

病理学第二

1 構成員

	平成18年3月31日現在
教授	1人
助教授	1人
講師（うち病院籍）	0人（0人）
助手（うち病院籍）	2人（0人）
医員	0人
研修医	0人
特別研究員	0人
大学院学生（うち他講座から）	2人（0人）
研究生	1人
外国人客員研究員	0人
技術職員（教務職員を含む）	2人
その他（技術補佐員等）	3人
合 計	12人

2 教員の異動状況

- 筒井 祥博（教授）（H6. 4. 1～現職）
 小杉伊三夫（助教授）（H15. 11. 1～現職）
 土田 孝（助手）（H12. 8. 1～現職）
 河崎 秀陽（助手）（H17. 4. 1～現職）

3 研究業績

数字は小数2位まで。

	平成17年度
(1) 原著論文数（うち邦文のもの）	2編（0編）
そのインパクトファクターの合計	4.08
(2) 論文形式のプロシーディングズ数	1編
(3) 総説数（うち邦文のもの）	2編（1編）
そのインパクトファクターの合計	5.69
(4) 著書数（うち邦文のもの）	0編（0編）
(5) 症例報告数（うち邦文のもの）	2編（0編）
そのインパクトファクターの合計	3.69

(1) 原著論文（当該教室所属の者に下線）

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

1. Matsukage S, Kosugi I, Kawasaski H, Miura K, Kitani H, Tsutsui Y: Replication and Viral

Gene Expression of Murine Cytomegalovirus in Mouse Embryonic Stem Cells during the Differentiation. Birth Defects Research (Part A) 76: 115-125, 2006.

2. Kosugi I, Kawasaki H, Tsuchida T, Tsutsui Y: Cytomegalovirus infection inhibits the expression of N-methyl-D-aspartate receptors in the developing mouse hippocampus and primary neuronal cultures. Acta Neuropathologica (Berlin) 109 (5): 475-482, 2005.

インパクトファクターの小計 [4.08]

(2) 論文形式のプロシーディングズ

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

1. 河崎秀陽, Mocarski ES, 筒井祥博: 神経幹細胞におけるシクロスポリンのサイトメガロウイルス感染抑制効果. 免疫の進化-シクロスポリン20年の軌跡V. Effect of Ciclosporin on Virus (シクロスポリン学術国際シンポジウム編) 医薬ジャーナル社 pp.215-220, 2006.

(3) 総 説

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

1. Tsutsui Y, Kosugi I, Kawasaki H: Neuropathogenesis in cytomegalovirus infection: indication of the mechanisms using mouse models. Reviews in Medical Virology 15 (5): 327-345, 2005.
2. 筒井祥博: β ヘルペスウイルスの中樞神経系感染. 日本臨牀「特集：ヘルペスウイルス学—基礎・臨床研究の進歩—」64(Suppl 3): 440-445, 2006.

インパクトファクターの小計 [5.69]

(5) 症例報告

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

1. Han GP, Miura K, Ide Y, Tsutsui Y: Genetic analysis of JC virus and BK virus from a patient with progressive multifocal leukoencephalopathy with hyper IgM syndrome. Journal of Medical Virology 76 (3): 398-405, 2005.

インパクトファクターの小計 [2.52]

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

1. Arai Y, Kohno S, Takahashi Y, Miyajima Y, Tsutsui Y: An autopsy case of Neuro-Behçet's disease with multifocal neutrophilic perivascular inflammation. Neuropathology, 2006. (in press)

インパクトファクターの小計 [1.17]

4 特許等の出願状況

	平成17年度
特許取得数 (出願中含む)	1件

- 河崎秀陽・筒井祥博：NIM811 (cyclophilin inhibitor) によるサイトメガロウイルス (CMV) 感染抑制効果 (特許・特願2005-308740) 出願中

5 医学研究費取得状況

	平成17年度
(1) 文部科学省科学研究費	3件 (600万円)
(2) 厚生科学研究費	1件 (340万円)
(3) 他政府機関による研究助成	0件 (0万円)
(4) 財団助成金	0件 (0万円)
(5) 受託研究または共同研究	1件 (600万円)
(6) 奨学寄附金その他 (民間より)	0件 (0万円)

