幹弘、朝長啓造、生田和良：ボルナ病ウイルス検出のための高感度 single-step RT-PCR ELISA 法の確立 第49回日本ウイルス学会学術集会 2001年11月 大阪
- 43 . 山下真紀子、神谷亘、小林剛、朝長啓造、生田和良：ボルナ病ウイルス持続感染：細胞の形態ならびに生存維持能力に与える影響の解析 第49回日本ウイルス学会学術集会 2001年11月 大阪

4) 特許等出願等

無し

5) 受賞等

無し