(1) 文部科学省科学研究費

- 筒井祥博 (代表者) 基盤研究 (B) (2) 「発育期ウイルス性脳障害における神経病原性の発生機序に関する分子病理」310万円 (継続)
- 小杉伊三夫 (代表者) 基盤研究 (C) (2) 「ウイルス性脳障害における免疫回避機構の解析」80万円 (継続)
- 河崎秀陽 (代表者) 若手研究 (B) 「神経幹細胞におけるサイトメガロウイルス感染感受性とサイクロフィリンの役割」210万円 (新規)

(2) 厚生科学研究費

- 筒井祥博 (分担者) 感覚器障害研究事業「先天性サイトメガロウイルス感染症による聴覚障害の実態調査並びに発症予防を目指した基礎的研究」大森孝一 (代表者) 福島県立医科大学340万円 (継続)

(5) 受託研究または共同研究

- 筒井祥博 (代表者) 病理組織標本を用いた研究「病理組織診断の研究への応用」600万円 (継続)

7 学会活動

	国際学会	国内学会
(1) 特別講演・招待講演回数	1件	0件
(2) シンポジウム発表数	1件	1件
(3) 学会座長回数	0件	2件
(4) 学会開催回数	0件	1件
(5) 学会役員等回数	0件	5件
(6) 一般演題発表数	3件	

(1) 国際学会等開催・参加

- 国際学会・会議等における基調講演・招待講演

1. 筒井祥博：Brain disorders induced by viral infection. 客員教授授与記念講演，河南中医学院（中国），2005.7

3) 国際学会・会議等でのシンポジウム発表

1. 河崎秀陽，Mocarski ES，筒井祥博：神経幹細胞におけるシクロスポリンのサイトメガロウイルス感染抑制効果．シクロスポリン学術国際シンポジウム「免疫の進化」，東京 2005. 8. 27-28

5) 一般発表

口頭発表

1. Tsutsui Y，Matsukage S，Kosugi I，Kawasaki H: Susceptibility to murine cytomegalovirus in mouse embryonic stem cells. 12th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, 2005.10.6 – 8, Cosmosquare International Education and Training Center, Osaka, Japan.

ポスター発表

1. Tsutsui Y，Ishiwata M，Kawasaki H，Kosugi I: Neuron-specific expression of the immediate-early 2 protein of murine cytomegalovirus in the developing mouse brain. 10th International CMV/Betaherpervirus Workshop, 2005.4.24 – 28, Williamsburg, VA, USA.
2. Kawasaki H，Mocarski ES，Kosugi I，Tsuchida T，Tsutsui Y: Cyclosporin A inhibits mouse cytomegalovirus infection in the neural stem/progenitor cells. 10th International CMV/Betaherpervirus Workshop, 2005.4.24 – 28, Williamsburg, VA, USA.

(2) 国内学会の開催・参加

1) 主催した学会名

1. 筒井祥博：第9回日本神経ウイルス研究会研究集会．商工会議所福利研修センター（浜松市）2005.6.9 – 11

3) シンポジウム発表

1. 筒井祥博，鈴木弘美，河崎秀陽，小杉伊三夫，韓桂萍：神経幹細胞へのマウスサイトメガロウイルスの潜伏感染の可能性．第53回日本ウイルス学会学術集会ワークショップ「ウイルス病原性発現の多様性」2005.11.22

4) 座長をした学会名

1. 筒井祥博：第45回日本先天異常学会学術集会
2. 筒井祥博：第9回日本神経ウイルス研究会研究集会

(3) 役職についている国際・国内学会名とその役割

1. 筒井祥博：日本先天異常学会理事

2. 筒井祥博：日本病理学会評議員
3. 筒井祥博：日本神経病理学会評議員
4. 筒井祥博：日本ウイルス学会評議員
5. 小杉伊三夫：日本病理学会評議員

8 学術雑誌の編集への貢献

	国内	外国
学術雑誌編集数（レフリー数は除く）	2件	1件

(1) 国内の英文雑誌の編集

1. 筒井祥博：Congenital Anomalies（日本先天異常学会），編集長，登録有り，インパクトファクター無し
2. 筒井祥博：Pathology International（日本病理学会），編集委員，登録有り，インパクトファクター0.925

(2) 外国の学術雑誌の編集

1. 筒井祥博：Birth Defects Research Part A（北米先天異常学会，米国），編集委員，登録有り，インパクトファクター1.548

(3) 国内外の英文雑誌のレフリー

1. 筒井祥博：Congenital Anomalies（日本）9回
2. 筒井祥博：Pathology International（日本）3回
3. 筒井祥博：Neuropathology（日本）1回
4. 筒井祥博：Archives of Virology（ドイツ）1回
5. 小杉伊三夫：Neuropathology（日本）1回

9 共同研究の実施状況

	平成17年度
(1) 国際共同研究	1件
(2) 国内共同研究	2件
(3) 学内共同研究	0件

(1) 国際共同研究

1. サイクロスポリンAのサイトメガロウイルスの増殖に与える影響，Stanford University（米国），2005.4-2006.3，資料の交換および研究打ち合わせ，論文投稿中

(2) 国内共同研究

1. ES細胞の樹立とサイトメガロウイルスの感染感受性，宮崎大学，2005.4-2006.3，研究者の派遣，論文掲載済
2. MCMV前初期遺伝子産物IE2およびIE3に対する融合蛋白法による大腸菌での発現と特異抗体

の作成と培養細胞・発育期感染脳における発現の比較解析，東京大学，2005.4－2006.3，研究者の派遣，論文掲載済

10 産学共同研究

	平成17年度
産学共同研究	0件

11 受賞

(2) 外国からの授与

1. 筒井祥博：客員教授，河南中医学院（中国）

12 研究プロジェクト及びこの期間中の研究成果概要

1. MCMVの感染による神経細胞のNMDAレセプター発現の抑制

ウイルス感染によって細胞が死ぬことなく，その機能が変化することが疾患につながる可能性がある。神経シナプスにおいてN-methyl-D-aspartate (NMDA) レセプターはグルタミン酸レセプターとして働き，long term potentiation (LTP) を起こし，記憶や学習に関与すると考えられている。

小杉らは，発育期マウス脳にMCMVを感染によって，NMDAレセプターの発現が如何に影響を受けるか解析した。MCMVを感染した脳では，小脳のCA1領域のNMDAレセプターの発現は減少するが神経細胞は保存されていた。CA1領域にウイルス抗原が発現しているがアポトーシスはほとんど認めなかった。CA1領域の神経細胞は生きていても関わらずNMDAレセプターの発現は抑制されることが分かった。初代培養神経細胞にMCMVを感染させNMDAレセプターの発現をみたところ，同様にMCMVの感染によってNMDAレセプターの発現は抑制されることが明らかとなった。NMDAレセプターのような神経機能に関わる遺伝子発現がMCMV感染で抑制されることは，CMVの神経細胞への感染によって神経機能障害が生ずる可能性を示唆している。CMVの神経細胞への持続感染が神経機能を変化させ精神発達遅延などの神経疾患に関連する可能性があると考えられる。

(小杉伊三夫，筒井祥博)

2. 神経幹・前駆細胞における潜伏感染の可能性

先天性CMV感染症やAIDSなどの免疫不全において，脳はCMVの主要な標的であるにも関わらず，CMVが脳で潜伏感染するかどうか明らかではなかった。私達はMCMVがマウス脳で潜伏感染することを，感染させて6カ月した脳を取り出し，大脳スライス培養をすることによって活性化してくることによって証明した (Tsutsui et al., J Virol, 2002)。再活性化してくる細胞が脳室壁の未分化神経系細胞である可能性が免疫染色で示唆されたので，未分化神経系細胞のマーカー遺伝子であるNestin-promoterにgreen fluorescent protein (GFP) 遺伝子を繋いだ組換え体を導入したTg マウスを用いた (慶応大学岡野栄之先生より供与)。Nestin-promoter TgにMCMVを感染させ，4カ月飼育してから脳を取り出し，GFPで蛍光に光るneurospheresを分離して，neurospheres

からのウイルスの放出を調べた。ウイルス複製の阻害剤である ganciclovir (GCV) 存在下で培養することによってウイルスの放出を抑え、neurospheresを分離することが出来た。分離した neurospheresをGCV非存在下でさらに1週間培養し、プラークアッセイを行った。GFPで光る neurospheresから感染性のウイルスが放出されることが明らかとなった(第53回日本ウイルス学会ワークショップで発表)。この結果は、MCMVが神経幹・前駆細胞で潜伏感染する可能性を示している。

(筒井祥博, 鈴木弘美, 韓桂萍, 河崎秀陽, 小杉伊三夫)

3. 神経幹・前駆細胞におけるサイクロスポリンA (CsA) によるサイトメガロウイルス抑制機序
河崎らはスタンフォード大学Dr. Mocarskiとの共同研究で、neurospheresへのMCMVの感染がサイクロスポリンA (CsA) で抑制されることを明らかにした。しかし、同様の免疫抑制剤であるFK506では抑制効果が無く、このCsAによる抑制はCSAと結合するサイクロフィリンAの機能を阻害するためである可能性を示した。MCMVの抑制は8週間以上続き、CsAを除くとMCMVが再活性化してくることから、この系はMCMVの未分化神経系細胞における潜伏感染とその再活性化の分子機構を研究するモデルになりうると考える。

(河崎秀陽, Dr. Mocarski, Stanford Univ., 小杉伊三夫, 筒井祥博)

4. マウス胎生幹 (ES) 細胞の分化とMCMVに対する感染感受性

私達は神経幹・前駆細胞はMCMVに感受性が高いことを報告した (Kosugi et al. Lab Invest 2000)。初期胚からのES細胞がCMVに感受性があるかどうかは、CMVの個体の発生、器官形成に与える影響を知る上で重要な問題である。前述したように私達は既にMCMV ie1-promoter-lacZ導入transgenic (Tg) マウスを作成した。今回このTgマウスからES細胞を分離し、ES細胞株を樹立して、MCMVに対する感受性を解析した。未分化なES細胞にMCMVを感染させると感受性を全く示さず、ES細胞の増殖因子であるleukemia inhibitory factor (LIF) を除去して分化へと誘導すると、一部の細胞が感受性を獲得した。Retinoic acid (RA) でES細胞を神経系へ分化させたところ、グリア系細胞がMCMVに感受性を示し、神経細胞はほとんど感受性を示さなかった。このie-promoter-lacZ Tgマウス由来ES細胞は、未分化な状態ではie-promoterの活性を示さず、LIFを除去して分化へと誘導すると、2週間ほどでie-promoterが活性化した。このES細胞にMCMVを感染させると、感染感受性はie-promoterの活性化と相関していた。初期胚からのES細胞がMCMVに感受性がないのは、種の保存のために感染から守られる重要な機構と考える。

(松影昭一：宮崎医科大学大学院生, 小杉伊三夫, 筒井祥博)

5. MCMV前初期遺伝子産物IE2およびIE3に対する融合蛋白法による大腸菌での発現と特異抗体の作成と培養細胞, 発育期感染脳における発現の比較解析

MCMVの前初期遺伝子はプロモーターを挟んで、一方にie1とie3, 反対方向にie2が読み出される。ie2のその機能は明らかでなく、HCMVのカウンターパートは分かっていない。私達はie2・ie3の遺伝子産物IE2及びIE3に対する抗体を融合蛋白法により大腸菌で発現させ、精製してラットに免疫してポリクローナルおよびモノクローナル抗体作成した。MCMVを感染した発育期脳におい

て、その発現をWestern blotting, 培養細胞および発育期脳で比較解析した。培養細胞における発現の時間経過, 核内の分布が異なり, 発育期脳においてグリア細胞と神経細胞とではウイルス遺伝子の発現動態が異なった。IE3はグリア細胞における溶解感染と関連し, IE2の神経特異的発現は, 神経細胞における持続感染への移行と関連して重要であると考えた。

(石渡瑞穂: 東大大学院生, 馬場 聡, 川島充詠, 小杉伊三夫, 河崎秀陽, 筒井祥博)

6. ミニポンプによる神経増殖因子の脳内持続投与によるMCMV感受性の促進

Epidermal growth factors (EGF) などはneurospheresの培養における神経増殖因子であることが知られている。EGF, FGF, NGFなどの神経増殖因子をミニポンプで脳内へ持続投与することによって, アダルトマウスの神経再生を促進し, MCMVを感染したところ感染が促進されることが明らかとなった。蛍光染色, 免疫染色, プラークアッセイ法などによってこの現象を定量的に解析している。この研究は神経変性疾患の治療として神経再生を促すとき, CMVの感染増強あるいは再活性化の可能性を示唆している。

(韓 桂 萍, 李 立, 筒井祥博)

7. 先天性サイトメガロウイルス感染症による難聴発生機序の動物実験モデルによる研究

本研究の目的は, 先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染症によって難聴がなぜ起きやすいかを明らかにする実験モデルを作成し, その病理発生に関わる要因を明らかにし, ヒトにおける予防法のための基礎を確立することである。私達は発育期マウス脳へマウスCMV (MCMV) を感染させて内耳への感染を解析する方法を確立してきた。今回は, より自然に近い腹腔内感染によって内耳に感染するモデルを作成した。出生2日目のマウス腹腔内へMCMVを感染させ, 脳へPBSあるいはリポポリサッカライド (LPS) を4回注入して, 感染後6日目に脳および内耳を取り出し, 免疫染色でウイルス感染細胞の分布, およびプラークアッセイ法でウイルス感染価を測定した。その結果, 単にウイルスのみを腹腔内感染しても脳あるいは内耳へ感染しないが, LPSの脳内投与により感染が強まり, 脳より内耳の方が感受性しやすく, 内耳においては蝸牛リンパ節, 外リンパ腔壁および血管内皮に感染しやすいが, 内リンパ腔には感染しにくいことが明らかになった。

(李 立, 小杉伊三夫, 筒井祥博)

8. 光る変異ウイルスの作成と大脳スライス培養における感染動態の解析

私達は緑色蛍光蛋白 (GFP) あるいは赤色蛍光蛋白 (DsRed) 遺伝子を挿入した変異ウイルスを作成する方法 (BAC法) を教室で確立し, GFPを発現するTgマウスを組み合わせ, 大脳スライス培養あるいはneurospheresの培養において, グリーンと赤の蛍光の対比によって生きた状態でウイルス感染動態を解析している。

(小杉伊三夫, 河崎秀陽, 土田 孝, 筒井祥博)

9. 人のサイトメガロウイルス感染剖検例による間質性肺炎の成立機序に関する研究

先天性CMV感染症, 臓器移植, 化学療法などで亡くなった症例でCMVの感染を伴っている症例35例を集め, 臨床記録, 剖検時のマクロ所見, 肺, 肝臓, 副腎, 膵臓へのCMVの感染をHEおよび

ウイルス抗原にたいする抗体を用いた免疫染色によって、分布、強さ等を調べ、特に肺におけるサイトカイン、Toll-like receptors等の発現等との関連を検索しつつある。

(土田 孝, 小杉伊三夫, 河崎秀陽, 金田正昭)

10. 人の潰瘍性大腸炎, クロウン病の長期間追跡による臨床的と病理的比較解析

私達の教室で潰瘍性大腸炎 (UC), クロウン病など炎症性腸疾患の症例を市内専門病院と共同で20年以上生検および手術材料による追跡を行ってきた。UC症例約400例, クロウン症例約50例の臨床的, 病理的所見をデータベース化しつつある。臨床および病理所見の長期に渡る経過の対比を解析し, 発症年齢, 性差, 高齢化との関連, 感染所見との関連を解析しつつある。

(上村 隆, 河崎秀陽, 金田正昭, 土田 孝, 小杉伊三夫, 筒井祥博)

11. 大脳大割切片を用いた神経病理学的研究

私達は既に人の剖検脳の大割切片を作り, 脳の前額切片全体のオリエンテーションのもとに解析するシステムを確立し, 症例数も100例に達している。大脳大割切片を用いてジオメトリックな定量的解析に取り組んでいる。

(筒井祥博, 宮崎一夫)

15 新聞, 雑誌等による報道

1. 「ウイルス感染による脳・神経障害解明へ：第9回日本神経ウイルス研究会研究集会」中日新聞 2005.6.8